

# 第八章-1 色谱法导论

## 第一节 色谱法原理和分类

严格意义上，色谱法是一种**分离**方法

分析**多组分混合物样品**最有力的手段之一

# 一. 色谱法发展历史

- 1906年俄国植物学家茨维特分离植物色素发明色谱原型装置,因此被提名为1917年诺贝尔化学奖的候选人。

--起名 *Chromatography*

—色谱, 沿用至今, 实际早已无色

—色层, 层析

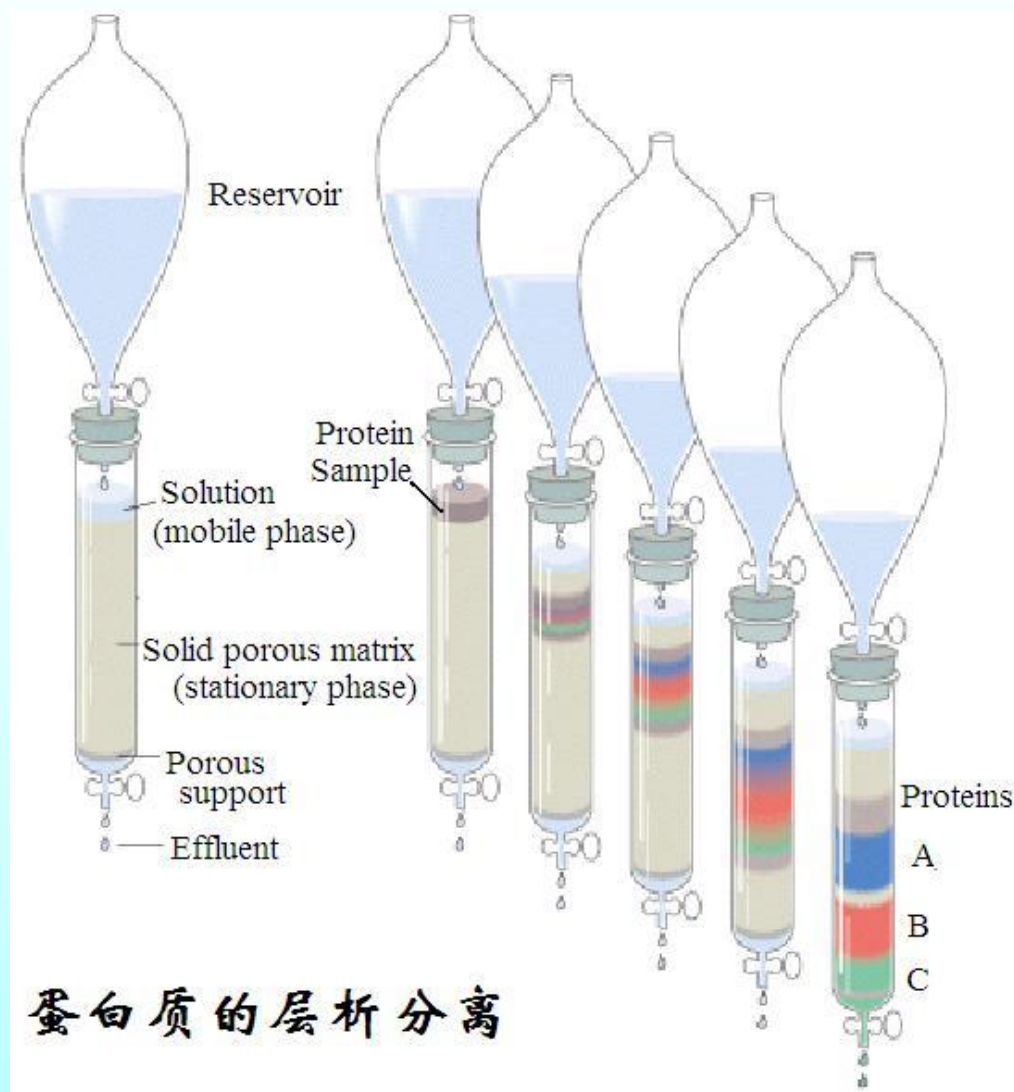
- 库恩(Kuhn)利用色谱法分离研究维生素和胡萝卜素, 获1938年诺贝尔化学奖

- 1952年, 马丁(Martin) 和辛格(Synge)因发明分配色谱法和纸色谱法获诺贝尔化学奖

- 据统计, 20多位获诺贝尔化学奖和生理医学奖的科学家得益于色谱分析法



# 一. 色谱法发展历史



类似  
现象

# 一. 色谱法发展历史

## 色谱法的发明

- 100多年前，德国化学家Runge对古罗马人的利用纸来分离染料的方法进行改进——纸上色谱技术
- 俄国植物学家茨维特Tsweet 首先将这种层析现象用于分离植物色素红萝卜素、叶黄素和叶绿素A、B，并将这种方法命名为色谱法（Chromatography: Chromat色彩，graphos图谱）  
——液-固色谱（是最先创立的色谱方法）
- 20年后Kuhn 与Lederer为了证实蛋黄中的叶黄素是植物叶黄素与玉米黄质的混合物，参考了Tsweet 的论文并采用色谱法进行研究工作
- 从此，色谱法才迅速引起各国科学工作者的重视并得以应用
- 早期的色谱法只是一种分离方法，用于不能或很难用萃取或蒸馏方法分离的混合物及性质极为相似的化合物，应用最广泛的领域是天然有机化合物的分离



# 一. 色谱法发展历史

## 色谱法的发明

- 1941年，Martin和Synge采用水分饱和的硅胶为固定相，以含有乙醇的氯仿为流动相分离乙酰基氨基酸并且提出了色谱塔板理论——分配色谱
- A.J.P.Martin和 R.L.M.Synge获得了1952年诺贝尔化学奖。在他们获得诺贝尔奖的论文中还指出“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。”“如果流动相用气体来代替，对分离更有好处”，“使用非常细的颗粒填料和柱的两端施加较大的压差，应能得到较小的理论塔板商”
- 1951年，Martin 和James采用气体作为流动相，以自动滴定仪作为检测器分析脂肪酸——气相色谱法
- 1958年，Golay又提出了使用毛细管柱代替填充柱可获得极高的分离效率——毛细管气相色谱法

从此，气相色谱法得以蓬勃发展。气相色谱学的诞生及其获得广泛的应用使色谱学逐渐成为分析化学的一个重要分支学科

# 一. 色谱法发展历史

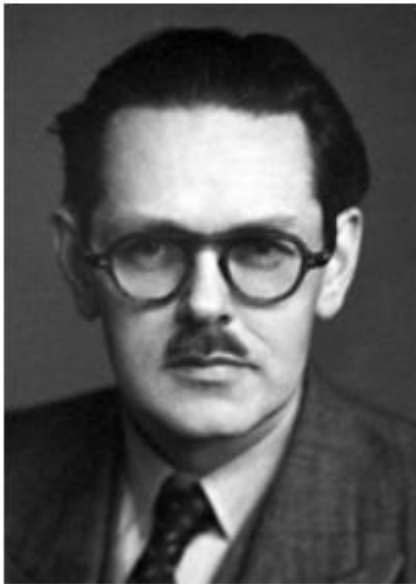


The Nobel Prize in Chemistry 1952  
Archer J.P. Martin, Richard L.M. Synge

The Nobel Prize in Chemistry 1952

Archer J.P. Martin

Richard L.M. Synge



Archer John Porter  
Martin



Richard Laurence  
Millington Synge

The Nobel Prize in Chemistry 1952 was awarded jointly to Archer John Porter Martin and Richard Laurence Millington Synge *"for their invention of partition chromatography"*

Dr. Archer Martin, Dr. Richard Synge. Your invention of partition chromatography has given to science a new tool which already has proved its usefulness in an impressive number of important investigations.

