



大学实验教学系列
DAXUESHIYANJIAOXUEXILIE

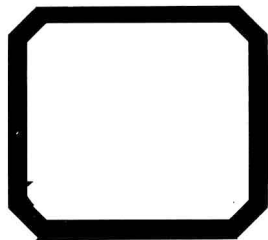
现代色谱原理与实验

陈利强 郭双林 孙 晶 主编

45

D00971093

HEUP 哈尔滨工程大学出版社
Harbin Engineering University Press



实验教学系列
SHIYANJIAOXUEXILIE

现代色谱原理与实验

陈利强 郭双林 孙 晶 主编 李晓菲 参编

常州大学图书馆
藏书章

HEUP 哈尔滨工程大学出版社
Harbin Engineering University Press

内容简介

本书系统地总结了现代色谱的基本概念、基本理论,对色谱分析样品的前处理进行了详细的论述,并根据实际科研和教学实践分析和总结了气相色谱和液相色谱故障产生的原因及故障排除法等,最后依据应用化学(环境监测与防治)的学科特点编排了12个检验实验。全书共分5章:第1章为色谱分析法的基本知识;第2章为样品的采集、制备和预处理;第3章为色谱仪器维护与故障排除概述;第4章为液相色谱仪维护与故障排除概述;第5章为实验部分。

本书可作为高等院校化学分析类专业的教材,也可供有关专业及从事环境保护和环境科学研究的专业人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

现代色谱原理与实验/陈利强,郭双林,孙晶主编.

—哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2012.8

ISBN 978-7-5661-0425-0

I. ①现… II. ①陈… ②郭… ③孙… III. ①色谱法
—教材 IV. ①O657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 189458 号

出版发行 哈尔滨工程大学出版社

社 址 哈尔滨市南岗区东大直街 124 号

邮政编码 150001

发行电话 0451-82519328

传 真 0451-82519699

经 销 新华书店

印 刷 哈尔滨工业大学印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 11.25

字 数 278 千字

版 次 2012 年 8 月第 1 版

印 次 2012 年 8 月第 1 次印刷

定 价 23.00 元

<http://press.hrbeu.edu.cn>

E-mail: heupress@hrbeu.edu.cn

前 言

随着科学技术的突飞猛进和国家经济建设的快速发展,色谱作为主要的分离分析技术,在科学研究与生产中需求与应用越来越广泛。当前人类社会进入了生命科学、材料科学、环境科学发展的快车道。而色谱技术是生命科学、材料科学、环境科学发展必不可少的手段和工具。因此,从事色谱分析工作的人员也越来越多,且刚刚从事色谱分析的人员急需普及和提高色谱分析的理论和技术。目前,尽管在市面上有很多色谱分析类书籍,但是大都要么侧重理论,要么侧重实验或者维修。对于初学者来说要想尽快掌握色谱分析技术缺乏相关三者合一的书籍。因此,我们根据多年来的研究实践并查阅和搜集了近年来最新发展的相关文献编写了本书,以求为高等院校、工矿企业、分析测试部门相关人员提供参考,也为高等院校相关专业师生提供一本实用的教学参考书。

本书共分5章,包括色谱分析法的基本知识,样品的采集、制备和预处理,色谱仪维护与故障排除概述,液相色谱仪器维护与故障排除概述以及实验部分。本书各章编写分工如下:郭双林编写第1章;孙晶编写第2章及实验9~12;陈利强编写第3章和第4章;李晓菲编写实验1~8。陈利强负责全书的统稿工作。

