

## 層析分析緒論

### 一 概述

一般而言，分析方法在最好的情況下應具有選擇性，而且是專一性的，例如：滴定中想要分析氯離子濃度，可是在分析中卻會受到其他陰離子的干擾，此分析方法就不具選擇性，在眾多分析方法中，首推層析法（**chromatography**）最為廣泛使用又極具選擇性，層析法首推蘇俄植物學家用來分析植物色素如葉綠素、葉黃素等，他以樹葉萃取物流過一根玻璃管，其內已填充細顆粒之碳酸鈣，被分離之物質在管內呈現有顏色之層帶，這也是他用以命名的選擇（**chroma** 希臘字意為"顏色"，**graphein** 意為"書寫"）。

### 二 層析法概述

在所有的層析分離法中，樣品皆溶於一個動相中（**mobile phase**），它可以是氣體、液體或超臨界流（**supercritical fluid**），此動相接著被迫通入一個不互溶的靜相（**stationary phase**）中，它已被固定於管柱內或一個物體表面。這兩相的選取是為了使分析物有不同之分佈。那些被靜相強制滯留的成分，將隨著動相慢慢流出，相對的，如果成分僅是弱弱的為靜相所留置，將會很快的流出。由於流動率（**mobility**）不同之結果，樣品成分將造成若干不連續之層帶，因此將可進行定性定量之分析。

#### 1 層析法之分類

層析法之分類方式有二種，如下

1.1 以何種物理方法使靜相和動相作為接觸，在管柱層析法（**column**）層析法中以重力或壓力迫使分析物通過一窄管柱內。在平面層析法（**planar**）中分析物以毛細管作用，通過平板間隙。

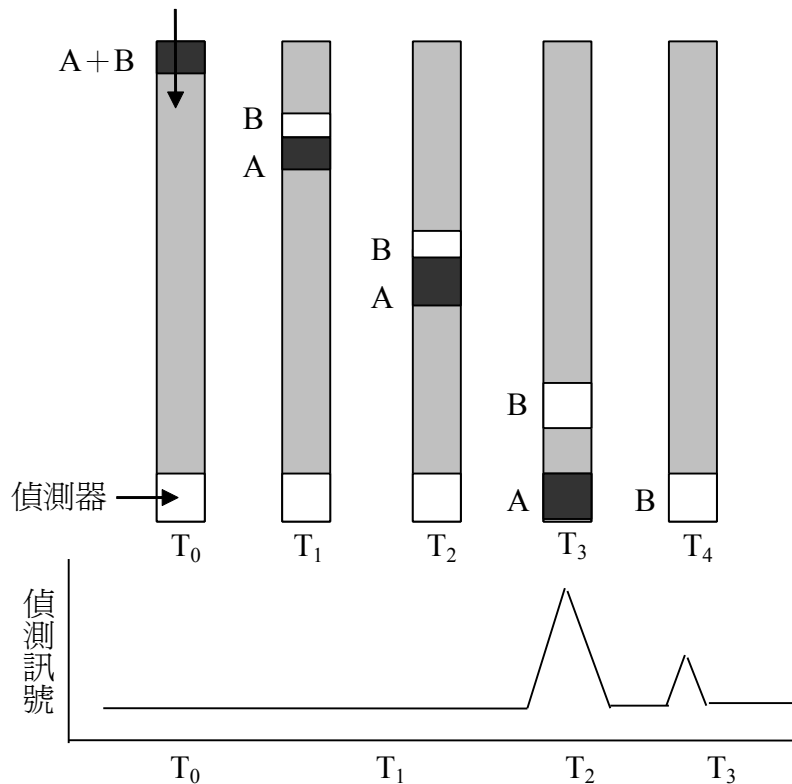
1.2 依據動相與靜相的型態及平衡所牽涉的溶質於二相間轉移的種類而來。例如：液相層析儀、氣相層析儀、超臨界流及薄層層析法等。

一般分類	特定方法	靜相	平衡類型
液相層析法 (動相：液體)	液體-液體，或分配	吸附在固體上之液體	不互溶液體間之分配
	液體-結合相	結合在固體表面之有機種類	液體與結合表面間之分配
	液體-固體，或吸附	固體	吸附
	離子交換 大小排除	離子交換樹脂 聚合物固體間隙之液體	離子交換 分配/篩濾

