

第十章 高效液相色谱法

第一节 概述

高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography; HPLC）于60年代末，在经典液相色谱法基础上，引入了气相色谱的理论与实验方法，发展而成的。

1. 高效液相色谱与经典液相色谱方法的比较

高速：HPLC采用高压输液设备，流速大增加，分析速度极快，只需数分钟；而经典方法靠重力加料，完成一次分析需时数小时。

高效：填充物颗粒极细且规则，固定相涂渍均匀、传质阻力小，因而柱效很高。可以在数分钟内完成数百种物质的分离。

高灵敏度：检测器灵敏度极高： UV —— $10^{-9}g$ ，荧光检测器—— $10^{-11}g$ 。

与经典液相色谱法的主要区别:

- 流动相改为高压输送
- 采用高效固定相
- 具有在线检测器
- 仪器化等。

高效液相色谱法与经典液相色谱法性能对比

	经典液相色谱	高效液相色谱(分析型)
固定相	一般规格	特殊规格
固定相粒度(mm)	75~500	3~20
固定相粒度分布(RSD)	20%~30	<5%
柱长(cm)	10~100	7.5~30
柱内径(cm)	2~5	0.2~0.5
柱入口压强(MPa)	0.001~0.1	2~40
柱效(每米理论塔板数)	10~100	$10^4\sim 10^6$
样品用量(g)	1~10	$10^{-7}\sim 10^{-2}$
分析所需时间(h)	1~20	0.05~0.5
装置	非仪器化	仪器化

5

2. HPLC与GC的比较

• **分析对象及范围:** GC只限于气体和低沸点的稳定化合物, 占有机物总数的20%; HPLC可以分析高沸点、高分子量的或热不稳定化合物, 占有机物总数的80%。

• **流动相的选择:** GC流动相为有限的几种“惰性”气体, 只起运载作用, 对组分作用小; HPLC流动相为液体或各种液体的混合。它除了起运载作用外, 还可与组分作用, 并与固定相对组分的作用产生竞争, 即流动相对分离的贡献很大, 可通过溶剂来控制和改进分离。

• **操作温度:** GC需高温; HPLC通常在室温下进行。

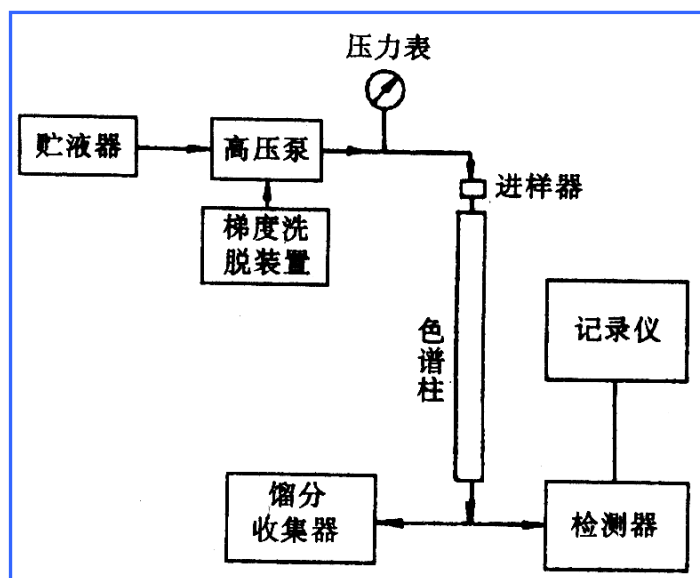
3. 高效液相色谱法的优点:

- ①适用范围广
- ②分离性能好
- ③分析速度快
- ④流动相可选择性范围宽
- ⑤灵敏度高
- ⑥色谱柱可反复使用
- ⑦流出组分容易收集
- ⑧安全。

3. 高效液相色谱法与气相色谱法应用范围对比

气相色谱法具有快速、分离效率高、用样量少等优点，但要求样品能气化，从而常受到限制。300万个有机化合物中，直接适用GC法仅占20%。对于挥发性差或热不稳定的化合物，虽可采取预处理方法，但增加了操作上的麻烦，及增加分析误差。

高效液相色谱法分析对象广，它只要求样品能制成溶液，而不须气化。适用于挥发性低、热稳定性差、分子量大的高分子化合物以及离子型化合物。如氨基酸、蛋白质、生物碱、核酸、甾体、类脂、维生素、抗生素等。分子量较大、沸点较高的有机物以及无机盐类，都可用HPLC法进行分析。



高效液相色谱仪示意图

第二节 高效液相色谱法基本原理

一、高效液相色谱法的分类

高效液相色谱法的分类与经典液相色谱法基本相同。一般都是按照分离机理来分类。

1 按固定相的聚集状态可分为

- 液-液色谱法(LLC)
- 液-固色谱法(LSC)

2 按分离机制可分为

- 分配色谱法
- 吸附色谱法
- 化学键合相色谱法
- 离子交换色谱法
- 分子排阻色谱法
- 亲和色谱法

二、基本原理

高效液相色谱法与气相色谱法的主要差别是**流动相的性质**不同。因此色谱理论中某些公式应用于HPLC时，其表现形式或参数的含义有某些差别。其他与气相色谱基本概念、保留值与分配系数的关系、差速迁移及塔板理论等内容大致相同。

1 保留值的概念

由于液体是不可压缩的，因此在HPLC中，对有些保留值不需校正。

2 分离度

HPLC中分离度理论塔板数及R与N， $r_{2,1}$ ， k' 的关系都与GC完全一致，当然在HPLC中，还提出折合塔板高度的概念

$$h = H/d_p$$

3 影响色谱峰展宽的因素

色谱峰展宽就是指柱内外各种因素引起色谱峰变宽或变形，从而造成色谱柱的柱效降低。

$$\sigma_T^2 = \sigma_{co}^2 + \sigma_{in}^2 + \sigma_{tu}^2 + \sigma_{De}^2 + \sigma_{or}^2$$

σ_{co}^2 为色谱系统观察到的色谱峰扩张的总方差；而 σ_{in}^2 、 σ_{tu}^2 、 σ_{De}^2 、 σ_{or}^2 为进样（系统和方式）、系统连接管、检测器和其他因素引起的色谱峰扩张。除 σ_{co}^2 外，其他因素造成的峰展宽称为柱外展宽，在HPLC中尤为严重。

下面讨论的是影响柱效的柱内因素

（一）Van Deemter方程式

1. 气相色谱的VD方程式

• 气-液色谱填充柱

因传质阻力近似等于液相传质阻力项，所以

$$H = A + B/u + C_1u$$

• 毛细管开口柱

毛细管开口柱，无多径项， $A=0$ 。因此，

$$H = B/u + C_1u$$

2. 液相色谱的VD方程式

(1) 涡流扩散项

$$A = 2 \lambda d_p$$

λ 为不规则填充因子, d_p 为担体颗粒直径, 当填料颗粒直径越小, 粒度范围越均匀, 涡流扩散的影响也越小, 这点与GC相似。

(2) 纵向扩散

$$B = C'_d \cdot D_m / u$$

此与GC在概念上完全一致, 而由于 D_m 比 D_g 要小 10^{4-5} 倍, 所以当HPLC的线速为10mm/s以上时, 可忽略不计。

(3) 流动相传质

$$C_m = C'_m \cdot d_p^2 \cdot u / D_m$$

指试样分子在流动相传质过程中，当流动相流过色谱柱填充物时，靠近固定相表面的流速要比流路通道中间的慢，这种传质影响柱效的变化与线速 u 成正比，与固定相的粒度 d_p 平方成正比。与分子在流动相中的扩散系数 D_m 成反比。而 C'_m 为常数。

(4) 滞留区传质

$$C_{sm} = C'_{sm} \cdot d_p^2 \cdot u / D_m$$

滞留区传质 H_{sm} 指试样分子在固定相孔中滞留区流动相传质过程，在固定相微孔内滞留区的流动相一般是不移动的，因此液流中的试样分子要与固定液进行质量交换时，必须首先自流动相中扩散至滞留区，如果固定相微孔既小又深，则传质速率就慢，峰展宽的影响也就越大。

(5) 固定相内传质

$$C_s = C'_s \cdot d_f^2 \cdot u / D_m$$

试样分子在固定相内传质过程中，主要为液液分配，试样分子从液相进入到固定相（固定液）内进行质量交换的传质过程是取决于固定液的液膜厚度 d_f 和试样分子在固定液中的扩散系数 D_s ，与GC相似。

综上所述，柱内色谱峰展宽所引起板高变化为：

$$H = 2\lambda d_p + \frac{C_d \cdot D_m}{u} + \left(\frac{C'_m \cdot d_p^2}{D_m} + \frac{C'_{sm} \cdot d_f^2}{D_m} + \frac{C'_s \cdot d_f^2}{D_s} \right) \cdot u$$

$$\text{或 } H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

3. 液相色谱影响柱效的讨论

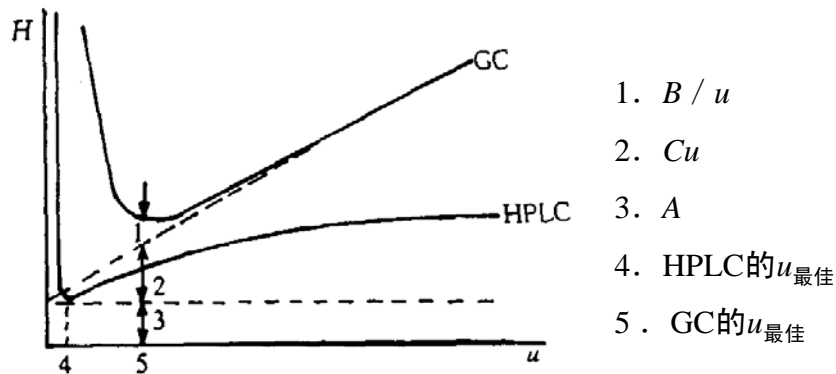
1) 纵向扩散项

液相VD方程式与气相色谱的区别，主要表现在 (B/u) 及传质阻力项 (Cu) 的差别上。首先 $B=2\gamma D_m$ ， D_m 是被分离组分在流动相中的扩散系数(GC中用 D_g 表示)。在HPLC中，流动相是液体，粘度 (η) 比气体大得多，柱温又比GC低得多(LC多采用室温)，而 $D_m \propto T/\eta$ ，因此HPLC的 D_m 比GC的 D_g 约小 10^5 倍。其次为节约分析时间，在HPLC的流速至少是最佳流速的3~5倍。这些因素都促使纵向扩散项 B/u 可忽略，于是在HPLC中

$$H = A + Cu$$

上式说明，在HPLC中，可以近似认为流动相的流速与板高成直线关系， A 为截距， C 是斜率。流速增大，板高增加，色谱柱柱效降低。为了兼顾柱效与分析速度，一般都尽可能地采用较低流速。内径(ID) 为4.6mm柱，流量多采用1 ml / min。

流动相的流速对GC与HPLC板高影响的差别如下图所示。



流动相流速对GC与HPLC的柱效影响对比

2) 涡流扩散项

$A = 2 \lambda d_p$ (λ : 填充不规则因子)。为了使 A 减小, 提高色谱柱柱效, 可从两方面采取措施:

- ①降低 d_p 目前商品柱多采用 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 粒径的固定相。
- ②降低 λ 采用球形、窄粒度分布($RSD < 5\%$)固定相及匀浆装柱。球形固定相, 除能降低 λ 外, 还能增加柱渗透性, 降低柱压。但固定相粒度越小, 越难装均匀, 因此需采用高压、匀浆装柱法。

** $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 球形固定相, 柱效可达 $8 \sim 5 \times 10^4/\text{m}$ 到 $1 \times 10^5/\text{m}$ 。

3) 传质阻力项

传质阻力项是传质阻力系数与流动相流速之积。与GC不同，在HPLC中传质阻力系数由三个系数组成：

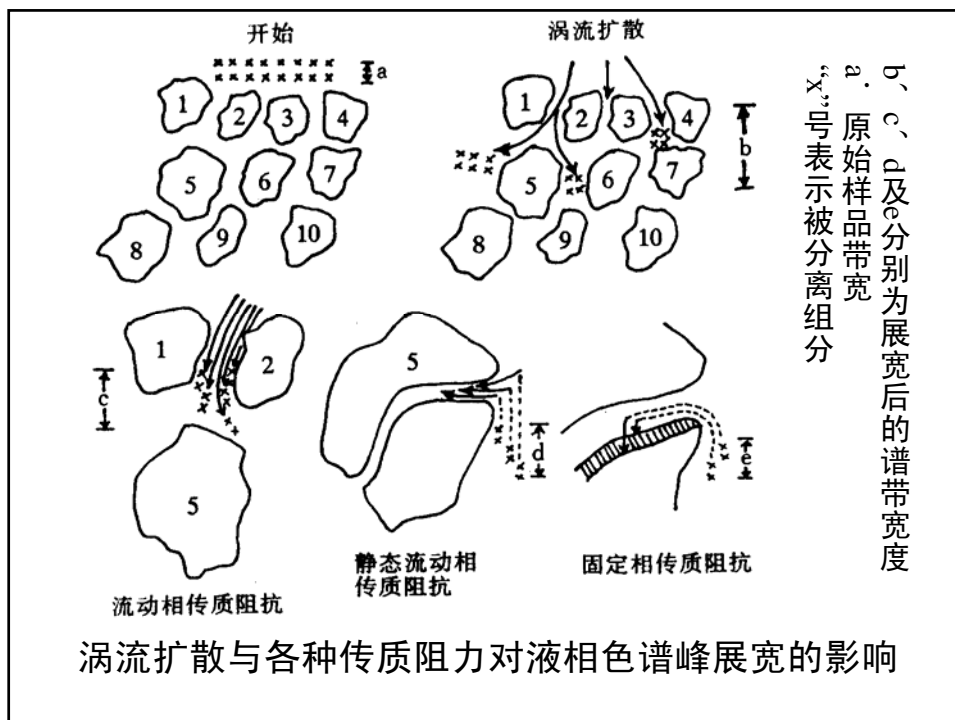
$$C = C_m + C_{sm} + C_s$$

C_m 、 C_{sm} 及 C_s 分别是组分在流动相、静态流动相和固定相中的传质阻力系数。只有使用厚涂层、并具有深孔的IEC中 C_s 才起作用。采用化学键合相后，“固定液”是键合在载体表面的官能团单分子层。因此传质阻力可以忽略。 $C=C_m+C_{sm}$ ，得：

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

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

上式是Van Deemter方程式用于HPLC最常见的表现形式。该式说明，HPLC色谱柱的理论塔板高度，主要由涡流扩散项、流动相传质阻力项和静态流动相传质阻力项三项所构成。各种阻力项对色谱峰展宽的影响如下图所示。



4. HPLC分离条件的选择

这里主要讨论传质阻力对板高的影响。

$$C_m = C'_m(d_p^2/D_m) \quad C_{sm} = C'_{sm}(d_p^2/D_m)$$

其中 d_p 是固定相粒径， D_m 是被分离组分分子的扩散系数。 C'_m 与 C'_{sm} 是两个比例系数。要提高柱效，可从减小 d_p 增大 D_m 入手。因 $D_m \propto T/\eta$ ，故采用低粘度流动相或增加柱温的方法。但增加柱温易产生气泡，因此改善柱效**主要靠采用低粘度流动相**，还可以降低柱阻。

**例如，虽然甲醇有害，却在HPLC中广泛使用，而很少用乙醇。因为甲醇粘度(0.6Pa·s)只有乙醇粘度一半的缘故。

提高HPLC柱效的方法：

- ①采用小粒度、窄分布的球形固定相，首选化学键合相，用湿匀浆法装柱。
- ②采用低粘度流动相，低流量（1 ml/min）。
- ③柱温以25°C为宜。太低则使流动相粘度增加。用水溶液为流动相的色谱分离方法（如IEC等）可按需要升温。

（二）Giddings偶合式简介

Giddings认为VD方程式中影响塔板高度的各项因素**并不是孤立的**。而且证明了**涡流扩散项A与流动相传质阻力项是偶合的**。因为一个分子不可能一直在一个流路中迁移，而保持在流路中心的分子与处于边缘的分子间的速度差不变。由于柱中存在着**径向**扩散作用，分子在另一瞬间可能进入到另一流路中，改变了在原流路中的速度差关系，甚至于相互抵消。因此，一组分子在一个流路中存在的迁移速度差所产生的流动相传质阻力项（ $C_m u$ ），必然与由一组分子走多径所引起的涡流扩散项（ A ）相关联。由于它们之间存在着相互抵消作用，使它们对峰展宽的贡献，小于它们单独贡献之和。

因此Giddings导出了用二项倒数和的倒数表示的偶合式:

$$H = \left(\frac{1}{A} + \frac{1}{C_m u} \right)^{-1} + B/u + C_{sm} u + C_s u$$

$$H = H_A + H_d + H_{sm} + H_s$$

H_A 称为偶合项。Giddings偶合式通式说明塔板高度由 H_A 、 H_d 、 H_{sm} 和 H_s 四项组成。在一般高效液相色谱法中 $H=H_A+H_{sm}$ ；在填充气相色谱法中 $H=H_A+H_d+H_s$ ，各符号的含义同前。

19

(三) 折合参数板高方程

为了比较不同色谱条件下的板高，Giddings提出折合板高 h (reduced plate height) 和折合流速 u_r (reduced velocity)。

