

现代仪器分析

马登龙 副教授

denglong.ma@xjtu.edu.cn

第7章 色谱法导论

(Chromatography)

- 7.1 概述
- 7.1.1 色谱分析法简介

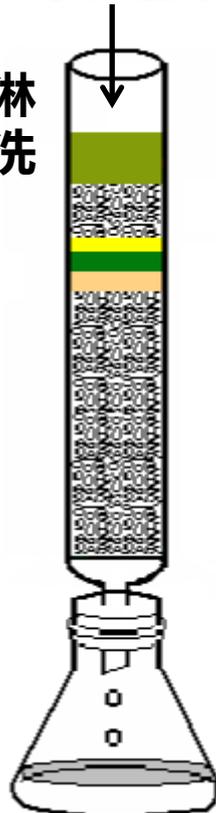
石油醚提取叶色素

石油醚 (流动相)

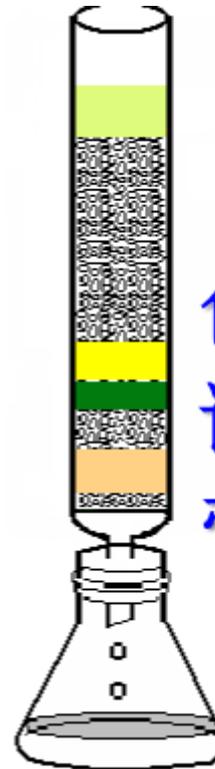
碳酸钙
(固定相)



淋洗



色谱柱



色谱带



茨维特, M. C.

1906年,
Tswett 研究植
物色素分离,
提出色谱法概念;



保罗·卡勒 (Paul Karrer)，瑞士化学家，植物色素、维生素研究
1937年获诺贝尔化学奖。



里夏德·库恩
奥地利-德国化学家；
胡萝卜素结构方面的
研究；
1938年度的诺贝尔化学
学奖金

- ✓ 1931年，R.库恩才发现茨维特所发明色谱法的重要性，此法才得到普遍的推广和应用；
- ✓ 凭借对色谱法的运用，卡勒与库恩分别于1937年，1938年荣获科学界的巅峰之奖——诺贝尔化学奖

色谱法的发展

色谱分析法 = 色谱法 + 定性 & 定量分析各组分

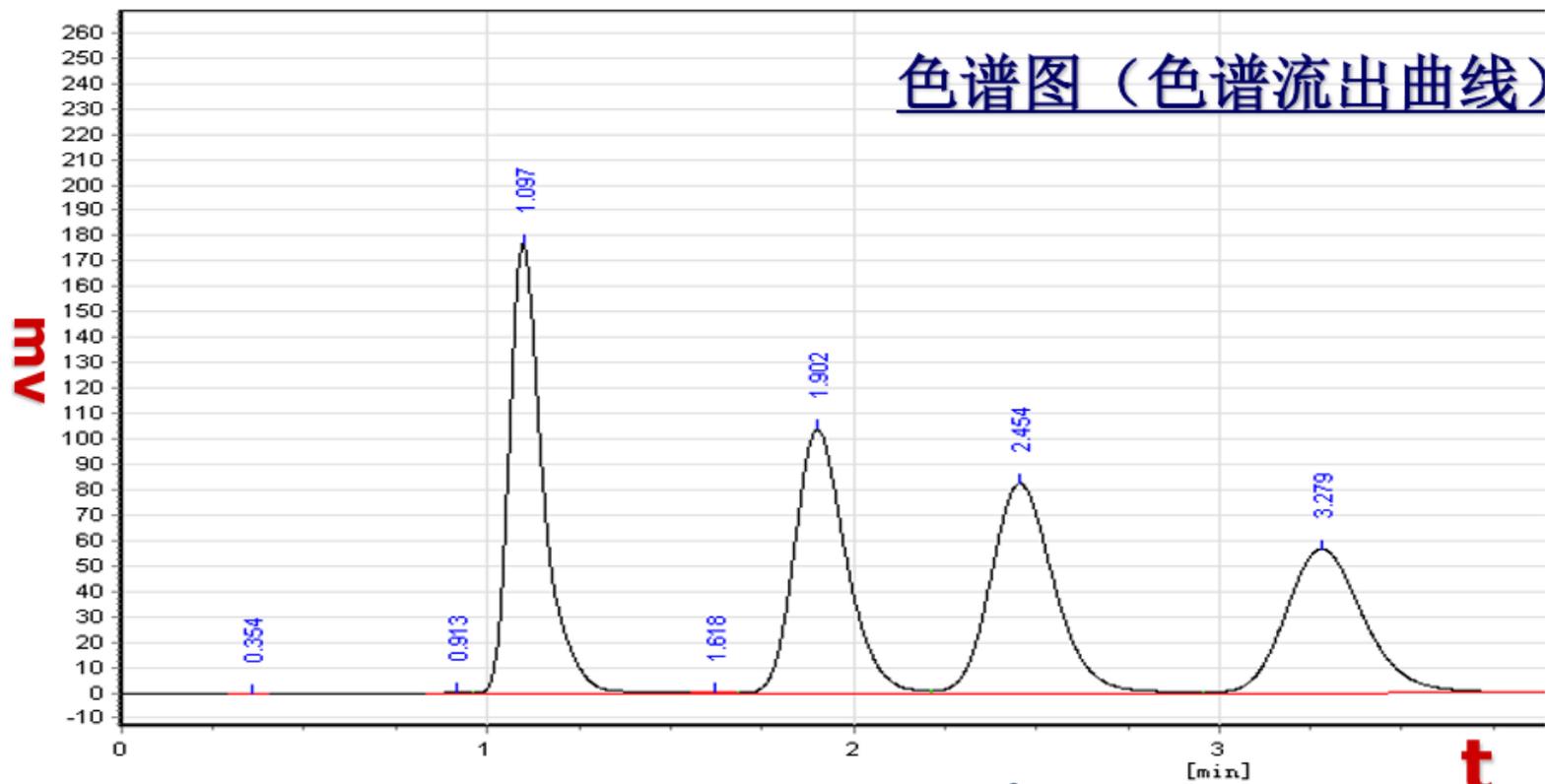
- **色谱技术**: 由色谱法 → 色谱分析法
- **分离物类型**: 由“有色” → “无色”
- **流动相**: 由液体 → 气体 → 超临界流体
- **固定相**: 由固体 → 液体
- **分离机理**: 由利用吸附差异
→ 利用其他性能差异
- **联用技术**: 由单型色谱分析
→ 色谱与其他分析技术的联用分析

7.1.2 色谱法分类

分类依据	色谱名称
流动相状态	气相色谱、液相色谱、超临界流体色谱
固定相状	气固色谱、气液色谱、液固色谱、液液色谱
操作形式	柱色谱、平板色谱（纸色谱和薄层色谱）
分离原理	吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、凝胶色谱
分析目的	分析色谱法、制备色谱法

7.1.3 色谱法的的基本概念

1. 色谱图



三要素:

横坐标: 组分出峰时间 (min)

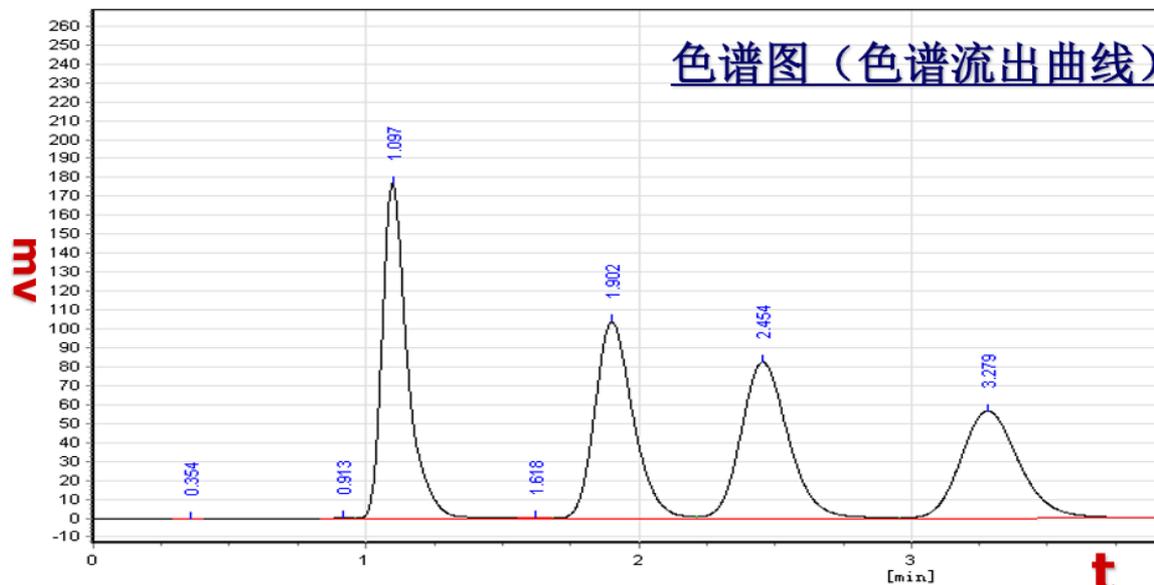
纵坐标: 响应值 (即组分的峰面积A 或峰高h)

每个峰: 表示一个完整结构的待分离纯组分。

得到哪些
信息?

