

第十四章 高效液相色谱法

high performance liquid
chromatography

HPLC

第十四章 高效液相色谱法

- ❖ 第一节 概述
- ❖ 第二节 基本原理
- ❖ 第三节 高效液相色谱法的主要类型
- ❖ 第四节 高效液相色谱仪
- ❖ 第五节 高效液相色谱法的应用

第一节 概述

❖ 高效液相色谱法（HPLC）

☞ - - 以高压液体为流动相的液相柱色谱法

。

☞ 又称为高压液相色谱法；高速液相色谱法

。

❖ 一、 高效液相色谱法与经典液相色谱法的比较

❖ 二、 高效液相色谱法与气相色谱法的比较

一、 高效液相色谱法与经典液相色谱法的比较

- ❖ 经典液相色谱法为基础，
- ❖ 引入气相色谱法的理论和实验技术，
- ❖ 高压输送流动相，流速快，分析速度快；
- ❖ 高效固定相，颗粒极细（一般为 $10\mu\text{m}$ 以下）、规则均匀的固定相，（键合相）传质阻抗小，柱效高，分离效率高；
- ❖ 高灵敏度检测器，灵敏度大大提高。紫外检测器最小检测限可达 10^{-9}g ，而荧光检测器最小检测限可达 10^{-12}g 。

二、 高效液相色谱法与气相色谱法的比较

- ✧ 不受试样的挥发性和热稳定性的限制，应用范围广；
- ✧ 可选用各种溶剂作为流动相，对分离的选择性有很大作用，选择性高；
- ✧ 一般在室温条件下进行分离，不需要高柱温。

❖ 特点：

- ✧ 高压、高效、高速、高灵敏度、适用范围广

❖ 适用：

- ✧ 高沸点、热不稳定有机及生化试样的高效分离分析。

第二节 基本原理

- ❖ 一、柱内展宽
- ❖ 二、柱外展宽

第三节 高效液相色谱法的主要类型

- ❖ 一、液 - 固吸附色谱法
- ❖ 二、化学键合相色谱法
- ❖ 三、流动相的要求和洗脱方式

第三节 高效液相色谱法的主要类型

- ❖ 分配色谱法 (partition chromatography)
- ❖ 吸附色谱法 (adsorption chromatography)
- ❖ 离子交换色谱法 (IEC)
- ❖ 空间排阻色谱法 (SEC)
- ❖ 化学键合相色谱法 (bonded phase chromatography. BPC)
- ❖ 胶束色谱法 (micellar chromatography ; MC)

根据固定相和流动相相对极性的大小

❧ **正相液液分配色谱法** (normal-phase liquid- liquid partition chromatography, NLLC)

❧ **反相液液分配色谱法** (reversed-phase liquid- liquid partition chromatography ,RLLC)

(二) 液-固吸附色谱法的流动相

❖ 常用溶剂：

☞ 己烷、四氯化碳、甲苯、乙酸乙酯、乙醇、乙腈、水。

❖ 流动相的选择

☞ 应重点考虑溶剂的极性

❖ 溶剂的极性强弱可用 Snyder 提出的溶剂极性参数 ϵ^0 来表示。 ϵ^0 为溶剂分子在单位吸附剂表面的吸附自由能。 ϵ^0 越大，说明溶剂的极性越强，洗脱能力就越强。

类型

❖ 分类

- ❧ 流动相按组成不同可分为单组分和多组分；
- ❧ 按极性可分为极性、弱极性、非极性；
- ❧ 按使用方式有固定组成淋洗和梯度淋洗。

❖ 在液-固吸附色谱法中，常常采用二元或二元以上的混合溶剂系统

- ❧ 这样可以找到适合强度的溶剂系统，而且还可以保持溶剂的粘度以降低柱压和提高柱效，还可以提高分离的选择性

选择流动时应注意的几个问题：

- ❖ （1）尽量使用高纯度试剂作流动相，防止微量杂质长期累积损坏色谱柱和使检测器噪声增加。流动相用 HPLC 级的试剂、超纯水
- ❖ （2）避免流动相与固定相发生作用而使柱效下降或损坏柱子。如使固定液溶解流失；酸性溶剂破坏氧化铝固定相等。
- ❖ （3）试样在流动相中应有适宜的溶解度，防止产生沉淀并在柱中沉积。
- ❖ （4）流动相同时还应满足检测器的要求。当使用紫外检测器时，流动相不应有紫外吸收。

