



第二章 色谱法的基本原理

Principles of Chromatography



本章基本要求

1. 了解混合物中各组分在色谱柱内分离的原因；
2. 了解色谱流出曲线和术语；
3. 了解柱效率的物理意义及计算措施；
4. 了解速率理论方程对实际分离的指导意义；
5. 掌握分离度的计算措施及影响分离度的色谱参数。

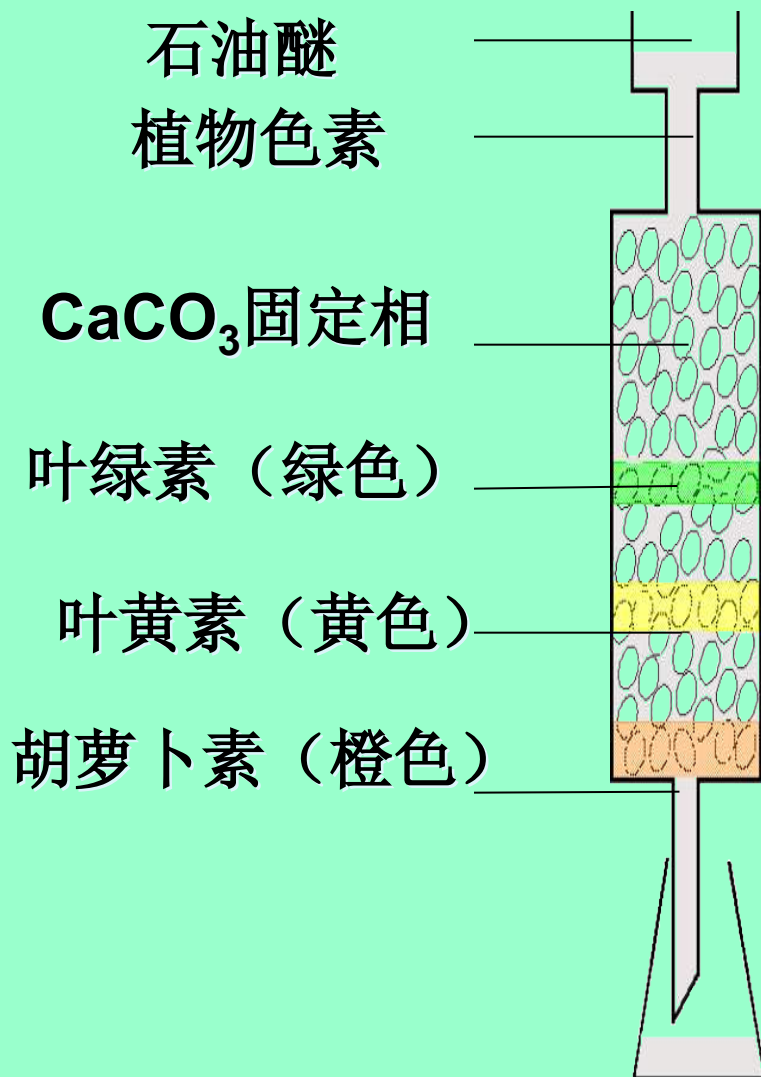
2.1 概述



色谱法发展史

色谱法是俄国植物学家Tswett（茨维特）于1923年首先提出的。他把植物色素的石油醚抽提液倒入一根装有固体碳酸钙颗粒（固定相）的竖直玻璃管（色谱柱）中，并再从管的上部加入纯的石油醚（流动相），任其自由流下。这时植物色素的抽提液沿玻璃管流动，在管内形成具有不同颜色的色带，每个色带代表不同的组分。

-----“色谱”（色层）因而得名



1941年，Martin、Syuge
发明了液-液色谱。

1952年，James、Martin
发明了气相色谱。

20世纪60年代，出现了高
效液相色谱。

几种基本术语:



- (1) **色谱法**: 借助在两相间分配系数的差别, 而使混合物中各组分取得分离的技术称为色谱分离技术。
- (2) **固定相**: 填充柱内的填料 (固体或液体) 。
- (3) **流动相**: 携带样品流过固定相 (气体、液体和超临界流体) 。
- (4) **色谱柱**: 装有固定相的柱。

