

21 世纪复旦大学研究生教学用书

现代色谱分析

张祥民 编著

复旦大学出版社

内 容 简 介

本书从色谱的基本理论——色谱过程动力学和色谱过程热力学的基本模型和理论关系,到色谱分析的基本保留现象与规律进行了阐述;而后系统分析介绍了色谱的基本分离模式,从气相色谱分离模式、液相色谱分离模式,到毛细管电泳各个分离模式等进行了系统阐释。本书还对色谱柱、检测器等新技术进行了总结分析;介绍了多维色谱新技术及其应用。

本书主要用于研究生教材,也适合作为科研人员与从事色谱分析测试工作的科学工作者的参考书。

编辑出版说明

21 世纪,随着科学技术的突飞猛进和知识经济的迅速发展,世界将发生深刻变化,国际间的竞争日趋激烈,高层次人才的教育正面临空前的发展机遇与巨大挑战。

研究生教育是教育结构中最高层次的教育,肩负着为国家现代化建设培养高素质、高层次创造性人才的重任,是我国增强综合国力、增强国际竞争力的重要支撑。为了提高研究生的培养质量和研究生教学的整体水平,必须加强研究生的教材建设,更新教学内容,把创新能力和创新精神的培养放到突出位置上,必须建立适应新的教学和科研要求的有复旦特色的研究生教学用书。“21 世纪复旦大学研究生教学用书”正是为适应这一新形势而编辑出版的。

“21 世纪复旦大学研究生教学用书”分文科、理科和医科三大类,主要出版硕士研究生学位基础课和学位专业课的教材,同时酌情出版一些使用面广、质量较高的选修课及博士研究生学位基础课教材。这些教材除可作为相关学科的研究生教学用书外,还可供有关学者和人员参考。

收入“21 世纪复旦大学研究生教学用书”的教材,大都是作者在编写成讲义后,经过多年教学实践、反复修改后才定稿的。这些作者大都治学严谨,教学实践经验丰富,教学效果也比较显著。由于我们对编辑工作尚缺乏经验,不足之处,敬请读者指正,以便我们在将来再版时加以更正和提高。

复旦大学研究生院

分析化学丛书

主编 杨芃原 乔登江
编委 邱德仁 张祥民 孔继烈
朱守正 黄庭国 张文莉

书目与作者

《蛋白质组学研究技术和方法》，杨芃原

《感耦等离子体光谱化学》，杨芃原

《原子光谱分析》，邱德仁

《工业分析化学》，邱德仁等

《现代色谱分析》，张祥民

《现代电分析化学》，孔继烈

前 言

现代色谱方法与高效毛细管电泳方法已经成为现代科学研究诸多前沿领域中不可或缺的关键技术手段和基本方法学基础,同时也成为现代工业、农业、生命科学、临床、医药、材料、环境等各个领域的常规分析基本手段和方法。

色谱学方法起源于 20 世纪 40 年代, Martin 和 Synge 创立的分配色谱方法及其系统的理论基础。1941 年 Martin 和 Synge 采用含水硅胶和氯仿-乙醇流动相首次分离了乙酰氨基酸,在此基础上提出塔板概念并建立了塔板理论。1951 年 James 和 Martin 创立气液色谱法,在惰性载体上涂渍难挥发的液体作为分离固定相,使得色谱应用范围迅速拓宽,1958 年 Golay 创立了高效毛细管气相色谱方法并建立了相关理论,大大提高了色谱方法的分离效率。六七十年代,高效液相色谱方法的出现进一步奠定了现代色谱理论、方法和仪器的基础,特别是高效填料和键合相高效液相色谱柱子的技术的成熟和广泛应用有力地推动了现代色谱分析方法的普及。1980 年 Jorgenson 等提出了高效毛细管电泳方法,扩展了现代色谱分离的领域和范围,形成了现代色谱分析较完整的体系。

