

第 11 章 色谱分析法导论

教学时数：6 学时

教学要求：

1. 色谱法分类
2. 熟练掌握色谱分离方法的原理
3. 色谱法的流出曲线和有关术语
4. 熟悉塔板理论和速率理论的主要内容。能够利用塔板理论和速率理论方程判断影响色谱分离各种实验因素
5. 分离度

教学重点与难点：

1. 色谱法基本原理。色谱法的分类。色谱分离过程及常用术语。
2. 色谱分离效能指标。塔板理论与速率理论。理论塔板数(n)及有效理论塔板数(n_{eff})和塔板高度(H)及有效塔板高度(H_{eff})的计算
3. 分离度和影响分离度的重要色谱参数

11-1 概述

一. 色谱法的由来

1. 1906 年由俄国植物学家 Tswett 创立

1906 年，俄国植物学家 Tswett 发表了实验结果，他为了分离植物色素，将植物绿叶的石油醚提取液倒入装有碳酸钙粉末的玻璃管中，并用石油醚自上而下淋洗，由于不同的色素在碳酸钙颗粒表面的吸附力不同，随着淋洗的进行，不同色素向下移动的速度不同，形成一圈圈不同颜色的色带，使各色素成分得到了分离。他将这种分离方法

命名为色谱法 (chromatography)。在此后的 20 多年里, 几乎无人问津这一技术。到了 1931 年, Kuhn 等用同样的方法成功地分离了胡萝卜素和叶黄素, 从此, 色谱法开始为人们所重视, 此后, 相继出现了各种色谱方法。

固定相: 在色谱柱中一相固定不动, 可以是固体, 也可以是液体。

流动相: 是携带试样混合物流过此固定相的流体 (气体或液体)。

色谱柱: 各种材质和尺寸 (铜, 不锈钢, 玻璃; U 形, 螺旋形)

被分离组分: 不再仅局限于有色物质。

2. 色谱法

当流动相中携带的混合物经过固定相时, 就会与固定相相互作用。由于各组分在性质和结构上的差异, 与固定相发生相互作用的大小, 强弱的差异, 因此, 随着流动相的移动, 混合物在两相间经过反复多次的分配平衡, 使得各组分被固定相保留的时间不同, 从而按一定次序从固定相中流出。这种借再两相间分配原理而使混合物中各组分分离的技术, 称为色谱法。实质: 分离。

二. 分类

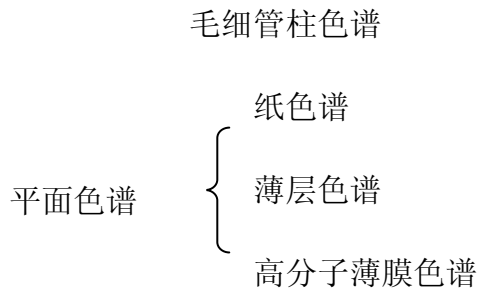
色谱法有多种类型, 从不同的角度可以有不同的分类法。

1. 按两相分子的聚集状态分

分类	流动相	固定相	类型
液相色谱	液体	固体	液-固色谱
	液体	液体	液-液色谱
气相色谱	气体	固体	气-固色谱
	气体	液体	气-液色谱

2. 按固定相的固定方式分类

柱色谱 { 填充柱色谱



3. 按分离机制分

吸附色谱法(利用吸附剂表面对不同组分的物理吸附性能的差异进行分离);

分配色谱法(利用不同组分在两相中有不同的分配来进行分离);

离子交换色谱法(利用离子交换原理);

排阻色谱法(利用多孔性物质对不同大小分子的排阻作用)等。

三. 色谱法的特点

1. 色谱法的优点

A: 分离效率高。几十种甚至上百种性质类似的化合物可在同一根色谱柱上得到分离，能解决许多其他分析方法无能为力的复杂样品分析。

B: 分析速度快。一般而言，色谱法可在几分钟至几十分钟的时间内完成一个复杂样品的分析。

C: 检测灵敏度高。随着信号处理和检测器制作技术的进步，不经过预浓缩可以直接检测 10^{-9} g 级的微量物质。如采用预浓缩技术，检测下限可以达到 10^{-12} g 数量级。