色谱分离过程: 当流动相中携带混合物经过固定相时, 与固定相发生作用, 因为各组分的构造性质 (溶解度、极性、蒸汽压和吸附能力等) 不同, 这种相互作用产生强弱的差别。在同一推动力的作用下, 不同组分在固定相**滞留时间**长短不同, 按先后不同的顺序从固定相中流出。

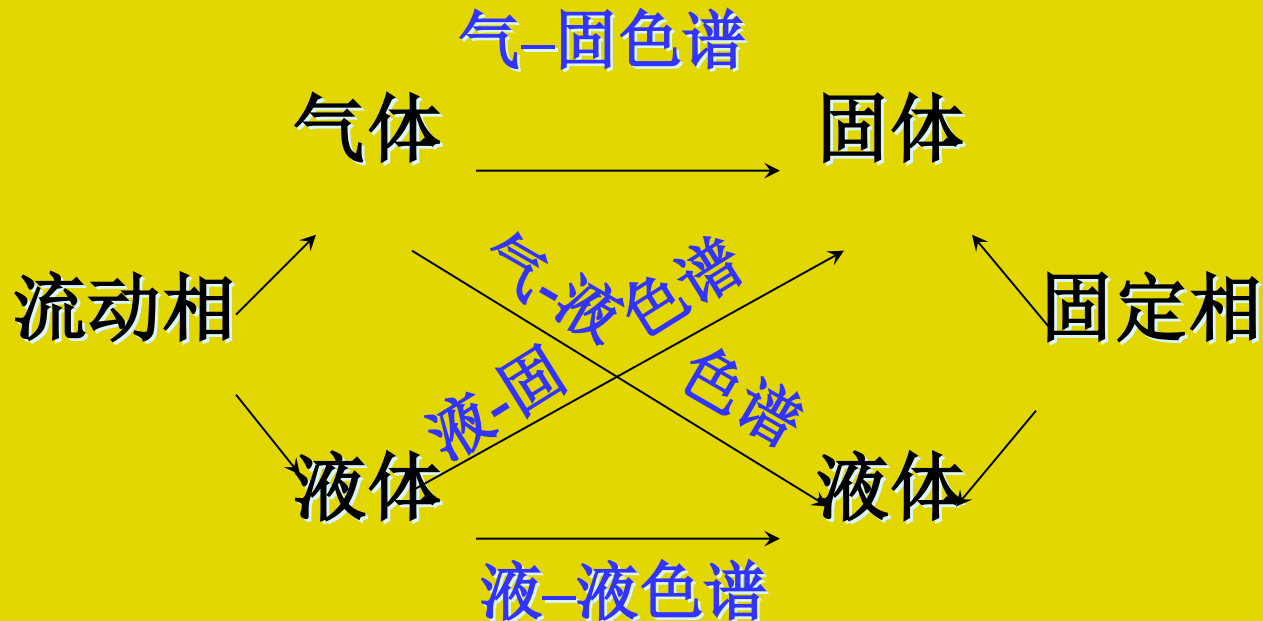
2.1.2 色谱法分类



1、按两相所处的状态分类

气相色谱 ----- 用气体作流动相
液相色谱 ----- 用液体作流动相

因为固定相可分为固体吸附剂和涂在固体担体上或毛细管内壁上的液体固定相，故可将色谱法分为下述四类：



2、按固定相形状分类



- ①**柱色谱**：固定相装在柱管内。它又可分为填充柱色谱和毛细管柱色谱。固定相装在色谱柱（玻璃管或毛细管）内。
- ②**纸色谱**：用滤纸作固定相或载体，把试样液体滴在滤纸上，用溶剂将它展开，根据其在纸上有色斑点的位置与大小，进行鉴定与定量测定。
- ③**薄层色谱**：将固定相研磨成粉末，再涂敷成薄膜。样品的分离形式类似纸色谱。

