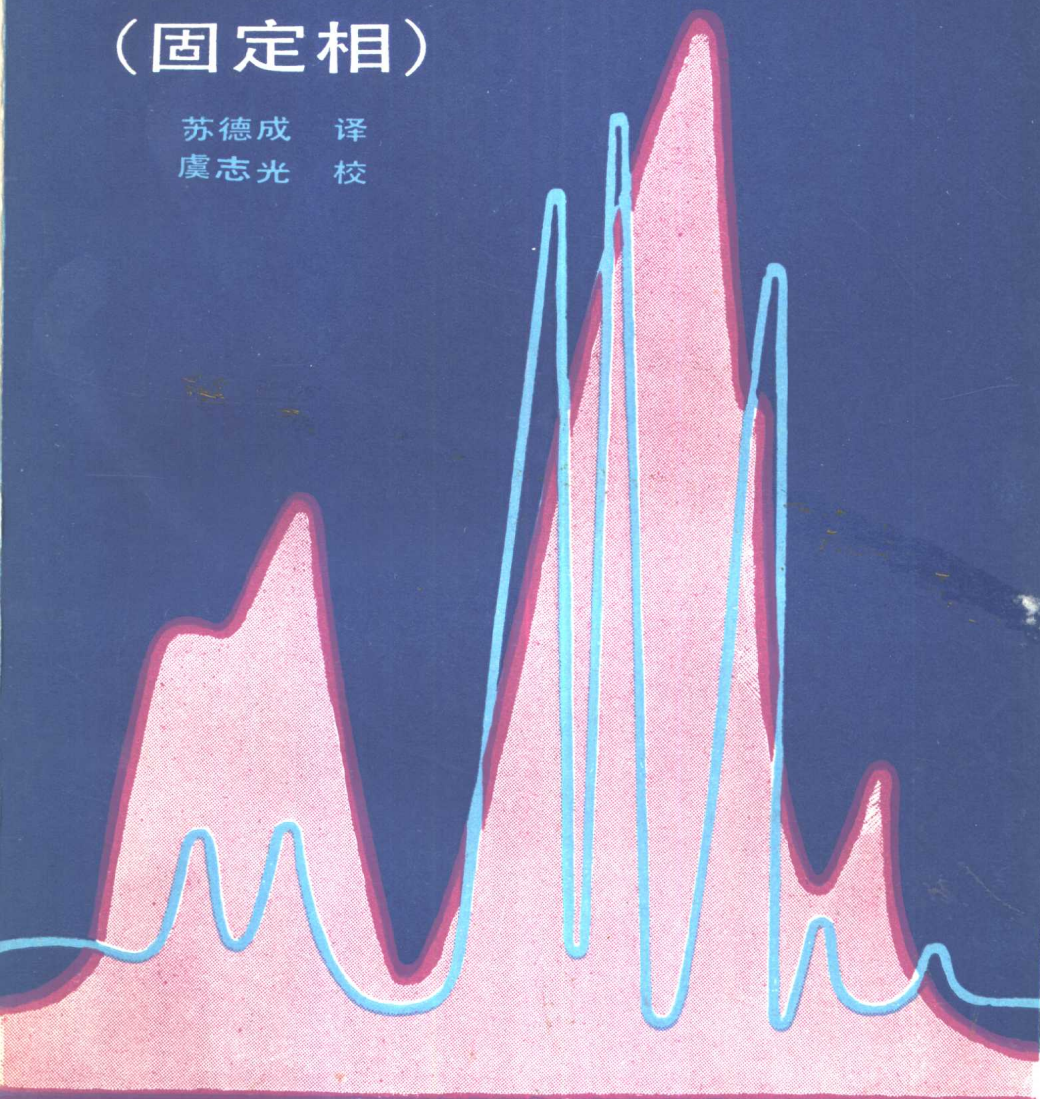


高速液体色谱填充剂

(固定相)

