

高效液相色谱的基础知识

龙豹
2024.11



1 高效液相色谱法的特点

2 高效液相色谱法仪器工作原理

3 高效液相色谱仪的维护

4 高效液相色谱法仪的注意事项

5 高效液相色谱的分析应用



高效液相色谱法的特点



高效液相色谱法（HPLC）是20世纪60年代末70年代初发展起来的一种新型分离分析技术，随着不断改进与发展，目前已成为应用极为广泛的化学分离分析的重要手段。它是在经典液相色谱基础上，引入了气相色谱的理论，在技术上采用了高压泵、高效固定相和高灵敏度检测器，因而具备速度快、效率高、灵敏度高、操作自动化的特点。为了更好地了解高效液相色谱法优越性，现从两方面进行比较：





1. 高效液相色谱法与经典液相色谱法

高效液相色谱法比起经典液相色谱法的最大优点在于高速、高效、高灵敏度、高自动化。高速是指在分析速度上比经典液相色谱法快数百倍。由于经典色谱是重力加料，流出速度极慢；而高效液相色谱配备了高压输液设备，流速最高可达 $103\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ 。例如对氨基酸分离，用经典色谱法，需用20多小时才能分离出20种氨基酸；而用高效液相色谱法，只需1h之内即可完成。



高效液相色谱法的特点



2. 高效液相色谱法与气相色谱法

(1) 气相色谱法分析对象只限于分析气体和沸点较低的化合物，它们仅占有机物总数的20%。对于占有机物总数近80%的那些高沸点、热稳定性差、摩尔质量大的物质，目前主要采用高效液相色谱法进行分离和分析。

(2) 气相色谱采用流动相是惰性气体，它对组分没有亲和力，即不产生相互作用力，仅起运载作用。而高效液相色谱法中流动相可选用不同极性的液体，选择余地大，它对组分可产生一定亲和力，并参与固定相对组分作用的剧烈竞争。因此，流动相对分离起很大作用，相当于增加了一个控制和改进分离条件的参数，这为选择最佳分离条件提供了极大方便。

(3) 气相色谱一般都在较高温度下进行的，而高效液相色谱法则经常可在室温条件下工作。



高效液相色谱法的特点



- **分析速度快**——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。
- **选择性高**——可选择固定相和流动相以达到最佳分离效果，可分析同类型的有机化合物及其同分异构体，还可以分析在性质上极为相似的旋光异构体。
- **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。





超高效液相色谱 (UPLC)

