

## 高效液相色谱 HPLC 培训教程（经典）

### I. 概论

#### 一、液相色谱理论发展简况

色谱法的分离原理是：溶于流动相(mobile phase)中的各组分经过固定相时，由于与固定相(stationary phase)发生作用（吸附、分配、离子吸引、排阻、亲和）的大小、强弱不同，在固定相中滞留时间不同，从而先后从固定相中流出。又称为层析法、层析法。

色谱法最早是由俄国植物学家茨维特（Tswett）在 1906 年研究用碳酸钙分离植物色素时发现的，色谱法(Chromatography)因之得名。后来在此基础上发展出纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法。

液相色谱法开始阶段是用大直径的玻璃管柱在室温和常压下用液位差输送流动相，称为经典液相色谱法，此方法柱效低、时间长（常有几个小时）。高效液相色谱法(High performance Liquid Chromatography, HPLC)是在经典液相色谱法的基础上，于 60 年代后期引入了气相色谱理论而迅速发展起来的。它与经典液相色谱法的区别是填料颗粒小而均匀，小颗粒具有高柱效，但会引起高阻力，需用高压输送流动相，故又称高压液相色谱法(High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)。又因分析速度快而称为高速液相色谱法(High Speed Liquid Chromatography, HSLP)。也称现代液相色谱。

#### 二、HPLC 的特点和优点

HPLC 有以下特点：

高压-压力可达 150~300Kg/cm<sup>2</sup>。色谱柱每米降压为 75 Kg/cm<sup>2</sup> 以上。

高速-流速为 0.1~10.0 ml/min。

高效-可达 5000 塔板每米。在一根柱中同时分离成份可达 100 种。

高灵敏度-紫外检测器灵敏度可达 0.01ng。同时消耗样品少。

HPLC 与经典液相色谱相比有以下优点：

速度快-通常分析一个样品在 15~30 min，有些样品甚至在 5 min 内即可完成。

分辨率高-可选择固定相和流动相以达到最佳分离效果。

灵敏度高-紫外检测器可达 0.01ng，荧光和电化学检测器可达 0.1pg。

柱子可反复使用-用一根色谱柱可分离不同的化合物。

样品量少，容易回收-样品经过色谱柱后不被破坏，可以收集单一组分或做制备。

#### 三、色谱法分类

按两相的物理状态可分为：气相色谱法(GC)和液相色谱法(LC)。气相色谱法适用于分离挥发性化合物。GC 根据固定相不同又可分为气固色谱法(GSC)和气液色谱法(GLC)，其中以 GLC 应用最广。液相色谱法适用于分离低挥发性或非挥发性、热稳定性差的物质。LC 同样可分为液固色谱法(LSC)和液液色谱法(LLC)。此外还有超临界流体色谱法(SFC)，它以超临界流体（介于气体和液体之间的一种物相）为流动相（常用 CO<sub>2</sub>），因其扩散系数大，能很快达到平衡，故分析时间短，特别适用于手性化合物的拆分。

按原理分为吸附色谱法(AC)、分配色谱法(DC)、离子交换色谱法(IEC)、排阻色谱法(EC，又称分子筛、凝胶过滤(GFC)、凝胶渗透色谱法(GPC)和亲和色谱法，此外还有电泳。按操作形式可分为纸色谱法(PC)、薄层色谱法(TLC)、柱色谱法。

#### 四、色谱分离原理

高效液相色谱法按分离机制的不同分为液固吸附色谱法、液液分配色谱法（正相与反相）、离子交换色谱法、离子对色谱法及分子排阻色谱法。

##### 1. 液固色谱法

使用固体吸附剂，被分离组分在色谱柱上分离原理是根据固定相对组分吸附力大小不同而分离。分离过程是一个吸附—解吸附的平衡过程。常用的吸附剂为硅胶或氧化铝，粒度 5~10 μm。适用于分离分子量 200~1000 的组分，大多数用于非离子型化合物，离子型化合物易产生拖尾。常用于分离同分异构体。

##### 2. 液液色谱法

使用将特定的液态物质涂于担体表面，或化学键合于担体表面而形成的固定相，分离原理是根据被分离的组分在流动相和固定相中溶解度不同而分离。分离过程是一个分配平衡过程。

涂布式固定相应具有良好的惰性；流动相必须预先用固定相饱和，以减少固定相从担体表面流失；温度的变化和不同批号流动相的区别常引起柱子的变化；另外在流动相中存在的固定相也使样品的分离和收集复杂化。由于涂布式固定相很难避免固定液流失，现在已很少采用。现在多采用的是化学键合固定相，如 C18、C8、氨基柱、氰基柱和苯基柱。

液液色谱法按固定相和流动相的极性不同可分为正相色谱法 (NPC) 和反相色谱法 (RPC)。

#### 正相色谱法

采用极性固定相(如聚乙二醇、氨基与腈基键合相)；流动相为相对非极性的疏水性溶剂(烷烃类如正己烷、环己烷)，常加入乙醇、异丙醇、四氢呋喃、三氯甲烷等以调节组分的保留时间。常用于分离中等极性和极性较强的化合物(如酚类、胺类、羰基类及氨基酸类等)。

#### 反相色谱法

一般用非极性固定相(如 C18、C8)；流动相为水或缓冲液，常加入甲醇、乙腈、异丙醇、丙酮、四氢呋喃等与水互溶的有机溶剂以调节保留时间。适用于分离非极性和极性较弱的化合物。RPC 在现代液相色谱中应用最为广泛，据统计，它占整个 HPLC 应用的 80% 左右。

随着柱填料的快速发展，反相色谱法的应用范围逐渐扩大，现已应用于某些无机样品或易解离样品的分析。为控制样品在分析过程的解离，常用缓冲液控制流动相的 pH 值。但需要注意的是，C18 和 C8 使用的 pH 值通常为 2.5~7.5 (2~8)，太高的 pH 值会使硅胶溶解，太低的 pH 值会使键合的烷基脱落。有报告新商品柱可在 pH 1.5~10 范围操作。

正相色谱法与反相色谱法比较表

	正相色谱法	反相色谱法
固定相极性	高~中	中~低
流动相极性	低~中	中~高
组分洗脱次序	极性小先洗出	极性大先洗出

从上表可看出，当极性为中等时正相色谱法与反相色谱法没有明显的界线(如氨基键合固定相)。

### 3. 离子交换色谱法

固定相是离子交换树脂，常用苯乙烯与二乙烯交联形成的聚合物骨架，在表面末端芳环上接上羧基、磺酸基(称阳离子交换树脂)或季氨基(阴离子交换树脂)。被分离组分在色谱柱上分离原理是树脂上可电离离子与流动相中具有相同电荷的离子及被测组分的离子进行可逆交换，根据各离子与离子交换基团具有不同的电荷吸引力而分离。

缓冲液常用作离子交换色谱的流动相。被分离组分在离子交换柱中的保留时间除跟组分离子与树脂上的离子交换基团作用强弱有关外，它还受流动相的 pH 值和离子强度影响。pH 值可改变化合物的解离程度，进而影响其与固定相的作用。流动相的盐浓度大，则离子强度高，不利于样品的解离，导致样品较快流出。

离子交换色谱法主要用于分析有机酸、氨基酸、多肽及核酸。

### 4. 离子对色谱法

又称偶离子色谱法，是液液色谱法的分支。它是根据被测组分离子与离子对试剂离子形成中性的离子对化合物后，在非极性固定相中溶解度增大，从而使其分离效果改善。主要用于分析离子强度大的酸碱物质。

分析碱性物质常用的离子对试剂为烷基磺酸盐，如戊烷磺酸钠、辛烷磺酸钠等。另外高氯酸、三氟乙酸也可与多种碱性样品形成很强的离子对。

分析酸性物质常用四丁基季铵盐，如四丁基溴化铵、四丁基铵磷酸盐。

离子对色谱法常用 ODS 柱（即 C18），流动相为甲醇-水或乙腈-水，水中加入  $3 \sim 10$  mmol/L 的离子对试剂，在一定的 pH 值范围内进行分离。被测组分保留时间与离子对性质、浓度、流动相组成及其 pH 值、离子强度有关。

## 5. 排阻色谱法

固定相是有一定孔径的多孔性填料，流动相是可以溶解样品的溶剂。小分子量的化合物可以进入孔中，滞留时间长；大分子量的化合物不能进入孔中，直接随流动相流出。它利用分子筛对分子量大小不同的各组分排阻能力的差异而完成分离。常用于分离高分子化合物，如组织提取物、多肽、蛋白质、核酸等。

## II. 基本概念和理论

### 一、基本概念和术语

#### 1. 色谱图和峰参数

色谱图(chromatogram)——样品流经色谱柱和检测器，所得到的信号-时间曲线，又称色谱流出曲线(elution profile)。

基线(base line)——经流动相冲洗，柱与流动相达到平衡后，检测器测出一段时间的流出曲线。一般应平行于时间轴。

噪音(noise)——基线信号的波动。通常因电源接触不良或瞬时过载、检测器不稳定、流动相含有气泡或色谱柱被污染所致。

漂移(drift)——基线随时间的缓缓变化。主要由于操作条件如电压、温度、流动相及流量的不稳定所引起，柱内的污染物或固定相不断被洗脱下来也会产生漂移。

色谱峰(peak)——组分流经检测器时响应的连续信号产生的曲线。流出曲线上的突起部分。正常色谱峰近似于对称形正态分布曲线（高斯 Gauss 曲线）。不对称色谱峰有两种：前延峰(leading peak)和拖尾峰(tailing peak)。前者少见。

拖尾因子(tailing factor, T)，用以衡量色谱峰的对称性。也称为对称因子(symmetry factor)或不对称因子(asymmetry factor)。《中国药典》规定 T 应为  $0.95 \sim 1.05$ 。T < 0.95 为前延峰，T > 1.05 为拖尾峰。

