仪器分析第9讲

气相色谱分析－2
液相色谱分析－1

朱永法
清华大学化学系
2005.4.26

气相色谱柱

- 气相色谱柱是色谱仪的分离系统；
- 色谱柱分两类：

    填充柱：

    毛细管柱：

气固色谱填充柱

- 在管内填充具有多孔性及较大表面积的吸附剂颗粒作为固定相，即构成气固色谱填充柱；
- 应用于惰性气体和H_2,O_2,N_2,CO,CO_2,CH_4等一般气体及低沸点有机物的分析；
- 常用吸附剂：非极性的活性炭，弱极性的氧化铝，强极性的硅胶和新型高分子多孔微球；

气固色谱常用吸附剂表

表 7.2 气固色谱法常用的吸附剂

吸附剂	使用温度/℃	性 质	分析对象	使用前活化处理
活性炭	<200	非极性	惰性气体、N_2、CO_2和低沸点碳氢化合物	装柱，在N_2保护下加热到140～180℃，活化2～4h
氧化铝	<400	弱极性	烃类及有机异构物	粉碎过筛，600℃下烘烤4h，装柱，高于柱温20℃下活化
硅胶	<400	氢键型极性	永久性气体及低级烃类	装柱，在200℃下通载气活化2～4h
分子筛	<400	极性	惰性气体和永久性气体	粉碎过筛，在550℃下烘烤4h
GDX	<250	按聚合原料不同，可从非极性到强极性	各种气体、低沸点化合物、微量水等	170～180℃下烘去微量水分后，在H_2或N_2气中活化处理10～20h

气液色谱填充柱

- 气液色谱柱的固定相是在化学惰性的固体微粒（担体）表面，图上一层高沸点有机化合物的液膜（固定液）。基于被分离组分在固定液中溶解度的不同，经反复分配，达到分离。
- 担体：是一种多孔性的、化学惰性的固体颗粒；**40-100**目；
- 对担体要求：比表面大，化学惰性，无吸附性，有空隙结构，热稳定性，机械强度高，均匀等；
- 担体的表面处理：酸洗，碱洗，硅烷化等；

常用气相色谱担体表

表 7.3 常用气相色谱担体

担体类型	名 称	适用范围	国外相应型号
红色担体	201 担体 6201 担体	分析非极性或弱极性组分	C-22 Chromosorb P
	301 担体 釉化担体	分析中等极性组分	Chegasorb Gas chrom R
白色担体	101 白色担体 102 白色担体	分析极性或碱性组分	Celite 545 Gas chrom (A. P. Q. S. Z)
	101 硅烷化白色担体 102 硅烷化白色担体	分析高沸点氢键型组分	Chromosorb A. G. W.
非硅藻土担体	聚四氟乙烯担体	分析强极性和腐蚀性组分	Teflon-6

固定液

- 固定液是气相色谱的固定相；
- 要求：热稳定性好，不热解；蒸汽压低，不流失；化学稳定性好；
- 固定液选用原则：相似相容原则
- 分离非极性物质采用非极性固定液，按沸点顺序流出，主要是色散力起作用；
- 分离极性物质，采用极性固定液；按极性大小顺序流出；
- 分离极性和非极性混合物，选用极性固定液；
- 能形成氢键的样品，采用极性或氢键型固定液；

毛细管柱

- 利用毛细管直接作为色谱柱，不需要填料，也称为空心柱；
- 涂壁空心柱，多孔层开管柱，涂载体空心柱，化学交联柱；
- 高效，100万理论塔板数，可分离复杂物质；
- 分离速度快；
- 灵敏度高；
- 适合复杂组成的分析；

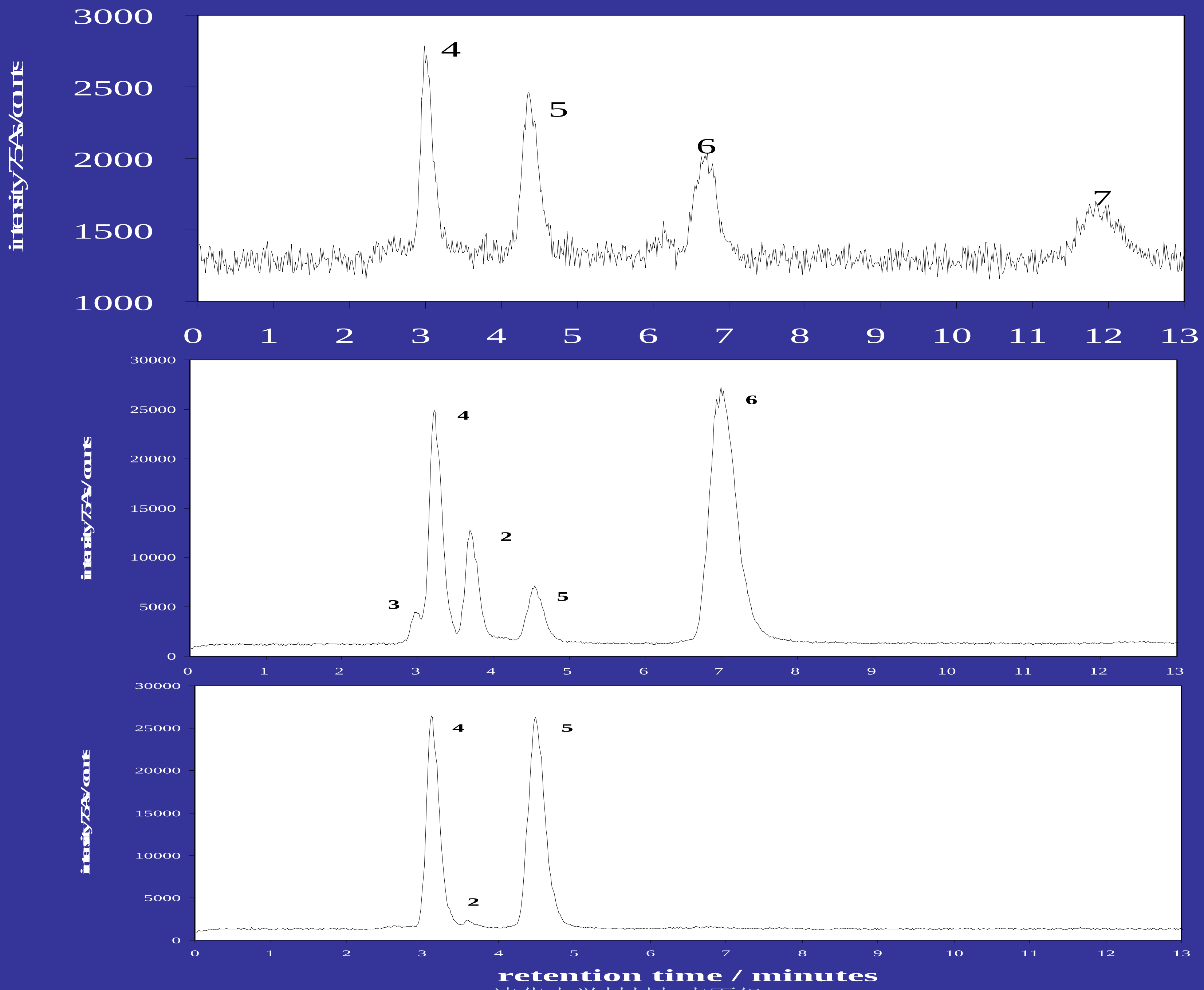
气相色谱分析方法

1、定性分析

（1）保留时间定性法（已知物对照方法）

在一定的色谱系统和操作条件下，每种物质都有一定的保留时间，如果在相同色谱条件下，未知物的保留时间与标准物质相同，则可初步认为它们为同一物质。

为了提高定性分析的可靠性，还可进一步改变色谱条件（分离柱、流动相、柱温等）或在样品中添加标准物质，如果被测物的保留时间仍然与标准物质一致，则可认为它们为同一物质。