D: 样品用量少。一次分析通常只需数纳升至数微升的溶液样品。

E: 选择性好。通过选择合适的分离模式和检测方法，可以只分离或检测感兴趣的部分物质。

F: 多组分同时分析。在很短的时间内 (20min 左右)，可以实现几十种成分的同时分离

与定量。

G: 易于自动化。现在的色谱仪器已经可以实现从进样到数据处理的全自动化操作。

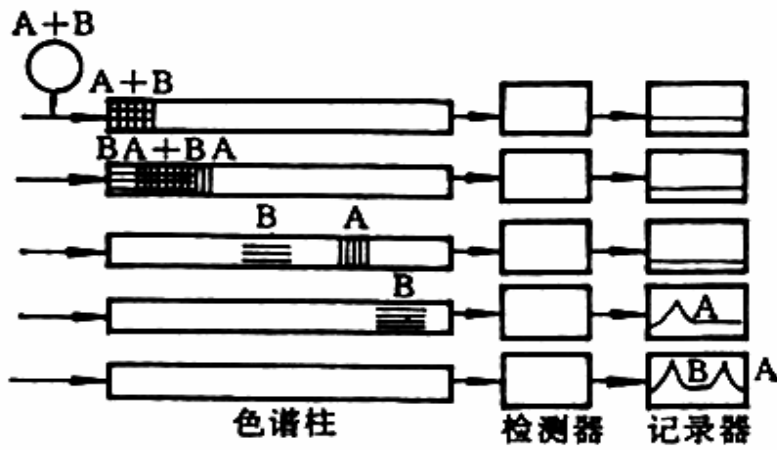
2. 色谱法的缺点

A: 定性能力较差。为克服这一缺点，已经发展起来了色谱法与其他多种具有定性能力的分析技术的联用。

B: 需要与其它分析方法联用

12-2 色谱分离原理

一. 色谱过程



色谱分离过程示意图

二. 色谱分离原理

色谱分离是基于试样中各组分在两相间平衡分配的差异；平衡分配可以用分配系数和容量因子来表征。

三. 色谱分离的特点

1. 不同组分通过色谱柱时的迁移速度不等

-----提供了分离的可能性。

2. 各组分沿柱子的扩散分布——峰宽

不利于不同组分的分离

11-3 色谱图及常用术语

一. 分配系数 (K) 和分配比

1. 分配系数 K

分配: 在色谱柱中, 由于组分与固定相和流动相分子间的相互作用, 它们既可以进入固定相, 也可返回流动相, 这个过程叫分配。

分配系数: 在一定温度和压力下, 组分在两相间分配达到平衡时的浓度 (单位: g/mL) 比, 称为分配系数, 用 K 表示, 即: $K = C_s / C_m$

式中: C_s 和 C_m 分别为组分在固定相和流动相中的浓度。

分配系数 K 的讨论:

- (1) K 值除了与温度、压力有关外, 还和组分的性质, 固定相和流动相的性质有关。
- (2) K 值的大小表明组分与固定相分子间作用力的大小, K 值大, 说明组分与固定相的亲合力大, 即组分在柱中滞留的时间长, 移动速度慢。组分在柱中移动速度与其分配系数成反比。
- (3) 不同组分分配系数的差异是实现色谱分离的基础。
- (4) 某组分的 $K = 0$ 时, 即不被固定相保留, 最先流出。

2. 容量因子 (k')

容量因子 (k'): 容量因子又称容量比或分配比, 是在一定温度和压力下, 组分在两相间分配达到平衡时的质量比。

$$k' = m_s / m_m$$

式中: m_s 和 m_m 组分在固定相中的质量和组分在流动相中的质量。

容量因子的讨论:

- (1) k' 除了与温度、压力有关外, 还与组分的性质、固定相的性质和流动相的性质及两相的体积比值有关。

(2) 衡量色谱柱对被分离组分保留能力的重要参数，数值越大，该组分的保留时间越长。

(3) 容量因子可以由实验测得。

3. 容量因子与分配系数的关系

$$K = k' \beta,$$

其中， β 为相比； $\beta = V_m / V_s$

上式中 V_m 为流动相体积，即柱内固定相颗粒间的空隙体积； V_s 为固定相体积；

对不同类型色谱柱， V_s 的含义不同：

气-液色谱柱： V_s 为固定液体积；

气-固色谱柱： V_s 为吸附剂表面容量。

二. 色谱图及常用基本术语

1. 色谱图：试样各组分经色谱柱分离后，进入检测器，检测器将各组分浓度（或质量）的变化转化为电压（或电流）信号，再由记录仪记录下来。所得的电信号强度随时间变化的曲线，称为流出曲线，也叫色谱图。