峰底-基线上峰的起点至终点的距离。

峰高(peak height, h) 峰的最高点至峰底的距离。

峰宽 (peak width, W) 峰两侧拐点处所作两条切线与基线的两个交点间的距离。W = 4σ

半峰宽 (peak width at half-height, Wh/2) - 峰高一半处的峰宽。Wh/2 = 2.355σ

标准偏差 (standard deviation, σ) - 正态分布曲线  $x = \pm 1$  时 (拐点) 的峰宽之半。正常峰的拐点在峰高的 0.607 倍处。标准偏差的大小说明组分在流出色谱柱过程中的分散程度。σ 小，分散程度小、极点浓度高、峰形瘦、柱效高；反之，σ 大，峰形胖、柱效低。

峰面积(peak area, A) - 峰与峰底所包围的面积。

#### 2. 定性参数 (保留值)

死时间(dead time,  $t_0$ )——不保留组分的保留时间。即流动相 (溶剂) 通过色谱柱的时间。在反相 HPLC 中可用苯磺酸钠来测定死时间。

死体积(dead volume,  $V_0$ )——由进样器进样口到检测器流动池未被固定相所占据的空间。

它包括 4 部分：进样器至色谱柱管路体积、柱内固定相颗粒间隙 (被流动相占据,  $V_m$ )、柱出口管路体积、检测器流动池体积。其中只有  $V_m$  参与色谱平衡过程，其它 3 部分只起峰扩展作用。为防止峰扩展，这 3 部分体积应尽量减小。 $V_0 = F \times t_0$  (F 为流速)

保留时间(retention time,  $t_R$ )——从进样开始到某个组分在柱后出现浓度极大值的时间。

保留体积(retention volume,  $V_R$ )——从进样开始到某组分在柱后出现浓度极大值时流出溶剂的体积。又称洗脱体积。 $V_R = F \times t_R$

调整保留时间(adjusted retention time,  $t'_R$ )——扣除死时间后的保留时间。也称折合保留时间(reduced retention time)。在实验条件 (温度、固定相等) 一定时， $t'_R$  只决定于组分的性质，因此， $t'_R$  (或  $t_R$ ) 可用于定性。 $t'_R = t_R - t_0$

调整保留体积(adjusted retention volume,  $V'_R$ )——扣除死体积后的保留体积。

### 3. 柱效参数

理论塔板数(theoretical plate number,  $N$ )--用于定量表示色谱柱的分离效率(简称柱效)。

$N$ 取决于固定相的种类、性质(粒度、粒径分布等)、填充状况、柱长、流动相的种类和流速及测定柱效所用物质的性质。在一张多组分数谱图上,如果各组分含量相当,则后洗脱的峰比前面的峰要逐渐加宽,峰高则逐渐降低。

用半峰宽计算理论塔板数比用峰宽计算更为方便和常用,因为半峰宽更易准确测定,尤其是对稍有拖尾的峰。

$N$ 与柱长成正比,柱越长, $N$ 越大。用 $N$ 表示柱效时应注明柱长,如果未注明,则表示柱长为1米时的理论塔板数。(一般HPLC柱的 $N$ 在1000以上。)

若用调整保留时间( $t'_R$ )计算理论塔板数,所得值称为有效理论塔板数( $N$ 有效或 $N_{eff}$ )。理论塔板高度(theoretical plate height,  $H$ )--每单位柱长的方差。实际应用时往往用柱长 $L$ 和理论塔板数计算。

### 4. 相平衡参数

分配系数(distribution coefficient,  $K$ )--在一定温度下,化合物在两相间达到分配平衡时,在固定相与流动相中的浓度之比。

分配系数与组分、流动相和固定相的热力学性质有关,也与温度、压力有关。在不同的色谱分离机制中, $K$ 有不同的概念:吸附色谱法为吸附系数,离子交换色谱法为选择性系数(或称交换系数),凝胶色谱法为渗透参数。但一般情况可用分配系数来表示。

在条件(流动相、固定相、温度和压力等)一定,样品浓度很低时( $C_s$ 、 $C_m$ 很小)时, $K$ 只取决于组分的性质,而与浓度无关。这只是理想状态下的色谱条件,在这种条件下,得到的色谱峰为正常峰;在许多情况下,随着浓度的增大, $K$ 减小,这时色谱峰为拖尾峰;而有时随着溶质浓度增大, $K$ 也增大,这时色谱峰为前延峰。因此,只有尽可能减少进样量,使组分在柱内浓度降低, $K$ 恒定时,才能获得正常峰。

在同一色谱条件下,样品中 $K$ 值大的组分在固定相中滞留时间长,后流出色谱柱; $K$ 值小的组分则滞留时间短,先流出色谱柱。混合物中各组分的分配系数相差越大,越容易分离,因此混合物中各组分的分配系数不同是色谱分离的前提。

在HPLC中,固定相确定后, $K$ 主要受流动相的性质影响。实践中主要靠调整流动相的组成配比及pH值,以获得组分间的分配系数差异及适宜的保留时间,达到分离的目的。容量因子(capacity factor,  $k$ )--化合物在两相间达到分配平衡时,在固定相与流动相中的量之比。因此容量因子也称质量分配系数。

容量因子的物理意义:表示一个组分在固定相中停留的时间( $t'_R$ )是不保留组分保留时间( $t_0$ )的几倍。 $k=0$ 时,化合物全部存在于流动相中,在固定相中不保留, $t'_R=0$ ;  $k$ 越大,说明固定相对此组分的容量越大,出柱慢,保留时间越长。

容量因子与分配系数的不同点是: $K$ 取决于组分、流动相、固定相的性质及温度,而与体积 $V_s$ 、 $V_m$ 无关; $k$ 除了与性质及温度有关外,还与 $V_s$ 、 $V_m$ 有关。由于 $t'_R$ 、 $t_0$ 较 $V_s$ 、 $V_m$ 易于测定,所以容量因子比分配系数应用更广泛。

选择性因子(selectivity factor,  $\alpha$ )--相邻两组分的分配系数或容量因子之比。 $\alpha$ 又称为相对保留时间(《美国药典》)。

要使两组分得到分离,必须使 $\alpha \neq 1$ 。 $\alpha$ 与化合物在固定相和流动相中的分配性质、柱温有关,与柱尺寸、流速、填充情况无关。从本质上来说, $\alpha$ 的大小表示两组分在两相间的平衡分配热力学性质的差异,即分子间相互作用力的差异。

### 5. 分离参数

分离度(resolution,  $R$ )--相邻两峰的保留时间之差与平均峰宽的比值。也叫分辨率,表示相邻两峰的分离程度。 $R=1$ 时,称为 $4\sigma$ 分离,两峰基本分离,裸露峰面积为95.4%,内侧峰基重叠约2%。 $R=1.5$ 时,称为 $6\sigma$ 分离,裸露峰面积为99.7%。 $R \geq 1.5$ 称为完全分离。

中国药典规定  $R$  应大于 1.5。

提高分离度有三种途径：①增加塔板数。方法之一是增加柱长，但这样会延长保留时间、增加柱压。更好的方法是降低塔板高度，提高柱效。②增加选择性。当  $\alpha = 1$  时， $R = 0$ ，无论柱效有多高，组分也不可能分离。一般可以采取以下措施来改变选择性：a. 改变流动相的组成及 pH 值；b. 改变柱温；c. 改变固定相。③改变容量因子。这常常是提高分离度的最容易方法，可以通过调节流动相的组成来实现。 $k_2$  趋于 0 时， $R$  也趋于 0； $k_2$  增大， $R$  也增大。但  $k_2$  不能太大，否则不但分离时间延长，而且峰形变宽，会影响分离度和检测灵敏度。一般  $k_2$  在 1~10 范围内，最好为 2~5，窄径柱可更小些。

## 二、塔板理论

### 1. 塔板理论的基本假设

塔板理论是 Martin 和 Synger 首先提出的色谱热力学平衡理论。它把色谱柱看作分馏塔，把组分在色谱柱内的分离过程看成在分馏塔中的分馏过程，即组分在塔板间隔内的分配平衡过程。塔板理论的基本假设为：

- 1) 色谱柱内存在许多塔板，组分在塔板间隔（即塔板高度）内完全服从分配定律，并很快达到分配平衡。
- 2) 样品加在第 0 号塔板上，样品沿色谱柱轴方向的扩散可以忽略。
- 3) 流动相在色谱柱内间歇式流动，每次进入一个塔板体积。
- 4) 在所有塔板上分配系数相等，与组分的量无关。

虽然以上假设与实际色谱过程不符，如色谱过程是一个动态过程，很难达到分配平衡；组分沿色谱柱轴方向的扩散是不可避免的。但是塔板理论导出了色谱流出曲线方程，成功地解释了流出曲线的形状、浓度极大点的位置，能够评价色谱柱柱效。

### 2. 色谱流出曲线方程及定量参数（峰高 $h$ 和峰面积 $A$ ）

由色谱流出曲线方程可知：当  $t = t_R$  时，浓度  $C$  有极大值。 $C_{max}$  就是色谱峰的峰高。因此：①当实验条件一定时（即  $\sigma$  一定），峰高  $h$  与组分的量  $C_0$ （进样量）成正比，所以正常峰的峰高可用于定量分析。②当进样量一定时， $\sigma$  越小（柱效越高），峰高越高，因此提高柱效能提高 HPLC 分析的灵敏度。

由流出曲线方程对  $V(0 \sim \infty)$  求积分，即得出色谱峰面积  $A$ 。可见  $A$  相当于组分进样量  $C_0$ ，因此是常用的定量参数。把  $C_{max} = h$  和  $Wh/2 = 2.355 \sigma$  代入上式，即得  $A =$