3000
2500
2000
1500
1000
4
5
6
7
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
4
2
3
5
6
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
4
5
2
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
retention time / minutes

清华大学材料与表面组

（2）保留指数（I）定性法

以正构烷烃为参考标准为100N，某一未知组分的保留行为用两个紧靠近它的标准物质（正构烷烃）来标定：

I = 100 N　　　　**N为碳原子数**

例如：　　正己烷　　**I = 600**

　　　　　正辛烷　　**I = 800**

其它化合物 $I_x = 100\,x$

x为组分相当于正构烷烃C原子的数

保留指数定性法实例

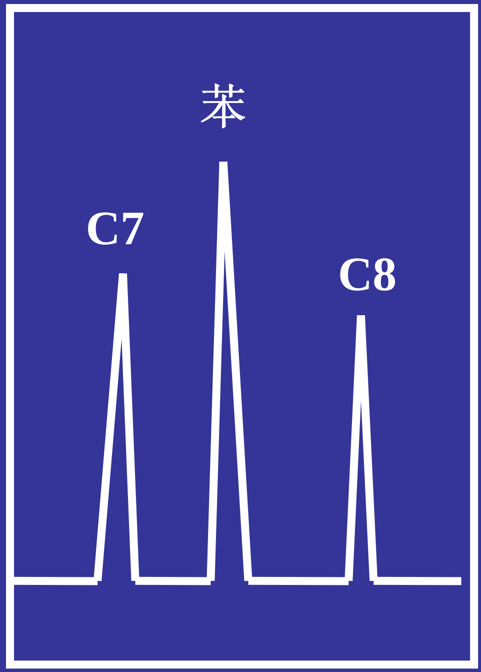
例如：苯在某柱子上的 $I_x = 733$

表示苯在该柱上的保留值相当于含7.33个碳原子的正构烷烃的保留值。所以保留指数可计算如下：

$$I = 100\left[N + \frac{\lg r_{x,N}}{\lg r_{N+n,N}}\right]$$

N，N+n ——分别为两个正构烷烃的碳原子数, n最好等于1

$$r_{x,N} = \frac{t'_{R(x)}}{t'_{R(N)}} \qquad r_{N+n,N} = \frac{t'_{R(N+n)}}{t'_{R(N)}}$$



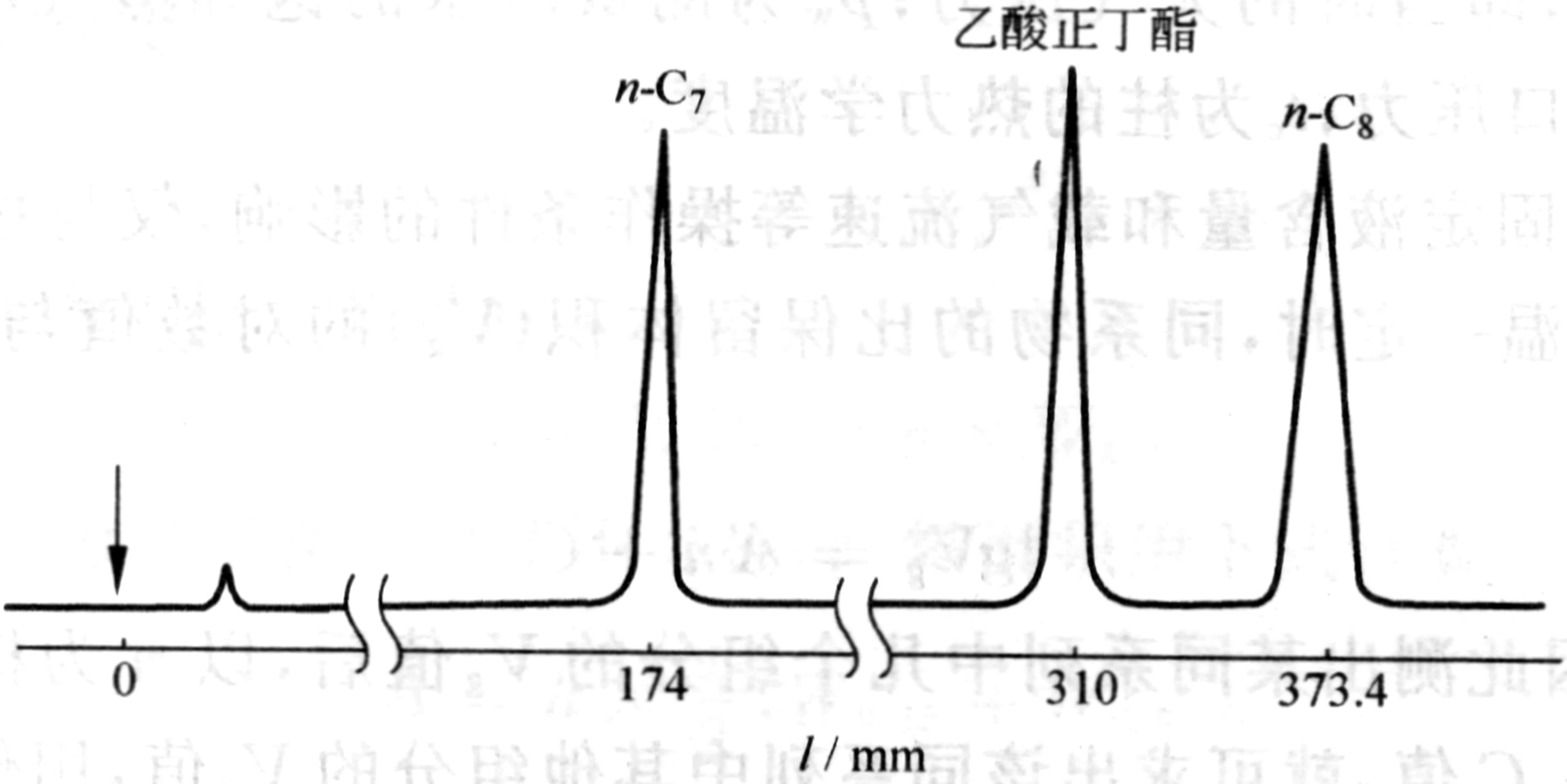


图 7.9 保留指数测定示意图

与其他仪器联用定性

1. 将具有定性能力的分析仪器如红外(IR）、核磁（NMR）、质谱（MS）、原子光谱（AAS、AES）等仪器作为色谱仪的检测器获得比较准确的定性信息。
2. 由于保留值（保留时间、保留指数等）定性受温度影响，因此应严格控制温度；
3. 当两个化合物的保留值相同或相近时，容易出现错判。

