

色 谱 理 论 基 础

陈 连 山

(研究生用)

辽宁师范大学化学系 大连

一九八六年十月

目 录

第一章 绪 论

§ 1-1 色谱法的历史	1
§ 1-2 色谱法与分类和定义	3
§ 1-3 色谱法特点和研究对象	4
§ 1-4 气相色谱过程	6

第二章 色谱理论

§ 2-1 历史情况	12
§ 2-2 平衡色谱理论	13
一、基本假设和基本关系式	13
二、对保留体积的解释	17
三、对色谱流出峰形状的解释	21
§ 2-3 塔板理论	22
一、基本假设	22
二、色谱流出曲线方程式推导	24
三、对保留值的阐明	26
四、流出曲线方程的连续函数形式	29
五、流出峰达到极大值的组分在柱后浓度	35
六、理论塔板高度的计算方法	37

七、从塔板理论来看影响区域宽度的因素.....	33
-------------------------	----

八、塔板高度的流计意义.....	42
------------------	----

§ 2-4 色谱的速率理论

一、塔板理论的弱点和速率理论的提出.....	45
------------------------	----

二、速率理论方程引出.....	46
-----------------	----

三、从速率方程来看实现高效色谱的方法的一些讨论.....	52
------------------------------	----

§ 2-5、关于色谱峰非对称性问题.....	56
------------------------	----

第三章 色谱固定相与色谱分离条件选择

§ 3-1 液体固定相—固定液.....	61
----------------------	----

§ 3-2 担体.....	78
---------------	----

§ 3-3 固体吸附剂.....	88
------------------	----

§ 3-4 新型合成固定相.....	90
--------------------	----

§ 3-5 色谱分离的优化指标.....	96
----------------------	----

一、色谱分离条件的优化指标—色谱响应函数 (CRF).....	96
---------------------------------	----

二、总分离效能指标 K_r 的定义.....	98
--------------------------	----

三、峰高分离度 K_r 的定义.....	100
------------------------	-----

四、总分离度指标与分析误差的关系.....	101
-----------------------	-----

1. 峰面积定量法.....	101
----------------	-----

2. 峰高是量法.....	109
---------------	-----

五、影响总分离效能指标的因素.....	111
---------------------	-----

六、色谱柱系统的选择性指标.....	113
--------------------	-----

§ 3-6 色谱操作条件的选择与预测.....	115
-------------------------	-----

一、根据分析任务确定所需的总分离效能指标.....	115
二、最难分离“物质对”的预测.....	115
三、同系物中最难分离“物质对”的预测.....	116
四、异构体中最难分离“物质对”的预测.....	117
五、载气最佳流速的选择.....	117
六、色谱柱温度的确定.....	119
 第四章 定性分析.....	123
§ 4—1 定性分析.....	123
§ 4—2 定性方法.....	127
 第五章 定量分析	
§ 5—1 定量分析的理论依据.....	147
§ 5—2 峰面积的测量方法.....	148
§ 5—3 定量校正因子及其应用.....	155
§ 5—4 定量计算方法.....	161
一、绝对法.....	161
二、标准样校正法.....	162
三、归一化法.....	163
四、内标法.....	165
五、内加法.....	167
六、载化定量法.....	169

