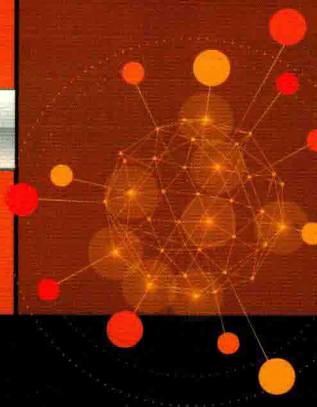


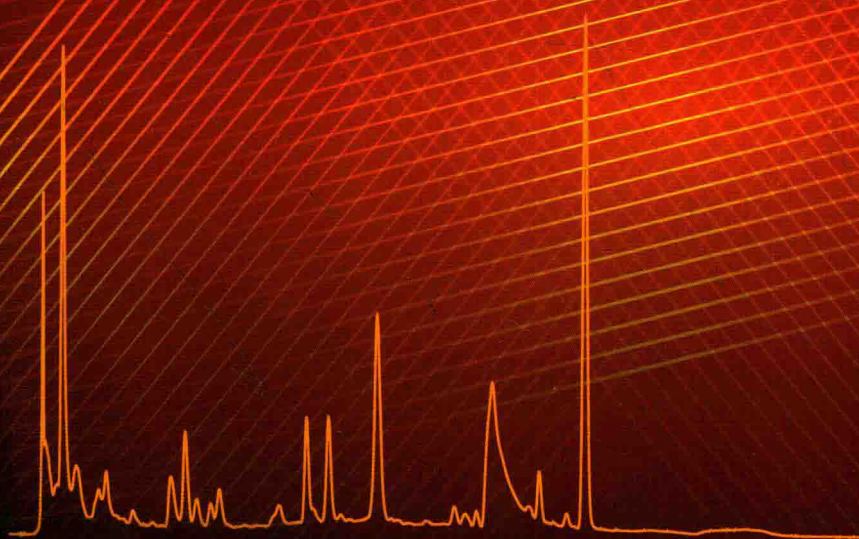
分析与检验技术类专业职业技能培训教材



液相色谱与液质联用技术 及应用

YEXIANG SEPU YU YEZHI LIANYONG JISHU JI YINGYONG

宓捷波 许泓 主编



学工业出版社

分析与检验技术类专业职业技能培训教材

液相色谱与液质联用技术 及应用

YEXIANG SEPU YU YEZHI LIANYONG JISHU JI YINGYONG

宓捷波 许泓 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书主要介绍液相色谱和液相色谱-质谱/质谱技术及应用。书中简述了两种仪器的工作原理,组成仪器各主要部件的功能、特性及参数。列举了其在主要应用领域的典型实例,并结合实际工作,介绍了应用该技术执行相关标准方法做分析检测时应注意的操作要点。

本书适用于在相关领域中从事分析检测工作的相关技术人员学习,还可作为高等院校相关专业学生学习的教材。

图书在版编目(CIP)数据

液相色谱与液质联用技术及应用/宓捷波,许泓主编.
北京:化学工业出版社,2018.4
分析与检验技术类专业职业技能培训教材
ISBN 978-7-122-31634-9

I. ①液… II. ①宓… ②许… III. ①液相色谱-技
术培训-教材 IV. ①O657.7

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第040701号

责任编辑:蔡洪伟 窦臻
责任校对:吴静

文字编辑:焦欣渝
装帧设计:王晓宇

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印 刷:三河市航远印刷有限公司
装 订:三河市瞰发装订厂
787mm×1092mm 1/16 印张11½ 字数238千字 2018年8月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899
网 址:<http://www.cip.com.cn>
凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:49.00元

版权所有 违者必究

丛书前言

为了出版一套服务于分析检验行业和企业优质系列丛书，化学工业出版社联合全国部分高等院校、职业院校，进出口检验检疫局及国内外著名仪器公司的专家，于2016年12月在北京召开“分析与检验技术专业丛书编写研讨会”，对目前国内分析检测行业的现状和发展趋向进行了充分的研讨，确定编写一套适应目前行业发展情况，具有指导意义的分析检测丛书，并明确了本系列丛书的编写内容和编写方案。丛书编写委员会以全国石油和化工职业教育教学指导委员会高职工业分析与环境类专业委员会副主任王炳强教授为主任，天津大学范国樑教授、班睿教授，天津科技大学杨志岩教授，天津出入境检验检疫局许泓研究员，南京科技职业学院王建梅副教授，江西省化学工业学校曾莉教授为专家组成员。参加研讨会的沃特世（Waters）科技公司北区应用部经理仇雯丽、安捷伦（Agilent Technologies）科技公司应用市场部经理祝立群、岛津（Excellence in Science）仪器设备公司市场部经理梁志莹、美国热电（Thermo Fisher）公司市场部经理贾伟和项目博士也在研讨会上充分发表了意见并提出很多建设性方案设想。相信本系列丛书的出版能有助于提高我国分析检测技术人员的创业创新意识，更好地服务于现代化企业和科学研究机构，并为从事分析检测工作人员服务。

