HPLC 原理和操作详解

Revised as of 23 November 2023

高 效 液 相 色 谱

我国药典收载高效液相色谱法工程和数量比较表：

方法	性质	数量			
		1985 年版	1990 年版	1995 年版	2023 年版
HPLC 法	鉴别		9	34	150
	检查		12	40	160
	含量测定	7	60	117	387

鉴于 HPLC 应用在药品分析中越来越多，因此每一个药品分析人员应当把握并应用 HPLC。

I. 概论

一、液相色谱理论进展简况

色谱法的分别原理是：溶于流淌相(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、安排、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。又称为色层法、层析法。

色谱法最早是由俄国植物学家茨维特〔Tswett〕在 1906 年争论用碳酸钙分别植物色素时觉察的，色谱法(Chromatography)因之得名。后来在此根底上进展出纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法。

液相色谱法开头阶段是用大直径的玻璃管柱在室温顺常压下用液位差输送流淌相，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根底上，于 60 年月后期引入了气相色谱理论而快速进展起来的。它与经典液相色谱法的区分是填料颗粒小而均匀，小颗粒具有高柱效，但会引起高阻力，需用高压输送流淌相，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 150~300 Kg/cm^2。色谱柱每米降压为 75 Kg/cm^2 以上。

高速——流速为~ ml/min。

高效——可达 5000 塔板每米。在一根柱中同时分别成份可达 100 种。

高灵敏度——紫外检测器灵敏度可达。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。

区分率高——可选择固定相和流淌相以到达最正确分别效果

。灵敏度高——紫外检测器可达，荧光和电化学检测器可达

。柱子可反复使用——用一根色谱柱可分别不同的化合物。

样品量少，简洁回收——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别挥发性化合物。GC 依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别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〔界于气体和液体之间的一种物相〕为流淌相〔常用 CO_2〕，因其集中系数大，能很快到达平衡，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)、安排色谱法(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、色谱分别原理

高效液相色谱法按分别机制的不同分为液固吸附色谱法、液液安排色谱法〔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，被分别组分在色谱柱上分别原理是依据固定相对组分吸附力大小不同而分别。分别过程是一个**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 5~10μm。适用于分别分子量 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。常用于分别同分异构体。

1. **液液色谱法** 使用将特定的液态物质涂于担体外表，或化学键合于担体外表而形成的固定相，分别原理是依据被分别的组分在流淌相和固定相中溶解度不同而分别。分别过程是一个**安排平衡**过程。

涂布式固定相应具有良好的惰性；流淌相必需预先用固定相饱和，以削减固定相从担体外表流失；温度的变化和不同批号流淌相的区分常引起柱子的变化；另外在流淌相中存在的固定相也使样品的分别和收集简单化。由于涂布式固定相很难避开固定液流失，现在已很少承受。现在多承受的是化学键合固定相，如 C_{18}、C_8、氨基柱、氰基柱和苯基柱。

液液色谱法按固定相和流淌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 承受极性固定相〔如聚乙二醇、氨基与腈基键合相〕；流淌相为相对非极性的疏水性溶剂〔烷烃类如正已烷、环已烷〕，常参加乙醇、异丙醇、四氢呋喃、三氯甲烷等以调整组分的保存时间。常用于分别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 C_{18}、C_8〕；流淌相为水或缓冲液，常参加甲醇、乙腈、异丙醇、丙酮、四氢呋喃等与水互溶的有机溶剂以调整保留时间。适用于分别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。

随着柱填料的快速进展，反相色谱法的应用范围渐渐扩大，现已应用于某些无机样品或易解离样品的分析。为掌握样品在分析过程的解离，常用缓冲液掌握流淌相的 pH 值。但需要留意的是，C_{18} 和 C_8 使用的 pH 值通常为~

〔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。有报告商品柱可在 pH ~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
流淌相极性	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限〔如氨基键合固定相〕。

