

色谱技术基础

色谱法，又称层析法。根据其分离原理，有吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱与排阻色谱等方法。

吸附色谱是利用吸附剂对被分离物质的吸附能力不同，用溶剂或气体洗脱，以使组分分离。常用的吸附剂有氧化铝、硅胶、聚酰胺等有吸附活性的物质。

分配色谱是利用溶液中被分离物质在两相中分配系数不同，以使组分分离。其中一相为液体，涂布或使之键合在固体载体上，称固定相；另一相为液体或气体，称流动相。常用的载体有硅胶、硅藻土、硅镁型吸附剂与纤维素粉等。

离子交换色谱是利用被分离物质在离子交换树脂上的离子交换势不同而使组分分离。常用的有不同强度的阳、阴离子交换树脂，流动相一般为水或含有有机溶剂的缓冲液。

排阻色谱又称凝胶色谱或凝胶渗透色谱，是利用被分离物质分子量大小的不同和在填料上渗透程度的不同，以使组分分离。常用的填料有分子筛、葡聚糖凝胶、微孔聚合物、微孔硅胶或玻璃珠等，可根据载体和试样的性质，选用水或有机溶剂为流动相。

色谱法的分离方法，有柱色谱法、纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法等。色谱所用溶剂应与试样不起化学反应，并应用纯度较高的溶剂。色谱时的温度，除气相色谱法或另有规定外，系指在室温下操作。

分离后各成分的检出，应采用各单体中规定的方法。通常用柱色谱、纸色谱或薄层色谱分离有色物质时，可根据其色带进行区分，对有些无色物质，可在245-365nm的紫外灯下检视。纸色谱或薄层色谱也可喷显色剂使之显色。薄层色谱还可用加有荧光物质的薄层硅胶，采用荧光熄灭法检视。用纸色谱进行定量测定时，可将色谱斑点部分剪下或挖取，用溶剂溶出该成分，再用分光光度法或比

色法测定，也可用色谱扫描仪直接在纸或薄层板上测出，也可用色谱扫描仪直接以纸或薄层板上测出。柱色谱、气相色谱和高效液相色谱可用接于色谱柱出口处的各种检测器检测。柱色谱还可分部收集流出液后用适宜方法测定。

柱色谱法

所用色谱管为内径均匀、下端缩口的硬质玻璃管，下端用棉花或玻璃纤维塞住，管内装有吸附剂。色谱柱的大小，吸附剂的品种和用量，以及洗脱时的流速，均按各单体中的规定。吸附剂的颗粒应尽可能保持大小均匀，以保证良好的分离效果，除另有规定外通常多采用直径为 0.07-0.15mm 的颗粒。吸附剂的活性或吸附力对分离效果有影响，应予注意。

吸附剂的填装 干法：将吸附剂一次加入色谱管，振动管壁使其均匀下沉，然后沿管壁缓缓加入开始层析时使用的流动相，或将色谱管下端出口加活塞，加入适量的流动相，旋开活使流动相缓缓滴出，然后自管顶缓缓加入吸附剂，使其均匀地润湿下沉，在管内形成松紧适度的吸附层。操作过程中应保持有充分的流动相留在吸附层的上面。湿法：将吸附剂与流动相混合，搅拌以除去空气泡，徐徐倾入色谱管中，然后再加入流动相，将附着于管壁的吸附剂洗下，使色谱柱表面平整。

俟填装吸附剂所用流动相从色谱柱自然流下，液面将柱表面相平时，即加试样溶液。

试样的加入 除另有规定外，将试样溶于层析时使用的流动相中，再沿色谱管壁缓缓加入。注意勿使吸附剂翻起。或将试样溶于适当的溶剂中。与少量吸附剂混合，再使溶剂挥发去尽后使呈松散状；将混有试样的吸附剂加在已制备好的色谱柱上面。如试样在常用溶剂中不溶解，可将试样与适量的吸附剂在乳钵中研磨混合后加入。

洗脱 除另有规定外，通常按流动相洗脱能力大小，递增变换流动相的品种和比例，分别分部收集流出液，至流出液中所含成分显著减少或不再含有时，再改变流动相的品种和比例。操作过程中应保持有充分的流动相留在吸附层的上面。