现代色谱分析领域正在迅猛发展,新技术、新方法层出不穷。其应用领域和范围,以及对社会生活的影响之广和对现代科学研究的促进是深远的。通过本书系统论述,概括现代色谱分析的各个方面尚有困难,因此作为研究生的教材和广大从事色谱分析和色谱技术与方法研究的读者的参考书,本书着重从现代色谱的基础理论、色谱方法建立、现代色谱仪器、色谱柱子、以及复杂体系分析的多维色谱等几个方面系统探讨色谱分析中所涉及的一系列核心问题,从而使读者对色谱方法的建立有一个系统、完整的了解,建立明确的现代色谱分析的思路和策略。

全书共分八章,第一章在阐述现代色谱的基本概念的基础上,对色谱分析涉及的塔板理论、扩散理论、速率理论和 Van Deemter 方程等色谱动力学过程进行了系统论述,明确了建立和发展高效色谱方法所必需的色谱动力学概念,同时该部分还对色谱分析所涉及的色谱过程热力学基本概念、色谱保留规律等进行了详细分析,阐明了色谱过程的热力学规律和基础。

第二章对现代色谱与高效毛细管电泳的 14 种基本分离模式逐一进行了系统分析比较,对每个分离模式所涉及的固定相类型、流动相与添加剂类型进行了详细论述、说明,同时列举了数十个典型的分析实例。

基于色谱的基本分离模式,第三章对建立和发展色谱分析方法所涉及的规则和原则进行了系统总结,列举了 20 项 68 条分析方法建立原则。提供了气相色谱和反相液相色谱保留值估算方法,对从气体小分子到蛋白质大分子等各种样品分析方法的建立,提出了完整的思路和顺序优先原则。对正确发展和建立色谱方法具有重要价值。

第四章对气相色谱、液相色谱和毛细管电泳常用的 12 种检测器的检测原理、结构、性能指标以及新技术等进行了系统介绍总结。第五章对现代色谱柱子的制备技术和研究进展进行了系统论述,既包括传统的高效液相色谱制备、气相毛细管色谱柱子的制备,也包括了石英毛细管高效液相色谱柱子制备、整体柱子制备以及气相毛细管 PLOT 柱子的制备等最新研究成果。第六章对现代色谱分析仪器最新发展和研究结果进行了系统介绍。包括便携式气相色谱仪器、色谱采样技术、液相色谱仪器原理、芯片分析仪器等诸多方面。

第七章针对越来越重要的蛋白质生物样品、中药复杂体系样品分析所需要的多维色谱方法,阐述了国际上最新的多维分析新技术、新方法、新仪器。其中,包括了许多本实验室的最新研究成果。

第八章通过大量典型实例所采用的色谱分离模式、柱系统、色谱固定相、流动相与添加剂,采用的检测器等手段对建立正确的完整的色谱分析方法的方方面面进行了针对性说明,既可以对色谱分析方法的建立提供参考,也可以提供验证。

本书中多个章节的内容是作者在中国科学院大连化学物理研究所国家色谱中心和在复旦大学从事色谱学研究以及本人所领导的课题组部分研究工作的总结,其中诸多学术思想是卢佩章院士和张玉奎院士等色谱学领域的前辈所创立的色谱学体系的组成部分。同时复旦大学出版社和复旦大学研究生院对本书的出版给予资助,在此谨表示深深的谢意。

作者 张祥民

2004 年 7 月 9 日

目 录

第一章 色谱理论.....	1
第一节 色谱基本关系.....	1
一、色谱保留值.....	1
二、色谱峰形与理论塔板数.....	3
三、分辨率与峰容量.....	4
第二节 色谱过程动力学基础.....	6
一、色谱动力学基本模型.....	6
二、Van Deemter 方程.....	15
三、色谱柱内谱带的柱末端效应.....	17
第三节 色谱过程热力学.....	20
一、分子间的作用能.....	20
二、气相色谱保留规律.....	28
三、液相色谱保留规律.....	39
参考文献.....	52
第二章 色谱基本分离模式.....	54
第一节 气相色谱.....	54
一、气固吸附色谱.....	54
二、气液分配色谱.....	63
第二节 高效液相色谱.....	68
一、反相液相色谱.....	68
二、正相液相色谱.....	75
三、离子对色谱.....	79
四、离子色谱.....	82
五、体积排阻色谱.....	89
第四节 毛细管电泳.....	92
一、区带电泳.....	93
二、毛细管胶束电动色谱.....	95
三、等电聚焦.....	102

