

第一章 绪论

色谱是现代分离分析的一个重要方法，也是一门新兴学科，近30年来，色谱学各分支学科，如气相色谱、液相色谱、薄层色谱、凝胶渗透色谱和纸色谱等都得到深入的研究，并广泛地用于许多领域，如石油化工、有机合成、生理生化、医药卫生，乃至空间探索等，无不运用色谱技术以解决各种分析分离问题。各种与色谱有关的联用技术的出现，比如色谱-质谱联用和色谱-红外光谱联用等开辟了复杂混合物分析检测的新天地。新的色谱方法，例如毛细管电泳、毛细管电色谱、分子生物色谱、超临界流体色谱等不断涌现。作为一种简单而有效的技术，色谱还渗入到催化机理、吸附动力学、化学反应动力学、溶液理论研究等方面，揭示了物理化学领域内的某些基本现象和规律的微小差异，色谱法已经成为人们认识客观世界必不可少的分析工具，同时也已成为生物活性物质分离纯化的最重要手段之一。色谱学在不断丰富、提高、发展的实践过程中，已经形成一门独立的学科。国内外都出版了许多有关色谱技术及原理的杂志与专著。

液-固色谱是最先创立的色谱方法，但经典的液相色谱柱多是采用碳酸钙、硅胶、氧化铝填充的玻璃柱管。流动相加在柱管上端，受地球吸引力的作用顺流而下，组分的检测则依靠肉眼的观察或将吸附剂从柱管里取出分析。自1905年创立液-固色谱以后，50多年的时间里，液-固色谱装置并无实质性的改进，其进展比较缓慢。但到20世纪60年代，随着人们在气相色谱方面知识的积累，采用高压输液泵及光学检测器，并制作出多种高效微粒填充剂，大大提高了液相色谱的分析能力，加快了液相色谱的分析速度。70年代又出现了采用自动电导检测器的新型离子交换色谱法，从而

使液相色谱无论是技术上还是在仪器上，都产生了一个新的飞跃。目前，气相色谱与液相色谱并驾齐驱，相辅相成，二者各自都有其驰骋的领域。80年代末期，又产生了毛细管电泳分析技术。这几种分离分析方法已经成为化学家、生物学家分析复杂混合物不可缺少的手段。

色谱作为一种分析方法，其最大特点在于能将一个复杂的混合物分离为各个有关的组成，然后一个个地检测出来，因此它是成分分析和结构测定的重要手段。那么究竟什么是色谱？它是一个什么过程？是什么原因促使不同物质得以分离呢？一般地讲，色谱是一个分离过程，一个建立在吸附、分配、离子交换、亲和力和分子尺寸等基础上的分离过程，它利用不同组分在相对运动、相互不溶的两相中，其中相对静止的一相称固定相，而另一个相对运动的相称流动相，利用吸附能力、分配系数、离子交换能力、亲和力或分子大小等性质的微小差别，经过连续多次在两相间的质量交换，使不同组分得到分离。例如利用不同组分间分配系数的差别，用毛细管色谱法可以将含上百个成分的复杂混合物一一分离。不同组分在性质上的差别是色谱分离的根本，即必要条件；而性质上微小差别的组分之所以能得到分离是因为它们在两相之间进行了上千次甚至上百万次的质量交换，这是色谱分离的充分条件。我们说色谱法是高效的，是因为它在许多过程中进行了成千上万次的质量交换，使性质上仅有微小差别的组分得以分离；它又是快速的，因为组分在两相的交换速度很快，通常仅千分之几秒，因此一个复杂样品的分析仅需几分钟到几十分钟；另外，色谱法还是很灵敏的，因为它采用近代光学或电子学的各种手段做检测器，一般可直接检测含量为百万分之几或更低的成分。色谱作为一种分离检测手段，可用于测定分子量很低的常量或痕量气体，又可分离测定分子量上百万的天然或合成物质；可分离性质非常接近的同位素、同分异构体、空间异构体、自旋异构体或光学异构的对映体，也广泛用于大分子或一些生物活性物质，如肽类、核酸、蛋白质以及阴阳离子的测定，它已经成为有机物和一些无机物分离测定的重要手段。

段是石油、化工、环保、医药、生化等部门科研和生产中分离检测的一个不可缺少的工具。色谱的重要性首先在于它使性质上非常接近的物质的分离测定成为可能。这一点正是近代化学、生物学研究与发展中一个极为重要和不可缺少的手段。

