

0657.7

D77

现代色谱技术

主 编	杜 斌	张振中
副主编	周彩荣	张 宣
	韩华云	冯文学
编 委	郭茂峰	马东玲
	王彩芳	贾 欣
	朱 玲	刘晓艳

河南医科大学出版社

· 郑州 ·

图书在版编目(CIP)数据

现代色谱技术/杜斌,张振中主编. —郑州:河南医科大学出版社,2001.8

ISBN 7-81048-484-2

I. 现… II. ①杜…②张… III. 色谱法
IV. 0657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 038775 号

河南医科大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

邮政编码 450052 电话 (0371)6988300

河南医版激光照排中心照排

河南东方制图印刷有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 14.625 字数 338 千字

2001 年 8 月第 1 版 2002 年 1 月第 2 次印刷

印数 4 091 ~ 6 140 册

定价:24.00 元

前 言

色谱作为一种分离与分析技术,已有近百年的历史。近半个世纪以来,色谱技术发展迅猛,无论是理论,还是各种分离模式,都趋向成熟,已成为分析化学的一个重要分支。色谱技术为医药、卫生、生化、环保等学科的发展作出了极大的贡献,同时在基因工程、生物工程及材料科学等方面也有着广阔的应用前景。作为这些学科必不可少的工具和手段,色谱技术愈发显示出其重要性,成为相关专业高素质人才必须掌握的重要内容。最近的统计资料显示,全世界各类分析仪器中,气相色谱仪和液相色谱仪的销售额占 25% ~ 30%,其中以液相色谱仪的需求量最大。多维色谱,如 LC-LC-MS 等用于药物、蛋白质、多肽结构的测定,并使操作完全自动化,这是 21 世纪色谱分析的发展方向之一。面对基因工程的挑战,人类基因测序工作仍然离不开现代色谱技术的应用。可以说:没有色谱技术,就没有生命科学与自然科学的良好发展。

有关色谱技术的各种书籍多是以色谱专业人员为对象编写的,或仅在仪器分析中予以简单介绍,缺少针对大专院校学生而编写的、能适应现代教育发展需要的色谱书籍。本着面向未来、面向社会需要的原则,着眼于夯实基础、造就合格人才的需要,我们把色谱方法的基础性、实践性和前瞻性统一起来,并确保与其他各相关课程的有效衔接。在查阅大量文献和参考大量书籍的基础上编写了这本《现代色谱技术》,力求在内容的编排上做到“先易后难,深入浅出,简明扼要,广度与深度适宜”。

本书共分七章,包括绪论、基础理论、气相色谱法、高效液相色谱法、薄层色谱法、毛细管电泳法和色谱联用技术。各章编写分工如下:杜斌(前言、第三章、第四章、第五章)、张振中(第三章、第四章、第六章)、周彩荣(第三章、第五章、第六章)、张宣(第四章、第五章、第七章)、韩华云(第三章、第五章)、冯文学(第四章、第七章)、郭茂峰(第二章、第六章)、马东玲(第二章、第七章)、王彩芳(第七章)、贾欣(第二章)、朱玲(第六章)、刘晓艳(第一章)。

感谢杨秦予、陈波在本书的出版过程中给予的许多帮助。

由于编者水平有限,书中难免有不当之处,敬请读者指正。

编 者

2001.2

目 录

第一章 绪 论	(1)
第一节 色谱法发展简史	(1)
一、色谱法的产生	(1)
二、色谱法的发展	(1)
三、色谱法的现状和未来	(2)
第二节 色谱法的定义与分类	(4)
一、色谱法的定义	(4)
二、色谱法的分类	(4)
第三节 色谱法与其他方法的比较	(6)
一、色谱法的特点和优点	(6)
二、色谱法的缺点	(7)
第二章 基础理论	(8)
第一节 色谱参数	(8)
一、色谱流出曲线与色谱峰	(8)
二、定性参数	(10)
三、柱效参数	(12)
四、分离参数	(14)
五、相平衡参数	(16)
第二节 塔片理论	(17)
一、基本假设	(17)
二、二项式分布	(18)
三、正态分布	(22)
第三节 速率理论	(23)
一、Van Deemter 方程式——气相色谱速率理论	(23)
二、Giddings 方程式——液相色谱速率理论	(26)
第三章 气相色谱法	(30)
第一节 概 述	(30)
一、气相色谱法发展简史	(30)
二、气相色谱法的分类	(30)
三、气相色谱法的特点	(31)
四、气相色谱法的流程	(31)
第二节 气相色谱填充柱	(32)
一、气-液填充柱	(33)

