

分析化学手册

〔美〕J.A.迪安 主编



科学出版社

www.sciencep.com

第 4 章 色 谱 法

4.1 色谱技术	4.4
4.1.1 色谱法的分类	4.4
4.1.2 色谱中的术语与相互关系	4.4
图 4.1 显示无保留溶质 t_M 及被保留物质 1,2 的保留时间和谱带宽度 W 的色谱图	4.5
图 4.2 不同内径色谱柱的线速和流速的比较	4.6
图 4.3 溶质的谱带曲线和用于柱效评价的色谱峰	4.8
图 4.4 谱带不对称性	4.9
图 4.5 分离度定义	4.10
表 4.1 与相对保留值有关的值	4.10
表 4.2 达到给定分离度所需的理论塔板数	4.10
图 4.6 气相色谱柱的典型 H/u (范第姆特) 曲线	4.12
4.1.3 定量分析	4.12
图 4.7 (a)用球-盘积分仪估算峰面积(b)处理基线校正的方法	4.13
4.1.4 样品的表征	4.15
图 4.8 一些同系物系列的保留时间(对数刻度)与碳原子数的关系图	4.16
4.1.5 衍生化反应	4.16
图 4.9 双柱图	4.17
4.1.6 制备色谱	4.18
参考书目	4.19
4.2 气相色谱法	4.19
4.2.1 载气的考虑	4.20
4.2.2 进样系统	4.21
表 4.3 热解吸方法	4.25
4.2.3 气相色谱柱	4.26
表 4.4 GC Porapak TM 多孔聚合物色谱固定相的特性	4.27
表 4.5 相当的气相色谱柱载体	4.28
表 4.6 Chromosorb 载体的性质	4.28
表 4.7 GC 载体的推荐液体负载	4.28
表 4.8 填充柱内径、柱长、颗粒大小和载气流速的关系	4.29

表 4.9 1/8 英寸(0.316cm)填充柱与大口径和 WCOT 柱的比较	4.29
表 4.10 GC 开管柱工作指南	4.30
4.2.4 固定相	4.31
表 4.11 气相色谱固定相的麦克雷诺常数	4.32
表 4.12 气相色谱固定相(每个极性组按字母顺序排列)	4.34
表 4.13 不同类型被分析物与所用固定相的对照表	4.35
表 4.14 气相色谱应用举例	4.35
4.2.5 检测器	4.43
图 4.10 GC 检测器的相对响应	4.44
表 4.15 火焰离子化检测器给出很小或无响应的气态物质	4.45
4.2.6 温度控制	4.47
4.2.7 气-固色谱法	4.48
表 4.16 气-固色谱法柱填料	4.48
4.2.8 超临界流体色谱法	4.49
4.2.9 分离优化	4.52
4.2.10 系统故障排除	4.55
参考书目	4.56
4.3 高效液相色谱法	4.56
4.3.1 液相色谱仪组成	4.57
表 4.17 典型的键合相填料特征	4.61
表 4.18 在 25℃ 有相同折光率和相同密度的溶剂	4.64
4.3.2 梯度洗脱(溶剂程序)	4.66
4.3.3 液-固色谱法(LSC)	4.67
表 4.19 色谱法常用溶剂	4.68
4.3.4 液-液色谱法	4.69
表 4.20 HPLC 应用方法举例	4.70
图 4.11 从一种溶剂组成转换至另一种的计算图	4.72
4.3.5 离子色谱法	4.72
图 4.12 离子色谱中使用各种洗脱液分离阴离子的简图	4.77
表 4.21 离子色谱法可测定的离子	4.77
表 4.22 离子色谱法应用方法举例	4.79
表 4.23 离子排阻填料 ORH-801(相互作用)的容量因子和保留时间	4.80
4.3.6 HPLC 的优化或方法开发	4.81
表 4.24 不同实验条件的典型性能	4.82
4.3.7 排阻(凝胶渗透)色谱法	4.82
图 4.13 排阻色谱的保留行为	4.83
4.3.8 疏水相互作用色谱法	4.84
4.3.9 故障排除	4.84

4.3.10 安全	4.86
参考书目	4.87
4.4 平面色谱法	4.87
4.4.1 薄层色谱法	4.87
表 4.25 溶剂强度参数的经验值 S	4.89
表 4.26 Brockmann 活性值	4.91
4.4.2 溶质的显色和定性鉴定	4.95
表 4.27 用于不同化合物官能团的喷雾显色试剂	4.95
4.4.3 定量	4.100
4.4.4 纸色谱法	4.101
4.4.5 区带电泳	4.102
4.4.6 毛细管电泳	4.104
参考书目	4.106
参考文献	4.106

4.1 色谱技术

色谱法是一种分离技术,它将试样分离成许多馏分,然后用某种方法对馏分进行测量和鉴定.欲分离的组分被分配在两种互不相溶的相层中.固定相是任何色谱的核心,它有时是固体但通常为液体.固定相附着在载体上,载体是惰性固体物质.试样常以气体形式或溶解在溶剂中,在流动相——气体或液体——的推动下,横过或通过固定相.当流动相通过固定相时,试样组分在两相间多次进行一系列的交换分配.分离的依据是试样中各组分的物理与化学性质的差别,这些差别控制着各个组分的运动(叫迁移)速度.当一个试样组分出现在色谱仪出口时,称之为洗脱.理想情况下,组分以高斯峰形式按与固定相相互作用增强的顺序从系统中流出.当一种组分被阻滞,足以不与相邻的一个峰重叠时,就实现了分离.