定量分析

色谱定量分析的依据是被测物质的量与它在色谱图上的峰面积（或峰高）成正比。

$$W_i = f_i' A_i$$

A_i为i组分色谱峰的面积；f_i’称为定量校正因子。

要进行定量分析，必须要测定峰面积和定量校正因子。

校正因子

分为绝对和相对校正因子两种。

绝对校正因子为

$$f_i' = \frac{W_i}{A_i}$$

绝对校正因子受实验条件的影响，定量分析时必须与实际样品在相同条件下测定标准物质的校正因子。常用相对校正因子。

相对校正因子f_m指某物质i与一选择的标准物质S的绝对校正因子之比。即

$$f_m = \frac{f_i'}{f_s'} = \frac{W_i / A_i}{W_s / A_s}$$

相对校正因子只与检测器类型有关，而与色谱条件无关。

常用于作为标准物质S的有苯（热导检测器）和庚烷（氢火焰离子化检测器）等

定量分析的方法

A、归一化法

若流出色谱柱组分的总量为：$\sum_{i=1}^{n} W_i = \sum_{i=1}^{n} A_i f_i$

则X组分所占的百分含量为 $W_x\% = \dfrac{A_x f_x}{\sum_{i=1}^{n} A_i f_i}$

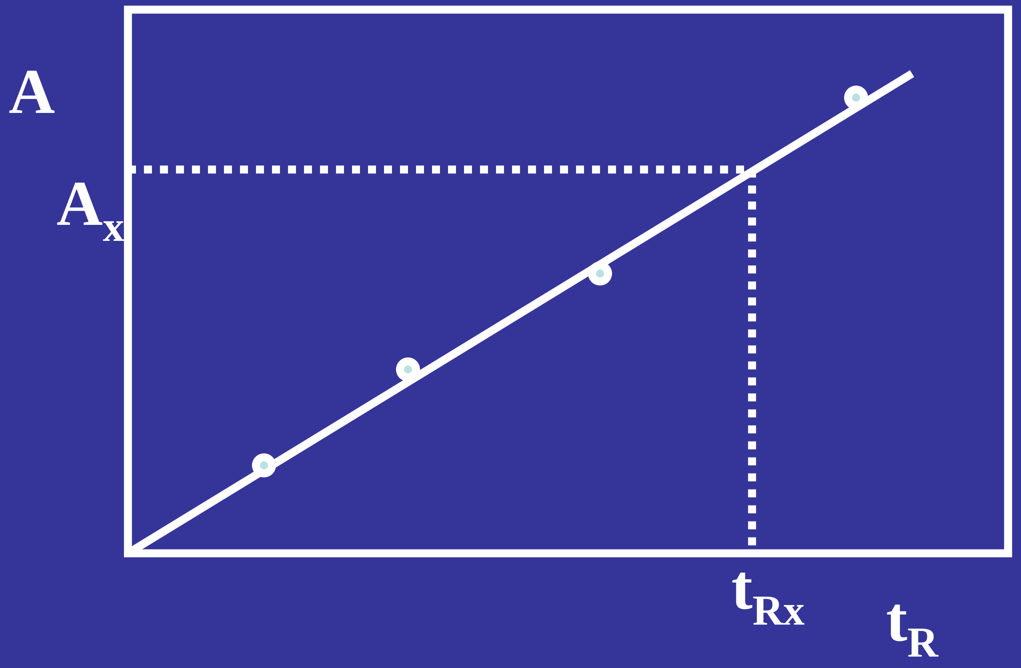
归一化法是将所有组分的峰面积A_i分别乘以它们的相对校正因子后求和，即所谓“归一”

采用归一化法进行定量分析的前提条件是样品中所有成分都要能从色谱柱上洗脱下来，并能被检测器检测。

定量分析的方法

B、外标法

将某组分的峰面积与该组分标准峰面积直接比较定量。或采用标准曲线法定量：



定量分析的方法

C、 内标法

比较标准质和被测组分的峰面积，从而确定被测组分的浓度

$$\frac{W_i}{W_s} = \frac{f_i A_i}{f_s A_s} \qquad W_i = \frac{f_i A_i}{f_s A_s} W_s$$

由于标准物质和被测组分处在同一基体中，可以消除基体带来的干扰。当仪器参数和洗脱条件发生非人为的变化时，标准物质和样品组分都会受到同样影响，这样消除了系统误差。

内标物应满足的要求

- 在所给定的色谱条件下具有一定的化学稳定性；
- 在接近所测定物质的保留时间内洗脱下来；
- 与两个相邻峰达到基线分离；
- 物质特有的校正因子应为已知的或者可测定；
- 与待测组分有相近的浓度和类似的保留行为；
- 具有较高的纯度。

气相色谱的应用举例

应用领域	分析对象举例
环境	水样中芳香烃，杀虫剂，除草剂，水中锑形态
石油	原油成分、汽油中各种烷烃和芳香烃
化工	喷气发动机燃料中烃类，石蜡中高分子烃
食品、水果、蔬菜	植物精炼油中各种烯烃、醇和酯，亚硝胺，香料中香味成分，人造黄油中的不饱和十八酸，牛奶中饱和和不饱和脂肪酸
生物	植物中萜类，微生物中胺类、脂肪酸类、脂肪酸酯类
医药	血液中汞形态、中药中挥发油
法医学	血液中酒精，尿中可卡因、安非他命，奎宁及其代谢物，火药成分，纵火样品中的汽油

毛细管色谱

- 分流进样；
- 无分流进样；
- 柱头进样；
- 直接进样；
- 程序升温蒸发进样
- 热离子检测器；
- 光离子化检测器；

表 7.4 GC 和 CGC 的比较

项目		GC	CGC
色谱柱	内径/mm	2～6	0.1～0.5
	长度/m	0.5～6	20～200
	相比 β	6～35	50～1 500
	总塔板数	$\sim 10^3$	$\sim 10^6$
动力学方程式	方程式	$H=A+\frac{B}{u}+(C_g+C_l)u$	$H=\frac{B}{u}+(C_g+C_l)u$
	涡流扩散项	$A=2\lambda d_p$	$A=0$
	分子扩散项	$B=2rD_g, r=0.5\sim 0.7$	$B=2D_g$
	气相传质项	$C_g=\frac{0.01k^2}{(1+k)^2}\frac{d_p^2}{D_g}$	$C_g=\frac{(1+6k+11k^2)}{24(1+k)^2}\frac{r^2}{D_g}$
	液相传质项	$C_l=\frac{2}{3}\frac{k}{(1+k)^2}\frac{d_f^2}{D_l}$	$C_l=\frac{2}{3}\frac{k}{(1+k)^2}\frac{d_f^2}{D_l}$
柱效	理论塔板数	$n=5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$	$n=5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$
	理论塔板高度	$H=L/n$	$H=L/n$
色谱仪	进样量/μL	0.1～10	0.01～0.2
	进样器	直接进样	采用分流器
	检测器	TCD,FID 等	常用 FID
	柱的制备	简单	复杂
	定量结果	重现性较好	比 GC 重现性差

气相色谱新进展

- 衍生化技术；
- 裂解色谱技术；
- 顶空进样技术；
- 二维气相色谱

气相色谱重要内容

- 色谱法原理
- 固定相，流动相；
- 保留时间；
- 分配系数；
- 分离度；
- 塔板理论；
- 流速的影响；
- 柱温的影响；
- 气相色谱仪结构
- 检测器种类及特点
- 灵敏度和检测限
- 色谱柱的种类和特点
- 定性分析方法
- 定量分析方法
- 样品制备方法
- 毛细管色谱法

