

第二节 定量方法

色谱中常用的定量方法有归一化法、标准曲线法、内标法和标准加入法。按测量参数分，又可将上述四种定量方法分为峰面积法和峰高法。这些定量方法又各有优缺点和使用范围，在什么情况下，选用哪种定量方法，这是一个十分重要的，必须正确决定的问题。如果定量方法选择不合适，所得出的定量结果也必然有较大的误差。下面将介绍各种定量方法的优缺点和适用条件。

一、峰高法和峰面积法的选择

在色谱定量分析中，选用峰高法还是选用峰面积法，主要决定在检测器的线性范围内，峰高和峰面积测量的准确性和重复性。除了归一化法最好用峰面积法外，其他三种定量方法中峰高和峰面积都可用作精确的定量方法。

在检测器的线性范围内，峰高和峰面积测量的准确性受色谱分离度的影响，要准确地测量峰高和峰面积，色谱分离应达到一定的分离度才行。图 3-18 至图 3-22^[19]给出了峰高比 1:1 至 16:1 时的标准分离度曲线，每张图上的黑点表示了每个峰峰尖的真实位置，此黑点与

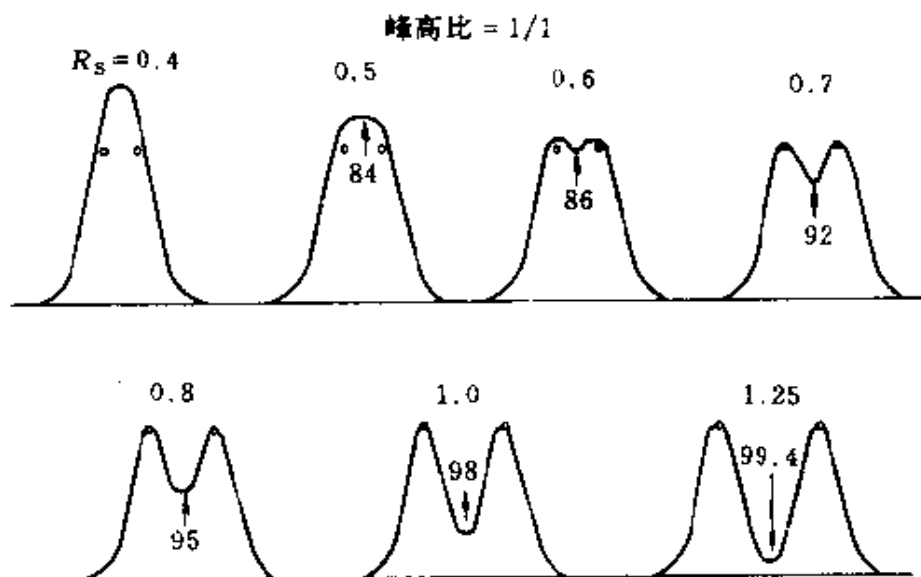


图 3-18 标准分离度曲线^[19]
(峰高比 1/1, 分离度 0.4~1.25)

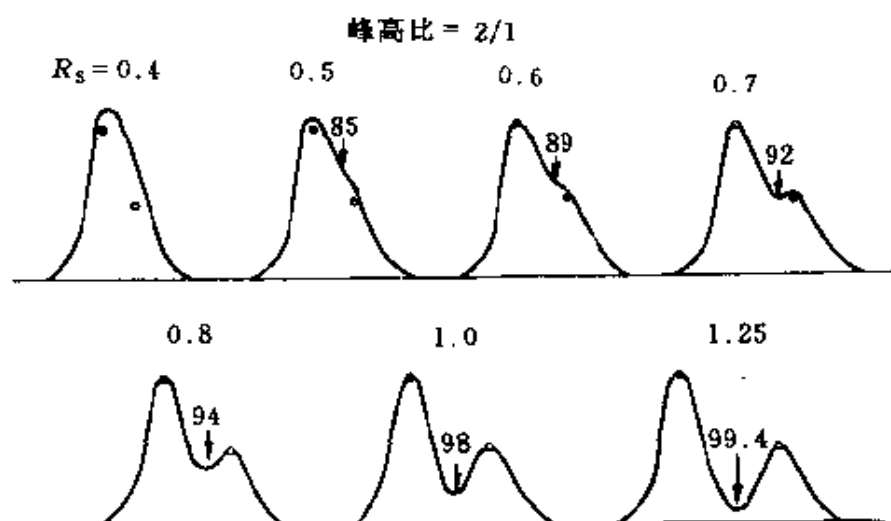


图 3-19 标准分离度曲线^[19]
(峰高比 2/1, 分离度 0.4~1.25)