苏德成 译
虞志光 校



上海科学技术文献出版社

高速液体色谱填充剂 (固定相)

苏德成 译 虞志光 校

上海科学技术文献出版社

充てん剤(固定相)
最新高速液体クロマトグラフィー《ライブラリ-3》

桥本勉 编著

发行所 武藏野书房 昭和 53 年 2 月 15 日第一刷发行

高速液体色谱填充剂
(固定相)

苏德成译 虞志光校

*

上海科学技术文献出版社出版
(上海市武康路 2 号)

新华书店上海发行所发行
上海商务印刷厂印刷

*

开本 850×1168 1/32 印张 6.5 字数 174,000

1986 年 11 月第 1 版 1986 年 11 月第 1 次印刷

印数: 1—2,300

书号: 15192·465 定价: 1.60 元

《科技新书目》125—175

前 言

液体色谱分离法历经数十年的发展，形成现代的高速液体色谱技术。高效填充剂则是高速液体色谱的核心。

近年来，高效填充剂在国内外的的发展极其迅速，各类产品繁多。日本桥本勉等编写的“填充剂(固定相)”一书系统地介绍了液体色谱中高效填充剂。

该书不仅介绍了高效填充剂的牌号和性能，而且还就各类填充剂的分离机理进行了论述，尤其是在应用方面列举了不少实例，于是具有较广泛的实用性。

本书翻译过程中曾得到蒋晓声和李毅弘两位先生的仔细审阅，谨此致谢。

限于水平，书中错误之处望读者批评指正。

译 者

目 录

第一章 填充剂的结构和分离功能	1
1.1 前言	1
1.2 高速化的理论基础	2
1.3 填充剂的结构	13
第二章 分离柱和填充方法	21
2.1 色谱管	22
2.2 填充方法	25
第三章 凝胶渗透色谱	32
3.1 概论	32
3.2 填充剂	34
3.3 应用	60
第四章 吸附色谱	69
4.1 吸附色谱填充剂	70
4.2 应用	81
第五章 分配色谱	97
5.1 前言	97
5.2 液-液色谱填充剂	100
5.3 液-液色谱填充剂的种类和性质	103
第六章 离子交换色谱	163
6.1 前言	163
6.2 高速液体色谱用的离子交换体的性质	164
6.3 高速液体色谱离子交换体的种类	168
6.4 应用	182
第七章 其他液体色谱	195
7.1 络合物液体色谱	195
7.2 配位体交换色谱(LE_xC).....	198

第一章 填充剂的结构和分离功能

1.1 前 言

液体色谱(LC)系指固定相和液态流动相处于恒定状态时,利用物质对两相相互作用的不同所形成的移动速度的差别,以达到分离目的的方法。这里的固定相通常保持着球形载体粒子,并以填充在色谱管中的状态,起着分离的机能。把保持有固定相的载体叫作填充剂,而把填充有填充剂的色谱管叫作分离柱。

液体色谱按固定相的种类,可分为液-固色谱和液-液色谱。另外,按照溶质和固定相的相互作用机理,可分为分配色谱(LLC)、吸附色谱(LSC)、离子交换色谱(IEC)及凝胶色谱(GC)等。有机溶剂体系的凝胶色谱,一般叫作凝胶渗透色谱(GPC)。

表 1.1 液体色谱的分离方法和分离参数^[1]

分 离 方 法	分 离 参 数	适 用 范 围
吸附色谱	吸附能	异构体的分离按官能团进行分离
分配色谱	溶解度	范围广
凝胶色谱	溶质分子的大小	高分子, 齐聚物
离子交换色谱	离子亲和力	氨基酸, 生化成分, 金属离子
亲和色谱	生化特异性(酶)	生物物质 ^[4] (基质, 抗生素, 激素)
配位交换色谱	络合物生成能量	氨基酸 ^[1] , 介电子化合物, 几何异构体 ^[2]
离子对色谱	离子对的溶解性	亲水胺 ^[1] , 四环素 ^[3]
离子排除色谱	DONNAN 膜平衡	脱盐, 溶解度不同的物质 ^[4]
盐析色谱	离子的溶剂化作用	蛋白质 ^[1,2] , 非电解质

