# 1 抗生素及其质量分析进展

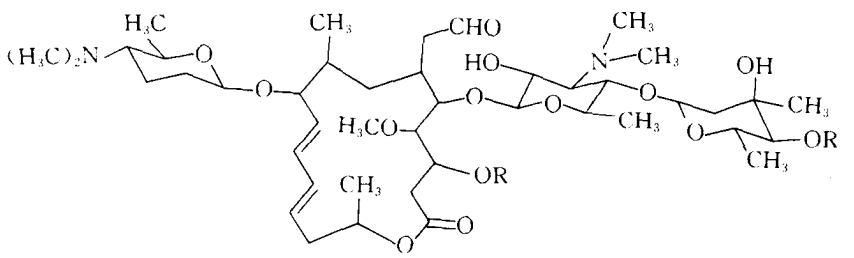
从 Flemming 1929 年发现第一个抗生素青霉素以来，经过近一个世纪的发展，抗生素(Abtibiotics）已经成为一门独立的综合学科。抗生素领域在迅速发展，其含义也在不断被充实。1942 年，链霉素的发现者 Waksman 定义：“抗生素是微生物在代谢中产生的具有抑制它种微生物生长活动、甚至杀灭它种微生物的化学物质”。但是由于抗肿瘤、抗寄生虫等抗生素的不断发现，使得抗生素的作用范围已远远超出了对微生物的作用；之后，又发现化学改造可以明显地改变已知抗生素的抗菌活性或毒性作用，推动了半合成抗生素的迅速发展；此时抗生素被定义为“是在低微浓度即可对某些生物的生命活性有特异抑制作用的微生物次级代谢产物及其衍生物”。近年来，由于化学合成工业的迅速发展，一些原来利用生物发酵的抗生素，已由化学合成方式生产，如氯霉素等；通过对传统抗生素的结构与功能的研究，人们设计出一些全新结构的全合成抗生素，如氨曲南、利萘唑烷等。故抗生素又被认为是对“在低微浓度即可对某些生物的生命活性有特异抑制作用的化学物质的总称”。

抗生素分析是依据抗生素的发展而产生，并伴随着抗生素的发展而发展的抗生素分支学科。抗生素学科的发展，不断为抗生素分析提出新要求，分析化学、分析仪器及计算机等学科的发展，使得抗生素分析手段不断充实，进而又促进了抗生素学科的发展。依据抗生素分析的服务对象，抗生素分析可主要分为抗生素成品药品的质控分析、生产过程中的控制和抗生素体内分析等。

## 1.1 抗生素药品的质控分析

### 1.1.1 抗生素药品的特点

(1)抗生素药品的纯度一般较化学药品低。抗生素药品的生产，目前一般由微生物在工业条件下发酵，再经化学纯化、精制和化学修饰等中间过程，最后制成适当的制剂。与一般的化学合成药品相比较，抗生素药品的结构、组成更复杂，表现为：①同系物多，如庆大霉素含有 $C_{1a}$，$C_1$，$C_2$ 和 $C_{2a}$ 等组分；国产一类新药必特螺旋霉素是将碳霉素 4″-异戊酰转移酶基因克隆到可产生螺旋霉素的宿主菌中，对螺旋霉素成功进行酰化改造后得到的新抗生素。由于 4″-异戊酰转移酶对于底物的选择不够专一，必特螺旋霉素是一组以 4″-异戊酰螺旋霉素为主的 4″-酰化螺旋霉素，按 4″-酰基上碳原子数目的不同可分为乙酰、丙酰、丁酰及异戊酰螺旋霉素等，其结构如图 1.1 所示；②异构体多，如多数半合成 β-内酰胺抗生素均存在光学异构体；③降解物多。



需要全本请访问 www.ertongbook.com

| | | |
|---|---|---|
| 异戊酰螺旋霉素Ⅲ | $R=COCH_2CH_3$ | $R'=COCH_2CH(CH_3)_2$ |
| 异戊酰螺旋霉素Ⅱ | $R=COCH_3$ | $R'=COCH_2CH(CH_3)_2$ |
| 异戊酰螺旋霉素Ⅰ | $R=H$ | $R'=COCH_2CH(CH_3)_2$ |
| 异丁酰螺旋霉素Ⅲ | $R=COCH_2CH_3$ | $R'=COCH(CH_3)_2$ |
| 异丁酰螺旋霉素Ⅱ | $R=COCH_3$ | $R'=COCH(CH_3)_2$ |
| 丁酰螺旋霉素Ⅲ | $R=COCH_2CH_3$ | $R'=COCH_2CH_2CH_3$ |
| 丁酰螺旋霉素Ⅱ | $R=COCH_3$ | $R'=COCH_2CH_2CH_3$ |
| 丙酰螺旋霉素Ⅲ | $R=COCH_2CH_3$ | $R'=COCH_2CH_3$ |
| 丙酰螺旋霉素Ⅱ | $R=COCH_3$ | $R'=COCH_2CH_3$ |
| 乙酰螺旋霉素Ⅲ | $R=COCH_2CH_3$ | $R'=COCH_3$ |
| 乙酰螺旋霉素Ⅱ | $R=COCH_3$ | $R'=COCH_3$ |
| 螺旋霉素Ⅲ | $R=COCH_2CH_3$ | $R'=H$ |
| 螺旋霉素Ⅱ | $R=COCH_3$ | $R'=H$ |
| 螺旋霉素Ⅰ | $R=H$ | $R'=H$ |

图 1.1　必特螺旋霉素组分结构

(2)抗生素的活性组分易发生变异。由于抗生素的生产和生物发酵有关，微生物菌株的变异、发酵条件的改变等均可导致产品质量的波动，如多组分抗生素，菌株或发酵条件的改变，可导致组分组成或比例的变化。

(3) 抗生素药品的稳定性一般较化学药品差。抗生素的分子结构中通常含有较活泼的化学结构，该结构通常又为抗生素的活性中心，如 β-内酰胺抗生素的 β-内酰胺环、链霉素中的醛基等。在贮存过程中，这些活泼基团易受外界环境的影响而发生变化，导致抗生素药品的稳定性较一般化学药品差。

### 1.1.2　抗生素药品质控分析的基本原则

抗生素药品的质控分析和其它化学药品一样，一般可分为鉴别、原料的一般检查项、制剂的一般检查项和含量测定四个方面。

(1)鉴别试验。鉴别试验的目的是验证某抗生素或其制剂，通常鉴别试验应包括对抗生素本身的鉴别和对抗生素盐的酸根或金属离子的鉴别。如对青霉素钠的鉴别应包括对青霉素的鉴别及对钠离子的鉴别；对硫酸链霉素的鉴别应包括对链霉素的鉴别和对硫酸根的鉴别。

对抗生素分子的鉴别通常可采用以下方法：

①检测抗生素分子中的特定官能团。利用抗生素分子中存在的特定官能团鉴别抗生素是简便、易行的方法，但由于官能团反应有时并非是该抗生素的特有反应，因此需要多种反应相互补充。以链霉素的鉴别反应为例：链霉素和双氢链霉素中的胍基和 8-羟基喹琳在一定的条件下均可产生颜色反应；但链霉素中的链霉糖经碱水解可生成麦芽糖，麦芽糖遇三价铁离子($Fe^{3+}$)形成紫色络合物；而双氢链霉素经碱水解不能形成麦芽糖。故链霉素的鉴别反应可选择胍基和麦芽糖两项反应。

②光谱分析。测定抗生素分子的紫外光谱或红外光谱，与已知的对照品或对照谱图进行比较，是抗生素鉴别的较专属方法。由于同类抗生素分子的紫外光谱差别较小，故红外光谱较紫外光谱在鉴别试验中更具有普遍意义。由于抗生素常存在多晶型现象，利用红外光谱进行鉴别时，如发现供试品和对照品或对照谱图不一致时，最好用相同溶剂同时重结晶供试品和对照品，使之处于相同晶型的情况下再进行测定。有时，多晶效应是由于研磨和压片过程中的晶相

