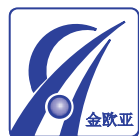


Waters 600

液相色谱学习



北京金欧亚科技发展有限公司
THE GREAT EUR-ASIA SCI & TECH DEVELOPMENT CO., LTD

北京崇文区左安门内大街8号伟图大厦301室

PC: 100061

Tel : 010-67136152/67100708

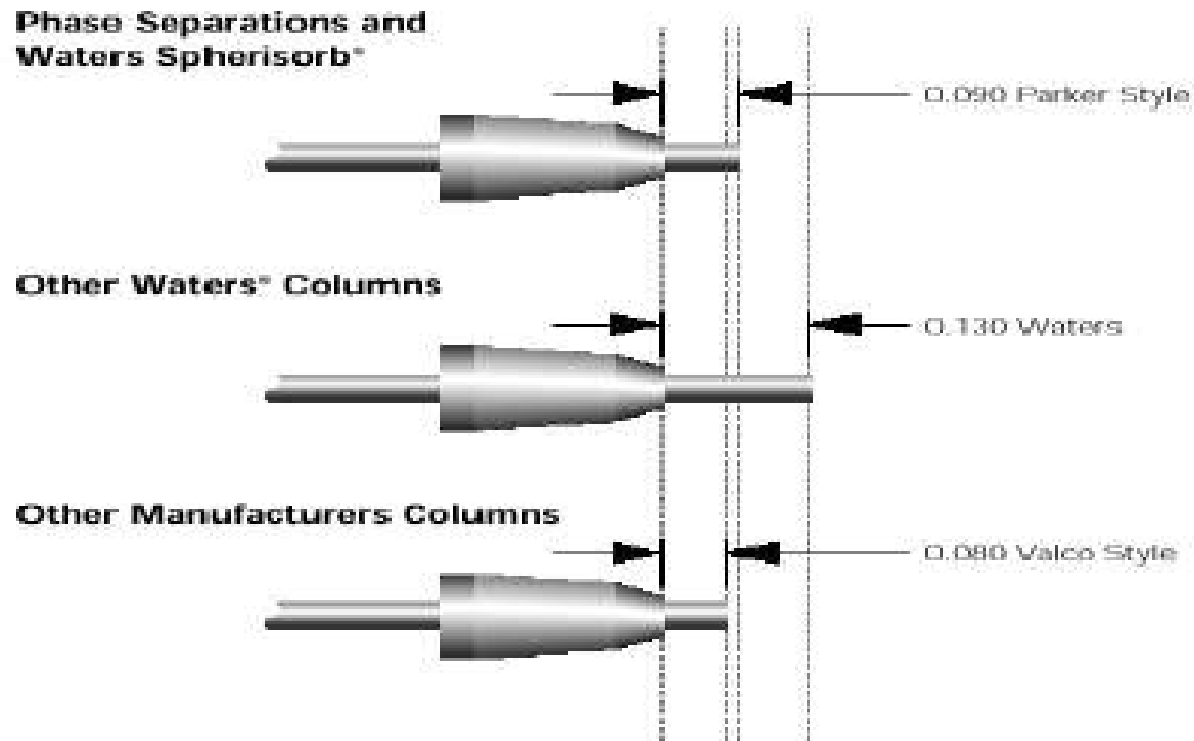
Fax : 010-67114016/67113925

[http: //www. jinouya. cn](http://www.jinouya.cn)