二、化学键合相色谱法

- ❖ 以化学键合相为固定相的色谱法，简称键合相色谱法 (bonded phase chromatography ; BPC)
- ❖ 化学键合相：采用化学反应的方法将官能团键合在载体表面所形成的固定相

化学键合相色谱法优点：

- ✧耐溶剂冲洗，化学性能稳定，热稳定性好 (70°C 以下不致破坏)，使用寿命长；
- ✧可以通过改变键合官能团的类型来改变分离的选择性；
- ✧传质速度快，柱效高；
- ✧适于梯度洗脱。

正相 (normal phase , NP) 键合相色谱法

固定相极性比流动相的极性要强，
适合于分离中等极性和极性强的化合物

反相 (reversed phase , RP) 键合相色谱法

固定相的极性比流动相极性弱，
适用于分离非极性至中等极性的化合物

(一) 化学键合相色谱法的固定相

❖ 键合相的种类：

❧ 化学键合相按基团与载体（硅胶）相结合的活性键类型，

❖ 分为酯化型 (Si-O-C) 和硅烷化型 (Si-O-Si-C)

❧ 化学键合相按基团的极性可将其分为非极性、中等极性和极性三类

❖ 1. 非极性键合相

❖ 2. 中等极性键合相

❖ 3. 极性键合相

(一) 化学键合相色谱法的固定相

❖ 1. 非极性键合相 (反相色谱键合相)

❧ 硅胶表面键合烷基硅烷, 为非极性基团, 其烷基配基可以是不同链长的正构烷烃,

❖ 如十八烷基硅烷 (octadecylsilane, ODS 或用 C_{18} 表示)

❧ 应用最广泛

❖ 辛烷基硅烷 (用 C_8 来表示) 又可以是带有苯基的碳链

❖ 非极性键合相型号 (国产):

❧ YWG-C18H37、YQG-C18H37、YWG-C6H5

(一) 化学键合相色谱法的固定相

❖ 2. 中等极性键合相

- ⌘ 常见的有醚基键合相。
- ⌘ 这种键合相可作为正相或反相色谱的固定相，视流动相的极性而定。

❖ 3. 极性键合相

- ⌘ 如氨基或氰基等，分别将氨丙硅烷基 $[-\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$ 和氰乙硅烷基键合在硅胶表面制成。它们常作为正相色谱的固定相。
- ⌘ 该键合相表面基团为极性较大的基团，



(二) 化学键合相色谱法的流动相

❖ 在化学键合相色谱中，溶剂的洗脱能力（即溶剂的强度）直接与溶剂的极性有关。

- ⌘ 正相键合相色谱中，由于固定相是极性的，因此极性强的流动相洗脱能力强；
- ⌘ 反相键合相色谱中，由于固定相是非极性的，因此，极性弱的流动相洗脱能力强



(三) 固定相和流动相的选择

1. 固定相的选择

❖ 分离中等极性和极性较强的化合物

❧ 选择极性键合相。其中氨基键合相是分离糖类最常用的固定相；氨基键合相对双键异构或含双键数不等的环状化合物的分离有较好的选择性。

❖ 分离非极性和极性较弱的化合物

❧ 选择非极性键合相，在反相离子抑制色谱和反相离子对色谱中也常用非极性键合相。十八烷基硅烷（ODS）是应用最广泛的非极性键合相，对于各类化合物都有很强的适应能力。

2. 流动相的选择

❖ 正相键合相色谱法

✧ 采用在烷烃中加适量极性调节剂的方法

❖ 反相键合相色谱法

✧ 一般以极性最大的水为主体，加入一定量与水互溶的甲醇、乙腈和四氢呋喃等极性调节剂。水 - 甲醇是反相色谱最常用的流动相

❖ 混合溶剂（二元或多元流动相）

三、流动相的要求和洗脱方式

❖ (一) 流动相的要求

- ❧ 1. 与固定相不互溶，也不发生化学反应。
- ❧ 2. 对被分离的样品有适宜的溶解性。
- ❧ 3. 溶剂的纯度高
- ❧ 4. 溶剂应与检测器相匹配。如使用紫外检测器，流动相在检测波长下不能有吸收。
- ❧ 5. 粘度要小，有利于提高传质速度，提高柱效，降低柱压。

