

# 关于液相色谱仪日常维护及常见故障解决

# 一、液相色谱仪日常维护及注意事项

- ❖ 1 流动相
- ❖ 2 脱气机（在线）
- ❖ 3 泵（单元、二元、四元）
- ❖ 4 进样器（手动、自动）
- ❖ 5 色谱柱
- ❖ 6 检测器(VWD/DAD/FLD/RID...)



# 1 流动相

- 所用溶剂应为HPLC级，水应为二次超纯水；
- 所用溶剂应经过过滤。过滤水应使用水相滤膜，过滤有机相应使用有机相滤膜，不能混用，也不要认错。每一张滤膜只能用一次，不能重复使用。
- 如果没有在线脱气机，所用溶剂应经过超声脱气。
- 水易滋生藻类，避免直接照射，过滤后的水最好使用不要超过两天。
- 如果条件允许可向溶剂中加入0.001-0.0001M的叠氮化钠。
- 注意溶剂的相容性，避免使用不相容的溶剂。
- 避免使用强酸、强碱或有机氯等腐蚀性溶剂。
- 在溶剂瓶中的溶剂过滤头可能会堵塞，必要时小心拿下用强酸（35%硝酸）浸泡1小时，用水冲洗，但不要使用超声处理。



## 溶剂信息

### 避免使用下列对不锈钢有腐蚀性的溶剂：

卤化物碱金属溶液和相应的酸溶液。

高浓度的无机酸例如：硝酸和硫酸。

能够形成卤素自由基或酸的氯化试剂及其混合物。

含有过氧化物的色谱级醚必须用氧化铝干燥剂。

在有机溶剂中的有机酸溶液。

含有强络合剂的溶液。

四氯化碳和异丙醇或THF混合液。

# 溶剂截止波长

溶 剂	UV截止波长 (nm)
乙 睛	190
水	190
环 己 烷	195
己 烷	200
甲 醇	210
乙 醇	210
乙 醚	220
二氯甲烷	220
氯 仿	240
四氯化碳	265
四氢呋喃	280 (220)
甲 苯	285

在使用紫外检测器时，所用波长与所用溶剂的截止波长接近（或低于截止波长）时，容易产生噪音干扰，从而影响检测结果。

所以在使用紫外检测器时，所用波长应至少比所用溶剂的截止波长大20nm以上。



## 生色团和最大吸收波长

生色团	分子式	实例	最大吸收波长 (nm)
羰基 (酮)	$RR'C=O$	丙酮	271
羰基醛	$RHC=O$	乙醛	293
羧基	$RCOOH$	醋酸	271
酰胺	$RCONH_2$	乙酰胺	208
次乙基	$RCH=CHR$	乙烯	193
亚次乙基	$RC=CR$	乙炔	173
睛	$RC=N$	乙睛	<160
硝基	$RNO_2$	硝基甲烷	271

溶剂、PH、温度等都会影响生色团的最大吸收峰的强度和位置。



## 溶剂过滤

不干净的溶剂或在溶剂瓶中长菌的溶剂会阻塞溶剂过滤器，降低泵的操作性能。遵从下列建议可以提高性能，延长溶剂过滤器的寿命：

使用无菌溶剂瓶避免溶剂长菌。

用滤膜过滤溶剂去除微生物。

每两天更换或过滤溶剂。

避免溶剂瓶直接日照。

向溶剂中加入 0.0001-0.001M 的叠氮化钠。



## 选择合适的滤膜

- ： 聚四氟乙烯滤膜：适用于所有溶剂，酸和盐，并无任何可溶物。
  - ： 醋酸纤维滤膜：适用于水基溶剂，不适用于有机溶剂，推荐用于蛋白质和其相关的样品。
  - ： 尼龙66滤膜：适用于绝大多数有机溶剂和水溶液，可用于强酸、70%乙醇、二氯甲烷、不适用于DMF二甲基甲酰胺。
  - ： 再生纤维素滤膜：具有蛋白质吸收低，同样适用于水溶性样品和有机溶剂。
- 注意：1， 每张滤膜只能用一次。  
2， 水相和有机相不要搞混。

