

高效液相色谱中有效理论塔板数的 变量因素和柱效率的研究

钟展环^①

中国地质大学应用化学系 武汉 430074

摘要 研究了高效液相色谱(HPLC)、高效离子色谱(HPIC)、高效离子排斥色谱(HPEIC)和低压离子色谱(LPIC)中有效理论塔板数的变量因素,提出了能定量表述柱分离效率的参数——柱效率 S 及其计算方法。给出了其它色谱参数(分离度 R_s , 分离系数 α 和容量因子 K')与有效理论塔板数及柱效率相关的实验结果。

关键词 理论塔板数 有效理论塔板数 柱效率 高效液相色谱 高效离子色谱 高效离子排斥色谱 低压离子色谱

1 概述

高效液相色谱法,包括高效离子色谱法,是重要的分析测试技术之一,适用范围很广。在医药学、生命科学、食品卫生及环境保护等方面为一种主要的分离、检测手段。近年来,色谱分析工作者对高效液相色谱中保留值规律方面的研究相当重视,对液相色谱分离原理、选择液相色谱的分离条件及其与流动相组成的相互关系等基础理论方面做了许多研究。采用统计热力学方法,已成功地提出了反相液相色谱溶质保留的机理^[1~3],并得到色谱分析工作者的普遍重视。

本文根据实验获得的保留值和谱峰半峰宽数据来研究高效液相色谱中的有效理论塔板数的变量因素,探讨它在建立色谱分析方法时的作用及意义。

对于一个色谱柱的分离效率,常用理论塔板数 n 来表示,如果色谱峰对称,并呈高斯正态分布, n 可近似地表示为^[4,5]:

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (1)$$

式中: t_R 是保留时间, $W_{1/2}$ 为半峰宽。如果采用相对保留时间 t'_R ($t'_R = t_R - t_{R0}$, t_{R0} 死时间指与固定相不发生保留的某物质从进样直到检测器出现信号极大点的时间),则可计算出有效理论塔板数 N :

$$N = 5.54 \left(\frac{t'_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2)$$

式(1)和式(2)是根据马丁的平衡塔板理论,将色谱作为一个具有一定有效塔板数的柱子来处理的。即假定在一个塔板中固定相与流动相之间达到局部的平衡推导出来的,这虽与真实情况有一定偏差,但可描述色谱峰的展开与变宽;可从实验色谱曲线计算获得色谱信息,故被广泛应用。普遍认为,在给定操作条件下(指色谱柱、流动相、流速和环境温度等操作条件相同的情况下),峰宽随着组分在柱中前进而加宽,两个相近的色谱峰如其峰的宽度相等,则两峰的理论塔板数相同^[6],还认为色谱图上不同的峰其理论塔板数相等,且不随容量因子 K' 值的改变而变化,断定半峰宽随保留时间呈比例地变

^① 钟展环 男,教授(理学博士),近年从事色谱分析技术研究工作。现在北京优联光电技术部从事高效液相色谱分析技术开发工作。

化^[7]。如采用有效理论塔板数 N , 在选定柱和给定操作条件下, N 对色谱图上每一个样组分峰均为常数^[7]。市售的色谱柱均标出理论塔板数值, 各种色谱方法(如药典)也规定使用柱的理论塔板数值。因此, 理论塔板数和有效理论塔板数被理解为一个常数, 用作色谱柱柱效的度量标准。如采用有效理论塔板数, 可以更好地表示样品组分与固定相和流动相的相互作用。

但是, 笔者从高效液相色谱、离子色谱、排斥色谱、低压离子色谱等各种方法中获得的许多实验数据证明, 理论塔板数和有效理论塔板数(为简化, 以下均用有效理论塔板数 N 表示)受到如流动相流速、温度、样品量等各种色谱参数的影响。即使在给定的完全相同的操作条件下, 如同一根分析柱、相同的流动相、流速和环境温度等等色谱条件所获得的色谱图上的每一个组分峰的 N 值并不相同。换言之, 一个色谱图上找不到相同 N 值的两个峰。因为半峰宽不是随保留时间增长而呈比例地增大。实际上, 一个色谱图上各组分峰的 N 值随相对保留时间(以下均用 t'_R 表示)的增加呈直线关系增大。用同一根柱得到色谱图上各组分的 N 值差别很大, 它是 t'_R 的函数也是流动相组成和流速的函数, 因此用变数 N 来度量分离柱的柱效是欠妥的。详细研究表明, 不同柱效的色谱柱得到的 $N-t'_R$ 图均是不同斜率的直线, 如果改用直线的斜率(S)表示分离柱的柱效, 它比用 N (或 n)更能合理地评价一根色谱柱性能的优劣。直线的斜率愈大柱效愈高, 斜率与待测组分、流动相组成、流速等因素无关, 它是一个常数:

$$S = N/t'_R = 5.54t'_R/(W_{1/2})^2 \quad (3)$$

式(3)中 S 的物理意义为单位相对保留时间内组分流过柱的有效理论塔板数^[8]。

实验求出: 日立 3056 柱在各种色谱条件下得到萘、蒽、喹 3 个组分的平均柱效率 $S =$

791($n = 25$), 相对标准偏差为 6.2%; 利宝真 AE₃ 阴离子柱的 6 个阴离子的平均柱效率 $S = 397$ ($n = 6$), 相对标准偏差 3.3%; 美国 SARASEP WA1 有机酸柱的 9 个有机酸的平均柱效率 $S = 96$, 相对标准偏差 5.8%($n = 9$)。因此, S 值愈大其分离性能愈佳。可任选一个组分的谱峰的 t'_R 和 $W_{1/2}$ 进行计算得出 S 值。笔者还研究了 N 、 S 与分离度(R_s)、容量因子(K')分离系数(α)等参数之间的关系, 并在高效液相色谱法定量测定酚酞的最佳色谱条件与 N 、 S 、峰面积(A_P)、峰高(H_P)及 t'_R 相互之间的关系基础上, 探讨了在建立色谱分析方法时各种参数的实际作用和意义。

2 分析仪器、试剂及方法

2.1 分析仪器

高效液相色谱仪

日立公司 L-7000 系列高效液相色谱仪。

日立 L-7100 可编程低压四元梯度/单元等度色谱泵。

日立 L-7400 UV 检测器。

日立 D-7500 积分仪。

日立 Gel 3056 柱($\Phi 4 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)。

高效离子色谱仪

天津利宝真 IC-100 型离子色谱仪。

利宝真电导检测器, $0.3 \sim 1\,000 \mu\text{S}/\text{cm}$, 温度补偿。

SP 4600 积分仪。

SP UV 2000 紫外可见检测器。

利宝真 AE₃ 阴离子柱及保护柱, 薄膜抑制柱。

美国 SARASEP WA1 有机酸排斥色谱柱。

低压离子色谱仪及柱(四川成都科技大学)。

2.2 试剂

所用试剂均为分析纯。

流动相 甲醇、乙腈、去离子水(电导率 $<1 \mu\text{S}/\text{cm}$)。1.80 mmol/L NaHCO_3 + 1.70 mmol/L Na_2CO_3 。1.8 mmol/L HNO_3 ; 0.15 mmol/L H_2SO_4 。

12.5 mmol/L H_2SO_4 。

标准溶液

间苯二酚、苯、萘、蒽和苊均配制成 0.1 g/L 的贮存溶液,使用时移取部分贮存液用甲醇稀释至所需浓度。酚酞用美国药典标准参考物质配成 0.528 g/L 的甲醇溶液。

用 NaF 、 NaCl 、 NaNO_2 、 NaNO_3 、 KBr 、 KH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 LiCl 、 NH_4Cl 和 KCl 配制各阴阳离子标准贮存液的浓度为 1 g/L。使用时移取部分贮存液用去离子水逐级稀释至所需浓度。

排斥离子色谱用的各种有机酸均为化学纯试剂,用去离子水稀释。

2.3 分析方法

2.3.1 高效液相色谱法

流动相用甲醇、乙腈、水,应用泵的低压四元梯度功能可任意设置溶剂的比例。流速 1.00 mL/min,待基线稳定后进样 10 μL 或 20 μL ,应用 L-7400 UV 检测器波长时间程序功能使待测组分在最大吸收波长位置检测。应用停泵扫描功能,可鉴定组分的吸光光谱曲线,给出每个组分色谱峰的光谱信息。应用 D7500 积分仪的百分面积法、归一化法、内标法和外标法的计算功能,可得到满意的谱图及定性、定量分析结果。

2.3.2 高效离子色谱法

采用分析柱、抑制柱的双柱法,流动相为 1.80 mmol/L NaHCO_3 + 1.70 mmol/L Na_2CO_3 。流速 1.0 mL/min,再生液为 12.5 mmol/L H_2SO_4 ,流速 3 mL/min,进样 50 μL ,电导检测器 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$,积分仪绘出色谱图。