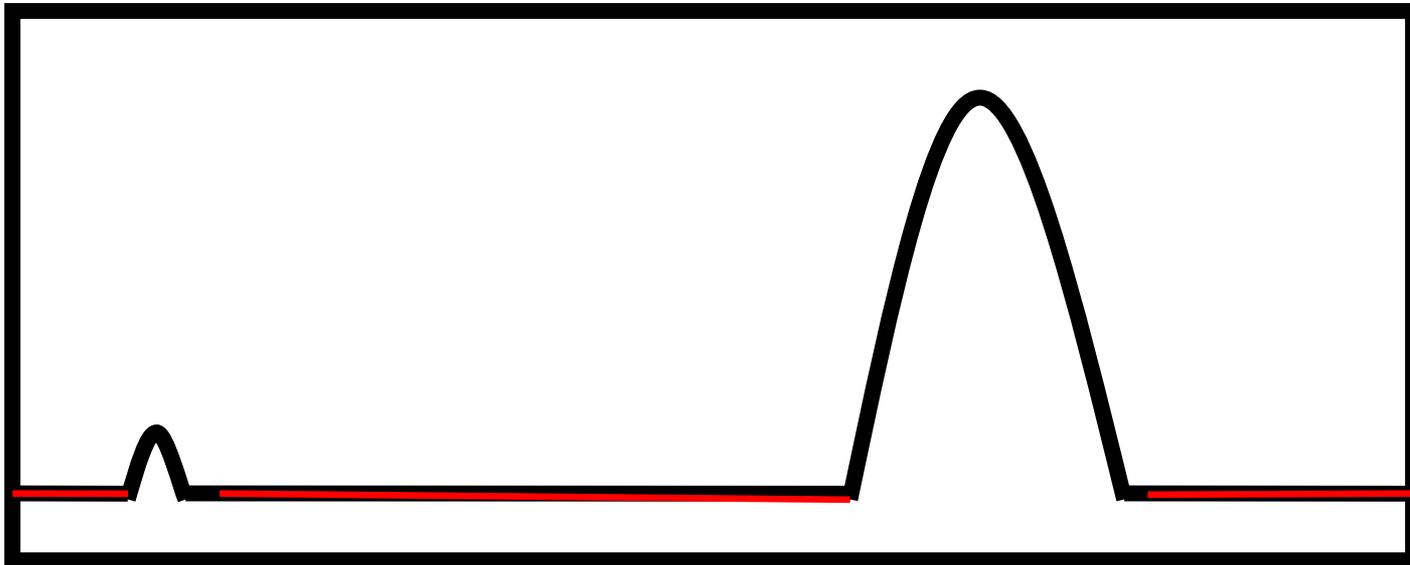
2. 色谱图中的重要信息

- 基线
- 保留时间 t_R 或保留体积 V_R
- 死时间或死体积
- 峰高 h 或峰面积 A
- 峰形 (峰宽)
- 分离度 R
- 色谱峰的个数



(1) 基线

- 只有流动相而没有组分通过检测器时的色谱曲线。
- 它反映了检测器稳定性随时间变化 而变化的情况。

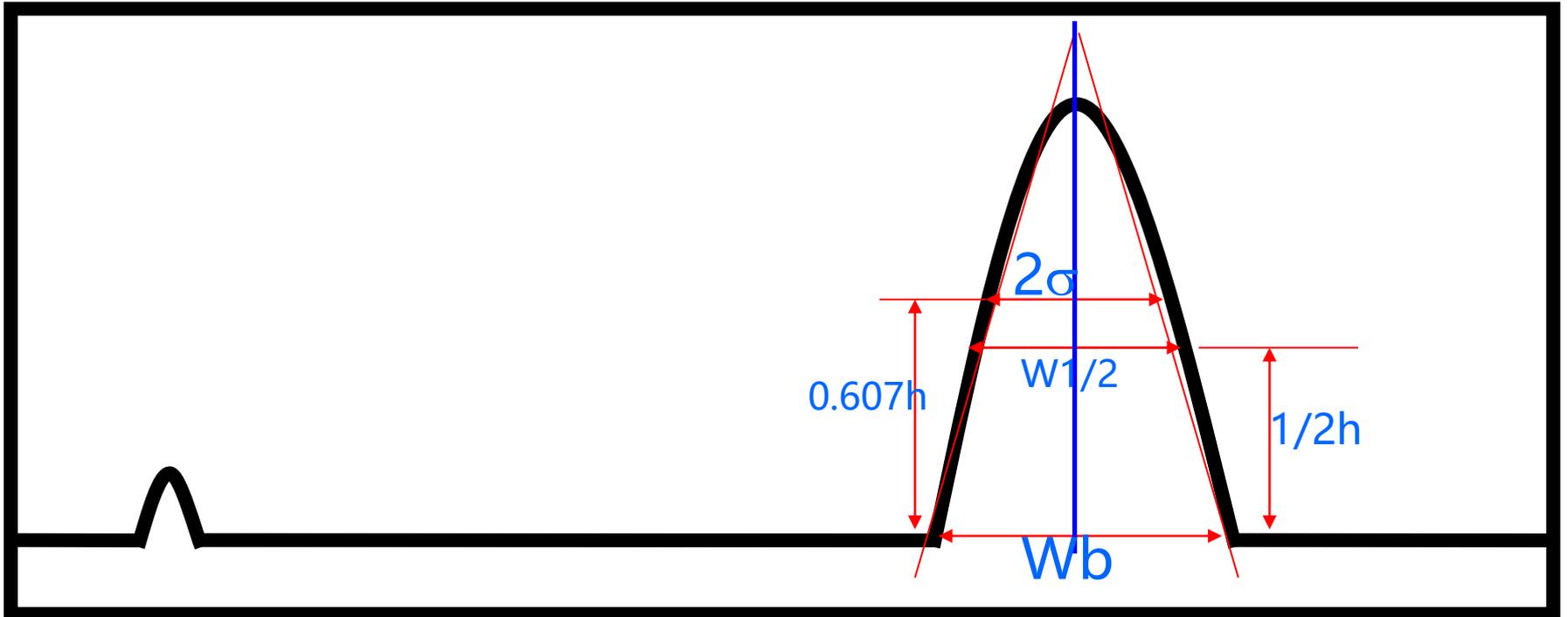


➤ 不正常基线会出现漂移/噪声

(2) 峰宽

- 峰底宽 W_b 、峰半宽 $W_{1/2}$ 、标准偏差 σ

$$2\sigma = W_{0.607h} \quad W_b = 4\sigma \quad W_{\frac{1}{2}} = 2\sigma\sqrt{2 \ln 2}$$

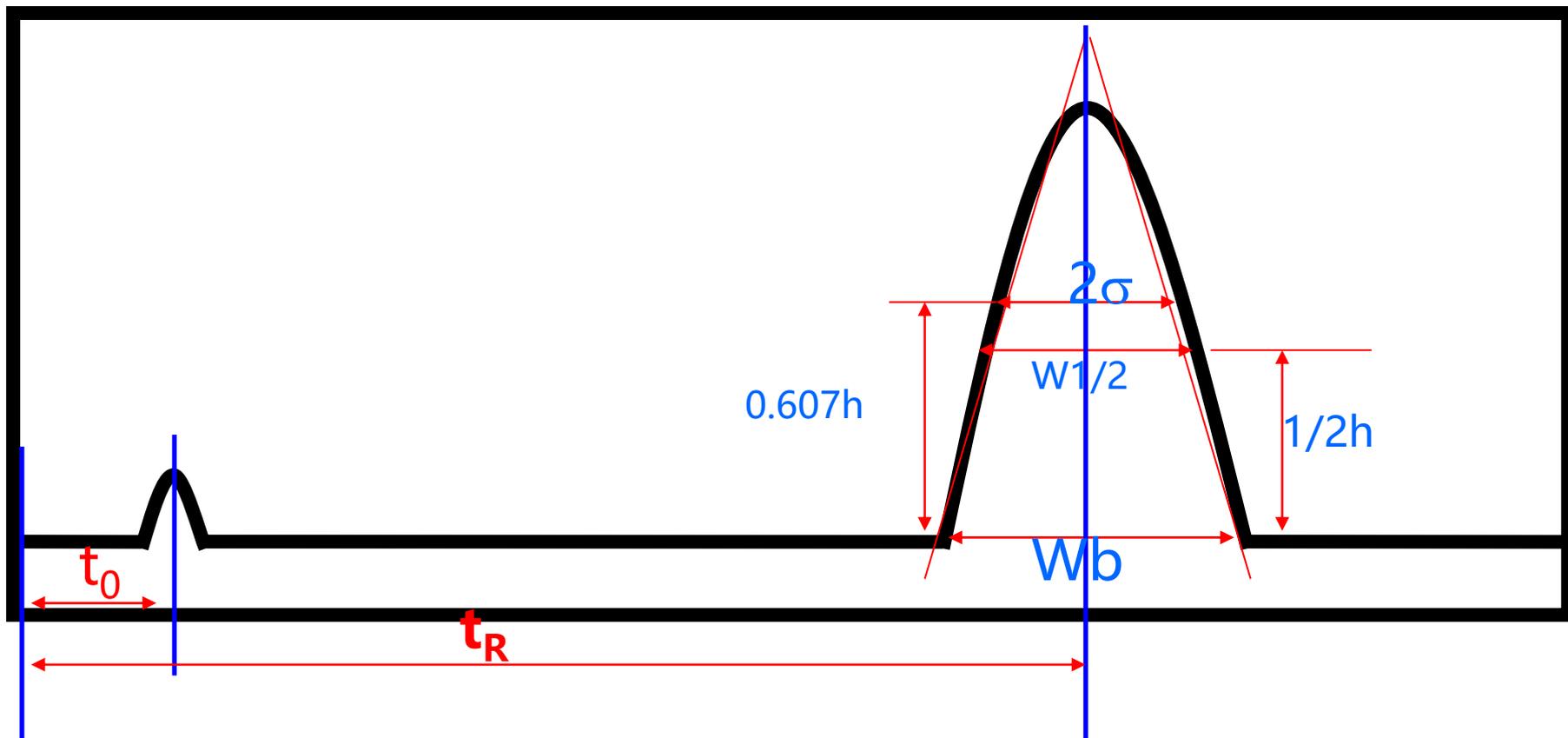


(3) 保留时间 t_R 或保留体积 V_R

- **组分**从进样到出现峰最大值时所需的时间 (t_R) 或流动相的体积 (V_R)。 **是色谱定性的指标!**

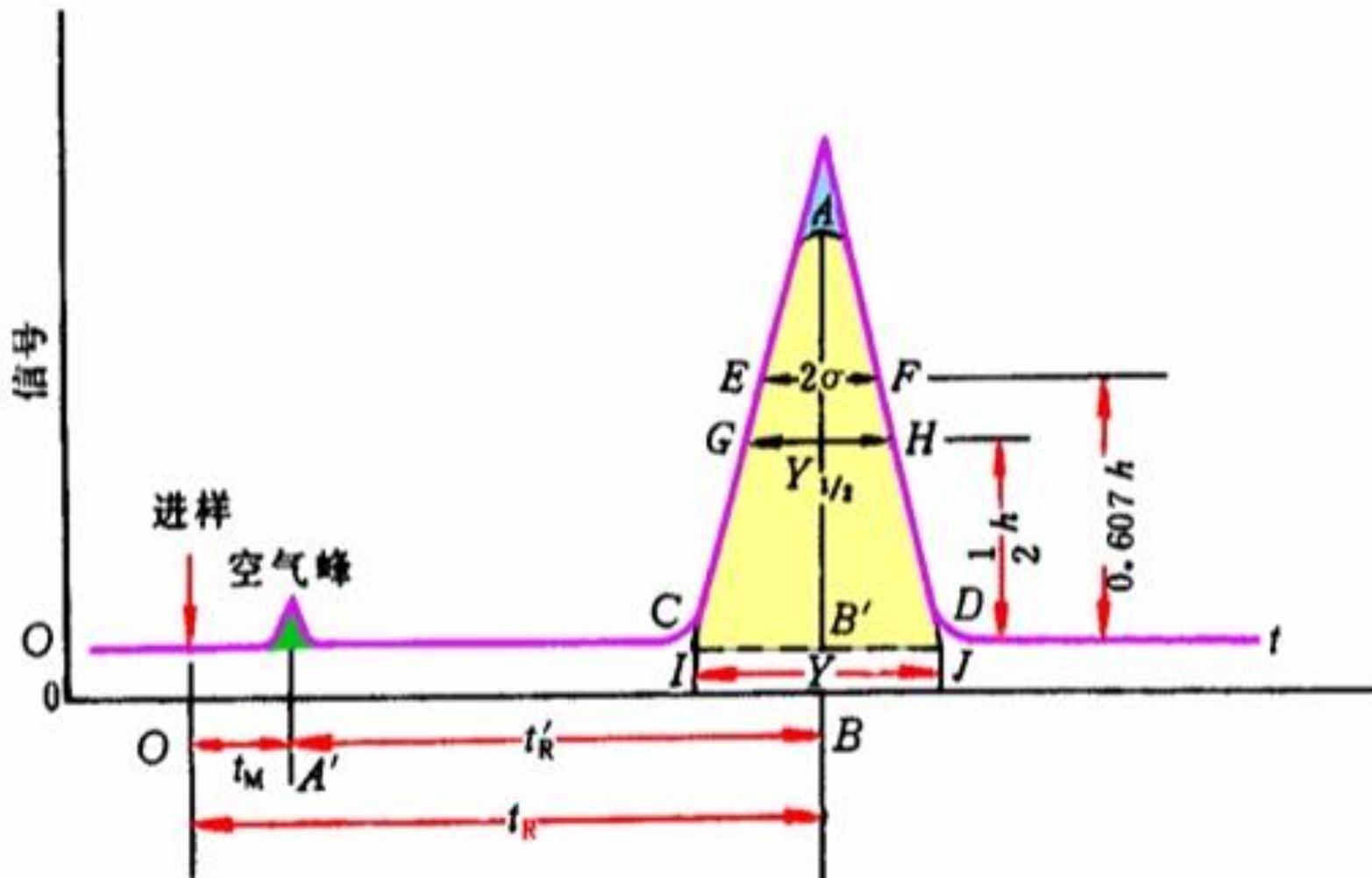
(4) 死时间 t_0 或死体积 V_0 :