纸色谱法

以纸为载体，用单一溶剂或混合溶剂进行分配。亦即以纸上所含水分或其他物质为固定相，用流动相进行展开的分配色谱法。

所用滤纸应质地均匀平整，具有一定机械强度，必须不含会影响色谱效果的杂质，也不应与所用显色剂起作用，以免影响分离和鉴别效果，必要时可作特殊处理后再用。

试样经层析后可用比移值（ R_f ）表示各组成成分的位置（比移值=原点中心至色谱斑点中心的距离与原点中心至流动相前沿的距离之比），由于影响比移值的因素较多，因此一般采用在相同实验条件下对照物质对比以确定其异同。作为单体鉴别时，试样所显主色谱斑点的颜色（或荧光）与供置，应与对照（标准）样所显主色的谱斑点或供试品-对照品（1：1）混合所显的主色谱斑点相同。作为质量指标（纯度）检查时，可取一定量的试样，经展开后，按各单体的规定，检视其所显杂质色谱斑点的个数或呈色（或荧光）的强度。作为含量测定时，可将色谱斑点剪下洗脱后，再用适宜的方法测定，也可用色谱扫描仪测定。

1、下行法 所用色谱缸一般为圆形或长方形玻璃缸，缸上有磨口玻璃盖，应能密闭，盖上有孔，可插入分液漏斗，以加入流动相。在近缸顶端有一用支架架起的玻璃槽作为流动相的容器，槽内有一玻璃棒，用以支持色谱滤纸使其自然下垂，避免流动相沿滤纸与溶剂槽之间发生虹吸现象。

取适当的色谱滤纸按纤维长丝方向切成适当大小的纸条，离纸条上端适当的距离（使色谱纸上端能足够浸入溶剂槽内的流动相中，并使点样基线能在溶剂槽侧的

玻璃支持棒下数厘米处)用铅笔划一点样基线,必要时色谱纸下端可切成锯齿形,以便于流动相滴下。

将试样溶于适当的溶剂中,制成一定浓度的溶液。用微量吸管或微量注射器吸取溶液,点于点样基线上,溶液宜分次点加,每次点加后,俟其自然干燥、低温烘干或经温热气流吹干。样点直径一般不超过 0.5cm,样点通常应为圆形。

将点样后的色谱滤纸上端放在溶剂槽内,并用玻璃棒压住,使色谱纸通过槽侧玻璃支持棒自然下垂,点样基线在支持棒下数厘米处。色谱开始前,色谱缸内用各单体中所规定的溶剂的蒸气饱和,一般可在色谱缸底部放一装有流动相的平底皿,或将浸有流动相的滤纸条附着在色谱缸的内壁上,放置一定时间,俟溶剂挥发使缸内充满饱和蒸气。然后添加流动相,使浸没溶剂槽内滤纸,流动相即经毛细管作用沿滤纸移动进行展开至规定距离后,取出滤纸,标明流动相前沿位置,俟流动相挥散后按规定方法检出色谱斑点。

2、上行法 色谱缸基本和下行法相似,唯除去溶剂槽和支架,并在色谱缸盖上的孔中加塞,塞中插入玻璃悬钩,以便将点样后的色谱滤纸挂在钩上。色谱滤纸一般长约 25cm,宽度则视需要而定。必要时可将色谱滤纸卷成筒形。点样基线距底边约 2.5cm,点样方法与下行法相同。色谱缸内加入适量流动相,放置,俟流动相蒸气饱和后,再下降悬钩,使色谱滤纸浸入流动相约 0.5cm,流动相即经毛细管作用沿色谱滤纸上升,除另有规定外,一般展开至 15cm 后,取出晾干,按规定方法检视。

色谱可以向一个方向进行,即单向色谱;也可进行双向色谱,即先向一个方向展开,取出,俟流动相完全挥发后,将滤纸转 90°,再用原流动相或另一种流动相进行展。亦可多次展开,连续展或径向色谱等。

薄层色谱法

按各单体所规定的载体，放入适当容器，加入适量水以配成悬浮液，在厚度均匀一致的 50×200mm 或 200×200mm 平滑玻璃板上将此悬浮液均布成 0.25mm 的厚度，风干后一般在 110 度下干燥 0.5-1h（或按单体规定）。