(1) 折合板高 $h = H/d_p$

折合板高以填料粒径为尺度来衡量塔板高度。

(2) 折合流速 $u_r = u \cdot d_p / D_m$

折合流速是扩散速度在填料粒度范围内的归一化，即流动相流经一颗填料的线速度与扩散速度之比。

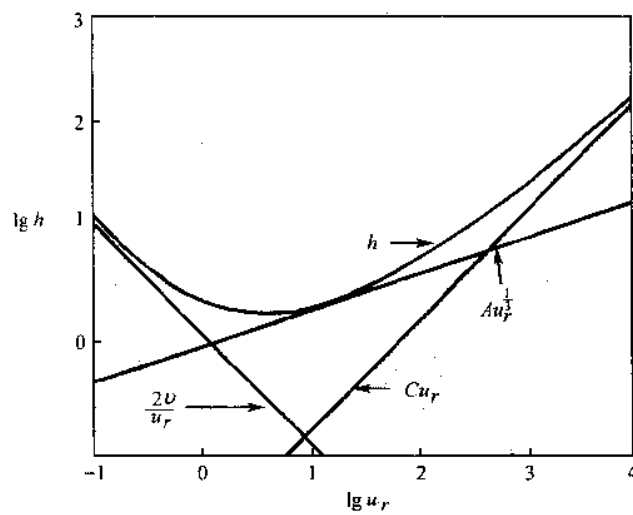
(3) 折合柱长 $l = L/d_p$

折合柱长用填料粒径来度量色谱柱长。

Knox 根据折合参数导出一个描述高效液相色谱区带扩张与流速关系的半经验折合参数板高方程

$$h = Au_r^{1/3} + \frac{B}{u_r} + C \cdot u_r$$

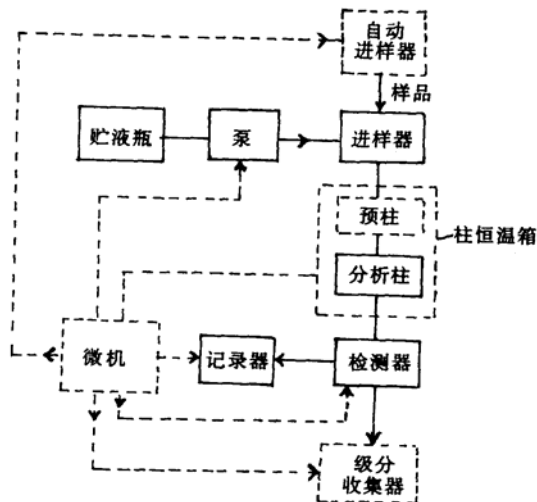
式中A、B、C为常数，其含义与Van Deemter方程相似，A项即涡流扩散项为由实验导出的实用的经验关系。



从图中可了解很多有意义的信息：如曲线平直，最低点过高（如 $h_{\min} = 10$ ），则A值大了，说明柱子填充不均匀；若曲线右边上升部分陡峭（如 $ur = 20$ 左右，而 $h = 10$ ）意味着C值大了，可能是填料质量不佳。

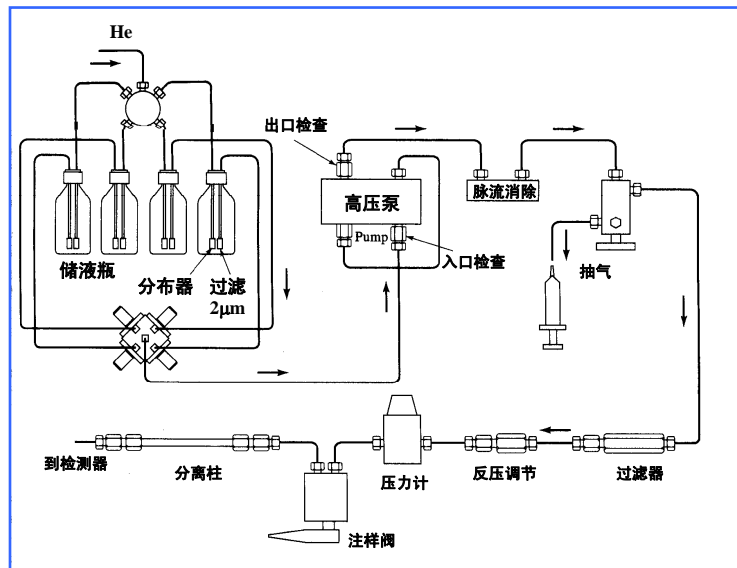
由 h 和 d_p 值还能求出 H 和 N ，
 如 $h = 2.5$ ，使用 $5 \mu\text{m}$ 填料
 则 $H = 2.5 \times 5 = 12.5 \mu\text{m}$
 相当于 $80,000$ 塔板/米

第三节 高效液相色谱仪



高效液相色谱仪示意图

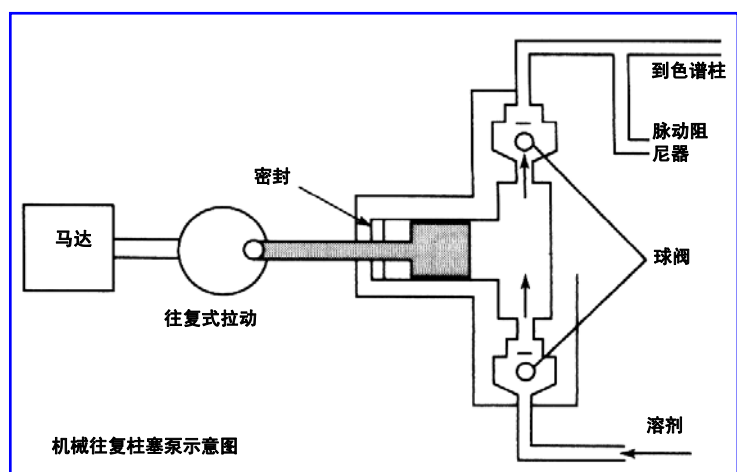
(虚线表示不是所有仪器都有的装置)



高效液相色谱仪详细流程图

一、输液泵

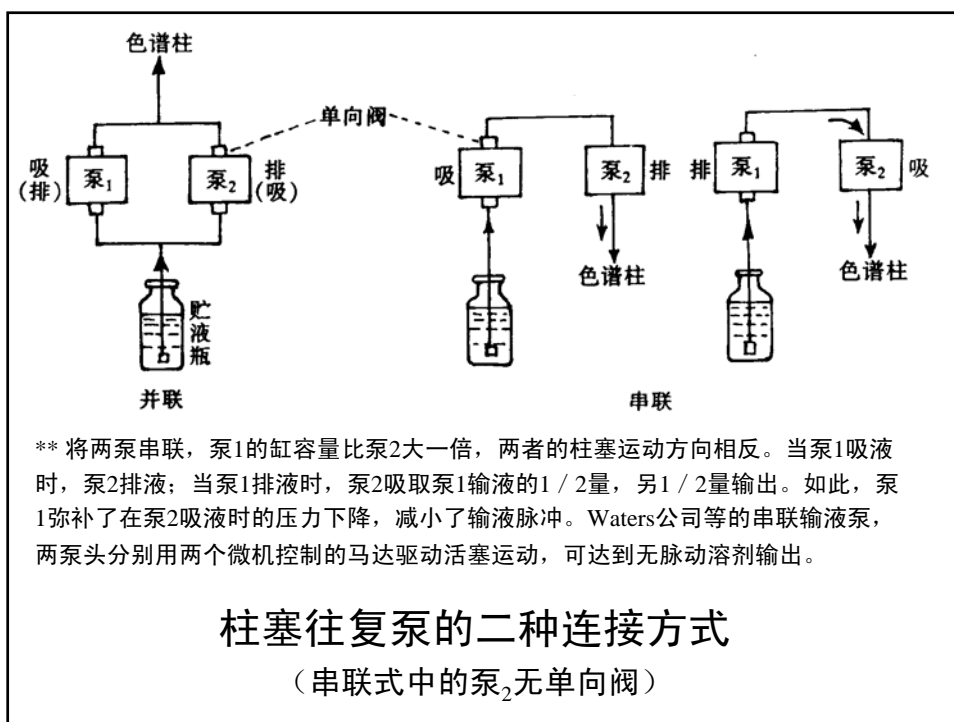
目前多用柱塞往复泵。



柱塞往复泵示意图

1 柱塞往复泵

分析型的柱塞往复泵容积一般只有0.1~1 ml，容易清洗和更换流动相。柱塞往复泵属于恒流泵，流量不受柱阻影响。泵压一般最高为40Mpa。这类泵的优点很多，但输液的脉动性较大是其缺点。目前多采用双泵补偿法克服脉动性。按泵联接方式分为并联与串联式，后者较多，因为它（见下图右）可节约一对单向阀。



输液泵的要求:

无脉动、流量恒定、并可自由调节。一般流量变化要求在2%~3%以内(高级输液泵的精密度RSD可达±0.075%)。还要求耐高压、耐腐蚀、适于进行梯度洗脱等。

2 梯度洗脱装置

按多元流动相的加压与混合顺序,可分为高压与低压梯度两种洗脱装置。**高压二元梯度洗脱**是由两个输液泵分别各吸一种溶剂,加压后再混合,混合比由二个泵的速度决定。**低压梯度洗脱**是用比例阀将多种溶剂按比例混合后,再加压输至色谱柱。低压梯度便宜,且易实施多元梯度洗脱,但**重复性**不如高压梯度洗脱装置。

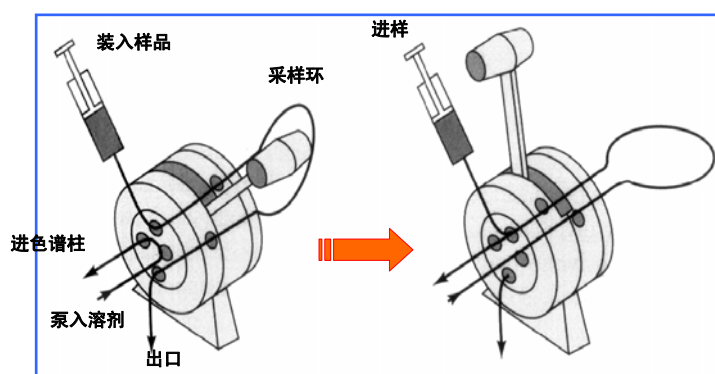
梯度洗脱的缺点是重复性不如恒组成洗脱。

二、色谱柱与进样器

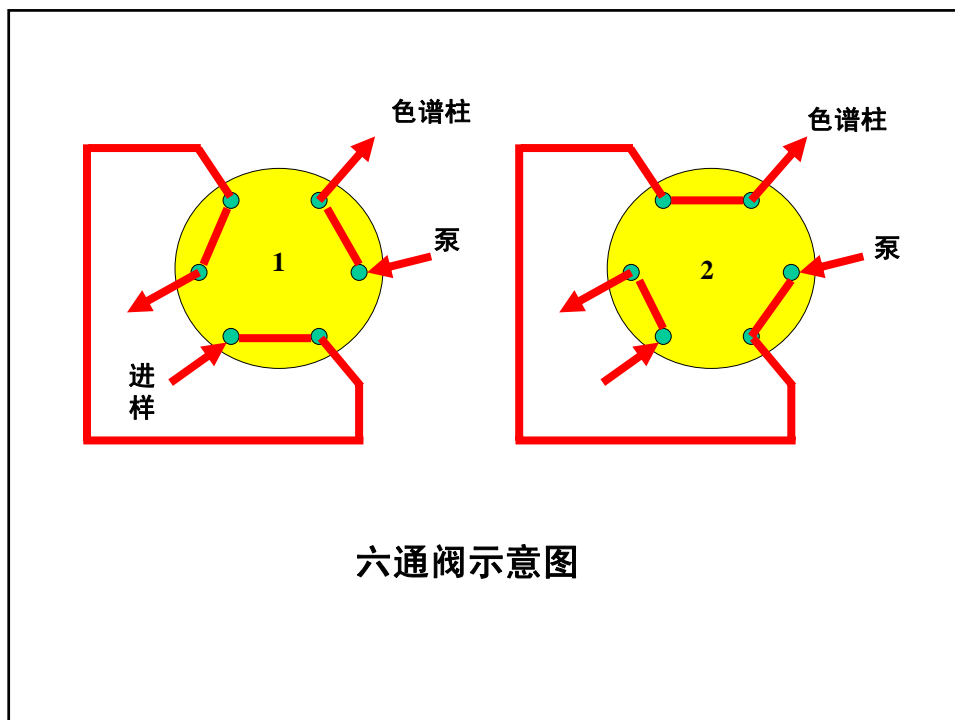
色谱柱是色谱仪最重要的部件。完整的色谱柱系统包括进样器、色谱柱、柱的进出口接头及至检测器的导管等。现选主要部分叙述如下：

1 进样器

进样器装在色谱柱的进口处，目前产品都配置六通进样阀（下图）。样管的体积固定，可按需更换。优点：进样量准确；重复性好；可带压进样等。



六通进样阀



2 色谱柱

柱管多用不锈钢制成，管内壁要求具有很高的光洁度。固定相采用匀浆法高压(50~100MPa)装柱。

- 分析型常量柱:内径(I.D.)2~4.6mm，柱长10~25cm
- 半微量柱:内径1~1.5mm，柱长10~20cm
- 微径柱: 内径0.05-0.75mm
- 实验室制备型柱内径20~40mm，柱长10~30cm。

3 色谱柱柱效的评价

柱效评价可了解所用色谱柱是否合乎要求。

《中国药典》1995版附录中规定，用高效液相色谱法或气相色谱法建立分析方法时，需进行“**色谱条件与系统适用性试验**”，给出分析状态下色谱柱（应达到的）最小理论塔板数、分离度和拖尾因子。分析样品时，需检验柱性能是否合乎要求。可见柱效评价的重要意义。常用色谱柱柱效评价条件见教科书。

4 色谱柱的再生

色谱柱价格较贵，再生可以延长使用柱寿命。

- 反相色谱柱以甲醇-水（95:5，V/V）、纯甲醇及一氯甲烷等为流动相，依次冲洗，顺序不得颠倒。每种流动相的冲洗体积应20倍于柱体积。然后，再以相反顺序依次冲洗。
- 正相色谱柱(含硅胶柱)以严格脱水的正己烷、异丙醇、一氯甲烷及甲醇为流动相，依次冲洗，顺序不得颠倒。其它步骤同上。

三、检测器

高效液相色谱仪的检测器是反映色谱过程中组分的浓度随时间变化的部件。要求检测器：

- 灵敏度高
- 噪声低
- 线性范围宽
- 重复性好
- 适用化合物的种类广

常用检测器种类

- 紫外检测器（UVD）应用最多。
- 荧光检测器（FD）灵敏度较高。
- 电化学检测器（ECD）
- 示差折光检测器（RID）是泛用型检测器，灵敏度不高。
- 蒸发光散射检测器（ELSD）新型检测器。
- 发光检测器是有发展前途的新型检测器。

(一) 紫外检测器

紫外检测器(ultraviolet detector; UVD或UV)

检测原理

测定样品组分通过流通池时对特定波长紫外线的吸收, 获得浓度-时间曲线。浓度与吸光度的关系服从Lambert-Beer定律。检测系统由光源、流通池(池体积一般为8mL)、检测元件、工作站及记录器等组成。

紫外检测器特点

- 灵敏度高。最高可达0.001 AUFS—满度吸光度单位); 噪音低, 最小检出量可达 $10^{-7} \sim 10^{-12}g$ 。
- 不破坏样品, 能与其它检测器串联, 可用于制备。
- 对温度及流动相流速波动不敏感, 可用于梯度淋洗。

属浓度型检测器

弱点:

- ①只能检测有紫外吸收的样品
- ②流动相的选择有一定限制，检测波长必须大于流动相的截止波长。

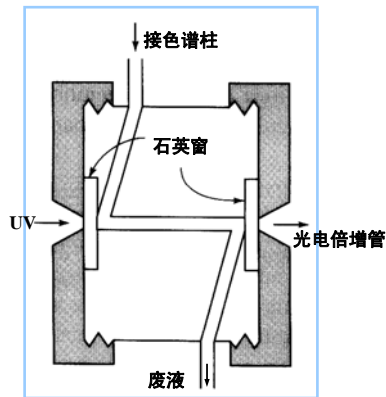
** 截止波长

用1cm光径的吸收池装溶剂，用空气为参比，改变照射波长，当吸光度 $A=1$ 时，此时的波长称为该溶剂的截止波长。例常用纯溶剂的截止波长：水190、乙腈190、甲醇205、正己烷210、乙醚220、四氢呋喃225、二氯甲烷245及氯仿245nm。

紫外吸收检测器的类型

• 可变波长型检测器

波长可按需要选择。可选择被测组分的最大吸收波长为检测波长，以增加检测灵敏度。但由于光源是通过单色器分光后再照射到样品上，照射光强度相应减弱。因此，这类检测器对检测元件（光电转换元件）及放大器都有较高的要求。由于约80%的物质可以产生紫外吸收。因此UVD是HPLC最常用的检测器。其光学结构与一般的紫外分光光度计一致，主要区别是用流通池替代了比色池。



可变波长紫外检测器

(吸收池为微量吸收池, 通常其光程为2-10mm, 体积约为1~10 μL 。)

