

色谱常见使用问题的详细解答

一、用 HPLC 进行分析时保留时间有时发生漂移，有时发生快速变化，原因何在?如何解决?

答：关于漂移问题：

- 1、温度控制不好，解决方法是采用恒温装置，保持柱温恒定
- 2、流动相发生变化，解决办法是防止流动相发生蒸发、反应等
- 3、柱子未平衡好，需对柱子进行更长时间的平衡

关于快速变化问题

- 1、流速发生变化，解决办法是重新设定流速，使之保持稳定
- 2、泵中有气泡，可通过排气等操作将气泡赶出。
- 3、流动相不合适，解决办法为改换流动相或使流动相在控制室内进行适当混合

二、色质联用中毛细柱的选择应注意什么问题?

答：1、柱效要高；2、热稳定性好；3、化学惰性强

具体选择应注意：1、柱极性。根据分析样品选择不同极性的柱子进行分析；2、柱子内径。内径大小决定柱容量；3、液膜厚度。分析样品温度不一样，对膜厚有不同要求，温度高液膜要厚，温度低液膜要薄；4、柱长度。柱越长，柱效越高，分离效果越好，但也存在吸附问题，柱子过长，分析时间长，因此要根据样品考虑柱子长度；5、外涂层(柱体)的选择；6、另外还有仪器型号、分析对象等因素。

三、液相色谱中峰出现拖尾或出现双峰的原因是什么?

- 答：1、筛板堵塞或柱失效，解决办法是反向冲洗柱子，替换筛板或更换柱子。
- 2、存在干扰峰，解决办法为使用较长的柱子，改换流动相或更换选择性好的柱子

四、从哪些方面可以简单判别毛细管柱子的热稳定性好坏?

- 答：1、分配容量(或容量因子)K，好的柱子在高温运行后，分配容量 K 不应有明显的下降，否则，说明柱子的热稳定性不好。
- 2、理论塔板数 n，热稳定性好的柱子经受高温后，理论塔板数应基本保持恒定
- 3、柱子的极性。热稳定性好的柱子，高温前后极性变化不大，具体表现为保留指数 I 值没有大的变化。
- 4、噪声。热稳定性好的柱子在高温下使用后，噪声不能增加。
- 5、柱子的去活层，毛细管柱子涂固定液前内部一般要用去活性试剂去活以增加惰性。质量好的毛细管柱子高温后，去活层不应该变化，表现在对强极性样品或酸性样品的吸附性不能增加。

五、为什么进样器内的玻璃衬套会对色谱行为造成影响?

