

物理化学仪器指南

第二册

色谱仪器

郭尧君 主编

科学出版社

5-3
G4J-1
114545

生物化学仪器指南

第二册

色谱仪器

郭尧君 主编

科学出版社

1989

内 容 简 介

本书是《生物化学仪器指南》的第二册,介绍常用于生化分析的气相色谱仪、低压液相色谱仪、高效液相色谱仪、氨基酸分析仪、蛋白质序列仪和电泳仪。分别描述每种仪器的简单原理、结构、种类、订货须知、安装要求、验收方法、附件配置以及应用范围,还附有国内外部分厂商的仪器照片和性能介绍。可供大专院校有关专业师生,科研单位和器材部门的工作人员,进出口公司的外贸人员参考。

生物化学仪器指南

第 二 册

色 谱 仪 器

郭尧君 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1985年11月第 一 版 开本:787×1092 1/16
1985年11月第一次印刷 印张:4 3/4 插页:8
印数:0001—1750 字数:95 000

ISBN 7-03-001260-7/Q·191

定价:6.20元

序 言

自1982年《生物化学实验技术》丛书问世以来,深受同行的欢迎。但是这套丛书在描述各种生化实验技术时,由于篇幅所限,对通常使用的各类仪器只作粗浅的介绍。为了弥补这方面的不足,使生化工作者在从事实验研究时,更好地了解和操作这些仪器,我们决定试编这套《生物化学仪器指南》书,作为前套丛书的姊妹篇。

近代生物学的长足进步,主要是与测度和观察以及制备技术的进步平行发展着的。而这一方面的进步又是和仪器与仪器的构筑 (Instrument and instrumentation) 分不开的。人们常常说科学已进入生物学的世纪,这正是由于上述两种进步促成的。在生物学发展过程中进步表现在两个方面:即一些新概念的提出,及一些存在的观念在实验上的体现。只要想一想50至60年代里Watson和Crick的关于核酸分子的双螺旋模型的提出及DNA分子的半保留复制方式的证明和X射线衍射及超离心实验技术的关系就可以明白技术的进步是怎样地推动了本世纪下半叶的生物学的进步。

我国目前在实验室工作中困难很大的一部分来自生物学工作者常常不熟悉仪器,而许多技术工作者又常常不了解生物学工作者的思路。其结果是常常产生一些方法学的错误与解释上的讹谬,甚至在实验技术上无从着手。解决这种困难的办法一方面应该是加强不同训练背景之间的人员合作,另一方面则应使两种工作人员在知识上及训练上做一定程度的相互渗透。渗透可以保证两种工作人员产生共同语言以进行概念及实验上的交换。我们的这套书正是朝着这一方向努力,希望它既有益于“纯粹的”生物学工作者,也有助于“纯粹的”技术工作者。

近来,我国大量进口与引进了国外的先进实验仪器以作为实验中的工作手段。但是只要到一些科研与教学单位去看一下,便知道这些仪器的使用常常远非是合理的,有的“大才小用”,有的搁置不用,有的则物非其用,其结果是外汇已经用了,实验室空间也占满了,但未能明显地推动研究工作。

仪器随着其自动化程度、精度以及用途的多样性,其价格差别也很大。对于一个购置仪器的人来说,首先要明白自己需要什么,能付的预算款有多少。对于仪器说来绝非按钮愈多愈好,它和使用者的目的是互为表里的。仪器的最佳选择应该是对研究工作者的工作完成有所裨益。

这套书介绍了仪器的原理、使用及其应用范围。在我们的书中登了一些厂家产品介绍,主要是作为例证式的介绍,当然它们不一定是唯一的选择。在仪器的选择中技术以外的因素,例如价格、伺服的简便性、实验人员使用仪器的频度也常常是选型所必不可少的考虑因素。

这套书定名为《生物化学仪器指南》,但考虑其内涵则并不局限于生化仪器,或者说它涉及的是在近代生物学中与生化方法一同使用着的仪器。全书分四册,依仪器使用者的宽度 (popularity),而定其先后次序予以介绍。读者可以由本书目录中看到被介绍的仪器中有的在发展阶段上已较成熟,但有的尚在其襁褓阶段。总的说来,成熟的仪器易于使