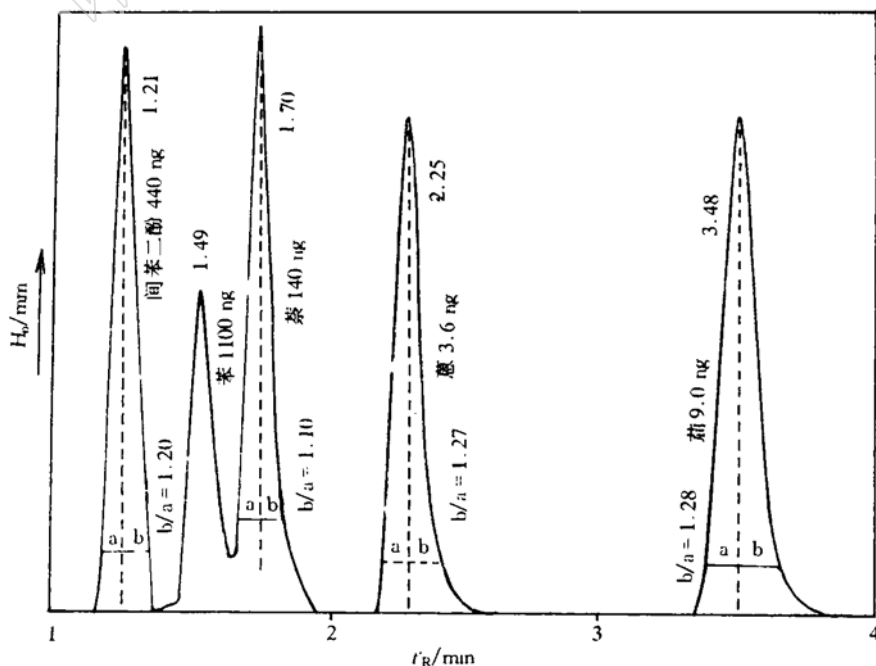


图1 HPLC 中5个组分数谱图

流动相 甲醇,流速 1 mL/min。

2.3.3 离子排斥色谱

流动相为 0.15 mmol/L H₂SO₄, 流速 0.7 mL/min, 进样 100 μL, 用 SP UV 2000 紫外可见检测器, 200 nm 处检测, 积分仪绘出色谱图。

在所有实验中得到的色谱图借助积分仪功能用最大走纸速度放大色谱图, 便于精确测量和计算半峰宽值, 提高 N、S 值的准确度。

3 结果与讨论

3.1 色谱峰性质考察

高效液相色谱的分离机理可用柱色谱原理描述。如图 1 所示, 样品溶液中有间苯二酚、苯、萘、蒽和蒽 5 种组分。当样品以很小量(10 μL)加到充填固定相的色谱柱内时, 起先 5 种组分混合物滞留在色谱柱柱床的顶端, 被认为是一个很窄的混合谱带。如以甲醇流动相连续地注入柱内, 各组分随流动相沿柱运动并逐渐分离直到最终完全相互分离且流出色谱柱, 形成各个色谱带。从图 1 看到 5 个组分的色谱峰近似正态分布曲线, 按不对称因子的定义计算出其值均在 1.28 以下。最先流出的谱带高而窄, 最后流出的谱带会稍稍变宽, 但峰形对称性仍然很好。表 1 是图 1 的波长时间程序。

表 1 HPLC 测定的波长时间程序

时间/min	λ/nm	A/Z
0.0	268	1
1.4	256	1
2.0	252	1
3.0	268	1
4.3		

图 2 为改变流动相中甲醇和水的比例后, 得到蒽和蒽的峰高、峰面积和相对保留时间的关系。从图 2 看出, 在一定的相对保留时间范围内(约 15 min), 蒽、蒽的峰面积稳定不变, 这表示流出组分的绝对量几乎不变但峰形发生变化, 表现在峰高值急剧下降了

2/3, 即峰形变低变宽。乙腈-水为流动相时结果完全一致。当相对保留时间超过 20 min 后, 峰面积也急剧减小, 表示组分在洗脱过程中已有损失。因此, 本文所讨论色谱峰的相对保留时间均控制在 15 min 内, 以保证洗脱的组分没有损失, 谱峰对称性好。图 3 表示保留时间 15 min 左右的蒽和 SO₄²⁻ 色谱峰, 其不对称因子为 1.33 和 1.34。综合图 1 和图 3 看出, 本文所研究的谱峰不对称因子基本上在 1.2~1.35 之间, 色谱峰形几乎相同, 这对有效理论塔板数的计算和比较更加合理和可靠。

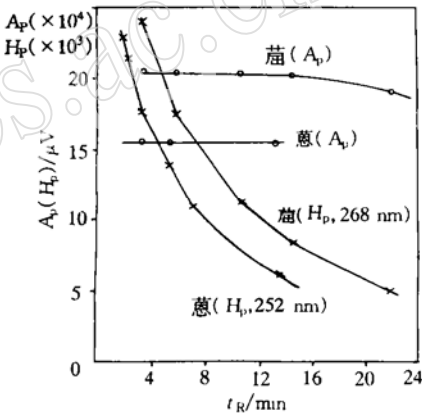


图 2 HPLC 中 t_R-A_p(H_p)关系

日立 3056 柱(Φ 4 mm×150 mm, 5 μm)
检测器用波长时间程序。

3.2 相对保留时间与半峰宽的关系

图 4 表明了高效液相色谱、高效离子色谱中各组分的相对保留时间和半峰宽的相互关系。图中 a 由图 1 中 5 个组分的实验数据绘制, 它们在一张色谱图中 t_R-W_{1/2} 呈很好的直线, 其斜率等于 40.5。表示 t_R 的增加为半峰宽的变宽的 40.5 倍。图中 b 表示蒽在流动相中 V_{乙腈}:V_水 改变时(100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30)得到的 t_R~W_{1/2} 还是一条直线, 斜率为 45.1。图中 c 表示高效离子色谱中通过 AE₃ 阴离子柱的 7 个组分的 t_R~W_{1/2} 也是线性关系, 斜率等于 30.8。这些结果表明, 在一张色谱图

上或一个组分在各种流动相时得到的 t'_R 与 $W_{1/2}$ 之间不是呈比例地变化,而是 t'_R 的增加比 $W_{1/2}$ 的变宽大几十倍,结果导致在一张多组分的色谱图上不能获得有效理论塔板数相同的两个色谱峰。因而 N 不可能是一个常数。