3、按分离过程的物理化学原理分类

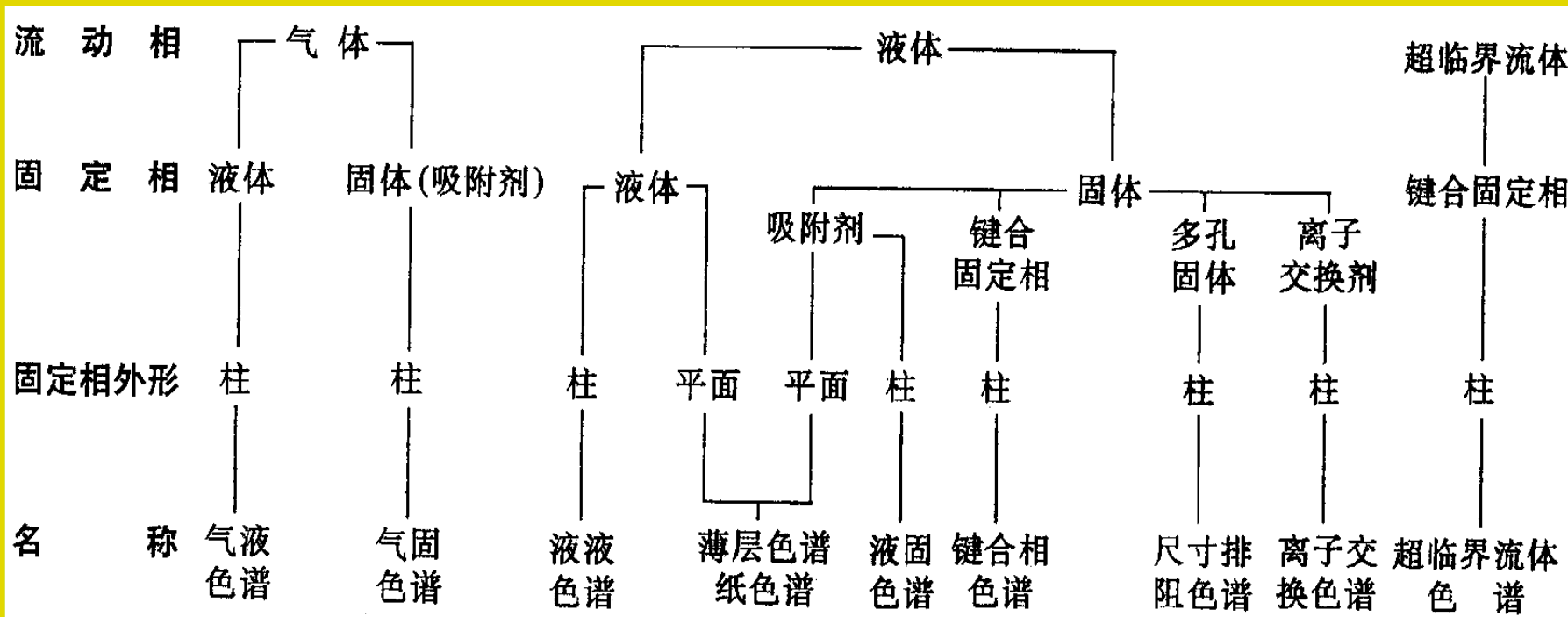


- ① **吸附色谱** (L-S, G-S)：利用吸附剂对不同组分物理吸附性能的差别进行分离。
- ② **分配色谱** (L-L, G-L)：利用不同组分在两相中分配系数的不同进行分离。在液-液分配色谱中，根据流动相和固定相相对极性不同，又分为正相分配色谱和反向分配色谱。
- ③ **离子交换色谱** (L-S)：利用组分离子与离子交换剂的互换能力不同进行分离。
- ④ **空间排阻色谱** (凝胶色谱法, L-S)：用多孔物质对不同大小分子的阻碍作用进行分离。固定相是一种分子筛或凝胶，利用各组分的分子体积大小不同而进行分离的措施。
- ⑤ **亲和色谱**：利用不同组分与固定相的高专属性亲合力进行分离的技术，常用于蛋白质的分离。

