第一章　药物分析新进展

近年来，由于科学技术的迅速发展，各学科之间相互渗透，化学分析领域也发生了巨大变化，目前药物分析已经发展为以仪器分析为主的现代药物分析。各种色谱分析方法的确立，各种色谱之间的联用，各种光谱、质谱、核磁共振的联用，以及计算机技术应用于药物分析领域，均为药物分析提供了准确、快速而又灵敏的分析方法。随着体微透析技术的发展，能够在不明显损伤动物或人体组织的情况下，实现长时间连续取样。它与分析仪器联用，可实现在生物体内微量样品的实时分析。

一、仪器的发展

药物分析中对比较复杂样品中的微量成分的检测是很困难的，由于色谱法对复杂样品有较好的分离能力，因此色谱法已经成为用途较广的分离分析技术。

较早出现的紫外－可见检测器（UV－VIS）和示差折光检测器（RID），仍是目前应用最广的检测器。RID是通用型检测器，但是灵敏度较低；UV－VIS检测具有较高的灵敏度，但只能检查出在特定波长下有吸收的化合物。近年来检测器发展得很快，二极管阵列检测器的普遍应用，通过计算机控制，获得吸收、波长和时间的三维色谱、光谱图。荧光检测器具有较高的灵敏度，一般是UV－VIS检测器的$10 \sim 10^3$倍，但是选择性较强。对一些电活性物质，电化学检测器灵敏度是UV－VIS检测器的$10^2 \sim 10^3$倍，例如有机胺类化合物。蒸发光散射检测器对紫外无吸收的化

需要全本请访问 www.ertongbook.com

合物，如甾体化合物、人参皂苷等，具有较高的灵敏度，是新一代的通用型检测器。此外还有化学反应检测器、手性检测器和放射性检测器等。由于接口技术的发展，使得液相色谱－质谱联用技术（LC－MS）趋于成熟，接口技术由传送带式、热喷雾、粒子束发展到大气压电离技术，使 LC－MS 成为一种灵敏度高（pg 级）、选择性强、样品用量少、分析速度快的仪器联用分析方法，使生物学家能够在分子水平上研究生命科学，解码生命。2000 年 6 月 26 日，为时 10 年耗资 30 亿美元的人类基因组工作草图绘制成功，完成了 30 亿个碱基因对序列测定，这在很大程度上得益于分离分析技术的发展。

1．色谱法

色谱法包括薄层色谱（TLC）、气相色谱（GC）、液相色谱（LC）高效液相色谱（HPLC）、超临界流体色谱（SFC）等。TLC 是一种操作简单、方便、迅速的色谱方法，并且不怕污染，可应用于药物及制剂的鉴别、杂质检查以及中药成分分析，但作为定量分析时，由于影响因素较多，准确性不如气相和液相色谱。近年来自动仪器迅速发展，出现了自动点样仪、自动程序多次展开仪、薄层扫描仪，使薄层色谱法成为重现性、准确度和精密度相当高的定量方法。GC 主要应用于对含挥发性成分的样品进行检测分析，尤其是含挥发性成分的多组分中药成分的检测分析。GC－MS 联用可以和 GC－FTIR 联用互相补充，使灵敏度大大提高。LC 是常用的药物分子分析方法，尤其是高效液相色谱（HPLC），在已知化合物中 70% 以上为不挥发性化合物，某些化合物通过衍生技术能提高挥发性，用 LC 分析，比 GC 更直接简便。HPLC 具有高效、快速、应用范围广等优点，特别适用于高沸点、大分子、强极性和热稳定性差的化合物的分离分析。SFC 适用于相对分子质量大、不易挥发、热不稳定的药物，通常用 CO_2 作为流动相，是一种新型的分离效果好的环保型色谱分析方

