



库仑阵列电化学检测器高效液相色谱仪的日常使用与维护

闫彦芳 张 壮 高永红 聂 波 王硕仁

(中医内科学教育部重点实验室,北京市高校重点实验室,北京中医药大学东直门医院,北京,100700)

摘 要 在使用库仑阵列电化学检测器高效液相色谱仪(HPLC-ECD)的过程中,难免碰到各种各样的问题,本文参考该仪器厂家的技术文献,结合本实验室的使用经验,从仪器系统各组成部分、色谱柱以及流动相等几个方面,探讨影响该设备正常使用的因素、常见故障的成因及解决方法,为 HPLC-ECD 仪器的使用人员提供技术参考。

关键词 HPLC-ECD 日常维护 故障排除 使用经验

库仑阵列电化学高效液相色谱仪(HPLC-ECD)可应用于神经生理、药理学、临床诊断、中药现代化研究、抗衰老相关研究、天然产物及食品科学、化妆品研制等领域,是近年来分析实验室新购较多的重要设备。该仪器由于自身构造和检测方法学特点使其在应用中难免出现各种各样的问题,维护费用昂贵,解决不当将直接影响到检测的准确性和仪器的正常工作。本文结合本实验室使用经验,从以下几个方面探讨其使用和维护中需注意的几个问题。

1. 整机的使用与维护

1.1 HPLC-ECD 系统

HPLC-ECD 系统由库仑阵列电化学检测器和高效液相色谱仪两大部分组成,因此,凡适用于高效液相色谱仪的正确使用与维护注意事项都可作为该仪器的使用参考^[1]。由于库仑阵列电化学高效液相色谱仪有它的自身特点,建议加装带有稳压器的最大功率不间断电源系统,避免突然断电或电压不稳引起的仪器受损。

1.2 仪器放置环境条件

环境条件改变会对实验结果带来显著影响。房间须双层玻璃,有向外通风防尘装置及遮挡紫外线等避光措施,以避免有些待测物见光分解或降解。

并应配备冷暖空调、温度、湿度计,保持室温在 20~25℃、相对湿度 30%~70%为宜。

1.3 开机维护

开机前,换好泵清洗液和流动相,如上液管内有空气可用专用注射器抽出。检查电源线路连接是否正确,各部分电源是否处于关闭状态。打开稳压电源且保持稳定后,再依次打开脱气机、A、B 泵及 purge 阀,用甲醇:水(20:80)高速冲洗输液泵 3min,排出气泡;冲洗 HPLC 包括色谱柱 30min,更换实验用流动相平衡柱系统 30~45 min,设定流速时应从小到缓慢增加,压力显示稳定后,依次打开自动进样器、柱温箱、检测器、系统控制电脑电源,设置参数并执行程序。观察柱压与流速是否相对应的平稳上升,待流速、系统压力稳定后,再施加电势设置检测参数并执行。此时要特别注意电势必须加在含盐的流动相所通过的电化学电极上,否则会导致昂贵的电极损坏。

1.4 关机维护

检测实验完毕,关闭电化学检测器的电势,在电脑控制程序界面执行停泵、停柱温箱、停自动进样器制冷,进样针冲洗后,依次关闭电脑、检测器、柱温箱、自动进样器。用适当的洗液清洗整个系统。一般做法为 A、B 泵更换流动相为甲醇:水(20:80),开

启输液泵控制流动相,高流量(purge键)冲洗泵系统3min,再用甲醇:水(20:80)0.4~0.6 mL/min冲洗包括色谱柱在内的整个系统30~45min,即可停泵,至柱压为5Bar以下,关闭泵。冲洗时洗脱液的用量一般为柱体积的20倍,如果1周以上不再使用仪器,则需彻底冲洗系统,以洗净盐类物质。此时,建议使用的冲洗液应与实验时用的流动相中的有机溶液和水一致(不再含有缓冲剂和盐),并按照不同色谱柱存放要求进行处理、存放。反相柱一般继续使用甲醇或乙腈:水(50:50)0.4~0.6 mL/min冲洗系统30~45min,因为低浓度的有机溶液在HPLC系统中长时间保留,有可能发生霉变并导致其它问题,所以最后应用100%甲醇或乙腈,冲洗系统30~45min(用高浓度的有机试剂替换系统管路中的流动相)。溶剂过滤头储存在储液瓶中,瓶中的流动相根据过滤头的不同不能少于2%~10%,否则空气将会进入系统。再次开机前先冲洗系统时,回到甲醇:水(50:50)冲洗系统30~45min,后再用甲醇:水(20:80)冲洗系统,开始使用。

