



药品



第十五章

高效液相色谱法

目录



第一节 概述



第二节 高效液相色谱法的主要类型及原理



第三节 高效液相色谱法的固定相和流动相



第四节 分离条件的选择

目录



第五节 高效液相色谱仪



第六节 定性定量分析法



第七节 毛细管电泳分离分析法简介

学习目标

- ☑ **掌握** 化学键合相、固定相和流动相、反相键合相色谱法的分离条件、速率理论
- ☑ **熟悉** 高效液相色谱仪的结构、定性定量分析方法
- ☑ **了解** 主要类型及原理、有关计算、毛细管电泳分离的基本原理、毛细管电泳仪



第一节

概述





1.高效液相色谱法（HPLC）的特点

- (1) 高压：压力可达15 ~ 30Mpa。**
- (2) 高速：流速为0.1 ~ 10.0ml/min。**
- (3) 高效：可达每米5000塔板以上。在一根柱中同时分离的成分可达100种。**
- (4) 高灵敏度：紫外检测器的灵敏度可达0.01ng，同时消耗样品少，具有分离、分析的双重作用。**



2.经典液相色谱法与高效液相色谱法的比较

高效液相色谱法	经典液相色谱法
▶ 柱长: 10 ~ 25cm	10 ~ 200cm
▶ 口径: 2 ~ 10mm	10 ~ 50mm
▶ 粒度: 5 ~ 50 μ m (2500 ~ 300目)	75 ~ 600 μ m (200 ~ 30目)
▶ 柱压力: 2 ~ 20MPa	0.001 ~ 0.1MPa
▶ 柱效: $2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4/\text{m}$	2 ~ 50/m
▶ 进样量: $10^{-6} \sim 10^{-2}\text{g}$	1 ~ 10g
▶ 分析时间: 3分钟 ~ 1小时	1 ~ 20小时



小结

1. 高效液相色谱法（HPLC）的流动相与经典液相色谱法一样均为液体，但其区别是在HPLC的液体流动相是在高压泵的作用下将试样输送到色谱柱中进行分离。
2. 高效液相色谱法（HPLC）具有高压、高速、高效和高灵敏度的特点。



第二节

高效液相色谱法的主要类型及原理





1.主要类型

- (1) 化学键合相色谱法(主要)。
- (2) 离子抑制色谱法。
- (3) 离子对色谱法。
- (4) 离子色谱法。
- (5) 亲和色谱法。



2.化学键合相色谱法

- (1) 化学键合相是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。**
- (2) 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)。**
- (3) 化学键合相的优点**
 - 固定相的均一性和稳定性好，使用过程中不易流失，使用周期长。
 - 柱效高，重现性好。
 - 能使用的流动相和键合相的种类多，分离的选择性高。
- (4) 根据化学键合相与流动相极性的相对强弱分类：分为正相（normal phase, NP）和反相（reversed phase, RP）键合相色谱法。**



正相键合相色谱法

正相键合相色谱法（固定相的极性大于流动相的极性）

- ◆ 采用极性键合相为固定相，如氰基（-CN）、氨基（-NH₂）或二羟基键合硅胶。
- ◆ 流动相：非极性或弱极性溶剂加极性调节剂如烷烃加醇类（正己烷-甲醇）。
- ◆ 适用范围：溶于有机溶剂的极性至中等极性的分子型化合物。
- ◆ 分离机制：将有机键合层看作一层液膜，溶质在两相间溶解。
- ◆ 极性强的组分 k 大，保留时间（ t_R ）长,后洗脱出柱。



反相键合相色谱法

反相键合相色谱法（固定相的极性小于流动相的极性）

- ◆ 固定相：非极性键合相如十八烷基硅烷（ C_{18} ，ODS）、辛烷基（ C_8 ）键合硅胶。
- ◆ 流动相：以水为基础溶剂，加入一定量与水混溶的极性调节剂，常用甲醇-水、乙腈-水等。
- ◆ 应用范围：较广泛，适用于非极性至中等极性的组分分离。
- ◆ 分离机制：保留行为。

主要是利用非极性溶质分子或溶质分子中的非极性基团与极性溶剂接触时产生排斥力，而从溶剂中被“挤出”，即产生疏溶剂作用，促使溶质分子与键合相表面的非极性的烷基发生疏水缔合，而使溶质分子保留在固定相中。



反相键合相色谱法

◆保留行为的主要影响因素

溶质的分子结构（极性）：**极性越弱，疏水性越强， k 越大， t_R 也越大；反之亦然。**

固定相：键合烷基的疏水性随碳链的延长而增加，溶质的 k 也增大。硅胶表面键合烷基的浓度越大，则溶质的 k 越大。

流动相：极性越强，洗脱能力越弱，使溶质的 k 越大。

溶剂种类：水（洗脱能力弱）为弱溶剂，醇（洗脱能力强）为强溶剂

溶剂比例：水的比例增加，使 k 增大。



3.其他高效液相色谱法

(1) 离子抑制色谱法 (ion suppression chromatography, ISC)