第一章 绪 论

§ 1-1 色谱法的历史

色谱法是在1906年俄国植物学家茨维特(M. Tswett)首先提出来的概念。他做这样一个实验,将绿色植物的叶子和清浩的砂子放在一起,用乳钵研磨,再加进石油醚进行提取,而植物叶中的色素被提取到石油醚中,将石油醚的提取液通过一根填充碳酸钙粉的玻璃柱管,这时植物色素被吸附在柱管顶部,用纯石油醚冲洗,随着石油醚溶剂不断通过碳酸钙柱管,携带着植物各种色素向下移动,这时从横的方向上可以看到在碳酸钙柱管上出现淡褐色、黄色、绿色的色带(轮)。即将提取液中各种色素(胡萝卜素、叶黄素、叶绿素A、叶绿素B)清楚的分开。同时, Tswett发现并命名了A和B两种叶绿素的存在。由于分离的是有色物质,在柱子上呈现的各种色带。因此称这种分离分析方法为色谱法。后来这种方法也广泛地应用于不带有颜色的物质分析,乃至今日仍沿用“色谱”一词,但是随着科学的发展已经失去原来的意义了。在1907年德国生物学学会会议上, Tswett第一次向人们公开展示了采用色谱法提纯植物色素溶液以及色谱图,显示着彩色环带柱管。但是当时Tswett不是一位著名的植物学家,而他的色谱论文又是用俄文发表的,这样,刚刚诞生的色谱分离技术并没有引起人们的注意。

事隔20年后, Knhn 和 Lederer 为了证实蛋黄内的叶黄素系植物叶黄素与玉米黄质的混合物。参考了 Tswett 的文章后他们采用了色谱法。用粉状的碳酸钙装填色谱柱,成功地从蛋黄中分离出

了植物的叶黄素。Kuhn、Lederer 工作的重要意义不仅仅在于证明了蛋黄叶黄素是氧化类胡萝卜素的混合物，更重要的是证实了 Tswett 的方法是可以用来进行制备分离。从此以后，色谱分离方法才迅速为各国科学工作者注意和应用。

液一固色谱的进一步发展有赖于瑞典科学家 Tiselius 以及 Claesson 的努力，他们创立了液相色谱的前缘分析与取代扩展技术。将吸附色谱法用于气体分析应归功于 AYouHuH, M 等人，他们采用前缘分析法分析了丙烷、戊烷、己烷及丙烷、己烷、空气的混合物。

分配色谱是由著名的英国学者 Martin 及 Sengé 创立的。1941 年，Martin 和 Syngé 采用硅胶饱和水分作为固定相，以含有乙醇的氯仿为冲洗剂分离乙酰基氨基酸。他们的文章中曾指出：“采用气体代替液体作为流动相分离各类化合物的可能性是存在的。”但是在实际工作中还需解决分离后物质的鉴定问题，由于当时的二次世界大战，研究工作迟迟未能跟上，最后还是 Martin 与 James 采用了自动滴定仪为鉴定器分析了脂肪酸，创立了气液色谱法。在气一液色谱法中，采用涂渍在惰性担体上的高沸点液体为固定相，代替了吸附分配原理，这样就大大地扩大了气相色谱法的应用范围，弥补了吸附种类不多的缺陷。从此以后，气相色谱技术得以广泛应用，蓬勃发展起来。

液一固色谱是最大先创立的方法，但自从 Tswett 创立液一固色谱后的五十多年的时间里，液一固色谱置并无多大的改进，进展十分缓慢，但到六十年代，采用了高压输液泵以及 学检测器，制出了多种高效微粒填充剂，大大提高了液相色谱的分析速度和色谱的分离能力，使液相色谱无论在技术还是仪器上，都产生了一个飞跃。目前，

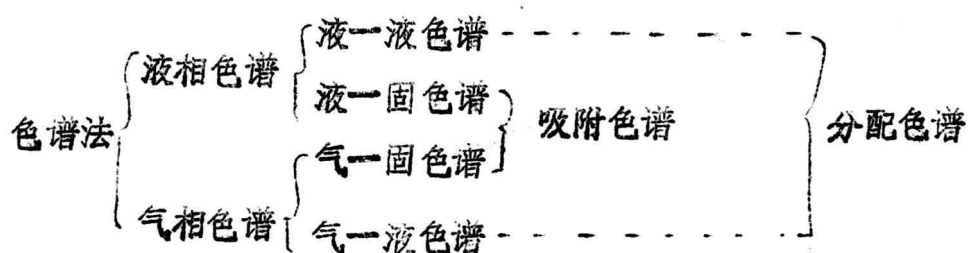
气相色谱与液相色谱并驾齐驱，相辅成，这两种色谱方法都已成为分析复杂混合物必不可少的手段。

