

有机仪器分析

上册

何明栋 编

西南林学院

一九九一年八月

前 言

有机分析仪器是人类感官的延伸，各种谱仪大大提高了人类认识自然和改造自然的能力，就主要作用而言，色谱仪的特长是对混合物的分离提纯，波谱仪的特长则是对物质的剖析鉴定。二者结合，可谓相得益彰。例如，色谱与质谱联合已成为鉴定未知物的强有力工具，被广泛应用于有机合成、石油化工、医药卫生、天然有机化学、生物化学、食品化学以及环境保护等学科，并为国民经济的发展发挥了重要的作用。

有机仪器分析也是研究生物学的强有力工具。如对植物化学成分的研究，可以从化学成分的角度研究植物的亲缘关系，建立植物分类学。通过对动物信息激素的研究，可以合成高效低毒的杀虫剂。通过对土壤、水源以及农林产品中的农药残留量的分析，可以更好地保护环境和人类健康。有机仪器分析可以帮助人们开发利用众多的农林副产品，可以指导人们合成性能特殊的新材料，甚至可以指导人类去揭示生命的奥秘。总之，面对世界新技术革命的挑战，对于林业院校的当代大学生来说，学习和掌握一些色谱学和波谱学知识是非常必要的。

本书是在1987年5月编写的《有机分析》一书的基础上，根据近几年来的教学实践以及本学科的发展现状进行编写的。编写时删去了化学鉴定法等内容，只保留色谱学和波谱学内容。由于这两部分知识离不开分析仪器，所以书名定为《有机仪器分析》。

本书分上下两册。上册介绍色谱学，内容包括柱色谱(CC)、纸上色谱(PC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)，下册介绍波谱学，内容包括紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振谱(NMR)、质谱(MS)以及这些解析技术的综合应用。全书共九章，每章除讲述基本原理和实验技术外，还列举了应用示例和安排了一定数量的习题。书末列有参考资料供查阅。

由于编者业务水平不高，实践经验不足，难免有缺点和错误，请读者指正。

编 者

1991年8月

目 录

第一章	色谱分析法	1
第一节	色谱法的产生及发展	1
第二节	色谱法分类	3
一	按两相的状态分类	3
二	按色谱分离原理分类	4
三	按固定相所处的外形分类	4
四	各种分类方法之间的关系	5
第三节	色谱分析法的基本原理	6
一	吸附色谱	6
二	分配色谱	11
第四节	吸附剂与流动相溶剂	13
一	常用吸附剂	13
二	吸附剂的活性及其测定	16
三	流动相溶剂	19
第五节	柱色谱法	21
一	吸附剂的选择和处理	21
二	色谱柱和装柱技术	22
三	加样技术	23
四	洗脱剂与洗脱技术	23
五	应用示例	26
第六节	纸色谱法	27
一	层析滤纸的选用	27
二	溶剂系统的选用	28
三	纸色谱实验操作方法	30
四	定性分析和定量分析	34
五	应用示例	36
第七节	薄层色谱法	39
一	薄层板的制作	40
二	薄层色谱操作技术	42
三	定性分析	48
四	定量分析	49
五	应用示例	53

习题	57
第二章 气相色谱法	60
第一节 气相色谱法简介	60
一 方法特点和应用范围	60
二 气相色谱分离原理	62
三 气相色谱的流程	63
第二节 色谱柱与固定相	64
一 气固填充色谱柱	65
二 气液填充色谱柱	69
三 色谱柱的制备	78
第三节 气相色谱检测器	81
一 检测器的性能指标	81
二 热导池检测器 (TCD)	85
三 氢火焰离子化检测器 (FID)	88
四 电子捕获检测器 (ECD)	91
五 火焰光度检测器 (FPD)	94
第四节 气相色谱基本理论	96
一 色谱图及有关术语	97
二 有关分离效能的指标	100
三 塔板理论	105
四 速率理论与影响柱效率的因素	108
五 色谱操作条件的选择	111
第五节 定性和定量分析	116
一 定性分析	116
二 定量分析	120
第六节 气相色谱分析应用示例	128
习题	132

第三章 高效液相色谱法	135
第一节 高效液相色谱法概述	135
第二节 高效液相色谱法的基本原理	137
一 溶质在色谱柱中的滞留	137
二 色谱柱的选择性及其柱效率	138