色谱法的分类大致如下：



根据以上所述，将色谱法的分类总结于下表中：



2.2 色谱分离原理



2.2.1 分配系数和分配比

分配系数:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \begin{array}{l} s: \text{固定相} \\ m: \text{流动相} \end{array}$$

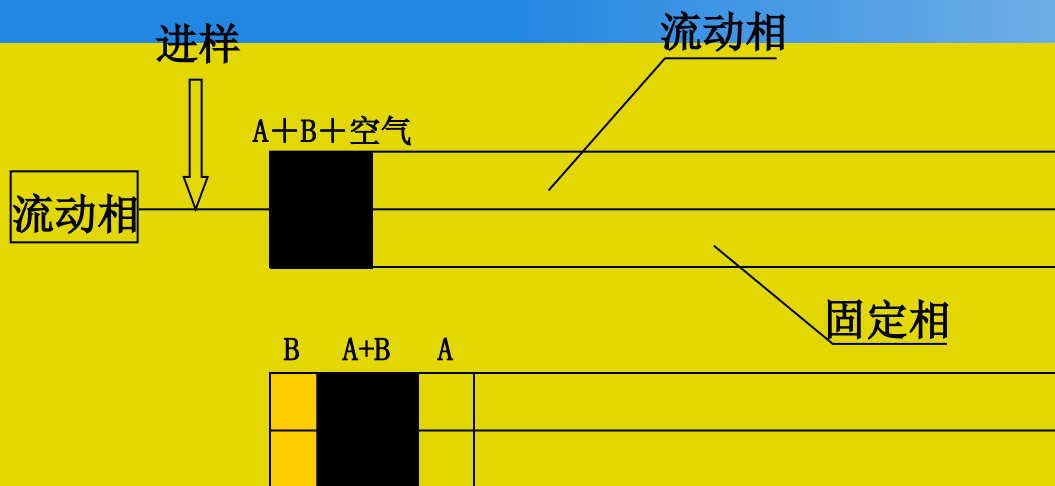
分配比 k (又称容量因子)

定义: 在一定的温度、压力下, 组分在气-液两相间达平衡时, 分配在液相中的重量与分配在气相中的重量之比。即

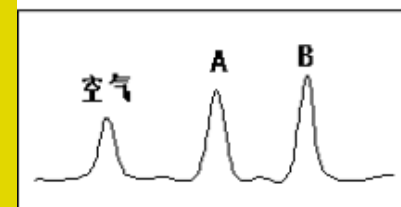
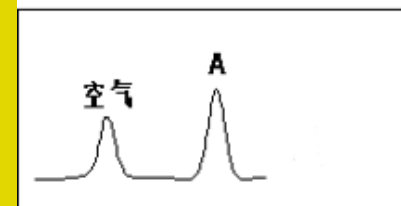
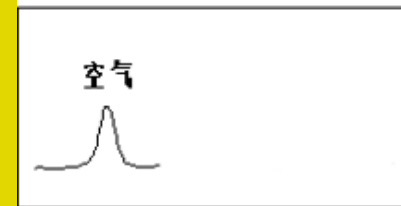
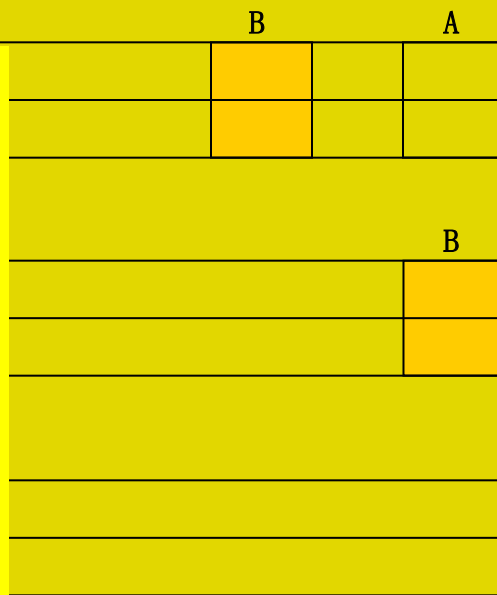
$$k = \frac{m_s}{m_m} = \frac{n_s}{n_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{K}{\beta} \quad \beta: \text{相比} \quad \beta = \frac{V_m}{V_s}$$

