

HPLC色谱分析中常见问题 与解决方法

姚彤炜 主讲

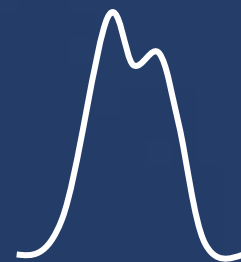
色谱柱失效症状

- 色谱柱压增高
- 峰变宽，拖尾，裂峰
- 塔板数下降，选择性下降，分离度降低
- 保留值减小或增大

色谱柱失效的原因

- 进口滤片堵塞
- 吸附了样品杂质
- 柱填充不良，使用久，
- 机械及热冲击造成空洞
- 固定相遭化学侵蚀

■**柱凹陷**——出现裂峰现象，填料与色谱柱顶端不齐平，可用相同填料填平凹陷处。



■**压力影响**——应避免突然的压力波动与任何的机械与热力冲击，如：

- 色谱柱掉在实验台上

- 骤然改变柱温

- 进样过程中转动进样阀太慢引起压力波动，使色谱峰产生裂隙

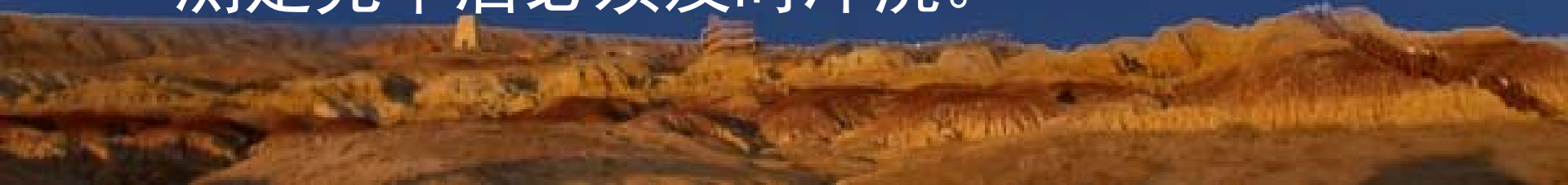
■ 柱压升高原因

- **强保留样品组分**——强吸附组分易聚集在柱进口填料上，严重缩短色谱柱寿命。尤其是生物样品提取物、含油成分、缓控释制剂中的高分子辅料等。当严重拖尾峰出现时往往是强保留污染物在柱口处聚集的信号。

■ 解决办法

- 使用**保护柱**可延长分析柱寿命
- 每天实验后应用强溶剂（例甲醇-水等，至少20-30倍柱体积的量）**冲洗色谱柱**
- **并定期进行保养**，以低流速的强溶剂较长时间冲洗色谱柱