一般分類	特定方法	靜相	平衡類型
氣相層析儀 (動相：氣體)	氣體-液體	吸附在固體上之液體	氣體與液體間之分配
	氣體-結合相	結合在固體表面之有機物種	液體與結合表面之分配
	氣體-固體	固體	吸附
超臨界流體層析法 (動相：超臨界流)		結合在固體表面之有機物種	超臨界流與結合表面之分配

## 2. 管柱流析層析法

以下面圖示說明分析物是如何利用流析 (elution) 層析法來分離。流析係利用連續添加新的動相將物種運送出管柱。如圖所示，取部分溶解在動相中的樣品，加入管柱頂端 (時間  $t_0$ )，在此樣品中成分分佈於兩相間，加入額外的流析液 (eluent)，迫使含有部分樣品之原來動相向下流動，此處動相又與新的靜相發生進一步的分配 (時間  $t_1$ )，在此同時，新的動相又在原樣品進入處與靜相發生分配。分析分子經由一連串動相與靜相轉換，因為樣品成分的移動僅能在動相間行進，物種移動的平均速率便視花費在動相的時間而定，被靜相強制留置的成分，其時間分率大，流出較慢，而予以分離。



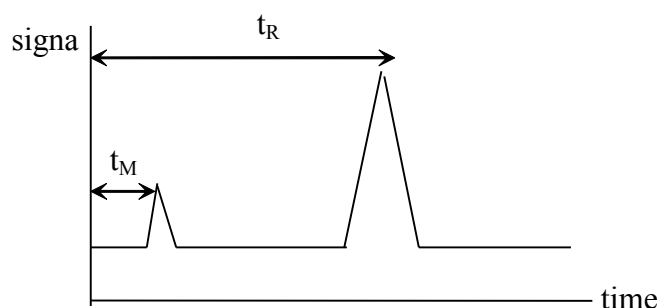
### 3. 層析法之相關計算

#### 3.1 滯留時間

樣品注入分析管柱至分析物尖峰到達偵檢器所用的時間稱為滯留時間 (retention time) 以符號  $t_R$  表示。左邊的小尖峰代表不滯留於管柱中的物種。不滯留物種到達偵測器時間以  $t_M$  表示，此時間稱為「無感時間 (dead time)」。不滯留物種的移動速率與動相分子的平均運動速率是相同的。

分析物移動的平均線性速率以下式表示  $\bar{v} = \frac{L}{t_R}$  其中  $L$  代表管柱長度。

同理，動相分子移動平均線性速率  $u$  為  $u = \frac{L}{t_M}$



#### 3.2 分配係數

通常，層析法所用到的平衡分配可以用簡單的方程式表示，如

$A_{\text{動相}} \leftrightarrow A_{\text{靜相}}$ ，此平衡式之平衡常數  $K$  被稱為分配比 (partition ration)，

或分配係數 (partition coefficient)，定義為  $K = C_S/C_M$ ，其中  $C_S$  為靜相內分析物之莫耳濃度， $C_M$  為動相內分析物之莫耳濃度，理想狀況下，此分配比在相當大濃度下是保持固定的。適用此定律的層析法，我們稱之為「線性層析法 (linear chromatography)」。

#### 3.3 滯留時間與分配係數的關係

我們將物種移動速率以動相速度的分率表示之：

$$\bar{v} = u \times \text{分析物在動相停留時間之分率}$$

而此分率等於分析物在動相中各時間之平均莫耳數，以分析物在管柱中的總莫耳數相除：

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{動相中分析物的莫耳數}}{\text{分析物總莫耳數}}$$

動相中分析物莫耳數等於動相中分析物莫耳濃度  $C_M$  乘以所佔體積  $V_M$ 。同樣的，靜相中分析物莫耳數等於靜相中分析物莫耳濃度  $C_S$  乘以所佔體積  $V_S$ 。因此

$$\bar{v} = u \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + C_S V_S / C_M V_M}$$

將分配係數代入上式，可得

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + KV_S/V_M} \quad (3.3.1)$$

此二種體積可在製備分析管柱時，估計得到。

### 3.4 容量因數

容量因數 (capacity factor) 是用來描述分析物在管柱中的移動速率，以物種 A 而言，容量因數  $k_A'$  義意為：

$$k_A' = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad (3.4.1)$$

其中  $K_A$  為 A 的分配係數，將 (3.4.1) 式代入 (3.3.1) 式中，可得

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k_A'} \quad (3.4.2)$$

再將  $u$  及  $v$  以滯留時間及無感時間代入上式，可得

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k_A'} \Rightarrow k_A' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3.4.3)$$

