



山东中医药高等专科学校
Shandong College Of Traditional Chinese Medicine

分析化学

高效液相色谱法基础知识

基础化学教研室 王蕾蕾





基础知识

- 高效液相色谱法（HPLC）是继气相色谱法后，70年代初期发展起来的一种以液体做流动相的新色谱技术。
- 高效液相色谱法以经典液相色谱法为基础，引用气相色谱法的理论，采用高效固定相、高压输液泵及高灵敏度在线检测手段。高效液相色谱具有分析速度快、分离效能高、自动化等特点。



基础知识

一、高效液相色谱法与经典液相色谱法的比较

相同点： 流动相都是液体

主要区别： 固定相的差别，
输液设备的差别
检测手段的差别



基础知识

	经典液相色谱法	高效液相色谱法
固定相	一般规格	特殊规格
固定相粒度 (μm)	75~500	3~20
固定相粒度分布 (RSD)	20~30%	<5%
柱长 (cm)	10~100	7.5~30
柱内径 (cm)	2~5	0.2~0.5
柱入口压强 (kg/cm^2)	0.001~0.1	2~40
柱效(每米理论塔板数)	10~100	$10^4\sim 10^5$
样品用量 (g)	1~10	$10^{-7}\sim 10^{-2}$
分析所需时间 (h)	1~20	0.05~0.5
检测手段	不能在线检测	能在线检测



基础知识

二、高效液相色谱法与气相色谱法的比较

相同点：兼具分离和分析功能，均可在线检测

主要区别：分析对象的差别和流动相的差别

1. 分析对象

GC：能气化、热稳定性好、且沸点较低样品；

高沸点、挥发性差、热稳定性差、离子型及高聚物的样品不可检测。

HPLC：溶解后能制成溶液的样品，不受样品挥发性和热稳定性的限制；分子量大、难气化、热稳定性差及高分子和离子型样品均可检测。



基础知识

2. 流动相差别

GC: 流动相为惰性气体，组分与流动相无亲合作用力，只与固定相作用

HPLC: 流动相为液体，流动相与组分间有亲合作用力，为提高柱的选择性、改善分离度优化了条件，对分离起很大作用。



基础知识

	气相色谱法	高效液相色谱法
应用范围	占有有机物的20%	占有有机物的80%
分离效果	高	更高
选择性	流动相是气体，只能选择固定相	流动相是液体，流动相、固定相都可选择。选择性广。
温 度	高温	常温（分离效果好）
灵敏度(g/ml)	10^{-12}	10^{-9}



高效液相色谱法的特点

“三高” “一快” “一广”

- ”高柱效
- 高灵敏度
- 高选择性
- 分析速度快
- 应用范围广泛



基础知识

三、高效液相色谱法的分类

可分为液固吸附色谱法、液液分配色谱法、化学键合相色谱法、离子交换色谱法、空间排阻色谱法等

(一) 化学键合相色谱法 (BPC)