表 1.1 综合了目前液体色谱所采用的各种分离方法及其各自的分离参数。LSC、LLC、IE_xC 及 GPC 四种是被广泛采用而具有代表性的分离方法。本书主要叙述有关这四种分离方法中的填充剂。

首先,把影响分离能力的因素分为分离柱因素和装置因素。其次,再把分离柱因素分为流体力学的峰扩展因素与溶质、固定相及流动相三者之间的相互作用因素来进行研究。此时,峰扩展因子决定于填充剂的形状、粒径及其分布以及填充状态等物理性质,而相互作用因素主要决定于填充剂的化学性质。

1.2 高速化的理论基础

1.2.1 影响分离能力的因素

一般,对 LC 来说,保留体积(V_R)、固定相体积(V_S)及流动相体积(V_M)三者之间的关系,可用式(1.1)表示:

$$V_R = V_M + K V_S \quad (1.1)$$

这里, K 叫作分配系数,表示在流动相和固定相中的溶质浓度的比值。对 GPC 来说,在填充分离柱中,粒子间的空隙体积(V_o)和 V_M 大致相等。溶质分配于固定相和流动相之间的数量比叫作容量因素(k'),用式(1.2)定义:

$$k' = K \frac{V_S}{V_M} = \frac{\text{固定相中的溶质数量}}{\text{流动相中的溶质数量}} \quad (1.2)$$

由式(1.1)和(1.2)得式(1.3):

$$V_R = V_M (1 + k') \quad (1.3)$$

如以 L 表示分离柱的长度, v 表示流动相的线速度 (cm/s), 则分离柱内流动相的流出时间(t_0)可用下式表示:

$$t_0 = \frac{L}{v} \quad (1.4)$$

而对应于 V_R 的保留时间(t_R)则可用下式表示:

$$t_R = \frac{L}{v} (1 + k') \quad (1.5)$$

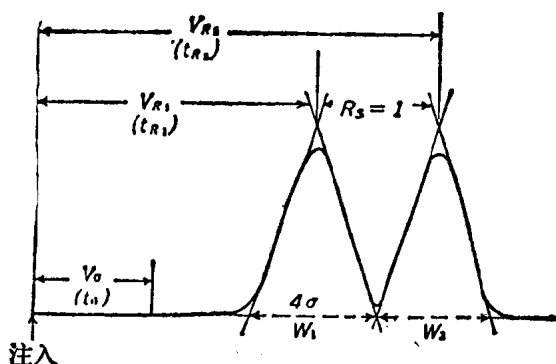


图 1.1 保留体积(保留时间)和峰的分离

图 1.1 表示色谱中各种符号之间的关系。

另一方面,两个峰的分离程度可用式(1.6)表示:

$$R_s = \frac{V_{R2} - V_{R1}}{(W_1/2) + (W_2/2)} = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{(W_1 + W_2)} \quad (1.6)$$

这里, R_s 叫作分离度, 它作为分离能力的参数而被经常采用。 W_1 和 W_2 分别表示峰在基线上的宽度。各个峰的形状在近似于高斯曲线的场合, 如果标准偏差为 σ , 由于 $W = 4\sigma$, 则分离度 R_s 就可用式(1.7)表示:

$$R_s = \frac{(V_{R2} - V_{R1})}{4\sigma} \quad (1.7)$$

当 $R_s = 1$ 时, 就叫作 4σ 的分离度, 峰实际上可被完全分离开来。

另外, 作为表示峰扩展的参数, 根据蒸馏理论塔板数的塔板理论, 理论塔板数 (N) 可定义为:

$$N = 16 \left(\frac{V_R}{W} \right)^2 = \left(\frac{V_R}{\sigma} \right)^2 \quad (1.8)$$

