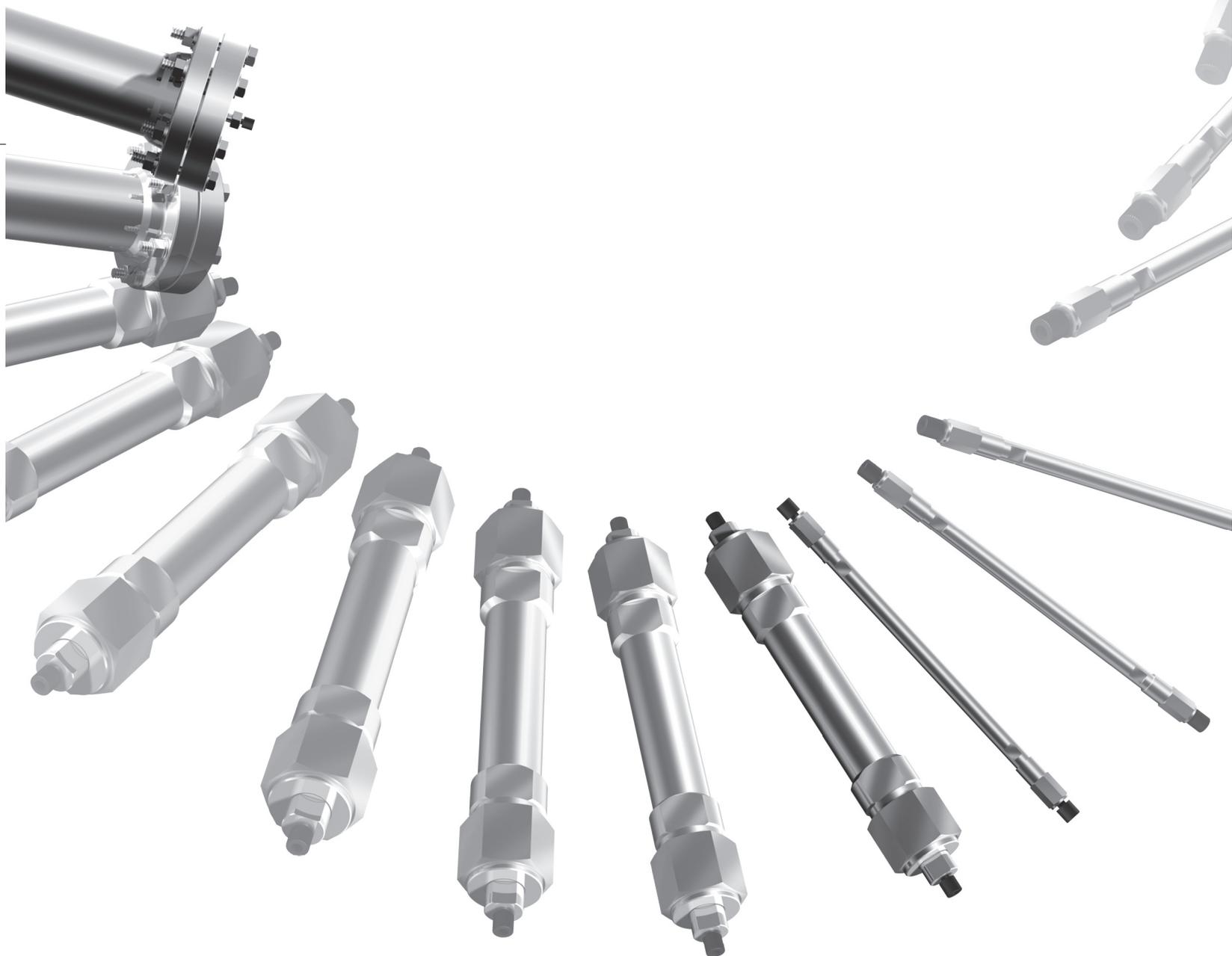
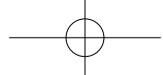


1. 常见问题和故障排除.....	166
(1) 常见问题和故障排除清单.....	166
(2) 常见问题.....	167
(3) 故障排除.....	174
2. 液相色谱基础知识.....	182
(技术信息)	
1. 高效液相的流动相准备	187
2. 色谱柱的内径选择(减小或增加尺寸).....	189
3. 解决压力增加的问题	191
4. 高效液相的样品准备	193
5. 梯度洗脱的基线噪音	198
6. 保护柱的影响.....	199
7. 反相色谱的填料选择	201
8. C ₁₈ 色谱柱流动相的开发方法.....	208
9. 与旧型号 COSMOSIL 比较.....	213





I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

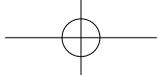
VI 技术信息

VII 化合物索引

1. 常见问题和故障排除

(1) 常见问题和故障排除清单

● 常见问题		Page
Q1	色谱柱的压力范围?	167
Q2	流速范围?	
Q3	推荐使用的pH范围?	
Q4	缓冲盐溶液的浓度是多少?	
Q5	该如何调整流动相?	168
Q6	应该用什么溶剂级为流动相?	
Q7	乙腈和甲醇之间的区别是什么?	169
Q8	可用于LC / MS或ELSD检测器的流动相是哪些?	
Q9	当使用离子对试剂时应该注意什么?	
Q10	使用流动相时应该按照什么流动方向?	
Q11	推荐的柱温范围是多少?	
Q12	运载溶剂是什么?	
Q13	该如何清洗色谱柱?	170
Q14	该如何保存色谱柱?	
Q15	一根色谱柱可以使用多久?	171
Q16	当色谱柱受损时会出现什么情况?	
Q17	如何确认色谱柱受损?	
Q18	当使用半微量色谱柱时应该注意什么?	
Q19	当使用超高压液相色谱柱时应该注意什么?	
Q20	可以加载多少样品在制备柱上?	
Q21	当在同一个仪器使用反相和正相两种条件应该注意什么?	
Q22	什么是色谱柱连接类型?	172
Q23	应该使用哪种检测方法?	
Q24	什么是常见的压力单位?	
Q25	什么是死体积?	173
Q26	滤柱和保护柱之间的区别是什么?	
Q27	如何预处理样品?	
Q28	如何选择内标物?	
● 故障排除		Page
T1	峰形差	174
T2	鬼峰	175
T3	无峰	176
T4	基线不稳定	178
T5	保留时间不稳定	179
T6	柱压升高	180
T7	泵压不稳	
T8	C ₁₈ 柱分辨率过低	
T9	反相柱上没有保留	
T10	在反相色谱柱上使用过多的分析时间	181
T11	分离性能和过去有差异	
T12	新的色谱柱产生不同的分离效果	
T13	通过色谱柱脱色(无色样品)	
T14	气体进入色谱柱	



(2) 常见问题

Q1. 色谱柱的压力范围?

色谱柱		压力范围
超高纯液相色谱柱	COSMOSIL 2.5C ₁₈ -MS-II COSMOSIL 2.5Cholesterol COSMOSIL 2.5πNAP COSMOSIL 2.5HILIC	30 MPa
碳纳米管色谱柱	COSMOSIL CNT系列	15 MPa 以下
其他色谱柱	分析柱 (内径 1.0-7.5 mm)	20 MPa 以下
	分析柱 (内径 10.0 mm 以上)	15 MPa 以下

注意；

即使是在推荐的压力范围内，柱压较大的变化也可能使色谱柱受损。

Q2. 流速范围?

在Q1注明的压力限制下，可以提高流量。

注意；

我们推荐使用在技术信息2的189页所描述的标准流速。一般情况下高柱压会使色谱柱寿命变短。

Q3. 推荐使用的pH范围?

色谱柱		推荐pH范围
COSMOSIL (硅胶基质) 系列	COSMOSIL C ₁₈ -MS-II COSMOSIL 3C ₁₈ -EB	pH 2-10
	COSMOSIL C ₁₈ -AR-II	pH 1.5-7.5
	其他色谱柱	pH 2-7.5
COSMOGEL (聚合物基质) 系列	COSMOGEL IEX系列	pH 2-12

注意；

上述表格显示的是填充材料可以承受的范围。离子样品需要调节pH值。

Q4. 缓冲盐溶液的浓度是多少?

色谱柱		缓冲盐溶液浓度
反相, 正相, HILIC		缓冲浓度: 0.005-0.1 mol/l 添加剂浓度 (三氟乙酸, 甲酸或者乙酸): 0.1-1.0%
离子交换	COSMOGEL IEX系列	缓冲浓度: 0.02-0.1 mol/l 与水混合的有机溶剂浓度极限 (例如, 甲醇): 20% 或更小
凝胶过滤	COSMOSIL Diol系列	混合浓度极限: 0.5 mol/l 或更小 盐浓度极限: 0.5 mmol/l 或更小
疏水作用	COSMOSIL HIC	缓冲浓度极限: 0.5 mol/l 或更小 缓冲浓度极限: 2 mmol/l 或更小

注意；

1. 不溶性化合物可能堵塞色谱柱。使用前需要过滤缓冲液或盐溶液。
2. 在分析中盐析可能会损伤柱子或仪器。在盐不能析出的浓度下使用色谱柱。
3. 盐沉淀通常发生在混合的有机溶液中。当流动相是混合溶液时需要注意。
4. 当仪器或是色谱柱中含有有机溶剂，在使用含盐流动相之前首先使用无盐流动相。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

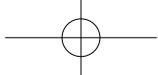
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



Q5. 该如何调整流动相?

请参照技术信息1第187页。

注意；

1. 每次都需要精确调整流动性比例和缓冲液浓度，因为浓度和pH值可能会影响分离度。
2. 溶剂混合后需要脱气。

Q6. 应该用什么溶剂级为流动相?

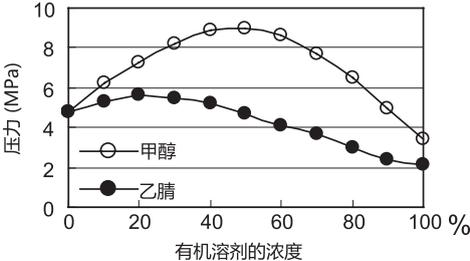
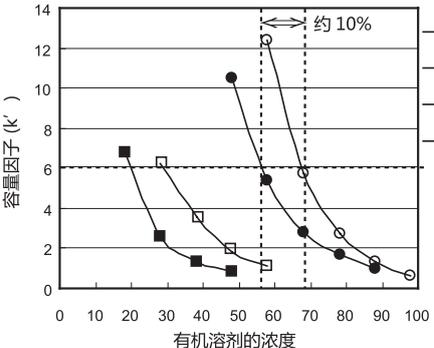
我们推荐使用色谱纯级溶剂，请参照第76页。

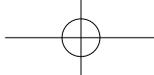
注意；

分析纯试剂不能用于梯度分析和微量分析因为他们含有紫外吸收的杂质，可以引起基线不稳或是不准确的检测。在短波长 210-220nm处会有显著影响。分析纯试剂中含有抗氧化剂可能会产生鬼峰(例如，四氢呋喃，氯仿)。分析试剂三氟乙酸化学不稳定不推荐用于高效液相。

Q7. 乙腈和甲醇之间的区别是什么?

下列表格显示了乙腈与甲醇的不同。

	乙腈(高效液相用)	甲醇(高效液相用)
压力	 <p>色谱柱 5C₁₈-MS-II 色谱柱尺寸 4.6 mm I.D. x 150 mm 流速 1.0 ml/min 柱温 30°C</p>	<p>有机溶剂种类和混合比例的不同导致反压不同。相同浓度下乙腈的反压比甲醇的反压大。</p>
洗脱强度	 <p>色谱柱 5C₁₈-MS-II 色谱柱尺寸 4.6 mm I.D.-150 mm 流速 1.0 ml/min 柱温 30°C</p>	<p>在同样浓度下，乙腈/水流动相的洗脱强度比甲醇/水流动相的洗脱强度大。 洗脱强度大约有10%的差距。 例如 乙腈/水 = 60/40的洗脱能力大概和甲醇/水 = 70/30的洗脱能力一致。</p>
吸光度	乙腈在远紫外区(波长小于250 nm)有较低的吸收	甲醇比乙腈在远紫外区(波长小于250 nm)有较大的吸收
流动相脱气	当乙腈与水混合时，由于吸收大量热量，比较难于脱气。	当甲醇与水混合时，由于放出大量热量，比较难于脱气。



Q8. 可用于LC / MS或ELSD检测器的流动相是哪些?

LC/MS或ELSD检测器需要使用挥发性溶剂。磷酸缓冲溶液不能使用。

试剂	可使用溶剂/添加剂
溶剂	甲醇, 乙醇, 乙腈, 水和其他
pH 调节试剂	乙酸, 甲酸, 三氟乙酸, 氨水, 乙酸铵, 甲酸铵和其他
离子对试剂	二丁胺, 三乙胺和其他

注意 ;

少量的非挥发性溶剂, 例如 DMSO (二甲亚砜) or DMF (二甲基甲酰胺) 如果他们混合甲醇或乙腈可以使用。然而, 如果浓度变高, 检测器的灵敏度将会减弱。

Q9. 当使用离子对试剂时应该注意什么?

- 离子对试剂浓度范围应该在5-10 mmol/l。
- 使用pH7的酸性离子对试剂和pH2.5的碱性离子对试剂为流动相。
- 有足够到达平衡的时间。
- 选择条件请参考第78页。

注意 ;

1. 高浓度离子对试剂可能会导致保留时间延长。
2. 调整流动相的pH值以便样品被很好的离子化。
3. 相对于不含离子对试剂的流动相需要更多的平衡时间。
4. 由于难以消除离子对试剂的影响, 建议使用固定的色谱柱使用离子交换试剂。

Q10. 使用流动相时应该按照什么流动方向?

流动相的方向按照色谱柱上标签注明的方向。

注意 ;

流动相从相反方向运行可能会使填料受损减少理论塔板数。此外, 杂质显著吸附在色谱柱柱头上可能会引起塌陷, 造成检测器, 管路污染和噪音。

Q11. 推荐的柱温范围是多少?

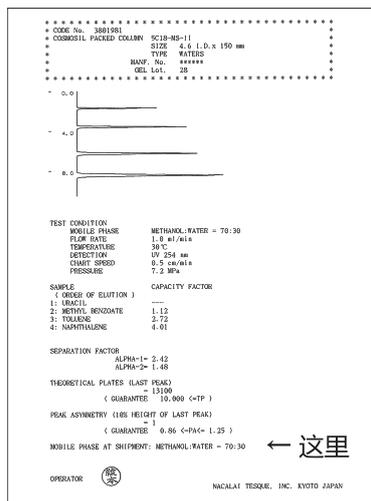
最高温度是60°C, 推荐温度使用范围是20-50°C。

注意 ;

1. 在碱性或是酸性条件高温进行分析实验可能会使色谱柱寿命缩短。
2. 保持恒定温度因为分析柱温度会影响保留时间。通常, 更高的温度会降低柱压力和缩短保留时间。

Q12. 运载溶剂是什么?

这取决于色谱柱型号。请参考色谱柱包装盒内的分析测试证书。



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

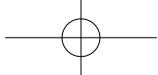
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



Q13. 该如何清洗色谱柱?

1. 如何清洗色谱柱中的缓冲液, 盐或酸?

使用不含缓冲液, 盐或酸的溶剂冲洗色谱柱10-15 分钟。并保存。

(例如, 使用甲醇 : 20 mmol/l磷酸缓冲溶液 = 50 : 50, 冲洗使用甲醇 : 水 = 50 : 50)

注意 ;

如果有有机溶剂和水的比例发生改变, 盐可能会析出。

2. 如何冲洗色谱柱中的杂质以达到平稳的基线?

充分溶解样品, 并且使用强洗脱机冲洗。

类型	可使用溶剂 / 添加剂
反相	(1) 样品不是蛋白质 甲醇或四氢呋喃 反相高效液相色谱柱清洁套装 (产品号 08966-30) (2) 样品是蛋白质 50-70%乙腈 : 水含0.1% 三氟乙酸。 注意 ; 当有机溶剂浓度高时一些蛋白质可能会沉积。
正相	甲醇, 四氢呋喃, 乙醇
富勒烯色谱柱	1, 2, 4-三氯苯和其他
Sugar-D, NH ₂ , HILIC	乙腈 : 水 = 50 : 50 *Sugar-D and HILIC可以使用100%水冲洗

注意 ;

不能使用碱性溶液 (pH 7.5 或更高), 它可以溶解硅胶。不可以使用强酸溶液 (pH 1.5或更低) 这样可以使键合相键断裂。

3. 如何消除堵塞色谱柱柱头的杂质?

用溶剂以平时分析速度一半的流速反相冲洗。

注意 ;

在冲洗时色谱柱与检测器分离。

4. 如果柱压高, 请参考技术信息3第191页。

Q14. 该如何保存色谱柱?

1. 短时间存储 (几天)

使用不含缓冲液, 盐或酸的溶剂冲洗色谱柱10-15 分钟。并保存。

(例如, 使用甲醇 : 20 mmol/l磷酸缓冲溶液 = 50 : 50, 冲洗使用甲醇 : 水 = 50 : 50)

2. 长时间存储 (一个月以上)

使用以下溶剂代替避免真菌, 干涩和柱受损。

色谱柱	缓冲液浓度或基础
反相	反相高效液相色谱柱储存溶液 (产品号 08967-20) 甲醇 : 水 = 70 : 30, 乙腈 : 水 = 70 : 30
正相	卤素或无酸的有机溶剂 (己烷 : 乙腈 = 90 : 10)
离子交换, 凝胶渗透, 疏水相互作用	0.05%叠氮化钠溶液和其他
富勒烯色谱柱	甲苯和其他
Sugar-D, NH ₂ , HILIC	乙腈 : 水 = 70 : 30

注意 ;

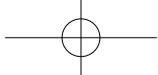
将色谱柱塞进放于平稳阴凉处。

Q15. 一根色谱柱可以使用多久?

操作条件可能会影响色谱柱寿命 (样品, 浓度, 盐, 酸, pH的有机溶剂)

注意 ;

样品处理不充分是最常见影响色谱柱寿命短的原因。请参考技术信息 4 第 193 页。



Q16. 当色谱柱受损时会出现什么情况？

色谱柱受损后常见现象是柱压升高，理论塔板数减少，保留时间缩短，峰型变差和分辨率降低。

注意；

请参考故障排除第174页。

Q17. 如何确认色谱柱受损？

按照“色谱柱附带的分析证书”的相同条件评估色谱柱受损。每次使用相同的仪器记录色谱柱的情况，记录标准值超时就要更换新的色谱柱。

重点	有用信息
利用率(k')	如果固定相脱落，保留时间可能会缩短。
理论塔板数(N)	可能因杂质或填料情况而减少。
峰不对称度(S)	可能由于填料受损或杂质吸附而减少。
压力	可能因为柱头堵塞，样品吸附或填料受损而升高。

(参考值)

以下参考值是 5C₁₈-MS-II(4.6 mm I.D. × 150 mm)

- 利用率(k') : 90% 或更少 萘 k'
- 理论塔板数(N) : 9000或更少
- 峰不对称度(S) : 超过范围0.86-1.25
- 压力 : 20 或更多

Q18. 当使用半微量色谱柱时应该注意什么？

使用专为半微量柱设计的注射器，管路检测器电池。

注意；

确认线性流动相流速与柱截面积成正比。更多信息，请参考技术信息2第189页。

Q19. 当使用超高压液相色谱柱时应该注意什么？

- 使用超高压液相色谱仪。
- 当您使用标准高效液相色谱仪时，缩短检测器响应时间(例如，0.02 秒)。
- 使用专为超高效液相色谱柱设计的注射器，管路检测器电池。
- 柱压可能是30 MPa或更少。

Q20. 可以加载多少样品在制备柱上？

样品载样由样品在流动相的分散或溶解而有所不同。分析柱决定最大载样量，并且由色谱柱的内径决定最大纯化量。

注意；

从分析柱放大到制备分离，请查考第35页。色谱柱内径，流量和柱管，请参考技术信息2第189页。

Q21. 在同一个仪器中使用反相和正相两种条件应该注意什么？

更换成两种流动相都可以使用的溶剂，如乙醇，然后更换新的流动相。

注意；

反相流动相(例如，甲醇，水)和正相流动相(例如，己烷)不能混合。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

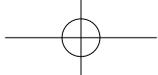
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



Q22. 什么是色谱柱连接类型?

