

# 仪器分析——色谱法

## Chapter 1 色谱基本概念

### 一. 分类:

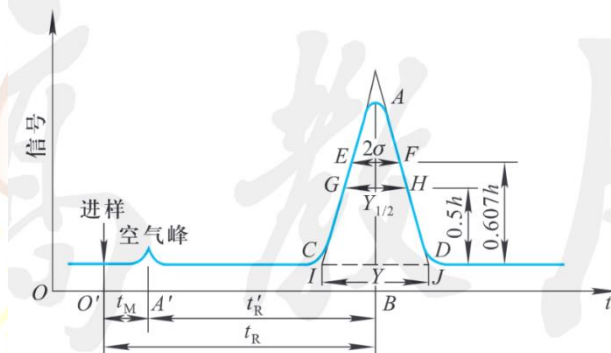
按照流动相的不同可分为:

1. 气相色谱法 (GC): 适用于分离易汽化、稳定、不易分解、不易反应的样品 (同系物、同分异构的分离)。
2. 液相色谱法 (LC): 适用于分离高沸点、热不稳定、离子型样品。
3. 超临界流体色谱 (SFC)。

按照固定相的不同可分为:

1. 柱色谱;
2. 纸色谱;
3. 薄层色谱 (TLC)。

### 二. 色谱术语:



1. **基线**: 柱后没有组分进入检测器时, 在操作条件下, 反应检测器系统噪声随时间变化的线。**基线漂移**指基线随时间的定向缓慢变化。基线噪声指各种因素引起的基线起伏。

2. **保留值**: 表示试样中各组分在柱内滞留时间的数值, 可用时间或者载气体积表示。保留值是色谱分离中的热力学因素决定的, **任何一种物质在特定的条件下都有固定的保留值**, 故可用作定性。

- I. **死时间** $t_M$ : **不被固定相吸附或溶解的气体 (空气、甲烷等)** 从进样开始到柱后出现浓度最大值的时间; **死时间正比于色谱柱的空隙体积**。
- II. **保留时间** $t_R$ : 被测组分从进样开始到浓度出现最大值所需的时间。
- III. **调整保留时间** $t'_R$ : 扣除死时间后的保留时间。
- IV. **死体积** $V_M$ :  $V_M = t_M q_{V,0}$ , 色谱柱填料后的空隙以及管路接头间的空间以及检测器空间的总和, 后两项可以忽略时, 死体积即柱内流动相体积。
- V. **保留体积** $V_R$ : 被测组分从进样开始到浓度出现最大值时载气通过的体积:  $V_R = t_R q_{V,0}$ , **事实上 $V_R$ 与载气流量大小无关, 载气流量增大对应 $t_R$ 减小**。
- VI. **调整保留体积** $V'_R$ :  $V'_R = V_R - V_M$ 。

3. **相对保留值**: 组分 2 与组分 1 调整保留值之比:

$$r_{21} = \frac{V'_{R,2}}{V'_{R,1}} = \frac{t'_{R,2}}{t'_{R,1}}$$

**相对保留值与柱长、柱径、填充情况以及流动相流速变化无关; 对气相色谱, 相对保**

留值只与柱温和固定相性质有关；对液相色谱，相对保留值与柱温、固定相性质以及流动相种类以及配比有关。

相对保留值也称为**选择性因子**，用 $\alpha$ 表示； $r_{21}$ 越大，说明两物种的分离度越好； $r_{21} = 1$ 时对应完全不能分离。

#### 4. 区域宽度：

- I. 标准偏差 $\sigma$ ：0.607 倍峰高处峰宽的一半；
- II. 半峰宽 $Y_{1/2}$ ：半峰高处的峰宽： $Y_{1/2} = 2.35\sigma$ ；
- III. 峰底宽 $Y$ ： $Y = 4\sigma$ 。