用,但难于得到新颖的结果;研制中的仪器使用者的技巧要高、投资风险要大,但开拓的可能也大些,这一些细心的读者当能心领神会。

这套书初步分为《光谱仪器》,《色谱仪器》,《波谱仪器、离心机、X射线衍射仪等》及《显微镜、电子显微镜及其附属设备》四册,它既可以分册使用,又互相配合,成为一个有机整体。近代的信息爆炸(information explosion)造成出版泛滥,有的书卷帙浩繁,不胜阅读之苦。我们的书以图释文,以电报式的语句,言简意赅地说明问题。我们力求使读者获得有用信息的同时能在金钱、时间及判断的花费上付出最低值。我们希望这些目的能够达到,并欢迎广大读者指正。

徐 浩

前 言

继第一册光谱仪器之后,本分册主要介绍色谱仪器。作为一种制备和定性、定量分析的有效工具——色谱仪器已被广泛应用在各个领域中。它主要是利用生物大分子本身的带电性质、分子大小等特性,在充满分离介质的层析柱中或凝胶介质中进行分离,从而达到制备或分析的目的。层析方面的仪器有制备用的层析仪以及主要用于分析的高效液相色谱仪和气相色谱仪,还有氨基酸分析仪及序列仪。电泳方面的仪器有用于蛋白质和核酸分析的各种水平和垂直电泳仪。本分册对这些色谱仪器的简单原理、仪器结构、种类、安装要求、性能检查、附件及简单的应用作一概略介绍,并附录一些仪器的性能。希望既能从中找到你需用的仪器,又节省经费、外汇,从而保证实验的需要。如果我们作者有限的知识和经验能为读者提供有价值的信息,这就是我们的心愿。

郭尧君

目 录

序言	(i)
前言	(iii)
第一章 气相色谱仪	赵成华 (1)
一、引言	(1)
二、气相色谱仪	(1)
(一) 进样系统	(2)
(二) 气相色谱柱	(3)
(三) 检测器	(4)
三、气相色谱的分离原理和分离条件选择	(5)
四、定性分析	(8)
五、定量分析	(8)
六、制备气相色谱	(9)
七、气相色谱仪在生物学中的应用	(10)
八、某些国内外气相色谱仪简介	(12)
九、气相色谱仪附件的选择和安装条件	(13)
第二章 低压液相色谱仪	贺宝珍 (14)
一、凝胶色谱法	(14)
(一) 原理	(14)
(二) 凝胶的类型、性质及厂商	(14)
(三) 凝胶层析的应用	(17)
(四) 凝胶过滤的实验操作	(17)
二、离子交换柱层析	(19)
(一) 原理	(19)
(二) 离子交换树脂的选择及操作	(19)
(三) 应用	(21)
三、亲和层析	(21)
四、低压柱层析装置	(22)
第三章 高效液相色谱仪	谢光华 (23)
一、原理	(23)
二、仪器	(24)
(一) 高压输液泵	(25)
(二) 进样阀	(25)
(三) 色谱柱	(26)
(四) 检测器	(26)
(五) 记录器(或积分仪)	(32)

• v •

(六) 梯度洗脱装置	(32)
(七) 分部收集器	(32)
三、选购知识	(33)
四、验收知识	(34)
(一) 高压输液泵	(36)
(二) 检测器	(36)
(三) 进样阀	(38)
(四) 色谱柱	(39)
(五) 记录仪	(39)
(六) 梯度洗脱装置	(39)
五、在生化中的应用	(40)
第四章 氨基酸分析仪贺宝珍	(41)
一、原理	(41)
二、氨基酸分析仪器	(42)
(一) 氨基酸分析仪的结构	(43)
(二) 不同型号仪器的性能	(44)
(三) 氨基酸分析仪进展	(45)
(四) 氨基酸分析仪的应用	(46)
三、氨基酸分析仪器技术	(46)
(一) 仪器安装及验收	(46)
(二) 仪器的维护和保养	(47)
(三) 氨基酸分析仪验收指标	(47)
第五章 蛋白质序列仪杨 端	(48)
一、前言	(48)
二、简单原理	(48)
(一) 偶联	(48)
(二) 断裂	(49)
(三) 转化	(49)
三、仪器种类及简单结构	(51)
(一) 液相(旋转杯)蛋白质/多肽序列仪	(51)
(二) 固相蛋白质/多肽序列仪	(52)
(三) 气相蛋白质序列仪	(53)
(四) 脉冲式液相蛋白质/多肽序列仪	(53)
四、实验室要求及所需附件	(55)
(一) 实验室要求	(55)
(二) 附件要求	(55)
(三) 试剂要求	(55)
五、对蛋白质样品的要求	(56)
第六章 电泳仪郭尧君	(57)
一、电泳技术的历史	(57)
二、电泳分离的原理	(57)