COSMOSIL和COSMOGEL的连接柱是Waters型的。

注意；

通常，Waters型可以连接到大多仪器设备，但是在使用前确认连接柱生产商。

Q23. 应该使用哪种检测方法?

样品或实验的目的决定了检测器的选取或实验的目的。

检测器	特点
紫外线可见光检测器 (UV/VIS 检测器)	[如何检测] 检测样品吸光度。 [样品] 高灵敏度的化合物有紫外吸光度。 不能用于无紫外吸光度的化合物。 [特点] 简单，广泛应用。
荧光检测器 (FLD)	[如何检测] 检测样品激发光的荧光。 [样品] 荧光样品。 [特点] 对很少或没有紫外线吸收的样品，高检测灵敏度可用于微量成分分析。
示差折光检测器 (RI detector)	[如何检测] 检测样品和流动相之间不同折射率。 [样品] 所有样品 [特点] 具有很少或没有紫外线吸收的样品具有很少或没有紫外线吸收。(例如，糖类，醇类，氨基酸)。其缺点是对温度，流动相的组成，和流速的改变灵敏。
电化学探测器 (ECD)	[如何检测] 电化学检测化合物如氧化或还原化合物。
蒸发光散射检测器 (ELSD)	[如何检测] 检测散射光的超微过滤器目标化合物的蒸发流动相。 [样品] 具有很少或没有紫外线吸收的样品。(例如，糖类，醇类，氨基酸)。 [特点] 对于样品具有很少或没有紫外线吸收。(例如，糖类，醇类，氨基酸)。它不是适用于沸点低的化合物。
质谱检测器 (MS Detector)	[特点] 可以使用质谱对单独部分进行定性分析。 缺点是有些溶剂不适合于质谱检测器

Q24. 什么是常见的压力单位?

大多数单位是SI单位，MPa。

注意；

过去的设备有时有不同的单位(换算：1 MPa = 10.197 kgf/cm² = 145.0 psi = 10 bar)。

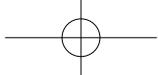
Q25. 什么是死体积?

死体积是从进样器开始到检测器结束，与分辨率无关。

注意；

1. 如果死体积大，样本可能扩散导致峰形差。
2. 选择合适的进样器，检测器单元和管路，及合适的柱内径减少死体积。

对于管路或流通池的内部直径，参考技术信息2第189页。



Q26. 滤柱和保护柱之间的区别是什么?

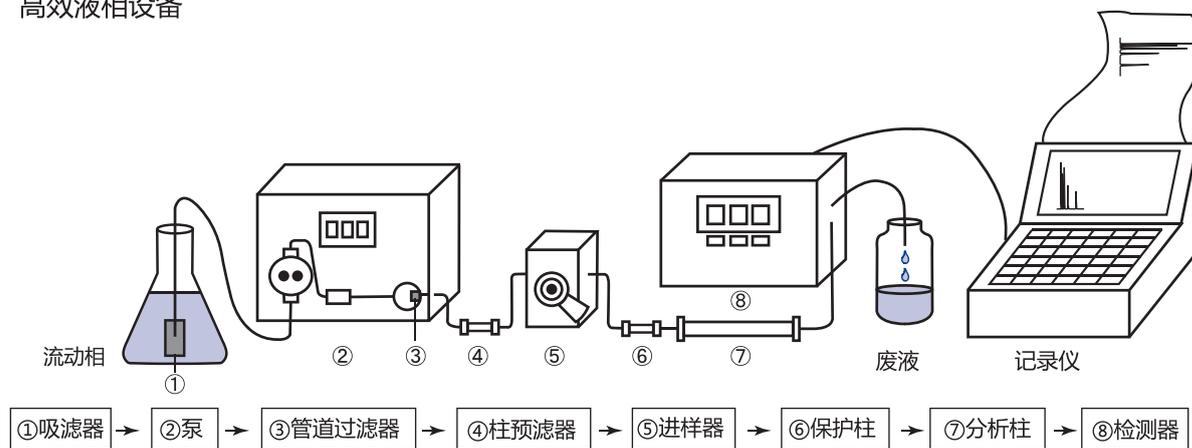
(1) 柱预滤器 (④)

连接泵和进样器之间消除流动相中固体杂质。

(2) 保护柱 (⑥)

连接进样器和分析柱只减少样品吸附。

高效液相设备



Q27. 如何预处理样品?

参考技术信息4第193页。

Q28. 如何选择内标物?

理想的内标特性，

- 峰的内标物与是目标化合物峰附近，但他们不重叠。
- 没有拖尾或吸附。
- 容易获得较低的价格。
- 有良好的化学稳定性。

对羟基苯甲酸甲酯~对羟基苯甲酸丁酯被广泛用于日本药典。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

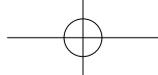
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

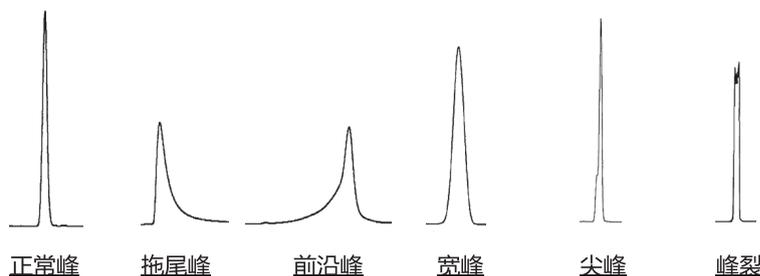
VI 技术信息

VII 化合物索引

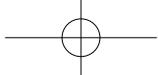


(3) 故障排除

T1. 峰形差



现象	原因	解决方案
特殊样品拖尾	碱性化合物和填料之间有离子交换相互作用。	使用残留较少硅醇基的色谱柱取代 (C ₁₈ -MS-II)。或在流动相中加入0.1-1%酸。
	金属配位化合物和填料之间发生络合。	在流动相中加入5mmol/l乙二胺四乙酸二水合物 (EDTA · 2Na)。
	在样品和填料之间的有氢键相互作用。	改变有机溶剂 (例如, 乙腈变为甲醇)。
所有样品均拖尾	填料有空隙或色谱柱可能损坏。	更换色谱柱。
	(如果在更换色谱柱后拖尾情况没有改善) 样品会在色谱柱的一边扩散出去。	减少死体积 (更多死体积信息参考第172页 Q25)。
前沿峰	进样量过量, 导致流动相的洗脱性或pH值明显发生变化。	用流动相溶解样品。如果样品不能溶解, 要先溶解到可用溶剂中, 然后稀释流动相。
		减少进样量1/2-1/10 注意; 峰值和峰展宽也可能发生。
宽峰 1 高分子量样品 (MW: 2,000 或更多)	大分子量蛋白质不能通过填料孔径。	使用反相宽孔径色谱柱, COSMOSIL Protein-R。更多信息参考第42页。
	样品量太大。	减少进样量至1/2-1/10。 注意; 可能产生拖尾峰。
	特殊样品严重拖尾可能是由于化合物吸收在填料上引起的。	使用COSMOSIL Protein-R, 有高回收率更多信息参考第42页。
	所有样品均严重拖尾, 色谱柱可能受损。	更换色谱柱。
	疏水层析中样品溶液中的硫酸铵的浓度太低 (HIC)。	调整硫酸铵的浓度至1 mol/l 或更多。



现象	原因	解决方案
宽峰 2 低分子量样品 (MW: 2,000 或更少)	样品量太大。	减少样品量从1/2到1/10。 注意； 拖尾峰可能会出现代替宽峰。
	特殊样品出现宽峰的原因可能是化合物吸附在填料上。	使用不同填料的色谱柱代替。 (COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II 适用于常规样品。它对于常规样品很少有吸收。更多信息请参考第14页。)
	所有样品均出现宽峰，可能是色谱柱受损。	更换色谱柱。
一些样品可能出现尖峰或峰裂。	含有两种以上样品，并且稍微分开。	寻找适合分离两种样品的条件。
	流动相和样品溶剂在他们的分离性上有明显的不同。	用流动相溶解样品。如果样品不能溶解，要先溶解到可溶剂中，然后稀释流动相。 减少载样量至1/2 到1/10。
	混合游离和非游离离子样本。	调节流动相的pH至pKa±2或更多，游离离子样本。
所有样品的尖峰或峰分裂发生	流动相和样品溶剂在他们的分离性上有显著的不同。	用流动相溶解样品。如果样品不能溶解，要先溶解到可用溶剂中，然后稀释流动相。 减少载样量至1/2 到1/10。
	色谱柱可能受损。	更换色谱柱。

T2. 鬼峰

分离方式	原因	解决方案
<反相色谱法> 使用梯度洗脱方法	水中杂质引起的鬼峰。	使用新的高效液相色谱级蒸馏水。
		使用预柱。更多信息请参考第198页。
<反相色谱法> 蛋白质样品	样品可能被吸附在色谱柱上，需要在下次分析洗脱出来。	冲洗色谱柱。更多冲洗方法信息请查询第170页。 COSMOSIL Protein-R，分离蛋白质有高回收率，推荐使用。更多信息请参考第42页。
<所有分离方式> 溶解样品和流动相有明显的不同。	样品溶解引起鬼峰。	使用与流动相一样的溶剂溶解样品。 用流动相溶解样品。如果样品不能溶解，要先溶解到可用溶剂中，然后稀释流动相。
<所有分离方式> 空白分析时流动相出现鬼峰 (每次进样峰面积减少)	注射器受污染。	用进样器注入20毫升溶剂洗柱，例如，甲醇，可以溶解污染物。
	微量进样针受污染。	用溶剂洗柱例如，甲醇，氯仿或水 溶解污染物。超声波清洗是有效。
其他	样品受污染或损坏。	重新配置样品。
	流动相中有稳定剂。	使用高效液相色谱级溶剂不稳定剂。

I
高效液相色谱柱

II
超高速液相色谱柱

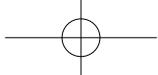
III
开放柱色谱填料

IV
相关产品

V
分析数据集

VI
技术信息

VII
化合物索引



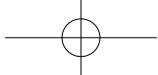
T3. 无峰

[如何确定原因] 首先检查 t_0 。

t_0 分析结果	原因
未检测到 t_0	检测器可能有问题
t_0 保留时间变化	泵可能有问题
t_0 保留时间和平常一样	色谱柱可能有问题

● 每种色谱柱的解决方案

色谱柱种类	原因	解决方案
反相色谱柱	样品存在色谱柱中取决于疏水性强。	增加流动相洗脱力量直到样品洗脱。 例如， 1. 甲醇或乙腈浓度增高（最高可达100%）。 2. 如果样品没有洗脱，增加10-30% 强洗脱性有机溶剂（例如，四氢呋喃或氯仿）到甲醇或乙腈中（例如，四氢呋喃：甲醇 = 30 : 70）。
	金属配位或基础化合物可以吸附在色谱柱上。	基础化合物可能会与硅胶上残存的硅醇基相互作用。使用COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II，有少量残存硅醇基或添加0.1-1%酸到流动相中。（例如，三氟乙酸，乙酸） 金属配合物有可能与填料中的少数金属相互作用。添加5 mmol/l 乙二胺四乙酸二水合物到流动相（EDTA · 2Na）。
正相色谱柱	样品的亲水性太强以致于样品仍然留在色谱柱中。	增加流动相洗脱力量直到样品洗脱出来。使用洗脱力强的溶剂替换例如，乙醇，或增加浓度。
	金属配位或基础化合物可以吸附在色谱柱上。	添加0.1-1%酸到流动相中（例如，三氟乙酸，乙酸）。
糖类分析柱（Sugar-D，NH ₂ -MS）或亲水性色谱柱（HILIC）	COSMOSIL 5NH ₂ -MS，样品会吸附在氨基上。	使用COSMOSIL Sugar-D降低吸附发生可能。
	样品一直在色谱柱中因为它的亲水性强。	增加流动相中水的浓度直到样品洗脱出来。COSMOSIL Sugar-D或COSMOSIL HILIC兼容100%含水流动相。COSMOSIL 5NH ₂ -MS兼容50%含水流动相（例如，乙腈：水 = 50 : 50）。
凝胶色谱柱（Diol）	样品有离子影响硅醇基。	在流动相中增加离子强度，加入约0.3 mol/l 盐，例如，氯化钠。 调整流动相pH到5.5或更少防止离子相互反应。
	亲水性相互作用可能会使样品被吸收。	加入10-50% 有机溶剂到流动相（例如，乙腈）
疏水性色谱柱（HIC）	样品疏水性极强。	添加5%有机溶剂（例如，甲醇或乙腈）。
	样品在进样前可能会有硫酸铵沉淀。	减少硫酸铵浓度至0.5mol/l或更少直到没有显著沉淀出现。



● 泵有问题

原因	解决方案
泵中有泡沫	泡沫破裂(请参考T7第180页)。
溶剂渗漏	拧紧连接器或更换套管。

● 检测器有问题

原因	解决方案
检测器没有正确连接	按照检测器用户操作手册正确连接。
检测器信号有问题	联系检测器制造商。
您的样品紫外吸收范围不稳定。	分析一个有合适紫外吸收的样品。如果样品没有或小紫外线吸附, 用示差折光检测器 (RI检测器) 或蒸发光散射检测器 (ELSD), 或标签样本。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

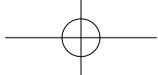
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

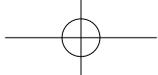
V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

T4. 基线不稳定

原因	解决方案
先前吸附于柱子里的杂质被洗脱出来。	使用强极性溶剂洗脱 (请参考170页Q13)。
COSMOSIL PE-MS · πNAP · PYE · NPE · PBB-R · Cholester 固定相有紫外吸收, 并且由于固定相有轻微的脱落导致基线不稳定 (脱落的固定相有紫外吸收)。	使用强极性溶剂洗脱 (请参考170页Q13)。
柱压突然变化会产生气泡。	脱气 (请参考第180页T7)。
当使用示差检测器 (RI检测器)	
较大的温差	使用温度调节装置保持恒温。注意空调可以加热示差检测器和色谱柱。 注意 ; 覆盖设备或管道, 以避免来自空调的温度波动。
在流动相中的残余气体。	脱气流动相 (通过超声波或吸引器)。
通过紫外光可见光检测器时出现尖峰	
气泡可能进入色谱柱或检测器。	增加压力, 去除气泡通过检测器。 注意 ; 压力太多可能会破坏检测器。如果问题仍存在, 请用溶剂 (例如, 异丙醇) 清洗15分钟, 此时请断开色谱柱和检测器的连接。
柱温度可能高于流动相的沸点, 产生了气泡在色谱柱内。	在适当温度进行分析。基本对于色谱柱来说, 20-50°C 是为较适宜的温度。 注意 ; 为了得到最好的结果, 在低于流动相沸点 20-50°C (例如, 在甲醇[沸点 : 64.7°C, 分析在45°C或以下) 的情况进行分析。
流动相中使用离子对试剂或缓冲液	
未达到柱平衡。	请使用更长的平衡时间。当使用离子对试剂和缓冲液作为流动相时, 要比流动相中不含盐的情况下使用更长的平衡时间。
盐可能在流动相中发生沉淀。	(a)降低缓冲液浓度 (例如, 100 mmol/l → 20 mmol/l) (b)更换缓冲溶液 (例如, 磷酸缓冲溶液 → 醋酸盐缓冲溶液) (c)减少有机溶剂的浓度 (例如, 70% 乙腈 : 水 = 70 : 30 → 50 : 50) (d)替换为不同的有机溶剂 (例如, 乙腈 → 甲醇)



T5. 保留时间不稳定

● 设备原因

设备	原因	解决方案
泵	气泡停留在单向阀内。	脱气 (请参阅第180页T7。)。正常相溶剂沸点较低, 所以很容易产生上下浮动。此外, 它的低粘度性也防止气泡被洗脱。
	溶剂泄漏。	收紧泄漏的部分。如果这个问题仍存在, 那么就替换零部件。
恒温浴 (调整温度)	在没有使用恒温浴或柱温箱的情况下, 柱温度会随着季节和时间有所差异。	使用恒温浴或柱温箱, 保持稳定的柱温度。 注意; 恒温槽或柱箱温度高于室温5°C的条件下, 做室温分析。

● 色谱柱因素

色谱柱种类	原因	解决方案
反相色谱柱	使用了离子试剂, 平衡色谱柱不当。	用更长的平衡时间。当使用离子对试剂时, 再平衡时间往往是必要的。
	如果100%水作为流动相C ₁₈ 柱, 色谱柱可能会出现崩塌。	COSMOSIL C ₁₈ -PAQ兼容100%含水流动相 (请参考第18页。) 注意; 对于保留时间不稳定的, 使用有机溶剂 (例如, 甲醇: 水 = 70 : 30) 进行冲洗恢复。
正相柱	少量的水在有机溶剂内会影响保留时间。	替换为不含水的流动相。如果样品中有水, 改变样品溶剂或减少注入体积。如果水已经进入色谱柱, 请用乙醇清洗恢复。
糖柱 (Sugar-D, NH ₂ -MS) 或者亲水性色谱柱 (HILIC)	少量填料脱落。	COSMOSIL Sugar-D 和COSMOSIL HILIC 可以用100%水冲洗15分来恢复。COSMOSIL 5NH ₂ -MS 可以用50%的谁溶剂 (例如, 乙腈: 水 = 50 : 50) 进行冲洗15分恢复。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

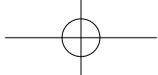
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



T6. 柱压升高

请参考第191页的技术信息3。

T7. 泵压不稳

原因	解决方案
气泡停留在单向阀内	通过泵指令对单向阀进行脱气(打开排液阀让流动相通过)。若问题仍存在,清洗单向阀,如纯水超声。

注意 ;

1. 如果气泡常出现在正相色谱,那么可以连接预柱来增加压力,让气泡洗提出来。
2. 流动相使用前进行超声脱气。

T8. C₁₈柱分辨率过低

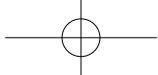
解决方案	特点
用更长一点的色谱柱	更长一点的色谱柱能够产生更好的柱效,产生更好的峰型也会导致柱压的增加和保留时间的推迟。
改变流动相(例如,pH,有机溶剂的类型或浓度)	经验或知识是基础。不要设置复杂的条件,因为它缺乏可重复性。
使用具有非疏水相互作用填料的色谱柱。	分离的样品的分子形状选择性或者 π - π 相互作用(除了疏水作用)。请参考技术资料7 第201页上的更多信息和各种互动专栏。

T9. 反相柱上没有保留

解决方案	特点
使用离子对试剂	离子对试剂使分离形成离子对的形态,增加其疏水性。因此,它并不适用于不能离解的样本。
使用亲水色谱柱(HILIC)。请参阅页面第36页。	能让较小的疏水性样品具有更长的保留时间。