色谱分析是一门快速发展的学科,涉及领域广泛,研究成果丰富,相关资料浩如烟海。在编写过程中,参考了许多国内外同行专家编写的论著,在此向文献的作者致以诚挚谢意。

该书在编写过程及审稿中得到了黑河学院物理化学系车文实主任与朱明霞教授的指导与帮助,在此表示衷心的感谢。

由于编者水平有限,书中错误和不当之处在所难免,敬请广大读者不吝指正。

陈利强

2012年4月9日于黑河

目 录

第 1 章 色谱分析法的基本知识	1
1.1 色谱分析法的分类及特点	1
1.2 色谱分析法的基本术语	2
1.3 色谱分析法的基本理论	5
1.4 色谱分析仪器	19
1.5 色谱分析法的固定相和流动相	30
1.6 色谱分析法的检测器	41
1.7 定性与定量分析	48
第 2 章 样品的采集、制备和预处理	54
2.1 未污染食品和残留农药作物样品的采集、保存、制备和预处理	54
2.2 水样的采集、保存和预处理	62
2.3 土壤样品的采集、制备、保存和预处理	71
2.4 环境空气污染物样品的采集	78
2.5 生物样品的采集、制备和预处理	81
第 3 章 色谱仪维护与故障排除概述	88
3.1 气相色谱常见故障检查诊断	88
3.2 部件的清洗	98
3.3 气相色谱使用注意事项	100
第 4 章 液相色谱仪维护与故障排除概述	102
4.1 液相色谱仪操作注意事项	102
4.2 高效液相色谱仪使用中常见故障及解决方法	104
4.3 色谱柱的正确使用、维护及保养方法与技巧	117
4.4 液相色谱配件及泄漏处理	122
4.5 高效液相色谱仪的操作保护及注意问题	124
4.6 液相色谱常用符号与术语	126
第 5 章 实验部分	129
实验 1 二硫代磷酸酯类杀虫剂:45% 马拉硫磷乳油中有效成分的测定 气-液分配色谱分析法	129
实验 2 二硫代磷酸酯类杀虫剂:乐果原药中有效成分的测定 气-液分配色谱分析法	132
实验 3 环境空气中苯、甲苯、二甲苯共存时的测定 气-液分配色谱分析法	135
实验 4 家用卫生杀虫用品:杀虫气雾剂有效成分的测定 气-液分配毛细管柱色谱分析法	137
实验 5 肉类、鱼类中四种有机磷农药残留量的测定及萃取 气-液分配色谱分	

析法	140
实验 6 食品防腐剂:苯甲酸、山梨酸、苯甲酸钠及山梨酸钾的测定及萃取 气-液分配色谱分析法	143
实验 7 食品中有机氯杀虫剂:六六六、DDT 残留量的测定及萃取 气-液分配色谱分析法	145
实验 8 水果、蔬菜、谷类中二十种有机磷农药残留量的测定及萃取 气-液分配色谱分析法	150
实验 9 土壤中有机氯农药:六六六、DDT 残留量的测定及萃取 气-液分配色谱分析法	155
实验 10 鲜鱼、虾类及其他水产品中甲基汞的测定	159
实验 11 离子色谱法测定水样中常见阴离子含量	165
实验 12 离子色谱法测定饮用水中钠、钾、镁、钙	168
参考文献	171

第 1 章 色谱分析法的基本知识

1.1 色谱分析法的分类及特点

色谱法 (Chromatography) 是一种重要的分离、分析技术,它是将待分析试样的各组分一一进行分离,然后顺序检测各组分的含量。

色谱分析法早在 1903 年由俄国植物学家茨维特 (Tswett) 分离植物色素时采用,后来不仅用于分离有色物质,还用于分离无色物质,并出现了种类繁多的色谱法。许多气体、液体和固体样品都能够找到合适的色谱法进行分离和分析。目前色谱法已广泛应用于许多领域,成为十分重要的分离、分析手段。不管属于哪一种色谱法,其共同的特点是具备两个相:不动的一相,称为固定相;另一相是携带样品流过固定相的流动体,称为流动相。当流动相中样品混合物经过固定相时,就会与固定相发生作用,由于各组分在性质和结构上的差异,与固定相作用的类型、强弱也有差异,因此在同一推动力作用下,不同组分在固定相滞留的时间长短不同,从而按不同的次序从固定相中流出。

1.1.1 色谱法的分类

色谱法是包括多种分离类型、检测手段和操作方式的分离操作技术,有多种分类方法。有时一种色谱技术常有多种不同的名称。从不同角度,可将色谱法分类如下:

1. 按两物理状态分类

用气体作流动相的称为气相色谱 (GC, Gass Chromatography), 用液体作流动相的称为液相色谱 (LC, Liquid Chromatography)。由于固定相可以是固体吸附剂或涂渍在载体上的固定液,所以气相色谱分为气-固色谱 (GSC) 和气-液色谱 (GLC); 液相色谱分为液-固色谱 (LSC) 和液-液色谱 (LLC)。用超临界流体作为流动相的称为超临界流体色谱 (SFC)。随着色谱工作的发展,通过化学反应将固定液键合到载体表面,这种化学键合固定相的色谱又称化学键合相色谱 (CBPC)。

2. 按固定相的形成分类

(1) 柱色谱 通常有两大类:一类是将固定相装入玻璃或金属管内,称为填充柱色谱;另一类是将固定液直接涂渍在毛细管内壁,或采用交联引发剂在高温处理下将固定液交联到毛细管内壁,称为毛细管色谱。

(2) 纸色谱 以多孔滤纸为载体,以吸附在滤纸上的水为固定相。各组分在纸上经展开而分离。

(3) 薄层色谱 以涂渍在玻璃板或塑料板上的吸附剂薄层为固定相,然后按照与纸色谱类似的方法操作。

3. 按分离过程物理化学原理分类

(1) 吸附色谱 用固定吸附剂作固定相,根据吸附剂表面对不同组分的物理吸附能力差异进行分离。

(2) 分配色谱 用液体作固定相,利用不同组分在固定相和流动相之间分配系数的差

异进行分离。

(3)按其他作用原理 可分为离子色谱、凝胶色谱、络合色谱、亲和色谱、热色谱等。根据以上所述,将色谱分析法的分类总结于表 1.1 中。

表 1.1 色谱分析法分类

流动相	气体		液体	
方法名称	气相色谱(GC)		液相色谱(LC)	
固定相	固体吸附剂	液体	固体吸附剂	液体
分离依据	吸附	分配	吸附	分配
方法名称	气-固色谱(GSC)	气-液色谱(GLC) 气-液分配色谱(GLPC)	液-固色谱(LSC)	液-液色谱(LLC)