- **流动相**流过色谱柱的时间或体积



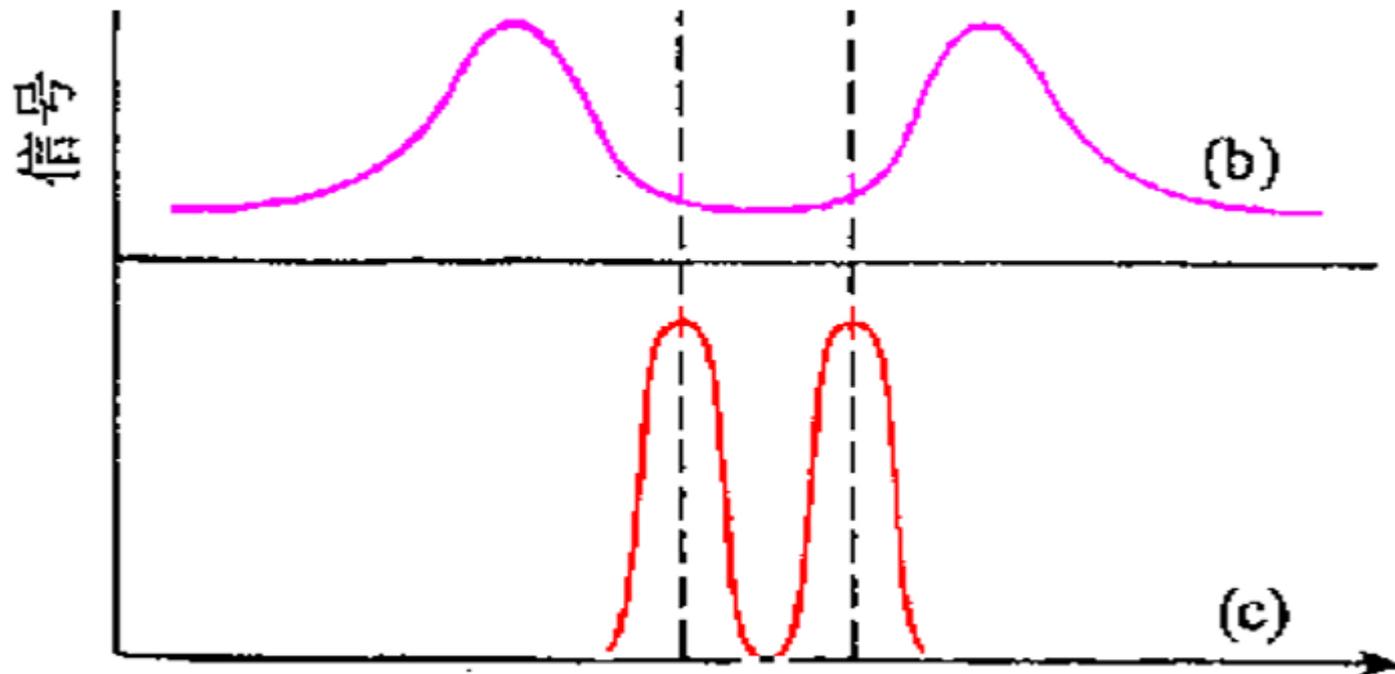
(5) 峰高 h 或峰面积 A

——作为色谱定量的指标!



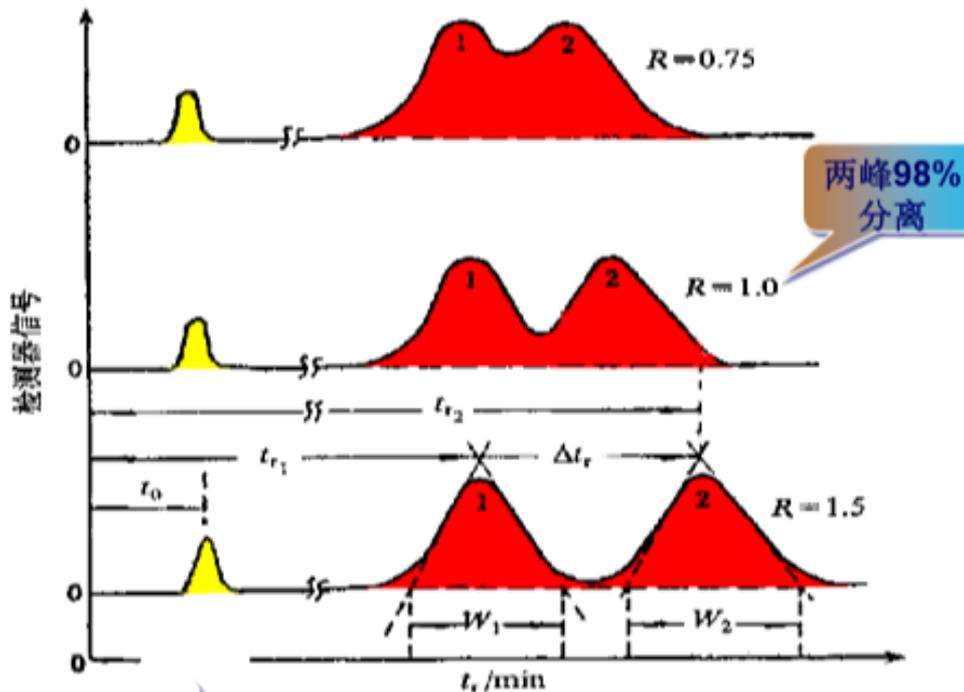
(6) 峰形 (峰宽)

- 评价色谱柱分离效能 (柱效) 的依据。
- 峰形 (峰宽) 越窄, 说明柱效越高



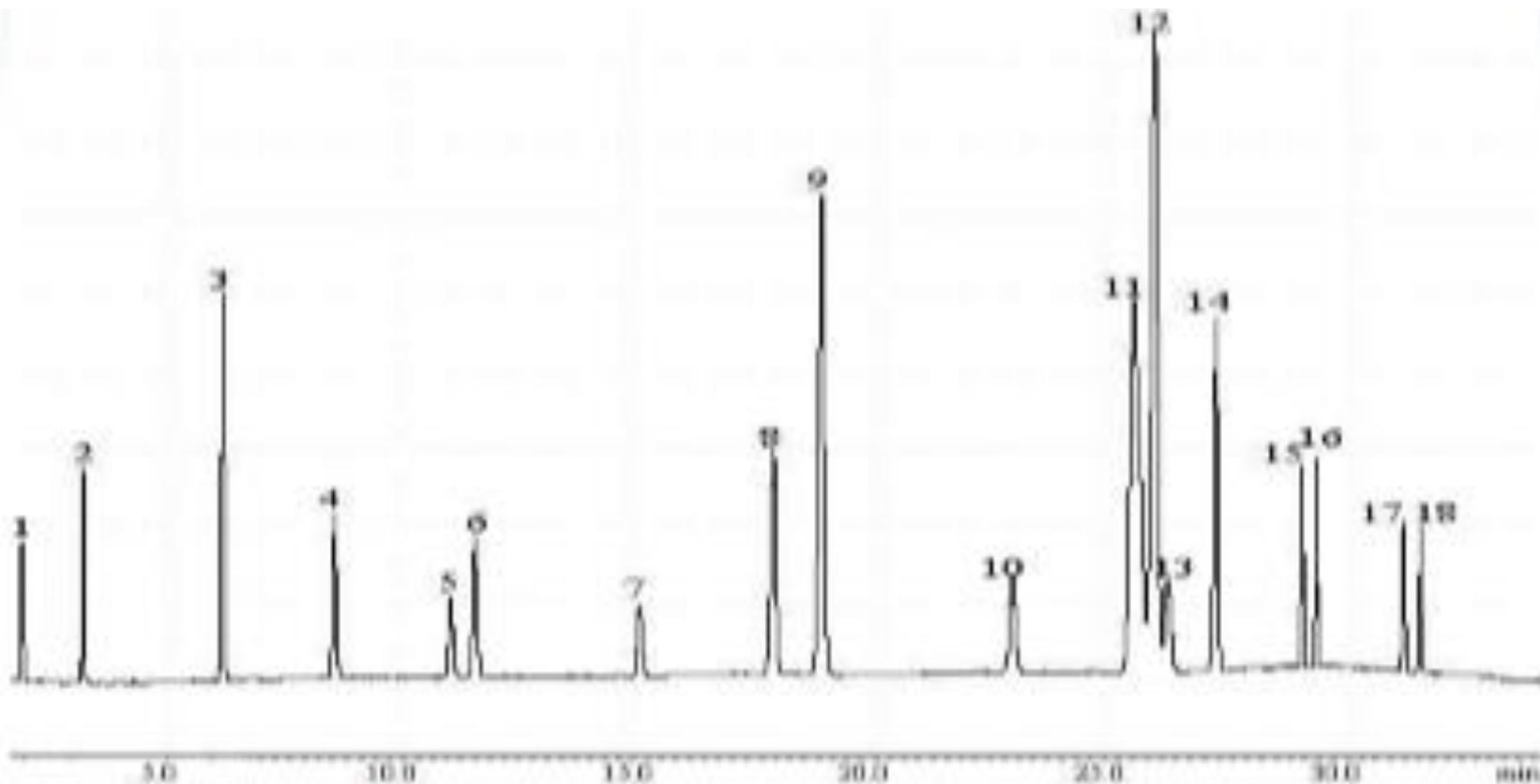
(7) 分离度 R

- 能表明色谱柱对各组分的**选择性**。
- 是评价**色谱分离条件**选择是否适宜的指标。
- ✓ R < 1 时，两峰未能完全分离；
- ✓ R=1.5 时可以认为两峰完全分离了。



$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{W_{b_2} + W_{b_1}}{2}}$$

(8) 色谱峰的个数 根据色谱峰的个数，可以判断样品中所含组分的最少数。



18种 脂肪酸标样的气相色谱图

7.1.4 色谱分配平衡

➤ 分配平衡：

色谱分析中，在一定温度下，组分在固定相和流动相之间所达到的平衡。

分配平衡用以下两个参数来表示：

✓ 分配系数 K

✓ 分配比（容量因子 k' ）

- **(1) 分配 (分布) 系数K (热力学因子)**

指组分在两相之间分配达到平衡时, 该组分在固定相和流动相中的**浓度之比**。即

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (K \text{ 大, 即 } t_R \text{ 长})$$