四、凝胶电泳	103
五、等速电泳	108
六、手性毛细管电泳	109
七、毛细管电色谱	113
参考文献	116
 第三章 色谱分析方法发展	121
第一节 色谱分析的优先条件	121
第二节 色谱分离模式和柱系统选择指标	123
第三节 常规色谱不能分离的样品	125
第四节 色谱保留值估算	126
一、气相色谱折合碳数	127
二、反相液相色谱容量因子估算	130
第五节 色谱分离模式、柱系统选择的基本原则	131
一、挥发性、热稳定性样品的分离模式	131
二、非挥发性、热稳定性差的样品分离模式	132
三、样品以定性分析目的为主、兼快速、高分辨分析模式	135
四、其他类样品分离模式	136
五、复杂体系样品多维分离模式	137
参考文献	137
 第四章 色谱检测技术与检测器	138
第一节 检测器的性能指标	138
第二节 气相色谱检测器	140
第三节 液相色谱检测器	146
第四节 电泳检测器	158
第五节 化合物类型与对应的检测器	161
参考文献	162
 第五章 色谱柱制备技术	164
第一节 气相色谱毛细管柱子的制备方法	164
第二节 液相色谱柱子制备方法	170
参考文献	188

第六章 现代色谱仪器新技术	192
第一节 气相色谱仪器及其微型化	192
一、进样技术	193
二、快速色谱技术, 高速升温、柱上加热	196
三、便携式仪器与芯片气相色谱	202
第二节 液相色谱仪器技术	208
一、液相色谱高压输液泵	209
二、微量输液泵	212
第三节 微流控芯片电泳仪器新技术	214
一、微流控芯片与功能集成技术	214
二、阵列毛细管电泳技术	217
第三节 芯片检测技术	219
参考文献	223
第七章 多维色谱分析系统	225
第一节 GC-GC 多维色谱	225
第二节 HPLC-CE 二维分离技术	227
一、LC-CE-LIF 多维分离系统	228
二、LC-CE-UV/MS 多维分离系统	230
第三节 LC-LC 二维液相色谱	239
第四节 芯片电泳多维分离技术	243
参考文献	246
第八章 色谱分析方法应用实例	248
第一节 按化合物类型分类	248
一、无机化合物	248
二、有机化合物	252
第二节 按样品类型分类	265
一、药物: 天然药物, 合成药物	265
二、生物分子	268
三、环境样品	281
四、石油化工	285
五、食品、香料	288
参考文献	291

第一章

色 谱 理 论

第一节 色谱基本关系

色谱是研究解决混合物分离问题的一个科学分支。色谱分离过程涉及诸多物理、化学学科基础问题。因此,探讨色谱学理论首先从色谱过程的热力学和动力学入手,应用多种数学方法和手段建立描述色谱过程的基本模型并对其求解获得色谱的基本保留值参数及其理论关系,同时,通过对实验现象的解释阐明色谱分离过程的机理,总结新的规律,完善色谱理论体系,解决不断出现的复杂体系的组分分离问题,形成现代色谱分离分析方法。为了更好地了解掌握色谱理论和方法,本章从色谱的基本关系出发,简要对色谱学的参数、涉及的基本概念进行阐述。

一、色谱保留值

色谱分离过程必须有足够的保留,混合物在色谱柱中分离成单一组分,依次从色谱柱中流出并取得要求的分离度才能进行定性定量。色谱分离过程中组分的保留与色谱流动相和固定相的两相分子间相互作用力大小有关,即与分配系数成比例关系。在特定的温度和柱子上,组分流出体积是固定不变的,在流动相的流速一定时,组分流出时间一定。因此,色谱的保留值 (retention) 是色谱定性最重要的热力学参数。