答：进样器内的玻璃衬套主要有下列作用：

- 1、提供一个温度均匀的汽化室，防止局部过热。

2、玻璃的惰性不如不锈钢好，减少了在汽化期间样品分解的可能性。

3、易于拆换清洗，以保持清洁的汽化室表面，一些痕量非挥发性组分会逐渐积累残存于汽化室，高温下会慢慢分解，使基流增加，噪声增大，通过清洗玻璃衬套可以消除这种影响。

4、可根据需要选择管壁厚度及内径适宜的玻璃衬套，以改变汽化室的体积，而不用更换整个进样加热块。从以上几个方面可以知道玻璃衬套对色谱行为造成影响的原因。

六、毛细管色谱分流进样时，非线性分流的主要原因是什么？

答：1、进样器温度太低，样品汽化不完全，发生分级分流。

2、进样器温度太高，某些组分可能发生热分解，也有的样品可能发生催化分解，或样品部分地被吸附在进样器内表面上。

3、在分流点以前样品没有混合均匀或混合不充分。

4、系统的进样垫，柱接头等地方漏气。

七、HPLC 灵敏度不够的主要原因及解决办法

答：1、样品量不足：解决办法为增加样品量

2、样品未从柱子中流出：可根据样品的化学性质改变流动相或柱子

3、样品与检测器不匹配：根据样品化学性质调整波长或改换检测器

4、检测器衰减太多：调整衰减即可。

5、检测器时间常数太大：解决办法为降低时间参数

6、检测器池窗污染：解决办法为清洗池窗。

7、检测池中有气泡：解决办法为排气。

8、记录仪测压范围不当：调整电压范围即可。

9、流动相流量不合适：调整流速即可。

10、检测器与记录仪超出校正曲线：解决办法为检查记录仪与检测器，重作校正曲线。

八、做 HPLC 分析时，柱压不稳定，原因何在？如何解决？

答：原因可能有：

1、泵内有空气，解决的办法是清除泵内空气，对溶剂进行脱气处理；

2、比例阀失效，更换比例阀即可。

3、泵密封垫损坏，更换密封垫即可。

4、溶剂中的气泡，解决的办法是对溶剂脱气，必要时改变脱气方法；

5、系统检漏，找出漏点，密封即可。

6、梯度洗脱，这时压力波动是正常的。

九、做 PGS / MS 分析时，如何防止焦油状污染物进入毛细柱？

答：聚合物，尤其是一些含氮、硫及卤素的高分子裂解时，常有焦油状物质产生。为防止这种焦油状物质进入毛细柱造成污染而使柱性能下降，可采用保护预柱，即在裂解器与毛细柱之间接一填充

预柱，通过控制预柱温度而使焦油状物质滞留在预柱内，预注可置于 GC 气化室内，这样既容易控制温度，又减少系统的死体积，当然，预柱填料需经常更换。

十、我最近更换了另一种牌号的 ODS 柱，虽然分离情况仍可以，但保留时间不能重现，为什么？

答：这是因为被分析物可能具有形成氢键的能力。尽管过去几年来，填料的制造技术有了极大的提高，但不同的厂商的 ODS 填料表面硅醇基的浓度不同。正是这些硅醇基可能与样品发生相互作用。因此，同一被分析物中的各组分在不同牌号的 ODS 柱上的相对保留时间就可能不同。在流动相中加入少量竞争物，如三乙胺(TEA)，将会使硅醇基的成键能力饱和，从而保证不同牌号柱子上的相对保留时间具有较好的重现性。

十一、我购买的 HPLC 柱验收测试时柱压过高，请问为什么？

答：柱压过高是 HPLC 柱用户最常碰到的问题。其原因有多方面，而且常常并不是柱子本身的问题，您可按下面步骤检查问题的起因。

- 1、拆去保护柱，看柱压是否还高，否则是保护柱的问题，若柱压仍高，再检查；
- 2、把色谱柱从仪器上取下，看压力是否下降，否则是管路堵塞，需清洗，若压力下降，再检查。
- 3、将柱子的进出口反过来接在仪器上，用 10 倍柱体积的流动相冲洗柱子，(此时不要连接检测器，以防固体颗粒进入流动性。这时，如果柱压仍不下降，再检查；
- 4、更换柱子入口筛板，若柱压下降，说明你的溶剂或样品含有颗粒杂质，正是这些杂质将筛板堵塞引起压力上升。若柱压还高，请与厂商联系。一般情况下，在进样器与保护柱之间接一个在线过滤器便可避免柱压过高的问题，SGE 提供的 Rheodyne 7315 型过滤器就是解决这一问题的最佳选择。

十二、高温毛细柱的使用寿命一般为多长？

答：毛细柱寿命除决定于柱子本身的性能外，在很大程度上取决于使用情况，比如使用温度、样品状态，进样量等，如果在其使用温度范围内，样品干净，色谱柱不被污染的情况下，柱子寿命一般在 2—3 年之间。

