

第十六章
高效液相色谱法
(High performance
liquid
Chromatography,HPLC)

16.1 概述

16.2 高效液相色谱仪

16.3 高效液相色谱分离法

16.4 色谱分离方法选择

下页



帮助

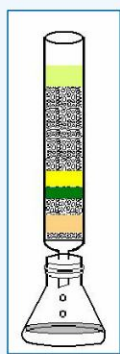
返回

本章作业： P380

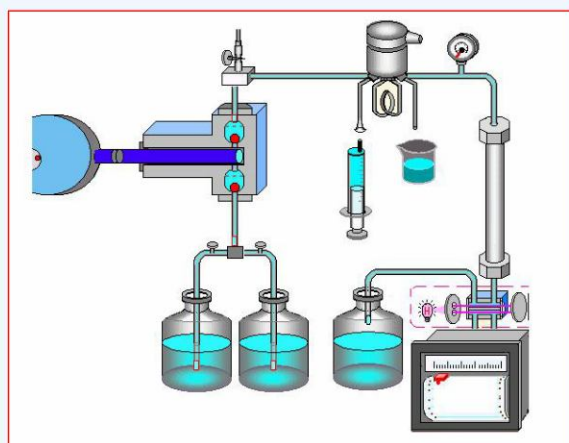
16-7, 16-16

16.1 概 述

16.1.1 高效液相色谱法与经典液相色谱法比较



经典液相柱
色谱装置



高效液相色谱仪

例：分离20种氨基酸

经典柱色谱

HPLC

柱长：170 cm
柱径：0.9 cm
F：30 mL/h
t_{分离}：>20 h

t_{分离}：1 h

	经典液相色谱	HPLC
固定相粒径	150-200 μm	3-10 μm
流动相驱动方式	重力或低压泵 很慢	高压泵(4.9 × 10 ⁷ Pa) 快(1-10mL/min)
流动相流速		

高压
高效
高速
自动化

16.1.2 高效液相色谱法与气相色谱法比较

- 适合于分子量大、高沸点、热不稳定的有机及生化试样，离子型化合物和高聚物的分离分析。
- 液体流动相参与分离过程，选择性高。
- 固定相类型多，分析方法选择余地大。
- 较低的柱温，有利于色谱分离。
- 液体扩散性小，纵向扩散可忽略，柱外扩张可忽略。
- 试样易于制备及回收。
- 仪器复杂昂贵。

16.2 高效液相色谱仪

16.2.1 仪器结构和部件

Agilent 1290 HPLC



2014-09-11

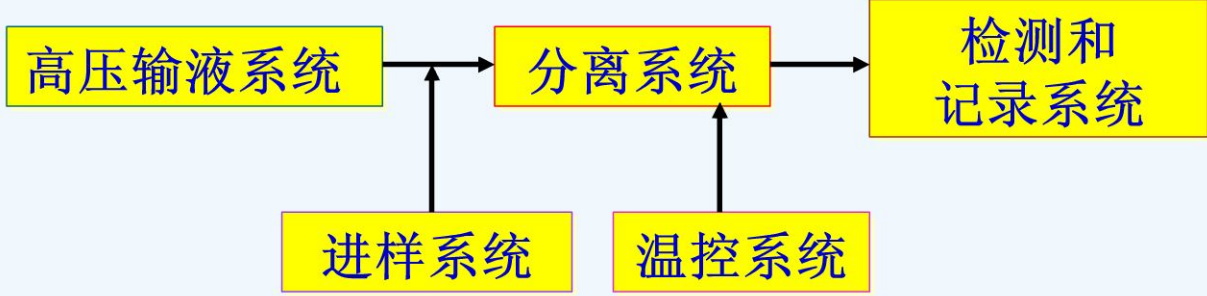
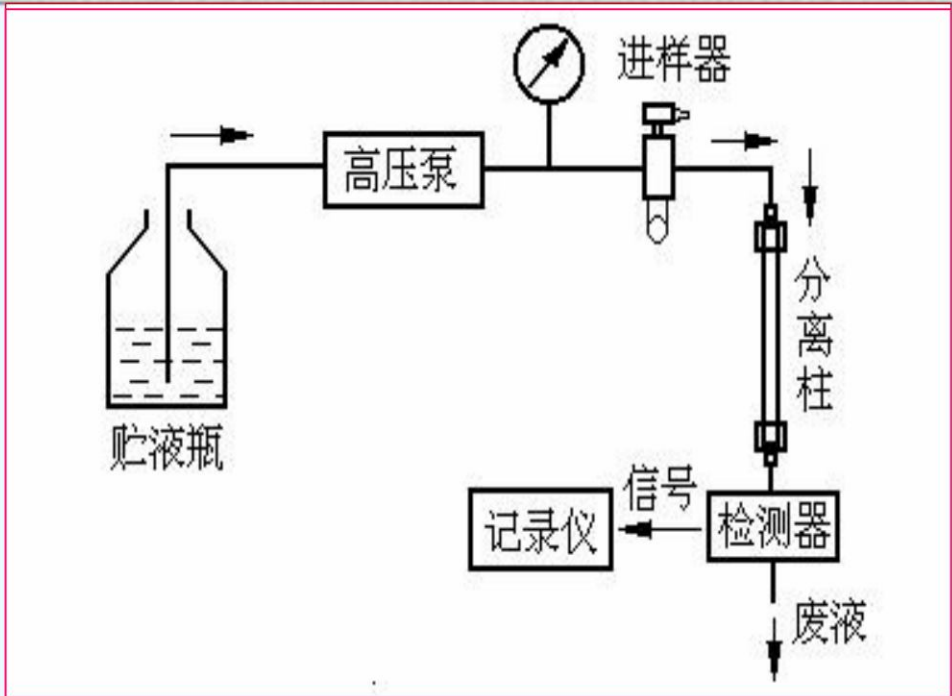
王图辉