(二) 洗脱方式

❖ 1. 恒定组成溶剂洗脱

✧ 采用恒定组成及配比的溶剂系统洗脱。

✧ 优点：

❖ 操作简便、柱易再生

✧ 缺点：

❖ 对于成分复杂的样品往往难以获得理想的分离结果

(二) 洗脱方式

❖ 2. 梯度洗脱 (gradient elution)

- ❧ 梯度洗脱又称梯度淋洗或程序洗脱。
- ❧ 它是指在一定分析周期内，按一定程序不断改变流动相的组成配比或 pH 等，改变流动相的极性

❖ 优点

- ❧ 能缩短分离周期、提高分离效能、改善色谱峰形、增加检测灵敏度。

❖ 缺点

- ❧ 有时会引起基线漂移及重复性差。

第四节 高效液相色谱仪





高效液相色谱仪



2017年 5月10日

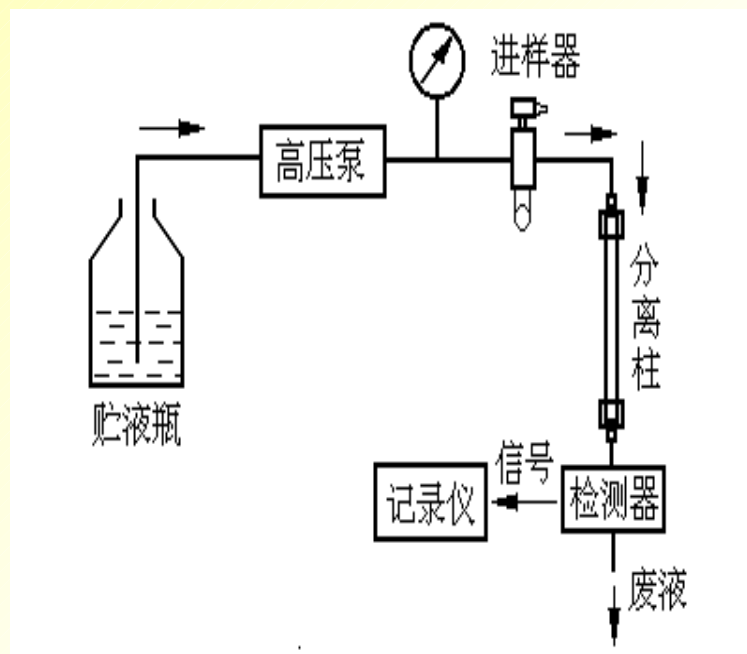
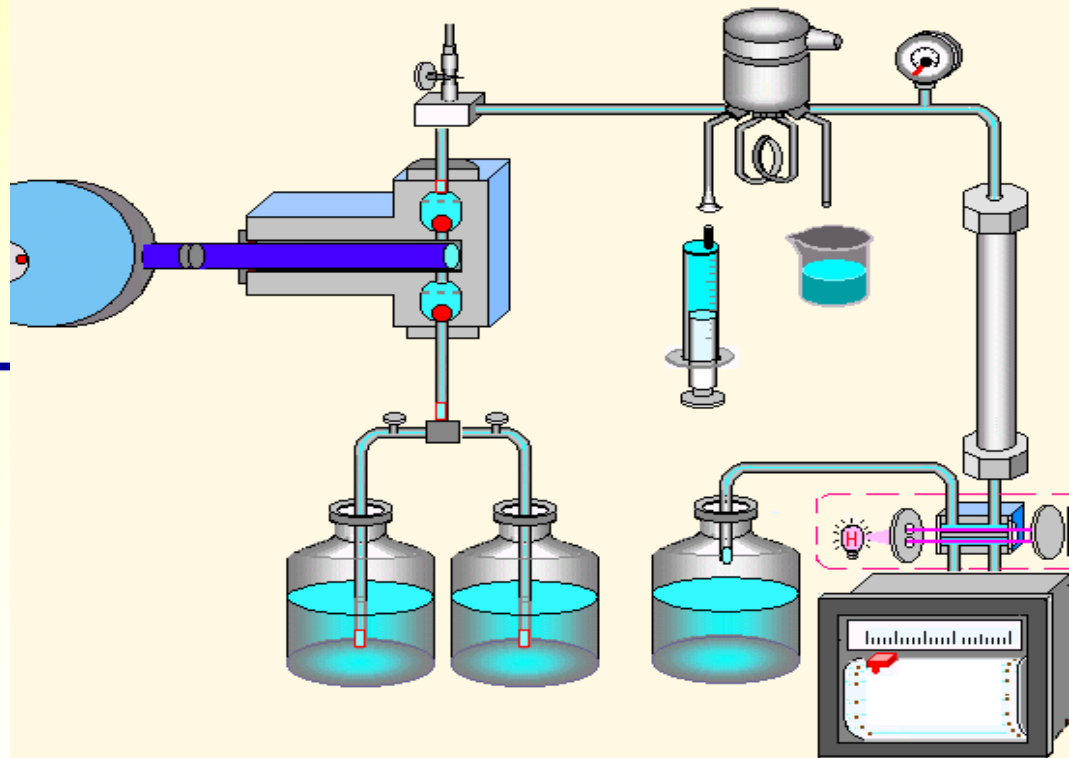


