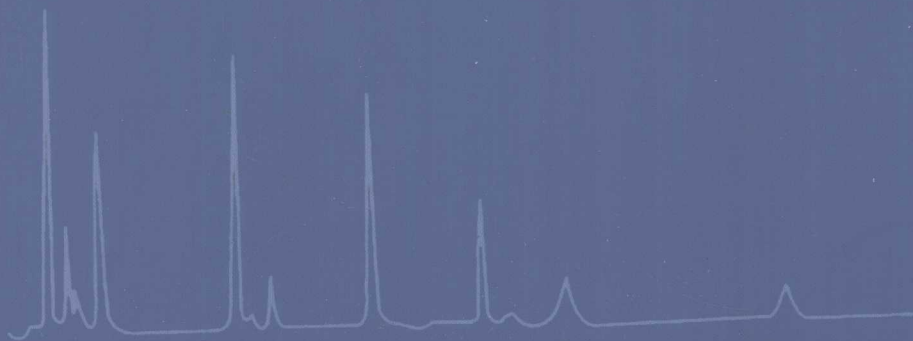


色谱分析法

苏立强 主 编

郑永杰 副主编



清华大学出版社

色谱分析法

苏立强 主 编

郑永杰 副主编

清华大学出版社

北京

内 容 简 介

本书在阐述基本理论的基础上,兼顾实际应用和学科发展的重点内容,对色谱分析法分类、不同分离模式的原理及方法发展、学科最新研究动态加以系统介绍。全书共分10章,主要内容包括:色谱法概述、色谱基本理论、气相色谱法、高效液相色谱法、平面液相色谱法、超临界流体色谱法、毛细管电泳、色谱的定性和定量分析方法、色谱联用技术、液相色谱样品预处理等。

本书可用作高等学校理工科专业的教材,也可供色谱分析工作者参考。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

色谱分析法/苏立强主编. —北京:清华大学出版社,2009.5

ISBN 978-7-302-19530-6

I. 色… II. 苏… III. 色谱法—化学分析 IV. O657.7

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第018077号

责任编辑:柳 萍

责任校对:刘玉霞

责任印制:杨 艳

出版发行:清华大学出版社

地 址:北京清华大学学研大厦A座

<http://www.tup.com.cn>

邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 刷 者:清华大学印刷厂

装 订 者:三河市金元印装有限公司

经 销:全国新华书店

开 本:170×230 印 张:26.25 字 数:496千字

版 次:2009年5月第1版 印 次:2009年5月第1次印刷

印 数:1~4000

定 价:39.80元

本书如存在文字不清、漏印、缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。联系电话:(010)62770177 转 3103 产品编号:023154-01

序

PREFACE

色谱法和分析化学中发展最快、应用最广的一门技术。作为一种多组分混合物的分离、分析强有力的工具,经过 100 余年的发展,尤其是近年来随着科学技术的突飞猛进,色谱分析从理论到技术也得到较快发展,超临界流体色谱、毛细管电泳、毛细管电色谱、微流控芯片等新型高效分离模式相继问世,极大地拓宽了其研究与应用领域。目前,色谱法已经成为分析化学学科一个重要分支,在化学、化工、轻工、石油、环保和医药等几乎所有科学领域内得到广泛应用,为信息科学、生命科学、材料科学、环境科学等新兴学科的发展作出了重要贡献。

我国的色谱研究与应用始于 20 世纪 50 年代,经过几代人的努力,在理论研究与分析实践等方面皆取得了系列成果。这些成就的取得,得益于人才的培养。从半个世纪以前的色谱讲习班,到现在的几乎所有高校都开设“色谱分析”课程,一大批高水平色谱分析人才脱颖而出,为色谱学科的发展与壮大奠定了基础。

虽然近几十年来,国内已有许多优秀的色谱法专著和参考书出版,但作为高校本科学生教材却只有有限几本,尤其是关于基本原理及方法发展方面的书更少,不能满足应用型色谱学人才培养的需要。本书作者从事色谱法教学和科研 20 多年,教学经验丰富。本书旨在推动色谱法的本科教学。全书内容丰富,通俗易懂,理论联系实际,也对最新的仪器、技术、方法与应用作了浅显的介绍。相信它的问世,定会受到广大师生和有关专业读者的欢迎,并在教学实践中发挥重要作用。

