

9713776



中华人民共和国国家标准

GB/T 16631—1996

柱液相色谱分析法通则

General rules for analytical methods
of liquid column chromatography



C9713776

1996-12-02 发布

1997-05-01 实施

国家技术监督局 发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
柱液相色谱分析法通则
GB/T 16631—1996

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

电 话:68522112

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
版权专有 不得翻印

*

开本 880×1230 1/16 印张 2 字数 51千字
1997年6月第一版 1997年6月第一次印刷
印数 1—800

*

书号: 155066·1-13814 定价 14.00 元

*

标 目 312—052

前 言

本标准是参考日本 JIS K0124—1983《高效液相色谱分析通则》以及有关国内、国外资料按 GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草与表述规则 第1部分：标准编写的基本规定》制定的。

日本 JIS K0124—1983 仅仅适用于高效液相色谱法，内容简单。本标准适用于柱液相色谱法（包括高效柱液相色谱法），并且增加了章、条及其相关的内容。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F、附录 G、附录 H、附录 J、附录 K、附录 L、附录 M、附录 N、附录 P 都是提示的附录。

本标准由中华人民共和国化学工业部提出。

本标准由化学工业部标准化研究所归口。

本标准起草单位：化学工业部标准化研究所、天津大学。

本标准主要起草人：蔡建安、赵秋雯。

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 引用标准	1
3 方法概要	1
4 仪器	1
5 流动相	3
6 柱填充剂	6
7 试验前的准备工作	9
8 操作	10
9 色谱柱的评价	10
10 色谱图的整理	11
11 定性分析	11
12 定量分析	11
13 分子量的测定	11
附录 A(提示的附录) 用于液相色谱法中溶剂的性质	13
附录 B(提示的附录) 二元溶剂体系的组成与其强度的关系	15
附录 C(提示的附录) 溶剂的选择性三角坐标	16
附录 D(提示的附录) 离子交换色谱法中常用的缓冲剂	17
附录 E(提示的附录) 柱填充剂	18
附录 F(提示的附录) 化学键合相柱填充剂	19
附录 G(提示的附录) 环境要求	21
附录 H(提示的附录) 安全要求	21
附录 J(提示的附录) 典型标准色谱图的操作参数	21
附录 K(提示的附录) 鉴定分离组分的仪器和化学方法	22
附录 L(提示的附录) 定量分析方法的计算公式	22
附录 M(提示的附录) 使用普适校准进行分子量测定的 $M-H$ 常数	23
附录 N(提示的附录) 典型的体积排除色谱法色谱图	24
附录 P(提示的附录) 平均分子量的计算示例	25

中华人民共和国国家标准

柱液相色谱分析法通则

GB/T 16631—1996

General rules for analytical methods
of liquid column chromatography

1 范围

本标准规定了柱液相色谱(简称液相色谱,下同)分析法通则,适用于采用液相色谱分析法对无机、有机化合物的定性、定量分析,以及对高分子化合物的分子量的测定的一般要求。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方面应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 9008—88 液相色谱法术语 柱液相色谱法和平面色谱法

3 方法概要

液相色谱分析法是在柱管内进行组分分离的液相色谱法。液体或固体试样用液态流体(溶剂或溶液)作为流动相使其通过色谱柱,由于试样在固定相和流动相中分配系数和其他作用力的差异、或流体力学体积的不同而被分离成各个组分,流动相中的各个组分通过特性检测器测量以及信号的记录,根据各组分的保留值、峰高、峰面积等进行定性、定量分析和分子量的测定。

4 仪器

液相色谱仪一般由分离、检测、记录等部件组成。如图 1 中所示。

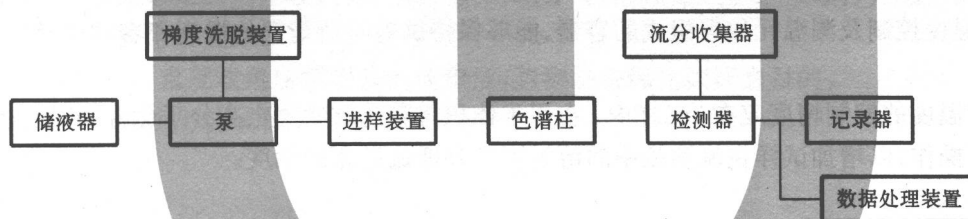


图 1 液相色谱仪示意图

4.1 分离部分

4.1.1 储液器

存储流动相的容器。有的包括加热器、搅拌器、真空口和通惰性气体的入口。容器中已经纯化的流动相,经烧结过滤头(5 μm),由泵输送到色谱柱。储液器的材质不应该被流动相侵蚀和污染。一般应该用玻璃,不锈钢或氟塑料等材质组成。

4.1.2 泵

输送流动相的部件。可以得到所需的压力并能调节及提供稳定的、精确的流量(一般是 0.1~9.9

mL/min)。使用于高效液相色谱的泵,可提供 0~35 MPa 的压力。泵有往复泵、注射泵、气动泵、蠕动泵等。泵体接触流动相的部分不应该被侵蚀和污染以及容易进行流动相的更换。

4.1.3 梯度洗脱装置

供给二元或多元混合溶剂可按需要并连续改变组分配比的部件。梯度洗脱装置有两类。

4.1.3.1 低压系统

流动相在常压下混合或流动相经电磁阀按比例进入泵,然后将其输入色谱柱系统。该装置所用的泵应该是内体积小,使流动相在泵内的混合影响减至最小。如往复泵。

4.1.3.2 高压系统

一般将两种流动相分别用泵增压,然后注入混合器中,再输入色谱柱系统。该装置所用的混合器的体积要尽量小,使在开始进行混合和在柱的入口处出现梯度之间只需要很短的时间。混合器应该易于清洗。

4.1.4 进样装置

能将试样注入色谱柱的部件。目前使用的有三种方法。

4.1.4.1 注射器

该法利用微量注射器(或一般注射器)将其针头穿过注射口处的隔膜直接把试样注入色谱柱。隔膜材料不仅能经受高压,还应对溶剂有良好的稳定性,一般应该使用氟橡胶垫片。当压力大于 10 MPa 时,应使用停流进样技术。