法。

2．光谱法

紫外－可见光谱能测出 190～700nm 范围内的光吸收变化，可以定性定量，最低检测浓度可以达到 10^{-10}mmol/L，属于浓度敏感型检测器。红外光谱（IR）是一种强有力的结构鉴定手段，几乎没有两种物质有完全相同的红外光谱。 20 世纪 70 年代傅立叶光谱技术问世，红外扫描速度大大提高，满足了 HPLC 检测要求，可以在 2.5～14.5μm 的波长范围内进行检测。几乎所有的化合物都有 C－H伸缩振动，所以红外检测器是一种通用型检测器（需要通过 3.5μm 红外光的干涉滤光片），它具有测量速度快、灵敏度高的特点（ng 级），但 HPLC－IR 仪价格昂贵。

荧光化合物都有两种特征光谱，激发光谱和发射光谱。荧光光谱实际上仅指发射光谱，波长范围为 280～900nm，检测限 10pg，样品要配成低于 10^{-6} mmol/L 浓度的溶液，溶剂不含荧光物质。激光诱导荧光的灵敏度已达 10^{-22}g，与 HPLC 联用，检测限为 10^{-15}g。

激光拉曼光谱（SERS），一般采用激光激发，是一种具有高灵敏度、高选择性的痕量分析检测技术，检测限在 0．3～3μg，可以和 HPLC 联用。

3．质谱和核磁共振波谱

质谱具有较高的灵敏度，能够准确测定未知化合物的相对分子质量。几乎所有化合物都能得到质谱信息，采用 HPLC－MS分析法有很多好处，它能成功地定性定量分析许多化合物。如氨基酸、大分子抗生素、类固醇、生物碱、多肽、蛋白质、青霉素、核苷、维生素和农药等。检测限在 ng～pg 级，可以组成 HPLC－DAD－MS 联用仪，提供紫外光谱、质谱、保留时间三元信息。LC－MS是比较成熟的分离分析仪器。

核磁共振波谱（NMR） （详见第六章）是测试药物和生物大

分子结构最好的手段。核磁共振波谱信息丰富，其化学位移和耦合常数能提供有关分子中每个氢原子的局部电子环境的结构信息，对未知化合物结构、构型及光学异构体的确认，是最有利的波谱技术，对于复杂的混合物，NMR 信息互相覆盖，需要色谱分离技术与 NMR 结合。HPLC－NMR 已经成为一种比较成熟的分析方法。NMR 对样品是非破坏性的，可以实现 HPLC－NMR－MS 和 HPLC－NMR－FTIR－MS 联用。二维及三维 NMR 波谱测定溶液中蛋白质的三维结构，可应用于生物工程领域。 NMR 在药物及临床化学方面，不需要事先分离就能检测混合物中各个组分，分析样品的药物代谢过程和药效。

4．毛细管电泳法

毛细管电泳法（CE）是 20 世纪 80 年代崛起的一种新型高效分离技术，它具有高效、快速、样品量小、灵敏、经济等特点，而且样品不怕污染。在药物分析中应用越来越广泛，尤其是在基因工程药物质量研究方面，被用于纯度和含量的测定。

5．热分析法

热分析法（TA）（详见第七章），常用于新药的研究。在药物分析领域应用广泛，主要包括化学药品鉴别、理化常数测定、纯度及稳定性考察。近些年来，对中药的活性成分、药材真伪及中药制剂的质量分析方法逐渐增多，一些发达国家已经将热分析法作为控制药品质量的主要手段之一。我国 2000 年版药典收录了热重分析法、差热分析法、差示扫描量热法等分析方法。

6．X－射线衍射法

近年来随着药学的迅速发展，发现药物的晶型与疗效、溶出度、生物利用度、药物的稳定性有很大关系。 X－射线衍射法在药物分析中的应用受到进一步重视。 1965 年以后，一些国家对无味红霉素混悬液中的原料晶型陆续制定了标准，如规定无效晶型不得超过 10%等。到了 20 世纪 70 年代，为了控制药品质量和