- 一是区别于HPLC的液相色谱新领域
- 一基于小颗粒填料和LC原理的一种创新技术
- 一实现超高分离度、灵敏度、分析速度





1 高效液相色谱法的特点

2 高效液相色谱法仪器工作原理

3 高效液相色谱仪的维护

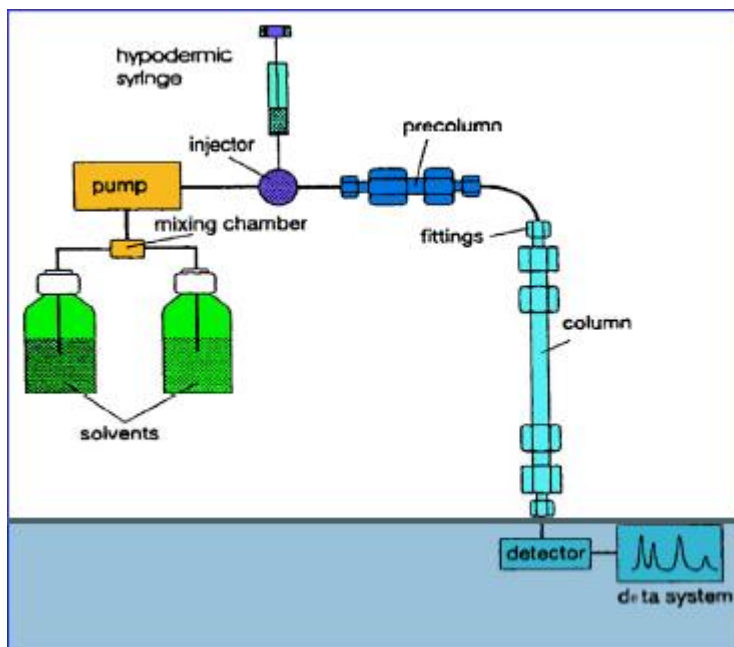
4 高效液相色谱法仪的注意事项

5 高效液相色谱的分析应用





HPLC系统的组成



- 高压输液系统
- 进样系统
- 分离系统
- 检测系统



高效液相色谱仪工作原理



Waters高效液相色谱仪 e2695



其工作过程如下：首先高压泵将贮液器中流动相溶剂经过进样器送入色谱柱，然后从控制器的出口流出。当注入欲分离的样品时，流经进样器贮液器的流动相将样品同时带入色谱柱进行分离，然后依先后顺序进入检测器，记录仪将检测器送出的信号记录下来，由此得到液相色谱图。





1. 高压输液系统

由于高效液相色谱所用固定相颗粒极细，因此对流动相阻力很大，为使流动相较快流动，必须配备有高压输液系统。它是高效液相色谱仪最重要的部件，一般由储液罐、高压输液泵、过滤器、压力脉动阻力器等组成，其中高压输液泵是核心部件。对于一个好的高压输液泵应符合密封性好，输出**流量恒定，压力平稳，可调范围宽，便于迅速更换溶剂及耐腐蚀**等要求。常用的输液泵分为**恒流泵**和**恒压泵**两种。恒流泵特点是在一定操作条件下，输出流量保持恒定而与色谱柱引起阻力变化无关；恒压泵是指能保持输出压力恒定，但其流量则随色谱系统阻力而变化，故**保留时间**的重视性差，它们各有优缺点。



高效液相色谱仪工作原理



2. 进样系统





3 分离系统——色谱柱

色谱柱是液相色谱的心脏部件，它包括柱管与固定相两部分。柱管材料有玻璃、**不锈钢**、铝、铜及内衬光滑的聚合材料的其他金属。玻璃管耐压有限，故金属管用得较多。一般色谱柱长5~30cm，内径为4~5mm，凝胶色谱柱内径3~12mm，制备柱内径较大，可达25mm以上。一般在分离前备有一个前置柱，前置柱内填充物和分离柱完全一样，这样可使淋洗溶剂由于经过前置柱为其中的固定相饱和，使它在流过分离柱时不再洗脱其中固定相，保证分离技术的性能不受影响。

柱子装填得好坏对柱效影响很大。对于细粒度的填料（ $<20\text{ }\mu\text{m}$ ）一般采用匀浆填充法装柱，先将填料调成匀浆，然后在高压泵作用下，快速将其压入装有洗脱液的色谱柱内，经冲洗后，即可备用。





4. 检测系统

目前有两种基本类型的检测器：

- 一类是溶质性检测器，它仅对被分离组分的物理或化学特性有响应，属于这类检测器的有紫外、荧光、电化学检测器等。
- 另一类是总体检测器，它对试样和洗脱液总的物理或化学性质有响应，属于这类检测器的有示差折光，蒸发光散射，电导检测器等。





(1) 紫外检测器

工作原理：

基于Lambert-Beer定律，计算公式为： $A = \lg(1/T) = Kbc$ 。

其中， A 为吸光度； T 为透射比（透光度），即出射光强度 I 比入射光强度 I_0 （ $T = I/I_0$ ）； K 为吸光系数，它与吸收物质的性质、入射光波长及温度等因素有关； b 为液层厚度（光程长度）； c 为溶液浓度。

该定律表明了物质对某一波长光吸收的强弱与吸光物质的浓度及其液层厚度间的关系，是分光光度法的基本定律，也是比色分析及分光光度法的理论基础，适用于所有的电磁辐射和所有的吸光物质，包括气体、固体、液体、分子、原子和离子。





(1) 紫外检测器

优点:

- a: 灵敏度高
- b: 线性范围广
- C: 对温度和流速不敏感, 适于进行梯度洗脱

限制:

- a: 没有紫外吸收的物质不能检测
- b: 应尽可能选择在检测波长下没有背景吸收的流动相
(限制了一些截止波长在200~300nm之间的良好溶剂的使用)





(1) 紫外检测器

(2) 荧光检测器

- 原理：

物质的分子或原子经光照射后，有些电子被激发至较高的能级，这些电子从高能级跃至低能级时，物质会发出比入射光波长较长的光，这种光称为荧光。荧光检测器就是在样品的激发波长处检测发射光的强弱。

- 荧光检测器是一种选择性检测器
- 不到20%的物质使用这种检测手段, 许多药物采用这种检测方法.