4.1.1 色谱法的分类

流动相可以是气体或液体,而固定相则只能是液体或固体.若固定相装在一根柱子里,则称为柱色谱法.固定相也可以占据一个平面,例如滤纸等,这就被称为平面色谱法,包括薄层色谱法、纸色谱法和电泳.

依流动相的物理状态,柱色谱法又可以再分成气相色谱法(GC)和液相色谱法(LC).如果样品以气体形式通过色谱仪,这种分析方法就是气相色谱法.气相色谱法包括气-液色谱法(GLC)和气-固色谱法(GSC),这是根据固定相的状态命名的.

液相柱色谱法包含了液体流动相和各种固定相之间数种不同的相互作用类型.若分离主要涉及在两种互不相溶的液体(一个固定相和一个流动相)之间的简单分配,此过程称之为液-液色谱法(LLC).在液-固(或吸附)色谱法(LSC)中,固定相的保留能力主要与物理表面作用力有关.在离子色谱中,离子或带电物质通过与固定相的对离子相互选择交换而分离,这就是离子交换色谱(IEC)、离子对色谱、或离子排阻色谱.在用多孔型聚合物填充的柱子中,样品组分可以利用排阻色谱法分离(也称凝胶渗透色谱),其分离依据主要是分子尺寸和几何形状.

4.1.2 色谱中的术语与相互关系

溶质的色谱行为可以用保留体积 V_R (或相对应的保留时间 t_R) 和分配比(或容量比) k' 描述.记录纸的距离通过乘以纸速转化为时间,及通过流速乘以时间转化为体积.假定流速是不变的,保留时间与保留体积可交换使用.

4.1.2.1 保留时间

流动相将溶质从注射点传递至固定相,再经过固定相至检测器(至图 4.1 溶质峰的顶部)所需时间定义为保留时间.保留体积是保留时间乘以体积流速 F_c ,我们将在后面讨

论.

$$V_R = t_R F_C \quad (4.1)$$

4.1.2.2 无保留溶质的保留时间

t_M 或 t_0 (见图 4.1) 是通过系统时未被吸附或分配的物质所需的时间, 也就是无保留溶质通过色谱柱的时间. 它代表着平均流动相分子通过固定相, 即经过柱或平面相的时间. 当转化体积为 V_M 时, 代表了柱的空体积 (死体积或滞留体积). 柱的死体积或死时间通常被认为是基线的第一次波动, 但是在 LC 分离中 t_M 处经常没有基线波动.

实际上, t_M 通常是通过注射 $k' = 0$ 的溶质而得到的 (也就是所有溶质都处于流动相中, 在固定相中没有分配). 当在气相色谱中使用热导检测器时, 注射空气就可得到 t_M , 对于其他的 GC 检测器, 沸点低于柱温 90°C 以上的溶质峰可给出 t_M 的估计值. 如用火焰离子化检测器时, 可以用甲烷达到这个目的.

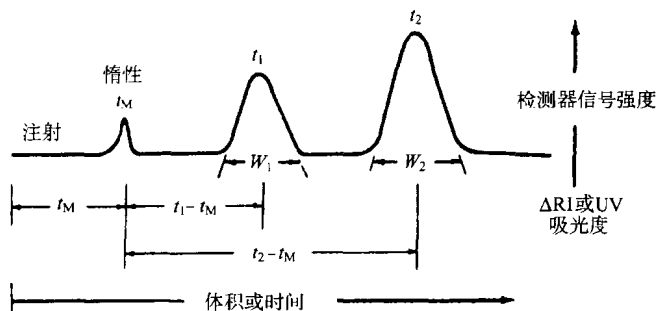


图 4.1 显示无保留溶质 t_M 及被保留物质 1, 2 的保留时间和谱带宽度 W 的色谱图

4.1.2.3 调整保留时间

保留时间 t_R' 或体积 V_R' 是扣除了流动相时间或体积的保留值, 在理论研究中很有用.

$$t_R' = t_R - t_M \text{ 或 } V_R' = V_R - V_M \quad (4.2)$$

4.1.2.4 体积流速

用柱参数可将体积流速 F_C 表示为

$$F_C = \frac{\pi d^2}{4} \epsilon \frac{L}{t_M} \quad (4.3)$$

式中: d 为柱内径;

L 为柱长;

ϵ 为柱填充的总孔隙率.

固体填料的总孔隙率为 0.35~0.45, 而多孔填料的总孔隙率为 0.7~0.9, 毛细管柱的总孔隙率是 1.

从等式 (4.3), 不同直径色谱柱的适当流速可以在假定两个柱子填充密度相同的条件

下大致估算出. 如果是这样, 那么

$$(F_C)_2 = (F_C)_1 d_2/d_1 \quad (4.4)$$

例如: 在内径为 4.6mm 的柱上, 以 $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度进行分析. 如果在内径为 9.4mm 的制备柱中希望获得相同的线流速, 则合适的体积流速应为 $2 \times (9.4/4.6)^2$, 即 $8.4\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. 增加柱长会成比例地增加柱效和分析时间, 但不影响流速.

4.1.2.5 流动相的速度

流动相的平均线速度 u 由无保留溶质通过柱子所需的时间测定.

$$u = L/t_M \quad (4.5)$$

例 4.1 通过 15m 色谱柱的线速为 $43\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, t_M 为多少?

$$t_M = L/u = 1500\text{cm}/43\text{cm}\cdot\text{s}^{-1} = 34.8\text{s}$$

在同样的流速下, 柱子的内径变化, 线速也变化. 要客观地比较色谱柱, 必须在同样的线速下操作. 图 4.2 给出了不同填充柱内径的线速与体积流速的关系(假定每个柱的填充密度相同).