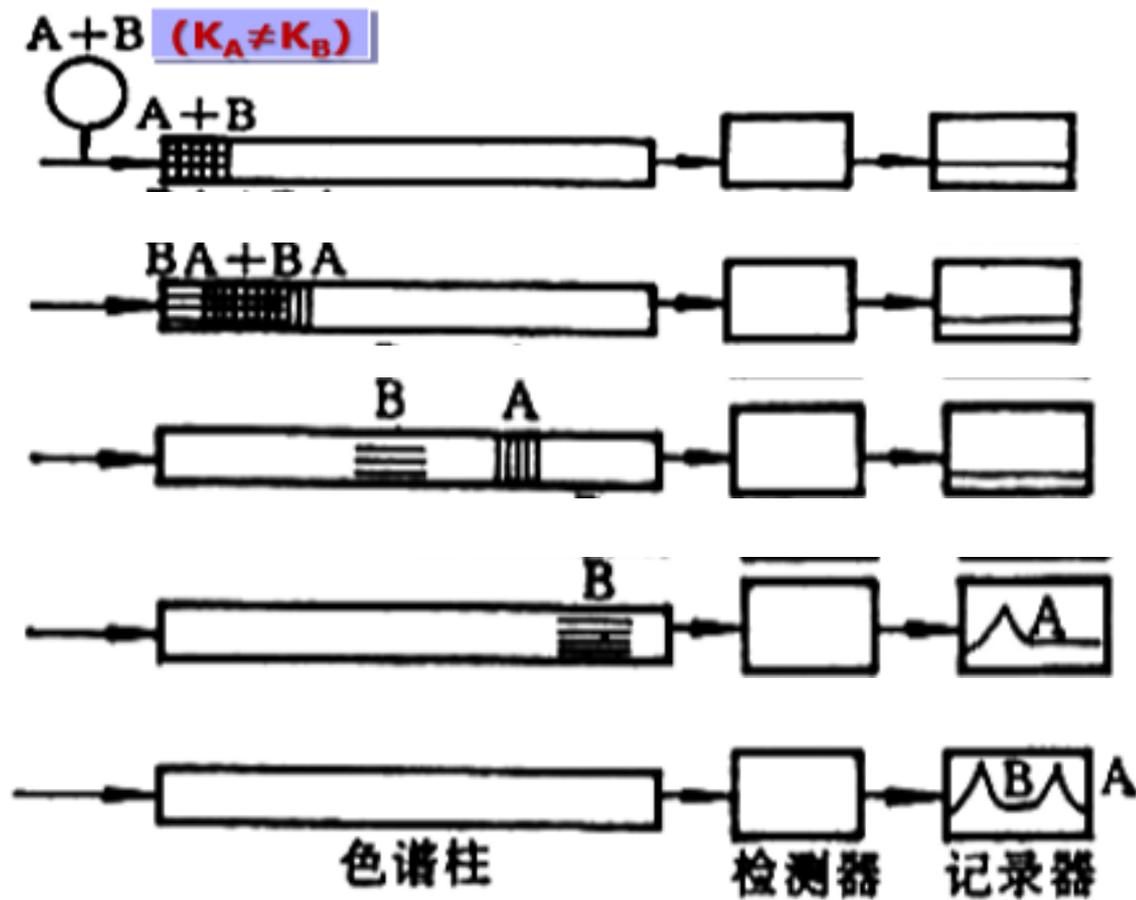
✓ **反映溶质与固定相、流动相作用力差别。**

- **(2) 分配比 (保留因子, 容量因子k')**

指组分在两相中分配达到平衡时, 组分在固定相与流动相中的**质量之比 (或分子数之比, 热力学因子)**。

$$k = \frac{N_s}{N_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} \\ = K \frac{V_s}{V_m}$$

(3) 混合组分的色谱分离过程



色谱分离过程示意图

➤ 色谱分离——是色谱体系热力学过程和动力学过程的综合表现;

➤ 色谱体系运行特点:

- ✓ **差速迁移**-不同组分迁移速率不同;
- ✓ **分子分布离散**-同种组分分子在迁移过程中分布空间扩展

➤ **热力学过程**——是指与组分在体系中**分配系数相关**的过程即各组分应具有不同的K值，是实现色谱良好分离的**内因**!

➤ **动力学过程**——是指组分在该体系两相间**扩散和传质**的过程。即决定了**分离效能**，柱效要高;

➤ 流动相的不间断流动是实现色谱良好分离的**外因**

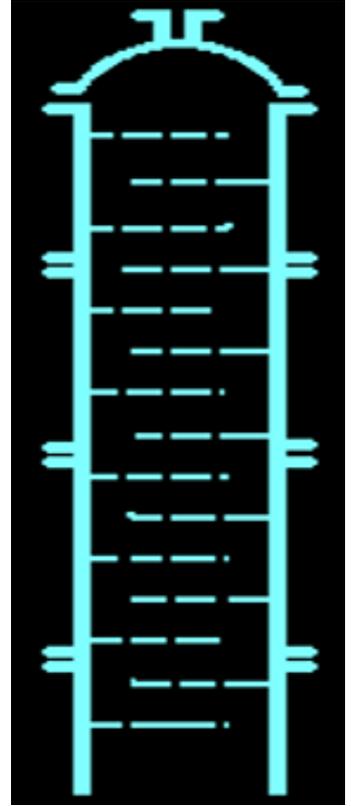
7.2 色谱分析的基本理论

- 7.2.1 塔板理论 (热力学)
- 7.2.2 速率理论 (动力学)

7.2.1 塔板理论 (热力学)

- ✓ 将色谱柱想象为一个精馏塔
- ✓ 设色谱柱的总长度为 L ，每一块塔板高度为 H ，则色谱柱中的塔板 (层) 数 n 为：

$$n = \frac{L}{H}$$



- ✓ n 和 H 可以作为描述**柱效能**的指标。 n 越大, H 越小, 柱效能越高, 分离得越好。

➤ 塔板理论的贡献在于：提出 n 和 H 可作为有效评价柱效能的指标；

➤ **不足：** 基于一些假设

✓ **迅速平衡假设：** 两相间瞬间达到平衡

✓ **间歇前进假设：** 流动相脉冲式间歇前进

✓ **无纵向扩散假设：** 忽略分子纵向扩散

✓ **分配系数恒定假设：** 在每个板上分布系数不变

? 无法解释为什么同一色谱柱在不同的流速下的柱效不同

? 未能指出影响柱效的因素及提高柱效的途径和方法。

7.2.2速率理论 (动力学)

1.速率理论方程 (范第姆特方程, Van Deemter equation)

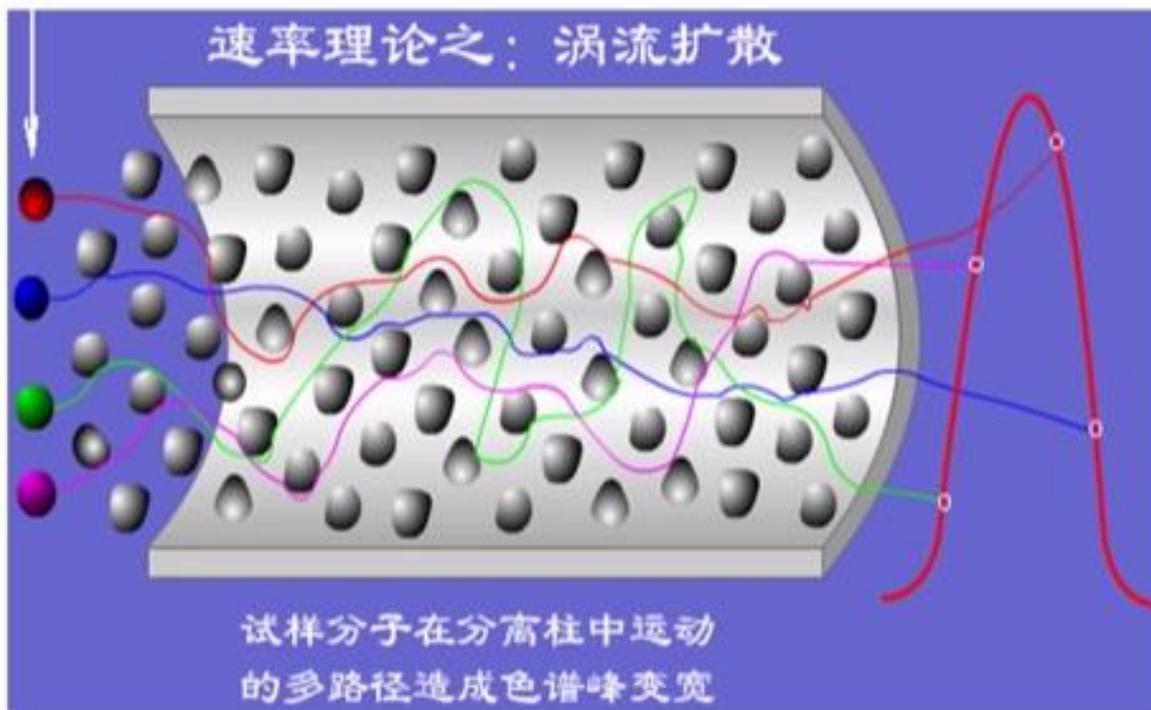
$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

式中 u —流动相流动的线速度

- (1) 涡流扩散项 A
 - (2) 分子扩散项 B/u
 - (3) 传质阻力项 $Cu, C=C_s+C_m$
- ✓ H 也称为塔板高度, 区别于塔板理论, 单位柱长统计意义的分子离散度, 作为柱效指标;
 - ✓ 只有这三项都比较小的时候, H 才比较小, 峰型才能变窄, 柱效才能提高;

(1) A—涡流扩散项:

指固定相填充不均匀引起的扩散



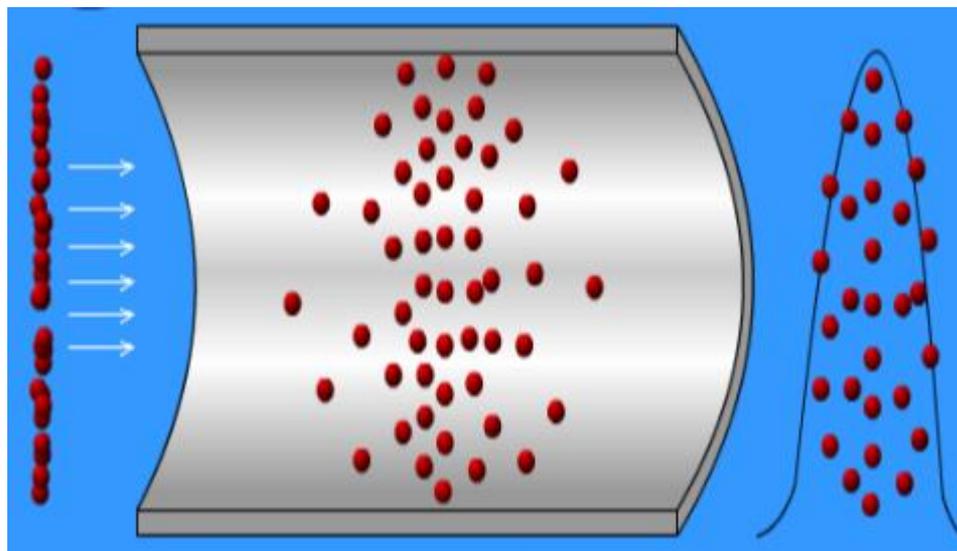
$$A = 2\lambda d_p$$

λ ——为填充的不规则因子

d_p ——固定相颗粒粒径

✓ 固定相颗粒越小 $d_p \downarrow$, 填充的越均匀, $A \downarrow$, $H \downarrow$,
 $n \uparrow$ (空心毛细管柱 $A=0$)

