

高效液相色谱仪的使用和维护

朱彭龄

(兰州大学 化学系, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 按照高效液相色谱仪(HPLC)分析过程的先后顺序说明仪器使用的注意事项^[1-2], 讨论色谱仪(LC)系统运行时故障的出现和排除。

关键词: 高效液相色谱仪; 分析过程; 注意事项

中图分类号: O657.7

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2012)04-0246-04

1 色谱仪(LC)使用的注意事项

1.1 LC 系统运行前的准备工作

1.1.1 配置柱前过滤器和反压调节器

首先检查系统, 确认已配置柱前过滤器和反压调节器。进样器和色谱柱间配置柱前过滤器是保护色谱柱不被颗粒物堵塞最好的办法, 颗粒物可能来自流动相、试样, 或由泵内密封圈和进样阀转子密封的磨损产生。5 μm 填料色谱柱的进口和出口筛板孔径为 2 μm 。3 μm 填料色谱柱进口筛板孔径为 2 μm 或 0.5 μm , 出口筛板孔径为 0.5 μm , 若柱前配置 0.5 μm 孔径筛板过滤器, 能有效地预防色谱柱被颗粒物堵塞。

大多数 LC 系统包括 UV 或荧光检测器。在检测器出口连接反压调节器或一段细内径的管路, 可防止在检测池内产生气泡和提高基线稳定性。产生的反压不能超过检测池所能承受的大小。

1.1.2 流动相的脱气和过滤

反相色谱一般以 C_8 或 C_{18} 键合相为固定相, 以含有机溶剂的水相为流动相。流动相由水相(溶剂 A)和有机相(溶剂 B)混合而成。2 种溶剂相互混合时释放出溶解的空气, 如果产生的气泡带到泵中, 输液泵则不能正常工作。流动相中溶解的气体还可能在 LC 系统低压端的检测器内产生气泡, 引起假峰。因此, 流动相或组成流动相的溶剂在使用前需要进行脱气。

有机相通常是 HPLC 级的甲醇或乙腈, 在有机

溶剂中溶解的气体较少, 因此可不经过滤和脱气处理直接使用。从超纯水系统得到的水也无需过滤, 但是水相含有原来是固体的溶质(如作为 pH 缓冲剂的磷酸盐)时, 必须过滤处理除去可能存在的颗粒物, 滤膜的孔径一般为 0.5 μm 。国内实验室大多采用抽真空过滤, 同时完成溶剂的过滤和脱气。

储液瓶要按照标准操作规程(SOP)所规定的步骤清洗后使用。建议将经脱气处理的溶剂 A 和溶剂 B 分别置于各自的储液瓶内, 在线混合, 而不是溶剂 A 和溶剂 B 先按一定的比例混合后, 再过滤脱气处理得到流动相。梯度洗脱时的情况肯定是如此。这里要强调的是, 等度洗脱最好也是在线制备流动相, 其原因如下: (1) 对于混合后脱气得到的流动相, 在过滤脱气时由于有机溶剂的挥发引起流动相组成的变化, 影响分析结果的重现性; (2) 从经济上考虑, 避免废弃剩余的流动相, 减少有机溶剂的浪费, 降低分析成本。

水相溶剂 A 中适于微生物的滋生, 尤其在含有缓冲剂的情况下。反相分离通常采用磷酸盐或醋酸盐缓冲剂, 其浓度一般为 10 mmol/L 或更高, 调节 pH 值为 2 ~ 8。在室温下放置, 缓冲水相溶剂将逐渐浑浊, 甚至产生絮状沉淀。因此, 需要对缓冲水相的使用期限制定相应的 SOP, 一般规定不超过 1 星期。

对于高压混合 LC 系统, 溶剂 A 和溶剂 B 在高压下混合制备流动相, 经抽真空过滤处理仍残留在溶剂中的气体不会形成气泡释放出来。对于低压混合 LC 系统, 溶剂在常压下通过比例阀相互混合后,

收稿日期: 2012-05-16; 修订日期: 2012-07-26.