三、各种电泳仪器与用途.....	(58)
(一) 垂直管型分析盘状电泳仪.....	(58)
(二) 垂直板状电泳仪.....	(59)
(三) 水平平板电泳仪.....	(59)
(四) 用于核酸分析的电泳仪器.....	(60)
(五) 电泳转移仪.....	(61)
(六) 制备电泳仪.....	(62)
四、电泳仪器的配套装备.....	(62)
(一) 电源.....	(62)
(二) 循环恒温水浴.....	(63)
(三) 凝胶干燥器.....	(63)
(四) 透照仪.....	(63)
(五) 电泳浓缩器.....	(63)
(六) 光密度扫描仪.....	(64)
五、应用.....	(64)

第一章 气相色谱仪

赵 成 华

一、引 言

气相色谱法是色谱法的一种。它是以气体(氮、氦或氢)作为流动相,以固体(气-固色谱)或液体(气-液色谱)作固定相,对混合物进行分离的,并在分离的基础上对物质进行定性、定量分析。气-固色谱常用活性炭、硅胶和分子筛作固定相。它是按吸附色谱原理进行工作的。它主要被用来分析永久性气体及低分子量烃类。由于它在生物学方面应用不多,这里不加详述。气-液色谱是按分配色谱原理工作的。自从 James 与 Martin 1952 年发明这种方法以来,它已被不断地加以完善。由于它的高效分离能力(例如毛细管色谱柱可分离出一百多个组分)、高选择性(可分离性质极近似的物质如顺、反异构体,旋光异构体等)、高灵敏度(某些检测器可分析 10^{-11} 克物质)及快速分析(一般只需数分或几十分钟即可),至今已在许多生产、研究部门得到了广泛的应用。在生物学上它可以分析生物体内许多重要物质如:酯类、糖类、氨基酸、固醇类、维生素等。在研究药物、毒物对生物体作用方面,它也是一种重要方法。近年来昆虫激素、昆虫信息素等生理活性物质研究得以飞速发展,气相色谱法起了关键的作用。

气相色谱法中使用的仪器叫气相色谱仪。美国于 1955 年、日本于 1957 年已开始出售气相色谱仪。随着色谱柱和检测器的发展,70 年代这种仪器已发展到成熟阶段。70 年代之后主要是引入许多先进的电子元件,仪器自动化程度大为提高。气相色谱仪的发展又大大地扩充了它的应用范围。因此它被称之为 20 世纪分析化学上一次最大的革命。

气相色谱仪不能直接分析在它的柱温范围内不能挥发的物质。此时往往需将它们转化成相应的衍生物,或是将大分子裂解为小分子方可分析。当然许多挥发度很低的物质也可用液相色谱分析。

二、气相色谱仪

图 1-1 是气相色谱仪流程示意图。载气由钢瓶流出,经减压阀减压,净化器净化,又经仪器中稳压阀、稳流阀之后进入气化室。用微量注射器注入的样品汽化后,即被载气带入色谱柱。样品在柱中分离后,按时间先后流入检测器。检测器能将流入的物质按其含量转为相应的电信号。电信号由放大器放大后输入记录仪,绘出一张色谱图。

气相色谱仪主要部件包括进样系统,色谱柱和检测器。

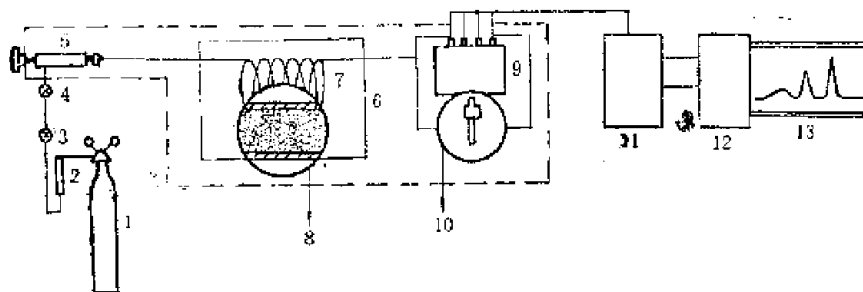


图 1-1 气相色谱仪的流程示意图

1. 载气瓶；2. 净化器；3. 稳压阀；4. 稳流阀；5. 进样口；
6. 柱炉；7. 色谱柱；8. 色谱柱切面；9. 热导检测器；10. 热丝切面；
11. 衰减器(TCD)或放大器(FID)；12. 记录仪；13. 色谱图。