E-mail: china.hplc@163.com

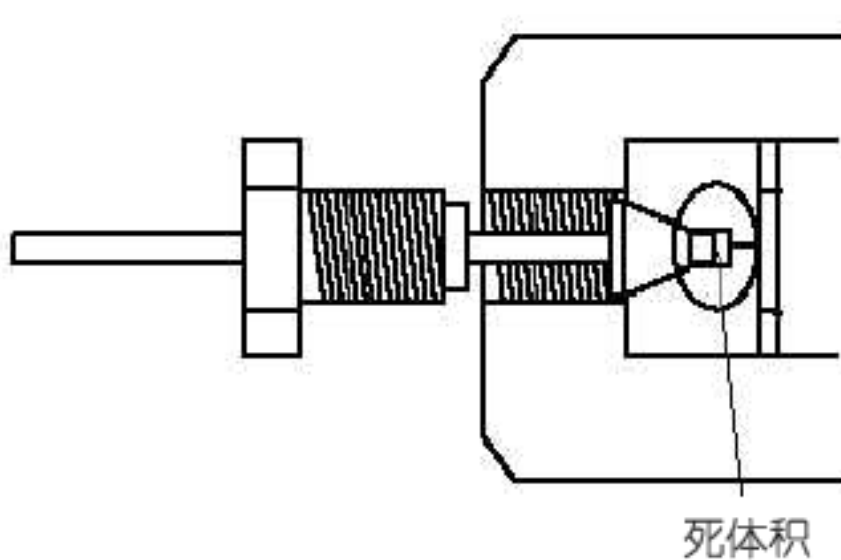
色谱柱的连接

各种锥箍和管路接头长度示意图：

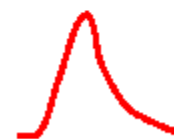


色谱柱的连接

Stop_depth长度不合适造成柱前死体积



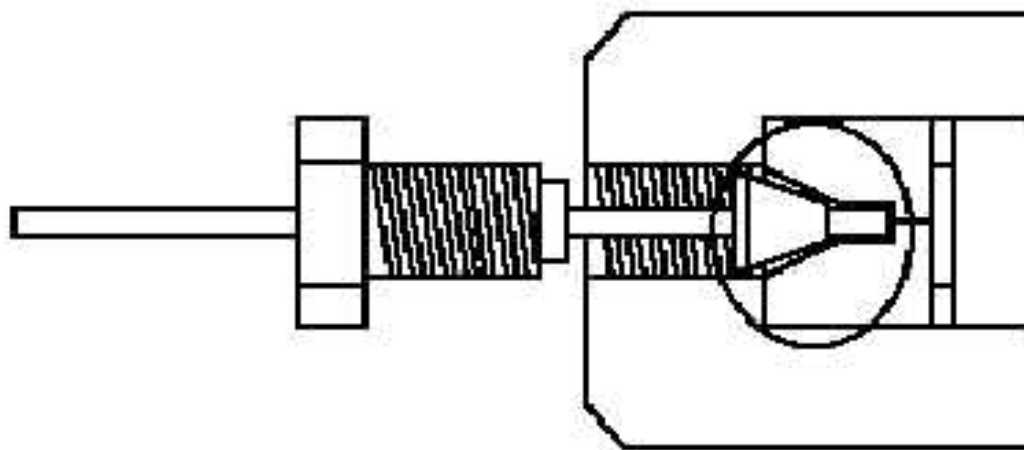
正常



峰扩散

色谱柱的连接

锥箍锥度不合适造成渗漏



Waters 色谱柱的连接

- **Waters**除**Spherisorb**以外的各种品牌的色谱柱用的是“**Waters**”标准，其**stop-depth**的长度为**0.130**英吋
- **Spherisorb**品牌的色谱柱及**Phase Separations**公司的其它品牌色谱柱用的是“**Parker-style**”标，其**stop-depth**为**0.090**英吋
- 连接**Waters** 色谱柱最好使用整体式**PEEK**工程塑料接头,(**P/N PSL613315**),耐压 **5000Psi**;亦可适用于不同厂家的色谱柱与**Waters**仪器的连接



测柱效-良好的色谱实验习惯

- 拿到一根新色谱柱时，先测柱效
- 保留在新色谱柱上测得的色谱图，并记录色谱测试条件
- 定期检测柱效
- 定期检测仪器的谱带展宽

测柱效的方法

- 色谱柱种类繁多,性能各异,测定方法亦各不相同
- **Waters**的色谱柱均附有**Use and Care**说明书,可按说明书所述方法测定
- 以下是**Waters**反相C₁₈柱的测定方法:
 - 流动相:乙腈/水=60:40;流速:1ml/min
 - 样品:50mg Acenaphthene(二氢茚)溶于100ml乙腈,加入600 μ l丙酮
 - 进样量1–3 μ l
 - 检测波长:254nm