式(1.7)中, 如 $W_1 = W_2$, 代入式(1.2)和(1.8)中, 则得式(1.9)和(1.10):

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) N^{1/2} \quad (1.9)$$

$$\alpha = \frac{V_{R2} - V_M}{V_{R1} - V_M} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (1.10)$$

式(1.10)中, α 表示两个溶质的分配系数之比, 叫作选择系数或相对保留值, 系表示对分离柱溶质的选择性能的参数。由式(1.9)可知, 为增大分离能力, 可采用增大 α 、增大 k' 及增大 N 等三种方法。另外, 在考察填充分离柱的分离能力时, 按照由固定相, 溶质及流动相的相互作用因素 k' 和 N 所表示的峰扩展, 能够分别考察各种影响因素。

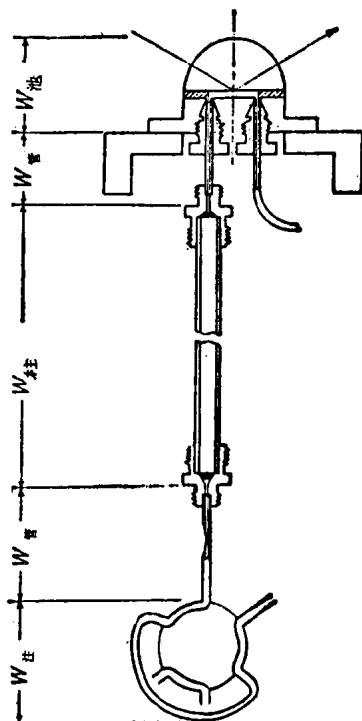


图 1.2 由装置部分引起的峰扩展因素^[1]

1.2.2 高速化的条件

为了以高速度进行 LC 的分离,在不降低分离能力下可增大流动相的线速度,或考虑采用高分离能力的短分离柱的方法。上述两种方法均涉及峰扩展,也即理论塔板数下降,本节以下所讨论内容,几乎都是基于共同的要素。

对峰扩展有关的因素可分为由分离柱内的扩散所形成的因素和由装置内部所形成的因素两种。如图 1.2 所示,装置内部中的扩散,系由试样注入部分($W_{\text{注}}$)、连接管道部分($W_{\text{管}}$)及检测器池部分($W_{\text{池}}$)等所组成。如分离柱内部的扩展为 $W_{\text{柱}}$,则峰的总扩展可用式(1.11)表示:

$$W^2_{\text{总}} = W^2_{\text{柱}} + W^2_{\text{注}} + W^2_{\text{管}} + W^2_{\text{池}} \quad (1.11)$$

液体色谱的高速化和高分离能力,即使在线速度大时,也可通过峰扩展的极度减小而达到。

a. 装置因素

图 1.3 表示苯按阴离子聚合而得的单分散聚苯乙烯(分子量为 20,000),由装置而形成的峰扩展对流速的依赖关系^[1]。试样的注入量为 50 微升,装置的总死体积为 85 微升,连接管道的内径为 0.6 毫米,池体积为 2 微升,试样浓度要外推到零。通常,高速液体色谱的流速为 1 毫升/分,由装置形成的扩展为总死体积的 2~3 倍。另外,扩展对流速的依赖性也很大,表现出要比填充直径为 20 微米粒子的分离柱($\phi 3/8$ 英寸 $\times$ 2 英尺)还要大的流速依赖性。因此,可考察有关 $W_{\text{注}}$ 、 $W_{\text{管}}$ 及 $W_{\text{池}}$ 的流速依赖性与分子量依赖性之间的关系。

b. 分离柱因素

通常,用每一块理论塔板的塔板高度 H ($H = L/N$) 表示分离柱效率的参数,这叫作理论塔板高度。Giddings 和 Mallik^[2] 从动力学的速度理论出发,推导出有关经过填充的分离柱体系的峰扩展式(1.12)。

