

# 高效液相色谱法原理与应用

## 参考书

《高效液相色谱及其应用》

《液相色谱检测方法》

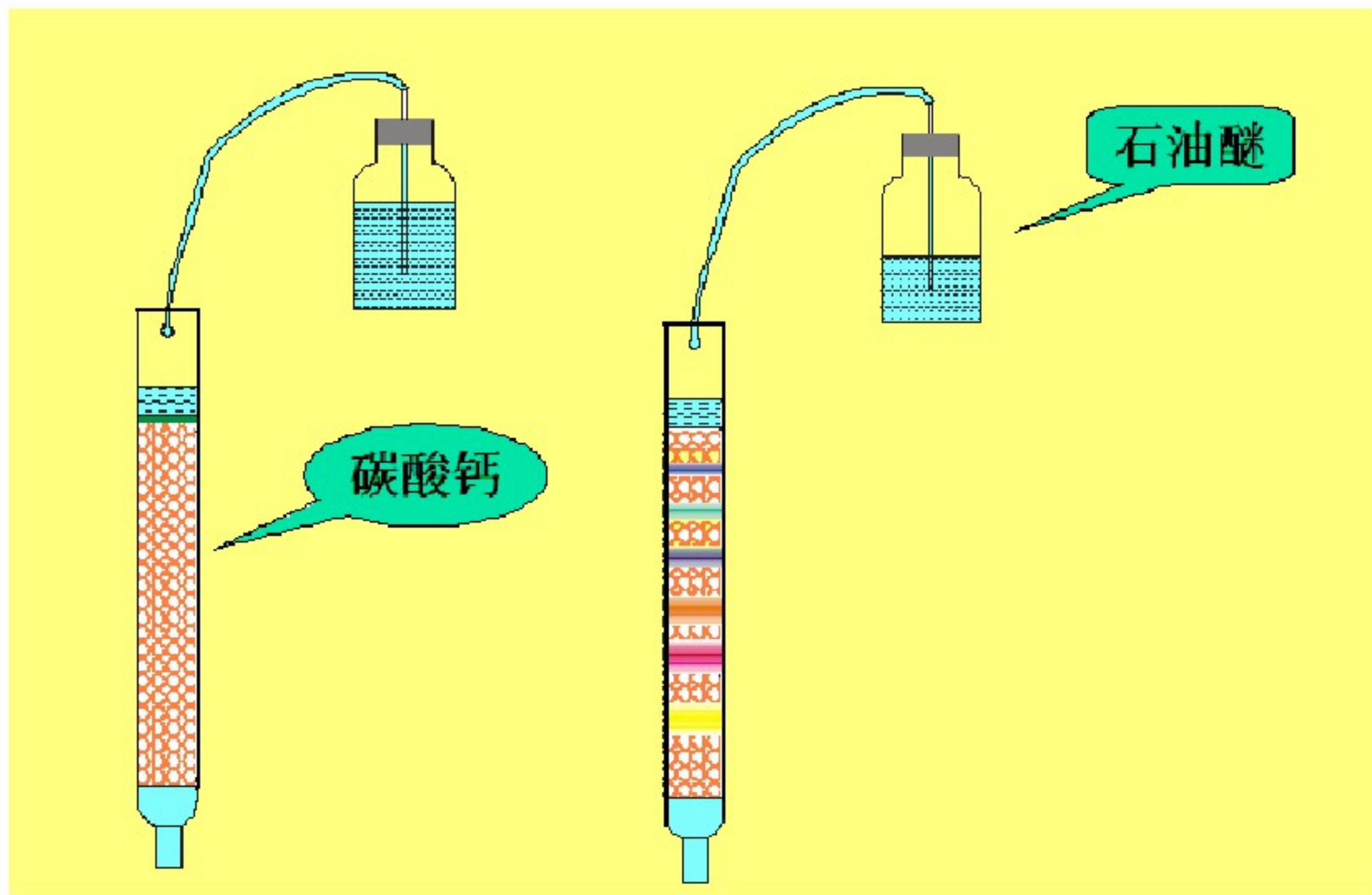
《实用高效液相色谱法的建立》

# 第1章 色谱基本原理

## 一、色谱法概述

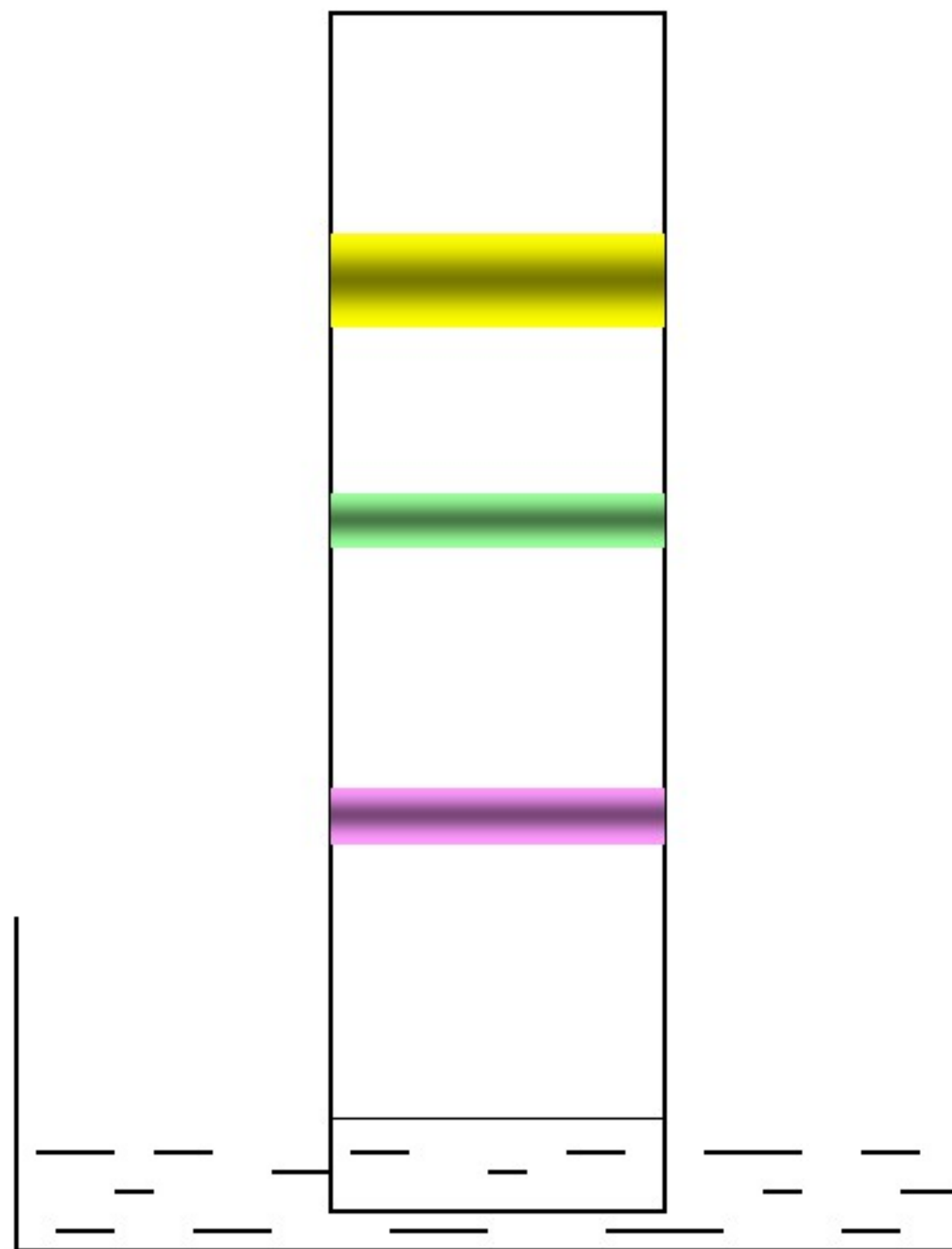
1. 色谱法的定义与特点
2. 色谱法的分离原理
3. 色谱法的特点
4. 色谱法的分类

# 1. 色谱法的定义



茨维特的实验

# 色谱分离效果图





因此

- 色谱法是一种分离方法。
  - 它的特点是：有两相，一是固定相，一是流动相，两相作相向运动。
- **Chromatography**
- 将色谱法用于分析中，则称为色谱分析。
  - 色谱分析是一种分离、分析法。

## 2、色谱法分离原理

- 当流动相中所携带的混合物流过固定相时，就会和固定相发生作用(力的作用)。由于混合物中各组分在性质和结构上有差异，与固定相发生作用的大小也有差异。因此在同一推动力作用下，不同组分在固定相中的滞留时间有长有短，从而按先后不同的次序从固定相中流出。

### 3、色谱法的分类

- 按流动相状态的不同，可分为

气相色谱法 (GC)

液相色谱法 (LC)

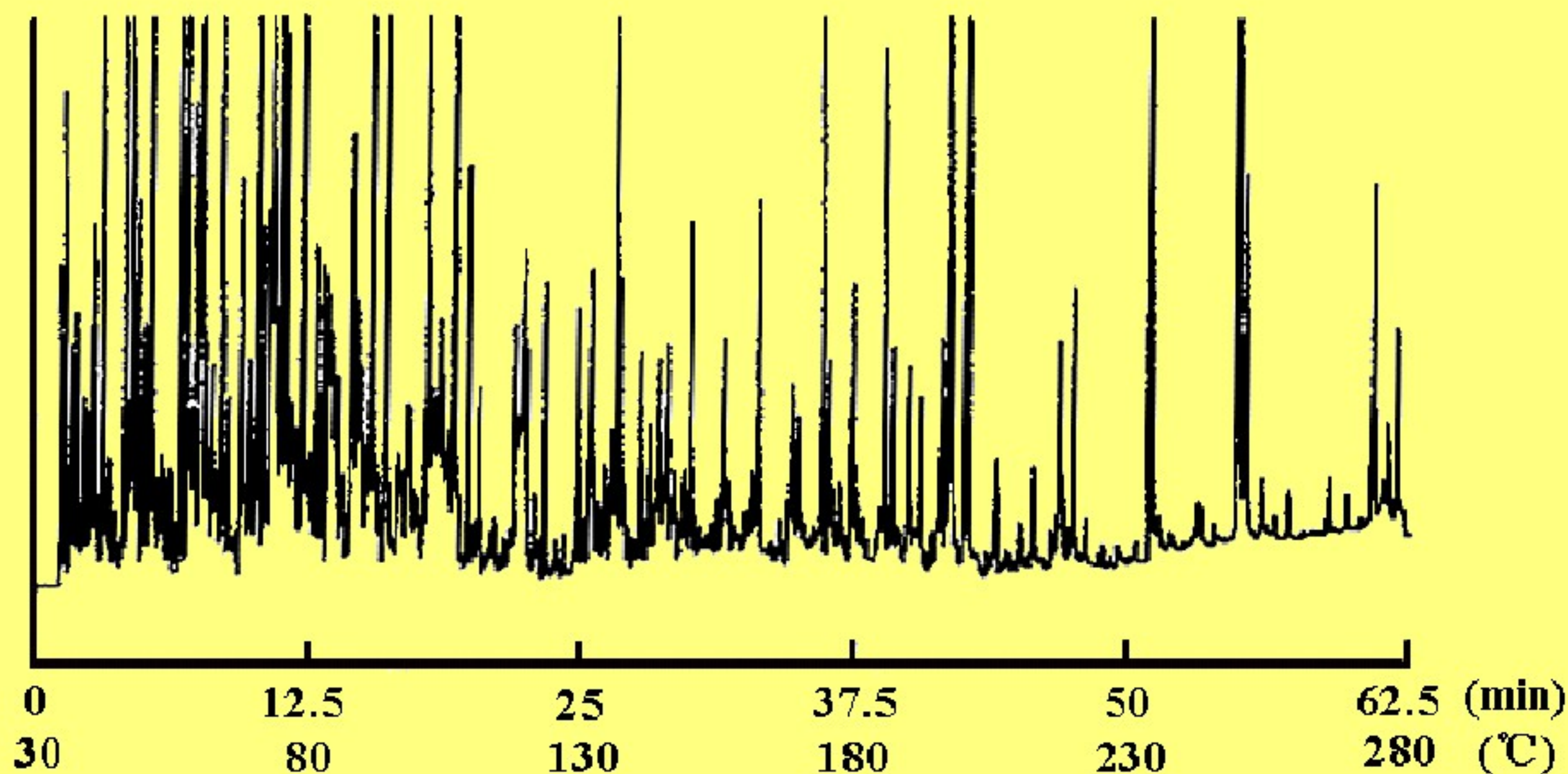
超临界流体色谱 (SFC)

# 什么是气相色谱法？

- 以气体为流动相的色谱法
- Gas Chromatography，简称GC
- 适合分离分析易汽化（在- 190℃-500℃范围内有0.2-10mmHg的蒸气压的）稳定、不易分解、不易反应的样品，特别适合用于同系物、同分异构体的分离。



# 应用举例 (GC)



大气中 $10^{-9}$  g/ml 级有机污染物富集进样色谱图

# 什么是液相色谱法？

- 以液体为流动相的色谱法
- Liquid Chromatography，简称LC
- 适合分离分析高沸点、热不稳定、离子型的样品。

- 按固定相使用的形式可液相色谱法又可分为：

### 柱色谱 (Column Chromatography)

将固定相装在色谱柱内

### 纸色谱 (Paper Chromatography)

用滤纸做固定相或固定相载体的色谱

### 薄层色谱 (Thin Lay Chromatography)

固定相均匀涂在玻璃板或塑料板上



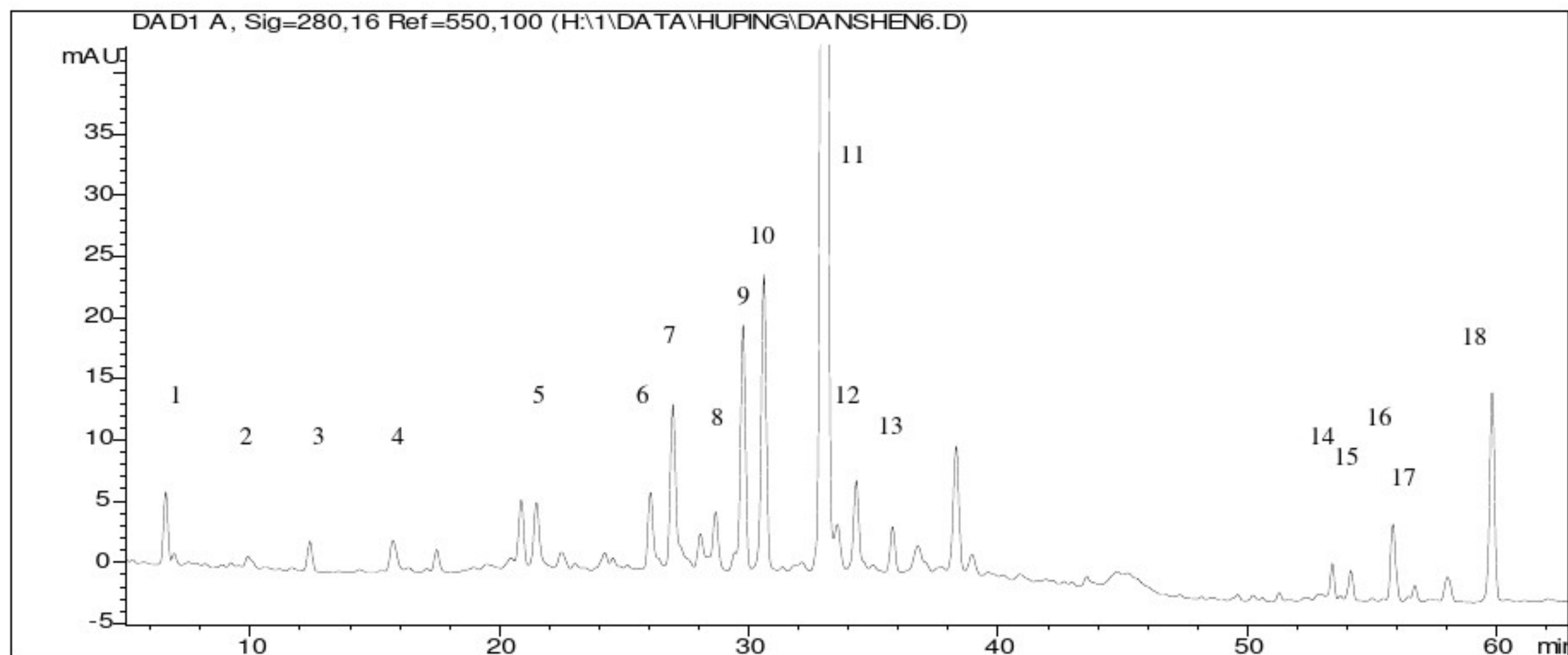
# TLC的应用



Bands	Description
1	Pseudoginsenoside F <sub>11</sub>
2	American Ginseng
3	Ginsenoside R <sub>g1</sub>
4	Ginsenoside R <sub>f</sub>
5	Ginseng
6	Ginsenoside R <sub>c</sub>
7	Ginsenoside R <sub>b1</sub>
8	Notoginseng
9	Notoginsenoside R <sub>1</sub>

人参、西洋参和三七药材的鉴别





## 丹参药材有效成分的HPLC图谱

1. Danshensu; 2. Protocatechuic acid; 3. Protocatechualdehyde; 4. Caffeic acid; 5. Salvianolic acid F; 6. Salvianolic acid D; 7. Salvianolic acid J / isomer; 8. Salvianolic acid E; 9. Rosmarinic acid; 10. Lithospermic acid; 11. Salvianolic acid B; 12. Salvianolic acid B / E / isomer ; 13. Salvianolic acid A; 14. Dihydrotanshinone I; 15. Tetrahydrotanshinone / isomer; 16. Cryptotanshinone; 17. Tanshinone I; 18. Tanshinone IIA



- 拖尾峰
- 伸舌峰
- 鬼峰、假峰
- 畸峰
- 峰底
- 基线漂移
- 基线噪声
- 谱带扩张

□ 死时间( $t_M$ ): 完全不保留组分流出系统的时间

□ 保留时间( $t_R$ ):

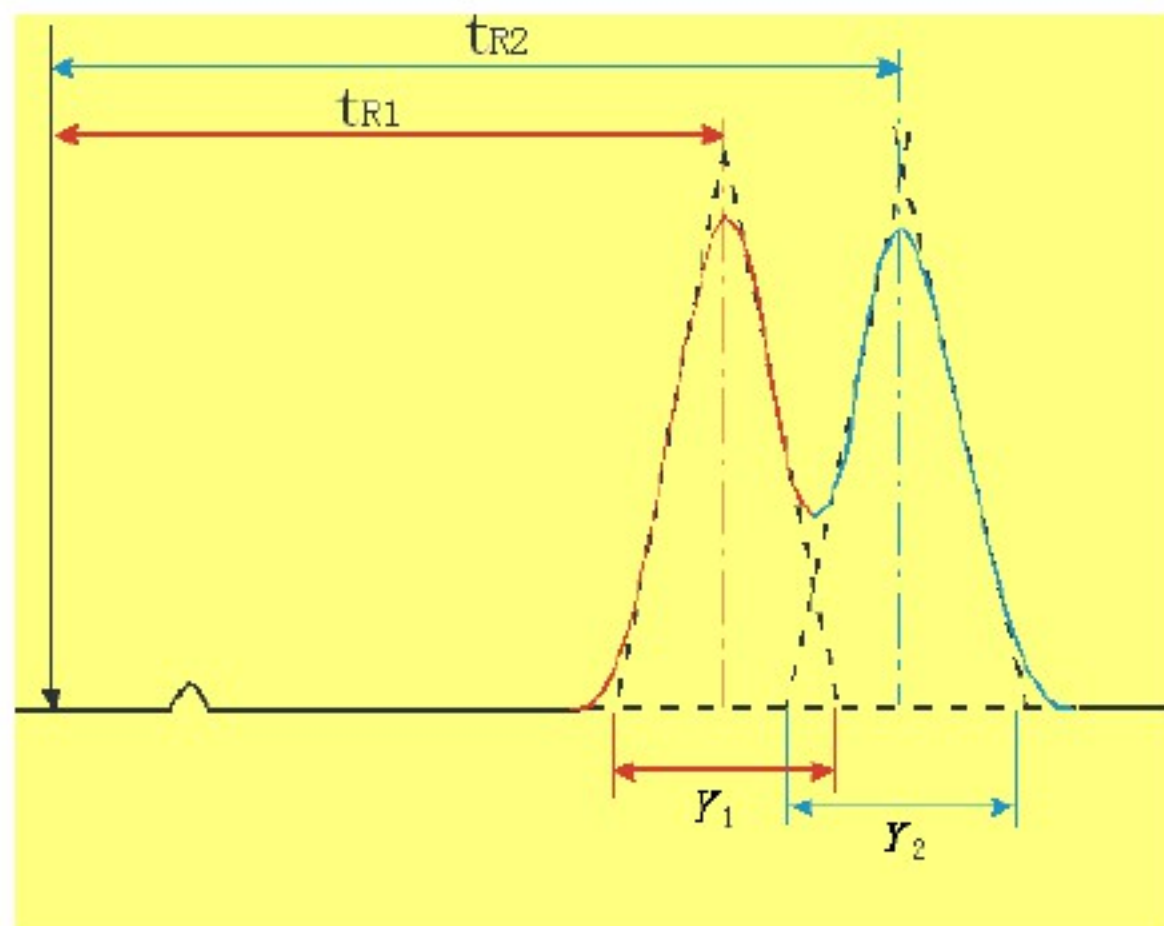
□ 调整保留时间( $t'_R$ ):  $t'_R = t_R - t_M$

□ 死体积( $V_M$ ):  $V_M = t_M \cdot F_0$

□ 保留体积( $V_R$ ):  $V_R = t_R \cdot F_0$

□ 调整保留体积( $V'_R$ ):  $V'_R = t'_R \cdot F_0 = (t_R - t_M) \cdot F_0$

## 2. 色谱分离基本方程



$$R = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

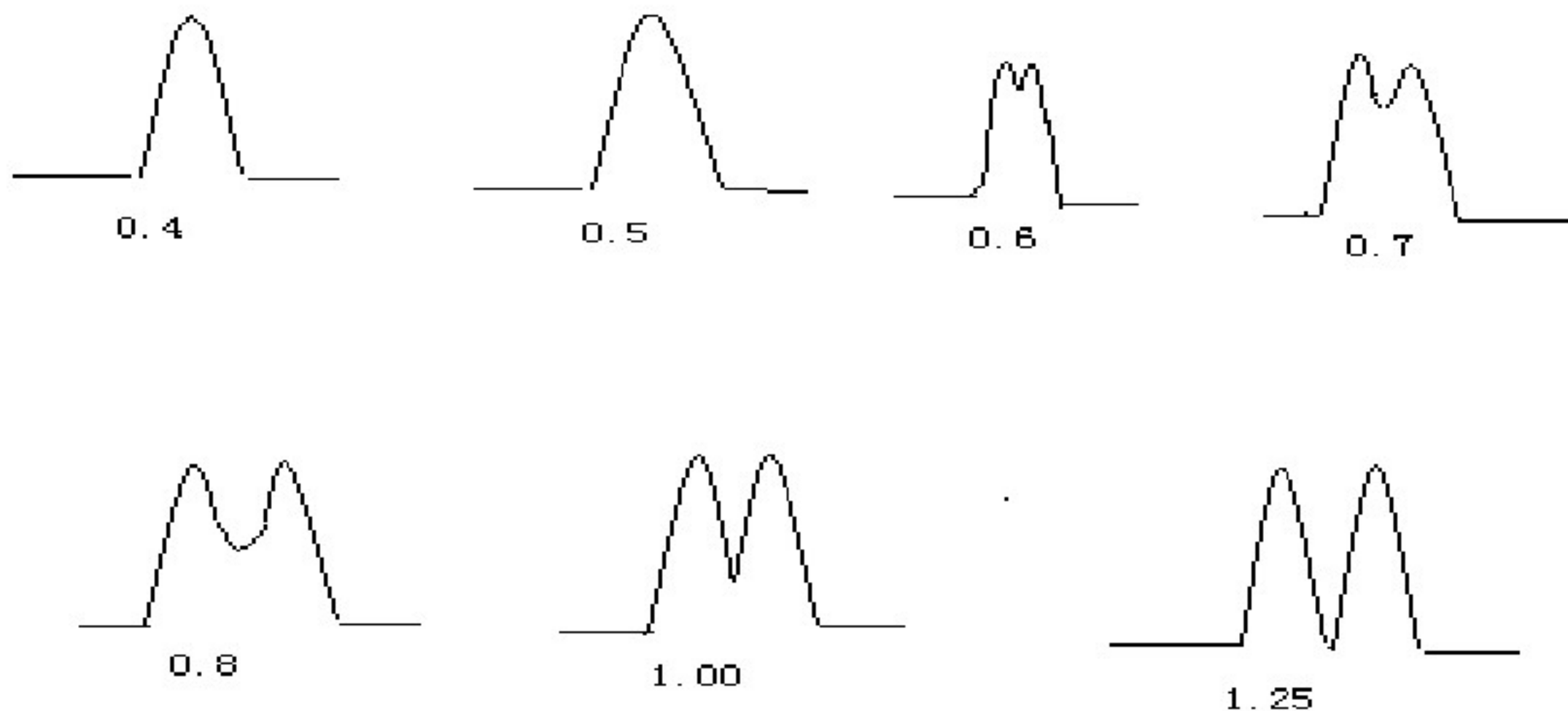
**R:** 分离度

**$t_R$ :** 保留时间

**$t_0$ :** 死时间

**W:** 峰底宽度

## 不同R值的峰重叠情况示意图



$R > 1.5$ 可以得到基线分离

分离度R反映的是相邻两个峰的分开程度

R太小，两个峰无法彻底分离

R太大，分离时间过长，工作效率低下

一般要求 $R > 1.5$ ，也可遵循行业特殊规定



## 色谱分离基本方程

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{k}{1 + k} \right)$$

根据该公式优化试验条件，提高分离度**R**。

从数学推导来看，分别增大**n**， $\alpha$ ，**k**值，都可以提高分离度。

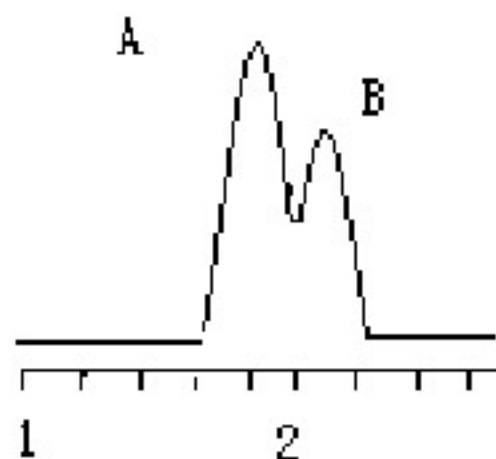
## • 分离选择性 ( $\alpha$ ) 对分离度 ( $R$ ) 的影响

