

# 色谱分析

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS

主编 孙晓莉 李晓晔

 第四军医大学出版社

# 色 谱 分 析

主 编 孙晓莉 李晓晔

副主编 刘 鹏 何 炜 兰 婷

编 委 (按姓氏笔画排序)

兰 婷 朱星枚 刘 鹏

孙晓莉 李明华 李晓晔

李穆琼 何 炜

## 图书在版编目(CIP)数据

色谱分析 / 孙晓莉, 李晓晔主编. —西安: 第四军医大学出版社, 2012. 6

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0085 - 3

I. ①色… II. ①孙… ②李… III. ①色谱法 - 化学分析 IV. ①0657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 054458 号

Sepu Fenxi

## 色谱分析

主 编 孙晓莉 李晓晔

责任编辑 富 明

执行编辑 崔宝莹

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)

电 话 029 - 84776765

传 真 029 - 84776764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 西安力顺彩印有限责任公司

版 次 2012 年 10 月第 1 版 2012 年 10 月第 1 次印刷

开 本 787 × 1092 1/16

印 张 14.5

字 数 360 千字

书 号 ISBN 978 - 7 - 5662 - 0085 - 3/0 · 15

定 价 40.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

# 前 言

分离科学是研究物质分离、富集和纯化的一门科学,涉及复杂物质分析的领域都离不开分离技术,许多学科的发展在不同程度上也依赖于分离科学的进步。它一方面在科学研究中起着至关重要的作用,极大地推动着其他学科的发展;另一方面还直接服务于国民经济和生产的需要。同时,当代科学技术和人类生产活动的飞速发展也向分离科学提出了严峻的挑战,并带来了前所未有的发展机遇。当今世界发展最快的科技领域如生命科学、信息科学、材料科学、生物工程、环境科学和生态保护、现代医学和中医药学、纳米科技等领域的基础和应用研究,都离不开各种类型的分析检测。分析测试是科技与生产的眼睛,是衡量一个国家经济与科技发展水平的主要标志,其对国民经济的重要作用任何其他方法与手段无法替代的。

全书共分八章,包括分离科学的概述和分离原理的简要介绍(第一章),色谱理论基础(第二章),平面色谱法(第三章),气相色谱法(第四章),高效液相色谱法(第五章),高效毛细管电泳(第六章),超临界流体色谱法(第七章)和样品的预处理及化学衍生法(第八章)。本书在简要介绍分离方法的基本概念和基本原理的基础上,对科学研究和生产实际中广泛应用的主要分离技术进行了重点阐述,力求做到立论严谨,叙述深入浅出,既注意到各种分离方法之间的内在联系,又重视各种分离方法的特殊个性,从而能使教学、科研和生产岗位上从事分析化学工作的广大读者从中获得比较系统的理论和实践知识,对工作有所帮助,从而推动我国分析化学的进一步发展。

本书的编著者皆为在教学与科研一线为色谱科学努力奋进的中青年专家,在书中反映了色谱领域的基本知识、基本方法和他们自己的宝贵经验以及有关领域的最新成果。本书可作为化学、药学、生命科学、材料科学等学科高年级本科生和研究生的教材,也可供从事相关科研和生产的科技工作者参考之用。由于作者水平有限,经验不足,本书中难免会有缺漏和错误,诚恳欢迎各位同行及师生批评指正。

孙晓莉 李晓晔

2012年7月

# 目 录

<b>第一章 概论</b> .....	(1)
第一节 色谱分析法的发展简史 .....	(1)
第二节 色谱分析法的原理和分类 .....	(2)
第三节 色谱分析法的应用 .....	(5)
<b>第二章 色谱分析法的基本理论</b> .....	(7)
第一节 色谱分析法的基本参数 .....	(7)
第二节 色谱分析法的基本理论 .....	(11)
<b>第三章 平面色谱法</b> .....	(19)
第一节 概述 .....	(19)
第二节 纸色谱法 .....	(23)
第三节 薄层色谱法 .....	(25)
<b>第四章 气相色谱法</b> .....	(31)
第一节 概述 .....	(31)
第二节 气相色谱仪 .....	(34)
第三节 气相色谱分离原理 .....	(38)
第四节 气相色谱固定相 .....	(38)
第五节 气相色谱检测器 .....	(45)
第六节 气相色谱分离操作条件的选择 .....	(55)
第七节 气相色谱的定性、定量方法 .....	(58)
第八节 裂解气相色谱法 .....	(62)
第九节 顶空气相色谱法 .....	(74)
第十节 气相色谱法的应用 .....	(80)