中国色谱学会理事长
中国科学院院士



2009 年 4 月

前言

FOREWORD

色谱学是分析化学的一个重要分支,已经成为现代科学研究等前沿领域不可或缺的关键技术手段,在现代工业、农业、生命科学、环境科学等领域中正发挥着重要作用。

有关色谱学理论及应用方面的专著国内外已经出版了很多种,然而,适合于高等学校本科相关专业使用的色谱分析教材很少,十余年前史景江先生主编,作者参加部分编写工作的《色谱分析法》一书目前仍在许多院校采用,这显然已不能反映当今色谱学的最新发展,编写一本适应形势发展的本科教科书已十分必要。

本书充分考虑到本科教学的特征,在阐述基本理论的基础上,兼顾实际应用和学科发展的重点内容,尤其注意教材的特点,力求做到简明扼要、深入浅出。主要内容包括:色谱法概述、色谱基本理论、气相色谱法、高效液相色谱法、平面液相色谱法、超临界流体色谱法、毛细管电泳、色谱的定性和定量分析方法、色谱联用技术、液相色谱样品预处理等。经过对本书的系统学习,可以对色谱分析法的基本原理与方法有系统全面的了解,为实际应用奠定基础。

本书第1,3,4章由齐齐哈尔大学苏立强编写,第2章由齐齐哈尔大学王颖编写,第5章由齐齐哈尔大学杨铁金编写,第6章由齐齐哈尔大学杨长龙编写,第7,9章由齐齐哈尔大学郑永杰编写,第8章由齐齐哈尔大学初红涛编写,第10章由华东理工大学、国家色谱中心张维冰编写。全书由苏立强、张维冰统稿。

编者力求结合多年的教学与科学经验,将本书编好,但限于水平及时间有限,书中错误与不足在所难免,恳请读者批评指正。

编 者

2009年4月

目录

CONTENTS

第 1 章 概论	1
1.1 色谱分析法的历史	1
1.2 色谱法的分类	3
1.2.1 按流动相和固定相的物态分类	3
1.2.2 按分离的原理分类	3
1.2.3 按固定相使用的方式分类	4
1.2.4 按色谱动力学过程分类	4
1.2.5 按色谱技术分类	5
1.3 色谱分析法的特点与局限性	6
1.4 色谱图和相关术语	7
1.5 色谱现代发展及相关联用技术	9
1.6 有关色谱的中文工具书和国内外主要色谱期刊	13
习题	15
第 2 章 基本理论	16
2.1 概述	16
2.2 平衡理论	17
2.2.1 分配系数	17
2.2.2 分配比	18
2.2.3 分配等温线	20
2.2.4 对色谱峰峰形的解释	22
2.3 塔板理论	23
2.3.1 塔板理论假说	23
2.3.2 基本关系式	27

2.3.3	色谱柱效能及评价	28
2.3.4	塔板理论的作用与不足	29
2.4	速率理论	29
2.4.1	色谱过程中的传质与扩散	30
2.4.2	速率理论方程	31
2.4.3	影响色谱峰展宽的其他因素	40
2.5	分离度	41
2.5.1	分离度的表达	42
2.5.2	影响分离度的因素	46
	习题	48
第3章	气相色谱法	52
3.1	气相色谱原理	52
3.1.1	气相色谱基本流程	52
3.1.2	气相色谱分离的原理	53
3.1.3	气相色谱常用术语及参数	53
3.2	气相色谱仪	56
3.2.1	填充柱气相色谱仪	56
3.2.2	毛细管柱气相色谱仪	60
3.2.3	色谱固定相	68
3.2.4	检测器	82
3.2.5	色谱数据处理系统	100
3.3	气相色谱辅助技术	106
3.3.1	裂解气相色谱法	106
3.3.2	衍生气相色谱法	117
3.3.3	顶空气相色谱法	122
	习题	125
第4章	高效液相色谱法	128
4.1	概述	128
4.2	液相色谱的板高方程	130
4.3	高效液相色谱仪	134
4.3.1	高压输液系统	134
4.3.2	进样装置	139

4.3.3	色谱柱系统	140
4.3.4	液相色谱检测器	144
4.4	高效液相色谱分离方式	152
4.4.1	液谱分离系统	152
4.4.2	液固吸附色谱	161