- 通过调节流动相的pH，抑制组分的解离，增加组分在固定相中的溶解度，改善峰形，以达到分离有机弱酸、弱碱的目的。
- 适用于 $3 \leq \text{p}K_{\text{a}} \leq 7$ 的弱酸、 $7 \leq \text{p}K_{\text{b}} \leq 8$ 的弱碱。

(2) 离子对色谱法 (ion pair chromatography, IPC)

- ◆ 该方法适用于分离可离子化的或离子型化合物，如生物碱类、儿茶酚胺类、有机酸类、维生素类、抗生素类药物等。
- ◆ 将离子对试剂加入含水的流动相中，组分离子在流动相中与离子对试剂的反离子 (counter ion) 生成中性离子对，增加溶质与非极性固定相的作用，使 k 增加，改善分离效果。



3.其他高效液相色谱法

(3) 离子色谱法 (ion chromatography, IC)

- ▶ 离子交换色谱法对许多正、负离子可实现分离，但由于一些常见的无机离子在可见或近紫外区没有吸收，因此难用紫外-可见检测器进行检测。1975年Small提出了将离子交换与电导检测器相结合分析各种离子的方法并称为离子色谱法。
- ▶ 适用于分离阴、阳离子，以及氨基酸、糖类、DNA和DNA的水解物等。

(4) 亲和色谱法 (affinity chromatography, AC)

- ▶ 亲和色谱法是将具有生物活性的配位基键合到载体或基质表面形成固定相，利用蛋白质和生物大分子与固定相表面上配位基的专属性亲和力进行分离的色谱方法。
- ▶ 是生物大分子分离和分析的重要方法。



小结

1. 高效液相色谱法（HPLC）分为液-固吸附色谱法、液-液分配色谱法（正相与反相）、离子交换色谱法、离子对色谱法及分子排阻色谱法等。
2. 化学键合相色谱法是将固定液的官能团通过化学反应键合到载体表面而制得的化学键合相（固定相）的色谱法。
3. 正相键合相色谱法是指固定相的极性大于流动相的极性；反相键合相色谱法是指固定相的极性小于流动相的极性。
4. 高效液相色谱法（HPLC）的分离机制主要是依据化合物的3种主要性质如极性、电荷和分子的大小。



第三节

高效液相色谱法的固定相和流动相





1. 固定相

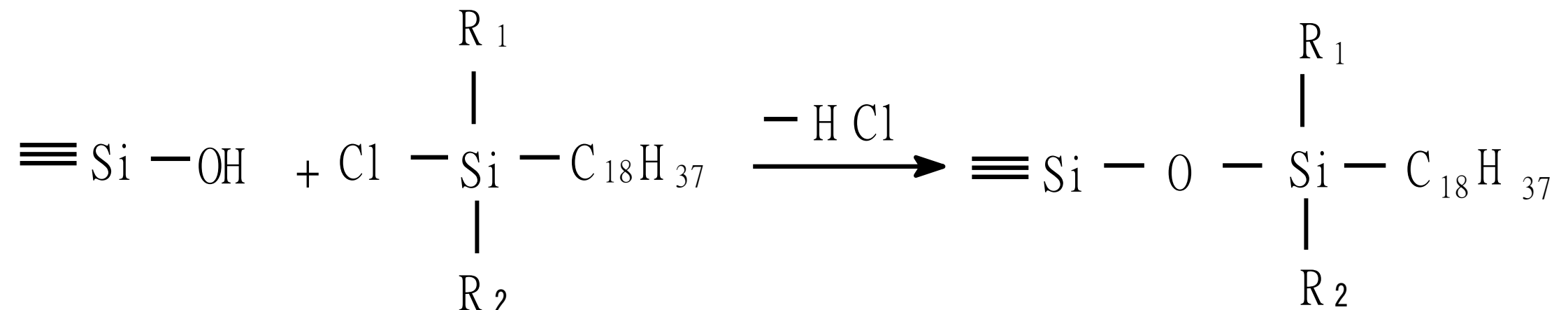
- ◆ HPLC的固定相多采用化学键合相。
- ◆ 键合相的特点：使用过程中不流失；化学稳定性好；适用于梯度洗脱；载样量大。
 - (1) 非极性键合相：非极性烃基如 C_{18} 、 C_8 等键合在硅胶表面，用于反相色谱。长链烷基可使溶质的 k 增大，载样量提高，稳定性更好。



1. 固定相

键合反应：

硅氧烷（Si - O - Si - C）型：氯硅烷与硅胶进行硅烷化反应。



(2) 中等极性键合相：醚基键合相，用于反相或正相色谱。

(3) 极性键合相：常用氨基（-NH₂）、氰基（-CN）键合相，一般用于正相色谱。



2.流动相

- ◆(1)对流动相的要求
- ◆不与固定相发生反应。
 - 对试样有适宜的溶解度，要求 k 在1 ~ 10范围内。
 - 与检测器相匹配，例如用紫外检测器时，不能选用对紫外光有吸收的溶剂。
 - 纯度高，黏度小。常使用低黏度的甲醇、乙腈，可以降低柱压、提高柱效。



