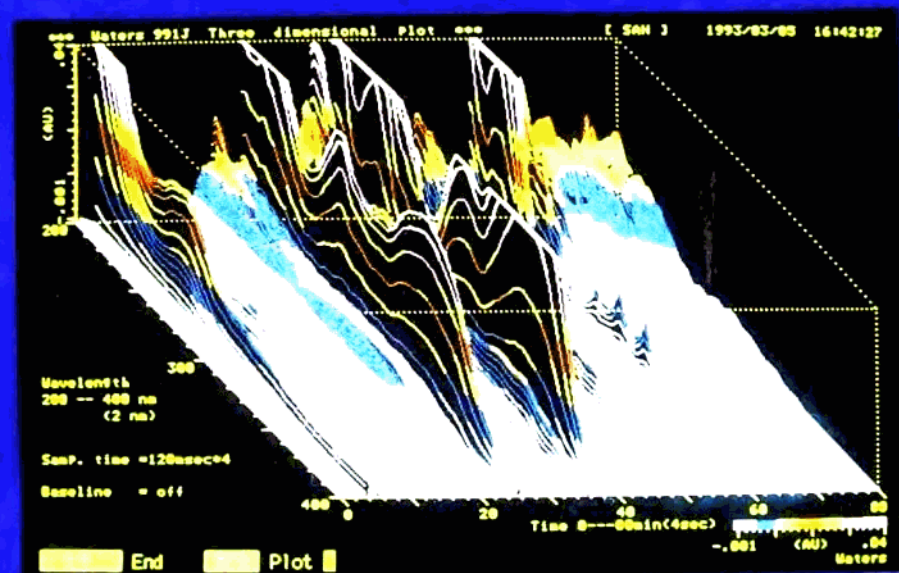


高效液相色谱 在中药研究中的应用

王喜军 编著



黑龙江科学技术出版社

(黑) 新登字第2号

内 容 提 要

高效液相色谱是目前中药分析及研究中的快速、准确的分析技术。本书分上、下两篇。上篇介绍高效液相色谱的基本理论、仪器及在中药分析中的基本操作方法。下篇为各论,具体介绍110余种中药及复方的高效液相色谱分析,涉及140种中药有效成分的高效液相色谱定性定量分析。全书内容新、详尽实用,部分内容为作者的研究成果,所介绍的仪器为较先进的 Waters 系列,可供中药检验、中药分析研究及生产企业中有关技术人员使用。

责 任 编 辑:车承樟

封 面 设 计:刘连生

高效液相色谱在中药研究中的应用

王喜军 编著

黑龙江科学技术出版社出版

(哈尔滨市南岗区建设街35号)

齐齐哈尔市铁路印刷厂印刷

黑龙江省新华书店发行

787×1092毫米 16开本 16印张 386千字

1994年12月第1版,1994年12月第1次印刷

印数:1-5000册 定价:18.00元

ISBN 7-5388-2745-5/R·396

前 言

高效液相色谱(HPLC)是60年代末和70年代初发展起来的一项快速准确的分析技术,其分析速度快,分离效能高,检测灵敏度大,样品适用范围广。目前已广泛地用于天然药物的分析,成为中草药化学成分的纯度鉴定、含量测定、复方质量控制及中药代谢研究等有力手段,它的应用已成为中药分析研究中的一个重要学科。

目前我国的高效液相色谱分析技术在医药行业已由原来的少数研究部门拥有发展到为众多的研究部门,药检分析部门,生产企业的质检部门及教学单位所广泛应用的一种手段。本书是作者在中药品质评价研究的第一手资料基础上,收集同道研究者的最新研究资料整理编著而成,旨在介绍高效液相色谱的基本理论、基本方法及在中药分析研究中的应用。全书介绍了110余种常见单味中药及其复方的具体HPLC分析法,涉及140个有效成分的定性定量分析。在内容上尽可能做到材料新颖系统、深入实用,面向所有从事色谱工作及从事中药教学、研究、质量检验及生产监测的工作人员。

在本书所涉及内容的研究工作及成书过程中,得到了作者导师——日本北海道药科大学鹿野美弘教授的悉心指导和提供第一手研究资料;亦曾得到黑龙江中医学院刘中申教授、苑春升教授两位老前辈的热情支持和关怀,他们对本书的内容提出了许多有益的建议和修改意见;在成书过程中还得到黑龙江中医学院中药系及中药鉴定教研室全体同道们的积极配合;尤其是作者的同窗好友刘一民先生在整个成书至付梓给予多方面的帮助。在此作者一并表示衷心的感谢。

由于时间仓促,加之水平有限,书中错误和不妥之处定会有之,敬请专家和广大读者从关怀青年科技工作者成长及对中药和色谱事业关心的角度提出批评指正,以便今后进一步使之完善。

作者

目 录

上 篇

第一章 高效液相色谱分析概述	(1)
第一节 液相色谱的产生与发展	(1)
第二节 高效液相色谱与经典液相色谱的比较	(1)
第三节 高效液相色谱与气相色谱的比较	(2)
第四节 高效液相色谱的特点	(2)
第五节 高效液相色谱的流程及高效液相色谱仪	(3)
第二章 高效液相色谱分离的方法及选择	(15)
第一节 高效液相色谱分离的方法	(15)
第二节 分离方法的选择	(16)
第三章 高效液相色谱的固定相流动相及其选择	(18)
第一节 高效液相色谱的固定相	(18)
第二节 高效液相色谱的流动相	(20)
第三节 固定相和流动相的选择	(23)
第四章 高效液相色谱的定性和定量分析	(24)
第一节 定性分析	(24)
第二节 定量分析	(26)
第五章 高效液相色谱样品制备及使用前处理	(29)
第一节 样品的制备	(29)
第二节 HPLC 前处理	(30)

下 篇

第六章 高效液相色谱在单味中药研究中的应用	(33)
1. 人参	(33)
2. 大黄	(35)
3. 生姜	(40)
4. 黄芩	(42)
5. 黄连	(44)
6. 黄柏	(45)
7. 吴茱萸	(47)
8. 苦参	(49)
9. 丹参	(51)
10. 防风	(56)
11. 当归	(58)
12. 地黄	(59)
13. 党参	(61)
14. 白芷	(63)
15. 甘草	(64)
16. 延胡索	(66)
17. 葛根	(68)
18. 柴胡	(69)
19. 芍药	(71)
20. 麦冬	(74)
21. 泽泻	(76)
22. 姜黄	(79)
23. 麻黄	(81)
24. 钩藤	(83)