为了更好地指导一线化验员和分析检测人员进行常规的工作，丛书分为六个板块单独成册，即：化验员实用操作指南、化学分析与电化学分析技术及应用、原子光谱分析技术及应用、分子光谱分析技术及应用、气相色谱与气质联用技术及应用、液相色谱与液质联用技术及应用。主持编写工作的专家都是分析检测第一线工作的博士、高级技术人员和专家学者。

本套丛书力求突出如下特色：

1. 注重内容的先进性和实用性。本书编写按照理论联系实际、注重实用的原则。在内容选用上，主要是依据有关国家标准所收录的内容及新规定而编写，并适当反映现阶段国内外新技术概况，以满足读者从事质量监控、面向国际市场的要求。

2. 注重理论与实践紧密结合。书中各章节理论知识都配有具体案例分析。这些案例都是作者长期实验的结晶和工作的总结，方便读者通过案例拓展相关的检测工作。实用案例中有很多是近年来形成的分析检验的行业案例，尚未形成国家标准，以满足在分析检测重要岗位上分析研究的特殊需要。

3. 注重实践操作指导。努力使本书适应高级技术应用型人才的使用，在一些问题的讨论上力求有一定的深度。在一些应用上给出一定的讨论空间，对层次比较高的读者可以查阅相关专著和资料去解决。

4. 注重方便于读者阅读和查找有关资料。本书内容编排上，把有关案例放在相关的章节内，使基本理论和案例训练衔接更为紧密，便于读者查找并使用。

本套丛书在编写过程中，沃特世、安捷伦、岛津、美国热电、美瑞泰克科技等公司

提供了大量案例供编者参考，编者还参考了有关专著、国标、图书、论文等资料，在此向有关专家、老师、作者致以衷心的感谢。

本套丛书编写过程中，得到中国化工教育协会和全国石油和化工职业教育教学指导委员会的指导和帮助；得到化学工业出版社的热情支持和业务指导，在此表示深深的谢意！

由于时间和水平所限，书中缺陷在所难免，欢迎广大读者提出宝贵意见。

编委会

2018年3月

商品化的高效液相色谱仪问世已有半个多世纪,经过不断完善,功能越来越多。现在的商品机,其输液泵的性能、检测器的类型、色谱柱的填料种类和规格较之早期仪器都有极大提升,因此分离效果越来越好,分析速度越来越快,检测的化合物种类越来越多,覆盖的领域越来越广,成为化学分析检测不可缺少的仪器。

20世纪末,常压电离接口技术解决了液相色谱-质谱联用的难题,使商品化液相色谱-质谱联用仪进入成熟期,成为真正能满足实用分析检测的仪器,其应用技术亦有了长足进步。液相色谱-质谱/质谱联用仪及技术以其独有的优势,成为21世纪以来发展和普及最快的化学分析检测仪器及技术。由于液相色谱-质谱/质谱联用仪定性准确,检测灵敏度高,定量有较宽的线性范围,使其应用领域更加广泛,已成为现代分析检测实验室不可或缺的仪器,是本书介绍的重点。

本书为分析检测类图书,书中简单介绍了液相色谱仪和液相色谱-质谱/质谱联用仪的技术原理、主要组成部件、功能、参数指标等。重点介绍两种仪器主要应用领域中的典型实例,以及采用该技术做分析检测时遇到的一些常见问题的解决方法。涉及色谱和质谱的基础理论知识部分,请参阅丛书的“气相色谱与气质联用技术及应用”。

本书在编写过程中主要参考了有关专著、国家标准和行业标准、图书、论文等资料,并结合我们实验室日常检测实际工作,描述了部分标准方法操作的关键控制点。安捷伦、SCIEX、岛津、赛默飞世尔科技、沃特世等公司的技术专家还为本书提供了部分应用方法实例。在此向有关老师、专家、论文作者、实验室人员致以衷心的感谢。

