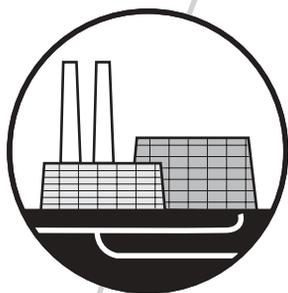


# Waters 2996 PDA 检测器

操作员指南



Waters

34 Maple Street  
Milford, MA 01757

715020232MD, 版本 C

# 声明

---

本档中的信息如有更改，恕不另行通知，且这些信息并不作为 Waters Corporation 的承诺。Waters Corporation 对此档中可能出现的任何错误不负任何责任。本档在出版时被认为是完整并且准确的。任何情况下，对与使用此档有关或因使用此档而导致的偶发或继发的损害，Waters Corporation 不负任何责任。

© 2006 WATERS CORPORATION. 于美国印刷。保留所有权利。未经出版商的书面允许，不得以任何形式转载本档或其中的任何部分。

Millennium、PIC 和 Waters 为注册商标，busLAC/E 和 PowerStation 为 Waters 公司的注册商标。

Micromass 是注册商标，MassLynx 是 Micromass Ltd. 的商标。

所有其它商标或注册商标均为其各自所有者的专有资产。



**注意：**使用本仪器时，请遵守质量控制和方法开发的通用步骤。

如果发现某种化合物的稳定性有变化、两种化合物间的溶解性状有变化或峰形状有变化，请立即查明变化原因。变化原因查明之前，请不要相信分离结果。

**注意：**本仪器的安装类别（超电压类别）为 II 级。II 级类别适用于使用本地电压水平（如墙壁电源插座）的设备。



**注意：**用户若未经有关法规认证部门明确允许便对本设备进行改变或改装，将失去合法使用该设备的权利。



**注意：**处理承压聚合物管路时应该谨慎：

- 处于承压聚合物管路附近时，一定要戴防护眼镜。
- 熄灭附近所有明火。
- 请勿使用严重挤压或扭曲的 Tefzel 管线。
- 不要在 Tefzel 管线中使用四氢呋喃 (THF)、浓硝酸或浓硫酸。
- 使用二氯甲烷及二甲基亚砜会导致 Tefzel 管线膨胀，大大降低管线的耐压能力。



**注意：**用户应当清楚，如果以制造商未指定的方式使用设备，可能有损设备所提供的保护。



**注意：**为防止发生火灾，更换保险丝时应使用相同类型和额定值的保险丝。



**注意：**为避免可能的电击，请在维修该仪器前关闭仪器并断开电源线。

## 常用符号

	直流电
	交流电
	保护性导线端子
	框架或底盘接线端
	注意或参阅手册
	注意：热表面或高温
	注意：小心触电（高压）
	注意：小心针刺
	注意：紫外线

# 2996 PDA 检测器信息

---

## 设计用途

“Waters® 2996 PDA 检测器”可应用于体外诊断性测试，以分析多种化合物，包括诊断指示剂和疗效监测化合物。开发方法时，请遵照“American Journal of Medical Technology（美国医疗科技期刊）”（1978）44 卷第 1 期 30 - 37 页上的“Protocol for the Adoption of Analytical Methods in the Clinical Chemistry Laboratory”。此协议包含实现系统性能和方法性能所需的完善操作步骤和方法。

## 生物危害性

分析生理性液体时，请采取一切预防措施，把所有的标本都当成潜在的传染源来对待。相关预防措施请参阅 CDC – NIH Manual（CDC – NIH 手册）上的“CDC Guidelines on Specimen Handling”。

## 校正

按照适用的纯标准样校正方法对方法进行校正。生成标准曲线时至少应使用 5 个标准样。浓度范围应覆盖质量控制样本、典型标本和非典型标本的全部范围。

## 质量控制

常规运行三个质量控制样本。质量控制样本应代表正常水平以下、正常水平和正常水平以上的化合物。确保质量控制样本的结果在允许范围内，并在每天、每次测试时都评估其精确度。质量控制样本的结果超出范围时搜集的数据可能无效。除非您确信色谱系统的性能可靠，否则不要报告此类数据。

## 常规维护

要清洁 Waters 2996 PDA 检测器的外部，请只使用不起毛的软纸巾或用中性肥皂和水浸湿的棉布。



# 目录

---

前言 .....	xiii
<b>第 1 章</b>	
<b>安装 .....</b>	<b>1</b>
1.1 安装场地要求 .....	1
1.2 电源连接 .....	2
1.3 Millennium <sup>32</sup> 工作站连接 .....	3
1.3.1 连接 IEEE-488 电缆 .....	3
1.3.2 设置 IEEE-488 地址 .....	5
1.4 非 IEEE-488 通信连接 .....	6
1.4.1 连接模拟输出电缆 .....	6
1.4.2 连接事件电缆 .....	7
1.5 流路连接 .....	9
1.6 启动和关闭检测器 .....	11
<b>第 2 章</b>	
<b>诊断和校正 .....</b>	<b>15</b>
2.1 诊断 .....	15
2.2 用户发起诊断 .....	17
2.3 PDA 校正 .....	17
<b>第 3 章</b>	
<b>维护 .....</b>	<b>19</b>
3.1 流动池维护 .....	19
3.1.1 冲洗流动池 .....	19
3.1.2 取出流动池 .....	20
3.1.3 拆卸并清洁流动池 .....	22
3.1.4 安装流动池装置 .....	24
3.2 更换灯 .....	25
3.3 更换保险丝 .....	27

<b>第 4 章</b>	
<b>2996 PDA 检测器的光学原理</b>	29
4.1	2996 检测器光学元件..... 29
4.2	分辨光谱数据..... 31
4.3	测量光电二极管上的光..... 32
4.4	计算吸光度数据点..... 35
4.4.1	计算吸光度..... 35
4.4.2	分辨率..... 37
4.4.3	过滤数据..... 38
<b>第 5 章</b>	
<b>光谱对照原理</b>	39
5.1	比较吸收光谱..... 39
5.2	将光谱表示为向量..... 40
5.2.1	由两个波长得出的向量..... 41
5.2.2	由多个波长得出的向量..... 41
5.3	光谱对照角..... 42
5.4	不良影响..... 44
5.4.1	检测器噪音..... 44
5.4.2	测光误差..... 44
5.4.3	溶剂变化..... 45
5.4.4	阈值角度..... 45
<b>附录 A</b>	
<b>检测器规格</b>	47
<b>附录 B</b>	
<b>备件</b>	49
<b>附录 C</b>	
<b>流动相吸光度</b>	51
<b>索引</b>	55

# 图形清单

---

1-1	Waters 2996 PDA 检测器尺寸.....	2
1-2	检测器后面板.....	3
1-3	IEEE-488 电缆连接示例.....	4
1-4	确定 IEEE-488 开关的位置.....	5
1-5	模拟输出端子板.....	7
1-6	事件输入 / 输出端子板 .....	8
1-7	压力螺丝装配.....	10
1-8	2996 检测器指示灯.....	12
3-1	取出流动池装置.....	21
3-2	流动池和流路连接装置.....	22
3-3	拆卸流动池.....	23
3-4	灯电源连接器和安装螺丝.....	26
3-5	保险丝盒.....	27
4-1	光学装置的光路.....	30
4-2	分辨率为 1.2 nm 的苯光谱 .....	32
4-3	光电二极管被光放电.....	33
4-4	吸光度为浓度的函数.....	36
5-1	比较两种化合物的光谱.....	40
5-2	绘制两个光谱的向量.....	41
5-3	具有较大光谱对照角的光谱.....	42
5-4	具有较小光谱对照角的光谱.....	43
5-5	某化合物在两种浓度下的吸收光谱.....	44
5-6	pH 和溶剂浓度 对对氨基苯甲酸吸收光谱的影响 .....	46



# 表格清单

---

1-1	场地要求.....	1
1-2	TTL 或开关端子上的事件输入端子规格 .....	8
1-3	接线端子上的事件输出端子规格.....	9
1-4	LED 指示灯在启动期间的顺序.....	12
2-1	2996 检测器故障排除.....	15
4-1	光学装置的组件.....	30
A-1	2996 检测器规格.....	47
B-1	备件.....	49
C-1	根据空气或水测量出的流动相吸光度.....	51



# 前言

---

Waters 2996 PDA 检测器操作员指南介绍了 Waters® 2996 PDA 检测器的安装、维护和故障排除步骤。还介绍了检测器光学元件和 Millennium<sup>®32</sup> 软件中用来分析 PDA 检测器数据的“光谱对照”原理。还包含了与向量分析、流动相吸光度、规格相关的信息。

本指南适用于需要安装、操作和维护 2996 PDA 检测器以及排除其故障的人员。也适用于那些要了解用 Millennium<sup>32</sup> 软件处理 PDA 检测器数据的“光谱对照”原理的用户。

## 结构

本指南包含以下内容：

第 1 章介绍如何安装和设置 2996 检测器。

第 2 章介绍如何排除 2996 检测器的故障。

第 3 章介绍如何更换流动池、灯和保险丝。

第 4 章介绍分辨光谱数据、测量光电二极管上的光、检验波长和计算吸光度数据的原理。

第 5 章介绍“光谱对照”的计算方法。

附录 A 提供了 2996 PDA 检测器的规格。

附录 B 列出了推荐使用的备件。

附录 C 提供了常用流动相多个波长处的吸光度的表。

## 相关文档

**Waters 许可、担保和支持：**提供软件许可和担保信息、介绍培训和扩展支持、解释 Waters 公司如何处理运输、损坏、索赔和退货事宜。

**Millennium<sup>32</sup> 帮助：**介绍所有 Millennium<sup>32</sup> 窗口、菜单、菜单选项和对话框。还包含要使用 Millennium<sup>32</sup> 软件所必须执行的所有任务的参考信息和执行步骤。它们是 Millennium<sup>32</sup> 软件的组成部分。

**Millennium<sup>32</sup> 软件入门指南：**介绍 Millennium<sup>32</sup> 系统的入门知识。介绍使用 Millennium<sup>32</sup> 软件采集数据、开发处理方法、查看结果和打印报告的基本方法。还介绍管理项目和配置系统的基本方法。

**Millennium<sup>32</sup> PDA 软件入门指南：**讲述使用 Millennium<sup>32</sup> PDA 软件开发 PDA 处理方法和查看 PDA 结果的基本方法。

**Millennium<sup>32</sup> 系统安装和配置指南：**介绍 Millennium<sup>32</sup> 软件安装（包括独立工作站、PowerStation™ 系统和客户机 / 服务器系统的安装）。讨论如何将计算机和色谱仪器配置为 Millennium<sup>32</sup> 系统的一部分。同时包括采集服务器（如 LAC/E<sup>32</sup> 模块、busLAC/E 卡以及用于和串行仪器通信的接口卡）的安装、配置和使用。

**Waters 2996 PDA 检测器认证工作手册：**介绍 2996 PDA 检测器的认证过程。

## 文档约定

本指南中可能会使用到以下约定：

约定	使用情况
<b>粗体</b>	粗体表示用户操作，如按键、菜单选取和命令等。例如，“单击 <b>Next</b> 可转到下一页”。
<i>斜体</i>	斜体表示需要您提供的信息，如变量。还表示强调和文档标题。例如，“请使用文件的实际名称替换 <i>file_name</i> ”。
Courier 字体	Courier 字体表示源代码示例和系统输出结果。例如，“出现 SVRMGR> 提示”。
<b>Courier Bold 字体</b>	Courier Bold 字体表明用户在源代码示例中输入的字符或按下的按键。例如，“在 LSNRCTL> 提示下，输入 <b>set password oracle</b> 以访问 Oracle”。
键	术语 <i>按键</i> 表示计算机键盘或小键盘上的按键。 <i>屏幕按键</i> 指仪器上屏幕正下方的按键。例如，“2414 检测器上的屏幕按键 A/B 显示所选通道”。
...	三个句点指示可以任意跟随多个同类项。例如，“您可以在每个文件夹中存储 <i>filename1</i> 、 <i>filename2</i> ...”。
>	菜单选项之间的右箭头表示应该顺次选择每个选项。例如，“选择 <b>文件 &gt; 退出</b> ”是指应先在菜单条中选择 <b>文件</b> ，然后从“文件”菜单中选择 <b>退出</b> 。

## 注

“注”介绍对操作员有帮助的信息。例如：

**注意：**在进行下一步之前，先记录您的结果。

## 注意

“注意”提供的信息与防止对系统或设备的可能损害有关。例如：



**注意：** 要避免损坏检测器流动池，请勿触摸流动池窗口。

## 小心

“小心”提供保证操作员安全所需的重要信息。例如：



**注意：** 为避免被灼伤，在拆下灯泡进行更换或调整前，请至少提前 15 分钟关灯。



**注意：** 为避免电击事故和人身伤害，请务必在执行维护工作前关闭检测器并拔下电源线。



**注意：** 为防止化学或电气危险，操作系统时请始终遵守实验室的安全操作规程。



# 第 1 章 安装

“Waters® 2996 光电二极管阵列 (PDA) 检测器”可在任何标准实验室环境下运行。此检测器需要电源、样品和废液流路以及 Millennium<sup>®32</sup> 或 MassLynx™ 工作站。检测器后面板上的可选连接可与图表记录器、数据积分器及其它与 Millennium<sup>32</sup> 或 MassLynx 软件控制不兼容的仪器进行通信。