<b>第五章 高效液相色谱法</b> .....	(87)
第一节 概述 .....	(87)
第二节 各种类型高效液相色谱的固定相和流动相 .....	(89)
第三节 高效液相色谱仪 .....	(105)
第四节 高效液相色谱检测器 .....	(120)
第五节 定性、定量分析 .....	(141)
第六节 应用与实例 .....	(143)
<b>第六章 高效毛细管电泳</b> .....	(151)
第一节 概述 .....	(151)
第二节 毛细管电泳基本原理 .....	(152)
第三节 毛细管区带电泳 .....	(159)
第四节 胶束电动毛细管色谱 .....	(161)
第五节 其他几种重要的毛细管分离模式 .....	(164)
第六节 毛细管电泳手性分离基本策略 .....	(165)
第七节 毛细管涂层和进样技术 .....	(166)
第八节 CE 检测方法和检测器 .....	(167)
第九节 高效毛细管电泳的应用 .....	(169)
<b>第七章 超临界流体色谱法</b> .....	(177)
第一节 概述 .....	(177)
第二节 超临界流体色谱法的基本原理 .....	(178)
第三节 超临界流体色谱的色谱柱和固定相 .....	(181)
第四节 超临界流体色谱的流动相和改性剂 .....	(183)
第五节 超临界流体色谱仪 .....	(186)
第六节 超临界流体色谱的应用 .....	(189)
<b>第八章 样品的预处理及化学衍生法</b> .....	(191)
第一节 生物试样的前处理 .....	(191)
第二节 化学衍生法 .....	(203)
<b>参考文献</b> .....	(225)

# 第一章 概 论

## 第一节 色谱分析法的发展简史

色谱分析法(chromatography)又称色谱法、层析法或层析法,是一种物理或物理化学的分离和分析方法,在分析化学、有机化学、生物化学等领域有着非常广泛的应用。它起源于20世纪初,1950年之后飞速发展,并发展出一个独立的三级学科——色谱学。历史上曾经先后有两位化学家因为在色谱领域的突出贡献而获得诺贝尔化学奖,此外色谱分析方法还在12项获得诺贝尔化学奖的研究工作中起到了关键作用。

### 一、色谱的起源

将一滴含有混合色素的溶液滴在一块布或一片纸上,随着溶液的展开可以观察到一个个同心圆环出现,这种层析现象虽然前人就已有的初步的认识并有一些简单的应用,但真正首先认识到这种层析现象在分离分析方面具有重大价值的是俄国植物学家 Tswett。1906年 Tswett 用碳酸钙填充竖立的玻璃管,以石油醚洗脱植物色素的提取液,经过一段时间的洗脱后,植物色素在碳酸钙柱中实现分离,由一条色带分散为数条平行的色带。这一实验将混合的植物色素分离为不同的色带,因此 Tswett 将这种方法命名为色谱法。由于 Tswett 开创性的工作,人们尊称他为“色谱学之父”,而以他的名字命名的 Tswett 奖也成为了色谱界的最高荣誉奖。

色谱法出现后,爆发的第一次世界大战使得色谱法并没有立即得到当时化学界的重视,20多年以后,1931年德国柏林威廉皇帝研究所的 Richard Kuhn 将 Tswett 的方法应用于叶红素和叶黄素的研究,这才让科学界接受了色谱法,也就是今天的吸附色谱法。此后的一段时间,以氧化铝为固定相的色谱法在有色物质的分离中取得了广泛的应用。

### 二、分配色谱的出现和色谱方法的普及

1940年,著名的英国科学家 Martin 和 Synge 创立了分配色谱,随后 Martin 和 Synge 采用水饱和的硅胶为固定相,以含有乙醇的氯仿为流动相分离乙酰基氨基酸,他们在这一工作中提出了用气体代替液体作为流动相的可能性。1951年 James 和 Martin 提出了从理论到实践都比较完整的气-液色谱方法,因而获得了1952年的诺贝尔化学奖。另一方面,1944年 Consden 等提出了纸色谱,1949年 Maclean 等在氧化铝中加入淀粉黏合剂制作的薄层板使薄层色谱法得以应用,而在1956年 Stahl 开发出的薄层色谱板涂布器,才使薄层色谱法得到广泛应用。

### 三、气相色谱和色谱理论的出现

1958年, Golay 首先提出了分离效能极高的毛细管柱气相色谱法, 发明了玻璃毛细管控制机, 从此气相色谱法超过最先发明的液相色谱法而迅速发展起来, 今天常用的气相色谱检测器也几乎是在五十年代发展起来的。