三、	谱带扩展	139
四	分离度及其控制原则	142
第三节	高效液相色谱仪的部件	144
一	贮液器	144
二	输液泵	145
三	梯度装置	146
四	进样装置	147
五	色谱柱	148
六	检测器	149
第四节	固定相与流动相	153
一	固定相	153
二	流动相	157
第五节	液相色谱的基本类型和用途	163
一	基本类型	163
二	液相色谱分离方式的选择	167
三	高效液相色谱的应用	168
	习题	171
	参考资料	173

第一章 色谱分析法

第一节 色谱法的产生及发展

色谱法是一种重要的分离分析方法，它的产生与发展已有八十多年的历史。公认的色谱法创始人是俄国植物学家茨维特 (Tswett)，他于 1906 年正式提出“色谱法”一词，并在此之前曾多次做了下述实验：把植物绿叶色素的石油醚提取液注入一根装有碳酸钙颗粒的直玻璃管中，然后用纯石油醚不断地淋洗柱子，经过一段时间，就可以看到玻璃管中具有不同颜色的“谱带”，从下到上分别是胡萝卜素、叶黄素和叶绿素 a、b (图 1-1)。因为此法能把不同色素按层分开，所以得到了色层法或色谱法的名称。后来许多无色物质也能用此法进行分离，但“色谱法”这一名词却保留至今。

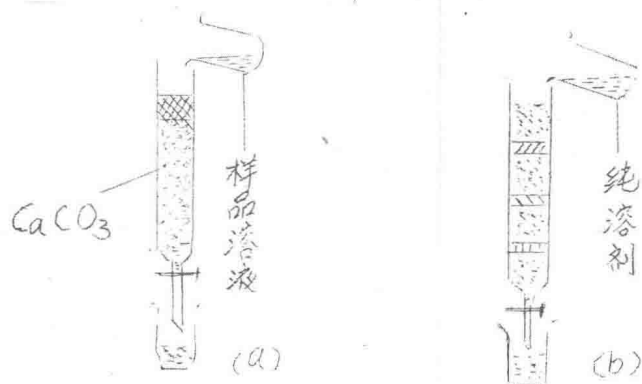


图 1-1 Tswett 色谱分离示意图

(a) 刚加入样品提取液

(b) 已加入部分溶剂冲洗

色谱分离技术开始并未引起人们的重视，直到三十年代初，库哈 (Kuhn) 等用此法分离了类胡萝卜素后，色谱法才得以广泛应用。四十年代和五十年代，色谱法不论是在实验技术还是在理论研究方面，都有突破性和广度性的发展。在色谱技术方面，1941年马丁 (Martin) 发明了分配色谱法，并于1944年提出了纸色谱法和薄层色谱法。1950年，戈雷 (Golay) 发明了高效能的毛细管柱，大大提高了色谱分离效能。五十年代末，霍姆斯 (Holmes) 将气相色谱与质谱联用，成为现代仪器分析的重要标志之一。在色谱理论方面，马丁于1949年提出了保留性质与热力学平衡常数的关系。1956年荷兰学者范第姆特 (Van Deemter) 在总结前人研究成果的基础上提出了范第姆特方程。他们从热力学和动力学的角度解释了色谱现象，对色谱学的发展作出了卓越的贡献。

色谱实验技术在近三十年来有了突飞猛进的发展，主要表现在三个方面：一是毛细管色谱法的研究和应用，解决了气相色谱法固有的许多技术难题，使气相色谱的发展进入一个崭新的阶段。二是高效液相色谱技术的发展，它克服了气相色谱法的缺点，在对高沸点大分子、强极性和热稳定性差的化合物的分离分析方面，有独特的效果，这就扩大了色谱技术的应用范围。三是色谱-质谱联用机的出现，成为剖析复杂物质的最好手段。

我国于五十年代开始色谱研究，六十年代曾取得可喜成果，七十年代停滞不前，八十年代以来，由于党和国家的重视，我国色谱工作有了长足的发展。据估计，我国目前有三万多人从事色谱工作，分布在国民经济中的各个领域，应用之广泛前所未有。我国已经能够生产质量较好的色谱仪，并受到用户的好评。为了推动色谱学的发展，国家批准成立了“中国化学会色谱委员会”，负责学术研究和交流。通过广大色谱工作者的努力，我国色谱基础理论和应用技术研究颇具特色，处于世界先进水平的行列。