#### 5. 保留指数（科互茨指数）：

是一种定性参数：

$$I = 100 \left( \frac{\lg X_i - \lg X_Z}{\lg X_{Z+1} - \lg X_Z} + Z \right)$$

$X_i$ 为所测物质的保留值（使用调整保留时间或者调整保留体积表示）， $Z$  以及  $Z+1$  代表对应正构烷烃的碳原子数，规定正构烷烃的保留指数为  $Z$  乘以 100。

同一物质在同一柱上，保留指数  $I$  值与柱温成线性关系，故可以用线性内插或者外推法求不同温度下的  $I$  值。

#### 6. 分配系数与分配比：

一定温度下组分在两相之间分配达到平衡时的**浓度比**称之为**分配系数  $K$** ：

$$K = \frac{c_s}{c_M} = \frac{\text{组分在固定相的浓度}}{\text{组分在流动相的浓度}}$$

一般来说**分配系数小的组分更快流出色谱柱**。

一定温度、压力下，组分在两相之间达到分配平衡时的**质量比**称为**分配比  $k$** ，又称**容量因子**或者**容量比**：

$$k = \frac{m_s}{m_M}$$

显然：

$$K = k \cdot \frac{V_M}{V_s} = k \cdot \beta$$

$\beta$ 称之为**相比**，填充柱的相比一般在 6~35，毛细管柱的相比一般在 50~1500。

一个重要关系：

$$t_R = t_M(1 + k)$$

或：

$$k = \frac{t'_R}{t_M}$$

分配系数和分配比都是**热力学性质**：分配系数和分配比都与组分与两相性质以及柱温柱压有关；而分配系数与两相体积无关、分配比与相比有关。

#### 7. 滞留因子：

$$R_s = \omega = \frac{1}{1 + k}$$

### 三. 色谱动力学理论:

#### 1. 塔板理论:

理论塔板数 (柱效):

$$n = 5.54 \left( \frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{Y} \right)^2 = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

$t = t_R$  时,  $c = c_{max}$ , 峰高正比于浓度  $c_0$ 。(峰高定量的基础);

$$c_{max} = \frac{c_0 \sqrt{n}}{\sqrt{2\pi} t_R} \quad (\text{重要})$$

显然  $n$  越大,  $c_{max}/c_0$  越大, 即 **保留时间一定时塔板数越多峰越高**;  $c_{max}$  反比于保留时间  $t_R$ , 故 **保留时间长小的峰高且窄、保留时间短的峰矮且宽**。

有效塔板数:

$$n_{eff} = 5.54 \left( \frac{t'_R}{Y_{1/2}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t'_R}{Y} \right)^2$$

塔板高度:

$$H = L/n$$

塔板理论的局限:

- I. 塔板理论不能解释塔板高度受哪些因素影响这个本质问题;
- II. 不能解释不同流量下测得的理论塔板数不同;
- III. 某些基本假设不当 (纵向扩散不能忽略、分配系数与浓度无关只在有限浓度范围成立、色谱法几乎不存在真正的平衡位置等)

#### 2. 速率理论:

范第姆特方程:

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

$A$  为涡流扩散项;  $B$  为分子扩散系数;  $C$  为传质阻力系数。 $u$  一定时, 只有  $ABC$  均很小时,  $H$  才能小, 柱效才能更高。