T10. 在反相色谱柱上使用过多的分析时间

解决方案	特点
使用梯度洗脱	梯度洗脱方法通过改变有机溶剂浓度缩短分析时间。缺点是需要有条件的设备,增加每个采集过程之间基线平衡的时间。
使用超高速液相色谱柱	请参阅第62页,获得更多信息。
改变流动相条件	通过改变pH值,有机溶剂的浓度或类型解决问题。
使用疏水性弱的色谱柱	推荐COSMOSIL CN-MS。请参阅第31页,获取更多信息。



T11. 分离性能和过去有差异

故障现象	原因	解决方案
理论塔板数减少	自然老化的硅胶填料	没有办法恢复。
保留时间或分离度的减少	杂质可能会吸附到填料	通过冲洗进行恢复。
	固定相脱落	没有办法恢复。

T12. 新的色谱柱产生不同的分离效果

原因	解决方案										
分析条件不适合样本	调整流动相的PH值在pKa±2之间或者更多。 使用重复性好的流动相。										
色谱柱性能老化	如果色谱柱老化的话，保留时间的减少，峰形的变化都可能发生。那么就要替换色谱柱。										
较大变化	(a)用三种不同的填料进行色谱柱的评估。 对于以下的色谱柱 (尺寸4.6 x 150 mm, 3只套装)。我们用3种不同的规格的填料来验证的色谱柱。 联系我们获取更多信息。 <table border="1" data-bbox="766 903 1134 1074"> <thead> <tr> <th>填料</th> <th>货号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>COSMOSIL 5C₁₈-MS-II</td> <td>09397-73</td> </tr> <tr> <td>COSMOSIL 5C₁₈-AR-II</td> <td>09396-83</td> </tr> <tr> <td>COSMOSIL Cholester</td> <td>07970-03</td> </tr> <tr> <td>COSMOSIL HILIC</td> <td>09385-23</td> </tr> </tbody> </table> (b)找到一个受批件差影响很小的分析条件。	填料	货号	COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II	09397-73	COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II	09396-83	COSMOSIL Cholester	07970-03	COSMOSIL HILIC	09385-23
填料	货号										
COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II	09397-73										
COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II	09396-83										
COSMOSIL Cholester	07970-03										
COSMOSIL HILIC	09385-23										
原因不在色谱柱 (例如, 流动相, 流速, 温度)	找到原因。										

T13. 通过色谱柱脱色 (无色样品)

原因	解决方案
少量的脱落物, 杂质或之前的样品。	用有机溶剂进行洗脱 (例如, 甲醇) 或者使用清洁方案如 HPLC 色谱柱 (产品号 08966-30)

注意 ;
少数的固定相对保留时间没有影响。

T14. 气体进入色谱柱

低粘度的溶剂 (例如, 甲醇) 用一半于分析条件的流速冲洗1小时。

注意 ;
密封存储在阴凉黑暗的地方。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

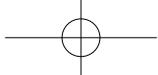
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



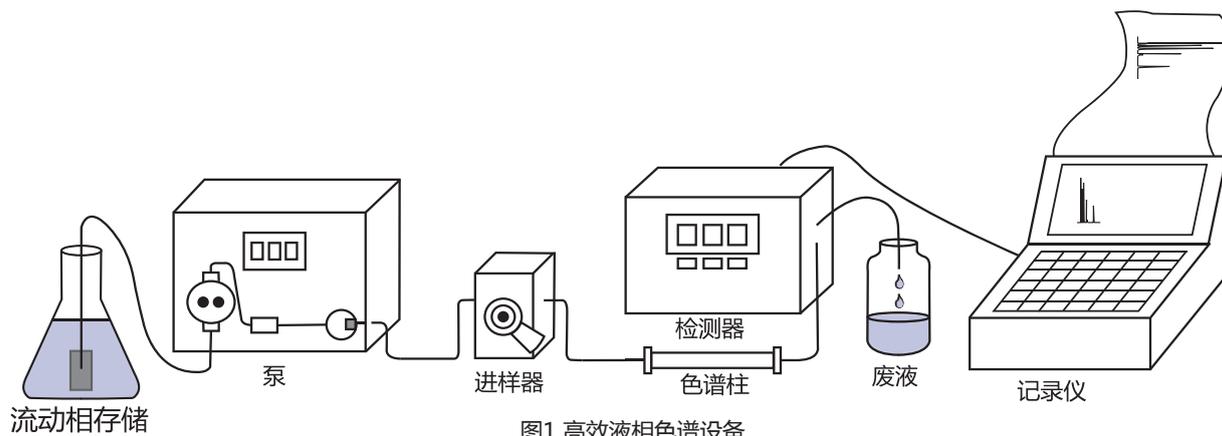
2. 液相色谱基础知识

液相色谱的历史

液相色谱最先是由Mikhail S. Tswett (1906-1907) 使用粉笔粉(碳酸钙)作为吸附剂, 分离成不同颜色的带叶色素创建的。随后反相色谱, 离子交换色谱, 尺寸排阻色谱法被开发。在1971年成功的J.J.科克兰德生产化学结合填料的液相色谱法, 建立了高效液相色谱法的基本知识, 这是现在的一个最重要的分析方法。

高效液相色谱设备

高效液相色谱设备连接如图1的顺序流动相依次从流动相储层, 泵, 进样器, 色谱柱, 检测器, 废液收集容器流过。样品引入流动相通过进样器和分离柱。色谱图是绘制的记录仪。



- 流动相存储
玻璃瓶或锥形烧瓶作为流动相储层。为了避免不溶性化合物在流动时堵塞, 一个吸滤器(或伸卡球)附加到入口。
- 泵
发送按一致流量或压力的流动相。连接两台泵使得能够梯度洗脱。
- 进样器
由微量注射器注入样品到色谱柱。自动进样器被广泛用于自动样品注入。
- 色谱柱
填料填充在不锈钢柱或玻璃柱中。为了避免填料的洗脱, 每个色谱柱的末端都有筛板(2微米)。
- 列式恒温烘箱
保持色谱柱在一定的温度下。对于反相色谱法和离子交换层析, 温度控制是非常重要的。温度保持在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 内, 恒温水浴循环或空气循环器被广泛使用。
- 检测器
检测每一个从色谱柱子上洗脱化合物, 并将其转换成电子信号。
- 记录仪
处理来自检测器的电子信号绘制色谱图。保留时间, 峰面积, 并会自动计算理论塔板数。



色谱图

洗脱指从色谱柱中提取留样。保留时间意味着样品进入到样品萃取之间的时间。色谱图是一个二维图(图2),揭示的横坐标和纵坐标上溶质的保留时间。色谱图显示了以下数据。

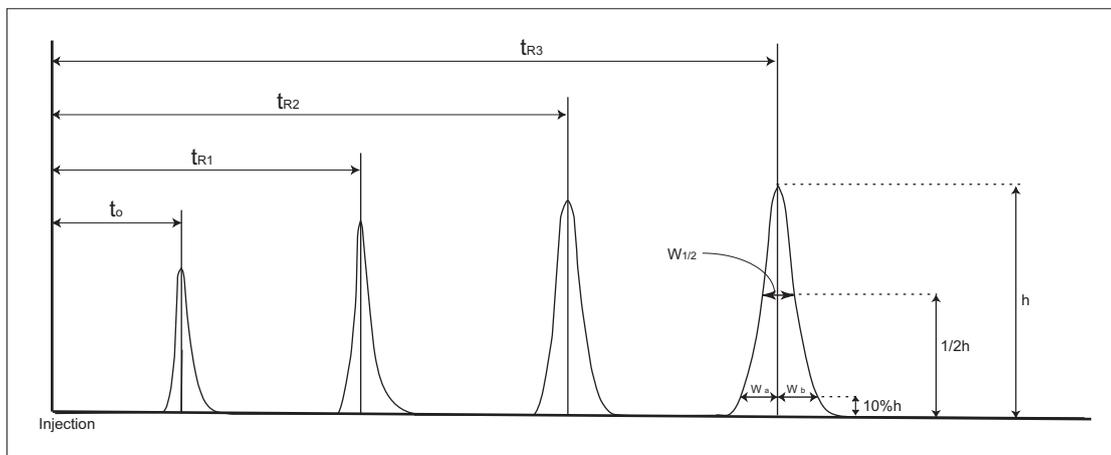


图2 色谱图

(1) t_0 :流动相的保留时间

非保留峰的保留时间。尿嘧啶被广泛使用作为标记反相。

(2) t_R :保留时间

从峰中间点的距离开始分析。

(3) h :峰高

从峰顶垂直基线距离。

(4) $W_{1/2}$:半峰宽

色谱峰高一半处的峰宽度

(5) k' (容量系数):容量因子,各试样的保持率, $k' = (t_R - t_0)/t_0$

较高的含量,意味着更长的保留。在相同的实验条件下(填料,流动相和温度下)K值是保持一致的。

(6) N (理论塔板数):理论塔板数, $N = 5.54 (t_R/W_{1/2})^2$

理论塔板数是在色谱柱中,有助于解释的分离过程的一个假想的层。较高的理论板数对应更好地柱效。塔板数取决于填料和实验条件。

(7) S (不对称因子):不对称因子, $S = W_b/W_a$

W_a :从前缘到峰值的中点的距离(在峰高 10%时测定)

W_b :从峰的中点到后缘的距离(在峰高 10%时测定)

不对称因子 $S=1$ 表示完全对称的峰,和 $S>1$ 表示拖尾,和 $S<1$ 表示前沿。拖尾可能由填料受损引起,不适合超载条件下使用。

(8) α (分离度):分离度, $\alpha = k'_2/k'_1$ (k'_1 和 k'_2 :每种样品的保留系数)

分离度必须大于 1 峰的分。较高的 α 值表示色谱峰之间的距离。

(9) R_s (分辨率):分辨率, $R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left\{ \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right\} \cdot \left\{ \frac{k'_2}{1 + k'_2} \right\}$

分辨率 (R_s) 是分开的两个样本。 $R_s = 1.5$ 表示基线分离。如果 R_s 的值小于 1.5, 峰可能会重叠。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



HPLC每个分离模式的特点

HPLC分离模式。

● 正相色谱

一般如硅胶或氧化铝作为吸附剂材料。因分析物的分离在填料中的吸附力的差异，导致它以不同的速度移动。分析物与填料之间的相互作用越强烈，速度移动越慢。

● 反相色谱

被分析物极性在流动相和非极性固定相之间分配，由于在这两个阶段之间的分布有差异，所以有不同的流动速度差异。如果分析物分配更多的固定相，流动速度将会较慢。非极性的填料，如十八烷基和辛基基团键合的硅胶被广泛使用。它们是在一定的pH和温度范围内的具有较好的热稳定性和水解稳定性，分离的效果受由固定相的类型，含碳量，封端处理，等影响。

● 离子交换色谱法

电荷的官能团键合到固体支持物分离与反离子的离子性溶质。被分析物由于在固定相的亲性和性的差异而分离。葡聚糖，纤维素，聚苯乙烯通常用作填充填料。典型的官能团是磺基丙基(SP)和羧甲基(CM)用于阳离子交换，和二乙氨基基乙基(DEAE)，四元铵(QA)的阴离子交换。影响分离性能的例子交换容量取决于官能团的类型和密度。

● 尺寸排阻色谱法

分析物根据分子大小而分离，小于孔径的分析物可以穿透孔穴并缓慢迁移，而较大的分析物从孔穴中排除，并迅速迁移。此模式主要用于高分子聚合物(分子量2000以上)的分离。有机膨胀型凝胶(例如，葡聚糖和聚丙烯酰胺)，无机凝胶(例如，硅胶和玻璃)被用作填料。

高效液相色谱法分离机制

最常用的模式，以反相为例。混合样品被注入到色谱柱中，疏水性分析物(A)分布在极性流动相和移动较快的色谱柱。相反，较高的疏水性的分析物(B)的分布在一个较长的时间的非极性固定相和移动较慢的色谱柱。因此，分析物流出的顺序是按极性最高先洗脱而非极性最低被洗脱。

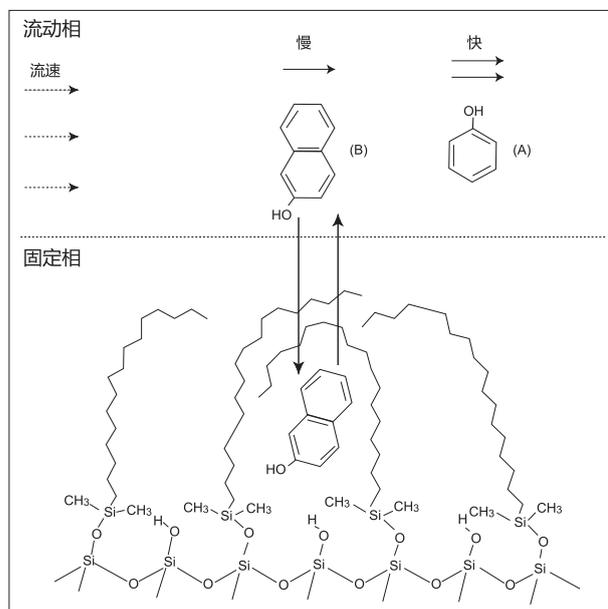
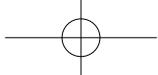


图3 分离机制



流动相溶剂

HPLC流动相重要的因素如下所示。

1. 样品成分的溶解度高
2. 良好的相溶性
3. 未检测到干扰源
4. 低粘度
5. 沸点高于工作温度
6. 毒性低，不易燃性
7. 低廉的价格
8. 使用HPLC级或过滤溶剂

接着，流动相的选择根据下面示出来导引分离模式。

● 正相色谱

一般情况下，极性溶剂混合，用一种非极性溶剂。通过改变混合比来调节分离度。请参阅极性和溶剂的溶解度。主要使用甲苯，己烷，氯仿，乙酸乙酯，乙酸和乙醇。

● 反相色谱

主要使用水，甲醇，乙腈和四氢呋喃。分离因子调节由这些溶剂的混合比率。当使用硅胶基质色谱柱，用于离子分析物时，它是可取的，以调节pH范围从2至7.5。通常，硅胶基质色谱柱不是很稳定，在此范围内，由于裂解的键合的基团在pH <2，和溶解在> pH值7.5的二氧化硅载体的外面。使用过滤的磷酸缓冲溶液或醋酸盐缓冲溶液的pH值控制。

● 离子交换色谱法

加入缓冲溶液中的水和盐的浓度（离子强度）和pH调整分离因子。离子强度越强，样品洗脱越易，较低的pH值减少在阴离子交换的分离因子，并增加了一个阳离子交换树脂上。阳离子的缓冲溶液，如氨和胺的用于阴离子交换，用于阳离子交换树脂和阴离子的缓冲液，如乙酸盐，甲酸盐和柠檬酸。

● 尺寸排阻色谱法

一般情况下，一个单一的溶剂作为流动相，使用，它不能改变调整分离因子。四氢呋喃，氯仿，甲苯和N，N-二甲基甲酰胺中常用的非水模式。添加水的缓冲溶液中，用于水性模式。调整pH值和离子强度，以防止吸附和 其它不期望的相互作用。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

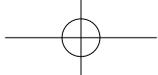
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



定量分析

绝对校准曲线法或内部标准的方法被用来计算由峰面积或高度的量或浓度的溶质。

● 绝对校准曲线法

1. 准备3-4个不同浓度的标准溶液。
2. 注入相同体积的每个标准溶液，记录色谱图，并测量峰面积。
3. 绘制校准曲线，X为标准物质的量，Y为峰面积。标准曲线通常是过原点的直线。
4. 在相同条件下注入样品作为标准，并记录色谱图。测量的峰面积（Y）和使用校准曲线来确定样品量。

此方法应该在一个给定的条件下进行准确。这种方法也被称为外标法。

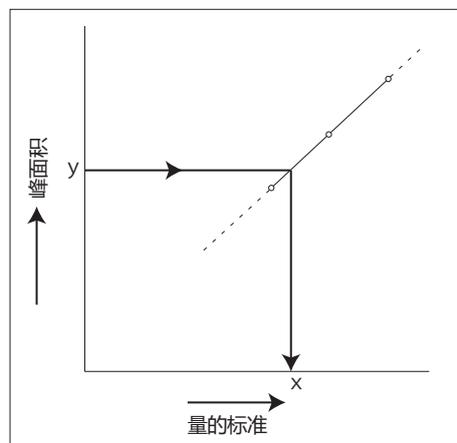


图4 绝对校准曲线

● 内标法

1. 准备3-4已知浓度^{*1}的标准和样品^{*2}的比例。
2. 注入一个恒定体积的各种浓度，记录色谱图和测量峰面积。
3. 通过绘制的 M_X / M_S 对 A_X / A_S 比准备的校准曲线（图5所示）。 M_X 是注入的样品量，和 M_S 是量的标准。 A_X 是样品的峰面积，和 A_S 是标准的峰面积。标准曲线通常是过原点的直线。
4. 然后，制备的试验溶液含有已知量的内标物的未知量的样品^{*3}。用于获得校准曲线，在相同条件下进行实验。
5. 使用校准曲线，来确定未知的样品量。

*1如果被证实为通过原点的直线校准曲线，绘制的 A_X / A_S 注入未知样品的浓度确定的一个点的校准曲线。

*2内部标准应具有相似的化学字符作为样本，而完全分开。

*3当内部标准被加入到试验溶液，确保不发生化学反应（例如，沉淀）。

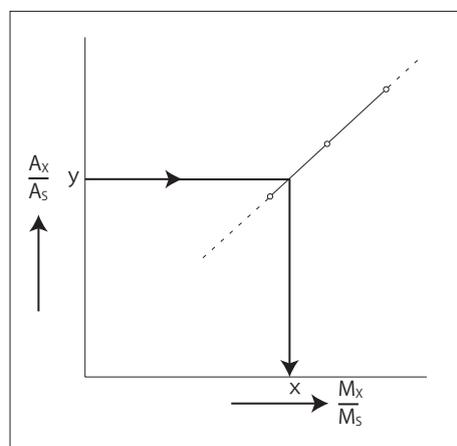


图5 内标法校准曲线

1. 高效液相的流动相准备

1) 有机相/水混合流动相

配制流动相 甲醇 : 水 = 70 : 30 (v/v) 1L

1. 在三角瓶中准备700 ml甲醇。
2. 在三角瓶中准备300 ml水。
3. 充分混合 1 和 2 并且脱气。

在流动相的配制过程中，重量称量较体积称量更精确。

使用甲醇和水配置1L流动相的组分配比表格

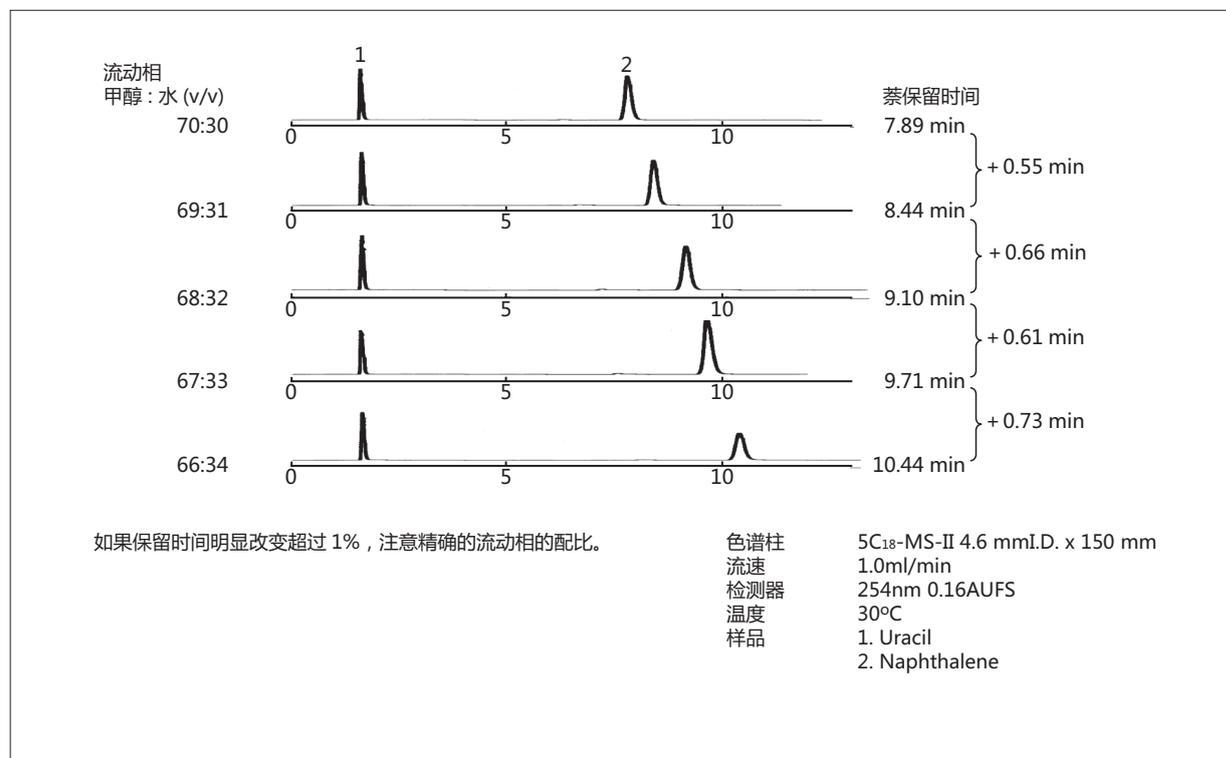
甲醇 / 水	甲醇 (g)	蒸馏水 (g)
90 : 10 (v/v)	711.9	99.8
80 : 20 (v/v)	632.8	199.6
70 : 30 (v/v)	553.7	299.5
60 : 40 (v/v)	474.6	399.3
50 : 50 (v/v)	395.5	499.1
40 : 60 (v/v)	316.4	598.9
30 : 70 (v/v)	237.3	698.7
20 : 80 (v/v)	158.2	798.6
10 : 90 (v/v)	79.1	898.4