上页

下页

返回

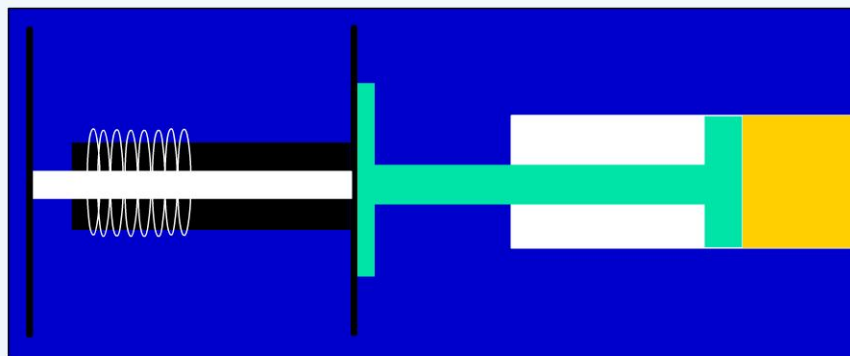
5



16.2.2 仪器部件简介

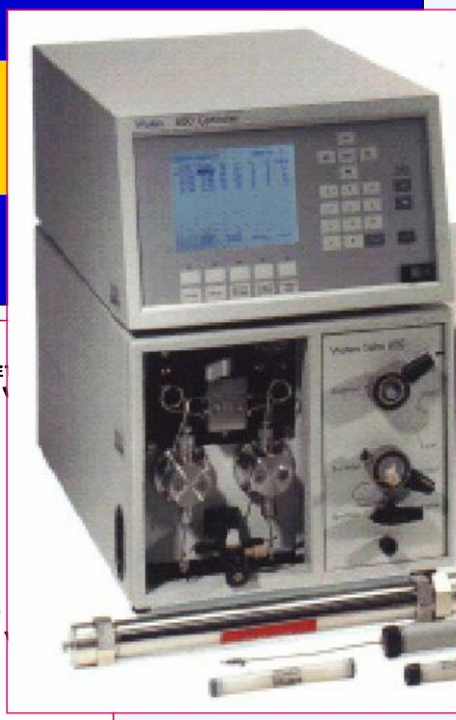
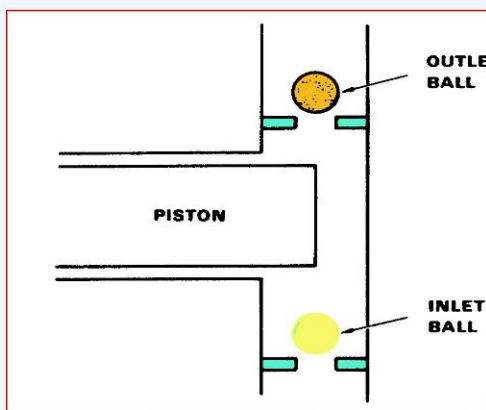
一、高压输液系统

1. 高压泵

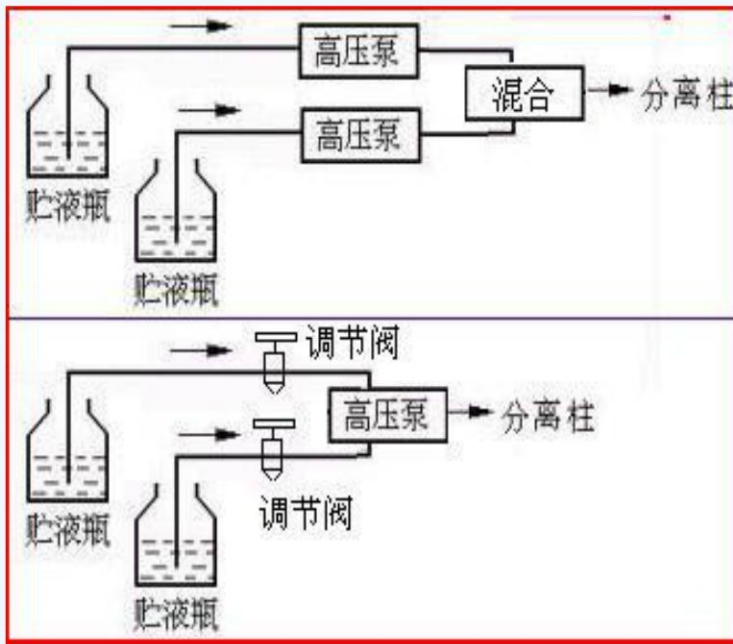


要求

输出压力高
平稳、脉冲小
流量稳定可调
耐腐蚀



2. 梯度淋洗 (Gradient elution)

