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，其中一个是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）是一种在经典液相柱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'。

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

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_c 之和。V_c 又称校正后保留容积，它与 k' 的关系为

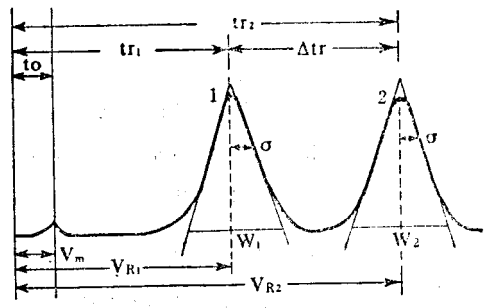


图 1-1　色谱流出曲线——色谱图

$$V_R = V_m + V_c = V_m + KV_s = V_m + k'V_m \qquad \text{式(1-2)}$$

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

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

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)。

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

在液相色谱中，液体在一定的压力下($<300kg/cm^2$) 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

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

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

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

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。

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

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

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

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。

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

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

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

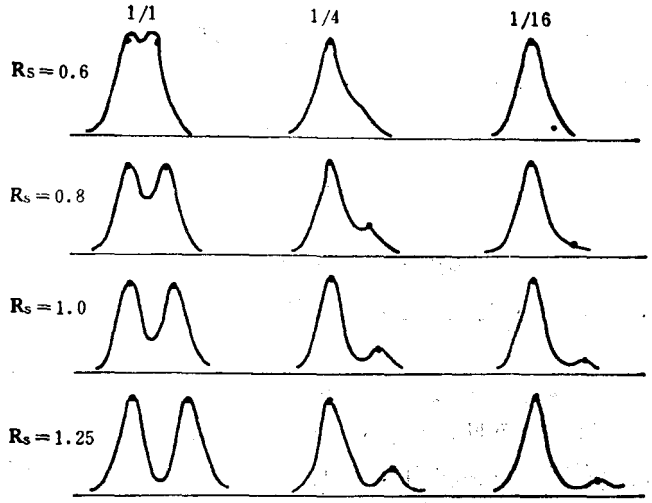


图 1-2　不同峰宽对分离度的影响

$$R_s=\frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{t_{r_2}-t_{r_1}}{t_{r_2}-t_0}\cdot\frac{t_{r_2}-t_0}{t_0}\cdot\frac{1}{1+k_2'}\right)=\frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{t_{r_2}-t_{r_1}}{t_{r_2}-t_0}\cdot\frac{k_2'}{1+k_2'}\right)$$

$$\because\ \alpha=\frac{k_2'}{k_1'}=\frac{t_{r_2}-t_0}{t_{r1}-t_0}=\frac{t'_{r_2}}{t'_{r_1}},$$

$$\therefore\ R_S=\frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2'}{1+k_2'}\right)\qquad\text{式(1-9)}$$

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 的影响就越来越小。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

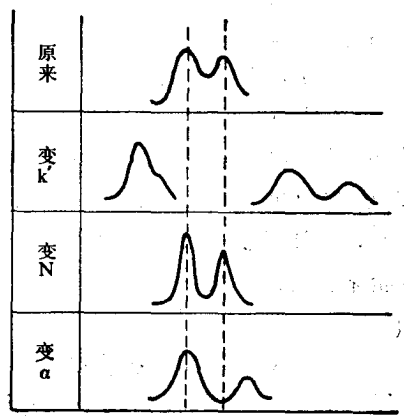


图 1-3　影响分离度的因素

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

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

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。

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

由峰底宽 $W = 4\sigma$，上式可写成

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

也可采用峰半宽 $W_{1/2}$ 来计算 N

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

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

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

$$N_{有效}=16\left(\frac{t_r'}{W}\right)^2=16\left(\frac{t_r}{W}\right)^2\cdot\left(\frac{t_r'}{t_r}\right)^2=N\cdot\left(\frac{k'}{1+k'}\right)^2 \qquad 式(1\text{-}15)$$

$N_{有效}$称为有效塔板数。上式中 t_0 越小，t_r' 越接近 t_r，$N_{有效}\approx N$。同样，如果 k' 越大，t_0所起的影响也越小。有关 R_s、α 与 $N_{有效}$的关系可用图1-4来表示。