1.1.2 色谱法的特点和应用

从茨维特建立色谱法至今,色谱法已经成为一门专门的学科,无论是在理论、技术,还是在仪器、应用等方面都有极大的发展。色谱法和其他分析方法相比较,具有下列特点:

1. 分离效能高

色谱法可以反复多次地利用被分离各组分性质上的差异,产生很大的分离效果。能在较短的时间内对组成极为复杂、各组分性质极为相近的混合物同时进行分离和测定。

2. 灵敏度高

可检测 $10^{-13} \sim 10^{-11}$ g 的物质,适于作痕量分析。色谱分析需要的试样量极少,一般以 μg 计,有时仅以 ng 计。

3. 分析速度快

一般只需几分钟或几十分钟便可完成一个分析周期,一次分析可同时测定多种组分。

4. 应用范围广

色谱法可分析气体、液体和固体物质。不适于色谱分离或检测的物质可通过化学衍生等方法转化为适于色谱分离、分析的物质。色谱法几乎能分析所有的化学物质。

色谱法的缺点是对未知物的定性分析比较困难。这是由于检测器不能按物质的不同给出不同的特征信号。如果没有已知纯物质色谱图对照,则很难判断某一物质峰代表何种物质。发展高选择性的检测器,发展色谱与其他分析方法联用,就可以解决未知物的定性分析问题,并更能发挥色谱法高分离效能的特点,大大提高分析工作的水平。

1.2 色谱分析法的基本术语

1.2.1 色谱流出曲线和色谱峰

当某组分从色谱柱中流出时,检测该组分的响应信号随时间变化所形成的峰曲线称为该组分的色谱峰,如图 1.1 所示。

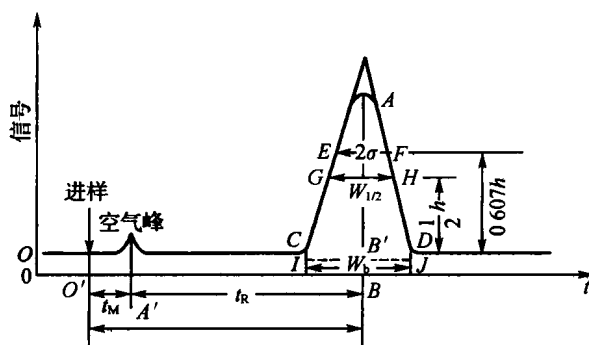


图 1.1 色谱流出曲线

当进样量很小、组分浓度很低时,在吸附等温线或分配等温线的线性范围内,色谱峰是对称的,可以用高斯正态分布函数表示。

$$c = \frac{c_0}{\sigma \sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{t-t_0}{\sigma}\right)^2\right] \quad (1-1)$$

式中 c ——不同时间 t 时某物质在柱出口处的浓度;

c_0 ——进样浓度;

t_r ——对应于浓度峰值的保留时间;

σ ——标准偏差。

1.2.2 基线

在正常操作条件下,仅有纯载气通过色谱柱时,检测器的响应信号随时间变化的曲线称为基线。稳定的基线应是一条平行于时间横坐标的直线,如图 1.1 中 CD 所示。

1.2.3 色谱峰高 h

色谱峰顶点与基线之间的垂直距离称为色谱峰高,以 h 表示,如图 1.1 中 AB 所示。

1.2.4 色谱峰区域宽度

色谱峰区域宽度是色谱曲线的重要参数之一,用于衡量柱效率及反映色谱操作条件的动力学因素。通常希望区域宽度越窄越好。色谱峰的区域宽度通常有以下三种表示方法:

1. 标准偏差 σ

色谱峰是一个对称的高斯曲线,在数理统计中用标准偏差 σ 来度量曲线宽度,即 σ 是 0.607 倍峰高处色谱峰宽度的一半,如图 1.1 中 EF 的一半。

2. 半高峰宽 $W_{1/2}$

峰高一半处对应的色谱峰宽度称为半高峰宽,简称半峰宽。半峰宽常用单位表示,一是距离,二是时间,可通过记录纸速与距离求出。

3. 色谱峰底宽 W_b

由色谱峰两侧拐点作切线与基线交点间的距离称为色谱峰底宽,简称峰底宽度。其表示单位和半峰宽相同。它与标准偏差的关系是 $W_b = 4\sigma$ 。

1.2.5 保留值

保留值是试样各组分在色谱柱中保留行为的量度,它反映组分与固定相间作用力大小,通常用保留时间和保留体积表示。对保留值的研究能揭示色谱过程的作用机理和分子结构特征,因而是色谱定性分析和色谱过程热力学特性的重要参数。