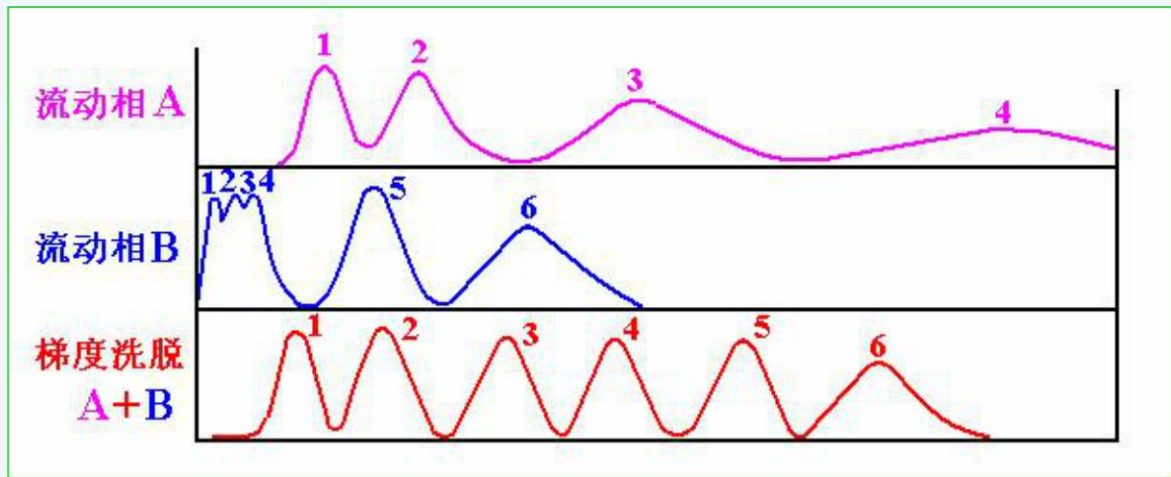


高压梯
度

低压梯
度

梯度洗脱

通过改变流动相的组成来调整组分的 k 值，改变分离因子 α 值，以达到最短时间内得到最佳分离的目的。

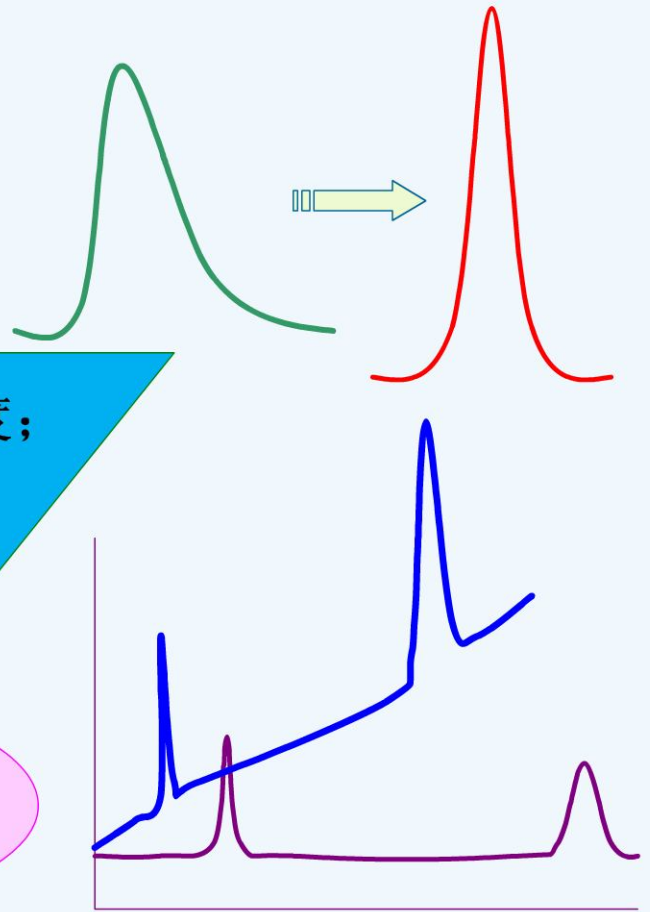


等度洗脱与梯度洗脱

梯度洗脱的特点

- ◆ 改善分离，加快分析速度；
- ◆ 改善峰形，减少拖尾；
- ◆ 可能引起基线漂移

分配比变化范围宽的复杂样品应采取梯度洗脱方式分离

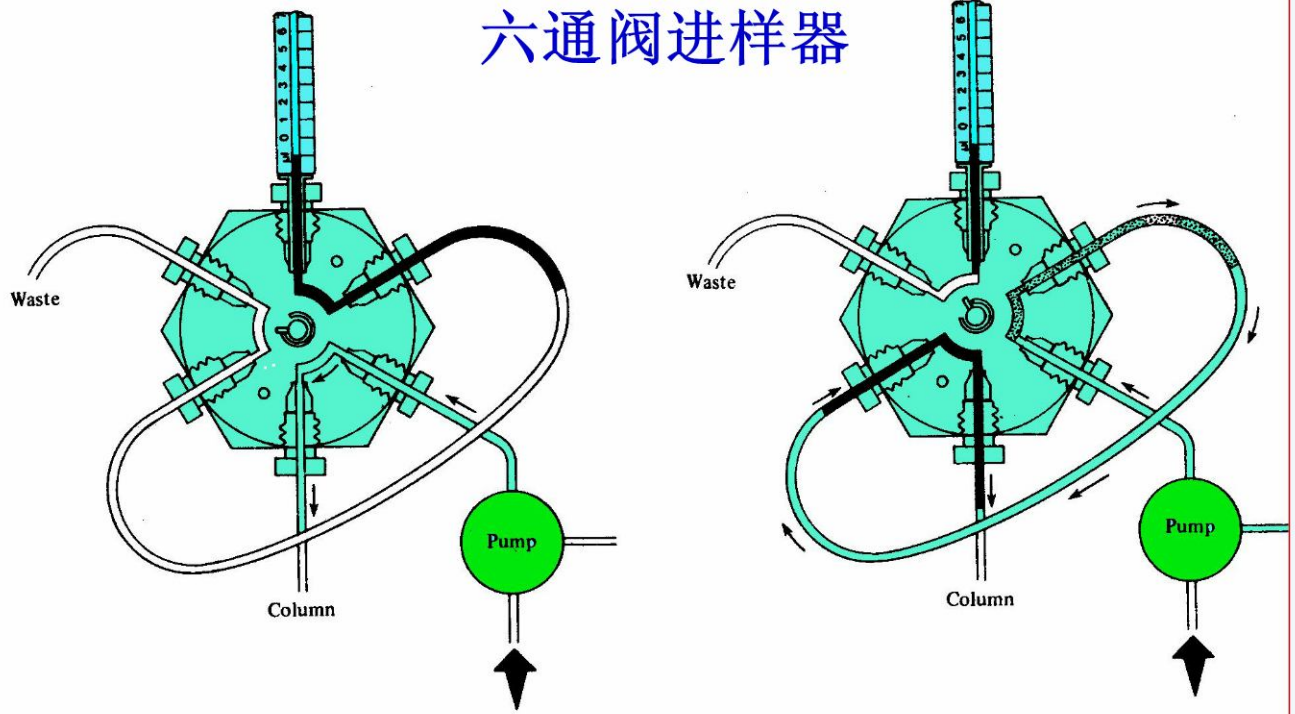


2. 对流动相溶剂的一般要求

- 1) 对样品有一定的溶解度，以防在柱头产生沉淀。
- 2) 适用于所选择的检测器。
- 3) 化学惰性好，以免破坏固定相。
- 4) 低粘度，增加样品的扩散系数，提高柱效。
- 5) 纯度高。溶剂不纯会增加检测器噪声，产生伪峰。

