

厦门大学



高等仪器分析

色谱与分离科学

主讲：张博

bozhang@xmu.edu.cn

0592-2188691, 15960817368

化学楼554房间



高效液相色谱法 (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography

High **Perssure** Liquid Chromatography

High **Speed** Liquid Chromatography

HPLC instruments are standard equipment in analytical laboratories, in third place after scales and pH meters.

——Prof. Dr. Heinz Engelhardt, 2003

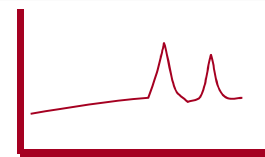
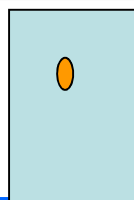
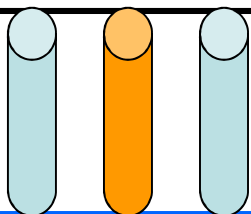


HPLC是在经典液体柱色谱的基础上, 在色谱理论指引下, 加以改进而发展起来的。特别是GC迅速成为一种仪器分析方法和社会需要分离分析难挥发复杂样品促进了HPLC的发展。近年来它以6-8%的增长率发展, 目前年发表论文数已超过GC。2000年仪器销售全球第一。



不同形式液相色谱的特征

特性	经典LC	TLC/PC	HPLC	HPLC 优势
进样	人工加样	点样	进样器	准确
溶液流动	重力	表面张力	高压泵	快速分离, 重现性好
检测和定量	收集馏分 检测	显色	连续检测	高灵敏度, 自动化
实验结果	棒式图	斑点	色谱图	





HPLC和GC的比较

历史上，高效液相色谱是吸取气相色谱与经典液相色谱优点，并用现代化手段加以改进，因此得到迅猛的发展。目前高效液相色谱法已被广泛应用于分析对生物学和医药上有重大意义的大分子物质，例如蛋白质、核酸、氨基酸、多糖类、植物色素、高聚物、染料及药物等物质的分离和分析。

高效液相色谱法的仪器设备费用比较昂贵，操作严格，这是它的主要缺点。



HPLC和经典LC比较

HPLC和CLC技术主要差别在于高效固定相、输液设备和连续检测。从速率理论得到塔板方程：

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{\Omega d_p^2}{D_M} u + \frac{\omega k}{(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_M} u + \frac{qk d_f^2}{(1+k)^2 D_s} u$$

涡流扩散、流型效应和停滞流动相慢传质均与 d_p 有关，小的 d_p 有利于提高柱效。高效固定相的重要特征是颗粒细小。

固定相的慢传质与 d_f 有关，减少 d_f 有利于提高柱效。键合相色谱有效降低 d_f ，柱效进一步提高。



➤ CLC填料的缺陷

粒度大、范围宽、不规则，不易填充均匀，扩散和传质阻力大，谱带展宽加大。它存在致命弱点：**速度慢、效率低和灵敏度低。**

➤ HPLC填料（高效固定相）

颗粒细、粒径窄、耐高压。达到传质阻力小，分离效率高。早期HPLC的固定相用涂渍的方法制备， d_f 大，这和GC一样，会大大降低色谱柱的柱效。现代HPLC填料多用键合固定相，其固定相膜很薄，因而大大提高了柱效。

高效固定相带来什么新问题？



高效填料带来两个新问题

- ★柱流动阻力大大增大，采用高压泵输液
- ★表面能很大，采用专业的装柱技术

目前CLC主要用于实验室制备分离。若用于分析则采用脱机或非连续检测。

HPLC的特征

采用**高效色谱柱、高压输液设备和高灵敏度检测器**，从而实现**高效、高速、高灵敏度、定量准确和程序化操作**，达到可与GC相媲美的分离分析性能。



历史上不同的HPLC名称

★高压液相色谱(High Pressure Liquid Chromatography)

★高速液相色谱(High Speed Liquid Chromatography)

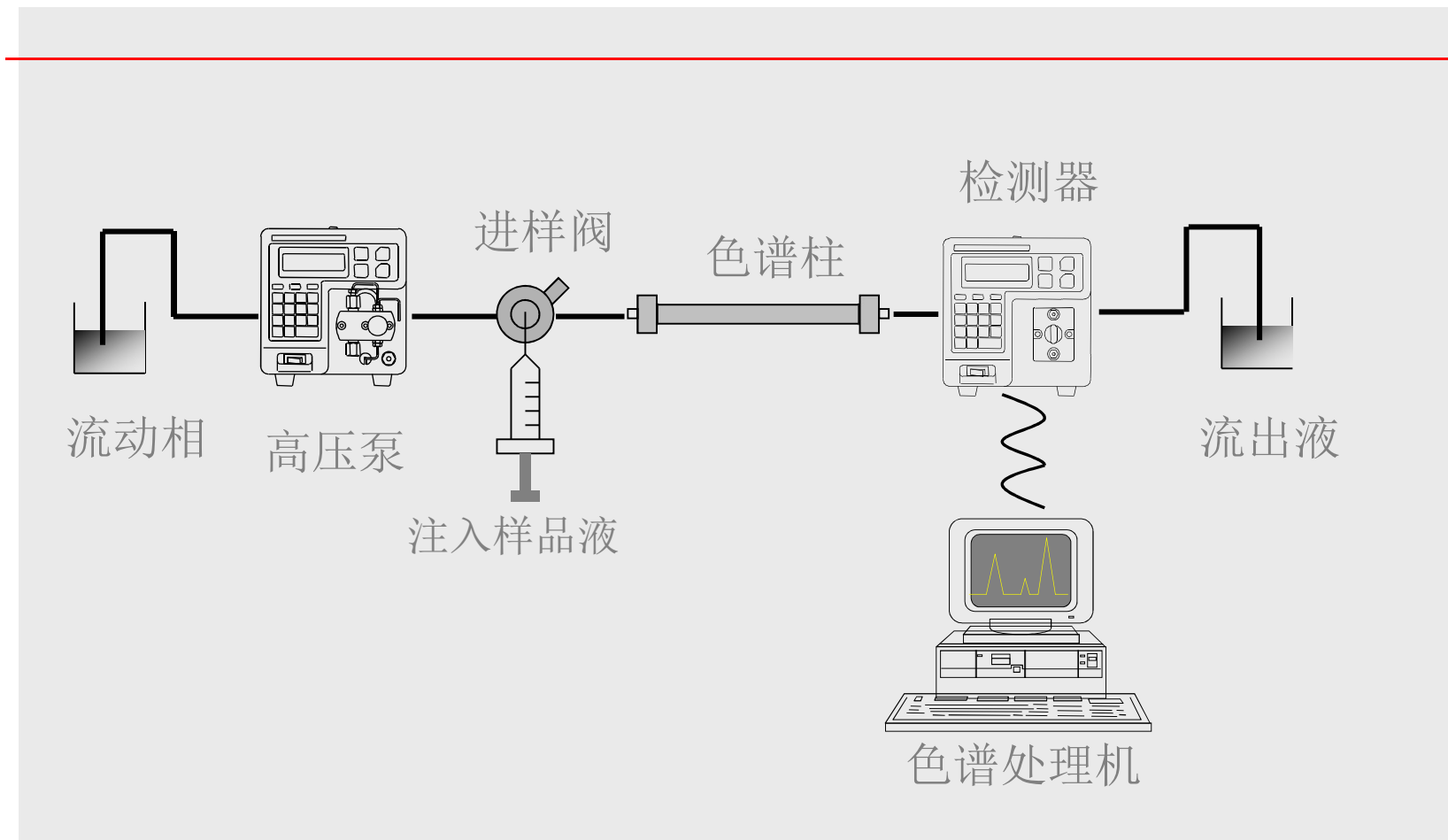
★高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography)

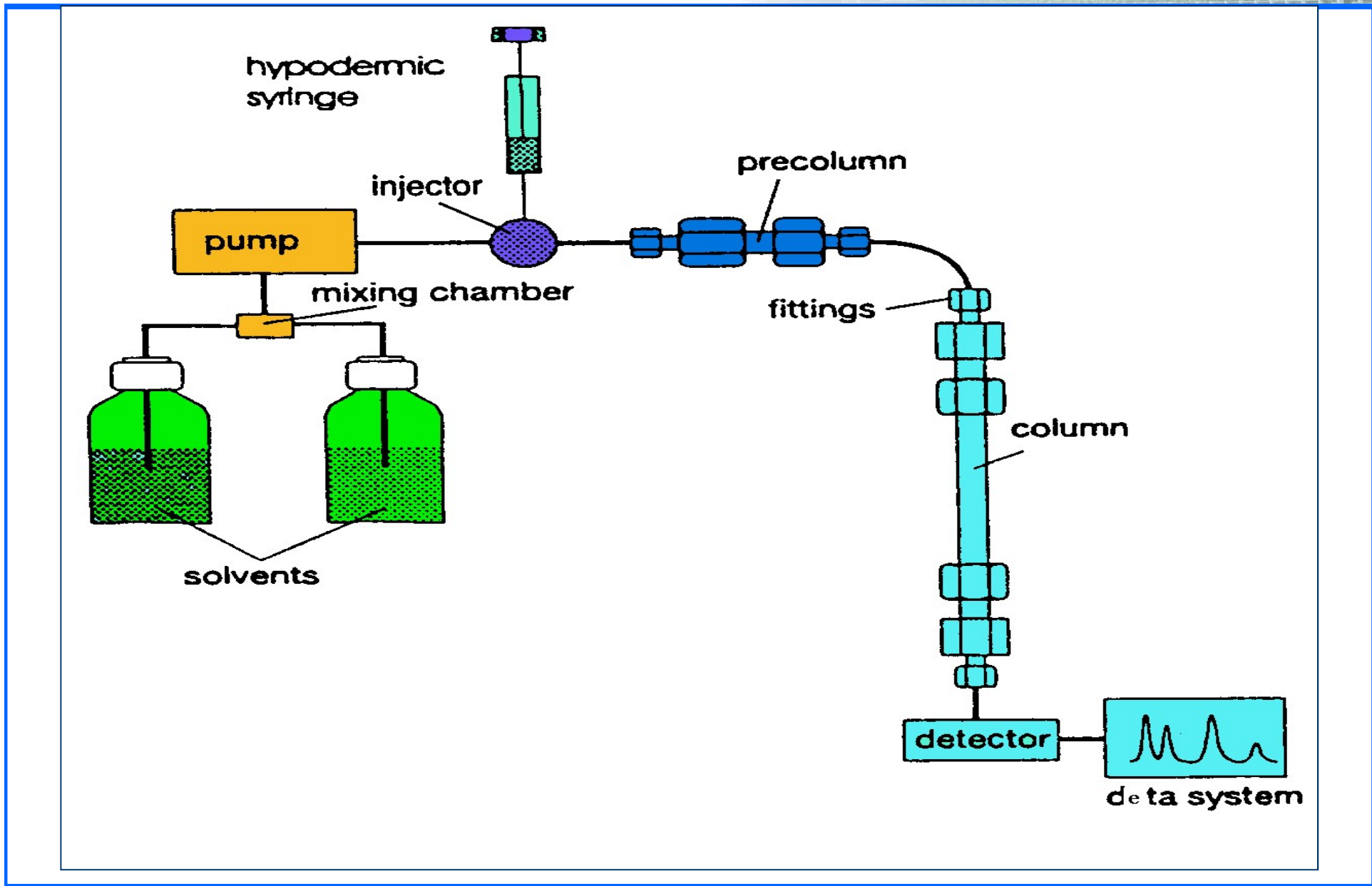
与CLC相比, HPLC使用时更方便, 对操作者的依赖性更小。HPLC高重现性和连续定量检测导致定性和定量分析结果具有较高准确性和精密度。