1. 保留时间 t_R

指某组分通过色谱柱所需时间,即从进样到出现某组分色谱峰最大值的时间,单位为 min 或 s,如图 1.1 中 OB 所示。保留时间取决于色谱过程的热力学因素,在一定色谱体系 and 操作条件下,任何一种化合物都有一个确定的保留时间,这是色谱定性的依据。

2. 死时间 t_0

指不被固定相吸附或溶解的物质从进样到出现其色谱峰最大值所需的时间,如图 1.1 中 OA' 所示。死时间也是气体流经色谱柱中空隙所需的时间。

3. 调整保留时间 t'_R

某组分的保留时间扣除死时间后的保留时间,如图 1.1 中 $A'B$ 所示,称为该组分的调整保留时间,即

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (1-2)$$

由于组分在色谱柱中的保留时间 t_R 包含了组分随流动相通过柱子所需的时间和组分在固定相中滞留所需的时间,所以 t_R 实际上是组分在固定相中停留的总时间。

保留时间是色谱法定性的基本依据,但同一组分的保留时间常受到流动相流速的影响,因此色谱工作者有时用保留体积来表示保留值。

4. 死体积 V_0

指在 t_0 这段时间内通过色谱柱的载气体积。死体积实际上就是色谱柱在填充后,柱管内固定相颗粒间所剩留的空间、色谱仪中管路和连接头间的空间以及检测器的空间的总和。当后两项很小可忽略不计时,死体积可由死时间与色谱柱出口的载气流速 F_0 计算:

$$V_0 = t_0 \cdot F_0 \quad (1-3)$$

式中 F_0 ——扣除饱和和水蒸气压并经温度校正的流速,可用以下公式表示:

$$F_c = F_0 \cdot \frac{P_0 - P_w}{P_0} \cdot \frac{T_c}{T_r} \cdot j \quad (1-4)$$

式中 F_c ——柱温压下通过色谱柱的平均载气流量;

F_0 ——用皂膜流量计在检测器出口实测的流量;

P_0 ——柱出口处压力;

P_w ——室温下水的饱和蒸气压;

T_c ——色谱柱温度;

T_r ——室温;

j ——压力校正因子,可由柱进出口压力按下式计算:

$$j = \frac{3}{2} \cdot \frac{(P_i/P_0)^2 - 1}{(P_i/P_0)^3 - 1} \quad (1-5)$$

式中 P_i ——柱入口处压力。

以上各式仅适用于气相色谱,不适用于液相色谱。

5. 保留体积 V_R

与各种保留时间对应,有相应的保留体积,其单位一般用 mL 表示。保留体积 V_R 是指从进样到出现某组分色谱峰最大值时所通过的载气体积。

$$V_R = t_R \cdot F_c \quad (1-6)$$

6. 调整保留体积 V'_R

某组分的保留体积扣除死体积后的保留体积,称为组分的调整保留体积。即

$$V'_R = V_R - V_0 \quad (1-7)$$

7. 相对保留值 $r_{2,1}$

指在相同操作条件下某组分 2 的调整保留值与另一组分 1 的调整保留值之比。即

$$r_{2,1} = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} = \frac{V'_{R(2)}}{V'_{R(1)}} \quad (1-8)$$

由于相对保留值仅与柱温和固定相性质有关,而与柱径、柱长、填充情况及载气流量等其他实验条件无关,因此,它在色谱法中,特别是在气相色谱法中,广泛用作定性的依据。在定性分析中,通常固定一个色谱峰作为标准(s),然后再求其他峰(i)对这个峰的相对保留值,此时可用符号表示,即

$$\alpha = \frac{t'_{R(i)}}{t'_{R(s)}} \quad (1-9)$$

式中, $t'_{R(i)}$ 为后出峰的调整保留时间,所以总是大于 1。相对保留值往往可作为衡量固定相选择性的指标,是色谱定性分析的重要参数之一,又称选择因子。

从色谱流出曲线中,可得许多重要信息:

- (1) 根据色谱峰个数,可以判断样品中所含组分的最少个数;
- (2) 根据色谱峰的保留值,可以进行定性分析;
- (3) 根据色谱峰的面积或峰高,可以进行定量分析;
- (4) 色谱峰的保留值及其区域宽度,是评价色谱效能的依据;
- (5) 色谱峰两峰间的距离,是评价固定相选择是否合适的依据。

1.3 色谱分析法的基本理论

色谱分析的目的是将样品中各组分彼此分离,组分要达到完全分离,两峰间的距离必须足够远,两峰间的距离是由组分在两相间的分配系数决定的,即与色谱过程的热力学性质有关。但是两峰间虽有一定距离,如果每个峰都很宽,以致彼此重叠,还是不能分开。这些峰的宽度是由组分在色谱柱中传质和扩散行为决定的,即与色谱过程的动力学性质有关。因此,要从热力学和动力学两方面来研究色谱行为。

