

# 2023 仪器分析

# 第三篇 色谱及分离分析

吴一诺 wyinuo3@mail.sysu.edu.cn



# **自录** ontents





### 第16章 色谱分析法导论

- 物质分离与色谱法
- 色谱流出曲线及有关术语
- 色谱分离机制
- **色谱法基本理论**
- ※响色谱分离的因素

### 重点与难点

### 掌握

色谱法相关概念及各种参数的计算公式,分配系数与保留因子定义及关系,塔板理论,塔板数和塔板高度,速率理论

### 熟悉

色谱过程;分配色谱、吸附色谱、离子交换色谱和分子排阻 色谱基本类型的分离机制,影响组分保留行为的因素

#### 了解

色谱分类及发展过程

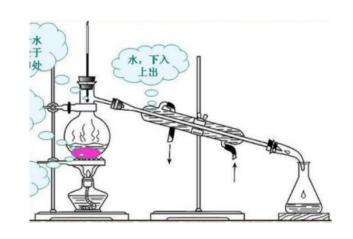
## 物质分离与色谱法

### 物质的分离与色谱法

物质的分离: 待分离物质存在性质差异



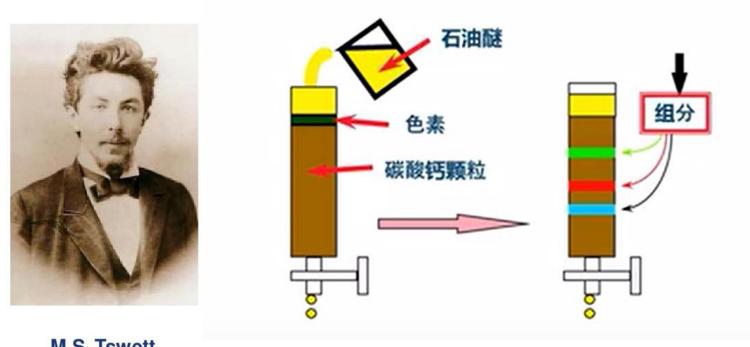
溶解度



沸点

### 色谱法

俄国植物学家茨维特: 1906年色谱分离法



M.S. Tswett

# 色谱过程

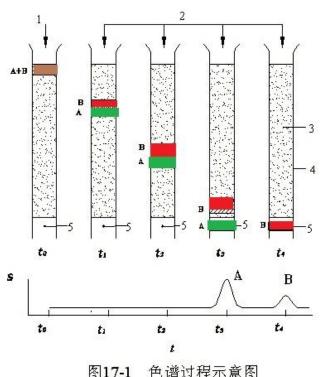
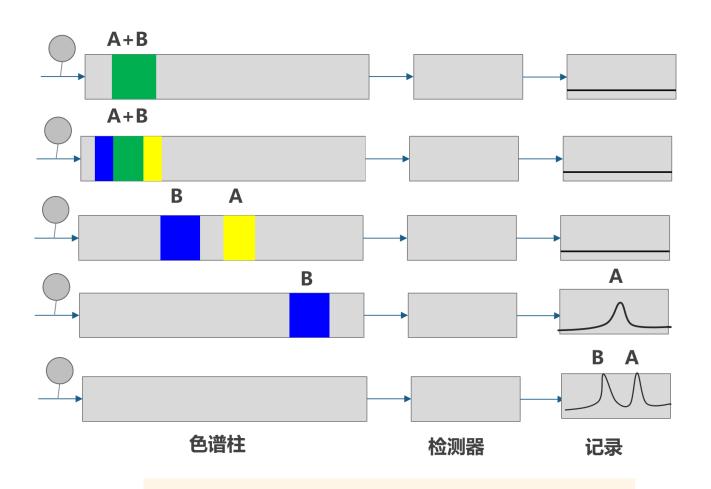


图17-1 色谱过程示意图 1.试样 2.流动相 3.固定相 4.色谱柱 5.检测器

组分的结构和性质微小差异 与固定相作用差异(吸附) 洗脱 随流动相移动的速度不等 (解吸附) 分布离散 色谱分离

# 色谱分析法



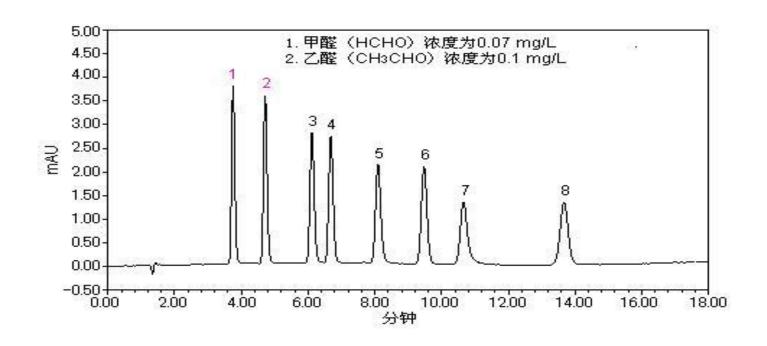
化工、石油、环境保护、生物化学、 医学和法医检验、制药、食品安全

# 2

# 色谱流出曲线及有关术语

# 色谱流出曲线

■ 检测器输出的电信号强度对时间作图所绘制的曲线

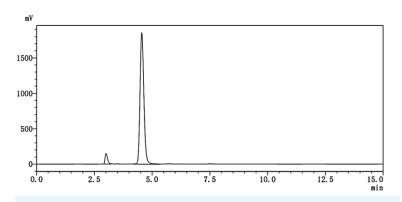


- 横坐标:时间
- 纵坐标:响应值

- 峰的个数
- 基线

# 色谱流出曲线

### 基线(baseline): 仅流动相进入检测器时检测到的信号



- ✓ 噪声:基线信号的随机波动
- ✓ 漂移:基线随时间有 趋向性的变化



### 影响因素:

- ✓ 电源及检测器不稳定
- ✓ 流动相含有气泡
- ✓ 色谱柱被污染

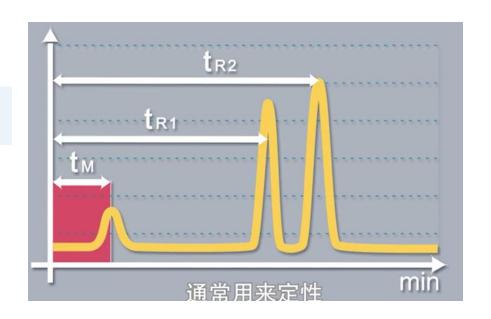
### 基线稳定方可进样测试!