5.5.1	电泳技术的基本原理及分类	234
5.5.2	常用电泳分离技术	236
5.5.3	IEF/SDS-PAGE 双向电泳法	239
	习题	242
第 6 章	超临界流体色谱法	244
6.1	超临界流体色谱的基本原理	244
6.1.1	超临界现象和超临界流体的特征	244
6.1.2	超临界流体色谱的特点	247
6.1.3	流动相及改性剂	249
6.1.4	色谱柱和固定相	252
6.2	超临界流体色谱仪器	254
6.2.1	SFC 的一般流程	254
6.2.2	SFC 流动相输送系统	255
6.2.3	SFC 分离系统	256
6.2.4	SFC 检测系统	256
6.3	SFC 联用技术	257
6.3.1	SFC-MS 联用	257
6.3.2	SFC-FTIR 联用	260
6.3.3	SFC-NMR 联用	261
6.4	超临界流体色谱的应用	263
6.4.1	糖类	263
6.4.2	脂肪酸和酯类	264
6.4.3	甘油酯	266
6.4.4	甾类化合物	267
6.4.5	维生素	268
6.4.6	氨基酸、肽、蛋白质	269
6.4.7	药物	270
6.4.8	手性对映体	274
6.4.9	展望	277
	习题	278
第 7 章	毛细管电泳	279
7.1	概述	279

7.2	毛细管电泳分离的一般过程	279
7.2.1	分离的一般过程	279
7.2.2	数学描述	280
7.3	毛细管电泳分离的基本原理	282
7.4	基本概念	283
7.4.1	电泳、淌度、绝对淌度及有效淌度	283
7.4.2	电渗、电渗率及合淌度	284
7.4.3	两相分配与权均淌度	286
7.5	毛细管电泳分类	287
7.6	毛细管电泳仪系统	288
7.6.1	电泳仪的结构	288
7.6.2	毛细管电泳仪的特点	289
7.7	毛细管电泳分离方式	289
7.7.1	毛细管区带电泳	289
7.7.2	毛细管凝胶电泳	292
7.7.3	胶束毛细管电动色谱	294
7.7.4	毛细管电色谱	299
7.7.5	毛细管等速电泳	301
7.7.6	毛细管等电聚焦	302
7.8	毛细管电泳柱技术	303
7.9	毛细管电泳检测技术	304
7.10	应用实例	305
	习题	308

第 8 章 色谱的定性和定量分析

8.1	色谱定性分析	309
8.1.1	一般性定性	309
8.1.2	利用保留值规律进行定性分析	316
8.1.3	利用选择性检测器定性	320
8.1.4	联用方法定性	321
8.1.5	化学方法定性	323
8.1.6	平面色谱中的定性方法	325
8.1.7	多种方法配合定性	326
8.2	色谱定量分析	327

8.2.1	定量分析的基本公式	327
8.2.2	色谱峰高和峰面积的测定	328
8.2.3	定量校正因子	333
8.2.4	定量方法	342
8.2.5	影响准确定量的主要因素	349
	习题	352
第9章	色谱联用技术	355
9.1	气相色谱-质谱联用技术	355
9.1.1	气相色谱-质谱联用仪器系统简介	355
9.1.2	气相色谱-四极杆台式质谱联用仪器简介	356
9.1.3	气相色谱-质谱联用的条件选择	357
9.1.4	气相色谱-质谱联用的谱图及其信息	358
9.1.5	气相色谱-质谱联用质谱谱库及检索简介	359
9.2	气相色谱-傅里叶红外光谱联用技术	362
9.2.1	气相色谱-傅里叶变换红外联用仪器系统简介	362
9.2.2	气相色谱-傅里叶变换红外数据采集与处理简介	366
9.2.3	气相色谱-傅里叶变换红外的条件优化	368
9.2.4	气相色谱-傅里叶变换红外联用技术的应用	369
9.3	液相色谱-质谱联用技术	369
9.3.1	LC-MS 接口	370
9.3.2	LC-MS 分析条件的选择	371
9.3.3	毛细管电泳-质谱联用	372
9.3.4	LC-MS 联用的应用	372
9.4	液相色谱-傅里叶变换红外光谱联用	373
9.5	色谱与其他仪器的联用	376
	习题	377
第10章	液相色谱样品预处理	378
10.1	概述	378
10.2	液液萃取	381
10.2.1	液液萃取的基本操作	382
10.2.2	液液萃取溶剂的选择	383
10.2.3	液液萃取常用装置	384