转变所致，此时应采用溶液法试验。

③色谱分析。薄层色谱法和 HPLC 是目前最常用的色谱鉴别方法。其基本原理基于相同色谱条件下，供试品和对照品应具有相同的保留值。其它可用于鉴别实验的色谱方法有纸层析法、电泳法等。色谱法是专属性较高的鉴别方法，随着色谱分析方法的普及，其应用也越来越广泛。

由于抗生素结构的多样性，在进行鉴别反应时，不应仅依靠一种鉴别反应，而应采用多种不同机理的反应，已达到相辅相成之效果。如对卡那霉素的鉴别，EP1999 年增补版中采用 TLC 法和颜色反应两种方法联合鉴别，这里显色反应作为一种辅助鉴别方法，首先确定供试品是否属于氨基糖苷类化合物，进而提高了 TLC 鉴别的可靠性。又如阿米卡星的鉴别，EP1999 年增补版中采用 TLC 法和红外法联合鉴别。氨基糖甙类抗生素分子主要为饱和的碳氢化合物，分子中的氨基、羟基等并非是红外光谱鉴别的最适基团，因此红外光谱图所能提供的结构特征峰并不丰富，单独采用红外光谱对氨基糖甙类抗生素进行鉴别，通常得不到满意的结果。在此，红外光谱法可作为 TLC 鉴别方法的补充。

(2)原料的一般检查项。设立一般检查项的目的，通常是为了检查药品是否符合医疗使用的要求、药品是否在可控状态下生产及推测药品的稳定性能否满足贮存条件的需要等。与临床应用密切相关的指标包括 异常毒性、热原、细菌内毒素、降压物质、无菌等 与产品稳定性有关的指标包括 结晶性、水分(干燥失重)、酸碱度等 判断药品是否在 GMP 条件下可控生产的指标包括 残留溶剂、粒度、重金属、炽灼残渣等。通常采用组分分析、比旋度,控制多组分抗生素的组成；采用相关物质分析、溶液的澄清度与颜色、控制产品中有机杂质的含量；采用炽灼残渣表征产品中无机杂质的含量。

(3)制剂的一般检查项。设立制剂一般检查项之目的与原料的一般检查项之目的相同，故许多检查项目与原料相同，并设有特殊的检查项目以确定制剂生产是否符合各种制剂的相应要求。其特殊的检查项目包括：

①含量均匀度及片重(装量差异)。该检查项目是为了保证不同支／片(囊)药品的含量均一。对于小剂量(规格)药品,需要检查含量均匀度,而对于含量相对较大的药品,采用装量差异或片重差异表征不同支／片(囊)药品的均一性。

由于含量均匀度测定对测定方法的专属性要求不高，虽然国外亦较多采用 HPLC 法测定含量均匀度，但国内通常首先选用 UV 法测定。

②溶出度及崩解度。溶出度和崩解度是口服制剂的特有检查项目。溶出度是一种模拟口服固体制剂在胃肠道中崩解和溶出的体外试验法。作为一种制剂质控手段，溶出度检查可以反映药物的晶型、粒度、处方组成、辅料等性质、生产工艺的差异等，是评价药物口服制剂的内在质量的重要指标。对水溶性较好的药品，通常仅需检查其崩解度，而水溶性不好的药品，则需要检查溶出度。虽然，有时选用的溶出度测定条件并不能反映药品在体内的实际溶出情况，但利用溶出度控制生产工艺的稳定性同样具有重要的意义。

(4) 含量测定。抗生素的含量测定是抗生素分析的核心，按其分析方法可分为微生物检定法和化学分析法两大类。

①微生物检定法。微生物检定法是以抗生素对微生物的杀伤或抑制程度为指标来衡量抗生素效价(Potency) 的方法。实验中供试品必须与效价已知的标准品相比较才能确定出自己的效价。由于抗生素微生物检定法的测定结果比较直观；而抗生素分子的结构、组分比较复杂，在药物的开发初期一般尚没有发展出较专属的化学测定方法，使得抗生素微生物检定法成为抗

生素含量测定的最基本方法。目前，对多组分抗生素，微生物检定法仍是首选的含量测定方法。

抗生素微生物检定法有杯碟法和比浊法两种。虽然两种方法一般可通用，但比浊法更有利于自动化操作，且手工操作比浊法更易控制实验误差。抗生素微生物检定法的基本原理为量反应平行线法，应用抗生素微生物检定法测定效价时，应采用生物统计的原理和方法对实验结果进行可靠性分析及误差估计，以确保实验结果准确可靠。

②化学测定法。化学测定法是利用化学分析的手段测定抗生素活性成分的方法。对结构和组分已知的抗生素，其含量测定方法包括：特定官能团分析法和分离分析法两类。通常利用特定官能团来测定抗生素的含量，其专属性较分离分析法差，但对于反应类型已知的化学反应有时可省略对照品，且方法也相对简便。

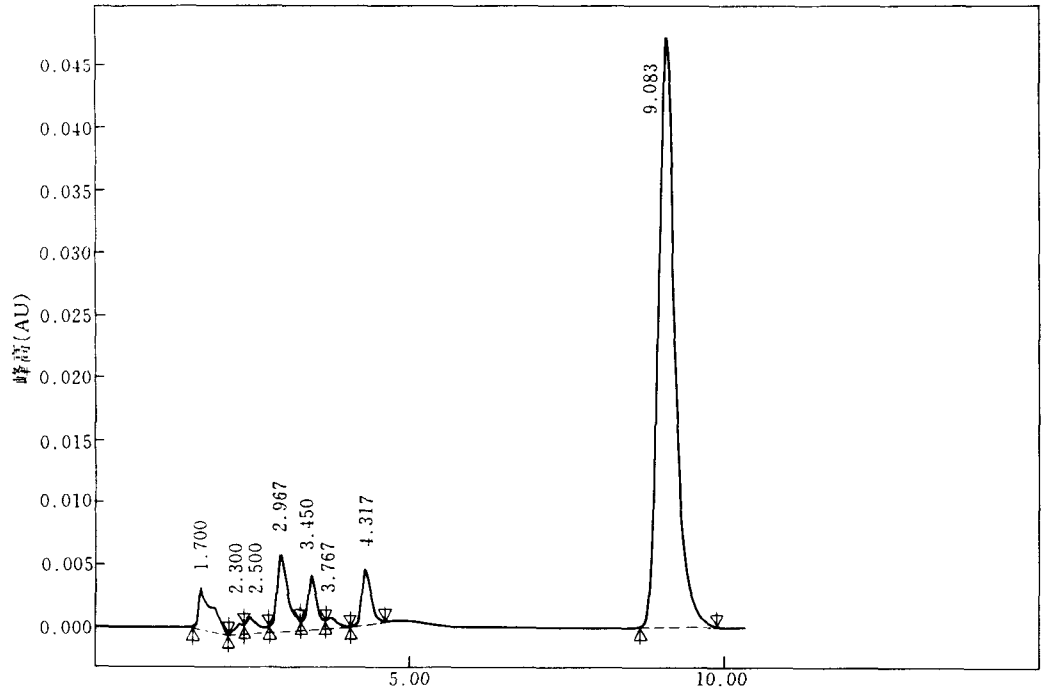
常用的特定官能团测定法又可分为直接测定法和间接测定法两类，其检测手段包括光谱分析法、电化学分析法和一般化学分析法。以青霉素类抗生素的含量分析为例，直接测定法可采用酸碱滴定法测定抗生素分子的羧基；间接测定法包括碘量法、电位滴定法、咪唑法等。碘量法测定，首先青霉素经碱水解形成青霉噻唑酸，然后与碘定量反应；电位滴定法测定，青霉素碱水解物中的巯基与硝酸汞定量反应，反应过程中以铂电极为指示电极，以硫酸亚汞电极为参比电极，根据反应中电位的变化判断反应终点；咪唑法测定，青霉素先经乙酰化后，由咪唑催化，在高汞盐溶液中被转化成青霉稀酸硫醇汞盐，在 325～345nm 波长处产生最大吸收，然后由分光光度法测定。

