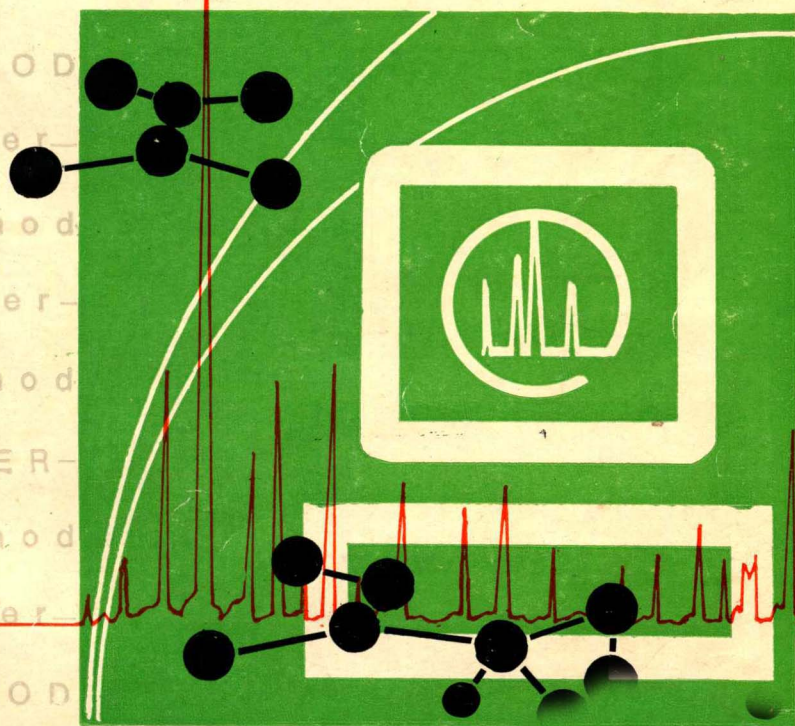


# 现代分析仪器 与测试方法

宋治军 纪重光 主编



西北大学出版社

## 现代分析仪器与测试方法

宋洽军 纪重光 主编

责任编辑：翁锡玲

---

西北大学出版社出版发行

(西安市太白路)

新华书店经销 西北农业大学印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 19.25 印张 450 000 字

1994 年 12 月第 1 版 1995 年 4 月第 1 次印刷

印数, 1—3000

---

ISBN 7—5604—0863—X/TH·5

定价: 14.80 元

# 序

科学技术的飞速发展,加快了各门学科的交叉、渗透和综合,新兴边缘学科层出不穷,对人们认识自然现象,掌握客观规律提出了更高的要求。传统的实验手段和分析方法已不能满足当今科学技术发展水平的需要,迫切要求采用现代分析仪器和先进的分析方法,从而在更深层次上揭示客观规律,拓宽研究领域。

古人云:“工欲善其事,必先利其器”,科学的发展也一样。电子显微镜的出现,使我们可以对细胞的超微结构进行精细观察;色谱技术、电泳技术的兴起和发展,极大地促进了生物大分子——蛋白质、酶、多糖、核酸等的分离、分析和鉴定;各种光谱技术、核磁共振技术以及电子计算机技术的突飞猛进,把实验手段和工作效率提高到一个崭新的水平。近年来,以信息科学、材料科学、生物工程等新科学技术为标志的革命正在世界范围内兴起,它们的应用必将带来科学技术又一次新的飞跃。

本书是作者多年实践经验的结晶。以长期的实验研究为基础,吸取国内外仪器分析的最新成果,系统地介绍了现代分析仪器原理和实验方法,选材新颖,注重理论联系实际。该书既包括经典的分析方法,更有先进的精密仪器分析技术,面向不同层次的读者。本书简明扼要,叙述流畅,方法具体实用,实乃从事生物、医学、食品和农业工作的科研人员和大专院校师生必备之参考书。希望它能对生物、医学、食品和农业研究工作产生促进作用和有益的影响。

1994年12月

# 前 言

仪器分析技术的发展和应⤵用,使生物、食品 and 农业科学得到了迅猛的发展,对生物、医学、食品及农业生产、科研、教学以及科研成果的推广产生了深远的影响。80年代以来,各大专院校和科研单位通过各种渠道,相继引进了一大批现代分析仪器,开发和建立了众多的仪器分析测试方法和实用技术。为了充分发挥这些仪器的功能,合理地利用技术资源,使其在教学、科研和生产实践中更好地发挥作用,我们组织了长期从事仪器分析工作的科技人员,分头执笔,最后由宋治军、纪重光、张林生和李宗让四位同志统稿整理,集成此书,奉献给大专院校的师生和有关生物、医学、轻工及农业领域科研、分析测试单位的科技工作者。该书也可作为农业院校研究生的教材或参考书。