2.流动相

- **(2)流动相对分离的影响**
- 溶剂的配比影响流动相的洗脱能力，改变保留时间；溶剂种类影响流动相的选择性，改变分离效果。
- **正相色谱法：溶剂的极性越强，洗脱能力越强。**
- **反相色谱法：溶剂的极性越强，洗脱能力弱。**



2.流动相

(2)流动相对分离的影响

- 例如水的极性大于甲醇，所以在反相色谱法中，甲醇的洗脱能力比水强，增大甲醇的比例，流动相的洗脱能力增强， k 与 t_R 减小。
- 由于不同种类的溶剂分子间的作用力不同，有可能使被分离的两个组分的分配系数不等，所以应采用选择性具有显著性差异的溶剂配制流动相，从而获得理想的分离。



2.流动相

(2)流动相对分离的影响

- 反相键合相色谱法常选用甲醇、乙腈和四氢呋喃为极性调节剂，水为底剂（洗脱强度较弱的溶剂）。一般情况下，甲醇-水能满足多数样品的分离要求，黏度小且价格低，因而是反相键合相色谱法中最常用的流动相。
- 正相键合相色谱法常选用乙醚、氯仿和二氯甲烷为极性调节剂，正己烷为底剂。



小结

1. 常用的反相色谱的固定相是 C_{18} ，正相色谱的固定相是硅胶与氨基键合相和氰基键合相。
2. 反相键合相色谱法中常选用的流动相是甲醇-水；正相键合相色谱法中常选用乙醚、三氯甲烷和二氯甲烷为极性调节剂，正己烷为溶剂。



第四节

分离条件的选择





1. 高效液相色谱的速率理论

◆ GC中的速率理论方程式：

$$H=A+B/u+Cu$$

◆ HPLC中的速率理论方程式：

$$H=A+C_m u+C_{sm} u$$

◆ 涡流扩散项(A)：

$$A=2\lambda d_p$$

➤ 减少固定相颗粒的直径 (d_p) ； 采用球形、粒度均匀的固定相，用匀浆法装柱，以减小填充因子 λ (同GC) 。



1. 高效液相色谱的速率理论

◆纵向扩散项(B/u)：**该项可忽略。**

$B=2rD_m$ 。溶质在流动相中的扩散系数 (D_m) 很小，室温操作，且 $u > u_{\text{最佳}}$ 。

◆传质阻力项 (Cu)

➤固定相传质阻力： C_s **可以忽略**，因 d_f （固定液膜厚度）极小。



1. 高效液相色谱的速率理论

- **流动相传质阻力：** C_m 与固定相颗粒粒度（ d_p ）及组分分子在流动相中的扩散系数 D_m 有关。 D_p 越小， C_m 越小； D_m 越大， C_m 越小。

要求： d_p 小， D_m 大。

- **静态流动相传质阻力：**由部分流动相在固定相微孔内的滞留而产生。

静态流动相传质阻抗系数 C_{sm} ： $C_{sm} \propto d_p^2$ ， $C_{sm} \propto 1/D_m$ ， $D_m \propto T/\eta$ 。

要求：固定相粒度（ d_p^2 ）、流动相黏度（ η ）都小。



1. 高效液相色谱的速率理论

◆ HPLC中的速率理论可表示为：

$$H=A+C_m u+C_{sm} u$$

- 原因：HPLC中的流动相为液体，固定相为化学键合相。
- 结果：HPLC的实验条件应该是：①小而均匀的球形化学键合相；②低黏度的流动相，流速不宜过快；③适当的流速，分析型一般流速为1ml/min左右；④柱温适当。



2.正相键合相色谱法的分离条件

- ◆ **固定相：极性键合相，如氰基、氨基键合相等。**
- ◆ **流动相：烷烃加适量的极性调节剂（正己烷-甲醇）。**



3.反相键合相色谱法的分离条件

- ◆ **固定相：非极性键合相，如C₁₈。**
- ◆ **流动相：以水为基础溶剂，加入甲醇、乙腈等极性调节剂。**



小结

- ▶ 高效液相色谱法中影响柱效的主要因素为涡流扩散项和传质阻抗项。由于液体的黏度比载气大得多，而且柱温多为室温，其纵向扩散项很小，可忽略不计，范氏方程简化为 $H=A+C\mu$ 。
- ▶ HPLC的理论塔板高度 H 与流动相的流速 u 成正比，为了获得较高的柱效，流速不宜快，一般流速为1ml/min。
- ▶ 一般情况下，甲醇-水系统已能满足多数样品的分离要求，乙腈-水系统要优于甲醇-水系统。