1. **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，在外表未端芳环上接上羧基、磺酸基〔称阳离子交换树脂〕或季氨基〔阴离子交换树脂〕。被分别组分在色谱柱上分别原理是树脂上可电离离子与流淌相中具有一样电荷的离子及被测组分的离子进展**可逆交换**，依据各离子与离子交换基团具有不同的电荷吸引力而分别。

缓冲液常用作离子交换色谱的流淌相。被分别组分在离子交换柱中的保存时间除跟组分别子与树脂上的离子交换基团作用强弱有关外，它还受流淌相的 pH 值和离子强度影响。pH 值可转变化合物的解离程度，进而影响其与固定相的作用。流淌相的盐浓度大，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。

2. **离子对色谱法** 又称偶离子色谱法，是液液色谱法的分支。它是依据被测组分别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，从而使其分别效果改善。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 C_{18}〕，流淌相为甲醇-水或乙腈-水，水中参加 3~10 mmol/L 的离子对试剂，在肯定的 pH 值范围内进展分别。被测组分保时间与离子对性质、浓度、流淌相组成及其 pH 值、离子强度有关。

3. **排阻色谱法** 固定相是有肯定孔径的多孔性填料，流淌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，直接随流淌相流出。它利用分子筛对分子量大小不同的各组分**排阻力量**的差异而完成分别。常用于分别高分子化合物，如组织提取物、多肽、蛋白质、核酸等。

II. 根本概念和理论

一、根本概念和术语

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)——经流淌相冲洗，柱与流淌相到达平衡后，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、流淌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、流淌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。流出曲线上的突起局部。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)——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~。T＜为前延峰，T＞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，$W_{h/2}$)——峰高一半处的峰宽。$W_{h/2}$＝σ

标准偏差(standard deviation，σ)——正态分布曲线 x＝±1 时[拐点]的峰宽之半。正常峰的拐点在峰高的倍处。标准偏差的大小说明组分在流精彩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。A＝×σ×h＝ σ h＝ $W_{h/2}$ h

2. 定性参数[保存值]

死时间(dead time，t_0)——不保存组分的保存时间。即流淌相[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淌池未被固定相所占据的空间。它包括 4 局部：进样器至色谱柱管路体积、柱内固定相颗粒间隙[被流淌相占据，V_m]、柱出口管路体积、检测器流淌池体积。其中只有 V_m 参与色谱平衡过程，其它 3 局部只起峰扩展作用。为防止峰扩展，这 3 局部体积应尽量减小。V_0＝F×t_0[F 为流速]

保存时间(retention time，t_R)——从进样开头到某个组分在柱后消灭浓度极大值的时间。

保存体积(retention volume，V_R)——从进样开头到某组分在柱后消灭浓度极大值时流出溶剂的体积。又称洗脱体积。V_R＝F×t_R

调整保存时间(adjusted retention time，t”$_R$)——扣除死时间后的保存时间。也称折合保存时间(reduced retention time)。在试验条件[温度、固定

相等〕肯定时，t''_R只打算于组分的性质，因此，t''_R〔或 t_R〕可用于定性。$t''_R = t_R - t_0$

调整保存体积(adjusted retention volume，V''_R)——扣除死体积后的保存体积。$V''_R = V_R - V_0$ 或 $V''_R = F \times t''_R$

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别效率〔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、流淌相的种类和流速及测定柱效所用物质的性质。假设峰形对称并符合正态分布，N 可近似表示为：

$$N = ^2 = 16^2 = ^2$$

N 为常量时，W 随 t_R 成正比例变化。在一张多组分色谱图上，假设各组分含量相当，则后洗脱的峰比前面的峰要渐渐加宽，峰高则渐渐降低。

用半峰宽计算理论塔数比用峰宽计算更为便利和常用，由于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，假设未注明，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。〕

假设用调整保存时间(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。H＝。实际应用时往往用柱长 L 和理论塔板数计算：H＝，H 有效＝。

1. 相平衡参数

安排系数(distribution coefficient，K)——在肯定温度下，化合物在两相间到达安排平衡时，在固定相与流淌相中的浓度之比。K＝。

安排系数与组分、流淌相和固定相的热力学性质有关，也与温度、压力有关。在不同的色谱分别机制中，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。但一般状况可用安排系数来表示。