§ 1—2 色谱法的分类和定义

从不同的角度有不同的分类方法

一、按流动相和固定相的聚集状态分类

用气体作流动相叫“气相色谱”，用液体作流动相叫“液相色谱”。由固定相的两种聚集状态，所以可组合四种色谱技术来。如下图反示。



二、按分离过程的物理化学原理分类

1. 吸附色谱：利用吸附剂表面对不同组分物理吸附性能的差别进行分离。

2. 分配色谱：利用不同组分在二相中分配系数不同进行分离。

3. 离子交换色谱：利用组分的离子交换能力不同进行分离。

按其他作用原理，还可分为凝胶色谱，配合色谱，电色谱，热色谱等。

三、按固定相的形状分类

1. 柱色谱； 2. 纸色谱； 3. 薄层色谱。

四. 按色谱动力学过程分类

1. 冲洗法：也叫洗提扩展。它是色谱过程中最常用的方法。

Tswett 分离植物色素就是用的这种方法。

2. 顶替法：也叫取代扩展。当试样加入色谱柱后，最后一种组分^{组分}吸附（或溶解）能力比所有组分都强的物质为流动相。此后各组分依次顶替流出。吸附能力最弱的组分，将首先流出色谱柱。这种方法有利于族分离，不能用于单组分分析。

3. 迎头法：又称前缘分析。将样品连续不断地通入色谱柱中，在柱后可得台阶形的浓度变化曲线。根据台阶位置可定性，按台阶高度进行组分定量。

从上面不难看出，色谱法虽然有各种类型，但都包括固定相和流动两部分。因此我们可下一个包括各种色谱法的定义，即什么是色谱分析法？这种方法是利用被研究的物质组分在两相中分配系数的差异，当两相作相对运动时，使组分在两相之间进行反复多次（可达2000~100万次）的分配。这样可使得原来有微小性质差异的组分，产生很大移动速度上的差别，从而使各组分得到分离。分析及测定一些物理化学常数的目的。

§ 1-3 色谱法的特点与研究对象

1. 能使许多化学性质相同的复杂组成的组分相互分离。在分析化学中有些很难对付的各种类的异构体。光学对映体等物质的分离分析，采用色谱有时很容易做到。但是在建立某一色谱分析法时，必须测定各纯物质的定量校正因子或作它们的定量分析校正曲线。即使分析一个组分也要这样作。因此较为费事。

2. 色谱法最大本事是分离，最大弱点是定性困难。因为从色谱图（ $mv \sim t$ 曲线）中也很少看出分子结构的信息，即若没有已知样品对照或文献上的保留数据参考对照，很难确定哪个峰代表什么，或代表哪个官能团。这一点尚需向质谱、尖谱请教。看来，人无完人，仪（器）无完仪，这种绝对观的方法论是可望而不可及。

3. 色谱法，不仅进行物质的分离分析，而且可以测定一些物理化学常数。例如，测定溶质在稀溶液的活度系数（见物化实验）以及砂化学家用色谱手段测定物理化学过程中的焓变（ ΔH ），熵变（ ΔS ），也有可能测定绝对反应速度。但也有其不足，数学处理太复杂。

由此看来，色谱法研究的对象首先还是混合物分离问题。使被分开的二物质（以后称为“物质对”）分开的流出峰相隔足够远，峰宽要窄。

另外，实验中“物质对”的两个峰有时重叠在一起，这时如何将它们完全分开？为此，要从物质在色谱中的运动情况来考虑。而要从物质在流动相，固定相中的分配扩散，输运速率的热力和动力学两方面考虑提高分离分析的选择性。

