

高效液相色谱仪常用检测器的使用与维护

龚时琼

(华中科技大学化学与化工学院 武汉 430074)

摘 要 高效液相色谱是高等院校、药业、食品、环保等各个领域常用的仪器之一。笔者对常用检测器的故障进行分析、同时对示差折光检测器的原理及使用等进行介绍,旨在给从事液相色谱仪使用的人员提供一点参考。

关键词 高效液相色谱仪 检测器 使用 维护

高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是现代分离测定的重要手段^[1]。从 20 世纪 60 年代后期发展以来,因其具有高效、快速、高灵敏度、能分析高沸点的热不稳定性物质的特点而被广泛应用于生化、药物及临床分析。高效液相色谱是用高压输液泵将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱,当携带着混合样品的流动相流经色谱柱时,被测物质在两相之间进行反复多次分配,由于各组分分配系数的差异,它们以不同的速度通过色谱柱,最后得以分离,在柱内各成分被分离后依次进入检测器,色谱信号由色谱工作站记录^[2]。

1 检测器的作用与类型

1.1 检测器的作用

高效液相色谱仪是由溶剂贮液器、泵、进样器、色谱分离柱、检测器和数据处理系统几部分组成。检测器、泵与色谱柱是组成高效液相色谱仪的三大关键部件,其中检测器是高效液相色谱仪的眼睛,它将样品的物理或化学特性信息转换成易测量的电信号输入到记录仪,并记录下来,得到样品组分分离的色谱图。

1.2 检测器的类型

通常将检测器分为通用型和选择型 2 种,通用型检测器是指可连续测量色谱柱流出物(包括流动相和样品组分)的全部特性变化;而选择型检测器是用以测量被分离样品组分某种特性的变化,这类检测器对样品中组分的某种物理或化学性质敏感,而这一性质是流动相所不具备的,或至少在操作条件下不显示。如紫外检测器、光电二极管阵列检测器、荧光检测器等属于选择型检测器;示差折光检测器、蒸发光散射检测器等属于通用型检测器。

2 检测器常见问题及解决方法

检测器性能的好坏直接影响仪器的正常工作,其中噪声和漂移是检测器稳定性的主要表现。

2.1 基线噪声较大的可能原因及对策

噪声是指由检测器输出与被测样品组分无关的无规则波动信号。对于判断基线噪声是来自检测器还是来自泵或流动相,可将泵关上,继续走基线,如果噪声立即停止,基线呈一条直线,说明基线噪声来自泵或流动相中的气泡,应设法排气;若停泵后仍有噪音出现,应检查检测器。如果上述都检查过,那需要考虑的其它问题就是:是否改变流动相的组成;是否改变检测波长;流动相是否相溶;流动相是否干净等问题,然后针对问题一一排除。

2.2 基线漂移

一般说来,机器刚启动时,基线容易漂移,对紫外检测器来说,大概需要 0.5h 的平衡时间,如果在实验过程中发现基线漂移,则可考虑以表 1 所列基线漂移的可能原因及解决方法。

表 1 基线漂移的可能原因及解决方法^[3]

原因	解决方法
温度波动(尤其是示差折光检测器)	控制好柱子和流动相的温度,检查是否有打开的窗户或空调对着柱温箱
流通池被污染或有气体	用甲醇或其他强极性溶剂冲洗流通池(不接柱子,直接接检测器)
紫外灯能量不足	更换新的紫外灯
流动相污染、变质	检查流动相的组成,使用高品质的化学试剂及 HPLC 级的溶剂
检测器没有设定在最大吸收波长处	将波长调整至最大吸收波长
流动相的 pH 值没有调节好	加适量的酸或碱调至最佳 pH 值,对于硅胶基质的填料,其所能承受的流动相范围约为 1~8

2.3 异常峰形

异常的色谱峰指的是色谱图中无峰或出现负峰、宽峰、双峰、肩峰、峰形不对称等情况。这要根据具体情况进行分析,然后有针对性地采取不同的解决方法。异常峰形及其分析(见表 2)。

表2 异常峰形及其分析^[3]