CLC的特点: 简便, 填料一次使用。



高效液相色谱仪基本装置图





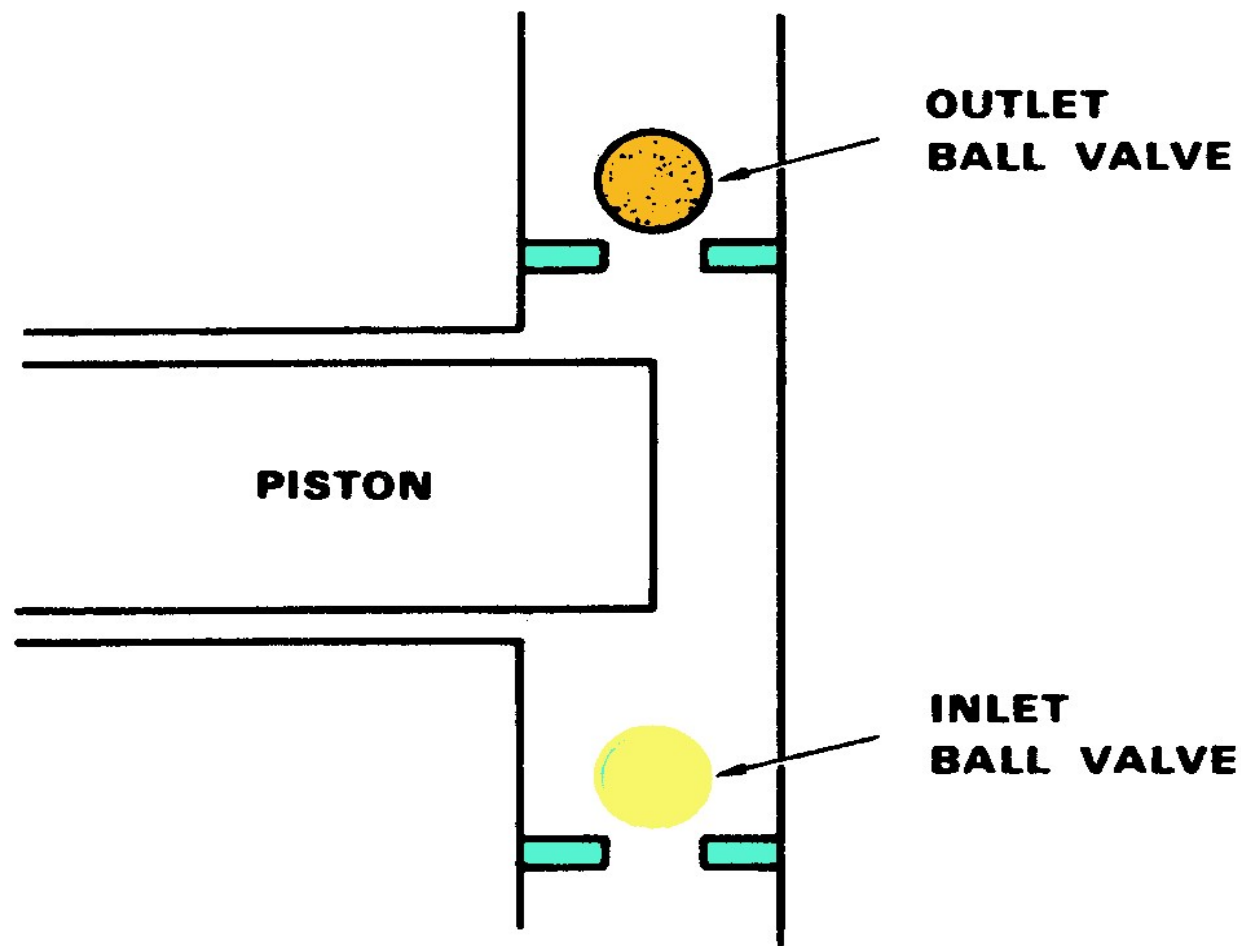


FIGURE 21.17. *Schematic diagram of a reciprocating pump. Solvent flow is in an upward direction. Courtesy of Varian Associates.*

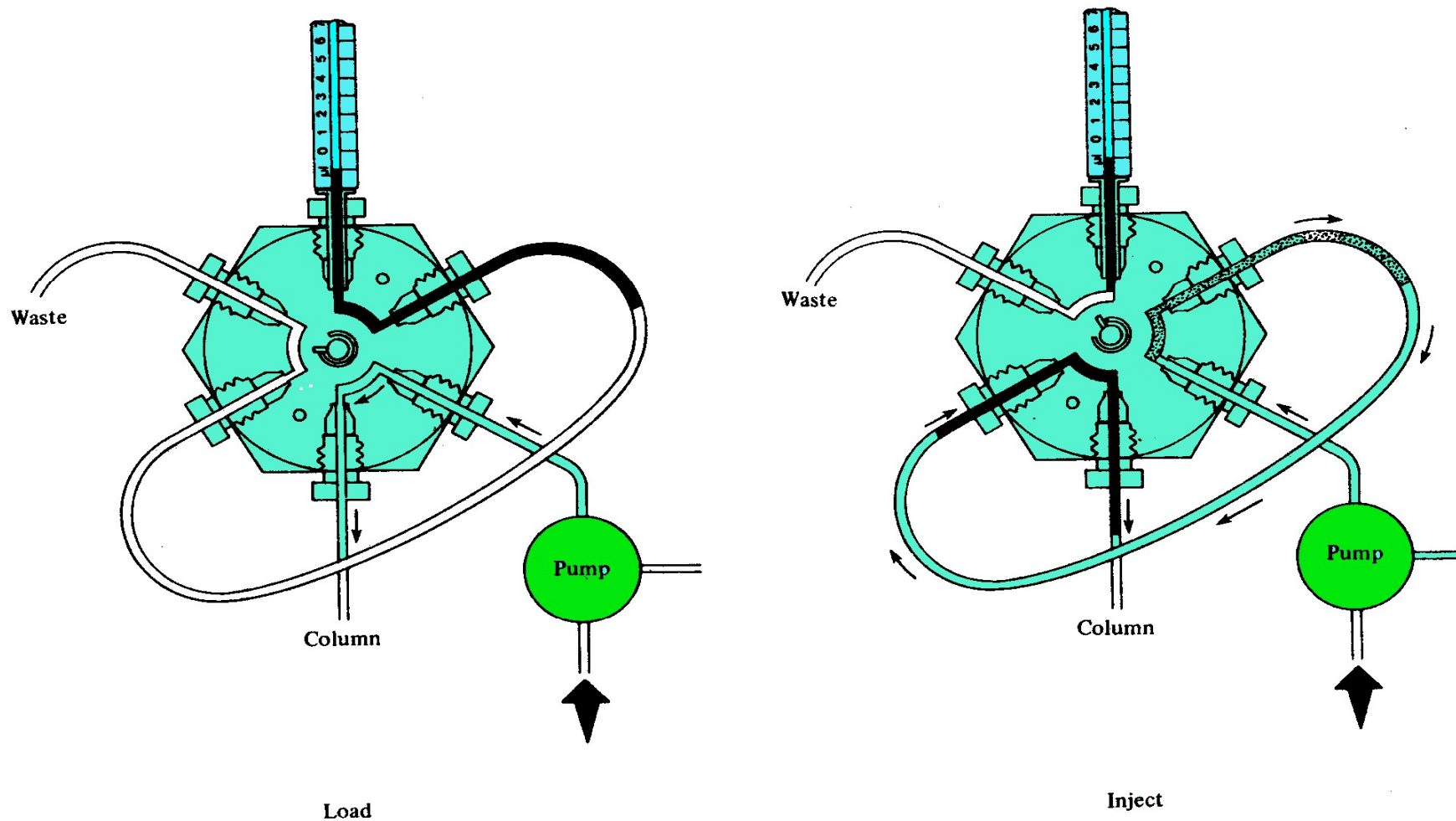
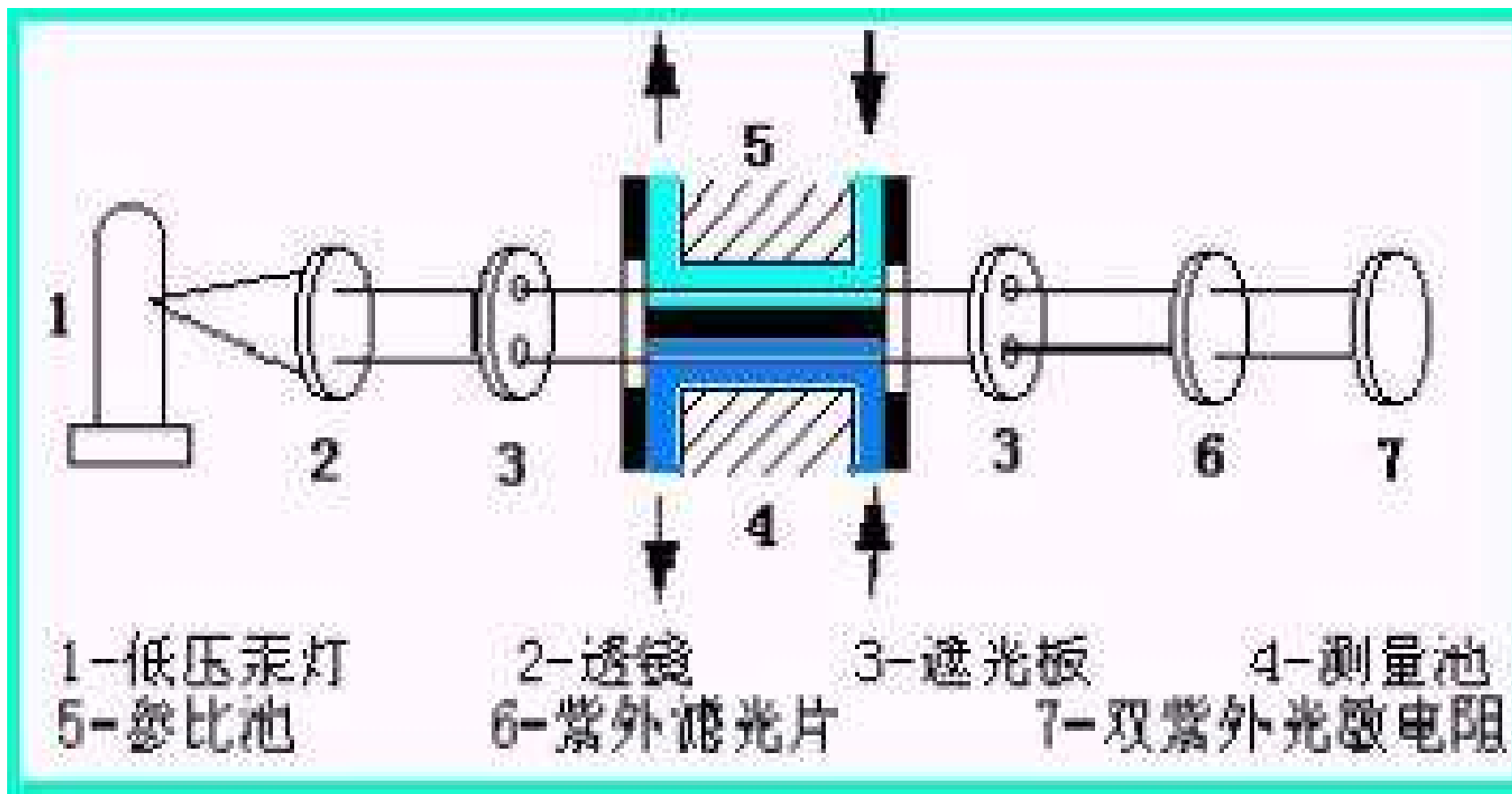
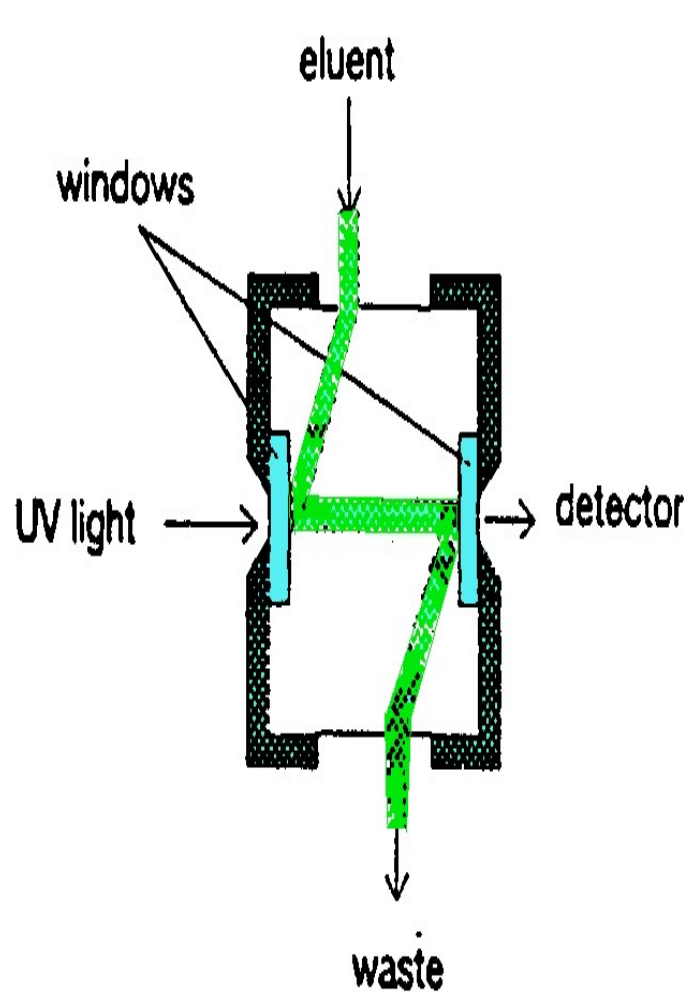


FIGURE 20-12 Six-port rotary sample-injection valve for HPLC. The arrows indicate the path of solvent flow. Courtesy of Varian Associates.