This tool has enabled research workers in chemistry, biology and medicine to tackle and solve problems which earlier were considered almost hopelessly complicated.

...It has been a great experience to all involved in such research to witness how much the study of these very complex problems has benefited from the very simple tool invented by you. I believe it is in the best British tradition to make great discoveries with simple means. Our high appreciation of your achievements is further strengthened by the fact that this pioneer work of yours was done during the first years of the World War, thus at a very difficult time for your country and your people.

## 二. 色谱法定义

- 色谱系统两相构成：

- 其中的一相固定不动，称为**固定相**

- 另一相是携带试样混合物流过此固定相的流体（气体或液体），称为**流动相**

- 色谱分离方式

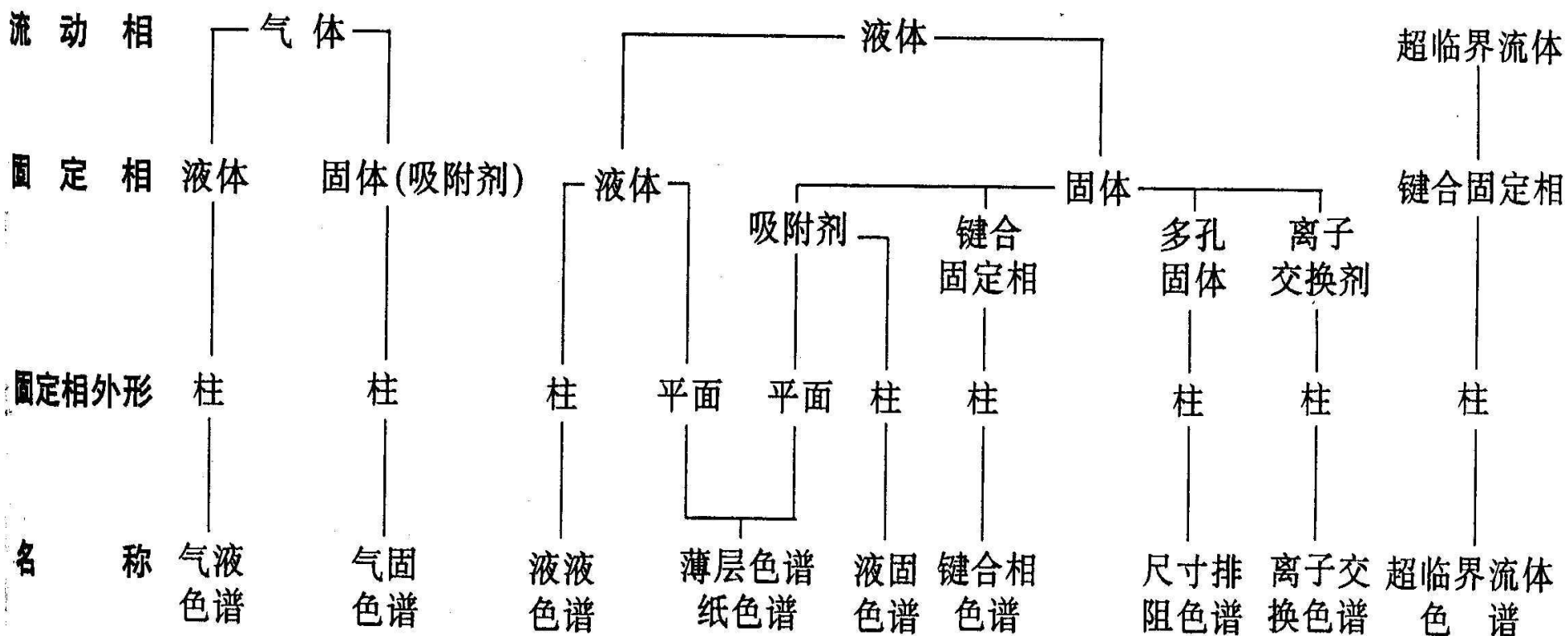
当流动相中携带的混合物流经固定相时，混合物与固定相发生相互作用。由于混合物中各组分在性质和结构上的差异，与固定相之间产生的作用力的大小、强弱不同，随着流动相的移动，混合物在两相间经过反复多次的分配平衡，使得各组分被固定相保留的时间不同，从而按一定次序由固定相中先后流出。与适当的柱后检测方法结合，实现混合物中各组分的分离与检测。