（一）进样系统

可根据需要选用不同类型的进样系统 (Injection system)。一般的进样系统由一根石英管或是硅烷化的玻璃管插入金属块构成。金属块可被电热丝加热到一定温度。它的一端接色谱柱，另一端伸出到仪器外部，由金属螺帽及硅橡胶加以密封。在汽化温度下，注入的样品可瞬间变为蒸气。

填充柱还可直接插入金属块中。此时样品即直接被注入柱头上，这叫柱上进样。现在越来越多的仪器都采用这种进样方式。它的优点是减少样品在汽化部位的扩散作用，提高柱效。

控制进样系统的温度是十分重要的。温度太低，液体试样不能全部变为蒸气，得不到对称的色谱峰。而温度过高对某些成分会引起分解或分子重排。对某些生物体中成分尤其应当注意这点。例如某些萜烯类化合物在进样口温度过高时就会分解。一般进样口温度可高于柱温 50°C 左右。对于含易分解组分的试样，温度还可再低些。

毛细柱由于能承受的样品量十分小 (通常较填充柱少 100—200 倍)，这就需要一种能对样品进行分流的毛细柱进样系统。这种进样系统在工作时先将试样蒸发为气体，在试样蒸气与载气混合均匀后由分流器按一定的分流比 (例如 100:1) 分流，大部试样被排到仪器之外，仅少量试样被载气带入柱中。

与分流进样系统相对应的还有一种无分流进样系统。当样品 (一般是浓度很稀的试样) 被注入进样口后立即挥发为蒸气。在一定柱温下 (一般较溶剂沸点低 $10-30^{\circ}\text{C}$)，这些溶剂在柱头有个滞留过程，它好像一个塞子阻止了溶质的扩散，从而使溶质在柱头得以浓聚。这就是“溶剂效应”。溶剂效应避免了色谱峰的扩展。在柱内后部的溶剂会产生拖尾现象，因此在进样后一定时间 (20—60 秒) 必须打开系统中的针阀，以清扫出后部的溶剂。当然此时也会损失一点样品。最后随着程序升温，样品中各组分得以在柱中推移和分离。

最近又发展了一种毛细柱柱上进样系统。利用这个系统可将样品直接注入柱上。较之分流和无分流进样系统它具有下列优点：1) 样品在较低的温度下 (一般等于样品中溶剂的沸点) 注入柱上，避免了某些成分的分解。2) 定量更准确。3) 进样口无硅橡胶，减少了色谱系统的污染源。

无分流进样技术可使 80% 以上样品进入柱内，而柱上进样可使全部样品进入柱内。

使用这两种技术可大大降低仪器分析时的最少检知量,因此对微量分析十分有利。

最后无论是使用那种类型的进样系统,都必须周期性地用溶剂清洗其内部管道,以除去硅胶橡胶碎片或是残存的难挥发物。使用填充柱柱上进样时可定期更换柱头上的玻璃棉。

(二) 气相色谱柱

气相色谱柱是色谱仪中最关键部分,它可被分为两种类型:填充柱和毛细柱。

1. 填充柱 填充柱是气相色谱分析中常用的柱型。虽然近年来由于熔融石英毛细柱商品化,采用毛细柱分析的工作越来越多,但填充柱还是在气相色谱分析中占有重要位置。它的优点在于制作简单、价格便宜。另外可供使用的固定液极多,可以根据样品的构成选择合适的固定液。利用填充柱还可制备少量纯样,以供光谱分析或生物试验之用。

填充柱材料可由不锈钢、铜、聚四氟乙烯或玻璃制成。现在基本上所有型号的仪器均采用硬质玻璃制成的柱子。这是由于玻璃柱对极性样品吸附性小、易清洗。生物试样多含极性化合物如醇、醛、酸、酯、糖等,在气相色谱分析的一系列问题上必须注意这点。一般地玻璃柱在使用前需经硅烷化处理。其目的在于使玻璃表面上的羟基被硅烷化,减少活性吸附基团。其办法很简单:将一根清洗干净并干燥过的柱子注满新配制的20%二甲基二氯硅烷甲苯溶液,两端密封之。两小时后倒出硅烷化试剂,并用甲苯、甲醇依次将柱子清洗干净,最后干燥之。