$$H = \frac{4}{3} \cdot \frac{D_m}{R_v} + \frac{R(1-R) d_p^2}{20 D_m} \cdot v$$

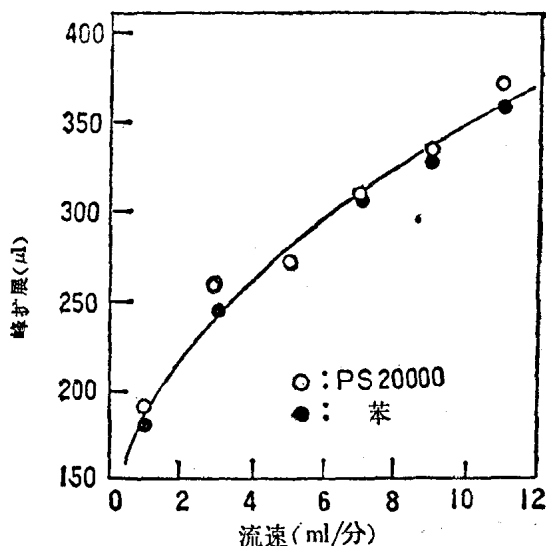


图 1.3 由装置引起的峰扩展对流速的依赖关系^[1]

$$+ \sum_i \frac{1}{\left(\frac{1}{2\lambda_i d_p} \right) + \left(\frac{D_m}{w_i d_p^2 v} \right)} \quad (1.12)$$

式中, D_m : 流动相中溶质的扩展系数;

v : 流动相的线速度;

R : 溶质和流动相的移动速度比 (t_0/t_R);

d_p : 第 2 项表示固定相的厚度, 第 3 项表示填充剂的直径;

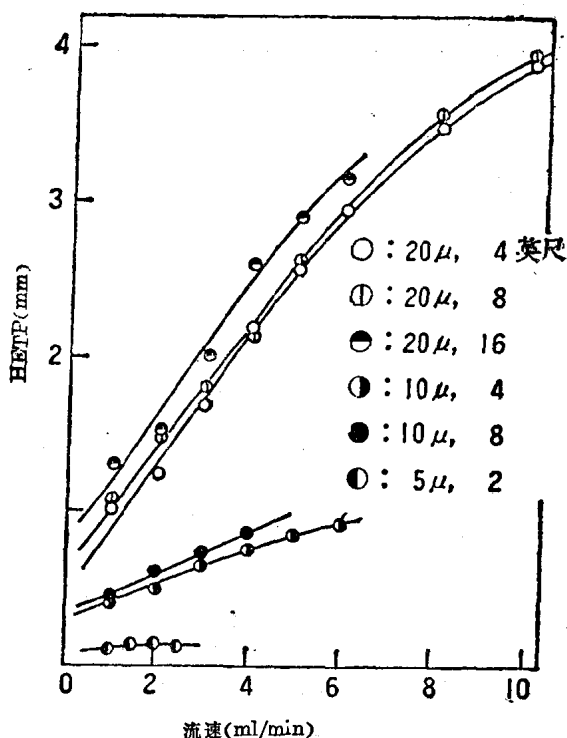
λ_i, W_i : 按分离柱的内径、填充剂粒子的直径和形状以及填充状态等所获得的几何学的参数。

第 1 项表示分离柱纵轴方向上的分子扩散, 对流动相来说, 与 v (0.03~10 厘米/秒) 相比, 由于 D_m (10^{-5} ~ 10^{-7} 厘米²/秒) 非常小, 通常即使略去也没有关系。

第 2 项表示固定相中非平衡物质移动的效果。为尽量减小由于第 2 项所引起的峰扩展, 必须缩短固定相中达到扩散平衡所需要的时间。减少固定相的厚度或减少填充剂的粒径, 可以作为缩短