### 三. 色谱法分类

## ● 分类依据:

## ——两相状态，分离机理，固相容器形状

### 表 15.1 色谱法分类





**气相色谱：流动相为气体（称为载气）。**

**按分离柱不同可分为：填充柱色谱和毛细管柱色谱；**

**按固定相的不同又分为：气固色谱和气液色谱**



# 液相色谱 Liquid Chromatography LC

液相色谱：流动相为液体（也称为淋洗液）。

固定相：

液体——分配色谱

吸附剂——液固色谱

化学键合相——键合相色谱

离子交换剂——离子交换色谱

分子筛——凝胶色谱

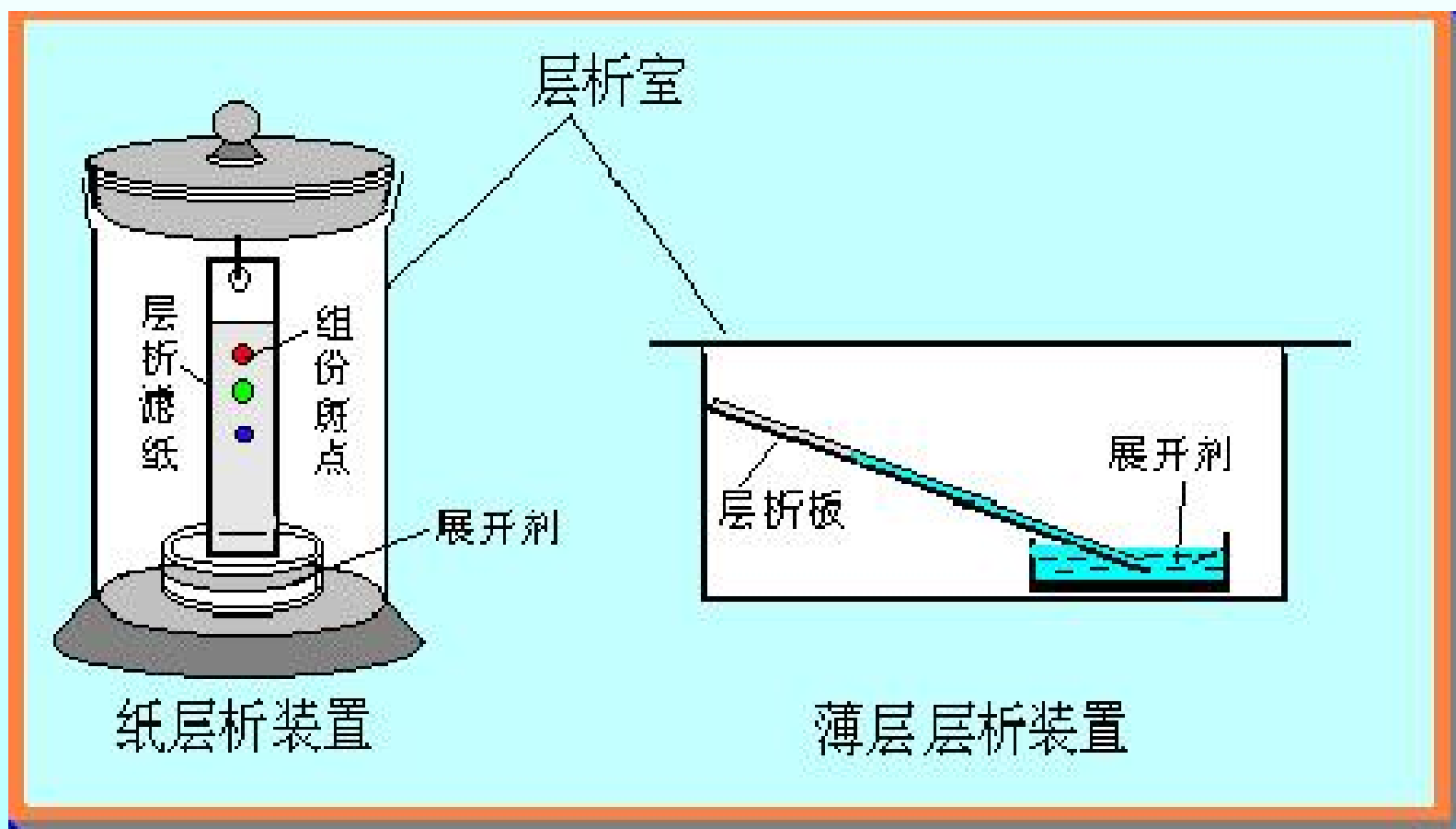
抗原抗体——亲和色谱

Waters LC 2690



# 其他色谱方法

## 薄层色谱和纸色谱：



# 三. 色谱流出曲线及有关术语

## 1. 色谱流出曲线

检测器信号——纵坐标  
时间——横坐标

得到的曲线=色谱图

## 2. 色谱峰

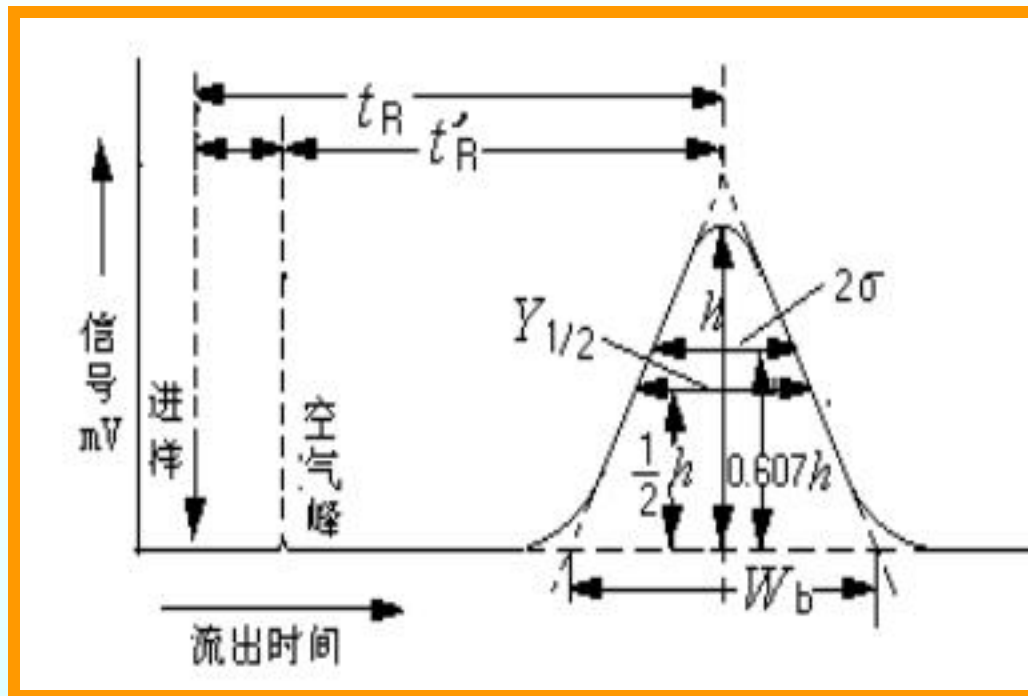
色谱流出曲线突起部分  
峰形——对称、拖尾、前延

## 3. 基线

无试样（单纯流动相），通过检测器时检测到的信号即为基线。

## 4. 峰高

峰顶点——基线垂直距离





## 5. 保留值

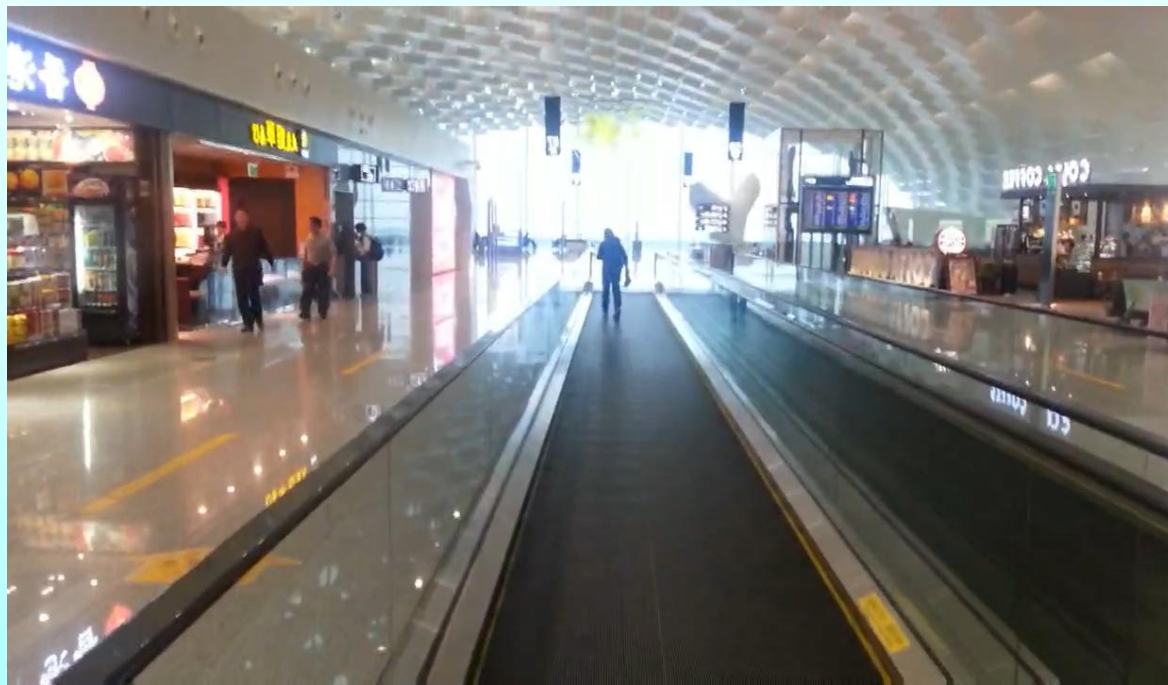
(1) **死时间** ( $t_M$ ,  $t_0$ ) : **不与固定相作用的物质** (不保留), 从进样到柱后出现浓度极大值时**所需的时间**。

(2) **保留时间** ( $t_R$ ) : 组分从进样到柱后出现浓度极大值时**所需的时间**。

(3) **调整保留时间** ( $t_R'$ ) :

$$t_R' = t_R - t_M$$

- $t_R'$ ——**等于样品在固定相中停留时间**
- $t_M$ ——**等于样品在流动相中停留时间**
- **不同组分在流动相中停留时间是相同的?**



## 5. 保留值

(4) **死体积** ( $V_M$ ) :  $V_M = t_M \times F_0$

意义=柱中未被固定相占据空间+进样器+检测器内空间

(5) **保留体积** ( $V_R$ ) :  $V_R = t_R \times F_0$  ( $F_0$ 为流动相流速)

(6) **调整保留体积** ( $V_R'$ ) :  $V_R' = V_R - V_M$

(7) **相对保留值**  $r_{21}$ :

组分2与组分1调整保留值之比:

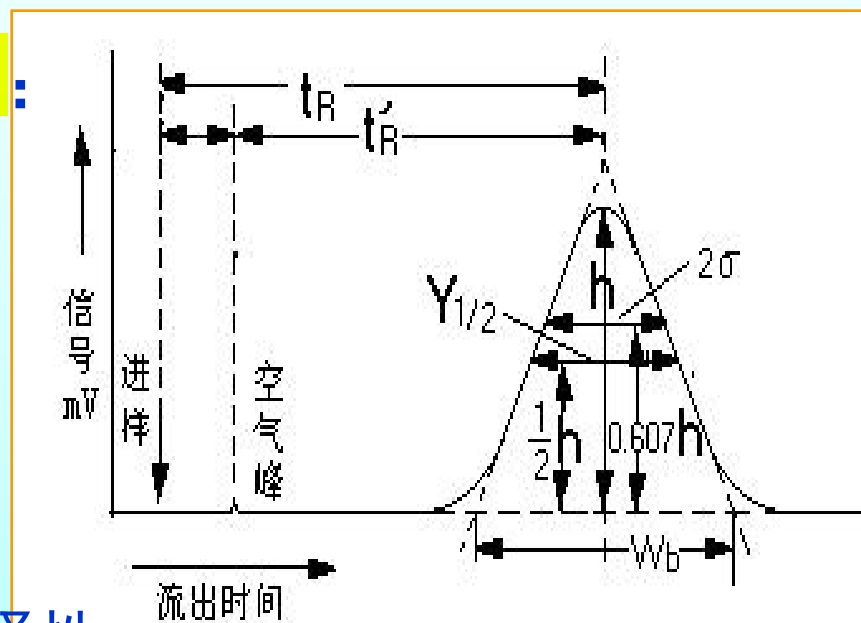
$$r_{21} = t'_{R2} / t'_{R1} = V'_{R2} / V'_{R1}$$

