

色谱—分析应用中关心的几个问题

报告人：王俊德

报告日期：2009.11.09

内容

- § 1. 色谱中的几个基本概念
- § 2. 气相色谱 (GC) / 毛细管气相色谱 (CGC)
- § 3. 定性定量分析
- § 4. 气相色谱 / 质谱
- § 5. 高效液相色谱 (HPLC) 简介

第一节 色谱中的几个基本概念

1. 色谱保留值

$$t_R = t_R^0 (1 + k')$$

其中，保留因子

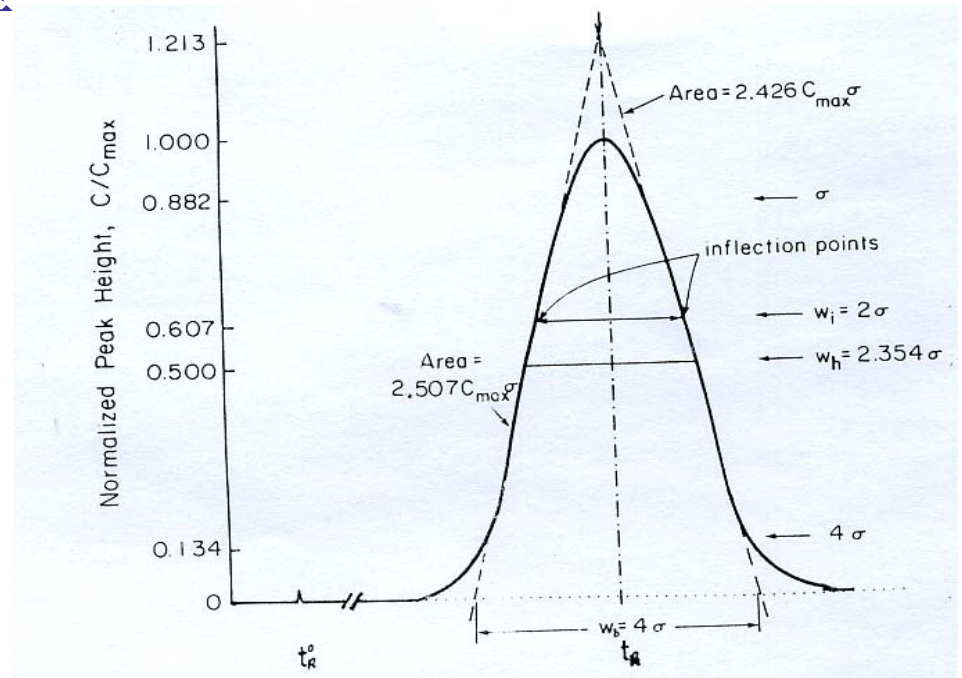
$$k' = \frac{t_R - t_R^0}{t_R^0} = K \frac{V_s}{V_m}$$

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}$$

2. 理论塔板数和柱效率

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

$$W_b = 1.699 W_h$$



3. van Deemter 方程

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

其中，涡流扩散： $A = 2\lambda d_p$ (d_p : 粒度)；
分子扩散： $B = 2\gamma D_g$ (D_g : 扩散系数)。

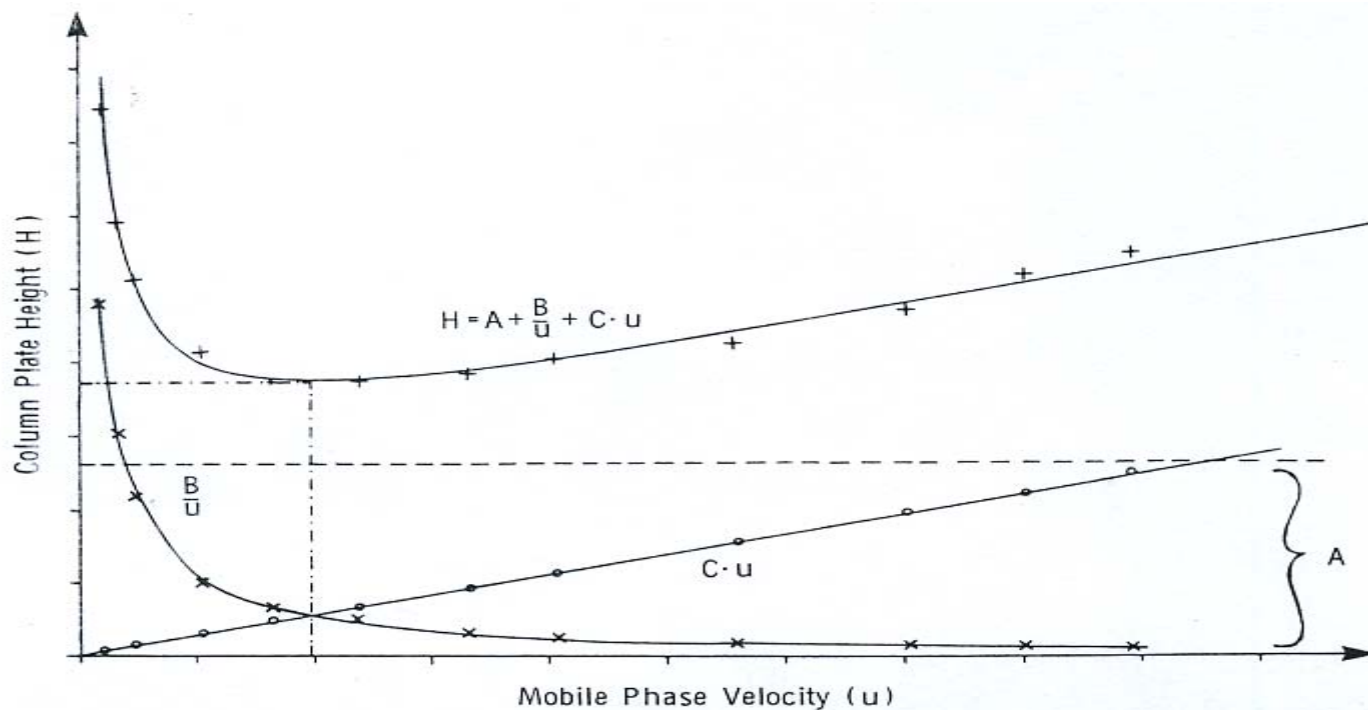


Figure 1.2 Relationship between band broadening and flow rate (van Deemter equation)

气相传质阻力:

$$C_g = \frac{1}{100} \frac{k'^2}{(1+k')^2} \frac{d_p^2}{D_g} \quad (\text{填充柱})$$

$$C_g' = \frac{1 + 6k' + 11k'^2}{24(1+k')^2} \frac{r_0^2}{D_g} \quad (\text{毛细管柱, } r_0: \text{毛细管半径})$$

液相传质阻力:

$$C_l = \frac{2}{3} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_f^2}{D_l}$$

(d_f : 液膜厚度, D_l : 液相扩散系数)

★ 细粒度, 细内径 (毛细柱), 低固定液含量, 薄液膜是提高柱效的几个主要因素。

u_{opt} : 7~15 cm/s (Packed column GC) ; 20~30 cm/s (CGC);

0.1 cm/s (HPLC)。

4. 分离度 R (或 R_s)