异常情况	分析及解决方法
色谱图中未出峰	系统未进样或样品分解；泵未输液或流动相使用不正确；检测器设置不正确。针对以上情况作相应调整
鬼峰	流动相脏
所出峰比预想的小	样品粘度过大；进样故障或进样体积误差；检测器设置不正确；定量环体积不正确；检测池污染；检测器灯出现问题
一个峰或几个峰是负峰	样品吸收比流动相吸收小；溶解样品的溶剂通过柱子时平衡被破坏；RID 中最常见
出现双峰或肩峰	柱头塌陷或柱床运动；泵头过滤芯部分堵塞；组分共流出
部分峰拖尾	二次保留效应（残留硅醇的相互作用）；小峰在大峰后洗脱出来
所有峰均脱尾	柱外效应；柱子失效；柱头有污染物堆积；重金属反应
平头峰	检测器设置不正确；进样体积太大或样品浓度太高
前伸峰	柱子过载；小峰在大峰之前洗脱出来
柱外扩展	用较短的、窄内径的毛细管连接进样器和色谱柱以及柱子和检测器；确认连接管的接头都相互匹配；使用死体积小流动池；减少进样量

3 示差折光检测器的原理及使用

3.1 示差折光检测器的概念

示差折光检测器（differential refractive Index detector, RID）是一种浓度型通用检测器，对所有溶质都有响应，其主要缺点是它对温度变化特别敏感，且不适于梯度淋洗色谱。示差检测器是基于连续测定样品流路和参比流路之间折射率的变化（或液体折光指数差值）来测定样品含量的。只要样品组分与流动相的折光指数不同，就可被检测，二者相差愈大，灵敏度愈高，在一定浓度范围内检测器的输出与溶质浓度成正比。

3.2 示差折光检测器的原理与结构

示差折光检测器按工作原理分为反射式、干涉式和偏转式3种^[4]。反射式是根据下述原理制成的：光在两种不同物质界面的反射百分率与入射角和两种物质的折射率成正比。应用较多，但当测定不同折射率范围的样品时，需要更换固定在三棱镜上的流通池。干涉式因其干涉池造价昂贵，使用较少。

偏转式是根据下述原理：当一束光透过折射率不同的两种物质时，此光束会发生一定程度的偏转，其偏转程度正比于两物质折射率之差。由于偏转式示差折光检测器有较宽的折光指数范围（1.00~1.75RIU），且可适用于各种溶剂折射率的测

定，故日常工作中多数采用偏转式，示差折光检测器的光学原理结构图（见图1）。

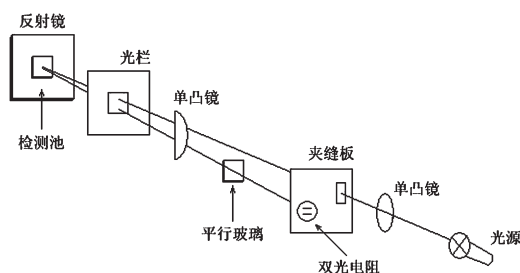


图1 偏转式示差折光检测器的光学原理结构图

3.3 示差折光检测器的使用

示差折光检测器主要受温度、流速以及流动相的种类等因素的影响，示差折光检测器是较难稳定，但是和仪器本身的硬件条件有问题，如能设法控制以下几个因素，情况会大有改善：(1) 流动相一定要混匀，而且要充分脱气，最好用单元泵。(2) 有条件的话将溶剂瓶、柱温箱、检测器的光学单元温度控制在同一个温度，且最好高于室温 5~10℃。不要将检测器放置在通风橱或是空调出风口处。(3) 环境温度不要变化太大，实验室最好门窗关闭，如果没有柱温箱那就把检测器温度调低一点。(4) 要把废液瓶和溶剂瓶放在示差检测器与泵以上位置，这样可以使样品池略有压力，有助于优化检测器性能。

此外，在安装示差检测器时，由于其流通池的反压估计为 5bar，所以示差检测器在流路系统里必须放在最后。如果还要在系统里增加一个检测器，必须放在示差检测器的前面，以防压力增大时损坏示差检测器的流通池。同时建议在运输或搬迁示差检测器到其他场所时，流通池里最好装异丙醇，这是为避免在周围环境温度降低时使流通池破裂。

以上简单介绍高效液相色谱仪常用检测器的正确使用、常见问题及解决方法。在日常工作中，如能认真对待这些事项，并做到有问题及时解决，必将会大大延长仪器使用寿命，并使仪器的性能得到最大限度发挥，保证检测准确性，降低检测成本。

参考文献

- 1 刘珍. 化验员读本《仪器分析》(第四版)(下册)[M], 北京: 化学工业出版社, 2004
- 2 赵青山, 李冬梅等. 高效液相色谱柱的使用及维护[J], 生命科学仪器技术与应用, 2006, (4): 44
- 3 刘萍, 候西成等. 高效液相色谱仪使用中常见的问题及解决方法[J], 分析检测, 饲料博览, 2007, (1): 35 ~ 36
- 4 赵联朝, 董正荣. 分析仪器及维护[M], 北京: 中国环境科学出版社, 2007