色谱保留时间 (retention time) t_r 、流量 (flow rate) F 和保留体积 (retention volume) V_r 有如下关系:

$$V_r = F \cdot t_r \quad (1-1)$$

如果色谱柱死体积 (hold-up volume) 为 V_0 ,死时间 (hold-up time) 为 t_0 ,则色谱过程纯保留体积 (即调整保留体积 adjust retention volume) V'_r 、纯保留时间 (调整保留时间 adjust retention time) t'_r 有:

$$V'_r = V_r - V_0 = F(t_r - t_0) = Ft'_r \quad (1-2)$$

色谱调整保留体积或调整保留时间与柱子死体积或死时间的比值为容量因

子 (capacity factor) k' 。容量因子是一个最重要的色谱热力学参数,其定义为:在分配平衡条件下,固定相中的分子个数与流动相中的分子个数的比值即为容量因子,有时又称为质量分配比 (mass distribution ratio)。

$$k' = \frac{m_s}{m_m} = \frac{V'_r}{V_0} = \frac{t'_r}{t_0} = \frac{V_r - V_0}{V_0} = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1-3)$$

其中, m_s 为固定相中分子个数或质量数, m_m 为流动相中分子数或质量数。因此,上式又有更常见的保留值表示形式:

$$t_r = t_0 (1 + k') \quad (1-4)$$

容量因子与分配系数 (distribution/partition coefficient) k 成正比,与色谱柱的相比 (phase ratio) β 成反比:

$$k' = k/\beta \quad (\beta = V_m/V_s, V_m, V_s \text{ 分别为流动相和固定相占有的体积}) \quad (1-5)$$

色谱分离过程中,常用相对保留值 α' 来描述不同保留值的组分:

$$\alpha' = \frac{t_{r2}}{t_{r1}} = \frac{1 + k'_2}{1 + k'_1} \quad (1-6)$$

然而,两组分容量因子的比值又称为选择性因子 (selectivity factor) α ,

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (1-7)$$

与 α' 比较, α 有不同的意义。选择性因子与相对保留值主要是为了消除流动相流速变化而采用的保留值定性参数,而选择性因子更加准确地描述了对两种溶质的分离程度大小,尤其是在 k' 值比较小的情况下。

对色谱流出组分进行定性的参数还有比保留体积 (proportional retention volume) V_g ,即单位质量的固定相上化合物具有的纯保留体积:

$$V_g = V'_r/g \quad (1-8)$$

式中, g 为固定相质量。在特定固定相上,各个化合物组分有固定的保留值。

Kovats^[1] 提出了保留指数 (retention index) I 定性的概念,采用一系列正构烷烃的保留值作为参照,通过下式计算特定化合物的保留指数:

$$I = 100 \times \left(n + \frac{\log k'_n - \log k'_{n-1}}{\log k'_{n+1} - \log k'_n} \right) = 100 \times \left(n + \frac{\log V'_n - \log V'_{n-1}}{\log V'_{n+1} - \log V'_n} \right) \quad (1-9)$$

式中, k'_n 为含有 n 个碳数的正构烷烃的 k' 值。Kovats 指数消除了色谱过程的流速, 柱子的相比等多种因素影响, 在特定温度下, 特定的固定相柱子上, 化合物的 Kovats 指数是常数。因此, 它被广泛应用于气相色谱定性。Sadler 保留指数手册收集了 2 000 余种化合物在 4 种色谱柱子上的 Kovats 指数数据^[2], 可直接用于气相色谱定性分析。

相对应于 Kovats 指数, 液相色谱有不少人提出类似的保留值方法, 但是测定的液相色谱保留指数均不是一个恒定的值。陈农等^[3]提出了反相液相色谱 a, c 作用指数 (interaction index) 定性的概念, 其中, c 值是仅与流动相体系相关的参数, 如化合物苯在甲醇/水体系的作用指数约为 -2.71 。