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

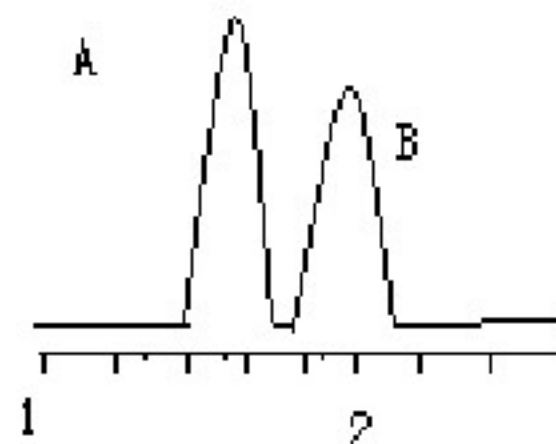


如果  $t_0 = 1 \text{ min}$

$$\alpha = 1.64 / 1.58 = 1.04$$



$$\alpha = 1.15 / 0.85 = 1.35$$



$$\alpha = 0.95 / 0.63 = 1.50$$

### 改变分离选择性 $\alpha$ 的方法

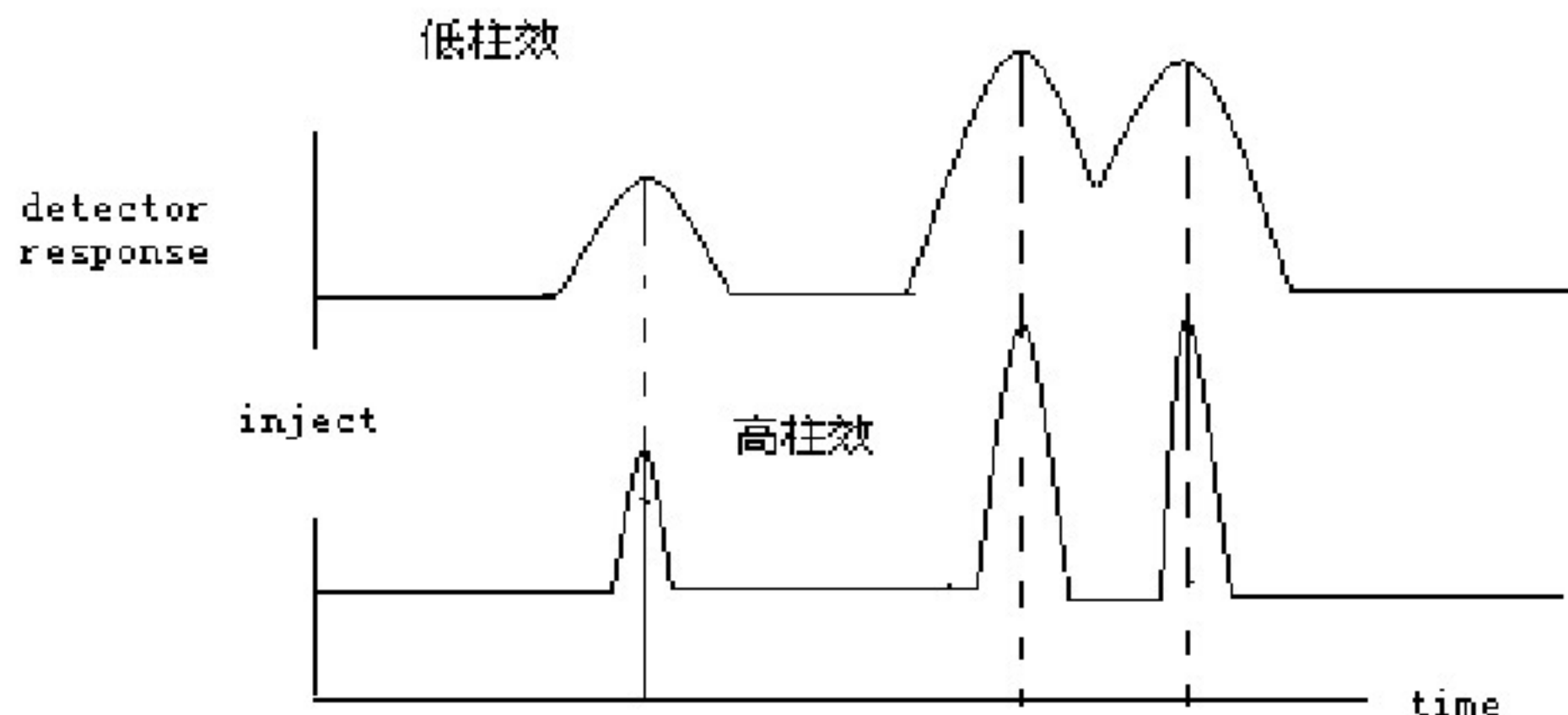
- 改用不同的流动相
- 改变流动相的组成
- 改变流动相 pH 值
- 改变柱温
- 应用特殊的化学效应
- 改变固定相

**$\alpha$  并非必须大于 1.5!**

尽量优化前几种实验条件提高  $\alpha$  值，  
避免改变固定相（买新柱子），以便降低成本



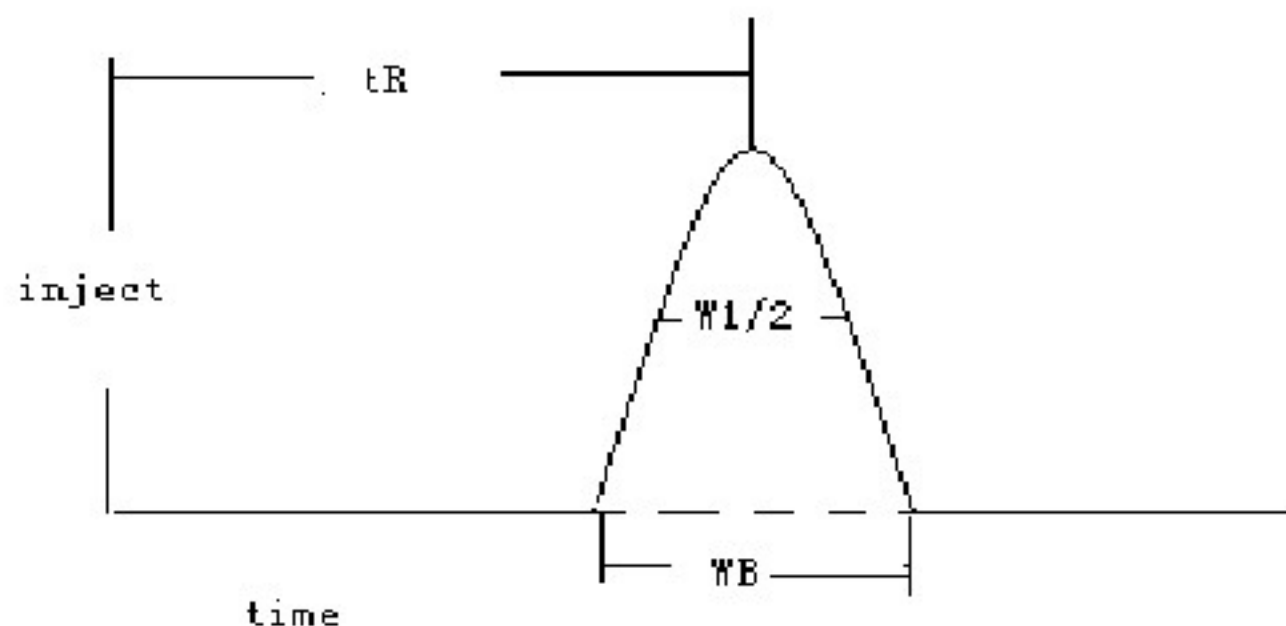
## •柱效 ( $n$ ) 对分离度 ( $R$ ) 的影响



以上两张谱图 $k'$ ,  $\alpha$ 值完全相同, 仅仅由于柱效高低不同使得它们具有不同的分离度。

直观的看, 峰的尖锐程度代表了柱效高低, 峰越尖锐, 其柱效越高, 通常使用理论塔板数 ( $n$ ) 的大小衡量柱效的高低

# 理论塔板数和理论塔板高度的计算方法



理论塔板数 
$$n = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

理论塔板高度  $HETP = L/n$

理论塔板数 $n$ 越大，柱效越高；理论塔板数 $HETP$ 越效，柱效越高

## •容量因子 (**k**) 对分离度 (**R**) 的影响

•容量因子  $k = K \frac{V_S}{V_M} = \frac{t_R'}{t_M}$

•容量因子越大，分离度越大。

<b>k</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>∞</b>
<b>k/k+1</b>	<b>0.50</b>	<b>0.75</b>	<b>0.83</b>	<b>0.88</b>	<b>0.90</b>	<b>0.92</b>	<b>0.93</b>	<b>1.00</b>

•但当容量因子大于10， $k/(k+1)$ 的改变不大，而分析时间将大大延长。因此，**k**的最佳范围是 $1 < k < 20$ 。

改变容量因子的方法有：

•改变柱温

•改变柱死体积，其中死体积对 $k/(k+1)$ 的影响很大。

•改变流动相的配比是最简便、最有效的方法

•梯度洗提

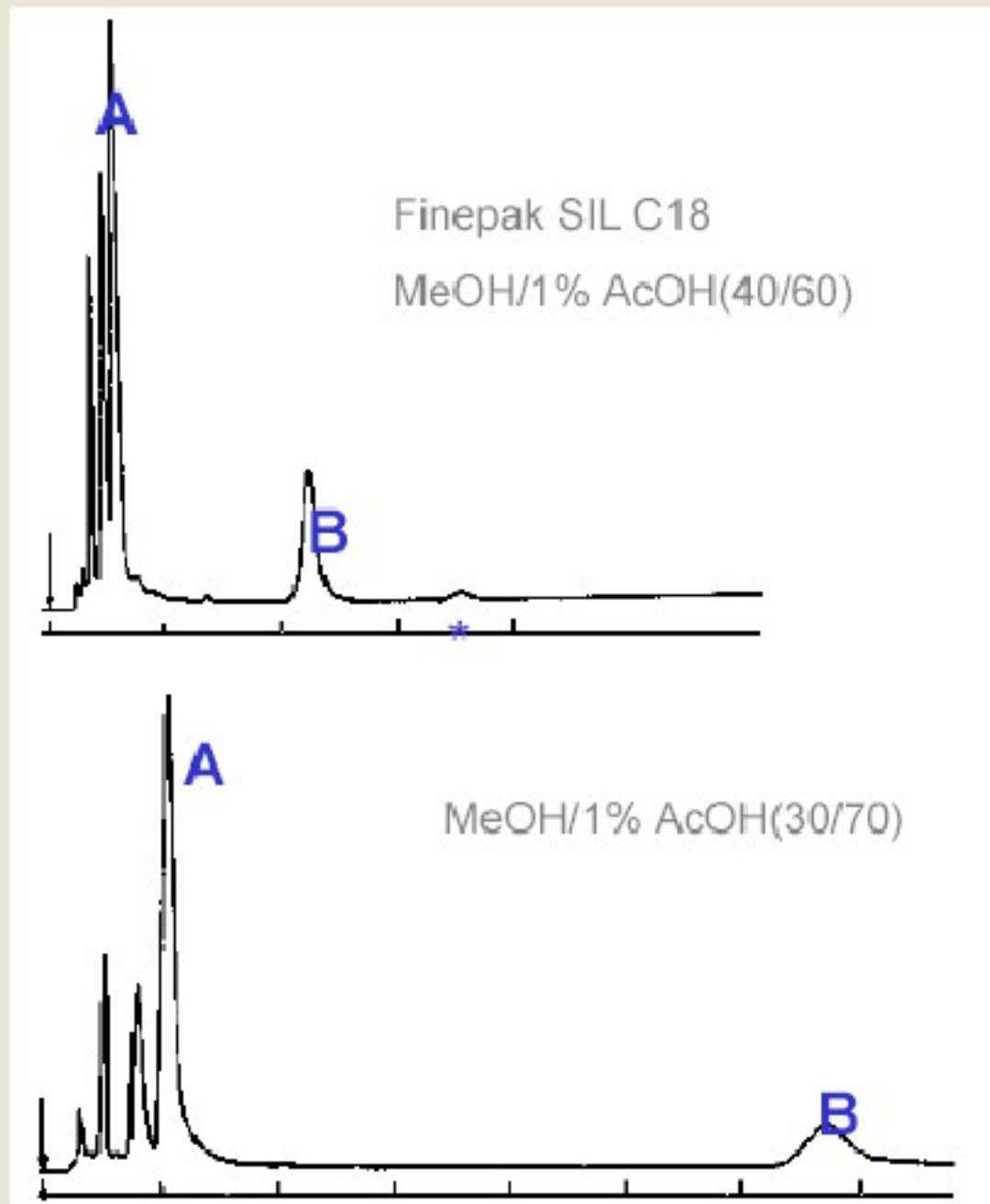
# 梯度洗提

- 梯度洗脱即程序控制流动相的组成，使在整个分离过程中，溶剂强度按照特定的变化规律增加。
  - 优点：分离复杂混合物，使所有组分都处在最佳的 $k$ 值范围内。
  - 缺点：检测器的使用受到限制，分析结果的重复性取决于流速的稳定性。柱子需进行再生处理。

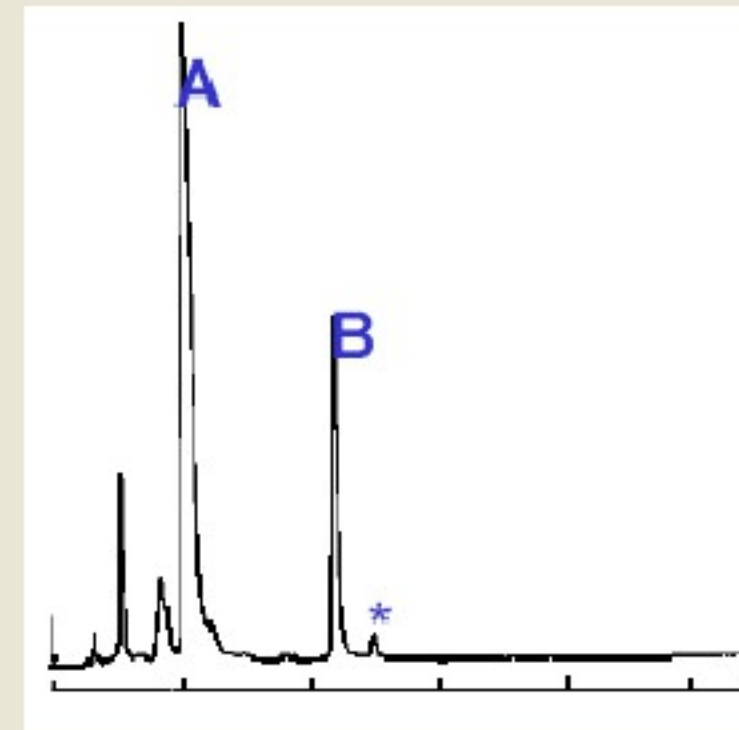


## Advantage of gradient elution method

Isocratic elution method



Gradient elution method



MeOH/1% AcOH  
30/70→45/55  
Linear Gradient, 16min

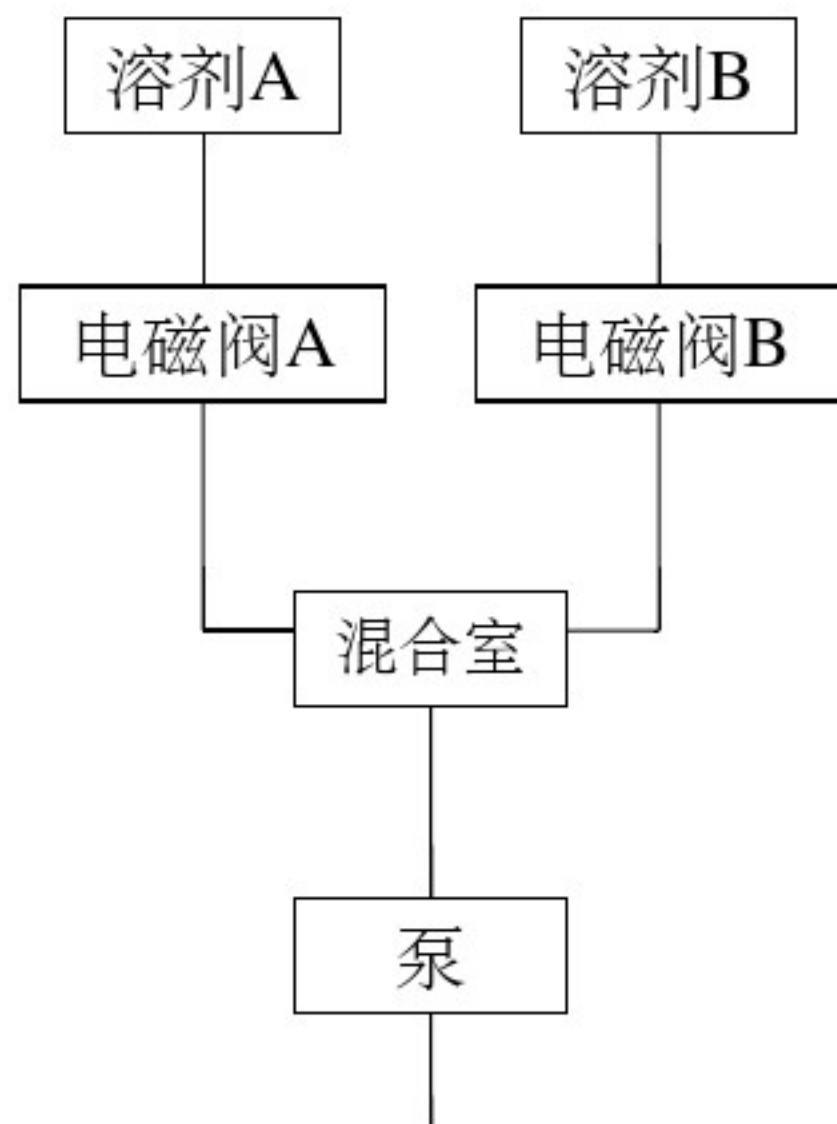
**A : Chlorogenic acid**

**B : Rutin**

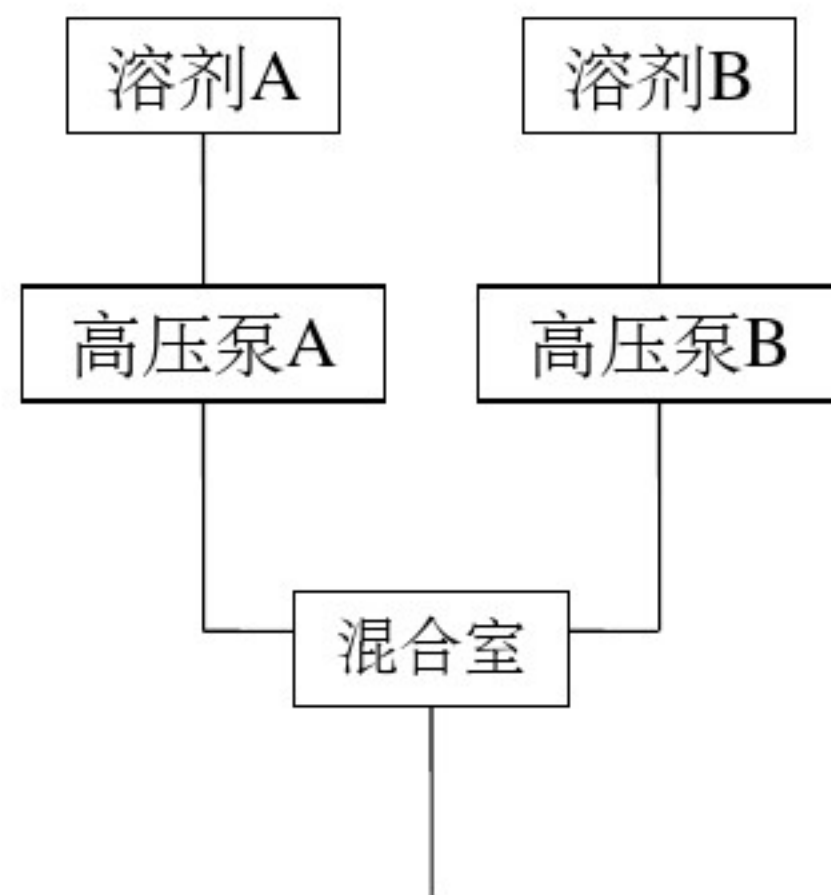
**\* : Impurity**

## 装置

- 低压梯度（内梯度）：溶剂在常压下混合，再用高压泵输送至柱系统。简单、经济，只需一个泵，所用溶剂的元数没有限制。
- 高压梯度（外梯度）：一般由两台高压泵构成，每台泵输送一种溶剂。溶剂在混合室混合后，在输入柱系统。流量精密度高，溶剂的可压缩性和热力学体积的变化可能影响输入柱子中溶剂的组成。