10.3	固相萃取	385
10.3.1	固相萃取的原理及特点	385
10.3.2	固相萃取常用的吸附剂	385
10.3.3	洗脱剂	386
10.3.4	固相萃取装置及操作	387
10.3.5	固相微萃取	389
10.4	膜分离	391
10.4.1	膜分离原理	392
10.4.2	膜的分类	392
10.4.3	膜分离过程的类型及特点	393
10.4.4	膜分离技术存在的问题及解决方法	393
10.5	衍生化技术	394
10.5.1	衍生化作用与反应要求	394
10.5.2	柱前衍生化	395
10.5.3	柱后衍生化	395
10.5.4	紫外衍生化	396
10.5.5	荧光衍生化	399
	参考文献	400

概 论

1.1 色谱分析法的历史

为了弄清楚混合物中的各组分是何种物质及含量是多少,可以采用的方法之一是先将各组分分离,然后对已分离的组分进行测定,色谱分析法就属于这种方法。色谱分析法的原理可以简述为:被分离的各组分是在两相之间反复进行分配的,其中一相静止不动,称为固定相,另一相是携带被分离组分流过固定相的流体,称为流动相。被分离组分与流动相和固定相都可能发生作用,但被分离的各组分的结构和性质不同,决定了它们与流动相和固定相之间的作用力也不同,导致各组分在固定相与流动相之间的分配系数有差异,经过反复多次的分配,随流动相向前移动,各组分运动的速度不同,彼此分离。

虽然关于色谱法的创立与起源在说法上略有不一,但人们基本上认为俄国植物学家茨维特(M. S. Tswett)是色谱法的创始人。因为他从1901年起研究用所谓“色谱法”分离、提纯植物色素。他在1903年3月21日于华沙自然科学学会生物学会会议上,提出题目为《一种新型吸附现象及其在生化分析上的应用》论文,叙述了应用吸附剂分离植物色素的新方法。他将叶绿素的石油醚抽提液倒入装有碳酸钙吸附剂的玻璃柱管上端,然后用石油醚进行淋洗,结果不同色素按吸附顺序在管内形成相应的彩色环带,就像光谱一样。他在1906年发表的另一篇文章中,命名这些色带为色谱图,称此方法为色谱法;在1907年于德国生物学会会议上,展示过有色带的柱管和提纯的植物色素溶液。

英国人马丁(A. J. P. Martin)与辛格(R. L. M. Synge)在1941年首次提出液液色谱法,使用装在粗柱管中的粗粒度填料,流动相种类少且只在重力的

作用下流过固定相,又没有高性能的检测器,因此柱效及检测灵敏度均较低。液相色谱法在此后较长的一段时间内无显著改善,即现在所说的经典液相色谱法。

1952年马丁与辛格又研究了在惰性载体表面上涂渍一层均匀的有机化合物液膜,以此作固定相,并以气体作流动相,创立了气相色谱法中应用极为广泛的气液相色谱法。马丁首次应用该方法成功地分离了脂肪酸混合物。

1956年马丁提出使用小口径(0.2mm)色谱柱的建议。

1957年美国学者Golay首先应用小口径毛细管进行色谱分离试验,获得了高于填充柱的分辨率和柱效能,并从理论上加以初步论述。

1959年Porath和Flodin提出了具有化学惰性的多孔凝胶作为固定相的空间排阻色谱法,根据固定相孔隙尺寸的不同而具有不同的选择性渗透能力,对分子质量及分子尺寸不同的组分具有选择性,适合测定聚合物的分子质量分布。

1970年以后逐渐发展了高效液相色谱法以及各种模式、多种高性能的检测器和联用手段,使液相色谱技术逐步产生了实质性的改进和极为广泛的应用。

1975年H. Small及其合作者发表了第一篇离子色谱论文,同年商品仪器问世。初期,离子色谱主要是用于阴离子的分析,目前已经成为在无机和有机阴、阳离子混合物分析中起重要作用的分析技术。