气相色谱的出现使色谱技术从最初的定性分离手段进一步演化为具有分离功能的定量测定手段, 并且极大地刺激了色谱技术和理论的发展。相比于早期的液相色谱, 以气体为流动相的色谱对设备的要求更高, 这促进了色谱技术的机械化、标准化和自动化; 气相色谱需要特殊的和更灵敏的检测装置, 这促进了检测器的开发; 气相色谱的标准化又使色谱学理论得以形成。色谱学理论中有着重要地位的塔板理论和 Van Deemter 方程, 以及保留时间、保留指数、峰宽等概念都是在研究气相色谱行为的过程中形成的。

### 四、高效液相色谱的出现

20 世纪 60 年代, 为了分离蛋白质、核酸等不易气化的大分子物质, 气相色谱的理论和方法被重新引入经典液相色谱。

1960 年末, Kirkland、Horvath 等人把高压泵和化学键合固定相用于液相色谱, 开发了世界上第一台高效液相色谱仪, 开启了高效液相色谱的时代。高效液相色谱使用粒径更细的固定相填充色谱柱, 提高色谱柱的塔板数, 以高压驱动流动相, 使得经典液相色谱需要数日乃至数月完成的分离工作得以在几个小时甚至几十分钟内完成。

1971 年 Kirkland 等人出版了《液相色谱的现代实践》一书, 标志着高效液相色谱法正式建立。在此后的时间里, 高效液相色谱法成为最为常用的分离和检测手段, 在有机化学、生物化学、医学、药物开发与检测、化工、食品科学、环境监测、商检和法检等方面都有广泛的应用。高效液相色谱法同时还极大地刺激了固定相材料、检测技术、数据处理技术以及色谱理论的发展。

此外, 超临界流体色谱法和高效毛细管电泳法则在 20 世纪 80 年代后逐步得到发展。

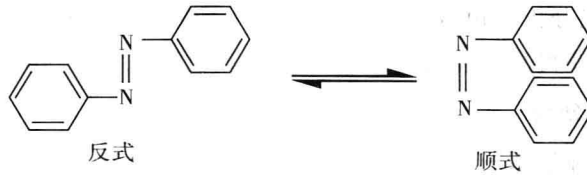
## 第二节 色谱分析法的原理和分类

### 一、色谱法的原理

色谱法的分离原理主要是利用样品中各组分在流动相与固定相中的分配系数差异而进行分离的。当两相相对运动时, 样品中的各组分将在两相中多次分配, 分配系数大的组分迁移速度慢; 反之则迁移速度快, 从而使混合物中各组分获得分离。

以顺式与反式偶氮苯用吸附色谱法分离为例, 说明色谱过程。偶氮苯有顺反两种异构体:





当这两种异构体共存时,由于它们的性质比较接近,用沉淀、萃取等一般方法难于分离,但用色谱法就比较容易分离。

取玻璃管一根,下端拉成漏斗状并垫一层脱脂棉或玻璃棉,然后装入吸附剂氧化铝(固定相),用少量石油醚将样品溶解后加到氧化铝柱的顶端,然后用一定体积的含有 20% 乙醚的石油醚(流动相)连续不断地冲洗色谱柱。由于两组分之间在性质上存在差异,它们在色谱柱内的两相中不断地进行吸附与解吸,经过无数次这样的吸附与解吸过程后,吸附能力弱的组分先由柱中流出,而吸附力强的组分则后流出,最终达到分离,见图 1-1。

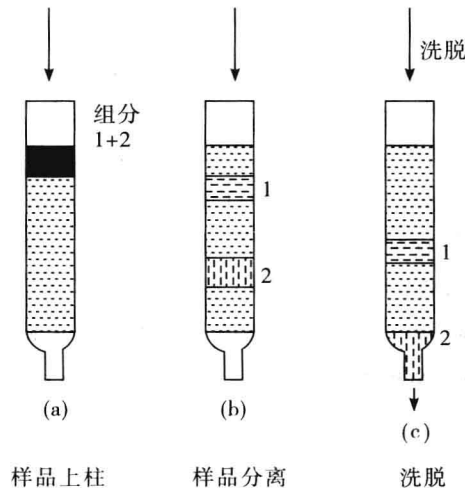


图 1-1 吸附柱色谱过程示意图

## 二、色谱法的分类

### (一)按固定相和流动相的物理状态分类

色谱分析中总是存在着两个相——流动相和固定相。按照流动相的状态,色谱可分为以下类型:

1. 液相色谱 液相色谱的流动相是液体。固定相是固体吸附剂时,称为液-固色谱;固定相是附载在固体担体上的液体时,称为液-液色谱。

2. 气相色谱 气相色谱的流动相是气体。固定相是固体吸附剂时,称为气-固色谱;固定相是附载在固体担体上的液体时,称为气-液色谱。

3. 超临界流体色谱 与上述的液相色谱和气相色谱不同,其流动相是超临界流体。所谓超临界流体是指温度和压力处于临界温度和临界压力以上的流体。这种流体对许多物质

具有良好的溶解性,能分析气相色谱法不能或难于分析的许多沸点高、热稳定性差的物质,而比液相色谱更容易获得高的柱效率,是介乎于气相色谱和液相色谱之间的一种色谱技术。

## (二)按分离机制分类

色谱法的基本原理是基于混合物中的组分在固定相与流动相之间的不均匀分配。不均匀分配的先决条件是各个单一组分对两相具有不同的“亲和力”和向两相不均匀扩散的传递性质。据此,可分为如下几类:

1. 吸附色谱法(adsorption chromatography) 也叫做液-固色谱法(liquid-solid chromatography, LSC),它是基于在溶质和用作固定相的固体吸附剂上的固定活性点位之间的相互作用的差异,而进行分离的方法,可以将吸附剂装填于柱中、覆盖于板上或浸渍于多孔滤纸中。吸附剂一般是具有大表面积的活性多孔固体,例如硅胶、氧化铝和活性炭等。活性点位例如硅胶的表面硅烷醇,一般与待分离化合物的极性官能团相互作用。分子的非极性部分(例如烷基)对分离只有较小的影响,所以液-固色谱法十分适于分离不同种类的化合物(例如分离醇类与芳香烃)。

2. 分配色谱法(partition chromatography) 也叫做液-液色谱法(liquid-liquid chromatography, LLC),它是利用不同组分在流动相和固定相之间的分配系数(或溶解度)的不同而使之分离的方法。固定相均匀地覆盖于惰性载体——多孔的或非多孔的固体细粒或多孔纸上。为避免两相的混合,两种分配液体在极性上必须显著不同。若固定液是极性的,流动相是非极性的,那么极性组分将较强烈地被保留,此系统称为正相液-液色谱。相反地,若固定相是非极性的,流动相是极性的,则极性组分易分配于流动相,此系统称反相液-液色谱。由于溶解度差别的细微效应,液-液色谱法很适于分离同系物和同分异构体。

3. 离子交换色谱法(ion exchange chromatography, IEC) 离子交换色谱法的固定相通常为离子交换树脂,树脂上具有固定离子基团及可交换的离子基团。当流动相带着组分电离生成的离子通过固定相时,组分离子与树脂上可交换的离子基团进行可逆交换,根据组分离子对树脂亲合力的不同而得到分离。IEC 在无机化学中广泛用于分离金属离子,在生物体系中广泛用于分离水溶性离子化合物,例如蛋白质、核苷酸和氨基酸等。

4. 分子排阻色谱法(molecular exclusion chromatography, MEC) 它是根据样品组分因分子大小不同而进行分离的方法,又称为体积排阻色谱法、空间排阻色谱法等。在分子排阻色谱法中,固定相为化学惰性的多孔性物质,多为凝胶,其孔径大小需与被分离化合物分子大小相近似。组分保留程度取决于组分分子与孔的相对大小,小分子可渗透进入孔中而被滞留,中等大小的分子可部分进入,大分子则完全被排斥。分子愈大,穿过固定相愈快,首先从柱中流出,所以分子排阻色谱法特别适用于高分子有机化合物、生物聚合物与较小分子的分离。

5. 亲和色谱法(affinity chromatography) 利用不同组分与固定相(固定化分子)共价键合的高专属性反应进行分离的一种新技术。常用于蛋白质的分离。

## (三)按操作形式分类

1. 柱色谱法(column chromatography, CC) 将固定相装于柱内,使样品沿一个方向移动

而达到分离。

2. 纸色谱法 (paper chromatography, PC) 用滤纸作液体的载体, 点样后, 用流动相展开, 以达到分离鉴定的目的。

3. 薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC) 将适当粒度的吸附剂涂铺成薄层, 以与纸色谱法类似的方法进行物质的分离和鉴定。