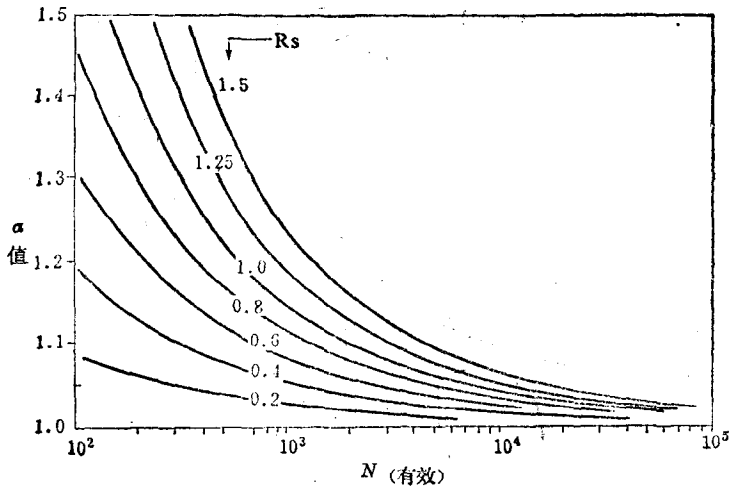


图 1-4 R_s、α 与 $N_{有效}$的关系

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

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

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 $N_{有效}$ 相对应的板高称为有效板高 $H_{有效}$。

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 $\sigma_{总}$ 来表示，则等于下列各因素引起峰展宽的均方差的总和。

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

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 $H_e = 2\lambda d_p$ 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 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。

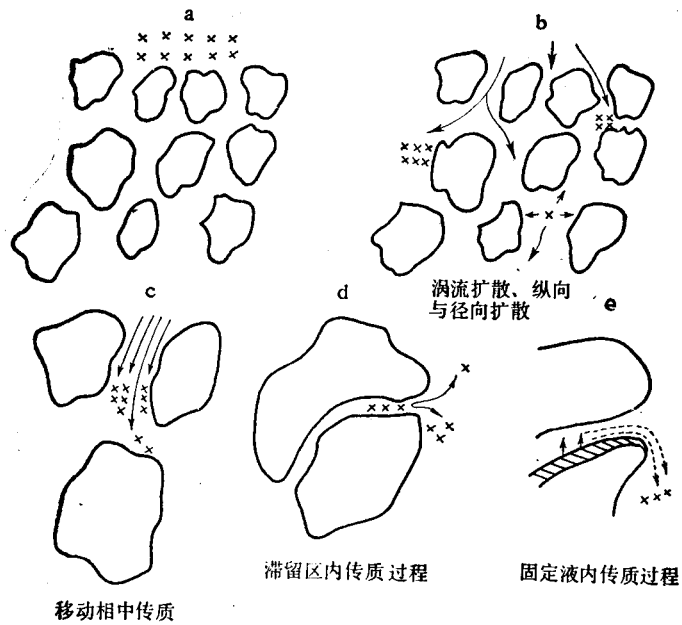


图 1-5 影响柱内峰展宽的因素

2. 纵向扩散 $H_d = \dfrac{C_d D_m}{u}$ 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(＞10mm/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：

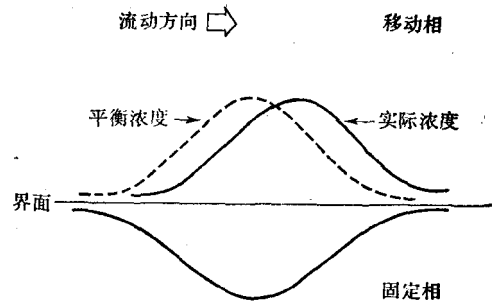


图 1-6 移动相与固定相的平衡

(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

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

(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。

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

(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。

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

综上所述，由柱内峰展宽所引起的板高变化可归结为

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

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

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

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～40μm 直径的玻珠表面 1～2μm 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

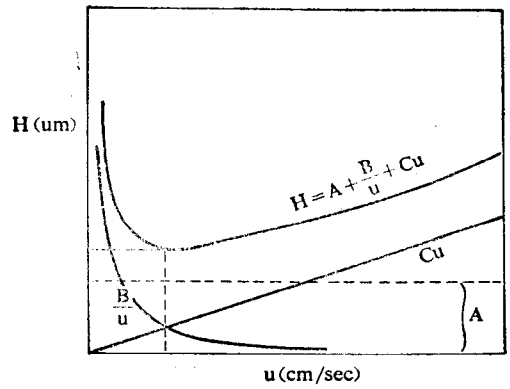


图 1-7 H-u 曲线

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，＜10μm 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，5μm 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。

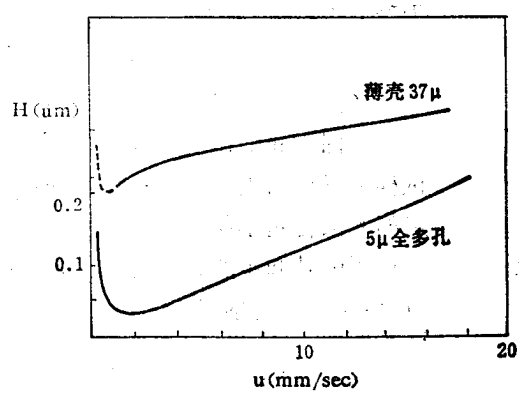


图 1-8 不同类型填料的 H-u 曲线

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，

$$\frac{d_c^2}{L d_p} \geqslant 16\left(\frac{2}{v}+0.15\right) \qquad \text{式(1-21)}$$