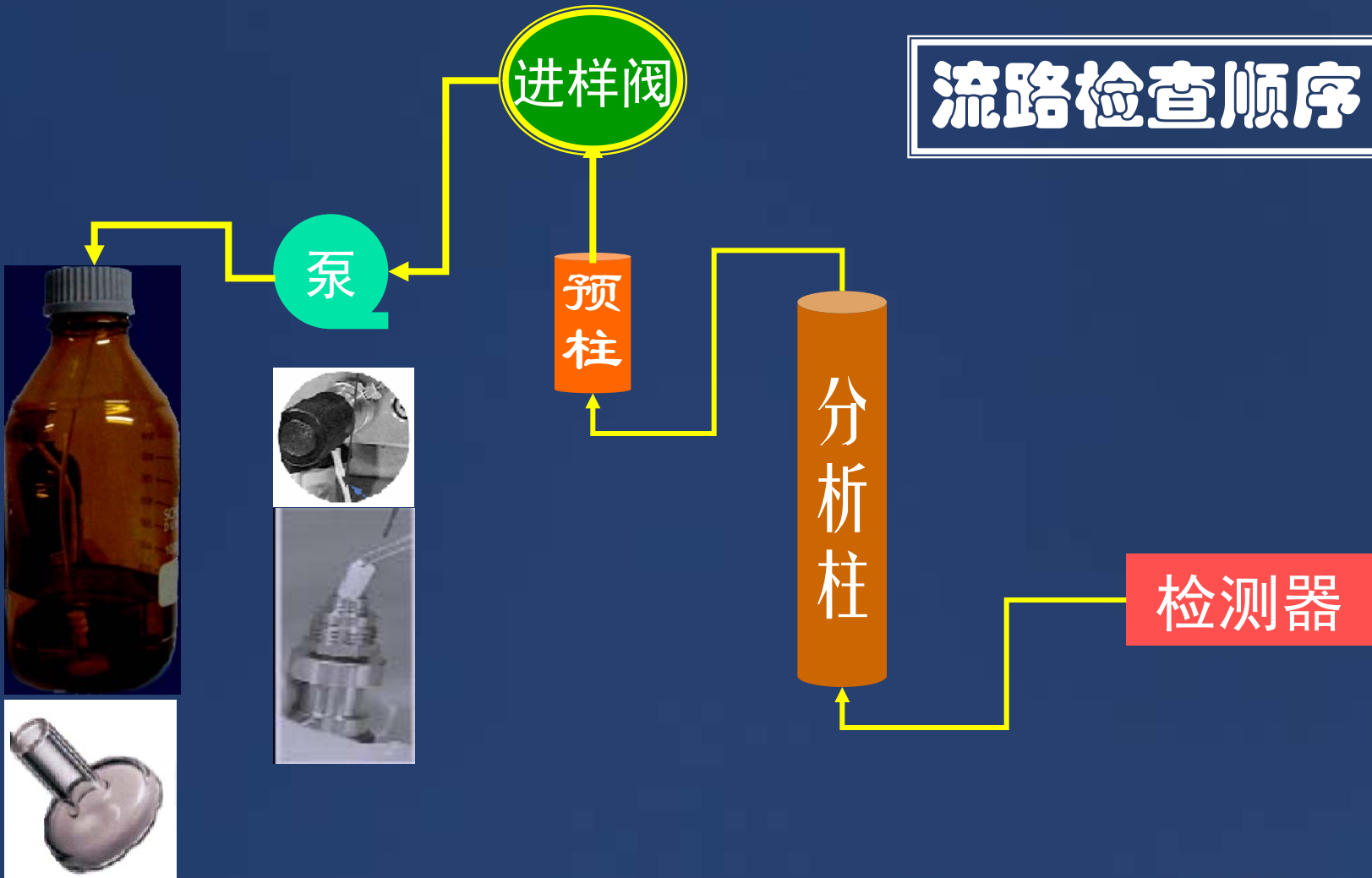
- **样品纯度差**——有微小的颗粒堵塞管路。
 - 可用滤膜过滤样品后再进样。
- **样品浓度高**——连续进样，造成过载。
 - 如果样品吸收度不是太低，使样品浓度在0.5mg/ml以下较适宜。
- **流动相中缓冲液浓度过高，有机相比例大**——在色谱过程中堵塞管路，析出的盐结晶还磨损泵、进样阀密封圈造成漏液。
 - 缓冲液浓度一般控制在20mmol以下较适宜，测定完毕后必须及时冲洗。



