

高效液相色谱仪使用中的常见故障及维护方法

徐晓玲,楼雪芳

(浙江大学城市学院 医学院 浙江 杭州 310015)

摘要:从泵压、基线、峰形及保留时间四方面出发,对高效液相色谱仪使用中常见的故障及如何排除故障、如何维护仪器进行综述。

关键词:泵压;基线;峰形;保留时间;高效液相色谱仪

中图分类号:TH833

文献标识码:B

文章编号:1008-021X(2014)09-0043-06

The Common Problems and Maintenance during Operation of High Performance Liquid Chromatography

Xu Xiaoling, Lou Xuefang

(Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China)

Abstract: The common problems and maintenance during operation of high performance liquid chromatography (HPLC) were stated generally from the perspective of pressure of pump, baseline, peak and the retention time.

Key words: pressure of pump; baseline; peak; retention time; high performance liquid chromatography (HPLC)

高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是现代分离分析技术中的一种重要手段,兴起于 20 世纪 60 年代。因其具有高分离效率、高灵敏度、高分析速度、适用范围广等特点,高效液相色谱已被广泛地应用于医药^[1-5]、化工^[6-8]、生物样品^[9-11] 的定性及定量检测中。近年来高效液相色谱法在药品检验中的应用更是不断增多。2005 年版《中国药典》采用该法 1366 种(次),最新的 2010 年版《中国药典》更是增加至约 2000 种^[12]。通过万方数据库检索统计,自 2000 年至今,本刊《山东化工》共收录以“HPLC”为题名或关键词的文章 26 篇。

高效液相色谱仪若操作不当,在使用过程中常会出现各种问题,对方法学的建立及验证等结果造成一定的影响。如果操作人员能严格遵守其使用规则,发现问题能及时排查、

解决,做到勤维护、早发现、早维护,则可使分析结果更加可靠、稳定。因此,本文以“高效液相色谱仪使用”为关键词对万方数据库进行检索筛选,对所得 56 篇文献,结合笔者工作中遇到的常见问题进行总结概括,以期更好地维护该仪器,延长使用寿命,提高分析工作效率。

1 高效液相色谱仪常见故障

高效液相色谱仪主要由储液瓶、输液泵、进样器、色谱柱、检测器和数据记录及处理装置组成。常见故障主要表现在泵压、基线、峰形及保留时间四方面,以笔者常用的 Waters 515 系列高效液相色谱仪 (515 HPLC pump, 2487 Dual Absorbance Detector) 为例,主要问题及解决方法如图 1~图 2、表 1~表 5 所示。

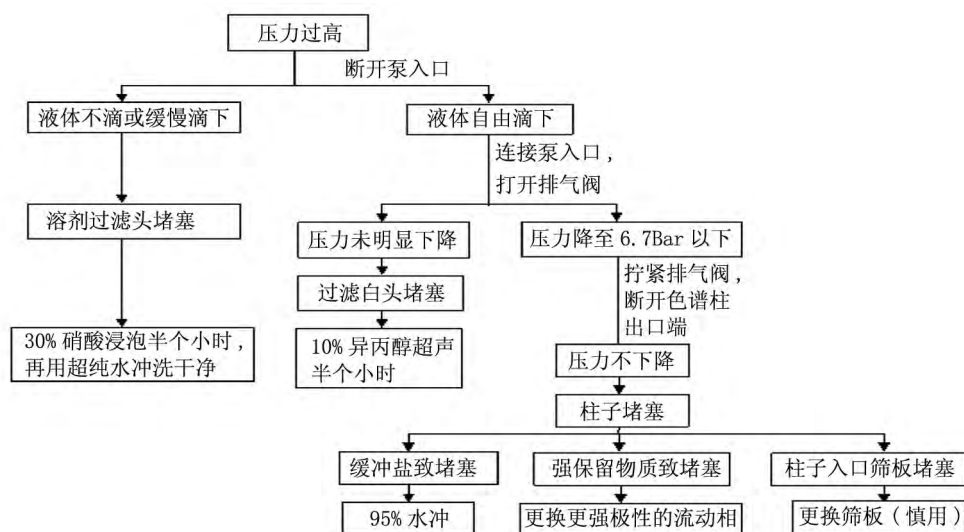


图 1 泵压高故障的排除方法

Fig. 1 The method to eliminate the reasons causing high pressure of pump

收稿日期:2014-07-26

作者简介:徐晓玲(1988—),女,硕士研究生,助理实验师,从事药物的活性评价研究。

表 1 常见泵压问题的产生原因及解决方法
Table 1 The method to solve the problems on pressure of pump