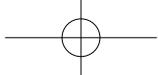
使用乙腈和水配置1L流动相的组分配比表格

乙腈 / 水	乙腈 (g)	蒸馏水 (g)
90 : 10 (v/v)	707.4	99.8
80 : 20 (v/v)	628.8	199.6
70 : 30 (v/v)	550.2	299.5
60 : 40 (v/v)	471.6	399.3
50 : 50 (v/v)	393.0	499.1
40 : 60 (v/v)	314.4	598.9
30 : 70 (v/v)	235.8	698.7
20 : 80 (v/v)	157.2	798.6
10 : 90 (v/v)	78.6	898.4

警告：甲醇和乙腈为有害物质，不能用于医疗用途。实验室处理必须配戴眼镜防护装置及面罩。

流动相中有机溶剂的成分对保留时间有很大的影响，有机溶剂的成分相差1%都会对保留时间有很大的影响。





技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

2) 有机溶剂/缓冲液混合流动相

(案例 1) 制备 20 mmol/l 磷酸盐缓冲液 (pH2.5)

1. 制备 20mmol/L 的磷酸二氢钠水溶液。(取 2.40 克磷酸二氢钠无水物 (产品号 31720-65) 在 1L 蒸馏水溶液中溶解。)
2. 准备 20 mmol / l 的磷酸水溶液。(取磷酸 2.31 克 (纯度 :85%) (产品号 08964-92), 在 1L 蒸馏水溶液中溶解。)
3. 混合 1 和 2, 调整 pH 值到 2.5。
4. 在减压下过滤, 以除去不溶性物质。(建议过膜 0.45 微米或更小的孔径。)

注意 ; 将溶液中的固体过滤完全, 以防止堵塞泵和色谱柱。
5. 当混合有机相时, 按体积比进行混合。

注意 ; 固体可能是混合后的沉淀物。

调整后的解决方案, 磷酸盐缓冲液 (pH 值 2.5) (5*) (产品号 08969-71) 的更多信息, 请参阅第 77 页。

(案例 2) 制备 20 mmol/l 磷酸盐 (pH7.0)

1. 制备 20 mmol/l 的磷酸二氢钠水溶液。(2.40 克磷酸二氢钠无水物 (产品号 31720-65) 溶解在 1L 蒸馏水溶液中。)
2. 制备 20 mmol/l 二磷酸氢钠的水溶液。(二磷酸氢钠, 2.84 克 (产品号 31801-05) 溶解在 1L 蒸馏水溶液中。)
3. 混合 1 和 2, 调整 PH 至 7。
4. 在减压下过滤, 以除去不溶性物质。(建议过膜 0.45 微米或更小的孔径。)

注意 ; 将溶液中的固体过滤完全, 以防止堵塞泵和色谱柱。
5. 当混合有机相时, 按体积比进行混合。

注意 ; 固体可能是混合后的沉淀物。

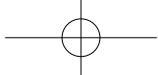
调整后的解决方案, 磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.0) (5*) (产品号 08968-81) 的更多信息, 请参阅第 77 页。

(案例 3) 制备 5mmol/l 1-己烷磺酸钠, 20mmol/l 磷酸盐缓冲液 (PH2.5)

1. 准备 5mmol/l 1-己烷磺酸钠, 20mmol/l 磷酸盐缓冲液 (PH2.5) 水溶液。(10 毫升 1-己烷磺酸钠 (0.5M 溶液) (产品号 31532-06) 和 2.40 克的钠磷酸二氢盐无水物 (产品号 31720-65) 在蒸馏水 1L 溶液溶解。)
2. 准备 5mmol/l 1-己烷磺酸钠, 20 mmol/l 磷酸水溶液。(溶于 10 毫升 1-己烷 (0.5M 溶液) (产品号 31532-06) 2.31 克磷酸 (纯度 :85%), (产品号 08964-92) 在蒸馏水 1L 溶液。)
3. 混合 1 和 2, 调整 PH 至 2.5。
4. 在减压下过滤, 以除去不溶性物质。(建议过膜 0.45 微米或更小的孔径。)

注意, 将溶液中的固体过滤完全, 以防止堵塞泵和色谱柱。
5. 当混合有机相时, 按体积比进行混合。

注意 : 固体可能是混合后的沉淀物。



2. 色谱柱的内径选择 (减小或增加尺寸)

介绍

下表显示了1.0 mm到50 mm内径的COSMOSIL色谱柱的参数：流速，进样器，内径，应用，比表面积（与内径4.6 mm柱子比较）及粒径。这些数据有助于您在常用4.6 mm内径分析柱基础上进行柱型的放大或缩小。

内径 (mm I.D.)	1.0	2.0	3.0	4.6	10	20	28	50
流速 (ml/min)	0.05	0.2	0.4	1.0	5.0	19	37	70
检测池 · 进样器	半微量分析			分析		制备		
内管直径 (mm)	0.05	0.1	0.2-0.3		1.0			
应用	LC-MS省溶剂		标准HPLC系 统下省溶剂	标准	半制备 (小规模)	制备 (中等规模)	制备 (大规模)	制备 (超大规模)
与4.6 mm内径分 析柱的表面积比	0.05	0.19	0.43	1.00	4.73	18.90	37.05	118.15
粒径 (μm)	3 或 5			5		15 以上		

柱尺寸减小

当广泛使用的 (4.6 mm内径) 分析柱按比例缩小为半微量柱或3.0 mm内径同样柱长的HPLC分析柱时，样品负荷剂量与柱子的横截面积成比例。3.0 mm内径柱具有高灵敏度，且节省溶剂，可与4.6 mm内径柱的配套设备通用。半微量柱 (2.0 mm内径及1.0 mm内径) 具有更高的灵敏度，且能分析微量组分，但是需要更换HPLC系统的管道，进样器及检测器等部件。

色谱柱尺寸	4.6 mm I.D. x 150 mm	3.0 mm I.D. x 150 mm	2.0 mm I.D. x 150 mm	1.0 mm I.D. x 150 mm
色谱图				
流速 (ml/min)	1.0	0.4	0.2	0.05
压力 (MPa)	3.4	3.6	3.8	3.6
进样体积 (μl)	1.0	0.4	0.2	0.05
检测池 · 进样器	分析		半微量分析	
检测精度 (AUFS)	0.08		0.04	
管路内径 (mm)	0.25		0.10	0.05

色谱柱 COSMOSIL 5C₁₈-MS- II
 流动相 乙腈 : 水 = 70 : 30
 流速 1.0 ml/min
 温度 30°C
 检测波长 UV 254 nm

样品
 1. Benzene 4. Propylbenzene
 2. Toluene 5. Butylbenzene
 3. Ethylbenzene 6. Amylbenzene

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

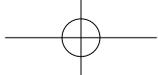
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

加大上样量例子 (制备精制用)

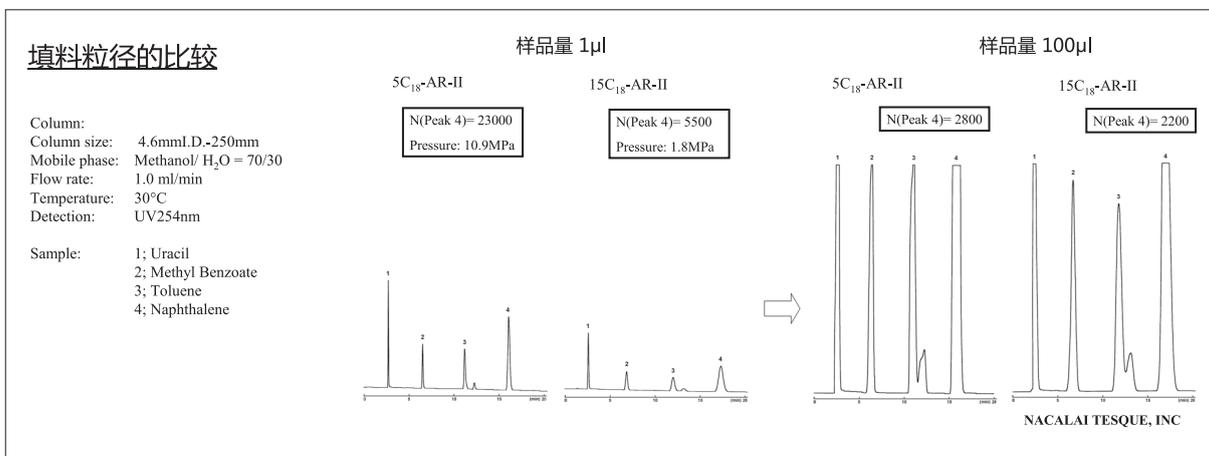
从内径4.6 mm的色谱柱, 放大到更大内径色谱柱 (色谱柱长度尺寸相同), 流动相的流速和样品的上样量与色谱柱的横截面积是成比例的。

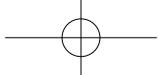
色谱柱尺寸	4.6 mm I.D. x 250 mm	10 mm I.D. x 250 mm	20 mm I.D. x 250 mm
色谱图			
流速 (ml/min)	1.0	5.0	18.9
压力 (MPa)	5.5	5.9	5.8
进样量 (μ l)	125	625	2, 500
检测池 · 进样器	分析		制备
管路内径 (mm)	0.25		1.0

色谱柱 COSMOSIL 5SL-II
 流动相 乙酸乙酯 : 乙醇 = 4 : 1
 温度 30°C
 检测波长 UV 254 nm
 样品 Triton X-100

填料粒径的比较

5 μ m的填料变化到15 μ m的填料时, 理论塔板数 (N) 变为1/3, 压力变化为只有1/9 (理论值)。下面的例子, 虽然当注入少量的样品时, 5 μ m和15 μ m的填料理论塔板数相差很大, 但是当大量增加样品量时, 理论塔板数就相差无几了。因此, 在内径28 mm以上的色谱柱使用的场合下, 我们推荐使用压力更低的15 μ m的色谱填料。





3. 解决压力增加的问题

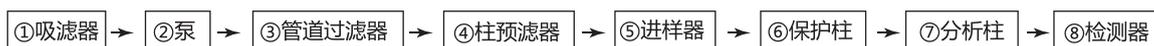
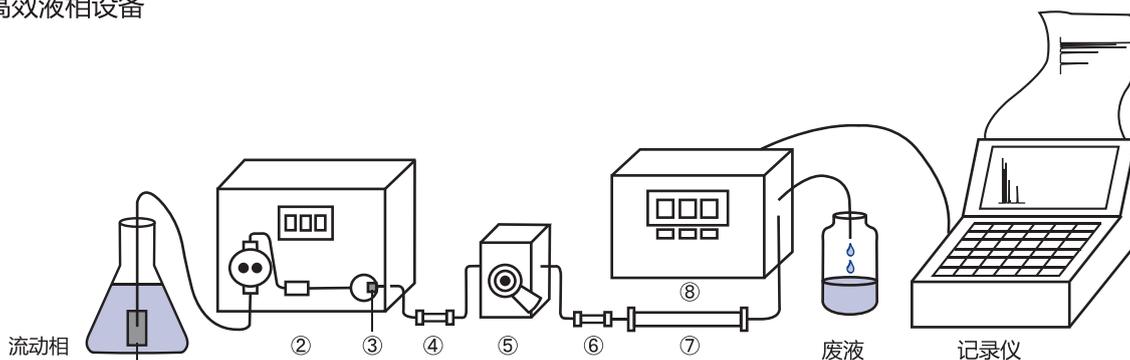
介绍

反复分析可能使柱压升高。连续在过高压力下使用色谱柱可能导致仪器过载和损坏。因此有必要监测柱压和及时解决问题。

判断堵塞点

柱压升高有可能是仪器的原因也有可能是色谱柱的原因，因此首要的是找到堵塞点。

高效液相设备



一部分一部分的断开部件，以监测堵塞点。如果没有色谱柱，理论上仪器柱压为0。那么问题可能出现在色谱柱堵塞。需要更换色谱柱。

设备堵塞

根据上述的方法，识别特定堵塞点。

(案例 1) 堵塞管道所造成的高压力

- 原因：盐沉积在管道。
- 解决方案：泵送水通过管路之前断开色谱柱和任何其他设备。逆向清洗也是一种有效的方式。如果情况没有改善，请更换一个新的管路。

(案例 2) 泵堵塞所造成的高压力

- 原因：在线过滤器泵被堵塞。
- 解决方案：拆开在线过滤器，浸泡在溶剂中，然后再超声清洗。如果情况没有改善，更换一个新的在线过滤器。

(案例 3) 手动进样器堵塞所造成的高压

- 原因：手动进样器被堵塞。
- 解决方案：与污染物相溶的溶剂 20 ml (例如，甲醇)，用进样器注入。在加载和注入位置两线洗净。清洁进样器在超声仪中也是有效的。如果是固体所造成的堵塞，反方向冲洗。如果情况没有改善，请更换一个新的进样器。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

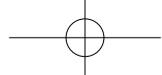
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

色谱柱堵塞造成压力增加的解决方案

(案例 1) 使用缓冲液之后, 由于有机溶剂的冲洗, 造成盐沉积在色谱柱内。

- 原因** : 盐沉积在色谱柱
- 解决方案** : 以正常流速的一半洗柱 30 分钟, 用 10% 的有机溶剂 (甲醇或乙腈) 的水溶液来以溶解盐沉积。如果情况没有改善, 在相同条件下, 100% 的水冲洗柱。
- 预防** : 要切换到浓度高有机溶剂时, 先使用一个缓冲阶段, 先使用无盐的流动相 (与相同浓度的有机溶剂作为缓冲区), 然后切换到含有较高试剂浓度的流动相。
例如: 改变流动相从 10/90(V/V) 乙腈和 20mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH2.5) 到 90/10(V/V) 乙腈和水, 先洗柱 15 分钟用 10/90(V/V) 乙腈 / 水, 然后切换到 90/10(V/V) 乙腈和水。

(案例 2) 样品没有完全溶解或未经过滤

- 原因** : 色谱柱填料被不溶性样品或杂质堵塞。
- 解决方案** : 反接柱子, 并从检测器断开连接, 然后进行 30 分钟冲洗色谱柱, 流速为分析时 (具有相同的流动相) 流速的一半。如果情况没有改善, 在前端的色谱柱内充填新的填料。(我们可以更换端部接头, 需要有偿服务费)
- 预防** : 我们强烈建议过滤的样品和流动相。有关详细信息, 请参阅第 193 页的技术信息 4。) 过滤样品前处理方法。
- 注意** : 如果该色谱柱不断地在相反的方向上进行连接, 它可能会恶化。

(案例 3) 很容易吸附到色谱柱上的蛋白质样品或稍溶于流动相的样品

- 原因** : 样品已吸附到填料上或沉积在色谱柱中。
- 解决方案** : 洗柱 30 分钟, 流速为正常流速一半, 使用可以溶解的吸附物质速的溶剂, 此冲洗过程适用于每个类型色谱柱。
[反相色谱]
a) 当吸收的物质不是蛋白质, 用甲醇或四氢呋喃。
b) 当吸收的物质是蛋白质, 用 50-70% 乙腈 / 水 (含 0.1% 三氟乙酸) 冲洗。然而 蛋白质可能在高浓度的有机溶剂中沉淀。
[COSMOSIL SL-II]
用甲醇, 四氢呋喃或乙醇洗涤。
[富勒烯色谱柱]
清洗使用邻二氯苯, 1, 2, 4- 三氯苯。
[COSMOSIL Sugar-D/NH₂/HILIC 色谱柱]
用 50/50 (体积 / 体积) 乙腈 / 水溶液冲洗 NH₂-MS 和用 100% 的水冲洗 SUGAR-D 柱和 HILIC 柱。
- 预防** : (a) 针对不同的样品选择适宜的预处理方法。第 193 页, 技术信息 4。
(b) 建议使用保护柱。更多信息请参详第 199 页, 技术信息 6。
- 注意**
- 当冲洗柱子时, 柱子的出水口不要连接, 让溶液流出。
 - 过渡的清洗可能会降低柱效。
 - 不要使用 pH 超过 7.5 的强碱性溶液或 pH 小于 1.5 的强酸性溶液冲洗硅胶填料。
 - 冲洗完后用制造商推荐的储存液保存柱子。
 - 如果情况没有改善, 考虑更换柱子。

(案例 4) 由于长期使用色谱柱发生损坏

- 原因 1** : 柱子由于长期使用有所损坏。
- 预防** : 根据第 I 部分 (原因 3) 那样冲洗色谱柱。
- 原因 2** : 由于长期使用色谱柱, 里面的硅胶发生破碎。
- 预防** : 更换柱子。

清洗后性能没有改善

当该色谱柱柱效洗涤后没有改善, 我们建议更换色谱柱, 以减轻压力, 降低仪器上的负担。如果峰的形状是可以接受的并且最大压力是小于 20MPa, 你可以继续使用色谱柱。



4. 高效液相的样品准备

样品在用HPLC分析之前需要进行预处理，去除样品可能含有的影响分析的杂质。预处理可以增加分析的重现性和灵敏度，且可以保护HPLC色谱柱。预处理方法因样品不同各异。下面是几种常见的预处理方法。

1) 过滤

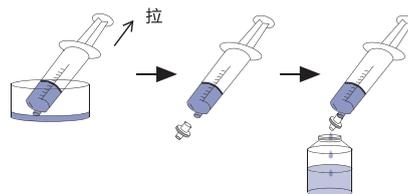
过滤是一种从溶液中去掉固体颗粒的常用方法。过滤可通过移除溶液中的颗粒物，沉积物及胶质最大限度地减少柱损耗，延长柱子的使用寿命。同时也有助于增加分析数据的重现性。本公司提供两种过滤器：注射过滤器和旋转过滤器。