由于时间和水平所限,书中存在缺陷在所难免,欢迎广大读者提出宝贵意见。

编者

2018年5月

目录

CONTENTS

第一章 液相色谱技术及应用 / 001

第一节 概述 / 001

一、液相色谱发展简史 / 001

二、液相色谱基本原理 / 003

三、液相色谱的分类 / 008

第二节 高效液相色谱仪器的基本结构及发展 / 010

一、高效液相色谱仪器的基本组成 / 010

二、液相色谱仪的发展方向 / 027

第三节 液相色谱技术的应用 / 040

一、液相色谱技术在医药领域的应用 / 040

二、液相色谱技术在食品安全领域的应用 / 047

三、液相色谱技术在环境监测领域的应用 / 062

第二章 液相色谱与质谱的联用技术及应用 / 070

第一节 概论 / 070

一、液相色谱的局限性及联用的必要性 / 070

二、联用接口的特点及要求 / 071

第二节 质谱简介 / 071

一、质谱技术的发展 / 071

二、质谱仪的分析原理及基本结构 / 073

三、主要的商品化质谱仪类型 / 078

第三节 液相色谱和质谱的连接接口 / 084

一、液体直接导入接口 / 085

二、连续流动快原子轰击 / 085

三、“传送带式”接口 / 087

四、离子束接口 / 087

五、热喷雾接口 / 087

六、激光解吸离子化接口及基质辅助激光解吸离子化接口 / 088

七、(大气压)电喷雾离子化接口 / 088

八、大气压化学离子化接口 / 091

九、大气压光电离接口 / 092

第四节 主流的液相色谱-质谱联用仪 / 093

一、液相色谱-三重四级杆质谱联用仪 / 093

二、液相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用仪 / 095

三、液相色谱-四级杆/线性离子阱-轨道离子阱质谱仪 / 096

四、液相色谱-离子阱-飞行时间质谱 / 097

第五节 液相色谱质谱联用技术的应用 / 098

一、液相色谱-质谱联用技术在医药司法领域的应用 / 098

二、液相色谱-质谱联用技术在食品安全领域的应用 / 120

三、液相色谱-质谱联用技术在环境监测领域的应用 / 144

四、液相色谱-质谱联用技术在兴奋剂检测领域的应用 / 157

缩略语表 / 170

参考文献 / 172

第一章

液相色谱技术及应用

第一节 概 述

一、液相色谱发展简史

从 20 世纪初色谱法发明以来，经历了整整一个世纪的发展，到今天液相色谱法已经成为最重要的分离分析方法，广泛地应用于许多领域，如石油化工、有机合成、生理生化、医药卫生、食品、环境保护乃至空间探索等。

在所有色谱技术中，液相色谱法 (liquid chromatography, LC) 是最早发明的。1906 年俄国植物学家茨维特 (Tswett) 将吸附原理应用于植物色素的分离实验，用碳酸钙填充竖立的玻璃管，以石油醚洗脱植物色素的提取液，经过一段时间洗脱之后，植物色素在碳酸钙柱中实现分离，由一条色带分散为数条平行的色带。由于这一实验将混合的植物色素分离为不同的色带，因此茨维特将这种方法命名为色谱法 (chromatography)，这个词是由希腊语中“色”的写法 chroma 和“书写” (graphein) 这两个词根组成的，派生词有 chromatograph (色谱仪)、chromatogram (色谱图)、chromatographer (色谱工作者) 等。这个单词最终被英语等拼音语言接受，成为色谱法的名称。汉语中的色谱是对这个单词的意译。

1931 年德国柏林威廉皇帝研究所的库恩将茨维特的方法应用于叶红素和叶黄素的研究，其研究成果获得了科学界的广泛承认，色谱法正式进入学术界。之后，在有色物质的分离中，以氧化铝为固定相的吸附色谱法受到众多研究者的青睐。

1938 年马丁和辛格将水吸附在固相的硅胶上，以氯仿冲洗，成功地分离了氨基酸，成为分配色谱应用的第一个成果。在获得成功之后，马丁和辛格的方法被广泛应用于各种有机物的分离。1943 年马丁和辛格又发明了蒸汽饱和环境下进行的纸色谱法。

1952 年马丁和詹姆斯提出用气体作为流动相进行色谱分离的设想，他们用硅藻土吸附的硅酮油作为固定相，用氮气作为流动相分离了若干种小分子量挥发性有机酸，完成了最早的气相色谱实验。气相色谱法在这一时期发展迅速，不同特性的检测器不断涌

现,同时,在色谱学理论中有着重要地位的塔板理论、范德姆特 (Van Deemter) 方程和保留时间、保留指数、峰宽等概念也逐渐成形。尽管这一时期,液相色谱发展仍十分缓慢,但气相色谱的检测器技术和色谱理论的发展为后期液相色谱的发展奠定了基础。

自 1906 年茨维特分离植物色素至 1960 年代末的液相色谱技术又称为经典液相色谱技术,这一时期的液相色谱通常用大直径的玻璃管柱在室温和常压下用液位差输送流动相,此方法由于使用的填充粒大于 $100\mu\text{m}$,提高柱效面临着困境,所以色谱分离效果差、时间长。

1969 年,科克兰、哈伯、荷瓦斯、莆黑斯、里普斯克等人开发了世界上第一台高效液相色谱仪,开启了液相色谱的新时代。之后,小粒径全多孔球形硅胶和稳定性键合固定相的出现,大大提高了色谱柱的塔板数,同时借助往复式双柱塞恒流泵以高压驱动流动相克服小粒径填料引起的高阻力,使得经典液相色谱需要数日乃至数月完成的分离工作得以在几个小时甚至几十分钟内完成,由于这种液相色谱技术具有高压、高速、高分离度的特征,因此被称作高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。