# 定性参数

### 保留时间(retention time; t<sub>R</sub>):

从进样到组分在柱后出现浓 度极大时的时间

### 死时间(t<sub>0</sub>):



- ✓ 不被固定相吸附或溶解的组分的保留时间
- ✓ 可用于计算流动相平均线速度

### 调整保留时间( $t_{R'}$ ): $t_{R'} = t_{R-} t_0$

 $\checkmark$  实验条件一定时, $t_{R}$  仅取决于组分的性质

# 定性参数

### 保留体积( $V_R$ )

$$V_{\rm R} = t_{\rm R} \cdot F_{\rm c}$$

从进样开始到组分在柱后出现浓度极大时所需通过色谱柱的流动相体积。

### 死体积( $V_0$ )

$$V_0 = t_0 \cdot F_c$$

- ✓ 由进样器至检测器的流路中未被固定相占有的空间。
- ✓ 固定相颗粒间间隙、色谱仪中管路和连接头之间的容积、检测器内空间的总和

#### 调整保留体积

$$V_{\rm R}' = V_{\rm R} - V_0 = t_{\rm R}' \cdot F_{\rm c}$$

由保留体积扣除死体积后的体积

# 定性参数

### 相对保留值(r)

$$r_{2,1} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{V'_{R_2}}{V'_{R_1}}$$

- ✓ 两组分的调整保留值之比,选一个色谱峰作为参照标准
- ✓ 仅与柱温及固定相性质有关

### 选择因子:

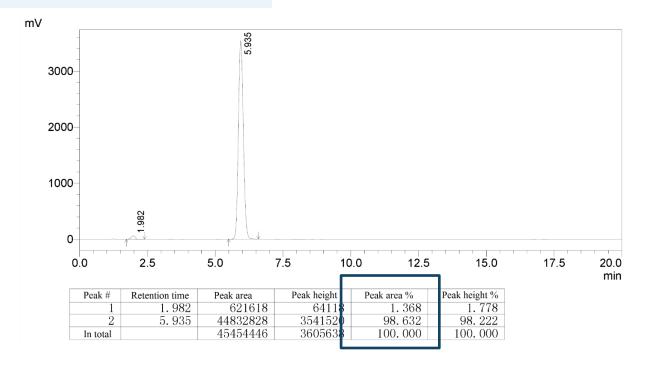
$$\alpha = \frac{t'_{r(i)}}{t'_{r(s)}}$$

- ✓ 相邻两组分保留时间之比。后/前
- ✓  $\alpha=1$ , 相邻两组分无法分离
- ✓ 反映不同组分在两相间分配平衡热力学性质的差异

# 定量参数

峰高(peak height; h): 组分在柱后出现浓度极大时的检测信号,即色谱峰顶至基线的距离

峰面积(peak area; A): 色谱曲线与基线间包围的面积



### 色谱峰的区域宽度

### 标准偏差(standard deviation; $\sigma$ ):

- ✓ 0.607倍峰高处的峰宽之半
- ✓ 组分被带出色谱柱的分散程度

### 半峰宽(W<sub>1/2</sub>):

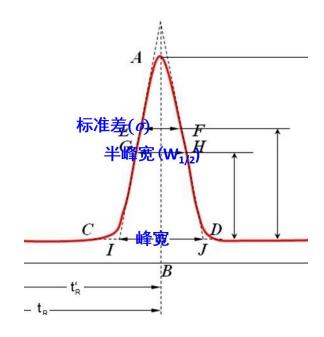
✓ 峰高一半处的峰宽

#### 峰宽(peak width; W):

✓ 色谱峰两侧拐点的切线在基线上截距

$$W_{1/2} = 2.355 \sigma$$

$$W = 4\sigma = 1.699W_{1/2}$$



### 习题

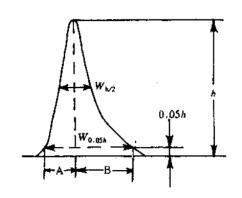
某色谱峰, 其峰高为0.607出色谱峰宽度为4 mm, 半峰宽为()