式中 v 为折合流速，等于 $\frac{u \cdot d_p}{D_m}$。如管径 d_c 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 5μm，$v=3$，则 $d_c \approx 4.5$mm。

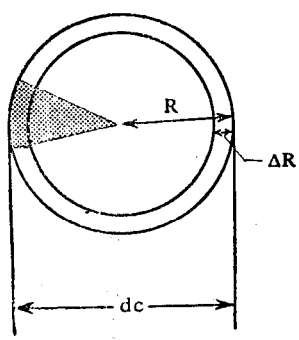


图 1-9 管壁区

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，$d_p \approx 20\mu$m，$d_c=2.5$mm，管壁区的径宽为 $\Delta R=0.6$mm，其体积占柱的总体积 42%；如 d_p 为 5μm，$d_c=5$mm，$\Delta R=0.15$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)。

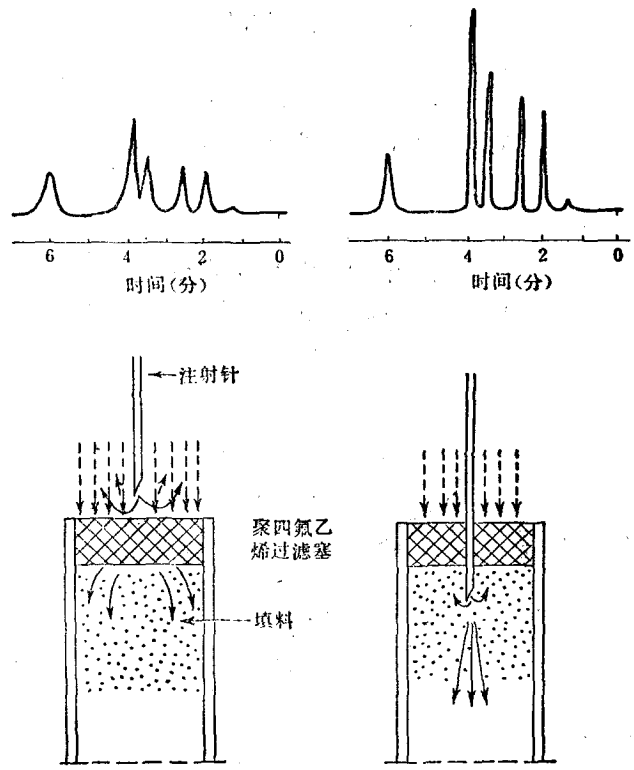


图 1-10 进样方式对峰展宽的影响

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心脏部分，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]。

折合板高 $h = H/d_p$ 式(1-22)

折合流速 $\nu = \frac{u \cdot d_p}{D_m}$ 式(1-23)

柱阻力参数 $\phi = \frac{\Delta p \cdot d_p^2}{L \cdot \eta \cdot u}$ 式(1-24)

h 代表以粒度为单位的板高，如 $d_p = 5\mu m$，$H = 0.015mm$,则 $h = 3$ ν 代表通过一个柱所需要的扩散速率，如 $d_p = 5\mu m$，$u = 10mm/秒$，$D_m = 2 \times 10^{-5} cm/秒$,则 $\nu = 2.5$。ϕ 代表用一定粒度的固定相装成长 L 的柱上,粘度 η 的移动相冲洗，达到一定的线速 u 所需的柱压 Δp。如柱阻力越大，达到所需线速的柱压降 Δp 也越大。

根据上述概念，Knox 等将板高方程改成能适用于不同粒度的填料，不同粘度的洗脱液和不同扩散系数的折合板高半经验公式。

$$h = A\nu^{0.33} + \frac{B}{\nu} + C\nu \qquad 式(1-25)$$

上式中 A、B、C 为常数，等式右边第一项是偶合涡流扩散项，第二项是纵向扩散项，最后一项是传质速率项。根据大量实验的归纳总结，式中 $A<2$，$B<4$，$C<0.2$。若以 $\log h \sim \log \nu$ 作图(图 1-11),当 $A=1$,$B=2$,$C=0.1$ 时，所得曲线的最小点处的 $h_{最小} \approx 2.5$;$\nu \approx 3$,亦即当 $\nu=3$ 时，代表柱效的板高 H 为填料粒度的 2.5 倍。以填料粒度 $d_p = 5\mu m$ 为例，$h \doteq 2.5$，$H = 12.5\mu m$，相当于 80,000 板/米。