色谱柱的正确使用及操作

- 流动相的转换
 - 特别是**GPC**柱
- 流速(压力)的变化幅度
- 温度的变化幅度
- 专用色谱柱：样品及溶剂的要求



正确使用色谱柱(一)

- 样品方面

- 除去微粒及杂质

- 了解样品在流动相中的溶解度

- 如溶样品的溶剂不是流动相，一定要用流动相试溶解度，防止其在流动相中析出

- 了解样品与色谱柱的基质/填料是否有相互作用

正确使用色谱（二）

■ 流动相方面

— 除去微粒

— 纯度的要求

- 超纯水，梯度实验时水中有机杂质含量要低

- 缓冲液的pH值，在填料的允许范围内

- 缓冲液（盐）的浓度

- 有机溶剂：色谱纯，杂质含量尽量低，并与填料相匹配

— 流动相对样品的溶解度

- 有机溶剂或水的比例



色谱柱的在线保护装置

- 给色谱柱提供物理的保护
 - 除去样品及流动相中的颗粒
- 给色谱柱提供化学的保护
 - 防止分析柱被化学污染
- 装置
 - 在线过滤器
 - **Sentry Guard** 保护柱



保护柱

- 可避免化学污染
 - 多数保护柱影响到整个色谱柱的柱效，特别是在用微柱时
- 选保护柱的原则
 - 与所用色谱柱品牌、内径一致
- **Sentry Guard**保护柱
 - 通用保护柱卡套部件号：
 - **WAT046910**(适用于3.0,3.9,4.6 × 20mm保护柱)
 - **186000262** (适用于2.1 × 20mm保护柱)
 - **WAT097958**(适用于2.1 × 10mm保护柱)



色谱柱的存放

- 存放前的处理
 - 除去杂质、缓冲盐
- 合适的存放溶剂
- 避免色谱柱床的干涸
- 避免机械震动
- 防止细菌生长
- 注意存放的温度

启动液相色谱仪器的流程

- 开启**HPLC**系统各个设备的电源
 - 打开泵、自动进样器、检测器电源，待设备通过自检后，打开计算机，启动色谱管理软件
- 准备流动相
 - 过滤, 脱气
- 色谱泵排气
 - 用新配制的流动相灌注泵

流动相的脱气

- 流动相脱气的目的
 - 使色谱泵的输液准确
 - 输液量均匀准确，并且脉动减小
 - 保留时间及色谱峰面积的重现性提高
 - 提高检测的性能
 - 防止气泡引起的尖峰
 - 基线稳定，信噪比增加
 - 溶剂的紫外吸收本底降低
 - 保护色谱柱
 - 减少死体积
 - 防止填料的氧化

流动相脱气的方法

- 加热
 - 简单，如同抽真空一起使用，其效果很好。但容易造成流动相组成的变化
- 抽真空
 - 同上，一般在溶剂抽滤的同时，也有脱气的效果
- 超声波振荡
 - 简单，但效果不够理想；超声时间不要太长(1分钟左右即可)
- 通惰性气体（一般用氮气）
 - 可保持在线连续脱气，多用于低压梯度
- 在线脱气机（in-line degasser）
 - 可保持连续脱气，多用于低压梯度



流动相的保存

- 有机溶剂流动相：
 - 室温下密封, 避光保存
- 缓冲盐流动相：
 - 当日现配现用
 - 低温下密封保存, 一般不超过3天
 - 防止微生物生长
- 有机溶剂与水（缓冲盐）混配的流动相：
 - 低温密封保存
 - 防止有机相的挥发
- 选用适宜的容器

