

HPLC 紫外分光检测器的波长范围、波长准确度和波长重复性及其测试方法的探讨

李昌厚

(中国科学院 上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要: 根据实践, 提出了高压液相色谱(HPLC)紫外分光检测器的波长范围、波长准确度和波长重复性等技术指标的具体、简易、可行的测试方法, 可供有关设计、制造、使用者参考。

关键词: 高压液相色谱; 波长范围; 波长准确度; 波长重复性; 测试方法

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2008)04-0202-03

目前, HPLC 的检测器有 30 多种^[1]。紫外检测器的使用覆盖面达到 HPLC 检测器的 75%, 国际上生产 HPLC 的厂商很多, 无一不带紫外检测器。中国也有 10 多家生产 HPLC 的企业, 基本上都带紫外检测器。并且, 有些 HPLC 只有紫外检测器一种, 而无其它检测器。HPLC 紫外检测器已在各个领域得到了广泛的应用, 特别在生命科学、药品、环保、粮食科学、农业科学、食品科学等领域应用更加广泛。但是, 目前国内外许多制造商在 HPLC 紫外检测器的主要技术指标测试方面还存在许多问题, 最主要的问题是对 HPLC 紫外检测器的主要技术指标的物理概念尚未搞清楚, 这些指标对分析结果的误差有多大影响未搞清楚, 这些指标的测试方法没有搞清楚。所以, 目前国内外对 HPLC 紫外检测器的主要技术指标测试方法很不统一。作者在从事 HPLC 紫外分光检测器仪器开发研究和应用研究的过程中, 对其主要技术指标及其测试方法进行了较深入的研究。本文根据仪器学理论^[2], 结合作者的实践, 从设计、制造、使用的角度, 对 HPLC 紫外分光检测器的主要性能技术指标之一的波长及其有关问题进行了研究, 分别提出了简易可行的测试方法。同时, 对几个有关问题进行讨论。

1 波长范围及准确度

1.1 波长范围

能保证使用时信/噪比(S/N) ≥ 2 的长波到短

波的波长区间叫波长范围。它直接影响仪器的使用范围^[2,3]。

1.2 波长准确度

实际测量波长的值与理论值的符合程度(或差值)叫波长准确度。仪器的波长不准会直接影响分析误差。

2 波长准确度的测试方法^[2]

(1) 采用中压或高压汞灯(作者采用国产原上海亚明灯泡厂生产的 GGQ80 仪用高压汞灯, 去掉玻璃外壳后直接使用), 对高压液相色谱仪(单色器)的 253.7、313.0、365.0、404.7、435.8、546.1、577.0、579.0 nm 等波长处的波长准确度进行测试, 效果非常好。因为 GGQ80 具有 80 W 的功率(交流 220 V 电压供电), 再去掉了玻璃外壳, 所以只要将去壳的 GGQ80 汞灯放在仪器的原光源位置(不需要作任何调节), 从长波向短波扫描, 就可以很方便的测试出 253.7~579.0 nm 波段的波长准确度。此方法非常方便、适用, 作者经常采用此方法, 都得到了满意的结果。

(2) 仪器的紫外区采用低压汞灯的 253.7 nm 或中压汞灯的 365.0 nm 测试; 在可见区用采中压汞灯的 435.8 nm 或 546.1 nm 测试; 在可见区也可采用氙灯的 656.1 nm 特征谱线测试。此种方法适用性较强, 对硅光电池、光电管、光电倍增管等做光接收器的高压液相色谱仪器都适用。已被很多科技

收稿日期: 2008-09-18; 修订日期: 2008-10-13。

编委简介: 李昌厚(1939-), 男, 《分析测试技术与仪器》编委, 教授, 博导, 主要从事分析仪器和仪器分析的研究。

工作者采用。

(3) 如果仪器是使用本身具有很大的放大倍数的光电倍增管做光接收器,则可以用一只低压汞灯(笔型如 HG20 型),从 600~250 nm 扫描,就可以得到 253.7、313.0、365.0、404.7、435.8、546.1、577.0、579.0 nm 等波长处的波长准确度。作者经常采用此方法,都得到了满意的结果。

(4) 如果液相色谱仪用硅光电池做光接收器,并且波长准确度要求不高(1 nm 左右),这时也可以用低压汞灯的 253.7 nm + 氙灯的 486.0 nm、656.1 nm 特征谱线进行波长准确度测试。具体做法也可以先测试低压汞灯的 253.7 nm(低压汞灯放在仪器原光源的位置,不需要做任何调节就可以进行测试),再测试仪器原有氙灯的 486.0、656.1 nm。此方法简单、适用,对操作者要求不高。目前,国内有些液相色谱仪的厂商就是采用这种方法,效果令人满意。

(5) 如果高压液相色谱仪的光接收器是光电倍增管,可以用一只低压汞灯或一只中压汞灯来测试波长准确度。具体操作是对汞灯(低压汞灯或中压汞灯)从长波向短波扫描,而后,每条特征谱线(579.0、577.0、546.1、435.8、404.7、365.0、313.0、253.7 nm)的理论值与实际测量值相减,就是波长准确度(数字前加“±”符号)。此种方法使用也很广泛。