## 1.1 安装场地要求

请在符合表 1-1 和图 1-1 规定的场地安装 “2996 PDA 检测器”。

表 1-1 场地要求

条件项	规定
环境温度	4 到 40 °C (39 到 104 °F)，每小时变化不超过 1 °C (以防漂移)
相对湿度	20% - 80%，无冷凝
工作台空间	宽度：11.5 英寸 (29 cm) 厚度：24 英寸 (61 cm) 高度：8.5 英寸 (22 cm)
工作台支架	可支撑 31.5 磅 (14.3 kg)
间隙	后部至少 4 英寸 (10 cm) 以利通风
电源	接地交流电源，100 到 240 Vac

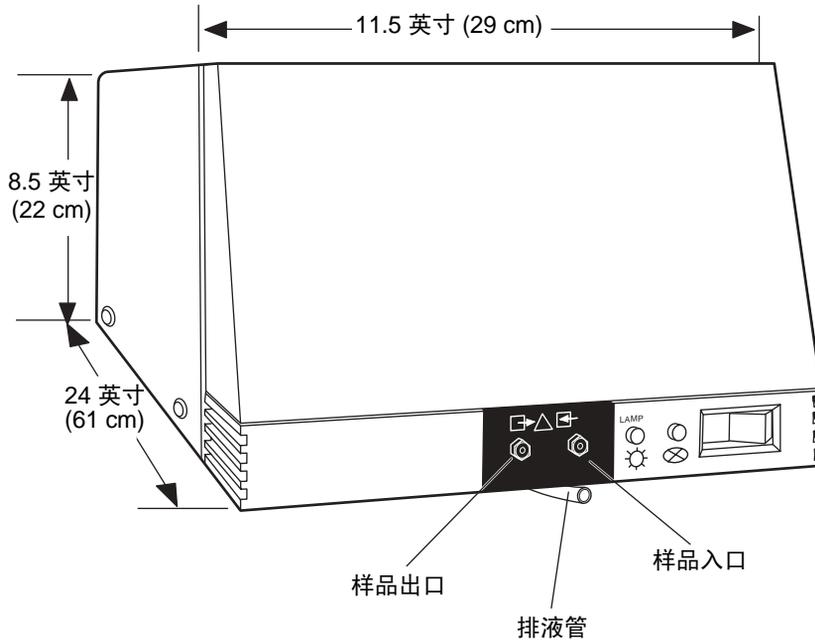


图 1-1 Waters 2996 PDA 检测器尺寸

## 1.2 电源连接

确保按以下过程完成“2996 PDA 检测器”的电源连接。

### 工作电压

“2996 PDA 检测器”有一个无需调节电压的通用输入电源。“Waters 2996 PDA 检测器”的电源要求为：

- **电压范围：**100 到 240 Vac
- **总功率：**100 VA
- **频率范围：**50 到 60 Hz

### 保险丝

“2996 PDA 检测器”附带额定值适合在北美地区工作的保险丝。如果在其它地点使用“2996 PDA 检测器”，请在检测器后部保险丝座中安装额定值符合 IEC 标准的保险丝（随“Waters 2996 检测器启动套件”提供）（请参阅第 3.3 节，更换保险丝）。

## 连接电源线

将“2996 检测器”电源线的一端接入后面板的电源插座（图 1-2），另一端接入电源插座。

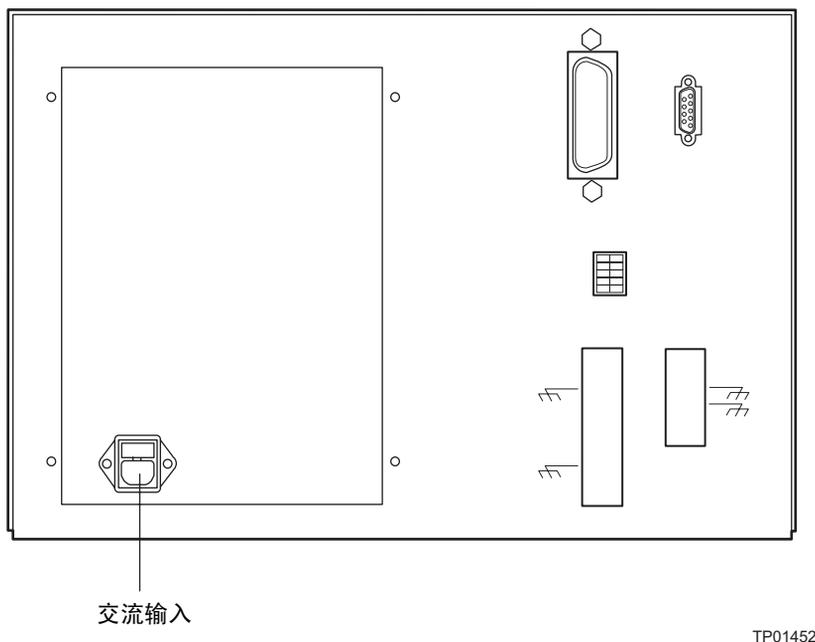


图 1-2 检测器后面板

## 1.3 Millennium<sup>32</sup> 工作站连接

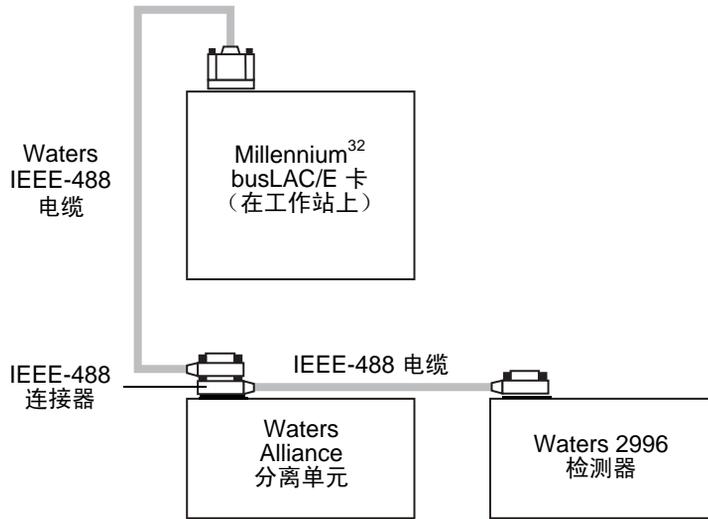
“2996 检测器”要求通过 IEEE-488 总线将信号连接到 Millennium<sup>32</sup> 工作站。所有检测器控制和数据采集通信均通过 IEEE-488 总线完成。

**注意：**如果无法通过 IEEE-488 总线传递进样开始信号，则须在“2996 检测器”后面板的“事件输入 1”端子提供信号（第 1.4.2 节，连接事件电缆）。

### 1.3.1 连接 IEEE-488 电缆

将“2996 检测器”连接到 Millennium<sup>32</sup> 工作站：

1. 将 IEEE-488 电缆的一端接入“2996 检测器”后面板上的 IEEE-488 插座。将电缆的另一端（堆叠式连接器，用于与其它仪器进行菊花链式连接）与色谱系统中的任一其它仪器上的 IEEE-488 连接器相连（图 1-3）。



TP01544

图 1-3 IEEE-488 电缆连接示例

**注意：**将 IEEE-488 设备连接到工作站上的 busLAC/E 卡的顺序并不重要。例如，在“2996 检测器”之前或之后连接“2690 分离单元”都是可以的。

2. 使用另一条 IEEE-488 电缆连接第一台仪器上的堆叠式连接器和另一台仪器上的 IEEE-488 连接器。
3. 对色谱系统中的每个 IEEE-488 仪器重复第 2 步，最多可连接 14 个 IEEE-488 仪器。

**注意：**设置系统时要注意电缆长度限制。有关 IEEE-488 接口指南列表，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 系统安装和配置指南。

4. 确保用手拧紧所有 IEEE-488 电缆螺丝。

## 电缆长度

连接各仪器和一个 busLAC/E 的所有电缆的最大长度是 2 米乘以设备数（或者 20 米，取两者较小值）。

两台设备间的最大电缆长度为 4 米。

**注意：**连接在一起的最大设备数为 14。

## 1.3.2 设置 IEEE-488 地址

设置“2996 检测器”的 IEEE-488 地址：

使用小螺丝刀（或类似设备）将检测器后面板（图 1-4）上的 IEEE-488 开关设置为“2996 检测器”的 IEEE-488 地址。此地址必须为 2 到 29 之间的数字，且必须不同于连接到采集服务器的任何其它组件的地址。

有关 IEEE-488 GPIB 开关正确设置的信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 系统安装和配置指南。

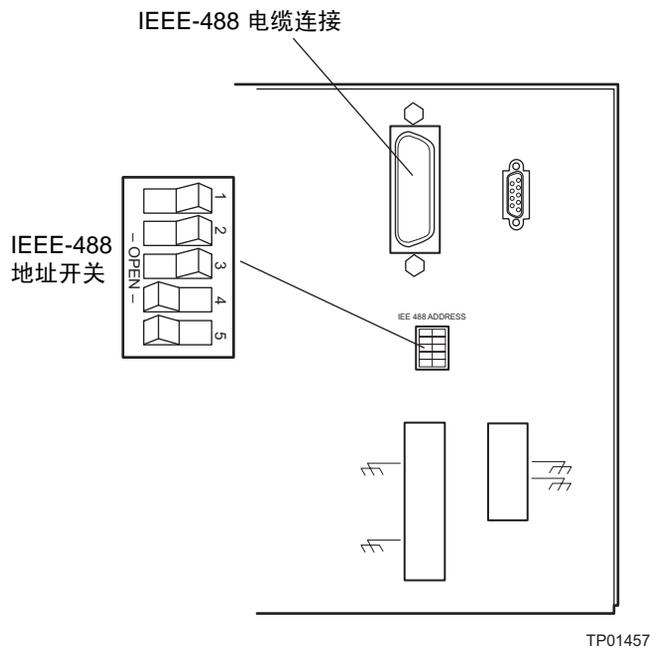


图 1-4 确定 IEEE-488 开关的位置

## 1.4 非 IEEE-488 通信连接

“2996 检测器”上的非 IEEE-488 通信连接包括：

- **模拟输出** - “2996 检测器”为积分器、图表记录器或其它组件提供了两个每吸光度单位 1 伏的无衰减模拟输出通道。
- **事件输入和输出** - “2996 检测器”与其它仪器间传递接线端子信号。

在后面板的模拟 / 事件端子上完成与 “2996 检测器”的所有非 IEEE-488 通信电缆连接（图 1-2）。



**注意：**针对可能影响本设备性能的外部电气干扰，为符合抗干扰的规定要求，在与螺旋式阻隔端子板进行连接时，请勿使用长度超过 9.8 英尺（3 米）的电缆。另外，请确保始终将电缆屏蔽护套与底座接地相连。

### 1.4.1 连接模拟输出电缆

“2996 检测器”生成的模拟输出信号值由通过 Millennium<sup>32</sup> 工作站设置的参数值指定。有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

#### 必备材料

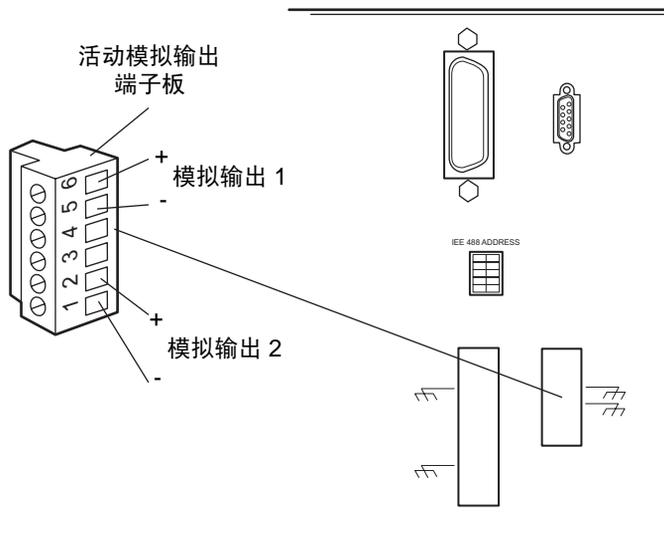
- 一把小号平头螺丝刀
- 一个绝缘剥线工具
- 模拟信号电缆（包含在 “Waters 2996 检测器启动套件” 中）

#### 过程

将 “2996 检测器” 连接到接收模拟输出信号的设备：

1. 从 “2996 检测器” 后面板上拉下模拟输出端子板（图 1-5）。此步骤可便于完成以下步骤。
2. 将模拟信号电缆一端的相应裸线插入 “模拟输出 1” 的正极 (+) 和负极 (-) 端子（图 1-5）。拧紧两个螺丝，固定 +、- 导线。
3. 将模拟信号电缆的另一端连接到外部设备的相应模拟输入端子，确保负极连至负极、正极连至正极。