**相对保留值**只与柱温

和固定相性质有关,

与其他色谱操作条件无关,

它表示了固定相对这两种组分的选择性。



## 6. 区域宽度

用来衡量色谱峰宽度的参数，有三种表示方法：

### (1) 标准偏差( $\sigma$ ):

即0.607倍峰高处色谱峰宽度的一半。

### (2) 半峰宽( $Y_{1/2}$ ):

色谱峰高一半处的宽度

$$Y_{1/2} = 2.354 \sigma$$

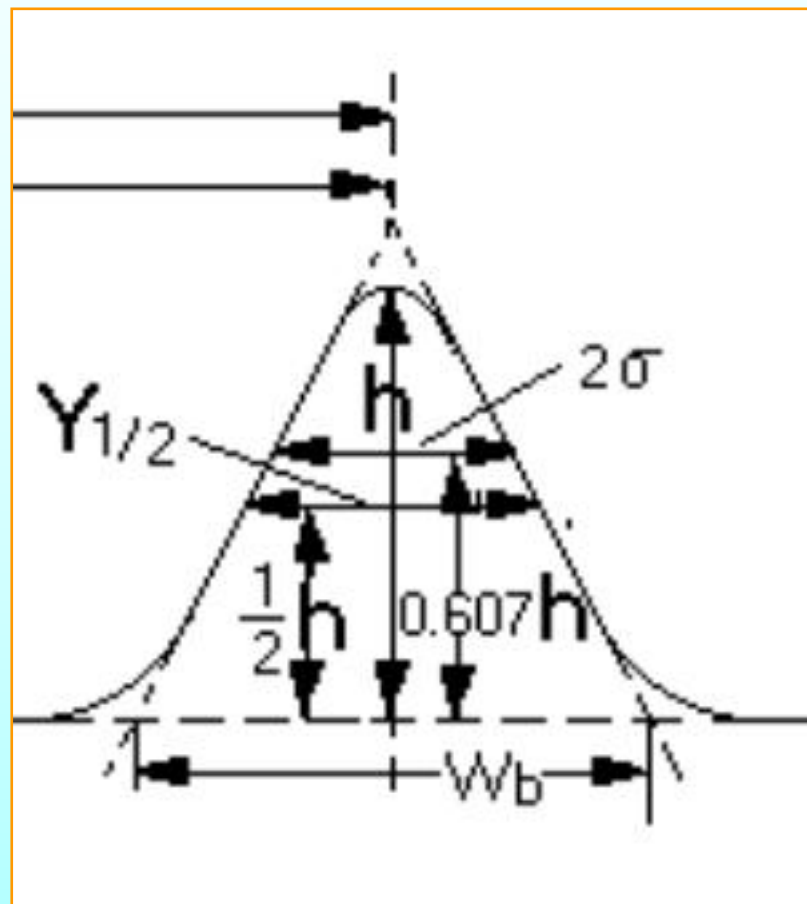
### (3) 峰底宽( $Y$ ): $W_b = 4 \sigma$

## 7. 用途

(1) 峰位——保留值，定性分析

(2) 峰高——峰面积，定量分析

(3) 峰宽——柱效评价



## 第二节

# 色谱基础理论

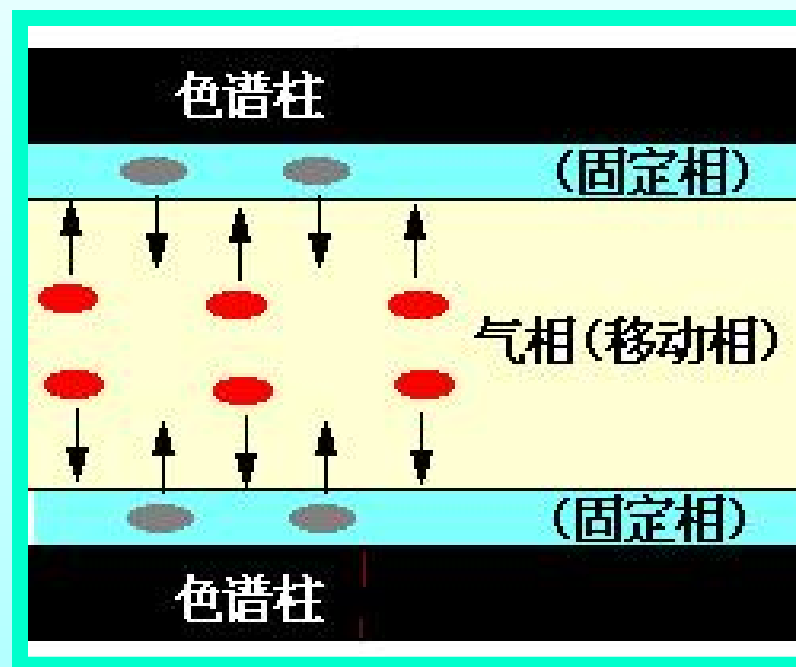


# 一. 分配系数 $K$

## 1. 分配系数

组分在固定相和流动相间发生的吸附、脱附，或溶解、挥发的过程叫做分配过程。在一定温度下，组分在两相间分配达到平衡时的浓度比，称为分配系数，用 $K$ 表示，即：

$$K = \frac{\text{组分在固定相中的浓度}}{\text{组分在流动相中的浓度}}$$



## 二、塔板理论-柱分离效能指标

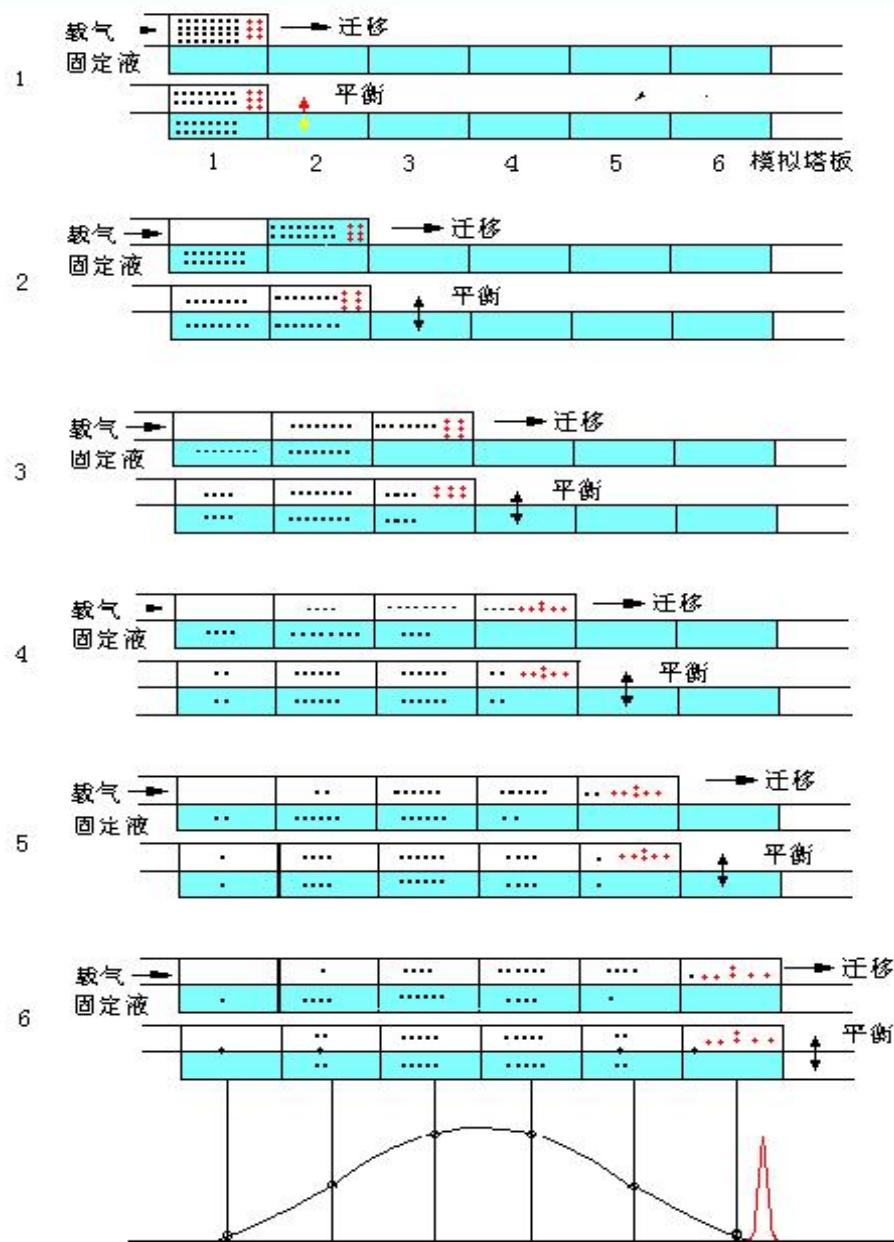
### 1. 色谱分离过程

● 当试样由载气携带进入色谱柱与固定相接触时，被固定相溶解或吸附。

● 随着载气的不断通入，被溶解或吸附的组分又从固定相中挥发或脱附，

● 挥发或脱附下的组分随着载气向前移动时又再次被固定相溶解或吸附。

● 随着载气的流动，溶解、挥发，或吸附、脱附的过程反复地进行。



## 二、塔板理论-柱分离效能指标

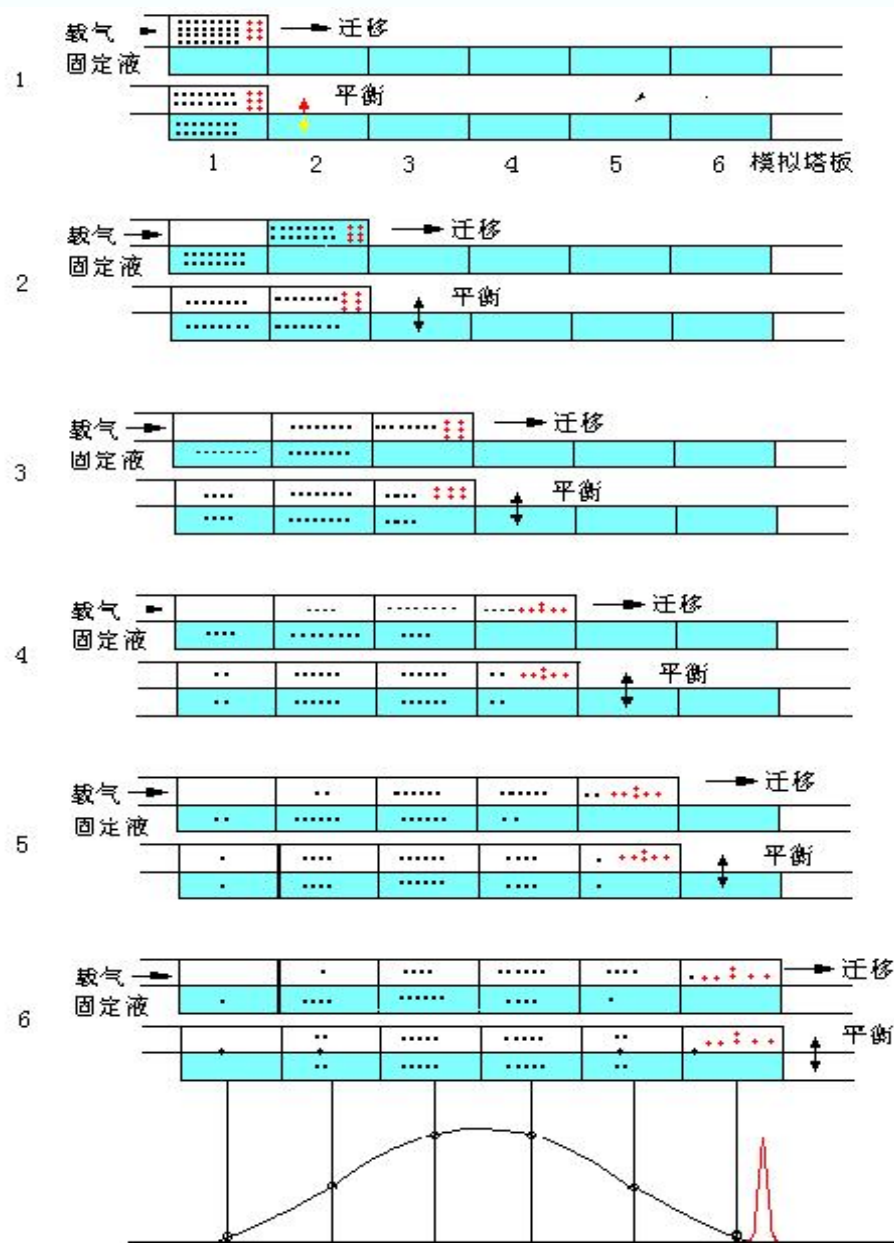
### 1. 色谱分离过程

● 当试样由载气携带进入色谱柱与固定相接触时，被固定相溶解或吸附。

● 随着载气的不断通入，被溶解或吸附的组分又从固定相中挥发或脱附，

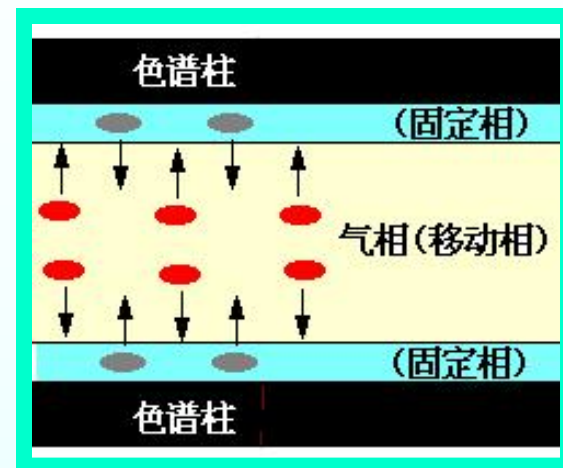
● 挥发或脱附下的组分随着载气向前移动时又再次被固定相溶解或吸附。

● 随着载气的流动，溶解、挥发，或吸附、脱附的过程反复地进行。



# 分配系数 $K$ 的讨论

$$K = \frac{\text{组分在固定相中的浓度}}{\text{组分在流动相中的浓度}}$$



- 试样一定时， $K$ 主要取决于固定相和流动相性质