二、进样系统

六通阀进样器



充样状态

注射状态

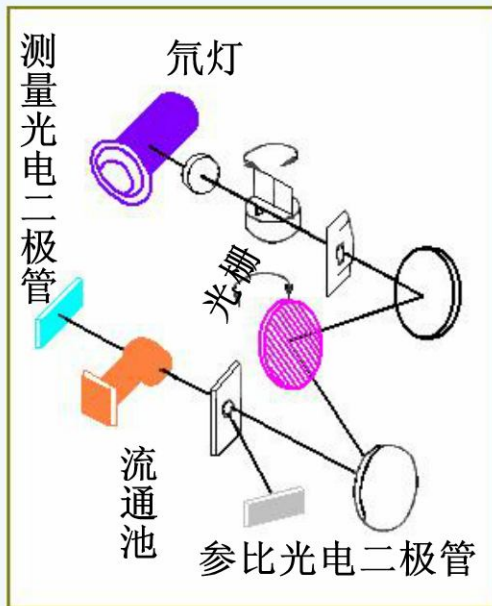
三、分离系统



	分析型柱	制备型柱
内径	0.05~6mm	10-50mm
柱长	5~30cm	10-50cm
柱填料粒径	1.7~5 μ m	5~10 μ m

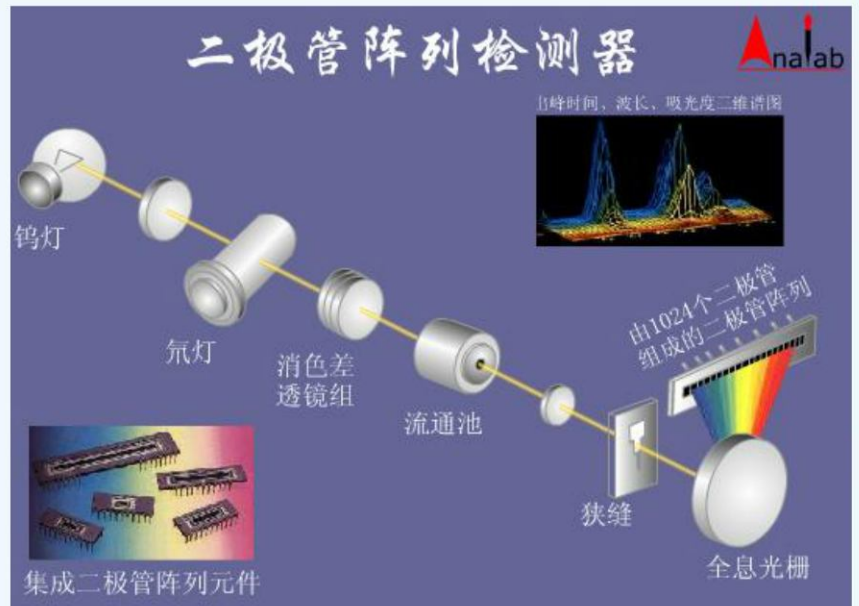
四、检测系统

1 紫外吸收检测器

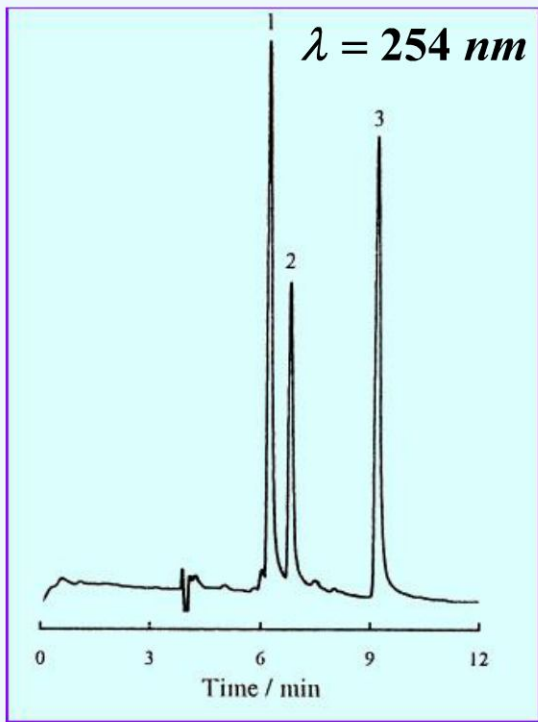


(a) 可变波长紫外检测器

2 二极管阵列检测器

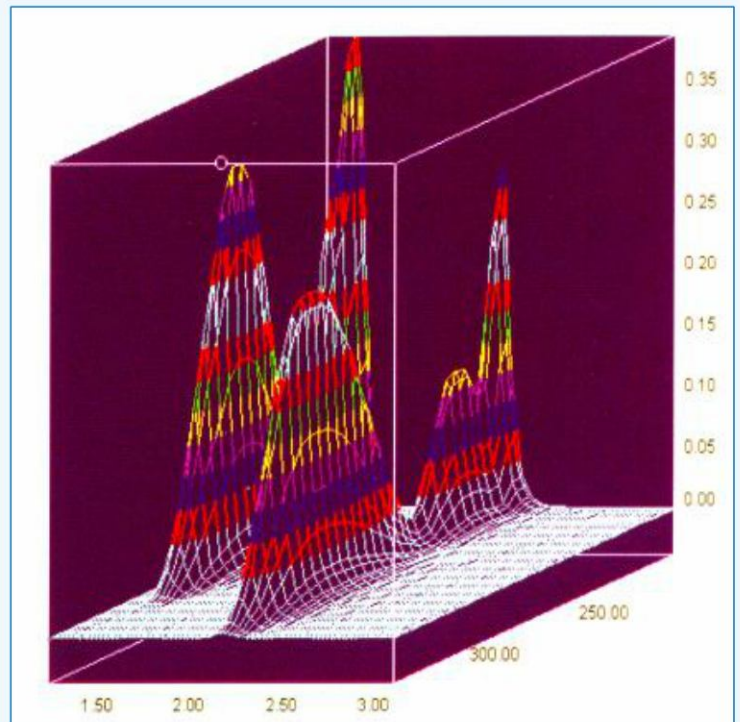


(b) 二极管阵列检测器



(a)

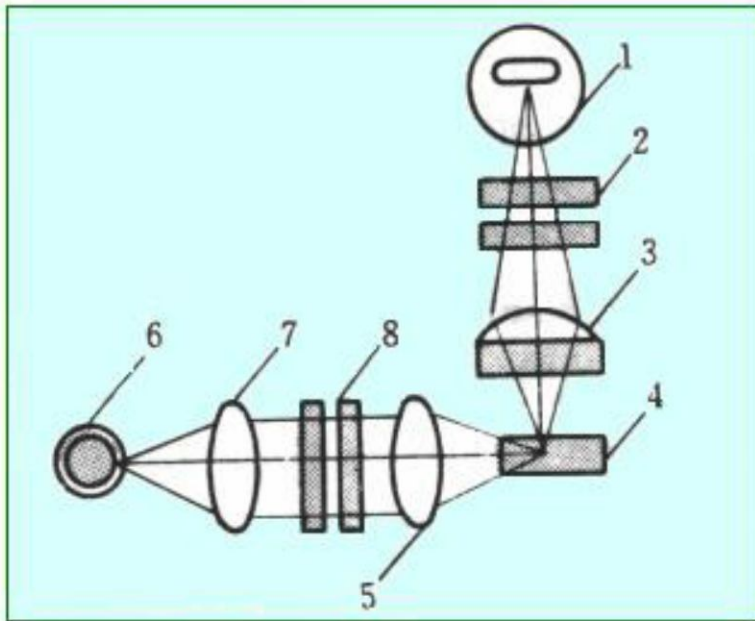
(a) 可变波长紫外检测器



(b)

(b) 二极管阵列检测器

3 荧光检测器



荧光检测器示意图

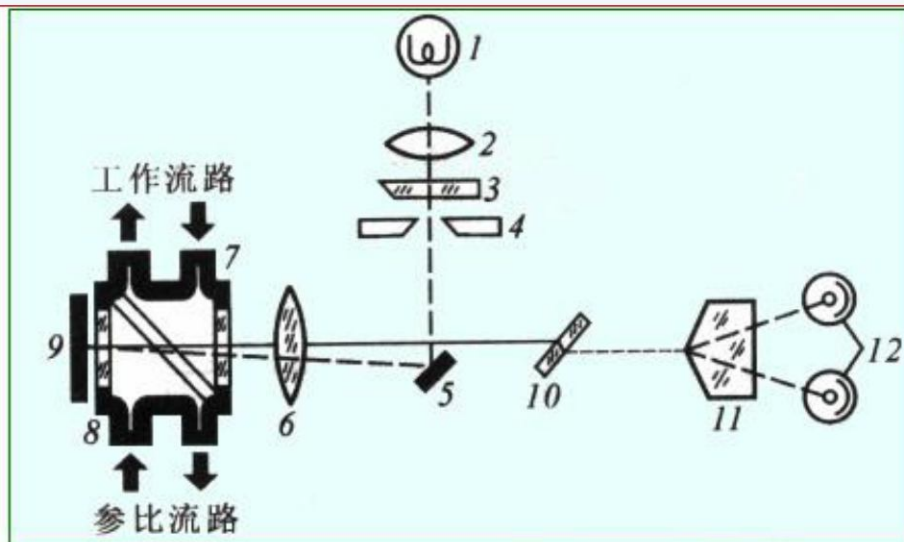
1—光电倍增管；2—发射滤光片；3—透镜；
4—样品流通池；5—透镜；6—光源；7—透镜
8—激发滤光片。

