

高效液相色谱仪使用方法

高效液相色谱法是 20 世纪 70 年代急剧发展起来的一项高效、快速的分离、分析技术。液相色谱法是指流动相为液相的色谱技术,在经典的液相色谱法基础上,引入气相色谱法理论,在技术上采用高压泵、高效固定相和高灵敏度检测器,实现了分析速度快、分析效率高和操作自动化,它具有高压、高速、高效、高灵敏度等特点。它是用高压输液泵将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂,缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱,经进样阀注入供试品,由流动相带入柱内,在柱内各成分被分离后依次进入检测器,色谱信号由记录仪、积分仪或色谱工作站记录。

1、高效液相色谱仪使用方法

高效液相色谱仪主要由高压泵,检测器,色谱柱,进样器等几个主要部分组成。根据使用的色谱柱类型不同高效液相色谱分为反相色谱和正相色谱;根据其使用目的的不同高效液相色谱分为分析色谱和制备色谱。用的较多的一般为反相的分析色谱。但在天然产物化学研究过程中,反相的分析和制备色谱较为常用。在其使用过程中一定要按照操作程序使用,才能得出较好的结果。

(一) 使用过程的注意事项

(1) 流动相

1、流动相应选用色谱纯试剂、高纯水或双蒸水,酸碱液及缓冲液需经过滤后使用,过滤时注意区分水系膜和油系膜的使用范围。

2、水相流动相需经常更换(一般不超过 2 天),防止长菌变质。

3、保持贮液瓶清洁,对专用贮液瓶应定期清洗;用试剂瓶作贮液瓶时,要经常更换。

4、定期(如半个月)在稀硝酸溶液中超声、清洗过滤器,保持过滤器畅通无阻。

5、使用 HPLC 试剂和新蒸二次蒸馏水作流动相,所使用的溶剂其截止波长一定要低于检测波长,对不是 HPLC 级的试剂要进行过滤(HPLC 级试剂出厂前已用 0.2 μ m 滤膜过滤)。对流动相一定要脱气。

6、每天开始使用仪器,注意放空排气,确保泵头、流动池以及其他流路系统中无气泡存在。

(2) 样品

1、采用过滤或离心方法处理样品,确保样品中不含固体颗粒。

2、用流动相或比流动相弱(若为反相柱,则极性比流动相大;若为正相柱,则极性比流动相小)的溶剂制备样品溶液,尽量用流动相制备样品液。

3、手动进样时,进样量尽量小,使用定量管定量时,进样体积应为定量管

的3~5倍。

4、对于生物发酵的培养液不能直接上样，首先要除掉蛋白，因为色谱柱对蛋白有特异性吸附，若被吸附将会严重堵塞色谱柱。

5、过滤样品用的针式过滤头也分水相和有机相，一定不要混用，有机溶剂能够溶解水相膜，若进入色谱柱则很难洗脱，堵塞柱子及容易让柱子产生鬼峰。

(3) 色谱柱

1、使用前仔细阅读色谱柱附带的说明书，注意适用范围，如pH值范围、流动相类型等；

2、使用符合要求的流动相；

3、使用保护柱，采用保护(警戒)柱,延长柱寿命。如污染物堆积于保护柱柱头,造成柱压升高,柱效下降,峰形变差时,卸下用强溶剂反冲后再用或更换新保护柱。

4、如所用流动相为含盐流动相，反相色谱柱使用后，先用水或低浓度甲醇(乙腈)水(如5%甲醇或者乙腈水溶液)，再用甲醇或者乙腈冲洗。

5、色谱柱在不使用时，应用甲醇或者乙腈冲洗，取下后紧密封闭两端保存；

6、不要高压冲洗柱子；

7、不要在高温下长时间使用硅胶键合相色谱柱，使用过程中注意轻拿轻放。

8、注意流动相经过柱子的流向，因为每根色谱柱都有固定的流动相流向。

9、避免超负荷进样,对250×4.6 mm的柱子,绝对进样量应不超过100μg。在灵敏度允许的前提下,应尽量将试样浓度降低,减少绝对进样量(进样体积可保持不变),这是保持HPLC柱性能持久良好的重要举措之一。

10、经常用强溶剂冲洗柱子,将柱内强保留组分及时洗脱出。反相柱用异丙醇-二氯甲烷(1:1)冲洗,正相(硅胶柱)用纯甲醇或异丙醇冲洗,时间均不少于1h。

11、做完试验,及时用适当溶剂冲洗柱子和进样阀,尤其是对过夜的柱子和进样阀,一定要用足量的水彻底洗净其中的盐类、缓冲液,再用甲醇或乙腈冲洗,并保存在乙腈中。正相柱保存在非极性有机溶剂(如己烷)中。