尽管高效液相色谱法近 20 多年来取得了巨大的进展，并在许多领域中发挥了很大的作用，但由于液体流动相高黏度限制了更长色谱柱的使用。常规的液相色谱柱长度在 20cm 左右，其柱效为 1 万理论塔板数左右。如何提高分离柱效解决复杂样品的分离分析问题一直成为液相色谱研究的基本课题之一。20 世纪 80 年代初期，人们试图采用毛细管液相色谱柱来解决这一难题，虽然毛细管液相色谱能大大提高分离柱效。但由于固定相制备、样品柱容量和进样过程的复杂性及相对较低的检测灵敏度等因素的限制，毛细管液相色谱柱在实际工作中没有获得广泛的应用。近年来，一种新兴的微柱分离分析技术正在获得广泛的关注，并成为液相色谱研究的热点之一。这一新兴的技术就是毛细管电色谱法。毛细管电色谱是在毛细管中填充或在毛细管壁涂布、键合色谱固定相，依靠电渗流 EOF 推动流动相，使中性和带电荷的样品分子根据它们在色谱固定相和流动相间吸附、分配平衡常数的不同和电泳速率的不同而达到分离分析的一种电分离模式。毛细管电色谱相对于常规的液相色谱而言，至少存在以下几方面的优点：（1）采用电渗流驱动流动相，不存在液相色谱法中压力差问题，因此可以使用更小粒度的固定相，更长的色谱柱进行分离分析，从而大大提高分离柱效。另一方面，由于电渗流驱动的塞状流型消除了压力驱动的液相色谱中抛物线流型的径向扩散对柱效的影响，即使采用相同粒度的色谱固定相，毛细管电色谱的柱效也比常规高效液相色谱柱效高 1 至 2 倍以上。（2）毛细管电色谱是微柱分离分析技术，很容易实现与其他分析技术，如质谱、红外光谱和核磁共振的联用。采用电动或压力进样，更适合于微量样品的分离分析。（3）由于电泳和分配机理的同时作用，非常适合于离子性和中性化合物的分离分析。（4）毛细管电色谱可以采用已有的各种液相

色谱固定相，从而大大提高了各种样品的分离选择性。

毛细管电色谱的发展可以追溯到 20 世纪 50 年代，Mould 和 Synge 将电场应用到薄层液相色谱中进行寡糖分离。1974 年，Pretorius 等人首次将电场引入到高效液相色谱中，显示出以电渗流 (electroosmotic flow 简称 EOF) 作为流动相推动力进行分离的巨大优势，但他们的文章在当时并未引起足够的关注。

1981 年，Jorgenson 和 Lukacs 在 $170\mu\text{m}$ 内径的毛细管中填充了 $10\mu\text{m}$ 粒径的 Partisil ODS-2 在电场作用下成功地分离了 9-甲基蒽和芘 获得了 31 000 理论塔板数的柱效。他们同时指出 在以电渗流作为流动相推动力的情况下，固定相填充的不规则性对样品区带展宽并不重要。这篇文章被认为是毛细管电色谱发展史上具有里程碑意义的文献。从此，毛细管电色谱开始受到了人们的关注。1982 年，Tsuda 等人首次实现了开管毛细管电色谱，并对多环芳烃进行了分离。随后，Martin 等人对开管毛细管电色谱中的轴向扩散和峰展宽进行了研究，从理论上证实了以电渗流作为流动相推动力的优越性。1987 年和 1988 年，Knox 和 Grant 对毛细管电色谱的理论进行了研究。不仅对以压力和电渗流作为流动相推动力的两个体系中的流型、区带展宽、焦耳热效应进行了比较，同时还对毛细管电色谱中的双电层现象进行了系统的研究。

1990 年，Tsuda 等人发展了毛细管电色谱连续进样技术，利用柱系统中同时存在的压力流和电渗流对柱内样品进行了富集和分离。1991 年 Knox 和 Grant 从理论上讨论了填料粒径大小和流动相中电解质浓度与电渗流速度以及柱效间的关系，并完善了他们所发展的毛细管电色谱理论。同年 Pfeffer 和 Yeung 利用毛细管电色谱分离了电迁移行为十分相近的氨基萘磺酸类化合物，并与毛细管区带电泳和高效液相色谱的分离结果进行了比较，显示出毛细管电色谱在分离方面的巨大优势。1992 年 Mayer 等人首次在毛细管电色谱开管柱上实现了抗感染类药物的对映体拆分。Li 等人于 1993 年利用 α -酸性糖蛋白作为固定相在毛细管电色谱填充柱上分离了手性化合物。1994 年，Smith 和 Evans 分别采用