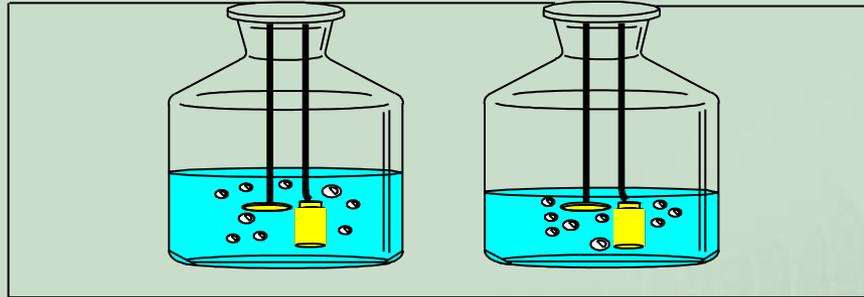


## 柱塞清洗附件Seal Wash

- ❖ HPLC使用缓冲溶液Buffer时，由于缓冲盐溶液存在高压盐析现象，析出的细小盐粒会损伤蓝宝石柱塞杆和密封垫，从而造成漏液等故障现象，因而建议选配柱塞清洗附件Seal Wash。
- ❖ 缓冲盐浓度大于0.01mol时，强烈建议选配在线的柱塞清洗附件Seal Wash。
- ❖ 清洗液配置：90%水+10%异丙醇溶液，流速为2-3滴/min。该混合液可抑制菌类生长和降低水的表面张力。清洗液虹吸流出，不能干涸。



