

| 故障症状   | 可能原因                | 解决办法  |
|--------|---------------------|---|
| 不出峰    | 错误的流动相条件            | 检测器显示的基线噪音是否正常? 如果检测器的输出只是一条直线, 可能检测器或数据传输不正常。去掉色谱柱进已知样品检查检测器的响应是否正常。                     |
|        | 没有进样, 或进样量不足        | 确保样品被注入定量环, 检查进样已经发生 (进样后会有压力波动)。   |
|        | 过高的背景电流噪音 (CAD)     | 检查流动相的质量, 具体见基线部分。  |
| 峰拖尾    | 样品容易挥发 (CAD)        | 查看分析物的蒸气压   |
|        | 样品与硅烷官能团反应          | 选择合适的色谱柱  |
|        | 缓冲能力不够              | 增大缓冲盐浓度   |
|        | 与固定相中痕量金属发生螯合反应     | 同上  |
|        | 柱外体积过大              | 用更短的管路连接, 检查管路内径: UHPLC (0.13mm/0.005英寸), HPLC (0.18mm/0.007英寸), 柱外体积应不超过最小峰体积的1/10。      |
|        | 不合适的管路接头            | 检查接头Ferrule是否正确, 建议使用Viper管路。   |
|        | 柱性能下降               | 更换色谱柱。高温条件下: 避免使用强腐蚀性条件 (比如磷酸盐), 将温度降至常温 (比如40度), 更换色谱柱类型 (比如水性柱)。高pH值条件下: 应选用兼容高pH值的色谱柱。 |
|        | 柱失效 (特别发生在UHPLC压力下) | 更换色谱柱。试着反冲 (出口直接流废液)。预防措施: 缓慢增加柱流速以减少色谱柱压力冲击。避免超出pH使用范围 (查看色谱柱须知)。平常使用压力应低于压力允许值的70%-80%。 |
| 峰前延    | 色谱柱前端过滤板堵塞          | 更换筛板。如前延峰很快再次出现, 注意检查颗粒物来源 (样品, 流动相, 泵, 进样阀)  |
|        | 色谱柱塌陷               | 更换色谱柱。检查色谱柱是否匹配此应用条件 (压力或pH值范围)。  |
|        | 柱过载                 | 减少进样量。增加柱容量 (选用更大内径色谱柱)   |
|        | 样品溶解液洗脱能力较强         | 用初始流动相溶解样品。降低样品溶解液洗脱强度或进样量。   |
| 峰展宽    | 检测池体积过大             | 检测池体积不应超过最小峰体积的1/10。UHPLC需用更小体积的检测池。  |
|        | 保留时间短的峰展宽更严重        | 柱外体积过大。检查管路内径及长度, 定量环尺寸, 检测池等。  |
|        | 检测器响应时间 (或时间常数) 过长  | 响应时间应小于最窄峰半峰宽的1/4。使用变色龙程序向导来优化响应时间 (或时间常数)。   |
|        | CAD与UV比较            | CAD检测器峰展宽程度要大于UV, 原因是CAD有雾化器。选择Viper或nanoViper管线连接降低死体积。                                  |
|        | 水平扩散过大              | 等度分离: 保留时间太长。使用梯度淋洗或选用洗脱能力更强的溶剂进行等度分离。选择保留强度更低的固定相 (比如C8代替C18)。线速度太低: 检查流速。               |
| 鬼峰     | 只有几个宽峰; 前一个样品没有洗脱干净 | 延长分析时间, 提高流动相洗脱强度(提高有机相)。在运行结束后, 用强流动相冲洗色谱柱。  |
|        | 污染 (进样器或色谱柱)        | 清洗进样器, 更换易污染的部件 (比如针或针座)。使用强流动相冲洗色谱柱 (检查色谱柱使用须知, 允许的使用反方向冲洗色谱柱)。                          |
|        | 流动相污染               | 水的质量: 使用HPLC级水。还有可能脱气机中细菌污染, 流动相改良剂 (比如纯度级低的TFA), 配制中手污染 (比如氨基酸流动相配制中没有戴手套)。使用样品净化技术比如SPE |
|        | 样品基体干扰              | 使用样品净化技术比如SPE   |
|        | 污染的雾化器 (CAD)        | 雾化室需要清洁。去除色谱柱, 用50/50: 水/甲醇 2mL/min冲洗几个小时, 并0.2-0.4 mL/min平衡过夜。再还原成原来流动相检查噪音水平。           |
|        | 污染的电位过滤器 (CAD)      | 更换电位过滤器   |
|        | 电雾针 (CAD)           | 使用甲醇清洁喷雾针   |
| 分叉峰或双峰 | 保护柱或色谱柱污染           | 1. 更换保护柱。2. 使用强溶剂清洗色谱柱, 必要时可以反冲。3. 更换分析柱。   |
|        | 样品溶解液洗脱能力强          | 用流动相稀释样品  |
|        | 共淋洗干扰               | 充分净化样品。选用不同流动相或色谱柱改变选择性。  |
|        | 磨损的转子密封             | 更换转子密封。对于较高或较低pH值的应用, 确保转子密封材料的兼容性。   |
|        | 色谱柱损坏 (UHPLC应用)     | 更换色谱柱。检查压力, 确保工作压力在允许压力的70-80%。缓慢的增加压力避免对色谱柱的过压冲击。  |
|        | 温度不匹配               | 一般发生在色谱柱内径大于3mm, 并且温度条件很高的情况下。选用预加热来确保色谱柱中流动相温度不会梯度变化。                                    |
|        | 不合适的管路接头            | 更换合适的Ferrule, 使用Viper管线, 可以将死体积降至最低。  |
| 负峰     | 不合适的参比波长 (DAD)      | 样品在参比波长范围内不能有吸收, 可能的话方法中可以不设置参比波长。  |
|        | 样品溶解液与流动相差别太大       | 使用流动相溶解样品   |
|        | 洗脱物比流动相吸收值低         | 1. 更换波长。2. 使用低吸收溶剂做流动相。   |
|        | 错误的信号输出极性           | 检查信号输出极性  |
|        | 废液引起 (CAD)          | 确保PEEK管在废液瓶中  |
|        | 电引起 (CAD)           | 清洁喷雾针   |