十三、如毛细管柱被污染，柱效和分辨率降低，有何方法使它恢复？是否可通过老化来解决？

答：根据柱污染程度可采取不同的方法来解决，如果污染不严重，污染物沸点不是太高，可通过老化来解决，但老化温度不可超过柱子的最高使用温度，且一般要较长时间(8—30 小时)，如果污染较严重，或通过老化仍不能使柱性能恢复，那就必须采用溶剂清洗，通常是用 5 倍柱容积的溶剂(如正戊烷，二氯甲烷等)通过色谱柱。当然，清洗溶剂用的越多，对柱性能的损坏越大，清洗完后，在通载气老化一定时间，如果柱性能恢复，便可继续使用。必须指出：只有交联柱才能清洗，对于非交联柱，清洗柱会彻底失效，因为固定液被洗掉了，至于清洗用溶剂的选择，可参考说明书。

十四、BPX70 毛细管柱是否可用于 GC / MS 分析？

答：完全可以，BPX70 为极性柱，使用温度范围宽(25—260℃)，程序升温可达 290℃，流失低，

适合于分析脂肪酸甲酯的各种位置和几何异构体，药物异构体，碳水化合物等。因 BPX70 为交联柱，故用于 GC / MS 很稳定，污染后可清洗再生。

十五、色谱管路故障的排除

1、管路阻塞

阻塞是管路的主要故障。管路完全或部分阻塞是由下列原因引起的：

- ①没有很好过滤流动相；
- ②样品中有微粒；
- ③泵或进样器垫圈产生碎片；
- ④预柱、护柱和分析柱中漏出填料；
- ⑤毛刺和锉屑进入；
- ⑥流动相中的结晶盐；
- ⑦微生物⑧系统中进入了其它颗粒性物质。

系统中管路阻塞的现象很少见，常见的是烧结过滤片（玻璃砂芯）阻塞。用烧结过滤器或过滤片（孔径 2-10 μ m）能去掉阻塞管路的微粒（如 0.25mm 管径）。

管路完全阻塞，压力会突然升高，超压。部分阻塞开始不明显，不断滞留在液流中的微粒压力会慢慢升高，最后完全阻塞。管路阻塞时会看到接头或垫圈渗漏，低压好一些，高压渗漏明显。

用系统分段法检查阻塞的管路，从后向前分别松开接头检查，找到阻塞管路后，应立即拆下来疏导或换新。如果是非刚性物质阻塞，如生物样品中的生物物质（蛋白质）、微生物等，可用极细的金属丝导通，也可以在火头上烧一烧，使有机物炭化，而后再导通。如果是刚性物质阻塞，要导通则十分困难，采用反冲的办法有时能成功。就是将管子调头用泵冲洗。操作时要注意保护眼睛和裸露的皮肤，因阻塞物会以很高的速度冲出来。

无法导通的管路要换上同样规格的管子。如果换上新管后又被阻塞，则应该停机检查上面提到的引起阻塞的几种原因。

2、管头损坏

管子切口不平整或密封卡套不平滑都不能密封。要重新切割去坏管头（包括卡套），调换新卡套，装上接头挤压卡紧。大多数渗漏是由接头引起的，而不是管子问题。

3、接头故障的预防与解决办法

几乎所有的接头故障都是可以避免的，按下列要求可以有效地预防接头的故障：

- ①使用仪器设计时的部件（如同一厂商的部件）；
- ②使用效果好的接头部件（如零死体积，即样品通过时 $V_0=0$ ）；
- ③按要求组装和拧紧接头，不可拧得过紧；
- ④避免接头混淆使用，及时作好标记；
- ⑤使用合格的工具。

组装/拆卸接头时要检查在密封面上有无微粒和无机盐晶体。这些污染物影响密封性能，更严重的使螺丝咬死。最后，旋紧接头时最好用死扳手，保证不咬坏接头。

平时要准备一些要能用到的各种接头备件。

十六、色谱泵的保养

要保持泵的良好操作性能，必须维护系统的清洁，保证溶剂和试剂的质量，对流动相进行过滤和脱气，下面列出预防泵故障的几项措施：

- 1)、用高质量试剂和 HPLC 级溶剂；
- 2)、过滤流动相和溶剂；
- 3)、脱气；
- 4)、每天开始使用时放空排气，工作结束后从泵中洗去缓冲液；
- 5)、不让水或腐蚀性溶剂滞留泵中；
- 6)、定期更换垫圈；
- 7)、需要时加润滑油；
- 8)、查阅有关泵操作手册中的其它建议。