主要部件

process and main assembly of

HPLC

- ❖ 一、 高压输液系统
- ❖ 二、 进样系统
- ❖ 三、 分离系统
- ❖ 四、 检测系统
- ❖ 五、 数据处理系统



输液系统
进样系统
色谱柱系统
检测系统
数据记录处理系统



一、输液系统

溶剂贮存器

由玻璃、不锈钢或氟塑料制成
容量为1~2L
流动相要经常更换

❖ 高压输液泵

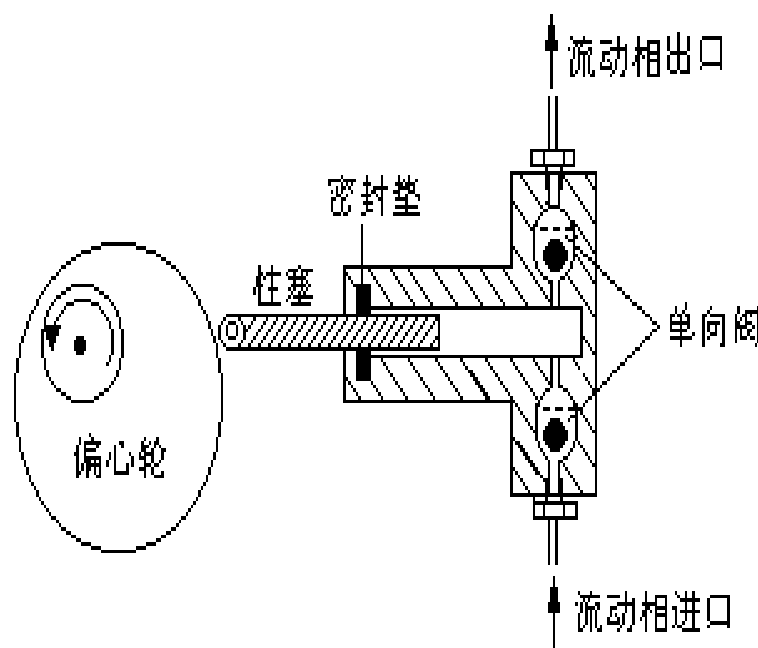
☞ 压力：150 ~ 350×10⁵ Pa

❖ 恒流泵：在输送流动相过程中流量恒定。常用柱塞往复泵

❖ 输液泵应具备的性能：

☞ 无脉动；流量恒定；流量范围宽且可调节；耐高压；耐腐蚀；适于梯度洗脱

2017年一月10日



过滤和脱气

❖ 流动相和样品溶液的过滤

❧ 目的：以免其中的细小颗粒堵塞色谱柱以及影响高压输液泵的正常工**作**。

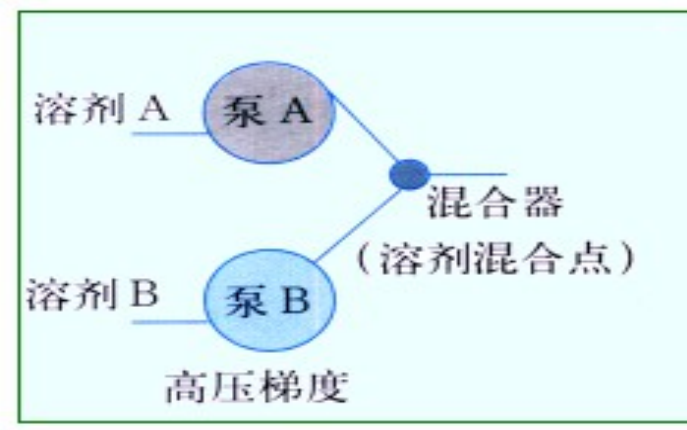