12、以硅胶为基质的柱子,如C-18,C-8等,要控制好流动相的pH值,一般不要低于2.5,不高于7.0

13、尽量用流动相溶解样品,一是避免出现拖尾峰、怪峰,二是避免试样在系统中由于溶解度降低而析出。

14、用HPLC分析酸碱性物质,由于吸附作用(次级保留)使峰形拖尾。加入改良剂可以大大改善峰形,提高积分的准确度。一般规则是:(1)分析酸性物质,

可加入1%的醋酸。(2) 分析碱性物质,可加入10~20 mmol/L三乙胺。(3) 酸碱物质混为一体,可同时加入1%的醋酸和10~20 mmol/L 三乙胺。

(4) 检测器

1、检测器主要有紫外检测器,折光检测器,二极管阵列检测器以及蒸发散射光检测器,不过最常用的是紫外检测器。因为折光和二极管阵列检测器对流动相的变化比较敏感而受限制。蒸发散射光检测器目前还不常用。

2、检测器的核心部件是检测池和光源,特别是紫外检测器的氙灯是有一定寿命的,在冲洗柱子等不需要检测器的时候尽量关闭氙灯以延长其使用时间。

3、检测池是容易污染的地方,应定时以5%的硝酸溶液冲洗检测池,在清洗检测池的过程中,一定要断开柱子,否则会破坏反相硅胶柱的基质导致柱子失效。

(5) 进样器

1、手柄处于Load和Inject之间时,由于暂时堵住了流路,流路中压力骤增,再转到进样位,过高的压力在柱头上引起损坏,所以应尽快转动阀,不能停留在中途。在HPLC系统中使用的注射器针头有别于气相色谱,是平头注射器。一方面,针头外侧紧贴进样器密封管内侧,密封性能好,不漏液,不引入空气;另一方面,也防止了针头刺坏密封组件及定子。

2、六通阀进样器的进样方式有部分装液法和完全装液法两种。使用部分装液法进样时,进样量最多为定量环体积的75%,如20 μ L的定量环最多进样15 μ L的样品,并且要求每次进样体积准确、相同;使用完全装液法进样时,进样量最少为定量环体积的3至5倍,即20 μ L的定量环最少进样60至100 μ L的样品,这样才能完全置换样品定量环内残留的溶液,达到所要求的精密度及重现性。推荐采用100 μ L的平头进样针配合20 μ L满环进样。

3、可根据进样体积的需要自己制作定量环,一般不要求精确计算定量环的体积,譬如,一根名义上10 μ L的定量环,实际是9 μ L还是11 μ L并不重要,因为被测样品和校正样品的进样体积保持一致,在计算结果时误差都被抵消了。

4、进样样品要求无微粒和能阻死针头及进样阀的物质,样品溶液均要用0.45 μ m的滤膜过滤。防止微粒阻塞进样阀和减少对进样阀的磨损。为防止缓冲盐和其它残留物质留在进样系统中,每次结束后应冲洗进样器,通常用不含盐的稀释剂、水或不含盐的流动相冲洗,在进样阀的Load和Inject位置反复冲洗,再用无纤维纸擦净注射器针头的外侧。

5、虽然六通阀进样器具有结构简单、使用方便、寿命长、日常无需维修等特点,但正确的使用和维护将能增加使用寿命,保护周边设备,同时增加分析准确度。如使用得当的话,六通阀进样器一般可连续进样3万次而无需维修。

(二) 操作过程

1、打开计算机电源,自上而下打开各个组件电源。

- 2、首先排除管路及溶剂中的气泡。
- 3、建立色谱方法，并根据实验结果调整方法达到最好的分离分析结果。
- 4、注意各流动相所剩溶液的容积设定，若设定的容积低于最低限会自动停泵，注意洗泵溶液的体积，及时加液。
- 5、使用过程中要经常观察仪器工作状态，及时正确处理各种突发事件。
- 6、使用手动进样器进样时，在进样前和进样后都需用洗针液洗净进样针筒，洗针液一般选择与样品液一致的溶剂，进样前必须用样品液清洗进样针筒 3 遍以上，并排除针筒中的气泡。
- 7、溶剂瓶中的沙芯过滤头容易破碎，在更换流动相时注意保护，当发现过滤头变脏或长菌时，不可用超声洗涤（因为易碎），可用 5%稀硝酸溶液浸泡后再洗涤。
- 8、实验结束后，一般先用水或低浓度甲醇水溶液冲洗整个管路 30 分钟以上，再用甲醇冲洗。冲洗过程中关闭 D 灯、W 灯。
- 9、关机时，先关闭泵、检测器等，再关闭工作站，然后关机，最后自下而上关闭色谱仪各组件，关闭洗泵溶液的开关。
- 10、使用者须认真履行仪器使用登记制度，出现问题及时向老师报告，不要擅自拆卸仪器。