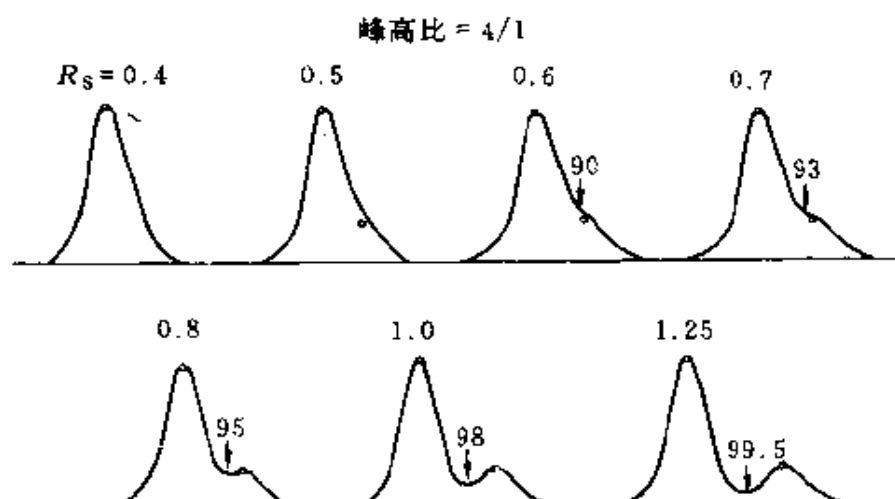


图 3-20 标准分离度曲线^[19]
(峰高比 4/1, 分离度 0.4~1.25)

图中所示的峰尖的垂直位移就是测量误差。峰高比越大, 要求能准确测量峰高的分离度也越大。峰高比为 1/1 和 2/1 时, 峰高能得到准确测量的最低分离度为 0.8; 峰高比为 4/1 时, 峰高能得到准确测量的最低分离度为 1.0; 峰高比 16/1 时, 峰高能得到准确测量的最低分离度为 1.25。关于分离度对峰高测定准确度的影响大致可认为: 当分离度

$R_s=1.0$ 时, 相对峰高从 128 : 1 变化到 1 : 128 时, 峰高的测量误差小于 $\pm 3\%$ 。

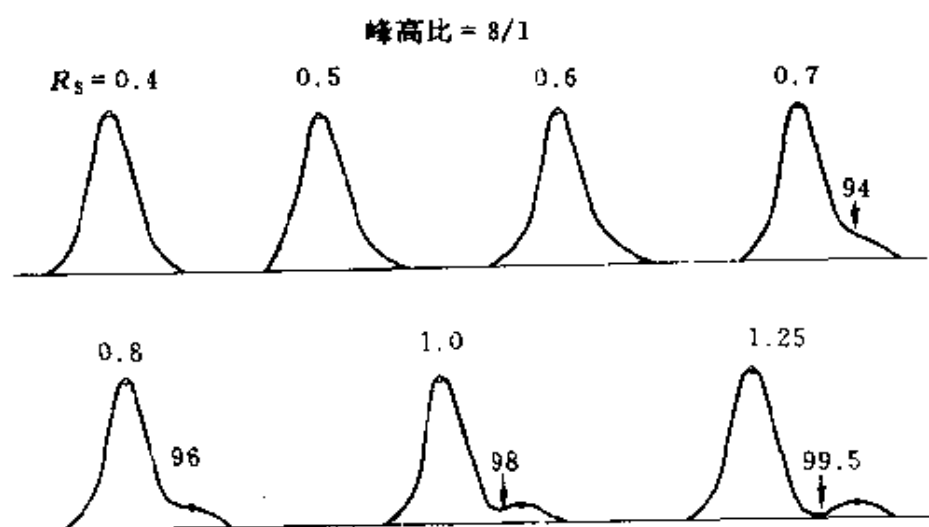


图 3-21 标准分离度曲线
(峰高比 8/1, 分离度 0.4~1.25)

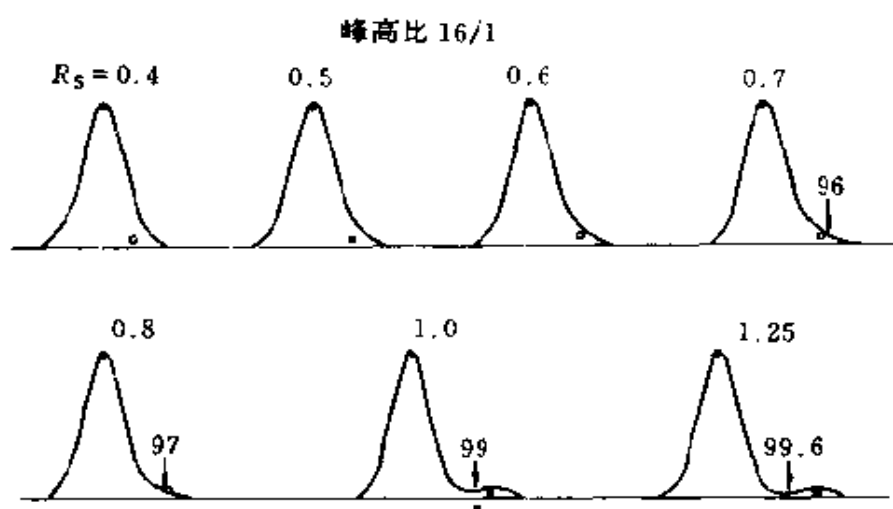


图 3-22 标准分离度曲线^[19]
(峰高比 16/1, 分离度 0.4~1.25)

