



中国科学技术大学
University of Science and Technology of China

分析化学 II 复习提要（色谱部分）

杨春雨

中国科学技术大学 化学物理系

2023 年 3 月 12 日

目录

1 概述	2
2 气相色谱法	5
3 高效液相色谱法	7

1 概述

1. 俄国植物学家 Tswett 利用吸附原理分离植物色素而发明色谱法，是分离科学技术发展中的重要里程碑。Martin 和 Synge 发明液液分配色谱、提出色谱塔板理论和预见采用气体流动相的优点，获得了 1952 年诺贝尔化学奖。
2. 色谱法的定义：色谱法也称层析法，是一种重要的物理化学分离方法。基于混合物中各组分在两相中分布系数的差异，当两相做相对移动的时候，被分离物质在两相之间进行连续、多次分配，组分分配系数的微小差异导致迁移速率差异，实现组分分离。

3. 色谱法分类

(a) 按固定相形态分类

- i. 柱色谱：固定相装在色谱柱内。依据柱管的大小、结构、制备方法不同又分为填充柱、整体柱、毛细柱和开管柱。
- ii. 平面色谱：固定相呈平面状，可以分为薄层色谱和纸色谱；

(b) 按照色谱动力学分类

- i. 淋洗色谱法，以与固定相作用力比分离组分弱的流体作为流动相，各组分按照与固定相作用力、缔合了或溶解力等，从弱到强先后洗出。形成连续、区域宽度逐渐展宽的 Gaussian 色谱峰；
- ii. 置换色谱法，用含与固定相作用力较被分离组分强的物质流体为流动相，依次将组分从固定相上置换下来；
- iii. 迎头色谱法，以试样混合物作为流动相、与固定相作用力弱的组分最先以纯物质状态流出，其后吸附力稍弱的第二个组分与第一个组分的混物流出色谱柱，以此类推；

(c) 可以按照两相的物理形态、固定相性质和结构、分离组分或溶质在色谱体系迁移中两相间的平衡类型或者作用机理对色谱方法进行分类。一般可以按照流动相为液态、气态、超临界流体分为液相色谱、气相色谱、超临界流体色谱。

4. 分配系数定义：色谱过程涉及溶质在两相中的分布平衡，平衡常数 K 被称为分布系数或分配系数，定义为

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad (1.1)$$

其中 c_s 是溶质在固定相中的浓度， c_m 是溶质在流动相中的浓度。

5. 流动相流经色谱柱的平均时间定义为死时间，以 t_M 来表示

$$t_M = L/u \quad (1.2)$$

L 为柱长， u 为溶剂通过色谱柱的平均线速度。

6. 保留时间：定义为溶质通过色谱柱的时间，即从进样到洗出最大浓度的时间，以 t_R 表示

$$t_R = L/u_x \quad (1.3)$$

u_x 为溶质通过色谱柱的平均线速度。

7. 调整保留时间：溶质在固定相上滞留的时间，即保留时间减去死时间，以 t'_R 来表示；

8. 比移值：只有在流动相的溶质分子是运动的，因此定义比移值 R_f

$$R_f = \frac{u_x}{u} = \frac{n_m}{n_m + n_s} \quad (1.4)$$

9. 保留体积：死时间内流经色谱柱的流动相体积称为死体积 V_M ，等于色谱柱内流动相的体积

$$V_M = t_M F_c \quad (1.5)$$

保留时间内流经色谱柱的流动相体积称为保留体积 V_R 。调整保留时间内流经色谱柱的流动相体积称为调整保留体积

$$V_R = t_R \cdot F_c \quad (1.6)$$

$$V'_R = t'_R \cdot F_c = (t_R - t_M) \cdot F_c = V_R - V_M \quad (1.7)$$

其中 F_c 是流动相平均体积流量。

10. 保留因子：溶质分布在固定相和流动相的分子数或者物质的量之比，

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s V_S}{c_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad (1.8)$$