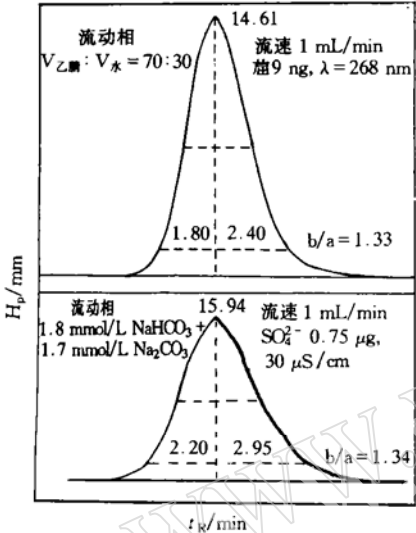


图 3 色谱峰的对称性

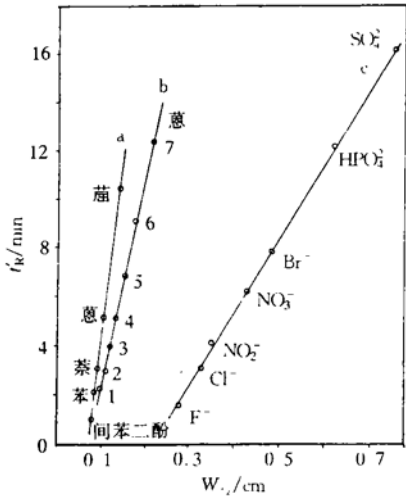


图 4 相对保留时间与半峰宽关系

a 线:纵坐标为 $1/4 t'_R$;
b 线:流速 1 mL/min,纵坐标为 $1/2 t'_R$;
c 线:流动相 1.80 mmol/L NaHCO_3 + 1.70 mmol/L Na_2CO_3 , 流速 0.8 mL/min 电导检测器 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

3.3 $N-t'_R$ 的关系

详细地考察了高效液相色谱、高效离子色谱、低压离子色谱和高效离子排斥色谱各方法中,在完全相同的实验条件下(包括柱、流动相、流速及环境温度等)得到各组分的 N 与 t'_R 结果,分别绘入图 5 至图 8 中。从各图中的每一条 $N-t'_R$ 直线充分说明了 N 是 t'_R 的函数。图 5 是高效液相色谱法中,采用日立 L-7400 紫外检测器的波长时间程序功能使各组分在最大吸收波长下检测。应用日立 D-7500 积分仪纸速 60 mm/min 可得到准确的半峰宽并将 t'_R 对 N 作图,得一直线。

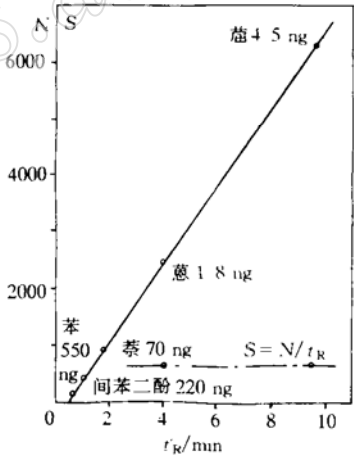


图 5 N (和 S) 与 t'_R 的关系

日立 3056 柱 (5 μm , Φ 4 mm $\times$ 150 mm),
流动相 $V_{甲腈}:V_{水}=90:10$, 流速 0.75 mL/min。

图 6 是高效离子色谱中用利宝真 AE_3 阴离子柱, SP 8810 泵, 流动相 1.80 mmol/L NaHCO_3 + 1.70 mmol/L Na_2CO_3 , 流速 1 mL/min, 电导检测器 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$, SP 4600 积分仪纸速 40 mm/min 得到的 7 个阴离子色谱图后,将 t'_R 和 N 作图,7 个阴离子的 $N-t'_R$ 也呈一直线。

图 7 是应用成都科技大学张新申教授开发的低压离子色谱仪得到的 4 个阳离子的

$N-t'_R$ 图,也呈良好的线性关系。

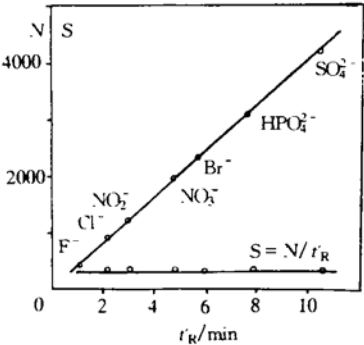


图 6 N (和 S)与 t'_R 的关系

各组分浓度(mg/L): F^- 2.5, Cl^- 3.5, NO_2^- 8.0, NO_3^- 10, Br^- 10, HPO_4^{2-} 20, SO_4^{2-} 10, 进样 50 μL 。

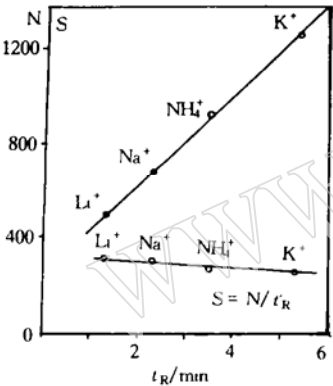


图 7 N (和 S)与 t'_R 的关系

流动相 1.8 mmol/L HNO_3 , 流速 1.0 mL/min, 进样体积 80 μL , 电导检测器, 各组分浓度(mg/L): Li^+ 0.98, Na^+ 1.19, NH_4^+ 1.8, K^+ 2.48。