2. 基线：柱中仅有流动相通过时，检测器检测到的信号即为基线。稳定的基线应该是一条水平直线。

3. 色谱峰：当某组分从色谱柱流出时，检测器对该组分的响应信号随时间变化所形成的峰形曲线称为该组分的色谱峰。

4. 峰高(h)：从色谱峰顶点到基线之间的垂直距离。

5. 区域宽度：

用来衡量色谱峰宽度的参数，有三种表示方法：

(1) 峰底宽度 w_b ：色谱峰两侧拐点上的切线在基线上的截距。（拐点位于 $0.607h$ 处）

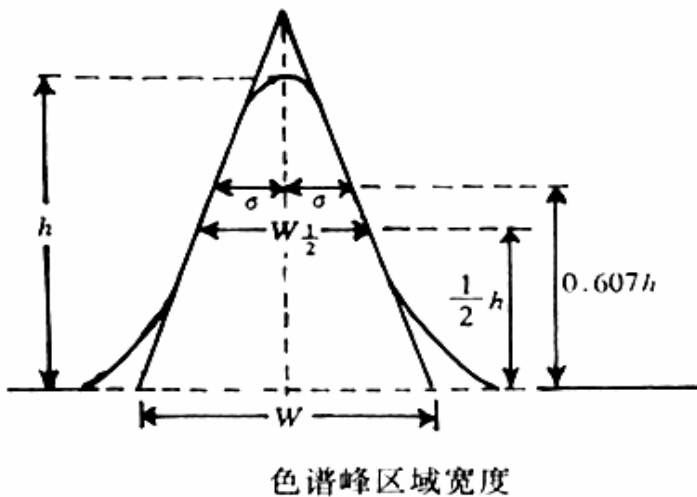
(2) 半峰宽 ($W_{1/2}$)：色谱峰高一半处的宽度

(3) 标准偏差 (σ)：即 0.607 倍峰高处色谱峰宽度的一半（或者拐点间距离的一半）。 $W_b = 4$

$$\sigma; W_{1/2} = 2.354 \sigma$$

(4) 峰面积：峰与基线延长线所包围的面积。

$$A = 1.065 h W_{1/2}$$



6. 保留值

(1) 保留时间 (t_R)：组分从进样开始到色谱峰最大值出现时所需要的时间。

注：某组分的保留时间就是它通过色谱柱所需要的时间。

(2) 死时间 (t_M)：不被固定相保留的组分，从进样到出现峰极大值所需要的时间。

注：对于同一试样所有组分死时间都相同。

$$t_M = L / u$$

其中 L 为柱长 (cm) ; u 为流动相平均线速度 (cm/s)

(3) 调整保留时间 $t_{R'}$ ：组分的保留时间与死时间之差值。

$$t_{R'} = t_R - t_M$$

注：(a) $t_{R'}$ 实际上就是组分在固定相中滞留的总时间。

(b) t_M 是组分在柱内流动相所占的空间内运行所消耗的时间。

(4) 保留体积 V_R ：从进样开始到色谱峰最大值出现时所通过的流动相体积，单位为 mL。

计算公式为： $V_R = \bar{F}_c t_R$

式中 \bar{F}_c 为流动相平均体积流速（mL/min）； t_R 为保留时间。

(5) 死体积 V_M ：不被保留的组分通过色谱柱所消耗的流动相体积，单位为mL。计算公式为： $V_M = \bar{F}_c t_M$

(6) 调整保留体积 $V_{R'}$ ：保留体积减去死体积，单位为mL。计算公式为：

$$V_{R'} = V_R - V_M$$

总结：色谱流出曲线的意义

由色谱流出曲线可以实现以下目的：

- (1) 根据色谱峰的数目，可以判断试样中所含组分的最少个数。
- (2) 根据色谱峰的保留值进行定性分析。
- (3) 依据色谱峰的面积或峰高进行定量分析。
- (4) 依据色谱峰的保留值以及峰宽评价色谱柱的分离效能。

三. 保留值与平衡常数（K）的关系

当某一组分的色谱峰最高点出现时，说明该组分恰好有一半的量洗脱在 V_R 的流动相中刚好流出柱子，其余一半仍留在柱内，即流在柱内的流动相（体积为 V_m ）与固定相（体积为 V_s ）中。根据物料平衡原理得：

$$V_R C_m = V_m C_m + V_s C_s$$

整理得到： $V_R = V_m + C_s V_s / C_m$

由于 $K = C_s / C_m$ ，且 $V_m \approx V_M$

所以： $V_R = V_m + K V_s$ -----色谱过程的基本方程

由于 $V_{R'} = V_R - V_m$

所以： $V_{R'} = K V_s$

四. 保留值与容量因子的关系

由式: $k' = K/\beta = (K V_s)/V_m = (K V_s)/V_M$

$$V_R = V_m + K V_s$$

可得: $k' = V_R'/V_M = t_{R'}/t_M$

$k' = t_{R'}/t_M$ 的讨论:

- (1) 提供了从色谱图上直接求算 k' 的方法。
- (2) 该式表示溶质分子花费在固定相中的时间比在流动相中长多少倍。

从上式还可以得到下面的两个关系式:

$$V_R = V_M(1 + k')$$

$$t_R = t_M(1 + k') = t_M(1 + K V_s / V_m)$$

五. 相对保留值

相对保留值, 也称选择性因子, 其定义为:

$$\alpha = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M) = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

习惯上, $t'_{R1} < t'_{R2}$, 所以 $\alpha > 1$ 。

又由于 $K' = \frac{t'_R}{t_M}$; $k' = (K V_s) / V_M$

所以: $\alpha = k'_2 / k'_1 = K_2 / K_1$

注: (1) α 是一个热力学参数。

(2) α 是柱温、组分的性质、固定相和流动相性质的函数, 与其它实验条件无关。

(3) α 绝对不是两个组分保留时间或保留体积之比。

(4) $\alpha = 1$, 分离不能实现。

13-4 色谱法基本理论

一. 塔板理论

塔板理论把气液色谱柱当作一个精馏塔，沿用精馏塔中塔板的概念描述溶质在两相间的分配行为，并引入理论塔板数 n 和理论塔板高度 H 作为衡量柱效的指标。

(一) 塔板理论的四个基本假设

1. 在柱内 1 个理论塔板高度内组分分配瞬间达到平衡。
2. 流动相进入色谱柱非连续而是脉动式的（间歇式的），每次进流动相为一个塔板体积。
3. 样品和流动相均加在第 0 号塔板上，且忽略样品沿柱方向上的纵向扩散。
4. 分配系数在各塔板上是常数。

(二) 色谱峰的对称分布

流出曲线上的浓度 C 与时间 t 的关系式可由下式表示：

$$C = \frac{C_0}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t-t_R)^2}{2\sigma^2}}$$

