

高效液相色谱(HPLC)标准操作程序

车羿臻 2023.12

HPLC 实物图如图 1 所示。



图 1 HPLC 实物图

一、使用前需注意：

1. 如果从未使用过这台 HPLC，需要在第一次使用时联系仪器管理员。
2. 检查流动相(如图 2)。保证流动相瓶内有至少 500 mL 液体，如果流动相不足，
水(A 瓶)：检查瓶壁内部和底部是否长藻，如果有，需要除藻后再加入超纯水；
乙腈(B 瓶)：如果长时间未使用过乙腈流动相或发现瓶壁底部有白色沉淀，倒掉
剩余乙腈后刷干净流动相瓶再加入 HPLC 级的乙腈；
甲醇(C 瓶)：直接加入 HPLC 级的甲醇装满。

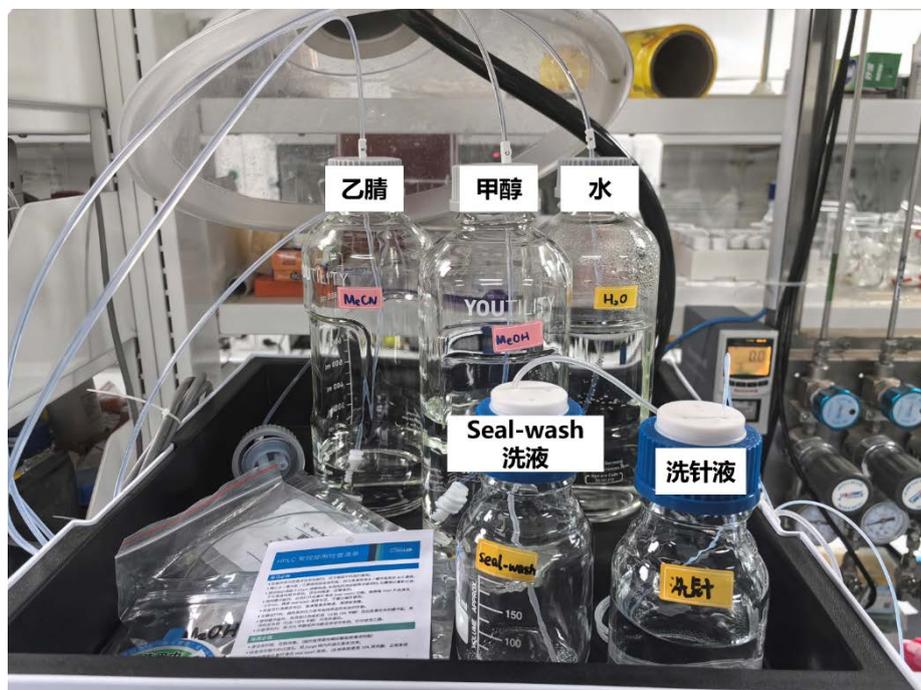


图 2 HPLC 流动相、洗液实物图

3. 四元泵模块(如图 3)：如果流动相为缓冲盐溶液，需要在使用前装满 seal-wash 洗液，配比通常是体积比为 9:1 的水-异丙醇溶液。

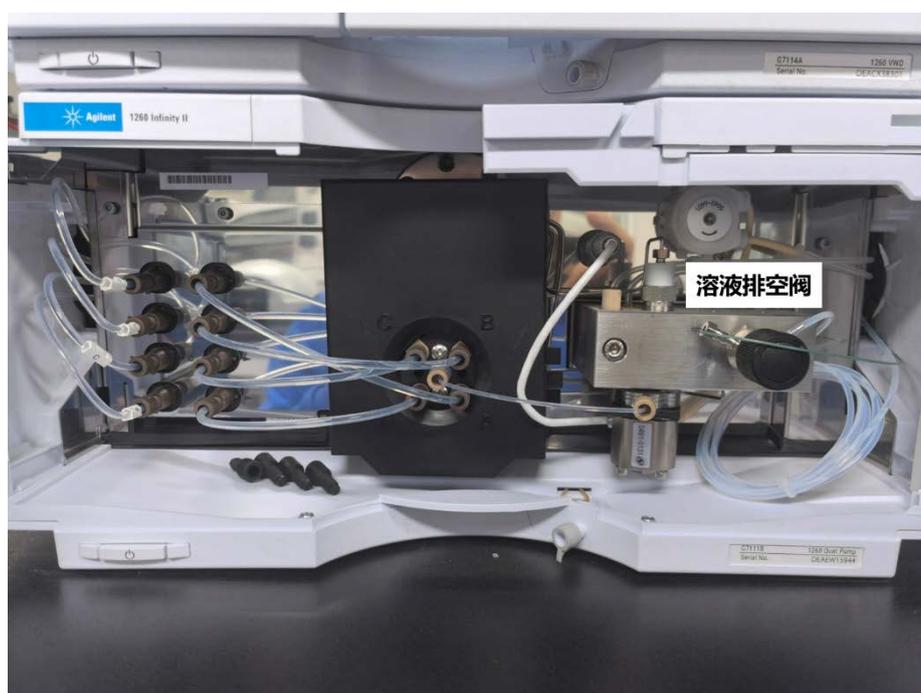


图 3 四元泵模块实物图

4. 自动进样器模块(如图 4): 确保有至少 30 mL 洗针液。洗针液目前的配比是体积比为 7:3 的甲醇-水溶液。



图 4 自动进样器模块实物图

5. 柱温箱模块(如图 5): 根据使用条件选择合适的色谱柱。目前装的色谱柱型号是 EC-C18, 使用前需要查阅色谱柱的说明书, 了解色谱柱的使用温度、pH 范围等, **对于 EC-C18, 禁止通过 100 % 的水流动相!** 如果需要更换色谱柱, 需要注意色谱柱流动方向, 并且两端需要与接口拧紧。拧紧后拔几下旁边管线, 如果不能拔出, 说明已经拧紧。如果测试条件下流动相压力超过 200 bar, 需要更换接口为金属接口。

