

第 13 章 高效液相色谱法

教学时数：6 学时

教学要求：

1. 熟悉 HPLC 的基本原理。
2. 了解高效液相色谱法的优点及使用范围；
3. 理解常用检测器的原理、优缺点及适用范围；
4. 理解各种分离方式（液固色谱；液液色谱；键合相色谱；离子交换色谱；离子对色谱；排阻色谱）的原理、适用的分析对象及选择原则。

教学重点与难点：

1. 高效液相色谱法。高效液相色谱法的特点。高效液相色谱与气相色谱的异同点。
2. 高效液相色谱仪的组成及工作原理。
3. 高效液相色谱的固定相及流动相。
4. 高效液相色谱的分离方式（液固色谱；液液色谱；键合相色谱；离子交换色谱；排阻色谱）。
5. 色谱分离方式的选择。

13-1 概述

高效液相色谱法是以气相色谱为基础，在经典液相色谱实验和技术基础上建立的一种液相色谱方法。

经典 LC 与 HPLC 比较

	经典LC	HPLC
柱之内径	1~5cm	~0.4cm
长度	50~100cm	15~50cm
填充材料粒度	150 μ m~200 μ m	4 μ m~10 μ m
使用压力	1~10atm	50~200atm
分离时间	0.5h~天	~10min

HPLC 特点：高压、高速、高效、高灵敏度、样品回收方便

与气相色谱法比较，HPLC 的优点：

1. 分析对象广 气相色谱只限于分析气体和沸点较低的化合物；HPLC 不受样品挥发性和热稳定性的限制，适用于高沸点、热稳定性差、摩尔质量大的物质。原则上讲，几乎可以分析除永久气体外所有的有机和无机化合物。
2. 流动相对分离起作用 气相色谱的流动相仅起运载作用，对组分不产生相互作用力；HPLC 的流动相对组分产生相互作用力，相当于增加了一个控制和改进分离条件的参数。
3. 经常在室温条件下操作 气相色谱法一般在较高温度下进行

一. 液相色谱分离原理及分类

液相色谱分离原理：液相色谱的分离系统也由两相——固定相和流动相组成。被分离混合物由流动相液体推动进入色谱柱中。根据各组分在固定相及流动相中吸附能力、分配系数、离子交换作用或分子尺寸大小的差异进行分离。