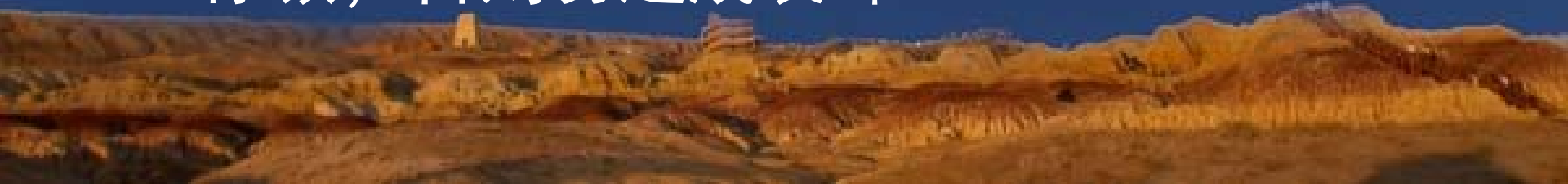
注意！

一旦柱压升高，应停止测定，用水冲洗数小时或更长时间，待压力下降后再测定，如果不清楚堵在哪一段，则应逐级检查，换泵头上滤芯，保护柱等。

流路检查顺序

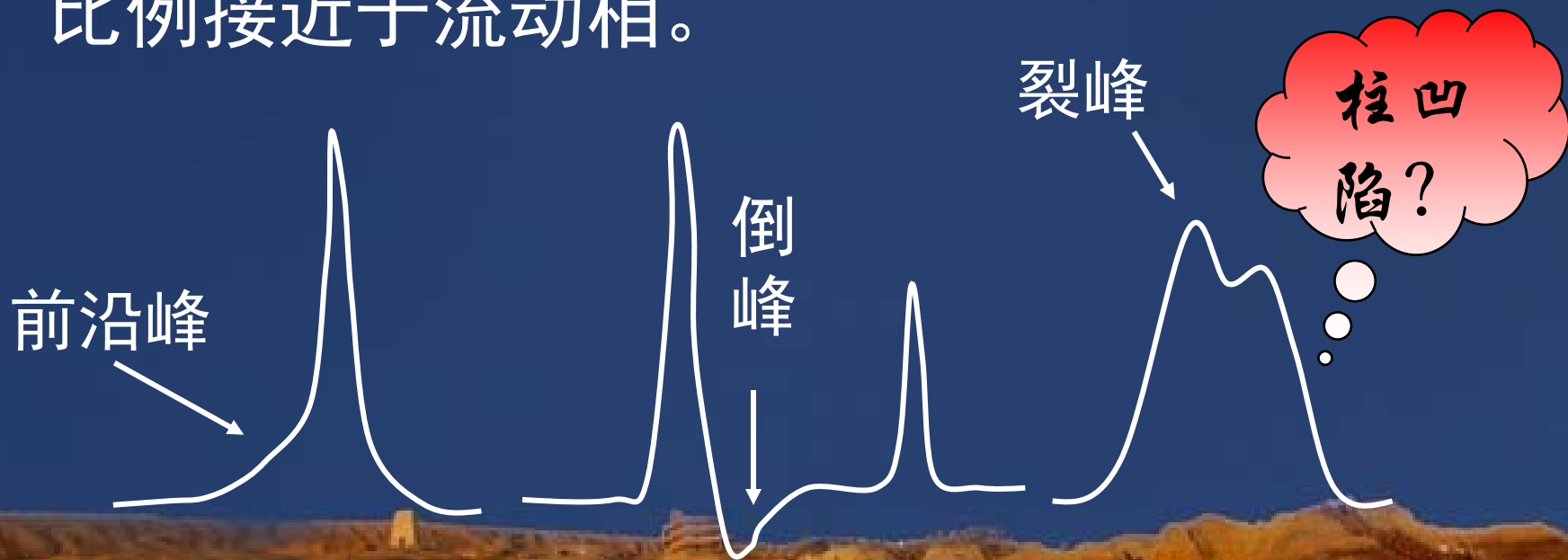


- 柱效低的原因
- 频繁更换流动相组成——加速柱效降低。
 - 最好一根色谱柱使用的流动相成分和pH值相近，如始终在酸性条件下或碱性条件下工作。
- 色谱柱的选择不合适或使用时间久
 - 更换色谱柱（厂家，型号）
- 进样操作不当
 - 转动进样阀时应一次转到位，不能过慢或停顿，否则易造成裂峰。



■ 样品溶剂与流动相成分不匹配

- 样品溶剂与流动相成分不匹配，造成前沿峰，倒峰或裂峰。如样品用纯甲醇作溶剂，而流动相中甲醇比例很低，这样易出现前沿峰，改变样品溶剂成分或比例，使醇-水比例接近于流动相。