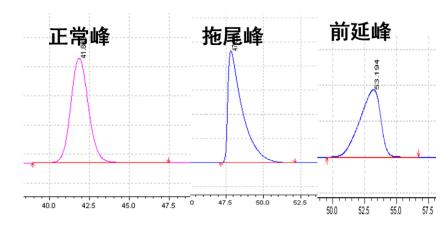
$$W_{1/2} = 2.355 \sigma$$

$$W_{1/2} = 2.355 \text{ X 4 mm}$$
  
= 9.42 mm

### 对称因子fs (symmetry factor): 衡量色谱峰的对称性

$$f_{\rm s} = \frac{W_{0.05h}}{2A} = \frac{(A+B)}{2A}$$

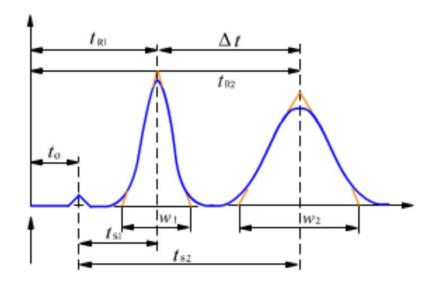




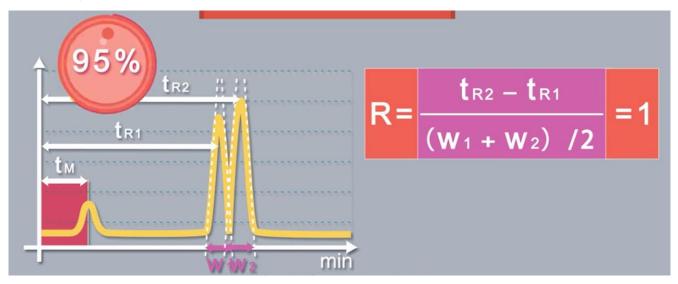
对称因子: 0.95-1.05 大于1.05 小于0.95

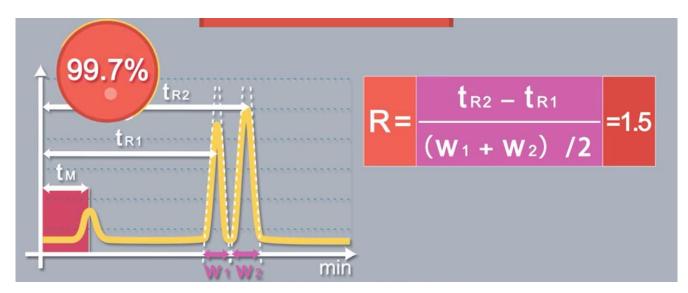
### 分离度: 总分离效能指标

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$



### 分离度





中国药典规定定量分析R≥1.5

# 总结

### 色谱流出曲线

### 定性参数

- ✓ 保留时间
- ✓ 保留体积
- ✓ 相对保留值
- ✓ 选择因子

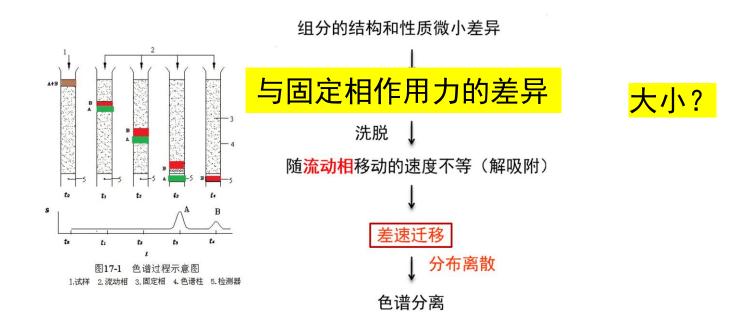
#### 定量参数

- ✓ 峰高
- ✓ 峰面积

#### 柱效参数

- ✓ 标准偏差
- ✓ 峰宽、半峰宽
- ✓ 分离度
- ✓ 理论塔板数
- ✓ 塔板高度

# 色谱过程



组分在流动相携带下通过固定相,在流动相和固定相间反复发生和达到"分配平衡"的过程

## 色谱过程

#### 分配系数

$$K = \frac{c_{\rm s}}{c_{\rm m}}$$

温度一定的平衡状态下,组分在固定相 (s) 与流动相 (m) 中的浓度 (c) 之比。

#### 影响因素:

组分、固定相、流动相、温度、 压力。

#### 容量因子

$$k = \frac{m_{\rm s}}{m_{\rm m}}$$

温度一定的平衡状态下,组分 在固定相和流动相中的质量 (m)之比。

#### 影响因素:

组分、温度、压力、固定相和 流动相的性质、<mark>体积的比值</mark>(β)

$$k = \frac{m_{\rm s}}{m_{\rm m}} = \frac{c_{\rm s} V_{\rm s}}{c_{\rm m} V_{\rm m}} = K \frac{V_{\rm s}}{V_{\rm m}}$$

### 习题

k= 10时,溶质在流动相中的百分率为()

A. 9.1% B.10% C. 90% D. 91%

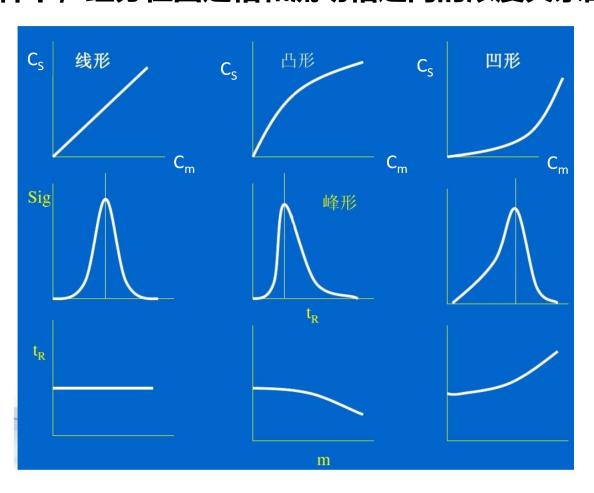
容量因子

$$k = \frac{m_{\rm s}}{m_{\rm m}}$$

1/11= 9.1%

# 分配等温线

### 恒温条件下, 组分在固定相和流动相之间的浓度关系曲线



# 色谱过程方程

### 保留值与分配系数关系:

$$t_{\rm R} = t_0 (1 + k) = t_0 (1 + k \frac{V_{\rm s}}{V_{\rm m}})$$

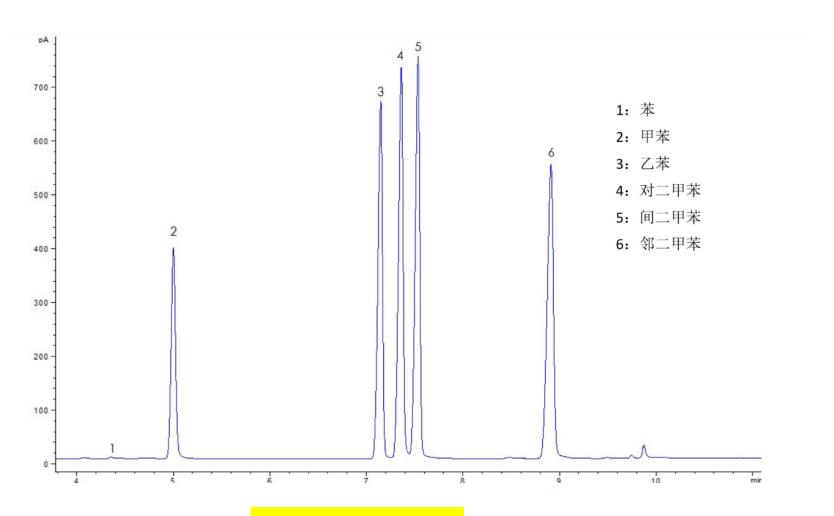
$$V_{\rm R} = V_0 (1 + k) = V_0 (1 + K \frac{V_{\rm s}}{V_{\rm m}})$$

$$k = rac{t_{
m R} - t_0}{t_0} = rac{t_{
m R}'}{t_0}$$
 k大保留时间长

$$\Delta t_R = t_{R_1} - t_{R_2} = t_0(k_1 - k_2) = t_0(K_1 - K_2) \frac{v_s}{v_m}$$