- I. **涡流扩散项  $A$ :** 流体碰到填充物颗粒后不断改变流动方向, 形成涡流引起 **色谱峰扩张**。 $A = 2\lambda d_p$ , 即  $A$  与填充物的平均直径  $d_p$  以及填充的不均匀性  $\lambda$  有关。使用适当 **细颗粒度** 以及 **颗粒均匀** 的 **担体** 并尽量 **填充均匀** 有利于减少涡流扩散 **提高柱效**。对于 **空心毛细管柱**,  $A = 0$ 。
- II. **分子扩散项 (纵向扩散项)  $B/u$ :** 试样 **组分在柱内纵向 (前后) 存在浓差形成浓度梯度**, 故使运动分子产生 **纵向扩散**。纵向扩散与组分在柱内的保留时间相关。 $B = 2\gamma D_g$ ,  $\gamma$  为弯曲因子,  $D_g$  为组分在流动相 (载气) 中的分子扩散系数。**保留时间越长纵向扩散项的影响越大, 色谱峰扩张越显著**。**相对分子量大/密度大的流动相分子扩散系数小**, 故在气相色谱中使用 **分子量大的载气如氮气** 可以使  $B$  降低; 此外  $D_g$  随温度升高而升高, 但反比于柱压。  
在液相色谱中纵向扩散项可以忽略, 影响液相色谱的主要是传质项。
- III. **传质项  $Cu$ :** 对于气相色谱, 系数  $C$  包括 **气相传质阻力** 和 **液相传质阻力** 两部分, 气相传质过程指组分从气相移动到固定相表面的过程, 气相传质阻力与填充物粒度平方成正比、与分子扩散系数成反比, 故使用 **粒度小、小分子量载气 (如氢气)** 可以使 **气相传质阻力降低**; 而液相传质过程是指组分从固定液的相界面移动到内部达到分配平衡的过程, **固定相的液膜厚度越小, 液相传质阻力越小**。

而对于液相色谱，则必须要**提高柱内装料的均匀性以及减小粒度来提高传质速率（或使用薄壳式担体）**；选用**低黏度流动相或者升高柱温使流动相黏度下降**也利于增高传质速率。

此外，**降低流动相流速可以降低传质阻力项**的影响，但是会导致**分子扩散项增加**，并且**延长了分析时间**。

IV. 此外对于液相色谱，**柱外展宽（柱外效应）**也会使色谱峰扩展：

- i. **柱内展宽**主要由于**进样**导致：进样器的死体积与进样时液流扰动引起的扩散。
- ii. **柱后展宽**主要由连接管、检测器流通池的**死体积**产生（**此项显著**）。

#### 四. 色谱分离条件：

##### 1. 分离度：

$$R = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(Y_1 + Y_2)}$$

若使用半峰宽计算：

$$R' = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(Y_{1/2(1)} + Y_{1/2(2)})}$$

且： $R = 0.59R'$ 。

基线分离： $R = 1.5$ 。

##### 2. 色谱分离基本方程：

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

故由此：

$$n = \left(\frac{1 + k}{k}\right)^2 n_{eff}$$

$$n_{eff} = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2$$

$$L = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \cdot H_{eff}$$

（一般柱的有效理论塔板高度 $H_{eff}$ 为0.1cm）

且：

$$R = \frac{1}{4}\sqrt{n_{eff}} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha}$$

##### I. 分离度与柱效( $n$ )的关系：

**增加柱长可以增加分离度，但会导致组分保留时间增长**，延长了分析时间以及导致**峰扩展**，故在达到合适分离度的前提下要选择相对短的柱子；减小塔板高度  $H$  也能提高  $n$  值（制备一根性能优良的柱子）。

##### II. 分离度与容量因子( $k$ )的关系：

**增加  $k$  值对分离有利**，但并非越大越好，因为 $\frac{k}{1+k}$ 随  $k$  的增大变化不大，反而会**增加分析延长**时间，故最佳范围为 $1 < k < 10$ 。

改变  $k$  的方式是改变**柱温**（影响分配系数）和**相比**（改变柱固定相量和死体积）；

死体积大时 $\frac{k}{1+k}$ 急剧下降，故使用细颗粒固定相紧密均匀填充有利于减少死体积并提高

分离度。**HPLC 中改变流动相的配比是最简便有效的方式。**

III. 分离度与选择因子( $\alpha$ )的关系：

**增大  $\alpha$  是提高分离度最有效的方法**；改变  $\alpha$  的有效方式是**改变柱温**，此外对于气相色谱，增大  $\alpha$  的最有效方式是**改变固定相**；而对于高效液相色谱，**改变流动相的种类和配比**是最有效的手段。