上述 5 种测试方法的具体操作、数据处理方法如下:对有关灯的每条谱线各实测至少 3 次或 5 次(或扫描 3~5 次)。用各次实际测试波长值与理论值之差中的最大值(最差者)表示该波长的波长准确度,但数字前面一定要加“±”符号(我国计量检定规程,也是国际接轨的作法)。最后,选取各点中最差的那个点,作为整机的波长准确度。此种数据处理方法比较严格,作者认为应该如此。

也可对 3 次或 5 次实际测量波长值取均值,用均值与实践测量值之差中最大(最差)者,再与理论值(汞灯和氙灯特征谱线的实际值)之差来表示波长准确度(据美国 NBS^[4]和 ASTM^[5]标准判断)。此种方法容易低估仪器的波长准确度。

目前,也有科技工作者采用重铬酸钾作为波长准确度的测试物质(我国液相色谱仪的计量检定规程 JJ G705 - 2002 就是如此规定的),其具体做法是:扫描重铬酸钾,在重铬酸钾的连续光谱图上“设定”几个“波长”值位置作为“理论值”,再寻找相应的波长“实测”值,然后将重铬酸钾的已知值与实际

测量值相减,其差值就是仪器的波长准确度。作者认为此种方法不可采用。因为,从仪器学理论^[5]讲,波长准确度测试时,要求用具有理论值的线光源,并且,最好各线相邻 20 nm 内没有谱线^[2]。而此方法用连续光源(氙灯),利用重铬酸钾的吸收带来判断波长位置。而重铬酸钾没有尖锐的吸收线,它是一个吸收带,所以理论峰值不存在^[2]。而该方法采用“设定”几个“波长”值位置来作为“理论值”是不对的。因此,不可能找到与需要测试的波长的相应理论值的峰值位置。如果说找到了,那只是根据随意设定的值来估计,不可能准确。这种方法既不科学,又不与国际接轨,因此作者建议不能采用之。

3 波长的重复性及其测试方法

多次波长准确度测试值中的最大值与最小值之差就叫波长重复性。它直接影响仪器的稳定性。

波长重复性的测定在第 2 节所述的各方法中,每种方法的 3 次或 5 次测试中,取最大测试值与最小测试值之差,就是波长重复性。也有科技工作者,用取每种方法的 3 次或 5 次测试中的平均值,与各次测试值中的最大值或最小值之差中的最差者,作为波长重复性(美国 NBS^[4]和 ASTM^[5]标准判断)。作者认为前者较好,比较严谨。

4 讨论

对同一个物质,不同的波长处会有不同的摩尔吸光系数。不同的摩尔吸光系数就有不同的灵敏度和不同的分析误差。所以,HPLC 紫外分光检测器的使用者(特别是对要求高精度的分析测试工作时)必须高度重视波长范围、波长准确度和波长重复性。

本文所述的测试方法,既适用于各类 HPLC 紫外检测器,同时也适用于所有的紫外可见分光光度计和各类光谱仪器、各类单色器波长准确度的检测。

参考文献:

- [1] 李昌厚,孙吟秋.最常用的三种光学式 HPLC 及有关问题[J]. 光学与光谱技术,1989, 15(3).
- [2] 李昌厚. 仪器学理论与实践[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [3] 李昌厚. 紫外可见分光光度计[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [4] NBS. Standards for Checking the Calibration of Spectrophotometers (200 - 1 000 nm) [S]. Washington: D C Reissued January,1967.

- [5] ASTM. 1982 Annual Book of AST Standards(Part42) M, J O S A , (51) :802.
(Printed in USA) , P335 [S]. Vandenbelt , 1961 , J

Study on Wavelength Range , Wavelength Accuracy , Wavelength Repetition and Test Method in HPLC

LI Chang-hou

(Shanghai Research Center of Biotechnology , Academia Sinica , Shanghai 200233 , China)

Abstract : The importance and test methods of wavelength range , wavelength accuracy , wavelength repetition in HPLC was discussed. Meanwhile the problem Relative Wavelength et al. was discussed in this paper.

Key words : HPLC ; wavelenth range ; wavelenth accuracy ; wavelength repetitione ; test method

Classifying number : O657. 32

关于举办《第十二届国际电分析化学会议》的通知

《第十二届国际电分析化学会议》经中国科学院批准,并受中国化学会委托,由中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室举办。会议将于 2009 年 8 月 12 日至 15 日在长春应化所举办。会议将特邀国际著名电分析化学家参加,会议语言为英语。欢迎参加,如提出报告,请交英文摘要一份(截止日期:2009 年 5 月 15 日。联系人:张柏林 研究员,吉林省长春市人民大街 5625 号,邮编:130022 电话/传真:0431 - 85262430,电子邮件:blzhang@ciac.jl.cn),随后寄上录用通知(国内来宾注册费 600 元)。最新详细信息(电子文件格式等)请登录 <http://isec.ciac.jl.cn/>。

《第十二届国际电分析化学会议》组委会

2008 - 12