4. 重新安装模拟输出端子板。



TP01456

图 1-5 模拟输出端子板

## 1.4.2 连接事件电缆

“2996 检测器”有四个用于接线端子信号的端子板连接：

- 两个输入信号端子（通常用于进样开始）
- 两个输出（可编程事件表）信号端子

如果无法通过 IEEE-488 总线传递进样开始信号，则须在“2996 检测器”后面板的“事件输入 1”端子提供信号。Rheodyne 7725i 等手动进样器配有一条电缆，连接进样器和“2996 检测器”后面板上的“事件输入”端子。

“2996 检测器”生成的事件输出信号值由通过 Millennium<sup>32</sup> 工作站设置的参数值指定。有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

### 必备材料

- 小号平头螺丝刀
- 一个绝缘剥线工具
- 事件信号电缆（包含在“Waters 2996 检测器启动套件”中）

## 过程

将“2996 检测器”连接到外部事件输入或输出设备：

从后面板拉下事件端子板（图 1-6）。这样便于完成以下步骤：

1. 将事件信号电缆一端的裸线插入相应事件输入或输出端子的正极(+)和负极(-)插槽（图 1-6）。拧紧两个螺丝，固定+、-导线。
2. 将事件信号电缆的另一端连接到外部设备的相应事件输入或事件输出端子。
3. 重新安装事件端子板。

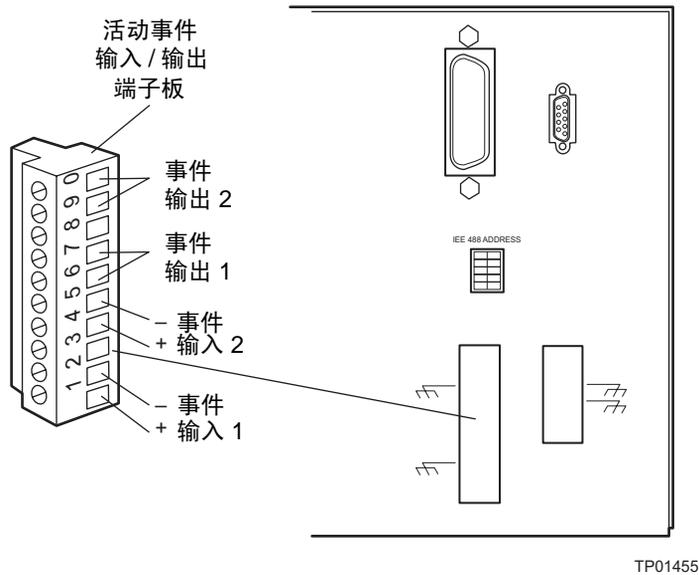


图 1-6 事件输入 / 输出端子板

## 电气规格

将外部设备连接到事件输入或输出端子前，请参阅表 1-2 和表 1-3 中的电气规格。

表 1-2 TTL 或开关端子上的事件输入端子规格

参数	规格
低触发	<1.8 V
高触发	>3.0 V
保护	±30 V

表 1-2 TTL 或开关端子上的事件输入端子规格 (续)

参数	规格
最小脉冲宽度	30 毫秒 (这可能限制了与要求快速脉冲的阀门的兼容性)
最大电流	5 mA

表 1-3 接线端子上的事件输出端子规格

参数	规格
最大功率	10 W
最大电流	20 V, 0.5 A
最高电压	24 V RMS



**注意：**为避免损坏“2996 检测器”电气部件，请确保如本节所述进行正确的电气连接。

## 1.5 流路连接



**注意：**为防止化学危险，处理溶剂时请始终遵守实验室安全操作规范。而且需要参考“材料安全数据表”以了解所使用溶剂的相关信息。

### 必备材料

- 5/16 英寸开口扳手
- 0.009 英寸 (0.23 mm) 内径不锈钢管路 (包含在“2996 检测器启动套件”中)
- 不锈钢管路切割器或划线钳
- 带塑料护套或布料护套的钳子
- 三个压力螺丝配件

### 过程

建立“2996 检测器”的流路连接：

1. 测量连接所需管路的长度：
  - 色谱柱出口到“2996 检测器”入口

**注意：**尽量缩短此管路的长度，以免增宽谱带。

- “2996 检测器” 出口到废液收集瓶

**注意：**确保此管路的长度至少为 1 至 2 英尺（30 到 60 cm），以免流动池中形成气泡。

- 如下切割两段管路的长度：
  - 使用 Waters 1/16 英寸不锈钢管路切割器或带切刃的锉刀在所需断点处划出管路的圆周。
  - 使用带有布料护套或塑料护套的钳子夹住管路划出标记的两端（以防损伤表面），然后轻轻前后掰动管路直至断开。
  - 将管路切口锉磨光滑、整齐，尽量减少死体积和谱带增宽。
- 在色谱柱出口管路的两端和检测器出口管路的一端装上压力接头（图 1-7）。

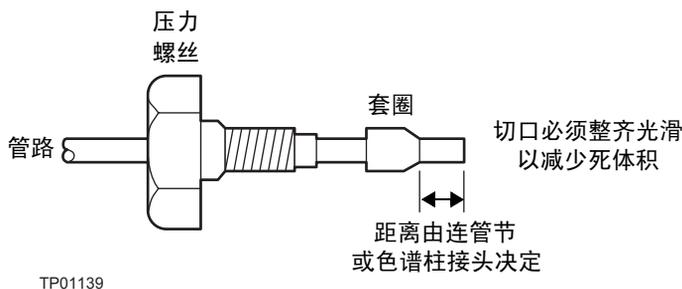


图 1-7 压力螺丝装配

- 将色谱柱出口管路的一端插入色谱柱出口的接头，然后用手指拧紧压力螺丝后再转动约 3/4 圈（使用 5/16 英寸开口扳手）。
- 将管路的另一端插入检测器入口的接头，然后如第 4 步所述拧紧压力螺丝。
- 将带有压力接头的检测器出口管路的一端插入检测器出口接头，然后用手指拧紧压力螺丝后再转动约 3/4 圈。将管路的另一端插入废液容器。



**注意：**为防止损坏流动池，请避免压力达到允许的最大压力，1000 psi (70 kg/cm<sup>2</sup>)。

## 1.6 启动和关闭检测器

整个启动过程需要不到一分钟的时间。完成后，应当让“2996 检测器”至少预热一个小时，然后再运行分析。请按本节所述过程操作，以确保可靠的检测器性能。

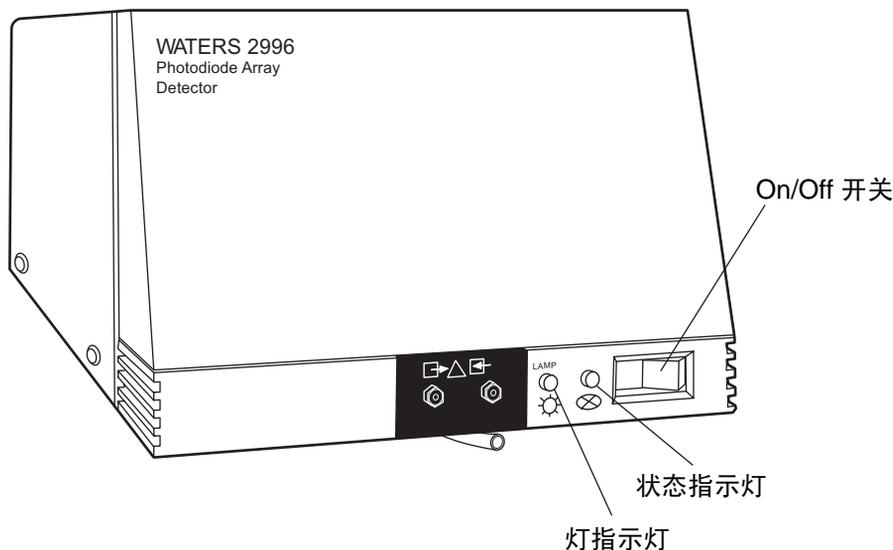
### 启动检测器

启动“2996 检测器”：

1. 在仪器方法中，将溶剂输送系统或泵设置为以 1 毫升 / 分钟流速输送脱气流动相。有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

**注意：**仅使用彻底脱气的 HPLC 级溶剂。流动相中的气体可能在流动池中形成气泡，并导致“参比能量”诊断失败。

2. 冲洗检测器 10 分钟或直到出口管路无气泡出现。
3. 将检测器前面板上的 0/1（关 / 开）开关（图 1-8）按到 1（开）位置。
4. 观察检测器前面板上的灯和状态指示灯 LED（图 1-8）。
  - 如果两个灯都亮起，则检测器通过了内部诊断。
  - 如果任一指示器灯闪烁或熄灭，请参阅第 2 章，诊断和校正中的故障排除表。
5. 采集数据前请等待一个小时，以使“2996 检测器”稳定。



TP01460

图 1-8 2996 检测器指示灯

表 1-4 LED 指示灯在启动期间的顺序

灯 LED	状态 LED	表示	故障排除
关	关	无电源或 CPU 故障。	检查交流电源和主保险丝。与 Waters 技术服务联系。
关	闪烁	2996 正在运行加电自检。	
闪烁	闪烁	2996 自检之一失败。	与 Waters 技术服务联系。
关	闪烁	2996 正在运行可信度测试。	
开	闪烁	灯启动成功。2996 正在启动校正。	
开	闪烁 30 秒以上	2996 可能未正确校正。	流动池中可能有气泡 (表 2-1)。与 Waters 技术服务联系。
开	开	校正成功。	

## 关闭检测器

关闭“2996 检测器”：

1. 如果流动相含有缓冲剂，将溶剂输送系统或泵设置为以 1 毫升 / 分钟的流速输送 HPLC 级水 10 分钟。否则，将溶剂输送系统或泵设置为以 1 毫升 / 分钟的流速输送脱气甲醇 10 分钟。
2. 将检测器前面板上的 0/1（关 / 开）开关按到 **0**（关）位置。



# 第 2 章

## 诊断和校正

“Waters 2996 光电二极管阵列检测器”会在启动时自动运行一系列内部诊断。检测器前面的指示器 LED 和 Millennium<sup>32</sup> 工作站上的信息可显示启动内部诊断的结果（图 1-8）。

如果要确定检测器运行期间产生故障的原因，可在 Millennium<sup>32</sup> 工作站上运行相同的内部诊断。有关检测器性能的有关信息也可从“PDA 校正”窗口获取，该窗口可从 Millennium<sup>32</sup> 软件中的“运行样品”访问。

如果遇到自己不能解决的问题（第 2.1 节，诊断），请与 Waters 技术服务联系，电话：(800) 252-4752（仅限于美国和加拿大客户）。其它客户，请拨打当地 Waters 子公司或当地“Waters 技术服务代表”的电话，或致电位于麻萨诸塞州米尔福德市（美国）的 Waters 公司总部。

### 2.1 诊断

请参阅表 2-1 排除在启动诊断和检测器运行期间遇到的故障。

表 2-1 2996 检测器故障排除

故障现象	可能的原因	纠正操作
两个 LED 都关闭	无电源	1. 检查电源线连接。 2. 检查插座是否有电。
	保险丝熔断	更换保险丝（第 3.3 节，更换保险丝）。
状态灯闪烁，但灯不亮	2996 正在运行可信度测试	

表 2-1 2996 检测器故障排除 (续)

故障现象	可能的原因	纠正操作
状态灯闪烁, 灯点亮	启动诊断失败	重新安装并检查流动池的定位。 冲洗流动池 (第 3.1.1 节, 冲洗流动池)。
	由于气泡或流动池污物引起到达光电二极管阵列的能量不足可导致光闸诊断失败	冲洗流动池 (第 3.1.1 节, 冲洗流动池)。 为避免形成气泡, 请检查检测器的废液出口是否连接了 1 至 2 英尺 (30 至 60 厘米) 长、内径为 0.009 英寸 (0.23 毫米) 的排放管。
	灯光暗淡	更换灯 (第 3.1.2 节, 取出流动池)。
	光闸故障信息	光闸发生故障
运行光闸诊断。有关详细信息, 请参阅 Millennium <sup>32</sup> 帮助。		
检测器不响应 Millennium <sup>32</sup> 工作站	检测器未连接到 busLAC/E 或 Millennium <sup>32</sup> 工作站中的 “LAC/E <sup>32</sup> 采集服务器”	检查 IEEE-488 电缆连接, 紧固接头。
	IEEE-488 地址错误	1. 确保 “2996 检测器” 的 IEEE-488 地址唯一且在 2 至 29 范围内 (请参阅 Millennium <sup>32</sup> 系统安装和配置指南)。 2. 重新扫描 IEEE-488 总线。有关详细信息, 请参阅 Millennium <sup>32</sup> 帮助。
参比光谱发生变化	流动相含有气体或被污染	准备新的流动相并彻底脱气。
	流动池中滞留气泡	重新安装并检查流动池的定位。 冲洗流动池, 或对检测器的废液出口施加微小反压。
		为避免气泡, 请检查检测器的废液出口是否连接了 1 至 2 英尺 (30 至 60 厘米) 长、内径为 0.009 英寸 (0.23 毫米) 的排放管。