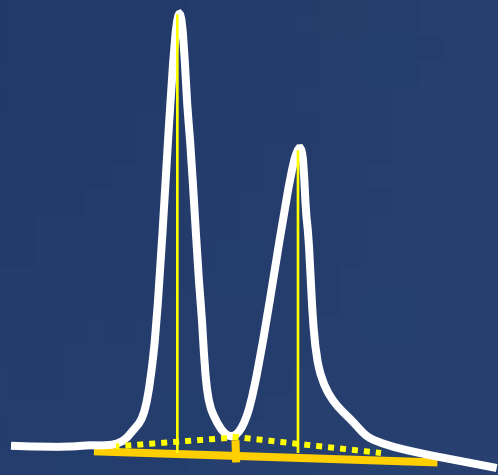
■ 结果不能重现

表现为同一样品溶液连续进样所得峰面积相差大，引起这种情况时，可从以下几方面来查找原因：

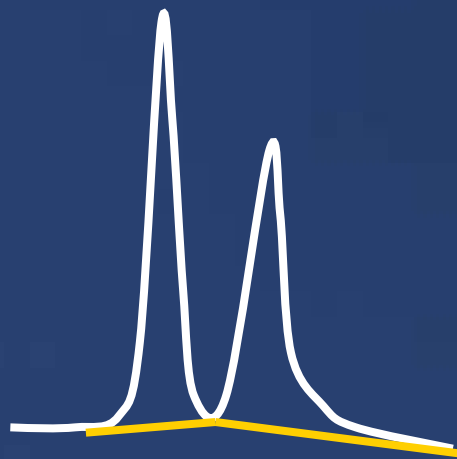
- **泵、进样阀、管路漏液**：造成峰面积变化
- **仪器未达平衡**：稳定时间不够
- **进样量太少**：注射体积刚够定量圈体积
- **检测器灵敏度改变**：如果同一样品两次进样峰面积相差10倍或更大倍数，则最可能的原因是检测器的灵敏度被无意中改变，软件的灵敏度改变不会影响峰面积的积分数值。



- 色谱软件积分方式是否一致——尤其是对于色谱峰较复杂的，积分时基线稍有变化将造成峰面积大的变化，如果两峰不是基线分离，则峰切割方式对峰面积有很大影响，有时候采用峰高较峰面积误差小。



