



药品



第十三章

液相色谱法



目录



第一节 基础知识



第二节 柱色谱法



第三节 薄层色谱法



第四节 纸色谱法

学习目标

- ☑ **掌握** 薄层色谱法的基本原理、吸附剂和展开剂的选择、具体操作方法和定性定量分析
- ☑ **熟悉** 色谱法的分类和基本原理、柱色谱法及其应用、纸色谱法的原理
- ☑ **了解** 色谱法的产生与发展、纸色谱法的操作方法及应用



第一节

基础知识





1. 色谱法的产生与发展

色谱法的创始人是俄国植物学家茨维特。

1931年德国库恩等人将茨维特的实验方法应用于叶红素和叶黄素的研究，被授予诺贝尔化学奖。20世纪30~40年代相继出现了薄层色谱法和纸色谱法。

1952年马丁和詹姆斯建立了以气体作为流动相的气相色谱法，奠定了现代色谱法的基础。1956年范第姆特提出了速率理论，1958年高莱开创了毛细管柱气相色谱法。至20世纪60年代末，气相色谱法达到鼎盛时期。

20世纪60年代末出现了高效液相色谱法（HPLC），HPLC为难挥发、热不稳定的高分子试样的分析提供了有力手段。

20世纪80年代出现了超临界流体色谱法和毛细管电泳技术。

20世纪90年代，出现同时集合HPLC和毛细管电泳的优点的毛细管电色谱。



2. 色谱法的分类