分离度对峰面积测量的影响较峰高要大, 图 3-23 给出了分离度 $R_s=1.0$ 和不同峰高比时, 面积较小峰的峰面积测量值为其真实面积的百分数。由图可见, 当峰高比大时, 面积较小峰的峰面积测量准确

度降低,此时测量较大峰的峰面积较准确,误差不超过1%。小峰峰面积测量误差都是负值,而大峰峰面积测量误差都是正值。

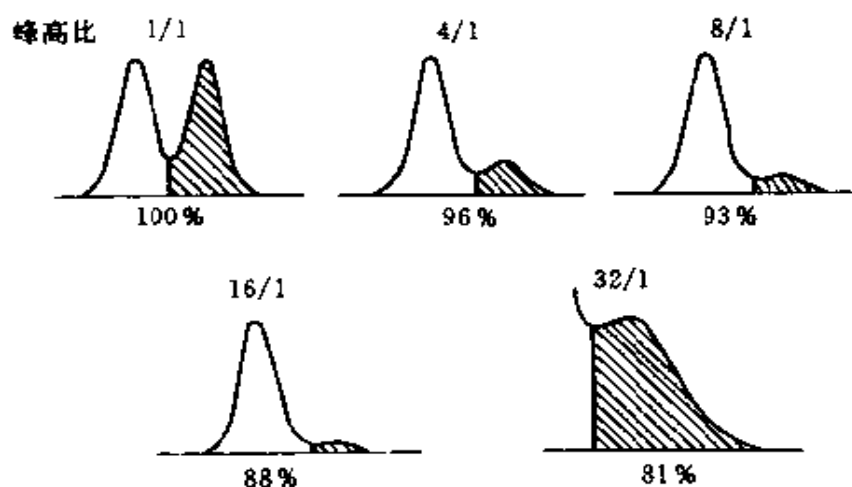


图 3-23 $R_s=1.0$ 时峰面积测量的误差

如果两个重叠峰峰高比为 x ($x>1$), 则两个峰峰面积测量误差关系为:

$$\text{较大峰峰面积测量误差} = \left(-\frac{1}{x}\right) \times \text{较小峰峰面积测量误差}$$

在图 3-22 中, 当峰高比为 4/1 时, 按小峰的峰面积测量误差为 -4%, 此时较大峰的峰面积测量误差则为 $\left(\frac{-1}{4}\right) \times (-4\%) = 1\%$; 而当峰高比为 16/1 时, 较小峰的峰面积测量误差为 -12%, 此时较大峰的峰面积测量误差则为 $\left(\frac{-1}{16}\right) \times (-12\%) = 0.8\%$ 。由此可见, 当分离度不好时, 测量小峰的峰面积的误差比测量小峰的峰高的误差要大。此时测量大峰的峰面积误差稍小些, 但仍比测量大峰的峰高的误差要大些。前面已指出当分离度 $R_s=1.0$ 当峰高比从 128:1 至 1:128 时, 峰高的测量误差最大为 $\pm 3\%$; 而当分离度 $R_s=1.0$, 若要求峰面积的测量误差在 $\pm 3\%$ 之内时, 估计峰高比只能从 3:1 至 1:3。所以, 峰面积定量方法比峰高定量方法要求有更好的分离度。在分离度不好的情况下, 用峰面积定量时, 可以从峰谷高 (h_r) 与小峰峰高 (h_2) 之比来估算测量小峰峰面积的相对误差 (图 3-24)。

表 3-12 列出了不同 h_r/h_2 时, 测量小峰峰面积的相对误差。

表 3-12 不同 h_1/h_2 时测量小峰
峰面积的相对误差

h_1/h_2	测量小峰峰面积的相对误差
0.25	-1%
0.38	-2%
0.57	-5%
0.75	-10%

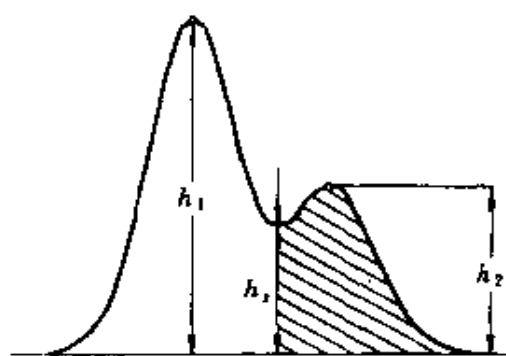


图 3-24 测量小峰峰面
积的相对误差估算

峰高和峰面积的准确测量还受到色谱分离参数——容量因子 (k')，柱理论塔板数 (n) 和流动相流速 (u) 的影响。L. R. Snyder 等人根据浓度型检测器 (如 GC 的 TCD, ECD; HPLC 的 UV, RI, 荧光检测器等) 的特点, 建立了一些规则来预测各种色谱分离参数改变时, 对检测器的响应值, 继而对定量分析时测量峰高和峰面积的准确度的影响 (见表 3-13)。