1.5 μm 和 3 μm 粒径的 ODS 以及 3 μm 的 SCX 固定相进行药物分离, 获得了 0.9~2 以及 0.04 的折合塔板高度. Rebscher 等人首次提出毛细管电色谱填充柱中区带展宽因素的实验测量方法. 同年 Bayer 等人利用高压液相色谱泵首次实现了毛细管电色谱的梯度洗脱, 并应用该技术成功地分离了寡聚核苷酸. Jacobson 等人也于同年制作了第一个毛细管电色谱芯片. 1995 年, Guo 等人首次利用溶胶-凝胶技术制备了开管毛细管电色谱柱. Lord 等人发展了毛细管电色谱与质谱的联用技术, 并将其应用于染料分析中. 1996 年, Yan 等人利用双电源实现了电压驱动下的流动相梯度洗脱, 成功地分离了 16 种多环芳烃. 同年, Fujimoto 等人首次制备了连续床层毛细管电色谱柱. 1997 年, Horvath 等人对毛细管电色谱的动力学进行了系统的研究, 考察毛细管电色谱填充柱中填充床层和开管部分中不同的电渗流和电导. Stahlberg 也对毛细管电色谱中的区带迁移理论进行了研究. 1998 年, Stead 等人发展了毛细管电色谱柱上浓缩技术, 并用于血浆中甾类化合物的分析. Bayer 等人首次实现了毛细管电色谱与核磁共振的联用. 次年 Horvath 等人进一步发展了毛细管电色谱的动力学理论, 对毛细管电色谱和高效液相色谱中影响柱效的各种参数进行了比较研究. Poppe 等人研究了填料孔结构对毛细管电色谱柱性能的影响.

1995 年以来中国科学院大连化物所国家色谱研究分析中心开展毛细管电色谱的研究工作, 是国内率先从事该领域研究工作的单位之一. 我们独立掌握了毛细管电色谱的装柱方法, 发展出毛细管电色谱的溶剂滴加和溶剂切换台阶梯度洗脱技术; 研究了短柱毛细管电色谱快速分离样品的可行性, 在 15s 以内分离了 8 种芳香烃化合物, 柱效达到 20 万理论塔板数/米. 建立了离子交换固定相与反相色谱固定相混合填充柱技术, 初步解决了毛细管电色谱在低 pH 值和有机溶剂浓度下难于进行操作的困难. 我们还在国际上首次建立了动态吸附固定相毛细管电色谱模式, 解决了用常规反相毛细管电色谱难于分离碱性或酸性化合物的问题, 并进行一些手性对映体的分离分析. 通过对微柱液相色谱和毛细

管电色谱分离中性化合物的比较，证明二者具有相似的保留机理，考察了中性化合物在毛细管电色谱中分子结构与保留值的定量关系。这些研究工作大大提高了我国毛细管电色谱研究领域在国际上的学术地位，并为在我国推广这一新技术奠定了良好的基础。

综上所述，尽管毛细管电色谱的发展历史并不很长，但它无论在理论、技术，还是应用方面都取得了很大的发展。目前，已有多篇毛细管电色谱的综述和专题讨论发表，并出现了商品化的产品和仪器。我们相信，随着毛细管电色谱理论和柱技术的进一步完善，它必将在更广泛的领域中得到发展和应用。

第二章 毛细管电色谱的基本原理

尽管毛细管区带电泳 (CZE) 是高分辨分离分析离子性化合物的技术, 但毛细管区带电泳并不能有效地分离分析中性化合物。Terabe 等人^[1]发明的胶束毛细管电动色谱 (MEKC) 很好地解决了这一问题。在胶束毛细管电动色谱中超过临界胶束浓度的表面活性剂被加入到本底电介质中, 从而在本底电介质中形成与 HPLC 固定相类似的准固定相。中性分子和离子性化合物通过在本底介质与胶束中的分配而得到分离, 化合物在胶束中溶解度越大, 其相应的保留值也越大。在 MEKC 的初始阶段, 表面活性剂种类较少成为 MEKC 发展的一个制约因素, 但随着一些新颖的表面活性剂的产生, 这一问题正逐步获得解决。另一方面, 高效液相色谱 (HPLC) 是分离分析中性和离子性化合物最常用的手段。20 世纪 70 年代初期以来, 由于对 HPLC 固定相广泛而深入的研究, 至今已有大量的具有不同化学结构和粒度从 $1.5\mu\text{m}$ 至 $10\mu\text{m}$ 的固定相可供人们选择使用。

