

中草药及其制剂 质量分析方法

● 赵余庆 编

辽宁科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

中草药及其制剂质量分析方法 / 赵余庆编. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1995.10

ISBN 7-5381-2150-1

I. 中… II. 赵… III. ①中草药-质量分析-分析方法②
中草药-制剂-质量分析-分析方法 IV. R28

中国版本图书馆CIP数据核字 (95) 第05346号

辽宁科学技术出版社出版

(沈阳市和平区北一马路108号 邮政编码110001)

辽宁省新华书店发行

沈阳新华印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 22³/₄ 字数: 550,000

1995年10月第1版

1995年10月第1次印刷

责任编辑: 寿亚荷

版式设计: 于浪

封面设计: 张志勇

责任校对: 刘庶

插图: 张辉

印数: 1—1,000

定价: 19.80元

前 言

中草药是我国传统的药物，已有几千年的应用历史。由于其药效显著，副作用小，越来越受到人们喜爱。中草药之所以在防病治病方面有独特的、不可替代的作用，除了理法方药不同于其他药物外，还由于每味中草药及其制剂都含有多种相互起协同作用的活性成分。因此，测定这些有效成分的含量是非常重要的，也是保证药品质量及用药安全、有效的必要手段。

随着科学技术的发展，中草药及其制剂的各种质量分析方法越来越多地被报道出来，并成为许多生产中草药制剂的企业或厂家用于控制产品质量的方法之一。但是，由于中草药品种繁多，基础研究工作还比较薄弱，其中某些有效成分尚不清楚，给中草药及其制剂研制工作增加了一定难度。从事中医中药科研、生产、临床的工作人员，都需要掌握中草药及其制剂的含量测定方法，而目前这方面资料零散、不系统，给他们的工作带来诸多不便。为此，笔者结合多年对中草药及其制剂开发研制方面的经验，收集和整理这方面的文献资料，编写成此书，希望能为中药研制单位和生产厂家的有关人员提供行之有效、简便易行的分析方法。

本书总论系统介绍了中草药及其制剂分析中常用的方法，包括高效液相色谱法、气相色谱法、薄层扫描法和比色及分光光度法，并对这些方法的基本原理、操作条件、定性和定量分析的程序进行了详细的论述。各论介绍了200种单味药及其制剂的含量测定方法，其中高效液相色谱法57种，气相色谱法26种，薄层扫描法58种，比色及分光光度法45种，其他方法14种；每一种分别介绍了仪器与试剂、实验方法与结果等，重点介绍了实验方法。各论编写时均按中草药名笔划顺序排列，选编的资料来自近年来中草药杂志和期刊，对其中某些文章的标题层次和顺序作了调整。个别文章的标题也有改动。改动中有疏漏不当之处请原作者原谅。

由于时间仓促和水平有限，书中难免有错误和不妥之处，敬请读者批评指正。

编 者

1995年2月

目 录

总 论

一、高效液相色谱法	1
(一) 基本原理	1
(二) 仪器	5
(三) 柱填料	8
(四) 流动相	11
(五) 实验方法	14
(六) 定性分析	19
(七) 定量分析	21
二、气相色谱法	22
(一) 基本原理	23
(二) 基本流程	23
(三) 色谱柱	24
(四) 操作条件选择	30
(五) 检测器	32
(六) 定性分析	37
(七) 定量分析	40
三、薄层扫描法	45
(一) 基本原理	45
(二) 薄层色谱参数	46
(三) 展开剂	47
(四) 薄层扫描条件的选择	48
(五) 色谱峰的鉴定方法	51
(六) 定量分析方法	52
四、比色及分光光度法	54
(一) 基本原理	54
(二) 目视比色法	56
(三) 光电比色法	57
(四) 显色反应及其条件	60
(五) 分光光度法	61