作者简介: 朱彭龄(1939-), 男, 教授, 博士生导师, 曾任“分析测试技术与仪器”编委, 研究领域: 液相色谱。E-mail: zhupl@lzu.edu.cn

再进入输液泵。如果脱气不彻底,溶剂混合时产生的气泡可使输液泵不能正常工作。低压混合 LC 系统最好配置有在线脱气机,溶剂 A 和溶剂 B 被充分地脱气后,再通过比例阀互相混合。否则,只能将预先混合制备的流动相抽真空过滤脱气处理后,置于储液瓶中使用。

1.1.3 自动进样器清洗液的脱气

如果 LC 系统包括有自动进样器,通常使用强度和流动相相当的非缓冲溶剂作为自动进样器的清洗液,使用前也须经脱气处理。

1.1.4 试样溶液的过滤或离心

试样溶液中可能有颗粒物或其它不溶物存在,如果被带进 LC 系统,可导致柱进口筛板被堵塞,色谱柱压升高,分离效率下降。为除去试样溶液中的颗粒物,用 $0.5\ \mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤是普遍采用的方法,但是,过滤操作会消耗费用和时间。此外,分析物可能被滤膜吸附,影响回收率,尤其是在低浓度范围;或者通过过滤器可能将一些物质带到试样中,干扰随后的色谱分析。因此,当试样需要过滤处理时,分析方法必须重新认证后才能使用,以探明过滤操作对分析结果的影响。

一个既经济又有效的办法是将试样溶液先离心数分钟,从离心管中取上部澄清液进样。柱前在线过滤器,可以进一步防止离心处理后可能残留的颗粒物进到色谱柱。

1.2 使用后的清洗

1.2.1 系统的清洗

清洗所要达到的是:(1)从 LC 系统清除含缓冲剂或添加剂的流动相;(2)用有机溶剂充满 LC 系统,包括输液泵、进样阀、色谱柱和检测器,高浓度有机溶剂有利于抑制微生物的滋生;(3)从色谱柱除去被吸附在固定相上的杂质。

首先更换纯水作为溶剂 A 和有机相混合,配制相同强度但不含缓冲剂的流动相,顶替出 LC 系统中含缓冲剂的流动相。冲洗体积约 $5\sim 10\ \text{mL}$ 后,切换到用纯有机溶剂冲洗,直至没有杂质峰被洗出为止。色谱柱可保持原位,或从 LC 系统取下,两端放上螺塞,拧紧,备用。

开始冲洗时,有机溶剂的比例不能太高,防止缓冲剂析出,致使系统被堵塞。若由于疏忽,堵塞情况发生,则应立即关机。然后,设置小流速(例如 $0.1\ \text{mL/min}$),用含少量有机溶剂(如 10%)的水冲洗 LC 系统,压力恢复正常后,再逐步切换到用纯有

机溶剂清洗。尽管水是缓冲剂最好的溶剂,但不能用水顶替,因为在纯水中,反相填料表面的键合相倒塌并折叠在一起,使水无法进入填料的孔隙。

关机状态下,含缓冲剂的流动相在 LC 系统的逗留时间不要过长,最好不超过 1 h,要尽快清洗,否则溶剂挥发生成的残留物能磨损泵内的部件。

离子对色谱的流动相含有离子对试剂,流动相和固定相之间需要较长的时间才能达到平衡。在连续使用相同的流动相时,每天使用后以低流速(如 $0.1\ \text{mL/min}$)保持系统运转,如此可缩短下一次开机后达到平衡所需的时间。因为很难从反相柱上彻底清洗离子对试剂,建议为离子对色谱分析配备专用的色谱柱。