二、气-固填充柱	(38)
第三节 气相色谱检测器	(40)
一、检测器的分类与性能指标	(40)
二、常用检测器	(42)
第四节 分离条件的选择	(47)
一、载气及流速的选择	(47)
二、色谱柱的选择	(48)
三、柱温的选择	(48)
四、其他条件选择	(49)
第五节 定性分析方法	(50)
一、利用保留值定性	(50)
二、利用同系物的碳数规律作图定性	(51)
三、利用选择性检测器定性	(52)
四、利用官能团分类试剂定性	(53)
五、利用两谱联用定性	(53)
第六节 定量分析方法	(53)
一、峰面积的测量	(53)
二、定量校正因子	(54)
三、定量分析方法	(56)
第七节 毛细管气相色谱简介	(58)
一、毛细管色谱柱的分类	(58)
二、毛细管柱的特点	(59)
三、毛细管柱气相色谱的进样系统	(59)
四、毛细管气相色谱柱的评价	(60)
五、应用实例	(62)
第八节 气相色谱法在药物分析中的应用	(63)
一、合成药	(63)
二、中药及中成药	(64)
三、制剂分析	(65)
四、药物监测与药代动力学研究	(66)
五、手性化合物的分离	(67)
第四章 高效液相色谱法	(69)
第一节 概 述	(69)
一、高效液相色谱法发展简史	(69)
二、高效液相色谱法在药物分析中的作用	(69)
三、高效液相色谱法与其他分离方法的比较	(69)
四、色谱类型	(70)
第二节 常用高效液相色谱法的分离机制	(70)

一、液-固吸附色谱法	(70)
二、液-液分配色谱法	(72)
三、化学键合相色谱法	(74)
四、离子对色谱法	(76)
五、离子交换色谱法	(77)
六、凝胶色谱法	(77)
七、手性色谱法	(78)
第三节 高效液相色谱固定相	(82)
一、液-固色谱固定相	(82)
二、液-液色谱固定相	(84)
三、离子交换键合相	(85)
四、凝胶	(86)
五、手性固定相	(87)
第四节 高效液相色谱的流动相	(88)
一、高效液相色谱流动相溶剂的物理性质	(88)
二、洗脱方式	(92)
第五节 仪器装置	(92)
一、高压输液系统	(92)
二、进样系统	(95)
三、色谱柱	(95)
四、检测器	(96)
第六节 定性、定量分析方法	(99)
一、定性分析方法	(99)
二、定量分析方法	(100)
第七节 高效液相色谱法在药物分析中的应用	(101)
一、合成药	(102)
二、中药及中成药	(103)
三、制剂分析	(104)
四、药代动力学研究	(106)
五、天然产物的分析	(106)
六、手性药物的拆分	(107)
第五章 薄层色谱法	(108)
第一节 概 述	(108)
一、薄层色谱法的特点	(108)
二、发展近况	(109)
三、薄层色谱的分类	(110)
第二节 薄层色谱法的基础理论	(110)
一、流速	(110)

二、保留值	(111)
三、塔片理论	(113)
四、分离参数	(113)
第三节 薄层色谱系统	(116)
一、薄层色谱法的基本材料及设备	(116)
二、吸附剂的选择	(117)
三、展开剂的选择	(118)
四、薄层板的制备	(120)
五、点样	(123)
六、展开	(124)
七、显色方法和显色剂	(126)
第四节 高效薄层色谱法	(127)
一、薄层色谱法的特点	(128)
二、吸附剂粒度与分离效能	(128)
三、预制高效薄层板	(128)
四、应用举例	(129)
第五节 反相薄层色谱法	(131)
一、反相键合相薄层色谱板	(131)
二、反相键合相薄层板的特点	(131)
三、反相键合相薄层色谱的展开	(132)
第六节 薄层定性分析	(134)
一、利用保留值定性	(134)
二、利用板上化学反应定性	(134)
三、利用板上光谱图定性	(135)
四、薄层色谱与其他技术联用定性	(136)
第七节 薄层定量分析	(137)
一、目视法	(137)
二、洗脱法	(137)
三、薄层扫描法	(139)
第八节 薄层色谱法在药物分析中的应用	(143)
一、合成药物的分析	(144)
二、中草药和中成药的成分分析	(148)
三、生化和抗生素研究	(151)
第六章 毛细管电泳法	(152)
第一节 概 述	(152)
一、毛细管电泳及其特点	(152)
二、毛细管电泳发展史	(152)
第二节 毛细管电泳基本装置与基本知识	(153)