高效液相色谱仪工作原理



(1) 紫外检测器

(2) 荧光检测器

- 优点：
 - a: 灵敏度非常高(灵敏度在目前常用的HPLC检测器中最高)，比紫外检测器高2—3个数量级，适合于痕量分析
 - b: 可以用于梯度洗脱
 - c: 对仪器的稳定性（如温度和压力的稳定性）依赖较小
 - d: 选择性好，优于紫外
- 缺点：
 - a: 适用范围有一定的局限性 —只适用于有荧光基团&衍生化之后有荧光基团的化合物
 - b: 定量分析时线性范围较窄

它适合于 稠环芳烃、氨基酸、胺类、维生素、蛋白质等荧光物质的测定





(1) 紫外检测器

(2) 荧光检测器

(3) 二极管阵列检测器

- 原理：

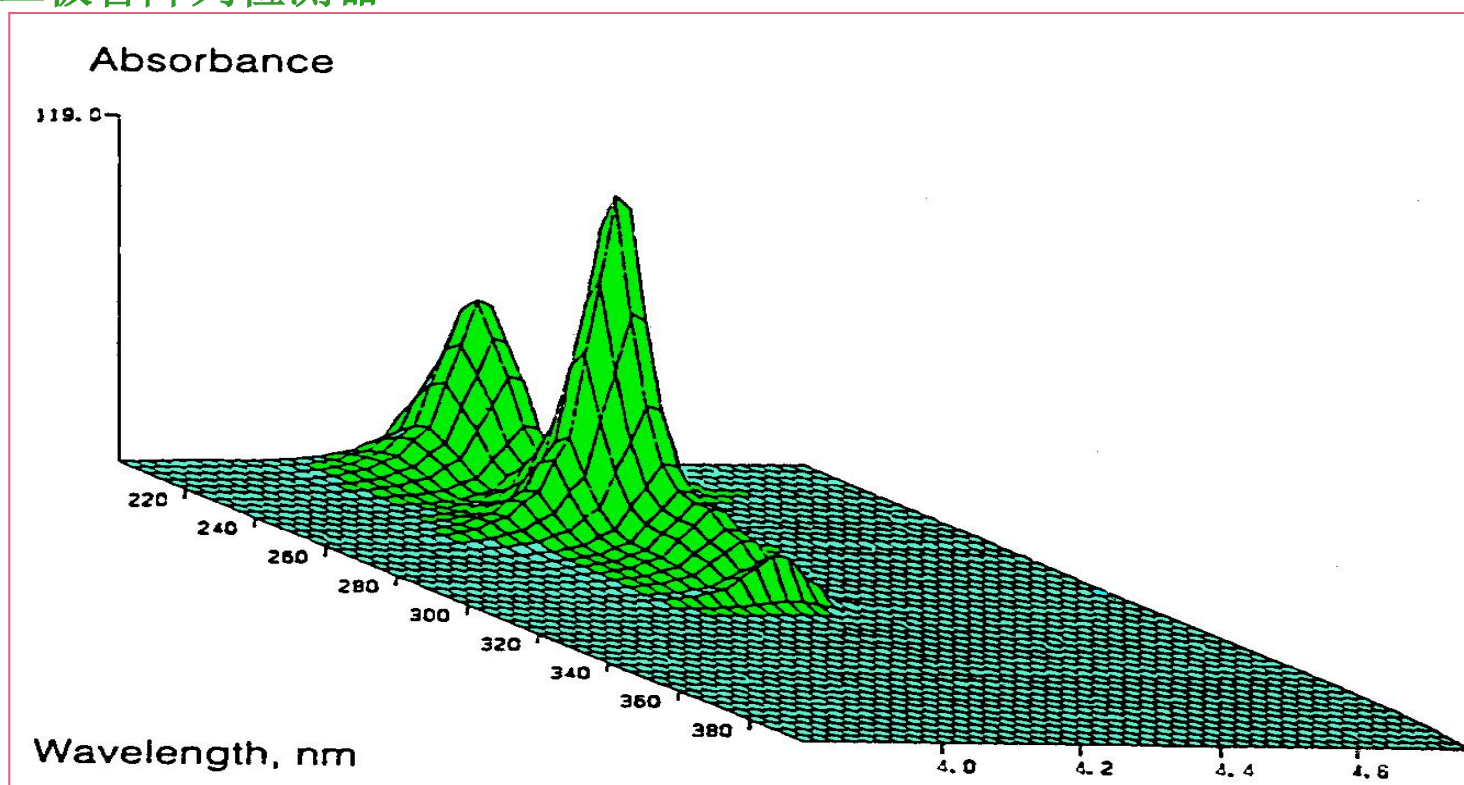
光电二极管阵列（或CCD阵列，硅靶摄像管等）作为检测元件的UV-VIS检测器。它可构成多通道并行工作，同时检测由光栅分光，再入射到阵列式接受器上的全部波长的信号，然后，对二极管阵列快速扫描采集数据，得到的是时间、光强度和波长的三维谱图。