(1) 按流动相与固定相的物态分类

气相色谱法

液相色谱法

超临界流体色谱法

(2) 按操作形式分类

柱色谱法

平面色谱法

(3) 按色谱过程的分离机制分类

吸附色谱法

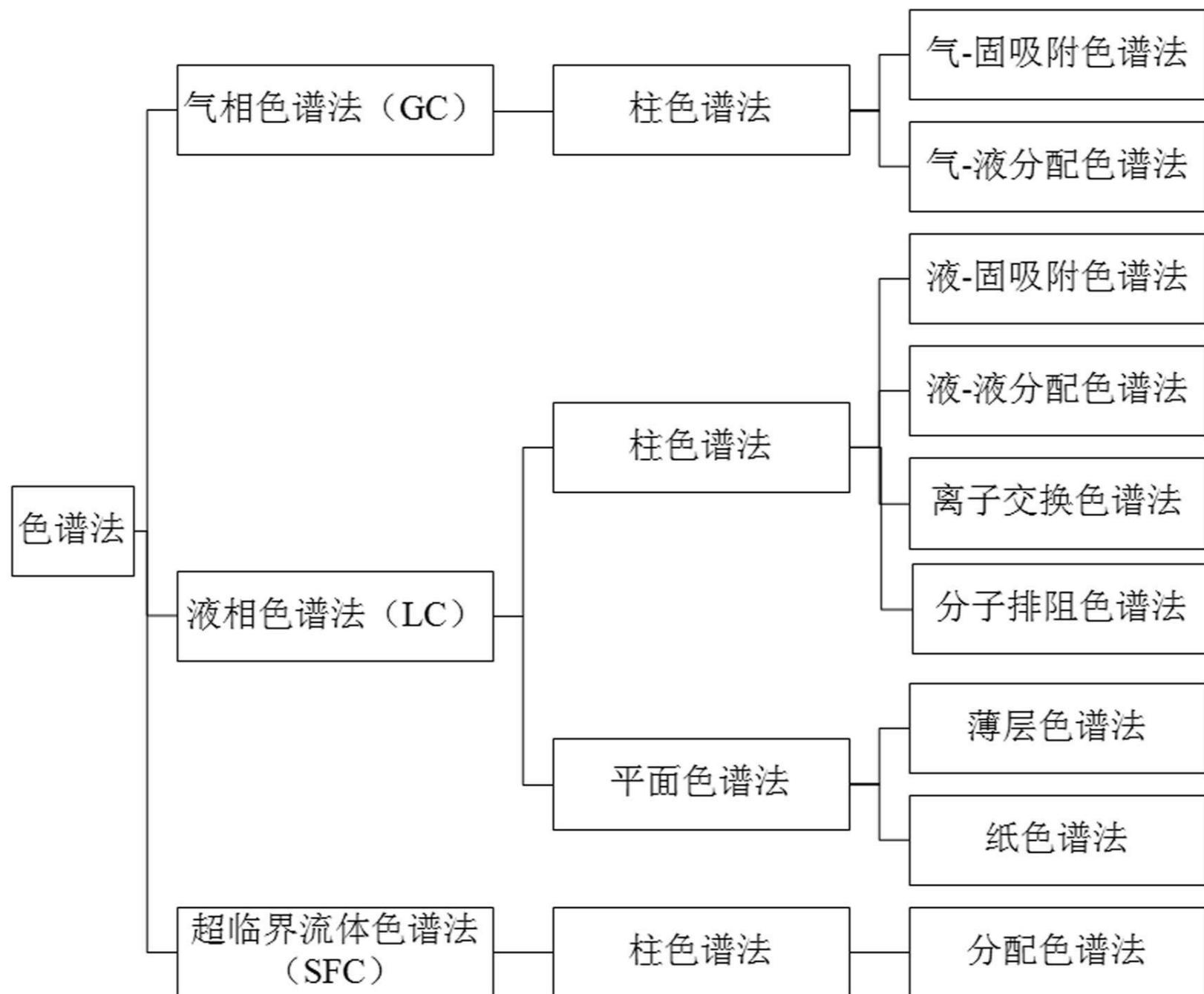
分配色谱法

离子交换色谱法

分子排阻色谱法



色谱法的各种分类方法并非是绝对的、孤立的，而是相互渗透、兼容的。

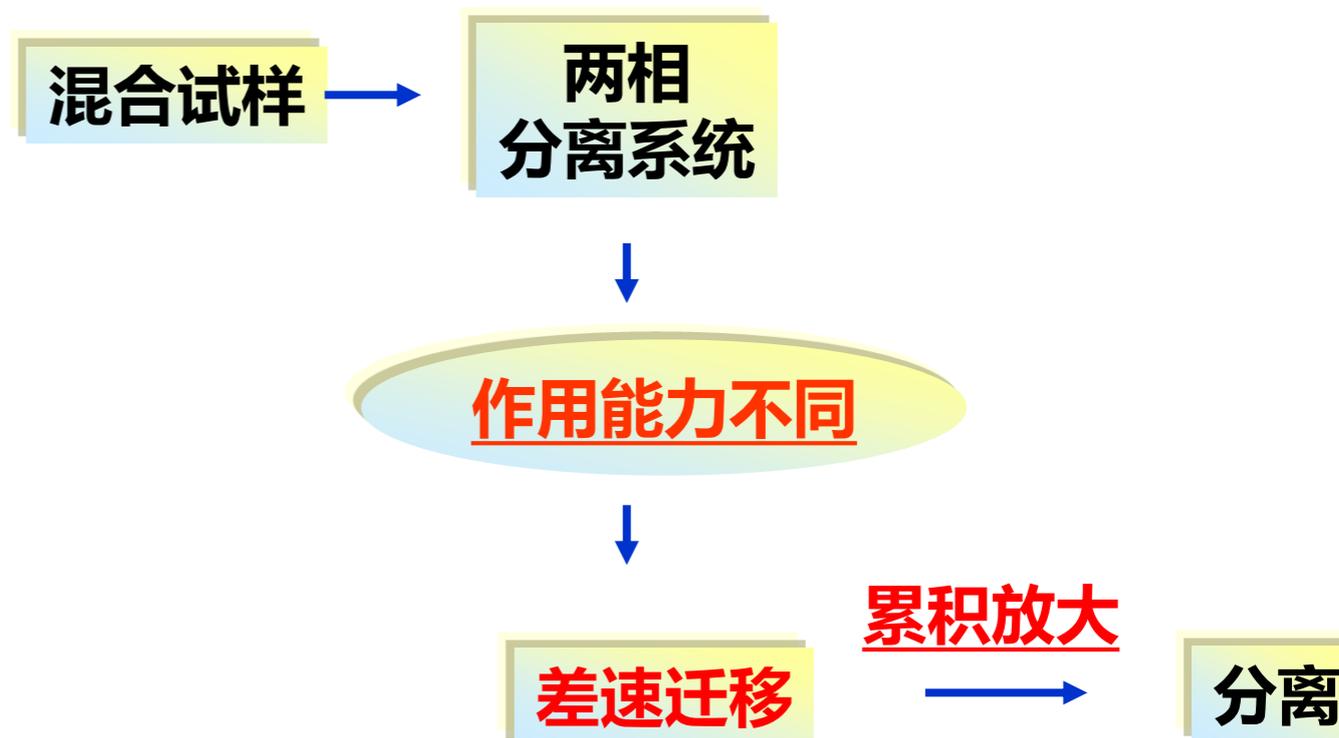
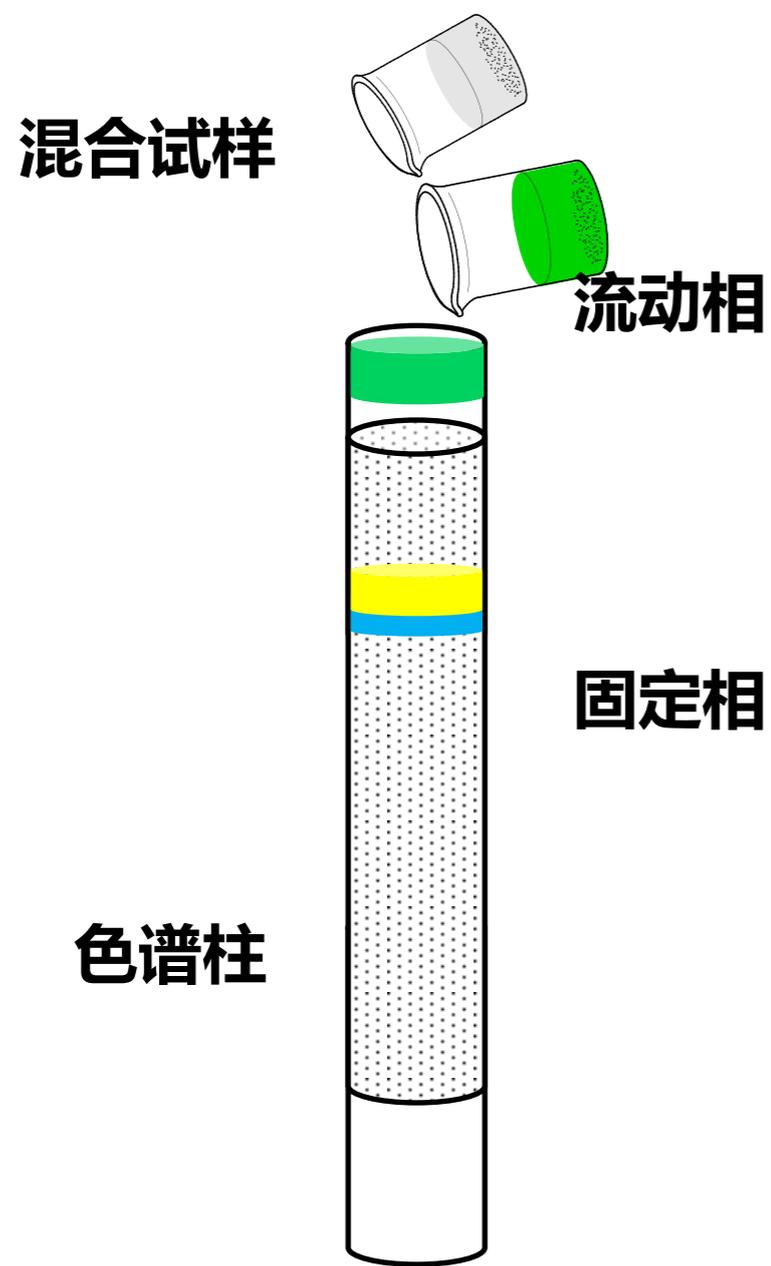