4.1.4.2 进样阀

该法利用六通阀和试样环管与色谱系统相连接,用微量注射器将试样注入并部分或完全充满环管,通过阀切换使流动相把环管中的试样携带入色谱柱。六通阀必须能耐高压。环管一般用不锈钢制成,其体积可从几个微升到几个毫升。对于使用小体积环管时,在阀的出口和色谱柱之间不能有明显的死体积。

当更换试样时,应该清洗六通阀,以免前后不同试样的干扰。

4.1.4.3 自动进样器

利用机械臂由微处理机控制,能将多个试样准确地、重现性地自动注入色谱系统,可以改变试样的处理、进样、分析等条件,进行连续自动分析,也能紧急插入分析。

4.1.5 柱箱

由加热、温度控制及测温元件等组成的容器。能够保持试验时所需要的温度和容纳试验所需用的色谱柱。

一般柱箱温度的控制精度应在 1% 之内。在用于体积排除色谱法测定高分子化合物时,有时需要在较高的温度下操作,以增加试样在流动相中的溶解度及降低流动相的粘度。

4.1.6 柱管

一般用不锈钢、玻璃或其他合成材料等材质制成。必须能承受试验时的操作压力,不与流动相起化学作用,柱管洁净,内壁光滑,耐腐蚀。

玻璃材质制成的柱管通常不能在高于 7 MPa 时使用。

目前一般用内径 4~8 mm、长 5~30 cm 或内径 1~2 mm、长 10~25 cm 的柱管。柱管的尺寸应与柱填充剂的颗粒度相匹配。

4.2 检测部分

4.2.1 检测器

检测器有时放置在能保持温度或高于柱箱温度的容器中。

目前使用的液相色谱检测器有两类。

总体性能检测器。如示差折光率检测器、(激光)光散射检测器、电导率检测器等。

溶质性能检测器。如紫外—可见光检测器、荧光检测器、红外光度计检测器等。

紫外—可见光检测器和示差折光率检测器是在液相色谱法中常用的二种检测器。

4.2.1.1 紫外—可见光检测器对温度和流速的变化相对地不敏感,对紫外—可见光有吸收的试样都能检测,其检测灵敏度由试样在该检测波长下的吸收系数决定,但在检测器波长范围内无吸收的试样则不能检测。

选用的流动相必须在检测器所用的波长处无吸收或低吸收,梯度洗脱时,若有微小的吸收,则必须进行背景扣除。用作流动相的溶剂,注意其紫外截止波长。

4.2.1.2 示差折光率检测器对任何组分的折光率和流动相的折光率有差别时都可以使用。检测器对温度的变化和流量的波动较敏感。

流动相组成的改变其折光率亦随之发生变化,因此,示差折光率检测器不能用于梯度洗脱。

4.2.1.3 二极管阵列检测器。这是采用光电二极管阵列作为检测元件的紫外—可见光检测器,可以多通道并列检测,或全光谱检测。

这种检测器主要特点:

——扫描速度快。可以在不停流的条件下获得洗脱组分的全光谱图,提供光谱资料;

——利用比较光谱法,判别色谱峰的纯度及分离状况。在色谱峰的前、后沿和峰高处各取一点,比较这三个位置的光谱图,若三个光谱图完全相互匹配时,说明是纯峰,若不完全匹配,说明峰中有杂质;

——能绘制三维色谱图。由于扫描速度快,约 10 ms 可以将 190~600 nm 整个光谱范围扫完,通过三维色谱图能观察到试样中所有组分对波长的响应值,又由于每个组分都有全波段的光谱吸收图,因此,可利用色谱保留值规律及光谱特征吸收曲线提高判别洗脱组分的性质的能力。

4.2.1.4 (激光)光散射检测器是测量分子溶液的散射光强度,一般测定高分子物质的分子量。

4.2.1.5 荧光检测器能测量某些组分在紫外光激发下所发射出的荧光,是一种很灵敏和选择性好的检测器。

4.2.1.6 电化学检测器可以在柱流出液中测量许多浓度很低的具有氧化或还原性、电导性以及一些离子型的组分,是一种有选择性和灵敏性的检测器。

4.2.2 流分收集器

用于收集流出液的装置。有手控和自动两种。

手控的流分收集器是根据需要分别收集保留值不同的组分于专用的管内。

自动的流分收集器是在确定收集保留值不同的组分,按照预定程序连续地打开或关闭相应的阀门,使流出液自动流向固定的管内。

多次进样时,可以重复收集所需组分的流出液,达到制备纯化试样的目的。

收集流出液一般使用玻璃材质的容器。

4.3 记录部分

4.3.1 记录器

能够在条状图纸上用记录笔记录色谱图,显示各组分的色谱峰。

4.3.2 数据处理装置

积分仪:按时间累积检测系统所产生的电信号,自动测定峰高及峰面积的数字积分器和打印机。

微处理机:通过微处理机与色谱仪的接口,将色谱信号及控制色谱仪各部分信号输送到微处理机。微处理机可以按指令控制一台或多台色谱仪,并处理各种色谱信号,进行计算及控制外部事件。

5 流动相

在液相色谱中由于流动相分子参与试样分子及固定相分子之间的作用,因此,在液相色谱法中流动相的选择是重要的分离因素。

液相色谱法中使用的流动相一般应该满足下列要求:

——与试样、固定相不发生反应;

- 不使试样改变性质、而又能溶解试样；
- 具有合适的溶剂强度；
- 溶剂沸点应该高于分离温度 20~50℃，粘度在分离温度下不超过 0.5 cP；
- 必须与检测器匹配；
- 用作流动相的溶剂(二种或二种以上)要互相溶解；
- 安全，低毒。

5.1 溶剂

在选择流动相时，必须考虑溶剂的各种性质。液相色谱法中用作流动相的溶剂的性质，见附录 A(提示的附录)。

5.2 分离度与 k' 值的关系

液相色谱法中相邻色谱峰的分离状况，可用分离度来表征。分离度可用公式(1)表示：

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{n} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \dots\dots\dots (1)$$

