

# 第 1 章 导 论

## 1.1 液相色谱法概述

### 1.1.1 液相色谱法的发展历史

早在 1903 年,俄国植物学家 Tswett 为了分离植物色素,将植物的石油醚提取液通过装有碳酸钙粉末的玻璃柱,使色素成分得到了分离,并将这一分离方法命名为色谱法(chromatography)。这一成果发表于 1906 年的德国植物学会志“Ber Deut Botan Ges”上<sup>[1,2]</sup>。在此后的 20 多年里,几乎无人问津 Tswett 的液相色谱技术。到了 1931 年,Kuhn<sup>[3]</sup>用液相色谱法成功地分离了胡萝卜素和叶黄素,并因此获得了诺贝尔奖。从此,许多科学家看到了这一技术的应用前景,色谱法开始为人们所重视。此后,相继出现了用硅胶作填料的液固分配色谱法(1941 年)、用离子交换树脂作填料的离子交换色谱法(1943 年)和凝胶渗透色谱法(1959 年)等液相色谱方法。

液相色谱法(liquid chromatography,LC)虽是最早发明的,但其发展并不是最快的,在液相色谱法普及之前,纸色谱法(1944 年)、气相色谱法(1952 年)和薄层色谱法(1956 年)是色谱分析法的主流。到了 20 世纪 60 年代后期,业已比较成熟的气相色谱法(gas chromatography,GC)的理论与技术被广泛应用到液相色谱法上来,使液相色谱法得到了迅速发展。填料制备技术的发展使人们能够得到具有高分离效率的粒径小而均匀的球形颗粒填料,而化学键合型等新型固定相的出现、柱填充技术的进步以及高压输液泵的不断改进等等,使液相色谱分析实现了高速化。具有这些优良性能的液相色谱仪于 1969 年商品化。从此,这种分离效率高、分析速度快的液相色谱就被称为高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC),早期的文献和书籍中也称高压液相色谱法或高速液相色谱法。

GC 只适合分析较易挥发、且化学性质稳定的有机化合物,而 HPLC 则适合于分析那些用 GC 难以分析的物质,如挥发性差、极性大、具有生物活性、热稳定性差的物质。现在,HPLC 的应用范围已经远远超过 GC 位居色谱法之首。

### 1.1.2 液相色谱法的分类

在色谱分离中固定不动、对样品产生保留的一相称为固定相(stationary phase)与固定相处于平衡状态、带动样品向前移动的另一相称为流动相(mobile phase)。可以根据流动相的状态将色谱法分成四大类,如表 1-1 所示。超临界流体色谱(super critical chromatography,SFC)采用临界温度和临界压力以上的流体作流动相,如超临界状态的 CO<sub>2</sub>。超临界流体既具有类似于气体的大扩散系数,也具有类似于液体的强溶解能力。电

色谱法虽说通常都使用缓冲溶液，但驱动溶质移动的力是电场，所以，将其单独归为一类比较合适。不过，一般的色谱书中只提及前三类。

表 1-1 按流动相种类分类的色谱法

色谱类型	流动相	主要分析对象
气相色谱法	气体	挥发性有机物
液相色谱法	液体	可以溶于水或有机溶剂的各种物质
超临界流体色谱法	超临界流体	各种有机化合物
电色谱法	缓冲溶液、电场	离子和各种有机化合物

广义地讲，固定相为平面状的纸色谱法（paper chromatography）和薄层色谱法（thin layer chromatography, TLC）也以液体为流动相，也应归于液相色谱法。不过通常所说的液相色谱法并不包括它们，而仅指所用固定相为柱型的柱液相色谱法（column LC）。在一般的色谱书中，都将液相色谱法按分离机理分成吸附色谱法（adsorption chromatography）、分配色谱法（partition chromatography）、离子交换色谱法（ion exchange chromatography, IEC）和凝胶色谱法（gel chromatography）四大类。其实近年发展起来的一些液相色谱方法并不能简单地归于这四类。表 1-2 列举了一些液相色谱方法，按分离机理，有的是相同或部分重叠的。但这些方法或是在应用对象上有独特之处，或是在分离过程上有所不同，通常被赋予了比较固定的名称。

表 1-2 HPLC 按分离机理的分类

类型	主要分离机理	主要分析对象或应用领域
吸附色谱	吸附能 氢键	异构体分离、族分离 制备
分配色谱	疏水作用	各种有机化合物的分离、分析与制备
凝胶色谱	溶质分子大小	高分子分离，分子量及其分布的测定
离子交换色谱	库仑力	无机离子、有机离子分析
离子排斥色谱	Donnan 膜平衡	有机酸、氨基酸、醇、醛分析
离子对色谱	疏水作用	离子性物质分析
离子抑制色谱	疏水作用	有机弱酸弱碱分析
配位体交换色谱	配位作用	氨基酸、几何异构体分析
手性色谱	立体效应	手性异构体分离，药物纯化
亲和色谱	生化特异亲和力	蛋白、酶、抗体分离，生物和医药分析
盐析色谱	溶剂化作用	蛋白质、非电解质分析

## 1.2 离子色谱法概述

### 1.2.1 离子色谱法的发展

早在 20 世纪 40 年代，离子交换树脂就已用于离子性物质的分离，不过，那时是将颗粒较大且不很均匀的离子交换树脂填充在玻璃柱中，流动相靠重力自然流下，只能做一些

简单的分离，不能对柱流出物进行连续的检测，而且分离效果差、耗时长。60年代末离子交换树脂性能有所改进，加上使用高压泵输送流动相，使离子交换树脂柱的分离效果和分析速度都大大提高。但是用作流动相的都是强电解质溶液，具有很高的背景电导，被测离子洗脱到流动相中所引起的电导变化很小，因此，无法用电导检测器区别流动相中淋洗离子和待测离子。而紫外或可见分光光度检测器又只能检测少数离子性物质。