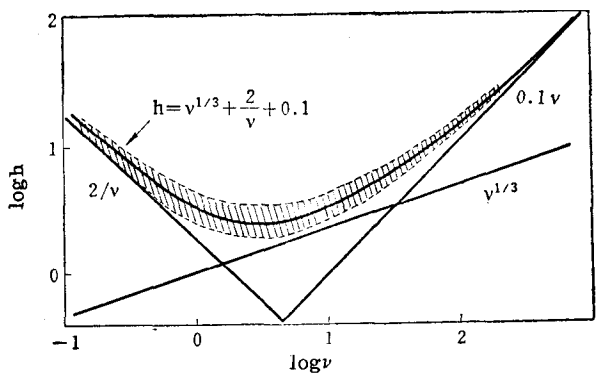


图 1-11 折合板高-折合流速曲线

在大多数情况下，式(1-25)中 $B=2$,由 A、C 的数值可以判断色谱柱性能的优劣。

(1) A 低(0.5)，C 低(0.05)图 1-12-a。

若曲线的最小点处于 $h<3$,则 $\nu=100$ 时,$h<10$，说明色谱柱装填得好，传质速率高。

(2) A 低(0.5),C 高 (0.3)(图 1-12-b)。

柱装填得好,但传质速率低,不宜做快速分析。

(3) A 高 (3),C 低(0.05),而且曲线最小点处平坦。(图 1-12-c)

说明装填差,柱效低,但传质速率好。

(4) A 高(3),C 高(0.3)。(图 1-12-d)

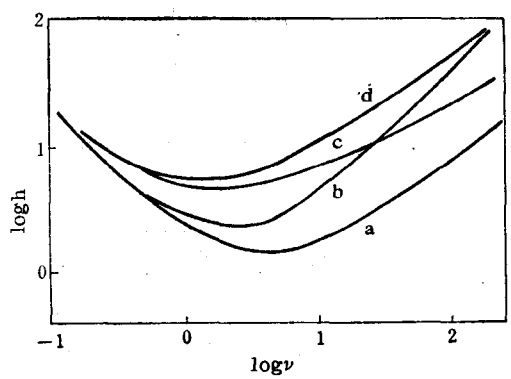


图 1-12 参数 A、C 的影响

说明二者都差，此柱性能不合格。

实际上，上述 Knox 方程中的常数 A、B、C 并非完全与 d_p 无关的参数。对不同的 d_p，h–ν 曲线是变化在某一区间范围内的（图 1–11 中斜线部分）。

衡量柱效的另一指标是透过度。柱透过度可由 t_0 反映出来，t_0 小，柱透过度好，分离时间也短。

$$t_0 = \frac{L}{N} = \frac{\eta L^2 f}{K_0 \cdot \Delta p} \qquad \text{式(1–26)}$$

式中 η——洗脱液粘度，f——柱的总孔度（total porosity）等于 $\frac{F \cdot t_0}{V_c}$，V_c——层析柱空管容积，K_0——柱的比透过度（Specific Permeability），为

$$K_0 = \frac{\eta L f u}{\Delta p} \qquad \text{式(1–27)}$$

K_0 与 F、η、L 成正比，与 Δp 成反比。在相同的 η 和 L 时，达到所需流速的柱压越小，即 $u/\Delta p$ 越大，柱的透过性越好。因此，在相同的实验条件下，$u/\Delta p$ 可直接用作衡量柱透过性的指标。另外，由上式也可知，要使柱透过性好，就要用 η 小的洗脱液。

为了使代表柱透过度的参数能包括填料粒度的因素，可应用流动阻力参数 ϕ 代替 K_0。

$$\phi = \frac{d_p^2}{K} \qquad \text{式(1–28)}$$

其中 $K = \frac{\eta L \cdot u}{\Delta p}$，$K_0 = K \cdot f$。

以上各式中，K 或 K_0 应越大越好，而 ϕ 则应越小越好。一般 ϕ 在 500～1000 范围内应认为是可用的。

透过性好的柱一定是分离速度快，但实际应用中，如何选择流速以便得到最佳柱效和最快的分离速度也是必须注意的问题。

如所周知，H–u 曲线最小点附近的板高最小，柱效最高，但对分离速度来说，最小点的流速并不是最佳流速。以 (H/u)–u 作图（图 1–13），当 u 达到一定值时，u 再增加 H/u 渐趋不变，亦即此时移动相经过每一塔板的时间（$H/u = t_0/N$ 达到最小值，这时的速度称为最佳流速 $u_{最佳}$。我们将国产 YWG–5μ 和 YWG–10μ 两种全多孔微粒硅胶装填成 10cm 长的柱，以己烷作洗脱液时所得的 H/u–u 曲线如图 1–13。其中三联苯（$k' = 5$）在 YWG5μ 硅胶上 $u_{最佳} \approx 3$mm/秒 $H/u \approx 4$ 毫秒，$\Delta p = 80$kg/cm²，$t_0 = 33$ 秒，$t_r = 198$ 秒。由 $H/u = t_0/N$ 计算，三联苯在最佳流速下只需 3.5 分钟左右即可以 $N = 80{,}000$ 板／米的柱效分离完毕[4]。