1.3.1 色谱法的分离原理

1. 气-固吸附色谱法的分离原理

固体固定相是表面有一定活性的固体吸附剂,具有多孔和较大面积,被测组分在吸附剂表面进行反复的物理吸附、脱附过程。由于被测物质各个组分的性质不同,它们在吸附剂上的吸附能力不一样,向前移动速度不一样,因此一定时间后,即通过一定量的载气后,试样中各个组分就彼此分离先后流出色谱柱。

2. 气-液分配色谱法的分离原理

色谱柱内紧密而均匀地装着惰性载体上的液体固定相,流动相则连续地流经其间,两相充分接触,但互不相溶。图 1.2 表示 A、B 二组分在色谱柱中的分离过程。将混合试样一次注入色谱柱后,流动相不断地流入色谱柱。刚进柱时,组分 A 和组分 B 是一条混合谱带。由于试样分子与两相分子间的相互作用,它们既可进入固定相,也可返回流动相,这个过程叫分配。当试样进入流动相时,它就随流动相一起沿柱床向前移动,当它进入固定相时,就被滞留而不再向前移动。与固定相分子间作用力越大的组分,越易进入固定相,向前移动的速度越慢;与流动相分子间作用力越大的组分,越易进入流动相,向前移动的速度越快。这样经过一定的柱长后,由于反复多次的分配,即使原来性质差异微小的组分也能达到很好的分离。结果,与流动相分子作用力小的组分,首先从色谱柱中流出,从而使试样内各组分得到分离。

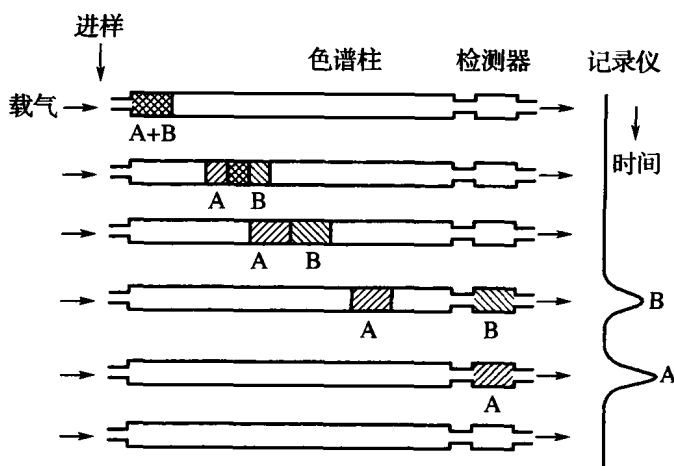


图 1.2 分配色谱分离过程

不同组分在通过色谱柱时移动速度不等,是色谱分离过程的第一个特点,它提供了实现分离的可能性。色谱分离过程的第二个特点是各组分沿柱子的扩散分布。组分分子开始在柱头的分布是一条很窄的线,当它们移动通过柱子时这条窄线就逐渐展宽,显然这种现象不利于实现不同组分的分离。

3. 液-固吸附色谱法的分离原理

液-固色谱的固定相是固体吸附剂。吸附剂是一些多孔的固体颗粒物质,位于其表面的原子、离子或分子的性质与其内部的原子、离子或分子的性质略有不同。表层的键因缺乏覆盖层结构而受到扰动,所以表层一般处于较高的能级,存在一些分散的具有表面活性的吸附中心。因此,液固色谱法是根据各组分在固定相上吸附能力的差异来进行分离的。

在进样以前,即流动相通过吸附剂时,溶剂分子便以单分子层形式占据吸附剂上活性中心点;进样后,即混合物各组分分子被溶剂带入色谱柱时,由于溶剂及混合物中各组分对吸附能力不同,故在吸附剂表面,组分分子 X 与溶剂分子 S 对吸附剂表面活性中心发生吸附竞争:



式中 X_m, S_{ads} ——溶剂中和被吸附的溶质分子;

X_{ads}, S_m ——被吸附剂所吸附的和在流动相中游离的溶剂分子;

n ——吸附 X 分子所需要吸附的 S 分子数目。

由式(1-10)可知,当吸附剂对溶质分子的吸附能力大于对溶剂分子吸附能力时,溶质分子就将吸附上,而将溶剂分子脱附;反之,溶质分子脱附。显然,溶质分子的吸附能力越大,则保留值越大;反之,保留值小或不被保留。同时,也不难理解,溶剂强度越大,溶质分子的竞争能力越小,越容易被洗脱下来。

吸附剂吸附试样的能力,主要取决于被吸附剂的比表面积和理化性质、试样的组成和结构以及洗脱液的性质等。组分与吸附剂性质近似时,易被吸附,呈现高的保留值;当组分分子结构与吸附剂表面活性中心的刚性几何结构相适应时,易于吸附,因此,吸附色谱可按族分离化合物。吸附色谱对同系物没有选择性,不能用该法分离相对分子质量不同的同系物。