各 论

一、高效液相色谱法应用实例	65
---------------	----

(一) 九分散中麻黄碱、伪麻黄碱和土的宁的含量测定	65
(二) 人参中人参皂甙-Rb ₁ 、Rb ₂ 、Rc、Rd、Re、Rg ₁ 的含量测定	68
(三) 八珍制剂中芍药甙的含量测定	69
(四) 大青叶和板蓝根药材及其制剂中2,4-喹啉二酮、靛蓝和靛玉红的含量测定	70
(五) 马钱子及其制剂中土的宁的含量测定	72
(六) 大黄中没食子酸和 d-儿茶素的含量测定	74
(七) 小檗、黄连和黄柏中黄连素的含量测定	76
(八) 大黄及其中成药中游离蒽醌的含量测定	77
(九) 贝母中贝母辛的含量测定	78
(一〇) 丹参注射液中丹参素、原儿茶醛及原儿茶酸的含量测定	79
(一一) 六神丸中蟾毒内酯类化合物的含量测定	81
(一二) 元胡中非洲防己胺、黄连碱、巴马亭和去氢紫堇碱的含量测定	82
(一三) 元胡中叔胺生物碱的含量测定	84
(一四) 牛黄解毒片中黄芩甙、番泻甙A和甘草酸的含量测定	86
(一五) 牛黄解毒片中结合大黄酸的含量测定	87
(一六) 石韦中芒果甙、异芒果甙和绿原酸的含量测定	87
(一七) 北五味子中有效成分的含量测定	89
(一八) 白头翁中毛茛甙及合成毛茛甙的含量测定	91
(一九) 乌头中乌头碱、次乌头碱和中乌头碱的含量测定	93
(二〇) 冬虫、夏草及虫草乌鸡胶丸中麦角甾醇的含量测定	96
(二一) 白芷中香豆素类成分的含量测定	97
(二二) 甘草中甘草酸、乌拉甘草皂甙甲和乌拉甘草皂甙乙的含量测定	99
(二三) 安宫牛黄丸中小檗碱的含量测定	101
(二四) 安宫牛黄丸中胆红素的含量测定	103
(二五) 连翘中咖啡酸、连翘酯甙、芦丁、连翘甙及连翘脂素的含量测定	104
(二六) 牡丹皮中丹皮酚的含量测定	107
(二七) 赤芍及其炮制品中没食子酸、d-儿茶精的含量测定	108
(二八) 杜仲中松脂醇二葡萄糖甙的含量测定	109
(二九) 何首乌及其片剂中大黄素和大黄素甲醚的含量测定	110
(三〇) 吴茱萸及其炮制品中吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量测定	113
(三一) 杞菊地黄口服液中丹皮酚的含量测定	114
(三二) 刺五加制剂中紫丁香甙的含量测定	114
(三三) 青木香中马兜铃酸A的含量测定	115
(三四) 复方丹参片中三种丹参酮的含量测定	116
(三五) 厚朴中厚朴酚及和厚朴酚的含量测定	118
(三六) 厚朴类原植物中季铵生物碱的含量测定	119
(三七) 厚朴和大叶木兰中厚朴酚与和厚朴酚的含量测定	121
(三八) 苦参与苦豆子中生物碱的含量测定	124
(三九) 苦参中槐果碱、苦参碱、槐定、氧化槐果碱和氧化苦参碱的含量测定	126

(四〇) 侧柏中槲皮甙的含量测定	127
(四一) 板蓝根中靛玉红与靛蓝的含量测定	129
(四二) 青黛中靛蓝和靛玉红的含量测定	130
(四三) 城口唐松草中唐松草新碱的含量测定	131
(四四) 葶苈中胡椒碱的含量测定	132
(四五) 洋金花类生药中东莨菪碱和阿托品的含量测定	133
(四六) 珍珠及珍珠层粉中氨基酸的含量测定	135
(四七) 秦皮中丁香甙、七叶亭、七叶灵、梣皮甙的含量测定	136
(四八) 党参中苍术内酯Ⅱ的含量测定	137
(四九) 逍遥丸中柴胡皂甙 b ₁ 、b ₂ 、芍药甙、苍术内酯和甘草酸的含量测定	139
(五〇) 清开灵注射液中绿原酸和黄芩甙的含量测定	140
(五一) 黄芪类中药中芒柄花素和毛蕊异黄酮的含量测定	141
(五二) 黄连、黄柏及其制剂中小檗碱型生物碱的含量测定	142
(五三) 黄连上清丸中十种成分的含量测定	143
(五四) 葛根中葛根素的含量测定	145
(五五) 落新妇和岩菖蒲中岩白菜素的含量测定	145
(五六) 蟾酥脂质体中三种蟾毒内酯成分的含量测定	147
(五七) 麝香、养香和原香中麝香酮的含量测定	149
二、气相色谱法应用实例	150
(五八) 土木香中土木香内酯和异土木香内酯的含量测定	150
(五九) 六味地黄汤中丹皮酚的含量测定	151
(六〇) 六神丸中麝香酮的含量测定	152
(六一) 六神丸(27个厂家)中龙脑与异龙脑的含量测定	153
(六二) 木香类药材中去氢木香内酯的含量测定	154
(六三) 牛黄解毒片中冰片的含量测定	156
(六四) 华佗再造丸中微量冰片的含量测定	158
(六五) 西洋参与人参总糖的含量测定	158
(六六) 肉桂油中桂皮醛的含量测定	161
(六七) 牡丹皮中丹皮酚的含量测定	162
(六八) 牡丹皮和六味地黄丸中丹皮酚的含量测定	163
(六九) 国公酒中乙醇的含量测定	164
(七〇) 冠心苏合丸中苯甲酸苄酯的含量测定	166
(七一) 莪术油中莪术醇及薄荷油中薄荷醇的含量测定	167
(七二) 黄芪中硒的含量测定	168
(七三) 蛇床子中香豆素类成分的含量测定	169
(七四) 黄柏果挥发油中 β -香叶烯的含量测定	172
(七五) 复方柴胡注射液中黄樟醚的含量测定	173
(七六) 厚朴及其提取液中厚朴酚和与厚朴酚的含量测定	174
(七七) 麻黄中麻黄生物碱的含量测定	175