	注射式过滤器	离心式过滤器
产品	Cosmonice Filter	Cosmospin Filter
		
使用	简单实用。直接连接注射器使用。	离心原理，简单实用
类型	W(亲水型) S(有机溶剂)	滤芯孔径：0.2 μm 滤芯孔径：0.45 μm
需要设备	注射器 样品瓶	离心机
参考	参考80页	参考80页

Cosmonice Filter

如何使用：

1. 将需要过滤的样品抽入注射器。
2. 将Cosmonice filter安装到注射器头上。
3. 推动注射器柱塞过滤样品。
4. 用HPLC分析过滤的样品。

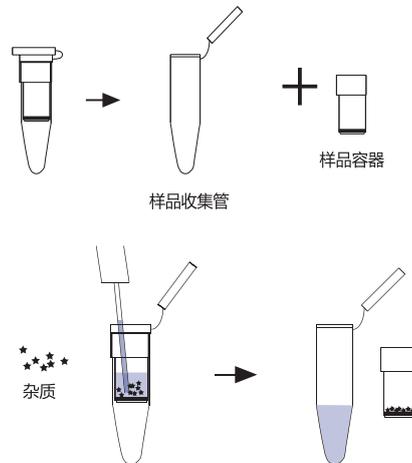


Cosmospin Filter

部件： 样品储存管
样品收集管

使用方法：

1. 将Cosmospin样品储存管插入Cosmospin样品收集管。
2. 把样品加入Cosmospin样品储存管。
3. 盖紧样品储存管的盖子，离心，滤液进入Cosmospin样品收集管。
4. 移除样品储存管，收集样品收集管中的滤液。
5. 用HPLC分析滤液。



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

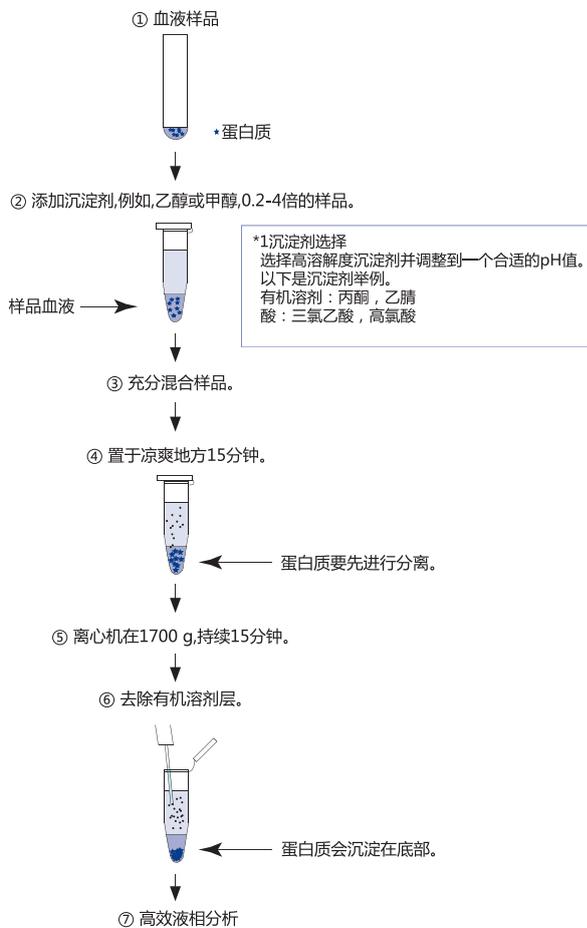
VI 技术信息

VII 化合物索引

2) 蛋白质沉降

蛋白质沉降是化工产品下游技术中普遍使用的移除蛋白质的分离方法。例如，分离血样中的药物浓度时，必须首先去除蛋白质。否则，蛋白质会吸附在柱子上，干扰分析。蛋白质沉降的方法包括盐析，等电点沉降及有机溶剂沉降。

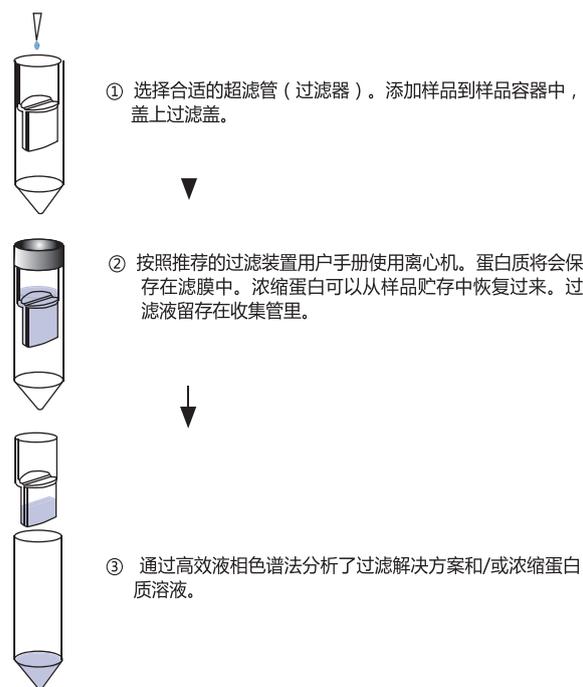
下面是采用有机溶剂沉降蛋白质的一般流程：



3) 超滤

超滤是利用固定孔径的半透膜过滤溶液收集蛋白质及其他大分子的一种分离方法。超滤可用于样品脱盐，从稀溶液（例如，尿样）中富集蛋白质，或将高蛋白浓度的溶液（例如，血清，血浆）中的蛋白质去除。

下面是超滤的一般流程：

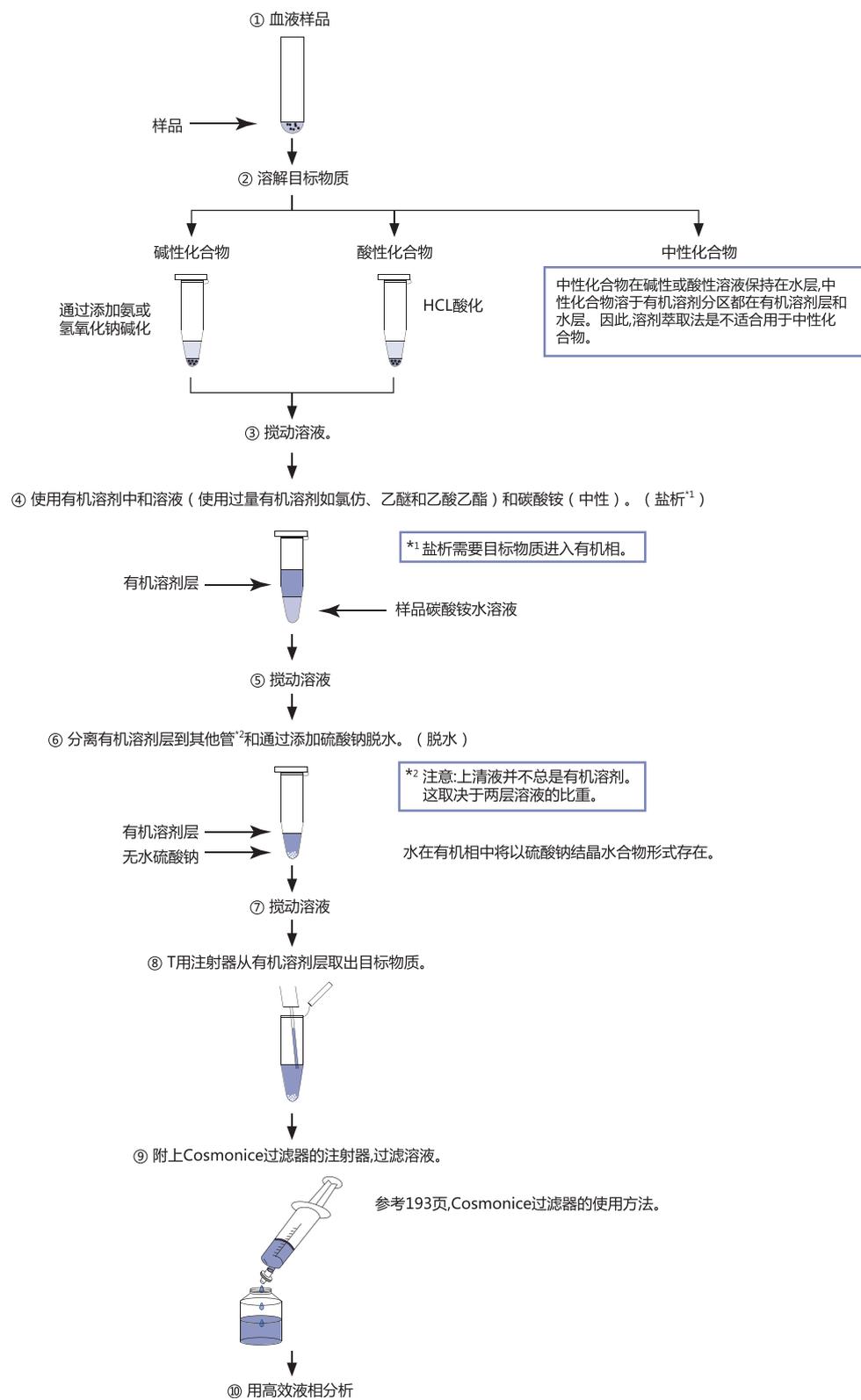




4) 溶剂萃取法

溶剂萃取法是根据利用化合物两种不互溶溶剂（水和一种有机溶剂）中溶解度的差异将其分离的方法。这种方法常被用来富集高疏水性的化合物，且分析灵敏度很高。将缓冲液加入样品，调pH，再使用乙醚，氯仿等有机溶剂将目标化合物萃取出来。然而，若目标化合物与蛋白质结合在一起，采用萃取法则很难奏效。

溶剂萃取法：



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

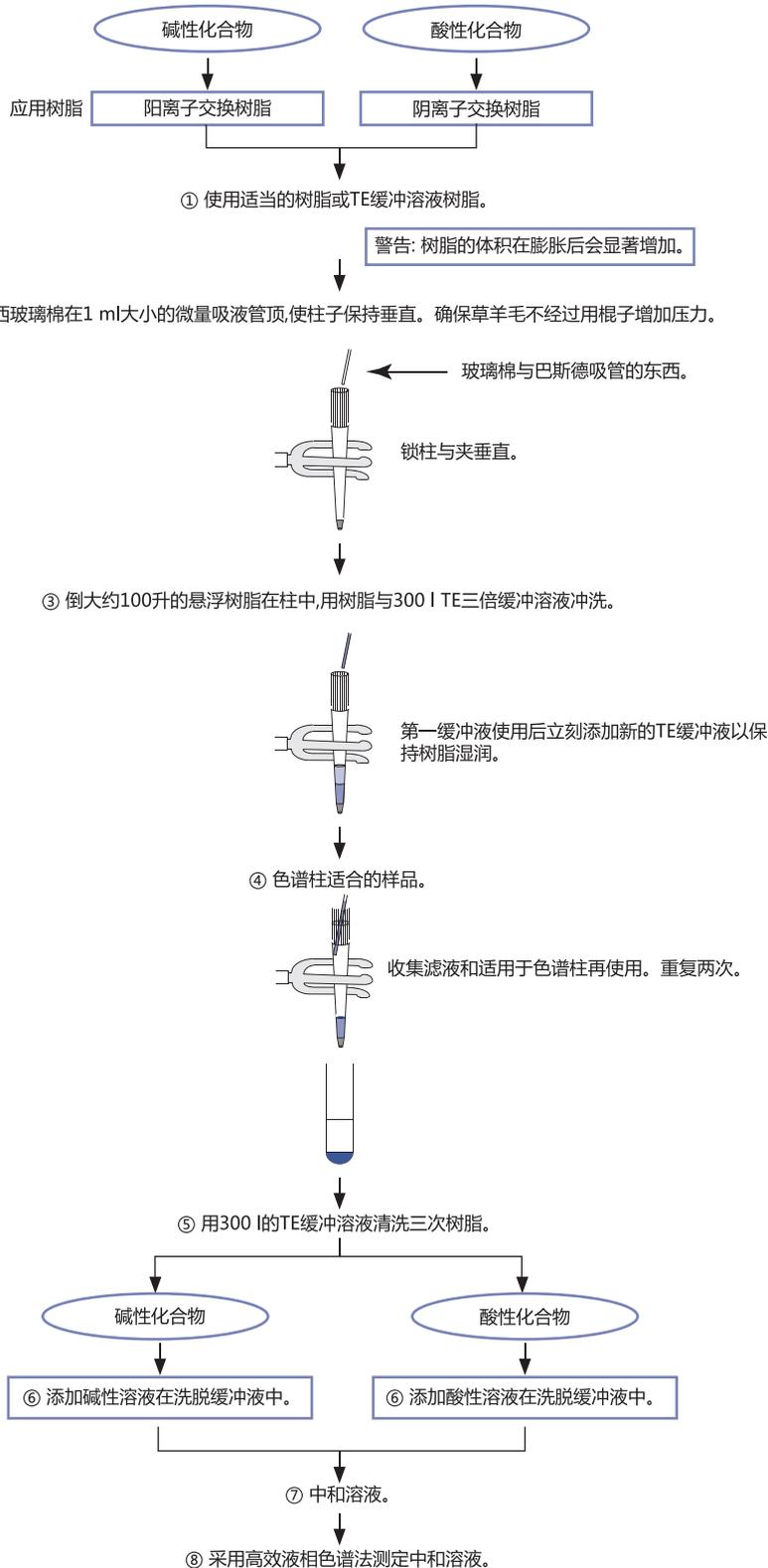


技术信息

5) 离子交换

某些样品由于存在乳化作用，不适宜采用溶剂萃取法进行预处理，可采用离子交换树脂预对其进行处理。首先需要选择合适的树脂，并确定相应的实验条件。例如，带负电荷的化合物可紧密吸附在DEAE纤维素树脂等阴离子交换树脂上。从而可以通过增加缓冲液中的盐浓度或者将其他有微弱吸附作用的杂质冲洗后调节洗脱剂的pH来收集目标化合物。

离子交换的步骤：



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

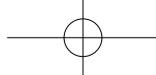
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

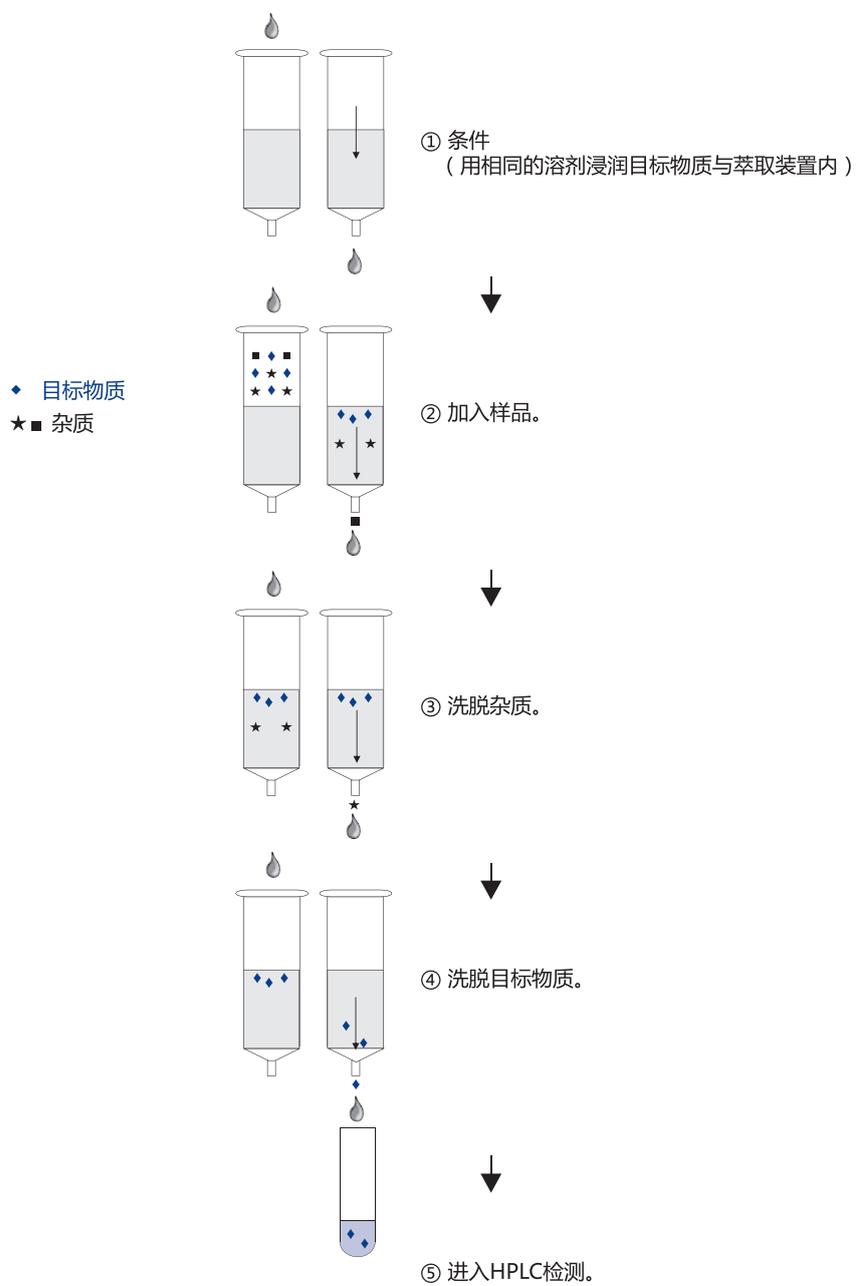
V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



6) 固相萃取



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

5. 梯度洗脱的基线噪音

在梯度分析中，流动相未完全混合或流动相的水中含有杂质可能引起基线噪音。假如是由于流动相未完全混合引起基线噪音，可在进样前通过混合器将流动相各组分混合均匀来改善（基线1→2）。如果是由于流动相中含有杂质引起基线噪音，可通过使用色谱预处理柱来改善（基线2→3）。COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6 mm I.D.×10 mm或者10 mm I.D.×20 mm作为预处理柱。

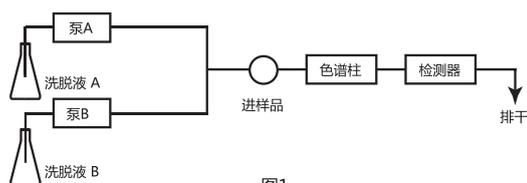
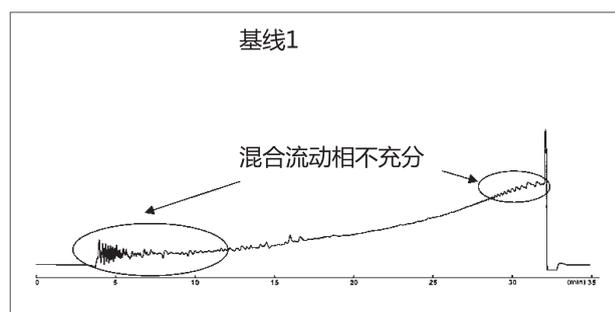