色谱法是一门物理分离技术，但学分析的人总想让它为定性定量服务。为此，必需在实验中找到或预测合适的操作条件，保证分离分析结果的准确性。

§ 1-4 气相色谱过程

一般常用的气相色谱所采用的基本流程如图 1-1 所示。

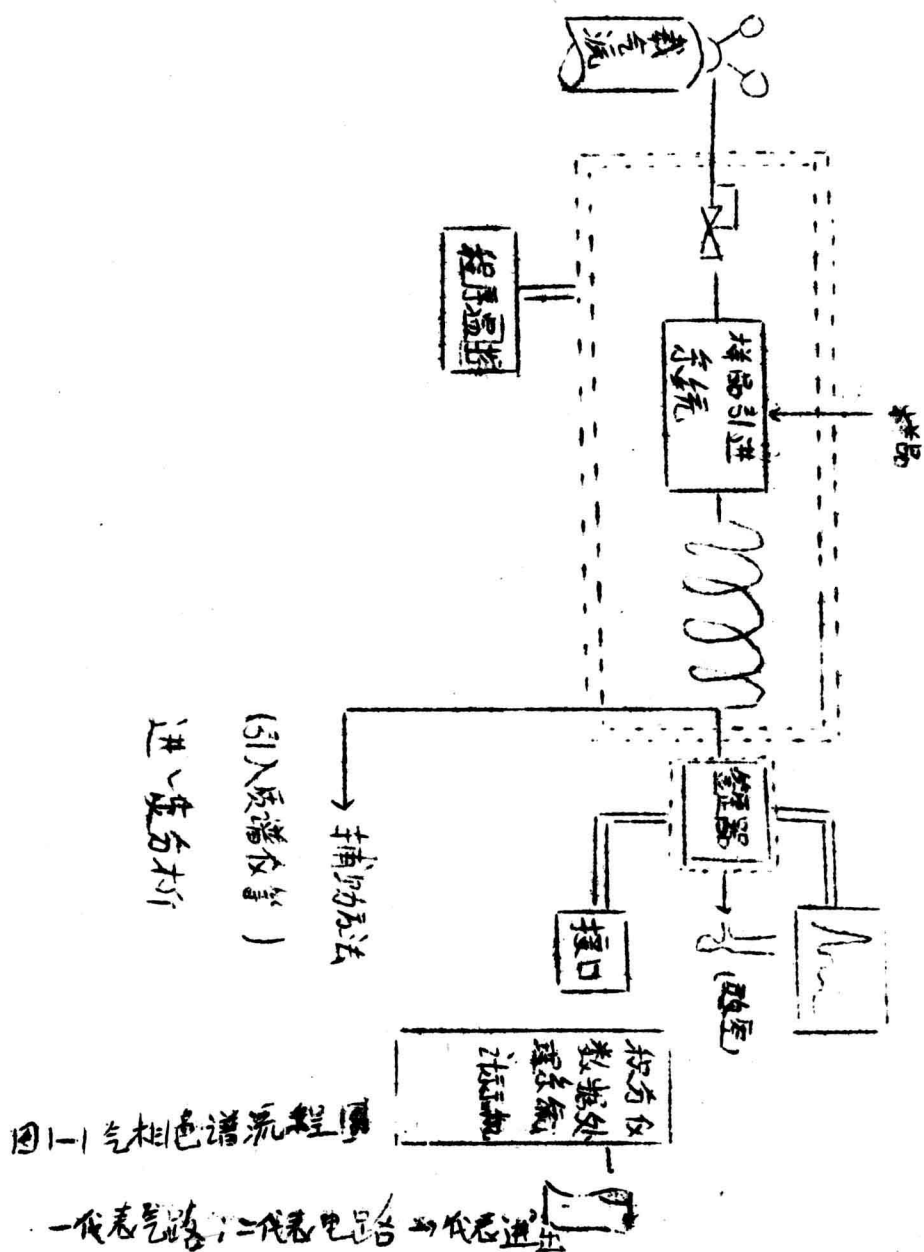


图 1-1 气相色谱流程图

气相色谱虽然型号很多，形式各不一样但主要由以下四部分组成：

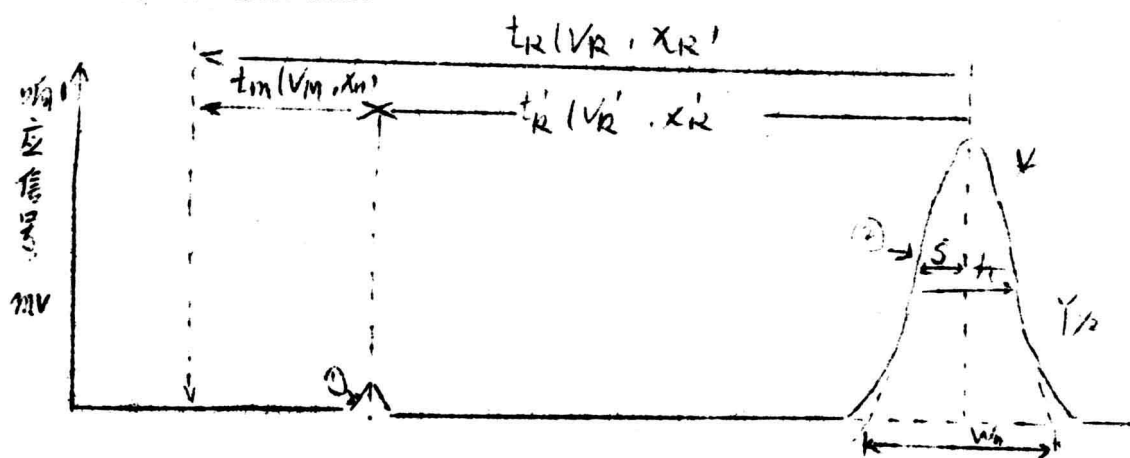
1. 载气钢瓶和流量调解系统，钢瓶流量表等。

2. 分离系统，色谱柱和进样器。

3. 检测系统，主要是检测器，记录仪。

4. 辅助系统，包括数据处理系统计算机和联用仪器（质谱等）

在进样前，先把载气调节到所需的流速，把气化室，色谱柱和检定器各调到所需要的温度。被分析样品从注射器进到气化室后，当样品受被气化并被载入色谱柱进行分离。经分离后的各各组分先后进入检定器，产生一定的输出讯号，经放大记录在记录器上。得到色谱图（见图 1-1）。色谱图是在检定器上产生的信号对时间作的图形。利用样品中组分在图上一定的保留时间来定性，用峰面积或峰高加以校正后进行定量。



→ 时间 t (体积, V ; 距离, X)

图 1-2 色谱流出曲线及保留值

~ 7 ~

图中 1. 不被吸附或溶解组分空气峰, 2. 样品组分峰

从色谱图中可看出如下的一些参数:

1. 色谱峰(流出峰)和基线

由检测器输出电信号强度对时间(或载气体积 V 或记录纸距离 X) 作图, 如果是不随时间变化的直线, 把这条直线叫基线; 如果曲线上出现突起部分, 就是色谱峰。

色谱峰的峰宽(也叫区域宽度)可以用下面三种方法来表示。

- (1) 半峰宽: 即峰高一半处的宽度, 常用 $Y_{1/2}$ (或 $2\Delta t_{1/2}$ 、 $2\Delta V_{1/2}$ 、 $2\Delta X_{1/2}$) 表示。
- (2) 基线宽度: 从峰两边拐点作切线, 并与基线相交点之间的距离。常用 W_b (或 Y) 表示。

- (3) 标准偏差: 曲线拐点处宽度的一半, 常用 σ 符号表示。
 $4\sigma = W_b$ 。

2. 死时间 (t_M), 保留时间 (t_R), 调整保留时间(也叫校正保留时间) (t'_R)