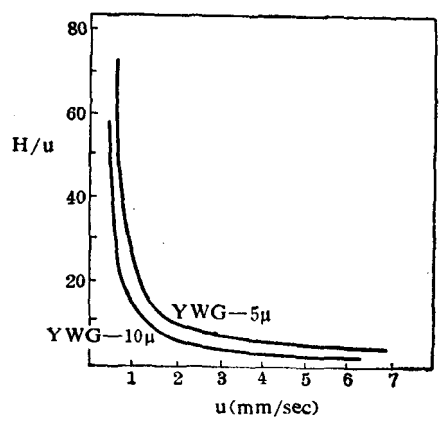


图 1–13 H/u–u 曲线

（张仁斌）

参 考 文 献

[1] Knox JH et al, J Chromatog., 122 (1976), 129

[2] Knox JH, J Chromatog. Sci., 15 (1977), 352

[3] Kikland JJ, J Chromatog. Sci., 15 (1977), 303

[4] 张仁斌等,中国科学 №.5 (1979), 455

[5] Bristow PA & Knox JH, Chromatographia, 10 (1977), 279

2 分离方法

2.1 液固吸附色谱

液固吸附色谱是液相色谱中最古老的一种方法。早在1903年茨维特就是应用这种方法成功地分离植物色素而创造了色谱法。七十多年来，吸附色谱仍然是液相色谱最重要的方法之一，并被广泛地应用。

高效液固吸附色谱与经典吸附色谱在方法原理上没有什么差别，而仅在色谱动力学性质上进行改进和提高，如采用粒度小(5 或 10μm)、筛分狭(±1～2μm)的吸附剂，以及应用高压匀浆装柱技术，提高了层析柱内填充床的致密均匀性，从而获得很高的柱效。

2.1.1 吸附色谱的保留机制

在装填有吸附剂的层析柱内，当洗脱液流过吸附剂时，吸附剂表面被溶剂分子以单分子层形式完全占有。当试样分子 X 被洗脱液带入柱内，在迁移的过程中便扩散到吸附剂表面和微孔内，并在所有表面上与已结合的溶剂分子 S 进行竞争吸附：

$$X + S_{吸附} \rightleftharpoons X_{吸附} + S \qquad 式(2\text{-}1)$$

如果试样分子 X 对吸附剂表面吸附基团（如硅胶的硅羟基）吸引力(包括色散力,诱导力、氢键力等）大于溶剂分子 S，则 X 取代 S 而吸附在吸附剂表面。在一定的浓度范围内，这一吸附——脱附过程是热力学平衡过程（线性等温吸附）。试样分子 X 的吸附力大小取决于以下二个因素：

(1) 吸附剂上被吸附与未吸附的表面相对容积。

(2) 试样分子 X 的净吸附能。

其中第一个因素主要取决于吸附剂的比表面积和表面吸附单分子层的厚度；后一个因素取决于吸附剂的理化性质,试样分子的组成和结构,以及洗脱液的性质。如硅胶吸附剂，其表面吸附基团是硅羟基，对含极性基团的样品分子，它的吸附力强，k' 也就大；而对那些极性小的烃类化合物吸附力就弱，k' 也小。不同极性或不同数量同一极性基团的试样分子，它们之间对吸附剂的作用也大小各异，从而得到很好的分离。对异构体的分离，液固吸附色谱也具有很高的选择性，这主要是各种异构体与表面吸附基团之间的吸附分布不同所致。

2.1.2 吸附固定相的结构和类别

高效液相色谱中应用最多的是硅胶吸附剂,其特点为：(1)不会与试样产生反应（氧化铝有时会产生催化反应）；(2)由于多孔结构而具有高的线性容量（上样

量)；(3)机械性能强，不会溶涨；(4)在制造过程中可以控制其物理性能，如比表面，孔结构等。

如前所述，要使液相色谱达到高速和高效，关键在于改进和提高层析柱填料的结构、性能和填充均匀性。经典液相柱色谱中的填料由于采用颗粒大，粒度范围广和不规则形状，柱内填充床很难达到均匀、紧密，不均匀的铺层所产生的涡流引起色谱区带明显扩散。另外，这些多孔型吸附剂的深孔显著地延缓了试样分子的传质过程，也引起了色谱区带的扩散。