保证临床疗效，更多的科研成果已列入某些药品的法定标准，收录于药典之中，美国药典国家处方集（NF）第13版最先增添了“X－射线衍射”一节，并刊载了一些药物多晶型物的X－射线衍射图谱。美国药典（USP）第19版在通则中列入了X－射线衍射法，对于定义、目的、要求、基本原理、仪器、方法，都作了说明和规定。结晶学学报1979年发表的有关药学方面的论文有秋水仙碱、四环素衍生物、辛可宁、氯霉素衍生物等50多篇，而且自1980年以后呈上升趋势。

应用X－射线衍射技术研究矿物药的组成、传统中药材的鉴定及药品真伪识别等具有专属性，并且准确可靠。

粉末X－射线衍射技术在药物分析中的应用，是20世纪80年代蓬勃兴起的新领域。大部分文献报道尚局限于晶型鉴别的基本应用阶段，系统理论的形成及深入物质微观结构的探讨，还在继续发展中。可以期待，随着现代技术的飞跃发展，尤其是计算机应用的程序化，人们对药物本质与特性的了解也更加深入，从而更迫切地要求掌握药物结构的内在规律而能动地去改造药物，使之满足人类的需要。这就给粉末X－射线衍射技术提供了一个更为广阔的应用空间。X－射线衍射技术与新兴学科结晶工程学的结合就是证明之一。更深入地对药物与细菌、细胞生化物质如蛋白质、酶、受体等复合物的结晶谱的研究，提供药物作用的立体化学细节，亦将是药物动力学、分子生物学与分子遗传学等有关基础学科发展中的重要内容。

二、分析方法的发展

药物分析方法向着准确、快速、精确、经济、通用的方向发展。准确性是第一位的，不同的分析方法有着各自的优缺点，1992～2000年我国分析实验室杂志中药物分析综述统计分析情况

需要全本请访问 www.ertongbook.com

见表 1：

表 1　1992～2000 年药物分析综述统计分析

年份	分光法	HPLC	GC	TLC	HPCE	电化学	其他	论文总数
1992	27.7	27.0	12.8	13.4	8.5	10.6		553
1994	27.1	29.9	10.3	16.6		4.7	11.4	923
1996	28.5	39.2	7.6	12.2		2.5	10.0	760
1998	17.6	44.5	9.7	16.1	3.2		9.0	870
2000	16.2	40.0	8.0	21.4	5.6		8.8	879

由上表可见 HPLC 及 TLC 所占比重较大，随着仪器的发展，这两种方法逐年增加，应用更加广泛，多维色谱用于药物、蛋白质、多肽结构测定，使 21 世纪的基因工程得到前所未有的发展，这将对人类做出巨大贡献。

三、体微透析技术的发展

体微透析技术源于 20 世纪 60 年代初神经化学实验灌流取样技术。由于定量分析方法的改进，使体微透析技术进入临床药理研究领域，尤其在药物作用机制及药动学方面发挥着独特的作用。体微透析技术既适用于麻醉动物，又可以用于清醒动物。它是在组织中植入半透膜探头装置，体外微量泵使灌流液流经探头，组织中被测物质沿浓度差逆向扩散进入灌流液，并达到一种动态平衡，通过测定流出液，即透析液中待测物的浓度，研究组织细胞外液中待测物的水平及其变化过程。体微透析技术的特点是创伤轻微、不易引起组织感染、不引起取样部位容积变化、能连续长时间取样，同时由于它取样量少、样品不易污染，可实现在线分析。体微透析取样技术必须与分析仪器联用才能进行体内药物分析，具有高灵敏度，样品需要量少，分析快速、准确，对微量样品实施实时在线测定分析，可以大大减少操作误差。体微

透析技术可与 HPLC、HPCE、MS 联用，由于体微透析的取样量少，所以用 HPLC 需选用毛细管色谱柱，才能保证定量的灵敏度。HPCE 所需样品量少，对样品的处理要求低，因此毛细管电泳比较适合与体微透析技术联用。 HPLC－MS，HPCE－MS 与体微透析联用可以对药物作药动学研究。