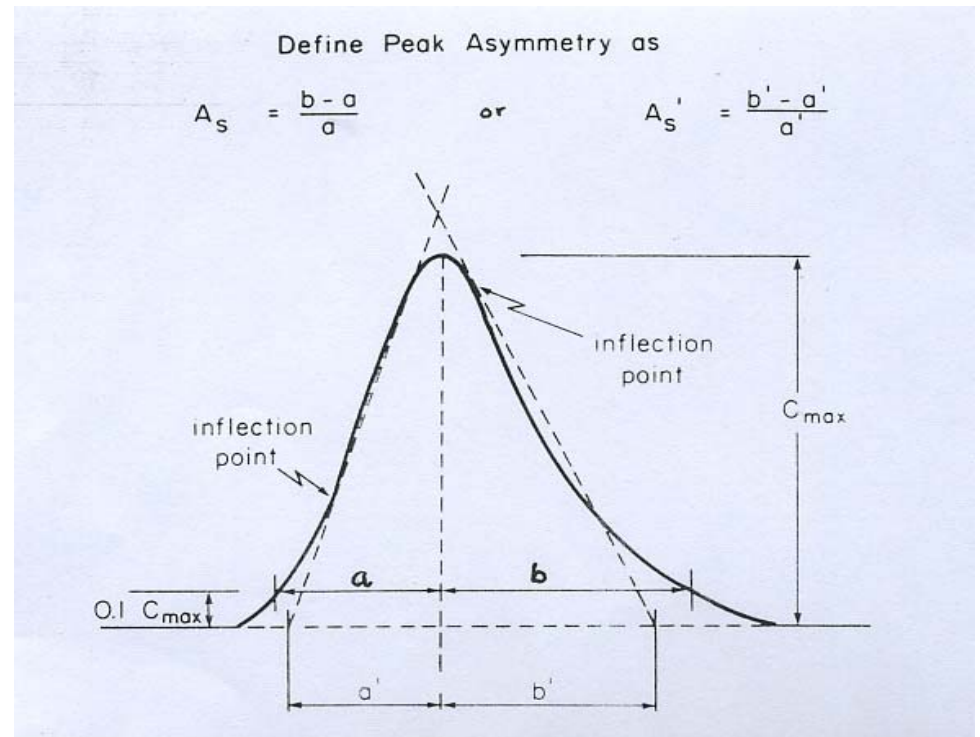
$$R = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2} (W_{b(1)} + W_{b(2)})}$$

$R=1.0$, 二等峰只能分开94% ;

$R=1.5$, 二等峰达到基线分离。

5. 峰不对称度 A_s

$$A_s = \frac{b}{a}$$



第 2 节

气相色谱(GC)/毛细管气相色谱(CGIC)

1. 吸附剂和担体

★吸附剂:

- ① 活性炭/碳分子筛(TDX)/石墨化炭黑——非极性、大比表面积。可分析 H_2S , SO_2 , 醇、酸、酚、胺等。
- ② 硅胶 —— 极性。分析气体烃, N_2O , SO_2 , H_2S , SF_6 , CF_2Cl_2 等。
- ③ 氧化铝—— 分析气体烃。
- ④ 分子筛 —— 分析上主要用A型和X型。 N_2 , O_2 , CO , CH_4 , CO_2 等分离。
- ⑤ 聚合物小球—— GDX, 有机担体, Porapak, Chromosorb系列等; 广泛用于气体和有机化合物及水分分析。

★担体: 分红色和白色两类。如国产6201 (红色) /白色担体 (包括硅烷化担体); 国外如: Chromosorb P/Chromosorb W 系列。

2. 固定液（又称“液相” liquid phase）

总共有四、五百种（也有说上千种）。按极性有不同的用途。最常用的十几种，见下表：

型号	化学组成	相似品牌	CP值	T _{max} (°C)
Squalane	角鲨烷	标准非极性液相	σ	120
OV-1	100% 甲基聚硅氧烷	类似：HP-1、DB-1、BP-1、CB-1 (非极性)	5	350
OV-101	100% 甲基聚硅氧烷	类似：HP-101、DB-101、SP-2100 (非极性)	5	350
SE-30	100% 甲基聚硅氧烷	类似：HP-1、DB-1、BP-1、BP-1CB-1 (非极性)	5	300
SE-52	5% 苯基95% 甲基聚硅氧烷	类似：HP-5、DB-5、BP-5 (非极性)	8	300
SE-54	5% 苯基95% 甲基聚硅氧烷	类似：HP-5、DB-5、BP-5 (非极性)	8	300
OV-17	50% 苯基50% 甲基聚硅氧烷	类似：DB-17、HP-17、HP-50 (弱极性)	21	375
OV-1701	7% 氰丙基7% 苯基甲基聚硅氧烷	类似：HP-1701、BP-10、DB-1701 (中极性)	19	300
OV-210	50% 三氟丙基50% 甲基聚硅氧烷	类似：HP-210、SP-2401、QF-1 (中极性)	36	275
OV-225	25% 氰丙基25% 苯基甲基聚硅氧烷	类似：HP-225 (中极性)	43	275
PEG-20M	聚乙二醇-20000	类似：HP-20M、DB-WAX (极性)	55	250
FFAP	聚乙二醇-20M-2-硝基对苯二甲酸酯	类似：HP-FFAP、BP-21SP-1000 (极性)	60	275
DEGS	聚二乙二醇丁二酸酯	用途：脂肪酸测定、极性物质分析 (强极性)	81	200
OV-275	100% 氰基聚硅氧烷	用途：单糖测定、极性物质分析 (强极性)	100	250

硅氧烷类固定液的优点：

- 1) 熔点低，沸点高，液态范围宽。T- η 系数小，T对柱效影响不大。
- 2) 蒸汽压小，热稳定性好，流失少。
- 3) 对大多数化合物有良好的溶解能力。

★固定液的选择原则：“相似相容”原理。

3. 检测器

表 9.2-5 常用气相色谱检测器性能比较

检测器	响应特性	噪声水平, A	基流, A	灵敏度, g/s	线性范围	响应时间, s	最小检测量, g
TCD	浓度型	0.005~ 0.01mV	无	$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-10}$ g/mL	$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	<1	$1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-6}$
FID	质量型	$1 \sim 5 \times 10^{-14}$	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-12}$	$< 2 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	<0.1	$< 5 \times 10^{-13}$
ECD	一般为浓度型	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-12}$	3H: $> 1 \times 10^{-6}$ 63Ni: 1×10^{-9}	1×10^{-14} g/mL	$1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-5}$ 与操作方式有关	<1	1×10^{-14}
FPD	测磷为质量型, 测硫与浓度平方成正比	$1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-10}$ 与光电倍增管有关	$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-9}$ 与光电倍增管有关	磷: $< 1 \times 10^{-12}$ 硫: $< 1 \times 10^{-11}$	磷: $> 1 \times 10^3$ 硫: $> 5 \times 10^2$ 在双对数坐标纸上	<0.1	$< 1 \times 10^{-10}$
TID	质量型	$< 5 \times 10^{-14}$	$< 2 \times 10^{-11}$	氮: $< 1 \times 10^{-13}$ 磷: $< 1 \times 10^{-14}$	$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	<1	$< 1 \times 10^{-13}$
PID	质量型	$1 \sim 5 \times 10^{-14}$	$< 1 \times 10^{-10}$	1×10^{-13}	$1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^8$	<0.1	$< 1 \times 10^{-11}$

4. 毛细管柱

目前广泛采用熔融石英（或称弹性石英）毛细管柱。常用两种内径规格：0.32(或0.25)mm 和0.53mm。柱外包一层聚丙烯氰保护膜。国内厂家：河北永年光导纤维厂。