表 3-13 色谱分离参数对浓度型检测器峰高和峰面积定量分析精度的影响

变化的参数	近 似 的 效 应	
	峰 高	峰 面 积
k'	$\frac{1}{1+k'}$	不变
n	$\sqrt{n}$	不变
u	$\leq u^{-0.2}$	$\frac{1}{u}$

由表 3-13 数据可看出: 当流动相 (GC 的载气, HPLC 的洗脱液) 流速可以准确控制, 而影响容量因子 (k') 的一些因素 (如 GC 的柱温、HPLC 的流动相的组成) 不能保持恒定 (如使用 GC 的程序升温, HPLC 的梯度洗脱) 时, 用峰面积定量较好; 而当容量因子 (k') 和柱效 (n) 保持不变, 流动相流速不稳定, 有微小变化时, 峰高受到的影响要小于峰面积, 此时用峰高定量能得到较为精确的定量结果。当柱效 (n) 有所变化时, 使用峰面积定量可得到较精确的结果。

总之, 在分离度较好, 色谱峰形较好, 峰面积可以准确测量时, 以

用峰面积法定量为好。特别是在气相色谱使用程序升温 and 液相色谱使用多元梯度洗脱时，最好使用峰面积法定量。但当分离度不好，色谱峰形不好（如严重拖尾）时，峰面积测量引起的误差较大，此时使用峰高法定量较好。保留时间短的色谱峰峰形较尖（峰尾宽较小），此时峰高测定较峰面积测定准确，宜用峰高法定量；而保留时间长的色谱峰峰形较宽（峰尾宽较大），此时峰面积测定较峰高测定准确，宜用峰面积法定量。

二、归一化法

把所有出峰的组分含量之和按 100% 计的定量方法，称为归一化法。当样品中所有组分均能流出色谱柱，并在检测器上都能产生信号的样品，可用归一化法定量，其中组分 i 的质量分数可按式 (3-18) 计算：

$$w_i = \frac{f_i A_i}{\sum_i f_i A_i} \times 100\% \quad (3-18)$$

式中 A_i ——组分 i 的峰面积；

f_i —— i 组分的质量校正因子。

当 f_i 为摩尔校正因子或体积校正因子时，所得结果分别为 i 组分的摩尔百分含量或体积百分数。

归一化法的优点是简便、准确，特别是进样量不容易准确控制时，进样量的变化对定量结果的影响很小。其他操作条件，如流速、柱温等变化对定量结果的影响也很小。

归一化法定量的主要问题是校正因子的测定较为麻烦，虽然一些校正因子可以从文献中查到或经过一些计算方法算出（本章第一节有介绍），但要得到准确的校正因子，还是需要用每一组分的基准物质直接测定。

归一化法主要用于 GC 的定量测定。GC 的一些主要检测器（如 FID 和 TCD）对某些组分（如同系物）的校正因子相近或有一定的规律，从文献中可以查到或进行计算。当校正因子相近时，可直接用峰面积归一化进行定量。例如，表 3-14 给出了 C_8 芳烃异构体的 GC 分析结果。四个组分的 FID 检测器的质量校正因子在 0.96~1.00 之间，结

果给出了用校正因子进行归一化法的定量结果和直接用峰面积进行归一化的定量结果。比较两个结果，误差很小，在这种情况下直接用峰面积归一是十分方便的，也是误差范围所允许的。

表 3-14 C₈ 芳烃异构体的分析 (FID 检测器)

组 分	乙 苯	对二甲苯	间二甲苯	邻二甲苯
峰面积 (A_i)	120	75	140	105
重量校正因子 (f_i)	0.97	1.00	0.96	0.98
$f_i A_i$	116	75	134	103
用校正因子归一化法定量结果	27.0	17.5	31.3	24.1
直接用峰面积归一化定量结果	27.2	17.1	31.8	23.9

对于 HPLC，由于经常使用的一些检测器（如 UV，荧光等），不仅对不同组分的响应值差别较大，不能忽略校正因子的影响，而且对于某些组分可能没有响应值（即不出峰），因此在 HPLC 中很少使用归一化法定量。

三、标准曲线法

标准曲线法也称为外标法或直接比较法，这是在色谱定量分析中，特别是 HPLC 定量分析中比较常用的方法，是一种简便、快速的绝对定量方法（归一化法则是相对定量方法）。

与分光光度分析中的标准曲线法相似，首先用欲测组分的标准样品绘制标准工作曲线。具体作法是：用标准样品配制成不同浓度的标准系列，在与欲测组分相同的色谱条件下，等体积准确量进样，测量各峰的峰面积或峰高，用峰面积或峰高对样品浓度绘制标准工作曲线，此标准工作曲线应是通过原点的直线。若标准工作曲线不通过原点，说明测定方法存在系统误差。标准工作曲线的斜率即为绝对校正因子。