上述时间的两种手段。最早的高速液体色谱,所用的填充剂由于固定相薄,因而缩短了达到扩散平衡所需要的时间。采用这个方法,由于粒径大,压力降(P 与 d_p^2 大约成正比)小,因此在难以获得高压泵的初始阶段,可以说是一个有效的方法。然而,存在着由第3项所引起的峰扩展效果大和固定相的试样负荷量小,而必须增大检测器灵敏度等的缺点。

图 1.4 表示有关 GPC 固定相中峰扩展对粒径的依赖关系^[1]。试样系分子量为 20 万的单分散聚乙烯,流动相为四氢呋喃。



试样: 单分散聚乙烯(分子量 20 万)
分离柱: TSK-GEL G4000H8(内径 7.6mm,
长度 60cm 8000TF/F)

图 1.4 固定相中理论塔板高度对流速的依赖关系

第3项表示由填充剂粒子间流动相中的非平衡物质的移动效果和涡流扩散所引起的峰扩展。涡流扩散因素($2\lambda_1 d_p$)依赖于填充剂的形状,粒径及填充的状态。对经过充分均匀填充的分离柱,在 $v \rightarrow 0$ 时,逐渐趋向 $H = 2d_p$ ^[1]。达到了最高理论塔板数为 $L/H = L/2d$,这意味着它是受填充剂粒径的支配的。非平衡物质移动效果按粒径的2次方成比例地增大。为减小由第3项所引起的峰扩展,要求采用球形的,粒径小的填充剂。另外,分离柱的填充状态也必须尽量接近于最紧密的填充状态。特别是GPC,正如LLC那样通过调节 k' ,不能大幅度地增大分离能力,因此必须尽可能地减小峰的扩展。

图1.5表示分离柱中固定相和流动相的峰扩展因素。

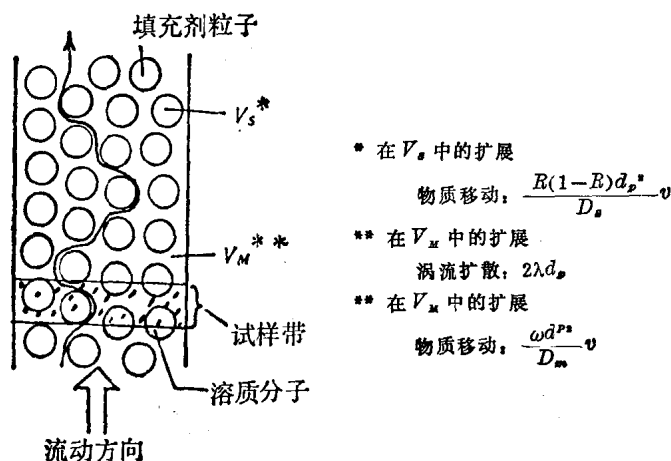


图1.5 填充分离柱和峰的扩展因素

从上述动力学速度理论公式中推导出的高速LC用填充剂的物理结构所要求的基本特性,有下列几项:

(1) 减小固定相的厚度。

与此项有相应关系的条件是要求减少试样的负荷数量和提高检测器的灵敏度。

(2) 减小粒径。

与此项有相应关系的条件是要求增大 P , 提高泵的压力以及需要均匀地进行填充的技术。

(3) 增大填充剂的细孔(内部空洞)。

在理论上虽没有定量, 但一般当细孔变小时溶质的物质移动速度变慢。

当增大细孔时, 扩散速度变快。另一方面, 减小了分离的有效表面积或空洞率。

1.2.3 容量因素

容量因素 k' 系指溶质分子在固定相中的数量与在流动相中的数量之比。在控制某个特定溶质的 k' 时, 可通过改变流动相和固定相的组成或性质来达到。在增大 k' 时, 必须选择对溶质具有溶解能力小的流动相组成, 或者选择对溶质易进行分配及易吸附 (K 值大) 的固定相。如果想使 k' 值变小, 则需采取与上述相反的一些措施。

