

高效液相色谱仪使用过程中常见问题及其解决方法

陈 莲 高 洪 肖 啸

高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是近 30 年发展起来的一种具有高灵敏度、高选择性的高效快速分离分析技术。它既能用于微量组分的分析测定, 又能用于大量的制备分离, 灵活多样, 其应用范围已超过其它各种分离方法, 尤其在生化医药样品的分析分离方面更能充分发挥它的特长, 为推动这些领域的进步和发展作出了巨大贡献。

液相色谱在使用过程中常会出现一些影响分析结果的小问题, 如果使用人员了解常见问题及其成

因和相关的解决方法, 能做到早预防、勤维护, 会使分析结果保持较好的稳定性与较高的精确性。

1 液相色谱仪系统

液相色谱仪主要由贮液瓶、泵、进样器、柱、柱温箱、检测器、数据处理系统组成(如图 1 所示)。对于整个系统而言, 柱子、泵和检测器是核心部件, 同时也是容易出事故的主要场所。

2 常见问题及解决方法

2.1 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

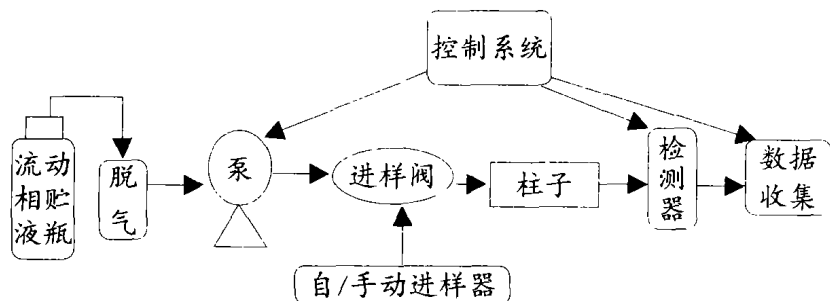


图 1 系统结构

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, 而是指压力波动范围在 50PSI 之间。压力过高、过低及波动较大都属于柱压问题, 但柱压的高低与色谱柱的种类、品牌、液相系统本身及使用的流动相种类相联系。值得注意的是在使用梯度洗脱时, 进柱压的平稳缓慢的变化是允许的。

陈莲, 云南农业大学动物科学技术学院, 在读硕士, 650201, 云南昆明。

高洪、肖啸, 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2005-04-21

在实际应用中柱压过高可从以下几个方面来考虑^[1]。首先考虑柱子是否被堵, 此时可更换一根新柱子进行检测。

2.2 针对保留时间漂移的问题^[2-3](表 2)

保留时间的改变是很多液相色谱使用者常碰到的问题, 其包括了保留时间增大和减小。它的产生与很多原因有关。

2.3 针对异常色谱峰问题^[2-4]

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。具体情况与原因分析如表 3。

3 高效液相色谱仪的保养^[5-7]

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

表 1 柱压问题

问题	解决方法	出现现象
色谱柱被堵塞	更换新的色谱柱	柱压升高
流速设定是否正确	重新设定正确流量	柱压升高
流动相比比是否正确	不同配比的流动相其粘度系数不相同,较高粘度的流动相相应的系统压力也大,如果可能更换成粘度较小的溶剂或重新设定配比。	柱压升高
系统压力零点飘移	调节压力传感器的零点	柱压升高
阻尼器堵塞	拆下后进行超声波清洗或更换新的阻尼器	柱压升高
进样器堵塞	参见说明书进行清洗	柱压升高
管路或连接口堵塞	更换被堵塞管路或按说明书进行清洗	柱压升高
压力传感器故障	与供应商联系,进行维修	柱压升高或降低或无柱压
没有流动相流出	检查储液瓶中是否有流动相,沉子是否浸没在流动相中,泵是否运行	柱压降低
系统存在漏液	检查各部件的连接点,进行再次固定	柱压降低
参比阀未关闭	将流速降低后关闭参比阀	柱压降低或没有柱压
系统管路中存在气泡	重新进行排气操作	柱压不稳
沉子表面的小孔被堵	将沉子取下后进行超声波清洗	柱压在较大范围内波动

表 2 保留时间漂移问题

可能原因	解决方法
温度变化	设定一个稳定的恒定的温度,而且当室温较所需温度大时要注意提高柱温
流量变化	在正确使用流速与流动相的前提下检查泵是否存在问题,比如漏液与在线混合的准确性
流动相的问题	使用预混合则要注意每次配液的准确性,精密度与 pH 值的变化;有可能是流动相被污染或者加入的添加剂对被测组分的干扰
色谱柱被污染	正/反相冲洗色谱柱或更换新色谱柱
梯度滞后时间设置不正确	检查泵和流路系统维护记录,确定很多系统最后使用之前有无调整。如果有变化,重新计算新的梯度滞后体积
色谱柱使用问题	不同的色谱柱尺寸与填料对同一物质的保留时间是不同的,同一批样品的分析最好使用同一色谱柱进行分析
系统不平衡	应使用充足时间来平衡整个系统,特别在色谱柱第一次使用离子对试剂时,要有充足时间和流动相体积来平衡色谱柱,每次开机使用时平衡时间至少为 0.5~1h,在改变流动相时也需要 0.5h 来重新平衡柱子