本书内容分为仪器篇和方法篇两大部分。仪器篇主要介绍分析测试中常用大型精密仪器的特点、发展、结构、原理和最基本的操作技术,力求使读者对这些仪器的全貌有系统的了解,为以后解决分析测试中遇到的实际问题奠定基础。方法篇主要介绍分析原理和操作技术,作者从大量的分析方法中选择了分析测试中常见项目的分析方法,所介绍的方法大都经过作者实践,实用可靠,且叙述从原理到具体的操作步骤,简明扼要,既有常规的方法,更有现代化的大型仪器分析方法,以满足不同层次的读者需要。其中“分析测试误差及质量控制”一章阐述了分析测试过程中误差的种类、来源及控制和消除误差的方法,帮助读者正确地了解分析质量控制过程,提高分析结果的精密度和准确度。

本书在编写过程中,参阅和引用了许多作者的资料和书籍,在此谨向这些作者致以谢意。

本书承西北农业大学安宝珠副教授审校了全文;汪沛洪教授、薛澄泽教授审阅了部分章节,提出了许多宝贵意见;荆家海教授对本书的编写给予了很大的支持和鼓励,并在百忙中为本书作序,谨此一并致谢。

限于作者水平,书中可能存在一些缺点和错误,敬请读者批评指正。

编 者

1994年12月

# 目 录

## 仪 器 篇

第一章 色谱分析仪器.....	(1)
§ 1.1 高效液相色谱法 .....	(1)
1.1.1 色谱法基本原理 .....	(1)
1.1.2 高效液相色谱仪 .....	(6)
1.1.3 高效液相色谱仪的应用 .....	(9)
§ 1.2 自动柱层析(色谱)法.....	(11)
1.2.1 仪器 .....	(11)
1.2.2 应用 .....	(13)
§ 1.3 离子色谱仪.....	(14)
1.3.1 离子色谱法发展与特点 .....	(14)
1.3.2 离子色谱法的基本原理 .....	(15)
1.3.3 离子色谱仪的结构 .....	(16)
1.3.4 离子交换色谱的基本操作技术 .....	(18)
§ 1.4 氨基酸自动分析仪.....	(19)
1.4.1 氨基酸自动分析仪的进展.....	(20)
1.4.2 氨基酸分析原理 .....	(21)
1.4.3 氨基酸分析仪的结构与功能 .....	(25)
1.4.4 氨基酸分析仪的应用 .....	(28)
§ 1.5 薄层色谱扫描仪.....	(29)
1.5.1 概况 .....	(29)
1.5.2 薄层色谱扫描仪的基本原理 .....	(30)
1.5.3 仪器 .....	(33)
1.5.4 薄层色谱法的操作与扫描仪的应用 .....	(35)
§ 1.6 电泳.....	(40)
1.6.1 电泳技术原理 .....	(40)
1.6.2 支持物的制备和特性 .....	(42)
1.6.3 电泳操作一般技术 .....	(43)
1.6.4 特殊电泳技术 .....	(45)
1.6.5 电泳技术的应用 .....	(50)
§ 1.7 气相色谱法.....	(50)

1.7.1	气相色谱法的特点	(50)
1.7.2	气相色谱分离原理	(51)
1.7.3	气相色谱仪主要结构及分析流程	(52)
1.7.4	定性定量分析方法	(53)
<b>第二章</b>	<b>光学分析仪器</b>	<b>(56)</b>
§ 2.1	紫外—可见分光光度计	(56)
2.1.1	紫外—可见分光光度法简介	(56)
2.1.2	紫外—可见分光光度法的基本原理	(57)
2.1.3	紫外—可见分光光度计的结构及仪器	(61)
2.1.4	紫外—可见分光光度计的基本方法	(65)
§ 2.2	红外分光光度计	(66)
2.2.1	红外分光光度计法简介	(66)
2.2.2	红外光谱法的基本原理	(67)
2.2.3	红外分光光度计的主要构成部件和工作方式	(69)
2.2.4	红外分光光度计测量的基本技术	(76)
§ 2.3	荧光分光光度计	(77)
2.3.1	荧光分光光度法简介	(77)
2.3.2	荧光光谱分析的基本理论	(78)
2.3.3	荧光仪器的基本构成部件及仪器	(81)
2.3.4	荧光分析的基本操作技术	(84)
§ 2.4	原子吸收分光光度计	(86)
2.4.1	原子吸收分光光度法简介	(86)
2.4.2	原子吸收光谱分析的基本原理	(87)
2.4.3	原子吸收分光光度计的基本构成与工作原理	(89)
2.4.4	原子吸收分光光度计的基本方法	(91)
§ 2.5	$^{15}\text{N}$ 发射光谱仪	(94)
2.5.1	$^{15}\text{N}$ 发射光谱法简介	(94)
2.5.2	$^{15}\text{N}$ 发射光谱法的基本原理	(94)
2.5.3	$^{15}\text{N}$ 发射光谱仪的基本构成部件	(96)
2.5.4	$^{15}\text{N}$ 发射光谱仪的基本操作技术	(96)
<b>第三章</b>	<b>物理分析仪器</b>	<b>(99)</b>
§ 3.1	电子显微镜	(99)
3.1.1	透射电子显微镜	(100)
3.1.2	扫描电子显微镜	(103)
§ 3.2	离心机	(106)
3.2.1	离心机的原理	(107)
3.2.2	超速冷冻制备式离心机的构造	(108)
3.2.3	离心转头	(109)