$1.064 \times Wh/2 \times h$ ，此为正常峰的峰面积计算公式。

## 三、速率理论（又称随机模型理论）

### 1. 液相色谱速率方程

1956 年荷兰学者 Van Deemter 等人吸收了塔板理论的概念，并把影响塔板高度的动力学因素结合起来，提出了色谱过程的动力学理论——速率理论。它把色谱过程看作一个动态非平衡过程，研究过程中的动力学因素对峰展宽（即柱效）的影响。

后来 Giddings 和 Snyder 等人在 Van Deemter 方程（后称气相色谱速率方程）的基础上，根据液体与气体的性质差异，提出了液相色谱速率方程（即 Giddings 方程）。

### 2. 影响柱效的因素

1) 涡流扩散 (eddy diffusion)。由于色谱柱内填充剂的几何结构不同，分子在色谱柱中的流速不同而引起的峰展宽。涡流扩散项  $A = 2 \lambda dp$ ， $dp$  为填料直径， $\lambda$  为填充不规则因子，填充越不均匀  $\lambda$  越大。HPLC 常用填料粒度一般为 3~10  $\mu m$ ，最好 3~5  $\mu m$ ，粒度分布  $RSD \leq 5\%$ 。但粒度太小难于填充均匀（ $\lambda$  大），且会使柱压过高。大而均匀（球形或近球形）的颗粒容易填充规则均匀， $\lambda$  越小。总的说来，应采用细而均匀的载体，这样有助于提高柱效。毛细管无填料， $A = 0$ 。

2) 分子扩散 (molecular diffusion)。又称纵向扩散。由于进样后溶质分子在柱内存在浓度梯度，导致轴向扩散而引起的峰展宽。分子扩散项  $B/u = 2 \gamma D_m/u$ 。 $u$  为流动相线速度，分子在柱内的滞留时间越长（ $u$  小），展宽越严重。在低流速时，它对峰形的影响较大。 $D_m$  为分子在流动相中的扩散系数，由于液相的  $D_m$  很小，通常仅为气相的  $10^{-4} \sim 10^{-5}$ ，因

此在 HPLC 中，只要流速不太低的话，这一项可以忽略不计。 $\gamma$  是考虑到填料的存在使溶质分子不能自由地轴向扩散，而引入的柱参数，用以对  $D_m$  进行校正。 $\gamma$  一般在 0.6~0.7 左右，毛细管柱的  $\gamma=1$ 。

3) 传质阻抗 (mass transfer resistance)。由于溶质分子在流动相、静态流动相和固定相中的传质过程而导致的峰展宽。溶质分子在流动相和固定相中的扩散、分配、转移的过程并不是瞬间达到平衡，实际传质速度是有限的，这一时间上的滞后使色谱柱总是在非平衡状态下工作，从而产生峰展宽。液相色谱的传质阻抗项  $C_u$  又分为三项。

①流动相传质阻抗  $H_m=C_m d_p^2 / D_m$ ， $C_m$  为常数。这是由于在一个流路中流路中心和边缘的流速不等所致。靠近填充颗粒的流动相流速较慢，而中心较快，处于中心的分子还未来得及与固定相达到分配平衡就随流动相前移，因而产生峰展宽。

②静态流动相传质阻抗  $H_{sm}=C_{sm} d_p^2 / D_m$ ， $C_{sm}$  为常数。这是由于溶质分子进入处于固定相孔穴内的静止流动相中，晚回到流路中而引起峰展宽。 $H_{sm}$  对峰展宽的影响在整个传质过程中起着主要作用。固定相的颗粒越小，微孔孔径越大，传质阻力就越小，传质速率越高。所以改进固定相结构，减小静态流动相传质阻力，是提高液相色谱柱效的关键。

$H_m$  和  $H_{sm}$  都与固定相的粒径平方  $d_p^2$  成正比，与扩散系数  $D_m$  成反比。因此应采用低粒度固定相和低粘度流动相。高柱温可以增大  $D_m$ ，但用有机溶剂作流动相时，易产生气泡，因此一般采用室温。

③固定相传质阻抗  $H_s=C_s d_f^2 / D_s$  (液液分配色谱)， $C_s$  为常数， $d_f$  为固定液的液膜厚度， $D_s$  为分子在固定液中的扩散系数。在分配色谱中  $H_s$  与  $d_f$  的平方成正比，在吸附色谱中  $H_s$  与吸附和解吸速度成反比。因此只有在厚涂层固定液、深孔离子交换树脂或解吸速度慢的吸附色谱中， $H_s$  才有明显影响。采用单分子层的化学键合固定相时  $H_s$  可以忽略。

从速率方程式可以看出，要获得高效能的色谱分析，一般可采用以下措施：①进样时间要短。②填料粒度要小。③改善传质过程。过高的吸附作用力可导致严重的峰展宽和拖尾，甚至不可逆吸附。④适当的流速。以  $H$  对  $u$  作图，则有一最佳线速度  $u_{opt}$ ，在此线速度时， $H$  最小。一般在液相色谱中， $u_{opt}$  很小 (大约 0.03~0.1mm/s)，在这样的线速度下分析样品需要很长时间，一般来说都选在 1mm/s 的条件下操作。⑤较小的检测器死体积。

### 3. 柱外效应

速率理论研究的是柱内峰展宽因素，实际在柱外还存在引起峰展宽的因素，即柱外效应 (色谱峰在柱外死空间里的扩展效应)。色谱峰展宽的总方差等于各方差之和，即：

$\sigma_2 = \sigma_2 \text{柱内} + \sigma_2 \text{柱外} + \sigma_2 \text{其它柱外效应}$  主要由低劣的进样技术、从进样点到检测池之间除柱子本身以外的所有死体积所引起。为了减少柱外效应，首先应尽可能减少柱外死体积，如使用“零死体积接头”连接各部件，管道对接宜呈流线形，检测器的内腔体积应尽可能小。研究表明柱外死体积之和应  $< VR/2$ 。其次，希望将样品直接进在柱头的中心部位，但是由于进样阀与柱间有接头，柱外效应总是存在的。此外，要求进样体积  $\leq VR/2$ 。

柱外效应的直观标志是容量因子  $k$  小的组分 (如  $k < 2$ ) 峰形拖尾和峰宽增加得更为明显； $k$  大的组分影响不显著。由于 HPLC 的特殊条件，当柱子本身效率越高 ( $N$  越大)，柱尺寸越小时，柱外效应越显得突出。而在经典 LC 中则影响相对较小。

### III. HPLC 系统

HPLC 系统一般由输液泵、进样器、色谱柱、检测器、数据记录及处理装置等组成。其中输液泵、色谱柱、检测器是关键部件。有的仪器还有梯度洗脱装置、在线脱气机、自动进样器、预柱或保护柱、柱温控制器等，现代 HPLC 仪还有微机控制系统，进行自动化仪器控制和数据处理。制备型 HPLC 仪还备有自动馏分收集装置。

最早的液相色谱仪由粗糙的高压泵、低效的柱、固定波长的检测器、绘图仪，绘出的峰是通过手工测量计算峰面积。后来的高压泵精度很高并可编程进行梯度洗脱，柱填料从单一品种发展至几百种类型，检测器从单波长至可变波长检测器、可得三维色谱图的二极

管阵列检测器、可确证物质结构的质谱检测器。数据处理不再用绘图仪，逐渐取而代之的是最简单的积分仪、计算机、工作站及网络处理系统。

目前常见的 HPLC 仪生产厂家国外有 Waters 公司、Agilent 公司（原 HP 公司）、岛津公司等，国内有大连依利特公司、上海分析仪器厂、北京分析仪器厂等。

## 一、输液泵

### 1. 泵的构造和性能

输液泵是 HPLC 系统中最重要部件之一。泵的性能好坏直接影响到整个系统的质量和结果的可靠性。输液泵应具备如下性能：①流量稳定，其 RSD 应  $<0.5\%$ ，这对定性定量的准确性至关重要；②流量范围宽，分析型应在  $0.1\sim 10\text{ ml/min}$  范围内连续可调，制备型应能达到  $100\text{ ml/min}$ ；③输出压力高，一般应能达到  $150\sim 300\text{ kg/cm}^2$ ；④液缸容积小；⑤密封性能好，耐腐蚀。

泵的种类很多，按输液性质可分为恒压泵和恒流泵。恒流泵按结构又可分为螺旋注射泵、柱塞往复泵和隔膜往复泵。恒压泵受柱阻影响，流量不稳定；螺旋泵缸体太大，这两种泵已被淘汰。目前应用最多的是柱塞往复泵。

柱塞往复泵的液缸容积小，可至  $0.1\text{ ml}$ ，因此易于清洗和更换流动相，特别适合于再循环和梯度洗脱；改变电机转速能方便地调节流量，流量不受柱阻影响；泵压可达  $400\text{ kg/cm}^2$ 。其主要缺点是输出的脉冲性较大，现多采用双泵系统来克服。双泵按连接方式可分为并联式和串联式，一般说来并联泵的流量重现性较好（RSD 为  $0.1\%$  左右，串联泵为  $0.2\sim 0.3\%$ ），但出故障的机会较多（因多一单向阀），价格也较贵。

### 2. 泵的使用和维护注意事项

为了延长泵的使用寿命和维持其输液的稳定性，必须按照下列注意事项进行操作：

①防止任何固体微粒进入泵体，因为尘埃或其它任何杂质微粒都会磨损柱塞、密封环、缸体和单向阀，因此应预先除去流动相中的任何固体微粒。流动相最好在玻璃容器内蒸馏，而常用的方法是滤过，可采用 Millipore 滤膜（ $0.2\mu\text{m}$  或  $0.45\mu\text{m}$ ）等滤器。泵的入口都应连接砂滤棒（或片）。输液泵的滤器应经常清洗或更换。

