

第十二章 液相色谱法

- ❖ 第一节 概述
- ❖ 第二节 柱色谱法
- ❖ 第三节 平面色谱法

第一节 概述

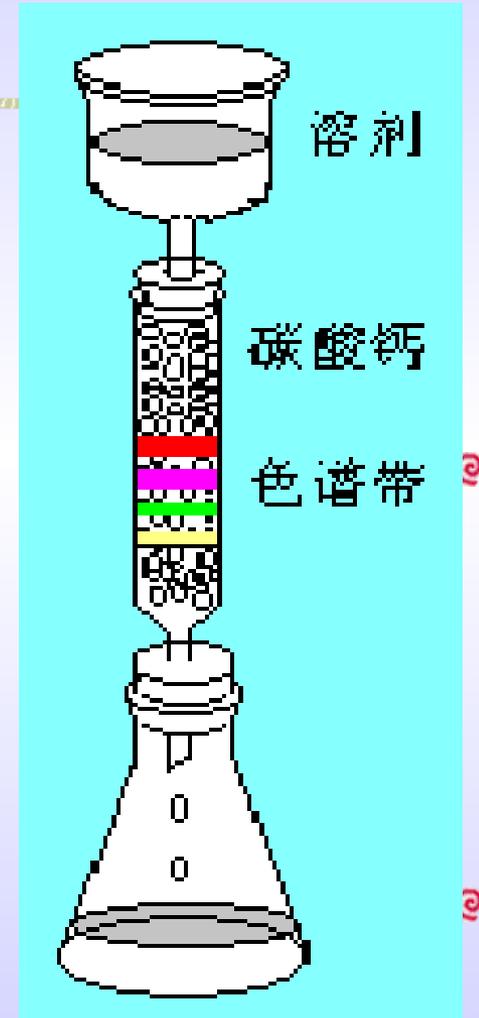
色谱法 (chromatography) 又称层析法，是一种依据物质的物理化学性质的不同（如溶解性、极性、离子交换能力、分子大小等）而进行的分离分析方法。

- ❖ 一、 色谱法的产生和发展
- ❖ 二、 色谱法的分类
- ❖ 三、 色谱法的基本原理

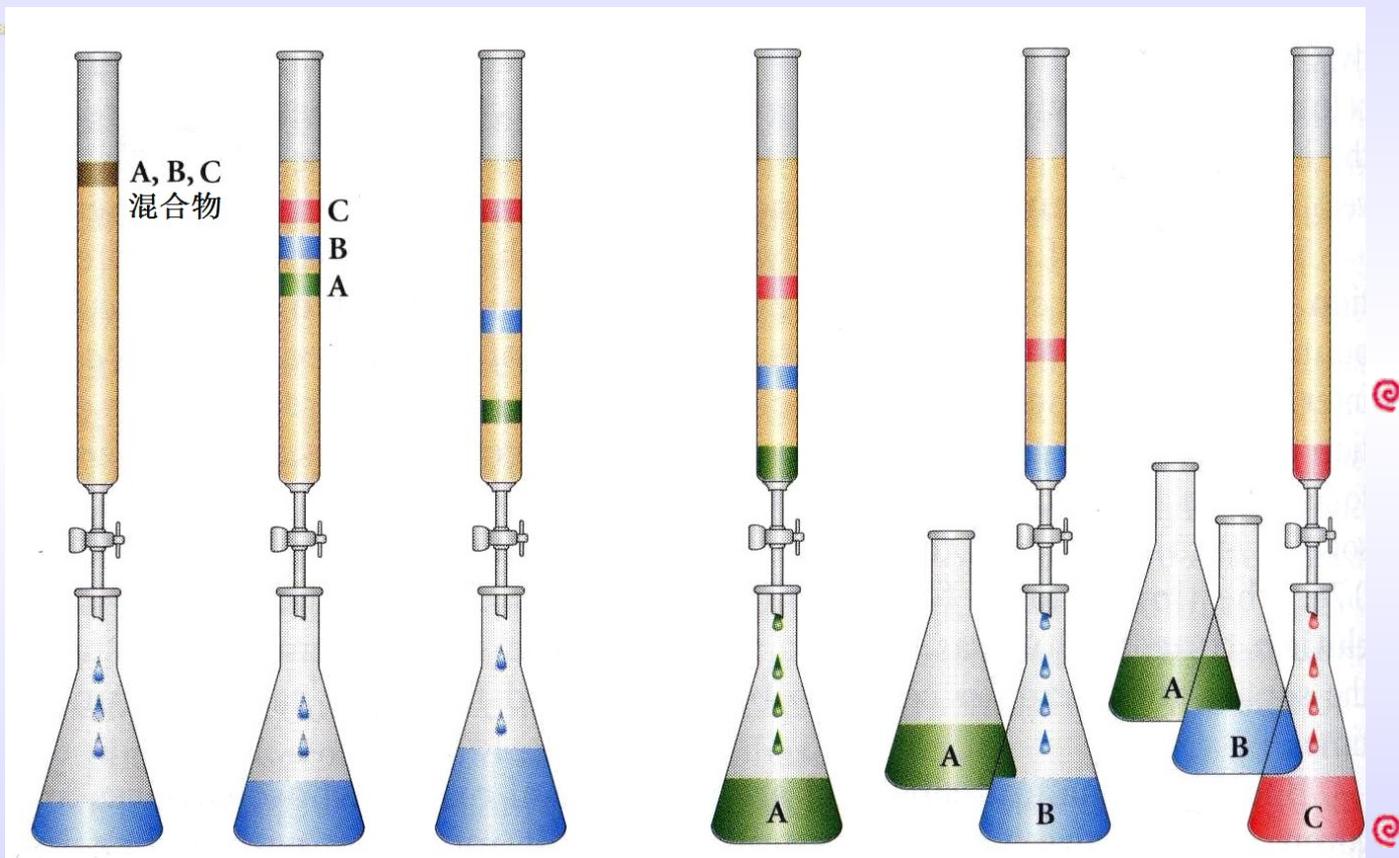
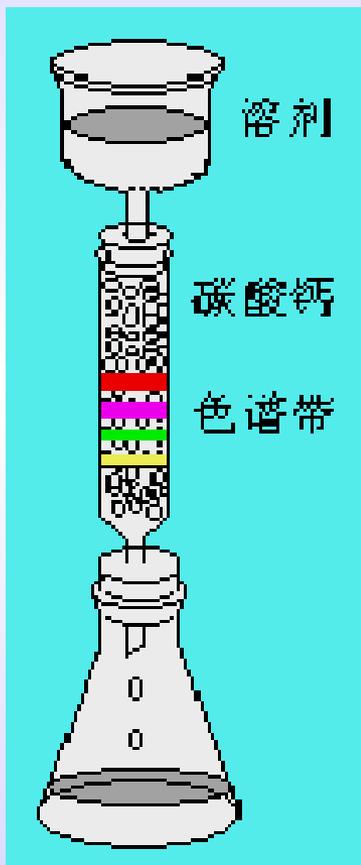
一、色谱法的产生和发展