1975年，Small等人<sup>[4]</sup>成功地解决了用电导检测器连续检测柱流出物的难题，即采用低交换容量的阴离子或阳离子交换柱，以强电解质作流动相分离无机离子，流出物通过一根称为抑制柱的与分离柱填料带相反电荷的离子交换树脂柱。这样，将流动相中被测离子的反离子除去，使流动相背景电导降低，从而获得高的检测灵敏度。从此，有了真正意义上的离子色谱法（ion chromatography, IC），IC也从此作为一门色谱分离技术从液相色谱法中独立出来。1979年，Gjerde等<sup>[5]</sup>用弱电解质作流动相。因流动相本身的电导率较低，不必用抑制柱就可以用电导检测器直接检测。人们把使用抑制柱的离子色谱法称作双柱离子色谱法（double column IC）或抑制型离子色谱法（suppressed IC），把不使用抑制柱的离子色谱法称作单柱离子色谱法（single column IC）或非抑制型离子色谱法（non-suppressed IC）。

## 1.2.2 离子色谱法的定义与类型

### 1.2.2.1 离子色谱法的定义

其实，给离子色谱法一个准确的定义是很难的，可以在不同的范围内，从不同的角度来描述离子色谱法。狭义而言，离子色谱法是以低交换容量的离子交换树脂为固定相对离子性物质进行分离，用电导检测器连续检测流出物电导变化的一种色谱方法。专用的离子色谱仪配置的是离子交换柱和电导检测器，这也正是它与普通液相色谱仪的不同之处。用专用的离子色谱仪可以进行离子交换色谱和离子排斥色谱两种方式的分析。目前，这两种分离方式仍然是离子色谱日常分析工作的主体。事实上，非离子交换树脂固定相和非电导检测器也已广泛用于离子性物质的分离与分析，特别是对近年来研究较多的生物医药样品中的有机离子的分析，用上述两种离子色谱分离方式已经无能为力了。因此，我们完全可以将离子色谱法的概念加以扩展。本书对离子色谱法的定义是：利用被测物质的离子性进行分离和检测的液相色谱法。正是基于这一考虑，采用普通液相色谱体系分离离子性成分的离子对色谱法和金属离子配合物色谱法也作为本书的重要内容加以介绍。

### 1.2.2.2 离子色谱法的类型

按分离机理可以将离子色谱法分为离子交换色谱法（IEC）、离子排斥色谱法（ion chromatography exclusion, ICE）、离子对色谱法（ion pair chromatography, IPC）、离子抑制色谱法（ion suppression chromatography, ISC）和金属配合物离子色谱法（metal complex ion chromatography, MCIC）。前三种分离方式模式是主要的，在一般的离子色谱书中均有介绍，后两种分离方式虽有应用报道，但没有作为离子色谱法的一种分离方式提出来。

离子交换色谱法是基于流动相中溶质离子（样品离子）和固定相表面离子交换基团之间的离子交换过程的色谱方法。分离机理主要是电场相互作用，其次是非离子性的吸附过程。其固定相主要是以聚苯乙烯和多孔硅胶作基质（载体）在其表面导入了离子交换功能基的离子交换剂（ion-exchanger）。离子交换色谱可以用于无机和有机离子的分离。阴离子的分离主要是采用季铵基作功能基的阴离子交换剂（anion-exchanger）阳离子的分离主要采用磺酸基和羧酸基作功能基的阳离子交换剂（cation-exchanger）。第4章将详细讨论离子交换色谱法。

离子排斥色谱的分离机理主要源于 Donnan 膜平衡、体积排阻和分配过程。固定相是具有较高交换容量的全磺化交联聚苯乙烯阳离子交换树脂，这种阳离子交换树脂一般不能用于阳离子的离子交换色谱分离。离子排斥色谱对于从强酸中分离弱酸以及弱酸的相互分离是非常有用的。如果选择适当的检测方法，离子排斥色谱还可以用于氨基酸、醛及醇的分析。第5章将详细讨论离子排斥色谱法。

离子对色谱的主要分离机理是吸附与分配。固定相则是普通 HPLC 体系中最常用的低极性的十八烷基或八烷基键合硅胶，固定相的选择性主要靠改变流动相来调节，通过在流动相中加入一种与溶质离子带相反电荷的离子对试剂，使之与溶质离子形成中性的疏水性化合物。离子对色谱基本上可以采用通常的反相 HPLC 的分离体系。离子对色谱在生物医药样品中离子性有机物的分析、工业样品中离子性表面活性剂以及环境与农业样品中过渡金属离子配合物的分析方面非常有用。第6章将详细讨论离子对色谱法。

离子抑制色谱法的分离机理和离子对色谱法相似，不过，它是通过控制流动相的 pH 值，弱酸或弱碱的离解得到抑制，使其以未离解的分子状态在两相间分配或吸附。离子抑制色谱法主要用于有机弱酸弱碱的分析。离子抑制色谱与离子对色谱的基本原理是相同的，都是将溶质离子转变成中性的、具有一定疏水性的分子。离子抑制色谱法也主要采用通常的反相 HPLC 的分离体系。在离子对色谱法中（第6章）将简要地介绍一下离子抑制色谱法。

金属配合物离子色谱法利用金属离子与适当的有机配位体的作用，形成金属配合物，采用通常的 HPLC 体系（如反相 HPLC）分离和检测。金属离子与小分子配位体形成的稳定配阴离子的分离体系主要在阴离子交换色谱法中介绍，金属配阴（阳）离子与离子对试剂反应后的分离体系主要在离子对色谱法（第6章）中介绍。第7章将主要讨论以显色剂、整合剂和有机大分子（冠醚）作配体的金属配合物离子色谱法。

### 1.2.3 离子色谱法的分析对象和应用领域

IC 不仅灵敏度高、分析速度快，能进行多种离子的同时分离，而且还能将一些非离子性物质转变成离子性物质后测定，所以在环境化学、食品化学、化工、电子、生物医药、新材料等许多领域都得到了广泛的应用。可以用 IC 分离和分析的物质如表 1-3 所示。离子色谱法的应用领域如表 1-4 所示。

表 1-3 离子色谱法分析对象物质

离子类别	主要离子种类
无机阴离子	卤素及简单阴离子、酸根阴离子、阳离子的配阴离子
无机阳离子	碱金属、碱土金属、过渡金属、稀土元素
有机阴离子	有机酸、烷基硫酸、烷基磺酸、磷酸、多聚磷酸
有机阳离子	胺、醇胺、铵盐、吡啶、生物碱、铊盐、磷盐
天然有机物	糖、醇、酚、醛、维生素
生物物质	有机磷化合物、氨基酸、肽、核酸、核苷酸、蛋白质、碱基、抗生素