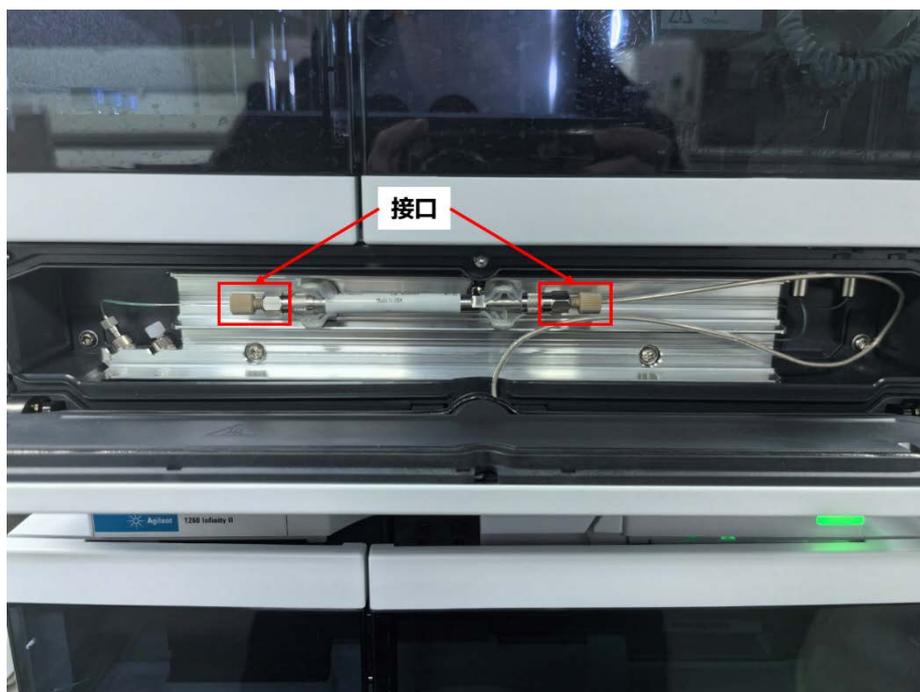


图 5 柱温箱模块实物图

6. 紫外检测器模块(如图 6)与蒸发光检测器模块：如果需要两个模块联用，将紫外检测器模块的出液口接至蒸发光检测器的入口。操作时请联系管理员。

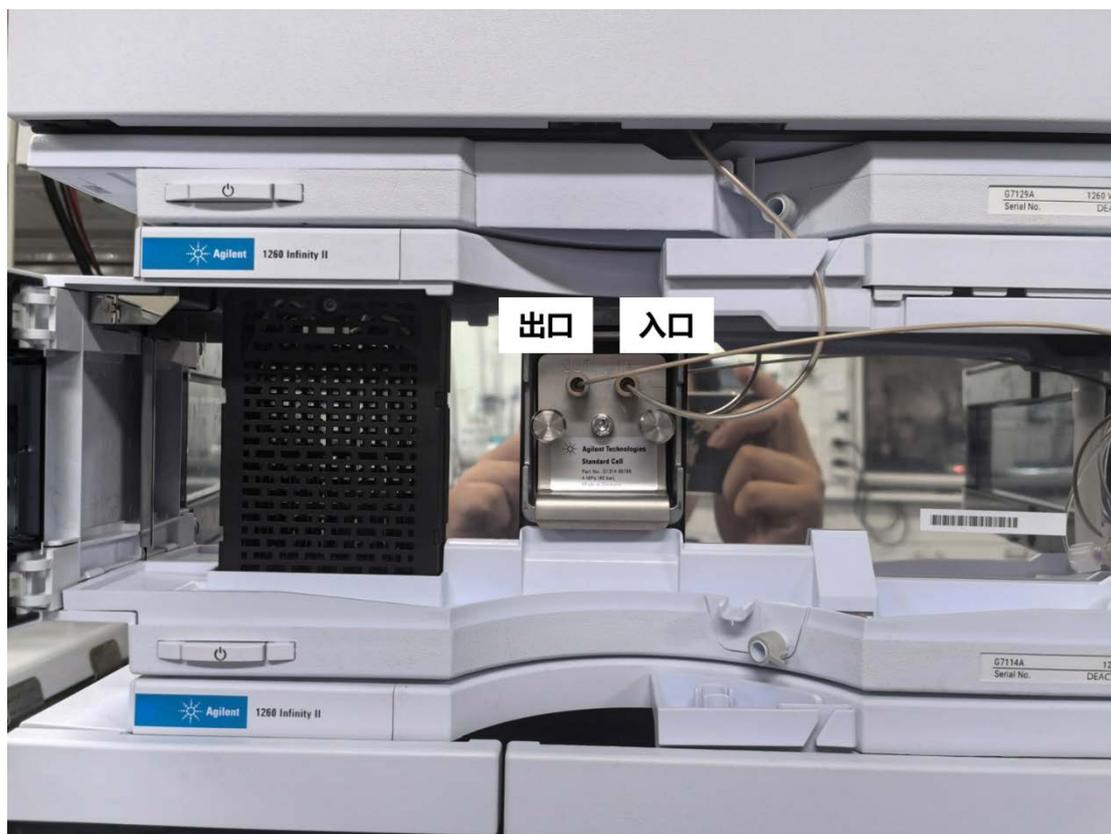


图 6 紫外检测器模块实物图

二、操作流程

以下步骤以绘制对苯二甲酸二钠标线为例，只涉及了紫外检测器的使用。

1. 配制标液：称量约 100 mg(实际称量 100.9 mg)对苯二甲酸于 10 mL 玻璃瓶中，加入 0.4 mL 10 M NaOH 溶液，加入 5 mL 超纯水，边摇晃边超声，固体对苯二甲酸迅速溶解。将溶液移入 10 mL 容量瓶中定容，在此基础上稀释，配制一系列浓度梯度的标液。需要注意，对于紫外检测器，标液中待检测浓度的物质最高浓度约 0.01 M。超过该浓度，积分面积偏小。待检测浓度很低时，基线不平。因此标液浓度既不能太低，也不能太高。
2. 将待测试的各标液装入 2 mL 样品瓶中，放入自动进样器模块。水和甲醇流动相瓶分别装满。
3. 先打开自动进样器、紫外检测器、四元泵设备上的开机按钮，稳定一段时间后打开软件上的开启按钮。
4. 排气：拧松四元泵设备的阀门，在软件上设置流速为 5 mL/min，流动相 A(水) 100 %。实时监测压力稳定 5 min 后，流速不变，流动相 C(甲醇) 100 %，实时监测压力稳定 5 min 后，调低流速至 1 mL/min，拧紧四元泵设备的溶液排空阀，此时实时监测压力的数值会大幅度上升。**注意该步骤在每次使用时都必须执行，并且操作顺序一定不能出错！**
5. 活化色谱柱(该步骤只适用于新色谱柱，已使用的色谱柱可跳过该步骤，这里的步骤只适用于 EC-C18)：编辑一个用于活化色谱柱的方法，四元泵模块的时间表部分设置一系列甲醇：水的浓度梯度(9: 1、8: 2、7: 3)，每个梯度活化