Z型检测池

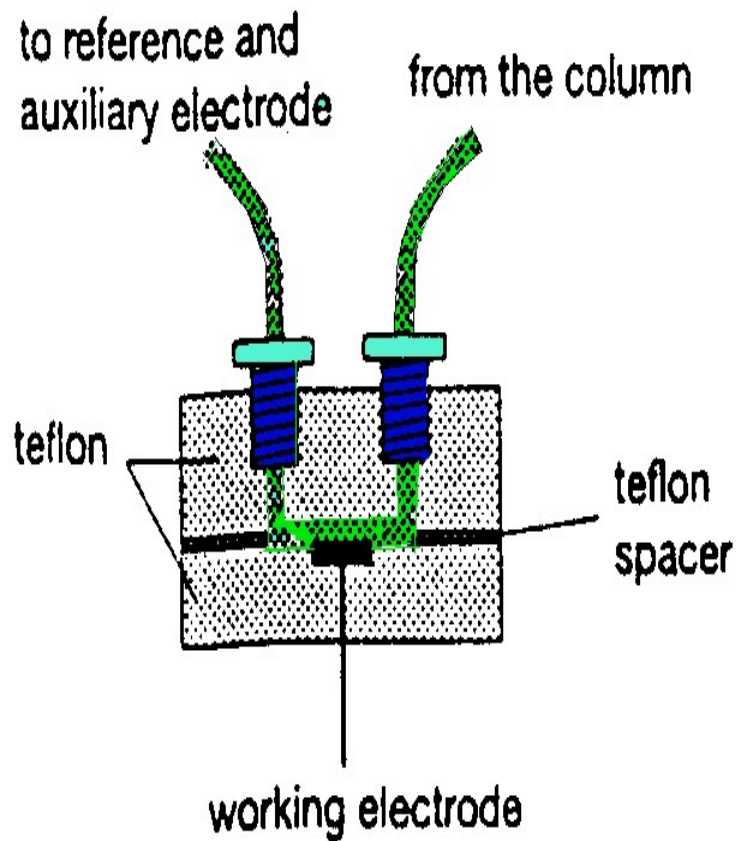


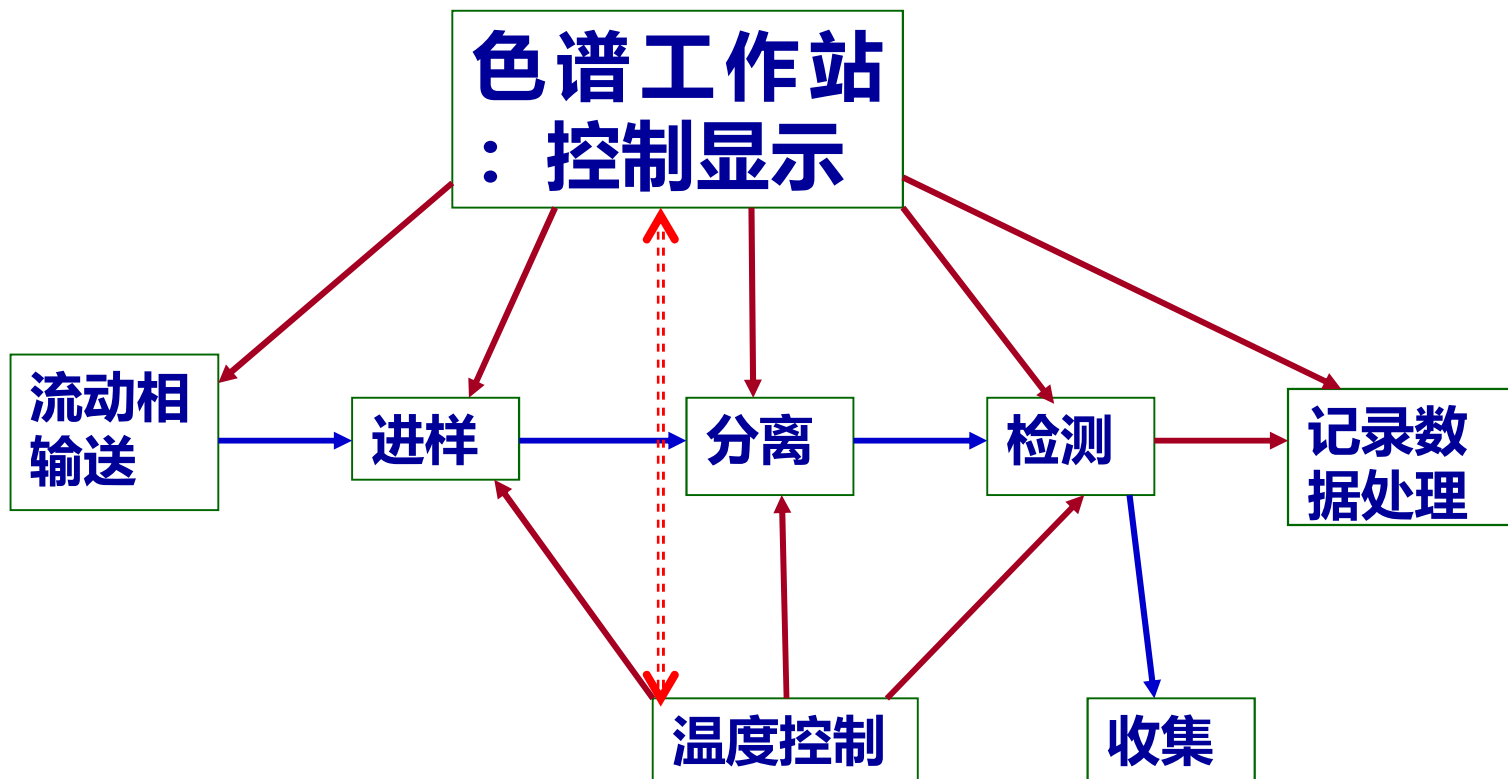
Fig. 20-5 Electrochemical detector with a glassy carbon working electrode

电化学检测器



从构成仪器的功能块可分为六大系统：流动相供给和输送系统、进样系统、分离系统、检测系统、记录或数据处理系统（色谱工作站）和辅助控制系统。由于流动相的性质不同，流路系统的仪器结构有所不同。但记录和数据处理系统相同。

- ◆ **色谱检测器**
 - ◆ **色谱数据处理**





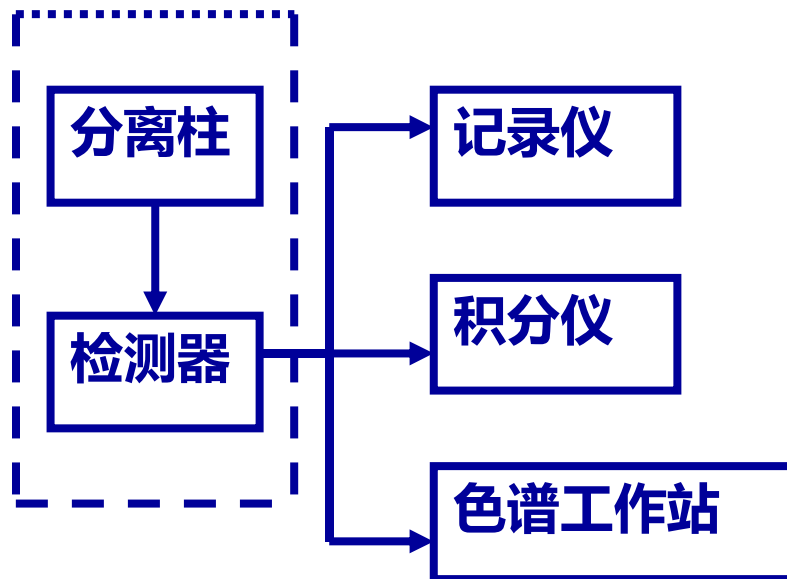
色谱检测器 (对流出物进行连续检测)

检测器是一种换能装置, 它将流动相中组分含量变化, 转变成可测量电信号(通常是电压), 输入记录器。从原理分析, 任何一种分析鉴定方法都可能成为色谱检测器。理想检测器应该是灵敏度高、线性范围大、对所有待测组分相同响应。检测器分为:

- 热学、光学、电学、电化学。。。检测器
- 总体性质检测器: 热导、示差折射、电导
- 溶质性质检测器: 氢焰、紫外、荧光
- 通用检测器与选择型检测器
- 浓度型检测器和质量型检测器



色谱数据处理



色谱仪信号输出方框图

色谱数据处理通过ADC转换器,把模拟信号转换成数字信号,然后采用色谱软件处理给出色谱图等信息。

数据处理原理:

- ◆ 峰的检测
- ◆ 数据采集
- ◆ 基线校正和重叠峰的分离

- 自动处理
- 人工修正



色谱工作站由色谱软件和接口组成。

色谱工作站的两大功能

色谱数据处理

ADC模数转换接口

记录并分析色谱流出曲线，这对于GC、HPLC和CE基本上是一样的；

如简易型色谱工作站，
积分仪

控制仪器参数

DAC模数转换接口

建议采用原版色谱工作站，
通常配有“电子钥匙”。



色谱智能化和专家系统简介

色谱智能化是新一代色谱仪的发展方向，其特点是代替人的部分智能，选择分析方法和确定最佳色谱条件，并有条件地进行部分组分定性工作。这项工作不仅要求计算机技术，更重要的是，要加强色谱的基础理论研究，提高色谱操作技术，特别是制备出性能稳定的色谱柱，这样才能使操作规范化，以实现人工智能色谱。

色谱专家系统是色谱智能化的一个重要组成部分，它从人工智能和数值计算方法出发开展研究，应包括以下几大部分：

- (1) 分离模式和柱系统的选择；
- (2) 预处理方法和检测器的选择；
- (3) 分离条件最优化；
- (4) 在线色谱峰的定性和定量；
- (5) 色谱硬件的诊断。



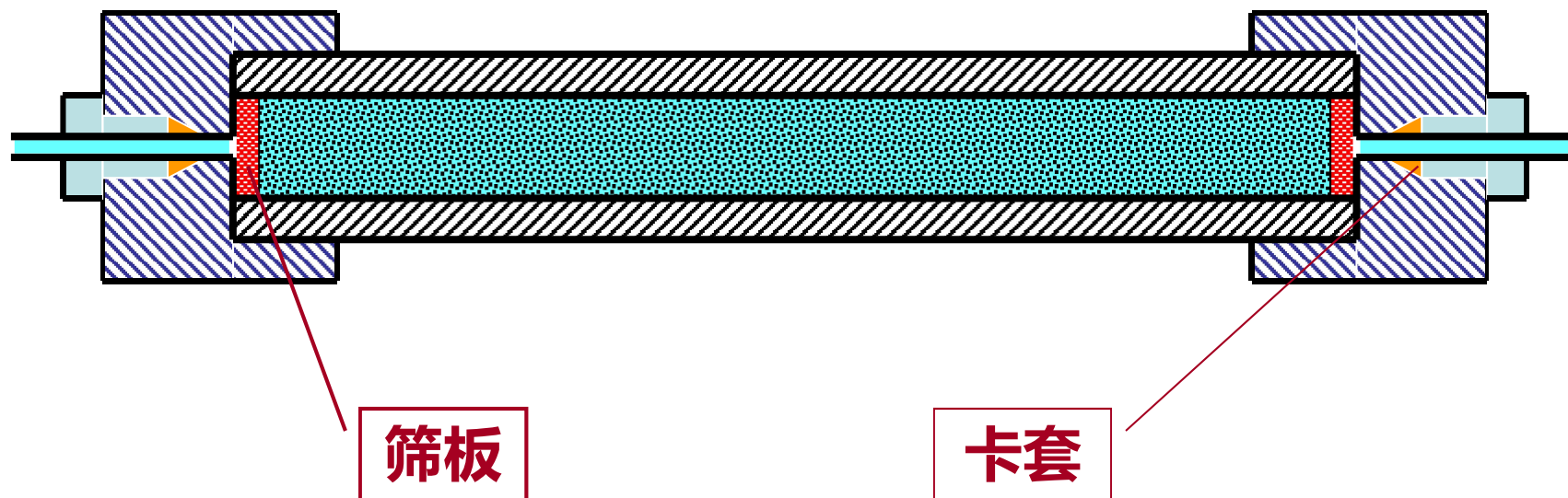
色谱柱（固定相、填料）

色谱柱是色谱仪的分离心脏，其核心是优质固定相（填料）。色谱分离的首要工作是选择性能良好的色谱柱，即在确定的分离条件下分离效率高和分析时间短的色谱柱。



色谱柱选择应考虑：

- 固定相类型, 主要取决于样品分离模式;
- 柱填料结构, 主要指颗粒的形状大小、均匀性、比表面、平均孔径和孔容等;
- 柱规格指柱内径、柱长度和填料粒度
- 色谱柱牌号/厂商。



注意流动方向标识!