k' 与 R_s 的关系可由式 (1.9) 中的第 2 项得到。也即, R_s 与 $k'/(1+k')$ 成比例关系。正如图 1.6 所示, k' 在 0.5~2 范围中, 在 k' 增加时, $k'/(1+k')$ 快速增加, 当其他条件一定时, R_s 显著增大。当 k' 大于 5 时, R_s 的增加比例减小, 当在 10 以上时, 流出时间 t_R 过大, 峰出现扩展, 于是检测就变得困难了。总之, 可根据 R_s 、 t_R 及峰检测的灵敏程度等三个条件来决定 k' 的最佳数值。一般, k' 的最佳的数值范围是 $1 \leq k' \leq 10$ 。

其次, 是考察在单位时间内使 R_s 变成最大的条件。作为分离柱分离能力的参数可引入有效理论塔板数 N_{eff} 的概念。

$$N_{eff} = \left(\frac{k'}{1+k'} \right)^2 N = 16 \left(\frac{t_R - t_0}{W} \right)^2 \quad (1.14)$$

N_{eff} 系包含有 k' 和 N 的两种分离能力因素的分离参数。当把 N_{eff} 代入分离度式 (1.9) 时, 则成式 (1.15);

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (N_{eff})^{1/2} \quad (1.15)$$

由保留时间的定义得式 (1.16);

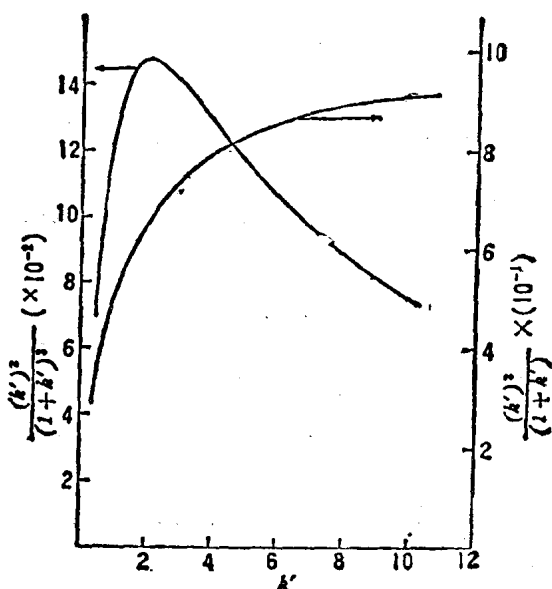


图 1.6 对 R_s 有作用的 k' 函数

$$t_R = N(1+k')H/v \quad (1.16)$$

由式(1.14)和式(1.16)可推导出式(1.17):

$$\frac{N_{eff}}{t} = \frac{v}{H} \cdot \left\{ \frac{k'^2}{(1+k')^3} \right\} \quad (1.17)$$

式(1.17)表示单位时间的有效理论塔板数和 k' 之间的关系。由此可推测出进行分离所必要的时间。图 1.6 是由 k' 对 $k'^2/(1+k')^3$ 作图而成。由图可知,在时间 t , 线速度 v 及理论塔板高度 H 保持一定的条件下,当 k' 为 2 时, N_{eff} 为最大。也即,如调节分离柱的长度使分离时间和流动相的线速度保持一定,当 k' 为 2 时,分离能力变成最大。另一方面,如使分离柱的长度一定,而改变 v 和 k' ,则 k' 的最佳数值大约等于 5。因此, k' 的最适宜值都接近于 1.5~4,但在实际应用时,由于正确地控制 k' 是有困难的,一般都选择 $1 \leq k' \leq 10$ 的范围。