- ❖ 俄国植物学家茨维特在 1906 年使用的装置，如图：
- ❖ 起分离作用的柱子叫**色谱柱**
- ❖ 固定不动的相，称为**固定相**
- ❖ 携带试样混合物流过此固定相的流体相（气体或液体），称为**流动相**

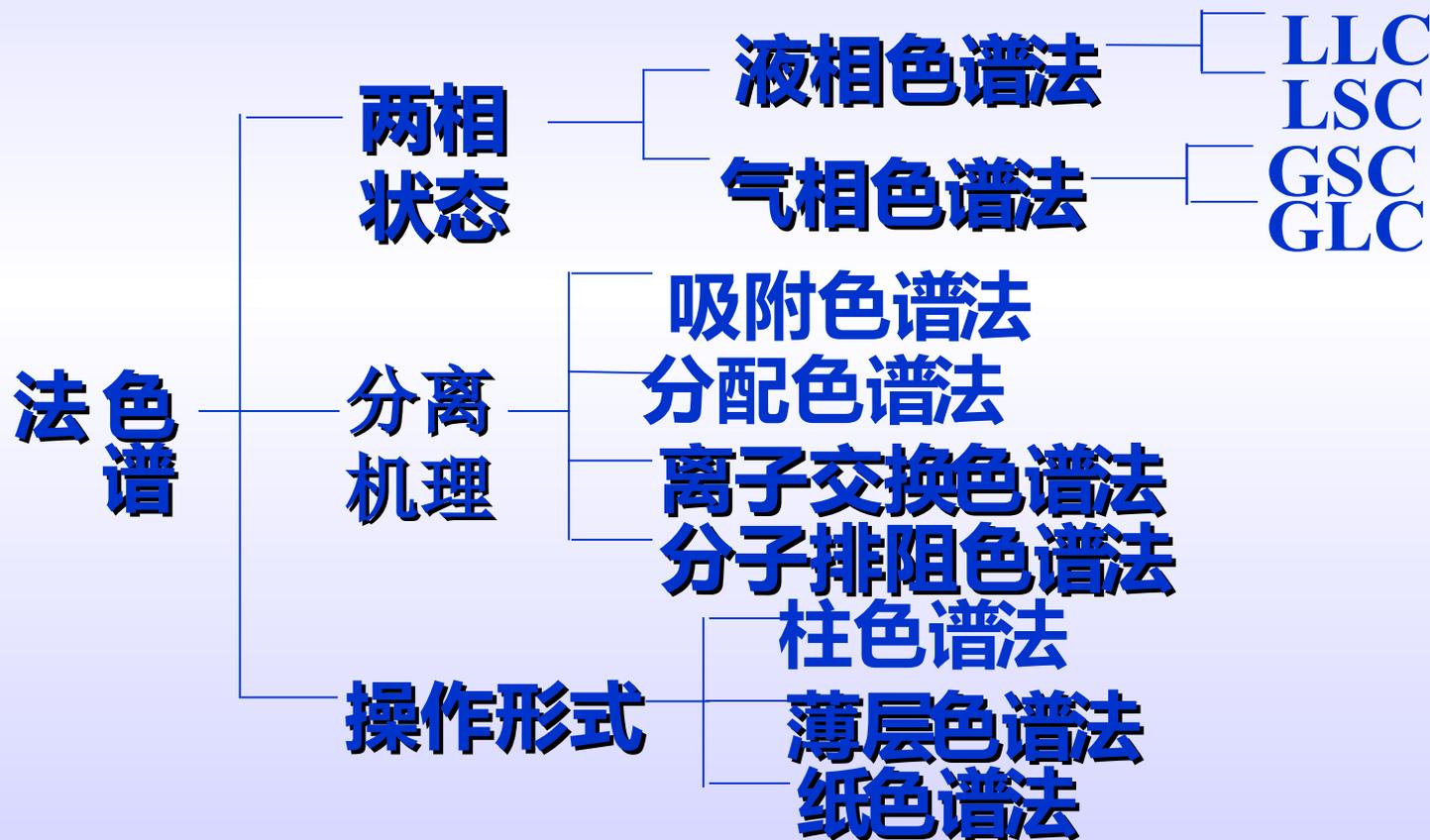
❖ **色谱法是一种分离技术**



一、色谱法的产生：分离植物色素



二、色谱法的分类



三、 色谱法的基本原理

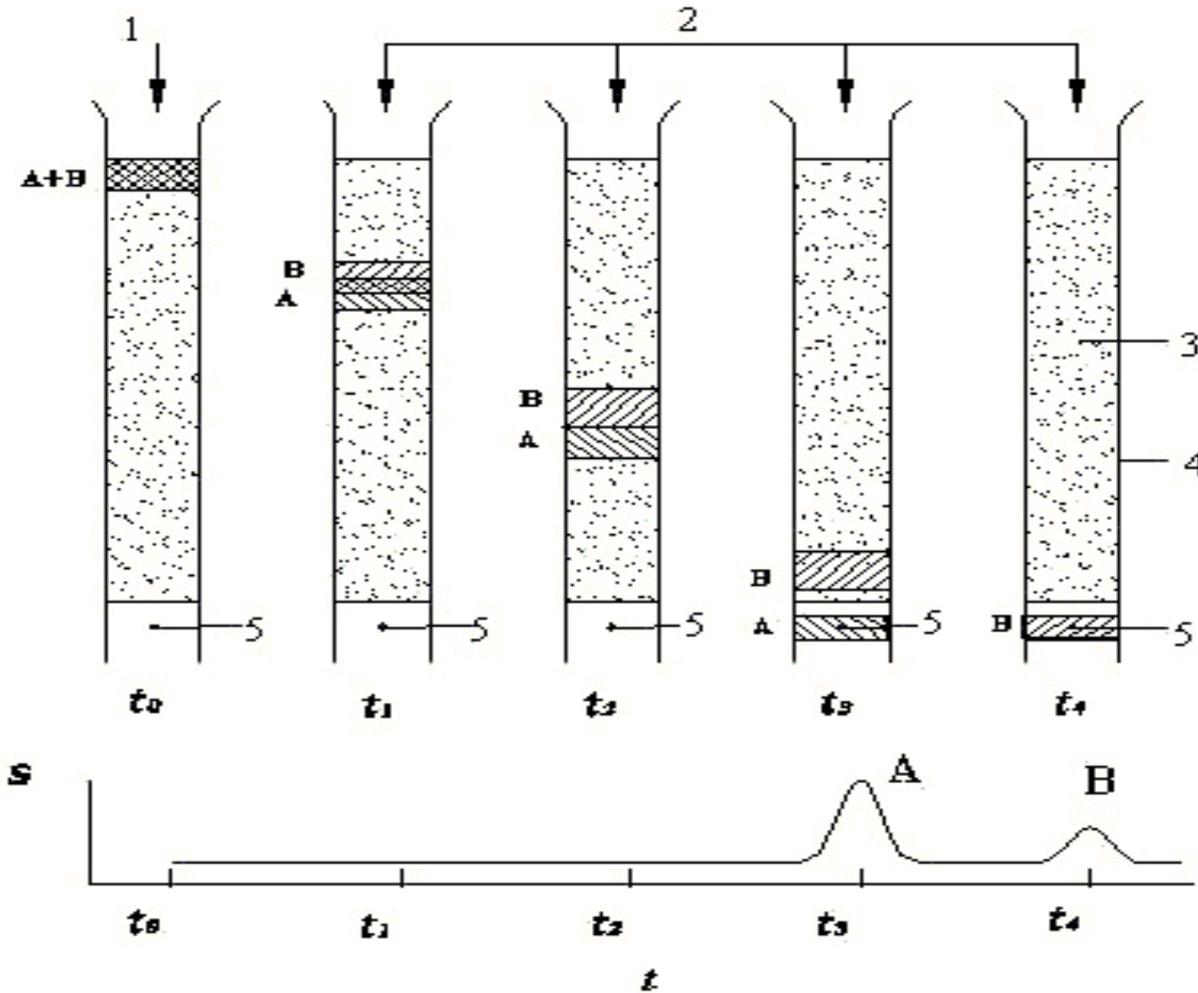
❖ (一) . 色谱过程

❖ 色谱法是一种分离技术，它是被分离物质分子在两相间分配平衡的过程。

❖ 以分离顺式和反式偶氮苯为例来说明色谱过程

色谱过程示意图

- 1、试样
- 2、流动相
- 3、固定相
- 4、色谱柱
- 5、检测器



❖ 由于两组分的性质存在微小差异，因而吸附剂对它们的吸附能力略有不同。经一段时间后，两组分的微小差异逐渐变大，最后彼此分离，而先后流出色谱柱。

小结：色谱过程

❖ **组分的结构和性质微小差异 → 与固定相作用差异 → 随流动相移动的速度不等 → 差速迁移 → 色谱分离。**

🌀 **两相及两相的相对运动构成了色谱法的基础；色谱过程就是组分的分子在流动相和固定相间多次“分配”产生“差速迁移”的过程。**

(二) 分配系数 K

- ❖ 被分离组分以不同的程度分布在两相中，溶质既可进入固定相，也可进入流动相，这个过程叫**分配**
- ❖ **分配系数**：在一定的温度和压力下，某组分在两相间的分配达到平衡时浓度（或溶解度）之比。

$$K = \frac{\text{组分在固定相中的浓度 } c_s}{\text{组分在流动相中的浓度}}$$

K { c_m
吸附色谱：吸附平衡常数（吸附系数）
分配色谱：分配系数
离子交换色谱：交换系数
凝胶色谱：渗透系数

(三) 保留值

❖ 某组分从开始洗脱到从柱中被洗脱下来所需要的时间称为保留时间 (retention time), 通常用符号 “ t_R ” 表示。

❖ 某组分从开始洗脱到从柱中被洗脱下来所需要的流动相的体积称为保留体积 (retention volume), 通常用符号 “ V_R ” 表示。