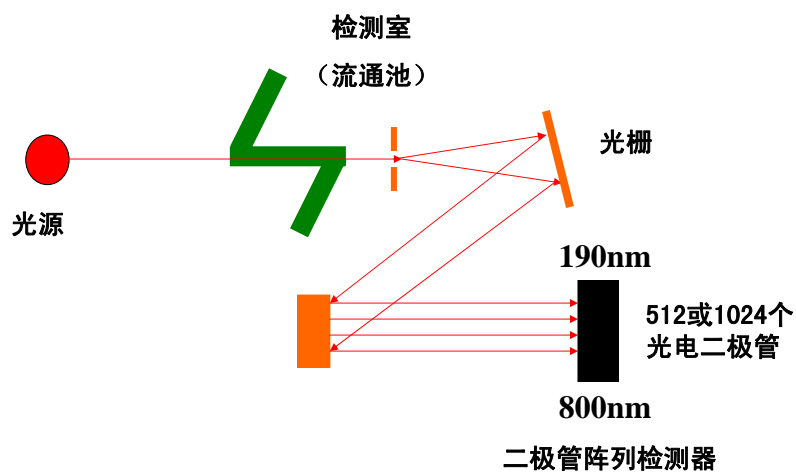
• 二极管阵列检测器

(photodiode array detector, DAD, PDA)

由于有些色谱组分在流通池中停留时间很短 (<1秒), 普通紫外分光光度计的扫描速度跟不上, 若停留扫描则破坏了分离状态。因而, 在50年代出现了DAD。一般是一个光电二极管对应接受光谱上一个纳米 (nm) 谱带宽度的单色光。

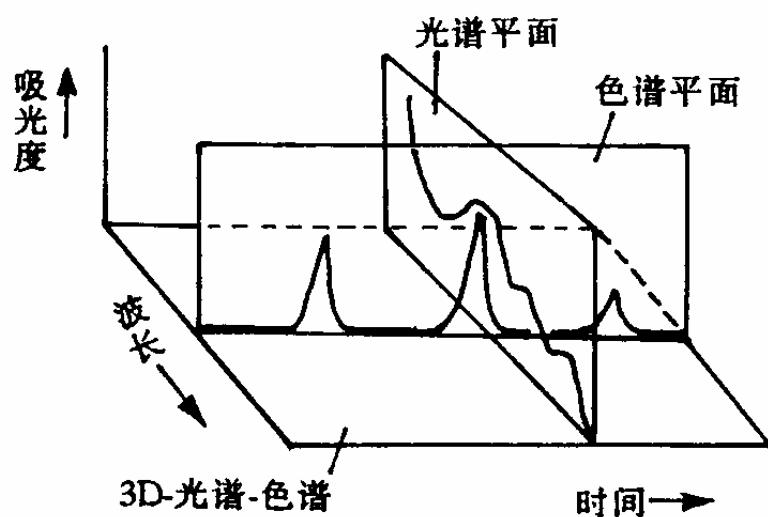
工作原理

当复**合**光透过流通池后，被组分选择性吸收，此时透过光具有了组分的光谱特征。此透过光（复**合**光）被光栅分光后，形成组分的吸收光谱，照射到光电二极管阵列装置上，使每个纳米光波的光强变成相应的电信号强度，因信号弱需经多次累加，而后给出组分的吸收光谱。这种记录方式不需扫描，因此最短能在几个毫秒的瞬间内获得流通池中色谱组分的吸收光谱。

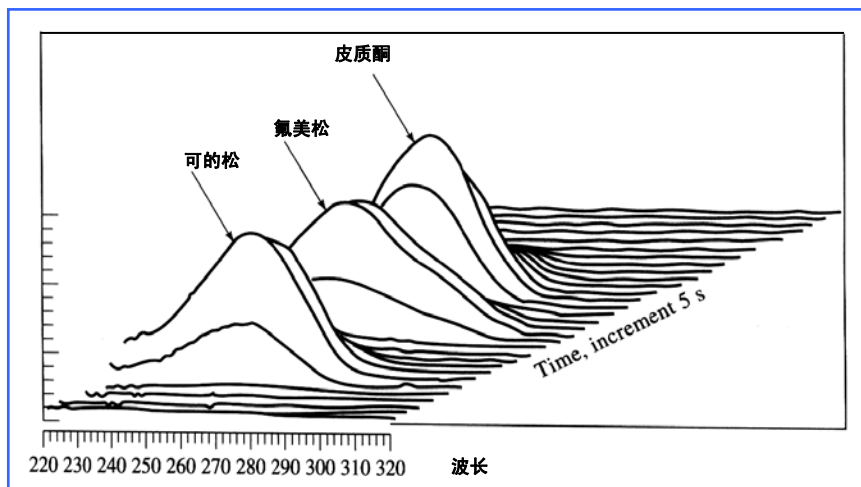


光电二极管阵列检测器示意图

用二极管阵列装置可以同时获得样品的色谱图（ $C-t$ 曲线）及每个色谱组分的吸收光谱（ $A-l$ 曲线）。色谱图用于定量，光谱图用于定性。也可以用计算机将这两种图谱绘在一张三维坐标图上（ $X-t$ 、 $Y-A$ 、 $Z-l$ ），而获得三维光谱-色谱图（3D-spectrochromatogram）。可以在一张三维色谱图上，同时得到定性、定量信息。



3D-光谱-色谱示意图



光电二极管阵列检测所获得的三维色谱-光谱图

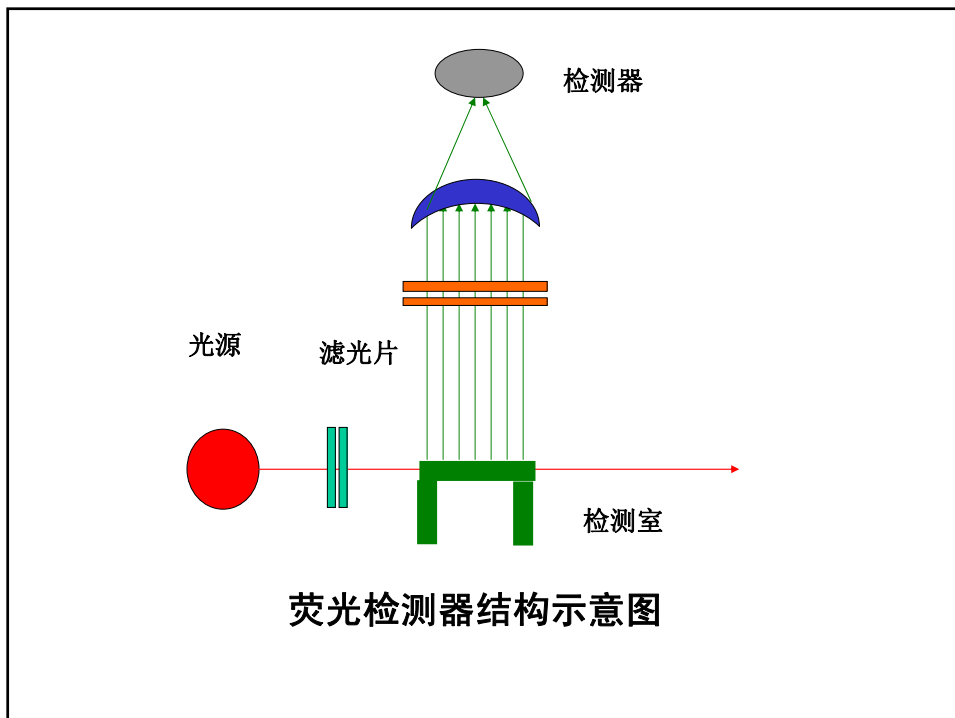
紫外检测器应用范围

紫外检测器的检测灵敏度高，但主要用于检测具有p-p或p-p共轭结构的化合物。如芳烃与稠环芳烃、芳香基取代物、芳香氨基酸、核酸、甾体激素、羧基与羰基化合物等。检测只含有p-p共轭结构的化合物（脂肪酸、酮及醛等）时，需用末端吸收。

(二) 荧光检测器

(fluorophotometric detector; FD)

具有流通池的荧光分光光度计。荧光检测器的检测限可达 $1 \times 10^{-10} \text{g/ml}$ ，比紫外检测器灵敏度高2~3个数量级，但只适用于能产生荧光或其衍生物能发荧光的物质。



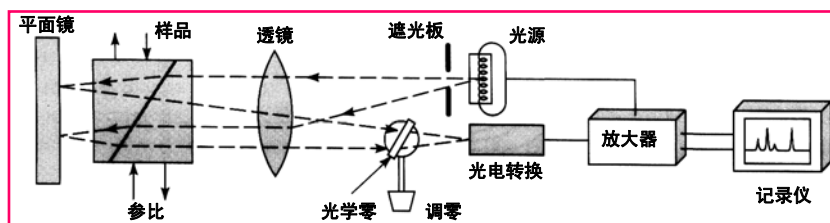
应用范围

主要用于氨基酸、多环芳烃、维生素、甾体化合物及酶类等的检测。在用于氨基酸检测时，由于多数氨基酸无荧光，需用柱衍生法制备衍生物。衍生法分为柱前与柱后衍生二种方法。常用邻苯二甲醛（OPA）或异氰硫基苯（PICO-TAG法）为衍生化试剂，是分析氨基酸应用最广的方法之一。

（三）示差折光检测器

原理：利用两束相同角度的光照射溶剂相和样品+溶剂相，利用二者对光的折射率不同，其中一束光（通常是通过样品+溶剂相）因为发生偏转造成两束光的强度差发生变化，将此差示信号放大并记录，该信号代表样品的浓度。

为通用型检测器，灵敏度为 $10^{-7}g/mL$ 。但对温度变化敏感，且不适于梯度淋洗。



示差折光检测器示意图

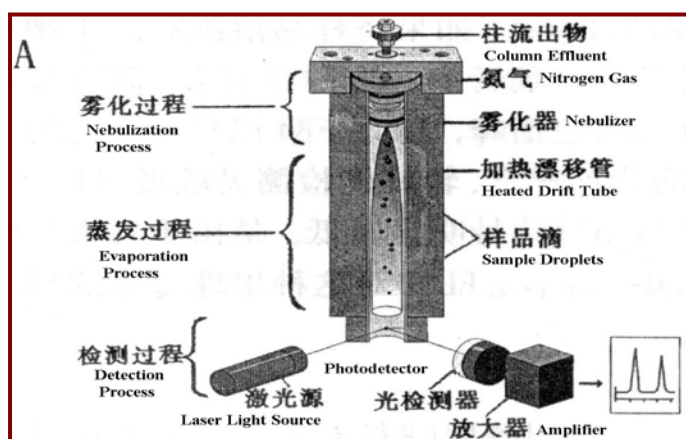
(四) 蒸发光散射检测器

(evaporative light scattering detector, ELSD)

90年代出现的最新型的通用检测器。理论上可用于检测挥发性低于流动相的任何样品组分，但对有紫外吸收的组分的检测灵敏度较低，主要用于糖类、高分子化合物、高级脂肪酸及甾体类等化合物检测。检测糖类时，最小检测量为5ng葡萄糖。ELSD还可用于凝胶色谱及超临界流体色谱的检测。

工作原理

将流出色谱柱的流动相及组分先引入通载气（常用高纯氮）的蒸发室，加热，使流动相蒸发而除去。样品组分在蒸发室内形成气溶胶，被载气带入检测室，用激光或强光照射气溶胶而产生散射光（丁铎尔光效应），测定散射光强而获得组分的浓度信号。



蒸发光散射检测器示意图

（适合于无紫外吸收、无电活性和不发荧光的样品的检测。）

散射光强 I 与进入检测器的气溶胶中组分的质点的“质量和” m 的关系为:

$$I = km^b$$

k 、 b 是两个与实验条件有关的常数（是取对数后的截距与斜率）。

（五）化学发光检测器

（chemoluminescence detector, CL）

化学发光检测器是近年来发展起来的高选择性及高灵敏度的新型检测器。该检测器**设备简单**，自身发光**不需光源**，**价格便宜**，而且**可以自制**，是一种有发展前途的检测器。化学发光反应常用酶为催化剂，将酶标记在待测物、抗原或抗体上，可进行**药物代谢分析及免疫发光分析**。该检测器在药物分析与药理研究上，刚开始应用，应用前景良好。

检测原理

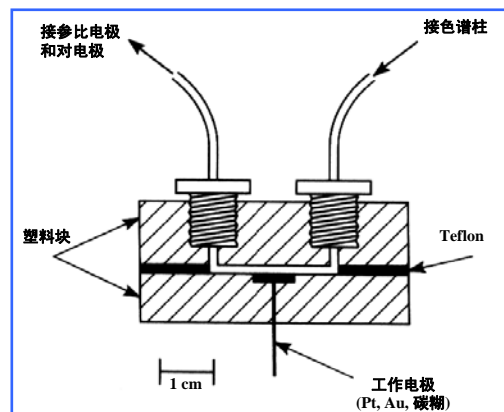
某些物质在常温下与发光试剂反应，生成处于**激发态**的产物，当它们由激发态**返回基态**时发射光子。由于物质激发态的能量来源于化学反应，因此称为化学发光。当被分离**组分**由色谱柱流出后，**与发光试剂反应**，而产生光辐射，其**光强与该组分的浓度成正比**。这种检测器的最小检测量可达**pg级**(10^{-12}g)。

(六) 安培检测器 (ampere detector, AD)

电化学检测器包括安培检测器、电导检测器及极谱检测器等。电导检测器主要用于离子色谱，安培检测器与极谱检测器可用于可氧化、还原的物质的检测。安培检测器**应用较广**，对有机还原性物质的检测限可达 $1 \times 10^{-12}\text{g} / \text{ml}$ ，**灵敏度很高**，但**不能检测不能氧化、还原的物质**。

检测原理

利用组分的氧化还原反应产生电流的变化，而进行检测。检测器相当于一个微型电解池。当被分析组分通过电极表面，在两电极间施加超过该组分氧化（或还原）电位的恒定电压时，在工作电极表面发生氧化或还原反应，两电极间就有电流通过，此电流大小与待测物浓度成正比。缺点是易受环境温度影响。



安培检测器示意图

由恒电位仪和一薄层反应池（体积为 $1\sim 5\mu\text{L}$ ）组成。流动相必须含有电解质，且呈化学惰性。它最适于与反相色谱匹配。

（七）电导检测器

电导检测器主要用于离子色谱及生物色谱纯化系统的检测。

工作原理：是基于待测物在一些介质中电离后所产生的电导（电阻的倒数）变化来测量电离物质的含量。电导检测器的主要部件是电导池。其响应受温度影响较大，因此需要将电导池置于恒温箱中。另外，当 $\text{pH}>7$ 时，该检测器不够灵敏。

第四节 固定相（stationary phase）

又称为填料，是高效液相色谱法的关键组成部分，它直接关系到柱效与分离度。

一 固定相分类

1 按承受压力分

刚性固体： SiO_2 基质，耐压 $7.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9 Pa$ 。

可制成直径、形状和孔隙深度不同的颗粒；主要用于吸附、分配和键合色谱；

硬 胶：聚合物基质（常用苯乙烯与二乙烯苯交联而成），耐压上限为 $3.5 \times 10^8 Pa$ ，主要用于离子交换和体积排阻色谱。

2 按孔隙深度分

表多孔型：在实心玻璃珠表面覆盖一层多孔活性材料（如硅胶、氧化铝、分子筛、聚酰胺等）。表面多孔型固定相颗粒大（易装柱）、多孔层厚度小且孔浅（渗透性好，出峰快）；但交换容量小。适于常规分离分析。

全多孔型：全部由硅胶或氧化铝微粒聚集而成，因颗粒极细，因而孔径小、传质快、柱效高。特别适于复杂混合物的分离。

二 液-固色谱固定相

具有吸附活性的吸附剂。常用的有**硅胶**、**氧化铝**及**高分子多孔微球**（有机胶），其次还有分子筛及聚酰胺等。

1 硅胶

硅胶分为表孔硅胶、无定形全多孔硅胶、球形全多孔硅胶及**堆积硅珠**等类型。因表孔硅胶粒度大、柱效低，已淘汰，只介绍后三种。



a

表孔硅胶



b

无定形全多孔硅胶



c

球形全多孔硅胶



d

堆积硅珠

各种类型硅胶示意图

(1) 无定形全多孔硅胶：（代号YWG，Y液、W无、G硅）

近似球形（上图b），粒径一般为 $5\sim 10\mu\text{m}$ 。理论塔板数可达5万 \sim 2万/米左右。YWG载样量大，可作为分析型与制备型柱的固定相，还可作为载体使用。

优点：**价格便宜、柱效较高、载样量大。**

缺点：**涡流扩散项大、柱渗透性差。**

(2) 球形全多孔硅胶：（国内代号YQG）

常用粒径 $3\sim 10\text{mm}$ 。YQG除具有YWG的优点外，还具有**涡流扩散项小及渗透性好**等优点。粒径可小至 $3\mu\text{m}$ ，柱效可达每米8万。

(3) 堆积硅珠：（堆积硅珠也属球形硅胶，国内代号YQG）

由二氧化硅溶胶加凝结剂聚结而成。堆积硅珠亦属全多孔型，与球形全多孔硅胶类似，粒径只有3~5 μm，理论塔板数可达8万/米，**传质阻抗小，样品容量大**，也是一种较好的高效填料。