思考题

p255-256

Q2， Q4，Q7，Q9，Q10

高效液相色谱法
High Performance Liquid Chromatography
HPLC

朱永法
清华大学化学系

概述

1. 高效液相色谱法是继气相色谱之后，70年代初期发展起来的一种以液体做流动相的新色谱技术
2. 适合于高沸点，难挥发，热不稳定物质，离子型化合物，高聚物，生物大分子等的分离和分析；
3. 高效液相色谱具有分析速度快、分离效能高、自动化等特点。所以人们称它为高压、高速、高效或现代液相色谱法
4. 是化学、生物化学与分子生物学、医药学、农业、环保、商检、药检、法检等学科领域与专业最为重要的分离分析技术，是分析化学家、生物化学家等用以解决所面临的各种实际分离分析课题必不可少的工具。

液相色谱与气相色谱的比较

1. 液相色谱所用基本概念：保留值、塔板数、塔板高度、分离度、选择性等与气相色谱一致。
2. 液相色谱所用基本理论：塔板理论与速率方程也与气相色谱基本一致。
3. 但由于在液相色谱中以液体代替气相色谱中的气体作为流动相，而液体和气体的性质不相同；
4. 此外，液相色谱所用的仪器设备和操作条件也与气相色谱不同，所以，液相色谱与气相色谱有一定差别，主要有以下几方面：

应用范围不同

1. 气相色谱仅能分析在操作温度下能气化而不分解的物质。对高沸点化合物、非挥发性物质、热不稳定化合物、离子型化合物及高聚物的分离、分析较为困难。致使其应用受到一定程度的限制，**据统计只有大约20%的有机物能用气相色谱分析**；
2. 液相色谱则不受样品挥发度和热稳定性的限制，它非常适合分子量较大、难气化、不易挥发或对热敏感的物质、离子型化合物及高聚物的分离分析，大约**占有机物的70～80%**

分离效率和因素不同

① 气相色谱的流动相载气是色谱惰性的，不参与分配平衡过程，与样品分子无亲和作用，样品分子只与固定相相互作用。而在液相色谱中流动相液体也与固定相争夺样品分子，为提高选择性增加了一个因素。也可选用不同比例的两种或两种以上的液体作流动相，增大分离的选择性

② 液相色谱固定相类型多，如离子交换色谱和排阻色谱等，作为分析时选择余地大；而气相色谱并不可能的

③ 液相色谱通常在室温下操作，较低的温度，一般有利于色谱分离条件的选择

分离效率和因素不同

（4）由于液体的扩散性比气体的小105倍，因此，溶质在液相中的传质速率慢，柱外效应就显得特别重要；而在气相色谱中，柱外区域扩张可以忽略不计

（5）液相色谱中制备样品简单，回收样品也比较容易，而且回收是定量的，适合于大量制备。

（6) 但液相色谱尚缺乏通用的检测器，仪器比较复杂，价格昂贵。在实际应用中，这两种色谱技术是互相补充的

高效液相色谱的优缺点

优点：

1. 检测的分辨率和灵敏度高，分析速度快，重复性好，定量精度高，应用范围广
2. 适用于分析高沸点、大分子、强极性、热稳定性差的化合物

缺点：

1. 价格昂贵，要用各种填料柱，容量小，分析生物大分子和无机离子困难，流动相消耗大且有毒性的居多
2. 目前的发展趋势是向生物化学和药物分析及制备型倾斜；

高效液相色谱理论

- 高效液相色谱的理论基本和气相色谱相同；
- 保留值，分配系数，分配比，分离度，塔板理论，速率理论等；
- 柱前峰展宽；
- 柱后峰展宽；

液相色谱分类

通常将液相色谱法按分离机理分成

液固吸附色谱法（**adsorption chromatography**）

液液分配色谱法（**partition chromatography**）

离子色谱法（**ion exchange chromatography**）

凝胶色谱法（**gel chromatography**）

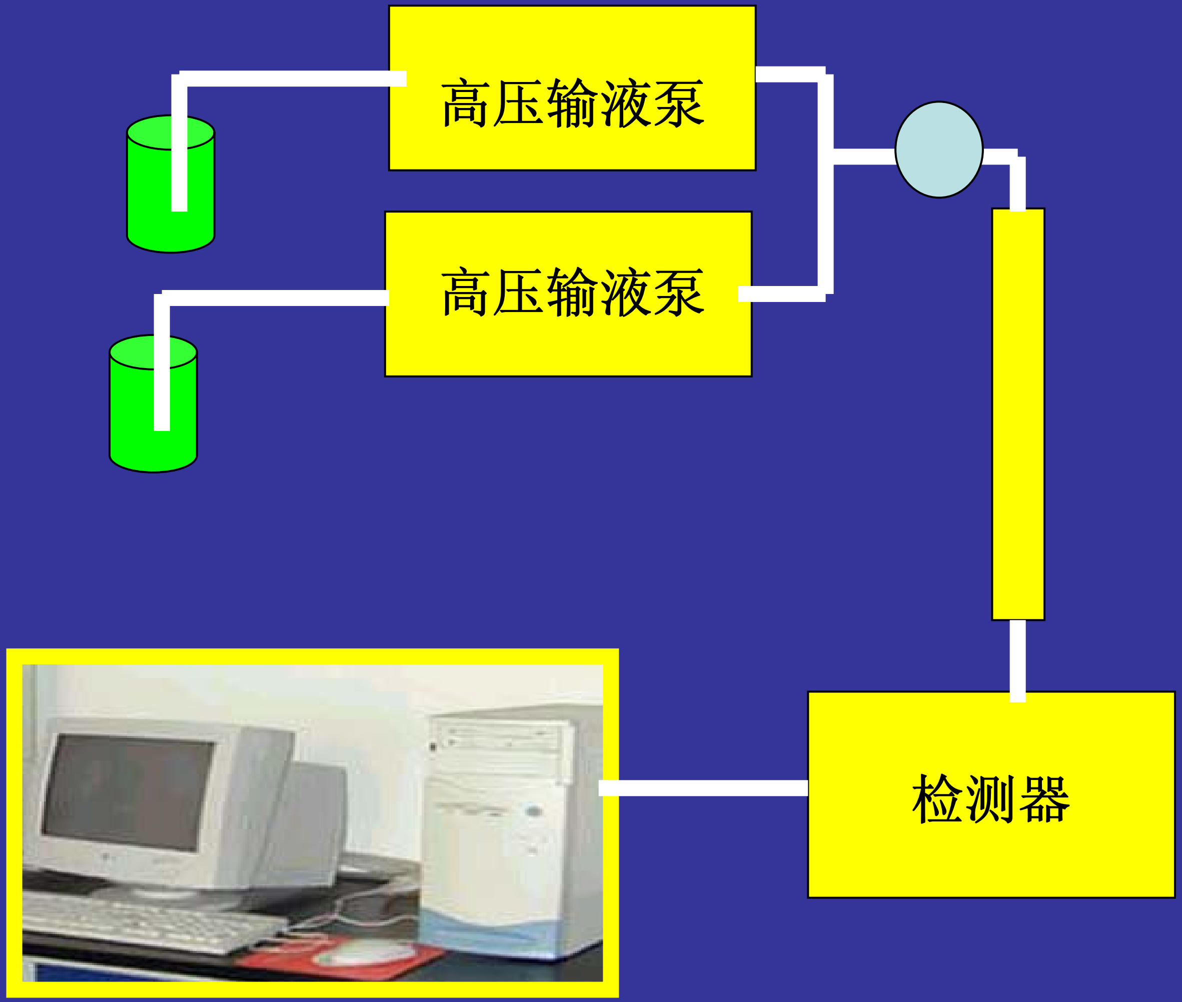
有些液相色谱方法并不能简单地归于这四类

液相色谱分类和机理

类 型	主要分离机理	主要分析对象或应用领域
吸附色谱	吸附能，氢键	异构体分离、族分离，制备
分配色谱	疏水分配作用	各种有机化合物的分离、分析与制备
凝胶色谱	溶质分子大小	高分子分离，分子量及其分布的测定
离子交换色谱	库仑力	无机离子、有机离子分析
手性色谱	立体效应	手性异构体分离，药物纯化
亲和色谱	生化特异亲和力	蛋白、酶、抗体分离，生物和医药分析