## 峰面积精度

| 故障症状    | 可能原因           | 解决办法  |
|---------|----------------|---|
| 仪器或样品引发 | 可能原因在于样品或自动进样器 | 使用HPLC系统重复分析样品: 1. 所有峰的峰面积总和和有差异 → 自动进样器原因; 2. 仅有部分谱峰面积有差异 → 样品不稳定。分析稳定的混合样品可以用来确定这原因 → 此时混合成分的峰面积应无变化; 3. 若部分色谱峰的面积值依然有差异, 请检查系统压力的稳定性和短期流速的稳定性。 |

| 故障症状        | 可能原因                           | 解决方案   |
|-------------|--------------------------------|--|
| 积分参数设定      | 色谱峰起止边界有差异                     | 检查软件积分设定, 例如, 可查询Chromleon®软件的在线支持帮助。有条件的话, 最好使用chromleon® 7 Cobra算法使之自动选择一个理想的积分设定。使用固定的数据采集频率而勿选用系统自动选择设定 (automatic)。 |
| 基线波动        | 泵脉冲, 比例阀混合产生的波动等原因造成色谱图积分没有重现性 | 请参考基线故障表   |
| 进样体积有差异     | 自动进样器从进样瓶中抽了空气                 | 检查样品填充高度及进样针抽样高度   |
|             | 样品降解                           | 使用合适的保存条件, 如使用含温控单元的自动进样器。   |
|             | 自动进样器流程中有气泡                    | 根据相关操作手册上的步骤冲洗自动进样器的流路管道。  |
|             | 自动进样器/进样阀或者注射器阀某处的连接不紧密        | 检查密封性, 紧固包含进样器的进样环节在内的各接头。   |
|             | 进样针堵塞或变形                       | 更换进样针, 排出自动进样器流路中的气泡。  |
|             | 自动进样器抽样速度过快, 导致吸入的样品中有很高的气体含量  | 降低进样针的抽样速度, 使抽样时间至少2-3秒, 在程序中设定一个抽样延迟时间 (如3秒)。给样品脱气泡并降低抽样速度。   |
|             | 进样阀密封泄露, 注射器中存在气泡              | 检查进样器的密封性, 注射器 (Syringe) 排气泡。  |
| 不适当的检测器参数设定 | 选择了错误的检测波长                     | 使用紫外光谱仪进行一次波长扫描有助于准确选择波长, 选择靠近光谱图最高点附近的波长, 如果多成分的光谱图差异较大, 则需要在检测时使用波长切换。   |
|             | 响应时间过短 高噪音 痕量样品积分不准确           | 请确认使用了正常的响应时间设定 (或时间常数设定)。通常情形 时间常数设定为最窄的色谱峰半峰宽时峰宽的1/4, 请参考操作手册以了解详情。  |
|             | 错误的雾化器温度 (Corona Ultra®型)      | 检查雾化器温度设定, 如果流动相使用大量的四氢呋喃或卤代试剂, 请设定温度为30°C。如果样品为半挥发性, 则需关闭雾化加热器以恢复监测器的响应。  |
| 前次分析有残留     | 残留 (进样针, 定量环, 针座)              | 扩展自动进样器的清洗选项以降低残留, 清洗进样针, 针座和转子密封。   |
|             | 柱记忆效应                          | 每个样品分析之后运行一个空白样品 (不进样)。如果此时有峰被检测到, 则说明有柱记忆效应存在。使用洗脱能力强的淋洗液冲洗色谱柱, 如果允许, 反置色谱柱进行再次冲洗; 更换色谱柱。                               |