如前圖所示， $t_R$  與  $t_M$  可從層析圖中很快獲得，當容量因數遠小於 1 時，流析迅速地發生使得要準確的決定滯留時間顯的相當困難。但是如果容量因數較大時，分析時間又會顯的過長，因此一個較適當分析方法其容量因數介於 1 至 5 之間。

### 3.5 選擇因數

管柱對物種 A 及 B 的選擇因數  $\alpha$  (selectivity factor) 可定義為：

$$\alpha = K_B / K_A \quad (3.5.1)$$

其中  $K_B$  為較強滯留物種 B 的分配比而  $K_A$  為較弱的分配比，或較快流析之物種 A 的分配比。由此定義， $\alpha$  永遠大於單位值「1」，將容量因數公式代入 (3.5.1) 中，經重組後可得兩分析物對管柱之選擇因數與容量因數之關係式為：

$$\alpha = \frac{k_B'}{k_A'} \quad (3.5.2)$$

將 (3.4.3) 代入上式中，可得以實驗層析中算出選擇因數的計算式：

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (3.5.3)$$

### 3.6 管柱之分析效率

平板高度及理論板數是最常被利用於描述管柱的分析效率，平板高度 (H) 及理論板數 (N) 其關係式如下：

$$N = L / H \quad \text{其中 } L \text{ 為管柱長度} \quad (3.6.1)$$

層析管柱的效率隨著理論板數越大，平板高度越小而增加，「平板高度」及「理論板數」是將層析管柱視為無數不連續、但相鄰，稱為理論平板 (theoretical plates) 的薄層所組成，在每一個平板上，假設物種於動相與

靜相間的平衡會發生，在管柱內分析物的向下即視為平衡的動相，由一板至另一板作階梯式的轉移。

其計算公式如下：

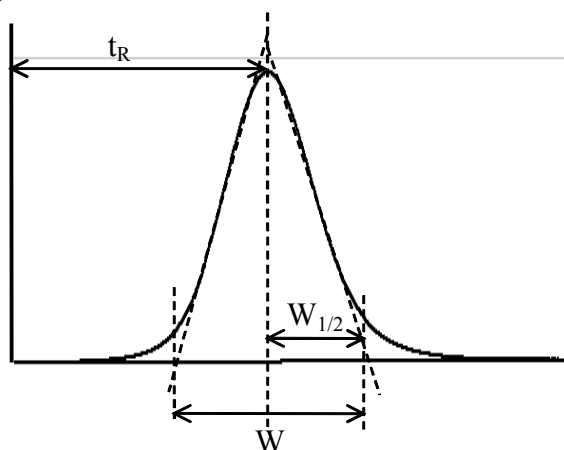
$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \quad (3.6.2)$$