分配系数不等。是分离的前提

# 色谱过程方程



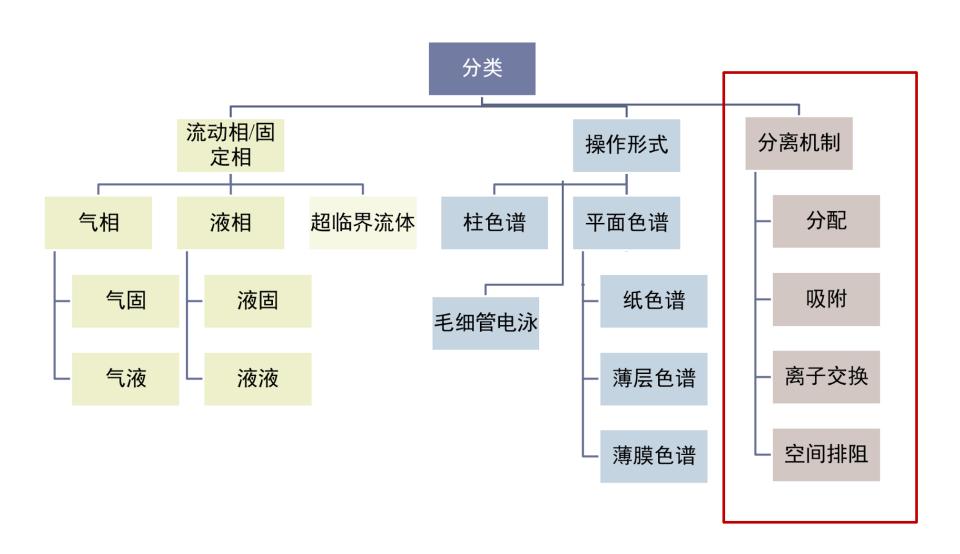
k大保留时间长

# 3

# 色谱法分类

# 及分离机制

## 色谱法分类



### 色谱法分离机制

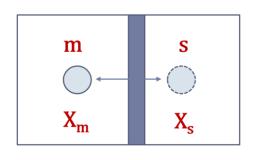
- 分配色谱(partition chromatography)
- 吸附色谱 (adsorption chromatography)
- 离子交换色谱 (ion exchange chromatography)
- 空间排阻色谱 (molecular exclusion chromatography)

色谱过程方程: 
$$t_{R} = t_{0}(1+k) = t_{0}(1+K\frac{V_{s}}{V_{m}})$$

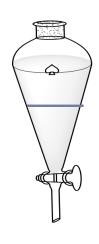
固定相?流动相?分离原理?分离顺序?

# 分配色谱法

### 组分在固定相和流动相中溶解度(分配系数)的差别



$$t_{\rm R} = t_0 (1 + K \frac{\rm V_s}{\rm V_m})$$



分析对象: 各类有机化合物, 生物大分子或天然产物

分离顺序:相似相溶原则

## 分配色谱法

#### 1. 固定相:

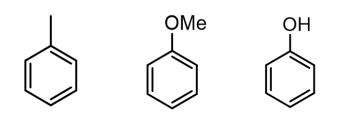
薄层液体,化学反应键合在惰性载体颗粒上。

### 2. 流动相:

- **气液分配色谱**:固定相极性、组分沸点和极性等
- 液液分配色谱:库仑力和氢键作用力,相似相溶原则

	两相极性	洗脱顺序
正相液液分配色谱	流动相<固定相	极性小先出
反相液液分配色谱	流动相>固定相	极性大先出

# 分配色谱法



极性:

正相色谱

出峰顺序:

>



>

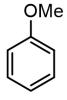
反相色谱

出峰顺序:??

保留时间:

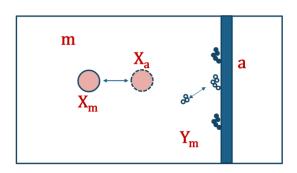


<



<

# 吸附色谱法



组分对固定相表面吸附中心 吸附能力(吸附系数)差别

$$t_{\rm R} = t_0 (1 + K \frac{\rm V_s}{\rm V_m})$$

固定相: 多孔固体吸附剂

✓ 硅胶(硅醇基)、氧化铝

#### 流动相:

✓ 气固吸附色谱、液固吸附色谱

### 分析对象:

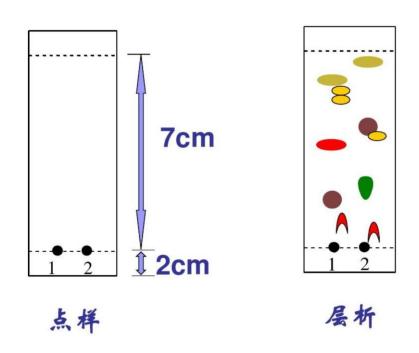
✓ 气体小分子和各类有机物

K: 吸附系数,吸附剂活性、组分和流动相性质

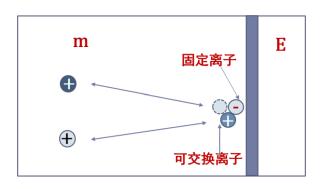
V<sub>s</sub>. 吸附表面积

# 吸附色谱法





### 离子交换色谱法



组分与离子交换剂的离子 基团离子交换能力(选择 性系数)差别

$$t_{\rm R} = t_0 (1 + K \frac{\rm V_s}{\rm V_m})$$

K: 离子交换系数

V<sub>s</sub>. 离子交换树脂体积

#### 固定相

- ✓ 离子交换树脂
- ✓ 化学键合离子交换剂

#### 流动相:

✓ 一定pH和离子强度的缓冲溶液

应用: 离子型组分

✓ 无机离子,有机和生物物质

#### 类型:

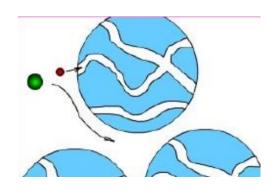
✔ 阴离子和阳离子交换色谱

在离子交换色谱法中,下列措施可以改变保留体积的是()