一、毛细管电泳基本装置	(153)
二、毛细管电泳基本知识	(154)
第三节 毛细管电泳的基本原理	(155)
一、毛细管区带电泳法的基本原理	(155)
二、凝胶毛细管电泳法的基本原理	(156)
三、无胶筛分毛细管电泳的基本原理	(157)
四、等电聚焦毛细管电泳法的基本原理	(158)
五、胶束电动毛细管色谱法的基本原理	(158)
第四节 毛细管涂层与进样技术	(160)
一、毛细管内壁涂层	(160)
二、进样	(163)
第五节 毛细管电泳检测方法和检测器	(166)
一、UV - 可见吸收检测法	(167)
二、光激发荧光检测法	(167)
三、电化学检测法	(168)
四、质谱检测法	(168)
五、折射指数检测法	(169)
第六节 毛细管电泳的应用	(169)
一、无机阳离子	(169)
二、无机阴离子与有机酸	(170)
三、氨基酸的分离分析	(172)
四、肽的分离分析	(173)
五、核酸的分离分析	(175)
六、毛细管电泳在药物及临床分析中的应用	(179)
第七章 联用技术	(188)
第一节 气相色谱 - 傅里叶变换红外光谱的联用技术	(188)
一、GC - FTIR 技术发展过程	(188)
二、GC - FTIR 系统的结构单元	(189)
三、数据处理系统	(194)
四、应用	(198)
第二节 高效液相色谱 - 傅里叶变换红外光谱联用	(199)
一、流动池技术	(200)
二、溶剂脱除技术	(201)
第三节 气相色谱 - 质谱联用技术	(203)
一、概述	(203)
二、GC - MS 联用仪的组成和工作原理	(203)
三、GC - MS 法与 GC 法的比较及联用仪操作要点	(207)
四、GC - MS 联用仪的应用	(208)

第四节 液相色谱 - 质谱联用	(211)
一、概述	(211)
二、有关名词	(212)
三、热喷雾接口	(213)
四、电喷雾接口	(216)
五、大气压化学电离接口	(218)
六、连续流动快原子轰击接口	(218)
七、毛细管电泳与质谱仪联用	(219)
第五节 气相色谱 - 傅里叶变换红外光谱 - 质谱联用	(220)

第一章 绪 论

第一节 色谱法发展简史

一、色谱法的产生

1906年,俄国植物学家 Tsweet(茨维特),在研究植物叶子的组成时,用碳酸钙作吸附剂,他把干燥的碳酸钙粉末装在竖立的玻璃柱中,然后把植物叶子的石油醚萃取液倒到管中的碳酸钙上,萃取液中的色素就吸附在管内上部的碳酸钙里,再用纯净的石油醚洗脱被吸附的色素,于是,在管内的碳酸钙上形成3种颜色的6个色带。当时茨维特把这种色带叫做“色谱”。在这一方法中管内填充物碳酸钙称为固定相(stationary phase),冲洗剂石油醚称为流动相(mobile phase)。把茨维特开创的方法称为液-固色谱法(liquid-solid chromatography, LSC),随着色谱法的不断发展,不仅用于有色物质的分离,而且大量用于无色物质的分离。色谱的“色”字虽已失去原有意义,但色谱名词仍沿用至今。