式中 C_0 为进样浓度， t_R 为保留时间， C 为时间 t 时在柱出口的浓度，此式称为流出曲线的方程式。

$$\text{当 } t = t_R \text{ 时} \quad \Rightarrow C_{\max} = \frac{C_0}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} = h$$

$$\Rightarrow \text{流出曲线方程} \quad C = C_{\max} \cdot e^{-\frac{(t-t_R)^2}{2\sigma^2}}$$

讨论：

$$t = t_R \Rightarrow C = C_{\max}$$

$$t < t_R \text{ 或 } t > t_R \Rightarrow C < C_{\max}$$

$$\sigma \downarrow \Rightarrow \text{峰越尖锐}$$

(三) 理论板数和理论塔板高度的计算

理论塔板高度 H ——为使组分在柱内两相间达到一次分配平衡所需要的柱长。

理论塔板数 n ——组分流过色谱柱时，在两相间进行平衡分配的总次数。

$$n_{\text{理}} = \frac{L}{H_{\text{理}}} \quad \text{或} \quad H_{\text{理}} = L/n_{\text{理}}$$

$$n_{\text{理}} = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

讨论: $n_{\text{理}} \propto L$, $n_{\text{理}} \propto \frac{1}{H_{\text{理}}}$

L 一定, $H_{\text{理}} \downarrow \Rightarrow n_{\text{理}} \uparrow$, 柱效 \uparrow , 分离能力 \uparrow ;

$H_{\text{理}}$ 一定, $L \uparrow \Rightarrow n_{\text{理}} \uparrow$, 但柱压和分析时间 \uparrow

注: 计算 $n_{\text{理}}$ 与所用组分有关, 选用组分不同则 $n_{\text{理}}$ 不同。 $n_{\text{理}}$ 无量纲, 计算时上下单位必须一致。

按上式计算出来的 n 和 H 值有时并不能充分地反映色谱柱的分离效能, 因为采用 t_R 计算时, 没有扣除死时间 t_M , 所以常用有效塔板数 ($n_{\text{有效}}$) 来表示柱效。

组分在 t_M 时间内不参与柱内分配。需引入有效塔板数和有效塔板高度:

$$n_{\text{有效}} = 5.54 \left(\frac{t'_R}{W_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t'_R}{W_b} \right)^2$$

$$H_{\text{有效}} = \frac{L}{n_{\text{有效}}}$$

因为 $k' = t'_R / t_M \Rightarrow n_{\text{eff}} = n_{\text{理}} \left(\frac{k}{1+k} \right)^2$

讨论: $n_{\text{有效}}$ 和 $H_{\text{有效}}$ 扣除了死时间, 更能真实的反映柱效

$k' \uparrow$, n 有效 $\rightarrow n$ 理

总结:

1. 塔板理论的贡献: 从热力学角度, 解释了色谱流出曲线的形状和浓度极大点的位置, 提出了评价柱效高低的 n 和 H 的计算式。
2. 当色谱柱长度一定时, 塔板数 n 越大(塔板高度 H 越小), 被测组分在柱内被分配的
次数越多, 柱效能则越高, 即使分配系数只有微小的差别, 仍可获得好的分离效果。
所得色谱峰越窄。
3. 不同物质在同一色谱柱上的分配系数不同, 用有效塔板数和有效塔板高度作为衡量柱
效能的指标时, 应指明测定物质。

塔板理论存在问题:

1. 做出了四个与实际不相符的假设, 忽略了组分在两相中传质和扩散的动力学过程。
2. 只定性给出塔板高度的概念, 却无法解释板高的影响因素。
3. 排除了一个重要参数——流动相的线速度 u , 因而无法解释柱效与流速关系, 更无法
提出降低板高的途径。

二. 速率理论

1956 年荷兰学者范第姆特 (Van Deemter) 等提出了色谱过程的动力学理论, 他们吸收了塔板理论的概念, 并把影响塔板高度的动力学因素结合进去, 导出了塔板高度 H 与载气线速度 u 的关系:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

式中 A : 涡流扩散项; $\frac{B}{u}$: 纵向扩散项; Cu : 传质阻力项; H : 理论塔板高度; u : 流动相的平均线速度(cm/s)。

由上式可见:

◆ 减小 A 、 B 、 C 三项可降低 H ，提高柱效；

◆ 存在着最佳流速。

各项的意义：

1. A —涡流扩散项（又称多径项）

产生原因：载气携带样品进入色谱柱，遇到来自固定相颗粒的阻力→路径不同→涡流扩散

$$A = 2\lambda dp$$

dp ：固定相的平均颗粒直径； λ ：固定相的填充不均匀因子

影响因素：固体颗粒物越小，填充越均匀， A 项越小。

注：粒径的降低也有一定的限度，小粒径的填料会使操作压力急剧提高，而过高的压力会造成设备制造和操作上的困难。空心毛细管柱： $A=0$

2. 分子扩散项 $\frac{B}{u}$ （又称纵向扩散项）

产生原因：样品以“塞子”的形式存在于柱的很小一段空间中，在“塞子”前后（纵向）存在着浓度差而形成浓度梯度，而使运动着的分子产生纵向扩散。

纵向扩散系数： $B = 2 \gamma Dg$

γ ：弯曲因子，填充柱色谱， $\gamma < 1$ 。

Dg ：试样组分分子在气相中的扩散系数（ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ）

影响因素：

(1) $\frac{B}{u} \propto t_R$ ：保留时间越长，分子扩散项对色谱峰扩张的影响越显著；

(2) 分子扩散项与流速有关，流速↓，滞留时间↑，扩散↑；

(3) $B \propto Dg$ ；而 Dg 与组分的性质、载气的性质、柱温、柱压有关。相对分子质量大的组分，其 Dg 小； $Dg \propto (M_{\text{载气}})^{-1/2}$ ； $M_{\text{载气}} \uparrow$ ， B 值↓。 Dg 随柱温的升高而增高，随柱压增大而减小。