4. 薄膜色谱法 (thin film chromatography) 将适当的高分子有机吸附剂制成薄膜以与纸色谱法类似的方法进行物质的分离和鉴定。

与柱色谱法相对应, 上述 2、3、4 三项色谱法统称为平面色谱法。色谱法分类见图 1-2。

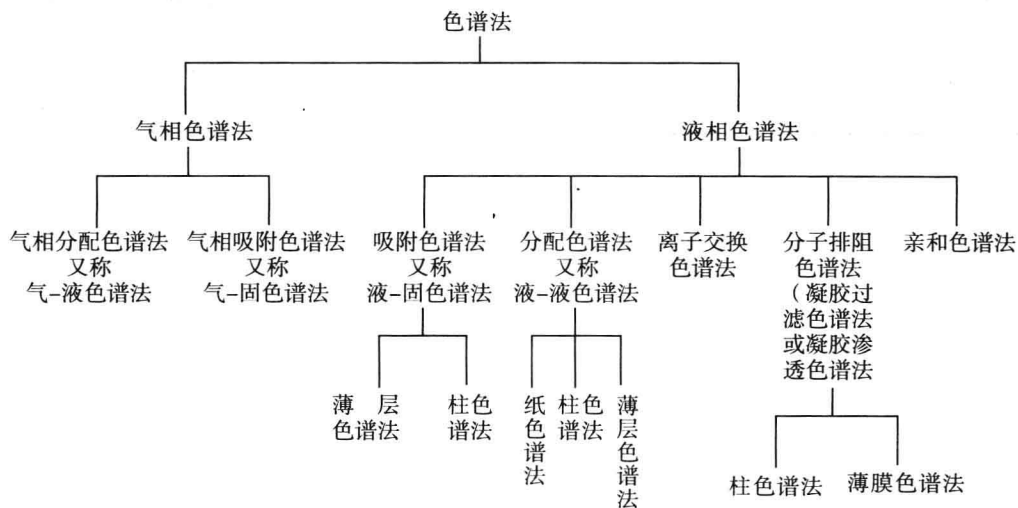


图 1-2 色谱法分类

### 第三节 色谱分析法的应用

世界性的科学技术和生产的发展、进步, 推动了分析化学的发展, 而色谱法是分析化学的重要组成部分, 从一出现就对科学的进步和生产的发展起着重要的作用。在 20 世纪 30—40 年代它为揭开生物世界的奥秘, 为分离复杂的生物组分发挥了它独特的作用; 50 年代为石油工业的研究和发展作出了贡献; 60—70 年代它成为石油化工、化学工业等部门不可缺少的分析监测工具。目前色谱法是生命科学、材料科学、环境科学、医药科学、食品科学、法庭科学以及航天科学等研究领域的重要手段。上世纪末人类基因组计划的提前完成和现在大规模进行的蛋白质组学的研究, 各种色谱方法起到了重要的作用。

色谱法的特点是它具有高超的分离能力, 而各种分析对象又大都是混合物, 为了分析鉴定它们的物质组成和含量, 必须进行分离, 所以色谱法成为许多分析方法的先决条件和必需的步骤。近年气相色谱用于痕量分析和环境样品分析。GC-MS 仪器联用技术用于各个领域的例行分析、中草药中有效成分的测定; HPLC-MS 联用技术的研究以及生化样品的检

测;各种有机化合物用 HPLC - MS 和 HPLC - NMR 分离和鉴定;毛细管电泳和毛细管电色谱在蛋白质和 DNA 检测中的应用等,都极大地提高了色谱在分析化学中的地位,见表 1 - 1。

表 1 - 1 近年来色谱法在各类分析化学方法中所占的地位

年代 所占比例% 方法	1946	1955	1965	1975	1985	1995
光谱法	14.3	26.3	28.7	29.7	30.0	30
色谱分析法	1.4	2.3	12.0	26.7	35.0	36
电化学法	4.4	6.2	10.2	13.5	15.0	26
放射分析法	1.0	2.0	6.5	13.8	17.0	18
比色法	23.0	20.0	15.2	9.2	2	/
滴定法	25.6	22.0	15.2	9.2	1	/
重量法	8.5	6.5	3.6	2.0	/	/

(兰 婷)

## 第二章 色谱分析法的基本理论

### 第一节 色谱分析法的基本参数

#### 一、色谱图基本术语

##### (一) 色谱图

色谱图反映了试样中各组分在色谱柱内差速迁移和分子离散形成的浓度分布。试样中各组分在色谱柱内分离,随流动相流出色谱柱,形成连续的色谱峰,并记录在等速移动的记录仪上,描绘出色谱图。因此,检测器输出的电信号强度随时间变化的曲线称为色谱流出线,也称为色谱图。流出线上突起部分就是色谱峰。色谱图通常具有如下基本特征:

1. 在适当的色谱条件下,样品中每个组分均有相应的色谱峰,色谱峰一般呈对称的高斯分布曲线。
2. 色谱峰的区域宽度与组分的洗出时间一般呈线性关系。

##### (二) 色谱图基本术语

图 2-1 是某组分的色谱流出线,现根据该图说明色谱图的有关术语。

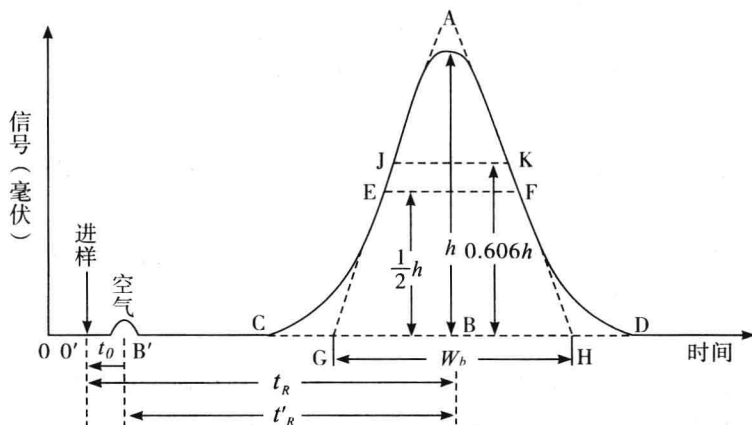


图 2-1 色谱流出曲线图

1. 基线(base line) 在实验条件下,色谱柱后没有样品组分流出的流出曲线称为基线,稳定的基线应该是一条水平直线,即图 2-1 中的 CD 线。
2. 峰高(peak height) 色谱峰顶点与基线之间的垂直距离,以  $h$  表示,即图 2-1 中的 AB 线。
3. 峰面积(peak area) 色谱曲线与基线间所包围的面积,以  $A$  表示,即图 2-1 中的

CEJAKFD 所包围的面积。

4. 色谱峰区域宽度(peak width) 这是色谱流出线的一个重要参数,它直接反映了分离条件的好坏。通常表示色谱峰区域宽度有三种方法:

(1) 标准偏差  $\sigma$  即 0.607 倍峰高处峰宽度的一半,即图 2-1 中 JK 的一半。

(2) 半峰宽度  $W_{1/2}$  (peak width at half-height) 即峰高一半处对应的峰宽,亦称区域宽度,半宽度,如图 2-1 中的 EF。它与标准偏差的关系为:

$$W_{1/2} = 2.354\sigma \quad (2-1)$$

由于半峰宽度容易测量,使用方便,所以一般都用它来表示区域宽度,其单位可用时间、体积或长度,视计算需要而定。

(3) 基线宽度  $W_b$  即色谱峰两侧拐点所做的切线在基线上的截距,如图 2-1 中的 GH。它与标准偏差  $\sigma$  的关系是:

$$W_b = 4\sigma \quad (2-2)$$

## 二、保留值 (retention)

保留值是样品中各组分,即溶质在色谱柱中保留行为的量度,它反映了溶质在两相间的分配情况,通常用保留时间和保留体积表示。对保留值的研究能揭示色谱过程的作用机制和分子(溶质、固定相和流动相)结构特征,因而它是色谱定性分析和色谱过程热力学特征的重要参数。

### 1. 保留时间

(1) 死时间  $t_0$  (dead time) 不被固定相吸附或溶解的物质进入色谱柱时,从进样到出现峰极大值所需的时间称为死时间。它正比于色谱柱的空隙体积。

因为这种物质不被固定相吸附或溶解,故其流动速度将与流动相流动速度相近。当流动相平均线速为  $u$  时,可用柱长  $L$  与  $u$  的乘积计算死时间,即:

$$t_0 = Lu \quad (2-3)$$

(2) 保留时间  $t_R$  (retention time) 试样从进样到柱后出现峰极大点时所经过的时间称为保留时间。

(3) 调整保留时间  $t'_R$  (adjusted retention time) 某组分的保留时间扣除死时间后,称为该组分的调整保留时间,即:

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (2-4)$$

由于组分在色谱柱中的保留时间  $t_R$  包含了组分随流动相通过色谱柱所需的时间和组分在固定相中滞留所需的时间,所以  $t_R$  实际上是组分在固定相中保留的总时间。