§ 3.3 光学显微镜 .....	(110)
3.3.1 显微镜的成像原理与放大率 .....	(110)
3.2.2 显微镜的构造 .....	(111)
3.3.3 几种光学显微镜 .....	(114)

## 方 法 篇

第四章 分析测试的误差及质量控制 .....	(118)
§ 4.1 分析测试中的准确度与精密度 .....	(118)
4.1.1 准确度 .....	(118)
4.1.2 精密度 .....	(118)
§ 4.2 误差的种类 .....	(120)
4.2.1 系统误差 .....	(120)
4.2.2 偶然误差 .....	(121)
§ 4.3 分析测试中实验数据的统计与处理 .....	(123)
4.3.1 有效数字的概念、修约及运算规则 .....	(123)
4.3.2 实验数据的处理 .....	(125)
4.3.3 测定结果的统计与表示方法 .....	(126)
4.3.4 可疑值的检验 .....	(128)
§ 4.4 分析质量控制 .....	(131)
4.4.1 实验室内部质量控制 .....	(131)
4.4.2 实验室间的质量控制 .....	(139)
第五章 蛋白质 .....	(143)
§ 5.1 蛋白质含量的测定(K 氏定氮法) .....	(143)
§ 5.2 谷物蛋白质的测定(双缩脲法) .....	(145)
§ 5.3 蛋白质含量的测定(Folin—酚试剂法) .....	(146)
§ 5.4 蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝 G-250 法) .....	(148)
§ 5.5 蛋白质含量的测定(紫外吸收法) .....	(149)
§ 5.6 谷物蛋白质组分连续累进提取分析 .....	(150)
§ 5.7 禾谷类作物种子醇溶蛋白质的 RP-HPLC 的分离鉴定 .....	(152)
§ 5.8 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量 .....	(153)
第六章 酶 .....	(158)
§ 6.1 过氧化氢酶活性的测定(滴定法) .....	(159)
§ 6.2 过氧化氢酶活性的测定(氧电极法) .....	(161)
§ 6.3 淀粉酶的测定 .....	(162)
§ 6.4 过氧化物酶、酯酶同工酶的测定 .....	(164)
第七章 氨基酸 .....	(170)
§ 7.1 蛋白质水解氨基酸的测定(盐酸水解法) .....	(170)
§ 7.2 胱氨酸的测定(过甲酸氧化法) .....	(174)

§ 7.3	色氨酸的测定(碱水解法) .....	(175)
§ 7.4	动物脂肪组织中羟脯氨酸测定 .....	(176)
§ 7.5	游离氨基酸的测定 .....	(176)
§ 7.6	$\beta$ -草酰氨基丙氨酸(BOAA)的测定 .....	(178)
§ 7.7	植物组织中游离氨基酸总量的测定 .....	(179)
§ 7.8	色氨酸含量的测定(木瓜酶水解法) .....	(180)
§ 7.9	谷物种子中色氨酸含量的测定 .....	(181)
§ 7.10	玉米种子中赖氨酸的测定 .....	(182)
§ 7.11	脯氨酸含量测定 .....	(184)
<b>第八章</b>	<b>碳水化合物</b> .....	<b>(186)</b>
§ 8.1	粗淀粉的测定(国标法) .....	(186)
§ 8.2	植物样品中淀粉的测定(蒽酮法) .....	(187)
§ 8.3	总糖的测定 .....	(188)
§ 8.4	还原糖、总糖的分光光度法测定 .....	(190)
§ 8.5	植物组织中可溶性糖的测定(液相色谱法) .....	(191)
§ 8.6	植物样品中可溶性糖的测定(蒽酮比色法) .....	(192)
§ 8.7	单糖的测定(气相色谱法) .....	(193)
§ 8.8	蔗糖的测定(比色法) .....	(195)
§ 8.9	粗纤维的测定 .....	(195)
§ 8.10	果胶质的重量法测定 .....	(197)
<b>第九章</b>	<b>有机酸、脂肪和植物激素</b> .....	<b>(199)</b>
§ 9.1	水果、蔬菜中总酸度的测定 .....	(199)
§ 9.2	食物中有机酸的测定(液相色谱法) .....	(200)
§ 9.3	食品中山梨酸、苯甲酸气相色谱分析 .....	(201)
§ 9.4	动植物油脂中高级脂肪酸的气相色谱分析 .....	(203)
§ 9.5	谷类油料作物种子粗脂肪的快速测定(油脂快速萃取仪) .....	(204)
§ 9.6	气相色谱法分析植物体内主要激素 .....	(205)
§ 9.7	植物激素乙烯的气相色谱测定 .....	(207)
<b>第十章</b>	<b>维生素</b> .....	<b>(209)</b>
§ 10.1	维生素 B <sub>1</sub> 的测定(荧光法) .....	(209)
§ 10.2	维生素 B <sub>1</sub> 的测定(液相色谱法) .....	(211)
§ 10.3	谷物中维生素 B <sub>2</sub> 的测定(荧光法) .....	(212)
§ 10.4	维生素 B <sub>1</sub> 、B <sub>2</sub> 、B <sub>6</sub> 的同时测定(液相色谱法) .....	(214)
§ 10.5	样品中总维生素 C 的荧光测定 .....	(215)
§ 10.6	反相高效液相色谱法测定维生素 C .....	(216)
§ 10.7	烟酸的测定 .....	(217)
§ 10.8	维生素 A 的测定 .....	(219)
§ 10.9	维生素 D 的测定 .....	(220)