二、色谱峰形与理论塔板数

色谱峰形 (peak shape) 指色谱峰的宽度和对称性。色谱峰展宽与色谱过程的传质, 溶质扩散, 柱外效应等多种因素有关, 在色谱过程动力学部分作系统论述。同时, 色谱峰是不对称的, 多数色谱动力学因素会造成色谱峰形拖尾。为了数学上计算方便, 通常将色谱峰看作为高斯分布的对称形状处理, 色谱峰宽与标准偏差 (standard deviation) 有:

$$w_b = 4\sigma \quad (1-10)$$

为了测定更准确, 通常将色谱峰高度一半的宽度作为测量点, 获得半峰宽 $w_{1/2}$, 与峰底宽和偏差有如下关系:

$$w_{1/2} = w_b / 1.699 = 2.355\sigma \quad (1-11)$$

然而, 实际色谱峰是不对称的。不对称的色谱峰形和峰宽的计算有较大偏差。因此, 引入了 EMG (exponential modified Gaussian model) 模型^[4], 其中在标准偏差的基础上, 又引入了拖尾因子 τ 。研究表明^[5], 采用 σ, τ 可以较好地描述大多数情况的色谱峰, 半峰宽又可表示为:

$$w_{1/2} = 0.64\sigma + 0.32\tau \quad (1-12)$$

最准确的色谱峰形描述方法是采用统计矩 (moment) 的方法^[5], 一阶原点矩 μ_1 即为色谱峰流出平均时间, 对于对称峰 $\mu_1 = t_r$, 即等于保留时间, 而拖尾峰则略大于保留时间。二阶中心矩 μ_2 表示色谱流出函数的分散程度, 即峰展宽程度, 它与 σ^2 成正比, 同时也与出峰时间成正比、与柱子长度成反比:

$$\mu_2 = \sigma^2 \cdot \left(\frac{t_r}{L} \right)^2 \quad (1-13)$$

三阶中心矩 μ_3 反映了函数分布的对称性, 表明色谱流出曲线是否对称, $\mu_3 = 0$ 为对称峰, $\mu_3 > 0$ 为拖尾峰, $\mu_3 < 0$ 为前伸峰。

根据矩的性质可以知道,色谱过程中各种影响色谱峰展宽的因素所造成的总的峰展宽,等于各个独立因素对峰宽的贡献之和。因此,进样过程、色谱扩散、传质、柱外效应、检测等环节引起的峰宽变化之和即为系统峰宽总的变化量,以方差为例有:

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \sigma_4^2 + \cdots \quad (1-14)$$

系统的流出峰的方差的平方与柱内流过的柱长成正比,与塔板高度成正比:

$$\sigma^2 = HL \quad (1-15)$$

式中, H 、 L 分别为理论塔板高度和柱长。由此,色谱柱理论塔板数 (theoretical plate number) $n = L/H$, 可通过下式计算:

$$n = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{t_r^2}{\sigma_t^2} \quad (1-16)$$

式中, σ_t 是以时间为单位表示的标准偏差。如果以测量的半峰宽、峰底宽来计算理论塔板数则有:

$$n = \left(\frac{t_r}{\sigma_t} \right)^2 = 16 \times \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 = 5.545 \times \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1-17)$$

同样方法,采用调整保留时间,可以计算有效塔板数 n_{eff} 及有效塔板高度 H_{eff} :

$$n_{\text{eff}} = \left(\frac{t'_r}{\sigma_t} \right)^2 = 16 \times \left(\frac{t'_r}{w_b} \right)^2 = 5.545 \times \left(\frac{t'_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1-18)$$

$$H_{\text{eff}} = L/n_{\text{eff}} \quad (1-19)$$

理论塔板数与有效塔板数之间存在:

$$n_{\text{eff}} = n \cdot \left(\frac{k'}{1+k'} \right)^2 \quad (1-20)$$

当容量因子为 0 时, n_{eff} 也为 0; 当 $k' = \infty$ 时, $n_{\text{eff}} = n$ 。

三、分辨率与峰容量

描述色谱峰之间的分离程度通常采用分辨率 (resolution) R_s , 其定义式为:

$$R_s = 2 \times \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2} \quad (1-21)$$

将 (1-4) 式、(1-7) 式、(1-16) 式代入 (1-21) 式, 则有:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{k'_2 - k'_1}{k'_2 + k'_1} \cdot \sqrt{n} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{n} \quad (1-22)$$

式中,对分辨率直接产生影响的有 3 个参数即 n 、 k' 、 α 。塔板数的平方根与分辨率成正比,较高塔板数的色谱系统,具有高效的分离结果。在 k' 值较小时容量因子 k' 对分辨率的影响较大,如果 $k' = 0$,则 $R_s = 0$,说明被分离的组分一定要有保留。选择性因子 $\alpha > 1$,即两组分保留值有足够的差别,其分离才能实现。因此,分辨率是色谱分离条件选择优化的重要指标。