保留时间是色谱法定性的基本依据,但同一组分的保留时间常受到流动相流速的影响,因此色谱工作者有时用保留体积来表示保留值。

### 2. 保留体积

(1) 死体积  $V_0$  (dead volume) 死体积指色谱柱在填充后,柱管内固定相颗粒间所剩留的空间、色谱仪中管路和接头间的空间以及检测器的空间的总和。当后两者很小可忽略不计时,死体积可由死时间与色谱柱出口的载气流速  $F_c$  ( $\text{cm}^3/\text{min}$ ) 计算。

$$V_0 = t_0 F_c \quad (2-5)$$

式(2-5)中  $F_c$  为扣除饱和水蒸气压并经温度校正的流速。该式仅适用于气相色谱,不适用于液相色谱。

(2) 保留体积  $V_R$  (retention volume) 保留体积是指从进样开始到被测组分在柱后出现浓度极大点时所通过的流动相的体积。保留时间与保留体积的关系是:

$$V_R = t_R F_c \quad (2-6)$$

(3) 调整保留体积  $V'_R$  (adjusted retention volume) 某组分的保留体积扣除死体积后,称为该组分的调整保留体积。

$$V'_R = V_R - V_0 = t'_R F_c \quad (2-7)$$

(4) 校正保留体积  $V_R^0$  (corrected retention volume) 校正保留体积是保留体积  $V_R$  与压力校正因子  $j$  的乘积,即:

$$V_R^0 = j V_R \quad (2-8)$$

其中

$$j = \frac{3}{2} \left[ \frac{\left(\frac{P_i}{P_0}\right)^2 - 1}{\left(\frac{P_i}{P_0}\right)^3 - 1} \right] \quad (2-9)$$

式(2-9)中  $P_i$  为柱进口压力,  $P_0$  为柱出口压力,仅适用于气相色谱。

(5) 净保留体积  $V_N$  (net retention volume) 净保留体积是调整保留体积  $V'_R$  与压力校正因子  $j$  的乘积,仅适用于气相色谱:

$$V_N = j V'_R \quad (2-10)$$

3. 相对保留值  $r_{2,1}$  (relative retention value) 组分2的调整保留值与组分1的调整保留值之比,称为相对保留值。相对保留值往往可作为衡量固定相选择性的指标,又称选择因子。

$$r_{2,1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}} \quad (2-11)$$

由于相对保留值只与柱温及固定相性质有关,而与柱径、柱长、填充情况及流动相流速无关,因此,它在色谱法中,特别是在气相色谱法中,广泛用作定性的依据。在定性分析中,通常固定一个色谱峰作为标准( $s$ ),然后再求其他峰( $i$ )对这个峰的相对保留值,此时可用符号  $\alpha$  表示,即:

$$\alpha = \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rs}} = \frac{V'_{Ri}}{V'_{Rs}} \quad (2-12)$$

式中  $t'_{Ri}$  为后出峰的调整保留时间,所以  $\alpha$  总是大于1的。

### 三、分配系数和分配比

1. 分配系数  $K$  吸附色谱的分离是基于反复多次的吸附—脱附过程,而分配色谱的分离是基于样品组分在固定相和流动相之间反复多次的分配过程。这种分离过程经常用样品分子在两相间的分配来描述,而描述这种分配的参数称为分配系数  $K$ 。它是指在一定温度

和压力下,组分在固定相和流动相之间分配达平衡时的浓度之比,即

$$K = \frac{\text{溶质在固定相中的浓度}}{\text{溶质在流动相中的浓度}} = \frac{C_s}{C_m} \quad (2-13)$$

分配系数是由组分和固定相的热力学性质决定的,它是每一个溶质的特征值,除了与温度、压力有关之外,还与组分的性质,固定相和流动相的性质有关,而与两相体积、柱管的特性以及所使用的仪器无关。

$K$  值的大小表明组分和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。因此,组分在柱中移动速度与其分配系数成反比。不同组分分配系数的差异,是实现色谱分离的先决条件,分配系数相差越大,越容易实现分离。

2. 分配比  $k$  分配比又称容量因子,它是指在一定温度和压力下,组分在两相间分配达平衡时,分配在固定相和流动相中的质量比。

$$k = \frac{\text{组分在固定相中的质量}}{\text{组分在流动相中的质量}} = \frac{m_s}{m_m} \quad (2-14)$$

$k$  值越大,说明组分在固定相中的量越多,相当于柱的容量大,因此又称分配容量或容量因子。它是衡量色谱柱对被分离组分保留能力的重要参数。 $k$  值也决定于组分及固定相的热力学性质。它不仅随柱温、柱压变化而变化,而且还与流动相及固定相的体积有关。

$$k = \frac{m_s}{m_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} \quad (2-15)$$