表 1-4 离子色谱法的主要应用领域

应用领域	主要应用对象
环境	大气成分(粉尘、颗粒物、雾、酸气)、酸雨、水质、地下水、自来水、地表水、工厂污水、生活污水、空气水质自动检测
食品	生鲜食品、果菜、酒、饮料、纯净水分析、酿造过程监控
农业	农药、肥料、土壤、饲料、粮食、植物分析
生物医学	血液、尿、输液成分、临床检查、人体微量元素分析
制药	植物药材、矿物药成分、制剂成分分析
材料	金属材料、半导体材料、表面处理、超纯水分析
工业	原料分析、产品质量控制、电解电镀液分析、造纸废水分析
化工	原料和产品分析，反应过程监控
日化	化妆品、洗涤剂、清洁剂、原料和产品成分分析

### 1.2.4 离子色谱法的优点

溶液中离子性成分的分析是一个经典的分析化学课题。对无机阳离子(金属离子)的分析来说,较早就有原子吸收光谱法(AAS)、电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)、X射线荧光光谱法等既快速又灵敏的分析方法。而一些有机阳离子(如胺类物质)的分离和分析就缺乏行之有效的方法。对阴离子的分析来说,在离子色谱法出现之前,只能用容量分析法、光度分析法、重量分析法和比浊法等传统的化学分析方法。这些方法灵敏度低,操作烦琐费时,不能进行多离子同时分析。虽说常见阴离子的离子选择性电极已有很大发展,但电极易被污染,稳定性和重现性较差。可以说,离子色谱法的诞生使阴离子的分析发生了革命性的变化。一般而言,离子色谱法具有以下特点:

(1) 分析速度快 现代科学研究、产品质量控制要求的分析样品数量不断增加,分析速度显得越来越重要。一般而言,离子色谱法分析一个样品平均只需约 10min。近年来,不断开发出高柱效的离子色谱柱,6个常见的无机阴离子( $F^-$ 、 $Cl^-$ 、 $NO_2^-$ 、 $Br^-$ 、 $NO_3^-$ 和 $SO_4^{2-}$ )在 5min 内可以完全分离,并实现同时定量分析。

(2) 检测灵敏度高 随着信号处理和检测器制作技术的进步,不经过预浓缩可以直接检测  $\mu\text{g/L}$  级的离子。进样量在  $50\mu\text{L}$  时,无机阴离子和阳离子的检测下限在  $10\mu\text{g/L}$  左右。绝对检出量在纳克水平。半导体精密电子工业中所用的超纯水也可以通过在线预浓

缩后用离子色谱法定量测定。如采用预浓缩技术，检测下限可以达到 ng/L 级。但是 应该指出的是采用预浓缩技术会使仪器变得更复杂和昂贵。如果要求更高的灵敏度，必然会受到环境条件的限制，因为  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Na}^+$  等无机离子无处不在。用离子色谱分析氨基酸时，如果采用荧光衍生化检测技术，也可达到 ng/L 级的高灵敏度。

(3) 选择性好 通过选择合适的分离模式和检测方法，可以获得较好的选择性。首先，一定的分离模式只对某些离子有保留，如在分离含有机物的食品、生物等样品时，IC 可以较好地避免有机物的干扰。在使用抑制型电导检测时，可以通过抑制器将被测离子的反离子从体系中排除，只有与被测离子带相同电荷的离子有响应。采用只对被测离子有响应的选择性检测器也可大大提高选择性，如分析含大量  $\text{Cl}^-$  样品中的  $\text{NO}_2^-$  时 如果用电导检测 则  $\text{Cl}^-$  的大峰对  $\text{NO}_2^-$  的定量干扰很大，如果采用紫外检测， $\text{Cl}^-$  没有紫外吸收 只有  $\text{NO}_2^-$  有响应。在柱后衍生化法中，可以通过衍生化试剂与待分析的某类离子的选择性反应来实现选择性分析。

(4) 多离子同时分析在 20min 左右时间内 实现 10 个以上离子的同时分离已是一件很容易的事。现在 同时分离无机离子和有机离子、离子与非离子极性化合物、阴离子与阳离子等不同类型离子已不再困难。另外，离子色谱法的峰面积工作曲线的线性范围一般有 2~3 个数量级，所以，含量相差数百倍或上千倍的不同离子也可一次进样同时准确定量。

(5) 离子色谱柱的稳定性高 色谱柱的稳定性主要由所用填料的类型决定。离子色谱法中使用量多的是有机聚合物作基质的填料，这种填料比反相 HPLC 中通常使用的硅胶基质填料要耐强酸和强碱性流动相。有机聚合物作基质的填料不如硅胶基质填料耐有机溶剂 所以在离子色谱中 为了改善疏水性离子的色谱峰形状 在流动相中加入有机溶剂时必须控制很小的有机溶剂比例（如 5% 以下），可喜的是，近两年已有能耐 100% 有机溶剂和在全 pH 值范围（pH1~14）内适用的高性能离子色谱柱上市。

### 1.2.5 离子色谱法的现状与发展趋势

随着科学技术的发展，离子色谱法的应用会越来越广泛，离子色谱的现状与发展趋势可以大致归纳于表 1-5 中。

近年来，随着毛细管电泳（capillary electrophoresis, CE）技术的迅速发展，有人预言 CE 将逐渐取代 IC 而成为离子性物质的主要分析方法。但多数分析工作者<sup>[6]</sup>坚信在今后相当长的时间内 IC 仍将是离子性物质（特别是无机阴离子）的最佳分离分析方法。其硬件和应用技术还会有较大的发展。例如，在 1999 年的国际离子色谱年会上，离子色谱创始人 Small 提出的电解离子色谱法仅以纯水作流动相就可以进行所有离子性物质的分析，再度引起各国离子色谱工作者的关注。可以说，IC 已经是一种硬件相当成熟的技术，其研究的重点是应用对象和应用领域的开发。而 CE 则仍处于以基础研究为主的时期。无疑，采用 CE 分析离子性物质的应用会越来越成熟和广泛。CE 和 IC 将长期共存，互为补充，给分析工作者的选择余地更大。表 1-6 是 IC 和 CE 作为离子性物质分离分析手段的优缺点