❖ 保留值是色谱法定性分析的基本参数。

(四) 分配系数与保留值的关系

- ❖ **K 值越大，移动速度越慢， t_R 越长，后出柱**
- ❖ **K 值越小，移动速度越快， t_R 越短，先出柱**
- ❖ **混合物中各组分间的分配系数 K 相差越大，各组分越容易被分离**

第二节 柱色谱法 @

- ❖ 一、液 - 固吸附柱色谱法
- ❖ 二、分配柱色谱法
- ❖ 三、离子交换柱色谱法
- ❖ 四、凝胶柱色谱法

一、液-固吸附柱色谱法

❖ (一) 原理

- ❖ 利用吸附剂对不同组分的吸附能力的差异进行分离的一种色谱法。
- ❖ 吸附作用与吸附平衡
 - ❖ 吸附平衡常数（吸附系数）

$$K = \frac{\text{组分在吸附剂中的浓度}}{\text{组分在流动相中的浓度}}$$

- ❖ 影响 K 的因素：吸附剂的活性、组分和流动相的性质
- ❖ K 的意义：组分的吸附系数 K 越大，表示越容易被吸附，保留时间越长，流出色谱柱就越慢。

(二) 吸附剂

❖ 1. 对吸附剂的基本要求是：

④ (1). 具有较大的表面积和足够的吸附能力

④ (2). 在所用的溶剂和洗脱剂中不溶解；不与试样各组分、溶剂和洗脱剂发生化学反应

④ (3). 颗粒较均匀，有一定的细度，在使用过程中不易破碎。

④ (4). 具有较为可逆的吸附性，既能吸附试样组分，又易于解吸。

❖ 目前最常用的吸附剂是硅胶和氧化铝，其次是聚酰胺、活性炭，还有多孔吸附树脂等

(三) 流动相 (洗脱剂)

❖ 洗脱剂的基本要求是：

- ④ (1). 对试样组分的溶解度要足够大。
- ④ (2). 不与试样组分和吸附剂发生化学反应。
- ④ (3). 粘度小，易流动。
- ④ (4). 有足够的纯度。

❖ 流动相的选择应考虑下列因素：

- ④ 被分离物质的结构、流动相的极性与固定相吸附力的关系

(四) 操作方法

❖ 1. 装柱

❖ 2. 加样

❖ 3. 洗脱

二、分配柱色谱法

(一) 分离原理

❖ 利用混合物中不同组分在两相溶剂中**溶解性不同**（分配系数不同），当流动相携带样品流经固定相时，各组分在两相间不断进行溶解、萃取，再溶解、再萃取。样品在色谱柱内经过无数次分配之后，而使分配系数稍有差异的组分得到分离。