死时间 (t_M) 是指不被固定相吸附或溶解(如空气或甲烷)从进样到柱后出现浓度极大值所需的时间。它是气体流过色谱柱空隙所需的时间。用 t_M 表示。扣除死时间的保留时间称为组分的调整保留时间。它是组分在担体外层固定中停留的时间。用 t'_R 表示。

$$t'_R = t_R - t_M \quad (1-1)$$

3. 死体积 V_M , 保留体积 V_R , 调整保留体积 V'_R

保留时间受载气流量影响。为了消除这一影响, 保留值可用流过载气的体积来表示, 称为保留体积。即用保留时间乘以载气平均

流量，即

$$\text{保留体积 } V_R = t_R \times F_c^l$$

$$\text{死体积 } V_M = t_M \times F_c^l$$

$$\text{调整保留体积 } V'_R = t'_R \times F_c^l$$

式中， F_c^l 表示操作条件下柱内载气的平均流量， F_c^l 可用下式计算。

$$F_c^l = F_{c0}^l \left(\frac{P_0 - P_W}{P_0} \right) \times \frac{8}{3} \left(\frac{(P_i/P_0)^2 - 1}{(P_i/P_0)^3 - 1} \right) \times \frac{T_c}{T_r}$$

..... (1-3)

式中， F_{c0}^l 代表用皂膜流量计测定的柱后流量

P_0 是柱后压（大气压）

P_W 是饱和水蒸气压。

P_i 是柱进口压力。

T_c 、 T_r 分别是柱温和室温，用 (K) 表示。

当载气流速（毫升/分） F_c^l 变大，保留时间变小，反之显然，故保留时间 $\times F_c^l = \text{常数}$ ，因此，用保留体积作色谱定性指标与载气流速无关。

4. 比保留体积 V_g

校正保留体积虽然消除了载气流速影响但仍和固定液含量有关，故引入比保留体积概念，在 0°C 时每克固定液的校正保留体积叫比保留体积，可用下式计算

$$V_g = \frac{273^\circ K}{T_c} \times \frac{V'_R}{W} \quad (\text{单位: ml/g}) \quad (1-4)$$

式中， W 代表固定液重量（单位，克）， T_c 是柱温（°K 表示）

V_g 值不受柱长，载气流速和固定液含量影响，仅与温度有关。
 V_g 可从有关文献中查到。

5. 相对保留值 $\gamma_{i,s}$

相对保留值 $\gamma_{i,s}$ ，又称溶剂效率 α ，它是某一组分 i 的校正保留值与一个标准物 s 的校正保留值的比值，所以叫相对保留值。

$$\gamma_{i,s} (= \alpha) = \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rs}} = \frac{V'_{Ri}}{V'_{Rs}} = \frac{V_{gi}}{V_{gs}} \quad (1-5)$$

只要柱温，固定相性质不变，即使载气流速固定液量由挥发有变化而 $\gamma_{i,s}$ 值不变。

色谱法分离是根据各组分分配系数的差异，而保留值又是色谱法进行定性的重要指标。因此我们下面进一步介绍保留值与分配系数的关系。

1. 分配系数 (K)

分配系数又称平衡常数，它是在一定温度和压力下，组分在液相和气相中的浓度比。

$$K = \frac{\text{组分在液相中的浓度 (克/毫升)}}{\text{组分在气相中的浓度 (克/毫升)}} = \frac{C_L}{C_M} \quad (1-6)$$

分配系数 K 随温度而变化，与柱中气相和液相的体积无关。

2. 分配比 (K')

分配比又称容量因子，容量比，分配容量。它是表示组分在一定温度和压力下，平衡时组分在液相和气相的重量比。

$$K' = \frac{\text{组分在柱中液相中的重量}}{\text{组分在柱中气相中的重量}} = \frac{p}{q} \quad (1-7)$$

分配比 K' 和分配系数 K 有如下关系:

$$K' = \frac{p}{q} = \frac{C_R \cdot V_R}{C_M \cdot V_M} = K \cdot \frac{V_R}{V_M} \quad (1-8)$$