## 2 脱气机



### 目的

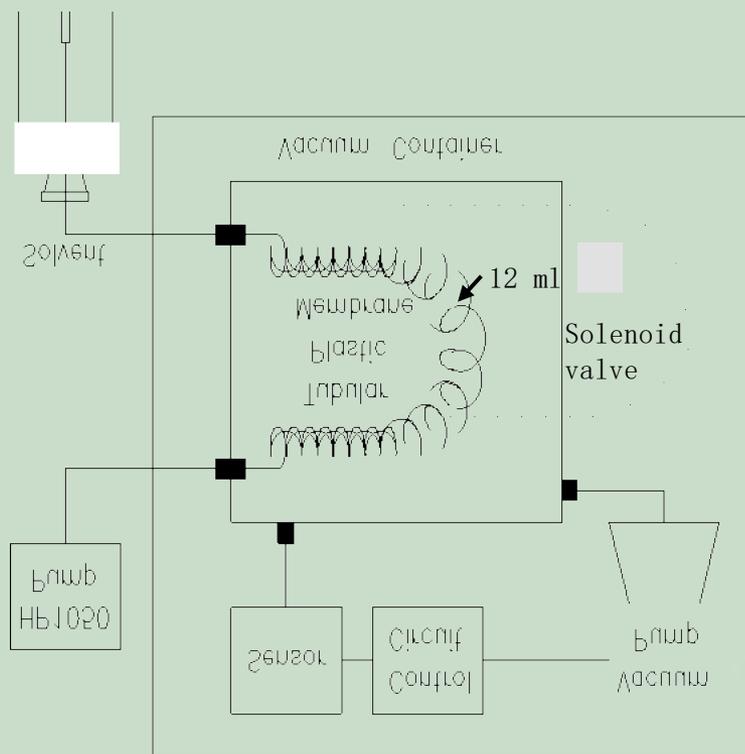
排除溶解在流动相中的氧气和氮气

### 脱气方法:

氦气脱气  
回流加热脱气  
真空脱气  
超声脱气

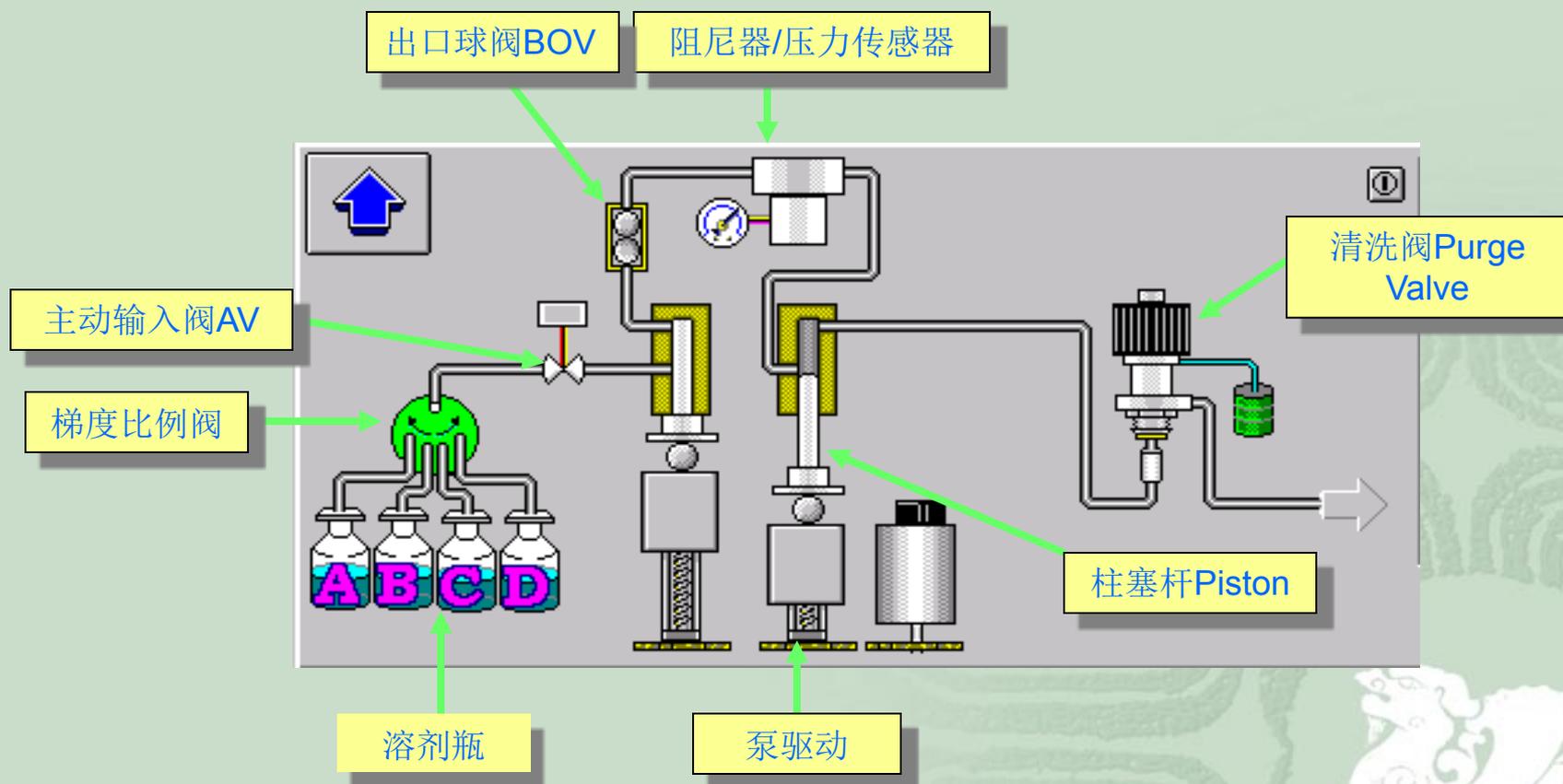


# 在线真空脱气机

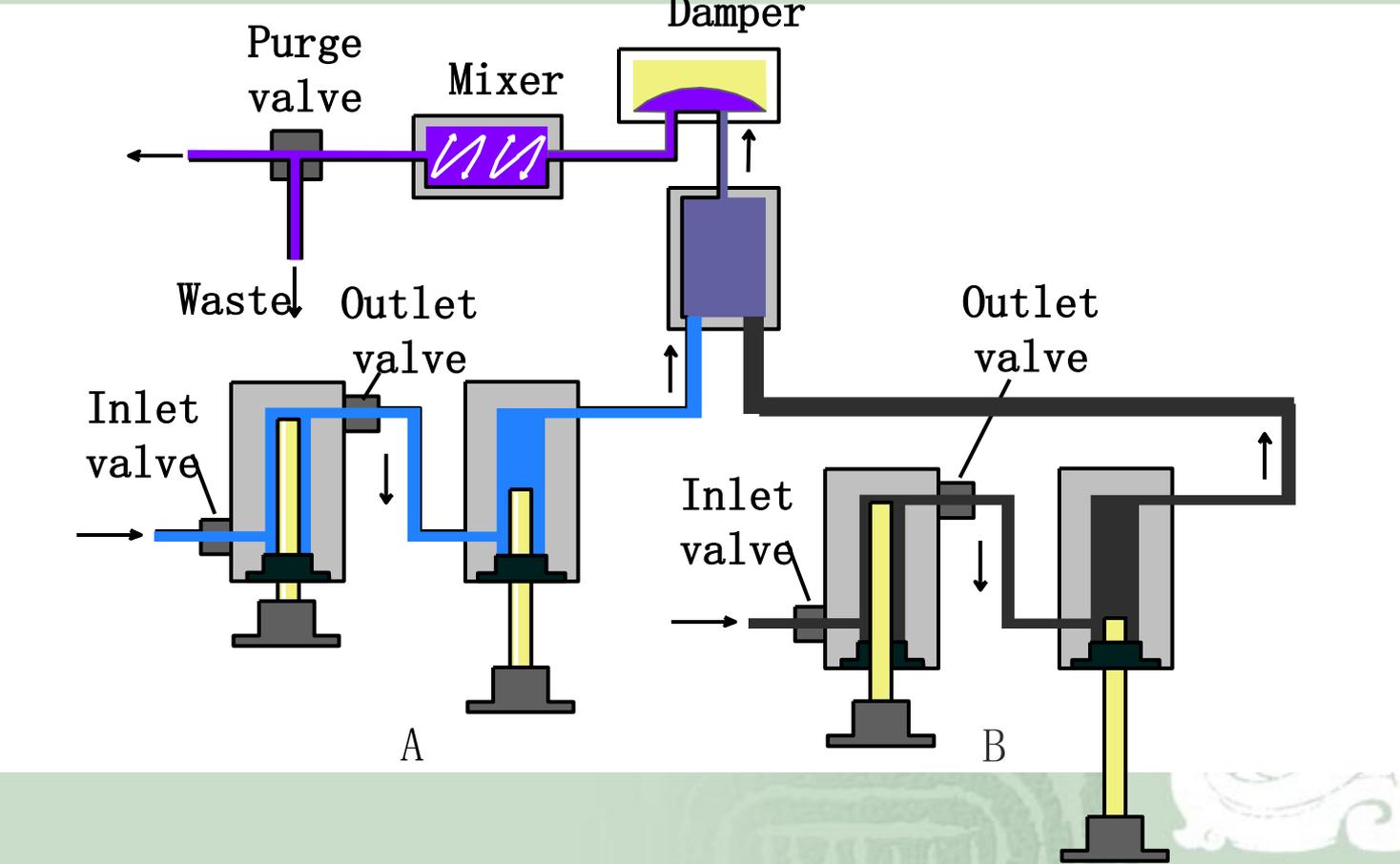


- i 为保证脱气机的良好使用性能，在下述情况下需要用注射器抽洗脱气机管路，每个通道使用不低于**30ml**的异丙醇。
- 1, 新的脱气机或新的管路；
  - 2, 更换了溶剂，尤其是缓冲盐与有机相之间、两个不相容流动相之间的互换时；
  - 3, 输液泵关闭了一段时间，或使用挥发性溶剂混合物。
  - 4, 完成上述操作后，打开清洗阀，用大流量冲洗，**5ml/min**。

# 3 泵



# 二元泵工作原理



## 泵的注意事项

1. 溶剂的过滤、脱气；
2. 避免使用腐蚀性溶剂；
3. 在满足分析的前提下，尽可能使用较低的流速—较低的系统压力。
4. 更换过滤白头；
5. 考虑溶剂的相容性；
6. 尽可能使用新鲜的水；
7. 使用0.01M以上浓度的缓冲溶液要选配柱塞清洗组件，清洗液不能干涸。
8. 使用正相溶剂比如环己烷时，建议使用聚乙烯密封垫，在0—200Bar下使用聚乙烯密封垫比标准密封垫更耐磨损。