②流动相不应含有任何腐蚀性物质，含有缓冲液的流动相不应保留在泵内，尤其是在停泵过夜或更长时间的情况下。如果将含缓冲液的流动相留在泵内，由于蒸发或泄漏，甚至只是由于溶液的静置，就可能析出盐的微细晶体，这些晶体将和上述固体微粒一样损坏密封环和柱塞等。因此，必须泵入纯水将泵充分清洗后，再换成适合于色谱柱保存和有利于泵维护的溶剂（对于反相键合硅胶固定相，可以是甲醇或甲醇-水）。

③泵工作时要小心防止溶剂瓶内的流动相被用完，否则空泵运转也会磨损柱塞、缸体或密封环，最终产生漏液。

④输液泵的工作压力决不要超过规定的最高压力，否则会使高压密封环变形，产生漏液。

⑤流动相应先脱气，以免在泵内产生气泡，影响流量的稳定性，如果有大量气泡，泵就无法正常工作。

#### 如果输液泵产生故障，须查明原因，采取相应措施排除故障：

①没有流动相流出，又无压力指示。原因可能是泵内有大量气体，这时可打开泄压阀，使泵在较大流量（如  $5\text{ ml/min}$ ）下运转，将气泡排尽，也可用一个  $50\text{ ml}$  针筒在泵出口处帮助抽出气体。另一个可能原因是密封环磨损，需更换。

②压力和流量不稳。原因可能是气泡，需要排除；或者是单向阀内有异物，可卸下单向阀，浸入丙酮内超声清洗。有时可能是砂滤棒内有气泡，或被盐的微细晶粒或滋生的微生物部分堵塞，这时，可卸下砂滤棒浸入流动相内超声除气泡，或将砂滤棒浸入稀酸（如  $4\text{ mol/L}$  硝酸）内迅速除去微生物，或将盐溶解，再立即清洗。

③压力过高的原因是管路被堵塞，需要清除和清洗。压力降低的原因则可能是管路有泄漏。检查堵塞或泄漏时应逐段进行。

### 3. 梯度洗脱

HPLC 有等强度(isocratic)和梯度(gradient)洗脱两种方式。等度洗脱是在同一分析周期内流动相组成保持恒定,适合于组分数目较少,性质差别不大的样品。梯度洗脱是在一个分析周期内程序控制流动相的组成,如溶剂的极性、离子强度和 pH 值等,用于分析组分数目多、性质差异较大的复杂样品。采用梯度洗脱可以缩短分析时间,提高分离度,改善峰形,提高检测灵敏度,但是常常引起基线漂移和降低重现性。

梯度洗脱有两种实现方式:低压梯度(外梯度)和高压梯度(内梯度)。

两种溶剂组成的梯度洗脱可按任意程度混合,即有多种洗脱曲线:线性梯度、凹形梯度、凸形梯度和阶梯形梯度。线性梯度最常用,尤其适合于在反相柱上进行梯度洗脱。

在进行梯度洗脱时,由于多种溶剂混合,而且组成不断变化,因此带来一些特殊问题,必须充分重视:

①要注意溶剂的互溶性,不相混溶的溶剂不能用作梯度洗脱的流动相。有些溶剂在一定比例内混溶,超出范围后就不互溶,使用时更要引起注意。当有机溶剂和缓冲液混合时,还可能析出盐的晶体,尤其使用磷酸盐时需特别小心。

②梯度洗脱所用的溶剂纯度要求更高,以保证良好的重现性。进行样品分析前必须进行空白梯度洗脱,以辨认溶剂杂质峰,因为弱溶剂中的杂质富集在色谱柱头后会被强溶剂洗脱下来。用于梯度洗脱的溶剂需彻底脱气,以防止混合时产生气泡。

③混合溶剂的粘度常随组成而变化,因而在梯度洗脱时常出现压力的变化。例如甲醇和水粘度都较小,当二者以相近比例混合时粘度增大很多,此时的柱压大约是甲醇或水为流动相时的两倍。因此要注意防止梯度洗脱过程中压力超过输液泵或色谱柱能承受的最大压力。

④每次梯度洗脱之后必须对色谱柱进行再生处理,使其恢复到初始状态。需让 10~30 倍柱容积的初始流动相流经色谱柱,使固定相与初始流动相达到完全平衡。

## 二、进样器

早期使用隔膜和停流进样器,装在色谱柱入口处。现在大都使用六通进样阀或自动进样器。进样装置要求:密封性好,死体积小,重复性好,保证中心进样,进样时对色谱系统的压力、流量影响小。HPLC 进样方式可分为:隔膜进样、停流进样、阀进样、自动进样。

**1. 隔膜进样。**用微量注射器将样品注入专门设计的与色谱柱相连的进样头内,可把样品直接送到柱头填充床的中心,死体积几乎等于零,可以获得最佳的柱效,且价格便宜,操作方便。但不能在高压下使用(如 10MPa 以上);此外隔膜容易吸附样品产生记忆效应,使进样重复性只能达到 1~2%;加之能耐各种溶剂的橡皮不易找到,常规分析使用受到限制。

**2. 停流进样。**可避免在高压下进样。但在 HPLC 中由于隔膜的污染,停泵或重新启动时往往会出现“鬼峰”;另一缺点是保留时间不准。在以峰的始末信号控制馏分收集的制备色谱中,效果较好。

**3. 阀进样。**一般 HPLC 分析常用六通进样阀(以美国 Rheodyne 公司的 7725 和 7725i 型最常见),其关键部件由圆形密封垫(转子)和固定底座(定子)组成。由于阀接头和连接管死体积的存在,柱效率低于隔膜进样(约下降 5~10%左右),但耐高压(35~40MPa),进样量准确,重复性好(0.5%),操作方便。

六通阀的进样方式有部分装液法和完全装液法两种。①用部分装液法进样时,进样量应不大于定量环体积的 50%(最多 75%),并要求每次进样体积准确、相同。此法进样的准确度和重复性决定于注射器取样的熟练程度,而且易产生由进样引起的峰展宽。②用完全装液法进样时,进样量应不小于定量环体积的 5~10 倍(最少 3 倍),这样才能完全置换定量环内的流动相,消除管壁效应,确保进样的准确度及重复性。

六通阀使用和维护注意事项:①样品溶液进样前必须用 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤,以减少微粒对进样阀的磨损。②转动阀芯时不能太慢,更不能停留在中间位置,否则流动相受阻,使泵内压力剧增,甚至超过泵的最大压力;再转到进样位时,过高的压力将使柱头



损坏。③为防止缓冲盐和样品残留在进样阀中，每次分析结束后应冲洗进样阀。通常可用水冲洗，或先用能溶解样品的溶剂冲洗，再用水冲洗。

4. 自动进样。用于大量样品的常规分析。

### 三、色谱柱

色谱是一种分离分析手段，分离是核心，因此担负分离作用的色谱柱是色谱系统的核心。对色谱柱的要求是柱效高、选择性好，分析速度快等。市售的用于 HPLC 的各种微粒填料如多孔硅胶以及以硅胶为基质的键合相、氧化铝、有机聚合物微球（包括离子交换树脂）、多孔碳等，其粒度一般为 3, 5, 7, 10  $\mu\text{m}$  等，柱效理论值可达 5~16 万/米。对于一般的分析只需 5000 塔板数的柱效；对于同系物分析，只要 500 即可；对于较难分离物质对则可采用高达 2 万的柱子，因此一般 10~30cm 左右的柱长就能满足复杂混合物分析的需要。

柱效受柱内外因素影响，为使色谱柱达到最佳效率，除柱外死体积要小外，还要有合理的柱结构（尽可能减少填充床以外的死体积）及装填技术。即使最好的装填技术，在柱中心部位和沿管壁部位的填充情况总是不一样的，靠近管壁的部位比较疏松，易产生沟流，流速较快，影响冲洗剂的流形，使谱带加宽，这就是管壁效应。这种管壁区大约是从管壁向内算起 30 倍粒径的厚度。在一般的液相色谱系统中，柱外效应对柱效的影响远远大于管壁效应。

#### 1. 柱的构造

色谱柱由柱管、压帽、卡套（密封环）、筛板（滤片）、接头、螺丝等组成。柱管多用不锈钢制成，压力不高于 70 kg/cm<sup>2</sup> 时，也可采用厚壁玻璃或石英管，管内壁要求有很高的光洁度。为提高柱效，减小管壁效应，不锈钢柱内壁多经过抛光。也有人在不锈钢柱内壁涂敷氟塑料以提高内壁的光洁度，其效果与抛光相同。还有使用熔融硅或玻璃衬里的，用于细管柱。色谱柱两端的柱接头内装有筛板，是烧结不锈钢或钛合金，孔径 0.2~20  $\mu\text{m}$  (5~10  $\mu\text{m}$ )，取决于填料粒度，目的是防止填料漏出。

色谱柱按用途可分为分析型和制备型两类，尺寸规格也不同：①常规分析柱（常量柱），内径 2~5mm（常用 4.6mm，国内有 4mm 和 5mm），柱长 10~30cm；②窄径柱（narrow bore，又称细管径柱、半微柱 semi-microcolumn），内径 1~2mm，柱长 10~20cm；③毛细管柱（又称微柱 microcolumn），内径 0.2~0.5mm；④半制备柱，内径 >5mm；⑤实验室制备柱，内径 20~40mm，柱长 10~30cm；⑥生产制备柱内径可达几十厘米。柱内径一般是根据柱长、填料粒径和折合流速来确定，目的是为了避开管壁效应。

#### 2. 柱的发展方向

因强调分析速度而发展出短柱，柱长 3~10cm，填料粒径 2~3  $\mu\text{m}$ 。为提高分析灵敏度，与质谱 (MS) 联接，而发展出窄径柱、毛细管柱和内径小于 0.2mm 的微径柱