表 2-1 2996 检测器故障排除 (续)

故障现象	可能的原因	纠正操作
排液管中有溶剂	流动池垫圈渗漏	使用新的垫圈重建流动池 (第 3.1.3 节, 拆卸并清洁流动池)。
	流动池接头渗漏	检查接头是否过紧或过松, 如有必要则更换接头。

## 2.2 用户发起诊断

**注意:** 系统管理员可通过禁用用户对“运行样品”窗口的访问来限制对“2996 检测器”诊断的访问。有关详细信息, 请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

用户发起的 PDA 诊断测试有两种类型:

- **内部测试** - 由仪器固件运行帮助您确定故障源的测试。这些测试不需要与外部设备连接。
- **交互式测试** - 检查检测器与连接的外部设备之间模拟输出和事件输入 / 输出信号通信的测试。这些测试需要与泵流量和 / 或测试设备连接。

在 Millennium<sup>32</sup> 软件中的“运行样品”可运行所有用户发起的诊断。有关“运行样品”和 PDA 诊断的详细信息, 请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

## 2.3 PDA 校正

可以调整或校正“2996 检测器”以确保波长读数准确。仅当“波长准确度”诊断 (在“内部诊断”测试中) 失败时, 才需重新校正“2996 检测器”。校正将纠正波长中可能由老化的光学器件或过度振动所造成的错误。

“2996 检测器”使用“PDA 校正”窗口校正, 您可从“运行样品”访问此窗口并从中进行以下操作:

- 查看给定波长范围内曝光时间对光电二极管饱和度的影响。
- 检验氘光谱 Balmer 线的波长位置 (486.0 纳米和 656.1 纳米)。
- 重新校正以在适当波长处设置 486 纳米的峰。

- 确保谱库匹配所需的精确数据。



**注意：**重新校正波长需要重新输入光谱库。

**注意：**系统管理员可通过禁用对“运行样品”窗口的访问来限制对“PDA 校正”窗口的访问。

**注意：**检查校正前，请确保流动池清洁（第 3.1.1 节，冲洗流动池）。

准备校正：

1. 将泵设置为以 1 毫升 / 分钟的流速传送脱气甲醇 10 分钟。如果甲醇与前一溶剂不能混溶，则可用易混溶的溶剂加以冲洗，然后再更换为甲醇。
2. 如果之前使用的是缓冲剂，则用 HPLC 级水以 1 毫升 / 分钟的流速冲洗 10 分钟，然后再用甲醇冲洗 10 分钟。

**注意：**请确保溶剂能够与前一种流动相混溶。

有关执行校正的详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

# 第 3 章

## 维护

---

本章阐述 “Waters 2996 光电二极管阵列检测器” 流动池、灯和保险丝的维护。



**注意：**为防止可能的电击，请不要取下 “2996 检测器” 电源防护罩。电源中没有需要用户维护的组件。

### 3.1 流动池维护

---

出现下列情况时，需要维护流动池：

- 参比光谱发生变化。
- 池液渗出排放管。
- 灯诊断（在 Millennium<sup>32</sup> PDA 诊断窗口中）失败，且指示状态的灯变亮（表 2-1）。
- “2996 检测器” 产生高反压。

**注意：**除流动池有污物外的其它条件可能导致灯光强度降低。有关详细信息，请参阅第 2 章，诊断和校正。

流动池维护由以下几部分组成：

- 冲洗流动池
- 取出流动池
- 拆卸并清洗流动池
- 安装流动池装置

#### 3.1.1 冲洗流动池

##### 必备材料

- HPLC 级水
- HPLC 级甲醇

如果需要清洁流动池，应首先尝试用溶剂进行冲洗。

## 过程

冲洗流动池：

1. 选择与您之前使用的样品和流动相混溶的溶剂。如果之前使用了缓冲剂，则用 HPLC 级水以 1 毫升 / 分钟的流速冲洗 10 分钟，然后再用表面张力较低的溶剂（如甲醇）进行冲洗。



**注意：**请确保溶剂能够与前一种流动相混溶。

2. 将泵的流量设置为 1 毫升 / 分钟，然后运行 10 分钟。
3. 通过执行灯诊断测试来测试灯能量。有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

如果灯诊断失败且灯的使用时间不超过 2000 小时或 1 年（无论先达到哪种情况），请按照第 3.1.2 节，取出流动池中介绍的步骤拆卸流动池并清洁各组件。

### 3.1.2 取出流动池

**注意：**无需关闭“2996 检测器”即可取出并更换流动池。

#### 必备材料

- 5/16 英寸开口扳手
- 十字螺丝刀
- 没有粉尘的手套

## 过程

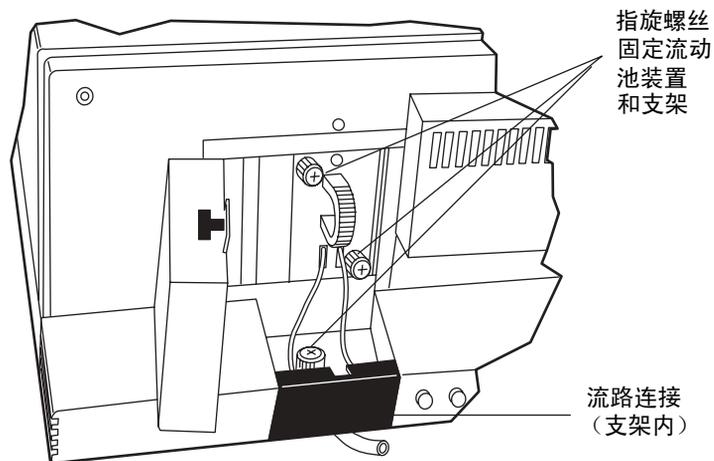
取出“2996 检测器”流动池：

1. 将流量设置为 0.0 毫升 / 分钟。
2. 关闭溶剂输送系统或泵电源以免接触化学物质。



**注意：**为避免流动相渗漏，请不要在色谱系统内有压力的情况下断开入口或出口流路的连接。断开流路前，务必先使系统排放。

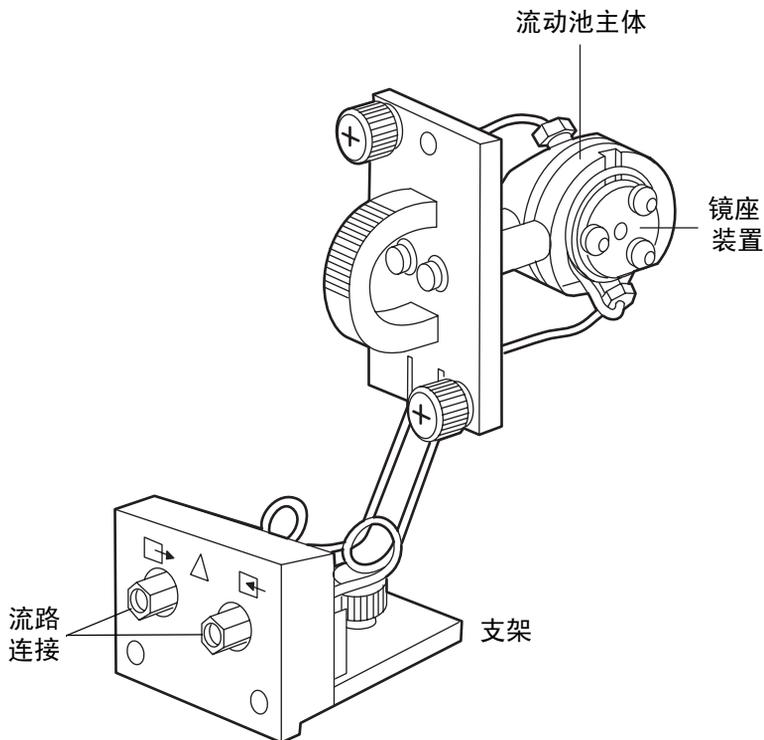
3. 使用 5/16 英寸扳手断开检测器前部的流路连接。
4. 提起 2996 检测器的前盖，并将其拉离检测器底盘。
5. 拉动黑色的拉环打开流动池的门，然后将门朝身体方向轻轻拉动（图 3-1）。



TP01462

图 3-1 取出流动池装置

6. 使用十字螺丝刀拧松将流动池装置固定到光学台的三个指旋螺丝和固定支撑流路连接的支架的指旋螺丝，然后卸下支架。
7. 朝身体方向轻轻拉动流动池装置然后将其从检测器中取出（图 3-2）。



TP01463

图 3-2 流动池和流路连接装置

### 3.1.3 拆卸并清洁流动池



**注意：**透镜表面的光亮度和透镜的定位对“2996 检测器”的性能至关重要。注意不要触摸或损坏透镜和镜座。



**注意：**为防止粘污透镜，拆卸、检查、清洁或替换流动池内零件时，或在其装置内拆卸或更换流动池时，请使用无粉尘手套。

#### 必备材料

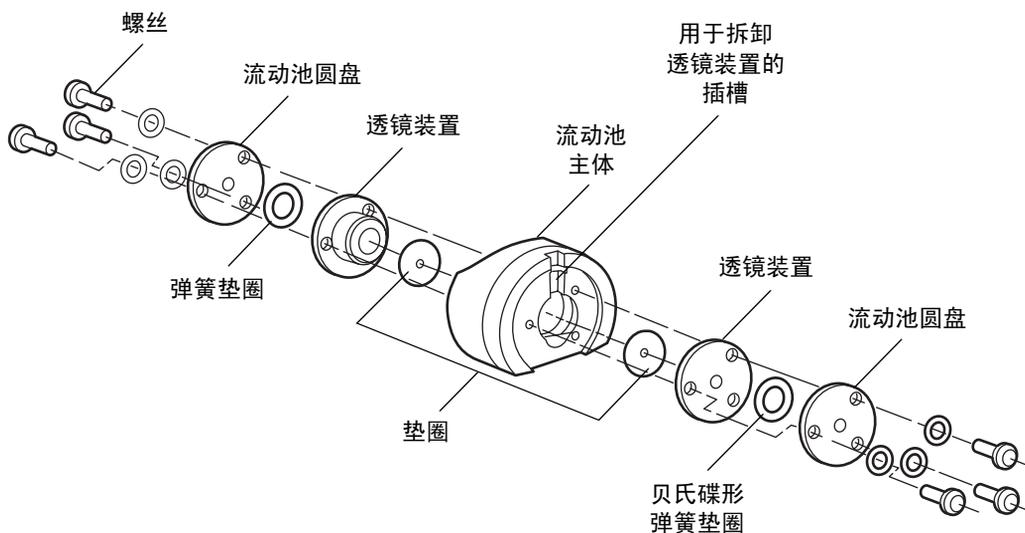
- TORX™ T10 螺丝刀
- 小号平头螺丝刀
- 镜头纸或无尘拭纸

- HPLC 级甲醇
- 贝氏碟形弹簧垫圈
- 流动池垫圈
- 没有粉尘的手套

## 过程

拆卸并清洗流动池（及透镜）：

1. 使用 TORX T10 螺丝刀取下用于固定镜座装置之一的三颗螺丝（图 3-3）。



TP01464

图 3-3 拆卸流动池

2. 使用小号平头螺丝刀，在插槽处轻轻地将透镜装置从流动池主体撬出。



**注意：**除甲醇以外的溶剂都可能损坏拆卸的流动池。如正常使用，垫圈将保护镜座免受溶剂腐蚀。

3. 使用蘸有甲醇的镜头纸或无尘拭纸擦拭透镜。
4. 取下并扔掉垫圈。

5. 重复步骤 1 到步骤 4 以取下、拆卸并清洁其它镜座装置。
6. 使用甲醇和无尘拭纸清洁流动池主体。

## 重新安装流动池

重新安装流动池（图 3-3）：

1. 将更换垫圈插入流动池主体的一侧。
2. 将透镜装置的螺丝孔与流动池主体上的孔对齐。
3. 将新的贝氏碟形弹簧垫圈（凹面朝外）放在透镜装置上。
4. 将流动池圆盘置于透镜装置上。
5. 使用 TORX T10 螺丝刀插入三颗螺丝，将其逐一拧紧，螺丝间以顺时针方向交替。拧紧螺丝直到与流动池圆盘接合，然后再将每颗螺丝拧紧 1/4 圈。如果有扭矩螺丝刀，请拧紧螺丝到 16 盎司英寸（0.113 牛顿米）。