上式表明分离度受 n (理论板数)、 α (分离因子)及 k' (容量因子)三个独立的因素的影响(对分析一般希望 $R=1$ 。 $R=1$ ，两色谱峰之间有 2% 的重叠， $R=1.5$ ，两色谱峰达到基线分离)。

柱效率愈高，分离愈好，因此，高效填充剂及有效的柱填充方法是取得高效色谱柱的关键。

从上面等式中，在 n 与 α 相同的条件下， $R \propto \frac{k'}{1+k'}$ ， k' 在 1~5 之间对 R 值影响最大，一般在液相色谱中控制在 1~10 之间(对分离及分析时间都比较合适)，通过调节溶剂的配比，即调节溶剂强度，使组分在此范围内进行洗脱。若在此范围内仍有某些组分不能分离，可以保持此合适溶剂强度的情况下，改变流动相性质，达到改变 α 的目的(α 与试样分子、流动相分子之间相互作用力有关)。

5.3 溶剂强度与极性的表示

5.3.1 溶剂强度参数 ϵ^0 。用硅胶，氧化铝柱填充剂测得。溶剂极性用溶剂强度参数 ϵ^0 表示， ϵ^0 值的大小表示该溶剂洗脱能力的大小，对于试样所有组分来说，增加 ϵ^0 值意味着溶剂强度的增加和 k' 值的减少。

在液固色谱法中，一般都采用二元溶剂混合物作为流动相，一个溶剂为惰性溶剂，另一个为极性稍强的溶剂，但混合后溶剂强度不呈线性变化。

二元溶剂体系的组成与其强度的关系，见附录 B(提示的附录)。

5.3.2 溶解度参数 δ 。由沸点计算得到。是溶剂极性较好的表示方法，溶剂相对极性的量度。非极性溶剂的 δ 值小，极性溶剂的 δ 值大，溶剂的分子与试样分子之间有相互作用力，即色散作用力 δ_d ，偶极作用力 δ_o ，接受氢质子的能力 δ_a ，氢质子给予能力 δ_b ，一般由 δ 值来控制溶剂强度，当 k' 值调节到合适范围($1 \leq k' \leq 10$)之后，根据试样的性质，可以用选择 δ 值相近，但 δ_d 、 δ_o 、 δ_a 、 δ_b 值不同的另一种溶剂来改变选择性。

5.3.3 溶剂极性参数 P' 。是在溶解度基础上提出的，因此，在液-液色谱法中 P' 值可以提供一个具有一定精度的溶剂强度的量度。根据分子间的作用力用 X_d (质子给予体)， X_a (质子接受体)， X_n (偶极矩)来代表溶剂的不同的作用力，并且将常用的溶剂按照选择性分成八个组，见附录 C(提示的附录 图 1)，同一组内的溶剂具有相似的选择性，这样，当需要改变选择性时，在同一组内只需选择具有代表性的溶剂即可。正相和反相色谱法中，利用溶剂的选择性三角坐标，见附录 C(提示的附录 图 2)，可以大大地简化正相和反相色谱法中溶剂的选择。当他们仍不能满足选择性要求时，可以考虑使用其他组的溶剂，或者更精细地调节选择性时，可以采用三元溶剂体系，一般可以用基础溶剂浓度调节溶剂强度，用另外二种溶剂浓度比来调节选择性。

5.4 正相和反相色谱法中用流动相

正相色谱法中，柱填充剂一般都具有极性(如硅胶、腈基、二醇基等化学键合相)。通常应采用非极性溶剂、烃类溶剂(如正己烷、正庚烷、异辛烷等)作为基础溶剂，加入适当比例极性较强的溶剂组成混合溶剂作为流动相。

溶剂强度可以通过改变混合溶剂中极性溶剂的比例来调整。当增大溶剂 P' 值时,溶剂强度增加,试样的 k' 值减少。如 k' 值超过 10 以后,组分仍达不到所需的分离度时,可以保持溶剂强度,用选择性三角坐标中提供的不同性质的溶剂来改善色谱峰重叠组分的分离度。

反相色谱法中,柱填充剂一般都是非极性的(如键合辛基、十八烷基化学键合相)。通常应采用极性较强的水作为基础溶剂,加入适当比例与之混合的极性较弱的溶剂(如甲醇)组成混合溶剂作为流动相。

溶剂强度一般通过改变加入水中溶剂的比例来调整,以达到组分的分离。当溶剂 P' 值增加时,溶剂强度会降低,试样的 k' 值增大。若个别组分达不到所需的分离度时,则可以根据分子间不同作用力性质的溶剂来改善,如用乙腈或四氢呋喃取代甲醇或加入到原来甲醇/水的溶剂体系中以改善分离。三元的水溶性流动相能对某些分离提供极好的选择性。

5.5 离子交换色谱法中用流动相

在离子交换色谱法中,流动相常用含盐的水溶液加入适当的改性剂(如甲醇、乙腈),用缓冲溶液保持所需要的 pH 值。

溶剂强度和选择性由以下几种变量决定:缓冲离子和盐的类型和浓度;与水互溶的有机溶剂的类型和浓度;流动相的 pH 值。

流动相的离子强度影响组分的保留值,当离子强度增加,溶剂强度亦随之增加,因为流动相中离子的增加导致流动相离子对试样离子在离子交换位的竞争交换作用增大,致使试样离子加速洗脱。同时,流动相离子的类型对溶剂强度有关,在阴离子交换中,具有相同浓度而不同的流动相阴离子,流动相溶剂强度一般按以下顺序改变:

柠檬酸根 > 硫酸根 > 草酸根 > 甲酸根 > 乙酸根

在阳离子交换中,流动相离子类型的变化也影响溶剂强度,但差别很小,主要是各种阳离子的大小和电荷变化较小,但有时阳离子类型的变化,可能改变选择性。

在离子交换色谱法中,pH 值的变化对试样离子的离子化及柱填充剂的离子化程度都有影响,因此,控制 pH 值的变化能改变流动相的溶剂强度,也能改变选择性。

离子交换色谱法中常用的缓冲剂,见附录 D(提示的附录)。

5.6 离子对色谱法中用流动相

离子对色谱法中可用正相或反相离子对色谱分离系统,一般反相分离系统的使用更为广泛。

反相分离系统用辛基、十八烷基化学键合相时,可采用甲醇/水或乙腈/水的混合溶剂作为流动相,在适当的缓冲溶液中加入与试样分子形成非离子型的离子对。

组分的分离随流动相的 pH 值、缓冲溶液的盐离子浓度、离子对试剂烷基链的长短、溶剂的种类以及温度等因素的变化而改变。

当改变一给定二元组分混合溶剂的相对浓度时,选择性的改变通常是很小的,一般通过改变溶剂来改变选择性,而改变流动相的 pH 值是改善分离选择性的一个很有效的方法。

正相分离系统中,丁醇或戊醇与二氯乙烷、三氯甲烷和(或)正己烷的混合溶剂是通常使用的流动相。

一般通过改变流动相的组成来改变分离选择性。

磷酸四丁基氯化铵和磷酸四丁基溴化铵(用于酸性化合物)以及戊烷磺酸和庚烷磺酸(用于碱性化合物)是常用的离子对试剂。

5.7 离子色谱法中用流动相

5.7.1 抑制型

一般选择用作流动相的洗脱剂应该是离子型水溶液,能从色谱柱上置换阴、阳离子,并在抑制柱上发生交换反应,使洗脱离子变成低电导率物质(如水、碳酸等)后再进入电导检测系统,从而解决了洗脱剂本身具有很高检测信号,即背景电导的干涉。

阴离子分离时,常用碱性洗脱剂,如氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠、四硼酸钠等。碳酸氢钠和碳酸钠的

二元混合缓冲溶液是最通用的洗脱剂。

其他洗脱剂还有 3-对羟基丙氨酸、甘氨酸、硅酸盐、对氰酚等。

阳离子分离时,最基本的是酸性洗脱剂,如盐酸、硝酸等以及盐酸和间苯二胺或硝酸和硝酸锌二元混合溶液洗脱剂。

5.7.2 非抑制型

一般选择用作流动相的洗脱剂除和柱填充剂有足够的亲和力、并能将试样的阴、阳离子一一洗脱外,应该是本身背景电导率较低的物质。不用抑制柱,洗脱剂通过色谱柱后直接进入电导检测系统。

阴离子分离时,苯甲酸盐和邻苯二甲酸盐的缓冲溶液($\text{pH}=4\sim7$)是最常用的洗脱剂。

柠檬酸盐是一种具较强洗脱能力的洗脱剂,阴离子的洗脱顺序和邻苯二甲酸盐相同。

氢氧化钾和酚盐的混合碱性洗脱剂对弱酸阴离子能够得到有效的分离。

对于多价阴离子,如磷酸等,可用葡萄糖酸盐加入四硼酸钠和 H_3BO_3 的较强缓冲能力的洗脱剂洗脱。

阳离子分离时,一般采用硝酸、盐酸等洗脱剂以及乙二胺硝酸盐洗脱剂。

用具有选择性络合能力的洗脱液可以成功地分离很多阳离子,如乙二胺阳离子加酒石酸根或 α -羟基异丁酸根组成的洗脱剂都具有很好的分离效能。

在离子色谱法中,常常是通过改变流动相来改变选择性,选择适当的洗脱剂是改善分离的有效方法。其次,洗脱剂的离子强度和 pH 值也是选择性和分离的有效因素。

5.8 体积排除色谱法中用流动相

体积排除色谱法与其他液相色谱法不同,不采用改变流动相的方法来改善分离度。流动相的选择主要考虑其溶解试样的能力与柱填充剂的匹配以及在分离时的温度下是否具有低粘度,因为高粘度的流动相将限制扩散作用,降低分离度。

流动相必须与检测器匹配外,也必须考虑流动相与柱填充剂的匹配,用强极性溶剂丙酮,乙醇,二甲基亚砷和水作流动相时,通常不能用于聚苯乙烯柱填充剂。在使用软质凝胶时,必须在流动相中加入盐类以保持离子强度,防止离子型试样通过色谱柱时导致凝胶收缩及色谱柱的渗透性降低。而使用硬质凝胶(如硅胶)时,含水的流动相中的 pH 值必须保持在 $2\sim8.5$ 之间,防止柱填充剂降解。

5.9 梯度洗脱

在分离 k' 值范围较宽的复杂的混合组分采用梯度洗脱技术,对流动相的要求应该是溶剂强度随时间而呈一定规律的变化,使得到的色谱图上的各个组分的谱带都有良好的分离。梯度洗脱可以改善分离,缩短组分洗脱的时间以及提高低含量组分检测的灵敏度。

5.10 溶剂的纯化

用作流动相的溶剂在使用之前,应该除去液体中的固体杂质,必要时,还应该纯化,纯化时通常使用硅胶、氧化铝、有时亦使用蒸馏。最好使用专门用于高效液相色谱的纯溶剂。

一般采用加热回流、超声波振荡、通入氮或氦气或真空方法脱气,除去溶解在流动相中的空气、避免在分离过程中在泵、色谱柱、检测器里形成气泡,消除流动相中存在的痕量氧气对试样、流动相、柱填充剂的氧化降解作用。

6 柱填充剂

高效色谱柱是现代液相色谱系统的核心,他能提供分离的组分生最小的谱带加宽。因此,良好的柱填充剂必须是能填充均匀,固定相传质阻力很小的物质。

一般使用的柱填充剂应该是:

- 固定相与流动相必须是互不相溶的;
- 具有高比表面积粒状物质或一定孔径的多孔物质;
- 具有良好的机械性能。

6.1 液-固色谱法中柱填充剂

一般采用具有较大比表面积($50\sim 100\text{ m}^2/\text{g}$)的吸附剂,通常是硅胶、氧化铝等。有多孔型柱填充剂和薄壳型柱填充剂,前者有球形和无定型二种形状。

目前大多数液-固色谱法中使用的是 $5\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 范围的多孔型球形硅胶柱填充剂。