硅胶是应用较广的（正相）固定相，主要用于分离溶于有机溶剂的**极性至弱极性的分子型化合物**。也可分离**某些几何异构体**，但不如氧化铝。

2 高分子多孔微球（YSG）

也称有机胶。常用的是由苯乙烯与二乙烯苯交联而成，如日立3010胶。该固定相可用于分离芳烃、杂环甾体、生物碱、油溶性维生素、芳胺、酚、酯、醛、醚等化合物等。多数认为其分离机制属于**吸附作用**，也有认为是**吸附、分配及空间排斥**作用兼有。有机胶表面为芳烃官能团，流动相为极性溶剂，相当于反相洗脱。这种固定相的柱效低（ 10^3m^{-1} ），但选择性好，峰形好。

三 化学键合固定相 (Chemically bonded phase)

用化学反应法将固定液的官能团键合在载体表面上，所形成的填料，简称键合相。

键合固定相优点：

- ① 使用过程中官能团不流失，
- ② 化学性能稳定，在pH2~8的溶液中不变质，
- ③ 热稳定性好，一般在70℃以下都稳定，
- ④ 载样量大，比硅胶约高一个数量级，
- ⑤ 适于作梯度洗脱。

1 化学键合相特点

一般的化学键合相具有分配作用及一定的吸附作用，吸附作用的大小，视键合覆盖率而定。用化学反应方法将载体表面上残存的硅醇基除去，称为封尾、封顶或遮盖 (end-capping)，所形成键合相称为封尾键合相。这种键合相没有吸附作用，但是缺点强疏水。



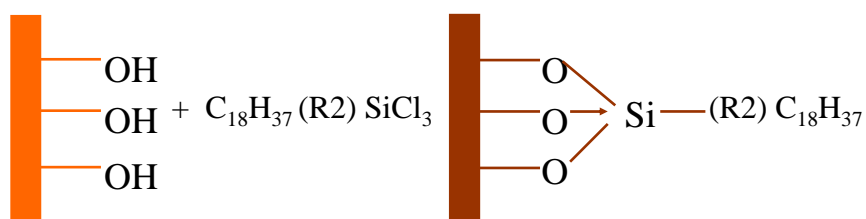
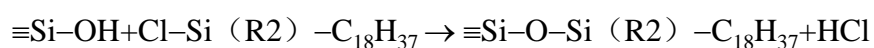
羟基键合相表面结构示意图

2 化学键合相的分类

化学键合相在高效液相色谱法中占有极重要的地位。目前多用Si-O-Si-C（硅氧烷）型键合相。按极性可将其分为非极性、中等极性与极性三类。键合相的性质与键合官能团性质、链长、载体性质及表面覆盖度等有关。

1) 非极性键合相

表面键合的基团为非极性烃基，如C₁₈（ODS，octadecyl silyl）、C₈、C₄与苯基（可诱导极化）等。ODS键合相是最常用的非极性键合相。其键合反应简化如下：



若上式的R₂是两个甲基，则构成**高碳**ODS键合相。这种键合相载样量大、吸附性能也大。若R₂是一个甲基，一个氯，氯与硅胶的另一个硅醇基再脱一分子HCl，则生成**中碳**ODS键合相。若R₂是两个氯，与另二个硅醇基再脱二分子HCl，生成**低碳**ODS键合相。

2) 中等极性键合相

常见的有醚基键合相(如YWG-ROR')。这种键合相可作正相或反相色谱的固定相，视流动相的极性而定。

3) 极性键合相

常用氨基(-NH₂)、氰基(-CN)极性键合相。分别将氨丙硅烷基[-Si(CH₃)₂NH₂]及氰乙硅烷基[Si(CH₃)₂CN]键合在硅胶上而制成。它们可用作正相色谱的固定相。可代替吸附剂硅胶，但由于表面键合降低了原有的活性机时保留时间重现性好，并得到较好的峰形，同时也改善了化合物的分离。

a) 氰基的极性小于硅胶，与硅胶有类似的选择性，对酸、碱化合物很少拖尾，由于氰基三键的存在，对双键异构体有很好的选择性。

b) 氨基是极性功能团并且呈碱性，显然它的选择性与呈弱酸性的硅胶表面有很大的区别。并且氢键作用力很强，导致多功能团化合物有很好的分离，如甾类和强心甙等。

c) Diol 键合相是由键合的环氧硅烷相水解而制备的。可用于强极性化合物的制备。

3 键合相载体

1) 载体性质

多数产品采用全多孔YWG、YQG或堆积硅球作为ODS键合相的载体。载体的比表面决定键合基团的总量，总量大， k 大，保留时间长。涡流扩散项与柱渗透性，取决于载体的形状，以球形为好。

键合相的常见型号。

国产品:

YWG-C₁₈H₃₇, (5、10μm)、

YQG-C₁₈H₃₇, (堆积硅珠, 3~5μm)

YWG-C₆H₅(5、10μm)等

固定相代号的前部为载体, 后部为官能团。

进口品:

NucleosilC₁₈(球形, 3或5μm)

Partisil 5-ODS(无定形, 5μm)等

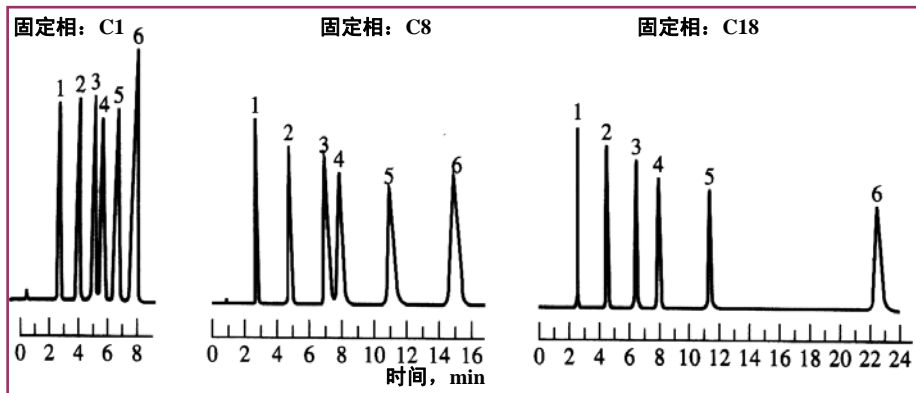
2) 表面覆盖度

在硅胶表面, 每平方纳米约有6个硅醇基可供化学键合。由于键合基团的立体结构障碍, 使这些硅羟基不能全部参加键合反应。参加反应的硅羟基数目占硅胶表面硅羟基总数的比例, 称为该固定相的表面覆盖度。覆盖度的大小, 决定键合相是分配, 还是吸附占主导。Partisil-ODS的表面覆盖度为98%, 即残存2%的硅羟基, 分配占主导。Partisil 10-ODS的表面覆盖度为50%, 既有分配又有吸附作用。封顶键合相只有分配作用, 如国内产品YWG-FN是用氟酰胺遮盖了硅胶的一些吸附部位, 分离效果良好, 但疏水性强, 同样分离条件下, 柱压高于普通键合相柱。

3) 键合基团的链长

链长增加，极性降低，载样量增大、 k 值增大，例 C_{18} 大于 C_8 。ODS键合相最大允许载样量为每克固定相 $2 \times 10^{-3}g$ 。

一般认为较长烷基链和较高键合量的固定相对较大的非极性溶质分离选择性比小分子溶质选择性好。键合烷基C6—C12之间，对小分子溶质选择性随碳链增加而增加，C12以上基本不变。键合烷基链之间的距离大约是0.9—0.95nm，当链长较长时，对小分子溶质来说可以钻进液珠状的键合相内。溶质在这种键合层与流动相之间的分配与链长无关，但在链长较短时，吸附因素变大，从而引起选择性变化。另有文献报道，当链长超过C4时，蛋白质在洗脱时严重变性。



硅胶-烷基键合相中烷基链长对反相色谱分离的影响

1-尿嘧啶; 2-苯酚; 3-乙酰苯; 4-硝基苯; 5-苯甲酸甲酯; 6-甲苯

四 其它固定相

1 离子交换剂

- 离子交换树脂 (基本上已被键合型离子交换剂替代)
- 键合型离子交换剂

是以全多孔球形或无定型硅胶为基体, 表面经化学键合上所需的离子交换基团。可分为强碱、弱碱或强酸、弱酸性离子交换剂。IEC常用的固定相有强酸性磺酸型(-SO₃H)阳离子键合相和强碱性季铵盐型(-NR₃Cl)阴离子键合相。还有含羧酸基或酚羟基的弱酸性阳离子交换剂等。

键合型离子交换剂特点

以全多孔硅胶为基体的键合型离子交换剂的柱效高，载样量大。这类固定相具有较高的耐压性、化学和热稳定性好，可以用高压匀浆法装柱。但它在 $\text{pH} > 9$ 的流动相中，硅胶容易溶解，未键合的残留硅羟基容易生成硅酸盐。因此，其适用范围只能在 $\text{pH} 0 \sim 8$ 。

** 由于流动相的 pH ，离子强度对被测组分的容量因子和分配系数有很大影响。因此需严格控制 pH 值和缓冲液浓度及离子强度。

2 凝胶

SEC，GPE或GFC所用的固定相，是具有一定孔径范围的多孔凝胶。根据耐压程度，凝胶可分以下三种。

• 软质凝胶

（如葡聚糖等）在压强 0.1MPa 左右即被压坏，因此这类凝胶只能用于常压下的凝胶色谱法。

• 半硬质凝胶

由苯乙烯和二乙烯苯交联的聚合物，能耐较高的压力，可用作以有机溶剂为流动相的高效凝胶渗透色谱法的填料。这种凝胶的优点是**具有可压缩性**，能填得紧密，**柱效高**。缺点是在有机溶剂中具有膨胀性，当流动相流经时，**随时改变着柱的填充状态**。国产品如NGS-01~08系列。

• 硬质凝胶

硬质凝胶可分为多孔硅胶及多孔玻璃珠等种类。其优点是在溶剂中**不变形**，孔径**尺寸固定**，**溶剂互换性好**。其缺点是装柱时较易碎，不易装紧，因此**柱效较差**，一般为有机凝胶柱效的 $1/3 \sim 1/4$ 。它的**吸附性较强**，有时易拖尾。国产硬质凝胶，如多孔硅珠NDG-1~6等。

在选用凝胶时，须注意凝胶分子量排斥极限及平均孔径等参数。样品分子量须小于凝胶的分子量排斥极限并大于全渗透点的分子量，即在凝胶的“分子量范围”内。否则 V_R 将不随分子量而变化。由于上述参数，是用标准样品测得。如NDG-1分子量排斥极限为 4×10^4 ，是用聚乙烯标样测得。因此，此参数不能套用至其它样品。可参考凝胶的平均孔径，使样品分子线团的平均尺寸略小于凝胶的平均孔径。无法估计样品分子大小与平均分子量时，可采用尝试法，用一系列凝胶柱测定，选出适宜的凝胶柱。

3 手性固定相 (chiral stationary phase; CSP)

• 合成手性固定相

将手性官能团键合在载体上而形成。合成手性固定相有 π -氢键型、配体交换型及蛋白质键合相等类别。 π -氢键型手性固定相是将具有光学活性的有机小分子通过间隔基键合到硅胶上而制得，以Pirkle型CSP应用最广泛，已发展至第三代产品。一般是CSP与相反构型的样品对映体作用力强。

天然手性固定相

将天然手性物质（环糊精及如微晶纤维素三乙酸酯等纤维素衍生物）固着在载体（常用硅胶）上而构成。

环糊精还可作为手性添加剂加到流动相中，分离几何异构体与对映体。

4. 亲合色谱固定相

由配基与载体构成。配基有生物专一性配基及基团亲合配基等类别。生物专一性相互作用的体系，如抗原-抗体、酶-底物、酶-抑制物及激素-受体等的任一方可作为另一方的配基。硅胶、交联琼脂糖凝胶及聚丙烯酰胺凝胶是常用载体。对于小分子配基，由于离载体表面太近，易受载体空间障碍的影响，而丧失亲合力，因此需在配基与载体间引入适当长度的**间隔臂**。

第五节 流动相 (mobile phase)

一 流动相的作用

在HPLC中，固定相一定时，溶质的保留和溶质对的分离主要由溶剂的性质（种类、配比）决定。因此在HPLC中，流动相的选择至关重要。但凝胶色谱法除外，因为凝胶色谱法的分配系数（渗透系数） K 只决定于凝胶孔径与被分离高分子的分子线团尺寸，而与流动相性质无关，只要是样品的良溶剂即可。

溶剂系统对分离度的影响，可用下式说明：

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{k_2 + 1}$$

式中各符号含义同气相色谱章。

虽然分配系数比 a 与容量因子 k 关联，但与GC不同，在HPLC中， a 主要受溶剂种类的影响； k 主要受溶剂的配比所左右。因为选择不同种类的溶剂，分子间的作用力不同，有可能使两个被分离组分的分配系数不等，使 a 增大。在溶剂系统组成一定时，改变溶剂的配比，洗脱能力改变， k 改变。由此可见，选择溶剂系统是以能获得较大的 a 与适宜的 k 值，而使 k 与 t_R 合乎要求为目的。

与GC流动相不同，HPLC流动相既有运载作用，又和固定相一样，参与对组分的竞争，因此流动相的选择对分离十分重要。理想的流动相应有下列特性：

- 1) 不与固定相发生化学反应。
- 2) 对样品有适宜的溶解度， k 在2~5(最佳范围)或1~10内。 k 值太小不利于分离； k 值太大可能使样品在流动相中沉淀。
- 3) 必须与检测器相适应，使用UVD时，溶剂截止波长要小于测量波长，使用IRD，溶剂折光率要与待测物有较大差别；
- 4) 高纯度。否则基线不稳或产生杂峰；
- 5) 化学稳定性好；
- 6) 适宜的粘度。过高，柱压增加，过低，易产生气泡。
- 7) 对待测物具一定极性和选择性；

二 流动相选择性

(一) Snyder溶剂分类法

可用于HPLC的溶剂有80余种，分类有利于合理选择流动相。样品组分、溶剂与固定相三者间的作用力为分子间作用力，组分的分配系数由三者的分子间作用力所决定。Snyder选了三个参考物质，用于检验溶剂的三种分子间作用力，分别用 X_e 、 X_d 及 X_n 表述。并将81种色谱常用溶剂，分为八类（组）。

参考物与被检溶剂间的作用力关系

参考物	乙醇 质子给予体	二氧六环 质子受体	硝基甲烷 强偶极分子
被检溶剂 作用力类型	质子受体作用力 (X_e)	质子给予作用力 (X_d)	强偶极作用力 (X_n)

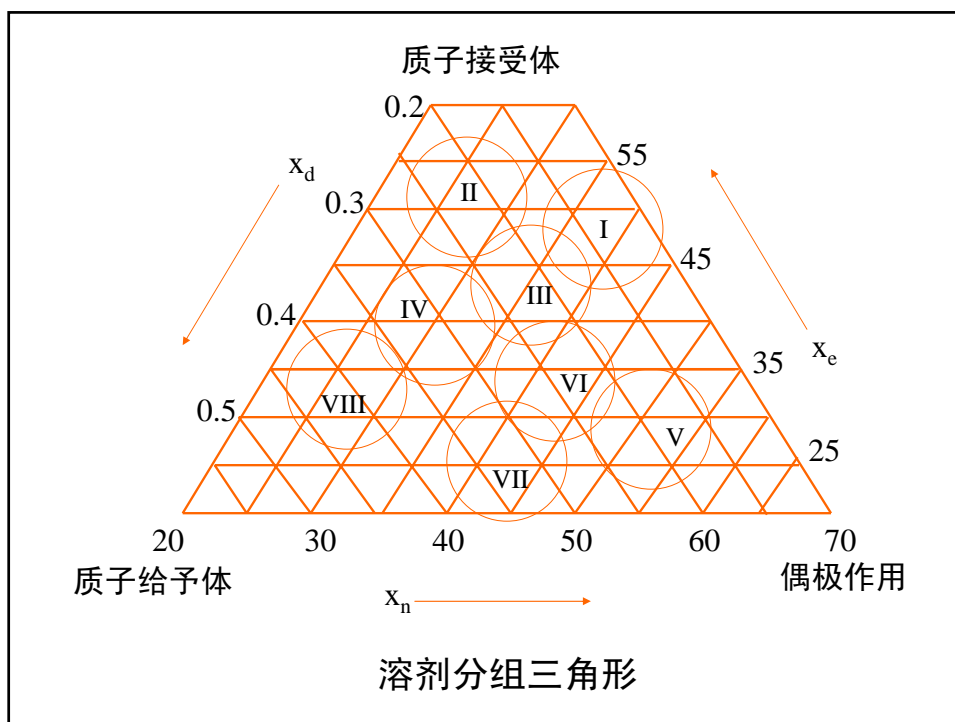
选择上述三个参考物，测定、计算出常用溶剂的极性参数 P' 值列于下表。

常用溶剂的极性参数 P' 与分子间作用力

溶剂	P'	X_e	X_d	X_n	溶剂	P'	X_e	X_d	X_n
正戊烷	0.0				乙醇	4.3	0.52	0.19	0.29
正己烷	0.1				乙酸乙酯	4.4	0.34	0.23	0.43
苯	2.7	0.23	0.32	0.45	丙酮	5.1	0.35	0.35	0.42
乙醚	2.8	0.53	0.13	0.34	甲醇	5.1	0.48	0.48	0.31
二氯甲烷	3.1	0.29	0.18	0.53	乙腈	5.8	0.31	0.31	0.42
正丙醇	4.0	0.53	0.21	0.26	乙酸	6.0	0.39	0.39	0.30
四氢呋喃	4.0	0.38	0.20	0.42	水	10.2	0.37	0.37	0.25
氯仿	4.0	0.25	0.41	0.33					