在测定样品中的组分含量时，要用与绘制标准工作曲线完全相同的色谱条件作出色谱图，测量色谱峰的峰面积或峰高，然后根据峰面积和峰高在标准工作曲线上直接查出进入色谱柱中样品组分的浓度，也可通过式 (3-19) 计算这一浓度。

$$p_i/\% = f_i A_i(h_i) \quad (3-19)$$

式中 $A_i(h_i)$ —— i 组分峰的峰面积（峰高）；

f_i —— i 组分标准工作曲线的斜率。

知道进入色谱柱中样品组分的浓度后，就可根据样品处理条件及进样量来计算原样品中该组分的含量了。

当欲测组分含量变化不大，并已知这一组分的大概含量时，也可以不必绘制标准工作曲线，而用单点校正法，即直接比较法定量。先配制一个和待测组分含量相近的已知浓度的标准溶液，在相同的色谱条件下，分别将待测样品溶液和标准样品溶液等体积进样，作出色谱图，测量待测组分和标准样品的峰面积或峰高，然后由式 (3-20) 直接计算样品溶液中待测组分的含量：

$$w_i/\% = \frac{w_s}{A_s(h_s)} \cdot A_i(h_i) \quad (3-20)$$

式中 w_s ——标准样品溶液质量分数，%；

w_i ——样品溶液中待测组分质量分数，%；

$A_s(h_s)$ ——标准样品的峰面积（峰高）；

$A_i(h_i)$ ——样品中 i 组分的峰面积（峰高）。

单点校正法实际上是利用原点作为标准工作曲线上的另一个点。因此，当方法存在系统误差时（即标准工作曲线不通过原点），单点校正法的误差较大。

标准曲线法的优点是：绘制好标准工作曲线后测定工作就很简单了，计算时可直接从标准工作曲线上读出含量，这对大量样品分析十分合适。特别是标准工作曲线绘制后可以使用一段时间，在此段时间内可经常用一个标准样品对标准工作曲线进行单点校正，以确定该标准工作曲线是否还可使用。

标准曲线法的缺点是：每次样品分析的色谱条件（检测器的响应性能，柱温度，流动相流速及组成，进样量，柱效等）很难完全相同，因此容易出现较大误差。另外，标准工作曲线绘制时，一般使用欲测组分的标准样品（或已知准确含量的样品），因此对样品前处理过程中欲测组分的变化无法进行补偿。

四、内标法

选择适宜的物质作为欲测组分的参比物，定量加到样品中去，依

据欲测组分和参比物在检测器上的响应值（峰面积或峰高）之比和参比物加入的量进行定量分析的方法称为内标法。它克服了标准曲线法中，每次样品分析时色谱条件很难完全相同而引起的定量误差。把参比物加到样品中去，使欲测组分和参比物在同一色谱条件下进行分析，可使定量的准确度提高，特别是内标法测定的欲测组分和参比物质在同一检测条件下响应值之比与进样量多少无关，这样就可以消除标准曲线定量法中由于进样量不准确产生的误差。

内标法的关键是选择合适的内标物。内标物应是原样品中不存在的纯物质，该物质的性质应尽可能与欲测组分相近，不与被测样品起化学反应，同时要能完全溶于被测样品中。内标物的峰应尽可能接近欲测组分的峰，或位于几个欲测组分的峰中间，但必须与样品中的所有峰不重叠，即完全分开。内标物的加入量应与欲测组分相近。当欲测组分（ i ）的量为 w_i ，加入内标物（ s ）的量为 w_s ，待测组分（ i ）和内标物（ s ）的峰面积（或峰高）分别为 A_i （或 h_i ）和 A_s （或 h_s ），待测组分（ i ）和内标物（ s ）的质量绝对校正因子分别为 f_i 和 f_s ，则有：

$$w_i = f_i' A_i(h_i)$$

$$w_s = f_s' A_s(h_s)$$

两式相除得：

$$w_i = \frac{f_i}{f_s} \cdot \frac{A_i(h_i)}{A_s(h_s)} \cdot w_s = f' \frac{A_i(h_i)}{A_s(h_s)} \cdot w_s \quad (3-21)$$

式中 f' 为待测组分（ i ）对内标物（ s ）的质量相对校正因子，可由实验测定或由文献值进行计算得到。

为使内标法适用于大量样品分析，可对内标法作一改进，将内标法与标准曲线法相结合，即使用内标标准曲线法。方法如下：用欲测组分的纯物质配成一系列不同浓度的标准溶液。取相同体积的不同浓度的该标准溶液，分别加入同样量的内标物，然后在相同的色谱条件下分别加入内标的一系列标准溶液。以欲测组分与内标物的响应值之比 $\frac{A_i(h_i)}{A_s(h_s)}$ 为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标作图，得到一条内标标准工作曲线，此直线应通过原点（如不通过原点，则说明方法有系统误

差)。分析样品时,取和绘制内标标准工作曲线时相同体积的样品和相同量的内标物,在和绘制内标标准工作曲线相同的色谱条件下测出欲测样品和内标物的响应值之比 $\frac{A_i(h_i)}{A_s(h_s)}$,由此比值可在内标标准工作曲线上查出样品中欲测组分的浓度,进而可以算出欲测组分在样品中的含量。这一方法可以省去测定相对校正因子的工作,特别适用于大批量样品的分析测定工作。