关闭系统时应注意的一些问题:对于HPLC-ECD系统,设备的运行程序因需停机时间长短不一而不同。非梯度系统如果每天都在应用,只在夜间停机,应让ECD系统一直打开,关掉电化学电极并让流动相以0.1 mL/min的低流速循环;梯度系统则不能再循环,而应使A、B泵各以50%的量组成流动相并使其总流速为0.025 mL/min运行系统,使流动相排到废液中。因为大部分ECD应用的缓冲液盐浓度在50~100 mM,如果没有流动,便有盐在HPLC系统中沉淀结晶,此沉淀不仅能损伤泵系统还能引起背景电压增高、鬼峰、压强变化等其它问题。

2 仪器各部件维护

2.1 稳压电源

电源如果近期不用,则关闭不间断电源,可不拔掉插销。拔掉插销不关闭电源,会使电源自动放电。蓄电池须半年放电一次,以延长电池使用寿命,但每次放电不要放净,留有一定电量,以保证稳压系统的启动。

2.2 输液泵

仪器设置的流速范围是0.001~9.999 mL/min,从系统压力和分离效果出发,一般实验时选择流速0.6~1.0 mL/min。每次开机时以甲醇:水

(20:80),高速冲洗输液泵3min,排出气泡、冲洗可能的盐结晶。每次关机时亦须以甲醇:水(20:80),高速冲洗输液泵3min,冲洗可能的盐结晶。在各部件流路清洗过程中,要关闭电势、断开电池。

2.3 PK材料管路维护

系统压强最好要维持在200bar以下,原因是该仪器流路系统整个管路由PK材料管连接,而PK管不耐高压,当系统压力超过200bar以上时,管路的各个部位发生易出现漏液情况,渗液少时不易发现,但影响柱压使检测样品的保留时间发生改变。可用小张滤纸在各接口处擦拭,检测有无渗液,并且各个接口的旋钮要拧紧。在PK管转弯处,系统压力、柱压高时经常会出现管壁穿孔(沙眼)漏液,因此更换PK管时转弯处弧度要大,否则易出现穿孔漏液。

如果泵系统是普通的高效液相色谱不锈钢泵,在分析前应对系统中不锈钢材料的输液泵、进样器和管道用6N硝酸溶液冲洗,进行钝化。钝化前应卸下色谱柱,用两通管连接管路。系统中的不锈钢管如果被腐蚀,进入系统的污染物可能引起电化学电池受污染,或本底电流变大,所以需定期钝化系统管路或换用PK管。

2.4 过压检查

如果系统压力明显升高需查明原因,可采用分段检查法,依次卸下检测电极、色谱柱、色谱柱前保护柱、自动进样器前预柱,开泵分段检查管路压强。

引起柱压显著升高的主要原因有二,一是保护柱中黑、白滤膜的堵塞,理想色谱条件下过滤膜是不需要更换的,然而在实际中因其被堵塞,一定要定期更换。液体进入色谱柱、电极前保护膜为白滤膜,液体进入自动进样器前保护柱为黑滤膜,防止滤膜堵塞除定期更换外,可采取以下解决办法:(1)每天开机冲洗系统的甲醇:水(20:80),用0.22 μ m滤膜过滤,2~4周全部更换1次。(2)用水非常关键,要求每厘米的阻抗必须是大于或等于18M Ω 的超纯水。所制水当天使用为好或存放在温度为4 $^{\circ}$ C的冰箱内一周以内使用,使用前应恢复至室温。(3)所有配制流动相的试剂均须色谱纯,以降低基线噪音,避免引发高本底电流,提高灵敏度,防止堵塞滤膜。(4)卸下保护柱,断开流路后,用甲醇:水(20:80)反冲滤膜,如系统压强下降不明显则更换新的滤膜。二是流路中出现盐结晶,解决办法:采用分段检查法,查