(microbore)。细管径柱的优点是：①节省流动相；②灵敏度增加；③样品量少；④能使用长柱达到高分离度；⑤容易控制柱温；⑥易于实现 LC-MS 联用。

但由于柱体积越来越小，柱外效应的影响就更加显著，需要更小池体积的检测器（甚至采用柱上检测），更小死体积的柱接头和连接部件。配套使用的设备应具备如下性能：输液泵能精密输出 1~100  $\mu\text{l}/\text{min}$  的低流量，进样阀能准确、重复地进样微小体积的样品。且因上样量小，要求高灵敏度的检测器，电化学检测器和质谱仪在这方面具有突出优点。

#### 3. 柱的填充和性能评价

色谱柱的性能除了与固定相性能有关外，还与填充技术有关。在正常条件下，填料粒度 >20  $\mu\text{m}$  时，干法填充制备柱较为合适；颗粒 <20  $\mu\text{m}$  时，湿法填充较为理想。填充方法一般有 4 种：①高压匀浆法，多用于分析柱和小规模制备柱的填充；②径向加压法，Waters 专利；③轴向加压法，主要用于装填大直径柱；④干法。柱填充的技术性很强，大多数实验室使用已填充好的商品柱。

必须指出，高效液相色谱柱的获得，装填技术是重要环节，但根本问题还在于填料本身性能的优劣，以及配套的色谱仪系统的结构是否合理。

无论是自己装填的还是购买的色谱柱，使用前都要对其性能进行考察，使用期间或放置一段时间后也要重新检查。柱性能指标包括在一定实验条件下（样品、流动相、流速、温度）下的柱压、理论塔板高度和塔板数、对称因子、容量因子和选择性因子的重复性，或分离度。一般说来容量因子和选择性因子的重复性在 $\pm 5\%$ 或 $\pm 10\%$ 以内。进行柱效比较时，还要注意柱外效应是否有变化。

一份合格的色谱柱评价报告应给出柱的基本参数，如柱长、内径、填料的种类、粒度、色谱柱的柱效、不对称度和柱压降等。

#### 4. 柱的使用和维护注意事项

色谱柱的正确使用和维护十分重要，稍有不慎就会降低柱效、缩短使用寿命甚至损坏。在色谱操作过程中，需要注意下列问题，以维护色谱柱。

① 避免压力和温度的急剧变化及任何机械震动。温度的突然变化或者使色谱柱从高处掉下都会影响柱内的填充状况；柱压的突然升高或降低也会冲动柱内填料，因此在调节流速时应该缓慢进行，在阀进样时阀的转动不能过缓（如前所述）。

② 应逐渐改变溶剂的组成，特别是反相色谱中，不应直接从有机溶剂改变为全部是水，反之亦然。

③ 一般说来色谱柱不能反冲，只有生产者指明该柱可以反冲时，才可以反冲除去留在柱头的杂质。否则反冲会迅速降低柱效。

④ 选择使用适宜的流动相（尤其是 pH），以避免固定相被破坏。有时可以在进样器前面连接一预柱，分析柱是键合硅胶时，预柱为硅胶，可使流动相在进入分析柱之前预先被硅胶“饱和”，避免分析柱中的硅胶基质被溶解。

⑤ 避免将基质复杂的样品尤其是生物样品直接注入柱内，需要对样品进行预处理或者在进样器和色谱柱之间连接一保护柱。保护柱一般是填有相似固定相的短柱。保护柱可以而且应该经常更换。

⑥ 经常用强溶剂冲洗色谱柱，清除保留在柱内的杂质。在进行清洗时，对流路系统中流动相的置换应以相混溶的溶剂逐渐过渡，每种流动相的体积应是柱体积的 20 倍左右，即常规分析需要 50~75ml。

下面列举一些色谱柱的清洗溶剂及顺序，作为参考：硅胶柱以正己烷（或庚烷）、二氯甲烷和甲醇依次冲洗，然后再以相反顺序依次冲洗，所有溶剂都必须严格脱水。甲醇能洗去残留的强极性杂质，己烷使硅胶表面重新活化。反相柱以水、甲醇、乙腈、一氯甲烷（或氯仿）依次冲洗，再以相反顺序依次冲洗。如果下一步分析用的流动相不含缓冲液，那么可以省略最后用水冲洗这一步。一氯甲烷能洗去残留的非极性杂质，在甲醇（乙腈）冲洗时重复注射 100~200 $\mu$ l 四氢呋喃数次有助于除去强疏水性杂质。四氢呋喃与乙腈或甲醇的混合溶液能除去类脂。有时也注射二甲亚砜数次。此外，用乙腈、丙酮和三氟醋酸（0.1%）梯度洗脱能除去蛋白质污染。

阳离子交换柱可用稀酸缓冲液冲洗，阴离子交换柱可用稀碱缓冲液冲洗，除去交换性能强的盐，然后用水、甲醇、二氯甲烷（除去吸附在固定相表面的有机物）、甲醇、水依次冲洗。

⑦ 保存色谱柱时应将柱内充满乙腈或甲醇，柱接头要拧紧，防止溶剂挥发干燥。绝对禁止将缓冲溶液留在柱内静置过夜或更长时间。

⑧ 色谱柱使用过程中，如果压力升高，一种可能是烧结滤片被堵塞，这时应更换滤片或将其取出进行清洗；另一种可能是大分子进入柱内，使柱头被污染；如果柱效降低或色谱峰变形，则可能柱头出现塌陷，死体积增大。

在后两种情况发生时，小心拧开柱接头，用洁净小钢将柱头填料取出 1~2mm 高度（注意把被污染填料取净）再把柱内填料整平。然后用适当溶剂湿润的固定相（与柱内相同）填满色谱柱，压平，再拧紧柱接头。这样处理后柱效能得到改善，但是很难恢复到新柱的水平。

柱子失效通常是柱端部分，在分析柱前装一根与分析柱相同固定相的短柱（5~30mm），可以起到保护、延长柱寿命的作用。采用保护柱会损失一定的柱效，这是值得的。

通常色谱柱寿命在正确使用时可达 2 年以上。以硅胶为基质的填料，只能在 pH2~9 范围内使用。柱子使用一段时间后，可能有一些吸附作用强的物质保留于柱顶，特别是一些有色物质更易看清被吸着在柱顶的填料上。新的色谱柱在使用一段时间后柱顶填料可能塌陷，使柱效下降，这时也可补加填料使柱效恢复。

每次工作完后，最好用洗脱能力强的洗脱液冲洗，例如 ODS 柱宜用甲醇冲洗至基线平衡。当采用盐缓冲溶液作流动相时，使用完后应用无盐流动相冲洗。含卤族元素（氟、氯、溴）的化合物可能会腐蚀不锈钢管道，不宜长期与之接触。装在 HPLC 仪上柱子如不经常使用，应每隔 4~5 天开机冲洗 15 分钟。

#### 四、检测器

检测器是 HPLC 仪的三大关键部件之一。其作用是把洗脱液中组分的量转变为电信号。HPLC 的检测器要求灵敏度高、噪音低（即对温度、流量等外界变化不敏感）、线性范围宽、重复性好和适用范围广。

##### 1. 分类

- 1) 按原理可分为光学检测器（如紫外、荧光、示差折光、蒸发光散射）、热学检测器（如吸附热）、电化学检测器（如极谱、库仑、安培）、电学检测器（电导、介电常数、压电石英频率）、放射性检测器（闪烁计数、电子捕获、氦离子化）以及氢火焰离子化检测器。
- 2) 按测量性质可分为通用型和专属型（又称选择性）。通用型检测器测量的是一般物质均具有的性质，它对溶剂和溶质组分均有反应，如示差折光、蒸发光散射检测器。通用型的灵敏度一般比专属型的低。专属型检测器只能检测某些组分的某一性质，如紫外、荧光检测器，它们只对有紫外吸收或荧光发射的组分有响应。
- 3) 按检测方式分为浓度型和质量型。浓度型检测器的响应与流动相中组分的浓度有关，质量型检测器的响应与单位时间内通过检测器的组分的量有关。
- 4) 检测器还可分为破坏样品和不破坏样品的两种。

##### 2. 性能指标

- 1) 噪音和漂移：在仪器稳定之后，记录基线 1 小时，基线带宽为噪音，基线在 1 小时内的变化为漂移。它们反映检测器电子元件的稳定性，及其受温度和电源变化的影响，如果有流动相从色谱柱流入检测器，那么它们还反映流速（泵的脉动）和溶剂（纯度、含有气泡、固定相流失）的影响。噪音和漂移都会影响测定的准确度，应尽量减小。
- 2) 灵敏度(sensitivity)：表示一定量的样品物质通过检测器时所给出的信号大小。对浓度型检测器，它表示单位浓度的样品所产生的电信号的大小，单位为  $\text{mV} \cdot \text{ml/g}$ 。对质量型检测器，它表示在单位时间内通过检测器的单位质量的样品所产生的电信号的大小，单位为  $\text{mV} \cdot \text{s/g}$ 。
- 3) 检测限(detection limit)

检测器灵敏度的高低，并不等于它检测最小样品量或最低样品浓度能力的高低，因为在定义灵敏度时，没有考虑噪声的大小，而检测限与噪声的大小是直接有关的。

检测限指恰好产生可辨别的信号（通常用 2 倍或 3 倍噪音表示）时进入检测器的某组分的量（对浓度型检测器指在流动相中的浓度——注意与分析方法检测限的区别，单位  $\text{g/ml}$  或  $\text{mg/ml}$ ；对质量型检测器指的是单位时间内进入检测器的量，单位  $\text{g/s}$  或  $\text{mg/s}$ ）。又称为敏感度(detectability)。  $D=2N/S$ ，式中  $N$  为噪声， $S$  为灵敏度。通常是把一个已知量的标准溶液注入到检测器中来测定其检测限的大小。

检测限是检测器的一个主要性能指标，其数值越小，检测器性能越好。值得注意的是，分析方法的检测限除了与检测器的噪声和灵敏度有关外，还与色谱条件、色谱柱和泵的稳定性和各种柱外因素引起的峰展宽有关。