**注意：**注意不要将螺丝拧得过紧。

6. 检查渗漏。如果发现渗漏，则重复步骤 5。
7. 重复步骤 1 到步骤 5，安装流动池的另一侧。

### 3.1.4 安装流动池装置



**注意：**光学台中流动池的定位对检测器的操作至关重要。注意不要损坏流动池主体。

安装流动池装置：

1. 垂直握住流动池装置（图 3-2），将其插入光学台。请注意，流动池使用光学台上的导销自行定位。
2. 轻轻推动装置的前部直到对准前定位销。
3. 用手拧紧指旋螺钉。
4. 重新连接流路。
5. 更换前盖。
6. 冲洗流动池（第 3.1.1 节，冲洗流动池）。

## 3.2 更换灯

---

存在下列任一情况时，请更换“2996 检测器”中的灯：

- 采样率需要很长的曝光时间（超过 100 毫秒）。
- 强度太低以致灵敏度不符合方法的要求。

**注意：**流动池插入不当可能导致灯出现问题。



**注意：**为避免电气危险和接触到 UV 光，开始此过程前，应关闭电源并断开电源线。



**注意：**灯和灯室会非常热。为避免接触过热表面，接触灯或灯附近的表面前，应让灯冷却 15 分钟。

**注意：**如果灯光强度较低，而灯尚未用足 2000 小时，可通过清洗流动池来增加灯光强度（第 3.1 节，流动池维护）。

流动相的吸光度也会影响灯光的外观强度。例如，在波长低于 220 纳米时，乙腈比甲醇透明。



**注意：**拆除包装或插入灯时，不要触摸灯泡玻璃。触摸灯泡玻璃会损坏灯并降低其使用寿命。



**注意：**为防止粘污灯泡玻璃，请使用无粉尘手套拆卸或更换灯。



**注意：**灯可能很热！取下灯之前让其冷却 15 分钟。

## 必备材料

- 一字螺丝刀
- 没有粉尘的手套



**注意：**为避免执行以下步骤时发生电气危险，应关闭 2996 检测器的电源并断开电源线。

## 过程

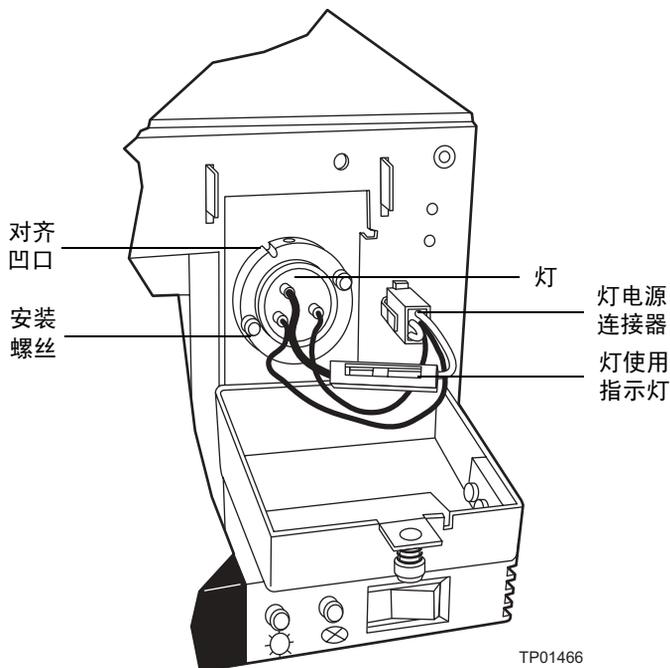
更换灯：

1. 关闭“2996 检测器”的电源，断开电源线，并让灯冷却至少 15 分钟。



**注意：**为避免接触过热表面，接触灯之前，应在关闭检测器的电源后至少等待 15 分钟。

2. 提起前面板盖并将其从底盘拉出。
3. 打开灯固定面板。



TP01466

图 3-4 灯电源连接器和安装螺丝

4. 使用一字螺丝刀卸下两颗安装螺丝。
5. 握紧灯的金属底座，将其拉出，然后放在一边。请勿用拉拽电线的方法取下灯。
6. 小心地拆除备用灯的包装。
7. 戴上无粉尘手套并握住灯的底座，使灯底座上的凹口与光学台上的定位销对齐。
8. 插入灯，并用两个螺丝将其固定。确保灯座与灯室平齐。
9. 重新连接灯电源连接器（图 3-4）。
10. 固定灯面板。
11. 安装前面板盖。
12. 重新连接电源线并打开“2996 检测器”的电源。

### 3.3 更换保险丝

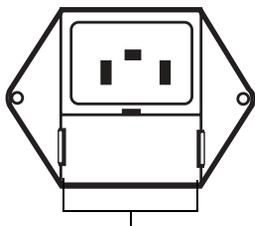
根据故障排除表（第 2.1 节，诊断）中说明的条件更换保险丝。“2996 检测器”需要两个 2 A、250 V 的保险丝（5 mm × 20 mm）。



**注意：**为避免电气危险，在执行以下步骤前应关闭“2996 检测器”的电源并断开电源线。

更换“2996 检测器”中的两根保险丝：

1. 关闭 2996 检测器的电源并拔下电源线。
2. 找到后面板上的电源线插头下方的保险丝盒（图 3-5）。



捏紧两边的夹锁即可接触到保险丝

图 3-5 保险丝盒

3. 拉出保险丝盒的时候捏紧保险丝盒上两边的夹锁。
4. 从保险丝盒上取下保险丝然后安装新的保险丝。

5. 将保险丝盒置于小定位销向下的位置，然后推入保险丝盒直至两边的夹锁卡入到位。
6. 连接电源线，然后打开“2996 检测器”的电源。

# 第 4 章

## 2996 PDA 检测器的光学原理

---

为了有效地使用 Millennium<sup>32</sup> PDA 软件，必须熟悉 “Waters 2996 PDA 检测器” 光学元件和电子元件的操作原理。

### 4.1 2996 检测器光学元件

---

“2996 检测器” 是一套紫外 / 可见光 (UV/Vis) 分光光度计：

- 带有 512 个光电二极管
- 每个二极管的光学分辨率为 1.2 nm
- 可操作的波长范围为 190 到 800 nm

图 4-1 显示了通过 “2996 检测器” 光学装置的光路。

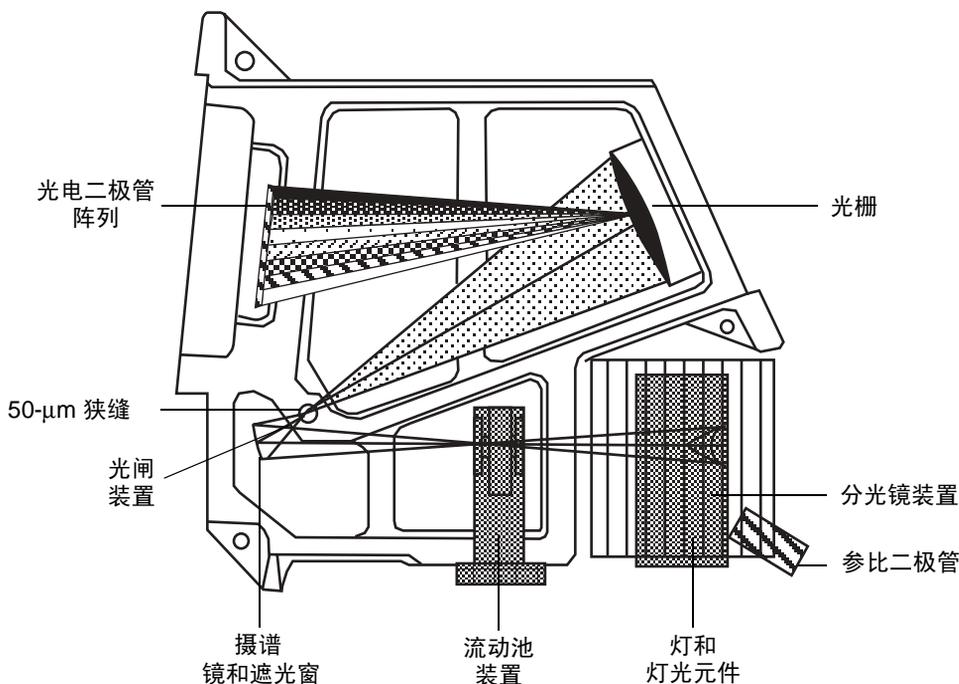


图 4-1 光学装置的光路

表 4-1 介绍了“2996 检测器”光学装置中的组件。

表 4-1 光学装置的组件

组件	功能
灯和灯光元件	通过反光镜将氙灯发出的光从分光器汇聚到流动池。
分光镜和参比二极管	将部分光反射回参比二极管，测量氙灯发出的光强度。检测器用此测量方法保持灯输出恒定。
流动池装置	放置多色光束通过的流路（包含洗脱液和样品）段。这种在灯和光栅间放置流动池的光学组件布置方式通常称为逆光方式。
反光镜和遮光窗	摄谱镜将通过流动池的光聚集到光学元件的摄谱仪部分的入口狭缝上。摄谱镜的遮光窗限定了聚焦到摄谱镜上的光束。
狭缝	控制投射到光电二极管的波长分辨率和光强度。狭缝的宽度为 50 $\mu\text{m}$ 。
光闸装置	防止光在样品测量和校正以外的时间到达光电二极管阵列。有关暗电流的详细信息，请参阅第 4.4.1 节，计算吸光度。

表 4-1 光学装置的组件 (续)

组件	功能
光栅	将光分散为波长谱带，并将这些波长谱带聚焦到光电二极管阵列平面。
次级滤光器	减少 UV 光（小于 370 nm）的二次反射对可见波长（大于 370 nm）处观察到的光强度的影响。
光电二极管阵列	512 个线性排列的光电二极管阵列。二极管宽度和间隔提供了 1.2 nm 的单一波长分辨率。

## 4.2 分辨光谱数据

区分相似光谱的能力取决于光电二极管的间隔和投射到光电二极管的光的带宽。投射到光电二极管的光的带宽取决于狭缝的宽度。

狭缝宽度确定：

- 光电二极管阵列可获得的波长带宽
- 到达光电二极管阵列的光强度（光通量）

狭缝生成一束很窄的光，从光栅反射到光电二极管阵列。投射到特定二极管的波长取决于光栅的反射角度。

图 4-2 显示了“2996 检测器”用 50- $\mu\text{m}$  狭缝测得的苯的吸收光谱。此光谱的波长分辨率足以区分出苯的五个主要吸收峰。

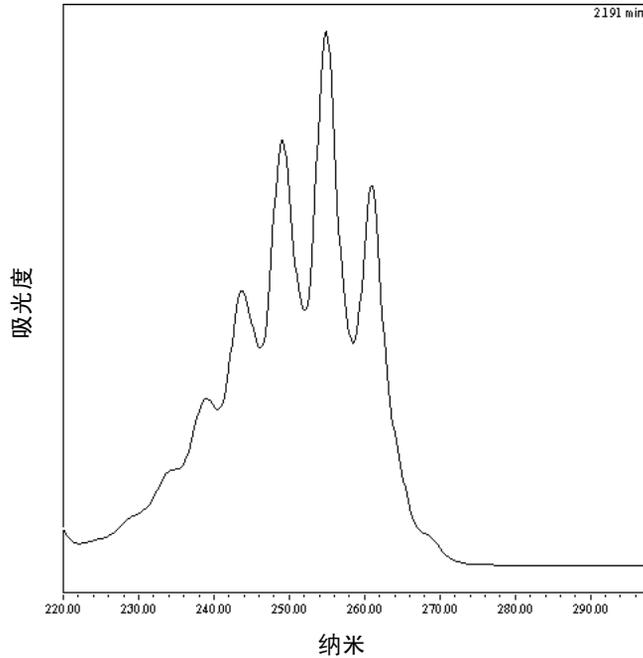


图 4-2 分辨率为 1.2 nm 的苯光谱

### 4.3 测量光电二极管上的光

“2996 光电二极管阵列检测器”通过测量投射到光电二极管阵列的光强度来确定流动池中样品的吸光度。

此阵列由 512 个排列成一排的光电二极管组成。每个光电二极管都充当一个电容器，保持有固定的电荷数。

投射到光电二极管的光使二极管放电（图 4-3）。放电的强度取决于投射到光电二极管的光强度。

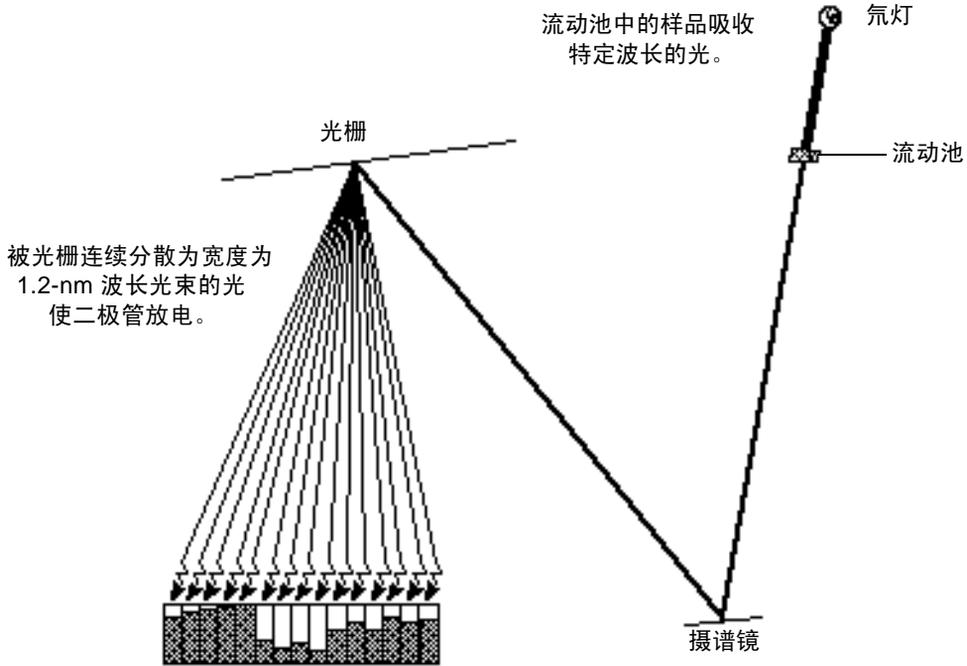


图 4-3 光电二极管被光放电

“2996 检测器”测量每个光电二极管再充电所需的电流。此电流与在由二极管曝光时间确定的间隔中通过流动池的光强度成正比。

## 曝光时间

“2996 检测器”对每个二极管进行再充电，并一次读取一个二极管的再充电电流。两次读取一个二极管之间的间隔即为曝光时间。“2996 检测器”顺序读取一次阵列的所有二极管并处理数据所需的时间少于 10 毫秒。最小的曝光时间为 10 毫秒。可将曝光时间设置为 10 到 500 毫秒。