● 色谱法分类示意图



3. 色谱法的基本原理

(1) 色谱过程





3. 色谱法的基本原理

(2) 分配系数和容量因子

① 分配系数 (K)

$$\text{分配系数 } (K) = \frac{\text{组分在固定相中的浓度 } (c_s)}{\text{组分在流动相中的浓度 } (c_m)}$$

② 容量因子 (k)

$$\text{容量因子 } (k) = \frac{\text{组分在固定相中的质量 } (m_s)}{\text{组分在流动相中的质量 } (m_m)}$$

③ 分配系数 (K) 与容量因子 (k) 的关系

$$k = \frac{m_s}{m_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$



3. 色谱法的基本原理

(2) 分配系数和容量因子

分配系数（或容量因子）越大，则组分在固定相中的浓度（或质量）越大，在固定相中的停留时间越长，随流动相迁移的速度就越慢，将后从色谱柱中流出。

混合物中各组分的 K （或 k ）不相等是色谱分离的前提，各组分之间的分配系数相差越大，越容易被分离。

(3) 色谱过程的分离机制

① 吸附色谱法：利用吸附剂对不同组分吸附能力的差异实现物质分离的方法。

按照流动相可为液体和气体，又可分为气-固吸附色谱法和液-固吸附色谱法。

组分的吸附平衡常数 K 越大，越易被吸附，保留时间越长，迁移速度越慢，后流出色谱柱。



3. 色谱法的基本原理

(3) 色谱过程的分离机制

②分配色谱法：利用不同组分在固定相和流动相中的**溶解度差异**，即在两相之间的分配系数 K 不同而实现物质分离的方法。

固定相：固定液

流动相可为液体或气体，又可分为液-液分配色谱法和气-液分配色谱法。

正相分配色谱法：固定相的极性 $>$ 流动相的极性

反相分配色谱法：固定相的极性 $<$ 流动相的极性

在正相色谱中，极性强的组分在色谱柱中的保留时间较长，后流出色谱柱。

在反相色谱中，极性强的组分先出柱，极性弱的组分后出柱。



3. 色谱法的基本原理

(3) 色谱过程的分离机制

③离子交换色谱法：利用不同组分离子对离子交换剂的**离子交换能力的差异**而实现物质分离的方法。

交换能力强的离子，迁移速度慢，保留时间越长，后流出色谱柱。

④分子排阻色谱法：利用多孔性凝胶对不同大小分子的排阻作用进行物质分离的方法。

凝胶色谱法的分离取决于**凝胶颗粒的孔径大小和被分离组分分子的大小**，与流动相的性质无关。

各组分按大分子、中等大小分子、小分子的先后顺序流出色谱柱。



第二节

柱色谱法





1.液-固吸附柱色谱法

(1) **固定相**：硅胶、氧化铝、聚酰胺、大孔吸附树脂和活性炭等。

①硅胶 ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)：硅醇基是硅胶的吸附活性中心，通过活化与脱活化可控制硅胶的活性。