内标法的优点是:进样量的变化,色谱条件的微小变化对内标法定量结果的影响不大,特别是在样品前处理(如浓缩、萃取,衍生化等)前加入内标物,然后再进行前处理时,可部分补偿欲测组分在样品前处理时的损失。若要获得很高精度的结果时,可以加入数种内标物,以提高定量分析的精度。

内标法的缺点是:选择合适的内标物比较困难,内标物的称量要准确,操作较麻烦。使用内标法定量时要测量欲测组分和内标物的两个峰的峰面积(或峰高),根据误差叠加原理,内标法定量的误差中,由于峰面积测量引起的误差是标准曲线法定量的 $\sqrt{2}$ 倍。但是由于进样量的变化和色谱条件变化引起的误差,内标法比标准曲线法要小很多,所以总的来说,内标法定量比标准曲线法定量的准确度和精密度都要好。

五、标准加入法

标准加入法实质上是一种特殊的内标法,是在选择不到合适的内标物时,以欲测组分的纯物质为内标物,加入到待测样品中,然后在相同的色谱条件下,测定加入欲测组分纯物质前后欲测组分的峰面积(或峰高),从而计算欲测组分在样品中的含量的方法。

标准加入法具体作法如下:首先在一定的色谱条件下作出欲分析样品的色谱图,测定其中欲测组分(i)的峰面积 A_i (或峰高 h_i),然后在样品中准确加入已知量为 Δw_i 的欲测组分(i),在与上述色谱条件完全相同的色谱条件下,作出已加入欲测组分(i)后的样品的色谱图,测定这时欲测组分(i)的峰面积 A'_i (或峰高 h'_i),此时根据式(3-1)可得:

$$w_i = f_i A_i(h_i) \quad (3-22)$$

$$w_i + \Delta w_i = f'_i A'_i(h'_i) \quad (3-23)$$

式中 w_i —— 欲测组分 i 在样品中的含量；

f_i 和 f'_i —— 加入欲测组分 i 前后两次测定时的绝对校正因子。

因为加入欲测组分前后两次测定的色谱条件完全相同，加入的物质与欲测组分又是同一物质，所以有 $f_i = f'_i$ ，将式 (3-22) 和式 (3-23) 两式相除，得：

$$\frac{w_i + \Delta w_i}{w_i} = \frac{A'_i(h'_i)}{A_i(h_i)} \quad (3-24)$$

由式 (3-24) 经过运算可得：

$$w_i = \frac{\Delta w_i}{\frac{A'_i(h'_i)}{A_i(h_i)} - 1} \quad (3-25)$$

由式 (3-24) 和所加入的欲测组分 (i) 的量 Δw_i 以及加入欲测组分前后两次测定的峰面积 A_i 和 A'_i (或峰高 h_i 和 h'_i)，就可以计算原样品中欲测组分 (i) 的含量。

标准加入法中加入的欲测组分 (i) 还可以作为另一欲测组分 (j) 的内标物，再用前述的内标法定量的方法来测定欲测组分 (j) 的含量，此时需要测定欲测组分 (j) 对另一欲测组分 (i) 的相对校正因子，用式 (3-21) 计算欲测组分 (j) 的含量：

$$w_j = f' \frac{A_j(h_j)}{A'_i(h'_i)} (w_i + \Delta w_i)$$

式中 f' —— 组分 j 对组分 i 的相对校正因子；

$A_j(h_j)$ —— 组分 j 的峰面积 (峰高)。

标准加入法的优点是：不需要另外的标准物质作内标物，只需欲测组分的纯物质，进样量不必十分准确，操作简单。若在样品的前处理之前就加入已知准确量的欲测组分，则可以完全补偿欲测组分在前处理过程中的损失，是色谱分析中较常用的定量分析方法。

标准加入法的缺点是：要求加入欲测组分前后两次色谱测定的色谱条件完全相同，以保证两次测定时的校正因子完全相等，否则将引起分析测定的误差。

第三节 影响定量分析结果准确性的因素

色谱定量分析中，每个操作步骤和每个色谱条件的选择都会对色谱定量分析结果的准确性产生影响，稍有不慎，就会使定量分析结果产生较大的误差，甚至会得到完全错误的结果。下面就影响色谱定量分析结果准确性的几个主要因素进行详细讨论。