高效液相色谱仪

高效液相色谱仪的结构



输液系统

进样系统

分离系统

检测系统

数据处理系统

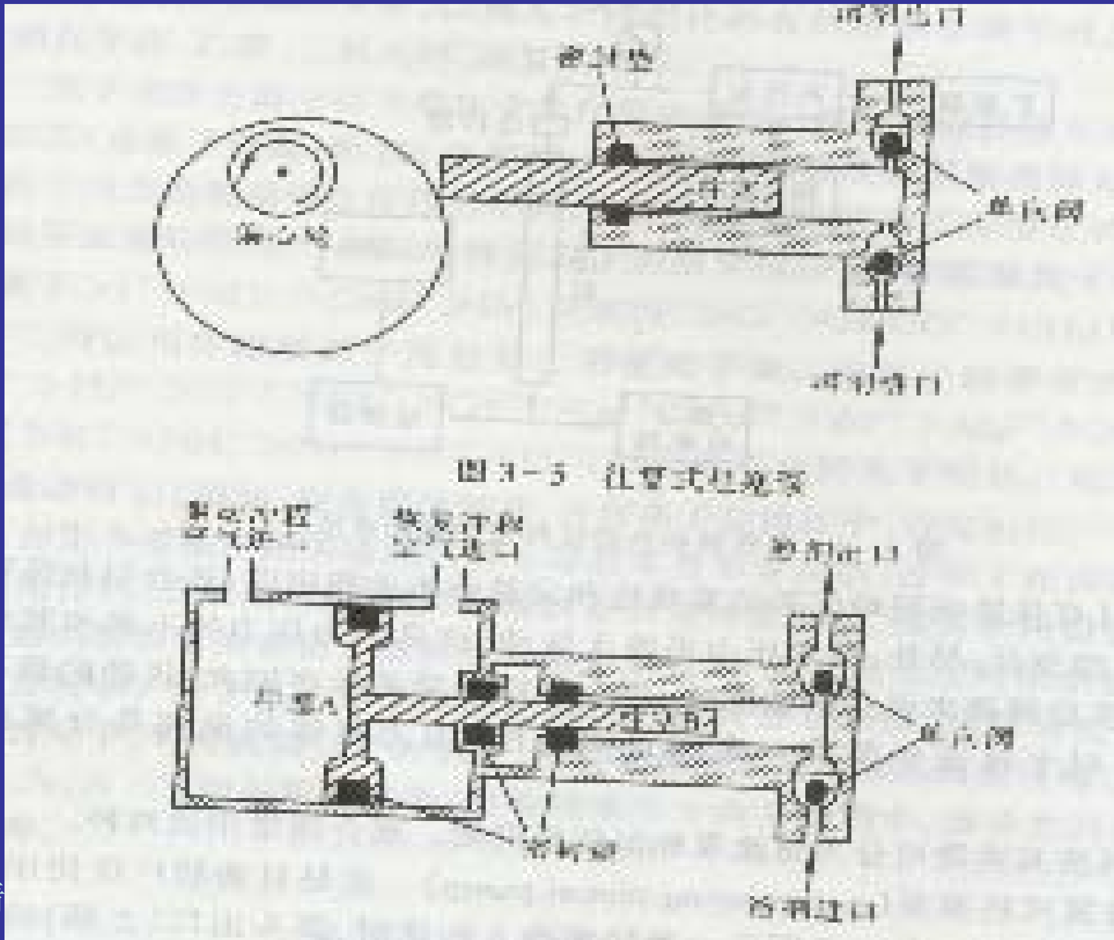
1、输液系统

(1) 高压输液泵

高压输液泵
在线脱气装置

高压输液泵是液相色谱仪的关键部件，其作用是将流动相以稳定的流速或压力输送到色谱系统。

输液泵的稳定性直接关系到分析结果的重复性和准确性。



(2)在线脱气装置

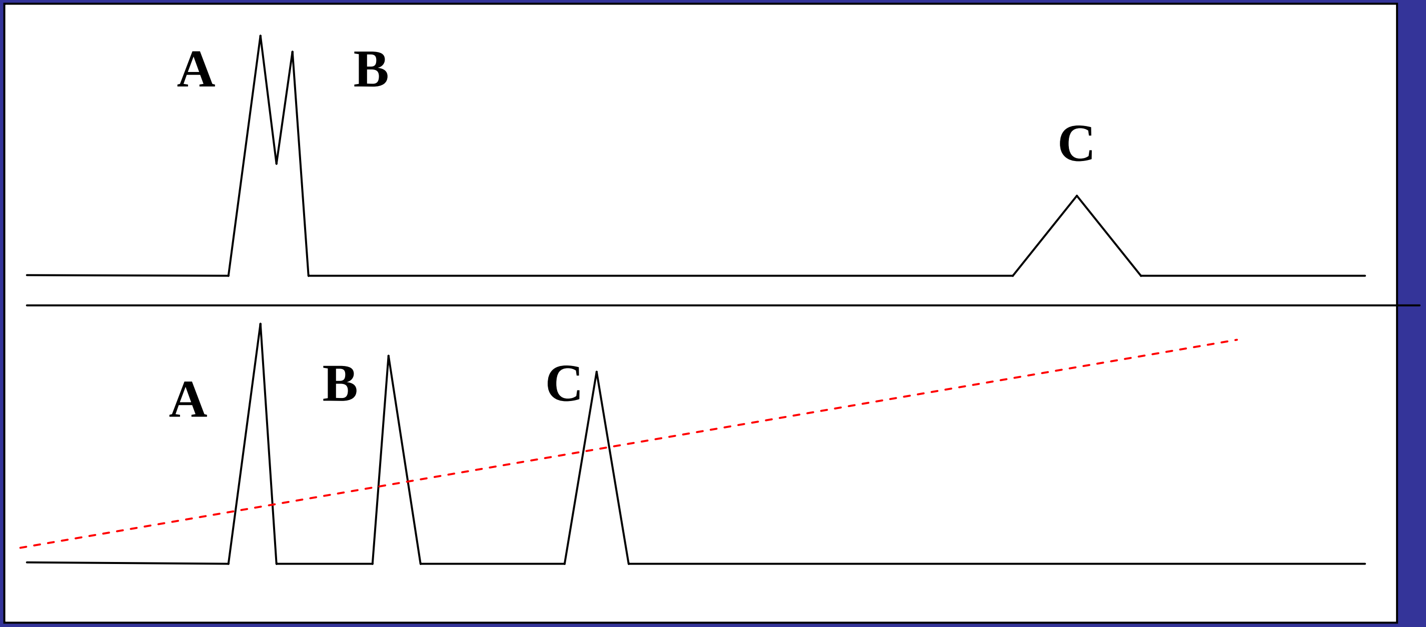
在线脱气装置用于脱去流动相中的溶解气体，流动相先经过脱气装置再输送到色谱柱。

除在线脱气装置外，目前也采用超声脱气、真空脱气等方式。

脱气不好时有气泡，导致流动相流速不稳定，造成基线飘溢，噪音增加。

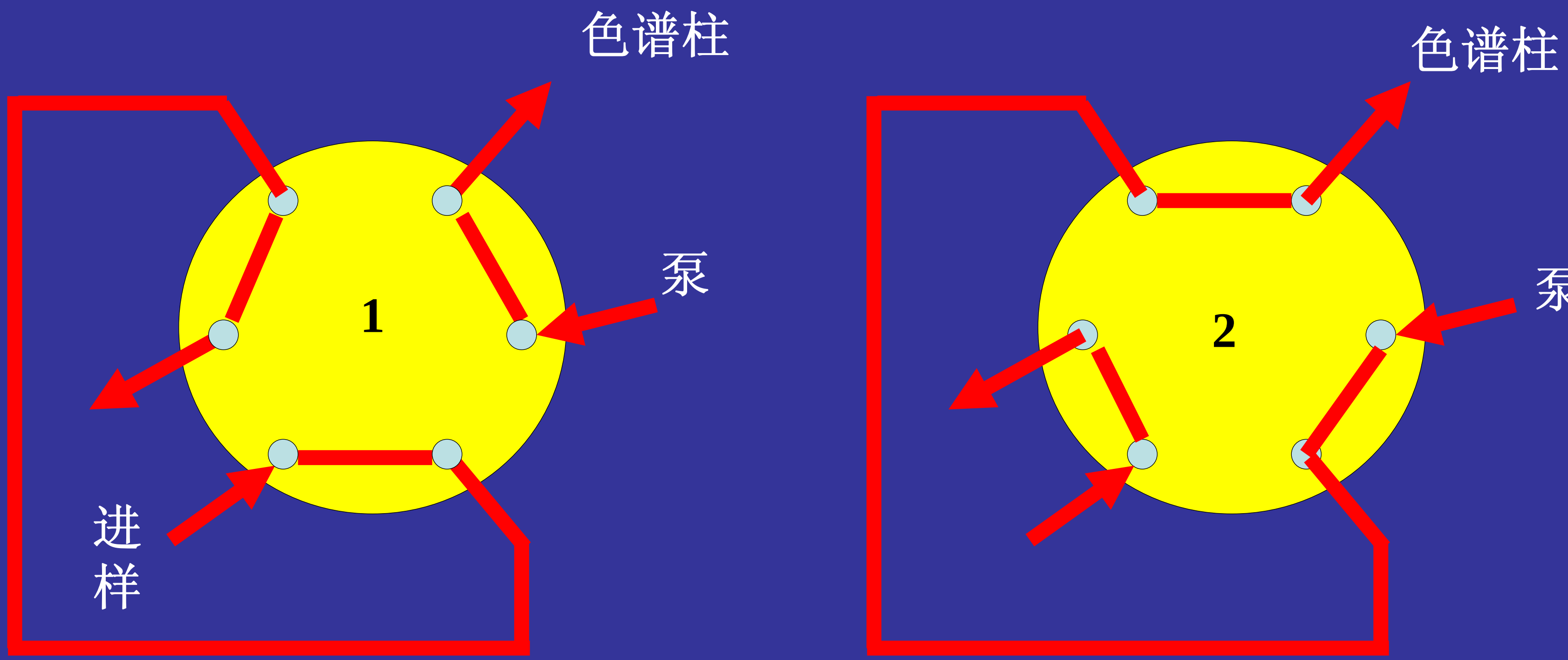
（3）梯度洗脱装置

梯度洗脱的实质是通过不断地变化流动相的强度，来调整混合样品中各组分的*k*值，使所有谱带都以最佳平均*k*值通过色谱柱。所起的作用相当于气相色谱中的程序升温，不同的是，在梯度洗脱中溶质*k*值的变化是通过溶质的极性、pH值和离子强度来实现的，而不是借改变温度（温度程序）来达到



2、进样系统

通常采用六通阀进样：



3、色谱柱

- **Normal column　　5 um、4.6 um**
- **Narrow bore column　　1-3 um**
- **Micro column　　< 1 um**

