

高效液相色谱

一. 简介

- 仪器型号：Agilent 1200 HPLC 高效液相色谱
- 仪器厂商：美国安捷伦 公司
- 仪器性能： 流速范围：0.001~5.0mL/min, 0.001mL/min 步进；压力范围：0-40 MPa (0-400 bar, 0-5880psi)；梯度组成精密密度：<0.15% SD (1mL/min)。
- 可测项目：可用于痕量分析，其检测限为 ppb~ppm 级。
- 样品要求：样品一般需预处理。

二、实验原理

分配色谱原理：主要基于样品分子在流动相和固定相间的溶解度不同(分配作用)而实现分离的液相色谱分离模式。

C18 柱-反相 HPLC (reversed phase HPLC)：由非极性固定相和极性流动相所组成的液相色谱体系。其代表性的固定相是十八烷基键合硅胶，代表性的流动相是甲醇和乙腈。是当今液相色谱的最主要分离模式，几乎可用于所有能溶于极性或弱极性溶剂中的有机物质的分离。

二极管阵列检测器 (diode array detector, DAD)

以光电二极管阵列作为检测元件的 UV-VIS 检测器，它可构成多通道并行工作，同时检测由光栅分光，再入射到阵列式接受器上的全部波长的信号，然后，对二极管阵列快速扫描采集数据，得到的是时间、光强度和波长的三维谱图。(Agilent 1200 DAD 全扫描波长范围为 190nm-950nm)

Agilent 1200 HPLC 液相色谱仪的工作过程：输液泵将流动相(经过在线过滤器)以稳定的流速(或压力)输送至分析体系，在进入色谱柱之前通过自动进样器将样品导入，流动相将样品带入色谱柱，在色谱柱中各组分因在固定相中的分配系数不同而被分离，并依次随流动相流至检测器，检测到的信号送至数据系统记录、处理或保存。

三、实验步骤

开 机

- 1) 将待测样品按要求前处理，准备 HPLC 所需流动相，检查线路是否连接完好，废液瓶是否够用等。
- 2) 开机。打开电脑、HPLC 各组件电源、打开软件。
- 3) 打开工作界面，按操作要求赶流动相气泡。（排气：打开“Purge”阀，点击“Pump”图标，点击“Setup pump”选项，进入泵编辑画面，设Flow: 3-5ml/min，点击“OK”。点击“ Pump ”图标，点击“Pump control”选项，选中“On”，点击“OK”，则系统开始Purge，直到管线内（由溶剂瓶到泵入口）无气泡为止，切换通道（A-B-C）继续Purge，直到所有要用通道无气泡为止。点击“Pump”图标，点击“Pump Control”选项，选中“Off”，点击“Ok”关系，关闭Purge valve。点击“Pump”图标，点击“Setup pump”选项，设Flow: 1.5ml/min。）
- 4) 配置仪器（配置 1200 系统模块，根据需要配置）
- 5) 建立平衡柱子分析方法，保存并运行。

编辑方法及样品分析

- 1) **方法信息：**从“Method”菜单中选择“Edit entire method”项，如上图所示选中除“Dataanalysis”外的三项，点击“Ok”，进入下一画面。在“Method Comments”中写入方法的信息。点击“Ok”进入下一画面。
- 2) **自动进样器参数设定：**选择合适的进样方式，“Standard Injection”----只能输入进样体积，此方式无洗针功能。“Injection with Needle Wash”----可以输入进样体积和洗瓶位置，此方式针从样品瓶抽完样品后，会在洗瓶中洗针。“Use injectorprogram”---可以点击“Edit ”键进行进样程序编辑。点击“Ok”进入下一画面。
- 3) **泵参数设定：**（以四元泵为例）在“Flow”处输入流量,如1.5ml/min，在“Solvent B”处输入70,(A=100-B-C-D),也可Insert 一行”Timetable”，编辑梯度。在“Pressure LimitsMax”处输入柱子的最大耐高压，以保护柱子。点击“Ok”进入下一画面。
- 4) **柱温箱参数设定：**在”Temperature”下面的空白方框内输入所需温度,并选中它。

- 5) **DAD检测器参数设定：**：**检测波长：**一般选择最大吸收处的波长。**样品带宽BW：**一般选择最大吸收值一半处的整个宽度。**参比波长：**一般选择在靠近样品信号的无吸收或低吸收区域。**参比带宽BW：**至少要与样品信号的带宽相等，许多情况下用100nm作为缺省值。**Peak width (Response time)：**其值尽可能接近要测的窄峰峰宽。**Slit-狭缝窄，**光谱分辨率高；宽时，噪音低。同时可以输入采集光谱方式，步长，范围，阈值。选中所用的灯。
- 6) **FLD检测器参数设定：** Excitation A: 激发波长:200-700nm,步长为1nm,或Zero Order。Emission: 发射波长: 280-900nm, 步长为1nm,或Zero Order。同时可以输入范围Range、步长step、采集光谱。
- 7) **运行序列：**新建序列，在序列参数中输入样品信息，在序列表中输入样品位置，方法等，运行该序列，等仪器显示ready，可运行样品

数据分析

- 1) 从“View”菜单中，点击“Data analysis”进入数据分析画面。
- 2) 从“File”菜单选择“Load signal”，选中您的数据文件名，则数据被调出。
- 3) 从“Integration”菜单中选择“Integration Events”选项，如下图所示。选择合适的“Slope sensitivity”，“Peak width”，“Area reject”，“Height reject”。
- 4) 从“Integration”菜单中选择“Integrate”选项，则数据被积分。
- 5) 如积分结果不理想，则修改相应的积分参数，直到满意为止。

关机

- 1) 关机前，先关灯，用相应的溶剂充分冲洗系统。
- 2) 退出化学工作站，依提示关泵，及其它窗口，关闭计算机（用shut down
- 3) 关）。
- 4) 关闭Agilent 1200各模块电源开关。

五、Agilent 1200 LC 维护保养：

- 1) 色谱柱长时间不用，存放时，柱内应充满溶剂，两端封死（乙睛/甲醇适于反相色

谱柱，正相色谱柱用相应的有机相)。

- 2) 流动相使用前必须过滤，不要使用多日存放的蒸馏水（易长菌）。
- 3) 使用含盐流动相，要配制 90%水+10%异丙醇，开启 seal-wash 清洗泵，
- 4) 溶剂不能干涸。

UnRegistered