吸附剂的吸附能力常用活性级数表示，吸附活性的强弱通常区分为I~V级。

硅胶的活性与其含水量有关，吸附剂含水量越大，活性级数越大，但活性越低，吸附能力越弱。

②氧化铝：由氢氧化铝在400~500°C灼烧而成，吸附能力略高于硅胶。

氧化铝的活性也与其含水量密切相关，含水量的增加可使活性降低，称为脱活性。

氧化铝分为酸性、碱性和中性3种，其中中性氧化铝应用广泛。



1.液-固吸附柱色谱法

硅胶和氧化铝的活性与含水量的关系

| 硅胶含水量% | 氧化铝含水量% | 活性级数 | 活性 |
|--------|---------|------|----|
| 0 | 0 | I | 高 |
| 5 | 3 | II | ↓ |
| 15 | 6 | III | |
| 25 | 10 | IV | ↓ |
| 38 | 15 | V | |



1.液-固吸附柱色谱法

(2) 流动相：有机溶剂。

洗脱能力主要由有机溶剂的极性决定，极性较强的流动相占据吸附中心的能力强，易将组分分子从吸附剂的活性中心上置换下来，洗脱能力强。

常用溶剂的极性由小到大的顺序为石油醚 < 环己烷 < 四氯化碳 < 苯 < 甲苯 < 乙醚 < 三氯甲烷 < 乙酸乙酯 < 正丁醇 < 丙酮 < 乙醇 < 甲醇 < 水。