3. 优化分离条件：

I. 最佳流速： $u_{\text{最佳}} = \sqrt{\frac{B}{C}}$ ，则此时对应最小的理论塔板数为 $H_{\text{最小}} = A + 2\sqrt{BC}$ 。

一般为了缩短分析时间往往使流速稍高于最佳流速。

由范第姆特方程，当流速  $u$  较小时，分子扩散项是色谱峰扩张的主要因素，此时最好选用分子量大的载气 ( $N_2$ 、 $Ar$ )；流速  $u$  较大时传质项是主要的因素，此时最好选用分子量小的载气 ( $H_2$ 、 $He$ )。

II. 柱温的选择：从分离的角度，**低柱温比较合适**，但温度低扩散速率减小，分配不能快速达到平衡，导致**峰变宽柱效下降**，以及**分析时间延长**。故应在保证较好的分离的前提下适量提高柱温。此外柱温会影响容量因子  $k$ 。

**程序升温：对沸点较宽的试样使用；柱温按照预定的加热速率，随时间作线性或者非线性增加；这样在较低的温度时低沸点组分可以得到较好的分离，高沸点的组分由温度升高也可以较快出峰。**

III. 柱的选择：柱长增加，塔板数增加对应分离效果好但分析时间长；柱径减小对应横向扩散减小柱效更高，但柱径小会使固定相难以均匀填充。关于填充物，粒径较小带来更好的分离度，但过小导致填充困难。关于液膜厚度，越小柱效越高，但允许的进样量也减小。

## Chapter 2 色谱定性定量方法

一. 定性方法：

定性指标：**保留值**；

1. 利用保留值直接定性：

- I. 利用**纯物质对照定性**：如直接利用保留时间或保留体积定性，或者使用已知物**增加峰高法定性**。（适用于简单混合物，并且对样品有一定了解，有纯物质）优点是应用简便不需要其他仪器，缺点是可信度不高（提高可信度：双柱/双体系定性）。
- II. 文献值对照：测定相对保留值或保留指数。（适用于简单混合物，无需纯物质）优点是不需要纯物质，保留指数可信度高，缺点是复杂化合物无文献数据。

2. 与其他仪器或者化学方法联合定性：

- I. 离线联用方式（GC 一般用液氮冷阱收集保存）。
- II. 在线联用方式。

3. 利用检测器的特征响应定性。



## 二. 定量方法:

色谱定量的基础是被测物质的量与峰面积或者峰高成正比:

$$m_i = f'_i \cdot A_i$$

$f'_i$  为绝对质量校正因子。

### 1. 信号定量:

I. 峰面积测量法:  $A = 1.065h \cdot Y_{1/2}$

II. 定量校正因子法: 绝对校正因子很难绝对测量, 故一般使用相对校正因子。

质量校正因子:

$$f_m = \frac{m_i A_s}{m_s A_i}$$

摩尔校正因子 (与体积校正因子等同):

$$f_m = \frac{m_i A_s M_s}{m_s A_i M_i}$$

相对响应值:

$$s = 1/f$$

理论上来说相对校正因子与标准物质、试样、检测器种类以及载气类型有关, 与其他色谱条件无关。

### 2. 定量计算法:

#### I. 归一化法:

$$\omega_i = \frac{m_i}{\sum m_i} \times 100\% = \frac{f_i A_i}{\sum f_i A_i} \times 100\% \approx \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100\%$$

使用要求: 所有组分均能流出色谱柱, 且在检测器上都有响应, 各组分峰无重叠。适合常量物质定量。有时也可用峰高代替面积定量。

#### II. 内标法:

加入一定量纯物质质量为  $m_s$  为内标物, 已知试样总质量为  $m$ , 则:

$$\frac{m_i}{m_s} = \frac{A_i f_i}{A_s f_s}$$

$$\omega_i = \frac{m_i}{m} \times 100\% = \frac{m_s \frac{A_i f_i}{A_s f_s}}{m} \times 100\% = \frac{m_s \frac{A_i f_i}{A_s}}{m} \times 100\%$$