弯曲因子 γ : 它的物理意义可理解为: 由于固定相颗粒的存在, 使分子不能自由扩散, 从而使扩散程度降低。对于空心毛细管柱: $\gamma=1$; 填充柱 $\gamma<1$ 。

注: γ 与前述 λ 虽同样是与填充物有关的因素, 但两者是有区别的。 γ 是指因填充物的存在, 造成扩散阻碍而引入的校正系数; λ 则是因填充物的不均匀性造成路径的不同。可以设想, 填充物填充得很均匀时, λ 可显著降低, 而扩散阻碍并不会显著减小。

总结: 为降低分子扩散程度, 采用分子量较大的载气, 采用较高的载气线速度, 控制较低的柱温。

3. 传质阻力项 $C_{\bar{u}}$

传质阻力系数包括气相传质阻力 C_g 和液相传质阻力 C_L 即:

$$C = (C_g + C_L)$$

(1) 气相传质:

气相传质过程是指组分在气相和气液界面上的传质。由于传质阻力的存在, 使得组分在两相界面上不能瞬间达到分配平衡。

对于填充柱:

$$C_g = \frac{0.01k'^2}{(1+k')^2} \cdot \frac{d_p^2}{D_g}$$

k' 为容量因子; d_p 为填充物颗粒直径; D_g 为组分分子在气相中的扩散系数。

由于 $C_g \propto d_p^2$; $C_g \propto \frac{1}{D_g}$, 因此, 采用粒度小的填充物和相对分子质量小的气体

(如 H_2) 作载气, 可减小 D_g , 提高柱效。

(2) 液相传质

液相传质过程是指试样从固定相的界面移动到液相内部, 并发生质量交换, 达到分配平衡, 然后又返回气液界面的传质过程。这个过程也需要一定的时间, 在此时间内,

气相中组分的其它分子仍随载气不断地向柱口移动，这也造成谱峰的扩张。

$$\text{液相传质阻力系数: } C_1 = \frac{2}{3} \cdot \frac{k'}{(1+k')^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_l}$$

式中， d_f 为固定相液膜厚度； D_l 为组分在液相中扩散系数。

因此，减小固定液的厚度 d_f ，增大组分在液相中的扩散系数 D_l ，可以减小 C_l 。

4. 速率理论的要点

(1) 组分分子在柱内运行的多路径与涡流扩散、浓度梯度所造成的分子扩散及传质阻力使气液两相间的分配平衡不能瞬间达到等因素是造成色谱峰扩展柱效下降的主要原因。

(2) 通过选择适当的固定相粒度、载气种类、液膜厚度及载气流速可提高柱效。

(3) 速率理论为色谱分离和操作条件选择提供了理论指导。阐明了流速和柱温对柱效及分离的影响。

(4) 各种因素相互制约，如载气流速增大，分子扩散项的影响减小，使柱效提高，但同时传质阻力项的影响增大，又使柱效下降；柱温升高，有利于传质，但又加剧了分子扩散的影响，选择最佳条件，才能使柱效达到最高。

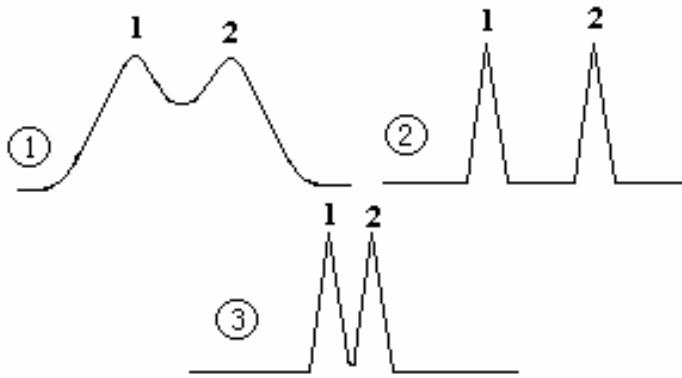
13-5 分离度

一. 柱效和选择性

◆ 衡量柱效的指标是理论塔板数（或 n_{eff} ），柱效反映了色谱分离过程的热力学性质。

◆ 选择性：在色谱法中，常用色谱图上两峰间的距离衡量色谱柱的选择性，其距离越大说明柱子的选择性越好。一般用相对保留值 α 表示两组分在给定柱子上的选择性。而柱子的选择性主要取决于组分在固定相上的热力学性质。

二. 分离度



相邻两组分在不同色谱条件下的分离情况：

①中两组分没有完全分离，②和③中两组分完全分离。可以看出②的柱效虽不高，但选择性好；③的选择性较差，但柱效较高。

1. 分离度

定义：相邻两色谱峰保留值之差与两峰底宽平均值之比。其数学表示式如下：

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{\frac{1}{2}(w_{b(2)} + w_{b(1)})}$$