第五节

高效液相色谱仪



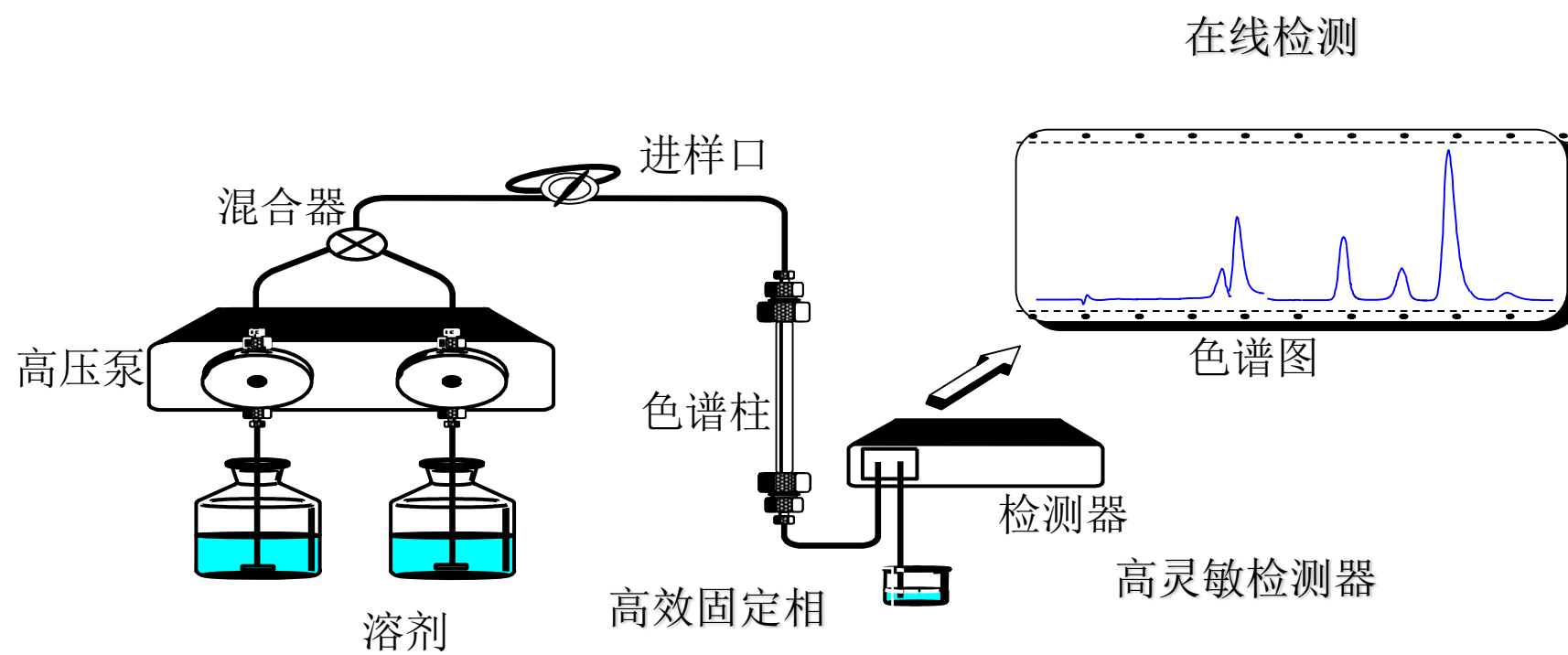


组成

- 输液系统
- 进样系统
- 分离系统
- 检测系统
- 数据记录及处理系统



高效液相色谱仪



高效液相色谱仪示意图



1. 输液系统（高压输液泵）

输液泵应具备的性能：

- **流量精度高且稳定。**
- **流量范围宽且可调。**
- **能在高压下连续工作。**
- **液缸容积小。**
- **密封性能好，耐腐蚀。**



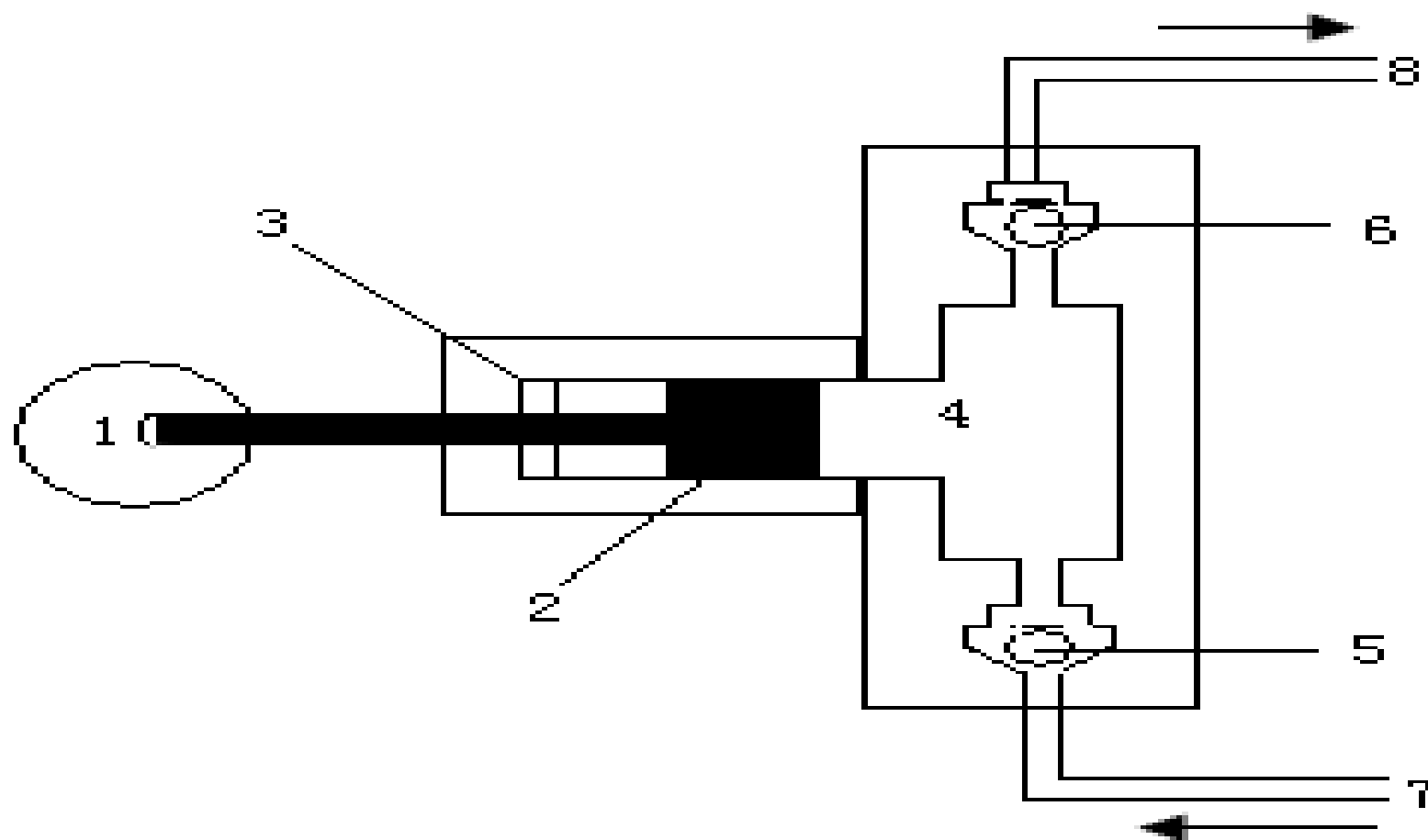
1. 输液系统（高压输液泵）

◆ 高压输液泵

- **恒流泵：**在输送流动相的过程中流量恒定，常用柱塞往复泵。