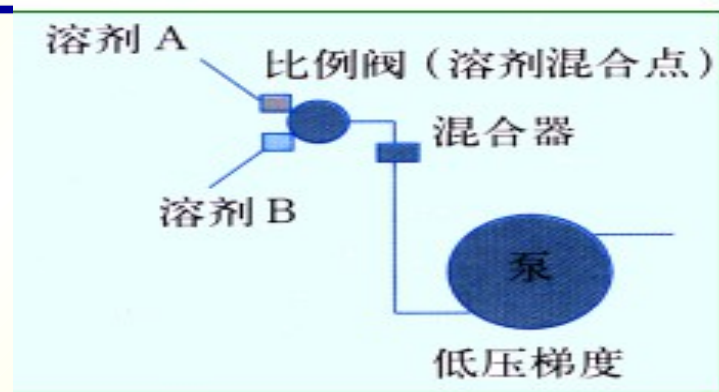
❖ 流动相进入高压泵前必须进行脱气处理

❧ 目的：除去其中溶解的气体（如氧气），防止流动相由色谱柱进入检测器时因压力降低而产生气泡，增加基线的噪音，造成灵敏度降低，甚至无法分析。

❧ 脱气方法：常用的脱气方法有低压脱气法、吹氮脱气法和在线脱气法。目前，许多高档的高效液相色谱仪都配有在线脱气装置。

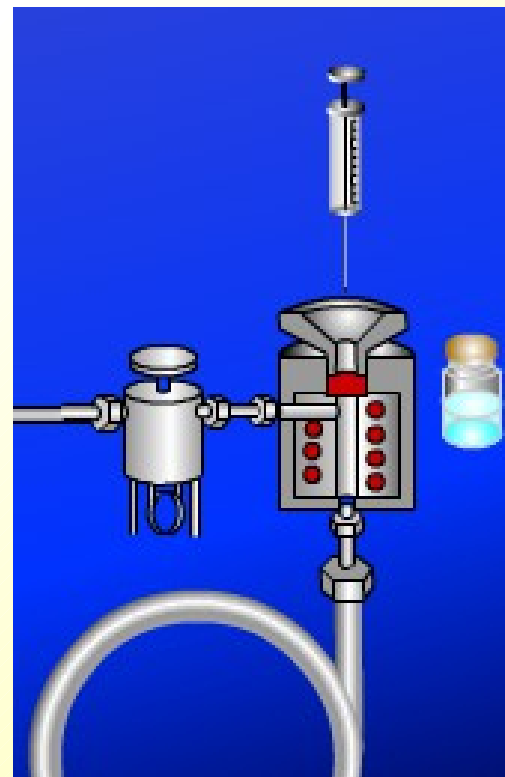
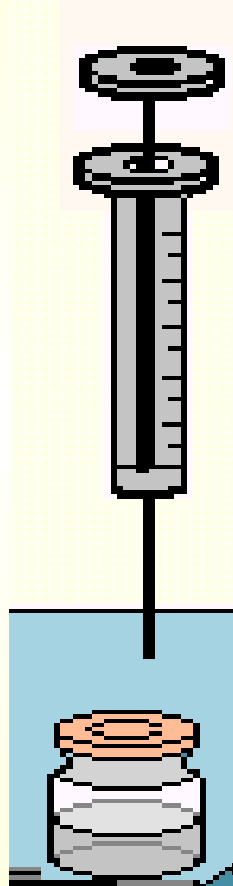
梯度洗脱 (gradient elution)

- ❖ **定义**——在分离过程中使两种或两种以上不同极性的溶剂按一定程序连续改变它们之间的比例，
- ❖ **目的**——使流动相的强度、极性、pH 或离子强度相应地变化，达到提高分离效果，缩短分析时间的目的。
- ❖ **梯度洗脱装置分类**：一类是外梯度装置（又称低压梯度；另一类是内梯度装置（又称高压梯度）