## 压力问题

| 故障症状        | 可能原因                         | 解决方案   |
|-------------|------------------------------|--|
| 压力过高/压力持续增加 | 缓冲溶液有析出物                     | 1. 检查缓冲溶液和最高比例的有机成分的兼容性 (在烧杯里); 2. 使用低比例有机溶剂的流动相冲洗整个系统及色谱柱; 3. 对流体部分 (从泵到检测器) 做一个系统性的检查以确定堵塞发生的部位。   |
|             | 毛细管弯折                        | 对流体部分 (从泵到检测器) 做一个系统性的检查以确定堵塞发生的部位   |
|             | 固体颗粒物存在于梯度混合器, 滤芯, 保护柱或色谱柱中。 | 使用合适的过滤器对流动相和样品进行过滤。滤芯的规格依使用的色谱柱粒径的规格而定。(例如, 使用低于2µm的柱填料粒使用0.22µm的滤膜, 3-5µm的柱填料粒使用0.45µm的滤膜)。检查和密封性有关的部件 (柱塞杆密封圈, 转子密封)。                               |
|             | 流速设定过高或温度设定过低                | 使用正确的设定  |
|             | 色谱柱老化                        | 随着色谱柱的长期使用系统压力有逐渐的升高是一种正常客观的现象。  |
|             | 梯度的变化引起压力的改变                 | 正常现象! 流动相组成直接影响其黏度, 而整个流动相的黏度直接影响整个系统的压力。  |
|             | 入口或雾化器处有堵塞 (CAD)             | 检查CAD仪器的背压, 其背压应低于10 Bar。  |
| 压力过低        | 毛细管线路连接有泄漏                   | 1. 检查接头是否紧固, 尤其是色谱柱前的接头。不借助工具仅用手指紧固的PEEK管和接头可能滑出了其理想位置; 2. 使用戴安公司的Viper或nanoViper毛细管可保证连接处的零死体积。   |
|             | 流速过低或温度过高                    | 使用正确的设定  |
|             | 泵头有气泡                        | 1. 使用脱气后的流动相最好使用氮气脱气或者使用在线真空脱气设备; 2. 泵头排气泡 (Purge); 3. 使用手工方式将液体从泵中抽出, 例如, 使用一个注射器连接到泵的出口处将液体抽出; 4. 临时使用脱气后的有机溶剂代替水进行相关管道的排气泡 (Purge), 然后再换回脱气后的水做流动相。 |
|             | 泵入口/出口单向阀被污染                 | 取出阀芯, 使用合适的溶液 (例如甲醇) 浸泡于容器中进行超声波清洗。  |
|             | 泵单项阀或者密封圈环掉                  | 高压梯度泵: 根据泵工作循环中的相关压力降低来确认损坏的泵。通过改变B泵的混合比例, 观察压力降低值得变化。使用Chromleon®软件中的泵诊断功能确定相关损坏的部件。  |
|             | 溶剂管道滤芯堵塞                     | 更换溶剂管道滤芯   |