上述清洗步骤仅适用于硅胶基质反相 LC 柱,关于其它类型色谱柱色清洗和储存,一定要按使用指南建议的操作步骤进行。

LC 系统一般配置有 UV 或荧光检测器。清洗 LC 系统的同时,检测器的流通池也被清洗。但是,质谱、光散射、电化学检测器使用后,需要进行专门的清洗处理。

1.2.2 泵密封圈背侧的清洗

清洗系统并不包括输液泵密封圈的背侧,这里仍然可能残留有含非挥发性缓冲剂的流动相。在关机状态下,溶剂逐渐挥发,在泵体内表面形成固体沉积物,这是泵密封圈磨损的主要原因。一些输液泵(如岛津 LC10A)的设计中,在泵体的后端留有清洗口,通过它注进纯水清洗,可防止固体沉积物的形成。仪器使用后,一定要记住这个清洗步骤。

1.2.3 进样器内的通道和定量环的清洗

虽然清洗 LC 系统时进样阀也同时被清洗,但是进样阀只能处于 LOAD 和 INJECT 两个位置中的一个,另一个位置的通道内还可能残存以前的流动相。如果生成缓冲剂或其它添加剂的沉积物,可以使进样阀的密封部件磨损。对于手动进样阀可以先用水,再用甲醇或乙腈清洗,在 LOAD 和 INJECT 两个位置上交替进行。自动进样器通常使用不含缓冲剂强度与流动相相当的溶剂作为清洗液。为清洗进样阀的通道,可以水代替试样,自动进样,用进样器清洗液或强度更高的溶剂清洗。

2 故障的判断和排除

压力是指示 LC 系统工作是否正常的重要依据。LC 系统压强大小和流动相的组成(粘度)、柱填

料的粒径和结构、柱的尺寸、流速等有关。在梯度洗脱的过程中,由于流动相组成的变化,以梯度运行周期,压力呈规律性的波动。在等度洗脱的情况下,系统的压力应该保持在适当的大小,压力过高、偏低、或出现周期性的脉动都是不正常的。

2.1 系统压力过高

一般压力过高是由堵塞所引起的。为了确定堵塞的位置,逆流动相的方向,从检测器开始,依次拧松连接检测器、色谱柱、柱前过滤器、进样阀、输液泵的接头,确认发生堵塞的组件或管道。柱前过滤器或一段管道堵塞时,更换过滤器筛板或管道,问题就可解决。

如果是色谱柱使系统压力升高,性质上这可能由物理的或化学的因素所引起。色谱柱进口处筛板被颗粒物封堵是物理的因素,通过反吹色谱柱就可以使压力恢复正常。反吹之前,断开检测器和系统的连接,再将色谱柱的方向倒置和管路相连后进行反吹,以防止检测池被污染。化学因素主要是指试样中的杂质被吸附在固定相上使色谱柱压升高。采用预柱、柱切换和固相萃取等手段,可以防止有害杂质进入分析柱。如果杂质已吸附在固定相上,一般也可以用高强度的流动相通过反吹把杂质从柱上清洗下来。但是,有些杂质可以不可逆地被吸附,如分析生物试样所遇到的情况,这时清洗也不能使色谱柱压恢复。在使用的过程中,色谱柱进口筛板处的填料逐渐产生凹陷,使柱效降低,峰形变坏(肩峰甚至双峰),柱反吹后可以继续保持在逆流方向使用,这样有利于避免再次堵塞,同时改善峰形,延长了柱寿命。

储液瓶输液管线滤头的作用是使管线沉在瓶的底部而不露出液面。滤头长时间浸泡在水相溶剂中,其空隙内能滋生出微生物,其结果是:(1)向已经过滤处理的溶剂中引入污染物;(2)堵塞滤头并致使系统压力升高。基于笔者的经验,水相溶剂储液瓶滤头,尤其在缓冲剂存在的情况下,最好几天内就在水中用超声波清洗 1 次。如果仪器在一段时间处于关机状态,系统清洗后从储液瓶取出滤头,用塑料膜将其包好。

2.2 系统压力偏低

反相 LC 在较高的压力下运行。引起系统压力低于正常值的一个原因是在接头处滴漏,通过目视检查或漏检器报警容易找到漏液的部位并排除故障。此外,泵体中有气泡也使压力偏低且不稳定。