毛细管区带电泳 (CZE) 的分离效率大大高于常规的 HPLC 的分离效率, 一般都超过 50 万理论塔板/米。毛细管区带电泳的缺点是不能分离具有相同电泳淌度的化合物。而 HPLC 对于各种类别的样品则可以通过调节多种操作参数, 如各种选择性固定相的选择获得有效的分离分析。虽然 HPLC 理论预测通过降低固定相粒度可以有效地提高色谱柱的分离效率, 但输液泵的耐压能力限制了很小颗粒固定相在常规 HPLC 中的应用。

毛细管电色谱 (CEC) 结合了毛细管区带电泳的高柱效和 HPLC 选择性固定相的优点, 具有高效、快速、微量的特点, 已成为目前色谱领域研究的热点之一。^[2~12]

§ 2.1 毛细管电色谱中的电动现象

任何毛细管电分离技术必须以以下二类基本电化学现象为基础,即基于双电层的电泳和电渗过程,而毛细管电色谱中溶质还存在流动相与固定相间的分配过程。

§ 2.1.1 电双电层

电双电层是浸入液体中所有表面的基本特征^[13,14]。在典型的硅胶、键合碳链硅胶和石墨碳表面都存在负电荷,对于硅胶而言,这些负电荷由表面硅羟基解离所产生。当硅胶表面与溶液相接触时,为了与硅胶表面固定化的负电荷达到电平衡,在硅胶表面会形成稍微过量的反电荷薄层。这一电荷薄层一般被分成两部分^[15],与固体表面非常接近的过量电荷和在表面有效地固定化的离子被称之为 Helmholtz 或 Stern 层,这一部分的过量电荷和离子不会对电动力学产生影响。另一部分过量电荷可以与溶液中的离子自由交换,这一部分过量电荷被称之为双电层中的扩散层或 Gouy-Chapman 层。与平衡离子相关的过量电荷密度随着与固体表面距离的增加而迅速降低。降低到 ϵ/e 时的距离被称之为双电层的厚度 (δ)。通常以 $1/\kappa$ 表示,其中 κ 是 Debye 长度。图 2.1 表示在固体表面形成双电层的示意图。

双电层厚度 δ 可由下式表示:

$$\delta = [(\epsilon_0 \epsilon_r RT) / (2F^2 C)]^{1/2} = [(\epsilon RT) / (8\pi CF^2)]^{1/2} \quad (2.1)$$

式中, ϵ_0 是真空介电常数 ($8.85 \times 10^{-12} \text{ C}^2/\text{N} \cdot \text{m}^2$), ϵ_r 是相对介电常数或介质介电常数(如水在 25 时 ϵ_r 为 ± 78), R 是气体普适常数 (8.314 J/K), T 是绝对温度, C 为电介质摩尔浓度, F 是法拉第常量 (96500 C/mol), ϵ 是缓冲液的介电常数 ($4\pi\epsilon_0\epsilon_r$)。在主体溶液中加入电介质会压缩双电层的厚度。例如,在水中加入一价阳离子盐,双电层的厚度 δ 会发生如表 2.1 所示的变化^[16]。

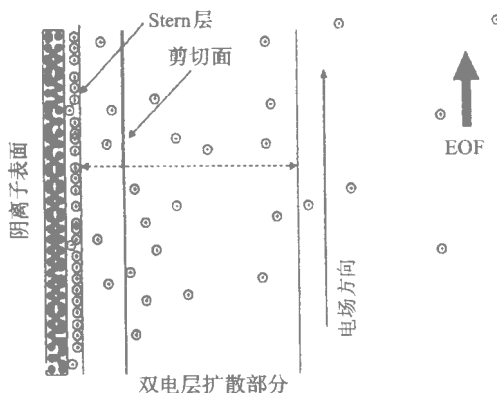


图 2.1 双电层示意图

表 2.1 在水中加入一价正电荷电介质时双电层厚度的变化

一价阳离子浓度/mol/L	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	0.1
双电层厚 $\delta/\mu\text{m}$	0.3	0.1	0.03	0.01	0.003	0.001

Zeta 势与扩散双电层的厚度存在以下的关系^[17]：

$$\xi = \frac{4\pi\delta\sigma}{\epsilon} = \frac{\delta\lambda}{\epsilon_0\epsilon_r} \quad (2.2)$$