◆灵敏度高，选择性好，可用于梯度洗脱。

4 示差折光检测器

◆利用组分与流动相的折射率之差进行检测。

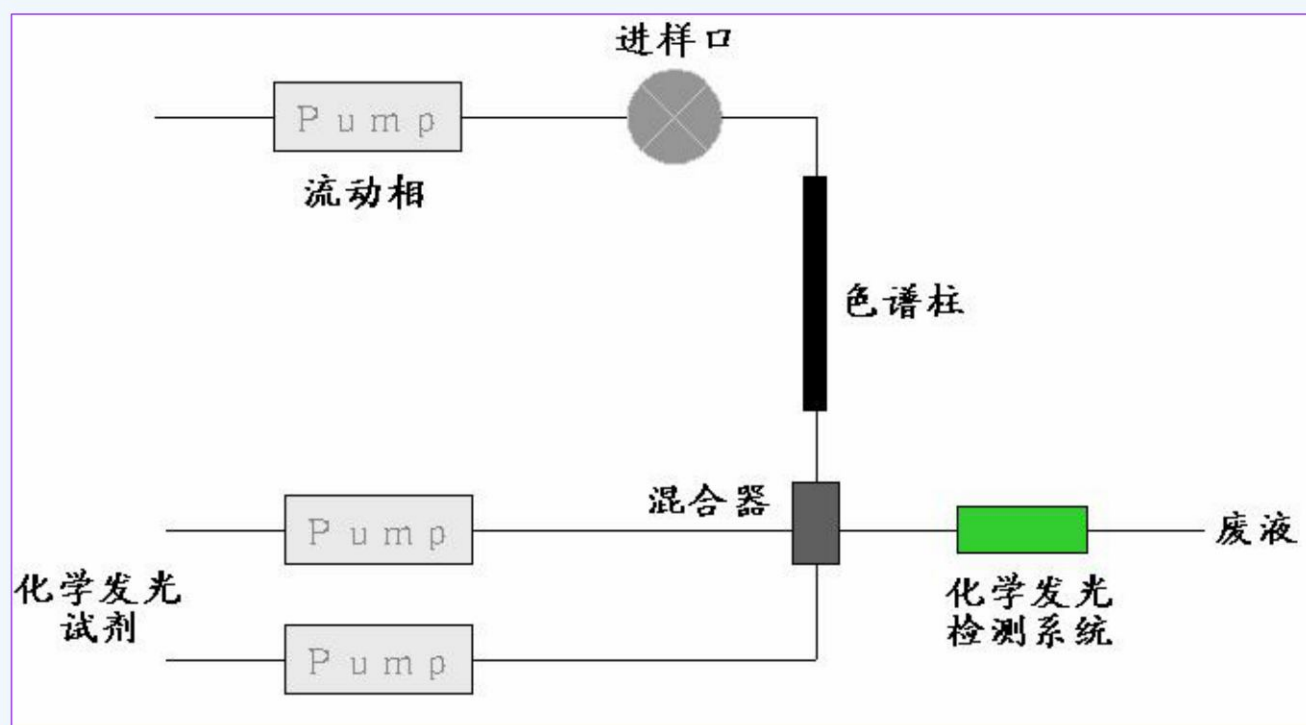
◆通用性好，灵敏度较低，不适用于梯度洗脱。



偏转式差示折光检测器光路图

1. 钨丝灯光源 2. 透镜 3. 滤光片 4. 遮光板 5. 反射镜
6. 透镜 7. 工作池 8. 参比池 9. 平面反射镜
10. 平面细调透镜 11. 棱镜 12. 光电管

5 化学发光检测器

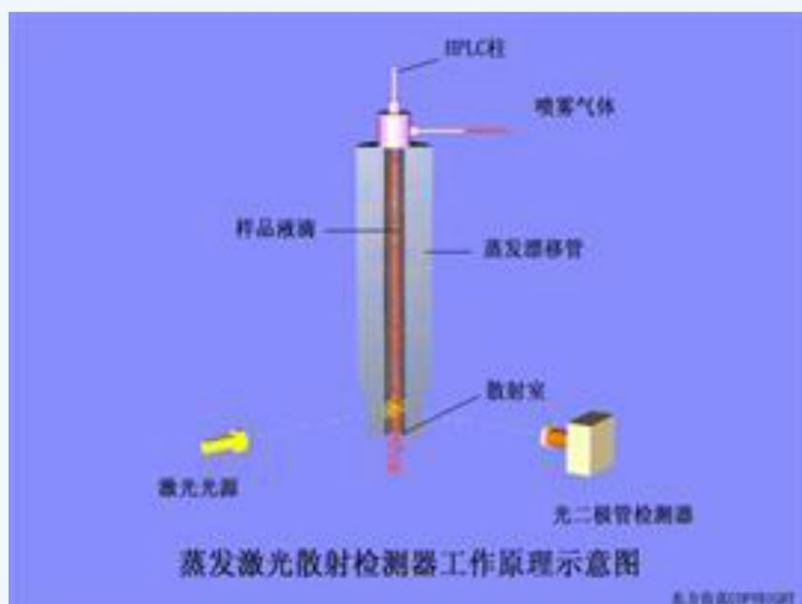


6 电化学检测器

① 电导检测器

② 安培检测器

7 蒸发光散射检测器



8 质谱检测器

各种液相色谱检测器比较

	响应	灵敏度	流速敏感	温度敏感	梯度洗脱	成本
紫外	选择性	ng	否	否	可以	低
荧光	选择性	pg	否	否	可以	较低
示差折光	通用性	mg	是	是	不可以	低
电化学	选择性	ng	是	是	有限制	较低
化学发光	选择性	pg	否	否	可以	较低
蒸发光散射	通用性	pg	否	否	可以	较高
质谱	通用性	pg	否	否	可以	高

一、液—固吸附色谱法(Liquid solid adsorption chromatography, LSC)

流动相为液体，固定相为固体吸附剂的色谱法。

1、分离机制

吸附色谱是被分离组份分子(溶质分子)与流动相分子争夺吸附剂表面活性中心，靠溶质分子的吸附系数不同而分离。如下图。



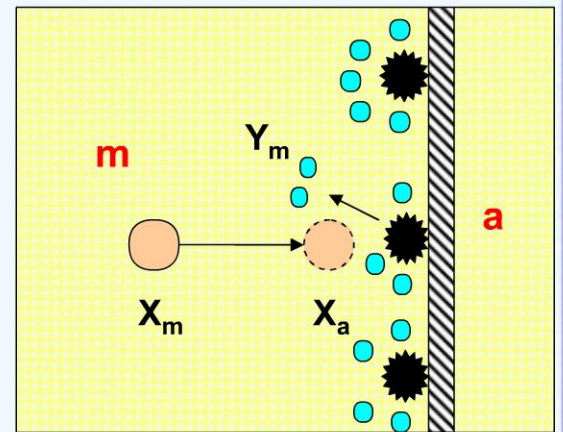
X: 溶质分子, Y: 溶剂分子, m与a表示流动相与吸附剂。

$$K_a = \frac{[X_a][Y_m]^n}{[X_m][Y_a]^n}$$

近似式:

$$K_a = [X_a] / [X_m]$$

K_a 为吸附平衡常数(吸附系数, adsorption equilibrium constant)



二、液—液分配色谱法(Liquid-liquid chromatography, LLC)

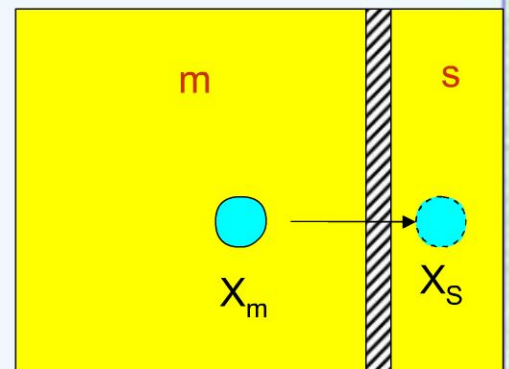
流动相与固定相都是液体的色谱法，称液液分配色谱法。

1、分离机制

分配色谱是被分离组份分子(溶质分子)溶于固定相(s)与流动相(m)达到“平衡”后分配系数不同而分离。如下图。

$$K = \frac{X_s / V_s}{X_m / V_m} = \frac{c_s}{c_m}$$

其它条件一定时，分配系数大的组分，保留时间长。



16.3 各种液相色谱法简介

16.3.1 高效液相色谱法分类

分类

液固吸附色谱(Liquid solid adsorption chromatography, LSC)

液液分配色谱(Liquid-liquid chromatography, LLC)

化学键合相色谱(Bond phase chromatography, BPC)

离子交换色谱(Ion exchange chromatography, IPC)

分子排阻色谱(Molecule exclusion chromatography, MEC)

2、正、反相液液色谱

1) 正相液液色谱 (normal phase, NP)

流动相的极性小于固定相的极性的液液色谱法。

样品中极性小的组分先出峰。

2) 反相液液色谱 (reversed phase, RP)