1971 年,科克兰等人出版了《液相色谱的现代实践》一书,标志着高效液相色谱法 (HPLC) 正式建立。现代意义的 HPLC 发展也自此进入高速推进的快车道。作为一种有效的分离检测手段, HPLC 在化学、医学、药物开发与检测、化工、食品科学、环境监测、检验检疫和法检等领域都展现出独特的优势。此外, HPLC 也直接推动了固定相材料、检测技术、数据处理技术以及色谱理论的发展。

1973 年,第一届国际液相色谱会议在瑞士的因特拉肯举行,这是一次 HPLC 研究者的盛会, HPLC 的研究及展示在会议中获得了大量学者的关注,其中几乎 50% 以上的论文将讨论的重点集中在色谱柱的问题上,其余论文则关注了 HPLC 的检测器和实际应用。

到 20 世纪 80 年代中期,计算机模拟预测高效分离结果与实际实验相结合,使计算机逐渐承担了色谱分析结果的繁重数学计算工作。期间,科达 (Kodak) 实验室中已经能够利用对聚合度为反相键合色谱柱分离 900 多种多聚取代磺酸芳香高级性化合物;雷格里尔、哈恩和汉卡克以及他们的同事建立了对映体 (手性异构体) 和大生物分子如蛋白质的 HPLC 方法;超临界流体色谱法 (SFC)、毛细管电泳 (LZE)、制备色谱法 (PC) 等也逐渐开始应用。

近年来, HPLC 的色谱柱改进和完善进程更是迅速,亚 $2\mu\text{m}$ 粒径、各种修饰已成为当前应用的热点;超高压输送泵的出现则不仅缩短了分离时间,而且将高效液相色谱的有效塔板数提高了数百倍,使分离效率飞速提高。

经过 30 多年的发展,现代高效液相色谱技术得到了不断的完善和改进,在输液泵、检测器、色谱柱及数据控制和处理系统等方面采用了许多专利技术,使泵的稳定性和重复性、检测器的灵敏度和检出能力、色谱柱的分离效能和应用范围及数据处理软件的智能化得到了很大的提高。现在, HPLC 几乎能够分析所有的有机、高分子及生物试样,

在目前已知的有机化合物中,若事先不进行化学改性,只有 20% 的化合物用气相色谱可以得到较好的分离,而 80% 的有机化合物则需 HPLC 分析。在短短的 30 多年里,HPLC 从初步成形发展成为成熟而广泛应用的分析方法。目前,HPLC 在化学、生物医药、食品等领域的分离和分析中已是不可或缺的重要技术。

二、液相色谱基本原理

(一) 概述

色谱法的分离以化合物在流动相与固定相之间的相互作用为基础,当溶于流动相中的各组份经过固定相时,由于与固定相发生作用(吸附、分配、离子吸引、排阻、亲和)的大小、强弱不同,在固定相中滞留时间不同,从而先后从固定相中流出。如果色谱分离过程中使用的流动相是液体,则称为液相色谱。高效液相色谱则指以泵高压驱动流动相,使用小粒径多孔硅胶或稳定键合固定相的液相色谱。

由检测器将分离情况转换成电信号进行记录,得到一条信号随时间变化的曲线,称为色谱流出曲线。当待测组分流出色谱柱时,检测器就可检测到相应组分的浓度,在流出曲线上表现为峰状,称为色谱峰,理想的色谱峰流出曲线应该是符合正态分布的曲线(见图 1-1)。

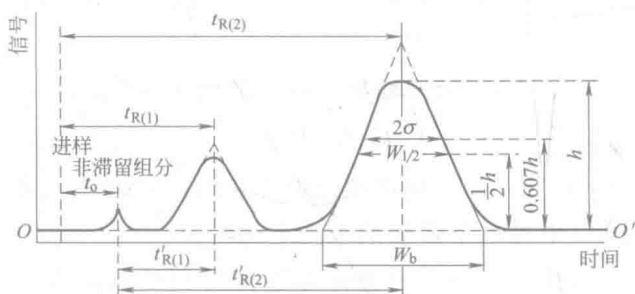


图 1-1 典型色谱流出曲线

为了解释色谱流出曲线的形状、探究实际色谱区带扩散的影响因素和从理论上指导色谱分离和定量结果,人们从热力学、动力学等方面进行了大量的研究,形成了塔板、速率、平衡等经典理论,为评价表征柱效、定量关联色谱参数与柱效以及探究各种因素对色谱流出曲线的影响奠定了研究基础。

(二) 基本概念和术语

高效液相色谱的分离原理、溶质在固定相中保留、扩散等概念基本源自气相色谱法,所以,适用于气相色谱的一些概念、术语及分离的基本关系式,往往也适用于高效液相色谱法。高效液相色谱法中的一些基本概念和术语如下:

① 色谱图(chromatogram) 样品流经色谱柱和检测器所得到的信号-时间曲线,又称色谱流出曲线(elution profile)。

② 基线 (base line) 经流动相冲洗, 柱与流动相达到平衡后, 检测器测出一段时间的流出曲线, 一般应平行于时间轴。

③ 噪声 (noise) 基线信号的波动。通常因电源接触不良或瞬时过载、检测器不稳定、流动相含有气泡或色谱柱被污染所致。

④ 漂移 (drift) 基线随时间的缓缓变化。主要由于操作条件如电压、温度、流动相及流量的不稳定所引起, 柱内的污染物或固定相不断被洗脱下来也会产生漂移。

⑤ 色谱峰 (peak) 组分流经检测器时响应的连续信号产生的曲线。流出曲线上的突起部分。正常色谱峰近似于对称形正态分布曲线 (高斯曲线)。不对称色谱峰有两种: 前延峰 (leading peak) 和拖尾峰 (tailing peak)。

⑥ 标准偏差 (standard deviation, σ) 正态分布曲线 $x = \pm 1$ 时 (拐点) 的峰宽之半。正常峰的拐点在峰高的 0.607 倍处。标准偏差的大小说明组分在流出色谱柱过程中的分散程度。 σ 小, 分散程度小, 极点浓度高, 峰形瘦, 柱效高; 反之, σ 大, 峰形胖, 柱效低。

⑦ 峰底 基线上峰的起点至终点的距离。

⑧ 峰高 (peak height, h) 峰的最高点至峰底的距离。

⑨ 峰宽 (peak width, W) 峰两侧拐点处所作两条切线与基线的两个交点间的距离。

$$W = 4\sigma$$

⑩ 半峰宽 (peak width at half-height, $W_{h/2}$) 峰高一半处的峰宽。

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

⑪ 峰面积 (peak area, A) 峰与峰底所包围的面积。

$$A = 1.064 W_{h/2} h$$

⑫ 死时间 (dead time, t_0) 不保留组分的保留时间, 即流动相 (溶剂) 通过色谱柱的时间。在反相 HPLC 中可用苯磺酸钠来测定死时间。

⑬ 死体积 (dead volume, V_0) 由进样器进样口到检测器流动池未被固定相所占据的空间。它包括 4 部分: 进样器至色谱柱管路体积、柱内固定相颗粒间隙 (被流动相占据, V_m)、柱出口管路体积、检测器流动池体积。其中只有 V_m 参与色谱平衡过程, 其他 3 部分只起峰扩展作用。为防止峰扩展, 这 3 部分体积应尽量减少。

$$V_0 = F \times t_0 (F \text{ 为流速})$$

⑭ 保留时间 (retention time, t_R) 从进样开始到某组分在柱后出现浓度极大值的时间。

⑮ 保留体积 (retention volume, V_R) 从进样开始到某组分在柱后出现浓度极大值时流出溶剂的体积, 又称洗脱体积。

$$V_R = F \times t_R$$

⑯ 调整保留时间 (adjusted retention time, t'_R) 扣除死时间后的保留时间, 也称折合保留时间 (reduced retention time)。在实验条件 (温度、固定相等) 一定时, t'_R 只决定于组分的性质, 因此, t'_R (或 t_R) 可用于定性。

$$t'_R = t_R - t_0$$

⑰ 调整保留体积 (adjusted retention volume, V'_R) 扣除死体积后的保留体积。

$$V'_R = V_R - V_0 \text{ 或 } V'_R = F \times t'_R$$

⑱ 理论塔板数 (theoretical plate number, N) 用于定量表示色谱柱的分离效率 (简称柱效), 取决于固定相的种类、性质 (粒度、粒径分布等)、填充状况、柱长、流动相的种类和流速及测定柱效所用物质的性质。若用调整保留时间 (t'_R) 计算理论塔板数, 所得值称为有效理论塔板数 ($N_{\text{有效}}$ 或 N_{eff})。

⑲ 理论塔板高度 (theoretical plate height, H) 每单位柱长的方差。实际应用时往往用柱长 L 和理论塔板数计算。

⑳ 分配系数 (distribution coefficient, K) 在一定温度下, 化合物在两相间达到分配平衡时, 在固定相与流动相中的浓度之比。

㉑ 容量因子 (capacity factor, k) 化合物在两相间达到分配平衡时, 在固定相与流动相中的量之比。因此容量因子也称质量分配系数。

㉒ 选择性因子 (selectivity factor, α) 相邻两组分的分配系数或容量因子之比。从本质上来说, α 的大小表示两组分在两相间的平衡分配热力学性质的差异, 即分子间相互作用力的差异。

㉓ 分离度 (resolution, R) 相邻两峰的保留时间之差与平均峰宽的比值, 也叫分辨率, 表示相邻两峰的分离程度。 $R \geq 1.5$ 称为完全分离。