处于良好操作状态的泵，应该能使色谱图上的基线平稳；保留时间的重复性好。在等度洗脱时压力波动小于 2%。梯度洗脱时压力变化应是缓慢和平稳的。

为了使故障发生后尽快排除，平时应常备密封、单向阀（入口与出口）、泵头装置、各式接头、保险丝等部件，以及更换工具。

十七、色谱仪器检定标准

色谱仪检定的特点

A) 检定时间长

检定一台色谱仪一般需要 3-5 个小时，时间较长。色谱仪在运行前首先要进行 1-2 小时的预热，否则仪器的基线难以稳定。另外在在检定过程中，基线和重复性的检定也都需要较长的时间。

B) 仪器型号繁多、操作复杂

色谱仪在运行前，需要更换色谱柱、流动相，启动泵和检测器，并对衰减、流速、纸速等进行设置，所以操作比较复杂。另外，色谱仪的型号比较多，各种型号色谱仪的操作界面都不尽相同，尤其是计算机工作站的引入，使得各种型号色谱仪的操作差别更大。

C) 维修困难

色谱仪的内部电路非常复杂，而且零部件的更换必须使用相应厂家生产的配套产品，因而维修比较困难。

D) 标准物质是主要的计量装置

不论是气相色谱仪，还是液相色谱仪，基线噪声、基线漂移、最小检测浓度都是三个最重要的指标，而对它们的检定只需使用标准物质即可进行

E) 分布不均衡

色谱仪检定的方法

1、液相色谱仪

实验室液相色谱仪是由输液系统、进样器、色谱柱、检测器和数据记录处理装置等几部分组成的分析仪器。图 3 是典型的液相色谱仪组成方框图。它利用样品中各组分在色谱柱中固定相和流动相间分配系数或吸附系数的差异，将各组分分离后进行检测，并根据各组分的保留时间和响应值进行定性、

定量分析。

主要检定项目：

泵流量设定值误差 SS、流量稳定性误差 SR

检定输液系统

定性、定量重复性

最小检测浓度、基线噪声、基线漂移

关于最小检测浓度的检定，规程规定“在静态条件下，用注射器注入标准物质”然后用最小检测限公式计算，得出结论（所谓静态条件，即在不开泵的情况下，把样品直接注入样品池）。但由于近年来液相色谱仪结构设计有了较大的改变，尤其是计算机工作站的引入，使它的超作方式更为简化。因而，原来规程所规定的检测方法已不在适用。对于它的检定应在动态条件下（即正常的开机进样情况），注入 20ML 标准物质，然后用最小检测限公式进行计算。若仪器的进样筏小于 20ML 应把测得的峰高换算成 20ML 时的峰高（20ML/进样筏容量*所测峰高）。以上测量方法与即将出版的液相色谱仪新检定规程上的方法是相同的。

至于基线噪声和基线漂移按照规程所规定的条件对仪器进行设定后，使仪器空走半小时即可在色谱图中读出。单位 AU 是一个紫外吸收的单位，一般它与单位 MV 是相对应的，如果仪器色谱图上显示的单位是 MV，可以通过查找仪器说明书找到换算关系。

检定原理：依据 JJG705-90《实验室液相色谱仪计量检定规程》。

检定周期：两年

2、气相色谱仪

气相色谱仪是根据试样中各组分在气固或气液两相间的吸附或分配系数的不同随载气移动而进行分离的仪器。分离后的组分按保留时间的先后顺序进入检测器，并自动记录检测信号，依据组分的保留时间和响应值进行定性、定量分析。气相色谱仪由气源、气路控制系统、进样系统、色谱柱、检测器、电气系统、记录及处理系统组成。