同样,由于峰底宽测量上的不便和准确性低的原因,定义了峰分离度 K_1 ,其中的峰宽采用半峰宽计算, K_1 是 R_s 的 1.70 倍,则有:

$$K_1 = 2 \cdot \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_{1/2(2)} + w_{1/2(1)}} = 1.70 \cdot R_s \quad (1-23)$$

同时考虑到实际分离情况,在不等高色谱峰分离时,相同的分辨率或分离度,对应的实际分离程度不同。所分离的两峰高差别越大,实际分离程度越小。因此,定义了峰高分离度 $K_3^{[6]}$:

$$K_3 = \frac{c_{\max} - c_V}{c_{\max}} \quad (1-24)$$

式中, $c_{\max}$ 为较小峰的流出曲线最大值, c_V 为两重叠峰的峰谷点值。两个峰完全分离时 $K_3 = 1$,两峰重叠没有峰谷点时,则 $K_3 = 0$ 。因此, K_3 是定量描述实际分离程度的指标,而与 K_1 不同,它不能描述两个完全分离色谱峰之间的距离,也不能描述色谱峰接近完全重叠时的程度。

与分离相关的色谱参数还有峰容量 (peak capacity, C_p)。峰容量是衡量色谱系统分离能力的重要指标,只有足够峰容量的柱系统才可有效解决组分的分离问题。峰容量的概念是将色谱柱中流出正常峰按照色谱峰宽变化,依次紧密排列,所能容纳的色谱峰数目。

根据 Giddings 的方法^[5],一定时间 (长度) 内流出峰的数目可由下式计算:

$$C_p = L/4\sigma \cdot R_s \quad (1-25)$$

式中, L 为时间 (长度) 区间, 4σ 为峰底宽, R_s 为要求的分辨率 (对基线分离的峰通常为 $R_s = 1.5$)。

采用色谱峰的相对保留值、容量因子、分辨率与柱效、峰容量的计算过程为: 第一个峰 $t_r(1) = t_0$, 第二个峰 $t_r(2) = t_0\alpha'$, 第 p 个峰 $t_r(p) = t_0\alpha'^p$ 则有 $\alpha'^p = t_r(p)/t_0 = 1 + k'_p$ 。峰容量 C_p 为:

$$C_p = \ln(1 + k'_p) / \ln \alpha' + 1 = \ln(1 + k'_p) / \ln(1 + 4R_s/\sqrt{n}) + 1 \quad (1-25')$$

图 1-1 为各种塔板数时,峰容量与时间的关系 (其中, $R_s = 1.5$, $u_0 = 30 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)。图中曲线表明,当色谱分析样品中峰较少时,采用短柱子 (峰容量较少),可以获得快

速分析 当样品峰较多时,采用长柱子 (即峰容量大的柱子), 可以获得相对快的分析结果。

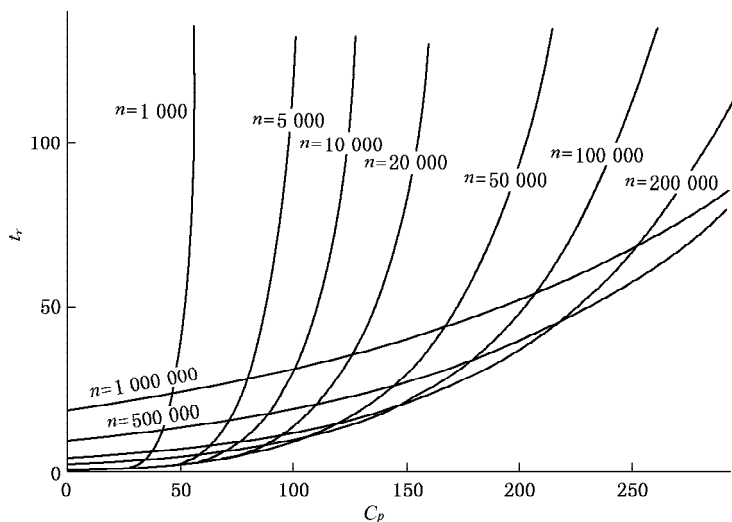


图 1-1 当 $R_s = 1.5$, $u = 30 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, $N = 3\,000 \text{ 塔板} \cdot \text{m}^{-1}$ 时, 峰容量与保留时间的关系 (1-25') 式的曲线^[6]