低压溶剂梯度方框图



高压溶剂梯度方框图

- 实现方式

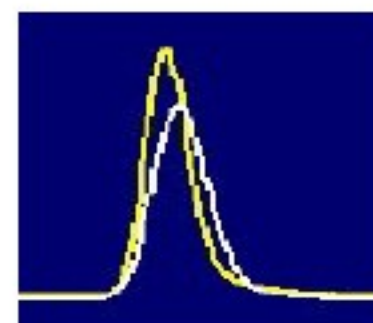
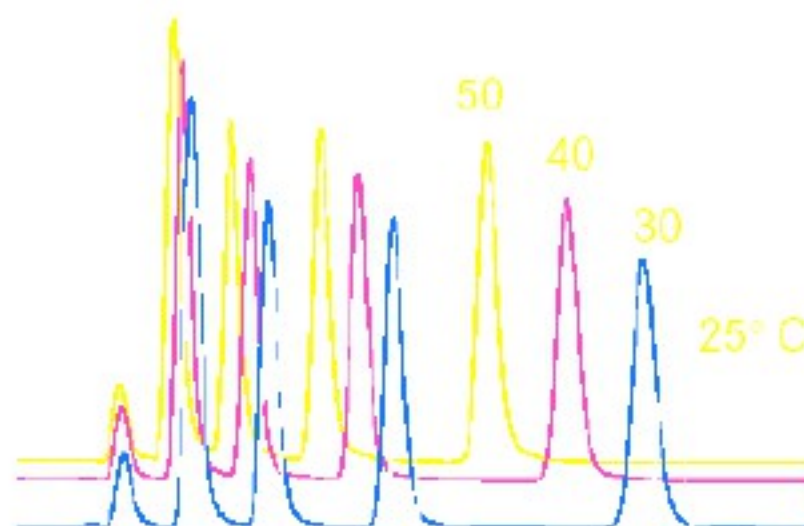
- 对于复杂样品，线性梯度是最好的。
- 正相色谱中，常用二氯甲烷加入正己烷来实现。
- 反相色谱中，乙腈，甲醇加入水中是最常用的。



## •温度的影响

### Impact of Temperature

- ▶ Faster Separation
- ▶ Narrower Peaks
- ▶ Lower Backpressure
- ▶ Lower Viscosity
- ▶ Greater Sensitivity-



- $n$ ,  $\alpha$ ,  $k$ 都会受到柱温的影响
- 不要使用过高温度，以保护柱子，60度算高温
- 温度对平衡常数有影响，有时会**影响出峰顺序**，注意对化合物进行定性后再定量
- 升温通常可以加速分离，缩短分析时间，但也不绝对

### 三、色谱定性定量方法

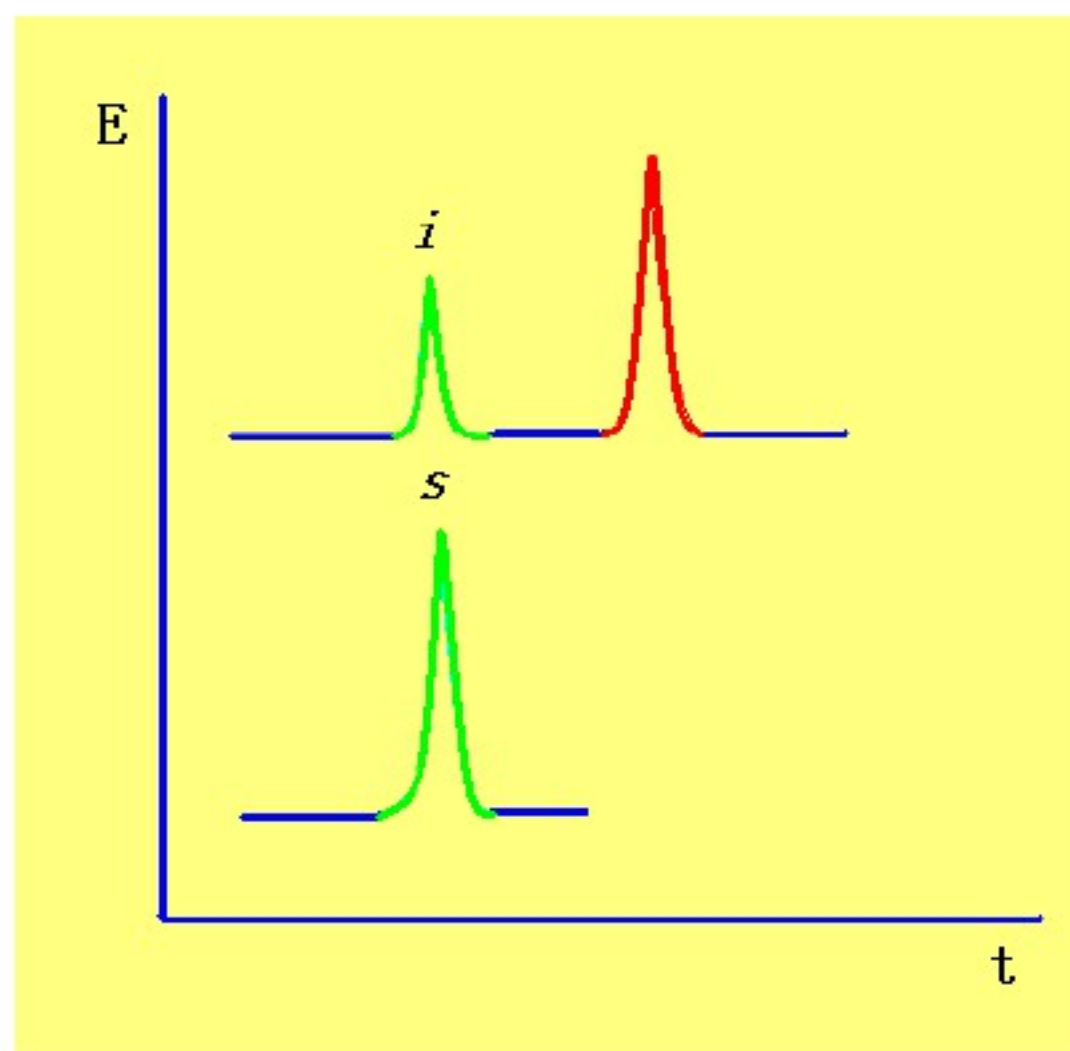
# 1. 色谱定性分析

## (1) 纯物对照定性

各物质在一定的色谱条件下均有确定不变的保留值，  
因此保留值可作为定性指标。

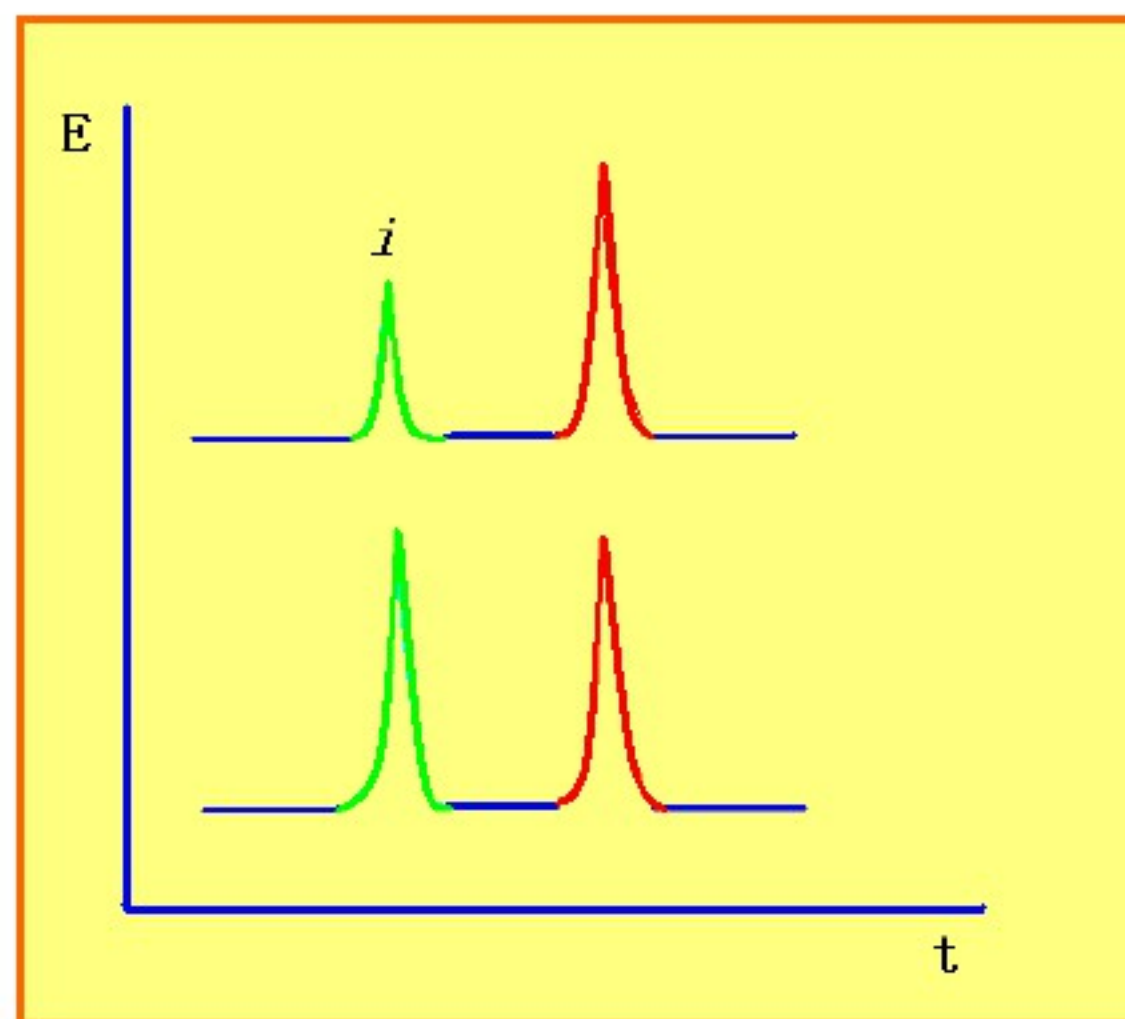
## 实现方法

- 利用保留时间和保留体积定性



➤ 用相对保留值定性  $r_{i,s} = \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rs}} = \frac{V'_{Ri}}{V'_{Rs}}$

➤ 用已知物增加峰高法定性



- 应用范围：适用于简单混合物，对该样品已有了解并具有纯物质的情况。
- 优点：应用简便，不需要其他仪器。
- 缺点：定性结果的可信度不高。
  - 提高可信度的方法：双柱、双体系定性

## (2) 与其它仪器或化学方法联合定性

- 离线联用方式
  - 化学法
  - 仪器法
- 在线联用方式
  - 化学法
  - 仪器法



## • 离线联用方式

- 收集方法：馏分收集器
- 应用范围：无标准物时，可对较为复杂的混合物进行定性分析
- 缺点：麻烦



## • 在线联用方式

### ➤ 与其它仪器联用定性

混合物经色谱分离后，将各组分直接由接口导入其它仪器中进行定性。常用的联用方法有：**LC-FTIR、LC-MS.....**

其它仪器相当于**色谱仪的检测器**。

- 使用范围：复杂样品的定性。
- 优点：不需要标准物，定性结果可信度高，操作方便。
- 缺点：需要特殊仪器或设备。

## 2 色谱定量分析

### (1) 色谱定量基础

色谱定量分析是基于被测物质的量与峰面积成正比。在一定色谱条件下有：

$m_i = f_i A_i$  其  $f_i$  是绝对质量校正因子

## (2) 定量要解决的问题

- 峰面积的测量和计算
- 校正因子的测量与计算
- 色谱定量方法及其应用

- 峰面积的测量与计算

- 积分仪或色谱工作站

简便、速度快，精度高，可达**0.2-2%**，对小峰及不对称峰的结果准确，是色谱发展趋势。

- 手动测量与计算

- 峰高乘半峰宽法：适于对称峰  $A=1.064Y_z$
- 峰高乘峰底宽度法：适于矮宽峰  $A=1.070$
- 峰高乘平均峰宽法：适于不对称峰

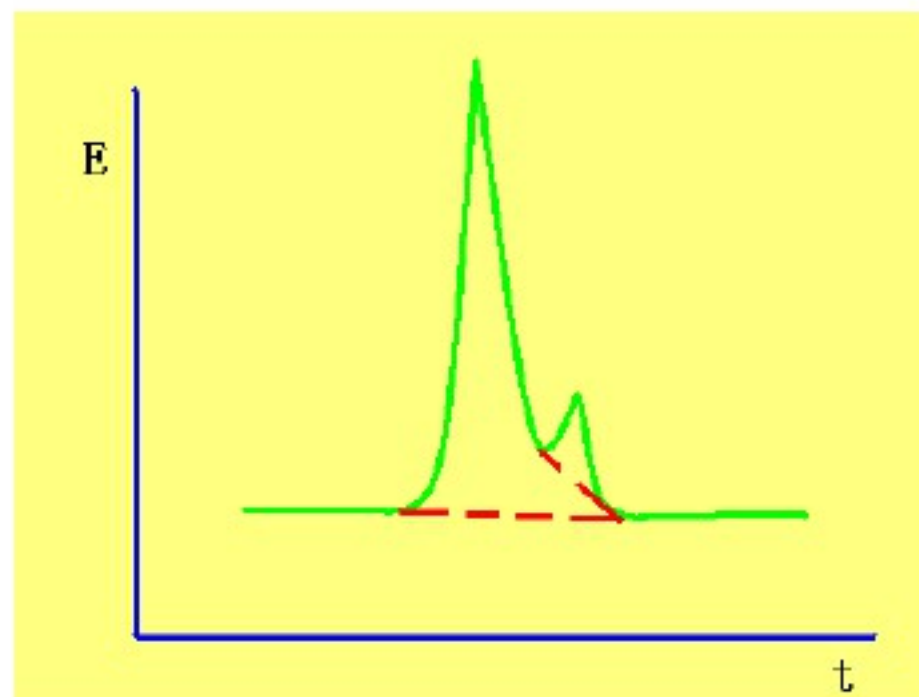
$$A=h \cdot \left( \frac{Y_{0.15} + Y_{0.85}}{2} \right)$$

- 峰高乘保留值法：适于狭窄峰，快速简便，常用于工厂控制分析。  $A=h \cdot t_R$

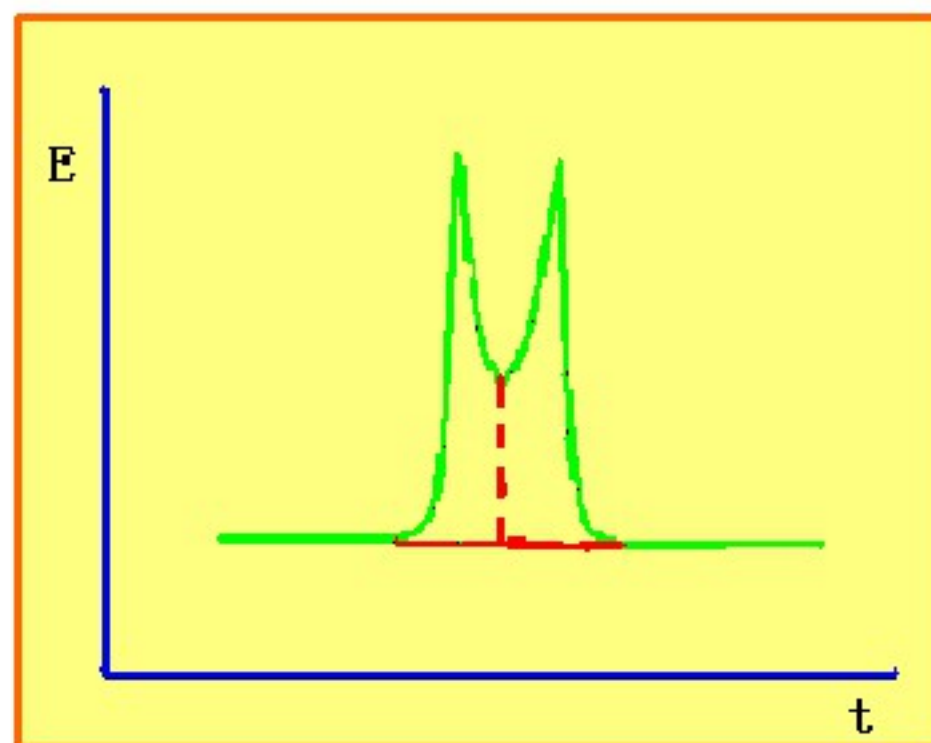


## ■ 重叠峰的测量

➤ 切线分峰

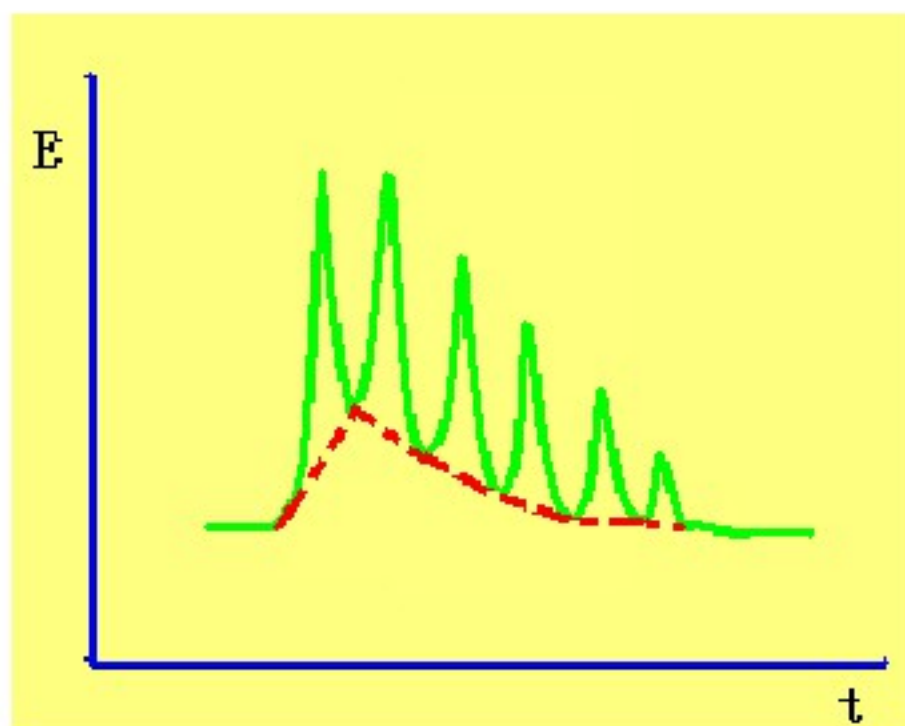


➤ 垂线分峰

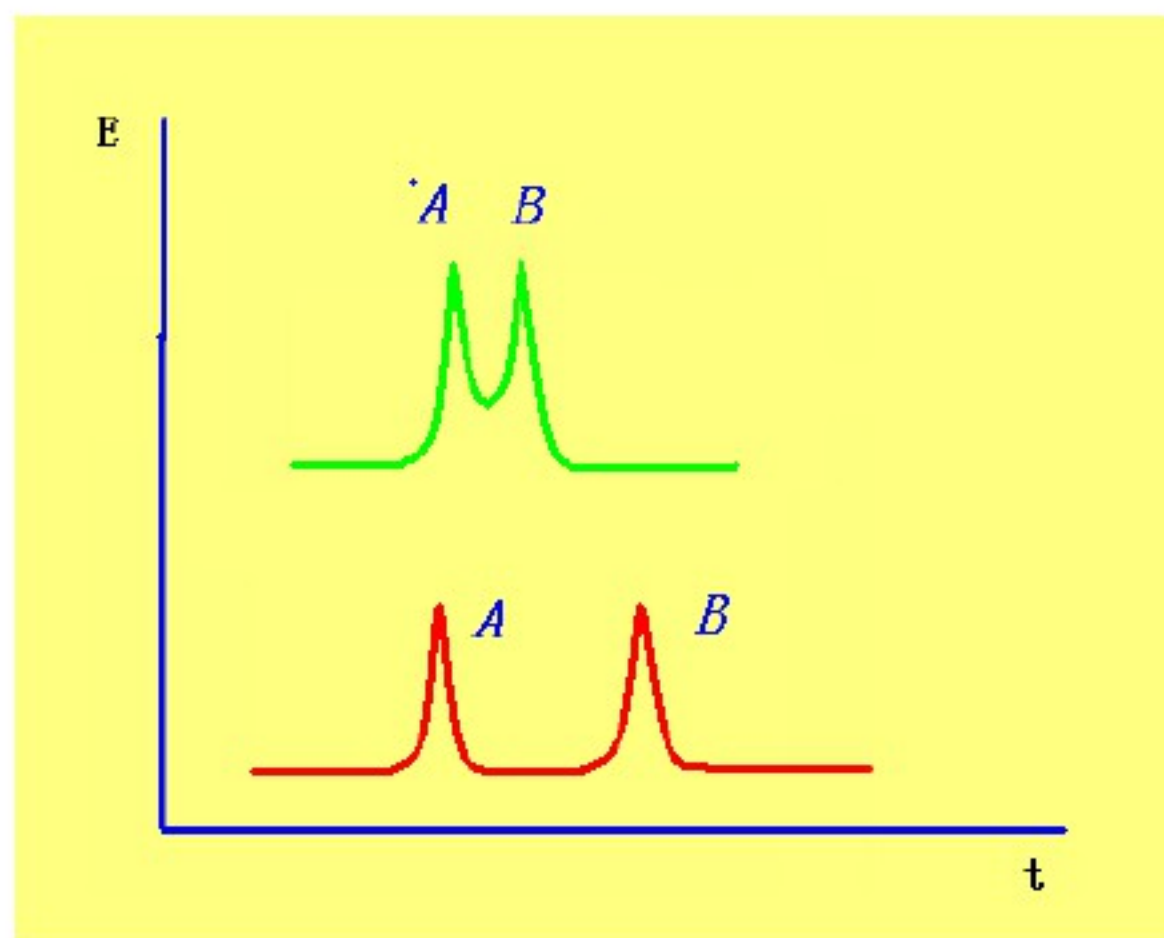




➤ 连线分峰



➤ 计算机拟合分峰



- 校正因子的测量与计算
- 相对校正因子

由于绝对校正因子与仪器的灵敏度有关，又由于灵敏度与实验条件相关，且每一检测器的灵敏度都是不同的，它不容易测量准确，亦无通用性，所以实际工作中使用相对校正因子。

➤ 质量校正因子

$$f_m = \frac{f'_{i,m}}{f'_{s,m}} = \frac{A_s m_i}{A_i m_s}$$

被测组分  
的质量

标准物质量

➤ 摩尔校正因子

$$f_M = \frac{f'_{i,M}}{f'_{s,M}} = \frac{A_s m_i M_s}{A_i m_s M_i}$$

➤ 相对响应值

$$S'_i = \frac{1}{f'_i}$$

分子量

- 定量方法

- 校正归一化法 —— 含归一化
- 内标法 —— 含内标标准曲线法
- 外标法 —— 含单点校正

## ■ 校正归一化法

➤ 推导:

$$C_i\% = \frac{m_i}{m} \times 100 = \frac{m_i}{m_1 + m_2 + \cdots + m_n} \times 100$$

$$= \frac{A_i f_i}{A_1 f_1 + A_2 f_2 + \cdots + A_n f_n} \times 100$$

$$C_i\% = \frac{f_i A_i}{\sum f_i A_i} \times 100$$



- **应用范围**：当试样中各组分都能流出色谱柱，且在检测器上均有响应，各组分峰没有重叠时，可用此法。
- **优点**：简便、准确，当操作条件如进样量等变化时，对定量结果影响很小，该法适合于常量物质的定量。
- **缺点**：对该法的苛刻要求限制了它的使用。