例如，如果曝光时间设置为 50 毫秒，则“2996 检测器”：

1. 对二极管 1 进行再充电，并读取二极管 1 再充电所需的电流
2. 对二极管 2 进行再充电，并读取二极管 2 再充电所需的电流
3. 继续对所有剩余的 510 个光电二极管进行再充电，并读取再充电所需的电流

4. 对所有二极管进行再充电并读取数据后，在对二极管 1 开始再充电和读取顺序前，等待大约 45 毫秒。

可在“2996 PDA 仪器方法编辑器”的“常规”选项卡中设置曝光时间参数。可指定 Auto Exposure（自动曝光）或 Exposure Time（曝光时间）。有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

**注意：**为获得最好的信噪比性能，请调整波长范围最优化自动曝光计算。有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

## 使用自动曝光参数

Auto Exposure（自动曝光）时间参数允许“2996 检测器”的光学元件根据灯的能量、灯的光谱、流动相的吸光度以及使用单一氙灯从 190 到 800 nm 选择的波长范围来计算对二极管进行再充电所需的最佳曝光时间。为了使检测器的噪音最小化，Auto Exposure（自动曝光）可将曝光时间调整为全刻度的 50% 到 90%。

Auto Exposure（自动曝光）时间设置确保了光电二极管：

- 不会由于过度曝光而达到饱和
- 能够在正常范围、释放暗电流的情况下正常操作

启用自动曝光，“2996 检测器”：

- 能够在运行开始时根据选定波长范围的最大光强度计算曝光时间
- 能够限制曝光，以使所有二极管在给定的波长范围内放电不会超过 90%
- 为每次运行提供适当的信噪比和动态范围设置

Auto Exposure（自动曝光）时间设置可能不支持分析所需的采样速率、波长范围或过滤时间常数设置的特定组合。如果出现这种情况，您可以通过手动设置曝光时间来调整每次实验的曝光时间。

## 使用曝光时间参数

使用 Exposure Time（曝光时间）参数可以手动设置光电二极管读取前的曝光时间长度。支持的范围为 10 到 500 毫秒。

**注意：**更改一组样品的曝光时间可能引起基线噪音的改变。

请注意，增加 Exposure Time（曝光时间）参数，有可能使二极管达到饱和。更长的曝光时间可能会因二极管饱和而使“2996 检测器”失去特定波长的信号。指定 Exposure Time（曝光时间）时，选择一个能在分析的波长范围内提供最优信噪比设置的值（请参阅下一主题“优化信噪比”）。

## 优化信噪比

为了优化信噪比，请选择一个采集的波长范围，使其只包含感兴趣的且流动相吸收最少的波长（附录 C，流动相吸光度）。将带宽设置为较高的值可提高信噪比。

## 4.4 计算吸光度数据点

---

“2996 检测器”在将数据传输到 Millennium<sup>32</sup> 数据库前进行吸光度值的计算。为了计算吸光度，“2996 检测器”：

- 用暗电流和参比光谱计算每个二极管的吸光度（第 4.4.1 节，计算吸光度）
- 计算在光谱每秒采样率中指定的特定波长的吸光度的平均值，并将此平均值报告为一个数据点（第 4.4.2 节，分辨率）
- 可使用过滤器（第 4.4.3 节，过滤数据）

### 4.4.1 计算吸光度

检测器通过从采集光谱中减去暗电流和参比光谱来计算吸光度。吸光度的原理是“比尔定律”。

#### 比尔定律

朗伯 - 比尔定律（通常称为“比尔定律”）描述了到达光电二极管的特定波长的光的强度与通过流动池的样品的浓度之间的关系。“比尔定律”的表示为：

$$A = \epsilon lc$$

其中：

$A$  = 吸光度

$\epsilon$  = 摩尔吸光系数

$l$  = 光程（“2996 检测器”的普通流动池为 1.0 厘米）

$c$  = 摩尔浓度

“比尔定律”只适用于平衡良好的稀释溶液。它假定样品折射率保持恒定、单色光且无漫射光到达检测器元件。随着浓度的增加，“比尔定律”的化学和仪器要求可能无法满足，从而导致（吸光度与浓度）线性偏差（图 4-4）。流动相的吸光度能会缩小线性范围，其数量如附录 C，流动相吸光度所示。

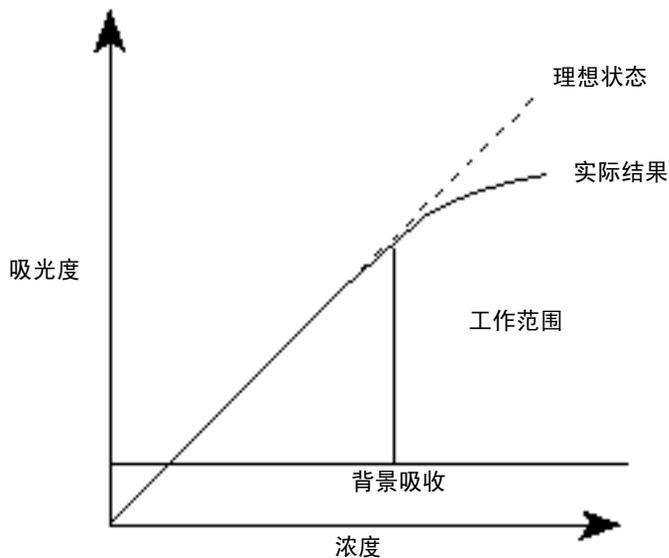


图 4-4 吸光度为浓度的函数

## 暗电流

即使光电二极管并未曝光，它也会随着时间的过去而放电。放电量称为暗电流。

色谱开始运行时，“2996 检测器”关闭光闸以读取每个二极管的暗电流。计算曝光时间后，光闸关闭，并且保持与曝光时间相同间隔的关闭状态。

检测器从测量样品和参比光谱的吸光度时记录的电流值中减去暗电流的值。

## 参比光谱

“2996 检测器”在测量暗电流之后和洗脱任何组分之前快速记录参比光谱。参比光谱是在打开光闸的情况下，在曝光时间指定的间隔期间内测量灯强度和流动相吸光度。

**注意：**为得到最佳结果，参比光谱应代表初始流动相。

**注意：**对于极长的曝光时间，完成暗电流和参比光谱的读取可能需要数秒时间。

## 吸光度

每次曝光时间结束时，“2996 检测器”都会用以下方程计算每个二极管的吸光度：

$$Absorbance_n = \log \left[ \frac{(S_n - D_n)}{(R_n - D_n)} \right]$$

其中：

$S$  = 样品分析时得到的数据

$D$  = 暗电流测试时得到的数据

$R$  = 从参比光谱中得到的数据

$n$  = 二极管编号

### 4.4.2 分辨率

“2996 检测器”向 Millennium<sup>32</sup> 数据库报告的数据可能是多个数据点的平均值。计算吸光度后，检测器根据以下数据计算吸光度的平均值：

- 光谱分辨率
- 采样率

#### 根据分辨率计算光谱数据的平均值

光谱分辨率（或带宽）是采集光谱中的数据点之间的波长间隔（纳米）。“2996 检测器”的最大分辨率为 1.2 nm。例如，在 3D 模式中，如果在 Millennium<sup>32</sup> 软件中将光谱分辨率设置为 3.6 nm，则“2996 检测器”将为每个报告波长计算三个相邻二极管的平均值。在 2D 模式中，根据带宽设置计算吸光度值。Millennium<sup>32</sup> 软件 4.0 版或更高版本支持 2D 模式。

#### 根据采样率计算色谱数据的平均值

采样率是每秒向 Millennium<sup>32</sup> 数据库报告的数据点数量。采样率间隔期间读取光电二极管的次数取决于曝光时间。例如，如果曝光时间为 25 毫秒，采样率为 1 秒，那么每个数据点的读数次数为：

$$\frac{1000 \text{ msec}}{25 \text{ msec}} = 40$$

计算读数的平均值并作为单个数据点报告。

## 结合光谱分辨率和采样率

光谱分辨率和采样率对噪音和光谱细节具有相反的影响。增加光谱分辨率参数的值和减少每秒光谱数都会减小数据文件的大小。

**注意：**数据存储率的根据是波长范围、光谱分辨率和采样率，它是在“2996 PDA 仪器方法编辑器”的“常规”选项卡中设置的。有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助。

### 4.4.3 过滤数据

使用“2996 PDA 仪器编辑器”的“常规”选项卡（有关详细信息，请参阅 Millennium<sup>32</sup> 帮助）将可选的噪音过滤器（Filter Response（过滤器响应）参数）应用到发往 Millennium<sup>32</sup> 软件数据库的数据中。噪音过滤器的默认值为 1 秒，它可为多数色谱分离提供良好的信噪比。

注意与过滤数据相关的以下信息：

- 噪音过滤器是数字（低通）过滤器。
- 过滤器计算的数据点是根据多个读数计算的某个波长的修正移动平均值。
- 过滤器的值与 0.1 到 3 秒 RC 过滤器的影响相对应。

# 第 5 章

## 光谱对照原理

---

本章介绍“光谱对照”技术的原理，它用于比较 2996 检测器采集的 UV/Vis 吸收光谱。“光谱对照”的理论依据是不同的化合物具有不同形状的吸收光谱。本章介绍“光谱对照”是如何将吸收光谱表示为向量的。“光谱对照”技术应用于 2996 检测器采集的 UV/Vis 吸光度数据时，可以确定光谱间的差异是由相同峰（共流出物）中存在多种化合物引起的，还是由噪音、测光误差或溶剂影响之类的不理想的条件引起的。

### 5.1 比较吸收光谱

---

吸收光谱的形状是由不同波长的相对吸光度确定的。化合物吸收光谱的形状是该化合物在溶剂中和测量吸收光谱的 pH 条件下的特征。

图 5-1 显示了 A 和 B 两个化合物的吸收光谱。化合物 A 在 245 nm 和 257 nm 之间的吸光度之比大约为 2.2，化合物 B 则为 0.7。

两个波长对的吸光度比率是一种很有限的光谱比较。要了解更多信息，需要比较多个波长对的吸光度比率。

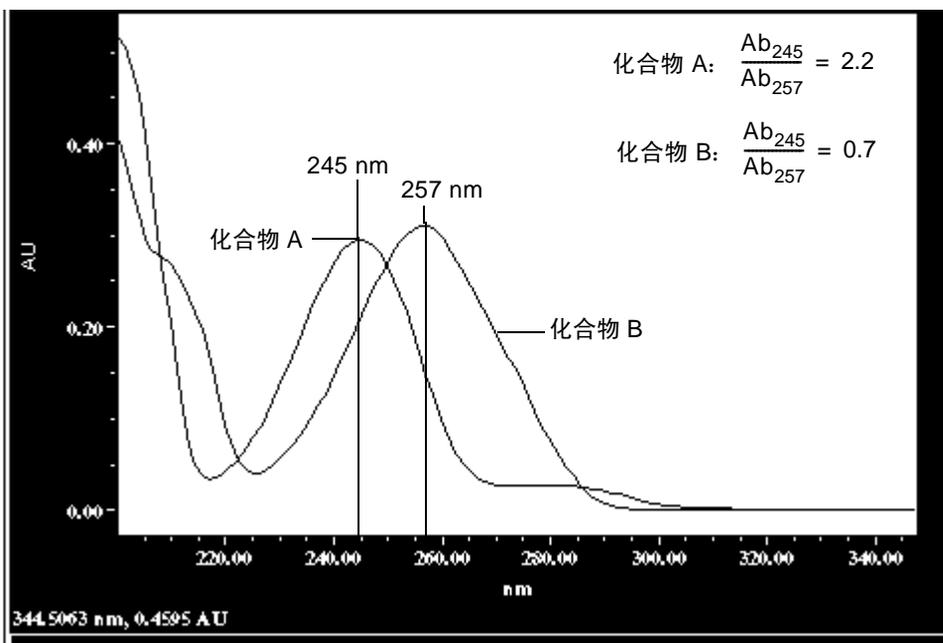


图 5-1 比较两种化合物的光谱

## 5.2 将光谱表示为向量

“光谱对照”技术用向量来计量光谱形状的差异。“光谱对照”先将基线校正光谱转换为向量，然后再对向量进行比较。光谱向量具有两种属性：

- **长度** - 与分析物的浓度成正比。
- **方向** - 由分析物在所有波长（它的吸收光谱）的相对吸光度确定。方向与整个波长采集范围内浓度低于 1.0 AU 的峰的浓度无关。