适用于只测试样中某几个组分, 尤其是所有组分不能完全出峰的情形。

优点是操作条件产生变化对应的误差被抵消, 定量准确, 适用于微量分析; 但每次分析都要称取内标物与待测物的质量, 不适合快速控制分析。

III. 内标标准曲线法:  $\omega_i \sim \frac{A_i}{A_s}$  作标准曲线, 可快速分析。可不严格进样

#### IV. 外标法 (标准曲线法):

使用待测物本身配置标准溶液, 响应信号对作  $\omega_i$  标准曲线。

单点校正 (配置浓度相近的标准溶液): 直接利用峰面积比或者峰高比求取。

准确度取决于进样量的重现性与操作条件的稳定性 (严格进样)

## Chapter 3 气相色谱法

### 一. 气相色谱仪的结构:

1. **载气系统**: 提供洁净、流量稳定的载气;
2. **进样系统**: 使样品瞬间汽化 (汽化温度应当比柱温高 30~70℃);
3. **柱系统**: 使样品分离;
4. **检测器**: 将组分浓度信号转化为电信号;
5. **色谱工作站**: 处理数据、控制仪器。

### 二. 检测器种类:

名称	原理	影响灵敏度的相关因素	响应特性种类	响应物种
<b>热导检测器 (TCD)</b>	不同的物质有不同的热导系数	I. 桥流工作电流越大灵敏度越高; 但电流太大会导致基线不稳甚至钨丝烧坏; II. 热导系数大的气体 (H <sub>2</sub> 、He) 作载气可使灵敏度高; N <sub>2</sub> 可能出现倒峰; III. 温度低时灵敏度高, 但不能低于柱温, 否则组分可能凝结。 IV. 热敏元件选用阻值大温度系数大的可以使灵敏度提高; V. 热导池死体积大, 灵敏度低 (主要缺点); 可使用微型池体。	<b>通用型检测器; 浓度型检测器; 非破坏型检测器; 灵敏度低</b> , 适合大于几十 ppm 含量的测定。	<b>几乎对所有物质都响应; 对卤化物、重金属酯类响应差</b>
<b>氢火焰离子化检测器 (FID)</b>	蒸汽分子被激发离子化在电场作用下定向迁移形成微电流, 进行放大记录	氢气流量过低会导致灵敏度低, 过高噪声大; 一般使用 N <sub>2</sub> 作为载气, 与 H <sub>2</sub> 流量比例在 1~1.5; 对气体纯度要求高, 否则影响基线; 使用温度 80℃ 以上灵敏度几乎相同, 但 80℃ 以下由于水蒸气冷凝灵敏度下降。	<b>选择性检测器; 质量型检测器; 破坏型检测器; 灵敏度高</b> , 可进行 ppb 级的痕量分析; <b>线性范围宽</b> 。	对 <b>大多数有机物</b> 响应; 对 <b>无机物无响应</b> ; 对含有 <b>硫、氧、卤素、氧、氮的有机物</b> 响应差
<b>电子俘获检测器 (ECD)</b>	电负性强的组分俘获电子形成负信号倒峰	组分 <b>电负性越强, 灵敏度越高</b> ; 载气纯度应高; 线性范围窄故进样量要小	<b>选择性检测器; 浓度型检测器; 破坏型检测器 灵敏度高</b> , ppt 级痕量分析; <b>线性范围窄</b> 。	对含 <b>高电负性原子或基团的化合物</b> 高响应, 如 <b>卤素、氧、磷、硫有机物、甾体、金属有机化合物、螯合物</b>
<b>火焰光度检测</b>	火焰体系中的激发态 S <sub>2</sub> * 或		<b>选择性检测器; 质量型检测器;</b>	对 <b>含硫磷的化合物</b> 灵敏度

器 (FPD)	HPO*碎片跃迁 回基态发射特 征分子光谱： $S+S=S_2^*$ ; $S_2^*=S_2+h\nu$		破坏性检测器； 灵敏度高。	高，其他有机 物不响应
------------	---	--	------------------	----------------