25. 桂皮	(86)	43. 血竭	(118)	
26. 厚朴	(88)	44. 熊胆	(120)	
27. 牡丹皮	(89)	45. 牛黄	(122)	
28. 橘红	(92)	46. 冬虫夏草	(124)	
29. 马兜铃	(94)	47. 大枣	(126)	
30. 胡椒	(95)	48. 秦艽	(128)	
31. 栀子	(97)	49. 石韦	(130)	
32. 山茱萸	(98)	50. 连翘	(131)	
33. 肉豆蔻	(100)	51. 牛蒡子	(134)	
34. 五味子	(102)	52. 独活	(135)	
35. 侧柏叶	(104)	53. 龙胆	(137)	
36. 青蒿	(105)	54. 天麻	(139)	
37. 茵陈蒿	(107)	55. 虎杖	(141)	
38. 金银花	(109)	56. 女贞子	(142)	
39. 洋金花	(111)	57. 陈皮	(145)	
40. 青风藤	(113)	58. 红豆杉	(146)	
41. 青黛	(115)	59. 关木通	(148)	
42. 藤黄	(117)	60. 麝香	(149)	
第七章 高效液相色谱在复方研究中的应用				(153)
1. 茵陈蒿汤	(153)	21. 齐墩果酸片	(193)	
2. 牛黄解毒片	(155)	22. 香砂养胃丸	(194)	
3. 茵陈五苓散	(158)	23. 麻子仁丸	(196)	
4. 逍遥丸	(160)	24. 更年安	(200)	
5. 当归芍药散	(163)	25. 雷公藤片	(201)	
6. 六神丸	(164)	26. 鼻炎康片	(203)	
7. 九分散	(166)	27. 六应丸	(204)	
8. 丹参注射液	(169)	28. 国公酒	(205)	
9. 复方丹参片	(171)	29. 骨刺消痛液	(207)	
10. 加味逍遥散(丸)	(173)	30. 益心口服液	(208)	
11. 安宫牛黄丸	(176)	31. 清热解毒口服液	(209)	
12. 小柴胡汤(片)	(178)	32. 夏天无制剂(注射液、眼药水)	(210)	
13. 藿香正气水(丸)	(179)	33. 杞菊地黄丸	(212)	
14. 海马补肾丸	(181)	34. 治浊固本丸	(214)	
15. 天麻注射液	(183)	35. 济生肾气丸	(215)	
16. 左金丸	(185)	36. 复方滴鼻剂	(216)	
17. 芫花萜膜	(186)	37. 蛇胆川贝液	(217)	
18. 小儿牛黄散	(188)	38. 消瘿片	(219)	
19. 人参蜂王浆	(189)	39. 川芷头痛丹	(221)	
20. 百合固金汤	(191)			

40. 温清饮.....	(222)	成分研究	(230)
41. 五味清浊散.....	(224)	46. 大活络丹.....	(233)
42. 补骨酯酊.....	(225)	47 太阳神口服液	(236)
43. 木香顺气丸.....	(227)	48. 补气养血注射液.....	(237)
44. 茵陈蒿汤口服后血中移行成分分 析	(228)	49. 健儿口服液.....	(238)
45. 甘草附子汤口服给药后血中移行 附表生药及制剂定量指标成分表.....		50. 蟾酥脂质体.....	(240)
成分英文名索引.....			(242)
成分中文名索引.....			(244)
			(247)

上 篇

第一章 高效液相色谱分析概述

高效液相色谱分析是60年代末70年代初发展起来的一项新颖快速分析技术。目前已广泛地用于天然产物的分析,成为中草药化学成分纯度鉴定、含量测定、复方质量控制、中药代谢研究等有力的手段,它的应用已成为中药分析研究的一个重要学科。

液相色谱分析是指流动相为液体的色谱技术,液相柱色谱是色谱法最古老的一种。但它使用颗粒填料和柱内不均匀的填充床,使这种方法分离效能和速度都较低。通过改进填料的粒度及柱压,在经典的液相柱色谱的基础上引入了气相色谱的塔板理论,在技术上采用了高压输液泵,高效固定相和高灵敏度的检测器,实现了分析速度快,分离效率高和操作自动化,这种色谱技术被称为高效液相色谱法,它可用作液固吸附、液液分配、离子交换和空间排除色谱(即凝胶渗透色谱)分析,其应用极为广泛。

第一节 液相色谱的产生与发展

高效液相色谱是在经典的液相色谱(柱层析)的基础上引入气相色谱的理论并加以改进而发展起来的。早在1906年俄国的植物化学家茨维特(Tswett)就发表了关于色谱的论文。他在研究植物叶色素成分时,将植物色素的石油醚溶液从一根填充碳酸钙颗粒的玻璃管上端加入沿管滤下,浸渍的色素就吸附在碳酸钙上,后用纯石油醚淋洗,结果按照不同色素的吸附顺序,在管内观察到它的相应的色带,就象光谱一样。茨维特把这些色带称为“色谱图”(Chromatogram),相应的方法叫“色谱法”(Chromatographic Method),这就是最初的液相色谱,此后经典的液相色谱法就逐步得到了应用。30年代有人用来分离了一系列天然产物。40年代末在液相色谱原理的基础上 Martin 和 Synge 提出了关于气-液分配色谱的比较完整的理论和方法,把色谱技术向前推进了一大步。50年代 Stail 提出了薄层色谱法,1958年基于 Moore 和 Stein 的工作,离子交换色谱的仪器化导致了氨基酸分析仪的出现,60年代出现了排阻色谱。从柱状液相色谱法的出现到60年代,虽然方法已得到了普遍的应用成为一种常见的分离手段,但与50年代初期发展起来的气相色谱法比较进展还是缓慢的,其原因除了缺乏完备的检测手段外,更重要的在于液相色谱传质速度慢、谱带区域扩展严重,因而分离时间长、效率低,在技术上迟迟未能有所突破。