## ➤ 面积归一化法

若各组分的定量校正因子相近或相同，则上式可简化为：

$$C_i\% = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100\%$$

## ■ 内标法

### ➤ 推导

将一定量的纯物质作为内标物，加入到准确称量的试样中。

$$\frac{m_i}{m_s} = \frac{f_i A_i}{f_s A_s}$$

$$\frac{m_i}{m_s} = \frac{f_i A_i}{f_s A_s} \Rightarrow \frac{m_i}{m_s} = \frac{f_i A_i}{f_s A_s} \Rightarrow \frac{m_i}{m_s} = \frac{f_i A_i}{f_s A_s}$$

单点校正

- **适用范围：** 当只需测定试样中某几个组分，且试样中所有组分不能全部出峰时可用。
- **优点：** 受操作条件的影响较小，定量结果较准确，使用上不象归一化法那样受到限制，此法适合于微量物质的分析。
- **缺点：** 每次分析必须准确称量被测物和内标物，不适合于快速分析。



## ➤ 内标标准曲线法（多点校正内标法）

$f_{i,s}m_s/m$  为常数  $K$ ，此时  $C_i\% = K \cdot (A_i/A_s)$ ，以  $C_i\%$  对  $A_i/A_s$  作标准曲线。

**优点：**不必测校正因子，消除了某些操作条件的影响，方法简便，适合液体试样的常规分析。。

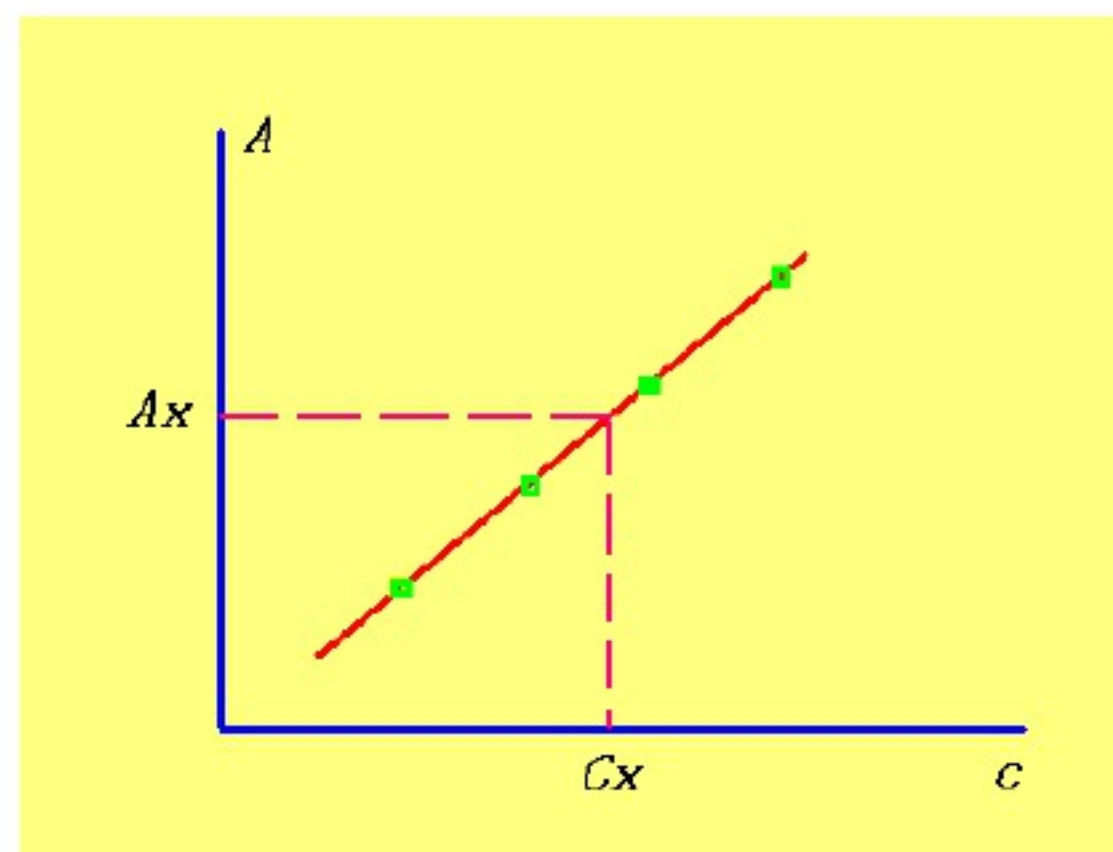


## ■ 外标法（标准曲线法）

➤ 用于常规分析

➤ **优点：**操作简单，计算方便。

➤ **缺点：**结果的准确度取决于进样量的重现性和操作条件的稳定性。该法必须定量进样。



## ➤ 单点校正

当被测试样中各组分的浓度变化范围不大时而用单点校正法。

即配制一个与被测组分含量十分接近的标准溶液，定量进样，计算被测物的含量。

$$C_i\% = \frac{A_t}{A_s} \cdot C_s \times 100\%$$

### (3) 定量中的误差问题

- 样品的代表性（样品的前处理）
- 进样系统的影响
- 柱系统的影响
- 测量误差
- 定量结果的误差分析

# HPLC主要类型及其选择

- 化学键合相色谱法
- 液固色谱法
- 离子对色谱法
- 离子色谱法
- 体积排阻色谱法

# 一、化学键合相色谱法

## 1. 分类

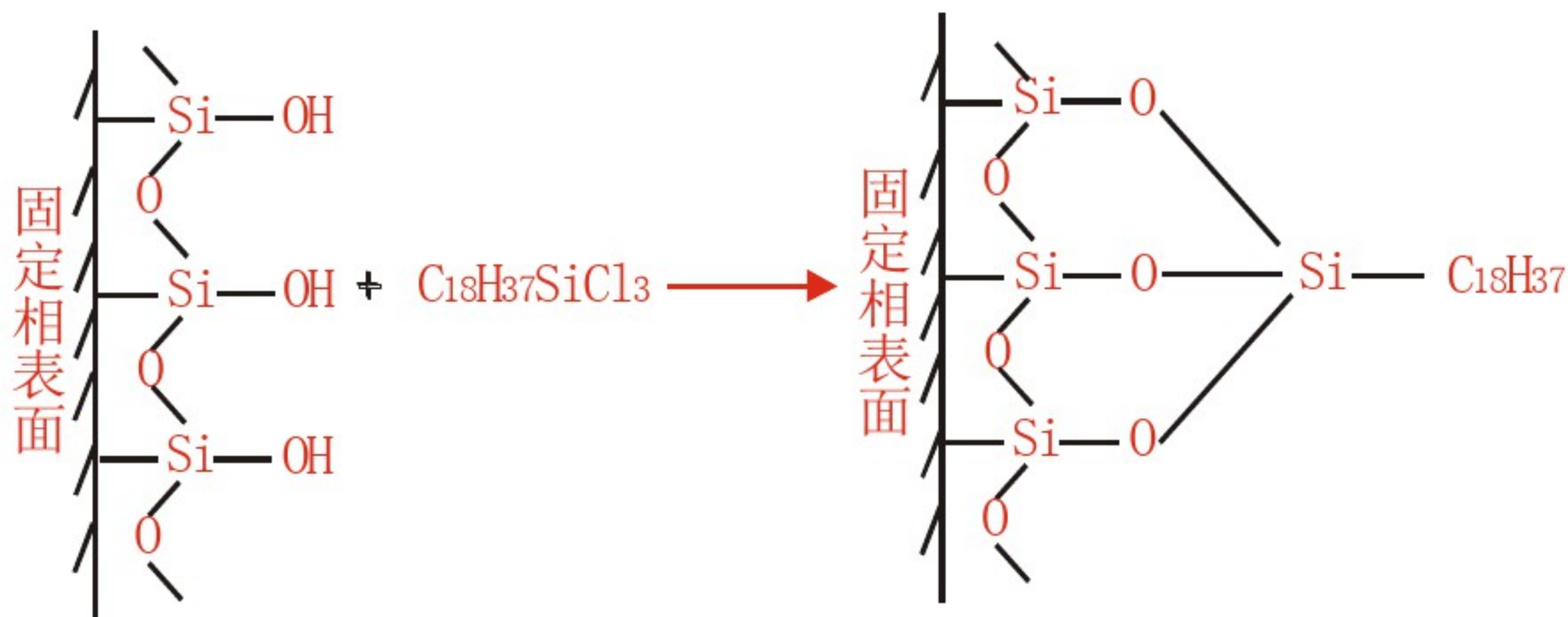
- 正相键合相色谱法 (Normal phase chromatography):  
固定相的极性大于流动相的极性, 适用于分离油溶性或水溶性的极性 or 强极性化合物
- 反相键合相色谱法 (Reversed phase chromatography):  
固定相的极性小于流动相的极性, 适于分离非极性、极性和离子性化合物。应用最广泛



# 正相色谱法与反相色谱法比较表

	正相色谱法	反相色谱法
固定相极性	高~中	中~低
流动相极性	低~中	中~高
组分洗脱次序	极性小先洗出	极性大先洗出

## 2. 固定相



- 疏水基团 如不同链长的烷烃 ( $\text{C}_8$ 和 $\text{C}_{18}$ ) 和苯基等
- 极性基团 如氨丙基, 氰乙基、醚和醇等。

## 常用固定相

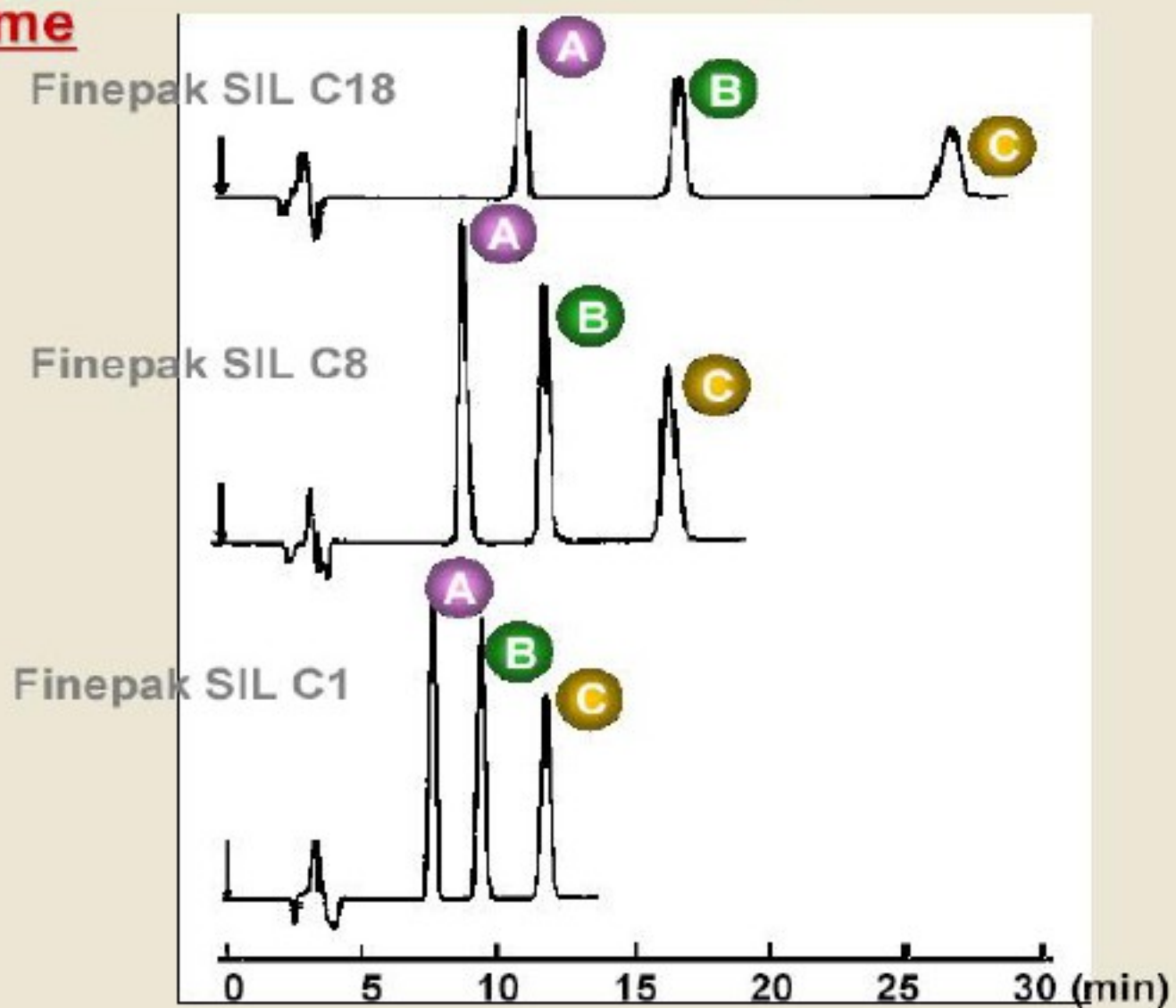
类型	分离方式	应用特点
C-18	反相、离子对	普适性好，保留值大。溶于水的高极性化合物、中等极性化合物
C-8	反相、离子对	与C-18类似，保留值略小
C-3, C-4	反相	保留值小，适合肽类和蛋白质
苯基	反相	保留适中，选择性不同。非极性、中等极性化合物
-CN	反相、正相	选择性与硅胶类似，保留小，用途广
-NH <sub>2</sub>	反相、正相、离子交换	分离糖类、核苷酸、固醇等
二醇基	正相	分离有机酸、排阻分蛋白质等
醚基	反相、正相	分离酚类、芳硝基化合物，保留比C-18强
聚苯乙烯基	反相	PH使用范围广，对部分分离峰形好，寿命长



## Length of packing materials carbon chains and retention time

Mobile phase :  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}(40/60)$

- A** : p-Hydroxy ethyl benzoate
- B** : p-Hydroxy propyl benzoate
- C** : p-Hydroxy butyl benzoate



- 不同厂商固定相的比较

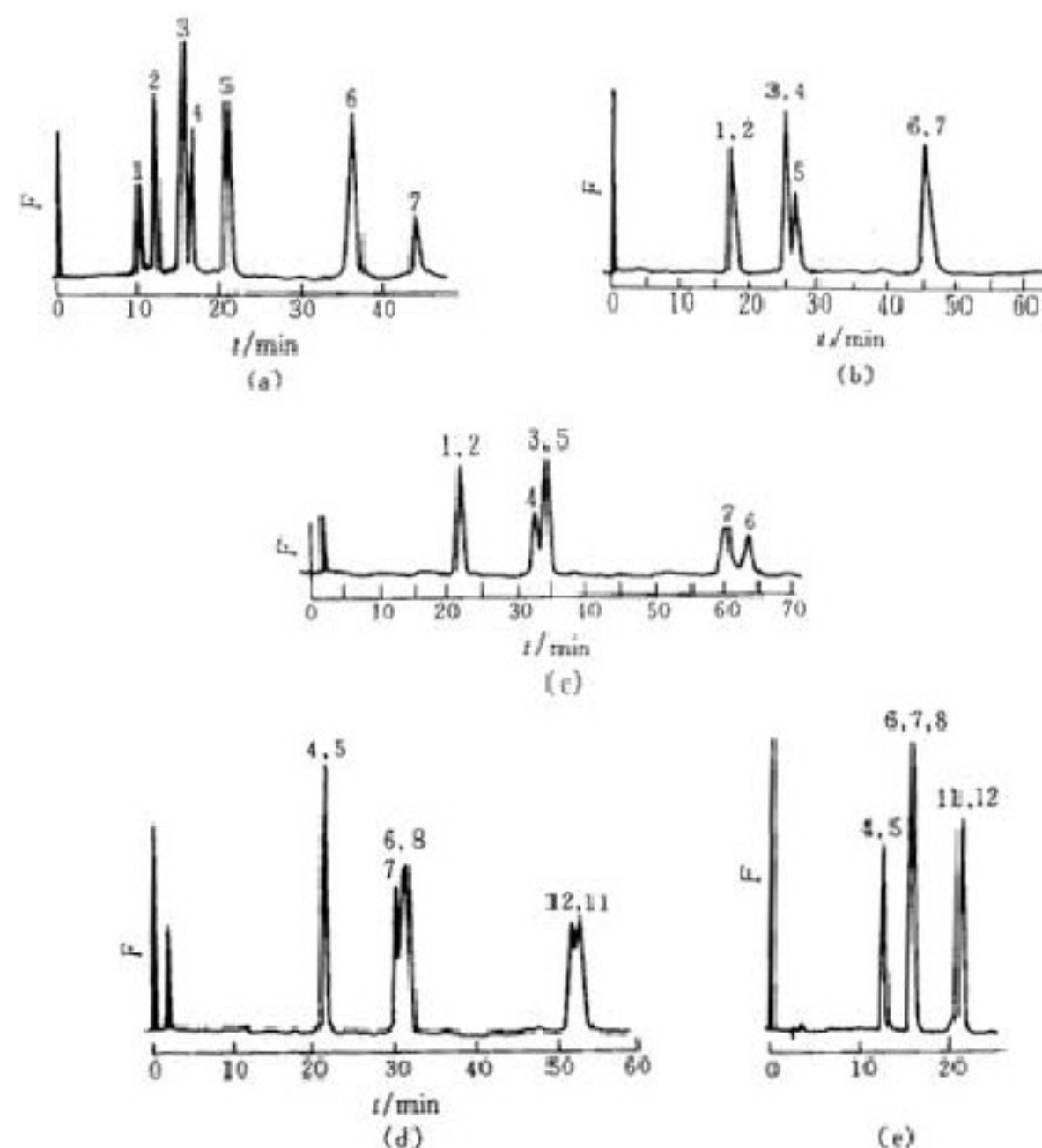


图 4-4 在五种不同型号 ODS-硅胶化学键合相上, 多环芳烃混合物的分  
 固定相: (a) HC-ODS (8.5%); (b) Lichrosorb RP-18 (19.8%);  
 (c) Partisil-10ODS-2 (16%); (d) Zorbax ODS (10%);  
 (e)  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (10%) (括号内为碳含量)  
 样品: 1—苯蒽; 2—蒽; 3—苯并 [a] 芘; 4—苯并 [b] 蒽代  
 蒽烯; 5—苯并 [k] 蒽代蒽烯; 6—苯并 [ghi] 芘;  
 7—吖啶并 [1, 2, 3-c, d] 芘; F—荧光强度



### 3. 流动相

- 溶剂具有稳定的化学性质
  - 溶剂的选择与使用的检测器要有相容性
  - 溶剂的粘度要小
  - 溶剂的沸点不能太低
  - 溶剂的纯度要高且价格便宜
- 
- 正相：正己烷、正庚烷、乙醚、二氯甲烷、氯仿等，己烷为主体，加入质子接受体乙醚或甲基叔丁基醚，质子给予体氯仿，偶极溶剂二氯甲烷
  - 反相：水、甲醇、乙腈、四氢呋喃、乙醇及其混合物等，以水为主体，加入质子接受体甲醇，质子给予体乙腈，偶剂溶剂四氢呋喃。

## 4. 影响保留值的因素

- 溶质结构对保留值的影响：
  - 正相：溶质极性越强，官能团越多，保留值越大
  - 反相：溶质极性越弱，疏水性越强，保留值越大。溶质的保留值与其分子非极性部分的总面积有关，面积大，保留值大。



## Retention behavior in reversed phase HPLC

Carbon chain length of sample

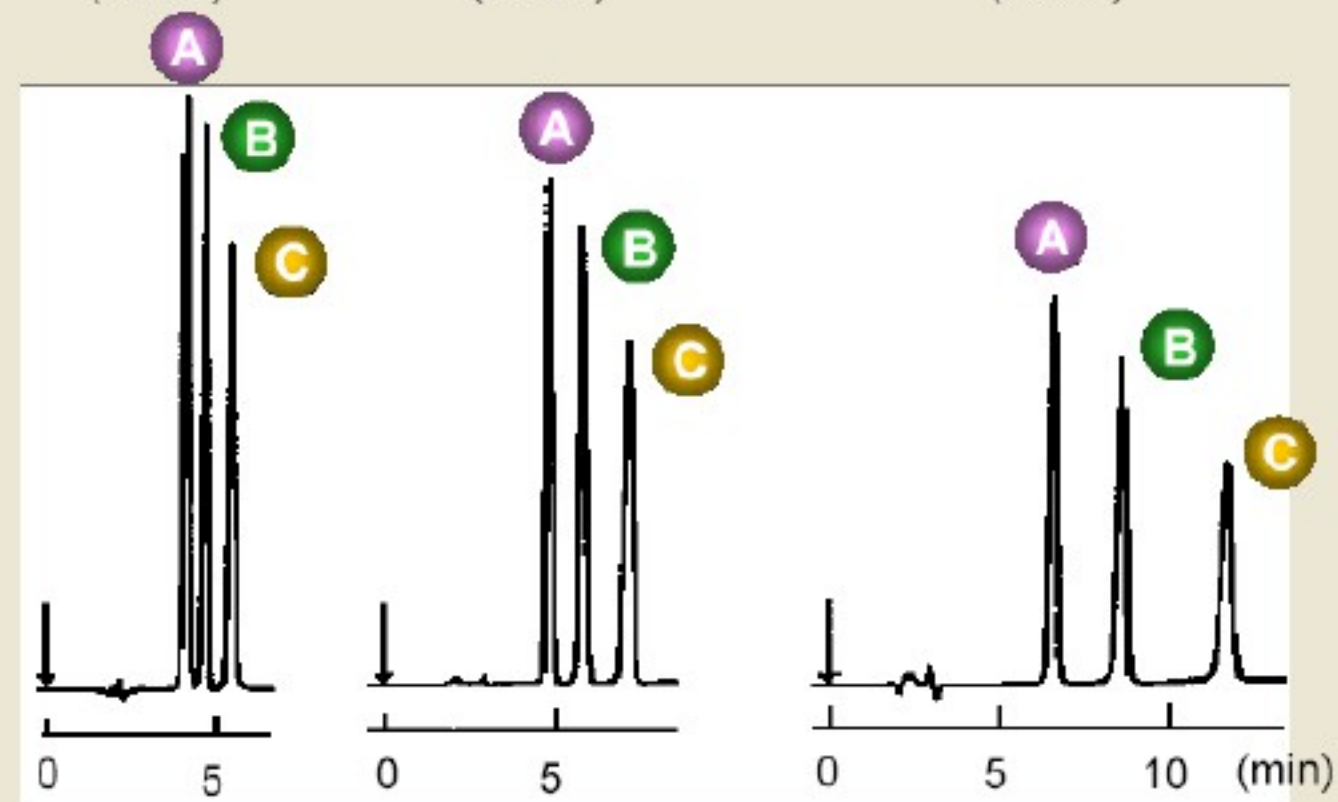
**A** < **B** < **C**

- A** : p-Hydroxy ethyl benzoate
- B** : p-Hydroxy propyl benzoate
- C** : p-Hydroxy butyl benzoate

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O  
(70/30)

(60/40)

(50/50)