检测器性能指标：

I. 灵敏度：

浓度型检测器：

$$S_c = \frac{q_v A}{m}$$

质量型检测器：

$$S_m = \frac{A}{m}$$

II. 检出限：

恰能鉴别的响应信号至少等于检测器噪声的 3 倍：

故检出限：

$$D = \frac{3N}{S}$$

(N 为噪声)。

III. 最小检测量：

与检出限成正比，且所得色谱峰越窄，最小检测量越小：

浓度型： $Q_0 = 1.065 Y_{1/2} \cdot q_v \cdot D$ ；

质量型： $Q_0 = 1.065 Y_{1/2} \cdot D$ ；

IV. 响应时间：指进入检测器的组分输出达到 63% 所需的时间。

该时间受到检测器死体积、电路滞后等影响。

### 三. 气相色谱固定相：

1. 气固色谱固定相：

气固色谱法一般用于分离常温下的气体（气体烃类）：

固定相	性质	分离特性
活性炭	非极性	分离永久性气体/惰性气体/低沸点烃类（极性化合物不可）
硅胶	氢键	永久性气体、低级烃
氧化铝	弱极性	烃类及其同分异构体、低温时可分氢同位素
分子筛	强极性	特别适合永久性气体/惰性气体的分离
高分子多孔小球 (GDX)	取决于 原料	分离气体和液体中的水等

2. 气液色谱固定相：

由担体+固定液构成。

I. 担体的要求：

- i. 表面积大；
- ii. 多孔性；
- iii. 机械强度高；
- iv. 热稳定性好；
- v. 化学惰性（表面无吸附性或者吸附性弱）；
- vi. 粒度细小均匀。



担体的类型：

类型	名称	特征	优点	缺点
硅藻土型	红色担体	孔径小，表面积大； 适合 <b>非极性</b> 与 <b>弱极性物种</b> 的分析。	1. 表面积大，涂固定液量大，分离效率高； 2. 结构紧密机械强度高。	表面有吸附活性中心，与极性固定液配合会导致分配不均匀影响柱效
	白色担体	煅烧时加入了碳酸钠，颗粒大，疏松，表面积小。 适合 <b>极性物质</b> 的分析。	1. 表面极性中心少，吸附性小。	机械强度差
非硅藻土型	聚四氟乙烯担体、玻璃微球担体（适合分离强极性化合物）			

分析一些化学活性物种时，需要处理担体将之钝化，方法有：酸洗碱洗、硅烷化。

II. 对固定液的要求：

- i. 挥发性小，减小流失；
- ii. 热稳定性好，操作温度下不发生分解，且保持液体状态；
- iii. 对试样各组分有适当的溶解能力；
- iv. 有一定选择性；
- v. 化学稳定性好。

固定液时间	极性	典例	应用
烃类	最弱	角鲨烷、阿匹松	非极性化合物
硅油类	极性范围广		广泛
聚乙二醇类	极性		强极性化合物
酯类	极性		极性化合物
腈类	极性		极性化合物

固定液与组分的作用力：静电力、诱导力、色散力、氢键。

固定液选取：相似相溶。

#### 四. 毛细管柱气相色谱法：

柱材料一般用石英。

特点：

1. 渗透性好，可使用长色谱柱（载气流动阻力小）；
2. 相比( $\beta$ )大，有利于实现快速分析；
3. 柱容量小，允许进样量小（否则过载会导致柱效降低）；
4. 总柱效高，便于分离复杂化合物；
5. 载气流速大但流量小；为了防止组分在柱外扩散，要求柱外死体积小，故采用**尾吹提供柱出口到检测器的载气流量，减少这一段死体积的影响以提高分辨率**；此外由于毛细管系统载气  $N_2$  流量小，使得**氢火焰检测器**所需  $N/H$  比过小降低灵敏度，**尾吹  $N_2$  可以增加  $N/H$  比从而提高检测器灵敏度**。
6. 分流进样：大量载气和试样放空，仅少量进柱（防止柱过载）。主要用于高浓度不可稀释的样品进样。瞬间进样故柱效很高；但宽沸点样品分流失真（只对归一化定量影响）导致定量准确性差重复性差。