§ 10.10	维生素 E 的测定 .....	(222)
§ 10.11	维生素 A、D、E 的液相色谱法测定 .....	(223)
<b>第十一章</b>	<b>矿物质</b> .....	<b>(225)</b>
§ 11.1	植物体中全磷的测定 .....	(225)
§ 11.2	土壤全磷的测定(比色法) .....	(226)
§ 11.3	土壤速效磷的测定 .....	(227)
§ 11.4	硼的测定(酸消煮——原子吸收法) .....	(228)
§ 11.5	食品中氟的测定(扩散——氟试剂比色法) .....	(230)
§ 11.6	碘的测定(水浸提——气相色谱法) .....	(232)
§ 11.7	硒的荧光分光光度测定法 .....	(234)
§ 11.8	植物硅的测定 .....	(236)
§ 11.9	土壤浸出液中 Cl <sup>-</sup> 的测定 .....	(237)
§ 11.10	土壤中全量铜、锌、铁、锰、铅、镉、镍、钴的测定 .....	(238)
§ 11.11	土壤中全量铬的测定 .....	(239)
§ 11.12	土壤中有效铜、锌、铁的测定 .....	(239)
§ 11.13	食品、饲料及生物样品中 15 种元素的测定 .....	(240)
§ 11.14	汞的测定 .....	(241)
<b>第十二章</b>	<b>农药残留</b> .....	<b>(243)</b>
§ 12.1	有机磷农药残留的测定 .....	(243)
§ 12.2	有机氯农药六六六、滴滴涕残留量的测定 .....	(245)
§ 12.3	反相离子抑制色谱法测定辛硫磷农药 .....	(249)
§ 12.4	N—亚硝酸胺总量的比色测定 .....	(250)
<b>第十三章</b>	<b>其它</b> .....	<b>(253)</b>
§ 13.1	烟叶中总烟碱的分光光度法测定 .....	(253)
§ 13.2	单宁的分光光度法测定 .....	(254)
§ 13.3	食物中胆固醇的比色测定 .....	(254)
§ 13.4	血清的总胆固醇的测定 .....	(255)
§ 13.5	反相 HPLC 测定植物组织中多胺 .....	(256)
§ 13.6	土壤中氧化亚氮的气相色谱测定 .....	(257)
§ 13.7	气相色谱测定低度酒中的醇度 .....	(258)
§ 13.8	蒸馏酒及配制酒中杂醇油的气相色谱分析 .....	(259)
<b>第十四章</b>	<b>物理分析技术</b> .....	<b>(261)</b>
§ 14.1	透射电镜生物样品的超薄切片技术 .....	(261)
14.1.1	取材 .....	(261)
14.1.2	固定 .....	(262)
14.1.3	漂洗、脱水、渗透和包埋 .....	(267)
14.1.4	超薄切片 .....	(269)
14.1.5	电子染色 .....	(275)

14.1.6	负染技术 .....	(276)
§ 14.2	扫描电镜生物样品制备方法 .....	(277)
14.2.1	扫描电镜对制备生物样品的基本要求 .....	(277)
14.2.2	扫描电镜生物样品制备的一般方法 .....	(279)
14.2.3	几类常见样品制备方法实例 .....	(279)
§ 14.3	离心理论与技术 .....	(282)
14.3.1	超速离心的基本理论 .....	(282)
14.3.2	密度梯度离心与制备方法 .....	(285)
14.3.3	植物病毒提纯及样品处理 .....	(288)
14.3.4	动物病毒分离提取的前处理 .....	(289)
14.3.5	植物亚细胞结构提取的样品处理方法与应用实例 .....	(290)

# 第一章 色谱仪器

色谱法是根据“Chromatography”一词翻译而来的。这一术语是俄国化学家茨维特于1903年首创的。他在白垩柱上用石油醚为溶剂,将绿叶中的色素分成不同颜色的区带,故命名为“色谱法”。其后,Martin和Synge于1941年发表了液相分配色谱的论文,为液相色谱、气相色谱、纸色谱和薄层色谱的发展奠定了基础。我国自50年代后期起开展了这方面的研究工作。

色谱法是用来分离混合物中各种组分的方法。色谱系统包括固定相和流动相。当流动相流过加有样品的固定相时,由于各组分在两相之间的浓度比例不同,就会以不同速度移动而相互分离。固定相可以是固体,也可以是被固体或凝胶所支持的液体。固定相可以装入柱中,也可以展成薄层或涂成薄膜,称为色谱“床”。流动相可以是气体,也可以是液体,前者称为气相色谱,后者称为液相色谱。其实质是利用待测物质在两相中具有不同的分配系数,当两相作相对运动时,各组分在两相中进行多次分配,使分配系数只有微小差异的组分得到分离,将这种分离方法与检测器结合就是色谱法。