四、中药分析的发展

中药的药效物质和中药及其复方制剂的质量标准规范化是中药现代化的中心环节。传统中药没有进入国际医药的主流市场，最根本的原因是中药理论无法与国际上普遍接受的现代医学理论接轨。最近几年发展起来的 HPLC 指纹图谱是信息量较大的中药识别和定量分析的有效方法。毕开顺教授等建立的模式识别系统对中药材和中药复方制剂的质量评价具有较好的效果。该方法旨在建立中药的药效－毒性指纹图谱，从而达到综合评价中药质量的目的。中药影响细胞基因表达的研究在国内已经展开，主要在免疫调节类中药、抗肿瘤类中药、活血化淤类中药、抗衰老类中药以及作用于神经系统、内分泌系统的中药。从分子基因水平上研究中药的作用机制，使中药获得微观表达，对筛选疗效确切的中药新药具有重要意义。

综上所述，药物分析是随着分析仪器的发展向着更加精确、快速、便捷、微量、痕量、环保的方向发展。研究药物在体内的吸收、分布、排泄、代谢转化，可以更好地服务临床，所以体内药物分析是药物分析的一个重要分支领域。国内对体内药物分析工作愈来愈重视，尤其是对中药的分析。中药是我国的宝贵遗产，它资源丰富，历史悠久，随着中国加入世界贸易组织，如何提高中药质量标准水平，把中药制剂打入国际市场，是我国中药发展的重要任务，也是药物分析的艰巨任务。

第二章　高效液相色谱法

作为色谱分析方法的一个分支，高效液相色谱法是在 20 世纪 60 年代末期，在经典液相色谱法和气相色谱法的基础上发展起来的新型分离技术。液相色谱包括传统的柱色谱、薄层色谱和纸色谱。20 世纪 50 年代后期气相色谱法在色谱理论研究和实验技术上迅速崛起，而液相色谱技术仍停留在经典操作方式上，其操作繁琐、分析时间冗长，因而未受到重视。 20 世纪 60 年代以后，随着气相色谱法对高沸点有机物分析局限性的逐渐显现，人们又重新认识到液相色谱法可以弥补气相色谱法的不足。随着微粒固定相的研制成功，液相色谱仪制造商在借鉴了气相色谱仪研制经验的基础上，成功地制造了高压输液泵和高灵敏度检测器，从而使液相色谱法获得新生。

从分析原理上讲，高效液相色谱法和经典液相（柱）色谱法没有本质的差别，但由于它采用了新型高压输液泵、高灵敏度检测器和高效微粒固定相，从而使经典的液相色谱法焕发出新的活力。经过近 30 年的发展，现在高效液相色谱法在分析速度、分离效能、检测灵敏度和操作自动化方面，都达到了与气相色谱法相媲美的程度，并保留了经典液相色谱法对样品适用范围广、可供选择的流动相种类多和便于用于制备色谱等优点。如今，高效液相色谱法已在生物工程、制药工业、食品工业、环境监测、石油化工等领域得到了广泛的应用。

第一节　高效液相色谱法的特点

高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography）作为一种色谱法，主要用于对多组分混合物的分离，这种方法不仅使以往的柱色谱法达到了高速化，而且使得其分离效能大大提高，故应用性更加广泛，比其他一些色谱法具有更多的优越性。现将其与气相色谱法和薄层色谱法进行比较，进一步说明高效液相色谱法的特点。

一、高效液相色谱法与气相色谱法的比较

尽管气相色谱法和液相色谱法的原理完全相同，但两者有很大差别。前者流动相采用的是对样品及填充剂均不活泼的气体(氦气或氮气),后者除传统的凝胶渗透色谱外,均采用对样品和填充剂具有亲和力的液体。以前，相对于液相色谱而言，气相色谱由于流动相的不同，曾经是惟一的一种可实现快速分析的色谱法，如今高效液相色谱法亦能使液相色谱实现快速分离，分离时间与气相色谱相比几乎没有什么差别，且分离性能和应用范围均比气相色谱优越得多。