- 4) 线性范围(linear range)：指检测器的响应信号与组分量成直线关系的范围，即在固定灵敏度下，最大与最小进样量（浓度型检测器为组分在流动相中的浓度）之比。也可用响应信号的最大与最小的范围表示，例如 Waters 996 PDA 检测器的线性范围是  $-0.1 \sim 2.0\text{A}$ 。

定量分析的准确与否,关键在于检测器所产生的信号是否与被测样品的量始终呈一定的函数关系。输出信号与样品量最好呈线性关系,这样进行定量测定时既准确又方便。但实际上没有一台检测器能在任何范围内呈线性响应。通常  $A=BCx$ ,  $B$  为响应因子,当  $x=1$  时,为线性响应。对大多数检测器来说,  $x$  只在一定范围内才接近于 1,实际上通常只要  $x=0.98\sim 1.02$  就认为它是呈线性的。

线性范围一般可通过实验确定。我们希望检测器的线性范围尽可能大些,能同时测定主成分和痕量成分。此外还要求池体积小,受温度和流速的影响小,能适合梯度洗脱检测等。

5) 池体积:除制备色谱外,大多数 HPLC 检测器的池体积都小于  $10\mu\text{l}$ 。在使用细管径柱时,池体积应减少到  $1\sim 2\mu\text{l}$  甚至更低,不然检测系统带来的峰扩张问题就会很严重。而且这时池体、检测器与色谱柱的连接、接头等都要精心设计,否则会严重影响柱效和灵敏度。

### 3. 紫外检测器 (ultraviolet detector)

UV 检测器是 HPLC 中应用最广泛的检测器,当检测波长范围包括可见光时,又称为紫外-可见检测器。它灵敏度高,噪音低,线性范围宽,对流速和温度均不敏感,可于制备色谱。由于灵敏度高,因此即使是那些光吸收小、消光系数低的物质也可用 UV 检测器进行微量分析。但要注意流动相中各种溶剂的紫外吸收截止波长。如果溶剂中含有吸光杂质,则会提高背景噪音,降低灵敏度(实际是提高检测限)。此外,梯度洗脱时,还会产生漂移。

注:将溶剂装入 1cm 的比色皿,以空气为参比,逐渐降低入射波长,溶剂的吸光度  $A=1$  时的波长称为溶剂的截止波长。也称极限波长。

中国药典对 UV 法溶剂的要求是:以空气为空白,溶剂和吸收池的吸收度在  $220\sim 240\text{nm}$  范围内不得超过 0.40,在  $241\sim 250\text{nm}$  范围内不得过 0.20,在  $251\sim 300\text{nm}$  范围内不得过 0.10,在  $300\text{nm}$  以上不得过 0.05。

UV 检测器的工作原理是 Lambert-Beer 定律,即当一束单色光透过流动池时,若流动相不吸收光,则吸收度  $A$  与吸光组分的浓度  $C$  和流动池的光径长度  $L$  成正比。

UV 检测器分为固定波长检测器、可变波长检测器和光电二极管阵列检测器 (photodiode array detector, PDAD)。按光路系统来分,UV 检测器可分为单光路和双光路两种。可变波长检测器又可分单波长(单通道)检测器和双波长(双通道)检测器。PDAD 是 80 年代出现的一种光学多通道检测器,它可以对每个洗脱组分进行光谱扫描,经计算机处理后,得到光谱和色谱结合的三维图谱。其中吸收光谱用于定性(确证是否是单一纯物质),色谱用于定量。常用于复杂样品(如生物样品、中草药)的定性定量分析。

### 4. 与检测器有关的故障及其排除

#### 1) 流动池内有气泡

如果有气泡连续不断地通过流动池,将使噪音增大,如果气泡较大,则会在基线上出现许多线状“峰”,这是由于系统内有气泡,需要对流动相进行充分的除气,检查整个色谱系统是否漏气,再加大流量驱除系统内的气泡。如果气泡停留在流动池内,也可能使噪音增大,可采用突然增大流量的办法除去气泡(最好不连接色谱柱);或者启动输液泵的同时,用手指紧压流动池出口,使池内增压,然后放开。可反复操作数次,但要注意不使压力增加太多,以免流动池破裂。

#### 2) 流动池被污染

无论参比池或样品池被污染,都可能产生噪音或基线漂移。可以使用适当溶剂清洗检测池,要注意溶剂的互溶性;如果污染严重,就需要依次采用  $1\text{mol/L}$  硝酸、水和新鲜溶剂冲洗,或者取出池体进行清洗、更换窗口。

#### 3) 光源灯出现故障

紫外或荧光检测器的光源灯使用到极限或者不能正常工作时,可能产生严重噪音,基线漂移,出现平头峰等异常峰,甚至使基线不有回零。这时需要更换光源灯。

#### 4) 倒峰

倒峰的出现可能是检测器的极性接反了,改正后即可变成正峰。用示差折光检测器时,如果组分的折光指数低于流动相的折光指数,也会出现倒峰,这就需要选择合适的流动相。如果流动相中含有紫外吸收的杂质,使用紫外检测器时,无吸收的组分就会产生倒峰,因此必须用高纯度的溶剂作流动相。在死时间附近的尖锐峰往往是由于进样时的压力变化,或者由于样品溶剂与流动相不同所引起的。

### 五、数据处理和计算机控制系统

早期的 HPLC 仪器是用记录仪记录检测信号,再手工测量计算。其后,使用积分仪计算并打印出峰高、峰面积和保留时间等参数。80 年代后,计算机技术的广泛应用使 HPLC 操作更加快速、简便、准确、精密和自动化,现在已可在互联网上远程处理数据。计算机的用途包括三个方面:

①采集、处理和分析数据;②控制仪器;③色谱系统优化和专家系统。

### 六、恒温装置

在 HPLC 仪中色谱柱及某些检测器都要求能准确地控制工作环境温度,柱子的恒温精度要求在  $\pm 0.1 \sim 0.5^\circ\text{C}$  之间,检测器的恒温要求则更高。

温度对溶剂的溶解能力、色谱柱的性能、流动相的粘度都有影响。一般来说,温度升高,可提高溶质在流动相中的溶解度,从而降低其分配系数  $K$ ,但对分离选择性影响不大;还可使流动相的粘度降低,从而改善传质过程并降低柱压。但温度太高易使流动相产生气泡。

色谱柱的不同工作温度对保留时间、相对保留时间都有影响。在凝胶色谱中使用软填料时温度会引起填料结构的变化,对分离有影响;但如使用硬质填料则影响不大。

总的说来,在液固吸附色谱法和化学键合相色谱法中,温度对分离的影响并不显著,通常实验在室温下进行操作。在液固色谱中有时将极性物质(如缓冲剂)加入流动相中以调节其分配系数,这时温度对保留值的影响很大。

不同的检测器对温度的敏感度不一样。紫外检测器一般在温度波动超过  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  时,就会造成基线漂移起伏。示差折光检测器的灵敏度和最小检出量常取决于温度控制精度,因此需控制在  $\pm 0.001^\circ\text{C}$  左右,微吸附热检测器也要求在  $\pm 0.001^\circ\text{C}$  以内。

## IV. 固定相和流动相

在色谱分析中,如何选择最佳的色谱条件以实现最理想分离,是色谱工作者的重要工作,也是用计算机实现 HPLC 分析方法建立和优化的任务之一。本章着重讨论填料基质、化学键合固定相和流动相的性质及其选择。

### 一、基质(担体)

HPLC 填料可以是陶瓷性质的无机物基质,也可以是有机聚合物基质。无机物基质主要是硅胶和氧化铝。无机物基质刚性大,在溶剂中不容易膨胀。有机聚合物基质主要有交联苯乙烯-二乙烯苯、聚甲基丙烯酸酯。有机聚合物基质刚性小、易压缩,溶剂或溶质容易渗入有机基质中,导致填料颗粒膨胀,结果减少传质,最终使柱效降低。

#### 1. 基质的种类

##### 1) 硅胶

硅胶是 HPLC 填料中最普遍的基质。除具有高强度外,还提供一个表面,可以通过成熟的硅烷化技术键合上各种配基,制成反相、离子交换、疏水作用、亲水作用或分子排阻色谱用填料。硅胶基质填料适用于广泛的极性和非极性溶剂。缺点是在碱性水溶性流动相中不稳定。通常,硅胶基质的填料推荐的常规分析 pH 范围为 2~8。

硅胶的主要性能参数有:

- ①平均粒度及其分布。
- ②平均孔径及其分布。与比表面积成反比。
- ③比表面积。在液固吸附色谱法中,硅胶的比表面积越大,溶质的  $k$  值越大。
- ④含碳量及表面覆盖度(率)。在反相色谱法中,含碳量越大,溶质的  $k$  值越大。

- ⑤含水量及表面活性。在液固吸附色谱法中，硅胶的含水量越小，其表面硅醇基的活性越强，对溶质的吸附作用越大。
- ⑥端基封尾。在反相色谱法中，主要影响碱性化合物的峰形。
- ⑦几何形状。硅胶可分为无定形全多孔硅胶和球形全多孔硅胶，前者价格较便宜，缺点是涡流扩散项及柱渗透性差；后者无此缺点。
- ⑧硅胶纯度。对称柱填料使用高纯度硅胶，柱效高，寿命长，碱性成份不拖尾。

2) 氧化铝

具有与硅胶相同的良好物理性质，也能耐较大的 pH 范围。它也是刚性的，不会在溶剂中收缩或膨胀。但与硅胶不同的是，氧化铝键合相在水性流动相中不稳定。不过现在已经出现了在水相中稳定的氧化铝键合相，并显示出优秀的 pH 稳定性。