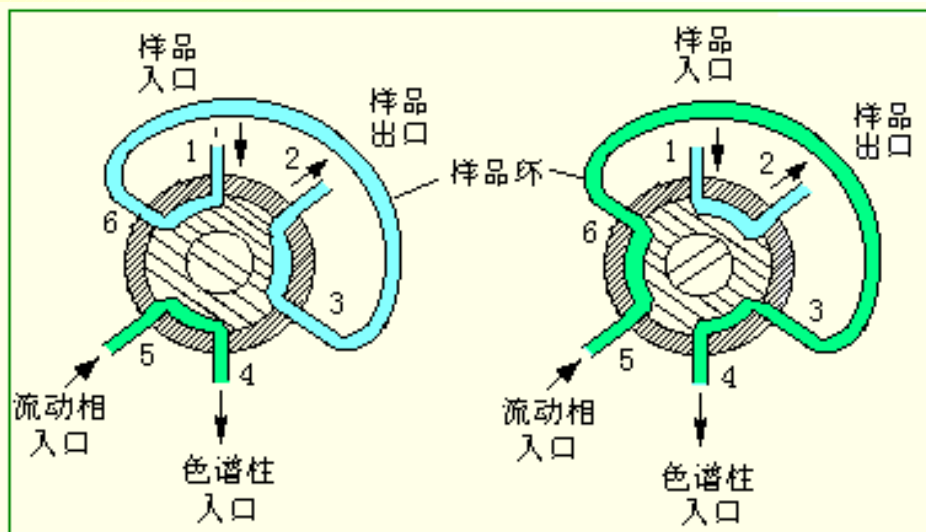


二、进样系统

- ❖ 进样器
- ❖ 优点是装置简单、价廉、死体积小
- ❖ 缺点是隔膜的穿刺部分在高压情况下容易漏液，而且进样量有限，重复性差，有时需停泵进样。



进样阀（六通阀）



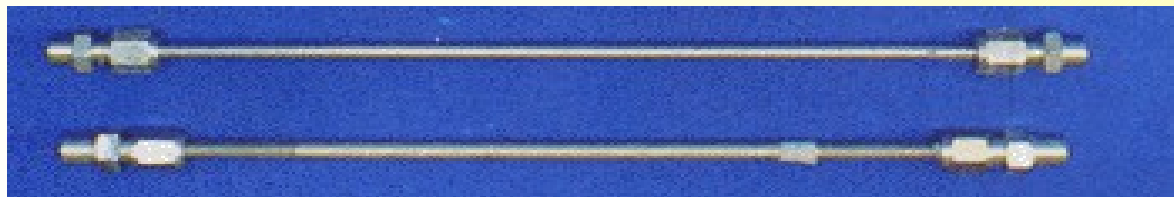
- ❖ **优点是进样时可保持系统的高压，进样方便、易操作，而且由于进样量是由定量管的体积严格控制，进样准确，重现性好，自动化程度高，适于做定量分析。**

自动进样装置

- ❖ 计算机自动控制进样阀，取样、进样、复位、清洗和样品盘的转动全部按预定的程序自动进行。
- ❖ 优点：自动进样重现性好，适合大量样品分析，可实现自动化操作。
- ❖ 目前比较典型的自动进样装置：
 - ⌘ 圆盘式和链式两种。

三、分离系统

- ❖ **分析柱**：柱体为直型不锈钢管，内径 2 ~ 5 mm，柱长 10 ~ 30 cm。
- ❖ **制备柱**：柱体为直型不锈钢管，内径 6 ~ 20 mm，柱长 10 ~ 30 cm。
- ❖ **新型毛细管柱**：柱体为石英管，内径 0.2 ~ 0.5mm，