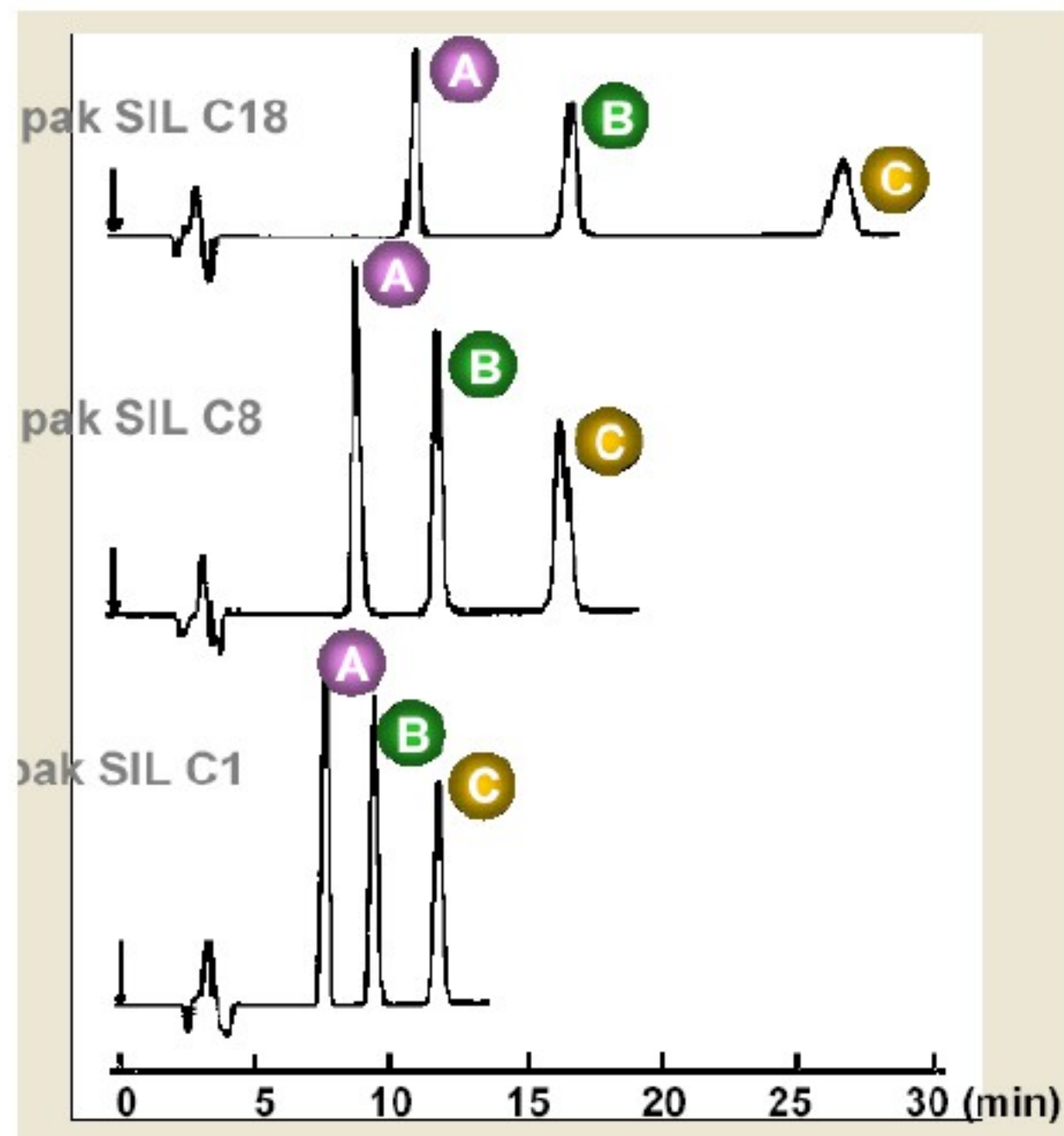
Low

Polarity of Mobile phase

High

Column : Finepak SIL C18

- 烷基键合固定相特性对保留值的影响：
  - 反相：键合相烷链长， $k$ 大，选择性好。



- 溶剂性质：
  - 正相：溶剂极性越弱，保留越大
  - 反相：流动相表面张力大、介电常数大，则极性越强。其斥力越大，溶质与固定相键合越强，保留值越大。



- 盐的影响：
  - 通常加入醋酸盐、硼酸盐、硫酸盐等。无机盐使流动相表面张力增大，对非离子性溶质，使 $k$ 增加，对离子型溶质， $k$ 下降。对碱性有机物有改善峰形的作用。
- pH值：
  - 加入酸、碱或缓冲液，控制PH，抑制溶质的离子化，改善峰形。用于分析弱酸、碱。

# 5 应用

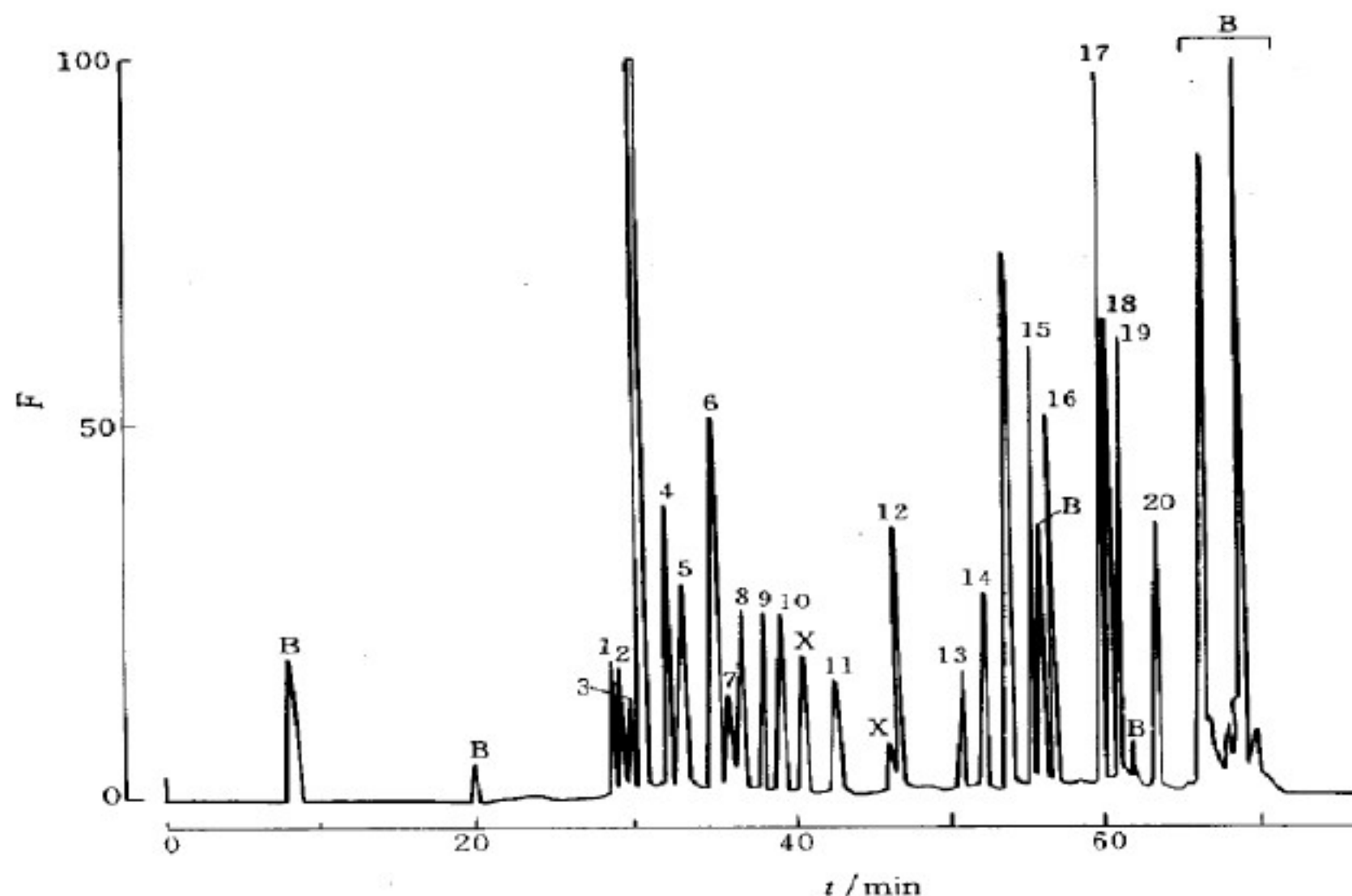


图 10-3 反相 HPLC 分离 Phisyl-Cl-氨基酸衍生物

1—半胱氨酸 (Cys); 2—天冬氨酸 (Asp); 3—谷氨酸 (Glu); 4—羟脯氨酸 (Hyp); 5—天冬酰胺 (Asn); 6—丝氨酸 (Ser); 7—蛋氨酸 (Met); 8—苏氨酸 (Thr); 9—甘氨酸 (Gly); 10—丙氨酸 (Ala); 11—脯氨酸 (Pro); 12—缬氨酸 (Val); 13—异亮氨酸 (Ile); 14—亮氨酸 (Leu); 15—苯丙氨酸 (Phe); 16—半胱氨酸 (Cys); 17—鸟氨酸 (Orn); 18—赖氨酸 (Lys); 19—组氨酸 (His); 20—酪氨酸 (Tyr);  
B—试剂空白杂质; X—未知; F—荧光强度

## 二. 液固色谱法

### Liquid Solid Chromatography

#### 1. 固定相

极性：硅胶、氧化镁、氧化铝等

非极性：活性炭、高分子多孔微球、碳多孔微球等

#### 2. 流动相

硅胶为固定相时：以弱极性的正构烷烃为主体，加入二氯甲烷等中等极性溶剂调节合适的洗脱强度。

可用水对硅胶进行减活处理，或加入四氢呋喃、乙腈、甲醇、异丙醇等改性剂

### 3. 影响保留值的因素

- 样品分子结构
  - 溶质分子的官能团极性增加，保留值增加
  - 溶质分子的官能团数目增加，保留值增加
  - 保留值与溶质的空间效应有关
  - 保留值与吸附中心的几何分布有关
- **b. 吸附剂**
  - 吸附剂的孔径越小，表面积越大，保留值越大
  - 吸附剂的活性越强，保留值越大，活性由流动相中的含水量来控制
- **c. 流动相**

## 4. 应用

- 中等分子量的油溶性样品如油品、脂肪、芳烃等
- 不同极性取代基的化合物
- 结构异构体和几何异构体混合物的分离



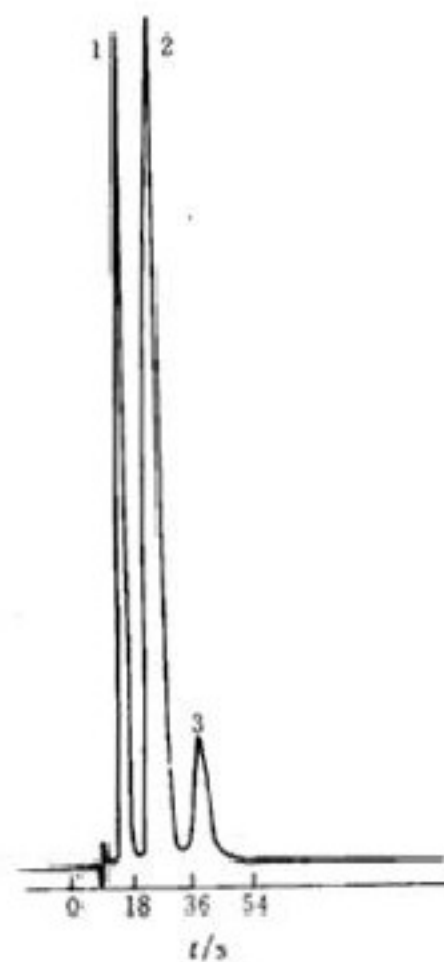


图 9-2 硝基苯胺异构体在  $10\mu\text{m}$

氧化铝上的液固色谱分离

色 谱 柱:  $150\text{mm} \times 2.4\text{mm}$ ,

LiChrosord Alox T; 检测器:

UVD,  $254\text{nm}$ ; 流动相:  $40\%$

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{己烷}$ , 流速  $100\text{mL/h}$ ;

样品: 浓度  $1\text{mg/mLCH}_2\text{Cl}_2$ ,

进样  $1\mu\text{L}$ .

1—邻硝基苯胺; 2—间硝基苯胺;

3—对硝基苯胺

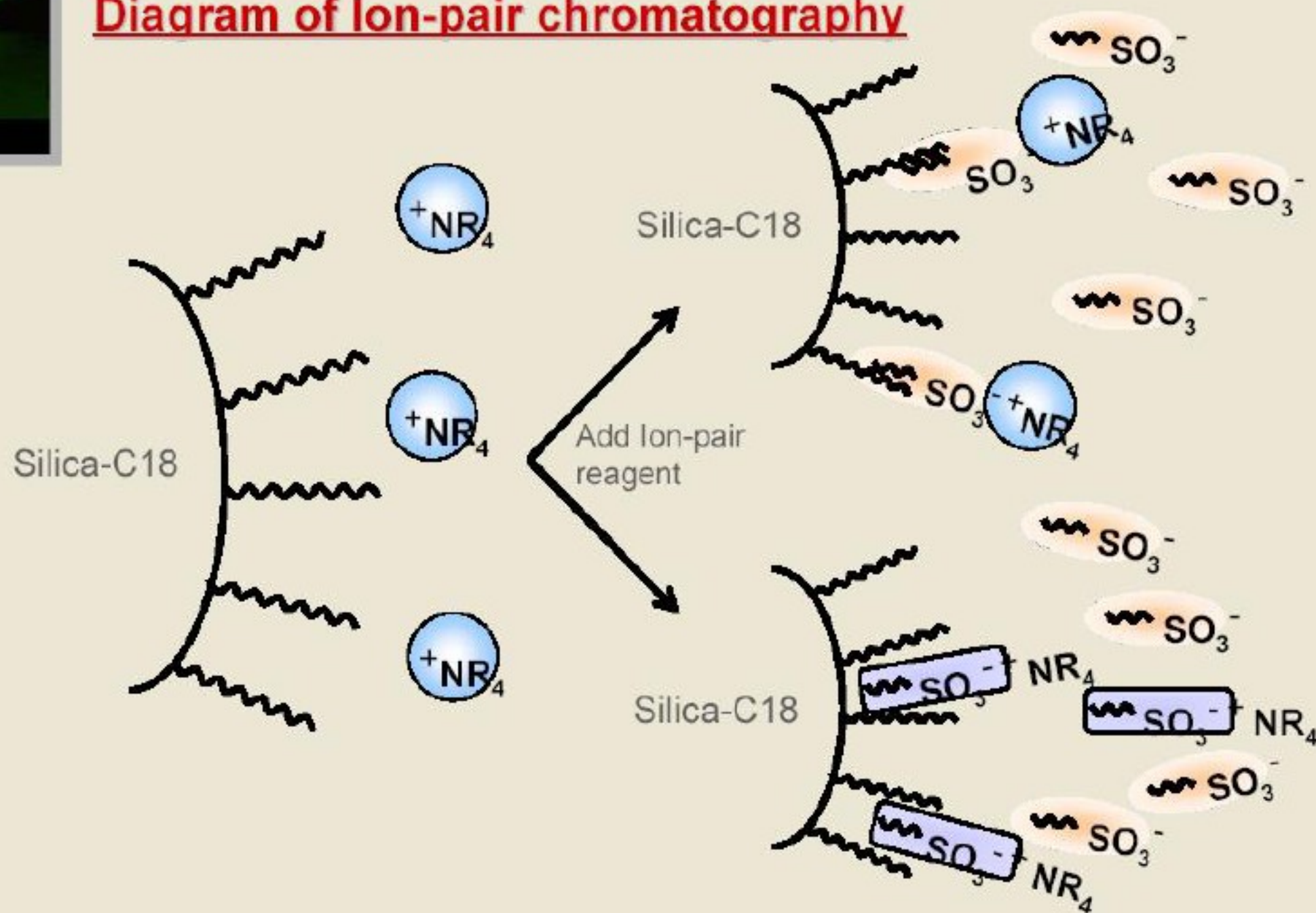
# 三、离子对色谱法

## Ion-pair chromatography

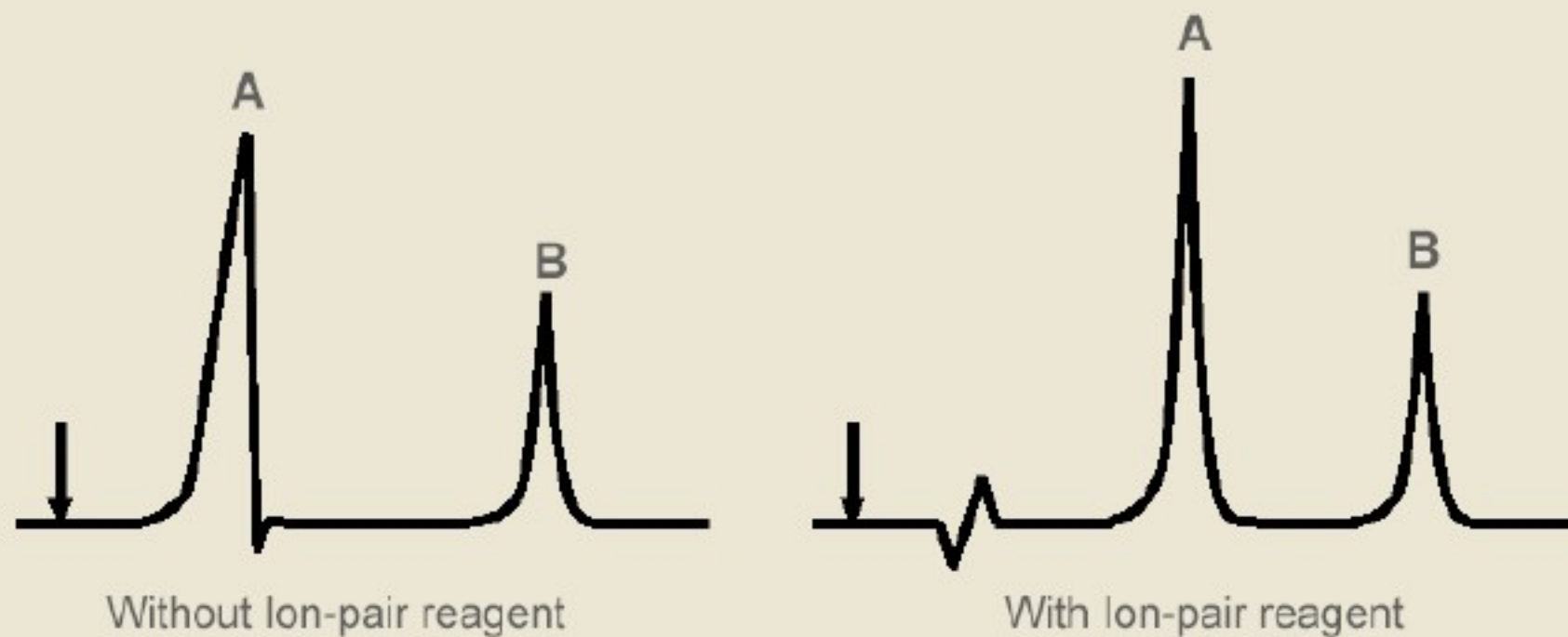
### 1. 基本原理

- 将一种或数种与样品离子电荷 ( $A^+$ ) 相反的离子 ( $B^-$ ) (称为对离子或反离子) 加入到色谱系统流动相中, 使其与样品离子结合生成弱极性的离子对 (中性缔合物) 的分离方法。多为反相离子对色谱

## Diagram of Ion-pair chromatography



## Chromatogram when ion-pair chromatography is used



### **Typical ion reagents**

Acidic ions : Tetra alkyl ammonium halide

Basic ions : l-Alkyl sulfonate

## 2. 固定相、流动相和离子对试剂

- 固定相多为C18, C8反相键合相
- 流动相是以水为主的缓冲液，或水-甲醇、水-乙腈等混合溶剂
- 离子对试剂：四丁基铵正离子、十六烷基三甲基铵正离子， $\text{C}_{10}\text{O}_4^-$ ，十二烷基磺酸根等

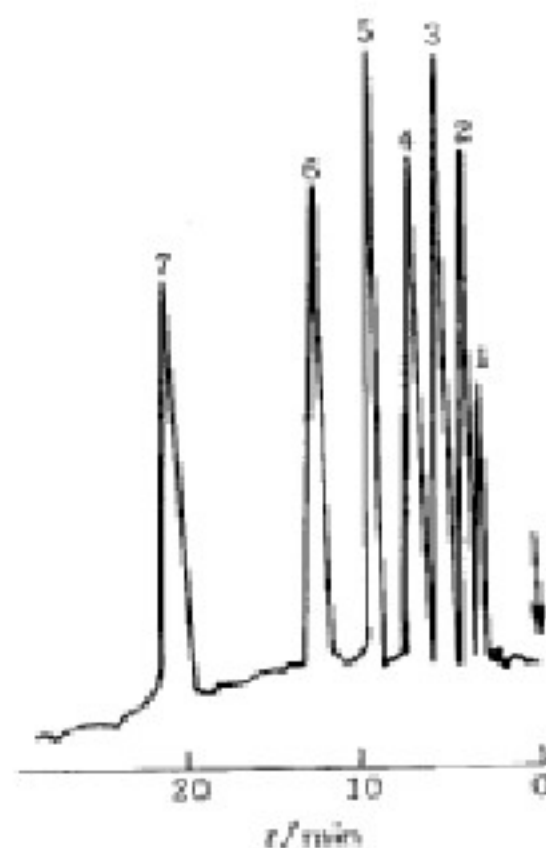


### 3. 影响保留值的因素

- **pH的影响**: 改善分离选择性的有效方法。  
反相中, 对于阴离子的分离, pH下降,  $k$ 减小。
- **离子对试剂的性质与浓度**: 反相中, 离子对试剂烷基链越长, 疏水性越大,  $k$ 越大。
- **溶剂的极性**: 反相中, 甲醇、乙腈等含量增加, 洗脱强度增大,  $k$ 下降。洗脱强度与极性参数、介电常数同时相关
- **离子强度**: 反相中, 离子强度增加, 溶质 $k$ 下降

## 4. 应用

有机酸、有机碱特别是强酸强碱的分析，如羧酸、磺酸、胺类、酚类、药物、染料等



反相离子对色谱分析有机酸

固定相：C18烷基键合相

流动相：0.03mol/L四丁基铵+戊醇

1. 4-氨基苯甲酸； 2. 3-氨基苯甲酸；  
3. 4-羟基苯甲酸； 4. 3-羟基苯甲酸；  
5. 苯磺酸； 6. 苯甲酸； 7. 甲苯-4-磺酸

## 液相色谱常用类型总结：

色谱类型 (Mode)	固定相 (Stationary Phase)	流动相 (Mobile Phase)	主要适用范围 (Compound Sepatated)
正相色谱 (Normal-Phase)	硅胶、氰基、氨基	有机溶剂	在水中绝对不溶解的物质或同分异构体
反相色谱色谱 (Reversed-Phase)	C-18,C-8,C-4,C-2	水/有机溶剂	中性、弱酸性、弱碱性物质
离子对色谱 (Ion-Pair)	C18,C-8	水/有机溶剂 离子对试剂	离子
离子交换色谱 (Ion Exchange)	阴离子和阳离子交换剂	水相/缓冲盐 对离子	离子
体积排阻色谱 (Size Exclusion)	聚酯、硅胶	水相(GPC) 有机相(GPC)	大分子量化合物 聚合物