- A. 改变离子交换剂
- B. 以二价金属盐溶液代替一价盐溶液作为流动相
- C. 降低流动相中盐的浓度
- D. 改变流速
- E. 改变流动相PH

**ABCE** 

### 空间排阻色谱法



被分离<mark>组分分子体积大小</mark>的不同,在多孔凝胶上受阻滞 的程度不同

$$t_{\rm R} = t_0 (1 + K \frac{\rm V_s}{\rm V_m})$$

K:渗透系数

V<sub>s</sub>. 凝胶孔隙体积

#### 固定相:

✓ 多孔凝胶(软质、半软质和硬质)

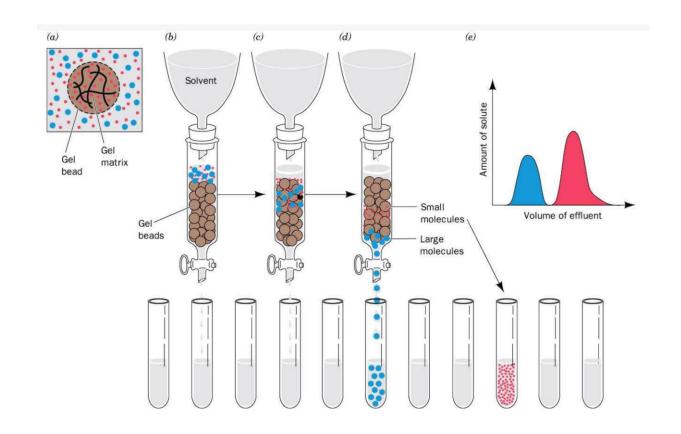
#### 流动相:

✓ 缓冲溶液或有机溶剂

#### 应用:

✓ 生物大分子或合成有机高分子

### 空间排阻色谱法



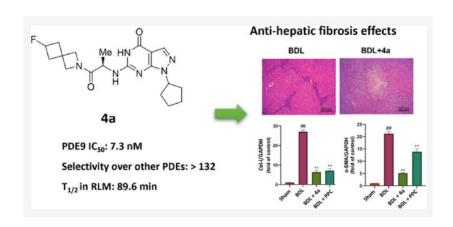
$$t_{\rm R} = t_0 (1 + K \frac{V_{\rm s}}{V_{\rm m}})$$

K:渗透系数

Vs. 凝胶孔隙体积

- 渗透系数:平衡时孔内外溶质的浓度比( $0 < K_0 < 1$ )
  - ✓由溶质分子的线团尺寸和凝胶孔穴的大小所决定。
  - ✓在一定分子线团尺寸范围内,组分按分子量的大小分离。

### PDE9蛋白纯化实例



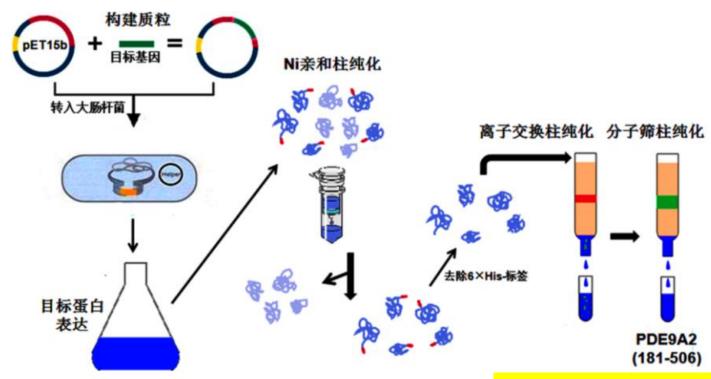


Compound	R <sub>3</sub>	$\Delta G_{\rm bind, pred}$ (kcal/mol)	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	RLM T <sub>1/2</sub> (min)		
2a	Me N-3	-38.22 ± 3.37	26 ± 4	-		
2b	OH-	$-37.42 \pm 2.75$	$41\pm5$			
2e	$O \hspace{1cm} N - (CH_2)_2^{-\frac{1}{2}}$	$-28.24 \pm 3.80$	$128\pm 9$			
2d	s	$-33.35 \pm 2.83$	$11 \pm 1$	8.41		
2e	-N_N-}-	$-34.73 \pm 3.28$	$26\pm3$	-		
2f	D—v_N+	$-31.82 \pm 3.16$	> 100	-		
2g	Mo-\N-\{-	$-32.15 \pm 2.90$	$53\pm1$	-		
3a	CI	$-40.00 \pm 3.52$	$5.4 \pm 0.6$	10.23		
3b	F-\(\bigver_{\frac{1}{2}}\)	$-35.91 \pm 2.80$	$12\pm2$	-		
3c	F>\_\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\	$-35.63 \pm 4.35$	$8.3\pm1.3$	9.88		
3d	MeO-\N-}-	$-34.17 \pm 2.85$	$38\pm3$	-		
3e	F <sub>3</sub> G N	$-32.91 \pm 3.44$	$24\pm3$	-		
3f	NC\(\bigve{N}\-\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\	$-32.80 \pm 2.57$	$22\pm2$	-		
4a	$F = \bigvee N^{\frac{1}{2}}$	$-36.18 \pm 2.64$	$7.3 \pm 0.1$	89.6		
4b	$CI = \bigvee N^{\frac{5}{2}}$	$-38.60 \pm 3.13$	$14\pm1$	19.6		
Sildenafil				5.37		



15个化合物IC<sub>50</sub> 每个3次,共需500 ug 蛋白,市售价格3万元左右

#### 蛋白纯化实例



>200mg PDEs蛋白

Ni-NT亲和柱: 去除杂蛋白

Q-SepHarose离子交换柱:蛋白根据电荷的不同进行分离

SepHacryl S300分子筛色谱柱:蛋白根据大小进一步分离

### 色谱类型总结

	分配	吸附	离子交换	分子排阻
原理	溶解度	吸附能力	离子交换能力	线团尺寸
固定相	薄层液体	多孔性吸附剂	离子交换树脂 化学键合离子 交换剂	多孔性凝胶
流动相	水 有机溶剂	气体 有机溶剂	缓冲溶液	水溶液 有机溶剂
分配系数K	分配系数	吸附系数	选择性系数	渗透系数