二、色谱法的发展

在茨维特提出色谱名词后的20年间没有人关注这一伟大发现,直到1931年德国的Kuhn和Lederer才重复了茨维特的某些实验,用氧化铝和碳酸钙分离了 α -、 β -和 γ -胡萝卜素,此后用这种方法分离了60多种此类色素。Martin和Synge在1940年提出液-液色谱法(liquid-liquid chromatography, LLC),即固定相是吸附在硅胶上的水,流动相是某种有机溶剂。1941年,Martin和Synge提出用气体代替液体作流动相的可能性,11年之后,James和Martin提出了从理论到实践较完整的气-液色谱方法(gas-liquid chromatography, GLC),从而获得了1952年的诺贝尔化学奖。在此基础上,1957年,Golay开创了开管柱气相色谱法(open-tubular chromatography, OTC),习惯上称为毛细管柱气相色谱法。1956年, Van Deemter等在前人研究的基础上发展了描述色谱过程的速率理论,1965年,Giddings总结和发展的前人的理论,为色谱的发展奠定了理论基础。另一方面早在1944年,Consden等发展了纸色谱,1949年,Maclean等在氧化铝中加入淀粉黏合

剂制作薄层板,使薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)得以实际应用,而在1956年,Stahl 发明出涂布器之后,才使 TLC 得到广泛应用。在20世纪60年代末把高压泵和化学键合相用于液相色谱,出现了高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)。20世纪80年代初超临界流体色谱(supercritical fluid chromatography, SFC)兴起。而在20世纪90年代毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)得到广泛应用。同时集 HPLC 和 CZE 优点的毛细管电色谱在20世纪90年代后期受到关注。由 Tsweet 提出色谱名词之后,至气相色谱法(含毛细管色谱法)的创立,应是现代色谱法的第一个里程碑,色谱-光谱联用技术、高效液相色谱法及毛细管电泳法可分别视为色谱法的第二、第三及第四个里程碑。在21世纪色谱技术将在生命科学等重要领域中发挥其不可替代的作用。

三、色谱法的现状和未来

色谱法是分析化学领域中发展最快、应用最广的分析方法之一。这是因为现代色谱法具有分离与分析2种功能,能排除组分间的相互干扰,逐个将组分进行定性、定量分析,而且还可制备纯组分。因此,在药物分析中,对于成分复杂的药品(如中药材、中成药、复方制剂等)分析、杂质检查、痕量分析或含量相差悬殊的成分的分析课题,通常情况下都首选色谱法,在各国药典中都大量收载色谱法,并呈明显上升趋势,是有力的证明。表1-1、表1-2 分别是美国药典与中国药典收载含量测定方法的统计表。

表1-1 美国药典含量测定方法比较(品种数)

版次	HPLC	GC	TLC	UV	IR	FL	AAS	NMR	TI
20 版	62	68	25	469	21	10	7	2	
21 版	363	142	698	13	17	27	2		
22 版	871	157	15	542	17	17	76	5	784
23 版	1 188	100	4	490	15	5	78	2	803
24 版	1 386	111	1	374	14	14	96	2	775

注: HPLC——高效液相色谱法 GC——气相色谱法 TLC——薄层色谱法 UV——紫外分光光度法
IR——红外分光光度法 FL——荧光分析法 AAS——原子吸收分光光度法 NMR——核磁共振法 TI——滴定分析法

从表1-1中可看出在美国药典中,色谱法在药品质量标准中处于最重要的地位,尤其是 HPLC 其应用频率逐版上升,至24版, HPLC 已成为美国药典应用频率最高的一种分析方法。

表 1-2 中国药典含量测定方法统计(%)

版次	HPLC	GC	TI	重量分析法	分光光度法
1953 年版	0	0	68.8	19.30	
1963 年版	0	0	68.2	11.30	6.91
1977 年版	0	0	61.8	3.89	22.30
1985 年版	1.17	0.29	57.8	2.64	28.00
1990 年版	6.09	0.42	52.1	2.29	26.30
1995 年版	8.01	0.57	51.8	1.42	28.90
2000 年版	17.80	0.60	47.6	1.20	28.00

从表 1-2 也可看出,近年来 HPLC 在我国已有较大发展,此势头还在继续增长,据专家估计,在 21 世纪初期,HPLC 将会发展成为中国药典中使用频率最高的一种仪器分析方法。