出阻塞处后,断开流路,用超纯水冲洗,流速应从小到缓慢增加,待系统压强下降稳定后,逐渐加大流速,连接系统流路后,再以甲醇:水(20:80)冲洗至系统压强稳定在正常水平。建议每天使用系统时都要做压力变化日志,提示:如果泵后面的过滤膜需经常更换,说明流动相(包括长菌)或泵的密封圈有可能出了问题,如果进样器后面的过滤膜需经常更换,说明样品前处理有问题。为保护电化学电池,一定要在线过滤,孔径 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器要放在电化学电极的前面。

2.5 自动进样器

(1)使用之前和之后都要清洗1遍自动进样针,如清洗不彻底,则会被阻塞,如进样针阻塞则卸下,用超声法反复清洗,如仍阻塞则更换进样针。

(2)洗针液所用甲醇:水(20:80),要用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤,2~4周重新配制更换,否则长菌后使滤膜过滤无效,液体黏度增大,吸液阻力增大,也可损坏进样器。

(3)把样品放入样品转盘池时,位置必须放正,并且样品转盘盖必须合槽,否则极易损坏进样针。

(4)从自动进样器的可靠性和稳定性考虑,不建议在无人监管情况下,长期过夜使用自动进样器。

2.6 元件组织箱(柱温箱)

温度设置后,等待自动升温到设置温度,系统压强平衡后,再打开检测器进行检测。柱温箱温度设置不应超过 45°C 。注意保护柱温箱中的阻尼器,每次拆卸安装管路时,特别注意各接口处要拧紧,以防系统压力高突然崩开,如果突然崩开,流路压力突然下降,可导致阻尼器损坏漏液;当系统压力在10bar以上时,不要打开PURGE阀,应等待仪器自动降压,否则也可造成流路压力突然下降,导致阻尼器损坏。

2.7 检测器

当检测器检测了大量的样品(如血液、尿液)或使用时间较长后,应对电极进行清洁,提高检测灵敏度^[2]。要经常注意维护工作电极的清洁度,一般做法为实验前可进行高电势设定(+1000mV,30s,这样做是为了将电极上的残留物质彻底氧化;-1000,30s是为了将其彻底还原),及定期清洗电极。如怀疑电极污染,可观察电极压力是否增高,正常一组电极压力应在30bar以下,如果压力高,要清洗电极,如果加电势,用含盐的流动相清洗;如果不加电势,则和清洗色谱柱一样,用纯水加甲醇、乙腈清洗。

不建议用硝酸清洗电极,只有在其他方法处理无效时,才用硝酸做电化学电极的最后一次清洗,但处理时决不能施加电势。

在满足实验需要的基础上,为了延长电极的寿命,如能以较低电势来检测,尽量就不选择较高的电势,而且低电势检测线、基线易平稳。使用库仑电极电势绝对不要超过该仪器规定的最大限值。以保障电化学电极在最好的状态下工作。

流动相的离子摩尔浓度对电化学电极的影响:摩尔浓度须根据实验要求确定,一般选择范围50~100mM,使用无盐的流动相只能用于冲洗系统,严禁施加检测电势,当施加检测电势时,不允许停泵15min以上,可保持低流速,确保足够的流动相流速以进行分析或过夜。如果泵在晚间存出了故障,而电势依然加在没有流动相流动的电化学电极上,必然会损坏电化学电极。在不运行系统时,最好关掉电化学电极,这样能通过减少电化学电极的工作时间和工作电流有效延长它的寿命。

流动相的pH值对电化学电极的影响:在大多数情况下,低pH值(酸性环境)能有效阻止有些分析物质被氧化,防止分析物(如儿茶酚胺)自氧化。在低pH值环境测量时,物质氧化所需的电势会比中性或碱性环境高。选择不同的pH值会影响化学分离,尤其是色谱柱洗脱时的顺序。一般来讲不要太注重pH值对电极较高响应的影响,而应保证在自氧化最小的情况下使被分析物质得到有效分离。建立伏安曲线(CV曲线^[3])将有助于通过优化分析物质的响应来确定能产生最大响应的最佳电势。