- **双泵：**为了克服流量的脉动，常用串联式。



1. 输液系统（高压输液泵）



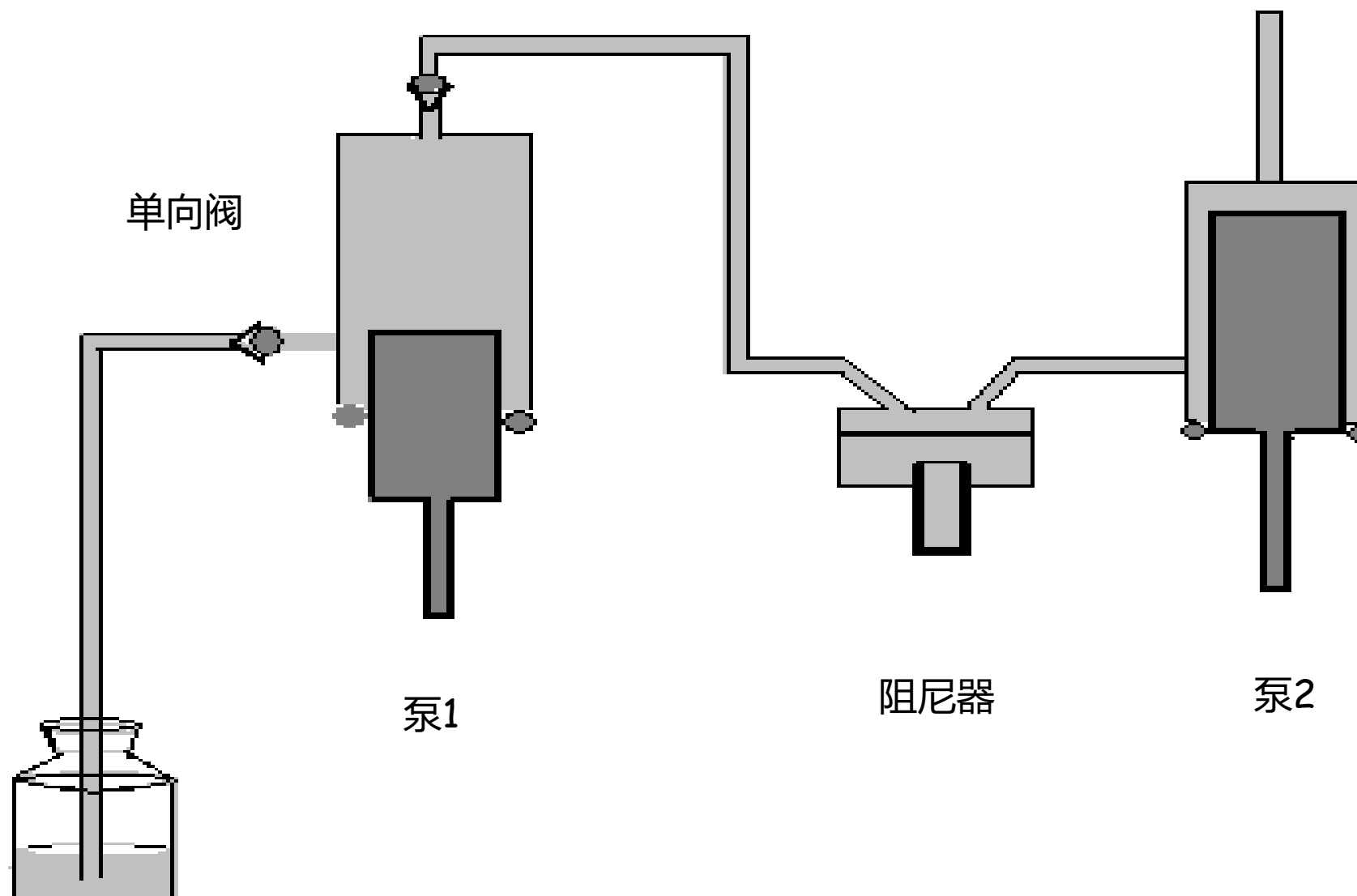
柱塞往复泵结构示意图

1.转动凸轮；2.柱塞；3.密封垫；4.液缸；5.入口单向阀；

6.出口单向阀；7.流动相入口；8.流动相出口



1. 输液系统（高压输液泵）



串联式柱塞往复泵示意图



1. 输液系统（高压输液泵）

- **洗脱方式**
- **等强度洗脱：**在同一个分析周期内流动相的组成保持恒定。适合于组分数目少、性质差别小的试样。
- **梯度洗脱：**在一个分析周期内，程序控制改变流动相的组成，如溶剂的极性、离子强度、pH等。分析组分数目多、性质差别大的复杂试样。