色谱分离的实质是样品分子与溶剂（流动相）及固定相分子间的作用力，作用力的

大小，决定色谱过程的分离行为。

根据分离机理可分为：液—固吸附色谱法、液—液分配色谱法、离子色谱法和凝胶色谱法。

13-2 高效液相色谱仪

高效液相色谱仪一般都具备贮液器、高压泵、梯度洗提装置（用双泵）、进样器、色谱柱、检测器、恒温器、记录仪等主要部件。

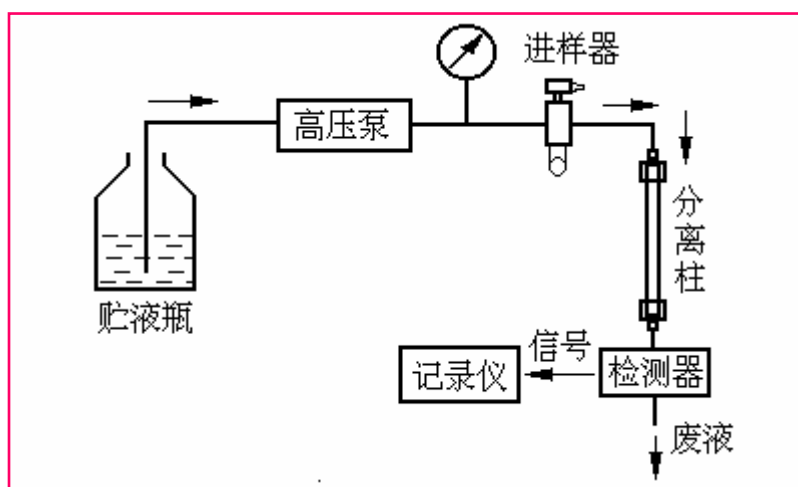


图 高效液相色谱仪的流程

一. 高压输液泵及梯度洗脱装置

1. 高压输液泵

高压输液泵是液相色谱仪的关键部件，其作用是将流动相以稳定的流速或压力输送到色谱系统。输液泵的稳定性直接关系到分析结果的重复性和准确性。

基本要求：(1) 流量准确可调， $0.1 \sim 10 \text{ ml/min}$

(2) 耐高压， $40 \sim 50 \text{ MPa}$

(3) 液流稳定，无脉动

(4) 死体积小，要求小于 0.5 ml

2. 梯度洗脱装置

梯度洗脱是使流动相中含有两种或两种以上不同极性的溶剂，在洗脱过程中连续或

间断改变流动相的组成，以调节它的极性，使每个流出的组分都有合适的容量因子，并使样品中的所有组分可在最短的分析时间内，以适用的分离度获得圆满的选择性分离。

内梯度：利用两台高压输液泵，将两种不同极性的溶剂按一定比例送入梯度混合室，混合后进入色谱柱。

外梯度：一台高压泵，通过比例调节阀，将两种或多种不同极性的溶剂按一定的比例抽入高压泵中混合。

三. 进样装置

通常使用耐高压的六通阀进样装置。

四. 色谱柱

色谱柱是色谱仪最重要的部件（心脏）。通常用后壁玻璃管或内壁抛光的不锈钢管制作的，对于一些有腐蚀性的样品且要求耐高压时，可用铜管、铝管或聚四氟乙烯管。

柱子内径一般为 1~6 mm。常用的标准柱型是内径为 4.6 或 3.9 mm，长度为 15~30 cm 的直形不锈钢柱。填料颗粒度 5~10 μm ，柱效以理论塔板数计大约 7000~10000。

发展趋势是减小填料粒度和柱径以提高柱效。

五. 检测器

1. 紫外吸收检测器

紫外吸收检测器是目前 HPLC 中应用最广泛的检测器。它灵敏度高，线性范围宽，对流速和温度变化不敏感，可用于梯度洗脱，它要求被检测样品组分有紫外吸收，使用的洗脱液无紫外吸收或紫外吸收波长与被测组分紫外吸收波长不同，在被测组分紫外吸收波长处没有吸收。

2. 光电二极管阵列检测器（PDAD）

3. 示差折光检测器 (DRD)

示差折光检测器也称折光指数 (RI) 检测器, 是一种通用型检测器, 只要被测组分与洗脱液的折光指数有差别就可使用。

4. 电导检测器

是离子色谱法应用最多的检测器, 依据物质在某些介质中电离后所产生电导变化来测定电离物质的含量。受温度的影响较大, 需放在恒温箱中。pH>7 时不够灵敏。

5. 荧光检测器

荧光检测器是一种专用型检测器, 灵敏度在目前常用的 HPLC 检测器中最高, 在 HPLC 中应用较多。仅次于紫外吸收。它用于能激发荧光的化合物。

6. 蒸发激光散射检测器

13-3 高效液相色谱法的主要分离类型

一. 液固吸附色谱法

1. 基本原理: 利用溶质分子占据固定相表面吸附活性中心能力的差异。
2. 固定相: 是固体吸附剂, 有下列两类: 极性 (硅胶、氧化铝)、非极性 (活性炭)。
3. 液固吸附色谱流动相: 各种不同极性的一元或多元溶剂。

流动相的基本要求:

- (1) 能溶解被分离的样品
- (2) 与所用检测器相匹配
- (3) 粘度尽可能小, 以获得高的柱效
- (4) 价格便宜、毒性小、易于纯化

流动相的选择原则:

极性大的试样用极性较强的流动相; 极性小的则用低极性流动相。

4. 分析对象：适用于分离相对分子质量中等的油溶性试样，对具有官能团的化合物和异构体有较高选择性.而对强极性或离子型的样品，有时会发生不可逆吸附，不能得到满意的结果。

二. 液-液分配色谱

液-液分配色谱的固定相与流动相均为液体（互不相溶）。

1. 基本原理

主要基于样品分子在流动相和固定相间的溶解度不同（分配作用）而实现分离的液相色谱分离模式。

分析对象：分析同系物及含有不同官能团的多组分的混合物。

2. 固定相

固定相是固定液涂抹在载体上制成。载体有全多孔型载体、表面多孔型载体、全多孔型离子载体；固定液： β,β -氧二丙腈，聚乙二醇，十八烷和角鲨烷。

3. 流动相

要求：对固定相的溶解度尽可能小。对于亲水性固定液，应选择疏水性流动相；反之，相反。

三. 化学键合相色谱

化学键合相色谱是在化学键合固定相上进行物质分离的一种液相色谱方法。

化学键合固定相：以化学反应的方法将功能分子结合到惰性载体上(全多孔或薄壳型微粒硅胶)。

化学键合固定相分类：根据在硅胶表面（具有 $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ 基团）的化学反应不同，键合固定相可分为：硅氧碳键型（ $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{C}$ ）；硅氧硅碳键型（ $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{C}$ ）硅碳键型（ $\equiv\text{Si}-\text{C}$ ）和硅氮键型（ $\equiv\text{Si}-\text{N}$ ）四种类型。