从样品分离的可能性来看，用气相色谱来分离样品，只需考虑样品和填充剂两者之间的关系即可，相对比较简单，但也使样品的分离受到了制约。采用高效液相色谱分离必须考虑样品、填充剂和流动相三者之间的关系。尽管分离洗脱时比较复杂，但说这种分离具有无限的可能性，绝不过分。事实上，在气相色谱中难以分离的样品，在高效液相色谱中往往可以轻易地得到解决。这两种分析方法的分离关系如图 2－1 所示。



图 2－1　高效液相色谱法与气相色谱法分离关系的比较

此外，对气相色谱法来说，样品必须以气体状态通过色谱柱和检测器，气相色谱的使用温度一般小于 350 ℃,对难以汽化的不挥发性物质以及受热易变质、分解的样品，一般难以直接进行分析。样品不经过前处理就能直接进行分析的化合物只占全部有机化合物的 20% 左右，相对分子质量分布大约在 50～600 之间。高效液相色谱则不同，除去为降低流动相的黏度或者是由于样品在常温下不溶解而需要加温外，一般室温下操作即可。而且只要样品能溶于某种溶剂，就可以成为分离对象。所以说利用高效液相色谱进行分析不受样品的热稳定性、挥发性和脂溶性的限制，从低分子到高分子，甚至光学异构体均在适用范围之内。

另外，高效液相色谱比气相色谱更容易对分离出来的样品进行回收。气相色谱的样品是在汽化状态下从色谱柱上洗脱下来，故需要色谱柱出口附近设置冷却装置或器皿，回收率因冷却效率而异，一般在 40%～70% 之间。高效液相色谱的样品是以溶液的状态从色谱柱上洗脱下来的，只需在色谱柱的出口处放置一个简单的容器，就很容易使回收率达到 80%～90% 以上。

二、高效液相色谱法与薄层色谱法的比较

薄层色谱法是利用薄层层析板（在玻璃板表面薄薄覆盖一层吸附剂）来进行分离的。由于设备简便，所以在许多领域中得到

广泛应用，尤其是在基层质检单位。对这种方法来说，薄层层析板表面吸附剂的厚度在整个表面不可能保持均衡不变，故用不同薄层层析板测得的样品各成分的展开距离很难再现。因此，在薄层色谱中，通常用样品移动比（流动相展开距离与样品展开距离之比，即 Rf值）进行定性分析。由于样品的展开距离不同，样品斑点的扩散比率也不相同，因此，一般只用于定性分离鉴定，而很难用于精确的定量分析。

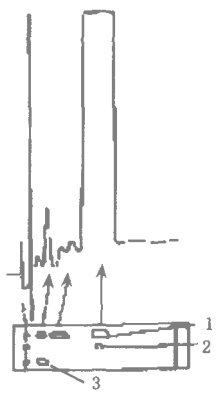


图 2－2　高效液相色谱法和薄层色谱法的比较
1－醋酸氢化可的松的分解样品；　2－醋酸氢化可的松对照品；
3－氢化可的松对照品

下面选一个分析实例对高效液相色谱法和薄层色谱法进行对比：醋酸氢化可的松及其分解物的色谱分离（见图 2－2)。利 用薄层色谱法进行分离展开，通常样品在展开前需要进行一系列复杂的预处理，即用氯仿萃取 4次、稀释 2次、浓缩 1次，最后再用乙醇溶解。分离展开后，为了对样品进行检测尚需用四氮唑蓝显色，整个分离、检验操作需要 3小时以上。而用高效液相色谱法进行样品预处理，只需用乙醇萃取即可进样，　15分钟内完成

需要全本请访问 www.ertongbook.com

分离分析操作。尽管使用的是高效液相色谱仪的初期产品，设备和色谱柱的性能均不理想，但与薄层色谱法相比，不仅是分离时间短，而且还能检测出不与四氮唑蓝反应的杂质。此外，高效液相色谱法比薄层色谱法的分辨率高，根据所得谱图上各色谱峰的峰高或峰面积可以对各个组分的含量进行定量测定。