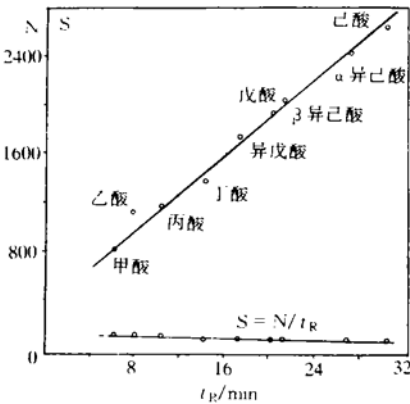


图 8 N (和 S)与 t'_R 的关系

HPEC 检测波长 200 nm。

图 8 应用 SP 8100 泵, 美国 SERASEP WA1 有机酸柱, 以 0.15 mmol/L H_2SO_4 作流动相, 流速 0.70 mL/min, SP UV 2000 型紫外可见检测器检测, SP 4600 积分仪绘制色谱图, 得到 9 种有机酸的离子排斥色谱, 它们的 $N-t'_R$ 图也是一条直线。

从图 5~8 看出, 在相同操作条件下得到的色谱图上的各组分的 N 值差别很大, 相差几倍至数十倍。表明 N 不是常数, 难以用它来度量柱的分离效率。相反, 如果采用直线的斜率 S ($S = N/t'_R$) 来表示柱的分离效率, 用其评价柱性能的优劣更为合理。直线的斜率愈大, 柱效率愈高。图 5~8 中各组分计算的 S 值是一条平行于横轴的直线, 它不受 t'_R 的影响。图 5~8 的 S 值分别为: 790, 397, 280 和 96。这些 S 值表示日立 3056 柱效最高, 依次是 AE_3 阴离子柱、低压柱和有有机酸柱。

3.4 不同色谱条件下的 $N-t'_R$ 关系

应用日立 L-7100 低压梯度比例阀, 改变甲醇-乙腈-水流动相中的溶剂比例, 进样 10 μL (萘 70 ng, 蒽 1.8 ng, 肟 4.5 ng) 得到一系列色谱图, 计算每个谱图上各组分的 N 值并按 t'_R 的大小排列, 列入表 2。可以看出, 流动相的组成改变时, $N-t'_R$ 仍呈线性关系, t'_R 从 1.59 增至 7.12 min, N 值增加约 5.5 倍, 但其柱效率 S 值变化很小, 25 个结果的相对标准偏差为 6.2%, 平均 S 值是 791。

3.5 流动相组成改变对 N 和 S 的影响

在高效液相色谱中, 为了达到所需要的分离度, 常常通过改变流动相的组成来改善分离效果。当流动相组成变化时, 流动相对待测组分的溶解度可能发生变化, 对样品中溶解度小的组分的分离会带来困难。如在甲醇-水的流动相中增加水的比例, 可使难溶于水的组分(如肟)保留时间急剧增加。这对改善组分的分离度有重要作用。当流动相中水的含量进一步增大时, 泵的压力大大增高, 这

对仪器的使用寿命是不利的。用乙腈代替甲醇,因其极性较弱,组分的保留值也较小。但行为相似。因此,只要选用不同的有机改进剂和控制它与水的比例,就可以改变样品组分的 K' 值和分离选择性。增加流动相中水的比例、各组分的相对保留时间延长, N 值随之增大。乙腈-水流动相比比例不同时得到的 N 值绘入图 9。可以看出,随着水量增加, N 值急剧增加,而柱效率 S 值几乎不变,用甲醇-水为流动相得到的规律相同。在高效离子色谱中改变流动相中 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 的浓度和比例,对 N 值影响也很大(见图 10)。7 种阴离子在各种流动相中的 N - t'_R 呈线性变化,而对 S 值影响甚小。

表 2 在各种色谱条件下萘、萘、萘的
 t'_R 、 N 和 S 综合结果

流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$	组份	t'_R (min)	N	S
75:15:15	萘	1.59	1091	688
90:5:5	萘	1.70	1210	713
95:0:5	萘	1.80	1379	756
93:0:7	萘	2.26	1631	724
16:70:14	萘	2.31	1858	799
100:0:0	萘	2.35	1908	792
0:70:30	萘	2.56	2092	817
85:5:10	萘	2.65	2034	767
50:35:15	萘	2.90	2498	853
72:15:13	萘	2.94	2387	814
90:0:10	萘	2.96	2156	727
71:15:14	萘	3.18	2664	842
70:15:15	萘	3.56	3053	856
75:10:15	萘	3.67	2977	810
95:0:5	萘	3.85	3276	828
90:5:5	萘	3.89	3017	774
93:0:7	萘	4.07	2995	738
16:70:14	萘	4.42	3888	878
0:75:25	萘	4.54	3780	817
85:5:10	萘	5.86	4385	770
50:35:15	萘	6.06	4921	814
0:70:30	萘	6.16	4766	774
72:15:13	萘	6.46	5159	799
90:0:10	萘	7.10	5515	778
0:80:20	萘	7.12	6048	852