1.2.4 选择系数的作用

选择系数又叫相对保留值或分离系数。正如式(1.10)所定义那样, α 系指两个溶质成分 k' 的比值。由式(1.15)可知, 当 α 增大时, R_s 与 $(\alpha-1)/\alpha$ 成比例地增大。 α 增大时, 由于 t_R 不增大, 但 R_s 会增大, 因此可以说这是提高分离能力的最有效的手段。支配这个 α 的主要因素虽有固定相与流动相的组成, 以及测定温度等, 但至今还没有发现预测 α 变化的一般法则。目前, k' 的最适当的范围是 $1 \leq k' \leq 10$, 因此常常采用反复改变各个溶质成分相互之间的 k' 的错误实验方法。

为了在尽可能短的时间内分离出多成分的混合物, 在色谱上使用使峰流出的间隔大体相同的方法, 是一个有效的方法。为此, 如果能够调节到使相邻峰的 α 值大体相同就行了。 α 值大能够非常迅速地得到分离, 在处理多数试样的程序分析中, 其目标是改善重要的测定条件。

1.2.5 分离柱的压力降和透过性

流动相的线速度 v , 按照 Darcy 法则, 可用式(1.18)表示:

$$v = \frac{K'P}{L} \quad (1.18)$$

这里, P 表示分离柱两端之间的压力降, L 表示分离柱的长度。 K' 表示分离柱的透过率。 K' 在均匀而紧密的填充柱中, 可用式(1.19)表示:

$$K' = \frac{d_p^2}{1000\eta f} \quad (1.19)$$

这里, η 为流动相的粘度(厘泊), f 为分离柱的总多孔度, 其值的范围从 0.4 (表面多孔性填充剂) 至 0.8 (完全多孔性填充剂)。

分离柱的比透过率 K^0 可用式(1.20)表示:

$$K^0 = \frac{v\eta Lf}{P} \quad (1.20)$$

液体的粘度由于约大于气体的粘度 100 倍, 当 K^0 , L 及 f 一定时, LC 的压力降大约为 GC 的 100 倍。另外, 按照 Kozeny—

Carman 式, K^0 可用式(1.21)表示:

$$K^0 = \left(\frac{d_p^2}{180} \right) \left[\frac{f_0^3}{(1-f_0)^2} \right] \quad (1.21)$$

这里, f_0 为粒子间的空隙率, 通常的填充分离柱大约为 0.4. f 和 f_0 的关系在用无细孔的玻璃填充分离柱的情况下 $f_0 = f$, 对全多孔性的填充剂来说, $f_0 \cong \frac{1}{2}f$

因此, 通常的填充柱, 式(1.21)可用下式近似地表示:

$$K^0 = \frac{d_p^2}{1000} \quad (1.22)$$

由式(1.15)、式(1.18)及式(1.19)可得式(1.23):

$$t_R = \frac{1000\eta f L^2 (1+k')}{P d_p^2} \quad (1.23)$$

由式(1.23)可知, 当填充剂的种类、 L 及 k' 一定时, 缩短分析时间的手段有: 尽管减小流动相的粘度; 增大粒径以及减小粒子间空隙率的方法。然而, 当增大粒径时, 由于分离能力降低, 因此有必要紧密地装填粒径小的填充剂。为此, 必然需要高压。最近的高速液体色谱采用具有最大输出为 340~400 公斤/厘米² 的泵, 而常规的泵的测定压力为 100 公斤/厘米² 左右。

对全多孔性的填充剂来说, f 为 0.8, 在通常测定中所用的单位 (t_R : 秒, η : 厘泊, L : 厘米, P : 磅/英寸² 及 d_p : 微米), 则式(1.23)可变为式(1.24):

$$t_R = \frac{1.2 \times 10^4 L^2 \eta (1+k')}{P d_p^2} \quad (1.24)$$

由式(1.4)可得式(1.25):

$$t_0 = \frac{1.2 \times 10^4 L^2 \eta}{P d_p^2} \quad (1.25)$$

采用式(1.25), 如 P 和 η 一定时, 若以 L 对 t_0 作图, 可用各种 d_p 值检验分离柱的透过性, 或以分离时间作为目标进行选择, 和以选择初始条件 (L 或 d_p 等) 作为指标而起作用。