(3) 色谱条件的选择：

被测物质的结构与性质；吸附剂的选择；流动相的选择。

一般原则： 分离极性较强的物质，一般选用吸附活性小的吸附剂和极性较强的洗脱液；分离极性弱的物质，一般选用吸附活性大的吸附剂和极性较弱的洗脱液。



2.液-液分配柱色谱法

(1) **固定相**: 由**惰性载体和固定液**组成。

载体在色谱中仅起到负载或者支撑固定液的作用。常用载体有硅胶、多孔硅藻土、纤维素等。

反相分配柱色谱常以液体石蜡等**非极性或弱极性溶剂作固定液**。

正相分配柱色谱常用**强极性溶剂作固定液**，如水、甲醇、甲酰胺、稀酸等。

(2) **流动相**: 流动相与固定相的极性差别很大，两者不互溶。

正相分配柱色谱常用**极性弱于固定相**的醇类、石油醚类、酮类、酯类、卤代烃及苯或其混合物。

反相分配柱色谱常用水、甲醇等**极性溶剂**。



3.离子交换柱色谱法

(1) **固定相**：阳离子交换树脂、阴离子交换树脂。

交联度：指离子交换树脂中交联剂的含量，通常以重量百分比表示。交联度用于衡量离子交换树脂的**选择性**。

交换容量：指实验条件下，每克干树脂真正参加交换的活性基团数目。交换容量用于衡量离子交换树脂的**交换能力**。

(2) **流动相**：以水为溶剂的缓冲溶液，可加入一些有机溶剂。

4.分子排阻柱色谱法

(1) **固定相**：多孔性凝胶，常用葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。

(2) **流动相**：水溶性试样常选择水溶液为流动相，而非水溶性试样选择四氢呋喃、三氯甲烷、甲苯等有机溶剂为流动相。



5. 柱色谱法的应用

(1) 液-固吸附柱色谱法的应用

硅胶：可用于酸性和中性化合物的分离。

氧化铝：中性氧化铝应用最广泛，可用于酸性、碱性、中性化合物的分离。

聚酰胺：用于分离酚类、酸类、硝基类、醌类等化合物的分离。

大孔树脂：用于水溶性化合物的分离及纯化。

(2) **液-液分配柱色谱法的应用**：适用于各类化合物的分离，特别是亲水性物质。

(3) **离子交换柱色谱法的应用**：去离子水的制备，中草药成分的分离萃取，各种有机酸、氨基酸的分离制备，抗生素的纯制，干扰离子的去除等。

(4) **分子排阻柱色谱法的应用**：大分子物质的分离，广泛用于天然药物化学和生物化学的研究、水溶性高分子化合物如蛋白制剂等的分析。



第三节

薄层色谱法



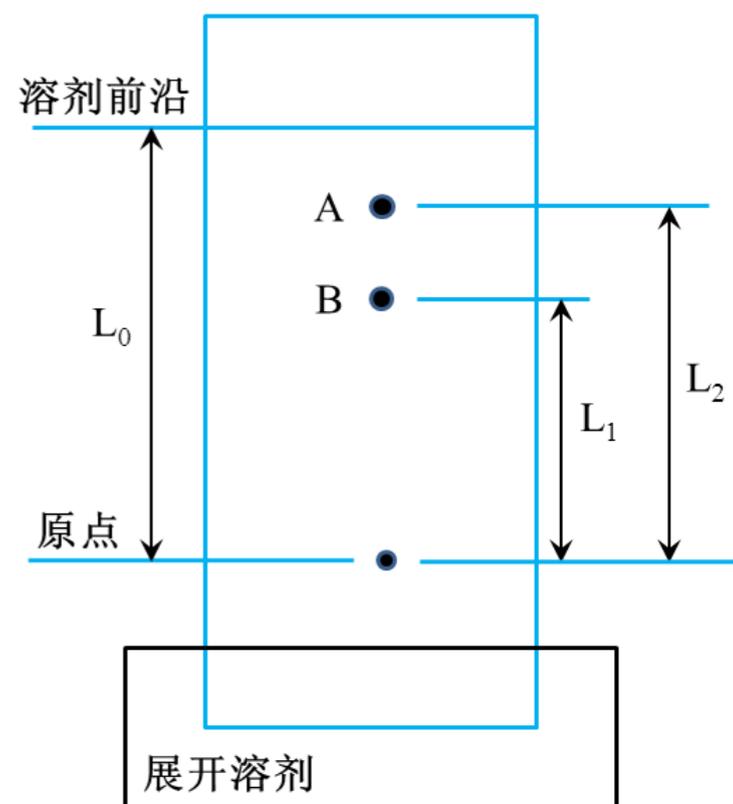


平面色谱法是组分在平面上展开的一种色谱分离方法，故分离过程又被称为展开，流动相被称为展开剂。平面色谱法主要包括薄层色谱法和纸色谱法。

1.基本原理

将含有A、B组分的混合溶液点在薄层板的一端，在密闭的容器中用适当的展开剂预饱和后展开，A、B两种组分首先被吸附剂吸附，然后被展开剂溶解而解吸并随展开剂向前移动，反复不断地进行吸附和解吸的过程。

若组分B的吸附系数大于组分A，吸附剂对组分B的吸附作用强，其在薄层板上的迁移速度较慢，组分A则迁移速度较快，A、B两种组分形成差速迁移，两者间的距离逐渐增大，经过一段时间后，在薄层板上形成互相分离的两个斑点。



● 薄层色谱展开示意图



2.比移值和相对比移值

(1) 比移值 (R_f)

$$R_f = \frac{\text{原点到斑点中心的距离}(L_i)}{\text{原点到溶剂前沿的距离}(L_0)}$$

色谱条件一定时， R_f 值可进行物质的定性鉴定。

R_f 值在0 ~ 1之间，可用范围是0.2 ~ 0.8，最佳范围是0.3 ~ 0.5。

(2) 相对比移值 (R_r)