对酸敏感或者能起催化反应的试样,可以考虑使用氧化铝。

吸附剂表面上吸附的水分子,在吸附分离性能中具有重要作用,而吸附剂水含量的控制通常是依靠改变流动相中的水含量来实现,一般用等水溶剂作流动相。使用等水溶剂有以下益处:

- 每次分离时,组分的保留值变化不大;
- 在某些情况下可获得较高的柱效率和减少谱带的拖尾;
- 部分补偿不同批号同类吸附剂之间的差别;
- 在分离过程中,可减弱吸附剂对试样的不必要的催化反应。

其次,流动相中加入改性剂也能改善分离性能。

液-固色谱和液-液色谱法中用柱填充剂和载体,见附录 E(提示的附录 表 E1)。

6.2 液-液色谱法中柱填充剂

一般是在惰性载体上均匀地涂渍一层固定液或者是在玻璃珠实心核的表面沉积一层多孔活性涂层(一般用硅胶,也可有氧化铝),形成表面多孔层颗粒,(多孔层厚度一般为 $1\sim 3\text{ }\mu\text{m}$)在此表面多孔层上再涂渍一层固定液的薄壳型柱填充剂。

由于机械涂渍的固定液容易流失,因此,目前在液-液色谱法中多数都使用化学键合相填充剂。

6.2.1 化学键合相柱填充剂

化学键合相填充剂是为了克服机械涂渍固定液在液-液色谱法中的不足而发展起来的,由于固定液是经化学键合到载体上的,在使用过程中不易洗脱或者流失,所以,色谱柱性能相当稳定。

化学键合相填充剂一般是在硅胶表面上的硅醇基团与各种有机化合物或有机硅化合物反应,键合上各种特定的基团而成的。这些特定基团,除烷基外,还有芳香基、腈基、硝基、烷基胺、二醇基等,形成具有不同极性的化学键合相填充剂。

化学键合相填充剂有三种形式:

Si-O-R(硅酸酯)该填充剂容易水解,热稳定性差,目前已较少使用。若使用硅酸酯填充剂时,只能用不含水和醇的流动相。

Si-C 和 Si-N 该填充剂的水解和热稳定性比硅酸酯填充剂性能好。但是,在填充剂表面常会留下一些无用的残基,影响组分的保留特性或使色谱峰拖尾。当使用水溶液作流动相时,必须将 pH 值限制在 $4\sim 8$ 的范围之内。

Si-O-Si-R(硅氧烷)该填充剂是通过硅醇基与单、二或三氯硅烷、二甲基、氨基、硅氧基或烷氧基硅烷反应而制得的单分子层的键合相填充剂。

这种填充剂在 $2\sim 8.5$ 的 pH 值范围内水解稳定性是很好的,热稳定性也好,是目前质量最好、应用最广泛的化学键合相填充剂。

如果键合的基团部分(R)含有官能团,如辛基、十八烷基等,得到的就是非极性化学键合相。若含有官能团,如磺酸基、氨基、羟基等,得到的就是极性化学键合相。

化学键合相填充剂比机械涂渍固定液的固定相有很多优越之处:

- 不需使用预饱和柱;
- 由于固定液永久性地键合在载体上,所以,在洗脱过程中,固定液不易洗脱或流失,流出液不受固定液污染,增加色谱柱的稳定性和寿命;
- 具有很高的柱效率和在高压下有很好的机械性能;
- 能够采用各种程序控制技术,包括梯度洗脱;
- 由于可以键合到载体上的官能团的种类很多,因而,正相和反相色谱的分离都可以用最简单的

直接的方式完成。

液相色谱法中使用的化学键合相柱填充剂,见附录 F(提示的附录)。

6.3 离子交换色谱法中柱填充剂

离子交换色谱法中使用的柱填充剂应该是:

- 离子交换物质应该是不溶解的;
- 具有化学稳定性;
- 有一定的离子交换容量;
- 在一定压力下,离子交换填充剂结构应该是稳定的,理想的应该是均匀的球状颗粒。

一般使用的离子交换柱填充剂是用聚苯乙烯和二乙烯基苯共聚物基体,被离子型官能团所取代的产物的聚合多孔型填充剂。

最常用的是具磺酸基($-\text{SO}_3\text{H}$)的阳离子的和具三烷基铵($-\text{NR}_3$)⁺的阴离子的普通的树脂型离子交换剂。

薄壳型填充剂用玻璃微球或表面多孔微粒(薄壳硅胶)作基体,再涂渍一层聚合的有机离子交换剂。

化学键合相柱填充剂是以硅胶为基体,然后在上面键合上一层聚合物,除聚苯乙烯外,还可用其他聚合物(如硅酮、氟碳聚合物),再可引入离子交换基团。

由于硅胶基体在 pH 值超过 8.5 时开始溶解,所以他们在强碱条件下不能应用。

其次,也可以多孔型或薄壳型硅胶上涂渍液体离子交换剂。

离子交换剂中由于不同的官能团而表现出不同的特性。因而,在选择离子交换剂时,不同的聚合相和不同的取代基的离子交换剂(强、弱离子交换剂)可以使组分的分离顺序或分离选择性产生差异。对于两性化合物(如氨基酸、蛋白质等),在一定的 pH 值下,可以用阳或阴离子交换剂分离。

离子交换剂中离子交换容量很重要,组分的相对保留值和试样的负载量随离子交换容量的增加而增大。

离子交换色谱法中用柱填充剂,见附录 E(提示的附录 表 E2)。

6.4 离子对色谱法中柱填充剂

离子对色谱法中大多采用微粒的(5~10 μm)多孔型柱填充剂。

反相分离系统中,目前通常使用非极性化学键合相柱填充剂。

正相分离系统中,一般使用多孔型硅胶作载体,以机械吸收并加有反离子的缓冲水溶液作固定液。但是必须防止反离子从固定相中流失以及水相必须有充分的缓冲作用。

6.5 离子色谱法中柱填充剂

离子色谱法中,一般用多孔型和薄壳型柱填充剂。

抑制型。色谱柱常用离子交换容量低、而有很高分离效能的薄壳型离子交换剂。抑制柱填充离子交换容量高的中、高交联度的强酸型阳离子或强碱型阴离子交换剂,但是,填充抑制柱在抑制柱容量耗一半时,往往会产生基线变差的现象,因此,在使用一定次数后必须再生。纤维抑制柱是通过离子交换纤维膜来进行抑制反应,但仍受洗脱剂强度和性质的限制,也不能用于梯度洗脱。新型的平板微膜抑制柱是同时具有填充抑制柱的离子交换容量高和纤维抑制柱的能自动连续再生及保持动态平衡的优点,适用于梯度洗脱。