k 随柱温、柱压、相体积变化, 由组分及固定液的热力学性质决定

2.2.2 分离原理



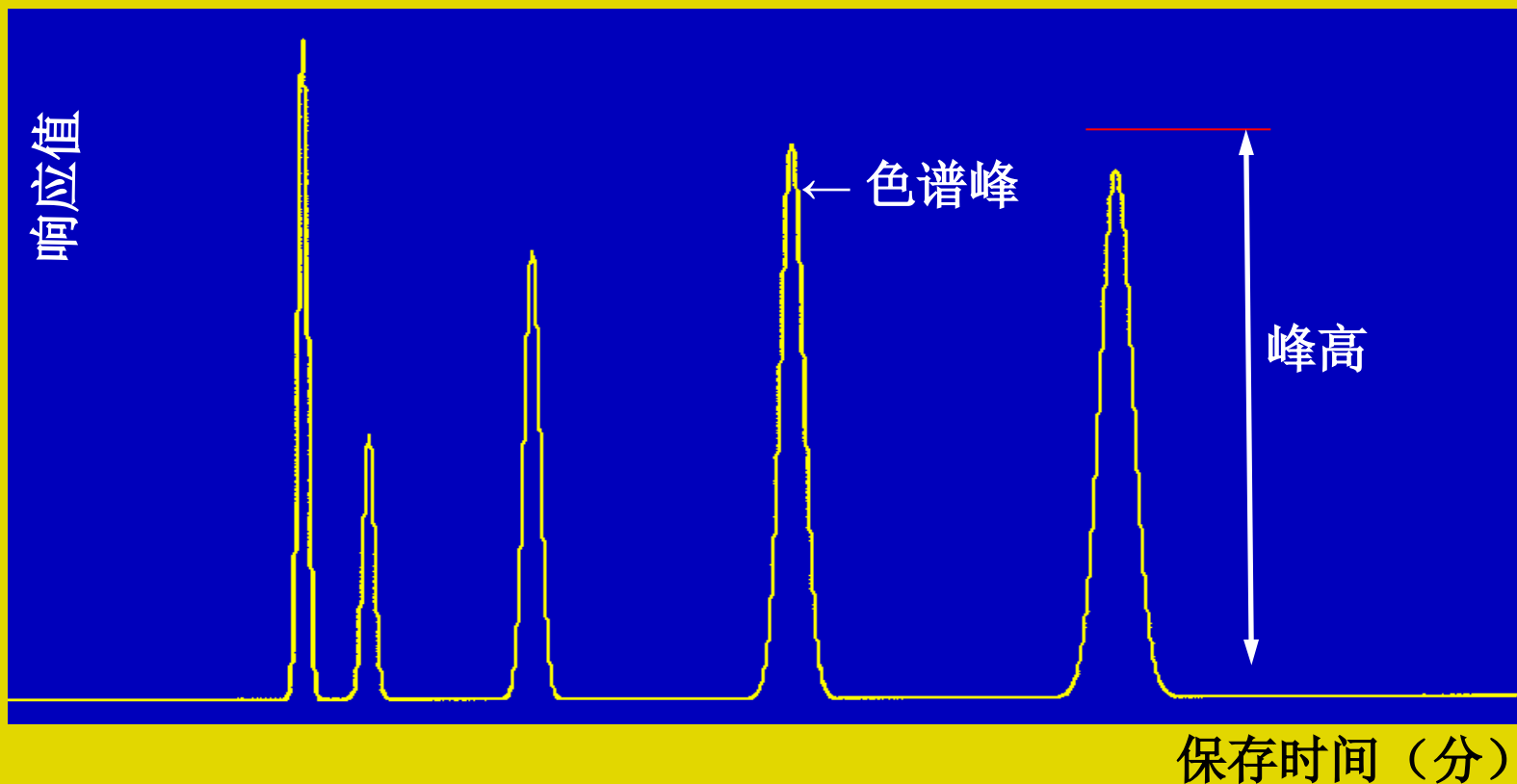
例：气相色谱法——载气（即流动相，是一种不与待测物作用、用来载送试样的惰性气体，如氮气等）载着待分离的试样经过色谱柱中的固定相，使试样在两相中发生反复历次的分配，最终使各组分分离，然后分别检测，统计各自的响应信号。