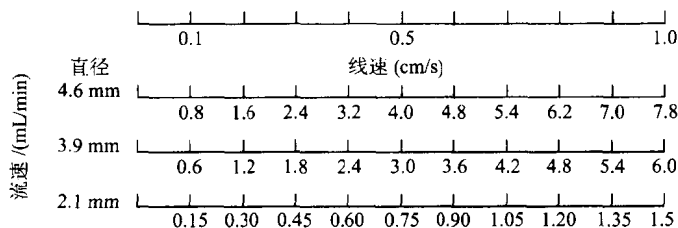


图 4.2 不同内径色谱柱的线速和流速的比较

4.1.2.6 分配系数

分配系数 K 是溶质在固定相(液相)与流动相(气相或液相)中的浓度比.

$$K = \text{流动相中溶质浓度} / \text{固定相中溶质的浓度} \quad (4.6)$$

它是一个热力学参数, 与温度和溶质自流动相至固定相的标准自由能变化有关.

4.1.2.7 分配比

分配比(或容量因子) k' 是样品分子在等度分离中被色谱柱保留程度的度量. 是溶质洗脱所用的时间与无保留溶质(其 $k' = 0$) 的保留时间之差除以无保留溶质洗脱时间.

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{KV_S}{V_M} \quad (4.7)$$

式中, V_S 和 V_M 分别是固定相和流动相的体积. 对于诊断目的, k' 值准确到整数就可以了.

保留时间通过下式与 k' 相关联:

$$t_R = t_M(1 + k') = \frac{L}{u}(1 + k') \quad (4.8)$$

分配比 k' 和溶质保留时间受分离时所用溶剂的组成(如果是液体)、固定相和温度(通过 K) 的影响. 通过延长每种溶剂在固定相中的相对保留时间, 厚的固定液膜可以增加溶质的分离度. 这需要配合增加柱固定相液膜厚度 d_f 来实现. 公式(4.9)指出了色谱柱的相比 β 与分配系数和分配比之间的关系.

$$K = \beta k' = \frac{r}{2d_f} k' \quad (4.9)$$

升高柱温可以减少厚液膜柱所增加的保留. 如果一个分析在标准液膜厚度的色谱柱上需要在低于室温的柱温条件下进行, 则使用厚液膜柱可在较高柱温下进行, 这对色谱工作者是有利的. 溶质的保留时间也受到柱长和流动相流速的影响. 记住, 尽管当流速变化时, t_M 也变化, 但 k' 不变.

例 4.2 如果例 4.1 中物质的 $k' = 2.25$, t_R 和 t_R' 的值为多少?

$$t_R = t_M(1 + k') = (34.8s)(1 + 2.25) = 113s(\text{或 } 1.88\text{min})$$

$$t_R' = t_R - t_M = 113 - 34.8 = 78s(\text{或 } 1.31\text{min})$$

4.1.2.8 柱的选择性或相对保留值

相对保留值 α 是一个选择性术语, 它有几种表示方法:

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R,2}'}{t_{R,1}'} \quad (4.10)$$

其中溶剂 1 在溶剂 2 前洗脱. 相对保留值越大, 邻近的两种被分析物之间的分离度越好. 相对保留值取决于: (1) 固定相和流动相的性质; (2) 色谱柱的操作温度. 对于给定的色谱柱, α 只是柱温的函数.

4.1.2.9 柱效能: 塔板高度和塔板数

最常用的色谱系统的效能参数是塔板数 N . 当洗脱发生时柱效决定了峰的宽窄程度. 柱数一般用色谱柱对给定峰所能提供的塔板数来表征. $\frac{L}{N}$ 给出塔板高度 H , 其中 L 为柱长, H 代表溶质经历一次分配时移动的距离. 在比较不同长度的柱时, 塔板高度是一个方便的参数.

有效塔板数 N_{eff} 反映了溶质经过柱时在流动相和固定相之间分配的次数.

$$N_{\text{eff}} = \frac{L}{H} = \left(\frac{t_R'}{\sigma}\right)^2 \quad (4.11)$$

式中, σ^2 是以时间为单位的谱带方差.

在理想的操作条件下, 溶质谱带的曲线接近于图 4.3 所示高斯分布曲线. 在 4σ 的基线宽度包含了 95% 的溶质谱带, 6σ 则包含了 99%, 其两边尾翼各留 0.5%.

在相同的操作条件下, 对一个测试色谱图测得的塔板数可以与柱制造商的数据进行比较. 峰底宽度 W_b 的实验测定值是峰两侧拐点的切线与基线相交点之间的距离. 它等同于 4 倍的标准偏差(即 $\sigma = W_b/4$), 故有