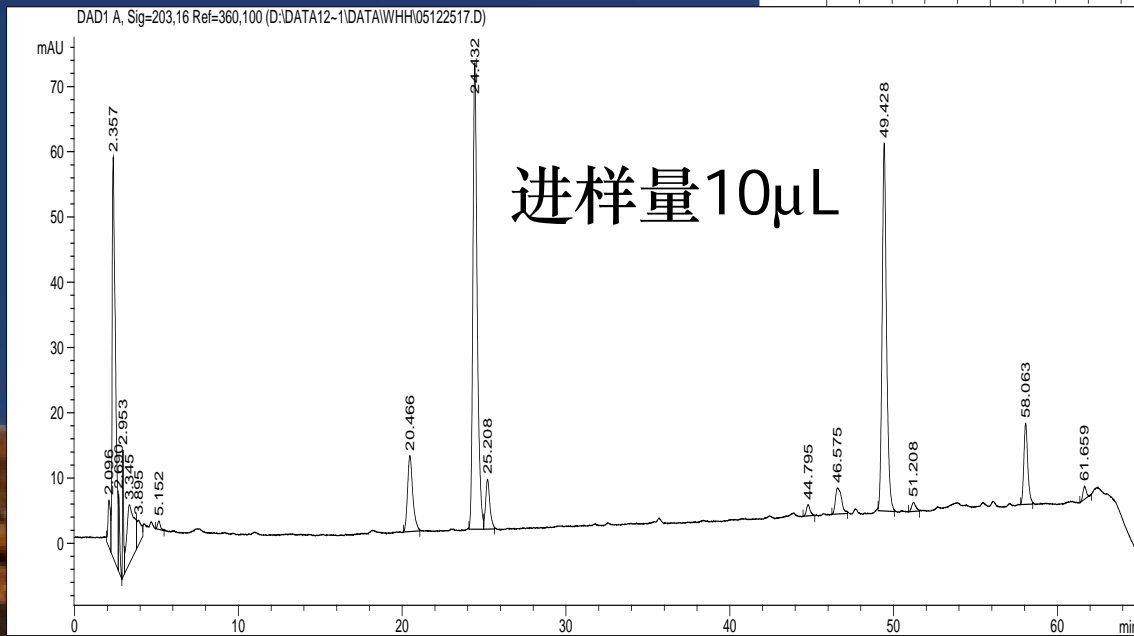
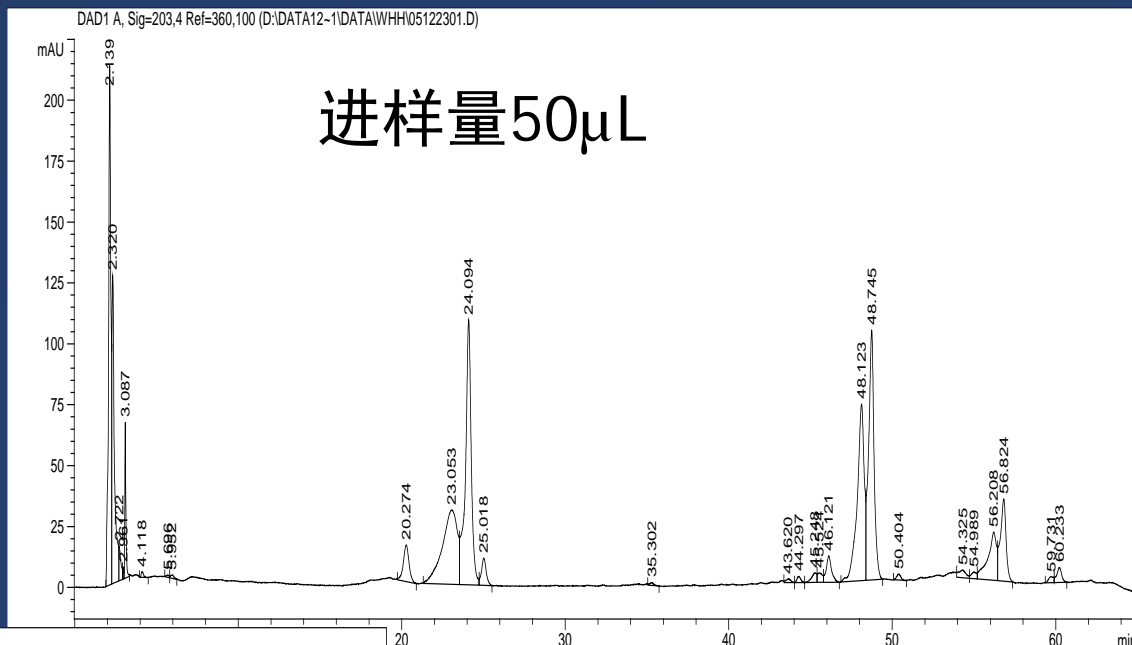
垂直切割



基线切割

• 进样量对色谱峰分离影响

例：三七提取物
以甲醇为溶剂，
流动相：
乙腈-水，梯度洗脱，
乙腈初始浓度20%



• 主动阀故障对色谱分离影响

- 主动阀阀芯出问题时，压力线会有不正常的压力降，或者是压力线波动很大，超过正负2-3个bar
- 导致进样后，各组分出峰忽而正常，忽而异常，且峰位置发生明显变化
- 更换主动阀阀芯，可消除上述症状



主动阀故障对色谱分离影响