2.3 色谱流出曲线



色谱流出曲线（色谱图）即色谱柱流出物经过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图，其纵坐标为信号强度，横坐标为保存时间。



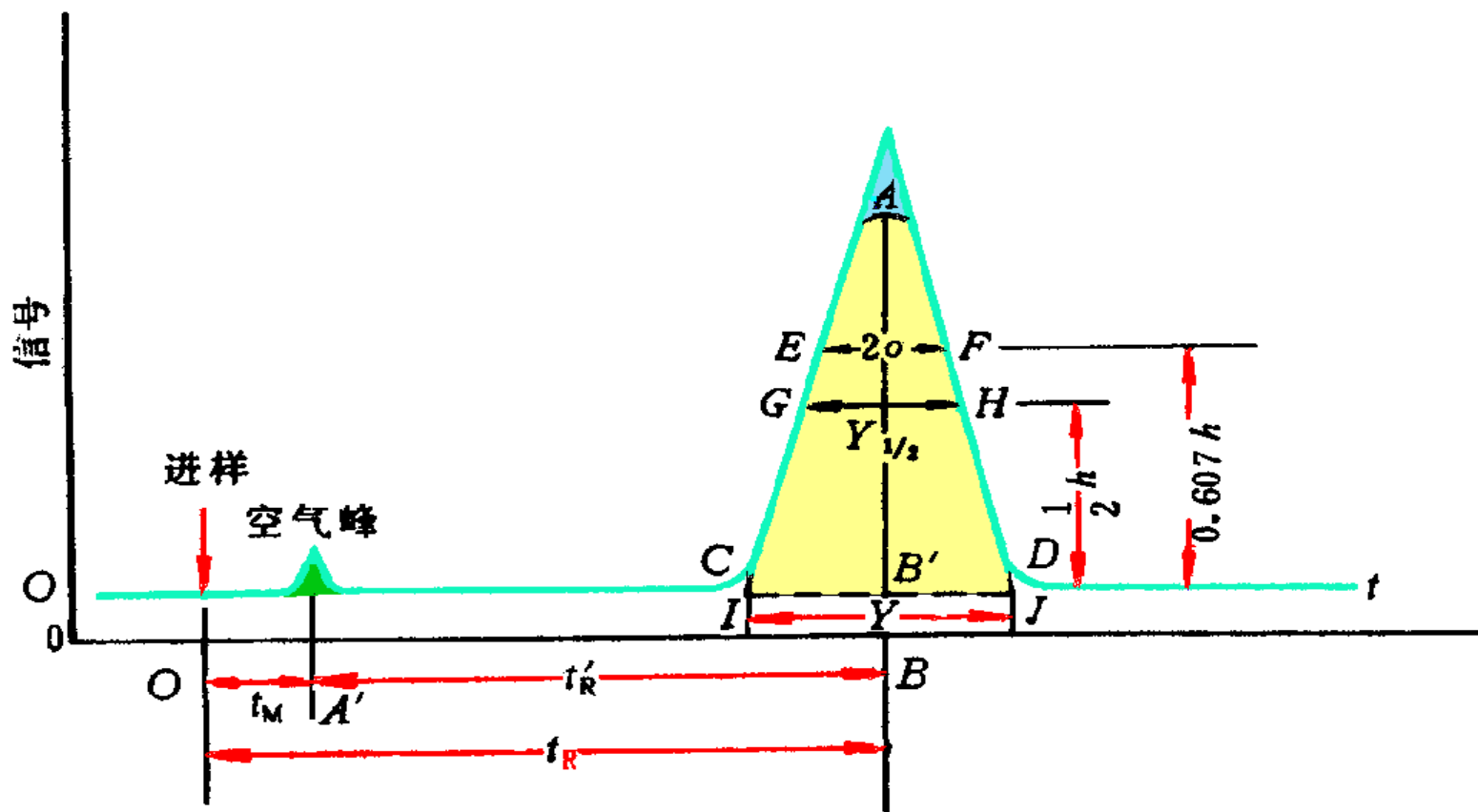


图 18-3 色谱流出曲线

1、有关术语



① 基线：柱中仅有流动相经过时，检测器响应讯号的统计值，即图中O-t线。稳定的基线应该是一条水平直线。

② 峰高：色谱峰顶点与基线之间的垂直距离， h

③ 原则偏差 σ

④ 峰面积 A

⑤ 半峰宽 $Y_{1/2} = 2.354 \sigma$

⑥ 峰底宽 $Y = 4 \sigma$

σ 、 $Y_{1/2}$ 、 Y ：区域宽度

2、保存值



死时间 t_m ：不被固定相吸附或溶解的组分进入色谱柱时，从进样到柱后出现浓度最大值所需的时间。对于气相色谱，常把空气(TCD)和甲烷(FID)从进样到出峰的时间称为 t_m 。如图中O-A'。这种物质不被固定相吸附或溶解，其流速与流动相的流速接近。测定流动相平均线速度 \bar{u} 时可用柱长 L 与死时间 t_m 的比值计算。

$$\bar{u} = \frac{L}{t_m}$$

$$t_m = \frac{L}{\bar{u}}$$



保存时间 t_R

试样从进样开始到柱后出现色谱峰极大值所需要时间。如图中O-B。它相应于样品到达检测器所需的时间。

$$t_R = t_R' + t_m$$

调整保存时间 t_R'

扣除死时间后的组份保存时间，

即
$$t_R' = t_R - t_m$$

组分在色谱柱中的保存时间 t_R 包括了组分随流动相经过柱子所需的时间和组分在固定相中滞留的时间； t_R' 实际上是组分在固定相中滞留的时间。单位(s)或(cm)。



死体积 V_m

