



博 学 而 笃 志

切 问 而 近 思

# 高效液相色谱法测定食品中的 防腐剂 and 甜味剂

## High performance liquid chromatography

复旦大学 化学教学实验中心

雷 杰



# 内容提要

- 高效液相色谱法(HPLC)的特点
- 高效液相色谱法的主要类型和原理
- 高效液相色谱仪
- 色谱柱简介
- 色谱理论基础
- 实验内容

# 一、高效液相色谱法(HPLC)的特点

近思

## 历史回顾

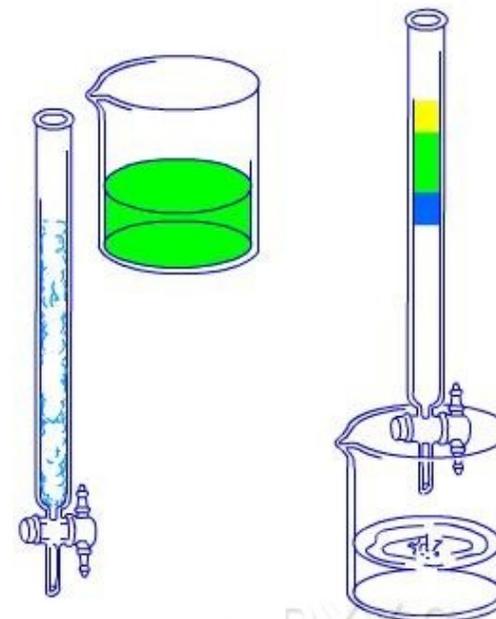
固定相、流动相；气相、液相。

- 1906 - Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919)

碳酸钙吸附剂  
石油醚

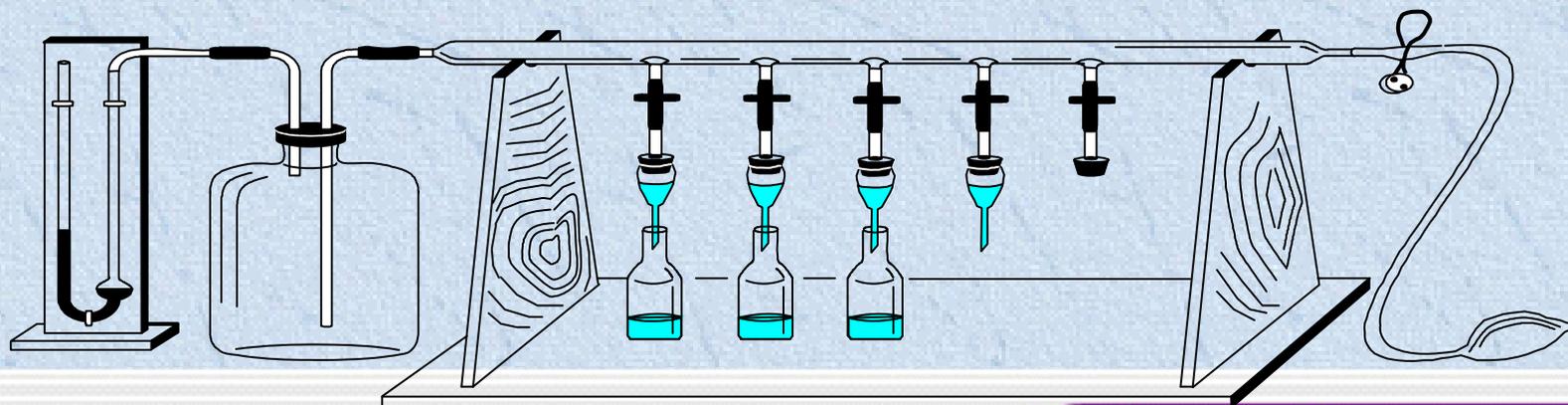
提名为1917年诺贝尔化学奖的候选人

- 1940's - 分配色谱和纸色谱
- 1950's - 气相, 薄层, 凝胶过滤色谱  
1955年第一台商品GC仪器的推出
- 1960's - 商业高效液相色谱.



柱色谱分离原理

1950年代之后飞速发展，并发展出一个独立的三级学科-色谱学。



Experimental Center for Chemical education, FDU

M.S. Tswett. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 24: 384-393 (1906)



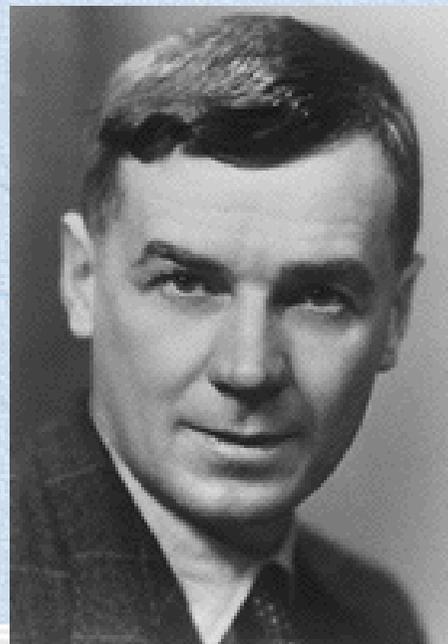
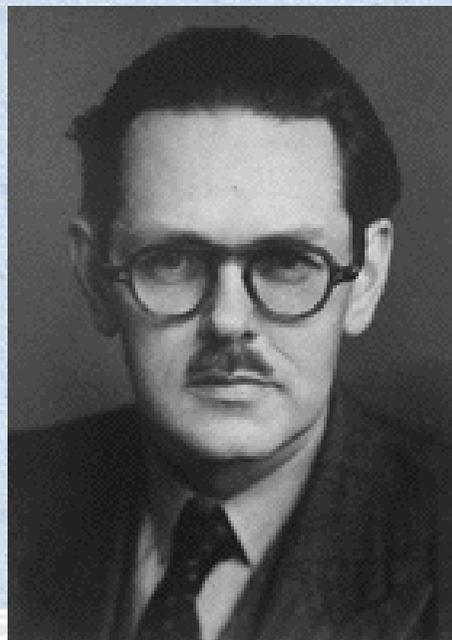
1952年，诺贝尔化学奖得主：**A.J.P.马丁**、**R.L.M.辛格**

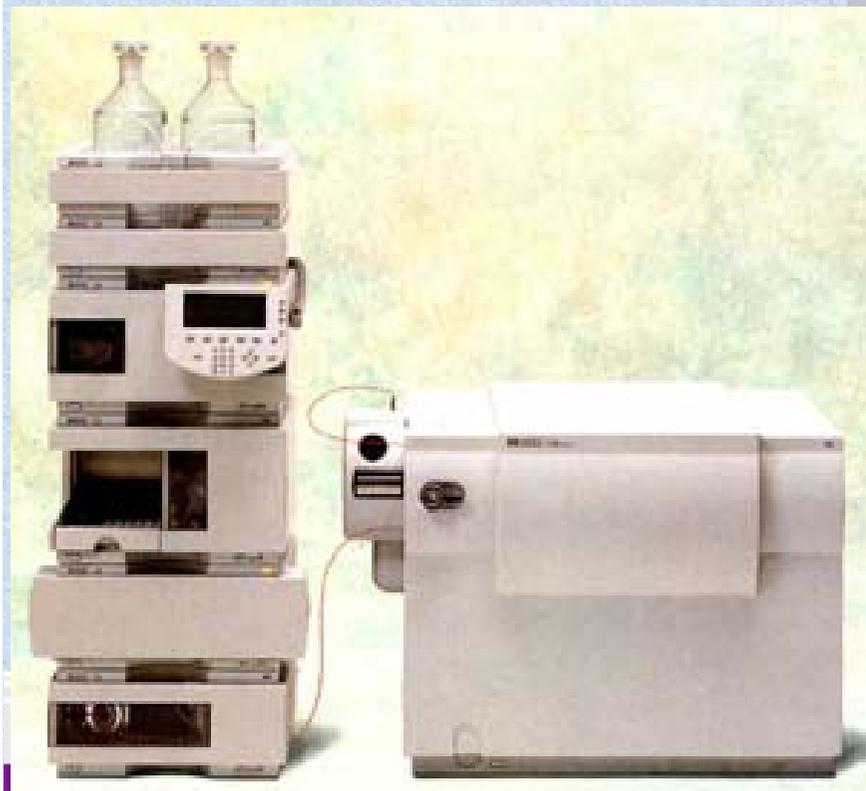
Archer John Porter Martin (1910-2002) 英国分析化学家