假设溶剂已充分脱气(参见 1.1.2),泵中的气泡可能来自低压管道一侧松动的接头处。气泡附着在聚四氟乙烯管壁上,或被流动的溶剂带到泵中。确定了松动的接头位置,用手拧紧,通过抽液/排气启动阀可将气泡抽除。

有时由于疏忽,储液瓶中的溶剂耗尽使空气进到输液泵内,系统压力下降,输液泵将停止工作。为了使系统恢复到正常状态,必须用流动相将连接管线、泵、色谱柱、检测器中的气体顶替出。在开始之前,断开输液泵出口处的连接,向储液瓶倒入溶剂。打开输液泵的抽液排气阀,提升储液瓶高度,借助虹吸作用和连接在排气阀上的注射器,使输液泵进口管线充满溶剂,在较高的流速下(如 5 mL/min)使泵运转几分钟。关闭抽液排气阀,将输液泵与系统连接,在正常流速下冲洗,排除逗留在线路、色谱柱和检测器中的气泡。

2.3 压力不稳定

系统压力不稳,出现周期性的波动可能由以下的原因引起:(1)输液泵内有气泡存在;(2)单向阀、泵密封圈渗漏(压力波动以泵循环为周期);(3)进样器渗漏(压力波动以进样器循环为周期);(4)室温的变化。

2.3.1 排除气泡

输液泵溶剂进口管路的内表面时常附着有气泡,可能随流动相带到泵中(参见 2.2)。溶剂中未能脱去的空气,也可能在泵中释放出来。通过抽液/排气启动阀可将泵体内的气泡抽除,解决输液时压力的波动。

2.3.2 清洗单向阀

虽然经过脱气和过滤处理,水相溶剂在放置和使用过程中容易产生絮状的微生物,使溶剂过滤头堵塞。若絮状物附着在单向阀上,可导致输液泵不能正常工作。

夏季室温较高,这种情况更容易发生。当确认输液泵是发生故障的部位时,首先要考虑的是清洗水相溶剂输液泵的单向阀。从泵上取下部件,依次浸在水、有机溶剂(如甲醇、异丙醇)、水中,用超声波清洗,可以得到满意的效果。此外,为了防止因泵柱塞密封圈磨损产生的颗粒物进入输液管道中,有些泵的出口单向阀包括有筛板,它也需和单向阀一起清洗。

2.3.3 温度的影响

流动相的粘度随温度升高而减小,因此系统压

力受温度的影响。色谱峰的保留也随温度变化,每升高 1 ℃,保留值大约减小 2%。因此,HPLC 系统最好配置柱温箱。有些 HPLC 分析是在室温下完成的。在该条件下,应采取措施保持室温稳定,以减小压力和保留的波动。

2.3.4 输液泵的检修

输液泵的后下方大多有一个滴液口。当泵运行时,若在该处出现液滴,预示泵密封圈受损,应该及时更换。

3 小结

为使 LC 系统正常运行,仪器使用者必须遵守一定的操作规范,并最好以 SOP 的形式将其确定下来。例如,与本文内容有关的 SOP 可能涉及到以下

方面:玻璃器皿的清洗,试剂的制备、标签和有效期,流动相的过滤和脱气,LC 仪器的常规检查和使用日志,LC 仪器的维修记录,LC 仪器季度性能检验,色谱柱加热器的操作和维护,离心机的操作和维护。分析人员按照 SOP 的要求进行操作,并养成习惯,就可以避免故障的发生,或者能及时排除所出现问题。

参考文献:

[1] 朱彭龄. 高效液相色谱仪性能的检验[J]. 分析测试技术与仪器, 2009, 15(3): 197-198.
[2] Dolan J W. Only three things[J]. LC • GC, 1998, 16(4):352.

Usage and Maintenance of HPLC Equipment

ZHU Peng-ling

(Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: In accordance with the priority of the analytical process of HPLC, points for attention of the application of the equipment are explained and the appearance of troubles and troubleshootings in the operation of the LC system and discussed.

Key words: HPLC; analytical process; points for attention

Classifying number: O657. 7

