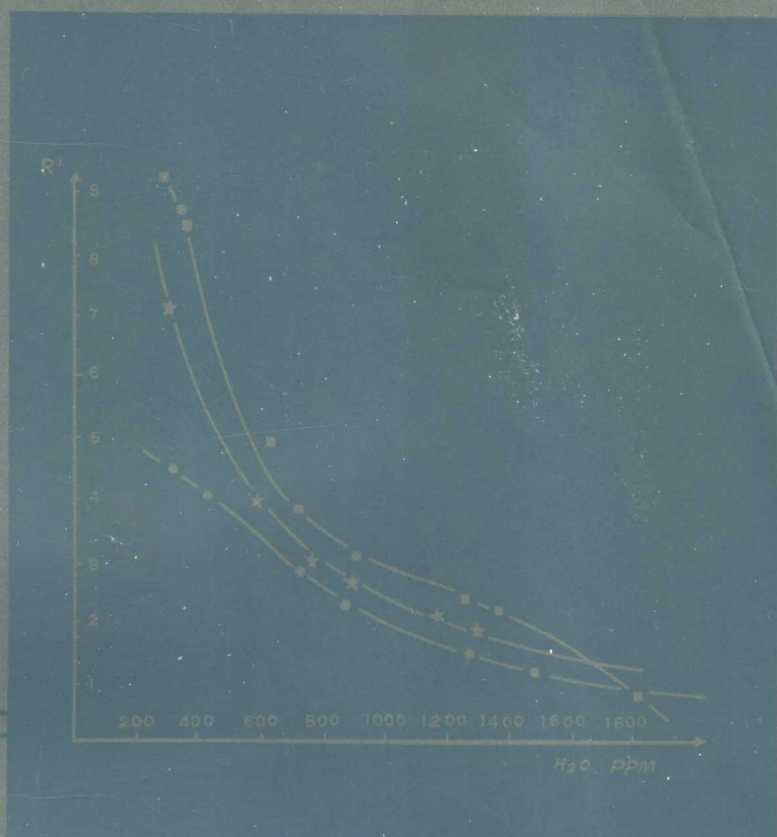
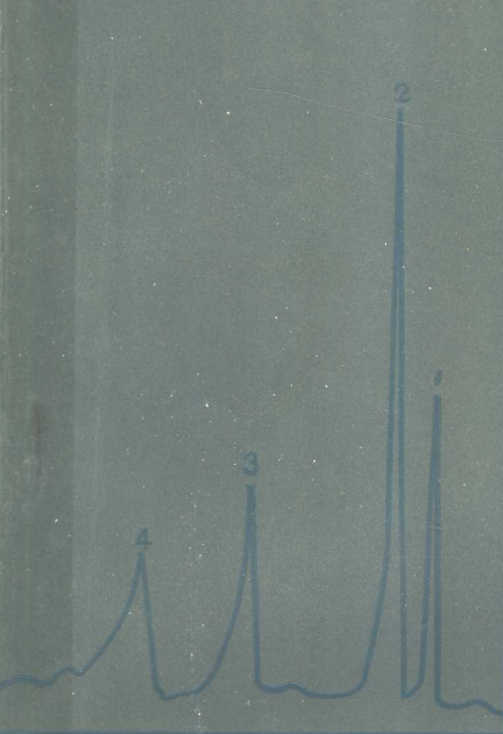




高效液相色谱

——在医药研究中的应用

张仁斌 徐修容 等编著

上海科学技术出版社

高效液相色谱

——在医药研究中的应用

张仁斌、徐修容等编著

上海科学技术出版社

高效液相色谱

——在医药研究中的应用

张仁斌 徐修容等 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 江苏泗阳印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 13.5 字数 336,000

1983年6月第1版 1983年6月第1次印刷

印数 1—4,900

统一书号 14119·1680 定价: (科五) 1.55元

序 言

1903 年俄国化学家茨维特(Tswett M. S.)发现色谱法至今已有 70 多年历史,它已经历了几个重要阶段而发展成各种各样的色谱分离法,并已成为分析化学的一个重要分支学科。

液相柱色谱是色谱法中最古老的一种,但长期来使用粗颗粒填料和柱内不均匀的填充床,使这种方法分离效能和速度都较低。早在 1941 年 Martin AJP 等曾指出如减小填料的粒度,增加柱长和柱压有可能克服其缺点,这一看法经过 20 多年后才逐渐受到重视。60 年代初气相色谱发展日趋完善,其中 Giddings JC 首先将气相色谱理论中板高方程经过修正后用于液相色谱,为液相色谱的现代化奠定了理论基础。Knox JH 等对色谱填料的粒度与柱效能间关系也做了大量研究,并指出减小填料直径可以大大提高分离效能。在此基础上 Horvath C 于 1967 年试制出了在 $70\mu\text{m}$ 玻璃珠上覆盖离子交换树脂的薄壳型填料,并应用高压输液泵、紫外检测器等组成了自动输液、检测的液相层析仪。Kirkland JJ 也系统地研究和各种新型薄壳型填料和化学键合相填料,在第五次国际色谱会议上受到普遍肯定和重视,此后液相色谱开始了全面的现代化发展。至今可归纳成三个阶段。

一、高速化(1967~1972 年):由于薄壳型填料的诞生和仪器的自动化使分离速度从过去几小时或几天提高到几分钟或几十分钟。仪器逐步商品化,还发展了梯度淋洗和各种类型检测器。化学键合相出现,为实际应用开辟了更广泛的领域。当时把这种方法称“高速液相色谱”(High Speed Liquid Chromatography, HSLO)或高压液相色谱(High Pressure LC, HPLC)。

二、高效化(1972~1977 年):由于解决了微粒型填料($5\sim 10\mu\text{m}$)的高压匀浆装柱技术,使全多孔微粒型填料进入实用阶段,这样柱效可达到每米几万甚至 10 万以上理论塔板数。在此期间,液相色谱基础理论也有较大的发展,故这种方法逐步改名为高效液相色谱(High Performance LC, HPLC)。各种高灵敏度检测器(如荧光,电化学)的出现使检测灵敏度可达 $10^{-12}\sim 10^{-14}\text{g}$ 水平。

三、现阶段(1977~1983 年):HPLC 虽具有单位长度(每米)内很高的柱效,但由于柱压的限制,实际应用的柱长都在 25cm 左右,它的实际总柱效却并不高(约 1 万左右理论塔板数)。为了获得更高的实用柱效,近几年来出现了微型填充柱(内径 1mm)和毛细管液相色谱(内径 0.05mm),它们实际总柱效可达 10 万理论塔板数。此外, HPLC 与质谱,核磁共振谱,红外光谱仪的联用技术以及计算机数据处理和操作系统控制的全自动化也有很大进展。

综上所述, HPLC 不仅在分离速度,分离效能,检测灵敏度,自动化等方面已达到可与 GC 相媲美的程度,它还具有样品适用范围广(特别对热不稳定物,难气化的样品)和可以大量制备(一次进样可达 100g)等优点,因此它已在色谱分析方

法中占有越益重要的地位。

我国从 1973 年即开展了 HPLC 研究工作,几年来在基础理论,仪器研制和应用方面均做了大量工作。本书是我们多年来在多次讲课的基础上进行文献及实践经验体会的总结,仅供从事这方面工作同志参考。

本书上篇介绍了 HPLC 的原理、方法和仪器,下篇介绍在药物及医学研究上的应用,共 13 章。为避免与已译成中文的国外同类书籍内容重复,我们力求内容结合我国实际情况。例如在方法一章中我们按目前实际应用分为吸附色谱,键合相色谱,离子对色谱来介绍,并增加方法选择内容。在仪器一章除了对各个部件装置和检测器作了比较详细阐述外,还简略介绍几种国内外商品仪器的结构和性能。本书重点在应用,故下篇选编了当前在医药研究方面最活跃的领域,例如中草药和抗生素成分的分离,神经递质和药物代谢产物的分离,光学异构体的拆分等。各章均有从事此方面工作的同志编写,编写人员名字列于章末。全书最后由张仁斌、徐修容和贺贤国同志负责校阅并定稿。

由于我们水平有限,实践经验尚少,加上 HPLC 技术本身发展日新月异,因此恳请读者对本书提出批评和指正。

徐叔云

1983.2.

目 录

上 篇

1 原理 (张仁斌)	1
1.1 色谱分离和保留值	1
1.2 分离度及影响因素	2
1.3 色谱峰展宽和柱效	5
1.4 色谱柱效能的评价	9
2 分离方法 (张仁斌)	13
2.1 液固吸附色谱	13
2.2 化学键合相色谱	20
2.3 离子对色谱	29
3 仪器装置 (杨一鸣、赵国栋)	36
3.1 绪言	36
3.2 高压输液系统	37
3.3 层析柱	42
3.4 进样装置及进样方式	43
3.5 梯度淋洗	46
3.6 几种商品仪器简单介绍	49
4 检测器 (王圣群、顾群)	53
4.1 检测器性能的几个有关参数	53
4.2 紫外检测器	56
4.3 荧光检测器	59
4.4 示差折光检测器	62
4.5 移动丝氢焰检测器	64
4.6 光导检测器	65
4.7 液-质联用(LC-MS)	67
4.8 仪器常见故障的分析和排除方法	70

5 定量分析方法 (周倩如)	74
5.1 取样技术.....	74
5.2 色谱分离.....	74
5.3 检测器的响应.....	75
5.4 定量方法.....	77

下 篇

6 药物及代谢产物的分析 (徐珩、唐琴梅)	79
6.1 绪言.....	79
6.2 层析前样本预处理.....	79
6.3 HPLC 定量测定药物及其代谢产物.....	80
6.4 体液样品中各种药物的 HPLC.....	83
6.5 应用举例	101
7 中草药化学成分的分析 (贺贤国)	106
7.1 各类植物化学成分分析方法概述	107
7.2 生药材有效成分含量的分析	113
7.3 解决实际分离问题的例子	116
8 生物胺的分离和测定 (徐修容、徐珩)	119
8.1 引言	119
8.2 儿茶酚胺、脂肪二胺和多胺及有关化合物的测定	119
8.3 生物样本中生物胺的测定	124
8.4 结束语	133
9 甾体激素的分析 (贺贤国)	135
9.1 生理体液中甾体激素的分析	136
9.2 甾体激素药物的分析	138
9.3 甾体样品的衍生化	138
9.4 甾体激素的 HPLC 定量分析.....	140

10 抗生素的分析 (龚炳永)	142
10.1 青霉素类	142
10.2 头孢菌素类	145
10.3 四环素类	151
10.4 大环内酯类	156
10.5 多烯大环内酯类	159
10.6 多肽类	163
10.7 氨基糖甙类	165
10.8 其他抗生素	167
 11 光学异构体的拆分 (徐修容)	 177
11.1 引言	177
11.2 分离方法	177
11.3 实验技术	187
11.4 结束语	188
 12 药物分配系数的测定 (徐珩、徐修容)	 189
12.1 引言	189
12.2 基本原理	189
12.3 实验方法	190
 13 化学衍生法 (徐修容)	 198
13.1 引言	198
13.2 柱前衍生	198
13.3 柱后衍生	202
13.4 化学衍生法在药物分析和药物研究中的应用	205
13.5 实验技术	206
13.6 结束语	207

1 原 理

上 篇

1.1 色谱分离和保留值

色谱法就是利用不同的物质在二个相, 其中一个固定不动的固定相和一个流动着的移动相之间, 具有不同的平衡分配系数来进行分离的方法。液相色谱是指移动相是液体的这类色谱法的总称。高效液相色谱(HPLC) 是一种在经典液相色谱基础上发展起来的新型柱色谱。根据固定相的不同, 高效液相色谱还可以分为吸附色谱、键合相色谱、离子交换色谱、离子对色谱和凝胶排斥色谱。

在高效液相色谱中, 当试样混合物以一定量进入层析柱后, 即被移动相带入柱内, 并在固定相和移动相之间不断进行分配平衡。不同的化合物由于他们之间理化性质的差异, 在两相中存在量也各不相同。固定相中存在量多的化合物, 冲洗出柱所需的移动相容积就较多, 移动相中存在量较多的化合物, 冲洗出柱所需的移动相容积就较少, 这称为色谱的保留作用。化合物在分配平衡时, 两相中存在量的比值称为容量因子 k' 。

$$k' = \frac{\text{化合物在固定相中的量}}{\text{化合物在移动相中的量}} = \frac{M_s}{M_m} \quad \text{式(1-1)}$$

如果化合物在固定相中的量等于零, 即全部存在在移动相中, 此化合物的 $k' = 0$, 即称为在该色谱条件下的非保留物质。

由层析柱分离后流出的组分, 当在一定量的情况下, 浓度随移动相容积之间的变化是一个高斯分布曲线, 此即色谱流出曲线, 曲线的峰形称为色谱峰, 由整个色谱分离过程所得的色谱流出曲线称为色谱图 (1-1)。在色谱图中, 相当于各色谱峰最大值的位置所流出的移动相容积称为保留容积 V_R , 它是层析柱移动相容积 V_m (又称非保留容积或死容积) 与耗费于冲洗该化合物所需移动相容积 V_o 之和。 V_o 又称校正后保留容积, 它与 k' 的关系为

$$V_R = V_m + V_o = V_m + K V_s = V_m + k' V_m \quad \text{式(1-2)}$$

$$K = \frac{\text{试样在固定相中的浓度}}{\text{试样在移动相中的浓度}} = \frac{[X]_s}{[X]_m} \quad \text{式(1-3)}$$

其中 K 为分配系数, V_s 为固定相容积。如果某化合物的 k' 为 2, 即平衡时物质在固定相中的量为在移动相中的二倍, 则耗费于将化合物自固定相中冲洗出柱的移动

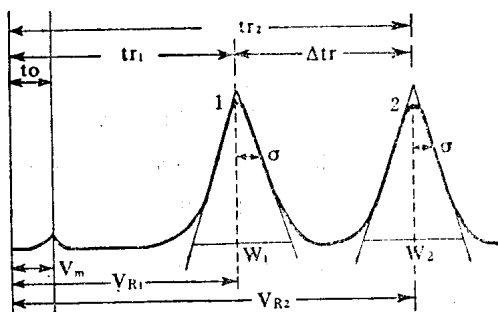


图 1-1 色谱流出曲线——色谱图

相容积为层析柱内移动相容积 V_m 的二倍。由以上各式可得色谱分离的基本方程式(1-4)。

$$V_R = V_m + k'V_m = V_m(1 + k') \quad \text{式(1-4)}$$

在液相色谱中,液体在一定的压力下($<300\text{kg/cm}^2$)可认为是不可压缩的。因此,在流量 F 恒定和层析柱内径均一的情况下,保留容积与流过层析柱的时间成正比。式(1-4)可写成

$$t_r = t_0(1 + k') \quad \text{式(1-5)}$$

其中 t_r 为该化合物的保留时间,相当于在色谱流出曲线上所对应的色谱峰最大值的时间。 t_0 称为非保留时间或死时间。由式(1-5), k' 可写成

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} = \frac{t'_r}{t_0} \quad \text{式(1-6)}$$

t'_r 为校正保留时间,为将保留物质冲洗出柱所需的净时间。 t_0 在实际工作中是一个常用的参数,一般采用与移动相相似的溶剂或找寻一个 k' 接近于零的物质来测定 t_0 值。

由于用流量 F (ml/分)来表示移动相的速度与层析柱的内径大小有关,所以也常用线性流速 U (mm/秒)来表示。它与柱长 L (mm)、非保留时间 t_0 有以下关系。

$$U = \frac{L}{t_0} \quad \text{式(1-7)}$$

1.2 分离度及影响因素

在色谱法中,二个组分分离得好坏常以分离度 R_s (也称分辨率 Resolution)来表示

$$R_s = \frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{\frac{W_2 + W_1}{2}} \quad \text{式(1-8)}$$

上式中, t_{r_1} 、 t_{r_2} 分别为二组分的保留时间, W_1 、 W_2 分别为二色谱峰的底宽。分子($t_{r_2} - t_{r_1}$)与固定相和移动相对试样的选择性(热力学特性)有关;而分母(二峰的底宽和之半)则反映了色谱分离的动力学特性。二色谱峰的保留时间相差越大或峰底宽和之半越小(峰越狭),则 R_s 越大,分离得越好。把色谱峰作为高斯分布曲线来看,在二峰峰高相等时, $R_s = 1, \frac{1}{2}(W_1 + W_2) = 4\sigma$, 二组分可达 98% 分离; $R_s = 1.25$, 分离可达 99.2%; 而 $R_s = 0.6$ 时, 则只有 86% 分离开, 二峰部分重叠图(1-2)。

由式(1-8), 分离度 R_s 与色谱分离中各主要参数 k' , 理论塔板数 N 和分离系数 α 有以下关系。

$$\text{设 } W_1 = W_2, \quad R_s = \frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{W_2}$$

$$\text{又, } N = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2, \quad \text{代入, } R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{t_{r_1}} \right)$$

$$\therefore k'_2 = \frac{t_{r_2} - t_0}{t_0}, \quad \therefore \text{可得}$$

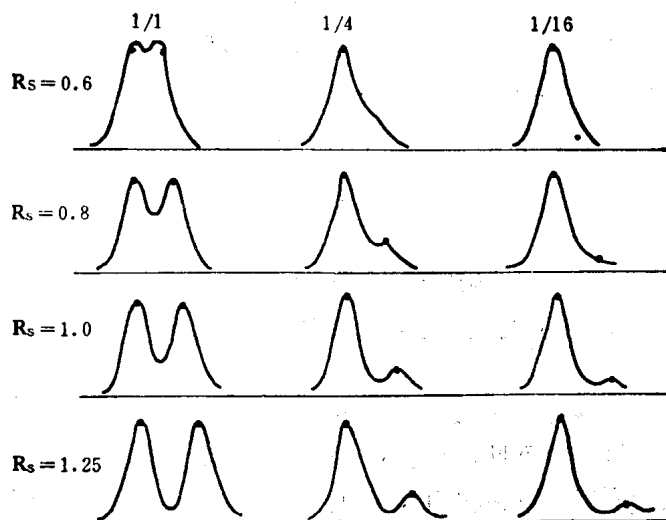


图 1-2 不同峰宽对分离度的影响

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{t_{r1} - t_0} \cdot \frac{t_{r2} - t_0}{t_0} \cdot \frac{1}{1 + k'_2} \right) = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{t_{r1} - t_0} \cdot \frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

$$\because \alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}},$$

$$\therefore R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \quad \text{式(1-9)}$$

提高分离度可以通过改变 α 、 k' 、 N 三个参数来实现。

1.2.1 容量因子 k'

在给定的层析柱固定相、移动相(冲洗液)、柱温和上样量不超负的情况下, k' 是常数,它是与试样的理化性质有关的热力学参数。在完全相同的实验条件下,用已知化合物做对照,如具有完全相同的 k' , 应可作为鉴别该物质的一个参数依据。

由图 1-3 见,增加 k' 可以提高分离度,但当 $k' > 5$ 以上,它对 R_s 的影响就越来减小。 k' 增加就延长分离时间,由于存在“一般色谱现象”,色谱峰形变坦,影响

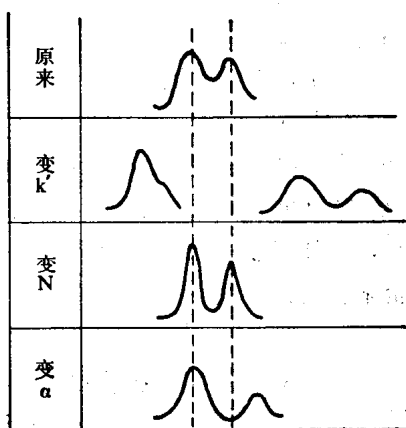


图 1-3 影响分离度的因素

检出灵敏度。因此, k' 改变的有效范围以 $1 < k' < 5$ 为宜。 k' 的改变可以通过调节移动相的极性来实现, 对正相色谱来讲, 移动相极性增加, k' 减小; 反相色谱则相反, 移动相极性增大 k' 增大。

1.2.2 分离系数 α

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{r_2}}{t'_{r_1}} \quad \text{式(1-10)}$$

α 代表了二个物质在相同的色谱条件下的分离选择性。物质的化学性质或结构上的差异, 反映在与固定相和移动相之间作用力也有所差异, 这就是色谱分离的基础。

改变 α 是改变后一组分相对于前一组分的保留时间。 α 可使 R_s 有较大的变化, 由式(1-9)可见, α 越小, 增加 α 对 R_s 产生的影响就越大。 α 的改变可以选择不同的固定相或移动相来实现。但改变固定相在液相色谱中比较麻烦, 如在一个色谱系统中用二根不同固定相的柱子, 则又必须考虑到移动相的适应性。比较行之有效的办法是改变移动相的极性, 如采用连续改变移动相极性的梯度淋洗或温度程序、流量程序等方法来提高分离选择性。

1.2.3 理论塔板数 N

理论塔板数 N 是反映物质在固定相和移动相中动力学特性的重要色谱参数, 它是代表层析柱分离效能的指标。理论塔板数可由下式计算。

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma} \right)^2 \quad \text{式(1-11)}$$

由峰底宽 $W = 4\sigma$, 上式可写成

$$N = \left(\frac{t_r}{W/4} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad \text{式(1-12)}$$

也可采用峰半宽 $W_{1/2}$ 来计算 N

$$\therefore W_{1/2} = 2 \times 1.177 \times \sigma \quad \text{式(1-13)}$$

$$\therefore N = 5.54 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{式(1-14)}$$

由式(1-12)可见, 在给定的色谱柱和实验条件下, 当 N 保持不变, t_r 越大, 色谱峰也越宽, 这就是“一般色谱现象”。

增加 N 来提高分离度, 就是使色谱峰变狭, 从而将二个相邻的峰分开。由表 1-1 可见, N 增加一倍, R_s 只提高 0.4 倍。 α 越小, 达到给定的 R_s 所需要的 N 数越大, 随着 α 的减少这种趋向越厉害。由此也可说明, 适当增加 α (如用梯度淋洗) 可降低所要求的 N (减少柱长), 并可加快分离速度, 如要求 $R_s = 1.0$, α 从 1.01 增加到 1.10, 则 N 从 163,000 减少到 1940。 N 的增加, 一种办法是增加柱长, 但这样分离时间便延长, 柱压升高。而通过提高柱填料的层析效能 (如减小填料粒度) 和装填的均匀致密来提高 N 则更为有效, 这也是 HPLC 与经典的液相柱色谱主要区别之处。

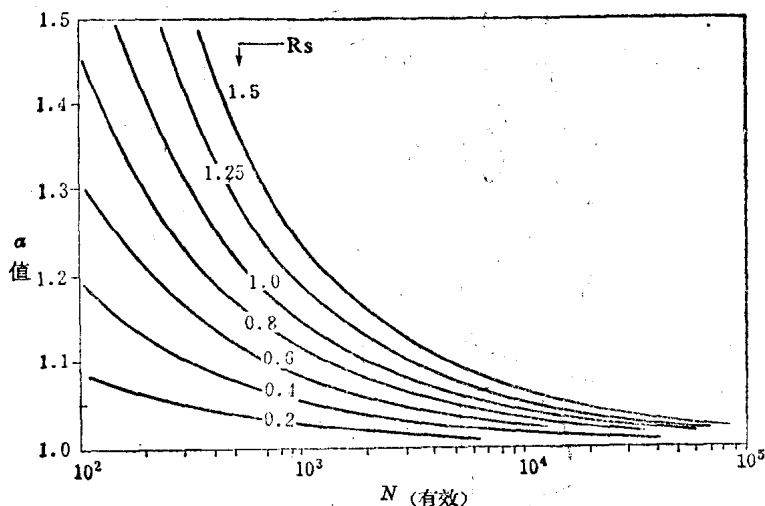
理论塔板数往往不能真实反映层析柱的分离效能, 因为 N 是以 t_r 来计算的。如果移动相经过层析柱的非保留时间 t_0 越大 (柱透过性差), t_r 与 t'_r 相差也越大。为了使得能真实地反映柱的分离效能, 应以 t'_r 来计算柱效。

表 1-1 理论板数、分离度与 α 的关系

α \ R_s	0.8	1.0	1.25	1.5
1.01	104000	163000	255000	367000
1.02	26600	41600	64900	93600
1.03	12100	18900	29500	42500
1.05	4600	7060	11000	15900
1.07	2390	3740	5840	8420
1.10	1240	1940	3020	4360
1.15	602	941	1470	2120
1.20	369	576	899	1300
1.30	193	301	469	677

$$N_{\text{有效}} = 16 \left(\frac{t'_r}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \cdot \left(\frac{t'_r}{t_r} \right)^2 = N \cdot \left(\frac{k'}{1+k'} \right)^2 \quad \text{式(1-15)}$$

$N_{\text{有效}}$ 称为有效塔板数。上式中 t_0 越小, t'_r 越接近 t_r , $N_{\text{有效}} \approx N$ 。同样, 如果 k' 越大, t_0 所起的影响也越小。有关 R_s 、 α 与 $N_{\text{有效}}$ 的关系可用图 1-4 来表示。

图 1-4 R_s 、 α 与 $N_{\text{有效}}$ 的关系

由图 1-4 可见, 当要求较大的 R_s 时, $N_{\text{有效}}$ 随 α 的减小而急剧增加, 如 $R_s = 1.5$ 时, $\alpha = 1.4$ 需要 $N_{\text{有效}} = 400$, 而 $\alpha = 1.1$ 时则 $N_{\text{有效}}$ 要增加 10 倍以上。

应用塔板数来表示柱效必须说明柱长多少, 为此, 可用理论塔板高度 H (简称板高) 来表示柱效。

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{式(1-16)}$$

如 250mm 长的层析柱有 10,000 塔板, 板高 H 等于 0.025mm。与有效塔板数 $N_{\text{有效}}$ 相对应的板高称为有效板高 $H_{\text{有效}}$ 。

1.3 色谱峰展宽和柱效

色谱峰展宽就是指由于柱内外各种因素引起色谱峰变宽或变形, 从而造成色

谱柱效的降低。引起色谱峰展宽的因素很多,如总的峰展宽用均方差 $\sigma_{\text{总}}^2$ 来表示,则等于下列各因素引起峰展宽的均方差的总和。

$$\sigma_{\text{总}}^2 = \sigma_{\text{柱内}}^2 + \sigma_{\text{检测器}}^2 + \sigma_{\text{接管}}^2 + \sigma_{\text{进样}}^2 + \sigma_{\text{其他}}^2 \quad \text{式(1-17)}$$

也可将上述各因素归成柱内和柱外二类。

1.3.1 柱内展宽

层析柱内峰展宽引起柱效 H 变化的因素有:

1. 涡流扩散

$$H_e = 2\lambda d_p \quad \text{式(1-18a)}$$

柱内填料如果大小不均匀,装填不紧密,相互间空隙不均一,液体流过时,就会由于流速不同而形成涡流扩散(图1-5-a)使峰展宽。由这种展宽引起柱效 H 的变化与填料的平均粒度 $\bar{d}_p$ 和代表装填均匀度 λ (包括粒度分布范围,装填性能等)成正比。填料粒度越小,粒度范围越狭,装填得越均匀致密,涡流扩散的影响也越小。

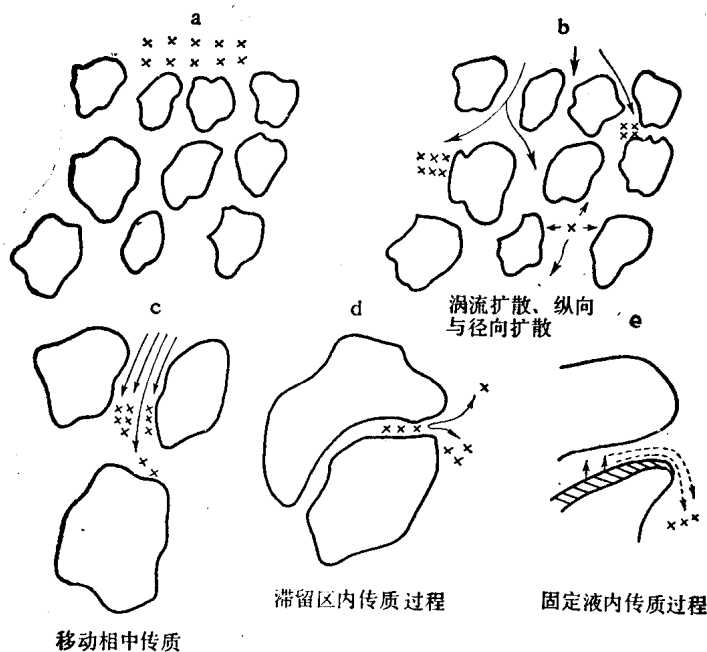


图 1-5 影响柱内峰展宽的因素

2. 纵向扩散

$$H_d = \frac{C_d D_m}{u} \quad \text{式(1-18b)}$$

当试样分子在层析柱内被移动相带向前时,由分子本身运动所引起的轴向(即纵向)扩散也会引起峰展宽。纵向扩散与分子在移动相中的扩散系数 D_m 成正比,与移动相的线速 u 成反比, C_d 是常数。由于分子在液体中的扩散系数比在气体中要小 4~5 个数量级,当移动相线速较大时($>10\text{mm/秒}$),由分子纵向扩散所引起的影响可忽略不计。

3. 传质速率

试样分子被移动相带着经过层析柱内固定相时,分子不断地由移动相进入固定相(如吸附色谱中的吸附过程),同时又从固定相不断地进入到移动相(如脱附过

程),如果传质速率很快,移动相的流速又较慢,试样上移动相和固定相中达到平衡时其浓度应与界面对称(图1-6)。但实际上分子在液体中的扩散系数较小,它的传质速率是有限的,而移动相也有相当的流速,因此不可能得到真正的平衡状态,这样就造成了峰的展宽。传质速率包括以下三项:

(1) 试样分子在移动相中的传质过程(图1-5-c)。

当移动相流过固定相时,靠近固定相表面的流速要比流路通道中间的慢,亦即靠近固定相表面的试样分子扩散所经过的距离比中间的要短些。这种影响引起板高的变化与线速 u 、填料粒度 d_p 的平方成正比,与试样分子在该移动相中的扩散系数 D_m 成反比, C_m 为常数

$$H_m = \frac{C_m d_p^2 u}{D_m} \quad \text{式(1-18c)}$$

(2) 试样分子在固定相孔内滞留的移动相中的传质过程图(图1-5-d)。

在固定相的微孔内的移动相称为滞留区移动相,一般是不移动的。液流中的试样分子要与固定相进行质量交换,必须先自移动相扩散进入到此滞留区。如果固定相的微孔越小越深,传质速率就越慢,峰展宽的影响也越大。这种影响在整个传质过程中是起主要作用的。固定相的粒度越小,它的微粒孔径越大,传质途径也越短,传质速率就越高。 C_{sm} 是与 k' 有关的常数。

$$H_{sm} = \frac{C_{sm} d_p^2 u}{D_m} \quad \text{式(1-18d)}$$

(3) 固定相(液)内的传质过程图1-5-e

这种过程主要发生在液-液分配色谱。试样分子从固定相滞留区进入到涂渍在担体表面的固定液内进行质量交换,它的传质速率是取决于固定液的液膜厚度 d_f 和试样分子在固定液内的扩散系数 D_s ,式中 C_s 是与 k' 有关的常数。

$$H_s = \frac{C_s d_f^2 u}{D_s} \quad \text{式(1-18e)}$$

综上所述,由柱内峰展宽所引起的板高变化可归结为

$$H = 2\lambda d_p + \frac{C_d D_m}{u} + \frac{C_m d_p^2 u}{D_m} + \frac{C_{sm} d_p^2 u}{D_m} + \frac{C_s d_f^2 u}{D_s} \quad \text{式(1-19)}$$

上式称为板高方程,是液相色谱中基本方程式之一。上式也可简写成

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad \text{式(1-20)}$$

将式(1-20)中的 H 与 u 作图,可得图1-7的曲线,称为板高-流速曲线。

根据以上讨论,要想减少柱内峰展宽,必须提高柱内填料装填的均匀性和减小填料粒径以加快传质速率。HPLC 的产生主要是由这些理论基础的指导,首先于1969年研制出了薄壳型填料。由于蒙覆在 $\sim 40\mu\text{m}$ 直径的玻璃珠表面 $1\sim 2\mu\text{m}$ 厚的多孔硅胶具有大的孔径和浅的孔道,传质速率大大提高,而大小均一的球形又为柱

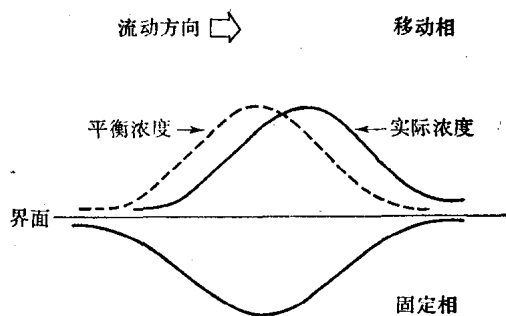


图1-6 移动相与固定相的平衡

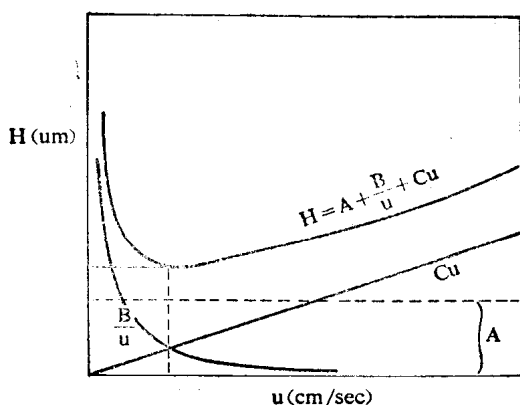


图 1-7 $H-u$ 曲线

$5\mu\text{m}$ 的填料可以达到每米 5 万以上的柱效, H 变小, 如图 1-8。这种填料目前已得到普遍应用。

除以上各项外, 柱内展宽因素尚有柱内径向扩散和管壁效应所引起的展宽因素。

当层析柱内移动相流速较慢时, 试样分子被移动相带着向前移动, 除了上述与流动方向相反的纵向扩散外, 还必须考虑分子的径向扩散。径向扩散的大小与分子移动的距离(即柱长)、填料粒度和移动相流速有关。当分子在移动过程中, 如管径不够大, 则将扩散到管壁区。管壁区移动相的流速比柱管中心要快, 这样就发生了峰的展宽。Knox 等^[1]根据实验结果提出以下半经验公式,

$$\frac{d_o^2}{L d_p} \geq 16 \left(\frac{2}{v} + 0.15 \right) \quad \text{式(1-21)}$$

式中 v 为折合流速, 等于 $\frac{u \cdot d_p}{D_m}$ 。如管径 d_o 与粒径 d_p 、柱长 L 之间满足上式, 试样分子在整个色谱过程中就不会径向扩散到管壁区, 达到了“无限直径”。例如 250mm 长的层析柱, 填料粒径 $5\mu\text{m}$, $v=3$, 则 $d_o \approx 4.5\text{mm}$ 。

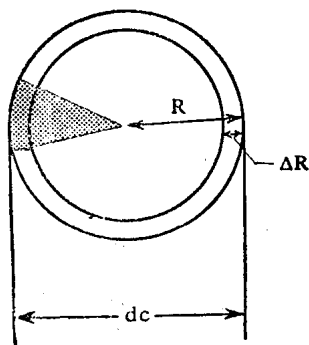


图 1-9 管壁区

内装填创造了良好的条件。由图(1-8)中薄壳型填料所得的 $H-u$ 曲线, 加大流速对柱效的影响较小就可以说明这一点。因而可以用作快速分析。由于填料的粒径较大, 曲线的最小点移向线速较小处。

由式 (1-19), H 近似地与 d_p^2 成正比, 因此减小粒径是提高柱效最有利的途径。早期由于装柱技术的困难, $<10\mu\text{m}$ 的填料没有得到实际应用, 1973 年开始, 装柱技术有了突破, 采用湿法匀浆高压装柱,

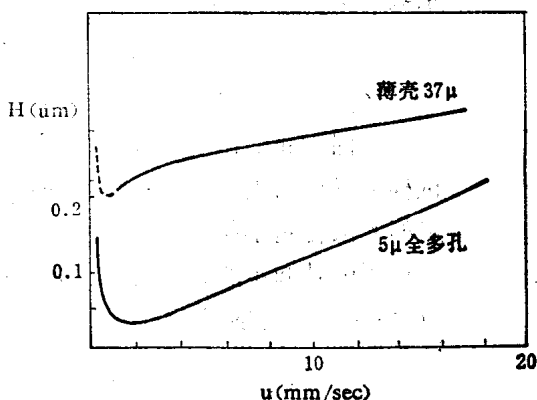


图 1-8 不同类型填料的 $H-u$ 曲线

关于管壁区的大小, Knox 等^[2]认为是填料粒度的 30 倍左右。由他们的实验结果, $d_p \approx 20\mu\text{m}$, $d_o = 2.5\text{mm}$, 管壁区的径宽为 $\Delta R = 0.6\text{mm}$, 其体积占柱的总体积 42%; 如 d_p 为 $5\mu\text{m}$, $d_o = 5\text{mm}$, $\Delta R = 0.15\text{mm}$, 管壁区体积占 12%(图 1-9)。

1.3.2 柱外展宽

柱外展宽又叫柱外效应(Extra-Column Effect),是指由层析柱外各种因素所引起的峰展宽。柱外峰展宽可以分为柱前和柱后两种,柱前展宽主要是由进样所引起;柱后展宽是由接管、流动池体积及检测器的响应时间等引起。过去因为色谱柱柱效不是很高,柱外展宽的影响不突出。自从高效层析柱问世以后,柱外展宽的影响也上升为很重要的因素,必须加以考虑。

液相色谱中的进样大都采用二类方式,一种是阀门进样,将试样由移动相液流带入柱内;另一种是注射进样,或者将试样注入到液流中(On Stream),或者将试样注入到填料顶端(On Column)。由于进样器内的死体积,以及进样时液体扰动所引起的扩散,使得试样在填料顶端以截面方式进入固定相,从而造成色谱峰展宽和不对称。近年来,不同的工作者对进样所造成峰展宽的影响进行了研究并指出^[3],如果将试样直接注入到

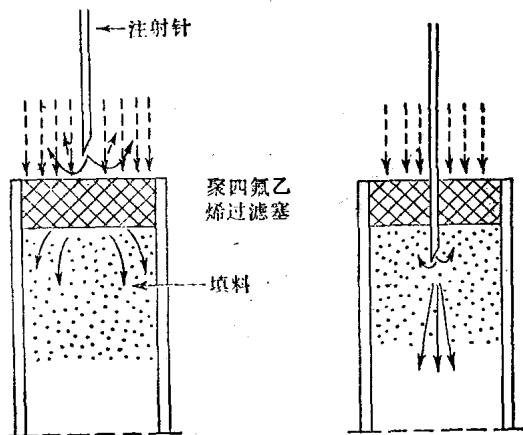
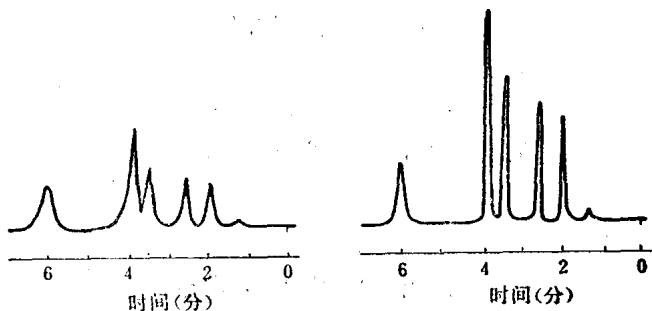


图 1-10 进样方式对峰展宽的影响

色谱柱填料顶端上的中心点,或填料顶端中心之内1~2mm处,将可减少试样在柱前的扩散,峰的不对称性得到改善,柱效显著提高^[4](图 1-10)。

克服柱后展宽主要是减少接管和检测器流动池容积,有关这些问题将在检测器一章内加以讨论。

1.4 色谱柱效能的评价

色谱柱是整个色谱系统的核心部分,它的质量优劣直接影响分离效果。目前色谱柱的总效能评价都从色谱动力学的角度来考虑。

作为高效色谱柱必须具备的条件是高的塔板数(高效),短的冲洗时间(高速),经济的柱压降 Δp (低压)。Knox 等以下列三个参数作为评价色谱柱效能的指标^[5]。

$$\text{折合板高 } h = H/d_p$$

$$\text{式(1-22)}$$