表 3 异常色谱峰问题

出现情况	问题分析
色谱图中未出峰	系统未进样或样品被分解;泵未输送流动相或流动相使用不正确;检测器设置不正确。针对以上情况成因作相应调整即可
一个峰或几个峰是负峰	流动相吸收本底高;进样过程中进入空气;样品组分的吸收低于流动相的吸收
所有峰均为负峰	信号电缆接反或检测器输出极性设置颠倒;光学装置尚未达到平衡
所有峰均为宽峰	系统未达到平衡;溶解样品的溶剂极性大于流动相极性;色谱柱尺寸及类型选择不正确;色谱柱或保护柱被污染或柱效降低;由于温度变化所引起
所出峰比预想的小	样品粘度过大;进样器故障或进样体积误差;检测器设置不正确,定量环体积不正确;检测池被污染;检测器灯出现故障
出现双峰或肩峰	进样量过大;样品浓度过高;保护柱或色谱柱柱头堵塞;保护柱或色谱柱污染或失效;柱塌陷或形成短通道
前伸峰	进样量或样品浓度过高;溶解样品的溶剂极性较流动相极性;保护柱或色谱柱污染或失效
拖尾峰	柱超载,降低样品量,增加柱直径采用较高容量的固定相;峰干扰,对样品进行清洁过滤,调整流动相种类或配比;排除硅羟基作用,可加入三乙胺,用碱致钝化柱增加缓冲液或盐的浓度,降低流动相 pH 值;柱内烧结不锈钢失效,更换烧结不锈钢,增加在线过滤器,对样品进行过滤;使体积或柱外体积过大,将连接点降至最低,尽可能使用内径较细的连接管;柱效下降,更换柱子,采用保护柱,对柱子进行再生
出现平头峰	检测器设置不正确;进样体积太大或样品浓度太高
出现鬼峰	可能为上次样品的残余。在每次进完样后需要用充足的时间来平衡和清洗整个系统;样品中存在未知物,改进样品的预处理;流动相被污染,更换新流动相,尽可能做到流动相现配现用,隔夜的流动相应放入冰箱储存,再次使用时要进行过滤,尽可能使用 HPLC 级试剂

温、恒湿,远离高电干扰、高振动设备。

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

3.2 泵的保养

葡萄糖转运蛋白的研究进展

赵小刚 安娟

存在于肠道、肾近端小管的葡萄糖转运载体对葡萄糖的吸收和重吸收具有很重要的作用。其中肠道葡萄糖主要是通过位于肠细胞膜上 Na^+ -依赖性葡萄糖转运载体(SGLT1)进行主动转运的。从十二指肠到回肠的肠轴上分布有不同的 SGLT 亚型,这些转运载体对葡萄糖和半乳糖的转运能力与它们的亲和力密切相关。这是由于 SGLTs 的结构及其理化性质不同而造成的,已有的研究已经证实动物日粮中的糖水平以及动物的年龄对小肠肠绒毛膜上皮细胞的 SGLTs 的数量和表达水平具有重要的调节作用。

1 肠道葡萄糖转运机制

赵小刚,中国科学院长沙亚热带农业生态研究所,在读博士,410125,长沙市马坡岭。

安娟,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2005-04-18

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,阀件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。

3.5 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。

4 结语

在高效液相色谱使用过程中故障排出时要遵守以下原则:一次只改变一个因素,从而确定假定因素

葡萄糖经肠腔进入血液是通过膜上两类特异性的载体相互结合而实现的。目前认为载体蛋白上存在着能与葡萄糖、 Na^+ 相结合的位点。当载体蛋白与葡萄糖、 Na^+ 相结合形成复合物,其构相发生了改变,并能迅速地将葡萄糖和 Na^+ 从管腔膜外侧转运到细胞内。进入细胞内的 Na^+ 再由细胞膜上的钠泵泵出,以维持管腔膜内外 Na^+ 的浓度差,管腔中的 Na^+ 易化扩散进入细胞内,葡萄糖被偶联转运进入细胞。当细胞内葡萄糖浓度升高以后,葡萄糖便顺着浓度差透过管膜上的载体易化扩散进入组织间液^[1]。

2 葡萄糖转运载体的种类及分布

葡萄糖转运载体主要有两大类:一类是 Na^+ -葡萄糖共转运载体 (Na^+ -glucose cotransporter, SGLTs)。该类载体能偶联葡萄糖直接沿着 Na^+ -电化学梯度摄入细胞,需要 Na^+ -K-ATP 酶的参与,因此称为主动转运。另一类是易化葡萄糖转运载体 (facilitateal glucose transporters, GLUTs)。该类载体使

与问题之间的联系;如果通过更换组件来排查故障时要注意将拆下的完好组件装回原位,从而避免浪费;养成良好的记录习惯,一个好的记录是成功地进行故障排除的关键。

总之,在使用高效液相色谱时一定要注意样品的前处理与仪器的正确操作和保养,仪器系统的干净是用好仪器和维护维修仪器的关键。

参考文献

- 1 李彤. 高效液相色谱仪的故障排除[J]. 色谱, 2003, 21(5): 535
- 2 张庆合, 李彤. 高效液相色谱仪的故障排除[J]. 色谱, 2004, 22(3): 297
- 3 伍音茵. 高效液相色谱仪的故障分析及处理对策[J]. 精细化工中间体, 2003, 33(2): 56-57
- 4 惠涛. 高效液相色谱仪常见故障及解决办法 [J]. 化学分析计量, 2002, 11(11): 40
- 5 杨进, 冯念伦. 高效液相色谱仪原理、临床应用及常见故障处理[J]. 医疗设备信息, 2001, (1): 18-19
- 6 姜维林, 姜胤. 高效液相色谱仪的正确使用与维护[J]. 实验技术与管理, 1999, 16(2): 114-117
- 7 卞慎之. 高效液相色谱仪维护及常规故障的判断[J]. 现代仪器使用与维修, 1996, (2): 25-26