2. 高效液相色谱仪常见故障及其原因

- 1、操作过程若发现压力很小，则可能管件连接有漏，注意检查。
- 2、连接柱子与管线时，应注意拧紧螺丝的力度，过度用力可导致连接螺丝断裂。柱接头处易发生漏液，可能情况为接头 Fittings 中间的管子未和接口处贴紧。不同厂家的管线及色谱柱头结构有差异，最好不要混用，必要时可使用 PEEK 管及活动接头。
- 3、操作过程若发现压力非常高，则可能管路已堵，应先卸下色谱柱，然后用分段排除法检查，确定何处堵塞后解决。若是保护柱或色谱柱堵塞，可用小流量流动相或以小流量异丙醇冲洗，还可采用小流量反冲的办法（新柱不提倡），若还是无法通畅，则需换柱。
- 4、运行过程中自动停泵，可能为压力超过上限或流动相用完。
- 5、泵压不稳或流量不准，可能为柱塞杆密封圈问题或 seal wash 垫圈问题，需更换。
- 6、基线产生不规则噪声，可能原因为系统不稳定或没达到化学平衡（使其平衡，若用离子对试剂，在首次使用时需要足够的时间和溶剂体积，色谱柱才能达到足够的平衡），流动相被污染（更换流动相，清洗储液器、过滤器，冲洗并重新平衡系统），色谱柱被污染（为证明可能的原因更换系统的色谱柱或使用一根同类的被证明性能好的色谱柱），检测器不稳定。

7、短期有规则的噪声，可能原因为泵压不稳或泵脉冲，调节溶剂不适当（如两种溶剂的互容性问题），泵入口管路松或堵塞，泵太脏，泵柱塞磨损，检测器不稳定。

8、长期有规则噪声，可能原因为室温不稳（未使用柱温箱）或使用柱温箱不当。

9、基线漂移，可能原因为系统不稳或没有达到化学平衡，室温不稳（未使用柱温箱），流动相污染或分解，柱污染，检测池泄漏，系统泄漏，固定相流失（另选流动相，另选色谱柱），测定的波长选择错误（对溶剂有吸收），样品组分保留太长（用强度合适的溶剂清洗色谱柱），检测器不稳定；

10、每次进样时的保留时间不重复，可能原因为系统不稳或未达到化学平衡，由于气泡、各部件磨损等原因引起的泵压或泵脉冲输液不稳定，进样体积太大或样品浓度太高平衡被破坏，溶剂配比不合适，柱被污染。

11、无峰，可能原因为检测器选择错误，使用错误的流动相，样品降解。

12、色谱峰比预计的小，可能原因为进样体积错误，检测器灯故障，进样问题（瓶号错、进样体积不合适、进样错误、针头堵塞）。

13、峰变宽，可能原因为进样体积太大或样品浓度太高，过滤器、保护柱入口、柱入口或连接管路有部分堵塞，检测器时间常数设置错误，进样器问题（如阀漏、针头堵塞或损坏），柱或保护柱被污染，对流动相来说样品溶剂太强，使用错误的色谱柱，温度变化。

14、出现双峰/肩峰，可能原因为保护柱或柱入口部分阻塞，柱或保护柱被污染，柱性能下降，保护柱失效，进样体积太大或样品浓度太高（样品过载），平衡破坏。

15、前沿峰，可能原因为进样体积太大或样品浓度太高（样品过载），平衡破坏，对于流动相来说样品溶剂非极性太强（对于反相柱），柱或保护柱被污染，柱性能下降，保护柱失效。

16、脱尾峰，可能原因为柱或保护柱被污染，柱性能下降，保护柱失效，进样器问题（如阀漏等），检测器时间常数设置错误。

17、出现鬼峰，可能原因为流动相被污染，样品预处理时产生降解或混入杂质，先前进样的流出物，样品定量管清洗不当，注射器脏，柱被污染，进样装置被污染，流动相中含有稳定剂/稳定剂变化。

液相色谱仪色谱柱使用及维护每天用足够的时间来平衡色谱柱，使用者会在处理问题方面获得最大的"补偿"，而且色谱柱的寿命也会变得更长！

修改于二零零一年三月