向量方向有助于标识化合物，因为方向是化合物吸收光谱的函数。光谱向量区分化合物的能力取决于光谱功能的分辨率。随着波长范围和光谱分辨率的提高，得到的光谱向量的精度也随之提高。由 2996 PDA 检测器测出的向量可以包括 190 到 800 nm 的任意范围的吸光度。要提高光谱的灵敏度，请将工作台分辨率设定为 1.2 nm。

## 5.2.1 由两个波长得出的向量

“光谱对照”算法使用向量来定性光谱（图 5-2）。为了解向量原则，考虑图 5-1 中所列的两个光谱的向量（图 5-2）。

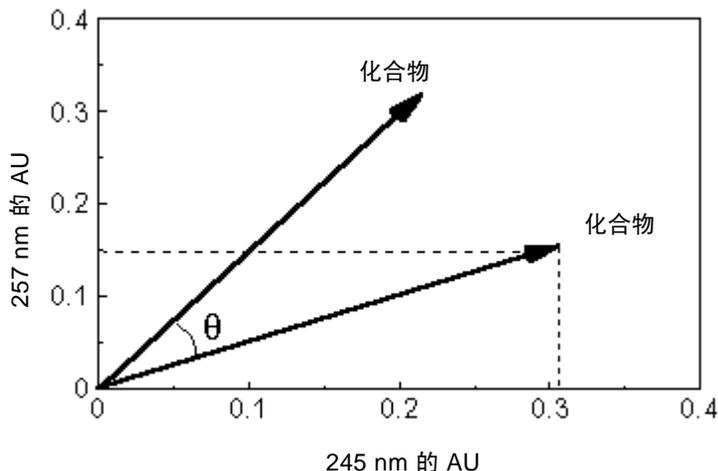


图 5-2 绘制两个光谱的向量

图 5-2 中的坐标轴都以吸光度为单位，两个用于计算吸光度比率的波长如图 5-1 所示。化合物 A 的向量顶点位于两个坐标轴表示的两个波长下的吸光度值（化合物 A）的交点处。化合物 B 的光谱向量按相同的方法生成。

化合物 B 的向量所指的方向不同于化合物 A 的向量所指的方向。方向上的差异称为“光谱对照角”，它反映了两种化合物在 245 nm 和 257 nm 两个波长处的吸光度比率的差异。“光谱对照角”（即图 5-2 中的  $\theta$ ）大于零表示光谱之间的（第 5.3 节，光谱对照角）的形状差异。向量的长度与浓度成正比。

## 5.2.2 由多个波长得出的向量

相对于用多个波长的吸光度比率进行比较而言，吸光度比率限定为两个波长时，两个不同光谱更有可能具有相同的吸光度比率。因此，“光谱对照”技术用多个波长的吸光度在  $n$ -维向量空间中构造向量，这里的  $n$  表示光谱的波长数。

为了比较两个光谱，“光谱对照”技术将在  $n$ -维空间中为每个光谱构造一个向量。通过数学方法比较两个光谱向量，计算两个向量的夹角。

与双波长比较一样， $n$ -维空间中的“零光谱对照角”表示所有对应波长吸光度的比率都相同。相反，如果有任一对吸光度的比率不同，则对应向量的指向也不同。

## 5.3 光谱对照角

相同形状光谱的向量指向相同的方向。不同形状光谱的向量指向不同的方向。两个光谱向量间的夹角，即“光谱对照角”，从数量上说明了两个光谱间的形状差异的大小。光谱对照角是两个光谱的光谱向量间方向差异。

“光谱对照角”可在 $0^\circ$ 到 $90^\circ$ 之间变化。接近 $0^\circ$ 的“光谱对照角”表示比较的光谱在形状上几乎不存在差异。比较同一光谱得到的“光谱对照角”为 $0^\circ$ 。最大为 $90^\circ$ 的“光谱对照角”表示两个光谱在任意波长均不重叠。

为了说明“光谱对照角”与光谱形状差异间的关系，考虑图 5-3、图 5-4 和图 5-5 中所示光谱对。

### 不同形状的光谱

在图 5-3 中，A 和 B 两种化合物的吸收光谱明显不同，因此“光谱对照角”很大。

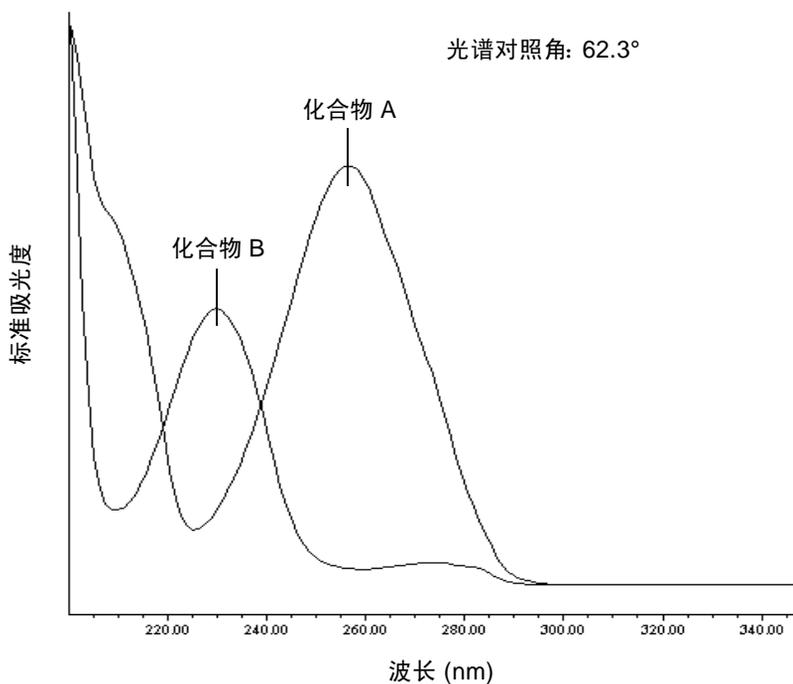


图 5-3 具有较大光谱对照角的光谱

## 形状相似的光谱

在图 5-4 中，A 和 B 两种化合物的吸收光谱相似，因此“光谱对照角”很小 ( $3.0^\circ$ )。

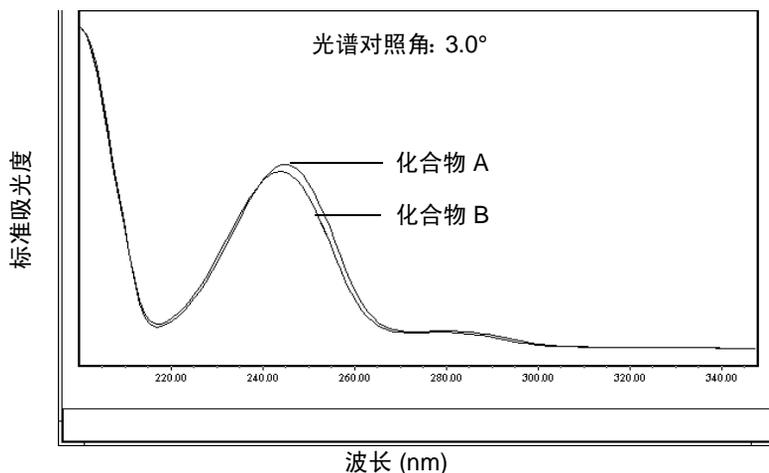


图 5-4 具有较小光谱对照角的光谱

## 同一化合物光谱间的差异

由于受到不同化合物的吸光度属性以外的因素的影响，吸收光谱间可能会出现细微但却很显著的差异。例如，同一化合物的多个光谱可能因检测器噪音、测光误差、高浓度样品或溶剂条件差异等原因而呈现出细微差异。例如，图 5-5 中的光谱便说明了仪器噪音对某种化合物的吸收光谱形状的影响。此类影响在信噪比较低的低浓度情况下很容易发生。请注意：该化合物吸收光谱间的“光谱对照角”仅为  $3.4^\circ$ 。

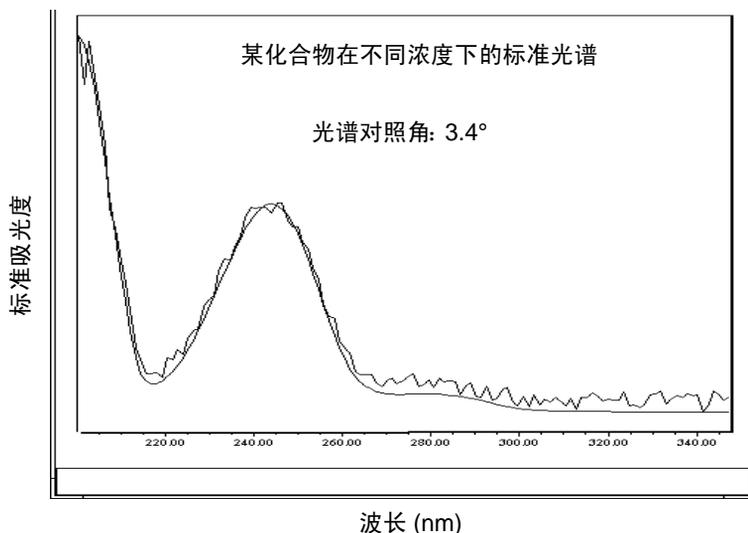


图 5-5 某化合物在两种浓度下的吸收光谱

## 5.4 不良影响

吸收光谱的形状差异可由以下不良影响中的一种或多种引起：

- 检测器噪音
- 高浓度样品引起的测光误差
- 溶剂成分改变

此类光谱变化的原因可引起化学纯度、基线分离峰而呈现出小幅度的光谱不均。通过比较“光谱对照角”与阈值角（第 5.4.4 节），便可评估光谱不均的程度。

### 5.4.1 检测器噪音

统计及热变化会增加 2996 检测器测量吸光度的电噪音。噪音表现为基线波动，即基线噪音。统计及热变化引起的吸光度差异的大小可以从谱图基线区域的仪器噪音来预测。

### 5.4.2 测光误差

在高吸光度（通常大于 1 AU）下，测光误差引起的组合影响会使结果略微（约为 1%）偏离比尔定律。尽管这一水平的测光误差对定量的影响可以忽略，但它们却可能成为光谱不均的重要来源。为了将所有“光谱对照”操作的测光误差影响降至最低，应将化合物的最

大吸光度控制在 1 AU 以下。请记住：流动相的吸光度会缩小现行的线性动态范围，减少量为流动相在每个波长的吸光度。有关流动相吸光度的例子，请参阅附录 C，流动相吸光度。

**注意：**有关测光误差曲线影响的详细信息，请参阅 仪器分析原理，第三版，Douglas A. Skoog 著，Saunders College Publishing，1985，第 168 至 172 页。

### 5.4.3 溶剂变化

只要溶剂浓度和成分不发生变化（等度操作），则溶剂的背景吸光度（若存在）应为常数。但溶剂 pH 或成分的变化（如发生在梯度操作中）会影响化合物的固有光谱形状，如图 5-6 中所示。

### 5.4.4 阈值角度

除了计算“光谱对照角”外，“光谱对照”技术还可计算“阈值角”。“阈值角”是非理想现象引起的光谱间最大的“光谱对照角”。

比较“光谱对照角”与“阈值角”有助于确定光谱间的形状差异是否是本征差异，即由不同的混合物引起的。通常，“光谱对照角”小于其“阈值角”表明形状差异只是由非理想现象引起的，而不能证明光谱间存在本征差异。“光谱对照角”大于其“阈值角”表明形状差异是由光谱间的本征差异引起的。在自动比较光谱对照时，光谱的最大吸光度应小于 1 AU。