(2) 分子扩散项



$$B = 2 r D_m / u$$

r —弯曲因子, 填充柱 $r < 1$,
空心柱 $r = 1$

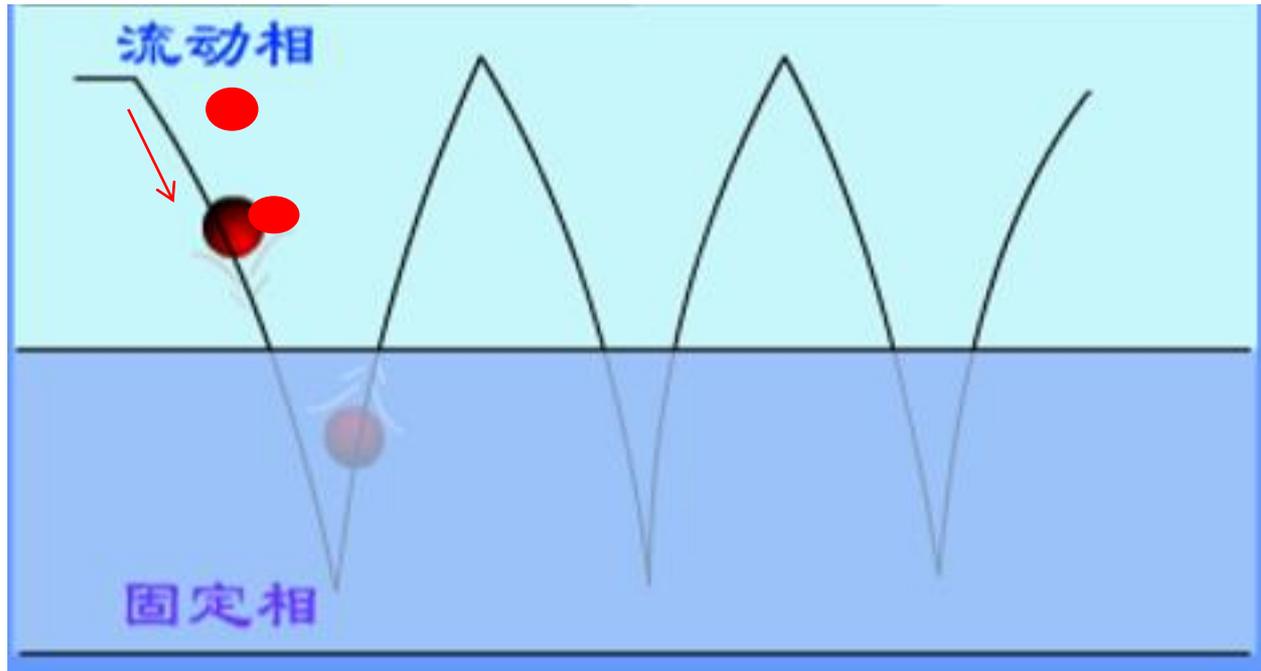
D_m —组分在流动相中的
扩散系数

试样分子沿色谱柱轴向扩散引起的色谱谱带展宽

- ✓ 柱内组分存在着浓度差;
 - ✓ 扩散导致色谱峰变宽;
 - ✓ 与流速有关, 流速 \downarrow , 滞留时间 \uparrow , 扩散 \uparrow ;
 - ✓ 扩散系数: $D_g \propto (M_{\text{载气}})^{-1/2}$; $M_{\text{载气}} \uparrow, D_m \downarrow, B \text{ 值} \downarrow$.
- 由于组分在液相中的扩散系数只有气体中的 $1/10^5$, 因此在液相色谱中 B 可以忽略。

(3) 传质阻力项 (C_u) — $C = C_m + C_s$

- ✓ C_m 指组分分子从流动相移向固定相表面进行两相之间的质量交换时所受到的阻力 (即**流动相传质阻力**)。
- ✓ C_s 指组分分子随流动相进入固定相之后扩散到固定相内部, 达到分配平衡后, 又回到界面, 再逸出界面, 被 (新的) 流动相带走这一过程所受到的阻力(即**固定相传质阻力**)。



$$C = \underbrace{q \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s}}_{C_s} + \underbrace{\omega \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_m}}_{C_m}$$

q 和 ω 为与两相的构型和性质有关的常数

d_p 和 d_f 为固定相颗粒直径和固定液膜的厚度

D_s 和 D_m 为溶质在固定相内和流动相内的扩散系数

！！ 如何降低流动相的传质阻力？

- ✓ 降低 d_f （固定相的液膜厚度）；增大 D_s （提高柱温）；
- ✓ 采用粒度小（ d_p 小）的固定相；扩散系数 D_m 大（即相对分子质量小）的气体（如氢气）做载气；

综上所述，速率方程为：

$$H = 2\lambda d_p + 2r \frac{D_m}{u} + q \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} u + \omega \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_m} u$$

➤ **速率理论的要点：**

- ✓ A、B、C三项因素是造成**色谱峰扩展，柱效下降的主要原因。**
- ✓ **范第姆特方程是指导选择分离操作条件的依据！**

问题：

- 1、怎样装柱才能使色谱柱的效率提高？
- 2、如何获得色谱最佳流速？

(1) 流动相流速

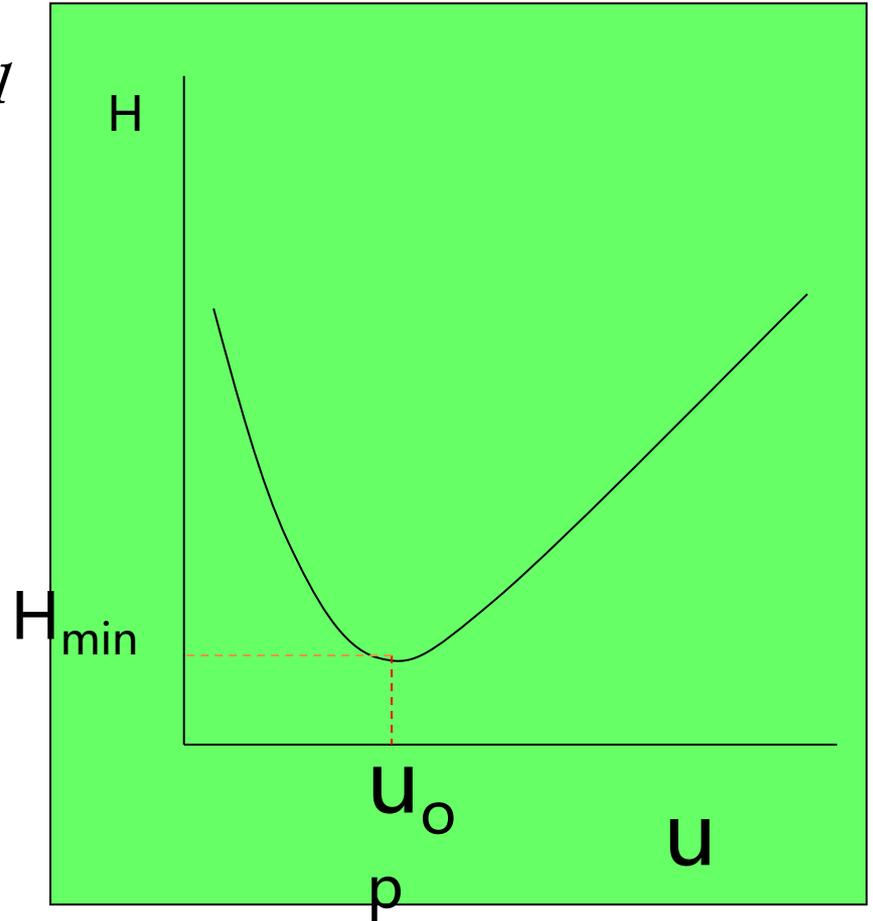
$$dH = dA + d \frac{B}{u} + dCu$$

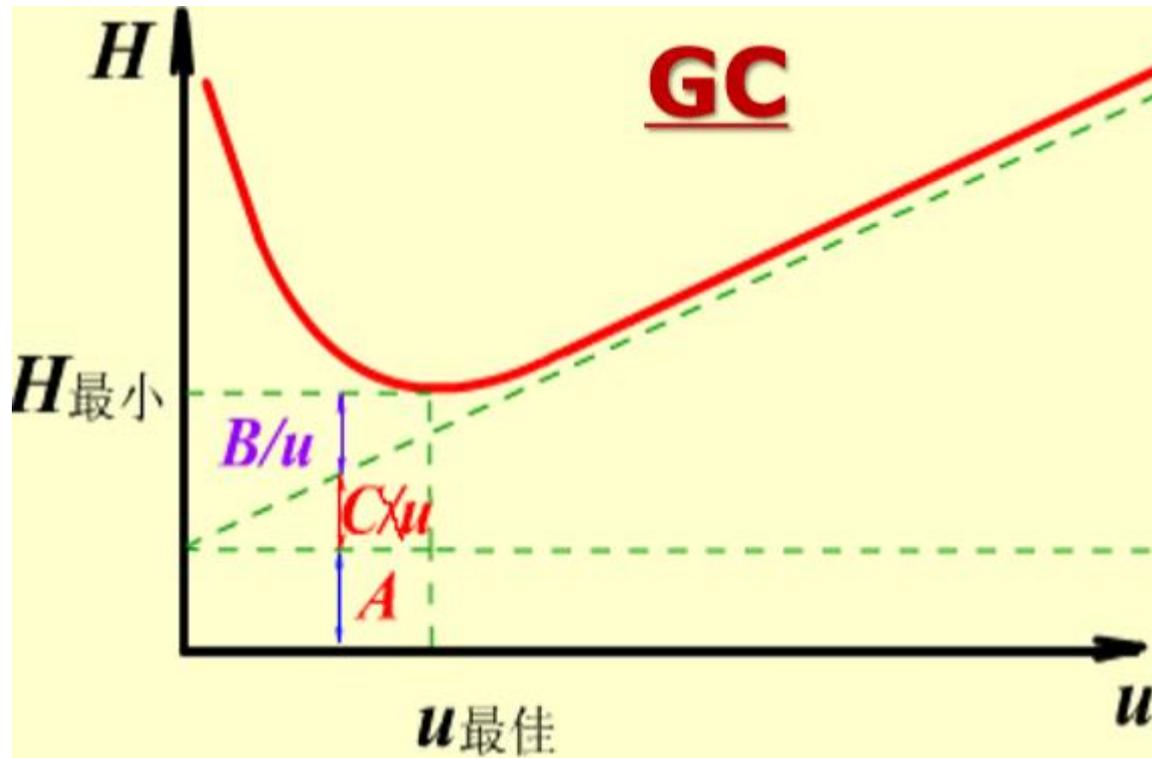
$$\frac{dH}{du} = -\frac{B}{u^2} + C = 0$$

$$\frac{B}{u^2} = C$$

$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

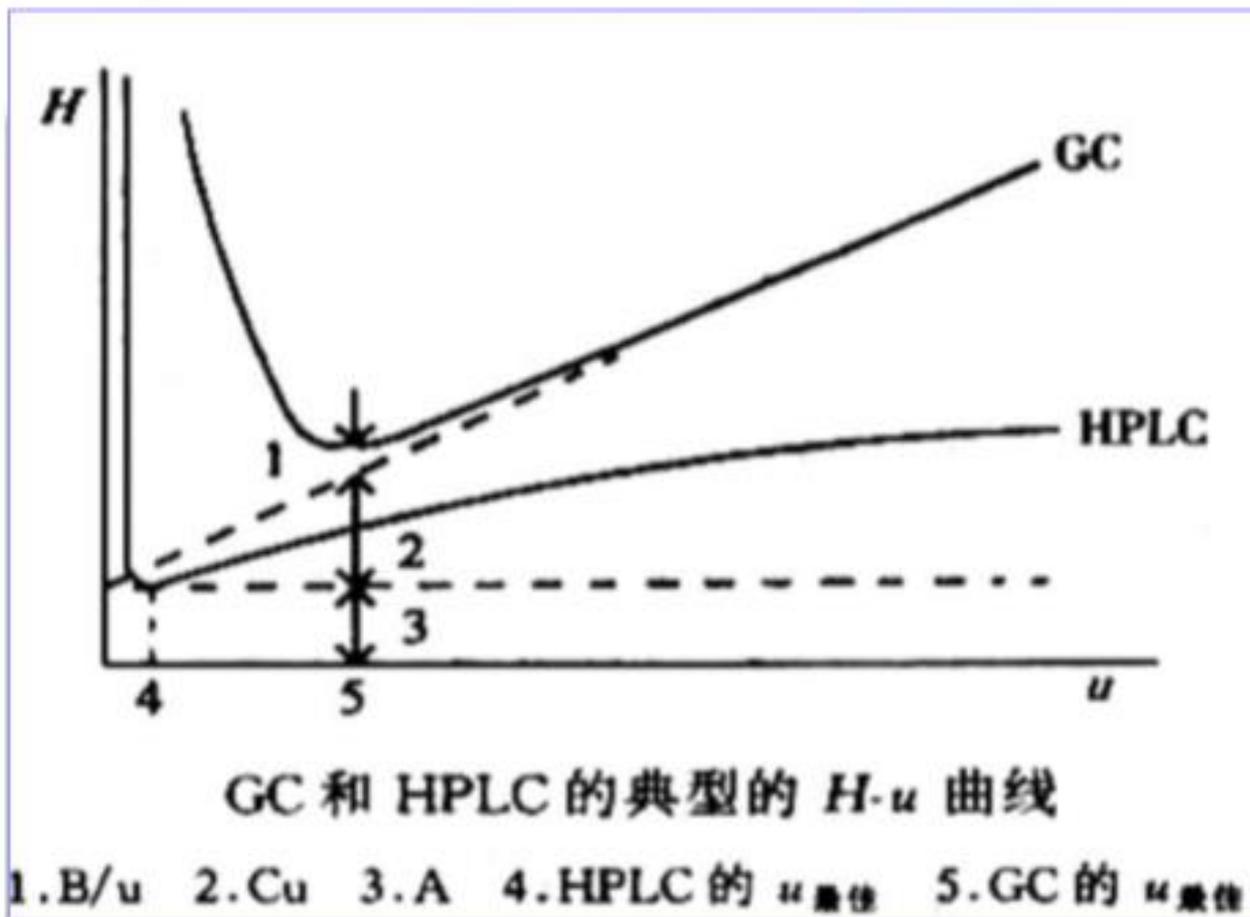
$$H_{min} = A + 2\sqrt{BC}$$





- $u < u_{\text{opt}}, H = A + B/u;$
- $u > u_{\text{opt}}, H = A + Cu;$

- ◆载气流速高时: Cu 是影响柱效的主要因素, 流速 \uparrow , 柱效 \downarrow 。
- ◆载气流速低时: B/u 成为影响柱效的主要因素, 流速 \uparrow , 柱效 \uparrow 。