点比较。

表 1-5 离子色谱的现状与展望

比较内容	现 状	发展趋势
仪器	桌式组合结构, 小型化, 计算机处理数据	一体型便携式, 微型化, 计算机全自动控制
固定相	单一离子交换体	多功能基, 混合床
柱尺寸	通常尺寸	半微柱、微柱、毛细管柱
检测器	通用型电导检测和紫外-可见检测 具有一定选择性的电化学、荧光、紫外-可 见光衍生化检测	联用技术: IC/MS, IC/AAS, IC/ICP-AES, IC/ICP-MS
分析对象	阴离子或阳离子分别测定	阴离子和阳离子同时测定 离子和非离子同时测定
主要样品	环境、食品、工业	环境、生物医药
分离模式	单一模式	混合模式

表 1-6 IC 和 CE 的优缺点比较

	IC	CE
优点	应用范围广; 硬件成熟; 检测手段多; 准确度和精 密度高; 可作为标准分析方法; 容易控制选择性。	灵敏度高; 分析速度快; 受样品基体影响 小(尤其在高 pH); 分析成本低。
缺点	分离效率不是很高; 分析速度相对较慢; 有时易 受基体影响(如强酸性样品); 分析成本较高。	稳定性和重现性较差; 灵敏度不太高; 选 择性的控制困难; 检测手段受限制; 难以 用于日常分析。

### 1.3 本书的编著原则与内容安排

在离子色谱法发展初期的 80 年代, 我国出版了几本有关离子色谱法的书籍(包括译著 [7~12])。但在最近十年, 离子色谱法的各个方面都有了很大发展, 反映这一成就的书籍在国内难以找到, 在国际上也为数不多。因此, 本书将在介绍离子色谱法的一般原理与技术的同时, 尽可能将离子色谱法的最新研究成果也作简单介绍。本书重点参考资料为近年离子色谱领域的研究文献以及国外近年出版的离子色谱书籍 [13~14]。

本书作者希望既照顾到化学及相关专业高年级学生和研究生学习离子色谱法基础知识的需要, 也希望能为使用离子色谱技术解决科研和生产中的分离分析问题的科研和技术人员提供有益的参考。色谱的基础理论在有关气相色谱法和液相色谱法的书中都有介绍, 本书只对阐述离子色谱法所必需的理论知识作简单介绍, 侧重分离方法、实验技术和应用, 尽可能提供比较全面的应用实例供使用者参考。

## 参考文献

- [1] Tswett M. Ber Deut Botan Ges, 1906, 24: 316
- [2] Tswett M. Ber Deut Botan Ges. 1906, 24: 385
- [3] Kuhn R, Lederer E. Ber Deut Botan Ges, 1931, 64 : 1349
- [4] Small H, Stevens T S, Baumann W C. Anal Chem. 1975, 47 : 1801~1809
- [5] Gjerde D T, Fritz J S, Schmuckler G. J Chromatogr A, 1979, 186: 509~519
- [6] Haddad P R. J Chromatogr A, 1997, 770 : 281~290
- [7] 邱陵. 高压离子交换色谱分离. 北京: 原子能出版社, 1982
- [8] 牟世芬, 刘开录. 离子色谱. 北京: 科学出版社, 1986
- [9] 张新申. 离子色谱分析及应用. 成都: 四川科学技术出版社, 1986
- [10] 吴宏, 彭中贵. 离子色谱及其应用. 重庆: 重庆出版社, 1988
- [11] 张振森, 陶恭益. 离子色谱原理. 北京: 北京大学出版社, 1990
- [12] [美]弗里茨 吉里德 布朗特著 陈体清译. 离子色谱. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1990
- [13] Weiss J. Ion Chromatography. 2nd ed. Weinheim: VCH, 1995
- [14] イオンクロマトグラフィー研究懇談会編. イオンクロマトグラフィーデータブック 東京(日本)科学新聞社, 1991

## 第 2 章 基础理论

离子色谱法是液相色谱法的一个分支领域，而液相色谱法的基本理论又是在气相色谱法理论的基础上发展起来的，因此，各种色谱分析方法的基础理论都是相通的，只不过离子色谱法有其独特之处。本章仅讨论在离子色谱法中常用的几个基本概念和理论问题，有关柱色谱理论的详细讨论可以参考相关文献和书籍 [1~4]。

### 2.1 基本概念

#### 2.1.1 保留时间与容量因子

色谱分离的实质是利用不同物质（溶质）在固定相和流动相之间的分配系数不同。当两相作相对运动时，被分离物质在两相中反复分配，由于分配次数很多，即使分配系数只有微小差别的多个组分，也可实现相互分离。物质在两相中的分配系数  $K$  可以用该物质在固定相中的浓度  $C_s$  和在流动相中的浓度  $C_m$  的比值表示 即

$$K = C_s / C_m \quad (2-1)$$

在整个离子色谱分离过程中，流动相始终是以一定的流速（或压力）在固定相中流动，并将溶质带入色谱柱。溶质离子因为静电力和其他相互作用，进入固定相后，即与固定相表面的功能基团作用，从而在固定相中保留。同时，溶质离子又被流动相中的淋洗离子顶替（交换）下来，进入流动相。与固定相作用（离子交换作用、分配作用等）越强的离子分配系数越大，在固定相中的保留时间就越长。

从色谱柱流出的溶液（柱流出物）进入检测器连续测定，得到如图 2-1 所示的色谱图，即柱流出物中溶质离子浓度随时间变化的曲线，直线部分是没有溶质流出时流动相的背景响应值，称作基线（base line）。在基线平稳后，通常将基线响应值设定为零，再进样分析。溶质开始流出至完全流出所对应的峰型部分称色谱峰（peak）基线与色谱峰组成了一个完整的色谱图（chromatogram）。如果溶质 A 在固定相中完全没有保留（ $K=0$ ）仅仅是从进样器开始，经过色谱柱和连接管路被流动相带到检测器，这段时间称作死时间（dead time），通常用  $t_0$  表示，即死时间被定义为无保留溶质通过色谱柱所需时间。 $t_s$  是溶质因与固定相作用在色谱柱中所耗费的时间，称溶质保留时间（solute retention time）或真实保留时间，它不包括死时间。通常所说的保留时间（retention time,  $t_R$ ）是指总保留时间（gross retention time）是  $t_s$  与  $t_0$  之和 即

$$t_R = t_0 + t_s \quad (2-2)$$

对于有效的离子色谱分离，色谱柱必须具有保留溶质离子的能力，而且还能使不同溶质离子之间达到足够大的分离。色谱柱的容量因子（capacity factor） $k'$  是溶质离子与色谱柱填料相互作用强度的直接量度，由下式定义：