官能团测定法的准确性除了与方法本身的准确性有关外，主要影响因素来自供试品中杂质和反应试剂的非特异反应。故清楚地了解供试品中的各类杂质，进而选用较专一的测定方法是减少干扰、提高检测准确性的主要手段。

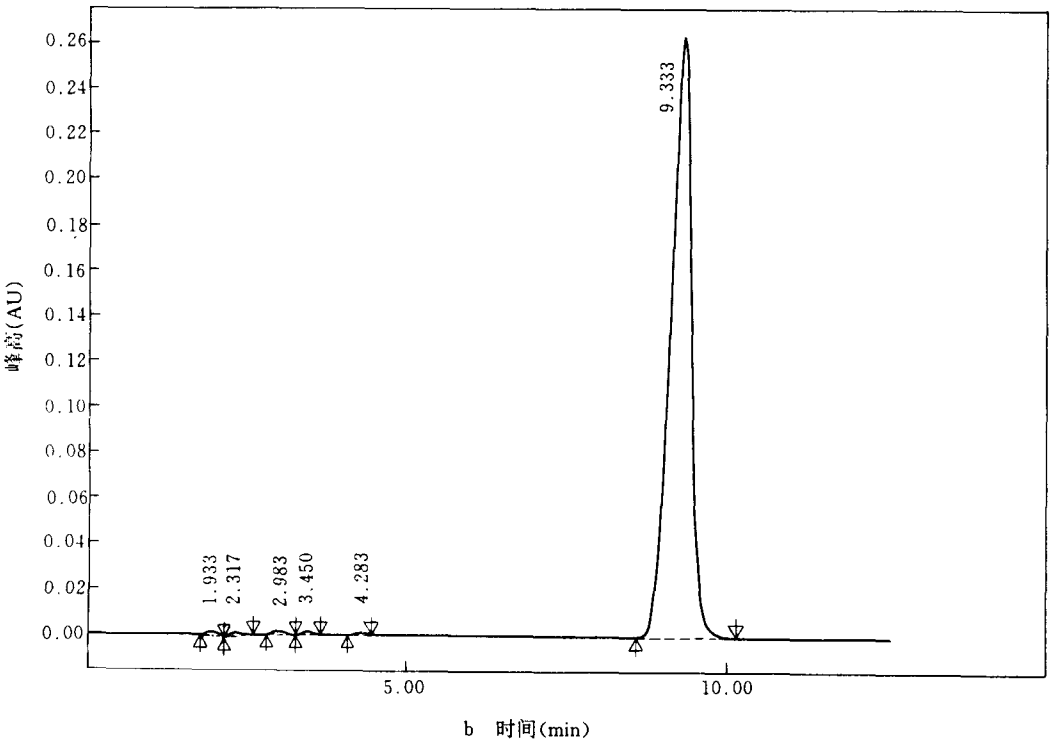
分离分析方法的基本原理是采用化学分离的手段使抗生素中的有效组分和杂质分离，进而准确测定抗生素活性组分的含量。如中国药典 1995 年版对利福平的测定，首先采用 TLC 方法，使利福平和其杂质分离，利福平斑点经洗脱后，再由 UV 法测定含量。该方法较 BP1993 年版利福平直接 UV 测定法的准确度大大提高。常用的分离手段是色谱法，利用 HPLC 法对单组分抗生素进行含量测定，是目前抗生素含量测定的发展方向。

③不同化学测定方法准确性的比较。以 HPLC 法和电位滴定法、咪唑法测定青霉素 V 钾原料及青霉素 V 钾片含量的比较为例。青霉素 V 中通常含有对羟基青霉素 V、青霉素 V 噻唑酸等杂质，在 HPLC 色谱图中（图 1.2），青霉素 V 的保留时间约 9min，对羟基青霉素 V 的保留时间约 3.4min，青霉素 V 噻唑酸的保留时间约 3min，并发现青霉素 V 溶液放置过程中产生保留时间约为 4.3min 的未知降解物，其片剂中存在保留时间为 2.3 和 4.3min 的未知杂质，可见 HPLC 法可将青霉素 V 和其诸杂质完全分离。

Ⅰ.HPLC法和电位滴定法测定青霉素 V 原料含量的比较。六批青霉素 V 钾原料电位滴定法和 HPLC 法测定结果的比较结果见表 1.1。两种方法的最大测定误差为 1.12%，经 $t$ 检验，两组结果在统计学上无显著性差异。提示两种方法的测定结果具有可比性。由表 1.1 还可见，电位滴定法的测定结果普遍略高于 HPLC 法结果。这可能是虽然电位滴定法可扣除青霉素 V 开环降解物类杂质，如青霉素 V 噻唑酸等对测定结果的影响，但其它具有 β-内酰胺环结构的杂质，如对羟基青霉素 V 等仍对含量测定结果有影响，使得测定结果偏高。由于该类杂质在成品原料中的含量较少，故使两种方法的测定结果较为接近，但仍表明 HPLC 法较电位滴定法的专属性更强。




a　时间(min)




b　时间(min)

**图 1.2　青霉素 V的 HPLC 色谱图**

**(a　青霉素 V 及其杂质混合物；b　青霉素 V片剂)**

需要全本请访问 www.ertongbook.com

表 1.1 HPLC 法和电位滴定法测定青霉素 V 钾原料含量的比较

| 样品 | 电位滴定结果（%） | HPLC 结果（%） | 偏差（%） |
|---|---|---|---|
| 1 | 100.35 | 99.29 | 1.06 |
| 2 | 99.67 | 98.55 | 1.12 |
| 3 | 100.17 | 99.06 | 0.91 |
| 4 | 100.22 | 99.25 | 0.97 |
| 5 | 99.18 | 98.80 | 0.38 |
| 6 | 99.39 | 99.16 | 0.23 |

Ⅱ. HPLC 法和咪唑法测定青霉素 V 片剂含量的比较。五批青霉素 V 钾片的 HPLC 法和咪唑法测定结果的比较见表 1.2。经 $t$ 检验，两组结果在统计学上未显示有显著性差异，提示两种方法的测定结果亦具有一定的可比性。但由表 1.2 可见，咪唑法的测定结果普遍较 HPLC 结果偏高，两种方法的最大测定误差为 2.5%。HPLC 分析发现，片剂中除含有青霉素 V 钾原料中的诸杂质外，还有其它未知杂质。和电位滴定法一样，具有 β-内酰胺环结构的杂质对咪唑法测定的干扰作用将导致测定结果偏高，且赋性剂及由其引入的杂质亦可能影响咪唑法的测定，这可能是咪唑法测定结果普遍偏高的原因。提示 HPLC 法测定青霉素 V 钾片较咪唑法更具有专属性。由于片剂中青霉素 V 诸杂质的含量及种类普遍多于原料，故易导致咪唑法和 HPLC 法对片剂测定结果的差异较电位滴定法和 HPLC 法对原料测定结果的差异大。

表 1.2 HPLC 法和咪唑法测定青霉素 V 钾片含量的比较

| 样品 | 咪唑法结果（%） | HPLC 结果（%） | 偏差（%） |
|---|---|---|---|
| 1 | 103.46 | 102.74 | 0.72 |
| 2 | 104.18 | 103.76 | 0.42 |
| 3 | 104.18 | 102.79 | 1.39 |
| 4 | 103.99 | 101.45 | 2.54 |
| 5 | 104.76 | 103.80 | 0.96 |