4. 液-液分配色谱法的分离原理

在液-液色谱中,一个液相作为流动相,而另一个液相则涂渍在很细的惰性载体或硅胶上作为固定相。流动相与固定相应互不相溶,两者之间应有一明显的分界面。分配色谱过程与两种互不相溶的液体在一个分液漏斗中进行的溶剂萃取相类似,当被分离试样进入色谱柱后,组分分子在两相间呈下列平衡:



式中 X_m, X_s ——流动相中和固定相中的组分分子。

分析的组分按照各自的分配系数 $K_1, K_2, \dots, K_n$, 在两相间进行分配。

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\frac{q}{V_s}}{\frac{q}{V_m}} = \frac{V_m}{V_s} \cdot \frac{q}{p} = k' \frac{V_m}{V_s} \quad (1-12)$$

式中 K ——分配系数;

k' ——容量因子或分配比;

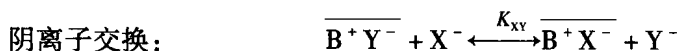
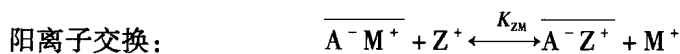
C_s, C_m ——组分在固定相和流动相中的浓度;

V_s, V_m ——固定相和流动相在柱中所占的体积。

与气-液分配色谱法一样,这种分配平衡的结果导致各组分的迁移速度具有差异性,从而实现分离。分配系数小的组分,保留值小,先流出柱。与气相色谱法不同的是,流动相种类对分配系数有较大的影响。

5. 离子交换色谱法的分离原理

离子交换色谱(IEC, Ion Exchange Chromatography)以离子交换树脂作为固定相,树脂上具有固定离子基团及可交换的离子基团。当流动相带着组分电离生成的离子通过固定相时,组分离子与树脂上可交换的离子基团进行可逆交换。根据组分离子对树脂亲和力不同而得到分离。



式中“ $-$ ”表示在固定相上, K_{XY} 和 K_{ZM} 是交换反应的平衡常数, Z^+ 和 X^- 代表被分析组分分离

子, M^+ 和 Y^- 表示树脂上可交换的离子团。

离子交换反应的平衡常数分别为

阳离子交换:

$$K_{ZM} = \frac{[A^-][Z^+][M^+]}{[A^-M^+][Z^+]} \quad (1-13)$$

阴离子交换:

$$K_{XY} = \frac{[B^+][X^-][Y^-]}{[B^+Y^-][X^-]} \quad (1-14)$$

平衡常数 K 值越大, 表示组分的离子与离子交换树脂的相互作用越强。由于不同的物质在溶剂中解离后, 对离子交换中心具有不同的亲和力, 因此具有不同的平衡常数。亲和力大的, 在柱中的停留时间长, 具有高的保留值。

6. 空间排阻色谱法的分离原理

排阻色谱法(SEC)亦称空间排阻色谱或凝胶渗透色谱法, 是一种根据试样分子的尺寸进行分离的色谱技术。

排阻色谱的分离机理是立体排阻, 试样组分与固定相之间不存在相互作用的现象。色谱柱的填料是凝胶, 它是一种表面惰性, 含有许多不同尺寸的孔穴或立体网状物质。凝胶的孔穴大小与被分离的试样分子大小相当, 仅允许直径小于孔开度的组分进入, 这些孔对于流动相分子来说是相当大的, 以至流动相分子可以自由地扩散出入。对不同大小的组分分子, 可分别渗入到凝胶孔内的不同深度, 大个的组分分子可以渗入到凝胶的大孔内, 但进不了小孔, 甚至于完全排斥; 小个的组分分子, 大孔、小孔都可以渗进去, 甚至进入很深, 一时不易洗脱出来。因此, 大的组分分子在色谱柱中停留时间较短, 很快被洗出, 它的洗脱体积很小; 小的组分分子在色谱柱中停留时间较长, 洗脱体积较大, 直到所有孔内的最小分子到达柱出口, 这种按分子大小而分离的过程才告完成。

因为分子尺寸一般随相对分子质量的增加而增大, 所以根据相对分子质量表达分子尺寸比较方便。将因分子过大而不能全部进入某一给定固定相孔内的最小的试样粒子的相对分子质量, 定义为该固定相的排阻极限。如图 1.3 中 A 点所对应的相对分子质量, 凡是比 A 点对应的相对分子质量大的分子均被排斥于所有的胶孔之外, 因而它们将以一个单一的谱带 C 出现, 在保留体积 V_0 时一起被洗脱。

很显然, V_0 是柱中凝胶颗粒之间的体积。随固定相不同, 排阻极限范围在 400 ~ 60 106 之间。将能够完全进入固定相最小孔内的最大试样粒子的相对分子质量定义为填料的渗透极限。如图 1.3 中 B 点对应的相对分子质量