图1



↓ + 搅拌器

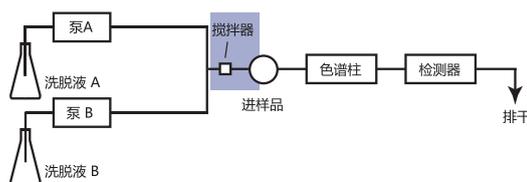
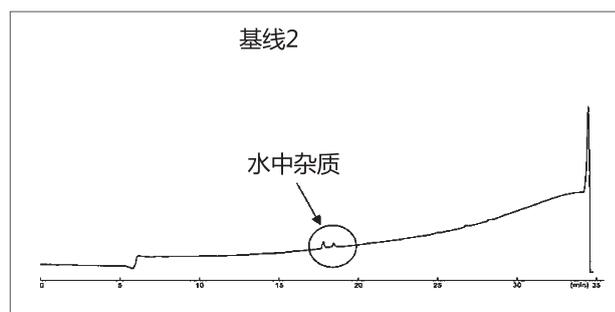


图2



↓ + 预柱

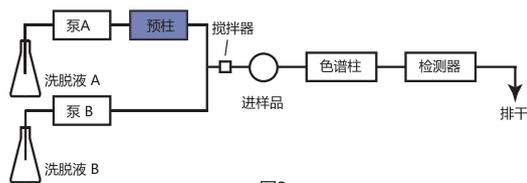
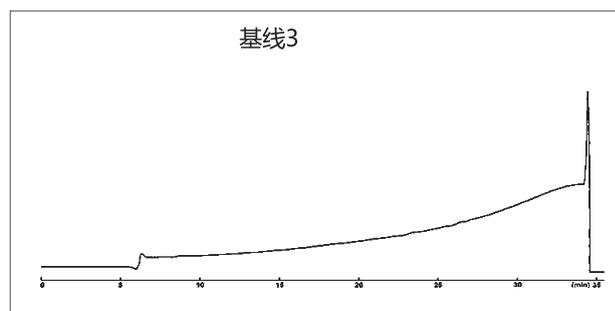


图3



色谱柱 COSMOSIL 5C₁₈-AR-300 4.6 mm I.D. x 150 mm
 预柱 COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6 mm I.D. x 10 mm
 流动相 A: 0.1% TFA 水溶液
 B: 0.1% TFA 95% 乙腈
 B: 0% → 100%/30 min 线梯度洗脱
 流速 1.0 ml/min
 温度 30°C
 检测器 UV 220nm

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

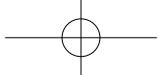
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



6. 保护柱的影响

介绍

使用保护柱可以同时保护分析柱和制备柱，因此推荐使用。COSMOSIL保护柱的填料与分析柱和制备柱的填料相同。因此，保护柱不会降低柱效。

保护柱的选择

分析和制备色谱柱的保护柱应使用相同的填料。保护柱的大小应该使用相同或更小的内径，柱长度短（10-50毫米）。有关的产品代码或尺寸的更多信息，请参阅色谱柱的各页。

（例如，主柱 :5C18-MS-II (20 mm I.D. x 250 mm) → 保护柱5C18-MS-II (10 mm I.D. x 20 mm)。

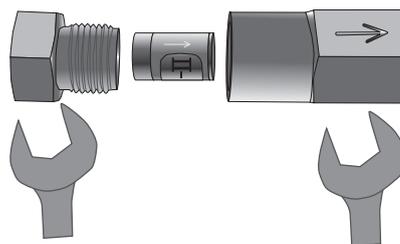
保护柱芯

对于常规色谱柱 (4.6 mm I.D. x 10 mm) 来说，保护柱和价格低廉的保护柱芯是配套使用的。柱芯是采用与分析柱相同填料的一次性保护柱。当使用保护柱芯，COSMOSIL保护柱柱套 (产品号 38009-79) 是必需的。保护柱套客户是可重复使用的。



COSMOSIL 保护柱套 (左)
保护柱芯 (右)

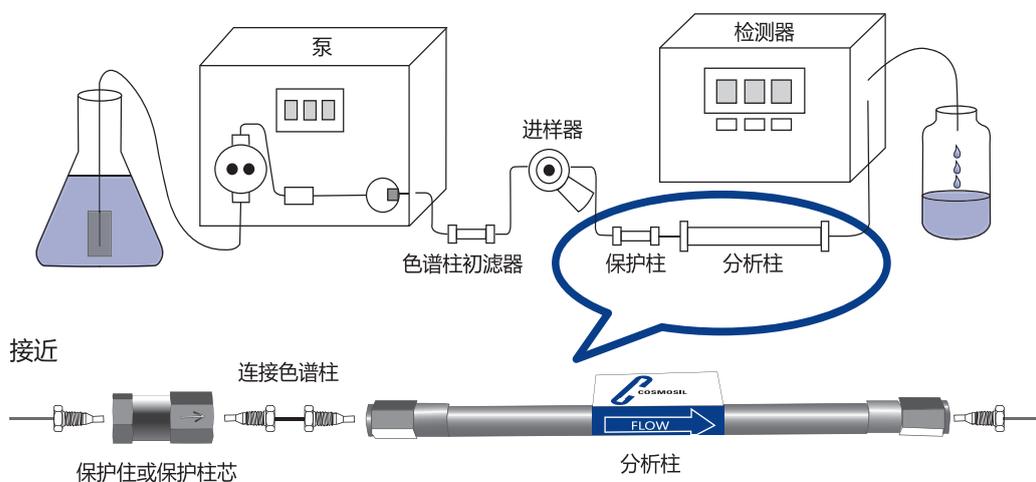
柱芯结构



欲了解更多信息有关如何使用保护柱芯
请参阅所附说明书。

连接保护柱

使用COSMOSIL色谱柱连接管 (产品号 37843-69) 的更多信息，请参阅第87页。



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

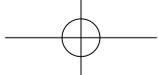
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

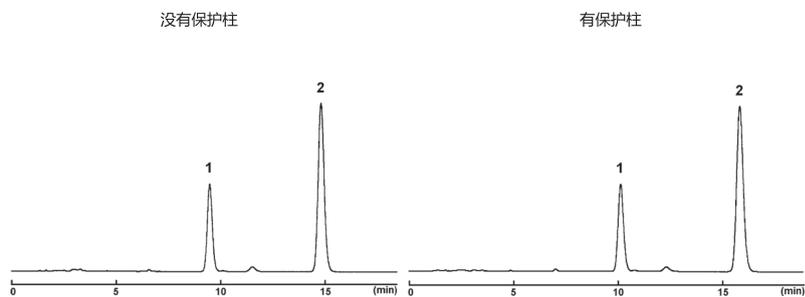
保护柱使用示例

下面两张色谱图中，左边是没有保护柱的情况下采用COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (4.6 mm I.D.×150 mm) 分析柱分析样品的色谱图。右边是同时使用保护柱 (4.6 mm I.D.×10 mm) 和COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (4.6 mm I.D.×150 mm) 分析柱分析样品的色谱图。结果表明由于保护柱的填料与分析柱相同，不会影响分离结果。

使用保护柱

Column: 5C₁₈-MS-II
Column size: (Analytical Column) 4.6mmI.D.-150mm
(Guard column) 4.6mmI.D.-10mm
Mobile phase: Methanol/ H₂O = 70/30
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Betamethasone 17-Valerate (0.25 μg)
2; Isoamyl Benzoate (2.5 μg)



NACALAI TESQUE, INC

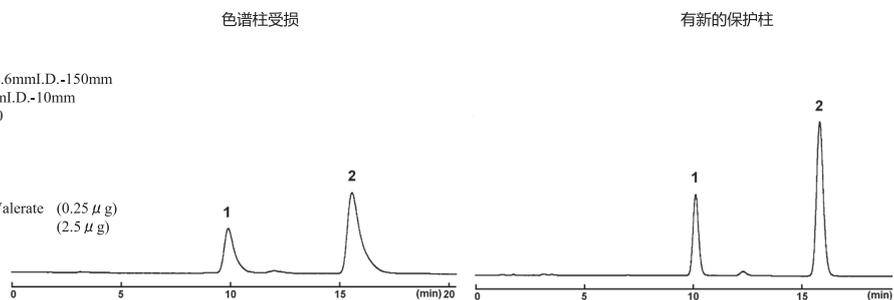
色谱柱的检测

建议经常检测柱效，及时更换损坏的柱子。如果持续使用已损坏的保护柱，分析柱也容易受到损坏。

替换保护柱

Column: 5C₁₈-MS-II
Column size: (Analytical Column) 4.6mmI.D.-150mm
(Guard column) 4.6mmI.D.-10mm
Mobile phase: Methanol/ H₂O = 70/30
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Betamethasone 17-Valerate (0.25 μg)
2; Isoamyl Benzoate (2.5 μg)



NACALAI TESQUE, INC

订购信息

请参考相应的色谱柱信息。

请参考87页保护柱的配件以及保护柱套。

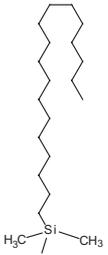
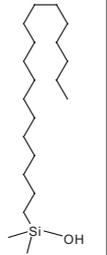
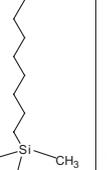
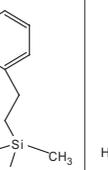
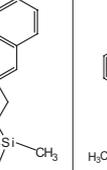
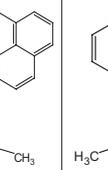
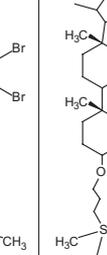
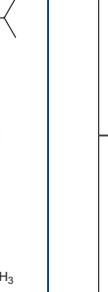
7. 反相色谱的填料选择

介绍

反相色谱法由于其理论塔板数高，分离效果好，回收率高及使用方便等优点是目前最常用的HPLC色谱法。十八烷基键合相硅胶（C₁₈，ODS）是反相色谱柱最常用填料。然而由于C₁₈色谱柱是以疏水相互作用为分离机制的，因此对于疏水性相近的化合物的分离效果不是很好。可以通过增加柱长及调整流动相或柱温来提高疏水性相近的化合物的分离效果。因此，反相色谱柱除了利用疏水相互作用还可以利用在硅胶柱上结合其他基团的键合色谱柱作为填料来增加样品的保留。

Nacalai提供多种COSMOSIL反相色谱柱填料。这些键合填料的基本技术参数及各自的保留机制如表1所示。键合色谱柱通过键合填料与样品之间的多种作用力实现样品的保留，可根据分离样品的不同需求选择色谱柱。

表格1. 固定相和填料的相互作用

填料	C ₁₈ -MS-II	C ₁₈ -AR-II	C ₈ -MS	PE-MS	πNAP	PYE	NPE	PBB-R	ChoIester
硅胶	高纯度球形多孔硅胶								
平均粒径	5 μm								
平均孔径	约 120 Å								
比表面积	约 300 m ² /g								
固定相									
	十八烷基	十八烷基	辛烷基	苯乙基	萘基	芘基乙基	硝基苯乙基	五溴苯基	胆甾醇基
键合类型	单点键合	多点键合	单点键合	单点键合	单点键合	单点键合	单点键合	单点键合	单点键合
主要作用	疏水相互作用	疏水相互作用	疏水相互作用	疏水相互作用 π-π 相互作用	疏水相互作用 π-π 相互作用	疏水相互作用 π-π 相互作用 色散相互作用 形状选择	疏水相互作用 π-π 相互作用 偶极-偶极相互作用	疏水相互作用 色散相互作用	疏水相互作用 形状选择
封端处理	接近完美封端								
碳含量	约 16%	约 17%	约 10%	约 10%	约 11%	约 18%	约 9%	约 8%	约 20%

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

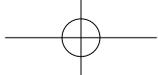
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

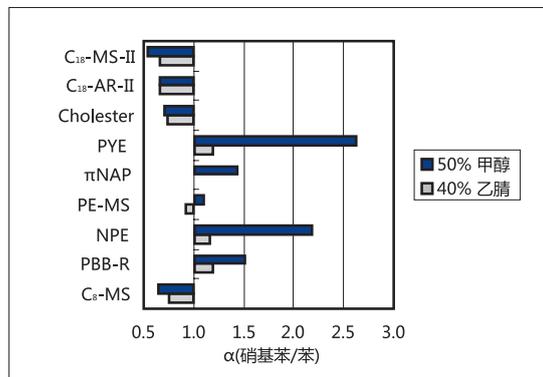
VII 化合物索引

1) 极性功能团的选择

选择性

通过对苯, 硝基苯 (含有硝基), 苯甲醚 (含有甲氧基) 三种化合物的分离效果来评价COSMOSIL色谱柱对极性官能团的选择性。下面四张色谱图分别是三种化合物在四种COSMOSIL色谱柱 (C₁₈-MS-II, PE-MS, πNAP 及PYE) 上分离的色谱图。三种化合物在C₁₈上洗脱顺序为硝基苯-苯甲醚-苯。在另外三种芳香柱 (PE-MS, πNAP 及PYE) 上的洗脱顺序正好相反。C₁₈柱依靠疏水相互作用分离样品, 而另外三种芳香柱依靠π-π相互作用分离化合物, 因此洗提顺序和C₁₈相反。

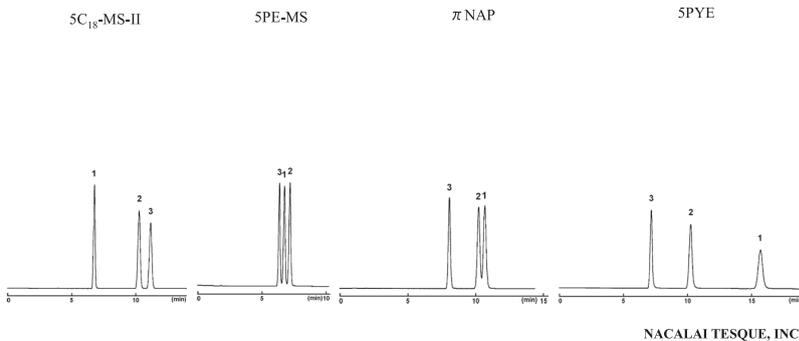
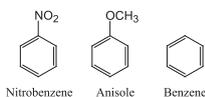
对于极性官能团的选择性对比的图表 如下所示。在九种COSMOSIL色谱柱中, PYE和NPE色谱柱对极性官能团有较强的选择性。在利用π-π相互作用分离的色谱中甲醇作为流动相比乙腈更有效。



极性功能团的选择

Column: 4.6mm I.D.-150mm
 Column size: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: Methanol / H₂O = 50/50
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Nitrobenzene (0.13 μg)
 2; Anisole (1.5 μg)
 3; Benzene (4.0 μg)



NACALAI TESQUE, INC

应用数据

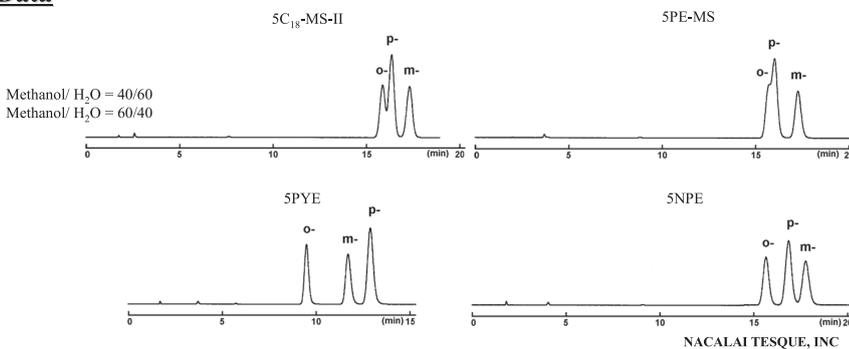
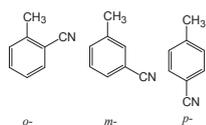
● 甲基苯腈异构体的分离

甲基苯腈有三个位置异构体, 而采用普通的C₁₈柱及π-π作用较弱的苯基柱很难将邻位和对位的异构体分离。而采用具有强π-π相互作用的PYE和NPE色谱柱可以将这三种异构体有效地分离。

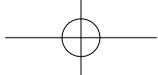
COSMOSIL Application Data

Column: 4.6mm I.D.-150mm
 Column size: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II, 5PE-MS, 5NPE
 5PYE
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: *o*-Tolunitrile (2.0 μg)
m-Tolunitrile (2.0 μg)
p-Tolunitrile (1.0 μg)



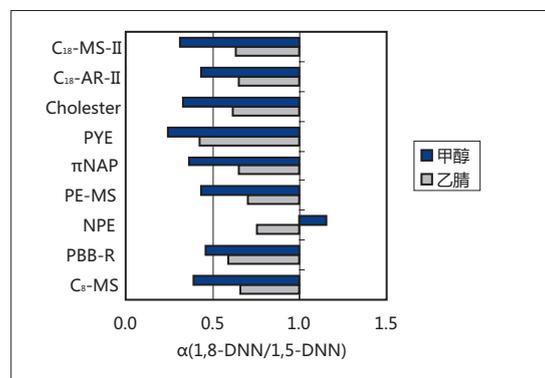
NACALAI TESQUE, INC



2) 对偶极的选择性

选择性

通过对1,5-二硝基萘和1,8-二硝基萘的分离效果来评价COSMOSIL色谱柱对偶极的选择性。由于二硝基萘相比于二甲基萘具有更强的 π - π 相互作用因此在PYE和NPE色谱柱上有很好的保留。然而，PYE和NPE色谱柱之间还有一些细微的差别。1,5-二硝基萘在PYE色谱柱上有较长的保留时间，而1,8-二硝基萘在NPE色谱柱上有较长的保留时间。这说明NPE色谱可能存在很强的偶极相互作用。与1,5-二硝基萘相比，1,8-二硝基萘上两个硝基与NPE色谱柱上键合的硝基苯基之间有更强的偶极相互作用。



对偶极的选择性

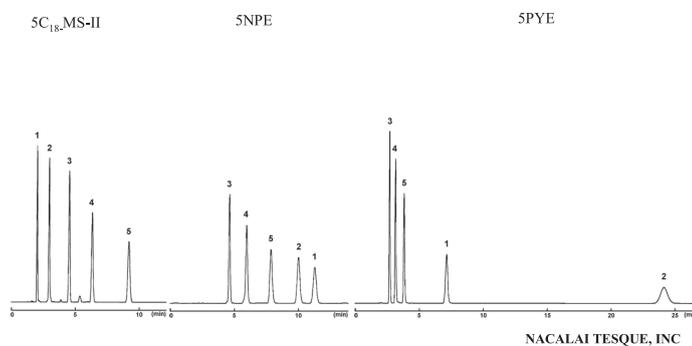
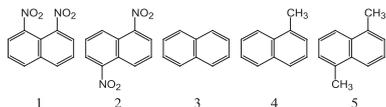
Column size: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: C₁₈-MS-II Methanol / H₂O = 80/20
 NPE Methanol / H₂O = 70/30
 PYE Methanol / H₂O = 90/10

Flow rate: 1.0 ml/min

Temperature: 30°C

Detection: UV254nm

Sample:
 1; 1,8-Dinitronaphthalene (1,8-DNN) (0.21 μ g)
 2; 1,5-Dinitronaphthalene (1,5-DNN) (0.11 μ g)
 3; Naphthalene (0.25 μ g)
 4; 1-Methylnaphthalene (0.35 μ g)
 5; 1,5-Dimethylnaphthalene (0.42 μ g)



应用数据

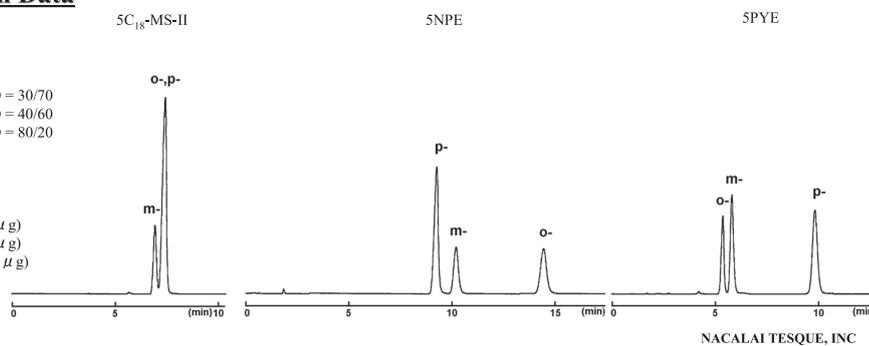
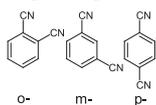
● 苯二甲腈异构体的分离