### 1.1.3 抗生素质控分析的进展

(1)测定方法仪器化。随着制药工业的发展，客观、准确地评价产品质量，用仪器分析法替代传统的手工观测、测定，已成为当今抗生素质控分析的发展方向。具体表现为：①HPLC 法迅速普及，广泛用于鉴别、含量测定、相关物质检查和组分测定；②抗生素微生物检定法已广泛使用由计算机控制的、利用 CCD 数字化扫瞄技术的抑菌圈测量仪进行测定；③传统的手工滴定法逐渐由电位滴定法所替代；④色度仪、浊度仪等光电一体化仪器正逐步替代颜色、澄清度等常规的裸眼观测。

(2)测定项目多样化、控制指标具体化。为全面保证药品的产品质量，仅用酸碱度、水分、含量、装量差异等传统的检查项目已不能满足现代质量控制的需要，针对具体产品的特点，已发展出多种特定的检查项目，如组分分析、高聚物分析、残留溶剂分析、释放度检查、溶出度检查等，以便多方位的控制产品质量，表现出质控分析项目的多样化。

另一方面，新制定的检查项目又有其明确的检查对象。如高聚物分析，一般仅针对过敏反应较严重的 β-内酰胺抗生素；有机溶剂残留量分析，仅针对采用溶媒结晶工艺生产的药品；降压物质检查一般仅针对发酵产品。即对每一特定的品种，甚至特定的生产工艺，都有其特定的质控标准。

质量控制标准的具体化还表现为，对一些生产工艺稳定，经多年检验产品质量也稳定的品种，取消一些原有的检查项目。如异常毒性检查和降压物质检查，在青霉素的质控标准中已取消。取消检查项目是慎重的，当生产工艺改变时，应恢复对取消项目的检查，以确保产品质量。

(3)体外实验将逐步取代动物实验。为克服动物实验误差大、影响因素较多之缺点，传统的动物实验正逐渐由体外实验所取代。最突出的例子是细菌内毒素检查法的应用。目前，除少数对细菌内毒素测定有干扰作用的抗生素尚保留家兔热原实验外，几乎所有的抗生素品种均可用细菌内毒素检查法替代家兔热原实验，并具有快速、准确之特点。

## 1.2 生物体内抗生素样品的分析

### 1.2.1 生物体内抗生素分析的目的

抗生素的作用对象是病原微生物，但作用场所却是机体。抗生素只有在机体的感染部位达到足够的浓度，才具有生物活性。目前对体内抗生素进行分析的目的可概括为：

(1)研究药品在机体各组织器官中的分别情况，以确定药品的有效作用部位，进而确定新药的适应症及药品与不良反应的联系。

(2)研究药品在机体内的吸收、代谢、消除速率，以确定给药剂量和给药时间间隔。

(3)进行药物生物利用度和生物等效性评价，以确保新剂型和仿制药品的临床效果。

(4)对治疗浓度和毒性浓度较接近的药物，对患者的血药浓度进行监测，以确保临床的安全有效。

总之，体内药物分析和新药的开发、应用关系密切。

### 1.2.2 生物体内抗生素分析的特点

(1)样本差异大。体内抗生素分析的主要任务是测定抗生素在体液（血液、组织液和尿液）中的浓度。由于机体的个体差异，来自不同个体的样本间的差异可能很大。机体的个体差异除了与机体的内在因素(如年龄、体重、健康状态等)有关外,还易受外界因素,特别是饮食条件的影响。故为得到正确的实验结果，实验中应尽可能选择较均一的个体，并实行饮食控制。此外，还应通过合理的实验设计、合理的结果处理方法和正确的评价方法，使个体差异的影响降至最低。

(2)样品浓度低。体内测定,抗生素样品在体液中的浓度通常较低,且样本量通常也较少。因此，体液抗生素分析方法的灵敏度一般要求较高，有时样品还需经过适当的富集才能用于测定。

(3)干扰因素多。体液测定的最主要干扰来源于其中存在的大量蛋白质。为避免蛋白质对测定的干扰，样品需经适当的前处理去除蛋白质或采用适当的对照克服蛋白质的干扰作用。

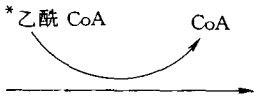
(4)实验周期长。体液样品通常不宜同时获得，有时一项实验需要数月才能完成。为保证不同时间采集、测定的样品具有可比性，测定方法应具有较高的重新性和再现性。

### 1.2.3 生物体内抗生素分析方法

(1)同位素示踪法。利用特制的带有某种放射性同位素标记的抗生素，可方便地研究药物在体内的吸收、分布和代谢情况。同位素示踪法的最大优点是灵敏度高，且测定方法相对较简单；缺点是特异性较差，有时无法区别原型药和代谢产物，且需要专门制备标记药物，并需要专门的检测设备及实验室。

(2)微生物测定法。利用体液中抗生素对微生物生长的抑制能力为指标，表征体液中抗生素的浓度。为提高方法的灵敏度及减少实验误差，实验中应选择敏感的指示菌，必要时可采用单层一薄层培养基，整个实验最好在大方盘中进行，其中设标准曲线。微生物测定法的优点是方法简单，对实验室的要求不高。但由于一些抗生素的代谢物也具有抗菌活性，故其方法的特异性不高。

(3)生化分析法。利用生物体内特异酶和抗生素的特异反应，测定抗生素浓度的方法。较成熟的方法有放射酶法(Redioenzymatic assay)。以氨基糖苷类抗生素血药浓度的测定方法为例，放射酶法的测定原理如下：







反应①和反应②分别利用由细菌中提取的乙酰转移酶和腺苷转移酶为特异酶，以 $C^{14}$标记的乙酰辅酶 A 和 $P^{32}$标记的 ATP 为底物，测定酶催化反应生成的放射性活性物质的量，并依据标准曲线计算抗生素的浓度。

放射酶法的优点在于不需要标记每一个特定的抗生素，一个特定的反应往往可适应一类抗生素的测定，且方法较简单、灵敏、准确。但由于实验中仍需要放射性标记物，故需要具备放射性活性测定的条件。

(4)免疫测定法。放射免疫法和酶免疫法均可用于生物体内抗生素的分析。此方法的关键是制备特异性抗体，如果抗体选择适当，方法的灵敏度和特异性均可优于其它分析方法，且适应于大批量样品的检测，故目前主要应用于临床样本的常规检验。

(5)化学分析法。虽然有些药品可利用荧光分析等方法直接测定血药浓度，但目前用于体液测定的主要方法是 HPLC 技术。除常规的紫外检测器外，荧光检测器、化学发光检测器及 HPLC 质谱联用技术也常用于对体内的药物分析，使得 HPLC 法具有较好的特异性和灵敏度。随着样品前处理方法的发展和自动进样技术的日趋普及，HPLC方法已成为体内药物分析的常规方法。

## 1.3 抗生素工业生产过程中的样品分析

### 1.3.1 抗生素工业生产过程中样品分析的目的

传统的抗生素工业生产，通常包括生产（包括发酵和化学合成）和分离纯化两个主要部分。以链霉素生产为例，其主要生产工艺如图 1.3所示，其中包括多极发酵和多层次的分离分化。