常见故障	产生原因	解决方法
无压力	流动相污染或其粘度过高	选择合适流动相及比例 重新配制 并用 0.45 μm 滤膜进行过滤
	流动相中有缓冲盐 造成单向阀堵塞	设流速为 5 mL · min ⁻¹ 拧松排气阀 进行 purge
	泵内有气体	设流速为 5 mL · min ⁻¹ 拧松排气阀 进行 purge
	高压密封垫变形	更换高压密封垫
压力不稳	单向阀污染(流动相中有盐析出, 造成球座上有细微固体颗粒, 导致宝石球和球座密封性不好)	设流速为 5 mL · min ⁻¹ 拧松排气阀 进行 purge
	高压密封垫损坏 ^[13] (流动相中有盐 老化快; 强酸强碱腐蚀)	更换高压密封垫
	滤芯(又称过滤白头, 位于排气阀内) 堵塞	10% 异丙醇超声半个小时, 后用 HPLC 级水冲洗干净
	泵内或溶剂内有空气	设流速为 5 mL · min ⁻¹ 拧松排气阀 进行 purge; 溶剂进行超声脱气
	比例阀失效	更换比例阀
	系统漏液	检查漏液处 根据情况拧紧或更换装置
	色谱柱堵塞	根据实际情况 对色谱柱冲洗过夜
压力过高	溶剂过滤头堵塞	放入娃哈哈水中超声清洗(塑料滤头除外)
	滤芯(又称过滤白头, 位于排气阀内) 堵塞	10% 异丙醇超声半个小时, 后用 HPLC 级水冲洗干净
	在线过滤器污染	将在线过滤器的筛板取出, 分别用 HPLC 级水和甲醇各超声清洗, 或者直接更换筛板
	流动相配比不合理(不同配比流动相粘度不同)	仔细查阅文献, 并精确量取所需溶液进行混合
	系统压力零点漂移	调节系统压力零点
	管路堵塞	根据实际情况 冲洗过夜
	手动进样器堵塞	用注射器吸取适量体积的 HPLC 级水, 注射入进样口, 使水体积超过定量环体积, 从废液瓶流出, 重复操作多次
	保护柱污染	更换保护柱
	色谱柱污染	根据实际情况 对色谱柱冲洗过夜
	混合器污染	拆卸下混合器 放入 HPLC 级水中超声清洗
压力过低	泵内有气泡	拧松排气阀 将注射器连接到排气阀上进行抽气排气; 溶剂进行超声脱气
	泵头漏液(流动相中有盐, 高压密封垫圈老化快; 强酸强碱高压密封垫圈腐蚀损坏)	更换高压密封垫
	系统漏液	检查漏液处 根据情况拧紧或更换装置