主要检定项目：载气流速稳定性、柱箱温度稳定性、基线噪声、基线漂移、灵敏度、检测限。

检定原理：依据 JJG700-1999《气相色谱仪计量检定规程》。

检定周期：2 年

十八、气相色谱常见故障检查诊断

气相色谱种类很多，性能也各有差别。主要包括两个系统。即气路系统和电路系统。

气路系统主要有压力表、净化器、稳压阀、稳流阀、转子流量计、六通进样阀、进样器、色谱柱、检测器等；电子系统包括各用电部件的稳压电源、温控装置、放大线路、自动进样和收集装置、数据处理机和记录仪等电子器件。

要分析和判断色谱仪的故障所在，就必须熟悉气相色谱的流程和气、电路这两大系统，特别是构成这两个系统部件的结构、功能。色谱仪的故障是多种多样的，而且某一故障产生的原因也是多方面的，必须采用部分检查的方法，即排除法，才可能缩小故障的范围。对于气路系统出的故障，不外乎是各种气体（特别是载气）有漏气的现象、气体不好、气体稳压稳流不好等等。

例如：基线若始终向下漂移，即“电平”值逐渐变小至负数，这极有可能是载气泄漏，那么就要

查找各个接头部件是否有漏的现象，若不漏而基线仍漂移，则可能是电路系统的故障。色谱气路上的故障，分析工作者可以找出并排除，但要排除电路上的故障则并非易事，就需要分析工作者有一定的电子线路方面的知识，并且要弄清楚主机接线图和各系统的电原理图（尤其是接线图）。在这些图上清楚的画出了控制单元和被控对象间的关系，具体的标明了各接插件引线的编号和去向，按图去检查电路、找寻故障是非常方便的。

色谱电路系统的故障，一般是温度控制系统的故障和检测放大系统的故障，当然不排除供给各系统的电源的故障。温控系统（包括柱温、检测器温控、进样器温控）的主回路由可控硅和加热丝所组成，可控硅导通角的变化，使加热功率变化，而使温度变化（恒定或不恒定）。而控制可控硅导通角变化的是辅回路（或称控温电路），包括铂电阻（热敏元件）和线性集成电路等等。

由上所述可知，若是温控系统的毛病，则应首先要检查可控硅是否坏，加热丝是否坏（断或短路），铂电阻是否坏（断或短路）或是否接触不良。其次检查辅回路的其它电子部件。

放大系统常见故障是离子讯号线受潮或断开、高阻开关（即灵敏度选择）受潮、集成运算放大器（如：AD515JH、OP07等）性能变差或坏等等。

色谱故障的排除既要做到局部又要考虑到整体，有“果”必有“因”，弄清线路的走向，逐步排除产生“果”（故障）的“因”，把故障范围缩小。

例如：若出现基线不停的抖动或基线噪音很大时，可先将放大器的讯号输入线断开，观察基线情况，如果恢复正常，则说明故障不在放大器和处理机（或记录仪），而在气路部分或温度控制单元；反之，则说明故障发生在放大器、记录仪（或处理机）等单元上。这种部分排除的检查故障方法，在实际中是非常有用的。

十九、液相色谱柱使用及保养

液相色谱仪由高压液体泵、检测器及液相色谱柱等三部分组成，其中液相色谱柱的正确安装和使用，是液相色谱工作的关键；也是液相色谱工作者获得正确可靠的实验数据的必经之路。