色谱柱是实现分离的核心部件，要求柱效高、柱容量大和性能稳定。柱性能与柱结构、填料特性、填充质量和使用条件有关。

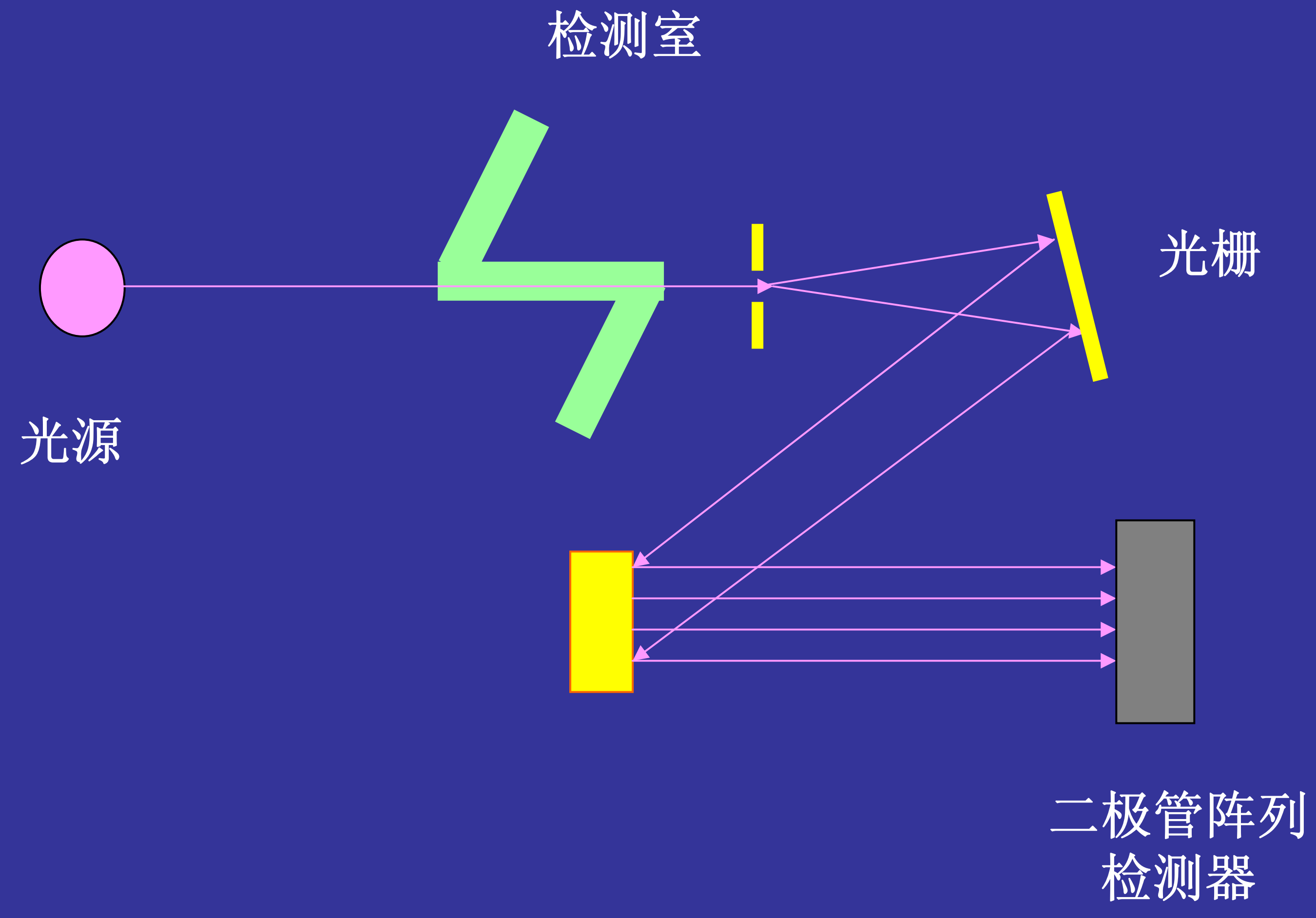
4、检测器

作用—— 用来连续监测经色谱柱分离后的流出物的组成和含量变化的装置。对检测器的要求是：灵敏度高，重复性好、线性范围宽、死体积小以及对温度和流量的变化不敏感等

目前最常用的检测器主要有：

- 紫外-可见检测器
- 荧光检测器
- 电化学检测器
- 蒸发光散射检测器
- 示差折光检测器