随着科学技术的发展,特别是计算机技术的突飞猛进,仪器的自动化程度、灵敏度、精密度、准确度都有了很大的提高,不仅使实验手段和工作效率提高到一个崭新的水平,而且极大地推进了生物大分子的分离、分析和结构的测定。

色谱法有许多类型,依据两相不同的状态可以分为吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、凝胶过滤色谱等。本章以固定相使用形式为依据,按液相色谱、离子色谱、气相色谱等分节介绍。

## § 1.1 高效液相色谱法

高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography,简称HPLC)又称高压(High Pressure)或高速(High Speed)液相色谱。经典液相色谱由于分辨率低、分析时间长、操作烦琐等,应用不广泛。由于高效且能承受高压的固定相(如高效离子交换树脂)的研制成功,紫外检测器等的出现,使经典液相色谱发展到70年代初期出现了高速液相色谱。由于采用高压泵,载液在色谱柱内的流速比经典液相色谱高得多,加之采用高分辨效率的固定相,高灵敏度的检测器,使得分析速度和分离效率大大提高,而且使用范围广,特别适合于生物大分子和强极性或不稳定化合物的分离分析。

### 1.1.1 色谱法基本原理

一切色谱的实质是利用物质在固定相和流动相之间有不同的分配系数。当两相作相

对运动时,待分离物质在两相中反复进行分配,使分配系数只有微小差别的组分得到有效的分离。

### 1. 色谱过程

假定样品中含有 A、B、C 三种组分,将样品以很小量加到充满固定相的色谱柱内。起初 A、B、C 三组分混合物滞留在色谱柱内的顶端,被认为是一个很窄的混合谱带,当流动相连续不断地注入柱中后,样品组分随流动相沿柱运动。与此同时,A、B、C 由逐渐分离到最终完全相互分离并流出柱末端,形成三个色谱带,如图 1.1.1 所示。

样品各组分在色谱柱内运动时有两个特点:一个是谱带得到分离,由于各组分的迁移速度不一样,产生差速迁移,实现了各谱带的分离;另一个是谱带有增宽效应,由于各组分分子要沿柱扩散分布,流出时间愈长,分子扩散愈显著,谱带增宽愈严重。这两个特点是极复杂的物

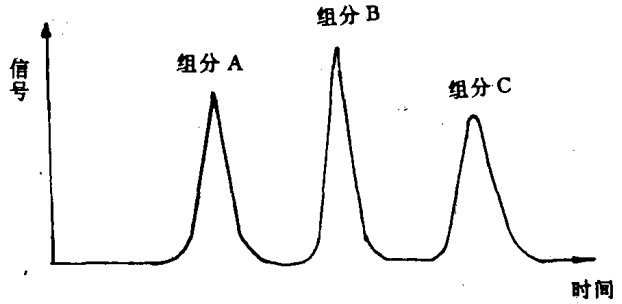


图 1.1.1 三个组分的色谱峰图

理化学过程,前者属热力学内容,后者为动力学因素所决定,两者同时存在,又相互制约和依存。

### 2. 色谱流出曲线及其宽度

样品组分经柱分离并于柱末端流入检测器,它们的浓度在记录器上作为分离时间的函数被记录下来,这样所得到的一条洗脱曲线叫色谱谱带或色谱峰。色谱峰的保留时间一般不随样品量变化,这是定性分析的依据。在一定条件下,色谱峰的峰高或峰面积是样品浓度的函数,这是定量分析的依据。

从色谱柱中流出的组分其质量分布即色谱峰形状近似为高斯分布(如图 1.1.2)。

$$P(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-x^2/2\sigma^2}$$

或

$$P(x) = P_0 e^{-x^2/2\sigma^2}$$

式中:  $P(x)$  表示  $X$  处的几率大小

$\delta$  表示高斯分布的均方根偏差(亦称标准偏差)

$P_0$  表示峰高

由以上公式可以看出,标准偏差  $\delta$  是测量区域宽度最严格的一个量。在实践中,还用色谱峰的半宽度( $W_{1/2}$ )和基线宽度( $W$ )来表示。标准偏差  $\delta$  是曲线拐点处的峰的半宽度,此处的峰宽是  $2\delta$ ,与此相应的峰高为  $0.607P_0$ 。 $W_{1/2}$  是色谱峰高一半处色谱峰的宽度。 $W$  为从谱带两边作切线延长到和基线相交所包含的谱带宽度。

$$W_{1/2} = \sqrt{8\ln 2}\sigma$$

$$W = 4\sigma$$

无论用哪种宽度来表示峰宽,越小表明谱带越窄,分离效果越好。

### 3. 塔板理论与柱的效能

#### (1) 塔板理论

塔板理论是色谱理论中一个重要的概念,亦称平衡理论。理论塔板学说是 Marin 和 Syngé 于 1941 年提出的。他们把分离柱比作蒸馏塔,蒸馏时,物质的气相与液相在每一理论塔板中达成平衡,在色谱法中,物质在固定相和流动相中分布达成平衡,每次平衡相当于一个理论塔板数。理论塔板数越多,分离越完全。所以一个柱的分离效率通常用理论塔板数  $n$  来表示, $n$  值按下式计算:

$$n = 16(\bar{V}/W)^2$$

在液相色谱法中,常用峰洗脱体积  $\bar{V}$  计算, $W$  则为用体积表示的峰宽。在气相色谱中常用保留时间  $t_R$  计算 [ $n=16(t_R/W)^2$ ],这时  $W$  也要用时间表示。因为半峰宽度 ( $W_{1/2}$ ) 容易测量准确,计算的  $n$  值也较准确,所以  $n$  值也可以用  $W_{1/2}$  来计算:

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

设柱的高度(或长度)为  $L$ ,则每一个理论塔板高度( $h$ )按下式计算:

$$h = \frac{L}{n}$$

#### (2) 分布常数和质量分布比

待分离物质之所以能够被分开是因为它们在两相中的溶解度不同,这是分配色谱中最关键的特性。通常用分配常数(Distribution Constant)  $K_D$  来表示,即平衡时固定相中与流动相中溶质浓度的比值:

$$K_D = \frac{X_s}{X_m}$$

式中  $X_s$  和  $X_m$  分别是组分在固定相和流动相中溶质的浓度,分配常数也叫分配系数。

如果不同浓度用物质的绝对量的比值,则称质量分配比( $D_m$ ),相当于气相色谱中的“容量因子”(Capacity Factor)。

$$D_m = \text{固定相中溶质量} / \text{流动相中溶质量} = \frac{\text{固定相中浓度} \times \text{固定相体积}}{\text{流动相中浓度} \times \text{流动相体积}}$$

$$D_m = K_D \cdot V_s / V_L$$

两相物质的分离取决于它们的  $D_m$  值的比率,称为“分离因子”,用  $\alpha$  表示:

$$\alpha = D_{m2} / D_{m1}$$

#### (3) 总保留体积与分布常数的系数

物质在流动相中才能随流动相一起移动,在固定相中则不能移动,所以留在固定相中的量越多,也就是  $K_D$  和  $V_s$  越大,总保留体积就越大,其关系式如下:

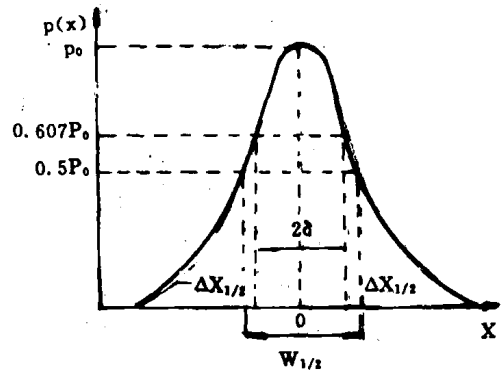


图 1.1.2 高斯分布曲线

$$V_R = V_L + K_D V_S$$

$V_R$  可作为物质定性的标准,这就要求在同一柱中,同样条件下进行试验,否则不好比较。在柱和条件有变动时,应该用  $K_D$  (分布常数) 作为标准。这是比较恒定的特性,由上式可以导出  $K_D$  的计算公式为:

$$K_D = (V_R - V_L) / V_S$$

#### 4. 速率理论与谱带增宽的来源

塔板理论在阐明色谱峰、保留值和效率方面有一定价值,但不能解释影响板高( $H$ )值的因素。1956年 Van Deemter 提出了速率理论,它吸收了塔板理论关于塔板高度的概念,把影响塔板高度的动力学因素等结合起来,较好地解释了色谱过程。

##### (1) 谱带增宽的来源及对板高( $H$ )的贡献

影响  $H$  值的因素主要来自三方面,涡流扩散、分子扩散和传质阻力。

涡流扩散( $H_E$ ):溶质在色谱柱内,由于填充的不均匀性,使溶质在流动相中形成类似涡流运动,造成了谱带的扩散,涡流扩散对理论塔板高度  $H$  的贡献为:

$$H_E = 2\lambda d_p$$

式中  $d_p$  为固定相颗粒直径, $\lambda$  为填充不规则因子。可知粒子越小,粒度越均一,装柱越均匀, $H_E$  值越小,柱效率即提高。

分子扩散( $H_L$ ):分子扩散就是物质分子由浓度高的区域向浓度低的区域运动,因而分子沿轴向扩散,引起区域扩张,分子扩散项对板高的贡献为:

$$H_L = 2\gamma D_f / u$$

式中  $u$  是流动相的线速度, $\gamma$  是弯曲因子, $D_f$  为溶质在流动相中的扩散系数,采用小而均匀的粒子装柱使  $\gamma$  值减小。如果流速太慢,待分离物质停留时间长,则扩散严重。由于溶质分子在溶剂中扩散系数仅相当于气体的  $10^{-5}$  倍, $D_m$  值较小,因而它对  $H$  值的贡献可忽略不计,所以液相色谱中的分子扩散影响远较气相色谱者小。

传质阻力:传质效应对板高的贡献有两项,即固定相传质和流动相传质。

固定相传质( $H_s$ )是指溶质分子由固定相界面扩散到液相内部,发生质量交换,又回到液液界面。由于传质速率的差异,溶质分子返回流动相的速度各不相同,造成了区域扩张,对  $H$  产生的贡献为:

$$H_s = q \frac{K'}{(1 + K')^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_s} \cdot u$$