1) 毛细管柱内表面的粗糙化和活化

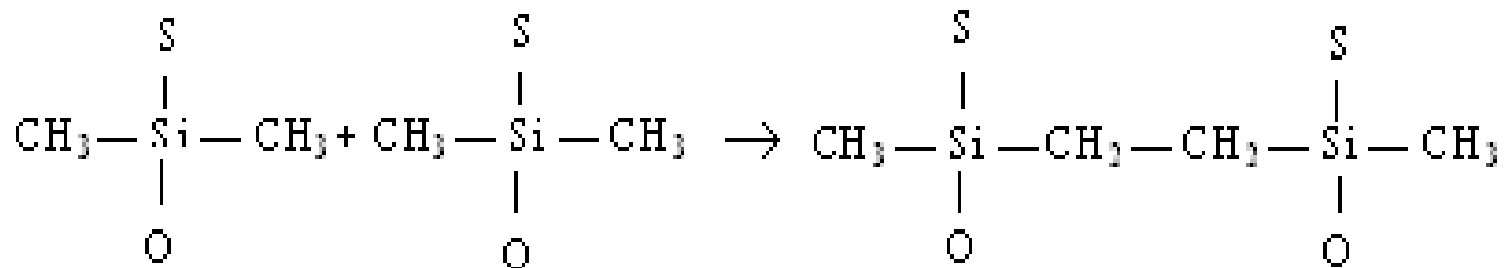
粗糙化：目的是为了增加比表面积和柱容量。方法：内表面沉积石墨化炭黑，NaCl，SiO₂等。

去活化：目的是消除表面残留的硅醇基，钝化表面。方法：硅烷化处理。

2) 固定液的涂渍

涂渍方法有动态法和静态法之分，除了这种物理涂渍的毛细管柱外，还有交联柱和化学键合相柱，用于更高的柱温和低流失的需要，例如 SE-54 柱，涂渍型 T_{max} = 300℃，交联型 T_{max}=350℃；PEG20M柱，涂渍型200℃，

交联型250 °C 等。交联一般是在过氧化物引发剂存在下，硅氧烷在高温下形成 $S_i-C-C-S_i$ 链：



3) 常用两种毛细管柱

- ① 壁涂毛细管柱 (WCOT)，最常用的一种。
- ② 多孔层毛细管柱 (PLOT)，更多用于气-固 CGC 柱和特殊要求 (如大容量) 的气-液 CGC 柱。

5.毛细管色谱的进样技术

1) 分流进样

毛细管柱容量小，需分流。从而导致样品“失真”或歧视效应，影响定量的准确性。

停流-分流进样。进样口内衬玻璃进样器，注射器针头紧密插入，停流，注样。停1~2秒后完全汽化，形成均匀的样品(溶质和溶剂)“塞子”然后拔针，载气迅速吹扫分流区，大部分被放空，小部分进入色谱柱。保留时间以拔针算起。

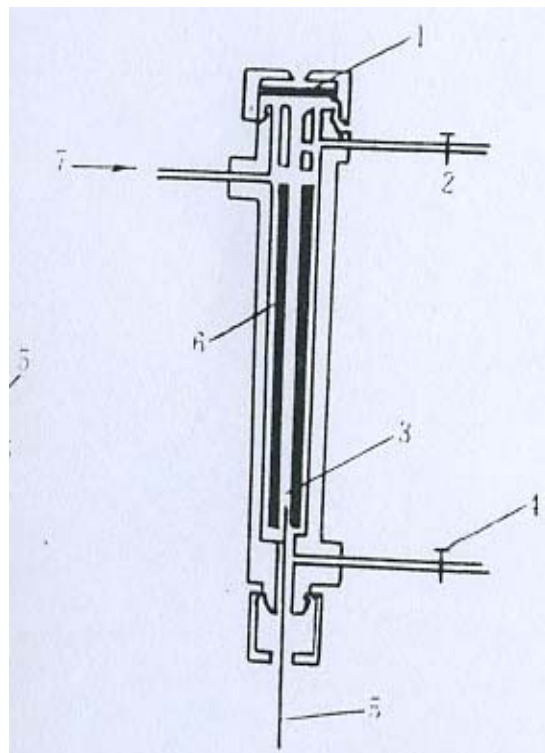


图 9.2-15 分流进样示意图
1—隔膜；2，4—针形阀；3—分流点；
5—毛细管柱；6—汽化室；
7—载气入口

2) 不分流进样

与0.53mm大内径毛细管柱配合使用，降低或消除“失真”的问题。但较大进样量 (特别是溶剂) 给柱寿命带来损害。

3) 冷柱头进样

适用于宽沸程样品，专用注射器（针头外径0.23mm, 长80cm）插入截止阀处，开阀，注样，退针，关闭，再拔出注射针，开始程序升温分析。

优点：消除“失真”，定量准确。

不足：要使用专用注射器，样品浓度 $>0.1\%$ 时要稀释。

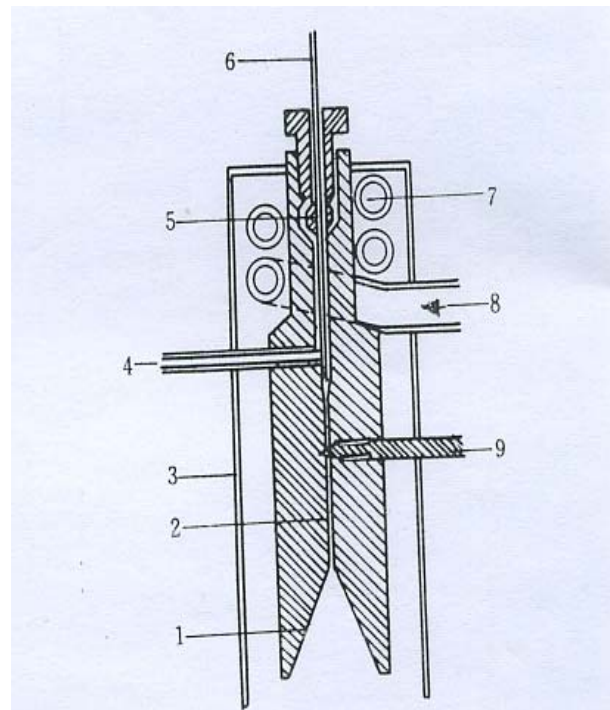


图 9.2-17 Grob 柱头进样器示意图
1—锥形孔；2—0.3mm 通道；3—钢杯；4—载气入口；
5—石墨垫；6—毛细管柱；7—冷却空气出口；
8—冷却空气入口；9—停止阀

第3节 定性、定量分析

1. 定性

- 1) 用纯样的保留时间定性
- 2) 利用检测器的选择性定性

GC中除了TCD, PID是通用型检测器外, 其余都是选择性的检测器。

- 3) 利用保留值变化规律定性
- 4) 离线或在线的GC/分析仪器联用(GC/MS, NMR, IR等)定性。

2. 定量

- 1) 峰面积(或峰高)作为定量时的数值依据
- 2) 定量方法

A. 外标法 要有标准样品; 在完全相同的色谱条件下测定标样和试样的峰面积或峰高; 准确的进样体积。

- B. 内标法** 要有待测物和内标物的纯样或已知浓度标样；内标物的合理选择（化学结构与待测物相似，出峰位置上没有其它峰干扰，尽量靠近待测物峰）。
- C. 归一化法** 要求试样中的所有组分在检测器上都有响应。此法在HPLC中使用很少。而在气相色谱中常用。