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

(三) 塔板理论

1. 塔板理论的基本假设

塔板理论是 Martin 和 Synger 首先提出的色谱热力学平衡理论。它把色谱柱看作分馏塔, 把组分在色谱柱内的分离过程看成在分馏塔中的分馏过程, 即组分在塔板间隔内的分配平衡过程。塔板理论的基本假设为:

① 色谱柱内存在许多塔板, 组分在塔板间隔 (即塔板高度) 内完全服从分配定律, 并很快达到分配平衡。

② 样品加在第 0 号塔板上, 样品沿色谱柱轴方向的扩散可以忽略。

③ 流动相在色谱柱内间歇式流动, 每次进入一个塔板体积。

④ 在所有塔板上分配系数相等, 与组分的量无关。

虽然以上假设与实际色谱过程不符, 如色谱过程是一个动态过程, 很难达到分配平衡; 组分沿色谱柱轴方向的扩散是不可避免的。但是塔板理论导出了色谱流出曲线方程, 成功地解释了流出曲线的形状、浓度极大点的位置, 能够评价色谱柱柱效。

2. 色谱流出曲线方程及定量参数 (峰高 h 和峰面积 A)

根据塔板理论, 流出曲线可用下述正态分布方程来描述:

$$c = \frac{m\sqrt{n}}{V_R\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{n}{2} \times \frac{(V-V_R)^2}{V_R^2}\right]$$

$$c = \frac{m\sqrt{n}}{t_R\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{n}{2} \times \frac{(t-t_R)^2}{t_R^2}\right]$$

由色谱流出曲线方程可知：当 $t=t_R$ 时，浓度 c 有极大值 $c_{\max}$ 。 $c_{\max}$ 就是色谱峰的峰高。上式说明：①当实验条件一定时（即 σ 一定），峰高 h 与组分的量 c_0 （进样量）成正比，所以正常峰的峰高可用于定量分析；②当进样量一定时， σ 越小（柱效越高），峰高越高，因此提高柱效能提高 HPLC 分析的灵敏度。

由流出曲线方程对 $V(0\sim\infty)$ 求积分，可得出色谱峰面积 $A=2.507\sigma h=c_0$ 。可见， A 相当于组分进样量 c_0 ，因此是常用的定量参数。把 $W_{h/2}=2.355\sigma$ 代入上式，即得 $A=1.064\times W_{h/2}\times h$ ，此为正常峰的峰面积计算公式。

(四) 速率理论（又称随机模型理论）

1. 液相色谱速率方程

1956 年荷兰学者 Van Deemter 等人吸收了塔板理论的概念，并把影响塔板高度的动力学因素结合起来，提出了色谱过程的动力学理论——速率理论。它把色谱过程看作一个动态非平衡过程，研究过程中的动力学因素对峰展宽（即柱效）的影响。后来 Giddings 和 Snyder 等人在 Van Deemter 方程（ $H=A+B/u+Cu$ ，后称气相色谱速率方程）的基础上，根据液体与气体的性质差异，提出了液相色谱速率方程（即 Giddings 方程）：

$$H = \left(\frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{1}{C_g u} \right)^{-1} + \frac{B}{u} + Cu$$

2. 影响柱效的因素

(1) 涡流扩散 (eddy diffusion) 由于色谱柱内填充剂的几何结构不同，分子在色谱柱中的流速不同而引起的峰展宽。涡流扩散项 $A=2\lambda d_p$ ， d_p 为填料直径， λ 为填充不规则因子，填充越不均匀 λ 越大。HPLC 常用填料粒度一般为 $3\sim 10\mu\text{m}$ ，最好 $3\sim 5\mu\text{m}$ ，粒度分布 $\text{RSD}\leq 5\%$ 。但粒度太小难以填充均匀（ λ 大），且会使柱压过高。大而均匀（球形或近球形）的颗粒容易填充规则均匀， λ 小。总的说来，应采用细而均匀的载体，这样有助于提高柱效。毛细管无填料， $A=0$ 。

(2) 分子扩散 (molecular diffusion) 又称纵向扩散。由于进样后溶质分子在柱内存在浓度梯度，导致轴向扩散而引起的峰展宽。分子扩散项 $B/u=2\gamma D_m/u$ 。 u 为流动相线速度，分子在柱内的滞留时间越长（ u 小），展宽越严重。在低流速时，它对峰形的影响较大。 D_m 为分子在流动相中的扩散系数，由于液相的 D_m 很小，通常仅为气相的 $10^{-4}\sim 10^{-5}$ ，因此在 HPLC 中，只要流速不太低的话，这一项可以忽略不计。 γ 是考虑到填料的存在使溶质分子不能自由地轴向扩散而引入的柱参数，用以对 D_m 进行校正。 γ 一般在 $0.6\sim 0.7$ 左右，毛细管柱的 $\gamma=1$ 。

(3) 传质阻抗 (mass transfer resistance) 由于溶质分子在流动相、静态流动相和固定相中的传质过程而导致的峰展宽。溶质分子在流动相和固定相中的扩散、分配、转移的过程并不是瞬间达到平衡, 实际传质速度是有限的, 这一时间上的滞后使色谱柱总是在非平衡状态下工作, 从而产生峰展宽。液相色谱的传质阻抗项 C_u 又分为三项。

① 流动相传质阻抗 $H_m = C_m d_p^2 u / D_m$, C_m 为常数。这是由于在一个流路中流路中心和边缘的流速不等所致。靠近填充颗粒的流动相流速较慢, 而中心较快, 处于中心的分子还未来得及与固定相达到分配平衡就随流动相前移, 因而产生峰展宽。

② 静态流动相传质阻抗 $H_{sm} = C_{sm} d_p^2 u / D_m$, C_{sm} 为常数。这是由于溶质分子进入处于固定相孔穴内的静止流动相中, 晚回到流路中而引起峰展宽。 H_{sm} 对峰展宽的影响在整个传质过程中起着主要作用。固定相的颗粒越小, 微孔孔径越大, 传质阻力就越小, 传质速率越高。所以改进固定相结构, 减小静态流动相传质阻力, 是提高液相色谱柱效的关键。

H_m 和 H_{sm} 都与固定相的粒径平方 d_p^2 成正比, 与扩散系数 D_m 成反比。因此, 应采用低粒度固定相和低黏度流动相。高柱温可以增大 D_m , 但用有机溶剂作流动相时, 易产生气泡, 因此一般采用室温。

③ 固定相传质阻抗 $H_s = C_s d_f^2 u / D_s$ (液液分配色谱), C_s 为常数, d_f 为固定液的液膜厚度, D_s 为分子在固定液中的扩散系数。在分配色谱中 H_s 与 d_f 的平方成正比, 在吸附色谱中 H_s 与吸附和解吸速度成反比。因此, 只有在厚涂层固定液、深孔离子交换树脂或解吸速度慢的吸附色谱中, H_s 才有明显影响。采用单分子层的化学键合固定相时 H_s 可以忽略。

从速率方程式可以看出, 要获得高效能的色谱分析, 一般可采用以下措施: ① 进样时间要短; ② 填料粒度要小; ③ 改善传质过程, 过高的吸附作用力可导致严重的峰展宽和拖尾, 甚至不可逆吸附; ④ 较小的检测器死体积; ⑤ 适当的流速, 以 H 对 u 作图, 则有一最佳线速度 u_{opt} , 在此线速度时, H 最小。一般在液相色谱中, u_{opt} 很小 (大约 $0.03 \sim 0.1 \text{ mm/s}$), 在这样的线速度下分析样品需要很长时间, 一般来说都选择在 1 mm/s 的条件下操作。

(五) 柱外效应

速率理论研究的是柱内峰展宽因素, 实际在柱外还存在引起峰展宽的因素, 即柱外效应 (色谱峰在柱外死空间里的扩展效应)。色谱峰展宽的总方差等于各方差之和, 即:

$$\sigma^2 = \sigma_{\text{柱内}}^2 + \sigma_{\text{柱外}}^2 + \sigma_{\text{其他}}^2$$

柱外效应主要由进样点到检测池之间除柱子本身以外的所有死体积所引起。为了减少柱外效应, 首先应尽可能减少柱外死体积, 如使用“零死体积接头”连接各部件, 管道对接宜呈流线型, 检测器的内腔体积应尽可能小。其次, 希望将样品直接进在柱头的中心部位, 但是由于进样阀与柱间有接头, 柱外效应总是存在的。此外, 要求进样体积 $\leq V_R/2$ 。



柱外效应的直观标志是容量因子 k 小的组分 (如 $k < 2$) 峰形拖尾和峰宽增加得更为明显; k 大的组分影响不显著。由于 HPLC 的特殊条件, 当柱子本身效率越高 (N 越大), 柱尺寸越小时, 柱外效应越显得突出。而在经典 LC 中则影响相对较小。

三、液相色谱的分类

液相色谱法可依据溶质在固定相和流动相分离过程的物理化学原理分类, 也可以按照溶质在色谱柱中洗脱的动力学过程分类。

(一) 按溶质在两相分离过程的物理化学原理分类

液相色谱法按分离机制的不同可分为液固吸附色谱法、液液分配色谱法 (正相与反相)、离子交换色谱法、离子对色谱法、分子排阻色谱法和亲和色谱法。

1. 液固色谱法

该法使用固体吸附剂, 被分离组分在色谱柱上的分离原理是根据固定相对组分吸附力大小不同而进行分离。分离过程是一个吸附-解吸附的平衡过程。常用的吸附剂为硅胶或氧化铝, 粒度 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ 。适用于分离分子量 $200 \sim 1000$ 的组分, 大多数用于非离子型化合物, 离子型化合物易产生拖尾。常用于分离同分异构体。

2. 液液色谱法

该法使用将特定的液态物质涂于担体表面, 或化学键合于担体表面而形成的固定相, 分离原理是根据被分离的组分在流动相和固定相中溶解度不同而分离。分离过程是一个分配平衡过程。

涂布式固定相应具有良好的惰性; 流动相必须预先用固定相饱和, 以减少固定相从担体表面流失; 温度的变化和不同批号流动相的区别常引起柱子的变化; 另外在流动相中存在的固定相也使样品的分离和收集复杂化。由于涂布式固定相很难避免固定液流失, 现在已很少采用。现在多采用的是化学键合固定相, 如 C_{18} 、 C_8 、氨基柱、氰基柱和苯基柱。

液液色谱法按固定相和流动相的极性不同可分为正相色谱法 (NPC) 和反相色谱法 (RPC)。正相色谱法采用极性固定相 (如聚乙二醇、氨基与腈基键合相); 流动相为相对非极性的疏水性溶剂 (烷烃类如正己烷、环己烷), 常加入乙醇、异丙醇、四氢呋喃、三氯甲烷等以调节组分的保留时间。常用于分离中等极性和极性较强的化合物 (如酚类、胺类、羰基类及氨基酸类等)。反相色谱法一般用非极性固定相 (如 C_{18} 、 C_8); 流动相为水或缓冲液, 常加入甲醇、乙腈、异丙醇、丙酮、四氢呋喃等与水互溶的有机溶剂以调节保留时间。适用于分离非极性和极性较弱的化合物 (表 1-1)。RPC 在现代液相色谱中应用最为广泛, 据统计, 它占整个 HPLC 应用的 80% 左右。

表 1-1 正相色谱法与反相色谱法对比

项目	正相色谱法	反相色谱法
固定相极性	高~中	中~低
流动相极性	低~中	中~高
组分洗脱次序	极性小先洗出	极性大先洗出

随着柱填料的快速发展,反相色谱法的应用范围逐渐扩大,现已应用于某些无机样品或易解离样品的分析。为控制样品在分析过程的解离,常用缓冲液控制流动相的 pH 值。但需要注意的是, C_{18} 和 C_8 使用的 pH 值通常为 2.5~7.5 (2~8), pH 值太高会使硅胶溶解,太低会使键合的烷基脱落。有报道称新商品柱可在 pH1.5~10 范围操作。

从表 1-1 可看出,当极性为中等时正相色谱法与反相色谱法没有明显的界线(如氨基键合固定相)。

离子对色谱法又称偶离子色谱法,是液液色谱法的分支。它是根据被测组分离子与离子对试剂离子形成中性的离子对化合物后,在非极性固定相中溶解度增大,从而使其分离效果改善。主要用于分析离子强度大的酸碱物质。分析碱性物质常用的离子对试剂为烷基磺酸盐,如戊烷磺酸钠、辛烷磺酸钠等。另外,高氯酸、三氟乙酸也可与多种碱性样品形成很强的离子对。分析酸性物质常用四丁基季铵盐,如四丁基溴化铵、四丁基铵磷酸盐。离子对色谱法常用 ODS 柱(即 C_{18}),流动相为甲醇-水或乙腈-水,水中加入 3~10mmol/L 的离子对试剂,在一定的 pH 值范围内进行分离。被测组分保留时间与离子对性质、浓度、流动相组成及其 pH 值、离子强度有关。

3. 离子交换色谱法

固定相是离子交换树脂,常用苯乙烯与二乙烯交联形成的聚合物骨架,在表面末端芳环上接上羧基、磺酸基(称阳离子交换树脂)或季铵基(阴离子交换树脂)。被分离组分在色谱柱上的分离原理是树脂上可电离离子与流动相中具有相同电荷的离子及被测组分的离子进行可逆交换,根据各离子与离子交换基团具有不同的电荷吸引力而分离。

缓冲液常用作离子交换色谱的流动相。被分离组分在离子交换柱中的保留时间除与组分离子与树脂上的离子交换基团作用强弱有关外,还受流动相的 pH 值和离子强度影响。pH 值可改变化合物的解离程度,进而影响其与固定相的作用。流动相的盐浓度大,则离子强度高,不利于样品的解离,导致样品较快流出。离子交换色谱法主要用于分析有机酸、氨基酸、多肽及核酸。

4. 排阻色谱法

固定相是有一定孔径的多孔性填料,流动相是可以溶解样品的溶剂。小分子量的化合物可以进入孔中,滞留时间长;大分子量的化合物不能进入孔中,直接随流动相流出。它利用分子筛对分子量大小不同的各组分排阻能力的差异而完成分离。常用于分离高分子化合物,如组织提取物、多肽、蛋白质、核酸等。