

高效液相色谱仪操作三要点

高效液相色谱仪（HPLC）现已成为有机化学分析的重要手段之一。同样，在食品分析中，无论是残留分析还是成分分析，HPLC 也已成为不可或缺的分析仪器。和其它分析仪器一样，你若想让 HPLC 很好地为你工作、得到可靠的数据，首先你要保养好它，使它处于一个良好的待机状态，这样你操作它进行分析时就可以比较顺利地获得理想的结果。而且良好规范的操作习惯可以延长仪器使用寿命。大家在学校或接受仪器公司培训的时候，老师或工程师会提出很多的操作注意事项。但要是总结归纳一下，最重要的有三点：脱气、过滤和冲洗。本文围绕这三点进行讨论，给新从事 HPLC 分析的工作者一点操作建议，希望能对正确的操作仪器有一点帮助。

脱气

流动相脱气对于避免 HPLC 系统出问题，顺利得到一个理想的数据是一个很有效的措施。HPLC 系统内是不能够有气泡存在的。HPLC 泵在输送液体时要产生很大的压力，由于气体的压缩比与液体相比大的多，因而当气泡存在时，你将观察到瞬间的流速降低和系统压力下降。如果这个气泡足够大，液相泵将不能输送任何溶剂，而且如果压力低于预先设定的压力低限，泵将停止工作。有些泵设计可以很好地排除气泡，而也有一些泵设计当气泡存在时将停止运转。

当一个气泡通过输液泵时，由于系统压力大，气泡通常会溶解在流动相溶液中，随流动相通过柱子。但是到达检测器流通池时系统压力又恢复到了大气压，因而气泡可能在检测器流通池中又显现，在色谱图上会出现不规则的毛刺。为解决这个问题，有些仪器公司设计一个反压控制器，这样可以在检测器出口提供足够的压力保持气泡始终溶解在流动相中直到它们流出检测器。当然，这个压力不能超过流通池所能承受的压力极限，否则可能损坏检测器。

紫外/可见光（UV/VIS）检测器的液相色谱图中的噪音毛刺通常是气泡进入并通过流通池的征兆。有些检测器对空气的存在也非常敏感，但表现出的征兆与 UV/VIS 不同，例如有报导说，当使用荧光（FL）检测器时，流动相中溶解氧的存在可能会使一些化合物失去荧光性。此外，对于利用待测物质在电极表面发生氧化还原反应引起电流变化而进行检测的电化学（EC）检测器，对流动相中的溶解氧的存在也非常灵敏。此外，气泡的存在有时还会导致保留时间不重现。

所以，必须注意消除流动相中的空气，并且还应避免空气由管路（如 PTFE 管）渗透进流动相中。

如果适当地关注在使用之前脱去流动相中溶解进的空气，上述这些问题均能避免，或把影响降至最低。常用的脱气方法有如下几种：

1. 吹氦脱气法。利用氦气在液体中溶解度比空气低的特性，在 0.1MPa 压力下，以约 60 mL/min 流速通入流动相储液容器中 10~15min，可以很有效地从流动相中排除溶解的空气，能排除接近 80% 的氧气。采用一个高效分布式喷射流装置，一体积的氦气可从流动相中将等体积的几乎全部气体排除。这意味着 1L 氦气通过 1L 流动相就可完成排气这个工作。这种脱气方法虽然好，但我们国内氦气价格较高，很少有实验室采用此方法。

2. 加热回流法。此法的脱气效果较好。在操作时要注意冷凝塔的冷却效率，否则溶剂会丢失，混合流动相的比例会有变化。

3. 抽真空脱气法。此法可使用真空泵，降压至 0.05~0.07MPa 即可除去溶解的气体。但是由于真空脱气会使混合溶剂组成发生变化，从而影响到实验的重现性，因此多用于单溶剂体系的简单分析。

4. 超声波脱气法。将欲脱气的流动相置于超声波清洗器中，用超声波震荡 10~20min。此法的脱气效果最差。

5. 在线脱气法。现在商品的 HPLC 仪器，均可配在线脱气机。在线脱气使用简单，低故障，有效。建议购买仪器时一定要购买，有的公司是作为选购件，所以与仪器公司谈配置时应与公司确认。

过滤

任何颗粒物进入 HPLC 系统后都会在柱子入口端被筛板挡住，最后的结果是将柱子堵塞，表现出的特征是系统压力增加并使色谱峰变形。因此，要采取各种预防措施，包括操作步骤和商品仪器自身的各种过滤设计，努力防止或减少颗粒物进入 HPLC 系统中，从而延长仪器和色谱柱的使用寿命，并提高数据的可靠性。在 HPLC 系统中，颗粒物的主要来源有三个途径：流动相、被测样品和仪器系统部件的磨损物。