在条件〔流淌相、固定相、温度和压力等〕肯定，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。这只是抱负状态下的色谱条件，在这种条件下，得到的色谱峰为**正常峰**；在很多状况下，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，只有尽可能削减进样量，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，后流精彩谱柱；K 值小的组分则滞留时间短，先流精彩谱柱。混合物中各组分的安排系数相差越大，越简洁分别，因此混合物中各组分的安排系数不同是色谱分别的前提。

在 HPLC 中，固定相确定后，K 主要受流淌相的性质影响。实践中主要靠调整流淌相的组成配比及 pH 值，以获得组分间的安排系数差异及适宜的保存时间，到达分别的目的。

容量因子(capacity factor，k)——化合物在两相间到达安排平衡时，在固定相与流淌相中的量之比。k＝。因此容量因子也称质量安排系数。

安排系数、容量因子与保存时间之间有如下关系：k＝＝＝K＝，t”$_R$＝k t_0。上式说明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”$_R$〕是不保存组分保存时间〔t_0〕的几倍。k＝0 时，化合物全部存在于流淌相中，在固定相中不保存，t”$_R$＝0；k 越大，说明固定相对此组分的容量越大，出柱慢，保存时间越长。

容量因子与安排系数的不同点是：K 取决于组分、流淌相、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，所以容量因子比安排系数应用更广泛。

选择性因子(selectivity factor，α)——相邻两组分的安排系数或容量因子之比。α＝＝ 〔设 k_2＞k_1〕。因 k＝t”$_R$/t_0，则α＝，所以 α 又称为相对保存时间〔《美国药典》〕。

要使两组分得到分别，必需使 α≠1。α 与化合物在固定相和流淌相中的安排性质、柱温有关，与柱尺寸、流速、填充状况无关。从本质上来说，α 的大小表示两组分在两相间的平衡安排热力学性质的差异，即分子间相互作用力的差异。

4. 分别参数

分别度（resolution，R）——相邻两峰的保存时间之差与平均峰宽的比值。也叫区分率，表示相邻两峰的分别程度。R＝。当 W_1＝W_2时，R＝。当 R＝1 时，称为 4σ 分别，两峰根本分别，暴露峰面积为%，内侧峰基重叠约 2 %。R＝时，称为 6σ 分别，暴露峰面积为%。R≥称为完全分别。《中国药典》规定 R 应大于。

根本分别方程——分别度与三个色谱根本参数有如下关系：

R＝××

其中称为柱效项，为柱选择性项，为柱容量项。柱效项与色谱过程动力学特性有关，后两项与色谱过程热力学因素有关。

从根本分别方程可看出，提高分别度有三种途径：①增加塔板数。方法之一是增加柱长，但这样会延长保存时间、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 α＝1 时，R＝0，无论柱效有多高，组分也不行能分别。一般可以实行以下措施来转变选择性：a. 转变流淌相的组成及 pH 值；b. 转变柱温；c. 转变固定相。③转变容量因子。这常常是提高分别度的最简洁方法，可以通过调整流淌相的组成来实现。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，否则不但分别时间延长，而且峰形变宽，会影响分别度和检测灵敏度。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. 塔板理论的根本假设

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别过程看成在分馏塔中的分馏过程，即组分在塔板间隔内的安排平衡过程。塔板理论的根本假设为：

1） 色谱柱内存在很多塔板，组分在塔板间隔〔即塔板高度〕内完全听从安排定律，并很快到达安排平衡。

2） 样品加在第 0 号塔板上，样品沿色谱柱轴方向的集中可以无视。

3） 流淌相在色谱柱内间歇式流淌，每次进入一个塔板体积。

4） 在全部塔板上安排系数相等，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，很难到达安排平衡；组分沿色谱柱轴方向的集中是不行避开的。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外形、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〕