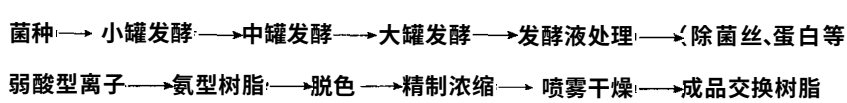



图 1.3 链霉素的主要工艺流程

在发酵过程中，为获得最大的产率，不仅要考虑单次发酵的发酵单位，还要考虑发酵周期及发酵过程中各种原材料的消耗情况等，希望以最小的消耗、最短的时间获得最大的经济效益。由于抗生素为微生物的次级代谢产物，微生物代谢的基本特征呈“反馈抑制”，即高浓度的产物抑制产物的进一步产生，故获得最大经济效益的最有效措施之一就是研究培养基一微生物代谢一产物抑制的关系，选择最佳培养基成分，并在发酵过程中对发酵液的抗生素浓度进行监测，使得发酵液中抗生素浓度达到抑制浓度时，及时转入下一级发酵(工艺)。

以经济效益为指标对生产过程进行控制是抗生素各个生产环节的普遍控制原则。获得最大的经济效益是抗生素生产过程中实行产物监测的根本目的所在。其次，通过对不同生产工艺或不同工序产物的比较分析，有助于帮助发现产品主要质量问题的原因，进而促进改进工艺，提高产品质量。如通过对不同结晶工艺青霉素的比较，发现青霉素中致敏性高分子杂质的含量和结晶工艺关系密切。此外，对纯化阶段的产物进行分析，可及时掌握产品质量信息，确保成品符合质量标准之规定。

### 1.3.2 生产过程中抗生素分析方法的特点

抗生素生产过程中进行含量测定的主要目的是为了对生产过程实行最优化控制。故以此为目的的抗生素分析方法应简便、快速，对方法的灵敏度、特异性等要求不高。如链霉素生产中效价的测定采用麦芽酚显色法，而不采用药典中收载的微生物检定法。

近年来为适应工业自动控制的需要，分析方法朝着自动分析的方向发展。如头孢菌素 C 发酵液的测定，采用烟酰胺法，其自动分析仪包括采样器、比例泵、反应器、检测器、控制器和记录仪等部件，可自动完成从取样到结果分析整个过程。

适用于工业化生产控制的理想分析方法是采用各种生物传感器进行分析。已报道的各类生物传感器及其应用情况见表 1.3。抗生素发酵过程中，利用生物传感器不仅可方便的进行含量分析，还使得“在线”连续监测成为可能。

表 1.3 生物传感器及其在抗生素分析中的应用

| 传感器类型 | 名　称 | 测定范围 | 相应时间 |
|---|---|---|---|
| 酶电极 | 青霉素电极 | $10^{-2}$～3mmol/L | 2～4min |
| 微生物电极 | 头孢菌素电极 | 60～500mg/L | |
| | 庆大霉素电极 | 1～20mg/L<br>8～70mmol/L | 3～10min<br>～1min |
| | 制霉菌素电极 | 1～800mg/L | 60min |
| 酶场效应晶体管(ENFET) | 青霉素-FET | 0.2～2.5mmol/L | ～10s |
| 酶热敏电阻 | 头孢菌素热敏电阻<br>青霉素热敏电阻 | 0.005～10mmol/L<br>0.05～500mmol/L | |

## 参 考 文 献


[1]李焕娄等. 中国抗生素杂志，1993(18)：85

[2]李家泰等. 中国临床药理学杂志，198(62)：158

[3]陈丽娟等. 医药工业，1987(18)：163

[4]张治锬. 抗生素药品检验. 北京：人民卫生出版社，1987

[5]许春向等编著. 生物传感器及其应用. 北京 科学出版社，1993

# 2 高效液相色谱仪及其进展

## 2.1 高效液相色谱法的发展史及其特点

现代自然科学可以细分为许许多多复杂的专门领域，各个领域都在从事如何更好地发挥本学科特点的研究工作，其数量之大，发展之快是过去所不能比拟的，所有涉及到处理化学物质的研究领域，不管其研究目的如何，都存在着一个共同的问题，这就是怎样在短时间内，从一个由多组分构成的混合样品中，将其组分或目的物逐一加以分离、分析，并回收到高纯物质。在这样一些分离、分析技术中，色谱法可以说是十分有效的。特别是近年来，由于高效液相色谱仪的迅速发展，使得其无论是在以分析为目的的，诸如混合物的分离、定性、定量等，还是在以提取为目的的分离、精制等各个领域的利用率都显著地增加。

本章通过对高效液相色谱仪及其发展的介绍，揭示高效液相色谱法之特点。

### 2.1.1 色谱法的发展史

可广泛用于对混合物进行分离的手段概括为溶剂萃取法、蒸馏法、透析法、电解法以及色谱法等，其可靠性以色谱分离法为最高。在上述的分离方法中，色谱法是一种较新的分离方法，最早出现于本世纪初：1906 年俄国植物学家 Tsweet 发明的利用吸附原理对叶绿素 a,b 的分离方法首次被命名为色谱法（Chromatography），这一词汇来源于希腊文 Chroma（色）和 graphos（记录），原因在于这种方法是将叶绿素这样一些有色物质，在柱中作为不同颜色的吸附带来加以分离的，因而这种方法具有记录颜色的意义。正因为如此，他才被推崇为今日色谱法的创始人。

然而与色谱法有关的一些现象，早在 19 世纪中叶就已经被人们所了解。其起源及发展可简单地概述如下：1845 年 Thompson 等就对离子交换现象进行过研究；1861 年 Schonbein 等报导了纸的毛细现象；1931 年 Kuhn 对 Tsweet 报道的分离叶绿素的方法加以改良，然后将其应用于对多种植物色素的分离；1938 年 Reichstein 报道了流动色谱法(Flowing chromatography),即借助于流动相(溶媒)的作用,使试样(溶质)从柱的下端流出。这种方法的特点是试样从柱中洗脱后，即可得到溶解状态的目的物，又能采用适当的方法，对溶液中的目的物进行定量。

直到 20 世纪 30 年代末期，利用色谱法对混合试样进行分离时，仍是根据吸附原理，采用填充了吸附剂的色谱柱来进行的。1941 年 Martin 等首次报道了分配色谱法，利用溶质在流动相和固定相中溶解度的差异进行分离，在该论文中，他首先提出了在分配理论方面著名的塔板理论；1952 年 Alm 又报导了可采用两种流动相进行的液相梯度洗脱法（Gradient elution),使得分配色谱法得以进一步完善。

1944 年 Martin 等报道了采用滤纸做固定相的纸色谱法；1958 年 Stall 报道了薄层层析色谱法。纸色谱法和薄层层析色谱法的设备和操作都比较简单，至今仍在化学领域中得到广泛地应用。

1952 年 Martin 等又发展了利用气体做流动相的气相色谱法。与利用液体做流动相的液相色谱法相比，由于流动相采用的是气体，使得样品通过交换柱的速率大大提高，因此色谱法首次成为一种快速的分析方法。此外，由于当时已经有了记录仪可进行自动记录，使得气相色谱得到飞速发展，至今不衰。

在离子交换色谱法方面，1935 年 Adams 等首次成功地合成了离子交换树脂；1947 年 Tompkins 等将离子交换色谱法应用于对稀土元素的分离；Spackman 等将离子交换色谱法用于对氨基酸的分离，其后又用于对许多离子性有机化合物的分离；近年来在高效液相色谱中，也广泛采用一些实用技术，诸如离子对色谱法及称之为离子抑制色谱法的分配色谱法等，以实现对离子化合物的分离分析。

在凝胶渗透色谱方面，Wheaton 等 1953 年报导了多孔性无机物（沸石）所具有的分子筛现象；1962 年 Porath 等首次发表了利用软质葡聚糖凝胶分离水溶性高分子化合物的报告，并将这一方法命名为凝胶渗透色谱法；1964 年 Moore 等采用硬质聚苯乙烯凝胶对可溶于有机溶剂中的高分子化合物进行分离，并且对其分子量的分布进行测定，完善了凝胶渗透色谱法。

