

快速液相的基础理论

■ Van Deemter方程和理论塔板高度-线速度曲线图

依据Van Deemter方程绘制的理论塔板高度-线速度曲线图(图1),一般用于说明色谱柱的分离特性。理论塔板高度-线速度图,纵坐标为理论塔板高度,横坐标为线速度(cm/min)。采用理论塔板高度和线速度的好处是因为二者不会因色谱柱种类不同而受到影响。

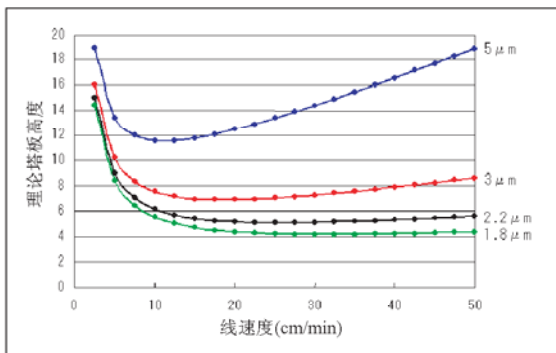


图1

下式即为Van Deemter方程:

$$H = A \times d_p + B/u + C \times d_p^2 \times u$$

其中

- H : 理论塔板高度 (height equivalent to a theoretical plate : HETP)
- d_p : 填料粒径 (particle size)
- u : 线速度 (linear velocity)
- $A \times d_p$: 涡旋扩散 (eddy diffusion)
- B/u : 分子扩散 (molecular diffusion)
- $C \times d_p^2 \times u$: 物质移动阻力 (non-equilibrium)

在实际的分析中,峰扩展可认为是发生涡旋扩散($A \times d_p$),分子扩散(B/u),物质移动阻力($C \times d_p^2 \times u$),其结果,色谱柱的理论塔板高度H增大。

造成涡旋扩散,分子扩散,物质移动阻力的原因是:

- 涡旋扩散 : 在填料粒子间的空隙中,流动相的流动不均匀而产生紊流。
- 分子扩散 : 沿流动相的流动方向,分析样品发生扩散。
- 物质移动阻力: 分析样品在流动相和固定相之间移动时产生延迟。

■ 实现分析快速化的途径

快速LC以分析快速化为目的,快速化也就是缩短出峰时间。通常,为缩短出峰时间有两种途径(流动相条件等因素除外)。

• 流量:

加大送液泵的流量,缩短分析样品通过色谱柱的时间。

例: 1 mL/min → 2 mL/min

• 色谱柱长度:

使用短色谱柱,缩短分析样品通过色谱柱的距离。

例: 150 mm → 75 mm

■ 理论塔板高度和线速度的关系

图2表示在一般LC分析中经常使用的粒径为5 μ m的色谱柱的「Van Deemter的理论塔板高度-线速度」图。理论塔板高度的值越小,分离越好,因此越往图的下侧走,色谱柱的性能越好。

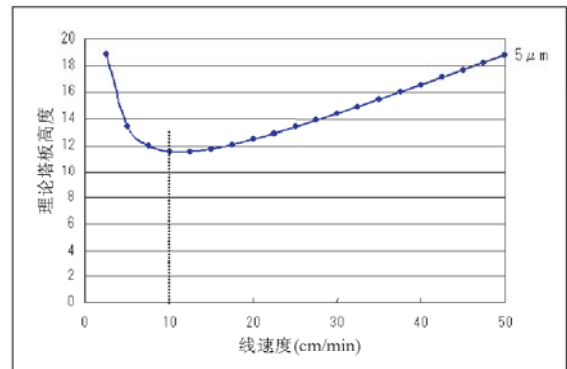


图2

图2中,最小理论塔板高度在线速度10cm/min附近。

但若将线速度从10cm/min的位置提高,即加大送液泵流量时将怎样呢?

从图中可知,提高线速度则曲线向右上方上升。这表明超过了粒径5 μ m色谱柱的适宜的流量,因此理论塔板高度发生恶化。以色谱柱的适宜流量送液时,峰最为尖锐,分离好——在Van Deemter曲线上,理论塔板高度最小时的速度相当于适宜流量。

送液泵的流量和出峰时间(保留时间)成反比,因此,假若将流量增加一倍,则分析时间可缩短1/2。但是,从图2可知,单纯地以高流量送液损害分离。

■ 理论塔板高度和色谱柱粒径的关系

那么，怎样做才能在确保分离效果的情况下实现分析的快速化呢？

解决方法之一是，采用更小粒径填料的色谱柱。

从图1可知，越是填料粒径小的色谱柱，其理论塔板高度越小，因此分离效果提高。根据Van Deemter公式，理论塔板高度与填料的粒径成正比。按照此种思路，如果填料粒径缩小至1/2的话，则理论塔板高度也缩小至1/2。即色谱柱性能提高至2倍。