60年代中后期,由于把气相色谱得到广泛的理论和实践上的经验应用于液相色谱系统的设计,提出了采用小颗粒高效固定相,同时采用了高压输液系统。这种高压系统强化了两相的传质过程,可获得高效分离,并且还配备了高灵敏度的检测器加以测定。基础理论的突破推动了技术上的飞跃,于60年代末,70年代初出现了分析速度快,分离效率高,操作自动化的高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography HPLC)。

第二节 高效液相色谱与经典液相色谱的比较

高效液相色谱是在经典的液相色谱的基础上,引入了气相色谱理论,并且应用了颗粒

直径小的高效固定相,配备了高压输液泵及高灵敏度的检测器而发展起来的一门强有力的分离分析技术。因此,在分离速度上,高效液相色谱比经典的液相色谱要快数百倍。经典柱是重力加料,分离一个组分需几小时或几天,而高效液相色谱所需的分析时间较之经典液相色谱少得多,一般都在一小时之内。例如,分离苯的羟基化合物七个组分,只要1min就可完成。流动相在色谱柱内的流速较之经典液相色谱高得多,一般达1~10ml/min,个别可高达100ml/min以上。同时分离效率也比经典液相色谱高,理论塔板数最高可达10万塔板/米,检出灵敏度也高,自动化程度也日趋完备。其他,如经典的液相色谱固定相一般只用一次,用过后即告报废,所以每次使用前必须重新装柱,即费人力又费物力。而高效液相色谱法则使用了密闭的、可以重新使用的柱子,同时用注射器和进样阀进样,准确而快速,操作方便,重复性好并且可连续的定量测定。故近代高效液相色谱无论是在定性还是在定量方面,都比经典的液相色谱有较高的准确性和精密度。

第三节 高效液相色谱与气相色谱的比较

气相色谱分析法是1952年英国生物化学家马丁(Martin H. J. P)等人创立的,我国在1956年开展了气相色谱分析法的研究工作。由于气相色谱分析法具有很好的分离能力,分析速度快,灵敏度高,使用方便,因此发展很快。目前已广泛普及到工农业生产部门、医药卫生部门以及科学研究单位,成为日常分析中的一种重要手段。但是气相色谱分析法由于需将被分析的物质转化成气态以后才能加以分析,目前受到技术条件的限制。气相色谱仪的工作温度一般只能在500℃以下,因此沸点太高的物质或不能气化的物质都无法用气相色谱来进行分析,对于热不稳定物质,加热后易于裂解,变质的物质,以及具有生理活性的物质,都不能采取升温气化的方法来分析,只有分子量在400以下的有机物质一般可采用气相色谱分析,此类物质约占有机物质总数的15%~20%,但占80%~85%的分子量在400以上的有机物则需采用高效液相色谱分析。

所以高效液相色谱分析法能补充气相色谱分析法的不足。另外,高效液相色谱分析法与气相色谱分析法相比还具有以下三方面的优点:

(1)液相色谱可选择两种色谱相(流动相和固定相)与样品分子相互作用,而气相色谱只能选择一种色谱相(固定相),因为流动相(载气)不与样品分子相互作用。因此,液相色谱就增加了一个可供选择的操作参数,可选择适宜的流动相以利于物质的分离。

(2)液相色谱有较多的可供使用的柱填充物(固定相),这就使色谱分离有更大的可能性。

(3)液相色谱所需的分离温度较低。较低温度有利于分子间的相互作用所以液相色谱经常可接近室温的条件下进行工作。

但高效液相色谱的“柱外效应”较大,分离测定时尽可能减少柱外死体积,这是由于物质分子在液相中的扩散系数比在气相中小4~5个数量级,流速也慢2~3个数量级而造成的。最后需说明,目前高效液相色谱检测器的灵敏度尚不及气相色谱。

第四节 高效液相色谱的特点

从高效液相色谱分析法与经典液相色谱分析法、气相色谱分析法的比较中,可以看到高效液相色谱法吸取了经典液相色谱和气相色谱两种方法的优点,因此在较短的时间内有

了飞跃的发展。综合起来高效液相色谱的新技术有以下的特点：

一、高压

液相色谱以液体作为流动相(称为载液),液体流经色谱柱时,受到的阻力较大,为了能迅速地通过色谱柱,必须对载液施加高压。在现代液相色谱中供液压力和进样压力都很高,一般可达到 $150\sim 300\text{kg}/\text{cm}^2$,甚至可达 $700\text{kg}/\text{cm}^2$ 以上。色谱柱的压力在 $75\text{kg}/\text{cm}^2$ 以上。高压是高效液相色谱的一个突出特点。因为液体不同于气体,它不易被压缩,且液体内部的势能较低,所以在这里使用高压没有爆炸的危险性。

二、高速

高效液相色谱所需的时间较之经典液相色谱快得多,一般可达 $1\sim 10\text{ml}/\text{min}$,个别可高达 $100\text{ml}/\text{min}$ 以上,这已近似于气相色谱的流速。

三、高效

气相色谱的分离效能很高,高效液相色谱的柱效则更高,一般约可达60 000理论板/米;这是由于近年来研究出了许多新型固定相(如化学键合固定相),使分离效率大大提高,有时一根柱可以分离组分100种以上。

四、高灵敏度

高效液相色谱已广泛采用高灵敏度的检测器,这样就进一步提高了分析的灵敏度。如紫外检测器的最小检测量可达毫微克数量级(10^{-9}g);荧光检测器的灵敏度可达(10^{-11}g)。高效液相色谱的高灵敏度还表现在所需试样很少,微升数量级的样品就可以进行分析。

综合上述,HPLC具有分离速度快、分离效能高、检测灵敏度高等优点,而且实现了数据处理和操做程序控制的自动化。在目前的色谱文献中,又把此法称之为:现代液相色谱(Modern Liquid chromatography),高速液相色谱(High speed Liquid chromatography)或高压液相色谱(High Pressure Liquid chromatography)。

第五节 高效液相色谱的流程及高效液相色谱仪

一、高效液相色谱的流程

图1.5-1表示了一台典型高效液相色谱仪的流程简图,贮存器(1)中的流动相溶剂被泵(2)吸入,然后输出,经压力和流量控制装置(4)后导入进样器(5)。被分析样品由进样器注入,并随流动相一起依次通过保护柱(6),分离柱(7)后进入检测器(8)。检测信号由微处理机(10)处采集并进行数据处理,或用积分仪(11)记录色谱图及峰面积(Area)峰高(Hight)和保留时间(Retention time, Rt)。在制备 HPLC 情况下,可依色谱图峰出现与否,使用馏分收集器(12),对流出组分进行定向收集。对复杂的中药及其复方制剂样品,可利用梯度控制程序进行梯度洗脱(Gradient System),从而使