✓ 液相色谱柱效主要受传质阻力影响，流速越高，柱效越低。故采用低粘度溶剂作为流动相，提高扩散系数提高柱效。

(2) 填料粒径

- 填料粒度降低，柱效提高；

$$H = 2\lambda d_p + 2r \frac{D_m}{u} + q \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} u + \omega \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_m} u$$

(3) 色谱柱温

- ✓ 影响 D_m 和 D_s ；
- ✓ 对分子扩散和传质阻力影响互相矛盾；
- ✓ 选择合适温度；

7.3 色谱定性和定量分析方法

7.3.1 色谱定性方法

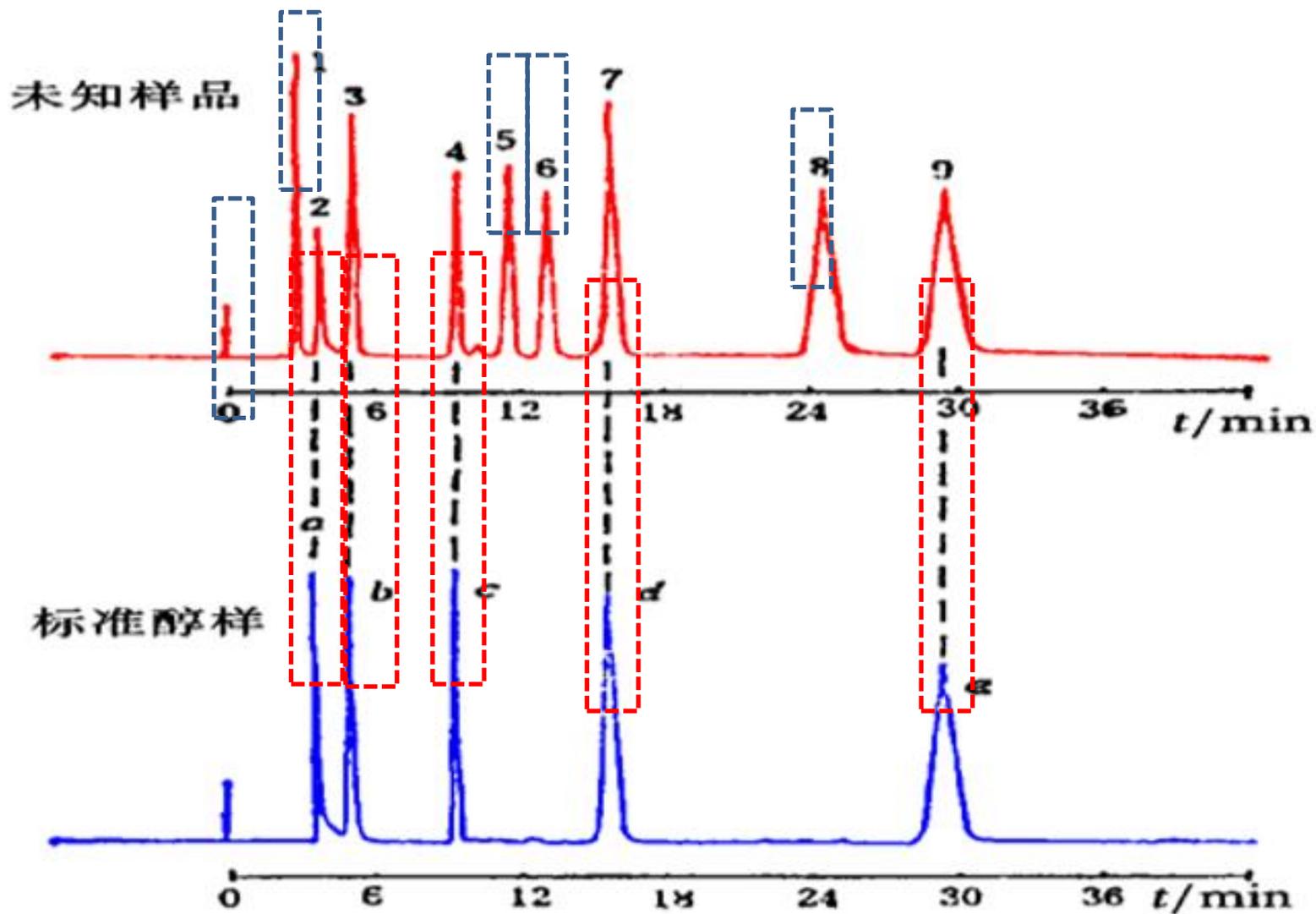
- 利用纯物质保留值 (t_R) 定性
- 与其它方法或仪器联合定性
- 利用检测器的选择性定性

1.利用纯物质保留值 (t_R) 定性:

- 即在一定的色谱条件下, 每组分的 t_R 表现出特征值, 可作为定性依据。

定性方法:

在相同色谱条件下, 分别将标样和 试样进行色谱分析, 比较两者 t_R , 如果相同, 即为同一种物质, 进而可以确定试样中的各组分。



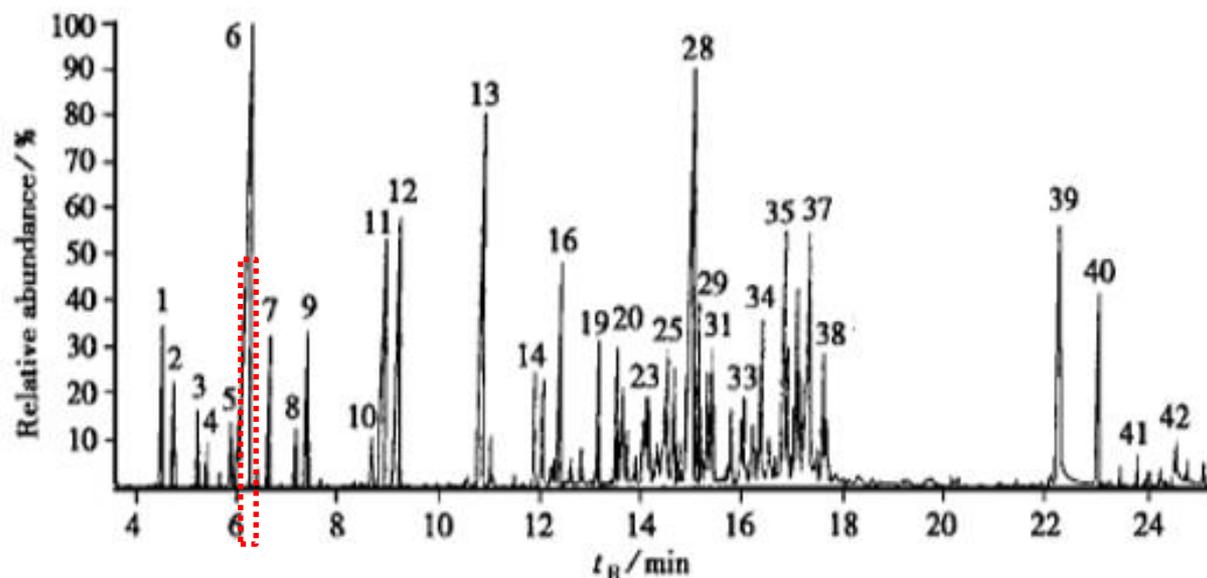
1 ~ 9 — 未知物的色谱峰 a — 甲醇峰 b — 乙醇峰
 c — 正丙醇峰 d — 正丁醇峰 e — 正戊醇峰