非抑制型。色谱柱一般采用离子交换容量低的多孔型离子交换剂。

6.6 体积排除色谱法中柱填充剂

体积排除色谱法中使用的柱填充剂按照化学类型分为三类:软质、半硬质和硬质凝胶。

软质凝胶。适合于用水溶液作为流动相,这种技术称凝胶过滤色谱法。由于色谱柱渗透性小,只能在低流速下使用,其次承受压力也很小,因而也不能在高压下使用。一般分离水溶性的小分子量的物质。

半硬质凝胶。适合于用有机溶剂作为流动相,这种技术称凝胶渗透色谱法。由于色谱柱渗透性良好并具有较强的强度,所以,可在较高的压力下提高流速时使用。一般孔径范围能适用于从小分子量到分

子量超过 10^6 的大分子的分离。

硬质凝胶。可用水溶液或有机溶剂作为流动相。由于色谱柱渗透性很高,强度好,可以在较高压力下的高流速时使用。一般孔径范围适用于分子量从 $10^4 \sim 10^6$ 的大分子的分离。

在体积排除色谱法中,由于柱填充剂的孔径的大小决定了试样分子量分离的范围,因此,在选择柱填充剂时,理想的柱填充剂在分子量对保留值的校准曲线图上,试样分子大小的保留值应该是在排除极限和渗透极限之间的线性渗透性范围之内。

体积排除色谱法中用柱填充剂,见附录 E(提示的附录 表 3)。

7 试验前的准备工作

7.1 仪器

液相色谱仪安放的地点应该符合环境要求,见附录 G(提示的附录),与色谱柱及流路的连接应该严密,在试验设定的压力(高压或低压)条件下,不能漏液,流速稳定。

仪器的灵敏度、基线漂移应该满足试验的要求。

7.2 色谱柱的填充方法

填充色谱柱的最佳步骤主要取决于所用的柱填充剂的性质和颗粒大小(粒径)。填充良好的色谱柱应该没有漕沟、裂痕和颗粒粒径分级的、均匀的填充床。

柱填充剂要尽可能的紧密,但不能使颗粒破裂。

7.2.1 干法填充

干法填充的方法与气相色谱法填充色谱柱基本相同。适用于粒径 $>20\ \mu\text{m}$ 的柱填充剂的填装。一般将柱管的一端用金属网,多孔烧结片,多孔滤网堵住,在振动柱管或减压情况下装入柱填充剂,待填充均匀、紧密以后,再将柱管的另一端堵住。

7.2.2 匀浆填充

使用的柱填充剂会在溶剂中溶胀或颗粒直径小于 $20\ \mu\text{m}$ 时,一般采用匀浆填充。

一般选择适当的溶剂,将柱填充剂颗粒分散在该溶剂中,制成匀浆悬浮体,在加压下填入柱管内。

对于大于 $10\ \mu\text{m}$ 颗粒粒径的柱填充剂,因沉降速度比较快,最好选择与颗粒密度近似相等的溶剂配制悬浮体,这种方法称等密度匀浆填充。

在填充之前,柱填充剂应始终保持悬浮状态,不聚集结块,不沉降分级。

在溶液中会溶胀的柱填充剂,在填充之前,必须预先在填充时用的溶剂中溶胀。

溶剂不应与柱填充剂作用,填装完毕后,溶剂应容易除去。

7.3 色谱柱的保养

为使色谱柱保持柱效能,延长寿命,必须注意以下事项:

- 色谱柱应该避免震动、机械撞击和过高的温度,以防填充床产生裂纹;
- 一般情况下,应该避免反冲,以防填充床的移动;
- 色谱柱若长期存放,应该用适当的溶剂充满,并将两端封住,以防填充床干裂;
- 使用时,不超过规定的压力、pH 值和溶剂的限制。
- 在进样器和色谱柱之间连接一根保护柱,不使其有害物质污染色谱柱。

7.4 流量的测量

在液相色谱法中,为准确测定保留值和色谱峰的大小,保持流量稳定及精确测量流量是非常重要的。尤其在体积排除色谱法中,流量的变化会给分子量测定带来较大的误差。

由于色谱柱部分堵塞,流动相粘度的变化和温度改变等因素都会使流量发生变化。

最常用测量流量的方法是容量法。这种方法是在规定的时间内收集流动相体积。

在体积排除色谱法中,常用一个虹吸计数器自动测量流量。他是使流动相流到一个具有一定体积的虹吸管里,当虹吸管排空时就会启动一个光电开关并在记录的色谱图上打上一个记号。根据已知虹吸管

的体积和依据讯号之间的距离而推算出时间后就能测量出流量。

这类流量的测量误差在1%左右。

此外,也可用重量法测量,即在已知的时间内将流动相收集后,称量。虽然此种方法测量流量最准确,但不能提供一个连续流量记录。一般只在校正泵的流量时使用。

7.5 试样的准备

根据有关采样标准规定的条件进行采样。

试样必须是代表总体特性量值的少量物质。

接触有毒和危险性试样时,应该符合安全要求,见附录H(提示的附录)。

试样的特殊保存和试验前需作特殊处理时,应该作必要的说明。

液体试样选用容量合适的注射器、环管或自动进样器导入试样。

固体试样通常溶解在适当的溶剂中,再按液体试样的进样方法导入试样。

导入试样的量应在检测器响应值的线性范围之内。

7.6 衍生化

在紫外—可见光区没有吸收或不能激发荧光的组分,可以用衍生化试剂在柱前或柱后进行衍生化反应,使之生成具有紫外生色基团或荧光基团的衍生物,可以改善色谱分离,提高组分的检测响应。