1979年弹性石英毛细管色谱柱商品化,使气相色谱的应用再次发生了飞跃。

虽然毛细管电泳以及后来发展的各种模式的相关技术可以上溯到20世纪60年代甚至50年代,但是迅速发展还是在80年代。1981年,Jorgenson和Lukacs使用75 μm 直径的熔融石英毛细管做CZE(毛细管区带电泳),利用电迁移进样和荧光检测,在30kV的电压下获得了 4×10^5 塔板/m的柱效,成为毛细管电泳发展史上的里程碑。之后发展了胶束电动色谱、毛细管凝胶色谱、毛细管电色谱等模式。主要应用领域是蛋白质分离、糖分析、DNA测序、手性分离、单细胞分析等。

我国色谱研究工作起步于1954年,由中国科学院大连化学物理研究所做出首张色谱图,并进行了早期的色谱理论和技术研究工作。半个世纪以来,全国范围内的多家高校、科研院所、仪器厂商等单位相继开展了众多的色谱法研究和应用工作。近年来,国际性、全国性、省级及区域性的各种色谱学术会议频繁举行,我国色谱工作者在色谱的基础理论和应用研究方面已经取得一些接近国际先进水平的成果,在仪器制造方面近年来积极引进、学习和吸收国外的先进技术,亦取得了显著的成就。

1.2 色谱法的分类

色谱法有多种类型,从不同角度出发,有各种色谱分类法。

1.2.1 按流动相和固定相的物态分类

按流动相的状态,色谱法可分为气相色谱法(流动相为气体)、液相色谱法(流动相为液体)和超临界流体色谱法;按固定相的状态,又可分为气固色谱法、气液色谱法、液固色谱法和液液色谱法等,见表 1-1。

表 1-1 按流动相和固定相的物态分类的色谱法

种 类	气 相 色 谱	液 相 色 谱	超临界色谱
流动相	气体	液体	超临界流体
固定相	固体	气固吸附色谱	液固吸附色谱
	液体	气液分配色谱	液液分配色谱

固定相为固体吸附剂,流动相为气体时,称为气固吸附色谱法。固定相是液体,而流动相是气体时,称为气液分配色谱。这时,该液体固定相附着在一种惰性的担体上(如硅藻土、玻璃微球等),装填到色谱柱中,起分配作用的是这层液体,因此这种色谱法叫气液色谱。

超临界流体色谱技术采用了近乎临界状态的稠密气体为流动相。这种状态下,流动相对多种物质具有良好的溶解性,因此许多在气相色谱过程中不稳定的化合物,在液相色谱上难以分离的化合物可以采用超临界流体色谱技术分析。这种技术介乎液相色谱和气相色谱之间,但不能取代其他种类的色谱技术。

1.2.2 按分离的原理分类

利用组分在流动相和固定相之间的分离原理不同来分类,可以将色谱法分为吸附色谱法、分配色谱法、离子交换色谱法、凝胶渗透色谱法、离子色谱法等 10 余种方法。

吸附色谱法是利用吸附剂对样品的吸附性能不同达到分离的。它可分为气固吸附色谱和液固吸附色谱。吸附剂是利用表面的性质来吸附化合物的,表面积越大的吸附剂,吸附能力越强。

分配色谱法的分离原理是试样组分在固定相和流动相之间的溶解度存在差

异,因而溶质在两相间进行分配。

离子交换色谱法是基于离子交换树脂上可电离的离子与流动相中具有相同电荷的溶质离子进行可逆交换,依据这些离子对交换剂具有不同的亲和力而将它们分离。

凝胶渗透(体积排阻)色谱法,以凝胶为固定相。它的分离机理与其他色谱法完全不同。它类似于分子筛的作用,但凝胶的孔径比分子筛要大得多,一般为数纳米到数百纳米。溶质在两相之间不是靠其相互作用力的不同来分离,而是按分子大小进行分离。

1.2.3 按固定相使用的方式分类

根据固定相在色谱分离系统中使用的方式,可分为柱色谱法、纸色谱法和薄层色谱法。

柱色谱是指将固定相放在玻璃、不锈钢、石英等管中,该管子叫做色谱柱,这种色谱法叫柱色谱。

如果固定相是用一张纸,并在上面涂以固定液。一般就是在纸上吸上水,成为纸上的固定液。当然要有一定的处理方法,利用纸上吸的水,再用另一种溶剂作冲洗剂。这种方法就叫做纸上层析,也叫纸色谱。