Richard Laurence Millington Synge (1914-1994) 英国生物化学家

获奖项目：发明分配色谱法。

预言了GC的诞生。（1952年，发表了第一篇GC论文）







高效液相色谱法是在经典色谱法的基础上，引用了气相色谱的理论；在技术上，流动相改为高压输送；色谱柱是以特殊的方法用小粒径的填料填充而成，从而使柱效大大高于经典液相色谱（每米塔板数可达几万或几十万）；同时柱后连有高灵敏度的检测器，可对流出物进行连续检测。高压液相色谱的特点有：



- 1. 高压：**液体流经色谱柱，受到阻力较大，为了迅速地通过色谱柱，必须对流动相施加高压。
- 2. 高速：**流动相在柱内的流速较经典色谱快得多，一般可达1~10ml/min。高效液相色谱法所需的分析时间较之经典液相色谱法少得多，一般少于1h。
- 3. 高效：**颗粒极细（一般为10 μm以下）、规则均匀的固定相，传质阻抗小，柱效高，分离效率高。
- 4. 高灵敏度：**高效液相色谱已广泛采用高灵敏度的检测器，进一步提高了分析的灵敏度。如荧光检测器灵敏度可达 $10^{-11}$ g。另外，用样量小，一般几个微升。
- 5. 适应范围宽：**气相色谱法虽具有分离能力好，灵敏度高，分析速度快，操作方便等优点，但是受技术条件的限制，沸点太高的物质或热稳定性差的物质都难于应用气相色谱法进行分析。而高效液相色谱法，只要求试样能制成溶液，而不需要气化，因此不受试样挥发性的限制。对于高沸点、热稳定性差、相对分子量大（大于400以上）的有机物（这些物质几乎占有有机物总数的75%~80%）原则上都可应用高效液相色谱法来进行分离、分析。据统计，在已知化合物中，能用气相色谱分析的约占20%，而能用液相色谱分析的约占70~80%。

## 二、高效液相色谱法的主要类型和原理

### (一) 主要类型

- 分配色谱法 (partition chromatography)
- 吸附色谱法 (adsorption chromatography)
- 离子交换色谱法 (IEC)
- 空间排阻色谱法 (SEC)
- 化学键合相色谱法 (bonded phase chromatography; BPC)
- 亲合色谱法 (affinity chromatography; AC)
- 手性色谱法 (chiral chromatography; CC)
- 胶束色谱法 (micellar chromatography; MC)
- 电色谱法 (electrochromatography; EC)



## (二) 化学键合相色谱法

通过特定的液态物质涂于担体表面，或化学键合于担体表面，现在多采用的是化学键合固定相，如C18、C8、氨基柱、氰基柱和苯基柱。

- 以化学键合相为固定相的色谱法，简称键合相色谱法。
- 化学键合相：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。

优点：

- (1) 固定相的均一性和稳定性好，在使用过程中不易流失，使用周期长；
- (2) 柱效高；重现性好；
- (3) 能使用的流动相和键合相的种类多，分离的选择性高

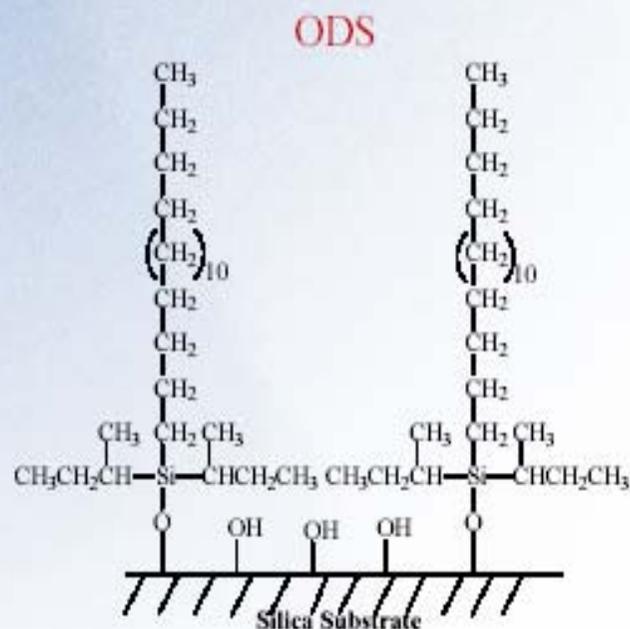
根据化学键合相与流动相极性的相对强弱

正相 (**normal phase, NP**) 和反相 (**reversed phase, RP**) 键合相色谱法：

## (三) 反相键合相色谱法

- 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：水为基础溶剂，加入一定量与水混溶的极性调整剂
  - 常用甲醇-水、乙腈-水体系等

### Typical Silica C18



- 应用：广。非极性至中等极性的组分，（还有有机酸、碱及盐等）



- 保留行为的主要影响因素

- 1、溶质的分子结构（极性）

极性越弱，疏水性越强，容量因子 $k$ 越大，保留时间 $t_R$ 也越大。

同系物碳数越多，极性越弱， $k$ 越大；

引入极性取代基，降低疏水性， $k$ 值变小。

- 2、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。



### 3、流动相

极性越强，洗脱能力越弱，使溶质的 $k$ 越大

- 溶剂种类：水为弱溶剂，醇为强溶剂
- 溶剂比例：水的比例增加，使 $k$ 增大
- 中性盐的加入：使中性溶质的 $k$ 增大
- pH：影响弱酸、弱碱的离解

流动相的pH降低，弱酸 $k$ 增大， $t_R$ 增大；弱碱相反。

### 三、高效液相色谱仪

Agilent HPLC1100 五个主要部分:

高压输液/溶剂传输系统

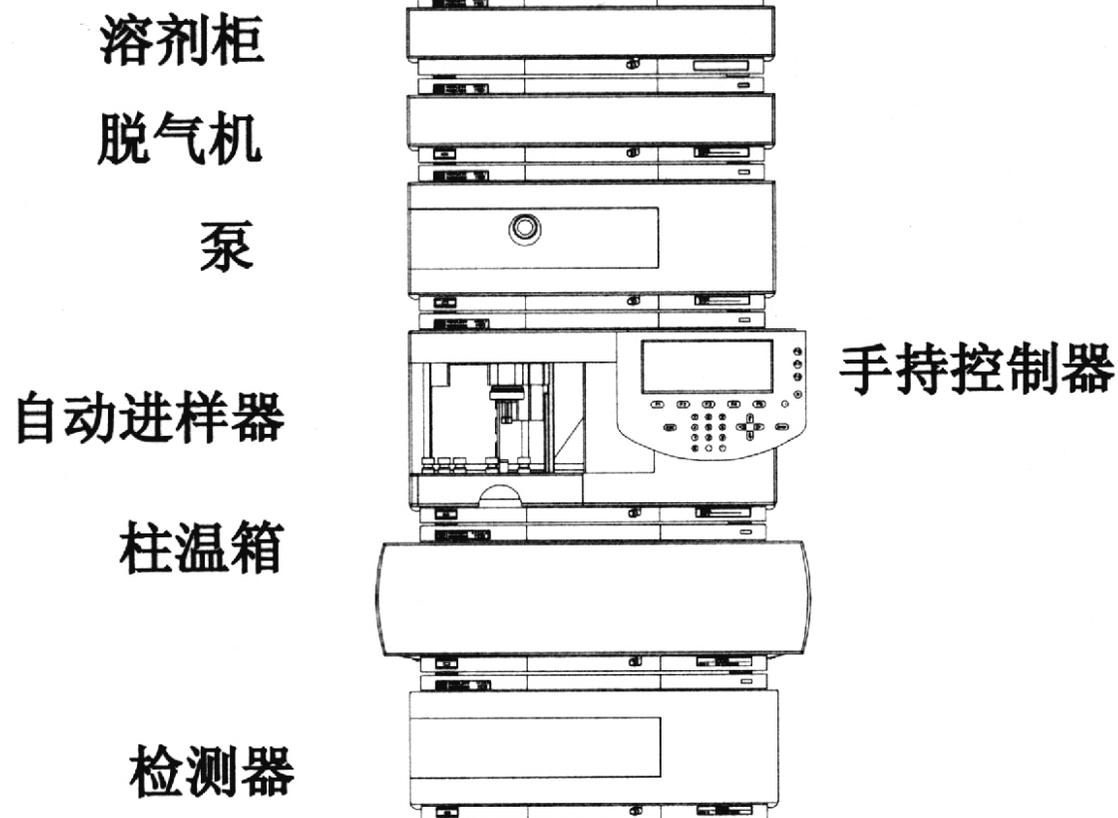
样品进样/引入系统

样品分离系统

信号检测系统

数据处理系统

仪器配置:在线脱气机、四元泵、多波长紫外检测器、柱温箱、手动进样器、20  $\mu\text{L}$  HPLC进样环。

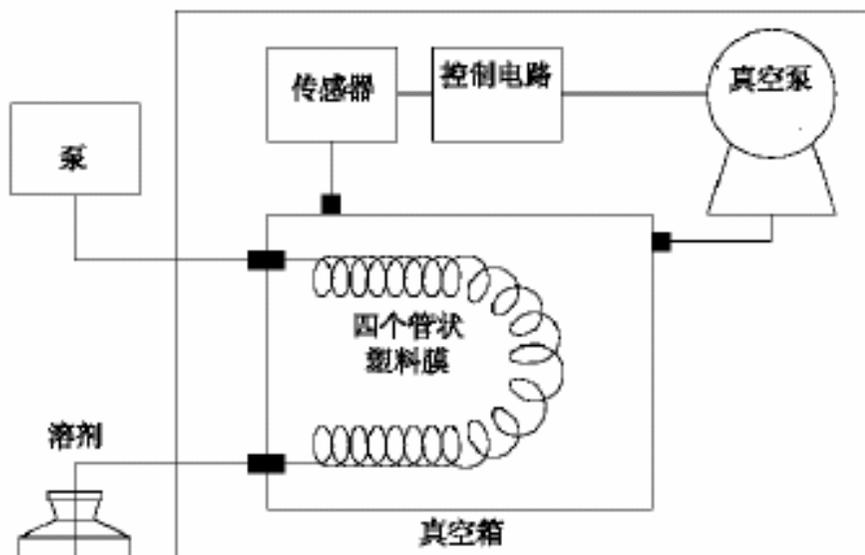


### Agilent HPLC1100堆积配置图

# Agilent 1100 在线脱气机日常维护,故障诊断

## 工作原理

总览 (只表示四个溶剂通道中的一个)



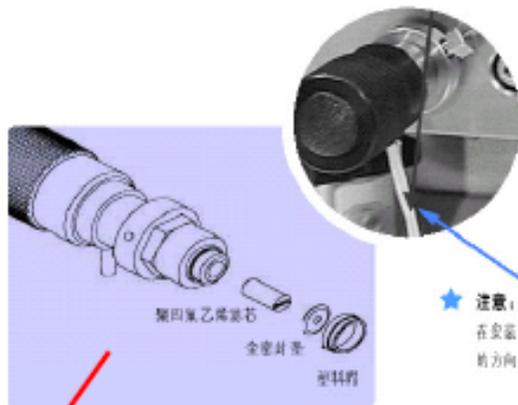
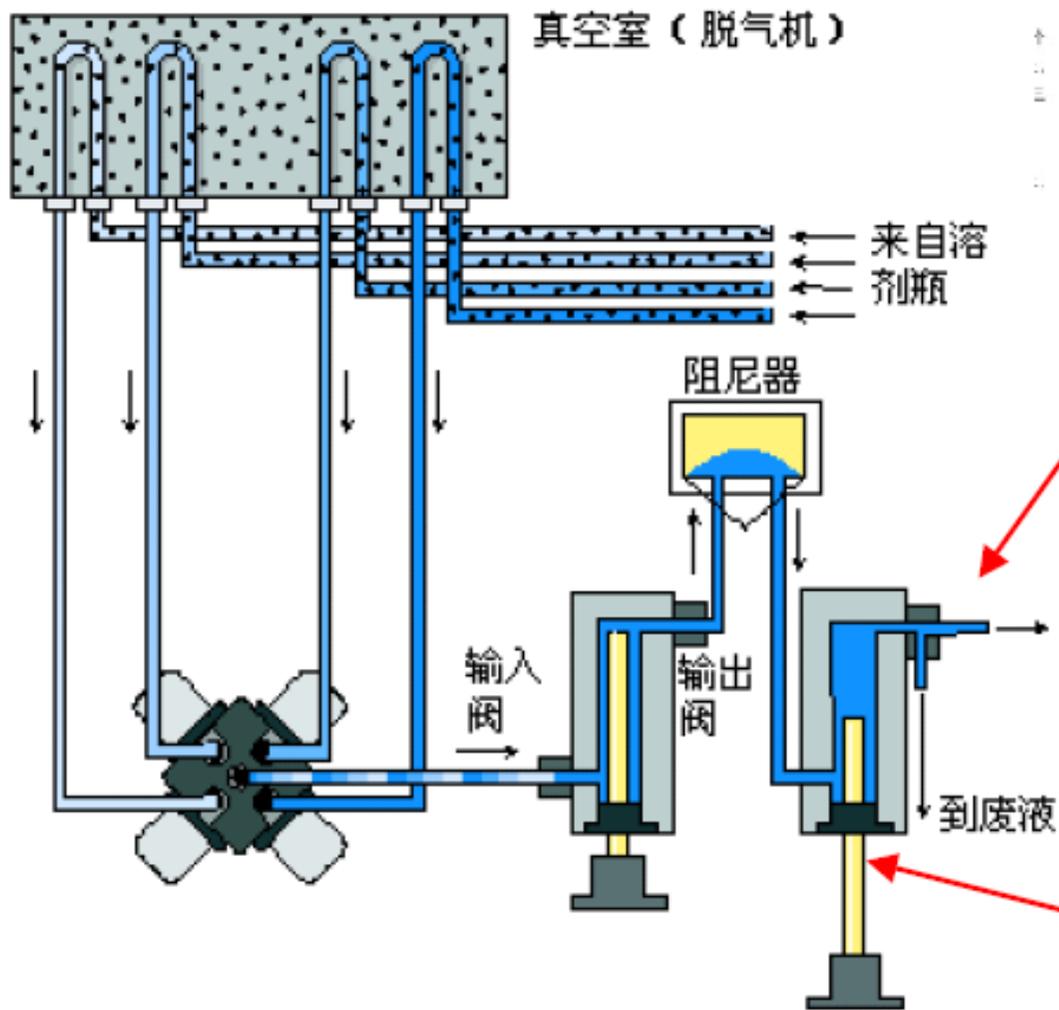
真空脱气机由一个四通道 (有四个管状塑料膜) 真空箱和一个真空泵构成。打开真空脱气机的电源开关后, 控制电路即开启真空泵, 真空泵运行使真空箱内产生部分真空。真空度由压力传感器测定。根据传感器信号, 真空脱气机通过运行或关闭真空泵来维持真空度。

溶剂瓶中的溶剂在 LC 泵的抽动下流过真空箱内的特殊管状塑料膜。当溶剂经过真空管时, 溶剂中溶解的气体将渗过塑料膜进入真空箱。到达真空脱气机出口时, 溶剂几乎已被完全脱气而不含有任何气体。