高效液相色谱法与经典液相（柱）色谱法、气相色谱法以及薄层色谱法的比较见表 2、表 3、表 4。

表 2　高效液相色谱法与经典液相（柱）色谱法的比较

项目 \ 方法	高效液相色谱法	经典液相色谱法
色谱柱：柱长（cm）	10～25	10～200
柱内径（mm）	2～10	10～50
固定相粒度：粒径（μm）	5～50	75～600
筛孔（目）	2 500～300	200～30
色谱柱入口压力（MPa）	2～20	0.001～0.1
色谱柱柱效（理论塔板数/m）	2 000～50 000	2～50
进样量（g）	10^{-6}～10^{-2}	1～10
分析时间（h）	0.05～1.0	1～20

表 3　高效液相色谱法与气相色谱法的比较

项目 \ 方法	高效液相色谱法	气相色谱法
进样方式	样品制成溶液	样品需加热汽化或裂解
流动相	1．液体流动相可为离子型、极性、弱极性、非极性溶液，可与被分析样品产生相互作用，并能改善分离的选择性 2．液体流动相动力黏度为10^{-3}Pa·s，输送流动相压力高达2～20MPa	1．气体流动相为惰性气体，不与被分析的样品发生相互作用 2．气体流动相动力黏度为10^{-5}Pa·s，输送流动相压力仅为0.1～0.5MPa

（续表）

项目＼方法	高效液相色谱法	气相色谱法
固定相	1．分离机理：可依据吸附、分配、筛析、离子交换、亲和等多种原理进行样品分离，可供选择的固定相种类繁多 2．色谱柱：固定相粒度为5～10μm；填充柱内径为3～6mm，柱长10～25cm，柱效为10^3～10^4；毛细管柱内径为0.01～0.03 mm，柱长5～10m，柱效为10^4～10^5；柱温为常温	1．分离机理：依据分配、吸附两种原理进行样品分离，可供选择的固定相种类较多 2．色谱柱：固定相粒度为0.1～0.5mm；填充柱内径为1～4mm，柱长1～4m，柱效为10^2～10^3；毛细管柱内径为0.1～0.3 mm，柱长10～100m，柱效为10^3～10^4；柱温为常温至300℃
检测器	选择性检测器：UVD，PDAD，FD，ECD；通用性检测器：ELSD，RID	选择性检测器：TCD，FID（有机物）；通用性检测器：ECD，FPD，NPD
应用范围	可分析低相对分子质量、低沸点样品；高沸点、中分子、高分子有机物（包括非极性、极性）；离子型无机化合物；热不稳定，具有生物活性的生物分子	可分析低分子、低沸点有机化合物；永久性气体；配合程序升温可分析高沸点有机化合物；配合裂解技术可分析高聚物

UVD—紫外吸收检测器；PDAD—二极管阵列检测器；FD—荧光检测器；ECD—电化学检测器；RID—折光指数检测器；ELSD—蒸发光散射检测器；TCD—热导池检测器；FID—氢火焰离子化检测器；ECD—电子捕获检测器；FPD—火焰光度检测器；NPD—氮磷检测器

表4　高效液相色谱法与薄层色谱法的比较

项目＼方法	高效液相色谱法	薄层色谱法
进样方式	样品制成溶液	样品制成溶液
流动相	1．液体流动相可为离子型、极性、弱极性、非极性溶液，可与被分析样品产生相互作用，并能改善分离的选择性 2．液体流动相动力黏度为10^{-3}Pa·s，输送流动相压力高达2～20MPa	1．液体流动相可为离子型、极性、弱极性、非极性溶液，可与被分析样品产生相互作用，并能改善分离的选择性 2．常压下展开