柱前衍生化用手工或离线方式较易进行,组分衍生化以后,再进入色谱分离系统。

因此,任何溶剂或混合溶剂均可使用,对反应进行的方式没有限制,反应速率不受时间的影响,选择合适的试剂以及萃取方法可以消除许多干扰,过量的试剂和溶剂容易除去。不足之处是可能发生的副反应,使色谱图复杂化。

柱后衍生化是在线进行,色谱柱的流出物直接进行衍生化反应并与一台适当的检测器相连。

因此,对流动相的选择严格,一般使用水溶性或与水混合的溶剂,同时必须考虑衍生化试剂,反应产物的溶解度以及他们与流动相可能发生的副反应,衍生化试剂对检测器不能有响应,并且,衍生化反应必须在较短的时间内完成,一般是在加热保温的情况下进行。

7.7 试验的准备

根据试验的要求,一般应选定下列参数:

——色谱柱的材质、内径(mm)、长度(cm);

——柱填充剂名称及其粒径(μm)或孔径或表面积;

——采用等度洗脱时,流动相名称及其组成、流速(mL/min);采用梯度洗脱时,流动相的名称、初始组成、组成变化率、最终组成等各种程序及流速(mL/min);

——柱箱温度、进样器温度, $^{\circ}\text{C}$;

——记录纸的速度(cm/min)、衰减。

8 操作

按照试验的要求,选定各种参数,进行试验。在达到各项预定的数值(温度,流速等),仪器的基线稳定之后,用进样装置导入试样,并立即记录试样的导入点。依据试样中组分含量的多少,调节仪器的衰减比,使各个组分的色谱峰尽可能的全部记录下来,但不得超出记录器的量程范围。亦可使用数据处理装置。

梯度洗脱分离之后,应把梯度最后部分的溶剂洗去,使色谱柱再生回复到初始状态。

9 色谱柱的评价

在一定的操作参数条件下,一根填充良好的色谱柱所能提供窄的谱带和改善分离的相对能力。这种柱效能,可根据色谱数据进行评价,一般用理论板数(n),有效板数(n_{eff}),理论板高(H),折合板高(h_r)表示。

其次,两个相邻组分的分离程度,可以用分离度(R)表示。

10 色谱图的整理

根据色谱图可以得到各个组分的保留值、峰高、半高峰宽和峰面积。峰高和峰面积也可以根据积分仪的记录和指示值来测量。并可以用数据处理装置处理色谱数据。

典型的标准色谱图应该明确地标明必要的操作参数,见附录 J(提示的附录)。

11 定性分析

在给定的色谱操作参数条件下,一个化合物的保留值是该组分的特性值。因此,最简单的方法是用标记物与未知组分的保留值直接比较。

可以更换多种柱填充剂、流动相及其组成来实现保留值的比较。

可以用流分收集器收集被分离出的纯组分,利用各种类型的官能团和组分的选择性显色反应来获得分离出未知组分的定性信息。

可以用液相色谱—质谱联用仪,液相色谱—红外光谱联用仪或用其他仪器和化学方法对未知组分进行鉴定,见附录 K(提示的附录)。

12 定量分析

液相色谱法的定量分析结果的准确程度取决于所采用校准的测定方法和组分谱带分离的程度(最小的谱带重叠)。严格控制某一具体分析的色谱操作参数的能力决定着分析结果的精密度。因此,从开始采样到最后计算的各个操作步骤都要十分细心,才能获得准确的定量分析结果。

按照色谱图中各组分谱带的峰高或峰面积,测定各组分的量之间的关系。

各组分的量与响应值应该呈线性关系,谱带最好是对称并且彼此完全分离。

常用的定量分析方法有:

- a) 内标法(见 GB/T 9088 中 7.12);
- b) 外标法(见 GB/T 9088 中 7.13);
- c) 叠加法(见 GB/T 9088 中 7.14)。

计算公式,见附录 L(提示的附录)。

12.1 定量结果的表示方法

定量分析的结果一般用质量分数和体积分数,其常用分数单位为 $10^{-2}(\%)$ 、 $10^{-3}(\%)$ 、 $10^{-6}(\text{ppm})$ 或 mg/L 、 g/m^3 等表示。

12.2 精密度

各组分分析结果的精密度由各分析方法中所规定的标准来确定。

12.2.1 重复性。

12.2.2 再现性。

13 分子量的测定

用体积排除色谱法测定高分子化合物的分子量及其分子量分布,它是以化学惰性的多孔物质作为固定相,有机溶剂或缓冲溶液及各种盐的水溶液作为流动相,试样的组分按分子体积(流体力学体积)的大小进行分离,利用校准曲线或函数和特性检测器进行测定。

13.1 色谱柱的校准

体积排除色谱法不是一个绝对的测定方法,对给定的色谱柱需要用单分散高分子的分子参数(分子量、特性粘度、流体力学体积等)标定其淋洗体积与分子参数之间的关系,然后用数学函数或曲线形式表示。

13.1.1 窄分布校准

用窄分布的标准物质标定色谱柱是目前常采用的方法。它是使用 $\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$ 值小于 1.1 的一系列分子量不同的标准物质,进行给定试验条件的色谱分析。从峰位、体积得到不同分子量的标准物质的淋洗体积 (V_e),以淋洗体积与相应的分子量的对数 ($\lg M$) 作图,绘制 $\lg M-V_e$ 的校准曲线。

然后,在相同的试验条件下,将试样进行色谱分析,根据试样中各组分的淋洗体积直接从校准曲线上查得分子量值。

但是,比较理想的标准物质只限于用阴离子聚合方法得到的聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙烯和聚异丁烯等。

该方法用的试样与标准物质的性质一致时,才能获得准确的分子量值。因此,方法的应用受到一定的限制。

标准物质的分子量可用(激光)光散射法、渗透压法或粘度法测定。

13.1.2 普适校准

由于色谱柱的淋出体积真正反映的是试样的流体力学体积 (V_h),因而, $\lg M-V_e$ 的标定关系只能用于测定与标准物质相同的试样,因为不同类型的试样特别是高分子物质,当分子量相同时,他们的流体力学体积并不相同。