表中的 P' 代表在正相色谱与硅胶吸附色谱法中溶剂的极性。 P' 大，洗脱能力大。 X_e 、 X_d 及 X_n 为三种作用力的相对值，三者之和为1。其数值的大小，表示作用力的强弱。

将每种溶剂的 X_e 、 X_d 及 X_n 值，按其数值，点在三角坐标纸的相应位置上。将相邻溶剂圈成一组，共分为8组，称为溶剂选择三角形（SST），如下图所示。



Snyder的溶剂选择性分组（部分）

组别	溶剂
I	脂族醚、四甲基胍、六甲基磷酰胺、三烷基胺
II	脂族醇
III	吡啶衍生物、四氢呋喃、酰胺(甲酰胺除外)、乙二醇醚、亚砷
IV	乙二醇、苯醇、乙酸、甲酸胺
V	二氯甲烷、二氯乙烷
VI	(a)三甲苯基磷酸酯、脂肪酮和酯、聚醚、二噁烷; (b)砒、腈
VII	芳烃、卤代芳烃、硝基化合物、芳醚
VIII	氟代醇、间甲酚、水、氯仿

I组溶剂的 X_c 值较大, 属于质子受体溶剂, 以脂肪醚为代表。

- VIII组的 X_d 相对最大, 属于质子给予体溶剂, 以氯仿为代表。

- V组的 X_n 相对最大, 属偶极作用力溶剂, 以二氯甲烷为代表。

- II组溶剂, 处于三角形顶部, 按分类应为质子受体溶剂。而II组为脂肪醇类是质子给予体溶剂, 这是该分类法不足之处。其它组别溶剂性质不典型。

** 选择不同组别的溶剂, 分子间作用力不同, 容易造成组分间的分配系数的差别, 使 a 改变, 以利于分离。

(二) 溶剂系统的四面体优化法

色谱柱和溶剂系统是液相色谱分离的两个关键。后者是实际工作中的关键。溶剂系统的优化方法一直是液相色谱较热门的课题。优化方法甚多, 这里主要介绍四面体优化法。

在介绍四面体法前, 先说明在正向和反相色谱法中最弱的溶剂这两个相反的概念。

溶剂强度参数概念

1 正相洗脱溶剂系统的极性参数 P'

正相洗脱适用于正相键合相色谱法及液-固吸附色谱法。溶剂的正相洗脱能力用极性参数 P' 表示。正相洗脱多元溶剂的极性参数 $P'_{ab\dots}$ 具有加和性，计算公式如下：

$$P'_{ab\dots} = P'_a \phi_a + P'_b \phi_b + \dots$$

P'_a 与 P'_b 为纯溶剂的极性参数， ϕ 为百分浓度。

2 反相洗脱溶剂系统的强度因子(S)

在反相洗脱中：溶剂的洗脱能力用 S 值表示，必须注意。反相洗脱，用前面所述的表（Snyder的溶剂选择性分组）计算混合溶剂的溶剂强度因子 $S_{ab\dots}$ 值，计算公式：

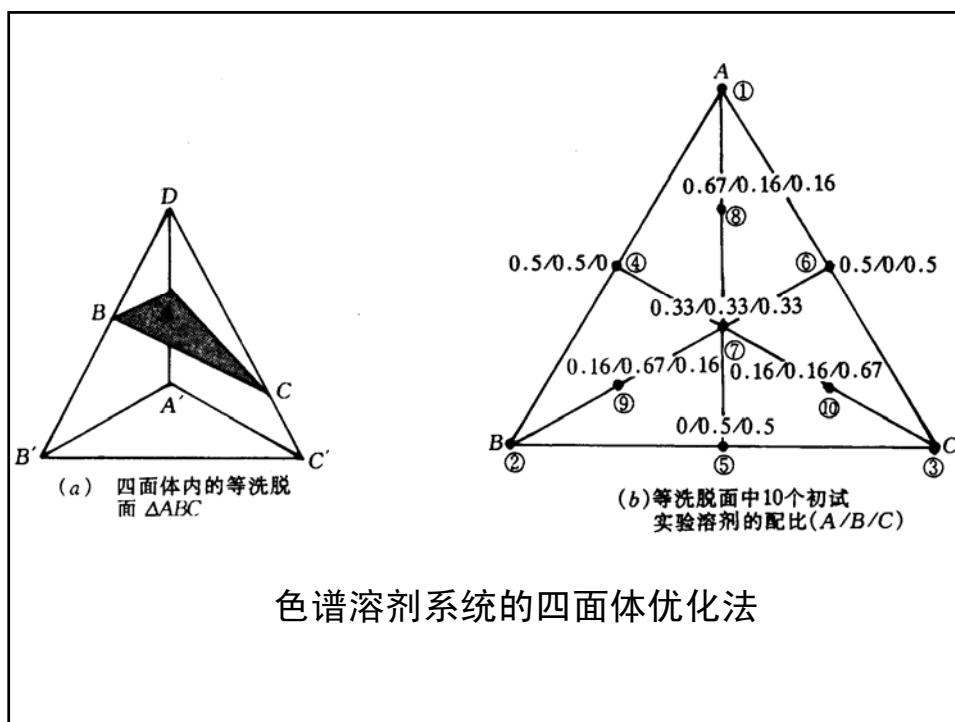
$$S_{ab\dots} = S_a \phi_a + S_b \phi_b + \dots$$

反相洗脱溶剂的强度因子S值

溶剂	S 值	组别
水	0	VIII
甲醇	3.0	II
乙腈	3.2	VI
丙酮	3.4	VI
二噁烷	3.5	VI
乙醇	3.6	II
异丙醇	4.2	II
四氢呋喃	4.5	III

四面体法

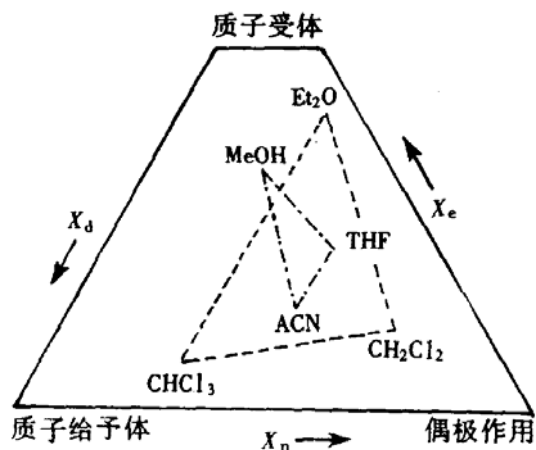
由三个不同组别的纯溶剂（A'、B'、C'）与底剂（D）组成正四面体（下图）。四面体每一个边代表相应两个纯溶剂组成的二元溶剂系统（下简称溶剂）的配比（如下图b所示）。底剂一般指洗脱强度（洗脱能力）最弱的溶剂。也有时选相对洗脱能力小的溶剂为底剂。反相色谱的A'、B'及C'首选甲醇、乙腈与四氢呋喃；正相色谱则首选乙醚、氯仿与二氯甲烷。



步骤:

- 1) 根据色谱类型（正、反相），按上述说明组成溶剂四面体
- 2) 寻找组分容量因子 $k \approx 3$ 的等洗脱强度面DABC。此面上任一配比的溶剂洗脱强度都相等；
- 3) 将此等洗脱面视为正三角形，按图b的比例选定数个等洗脱强度的初试溶剂。①~③为二元、④~⑥为三元和⑦~⑩为四元溶剂。若进行离子对色谱法或离子抑制色谱法，需要添加试剂，元数等同增加。一般配制①~⑦号足矣。
- 4) 用①~③初试溶剂作为流动相，检查分离效果，从中选出最好的溶剂。否则在较好点的周围，再组成一个小三角形，再按图b的比例配制几个溶剂进一步搜索，直到满意为止。

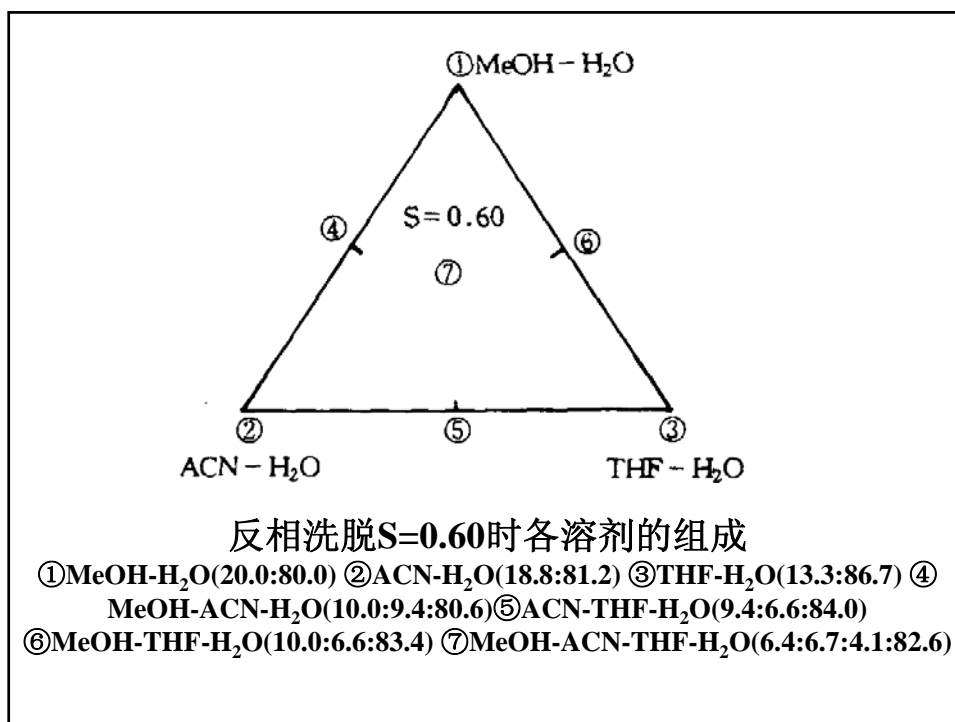
分离方法优化实例



THF 四氢呋喃
ACN 乙腈
MeOH 甲醇
Et2O 乙醚

正反相洗脱三顶点溶剂选择
.....正相色谱 - - - -反相色谱

用ODS键合相柱与甲醇-水，分离某多组分样品。经数次调整配比，在甲醇-水(20.0:80.0)时，样品中保留时间适中组分的 $k \approx 3$ (或2~5)。计算出其 S 值为0.6。用此值及乙腈与水的 S 值，计算出②号二元溶剂的配比:乙腈-水(18.8:81.2)。同法算出③号二元溶剂:四氢呋喃-水(13.3:86.7)。算出①、②、③的组成(配比)，即确定了分析该样品 $k \approx 3$ 时的等洗脱面 ΔABC 在四面体中的位置。将①、②、③三个二元溶剂代入上图，按所标的比例，算出④~③三个三元溶剂的组成及⑤号四元溶剂的组成，计算结果列于下图中。用①~③号溶剂系统作为初试溶剂，进样，检查分离结果，选出较优的溶剂。若不满意可再配③~⑩号溶剂，或三角形上其它组成的溶剂，至满意为止。



3. 用TLC作为HPLC流动相选择的先导

利用相同原理的TLC与HPLC的分离原理一致，用TLC作为HPLC溶剂选择的先导，则省时、经济。用以可以解决下列问题：

- 已知 $R_f=1/(k+1)$ ，因此由TLC测得的 R_f ，可以提示在相同类型色谱体系时，HPLC的容量因子 k
- 在HPLC中 k 的最佳范围是2~5，相应 R_f 为0.33~0.17，而TLC最佳 R_f 范围为0.5~0.3。因此适当改变溶剂极性，降低洗脱能力即可将文献上的TLC溶剂系统作为相同类型HPLC的流动相。

(三) 洗脱方式

1.恒组成溶剂洗脱(isocratic elution)

用恒定配比的溶剂系统洗脱，优点：

- 方法简便
- 色谱柱易再生，但对复杂样品，往往不能兼顾所有组分的分离。

2.梯度洗脱 (gradient elution, 梯度淋洗)

溶剂选择的两个原则：一是溶剂强度，二是溶剂选择性。溶剂强度决定了溶质的 k' 值，即保留时间，为了改善组分的分离，可延长分析时间。但物质对的分离主要取决于溶剂的选择性。

方法：在一个分析周期内，按一定程序不断改变流动相的浓度配比。梯度洗脱可以使一个复杂样品中性质差异较大的组分，都能在各自适宜的分条件（容量因子 k 适宜）下分离。

混合溶剂有两种情况，一是大比例混合，二是在主要溶剂中添加少量的极性化合物，后者也称为改性剂。溶质的保留在这两种情况下是不一样的。前者依赖于各种溶剂的选择性，后者主要依赖于所添加的少量的极性溶剂。因此使用混合溶剂可能会改变出峰顺序。

1 优点:

- ①缩短分析周期
- ②提高分离效果
- ③改善峰形，很少拖尾
- ④增加检测灵敏度(因峰变瘦、变高)

2 缺点:

有时会引起基线漂移及重复性不佳。

第六节 高效液相色谱方法

高效液相色谱是以溶剂液体为流动相的色谱方法。按照固定相不同可分为：液液分配色谱；吸附色谱（液固色谱）；离子交换色谱；尺寸排阻色谱（凝胶渗透色谱）。此外还有亲和色谱、平板色谱（薄层色谱）等。

本节主要介绍食品与生物领域中最常用的化学键合相及吸附色谱法等。

一、液-固吸附色谱法（LSC）

1 分离机理

吸附色谱是被分离的组分分子（溶质分子）与流动相分子争夺吸附剂表面的活性中心，通常被测组分在固定相表面具有吸附作用（如与硅胶的硅醇基可发生偶极与诱导偶极、偶极与偶极、氢键等作用），且各组分的吸附能力不同（吸附系数的差别），使组分在固定相中产生保留和实现分离。

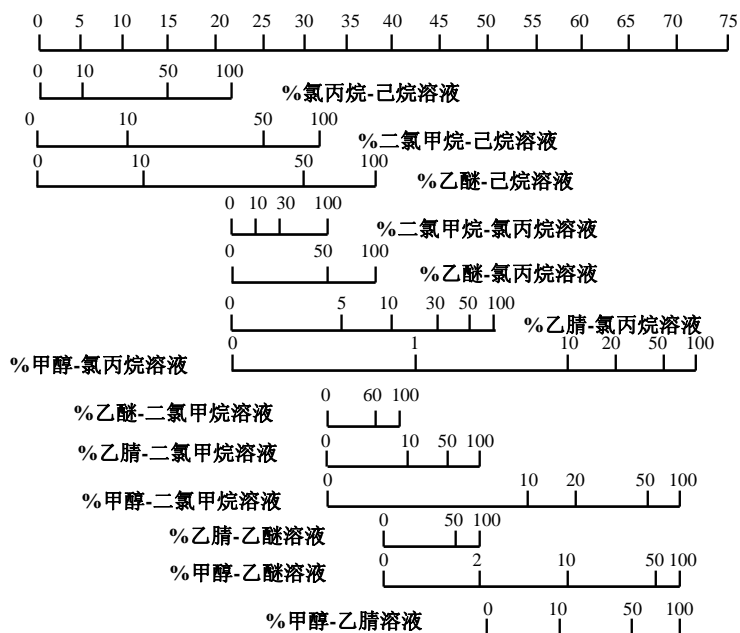
2 流动相

在吸附色谱中，固定相为极性吸附剂，因此流动相多以非极性溶剂为主，大致可分为四类：

- 1) 非极性，如正己烷等烃类。
- 2) 中等极性，如卤代烃、酯类。
- 3) 极性，如醇和乙腈。
- 4) 弱极性有机溶剂或非极性溶剂与极性溶剂的混合物，如正构烷烃、二氯甲烷/甲醇、乙酸乙酯/乙腈等。

* 水虽然是极性很强的溶剂，可以作溶剂吗？

** 在某些情况下，如分析甾类化合物时，为了使吸附剂降低活性，可添加少量高极性的物质。



在用硅胶为固定相的液固色谱法中，常用流动相是以烷烃为底剂加入适当极性调整剂组成的二元或多元溶剂系统。溶剂系统的极性越大，洗脱力越强，容量因子 k 及 t_R 越小。

**说明：硅胶遇水容易失去吸附活性，但微量水可改善拖尾。若硅胶含水量超过某限度（有17%之说），则完全失活，而变成分相色谱，此时水为固定液。因此，用硅胶作吸附色谱时，必须使用不含水的流动相。硅胶除作为吸附剂应用外，更主要的是作为键合相的载体（或称基体）。

3 影响容量因子的因素（溶质的保留规律）

在色谱柱一定（ S 与 V_m 一定）及柱温一定时， k 与溶质及溶剂的性质有关。即溶质的保留与溶质分子的功能团、分子大小，及分子空间结构等有关。在吸附色谱法中，硅胶是最常用的吸附剂，故以硅胶为例讨论。