# Agilent 1100 四元泵工作原理

## 四元泵的液路



★ 注意：  
在安装过程中请注意管接口的方向，确保正确。

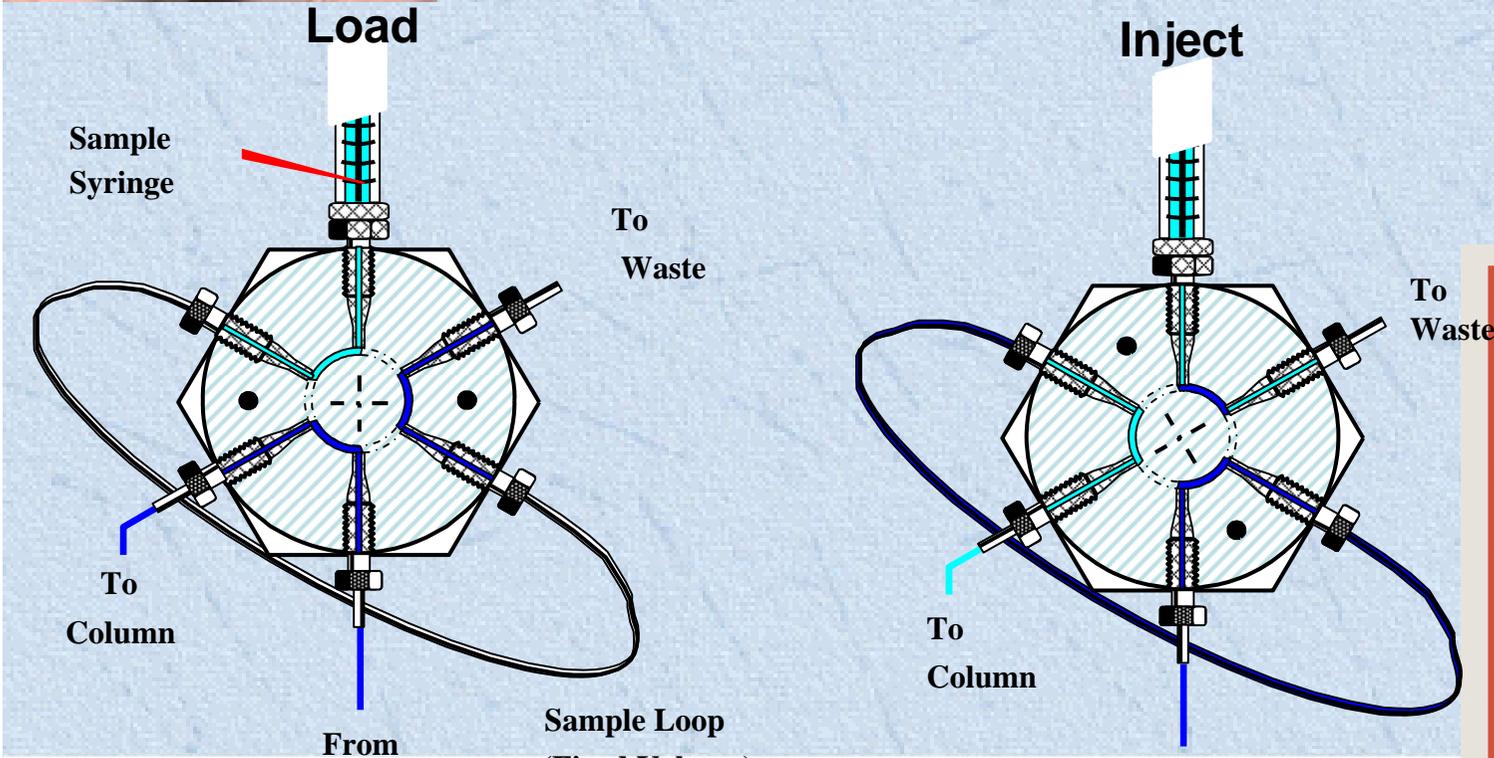




而 笃 志

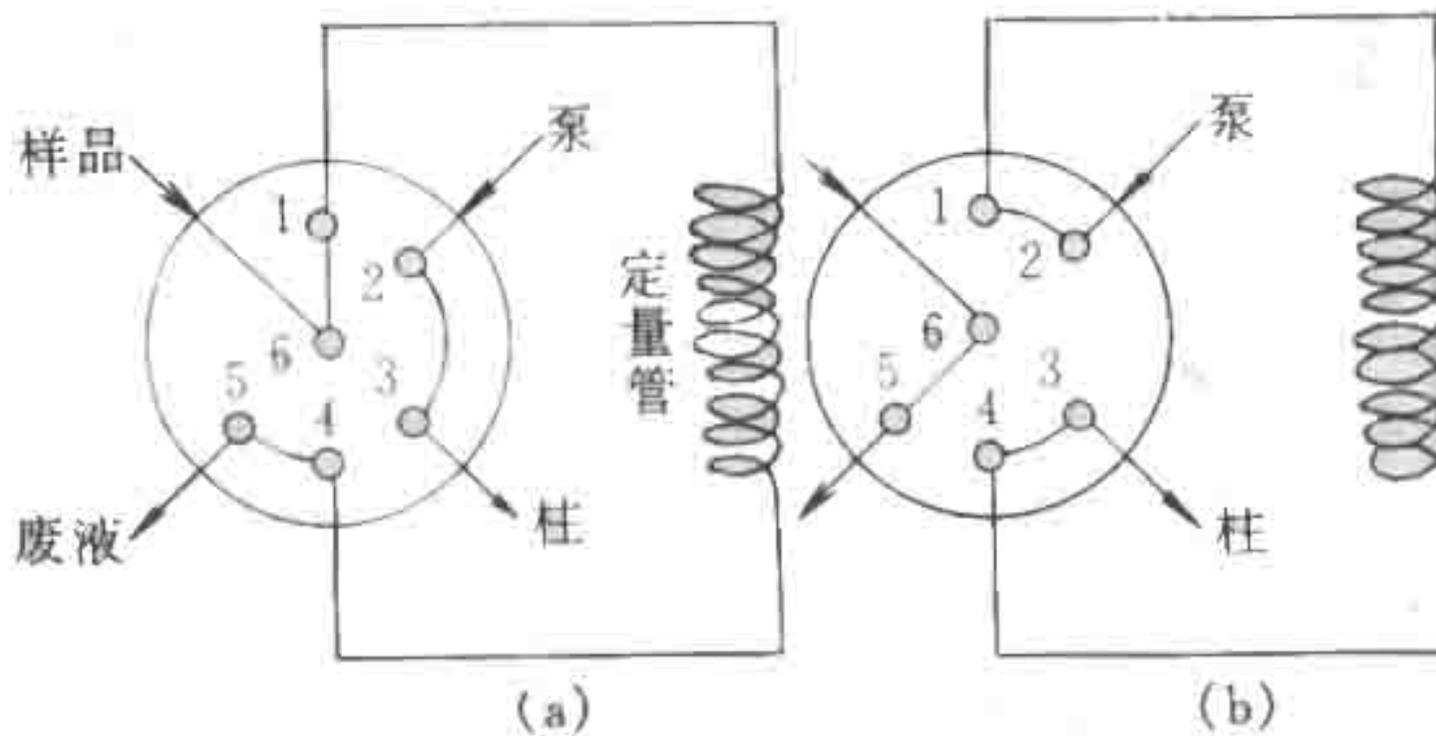


# Agilent 1100 手动进样器工作原理



**NEEDLE TIPS**

-  Blunt, open end
-  Bevel, open end
-  Side port, taper



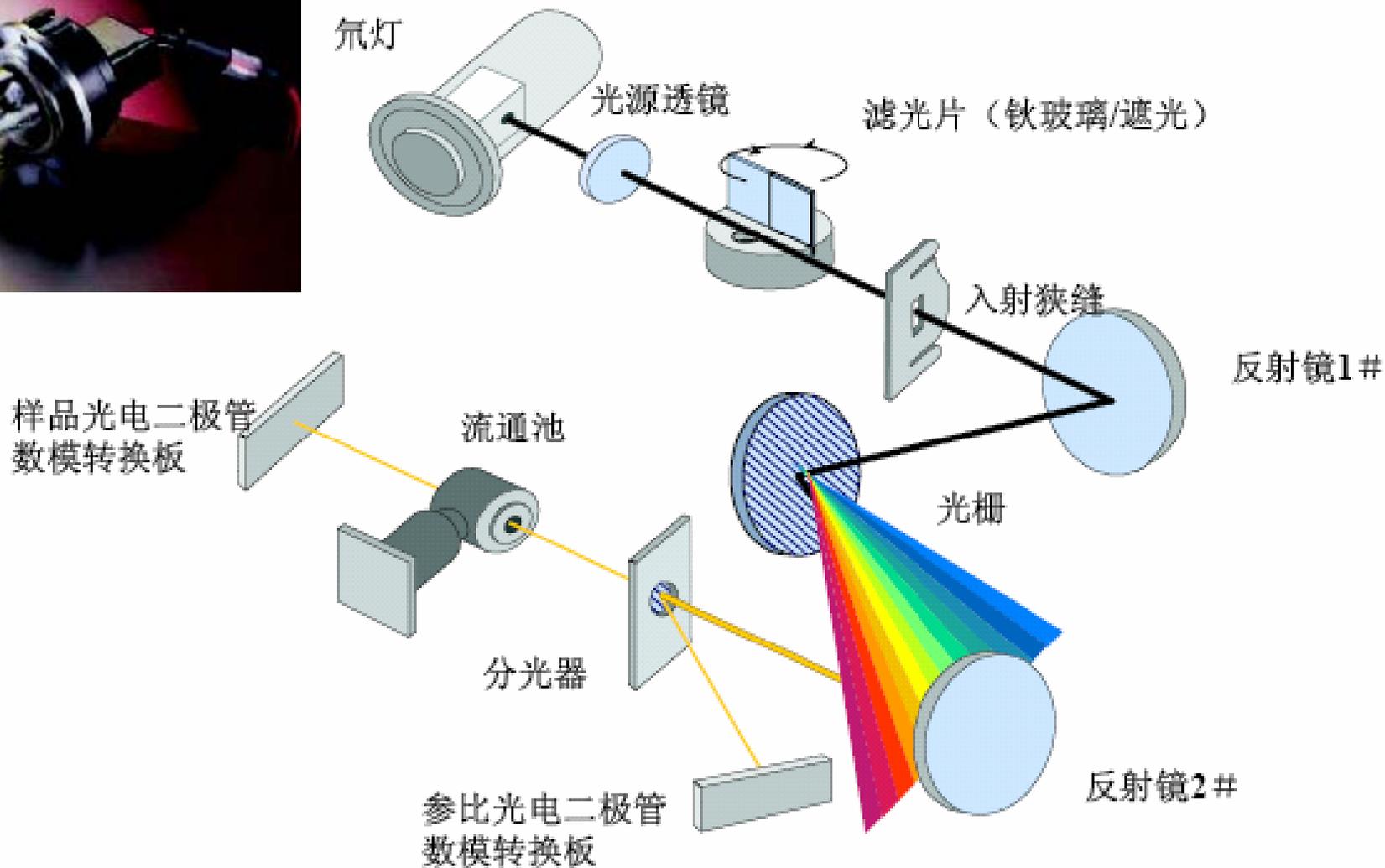
### 高压六通阀进样

(a) 取样; (b) 进样

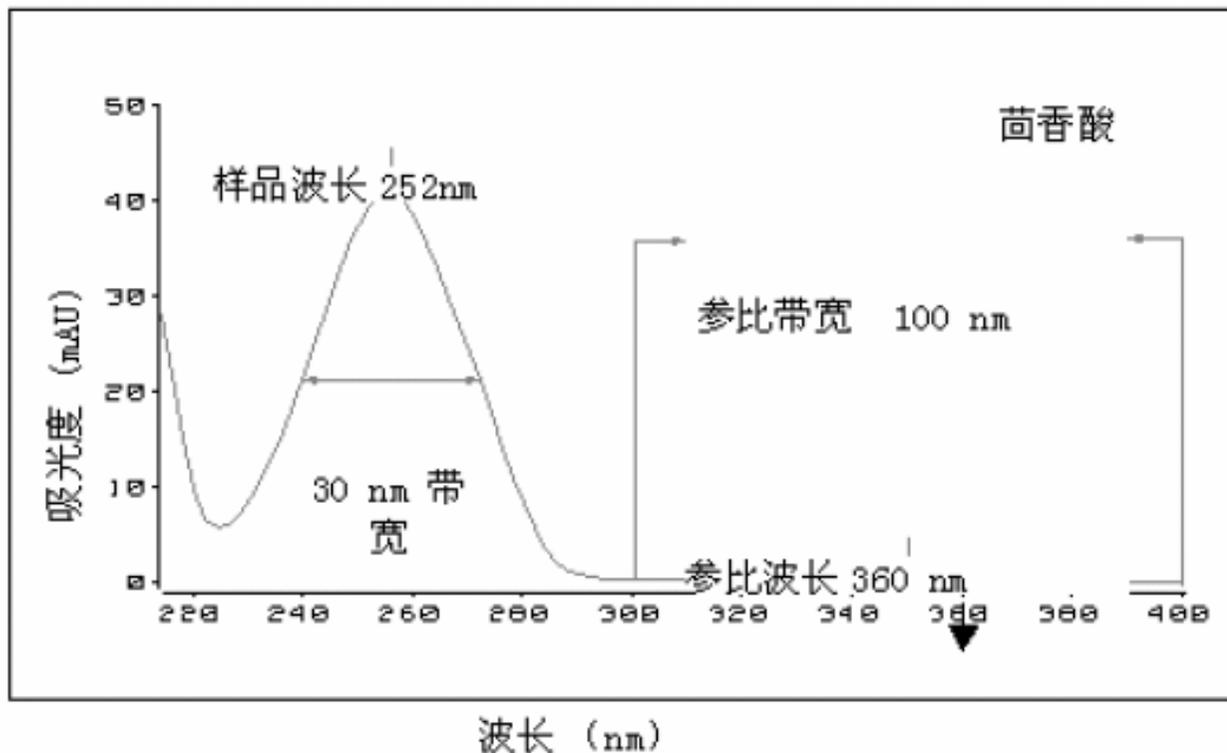


# Agilent 1100 紫外检测器工作原理

切 问 而 近 思