3. 定量分析中应注意的几个问题

- A. 采样的代表性和样品溶液的均匀性。
- B. 定量校正因子（ f_i ）即单位峰面积代表的物质质量。
- C. 标准曲线（或检量线）和线性范围。

标准曲线描述待测物的峰面积（或峰高）与其在试样溶液中浓度之间的关系，其线性部分一般用线性回归方程： $y=ax+b$ 来定量描述。在GC中，大部分线性范围都比较宽， 10^7 。但ECD 和FPD较窄， 10^3 。定量分析时一般实际测定。

D. 标准曲线定量和单点定量

前者适合于待测物含量变化范围宽的试样分析（如农残分析，环境样品和生物样本中的微量或痕量成分的分析）；后者适合于固定产品的分析，即试样中待测组分的含量波动不大，因而可配制一个与其含量相当的标准溶液测定，比对分析，直接算出结果。这实际上是“标准曲线定量法”的一个特例。

E. **最小检出限 (LOD)** 表示仪器在信噪比： $S/N = 2$ 或 3 时，所能检出的最小量。

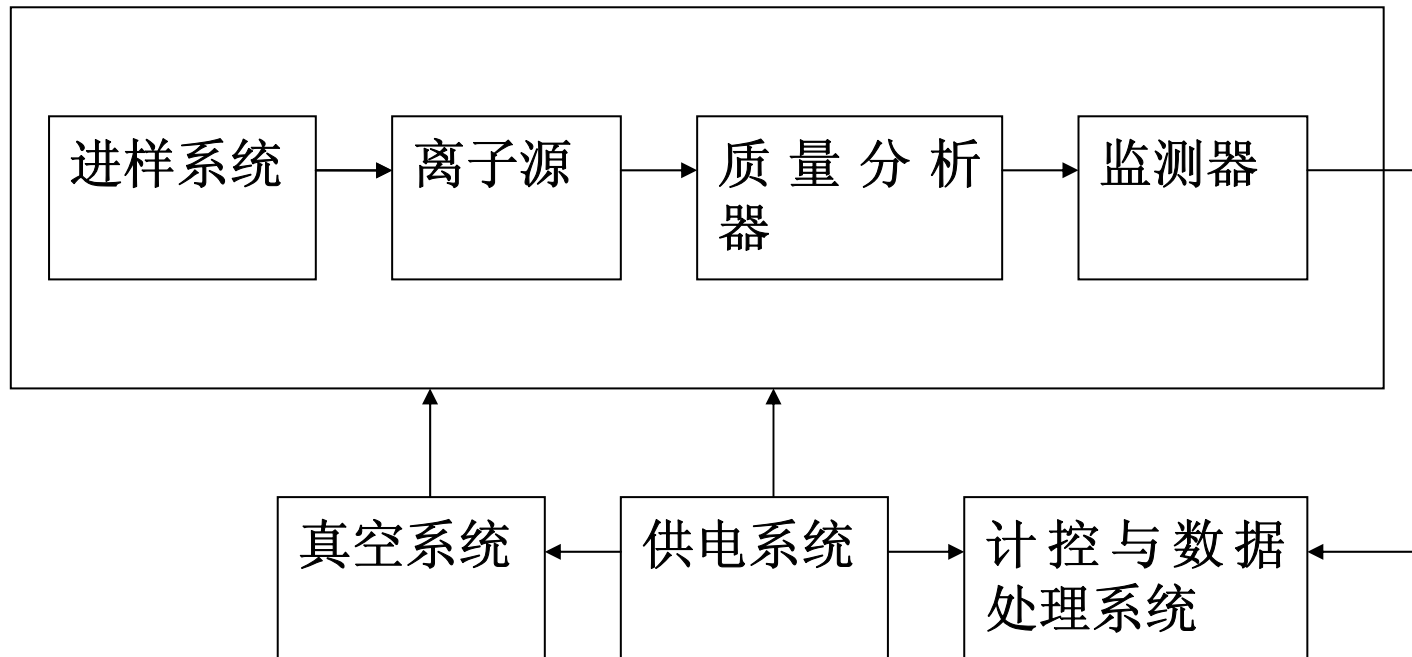
最低定量限 (LOQ) 在痕量分析，如农残分析时，用此指标能给出准确定量结果的最低浓度，一般取 $S/N = 10$ 来计算。

回收率 当样品经历过萃取、吸附、过滤、衍生等可能导致待测物质量损失的前处理步骤，或样品基体复杂，由于存在着所谓的“基体效应”可能影响检测信号强度，特别是在用质谱，荧光等手段检测的情况下，在建立分析方法时，必须要做回收率试验。这是所建的定量方法之可靠性的一个重要指标。

第4节 气相色谱/质谱联用

1. 有机质谱简介

1) 基本组成

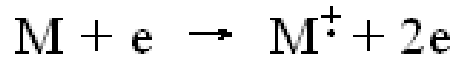


2) 电离源

A. 电子轰击源 (EI)

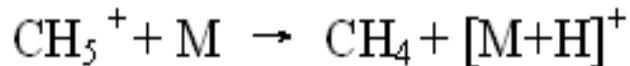
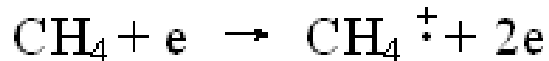
标准电子能量70eV,

真空度 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ Pa。



B. 化学电离源 (CI)

反应气 (CH_4 , $i\text{-C}_4^0$, NH_3 等) 在离子源中先电离, 与样品分子发生离子分子反应, 产生准分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。以 CH_4 为例, 反应如下:



这是一种软电离源, 再分裂的机会少, 质谱图简单。

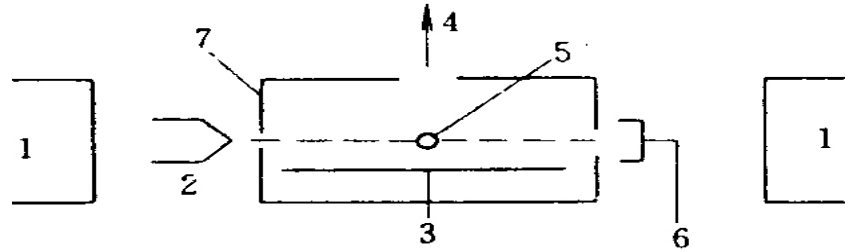


图 1-3 电子轰击电离源示意图^[1]