（续表）

项目 \ 方法	高效液相色谱法	薄层色谱法
固定相	1．分离机理：可依据吸附、分配、筛析、离子交换、亲和等多种原理进行样品分离，可供选择的固定相种类繁多 2．色谱柱上分离；柱温为常温	1．分离机理：可依据吸附、分配、筛析、离子交换、亲和等多种原理进行样品分离，可供选择的固定相种类繁多 2．常温下薄层板上分离
检测器	选择性检测器（UVD，PDAD，FD，ECD）和通用性检测器（ELSD，RID）；灵敏度、分辨率高，可以定性定量	化学显色剂显色或紫外光灯下显色；重现性差，只用作定性分离鉴别
应用范围	可分析低分子、低沸点样品；高沸点、中分子、高分子有机物（包括非极性、极性）；离子型无机化合物；热不稳定，具有生物活性的生物分子	可分析低分子、低沸点样品；高沸点、中分子、高分子有机物（包括非极性、极性）；离子型无机化合物；热不稳定，具有生物活性的生物分子
仪器组成	高压输液系统，进样系统，色谱柱系统，检测系统和结果处理系统	层析设备，点样装置，薄层板，显色剂

通过以上介绍可知高效液相色谱法具有以下特点：

(1)分离效能高。由于新型高效微粒固定相填料的使用，液相色谱填充柱的柱效可以达到 $2\,000 \sim 50\,000/m$ **理论塔板数,远远高于气相色谱填充柱** $1\,000/m$ **理论塔板数的柱效。**

(2)选择性高。由于液相色谱柱具有高柱效，并且流动相可以控制和改善分离过程。因此,高效液相色谱法不仅可以分析不同类型的有机化合物及其同分异构体,还可以分析在性质上极为相似的旋光异构体,在高疗效的合成药物和生化药物的生产控制分析中发挥重要作用。

(3)检测灵敏度高。在高效液相色谱法中使用的检测器大多数都具有较高的灵敏度。如被广泛使用的紫外检测器，最小检出量可达 $10^{-9}g$ **用于痕量分析的荧光检测器,最小检出量可达** $10^{-12}g$.

(4)分析速度快。由于高压输液泵的使用，相对于经典液相柱色

谱,其分析时间大大缩短,几分钟到几十分 钟即可完成样品的分离。

高效液相色谱法除了具有以上特点外，其应用范围也日益扩大。由于使用了非破坏性检测器,样品被分离后,在大多数情况下,可除去流动相,实现对少数珍贵样品的回收，亦可以用于样品的纯化制备。

第二节　高效液相色谱仪及其进展

现代高效液相色谱仪主要包括高压输液系统、进样系统、色谱柱系统、检测系统和结果处理系统 5 大部分,前 4 大部分又被称为液相色谱的硬件系统,本节在对以上 5 部分进行介绍的同时,对目前液相色谱仪的最新进展也做一简单介绍。

高效液相色谱仪可分为分析型和制备型，虽然它们的性能各异、应用范围不同,但其基本组件是相似的,对分析型商品仪器有以下两种组合方式:①完全紧凑的整体系统。其死体积小、灵敏度高,体现高效液相色谱仪总体实用的特点。②独立部件的组合系统。其灵活性高,可根据不同的分析目的,组装成不同的连接方式。

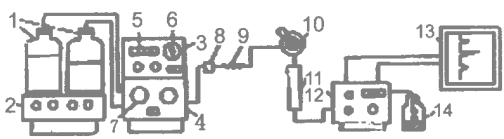


图 2－3　高效液相色谱仪的组成

1－贮液罐;2－搅拌、超声脱气器;3－梯度洗脱装置;4－高压输液泵;5－流动相流量显示;6－柱前压力表;7－输液泵泵头;8－过滤器;9－阻尼器;10－六通进样阀;11－色谱柱;12－检测器;13－记录仪或色谱工作站;14－回收废液罐

现在，用计算机控制的高效液相色谱仪，其自动化程度很高，既能控制仪器的操作参数(如溶剂梯度洗脱、流动相流量、柱温、自

动进样、洗脱液收集、检测器功能等),又能对获得的色谱图进行收缩、放大、叠加等处理,为色谱工作者提供了高效率、功能齐全的分析工具。图 2－3 为高效液相色谱仪的组成示意图。