➤ a,b,c,d,e有对应峰，其它无

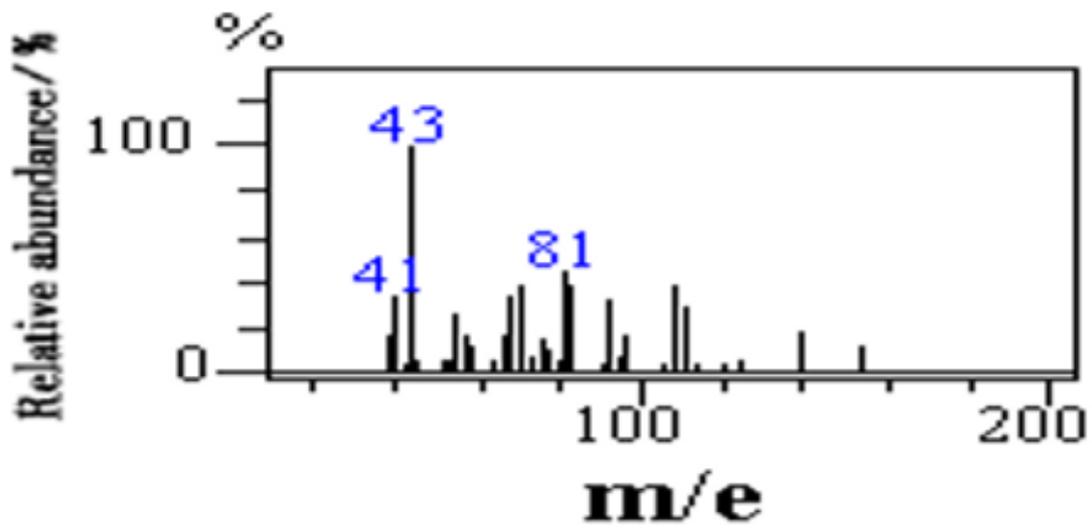
2. 与其它方法或仪器联合定性

如 GC (HPLC、SFC) – MS
GC (HPLC) – FTIR
GC (HPLC) – NMR 等。

即综合利用**色谱仪的高分辨能力**与 **质谱仪的高鉴别能力**，发挥两种仪器各自的优点。



总离子
流色谱

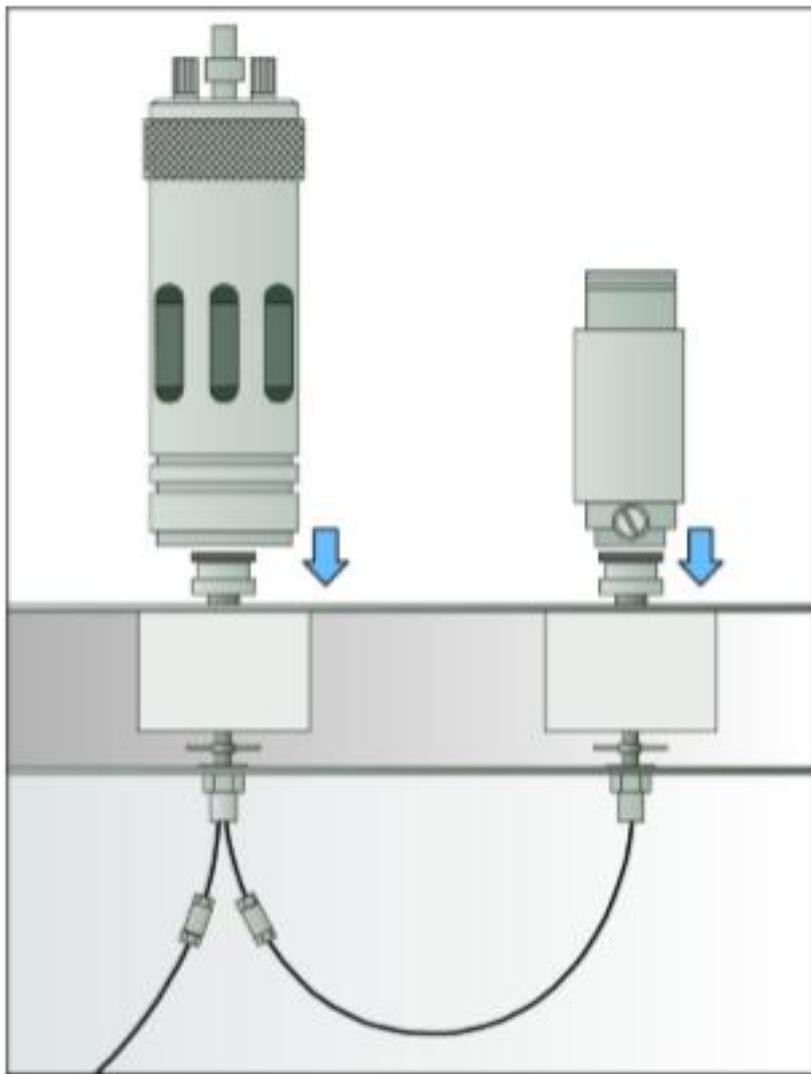


6号峰的
质谱图

3. 利用检测器的选择性定性

- 利用各类化合物在不同的检测器上的灵敏度差别进行初步的分类定性;
- 如
 - ✓ GC-FID (火焰离子化检测器) : C
 - ✓ GC-FPD (火焰光度检测器, flame photometric detector) : P、S
 - ✓ GC-ECD (电子俘获检测器) : F、Cl、Br、I
 - ✓ GC-NPD (氮磷检测器(nitrogen phosphorus detector)) : N、P

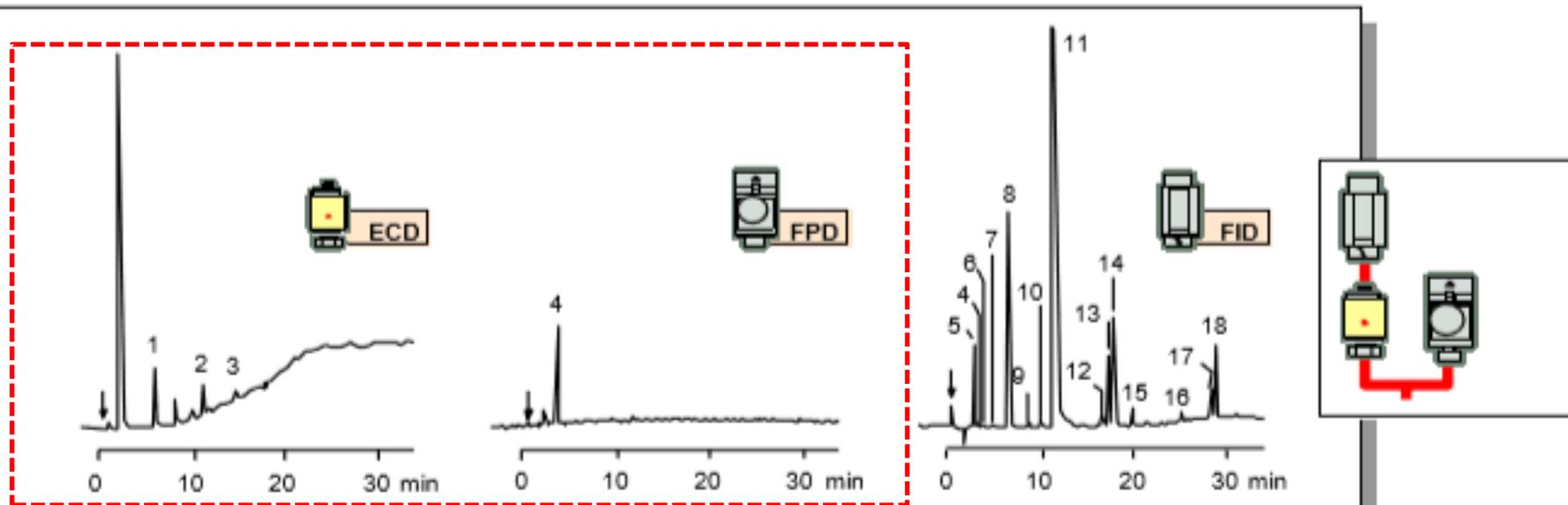
多检测器同时检测技术 - 串联检测



FID, ECD, NPD 或
FPD
同 PID 串联

啤酒中二酮的检测

FID/ ECD/FPD配置



1	四氯化碳+三氯乙烷	7	丙酮	13	乙酸异戊酯
2	丁二酮 (95 ppb)	8	乙酸乙酯	14	庚酮(内标. 5 ppm)
3	2,3-戊二酮 (30 ppb)	9	丙酸乙酯	15	2-甲基丙醇
4	二甲基硫化合物 (50 ppb)	10	甲醇	16	己酸乙酯
5	乙醛	11	乙醇	17	选择活性戊醇
6	甲酸乙酯	12	正丙醇	18	异戊醇

7.3.2 色谱定量方法

1. 定量依据:

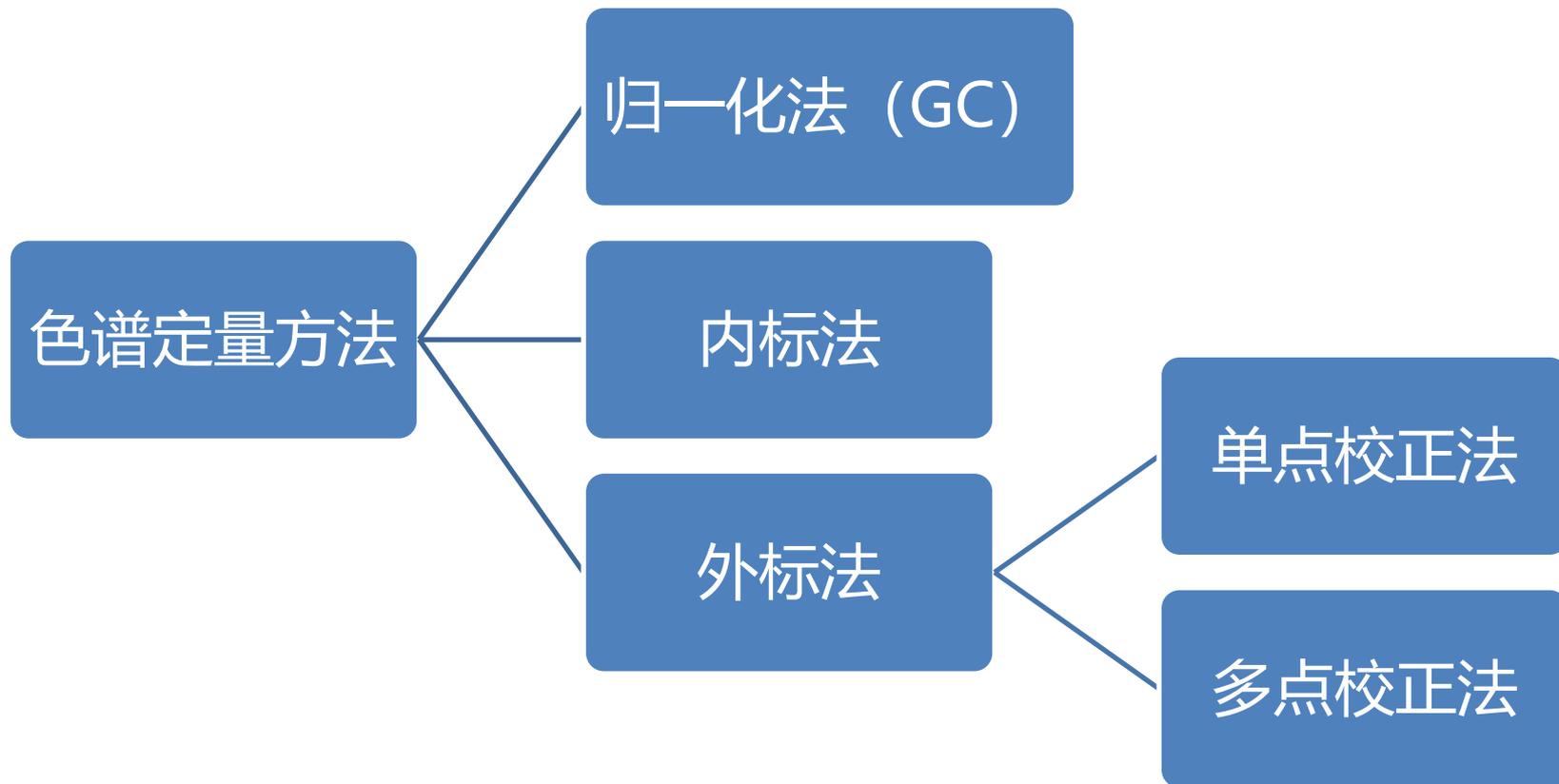
在相同的色谱条件下, 被测组分的质量 m_i 与对应峰的检测器响应值 (峰面积 A_i 或峰高 h_i) 成正比,

其数学表达式为:

$$m_i = f_i A_i \text{ 或 } m_i = f_i h_i$$

(f_i 简称校正因子)

2、定量方法



➤ 定量方法-内标法:

在出现下列情况时, 可采用**内标法定量**。

- ✓ 样品中组分不能全部出峰;
- ✓ 检测器不能对各个组分均产生信号;
- ✓ 只需测定样品中的某几个组分。

即
$$m_i / m_s = A_i f_i / A_s f_s$$

$$w_i = m_i / m = A_i f_i m_s / A_s f_s m$$

式中 $f_s = 1$; (测定校正因子标准物和内标物为同一化合物);
m为试样质量; m_i -组分质量; m_s -内标物

- ✓ **f 即相对校正因子**, 可以通过标样测得, 或通过内标标准曲线直接校正, 所以内标法也 称为**内标标准曲线法**。

内标物的选择应考虑

- ✓ 是试样中不存在的纯物质；
 - ✓ 其含量应与待测组分含量接近；
 - ✓ 内标物的出峰位置应在待测组分附近，但又能分离开。
-
- **优点：**定量准确，操作条件对测定的准确度影响不大。
 - **不足：**必须准确称量试样和内标物；选择合适的内标物比较困难。

常用于定量要求较高的测定！

➤ 定量方法-归一化法:

$$W_i = \frac{m_i}{m} \times 100\% = \frac{m_i}{m_1 + m_1 + \dots + m_n} \times 100\%$$
$$= \frac{f'_i \cdot A_i}{\sum f'_i \cdot A_i} \times 100\%$$

- ✓ **优点:** 简便、准确, 对操作条件的控制要求不苛刻;
- ✓ **不足:** 在试样 n个组分不能全部出峰时不能使用。
- ✓ **GC定量方法!** (如测定烷烃类化合物, 校正因子相近)