(七八) 羟基斑蝥胺及斑蝥素的含量测定	178
(七九) 斑蝥体内斑蝥素的含量测定	179
(八〇) 雷公藤中雷公藤甲素的含量测定	179
(八一) 薄荷油中薄荷醇、薄荷酮和醋酸薄荷酯的含量测定	181
(八二) 麝香中麝香酮的含量测定	181
(八三) 麝香和麝香注射剂中麝香酮和雄甾烷的含量测定	184
三、薄层扫描法应用实例	186
(八四) 人参中单体皂甙的分离与含量测定	186
(八五) 儿茶中儿茶素的含量测定	188
(八六) 马钱子及其制剂中土的宁的含量测定	190
(八七) 山荷叶中木脂素的含量测定	191
(八八) 大黄属植物中蒽醌衍生物的分离及含量测定	192
(八九) 五仙回春胶囊中淫羊藿甙的含量测定	196
(九〇) 丹参中水溶性酚酸类成分的含量测定	197
(九一) 五苓散各种有效成分的测定	200
(九二) 六味地黄丸中熊果酸的含量测定	201
(九三) 元胡中延胡索乙素的含量测定	202
(九四) 元胡止痛片中延胡索总碱及乙素的含量测定	203
(九五) 元胡地上部分海罂粟碱和南天竹啡碱的含量测定	204
(九六) 天麻中天麻素的含量测定	205
(九七) 戊己丸中芍药甙、小檗碱和巴马亭的含量测定	206
(九八) 北五味子有效成分的含量测定	208
(九九) 乌头类生药中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的含量测定	210
(一〇〇) 白虎汤液中无机元素、芒果甙和甘草酸的含量测定	211
(一〇一) 生脉散口服液中含人参皂甙的含量测定	213
(一〇二) 白带丸中小檗碱、巴马亭的含量测定	214
(一〇三) 生脉饮中五味子醇甲的分离与含量测定	216
(一〇四) 龙胆中苦甙类的含量测定	218
(一〇五) 防风通圣丸中大黄素和黄芩甙的含量测定	220
(一〇六) 蛇床子中蛇床子素和欧前胡素的含量测定	221
(一〇七) 当归龙荟丸中大黄素和靛玉红的含量测定	222
(一〇八) 当归和欧当归中萹本内酯的含量测定	224
(一〇九) 朱砂安神丸中有效成分的测定	225
(一一〇) 芍药中芍药甙的含量测定	228
(一一一) 安胃片中延胡索乙素的含量测定	229
(一一二) 安宫牛黄丸中去氧胆酸和胆酸的含量测定	230
(一一三) 连翘中连翘酯甙的分离和含量测定	231
(一一四) 牡丹皮和徐长卿中丹皮酚的含量测定	233
(一一五) 忍冬根茎叶中绿原酸的含量测定	235

(一一六) 知母中知母皂甙A ₁ 的含量测定	236
(一一七) 参麦注射液中人参二醇的含量测定	237
(一一八) 苦参及其制剂中生物碱的薄层分离和含量测定	239
(一一九) 青蒿中青蒿素的含量测定	241
(一二〇) 青蒿素油注射液中青蒿素的含量测定	242
(一二一) 栀子及越鞠丸中栀子甙的含量测定	244
(一二二) 复方丹参片中冰片、三七皂甙和丹参酮的含量测定	245
(一二三) 穿心莲中穿心莲内酯、新穿心莲内酯和脱氧穿心莲内酯的含量测定	246
(一二四) 香连丸中小檗碱的含量测定	247
(一二五) 香连丸中小檗碱和木香内酯的含量测定	249
(一二六) 茵陈片中齐墩果酸的含量测定	250
(一二七) 绞股蓝中绞股蓝皂甙的含量测定	251
(一二八) 茜草属植物中茜草素的含量测定	252
(一二九) 鸦胆子中鸦胆苦醇(抗癌剂)的含量测定	253
(一三〇) 姜黄属植物根茎中姜黄素的含量测定	254
(一三一) 秦皮中香豆素的含量测定	255
(一三二) 秦艽及其炮制品中秦艽甲素和秦艽丙素的含量测定	258
(一三三) 莪术油中莪术醇的含量测定	259
(一三四) 黄连中小檗碱、巴马亭和药根碱的含量测定	262
(一三五) 淫羊藿炮制前后淫羊藿甙的含量测定	263
(一三六) 黄芪茎叶中黄酮甙的含量测定	264
(一三七) 麻黄及其炮制品中L-麻黄碱和d-伪麻黄碱的分离和含量测定	266
(一三八) 紫草中萘醌成分的含量测定	267
(一三九) 紫草中紫草素的含量测定	268
(一四〇) 葛根中葛根素的含量测定	270
(一四一) 银翘解毒片中氯原酸与异氯原酸的含量测定	271
四、比色及分光光度法应用实例	272
(一四二) 一叶萩中一叶萩碱的含量测定	272
(一四三) 人工牛黄中胆酸的含量测定	274
(一四四) 二陈丸中陈皮甙的含量测定	275
(一四五) 二妙丸和三妙丸中小檗碱的含量测定	276
(一四六) 人参制剂的保健滋补口服液中人参总皂甙的含量测定	277
(一四七) 儿茶中儿茶素的含量测定	278
(一四八) 马钱子中士的宁的含量测定	278
(一四九) 马钱子中番木鳖碱的含量测定	279
(一五〇) 大黄中蒽醌甙元的含量测定	280
(一五一) 大黄中鞣质的含量测定	282
(一五二) 山楂冲剂中总黄酮的含量测定	283
(一五三) 中成药中小檗碱型生物碱的含量测定	284