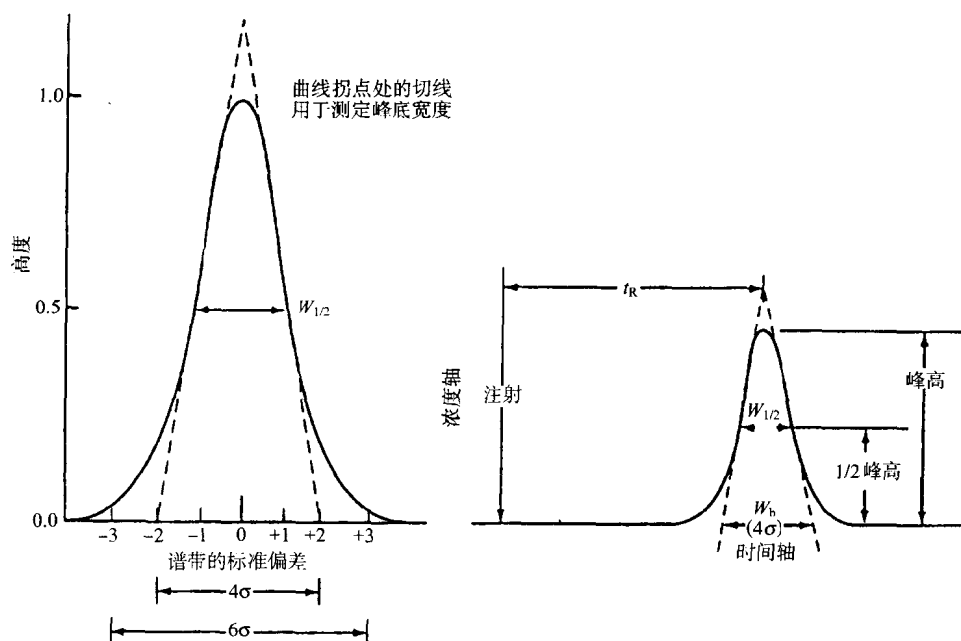


图 4.3 溶质的谱带曲线和用于柱效评价的色谱峰

$$N_{\text{eff}} = 16 \left(\frac{t'_R}{W_b} \right)^2 \quad (4.12)$$

测定半峰宽 $W_{1/2}$ 是更好的选择,特别是当峰不对称时.故

$$N_{\text{eff}} = 5.54 \left(\frac{t'_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (4.13)$$

表观(或理论)塔板数 N_{app} 与前面处理的不同之处只是采用了未调整的保留时间(或体积).它可以测量整个系统的效能,而不仅仅是色谱柱的效能.一般来说,对于标准填充柱,仪器死体积的贡献额较小,当柱的内径与长度变小时,仪器的贡献就会变得明显.

前面曾指出,调整保留时间在理论上比保留时间更重要.因此,在比较色谱柱时,有效塔板数经常是更好的参数,特别是当填充柱与开管柱比较时.

与 N 值较小的色谱柱相比, N 值大的色谱柱产生的峰较窄且分离度更好.当测量 N 时, k' 至少为 3, 大于 5 更好.有效塔板数随着 k' 增加而增加,在高 k' 值时,将趋近 N_{app} , 此时 t_M 远小于 t_R .

例 4.3 当使用 1.5m 的色谱柱在 25℃ 分析时,溶质的 $t_R = 9.55\text{min}$, 该溶剂的有效塔板数是多少? $W_b = 0.71\text{min}$, 在同一色谱图上甲烷的保留时间为 0.39min.

用甲烷(b.p. -182.5℃)的保留时间作为 t_M , 结果是

$$t'_R = 9.55 - 0.39 = 9.16\text{min}$$

$$N_{\text{eff}} = 16 \left(\frac{9.16}{0.71} \right)^2 = 2660$$

和 $H = 1500\text{mm}/2660 = 0.56\text{mm}$

4.1.2.10 谱带不对称性

峰的不对称性或拖尾因子 TF 被定义为特定峰高时峰半宽的比, 常常是在 10% 的峰高处. 如图 4.4 所示.

$$TF = \frac{b}{a} \quad (4.14)$$

对称峰的 TF 值为 1, 拖尾峰的值大于 1, 前伸峰(前沿处, $a > b$)的值将小于 1.

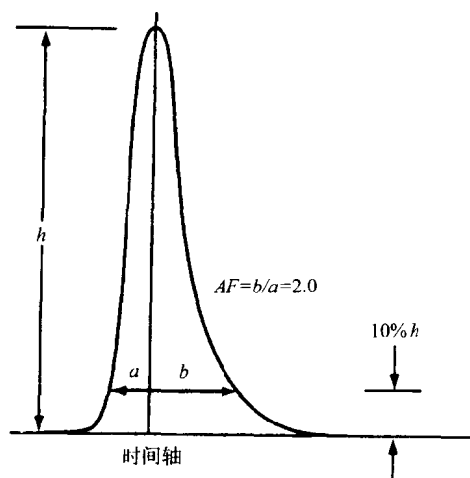


图 4.4 谱带不对称性

当峰的 $k' = 2$, 不对称因子在 0.95 ~ 1.15 范围外时, 柱的表观塔板数若按公式 (4.12) 或 (4.13) 计算就会特别高, 此时宜按 Dorsey-Foley^[1] 公式计算:

$$N_{\text{eff}} = \frac{41.7 \left(\frac{t'_R}{W_{0.1}} \right)^2}{\left[\left(\frac{b}{a} \right) + 1.25 \right]} \quad (4.15)$$

4.1.2.11 分离度

两个相邻谱带的分离程度即分离度, R_s 的定义为两相邻峰(或峰中心)之间的距离除以平均谱带宽度. 如图 4.5 所示. 以时间为单位测量:

$$R_s = \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{0.5(W_2 + W_1)} \quad (4.16)$$

为方便起见, 表达式常简化为

$$R_s = \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{W_2} \quad (4.17)$$