V_S 和 V_M 分别为固定相和流动相的体积，两者之比为相比，记为 β 。保留因子还满足：

$$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1.9)$$

11. 选择性因子（相对保留值）：它反映不同的溶质和固定相作用力的差异，

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_2}{t'_1} \quad (1.10)$$

12. 保留指数：公式

$$I_R = 100X = 100 \left[n + \frac{\lg t'_{R(x)} - \lg t'_{R(n)}}{\lg t'_{R(n+1)} - \lg t'_{R(n)}} \right] = 100 \left(n + \frac{\lg \alpha(X, n)}{\lg \alpha(n+1, n)} \right) \quad (1.11)$$

其中调整保留时间可以使用其他的保留值来代替。

13. 塔板理论的基本假设：

- (a) 色谱柱由柱内外直径一致、填充均匀的若干小段组成，称为塔板，其高度均相等（记为 H ），称为塔板高；
- (b) 溶质在每一个塔板上的分布常数或者分配系数不变，在两相之间瞬间达成分布平衡，纵向的分子扩散可以忽略不计（线性理想色谱）；
- (c) 流动相经过色谱柱是不连续的，是一个脉冲式的间歇过程，每次进入和从上一个塔板向下一个塔板转移的流动相体积相等，为一个塔板的流动相体积 ΔV_m 。

14. 色谱流出曲线方程（塔板理论方程）：洗出曲线趋向于正态分布，可以近似用下面的方程描述

$$c = \left(\frac{N}{2\pi} \right) e^{-\frac{N}{2} \left(\frac{V_R - V}{V_R} \right)^2} \frac{M}{V_R} \quad (1.12)$$

15. 理论塔板数：考虑 $c/c_{\max} = 1/2$ 的时候，

$$\frac{c_{\max}}{c} = 2 = e^{\frac{N}{2} \left(\frac{\Delta V_{1/2}}{V_R} \right)^2} \Rightarrow N = 8 \ln 2 \left(\frac{V_R}{2\Delta V_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{V_R}{2\Delta V_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{2\Delta t_{1/2}} \right)^2 \quad (1.13)$$

或者我们也有

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (1.14)$$

于是就有塔板高度为 $H = L/N$ 。

16. 为了扣除死时间的影响，我们有有效塔板数和有效塔板高度

$$N_{\text{eff}} = 5.54 \left(\frac{t_R - t_M}{2\Delta t_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t'_R}{2\Delta t_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t'_R}{W} \right)^2 \quad (1.15)$$

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}} \quad (1.16)$$

17. 速率理论方程

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad (1.17)$$

其中 u 为流动相平均线速率、 A 为涡流扩散因子， B/u 为分子扩散因子， Cu 为传质因子， C_s 和 C_m 分别为流动相和固定相传质系数。 H 也被称为塔板高或者色谱柱效指标， H 越小，色谱柱效越高。

18. 最佳速率和最小塔板高度，对 H 关于 u 求导可以得到

$$u_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C_s + C_m}}, \quad H = A + 2\sqrt{B(C_s + C_m)} \quad (1.18)$$

19. 影响柱效的因素：流动相速度、填料粒径、色谱柱温度；

20. 柱外谱带展宽效应的因素：进样操作和进样系统死体积、进样系统和色谱柱以及色谱柱和检测器连接、检测器、色谱柱头。

21. 分离度：相邻两组分色谱峰保留值 t_{R1} 和 t_{R2} 之差和两峰底 W_1, W_2 平均宽度之比，

$$R = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{1/2(W_1 + W_2)} \quad (1.19)$$

$R = 1$ 基本分离， $R = 1.5$ 完全分离。

22. 两个峰的保留值接近的时候 $W_1 = W_2 = W$ ，则按照 $W = \frac{4\sqrt{N}}{t_R}$ ，于是

$$R = \frac{\sqrt{N} t_{R1} - t_{R2}}{4 \frac{t_{R2}}{t_R}} = \frac{\sqrt{N} k_2 - k_1}{4 (1 + k_2)} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (1.20)$$