$$R_r = \frac{\text{原点到待测组分斑点中心的距离}(L_x)}{\text{原点到参考物质斑点中心的距离}(L_s)}$$

用 R_r 定性时可选择试样中不存在的某种纯物质或试样中的某一已知组分作为对照标准物质。

R_r 与 R_f 的取值范围不同， R_r 可大于1，也可以小于1。



3. 吸附剂的选择

与吸附柱色谱法的吸附剂相似，颗粒更细，分离效率更高。

常用硅胶、氧化铝、硅藻土、微晶纤维素和聚酰胺等，以硅胶为吸附剂的薄层色谱应用最广。

4. 展开剂的选择

展开剂的选择遵循“相似相溶”原则。

通常先用单一溶剂展开，然后根据分离效果再改变展开剂的极性或采用混合溶剂展开。

在多元溶剂中，占比例较大的溶剂起到溶解、分离的作用，比例小的溶剂起调节溶剂极性、改善 R_f 的作用。



5.操作方法

薄层色谱法的操作可分为**制板、点样、展开、斑点定位**4个步骤。

(1) **制板**: **选取、涂铺、活化**。

(2) **点样**: **画基线、标记试样点、点样**。

(3) **展开**

①**预饱和**: 先进行预饱和, 避免边缘效应。

②**展开**: **单向展开、双向展开、多次展开**。

(4) **斑点定位**

①**物理方法**

②**化学方法**

常用的显色剂分**通用型和专属型**两种。

常见的显色方法有**蒸气显色法、浸渍显色法、加热显色法和喷雾显色法**。

6.定性定量分析

(1) 定性鉴别

①利用 R_f 值定性。

②利用 R_r 值定性：

组分的 R_r 值定性比 R_f 值更为可靠。

(2) 杂质检查

①杂质对照品比较法。

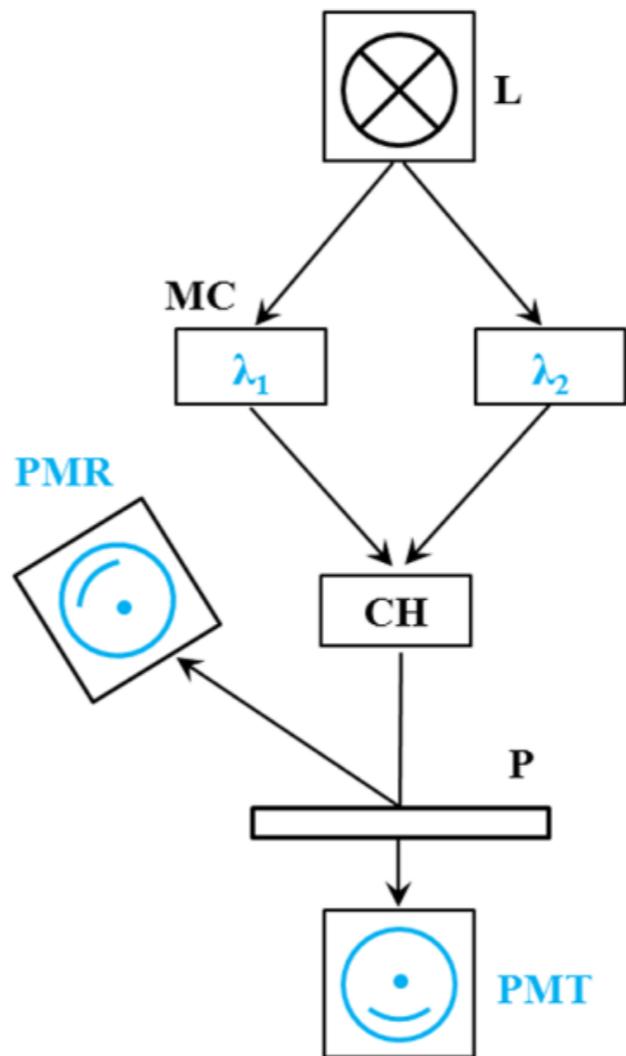
②主成分自身对照法。

(3) 定量分析

①目视比色法。

②洗脱法。

③薄层扫描法。



● 双波长双光束薄层色谱扫描仪的基本光路示意图



7.应用实例

应用于物质的分离与鉴定，也可用于小量物质的提纯和精制。在药学领域，可用于药品的纯度控制和杂质检查、中药的定性鉴定和天然药物有效成分的分离与测定。

例如：头孢拉定为广谱抗生素，可用于呼吸道、泌尿道、皮肤和软组织等的感染。

《中国药典》（2015年版）二部采用薄层色谱法对头孢拉定进行鉴别。具体操作：取本品与头孢拉定对照品适量，分别加水溶解并稀释制成每1ml中约含6mg的溶液，作为供试品溶液与对照品溶液。吸取上述两种溶液各5 μ l，分别点于同一硅胶G薄层板，经105 $^{\circ}$ C活化后，置5%（ml/ml）正十四烷的正己烷溶液中，展开至薄层板的顶部，晾干，以0.1mol/L枸橼酸溶液-0.2mol/L磷酸氢二钠溶液-丙酮（60：40：1.5）为展开剂，展开，取出，于105 $^{\circ}$ C加热5分钟，立即喷以用展开剂制成的0.1%茚三酮溶液，在105 $^{\circ}$ C加热15分钟后，检视。供试品溶液所显主斑点的位置和颜色应与对照品溶液所显主斑点的位置和颜色相同。