1. 反相键合相色谱法

- (1) 分离机制：疏溶剂作用理论。
- (2) 固定相：极性小的烷基键合相，如C₈柱，C₁₈柱（ODS柱——HPLC约 80%问题）。
- (3) 流动相：极性大的甲醇-水或乙腈-水。反相键合相色谱法中，流动相极性 > 固定相极性。

2. 正相键合相色谱法

- (1) 分离机制：依靠溶质分子与固定相之间的静电力、诱导力、或氢键作用力。
- (2) 固定相：极性大的氰基、氨基和二醇基键合相。
- (3) 流动相：非极性或极性小的溶剂+适量的有机极性调节剂（氯仿、醇、乙腈等）。

3. 离子性键合相色谱法

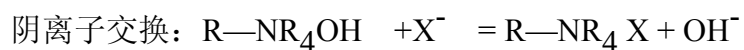
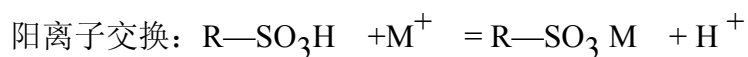
- (1) 固定相：以薄壳型或全多孔微粒型硅胶为基质，化学键合各种离子交换基团。
- (2) 流动相：一般为缓冲溶液。

化学键合固定相的优点：改变流动相的组成和种类，可有效分离各种类型化合物（极性、非极性和离子型），适合于梯度淋洗。

四. 离子交换色谱法

1. 离子交换色谱的分离原理

在离子交换色谱中，样品离子对离子交换剂上带固定电荷的活性交换基团之间发生离子交换，不同的样品离子对离子交换剂的亲和力不同，或者说相互作用不同，作用弱的溶质不易被保留，先从柱中被冲洗出来，反之，作用强的，保留较长，较晚淋洗出来。



- 2. 固定相：阳离子交换树脂或阴离子交换树脂。

3. 流动相：阴离子离子交换树脂作固定相，采用酸性水溶液；阳离子离子交换树脂作固定相，采用碱性水溶液。

4. 分析对象：离子或可解离的化合物、氨基酸、核酸等。

五. 排阻色谱法

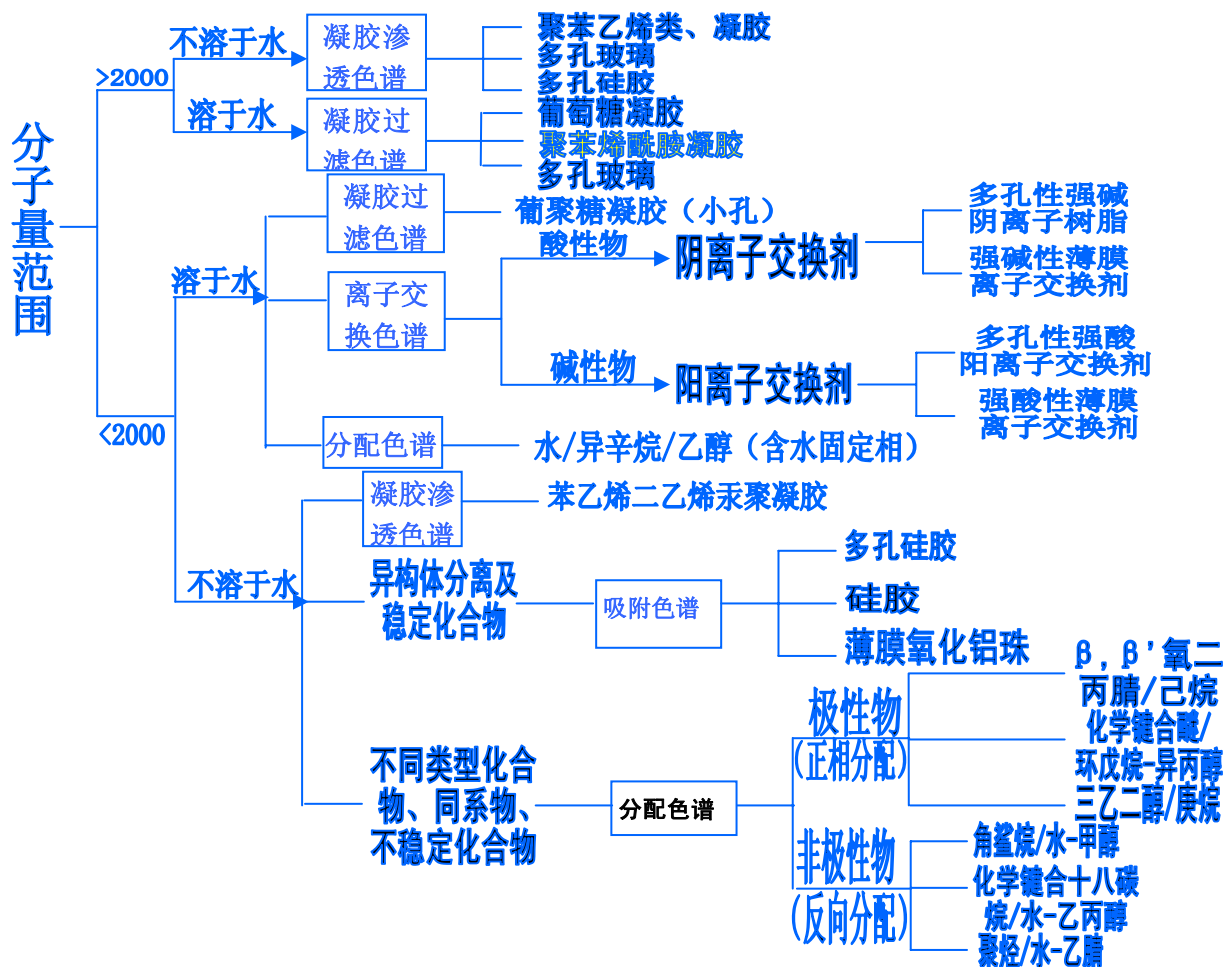
1. 基本原理：立体排阻，按分子大小分离。小分子可以扩散到凝胶空隙，由其中通过，出峰最慢；中等分子只能通过部分凝胶空隙，中速通过；而大分子被排斥在外，出峰最快；溶剂分子小，故在最后出峰。