柱内填充物是表面涂了一层固定液的担体。固定液含量用固定液和担体间的重量百分比表示。如称取100克担体、3克固定液,那么配出的填料固定液含量就为3%。涂渍固定液的步骤如下:先称取一定量担体和固定液,将固定液溶于溶剂中(每种固定液都有其适宜的溶剂,可查阅有关书籍或手册)。将含固定液的溶剂倒入担体中,在通风条件下用红外灯将溶剂蒸干。当然最好还是用旋转蒸发器蒸去溶剂。在配制过程中应避免搅动担体,否则担体碎裂后,会造成柱效下降。

涂完固定液的担体即可用于装柱。将管柱一端塞好经酸洗、碱洗和硅烷化处理过的玻璃棉,接水泵抽气(开始用较小的抽力,随着柱中担体增加再加大抽力),另一端加一小漏斗缓慢地加入担体。在抽气的同时用一木棍轻轻地敲打管壁,待装到接近柱头后再塞上玻璃棉。

新柱老化后方可使用。其方法是将柱子一端接于进样口并通入5—10毫升/分的氮气,另一端悬空(不要接检测器)。然后用低于该固定液最高使用温度、高于实际使用温度的柱温条件,加热4—8小时。在升高柱温时最好用每分钟2—4℃的速率来程序升温。其目的是在低温下除去柱内的氧气,防止某些固定液(如PEG 20M)在高温下被氧化。老化的目的是除去柱内的杂质,并使固定液在担体上分布得均匀。

2. 毛细柱 毛细柱是一种高效色谱柱。尽管在1958年已出现毛细柱,但由于制作和使用方面的困难,致使它在气相色谱中使用的广泛性不及填充柱。自从Perkin-Elmer公司发展了熔融石英毛细柱后(fused silica capillary column),它的使用已越来越广泛。

为便于比较,填充柱和毛细柱的主要参数列于表1-1中。

由表1-1可见:毛细柱由于柱子很长,可以得到很高的总有效塔板数(衡量柱效的单位)。毛细柱之所以分离效果好,这是一个主要原因。还需注意到由于柱效高,毛细柱色谱峰更加狭窄(图1-5、1-6),即组分集中在短时间内流入检测器。毛细柱还使用流量衡

表 1-1 填充柱和毛细柱的主要参数比较

	填 充 柱	毛 细 柱
长度 (米)	1.5—6	5—100
内径 (毫米)	2—4	0.2—0.7
流速 (毫升/分)	10—60	0.5—15
压力降 (磅/平方英寸)*	10—40	3—40
每米有效塔板数	2 500 (内径2毫米)	3 000 (内径0.25毫米)
总有效塔板数	5 000	150 000
柱容量	10微克/峰	<50纳克/峰
液膜厚度 (微米)	1—10	0.05—1

* 1 磅=0.453592千克, 1 英寸=0.0254米。

定的氮气作补充气 (make up gas), 这种气体可不受载气流量改变的影响 (可将其流量调至使火焰离子化检测器产生最高灵敏度处)。同时毛细柱的柱流失要比填充柱少得多 (因固定液含量下降), 这就大大地提高了检测器信噪比。由于上述两点原因, 从而使火焰离子化检测器灵敏度大为提高。有人计算过可降低检测极限 5—100 倍! 这就是毛细柱和无分流进样法相结合可以检知极微量成分的原因。作者在昆虫外激素研究中, 使用毛细柱和火焰离子化检测器可毫不困难地测得 0.1 纳克的物质, 而填充柱仅可检知 5—10 纳克物质。

毛细柱的类型很多。它大致可分为两种类型: 1) WCOT 柱 (wall-coated open tubular column)。这种柱子是将固定液直接涂于金属、玻璃或石英管内壁而制成。早期是采用不锈钢或玻璃做为管柱材料。现在已发展起来了以石英做材料的熔硅柱也叫弹性毛细柱。弹性毛细柱柱效高、寿命长 (可使用一年以上)、安装方便 (不易折断), 因而得到广泛应用。还可通过化学键合的办法, 将固定液键合到管壁上, 这叫键合相弹性毛细柱。这种柱子由于固定液和管壁结合得很牢, 甚至可以用溶剂 (如戊烷) 清洗柱内由于长期使用所造成的污染。也有内径为 0.5 毫米的大口径弹性毛细柱, 这就增加了柱容量, 利用它可制备纯度极高的样品。弹性毛细柱已被国内外许多厂商作为商品出售。例如澳大利亚的 S.G.E 公司、美国的 Perkin-Elmer 公司、J&W 公司和 Hewlett Packard 公司出品的弹性毛细柱性能都很好。弹性毛细柱由于采用石英作为管壁, 故对样品吸附性极小, 这点特别有利于分析生物样品。2) SCOT 柱 (support-coated open tubular column)。它是将柱内壁作适当处理, 如将玻璃柱内壁涂一层极细的担体, 然后再涂固定液制成。这种柱子的柱容量较大, 可直接将样品导入柱中, 而无需特殊的毛细柱进样器。它的主要缺点是柱效低、寿命短。