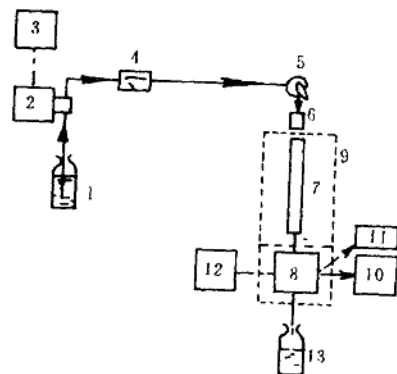


图 1.5-1 高效液相色谱流程

复杂成分得以最佳分离。比较简单的样品用等比洗脱系统(Isocratic System)即可达到分离和分析的目的。整个仪器可以通过电脑操作,如 Waters 991J 及 996™ 程序系统及泵控制系统,可以达到分析和数据处理自动化。

二、高效液相色谱仪

经典液相色谱发展到高效液相色谱,主要是对前者作了三大改进。首先是应用了各种高效能的固定相,使液相色谱分析法达到了高效。其次,由于固定相的颗粒直径很小,要使冲洗液以一定的流速流过色谱柱,只靠经典色谱法中利用冲洗液的高液位到低液位的重力作用把样品从色谱柱冲洗下来的办法已不能适用了,这就对供液系统提出了新的要求,因此必须由高压泵加压来解决。这也就使分离达到了高速。第三,采用了先进的高灵敏度检测器。经典法中原来依靠分别收集色谱尾的流出物浓缩后用物化方法分别检测,最后绘出色谱图来记录检测结果的。这种办法既费工又费时,已远远不能适应实际应用的需求了。因此就采用了能自动记录色谱图的高灵敏度检测器。仪器装置方面的迅速发展、改进和提高,进一步推动了高效液相色谱的发展;而高效液相色谱法的发展又不断给仪器装置提出了新的要求,也促进了仪器装置的进步。

从目前情况来看,仪器装置品种繁多,性能质量已经发展到比较成熟的地步,其中高压泵最高可达 $700\text{kg}/\text{cm}^2$,检测器也从固定单波长紫外检测器发展到可变波长紫外—可见光检测器,示差折光、荧光、电导及质谱等多种检测器而且灵敏度也大大提高。另外各种附属设备也日趋完备,如进样器,梯度洗提,自动收集器等,近年来还加上了微处理机的数据处理系统。同时也从分析型向两头发展到进样量可到上百克的制备型高效液相色谱和每分钟流量仅几微升的微型高效液相色谱。为了提高实际总柱效,还在研制毛细管高效液相色谱。从上面可知,随着高效液相色谱技术的发展,高效液相色谱仪也得到了极其迅速的发展。1967年 Horvath 首次介绍了他的高效液相色谱仪,由于采用了高压供液、新型固定相,以及高灵敏度的紫外吸光式检测器,因此可以认为这是第一台高效液相色谱仪,型号为 LCS-100。此后陆续出现了一些新产品,如美国的 Waters 系列、日本的 Shimadzu 系列等均为现代广泛应用的高性能高效液相色谱仪。Waters 公司已开发了二极管阵列三维检测系统及液—质连用系统。我国自己制造的高效液相色谱仪已试制成功,如北京分析仪器厂的 SY-01 型液相色谱仪,上海药物所的高速液相色谱仪,上海分析仪器厂的 150 型,1600 型液相色谱仪;还有南京分析仪器厂、四川分析仪器厂制造的高效液相色谱仪等。

(一)理想的液相色谱仪

1. 理想的液相色谱仪的一般要求

(1)速度快。高效液相色谱也称高速液相色谱,这就是说首先要速度,有了速度才能使流动相迅速通过小颗粒色谱柱系统,从而可以提高分离效率。这个快速度是通过采用高压输液泵来达到的,也就要求泵的压力要提高。

其次,为了快速得到分离数据,希望配有数据处理装置。为了获得高效,则要求仪器的检测器、样品池和管道及连接件间的死体积小。

(2)分析对象广。这就要求整个仪器的输液系统(溶剂槽、泵的液缸、管道、样品池和连接件等),采用耐腐蚀的材料,以防止各种溶剂和样品对它的腐蚀,因为这些设备被腐蚀后会对分离过程产生干扰;并且希望流动相及样品具有较好的化学稳定性;同时还要有多种不同类型的检测器以适应不同样品的特性。

(3)准确,重复性好。这就要求仪器能精确地控制工作条件。例如色谱柱和检测器的温度、梯度洗提时对流动相成分变化的重复性以及流速的稳定等。

2. 理想液相色谱仪的组成部分

高效液相色谱仪总体可分为三部分:流动相供输系统、进样装置和色谱柱、检测器。

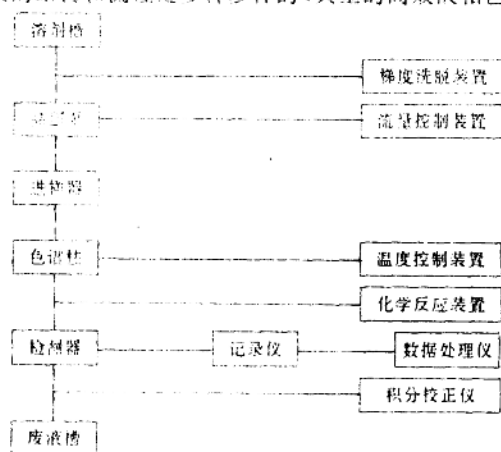
(1)理想的流动相供输系统。它提供一切所需流动相的恒定流动,使得从已烷到水的各种流动相可用于吸附色谱和键合相色谱,为离子交换色谱随时提供各种强度或 pH 的缓冲溶液,并能根据需要提出程序梯度洗脱溶剂系统。