(一五四) 丹参及其注射液中水溶性总酚含量的测定	285
(一五五) 丹参中丹参素含量测定	287
(一五六) 甘草及其制品中甘草酸的含量测定	288
(一五七) 牛黄类中成药中胆红素的含量测定	290
(一五八) 白芷制剂中欧芹属素乙、异欧芹属素乙的含量测定	291
(一五九) 北豆根制剂中北豆根总碱的含量测定	293
(一六〇) 决明子及其炮制品中蒽醌的含量测定	294
(一六一) 华山参片总生物碱的含量测定	295
(一六二) 牡丹皮中丹皮酚的含量测定	295
(一六三) 何首乌及其炮制品中二苯乙烯甙的含量测定	297
(一六四) 陈皮中陈皮甙的含量测定	299
(一六五) 罗布麻中金丝桃甙的含量测定	300
(一六六) 杭白芷香豆素的含量测定	301
(一六七) 青蒿中青蒿素的含量测定	302
(一六八) 青黛中靛玉红与靛蓝的含量测定	303
(一六九) 复方黄连素注射液中甲氧苄氨嘧啶 (TMP) 的含量测定	304
(一七〇) 穿心莲叶、茎中穿心莲内酯的含量测定	305
(一七一) 枸杞子中多糖的含量测定	307
(一七二) 复方芦丁片中芦丁的含量测定	308
(一七三) 益母草中益母草总生物碱的含量测定	309
(一七四) 益母草冲剂中生物碱的含量测定	310
(一七五) 盐酸麻黄素滴鼻液中盐酸麻黄素的含量测定	310
(一七六) 盐酸麻黄碱制剂中盐酸麻黄碱的含量测定	311
(一七七) 黄连及其制剂中小檗碱的含量测定	313
(一七八) 麻杏止咳片中盐酸麻黄碱含量测定	315
(一七九) 黄芩中黄芩甙的含量测定	315
(一八〇) 黄芩中黄酮类成分的含量测定	317
(一八一) 银黄注射液中黄芩甙和绿原酸的含量测定	319
(一八二) 紫草中紫草脂肪油的含量测定	321
(一八三) 舒冠通糖浆中黄酮类的含量测定	322
(一八四) 蒿蓄中蒿蓄甙的含量测定	323
(一八五) 橙皮甙胶囊中橙皮甙的含量测定	325
(一八六) 鹤草芽中鹤草酚的含量测定	327
五、其他方法应用实例	328
(一八七) 八珍方不同制剂中微量元素的含量测定	328
(一八八) 牛黄清心丸中 Cu 等八种微量元素的含量测定	329
(一八九) 马兜铃中马兜铃酸的含量测定	330
(一九〇) 罗布麻中金丝桃甙的含量测定	332
(一九一) 槐花中芦丁的含量测定	333

(一九二) 三七和云南白药中人参二醇和人参三醇的含量测定	334
(一九三) 怀牛膝及其制剂中齐墩果酸含量测定	335
(一九四) 大黄中大黄素、大黄酚与大黄酸的含量测定	336
(一九五) 保肾乙丸中苯并(a)芘的含量测定	337
(一九六) 三七伤药片中生物碱含量测定	338
(一九七) 大蒜及其制剂中大蒜辣素的含量测定	340
(一九八) 乳癖消片中碘的含量测定	341
(一九九) 冰硼散中煅硼砂的含量测定	342
(二〇〇) 石膏、钟乳石和浮海石中钙的含量测定	343
各论部分资料来源	344
中文植物化学成分、中草药、中成药索引	350

总 论

一、高效液相色谱法

高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是由经典的液相色谱法发展而来的。60年代中期色谱工作者运用气相色谱的基础原理对液相色谱的机理进行了深入的研究, 提出了采用小颗粒高效固定相, 同时还使用了高压泵组成了高压系统。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。因此, 在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, 从根本上解决了经典液相色谱法的不足, 成为一种十分有效而且很有发展潜力的方法 (见表1—1)。

表1—1 经典液相色谱与高效液相色谱的比较

	经典液相色谱	高效液相色谱
柱填料	一般规格	特殊规格
柱填料颗粒大小(μ)	75—600	10—50
(筛目)	30—200	300—400
柱填料颗粒大小的分布(σ)	20—30%	< 5%
柱长(cm)	10—100	100—500
柱内径(cm)	2—5	0.1—1.0
柱入口压力 (大气压)	0.01—1.0	20—300
柱效 (理论塔板)	2—50	10^3 — 10^4
分离速度 (理论塔板/秒)	< 0.05	1—20
样品取量(g)	1—10	10^{-6} — 10^{-2}
分析需用时间(h)	1—20	0.05—1

从表1—1中可以看出, 高效液相色谱法比经典液相色谱法具有取样量小、分析时间短、柱效高、灵敏度高、自动化程度高等优点。同时, 高效液相色谱法用注射器和进样阀进样, 准确而快速, 操作方便, 重复性好, 并且可做连续的定量测定。

归纳起来, 高效液相色谱法有以下特点: 适用范围广; 分离效率高; 分离分析速度快; 流动相选择性广; 灵敏度高; 色谱柱可反复使用; 流出组分容易收集; 室温下高压液体并无爆炸危险等。