(三) 检测器

检测器的种类繁多, 根据样品构成、分析目的可选用不同的检测器。常用的类型有两种: 热导池和火焰离子化检测器 (TCD 和 FID)。

1. 热导池检测器 (TCD) 热导池通常由池体和热敏元件构成。热敏元件为钨丝或铼钨丝。通以直流电后, 其温度就会较周围池腔高。组分流入池腔后, 组分加载气的热导率与纯载气的热导率是不同的。这就改变了热敏元件的温度, 因而其电阻也随着改

变,电路上就产生一信号电压。通过纯载气的参考池和通过载气加样品的测量池分别组成了惠斯登电桥的两臂。通过电桥很容易测到信号电压。

显然载气与试样间热导率差异越大,则检测器灵敏度越高。用氢或氦作载气可获得较高灵敏度。

TCD对无机气体及有机物均有响应,但它的灵敏度较FID低两个数量级。因此对微量成分分析和毛细柱分析不适用。它不会破坏试样,检测后试样还可被回收。

2. 火焰离子化检测器(FID) 这种检测器由喷嘴和收集极构成。两者间有一恒定的直流电压。柱后的有机物流入喷嘴后,即在喷嘴上部的氢焰中燃烧,此时有极微量有机物被电离,收集极便可收集到一股微电流。微电流可经放大器放大,然后再被记录仪记录。

载气(氮)、氢气及空气需有一定比例(对填充柱可为1:1:10),否则会影响灵敏度或是不能燃烧。

FID灵敏度高,浓度与检测器响应的线性范围宽,适宜于分析一切能在火焰上被电离的组分。在痕量分析、毛细柱分析上它是极其有用的。

三、气相色谱的分离原理和分离条件选择

气-液色谱(GLC)的分离原理:当一试样在色谱柱行进时,各组分在气相和液相间的分配系数不同,也即在液相中溶解能力不同,因而被多次分配。最后各组分在柱中运行速度不一,经过一定长度的柱子后便被分开。

图1-2是一张典型色谱图。图上各部分有专门名称,分析一张色谱图必须了解这些名称。

(1) 基线:直线OK称为基线。它表示只有载气通过检测器时所得的本底。

(2) 峰1和峰2:当被分离组分和载气一齐通过检测器时,所得的信号-时间曲线。

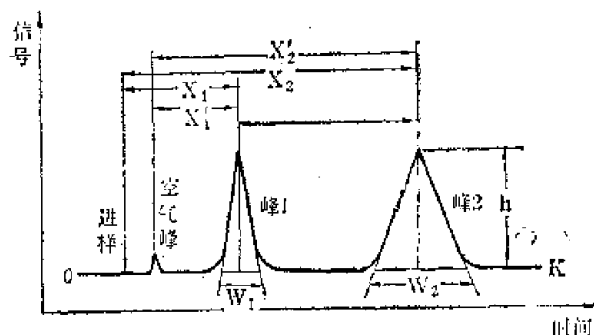


图 1-2 色谱图与色谱图中的常见名称

(2) 峰宽: (峰宽) 峰宽是指峰底宽度,即峰底与基线相切点的切线距离。

则两峰完全分开。组分在柱中分离过程,就是它在固定相中和在流动相中多次分配的过程。两组分能被分开基于它们在某一固定相中有不同的分配系数(在分配平衡时,组分在两相中数量之比)。两组分配系数相差越大,则越易分开。分离也与峰宽有关,即与组分在柱中的扩散速度有关。考虑到这些因素,可得到公式(2):