➤ 定量方法-外标法

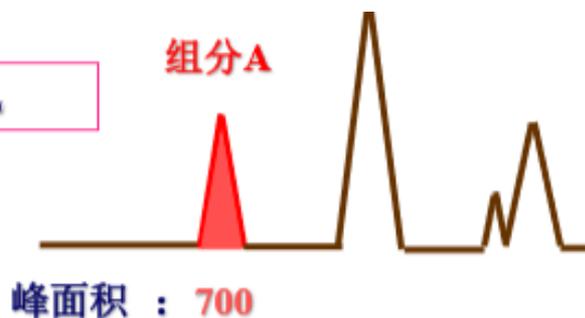
✓ **单点校正法**

✓ **多点校正法**

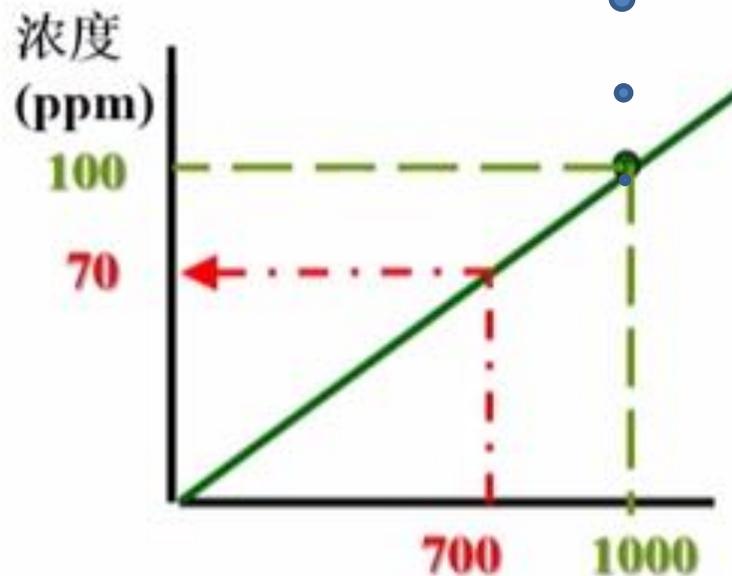
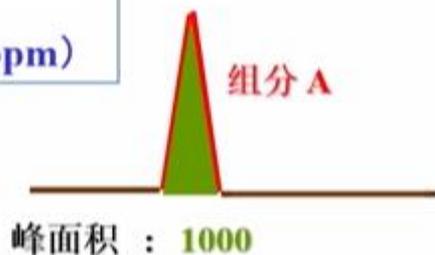
- **优点：**不需要校正因子，适合测定大批量样品。
- **不足：**对操作条件的稳定性和进样量的重现性要求较高。

单点校正

未知样 1uL



标样 1uL
(组分A 100ppm)



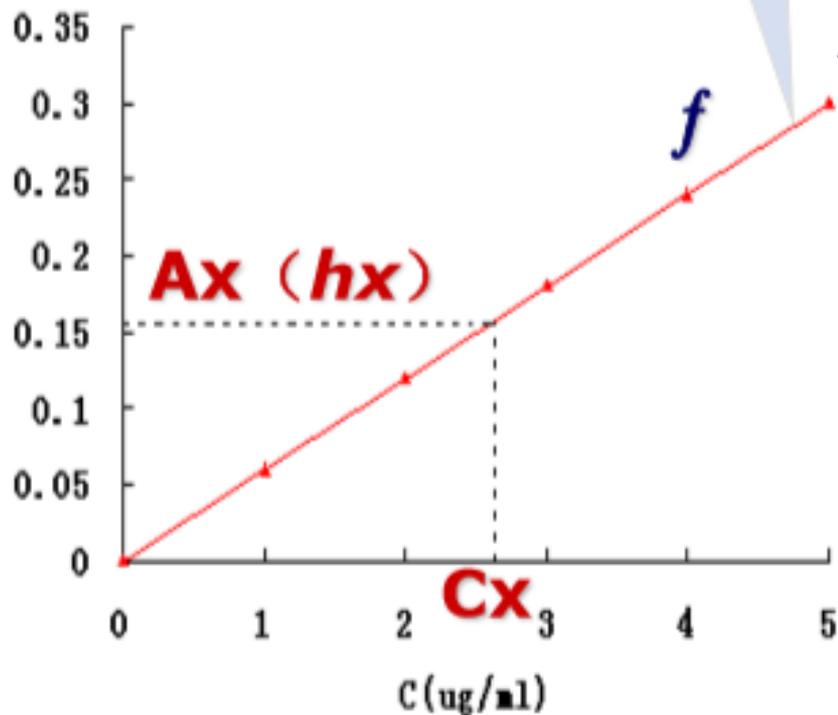
单点校正法: $m_i = f_i A_i$ ($f_i = f_s$)

$$C_i = C_s (\text{标准}) \times A_i / A_s (\text{标准})$$

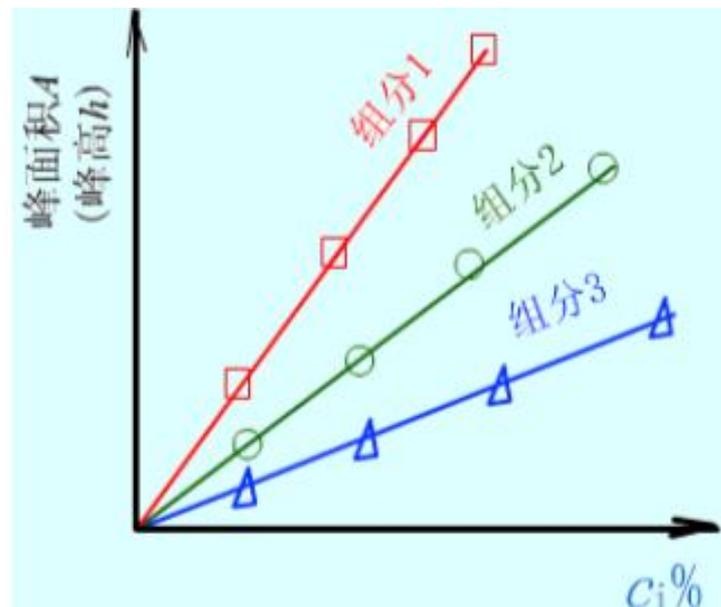
组分A的浓度为
70ppm

多点校正

$$m = fA \quad (\text{或} f h)$$



单组分标准曲线法



多组分标准曲线法

本章重点

- 色谱法的分类;
- 色谱流出线特征及相关参数;
- 色谱分配理论及相关表征参数;
- 色谱法塔板理论;
- 色谱法速率理论;
- 提高色谱法柱效的方法;
- 色谱法定性和定量分析方法;

- **用色谱方法进行蔬菜农药残留检测的流程?**
- **作业: 17-8,17-9,17-10,17-12,17-20**

其死时间为 2 min, 试计算:

(1) 组分 B 对 A 的相对保留值。

(2) 组分 A, B 的保留因子。

(3) 组分 B 通过色谱柱在流动相、固定相停留的时间是多少? 各占保留时间分数为多少?

17-6 试说明塔板理论基本原理, 它在色谱实践中有哪些应用?

17-7 在长为 2 m 的气相色谱柱上, 死时间为 1 min, 某组分的保留时间 18 min, 色谱峰半高宽度为 0.5 min, 试计算:

(1) 此色谱柱的理论塔板数 N , 有效理论塔板数 N_{eff} 。

(2) 每米柱长的理论塔板数。

(3) 色谱柱的理论塔板高 H , 有效理论塔板高 H_{eff} 。

17-8 什么是速率理论? 它与塔板理论有何区别与联系? 对色谱条件优化有何实际应用?

17-9 试列出影响色谱峰区域扩张的各种因素。

17-10 设气相色谱柱的柱温为 180 °C 时, 求得 van Deemter 方程中的 $A = 0.08 \text{ cm}$, $B = 0.18 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $C = 0.03 \text{ s}$, 试计算该色谱柱的最佳流速 u_{opt} ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) 和对应的最小板高

47-12 在气相色谱分析中,使用同一色谱柱,分别采用相对分子质量和扩散系数不同的 N_2 和 H_2 作载气,比较两者 $H-u$ 曲线图(图 17-12),试说明:

(1) 为什么用 N_2 作载气比用 H_2 作载气最佳 u_{opt} 流速较小? (P 比 P' 更靠近零点。)

(2) 为什么用 N_2 作载气比用 H_2 作载气最小板高 H_{min} 较低? (P' 对应的 H_{min} 较小。)

(3) 当载气流速大于 u_{opt} 时,为什么 N_2 作载气比用 H_2 作载气板高上升较快,且板高较高?

(4) 当载气流速小于 u_{opt} 时,为什么 N_2 作载气比用 H_2 作载气板高上升较慢,且板高较低?

(5) 根据上述现象,哪种载气较适用于快速分析?

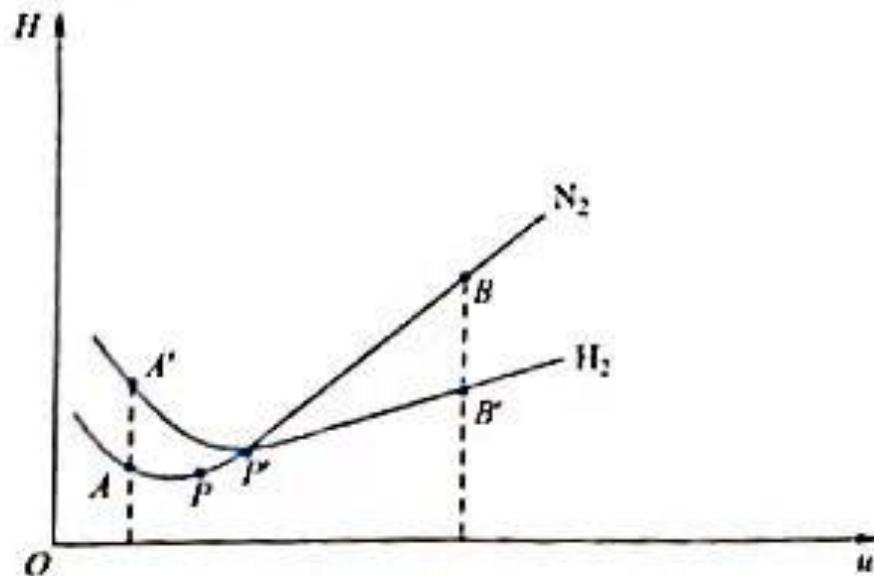


图 17-12 氮和氢作载气的 $H-u$ 曲线

17-17 设 $K_a = 5.81, K_b = 6.20$, 重复计算 17-16 中各问题。

17-18 根据色谱保留值为什么难以对未知结构的新化合物进行定性鉴定?

17-19 色谱定量分析为什么要用引入定量校正因子或已知标样校正? 常用定量校正因子有哪几种表示方式? 如何测定?

17-20 用归一化法测定石油 C₆ 芳烃馏分中各组分含量, 进样分析洗出各组分色谱峰面积和已测定的定量校正因子如下, 试计算各组分含量。

组分	乙苯	对二甲苯	间二甲苯	邻二甲苯
峰面积/mm ²	180	92	170	110
f'	0.97	1.00	0.96	0.98

17-21 已知某试样共含有四个组分, 洗出峰面积积分值, 已知其定量校正因子如下, 计算各组分含量。

组分	1	2	3	4
峰面积(积分值)	17 312	35 731	28 453	11 174
f'	1.731	4.188	2.418	1.186

17-22 采用内标法测定天然产物中某两成分 A、B 的含量, 选用化合物 S 为内标和测定相对定量校正因子标准物。

(1) 称取 S 和纯 A、B 各 180.4 mg, 188.6 mg, 234.8 mg, 用溶剂在 25 mL 容量瓶中配制三元标样混合物, 进样 20 μ L, 洗出 S、A、B 相应色谱峰面积积分值为 48 964, 40 784, 42 784, 计算 A、B 对 S 的相对定量校正因子 f' 。

(2) 称取测定试样 622.6 mg, 内标物(S) 34.00 mg, 与(1)相同溶剂、容量瓶、进样量, 洗出 S、A、B 峰面积为 32 246, 46 196, 65 300, 计算组分 A、B 的含量。