色谱柱的结构

色谱柱由柱管、填料、密封圈、过滤板、柱头等组成。应特别注意柱头规格及无死体积连接的特性。

柱规格

制备柱

分析柱

微径柱液相色谱 (Microbore HPLC)

毛细管液相色谱 (Capillary HPLC)

快速柱：高效短柱，如 $4.6 \times 30\text{mm}$, $3\mu\text{m ODS}$ 柱

整体柱 (Monolithic column)



柱填料

硅胶和硅基仍是目前最广泛应用的液相色谱柱填料。此外还有高分子多孔微球、高疏水表面的多孔碳、无机金属氧化物等。

1. 填料的特性

1) 基质材料

- ① 无机基体：硅胶、氧化铝、氧化锆和二氧化钛等
- ② 交联聚合物：聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯等
- ③ 复合材料：无机基体复合一层聚合物

2) 形状：球形和不规则

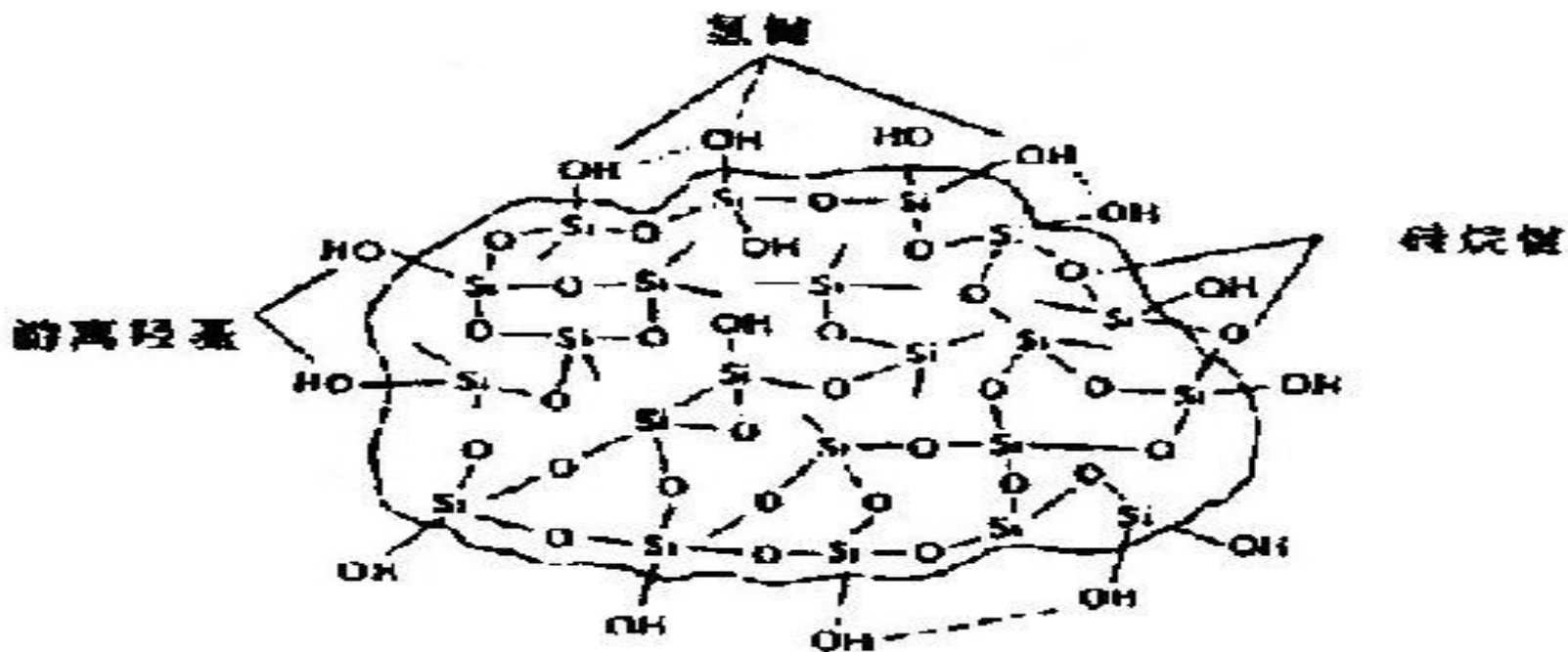
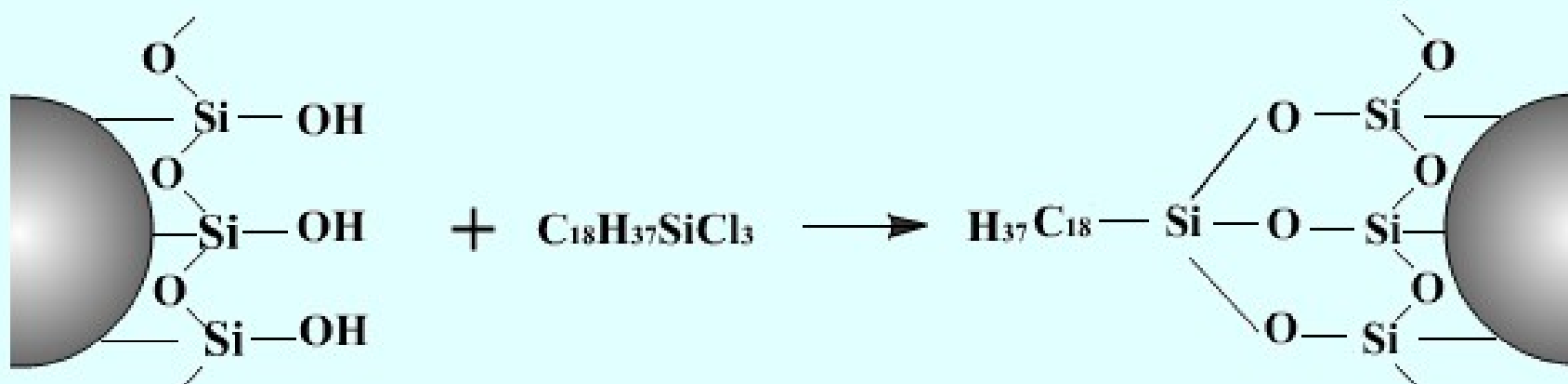


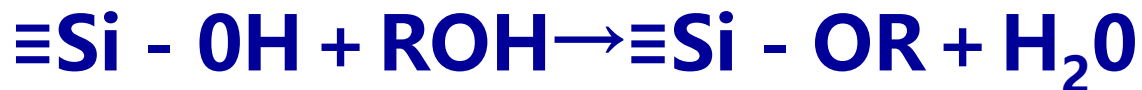
图 21.25 表明各种类型化学键和硅醇官能团的硅胶结构示意图





键合固定相的制备

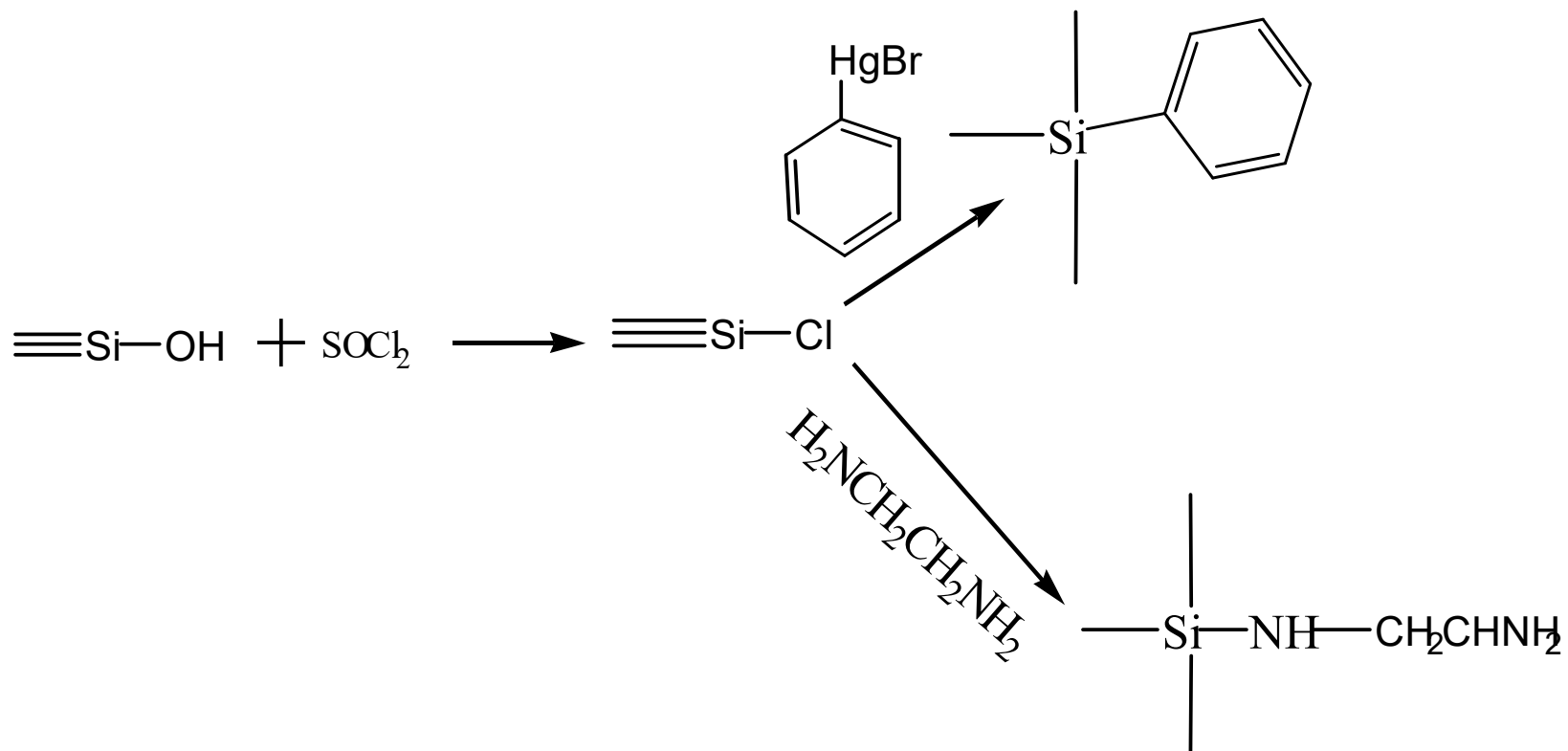
(1) 硅酸酯 ($\equiv\text{Si}-\text{OR}$) 键合固定相,它是最先用于液相色谱的键合固定相。用醇与硅醇基发生酯化反应:



由于这类键合固定相的有机表面是一些单体,具有良好的传质特性,但这些酯化过的硅胶填料易水解且受热不稳定,因此仅适用于不含水或醇的流动相。

(2) $\equiv\text{Si} - \text{C}$ 或 $\text{Si}-\text{N}$ 共价键合固定相

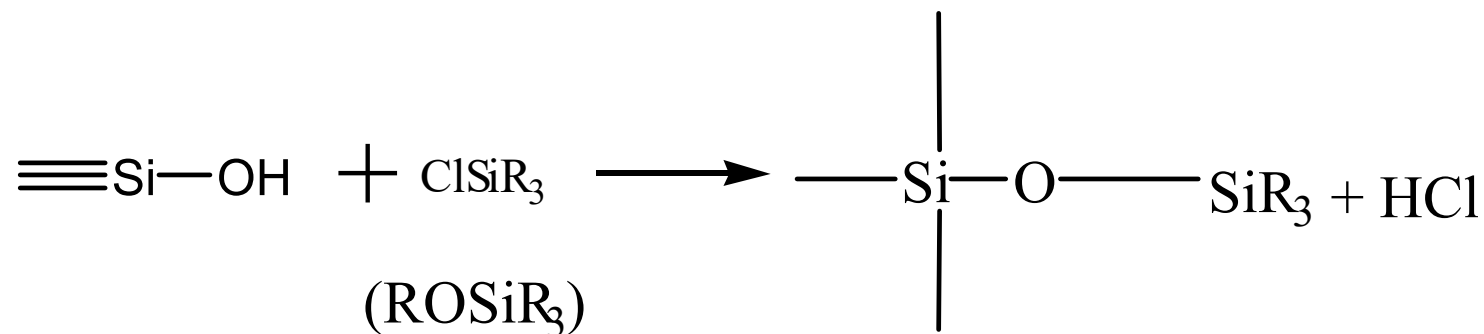
制备反应如下



共价键键合固定相不易水解，并且热稳定较硅酸酯好。缺点是格氏反应不方便；当使用水溶液时，必须限制pH在4~8范围内。



(3) 硅烷化 ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{C}$) 键合固定相 制备反应如下: (最常见类型!)



这类键合固定相具有热稳定性好, 不易吸水, 耐有机溶剂的优点。能在70°C以下, pH2~8范围内正常工作, 应用广泛。



3) 粒度及分布范围

4) 孔径和耐压性

一般硅胶的孔径在60-125A，但大孔硅胶的孔径为300-1000A。硅胶填料的产品差异主要取决于：

- ① 微粒基质的制备过程差异；
- ② 基质和键合物反应的差异；
- ③ 柱装填技术专利的差异。

一些键合键新技术：

- (1) RX技术 (Tx technology) “碱性脱活”
- (2) SB技术 (Stabilized Bonding) “高覆盖量”
- (3) 封端技术 (End-Capping)



固定相类型 (Stationary phase)

1) 按色谱保留原理把填料分为：吸附剂、离子交换剂、涂敷固定液、分级孔径或交联度填料等。

2) 按特性分类

① 硅胶：极性吸附剂

② 键合固定相 (为什么要键合?)