## 第3章 高效液相色谱法的建立与应用

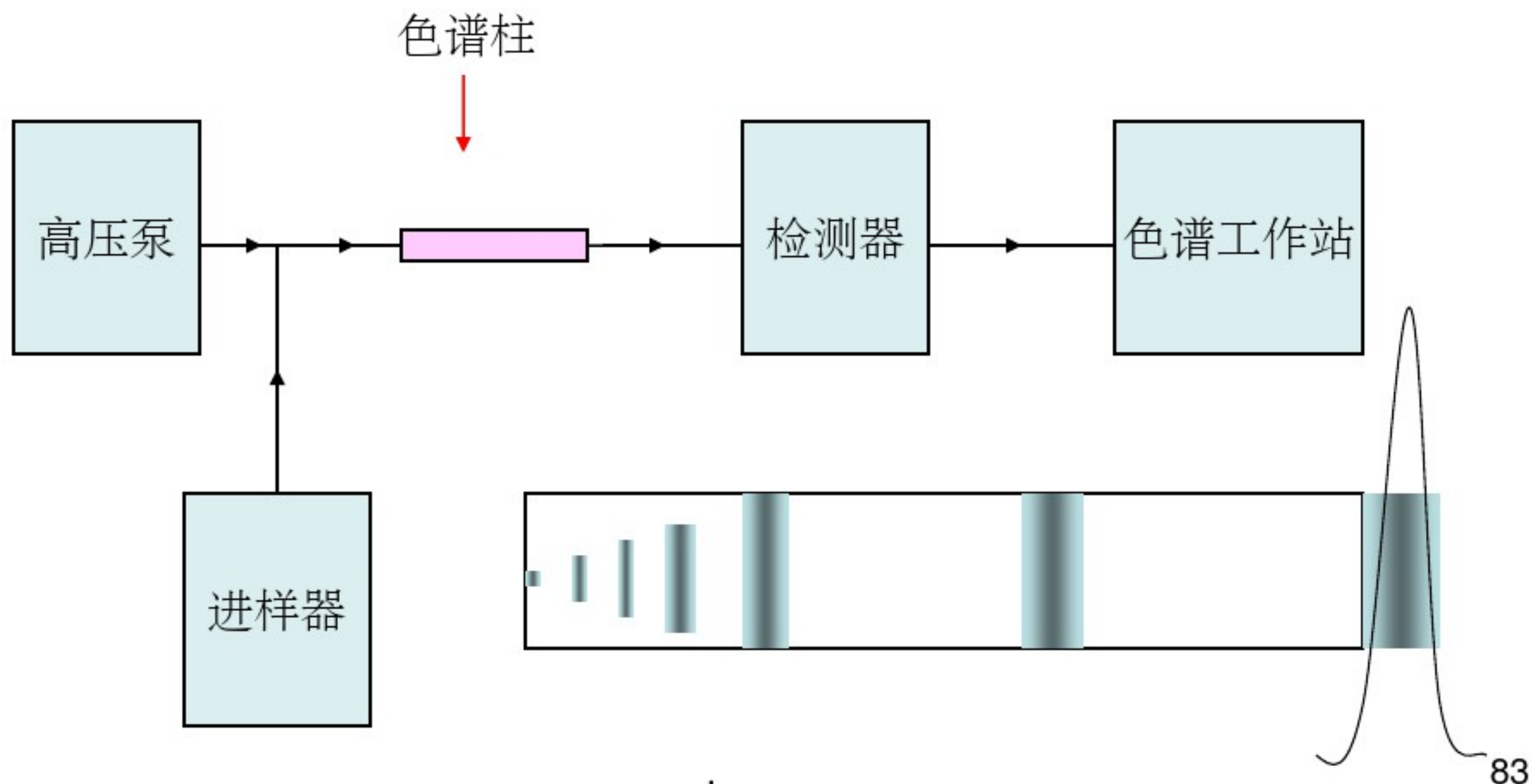
# 我国药典收载高效液相色谱法项目 和数量比较表：

方法	项目	1985年版	1990年版	数量	1995年版	2000年版
HPLC法	鉴别		9		34	150
	检查		12		40	160
	含量测定	7	60		117	387



# 高效液相色谱仪的分析原理

- 高效液相色谱仪的结构
- 色谱柱在高效液相色谱仪中的作用和峰形产生原理



# HPLC有以下特点

- 高压——压力可达 $150\sim 300\text{ Kg/cm}^2$ 。色谱柱每米降压为 $75\text{ Kg/cm}^2$ 以上。
- 高速——流速为 $0.1\sim 10.0\text{ ml/min}$ 。
- 高效——可达10000塔板每米。在一根柱中同时分离成份可达100种。
- 高灵敏度——紫外检测器灵敏度可达 $0.01\text{ ng}$ 。同时消耗样品少。

# HPLC与经典液相色谱相比有以下优点：

- 速度快——通常分析一个样品在15~30 min，有些样品甚至在5 min内即可完成。
- 分辨率高——可选择固定相和流动相以达到最佳分离效果。
- 灵敏度高——紫外检测器可达0.01ng，荧光和电化学检测器可达0.1pg。
- 柱子可反复使用——用一根色谱柱可分离不同的化合物。
- 样品量少，容易回收——样品经过色谱柱后不被破坏，可以收集单一组分或做制备。

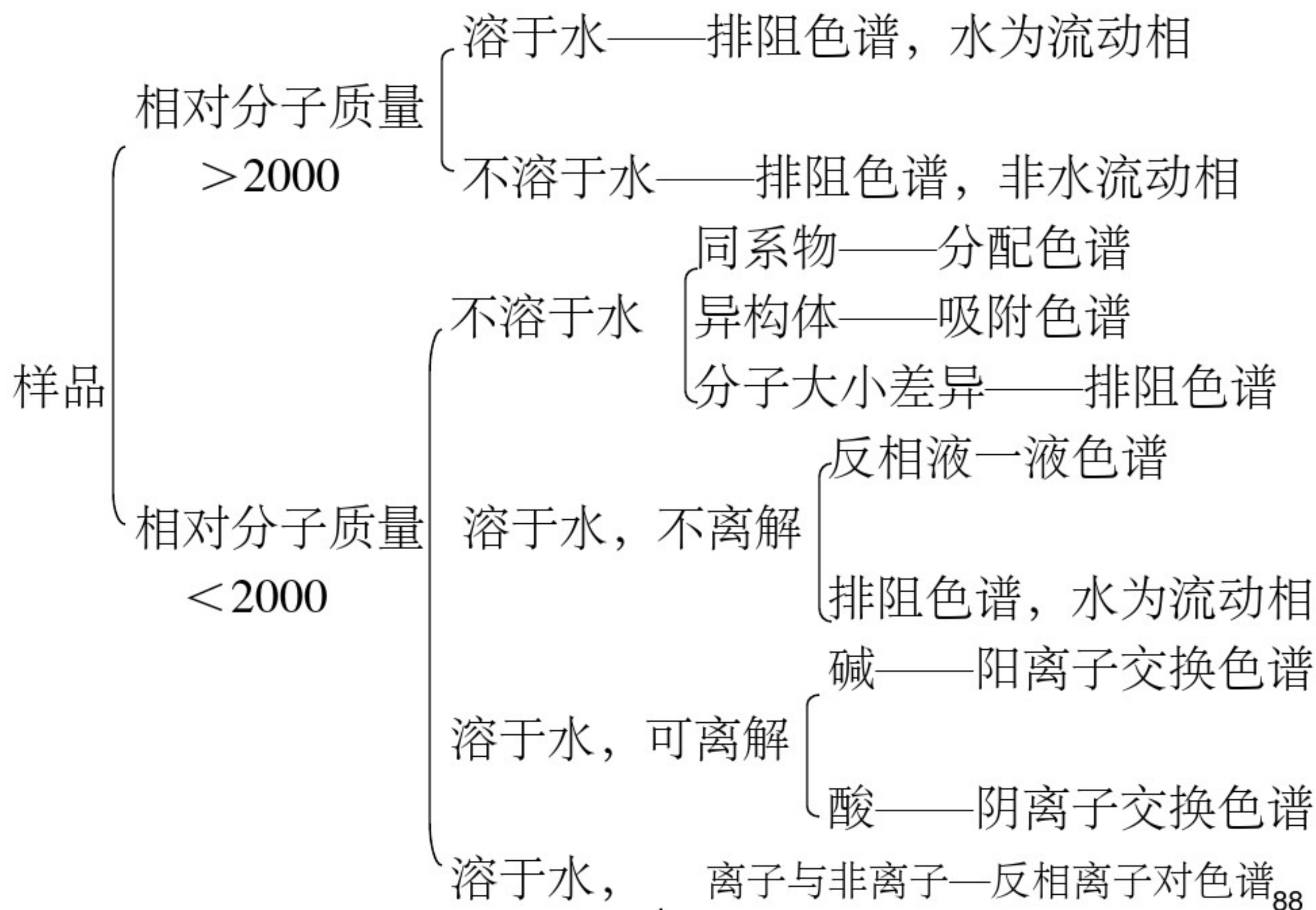
# 一. 高效液相色谱法的建立

## 1. 了解样品

- In which materials ?
- In what concentration ?
- Which sample ?
- With which technique ?

- What is the sample ?
  - Concentration of the interested component
  - Contaminant
  - Characteristics of the sample
  - Structure
  - Molecular weight
  - pKa
  - Solubility





## 2. 选择合适的分析方法

### – Analytical technique

- » Column
- » Mobile phase
- » Detector
- » Sample preparation

### 3.分析条件的优化

- 流动相种类与配比
- 梯度
- 温度
- 流速
- 检测波长
- 进样量

## 二、高效液相色谱法的应用

### • 样品测定

1. **流动相比比例调整**：由于我国药品标准中没有规定柱的长度及填料的粒度，因此每次新开检新品种时几乎都须调整流动相（按经验，主峰一般应调至保留时间为6~15分钟为宜）。所以建议第一次检验时请少配流动相，以免浪费。弱电解质的流动相其重现性更不容易达到，请注意充分平衡柱。

# 样品测定

- 2. 样品配制：①溶剂；②容器：塑料容器常含有高沸点的增塑剂，可能释放到样品液中造成污染，而且还会吸留某些药物，引起分析误差。某些药物特别是碱性药物会被玻璃容器表面吸附，影响样品中药物的定量回收，因此必要时应将玻璃容器进行硅烷化处理。



# 样品测定

- **3. 记录时间：**第一次测定时，应先将空白溶剂、对照品溶液及供试品溶液各进一针，并尽量收集较长时间的图谱（如30分钟以上），以便确定样品中被分析组分峰的位置、分离度、理论板数及是否还有杂质峰在较长时间内才洗脱出来，确定是否会影响主峰的测定。

# 样品测定

- 4. 进样量：药品标准中常标明注入 $10\mu\text{l}$ ，而目前多数HPLC系统采用定量环（ $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 和 $50\mu\text{l}$ ），因此应注意进样量是否一致。（可改变样液浓度）

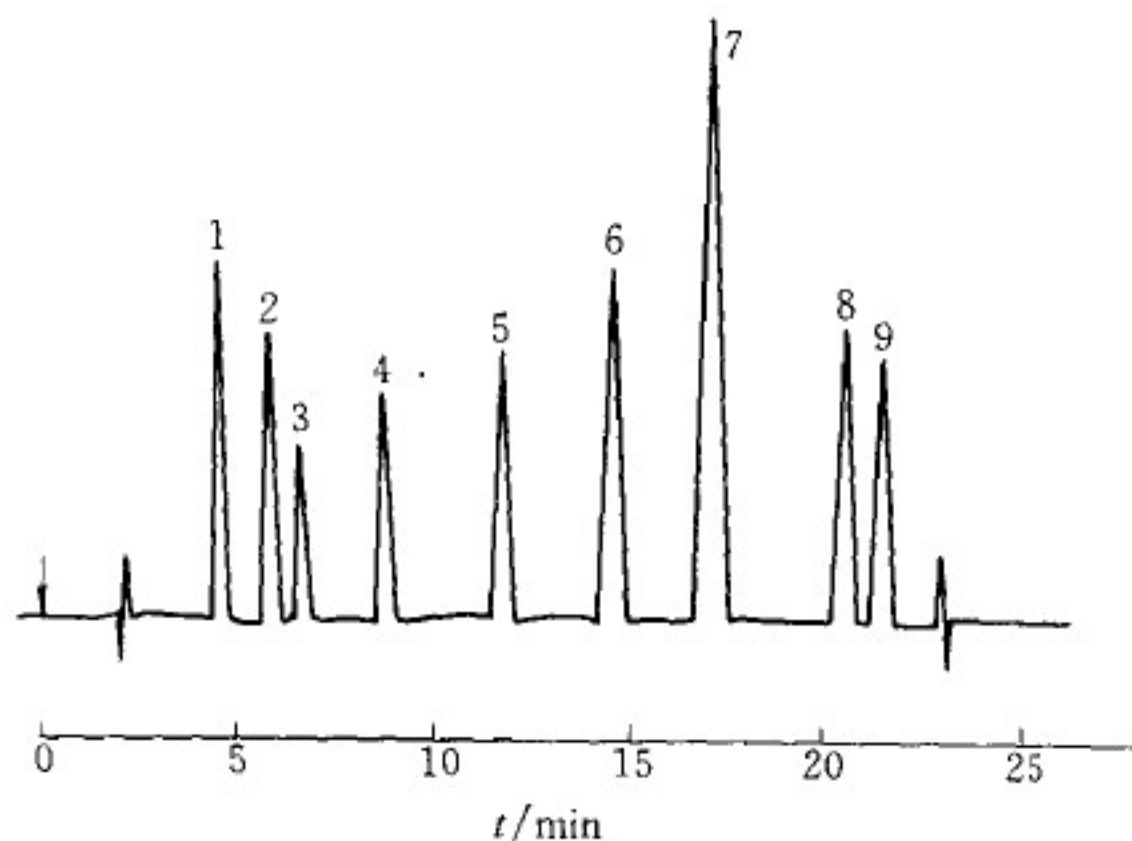
# 样品测定

- 5. 计算：由于有些对照品标示含量的方式与样品标示量不同，有些是复合盐、有些含水量不同、有些是盐基不同或有些是采用有效部位标示，检验时请注意。

# 方法研究

- 1. 波长选择：首先在可见紫外分光光度计上测量样品液的吸收光谱，以选择合适的测量波长，如最灵敏的测量波长并避开其它物质的干扰。从紫外光谱中还可大体知道在HPLC中的响应值，如吸收度小于0.5时，HPLC测定的面积将会很小。
- 2. 流动相选择：尽量采用不是弱电解质的甲醇-水流动相。

# 1. 食品分析

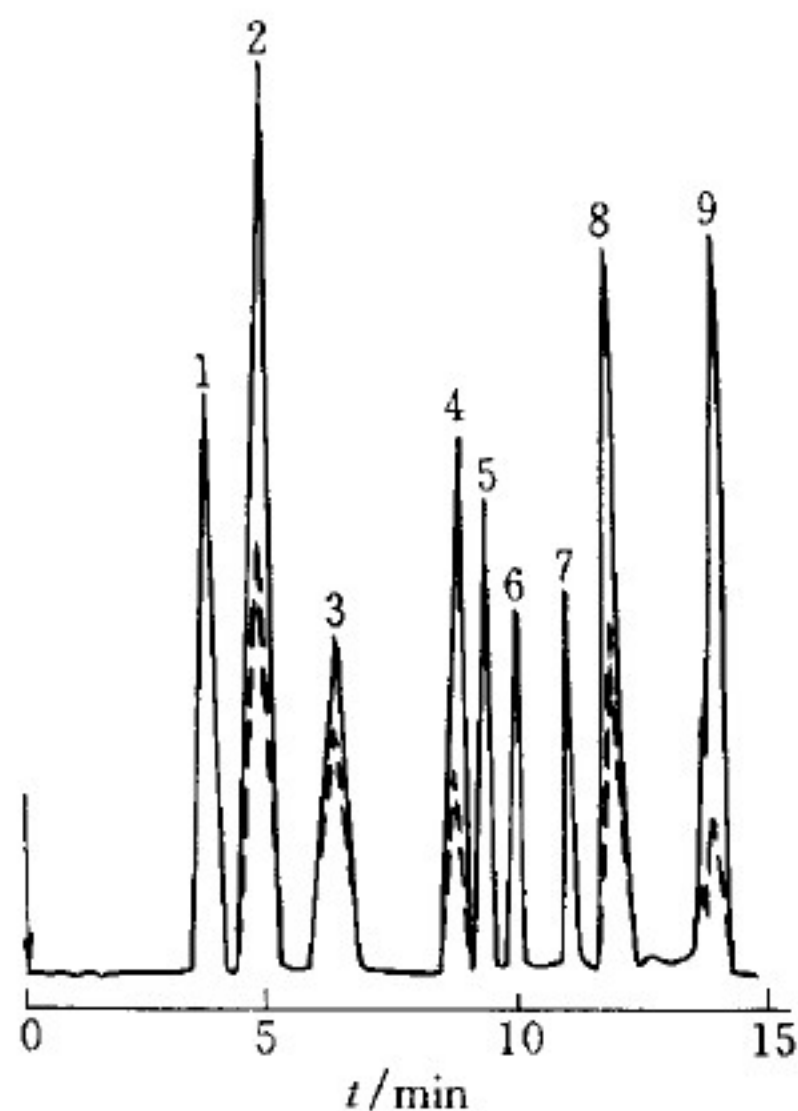


反相离子对色谱分离水溶性维生素

1—维生素 C；2—维生素 B<sub>1</sub>；3 维生素 B<sub>6</sub>；4—烟酸；5—维生素 K<sub>3</sub>（亚硫酸氢钠甲基奈醌）；6—烟酰胺；7—对羟基苯甲酸；8—维生素 B<sub>12</sub>；9—维生素 B<sub>2</sub>

Biophase ODS (5 $\mu$ m,  $\phi$ 4.6mm  $\times$  250mm), 流动相: (A) 1% 乙酸 + 0.5% 三乙胺溶液 (pH=4.5); (B) A + 甲醇 (50 : 50)。梯度洗脱程序在 0~10min 内, 流动相 B 由 0 增至 80%, 再维持 15min。流量为 1mL/min, 用 UVD (275nm) 检测。





软饮料中添加剂的

反相键合相色谱分离图

1—苯甲酸；2—山梨酸；3—糖精钠；  
4—柠檬黄；5—苋菜红；6—胭脂红；  
7—日落黄；8—咖啡因；9—亮蓝

色谱柱为  $\mu$ -Bondapak ( $10\mu\text{m}$ ,  $\phi 8\text{mm} \times 100\text{mm}$ ), 流动相 A 为  $0.02\text{mol/L}$  乙酸铵, B 为甲醇。  
6 个检测波长: 225、230、255、258、273 和  $600\text{nm}$  进行检测

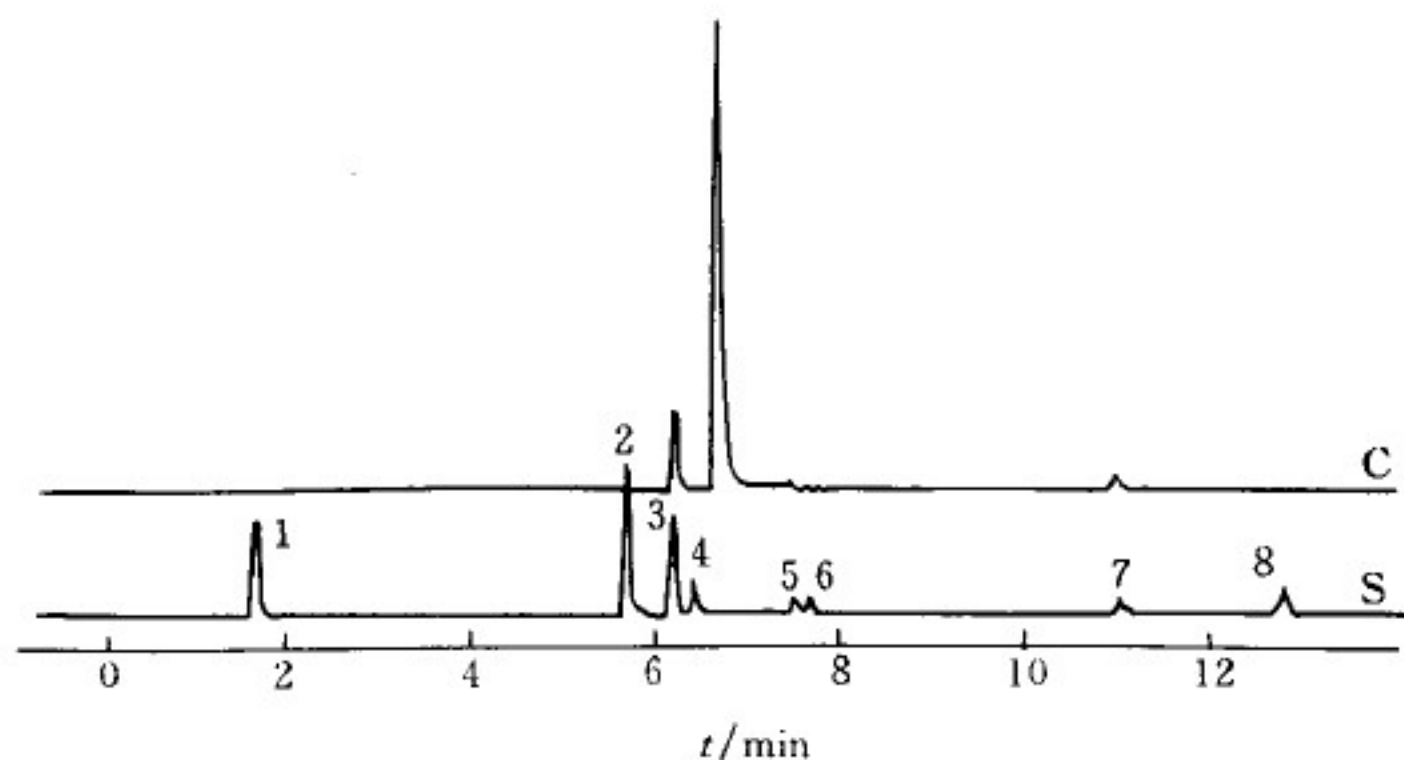


图 10-50 口香糖中抗氧化剂的分析

1—维生素 C (V<sub>c</sub>); 2—栝酸丙酯 (PG); 3—2, 4, 5-三羟基苯丁酮 (THBP); 4—(单)叔丁基对苯二酚 (TBHQ); 5—叔丁基对羟基苯甲醚 (BHA); 6—4-羟基-2, 6-二叔丁基酚 (IonoX-100); 7—2, 6-二叔丁基对甲酚 (BHT); 8—抗坏血酸基软脂酸酯 (ACP)

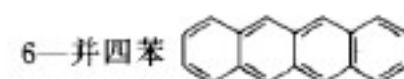
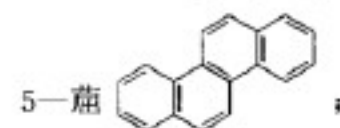
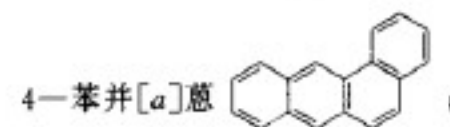
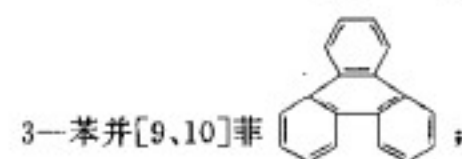
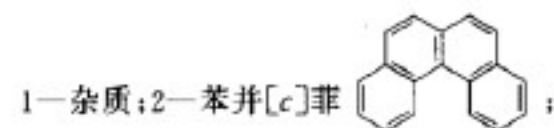
C—口香糖; S—标样