將 (3.6.1) 代入上式，可得 N

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (3.6.3)$$

另一個被認為較可靠求 N 的約進法是決定  $W_{1/2}$  (半波峰高度寬度)，它是  
以半波峰寬度來計算，其公式如下：

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (3.6.4)$$



#### 四 層析圖譜概述

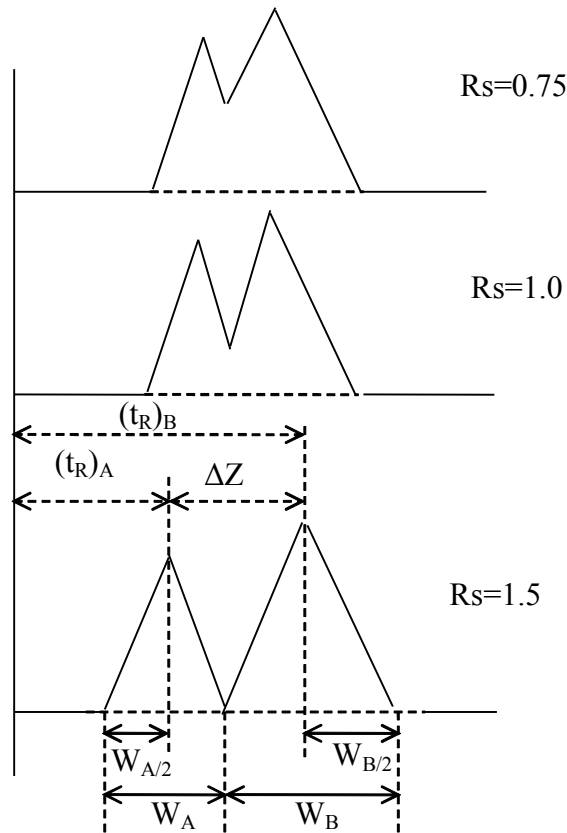
經上述說明層析法如何分離物種後，我們可以利用此特性進行物種之定性及定量分析，但是要完成此項工作必須借重層析圖譜方能完成。層析圖譜是利用層析儀層析後，經由偵測儀器將化學能轉換成電子訊號後輸出，即得到以時間（橫軸）及電子訊號（縱軸）之分析圖譜。

##### 4.1 分析圖譜之判別

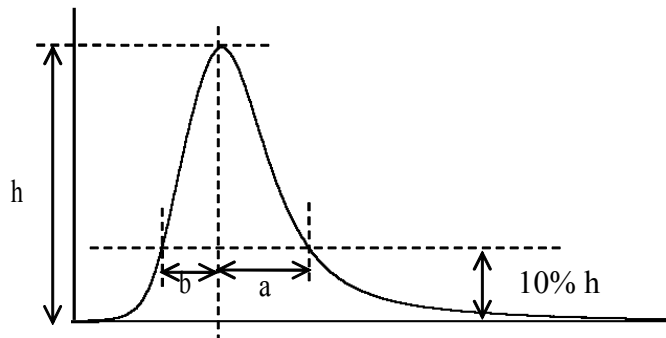
由於分析圖譜是以電子訊號為依據，而電子訊號會受溫度、電位、不明分析物干擾，因此判別有效波峰成為解析圖譜的首要工作，以偵測極限規定為例，要判別有效波峰需根據訊號雜訊比 (Signal-To-Noise ratio) 來衡量，簡稱 S/N 比，其公式如：(分析物訊號) / (雜質訊號) = 3:1，方可判定為有效波峰。

此外，當有二個波峰同時存在層析圖譜時，其解析度  $R_s$  也是一個必須判別的依據，其公式如下：

$$R_s = \frac{\Delta Z}{W_{A/2} + W_{B/2}} = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

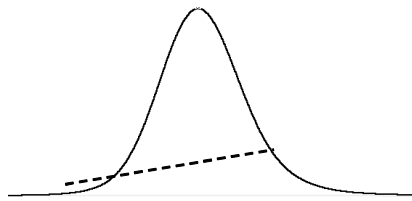


由於層析圖譜基本上是一個高斯分佈圖形，而高斯分佈有左右對稱的特性，如果層析圖譜有左右不對稱的情形發生時，如曳尾（tailing）或趨前（fronting）的現象，將造成積分上不正確或解析度不佳，因此將會以對稱性（ $A_s$ ）評估之，其公式如： $A_s = a/b$ ，其值介於 0.5~2 之間。

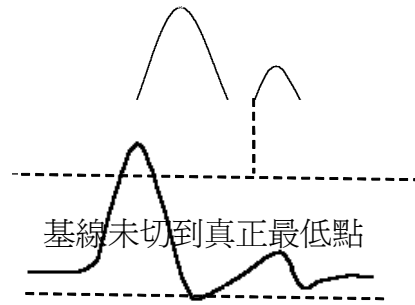


#### 4.2 層析圖譜積分基線

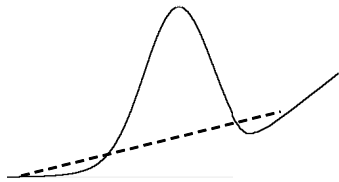
層析圖譜的積分基線決定了波峰的高度與面積值，會影響定性與定量之準確性，因此積分基線能否準確切割重疊峰或準確決定基線的終起點，成為相當重要的工作。層析圖譜積分時常會遇到下列問題：