硅胶与溶质分子的亲合力顺序

饱和烃 < 芳烃 < 有机卤化物 < 硫醚 < 醚
< 硝基化合物 < 酯~醛~酮 < 醇~胺 < 砒 < 亚砒
< 酰胺 < 羧酸。

功能团的极性越大，则吸附作用越强。水的氢键作用可导致永久性吸附。

** 功能团相同，同系物的保留值随烃基增加而减少。非同系物间很难比较。

** 同分异构体，主要指几何异构体，由于空间结构的差别，在吸附剂上的吸附强度差别很大。

4 存在的问题：

1 高度活泼的吸附剂可能导致不可逆的样品吸附或变化，硅胶是酸性的，能强烈保留碱性化合物。而氧化铝是碱性的，可能引起对酸敏感的化合物发生反应。加上预柱可防止不可逆吸附物质对分析柱的污染。

2 薄层色谱（TLC）对于预测LSC的吸附剂、流动相及操作条件很有用的，但某些薄板上的粘合剂可能影响TLC的结果。当采用单一溶剂时，常可直接从TLC推广应用至柱上。但混合溶液剂系统则有时会出现困难。因为各溶剂对干的吸附剂常有不同的亲和性，因而在 TLC 板是发生分离的。

3 吸附剂的稳定性和产品批间的一致性不太理想，从而影响了溶质保留值的重现性。

4 溶剂纯度在 LSC 中特别重要，有紫外吸附的杂质是绝对不允许的，水对洗脱也有影响，其他极性杂质可能会影响柱的稳定性和洗脱体积，并在柱顶积累而引起污染，从而改变柱的吸附特性。当进行梯度洗脱时，就可能会形成无法解释的峰。

5 应用范围

吸附色谱用于结构异构体分离和族分离仍是最有效的方法，如农药异构体分离、石油中烷、烯、芳烃的分离、食品中的甾醇的分离。

缺点是容易产生不对称峰和拖尾现象。

二、液—液分配色谱法（LLC）

1 分离机制

靠样品组分溶入固定相(s)与流动相(m)达到“平衡”后分配系数(狭义)的差别而分离。在选择分离条件时，务使样品的各组分在固定相与流动相中的溶解度产生差别，即 K 或 k 产生差别，才能分离。然而与气相色谱法不同的是，流动相的种类对分配系数有较大的影响。

2. 液—液分配色谱的类型

- 流动相极性小于固定相极性的液—液色谱法称为正相液—液色谱法。适合于分离极性化合物
- 流动相极性大于固定相极性的液—液色谱法称为反相（逆相）液—液色谱法。适合于分离芳烃、稠环芳烃及烷烃等化合物。

1) 正相液-液色谱法

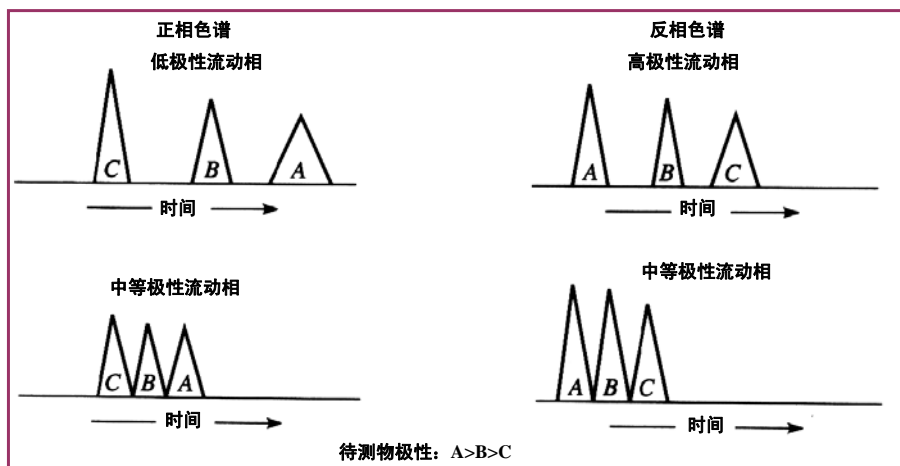
简称正相色谱法或称正相洗脱、正相冲洗。在作正相洗脱时，主要靠组分的极性差别产生溶解度差别而分离。样品中极性小的组分先流出色谱柱，极性大的后出柱。这是因为极性小的组分在固定相中的溶解度小，容量因子小的缘故。

** 用含水硅胶为固定相，以烷烃等为流动相，可作为原始正相液-液色谱法的代表。这种方法虽在TLC中还广泛应用，但固定液易流失，在HPLC中已被**正相键合相色谱法**所替代。

2) 反相液-液色谱法

简称反相色谱法或称为反相洗脱(冲洗)。在作反相洗脱时，样品中极性大的组分先流出色谱柱，极性小的组分后出柱。现在物理涂渍的液-液色谱固定相已**完全被化学键合相**所取代。

正、反相色谱中极性和保留时间的关系



三、化学键合相色谱法（BPC）

将固定液的官能团键合在载体的表面，而构成化学键合相。简称键合相色谱法。常用化学键合相既有分配作用，又有吸附性能（封尾键合相除外）。键合相色谱法是最应用最广的色谱法，化学键合相已广泛用于正相与反相色谱法、PIC、ISC、IEC及CEC等诸多色谱中。

化学键合相特点

化学键合固定相是通过化学反应将有机分子键合在载体表面所形成的柱填充剂，具有稳定、流失小、适于梯度淋洗等特点。这种固定相分离机理既不是简单的吸附，也不是单一的液液分配，而是二者兼而有之。化学键合的表面覆盖度决定哪种机理起主要作用。对多数键合相来说，以分配机理为主。

（一）反相键合相色谱法

典型的反相键合相色谱法（RBPC或RHPLC，简称反相色谱法）是非极性固定相和极性流动相组成的色谱体系。固定相常用十八烷基(octadecylsilyl, 缩写ODS或C₁₈)键合相，流动相常用甲醇-水或乙腈-水。

非典型反相色谱系统，用弱极性或中等极性的键合相和极性大于固定相的流动相组成。

1 分离机理

反相键合相表面具有非极性烷基官能团，及未被取代的硅醇基。硅醇基具有吸附性能，剩余硅酸基的多寡，视覆盖率而定。因此，分离机制比较复杂，这里只简要介绍其中一种理论——疏溶剂理论。

疏溶剂理论：

当一个非极性溶质或溶质分子中的非极性部分与极性溶剂相接触时，相互产生斥力，自由能 (G) 增加，熵减小，不稳定性增加。为了弥补熵的损失，溶质分子中非极性部分结构的取向，将导致在极性溶剂中形成一个“空腔”，这种效应称为**疏溶剂或疏水效应**。该理论认为，在键合反相色谱中溶质的保留主要是溶质分子与极性溶剂分子间的**排斥力**，促使溶质分子与键合相的烃基发生疏水缔合。

2 流动相极性与容量因子的关系（溶质的保留规律）

流动相的**极性增大**，**洗脱能力降低**，溶质的 **k 增大**， **t_R 增大**；结构相近组分，极性大的先出柱。

反相色谱法是应用最广的色谱法，虽然主要用于分离非极性至中等极性的各类分子型化合物，因为键合相表面的官能团不流失，**溶剂的极性可以在很大范围内调整**，因此**应用范围很宽**。由它派生的反相离子对色谱法与离子抑制色谱法，可以分离离子型化合物。反相液相可以解决80%的液相色谱分析。对于**结构异构体的分离**，则应**选用吸附色谱法**。

反相键合色谱法总结

反相键合色谱法	固定相极性小	如硅胶-C18，硅胶-苯基；
	流动相极性大	甲醇-水、乙腈-水、水和无机盐的缓冲液。
	分析对象	多用于多环芳烃(PAHs)等低极性化合物分离；改变流动相配比，也可分离极性化合物；缓冲液可用于易离解的化合物，如有机有机酸、有机碱和酚类。

反相键合色谱中，随流动相极性减少，组分分配比 **k 增加**。

**** 在HPLC分析中，有时要在流动相中加入适量的盐（碳酸铵、四烷基铵盐）或酸，为什么？**

答：都是为防止峰形拖尾。加入盐类是为了减少待测物与键合相表面的残留硅醇基作用；加入酸是抑制酸类待测物的离解，使其以游离酸在柱内分离。

（二）正相键合相色谱法

氰基与氨基化学键合相是正相键合相色谱法（NBPC；NHPLC）较常用的固定相。流动相与以硅胶为固定相的吸附色谱法的流动相相似，也是用烷烃（常用正己烷等）加适量极性调整剂而构成。氰基键合相的分离选择性与硅胶相似，但极性小于硅胶，即用相同的流动相及其它条件相同时，同一组分的保留时间将小于硅胶。许多需用硅胶柱分离的课题，可用氰基键合相柱完成。氨基键合相与硅胶的性质有较大差异，前者为碱性；后者为酸性。在作正相洗脱时，表现出不同的选择性。氨基键合相色谱柱是分析糖类最重要的色谱柱，也称为碳水化合物柱。

28

1 分离机理

主要靠范德华作用力的定向作用力、诱导作用力或氢键作用力。例如，用氨基键合相分离极性化合物时，主要靠被分离组分的分子与键合相的氢键作用力的强弱差别而分离，如对糖类的分离等。若分离含有芳环等可诱导极化的非极性样品，则键合相与组分分子间的作用力，主要是诱导作用力。

2 流动相的极性与容量因子的关系

在作正相洗脱时，流动相的**极性增大**，**洗脱能力增加**， k 减小， t_R 减小；反之 k 与 t_R 增大。
分离结构相近的组分时，极性大的组分后出柱。

正相键合色谱总结

正相键合色谱法	固定相极性大	硅胶-OH(或双-OH), 硅胶-CN
	流动相极性小	烃类+适量极性溶剂($CHCl_3$, CH_3OH , CH_3CN)
	分析对象	多用于极性或中等极性化合物的分离。还可用于分离异构体、极性不同的化合物以及不同类型的化合物。

正相键合色谱中，随流动相极性增加，组分分配比 k 增加。

第六章 定量、定性分析方法和应用

(1) 保留时间定性法（已知物对照方法）

在一定的色谱系统和操作条件下，每种物质都有一定的保留时间，如果在相同色谱条件下，未知物的保留时间与标准物质相同，则可初步认为它们为同一物质。

为了提高定性分析的可靠性，还可进一步改变色谱条件（分离柱、流动相、柱温等）或在样品中添加标准物质，如果被测物的保留时间仍然与标准物质一致，则可认为它们为同一物质。

(2) 保留指数（I）定性法

以正构烷烃为参考标准，某一未知组分的保留行为用两个紧靠近它的标准物质（正构烷烃）来标定：

$$I = 100 \frac{\log t'_{RX} - \log t'_{RZ}}{\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ}} + 100Z$$

参比标准分别为两个相邻的正构烷烃Z，Z+1

例如：苯在某柱子上的 $I_x = 733$

表示苯在该柱上的保留值相当于含7.33个碳原子的正构烷烃的保留值。

(3) 与其他仪器联用定性

将具有定性能力的分析仪器如红外 (IR)、核磁 (NMR)、质谱 (MS) 等仪器作为色谱仪的检测器获得比较准确的定性信息。

* 由于保留值 (保留时间、保留指数等) 定性受温度影响, 因此应严格控制温度; 当两个化合物的保留值相同或相近时, 容易出现错判。

(4) 化学方法定性

a: 柱前预处理

在样品进入柱前，加入特征性试剂与不加试样的色谱图对照，判断样品中存在组分。

如酮类样品加入2, 4-二硝基苯肼后，生成橙黄色沉淀，即在色谱图上不出峰。

b: 柱后流出物化学反应定性

(5) 其他定性方法:

a: 利用检测器的选择性定性

b: 利用裂解色谱法定性

第二节 定量分析

色谱定量分析的依据是被测物质的量与它在色谱图上的峰面积（或峰高）成正比。

$$W_i = f_i A_i$$

f_i 称为定量校正因子。

(1) 校正因子 f_i

分为绝对和相对校正因子两种。绝对校正因子为

$$f_i = \frac{W_i}{A_i}$$

绝对校正因子受实验条件的影响，定量分析时必须与实际样品在相同条件下测定标准物质的校正因子。因此常用相对校正因子：

相对校正因子 f'_i 为待测物质*i*与一选择的标准物质*S*的绝对校正因子之比。即

$$f'_i = \frac{f_i}{f_s} = \frac{W_i / A_i}{W_s / A_s}$$

相对校正因子只与检测器类型有关，而与色谱条件无关。

校正因子的测量方法：

准确称取被测组分和标准物质，最好为色谱纯试剂，准确称量进样，测量峰面积，分别按上述公式计算校正因子。

** 常用于作为标准物质S的有苯（热导检测器）和庚烷（氢火焰离子化检测器）等。

（2）定量分析的方法

A、归一化法

若流出色谱柱组分的总量为：
$$\sum_{i=1}^n W_i = \sum_{i=1}^n A_i f_i$$

则X组分所占的百分含量为
$$W_i \% = \frac{A_x f_x}{\sum_{i=1}^n A_i f_i}$$

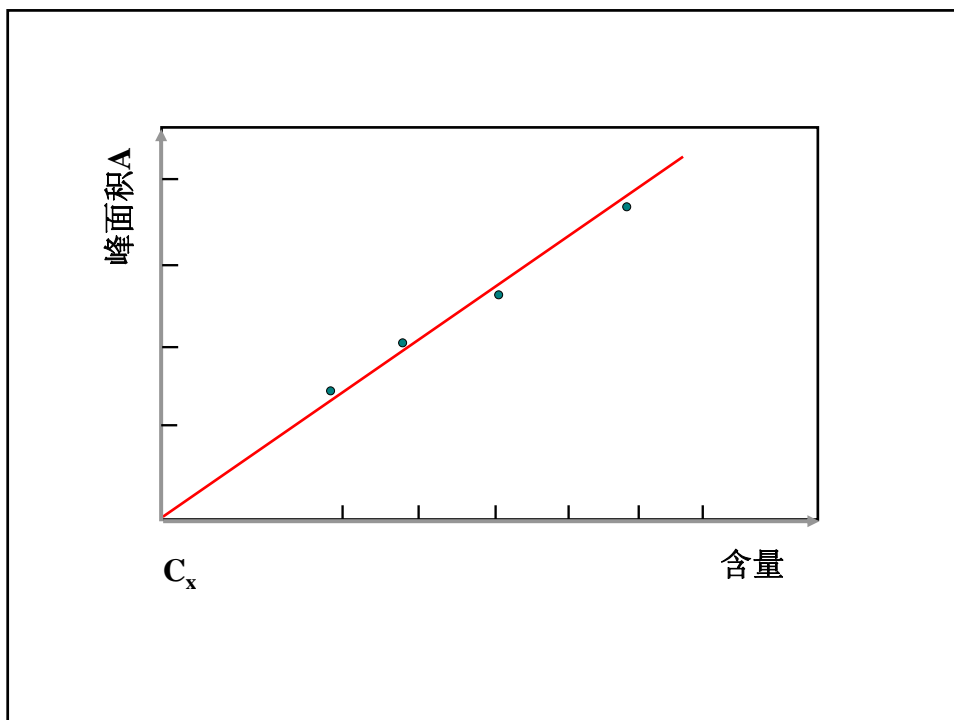
归一化法是将所有组分的峰面积 A_i 分别乘以它们的相对校正因子后求和，即所谓“归一”。

** 采用归一化法进行定量分析简便准确，但其前提条件是样品中所有成分都要能从色谱柱上洗脱下来，并能被检测器检测。

B、外标法

1) 直接比较法：将未知样品中某一物质的峰面积与该物质的标准品的峰面积直接比较进行定量。通常要求标准品的浓度与被测组分浓度接近，以减小定量误差。

2) 标准曲线法：将被测组分的标准物质配制成不同浓度的标准溶液，经色谱分析后制作一条标准曲线，即物质浓度与其峰面积（或峰高）的关系曲线。根据样品中待测组分的色谱峰面积（或峰高），从标准曲线上查得相应的浓度。标准曲线的斜率与物质的性质和检测器的特性相关，相当于待测组分的校正因子。



C、内标法

内标法是将已知浓度的标准物质（内标物）加入到未知样品中去，然后比较内标物和被测组分的峰面积，从而确定被测组分的浓度。

$$\frac{W_i}{W_s} = \frac{f_i A_i}{f_s A_s} \quad W_i = \frac{f_i A_i}{f_s A_s} W_s$$

由于标准物质和被测组分处在同一基体中，因此可以消除基体带来的干扰。而且当仪器参数和洗脱条件发生非人为的变化时，标准物质和样品组分都会受到同样影响，这样消除了系统误差。

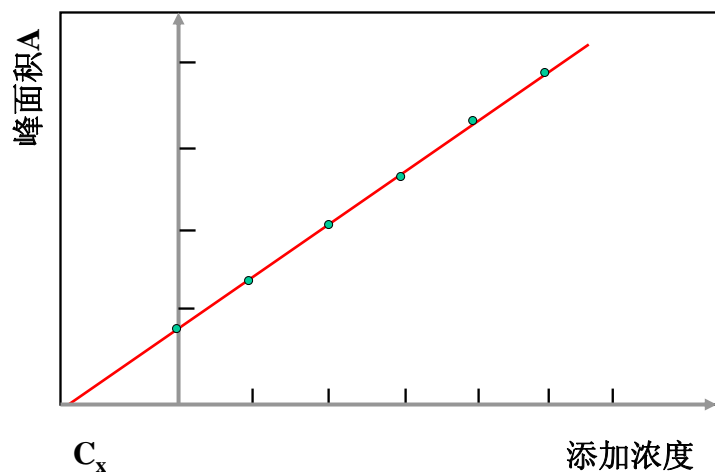
内标物应满足的要求：

- 在所给定的色谱条件下具有一定的化学稳定性；
- 在接近所测定物质的保留时间内洗脱下来；
- 与两个相邻峰达到基线分离；
- 物质特有的校正因子应为已知的或者可测定；
- 与待测组分有相近的浓度和类似的保留行为；
- 具有较高的纯度。