从以上色谱法的发展简史可以看出，色谱法起始于以分离分析和分离精制为目的的液相色谱，而后随着气相色谱的出现和发展，才正式成为一种能进行分离、定性、定量的仪器分析方法。同气相色谱相比，液相色谱实现快速分析要来得晚些，这是因为伴随着高速化所必需的一些装置，如高压定量泵、高压进样阀、高灵敏度检测器以及耐压充填剂等的开发都比较迟。液相色谱的高速化以 1967 年 Huber 等开展的高速液液分配色谱法的工作为开端；同年 Horvath 等发明了表面交换体，1969 和 1971 年 Kirkland 等先后研制成功了表面多孔性填充剂及化学键合型填充剂；伴随着液相色谱设备的不断改良和创新，高效液相色谱才逐渐得以完善。

近年来，随着色谱技术在各个领域日益广泛地应用以及微型计算机技术的发展，一代新型的色谱仪即智能色谱仪脱颖而出，并受到色谱界的普遍重视。1981 年杜邦公司的可自动选择最佳分离方法的液相色谱仪“探索者”(Sentinel)问世 随后惠普公司、瓦里安公司、玻金埃尔默公司、沃特斯公司等竞相对全盘自动化高效液相色谱仪进行开发研究；中国自 1982 年起，在国家科委的支持下也开展了智能高效液相色谱仪的研制工作，经过 8 年的努力，完成了全盘自动化高效液相色谱仪原理样机及其专家系统，二者相结合就形成了智能高效液相色谱仪。上述色谱法的发展简史见表 2.1。

表 2.1 色谱法的发展简史

| 年份 | 研究者 | 业绩 | 年份 | 研究者 | 业绩 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1845 | Spence 和 Thompson | 发现离子交换现象 | 1953 | Wheaton 和 Bauman | 不相容原理 |
| 1861 | Schonbein | 研究毛细现象 | 1958 | Stall | 薄层层析色谱法 |
| 1906 | Tsweet | 分离叶绿素，命名色谱法 | 1962 | Flodin 和 Porath | 凝胶渗透色谱法 |
| 1931 | Kuhn | 分离植物色素 | 1964 | Moore | 凝胶渗透色谱法 |
| 1935 | Adams 和 Holmes | 研制离子交换树脂 | 1967 | Horvath | 研制表面交换体 |
| 1938 | Reichstein | 流动色谱法 | 1967 | Huber 和 Hulsman | 高速液液色谱法 |
| 1941 | Martin 和 Synge | 分配色谱法 | 1969 | Kirkland | 研制表面多孔性填充剂 |
| 1944 | Martin 和 Synge | 纸色谱法 | 1971 | Kirkland | 研制化学键合型填充剂 |
| 1947 | Tompkins | 分离稀土元素，离子交换色谱 | 1975 | Korpi，Wittmer 和 Haney | 离子对色谱法 |
| 1952 | Martin 和 James | 气相色谱法 | 1981 | 杜邦公司 | 自动选择最佳分离方法的液相色谱仪 |
| 1952 | Alm | 梯度洗脱法 | | | |

需要全本请访问 www.ertongbook.com

### 2.1.2 色谱法的分类

色谱法有多种分类方式，一般可根据流动相的特性进行大分类，再根据流动相和固定相的组合进行中分类，最后参照分离时流动相和固定相的相互作用进行小分类。根据流动相的特性大致可将色谱法分为三类：以气体为流动相的气相色谱(Gas chromatography)法，以液体为流动相的液相色谱(Liquid chromatography)法和以超临界流体为流动相的超临界色谱(Supercritical fluid chromatography)法。液相色谱法又可进一步分为柱色谱(Column chromatography)法、薄层层析色谱(Thin-Layer chromatography)法、纸分配色谱(Paper partition chromatography)法等。可以把高效液相色谱(High perfomance liquid chromatography)法看作是一种以快速分析为目的，采用特殊装置的柱色谱法。对高效液相色谱来说，又可根据样品分离时相互作用的不同进一步分为四种类型：吸附色谱(Adsorption chromatography)法、分配色谱(Partition chromatography)法、离子交换色谱(Ion-Exchange chromatography)法和凝胶渗透色谱(Gel permeation chromatography)法，上述分类之间的关系如图 2.1 所示。

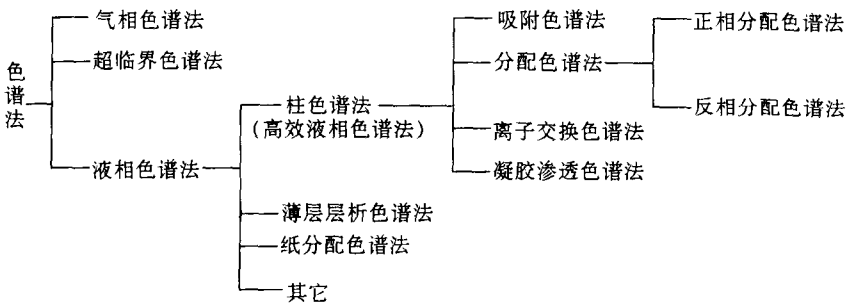



图 2.1 色谱分类法

### 2.1.3 高效液相色谱法

从色谱发展史可以看出，当今高效液相色谱的构想早在色谱法创始之初就已经产生。将样品添加或注入到色谱柱的上沿，借助于流动相送入色谱柱（分离场所）内；色谱柱由固定相和流动相构成，通过样品和固定相及流动相间的化学、物理作用，达到分离的效果，并从色谱柱的下端洗脱出来。因此，样品的洗脱速度取决于流动相的流速，以及色谱柱内各样品组分与固定相和流动相相互作用的强弱。若流动相为气体，显然移动速度很快，比较容易达到高速分离；相反对于用液体做流动相的柱色谱法来说，由于流动相粘度显著增高，从而增加了流动相通过色谱柱的阻力，自然也就要求有较长的分离洗脱时间。

高效液相色谱法旨在尽快地使液相色谱过程得到实施。为了缩短分离时间，即达到高速化，首先要尽可能地加大流动相的流速，为此就需要使交换柱的前沿和下沿之间具有足够大的压差。这样，前沿附近的压力就变得相当高了，故需要一种能够在这样的条件下，将流动相强制送入色谱柱内的高性能耐压恒流泵。此外，为了快速分离试样，还需要一种具有高分离性能的固定相，以期固定相和流动相之间在尽可能短的时间内就能达到平衡，否则样品在非平衡状态下通过色谱柱时，其分离状态会显著恶化。因此，所谓高效液相色谱不过是一种用液体作流动相，通过耐压恒流泵输送流动相，让溶于流动相中的混合物通过充填有高分离能力的色谱柱，从而达到迅速洗脱分离之目的的一种液相色谱法。从色谱柱上洗脱下来的各种成分可用各种检测器进行测定，同时可借助记录仪自动记录洗脱状态的变化（色谱图）。故高性能耐压恒流泵

和高分离性能的固定相是高效液相色谱法成为现实的两大重要因素。

近年来，由于高性能耐压恒流泵及相应高压输液系统的不断完善，种种具有高分辩分离能力的填充剂的开发成功，再加上各种新研制的高灵敏度检测器，使得今日的高效液相色谱法更加完善。

### 2.1.4 高效液相色谱法的特点

高效液相色谱法作为一种色谱法，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，且使得其分离性能大大提高，故应用性更加广泛，较之其它一些色谱法具有更多的优越性。现将其与在许多领域中已广泛应用的气相色谱法及薄层层析色谱法进行比较，进一步揭示高效液相色谱法的特点。

(1)高效液相色谱和气相色谱的比较。尽管气相色谱和液相色谱的原理完全相同，但二者有很大的差别。前者流动相采用的是对样品及填充剂均不活泼的气体（氦气和氮气），后者除传统的凝胶渗透色谱外，均采用对样品及填充剂具有亲合力的液体。以前，相对于液相色谱来说，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，而今高效液相色谱亦能使液相色谱实现快速分离，分离时间和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较气相色谱优越得多。