第二节 色谱过程动力学基础

一、色谱动力学基本模型

1. 塔板理论

塔板理论是 Martin 和 Synge^[7] 于 1941 年提出的,是为了解释色谱分离过程,采用与蒸馏塔类比的方法得到的半经验理论。塔板理论虽然有许多局限性,比如,色谱柱中并不存在塔板,其数量随操作条件和分离物质的性质而有所变化,但是其形象的概念沿用至今仍然无法替代。塔板理论采用了概率论方法,在 7 点基本假设的基础上建立起来的。塔板理论的基本假设包括:溶质在色谱柱中分配达成一次平衡需要一定柱长,这一长度即为一个塔板高度 H ;如果色谱柱长为 L ,柱子总的理论塔板数为 $n = L/H$;同时,塔板理论在数学处理过程中,认为样品分子不是连续流过柱子,而是在塔板间跳跃式前进的,跳动的总次数为 r , $r = V/Hq\kappa$ (V 是流出体积, q 是柱截面积, κ 流动相占有的横截面积分数),其中 n 次跳动在流动相中, $(r - n)$ 次跳动在固定相中;样品全部加在第 0 块塔板上;流动相不可压缩;物质在两相间分配等温线是线性的,即其分配系数为常数 k 。由此得到的样品分子在 n 号塔板上的浓度为:

$$c(r, n) = c_0 k'^n r^{-n} / [(1+k')^r (r-n)!] \quad (1-26)$$

式中, c_0 为进样浓度。(1-26) 式为一离散的二项式分布函数, 使用起来很不方便, 故将其通过 Taylor 级数在其极大值处展开, 从而转换成连续函数形式^[6] :

$$c(V) = c_0 \exp \left\{ \frac{n}{2} \cdot \frac{V_r}{V_0} \left[- \sum_{i=0}^{\infty} \left(\frac{(V_r/V_r')^{2i+1} - 1}{(i+1)(2i+1)} \left(\frac{V}{V_r} - 1 \right)^{2i+2} \right) + \sum_{i=0}^{\infty} \left(\frac{(V_r/V_r')^{2i+2} - 1}{(i+1)(2i+3)} \left(\frac{V}{V_r} - 1 \right)^{2i+3} \right) \right] \right\} \quad (1-27)$$

可以证明, (1-27) 式为一个拖尾形的不对称流出曲线。为计算方便, 取其前三项, 即 $i = 0 \sim 2$, 得到 :

$$c = \frac{m}{b\sqrt{\pi}} e^{-\Delta V^2/b^2} = c_{\max} e^{-\Delta V^2/b^2} \quad (1-28)$$

式中, $b = [2HLq^2\kappa^2k'(1+k')]^{\frac{1}{2}}$, $\Delta V = V - V_r$ 。如果将 (1-28) 式中 $\Delta V = (1+k')q\kappa\Delta x$, $k'(1+k') \approx (1+k')^2$ 代入得 :

$$c = c_{\max} \exp \left\{ - \frac{\Delta x^2}{2HL} \right\} \quad (1-29)$$

与正态分布曲线 :

$$p(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp \left\{ - \frac{\Delta x^2}{2\sigma^2} \right\} \quad (1-30)$$

(1-30) 式相比, 则有 : $HL = \sigma^2$, 即 (1-15) 式。溶质在柱内的区带半宽度 $\Delta x_{1/2}$ 有 :

$$\Delta x_{1/2} = \sqrt{2\ln 2} \cdot \sigma = \sqrt{2\ln 2} \cdot \sqrt{HL} \quad (1-31)$$