## 优化波长设定



Store	Sample,Bw	Reference,Bw		
A: <input checked="" type="checkbox"/>	252	4	360	1e02 nm
B: <input checked="" type="checkbox"/>	252	30	360	100 nm
C: <input type="checkbox"/>	210	8	360	90 nm
D: <input type="checkbox"/>	230	16	360	60 nm
E: <input type="checkbox"/>	280	16	360	60 nm

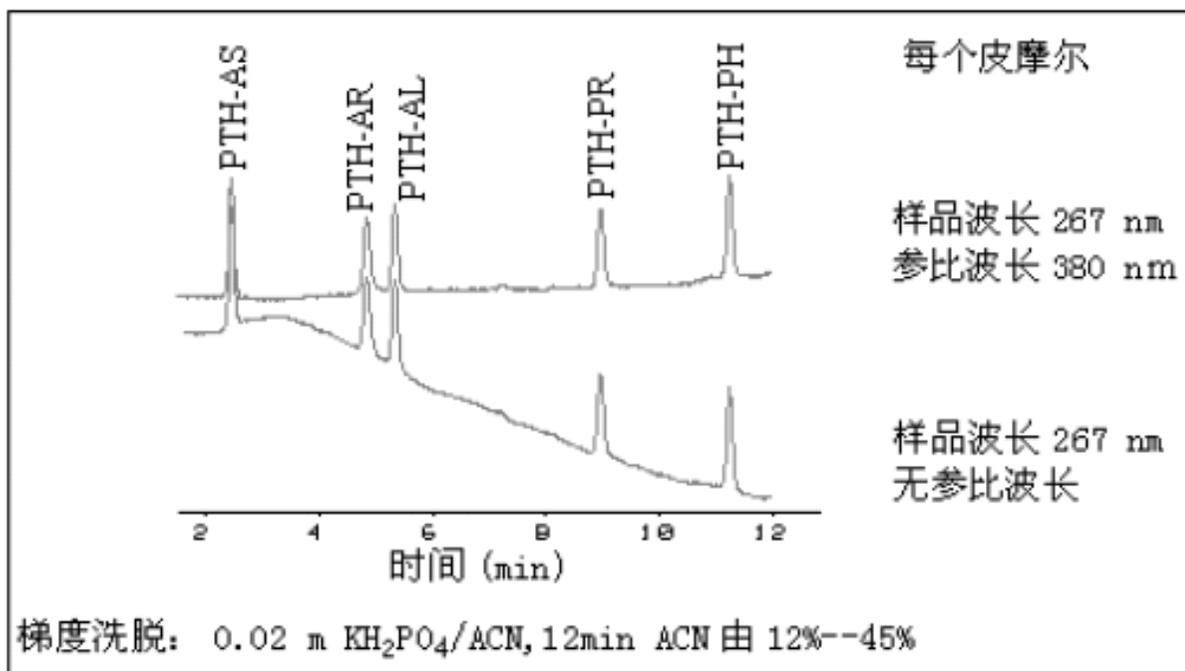
使用较宽的带宽有降低噪声的优点，能在整个波长范围内降低噪声—和使用 4 nm 带宽相比采用 30 nm 带宽，基线噪声降低约 2.5 倍。而信号值是 4-nm 带宽的 75%，在此例中信噪比增大 2 倍。