高效液相色谱仪工作原理



- (1) 紫外检测器
- (2) 荧光检测器
- (3) 二极管阵列检测器





(1) 紫外检测器

(2) 荧光检测器

(3) 二极管阵列检测器

与普通UV-VIS检测器不同之处:

a: 普通UV-VIS检测器是先用单色器分光, 只让特定波长的光进入流动池。

而二极管阵列UV-VIS检测器是先让所有波长的光都通过流动池, 然后通过一系列分光技术, 使所有波长的光在接受器上被检测.

b: 普通UV-VIS检测器只能得到二维的谱图, 而DAD可以得到三维图谱.





(1) 紫外检测器

(2) 荧光检测器

(3) 二极管阵列检测器

应用

a: 色谱峰纯度检查

b: 色谱峰鉴定

三维色谱能提供更多全面的信息。





- (1) 紫外检测器
- (2) 荧光检测器
- (3) 二极管阵列检测器

(4) 示差折光率检测器

是一种通用型检测器，只要被测组分与洗脱液的折光指数有差别就可使用。生命科学中常遇到各类糖类化合物，没有紫外吸收，一般常用示差折光检测器。它的通用性比UVD广，但灵敏度要低，对温度变化敏感，并与梯度洗脱不相容，因而限制了它的使用。





- (1) 紫外检测器
- (2) 荧光检测器
- (3) 二极管阵列检测器
- (4) 示差折光率检测器

(5) 电导检测器

电化学检测器（ECD） ECD是根据物质的电还原性和电氧化性来进行检测的，应用于对紫外光没有吸收或不能发出荧光，但具有电活性的物质测定。若结合衍生技术，也可应用于非电活性物质的检测。安培检测器和电导检测器在生化、医学、食品和环境分析中获得广泛的应用。