注：计算 R_s 时，组分的保留值和峰底宽要采用相同的单位。

一般来说： $R_s < 1$ ，两峰总有部分重叠；

$R_s > 1$ ，两峰能明显分离；

$R_s = 1.5$ ，两峰才能完全分离（相邻两峰完全分离的标准）。

2. 分离度公式

令 $w_{b(2)} = w_{b(1)} = w_b$ ，相邻两组分的 n 一致

$$\begin{array}{l}
 t_{R1} = t_M(1+k_1') \\
 t_{R2} = t_M(1+k_2') \\
 R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{\frac{1}{2}(w_{b(2)} + w_{b(1)})} \\
 \Rightarrow R_s = \frac{t_M(k_2' - k_1')}{w_{b(2)}} \\
 n = 16 \left(\frac{t_{R2}}{w_{b(2)}} \right)^2 \Rightarrow w_{b(2)} = \frac{4t_{R2}}{\sqrt{n}} \\
 t_{R2} = t_M(1+k_2') \\
 \Rightarrow \frac{4t_M(1+k_2')}{\sqrt{n}}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} t_{R1} \\ t_{R2} \\ R_s \\ n \\ w_{b(2)} \end{array}} \right\} \Rightarrow$$

$$\begin{array}{l}
 R_s = \frac{\sqrt{n}(k_2' - k_1')}{4(1+k_2')} \\
 \alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \\
 R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \left(\frac{k_2'}{1+k_2'} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \\
 n_{eff} = n \left(\frac{k_2'}{1+k_2'} \right)^2
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} R_s \\ \alpha \\ R_s \\ n_{eff} \end{array}} \right\} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow n_{eff} = 16R_s \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right)^2$$

讨论:

$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \left(\frac{k_2'}{1+k_2'} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$$

↑
↑
↑

柱效项 柱容量项 柱选择项

① 分离度与柱效的关系

影响色谱峰的宽窄。主要取决于色谱柱性能及载气流速。

根据: $R_s \propto \sqrt{n} \Rightarrow n \uparrow \Rightarrow R_s \uparrow$

而 $n \propto L$ 或 $n \propto \frac{1}{H}$; 所以 $L \uparrow$ 或 $H \downarrow$ 可得: $n \uparrow, R_s \uparrow$

注: 增加柱长可改进分离度, 但增加柱长会使各组分的保留时间增长, 延长了分析时间并使峰产生扩展。因此, 设法降低板高, 提高柱效, 才是提高分离度的最好方法。

② 分离度与柱选择性的关系

影响峰的间距。主要受固定相性质, 以及柱温影响。

因为 $R_s \propto \frac{\alpha-1}{\alpha}$; 所以 $\alpha \uparrow, \frac{\alpha-1}{\alpha} \uparrow, \Rightarrow R_s \uparrow$

注: a: α 值的微小变化对 R_s 的影响都很大, 增大 α 值是提高分离度最有效的办法。如 $\alpha=1.1$ 增大到 $\alpha=1.2$, R_s 可以增大一倍。

b: 增加 α 简便而有效的方法是通过改变固定相, 使各组分分配系数有较大差异。

c: 当 $\alpha=1$ 时, $R_s=0$, 分离无法实现。

③ 分离度与容量因子的关系

影响峰位。主要受固定相用量、柱温和载气流速的影响。

k' 值大一些对分离有利, 但并非越大越好。

k' 值对 $k'/(k'+1)$ 的影响

k'	0.5	1.0	3.0	5.0	8.0	1.0	3.0	5.0
$\frac{k'}{k'+1}$	0.33	0.5	0.75	0.83	0.89	0.91	0.97	0.98

注: k' 值的最佳范围是 $2 < k' < 5$, 在此范围内, 既可以得到大的 R_s 值, 亦可使分析时间不至于过长。在 GC 中, 增加固定液的用量或降低柱温, k' 值增大; 对 LC 来说, 对 k' 值的控制是通过控制流动相的极性来实现的。