依据塔板理论，流出曲线可用下述正态分布方程来描述：

C＝e　　或　　C＝e

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}＝。C_{max} 就是色谱峰的峰高。因此上式说明：①当试验条件肯定时〔即 σ 肯定〕，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当进样量肯定时，σ 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~∞）求积分，即得精彩谱峰面积 A＝×σ×C_{max}＝C_0。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 $W_{h/2}$＝σ 代入上式，即得 A＝×$W_{h/2}$×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 等人吸取了塔板理论的概念，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，争论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[H＝A＋B/u＋Cu，后称气相色谱速率方程]的根底上，依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]：

H＝2λd_p＋＋\s\up 5(2p＋\s\up 5(2p＋\s\up 5(2f

2．影响柱效的因素

1）涡流集中[eddy diffusion]。由于色谱柱内填充剂的几何构造不同，分子在色谱柱中的流速不同而引起的峰展宽。涡流集中项 A＝2λd_p，d_p为填料直径，λ为填充不规章因子，填充越不均匀 λ 越大。HPLC 常用填料粒度一般为 3~10μm，最好 3~5μm，粒度分布 RSD≤5%。但粒度太小难于填充均匀[λ大]，且会使柱压过高。大而均匀[球形或近球形]的颗粒简洁填充规章均

匀，λ越小。总的说来，应承受细而均匀的载体，这样有助于提高柱效。毛细管无填料，A＝0。

1）分子集中〔molecular diffusion〕。又称纵向集中。由于进样后溶质分子在柱内存在浓度梯度，导致轴向集中而引起的峰展宽。分子集中项 B/u＝$2\gamma D_m/u$。u 为流淌相线速度，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为分子在流淌相中的集中系数，由于液相的 D_m很小，通常仅为气相的 10^{-4}~10^{-5}，因此在 HPLC 中，只要流速不太低的话，这一项可以无视不计。γ是考虑到填料的存在使溶质分子不能自由地轴向集中，而引入的柱参数，用以对 D_m进展校正。γ一般在~左右，毛细管柱的γ＝1。

2）传质阻抗〔mass transfer resistance〕。由于溶质分子在流淌相、静态流淌相和固定相中的传质过程而导致的峰展宽。溶质分子在流淌相和固定相中的集中、安排、转移的过程并不是瞬间到达平衡，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 Cu 又分为三项。

①流淌相传质阻抗 $H_m＝C_m d^2pu/D_m$，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。靠近填充颗粒的流淌相流速较慢，而中心较快，处于中心的分子还将来得及与固定相到达安排平衡就随流淌相前移，因而产生峰展宽。

②静态流淌相传质阻抗 $H_{sm}＝C_{sm} d^2pu/D_m$，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淌相中，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。所以改进固定相构造，减小静态流淌相传质阻力，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 d2p 成正比，与集中系数 D_m 成反比。因此应承受低粒度固定相和低粘度流淌相。高柱温可以增大 D_m，但用有机溶剂作流淌相时，易产生气泡，因此一般承受室温。

③固定相传质阻抗 $H_s = C_s d2fu/D_s$〔液液安排色谱〕，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集中系数。在安排色谱中 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。承受单分子层的化学键合固定相时 H_s 可以无视。

从速率方程式可以看出，要获得高效能的色谱分析，一般可承受以下措施：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峻的峰展宽和拖尾，甚至不行逆吸附。④适当的流速。以 H 对 u 作图，则有一最正确线速度 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~0.1mm/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

速率理论争论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：

$$\sigma^2 = \sigma2\ 柱内 + \sigma2\ 柱外 + \sigma2\ 其它$$

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全部死体积所引起。为了削减柱外效应，首先应尽可能削减柱外死体积，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。争论说明柱外死体积之和应＜V_R/。其次，期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≤V_R/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 大的组分影响不显着。由于 HPLC 的特别条件，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、柱温掌握器等，现代 HPLC 仪还有微机掌握系统，进展自动化仪器掌握和数据处理。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展梯度洗脱，柱填料从单一品种进展至几百种类型，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、可确证物质构造的质谱检测