1 高效液相色谱法的特点

2 高效液相色谱法仪器工作原理

3 高效液相色谱仪的维护

4 高效液相色谱法仪的注意事项

5 高效液相色谱的分析应用





泵的使用和维护

- 防止任何固体微粒进入泵体，因为尘埃或其它任何杂质微粒都会磨损柱塞、密封环、缸体和单向阀，因此应预先除去流动相中的任何固体微粒。流动相最好在玻璃容器内盛放，而常用的方法是滤过，可采用滤膜（ $0.2\mu\text{m}$ 或 $0.45\mu\text{m}$ ）等滤器。输液泵的滤器应经常清洗或更换。
- 流动相不应含有任何腐蚀性物质，含有缓冲液的流动相不应保留在泵内，尤其是在停泵过夜或更长时间的情况下。如果将含缓冲液的流动相留在泵内，由于蒸发或泄漏，甚至只是由于溶液的静置，就可能析出盐的微细晶体，这些晶体将和上述固体微粒一样损坏密封环和柱塞等。因此，必须泵入纯水将泵充分清洗后，再换成适合于色谱柱保存和有利于泵维护的溶剂（对于反相键合硅胶固定相，可以是甲醇或甲醇-水）。
- 泵工作时要留心防止溶剂瓶内的流动相被用完，否则空泵运转也会磨损柱塞、缸体或密封环，最终产生漏液。
- 输液泵的工作压力决不要超过规定的最高压力，否则会使高压密封环变形，产生漏液。
- 流动相应先脱气，以免在泵内产生气泡，影响流量的稳定性，如果有大量气泡，泵就无法正常工作。



高效液相色谱仪的注意事项



柱的使用和维护

- 1、使用前仔细阅读色谱柱附带的说明书，注意适用范围，如pH值范围、不得注射强酸强碱的样品，特别是碱性样品。
- 2、使用符合要求的流动相；
- 3、使用保护柱；
- 4、如所用流动相为含盐流动相，反相色谱柱使用后，先用水或低浓度甲醇水（如5%甲醇水溶液），再用甲醇冲洗。
- 5、长时间不用仪器，应该将柱子取下用堵头封好保存，注意不能用纯水保存柱子，而应该用有机相(如甲醇等)，因为纯水易长霉。
- 6、不要高压冲洗柱子；
- 7、不要在高温下长时间使用硅胶键合相色谱柱；
使用过程中注意轻拿轻放。





流动相的脱气

HPLC所用流动相必须预先脱气，否则容易在系统内逸出气泡，影响泵的工作。气泡还会影响柱的分离效率，影响检测器的灵敏度、基线稳定性，甚至使无法检测。（噪声增大，基线不稳，突然跳动）。此外，溶解在流动相中的氧还可能与样品、流动相甚至固定相（如烷基胺）反应。溶解气体还会引起溶剂pH的变化，对分离或分析结果带来误差。





紫外灯的保养：

在分析完成后，马上关闭检测器，以延长灯的使用寿命。





1 高效液相色谱法的特点

2 高效液相色谱法仪器工作原理

3 高效液相色谱仪的维护

4 高效液相色谱法仪的注意事项

5 高效液相色谱的分析应用





一、流动相

- 1、流动相应选用色谱纯试剂、高纯水，酸碱液及缓冲液需经过滤后使用，过滤时注意区分水系膜和油系膜的使用范围；
- 2、水相流动相需经常更换（一般不超过3天），防止长菌变质。





二、样品

- 1、采用过滤或离心方法处理样品，确保样品中不含固体颗粒；
- 2、用流动相或比流动相极性弱的溶剂制备样品溶液，尽量用流动相溶解样品。





三、操作过程

- 1、仪器开机自检正常后，先用预定方法平衡系统，待温度稳定后运行检测器（以延长灯的使用寿命），稍后观察基线，如基线稳定后再运行预定序列；
- 2、溶剂瓶中的沙芯过滤头容易破碎，在更换流动相时注意保护，当发现过滤头变脏或长菌时，不可用超声洗涤，可用5%稀硝酸溶液浸泡后再洗涤；
- 3、实验结束后，一般先用水或低浓度甲醇水溶液冲洗整个管路30分钟以上，再用甲醇冲洗。冲洗过程中关闭D灯、W灯；