⤵ **正相色谱**：流动相的极性比固定相的极性弱

⤵ **反相色谱**：流动相的极性比固定相的极性强



(二) 载体 (担体)

❖ 载体的作用

✎ 在分配色谱中，载体起着负载或支持固定液的作用

❖ 对载体的要求：

✎ 惰性、纯净、颗粒大小适宜；既能吸附固定液，又不吸附被分离的组分和流动相

❖ 常用的载体：

✎ 吸水硅胶、多孔硅藻土、纤维素粉、滤纸

第三节 平面色谱法

- ❖ 一、薄层色谱法
- ❖ 二、纸色谱法

一、薄层色谱法

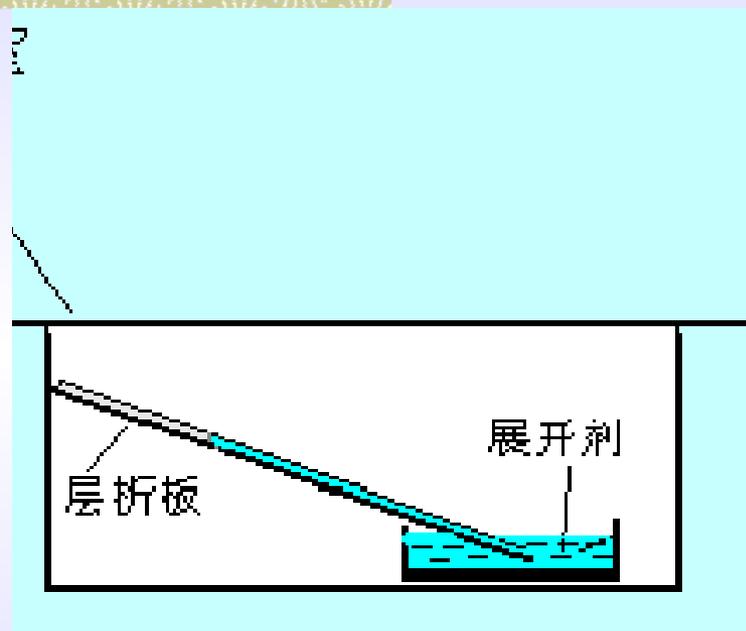
(thin layer chromatography ; TLC)

- ❖ **薄层色谱法：**将固定相涂布成一均匀薄层，在此薄层上进行分离样品的方法。
- ❖ **薄板：**铺好固定相的板称为薄板。
- ❖ **特点：**
 - ❖ 快，需十至几十分钟，同时展开多个试样。
 - ❖ 试样预处理简单，对试样限制少。
 - ❖ 载样量比较大，适用于制备。
 - ❖ 仪器简单，操作方便。
 - ❖ 分离能力较强。
 - ❖ 灵敏度较高。

(一)、基本原理

❖ 分类

- ❖ 薄层色谱流动相的移动是依靠毛细作用。将试样点在薄板的一端，并将该端浸在作为流动相的溶剂（展开剂）中，随着溶剂向上的移动，经过试样点时，带动试样向上运动。



薄层色谱法装置

1. 分离原理（吸附薄层色谱法）

- ④ 固定相——吸附剂
- ④ 流动相——液体，又称展开剂
- ④ 操作方式——薄层板上

❖ 原理

- ④ 组分在薄层板上吸附、解吸附、再吸附、再解吸附的过程。
- ❖ 吸附系数不等产生差速迁移， K 值大的组分随展开剂移动速度慢，在后； K 值小的组分随展开剂移动速度快，在前。
- ❖ 故薄层色谱又称敞开的柱色谱

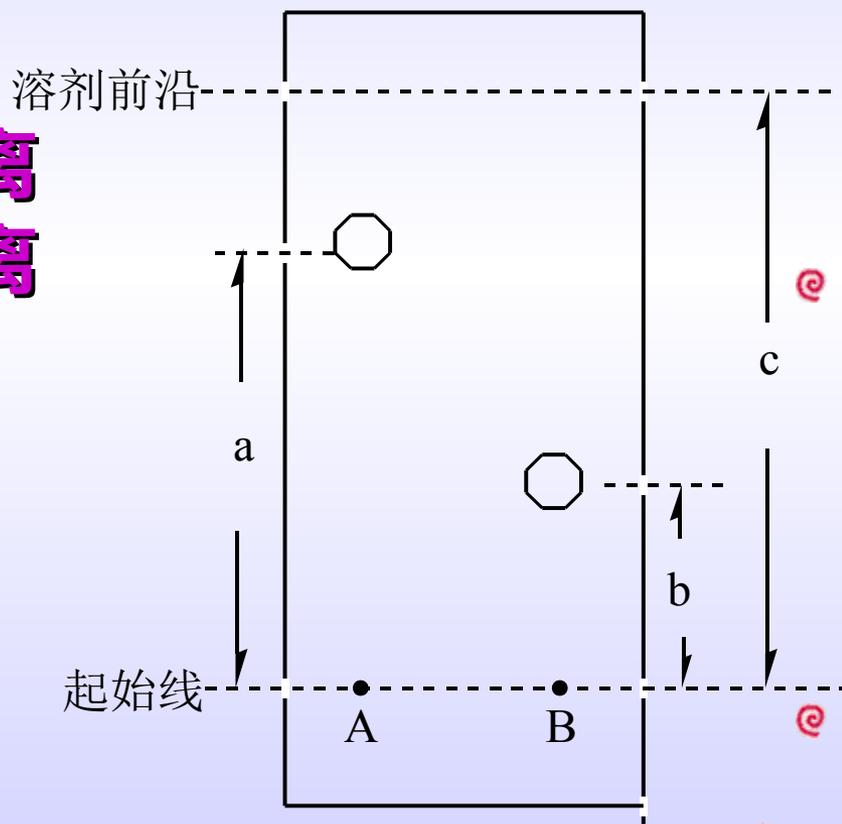
2. 比移值和相对比移值

❖ 比移值 R_f

$$R_f = \frac{\text{原点到斑点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

$$R_{f(B)} = \frac{b}{c}$$

$$R_{f(A)} = \frac{a}{c}$$



比移值 R_f 意义：

- ④ (1) 可定性分析：条件一定时， R_f 是一常数，结构不同的物质，性质不同，其 R_f 值不同。（故同一块薄层板中，同一个物质斑点不随展开时间长短变化而变化）
- ④ (2) 各组分的 R_f 值差越大，分离得越开