以上 2 个表只是色谱法在药学应用中的一个有力佐证。目前色谱法已飞速发展成为分析化学中最重要的分析方法,而广泛用于科研、生产各领域。有报道显示气相色谱仪和备件在世界市场上高达 10 亿美元,并将以 3%~4% 的速度逐年增长。之所以如此,是由于气相色谱的灵敏度高、分析速度快、定量分析精度高。尤其是毛细管气相色谱法在分析更为复杂的混合物时,将能发挥重要作用。未来的发展趋势是增强自动化。气相色谱/质谱联用仪(GC/MS)将以 5%~10% 的速度递增,气相色谱/付氏红外光谱联用仪(GC/FTIR)会维持现状,气相色谱/核磁共振波谱联用仪(GC/NMR)有商品仪器问世。

高效液相色谱近年来以 6%~8% 的速度增长,其中较活跃的领域是离子色谱、疏水作用色谱、手性分离及反相色谱。HPLC 除具有 GC 的优点外,还具有应用面广,可进行制备分离的特点,多维色谱,如 LC-LC-MS 等用于药物、蛋白质、多肽结构测定,并使整个操作完全自动化,这是 21 世纪色谱分析的发展方向之一。面对基因工程的挑战,原预计到 2005 年,人类 3 万~3.5 万条基因测序工作可以做完,现已于 2000 年完成,这仍然离不开现代色谱技术的应用。从某种程度上说没有色谱法就没有人类社会发展的今天。

薄层色谱法在自动化程度、分辨率及重现性等方面仍不如 GC 和 HPLC,被认为只是一种定性和半定量的方法。但近年来,薄层色谱法操作正走向标准化、仪器化和自动化,如自动点样仪、自动程序多次展开仪、薄层扫描仪等多种仪器出现,还引入了强制流动技术,使薄层色谱法发展成为具有相当好的重现性、准确性和精密度的定量分析方法。

毛细管电泳是 20 世纪 80 年代崛起的一种新的高效分离技术,具有高效、低耗、快速、灵敏等特点。从它问世以来就引起了分析化学家的极大兴趣,由于它具有惊人的高柱效,许多色谱学家希望它能解决一切分离问题。但他们失望了,虽然其中毛细管区带电泳

(CZE)具有很高的柱效,却失去了色谱方法灵活调节分离因子的机动性,它难以成为定量分析的手段,其分析结果的偏差比 HPLC 大一个数量级,这是一个极大的障碍,要解决这一问题,需付出艰辛的研究。现在电色谱(electro - chromatography, EC)成为这一领域的新秀,很多人希望它能获得成功,但 EC 驱动流动相的方法和 CZE 相同,均使用电渗流,其流动速度的波动造成在定量分析中的误差,要克服这一困难目前仍是具有挑战性的问题。许多理由表明 SFC 是不够成功的,尚有许多问题要解决,但它也有一定的应用领域,如在分析生物大分子中有非常突出的优点。

第二节 色谱法的定义与分类

一、色谱法的定义

色谱法或色谱分析也称之为层析法(chromatography),是一种物理或物理化学的分离分析方法。特别是在近二十多年中,由于气相色谱法、高效液相色谱法及薄层扫描法的飞速发展,而形成一门专门的学科,称为色谱学。它已广泛用于各个领域,成为多组分混合物的最重要的分离分析方法。它利用混合物中各组分在两相间分配系数的差别,当溶质在两相间做相对移动时,各物质在两相间进行多次分配,从而使各组分得到分离。可完成这种分离的仪器即色谱仪。分配系数大的组分迁移速度慢,反之迁移速度快而被分离。

二、色谱法的分类

色谱法从不同的角度,有不同的分类方法,通常可按分子聚集状态、操作方法及分离原理等进行分类。

(一)按流动相与固定相的状态分类

1. 按流动相的状态分类 在色谱中流动相可以是气体、液体或超临界流体,相应分为气相色谱(gas chromatography, GC)、液相色谱(liquid chromatography, LC)和超临界流体色谱(supercritical fluid chromatography, SFC)。

2. 按固定相的状态分类 固定相可以是固体或液体。因此,气相色谱法又可分为气-固色谱法(GSC)与气-液色谱法(GLC),前者是以气体为流动相,固体为固定相的色谱,后者是以气体为流动相,液体为固定相的色谱。液相色谱又可分为液-固色谱(LSC)和液-液色谱(LLC),前者是以液体为流动相,固体为固定相的色谱;后者是以一种液体为流动相,另一种液体为固定相的色谱。