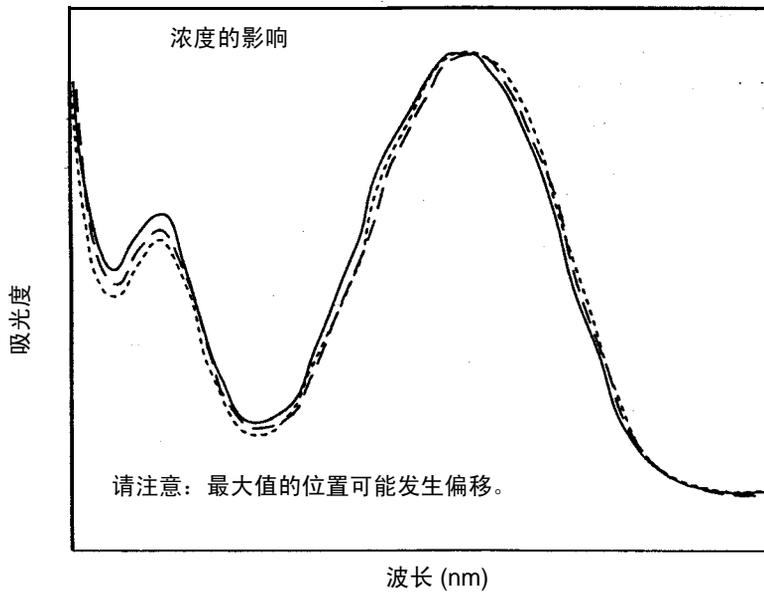
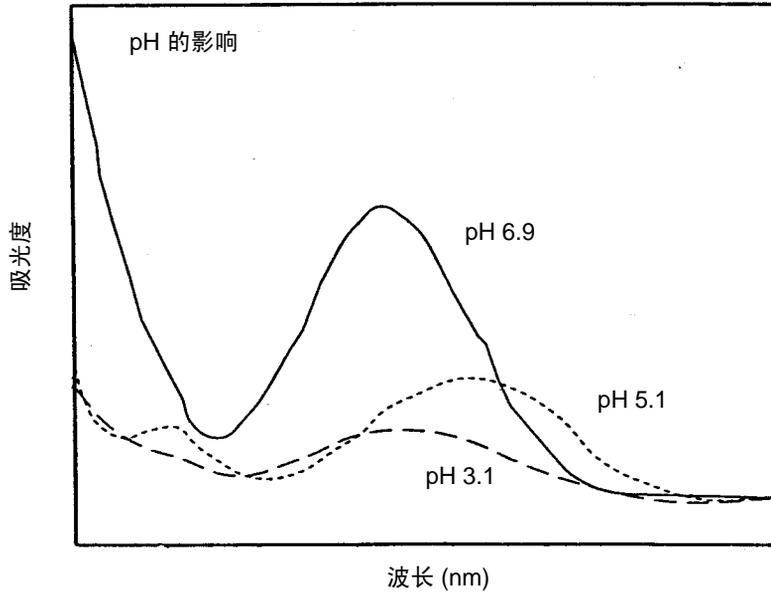


图 5-6 pH 和溶剂浓度  
对对氨基苯甲酸吸收光谱的影响

# 附录 A

## 检测器规格

表 A-1 列出了 2996 PDA 检测器的规格。

表 A-1 2996 检测器规格

项目	规定
尺寸	宽度: 11.5 英寸 (29 cm) 厚度: 24 英寸 (61 cm) 高度: 8.5 英寸 (22 cm)
重量	31.5 磅 (14.3 kg)
波长范围	190 到 800 nm
波长准确度	±1 nm
线性范围*	5%, 2.0 AU、羟苯甲酸丙酯、256 nm
光谱分辨率	1.2 nm
基线噪音	±1.5 × 10 <sup>-5</sup> AU 峰到峰、干燥、254 nm
漂移	1 × 10 <sup>-3</sup> AU/ 小时、254 nm (预热后) ΔT ≤ 1°C 每小时
流动池	光程 (mm):
标准样	10
半制备	3
可变光程流动池	0.15 到 3
微孔	3
惰性	10
自动净化	0.5
	管路 (ID):
	0.009 英寸
	0.040 英寸
	0.004 英寸
	0.005 英寸
	0.010 英寸
	0.009 英寸 (A 入口)
	0.020 英寸 (P 入口)
	0.040 英寸 (常见出口)

\* 依据 ASTM 685-79

A

# 附录 B

## 备件

建议用户安装表 B-1 中列出的备件。在“2996 检测器”上执行未经授权的操作所导致的损坏可能让某些担保无效。

表 B-1 备件

项目	部件号
标准流动池	WAT057919
半制备流动池	WAT057463
微孔流动池	WAT057462
惰性流动池	WAT057461
自动净化流动池	289000612
可变光程流动池	WAT057664
垫圈, 流动池 (2)	WAT057924
贝氏碟形垫圈 (2)	WAT057925
透镜支架和透镜 (2)	WAT057923
半制备透镜套件	WAT057968
氙灯	WAT052586 (PM Kit)
保险丝, 快速 4A, 250 V (5 × 20 mm)	WAT057337
Waters <sup>®</sup> 高氯酸钬波长准确度溶液	WAT042885
Waters 吸光度检测器线性溶液	WAT042881



**B**

# 附录 C

## 流动相吸光度

本附录列出了常用流动相多个波长处的吸光度。仔细选择流动相以减少基线噪音。

最适合应用的流动相是在选定检测波长处为透明的流动相。这种流动相可确保任何吸光度只和样品有关。流动相的吸光度还会减少检测器的线性动态范围，减少量为自动复零的光吸收量。流动相的波长、pH 和浓度会影响其吸光度。表 C-1 提供了几个流动相的示例。

表 C-1 根据空气或水测量出的流动相吸光度

	指定波长处的吸光度 (纳米)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
<b>溶剂</b>										
乙腈	0.05	0.03	0.02	0.01	0.01	<0.01	—	—	—	—
甲醇 (未脱气)	2.06	1.00	0.53	0.37	0.24	0.11	0.05	0.02	<0.01	—
甲醇 (已脱气)	1.91	0.76	0.35	0.21	0.15	0.06	0.02	<0.01	—	—
异丙醇	1.80	0.68	0.34	0.24	0.19	0.08	0.04	0.03	0.02	0.02
不稳定的四氢呋喃 (THF, 新鲜)	2.44	2.57	2.31	1.80	1.54	0.94	0.42	0.21	0.09	0.05
不稳定的四氢呋喃 (THF, 旧的)	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	2.5	1.45
<b>酸和碱</b>										
乙酸, 1%	2.61	2.63	2.61	2.43	2.17	0.87	0.14	0.01	<0.01	—
盐酸, 0.1%	0.11	0.02	<0.01	—	—	—	—	—	—	—
磷酸, 0.1%	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—	—
三氟乙酸	1.20	0.78	0.54	0.34	0.22	0.06	<0.02	<0.01	—	—



表 C-1 根据空气或水测量出的流动相吸光度 (续)

	指定波长处的吸光度 (纳米)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
磷酸氢二铵, 50 mM	1.85	0.67	0.15	0.02	<0.01	—	—	—	—	—
三乙胺, 1%	2.33	2.42	2.50	2.45	2.37	1.96	0.50	0.12	0.04	<0.01
<b>缓冲剂和盐</b>										
醋酸铵, 10 mM	1.88	0.94	0.53	0.29	0.15	0.02	<0.01	—	—	—
碳酸氢铵, 10 mM	0.41	0.10	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—
EDTA, 磷酸氢 二钠, 1 mM	0.11	0.07	0.06	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
HEPES, 10 mM, pH 7.6	2.45	2.50	2.37	2.08	1.50	0.29	0.03	<0.01	—	—
MES, 10 mM, pH 6.0	2.42	2.38	1.89	0.90	0.45	0.06	<0.01	—	—	—
磷酸钾, 一元碱 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), 10 mM	0.03	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
磷酸钾, 二元碱 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), 10 mM	0.53	0.16	0.05	0.01	<0.01	—	—	—	—	—
乙酸钠, 10 mM	1.85	0.96	0.52	0.30	0.15	0.03	<0.01	—	—	—
氯化钠, 1 M	2.00	1.67	0.40	0.10	<0.01	—	—	—	—	—
柠檬酸钠, 10 mM	2.48	2.84	2.31	2.02	1.49	0.54	0.12	0.03	0.02	0.01
甲酸钠, 10 mM	1.00	0.73	0.53	0.33	0.20	0.03	<0.01	—	—	—
磷酸钠, 100 mM, pH 6.8	1.99	0.75	0.19	0.06	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	<0.01

表 C-1 根据空气或水测量出的流动相吸光度 (续)

	指定波长处的吸光度 (纳米)									
	200	205	210	215	220	230	240	250	260	280
Tris HCl, 20 mM, pH 7.0	1.40	0.77	0.28	0.10	0.04	<0.01	—	—	—	—
Tris HCl, 20 mM, pH 8.0	1.80	1.90	1.11	0.43	0.13	<0.01	—	—	—	—
<b>Waters PIC<sup>®</sup> 试剂</b>										
PIC A, 1 样品瓶 / 升	0.67	0.29	0.13	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	<0.01
PIC B6, 1 样品瓶 / 升	2.46	2.50	2.42	2.25	1.83	0.63	0.07	<0.01	—	—
PIC B6, 低 UV, 1 样品瓶 / 升	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
PIC D4, 1 样品瓶 / 升	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01
<b>去污剂</b>										
BRIJ 35, 1%	0.06	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	<0.01	—	—	—
CHAPS, 0.1%	2.40	2.32	1.48	0.80	0.40	0.08	0.04	0.02	0.02	0.01
SDS, 0.1%	0.02	0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—	—
Triton <sup>®</sup> X-100, 0.1%	2.48	2.50	2.43	2.42	2.37	2.37	0.50	0.25	0.67	1.42
Tween <sup>™</sup> 20, 0.1%	0.21	0.14	0.11	0.10	0.09	0.06	0.05	0.04	0.04	0.03



C

# 索引

## A

- 暗电流 36
- 安装
  - 场地选择 1
  - 电气 2
  - 流体 9

## B

- 保险丝
  - 额定值符合 IEC 标准 2
  - 更换 27
  - 维护 27
- 备件 49
- 比尔定律 3544
- 波长
  - 流动相吸光度 51
  - 生成的向量 41
  - 准确性 17
- 部件, 备用 49
- 不理想 44
- 不良影响, 形状差异 44

## C

- 采集
  - 曝光时间参数 34
  - 自动曝光参数 34
- 参比光谱 36
- 测光误差 4445
- 纯度角, 测光误差影响 45

## D

- 灯
  - 更换 2526
  - 硬件原理 30

- 电气连接 2
- 电源连接 2
- 端子板
  - 连接 78
  - 图 8

## E

- 额定值符合 IEC 标准的保险丝 2

## F

- 非 IEEE-488 连接 6

## G

- 故障排除 1518
- 关闭, 过程 13
- 管路, 切割 10
- 光电二极管阵列 32
- 光谱
  - 光谱形状差异 44
  - 生成的向量 41
  - 向量 40
- 光谱对照
  - 光谱形状差异 44
  - 生成的向量 41
  - 向量 40
  - 原理 3946
- 光谱分辨率 31
- 光谱相同, 光谱形状差异 44
- 规格
  - 模拟输出 67
  - 事件输出 8
  - 事件输入 8
  - Waters 299647

**H**

后面板连接 3

**J**

接头 10  
接线端子 6

**L**

连接

端子板 8  
非 IEEE-4886  
后面板 3  
流体 9  
色谱柱 9  
事件 8

联系 Waters 技术服务 1517

流动池

冲洗 19  
分解图 23  
清洗 23  
取下 20  
维护 19

流动相

波长 51  
吸光度 51

**M**

Millennium 色谱管理器, 连接 3  
模拟输出规格 67

**P**

匹配角, 测光误差影响 45  
曝光时间参数 34

**Q**

启动, 过程 11

**R**

溶剂变化 45  
溶剂角, 测光误差影响 45

**S**

色谱柱, 连接 9  
生成的向量 41  
事件

电气规格 8  
端子板连接 7  
连接 68

输出 68

数据采集

曝光时间参数 34  
自动曝光参数 34

输入 68

**W**

Waters 2996

暗电流 36  
备件 49  
参比光谱 36  
光电二极管阵列概述 32  
光谱分辨率 31  
规格 47  
探测器光学元件, 概述 2931  
吸光度计算 3537  
狭缝宽度 31  
硬件原理 2938

Waters 技术服务, 联系 1517  
维护

保险丝 27  
灯 25  
流动池 19

PDA 检测器 1928  
文档约定 xiv

## X

吸光度

- 测光误差 44
- 流动相 51
- 溶剂变化影响 46
- Waters 2996 计算 3537
- 最大 45

狭缝宽度 31

向量

- 光谱对照 40
- 光谱, 表示 40
- 由多个波长生成 41
- 由两个波长生成 41

校正 17

## Y

压力接头 10

液体

- 接头 10
- 连接管路 9

仪器方法

- 曝光时间参数 34
- 自动曝光参数 34

阈值角度 44

约定, 文档 xiv

## Z

噪音影响 44

诊断 17

自动曝光参数 34

最大吸光度 45