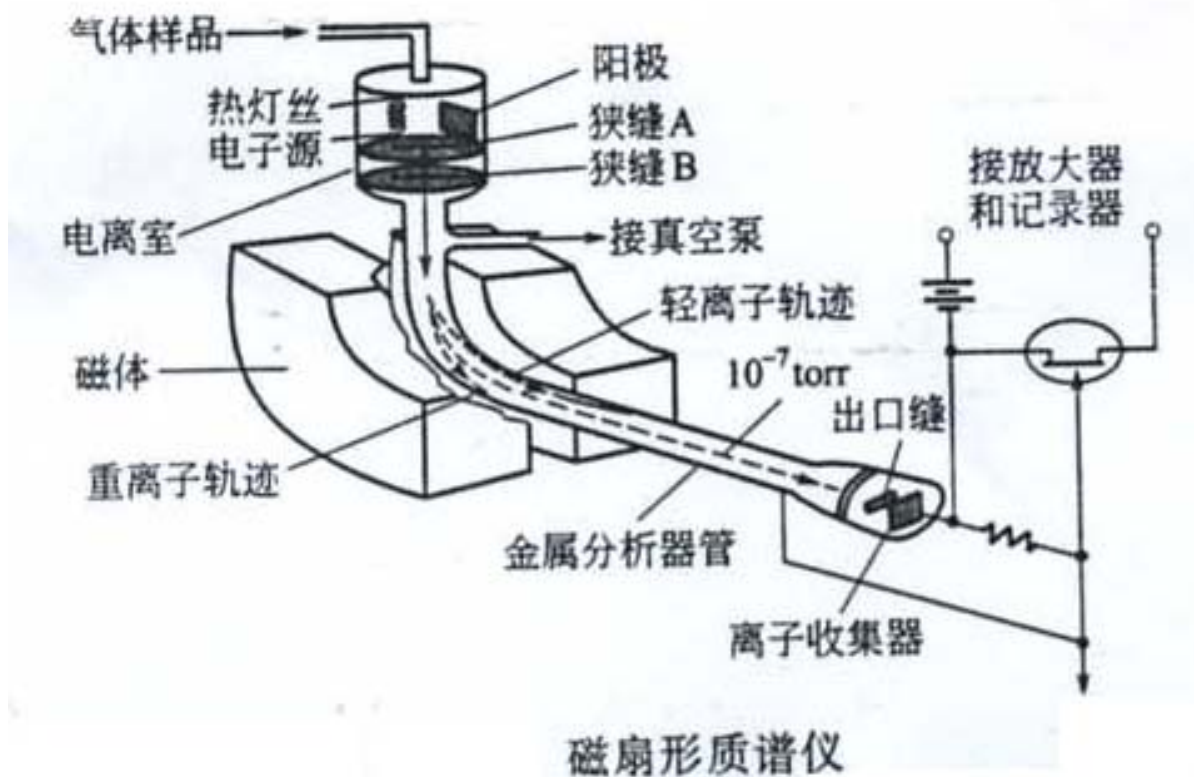
1—源磁铁; 2—灯丝; 3—推斥极;

4—离子束; 5—样品入口;