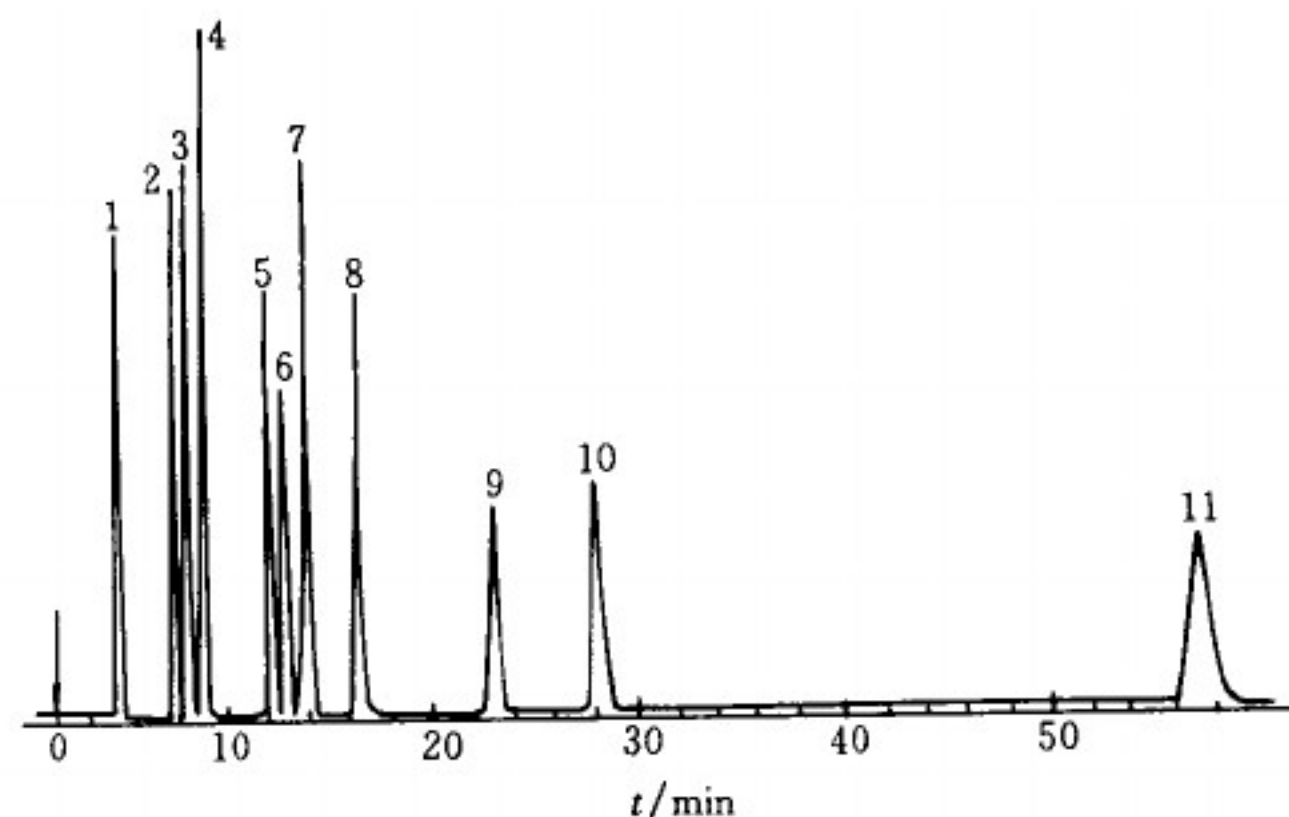
Lichrosorb RP-18 (10 $\mu$ m,  $\phi$ 3.2mm $\times$ 250mm)。流动相梯度: 16min 内从 H<sub>2</sub>O : 乙酸 (95 : 5) 增加至乙腈 : 乙酸 (95 : 5); 1mL/min。用 UVD (280nm) 检测

## 2.环境分析



具有四个苯环的  
多环芳烃异构体的分离



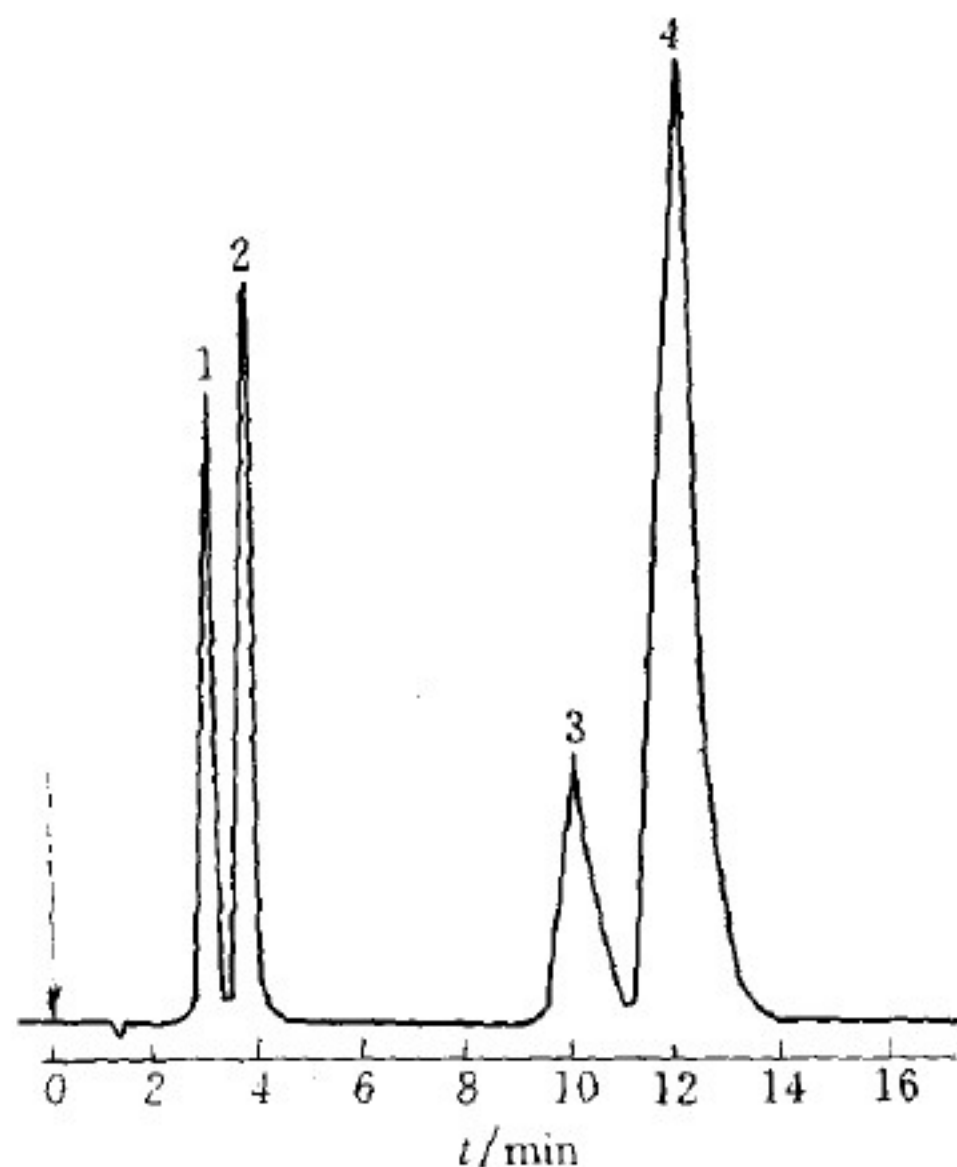


苯酚及其衍生物的分离谱图①

1—苯酚(270); 2—4-甲酚(280); 3—2-甲酚(270); 4—2-氯酚(275); 5—4-氯酚(280);  
 6—2, 6-二甲酚(270); 7—2, 4-二甲酚(280); 8—2, 6-二氯酚(275);  
 9—2, 4, 6-三甲酚(280); 10—2, 4-二氯酚(287); 11—2, 4, 6-三氯酚(287)

色谱柱为 Spherisorb ODS2 ( $5\mu\text{m}$ ,  $\phi 4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$ ), 流动相为甲醇+乙腈+四氢呋喃+水 (体积比为  $28.7 : 4 : 3.8 : 63.5$ )。用 UVD 检测, 检测波长在  $270 \sim 287\text{nm}$ 。

### 3. 药物分析



反相离子对色谱分离生物碱

1—吗啡；2—可待因；3—那可汀

(诺斯卡宾)；4—罂粟碱

色谱柱为 Lichros-orbsi-60—NH<sub>2</sub> (5 $\mu$ m,  $\phi$  4mm  $\times$  250mm), 流动相为 85% 乙腈 + 15% 0.005mol/L 四丁胺磷酸盐溶液; 流量为 1mL/min; 用 UVD (284nm) 检测。样品溶于 80% 乙腈 + 20% 0.004mol/L 硫酸中, 进样 2 $\mu$ l。



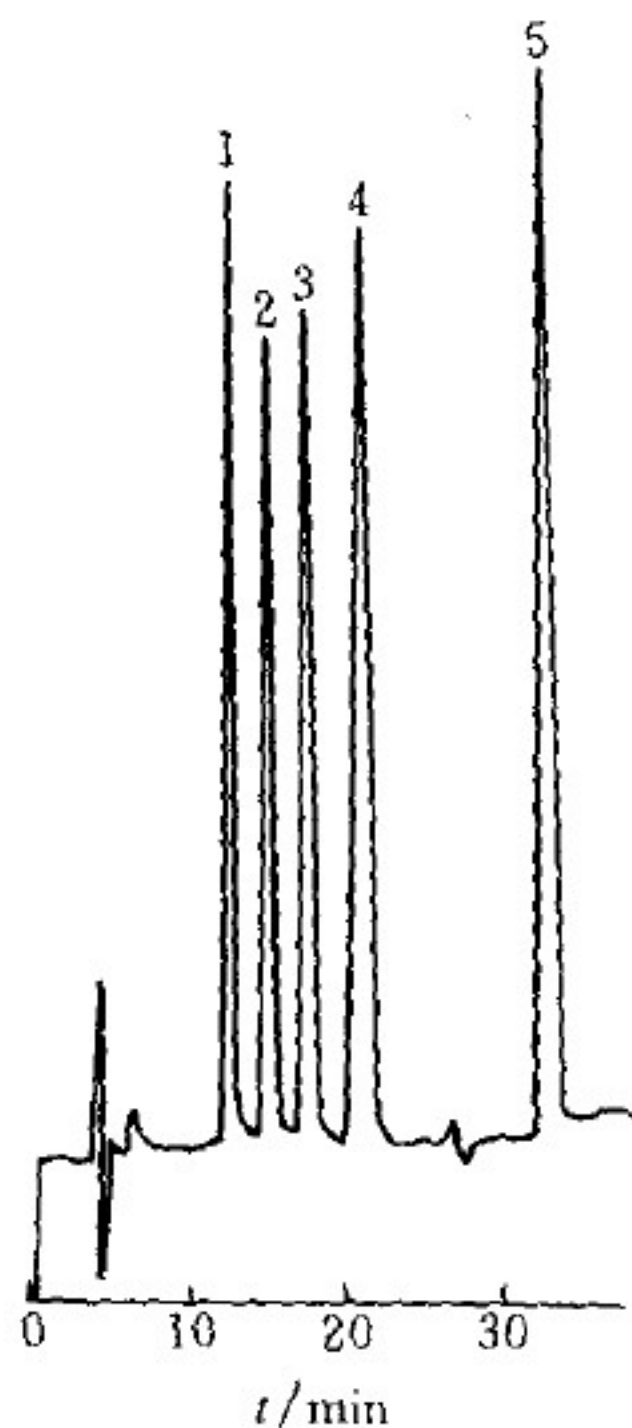
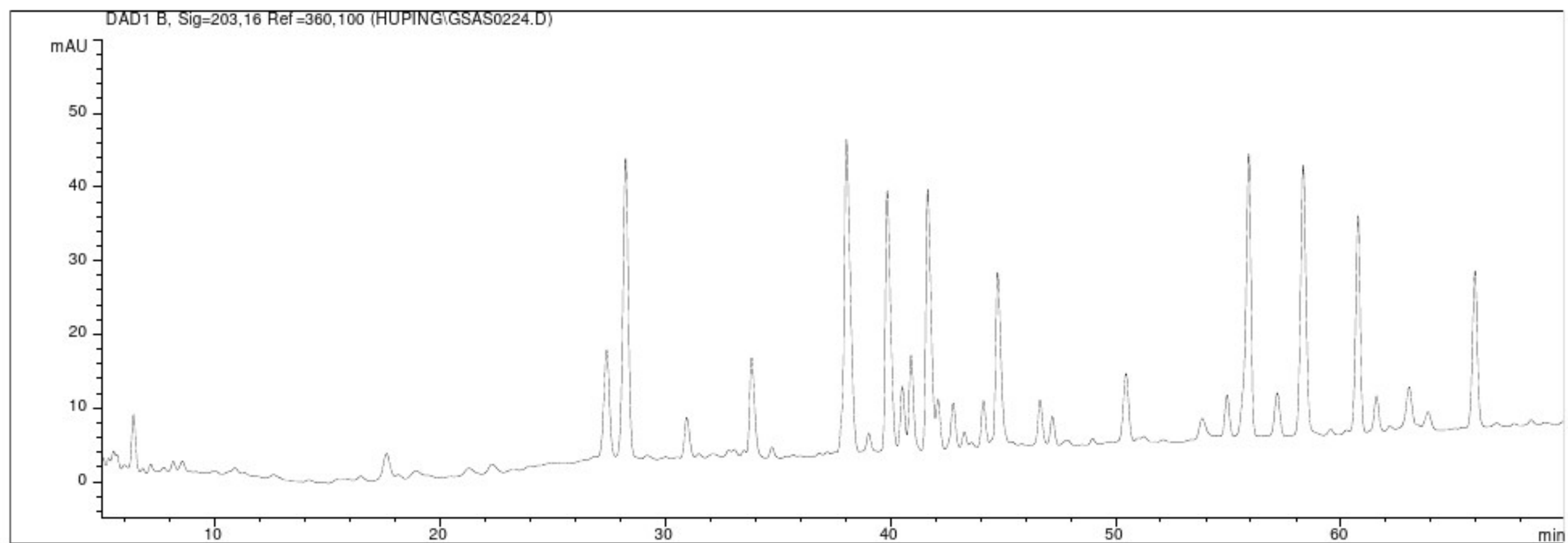


图 10-33 头孢菌素混合物的分析

1—头孢菌素Ⅳ；2—头孢甲氧霉素；3—头孢菌素Ⅵ；4—头孢菌素Ⅱ；5—头孢菌素Ⅰ

可使用微填充柱： $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  ( $10\mu\text{m}$ ,  $\phi 1\text{mm}$   $\times 250\text{mm}$ )，流动相为  $0.01\text{mol/L}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液-甲醇 (75 : 25)，流量：开始至 23min 为  $50\mu\text{L/min}$ ，23min 后为  $150\mu\text{L/min}$ ，用 UVD (254nm) 检测



## 人参皂苷的分析

## 5. 农药分析

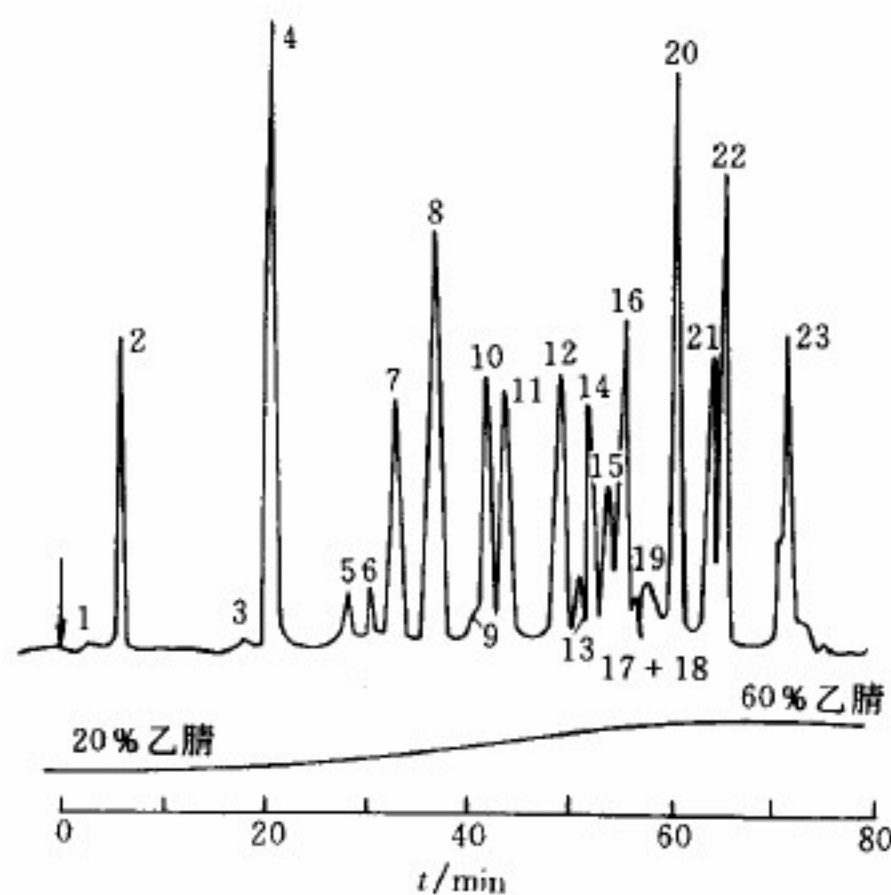


图 10-67 氨基甲酸酯类农药的分离谱图

1—溶剂；2—灭多虫；3—涕灭威；4—异索威；5—杀灭威；6—克百威丹；  
7—百草威；8—甲萘威；9—混杀威；10—苯胺灵；11—氯灭杀威；12—灭虫威；  
13—白克威；14—芽后苯敌草；15—Chloroprophen；16—Eplan；17—Bux；  
18—敌菌丹；19—燕麦灵；20—克草猛；21—苏达灭；22—燕麦敌；23—野麦畏

$\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (10 $\mu$ m,  
 $\phi$ 4mm $\times$ 300mm),  
流动相为 20% 乙腈水溶液

# 第4章 仪器使用细节

# 1.HPLC用水

专门的纯水机或超纯水机；  
去离子水重蒸；  
二次或三次重蒸水；  
采用类似家用的纯水机；  
市场上瓶装的纯净水或蒸馏水；  
其它途径；



## 2. 样品

- 溶解样品用溶剂最好是流动性，或者用溶剂强度与流动相相近的溶剂。
- 进样样品要求无微粒，样品溶液均要用0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。

### 3.流动相的配制

- 流动相通常按体积比配制。
- 流动相在使用前一般都需要过滤，尤其使用了加缓冲盐的流动相时。
- 如果没有自动脱气装置，流动相配好后应该采用合适的方法脱气，如超声波脱气，真空脱气、氮气脱气等。

## 4. 六通阀的使用

- 在HPLC系统中使用的注射器针头有别于气相色谱，是平头注射器。一方面，针头外侧紧贴进样器密封管内侧，密封性能好，不漏液，不引入空气；另一方面，也防止了针头刺坏密封组件及定子。尽快转动阀，不能停留在中途，否则过高的压力在柱头上引起损坏。
- 六通阀进样器的进样方式有部分装液法和完全装液法两种。使用部分装液法进样时，进样量最多为定量环体积的75，并且要求每次进样体积准确、相同；使用完全装液法进样时，进样量最少为定量环体积的3至5倍，即20 $\mu$ l的定量环最少进样60至100 $\mu$ l的样品，这样才能完全置换样品定量环内残留的溶液，达到所要求的精密度及重现性。

- 防止微粒阻塞进样阀和减少对进样阀的磨损。为防止缓冲盐和其它残留物质留在进样系统中，每次结束后应冲洗进样器，通常用不含盐的稀释剂、水或不含盐的流动相冲洗，在进样阀的**Load**和**Inject**位置反复冲洗，。