要求  $Bw(Ref.) > Bw(Sam.) > Slit$ ，其中样品的谱带宽度 Bandwidth (Sam.) 应约等于其紫外吸收峰的半峰宽。



# Agilent 1100 DAD紫外检测器性能优化

使用和不使用参比波长时，PTH-氨基酸的梯度洗脱分析



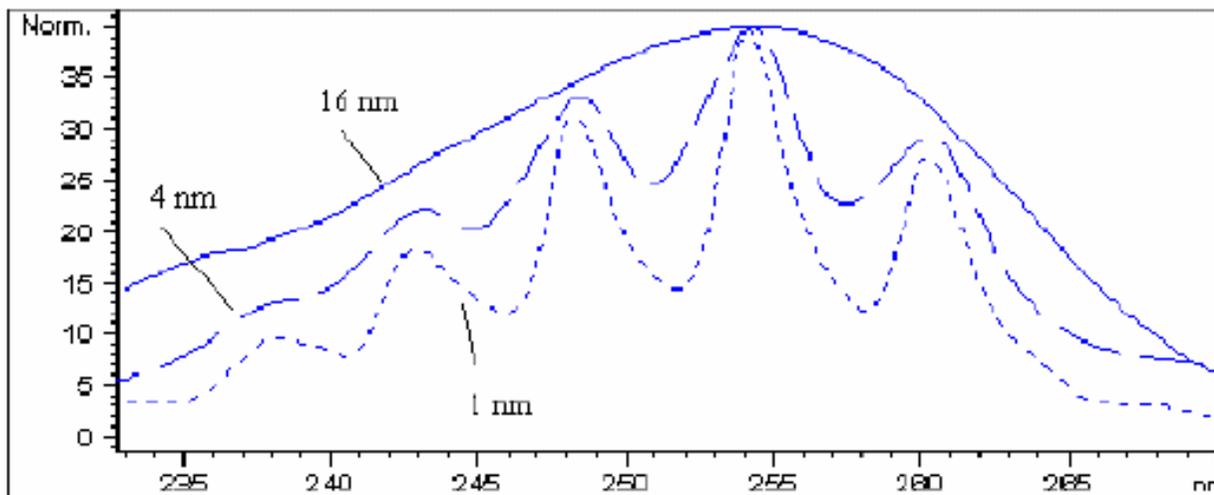
Signals	Store	Sample,Bw	Reference,Bw	
A:	<input checked="" type="checkbox"/>	267 4	380 80	rm
B:	<input checked="" type="checkbox"/>	267 4	Off	rm
C:	<input type="checkbox"/>	210 8	350 90	rm
D:	<input type="checkbox"/>	230 16	350 60	rm
E:	<input type="checkbox"/>	280 16	350 80	rm



# Agilent 1100 DAD紫外检测器性能优化

问而近思

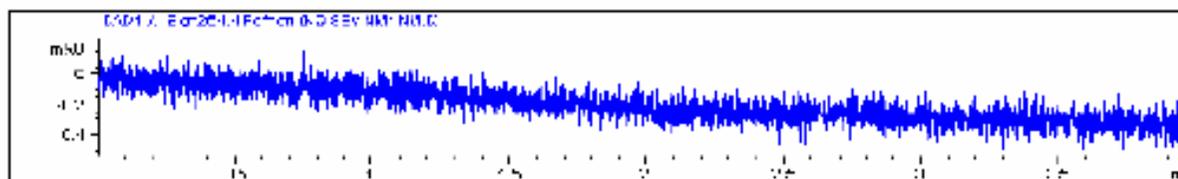
## 1. 4 和 16 nm 狭缝宽度苯的吸收光谱



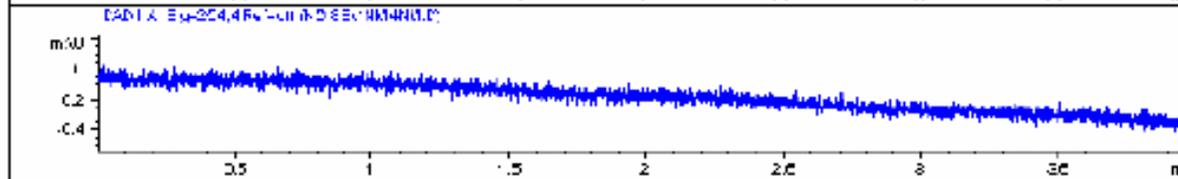
使用宽狭缝时通过流通池的光量多，可以降低极限噪声，如图 14 所示。

## 狭缝宽度对基线噪声的影响

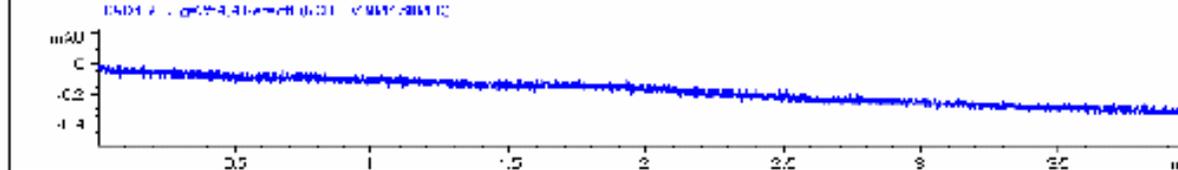
狭缝宽度 1 nm



狭缝宽度 4 nm



狭缝宽度 16 nm



Experin

实验中心



## Agilent 1100 数据处理系统 (略)

见课堂讲解

### 1100 指示灯的意义

状态指示灯：位于各自模块的右上方。

**呈黄色：**该仪器在未准备好状态(Not-ready)或正在自检。

**呈绿色：**该仪器正在运行，采集数据(Run)。

**无颜色：**该仪器已准备好等待运行(Pre-run)。

**呈红色：**该仪器检测到有故障发生，仪器在错误状态(Error)。

## 四、色谱柱简介

微型化  
制备柱  
锥形柱  
填料





## 柱长、内径

- 柱长：一般为**2.0-250 mm**，柱越长，分离度越高，但柱压更高，分离所需时间更长。
- 分离度和理论塔板数的平方根成正比，所以增加柱长并不是最有效的分离手段。一般情况下**20 cm**、**5  $\mu\text{m}$** 填料可以提供足够的理论塔板数。
- 内径：小于**1 mm**的为毛细管柱；**4.6 mm**的分析柱；大于**10 mm**的半制备或者制备色谱柱。
- 不同仪器设备配制由相应的最佳流速，因此适用于不同内径的色谱柱。如果配制不匹配，则柱外效应会放大。



## 色谱柱填料简介

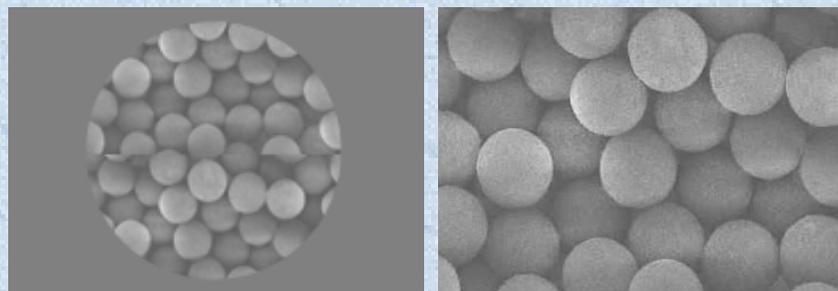
常用基质:

硅胶

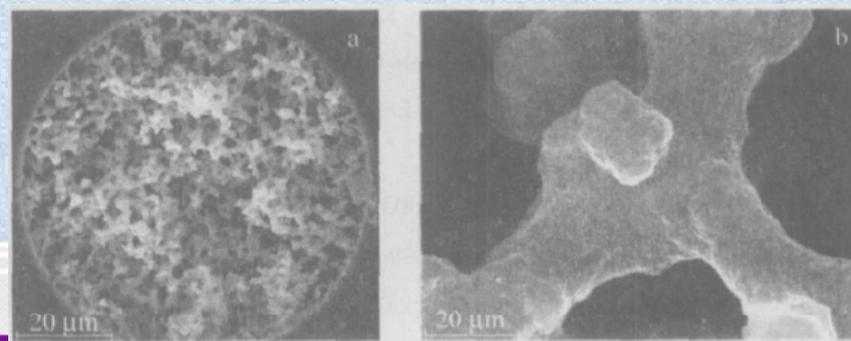
其他无机基质材料（氧化铝、氧化锆等）

有机高分子基质填料（多糖型、聚苯乙烯等）

微米球颗粒



整体柱

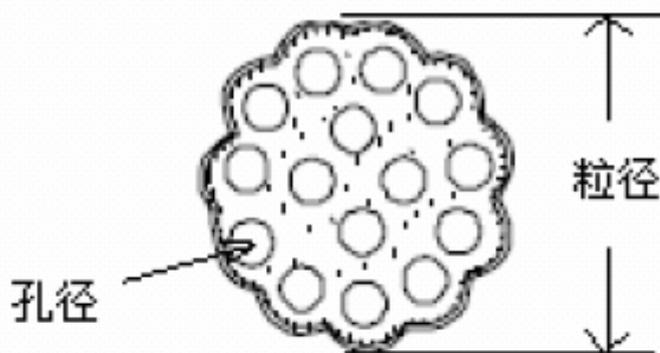


## 粒径

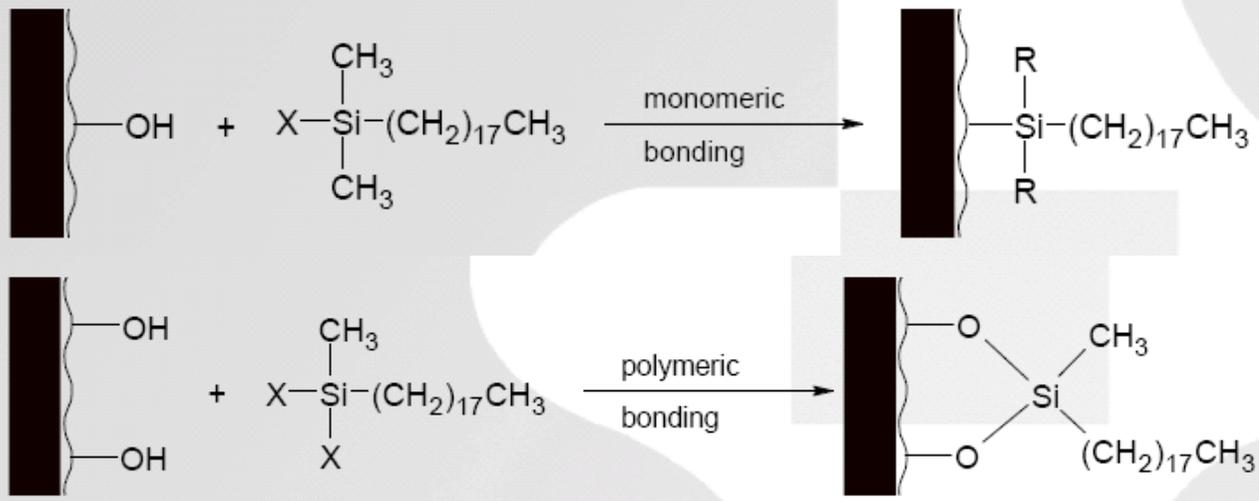
- 粒径越小，分离越快，柱效越高。但柱压力越高，柱容易被污染，寿命低
- **LC-MS**和常规分析柱通常使用 $5\ \mu\text{m}$ 填料。 $3\ \mu\text{m}$ 填料使用的困难程度大，一般非必要时不使用(**ODS-100V**)
- **Super-ODS**为 $2\ \mu\text{m}$  填料，**UPLC**为 $1.7\ \mu\text{m}$ 填料
- $3\text{cm}$ 以下的制备色谱柱通常使用 $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ 填料
- 更大内径的制备色谱柱通常使用更大的粒径，如 $10\ \mu\text{m}$ ，或 $20\ \mu\text{m}$

## 孔径

- 孔径小，含孔率高，则比表面积大，载碳量高
- 化合物在孔内分离
- 孔径大小必须和分子大小相匹配，分子必须能进入孔内，一般小分子使用 $80\text{-}120\text{\AA}$ ，大分子通常使用 $300\text{\AA}$ 。为了达到最佳分离，一般要求孔径直径是分子直径的3倍以上

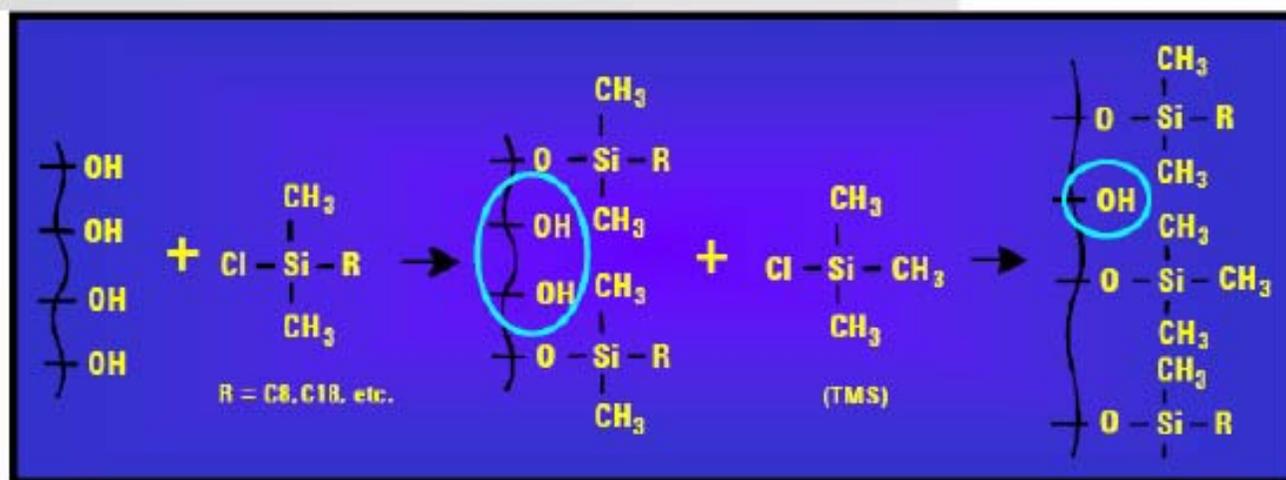


键合方式:



通过特定的液态物质涂于担体表面，或化学键合于担体表面，现在多采用的是化学键合固定相，如**C18**、**C8**、氨基柱、氰基柱和苯基柱。

封端：（目的是减小残留硅羟基）



Experimental

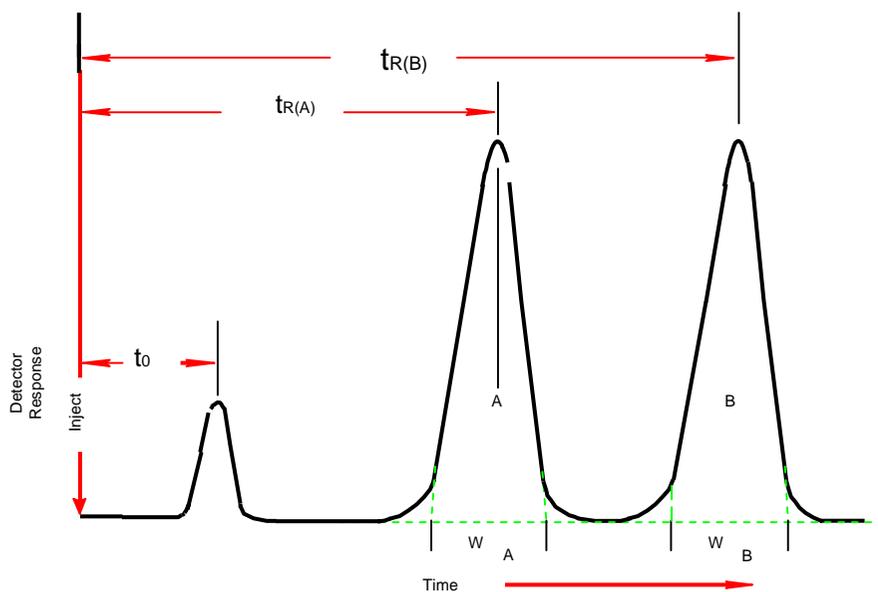
固定相键合  
二甲基硅烷

封端  
四甲基硅烷

# 五、色谱理论基础

## 色谱参数

一定性和定量：保留时间和峰面积（峰高）



$t_R$  = 保留时间  
 $t_0$  = 死时间  
 $W$  = 峰底宽度

分离度  $R = 2 \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{W_A + W_B} = 1.176 \frac{t_{R(B)} - t_{R(A)}}{W_{1/2A} + W_{1/2B}}$