以离薄层板一端约 25mm 的位置作为点样基线，用微量吸管按规定量吸取试样液和对照（标准）液，点于基线上，点与点之间的距离在 10mm 以上，液点的直径约 3mm，风干后，基线一端向下，将薄层板放入展开溶剂，溶剂层深 10mm，并预经开展溶剂的蒸汽饱和。在展开溶剂从基线上升至规定距离（一般为 15cm）后，取出薄层板，风干，然后按规定的方法，对斑点的位置和颜色进行检查。

气相色谱法

气相色谱法是在以适当的固定相做成的柱管内，利用气体（载气）作为移动相，使试样（气体、液体或固体）在气体状态下展开，在色谱柱内分离后，各种成分先后进入检测器，用记录仪记录色谱谱图。

在对装置进行调试后，按各单体的规定条件调整柱管、检测器、温度和载气流量。进样口温度一般应高于柱温 30-50 度。如用火焰电离检测器，其温度应等于或高于柱温，但不得低于 100 度，以免水汽凝结。色谱上分析成分的峰的位置，以滞留时间（从注入试样液到出现成分最高峰的时间）和滞留容量（滞留时间×载气流量）来表示。这些在一定条件下，就能反应出物质所具有特殊值，并据此确定试样成分。

根据色谱上出现的物质成分的峰面积或峰高进行定量。峰面积可用面积测定仪测定，按半宽度法求得（即以峰 1/2 处的峰宽×峰高求得）。峰高的测定方法是从峰高的顶点向记录纸横座标准垂线，找出此垂线与峰的两下端联结线的交点，即以此交点至峰顶点的距离长度为峰高。

定量方法可分以下三种：

1、内标准法 取标准被测成分，按依次增加或减少的已知阶段量，各自分别加入各单体所规定的定量内标准物质中，调制标准溶液。分别取此标准液的一定量注入色谱柱，根据色谱图取标准被测成分的峰面积和峰高和内标物质的峰面积和峰高的比例为纵坐标，取标准被测成分量和内标物质量之比，或标准被测成分量为横坐标，制成标准曲线。

然后按单体中所规定的方法调制试样液。在调制试样液时，预先加入与调制标准液时等量的内标物质。然后按制作标准曲线时的同样条件下得出的色谱，求出被测成分的峰面积或峰高和内标物质的峰积或峰高之比，再按标准曲线求出被测成分的含量。

所用的内标物质，应采用其峰面积的位置与被测成分的峰的位置尽可能接近并与被测成分以外的峰位置完全分离的稳定的物质。

2、绝对标准曲线法 取标准被测成分按依次增加或减少阶段法，各自调制成标准液，注入一定量后，按色谱图取标准被测成分的峰面积或峰高为纵坐标，而以标准被测成分的含量为横坐标，制成标准曲线。然后按单体中所规定的方法制备试样液。取试样液按制标准曲线时相同的条件作出色谱，求出被测成分的峰面积和峰高，再按标准曲线求出被测成分的含量。

3、峰面积百分率法 以色谱中所得各种成分的峰面积的总和为 100，按各成分的峰面积总和之比，求出各成分的组成比率。

气液色谱法

这时所指的气液色谱法，主要用于各种香料物质的分析，基本条件和参数主要依照美国精油协会（EOA）于 1979 年所建议的方法。其基本原理、操作、标准状态等均与上述气相色谱法相同。

1、柱用 304 号合金所制不锈钢管，长 3m，内径 2.16-2.57mm，外径 3.18mm。
底物：极性柱为聚乙二醇 20M (Carbowax 20M) ,分子量约 2 万；非极性柱为气相色谱级甲基硅氧烷 (SE-30)，或二甲基硅氧烷 (OV-1 或 OV-101)。底物浓度：重量的 10%。固体载体：10 目或 20 目熔融煅烧过的硅藻土，经硅烷化和酸洗后，其自由倾落密度为 0.2g/cm³，最小 120 目，最大 80 目。装填密度每 cm³ 应大于 0.24g。

2、载气 氮。最低流量为每分钟 25-50ml。

分析状态

极性柱：起始温度，最低 75 度；最终温度，最高 225 度。升温速度，每分钟 2-8 度。

非极性柱：起始温度，最低 75 度；最终温度，不超过 275 度；升温速度，每分钟 2-8 度。

进样温度：225-250 度。试样量：0.1-1 μ l。

检测器：用热导池。检测器的操作条件应维持恒定。