式中 σ 是 Gouy-Chapman 层中过量离子的电荷密度。Zeta 势与固体表面以及溶液中离子状态（如 pH 值和离子强度）的性质相关。当溶液为极性溶剂（如水）时，在极性（如硅胶和玻璃）或非极性（如石墨碳）表面^[18]的 Zeta 电位势可达到 10~100mV。非极性溶剂（如正己烷）与极性或非极性表面接触时，通常不会产生 Zeta 电位势，但如在非极性溶剂中加入少量 10^{-5}mol/L 的可以解离的物质，如二异丙基水杨酸钙，则在固体表面可以产生与极性溶剂同量级的电位势^[19]。

§ 2.1.2 电渗

在电色谱中,当电压施加于色谱柱的二端时产生电场梯度 ($E = V/L$) 在双电层中的过量离子 或至少是不紧密吸附在 Stern 层中的离子) 会带着任何液体向着电极运动。由于液体黏度 (η) 的阻力,这一液体的流型是塞状流型,只有在双电层的扩散部分是抛物线流型;同时由于色谱柱内径远远大于双电层的厚度,因此总体而言,流动相在柱内的运动可以被认为塞状流型。这一过程被称为电渗过程,由此产生的液体流动被称为电渗流。由于电渗流是电色谱分离的驱动力,因此它也是电色谱中的最基本过程之一。Whitehead^[20] 和 Van de Goor^[21] 等人详细研究了电渗流过程,认为平均电渗流流速可由下式表达:

$$u_{\infty} = (\epsilon_0 \epsilon_r \xi / \eta) E = (\epsilon \xi / 4\pi n) E = \mu_{\infty} E \quad (2.3)$$

式中, μ_{∞} 是电渗流淌度, E 是施加电压, η 是电介质的黏度如把电色谱中一些典型的物化参数 ($\xi = 50 \text{ mV}$, $\eta = 10^{-3} \text{ N/m}^2$, $E = 50\,000 \text{ V/m}$) 代入式 (2.3) 中,在以水作为流动相时计算所得的电渗流流速为 1.8 mm/s 这是 HPLC 典型的流速。式 (2.3) 表明,电渗流淌度主要由 Zeta 电位势 (ξ) 和黏度 (η) 所决定而这二个参数与其他的影响因素如表面电荷密度、电介质浓度和 pH 值、共溶剂和其他添加剂相关^[12~25]。有研究表明,在恒定流动相 pH 值时,电渗流淌度随着离子强度的增加而减少。在石英毛细管中 pH 值对电渗流淌度的影响比较复杂,在强酸性缓冲液中电渗流淌度很小,当缓冲液的 pH 在 3~8 范围内电渗流淌度随 pH 值的升高而迅速增大,当缓冲液 pH 高于 8 时随着 pH 值的升高电渗流淌度仍缓慢增加^[25]。但是, pH 对电渗流淌度的影响还与缓冲液系统和石英毛细管柱的性质相关。Kenndler 等人^[26] 则发现电渗流淌度随流动相中有机溶剂浓度升高而线性降低。有人发现当采用甲醇或乙腈作为有机溶剂时,在毛细管柱中观察到的电渗流淌度存在差别,这一现象可以由这二种溶剂的黏度和介电常数的差别来

解释。相对于水而言，甲醇对电渗流和电流没有明显的减少，而乙腈对电渗流和电流却有明显减少。电色谱中最有效的流动相应使 Zeta 电位势尽可能的高，而导电性和黏度尽可能低，此外，柱温通过对流动相黏度的影响也会对电渗流淌度产生一定的影响^[27]。

电渗流的方向主要由本底电介质的性质所决定。在以磷酸钠作为电介质时，电渗流向阴极流动，这一电渗流的方向对阴离子的分析很有利。但阴离子会与电渗流反方向迁移，导致很低的总淌度和很长的分析时间。在这种情况下改变电渗流运动方向是必须的。当长碳链的季铵盐加入到缓冲液中时，它可以吸附在硅胶表面上^[28]，导致过量的反电荷离子同时使电渗流反向运动。因此主体溶液会向阳极移动。测定电渗流的常用方法有以下几种：(1)直接测定目标容器中溶液体积的变化^[29]；(2)测定被转移的缓冲液质量的变化^[21,30]；(3)测定由不同导电性的缓冲液加入毛细管柱时电流的变化^[31]；(4)通过泳动电势的测量测定管壁的 Zeta 电位势^[21]；(5)测定中性标记物的迁移时间^[30,32,33]。在以上几种方法中，最后一种方法是最常用的，这是因为这一方法同时还可用于分析过程中 EOF 的控制。当紫外光 UV 作为检测器时，具有 UV 吸收的中性化合物，如二甲基甲酰胺、亚异丙基丙酮可以作为中性标记物，甚至是没有 UV 吸附的化合物如甲醇、乙醇等可以通过基线的波动作为测电渗流的中性标记物^[34]。