❖ R_f 与分配系数 K 的关系：

K 大，组分在固定相中浓度大，移动速度慢， R_f 小。

❖ 要求：

2016年十一月16日

R_f 的影响因素

R_f 的影响因素

- ④ (1) 吸附剂的吸附性能
- ④ (2) 展开剂的极性
- ④ (3) 薄层板中吸附剂的厚度
- ④ (4) 展开的时间
- ④ (5) 色谱缸中蒸气的饱和程度

❖ R_f 的缺点:

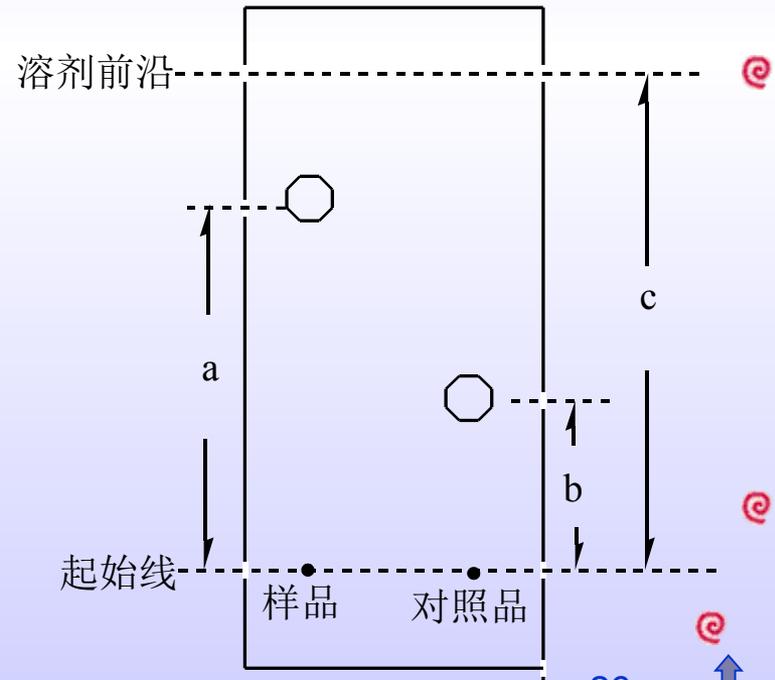
- ④ 影响因素很多，很难得到重复的值

相对比移值 (R_s)

$$R_s = \frac{\text{原点到样品组分斑点中心的距离}}{\text{原点到对照品斑点中心的距离}}$$

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

- ❖ R_f 小于 1，但 R_s 不一定
- ❖ R_s 在 $0 \sim \infty$ 之间
- ❖ 若 $R_s = 1$ ，试样与对照品一致



(二) 吸附剂的选择

❖ 与柱色谱中的吸附剂相似，只是

❧ 颗粒更细。

❧ 分离效率比柱色谱高

❖ 常用的吸附剂有

❧ 硅胶和氧化铝，颗粒在 200 目 (颗粒直径在 10 ~ 40 μm) 左右。

(三) 展开剂的选择

- ❖ 薄层色谱中展开剂的选择原则与柱色谱中的洗脱剂的选择原则相似。
- ❖ 在薄层分离中一般各斑点的 R_f 在 0.2 ~ 0.8 之间，各组分 R_f 值之间应相差 0.05 以上，否则易造成斑点重叠。
- ❖ 薄层色谱法中常用的溶剂，按极性由弱到强的顺序
 - 石油醚 < 环己烷 < 二硫化碳 < 四氯化碳 < 三氯乙烷 < 苯 < 甲苯 < 二氯甲烷 < 氯仿 < 乙醚 < 乙酸乙酯 < 丙酮 < 乙醇 < 甲醇 < 吡啶 < 水

混合溶剂

❖ 先用单一溶剂展开，

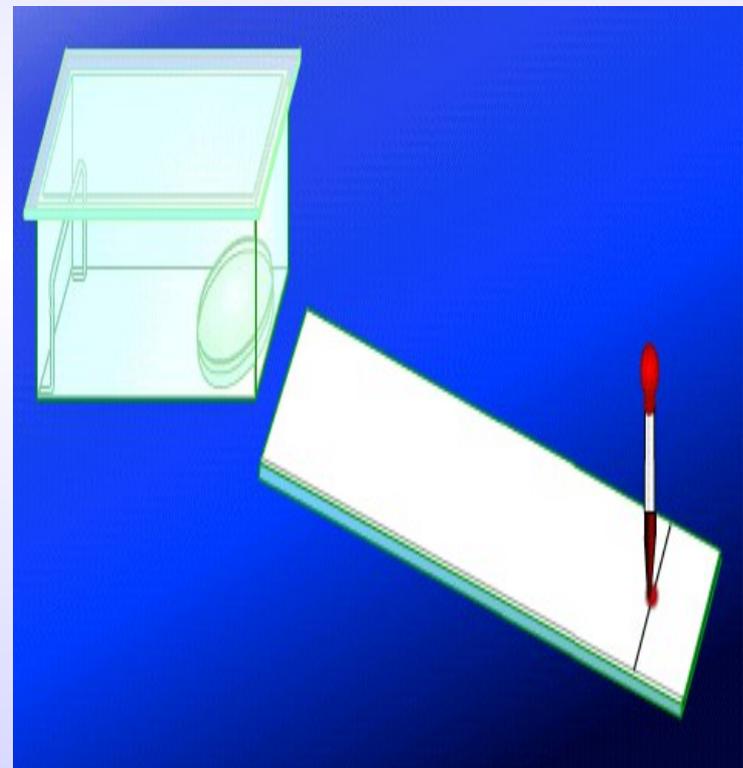
- ❖ 若 R_f 值太小，则加入一定量极性强的溶剂，如乙醇、丙酮等，
- ❖ 如果 R_f 值太大，则加入适量极性弱的溶剂（如环己烷、石油醚等），以降低极性。