保存于聚乙烯瓶中的超纯水

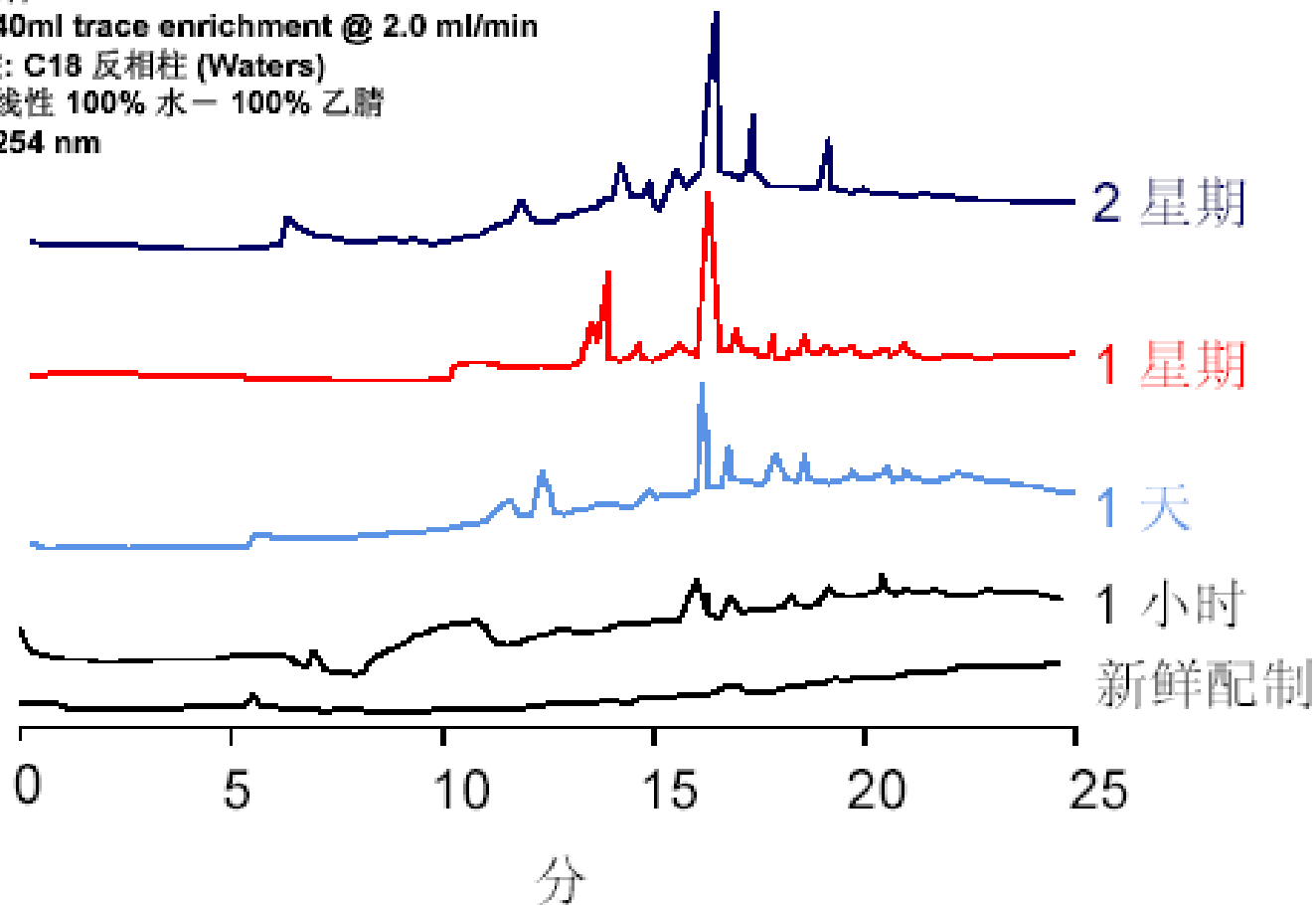
测试条件

水样: 40ml trace enrichment @ 2.0 ml/min

色谱柱: C18 反相柱 (Waters)