为了进行大批样品的分析，有时需建立校正曲线。具体操作方法是以待测组分的纯物质配制成不同浓度的标准溶液，然后在等体积的这些标准溶液中分别加入浓度相同的内标物，混合后进行色谱分析。以待测组分的浓度为横坐标，待测组分与内标物峰面积（或峰高）的比率为纵坐标建立标准曲线（或线性方程）。在分析未知样品时，分别加入与绘制标准曲线时同样体积的样品溶液和同样浓度的内标物，用样品与内标物峰面积（或峰高）的比值，在标准曲线上查出被测组分的浓度或用线性方程计算。

D. 标准加入法

标准加入法可以看作是内标法和外标法的结合。具体操作是取等量样品若干份，加入不同浓度的待测组分的标准溶液进行色谱分析，以加入的标准溶液的浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制如下图所示的工作曲线。



样品中待测组分的浓度即为工作曲线在横坐标延长线上的交点到坐标原点的距离。由于待测组分以及加入的标准溶液处在相同的样品基质中，因此，这种方法可以消除基质干扰。但是，由于对每一个样品都要配制三个以上的、含样品溶液和标准溶液的混合溶液，因此，这种方法不适于大批样品的分析。

定量分析误差来源：

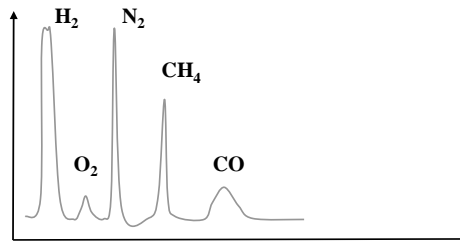
- (1) 样品的稳定性及代表性
- (2) 进样系统的影响
- (3) 柱系统影响
- (4) 气相色谱操作条件的影响
 - i) T_C 应控制 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 范围
 - ii) T_D （如TCD比较敏感，应控制在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以内）
 - iii) 载气流速的影响
- (5) 检测器的影响
 - 如种类、灵敏度、检测限、线性范围

第七章 色谱分析的应用

第一节 气相色谱分析的应用

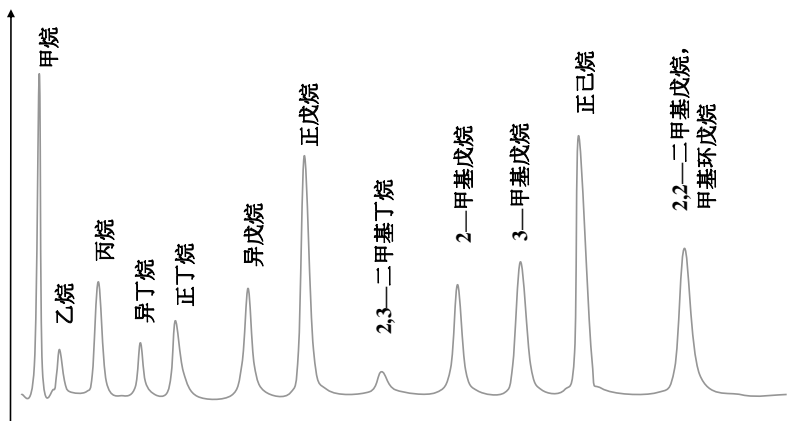
一 气相色谱在化工中应用

同时分离与分析 H_2 , O_2 , N_2 , CH_4 , CO 实例



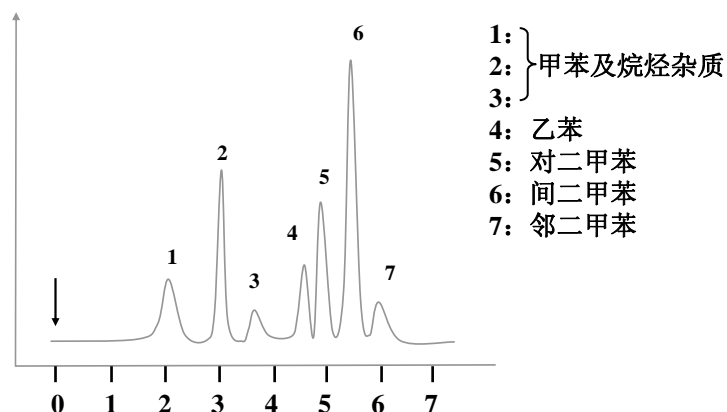
H_2 , O_2 , N_2 , CH_4 , CO 的分离图

毛细管柱分析低分子量烃类化合物的分析



色谱条件: $55m \times 0.27mm$; OV-101; $d_f=0.9 \mu m$; $T_c=69^\circ C$

芳烃类化合物的分析



色谱条件：邻苯二甲酸二壬酯：有机皂土：6201担体=2：23：100；
热导检测器；Tc=69℃；载气：H₂，流速40ml/min。

醇类化合物的分析

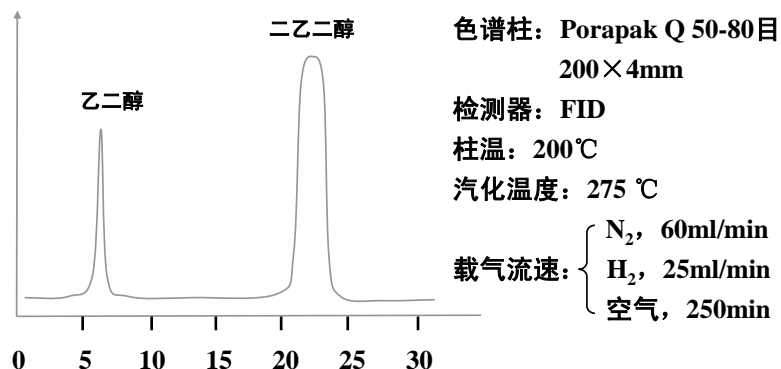
一元醇的色谱分析：

若采用气液色谱柱，一般采用聚乙二醇、芳羧酯类固定液，分析含水低碳醇时经常GDX固定相，若采用更强的极性固定液似乎并不能得到很好的分离。

有人研究了各种辛醇异构体在聚乙二醇固定液上分离结果，二个沸点相接近的异构醇，往往伯醇的保留值大于仲醇，而仲醇的保留值大于叔醇。其原因是无论氢键作用力或静电力的大小都与被分析物的分子体积有关，在相同碳原子中叔醇的空间阻碍大于仲醇，仲醇大于伯醇。

多元醇的色谱分析

多元醇一般为乙二醇、二乙二醇、三乙二醇和四乙二醇。可采用阿匹松L、硅油类固定液，现在分离采用高分子多孔小球（GDX 或 Porapak）。



酚类的色谱分析

低级酚是化工的重要原料，用途很广，可用作制取酚醛塑料、合成纤维、染料、炸药的原料。也是良好的浮游选矿剂、杀虫剂、除草剂和消毒液。

采用非极性固定液甲基硅油，各种酚按沸点大小流出，采用赤藓醇固定液，各种出峰次序是与其氢键结合力大小有关，特别是邻位取代基往往有较小的保留值，大大提前于相应其它醇类。其原因是邻位取代基的存在，因空间障碍影响了被测物的羟基与固定液之间的氢键结合力。

间位和对位甲酚，间位和对位乙基酚，2，4-和2，5-二甲基酚，这些物质对的色谱峰出现重迭。可采用有机皂土或液晶来分离。

由于低级酚有较强的极性，选用的固定液通常都需要钝化，在固定液中加入少量酸添加剂，如磷酸、挥发性低的有机酸，往往使酚的峰形较为对称。

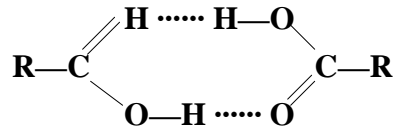
醇、酚类的酯化反应

一元醇，低级一元酚可以直接进样，无须样品转化仍可得到较满意的结果，但对于多元醇，如丙三醇，季戊四醇，以及多元酚、萘酚、甾醇等高沸点化合物，往往需要进行酯化后转化成相应的酯才能进行色谱分析。

羧酸类和酯类化合物的分析

羧酸是一类重要的酸性有机化合物。它们常以酯或盐的形式广泛存在于自然界中，乙酸是重要的化工原料，高碳脂肪酸是助剂工业和日用化工的原料。

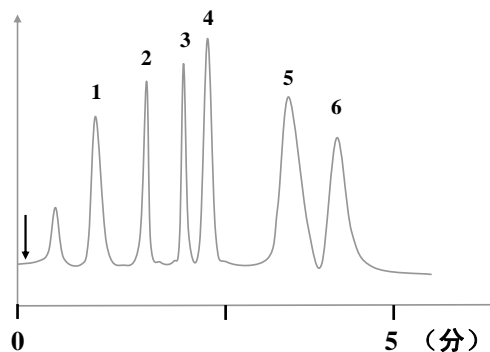
由于羧酸通过氢键成双分子缔合，低碳的羧酸甚至在气相时仍以双分子缔合状态存在。



因此羧酸的沸点比同分子量的醇的沸点还要高，如乙为78℃，而同分子量的甲酸为101℃。

低碳脂肪酸的分析

对于C5—C14脂肪酸，曾采用开管柱，但分离效果不理想。另外还可直接采用高分子多孔小球作为固定相，效果较好，下图为高分子多孔小球 Chromosorb-101 分析水中低碳酸。



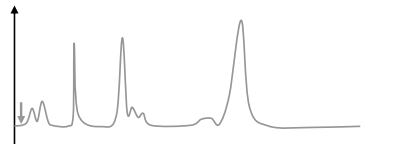
固定相80-100目，色谱柱长6英尺×2毫米内径，玻璃管柱，柱温200℃，流速40毫升/分钟。检测器为TCD。

酯类的分析

在气相色谱中，酯类的分析是比较容易的。聚酯类固定液广泛用于酯类化合物的分析，同时得到对称的色谱峰。

其他含氧化合物，如酮、醛的分析，一般可采用硅油、聚乙二醇系列固定液和酯类固定液。

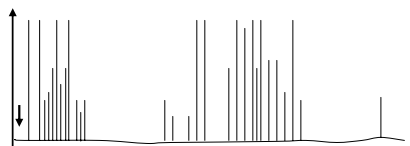
组分较复杂的化工原料的分析



色谱柱：6英尺×1/4英寸



色谱柱：500英尺×0.03英寸



色谱柱：80米×0.25毫米

薄荷油的分析

二 气相色谱在环境科学中的应用

大气中污染物的分析

大气中的主要有害物有：有毒气体及蒸汽，如SO₂，H₂S，CO，NO，各种氧化物、过氧化物、烃类化合物、有机醛类等；粉尘及烟雾；致癌性物质，如多环、氮杂环芳烃中的3，4-苯并芘，喹啉苯吡等；还有有机金属化合物；氯代烃类等微粒；大气中化学反应产物，如汽车尾气中的碳氢化合物与氮氧化物

多环芳烃（PAH）的分析

PAH具有致癌性，较好的分析方法是采用毛细管色谱，其分析步骤包括采样、萃取、浓缩、柱色谱预分离和气相色谱分离。

水中污染物的分析

水中有机氯农药的分析

目前有机农药主要为有机磷和有机氯两大类，有机磷毒性大，但易分解，而有机氯则相反。

对于六六六和DDT混合农药分析的色谱条件为：

3%OV-17涂于Gas Chrom-Q 60/80目

载气 N₂ 100ml/min

柱温 170℃

检测器 ECD

有机磷农药则采用10%DC-200和10%QF-1各50%分涂，检测器为FPD

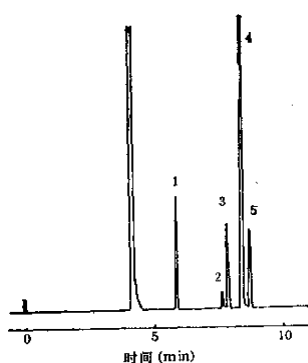
三 气相色谱在食品与生物工程中的应用

• 脂类分析

所有脂肪酸都以甘油酯的形式存在，如硬脂酸（十八碳），油酸（顺-9十八烯酸），而甘油三酯的挥发性很差，可用短柱，高柱温，低涂渍量，硅烷化担体进行色谱分析，常用的柱子为OV-1，SE-30，OV-17，这些都不是较理想的方法。

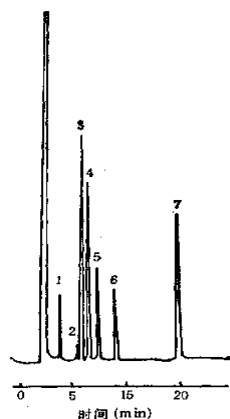
需要将它们转化为挥发性的衍生物，方法是将油脂先皂化，再对所得的游离脂肪酸进行酯化。皂化在NaOH溶液中进行，样品再与酸性酯化试剂条件混合，一步生成挥发性脂肪酸酯衍生物。

典型分析实例：月见油草油中脂肪酸含量的分析



色谱条件：PEG-20M交联石英毛细管柱
20m×0.25mm；柱温：200℃；载气：N₂；检测器：
FID；
色谱峰：1. 软脂酸甲酯；2. 硬脂酸甲酯；3. 油酸甲酯；
4. 亚油酸甲酯；5. γ-亚油酸甲酯

典型分析实例：菜籽中脂肪酸的气相色谱分析

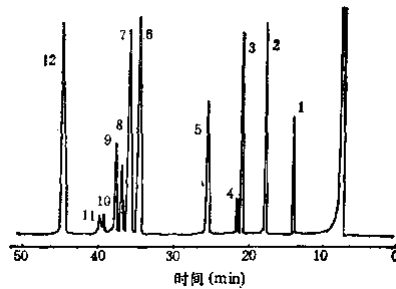


色谱条件：PEG-20M交联石英毛细管柱19m×0.21mm；
柱温：200℃；载气：N₂；检测器：FID；
色谱峰：1. 软脂酸甲酯；2. 硬脂酸甲酯；3. 油酸甲酯；
4. 亚油酸甲酯；5. 亚油酸甲酯；6. 花生烯酸甲酯；7. 芥酯甲酯

• 糖类分析

糖类分析广泛存在于自然界中，多糖不能在气相色谱中进行分析，即使将其降解为寡糖和单糖以后，由于它们的分子中具有多个羟基和部分羰基、氨基等极性基团，氢键力较强，因而熔点高，挥发性极低，仍不能在气相上分离检测，必须衍生化。一般采用醚化或酯化，最常用的三甲基硅烷化衍生物。其中溶剂为无水吡啶。

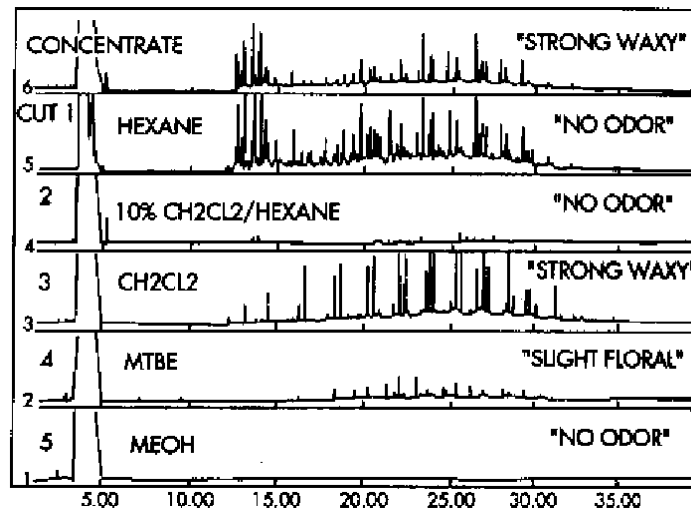
典型分析实例：单糖的测定（脎化后再三甲基硅烷化）



色谱条件：OV-101涂渍玻璃毛细管柱50m×0.3mm；
柱温：175℃；载气：Ar；检测器：FID；
色谱峰：1.脱氧核糖；2.阿拉伯糖；3,4.鼠李糖；5.2-脱氧核糖；6,7.果糖；8,10.半乳糖；9,11.葡萄糖；葡萄糖醇

包装材料中的残留挥发物的测定

包装材料中残留挥发物不管从健康（如它们是有毒的）或是质量（在食品中产生不良风味）的角度来看都是一个问题。当包装工业从玻璃发展到高分子材料时，就存在着更多的这方面的问题。GC最广泛地用于这些材料的残留挥发物的测定。