流动相的极性大于固定相的极性的液液色谱法。

样品中极性大的组分先出峰。

3) 常见溶剂极性顺序

水、甲酰胺、乙腈、甲醇、乙醇、丙醇、丙酮、二氧六环、四氢呋喃、甲乙酮、正丁醇、乙酸乙酯、乙醚、异丙醚、二氯甲烷、氯仿、溴乙烷、苯、氯丙烷、甲苯、甲氯化碳、二硫化碳、环己烷、己烷、庚烷、煤油。

三、化学键合相色谱法(Bond phase chromatography, BPC)

固定液的官能团键合在载体的表面，构成化学键合相。以化学键合相为固定相的色谱法称为化学键合相色谱法。是应用最广泛的色谱法。

1、反相键合相色谱法

非极性固定相和极性流动相组成的色谱体系。

固定相常用十八烷基键合硅胶(octadecylsilane, ODS, C₁₈), 流动相常用甲醇-水或乙腈-水。

1) 分离机制

疏溶剂理论

当一个非极性溶质或溶质分子中的非极性部分与极性溶剂相接触时，相互产生斥力，将导致在溶液中形成一个“空腔”，这种效应称为疏溶剂或疏水效应。

该理论认为：在键合相反相色谱中溶质的保留主要不是由于溶质分子与键合相间的色散力，而是溶质分子与极性溶剂分子间的排斥力，促使溶质分子(S)与键合相的羟基(L)发生疏水缔合。



2、正相键合相色谱法

腈基与胺基化学键合相是正相键合相色谱中常用的固定相。流动相主要由烷基(正己烷)加适量极性调整剂组成。

1) 分离机制

范德华力：定向作用力、诱导作用力和氢键作用力。

2) 流动相的极性与容量因子的关系

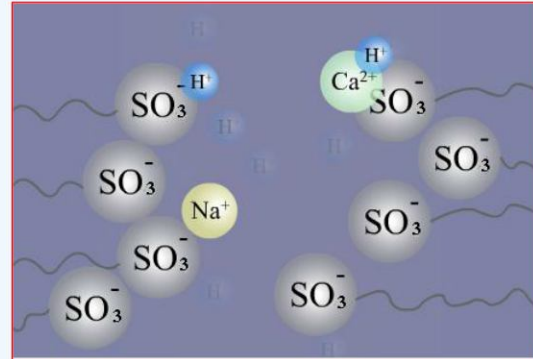
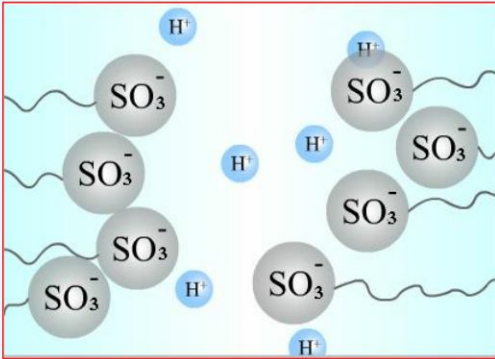
正相洗脱时，流动相的极性增大，洗脱能力增强， k 减小， t_R 减小。

分离结构相似的组分时，极性大的组分后出峰。

四、离子交换色谱法 (Ion exchange chromatography, IEC)