若使用无分流进样，一般用于沸程窄大极性的痕量分析，定量相对误差小于分流法，但线性差。

## Chapter 4 高效液相色谱法

### 一. 基本结构:

1. 高压输液系统（往复泵、气动放大泵）；
2. 梯度洗提装置：**梯度洗提指程序控制流动相的组成，使在分离过程中溶剂强度按照特定的变化规律增加；**
  - a) 优点：便于分离复杂化合物，使所有组分都处于较合适的  $k$  值范围内；
  - b) 缺点：检测器使用受限；分析结果的可重复性取决于流速的稳定性；色谱柱需要再生处理。
3. 进样系统（六通进样阀）；
4. 柱系统；
5. 检测系统：

检测器	介绍	性质
<b>紫外检测器 (UVD)</b>	分为固定波长的紫外检测器/可变波长的紫外检测器/二极管阵列检测器。	选择性检测器（紫外吸收型组分，如芳烃类）； 灵敏度高（ $10^{-9}\text{g/mL}$ ）； 线性范围宽； 对温度以及流动相组成变化不敏感； 适合梯度洗提； 是 HPLC 常规检测器； 溶剂选用受限（如苯之类溶剂紫外光不透过）。
<b>示差折光检测器 (RID)</b>	分为偏转式和反射式；主要通过溶有试样的溶剂与纯溶剂之间折射率的差对应浓度。	通用型检测器； 灵敏度低； 基线容易受温度影响； 不适合梯度洗提。 溶剂选用不受限。
<b>荧光检测器 (FLD)</b>	一些有机芳环分子受紫外光激发发出比紫外光波长长的荧光。	选择性检测器（荧光型分子：对称有机共轭分子、生化物质）； 灵敏度很高（比紫外高 1000 倍）； 对温度不敏感； 适合梯度洗提； 溶剂选用受限。
<b>蒸发光散射检测器 (ELSD)</b>	激光散射光强与质量 $m$ 具有一定关系。	通用型检测器； 灵敏度较高； 响应信号几乎不受温度和溶剂的影响； 适合梯度洗提。
<b>电导检测器</b>	根据电导变化检测含量；是 <b>离子色谱法中最常用的检测器</b> 。	选择性检测器（离子化合物）； 灵敏度高； 响应受温度影响； 不能梯度洗提； 溶剂选用受限。

### 二. HPLC 的主要类型:

1. 液-液分配色谱法以及化学键合相色谱:

流动相和固定相都是液体；为了避免固定液损失，一般对于亲水性固定液使用疏水性流动相（**流动相极性小于固定相，称之为正相色谱，小极性先出峰**）；对于疏水性固定液使用亲水性流动相（**流动相极性大于固定相，称之为反相色谱，大极性先出峰**）。

由于色谱分离过程中固定相在流动相中的微量溶解以及流动相通过固定相会产生机械冲击，导致液液色谱固定液不断流失；故采用**化学键合相色谱**，将各种有机基团通过化学

反应的方式键合到硅胶表面的羟基上。最常用的是**反向键合相色谱：疏溶剂机理，适合分离极性/非极性/离子化合物**。**正相键合相色谱法**常用于**油溶性化合物的分离**。

化学键合相色谱优势：

- I. 无液坑，比液体固定相传质速率快；**
- II. 无固定液损失，寿命稳定性更好；**
- III. 可以键合不同基团灵活改变选择性；**
- IV. 有利于梯度洗提。**