- 一定温度下，组分的分配系数 $K$ 越大，出峰越慢；
- 每个组份在各种固定相上的分配系数 $K$ 不同；
- 选择适宜的固定相可改善分离效果；
- 试样中的各组分具有不同的 $K$ 值是分离的基础；
- 某组分的 $K = 0$ 时，即不被固定相保留，最先流出。



## 2、容量因子与分配系数

**分配系数 $K$** ：组分在两相间的浓度比；

**容量因子 $k$** ：平衡时，组分在各相中总的质量比；

$$k = M_s / M_m$$

$M_s$ 为组分在固定相中的质量， $M_m$ 为组分在流动相中的质量。

**容量因子 $k$ 与分配系数 $K$ 的关系为：**

$$k = \frac{M_s}{M_m} = \frac{\frac{M_s}{V_s} V_s}{\frac{M_s}{V_m} V_m} = \frac{c_s}{c_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} = \frac{K}{\beta}$$

式中 $\beta$ 为相比 =  $V_m / V_s$

填充柱相比：6~35；

毛细管柱的相比：50~1500

容量因子越大，保留时间越长。

可由保留时间计算出容量因子，两者有以下关系：

$$t_R = t_M (1 + k)$$

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

## 2. 结论

色谱柱长:  $L$

虚拟的塔板间距离:  $H$

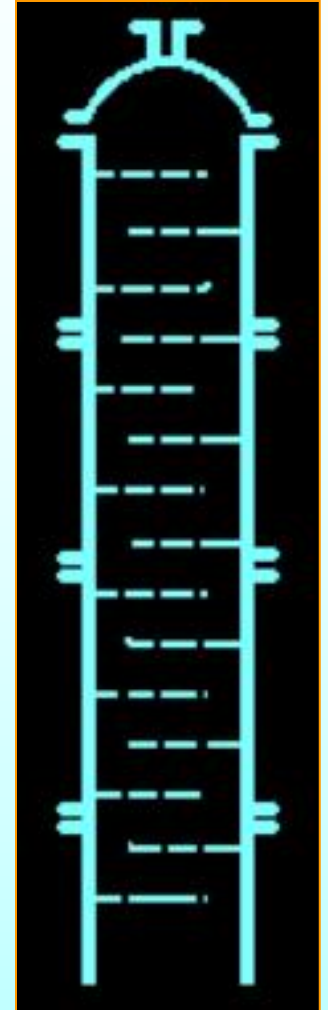
色谱柱的理论塔板数:  $n$

则三者的关系为:

$$n = L / H$$

理论塔板数与色谱参数之间的关系为:

$$n = 5.54 \left( \frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$



# 有效塔板数和有效塔板高度

- 单位柱长的塔板数越多，表明柱效越高。
- 用不同物质计算可得到不同的理论塔板数。
- 组分在 $t_M$ 时间内不参与柱内分配。需引入有效塔板数和有效塔板高度：

$$n = 5.54 \left( \frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

$$n_{\text{有效}} = 5.54 \left( \frac{t'_R}{Y_{1/2}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t'_R}{W_b} \right)^2$$