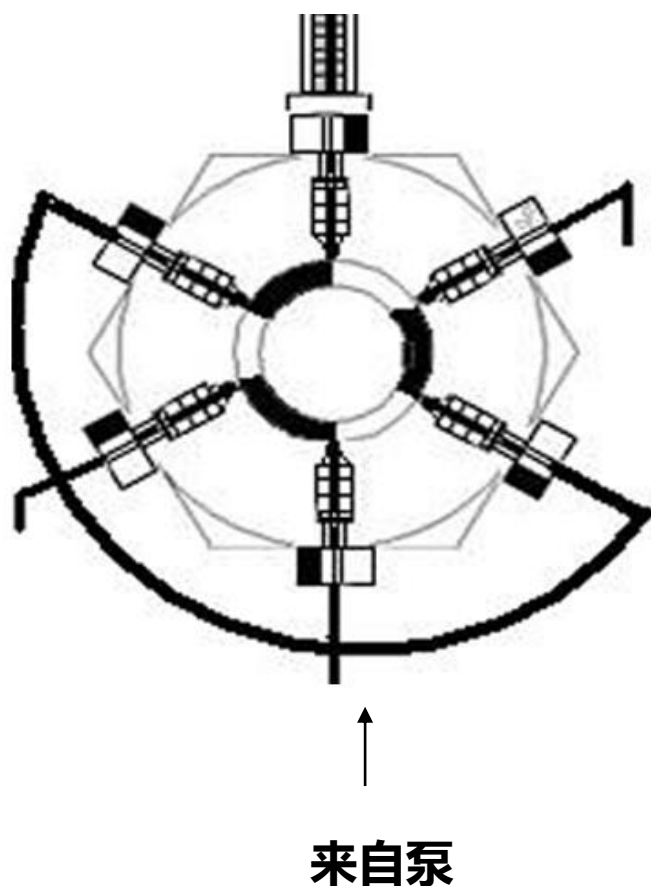


2.进样系统

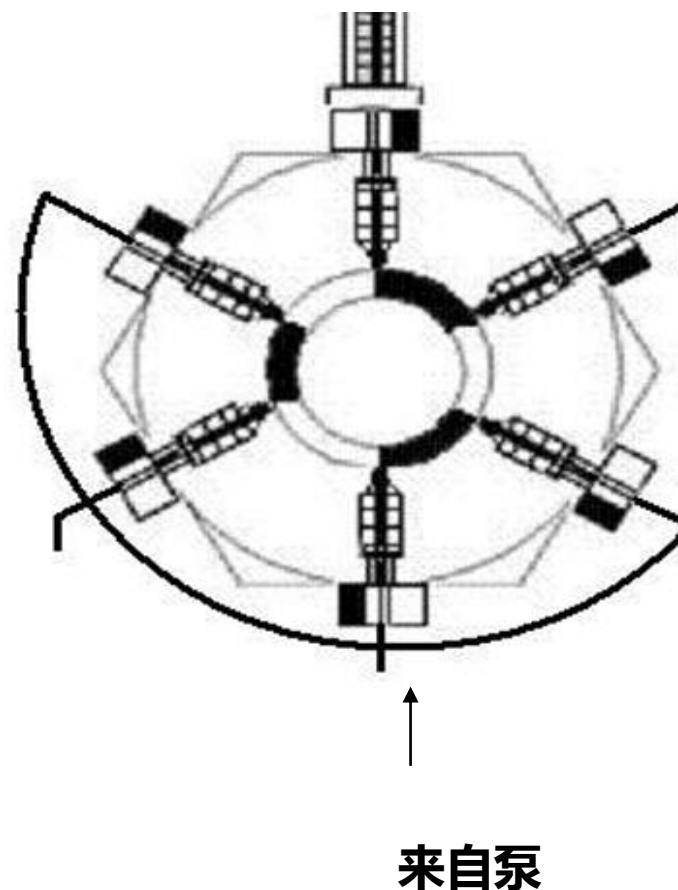
◆进样器

- 进样阀（六通阀），常用带有定量管的六通阀。
- 自动进样装置。

充样位置 (load)



进样位置(inject)



六通阀进样示意图



3.分离系统

◆色谱柱 (column)

- 由柱管和固定相组成。
- 可重复使用。
- 实验结束，要用经过滤和脱气的适当溶剂冲洗色谱系统。



4.检测系统

◆对检测器（detector）的要求：

- 灵敏度（sensitivity）高（检测限低）。
- 噪声（noise）低。
- 线性范围（linear range）宽。
- 重复性（repeatability）好。
- 适用范围广（通用型、专属型）。



4.检测系统

(1) 紫外检测器(ultraviolet detector)

- ◆**检测原理：**朗伯-比尔定律，即 $A=KcL$ 。
- ◆**特点：**紫外检测器的灵敏度、精密度及线性范围好，不易受温度和流速的影响，可用于梯度洗脱。
- ◆**局限：**只能检测有紫外吸收的物质，流动相的截止波长应小于检测波长。
为专属型、浓度型检测器。



4.检测系统

- 紫外检测器的分类：
- 固定波长检测器：254nm。
- 可变波长检测器：200~400（800） nm。
- 光电二极管阵列检测器 (photodiode array detector, PDAD)：一系
列光电二极管，可以进行波长快速扫描，同时获得样品的色谱图和
每个色谱组分的光谱图。

吸收光谱用于组分的定性，色谱峰面积用于定量， 判断峰纯度。



4.检测系统

(2) 荧光检测器(fluorescence detector, FD)

◆特点：选择性好，专属型检测器，灵敏度比紫外检测器高（检测限为 10^{-10} g/ml）。

(3) 示差折光检测器