从样品分离的可能性来看，用气相色谱分离试样，只需考虑试样和填充剂二者间的关系即可，相对说来比较简单，但也使试样的分离受到了制约。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。尽管分离洗脱时较为复杂，但说这种分离具有无限的可能性，绝不是言之过分。事实上，在气相色谱中难以分离的试样，在高效液相色谱中往往可以轻易地得到解决。这两种色谱方法的分离关系如图 2.2所示。

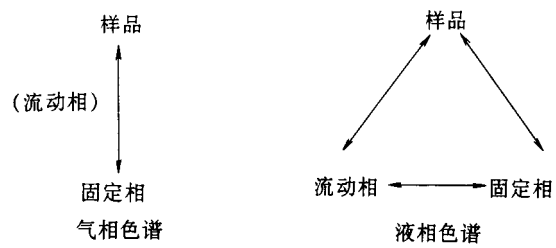



图 2.2 色谱分离关系的比较

此外，对气相色谱来说，样品必须以气体状态通过色谱柱及检测器。气相色谱的使用温度一般＜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。试样不做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,分子量分布大约在 50～600 之间。高效液相色谱则不同，除去为降低流动相的粘度，或者是由于试样在常温下不溶解而需要加温之外，一般室温下操作即可；且只要试样可溶于某种溶剂，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试样的热稳定性、挥发性、水溶性和脂溶性的限制，从低分子到高分子，甚至旋光异构体均在适用范围之内。

另外，高效液相色谱较气相色谱更容易对分离出来的试样进行回收。气相色谱的样品是在汽化状态下从色谱柱上洗脱下来，故需要在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。高效液相色谱的试样是以溶液状态从色谱柱上洗脱下

来的，只要在色谱柱的出口附近放置一个简单的容器，就很容易使回收率达到 80%～90%以上。

(2)高效液相色谱和薄层色谱的比较。薄层层析色谱是利用薄层层析板（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地应用。但是对这种方法来说，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试样各成分的展开距离很难再现。因此,在薄层层析色谱法中,通常用试样移动比(流动相展开距离与试样展开距离之比，即 $R_f$ 值)进行定性分析。另外,由于试样的展开距离不同,样品斑点的扩散比率也不相同。因此，一般只用作定性分离，而难以作精确的定量分析。

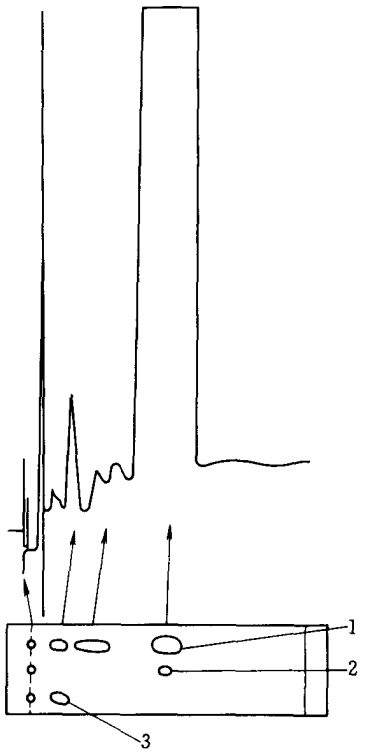



图 2.3 高效液相色谱和薄层层析色谱的比较
1 氢化醋酸可的松分解样品；2 氢化醋酸可的松对照品；3 氢化可的松对照品；色谱条件：高效液相色谱法；色谱柱 Bondapak $C_{18}$/corasil (60mm×2mm i.d)；流动相 乙腈-水(18∶82)；薄层层析色谱法，硅胶 F；展开剂 丙酮

下面选一个薄层层析色谱和高效液相色谱的分析实例加以对比：利用薄层层析色谱和高效液相色谱得到的氢化醋酸可的松及其分解物的分离色谱图(图 2.3)。利用薄层层析色谱法展开时，通常试样在展开前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，为了对试样进行检测尚须用四唑蓝显色，整个分离、检验操作需要 3h 以上的时间。高效液相色谱的样品预处理，只需经乙醇萃取，即可进样，15min 内完成分离分析操作。尽管使用的是高效液相色谱仪初期的产品，设备和色谱柱的性能均不理想，但与薄层层析色谱相比，不仅仅是分离时间短，而且还能检测出不与显色剂四唑蓝反应的杂质。此外，高效液相色谱较薄层层析色谱的分辨率高，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。

## 2.2 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五大部分，前四大系统又被称为液相色谱的硬件系统，本节重点对此进行介绍，对结果处理系统只做一般性介绍。

### 2.2.1 高压输液系统

高效液相色谱仪输液系统包括贮液罐、高压输液泵和梯度洗脱装置等。

(1)贮液系统：溶剂贮存器用来供给足够数量的符合要求的流动相，以完成分析工作。对溶剂贮存器的要求是：①必须有足够的容积，以备重复分析时保证供液；②脱气方便；③能承受一定的压力；④所选用的材质对所用溶剂都是惰性的。

溶剂贮存器一般是以不锈钢、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，在梯度洗脱时尤其突出。常用的脱气方法如下：

①低压脱气法 电磁搅拌、水泵抽空，可同时加温或向溶剂中吹氦气。由于抽真空或加热过程中可能引起流动相中低沸点溶剂的挥发，进而影响其组成，故此法不适用于对以低沸点溶剂为强溶剂、且色谱系统对流动相中强溶剂十分敏感的流动相的脱气。

②吹氦脱气法：氦气经由一圆筒过滤器通入流动相中，在 0.5kg/cm² 压力下保持 10～15min，氦气的小气泡可将溶于流动相中的空气带出。此法简单方便，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。

③超声波脱气法：将流动相瓶置于超声波清洗槽中，以水为介质超声脱气。一般 500ml 溶液约需超声 20～30min 即可达到驱气目的。此法方便，不影响溶剂的组成，并适用于各种溶剂，目前国内使用的较为普遍。使用此法需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%，以保证保留时间的重复和定性、定量的精度。

②输出压力高：要求最高压力为 35～50MPa/cm²。

③流量范围宽：一般要求在 0.001～10ml/min 范围任选。

④耐酸、碱和缓冲液腐蚀。

⑤压力波动小，更换溶剂方便，死空间小，易于清洗和更换溶剂。

⑥具有梯度洗脱功能。

高压泵的分类，按排液性能可分为恒流泵和恒压泵；按机械结构又可分为液压隔膜泵、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稳定不变的压力，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：填料装填得不均匀而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粘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得优越，故目前使用的很普遍。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) 高压输液泵的结构：

①液压隔膜泵。这种泵的特点是制造工艺要求低，高压密封易于解决。缺点是排、吸液切换时压力波动较大，其结构如图 2.4 所示。

当柱塞作往复运动时，泵体内的隔膜受油压的作用，作‘吸’和‘压’的运动，当柱塞推入缸体时，泵头出口的单向阀打开，同时流动相进口的单向阀关闭，此时输出流动相；反之，当柱塞从缸体向外拉时，流动相入口的单向阀打开，出口的单向阀关闭，一定量的流动相被吸入缸体；通过调节泵活塞运动的冲程就可以得到不同的压力输出，从而达到控制流量的目的。

②气动放大泵。其特点是制造容易，输液时压力稳定无脉动。缺点是流量调节不方便，很少用于梯度洗脱。在色谱柱系统流路阻力变化时，流量亦随之改变。目前多用于装柱。其结构如图 2.5 所示。