（一）、液相色谱柱的安装：

1、液相色谱柱的结构：

a、空柱由柱接头、柱管及滤片组装而成。

柱接头采用低死体积结构，柱接头是两端螺纹组件，一端是为 7/16 英寸外螺纹，另一端是 3 / 16 英寸的内螺纹(国内外已规范化)。7 / 16 英寸外螺纹与 1 / 4 英寸柱管($\Phi 6.35\text{mm}$)连接，中间放置压环用于密封。3 / 16 英寸的内螺纹与 1 / 16 英寸($\Phi 1.57\text{mm}$)的连接管连接，中间也放置压环用于柱接头的密封。为了尽量减少柱外死体积，在安装色谱柱时，用 $\Phi 1.57\text{mm}$ 连接管通过空心螺钉压环后要尽量插到底，然后再拧紧空心螺钉。压环被空心螺钉挤压变形后紧箍在连接管上(连接管通过压环后露出的管长度应严格控制在 2.5mm 长或其他固定尺寸)。

在两端柱接头内，柱管两端各放置一片不锈钢滤片(或滤网)，用于封堵柱填料不被流动相冲出柱外而流失。空柱各组件均为 316# 不锈钢材质，能耐受一般的溶剂作用。但由于含氯化物的溶剂对其有一定的腐蚀性，故使用时要注意，柱及连接管内不能长时间存留此类溶剂，以避免腐蚀。

b、柱填料：

液相色谱柱的分离作用是在填料与流动相之间进行的，柱子的分类是依据填料类型而定。

正相柱：多以硅胶为柱填料。根据外型可分为无定型和球型两种，其颗粒直径在 3—10 μm 的范围内。另一类正相填料是硅胶表面键合—CN，—NH₂ 等官能团即所谓的键合相硅胶。

反相柱：主要是以硅胶为基质，在其表面键合十八烷基官能团(ODS)的非极性填料。也有无定型和球型之分。

常用的其他的反相填料还有键合 C8、C4、C2、苯基等，其颗粒粒径在 3—10 μm 之间。

2, 色谱柱的安装:

a、拆开柱包装盒，确认色谱柱的类型、尺寸、出厂日期以及柱内贮存的溶剂。

b、拧下柱两端接头的密封堵头放回包装盒供备用。

c、按柱管上标示的流动相流向，将色谱柱的入口端通过连接管与进样阀出口相连接(如条件允许，建议在柱前使用保护柱)；柱的出口与检测器连接。连接管是外径为 1.57mm、内径为 0.1-0.3mm 的不锈钢管。连接管的两端均有空心螺钉及密封用压环。在接管时一定要设法降低柱外死体积。连接管通过空心螺钉、压环后尽量用力插到底，然后顺时针拧紧空心螺钉，直到拧不动为止，再用扳手继续顺时针拧 1 / 4-1 / 2 圈，切记不要用力过大。如色谱柱通过流动相加压后有漏液现象，请用扳手继续顺时针拧 1 / 4 圈，直至不漏液为止。

(二)、液相色谱柱的使用:

色谱柱在使用前，最好进行柱的性能测试，并将结果保存起来，作为今后评价柱性能变化的参考。但要注意：柱性能可能由于所使用的样品、流动相、柱温等条件的差异而有所不同；另外，在做柱性能测试时是按照色谱柱出厂报告中的条件进行(出厂测试所使用的条件是最佳条件)，只有这样，测得的结果才有可比性。

1、样品的前处理:

a、最好使用流动相溶解样品。

b、使用予处理柱除去样品中的强极性或柱填料产生不可逆吸附的杂质。

c、使用 0.45 μm 的过滤膜过滤除去微粒杂质。

2、流动相的配制:

液相色谱是样品组分在柱填料与流动相之间质量交换而达到分离的目的，因此要求流动相具备以下的特点:

a、流动相对样品具有一定的溶解能力，保证样品组分不会沉淀在柱中(或长时间保留在柱中)。

b、流动相具有一定惰性，与样品不产生化学反应(特殊情况除外)。

c、流动相的黏度要尽量小，以便在使用较长的分析柱时能得到好的分离效果；同时降低柱压降，延长液体泵的使用寿命(可运用提高温度的方法降低流动相的黏度)。

d、流动相的物化性质要与使用的检测器相适应。如使用 UV 检测器，最好使用对紫外吸收较低的溶剂配制。e、流动相沸点不要太低，否则容易产生气泡，导致实验无法进行。

f、在流动相配制好后，一定要进行脱气。除去溶解在流动相中的微量气体既有利于检测，还可以防止流动相中的微量氧与样品发生作用。

3、流动相流速的选择:

因柱效是柱中流动相线性流速的函数，使用不同的流速可得到不同的柱效。对于一根特定的色谱柱，要追求最佳柱效，最好使用最佳流速。对内径为 4.6mm 的色谱柱，流速一般选择 1ml / min，对于

内径为 4.0mm 柱, 流速 0.8ml / min 为佳。

当选最佳流速时, 分析时间可能延长。可采用改变流动相的洗涤强度的方法以缩短分析时间(如使用反相柱时, 可适当增加甲醇或乙腈的含量)。

注意:

a. 由于甲醇廉价, 对于反相柱推荐使用甲醇体系(必须使用乙腈的场合除外)。

b. 对于正相柱推荐使用沸程为 30-60℃ 的石油醚或提纯后的己烷作流动相, 没有提纯的己烷不得使用。用水最好使用超纯水(电阻率大于 18 兆欧), 去离子水及双蒸水中含有酚类杂质, 有可能影响分析结果。

c. 含水流动相最好在实验前配制, 尤其是夏天使用缓冲溶液作为流动相不要过夜。最好加入叠氮化钠, 防止细菌生长。

d. 流动相要求使用 0.45 μ m 滤膜过滤, 除去微粒杂质。

e. 使用 HPLC 级溶剂配制流动相, 使用合适的流动相可延长色谱柱的使用寿命, 提高柱性能。

4、柱性能测试:

启动液相色谱仪: a、流动相流速设定为 1ml / min。

b、UV 检测器波长设定为 254nm。

使用出厂测试时使用的流动相组成及测试样品。

记录并计算测试结果。

*参考(标准 JB5226-91)液相色谱仪测试用标准色谱柱

二十、泵的操作与维护

正如人的心脏一样, 高效液相色谱仪中的高压恒流泵必须能可靠的运转. 但是要真正做到长时间低维护的可靠运转, 就需要对泵有足够的了解, 并注意与之有关的事项.

1. 通常的设计

目前作为商品出售的高压恒流泵多为往复式柱塞泵, 结构原理如图 1 所示. 凸轮与连杆将电机的圆周运动转变为柱塞杆的线性运动, 在有单向阀的结构中, 柱塞杆将常压下储液瓶中的流动相吸至泵腔后再送出, 其耐压可达 41MPa. 通过改变凸轮的形状和电机的转速及柱塞杆的尺寸可以将流动相的脉动降至最小. 如果对泵的各个部分都有清楚的认识, 将来排出操作过程中出现的故障就很简单了.

单向阀: 泵头通常由两部分组成--单向阀和密封圈-柱塞杆. 图 2 是单向阀的示意图. 该单向阀一般由阀体\塑料\或陶瓷阀座和红宝石球组成. 在压力的作用下宝石球离开阀座(图 2-a), 流动相流过单向阀; 反之, 在反向力的作用下, 宝石球回到阀座上(图 2-b), 此时流动相不再流过单向阀. 显然宝石球与阀座之间的配合必须非常适合才能防止流动相的泄漏. 为了保证单向阀不发生泄漏, 一些单向阀中安装了两套宝石球和阀座, 也有一些单向阀是将宝石球用一个合适的弹簧压在阀座上. 在不同的应用领域, 单向阀阀体的材料有所不同, 例如考虑生物兼容性的系统, 单向阀的阀体往往采用金属钛, 而不用不锈钢. 为了降低成本和减少维护费用, 一些生产厂商还采用了可置换式的卡套式塑料单元件, 当然其功能仍保持不变.