如果用不同类型的试样在相同的试验条件下进行色谱分析,用流体力学体积作为分子参数的校准曲线或函数,也就是用特性粘度与分子量的乘积的对数值 ($\lg [\eta]M$) 为纵坐标,淋洗体积为横坐标作图所得到的曲线,它就是一条对多数高分子物质都普遍适用的校准曲线。

普适校准曲线得到的数据是各淋洗体积所对应的 $[\eta]M$,所以如果要得到分子量,还需用粘度计测定各淋洗体积的 $[\eta]$ 。如果试样和标准物质在工作溶剂中的特性粘度—分子量方程式(即 $M-H$ 方程式 $[\eta]=KM^\alpha$)常数 K 、 α 值已知时,见附录 M(提示的附录)就可以通过公式(2)把标准物质的 $\lg M-V_e$ 的校准曲线转换成试样的 $\lg M-V_e$ 的校准曲线而直接应用。

$$\lg M_2 = \frac{1}{\alpha_2 + 1} \lg \left(\frac{K_1}{K_2} \right) + \left(\frac{\alpha_1 + 1}{\alpha_2 + 1} \right) \lg M_1 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中: M_1 ——标准物质的分子量;

M_2 ——试样的分子量;

α_1, K_1 ——标准物质在某溶剂中的粘度常数;

α_2, K_2 ——试样在某溶剂中的粘度常数。

目前,常用的标准物质是用离子型聚合的聚苯乙烯(分子量 $6 \times 10^2 \sim 3 \times 10^6$)、葡聚糖、聚环氧乙烷。

普适校准是目前测定分子量中使用最广泛的方法。

13.2 色谱图的整理

典型的体积排除法色谱图,见附录 N(提示的附录)。按色谱峰的前沿和后沿画一基线,再将整个谱图与基线所围的面积按淋洗体积等分为若干条块(至少 20 条块以上),测量这些淋洗体积处的条块高度,并由校准曲线查出各等分点的淋洗体积所对应的分子量值。

条块高度的测量误差一般应该小于 $\pm 0.1 \text{ mm}$ 。

13.3 分子量的计算

根据淋洗体积和分子量值,把数据列成表,见附录 P(提示的附录),计算试样分子量平均值。

数均分子量 ($\bar{M}_n$),重均分子量 ($\bar{M}_w$) 和多分散系数 (D) 用公式计算。

以上是未经加宽校正的表观平均分子量和多分散系数。 D 表示高聚物分子量分布宽度的参数,分布越窄,其值越接近 1,一般 $D \leq 1.1$ 时称单分散。

由于纵向扩散,传质阻力等因素的影响,引起色谱峰的谱带加宽,这种加宽并不能代表高聚物实际的多分散系数。必要时,可对谱带进行加宽校正。

附录 A

(提示的附录)

用于液相色谱法中溶剂的性质

表 A1 用于液相色谱法中溶剂的性质

溶剂 ¹⁾	紫外截止 波长 ²⁾ (nm)	折光率 (25℃)	沸点(℃)	粘度 (cP, 25℃)	P'	$\epsilon^{03)}$	选择性 分组 ⁴⁾	水在溶剂中的 溶解度 ⁵⁾	$\delta^6)$
异辛烷 ^(**) (2,2,4-三甲基戊烷)	197	1.389	99	0.47	0.1	0.01	—	0.011	7.0
正庚烷 ^(**)	195	1.385	98	0.40	0.2	0.01	—	0.010	7.4
正己烷 ^(**)	190	1.372	69	0.30	0.1	0.01	—	0.010	7.3
正戊烷 ^(**)	195	1.355	36	0.22	0.0	0.00	—	0.010	7.1
环己烷	200	1.423	81	0.90	-0.2	0.04	—	0.012	8.2
环戊烷 ^(**)	200	1.404	49	0.42	-0.2	0.05	—	0.014	8.1
1-氯丁烷 ^(**)	220	1.400	78	0.42	1.0	0.26	VIa		
二硫化碳 ^(**)	380	1.624	46	0.34	0.3	0.15	—	0.005	10.0
2-氯丙烷 ^(**)	230	1.375	36	0.30	1.2	0.29	VIa		8.3
四氯化碳	265	1.457	77	0.90	1.6	0.18	—	0.008	8.6
三乙胺		1.398	89	0.36	1.9	0.54	I		7.5
溴乙烷 ^(**)		1.421	38	0.38	2.0	0.35	VIa		8.8
异丙醚 ^{(**)(****)}	220	1.365	68	0.38	2.4	0.28	I	0.62	7.0
甲苯	285	1.494	110	0.55	2.4	0.29	VI	0.046	8.9
对二甲苯	290	1.493	138	0.60	2.5	0.26	VI		
氯苯		1.521	132	0.75	2.7	0.30	VI		9.6
溴苯		1.557	156	1.04	2.7	0.32	VI		9.9
邻二氯苯	294	1.549	180	1.26			VI		10
乙醚 ^{(**)(****)}	218	1.350	35	0.24	2.8	0.38	I	1.3	7.4
苯	280	1.498	80	0.60	2.7	0.32	VI	0.058	9.2
磷酸三甲苯酯					4.6		VIa		
二氯甲烷 ^(**)	233	1.421	40	0.41	3.1	0.42	V	0.17	9.6
苯甲醚		1.514	154	0.9	3.8		VI		9.7
异戊醇		1.405	130	3.5	3.7	0.61	II	9.2	
1,2-二氯乙烷	228	1.442	83	0.78	3.5	0.44	V	0.16	9.7
正丙醇	240	1.385	97	1.9	4.0	0.82	I	混溶	10.2
四氢呋喃 ^(**)	212	1.405	66	0.46	4.0	0.57	III	混溶	9.1
乙酸乙酯 ^(**)	256	1.370	77	0.43	4.4	0.58	VIa	9.8	8.6