1 高效液相色谱法的特点

2 高效液相色谱法仪器工作原理

3 高效液相色谱仪的维护

4 高效液相色谱法仪的注意事项

5 高效液相色谱的分析应用





在食品安全检测中的应用

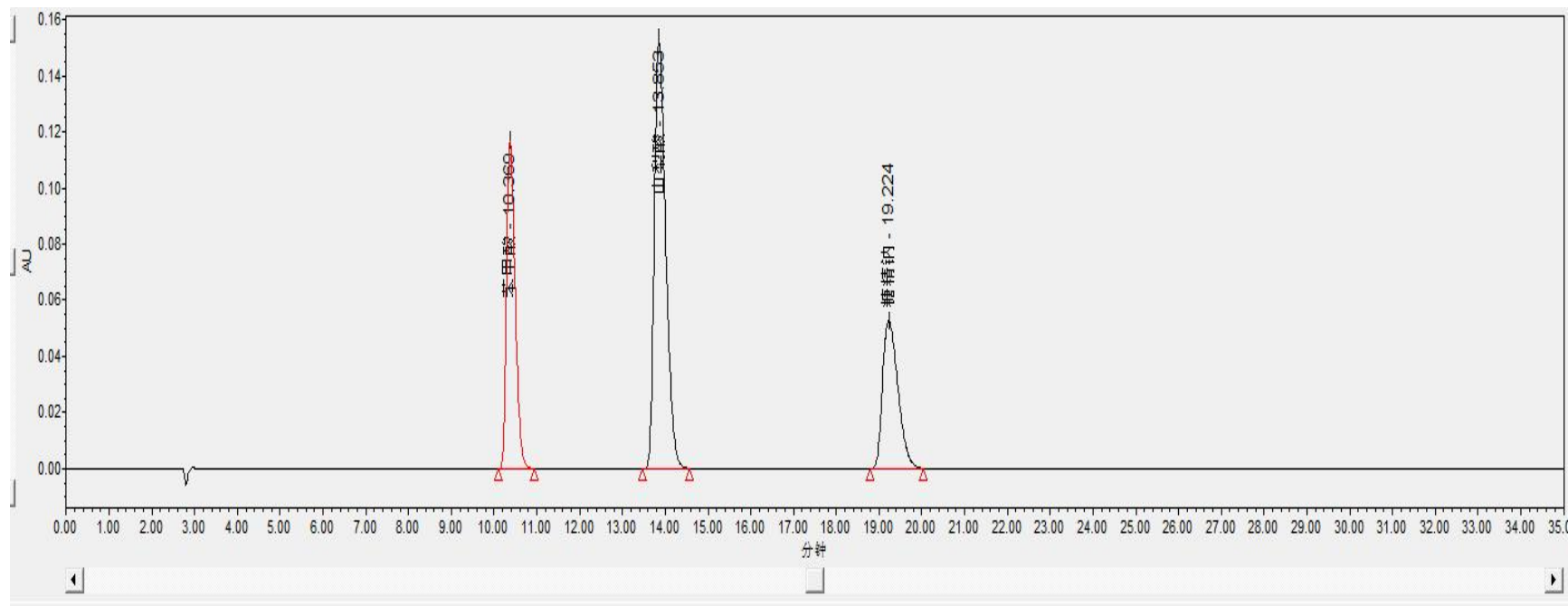
- —食品添加剂如：苯甲酸、山梨酸、糖精钠、着色剂等；
- —非法添加物如：三聚氰胺、苏丹红等；
- —污染物如：苯并芘、黄曲霉毒素B₁等；
- —食品营养指标果糖、葡萄糖、白藜芦醇等；
- —农药残留如：氨基甲酸酯类、阿维菌素等；
- —兽药残留如：孔雀石绿等；



高效液相色谱的分析应用



苯甲酸、山梨酸、糖精钠标样色谱图



名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏秒)	% 面积	高度 (微伏)	积分类型	含量	单位	峰类型	峰代码
苯甲酸	10.369	1625380	28.14	116683	BB	50.000	mg/L	找到	
山梨酸	13.853	2829751	49.00	153198	BB	50.000	mg/L	找到	
糖精钠	19.224	1320029	22.86	52763	BB	50.000	mg/L	找到	