质量, 凡是比 B 点对应的相对分子质量小的分子都可以完全渗入凝胶孔穴中。同理这些化合物也将以一个单一谱带 F 在保留体积 V_i 被洗脱。

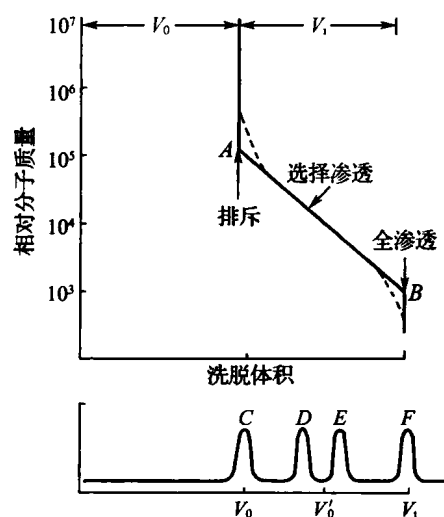


图 1.3 空间排阻色谱法示意图

可以预料,相对分子质量介于上述两个极限之间的化合物,将根据它们的分子尺寸,进入一部分孔穴,而不能进入另一部分孔穴,其结果使这些化合物按相对分子质量降低的次序被洗脱。所以,在选择固定相时,应使欲分离试样粒子的相对分子质量落在固定相的渗透极限和排阻极限之间。

由色谱过程的基本方程式可得

$$V_R = V_0 + K_{SEC} V_i \quad (1-15)$$

式中 V_R ——保留体积;

V_0 ——凝胶颗粒之间的体积;

V_i ——凝胶内孔体积,即溶质分子能够渗透进去的那部分体积;

K_{SEC} ——排阻色谱的分配系数,因此

$$K_{SEC} = \frac{V_R - V_0}{V_i} \quad (1-16)$$

所以, K_{SEC} 被定义为溶质分子渗入内孔体积的分数,其数值在0~1之间,其值取决于组分子的大小。对于完全不能进入凝胶孔内的大分子,其分配系数为零,即 $K_{SEC} = C_s/C_m = 0$,对于能自由出入凝胶孔的小分子,其在固定相内部的浓度与在固定相外部的浓度相同,则 $K_{SEC} = 1$,即 $V_R = V_0 + V_i$,因此所有组分只能在 V_0 和 $V_0 + V_i$ 的洗脱体积之间被依次洗脱下来,不会超越这个界限。

同时还可以看出,柱子的间隙体积 V_0 可通过测量相对分子质量大于固定相排阻极限的物质的保留体积而决定;对于已知 V_0 的柱子,其固定相体积可以通过测量相对分子质量小于固定相渗透极限的物质的保留体积而决定。因为该物质 K_{SEC} 为1, V_R 和 V_0 已知,所以利用式(1-16)可计算 V_i 。能够部分进入固定相孔内的物质,其分配系数一定在0~1之间,可通过把物质的 V_i , V_0 和保留体积代入式(1-16)而求出。

排阻色谱法中,保留时间是分子尺寸的函数,因此有可能提供分子结构的某些信息。它主要用来确定分散性聚合物的相对分子质量分布情况,但它不能分辨分子大小相近的化合物。一般说来,相对分子质量的差别须在10%以上时才能得到分离,所以该法不能用于分离复杂混合物。

1.3.2 塔板理论

塔板理论亦称平衡理论,即把气-液色谱过程看成是组分在固定液里的溶解平衡过程,或称分配平衡过程。可用分配系数、分配比等概念来描述组分在给定两相间的分配行为。

1. 分配平衡

(1)分配系数 K 分配色谱的分离是基于样品组分在固定相和流动相之间反复多次的分配过程,而吸附色谱的分离是基于反复多次地吸附-脱附过程。这种分离过程经常用样品分子在两相间的分配来描述,而描述这种分配的参数称为分配系数,用 K 表示。它是指在一定温度、压力下,组分在液相和气相之间分配达到平衡时的浓度比,即

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (1-17)$$

式中 C_s ——组分在液相中的浓度;

C_m ——组分在气相中的浓度。

分配系数是由组分和固定相的热力学性质决定的,它是一个溶质的特征值,仅与固定

相和温度这两个变量有关,而与两相体积、柱管的特性以及所使用的仪器无关。

(2)分配比 k 分配比又称容量因子,是指在一定温度和压力下,组分在液相和气相之间分配达到平衡时的质量比,即

$$k = \frac{m_s}{m_m} \quad (1-18)$$

式中 m_s ——组分在液相中的质量;

m_m ——组分在气相中的质量。

k 值越大,说明组分在固定相中的量越多,相当于柱的容量大,因此又称分配容量比或容量因子。它是衡量色谱柱对被分离组分保留能力的重要参数。 k 值也决定于组分及固定相热力学性质。它不仅随柱温、柱压变化而变化,还与流动相及固定相的体积有关。

$$k = \frac{m_s}{m_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} \quad (1-19)$$

式中 C_s ——组分在固定相的浓度;

C_m ——组分在流动相的浓度;

V_s ——柱中流动相的体积,近似等于死体积;