6—阳极; 7—电离盒

3) 质量分析器

A. 单聚焦质量分析器，基本型，低分辨MS（分辨率在10000以下）



B. 双聚焦质量分析器，分辨率达60000，属高分辨质谱

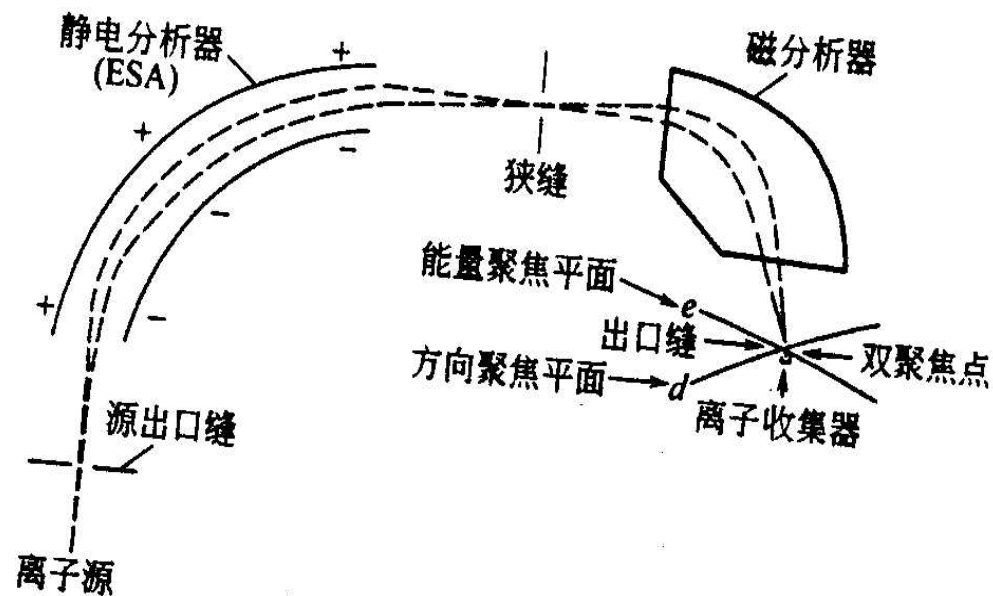


图 7-8 双聚焦质谱仪

C. 四极质量分析器（四极滤质器）

D. 离子阱质量分析器

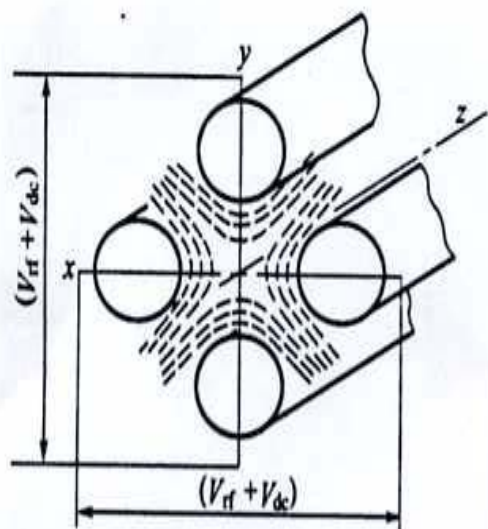


图 7-9 四极质量分析器

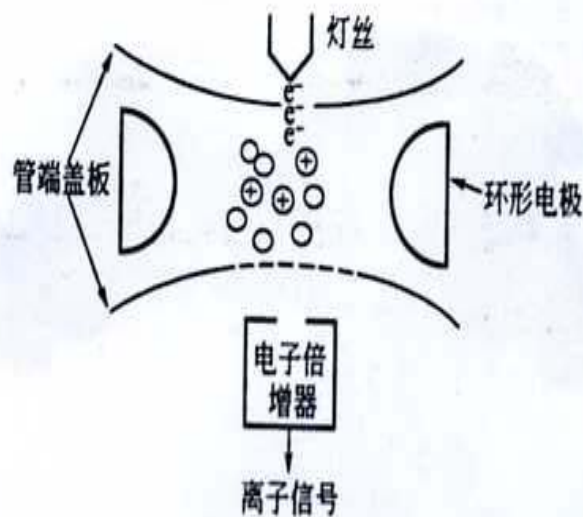


图 7-10 离子阱质量分析器

b-2

E. 飞行时间质量分析器

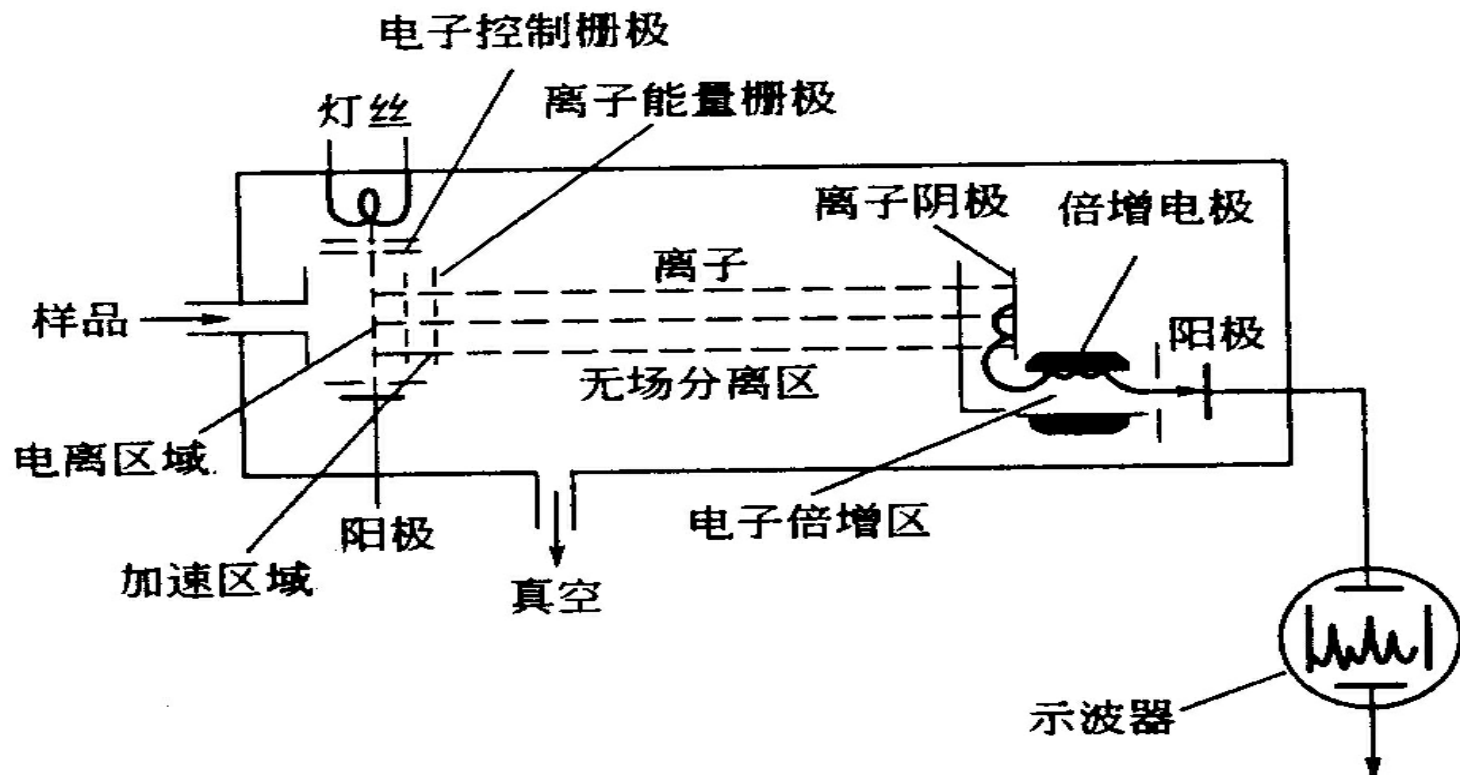


图 7-11 飞行时间质谱仪

6-2E

2. GC/MS联用

A. GC/MS联用中主要的技术关键

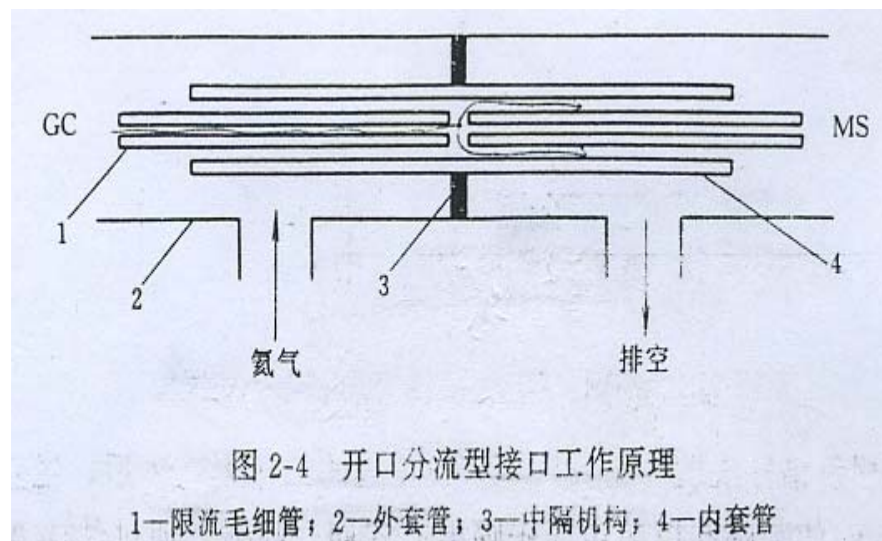
- ① 压力匹配：GC的 10^5Pa 到MS的 $10^{-4} - 10^{-5}\text{Pa}$ 。
- ② 扫描速度：GC峰宽数秒钟，每个峰至少需要6个以上的数据点；每个点能在很短的时间内完成多次全质量范围的多次扫描；在选择离子检测时，要求MS能在不同质量数之间来回切换，以及不同形式的质谱数据的显示。
- ③ GC-接口-MS仪器系统的计算机控制的数据处理。

B. 接口技术

- ① 毛细管柱出口直接导入型， $\Phi 0.25\text{mm}$ 和 $\Phi 0.32\text{mm}$ 柱($1\text{mL}/\text{min}$)是目前最常使用类型。

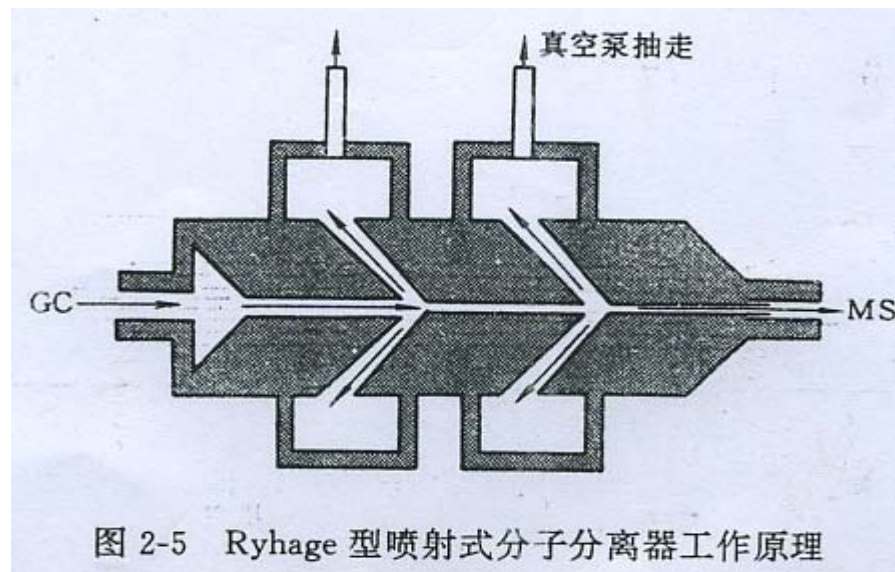
② 开口分流型

柱流出物部分引入MS，外套中充He气。不适用于填充柱。



③ 喷射式分子分离器

单级和多级喷口，
喷口超音速气流，待
测物引入MS，可用于
填充柱。



C. GC / MS仪器系统

高档-中档-低档三类GC / MS联用仪，或分研究级和常规检测级(如MSD) 两种类型。

常见的几种GC / MS系统有：

GC / MS：通常是指采用四级杆质谱或磁质谱。

GC / IMS：指采用离子阱质谱。

GC / TOF MS：指采用飞行时间质谱。

质谱可以是单级的，也可以是多级串联的(MS-MS或“MSⁿ”， n=2~5)