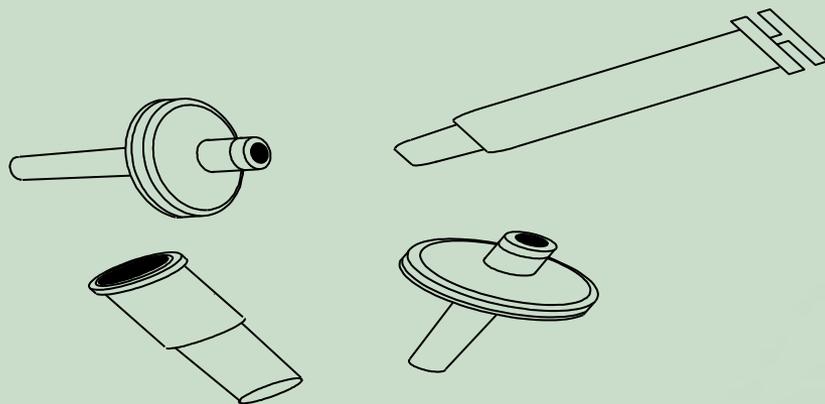
### i 四元泵：

四元泵多通道比例阀MCGV使用时注意，缓冲溶液要放在下面通道，以避免盐颗粒析出。

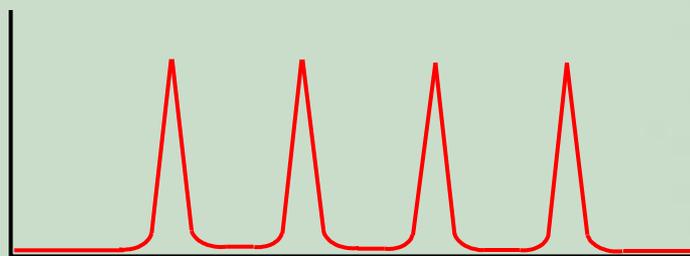
### 二元泵：

设置压缩因子补偿，以达到最佳比例效果。

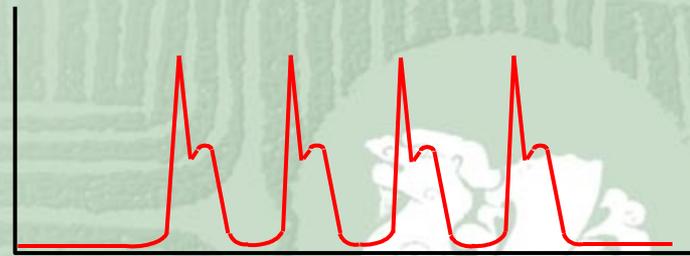
## 4 进样器



- 过滤样品，确保样品中不含固体颗粒
- 用流动相或比流动相弱的溶剂溶解样品
- 进样量尽量小



样品完全溶解在流动相中

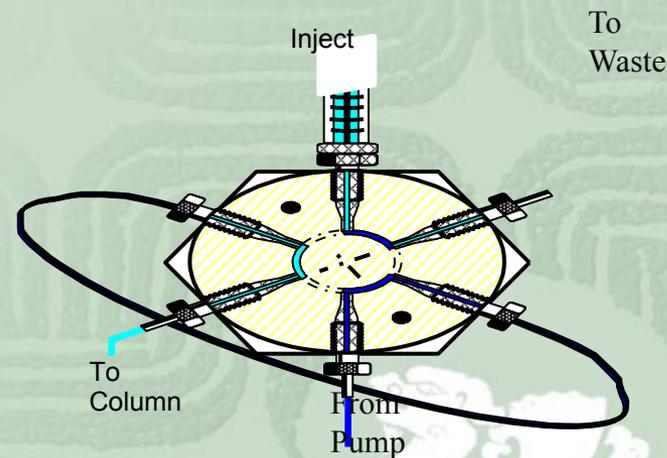
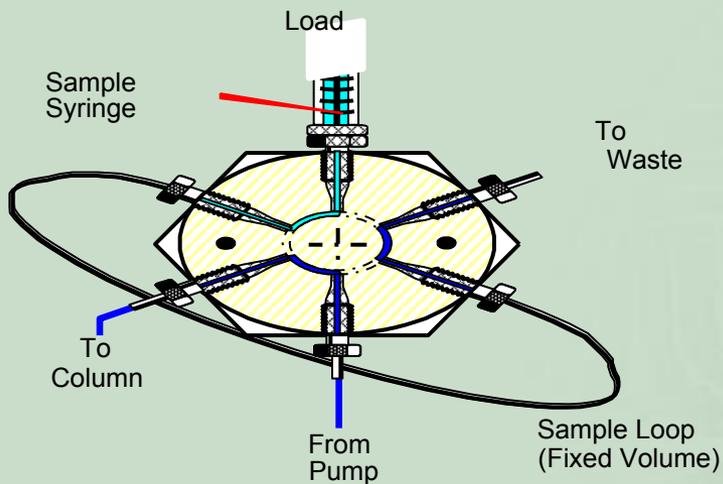