$$H_{\text{有效}} = \frac{L}{n_{\text{有效}}}$$

### 3.塔板理论的要点:

(1)当色谱柱长度一定时, 塔板数  $n$  越大(塔板高度  $H$  越小), 被测组分在柱内被分配的次数越多, 柱分离效率则越高, 所得色谱峰越窄。

(2)不同物质在同一色谱柱上的分配系数不同, 用有效塔板数和有效塔板高度作为衡量柱效能的指标时, 应指明测定物质。

(3)柱效不能表示被分离组分的实际分离效果, 当两组分的分配系数  $K$  相同时, 无论该色谱柱的塔板数多大, 都无法分离。

(4)塔板理论无法指出影响柱效的因素及提高柱效的途径



### 三、速率理论-影响柱效的因素

#### 1. 速率方程（也称范·第姆特Van Deemter方程式）：

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

$H$ ：理论塔板高度，

$u$ ：流动相流速

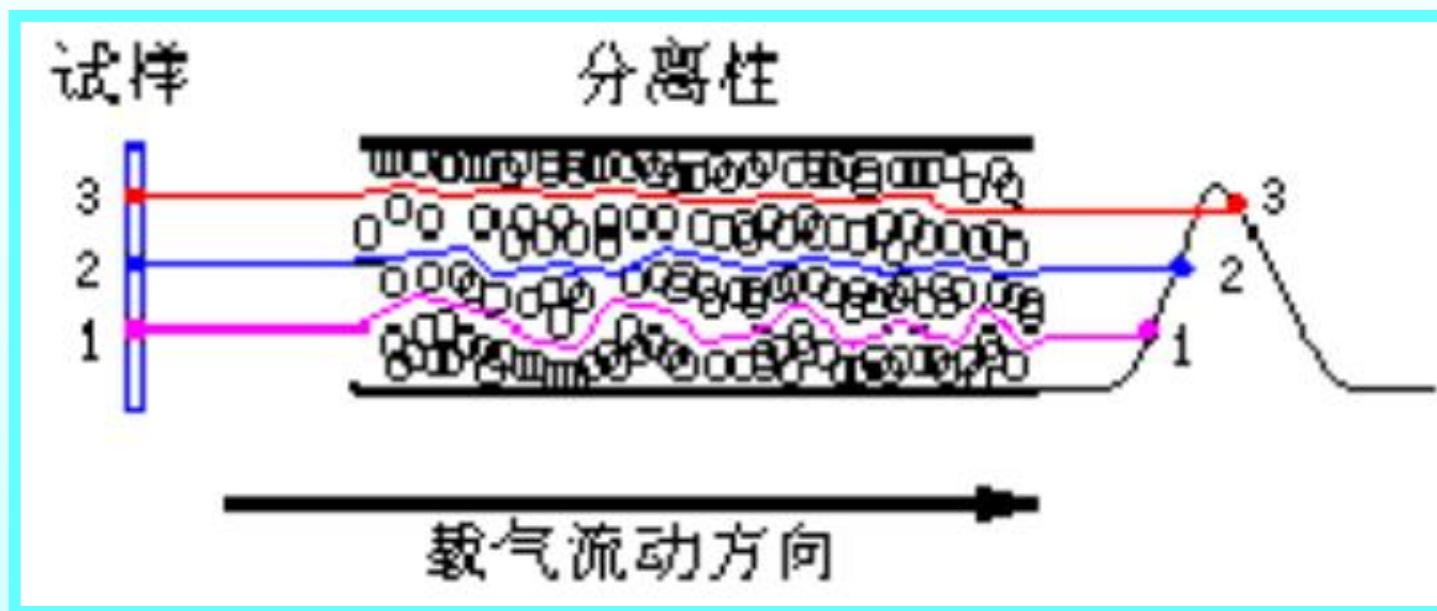
减小  $A$ 、 $B$ 、 $C$  三项可提高柱效

## 2. 涡流扩散项—A

$$A = 2\lambda d_p$$

$d_p$ : 固定相的平均颗粒直径

$\lambda$ : 固定相的填充不均匀因子



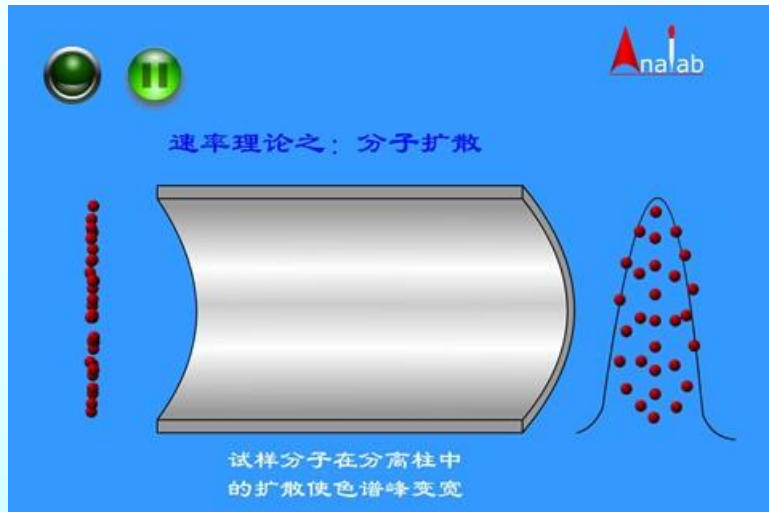
- 固定相颗粒越小 $d_p \downarrow$ ，填充的越均匀， $A \downarrow$ ， $H \downarrow$ ，柱效 $n \uparrow$
- 表现在涡流扩散所引起的色谱峰变宽现象减轻，色谱峰较窄。但 $d_p \downarrow$ ，同时引起柱流阻增加

### 3. 分子扩散项 $B/U$ — $B$ 分子扩散系数

$$B = 2 \nu D_g$$

—— $\nu$ ：弯曲因子，表示固定相对分子扩散的阻碍作用。

—— $D_g$ ：试样组分分子在流动相（气相）中的扩散系数。



——分子扩散导致色谱峰变宽， $H \uparrow (n \downarrow)$ ，柱效变差。

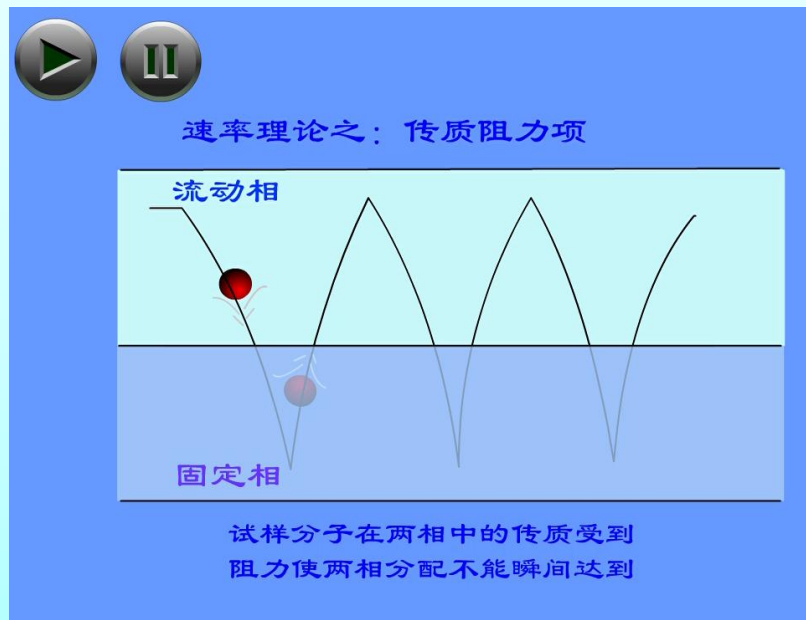
——分子扩散项与流速有关，流速 $\downarrow$ ，滞留时间 $\uparrow$ ，扩散 $\uparrow$ ，

——扩散系数： $D_g \propto (M_{\text{载气}})^{-1/2}$ ； $M_{\text{载气}} \uparrow$ ， $B$ 值 $\downarrow$   $T \uparrow ?$