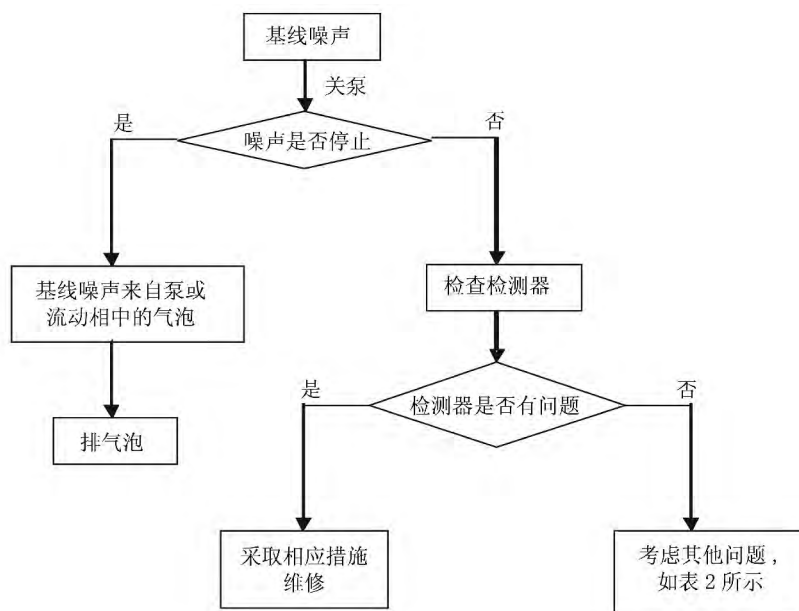


图 2 基线噪音过大故障的排除方法

Fig. 2 The method to eliminate the reasons causing noise of baseline

表2 常见基线问题的产生原因及解决方法
Table 2 the method to solve the problems on baseline

常见故障	产生原因	解决方法
基线漂移 (或上下波动)	系统漏液、有空气进入	检查各线路并拧紧; 设流速为 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 拧松排气阀, 进行 purge
	流动相不纯、污染、未脱气	重新配制流动相, 并进行超滤及超声脱气
	流动相比比例不当, 或混合不均匀	重新精密量取各溶液并混合均匀配制流动相
	色谱未平衡好	继续进行平衡, 直至基线稳定
	色谱柱后期污染	根据实际情况, 对色谱柱冲洗过夜
	样品未走完	继续走完样品, 直至不再出峰
	样品中有强保留物质(馒头峰)	更换更强极性的流动相冲洗色谱柱, 而后平衡柱子
	柱温波动	避免柱子放置于有气流或有阳光的地方
	检测池污染	清洗检测池
	紫外灯使用到极限或出现故障	更换或维修紫外灯
基线噪声大	电压不稳	检查电压
	检测器未设定在最大吸收波长处 ^[14]	查阅文献, 并设定在最大吸收波长
	系统漏液	检查各线路并进行相应更换或拧紧
	系统内有气泡(尖锐峰)	设流速为 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 拧松排气阀, 进行 purge
	流动相污染(有干扰杂质)	重新配制流动相, 并进行超滤及超声脱气
	流动相选择不合理, 不相溶	重新选择流动相
	流动相混合不均匀	重新配制流动相
	温度影响(柱温过高, 检测器未加热)	选择合适柱温
	色谱柱填料流失或阻塞	更换色谱柱或根据堵塞物情况, 对色谱柱冲洗过夜
	检测池堵塞、污染	清洗检测池
紫外灯使用到极限或出现故障	更换或维修紫外灯	
进样量过大	减少进样量	
机器灵敏度高	选择适合样品分析的机器	

表3 常见峰形问题的产生原因及解决方法
Table 3 The method to solve the problems on peaks

常见故障	产生原因	解决方法
平头峰	检测池污染	清洗检测池
	紫外灯出现故障	维修紫外灯
	进样量太大	减少进样量
分叉峰 (双峰/肩峰)	保护柱污染	更换保护柱
	色谱柱污染或失效	根据实际情况, 对色谱柱冲洗过夜
	进样阀污染或损坏	用注射器吸取适量体积的 HPLC 级水, 注入入进样口, 使水体积超过定量环体积, 从废液瓶流出, 重复操作多次
	检测池污染	清洗检测池
	溶解样品选择的溶剂不合理, 过强	选择合适的溶剂
拖尾峰	样品过载 ^[15] (进样量过大; 浓度过高)	减少进样量或降低样品浓度
	色谱柱碰撞或跌落, 造成柱内固定相振动形成空隙或不均匀	更换色谱柱
	柱超载, 进样量过大	降低样品量
	流动相配比不合理	选择合适的配比配制流动相
	流动相流速不合理	调节流速
	流动相 pH 不合理	选择合适的 pH
	色谱柱选择不合理, 死体积或柱外体积过大	更换合适的色谱柱
样品不纯, 峰干扰	纯化样品	
伸舌峰	柱温低	选择合适的柱温
	溶解样品选择的溶剂不是流动相	选用流动相溶解样品
	流动相流速不合理	调节流速
	流动相配比不合理	选择合适的配比配制流动相