- 质谱检测器

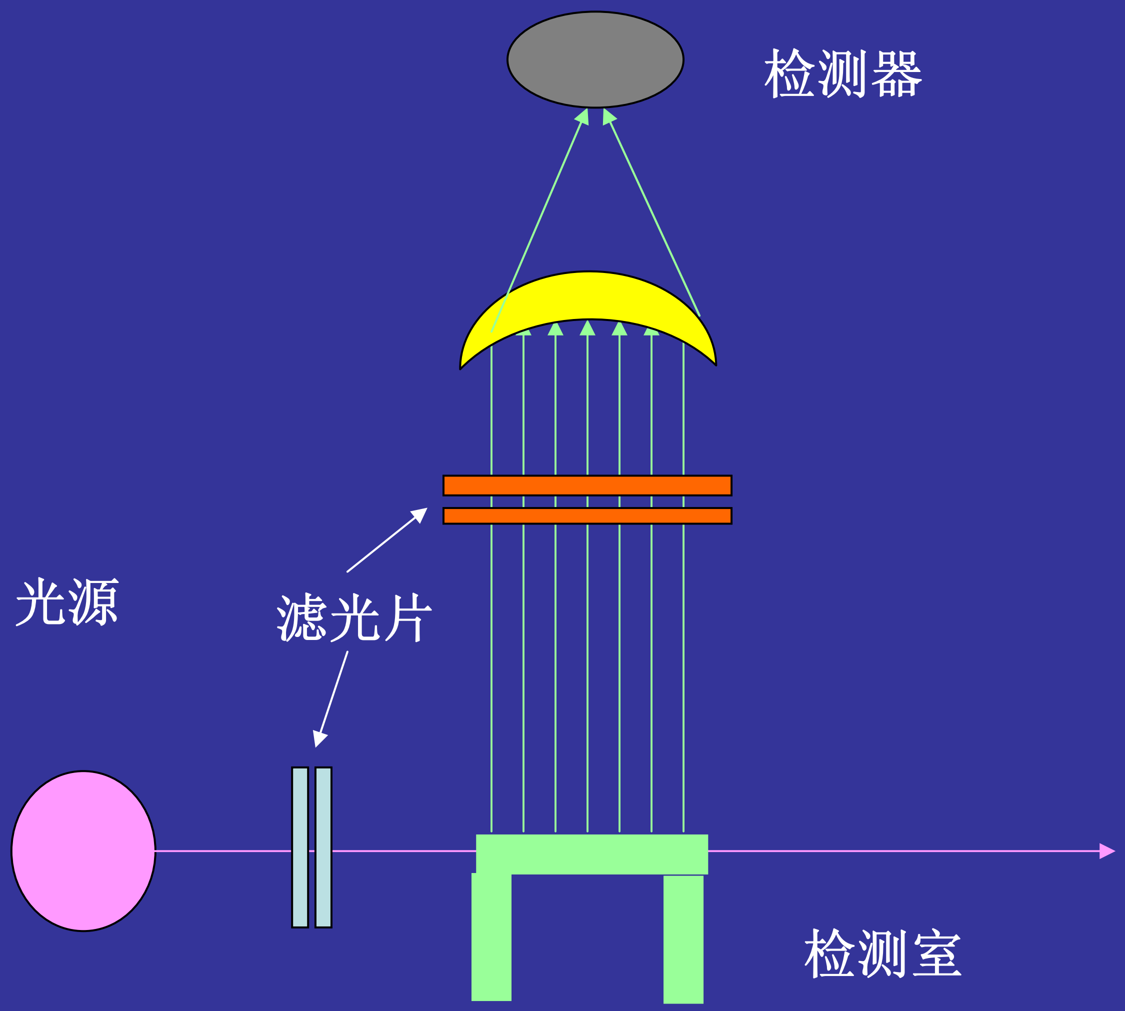
（1）紫外-可见检测器



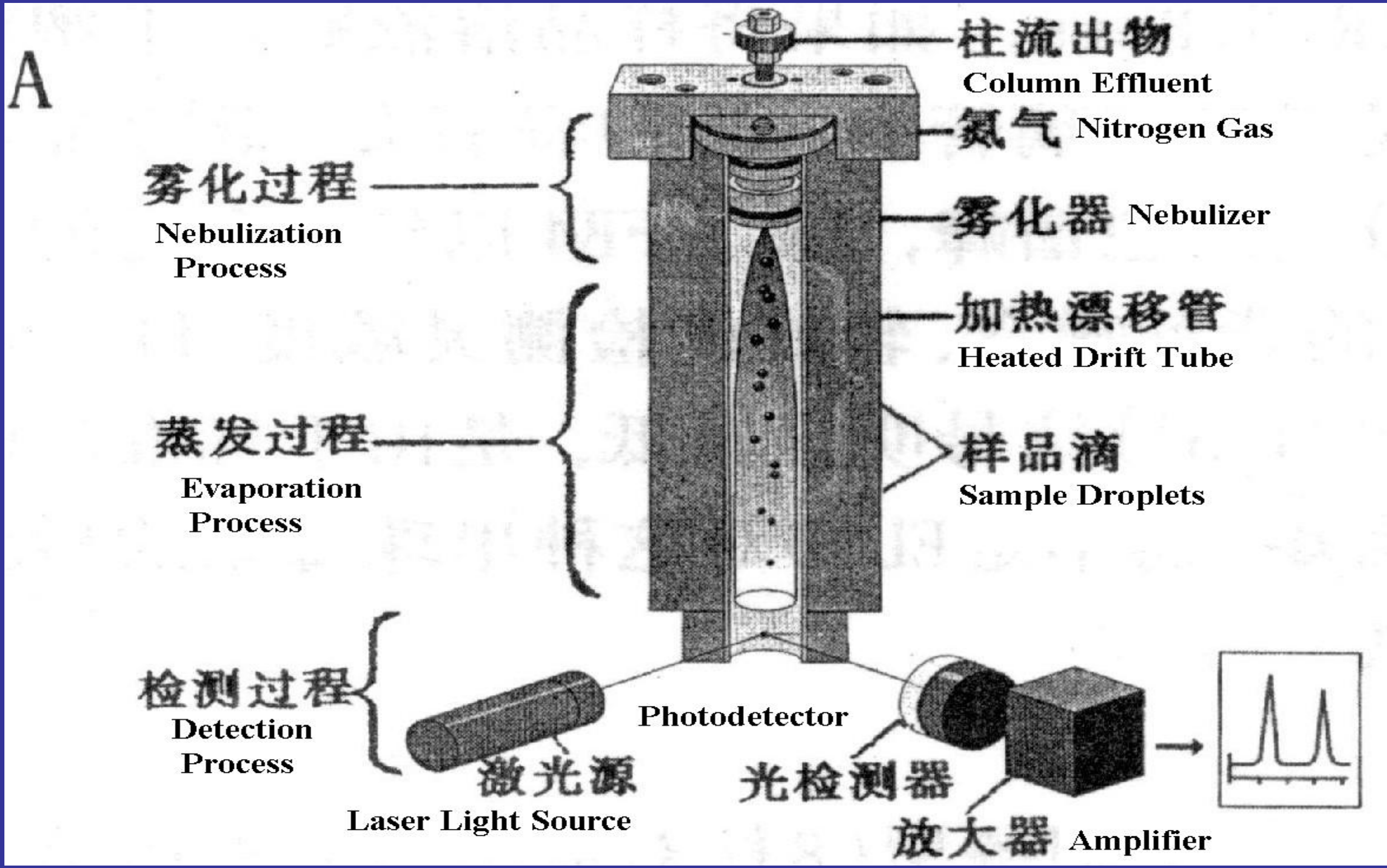
（2）荧光检测器

1. 许多有机化合物，特别是芳香族化合物、被一定强度和波长的紫外光照射后，发射出较激发光波长要长的荧光。但可以与发荧光物质反应衍生化后检测。
2. 特点： 有非常高的灵敏度和良好的选择性，灵敏度要比紫外检测法高2~3个数量级，特别适合于药物和生物化学样品的分析。