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_s}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (2-3)$$

式中  $V_R$  和  $V_0$  分别为总保留体积和空保留体积。

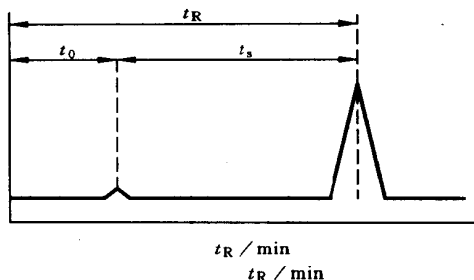


图 2-1 色谱图与保留时间的概念

### 2.1.2 色谱峰的对称性

在理想情况下，色谱峰的形状可以近似地用高斯（Gaussian）曲线描述，如图 2-2 所示。图中  $\sigma$  为标准偏差（拐点处的半峰宽）， $h$  为最大峰高， $w$  为峰宽。

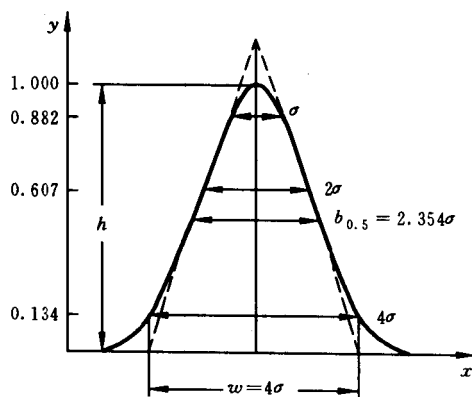


图 2-2 高斯曲线

在任意给定位置  $x$  处的峰高  $y$  可以用下式描述：

$$y = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-y)^2}{2\sigma^2}} \cdot y_0 \quad (2-4)$$

式中  $y_0$  为峰极大值 即  $h$  在实际的色谱过程中，溶质从色谱柱中流出时，很少符合高斯分布，而是具有一定的不对称性。我们可以定义一个不对称因子（asymmetry）来定量地表示色谱峰的不对称程度，如图 2-3 所示 将 10% 峰高处前半峰的宽度设为  $a$  同高度处后半峰的宽度设为  $b$  将  $b$  与  $a$  的比值定义为不对称因子  $A_s$ ，即

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (2-5)$$

当  $A_s$  大于 1 时，色谱峰的形状是前半部分信号增加快，后半部分信号减少慢，这种不对称

峰称作拖尾峰(tailing peak)。引起峰拖尾的主要原因是溶质在固定相中存在吸附作用,因此,拖尾峰也称为吸附峰。当  $A_s$  小于 1 时,色谱峰的形状则是前半部分信号增加慢,后半部分信号减小快,这种不对称峰称作伸舌峰 leading peak 或 fronting peak)。因为伸舌峰产生的原因主要是固定相不能给溶质提供足够数量合适的作用位置,使一部分溶质离子(或分子)超过了峰的中心,即产生了超载,所以伸舌峰也称超载峰。在实际色谱分析中,  $A_s$  通常在 0.7~1.4 范围。作为一个参考标准,如果  $A_s$  在 0.8~1.2 范围内我们可以认为色谱峰具有较好的对称性。

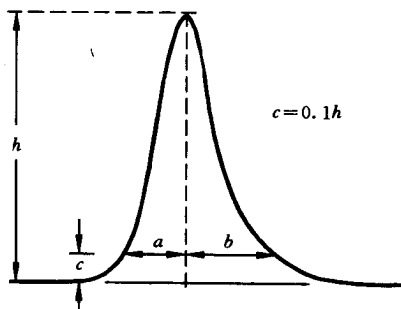


图 2-3 不对称因子的定义

### 2.1.3 分离度

色谱分析的目标就是要将混合物中的各组分分离,两个相邻色谱峰的分度度  $R$  (resolution) 定义为两峰保留时间差与两峰峰底宽平均值之商,即

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_1 + w_2}{2}} = \frac{2\Delta t_R}{w_1 + w_2} \quad (2-6)$$

式中:  $t_{R1}$  和  $t_{R2}$  分别为峰 1 和峰 2 的保留时间,  $w_1$  和  $w_2$  分别为峰 1 和峰 2 在峰底(基线)的峰宽,即通过色谱峰的变曲点(拐点)所作的三角形的底边长度。如图 2-4 所示,计算分离度所需的参数都可以从色谱图中获得。如果色谱峰呈高斯分布,则分离度  $R=2$ (相当于

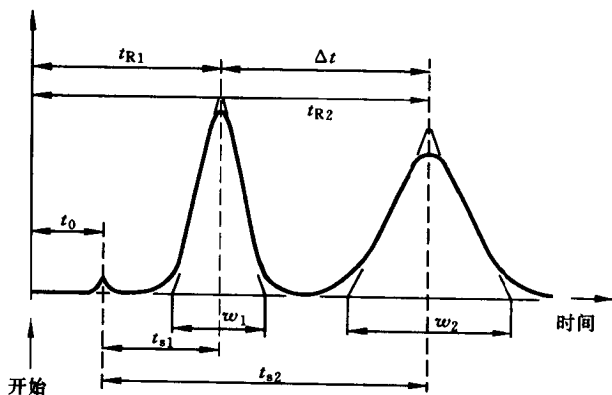


图 2-4 计算分离度和选择性的参数

$8\sigma$  分离)即可完全满足定量分析的需要。因为在基线位置的峰宽  $w$  为  $4\sigma$ ,  $R=2$  时, 两个峰完全到达了基线分离。通过调节色谱条件还可获得更高的  $R$  值, 不过这时的代价将是分析时间增加。如果两组分浓度相差不是太大, 分离度  $R=0.5$  时, 仍然可以看得出两个峰的峰顶是分离的。