续表 3

常见故障	产生原因	解决方法
伸舌峰	流动相 pH	选择合适的 pH
	样品过载	减少进样量或降低样品浓度
	色谱柱选择不合理	更换合适的色谱柱

表 4 关于出峰其他问题的产生原因及解决方法
Table 4 The method to solve the other problems on peaks

常见故障	产生原因	解决方法
峰过小	紫外灯出现故障	维修紫外灯
	样品黏度过大	选择合适的流动相溶解样品或对样品进一步纯化
	样品不能在紫外检测器下检测	选用带有非紫外检测器的 HPLC 对样品进行检测
	样品进样量不足	增加进样量
	定量环体积不正确	维修定量环
	流动相比例不对或流动相不对	选择合适比例的流动相
	检测器衰减太多	调节衰减
峰展宽	检测池污染或有气泡	清洗检测池
	进样体积过大	减小进样量
	系统内有气泡	设流速为 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 拧松排气阀 进行 purge
	数据采集速率太慢	维修数据采集系统
	流动相粘度太大	调节流动相比例降低流动相粘度
	检测池体积过大	选用合适的检测器
	样品过载	减小样品浓度或减小进样体积
	检测器时间常数过大	调节检测器时间显示范围
	系统未达到平衡	继续平衡,直至基线稳定
	溶解样品的溶剂极性大	选择合适的溶剂
色谱柱尺寸及类型选择不正确	选用合适的色谱柱	
倒峰	色谱柱或保护柱被污染或柱效降低	更换合适的色谱柱; 或根据实际情况,对色谱柱冲洗过夜
	温度变化引起	避免柱子放置于有气流或有阳光的地方
	检测器的极性接反	维修检测器
	检测器氙灯衰减	更换氙灯
	光学装置尚未达到平衡	预热 30 min 平衡系统
	如果流动相中有紫外吸收的杂质 无吸收的组分就会产生倒峰	重新配制流动相,避免污染
鬼峰	流动相吸收本底高或样品组分的吸收低于流动相的吸收	重选合适的流动相
	进样过程中进入空气	规范操作,重新进样
	进样阀残余峰	进针前需清洗进样阀,进样后等所有峰都走完再进行后续操作
	色谱柱污染	根据实际情况,根据实际情况,对色谱柱冲洗过夜
	柱未平衡	重新平衡柱
	样品中存在未知物	改进预处理方法 纯化样品
	流动相不纯净,如水污染(反相) 通过变化	重新配制流动相 检查水质量,用 HPLC 级的水
含蛋白质的样品	梯度洗脱时,可能是蛋白质在初始梯度溶解不完全造成的,因此可纯化样品或每次用足够的时间待样品中蛋白质出峰完全后停机	
	流路中有小气泡	设流速为 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 拧松排气阀 进行 purge

表5 保留时间问题的产生原因及解决方法
Table 5 The method to solve the problems on retention time

解决方法	常见故障	产生原因
保留时间漂移	进样量相差较大	规范操作,保持每次的进样量基本一致
	系统未平衡	用充足的时间来平衡系统
	泵内有空气	设流速为 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 拧松排气阀, 进行 purge
	分析方法不合理	查阅文献,重新设计分析方法
	系统漏液	检查各流路,拧紧各处螺丝
	室内温度不稳	保持恒定的温度
	流动相混合不均匀	重新混合流动相
保留时间缩短	流动相污染或挥发	重新配制流动相,并进行超滤及超声脱气
	色谱柱选择不合理	选择合适的色谱柱
	色谱柱的固定相稳定性,如发生水解	与流动相类型和配体有关,选择合理的流动相
	色谱柱使用后污染	根据试剂情况,对色谱柱冲洗过夜
保留时间延长	流速增加	流速增加,检查泵,重新设定流速
	样品超载	降低样品量
	键合相流失	流动相 pH 值保持在 7.5; 检查装柱方向是否正确
保留时间缩短	流动相组成变化	防止流动相蒸发或沉淀
	温度增加	保持柱子恒温,避免放置于阳光照射到的地方
	流速下降,管路泄漏	更换泵密封圈,排除泵内气泡
保留时间延长	硅胶柱上活性点变化	用流动相改性剂(如加三乙胺),或采用碱至钝化柱
	流动相组成变化	防止流动相蒸发或沉淀
	温度降低	保持柱子恒温,避免放置于空调出风口

2 高效液相色谱仪的维护

2.1 清洗溶剂过滤头

溶剂过滤头可对流动相进行初步地过滤,但由于长时间浸泡或使用,容易堵塞、污染,造成泵压升高等一系列故障。因此,经常清洗溶剂过滤头是对高效液相色谱仪进行维护的重要步骤。

处理方法: 溶剂过滤头浸泡于 5% 硝酸溶液中,超声清洗 10 min,再用 HPLC 级水清洗数次即可(塑料过滤头不可超声);或将溶剂过滤头于 5% 硝酸溶液中浸泡过夜,轻轻震荡 3~5 次,再将过滤器用 HPLC 级水冲洗。待清洗完毕,将其安装在系统上,放入流动相,设流速为 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,打开排气阀,进行 Purge 清洗,如仍有气泡不断从过滤器冒出,继续将过滤器浸泡于 5% 硝酸溶液中,如没有气泡不断从过滤器中冒出,说明过滤器内部的霉菌菌团已被硝酸破坏,流动相可以流畅地通过过滤器。