🌀 还可加入一定比例的酸或碱，使斑点集中

❖ 若要改变比移值时，除了改变展开剂的极性外，还可通过改变吸附剂的活性来调节。

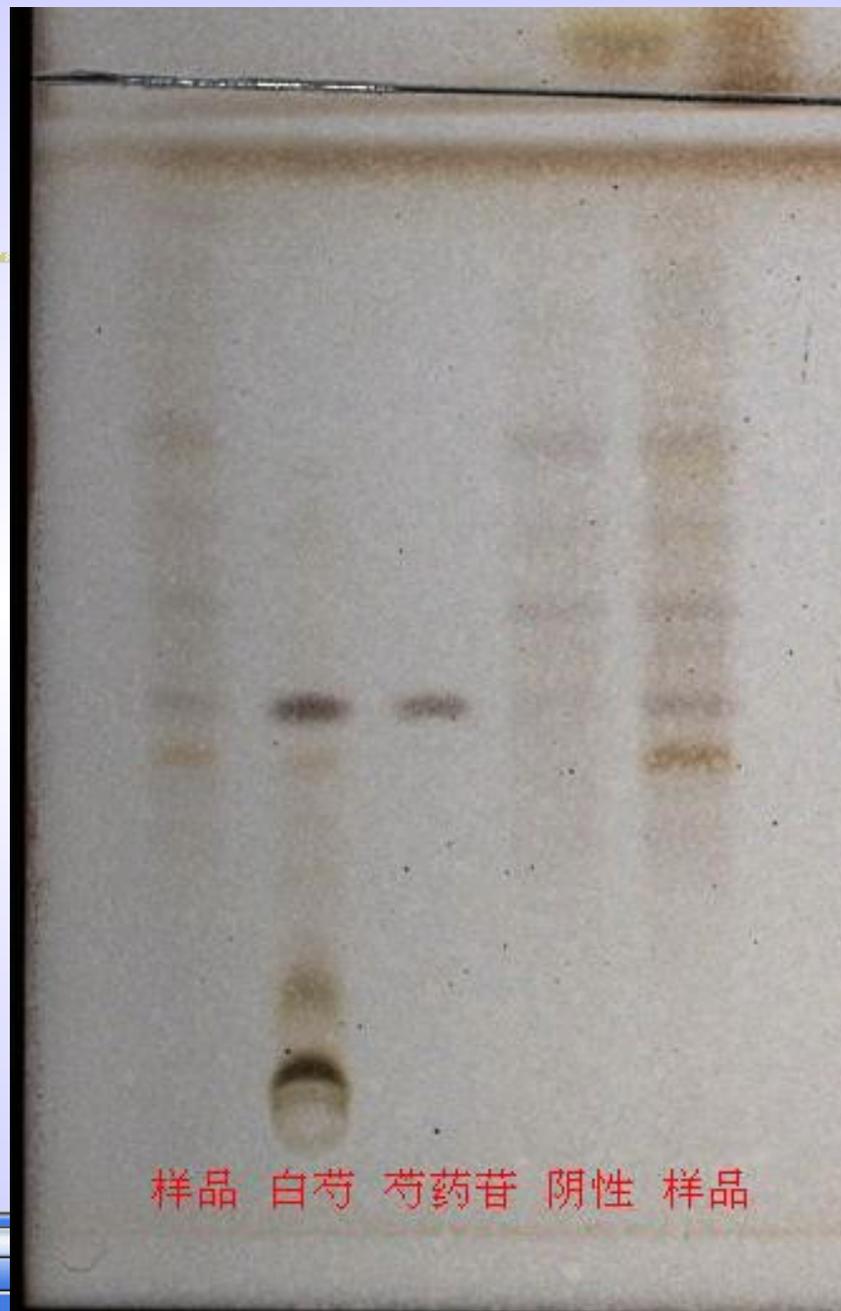
(四) 操作方法

- ❖ 制板 均匀
- ❖ 点样
 - ⌚ 距底边 1.5 ~ 2cm 处画一条起始线, 试样点的直径一般应小于 0.5mm
- ❖ 展开 (多种方式)
- ❖ 预饱和
- ❖ 显色
- ❖ 定性、定量分析



四、操作方法

1. 制板
2. 点样
3. 展开
4. 斑点定位

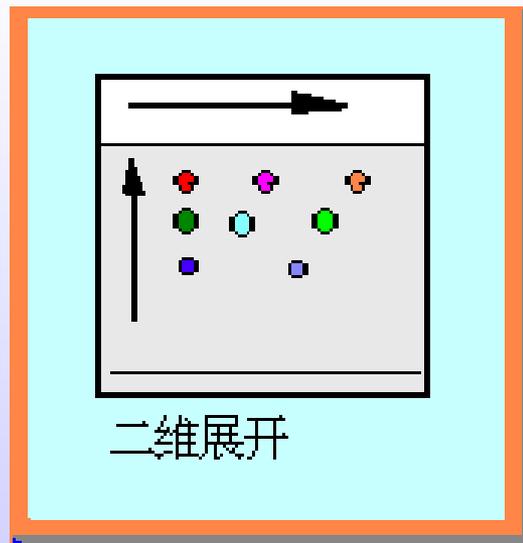
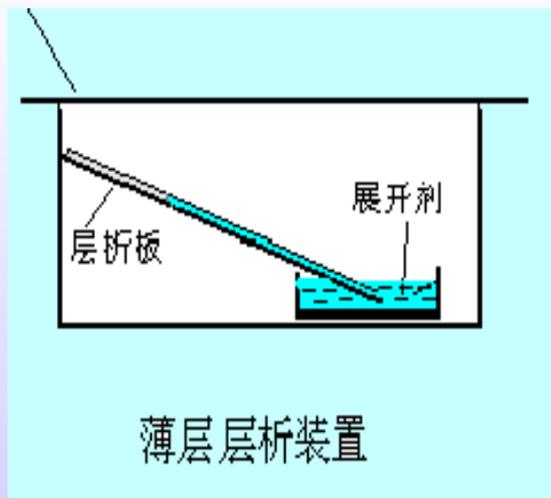
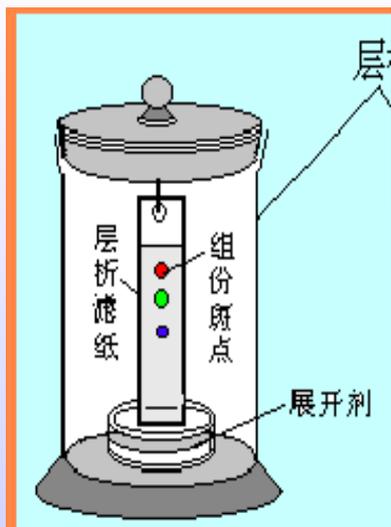