样品没有完全溶解

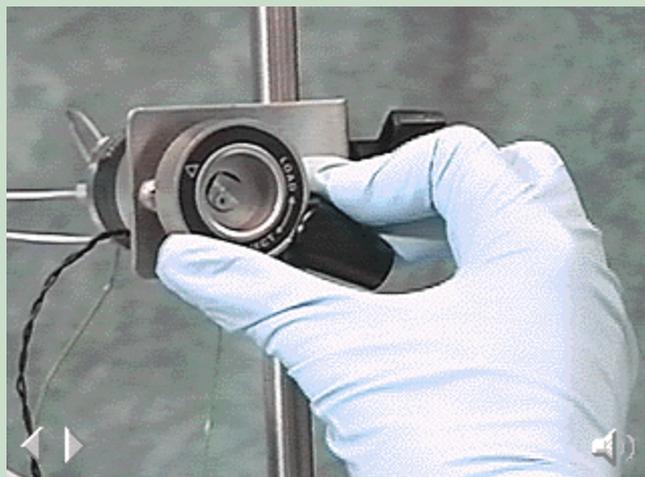
# 六通阀

## 手动进样器

手动进样阀 - 六通阀



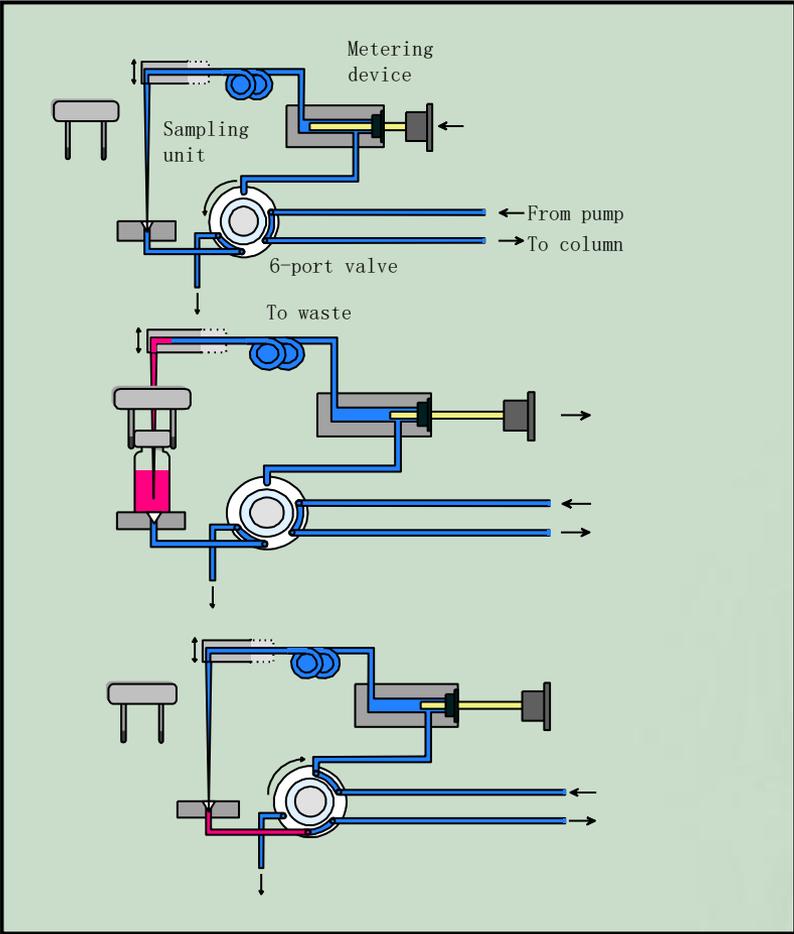
# 手动进样器



- ❖ 样品要干净、经过过滤。
- ❖ 合适的进样体积，比如定量环为20ul，进样体积应为0—10ul，或者20ul，进样20ul时注射样品量应至少60ul以上。
- ❖ 定期清洗进样阀，清洗过程如下：
  - 1，将进样阀旋至Inject位置；
  - 2，用带有专用头的注射器用纯水约20—30ml冲洗进样阀；
  - 3，将进样阀旋至Load位置。参考左图。



# 自动进样器



准备位置

调用样品瓶  
吸样品

进样和运行位置

标准进样过程 ...



# 自动进样器

- 样品要干净、经过过滤。
  - 1 洗针：把样品残留降低到最小限度，可降低进样的记忆效应，洗针瓶最好不要加瓶垫。
  - 1 多次吸液
- 用于进样量大于100 $\mu$ l



# 色谱柱保护

过滤所有的溶剂和样品

使用保护柱

仪器在使用完毕，要冲洗整个系统，移走系统中的缓冲液。

柱子在不使用时，两端密封保存

在适当的溶剂中保存柱子

注意色谱柱的pH值使用范围

不要高压冲洗柱子

不要高温下过长时间使用硅胶键合相



# 色谱柱的再生

- 进行色谱柱再生时，应使用一个廉价的泵，我们建议最好不要使用您的高效液相色谱仪上的泵。
- 色谱柱尺寸 柱体积 所用溶剂的体积
- 125-4 1.6ml 30ml
- 250-4 3.2ml 60ml
- 250-10 -20ml 400ml
- 请根据下表选择您的再生方法：
- 极性固定相（如Si，NH<sub>2</sub>\*，DIOL基色谱填料）的再生：  
正庚烷→氯仿→乙酸乙酯→丙酮→乙醇→水\*\*
- 非极性固定相（如反相色谱填料RP-18，RP-8，CN等）的再生：  
水→乙腈→氯仿（或异丙醇）→乙腈→水
- 0.05M稀硫酸可以用来清洗已污染的色谱柱
- 注意：  
在对NH<sub>2</sub>改性的色谱柱进行再生时，由于NH<sub>2</sub>可能成铵根离子的形式存在，因此应该在水洗后用0.1M的氨水冲洗，然后再用水冲洗至碱溶液完全流出。
- \*\*如果简单的有机溶剂/水的处理不能够完全洗去硅胶表面吸附的杂质，用0.05M稀硫酸冲洗非常有效。

## 6 检测器

- i VWD的光源—氙灯有一定的半衰期，一般为1000小时左右，所以在没有样品分析任务时要关闭氙灯，以延长氙灯的使用寿命。
- i 流动池污染后，会造成灵敏度下降、噪声加大，应避免脏的样品进入流动池。定期使用异丙醇冲洗系统对保持流动池性能有一定好处。
- i 更换氙灯。