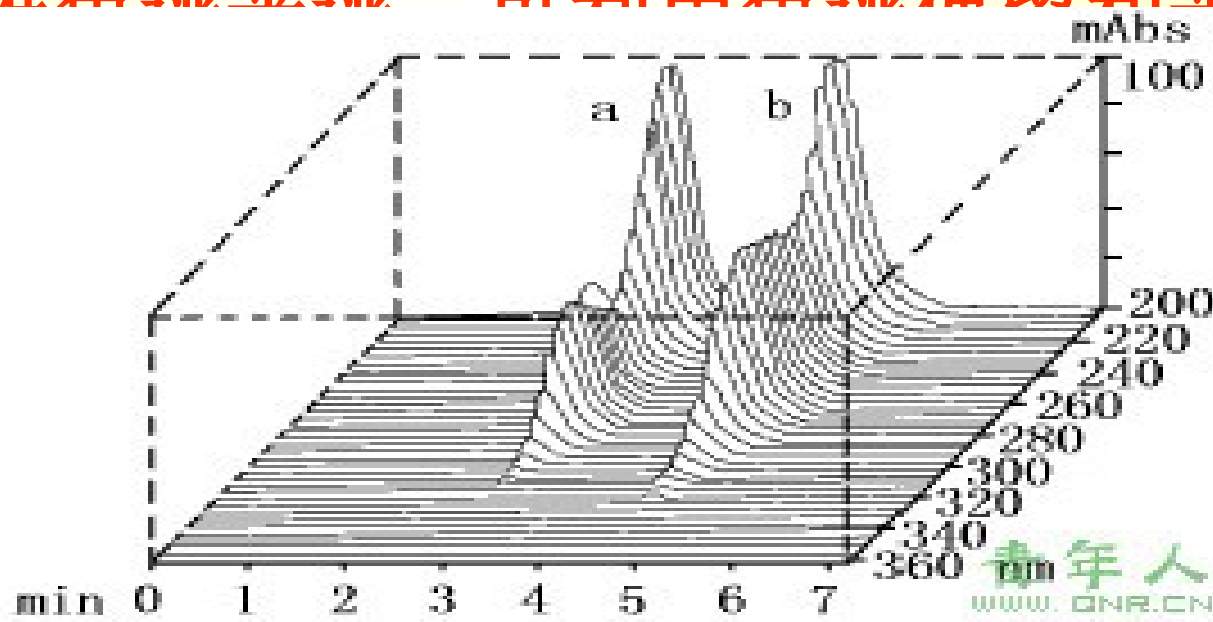
四、检测系统

- ❖ **检测器的作用是将样品组成和含量的变化转变为可供检测的信号。**
- ❖ **检测器的要求是：灵敏度高，重复性好、线性范围宽、死体积小以及对温度和流量的变化不敏感等。**

检测器的类型

❖ **专用型检测器**，又称**溶质性质检测器**，它仅对被分离组分的物理或物理化学性质有响应。

❖ **有紫外（光电二极管阵列检测器）**，可得到**三维色谱图**，**可利用各谱带吸收光谱特征**、**荧光**



检测器的类型

❖ **通用型检测器**，又称**总体性检测器**，它对**试样和洗脱液总的物理和物理化学性质**响应。

⚡ **有示差折光检测器、蒸发管检测器等。**



❖ 液相色谱通用型检测器有示差折光检测器和蒸发光散射检测器，其中紫外检测器用于具有紫外吸收的化合物，蒸发光散射检测器对糖类物质响应较好，荧光检测器可用于黄曲霉素的测定。



五、 数据处理系统

❖ 色谱工作站记录和处理色谱分析数据

❖ 工作站的功能主要包括：

✧ 自动诊断功能、智能控制功能、数据实时采集和图谱处理功能、进行计量认证功能和多台仪器控制功能等

第五节 高效液相色谱法的应用 @

- ❖ 一、 定性定量分析
- ❖ 二、 制备纯物质
- ❖ 三、 分离

一、定性定量分析

❖ 定性分析方法：

如标准对照法，保留值定性法、相对保留值定性法和文献值对照法等。也可收集分离馏分，用专属的化学反应或红外、荧光、质谱等非色谱法定性

❖ 定量分析方法：

外标法、内标法（同 GC）

二、制备纯物质

❖ 其方法是：在色谱仪的出口处，安装一个馏分收集器，按色谱峰の出峰信号起落，逐一收集起来，除去流动相，即可得到物质的纯品，纯度可达 99.99% 以上。

三、分离

❖ 成果:

❧ 高效液相色谱法不仅分离了大量的无机物（如稀土及各种裂变产物等），同时还对大量的合成有机物、天然产物、核酸、核甙、核甙酸及有关的化合物进行了有效的分离，解决了许多生物学上的重要问题（如蛋白质的结构和氨基酸的快速分离等）。

❖ 优点:

❧ 它不受样品挥发度和热稳定性的限制，非常适合于分离生物药品的大分子、离子型化合物、不稳定的天然产物以及其它高分子量和挥发性差的混合物。