# 4

#### 塔板理论

#### 速率理论

课本第十八章18.2.2内容提前

### 色谱分离

#### 色谱分离的前提

$$t_{\rm A} \neq t_{\rm B}$$



$$k = \frac{t_{\mathrm{R}} - t_{\mathrm{0}}}{t_{\mathrm{0}}} = \frac{t_{\mathrm{R}}'}{t_{\mathrm{0}}}$$



 $K_{A} \neq K_{B}$  或 $k_{A} \neq k_{B}$ 

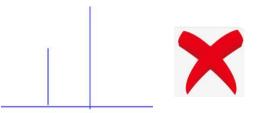
分配系数不同的物质,即可 在色谱柱上实现有效分离?



#### 组分具有不同的分配系数

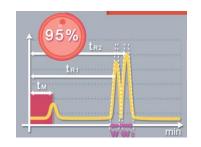
### 色谱流出曲线

#### 色谱峰形状:

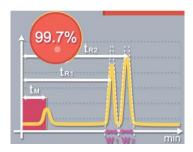


塔板理论

热力学:相平衡





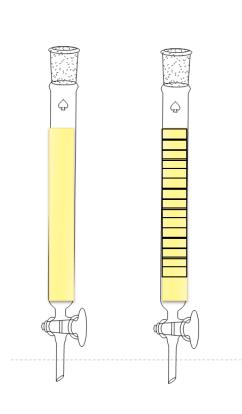


速率理论

动力学:流体动力学

#### 假设前提:

- ✓ 在色谱柱内每一"塔板" H内,组分在两相间瞬间达到分配平衡。
- ✓ 流动相以以一个塔板体积为最小体积流量单位间歇式进入色谱柱
- ✓ 分配等温线为直线型,即分配系数在各塔板内是恒定的。
- ✓ 所有组分同时进入零号塔板,各塔板间没有纵向 扩散。



柱效参数:理论塔板数N、理论塔板高度H

 $N^{\uparrow}$ , 分配次数 $^{\uparrow}$ , 柱效 $^{\uparrow}$  H = L/N

#### 质量分配和转移

组分A( $k_A$ = 1)和组分B( $k_B$ = 0.5)的分配和转移

- ①设色谱柱的塔板数n=5,即r=0、1、2、3、4(或n-1)号。
- ②将100 μg 的A 加到第0号塔板上。
- ③分配平衡后,0号塔板内 $m_s/m_m = 50 \mu g / 50 \mu g$ 。
- ④不断加入流动相,进行脉动式的转移

0	1	2	3	4
---	---	---	---	---

第一次分配时: 第一次分配后:

固定相

流动相

100 μg 新流动相 50 μg 50 μg

固定相

流动相

第二次分配时:



0号塔板:1号塔板:

50 μg 50 μg

#### 第二次分配后:

25 μg	25 μg	
25 μg	25 μg	

#### 第三次分配时:

固定相

流动相

25 μg	25 μg	
新流动相	0号塔板流 动相25 μg	<b>1号塔板流动</b> 相25 μg

第三次分配后:

12.5 μg	25 μg	12.5 μg
12.5 μg	25 μg	12.5 μg

0号塔板: 1号塔板: 2号塔板:

 $25 \mu g$   $50 \mu g$   $25 \mu g$ 

**6.3** μg A

#### 组分A $(k_A=1)$ 与组分B $(k_B=0.5)$

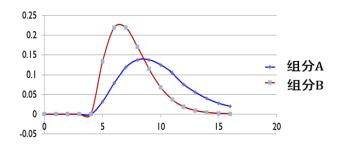
N	0	1	2	3	4	柱	出口
0		100	0	0	0	0	0
1		50	50	0	0	0	0
2		25	50	25	0	0	0
3		12.5	37.5	37.5	12.5	0	0
4		6.3	25	37.5	25	6.3	0
5		3.2	15.7	31.3	31.3	15.7	3.2
6		1.6	9.5	23.5	31.3	23.5	7.9
7		0.8	5.6	16.5	27.4	27.4	11.8
8		0.4	3.2	11.1	22	27.4	13.7
9		0.2	1.8	7.2	16.6	24.7	13.7
10		0.1	1	4.5	9.4	20.7	12.4

组分 $A(k_A=1)$ 在n=5的色谱柱内和出口的分布

#### 两组分的分离

N	柱出口 A质量	柱出口 B质量
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	3.2	10.9
6	7.9	21.9
7	11.8	21.9
8	13.7	17
9	13.7	11.4
10	12.4	6.8

#### 色谱分离曲线



#### 组分B

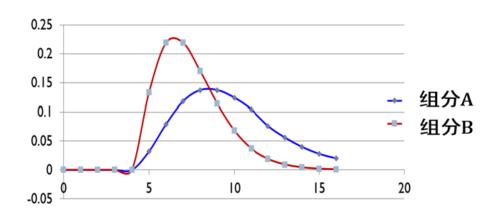
k=0.5, <mark>当N=6和7时</mark>,柱出口产生B的浓度最大点。

#### 组分A:

k=1, N=8和9时,柱出口处达到浓度最大点。

两组分开始分离,

k小的组分B在柱后先出现浓度极大值,即先出柱。



- 分配系数(容量因子)不等是分离的前提
- № 的组分在先出柱
- 一根色谱柱*n*=10<sup>3</sup>以上,组分有微小的分配系数(容量因子)差别即可实现完全分离。

■ 色谱流出曲线:当塔板数很大时,流出曲线趋于正态分布曲线

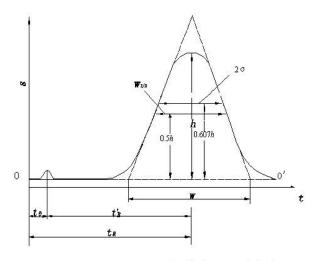


图17-2 色谱流出曲线(色谱图)和区域宽度

$$C = \frac{C_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-t_R)^2}{2\sigma^2}}$$