#### 2.1.4 选择性系数

两个组分达到分离的一个决定性参数就是两组分的相对保留值, 将其定义为两个色谱峰真实保留时间  $t_r$  之比, 称作选择性系数  $\alpha$ , 即

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (2-7)$$

从图 2-4 可知, 计算选择性系数  $\alpha$  所需参数也可以从色谱图中获得。选择性系数  $\alpha$  主要由固定相的性质决定, 在 HPLC 中, 选择性系数  $\alpha$  也受流动相组成的影响。当选择性系数  $\alpha=1$  时, 则说明在给定的色谱条件下, 两组分不存在热力学上的差异, 无法实现相互分离。

## 2.2 色谱过程动力学<sup>[1,5,6]</sup>

### 2.2.1 色谱过程动力学的几种主要理论

色谱过程动力学研究物质在色谱过程中的运动规律, 如解释色谱流出曲线的形状、谱带展宽的机理, 从而为选择色谱分离条件提供理论指导。用严格的数学公式表述色谱理论需要根据溶质在柱内的迁移过程及影响这一过程的各种因素, 列出相应的偏微分方程组, 求出描述色谱谱带运动的方程式。其数学处理相当复杂, 方程组的求解也非常困难。在实际研究中, 通常要进行适当的条件假设并作简化的数学处理。本书仅对主要动力学理论的概念作一简单的说明, 同时给出一些经过简化的重要的理论公式。

Wilson 等人<sup>[7,8]</sup>提出的平衡色谱理论假设溶质在流动相和固定相之间的分配平衡在整个色谱过程中均能瞬时完成, 于是就可以不考虑传质速率的有限性以及物质分子的纵向扩散性对平衡过程的影响。根据物料平衡的原理就可以推导出描述溶质在两相间分配和移动规律的关系式。正因为平衡色谱理论的假设忽略了传质速率有限性对传质过程的影响, 以及纵向扩散对谱带展宽的影响, 所以它不能说明色谱流出曲线展宽的本质。

Martin 和 Synges<sup>[9]</sup>提出的塔板理论 (plate theory) 是将蒸馏塔中的塔板概念用于色谱柱中溶质的传输所提出的半经验式的理论。塔板理论是最为广泛采用的理论, 它能较好地解释色谱法中保留值的概念, 能粗略地说明色谱流出曲线的形状, 也能说明色谱谱带宽度随柱长的增长而展宽的规律、谱带展宽对理论塔板高度的影响。理论塔板高度是一个很抽象的物理量, 塔板理论也没有回答其决定因素是什么。

Amundson 等<sup>[10]</sup>在大量实验的基础上提出了纵向扩散理论, 并指出了纵向扩散对谱带展宽的影响。在传质速度较快而纵向扩散为谱带展宽的主要因素时, 该理论具有重要的指导意义。

Goldstein 等<sup>[11~13]</sup>提出的速率理论 (rate theory) 不考虑纵向扩散的影响。该理论认为, 在谱带运动过程中, 溶质在流动相与固定相之间的平衡不能瞬间完成, 即传质速率并不是无限大, 物质在两相间的分配平衡需要消耗一定的时间。

人们可以综合运用上述理论解释色谱柱中的物理化学过程。下面分别介绍常用的塔板理论和速率理论。

## 2.2.2 塔板理论

### 2.2.2.1 塔板理论的主要假设

溶质分子通过色谱柱时, 不可避免地会在一定程度上发生谱带展宽, 表现在色谱图上就是色谱峰变宽。谱带展宽是溶质的扩散过程和流动相的流动过程所引起的。谱带展宽的直接后果就是导致相邻色谱峰的谱带部分重叠, 即影响溶质间的分离。所以, 谱带展宽程度是衡量色谱柱效能的重要指标。

塔板理论把气液色谱柱当作一个精馏塔, 沿用精馏塔中塔板的概念描述溶质在两相间的分配行为, 并引入理论塔板数 (the number of theoretical plate)  $N$  和理论塔板高度 (theoretical plate height)  $H$  作为衡量柱效的指标。在离子色谱中也仍然用理论塔板数或理论塔板高度来衡量色谱柱效能。

根据塔板理论, 溶质进入柱入口后, 即在两相间进行分配。对于正常的色谱柱, 溶质在两相间达到分配平衡的次数在数千次以上。最后, 挥发度最大、保留最弱的溶质最先从“塔顶”(色谱柱出口逸出、流出) 从而使不同挥发度(保留值)的溶质实现相互分离。

由于流动相连续地进入柱内, 溶质不可能在柱内各处都瞬间达到平衡。为了便于研究, 塔板理论作了如下一些假设:

(1) 将色谱固定相分成若干不连续的体积单元, 每个体积单元相当于精馏塔中的一块塔板, 实际上在柱内是不可能存在这样的塔板的, 所以称作理论塔板 (theoretical plate)。

(2) 每一块塔板的一部分空间被固定相占据, 另一部分被流动相占据。流动相所占据的空间称为塔板体积 ( $\Delta V_m$ )。流动相从柱入口以一个个  $\Delta V_m$  的体积不连续地加入。

(3) 溶质在每块塔板上都能瞬间在两相间达到平衡。

(4) 在所有塔板上的分配系数都是常数, 与溶质浓度无关, 即相当于线性等温线的情况。

(5) 塔板间的纵向扩散可以忽略。

### 2.2.2.2 理论塔板数和理论塔板高度

理论塔板数  $N$  可以从色谱图中溶质色谱峰的有关参数计算, 常用的计算公式有以下两式:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{b_{1/2}} \right)^2 \quad (2-8)$$