将固定相均匀地涂在玻璃或其他材料的平板上,形成一个固定相的薄层,用来进行色谱分离,称为薄层色谱。

1.2.4 按色谱动力学过程分类

根据流动相洗脱的动力学过程不同,可分为冲洗色谱法、顶替色谱法和迎头色谱法等。目前,色谱分析中主要用的是冲洗法,顶替法和迎头法虽然还在用,但是用得很少。

冲洗法就是把样品加在固定相上,然后用流动相冲洗。根据吸附能力和分配系数的不同,按次序洗脱出来。分配系数最小的先出来。冲洗剂,或者是气体,或者是液体是不断加上去的。这是一种最简单的方法。

还有一种方法,就是把样品加到固定相上以后,例如把烷烃、烯烃和芳烃的混合样品加到硅胶上,再加入甲醇。由于甲醇的吸附能力较强,它一进去后就在所有的过程中把其他东西往下顶,但是由于芳烃的吸附能力比烯烃强,烯烃的吸附能力又比烷烃强,因此,甲醇首先顶的是芳烃,芳烃下来又顶烯烃。所以经过一段时间以后,流出的次序是:烷烃走在最前面,烯烃走在中间,芳烃走在最后,再后面就是甲醇。这就是顶替法。

如果不加顶替剂,而是让样品连续地通过色谱柱,首先出来的还是烷烃。因为在柱子所吸附的样品中,烷烃的吸附能力最小,最容易饱和,因此烷烃先出来,接着就是烯烃。因为是连续进样,所以第二个出来的是烷烃和烯烃的混合物,而不是纯烯烃。同样,最后出来的是烷烃、烯烃和芳烃的混合物,而不是纯芳烃。这就像波浪一样迎头而来,所以叫做迎头法。顶替法和迎头法在气相色谱中现在用得很少,但在生化样品的制备色谱中,仍用得较多。

1.2.5 按色谱技术分类

为提高组分的分离效能和高选择性,采取了许多技术措施,根据这些色谱技术的性质不同而形成了多种色谱种类,包括程序升温气相色谱法、反应气相色谱法、裂解气相色谱法、顶空气相色谱法、毛细管气相色谱法、多维气相色谱法、制备色谱法 7 种方法。

程序升温气相色谱法,是沸点范围较宽的试样适宜采用的一种方法。即柱温按预定的加热速度,随时间线性或非线性地增加。升温的速度一般呈线性,即单位时间内上升的温度是恒定的,例如 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 等。在较低的初始温度,沸点较低的组分,即最早流出的峰可以得到良好的分离。随柱温增加,较高沸点的组分也能较快地流出,并和低沸点组分一样也能得到分离良好的尖峰。

反应气相色谱法是利用适当的化学反应将难挥发试样转化为易挥发的物质,然后以气相色谱法分析。这样使那些原本不适用于气相色谱分析的物质也能进行色谱分析,扩大了色谱法的应用范围。

裂解气相色谱法是将分子质量较大的物质在高温下裂解后进行分离检定,已应用于聚合物的分析。同样,使色谱法的应用范围得以延伸。

顶空气相色谱法,严格来讲,是一种进样技术。即不直接将样品进入色谱柱,将固体或气体样品置于密闭的容器中,在一定的温度下,使气、固或气、液两相达到平衡,然后吸取上端的气体进样,通过平衡气体的分析结果来确定实际样品的组成和含量的分析方法。

毛细管气相色谱法是采用高分辨能力的毛细管色谱柱来代替填充柱分离复杂组分的色谱法。虽然毛细管柱每米理论塔板数与填充柱相近,但可以使用 $50\sim 100\text{m}$ 的柱子,而柱压降只相当于 4m 长的填充柱,总理论塔板数可达 $10\text{万}\sim 30\text{万}$ 。毛细管柱气相色谱法是一种高效、快速、高灵敏的分离分析方法。

多维气相色谱法,指在使用多柱或多检测器的基础上,还要使用多通阀或通过改变串联双柱前后压力的办法来改变载气在柱内的流向。也就是说,样品可在经过第一次分离后,又通过改变载气流向的办法,使样品全部或部分经过第二柱进行