式中  $d_f$  为固定相的液膜厚度, $D_s$  为溶质分子在液相里的扩散系数, $q$  为构型因子,当把液膜看成球面时, $q = 8/\pi^2$ ,如为平面时, $q = 2/3$ 。

流动相传质分为流动状态的流动传质  $H_D$  和静止状态的流动传质( $H_{SM}$ )。  $H_M$  是指处于同一流路中的分子,其流速各不相同,靠近固定相边壁的分子,移动速度比流路中央的分子慢,形成了流型扩张( $H_D$ ),其方程为:

$$H_D = \Omega \cdot d_p^2 \cdot u / D_f$$

但流动相传质与涡流扩散常会偶合在一起,二者的偶合对板高的贡献小于二项贡献之和。即:

$$H_M = \frac{1}{1/H_E + 1/H_D} = \frac{1}{1/2\lambda d_p + D_f/\Omega \cdot d_p^2 \cdot u}$$

$H_{SM}$ 是指多孔固定相的孔穴内充满了静态的流动相,分子必须穿过这段停滞的流动相才能扩散到固定相表面。由于扩散距离不同,溶质返回到流路中的速度不同,引起区域扩张。它对板高  $H$  的贡献为:

$$H_{SM} = \frac{(1 - \Phi + K')^2 \cdot d_p^2 \cdot u}{30(1 - \Phi)(1 - K')^2 \cdot \gamma \cdot D_f}$$

式中:  $\Phi$  为微孔内空间的流动相分数

$\gamma$  为弯曲因子

(2) 速率理论方程

塔板高度等于各项对板高贡献之和。即  $H = H_L + H_S + H_{SM} + H_M$

将上述各式代入得

$$H = \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{2}{3} \cdot \frac{K'}{(1 + K')^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_s} + \frac{(1 - \Phi + K')^2 \cdot d_p^2 \cdot u}{30(1 - \Phi)(1 - K')^2 \cdot \gamma \cdot D_m} + \frac{1}{1/2\lambda d_p + D_m/\Omega d_p^2 \cdot u}$$

化简可得

$$H = B/u + C_S u + C_{SM} u + (1/A + 1/C_M \cdot u)^{-1}$$

由于涡流扩散的贡献远小于流动相传质,涡流扩散又可忽略,因此可进一步化简为

$$H = A + C_S u + C_{SM} \cdot u = A + C \cdot u$$

式中

$$C = C_S + C_{SM}$$

5. 分离度 ( $R_S$ )

分离度又称分辨率,是表示谱带之间所能分离的尺度(图 1.1.3)。 $R_S$  等于两峰中心之间的距离除以峰的平均宽度 ( $\frac{1}{2}W$ )。

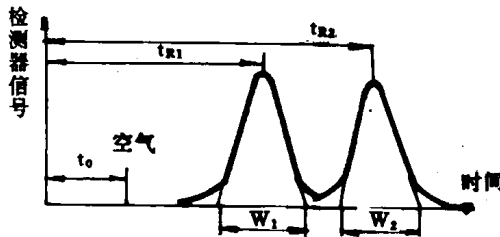


图 1.1.3 两个组分的色谱峰图

$$R_S = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

如两峰的半宽度相等且峰形对称,则有:

$$R_S = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{W} = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{4\sigma}$$

把分离度与色谱的基本参数联系起来,则有:

$$R_S = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{D_{m2}}{1 + D_{m1}} \right) \sqrt{n_2}$$