为了克服上述缺点，高效液相色谱中主要采用以下二种结构类型的吸附剂填料。

1．薄壳型

这种填料具有直径 35μm 左右的坚实的玻璃核心，外面包覆一层很薄的(1～2μm)多孔色谱材料(如硅胶、氧化铝、聚酰胺或离子交换树脂)，这就提高了承受高压的机械强度和填充的均匀性。而且由于包覆的薄层中的浅孔，有些薄壳型填料还采用大的孔径(500Å)，从而显著减低了分子在吸附剂深孔中缓慢传质过程所造成的色谱区带扩散。这类填料称为表面多孔珠（Superficially porous bead)、多孔层珠(Porous layer bead）或薄壳珠(pellicular bead)，其中如美国 Waters 公司的 Corasil 是表层不控制孔径的，孔径为 100Å，表面积为 7～14m²/g 的薄壳型硅胶填料。Du-pont 公司的 Zipax 系列是控制表面孔径的薄壳型硅胶填料，它的孔径为 500Å 左右，所以比表面积只有 1～2m²/g。其他牌号名称如西德 E. Merck 公司的 Perisorb，美国的 Bondapak 等都属于这类填料，性质大同小异。

薄壳型填料的主要优点是透过性好，有利于快速分析。缺点是比表面积小，上样量低，柱效不够高(约 1,000～5,000板／米)。

2．全多孔微粒型

根据前章所述理论，代表层析柱柱效的板高 H 是与填料直径 d_p 的平方成正比。粒径减小，填料的微孔相对深度也减小，这样可以加快传质速率，因此，目前高效液相色谱中大都采用这种全多孔微粒型吸附剂填料，常用的是 5μm 和 10μm 二种，筛分范围一般为 ±1～2μm 左右，在应用高压匀浆装柱和点进样技术，最高柱效可达 80,000～100,000 板／米。它的主要优点是柱效高、上样量大，缺点是透过性不如薄壳型填料。

全多孔微粒型填料也分二类，一类是不规则型的硅胶或氧化铝，如 Lichrosorb SI-60，μ-Porasil，Partisil-10 等，另外一类是球形的全多孔微粒吸附剂，如美国

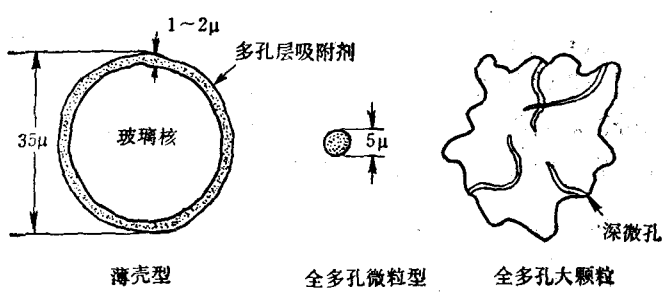


图 2-1 吸附剂的类型

Du-Pont公司的 Zorbax 是表面孔径均一的球形硅胶，据报导它是由 50Å 的硅胶微粒凝聚成 5～7μm 的球形填料，其特点是透过性优于不规则形微粒硅胶。还有 E. Merck 公司的 Lichrospher 也是球形微粒硅胶。球形微粒硅胶与不规则形的柱效相近，但前者透过性要比后者大一倍。

2.1.3 吸附固定相的性质

在液固吸附色谱中控制保留值和选择性的重要的因素之一是吸附剂的比表面积和表面活性，吸附剂的孔径和比孔容则是与比表面积相关的参数。

1．比表面积 S

硅胶或氧化铝这类吸附剂比表面积的大小直接关系着容量因素 k'。根据

$$k' = K\frac{V_s}{V_m} \qquad \text{式(2-2)}$$

其中 V_s 是固定相容积，V_m 是移动相容积。当平均孔径 D 保持恒定时，V_s 与比表面积成正比，由此可知，k' 也取决于比表面积 S。

吸附剂的比表面积与孔径大小成反比。吸附剂的孔径越大，比表面积就越小。表 2-1 为球形微粒硅胶 Lichrospher 的平均孔径与表面积、孔容之间的关系。

表 2-1 球形硅胶 **Lichrospher** 的规格[1]