从图1可知，按 $5\mu\text{m} \rightarrow 3\mu\text{m} \rightarrow 2.2\mu\text{m}$ 的顺序缩小填料粒径，则理论塔板高度为最小时的线速度值变大。即越是粒径小的色谱柱其最适宜流量就越大，因此可进行快速分析。并且，填料粒径按 $5\mu\text{m} \rightarrow 3\mu\text{m} \rightarrow 2.2\mu\text{m}$ 的顺序变小，在高流量区域的曲线斜率变小，因此可得到稳定的分离效果。

根据Van Deemter公式，最适宜流量与填料粒径成反比例。按照这个思路，如果填料粒径缩小为1/2，则最适宜流量增大至2倍。于是，送液泵的流量可增大至2倍，因此可在保持分离的状态下将分析时间缩短至1/2。

■ 理论塔板高度和色谱柱长度的关系

为实现快速分析，色谱柱的长度也很重要。

使用长色谱柱则分离变好，但出峰时间变长——色谱柱的长度与出峰时间(保留时间)成正比。比如，将色谱柱长度缩短至1/2则出峰时间也缩短至1/2。因此，如果能得到同样的理论塔板高度的话，短色谱柱适于快速分析。

■ 线速度与色谱柱内径的关系

所谓线速度(cm/min)是指在色谱柱内部流动的流动相的速度。而所谓流量(mL/min)是指由送液泵输入色谱柱的液量。变更为不同内径的色谱柱，则色谱柱的截面积发生变化。因此，即使不改变送液泵流量，也可改变线速度。比如，从内径4.6mm的色谱柱变更为2mm的色谱柱，则截面积减小至1/5 ($16.6\text{ mm}^2 \rightarrow 3.1\text{ mm}^2$)，因此送液泵流量一定的状态下，线速度增加至5倍。

因此，提高线速度缩短分析时间的手段，除了增加送液泵流量的方法以外，还可选择变更为截面积小的色谱柱，即内径小的色谱柱。

■ 快速化所产生的问题：装置的耐压

色谱柱的压力与流动相的粘性成正比、与色谱柱长度成正比、与送液泵的流量成正比、与填料粒径的2次方成反比。可表示为下式：

$$P = \rho \times L \times v / d_p^2$$

其中

- P : 色谱柱上所加的压力
- ρ : 压力系数(流动相粘度的函数)
- L : 色谱柱长度
- v : 线速度
- d_p : 填料粒径

按照这个思路，将色谱柱长度缩短至1/3则压力减小至1/3；并且，将送液泵流量增加至3倍则压力增加至3倍。粒径 $1.7\mu\text{m}$ 是 $5\mu\text{m}$ 的约1/3，所以压力增加至约9倍。因此，将分析条件从以往的分析方法变更为实现了快速化的分析方法时，总计压力与粒径 $5\mu\text{m}$ 的以往的色谱柱相比，增加了 $1/3 \times 3 \times 9 = 9$ 倍。

当使用粒径 $2\mu\text{m}$ 以下色谱柱的快速LC，其硬件必须耐高压。

■ 高温分析

为改善分离效果的手段还有色谱柱的高温化。

提高色谱柱的温度则流动相的粘性变小，可加大物质的速度。

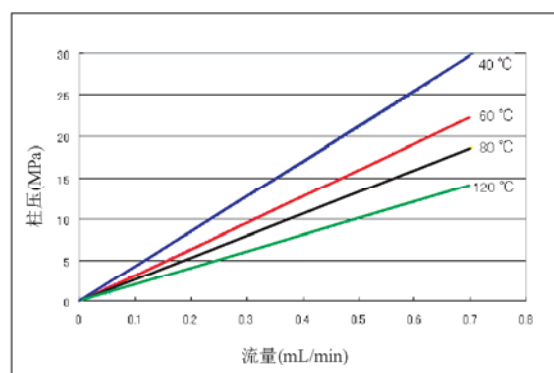


图3

据此，不采用长色谱柱或小粒径填料也可提高峰的分。但是，高温化有可能加快色谱柱的劣化，另外，会产生样品的变性、分解，因此，不能适用于所有的应用。

■ 结束语

快速分析不能牺牲一般LC应有的基本性能和通用性。如：

- (1) 峰面积和保留时间的重现性
- (2) 分离度
- (3) 交叉污染
- (4) 灵敏度、基线噪音
- (5) 梯度
- (6) 系统的扩展性
- (7) 分析方法的通用性(常规和快速分析相互转换)
- (8) 维护频率和维护费用

快速分析也不能仅仅只说一次分析的快速化，还要考虑从开始分析的准备、实施连续分析、结束分析、直到关闭系统等总分析时间是否能实现快速化。如：

- (1) 每一次的分析时间
- (2) 包括自动进样器的动作时间、进样针清洗时间在内的总分析时间
- (3) 仪器准备所需时间