2.2 清洗单向阀

实验所用流动相中若添加缓冲盐等物质,在有机相比例高的情况下容易析出盐颗粒,造成球座上有细微固体颗粒,导致宝石球和球座密封性不好,从而导致单向阀堵塞、污染。因此,在使用含缓冲盐类的流动相后,应及时冲洗泵或清洗单向阀,以保证单向阀的正常使用。

处理方法: 将入口单向阀和出口单向阀分别标注,然后置于预先加入纯净水的玻璃烧杯中,注意将宝石球向上放置,按以下顺序进行: 纯净水超声清洗 10min 以上,纯净水最

好事先加热至 50°C 左右,这样效果更好;换甲醇超声清洗 15min。

2.3 清洗进样阀

高校基础实验室大多配备手动进样阀,以锻炼学生的动手操作能力。实验完毕后,对进样阀的清洗亦不可疏忽,若不清洗干净,容易引起鬼峰、分叉峰等杂峰干扰样品出峰,影响结果的准确性。

处理方法: 若分析样品中不含缓冲盐,则用 10 mL 注射器吸取 10 倍定量环体积的 HPLC 级水,从进样口注射,使得水从废液瓶中流出,重复 3 次;而后用 HPLC 级甲醇同样方法进行冲洗 3 次即可。若分析样品中含有缓冲盐,则先用 10 mL 注射器吸取 10 倍定量环体积的 HPLC 级水,从进样口注射,使得水从废液瓶中流出,重复 10 次,保证彻底冲洗干净定量环中的缓冲盐;而后用 HPLC 级甲醇同样方法进行冲洗 3 次。

2.4 冲洗色谱柱

色谱柱是 HPLC 的核心部件,由于现今使用 HPLC 分析的样品种类繁多,组成复杂,色谱柱极易被污染、堵塞,造成柱压升高、峰形改变等故障。因此,如何对色谱柱进行维护方面,延长其使用效率及寿命具有十分重要的现实意义。

处理方法: 做完试验,及时用适当溶剂冲洗柱子,尤其是对过夜的柱子,一定要用足量的 HPLC 级水(忌纯水,纯水最大比例为 95:5 水-甲醇)彻底冲洗干净其中的盐类,再用甲醇或乙腈冲洗,反相柱保存在乙腈中,正相柱保存在非极性有机溶剂(如己烷)中。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,冲洗时间大于 1 h。

2.5 清洗检测池

流动相中含有缓冲盐或样品中含有杂质,易造成检测池中污染、堵塞,引起基线不稳、漂移或是峰形过小、峰分叉等问题。因此,定期对检测池进行清洗可提高谱图质量,延长高效液相色谱仪的使用寿命。

处理方法:用注射器抽 10 mL 异丙醇冲洗,去掉流动相残留;再抽 10 mL HPLC 级纯水冲洗检测池;而后抽取 10 mL $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸,冲洗检测池去掉沉积物,操作此步骤应十分小心;最后至少用 100 mL HPLC 级纯水正向冲洗检测池。

为了减少上述操作的麻烦,清洗更充分,可采用以下步骤^[16]:准备一清洗瓶,将清洗瓶放置于高于检测池 40 cm 的地方;拆下柱子,在检测器出口处接一根约 50 cm 长的聚乙烯管;将管子浸入清洗瓶中;然后利用重力使清洗液自然流经池,并在检测器进口处用洗耳球吸液。冲洗溶液顺序为 50 mL 异丙醇—50 mL 蒸馏水—250 mL $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸—100 mL 蒸馏水。用此法冲洗不需要拆开池,无损于管路,因此可用较大体积的清洗液缓慢冲洗。

参考文献

[1] 吉艳彬,孙 瑶,王春华,等. HPLC 法检测甘草中甘草次酸的含量[J]. 山东化工, 2013, 42(10): 68 - 70.

[2] 舒孟英. 洛伐他汀中有关物质甲酸的 HPLC 测定[J]. 山东化工, 2013, 42(4): 72 - 76.

[3] 陈 英,孙婉洁,陈安敏,等. HPLC 法测定氟苯尼考原料甲磺胺的相关物质[J]. 山东化工, 2014, 43(1): 67 - 68.

