

特点

高压、高效、高速、高灵敏度

应用：试样范围——高沸点（分子量>400）、热不稳定有机及生化试样的高效分离分析方法。

影响分离的因素

因为流动项是液体，所以**分子扩散项B可近似为0**，只需考虑A项和C项

$$\text{速率方程: } H = A + \frac{B}{u} + C u$$
$$\frac{2\lambda dp}{0} \quad (dp^2 \quad dp^2 \quad df^2 \quad 1/D_m \quad 1/D_s) u$$

在高效液相色谱中:

- 采用小粒度固定相（3-10 μm）， $dp \downarrow$ ， $H \downarrow \downarrow$
- 采用化学键合固定相（单分子层）， $df \downarrow$ ， $H \downarrow$
- 采用低黏度流动相， $D_m \uparrow$ ， $H \downarrow$
- 采用低流速流动相， $u \downarrow$ ， $H \downarrow$

仪器组成

进样阀、高压泵、进样阀、分离柱、检测器、记录仪

高压输液泵

压力150-350atm

要求压力平稳、脉冲小、流量稳定可调、耐腐蚀

梯度洗脱装置

分为外梯度和内梯度

进样装置

六通阀

检测器

UV、荧光、示差折光、电化学、质谱

UV

最常用，对流量和温度的波动不敏感

示差折光

通用性，但对温度变化敏感且不适用于梯度洗脱

安培传感器

检测具有电活性的物质

固定相

按材料分类

刚性固体固定相：二氧化硅基质

硬胶固定相： 高分子聚合物

按孔隙类型分类

表面多孔型：实心玻璃珠外覆盖一层多孔材料（如硅胶）

全多孔型：由10 nm的硅胶微粒制成

流动相

要求

纯度高（色谱纯）

黏度低（如乙腈 0.65 mN.s/m², 甲醇 0.95, 水 1.00 ）

稳定，不与组分反应

与检测器匹配 （紫外检测器中，溶剂的截止波长）

主要分离类型

吸附色谱（液-固吸附色谱）

利用各组分在固定相上吸附能力不同实现分离

常用于立体异构体的分离

分配色谱（液-液分配色谱）

组分在两相间的分配系数不同而分离

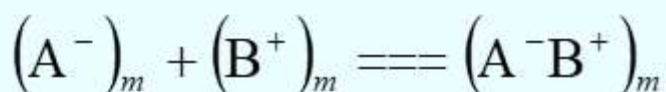
化学键合相色谱

十八烷基键合硅胶

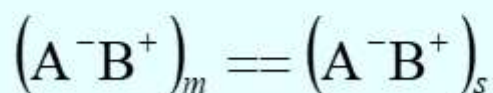
反相离子对色谱

——反相离子对色谱

如，分离有机酸，易离解，分配系数小



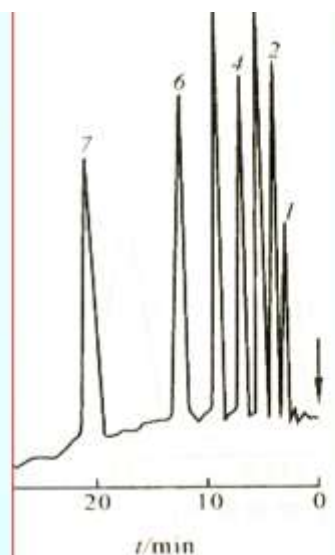
待测离子 反离子试剂 离子对（疏水）



反离子试剂：

阴离子试样：烷基铵阳离子
表面活性剂

阳离子试样：烷基磺酸钠阴
离子表面活性剂



1. 4-氨基苯甲酸 2. 3-氨基苯甲酸
3. 4-羟基苯甲酸 4. 3-羟基苯甲酸
5. 苯磺酸 6. 苯甲酸
7. 甲苯-4-磺酸

色谱条件：-C2 键合相

0.03 mol/L 四丁基铵+
戊醇，pH 7.4

离子交换色谱

固定相：离子交换树脂

流动相：一定pH和离子强度的缓冲液

离子的交换反应平衡常数K（离子选择性系数）越大，越容易被静电吸附保留，而难于洗脱

其中离子色谱法：

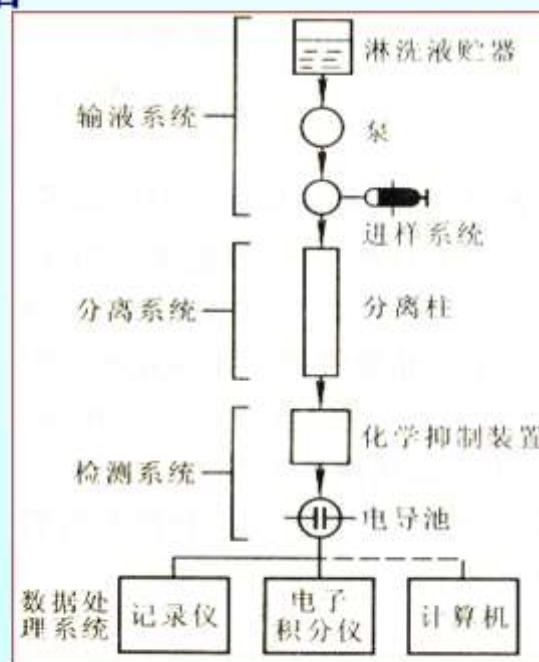
特指：采用电导检测器的离子交换色谱

离子色谱的仪器特点：

- (1) 电导检测
- (2) 分离柱后、电导检测器前接有抑制柱，以消除流动相中大量的离子，减小电导检测的背景电流，改善检测限

离子色谱的适用范围：

无机离子、脂肪酸等小离子的分离测定。



空间排斥色谱

凝胶为固定相，大的分子先流出

6. 亲和色谱法 (Affinity chromatography)

利用生物大分子间
(如抗体/抗原、酶/底物)
的特殊选择性作用力进行分离

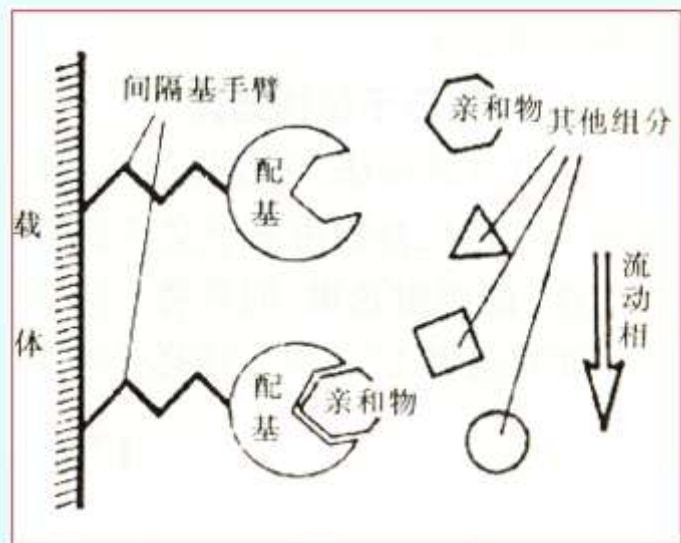
固定相: 固定化抗体或酶

流动相: 缓冲液

特点: 选择性高

生物试剂昂贵

原理与一般色谱法不同



亲和色谱分离原理示意图

UPLC

突破极限压力至1000atm