## 二、液相色谱仪故障分析

能引起HPLC发生问题的潜在因素：

工作环境

流动相

进样器

在线过滤器

色谱柱

数据处理装置

电源及地线

泵

保护柱

连接管路

检测器

操作



## 逻辑判断及处理

### 问题

#### 化学品

- \*色谱柱/保护柱
- \*溶液
- \*样品

#### 环境

- \*电源
- \*地线
- \*温度
- \*湿度
- \*清洁程度

#### 机器

- \*泵
- \*进样器
- \*检测器
- \*数据处理单元



# 液相色谱仪器出现故障可以从多方面入手

- 1.从部件的运转情况推测，如压力、流速的变化
- 2.从色谱图的异常情况推测，如出峰时间、峰形
- 3.从数据结果中分析



# 典型故障分析及实例 **基线噪声**

流动相内含有空气 - **脱气处理**

检测池内有气泡 - **冲洗检测池或在检测池出口接一段内径0.009“的管子(此法只适用于耐压检测器 !!!)**

色谱柱内有未洗脱尽的组份 - **洗脱色谱柱.**

系统有漏液之处 - **检漏并处理**

电噪声 - **去除噪声源, 信号线屏蔽, 检查系统接地状况**

检测器光源灯能量低 - **更换光源灯**

检测池污染 - **冲洗检测池**



## 基线周期性噪声

绝大多数情况下是来源于泵的问题

泵头内有气泡 - 流动相脱气，泵头排气(注意正确的排气方法)

泵进出口阀有问题 - 更换阀组件

柱塞杆有问题 - 更换柱塞杆及其密封圈

溶剂混合不良 - 加装混合器

电噪声 - 去除噪声源



## 非周期性噪声

气泡 — 流动相脱气

检测池内有气泡 — 流动相脱气，检测池后加适当反压

系统有漏液之处 — 检漏并处理

溶剂混合不良 — 加装混合器

电噪声 — 去除噪声源



## 基线漂移

梯度系统 - 溶剂A于溶剂B的ABS值相差大 - 试用另种溶剂或使用基线扣除法

色谱柱有其他组份被洗脱出 - 冲洗, 直至基线稳定

溶剂发生变化 (如溶入气体或溶剂挥发) - 氦气或脱气机脱气, 溶剂瓶避光, 密封(但要 注意防止溶剂瓶内产生负压)

系统有漏液之处 - 检漏并处理

环境温度影响 (尤其对示差, 电导, 电化学检测) - 室温, 柱温, 检测池温度控制

反压变化 - 溶剂和样品过滤. 注意黏度过大的样品

## 基线周期性波动

温度影响 — 环境温度及检测池温度控制. 注意空调机的影响

溶剂混合不良 — 加装混合器

流动相脱气不良 — 流动相脱气

供电电源的影响

泵不良 — 检修处理



## 基线有无规律的尖峰

气泡 — 溶剂脱气

电路接触不良 — 保证清洁，接线牢固，接点无氧化

光源灯不良 — 检查处理

电噪声 — 去除噪声源



## 无样品峰

未进样

泵未工作

漏液

流动相或样品的问题

柱子或保护柱的问题

数据采集装置的问题或其与检测器连线的问题

最简单快捷的检查 - 泵是否工作, 系统是否漏液, 进一针丙酮溶液检查检测器读数及数据单元是否有响应

## 负峰

组份的ABS值小于溶剂的ABS值

气泡通过了检测池

对RI检测器不一定是有了问题，很可能是正常的

所有峰都是负峰 - 可能是检测器输出与数据单元连线  
极性接反



## 峰形不好 - 如峰拖尾, 峰分叉, 出肩膀

在线过滤器 (IN LINE FILTER) 污染 (通常会伴随有系统压力升高之现象)

色谱柱污染

系统有不正常的死体积 - 检查管路连接是否正确 - 内径, 接头

保护柱 (GUARD COLUMN) 污染

溶剂不好或使用不对

样品不好

色谱柱坏了 - \* PH  $< 2$  或  $> 8$  会破坏柱子内的填料  
\* 流速变化率太大 - 操作上应注意



# 系统性能：重复性差

两个要点- 峰保留时间 (RT) 重现性, 峰面积重现性

**RT重现性不好** - 无规律变化 : \*流量不稳 - 气泡, 漏液, 泵  
\*温度影响

有规律的变化, 且逐渐趋于稳定 : 系统未充分平衡

**RT 重现性好, 但峰面积重现性不好** - \*进样量-选用定量管进样时, 进样  
体积应大于3倍定量管容积;  
\*样品, 气泡;  
\*样品在流动相各组份中不能充分  
溶解(通常伴随有柱压逐渐升高  
且经反冲后, 柱压会恢复正常之现象);  
\*基线噪声的影响;  
\*积分处理的影响;



以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/846231141223011011>