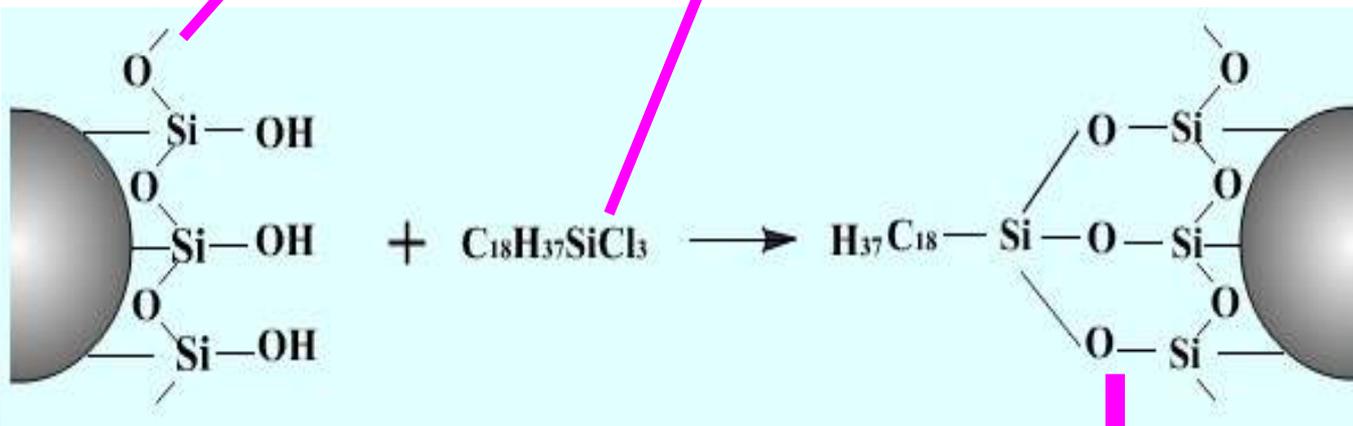
利用化学反应将**固定液**的官能团键合在**载体**表面叫**化学键合相**。固定相为化学键合相的色谱称为**化学键合相色谱法 (BPC)**。



基础知识

硅胶(载体)

十八烷基氯硅烷



十八烷基键合相 (ODS)

固定相



基础知识

化学键合固定相代替机械涂渍的液体固定相。不仅避免了液体固定相的流失，还改善了固定相的功能，提高了分离的选择性。

适用于分离几乎所有类型的化合物。

化学键合相又分为正相键合相和反相键合相。



基础知识

正相键合相色谱法

1. 固定相：极性大的氰基或氨基键合相
2. 流动相：底剂 + 有机极性调节剂
底剂(主体溶剂)：极性小的有机溶剂
3. 流动相极性与 k 的关系
流动相极性 \uparrow ，洗脱能力 \uparrow ， k \downarrow ，组分 t_R \downarrow
4. 出柱顺序：极性小的组分先出柱，极性大的组分后出柱
5. 适用性：极性或强极性组分



基础知识

反相键合相色谱法

1. 固定相：极性小的烷基键合相 C_8 柱， C_{18} 柱 (ODS柱)
2. 流动相：底剂 + 有机调节剂 (极性调节剂)
底剂 (主体溶剂)：极性大的水或缓冲溶液
3. 流动相极性与 k 的关系
流动相极性 \uparrow ，洗脱能力 \downarrow ， $k\uparrow$ ，组分 $t_R\uparrow$
4. 出柱顺序：极性大的组分先出柱；极性小的组分后出柱
5. 适用性：非极性~中等极性组分 (用于HPLC 80%)



四、对流动相的要求

流动相应符合价廉、容易购得、使用安全、纯度高的要求。

流动相还应满足高效液相色谱法分析的下述要求：

- (一) 具有低的黏度和适当低的沸点
- (二) 与固定相不相溶，并能保持色谱柱的稳定性
- (三) 对样品有足够的溶解能力，以提高测定的灵敏度和精密度
- (四) 与所使用的检测器相匹配
- (五) 应尽量避免使用具有显著毒性的流动相



五、洗脱方式

(一) 恒定组成溶剂洗脱

采用恒定组成及配比的混合溶剂洗脱，是最常用的色谱洗脱方式。

操作简便、柱易再生。

对于成分复杂的样品往往难以获得理想的分离结果。



(二) 梯度洗脱

是指在一个分析周期内，按一定程序不断改变流动相的浓度配比或pH而进行的洗脱方法。

用于分析组分数目多、组分 k 值差异较小的复杂样品，以缩短分析时间、提高分离效、改善色谱峰形、提高检测灵敏度。

有时会引起基线漂移，重现性不好。



山东中医药高等专科学校
Shandong College Of Traditional Chinese Medicine

分析化学

高效液相色谱法基本原理

基础化学教研室 王蕾蕾



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/045003021123011131>