## 保留时间变化

| 症状     | 可能原因          | 解决办法  |
|--------|---------------|---|
| 保留时间缩短 | 固定相老化         | 更换色谱柱, 使用时注意色谱柱适用的PH值范围, 通常反相硅胶柱适用的pH值范围为2-8。                                 |
|        | 平衡时间不够        | 增加平衡时间, 平衡流量须达到柱体积的5-10倍。   |
|        | 色谱柱过载         | 减少进样量或者用更大柱容量的柱子  |
|        | 流动相配比错误       | 1. 检查预先混合好的流动相; 2. 作比例混合准确度的OO测试; 3. a) 高压比例混合: 检查泄漏或水中的气泡; b) 低压比例混合: 检查比例阀。 |
|        | 流速增加          | 检查流速的设置, 作流速准确度的OO测试。   |
|        | 低有机相导致固定相疏水塌陷 | 使用能兼容低有机相的固定相; 在高浓度有机相, 高压条件下润湿化色谱柱; 仔细阅读色谱柱说明书。                              |

| 症状     | 可能原因            | 解决办法   |
|--------|-----------------|--|
| 保留时间增加 | 流动相配比错误         | 1. 检查预先混合好的流动相, 确保混合充分; 2. 作比例混合准确度的OO测试; 3. 高压比例混合: 检查泄漏或改良有机相中的气泡; 4. 低压比例混合: 检查比例阀。 |
|        | 固定相中活性部位        | 在有机相中加入碱性改良剂 (例如TEA), 增加缓冲容量或者用更好端基封尾的柱子。  |
|        | 流速降低            | 检查流速的设置, 检查毛细管连接处漏液情况。   |
| 保留时间分散 | 平衡时间不够          | 增加平衡时间, 平衡流量须达到柱体积的5-10倍。  |
|        | 流动相比比例混合不准确     | 作比例混合准确度的OO测试, 清洗/更换单向阀; 或是联系Dionex客服校准/更换比例阀。   |
|        | 缓冲容量不足          | 增加缓冲液浓度到20mM以上, 在其缓冲范围的pH条件下工作   |
|        | 柱温改变            | 最好把柱子放入柱温箱中, 监测柱温箱温度。  |
|        | 进样与泵周期不同步 (低压泵) | 在Chromleon®软件中激活功能: 进样与泵同步。  |