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2-9)$$

式中： $b_{1/2}$ 为半峰宽； $w$ 为峰底宽（经过色谱峰的拐点所作三角形的底边宽）。

由于死时间  $t_0$  不反映溶质与固定相作用的本质，所以有另一种计算公式是将  $t_0$  从总保留时间  $t_R$  中扣除 即计算  $N$  时以真实保留时间  $t_s$  代替  $t_R$  得到的  $N$  值称为有效理论塔板数  $N_{\text{eff}}$  即

$$N_{\text{eff}} = 5.54 \left( \frac{t_s}{b_{1/2}} \right)^2 \quad (2-10)$$

或

$$N_{\text{eff}} = 16 \left( \frac{t_s}{w} \right)^2 \quad (2-11)$$

在测量和计算理论塔板数时，应该注意以下事实：

(1) 理论塔板数  $N$  是人为的抽象概念，用不同方法测得的  $N$  值可能相差很大。在比较性质相近的色谱柱时，或为了给研制和生产的色谱柱建立一个性能评价标准时，理论塔板数是有用的。因为  $N$  不仅与固定相性质和溶质性质有关，而且与几乎所有的实验条件相关 所以 比较柱效时应指定溶质、固定相以及柱温、流动相和进样量等实验条件。

(2) 计算  $N$  的公式是按正态分布方程推导出来的，所以不对称峰的  $N$  的计算就会有误差。这种计算误差有时会高达 10%~20%。

(3) 溶质的进样量不在线性范围内时，峰宽和峰高不与溶质浓度成正比，由此时的峰宽值计算得来的  $N$  是不真实的。

(4) 计算  $N$  时，保留值和峰宽应用同样的单位，如时间都用分 (min)。

当样品分子在流动相和固定相之间的分配平衡已经建立，理论塔板高度  $H$  或有效理论塔板高度  $H_{\text{eff}}$  与塔板数和色谱柱长  $L$  之间的关系如下：

$$H = \frac{L}{N} \quad (2-12)$$

或

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}} \quad (2-13)$$

理论塔高度  $H$  也可以直接从色谱图中该溶质色谱峰的有关测定参数计算：

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{1}{16} \cdot \frac{w^2}{L} = \frac{1}{8 \ln 2} \left( \frac{b_{1/2}}{L} \right)^2 \quad (2-14)$$

式中  $8 \ln 2$  项的得来是已假定色谱峰为高斯分布曲线。

根据式 (2-12) 和 (2-14) 理论塔板数  $N$  也可表示为

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (2-15)$$

可以用下面一个简单的关系式把色谱柱的分离度  $R$  与柱效  $N$ 、选择性系数  $\alpha$  和容量因子  $k'$  联系起来：

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{k' + 1} \right) \quad (2-16)$$

式 (2-16) 右边第一项为柱效项，提高理论塔板数  $N$  不仅分离度  $R$  改善 而且色谱峰变得尖锐 有利于提高检测灵敏度 第二项为柱选择性项 选择性系数  $\alpha$  增大 该项的值也随

增大，即分离度增大；第三项为容量因子项  $k'$  增大的结果也是使分离度增大，不过  $k'$  的增大将增大色谱峰的展宽，从而降低检测灵敏度。

如果将式 (2-16) 重新整理，即可得到理论塔板数  $N$  与  $R, \alpha$  和  $k'$  的关系式：

$$N = 16R^2 \left( \frac{k' + 1}{k'} \right)^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \quad (2-17)$$

对于任何给定的  $\alpha$  和  $k'$  值，即可计算出达到预期分离度所需要的最低柱理论塔板数。

### 2.2.3 速率理论

#### 2.2.3.1 塔板理论的缺陷

塔板理论把色谱柱假想成精馏塔，用处理蒸馏分离过程的方法处理色谱分离过程。塔板理论形象简明，在气相色谱中能很好地解释很多实验过程。在液相色谱中它也能满意地解释色谱流出曲线呈高斯分布，溶质的保留值与分配系数之间的关系，并能成功地用于理论塔板数的计算。但是塔板理论在研究溶质的分配行为时，作了一些假设，这些假设与实际情况不完全符合，尤其是它忽略了流动相流速这一重要参数对柱效产生的影响，所以它无法解释流速不同时柱效不同的原因。液固两相体积的大小直接决定了溶质在柱内扩散时所必须经历的距离长短，塔板理论忽略了两相的体积，因此不能解释溶质在柱内的扩散和传质阻力对保留值的影响。

#### 2.2.3.2 色谱过程中的溶质扩散与传质阻力

为了克服塔板理论的缺陷，van Deemter 等<sup>[14]</sup>在 Martin 等人<sup>[9]</sup>工作的基础上，比较完整地解释了速率理论。后来 Giddings 等<sup>[15]</sup>又作了进一步的完善。速率理论充分考虑了溶质在两相间的扩散和传质过程，更接近溶质在两相间的实际分配过程。

当溶质谱带向柱出口迁移时，必然会发生谱带展宽。谱带迁移速率的大小决定于流动相线速度和溶质在固定相中的保留值。同一溶质的不同分子在经过固定相时，它们的迁移速率是不同的，正是这种差异造成了谱带的展宽。谱带展宽的直接后果是影响分离效率和降低检测灵敏度，所以，抑制谱带展宽就成了高效分离追求的目标。

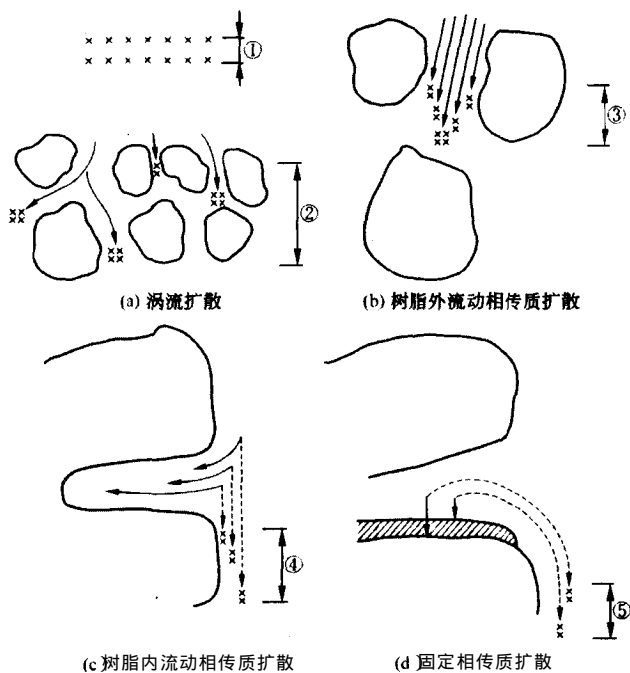
引起谱带展宽的主要因素有涡流扩散 (eddy diffusion)、纵向扩散 (longitudinal diffusion) 和两相中传质阻力 (resistance to mass transfer) 引起的扩散。图 2-5 是色谱柱中溶质谱带展宽的几种主要因素的图示。