第二节 色谱法分类

色谱法主要有以下三种分类方法。

一、按两相的状态分类

在色谱分析中有流动相和固定相（“相”指体系中某一均匀部分）。流动相在色谱过程中能携带组分向前移动，它可以是气体或液体。固定相是色谱过程中不移动的具有吸附活性的固体，或者是涂渍在载体表面上的高沸点液体。按两相的状态可把色谱法分为以下四类：

- 1、气固色谱法(GSC)，流动相为气体，固定相为固体。
- 2、气液色谱法(GLC)，流动相为气体，固定相为液体。

3. 液固色谱法 (LSC)。流动相为液体，固定相为固体。

4. 液液色谱法 (LLC)。流动相为液体，固定相为液体。

1 和 2 属于气相色谱法，3 和 4 属于液相色谱法。

二、按色谱分离原理分类

按分离原理可以把色谱分成四类：

1. 吸附色谱 以吸附剂为固定相，利用它对不同组分吸附性能的差异达到分离目的。如气固色谱法和液固色谱法均属此类。

2. 分配色谱法 利用不同组分在流动相和固定相之间的分配系数（或溶解度）的差别进行分离，称为分配色谱法。如气液分配色谱和液液分配色谱均属此类。

3. 离子交换色谱 这是利用不同组分对离子交换树脂的亲合力的差异进行分离的色谱法，广泛用于无机离子的分离及生物化学中各种核酸衍生物及氨基酸的分离。

4. 凝胶色谱 又称排代色谱。其分离机理是利用某些凝胶对不同组分分子体积大小的差异，产生不同的滞留作用，从而达到分离的目的。

三、按固定相所处的外形分类

1. 柱色谱法 把固定相填充在玻璃管或金属管内，固定相被柱管所包围的称为柱色谱法。柱色谱法又分为填充柱色谱

法和开管（毛细管）柱色谱法。前者是将固定相均匀填充在柱管内，后者是将固定相涂在一根毛细管内壁而毛细管中心是空的，称为开口管柱色谱。

2. 纸色谱 利用滤纸作为载体，以纸纤维吸附的水分为固定相，把试样液体滴在滤纸一端，用溶剂（流动相）展开以达到分离，然后进行定性与定量分析。

3. 薄层色谱法 它是将吸附剂涂布在玻璃板上或压成薄膜，然后用与纸色谱相类似的方法进行操作。

四、各种分类方法之间的关系

色谱法的名称很多，即使同一种色谱法，也有不同的名称。各种分类方法的分类原则都是按每一种色谱法的某一特性（如固定相的“物态”或“形态”等）加以归纳分类的。显然，各种分类方法之间是有联系、有区别的。

应当指出，任何一种色谱法所发生的机理往往不是单一的，而是几种机理同时发生作用。一般而言，当固定相为固体时，以吸附为主；当固定相为液体时，以分配为主。此外，还与所用材料的性质和实验条件有关，所以分类之间的界限不是绝对的，各种分类法之间是有联系的，表 1-1 是一些主要色谱方法。

表 1-1 主要色谱法

色谱形式	流动相	固定相	分离原理	应用范围
柱色谱	液体	固体	吸附	制备性分离

续上表

色谱形式	流动相	固定相	分离原理	应用范围
薄层色谱	液体	固体	吸 附	定性分析和少量制备分离
纸色谱	液体	液体	分 配	极性有机物和无机物的定性和定量分析
气相色谱	气 体	液体	分 配	定性和定量分析, 也可作制备性分离.
高压液相色谱	液体	液体	分 配	分析和制备性分离
	液体	固体	吸 附	

第三节 色谱分析法的基本原理

色谱方法很多, 但按分离过程的物理化学原理分类不外是两种, 即吸附色谱和分配色谱 (见表 1-1)

一、吸附色谱

吸附色谱可分为吸附柱色谱和吸附薄层色谱。

关于吸附柱色谱的原理, 简单说来, 就是被测样品各组分在色谱柱中的吸附剂上被吸附与被解吸附的反复过程。在这个过程中, 用来起解吸附作用的是向柱中加入的适当溶剂。图 1-2 是二元混合物的柱层析示意图。图中, (1) 为装有吸附剂 (如氧化铝) 的色谱柱, 当把混合试样 A 和 B 的溶液加到层析柱后, 由于吸附剂表面与组分分子的相互作用, 使组分分子在吸附剂表面的浓度增大, 这种现象称为吸附 [见 (2)、(3)], 虚线是

