

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 也叫高压液相色谱 (high pressure liquid chromatography)、高速液相色谱 (high speed liquid chromatography)、高分离度液相色谱 (high resolution liquid chromatography) 等。是在经典液相色谱法的基础上, 于 60 年代后期引入了气相色谱理论而迅速发展起来的。它与经典液相色谱法的区别是填料颗粒小而均匀, 小颗粒具有高柱效, 但会引起高阻力, 需用高压输送流动相, 故又称高压液相色谱。又因分析速度快而称为高速液相色谱。

高效液相色谱是目前应用最多的色谱分析方法, 高效液相色谱系统由流动相储液瓶、输液泵、进样器、色谱柱、检测器和记录器组成, 其整体组成类似于气相色谱, 但是针对其流动相为液体的特点作出很多调整。HPLC 的输液泵要求输流量恒定平稳; 进样系统要求进样便利切换严密; 由于液体流动相粘度远远高于气体, 为了减低柱压高效液相色谱的色谱柱一般比较粗, 长度也远小于气相色谱柱。HPLC 应用非常广泛, 几乎遍及定量定性分析的各个领域。

使用高效液相色谱时, 液体待检测物被注入色谱柱, 通过压力在固定相中移动, 由于被测物种不同物质与固定相的相互作用不同, 不同的物质顺序离开色谱柱, 通过检测器得到不同的峰信号, 最后通过分析比对这些信号来判断待测物所含有的物质。高效液相色谱作为一种重要的分析方法, 广泛的应用于化学和生化分析中。高效液相色谱从原理上与经典的液相色谱没有本质的差别, 它的特点是采用了高压输液泵、高灵敏度检测器和高效微粒固定相, 适于分析高沸点不易挥发、分子量大、不同极性的有机化合物。

发展历史:

1960 年代, 由于气相色谱对高沸点有机物分析的局限性, 为了分离蛋白质、核酸等不易气化的大分子物质, 气相色谱的理论和方法被重新引入经典液相色谱。1960 年代末科克兰 (Kirkland)、哈伯、荷瓦斯(Horvath)、莆黑斯、里普斯克等人开发了世界上第一台高效液相色谱仪, 开启了高效液相色谱的时代。高效液相色谱使用粒径更细的固定相填充色谱柱, 提高色谱柱的塔板数, 以高压驱动流动相, 使得经典液相色谱需要数日乃至数月完成的分离工作得以在几个小时甚至几十分钟内完成。

1971 年科克兰等人出版了《液相色谱的现代实践》一书, 标志着高效液相色谱法 (HPLC) 正式建立。在此后的时间里, 高效液相色谱成为最为常用的分离和检测手段, 在有机化学、生物化学、医学、药物开发与检测、化工、食品科学、环境监测、商检和法检等方面都有广泛的应用。高效液相色谱同时还极大的刺激了固定相材料、检测技术、数据处理技术以及色谱理论的发展。

1960 年代前, 使用的填充粒大于 $100\ \mu\text{m}$, 提高柱效面临着困境, 后来的研究人员便采用微粒固定相来突破着一瓶颈。科克兰、荷瓦斯制备成功薄壳型固定相, 这种在固定相在玻璃微球表面具有多孔薄壳, 实现了高速传质, 为高效液相色谱技术的发展奠定了稳固的基础。随着填料粒径的降低, 更高的柱效也得以实现。1960 年代研制出气动放大泵、注射泵及低流量往复式柱塞泵, 但后者的脉冲信

号很大，难以满足高效液相色谱的要求。1970 年代，往复式双柱塞恒流泵，解决了这一问题。1970 年代后科克兰制备出全多孔球形硅胶，平均粒径只有 $7\ \mu\text{m}$ ，具有极好的柱效，并逐渐取代了无定形微粒硅胶。之后又制造出的键合固定相使柱的稳定性大为提高，多次使用成为可能。1970 年后，适合分离生物大分子的填料又成为研究的热点。1980 年后，改善分离的选择性成为色谱工作者的主要问题，人们越来越认识到改变流动相的组成是提高选择性的关键。

高效液相色谱的特点：

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——塔板数可达 5000/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 0.01ng 。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 $15\sim 30\ \text{min}$ ，有些样品甚至在 $5\ \text{min}$ 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 。

色谱柱可反复使用——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。