所以

$$N = 16R^2 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)^2 \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right)^2 \quad (1.21)$$

23. 分离速度及其影响因素：完成分离所需时间取决于迁移速率慢的组分

$$t_{R2} = 16R^2 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)^2 \frac{(k_2 + 1)^3 H}{k_2^2 u} \quad (1.22)$$

24. 色谱峰容量：一定色谱操作条件下，色谱柱在一定时间内能够容纳的达到一定分离度的色谱峰的数量。
25. 提高理论塔板数的方法：增加柱长，提高柱效（高效液相色谱可以通过降低流动相速度提高柱效）。此外还可以降低固定相填料直径。
26. 色谱定性方法主要是保留值定性，但是保留值定性缺乏典型的分子结构特征，只能鉴定已知物。在同等条件下用已知化合物做标样与试样种色谱峰对照定性或者将已知化合物加入试样中导致某色谱峰增高定性。其他方法主要是一些保留值的经验规律，比如同系物的 $\log k - n$ 关系。
27. 色谱定量分析：色谱的定量分析是按照检测响应信号的大小测定试样中各组分的相对含量。定量依据是每个组分的量（质量或者体积）和检测响应信号的大小和色谱检测器的响应值成正比。色谱峰面积 A 满足

$$A = h \times 2\Delta X_{1/2} \quad (1.23)$$

保留值小，峰宽窄且难以准确测量的组分可以按照峰宽定量。

28. 色谱定量方法：1. 配制一系列标准曲线，得到每个组分浓度与相应峰面积或者峰高的校准曲线。这是一个绝对定量方法。实际分析中也可以利用物质含量和峰面积成正比，采用单点校正。2. 选择一个一般不存在于试样中的合适内标化合物，要求内标是高纯化合物且和试样中各组分易于分离，不和组分发生化学反应。内标法对分离检测条件不如外标敏感。3. 试样中组分全部洗出后，可以用峰面积归一化法求各组分含量。

2 气相色谱法

1. 气相色谱法的分类：

- (a) 填充柱气相色谱仪：其气路是一个载气连续运行的管路高气密性系统，气路流程主要有单柱单气路和双柱双气路。单柱单气路用于恒温分离分析，双柱双气路用于程序升温分离分析。常见载气有氢气、氮气、氦气、氩气。
- (b) 毛细管气相色谱仪：毛细管柱内径约 0.32-0.25mm，柱容量小，相比填充柱气相色谱仪增加了一个分流/不分流进样器，柱后装有辅助尾吹气。毛细管柱进样谱带展宽的柱外效应对柱效和定量的精确性影响很大。进样方式主要有分流进样、不分流进样（适合痕量分析）、直接进样、冷柱头进样和程序升温进样。
- (c) 制备型气相色谱仪：是制备纯组分的填充柱气相色谱仪，适用于较大试样量制备分离纯组分，需要进样量大，色谱柱内径和长度一般大于填充柱气相色谱仪，内径大于 10mm，柱长在 3-10m。后面装有分流阀，少量进入检测器，大量进入收集系统冷冻收集。

2. 气相色谱仪的基本结构大概有：载气瓶、减压/稳流阀门、流量计、进样器、色谱柱、色谱炉、检测器、数据处理系统。

3. 程序升温技术：在一个分析周期内，柱温呈线性或者非线性增加。

4. 色谱检测器的分类：

- (a) 依据输出信号记录方式不同，可以分为微分型和积分型，积分型色谱流出曲线是台阶型，给出各组分浓度叠加的总和。微分型给出分离后各组分浓度随时间的变化。目前主要使用微分型。