 $\sigma$ : 标准差

C: 任意时间t时的浓度

 $C_0$ : 峰面积A,即相当于某组分的总量

### 色谱流出曲线方程

$$C = \frac{C_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-t_R)^2}{2\sigma^2}} \qquad t = t_R \\ C_{\text{max}} = \frac{C_0}{\sigma\sqrt{2\pi}}$$

- ✓  $\sigma$ 一定时, 峰高h 取决于 $C_0$
- ✓  $C_0$ 一定时,峰高h取决于 $\sigma$

$$C = C_{\text{max}} e^{-\frac{(t-t_{\text{R}})^2}{2\sigma^2}}$$

- $\checkmark$  C 随时间t向峰两侧对称下降。
- $✓ \sigma$ 越小,峰越锐。 $\sigma$ 可作为柱效参数

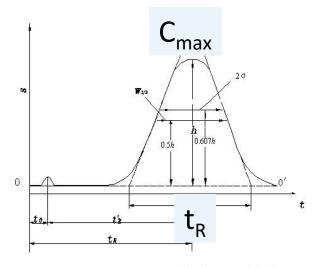


图17-2 色谱流出曲线(色谱图)和区域宽度

#### 色谱流出曲线方程

#### 峰高

$$c_{max} = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \frac{V_R}{\sqrt{N}}} M$$

- □ 进样量M越大,峰c<sub>max</sub>越高(定量)
- □ 进样量M一定时,保留体积V<sub>R</sub>越大,峰c<sub>max</sub>越低
- □ 保留体积V<sub>R</sub>和进样量M一定时,柱效N越高,峰高越高
- □ 进样量M和柱效N一定时,保留时间小的峰高且窄,后流出的峰低且宽

### 色谱流出曲线方程

$$\sigma = \frac{V_R}{\sqrt{N}} \qquad \sigma = \frac{t_R}{\sqrt{N}}$$

$$W_{1/2} = 2.355 \sigma$$

$$W = 4\sigma = 1.699W_{1/2}$$

#### 理论塔板数和塔板高度

$$N = \left(\frac{V_R}{\sigma}\right)^2 = 16\left(\frac{V_R}{W}\right)^2 = 5.54\left(\frac{V_R}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$$

#### 有效塔板数和塔板高度

$$N_{e_f f} = 16 \left(\frac{V_R'}{W}\right)^2 = 5.54 \left(\frac{V_R}{W_{1/2}}\right)^2$$

$$N_{eff} = 16 \left(\frac{t_{R'}}{W}\right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_{R'}}{W_{1/2}}\right)^2$$

#### 优点:

- 阐明了溶质在色谱柱内分布变化规律
- ✓ 描述了溶质洗出最大浓度所处位置及影响因素
- ✓ 获得保留体积基本关系式
- ✓ 提供了塔板数和塔板高度柱效指标

#### 局限:

- ✓ 理想状态: 假定分配系数保持不变
- ✓ 忽视纵向扩散
- ✓ 未考虑各种动力学因素
- ✓ 未考虑柱结构参数、色谱操作参数与理论塔板数关系

1956年,荷兰学者范第姆特(Van Deemter)提出了色谱过程动力学理论——速率理论。

影响H的动力学因数

■ 涡流扩散(eddy diffusion, 多径扩散)

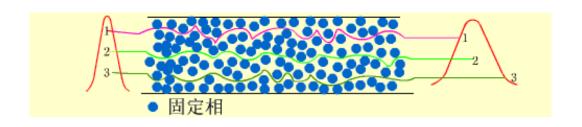
柱填充不均匀使同一个组分分子经不同长度途径流出色谱柱,引 起峰型扩张

$$A=2\lambda d_{\rm p}$$

A: 涡流扩散系数, 其单位为cm。

λ: 填充不规则因子, 填充技术和填料颗粒形状决定。

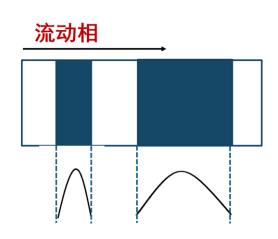
d<sub>p</sub>: 填料 (固定相) 颗粒的平均直径



■ 纵向扩散 (longitudinal diffusion, 分子扩散)

浓度梯度的存在造成的区带展开

$$B=2\gamma D_{\rm m}$$



γ: 弯曲因子

✓ 与填充物的形状和填充状况有关

 $D_{\rm m}$ : 组分在流动相中的扩散系数。

✓ 流动相性质(正比)、柱温(正比)、 柱压(反比)有关

- 传质阻抗(mass transfer resistance)
  - ✓ 组分无法在两相间瞬间平衡,使有些分子较快向前移动, 而另一些滞后,引起峰展宽。
  - ✓ 传质过程:溶解——扩散——转移

$$C_s = q \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{Ds}$$

- ✓ Ds: 组分在固定液中扩散系数
- ✓ D<sub>f</sub>: 固定液平均膜厚度
- ✓ q: 固定相颗粒形状和孔结构决定的结构因子

$$H = A + B/u + Cu$$

涡流扩散 A 不受u影响

纵向扩散 B/u:  $u \uparrow$ ,  $H \downarrow$ 

传质阻抗 Cu: u↑, H↑

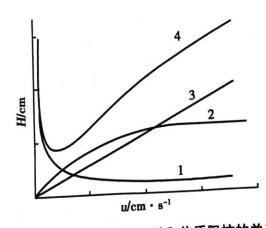


图 16-13 流速与纵向扩散和传质阻抗的关系 1. 纵向扩散项(B/u) 2. 流动相传质阻抗( $C_m u$ ) 3. 固定相传质阻抗( $C_n u$ ) 4. H-u 关系曲线

- ◆ u 较低时: B/u主导, u升高,H降低,柱效升高
- ◆ u 较高时: Cu主导, u升高, H升高, 柱效降低
- ▶ 塔板高度最小值, u 最佳, u 最佳时, 分析时间较长, 实际u通常 高于u最佳