基線未切到真正最低點

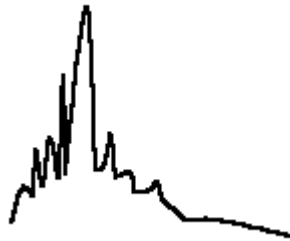


基線未切到真正最低點

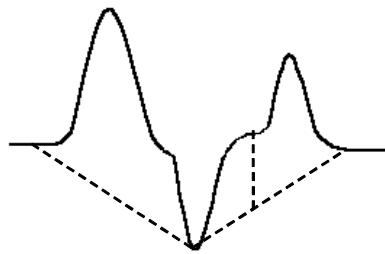


基線連線不準

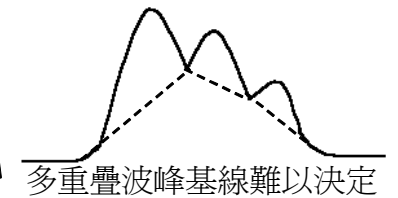
基線連線不準



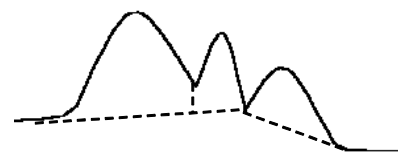
多波峰（基線飄移）  
還是單一波峰加雜訊



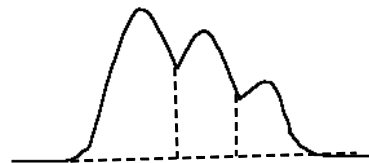
負波峰難以積分



多重疊波峰基線難以決定



基線決定準確度



#### 4.3 積分原理：

首先，想要將層析圖譜正確積分必須得到準

確之原始數據（raw data），才能得到正確之積分基線，一般基線的決定有

下列方式：

4.3.1 一般積分器以原始訊號改變的速度來決定積分基線。

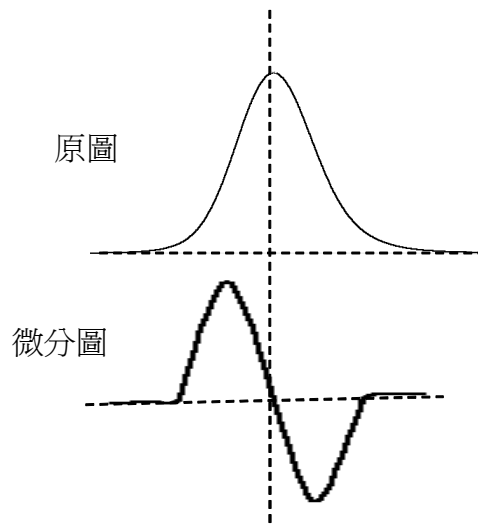
4.3.2 利用角度法 (Drift)：設定積分角度，由作低點做為起點，依設定角度畫直線，與波峰交接觸即是基線終點。

4.3.3 以微分圖譜的斜率決定積分基線。

我們可從一般層析圖譜來看，在波峰上的每一點作一條切線，其切線的斜率有下列特性。

波峰位置	切線斜率值
波峰起點	斜率 = 0
波峰起點至最高點	斜率 > 0，斜率逐漸變大，再逐漸變小。
最高點	斜率 = 0
最高點至波峰終點	斜率 < 0，斜率逐漸變小，再逐漸變大。
波峰終點	斜率 = 0

我們將每一點切點斜率畫在座標軸上，可得下面圖形。



因此，我們只要決定微分圖的斜率值，就可以決定基線的終起點，也就是說微分圖超過設定斜率後才能判斷是為波峰起點；當波峰最高點時，恰為微分圖由下轉負的位置，但因雜訊關係，一般上還是會再下降數點後再決定波峰尖峰 (peak crest)；當微分峰通過負值最低點時又進入向上斜率值，且微分值幾近等零，此稱為波峰終點 (end)。

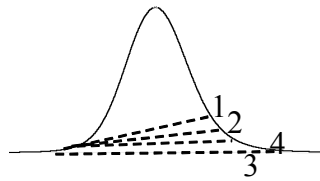


#### 4.4 積分基線的設定

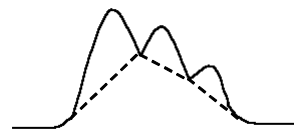
由於積分基線的設定與器廠商有關，僅根據儀訊華軟體的部分說明，然而其他儀器之設定大同小異。