(b) 按照检测机理的不同可以分为浓度型和质量型；

(c) 按照选择性可以分为通用型和选择型，通用型对所有物质有响应，通用型对所有物质都有响应。

5. 色谱检测器的主要性能指标有：灵敏度

$$S = \frac{\Delta R}{\Delta Q} \quad (2.1)$$

检出限，其定义为检测器产生能检定的信号时（即检测信号为检测器噪声的三倍的时候）单位载气所含物质的量（浓度型）或者单位时间内进入检测器的物质质量（质量型）

$$D = \frac{3R_N}{S} \quad (2.2)$$

最小检测量和最小检测浓度。

(a) 热导检测器的工作原理：每种物质都有其独有的导热能力，组分不同导热能力不同，金属丝的电阻随温度改变而改变。它结构简单，性能稳定，对无机物和有机物都有响应，线性范围宽，是使用的最广泛的色谱检测器之一。

(b) 氢火焰离子化检测器的工作原理：以氢气和空气燃烧的火焰作为能源，含碳有机物在火焰中燃烧产生离子，在外加电场的作用下离子定向移动形成离子流，微弱的离子流经过高电阻放大为电压信号被记录下来。氢火焰离子化检测器对含碳有机物灵敏度很高，是典型的破坏型、质量型检测器。属于选择型检测器，对很多无机物没有响应。

(c) 电子捕获检测器：以 ^{63}Ni 或者 ^3H 作为放射源的离子化检测器，主要用于检测高电负性的化合物比如含卤素、硫、磷、氰基等，是一种高选择性、高灵敏度、对痕量高电负性有机物最有效的检测器，广泛用于农药残留分析。但是线性范围窄、测定结果重现性受操作条件和放射性污染的影响大。原理是：放射源让载气电离产生基流，电负性强的化合物捕获电子使得基流下降。

(d) 火焰光度检测器，也被称为硫、磷检测器。实际上是一个简单的发射光谱仪，以一个温度为 2000-3000K 的富氢火焰作发射源，当有机磷、硫进入富氢火焰中燃烧的时候产生 HPO 或者 S_2^* 碎片，分别发出 480-600nm 和 350-430nm 特征波长的光，以适当的滤光片分光（P 526nm, S 394nm）。经光电倍增管将光信号转变成电信号。

(e) 氮、磷检测器，也被称为热离子检测器、是一种质量检测器，适用于分析氮、磷化合物的高灵敏度、高选择性检测器，结构类似 FID。将陶瓷珠放置在氢火焰和收集极之间。

6. 气相色谱固定相：

(a) 固体固定相：包括固体吸附剂（多孔性固体材料）、高分子多孔微球、化学键合固定相。一般用于分离分析永久性气体（ H_2O , O_2 , CO , CH_4 等）、无机气体和低沸点碳氢化合物、几何异构体和强极性物质。可以用去尾剂覆盖一些活性中心。

(b) 液相固定相：采用液体固定相，溶质在气液两相间的分布等温线呈线性、可以获得较对称的色谱峰，保留值重现性好；可供选择的固定液多，适用范围广；可以通过改变固定液的用量调节固定液膜的厚度，控制 k 值，改善传质，获得高柱效。固定液需要时高沸点有机物，1) 对组分有良好的分离选择性、2) 热稳定性和化学稳定性高、3) 操作温度下有较低的蒸汽压，4) 润湿性好。液相附着在载体上，载体有硅藻土载体和非硅藻土载体。

7. 毛细管柱：由于填充柱内填充的填料颗粒不均匀，多路径使涡流扩散严重。毛细管柱在细而长的毛细管内壁涂上固定液用于色谱分离。其特点主要有

- (a) 柱的渗透性好，毛细管柱的比渗透率比填充柱大接近两个数量级，可以采用高线速载气实现快速分析；
- (b) 柱效高，可以采用长色谱柱，总理论塔板数可以达到 10^6 ，特别适合分离性质及其相似的混合物；
- (c) 相比高，传质加快，柱容量小。