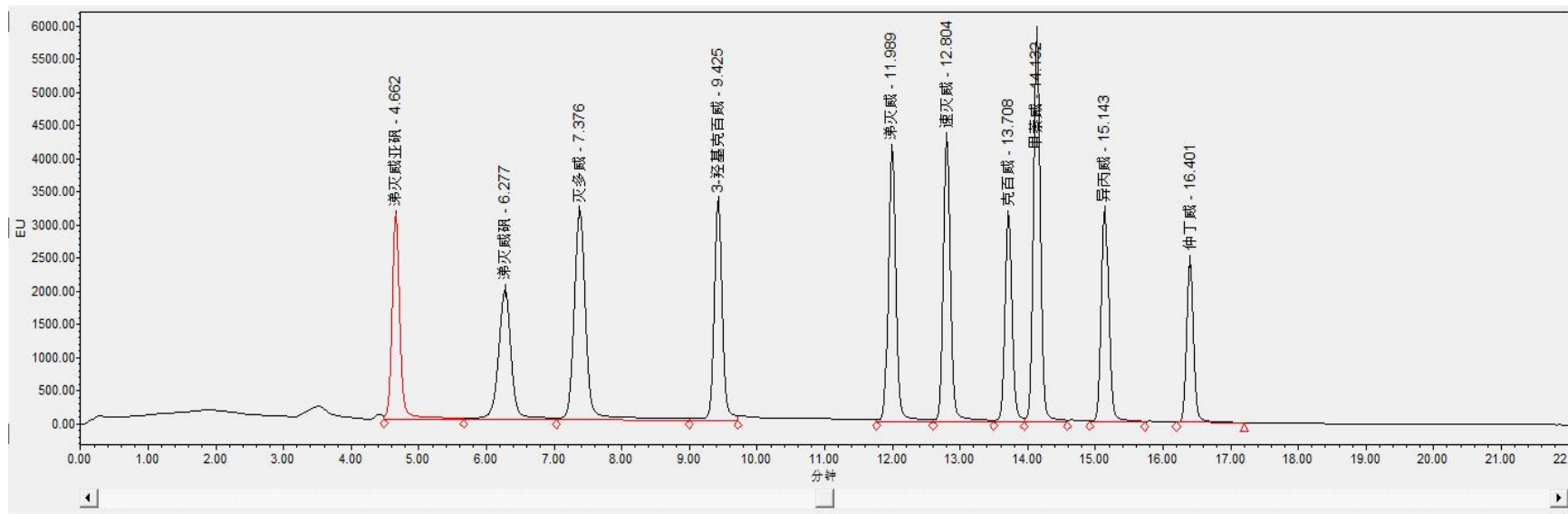
色谱柱: 菲罗门 C18柱(4.6mm×150mm, 5μm);
流动相: 0.02mol·L⁻¹乙酸铵溶液-甲醇(96+4);
流速量: 1.0mL·min⁻¹;
柱温: 30℃
检测波长: 230nm;



高效液相色谱的分析应用



氨基甲酸酯标样色谱图



名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏秒)	% 面积	高度 (微伏)	积分类型	含量	单位	峰类型	峰代码
涕灭威亚砷	4.662	258660484	8.83	30924404	VV	2.000	µg/ml	找到	
涕灭威砷	6.277	266352045	9.09	19747306	VV	2.000	µg/ml	找到	
灭多威	7.376	398914135	13.61	31603036	VV	2.000	µg/ml	找到	
3-羟基克百威	9.425	281749263	9.62	33315475	VV	2.000	µg/ml	找到	
涕灭威	11.989	315970934	10.78	41331851	VV	2.000	µg/ml	找到	
速灭威	12.804	328704983	11.22	43064944	VV	2.000	µg/ml	找到	
克百威	13.708	232844497	7.95	31372428	VV	2.000	µg/ml	找到	
甲萘威	14.132	428255184	14.62	58678232	VV	2.000	µg/ml	找到	
异丙威	15.143	239915973	8.19	32012171	VV	2.000	µg/ml	找到	
仲丁威	16.401	178780473	6.10	24465012	VB	2.000	µg/ml	找到	

色谱柱: Waters C18柱(4.6mm×150mm,5µm);

流动相: 水+甲醇梯度洗脱;

流速量:1.0mL·min⁻¹;