组分在两相的分配比等于组分在液相中的停留时间与在气相中停留时间之比

$$K' = \frac{\tau_R'}{\tau_M} = \frac{V_R'}{V_M} \quad (1-9)$$

所以分配比可通过实验直接从色谱图上求出。

将式 (1-8), (1-9) 结合, 得到

$$\frac{V_R'}{V_M} = K \frac{V_R}{V_M}, \quad V_R' = KV_R$$

因 $V_R' = V_R - V_M$, 故

$$V_R' = V_M + KV_R \quad (1-10)$$

式 (1-10) 直接把色谱的保留值和热力学系数 K 联系起来。所以可用色谱质测定一些热力学常数; 另外也看出, 当实验条件一定时 (温度, τ_M , V_R , V_M 等) 一定时, 调整保留时间 τ_R' 和分配系数 K 成正比。由于分配系数是由组分性质决定的。从而是可以调整保留时间 τ_R' 进行定性的。

第二章 色谱理论

§ 2-1 历史情况

上面我们介绍了色谱过程，有了一些感性知识，这一章我们介绍一些色谱理论。目的是为了了解释色谱流出曲线的形状，说明影响色谱区域宽度的扩张因素和机理，研究物质在色谱过程中的运动情况，从而为得到高效能色谱柱系统提供理论上的指导以及为选择色谱分离条件打下理论基础。不过，色谱理论至今还不太成熟，只能定性或半定量地解释色谱过程的一些实验现象。尽管如此，从中还是可以为高效能色谱柱系统提供理论上的指导以及为选择色谱分离条件奠定理论基础。

早在1940年，随早液体色谱的发展Wilson就提出了平衡色谱理论。后来 Vault 等人又作了进一步发展，将其理论用于解释实验事实，并对于谱线移动的速度和非线性分配等温线时的流出曲线形状给了较好的说明。但是由于他们的理论忽略了传质速率有限性与物质分子纵向扩散性的影响，因而对于在线性色谱条件下区域扩张的现象不能给予解释。1941年，Martin和SYnge 在他们的第一篇关于分配色谱文献中发展了分配系数与谱带速率的理论关系，而引入理论塔板的概念。在这个理论中，色谱过程被比拟为蒸馏塔的蒸馏过程，而色谱柱被为一系列小段的平衡单元——理论塔板的结合。在色谱柱足够长，理论塔板高度充分小以及分配等温线呈线性的情况下，这个理论对色谱流出曲线分布和谱带移动规律以及柱长与理论塔

塔板高度 H 对区域扩张的影响给出了较好的阐明。由于塔板理论对影响理论塔板高度 H 的各种因素没有从本质上说明，因而这个理论还只是半经验式的理论，并未能掌握色谱过程的本质。

首先揭露影响色谱区域宽度内因素的是气相纵向扩散理论和考察传质速率有限性的速率理论。当物质在两相间交换很快的情况下，气相纵向扩散理论在气相色谱中具有一定的指导意义；而在液相色谱中，当纵向扩散的影响允许忽略，而考察传质速率有限性时速率理论也取得了重要的成就。

由于色谱过程中，影响区域扩散的因素是多方面的，深入地研究又进一步地推动了理论的发展。在气相色谱方面出现了考察传质速率和纵向扩散同时影响的 Golay 方程式，以及考察传质速率和纵向扩散互相影响的关系式，在液相色谱方面 Horvath 和 Lin 根据间隙流滞流体模型导出了描述液一固色谱塔板高度的关系式。这些发展都使色谱理论更全面确切地揭露色谱过程的本质做出贡献。更好地说明色谱过程中的各种操作参数对柱效能影响。

本章中，将介绍一些基本的，常用的色谱理论，如色谱平衡理论，塔板理论，速率理论。最后简洁讨论色谱的不对称峰，以使理论与实验结合起来，打好“立业”的基础。

§ 2-2 平衡色谱理论

一、基本假设和基本关系式

平衡色谱理论由 Wilson 等人发展起来的。假设组分在流动相和固定相之间的分配平衡，在整个色谱过程中均能瞬时达到，那么就不考虑传质速率的有限性和物质的弥散对平衡形成的影响。根据物料平