式中  $\alpha$  称分离因子,  $\alpha = \frac{D_{m2}}{D_{m1}}$

分离度方程还可改写为

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \sqrt{n_{\text{有效}}}$$

由方程可以看出,分离度是选择性、柱效和柱容量的函数。

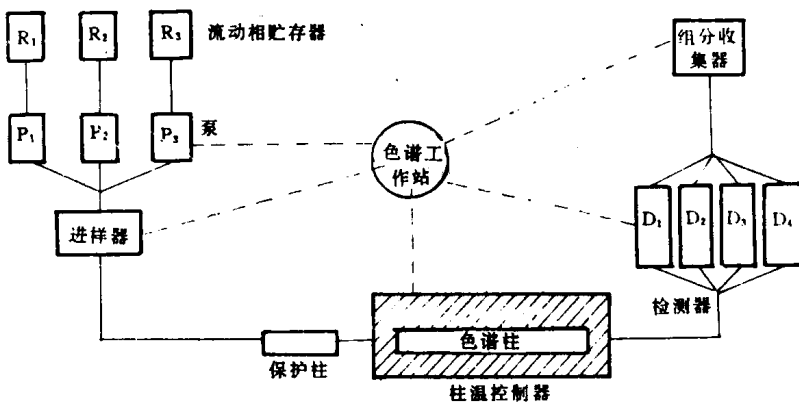
### 6. 谱带变形和柱外增宽

事实上,色谱带并不是典型的对称图形,而是发生了伸舌或拖尾现象,其原因是由于吸附等温线的非线性、柱内壁效应、化学拖尾和溶剂拖尾所致。

色谱峰不仅在柱内发生增宽,而且在进样系统、连接管和检测器内也会发生增宽,称柱外增宽。

## 1.1.2 高效液相色谱仪

高效液相色谱仪(HPLC)是近代机械、光学和电子学等技术进步的结晶,特别是70年代中期以后,微处理机的应用,大大提高了仪器的自动化水平和分析精度。进入80年代,计算机技术的突飞猛进,使高效液相色谱仪实现了智能化,特别是近年问世的色谱管理系统集数据采集、数据处理、系统控制和分析结果与图谱后加工融于一体,给色谱界带来了一种全新的观念和探索。图1.1.4是一台HPLC仪的方框图。输液泵将流动相贮存器中的液体泵入色谱系统,样品从进样器导入,经保护柱进入色谱柱分离后流经检测器,检测信号经放大转换后,以图谱的形式显示在色谱工作站荧屏上,同时,根据色谱法的定性定量原理计算并打印出分析结果。另外,当需分离组分时,可将从检测器流出的液体接入级分收集器,分部收集各组分。下面简要介绍一下HPLC仪的各部件。



$P_{1-3}$ : 泵;  $D_{1-4}$ : 检测器(紫外/可见、荧光、示差折光、电化学检测器)

图 1.1.4 高效液相色谱仪方框图

### 1. 流动相贮存器

流动相贮存器是用于盛流动相的,多用 1L 的棕色玻璃瓶。配好的流动相必须经超滤后方可倒入,且用前还需脱气。一方面因为流动相中溶解的气体会影响流动相的流速和



检测器的稳定性,另一方面其中的氧分子还可能与样品组分或固定相发生反应。流动相脱气的方法分超声波法、真空法和通氮气法。对于高灵敏度或低紫外检测的分析,除流动相用前脱气外,还需在线通氮气脱气。

## 2. 输液泵

输液泵是 HPLC 仪的“心脏”,用于泵激流动相。其性能的好坏直接影响整套仪器分析结果的准确性和重复性。对输液泵的一般要求是耐高压(300~600kg/cm<sup>2</sup>)、流速稳定、流量范围宽(0.1~9.9ml/min)、耐腐蚀、泵室容量小、重复性高,并能长时间连续运转。目前,商品化的 HPLC 仪普遍采用泵体积小、方便多用途的往复泵和隔膜泵。以往复泵为例,又有单、双和三泵头结构之分。显然,在单泵头的情况下,如果没有补偿机构,脉动较大,若改为双泵头或三泵头,交替动作的柱塞分别以 180°和 120°的相位差排液和吸液,则输出液流的脉动大为改善。对于分子极性或分子量范围宽的复杂混合物的分离,为了能在短时间内实现各组分的最佳分离,常常需要采用梯度洗脱方式,这时就需要使用两台或三台泵(分别称之为二元和三元梯度洗脱)或一个可用色谱工作站控制的多点阀分别实现泵后高压和泵前低压混合达到按设定的程序逐步(线性或非线性)地改变混合流动相的组成,以提高色谱图中单位时间内的峰容量。

## 3. 进样器

进样器是将样品导入色谱柱的装置,据其工作原理可分为注射、停流、阀门和自动进样四种方式,其中阀进样最为常用。图 1.1.5 是六通阀的工作原理图。载样时,样品暂滞留在一个外接环管,然后只要将阀柄按顺时针方向旋转 60°,外接环管中的样品即便导入色谱系统。采用自动进样器,可以避免手动注射进样时产生的误差,从而增加重复性和减少操作时间,而且最重要的优点是进样量可以变化和实现计算机控制。特别适用于色谱条件的优化工作。

## 4. 保护柱

保护柱是加在进样器与色谱柱之间一段长为 5~30mm、内装与色谱柱相同或相似的填料的短柱,用来捕获样品中强保留或不可逆吸附的组分,使色谱柱不被污染,达到延长色谱柱寿命的目的。一般情况下,保护柱均是用易于干填和价廉的薄壳型填料装填。

## 5. 色谱柱

一般认为色谱柱是色谱仪的“大脑”,一台仪器“灵”与“不灵”主要取决于它,因为它是色谱核心问题——分离所发生的场所。在色谱发展史上,色谱柱填料与柱技术的发展一直是色谱工作者共同关心的问题。事实上,HPLC 每一重大发展几乎都与色谱柱技术的不断

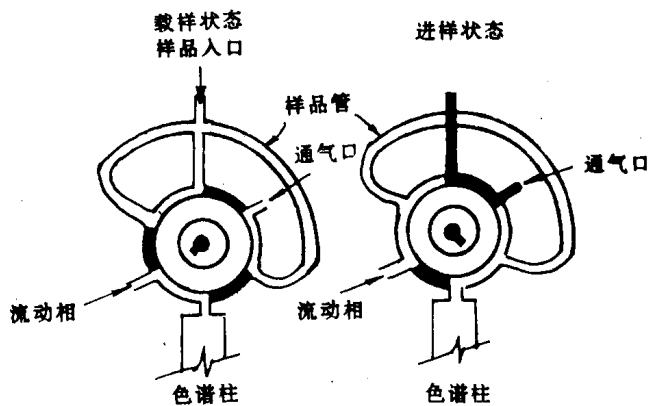


图 1.1.5 六通微量高压进样阀