展开

展开的过程就是混合物分离的过程。

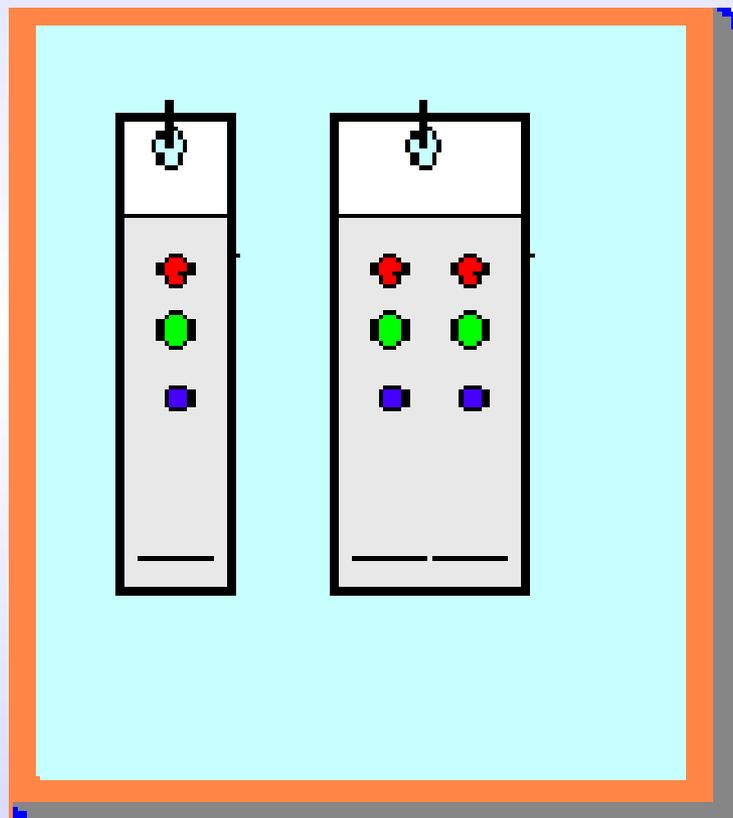
展开方式

- (1) 近似水平法；
- (2) 上行法；
- (3) 多次展开法
- (4) 双向展开法



显色（斑点定位）

- 1. 直接观察：有色斑点
- 2. 有些组份在紫外光照射下产生荧光，可在紫外灯下用铅笔将组份斑点描绘出来。
- 3. 化学显色：常用的方法有喷洒显色剂、碘蒸气熏或氨水熏等