- 利用样品池和参比池之间折光率的差别来对组分进行检测，测得的折光率差值与样品组分的浓度成正比。
- 每种物质的折射率不同，原则上讲都可以用示差折光检测器来检测。
- 其主要缺点是折光率受温度影响较大，且检测灵敏度较低，不能用于梯度洗脱。



4.检测系统

(4) 蒸发光散射检测器：样品组分在蒸发室内形成气溶胶，而后进入检测室。

用强光或激光照射气溶胶而产生散射，测定散射光强而获得组分的浓度信号。

(5) 安培检测器：利用组分在氧化还原过程中产生的电流或电压变化来对样品进行检测。

只适于测定具有氧化还原活性的物质，测定的灵敏度较高，检测限可达 10^{-9}g/ml 。



5.数据记录及处理系统

- ◆微机采集和分析色谱数据：给出峰宽、峰高、峰面积、对称因子、分离度等色谱参数。
- ◆复杂的试样需要“色谱专家系统”。



6. 高效液相色谱仪的主要性能指标

- ◆ 流量精度
- ◆ 噪声
- ◆ 漂移
- ◆ 检测限
- ◆ 定性与定量重复性



课堂活动

试说出高效液相色谱仪的基本组成及工作流程。



小结

- 高效液相色谱仪主要包括输液系统、进样系统、分离系统、检测系统和数据记录及处理系统。
- 高效液相色谱使用的高压泵按输液性能可分为恒压泵和恒流泵。
- 常用的高效液相色谱检测器有紫外检测器、荧光检测器、示差折光检测器、蒸发光散射检测器、安培检测器等。



第六节

定性定量分析方法





1.定性分析方法

HPLC的定性分析方法与GC相似，有色谱鉴定法、化学鉴定法、多谱联用鉴定法。利用纯物质和样品的保留时间或相对保留时间的相互对照进行定性判断。



2.定量分析方法

HPLC的定量分析方法与GC相同，常用外标法、内标法和内加法，而归一化法应用较少。在进行样品测定前要做系统适用性试验，即用规定的方法对仪器进行试验和调整，检查仪器系统是否符合药品标准的规定。《中华人民共和国药典》（2015年版）规定的色谱系统适用性试验包括理论塔板数、分离度、拖尾因子、重复性。