荧光检测器结构示意图

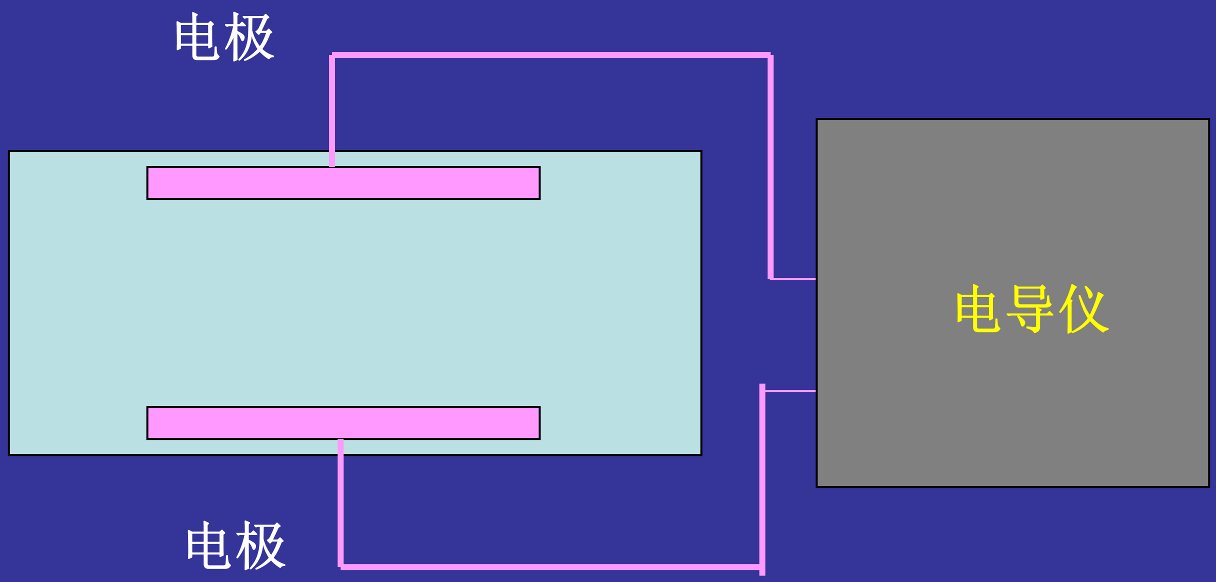


（3）蒸发光散射检测器



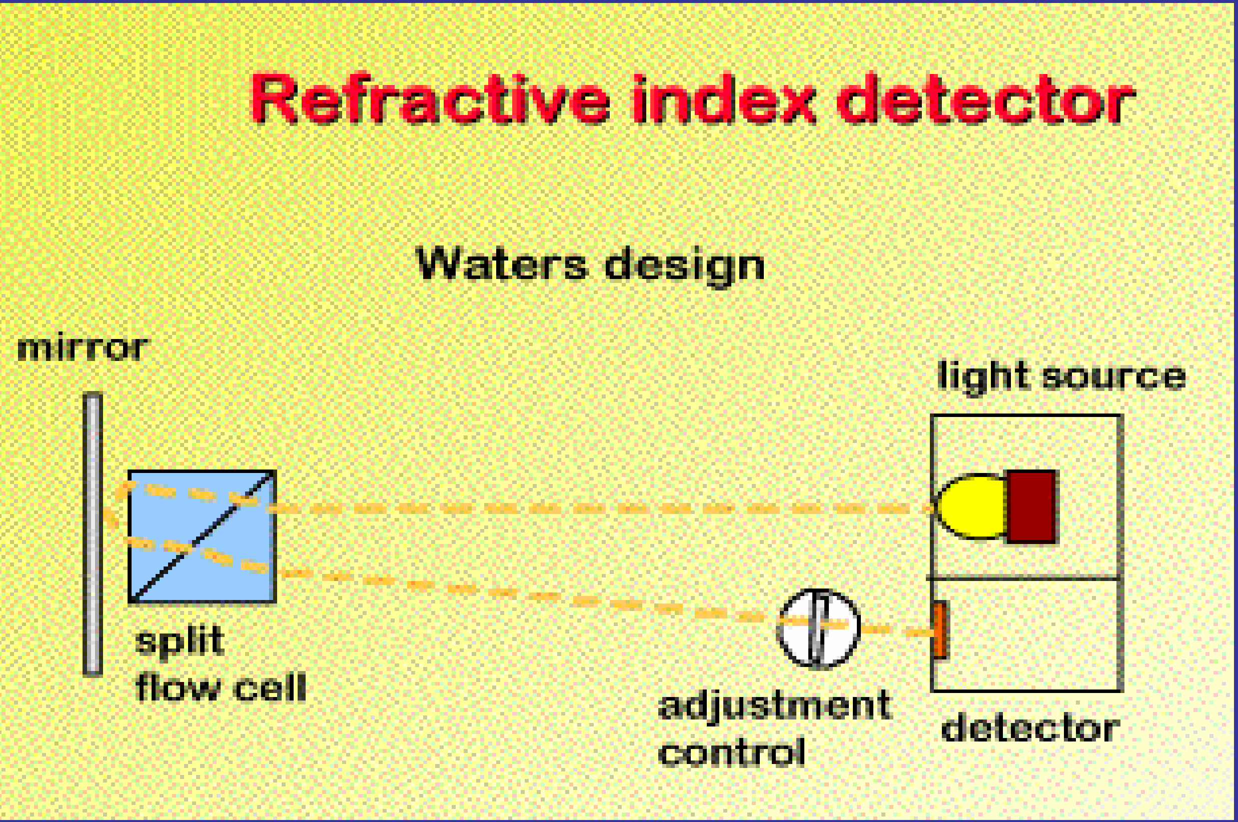
蒸发光散射检测器适合于无紫外吸收、无电活性和不发荧光的样品的检测。

（4）电化学检测器（以电导检测器为例）



应用于离子色谱

（5）示差折光检测器



浓度型监测器，适当条件下对所有的溶质都有响应，应用范围宽

The End!

Thanks