溶剂前沿的部位]。(4)表示用适当的溶剂(如石油醚、己烷等)淋洗柱子,此时被吸附的物质A、B就会不同程度地从吸附剂上被溶剂溶解下来,这一过程称为“洗脱”或“解吸附”。淋洗时,溶剂的解吸附作用实际上是和吸附剂的吸附作用同时并且交替进行的,在一定温度下,吸附和溶解达成平衡。由于各组分对吸附剂具有不同的亲和力,对溶剂具有不同的溶解度,所以在连续不断的多次的吸附、解吸附、再吸附、再解吸附...的过程中,那些对吸附剂亲和力弱,对溶剂溶解度大的组分(如组分A)便较快地随溶剂移到柱的下端,首先从柱中流出。组分B则留在A的后面,从而达到了分离的目的(如图(5))

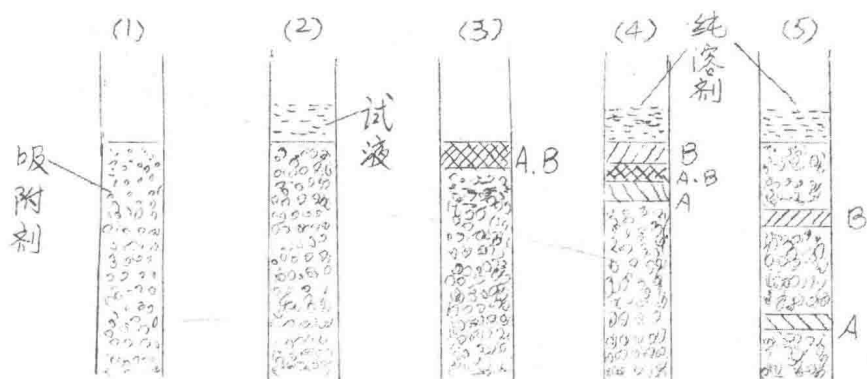


图1-2 二元混合物的柱层析示意图

吸附剂对试样中各组分吸附的强弱可用吸附分配系数K定量地表示如下:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (1-1)$$

式中: C_s —— 组分在固定相上的浓度;

C_m —— 组分在流动相上的浓度。

在一定的温度下，组分的分配系数与吸附剂的性质和流动相的性质有关。当吸附达到平衡时，组分在两相中的相对浓度可用吸附等温线来描述。所谓吸附等温线就是在一定温度下，当吸附达到平衡时，组分在两相中的浓度的相对关系曲线。吸附等温线有三种类型，其形状和相应的色谱图（或称洗脱曲线）如图 1-3 所示。

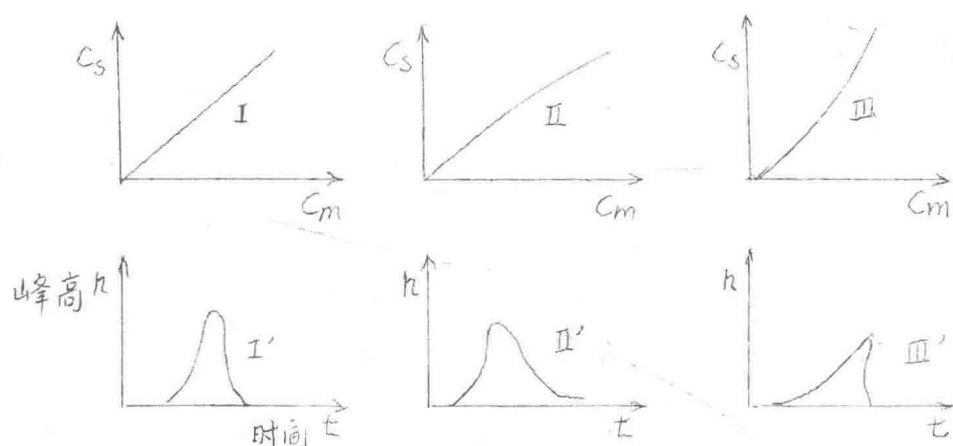


图 1-3 吸附等温线(I、II、III)及色谱图(I'、II'、III')