▲流动相

如果流动相均由高效液相色谱级溶剂组成，流动相没有必要过滤。这是因为高效液相色谱级的有机溶剂，例如乙腈、甲醇等，在制造的工艺过程中都已经过了 0.2 μm 微孔滤膜过滤。同样的，无论你是买的 HPLC 级的水还是在实验室使用超纯水净化系统制备的水，最后一步也是通过 0.2 μm 微孔滤膜。然而，如果有任何一种缓冲液中加入了固体物，例如磷酸盐，流动相过滤将是必要的一个步骤。虽然缓冲盐可能是可溶解的、高纯的，但它还是可能含有颗粒物质，例如在盖试剂瓶的塑料内盖时，塑料瓶盖子与瓶口边缘挤压就会产生塑料颗粒。在这种情况下，添加的一种固体物可能完全溶解了，但是少量杂质颗粒存在于流动相中成为残渣。

流动相通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤对于从流动相中除去所有颗粒物是一个有效方法。0.2 μm 微孔滤膜也可以用，但是它们就这个应用而言并不比 0.45 μm 微孔滤膜更有效，而且它的过滤速度会更慢，特别是当实验室使用的试剂和水的质量不太好时。建议实验室在编写制定流动相制备标准操作程序（SOPs）时，可以借鉴国际上同类实验室的规定，即：

流动相制备仅采用 HPLC 级液体时不需要过滤，反之所有流动相组成在使用前必须过滤。

在连接储液瓶和泵的输液管的末端入口采用下沉式过滤器（常见材质有熔融玻璃砂芯滤板和微孔金属的两种）也是很重要的。这个过滤器的规格为≥10 μm 的微孔物质，所以它不能取代流动相过滤步骤，但是它能除去系统中的尘土并保证储液瓶、输液管使用的可靠性。

▲被测样品

液相系统中的第二个颗粒物来源是被测样品。一些实验室在将他们的样品放置在自动进样器盘（或手动进样）以前，所有样品都先通过一个 0.45 μm 针筒式过滤器过滤。这是一个有效除去被测样品中颗粒物的方法。但是这个过程也有一点需要关注：你使用了针筒式过滤器就不可能 100% 得到通过过滤器的被测样品，总会有或多或少的丢失。丢失来自这样几方面：过滤器滤膜的吸附、过滤器滤出的颗粒物上的吸附、针筒式滤膜过滤器与针筒连接处的渗漏等。如果有丢失，过滤后液体中被测物的含量或浓度与原基本样液的含量或浓度还相同吗？这个问题一般需要通过实验确认。确认这步是要增加工作量和费用的。过滤器的使用是一种消耗，每个过滤器的价格从几元到十几元。但在做食品中残留物分析时，由于基质大多比较复杂，所以过滤这步已成为不可或缺的一步。在实际分析工作中，一般检测每一组样品会带一个外标、一个添加回收或是质控样品，所以，只要最终检测时得到的信噪比能满足检出限要求，可将这步视为系统误差而忽略。

▲仪器系统部件的磨损物

最后，在 HPLC 系统中颗粒物的另一个主要来源是输液泵密封垫和进样阀旋转轴的磨损。关于输液泵密封垫的磨损更换有两种不同建议。

第一种建议认为，在一般实验室中输液泵密封垫通常使用寿命为六个月到一年，因此建议半年或一年更换这些密封垫，实验室应基于上述观点制定定期预防性维护计划。该观点认为：与输液泵密封垫颗粒堵塞柱子而更换新柱子的费用相比，更换密封垫的费用低些。一些输液泵有玻璃砂芯或筛网，可在流路中滤掉从泵密封垫磨损下来的颗粒物，防止这些颗粒物随流动相流至柱头。若有这种装置应查阅输液泵操作手册，查看推荐的这种过滤器清洗或更换的间隔。

另一种建议则认为，原装密封垫的密封效果最好，更换以后容易引起流动相渗漏。所以，只要不漏液就不要轻易更换密封垫。

两种说法都有其道理，具体如何操作，建议与仪器公司工程师沟通，各公司的仪器还是有些不同的。

自动进样器旋转轴的密封随着使用时间也会磨损，即便是高负荷的运转旋转轴密封垫也可以使用几年。如果你的自动进样器系统有计数进样阀转动次数的功能，你可以设定一个警铃当预设阀转动次数已达到时提醒你。曾有一种说法，进样器最多转动 20,000 次，这仅仅是进样 10000 个；但这似乎不是实验室涉及的常规样品分析使用寿命，它们的实际使用寿命会更长。旋转轴密封磨损后会渗液，比较明显的特征是同一样品多次进样后，峰面积值差别比较大（RSD>5%）。当然，输液泵的密封垫和旋转轴的密封垫磨损将增加更多研磨物在流动相中，加速对这些部件的损伤。此外，如果你日常运行的流动相有缓冲盐，如磷酸缓冲盐，密封垫的磨损会更快。