容量因子  $K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

色谱过程热力学



## 色谱过程动力学 之 塔板理论

$$\text{理论塔板数 } n = 16 \left( \frac{V_R}{W_b} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

$$\text{塔板高度 } H = L/n$$

$$\text{有效塔板数 } n_{\text{eff}} = 5.54 \left( \frac{t'_R}{W_{1/2}} \right)^2 = \left( \frac{t'_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left( \frac{t'_R}{W_b} \right)^2$$

$t_R$  为样品的保留时间； $W_b$  为峰底宽； $t'_R$  为调整保留时间； $L$  色谱柱长度。

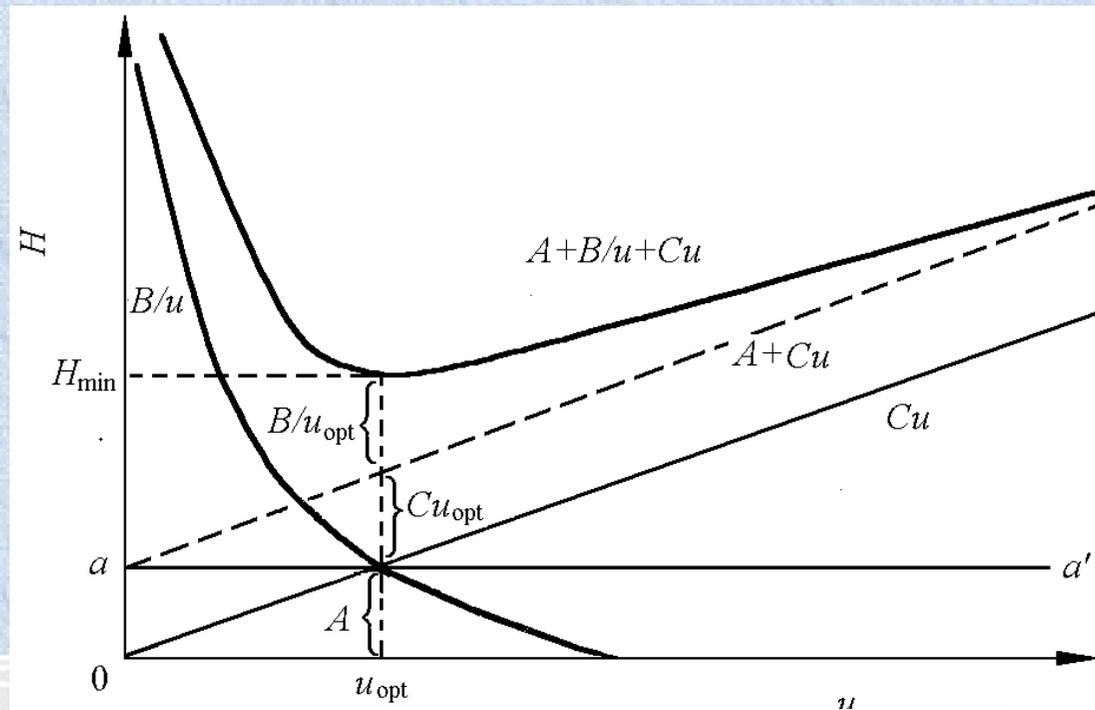


# 色谱过程动力学 之 速率理论

1956年范·第姆特 (Van Deemter) 根据物料平衡导出了:

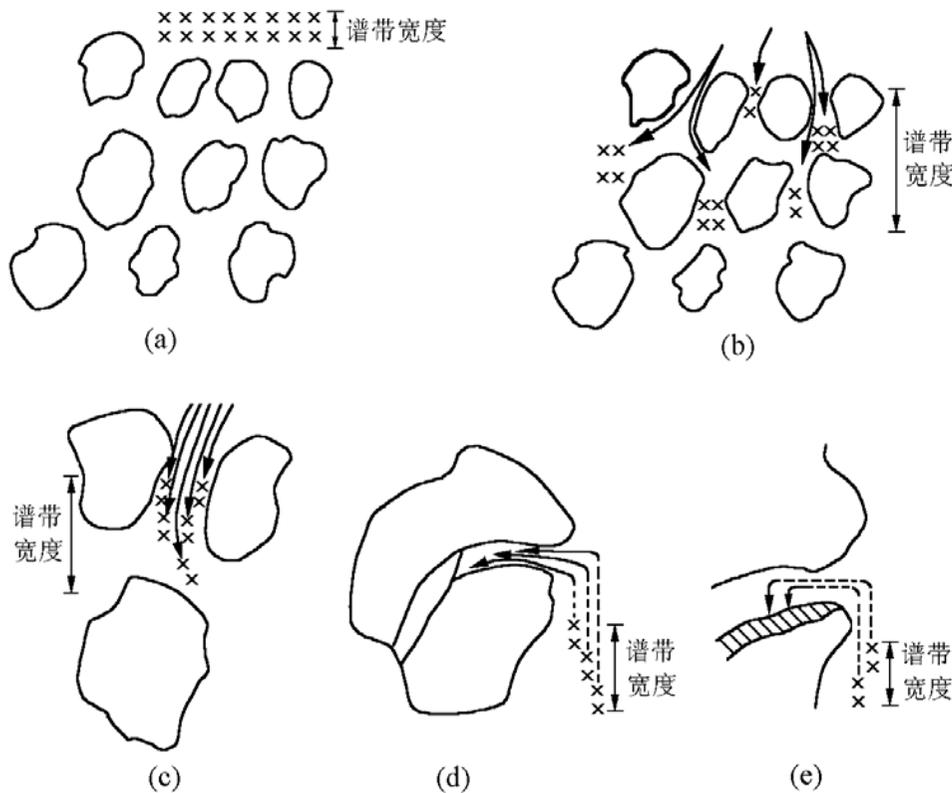
$$H = A + B/u + (C_m + C_s)u$$

其中 $u$ 为流动相线速度,  $A$ 为涡流扩散项因素,  $B$ 为纵向扩散项系数,  $C_m$ 、 $C_s$ 分别为流动相和固定相传质阻力项系数。



# 吉丁斯 (Giddings) 等人导出了液相色谱的速率方程如下：

$$H = \underbrace{2\lambda d_p}_{\text{涡流扩散项}} + \underbrace{2\gamma_m D_m / u}_{\text{纵向扩散项}} + \left( \underbrace{\frac{\omega d_p^2}{D_m}}_{\text{流动相传质阻力项}} + \underbrace{q \frac{k' d_s^2}{(1+k')^2 D_s}}_{\text{固定相传质阻力项}} + \underbrace{\frac{(1-\varepsilon+k')^2}{30(1-\varepsilon)(1+k')^2} \cdot \frac{d_p^2}{r D_m}}_{\text{停滞流动相传质阻力项}} \right) \cdot u$$



液相色谱中各因素对组分在柱中的扩展分布的影响

(a)起始 (b)涡流扩散 (c)流动相传质 (d)停滞流动相传质 (e)固定相传质

$u$ : 流动相线速度;

$\lambda$ : 填充不规则因子;

$d_p$ : 固定相的平均粒径;

$\gamma_m$ : 流动相弯曲因子

(流动相路径弯曲形成的分子扩散障碍)

$D_m$ : 溶质在流动相中的扩散系数

(与温度成正比,与分子量的平方根成反比)

$K'$ : 容量因子/分配容量;

(组分在固定相和流动相中的分配质量之比)

$\varepsilon$ : 固定相的空隙度.

$r$ : 固定相颗粒孔道弯曲有关的因子

## 六、实验内容

- 防腐剂，苯甲酸和山梨酸及其盐类都是常用食品防腐剂，糖精钠是食品中常用的人工甜味剂。
- 我国食品卫生标准规定苯甲酸和山梨酸在饮料中最大使用量均为0.2 g/kg。糖精钠最大使用量为0.15 g/kg。
- 对以上三种食品添加剂测定的标准方法有：薄层色谱法、气相色谱法及高效液相色谱法，
- 而高效液相色谱法可以对各种添加剂同时测定，具有高效、高速、高灵敏度及高自动化等特点。
- 本实验采用高效液相色谱配合多波长紫外检测器，反相色谱法同时测定上述三种食品添加剂，利用保留值定性，外标法定量。