(2)进样装置和色谱柱。无论柱头的压力多大,所需要样品能够不经稀释注入柱头,并在样品不发生分散的情况下完成所需的分离。第一个要求在大多数进样系统已近于解决。第二个要求则因色谱过程的本质而难以实现,但凭借对柱填充物、柱本身以及柱填充方法进行特别小心的设计和制作,可对所希望的分离创造出出色的色谱条件。

(3)检测器。理想的检测器应能检测出流动相中含有的单一分子,在整个浓度范围内产生线性响应而不引起柱外扩散,价廉易得,具有非破坏性和一致性,产生可重现的,稳定的输出。然而,这些要求也是无法达到的。现在可以得到的检测器虽然在个别方式上是出色的装备,但要达到上述理想状态则尚有很大距离。

(二)高效液相色谱仪的基本组成部分

高效液相色谱仪的结构和流程是多种多样的,典型的高效液相色谱仪如下图所示:



高效液相色谱仪一般都具备溶剂槽、高压泵、梯度洗提装置、进样器、色谱柱、检测器、恒温器、记录仪等主要部件。从图1.5-1可以看到,溶剂槽中存贮的流动相常需要脱气(特别是甲醇和水),再用高压泵送到色谱柱入口,当采用梯度洗提时常需要2个泵来完成。样品由进样器注入流动相系统,而后进入色谱柱进行分离,分离后的样品由检测器进行检测,输出信号供给记录仪或数据处理装置,如果需要将分离后的样品作进一步分析,则在色谱柱的一侧将各样品馏分收集起来。

现将溶剂槽、高压泵、梯度洗提装置、进样器、色谱柱、检测器等主要部件简单介绍如下:

1. 溶剂槽

溶剂槽必须用几乎不受任何溶剂腐蚀的材料制作,在使用有害、易燃溶剂时,也应安全

可靠。

溶剂槽通常采用不锈钢、玻璃和聚四氟乙烯制造,其容量的大小虽然与流动相的消耗量有关,但通常为0.5~1L。有的高压泵不需溶剂槽而直接从溶剂瓶中将洗脱液吸入泵内。

2. 高压泵

液相色谱流动相的输送是由高压泵来完成的,由于色谱柱很细(1~6mm)固定相直径小(目前大多数采用5~10 μ m,也有3 μ m),因此阻力很大。为了达到快速高效的分离,必须有很高的柱前压力,才能获得高的液体流速。所以高压泵是液相色谱的主要部件之一。目前一般的高压泵压力为150~350kg/cm²,已能满足多数分析要求(有关报道不一,要视具体情况。柱长则压力高,柱短则压力低),也有超过700kg/cm²的。

对高压泵来讲,关键是流量稳定,因为它不仅影响柱的分离效能,而且直接影响到峰面积的重复性和定量的精度,还会引起保留时间和分辨力的变化;另外要求压力平稳无脉动,这是因为压力的不稳定和脉动的变化对很多检测器来说是十分敏感的,它们会使检测器的噪声加大,仪器的最小检出量变坏;对流速也希望有一定的可调范围,因为流动相的流速也是分离条件之一。泵的输出量的范围越大,那么选择分离条件时就越灵活。

高压输液泵按其性质可分为恒流泵和恒压泵两类。

(1)恒流泵。恒流泵对输出液体的流量保持恒定,与外界色谱柱等阻力无关。往复式柱塞泵及隔膜泵均属恒流泵。往复式柱塞泵最大的优点是泵的液腔体积小(约1/3~1/2ml),换液清洗方便、且可连续供应,尤其适用于外梯度洗提。其最大缺点是输出液压随柱塞的往复运动而有明显的起伏脉动。为此,在实际应用时,必须外加压力阻滞器以使压力平稳。但这又增加了管道的死体积,对于更换溶剂和梯度洗提来说都是不利的。另外也有采用双头泵或多头泵交替联动以消除压力脉冲,可是仍不够理想。近年来由于设计水平的提高,采用了阿基米德螺线加工的凸轮,使用双头泵或多头泵在排液时互补,减小了压力脉动,取得了良好的效果;其次这种泵柱塞往复运动频率高,因此对密封圈和单向阀要求有较高的耐磨性能和高的刚度,如采用含石墨的聚四氟乙烯材料做密封圈,用人造宝石做单向阀中的小球和阀座等。

(2)往复柱塞泵。它的构造与一般工业用的高压供液泵相似,唯体积较小,如图1.5-2所示,由马达齿轮组合带动小柱塞(13mm左右),在密封圈密封的小液腔内以每分钟数十次到100多次的速度往复运动。当小柱塞抽出时,液体自入口单向阀吸入液缸;当小柱塞推入运动,入口单向阀受压关死,液体自出口单向阀输出;当柱塞再次抽出时,管路中液体外压力迫使出口单向阀关闭,同时液体又自入口单向阀吸入液腔。如此周而复始,压力渐渐上升,输出液体的流量可依据柱塞往复运动的冲程来调节,现较多以调节马达的转速来实现。

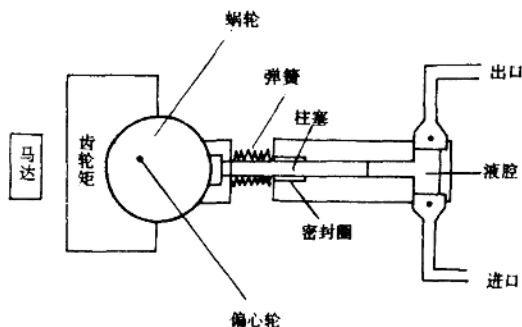


图 1.5-2 恒流泵的结构

隔膜泵也是一种往复式柱塞泵,所不同的是为了防止柱塞运动时沾污液体和便于柱塞

和液腔的动密封,用不锈钢弹性隔膜将柱塞和液腔分开,这种泵与往复式柱塞泵有同样的优缺点,如岛津 LC-3A、LC-5A 采用的是 CDQR 方式, (Constant Displacement with Quick Return, 简称 CDQR), 即快速往返恒定送液。这种方式虽然也是用一个柱塞,但是此柱塞具有独特的动作,从而大大减少了泵本身的脉动。LC-4A 是两柱塞泵,用微机控制的三液混合送液系统 (Microprocessor-controlled Ternary solvent Delivery system, 简称 TSDS)。