V_m ——柱中固定相的体积,在不同类型色谱中有不同的含义。

例如:在分配色谱中, V_s 表示固定液的体积;在尺寸排阻色谱中,则表示固定相的孔体积。

分配系数与两相体积无关,而分配比则随固定液的量而改变, k 值越大,组分分配在固定液中的量越多。它是衡量色谱柱对被分离组分保留能力的重要参数。某组分的 k 值可由实验测得。设流动相在柱内的线速度为 u ,组分在柱内线速度为 u_s ,由于固定相对组分有保留作用 $u_s < u$,因此两速度之比称为滞留因子 R_s 。

$$R_s = \frac{u_s}{u} \quad (1-20)$$

R_s 若用质量分数表示,即

$$R_s = \frac{m_s}{m_m + m_s} = \frac{1}{m_s} = \frac{1}{1 + k} \quad (1-21)$$

对组分和流动相通过长度 L 的色谱柱,其所需时间分别为

$$t_R = \frac{L}{u_s} \quad (1-22)$$

$$t_0 = \frac{L}{u} \quad (1-23)$$

整理式(1-20)~(1-23),可得

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} \quad (1-24)$$

上式说明,某组分的保留时间越长,则 k 值越大,色谱柱对该组分的保留能力就越强。

(3)分配系数 K 与分配比 k 的关系

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{m_s/V_s}{m_m/V_m} = k \cdot \frac{V_m}{V_s} = k \cdot \beta \quad (1-25)$$

式中 β 称为相比率,它是反映各种色谱柱柱型特点的又一个参数。例如,对填充柱,其 β 值一般为 6~35;对毛细管柱,其值为 60~600。

(4)分配系数 K 及分配比 k 与选择因子 α 的关系 根据式(1-9), (1-24), (1-25), 对 A, B 两组分的选择因子用下式表示

$$\alpha = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A} \quad (1-26)$$

式(1-26)表明,通过选择因子 α 把实验测量值 k 与热力学性质的分配系数 K 直接联系起来, α 对固定相的选择具有实际意义。如果两组分的 K 或 k 值相等,则 $\alpha=1$, 两个组分的色谱峰必将重合,说明分不开。两组分的 K 或 k 值相差越大,则分离得越好。因此两组分具有不同的分配系数是色谱分离的先决条件。

(5)色谱基本保留方程 由式(1-24)得

$$t_R = t_0(1+k) \quad (1-27)$$

若载气流量 F_c 恒定,根据保留体积定义,将式(1-3), (1-6), (1-25)代入式(1-27)得

$$V_R = V_m + KV_s \quad (1-28)$$

式(1-28)称为色谱基本保留方程。色谱柱确定后, V_m 和 V_s 即为定值。由此可见,分配系数不同的各组分具有不同的保留值,因而在色谱图上有不同位置的色谱峰。

2. 塔板理论

塔板理论最早由马丁(Martin)等人提出,把色谱柱比作一个精馏塔,沿用精馏塔中塔板的概念来描述组分在两相间的分配行为,同时引入理论塔板数作为衡量柱效率的指标。

塔板理论假设:

(1)在每一块塔板上,被分离组分在气-液两相间瞬时达到一次分配平衡,这一小段柱长称为理论塔板高度,用 H 表示。

(2)以气相色谱为例,载气进入色谱柱不是连续进行的,而是脉动式,每次进气为一块塔板体积(ΔV_m)。

(3)所有组分开始时存在于第0号塔板上,而且由东到西沿轴扩散可忽略。

(4)分配系数在所有塔板上是常数,与组分在某一塔板上的量无关。

为简单起见,设色谱柱由5块塔板($n=5$, n 为柱子的塔板数)组成,并以 r 表示塔板编号, $r=0, 1, 2, \dots, n-1$; 某组分的分配比 $k=1$ 。

根据上述假定,在色谱分离过程中,该组分的分布可计算如下:

开始时,若有单位质量,即 $m=1$ 的组分加到第0号塔板上,分配平衡后,由于 $k=1$, 即 $m_g = m_m$, 故 $m_g = m_m = 0.5$ 。当一个板体积的载气以脉动形式进入0号板时,就将气相中的 m_m 部分组分的载气顶到1号板上,此时0号板液相中 m_g 部分组分及1号板气相中的 m_m 部分组分,将各自在两相间重新分配。故0号板上所含组分总量为0.5,其中气-液两相各为0.25;而1号板上所含总量同样为0.5,气-液两相各为0.25;以后每一个新的板体积载气以脉动式进入色谱柱时,上述过程就重复一次(见表1-2)。

按上述分配过程,对于 $n=5, k=1, m=1$ 的体系,随着脉动进入柱中体积载气的增加,组分分布在柱内任一板上的总量(气-液两相中的总质量)同表1-3。

经 N 次转移后,各塔板上组分含量的分布符合 $(m_g + m_m)N$ 的二项式展开式。如 $N=4, k=1$ 时,展开式为 $m_g^4 + 4m_g^3m_m + 6m_g^2m_m^2 + 4m_gm_m^3 + m_m^4$ 。