式中  $V_m$  为柱中流动相的体积,近似等于死体积。 $V_s$  为柱中固定相的体积,在各种不同类型的色谱中有不同的含义。例如:在分配色谱中  $V_s$  表示固定液的体积,在尺寸排阻色谱中,则表示固定相的孔体积。

3. 分配系数  $K$  与分配比  $k$  的关系 由(2-13)式可得:

$$K = k \cdot \beta \quad (2-16)$$

其中  $\beta = V_m / V_s$ ,称为相比,它是反映各种色谱柱柱型特点的又一个参数。例如,对填充柱,其  $\beta$  值一般为 6 ~ 35;对毛细管柱,其  $\beta$  值为 60 ~ 600。

$K$  和  $k$  是两个不同的参数,但在表征组分的分离行为时,二者是完全等效的。 $k$  值可以方便的由色谱图直接求得,所以容量因子  $k$  是一个重要的色谱参数。

4. 分配系数  $K$  及分配比  $k$  与保留值的关系 色谱过程中的分配平衡是在色谱柱中的固定相和流动相之间进行的,因此分配比也可以用组分停留在固定相和流动相中的时间来表示,或者用组分通过色谱柱时所消耗的流动相来表示,则分配比可写成:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{V'_R}{V_0} \quad (2-17)$$

由此,分配比  $k$  值可直接从色谱图中测得。

另外,对  $A$ 、 $B$  两组分的相对保留值,可用下式表示:

$$\alpha = \frac{t'_{RA}}{t'_{RB}} = \frac{V'_{RA}}{V'_{RB}} = \frac{k(A)}{k(B)} = \frac{K(A)}{K(B)} \quad (2-18)$$



通过  $\alpha$  把实验测量值  $k$  与热力学性质的分配系数  $K$  直接联系起来,  $\alpha$  对固定相的选择具有实际意义。如果两组分的  $K$  或  $k$  值相等, 则  $\alpha = 1$ , 两个组分的色谱峰必将重合, 说明分不开。两组分的  $K$  或  $k$  值相差越大, 则分离得越好。因此两组分具有不同的分配系数是色谱分离的先决条件。

## 第二节 色谱分析法的基本理论

色谱法是一种分离、分析方法。无论进行定性或定量工作, 首先都必须把两组分分开, 所以分离是分析的前提。要使两组分能完全分离, 必须满足以下三点:

- 第一: 两组分的分配系数必须有差异;
- 第二: 区域扩宽的速率应小于区域分离的速度;
- 第三: 在保证快速分离的前提下, 提供足够长的色谱柱。

第一、二点是完全分离的必要条件。作为一个色谱理论, 它不仅应说明组分在色谱柱中移动的速率, 而且应说明组分在移动过程中引起区域扩宽的各种因素。塔板理论和速率理论均以色谱过程中分配系数恒定为前提, 故称为线性色谱理论。

### 一、塔板理论

把色谱柱比作一个精馏塔, 沿用精馏塔中塔板的概念来描述组分在两相间的分配行为, 同时引入理论塔板数作为衡量柱效率的指标, 即色谱柱是由一系列连续的许多小段组成, 在每一小段内, 一部分空间为固定相所占据, 另一部分空间充满流动相。组分随流动相进入色谱柱后, 在两相间进行分配。

塔板理论假设:

1. 在柱内一小段长度  $H$  内, 组分可以在两相间迅速达到平衡。这一小段称作一个理论塔板, 这一小段柱长称为理论塔板高度  $H$ 。
2. 以气相色谱为例, 载气进入色谱柱不是连续进行的, 而是脉动式的, 每次进气为一个塔板体积 ( $\Delta V_m$ )。
3. 所有组分开始时存在于第 0 号塔板上, 而且试样沿轴向的扩散可忽略。
4. 分配系数在所有塔板上是常数, 与组分在某一塔板上的量无关。

由此可简单地认为: 在每一块塔板上, 溶质在两相间很快达到分配平衡, 然后随着流动相按一个一个塔板的方式向前移动。对于一根长为  $L$  的色谱柱, 溶质平衡的次数应为:

$$n = \frac{L}{H} \quad (2-19)$$

$n$  称为理论塔板数。

由上式可知, 色谱柱长  $L$  固定时, 柱效随理论塔板数  $n$  的增加而增加, 随板高  $H$  的增大而减小。柱效率越高, 分离能力越强。

塔板理论内容:

- 第一: 当溶质在柱中的平衡次数, 即理论塔板数  $n$  大于 50 时, 可得到基本对称的峰形曲