采用硅胶表面键合技术，对硅胶微粒表面进行修饰---硅烷化，使得硅胶表面带有不同的功能团，以适应不同的分离需要。目前在色谱填料中，键合相约占78%(其中C₁₈占反相色谱的72%)，硅胶约占10%)。

A. 基质：200-300m²/g的硅胶；聚合物，如聚苯乙烯和聚乙烯醇胶等。



键合相类型

烷基： C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_6 、 C_8 、 C_{12} 、 C_{16} 、 C_{18} 、 C_{22} 等反相柱；

苯基： C_6H_5- ，含有 $\pi-\pi$ 相互作用；

氰基： $-(CH_2)_3-CN$ ，带有给电子作用、羟基的氢键作用；正相、反相均可。

氨基： $-(CH_2)_3-NH_2$ ，弱阴离子型键合相，可用于糖分析。

其它极性键合相还有：二醇基 Lichrosorb DIOL；硝基 Nucleosil- NO_2 ；二甲胺基 Nucleosil- NMe_2 等。

C. 键合层（单层和聚合物）



柱性能测试：应指定色谱条件和检测物质

- 1. 理论塔板高度**
- 2. 峰不对称因子：应小于或等于1.2**
- 3. 相对保留值和分配比的重现性：精密度应优于5%和10%**
- 4. 柱阻力因子：
$$\phi = 0.1 \Delta P t_0 d_p^2 \div (10^9 \eta L^2)$$

多孔填料 ϕ 为500-1000**
- 5. 折合塔板高度**



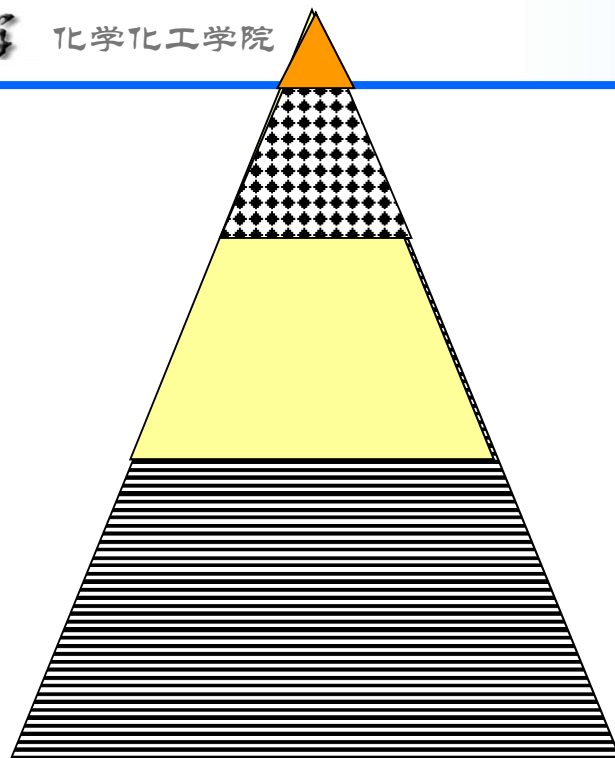
流动相 (Mobile phase)

流动相（淋洗剂、洗脱剂）是影响液相色谱分离的一个非常重要的实验因素。改变流动相性质和组成将改变溶质组分的保留值、分离选择性和柱效。在实际工作中，流动相的可选择范围较大是液相色谱的一个显著特点。

流动相选择和优化是大多数液相色谱分析的主要研究工作，在合理的时间内，所用的流动相要能使样品各组分达到足够的分离。



液相
色谱
溶剂
选择
范围



合适选择性溶剂

合适保留值溶剂

合适物理性质溶剂

所有溶剂

液相色谱流动相溶剂的选择步骤:

- 选择具有合适物理性质的溶剂，如沸点、粘度、紫外截止波长等
- 选择合适洗脱强度的溶剂：简单样品， $2 \leq k' \leq 5$ ；复杂样品， $0.5 \leq k' \leq 20$
- 改变溶剂的选择性，使被分离组分具有较高的 α 值



流动相溶剂的选择

溶剂的实用要求：在实际操作中所选用的流动相能保证色谱系统的分离过程可重复进行：**溶剂纯度和化学特性须满足色谱过程稳定性和重复性的要求；溶剂应不干扰检测器的工作；在制备分离中，溶剂应当易于除去，不干扰对分离组分的回收。**

1. **与色谱系统的适应性：**溶剂要有一定的化学稳定性，不与固定相和样品组分起反应。

2. **溶剂的纯度（包括毒性和价格）**

HPLC级：色谱淋洗剂，波长—透光率

A.R.级：主成分及杂质含量



3. 溶剂的粘度要小： 一般 η 约为(0.4-0.5) mPa·s , 最大也不超过 2mPa·s。粘度大, 流动相传质慢, 柱效下降；同时柱压增大。

4. 与检测器匹配： UV检测要求mp的背景吸收要低, 所用溶剂的截止波长 ($T < 10\%$ 对应的波长)要与之相匹配。而RI检测则要求溶剂的折光指数与溶质的差别要大, 以利于检测。

5. 沸点低： 对制备色谱, 采用低沸点溶剂时的固体残留物少, 有利于提高纯度。

6. 其他要求： 溶剂对样品要有一定的溶解度。
mp用前要脱气处理。便于更换和清洗。



流动相及溶剂极性 (资料)

- (1) 流动相按组成不同可分为单组分和多组分;
- (2) 按极性溶剂可分为极性、弱极性、非极性;
- (3) 按使用方式有固定组成淋洗 (等度洗脱) 和梯度淋洗。

常用溶剂:己烷、四氯化碳、甲苯、乙酸乙酯、乙醇、乙腈、水;

- (4) 采用二元或多元组合溶剂作为流动相可以灵活调节流动相的极性或增加选择性, 以改进分离或调整出峰时间;
- (5) 亲水性固定液常采用疏水性流动相, 即流动相的极性小于固定相的极性, 称为正相液液色谱法, 极性柱也称正相柱;
- (6) 若流动相的极性大于固定液的极性, 则称为反相液相色谱, 柱也称为反相柱。组分在两种类型分离柱上的出峰顺序相反。



高效液相色谱流动相溶剂的物化性质 (部分)

溶剂	紫外截止 波长/nm	折光指数 (25℃)	沸点/℃	粘度/mPa·s (25℃)	P'	ϵ°
异辛烷 (2, 2, 4-三甲基戊 烷)	197	1.389	99	0.47	0.1	0.01
正庚烷	195	1.385	98	0.40	0.2	0.01
正己烷	190	1.372	69	0.30	0.1	0.01
环戊烷	200	1.404	49	0.42	-0.2	0.05
1-氯丁烷	220	1.400	78	0.42	1.0	0.26
溴乙烷		1.421	38	0.42	2.0	0.35
四氢呋喃	212	1.405	66	0.38	4.0	0.57
丙胺		1.385	48	0.46	4.2	
乙酸乙酯	256	1.370	77	0.36	4.4	0.53
	245	1.443	61	0.43	4.1	0.40



液相色谱中的溶剂强度

1. 溶剂强度是描述色谱性能的主要指标，表示溶剂对样品的洗脱能力，它决定于溶剂与溶质之间分子的作用力。目前还没有一个统一标准描述不同类型液相色谱体系中的溶剂强度，而是采用相对极性和溶解度参数等作为溶剂强度指标。

1) 溶解度参数 δ (参见溶剂选择性)

2) 极性参数 P'

根据固定相和流动相的极性大小，人们把液相色谱分成：

◆ 正相色谱：固定相极性大于流动相 (包括硅胶吸附色谱)

◆ 反相色谱：固定相极性小于流动相

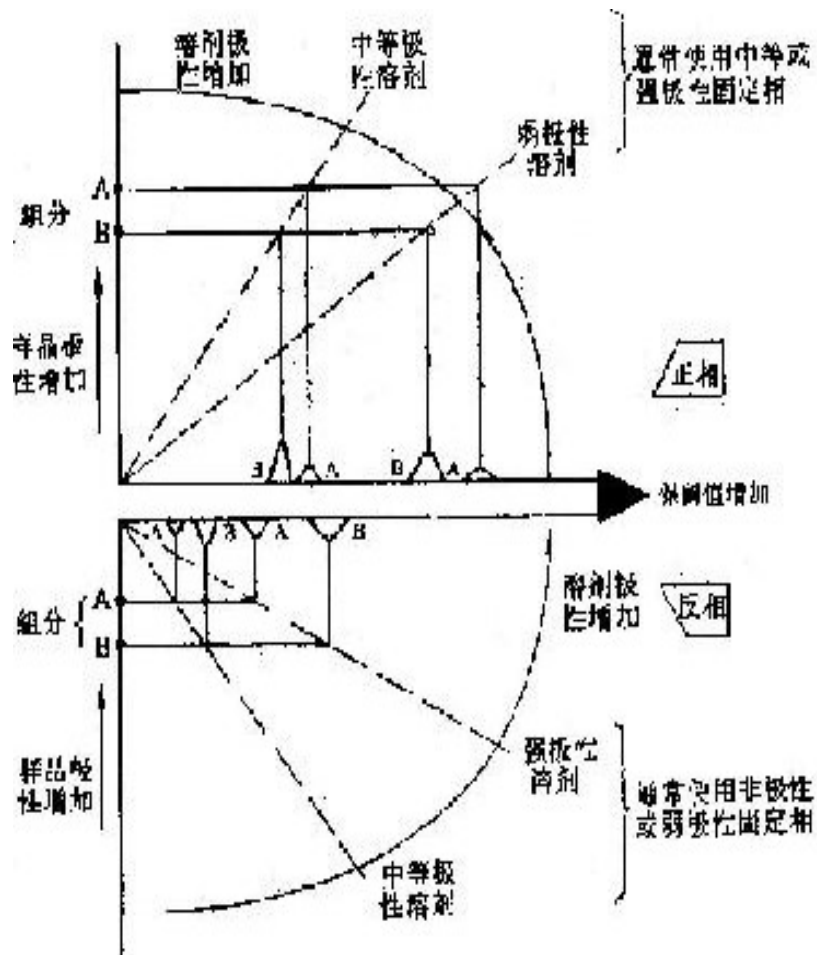


图 溶质保留值随它和溶剂极性变化的一种保留规律

正相色谱：增加溶剂极性，保留时间增大或变小？

反相色谱：增加溶剂极性，保留时间又如何变化？



洗脱强度与溶剂极性

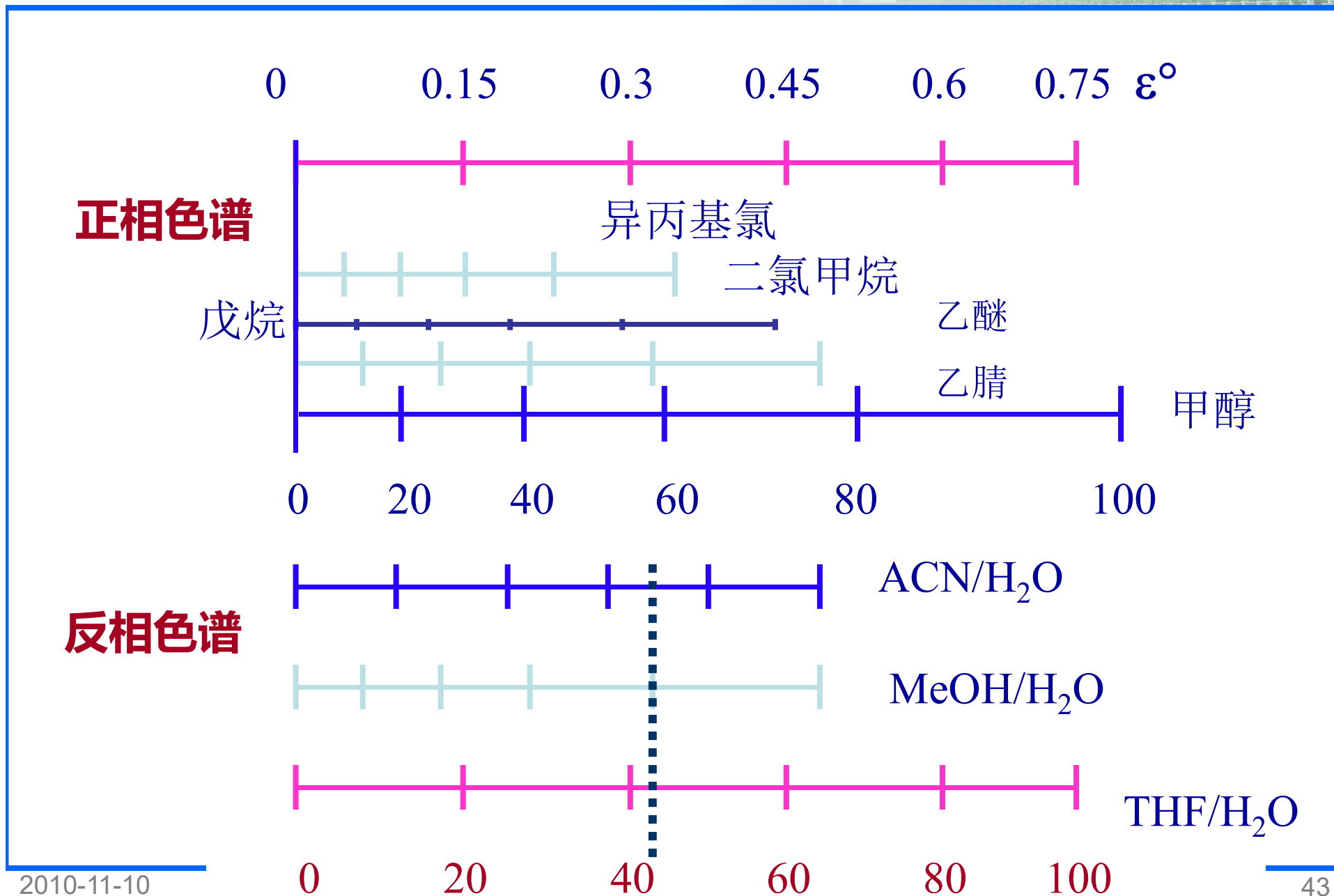
分子间相互作用有色散力、偶极作用、氢键和介电作用。某一溶质与其它分子相互作用大小的程度可以用极性大小表示。极性越大，它与其它分子的作用力越大。