柱塞杆与密封圈: 柱塞杆在泵头内做前后的往复运动, 完成将流动相吸入泵头然后再输出的过程. 柱塞杆的典型材料蓝宝石, 不锈钢或其他材质的柱塞杆往往用于一些特殊的领域. 泵头内的密封圈是防止流动相从柱塞杆的周围流走而设计的. 图 3 是柱塞杆的运动过程示意图.

在吸液过程中(图 3-b),由于柱塞杆的运动而在泵腔内形成负压.此时因色谱柱的,泵头外的压力显然高于泵头内,在这两种压差下出口单向阀的宝石球落回到阀座上;而对于入口单向阀,因为外界大气压大于泵腔内的压力,宝石球离开阀座,流动相顺利的进入泵腔.

与此相反的输液过程见图 3-b.由于柱塞杆的运动使压力增加,入口单向阀的宝石球落回到阀座,入口单向阀处于关闭状态;当泵头内的压力继续增加,并且超过了泵头外的色谱柱的反压时,出口单向阀开启,流动相输出.

二十一、装填柱子的注意事项

装填柱子的注意事项:

(1) 装填过程中要边抽、边敲、边加入固定相,以保证装的紧密而均匀。不要敲得过猛,以免震碎载体,也不要让固定相断流,致使管内的固定相时松时紧,甚至形成断裂。

(2) 要分别标明柱管两端。装填时接真空泵的一端比较紧密,应同检测器连接;另一端则同检测器连接。如果接反了,柱效会降低 10%左右。

二十二、液相色谱仪的最小检测浓度和流通池的光程(体积)有什么含义?

某些国产仪器在公布其技术指标时,大多只写了“噪音和漂移”的指标。用户觉得指标都差不多,但却忽略了另外二个较为重要的指标:“最小检测浓度和光程”,这二个指标有什么作用呢?它们代表了什么含义?

这里来解释一下:

最小检测浓度是考验仪器的灵敏度。最小检测浓度数值大,仪器的灵敏度就小,不能反应真正的噪音和漂移水平。例如:我公司的最小检测浓度小于 $1 \times 10^{-8} \text{g/ml}$ (萘/甲醇溶液),而某些仪器是: $4 \times 10^{-8} \text{g/ml}$ (萘/甲醇溶液)。这就说明我们的仪器灵敏度大,可以检测更微量的样品。同样如我公司仪器把最小检测浓度调较得和其它产品是一样,也就表明我们可以做得比其它产品噪音和漂移低 4 倍。

可以从这个公式看出: 最小检测浓度 = $2 \times$ 仪器的噪音 \times 进样的样品浓度 / 样品的峰高值

那光程又代表什么? 我们先看下面一个公式,比尔定律:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon CL$$

A 是吸收率; I_0 代表参照池的光强; I 为样品池的光强; ϵ 为摩尔吸光系数; C 是样品浓度; L 就是流通池的光程。

可以看出在同样的“C”样品浓度情况下,“L”流通池的光程越大,仪器的“A 吸收率”也就越大。这样可以检测到的样品浓度就越小。为什么有些厂家把仪器的流通池光程做得很小,有些只有: 3.5mm、4.5mm 或 5.5mm,而不是我公司的 8mm。这是因为这些厂家不能有效的降低整个系统的“噪音和漂移水平”,只能牺牲流通池光程,也就是牺牲了仪器的检测灵敏度和最小检测浓度,来达到降低“噪音和漂移水平”目的。用通俗的说法比喻: HPLC 就是一台音响,光程就是这台音响的音量控制键,光程越小就是把音量调小了,耳朵对音响本身的噪音和失真(可以理解为仪器的噪音和漂移)感觉就越小。但也就说明了这些仪器整体系统的制造水平不高。