2.定量分析方法

- ◆ **外标法：**是以对照品的量对比求算试样含量的方法。只要待测组分出峰、无干扰、保留时间适宜，即可用外标法进行定量分析。
- ◆ **内标法：**是以待测组分和内标物的峰高比或峰面积比求算试样含量的方法。使用内标法可以抵消仪器稳定性差、进样量不够准确等原因带来的定量分析误差。内标法可以分为校正曲线法、内标一点法（内标对比法）、内标二点法及校正因子法。
- ◆ **内加法：**是将待测物*i*的纯品加至待测样品中，测定增加纯品后的溶液比原样品溶液中*i*组分的峰面积增量，来求算*i*组分含量的定量分析方法。



第七节

毛细管电泳分离分析法简介





1.毛细管电泳分离的基本原理

- ◆ **电泳迁移：**不同分子所带的电荷性质、多少不同，形状、大小各异。一定电解质及pH的缓冲液或其他溶液内受电场作用，样本中的各组分按一定速度迁移，从而形成电泳。
- ◆ **电泳迁移速度(v)可用下式表示：** $v=uE$ 。
- ◆ **电渗迁移：**电渗迁移指在电场作用下溶液相对于带电管壁移动的现象。特殊结构的熔合硅毛细管管壁通常在水溶液中带负电荷，在电压作用下溶液整体向负极移动，形成电渗流。



1.毛细管电泳分离的基本原理

分离分析类型

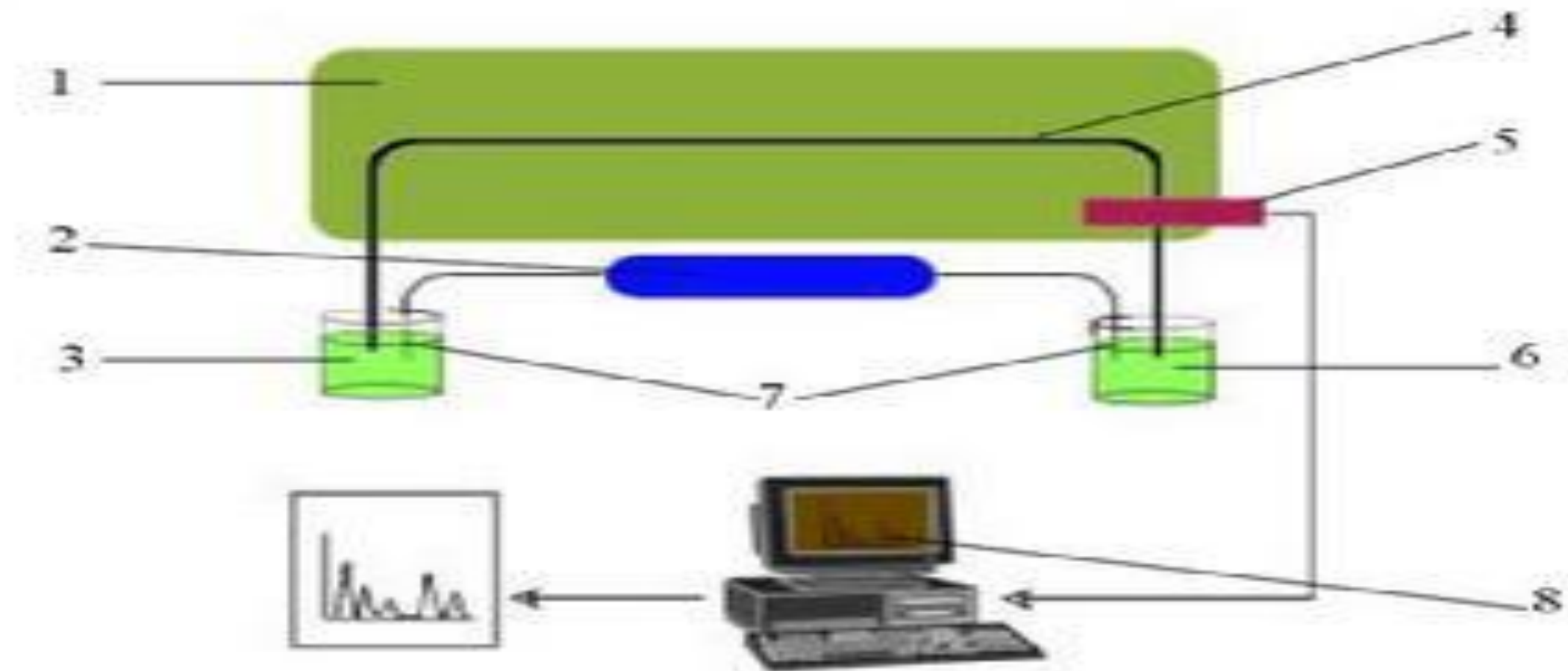
毛细管区带电泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)

毛细管胶速电动色谱 (micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC)

毛细管等速电泳 (capillary isotachopheresis, CITP)

此外, 还有**毛细管凝胶电泳** (CGE)、**毛细管电色谱** (CEC) 及**非水毛细管电泳** (CNACE) 。

2.毛细管电泳仪



毛细管电泳仪器简图

1.温度控制系统；2.高压电源；3.高压电极；4.毛细管；5.检测器；

6.低压电极槽；7.铂丝电极；8.记录/数据处理



第十五章 高效液相色谱法

THANKS

谢谢观看