3) 聚合物

以高交联度的苯乙烯-二乙烯苯或聚甲基丙烯酸酯为基质的填料是用于普通压力下的 HPLC，它们的压力限度比无机填料低。苯乙烯-二乙烯苯基质疏水性强。使用任何流动相，在整个 pH 范围内稳定，可以用 NaOH 或强碱来清洗色谱柱。甲基丙烯酸酯基质本质上比苯乙烯-二乙烯苯疏水性更强，但它可以通过适当的功能基修饰变成亲水性的。这种基质不如苯乙烯-二乙烯苯那样耐酸碱，但也可以承受在 pH13 下反复冲洗。

所有聚合物基质在流动相发生变化时都会出现膨胀或收缩。用于 HPLC 的高交联度聚合物填料，其膨胀和收缩要有限制。溶剂或小分子容易渗入聚合物基质中，因为小分子在聚合物基质中的传质比在陶瓷性基质中慢，所以造成小分子在这种基质中柱效低。对于大分子像蛋白质或合成的高聚物，聚合物基质的效能比得上陶瓷性基质。因此，聚合物基质广泛用于分离大分子物质。

2. 基质的选择

硅胶基质的填料被用于大部分的 HPLC 分析，尤其是小分子量的被分析物，聚合物填料用于大分子量的被分析物质，主要用来制成分子排阻和离子交换柱。

	硅胶	氧化铝	苯乙烯-二乙烯苯	甲基丙烯酸酯
耐有机溶剂	+++	+++	++	++
适用 pH 范围	+	++	+++	++
抗膨胀/收缩	+++	+++	+	+
耐压	+++	+++	++	+
表面化学性质	+++	+	++	+++
效能	+++	++	+	+

注：+++好 ++一般 +差

二、化学键合固定相

将有机官能团通过化学反应共价键合到硅胶表面的游离羟基上而形成的固定相称为化学键合相。这类固定相的突出特点是耐溶剂冲洗，并且可以通过改变键合相有机官能团的类型来改变分离的选择性。

1. 键合相的性质

目前，化学键合相广泛采用微粒多孔硅胶为基体，用烷烃二甲基氯硅烷或烷氧基硅烷与硅胶表面的游离硅醇基反应，形成 Si-O-Si-C 键形的单分子膜而制得。硅胶表面的硅醇基密度约为 5 个/nm<sup>2</sup>，由于空间位阻效应（不可能将较大的有机官能团键合到全部硅醇基上）和其它因素的影响，使得大约有 40~50%的硅醇基未反应。

残余的硅醇基对键合相的性能有很大影响，特别是对非极性键合相，它可以减小键合相表面的疏水性，对极性溶质（特别是碱性化合物）产生次级化学吸附，从而使保留机制复杂化（使溶质在两相间的平衡速度减慢，降低了键合相填料的稳定性。结果使碱性组分

的峰形拖尾)。为尽量减少残余硅醇基,一般在键合反应后,要用三甲基氯硅烷(TMCS)等进行钝化处理,称封端(或称封尾、封顶, end-capping),以提高键合相的稳定性。另一方面,也有些 ODS 填料是不封尾的,以使其与水系流动相有更好的“湿润”性能。

由于不同生产厂家所用的硅胶、硅烷化试剂和反应条件不同,因此具有相同键合基团的键合相,其表面有机官能团的键合量往往差别很大,使其产品性能有很大的不同。键合相的键合量常用含碳量(C%)来表示,也可以用覆盖度来表示。所谓覆盖度是指参与反应的硅醇基数目占硅胶表面硅醇基总数的比例。

pH 值对以硅胶为基质的键合相的稳定性有很大的影响,一般来说,硅胶键合相应是在 pH=2~8 的介质中使用。

## 2. 键合相的种类

化学键合相按键合官能团的极性分为极性和非极性键合相两种。

常用的极性键合相主要有氰基(-CN)、氨基(-NH<sub>2</sub>)和二醇基(DIOL)键合相。极性键合相常用作正相色谱,混合物在极性键合相上的分离主要是基于极性键合基团与溶质分子间的氢键作用,极性强的组分保留值较大。极性键合相有时也可作反相色谱的固定相。

常用的非极性键合相主要有各种烷基(C<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>)和苯基、苯甲基等,以 C<sub>18</sub> 应用最广。非极性键合相的烷基链长对样品容量、溶质的保留值和分离选择性都有影响,一般来说,样品容量随烷基链长增加而增大,且长链烷基可使溶质的保留值增大,并常常可改善分离的选择性;但短链烷基键合相具有较高的覆盖度,分离极性化合物时可得到对称性较好的色谱峰。苯基键合相与短链烷基键合相的性质相似。

另外 C<sub>18</sub> 柱稳定性较高,这是由于长的烷基链保护了硅胶基质的缘故,但 C<sub>18</sub> 基团空间体积较大,使有效孔径变小,分离大分子化合物时柱效较低。

## 3. 固定相的选择

分离中等极性和极性较强的化合物可选择极性键合相。氰基键合相对双键异构体或含双键数不等的环状化合物的分离有较好的选择性。氨基键合相具有较强的氢键结合能力,对某些多官能团化合物如甾体、强心甙等有较好的分离能力;氨基键合相上的氨基能与糖类分子中的羟基产生选择性相互作用,故被广泛用于糖类的分析,但它不能用于分离羰基化合物,如甾酮、还原糖等,因为它们之间会发生反应生成 Schiff 碱。二醇基键合相适用于分离有机酸、甾体和蛋白质。

分离非极性和极性较弱的化合物可选择非极性键合相。利用特殊的反相色谱技术,例如反相离子抑制技术和反相离子对色谱法等,非极性键合相也可用于分离离子型或可离子化的化合物。ODS(octadecyl silane)是应用最为广泛的非极性键合相,它对各种类型的化合物都有很强的适应能力。短链烷基键合相能用于极性化合物的分离,而苯基键合相适用于分离芳香化合物。

另外,美国药典对色谱法规定较严,它规定了柱的长度,填料的种类和粒度,填料分类也较详细,这样使色谱图易于重现;而中国药典仅规定填料种类,未规定柱的长度和粒度,这使检验人员难于重现实验,在某些情况下还浪费时间和试剂。

## 三、流动相

### 1. 流动相的性质要求

一个理想的液相色谱流动相溶剂应具有低粘度、与检测器兼容性好、易于得到纯品和低毒性等特征。

选好填料(固定相)后,强溶剂使溶质在填料表面的吸附减少,相应的容量因子 k 降低;而较弱的溶剂使溶质在填料表面吸附增加,相应的容量因子 k 升高。因此, k 值是流动相组成的函数。塔板数 N 一般与流动相的粘度成反比。所以选择流动相时应考虑以下几个方面:

①流动相应不改变填料的任何性质。低交联度的离子交换树脂和排阻色谱填料有时遇到某些有机相会溶胀或收缩,从而改变色谱柱填床的性质。碱性流动相不能用于硅胶柱系统。酸性流动相不能用于氧化铝、氧化镁等吸附剂的柱系统。

- ②纯度。色谱柱的寿命与大量流动相通过有关，特别是当溶剂所含杂质在柱上积累时。
- ③必须与检测器匹配。使用 UV 检测器时，所用流动相在检测波长下应没有吸收，或吸收很小。当使用示差折光检测器时，应选择折光系数与样品差别较大的溶剂作流动相，以提高灵敏度。
- ④粘度要低（应 $<2\text{cp}$ ）。高粘度溶剂会影响溶质的扩散、传质，降低柱效，还会使柱压降增加，使分离时间延长。最好选择沸点在  $100^{\circ}\text{C}$  以下的流动相。
- ⑤对样品的溶解度要适宜。如果溶解度欠佳，样品会在柱头沉淀，不但影响了纯化分离，且会使柱子恶化。
- ⑥样品易于回收。应选用挥发性溶剂。

## 2. 流动相的选择

在化学键合相色谱法中，溶剂的洗脱能力直接与它的极性相关。在正相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而增加；在反相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而减弱。正相色谱的流动相通常采用烷烃加适量极性调整剂。

反相色谱的流动相通常以水作基础溶剂，再加入一定量的能与水互溶的极性调整剂，如甲醇、乙腈、四氢呋喃等。极性调整剂的性质及其所占比例对溶质的保留值和分离选择性有显著影响。一般情况下，甲醇-水系统已能满足多数样品的分离要求，且流动相粘度小、价格低，是反相色谱最常用的流动相。但 Snyder 则推荐采用乙腈-水系统做初始实验，因为与甲醇相比，乙腈的溶剂强度较高且粘度较小，并可满足在紫外  $185\sim 205\text{nm}$  处检测的要求，因此，综合来看，乙腈-水系统要优于甲醇-水系统。

在分离含极性差别较大的多组分样品时，为了使各组分均有合适的  $k$  值并分离良好，也需采用梯度洗脱技术。

反相色谱中，如果要在相同的时间内分离同一组样品，甲醇/水作为冲洗剂时其冲洗强度配比与乙腈/水或四氢呋喃/水的冲洗强度配比有如下关系：

$$C_{\text{乙腈}} = 0.32C_{\text{2 甲醇}} + 0.57C_{\text{甲醇}}$$

$$C_{\text{四氢呋喃}} = 0.66C_{\text{甲醇}}$$

$C$  为不同有机溶剂与水混合的体积百分含量。100%甲醇的冲洗强度相当于 89%的乙腈/水或 66%的四氢呋喃/水的冲洗强度。

## 3. 流动相的 pH 值

采用反相色谱法分离弱酸 ( $3 \leq \text{pKa} \leq 7$ ) 或弱碱 ( $7 \leq \text{pKa} \leq 8$ ) 样品时，通过调节流动相的 pH 值，以抑制样品组分的解离，增加组分在固定相上的保留，并改善峰形的技术称为反相离子抑制技术。对于弱酸，流动相的 pH 值越小，组分的  $k$  值越大，当 pH 值远远小于弱酸的  $\text{pKa}$  值时，弱酸主要以分子形式存在；对弱碱，情况相反。分析弱酸样品时，通常在流动相中加入少量弱酸，常用  $50\text{mmol/L}$  磷酸盐缓冲液和 1%醋酸溶液；分析弱碱样品时，通常在流动相中加入少量弱碱，常用  $50\text{mmol/L}$  磷酸盐缓冲液和  $30\text{mmol/L}$  三乙胺溶液。