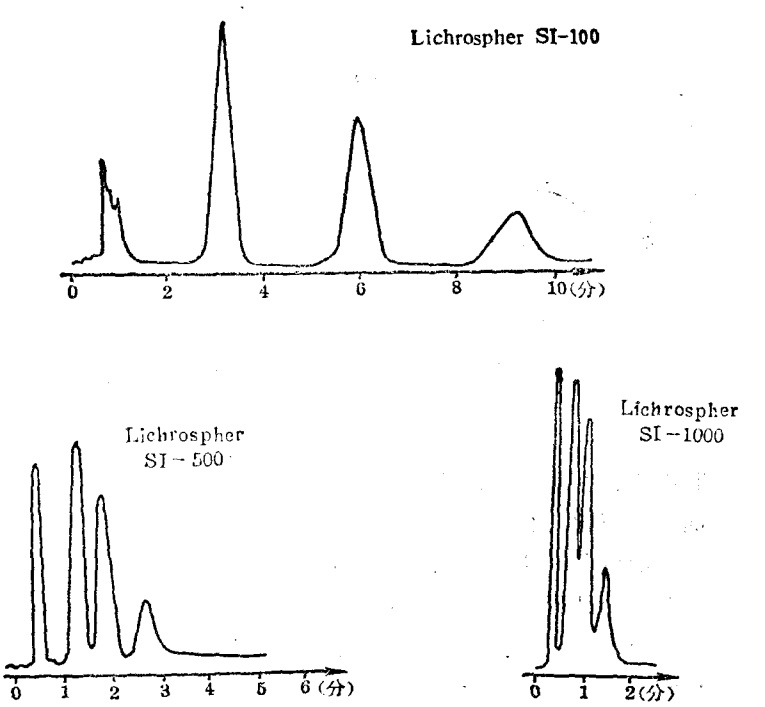
填　　料	粒　度	比表面积	平均孔径	孔　容
Lichrospher SI-100	5μ	250m²/g	100Å	1.2ml/g
SI-300	5μ	250m²/g	300Å	2.0ml/g
SI-500	5μ	50m²/g	500Å	0.8ml/g
SI-1000	5μ	20m²/g	1000Å	0.8ml/g
SI-4000	5μ	6m²/g	4000Å	0.8ml/g

图 2-2为用不同孔径的球形硅胶 Lichrospher 分离 Oestrogen 的色谱图[1]。由图可见，吸附剂的孔径越小，k'越大。用 SI-100分离 4 个组分需 10 分钟，而用 SI-1000 则只需 1.5分钟。当然，孔径越大，比表面积越小，上样量就少。一般分子量小于 2000 的试样，用孔径 100Å 的吸附剂(硅胶)是比较合宜的。

2．表面活性

吸附剂硅胶表面的硅羟基是极性的吸附基团，它的类型、分布和反应性决定了吸附剂的表面活性（吸附能力的大小）[2]。在室温情况下，硅胶表面除了存在着表面羟基外，还有一定量的物理吸附水，这些表面吸附水是借氢键力结合在硅胶表面羟基上。当温度升高，表面吸附水逐渐减少。到 200°C时，表面吸附水便失去殆尽，此时硅胶上只剩下表面羟基，表面活性最大，吸附力最强，这一过程称为吸附剂的活化。温度超过 200°C以后，硅胶表面羟基开始逐渐转变成硅氧烷基，这称为去羟基作用 dehydroxylation 。到 500°C，大部分羟基都转化成硅氧烷基，此时若在冷后加水，这一作用可以逆转，硅氧烷基仍可转化成硅羟基，但若温度达到 700°C，则全部羟基都转变成硅氧烷基，而且不能再逆转（图 2-3）。

如上所述，硅胶的吸附性能与其表面的羟基性质和物理吸附水有很大关系，表面吸附水越多，活性越低，反之，如果硅胶表面只有硅羟基则活性最大。因此吸附剂的活性可借表面吸附水的量来加以调节控制，这称为吸附剂的去活化作用。



b

图 2-2　硅胶孔径对分离速度的影响

柱：200×3mm，洗脱液：0.5%乙醇/正庚烷，流量：2.5ml/分，试样 Oestrogen

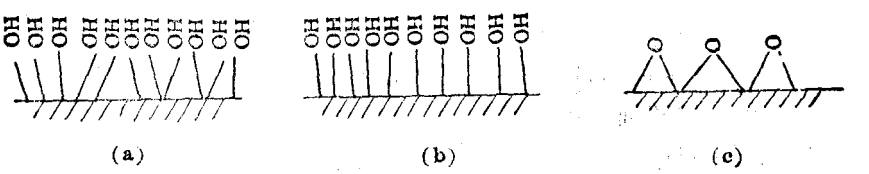


图 2-3　硅胶表面活性

(a) 室温　(b) <200℃　(c) >700℃

Snyder 认为[8]，以硅胶表面50～70%面积蒙覆单分子层水作为吸附剂去活化的标准条件，方法如下：

将硅胶在 125～150°C干燥 8～16小时后，置于磨口瓶中，在干燥器内放冷，然后加入相当于硅胶比表面每 100m² 0.02～0.04g 的重蒸馏水（例如硅胶表面积为300m²/g，则每 g 吸附剂，需加入 0.06～0.12g 的水），激烈振摇直到所有结块完全消失为止。静置过夜待用。