1 分离原理

阳离子交换



阴离子交换



2. 固定相(离子交换树脂)的分类

依据活性基团分类

阳离子交换树脂

交换基为酸性， H^+ 与阳离子交换

强酸型



使用 pH 范围

$pH > 2$

弱酸型



$pH > 6$



$pH > 10$

阴离子交换树脂

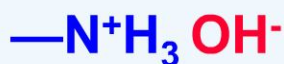
交换基为碱性，阴离子发生交换

强碱型



$pH < 12$

弱碱型

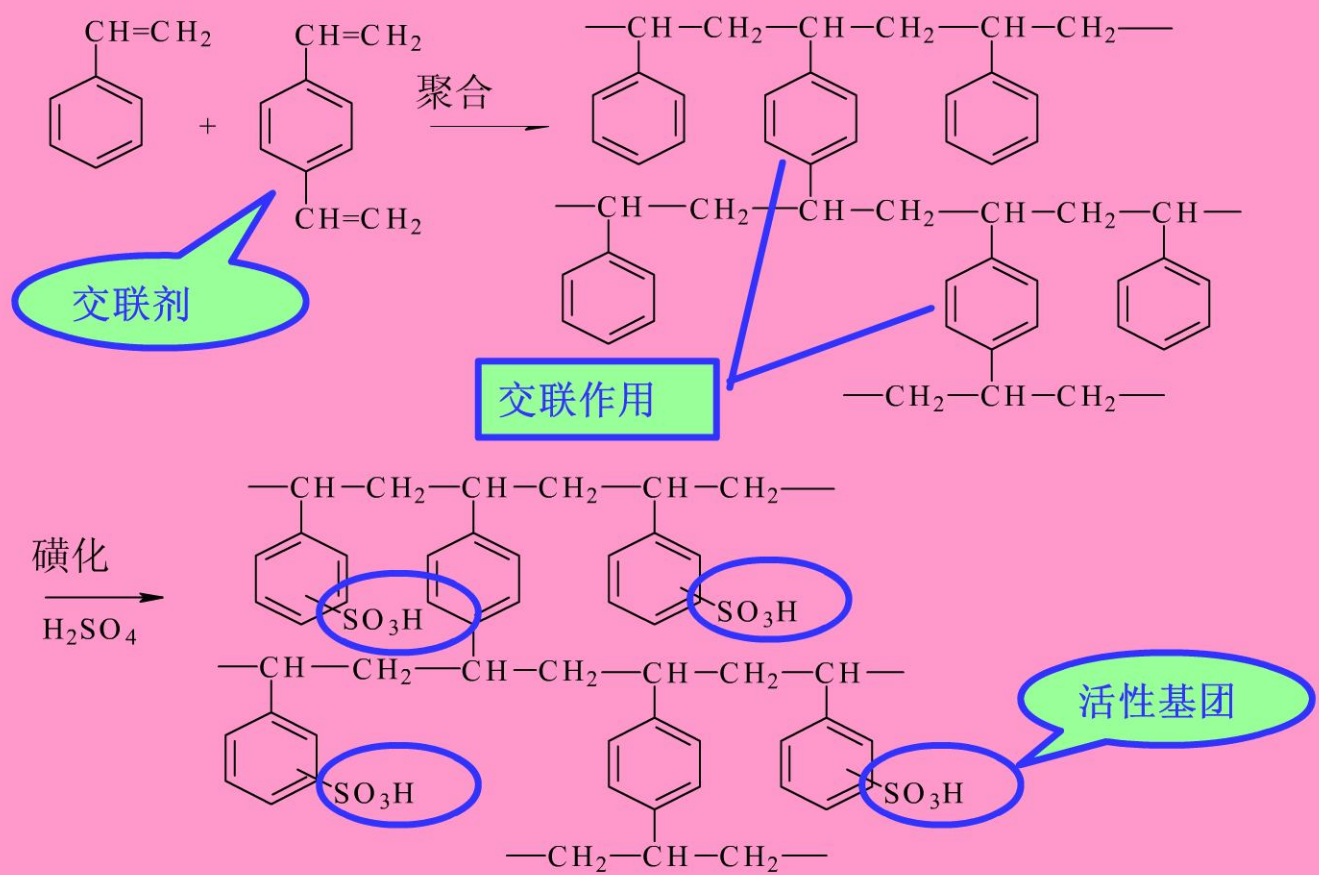


$pH < 4$



3. 阳离子交换树脂的结构

聚苯乙烯磺酸型阳离子交换树脂



4. 影响离子保留的因素

1) 离子的性质

- ◆ 电荷数
- ◆ 半径
- ◆ 极化程度等

2) 流动相性质

洗脱剂种类、浓度、pH及流速

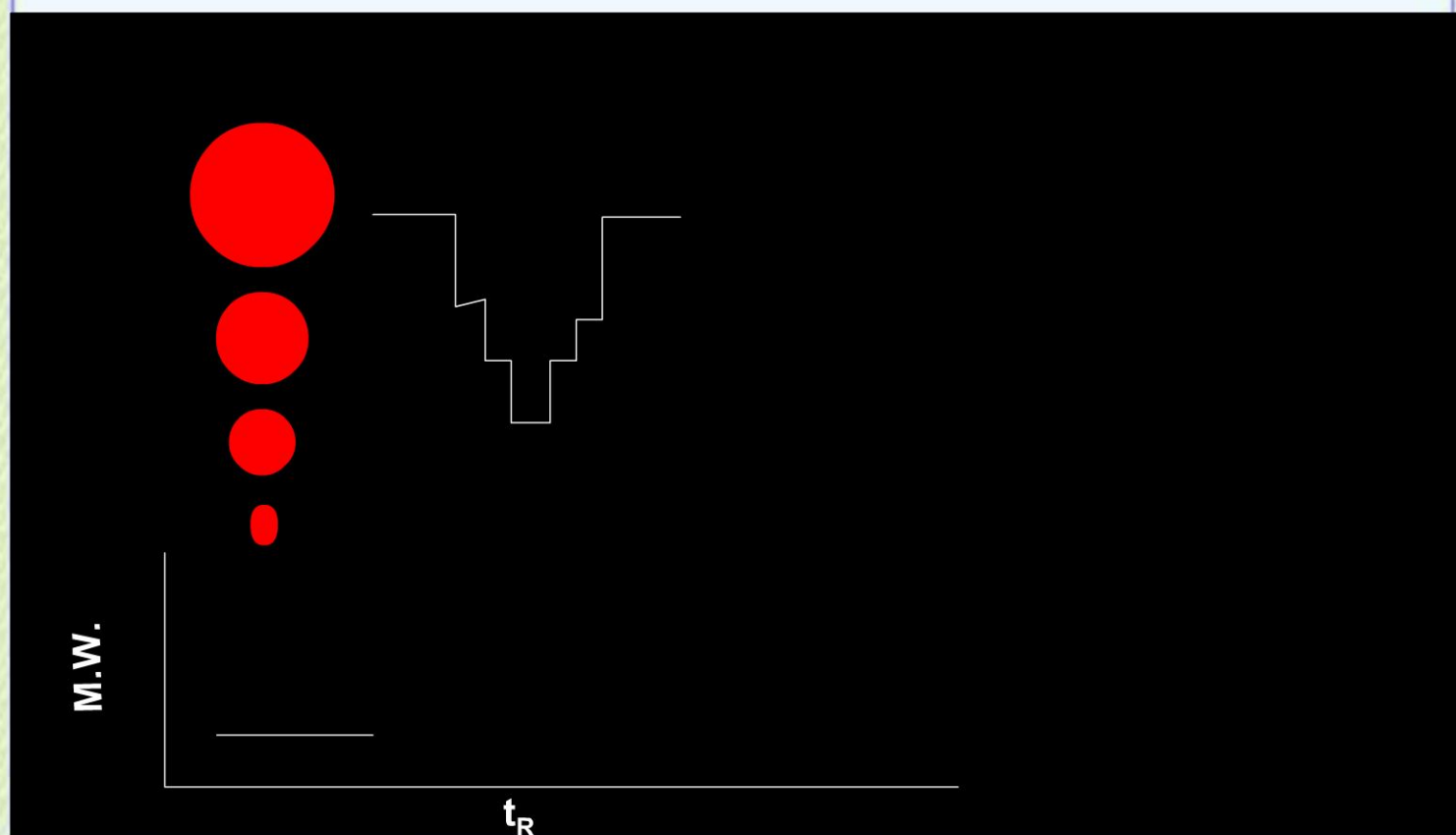
3) 固定相性质

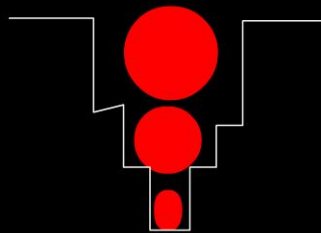
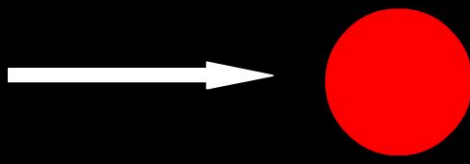
活性交换基团、柱长等

4) 其他条件

温度

五、空间排阻色谱法(Size exclusion chromatography, SEC)

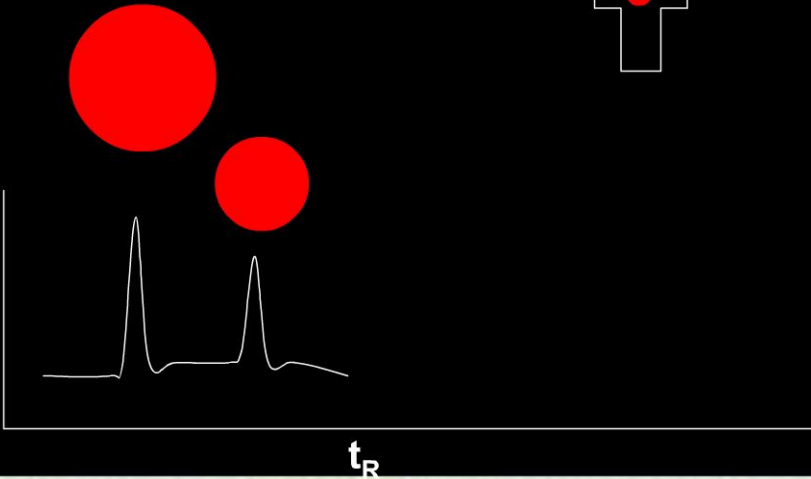
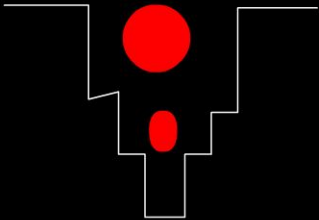


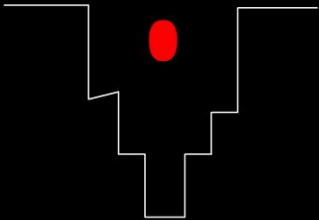


M.W.