第四节

纸色谱法





1.基本原理

以纸为载体，固定相通常是滤纸上吸着的**水**，流动相是**含水的有机溶剂**。

纸色谱法一般为**正相分配色谱**，依据组分在两相间的分配系数不同而实现分离。

2.操作方法

- (1) **滤纸的选择。**
- (2) **点样：**画基线、标记试样点和点样。
- (3) **展开：**常用上行展开。
- (4) **斑点定位：**不能在高温下显色，也不能使用腐蚀性显色剂。

3.定性定量分析

- (1) **定性分析：** R_f 和 R_r 值。
 - (2) **定量分析：**用目视比色法进行半定量分析，定量分析常采用剪洗法。
-

小结

1. 色谱法按照两相分子的物态分类分为液相色谱法、气相色谱法；按照操作形式分类分为柱色谱法、平面色谱法；按色谱过程的分离机制分类分为吸附色谱法、分配色谱法、离子交换色谱法、分子排阻色谱法。
2. 色谱过程为不同组分与固定相间的作用强度不同而出现差速迁移，且差异被累积放大，最终实现分离。分配系数不相等是组分分离的前提。
3. 吸附色谱法依据吸附剂对不同组分吸附能力的差异实现分离；分配色谱法是依据被分离的组分在固定相和流动相间的溶解度不同实现分离；离子交换色谱法是利用被分离组分离子与离子交换树脂之间的离子交换能力的差异实现分离；分子排阻色谱法是利用被分离组分分子的大小和凝胶孔径的关系实现分离。

小结

4.柱色谱法可分为吸附柱色谱法、分配柱色谱法、离子交换柱色谱法、分子排阻色谱法。

吸附柱色谱法的固定相有硅胶、氧化铝、聚酰胺、大孔树脂等；流动相根据与组分“相似相溶”的原则选择。

分配柱色谱法的固定相由载体和固定液组成，正相分配色谱法常以强极性溶剂作为固定液，反相分配色谱法常以弱极性或者非极性溶剂作为固定液。正相分配色谱法的流动相常用极性小于固定液的醇类、石油醚类、酮类等，反相分配柱色谱的流动相常用水、甲醇等极性溶剂。

离子交换柱色谱法的固定相为离子交换树脂，流动相为以水为溶剂的缓冲溶液。

分子排阻色谱法的固定相为多孔凝胶，水溶性试样通常选择水溶液为流动相，非水溶性试样选择四氢呋喃、三氯甲烷、甲苯等有机溶剂。

小结

5. 薄层色谱法以吸附薄层色谱应用最为广泛，薄层色谱操作可分为制板、点样、展开、斑点定位4个步骤，常采用比吸附柱色谱法颗粒更细、更均匀的吸附剂，常采用混合展开剂展开，利用 R_f 或 R_r 值进行定性分析，定量分析方法有目视比色法、洗脱法和薄层扫描法。
6. 纸色谱法一般为正相分配色谱法，以纸纤维为载体，以水为固定相，以含水的有机溶剂为展开剂，可利用 R_f 值或 R_r 值定性；纸色谱的定量分析已经很少采用。



药品

第十三章 液相色谱法

THANKS

谢谢观看