注：流动相中加入有机胺可以减弱碱性溶质与残余硅醇基的强相互作用，减轻或消除峰拖尾现象。所以在这种情况下有机胺（如三乙胺）又称为减尾剂或除尾剂。

## 4. 流动相的脱气

HPLC 所用流动相必须预先脱气，否则容易在系统内逸出气泡，影响泵的工作。气泡还会影响柱的分离效率，影响检测器的灵敏度、基线稳定性，甚至使无法检测。（噪声增大，基线不稳，突然跳动）。此外，溶解在流动相中的氧还可能与样品、流动相甚至固定相（如烷基胺）反应。溶解气体还会引起溶剂 pH 的变化，对分离或分析结果带来误差。

溶解氧能与某些溶剂（如甲醇、四氢呋喃）形成有紫外吸收的络合物，此络合物会提高背景吸收（特别是在  $260\text{nm}$  以下），并导致检测灵敏度的轻微降低，但更重要的是，会在梯度淋洗时造成基线漂移或形成鬼峰（假峰）。在荧光检测中，溶解氧在一定条件下还会引起淬灭现象，特别是对芳香烃、脂肪醛、酮等。在某些情况下，荧光响应可降低达 95%。在电化学检测中（特别是还原电化学法），氧的影响更大。



除去流动相中的溶解氧将大大提高 UV 检测器的性能，也将改善在一些荧光检测应用中的灵敏度。常用的脱气方法有：加热煮沸、抽真空、超声、吹氦等。对混合溶剂，若采用抽气或煮沸法，则需要考虑低沸点溶剂挥发造成的组成变化。超声脱气比较好，10~20 分钟的超声处理对许多有机溶剂或有机溶剂/水混合液的脱气是足够了（一般 500ml 溶液需超声 20~30min 方可），此法不影响溶剂组成。超声时应注意避免溶剂瓶与超声槽底部或壁接触，以免玻璃瓶破裂，容器内液面不要高出水面太多。

离线（系统外）脱气法不能维持溶剂的脱气状态，在你停止脱气后，气体立即开始回到溶剂中。在 1~4 小时内，溶剂又将被环境气体所饱和。

在线（系统内）脱气法无此缺点。最常用的在线脱气法为鼓泡，即在色谱操作前和进行时，将惰性气体喷入溶剂中。严格来说，此方法不能将溶剂脱气，它只是用一种低溶解度的惰性气体（通常是氦）将空气替换出来。此外还有在线脱气机。

一般说来有机溶剂中的气体易脱除，而水溶液中的气体较顽固。在溶液中吹氦是相当有效的脱气方法，这种连续脱气法在电化学检测时经常使用。但氦气昂贵，难于普及。

### 5. 流动相的滤过

所有溶剂使用前都必须经 0.45 $\mu$ m（或 0.22 $\mu$ m）滤过，以除去杂质微粒，色谱纯试剂也不例外（除非在标签上标明“已滤过”）。

用滤膜过滤时，特别要注意分清有机相（脂溶性）滤膜和水相（水溶性）滤膜。有机相滤膜一般用于过滤有机溶剂，过滤水溶液时流速低或滤不动。水相滤膜只能用于过滤水溶液，严禁用于有机溶剂，否则滤膜会被溶解！溶有滤膜的溶剂不得用于 HPLC。对于混合流动相，可在混合前分别滤过，如需混合后滤过，首选有机相滤膜。现在已有混合型滤膜出售。

### 6. 流动相的贮存

流动相一般贮存于玻璃、聚四氟乙烯或不锈钢容器内，不能贮存在塑料容器中。因许多有机溶剂如甲醇、乙酸等可浸出塑料表面的增塑剂，导致溶剂受污染。这种被污染的溶剂如用于 HPLC 系统，可能造成柱效降低。贮存容器一定要盖严，防止溶剂挥发引起组成变化，也防止氧和二氧化碳溶入流动相。

磷酸盐、乙酸盐缓冲液很易长霉，应尽量新鲜配制使用，不要贮存。如确需贮存，可在冰箱内冷藏，并在 3 天内使用，用前应重新滤过。容器应定期清洗，特别是盛水、缓冲液和混合溶液的瓶子，以除去底部的杂质沉淀和可能生长的微生物。因甲醇有防腐作用，所以盛甲醇的瓶子无此现象。

### 7. 卤代有机溶剂应特别注意的问题

卤代溶剂可能含有微量的酸性杂质，能与 HPLC 系统中的不锈钢反应。卤代溶剂与水的混合物比较容易分解，不能存放太久。卤代溶剂（如  $CCl_4$ 、 $CHCl_3$  等）与各种醚类（如乙醚、二异丙醚、四氢呋喃等）混合后，可能会反应生成一些对不锈钢有较大腐蚀性的产物，这种混合流动相应尽量不采用，或新鲜配制。此外，卤代溶剂（如  $CH_2Cl_2$ ）与一些反应性有机溶剂（如乙腈）混合静置时，还会产生结晶。总之，卤代溶剂最好新鲜配制使用。如果是和干燥的饱和烷烃混合，则不会产生类似问题。

### 8. HPLC 用水

HPLC 应用中要求超纯水，如检测器基线的校正和反相柱的洗脱。

进行 HPLC、GC、电泳和荧光分析，或在涉及组织培养时，没有有机物污染是非常重要的。测高锰酸钾颜色保留时间的定性方法反应慢，对很低水平的有机物（对 HPLC 可能还是太高了）不够灵敏，特别是不能定量。总有机碳 (TOC) 分析仪（把有机物氧化成  $CO_2$ ，测游离的  $CO_2$ ）常用于 I 类 (NCCLS) 水中低浓度有机物的测定。

I 类水标准：

	NCCLS	ASTM
电阻率, $M\Omega \cdot cm$ , 25 $^{\circ}C$ , 最小	10.0	18.0

硅酸盐, mg/L, 最大	0.05	0.003
微粒, μm 滤器	0.22	0.2
微生物, CFU/ml	10	分三档

美国药典 24 版 (2000 年) 要求 TOC < 0.5 mg/L (用标准蔗糖溶液 1.19 mg/L), 电导率在室温 pH 6 时 ≤ 2.4 μS/cm (即 ≥ 0.42 MΩ · cm)。HPLC 级水增加吸收特性: 在 1cm 池中, 用超纯水作空白, 在 190nm、200nm 和 250~400nm 的吸收度分别不得过 0.01、0.01 和 0.05。增加不挥发物, ≤ 3ppm (中国药典纯水 ≤ 10ppm)。

## V. HPLC 应用

### 一、样品测定

1. 流动相比例调整: 由于我国药品标准中没有规定柱的长度及填料的粒度, 因此每次新开检新品种时几乎都须调整流动相(按经验, 主峰一般应调至保留时间为 6~15 分钟为宜)。所以建议第一次检验时请少配流动相, 以免浪费。弱电解质的流动相其重现性更不容易达到, 请注意充分平衡柱。

2. 样品配制: ①溶剂; ②容器: 塑料容器常含有高沸点的增塑剂, 可能释放到样品液中造成污染, 而且还会吸留某些药物, 引起分析误差。某些药物特别是碱性药物会被玻璃容器表面吸附, 影响样品中药物的定量回收, 因此必要时应将玻璃容器进行硅烷化处理。

3. 记录时间: 第一次测定时, 应先将空白溶剂、对照品溶液及供试品溶液各进一针, 并尽量收集较长时间的图谱(如 30 分钟以上), 以便确定样品中被分析组分峰的位置、分离度、理论板数及是否还有杂质峰在较长时间内才洗脱出来, 确定是否会影响主峰的测定。

4. 进样量: 药品标准中常标明注入 10ml, 而目前多数 HPLC 系统采用定量环(10ml、20ml 和 50ml), 因此应注意进样量是否一致。(可改变样液浓度)

5. 计算: 由于有些对照品标示含量的方式与样品标示量不同, 有些是复合盐、有些含水量不同、有些是盐基不同或有些是采用有效部位标示, 检验时请注意。

6. 仪器的使用:

①流动相滤过后, 注意观察有无肉眼能看到的微粒、纤维。有请重新滤过。

②柱在线时, 增加流速应以 0.1ml/min 的增量逐步进行, 一般不超过 1ml/min, 反之亦然。否则会使柱床下塌, 叉峰。柱不线时, 要加快流速也需以每次 0.5ml/min 的速率递增上去(或下来), 勿急升(降), 以免泵损坏。

③安装柱时, 请注意流向, 接口处不要留有空隙。

④样品液请注意滤过(注射液可不需滤过)后进样, 注意样品溶剂的挥发性。

⑤测定完毕请用水冲柱 1 小时, 甲醇 30 分钟。如果第二天仍使用, 可用水以低流速(0.1~0.3ml/min)冲洗过夜(注意水要够量), 不须冲洗甲醇。另外需要特别注意的是: 对于含碳量高、封尾充分的柱, 应先用含 5~10% 甲醇的水冲洗, 再用甲醇冲洗。

⑥冲水的同时请用水充分冲洗柱头(如有自动清洗装置系统, 则应更换水)。

### 二、方法研究

1. 波长选择: 首先在可见紫外分光光度计上测量样品液的吸收光谱, 以选择合适的测量波长, 如最灵敏的测量波长并避开其它物质的干扰。从紫外光谱中还可大体知道在 HPLC 中的响应值, 如吸收度小于 0.5 时, HPLC 测定的面积将会很小。

2. 流动相选择: 尽量采用不是弱电解质的甲醇-水流动相。