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

其中 α 为两组分分配系数之比,也即为两组分相对保留值 X'_2/X'_1 。 N 为有效理论塔板数,是衡量柱效的指标。它可由校正保留时间、峰宽计算得来。

$$N = 16 \left(\frac{X'}{W} \right)^2 \quad (3)$$

X' 为校正保留值。 W 为峰宽。它们的数值可用时间也可用距离单位表示。

影响分离度的因素很多,而且填充柱和毛细柱情况不一样,因此分别加以说明。首先说明一下影响填充柱分离的一些因素。

1. 担体 好的担体有较大的比表面、颗粒度均匀、表面吸附性低、热稳定性好且有一定强度。

常用的是硅藻土担体。可分为红色担体与白色担体两类。白色担体较红色担体比表面要小、强度也低,但表面吸附性低,故适于分析极性化合物。白色担体型号很多,国外有 Celite 545、Chromosorb W、Gas Chrom Q 等。国内有 101、102 等。它是生物样品分析中常用的担体。

担体颗粒的粗细也会影响柱效。细颗粒的担体比表面大,可使柱效提高。一般 2 米长的柱子可用 100—120 目的担体。如柱子再加长时就得用较粗颗粒的担体,否则对载气阻力过大,影响载气流量。

为减少担体表面的吸附性,常用酸洗、碱洗的办法。有时还用二甲基二氯硅烷(DMCS)进行硅烷化处理,以封闭担体表面上的 OH 基。在涂非极性固定液时常用这种担体。

2. 固定液 对固定液有下列要求: 1) 在操作温度下,蒸气压低、热稳定性好、呈液态。2) 组分在固定液中有一定溶解力。3) 选择性好,对沸点相近、结构不同的物质有较高的分离能力。

固定液种类繁多,可分为非极性(包括弱极性的如 SE 30、OV-1、OV-101、DC200 等),中等极性(如 OV-17、OV-225、CHDMS、PEG 20 M 等)、强极性(如 DEGS、TCEP、OV-275 等)和氢键型四类。近年来又发展了特殊用途的固定液如分离顺、反异构体的液晶类固定液和分离手性化合物的手性固定液。

选用固定液可根据“相似性原则”进行,即固定液性质与被分离物有某些相似性,如官能团、化学键、极性、某些化学性质。此时被分离物在固定液中溶解度大,易分离。

在极性固定液中,物质首先按极性大小被分离(极性小的先流出),极性相同则按沸点高低分离(沸点低的先流出)。在非极性固定液中,物质则按沸点顺序分离。

在分析复杂的样品时必须使用两根不同性质固定液的柱子。因为某一种固定液只能分开某些组分,而不能分开另一些组分。未分开的组分可以被收集下来,再用另一根柱分离。也可使用混合固定液的办法来解决。

目前多采用低固定液含量的柱子(5—10%)。固定液含量低,可使用较低柱温,此时可得较大的分配系数,从而改善分离。固定液含量与所使用的担体类型有关,使用比表面较小的担体时(如 Chromosorb G)固定液含量就要小。

3. 柱温 柱温太高会使固定液选择性变坏,不利于分离。若降低太多,则保留时间延长而影响分析速度。选择柱温可根据样品沸点来确定。一般柱温可比样品平均沸点低 100 度左右。

对宽沸程混合物则采用程序升温的办法。这就解决了分离效果和分析速度的矛盾。

4. 载气 选择载气要根据分析需要、检测器类型来确定。载气纯度要高。使用任何一种气体作载气都要调至最佳线性流速。氮气的最佳线性流速为 10—12 厘米/秒,氢气为 15—20 厘米/秒。

5. 柱长和内径 柱子增长,有效塔板数 N 也随着增加,因此分离度 R 也增加(公式 2)。但柱子太长则保留时间和柱前压也会增加许多,故柱长受到限制。填充柱一般为 2 米,有时为了需要也可长至 10 米。

柱内径一般为 2—4 毫米。太细柱容量要下降,太粗则柱效下降。

上述各种因素同样会影响毛细柱的分离能力,但毛细柱的基本参数(表 1-1)与填充柱很不一样,因此需加以说明。

(1) 固定液:毛细柱能使用的固定液要比填充柱少得多,尤其是极性固定液。因为某些固定液难以完成涂渍。另一方面毛细柱由于有效塔板数极高、分离能力强故也不需要十分繁多的固定液。对一般实验室有一根极性柱和一根非极性柱也就够了。市售的毛细柱有不同的液膜厚度,液膜厚则对分离强挥发性物质有利,柱子分离能力也会增加。但对弱挥发性物质保留时间也会增加。

(2) 毛细柱柱温:柱温影响分离的情况与填充柱一样。在毛细柱中一般最高使用温度要较相同固定液的填充柱低一些。使用毛细柱时一般采用程序升温的办法,这一方面是某些进样系统的需要(如无分流进样、柱上进样等),另一方面是毛细柱液膜很薄,采用程序升温不易损坏液膜。