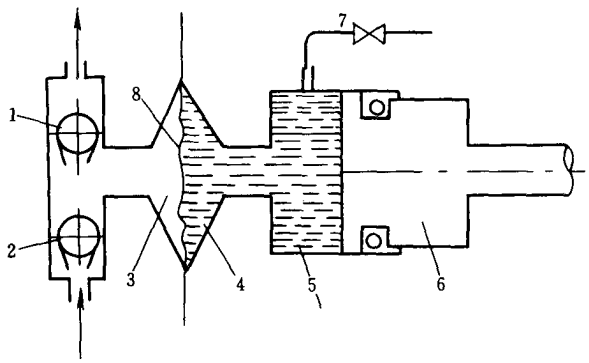



图 2.4 液压隔膜泵结构示意图
(1,2 进出口单向阀；3 载液缸；
4 压力传递介质缸；5 压力传递介质；6 柱塞；
7 压力传递介质输入阀；8 压力传递隔膜)

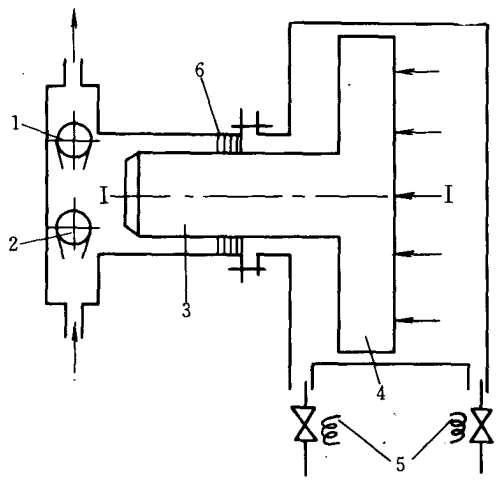



图 2.5 气动放大泵结构示意图
(Ⅰ 气缸；Ⅱ 液缸；1,2 进出口单向阀；
3 柱 塞 4 气缸活塞；5 电磁阀；6 密封环)

气动放大泵的工作原理以流体的压力传导原理

$$P_1S_1 = P_2S_2$$

为依据。压力为 $P_1$ 的低压气体推动大面积气缸活塞 Ⅰ，则在小面积液缸柱塞 Ⅱ 输出压力增大至 $P_2$ 的液体，压力增大的倍数完全取决于 Ⅰ 和 Ⅱ 两活塞的面积比。气动放大泵属于恒压泵，泵体一次吸入液体的体积可以从数 10ml 至 100ml 以上，具体数值取决于液缸的体积。

③螺旋注射泵(电动螺旋泵)。这种泵流量稳定，属恒流泵。缺点是间断式供液，更换溶剂时清洗不方便。采用双缸结构解决了间歇供液的问题，但清洗困难仍无法克服。目前多用于超临界色谱。其结构如图 2.6 所示。

此泵相当于一个大型注射器，柱塞起着注射器芯的作用。柱塞在作一次吸液动作之后，柱体内储存的液体通过柱塞的等速推移，输出无脉动的、恒流的流动相。泵的压力主要取决于色谱柱的阻力，泵的流量由柱塞恒移的速度调节。

④往复柱塞泵。这是目前在高效液相色谱仪中采用最广泛的一种泵，其结构原理如图 2.7 所示。由于这种泵的柱塞往复运动频率较高，所以对密封环的耐磨性及单向阀的刚性和精度要求都很高。密封环一般采用聚四氟乙烯添加剂材料制造，单向阀的球、阀座及柱塞则用人造宝石材料。往复泵有单柱塞、双柱塞（又分为并联式、补偿式或串联式、压吸入式等）和三柱塞泵等。一般来说，柱塞增加，其流量更平稳、脉动小。但构造也相对复杂，故障率明显增加。

Ⅰ.单柱塞泵 其结构如图 2.7 所示。这种泵压力的流量波动大。采取一些必要的措施如增加阻尼器，对凸轮形状作特别设计以及利用先进的电子技术也可获得满意的结果，如岛津公司的 LC－3A 液相色谱仪所用的单柱塞泵，采取在排液冲程结束瞬间突然加速吸液，然后立即

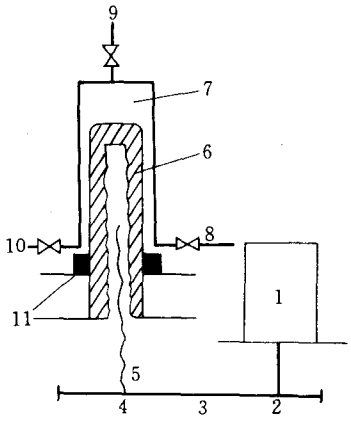



图 2.6 螺旋注射泵结构示意图
(1 电机;2,3,4 传动齿轮;5 丝杠;6 柱塞;
7 液缸;8,9,10 高压针形阀;11 密封圈)

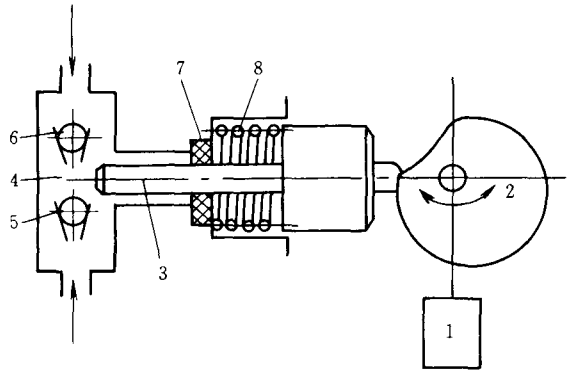



图 2.7 单柱塞泵结构示意图
(1 电机;2 凸轮;3 柱塞;4 泵腔;
5,6 吸排液单向阀;7 密封环;8

高速排液，使压力很快恢复到原有状态后，再匀速排液。其排液特征如图 2.8 所示。

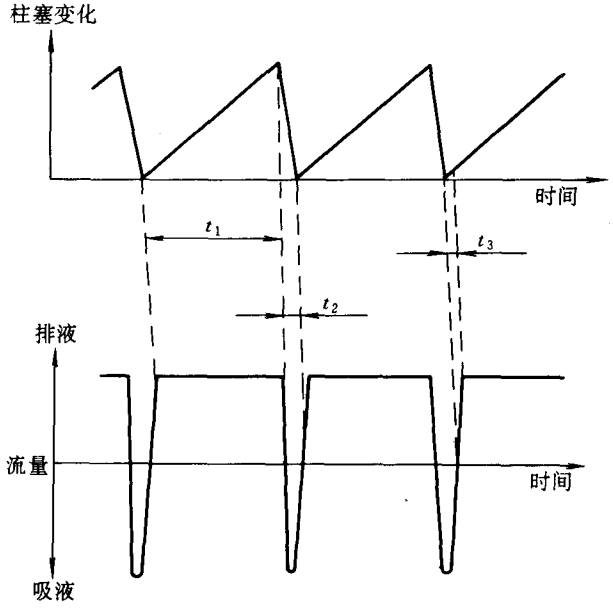



图 2.8 单柱塞泵柱塞变位与流量特性曲线

Ⅱ.双柱塞并联泵：即两个泵头并联使用，凸轮相差 180°。其排液特征如图 2.9 所示。为进一步改进泵的性能，把凸轮 360°曲线分为匀加速、匀速和匀减速三段。凸轮相差 90°，排液特性见图 2.10。图 2.11 是 PE 公司系列－3 液相色谱仪所采用的双塞并联结构示意图。

Ⅲ.双柱塞补偿泵：其结构如图 2.12 所示，主、副泵腔容积比为 2∶1。当主泵排液时，其中 50%的液体被副泵头吸入，另 50%输入色谱柱系统；当主泵头吸液时，副泵头将原先吸入的 50%的液体再供给色谱柱系统。其排液特征如图 2.13 所示。

这种结构又叫往复串联式泵，它比并联式的结构少用两组单向阀。由于单向阀的沾污往往

需要全本请访问 www.ertongbook.com