##### 4.4.1 靈敏度 (sensitivity)

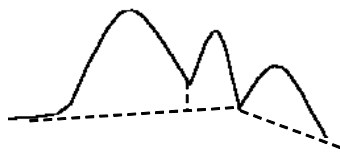
即微分圖經過下降斜率後，經過多少數據點後稱為波峰結束點。其影響如下圖所示：



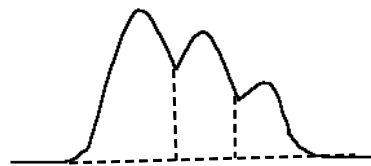
波峰結束點，靈敏度越  
小，波峰越早結束。



是單一波峰或重疊波峰  
設為：1



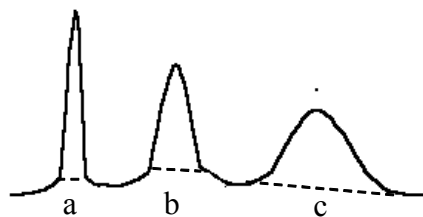
設為：2~5



設為：6~30

##### 4.4.2 半波峰寬度 (half peak width)

設定可允許半波峰最窄範圍，見下圖所示。



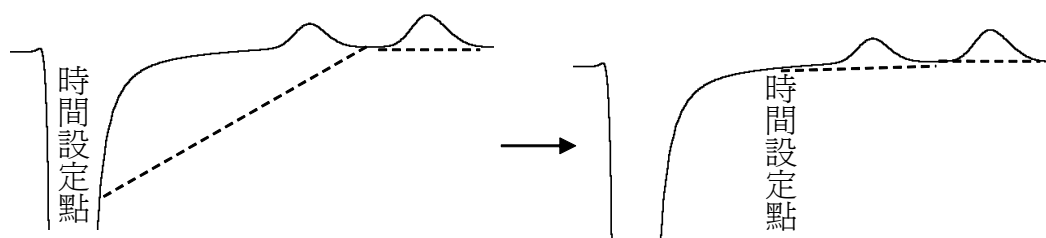
若設定值小時 a 時，則 A、  
B、及 C 均稱為 PEAK，如  
果設定值介於 a、b 之間，  
則 A 為雜訊不積分，而 B、  
C 才稱為 PEAK。

##### 4.3.3 最小積分面積

我們可利用最小面積積分設定，將不要的波峰或雜訊不與以積分，以得到較佳的積分條件。

#### 4.3.4 不積分區間

我們可利用不積分區間設定，避掉不要的波峰或雜訊，以得到較佳的積分條件，如下圖。



### 五 定性與定量分析概述

層析法除了用於分離混存物質之用外，它亦可應用於定性鑑別與分離物種的定量分析，其特性如下：

#### 5.1 定性分析

以層析圖作為定性分析上主要是以滯留時間作為判斷依據，一張層析圖僅提供樣品中每一種物種的單一定性資料，也就是滯留時間內或在某段流析時間內，它在靜相中的位置。

然而此判斷有一缺點，就是相同的分析條件，會具有相同滯留時間的物種應不只一種，也就是說，在一張層析圖上其波峰所代表的意義僅具有時間與量（面積值或高度），並不具物種的任何資訊，如果真是這樣？我們該如何進行定性分析呢？我們可經由一連串實驗證明定性結果，利用不同的分析條件分析樣品檢視其分析結果是否一致？或是改變分析物濃度見其波峰是否也會隨之變動？（此為分析方法確效的一部份）如此一來，我們就可以根據滯留時間予以物種定性上的佐證；以反方向來想，層析分析將可以用來證明物種「不存在」的依據。

#### 5.1 定量分析

定量層析法是根據分析物尖峰高度或波峰面積，與一個或多個標準物作比較，以瞭解分析物種所含的量為多少。

##### 5.1.1 計算原理

根據前面對層析法之敘述，我們可以瞭解分析物量的多寡將影響到層析圖物理量（面積，高度）的大小，因此我們就利用此一特性來予以定量分析。

##### 5.1.1.1 根據波峰高度的分析

層析尖峰的高度可由尖峰兩側之基線用直線連接，再測量由尖峰到此基線的重直距離而得。因為波峰與高度對同一物質而言有反比作用，所以在採用高度計算時需注意此效應（避免波峰