(3) 恒压泵。这类泵与恒流泵不同,它是保持输出压力恒定,而流量随外界阻力变化而改变的,因此反压较大。

气动泵就是恒压泵的一种。这种泵的优点是压力稳定,无脉冲,结构简单,操作方便,可以做制备分离;缺点是流速随溶剂粘性不同而改变。现在,往复式柱塞泵解决了脉动的问题,故气动泵已在实际中较少应用,但是对匀浆装填高效柱来讲,气动泵仍是最佳工具,它可以使色谱柱的固定相装填致密均匀,从而得到较高的柱效。

高压气动泵由液缸和气缸两部分组成,如图 1.5-3 所示。

圆筒形气缸内有一活塞,由活塞上的“O”形环与气缸内壁作动密封,在活塞轴心上连有一液缸塞,以“V”形聚四氟乙烯密封环柱塞和液缸的动密封。气缸活塞与液缸柱塞的面积比大约为 45:1 (也有采用 10:1,上海分析仪器厂 150 型 48:1)。当用 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 的压力 (不计摩擦力),将液缸内液体推出,调节气体压力即可改变输出的压力。

压缩空气经稳定阀 H 通过气体换向阀 G 进入气缸,推动活塞 A,由 A 将压力通过液压活塞 B 压缩液体,经单向阀 C 输出。当液缸 E (容量 70ml 左右) 内液体全部排光时,活塞 A 碰到微动开关 F,触发控制线路 W 使二位四通电磁阀动作,换向阀 G' 放空, G 接通,泵进入吸液状态,此时压缩空气 ($6\sim 7\text{kg}/\text{cm}^2$) 直接通过换向阀进入气缸,推动活塞 A 向相反方向迅速移动。同时液活塞 B 也向相反方向移动,液缸 E 形成局部真空。通过单向阀 D 将贮槽内液体吸入液缸,当活塞 A 碰到微动开关 F' 时,又触发控制线路 W 使二位四通电磁阀反应动作,此时气体换向阀 G' 又接通, G 放空;泵又进入工作状态,输出高压液体。

Waters 600 泵利用非圆齿轮组的专利技术,提供稳定无脉动溶剂输送,可用于各种精密实验。

3. 梯度洗提装置

梯度洗提装置 (又称梯度洗脱、梯度淋洗装置) 就是载液中含有两种 (或更多) 不同极性的溶剂,在分离过程中按一定的程序连续改变载液中的浓度和极性,通过载液中极性的变化来改变样品被分离组分的分离因素以提高分离效果和加快分离速度。应用梯度洗提以后

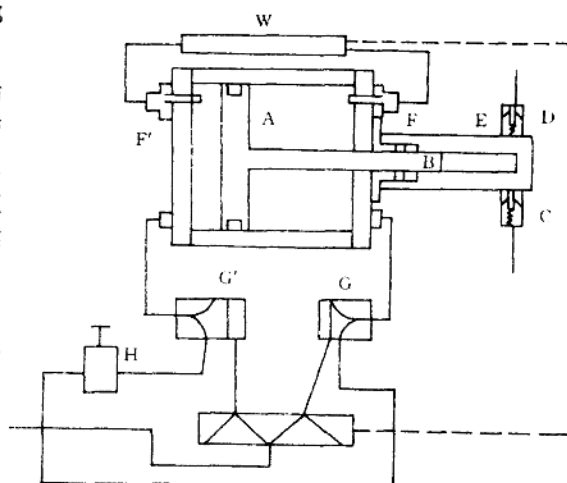


图 1.5-3 气动放大泵的结构
A、B 活塞 C、D 单向阀 E 液缸 F、F' 微动开关
G、G' 换向阀 H 稳定阀 W 触发控制线路

可以使分离时间缩短,分辨率增加。由于峰形的改变还可以提高最小检测量和定量分析的精度。

梯度洗提的作用和气相色谱中程序升温相类似,下面加以说明,如图1.5-4所示(图中1~6表示组分色谱峰)。A液是一种组成的流动相,洗脱时,若样品中各个成分的容量因子(K')相差较大,那么,就会出现 K' 大的成分峰宽而且低,并且分析时间长。

B溶液是溶解力强的流动相,洗脱时各个成分很快被洗脱出来, K' 值小的成分达不到分离的目的。若将AB流动相适当地混合,并找出合适的分析条件,就不会出现上述情况。

若样品成分的 K 值相差很大,将A、B流动相的组成随时间改变,也可以缩短整个分析时间。梯度操作的溶剂系统可以是2元、3元,甚至4元的,但最常用的是2元溶剂梯度。

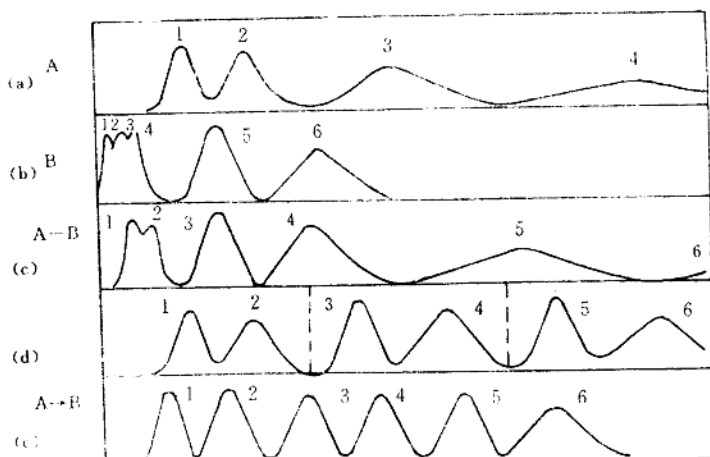


图 1.5-4 分段洗脱和梯度洗脱

梯度洗提可以采用在常压下预先按一定的程序将溶剂混合后再用泵输入色谱柱,这叫做低压梯度,也称外梯度。也可以将溶剂用高压泵增压以后输入色谱系统的梯度混合器混合后送入色谱柱,即所谓高压梯度,或称内梯度。

梯度洗脱时,为了得到重复的保留数据,流速和溶剂组成的准确尤为重要。一台好的梯度淋洗设备除了泵以外,梯度曲线的灵活性、混合的均匀性,以及滞后和畸变都是很重要的考察指标。

4. 进样器

高效液相色谱仪采用的进样方式主要有三种:

(1)注射器进样。注射器进样是目前常用的进样方式,可以采用注射器穿过弹性垫直接进样和注射器隔断式进样两种方式。

直接进样 它用高压注射器吸入小量样品(10 μ l)穿过弹性垫将样品送到压力系统中去。在进样时要防止针头插入柱的填料中去以免破坏填料影响分离效果。进样器的空腔和死体积应尽量小,进样时样品不应倒流,这些都影响色谱峰的展宽。在选择弹性垫材料时应选择那些对采用的溶剂和样品无溶解或无化学反应的材料。这种进样方式可用于压力70~150kg/cm²的系统进样。这种进样方式的优点是:装置比较简单,成本低,而且可根据分析的需要任意改变进样体积,造成峰展宽的现象小。但进样量不能太大,适用应力范围小,进样重复性较差(只能到1%~2%),样品容易渗漏。

隔断式进样 为了防止上述注射器直接进样后由穿刺孔向外泄漏,样品向弹性材料渗

透或者隔热材料落入柱内等问题,因此采用了隔断式进样装置。在这种方法中高压注射器的针头用氟塑垫圈在进样口加以密封,隔断器只是在进样动作时才开启,进样后即将针头密封垫从高压系统中隔开,它可在 $200\sim 350\text{kg}/\text{cm}^2$ 的压力下工作。

(2)带定量管的进样阀进样:进样阀方式 如图1.5-5所示,在高压六通阀上装有一根一定容量的管子,首先在实线的流路上用注射器将样品注入定量管(这时使用的注射器容量多在 1ml 以上)。装完样品后,将阀转换成虚线的环路这样流路与定量管接通,将样品送入柱中,虽然这种方式的重现性非常好,但是不能注入小体积样品(注入量不能小于 $1.2\mu\text{l}$),并且,改变注入量时要更换定量管。

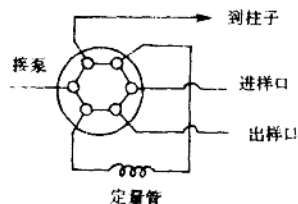


图 1.5-5 进样阀

可变方式 可将任意量的样品(标准是 $0\sim 200\mu\text{l}$)用常压微量注射器根据流路的转换将样品送入高压色谱柱中,流路图如图1.5-6所示。图1.5-7示出了注射器的结构。

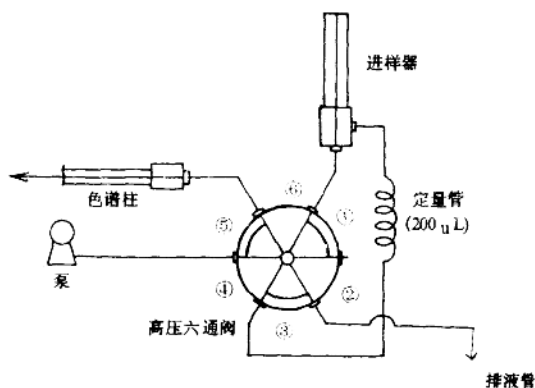


图 1.5-6 流路

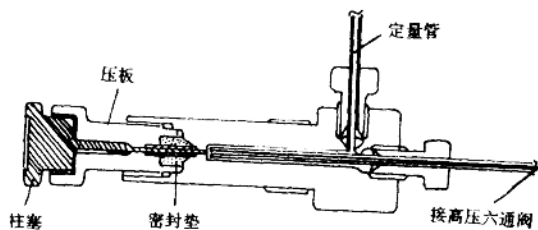


图 1.5-7 进样器

目前几乎所有高效液相色谱仪器制造厂家都采用进样阀的进样方式,虽然由于阀接头和连接管死体积的存在,柱效稍低于注射器进样,但因耐高压,重复性良好,操作方便,因而深受色谱工作者的欢迎。

(3)自动进样装置是采用一个微处理器来控制一个六通阀的采样(通过阀针)、进样和清洗等操作。操作者只需把装好样品的小瓶按一定次序放入样品架上(此样品架有转盘式的、排式和链式的等),然后送入程序(如进样次数、分析周期等),启动,设备将自动运转。

5. 色谱柱

色谱柱的设计(包括柱型、结构、填料及装填方法)或称柱技术(Column Technology)对液相色谱的发展和近代高效液相色谱的分离效能,起关键性作用。高效液相色谱柱大致可分为三种类型:内径小于 2mm 的称为细管径或称微管径柱;内径在 $2\sim 5\text{mm}$ 范围的是常规的高效液相色谱柱;内径大于 5mm

的一般称半制备或制备柱。

高效液相色谱的重要进步之一是对高效色谱柱的研究。由于使用了高效微粒固定相,色谱峰在柱内的扩宽现象大大减少。目前,具有几千或上万理论塔板数的 5 或 $10\mu\text{m}$ 多孔微粒

硅胶(一般柱长为10~25cm)已成为常规色谱分析用的柱子。近年来,3 μ m 微粒硅胶以及以此为基体的十八烷基键相也开始进入商品市场。这种柱虽然要承受更大的柱压降,但由于保留值缩短,峰容积减少,柱效大有增加,10~15cm 的柱长就可取得10 μ m 微粒硅胶柱长25cm 相似柱效。当然对待这种高效的柱子,必须充分重视所有柱外效应,包括进样体积、溶解样品所用的溶剂(极性情况)等。检测器的形式,既可以保持高的回收率,又能大大简化操作手续,并且减少二次污染。

为了耐腐蚀,曾尝试了内壁衬玻璃或聚四氟乙烯的不锈钢柱,这样还可得到较惰性的表面。Waters 公司出品的压缩装置以聚乙烯为管材,可减少管壁效应,并因可用较大流速,所以也有利于缩短分析时间。

到目前为止,硅胶是应用最为广泛的柱填充材料,也是键合相的主要基本材料。此外,高分子多孔微球,如聚苯乙烯、二乙烯苯、聚甲基丙烯酸酯等,可制成不同孔径、含有不同官能团的色谱填料,可应用于较宽的 pH 范围,但柱效仍比不上硅胶。另一较新的填料是聚四氟乙烯还原制得具有高度疏水表面的碳、多孔碳和石墨碳等,它们都具有“反相”的特色,最大优点是可用于较高的 pH,用于生物大分子排阻色谱。以纤维素和改性纤维素结合的硅胶,具有聚酰亚胺表面的硅胶及环糊精等所具有的特性,也是新型的柱填充材料。