一般有下面的类型

- (a) 涂壁开管柱；
 - (b) 壁处理开管柱；
 - (c) 多孔层开管柱；
 - (d) 载体涂层开管柱；
 - (e) 填充毛细管柱；
8. 气相色谱中温度的选择包括三个部分：气化室温度、检测器温度和柱温；显然柱温是影响色谱分离效能和分析时间的一个最重要操作参数。柱温提高增加扩散系数提高柱效，但是会加剧纵向扩散，降低柱效。此外，提高柱温一般会导致相对保留值降低，分离选择性下降。柱温选择首先要考虑的是固定液的最高使用温度，避免固定液的流失（比固定液的最高使用温度低 30-50 摄氏度）。对于宽沸程的试样，可以采用程序升温技术。气化室的温度一般在试样的沸点或者高于柱温 50-100 摄氏度。检测器的温度一般高于柱温，避免污染或者异常响应。

3 高效液相色谱法

1. 高效液相色谱的特点：

- (a) 高效（最多 15-30 万理论塔板数）、高速（百倍）、高灵敏度；
- (b) 填料粒径（3-10 μm ，经典柱液相大于 100 μm ）和流动相性质影响色谱柱效；柱效升高 1-2 个数量级（理论： 10^3 ）；

2. 高效液相色谱的适用范围：高效液相色谱适用于占有有机物接近 80% 的高沸点、热不稳定、生物活性、高分子化合物以及无机离子型化合物。（气相色谱分析对象仅限于气体和沸点较低的化合物，仅占有有机物的 20%，但是操作简单，成本低，在石油加工中应用较多）。

3. 依据色谱固定相和色谱分离的物理化学原理，高效液相色谱可以分为：

- (a) 吸附色谱：固体吸附剂为固定相，不同极性的溶剂为流动相；
- (b) 分配色谱：涂渍或者化学键合在载体基质上的固定液为固定相或者化学键合固定相；
- (c) 离子交换色谱：用含离子交换基团的固定相以具有一定 pH 的含离子的溶液为流动相，基于离子性组分和固定相离子交换能力差异实现组分分离；
- (d) 体积排阻色谱：化学惰性的多孔凝胶或材料作为固定相，按照组分分子体积差异，（即分子在固定相空穴中的体积排阻作用差异实现组分分离）。也被称为凝胶色谱。药物分子进入色谱柱后，它们中的不同组分按其大小进入相应的孔径内，大小大于所有孔径的分子不能进入填充剂颗粒内部，在色谱过程中不被保留，最早被流动相洗脱至柱外，表现为保留时间较短；大小小于所有孔径的分子能自由进入填充剂表面的所有孔径，在柱子中滞留时

间较长，表现为保留时间较长；其余分子则按分子大小依次被洗脱。被广泛应用于大分子分级，即用来分析大分子物质相对分子质量的分布。

4. 正相色谱和反相色谱：固定相强极性、流动相相对非极性为正相色谱，反之为反向色谱。
5. 基本结构：流动相储器和溶剂处理系统、高压泵系统、进样系统、高效液相色谱柱、检测器
6. 紫外吸收检测器：原理类似一般的光分析仪器，
7. 光二极管阵列检测器：进入流通池的不是单色光，复合光聚焦后照射到流通池上，投射到 200 到 1000 多个二极管组成的二极管阵列而被检测。
8. 荧光检测器：利用化合物的光致发光特性（不产生荧光的可以和荧光试剂反应），激光发射光路和荧光发射光路相互垂直。比紫外光灵敏度高 2-3 个数量级，特别适用于痕量组分测定。
9. 示差折光检测器：基于折射率差异；通用型，灵敏度不高 $10^{-6} - 10^{-7}$ ，
10. 蒸发光散射检测器：洗出液雾化后，通过激光束，检测光散射，对所有物质都有响应；
11. 电雾式检测器：洗脱液经雾化后形成颗粒，经过蒸发管干燥与带电氮气碰撞，使得分析物颗粒带上正电荷，最后通过静电计测量分析物颗粒表面的电荷量，实现检测。特点：通用型，适用于难挥发性化合物检测。高灵敏度“ng”，重现性好、稳定性好。2004 年推出。
12. 溶剂 A 和 B 的极性参数可以按照下式求出