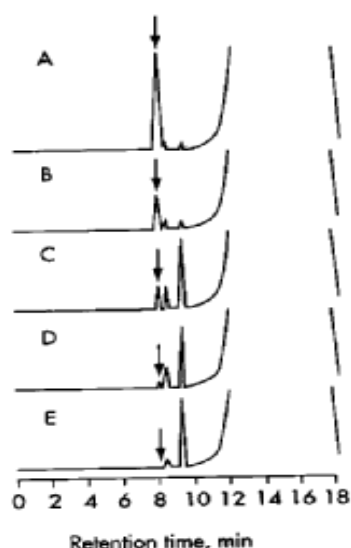


食品包装膜的毛细管色谱图

上面的色谱图是先用蒸汽蒸馏食品包装膜，然后经有机溶剂萃取蒸馏液中的挥发物，再浓缩有机溶剂萃取液，然后在毛细管柱上进行色谱分离得到的（图顶部的色谱图）。色谱图的复杂性说明浓缩物在硅胶柱上进行进一步的分离。每个成份再进行色谱分析。标有“Cuts1-5”分别是用（1）己烷通过硅胶柱去除饱和碳水化合物(Cut)；（2）10%CH₂Cl₂/己烷去除不饱和和芳香族的碳水化合物(Cut2)；（3）CH₂Cl₂去除酮和醛类化合物；（4）甲基叔丁基醚去除酸类化合物和不饱和酮和醛（Cut4）；（5）乙醇去除残留的极性挥发物（Cut5）。可以看到从包装材料中萃取的挥发物经预先分离后，极大地简化色谱图，可以让研究人员集中在引起包装材料不良风味的挥发物的研究上。

调味料中环氧乙烷的顶空分析

使用顶空进样方法来测定ETO。由于ETO易挥发，有足够的灵敏度，顶空技术又简单可行，因此，使用该法非常合理。该法为先把1g经粉碎的调味料加至22ml的顶空小瓶中（瓶子用Teflon隔膜把样品密封），加入内标物（1-辛醇），小瓶在60℃下保温20min，然后取出，并取大约1ml样品顶空的气样进气相色谱进行分析。在多孔高分子毛细管柱上（二乙烯苯高聚物），ETO从样品的挥发物中分离出来。纯ETO、调味料和掺入ETO的调味料的典型色谱图见下图。



调味料中环氧乙烷的顶空分析色谱图

第二节 液相色谱分析的应用

一 液相色谱分析在化工中的应用

多环芳烃的分析

多环芳烃的分析，可用反相或吸附色谱法分析。反相色谱法用**ODS柱**，用乙腈-水或甲醇-水为流动相。但用甲醇-水时，保留时间较长，因此多采用梯度洗脱。多环芳烃也可用**硅胶(YWG等)柱**，以不含水的正己烷为流动相，也能获得较好的分离效果，但需注意溶解样品的**溶剂应与流动相的性质相近**。许多多环芳烃是致癌物质，其含量监测在食品分析与环境保护监测中都有实用意义。

二 液相色谱分析在医药工业中的应用

蒽环类抗生素的分析

蒽环类（anthracyclines）抗生素具有两个酚羟基，能与离子对试剂四丁基胺(TBA)磷酸盐结成中性离子对，因此可用**反相离子对色谱法**分析，方法简便。图21-19所示的流动相是甲醇-水(65:35)，其中加入10mmol / L的TBA磷酸盐。分离效果良好。

三 液相色谱分析在食品中的应用

Analysis of the Triglyceride

样品制备：样品溶于四氢呋喃

柱子：200×2.1mm Hypersil MOS, 5 μ m

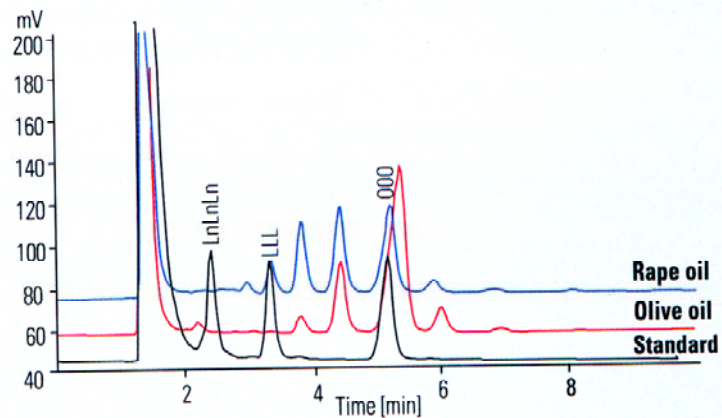
流动相：丙酮/乙腈（30：70）

流速：0.5ml/min

柱温：30℃

进样体积：2 μ l

检测器：示差折光检测器



Analysis of the Triglyceride pattern of olive oil and rape oil

Analysis of a dietary fat triglyceride pattern

样品制备: 0.215g 脂肪样品用于500ul, 80°C MeOH/KOH溶液中水解, 冷却后加入1.5ml乙腈/四氢呋喃 (1: 1), 混合摇匀5min, 经0.45um微滤膜过滤。

柱子: 200×2.1mm Hypersil MOS, 5um

流动相: A=水 (70%), B=乙腈+1% THF (30%)

梯度: at 5min 30% B, at 15min 70% B, at 25min 98% B

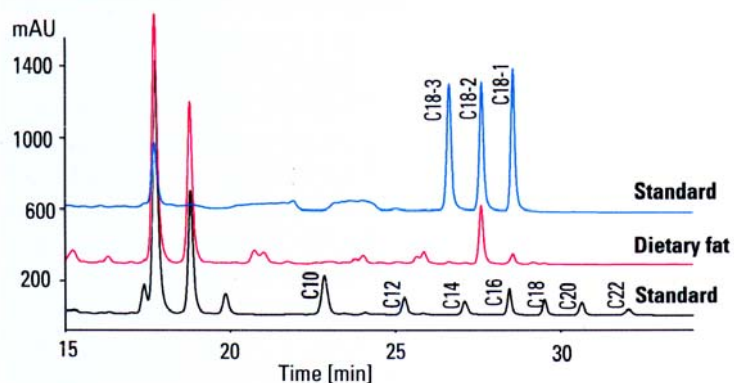
流速: 0.3ml/min

柱温: 50°C

进样体积: 2ul

检测器: 多波长检测器 258nm

衍生化: 60mg/ml 溴代苯甲酰甲基溶于乙腈溶液中。



Analysis of a dietary fat triglyceride pattern

Analysis of carbonhydrates

主要分析对象：葡萄糖、半乳糖、棉子糖、果糖、甘露醇、山梨(糖)醇、乳糖、麦芽糖、纤维二糖、蔗糖

样品制备：样品直接进样

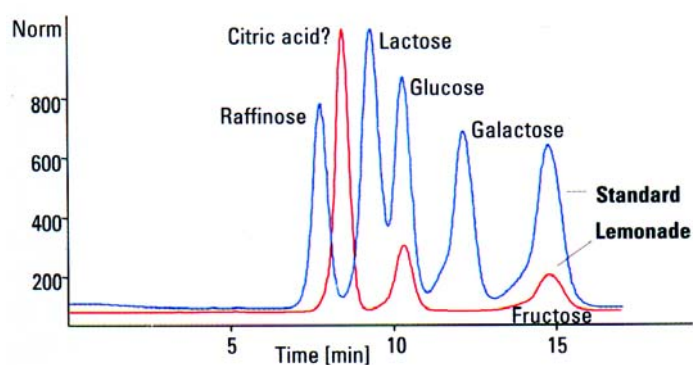
柱子：300×7.8mm Bio-Rad, HPXP, 9um

流动相：water (30: 70)

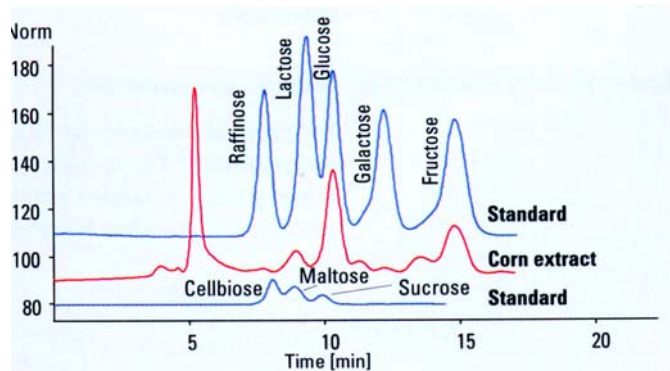
流速：0.7ml/min

柱温：80℃

检测器：示差折光检测器



Analysis of carbonhydrates in lemonade



Analysis of carbohydrates in corn extract

Analysis of Vitamins

主要分析对象：脂溶性维生素，VE、VD和VA，以及水溶性维生素，VC、VB₆、VB₂、VB₁和VB₁₂。

样品制备：水溶性维生素，过滤

柱子：100×4mm，Hypersil BDS，3μm

流动相：A=水（用H₂SO₄调至pH2.1）=99%

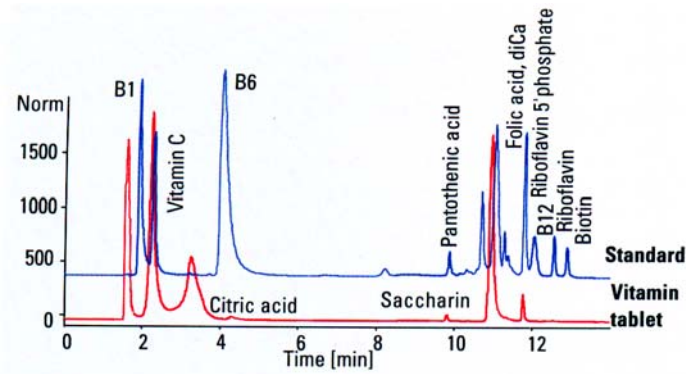
B=ACN+10%A=1%

梯度：at 3.5min 1%B, at 11min 25%B, at 19min 90%B

流速：0.5ml/min

柱温：30℃

检测器：UV-DAD，检测波长220/30nm



Analysis of water-soluble vitamins in vitamins tablet

样品制备：20g 含维生素E样品溶于15ml正己烷中

柱子：100×2.1mm，Hypersil SI 100，5um

流动相：正己烷 + 2%异丙醇

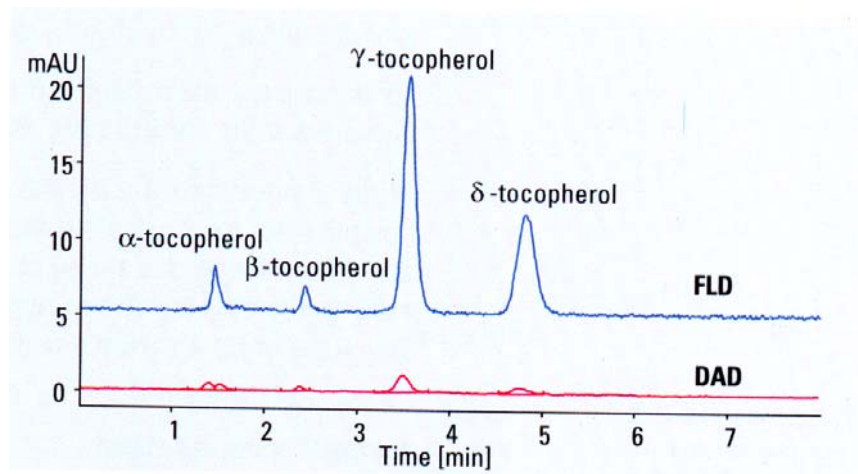
终止时间：8min

流速：0.3ml/min

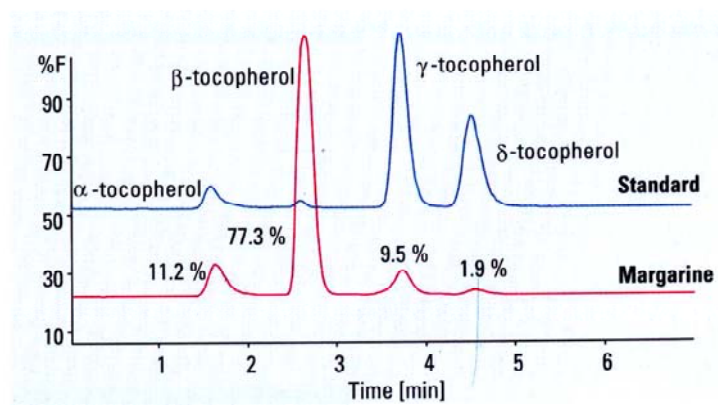
柱温：25℃

检测器：UV-DAD，检测波长295/80nm

荧光检测器，激发波长295nm，发射波长：330nm



Analysis of tocopherols on normal phase by UV and FD



Analysis of tocopherol concentration in margarine fat extract with fluorescence detection

Analysis of amino acid

样品制备: 过滤

柱子: 200×2.1mm, Hypersil ODS, 5 μ m

流动相: A=0.03M 醋酸钠 pH=7.2 + 0.5% THF

B=0.1M醋酸钠/CAN (1:4)

梯度: at 0min 0%B at 0.45ml/min flow rate

at 9min 30%B,

at 11min 50%B at 0.8ml/min

at 13min 50%B

at 14min 100%B at 0.45ml/min

at 14.1min at 0.45ml/min

at 14.2min at 0.8ml/min

at 17.9min at 0.8ml/min

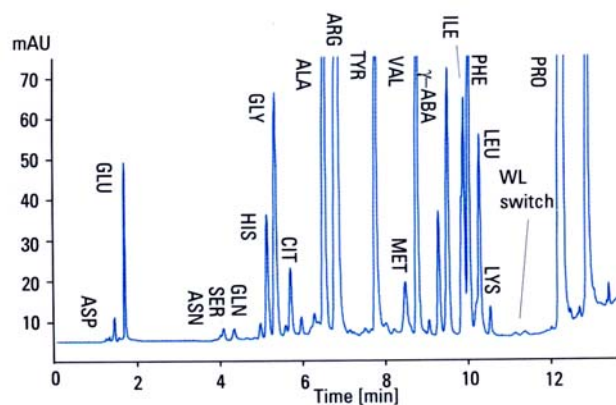
at 18min at 0.45ml/min

流速: 0.45ml/min

柱温: 40°C

检测器: UV-DAD, 检测波长338和266nm

荧光: 激发波长230nm, 发射波长450nm。



Analysis of amino acid in beer after online derivatization

Analysis of peptides

样品制备: 燕麦光敏色素的胰蛋白酶水解液, 7pmol/ul。

柱子: 250 × 0.03 mm, C18, 5um

流动相: A=0.025% TFA in water

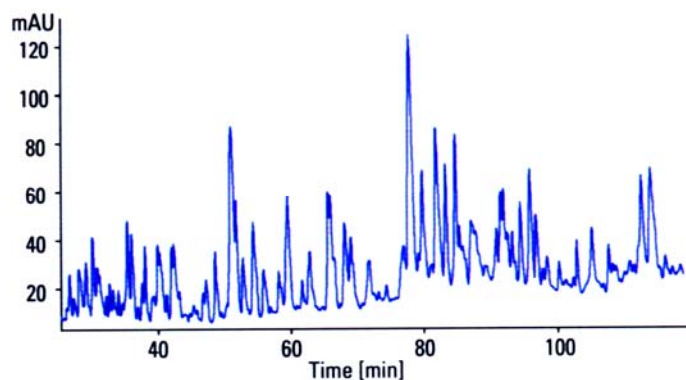
B=0.02% TFA in ACN

梯度: 0.35% B/min

流速: 100ul/min split to 4ul/min

柱温: 25°C

检测器: UV-VWD, 检测波长206nm, with a 35nl,
8mm flow cell



**Analysis of peptides from phytochrome tryptic
digest of oat digest**

第八节 色谱分离方法的选择

要正确地选择色谱分离方法，首先必须尽可能多的了解样品的有关性质，其次必须熟悉各种色谱方法的主要特点及其应用范围。

选择色谱分离方法的主要根据是样品的相对分子质量的大小，在水中和有机溶剂中的溶解度，极性和稳定程度以及化学结构等物理、化学性质。

一、相对分子质量

相对分子质量较低（一般在200以上），挥发性比较好，加热又不易分解的样品，可以选择气相色谱法进行分析。相对分子质量在200~2000的化合物，可用液固吸附、液-液分配和离子交换色谱法。相对分子质量高于2000，则可用空间排阻色谱法。

二、溶解度

水溶性样品最好用离子交换色谱法和液液分配色谱法；微溶于水，但在酸或碱存在下能很好电离的化合物，也可用离子交换色谱法；油溶性样品或相对非极性的混合物，可用液-固色谱法。

三、化学结构

若样品中包含离子型或可离子化的化合物，或者能与离子型化合物相互作用的化合物（例如配位体及有机螯合剂），可首先考虑用离子交换色谱，但空间排阻和液液分配色谱也都能顺利地应用于离子化合物；异构体的分离可用液固色谱法；具有不同官能团的化合物、同系物可用液液分配色谱法；对于高分子聚合物，可用空间排阻色谱法。

七、色谱分离方法的选择

分子量	水溶性	方 法	流动相
>2000	可溶	排阻色谱	水
	不溶	排阻色谱	水
<2000	不溶	分配色谱(同系物)	各种
		吸附色谱(异构物)	各种
		排阻色谱(分子大小)	各种
	可溶但不解离	反相液液色谱	各种
		排阻色谱	水
	可溶且不解离	阳离子交换色谱(碱)	缓冲液
		阴离子交换色谱(酸)	缓冲液
可溶离子或非离子	反相离子色谱	缓冲液	

色谱法基本要求

1. 掌握色谱法的分类，色谱流出曲线及有关术语；
2. 掌握色谱法的基本理论，了解柱效的影响因素；
3. 掌握分离度与柱效、选择因子、容量因子、分析时间之间关系；
4. 了解定性、定量分析方法；
5. 掌握气相色谱流程及气相色谱仪的结构；

6. 掌握气相色谱固定相的特性；
7. 掌握检测器性能指标的描述方法；
8. 掌握液相色谱仪的基本结构及基本概念；
9. 液相色谱法的主要类型及固定相、流动相的选择。
10. 了解色谱方法的选择。