记录



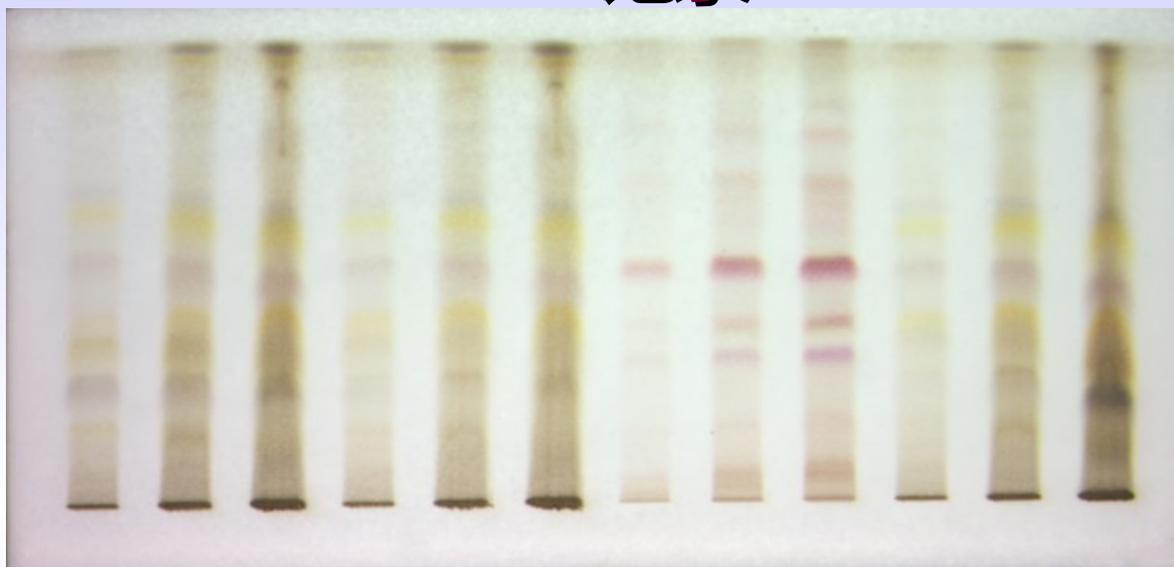
展开剂：氯仿 - 甲
醇 - 水 30 : 10 :
1

固定相：硅胶 G 预
制板

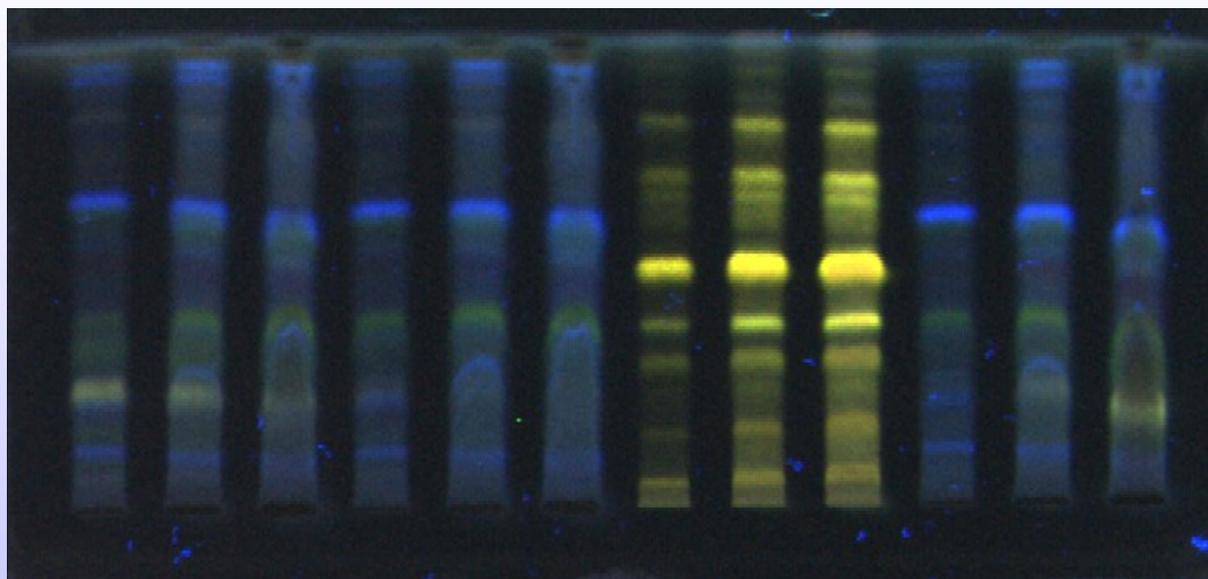
显色剂：2% 对二甲
氨基苯甲醛的 40%
硫酸溶液

样品：制剂及柴胡对
照药材

可见光



366nm





显色剂类型

通用型

硫酸乙醇溶液:对大多数有机物能显示出不同颜色

碘:对许多有机物可显色,如生物碱、氨基酸

0.05%荧光黄甲醇溶液:对芳香族与杂环化合物显色

茚三酮是氨基酸专用显色剂

专属型

三氯化铁-铁氰化钾是含酚羟基物质的显色剂

溴甲酚绿是酸性化合物的显色剂

显色方式

浸渍法:适用于软板

直接喷雾法:适用于硬板



定性与定量分析

❖ 定性

↪ 比移值

❖ 定量分析

↪ 目视法

↪ 斑点洗脱法

↪ 薄层扫描法

薄层色谱法的优缺点

❖ 优点

- ❧ 薄层色谱法简单、方便、及操作费用低
- ❧ 可以在一块薄板上同时展开多个试样。
- ❧ 采用方形薄层板还可以方便的进行二维展开，即按一般方法展开后，改变方向和展开剂再次展开，进一步改善分离效果。
- ❧ 试样一般不需要经过预处理即可分离。

❖ 缺点

- ❧ 分离效率较低，不适用挥发性试样分离。

(五)、应用

❖ 薄层色谱法在染料、农药、医药、有机酸碱类化合物、糖类化合物、氨基酸、蛋白质及中草药中有效成分的分离分析中经常被使用。也可以用于无机离子的分离。还经常作为高效液相色谱的一种预试方法。

二、纸色谱法

❖ (一) 基本原理

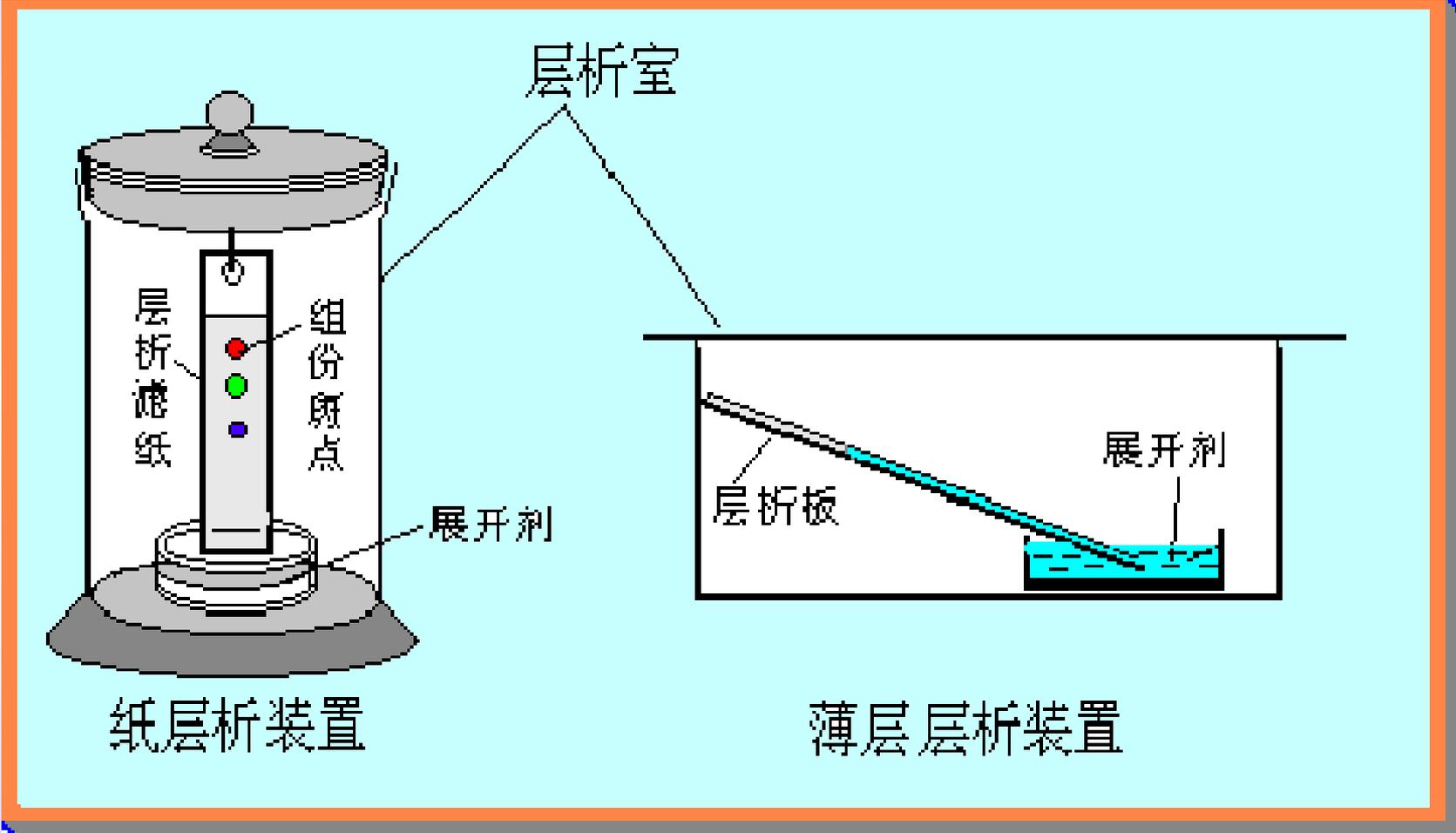
❖ 纸色谱法 - - 以滤纸作为载体的色谱法

❖ 固定相 - - 纸纤维上吸附的水

❖ 滤纸中的纤维素通常吸收 20%-25% 的水分，其中约 6% 的水分子通过氢键与纤维素上的羟基结合，在分离过程中不随有机溶剂流动，形成纸色谱中的固定相；

❖ 流动相 - - 与水不相溶的有机溶剂

❖ 机理 - - 属于分配色谱



主页

目录

上一页

下一页

后退

退出