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B \quad (3.1)$$

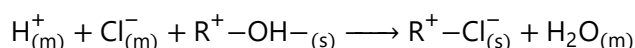
(a) 对于极性吸附和正向色谱， P' 和 k 的关系大致如下式：

$$k_2/k_1 = 10^{(P'_1 - P'_2)/2} \quad (3.2)$$

(b) 对于反向色谱

$$k_2/k_1 = 10^{(P'_2 - P'_1)/2} \quad (3.3)$$

13. 梯度洗脱：由于各组分的分配比、吸附系数变化范围宽，因此连续改变流动相的组成，使得各组分都能在其最佳 k' 的时候流出。有高压梯度（需要两个高压泵，价格昂贵）和低压梯度（易形成气泡）两种方式。
14. 分配色谱的原理和类型：主要基于样品分子在流动相和固定相间的溶解度不同（分配作用）而实现分离的液相色谱分离模式。主要有液液分配色谱和化学键合色谱。
15. 离子交换色谱的原理：带负电荷的交换基团（如磺酸基和羧酸基）可以用于阳离子的分离，带正电荷的交换基团（如季胺基）可以用于阴离子的分离。以阴离子分离为例，由于静电场相互作用，样品阴离子以及淋洗剂阴离子都与固定相中带正电荷的交换基团作用，样品离子不断地进入固定相，又不断地被淋洗离子交换而进入流动相，不同的样品阴离子与交换基的作用力大小不同，电荷密度大的离子与交换基的作用力大，在树脂中的保留时间就长，于是不同的离子相互分离。
16. 由于离子交换色谱流动相电解质浓度高，检测器对溶质离子不灵敏，因此引入了抑制柱（离子色谱抑制器），抑制住填充第二种离子交换填料，将流动相淋洗离子转变成低电离的分子，从而不影响后续分析，eg.



17. 体积排阻色谱的原理：以多孔性物质作固定相，比固定相孔径小的分子才能进入孔内而产生保留，溶质分子体积越小，进入固定相孔内的机率越大，于是在固定相中停留（保留）的时间也就越长，又称体积排斥色谱、空间排阻色谱。
18. 在排除极限 A 和渗透极限 B 之间的区域称为选择型渗透区，从 A 随着分子量降低，溶质分子在凝胶穴中逐渐渗透，慢慢迁移，溶质按照分子量分级分离形成系列色谱峰， A 以上和 B 以下都是单一色谱峰。
19. 双电层是浸没在液体中两相界面都具备的一种特性，通常是指两相之间的分离表面，形成相对固定和游离的、与表面电荷异号的两部分或者双离子层。
20. 双电层可以分为表面-紧密层-扩散层，电荷密度随着和表面的距离急剧减小；紧密层和扩散层交点的电势我们称之为 Zeta (ζ) 电势，在扩散层内衰减 e 倍所需要的距离被称为扩散层的厚度。
21. 电泳：带电粒子在电场的作用下，以不同的速度向其所带的电荷相反电场方向迁移的现象叫做电泳。
22. 淌度：定义为带电粒子在单位场强下的平均电泳速率：

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad (3.4)$$

23. 电渗流：除了电泳之外，毛细管中还存在一种电动现象，即电渗。实际上是溶剂化的离子带动溶剂的运动（和双电层有关）。
24. 毛细管电泳和毛细管电色谱的分离原理：正离子的运动方向和电渗和电泳一致，因此它应最先流出。中性分子与电渗流同速，随电渗而行。负离子因其运动方向和电渗相反，在中性粒子之后流出。

杨春雨

2023 年 3 月 12 日于中国科大东区图书馆