近期以来,柱工作的另一重要方面是提高柱的重现性,特别是键合相性。同时,发展专用的分析柱,延长柱的寿命工作颇受重视。

小径柱是把常规的4.6mm 内径换成1mm 内径的柱,其优点是:①仪器的装置变化不大;②保持高效而柱压降增加不多;③流动相的消耗可减少95%。典型的最佳流速是5~200 μ l/min,对于 K 大的溶质可选用较快流速下操作。

空心毛细管柱在气相色谱分析中由于渗透性大大改善而获得了很大的成功,但在液相色谱分析中,虽可获得较高的柱效,但要适应常规分析的要求,尚有很大的差距。填充毛细管柱的实用性看来是有前途的。

液相色谱常用的色谱柱大都采用内径1~6mm 厚的玻璃管或内壁抛光的不锈钢管,柱子长度一般为0.5m(据实际可长可短)。柱子的形状一般采用直柱形,这样装柱换柱都比较方便。螺旋形柱子柱效将明显降低而且很难采用干式装柱法。直形的玻璃柱管和内壁抛光的不锈钢柱管具有较高的柱效,易于在干式填充时保证填充均匀。

液相色谱的装柱是一项技巧性很强的技术,对色谱工作影响很大。对某种填充剂(如多孔玻璃微珠等)当粒度大于20 μ m 比较容易装柱,一般都采用和气相色谱相同的干式装柱法。当柱填料(如化学键合固定相)粒度小于20 μ m,不能用于干式装填时则必须用湿式装柱法。先将填充材料配成悬浊液贮于容器中,在高压泵的作用下压入色谱柱。根据原贮填充剂重量和排出的填充剂重量可以准确知道填入柱内的填充剂的重量。

6. 检测器

检测器在高效液相色谱中的地位与其它的液相色谱法相比有它一定的特殊性。由于高效液相色谱法的微量样品、高效和高速的分离特点,人的肉眼观察和分段取样再用仪器检测的方法已不能适应它的需要,因此,高灵敏度的检测器已是高效液相色谱法中不可缺少的一部分。

检测器装在液相色谱柱的出口,样品在色谱柱中被分离以后,随同流动相连续地流经检测器,根据流动相中样品量或样品浓度可以输出一个信号,来定量表示被测组分含量或

浓度的变化,最终得到样品中各个组分的含量。检测器是色谱分析工作中定量分析的主要工具。

一个理想的检测器应该具有灵敏度高、重复性好、响应快、峰形好、线性范围宽、适用范围广、对流量和温度的变化不敏感等要求。但目前还没有一个很理想的液体色谱检测器,从目前商品仪器来看,最广泛应用的是紫外光度检测器、示差折光检测器、荧光检测器及质谱检测器,现简要地介绍前三种检测器的基本原理及特性。

(1)紫外光度检测器(UV)。它的作用原理是基于被分析样品对特定波长紫外光的选择性吸收,样品浓度与吸光度的关系服从比耳定律。检测器原理见图1.5-8所示,它是一种双光路结构的紫外光度检测器光路图。由低压汞灯发出的两束光,经透紫滤波色片 F_1 、 F_2 变成两束单色性能较好的253.7 nm的紫外光,然后经过透镜 L_1 、 L_2 分别聚焦到样品池 C_1 和参考池 C_2 的中心位置,再由透镜 L_3 、 L_4 经直角反射镜会聚到光电管 D_1 、 D_2 上。当测量池无样品时,参考和测量两束光强相近,从而两光电管上产生的光电流输出,由微电流放大器调至零点,当测量池有样品通过时,二光电管输出一定差值的光电流,经微电流放大器后由记录仪记录。

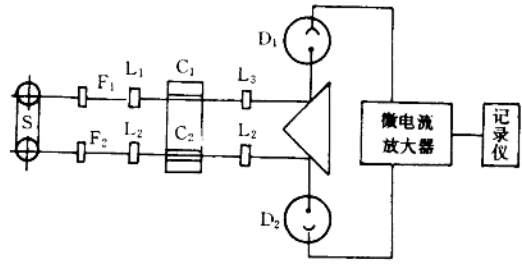


图 1.5-8 紫外检测器光路图

UV 的测定波长一般为254nm 和280nm 两种。为扩大其使用范围,将其与可见—紫外分光光度计联用,这样,测定波长范围可按被测试样的紫外吸收特性任意选择工作波长,从200~280nm。此时的光源,在可见光部分常采用钨灯,紫外部分采用氢弧灯,利用棱镜或光栅分光。

紫外光度检测器具有很高的灵敏度,最小检测量可达 $10^{-9}g$ 。因而即使那些对紫外光吸收不甚敏感,吸收系数较低的物质,也可用这种检测器进行微量分析。此外,这种检测器对温度和流速不敏感,所以几乎所有的 HPLC 色谱仪都有紫外光度检测器。

最近已研制出光电二极管阵列式紫外—可见检测器如最新的 Waters™996光电二极管阵列检测器,波长可由190~800nm 进行全波长扫描检测及岛津 SPD-MIA 型等,现以岛津 SPD-MIA 型为例作一介绍。

SPD-MIA 的测光方式见图1.5-9。

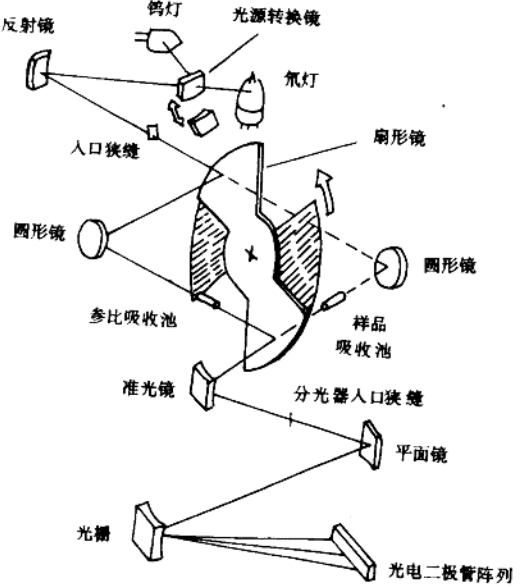


图 1.5-9 SPD-MIA 的测光方式