一、样品制备

被分析的样品确定后，首先要把其中的欲测组分转化成能用色谱进行分析的实验用样品，这一过程称为样品制备。在样品的制备过程中，欲测组分不能发生任何损失。如要将欲测组分转变成另一便于色谱分析或检测的形态时，可将不能气化的欲测组分通过衍生化转变成可以气化的形态，以便于气相色谱的分析；也可将没有紫外吸收的欲测组分通过衍生化转变成有紫外吸收的形态，以便于液相色谱的紫外检测器检测等。这些转变一定要是定量的，最好转化率达到100%（转化率达不到100%时，一定要知道准确的转化率，以便最后计算欲测组分的含量）。在选择提取或溶解欲测组分的溶剂时，对于气相色谱分析要考虑这一溶剂应能气化，气化温度要低于欲测组分的分解温度，气化后的气体不与色谱柱中的固定相发生化学反应；对于液相色谱分析要考虑这一溶剂应与液相色谱的洗脱液互溶，而且不与洗脱液和色谱柱中的固定相发生化学反应。在用液相色谱分析时，最好选用所选择的洗脱液作为溶剂来溶解或提取被分析样品中的欲测组分，这样可以避免溶剂峰的干扰。

在样品制备过程中，要同时考虑将被分析的样品中，可能干扰欲测组分定量的物质尽可能的分离出去。当欲测组分含量很低时，还要考虑通过样品制备使欲测组分在试验样品中的含量得以提高（即通过样品制备，将欲测组分加以富集），以便于最后的色谱分析。

样品制备过程中，影响色谱定量分析结果准确性的主要因素是被分析样品中的欲测组分是否能100%定量地转入到制备好的，可用于色谱分析的实验用样品中去，这可用回收率试验来检验，即可用已知量的欲测组分，用样品制备的同样方法处理，将这一欲测组分制备成可用于色

谱分析的实验用样品，再定量测定欲测组分的量。将这一测定结果与原来取的已知量相比，即可得到这一样品制备方法的回收率。当样品制备方法的回收率较低时，宜用标准加入法定量，这样可以补偿欲测组分在样品制备过程中的损失，使色谱定量分析结果更加准确、可靠。

实验用样品制备好后的贮存是否妥当，也是影响色谱定量分析结果准确性的又一个因素。贮存条件选择不好，可能会使欲测组分的浓度由于溶剂的挥发而发生变化；也可能由于欲测组分的分解、氧化或其他化学反应而使欲测组分的浓度发生变化。这些变化都能够使色谱定量分析结果产生错误。

样品制备过程和贮存过程中产生外界物质的沾污，也可能影响欲测组分的测定。特别是周围环境中存在着大量欲测组分时，沾污将严重影响定量分析结果的准确性，这点在测定痕量组分时需要特别注意。

实验用样品制备好后应该尽可能立即进行色谱定量分析，减少实验用样品的贮存时间。在必须贮存时，一定要注意贮存的条件，低温、干燥、避光等条件是贮存样品的必要条件。用标准加入法定量时，也可补偿贮存时样品发生的一些变化，使定量分析的结果更加准确，可靠。

样品制备常涉及的操作有：溶解（或提取）、浓缩、萃取、预分离、衍生化等，这些操作都有可能使欲测组分含量和形态发生变化。因此要进行样品制备的条件实验，研究这些操作对欲测组分含量和形态的影响，以便选择最佳的样品处理条件，尽可能减小欲测组分含量和形态的变化（当然衍生化就是要使欲测组分形态发生变化，但这一变化一定是要定量的）。同时要研究样品制备过程中欲测组分含量和形态变化的规律及变化大小，以便在最后数据处理时对这一系统误差——样品制备误差加以定量校正。对样品制备的详细讨论可参见本丛书《色谱分析样品处理》一书。

二、进样技术

当色谱定量分析采用归一化法、内标法和标准加入法时，进样的误差可以被这些方法本身所具有的特性所消除，即进样产生的误差不会影响最后的定量分析结果。但是，采用标准曲线法（即外标法）作定量分析时，进样的误差（即进样的准确性和重复性）将直接影响定

量分析结果的误差（即定量分析结果的准确性和重复性）。

进样对标准曲线法定量分析误差的影响主要有以下两个因素：一个是进样装置的准确度和精度；另一个是色谱分析人员对进样技术掌握的熟练程度。

在气相色谱定量分析中，对于气体样品进样，大都采用定量进样阀定体积进样，准确性和重复性较好，进样精度优于 0.5%。若采用医用注射器定体积进样，准确性和重复性都较差，进样精度约为 5.0%。对于液体和固体样品，一般用溶剂溶解和稀释后，用微量注射器定体积进样，其准确性和重复性决定于所用注射器的质量，刻度读数的准确度和进样量大小，进样精度一般约为 2.0%。在用注射器进样时，插针的快慢、进针的位置、深度和操作人员的熟练程度都将影响进样的准确性和重复性。对于沸程宽的液体样品，取样、进样要快，但拔针要慢，以防止难挥发的组分在拔针时还没完全进入柱子而随拔针时跑出，引起进样的误差。气化室的温度要足够高（一般比柱温高 50~100℃），以保证所有组分瞬间气化，但要注意在高温时样品可能在气化室内裂解或发生化学反应引起误差。