严格地讲, 公式 (4.16) 或 (4.17) 只有当两个峰具有相同峰高时才有效. Snyder^[2] 曾提出一个实用的方法, 他的论文包括了有各种峰高比和分离度的用计算机绘出的成对色谱峰. 给定的实验色谱图与报告中提出的相比较后, 选出实验色谱图与指定分离度值匹配最

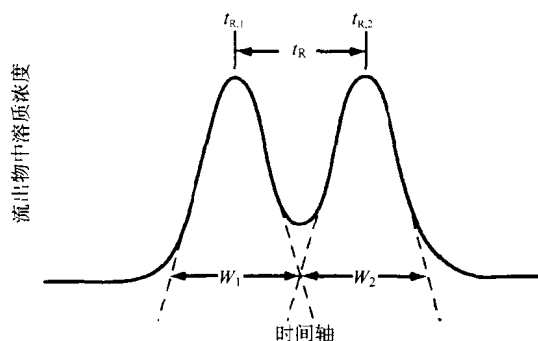


图 4.5 分离度定义

佳的结果。

前面的公式定义了在一定条件下的分离度,但它未能使分离度与分离条件关联起来,也未能指出如何提高分离度.对于后面一个目的,基本分离度公式如下

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \left(\frac{L}{H} \right)^{1/2} \quad (4.18)$$

对于两个特定(通常是相邻)的溶质的分离,所需塔板数($N = L/H$)与相对保留值(表 4.1)和分配比成反比.增加 k' ,则 $(k' + 1)/k'$ 减少(表 4.2).

表 4.1 与相对保留值有关的值

α	$\left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2$	N_{req} 当 $R_s = 1.5$ 和 $k' = 2$ 时	L_{req}/m 当 $H = 0.6\text{mm}$ 时
1.01	10 201	826 281	495
1.02	2 601	210 681	126
1.03	1 177	95 377	52
1.04	676	54 756	33
1.05	441	35 721	21
1.10	121	9 801	5.8
1.15	58	4 418	2.6
1.20	36	2 916	1.7
1.25	25	2 025	1.2
1.30	19	1 514	1.0

表 4.2 达到给定分离度所需的理论塔板数

容量因子 k'	$R_s = 1.5$		$R_s = 1.0$	
	$\alpha = 1.05$	$\alpha = 1.10$	$\alpha = 1.05$	$\alpha = 1.10$
0.2	571 500	156 800	254 000	69 700
0.5	142 900	39 200	63 500	17 400
1.0	63 500	17 400	28 200	7 700
2.0	35 700	9 800	15 900	4 400
5.0	22 900	6 300	10 200	2 800
10.0	19 200	5 300	8 500	2 300
20.0	17 500	4 800	7 800	2 100

一根柱子可能有足够选择性,但柱效却低(相邻谱带分得开,但峰不够窄).另一方面,谱带可能窄,分离却差(柱效好但选择性差).

例 4.4 求反-2-丁烯($t_R = 3.12\text{min}$)和顺-2-丁烯($t_R = 3.43\text{min}$; $W_b = 0.31\text{min}$)的分离度.

$$R_s = \frac{t_{R,\text{顺}} - t_{R,\text{反}}}{W_{b,\text{顺}}} = \frac{3.43\text{min} - 3.12\text{min}}{0.31\text{min}} = 1.00$$

这不是基线分离度的 1.5,但是分离度与柱长的平方根成比例,增加柱长 2.25 倍(2.25 的平方根为 1.5).

$$\frac{(R_s)_2}{(R_s)_1} = \left(\frac{1.5}{1.0}\right)^2 = 2.25$$

4.2.8 节和 4.3.4 节将分别讨论气相色谱和柱液相色谱中操作条件的优化.

4.1.2.12 分离数

TZ 即分离数曾用来表示柱的分离效能.它是理论上在两个相邻的正构烷烃同系物之间可以分离的峰的数量.

$$TZ = \left(\frac{t_{R,b} - t_{R,a}}{W_{0.5,a} + W_{0.5,b}} \right) - 1 \quad (4.19)$$

式中, a 和 b 是相邻的同系物,而 $W_{0.5}$ 是半峰宽.这两个峰通常是相差一个亚甲基的直链烷烃.分离度值和 TZ 值的关系如下:

$$R_s = 1.177(TZ + 1) \quad (4.20)$$

在程度升温分析中,塔板数或有效塔板数不再有意义,此时 TZ 是有用的.无论操作条件如何, TZ 等于 5 意味着在色谱图的这一范围两个相邻的正构烷烃之间可以分离开 5 个相邻洗脱的被分析物($R_s = 1$).

Giddings^[3] 计算了不同色谱技术的峰容量.

4.1.2.13 范第姆特方程

柱效能与选择性不同,它是流动相平均速度、柱内径或平均颗粒直径、载气类型(在 GC 中)和溶质类型及其保留性能与固定相液膜厚度的函数.范第姆特方程将塔板高度与流动相速度和实验变量关联起来.两个 C 项分别代表固定相中和流动相中的质量传递. Hawkes^[4] 评述了曾被提出的各种速率方程,提出了新的方程.

$$H = A + \frac{B}{u} + C_{\text{固定相}}u + C_{\text{流动相}}u \quad (4.21)$$

A 项的定义为

$$A = \lambda d_p \quad (4.22)$$

式中: d_p 是颗粒直径; λ 是填充均匀性和柱的几何形状的函数. A 项(多径项)反映填料颗粒周围流速和路径长度的不均匀性.在现代速率理论中, A 项与 $C_{\text{流动相}}$ 项偶合.在开管柱中, A 项为 0.