(一) 基本原理

高效液相色谱是在经典液相色谱的基础上由于引入了气相色谱的理论而发展起来的, 随着色谱实践的不断发展, 这些理论还在不断完善着。为了有个比较系统的概念, 再扼要地简

述如下：

1. 基础概念 差速移行 (Differential migration) 色谱过程是物质在相对运动的两相间平衡分布的过程。在色谱柱中，任一溶质分子都按其特定的速度移行，并在固定相与流动相之间连续不断地往返着。

在单位时间内，一个分子在流动相中出现的几率，也就是该分子在流动相中停留的时间，以R代表；若 $R = 1/3$ ，意思是这个分子1/3的时间在流动相中，而2/3的时间在固定相中。

同理，R也可用来表示这一溶质分子在流经整个柱时移行速度的情况；若 $R = 1/3$ ，意思是这个分子流经整个柱的移行速度相当于流动相流经整个柱的移行速度的1/3(R_i值就是反映了这个概念)。

同理，R也可用来表示同一溶质的大量分子在两相中的分布情况；若 $R = 1/3$ ，意思是在单位柱体积中1/3的溶质在流动相，而2/3 (也就是1-R) 在固定相中。

由此可见，R既反映了溶质的移行时间，也反映了它的移行速度以及在两相中的分布情况。

根据分配定律：

$$\text{一个溶质的分配系数 } K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{溶质在固定相中的浓度}}{\text{溶质在流动相中的浓度}} \quad (1)$$

这个比值在低浓度时是一常数，只受温度的影响。

在柱(纸或薄层)上的任何一个单位体积中，溶质在固定相的量(也就是相当于在固定相的部分，1-R)与它在流动相的量(也就是相当于在流动相的部分，R)的比值是 $V_s \cdot C_s / V_m \cdot C_m$ 或 $K \cdot V_s / V_m$ (V_s / V_m 是单位体积中固定相与流动相体积的比值)。

$$\text{即: } \frac{1-R}{R} = \frac{V_s}{V_m} \cdot \frac{C_s}{C_m} \quad \therefore \frac{C_s}{C_m} = K$$

$$\therefore \frac{1-R}{R} = K \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

$$\text{或 } K = \frac{(1-R)V_m}{RV_s} = \frac{V_m - RV_m}{RV_s} = \frac{\frac{V_m}{R} - V_m}{V_s}$$

$$\text{移项 } KV_s + V_m = \frac{V_m}{R}$$

$$\therefore R = \frac{V_m}{V_m + KV_s} \quad (2)$$

如果用 t_m 代表流动相分子流经整个柱体所需的时间，那么，溶质分子移行同样距离的时间(也就是保留时间，以 t_i 表示)应为：

$$t_i = \frac{t_m}{R_i} = t_m \left(1 + K_i \frac{V_s}{V_m} \right) \quad (3)$$

而另一个溶质分子在柱上的保留时间(以 t_2 表示)应为：

$$t_2 = \frac{t_m}{R_2} = t_m \left(1 + K_2 \frac{V_s}{V_m} \right) \quad (4)$$

在单位长度内组分移行距离的差异就是判断一个系统的分离能力大小的依据。对于一定的色谱条件来说，组分及流动相移行全柱的时间是与柱长成正比的，因此：

$$\frac{\text{移行距离的差异}}{\text{单位长度}} = \frac{t_2 - t_1}{t_m} = \frac{\Delta t}{t_m} = \frac{V_s}{V_m} (K_2 - K_1) = K_1 \frac{V_s}{V_m} (\alpha - 1) \quad (5)$$

式中： α 为 K_2/K_1 。

由此可见：差速移行是色谱法的基础。为要提高分离能力即增大 $\Delta t/t_m$ ，也就应增加 K 值、 V_s/V_m 值或 α 值（即 K_2/K_1 值）。

在高效液相色谱中，选择合适的 K 值、 V_s/V_m 值以及 α 值是非常重要的，现分述如下：

(1) 关于分配系数 K 值：液相色谱的主要优点之一就是通过对流动相的选择可以获得合适的 K 值。而在气相色谱中，通过气体的选择对分配系数并没有什么影响。溶质在流动相中的浓度（也就是 K 值）主要是由其蒸气压决定。因此， K 值的变化往往通过控制柱温进行。另一方面，在液体中分子间的相互作用比较强烈，流动相与固定相竞相占有溶质分子。如果增大溶质在流动相中的溶解度，与气相色谱比较，可以使 K 值减小近 10^3 倍，有时，甚至可使 K 值的变化高达 10^{10} 倍。由式(5)可见最好 K 值越大越好。但是实际上， K 值在 $1-10^2$ 之间，即可获得良好的分离。当 $K < 1$ 时，组分洗脱过快，不能很好分离；当 $K > 100$ 时，对于一般分离就得需要很长时间。事实上， $K > 10$ 时，随着 K 值的加大，分离效能的提高是微小的。

(2) 关于 V_s/V_m 值：式(5)表明：随着 V_s/V_m 比值增大， Δt 也可增加。而 V_s/V_m 比值的增大可以通过柱填料的选择进行。例如，在分配色谱中采用负载液体能力较高的载体；在吸附色谱中提高吸附剂的活性表面；在离子交换色谱中提高负荷密度；或在凝胶渗透色谱中增加高聚物构格的孔数都可使 Δt 增加。但是以上因素的增加也使溶质在固定相中的转移阻力加大。从要求高速的角度考虑，由于这种阻力的加大反而不如不增加 V_s/V_m 为好。为此，选择应该适当。