## 4. 传质阻力项 $C_u$ —传质阻力系数 $C$

——组分在气相和液相两相间进行反复分配时，遇到阻力。

——传质阻力包括流动相传质阻力  $C_m$  和固定相传质阻力  $C_s$ 。



#### 4. 传质阻力项 $C_u$ — 传质阻力系数 $C$

—— 组分在气相和液相两相间进行反复分配时，遇到阻力。

—— 传质阻力包括流动相传质阻力  $C_m$  和固定相传质阻力  $C_s$ 。

即：

$$C = (C_m + C_s)$$

$$\text{GC中: } C = (C_g + C_l)$$

$$C_g \propto \frac{d_p^2}{D_g}$$

$$C_L \propto \frac{d_f^2}{D_L}$$

固定相  
液膜厚度

## 5. 速率理论的要点

(1) 被分离组分分子在色谱柱内运行的多路径、浓度梯度所造成的分子扩散及传质阻力使气液两相间的分配平衡不能瞬间达到等因素是造成色谱峰扩展、柱效下降的主要原因。

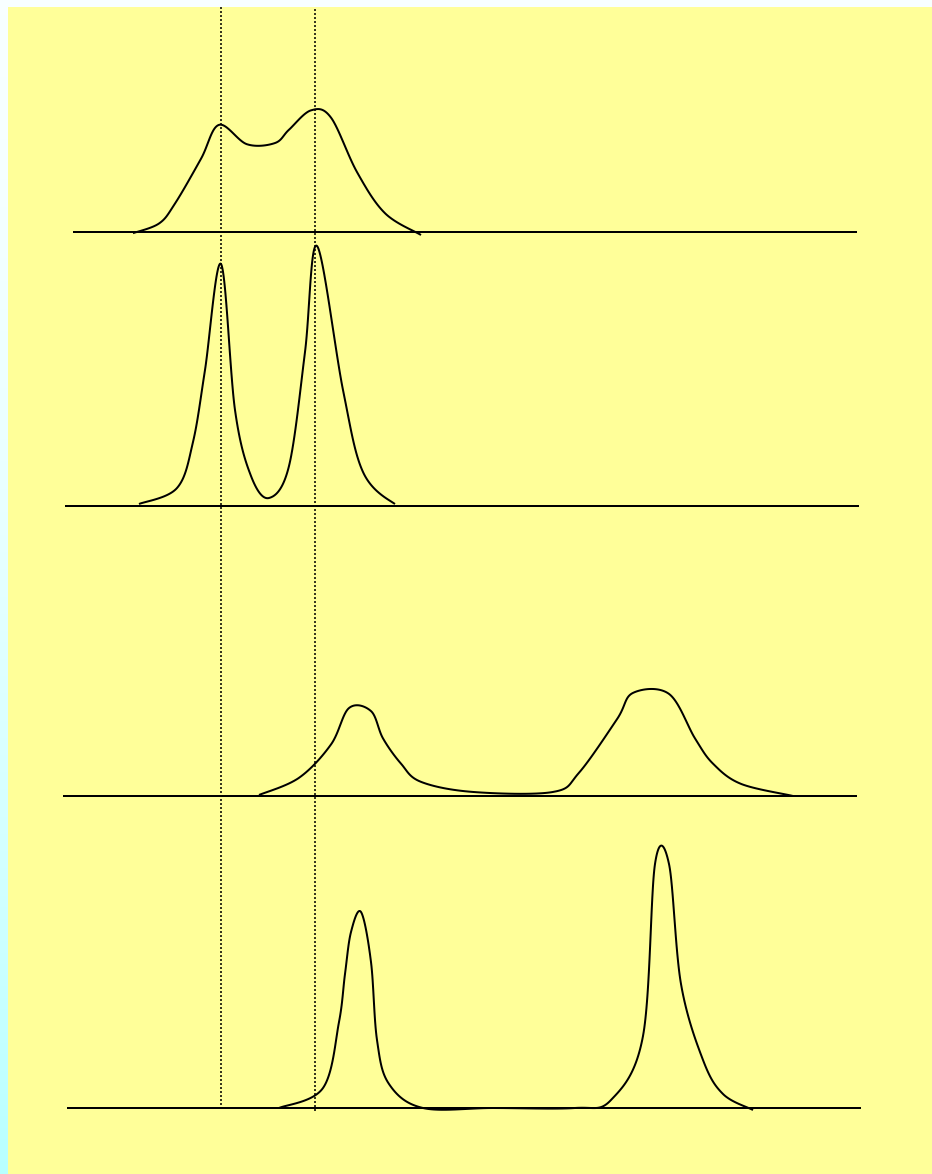
(2) 通过选择适当的固定相粒度、载气种类、液膜厚度及载气流速可提高柱效。

(3) 速率理论为色谱分离和操作条件的选择提供了理论指导，阐明了流速和柱温对柱效及分离的影响。

(4) 各种因素相互制约，如载气流速增大，分子扩散项的影响减小，使柱效提高，但同时传质阻力项的影响增大，又使柱效下降；柱温升高，有利于传质，但又加剧了分子扩散的影响，选择最佳条件，才能使柱效达到最高。



## 五、 分离度



### 1. 色谱分离中的四种典型情况

① 分离效果差，柱效低，选择性（ $\alpha$ ）低

② 完全分离，柱效高，峰窄，选择性（ $\alpha$ ）低；

③ 完全分离，选择性（ $\alpha$ ）增加，柱效低，峰宽

④ 完全分离，柱效高，选择性（ $\alpha$ ）好

## 2. 分离度定义式

$$R = \frac{2(t_{R(2)} - t_{R(1)})}{W_{b(2)} + W_{b(1)}}$$
$$= \frac{2(t_{R(2)} - t_{R(1)})}{1.699(Y_{1/2(2)} + Y_{1/2(1)})}$$

$R=0.8$ : 两峰的分离程度可达89%;

$R=1.0$ : 分离程度98%; **基本分离**

$R=1.5$ : 达99.7% **完全分离**

### 3. 色谱分离基本方程式

假设  $W_{b(2)} = W_{b(1)} = W_b$  (相邻两峰的峰底宽近似相等)

,  $k_1 \approx k_2 = k$ , 可导出下式:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{n} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{k}{1 + k} \right)$$

选择因子

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

讨论:

色谱分离基本方程式

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k}{(k + 1)}$$

(1) 分离度与柱效的关系

$$R \propto \frac{\sqrt{n}}{4}$$

增大 n 的方法:

a. 增加柱长  
以延长分析时间  
为代价

$$\left( \frac{R_1}{R_2} \right)^2 = \frac{n_1}{n_2} = \frac{L_1}{L_2}$$

b. 减小塔板高度 H

制备优质柱, 改变分离条件等

## (2) 与选择因子的关系 $\alpha = \frac{t_2'}{t_1'} = \frac{K_2}{K_1} \neq 1$

对于一定的选择因子 $\alpha$ ，达到一定分离度  $R$  所需要的有效塔板数  $n_{\text{eff}}$

$\alpha$	$n_{\text{eff}}$	
	$R=1.0$	$R=1.5$
1.00	无穷大	无穷大
1.005	650 000	1 450 000
1.01	163 000	367 000
1.05	7 100	16 000
1.10	1 900	4 400
1.50	140	320

$\alpha$  对分离度的影响重大

通过选择固定相、流动相的种类改变  $\alpha$

### (3) 与容量因子（分配比）的关系

$k$ 值对 $k/(k+1)$ 的影响

$k$	0.5	1.0	2.0	3.0	5.0	8.0	10	30	50
$k/(k+1)$	0.33	0.50	0.67	0.75	0.83	0.89	0.91	0.97	0.98

$k$ 值的最佳范围： $1 < k < 10$

改变两相的相比、改变柱温等措施改变  $k$  值



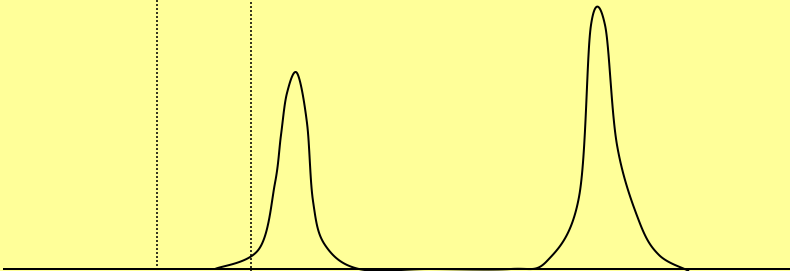
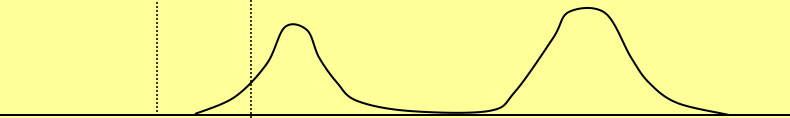
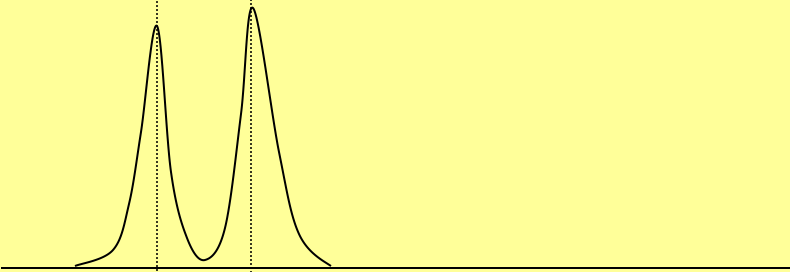
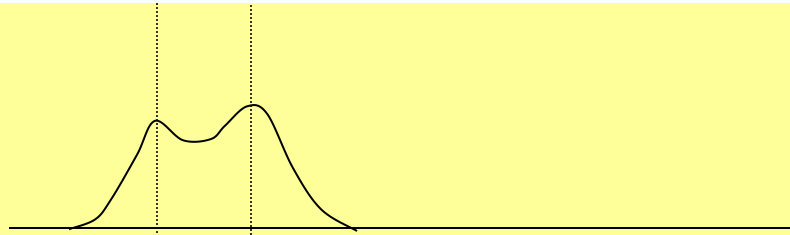
## 规律：

- 塔板理论和速率理论都难以描述难分离物质对的实际分离程度。即柱效为多大时，相邻两组份能够被完全分离。
- 难分离物质对的分离度大小受色谱过程中两种因素的综合影响：

保留值之差——选择性——色谱过程的热力学因素；

区域宽度——柱效——色谱过程的动力学因素。

- 提高  $n$  和  $\alpha$  是提高分离度的有效途径
- $k$  的范围  $1 < k < 10$



①  $R \downarrow, n \downarrow, \alpha \downarrow$

②  $R \uparrow, n \uparrow, \alpha \downarrow$

③  $R \uparrow, n \downarrow, \alpha \uparrow$

④  $R \uparrow\uparrow, n \uparrow, \alpha \uparrow$

# 作业

**P305: 8.15, 8.18**