[4] 于春霞,王爱青,王 玮,等. 高效液相色谱法测定肾炎解热片中连翘苷的含量[J]. 山东化工, 2011, 40(11): 36 - 38.

[5] 付 建,苏贵勇,赵海桥,等. HPLC 法测定左乙拉西坦

片的右旋异构体[J]. 山东化工, 2014, 43(4): 87 - 91.

[6] 仲新华,王纯利,王文全,等. 煤化工废水中硝基苯胺类污染物的 HPLC 测定[J]. 环境保护科学, 2011, 37(6): 59 - 62.

[7] 田志铭. 高效液相色谱柱切换技术在油相内石油磺酸盐分析中的应用[J]. 油气地质与采收率, 2006, 13(5): 81 - 82.

[8] 张艳丽,金艳春,王海君,等. 高效液相色谱法测定柴油中芳烃含量[J]. 炼油与化工, 2006, 17(2): 52 - 53.

[9] 厉将斌,张 壮,李曰庆,等. 反相高效液相色谱法测定兔血清中小檗碱浓度[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3): 27 - 29.

[10] 杨 娟,王 兴,李晓倩,等. RP - HPLC 检测大鼠大血管中异钩藤碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 235 - 238.

[11] 闫 寒,付 衍,彭 娟,等. 大鼠含药血清中芍药苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 89 - 91.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

[13] 巩克民,林 锐,季宏建,等. 高效液相色谱的优化与维护[J]. 分析仪器, 2012(6): 96 - 98.

[14] 刘 萍,侯西成,郝满良,等. 高效液相色谱仪使用中常见的问题及解决方法[J]. 饲料博览, 2007(1): 34 - 36.

[15] 王 利,张亚东,薛 永,等. 岛津 LC - 10AT 型高效液相色谱仪常见故障及解决方法[J]. 中外健康文摘, 2010, 34(7): 437 - 437.

[16] 徐秀珍. 高效液相色谱仪常见故障及维护与保养[J]. 中国新技术新产品, 2010(12): 74.

(本文文献格式: 徐晓玲,楼雪芳. 高效液相色谱仪使用中的常见故障及维护方法[J]. 山东化工, 2014, 43(9): 43 - 48.)

(上接第 42 页)

研究还处于基础研究阶段,本论文对电化学生物传感器做了简要介绍,着重讲述纳米材料在电化学生物传感器领域的应用,旨在启发更多读者对该领域进行探索。

参考文献

[1] 龚竹青,王志兴. 现代电化学[M]. 长沙: 中南大学出版社, 2010: 164 - 169, 244 - 258.

[2] 谢乃贤. 电世界的奇葩,话说生物电化学[M]. 湖南: 湖南教育出版社, 1998: 137 - 169.

[3] 左国防,王小芳. 生物电化学与电化学生物传感研究进展[J]. 仪表技术与传感器, 2010(7): 16 - 18.

[4] 王宗花,郭新美,夏建飞,等. 基于纳米材料电化学生物传感器的研究进展[J]. 分析测试学报, 2011, 30(11): 1216 - 1223.

[5] 赵晓琴,陈金媛,宋莉莉. 纳米二氧化钛管电化学生物传感器用于测定水体中微囊藻毒素[J]. 浙江工业大学学报, 2012, 40(2): 148 - 151.

[6] 蒋 文,袁 若. 纳米材料在电化学生物传感器及生物电分析领域中的应用[J]. 分析测试学报, 2012, 30(11): 1200 - 1206.

[7] 王玲玲,余 晟,余 萌. 基于石墨烯 - 壳聚糖/纳米金的酪蛋白电化学免疫传感器[J]. 信阳师范学院学报, 2012, 25(2): 229 - 232.

[8] Wang J, Liu G D, Polsky R, et al. Electrochemical Communication[J]. 2002(4): 722 - 726.

[9] Wang J, Liu G. D., Merkoci A. American Chemical Society[J]. 2003, 125(11): 3214 - 3215.

[10] 颜 妍,王正武,赵波. 纳米材料构建的电化学生物传感器及其应用研究进展[J]. 南京晓庄学院学报, 2011, 27(3): 41 - 45.

(本文文献格式: 谷建华,刘青霞. 纳米材料在电化学生物传感器方面的研究进展与应用[J]. 山东化工, 2014, 43(9): 41 - 48.)