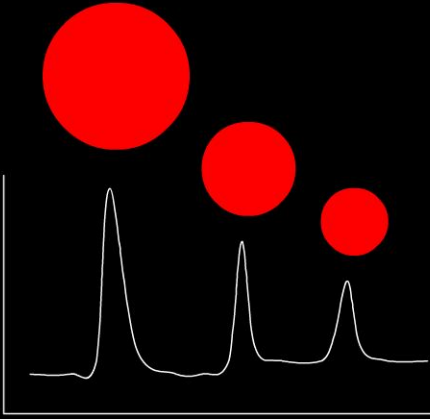


t_R

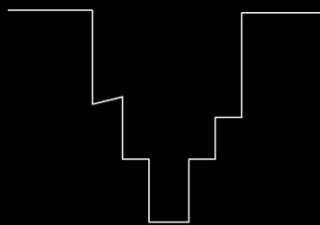




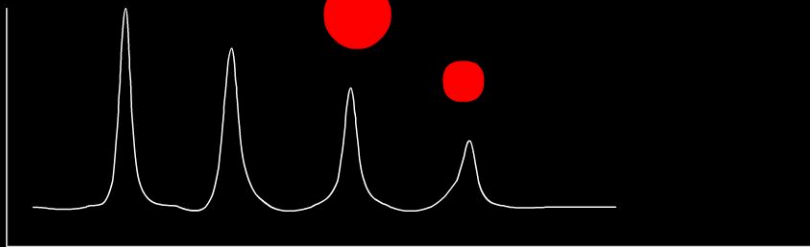
M.W.



t_R



M.W.



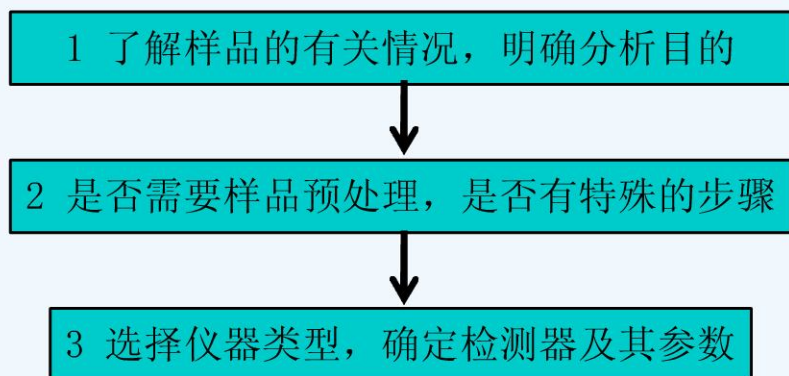
t_R

各种色谱分离方法比较

分离类型		分离原理	固定相	流动相	应用对象
液-固吸附色谱		固定相上吸附解吸	硅胶、氧化铝等固体吸附剂	不同极性的一元或多元溶剂	不同官能团的化合物和异构体
液-液分配色谱		在固定相和流动相上分配	多孔型载体+极性或非极性固定液	与固定液极性相反	分析各种不同性质的物质
化学键合相色谱	反相键合	与固定相缔合、解缔作用	硅胶键合非极性固定相	甲醇、乙腈-水、缓冲溶液等	分离同系物、多环芳烃等
	正相键合	在固定相和流动相上分配	硅胶键合极性固定相	非极性或极性小的溶剂	分离异构体，极性不同的化合物
	离子键合	反复离子交换反应	硅胶键合离子交换基团	缓冲溶液	离子化合物或有机酸碱
离子交换色谱		反复离子交换反应	载体表面涂覆离子交换树脂	酸或碱溶液	离子化合物或有机酸碱、生物物质
排阻色谱		按分子大小分离	凝胶(具有一定大小孔隙分布)	缓冲液或有机溶剂	大分子物质、测量相对分子量

16.4 色谱分离方法的选择

一、HPLC方法建立的步骤



4 选择液相色谱分离类型，色谱柱，流动相，其他相关条件（如波长等），进行预实验，估计最佳条件

5 优化分离条件，选择最佳检测器参数、色谱柱、流动相比例等

6 检查出现的各种现象和问题(包括仪器、样品稳定性等) 选择解决办法和特殊步骤

7a 回收纯化物质

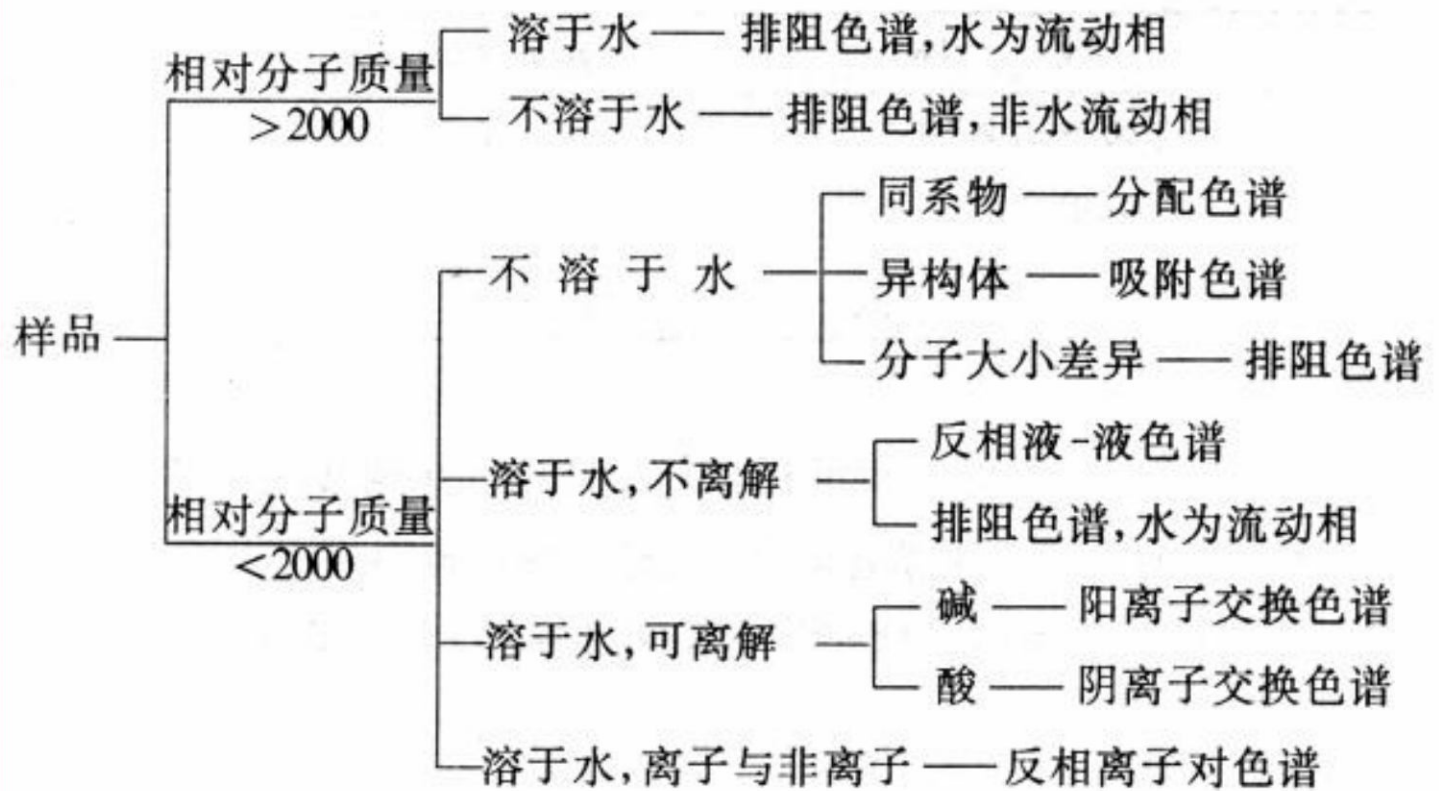
7b 定量校正

7c 定性方法

8 方法论证进入常规实验室

二、色谱分离方法的选择

表 液相色谱分离类型选择参考表





祝同学们考试成功!