“极性”溶剂容易吸收和溶解“极性”物质。

溶剂洗脱强度指流动相中溶剂的洗脱能力，它不仅与流动相，而且与固定相的极性有关。在正相色谱中，“溶剂洗脱强度”与溶剂极性成正比；而在反相色谱中，溶剂极性越大，洗脱能力越小。



溶剂强度图





混合溶剂的极性

在液相色谱中，一般溶剂的极性变化二个单位，溶质的分配比差不多能有十倍的变化。通过溶剂强度参数的计算，可以较好地较快地选择合适溶剂或调整流动相的极性范围。如：

①正相色谱： $k_2' / k_1' = \exp [(P_1' - P_2')/2]$

②反相色谱： $k_2' / k_1' = \exp [(P_2' - P_1')/2]$

在液相色谱常用混合溶剂作流动相。混合溶剂的 P' 具有加和性：

$$P'_{ab} = \phi_a P'_a + \phi_b P'_b, \quad \phi \text{ 为某一溶剂的体积分数。}$$



溶剂选择性分类

一般地说, 改变溶剂比例可调节流动相的极性, 从而使得组分的容量因子落在合适的范围内。但由于分子间相互作用的类型相同, 分离因子变化不大。因此专门研究了各种溶剂的选择性, 并将常用溶剂进行分类。



流动相的优化

流动相优化主要是考察流动相组成对保留时间、分离因子和分离度等参数的影响。

使用混合溶剂最大优点：获得最佳的分离选择性；保持流动相的低粘度，从而保证高的柱效。

在吸附色谱中混合溶剂选择规则：混合溶剂中极性强的组分含量大或小时，有最大的 α 值；能与溶质发生氢键作用的溶剂，有较好的分离选择性。



梯度洗脱技术

梯度洗脱（溶剂程序）：通过改变流动相的组成来调整组分的 k' 值，改变分离因子 α 值，以达到最短时间内得到最佳分离的目的。

为什么程序升温在液相色谱中没有受到青睐？

在液相色谱中最低温度和最高温度受到流动相的黏度和沸点的限制；同时它的温度效应比较小。

- **梯度洗脱的特点**
- **梯度洗脱的主要条件**
- **梯度洗脱的基本原理**



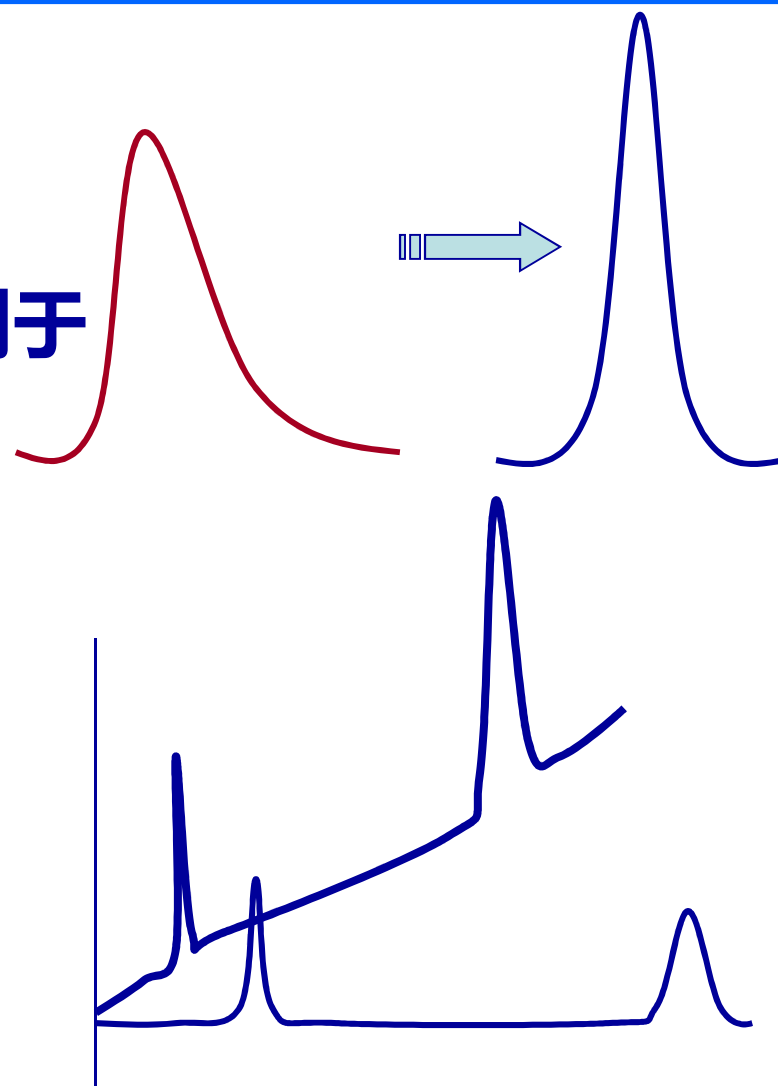
1. 梯度洗脱的特点

(1) 改善分离, 加快分析速度;
(2) 改善峰形, 减少拖尾, 有利于痕量组分的检测;

(3) 增加峰容量;

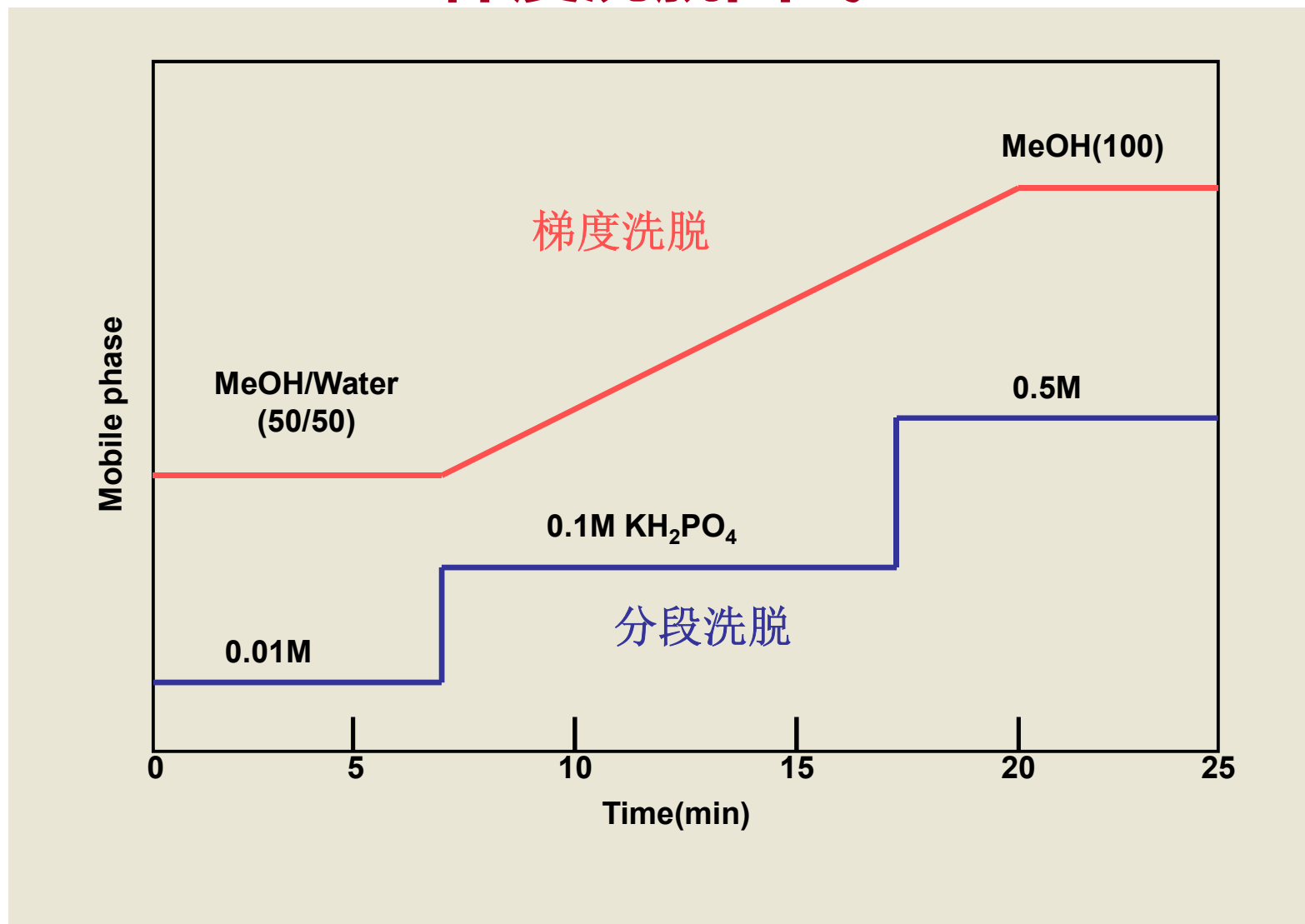
(4) 强烈滞留的组分不容易残留在柱上, 保持柱性能长期良好;

(5) 下次分析时, 流动相需要一段平衡时间; 不同溶剂的UV吸收程度稍有差异, 可能会引起基线漂移。





梯度洗脱曲线

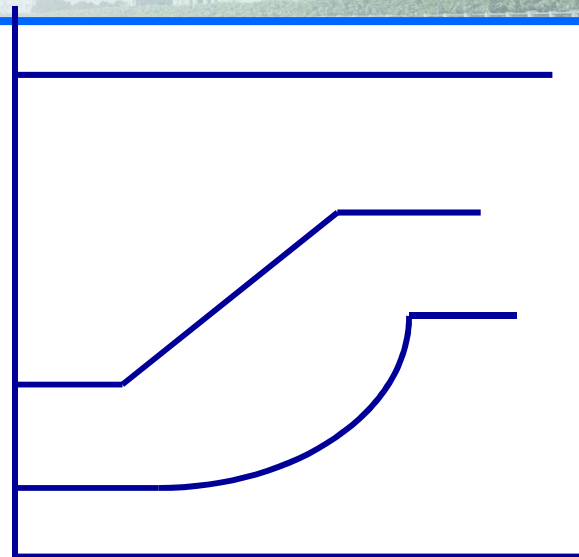




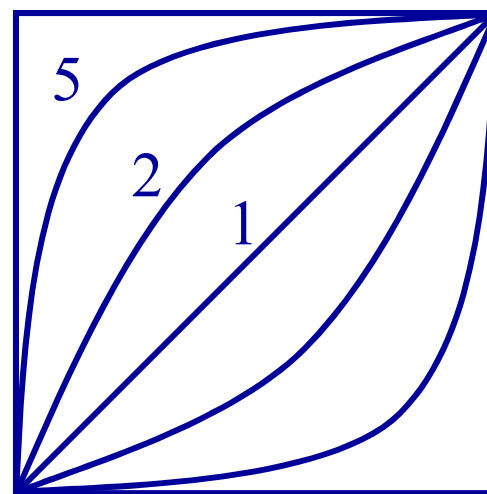
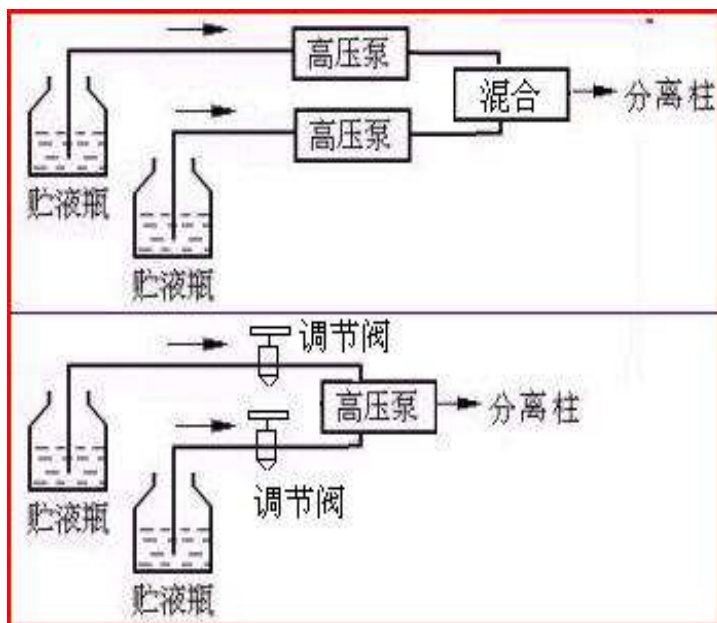
2. 梯度洗脱的主要条件