(二) 按操作形式分类

按操作形式可分为柱色谱法、平面色谱法及逆流分配等类别。

柱色谱法 (column chromatography) 将固定相装在色谱柱里, 色谱过程在色谱柱内进行。按色谱柱粗细, 可分为一般柱色谱法、毛细管柱色谱法及微填充柱色谱法等类别。按固定相填充情况, 又可分为填充柱色谱法及开口柱色谱法 2 类。气相色谱法与高效液相色谱法 (HPLC) 及超临界流体色谱法 (SFC) 等属于柱色谱法范围。高效液相色谱法与经典液相柱色谱法不同, 主要在于色谱柱内填料的性能不同。前者采用高效固定相, 而后者用一般固定相。其次是装置不同, 前者仪器化, 后者手工操作。

平面色谱法 (planar chromatography) 系色谱过程在固定相构成的平面层内进行的色谱法。又分为纸色谱法 (paper chromatography, PC)、薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC) 及薄膜色谱法 (thin film chromatography, TFC) 等。用滤纸作固定液载体的色谱法称为纸色谱法。将固定相铺在玻璃板或铝箔板上, 构成一定厚度的薄层板, 用这种薄层板进行分离分析的方法称为薄层色谱法。薄膜色谱法与薄层色谱法类似, 主要区别是它的固定相是用高分子材料制成的薄膜。

逆流分配法 (countercurrent distribution) 属液相色谱法的范畴, 因目前应用较少, 所以不再介绍。

(三) 按色谱过程的分离机制分类

按色谱过程的分离机制可将色谱法分为: 吸附色谱法、分配色谱法、体积排阻色谱法、离子交换色谱法及亲和色谱法等类别。前 4 种为基本类型色谱法。

吸附色谱法 (adsorption chromatography) 所用固定相为吸附剂, 靠样品组分在吸附剂上的吸附系数 (吸附能力) 差别而分离。

分配色谱法 (partition chromatography) 其固定相为液态, 利用样品组分在固定相与流动相中的溶解度不同, 引起分配系数的差别而分离。LLC 与 GLC 都属于分配色谱法范围。流动相的极性大于固定相的极性的液相色谱法, 称为反相 (reversed phase, RP) 色谱法; 反之, 称为正相 (normal phase, NP) 色谱法。

体积排阻色谱法 (size exclusion chromatography, SEC) 也称为凝胶色谱法, 是以一定尺寸的多孔固体为固定相, 以液体为流动相, 按分子尺寸大小进行分离的方法。多用于高聚物分子质量分布和含量的测定。

离子交换色谱法 (ion exchange chromatography, IEC) 用离子交换树脂为固定相的色谱法称为离子交换色谱法。这种方法是靠样品离子与固定相的可交换基团交换能力 (交换系数) 的差别而分离。

亲和色谱法 (affinity chromatography, AC) 将具有生物活性 (如酶、辅酶、抗体等) 的配位基键合到非溶性载体或基质表面上形成固定相。利用蛋白质或生物大分子与亲和色谱固定相表面上配位基的亲合力进行分离的色谱法, 称为亲和色谱法。这种方法专用于分离与纯化蛋白质等生化样品。

化学键合相色谱法 (chemical bonded phase chromatography, BPC) 将固定相的官能

团键合在载体表面,所形成的固定相称为化学键合相。用化学键合相的色谱法称为化学键合相色谱法,简称键合相色谱法。化学键合相可作为液-液分配色谱法、离子交换色谱法、手性化合物拆分色谱法及亲和色谱法等色谱法的固定相。

毛细管电色谱法 (capillary electro - chromatography, CEC) 其分离机制是靠色谱与电场2种作用力,依据样品组分的分配系数及电泳速度差别而分离。该法可分为填充毛细管电色谱法及开管毛细管电色谱法两大类。前者是将细粒径固定相填充在毛细管柱中,后者是把固定相的官能团键合在毛细管内壁表面上而形成的色谱柱。毛细管电色谱法是最新的色谱法,柱效可达 10^6 片 / m,它快速、经济、应用广,是最有前途的分析方法。

毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE) 样品在毛细管的液体介质中,在电场力作用下的分离分析方法称为毛细管电泳法。它已成为生命科学的最重要的研究手段之一。

(四) 按使用领域不同对色谱仪的分类

1. 分析型色谱仪 又可分为实验室用色谱仪和便携式色谱仪。它主要用于各种样品的分析,其特点是色谱柱较细,分析的样品量少。

2. 制备型色谱仪 又可分为实验室用制备型色谱仪和工业用大型制造纯物质的制备色谱仪。制备型色谱仪可以完成一般分离方法难以完成的纯物质制备任务,如纯化学试剂的制备,蛋白质的纯化。

第三节 色谱法与其他方法的比较

一、色谱法的特点和优点

(一) 色谱法的特点

色谱法是以其高超的分离能力为特点,它的分离效能远远高于其他分离技术如蒸馏、萃取、离心等方法。

(二) 色谱法的优点

1. 分离效能高 如毛细管气相色谱柱理论塔片数可达7万~12万。而毛细管电泳柱一般有几十万理论塔片数,至于凝胶毛细管电泳柱可达上千万理论塔片数的柱效。

2. 应用范围广 它几乎可用于所有化合物的分离和测定,无论是有机物、无机物、低分子或高分子化合物,甚至有生物活性的生物大分子也可以进行分离和测定。

3. 分析速度快 一般在几分钟到几十分钟就可完成一次复杂样品的分离和分析。

4. 样品用量少 用极少的样品就可完成一次分离和测定。

5. 灵敏度高 如气相色谱可以分析几纳克的样品,火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)可达 10^{-12} g/s ,电子捕获检测器(electron capture detector, ECD)达 10^{-13} g/s ;检测限为 10^{-9} g/L 和 10^{-12} g/L 。

6. 分离和测定一次完成 可以和多种波谱分析仪器联用。

7. 易于自动化 分离与分析自动完成,可在工业流程中使用。

二、色谱法的缺点

任何分析方法都有它的优点,同时也存在某些缺点。色谱法的优点是突出的,但也有缺点,即对所分析对象的鉴别力是较差的,一般来说色谱的定性分析是靠保留值定性,但在一定的色谱条件下,一个保留值可能对应多个化合物,所以色谱方法要和其他方法配合才能发挥更大的作用。

第二章 基础理论

色谱理论主要可分为热力学理论及动力学理论两大类。热力学理论是从相平衡的观点去研究色谱过程的,以塔片理论为代表。动力学理论是从动力学观点,去研究色谱过程中各种动力学因素对色谱峰扩展的影响,以范第姆特(Van Deemter)方程式为代表。这些理论都是用于说明色谱流出曲线的形状及其影响因素,而色谱流出曲线,则用色谱参数具体描述。

第一节 色谱参数

色谱法中常用的参数包括:定性参数、定量参数、柱效参数、分离参数及相平衡参数等。由于色谱参数与流出曲线之间关系密切,故先介绍色谱流出曲线。

一、色谱流出曲线与色谱峰

(一) 色谱流出曲线

色谱流出曲线即色谱图,是样品被流动相冲洗,通过色谱柱,流经检测器,所形成的浓度信号随洗脱时间变化而形成的曲线,称为色谱流出曲线(简称流出曲线),即浓度-时间曲线。

(二) 基线

当没有样品进入色谱仪检测器中或虽有样品通过,但其浓度变化不能被检测器所检测时,所给出的流出曲线称为基线(base line)。

1. 正常基线 应为一条平行于横轴(时间轴)的直线,如图2-1所示,0为基线。基线反映仪器及操作条件的恒定程度。基线的高低,反映检测器的本底高低。主要由流动相中的杂质等因素决定。

2. 噪声 各种未知的偶然因素引起基线起伏的现象称为噪声(noise, R_N)。噪声的大小可用噪声带(峰-峰值)的宽度来衡量。通常记录1h的基线,取噪声带的最宽处来衡量噪声 R_N 的大小。

例:某检测器,不进样,记录1h的基线(图2-2),测得噪声带宽为0.02 mV(峰 -