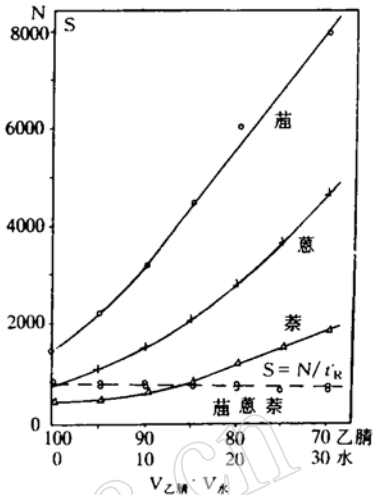


图 9 流动相组成变化对 N 和 S 的影响
HPLC 中, 流速 1 mL/min。

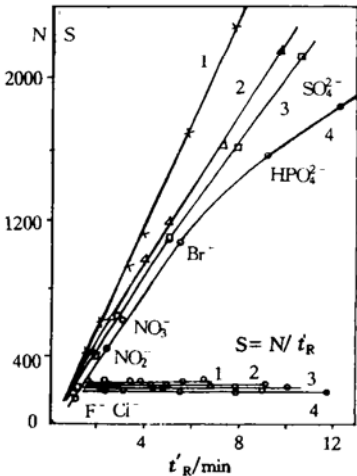


图 10 流动相变化对 N 和 S 的影响
HPIC 中: 流速 1.20 mL/min 流动相:

- 1 - 2.16 mmol/L NaHCO_3 + 2.04 mmol/L Na_2CO_3 ;
- 2 - 1.98 mmol/L NaHCO_3 + 1.85 mmol/L Na_2CO_3 ;
- 3 - 1.80 mmol/L NaHCO_3 + 1.70 mmol/L Na_2CO_3 ;
- 4 - 1.62 mmol/L NaHCO_3 + 1.53 mmol/L Na_2CO_3 。

3.6 流动相流速变化对 N 和 S 的影响

根据色谱过程的速率理论, 溶质分子在流动相和固定相之间的传质作用使溶质在通过色谱柱时对称性地扩展, 其扩展程度是流

动相流速的函数。增加流速会增强局部不平衡效应,而溶质纵向扩散作用减小,结果缩短了组分的保留时间,它对理论塔板数的贡献是 N 为流速的函数。流速愈大, N 值愈小(图 11), 甲醇-水和乙腈-水流动相流速变化得到的规律完全一样。在高效离子色谱中 7 种阴离子在不同流速下的 N 值变化呈线性关系。流速愈大, t'_R 变小、 N 值也愈小。而柱效率 S 值几乎不变(图 12)。

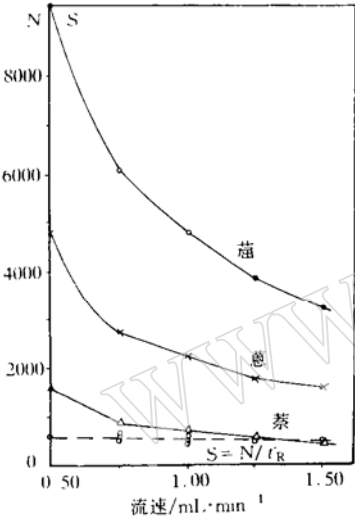


图 11 流动相流速变化对 N 和 S 的影响
HPLC 中, 流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=90:10$ 。

3.7 色谱柱对 N 和 S 的影响

高效液相色谱、高效离子色谱的发展是由柱技术的突破而发展起来的。对色谱柱的要求是分离度高、柱容量大、分析速度快。这与柱填料的结构和装填技术密不可分。一根色谱柱是否适用于所需要的分离,很大程度上取决于柱填料的性质,但操作条件的选择也起着十分重要的作用,表 3 比较了 3 种 ODS 柱(十八硅烷)对酚酞样品的 t'_R 、 $W_{1/2}$ 、 N 和 S 的关系(其他色谱的条件完全相同)。结果显示,日立 3056 柱的柱效率最高,它的 S 值比 GL.S DOS-2 柱和大连柱分别高 2.2 倍和 5.1 倍。

图 13 比较了高效离子色谱中 4 根利宝真同型号阴离子柱(A、B、C、D)对 7 种阴离子的 t'_R 与 N 的关系,与前面得出的规律相似。7 种阴离子对每一种柱的 $N-t'_R$ 均呈直线关系。直线的斜率 S 愈大其柱效愈高,反之愈低。每一种柱只有一个 S 值。

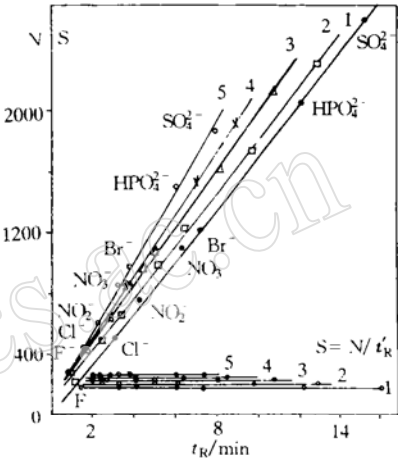


图 12 流动相流速变化对 N 和 S 的影响
HPIC 中, 流动相 1.80 mmol/L $\text{NaHCO}_3 + 1.70 \text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3$
流速 (mL/min): 1-0.8; 2-1.0;
3-1.20; 4-1.40; 5-1.60。