B 项的定义为

$$B = 2\gamma D_M \quad (4.23)$$

式中, γ 是阻滞因子, 它反映由填充床结构阻碍造成的轴向扩散. D_M 是溶质在流动相中的扩散系数. 溶质分子将从谱带中心位置的高浓度区域向低浓度区域扩散, 这一扩散与 D_M 成正比. 其效应是时间的函数, 随着时间增加, 谱带扩展了, 谱带的最大值降低了. 这导致了被分析物通过系统时的谱带展宽. 在开管柱中, γ 值是 1; 对于填充柱, 玻璃珠的 γ 值是 0.6~0.7, 红色硅藻土 W(Chromosorb) 为 0.74, 红色硅藻土 P(Chromosorb) 为 0.46, 纸为 0.7~0.9. 在很多色谱分析中, 由于流动相速度足够大, 所以 B 项就不重要了.

$C_{\text{固定相}}$ 项与 d_f/D_s 成正比. 其中 d_f 是固定相的膜厚, D_s 是溶质在固定相中的扩散系数.

$C_{\text{流动相}}$ 项与 d_p/D_M 成正比. 其中 d_p 是填料的颗粒直径, D_M 是溶质在流动相中的扩散系数. 图 4.6 为范第姆特曲线, 说明了一个特定组分的柱效与流速(线性速度)的关系.

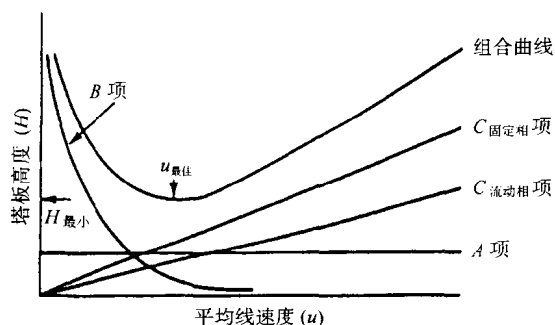


图 4.6 气相色谱柱的典型 H/u (范第姆特) 曲线

4.1.2.14 分析时间和分离度

保留时间与给定分离度所需的塔板数、分配比、塔板高度和流动相线速的关系为

$$t_R = N_{\text{req}}(1 + k') \left(\frac{H}{u} \right) \quad (4.24)$$

或

$$t_R = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right) \left[\frac{(1 + k')^3}{k'^2} \right] \left(\frac{H}{u} \right) \quad (4.25)$$

每个色谱柱都有最佳的流动相速度. 当 $k' = 2$ 时, t_R 为最小, 也就是 $t_R = 3t_M$. 当流动相速度超过最佳值时, 柱效逐渐有损失, 但分析速度提高了(保留时间较短). 实际上, 当 k' 在 1 和 10 之间时, 分析时间增加甚微. 流动相速度增长两倍, 分析时间大约减半(实际上是 H/u 值影响分析时间). H/u 值可以从实验塔板高度-线速图中得到. 于是可作一些折衷, 当柱子分离能力大时(相对尖的峰之间距离大), 可牺牲柱效以提高分析速度.

4.1.3 定量分析

对溶质浓度有应答的色谱检测器产生信号, 信号大小与通过检测器的溶质浓度成比

例. 对这些检测器而言, 峰面积与组分质量成正比, 与流动相流速成反比. 因此, 在进行定量分析时, 流速必须保持不变.

对质量流速有应答的微分型检测器, 峰面积不受移动相流速影响.

4.1.3.1 峰面积积分

4.1.3.1.1 峰高

从基线至峰最大值的距离为峰高. 虽然简单, 但峰高对操作条件和样品注射的小变化敏感. 精确度比测量峰面积好, 特别是对窄峰.

4.1.3.1.2 峰高乘以半峰宽

这种测量是基于假定理想高斯峰为三角形. 在峰底画基线, 测峰高. 将测量尺置于峰半高处, 并平行于基线, 测此处的峰宽. 面积则是高乘以宽.

4.1.3.1.3 盘式积分仪

盘式积分仪具有良好精确度, 与峰形无关. 图 4.7 说明了如何阅读积分仪画线. 锯齿型线的一个行程(无论向上或向下)代表 100 个面积计数. 锯齿间的每个水平间隔的值为 10, 小于 10 的值是估算的. 某些盘式积分仪将稍伸出最高水平线的两个齿尖之间的面积作为 600 个面积计数, 这样使得计算完整行程数更为容易.

