



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

基础化学教研室 王雷清





■ 高效液相色谱法（HPLC）是继气相色谱法之后，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。



一、高效液相色谱法与经典液相色谱法比较

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



一、高效液相色谱法与经典液相色谱法比较

	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



二、高效液相色谱法与气相色谱法比较

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。



二、高效液相色谱法与气相色谱法比较

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。



二、高效液相色谱法与气相色谱法比较

	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



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

分析化学

高效液相色谱法分类





三、高效液相色谱法的分类

(一) 化学键合相色谱法 (BPC)

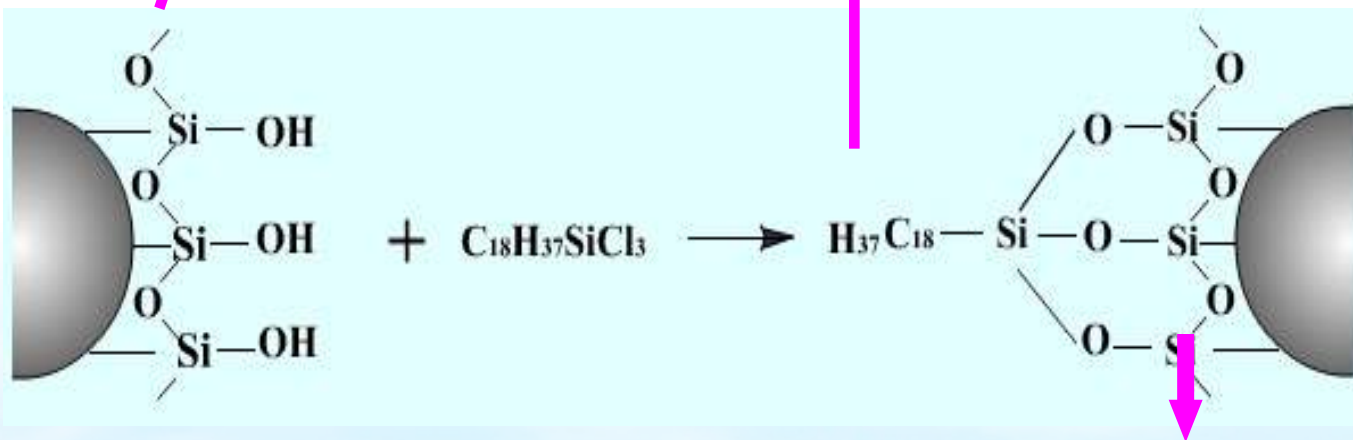
利用化学反应将固定液的官能团键合在载体表面叫**化学键合相**。

固定相为化学键合相的色谱称为**化学键合相色谱法 (BPC)**。



硅胶(载体)

十八烷基氯硅烷



十八烷基键合相(ODS)

固定相



(一) 化学键合相色谱法

化学键合固定相是通过化学反应把各种不同的有机基团键合到硅胶（载体）表面的游离羟基上，代替机械涂渍的液体固定相。这不仅避免了液体固定相流失的困扰，还大大改善了固定相的功能，提高了分离的选择性。化学键合色谱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。



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(同LSC)
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

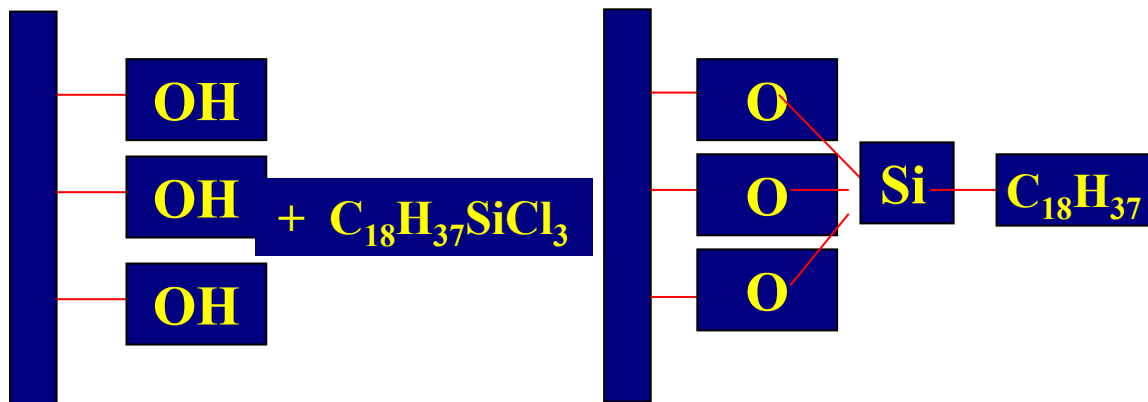


反相键合相色谱法

1. 固定相: 极性小的烷基键合相 C₈柱, C₁₈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%)



化学键合相色谱法的固定相



非极性键合固定相：键合在载体表面的功能分子是**烷基、苯基**等非极性有机分子。如最常用的ODS柱就是最典型的代表，其极性很小。

极性键合固定相：键合在载体表面的功能分子是具有**二醇基、醚基、氰基、氨基**等极性基团的有机分子。



化学键合相色谱法的优点

1. 使用过程中不流失；
2. 化学性能稳定，一般在pH2~8的溶液中不变质；
3. 热稳定性好一般在10℃以下不变性；
4. 载样量大，比硅胶约高一个数量级；
5. 适于梯度洗脱。



山东中医药高等专科学校

Shandong College Of Traditional Chinese Medicine

分析化学

液-固吸附色谱法





(二) 液-固吸附色谱法

1. **分离原理**：以固体吸附剂为固定相，根据其对不同组分吸附能力的差异进行混合物分离。表现在溶质分子占据固定相表面吸附活性中心能力的差异（**分离前提： K 不等或 k 不等**）。



(二) 液-固吸附色谱法

2. 固定相：固定相通常是活性硅胶、氧化铝、活性炭、聚乙烯、聚酰胺等固体吸附剂，所以吸附色谱也称液-固吸附色谱。活性硅胶最常用。



(二) 液-固吸附色谱法

3. **流动相：**弱极性有机溶剂或非极性溶剂与极性溶剂的混合物，如正构烷烃（己烷、戊烷、庚烷等）、二氯甲烷/甲醇、乙酸乙酯/乙腈等。



(二) 液-固吸附色谱法

4. 影响 k 的因素：与固定相性质和流动相性质有关

溶质分子极性 \uparrow ，洗脱能力 \downarrow ， $k\uparrow$ ， $t_R\uparrow$

溶剂系统极性 \uparrow ，洗脱能力 \uparrow ， $k\downarrow$ ， $t_R\downarrow$

注：调节溶剂极性，可以控制组分的保留时间



(二) 液-固吸附色谱法

5. 出柱顺序：强极性组分后出柱，弱极性组分先出柱

应用： 用于结构异构体分离和族分离仍是最有效的方法，如农药异构体分离、石油中烷、烯、芳烃的分离。

缺点： 容易产生不对称峰和拖尾现象。



四、对流动相的要求

1. 流动相具有低粘度和适当低的沸点。
2. 流动相与固定相不相溶。
3. 流动相对样品有足够的溶解能力。
4. 流动相与所使用的检测器相匹配。
5. 流动相应无显著毒性。

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/128003043046006051>