#### 影响谱带扩宽的其他因素

- 1. 非线性色谱: 载样量过大
- 2. 活性中心对组分吸附能力过强
  - ✓去除活性中心
  - ✓流动相中加入竞争性添加剂
- 3. 柱外效应
  - ✓进样方式和技术
  - ✓进样器、检测器、连接管等死体积



### 基本分离方程及

影响分离度的因素

### 基本分离方程

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \qquad k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R'}{t_0} \qquad \alpha = \frac{t'_{r(i)}}{t'_{r(s)}}$$

$$k = \frac{t_{\mathrm{R}} - t_{\mathrm{0}}}{t_{\mathrm{0}}} = \frac{t_{\mathrm{R}}'}{t_{\mathrm{0}}}$$

$$\alpha = \frac{t'_{r(i)}}{t'_{r(s)}}$$

#### 色谱基本分离方程式:

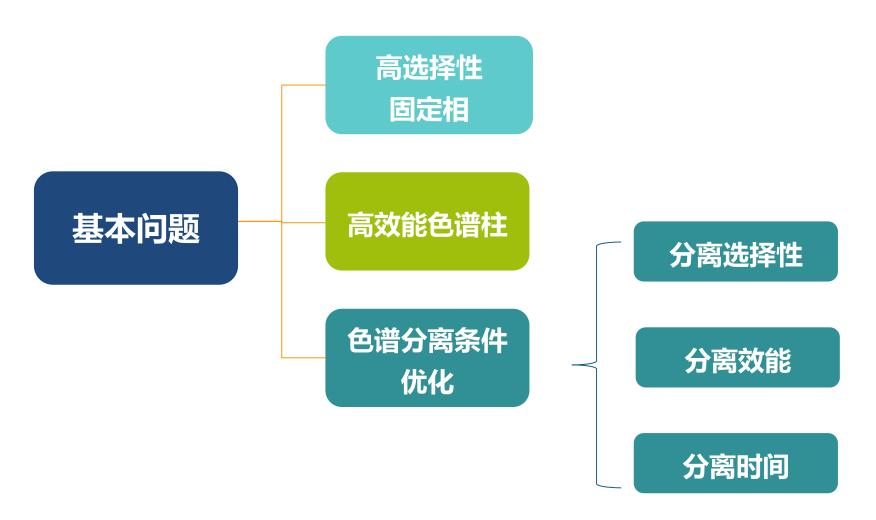
$$\mathbf{R} = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k}$$

N: 理论塔板数

 $\alpha$ : 选择因子,  $t_{R2}'/t_{R1}'$ 

k: 容量因子 ,  $t_{R2}'/t_0$ 

#### 色谱分离实践



尽可能短的时间内实现尽可能多的组分的分离

### 分离度与分离时间

$$t_R = \frac{16R^2H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \frac{(1+k)^3}{k^2}$$

1. u 不变, 塔板高度 H 下降, t<sub>R</sub>下降

瞬间达到分配平衡

- 2. 改变固定相和流动相性质
- 3. 调节 α和k

复杂组分: k范围宽

- ✓ 气相色谱:程序升温
- √ 液相色谱: 梯度洗脱

#### 分离度与塔板数

$$R = \frac{\sqrt{L}}{4\sqrt{H}} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k} \qquad \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^2 = \frac{N_2}{N_1} = \frac{L_2}{L_1}$$

提高柱长和降低塔板高度可提高R

分离时间、峰宽均增加

为分离时间不变则需提高流速,则柱压增加

#### 平衡

### 分离度与容量因子、选择系数

$$\mathbf{R} = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k}$$

- 1. k增加, R增加,控制 k 2-5,复杂组分1-10
- 2. α增加, R增加, t<sub>R</sub>减小

改变固定相种类、柱温、流动相性质与组成

其他实验条件都不变,柱长增加1倍,则理论塔板数()

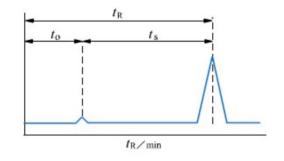
A. 不变 B. 增加1倍 C. 增加 $\sqrt{2}$ 倍 D. 减少 $\sqrt{2}$ 倍

B. 增加1倍

在一根3 m长的色谱柱上分离一个试样结果如下: 死时间1min,组分1的保留时间为14min,组分2的保留时间为17min,峰宽为1 min.

- 1. 用组分2计算色谱柱的理论塔板数N及塔板高度H。
- $2. 求调整保留时间t_{R1}$  及 $t_{R2}$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$$
$$= 16 (17/1)^2$$
$$= 4624$$

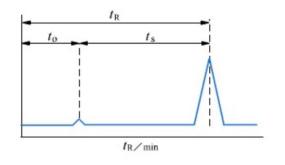


$$t_{R1}' = 14-1 = 13 \text{ min}$$
  $t_{R2}' = 17-1 = 16 \text{ min}$ 

在一根3 m长的色谱柱上分离一个试样结果如下: 死时间1min,组分1的保留时间为14min,组分2的保留时间为17min,峰宽为1 min.

- 3. 用组分2求N<sub>eff</sub>及H<sub>eff</sub>
- 4. 求容量因子 $k_1$ 及 $k_2$
- 5. 求相对保留值r<sub>2.1</sub>和分离度R

$$N_{eff} = 16 \left(\frac{t_{R'}}{W}\right)^{2} = 5.54 \left(\frac{t_{R'}}{W_{1/2}}\right)^{2}$$
$$= 16 (16/1)^{2}$$
$$= 4096$$



$$k_1 = t_{R1}'/t_0 = 13$$
  $k_2 = t_{R2}'/t_0 = 16$   $r_{2,1} = k_2/k_1 = 16/13 = 1.2$ 

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \qquad \mathbf{R} = \frac{\sqrt{N} \alpha - 1}{4 \alpha} \frac{k}{\alpha + 1} = 2.7$$

#### 本章小结

- 1. 色谱的基本术语: 会运用
- 2. 色谱分离机制: 熟悉机制和影响因素
- 3. 色谱理论: 塔板理论和速率理论, 会计算



## 谢谢!



吴一诺 wyinuo3@mail.sysu.edu.cn