器。数据处理不再用绘图仪，渐渐取而代之的是最简洁的积分仪、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、上海器厂、北京器厂等。

一、输液泵

1. 泵的构造和性能

输液泵是 HPLC 系统中最重要的部件之一。泵的性能好坏直接影响到整个系统的质量和分析结果的牢靠性。输液泵应具备如下性能：①流量稳定，其 RSD 应＜%，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~10 ml/min 范围内连续可调，制备型应能到达 100 ml/min；③输出压力高，一般应能到达 150~300 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。恒流泵按构造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，因此易于清洗和更换流淌相，特别适合于再循环和梯度洗脱；转变电机转速能便利地调整流量，流量不受柱阻影响；泵压可达 400 kg/cm^2。其主要缺点是输出的脉冲性较大，现多承受双泵系统来抑制。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%左右，串联泵为~%〕，但出故障的时机较多〔因多一单向阀〕，价格也较贵。

各品牌输液泵的根本参数：

工程	Waters 515 型	HP 1100 型	LC-10ATvp 型	Elite P200 II 型	检定要求
流速范围	~10	~10	~	~	
调整精度					
流量周密度	RSD %	%[<%]	%	%	%
流量准确度			±%	±%	±%
最高压力	4000 Psi	40 MPa	MPa	MPa	
密封圈寿命					
流淌相的脉冲					

2. 泵的使用和维护留意事项

为了延长泵的使用寿命和维持其输液的稳定性，必需依据以下留意事项进展操作：

①防止任何固体微粒进入泵体，由于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，因此应预先除去流淌相中的任何固体微粒。流淌相最好在玻璃容器内蒸馏，而常用的方法是滤过，可承受 Millipore 滤膜[μm 或 μm]等滤器。泵的入口都应连接砂滤棒[或片]。输液泵的滤器应常常清洗或更换。

②流淌相不应含有任何腐蚀性物质，含有缓冲液的流淌相不应保存在泵内，尤其是在停泵过夜或更长时间的状况下。假设将含缓冲液的流淌相留在泵内，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，必需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泵工作时要留心防止溶剂瓶内的流淌相被用完，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流淌相应领先脱气，以免在泵内产生气泡，影响流量的稳定性，假设有大量气泡，泵就无法正常工作。

假设输液泵产生故障，须查明缘由，实行相应措施排解故障：

①没有流淌相流出，又无压力指示。缘由可能是泵内有大量气体，这时可翻开泄压阀，使泵在较大流量〔如 5ml/min〕下运转，将气泡排尽，也可用一个 50ml 针筒在泵出口处帮助抽出气体。另一个可能缘由是密封环磨损，需更换。

②压力和流量不稳。缘由可能是气泡，需要排解；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局部堵塞，这时，可卸下砂滤棒浸入流淌相内超声除气泡，或将砂滤棒浸入稀酸〔如 4mol/L 硝酸〕内快速除去微生物，或将盐溶解，再马上清洗。

③压力过高的缘由是管路被堵塞，需要去除和清洗。压力降低的缘由则可能是管路有泄漏。检查堵塞或泄漏时应逐段进展。

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淌相组成保持恒定，适合于组分数目较少，性质差异不大的样品。梯度洗脱是在一个分析周期内程序掌握流淌相的组成，如溶剂的极性、离子强度和 pH 值等，用于分析组分数目多、性质差异较大的简单样品。承受梯度洗脱可以缩短分析时间，提高分别度，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展梯度洗脱。

在进展梯度洗脱时，由于多种溶剂混合，而且组成不断变化，因此带来一些特别问题，必需充分重视：

①要留意溶剂的互溶性，不相混溶的溶剂不能用作梯度洗脱的流淌相。有些溶剂在肯定比例内混溶，超出范围后就不互溶，使用时更要引起留意。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。进展样品分析前必需进展空白梯度洗脱，以识别溶剂杂质峰，由于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。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：
https://d.book118.com/668112011063006107