柱温: 42℃

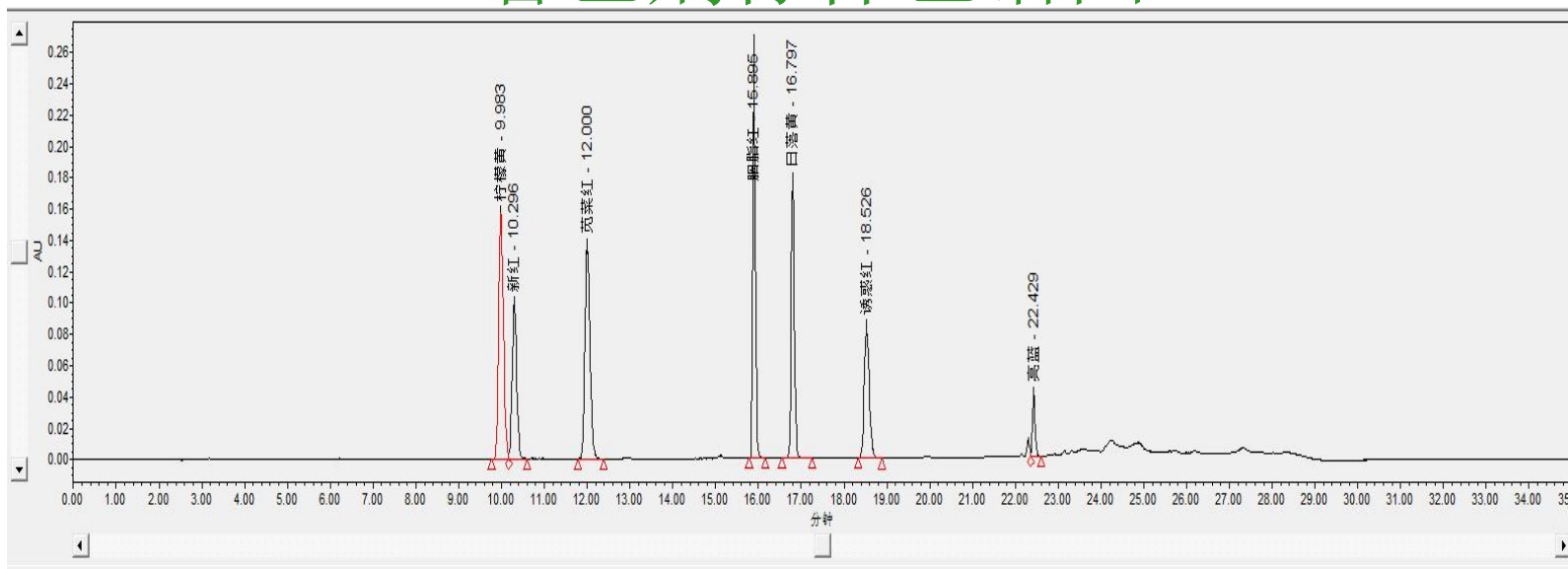
发射波长: 330nm, 吸收波长465nm;



高效液相色谱的分析应用



着色剂标样色谱图



名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏秒)	% 面积	高度 (微伏)	积分类型	含量	单位	峰类型	峰代码	s/n
1 柠檬黄	9.983	1207354	20.20	157086	BV	20.000	μg/ml	找到	457.089655	
2 新红	10.296	739427	12.37	99184	VB	20.000	μg/ml	找到	288.603990	
3 苋菜红	12.000	1135065	18.99	136102	BB	20.000	μg/ml	找到	396.028508	
4 胭脂红	15.895	1107894	18.54	265080	BB	20.000	μg/ml	找到	771.328407	
5 日落黄	16.797	922301	15.43	177973	BB	20.000	μg/ml	找到	517.864324	
6 诱惑红	18.526	691583	11.57	84049	BB	20.000	μg/ml	找到	244.565655	
7 亮蓝	22.429	173276	2.90	40691	VB	20.000	μg/ml	找到	S05 S06 118.403032	

色谱柱: 赛默飞 C18柱(4.6mm×150mm,5μm);
流动相: 0.02mol·L⁻¹乙酸铵溶液-甲醇 梯度洗脱;
流速量:1.0mL·min⁻¹;
柱温: 30℃
检测波长: 230nm;



THE
END



THANK YOU