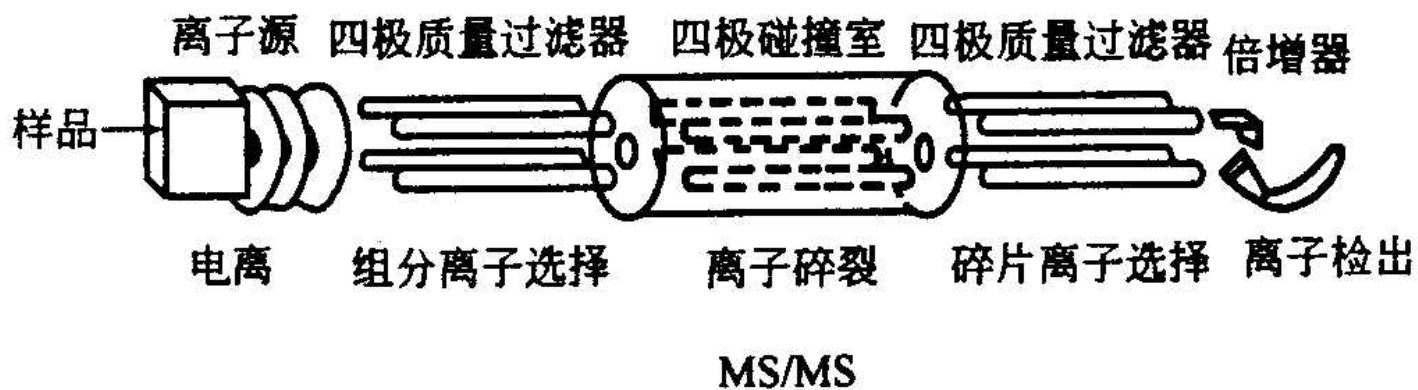
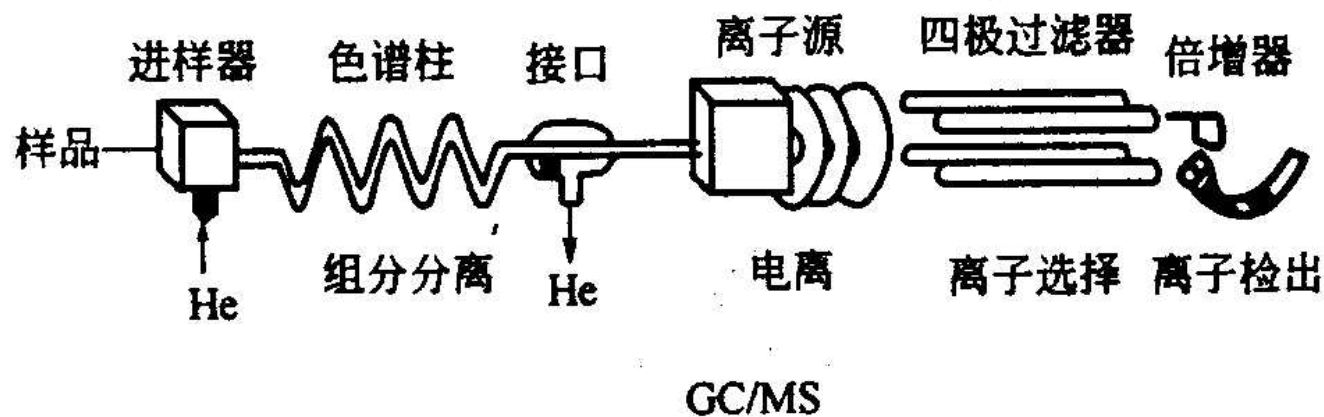


图 7-16 三级四极杆串联质谱仪和气相色谱-四极杆质谱仪的比较

D. MS谱库简介

纯化合物在标准质谱条件（EI源，70eV）下所得各种质谱数据汇集，包括各化合物的名称、分子式、结构式、各种质谱图、匹配度（测算时）。

- ① NIST（National Institute of Science and Technology）库，64K MS图。
- ② NIST/EPA/NIH（National Institute of Health）129K MS图。
- ③ Wiley库，三种版本，第6版本230K MS图。

此外，还有农药库、药物库、挥发油等专业库。所有的GC-MS仪器，厂家都给配上了上述三个谱库之一。尤以NIST/EPA/ Wiley为最普遍。

注意的几个问题：

- ① 标准条件下的谱图比较；
- ② 本底扣除（靠实践经验）；
- ③ TIC图中强峰不宜在峰顶扫描，而应在峰的后沿，以防由于多分子离子反应，出现 $[2M]^+$ ， $[2M+1]^+$ ， $[2M-1]^+$ 的情况；
- ④ 要看匹配度，但不一定匹配度高就是要检查的化合物，要做必要的人工谱图解析（包括样品来源，组成，**MS**裂解规律的运用等）
- ⑤ 一些重要的质谱规律。

- 分子离子峰的确认

合理的质量丢失。如中性小分子的丢失： H_2O (18), CO (26), CO_2 (44)等；丢失质量数在4-14和21-25的中性碎片而产生重要质谱峰是不可能的等。

能通过合理的离子碎裂产生谱图中的一些重要离子峰。稳定性好的离子峰的存在，如苯系化合物的 C_7H_7^+ (91), 高支链度的烃基，麦氏重排等等。

- 同位素离子，如含Cl的化合物，一个Cl时，有 $\text{M}^+/\text{(M+2)}^+/\text{(M+4)}^+$ (9:6:1) 的同位素峰存在。——
(3+1)ⁿ。

- 氮规律

第5节 高效液相色谱简介

1.HPLC的特点（与GC比较）：除了名词、概念、原理，数据处理等相似外，有着不同的特点。

- ① 色谱柱，固定相（3-10 μm ），柱外效应。
- ② 流动相溶剂，压力大，泵驱动。样品只要有一定的溶解度即可（不像GC要有挥发性）加之流动相种类多，应用更广。
- ③ 流动相种类多，参与分离，梯度淋洗（GC：程序升温）可浓度梯度，pH梯度，流速梯度等。
- ④ 分离条件温和，利于制备分离（检测器是非破坏型的光学检测器）。
- ⑤ 阀进样，注射针头（平头）。

2. 液相色谱分离模式

1). 吸附色谱(LSC)

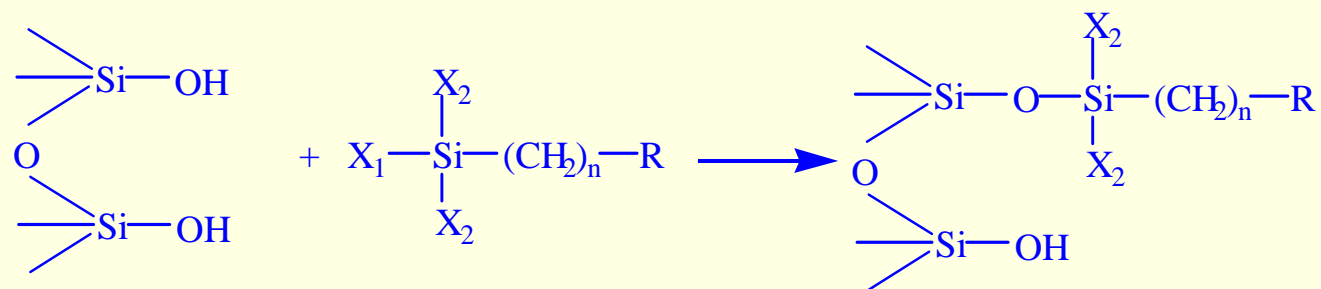
— SiO_2 吸附剂或基质

—有机化合物极性顺序:

氟代烷 < 烷(烯) 烃 < 卤代烃 < 醚 < 酯 < 酮、醛
< 腈 < 醇 < 酰胺 < 胺 < 酸

—应用: 异构体分离, 族分离,
flash chromatography

2). 化学键合相色谱 (CBSP)