一、高压输液系统

高压输液系统包括贮液罐、高压输液泵和梯度洗脱装置等。

1. 贮液罐

贮液罐用来供给足够数量的符合要求的流动相以完成分析工作。对贮液罐的要求是 必须有足够的容积,以备重复分析时保证供液 脱气方便、能承受一定的压力 所选用的材料都是惰性的。

贮液罐一般是以不锈钢、玻璃或聚四氟乙烯衬里塑料为材料,容积一般为 0.5～2L 为宜。溶剂使用前必须脱气。因为色谱柱是带压操作的,而检测器是在常压下工作,若流动相中所含的空气不除去,则流动相通过色谱柱时其中的气泡受到压力而压缩,流出色谱柱后到检测器时因常压而将气泡释放出来，造成检测器噪声大,使基线不稳,仪器不能正常工作(在梯度洗脱时尤为明显)。常用的脱气方法为低压脱气法、吹氦脱气法和超声波脱气法。低压脱气法不适用于对以低沸点溶剂为强溶剂而且色谱系统对流动相中强溶剂十分敏感的流动相的脱气 吹氦脱气法简单方便,适用于所有流动相脱气,但由于氦气价格昂贵,在国内尚难以普及 超声波脱气法方便,不影响溶剂的组成,并适用于各种溶剂,此法目前在国内使用较为普遍。使用此法应注意不要将溶剂瓶与超声波清洗槽底或壁相接触，以免溶剂瓶破裂。

2. 高压输液泵

高压输液泵是液相色谱仪的重要部件，它将流动相输入到色谱柱系统，使样品在色谱柱系统中完成分离过程。现代高效液相色谱仪的高压泵应具备如下性能：

(1)流量稳定,通常要求流量精度约 ±1%。

(2)输出压力高,要求最高压力为 35~50MPa。

(3)流量范围宽,一般在 0.001~10mL/min 范围内。

(4)耐酸、碱和缓冲液腐蚀。

(5)压力波动小,死空间小,易于清洗和更换溶剂。

(6)具有梯度洗脱功能。

高压输液泵,按排液性能可分为恒流泵和恒压泵两类 按机械结构可分为液压隔膜泵、气动放大泵、螺旋注射泵和往复柱塞泵 4种,前两种为恒压泵,后两种为恒流泵。恒压泵可以输出一个恒定不变的压力,在一般的系统中,由于系统的阻力不变,恒压亦可以达到恒流的效果,但当系统阻力变化时,输出压力虽然不变,但流量却随阻力而变化。恒流泵则无论色谱柱系统阻力如何变化都可以保证其流量基本不变。在色谱法实际操作中,色谱柱系统的阻力总是要变的,例如 填料装填的不均匀,高压造成缝隙逐渐减小,填料变形;环境温度变化及梯度冲洗时流动相黏度的变化等都会造成色谱柱系统的阻力改变。由此可见,恒流泵比恒压泵更显优越,目前使用得很普遍。然而,恒压操作对于在泵和色谱柱系统允许的最大压力下冲洗色谱柱系统很方便且安全,因此,有些恒流泵亦带有恒压输液的功能,以满足多种需要。

3.梯度洗脱

梯度洗脱分为低压梯度(又称外梯度)和高压梯度(又称内梯度)。低压梯度采用在常压下按预定的程序将溶剂混合,再用泵输入至色谱柱系统,亦称为泵前混合。高压梯度由两台高压输液泵、梯度程序控制器(或计算机及接口板控制)、混合器等部件组成。两台泵分别将两种极性不同的溶剂输入混合器,经充分混合后进入色谱柱系统。这是泵后高压混合的一种形式。

高压梯度所采用的输液泵多为往复柱塞泵。采用此泵流量精度高,梯度洗脱曲线重复性好。

需要全本请访问 www.ertongbook.com