梯度: 线性 100% 水 - 100% 乙腈

波长: 254 nm



保存于棕色玻璃瓶中的超纯水

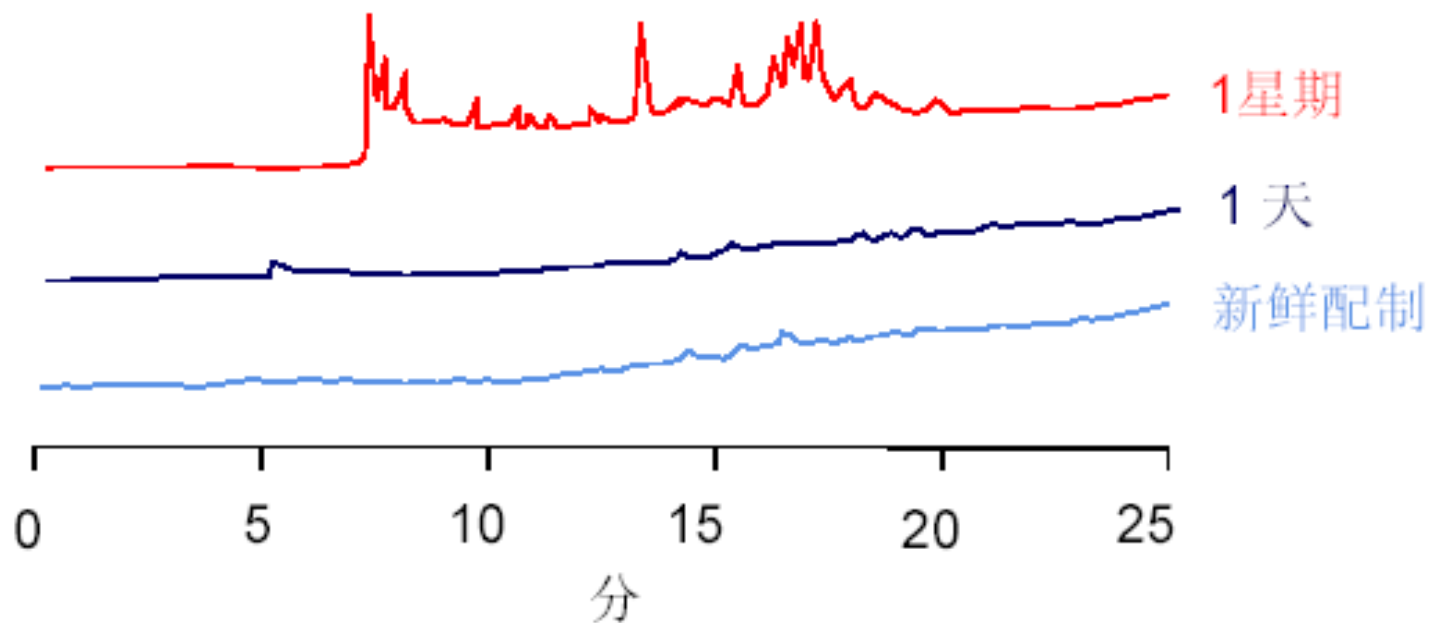
测试条件

水样: 40ml trace enrichment @ 2.0 ml/min

色谱柱: C18 反相柱 (Waters)

梯度: 线性 100% 水 - 100% 乙腈

波长: 254 nm



色谱泵的排气操作

- 色谱泵实验前，应先确认泵头内没有气体，如有气体要按以下步骤排气：
 - 将泵入口管吸滤头放入脱过气的流动相中
 - 打开泵及在线脱气机电源开关
 - 将排液阀打开，或断开与色谱柱连接的管路
 - 设置流速到**6-9ml/min**,排液阀出口有液流连续流出
 - 必要时(600泵)用**10ml**注射器从泵入口注入流动相
 - 对于600, 2695四元梯度泵, 分别对所用各路溶剂进行排气操作
 - 停止泵流速, 关闭排液阀, 恢复断开的管路, 备用
- 注: 泵排气后, 应输液稳定(系统压力脉动小, 一般在几十Psi以内), 否则, 需重做排气操作



色谱泵的运行

- 排气后的色谱泵即可用于实验运行
 - 注意：
 - 排气后，先设流速为 0
 - 恢复排气时断开的部分，如：进样器、色谱柱
 - 如需要，恢复排气时断开的控制线
- 根据色谱柱的不同，逐渐提高流速到设定值
- 若使用缓冲盐流动相，用前和用后均需用水过渡（包括排气操作）