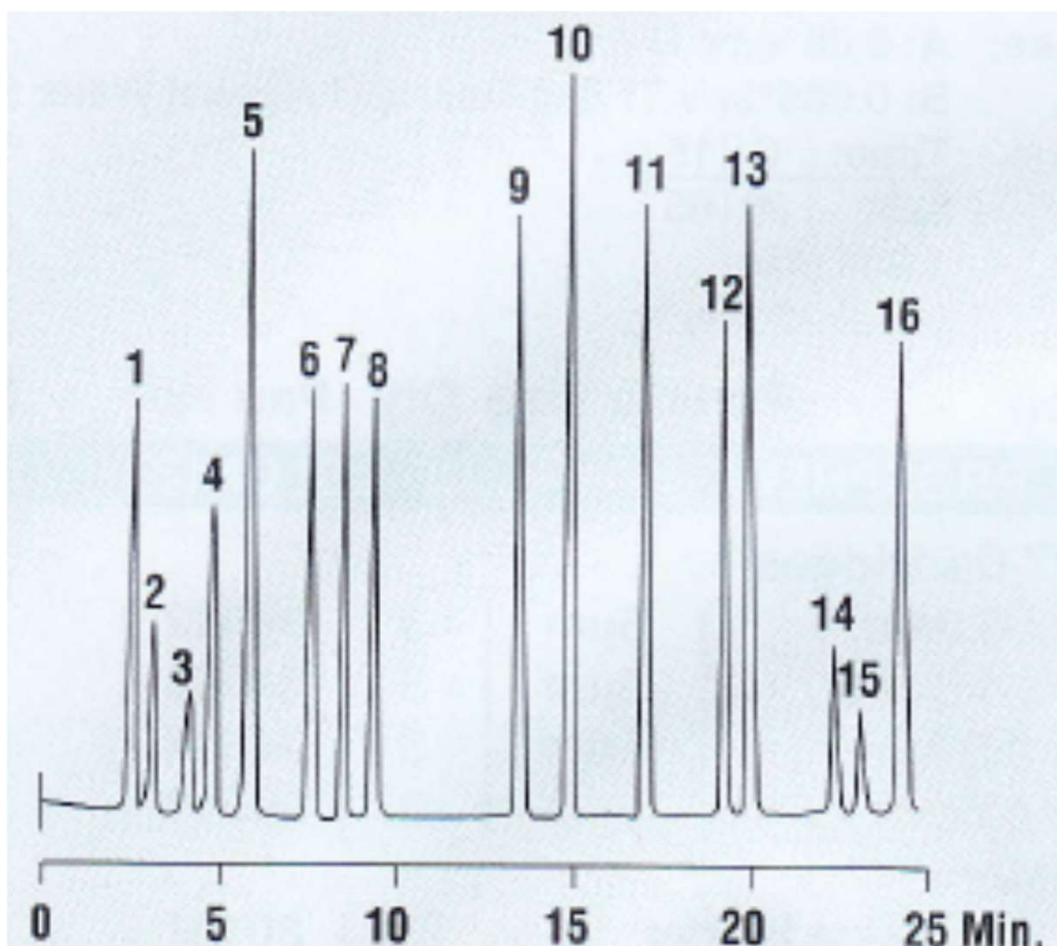
- ① A 流动相/弱溶剂组成;
- ② B 流动相/强溶剂组成;
- ③ 梯度时间;
- ④ 梯度曲线: 线性、凸型或凹型等。

强溶剂
A%



time





Priority Pollutant PAH's (EPA Method 610)

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 1. Naphthalene | 9. Benz[a]anthracene |
| 2. Acenaphthylene | 10. Chrysene |
| 3. Acenaphthene | 11. Benzo[b]fluoranthene |
| 4. Fluorene | 12. Benzo[k]fluoranthene |
| 5. Phenanthrene | 13. Benzo[a]pyrene |
| 6. Anthracene | 14. Benzo[g,h,i]perylene |
| 7. Fluoranthene | 15. Dibenz[a,h]anthracene |
| 8. Pyrene | 16. Ideno[1,2,3-cd]pyrene |

Column: ProSphere 300 PAH, 300Å, 5µm, 150 x 4.6mm
Mobile Phase: A: Water
B: Acetonitrile
Gradient:

Time:	0	3	23	28
%B:	50	50	100	100

Flowrate: 2.0mL/min
Temp: 25°C
Detector: UV at 254nm

多环芳烃高效液相色谱分析



高效液相色谱的主要分离方法

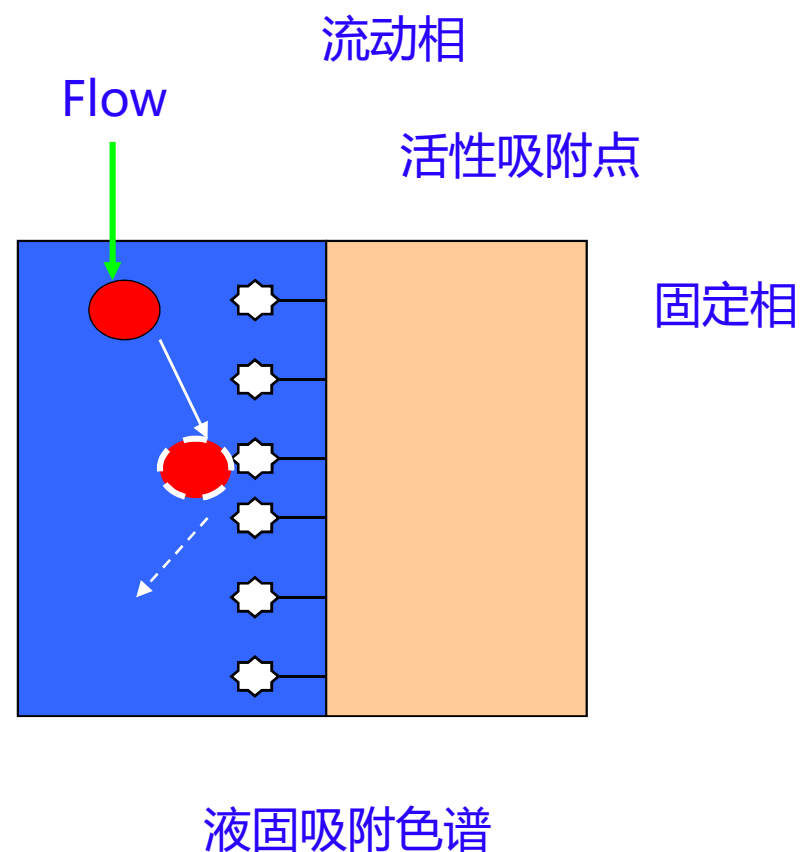
根据溶质的不同保留机理或色谱分离过程的物理化学原理，液相色谱的分离模式可分为：

- 吸附色谱 (Adsorption Chromatography)
- 分配色谱 (Partition Chromatography)
- 离子交换色谱 (Ion Exchanger Chromatogr.)
- 空间排阻色谱 (Size Exclusion Chromatogr.)



吸附色谱

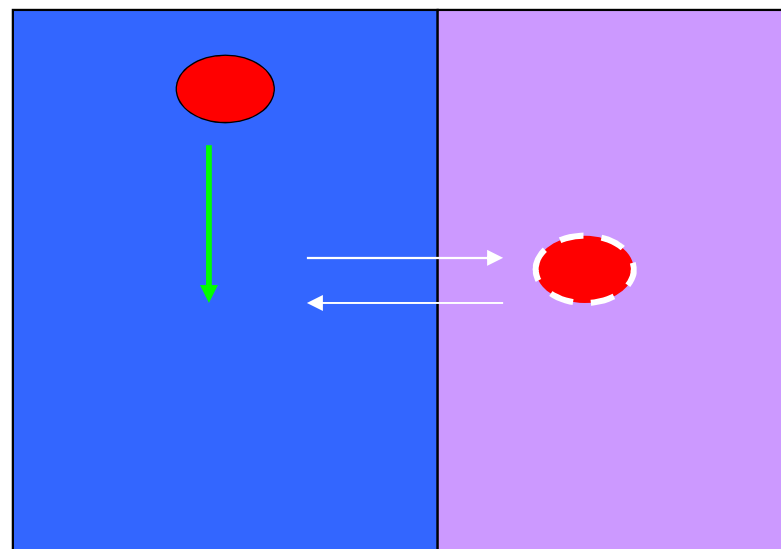
用固体吸附剂作固定相，以不同极性溶剂作流动相，样品中各组分依据它们在吸附剂上吸附力的大小来进行分离的色谱方法。





分配色谱

用涂渍在基体上的固定液作固定相，以不同极性溶剂作流动相，样品中各组分依据它们在固定液中溶解能力大小，即在固定相和流动相间的分配系数大小来进行分离的色谱方法。

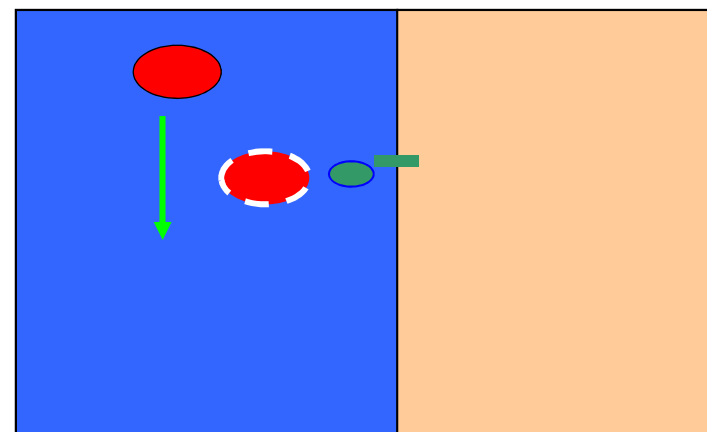


液液分配色谱



离子交换色谱

用离子交换剂作固定相，以具有一定pH值的缓冲溶液作流动相，样品中各离子组分依据它们与离子交换剂上荷电交换基团的交换能力大小来进行分离的色谱方法。

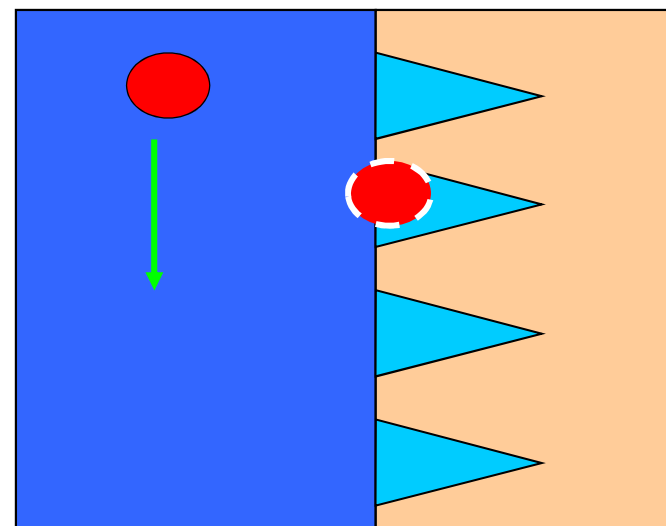


离子交换色谱



排阻色谱

用化学惰性多孔物质作固定相，样品中各组分依据它们在流动相的分子体积大小来进行分离的色谱方法。以水溶液作流动相的排阻色谱称为凝胶过滤色谱（GFC）；以有机溶剂作流动相的排阻色谱称为凝胶渗透色谱（GPC）。

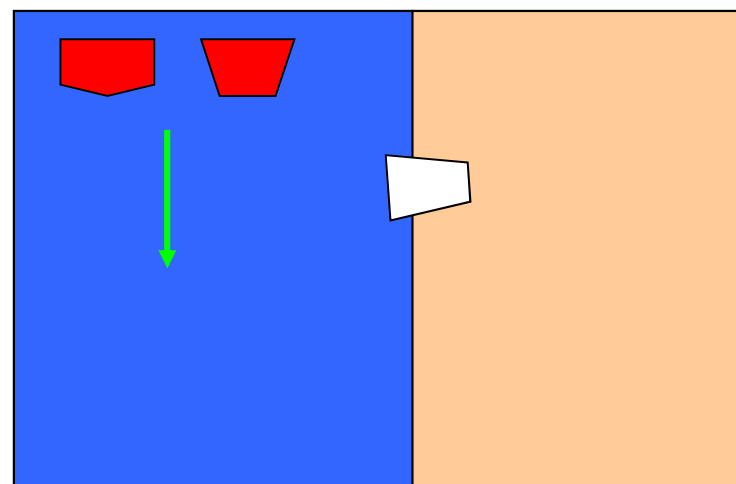


排阻色谱



亲和色谱

在基体上固载化生物特异性吸附的配位体作固定相，以具有一定pH值的缓冲溶液作流动相，样品中各生物活性分子组分依据它们与固相基体上固载的配位体之间的特异亲合力大小来进行分离的色谱方法。



亲和色谱



正相色谱 (Normal Phase Chromatography)

正相色谱采用**硅胶、氧化铝或带有氰基、二醇基和氨基的极性固定相**，**非极性流动相操作模式**，依据**溶质分子的极性大小进行分离**。**溶质分子与固定相的硅醇基等极性基团产生特异的极性相互作用**，**极性相互作用大的保留时间大，反之保留时间小**。

- ◆ **硅胶吸附色谱 (液固色谱)**

- ◆ **键合相正相色谱 (氰基和氨基柱)**

正相色谱中色谱柱强度：

硅胶柱 \approx 氧化铝柱 > 氨基柱 > 二醇基柱 > 氰基柱



液固吸附色谱

液固色谱的分离基础是样品组分分子与固体吸附剂表面活性点上的竞争吸附以及组分分子与流动相分子的相互作用。

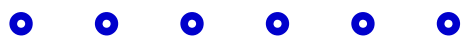
液固吸附色谱适合分离那些能溶于有机溶剂、具有中等分子量的组分，它能分离不同类型的化合物，如具有不同取代基，或取代基相同但其数目不同的化合物。

对于异构体的分离，液固吸附色谱比其它液相色谱有更高的选择性。如反相色谱中双键位置不同的异构体不能理想分离时，可选用硅胶吸附或涂渍银离子的硅胶吸附色谱分离。



为什么 (有机) 合成中常用液固吸附色谱 (硅胶柱) 分离纯化产物?