2. 固定相：凝胶(具有一定大小孔隙分布)。

3. 流动相：要求能溶解样品，粘度低，与检测器相匹配。

4. 分析对象：分离大分子物质，分离范围是相对分子质量 2000~2,000,000。

13-4 色谱分离方法的选择



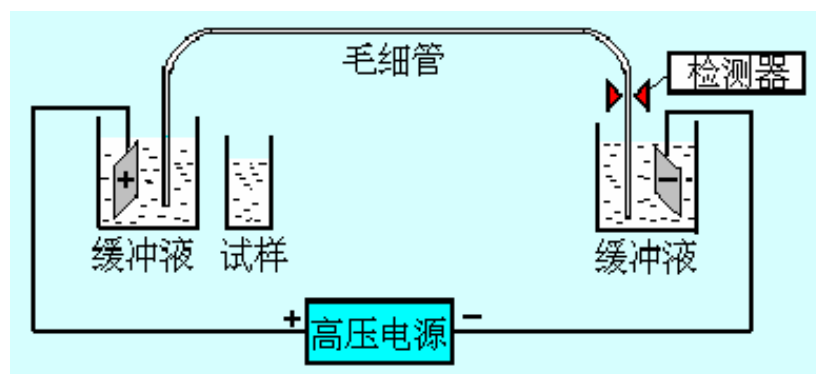
13-5 毛细管电泳

一. 高效毛细管电泳的基本原理

当带电离子以速度 v 在电场中移动时，受到大小相等、方向相反的电场推动力和平动摩擦阻力的作用。

物质离子在电场中差速迁移是电泳分离的基础。

毛细管电泳仪器：



本章小结

1. 高效液相色谱法是以气相色谱为基础,在经典液相色谱实验和技术基础上建立的一种液相色谱方法。其特点:高压、高速、高效、高灵敏度
2. 液相色谱是根据被分离混合物各组分在固定相及流动相中吸附能力、分配系数、离子交换作用或分子尺寸大小的差异进行分离。根据分离机理可分为:液—固吸附色谱法、液—液分配色谱法、离子色谱法和凝胶色谱法等。
3. 高效液相色谱仪一般都具备贮液器、高压泵、梯度洗提装置(用双泵)、进样器、色谱柱、检测器、恒温器、记录仪等主要部件。常用检测器有可变波长可见——紫外检测器,荧光检测器、示差折光检测器。
4. 在选择固定相与溶剂系统后,影响 HPLC 效率的因素主要有:流动相的线速度、颗粒直径、柱直径及溶质的扩散等。