## 5.泵的保养

- 使用流动相尽量要清洁；
- 进液处的砂芯过滤头要经常清洗；
- 流动相交换时要防止沉淀；
- 避免泵内堵塞或有气泡；

## 6. 色谱柱

### 色谱柱问题及解决方法：

- 保留值和分离度的重现性：影响方法的准确度与精密度
- 谱峰拖尾：分离质量下降，精密度下降
- 色谱柱寿命



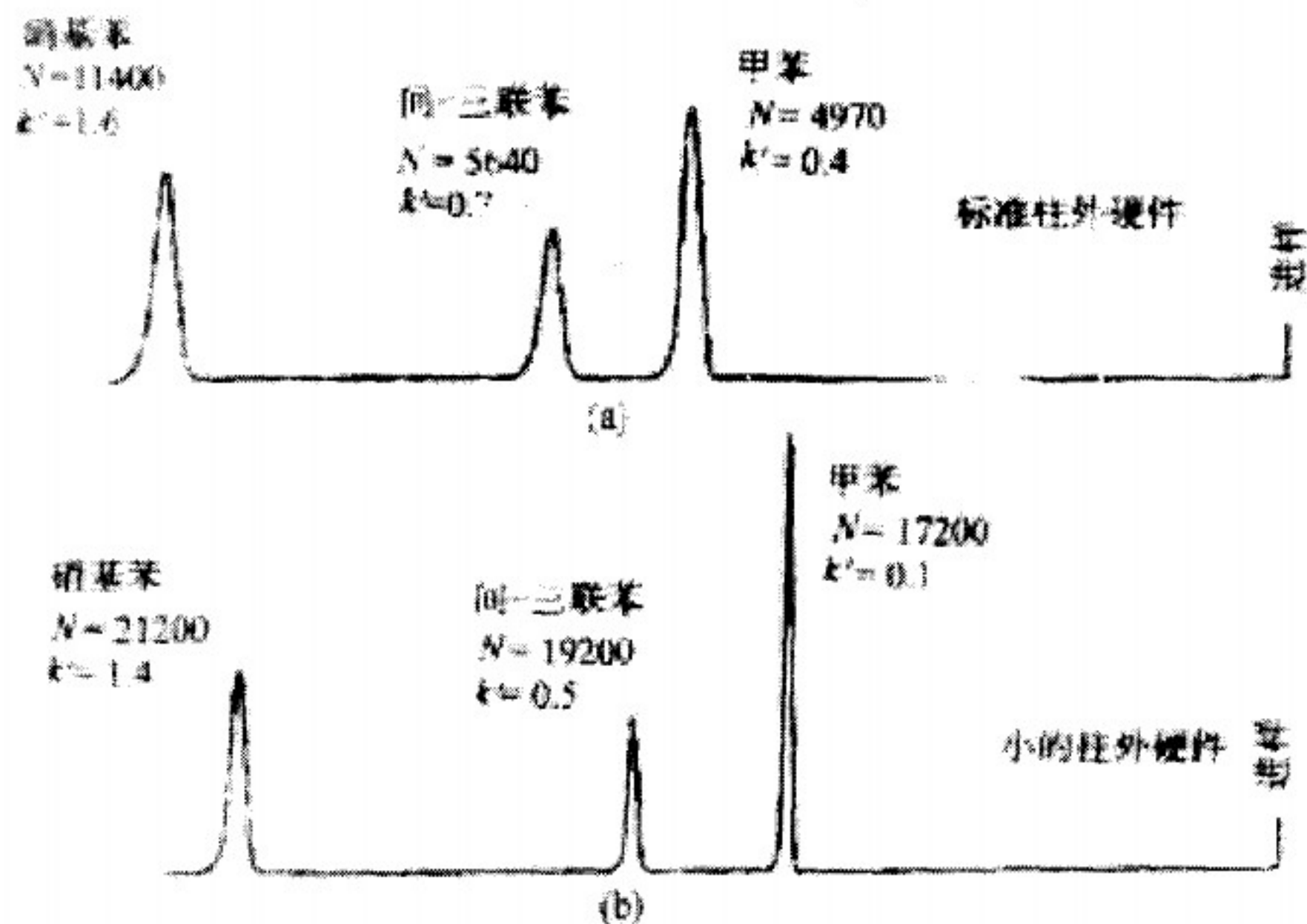
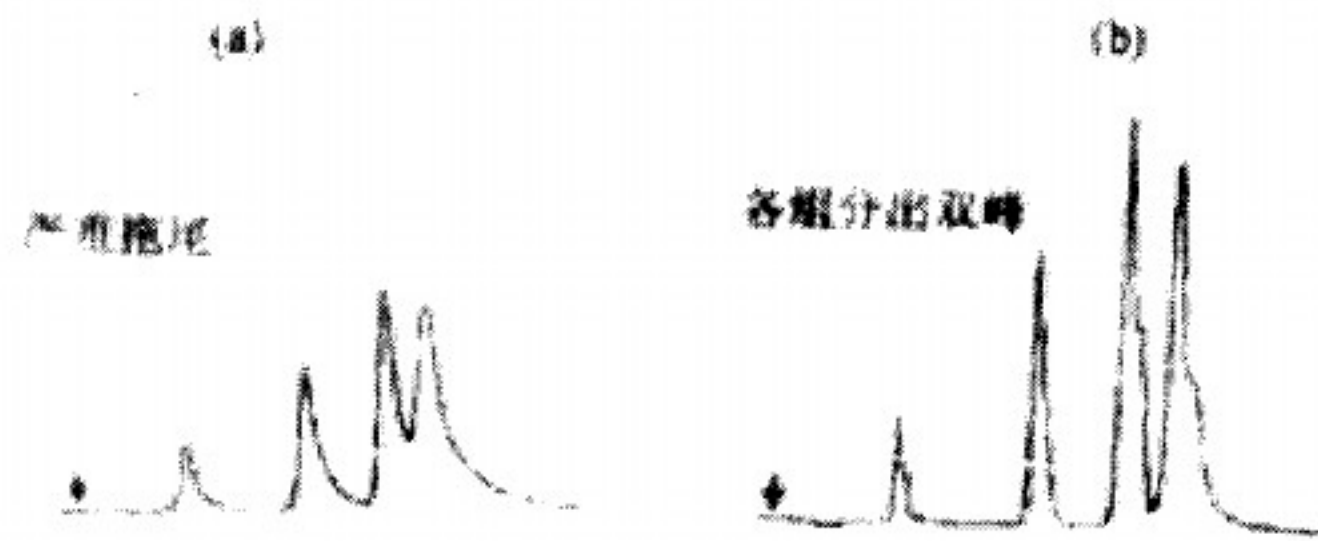
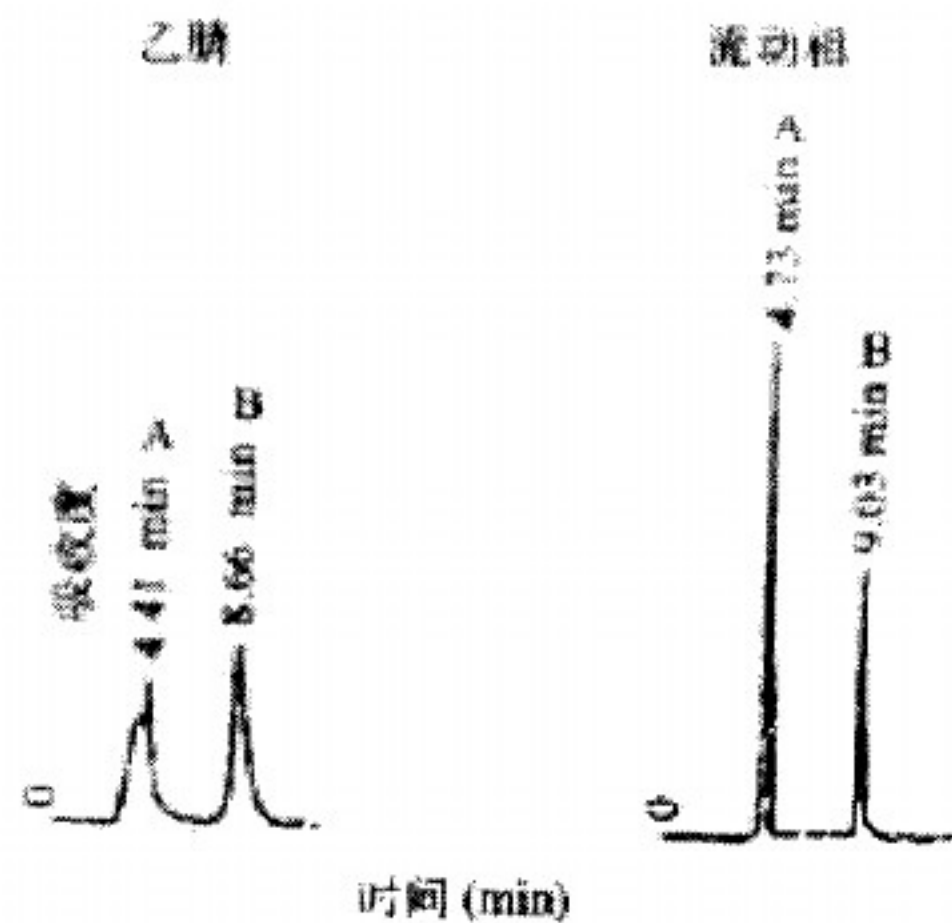


图 3-11 柱外谱峰拖尾效应<sup>(22)</sup>

色谱柱:  $15 \times 0.45\text{cm}$ ,  $3\mu\text{m}$  Spherisorb 硅胶; 流动相: 己烷/乙醇 (99/1, v/v); 流速:  $2.0\text{mL}/\text{min}$ . (a)  $10\mu\text{L}$  进样阀和  $8\mu\text{L}$  检测池的商用色谱仪; (b)  $0.5\mu\text{L}$  进样阀和  $1\mu\text{L}$  检测池的小体积系统.



色谱柱问题的某些症状



样品溶剂对分离结果的影响

# 高效液相色谱柱发展史

- 19世纪70年代中期，HPLC仪开始出现，主要填料：10  $\mu\text{m}$  的无定型硅胶颗粒。
- 70年代后期，发展了反相液相色谱。
- 80年代，HPLC 被广泛应用于化合物的分离，主要填料：粒径为5 ~ 10  $\mu\text{m}$  球形硅胶。
- 90年代早期，粒径为 5  $\mu\text{m}$  的高纯硅胶，即所谓的 B 型硅胶被发展，并成为这个行业填料的标准，这种 B 型硅胶含有微量的金属。
- 90年代后期，为了满足快速分离的需求，发展了 3  $\mu\text{m}$  或 3.5  $\mu\text{m}$  的球形硅胶，其作用和性能逐渐的获得了人们的认同和接受。
- 21世纪早期，为适应超快速的分离要求，粒径小于 2  $\mu\text{m}$  的填料被开发出来，发展出了整体柱、无机和有机杂化硅胶。
- 目前，市场上流行的分析用的 HPLC 硅胶基质填料主要为 B 型硅胶。

# PLC色谱柱及其填料的特征

- HPLC 色谱柱的基质材料
  - 硅胶与聚合物
  - 现代高效液相色谱填料的特征
- 色谱柱结构
- 固定相
  - 键合相
  - 色谱柱接头
  - 键合相稳定性

# 硅胶基质材料

1. 目前应用最为广泛的基质材料。
2. 高机械强度和高的比表面积。
3. 可利用直接的广泛的表面键合反应来满足正相、反相、离子交换、疏水作用色谱和体积排除色谱的需求。
4. 高效。
5. 重现性好。
6. pH 适用范围为pH 2—8。
7. 具有容易导致强碱性物质拖尾的，表面活性和带酸性的硅羟基。

# 聚合物基质材料

1. 交联苯乙烯、二乙烯基苯和甲基苯烯酸酯。
2. pH 稳定性好: pH 1—13。
3. 可以在很宽的范围内进行表面化学处理以满足反相色谱、离子交换色谱、疏水作用色谱和体积排阻色谱的需求。
4. 在中等 pH 条件下对强碱性物质具有更好的峰形。
5. 填料的体积随着流动相的不同而改变, 如膨胀或收缩。
6. 分离效率相对硅胶而言比较低
7. 重现性不好



# 硅胶外形

## 无定型硅胶:

- 最初的 HPLC 填料
- 粒径  $>5\ \mu\text{m}$
- 柱床稳定性差
- 比表面积较小
- 价格便宜

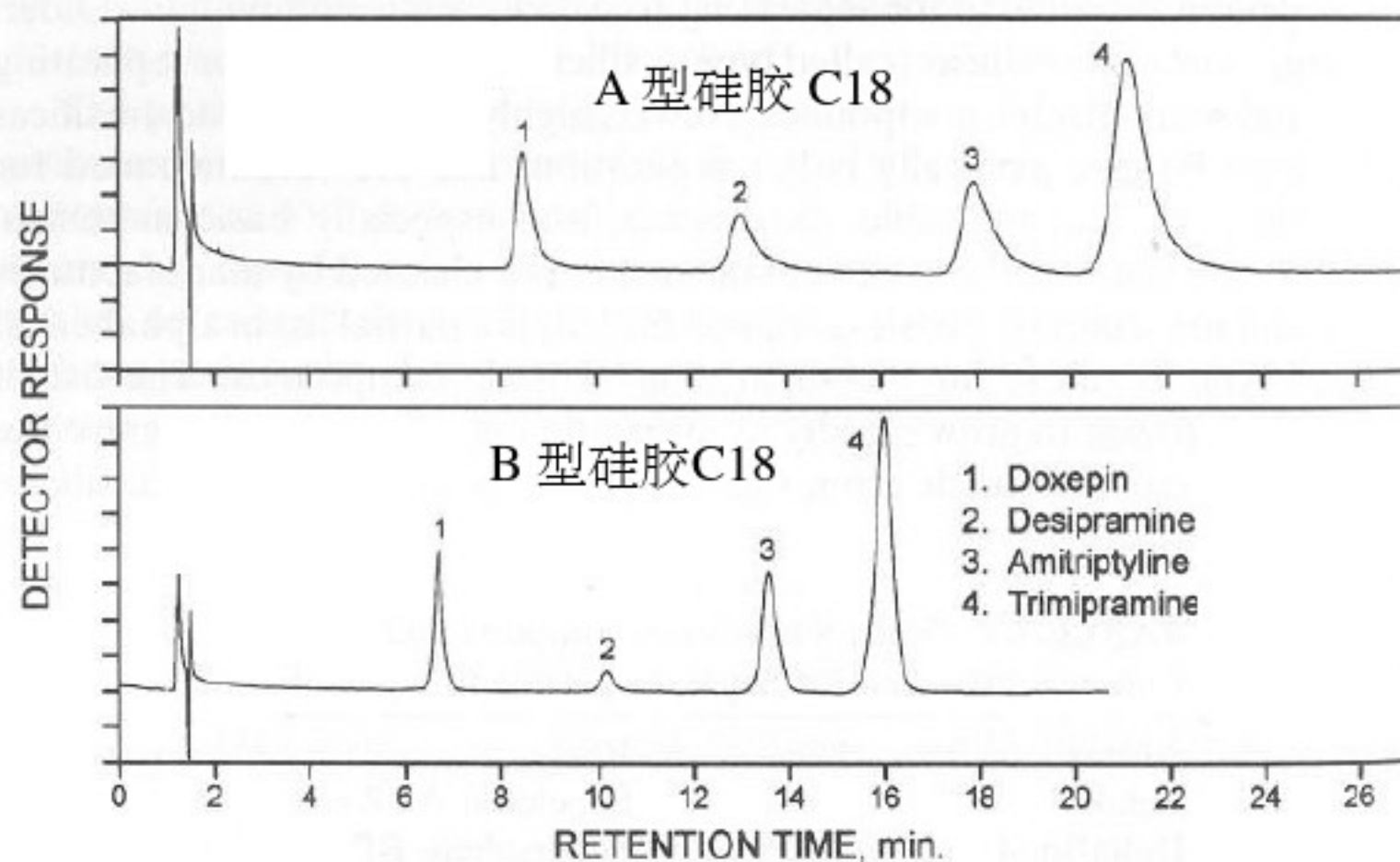
## 球形硅胶:

- 现代 HPLC 填料
- 粒径小 ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $3\ \mu\text{m}$ ,  $<2\ \mu\text{m}$ )
- 重现性好
- 稳定性好
- 分离效率高

# 硅胶纯度

- 硅胶纯度对强极性化合物的分离最重要。
- 以前的纯度较低的硅胶（称为 **A** 型硅胶），**A** 型硅胶是以金属硅酸盐制备而来，具有很高的金属含量，可被用作中性化合物和非离子化合物的分离。
- 纯度高、酸性较弱的硅胶（称为 **B** 型硅胶），这种硅胶是以无金属的工艺制备而来，只含有微量的金属，建议用于分离离子化合物和可电离的化合物，特别是碱性化合物。
- 金属杂质引起对螯合剂和碱性化合物的分离产生不对称峰或拖尾峰。

# 硅胶纯度



M+

表面金属能与螯合化合物络合

强酸性

→ OH

— — M—Si — —

内部的金属对表面硅羟基  
具有活化作用

# 硅胶孔径

孔径	作用和效能
< 60 nm	对 <b>HPLC</b> 分析没有用，会引起峰形拖尾和较低的分 离效率
60 – 150 nm	对小分子的分离效果理想 ( <b>MW &lt; 4,000 to 130,000</b> ), 例如药物分子、传统的中药和小分子的缩氨酸
300 – 1,000 nm	对大分子的分离效果理想，如多肽、核苷和高分子
> 1,000 nm	对聚合物的分离效果理想，如 <b>DNA</b> 和生物大分子

# 硅胶粒径

粒 径	作 用 和 效 能
5 $\mu\text{m}$	目前应用最广泛，可以满足从分析到半制备的分离
3 – 3.5 $\mu\text{m}$	常用于分析柱上的快速分离，色谱柱短，节省溶剂
< 2 $\mu\text{m}$	常应用于超快速分离， high throughput, 分离度高
7 – 10 $\mu\text{m}$	常用于半制备色谱柱
10 – 20 $\mu\text{m}$	常用于制备色谱柱

# HPLC 色谱柱结构

类 型	内径D (cm)	柱长(cm)	粒径 ( $\mu\text{m}$ )
分析柱	0.3 – 0.46	3 - 25	3 - 10
微孔柱	0.1, 0.21	15, 25	3 - 8
半制备柱	0.8 – 1.0	10 - 25	5 - 20
制备柱	2.0 – 5.0	10 - 25	5 - 20



# 键合相

- 键合相:
  - 反相: 70%;
    - C18, 65%; C8, 15%; Cyano, 5%, 苯基柱 <5%,
  - 正相: 20%;
    - 硅胶、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CN}$
  - 其它 (手性柱, 离子交换柱): 10%
- 反相色谱是目前应用得最为广泛的高效液相色谱方法。
- C18 和 C8 在反相色谱终应用得最为广泛。

# 封 尾

- 封尾是用如三甲基硅烷等小分子与键合了**C18**以后的硅胶进行进一步的反应。
- 由于硅烷相对很大的体积，使得**C18** 和其它键合相在发生键合反应时只能覆盖不到硅胶表面的 **50%** 。
- 硅胶表面未被键合的酸性硅羟基将会与被分析物相互作用，特别是在中性条件下会对强碱性化合物产生严重的峰形拖尾。
- 封尾工艺使得表面残余的硅羟基被进一步的消除，为小分子所取代。
- 封尾工艺能促使色谱柱对极性和碱性化合物的分离具有良好的峰形。

# 理论塔板数 N

粒径 ( $\mu\text{m}$ )	柱长 (cm)	塔板数 N
10	15	6,000-7,000
10	25	8,000-10,000
5	10	7,000-9,000
5	15	10,000-12,000
5	25	17,000-20,000
3	5	6,000-7,000
3	7.5	9,000-11,000
3	10	12,000-14,000
3	15	17,000-20,000

色谱柱的柱效高意味着色谱柱装填得好

# 评价色谱柱好坏的标准

- 1) 理论塔板数 $N$
- 2) 拖尾因子 $T_f$
- 3) 色谱柱背压
- 4) 色谱柱批与批之间的重现性
- 5) pH值的适用范围
- 6) 使用寿命

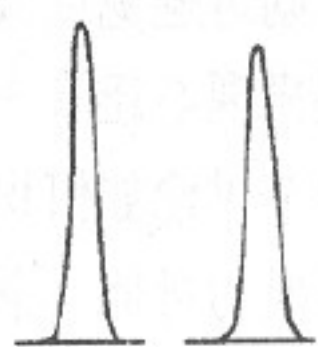
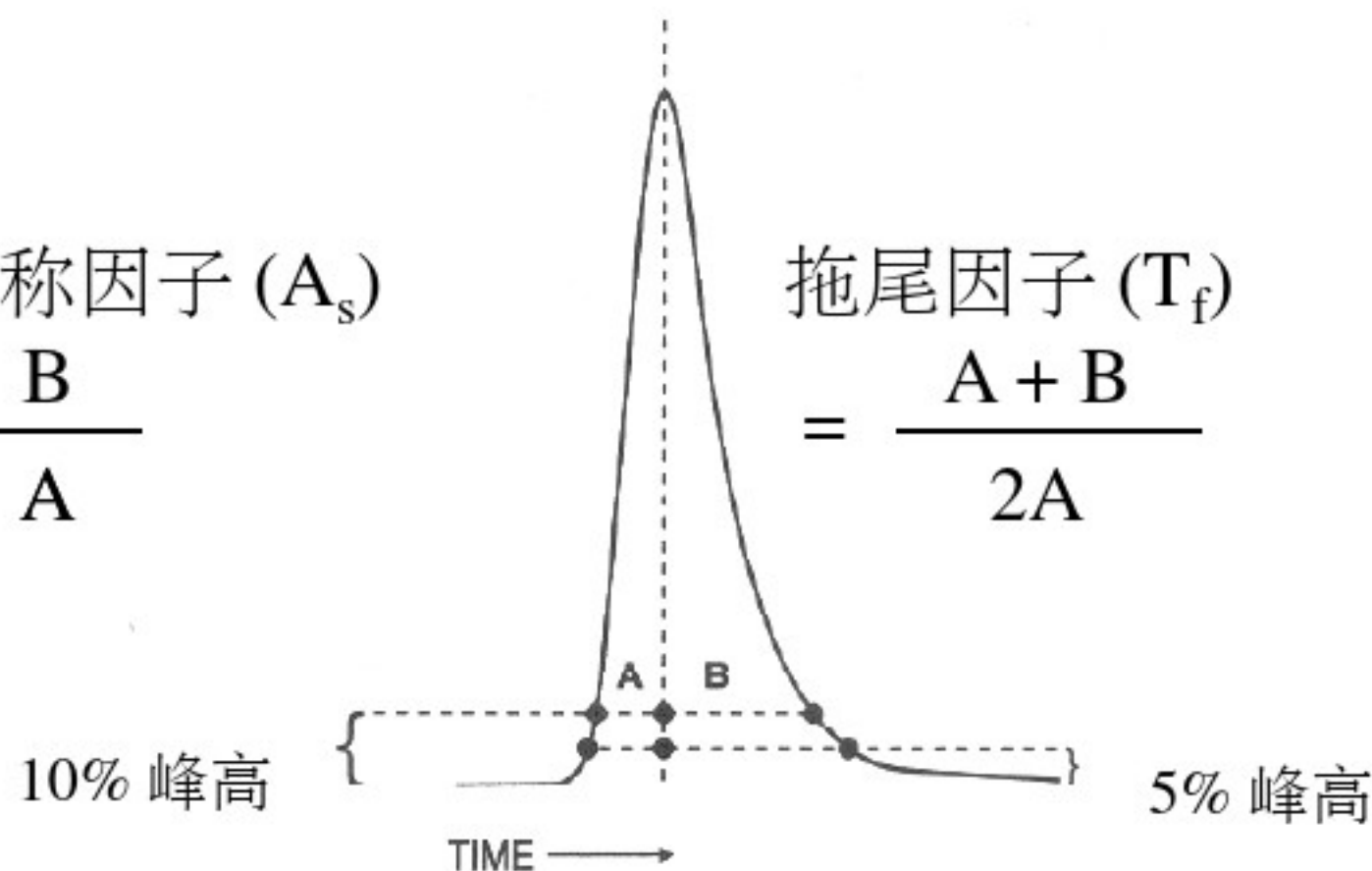
# 拖尾因子 $T_f$

不对称因子 ( $A_s$ )

$$= \frac{B}{A}$$

拖尾因子 ( $T_f$ )

$$= \frac{A + B}{2A}$$



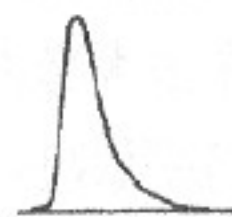
$A_s = 1.0-1.05$

很好



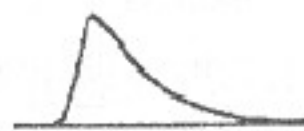
$A_s = 1.2$

一般



$A_s = 2$

差



$A_s = 4$

很差

不对称因子

和拖尾因子的关系

$A_s$ (at 10%)	$T_f$ (at 5%)
1.0	1.0
1.3	1.2
1.6	1.4
1.9	1.6
2.2	1.8
2.5	2.0

# 色谱柱背压

$$P = \frac{3000L\eta}{t_0 d_p^2}$$

$P$  是色谱柱背压 (psi),  $L$  是色谱柱的长度 (cm),  
 $\eta$  流动相的粘度 (cP),  $t_0$  是色谱柱死时间,  $d_p$   
是粒子的直径 ( $\mu\text{m}$ )

1. 粒径均一会使色谱柱的背压相对较低。
2. 色谱柱两端的压力降不应超过公式计算所得的30%。
3. 硅胶粒径对色谱柱的压力具有很大的影响；硅胶粒子越小，色谱柱的背压越大。
4. 色谱柱的背压还与流动相的粘度有关。



# 为什么色谱柱会失去作用？

1. 部分原因是色谱柱塞板或柱床被堵塞 —— 导致色谱柱背压上升、峰形拖尾和柱效下降。
2. 吸附了样品杂质 —— 导致柱效下降、选择性和保留时间改变。
3. 色谱柱没装填好 —— 导致柱效下降和峰形拖尾。
4. 物理损伤或受热引起的缺口 —— 导致柱效下降和峰形拖尾。
5. 对硅胶基质或键合相的化学腐蚀 —— 导致选择性变弱、峰形拖尾、保留能力下降（或对碱性化合物的保留能力增强）。

# 现代高效液相色谱柱的要求

1. 超纯 B 型球形硅胶 —— 峰形好、柱效高。
2. 不能有使色谱性能降低的直径小于 $50\text{ \AA}$ 的微孔。
3. 粒径尺寸从  $3\text{ }\mu\text{m}$  到  $10\text{ }\mu\text{m}$  ——能满足从分析到制备色谱规模的需求。
4. 色谱柱柱床装填好 —— 使用寿命长、柱效高。
5. 封尾彻底 —— 峰形好、使用寿命长。
6. 批与批之间得重现性好。
7. 不同的相具有不同的选择性 —— 能更好的实现分离。
8. 键合相化学稳定好 —— 适用的 pH 范围广, 使用寿命长。

# 为什么反相色谱应用如此广泛？

- 它能使中性化合物和极性化合物在一根色谱柱中得到分离。
- 适用于多种基体中的多类不同性质化合物的测定和分离。
- 保留时间可以用分子的疏水性进行描述和解释。
- 所用高纯度的水、甲醇和乙腈等溶剂价格便宜、实用。
- 选择性可通过用缓冲溶液进行调节（通过调节pH值来调节离子强度和胶团粒子大小等等），以实现最佳分离。

## 7. 检测器的保养

- 在分析前、柱平衡得差不多时，打开检测器；紫外检测器的平衡时间大约需要**20**分钟，示差折光检测器则更长。在分析完成后，马上关闭检测器。
- 检测池污染时，将柱拆下，用合适的溶剂冲洗污染物。