苯二甲腈位置异构体的分离。苯二甲腈有三种位置异构体。NPE和PYE色谱柱可通过 π - π 相互作用将这些化合物实现完全分离。此外，NPE色谱柱由于存在偶极相互作用可更好的保留邻苯二甲腈。

COSMOSIL Application Data

Column:
 Column size: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol / H₂O = 30/70
 5NPE Methanol / H₂O = 40/60
 5PYE Methanol / H₂O = 80/20
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample:
 o-; Phthalonitrile (0.3 μ g)
 m-; Isophthalonitrile (3.0 μ g)
 p-; Terephthalonitrile (0.15 μ g)



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

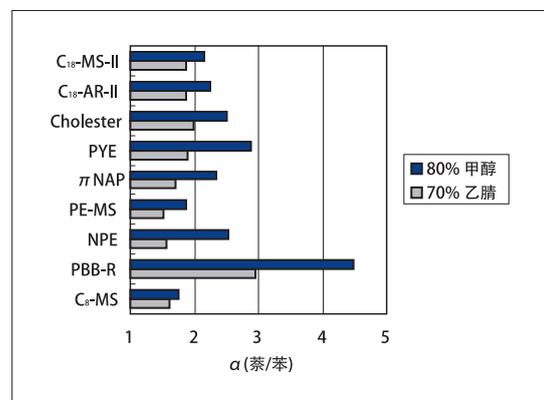
VII 化合物索引

技术信息

3) 对芳香族化合物的选择性

选择性

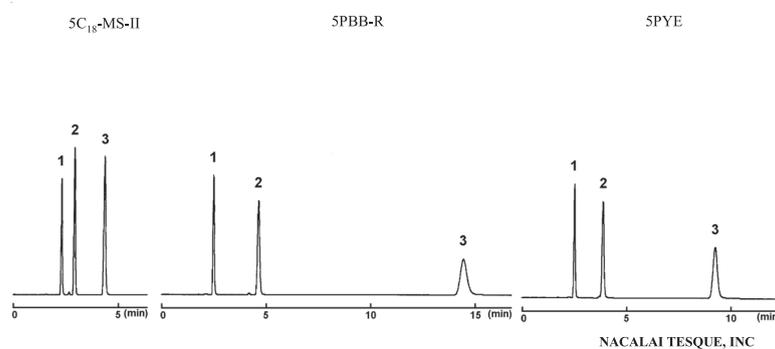
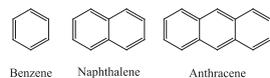
通过对苯萘蒽三种芳香族化合物的分离来评价色谱柱的性能。在所有色谱柱中的洗提顺序均为：苯-萘-蒽。保留时间随着芳香环数目的增多而延长。此外，PBB-R，PYE等高色散的填料对于芳香族化合物有更强的保留作用。



对芳香族化合物的选择性

Column: 4.6mm I.D. x 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol/H₂O = 90/10
 5PBB-R Methanol/H₂O = 90/10
 5PYE Methanol/H₂O = 80/20
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67 μg)
 2; Naphthalene (0.11 μg)
 3; Anthracene (0.0063 μg)



应用数据

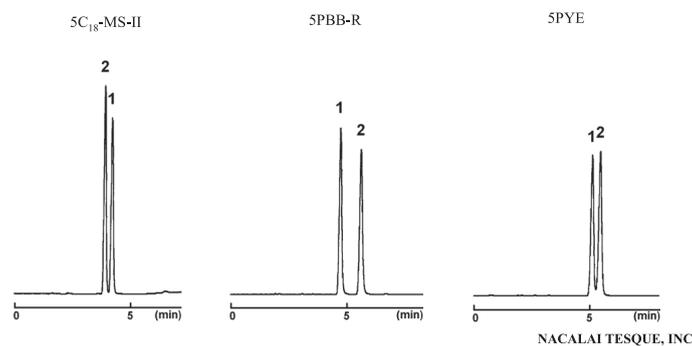
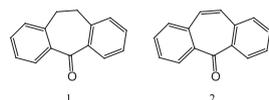
● 二苯并环庚酮与二苯并环庚烯酮的分离

在C₁₈柱的色谱图上，二苯并环庚酮（峰1）的保留时间比二苯并环庚烯酮（峰2）长。而PBB-R和PYE色谱柱的色谱图上，由于这两种色谱柱的固定相与二苯并环庚烯酮之间存在π电子共轭效应，因此二苯并环庚烯酮的保留时间比二苯并环庚酮上。

COSMOSIL Application Data

Column: 4.6mm I.D. x 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol/H₂O = 80/20
 5PBB-R Methanol
 5PYE Methanol/H₂O = 90/10
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Dibenzosuberone (0.1 μg)
 2; Dibenzosuberone (0.025 μg)

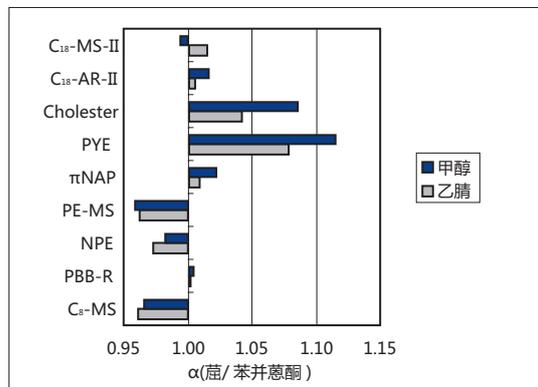




4) 分子形状的选择性

选择性

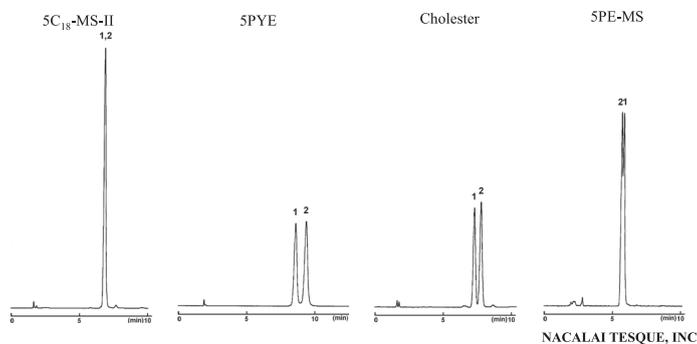
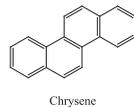
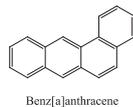
通过对屈和苯(α)并三苯分离效果来对评价色谱柱对分子形状的识别。屈和苯(α)并三苯是一组聚芳香族化合物的异构体,它们均含有四个苯环,由于其疏水性及芳香性很相似,因此很难将其分离。然而,由于PYE和胆固醇基色谱柱具有识别分子形状的功能,因此能将屈和苯(α)并三苯很好的分离。



分子形状的选择性

Column: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II, 5PYE Methanol / H₂O = 90/10
 Cholester Methanol
 5PE-MS Methanol / H₂O = 80/20
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Tetraphene [Benz[a]anthracene] (0.04 μg)
 2; Chrysene (0.04 μg)



NACALAI TESQUE, INC

应用数据

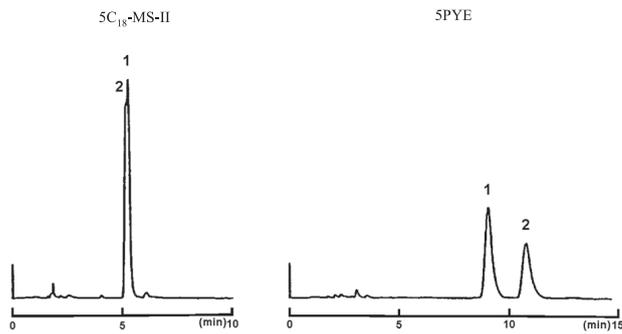
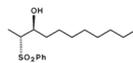
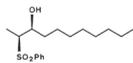
● 非对映异构体的分离 (苏式及赤式)

C₁₈不能分离苏式及赤式的非对映异构体,而PYE色谱柱对于赤式异构体的保留时间比苏式异构体长,可很好的将其分离。

COSMOSIL Application Data

Column: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: Methanol / H₂O = 80/20
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Threo form
 2; Erythro form



NACALAI TESQUE, INC

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

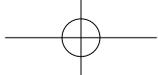
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

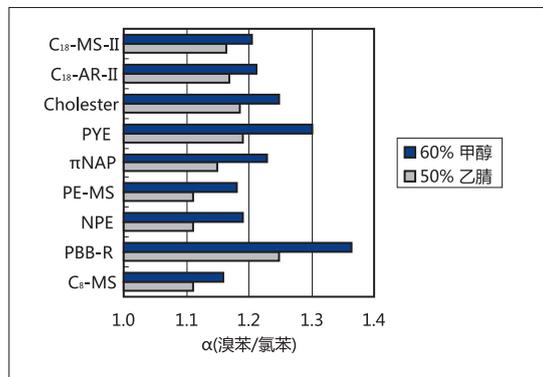
VI 技术信息

VII 化合物索引

5) 对于卤化物的选择性

选择性

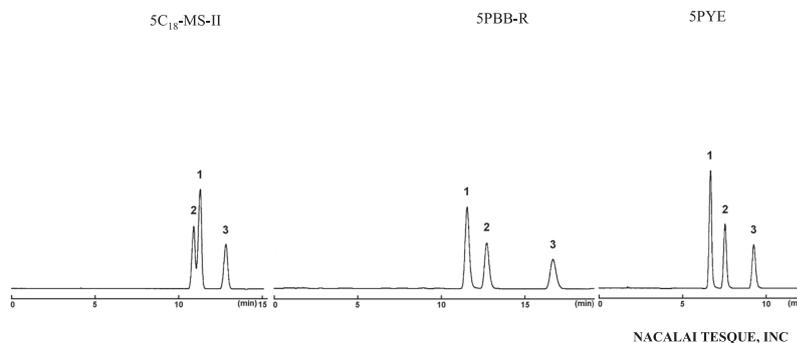
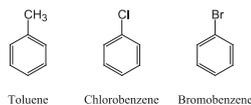
通过对氯苯和溴苯的分离效果来评价色谱柱对于卤素的选择性。由于PBB-R结构中五个溴原子强烈的色散作用对于卤化物有极高的选择性。



对于卤化物的选择性

Column: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: Methanol/ H₂O = 60/40
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Toluene (3.3 μg)
 2; Chlorobenzene (3.3 μg)
 3; Bromobenzene (3.3 μg)



NACALAI TESQUE, INC

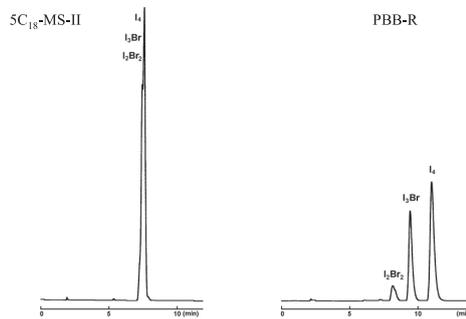
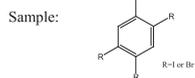
应用数据

● 对卤代交换反应产品的分离

相对于溴原子, PYE和PBB-R色谱柱对碘原子有更强的保留作用。因此, PYE和PBB-R色谱柱可以分离复杂的含有溴和碘化合物的混合物。

COSMOSIL Application Data

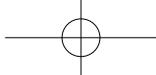
Column: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol/ H₂O = 90/10
 PBB-R Methanol
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm



NACALAI TESQUE, INC

Sample courtesy of Dr.H.Yamamoto,RIKEN

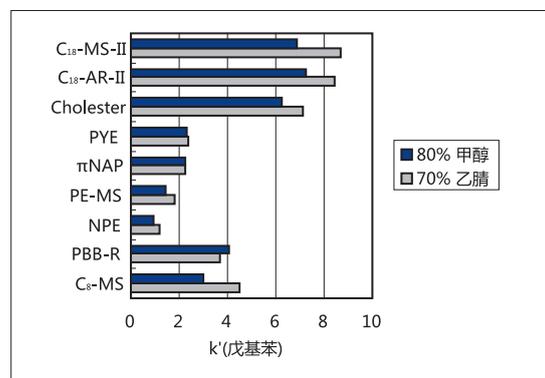
AP-1029



6) 疏水作用的选择性

选择性

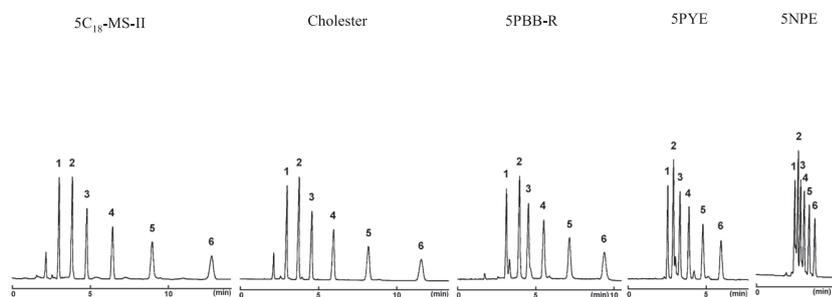
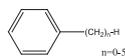
通过分离不同的烷基苯来评价色谱柱对于疏水作用的选择性。
C₁₈柱和胆固醇基色谱柱对于疏水作用有相似的选择性。其他色谱柱的疏水作用选择性均较C₁₈差。



疏水作用的选择性

Column: 4.6mm I.D. x 150mm
Mobile phase: Methanol/H₂O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67 μg)
2; Toluene (1.67 μg)
3; Ethylbenzene (1.67 μg)
4; Propylbenzene (1.67 μg)
5; Butylbenzene (1.67 μg)
6; Amylbenzene (1.67 μg)



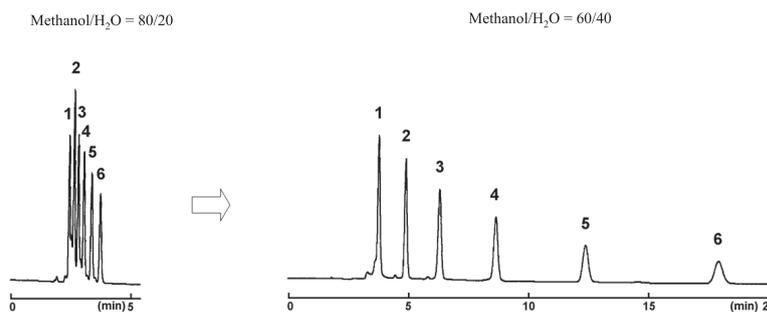
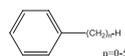
NACALAI TESQUE, INC

在反相色谱中，降低流动相中有机溶剂的浓度会大大增加保留时间。在NPE色谱中当甲醇浓度降到60%，其保留时间会增加到与C₁₈柱采用80%甲醇流动相的保留时间接近。

调整保留时间

Column: 5NPE
Column size: 4.6mm I.D. x 150mm
Mobile phase: Methanol/H₂O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67 μg)
2; Toluene (1.67 μg)
3; Ethylbenzene (1.67 μg)
4; Propylbenzene (1.67 μg)
5; Butylbenzene (1.67 μg)
6; Amylbenzene (1.67 μg)



NACALAI TESQUE, INC

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

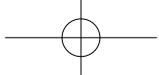
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

8. C₁₈色谱柱流动相的开发方法

介绍

反相高效液相色谱法，十八烷基键合硅胶柱（C₁₈，ODS）是应用最广泛的。可以通过出版物，从制造商的应用手册和自己的经验为C₁₈柱去摸索一个适当的流动相条件。本节介绍了传统方法的流动相条件。以下面的常用色谱柱做例子。

填料: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, COSMOSIL 5C₁₈-AR-II
色谱柱规格:(内径 x 长度(mm)) : 4.6 mm I.D x 150 mm

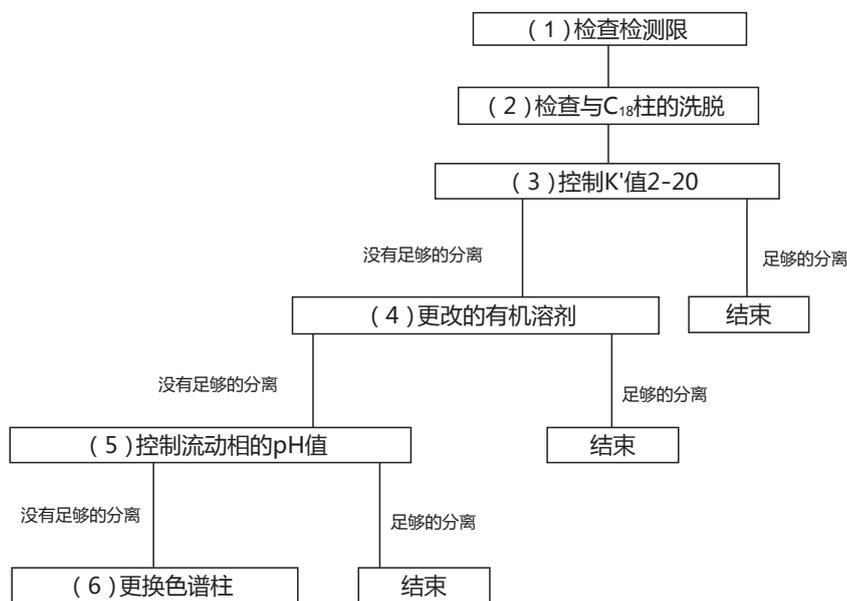
开发流动相条件的方法

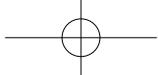
等度洗脱的方法中，在整个运行过程中流动相组成保持不变。梯度法中，流动相组成会发生变化。每一种方法需要严格的制备流动相和控制色谱柱的温度，以实现良好的分离。

● 等度方法

流动相条件的一般方法步骤如下。首先，具有较强的溶剂洗脱的样品，要检查是否可以被检测。然后，改变流动相条件下的保留时间分离样品。增加洗脱效率的溶剂浓度，能有较短的保留时间，反之降低它们的浓度，则导致保留时间较长。如果您的样品是离子化的，如酸和胺组，通过缓冲液调整pH值是非常好的办法。离子化控制方法或离子对色谱法被用来增加离子化样品保留时间，该方法在流动相中使用离子对试剂（例如，烷基苯磺酸盐为碱性化合物，酸性化合物季铵盐）与样品以形成离子对。

例如) 基本条件设定的程序





1. 用较强的洗脱溶剂检查样本。在此步骤中，检测通过连接进样器连接检测器，但不接色谱柱。
2. 查阅相关含碳量和C₁₈色谱柱，以甲醇水溶液做流动相洗脱。
3. 通过在流动相中的甲醇的量改变来控制的k' 的值至2-20。
4. 如果分离不够，改变甲醇或乙腈添加四氢呋喃改变流动相的选择性。
5. 如果发生拖尾峰为碱性化合物，通过加入缓冲液到流动相来控制PH值。
6. 如果在步骤5之后的分离不令人满意，更改为其他C₁₈柱或其他键合相色谱柱如烷基类，芳族系及其他。

● 梯度法

梯度法连续改变流动相中有机溶剂的比例。方法主要用于缩短样品分离时间，而这些样品通常都具有较宽疏水性和分子量，洗脱时间较长，有机试剂的组分微小调整就能有很大保留时间变化的特点。它也是用于大分子的化合物（例如，肽）。梯度法不能和RI检测器兼容，梯度法的发展就不在这里过多叙述了。