##### 1. 涡流扩散

当溶质随流动相流向色谱柱出口时，溶质和流动相受到填料颗粒的阻力，不断改变流动方向，致使同一溶质的不同分子在通过填料的过程中所走的路径不一样，所取路径最长和最短的溶质分子（离子）流出色谱柱的时间相差越大，则峰的展宽越严重。溶质分子在前进过程中形成的这种紊乱类似于“涡流”的流动，所以称之为涡流扩散。图 2-5(a) 表示涡流扩散引起的色谱峰展宽。涡流扩散引起的峰展宽的大小由下式决定：

$$\sigma_c^2 = 2\lambda \cdot d_p \cdot L \quad (2-18)$$

式中： $\lambda$  为填充不规则因子，它由填料颗粒直径  $d_p$ 、粒度范围和柱填充状况决定； $L$  为柱长。由上式可知，采用颗粒细且粒径分布窄的球形填料，并仔细填充避免颗粒破碎，就可以



图中 ①~⑤ 表示所引起的峰展宽的大小

图 2-5 色谱柱中溶质谱带展宽的几种主要因素

减小涡流扩散引起的峰展宽。但是，颗粒过细又会使柱压升高。

## 2. 纵向扩散

纵向扩散是溶质分子在移动方向上向前和向后的扩散，即  $x$  轴方向的扩散。它是由浓度梯度所引起的。样品溶液从柱入口加入，样品带像一个塞子随流动相向前推进，由于存在浓度梯度，塞子必然会自发地向前和向后扩散，引起谱带展宽。纵向扩散引起的峰展宽的大小由下式决定：

$$\sigma_t^2 = \frac{2\gamma_m \cdot D_m \cdot L}{v} \quad (2-19)$$

式中： $\gamma_m$  为弯曲因子或阻碍因子，它反映固定相颗粒的几何形状对溶质分子扩散的阻碍情况， $\gamma_m$  通常小于 1； $v$  为流动相线速度， $D_m$  为溶质在流动相中的扩散系数， $D_m$  与溶质性质、柱温、压力和流动相性质等许多因素有关。溶质分子在溶液中的扩散系数大约只有在气体中的十万分之一，所以液相色谱中溶质的纵向扩散通常是很小的。图 2-6 是纵向扩散引起峰展宽的示意图。随着样品带在固定相中的移动，因纵向扩散使样品带宽逐渐增加，相应地，得到的色谱峰就越来越宽而矮。

## 3. 流动相传质阻力引起的扩散

溶质分子要从流动相转移到固定相中，就要从流动相主体扩散到液固界面，阻碍这一扩散过程的阻力称流动相传质阻力。溶质从流动相主体扩散到两相界面需要时间，而同一溶质的不同分子处在离两相界面距离不等的位置，它们到达两相界面所需的时间也就不同，有些溶质分子往往还没到达界面就被流动相带着继续向前，这就阻止了溶质在两相间

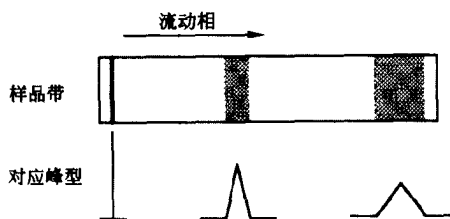


图 2-6 纵向扩散引起样品带和色谱峰展宽示意图

瞬时建立平衡 造成有的分子超前 有的分子落后 使溶质谱带展宽。另外 离填料颗粒表面近的溶质因受功能基的作用，要比离填料颗粒表面远的溶质移动得慢，从而引起谱带展宽 如图 2-5(b)所示。流动相传质阻力引起的谱带展宽程度由下式决定：

$$\sigma_m^2 = \frac{\omega \cdot d_p^2 \cdot L}{D_m} \cdot v \quad (2-20)$$

式中柱系数  $\omega$  由柱填料性质和柱填充过程决定。

当使用多孔固定相时，除颗粒间的流动相外，颗粒内部孔隙中还存在不随主体流动相移动的所谓停滞流动相。使用这种固定相时还应考虑溶质在停滞流动相中的传质阻力所引起的峰展宽 如图 2-5(c) 所示。现在的高效离子色谱中已不大使用这种多孔固定相，所以通常不考虑这部分峰展宽。

#### 4. 固定相中传质阻力引起的扩散

如图 2-5(d) 所示，溶质分子到达两相界面后，将继续扩散到固定相内部达到分配平衡，然后又返回到两相界面。溶质在这一移动过程中的阻力称为固定相传质阻力。固定相传质阻力引起的谱带展宽由下式决定：

$$\sigma_s^2 = \frac{f \cdot k_c \cdot d_f^2 \cdot L}{D_s} \cdot v \quad (2-21)$$

式中： $f$  为固定相因子，与固定相性质有关  $d_f$  为固定相厚度  $D_s$  为溶质在固定相中的扩散系数  $k_c$  为容量因子。

### 2.2.3.3 van Deemter 速率方程式

色谱峰的总展宽  $\sigma^2$  是各种因素引起的展宽的总和，即

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^n \sigma_i^2 \quad (2-22)$$

色谱柱的总理论塔板高度  $H$  可以表示如下：

$$\begin{aligned} H = \frac{\sigma^2}{L} &= \frac{\sigma_c^2 + \sigma_i^2 + \sigma_m^2 + \sigma_s^2}{L} \\ &= 2\lambda \cdot d_p + \frac{2\gamma_m \cdot D_m}{v} + \frac{\omega \cdot d_p^2}{D_m} \cdot v + \frac{f \cdot k_c \cdot d_f^2}{D_s} \cdot v \end{aligned} \quad (2-23)$$

如果色谱条件已经确定，只有流速是变量时，表示  $H$  与  $v$  关系的上述 van Deemter 方程式可以简写如下：