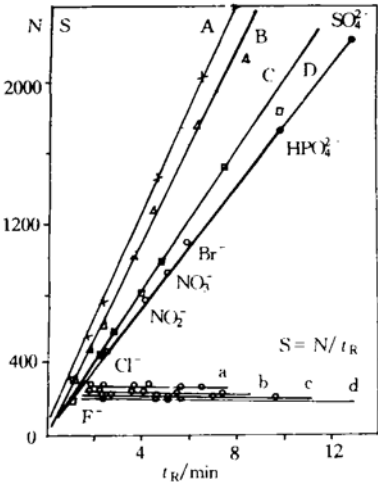


图 13 不同色谱柱对 N 和 S 的影响
HPIC 中, 流动相 1.93 mmol/L $\text{NaHCO}_3 + 1.82 \text{ mmol/L Na}_2\text{CO}_3$; 流速 1 mL/min;
电导检测器 $30 \mu\text{S/cm}$ 。

表 3 色谱柱对 N 和 S 的影响^①

色谱柱	t'_R/min	$W_{1/2}/\text{cm}$	N	S
日立 3056 (5 μm , Φ 4 mm $\times$ 150 mm)	4.82	0.21	2920	606
GL·S DOS-2 (5 μm , Φ 4.6 mm $\times$ 150 mm)	5.60	0.34	1504	269
大连柱 (Φ 5 mm $\times$ 300 mm)	7.49	0.59	894	119

① 流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{HAc}}=50:50:1$;流速 1 mL/min;
酚酞 0.528 g/L,进样 10 μL ;280 nm 检测。

3.8 N 、 S 与 R_s 、 K' 、 t'_R 和 α 的关系

容量因子 K' 表示某一溶质在色谱柱中任意位置达到平衡后,该溶质在固定相中的量与在流动相中的量之比。常用下式计算:

$$K' = (t_{R1} - t_{R0}) / t_{R0} \tag{4}$$

为了测定 K' 值,应先确定死时间 t_{R0} ,可把一种比流动相强度还要弱的溶剂作为样品注入柱中,其保留时间等于 t_{R0} ,可见 K' 主要由保留时间决定。

分离系数 α (又称分离因子)是两种溶质的相对保留时间之比,它代表溶质之间平衡分配热力学性质的差异。其值与两溶质在色谱条件下两相中分子间相互作用的差别有关。常用下式计算:

$$\alpha = (t_{R2} - t_{R0}) / (t_{R1} - t_{R0}) = K'_2 / K'_1 \tag{5}$$

分离度(又称分辨率)是表示相邻组分数谱峰之间分离的程度,用 R_s 表示。 R_s 定义为相邻谱峰中心之间的距离除以峰的平均宽度。即:

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / \frac{1}{2} (W_1 + W_2) \tag{6}$$

因为 $\frac{1}{2} (W_1 + W_2) = 0.85 (W_{1/2} + W_{2/2})$,代入式(6),可用两峰的半峰宽及保留时间计算。

一个重要的分离度方程式把上述几个色谱参数结合在一起,最终用下式表达:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \tag{7}$$

通常,在推导上述分离度方程式时,是把 N 作为常数来考虑的。但是,本文的许多实验验证在色谱过程中的一张色谱图上, N 值不是常数,而是变数。用式(7)计算的 R_s 值,必然与实际得到的结果发生偏差,或者说式(7)难以成立。

一组改变乙腈-水比例的流动相对萘的实验结果列于表 4。表 4 中列入用 α 和 N 计算的 R_s 与实验得到的 R_s 之间差别很大。更不必说用一个 N 值计算时产生的偏差了。实际上, N 值与 K' , R_s , t'_R 及 α 均呈线性关系变化,而柱效率 S 则与这些参数无关。

表 4 萘的色谱参数实验结果^①

流动相 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}$	t'_R (min)	N	S	K'	α	R_s	R_s [由式(7)计算]
100:0	1.11	709	639	1.20	1.60	2.8	2.5
95:5	1.46	1008	690	1.52	1.69	3.5	3.2
90:10	1.95	1544	792	2.03	1.86	4.9	4.5
85:15	2.56	2092	817	2.67	1.93	6.1	5.5
80:20	3.41	2862	839	3.58	2.08	7.9	6.9
75:25	4.54	3730	822	4.73	2.15	9.5	8.2
70:30	6.16	4766	774	6.43	2.27	11.5	9.7

① HPLC 中,日立 3056 柱,流速 1 mL/min,测定波长 252 nm,萘 1.8 ng。

3.9 关于有效理论塔板数的实用意义^①

高效液相色谱法在药物的定量测定和研究中起着重要的作用。本节以高效液相色谱法测定酚酞为例,讨论有效理论塔板数在建立方法时的实际作用和意义。酚酞作为一种化学药品以及医用泻药,美国药典规定的色谱方法是以 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{HAc}}=50:50:1$ 为流动相,色谱柱理论塔板数应大于 900,谱图的不对称因子小于 2,重复进样的相对标准偏差小于 2.0%。