- 经济或性价比高
- 容量大
- 溶剂容易除去





一、原理

在吸附色谱过程中，样品分子通过色谱柱时，溶质的保留受到固定相的吸附力和流动相的溶解力/“拉力”的竞争作用。对于硅胶极性吸附剂，诱导、氢键这样等是强烈的，为主要作用力，而色散力是微不足道的。

根据**吸附顶替模型**，在进行色谱分离时，吸附剂表面首先被溶剂分子覆盖形成一单分子层。当溶质分子从流动相引入后，则会顶替掉吸附剂表面上原来覆盖的溶剂分子而被吸附。



二、流动相的选择

在硅胶吸附色谱中，对相对保留值和分离选择性起主导作用的是溶质与固定相的作用，流动相主要是调节溶质的保留值在适当范围内，对选择性的影响一般较小。

液固吸附色谱的流动相 ε° 值要适当，常用正己烷、正庚烷为主，添加少量 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 、 CH_3CN 和 CH_3OH 。

值得注意的是，有机溶剂中的少量水对分离的影响。



三、样品分子结构对保留的影响

样品分子的结构决定它们在色谱柱上保留。而对于吸附色谱来说,主要取决于样品分子所含的官能团的类型及其数目。

一些常见官能团的吸附强度大致如下:

- 不吸附: 烷烃
- 弱吸附: 烯烃、硫醇、硫醚、单环或双环芳烃、卤代芳烃
- 中等吸附: 多环芳烃、醚、腈、硝基物、大多数羰基化合物
- 强吸附: 醇、酚、胺、酰胺、亚枫、酸和多官能团化合物

样品分子的保留还取决于溶质是否能与吸附剂取得最大程度的作用,即分子空间效应。例如:

- 与官能团相邻的大烷基可能降低保留能力; (位阻效应)
- 顺式化合物的保留能力可能比反式化合物强;
- 对位化合物的保留能力可能比邻位化合物强等等。



液固色谱的应用特点:

- 液固色谱对具有不同极性取代基的化合物表现出较高的选择性，但对同系物的分离能力较差
- 对强极性或离子型样品，因有时会发生不可逆吸附，液固色谱常不能获得满意的分离效果。
- 吸附剂的含水量对吸附剂活性、样品容量和保留值有较大影响

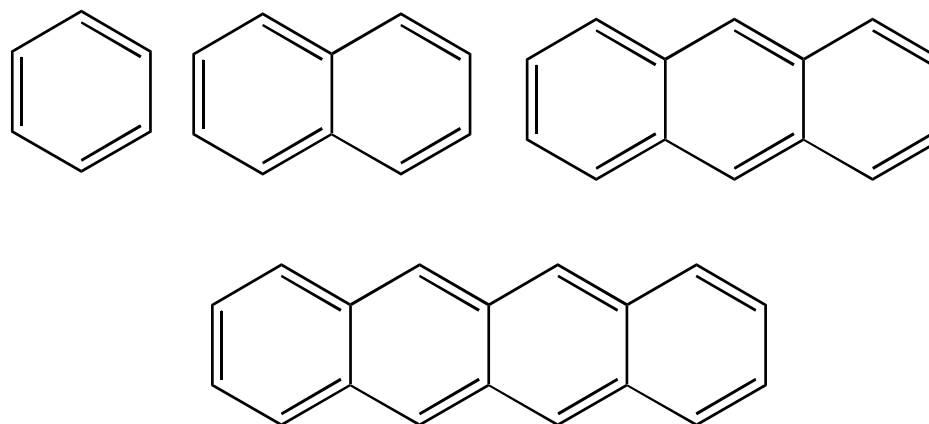
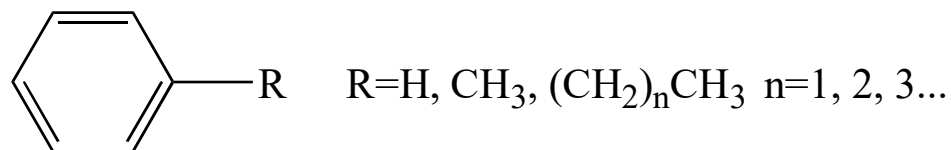
液固吸附色谱主要用于异构体的分离、族分离和制备色谱。



反相键合相色谱

键合相色谱是目前HPLC中最常见的分离模式，约80%的HPLC是采用键合相色谱柱完成的。

- 烷基苯同系物分离分析
- 多环芳烃分离分析





一、原理和分离对象

1. 正相色谱和反相色谱

键合相的种类比较多, 有非极性、极性和离子交换基团, 可使用于正相、反相和离子交换色谱。如氰基柱, 即可用作正相色谱, 又可用作反相色谱。

2. 反相键合相色谱的优缺点

(1) 反相键合相色谱的优点

- ① 样品极性范围宽, 有多种键合相可供选择;
- ② 使用的溶剂相对便宜, 平衡速度快;
- ③ 离子/离解化合物用离子对/离子抑制技术分析;
- ④ 容易操作, 分析速度更快, 重现性更好。



(2) 键合相的使用极限

- ① 对于硅基键合相, mp的pH应控制在2.5-7.5:
pH<2.5, 键合相易脱落; pH>7.5, 硅胶可能溶解。
- ② 残留的硅羟键可能吸附样品分子或杂质, 引起拖尾, 或 t_R 发生变化;

3. 反相键合相色谱的主要特点

- ★ 柱稳定高、寿命长
- ★ 溶剂相对便宜
- ★ 流动相可控制条件较多, 如溶剂强度范围大 (从纯水到非极性溶剂, 如Hex), 调整pH和I等
- ★ 含水体系有利于生物样品分析



二、流动相的选择

对于正相色谱, 采用弱极性流动相, 极性最弱的组分最先流出, 增加流动相的极性将减少组分的保留。

根据流动相, 反相色谱能区分为纯水溶液、**混合水溶液**和非水反相系统。

反相色谱中常用洗脱剂包括水、乙腈、甲醇和四氢呋喃等, 流动相的洗脱强度由有机溶剂浓度及其类型共同决定, 这种影响见反相色谱溶剂强度图。



三、反相色谱的保留机理

	正相色谱	反相色谱
固定相	极性	非极性
流动相	非极性	极性
溶质分子与固定相作用力	极性作用力（偶极、氢键）“强烈”	色散力（非选择性）“微弱”
溶质分子与流动相作用力	色散力（非选择性）	极性作用力（偶极、氢键）
极性溶质	保留时间随极性增大而增大	小或难保留
非极性溶质	小或难保留	可保留，保留时间随极性减少而增大



Carbon chain length of sample

A **B** **C**

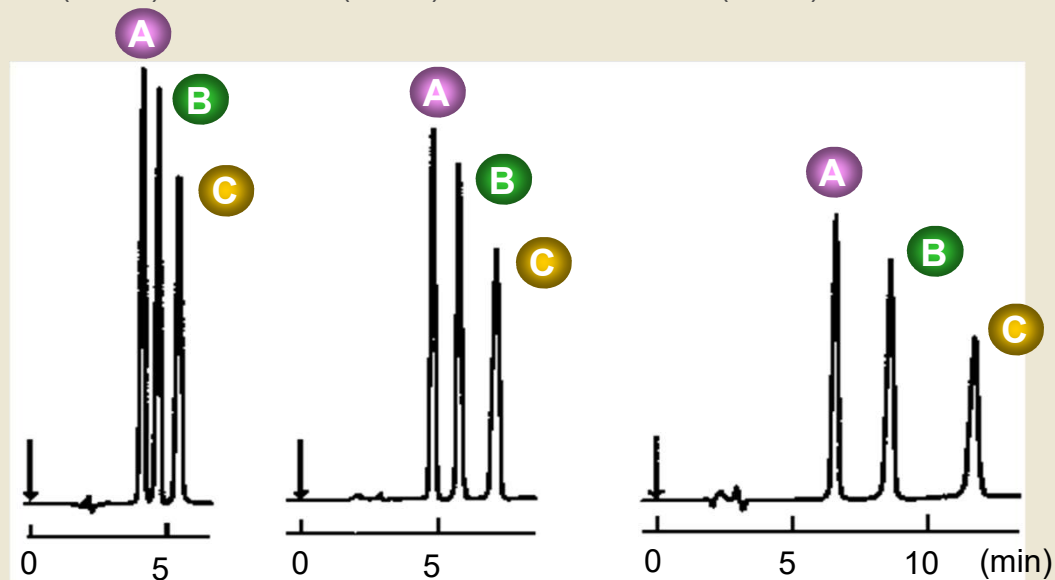
- A** : p-Hydroxy ethyl benzoate
- B** : p-Hydroxy propyl benzoate
- C** : p-Hydroxy butyl benzoate

Retention behavior in reversed phase HPLC

CH₃CN/H₂O
(70/30)

(60/40)

(50/50)



Low

Polarity of Mobile phase

High

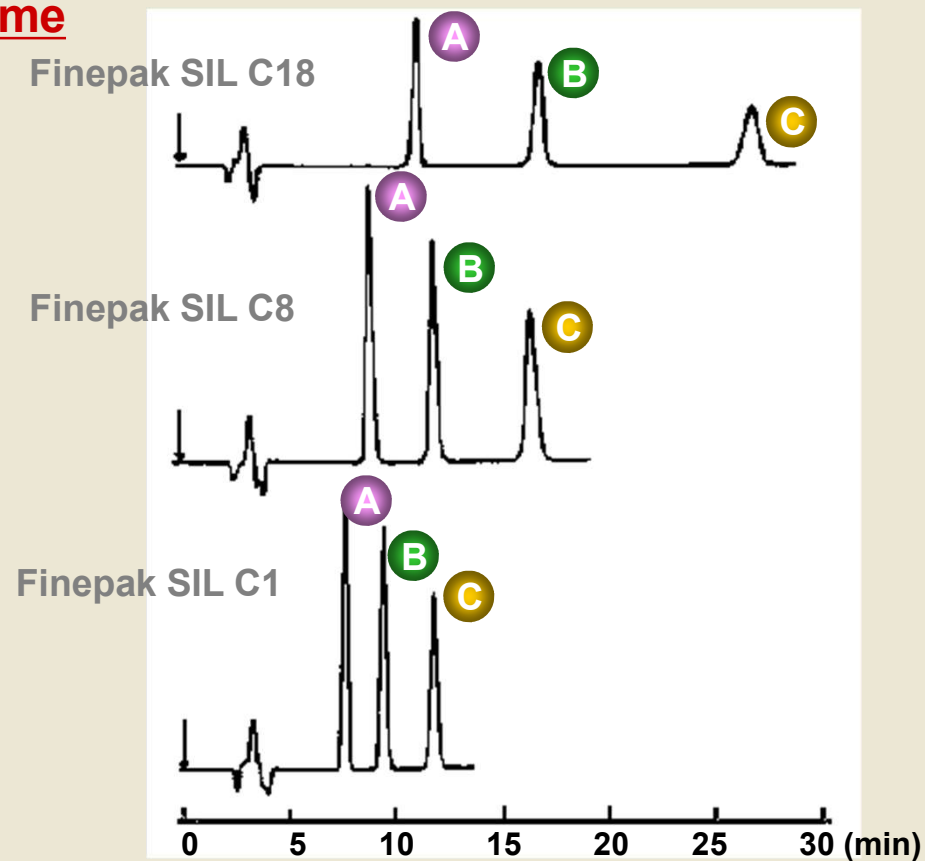
Column : Finepak SIL C18



Mobile phase : CH₃CN/H₂O(40/60)

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

Length of packing materials carbon chains and retention time





③ 溶质

- 离子化合物不被保留，如苯甲酸钠
- 非离子化合物：极性大, k' 值小
- 非极性化合物：分子表面积大, k' 值大
- 同系物：链长增大, k' 值增大
- 苯系物：环数增大, k' 值增大;
- 若化合物的非极性部分相同, 极性官能团增加, 则 k' 值下降
- 几何异构体：能形成内氢键的异构体的化合物 k' 值大。