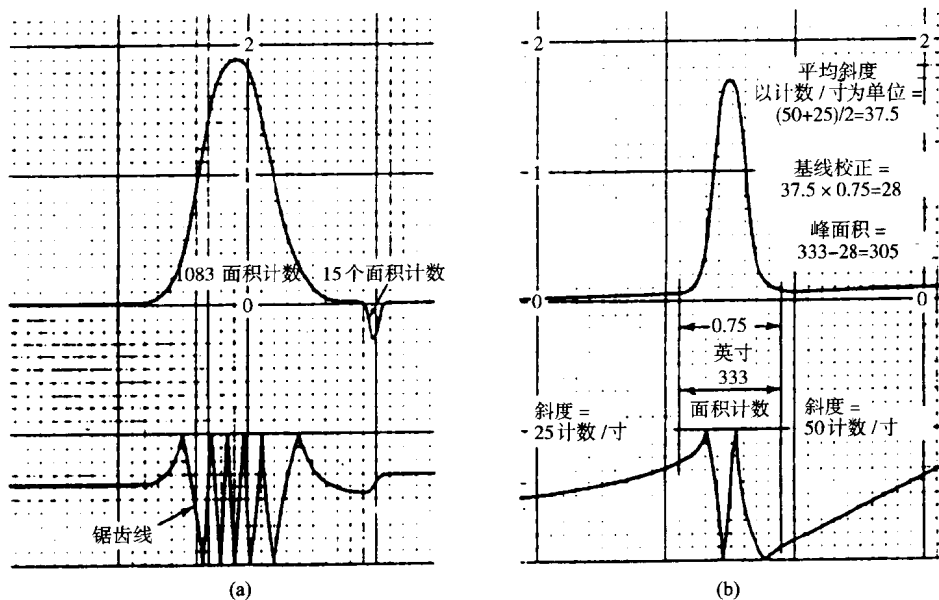


图 4.7 (a)用球-盘积分仪估算峰面积; (b)处理基线校正的方法

4.1.3.2 计算积分仪

计算积分仪能够从色谱峰曲线离开基线点到回到基线点之间通过集束自动测定峰面积, 对于重叠的色谱峰, 采用特别计算方法分配面积至每个组分. 在恒温分析中, 软件可随时间自动改变斜率的灵敏度. 这使得尖而窄峰和低而平峰具有相同的测定精度.

4.1.3.3 计算方法

一旦峰高或峰面积被测定, 有 4 个主要的计算方法可将这些数值表征为溶质的量.

4.1.3.3.1 标样校正

每种组分的校正曲线通过纯标样分析来绘制,对标样和样品使用相同的进样体积和操作条件.被测组分的浓度可以从它的校正曲线上读出,或者,如果曲线是线性的话,

$$X = K(\text{面积})_x \quad (4.26)$$

式中: X 是溶质的浓度; K 是比例常数(校正曲线的斜率).在这种计算方法中只有要计算的组分的峰面积需要测定.但此方法依赖于操作者,需要有好的实验室技术.

当面积转化为体积时和当给定检测器对每种分子类型的化合物响应不同时,必须考虑相对响应因子.

例 4.5 邻二甲苯和甲苯的相对响应因子(相对于苯,苯的值指定为 1)分别是 0.570 和 0.793.这三种溶质的未知混合物给出峰高(mm)如下:苯,98;邻二甲苯,87;甲苯,86.

$$\begin{aligned} \text{总的折合响应} &= \frac{H_{\text{bz}}}{1.00} + \frac{H_{\text{xyI}}}{0.570} + \frac{H_{\text{tol}}}{0.793} \\ &= \frac{98}{1.00} + \frac{87}{0.570} + \frac{86}{0.793} \\ &= 98 + 153 + 108 = 359 \end{aligned}$$

苯: $(98/359)(100) = 27.3\%$;

邻二甲苯: $(153/359)(100) = 42.6\%$;

甲苯: $(108/359)(100) = 30.1\%$.

4.1.3.3.2 面积归一化

欲使用这种方法,全部样品必须都能被洗脱.全部组分必须分离,而且每个峰必须完全分离.每个峰下面的面积都要测量,必要时用上述的响应因子校正.所有峰面积一起相加.每个峰的面积乘以 100,再除以总峰面积就得到了这个组分的百分含量.如果某一样品组分不能从色谱柱上流出或所用检测器不对该组分产生信号,定量结果将是无效的.

4.1.3.3.3 内标法

这种技术中,对已知量的内标物进行色谱分析,并获得面积对浓度的关系.然后将已知量的内标物加进未作任何样品预处理或分离操作的“原始”样品中.样品分析中内标的峰面积与内标单独分析时的峰面积相比.这个比值用做进样量变化、任何样品预处理操作中的损失、或样品不完全洗脱的校正系数.用作内标物的物质必须与邻近的样品组分完全分离,决不能干扰样品组分的分离,且样品本身根本不含该物质.

例 4.6 假定 50.0 mg 的内标物加入 0.500g 的样品中.所得到的色谱图显示 5 个组分,其面积(任意单位)如下: $A_1 = 30$, $A_2 = 18$, $A_{\text{标}} = 75$, $A_3 = 80$, $A_4 = 45$,加起来总值为 248.样品中组分 3 的含量为

$$W_3 = W_{\text{标}} \left(\frac{A_3}{A_{\text{标}}} \right) = 0.0500 \left(\frac{80}{75} \right) = 0.0533\text{g}$$

组分 3 百分含量:虽然样品 3 看起来是主要的组分,但只代表了全部样品的 10%

$$\left(\frac{0.0533\text{g}}{0.500\text{g}} \right) \times 100 = 10.66\%$$

大部分样品并未显示在色谱图上,当有机混合物含有某些无机盐时就是这种情况.此

时,一般需要确定响应因子比值(比如 $K_{\text{标}}/K_3$)

$$\frac{K_{\text{标}}}{K_3} = \frac{(W_3 A_{\text{标}})}{(W_{\text{标}} A_3)}$$

4.1.3.3.4 标准加入法

如果只有少数样品进行色谱分析,很可能使用标准加入法.先记录未知样品的色谱图,然后在样品中加入已知量的被分析物,使用相同的试剂,仪器参数和分析流程重新获得色谱图.根据峰面积(或峰高)的增加,通过内插法就能计算出原来的浓度.检测器响应值必须是被分析物的线性函数,在分析物零浓度时无信号产生(除了背景).在标准物加入和实际分析之间必须有足够的时间,以使加入的标准品与任何基质干扰物之间建立起平衡.