不能被固定相滞留的（惰性）组分从进样到出现峰最大值时所消耗的流动相的体积。死体积可由死时间与流动相体积流速 F_0 (L / min) 计算：

$$V_m = t_m \cdot F_0$$

保存体积 V_R

从进样开始到柱后被测组份出现浓度最大值时所通过的流动相体积。如下：

$$V_R = t_R \cdot F_0$$



调整保存体积 V_R'

某组份的保存体积扣除死体积后，称该组份的调整保存体积

$$V_R' = t_R' \cdot F_0 \quad \text{或} \quad V_R' = V_R - V_m$$

相对保存值 $\alpha_{2,1}$

某组份2与组份1的调整保存值之比，是一种无因次量。

$$\alpha_{2,1} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} = \frac{V_{R2}'}{V_{R1}'} \neq \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

$\alpha_{2,1}$ 的大小与两组分的**选择性**有关。 $\alpha_{2,1}$ 越大，选择性越好，越轻易分离。 $\alpha_{2,1}$ 只与**柱温**及**固定相**的性质有关，而与柱径、柱长、填充情况及流动相流速无关。所以是色谱法中，尤其是气相色谱法中广泛使用的定性数据。



从色谱流出曲线上，能够得到许多主要信息：

- ① 根据色谱峰个数，能够判断样品中所含组份的至少个数。
- ② 根据色谱峰的保留值（或位置），能够进行定性分析。
- ③ 根据色谱峰的面积或峰高，能够进行定量分析。
- ④ 色谱峰的保留值及其区域宽度，是评价色谱柱分离效能的根据。
- ⑤ 色谱峰两峰间的距离，是评价固定相(和流动相)选择是否合适的根据。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/067126066160006156>