新柱往往要老化一夜,此时当然也需采用程序升温。只要试样中各组分保留时间不是太长就不要使用太高的上限柱温,这样可以延长柱寿命。

(3) 柱长和内径:常用的毛细柱一般长 25—50 米。毛细柱因为长度较长,又使用程序升温,所以保留时间一般也较长。超过 50 米的柱子很少采用,因为根据公式(2)分离度仅与有效板数的平方根成正比,即柱长增加到 4 倍,分离度才能增加 1 倍,但此时的保留时间要延得很长。

内径一般在 0.2—0.5 毫米。使用粗柱可增加柱容量,但柱效会降低。

(4) 载气:一定要使用高纯度的载气(99.999% 的氮或氢)。使用氮作载气要保持在最佳线速上,过高的线速,则柱效下降。但使用氢作载气可超过最佳线速。这是因为氢气流速较快时对最小塔板高度(长度/塔板数)不致于影响太大。但使用氢气时要特别注意安全。

微量的氧气会破坏某些固定液如 PEG 20M。因此在使用毛细柱做分析时最好在载气进入柱前加一个装有脱氧剂的管子(可从大连催化剂厂购到)。同时还得注意消除微量注射器中的空气。

生物试样中往往含有许多难以挥发的成分。这些难挥发性成分常常不是分析的对象。如果将它们连同挥发性成分一起注入柱中不但影响分离,还会污染柱子,特别是污染毛细柱。此时要求分析者采用蒸馏或凝胶渗透色谱法除去这些难挥发物。如果分析对象就是这些难挥发物,可经化学反应转化为挥发物。例如长链脂肪酸可与重氮甲烷反应生成沸点较低的脂肪酸甲酯。

四、定性分析

各种物质在一定的色谱条件下,都有其自己的保留时间。用未知物和已知物在同一色谱条件分析,看其保留时间是否相同,这便是重要的定性指标。使用相对保留值可以减少分析条件不同造成的误差,此时只需固定液和柱温一致便可以了。

利用共同进样技术也可消除在比较保留时间时因色谱条件差异而造成的误差。此时将未知物与标准物一起注入色谱系统,如果未知物中某一色谱峰明显增高,这个峰便可初步推断就是标准物。此时标准物纯度要高。

脂肪族同系物在同一色谱条件下,其碳数与它们的保留时间(也可用记录纸上色谱峰的保留距离来表示)对数呈线性关系。根据这个规律在有一系列同系物情况下,可用作图法测定未知物是属于同系物中哪一种。

计算一个未知物的 Kovats 指数,再与文献值核对,也是一种定性方法。

上述方法均需标样,同时要两个不同性质(极性和非极性)色谱柱分析才为可靠。即使如此,若要对物质进行最后定性还需结合其他方面的(如光谱分析)分析数据。

对一结构完全未知的物质,可用反应色谱法(用 GC 来检查未知物是否能与某试剂起反应,来得到与结构有关的信息),或进行 GC-MS、GC-IR、核磁共振等分析来定性。近年来毛细柱 GC-MS 已发展到成熟阶段,无论是毛细柱的分辨力或是质谱的灵敏度都是极高的。此时质谱仪可被看成是一个检测器,由此而得的结构信息要比 GC 多得多。

五、定量分析

根据在某一色谱条件下,某物质在样品中的含量与其峰高或峰面积成正比的关系,可进行定量分析。

常用的方法有外标法、内标法和归一化法。外标法是先测得某标准物不同浓度的峰高或峰面积并作出浓度—峰高(峰面积)标准曲线。然后在同一色谱条件下,用未知含量物的峰高或峰面积与其相应的曲线核对来定量。内标法是用某已知含量的标准物与未知含量的样品一起注入色谱柱,可根据已知含量物和未知含量物峰面积(或峰高)之比来计算出含量。当标准物和待测物不是同一物质时,需考虑检测器对不同物质响应值差异。可用校正因子对此差异校正。校正因子可由文献中查出。归一化法可用于同系物中,这时各组分均能分开且响应值近似,因此某一组分的百分含量即为它的峰面积与总峰面积之比。

影响定量的因素很多,像进样技术、仪器工作稳定性、峰高或峰面积测量误差等。分析时必须注意这些因素。

目前很多气相色谱仪都附有微处理机,利用它可自动记录各色谱峰的保留时间和相