## 基线

| 症状          | 可能原因              | 解决办法   |
|-------------|-------------------|--|
| 高噪音基线周期性波动  | 源于泵的压力波动          | 采集压力通道的信号, 观察压力波动是暂时性的还是一直存在的。要是基线波动与泵压力波动一致, 冲洗泵, 使用Chromleon®软件对泵诊断测试, 观察预压缩值, 并与手册中的值进行比较; 观察在现在的流动相/流速条件下, 混合体积是否合适。 |
|             | 流路中的气泡            | 移除气泡 (请参考前面压力部分)   |
|             | 设置了错误的参比波长 (DAD)  | 样品在参比波长范围内不能有吸收, 可能的话方法中可以不设置参比波长。   |
|             | 混合不充分             | 周期性成波浪状的噪音, 噪音大小与流动相, 检测器类型, 检测器布局都有关系。根据厂家推荐值来增加混合体积。   |
|             | 流动相降解             | 用新配制的流动相冲洗系统。有必要的话, 反冲色谱柱 (柱压过高)。  |
|             | 接地不合适 (CAD)       | CAD仪器应该连接电涌保护器, 并且与HPLC使用同一个电路。  |
| 高噪音基线非周期性波动 | 流动相质量             | 保证用色谱级或是更好质量的有机相, 尤其是柱填料低于2µm或使用蒸发型检测器 (例如CAD) 时。尽量用固体颗粒含量很低的流动相。  |
|             | 不挥发流动相 (CAD)      | 使用CAD时, 保证用挥发缓冲液和添加剂。  |
|             | 喷雾器 (CAD)         | 喷雾器需要清洗, 断开色谱柱, 用水/甲醇 (80/20), 2mL/min的流速清洗HPLC-CAD系统数小时, 然后降低到0.2-0.4mL/min过夜冲洗。使用与原来组成和流速一样的新制流动相, 观察基线水平。             |
|             | 溢流 (CAD)          | 自始至终确认没有errors; 确认所有的诊断测试结果都在指标的要求范围之内。  |
|             | 氮气 (CAD)          | 使用纯度99%和没有水蒸汽、固体颗粒的氮气; 必要时, 更换第二级过滤器。  |
|             | 响应时间 (时间常数) 设置太短  | 时间常数通常设置为最窄峰半峰宽的1/4; 更多信息请参考操作者手册。   |
|             | 带宽设置太短 (UV检测器)    | 带宽越小, 峰分辨率越好; 带宽越大, 信噪比越好; 更多信息请参考操作者手册。   |
|             | 不合适的参比波长 (DAD)    | 样品在参比波长范围内不能有吸收, 可能的话方法中可以不设置参比波长。   |
| 高噪音漂移       | “高噪音基线非周期性波动”所述原因 | 见上面“高噪音基线非周期性波动”部分   |
|             | 梯度分析 (CAD)        | 保证流动相质量; 尽量使用梯度变化缓慢的方法; 用逆转梯度法。  |
|             | 检测器灯室/光源温度不稳      | 检测器需要预热, 根据光源设计不同可能需30分钟到几小时不等; 请参阅操作者手册。  |
|             | 流动相不均匀            | 一天以上未使用流动相, 用前轻轻晃动瓶子使流动相均匀。  |
|             | 色谱柱污染             | 用强流动相清洗色谱柱, 可能的话反接色谱柱 (参阅色谱柱说明书)。  |
|             | 流通池污染             | 清洗流通池 (参阅操作者手册); 必要时更换流通池。   |
|             | 新灯                | 点灯数小时让灯能量达到一个平衡值   |
|             | 环境温度不稳            | 确保实验室温度和湿度稳定; 在Chromleon®软件中可以用检测器温度通道来记录温度波动; 确认灯和流通池盖子在正确的位置; 关好检测器的门。   |
| 色谱柱平衡太慢     | 离子对色谱             | 通常离子对色谱需要较长的起始平衡时间; 使用短烷基链的离子对基质时, 平衡时间会短于长烷基链的离子对基质。  |
| 毛刺峰         | 流通池中的气泡           | 通常, 气泡是随机产生的, 通过下面步骤判断: 1. 另外一個波长下也有相似高度的怪峰; 2. 在流通池后面加背压, 怪峰消失。解决办法: 确保连接处紧密; 为流动相脱气; 在流通池后面加背压管 (例如100psi, 请参阅流通池说明书)。 |
|             | 排放造成的怪峰 (CAD)     | 检查废液瓶和排液/放空装置上是否泄漏; 检查排液管线里是否还有一根管。  |
|             | 放电头被污染 (CAD)      | 电晕金属线需要清洗  |
|             | 喷雾器 (CAD)         | 喷雾器需要清洗: 断开色谱柱, 用水/甲醇 (80/20), 2mL/min的流速清洗HPLC-CAD系统数小时, 然后降低到0.2-0.4mL/min过夜冲洗。用新鲜配制的, 与原来组成和流速一样的流动相, 观察基线水平。         |
|             | 接地不合适 (CAD)       | CAD仪器应该连接浪涌电压保护器, 并且与HPLC使用同一个电路; 确保CAD使用的电路中没有大功率设备, 例如冷冻箱, 空压机等。   |
|             | 色谱柱储液时两端未加盖       | 用强流动相冲洗色谱柱, 注意合适的存放条件, 反相柱通常储存在无缓冲液、高有机相溶液中。   |
|             | 检测时灯强或是参比波长的迅速变化  | 1. 更换紫外灯或是可见灯; 2. 检查灯安装是否到位。   |
|             | 电的干扰              | 先排除了别的可能原因; 怪峰不是随机的, 而是与某些周期有关的 (例如电路中大功率设备的周期性耗电); 另外, 电路中电流的波动很容易引起怪峰。解决办法: 仪器使用的电路不要使用大功率设备或是用UPS来防止电流波动。             |
|             | 柱温大大高于流动相的沸点      | 在流通池后面加背压管 (例如100psi, 请参阅流通池说明书); 使用柱后冷却器 (只为某些型号柱温箱提供, 例如UltiMate® 3000 TCC-3000RS)。                                    |



Chromleon®软件系统



附件