图中 I 为线性等温线，其斜率就是分配系数 K 。II 和 III 为非线性等温线。显然，组分的吸附等温线呈线性时，它在柱中移动的速度就与其原始浓度无关。此时，组分以恒定的速度向前进行，所得到的色谱图为对称峰形（I'）。但是这种情况是很少的，只有组分的浓度在较低的范围时才呈线性。当组分的浓度较高时，其吸附等温线就呈非线性（如图 II'、III'），II' 的色谱图称为拖尾峰，III' 的色谱图称为“伸舌头峰”。其中拖尾峰最常见，为了减少色谱峰拖尾，实际工作中应尽量控制

试样的进样量在合适的范围内。

吸附薄层色谱则是利用上述原理在涂有吸附剂的薄层板上分离不同物质组分。其方法是：将浓缩的试样溶液滴在薄层板上，称为“点样”，然后让一定的溶剂系统通过毛细作用沿一定方向缓慢浸润薄层板，带动试样在板上向前迁移。这个迁移的过程实际上也是试样中各组分在吸附剂和溶剂系统之间连续不断地吸附、解吸附、再吸附、再解吸附的过程。此过程称为展开，而溶剂系统则称为展开剂。展开的结果，试样中与薄层上吸附剂亲和力强的组分留在板的下端，处于起初点样点（称为原点）附近；试样中亲和力弱的组分则被溶剂带到板的上部，亲和力越弱，离原点越远，于是试样的不同组分就得到了分离。图 1-4 薄层板上的农药斑点，表明了这种分离结果。

比移值可看作某一被测组分的特征值，用 R_f 表示。它表明被测物质组分经展开后在薄层板上迁移远近的数值，其定义是：

$$\text{比移值}(R_f) = \frac{\text{斑点中心至原点的距离}}{\text{溶剂前沿至原点的距离}}$$

为什么试样中的不同组分会对薄层板上的吸附剂有不同的亲和力呢？这主要是和各组分的极性大小有关。在图 1-4 中， β 体六六六停留在薄板的最下端，是由于它对吸附剂硅胶的亲和力较强，实际上也就是它的极性较大；反之， pp' -DDE 对硅胶的亲和力最小，移到板的最上端，表明它的极性最小。

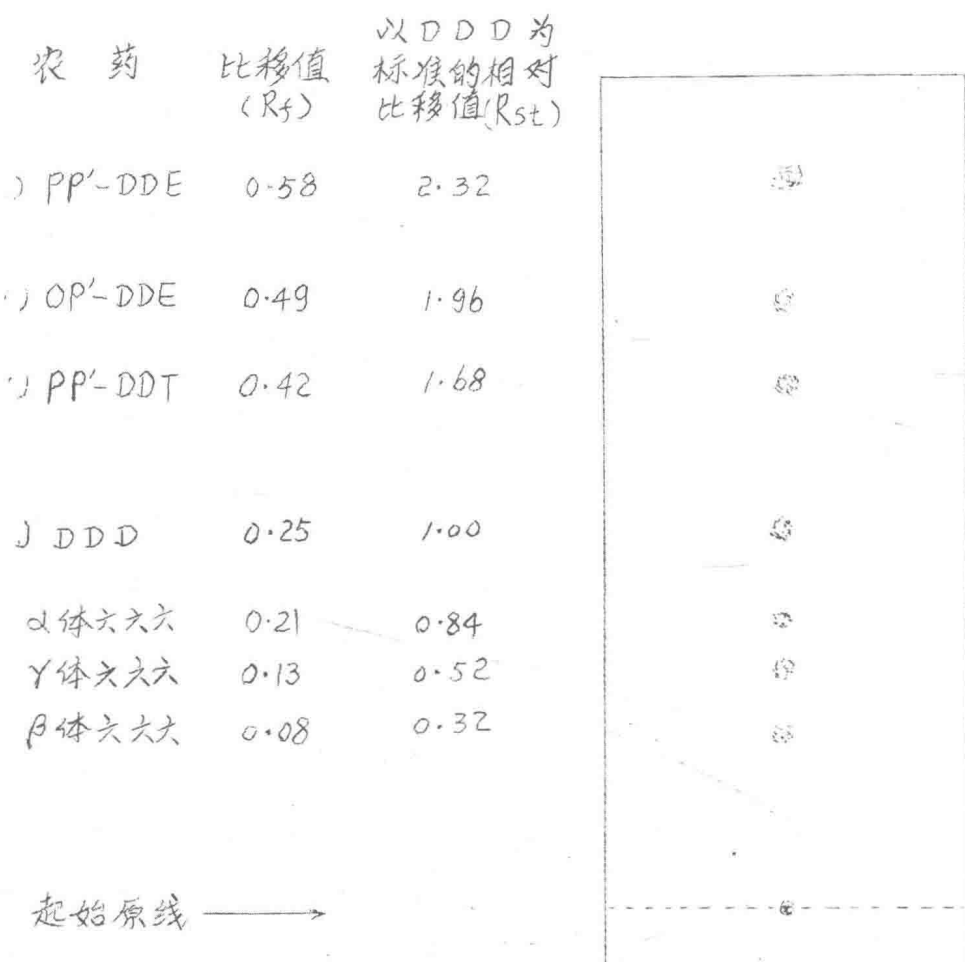
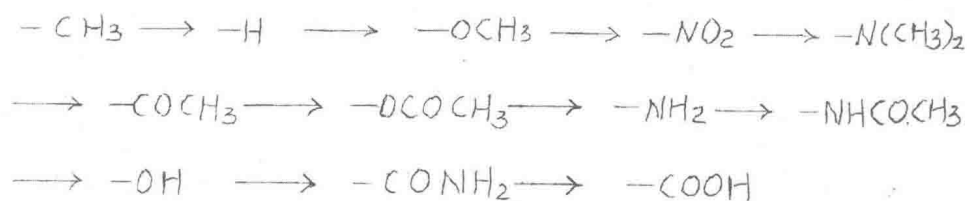