§ 2.1.3 电泳

一些物质在一定 pH 值的缓冲溶液中带有有效的正或负电荷，这些带电荷的离子性化合物在施加电压的电色谱系统中会向相应的阴或阳电极运动。离子性化合物的电泳迁移速度 (u_{ep}) 可由下式表示：

$$u_{ep} = \mu_{ep} E = \mu_{ep} (V/L) \quad (2.4)$$

式中， μ_{ep} 是电泳淌度， μ_{ep} 与离子性物质的 Zeta 电势 (ξ) 和缓冲液的浓度及性质相关：

$$\mu_{\text{ep}} = 2/3(\epsilon_0 \epsilon_r \xi / \eta) \quad (2.5)$$

其中离子物质的 Zeta 电势取决于它的电荷数 ($q_{\pm}$) 和体积 (r_s) 以及缓冲液的介电常数:

$$\xi = q_{\pm} / r_s \epsilon \quad (2.6)$$

将式 (2.4), (2.5) 和 (2.6) 组合起来, 经处理后可得电泳迁移速度的表达式为

$$u_{\text{ep}} = \frac{q_{\pm} E}{6\pi r_s \eta} \quad (2.7)$$

式 (2.7) 表明电泳现象所产生的迁移只对离子性化合物有效, 电泳迁移速度取决于离子的净电荷和体积、电场强度、缓冲液的性质和柱温。离子性化合物溶剂化的差别 (离子体积越小, 溶剂化越强) 会影响它的有效离子半径, 进而影响它的电泳迁移速度。对于处于解离平衡的物质, 则必须考虑到解离平衡过程对离子浓度的影响。

§ 2.2 毛细管电色谱保留值的表征和理论处理

§ 2.2.1 色谱分配机理

中性化合物在电色谱中的保留主要由溶质在固定相和流动相之间的分配所决定。在电介质溶液作为流动相的电色谱系统中, 固定相以二种类型存在: (1) 与常用 HPLC 的色谱柱相同 固定相为微球填充层床结构; (2) 毛细管内壁薄层型固定相。溶质在二相中的分配可以由色谱容量因子 k' 表达, k' 被定义为

$$k' = \frac{\text{溶质在固定相中的量}}{\text{溶质在流动相中的量}} \quad (2.8)$$

式中 k' 值与溶质在二相间的分配系数 (D) 和相比 (ϕ) 存在以下关系:

$$k' = D\phi \quad (2.9)$$

作为一个合理的假设, ϕ 被认为与柱温无关 因此 柱温对 k' 的影响与对 D 的影响是一致的.

§ 2.2.2 中性溶质迁移参数的表征

中性溶质在电色谱中的迁移可由电渗流线速度 (u_{eo}) 和溶质在二相的分配程度表征:

$$u_{mig} = \frac{u_{eo}}{1 + k'} \quad (2.10)$$

而 u_{eo} 可用下式表达

$$u_{eo} = \mu_{eo} V/L \quad (2.11)$$

把式 (2.11) 代入式 (2.10) 可得

$$u_{mig} = \frac{\mu_{eo}}{1 + k'} \frac{V}{L} \quad (2.12)$$

因此, 中性化合物的保留时间 (t_r) 可以通过在式 (2.12) 中引入进样至检测端的色谱柱长 L_{id} 表示为

$$t_r = \frac{L_{id}}{u_{mig}} = \frac{L_{id} \cdot L \cdot (1 + k')}{\mu_{eo} \cdot V} \quad (2.13)$$

由于 μ_{eo} 是与非保留的中性标记物的迁移时间 (t_{eo}) 相关 并可表达为

$$t_{eo} = \frac{L_{id} \cdot L}{\mu_{eo} \cdot V} \quad (2.14)$$

把式 (2.13) 代入式 (2.14) 中可得:

$$t_r = t_{eo}(1 + k') \quad (2.15)$$

由于电色谱谱图与一般的色谱图非常相似 与 HPLC 中测定非保留标记物的死时间计算 k' 值相同, 在电色谱中我们可以通过测定

非保留标记物的迁移时间 (t_{∞}) 来计算 k' 值:

$$k' = (t_r - t_{\infty})/t_{\infty} \quad (2.16)$$

§ 2.2.3 简单离子迁移参数的表征

对于完全电离的离子, 由于不存在次级化学平衡, 分离机理相

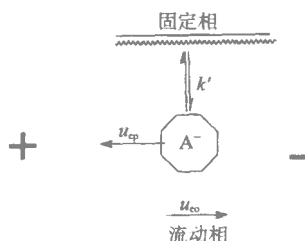


图 2.2 离子在 CEC 中的迁移示意图

对简单。图 2.2 所示为离子在 CEC 中迁移的示意图。从图 2.2 中可以看出离子在分配和电泳的共同作用下而得以分离。由液相色谱容量因子 k' 的定义可知, 离子 A^- 在固定相和流动相中的分布系数 F_s 和 F_m 分别为

$$F_s = k'/(1 + k') \quad (2.17)$$

$$F_m = 1/(1 + k') \quad (2.18)$$

流动相中的离子在电渗和电泳的共同作用下而运动, 因此其迁移速度 u_m 可用下式表示:

$$u_m = u_{\infty} + u_{ep} = \mu_{\infty}E + \mu_{ep}E \quad (2.19)$$

即其迁移速度 u_m 为电渗流 u_{∞} 和电泳流 u_{ep} 的矢量和。式中 μ_{∞} , μ_{ep} 和 E 分别为电渗淌度、电泳淌度和电场强度。离子在固定相中也可能受到电场的作用而迁移。假设迁移速度为 u_s 。则离子在 CEC 中的迁移速度 u_{mig} 为 u_m 和 u_s 的重量平均值, 可用下式表示:

$$u_{mig} = F_s u_s + F_m u_m \quad (2.20)$$

将式 2.19 代入式 2.20 可得:

$$u_{mig} = [k' u_s / (1 + k')] + [(u_{ep} + u_{\infty}) / (1 + k')] \quad (2.21)$$

定义 CEC 的保留因子 k^* 为

$$k^* = (t_r - t_0)/t_0 \quad (2.22)$$

式中 t_r 和 t_0 分别为样品的出峰时间和不保留的中性化合物的出峰时间, 其值可用下式表示:

$$t_r = L_{id}/u_{mig}; \quad t_0 = L_{id}/u_{eo} \quad (2.23)$$

式中 L_{id} 为从进样端到检测窗口之间的长度。综合式 (2.22) 和 (2.23), k^* 可用迁移速度表示为

$$k^* = u_{eo}/u_{mig} - 1 \quad (2.24)$$

将式 2.21 代入式 (2.24) 整理得:

$$k^* = \frac{1}{\frac{1 + \mu_{ep}/\mu_{eo}}{1 + k'} + \frac{k'}{1 + k'}\mu_s/\mu_{eo}} - 1 \quad (2.25)$$

式中, μ_s 为离子在固定相中的电泳淌度, 不难理解, 离子在固定相中的迁移速度比在流动相中小得多, 忽略 μ_s 可得下式:

$$k^* = \frac{k' - \mu_{ep}/\mu_{eo}}{1 + \mu_{ep}/\mu_{eo}} \quad (2.26)$$

该式与文献 [35] 报道的相似 而与文献 [36] 不一致。这可能是由于 CEC 保留因子的定义不同, 文献 [36] 以迁移距离来定义 而我们以迁移时间来定义。用迁移时间定义 CEC 保留因子与 HPLC 中定义相似, 易于理解, 而且迁移时间可以直接从色谱图上获得, 因而比较直观。CEC 保留因子 k^* 反映了离子性溶质在 CEC 中的实际的保留情况。

从式 (2.26) 可以看出, 离子在 CEC 中的分离机理比单纯的 HPLC 或 CZE 复杂, 其保留因子 k^* 不是 HPLC 的容量因子和 CZE 的选择性因子 (μ_{ep}/μ_{eo}) 的简单加和, 而是它们的有机组合。式 (2.26) 说明溶质在 CEC 中保留的大小主要取决于 k' 和 μ_{ep} , k'

反映了溶质疏水性的大小, 这说明 CEC 既可以根据溶质疏水性的不同, 又可以按照电泳淌度的不同进行分离, 从而克服了 CZE 只能根据溶质电泳淌度的不同, 反相 HPLC 只能根据溶质疏水性不同来分离的局限。图 2.3 给出了 k^* 与 k' 的关系, k^* 随 k' 的增大