(3) 关于 α 值： α 值是两种溶质分配系数的比值，即 $\alpha = K_2/K_1$ ，是判断两种物质在一定条件下能否彼此分离的尺度。如果 $\alpha = 1$ ，表示两物质在给定的系统中分配系数一样，根本无法分离。采用液体作为流动相的重要优点就是有可能变换其选择性，提高 α 值来增加 Δt ，特别是在吸附色谱时，以及采用化学键合相填料的分配色谱时更为有效。

2. 柱效的评价

(1) 保留时间与保留体积、峰宽与峰高：组分在理想的色谱柱中应表现为高斯(Gauss)型的常态分布。从进样时开始，经过洗脱，到柱后出现峰的最大点时止，即为组分在柱内的保留时间（以 t_r 表示）；与保留时间相对应的流入柱内的流动相的体积，称为保留体积（以 V_r 表示）。实际上，当进样后，有些不被固定相保留的组分在柱后出现峰的最大点时，即为空隙时间（或称死时间，以 t_0 表示）或空隙体积（ V_0 ）；这样，样品在柱内的真正保留时间与保留体积就应该扣除上述的空隙数值，得到校正保留时间（以 t_r' 表示）或校正保留体积（以 V_r' 表示）。

峰宽（以 W 表示）即通过流出曲线的拐点所作切线在基础上的截距。峰高（以 h 表示）即峰顶至基线的距离。

(2) 分配容量(Capacity factor)：分配容量，也称“保留能”（以 k_r' 表示），也有以 k' 或 k_r 表示的，可以表示色谱柱对组分保留程度，其关系式如下：

$$k_r' = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{t_r - t_0}{t_0} = \frac{V_r - V_0}{V_0} \quad (6)$$

如果 k_r' 值太小, 表示色谱柱对组分的保留能力很弱, 组分洗出过快, 说明流动相对组分的溶解能力过强; 反之, 如果 k_r' 值太大, 表示保留能力过强, 组分洗出费时很长, 这就需要增强溶剂洗脱能力来缩短保留时间。

(3) 理论塔板数与塔板高度: 高效液相色谱可用理论塔板的概念来描述柱效。这个理论把色谱柱比作一个分馏塔, 在每个塔板高度间隔内, 样品混合物在两相达成分配平衡, 最后由于差速移行而彼此分离。尽管这个概念并不完全符合色谱柱内的分离过程, 色谱分离和一般的分馏塔分离有着重大的差别, 但是这个比喻还是形象简明的, 因而迄今被广泛地采用着。理论塔板数的计算方法是:

$$N (\text{理论塔板数}) = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad (7)$$

式中: t_r 与 W 分别为组分的保留时间与峰宽。由上式可见: 峰宽越窄, 塔板数越大, 说明柱效越好。

另外, 也可用塔板高度表示柱效。如色谱柱的长度为 L , 则每一理论塔板的高度 (以 HETP 或 H 表示) 为:

$$\text{HETP} = H = \frac{L}{N} \quad (8)$$

理论塔板数越多, 塔板高度就越小, 即表示柱效越好。

(4) 分离度 (Resolution): 如果要分离两种物质, 只各有一个分子, 那么它们肯定是可以完全分开的。但是, 事实上甚至最灵敏的检测器也需要 10^{10} 以上的分子方可产生可辨认的信号, 而大部分检测器需要较大几倍的样品量方可。因此, 当分离大量分子时, 由于检出水平的限制, 应当考虑到这只是相对的分, 而不是绝对的分。

溶质分子的谱带在柱上移行的过程中有扩张的倾向, 这种扩张是由于装柱不均匀而导致的流速不等, 纵向扩散以及物质在两相中运转的阻力所造成的。因此, 尽管两个组分的峰尖已经彼此分开, 如果各自的峰宽很大, 那么它们也未必能分得开。正因为这样, 用来表示两种组分分离情况的“分离度” (以 R_s 表示) 是保留时间差异 (Δt) 与峰宽 (W_a 与 W_b) 两者的函数, 其关系式如下:

$$R_s = \frac{\Delta t}{\frac{1}{2}W_a + \frac{1}{2}W_b} = \frac{2\Delta t}{W_a + W_b} \quad (9)$$

如果将 $N = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$ 代入式 (9), 则可得:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{k' + 1} \quad (10)$$

此式反映了分离度 (R_s) 与柱效 (N)、溶剂选择性 (α) 以及分配容量 (k') 的关系。在此式的基础上, 即可用来计算所需色谱柱的长度 (将在“色谱柱”一节项下讨论)。

在高效液相色谱过程中, 也和气相色谱过程一样, 流速是影响柱效和分离速度的重要因素。但两者却有显著的不同。关于柱效 (以理论塔板高度 H 代表) 与流速 (以 u 表示流动相在柱上的平均线速度, 单位为 cm/sec) 的关系可用图 1-1 进行对照比较。