如果未知浓度 x 的样品得到的仪器读数(面积或高)为 R_x ,加入已知浓度 a 的被分析物后,样品所得读数为 R_1 ,那么 x 可以从下式求得

$$\frac{x}{(x+a)} = \frac{R_x}{R_1} \quad (4.27)$$

如果加入的标样量明显地改变了样品总的体积,就必须做稀释校正.常需要加入至少另一个标样检验结果.从统计学的角度看,加入被分析物的量等于原样品中该物质量的两倍或一半是最佳的.

4.1.4 样品的表征

4.1.4.1 保留数据的使用

在固定条件下,特定溶质的保留时间是不变的,所以可以用来鉴定该溶质.这可通过比较样品组分和纯标样的保留时间来完成.

对于等度(HPLC)和等温(GC)洗脱,保留时间一般呈规律性变化,可以通过分子中某些重复取代基团 i 来预测,例如同系物中的 $-\text{CH}_2-$ 官能团.

$$\log t_{R,i} = mN_i + \text{常数} \quad (4.28)$$

式中: m 是常数; N_i 是同系物系列中重复基团数(或碳原子数)(图 4.8).实际上分配比 k' 优于保留数据,因为 k' 不受流动相流速或柱几何形状的影响.

在样品中加入某一组分的纯标样可以确认给定组分的色谱峰.若两个组分相同,只有峰高会变化.当然,如果采用此法鉴定峰,纯标样必须是可获得的.

4.1.4.2 科瓦茨保留指数系统^[5]

目前尚无相对于单一标准物的保留数据,因此文献中也就没有相对保留数据的表.科瓦茨建议使用一系列标准物,他推荐使用正构烷烃.根据定义,这些碳氢化合物的保留指数(RI)被指定为参考数,即分子中碳原子数的 100 倍.如丁烷、戊烷、己烷、辛烷的保留指数分别是 400, 500, 600 和 800,而不管使用的柱或操作条件(但是必须明确标明操作条件与色谱柱,如液体的负载量,使用的某种载体和任何预处理方法).当用特定的柱子等温分析时,被分析物的调整保留时间的对数(流速及压力降必须恒定)对碳原子数作图,结果是直线,如公式(4.27)所预期.如果其他组分在相同的条件下进行实验,它的保留指数可以从图中查出.换句话说,保留指数可以用下式计算:

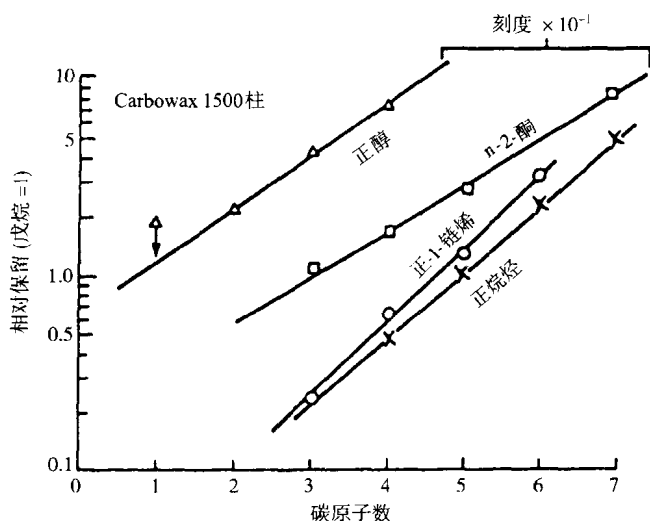


图 4.8 一些同系物系列的保留时间(对数刻度)与碳原子数的关系图

$$I = 100 \left[\frac{(\log t'_R)_{\text{未知物}} - (\log t'_R)_x}{(\log t'_R)_{x+1} - (\log t'_R)_x} \right] + 100x \quad (4.29)$$

式中: x 代表刚好在未知物前流出的碳原子数为 x 的链烷烃, $x+1$ 代表刚好在未知物后流出的 $x+1$ 个碳原子数的链烷烃。

保留指数已经成为报告 GC 数据的标准方法。根据定义,就像标准所规定的那样,任何同系物系列的成员彼此之间相差 100 个单位。这种关系并不总是准确的,但却十分流行,在特别的应用中也有用其他同系物作标准的。

4.1.4.3 色谱交互查对

用保留时间(或 k' 值)鉴定样品组分的能力通过使用不同固定相(在气相色谱中)得到明显的增强。一个柱子使用极性固定相,第二个柱子用非极性固定相,将提供更多的信息。如果取两个固定相的保留时间相对作图,可以得到通过原点的直线(每个同系物一条)。如果取保留时间的对数作图,根据每一个同系物组官能团的重复数(或 C 数目),可以得到具有线性分布点的相应平行线系列(图 4.9)。

气相色谱中的保留指数系统,如 Kovats 指数系统和 Rohrschneider 或 McReynolds 常数也可用于定性分析。这些将在 4.2.4.2 节中讨论。

4.1.4.4 辅助技术鉴定

前面所述基于保留时间的技术都不能作出绝对的鉴定结论,因为很多组分有相同的保留时间。然而,一些光谱技术可以独立获得结构信息。这就导致了联用技术,如气相色谱-质谱和气相色谱-红外光谱。若能获得参考光谱图,就可能从结构上鉴定化合物。

4.1.5 衍生化反应^[6]

用于色谱分析的衍生化反应大多数可归入三种反应类型:硅烷化、烷基化和酰化反