在使用注射器进样时要经常注意进样品的橡胶垫在多次注射后的漏气问题，由于漏气也会造成样品的损失，所以要经常检查。

在高压液相色谱定量分析中，多采用六通阀进样，这是因为高压液相色谱进样一般是在高压下进行，进样量大小由定量进样管决定，准确性和重复性都较好，进样精度也优于 0.5%。当高压液相色谱采用微量注射器通过隔膜进样时，往往要停流进样，否则由于柱压太高，针内样品很难完全进入柱子，时有泄漏，这时的进样准确性和重复性都较差。高压液相色谱的进样还可以使用微量注射器通过六通阀进行，这时可避免隔膜进样的缺点。如只有 5 μ L 进样管而要进 1 μ L 样品时，可用微量注射器通过六通阀进行。此时进样量的准确性和重复性取决于微量注射器的质量和刻度读数的精度，进样精度约为 2.0%。

在平板色谱中，标准曲线法定量分析的主要误差来自于点样。平板色谱点样器有手动点样器和自动点样器。手动点样器有微量注射器、定容毛细管点样器等，点样量的准确性和重复性约在 2.0%~4.0%。

自动点样器可由微处理器控制，点样量的准确性和重复性都很好，点样量的精度优于 1.0%。

三、色谱条件的选择

前面讨论用峰高还是用峰面积作定量计算时，曾经讨论过色谱条件对峰高和峰面积的影响，这些影响将直接影响到色谱定量分析的准确性和重复性。在保证分离度 >1.5 的条件下，柱效的变化对采用峰面积定量的定量分析结果没有影响，而对使用峰高定量的定量分析结果会产生影响。流动相流速的变化对以相对法定量的归一化法，内标法和标准加入法的定量分析结果没有影响，而对标准曲线法的定量分析结果会产生影响。流动相流速的变化对标准曲线法中峰面积定量的定量分析结果的影响比峰高定量的定量分析结果的影响要大，故在流动相流速不易控制时，若应用标准曲线法定量，应采用峰高定量。

在气相色谱中，柱温的变化会影响保留时间和峰高，柱温的升高将使保留值缩短、峰高增大。柱温变化对峰高的影响随分子量增加而增大，这说明柱温的变化对各组分的峰高的影响是不等效的，即使是以相对法定量的归一化法、内标法和标准加入法也无法消除柱温的变化对峰高大小的影响。在特定条件下得到的数据表明，如要求柱温的变化引起的定量分析误差小于 0.6%，则柱温的变化不应超过 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。柱温的变化对峰面积大小的影响较小，故在气相色谱中多采用峰面积定量。

在液相色谱中，流动相的组成变化，如采用梯度洗脱时，固定相、洗脱液和欲测组分之间的平衡很难保持严格一致，加之梯度洗脱时基线经常出现漂移，使峰面积和峰高的测量容易产生较大的误差，故在液相色谱定量分析中不采用梯度洗脱，而且要尽量保持洗脱液组成的稳定。

总之在色谱定量分析中，要尽可能保持色谱条件的稳定，保证每次进样时色谱条件尽可能保持一致。

四、检测器特性

检测器工作的稳定性和线性范围将直接影响色谱定量分析结果的准确性和重复性。

色谱定量分析的基础是：

$$w_i = f_i A_i(h_i)$$

这就要求检测器对所测组分的响应值与所测组分的含量呈线性关系。实际上任何检测器的响应都有一定的线性范围（参见本丛书《气相色谱检测方法》和《液相色谱检测方法》两书），超出这一范围，检测器的响应值与含量之间的关系将偏离线性范围，这时再用上述公式计算，必将会产生较大的误差。所以，要想获得准确的定量分析结果，进样量绝不能使进入检测器的被测组分含量超出检测器的线性范围。选用的进样量最好能使检测器的响应值落在其线性范围的中间部分，此时的误差最小。

不同类型的色谱检测器影响其工作稳定性的因素是不同的，如气相色谱中的氢火焰离子化检测器工作的稳定性主要受燃气——氢气和空气的比例和流速以及载气的流速影响很大，要保持氢火焰离子化检测器定量分析结果的重现性在1%之内，就要求空气和氢气的流速应控制在1.5%的精度，载气流速应控制在2%的精度。又如，气相色谱中的热导检测器，要求池体的温度控制精度为 $\pm 0.05^\circ\text{C}$ 时才能得到稳定的定量分析结果。有关影响各种类型检测器工作稳定性的因素可以参见本丛书的《气相色谱检测方法》和《液相色谱检测方法》两本专著。

对于某些特殊组分可使用选择性检测器，使某些干扰物在选择性检测器上不被检出，从而可以消除干扰，得到较好的定量分析结果。

总之，可以通过选择合适的检测器和检测器的工作参数，使色谱定量分析中由检测器引起的误差降到最低。

五、分离度

分离度大小将影响峰高和峰面积测量的准确度，而峰高和峰面积测量的准确度将直接影响色谱定量分析的准确度。分离度对峰高和峰面积测量准确度的影响在前面“峰高和峰面积的准确测定”和“峰高和峰面积法选择”两小节中作了详细的讨论，在此就不多述了。

第四节 痕量分析

痕量分析中的“痕量”是指欲测组分的量很低，这有两种情况：一