13-6 定量定性分析

一. 定性分析

1. 利用保留值定性

a. 利用纯物质定性

通过对比试样中具有与纯物质相同保留值的色谱峰，来确定试样中是否含有该物质及在色谱图中位置。不适用于不同仪器上获得的数据之间的对比。

特点：定性专属性差

适用范围：适用于组成比较简单，且有纯物质的未知物。

b. 相对保留值法

相对保留值 $\alpha_{i,s}$ ：组分 i 与基准物 s 的调整保留值的比值。即：

$$\alpha_{i,s} = t_{Ri}' / t_{Rs}' = V_{Ri}' / V_{Rs}'$$

测定方法：在某一固定相及柱温下，分别测出组分 i 和基准物 s 的调整保留值，再按上式求出 $\alpha_{i,s}$ 。

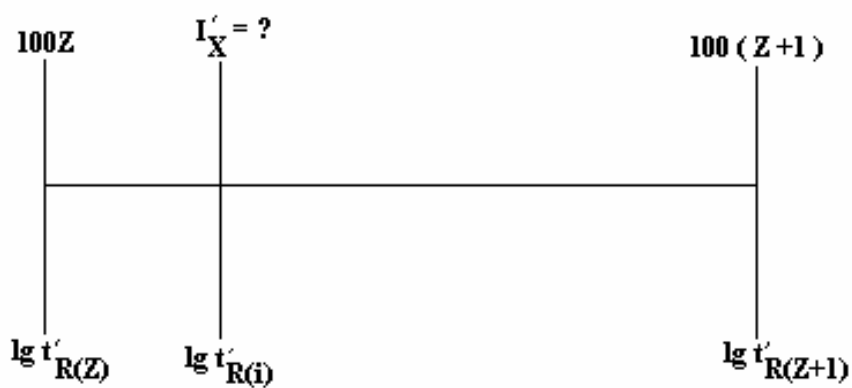
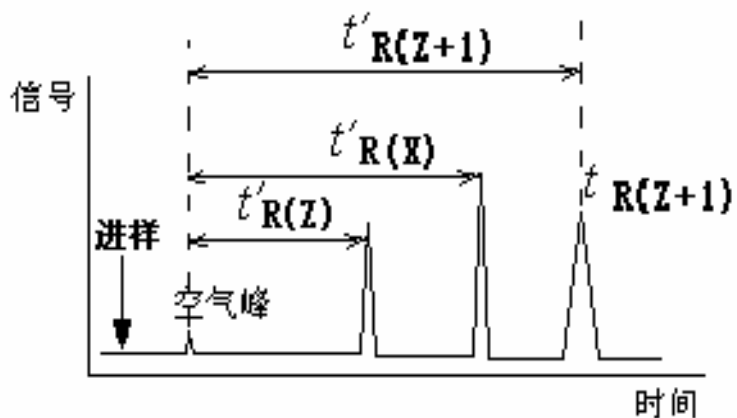
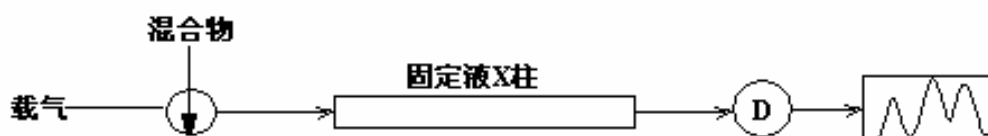
相对保留值仅与柱温和固定液性质有关。在色谱手册中都列有各种物质在不同固定液上的保留数据，用已经求出的相对保留值与文献相应值比较即可定性。

c. 利用保留指数定性

保留指数，又称 Kovats 指数 (I)，是一种重现性较好的定性参数。

测定方法：

- ① 将正构烷烃作为标准，规定其保留指数为分子中碳原子个数乘以 100 (如正己烷的保留指数为 600)。
- ② 其它物质的保留指数 (I_X) 是通过选定两个相邻的正构烷烃，其分别具有 Z 和 $Z+1$ 个碳原子。被测物质 X 的调整保留时间应在相邻两个正构烷烃的调整保留值之间如图所示：



内插法求 I'_X 示意图

$$\frac{I'_x - 100Z}{\lg t'_{R(i)} - \lg t'_{R(Z)}} = \frac{100(Z+1) - 100Z}{\lg t'_{R(Z+1)} - \lg t'_{R(Z)}}$$

③计算方法:

$$t_{R(z)}' < t_{R(i)}' < t_{R(z+1)}'$$

$$I_x = 100 \left(Z + \frac{\lg t''_{R(i)} - \lg t'_{R(Z)}}{\lg t'_{R(Z+1)} - \lg t'_{R(Z)}} \right)$$

特点：保留指数仅与固定相的性质、柱温有关，与其它实验条件无关。其准确度和重现性都很好。只要柱温和固定相相同，就可引用文献值进行定性鉴定，而不必用纯物质相对照。

d. 与其它分析仪器联用的定性方法

小型化的台式色谱联用仪（GC-MS；LC-MS）；色谱-红外光谱联用仪。

二. 定量分析

$$m_i = f_i' \cdot A_i \quad \text{— 定量分析的依据}$$

在定量分析中需要：

- ① 准确测量出峰面积或峰高。
- ② 准确求得比例常数—校正因子。
- ③ 选择合适的定量计算方法，将测得组分的峰面积换算为质量分数。

（一）峰面积测量

1. 对正常峰：

$$A = 1.065 \times h \times w_{\frac{1}{2}}$$

2. 不对称峰：

$$A = \frac{1}{2} \cdot h \cdot (w_{0.15} + w_{0.85})$$

3. 自动积分仪

（二）定量校正因子

前提：同一检测器对不同的物质具有不同的响应值，所以两个相等量的物质出的峰面积往往不等，这样就不能用峰面积来直接计算物质的含量。需引入“定量校正因子”。

校正因子分为绝对校正因子和相对校正因子。

1. 绝对校正因子:

$$m_i = f_i A_i \Rightarrow f_i = \frac{m_i}{A_i}$$

f_i —绝对校正因子(与组分性质、仪器灵敏度有关), m_i —进入检测器中物质的量或质量。

2. 相对校正因子

定义: 即组分 i 的绝对校正因子与标准物质 s 的绝对校正因子之比。

$$f_i' = \frac{f_i}{f_s} = \frac{m_i/A_i}{m_s/A_s} = \frac{A_s/A_i}{m_s/m_i}$$

f_i' —相对校正因子(与操作条件变化无关)

当 m_i 、 m_s 以摩尔为单位时, 所得相对校正因子称为相对摩尔校正因子, 以 f_M' 表示; 当

m_i 、 m_s 用质量单位时, 为相对质量校正因子, 以 f_W' 表示。

相对校正因子的测定:

过程: 精称纯品 i + 基准物 s → 混匀进样 → 测 A_i 和 A_s

注: ◆一般文献上提到的校正因子就是相对校正因子。

◆相对校正因子与待测物、基准物和检测器类型有关, 与操作条件(如进样量)无关。

(三) 定量方法

1. 归一化法

把所有出峰组分的含量之和按 100% 计算的定量方法称为归一化法。组分 i 的质量分数 m_i 可按下式计算:

$$m_i\% = \frac{A_i f_i}{\sum_{i=1}^n A_i f_i} \times 100\%$$

前提：试样所有组分都产生信号并能检出色谱峰。

特点及要求：

- a. 归一化法简便、准确；
- b. 进样量的准确性和操作条件的变动对测定结果影响不大；
- c. 色谱条件略有变化对结果几乎无影响。

缺点：

- a. 所有组分必须在一定时间内都出峰；
- b. 必须已知所有组分的校正因子；
- c. 不适合微量组分的测定。

2. 外标法

外标法也称为标准曲线法。

特点及要求：

- a: 外标法不使用校正因子，不需要所有组分出峰；
- b: 操作条件变化对结果准确性影响较大；
- c: 对进样量的准确性控制要求较高，适用于大批量试样的快速分析。

3.内标法

当只需要测定试样中某几个组分时，而且试样中所要组分不能完全出峰时，可采用此法。无待测物纯品，加入样品中不含对照物，以待测组分和对照物的响应信号对比定量。

内标物要满足以下要求：

- (a) 试样中不含有该物质；
- (b) 与被测组分性质比较接近；

(c) 不与试样发生化学反应;

(d) 出峰位置应位于被测组分附近, 且对组分峰无影响。

试样配制: 准确称取一定量的试样 m , 加入一定量内标物 m_s

计算式:

$$\frac{m_i}{m_s} = \frac{A_i f'_i}{A_s f'_s} \Rightarrow m_i = \frac{A_i f'_i m_s}{A_s f'_s}$$

$$m_i \% = \frac{m_i}{m} \times 100\% = \frac{A_i f'_i m_s}{A_s f'_s m} \times 100\%$$

内标法优点:

- (1) 进样量不超量时, 重复性及操作条件对结果无影响
- (2) 只需待测组分和内标物出峰, 与其他组分是否出峰无关
- (3) 适合测定微量组分

内标法缺点:

制样要求高; 找合适内标物困难; 已知校正因子。

本章小结

1. 色谱过程是一种基于组分在两相间“差速迁移”的分离过程。色谱过程中相对运动的一相称为“流动相”; 相对静止的一相称为“固定相”, 组分分子在两相之间通过吸附、分配、离子交换和分子大小的不同达到分离的目的。色谱法的突出特点是分离效能高、分析速度快。
2. 色谱过程中最常用的热力学参数是分配系数和容量因子, 分配系数和容量因子的不同是色谱分离的前提。
3. 色谱法的分类, 按两相的物理状态分为气相色谱和液相色谱; 按分离机理分为吸附色

谱法、分配色谱法、离子交换色谱法、凝胶色谱法或尺寸排阻色谱法及亲和色谱法；按固定相的外型分为柱色谱、平板色谱（分为薄层色谱和纸色谱）。

4. 介绍了保留时间、死时间、调整保留时间、保留体积、死体积、调整保留体积等名词和术语。
5. 色谱法的基本理论主要有塔板理论和速率理论。塔板理论把气液色谱柱当作一个精馏塔，沿用塔板的概念描述溶质在两相间的分配行为，并引入理论塔板数 n 和理论塔板高度 H 作为衡量柱效的指标。由于理论塔板数 n 和理论塔板高度 H 的不足，实际用有效理论塔板数 $n_{\text{有效}}$ 和有效理论塔板高度 $H_{\text{有效}}$ 作为衡量柱效的指标。速率理论是有关色谱过程的动力学理论，吸收了塔板理论的概念，并把影响塔板高度的动力学因素结合进去，导出了塔板高度 H 与载气线速度 u 的关系。指出理论塔板高度 H 是峰展开的量度，理论塔板高度 H 受涡流扩散项、纵向扩散项和传质阻力项的影响。
6. 担体：在 G—S 色谱柱中为固定相，在 G—L 色谱柱中为支持体，其上涂布固定液。但担体表面结构与性质及其预处理，决定着担体的色谱性能，并有多种类型。
固定液：选择好固定液是分析成败的关键，原则上利用相似相溶原理。对极性化合物利用极性固定液，组分按极性小、大顺序流出。非极性化合物用非极性固定液，组分按沸点顺序分离。
7. 检测器为测量组分含量的变化以电信号显示记录。热导检测器：浓度型检测器，不同组分其热导系数不同而达检测目的。氢火焰离子化检测器：为质量型检测器，样品通过热解电离并产生电流而检测。其他：如电子捕获、火焰光度检测器等。
8. 分离度是衡量分离效果的重要指标。熟悉塔板高度、塔板数、分离度等相关计算。
9. 色谱法可以进行定性和定量分析。定性分析的方法有利用纯物质定性、相对保留值法和相对保留值法；定量分析方法有归一化法、外标法和内标法。