无论颗粒物源于何物，实验时都要将其除去。推荐在 HPLC 系统中采用一个 0.45 或 0.5 μm 的在线多孔过滤器，接在自动进样器和柱子之间，即使已使用了保护柱。这个在线过滤器将成为挡板代替柱头的滤板，而且如采用一个玻璃砂芯滤板，既便宜，更换又方便（几分钟就可更换）。若采用在线过滤，HPLC 系统检测每批样品开始前记录下压力值，当压力上升一定值，例如 25%或增加 500psi，应该更换玻璃砂芯滤板了，更换以后冲洗几分钟系统将恢复到原来的压力值。

冲洗

使 HPLC 系统良好运行的第三个要点是保持系统的清洁。你需要关注流动相流经该系统的所有地方，对于这些地方经常性的冲洗，将使你的系统保持在“Ready”状态。

▲流动相储液瓶

首先要经常清洗流动相储液瓶，或者每做一批新样品更换一次流动相。一个脏的储液瓶将会污染注入的流动相。建议储液瓶中缓冲液使用时间不要超过一周，而有机溶剂使用时间不要超过一个月。也有人建议储液瓶中保持用溶剂充满，直到更换分析方法储液瓶需更换新溶剂（流动相组成发生变化）时，将旧溶剂倒掉更换新溶剂，这样胜于将溶剂用完。但对于分析样品量少的实验室而言似乎有些浪费。仪器公司的工程师建议储水瓶的水要天天换，每周瓶子还应该用异丙醇清洗一次。有的实验室则在水里加入 0.1~1 mM 的甲酸抑制微生物的生长。这些做法看起来有些繁琐，但却能起到“磨刀不误砍柴工”作用。

▲泵

接下来要冲洗的是泵。千万不要一分析完冲几分钟后就停泵，特别是当流动相中含有难挥发的缓冲液（如磷酸盐）时。如果仪器不是连续使用，当流动相蒸发时，难挥发物就会粘在活塞密封垫的表面，难挥发物将形成固体物沉淀。这是泵密封垫磨损和单向阀渗漏的主要原因之一。所以，无论使用长短，在停泵以前一定要用非缓冲液流动相冲洗泵在半个小时以上，要是流动相中有难挥发缓冲盐则建议冲洗的时间应该更长些。

▲自动进样器

自动进样器也要按规定清洗。现在的仪器多配有自动进样器的冲洗液瓶，通常只要注意及时更换、补充冲洗液即可。自动进样器用的洗涤液也要采用与流动相相同的方式处理，并根据溶剂的有效期和规定，清洗储液瓶或更换洗涤液。现在的自动进样器设置、操作都很简单，如果时间允许（特别是利用夜间运行），每次分析完后设置进 1、2 针纯溶剂（如甲醇、乙腈），也是一个好做法。

▲色谱柱

对柱子的污染是随使用时间而增加。通常表现是：运行走基线时在记录的色谱图中基线噪音增加，泵压也增加。解决这个问题的最有效方法就是在每一批样品分析结束后或准备卸下柱子时用大量的流动相冲洗柱子（例如，甲醇、乙腈和水）。用梯度冲洗效果更好，具体的比例要根据柱子的说明书和性质而定。

▲检测器

如果是正常使用，检测器将依据其性质并按照说明书规定进行洗。例如 UV/VIS 检测器或 FL 检测器，在对柱子和系统进行冲洗时也就一同对检测器流通池中污染物进行了清洗。但是蒸发光检测器或质谱仪则需要按照说明书进行定期清洗。这些检测器在使用时会有难挥发污染物沉积，如质谱仪离子源的喷针、毛细管、锥孔板、预四极等部件，因而需要定期清洗。而且对联有这些检测器的系统冲洗时，最好与这些检测器断开，以减少对检测器的污染。

总之，实验室日常使用的液相色谱仪要是能认真做好这三项工作——脱气、过滤和冲洗，你的仪器可以得到良好的预防性维护，使用时就会感到比较顺手。当然，在实际操作时遇到的问题并没有这么简单，但这三个良好习惯将是正确操作、使用 HPLC 系统的基础。