图 1-4 几种有机农药的薄板层析
(硅胶——庚烷系统)

物质的极性强弱与它具有的官能团以及分子结构有关。具有同种官能团的化合物，往往具有相近的极性，官能团不同，极性也就不同。例如，以苯为展开剂，在硅胶或氧化铝薄层板上分离醚类、脂类、酮类、醛类、醇类及酸类时，醚类和脂类迁移到薄层板的上方，酮类及醛类在中部，醇类在下方，而酸类几乎停留在原点上。这个分离的次序就是化合物的极性不同

的结果。在这个例子中，极性较大的化合物是醇类和酸类，极性较小的化合物是醚类和脂类。日本原昭二等人提出各类基团极性由弱到强的顺序如下：



此外，单就烃类而言，也有极性大小的差别，在氧化铝或硅胶薄层板上，饱和烃类不易被吸附，展开时移动最快；不饱和烃类则较易被吸附；有共轭双键的烃类比非共轭双键者更易被吸附。

二、分配色谱

分配柱色谱是利用各组分在两种不相混溶的溶剂中的分配系数不同而得到分离，它相当于一种连续性的溶剂抽提法。分配色谱也和吸附色谱一样，可以分为分配柱色谱和分配薄层色谱。纸上色谱的原理也基于分配。

分配柱色谱也是在色谱柱中进行，但柱内装的是称为“担体”或“载体”的惰性填充物，用来牢固地吸附某一种溶剂，这种溶剂称为静相溶剂或固定相溶剂，静相溶剂对被测物质有一定的溶解能力。用来淋洗的溶剂称为动相溶剂。静相溶剂和动相溶剂都不与担体起作用。

当被分离的样品加入柱的上端时，动相溶剂带着组分沿担

体流动，组分就在两相之间进行分配。当温度一定，分配达平衡时，组分在固定相中的浓度与在流动相中的浓度之比是一常数，称为分配系数，用下式表示：

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (1-2)$$

式中 K 为分配系数， C_s 为组分在固定相中的浓度， C_m 为组分在流动相中的浓度。

从上式可以看出：如果混合样中两个组分具有相同的分配系数，它们的色谱峰因重合而达不到分离的目的。如果两个组分的分配系数相差越大，则它们的色谱峰就相差越远，分离效果就越好。对于同一个组分而言，其分配系数大，在柱中运行的速度就慢；反之，在柱中运行的速度就快。由于各物质的分子结构不同，各组分的分配系数总是有差异的，试样在柱中运行一段时间后，它们的距离就会逐渐拉开，从而达到分离的目的。

分配薄层色谱的原理与分配柱色谱相似，只是以涂在薄层板上的溶剂作静相，以不断通过板面的展开剂作动相，组分在静、动两相间进行分配，最终得以分离。

纸色谱法是以纸作为载体的色谱法，所用的滤纸含有许多亲水性羟基，当纸吸附了水时，其羟基能与水分子形成氢键，将水分子牢牢地吸附在纸的表面，其中约有 6% 的水与纤维素形成复合物，这部分水可认为是固定相。当把试样加到滤纸上