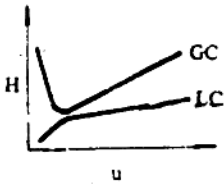


图1-1 柱效与流速关系的典型曲线图

两者所以不同的主要原因是溶质在气相中的扩散系数比在液相中要大 10^4-10^5 倍。在气相色谱中，图1-1中GC曲线可以下式表示：

$$H = A + B/u + Cu \quad (11)$$

上式在液相色谱中，由于溶质在流动相中的扩散可以忽略，因而可将上式 B/u 项略去；这样，柱效与流速的关系即可以下列简式近似地表示：

$$H = A + Cu = 2\lambda dp + \frac{2}{3} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s} u \quad (12)$$

式中： d_s 与 D_s 分别为固定相的液膜厚度与组分在固定相的扩散系数。

归纳起来，在高效液相色谱中，描述色谱柱性能的基本指标有“分配容量”(k')、“所用溶剂系统的选择性能”(α ，也可称为“分离系数”)以及“理论塔板数”(N或“塔板高度”H)；判断分离能力大小的是“分离度”(R_s)；影响柱效的因素为“流速”(u)、涡流扩散情况($A = 2\lambda dp$)以及传质阻力($C = \frac{2}{3} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s}$)等等。

(二) 仪器

1. 高效液相色谱仪的基本组成与工作流程(如图1-2) 经过用加热等方法脱气后的溶剂，输送至高压泵，加压至所需要的压力。再通过过滤器除去机械杂质，流经阻尼器使液流稳定。必要时再通过预柱(也可称“预饱和器”)，内装涂有固定相的惰性材料，使流动相预先为固定相所饱和，以防止色谱柱中固定相的流失。这种预柱装置仅用于非化学键合固定相分配色谱。样品由色谱柱顶端进样装置处注入，流出的组分至检测器产生与浓度成比例的信号，放大后至记录仪；同时，流出的组分可用分部收集器收集。柱及配件一般用不锈钢制作。

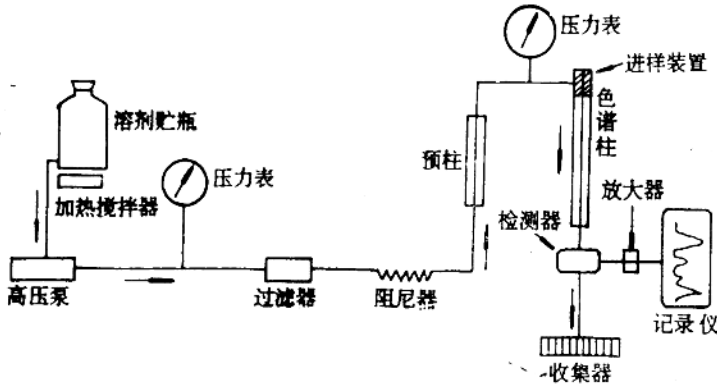


图1-2 高效液相色谱仪基本组成示意图

2. 高压泵 高压泵是高效液相色谱的关键部件之一。目前已有多种，有不同的分类方法。按照输送液体的情况可分为恒流泵与恒压泵；按照动力源的不同可分为马达泵与气动泵；按照构造的型式又可分为往复型，注射器型(或排液型)与压力容器型。

往复型高压泵的优点是输送液体的量不受限制，且便于更换溶剂及梯度洗脱；缺点是有脉动问题。这样会影响对流速敏感的检测器（如微量吸附热检测器）的稳定性、柱的分离度以及重现性等（应用紫外检测器时并无多大影响）。一般可采用阻尼装置。也有在泵与柱之间联接一数米长、内径为1.5mm的尼龙管，以衰减脉动现象。

注射器型与压力容器高压泵都没有脉动的缺点，但不便于更换溶剂，在梯度洗脱时需采用双泵。

压力容器型高压泵是用压缩空气（如氮气）作为动力，加压力于密闭容器液面上，然后由浸入液面下的导管，将流动相压往色谱柱。当操作压力在数十个大气压以下、柱长在1—2m以内时，即可用此泵。但必须用汞或聚乙烯薄膜传递压力，以防气体溶入流动相而导致基线不稳，甚至使柱内填充情况紊乱，因此，对高压泵的要求是：无脉动、流速恒定（变化在2—3%）、流量可自由调节。

3. 预柱（预饱和器） 由于液体对溶质的溶解能力往往比同体积的气体要大 10^4 倍，所以液体流动相对柱填充的影响是不容忽视的。

在液-液分配色谱中，色谱柱中的固定相有可能被流动相溶解而流失；在液-固吸附色谱中，吸附剂中的水分也可能发生类似情况。为了避免这种情况的发生，可以采用预柱（预饱和器），内装涂有固定相的惰性材料，使流动相预先为固定相所饱和（当吸附色谱时需事先将流动相用水饱和），以防止固定相的流失。当应用化学键合相填料作为固定相时，一般就无需预饱和装置。

4. 进样装置 一般进样的方式可分为两大类：在加压下进样或常压进样。

（1）在加压下进样（流动进样）：即在流动相流动的情况下进样。当操作压力在1000 psig (pounds per square inch; 1bs/in²; 磅/英寸²表压) 以下，进样量较小时，可用一般气相色谱用的10 μ l注射器进样，但进样装置中必须装有不被溶剂作用的硅橡胶或氟橡胶隔膜(septum)。有人采用了特殊设计的双层硅橡胶隔板装置，可在213大气压及190°C下连续使用200余次。但当压力较大或进样量较大时，注射器进样则不适用，常用六通阀进样，进样量可大大增加，适用于制备色谱。采用六通阀进样，既可在高达300大气压下操作，也可用于常压下进样。

（2）常压进样（静止进样）：即在流动相停止流动情况下进样。将样品直接置入柱顶，再将进样处装妥后开始操作。由于溶质在液相中扩散极慢，这样做对分离效能的影响不大。

5. 柱 色谱用柱是高效液相色谱仪的心脏部件。一般为不锈钢管，长度从10cm—1m，内径为2—10mm。柱越长越有利于物质的分离，但也会产生较高的回压。柱径较大时可减少柱壁效应，因而可获得较高的柱效。

柱的外部有时可装一盛水的套管，用以控制柱温；柱的末端装有多孔的金属滤片用以阻止填料进入检测器。

6. 检测器 检测器是用来反映柱中流出物的组分与含量的重要部件。一个好的检测器应该是对溶质灵敏度高、噪音低、线性响应范围广，可适用于各类化合物，对流动相以及流速与温度的波动不敏感等等。但是，到目前为止，检测器还是高效液相色谱仪中较为薄弱的环节。当前应用最广的是紫外检测器、示差折光检测器与迁移-离子化检测器。此外，尚有灵敏度较高的荧光检测器以及微量吸附热、电导、介电常数、放射性、极谱、红外等检测

器。现将常用的几种检测器及其优缺点分述比较如下：

(1) 紫外检测器 (UV 检测器)：它是利用流出组分有紫外吸收而被检出的。当前用得较多的是以低压汞灯所发射的254nm的紫外光进行检出，灵敏度可达 10^{-9} g/ml。特殊需要时也可采用280nm或315nm的紫外光，但不如254nm有效和适应性广。目前通用的“流通”检测器其光路长1cm，容积低至10—20 μ l。大多数记录式紫外分光光度计都可稍加改装用作检测器，且可抓住瞬间进行紫外吸收光谱扫描，以有助于溶质的鉴定。

(2) 示差折光检测器 (DR 检测器)：对于没有紫外吸收的组分，可用示差折光检测器检出。它的原理是利用样品池与参比池的折光差来进行检出。因此，只要被测组分与流动相液体之间有折光差，任何组分都可被检出，这是它的优点，但灵敏度较差。对温度变化极为敏感，每变化约1 $^{\circ}$ 时即可引起 10^{-4} 数量级的折光差，所以操作时应严格控制温度，这种检测器也不适用于梯度洗脱法。

(3) 金属传动丝-氢火焰离子化检测器 (迁移-离子化检测器；Moving-wire FID detector)：氢火焰离子化检测器在气相色谱中已广泛应用，但用于液相色谱时，只能适用于不易挥发的溶质，并以挥发性的有机溶剂作为流动相，如果用于其它溶质时，则需先将洗脱溶剂与样品分开，然后进行燃烧、分解、检定。金属传动丝-氢火焰离子化检测器就是为此而设计出来的。这种检测器可用于梯度洗脱法，受流速与温度波动的影响较小，灵敏度应该是较高的，但由于流出液中仅有部分(2—3%)溶质被传送供检，所以灵敏度只有 10^{-6} g/ml。近来对这种检测器的改进报道较多，有可能成为一种灵敏度较高而且适应性广的检测工具。

(4) 吸附热检测器 (微量吸附热检测器；Heat of adsorption detector；HAD)：吸附热检测器适用性较广，可用于吸附、分配、离子交换和凝胶渗透四种类型的液谱分析。它的工作原理是：当流出液中的溶质流经一种吸附剂(如，氧化铝、硅胶或多孔玻球等)表面时，由于吸附剂表面对溶质产生吸附作用而放热，致使温度上升，这种温度的微小变化(10^{-4} $^{\circ}$)即可用埋藏在吸附剂中间的热电偶或热变电阻器测出；当溶质由吸附剂表面“解吸”下来时就会“吸热”，而使温度下降。由于吸附与解吸，所形成的信号曲线是不对称的S-型曲线。

这种检测器的优点是可以装在色谱柱的出口，使死体积极小，可以检出样品中的所有组分；但与其他检测器相比不适于定量分析，对流速波动敏感，对室温控制要求极严，溶质浓度较大时不适用，用于梯度洗脱时也会因溶剂组成的变换而使基线漂移。

这种检测器特别适用于糖类、挥发油、类脂、核苷酸、甘油三磷酸酯以及氨基酸等。

(5) 常用的几种液谱检测器的特性比较列于表1—2。

表1—2 四种液谱检测器的特性比较

检测器	适用范围	能否梯度洗脱	检出限度 (g/ml)	对溶剂溶质需否特殊要求	对溶质破坏与否	线性范围
紫外吸收	仅适用于有紫外吸收的物质	可以	10^{-9}	需要	不破坏	10^4
示差折光率	通用	不能	10^{-7}	无需 (对温度敏感)	不破坏	10^3
迁移-离子化	通用	可以	10^{-6} — 10^{-7}	需要	破坏	10^3
示差吸附热	通用	不能	10^{-7}	无需 (对温度极敏感)	不破坏	10^2