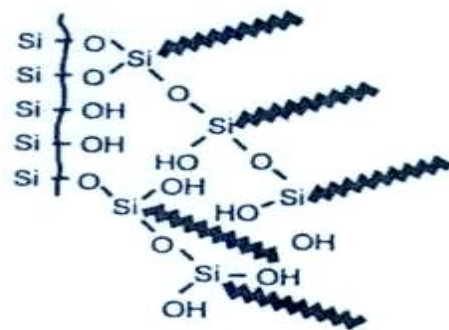


R=烷基, 腈基, 胺基, 硝基, 二醇基等

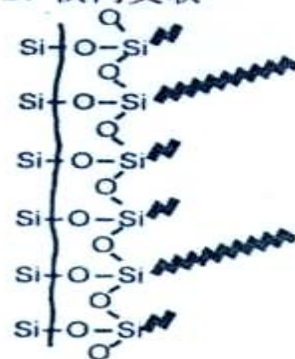
X₁=-Cl, -OCH₃, -OC₂H₅

X₂=-Cl, -CH₃, -< , -|-

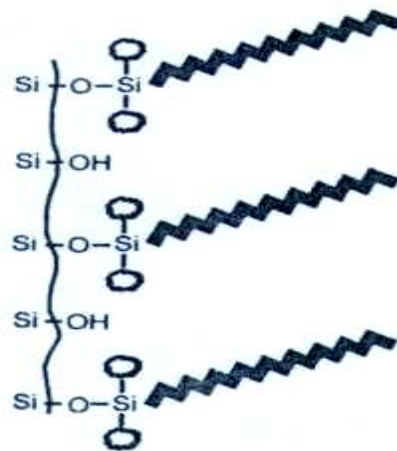
A. 纵向交联



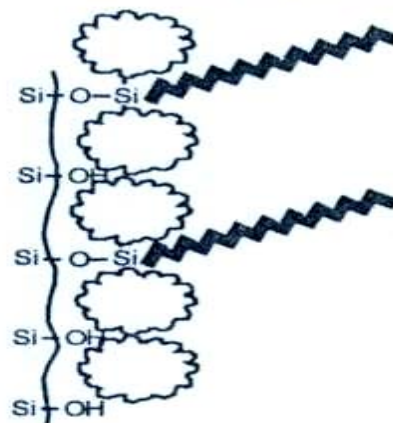
B. 横向交联



C. 单体(二甲基-取代)



D. 单体(空间保护)



C₁₈ 硅烷键合相的种类

正相和反相色谱的区别

比较项目	正相色谱	反相色谱
固定相	极性	非(弱)极性
流动相	非(弱)极性	极性
流出次序	极性组分 k' 大	极性组分
流动相极性的影响	极性增加, k' 减小	极性增加 k' 增大

3) 正相色谱

固定相：如Lichrosphere-CN, -NH₂, -DIOL, -NO₂

流动相：同LSC

反相色谱

固定相：如Lichrosphere-RP18(即C₁₈, ODS)

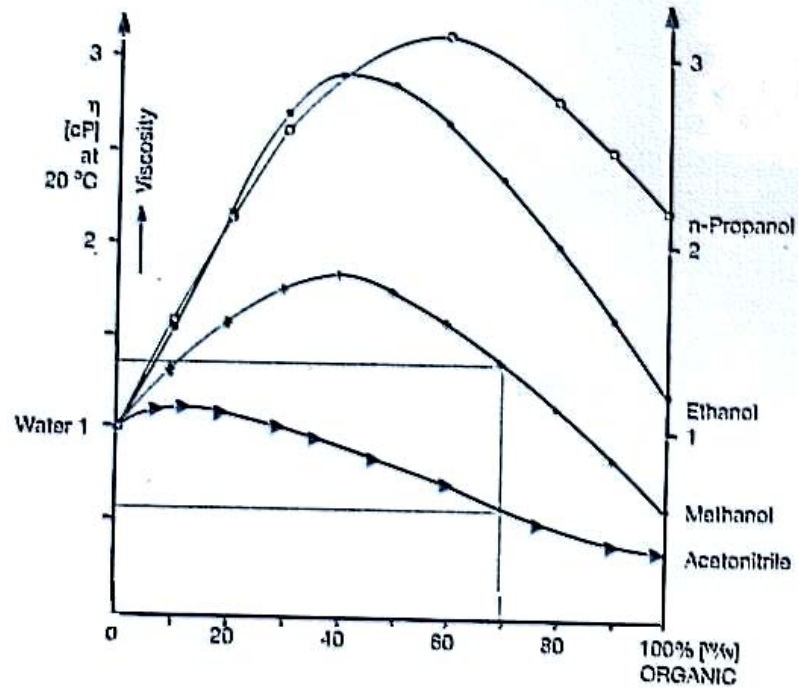
-RP8(即C₈)

-RP2(即C₂)

-RP1 (即C₁)

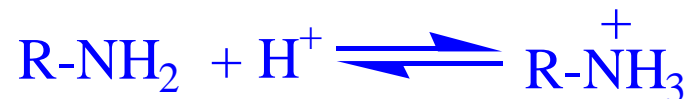
-Phenyl(即苯基)

流动相： 甲醇/水, 乙腈/水, 四氢呋喃/水,
二氧六环/水



RP-HPLC中流动相组成与其性质的关系

4) 离子抑制色谱 (Ion Suppression Chromatography)



流动相：缓冲液+有机溶剂

5) 离子对色谱 (Ion-pair(ed) Chromatography, IPC)



S. P. — C₁₈, C₈

M. P. — MeOH/H₂O (ACN/H₂O)

$[C_{\text{aq}}^{+}] = 5 \sim 10 \text{ mmol/L}$

离子对试剂的选择

离子对试剂	主要应用对象
季胺盐类（如 TMA，TBA，CTMA）	阴离子表面活性剂，磺酸染料，氢化考地松及其盐
叔胺（如三辛胺）	磺酸盐，羧酸等
烷基磺酸盐（如甲烷-，戊烷-，己烷-，庚烷-，樟脑-磺酸盐）	强/弱碱，苄烷基铵盐，儿茶酚胺，肽，鸦片碱等
高氯酸，三氟乙酸	可与许多碱性物质生成离子对
烷基硫酸盐（如辛，癸，十二烷基硫酸盐）	与烷基磺酸盐相似，选择性有所不同

3. 离子交换色谱 (IEC, IC)

S.P.—ST/DVB,PA, 键合硅胶

M.P.—缓冲液 (有时需加有机改性剂)

应用: 有机酸, 碱, 盐和可解离化合物

离子色谱 (Ion Chromatography, IC)

以 F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 为例

4. 体积排阻色谱 (Size Exclusion Chromatography SEC)

◆ 凝胶渗透色谱 (Gel Penetration Chromatography, GPC)

应用: 合成(有机)聚合物分子量分级

◆ 凝胶过滤色谱 (Gel Filtration Chromatography, GFC)

应用: 水溶性生物大分子分子量分级

5. 亲和色谱 (Affinity Chromatography, AC)

应用: 高选择性吸附分离

参考书

- 1) 李浩春主编,“分析化学手册”,第五分册:气相色谱分析,1999,化学工业出版社;
- 2) 朱良漪主编,“分析仪器手册”,1997,化学工业出版社;
- 3) 中科院大连化物所,“气相色谱法”,1972,科学出版社;
- 4) 汪正范等编著,“色谱联用技术”,2001,化学工业出版社;
- 5) 王俊德等编著,“高效液相色谱法”,1992,中国石化出版社。

谢谢！