在实验中,当电势增加,需检测样品的各组分峰高和峰面积已达到最大,再增加电势也不会再增加峰高和峰面积时,则应选择能达到最大面积时所需的最低电势做为工作电势。

2.8 色谱柱的使用和保养^[4,5]

由于待测样本多为血样、尿样、组织样本,对样本的预处理应尽可能多地除去杂质和干扰物质。如要冲洗色谱柱,必须断开色谱柱后端的连接,冲洗液用烧杯接住,不使其进入检测器。使用预柱和保护柱,可防止气体进入色谱柱。色谱柱的清洗、色谱柱的存放等,均按照色谱柱使用说明书中的要求进行。

2.9 系统控制电脑及打印机

该仪器配备的电脑及打印机须为专用,不能用

做其它的文件处理,以确保不染病毒,避免系统程序重新安装带来的繁琐,每天每一批数据采集、处理完成后,要以移动硬盘或光盘拷贝数据,进行备份。

3 流动相的配制应用问题^[6]

3.1 流动相的过滤

流动相最好现用现配,在使用前一定要过滤,否则会堵塞流路的正常通道,使色谱柱的阻力增加,柱压升高,柱效下降。流动相过滤必须要用孔径 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤膜,原因有二,第一是要滤去流动相中的微粒以减少柱子的堵塞,第二是库仑电化学电池里的工作电极是由多孔石墨制成的,石墨的孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 。过滤膜分水系和有机系两种,含40%以上的有机试剂,要用有机系膜过滤,检测所用试剂要用色谱纯级,否则其中有些杂质过滤不掉。

3.2 流动相的 pH 操作范围

当使用极端 pH 时,一定要多加注意,如 pH 呈碱性和大的背景电流同时作用将损坏电化学电池。色谱柱对 pH 值的限制要求也要特别注意,一定要确保色谱柱适于分析时的 pH 环境,不适宜的 pH 将使色谱柱中的填料有可能进入测量系统,污染或损坏电化学电极。

3.3 流动相脱气

流动相进入系统前要使用脱气机或脱气法对流动相进行脱气处理。如水和甲醇混合后会产生大量

的气泡。如果脱气不好,气泡会进入系统,停留在输液泵,导致压力不稳,出现不稳定噪音,如进入检测器,则导致出现连续规律的色谱峰,影响检测的准确性。解决办法是停泵,流动相重新脱气,系统加大流速冲洗,去掉其中的气体。

3.4 流动相中的电化学活性试剂

EDTA 是流动项中经常使用的一种试剂,用于螯和氧化的金属离子,可降低本底电流。在电势大于 400mV 时,EDTA 具有很高的电化学活性,所以工作电势大于 400mV 时,流动相中就不能再使用 EDTA 而应改用柠檬酸盐来代替。TEA(三乙醇胺)可用来改善色谱峰的峰形,它含有电化学活性的杂质,在高电势时这种杂质会发生特别的氧化反应。因此要用最小量的 TEA,一般用量小于 $100\mu\text{L/L}$ 。

参考文献

- 1 杨泽生. 现代仪器, 2008, (3): 58-59
- 2 esa Technical Note "Prolonging Cell Performance"(文件目录号:70-5017)
- 3 esa Technical Note Coulochem II 操作手册中 6.3, 6.4a, 6.4b
- 4 姜维林, 李蕾, 姜胤. 实验技术与管理. 1999, 16(2): 114-117
- 5 陆森林, 张虎军. 成都军区医院学报. 2002, 4(3): 24-25
- 6 esa 应用与技术文献美国惠泽公司 2002

收稿日期: 2009-12-02

Roatine use and maintenance of high performance liquid chromatograph with electrochemical detector.

Yan Yangfang, Zhang Zhuang, Gao Yonghong, Nie Bo, Wang Shuoren (Ministry of Education Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Beijing Key Laboratory of Higher Learning Institute, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700)

Various problems could be encountered in the use of high performance liquid chromatograph-electrochemical detector. This paper investigates the factors affecting the normal use of the instrument, such as system components, chromatographic column, mobile phase and so on. The common troubles, their are discussed.