- 10 min, 流速为 0.5 mL/min。序列设置一个空针, 运行序列。
6. 冲洗色谱柱: 设置为测试所用的流动相比比例和流速(甲醇: 水=7: 3, 流速为 0.5 mL/min), 实时监测压力稳定 10 min 后可以下一步操作。
 7. 设置测试方法: 编辑一个测试方法, 命名为“TPA”。四元泵设置流速为 0.5 mL/min, 流动相甲醇: 水=7: 3; 柱温箱设置温度为 30 °C, 紫外检测器设置检测双波长为 240 nm 和 250 nm。
 8. 设置序列表: 只需要写样品位置、样品名称、测试方法。
 9. 运行序列, 不保存序列模板。测试结束后调节流动相流速至 0 mL/min, 在软件上关闭所有设备, 然后关闭设备上自动进样器、紫外检测器、四元泵的开关机键。
 10. 手动积分所得曲线的峰, 对苯二甲酸二钠的保留时间在 1.4-1.8 min 左右, 结果如表 1 所示。
 11. 在 excel 里, 以标液浓度为横坐标, 积分面积为纵坐标作图, 得到一条线性的直线(如图 7 所示), $R^2=0.99999$ 。

表 1 对苯二甲酸二钠的标液浓度与积分面积

浓度 (mg/mL)	1.009×10^{-3}	2.018×10^{-3}	5.045×10^{-3}	1.009×10^{-2}	2.018×10^{-2}	5.045×10^{-2}	1.009×10^{-1}
积分面积	50.17	105.14	252.41	492.03	1021.10	2509.72	5046.40

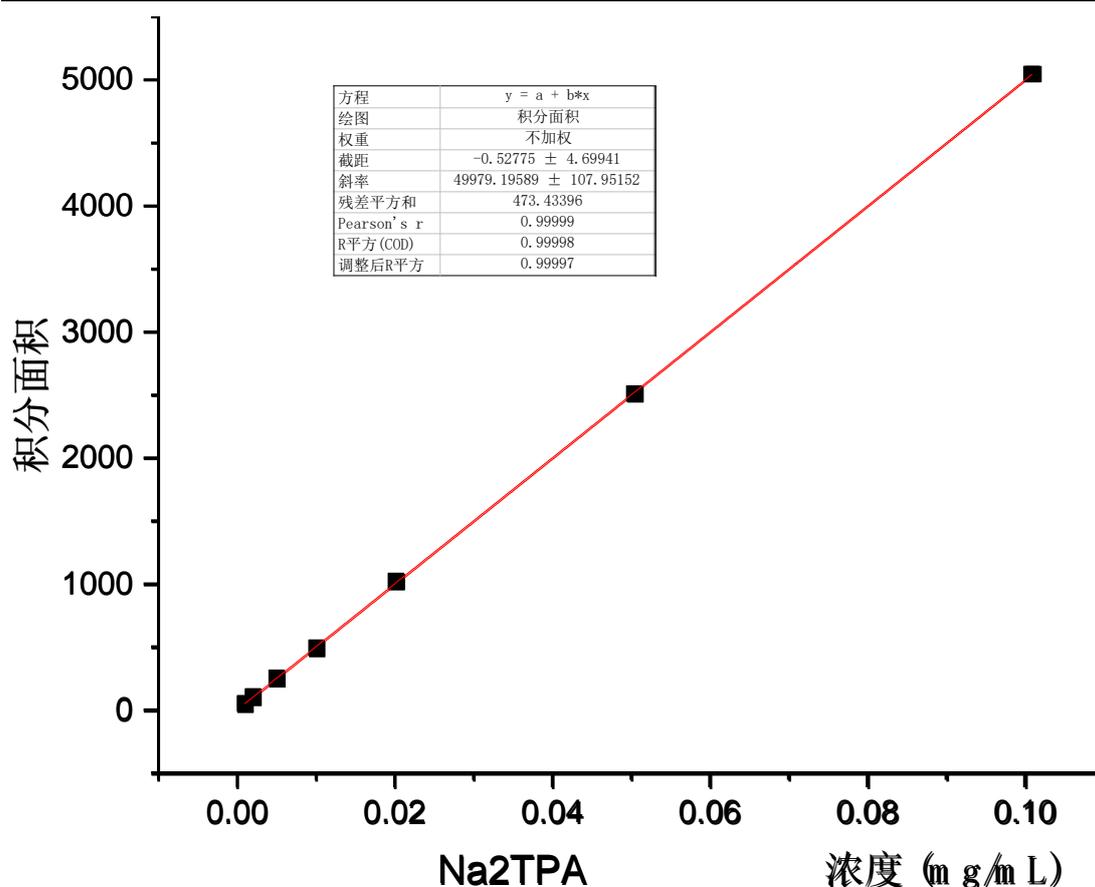


图 7 对苯二甲酸浓度与积分面积关系曲线