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

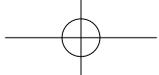
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

反相条件下方法学设定

反相色谱法是没有一种简单的方法来设定的流动相。正相色谱流动相条件下，可以简单地用薄层色谱法确定。因此，反相色谱流动相组分（有机溶剂的浓度）通常是通过反复试验和错误来确定出来的。如果得知分析物的结构话，此处是通用方法来配置一个合适有机溶剂浓度的流动相。

针对基本化学构架的有机溶剂浓度 + 取代基的影响 = 最好的有机溶剂的浓度

● 条件设定

选择条件的基础上保留时间为图1在所示的基本化学构架，然后调整为杂原子和取代基的影响。

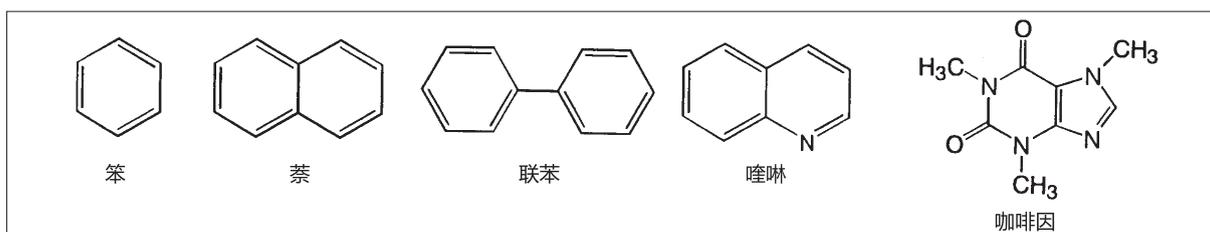
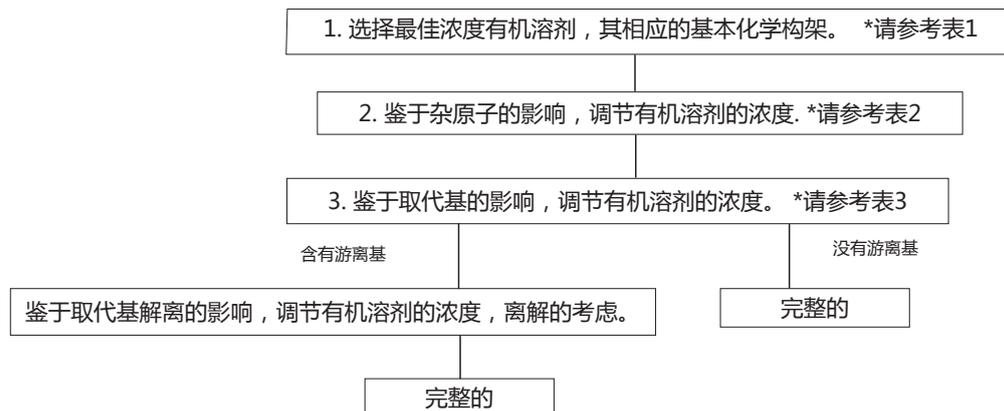


图1 基本化学的结构

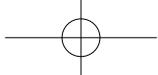


1. 选择在图1中类似的基本化学结构的化合物，作为目标样品。选择最好的有机溶剂浓度。

表1 基本的化学结构的保留时间

基本骨架	色谱柱种类	在不同的甲醇浓度的保留时间（分）						
		80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%
苯	5C ₁₈ -MS-II	-	4	7	11	20	-	-
	5C ₁₈ -AR-II	-	4	7	13	23	-	-
萘	5C ₁₈ -MS-II	5	8	18	-	-	-	-
	5C ₁₈ -AR-II	5	10	22	-	-	-	-
联苯	5C ₁₈ -MS-II	8	13	-	-	-	-	-
	5C ₁₈ -AR-II	7	15	-	-	-	-	-
喹啉	5C ₁₈ -MS-II	-	-	-	-	6	11	-
	5C ₁₈ -AR-II	-	-	-	-	8	17	-
咖啡因	5C ₁₈ -MS-II	-	-	-	-	-	4	9
	5C ₁₈ -AR-II	-	-	-	-	-	4	9

色谱柱: COSMOSIL 4.6 mm I.D. × 150 mm 流速: 1.0 ml/min 检测器: UV 254 nm



2. 如表2中所示的杂原子，影响调节有机溶剂的浓度。

表2 杂环或多环芳族化合物的有机溶剂的浓度调整

杂环， 多环芳香烃		样品	5C ₁₈ -MS-II	5C ₁₈ -AR-II
共轭环1		苯	+10%	+10%
环己烷 杂环	S1	噻吩	±0%	±0%
	O1	咪喃	-5%	-5%
	N1	吡啶	-20%	-10%
羧基		苯醌	-5%	-5%
双键		-	-5%	-5%

3. 从表格3中寻找合适的替代试剂调整有机相浓度。

表3中 通过取代基的进行有机溶剂的浓度的调整

替换	甲醇浓度		替换	甲醇浓度
	5C ₁₈ -MS-II	5C ₁₈ -AR-II		
-F	0	0	-CH ₂ - (烷基链) 甲醇浓度 基本构架	100-90% +10% (4 of -CH ₂ -) 90-80% +10% (3 of -CH ₂ -) 80-60% +10% (2 of -CH ₂ -) < 60% +10% (1 of -CH ₂ -)
-Cl	+10%	+10%		
-Br	+10%	+10%		
-I	+20%	+15%		
-CONH ₂	-40%	-40%	- 苯基 甲醇浓度 基本构架	100-90% +5% (1 of - Phenyl) 90-60% +10% (1 of - Phenyl) < 60% +20% (1 of - Phenyl)
-COCH ₃	-10%	-10%		
-COOCH ₃	0	0		
-OCH ₃	0	0		
-CHCH ₂ O	-10%	-10%		
-CH ₂ OH	-30%	-30%		
-OH	-30%	-30%		
-NO ₂	-10%	-5%		
-CN	-20%	-15%		
-NH ₂	-40%	-30%		
-SCH ₃	+10%	+10%		

色谱柱: COSMOSIL 4.6 mm I.D. × 150 mm

流速: 1.0 ml / min 检测器: UV 254 nm

* 效果可能由该取代基的位置而发生转变。

4. 解离取代基的化合物对轻微的PH值变化都会非常敏感。流动相pH值保持一致，以获得可重复的数据。表4示出的酸性(pH为2)和中性(pH值为7)的取代基的影响。

表4中 电解的取代基对于有机溶剂的影响

取代基电解	甲醇浓度的变化 (pH值2)	甲醇浓度的变化 (pH值为7)
-COOH	-10~-20%	-30~-40%
-SO ₃ H	-20~-40%	-30~-40%
-PO ₄ H ₂	-20%	-50%
-BO ₂ H ₂	-20%	-20%
-NH ₂ (分子类型)	-60%	-10%
-NH ₂ (环胺)	-50~-60%	-10~-20%
-NH ₂ (离子型)	-	-40~-50%

色谱柱 :COSMOSIL 5C₁₈-MS-II , 4.6 mm I.D. x 150 mm
缓冲液 pH2 :20 mmol/l H₃PO₄
pH7 :20 mmol/l H₃PO₄/Na₂HPO₄=2/3
流速 :1.0 ml/min
检测器 :UV 254 nm

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

技术信息

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

● 条件设置的示例

色谱柱 : COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm

(1) 苯氧基吲哚

<计算方法> 基本构架 类似萘基 + (异环N)
=70%+(-20%)
=50%

更换 (苯基) + (-OCH₂- 等于 -OCH₃)
=(+10%) + (+0%)

基本构架 + 替换 = 50% + (+10%) = 60%

<结果> 60%甲醇(甲醇:水=60:40)
保留时间=13.7分

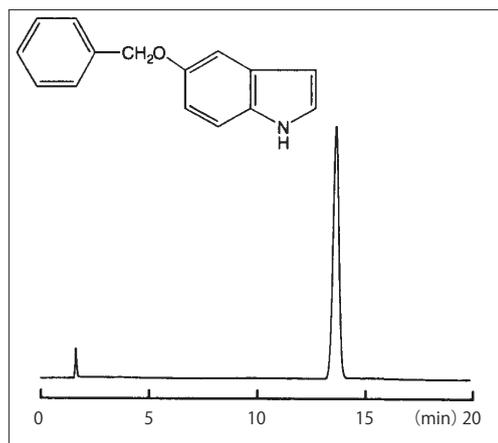


图2 5-苯氧基分析

(2) 香草酸

<计算方法> 基本构架 苯=60%

不可解离 (-OH) + (-OCH₃) + (-CH₂)
=(-30%) + (0%) + (+10%)
= -20%

可解离 -COOH = -10~-20% (pH 2)
-30~-40% (pH 7)

基本构架 + 替换 = 甲醇浓度是
酸性范围 (pH 2) 30-20%
中性范围 (pH 7) 10-0%

<结果> (pH2) 30%甲醇 : 保留时间=5.7分
20%甲醇 : 保留时间=11.7分
(pH7) 10%甲醇 : 保留时间=4.0分
0% 甲醇 : 保留时间=12.1分

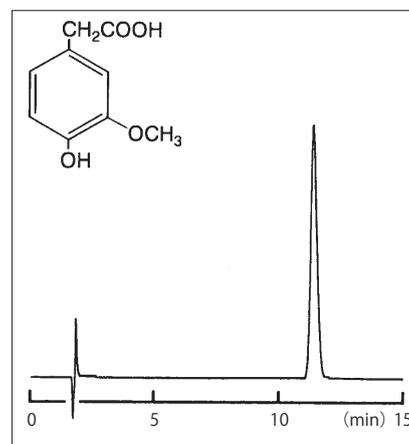
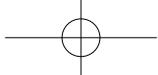


图3 20%甲醇 (pH为2) 的分析

试剂保留的预测结果与有机溶剂浓度计算结果可能有±10%的误差。

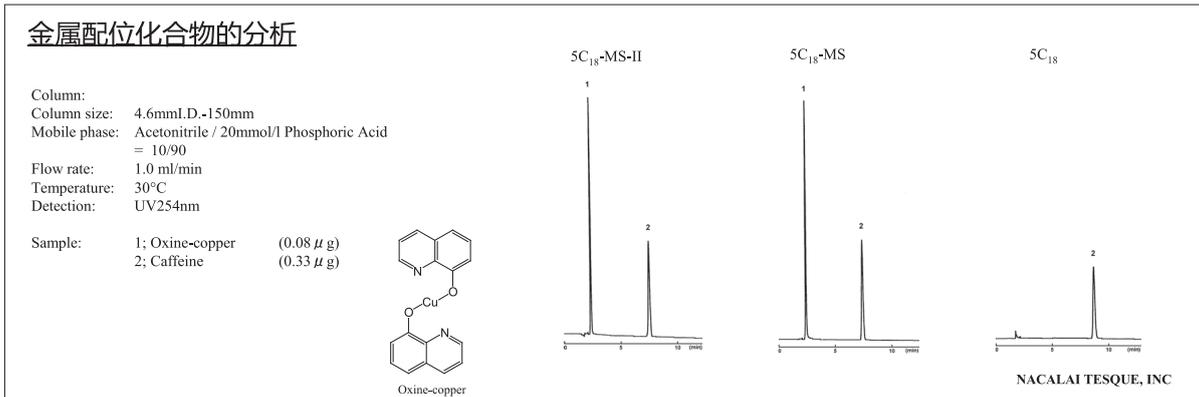


9. 与旧型号COSMOSIL比较

1) 新款 COSMOSIL (5C₁₈-MS-II) vs. 旧款COSMOSIL (5C₁₈ and 5C₁₈-MS)

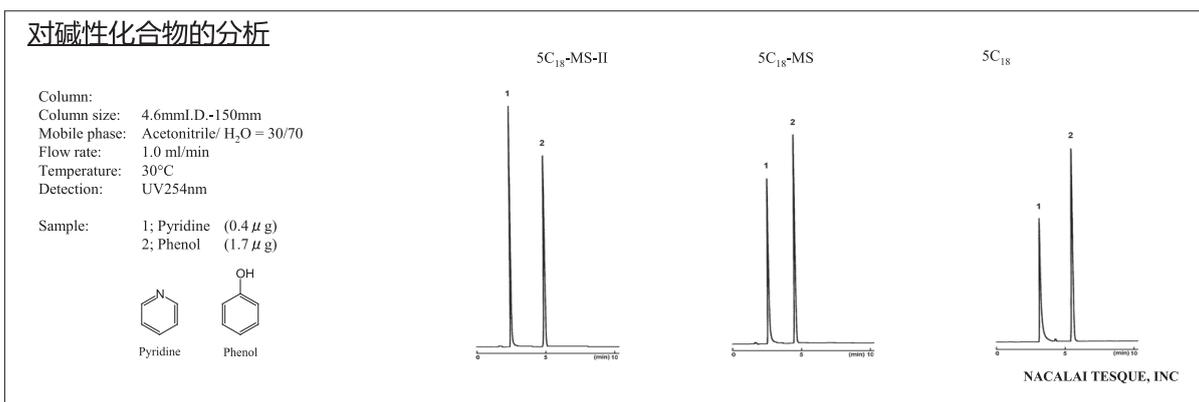
金属配位化合物的分析

金属配位化合物，例如，羟基喹啉-铜，在COSMOSIL 5C₁₈不会被洗脱，因为它的硅胶含有高浓度的金属杂质。COSMOSIL 5C₁₈-MS或5C₁₈-MS-II可以分离的相同的金属配位化合物，因为它们是具有高纯度（99.99%）的硅胶填料。



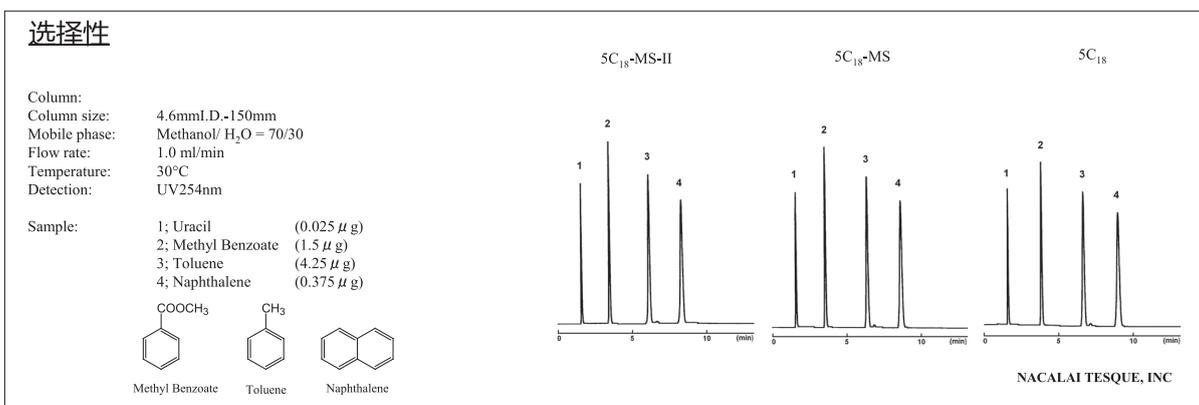
对碱性化合物的分析

COSMOSIL 5C₁₈-MSII比COSMOSIL 5C₁₈-MS有更好的分离，因为COSMOSIL5C₁₈-MS-II改进了封端处理的方法。



选择性

COSMOSIL 5C₁₈, 5C₁₈-MS和5C₁₈-MS-II之间的选择性存在的差别不大。相同的分析条件下，旧型号的色谱条件可以直接在新的型号上使用。



I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

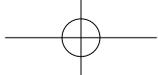
III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引



技术信息

2) 新款 COSMOSIL (5C18-AR-II) vs. 旧款COSMOSIL (5C18-AR)

I 高效液相色谱柱

II 超高速液相色谱柱

III 开放柱色谱填料

IV 相关产品

V 分析数据集

VI 技术信息

VII 化合物索引

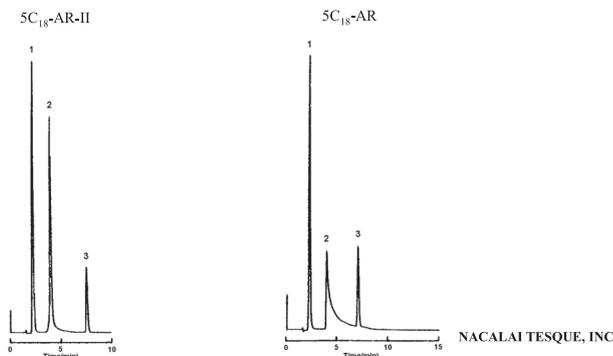
金属配位化合物的分析

COSMOSIL5C18 AR-II的金属配位化合物的分离表现出更好的效果例如，8-羟基喹啉比COSMOSIL 5C18-AR，皆因为高纯度硅胶。

金属配位化合物的分析

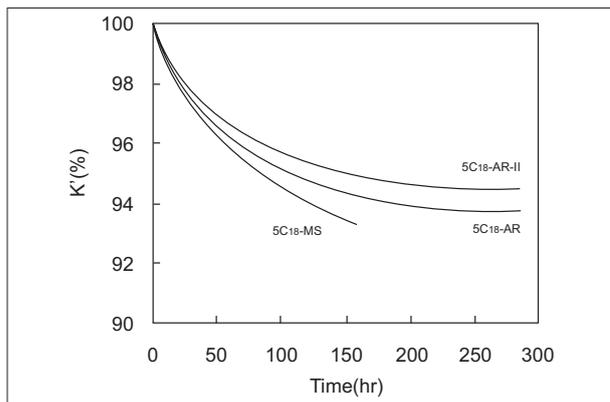
Column: 4.6mmI.D.-150mm
 Mobile phase: Methanol/ 20mmol/l Phosphate buffer(pH7) = 60/40
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Acetylacetone
 2; 8-Hydroxyquinoline [8-Quinolinol]
 3; Benzene



耐酸性

COSMOSIL 5C18-AR-II相对于 5C18-AR显示更优异的耐酸性。



用0.1%三氟乙酸在60°C的降解试验

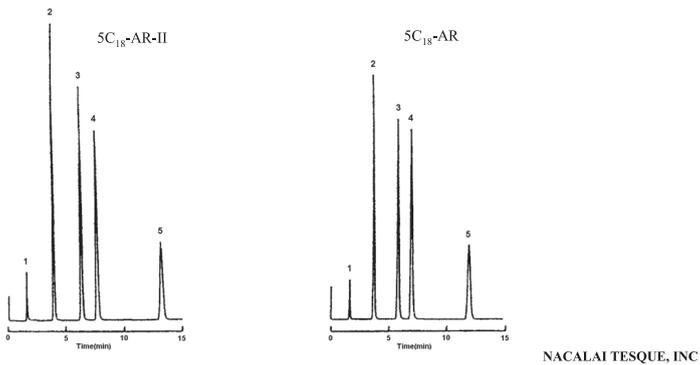
选择性

COSMOSIL 5C18 AR-II和COSMOSIL 5C18 AR对于非解离的有机化合物的选择性是相同的，因为两者中的碳含量是相同的。

选择性

Column: 4.6mmI.D.-150mm
 Mobile phase: Methanol/ H₂O = 60/40
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Uracil
 2; Acetophenone
 3; Methyl Benzoate
 4; Benzene
 5; Toluene



COSMOSIL 5C18-MS-II和COSMOSIL 5C18-AR-II支持验证。

我们建议使用新的COSMOSIL色谱柱来用于您新的色谱应用上。