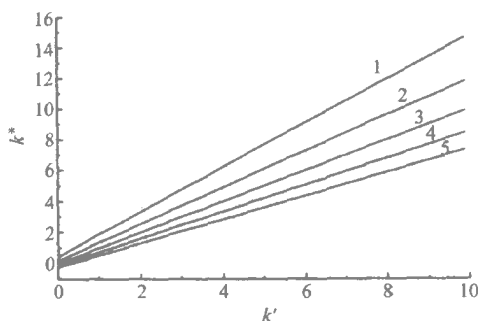


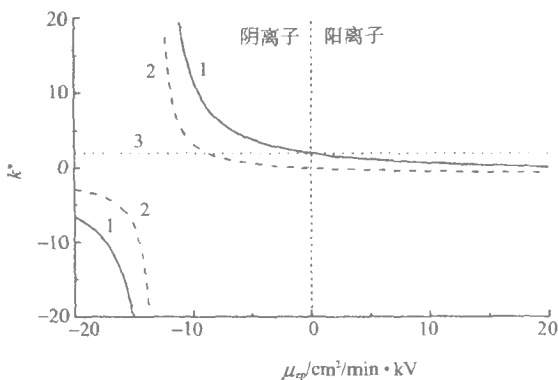
图 2.3 k^* 与 k' 的关系

参数: 1. $\mu_{\infty}=13, \mu_{\text{ep}}=-4$; 2. $\mu_{\infty}=13, \mu_{\text{ep}}=-2$;

3. $\mu_{\infty}=13, \mu_{\text{ep}}=0$; 4. $\mu_{\infty}=13, \mu_{\text{ep}}=3$;

5. $\mu_{\infty}=13, \mu_{\text{ep}}=4$ (μ_{∞} 和 μ_{ep} 的单位为 $\text{cm}^2/\text{min}\cdot\text{kV}$)

而增大, 其斜率和截距取决于电泳和电渗淌度的大小和方向。对于中性溶质斜率为 1, 截距为 0, $k^* = k'$ 反映纯粹的色谱过程。对于阴离子, 斜率大于 1, $k^* > k'$; 对于阳离子, 斜率小于 1, $k^* < k'$ 。在 HPLC 中 $k' \geq 0$, 而在 CEC 中由于受电泳淌度的影响, k^* 既可以大于 0 也可以小于 0。图 2.4 给出了 μ_{ep} 与 k^* 的关系。由图可知, 对于正离子, k^* 随 μ_{ep} 的增大而减小。如果 μ_{ep} 足够大, k^* 有可能小于 0, 此时样品比 t_0 先出峰。对于负离子, k^* 随 μ_{ep} 的增大而增大。在 $\mu_{\text{ep}} = \mu_{\infty}$ 时, k^* 趋于无穷大, 此时样品将不出峰。如果 μ_{ep} 进一步增大, k^* 小于 0, 样品的迁移方向与电渗流方向相反。由此可见, 在两种情况下 k^* 小于 0, 一是阳离子的电泳淌度比电渗淌度大, 样品峰比 t_0 峰先出来; 二是阴离子的电泳淌度比电渗淌度大, 阴离子的迁移方向与电渗流相反, 此时, 在操作上需要正极进样, 负极检测。

图 2.4 k^* 与 μ_{cp} 的关系

参数: 1. $k' = 2$, $\mu_{eo} = 13$; 2. $k' = 0$, $\mu_{eo} = 13$; 3. $k' = 2$, $\mu_{eo} = 0$

(μ_{eo} 和 μ_{cp} 的单位为 $\text{cm}^2/\text{min} \cdot \text{kV}$).

式(2.26)没有考虑流动相 pH 值对 k^* 的影响情况, 但 pH 值将通过影响 k' , μ_{cp} 和 μ_{eo} 而影响 k^* . 其中, pH 值对 μ_{eo} 的影响最为显著. 在反相 CEC 中, 一般认为电渗淌度随着 pH 值的增大而增大, 而在高 pH 值和低 pH 值时变化缓慢, 但二者之间尚缺乏定量关系. 我们发现下式可以比较好的描述 μ_{eo} 和 pH 值间的关系:

$$\mu_{eo} = a + \frac{b}{c + [\text{H}^+]} \quad (2.27)$$

式中 a , b , c 为常数. 图 2.5 是根据我们的实验所得到的反相 CEC 中电渗流随 pH 值变化的关系曲线, 用上式拟合, 相关系数为 0.982, 可用下式表示:

$$\mu_{eo} = 2.85 + \frac{3.8 \times 10^{-5}}{3.6 \times 10^{-6} + [\text{H}^+]} \quad (2.28)$$

将式(2.28)代入式(2.26)得