通过对塔板理论的分析, 可以得到色谱方法中一系列最基本的概念。由 (1-28) 式可知, 进样量 m 越大, $c_{\max}$ 越大, 两者在固定的分离条件下成正比关系, 是色谱峰定量的理论根据 ; 同时, 由于 b 值中包含 H 、 L 、 q^2 、 κ^2 、 k' 等参数, 当塔板高度 H 越小, 即柱效越高时 $c_{\max}/m$ 越大, 这意味着单位数量的样品产生的浓度越大, 稀释比越小 ; 同理, 色谱柱越短, 样品浓度比越大 ; 色谱柱越细 (q 小) 填充紧密 (κ 小) 时, 样品稀释比越小 ; 保留值越大的组分 (k' 大), 其浓度比越小或稀释比越大, 采用程序升温, 或梯度洗脱可有效减小 k' 值, 提高流出组分的浓度, 降低稀释比, 提高信噪比和检测灵敏度。

对 (1-26) 式和 (1-27) 式进行三阶矩分析可以证明, 塔板理论得到的流出曲线是拖尾的, 即 $\mu_3 > 0$ 。事实表明色谱峰是不对称的, 塔板理论所得到的基本动力学模型与实际色谱流出峰一致。然而, 塔板理论在经过 Taylor 级数展开后为计算方便, 仅取无穷级数的前 3 项获得了近似流出曲线, 即 (1-28) 式的正态分布

曲线。这一近似造成了对色谱峰形对称性认识的概念差别,希望加以正确区分。

由 (1-29) 式和 (1-30) 式对比可引申出塔板高度在概率统计理论中性质。根据概率论,有限个独立随机变量和的方差,等于这些变量方差的和。因此,塔板高度 H 值是由影响塔板高度的各个独立因素对塔板高度的贡献值之和:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \sum \frac{\sigma_i^2}{L} = \sum H_i \quad (1-32)$$

通过分别对影响塔板高度的各个因素的研究,可以全面了解、认识、描述色谱动力学过程的塔板高度变化的本质,从而为建立高效色谱分离方法打下基础。

塔板理论另一个重要概念是色谱峰流出时的柱末端效应。柱末端效应是色谱峰形变化规律的基本着眼点,是峰形预测计算的基础,将在后面作专门讨论。

2. 扩散理论

塔板理论获得了一系列色谱的基本参数和基本概念的明确定义,但是,塔板理论却不能解释是什么动力学因素造成了色谱峰的展宽。因此,称塔板理论为半经验的理论。

分子扩散是非常普遍的现象,当一滴墨水掉入一杯水中,可观察到墨水的由高浓度向低浓度扩散的过程。随着时间的推移,浓度梯度减小,扩散速度变慢,直至达到完全均一浓度。这一过程是完全自发进行的。根据 Fick 定律^[1]:

$$\frac{dm}{dt} = -D \frac{dc}{dx} \quad (1-33)$$

单位面积上,物质的扩散速率 dm/dt 与该物质的扩散系数 D 成正比,并与该物质的浓度梯度成正比。(1-33) 式中的负号为扩散方向与浓度梯度的方向相反。不同分子在其所处的不同黏度和密度的介质中有不同的扩散系数。在相同的介质中,越小的分子具有越大的扩散系数;在不同的介质中如气体和液体中,分子扩散速度相差巨大。在气体中由于分子间相互作用微弱、气体密度小,因此分子扩散速度主要与分子的质量、碰撞半径、气体密度等参数有关。在液体中,主要与液体的黏度和分子间相互作用有关。

根据 Amundson 等人^[1]认为,色谱峰宽主要的产生原因是流动方向的扩散,即纵向扩散。为了获得纵向扩散对色谱动力学过程理论描述,通过物质在两相间的传递和质量平衡建立了其基本模型。图 1-2 为描述该动力学过程的物料平衡的示意图。其中,将研究的着眼点放在长度为 dx 的一小段色谱柱内,经过 dt 时间,由流动相流动进入 dx 段的物质质量为 $cuq\kappa dt$,同时由 Fick 定律, dt 时间扩散到 dx 段的物质质量为 $-q\kappa D_{\text{纵}} (\partial c / \partial x) dt$,因此, dt 时间进入 dx 段的物质量为: