

高效液相色谱泵出口单向阀功能的新性能测试

Eduard ROGATSKY, Matthew GALLITTO, Daniel T. STEIN

摘要 高效液相色谱(HPLC)中泵的单向阀要承受反复的机械强度压力,故容易发生故障。由于外部漏液会导致泵压明显下降,所以这种情况很容易诊断,然而遗憾的是,泵内部连接的漏液却是比较复杂的,因为此时不会有一个明显的压力下降,所以HPLC软件程序中的诊断算法也无法识别。本文讨论了一个测试发现单向阀隐藏故障并清除故障的方法。

单向阀对于高效液相色谱(HPLC)泵硬件来说是一个重要的机械部件。在参考文献[1]中对单向阀的功能和硬件设计进行了详细描述。简单来说,就是一对单向阀(入口和出口)阻止流体在HPLC泵头里从高压区流向低压区,从而泵的活塞在高压下使流动相通过色谱柱。“一个功能适宜的单向阀必须能够快速方便地打开和关闭,同时还要确保密闭性在一个宽的压力值范围内均有效^[1]”。

根据定义,HPLC泵上的单向阀是在高压下承受重复的机械压力,因此这个设备比HPLC泵的其他部件(例如活塞或活塞密封圈)更易出现故障。但在单向阀出现故障时却很难识别,虽然HPLC可以通过泵压力下降准确地检测不同类型的外部泄漏,然而遗憾的是泵内部连接的漏液却是比较复杂的,因为此时不会有一个明显的压力下降,所以HPLC软件程序中的诊断算法也无法识别。

已有人在运行高通量的多维液相色谱时发现了这个问题^[2]。他们观察到在这个应用程序中,被分析物的保留时间非常慢但是平稳增加大约10%;然而硬件诊断测试却能成功通过。这种现象不能解释为色谱柱的损坏,而且正如所预料的那样换色谱柱是无益的。这个问题需要通过替换安捷伦1100二元HPLC泵(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)B泵头(提供有机溶剂)上的出口单向阀才能解决。值得注意的是,替换A泵头的单向阀不会影响保留时间(数据没有列出)。

Agilent 1100系列二元泵G1312A由两个一模一样

的溶剂传输通道(泵头)组成。每个泵头使用两个活塞来输送溶剂,即入口和出口单向阀(图1)。为了找出可能的泵故障,压力测试(PT)和漏液测试(LT)可作为ChemStation软件(Agilent)的一部分。压力测试仅使用A通道使压力增加到390 bar,然后泵流速关闭。预期的压降应该不超过2 bar/min。这种测试能有效地评估外部泄漏;然而内部泄漏可能仍旧存在并且很难发现。例如,对12个已使用过的出口单向阀进行试验研究,其中一些虽能成功通过压力测试,但是不能通过漏液测试,漏液测试对内泄漏评估更有效。在这个测试中,每个活塞以3 μ L/min速度传输30 s,所得到的压力曲线应是水平的(稳定水平)或是极小正数,换句话说,如果压力出现负的斜率,测试就失败了,意味着所输送的异丙醇100%的损失。压力曲线是水平的而不是降低的内漏是ChemStation诊断方法/算法认为可接受的内漏。当溶剂传输时在活塞1的冲击下通过一个发生故障的入口单向阀部分回流到溶液存储器中,此时就会发生内漏。或者,溶液在活塞2的冲击下通过发生故障的出口单向阀部分回流到室1。当活塞2传输溶剂时,充满大气压的室1会发生从高压到低压的回流。内漏影响泵头传输的实际流速,它比软件预调的值少。流量计可以测出泵流量,理论上,在安装流速限制器(例如毛细管)之后,精确流量计可以检测出微小的内泄露。然而,一个液体流量计价格昂贵,且很难保证同步性,在分析实验室里很少使用。因此检测内泄漏极具挑战性。

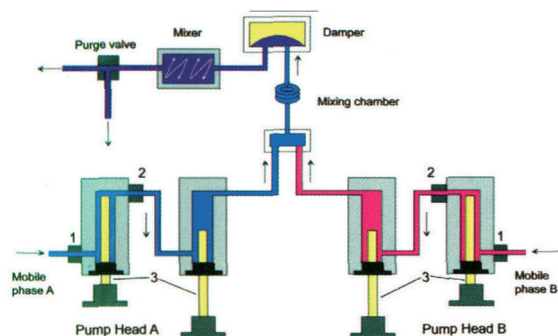
如上所述,增加的保留时间可以用来解释流动

作者简介

Dr. Rogatsky is Senior Scientist, Clinical Chemistry R&D, and Dr. Stein is Director, Biomarker Analytical Resource Center, Analytical Core Lab, Einstein-Montefiore Institute for Clinical and Translational Research, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Ave., Golding Bldg., Rm. G02, Bronx, NY 10461, U.S.A.; tel.: 718-430-3391; fax: 718-430-8998; e-mail: eduard.rogatsky@einstein.yu.edu. Mr. Gallitto, of John F. Kennedy High School, Bellmore, NY, was Dr. Rogatsky's summer student.

该文已获得American Laboratory/Labcompare再版许可。

相在泵头B(传输有机相)的内泄漏。这样的泄漏从传输泵头室2到计量泵头室1都可能发生。如果出口单向阀的球座坏了也可能发生回流。因此越少的有机溶剂通过泵传输到色谱柱,保留时间就越长。保留时间增加的另外一种可能是通过一个没有完全关闭的入口单向阀从室1漏液。理论上,如果泵头A的机械耐用性比泵头B高(导致更多的内漏),这样的循环将会减少被分析物的保留时间。这种漂移,可能会错误的解释为是色谱柱损坏造成的结果。



1 - Inlet check valve; 2 - Outlet check valve; 3 - Piston.

图1 G1312A 二元泵流量曲线图。(Copyright 2004, Agilent Technologies, Inc. 允许复制。Agilent Technologies, Inc. 资料描述的准确性或完整性不作保证,并据此不承担任何责任。)

一般的HPLC诊断测试无法诊断出微量的内漏液,所以研发出一系列的性能测试,以期设计出解决潜在的单向阀溶液传输问题故障的方法。实验是在Agilent 1100系列二元泵G1312A和紫外检测器G1314A上完成的。

我们建议以下的方法。在泵维护或修理后,在相同流量下,使用水作为流动相A和水/0.1%丙酮作为流动相B运行30 min的梯度,更换一根色谱柱,安装上背压阀。作者使用1.5 mX65 μ m i.d.的PEEK管(p#1560, IDEX/Upchurch, Oak Harbor, WA)作为一个零死体积的流量限制器,这种管子在0.5 mL/min时产生250 bar的压力。然后,达到最大吸收信号一半时的保留时间可以通过254 nm波长的紫外曲线计算出来^[3]。通过减去梯度前的平衡时间和二分之一的程序设定梯度时间(半梯度时间),我们就可以得到最大信号一半时的延迟时间和半梯度时间^[3],并且可以计算出流量所允许的延迟体积V50的倍增系数。理想的二元泵(没有死体积,同时A、B两通道操作完全相同)的V50的值与半梯度体积相同。换句话说,在到达半梯度时间点时,通道传输相同的流量和紫外信号最大值的

一半是可以预计的。

当泵有确定的死体积时,到达最大信号半值的时间会发生延迟。如果A通道内泄漏,则会使A通道传输更少的流动相,导致最大信号半值更早发生,V50的值将减少(梯度比预料的稍微更陡)。在B通道微小的漏液将导致最大信号半值延迟,V50的值将变大。比较前后所获得的紫外曲线,即使呈现不同梯度也可能并不是漏液的问题,而是B的预处理(在溶剂中丙酮的百分含量)不精确或紫外灯效能降低所导致的。

相比之下,无论信号最大值如何变化,V50的值是不变的。当V50的值确定后,在当前硬件配置中,它可以作为一个给定的泵(梯度识别)的参比值。值得注意的是,这个值与压力、温度和硬件都有关。如果在V50中和之前的测量对比存在5%的偏差,但是诊断测试完全成功,作者则建议交换AB出口单向阀并重复测试。再次强调,V50的增加意味着B通道漏液,减低说明A通道漏液。转换出口阀后重新检查梯度运行,最新得到的V50值增加说明出口单向阀有故障,如果V50值仍然不变,说明在以上怀疑的通道中入口阀出现故障。

因为搭建的诊断测试不能识别微泄漏,所以严格控制V50的值对确保快速硬件诊断与维修而言就显得尤为重要。被分析物保留时间的漂移可以很明确地指出与这个硬件相关的漏液情况。在40~60 min的梯度(常用的蛋白质组学分析)实验中,我们应该评价每个溶液传输通道性能,用以排除硬件对保留时间不稳定的影响。如果V50值先前未确定或不能进行常规监控,那么诊断和维修会更为复杂和冗长。因此,使用高压液体流量计对于系统性能控制而言,可能是快速的但却花费昂贵的选择。

参考文献:

- [1] Dolan J. Check valve problems. LC · GC North Amer, 2006, 24: 132 - 8.
- [2] Rogatsky E, Braaten K, Cruikshank G, Jayatilake H, Zheng B, Stein D T. Flow inconsistency: the evil twin of column switching - hardware aspects. J Chromatogr A, 2009, 1216: 7721 - 7.
- [3] Dolan J. Dwell volume revisited. LC · GC North Amer, 2006, 24: 458 - 66.

A Novel Performance Test for Outlet Check Valve Function in HPLC Pumps

Eduard ROGATSKY, Matthew GALLITTO, and Daniel T. STEIN

Check valves in HPLC pumps are exposed to repeated mechanical stress and are prone to malfunction. Diagnostic tests efficiently detect the presence of external leaks associated with a pump pressure drop. Unfortunately, the identification of internal pump leaks is more complicated because they do not lead to a substantial pressure drop, and are therefore unrecognized by diagnostic algorithms used in HPLC software programs. This article discusses a troubleshooting protocol for the assessment of hidden check valve malfunction.

新闻动态

发光二极管照明、光伏发电等一批关键核心技术取得突破，为培育和发展战略性新兴产业提供技术支撑。目前，新能源汽车已在25个城市的公务用车和公共服务用车领域进行推广应用示范。21个城市开展了半导体照明试点，节电超过1.64亿千瓦时。

数字四：产学研结合日渐紧密，企业支出占全社会研发支出逾70%

2009年，国家科技支撑计划的95%、国家科技重大专项的50%、国家高技术研究发展计划(863计划)的35%以上项目由企业牵头实施。国家科学技术进步奖获奖项目中，68%的项目由企业牵头或参与完成。

2009年，中央级转制院所获得国家财政纵向科技经费71亿元，来自市场的横向科技性收入为233亿元。许多研究型大学接受来自企业委托的横向科技经费占经费总额一半以上。

通过产业技术创新联盟建设，我国组建了汽车轻量化、数控机床高速精密化、半导体照明、杂交水稻等56个联盟。集聚了1100多家行业龙头企业、重点大学和科研机构，参与联盟企业2009年主营业务收入超过7万亿元。

数字五：外资研发机构技术交易额占我国全部技术市场交易的25%

截至2009年，我国已与152个国家和地区建立科技合作关系，积极参与了国际核聚变能源计划、伽利略计划、国际对地观测等国际大科学工程。

我国目前有3300多个外资研发机构。2009年，外资研发机构产生的技术交易额，占我国全部技术市场交易的25%。世界500强中有346家已在我国建立研发中心。

2010年，中美就化石能源合作续约，完成了中美清洁能源联合研究中心项目招标，正式启动联合研究工作。