

HPLC 的正确使用和科学保养

- 1、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。
 - 2、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。
 - 3、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 试剂出厂前已用 $0.02\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤）。对流动相一定要脱气。
 - 4、每天开始使用仪器，注意放空排气，确保泵头、流动池以及其它流路系统中无气泡存在。
 - 5、珍惜保护色谱柱，避免柱头突然产生大的波动，扰动损伤柱床。如避免泵启动过速、升压过快、样品阀搬动过慢所造成的柱压大的波动。
 - 6、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。
 - 7、避免超负荷进样，对 $250\times 4.6\text{mm}$ 的柱子，绝对进样量应不超过 $100\ \mu\text{g}$ 。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。
 - 8、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。
 - 9、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。
 - 10、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。
 - 11、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。
 - 12、对于阻塞或受伤严重的柱子，必要时，可卸下不锈钢滤板，超声洗去滤板阻塞物，对塌陷污染的柱床进行清除、填充、修补工作，此举可使柱效恢复到一定程度（80%），有继续使用的价值。
 - 13、色谱仪检测器输出与积分仪（处理机）要匹配，要合理设置参数如斜率、半峰宽、阈值、AUFs 值、衰减等。将适宜的进样量和合适的参数结合起来，使主峰峰高达到记录仪满量程的 80%左右。
 - 14、用 HPLC 分析酸碱性物质，由于吸附作用（次级保留）使峰开拖尾。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% 有醋酸。（2）分析碱性物质，可加入 $10\text{--}20\text{mmol/L}$ 三乙胺。（3）酸碱物质混为一体，可同时加入 1% 的醋酸和 $10\text{--}20\text{mmol/L}$ 三乙胺

高效液相色谱仪的使用保养及常见问题解决方法

一. HPLC 的正确使用

- 1、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。
- 2、定期在稀硝酸溶液中超声、清洗过滤器，保持过滤器畅通无阻。（溶剂

过滤器)

3、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 试剂出厂前已用 $0.02\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤）。对流动相一定要脱气

常用的脱气方法有：加热煮沸、抽真空、超声、吹氮等。对混合溶剂，若采用抽气或煮沸法，则需要考虑低沸点溶剂挥发造成的组成变化。超声脱气比较好，10~20 分钟的超声处理对许多有机溶剂或有机溶剂/水混合液的脱气是足够了（一般 500ml 溶液需超声 20~30min 方可），此法不影响溶剂组成。超声时应注意避免溶剂瓶与超声槽底部或壁接触，以免玻璃瓶破裂，容器内液面不要高出水面太多。离线（系统外）脱气法不能维持溶剂的脱气状态，在你停止脱气后，气体立即开始回到溶剂中。在 1~4 小时内，溶剂又将被环境气体所饱和。

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

5、珍惜保护色谱柱，避免柱头突然产生大的波动，扰动损伤柱床。如避免泵启动过速、升压过快、样品阀搬动过慢所造成的柱压大的波动。

6、采用保护柱，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。

7、避免超负荷进样，对 $250\times 4.6\text{mm}$ 的柱子，绝对进样量应不超过 $100\ \mu\text{g}$ 。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。

8、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，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。

10、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。

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

二. 常见问题解决方法

1 针对柱压问题（表 1）

柱压问题是使用高效液相色谱过程中需要密切注意的地方，柱压的稳定与色谱图峰形的好坏、柱效、分离效果及保留时间等密切相关。所谓柱压稳定并不是指压力值稳定于一个恒定值，而是指压力在波动范围。

柱压不稳定，原因可能有：

- a 有空气，解决的办法是清除泵内空气，对溶剂进行脱气处理；
- b 比例阀失效，更换比例阀即可。
- c 泵密封垫损坏，更换密封垫即可。

- d 溶剂中的气泡，解决的办法是对溶剂脱气，必要时改变脱气方法；
 - e 系统检漏，找出漏点，密封即可。
 - f 梯度洗脱，这时压力波动是正常的。
-

但是在使用梯度洗脱时，进柱压的平稳缓慢的变化是允许的。

2 针对异常色谱峰问题

异常的色谱峰指的是色谱图中无峰或出现负峰、宽峰、双峰、肩峰、峰形不对称等情况。

3 高效液相色谱仪的保养

3.1 HPLC 的日常操作条件

工作温度 10~30℃；相对湿度<80%；最好是恒温、恒湿，远离高电干扰、高振动设备。

3.2 泵的保养

使用流动相尽量要清洁；进液处的沙芯过滤头要经常清洗；流动相交换时要防止沉淀；避免泵内堵塞或有气泡。

3.3 进样器的保养

每次分析结束后，要反复冲洗进样口，防止样品的交叉污染。

3.4 柱的保养

柱子在任何情况下不能碰撞、弯曲或强烈震动；当柱子和色谱仪连接时，阀门或管路一定要清洗干净；要注意流动相的脱气；避免使用高粘度的溶剂作为流动相；进样样品要提纯；严格控制进样量；每天分析工作结束后，要清洗进样阀中残留的样品；每天分析测定结束后，都要用适当的溶剂来清洗柱；若分析柱长期不使用，应用适当有机溶剂保存并封闭。

正确使用缓冲盐：

正确使用缓冲盐的目的是防止缓冲盐的析出，可归结为一句话：使用前要过渡，使用后要冲洗。具体方法为：

使用缓冲盐前要用过渡流动相以 1.0mL/min 的流速冲洗 20-30 倍的柱体积，然后再使用含有缓冲盐的流动相；使用后除去的方法为用过渡流动相以 1.0mL/min 流速冲洗 30 倍柱体积，然后以纯有机溶剂冲洗 30 倍柱体积保存。

过渡流动相是指有机相和水相组成与分析流动相相同，但是不含缓冲盐的溶液。

4 检测器(UV)的保养

紫外灯的保养要在分析前、柱平衡得差不多时，打开检测器；在分析完成后，马上关闭检测器。同时样品池要保养。