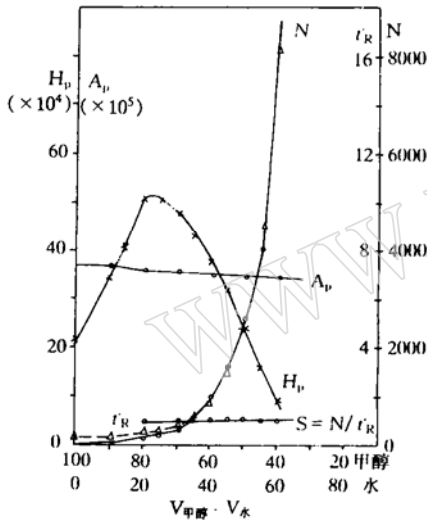


图 14 酚酞测定最佳条件及各参数关系
HPLC 中,日立 3056 柱($\Phi 4\text{ mm}\times 150\text{ mm}$);
流速 1 mL/min;进样 10 μL ;酚酞 5.28 μg ;
紫外检测器 280 nm。

本文用日立 3056 柱,以甲醇-水-HAc 的混合溶液作流动相,用美国药典标准物质酚酞配制标准溶液,试验最佳的色谱条件。结果表明,HAc 的存在与否及其量的多少对酚酞的色谱性质没有影响,不必加入。试验结果综合绘入图 14。可以看出,在实验范围内流动相甲醇-水的比例变化与谱峰面积无关,

但峰形的变化很大。当 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ 在 75:25 ~ 80:20 之间时,峰高值最大且稳定,峰对称性最佳(不对称因子为 1.13)谱峰重现性好,保留时间约 1.4 min,分析速度快、结果准确,是酚酞定量的最佳条件。但这个色谱条件下 N 值只有 140。如按美国药典规定的流动相,保留时间约 5.8 min, N 值为 2900。既消耗试剂,分析速度也慢。由此得出,有效理论塔板数的值在拟定和建立一个色谱方法时并不具有实际的指导意义。

4 结论

综上所述,可得出以下结论:

①色谱图上各组分的半峰宽与相对保留时间值(或保留时间值)不呈比例地变化,故在一张多组分的色谱图上不能获得两个相同有效理论塔板数的两个色谱峰。

②有效理论塔板数是相对保留时间的函数,即使在色谱条件完全相同的操作条件下得到的一张多组分的色谱图上,各组分的 $N-t'_R$ 图均呈直线关系变化。 N 值是个变数,不是一个常数。

③色谱图上各组分的 $N-t'_R$ 直线的斜率 S 是一个常数,它不受组分、流动相组成和流速的影响,可以更合理地评价色谱柱性能的优劣,斜率愈大柱效率愈高,是一个重要的色谱参数。

④由于 N 是变数,与 N 相关的公式,如有名的分离度方程式 $R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N}$ 计算的结果与实测值之间有很大的偏差,在一个多组分的色谱图上,不可能用一个 N 值去计算 R_s ,故采用该式进行计算时,应予考虑。

5 参考文献

1 戴朝政,卢佩章. 关于液相色谱保留公式的补充. 色

① 本节实验工作与地矿部岩矿测试技术研究所高级工程师李梅共同完成。

- 谱. 1994, 12(1):1.
- 2 汪小红, 王连生, 田笠卿. 反相高效液相色谱中溶质保留值与流动相组成关系的探讨. 色谱. 1992, 10(2):70.
- 3 戴朝政. 从分子微观参数预测反相色谱保留方程系数. 色谱. 1995, 13(2):75.
- 4 Martin A J P, Synge R L M. A New Form of Chromatogram Employing to Liquid Phase. *Biochem J.* 1941, 35:91.
- 5 卢佩章, 戴朝政. 色谱理论基础. 北京: 科学出版社, 1989.
- 6 朱彭龄, 云自厚, 谢光华. 现代液相色谱. 兰州: 兰州大学出版社, 1989. 14.
- 7 金恒亮. 高压液相色谱法. 北京: 原子能出版社, 1987. 24~26.
- 8 钟展环, 沈坤. 离子色谱仪. 天津: 天津利宝真测试仪器有限公司, 1992. 46.
- (收稿日期: 1995-10-18, 修回日期 1996-02-24)

A Study on Variable Factors of Effective Theoretical Plate Number and Column Efficiency in High Performance Liquid Chromatography

Zhong Zhanhuan

(Department of Applied Chemistry, China University of Geosciences, Wuhan 430074)

The variable factors which influence the effective theoretical plate number in HPLC, HPIC, HPEIC and LPIC are discussed in this paper. "S" (Column efficiency), a new parameter which can express the column separation efficiency quantitatively and its calculation method are proposed. The effects of other factors (R_s , K' and α) on the effective theoretical plate number and column efficiency are also discussed.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC), high performance ion chromatography (HPIC), high performance ion exclusion chromatography (HPIEC), low pressure ion chromatography (LPIC), effective theoretical plate number(N), column efficiency(S)