固定相：若为疏水性，一般使用硅胶键合不同链长的烷基(C<sub>8</sub>和 C<sub>18</sub>)或者苯基。

若为亲水性，一般使用硅胶键合氨基、氰乙基、醇或者醚。

流动相：对于**正相色谱**，一般用**低极性溶剂**如正己烷、苯、氯仿等作为底剂，洗脱剂根据试样性质选择极性强的针对性试剂，比如醇、醚、酮、酸。

对于**反相色谱**，一般用以**水为主体的流动相**，加入不同配比的有机溶剂作为调节剂，如甲醇、ACN、二氧六环、THF 等。

## 2. 液-固吸附色谱法：

流动相为液体、固定相为固体，机理上是流动相与溶质在固定相上的竞争吸附。

常用于**中等分子量的油溶性样品如油品、脂肪、芳烃等的分离、不同极性取代基化合物的分离以及结构异构体、几何异构体混合物的分离**。

固定相：极性：硅胶、氧化镁、氧化铝等；

非极性：活性炭、高分子多孔微球、碳多孔微球。

流动相：使用**硅胶作为固定相时**，一般用**弱极性的正构烷烃**作为主体，加入 DCM 等中等极性的溶剂调节合适洗脱强度。可用水对硅胶进行**减活处理**，或加入 THF、ACN、甲醇、异丙醇等**改性剂**。

## 3. 离子对色谱法：

将一种或多种与溶质离子电荷相反的离子加入流动相或者固定相中，使之与溶质离子形成疏水性离子对化合物，来控制溶质离子的保留。常用于**有机强酸碱的分析**。

固定相：C<sub>8</sub>、C<sub>18</sub>反相键合相；

流动相：以水为主的缓冲液、水-甲醇、水-ACN 等；

离子对试剂：分离阳离子主要使用**烷基磺酸盐类**；分离阴离子主要使用**烷基铵类**。

## 4. 离子交换色谱法以及离子色谱法(IC)：

试样中的离子与离子交换树脂上的离子发生交换，不同的离子与树脂的亲和能力不同，亲和力越大，离子越难以洗脱，从而得到分离。使用**电导检测器**。

对于 IC，最大的改进是解决了微量组分的检测问题，可分为如下两种：

**双柱抑制型**：在分离柱和检测器之间加一个化学抑制器，作用有二：

- I. 降低淋洗液的背景电导；**
- II. 增加被测离子的电导值，改善信噪比。**

双柱抑制型 IC 的灵敏度高。

**单柱非抑制型**：淋洗液直接进入电导检测器。

简单、死体积小分辨率好，但灵敏度低。

固定相：**离子交换剂**（乳胶薄壳型离子交换小球）。

流动相：对于双柱抑制型 IC，分离阳离子一般使用无机酸如 HCl、HNO<sub>3</sub> 等，分离阴离子一般使用 NaOH、NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、苯甲酸及其盐、酒石酸、柠檬酸等。

**IC 是分析无机阴离子的首选办法**，也可以用于**分析无机阳离子、有机酸碱、糖类、蛋白质等**。

## 6. 空间排阻色谱法(SEC)：

以**多孔凝胶为固定相**，利用凝胶的孔径控制分离，使样品中分子大小不同的组分分离（峰容量有限）

使用**水溶液作流动相**——**凝胶过滤色谱法(GFC)**，适用于**分析生物大分子（多肽、多糖、蛋白质、核糖）**。

使用**有机溶剂作流动相**——**凝胶渗透色谱法(GPC)**，适用于**分析高聚物分子量（聚乙烯等）**。

### 三. 色谱种类的选择:

样品	相对分子 量>2000	溶于水	排阻色谱法，水作流动相	
		不溶于水	排阻色谱法，非水流动相	
	相对分子 量<2000	不溶于水	同系物	键合相色谱
			异构体	液固色谱
			分子大小差异	排阻色谱
		溶于水不 解离	反相键合相色谱	
			排阻色谱—水流动相	
		溶于水可 解离	碱	阳离子色谱
			酸	阴离子色谱
		溶于水， 要求分离 离子与非 离子	反相离子对色谱	