太寬，高度效應不明顯)。

#### 5.1.1.2 根據波峰面積的分析

波峰面積與前述之效應無關，因此由面積作為分析參數會比用高度來的好，此外，決定波峰高度比計算波峰面積比較起來較容易產生誤差，因為窄波峰之最高點不容易正確得之，但是窄波峰之面積卻容易計算的多。

#### 5.1.2 計算方法

大部分層析法均是利用標準對照品經過層析取得物理量以建立檢量線的方式進行樣品定量，檢量線的建立即是以「最小平方法」的計算公式，計算出檢量線，在根據分析物之物理量迴歸回檢量線，即可得知分析物之濃度。然而，用來計算檢量線分析參數可根據分析特性而有以下之選擇：

##### 5.1.2.1 外部標準品法：

即是直接以不同濃度的標準品之物理量與濃度計算檢量線而得，此種方式是最直接的方法，優點是計算簡單，分析方法僅需考慮是否分離出分析物即可；缺點是樣品進樣時的體積將會是影響檢量線計算的準確性與分析過程中是否有分析物會有遺漏情形發生（現在可以以儀器之設計克服進料問題，但分析過程中就無法避免了）。

##### 5.1.2.2 內部標準品法：

由於外部標準品法有上述之問題，因此我們可以利用內部標準品法克服上述問題，以得到校正後的分析量，其方法就是在不同濃度之標準品中加入相同濃度之內部標準品（以下簡稱內標品），此時標準品與內標品其濃度比例是固定的，不論是樣品進料或是任何分析過程，其濃度比例之改變是可以忽略的，因此我們可以利用標準品與內標品面積（高度）的比值與濃度進行檢量線之計算，如此一來就不會有外部標準品法的問題，而唯一的缺點是，計算上多一道手續，而且分析方法就必須兼顧標準品與內標品之解析度（resolution）了。

##### 5.1.2.3 總面積法：

如果覺得內部標準品法需要找到一個較佳的分析條件太過麻煩，又必須避免外部標準品法的問題時，我們可採用總面積法，總面積法就是將層析圖所有波峰的面積加總起來與分析物的面積求其比值，再與濃度計算檢量線，即可。此方法有一個必須克服的問題是，當計算分析物時，必須其層析圖譜之波峰與標準品的層析圖波峰需一致，否則會有誤差發生。

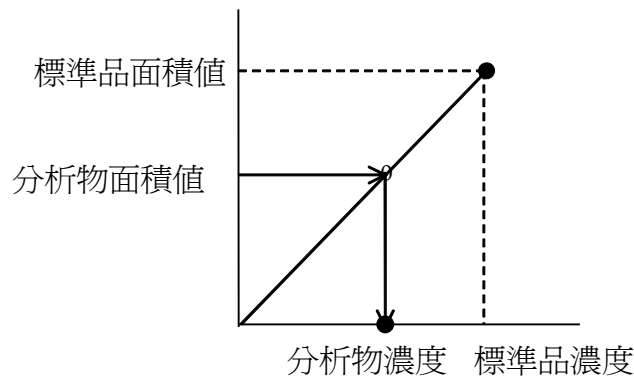
### 5.1.3 檢量線類別

根據分析方法需求之不同，檢量線也有下列方式可供選擇：

#### 5.1.3.1 單點檢量線 (single point calibration)

利用一點與分析物濃度接近的標準品進行層析分析，將所得的物理量與濃度之比值進行定量分析，其公式如下：

$$\frac{\text{分析物濃度}}{\text{分析物面積或高度值}} = \frac{\text{標準品濃度}}{\text{標準品面積或高度值}} \quad \text{或者}$$
$$\frac{\text{分析物濃度}}{\text{分析物與內標品之面積或高度比值}} = \frac{\text{標準品濃度}}{\text{標準品與內標品之面積或高度比值}}$$



#### 5.1.3.2 多點檢量線法 (multi. point calibration)

配製一系列不同濃度之標準品進行層析分析，再根據所得之物理量與濃度計算檢量線，其檢量線公式如： $[\text{面積或高度}] = a[\text{分析物濃度}] + b$ ，其中  $a$  為檢量線斜率， $b$  為截距（見統計概論中最小平方法），我們可以得知分析物之面積或高度，再導入上述公式中，求的分析物濃度，此種模式亦可使用內部標準品法。