上述方法可以严格控制吸附剂表面水的含量，从而调节活度。如需较高的活度可酌量减少水的加入量，或在上述处理好的吸附剂中加入按比例量的干吸附剂；如需较低活性则加入按比例量的水。

在实际应用时，洗脱液中的含水量对吸附剂活性也有很大影响，特别是用低极性洗脱液（如烷烃、二氯甲烷等）分离极性小的化合物，影响更为显著。图 2-4 是几种不同的硅胶分离 Linuron 时[1]，洗脱液二氯甲烷中含水量对 k' 的影响。由图中

可见，当含水量增加时 k' 显著降低，超过 1500PPM 时，曲线变化平坦，k' 几近不变，此时硅胶表面蒙覆的水层已经起液液分配色谱中的固定液的作用了。因此严格控制洗脱液中水含量也是保证 k' 重复性的很重要因素。在实际使用中，洗脱液含水量可将分子筛干燥过的溶剂与水饱和的溶剂（就是干的和湿的溶剂）各一半混合而成。为了避免水滴和溶剂的非均相，可将溶剂通过含 30% 水的粗颗粒硅胶柱制得。

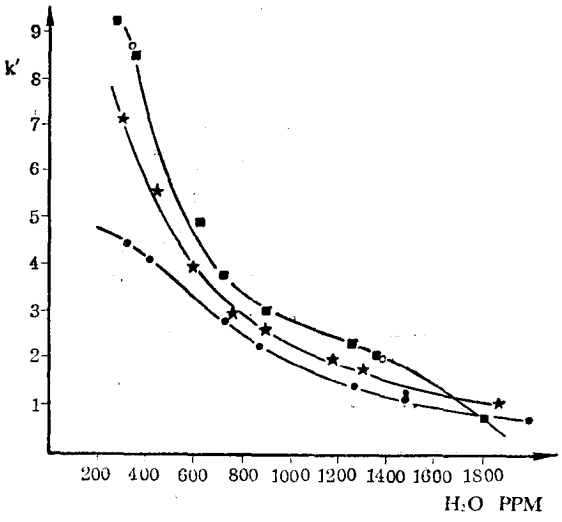


图 2-4 洗脱液含水量对 k' 影响

●——Lichrosorb SI-100 (5μm)
★——Partisil-5 (5μm)
■——Lichrosorb SI-60(5μm)
洗脱液——二氯甲烷

吸附剂的去活化作用亦可在洗脱液中加入少量极性的或中等极性的溶剂来调节控制，这种溶剂就称为极性调制剂（Polarmoderator）。用这种方法去活化有以下优点：

（1）当增加试样负载量时可减少拖尾

（2）提高柱效

（3）减少保留值的变化

常用的调节吸附剂的活性的极性溶剂有乙醇、异丙醇、乙腈、乙酸乙酯等，但它们的用量不能超过 1%，否则就变成混合溶剂的洗脱液了。

3．样品负载量和线性容量

线性容量是指在线性等温吸附线的范围内，单位重量吸附剂上能够负载试样的量，试样（克）/吸附剂（克）。Snyder 提出[8]吸附剂的线性容量用 $\theta_{0.1}$ 来表示，它的定义是引起容量因素 k' 改变 10% 时的样品负载量（图 2-5）。$\theta_{0.1}$ 取决于试样的结构组成、溶剂的组成、吸附剂的性质和温度。对给定的溶质和溶剂来讲，$\theta_{0.1}$ 主要取决于吸附剂的比表面和表面活性，比表面越大，线性容量也越高。如孔径为 60～100Å 的全多孔微粒型硅胶的 $\theta_{0.1}$ 在 10^{-3}～10^{-4}g/g 范围，而薄壳型硅胶则只有 10^{-5}～

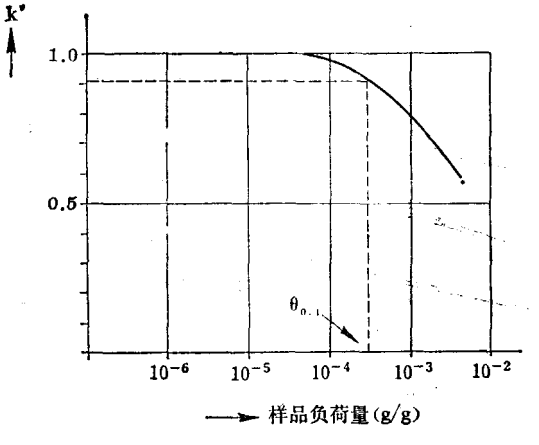


图 2-5 样品负荷量对 k' 的影响