

色谱技术丛书
化学工业出版社

色谱分析概论

傅若农 编著



0657.7
05

00012420

色谱技术丛书

色谱分析概论

傅若农 编著



H1186/31

化学工业出版社



C0489033

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

色谱分析概论/傅若农编著. —北京: 化学工业出版社,
1999.9

(色谱技术丛书/傅若农主编)

ISBN 7-5025-2637-4

I. 色… II. 傅… III. 化学分析-色谱法 IV. 0657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 38550 号

色谱技术丛书
色 谱 分 析 概 论
傅若农 编著
责任编辑: 任惠敏
责任校对: 蒋 宇
封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社出版发行
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销
化学工业出版社印刷厂印刷
三河市前程装订厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 9¼ 字数 235 千字

2000 年 1 月第 1 版 2000 年 1 月北京第 1 次印刷

印数: 1—4000

ISBN 7-5025-2637-4/TQ·1175

定 价: 19.50 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

色 谱 技 术 丛 书

傅若农 主编

汪正范 刘虎威 副主编

各分册主要执笔者:

- | | | | | |
|---------------|-----|-----|-----|-----|
| 《色谱分析概论》 | 傅若农 | | | |
| 《色谱定性定量》 | 汪正范 | | | |
| 《气相色谱检测方法》 | 吴烈钧 | | | |
| 《液相色谱检测方法》 | 张晓彤 | 云自厚 | | |
| 《气相色谱方法及应用》 | 刘虎威 | | | |
| 《高效液相色谱方法及应用》 | 于世林 | | | |
| 《平面色谱方法及应用》 | 何丽一 | | | |
| 《离子色谱方法及应用》 | 牟世芬 | 刘克纳 | | |
| 《毛细管电泳技术及应用》 | 陈义 | | | |
| 《色谱分析样品处理》 | 王立 | | | |
| 《色谱联用技术》 | 汪正范 | 杨树民 | 吴侔天 | 岳卫华 |
| 《色谱柱技术》 | 刘国铨 | 余兆楼 | | |
| 《色谱仪器维护与故障排除》 | 吴方迪 | | | |

序

色谱作为一种分离技术与方法，自本世纪初发表第一篇论文算起，已有 100 年的历史，虽然在前 30 多年间这种方法未受到应有的重视，但自 40 年代以后，逐渐得到发展，而且其势头越来越猛，从技术到理论，到各种分离模式，以及在各个科学领域内的应用，得到了突飞猛进的发展，现在已经成为分析化学学科中的一个重要分支。同时为许多重要学科的发展作出了极大的贡献。在人类进入 21 世纪之际，人们面临着在信息科学、生命科学、材料科学、环境科学等领域的快速发展的挑战，在这些领域人才的需求成为国家高度发展的至关重要的因素。而色谱技术是生命科学、材料科学、环境科学必不可少的手段和工具。根据最近的统计在全世界各类分析仪器中气相色谱仪和液相色谱仪的营销总额占 25%~30%。2000 年对各类分析仪器的需求量也以液相色谱仪最多。可以毫不夸张地说，如果没有色谱技术的应用，自然科学和生命科学能发展到今天的这个样子是很难想象的。

有关色谱的各种专著国内外已经出版了许多种，其中多是针对色谱专业人员而写的专著，而缺少一套系统的比较全面的介绍当代色谱技术的丛书，供广大的工厂企业中从事色谱分析的初中级技术人员和科研院所的科技人员，大专院校的研究生，甚至管理人员及有关领导学习参考的书籍。为此化工出版社提议，由北京理化分析测试学会组织编写了这套‘简明扼要，深入浅出，通俗易懂，新颖实用’的色谱技术丛书。这套书以傅若农教授为主编，汪正范教授和刘虎威副教授作副主编。为联系方便，主要请在京的专家来编写，并自 1998 年初开始运作。从方便读者学习角度出发，将色谱技术的主要内容分为 13 册。分别为：傅若农之《色谱分析概论》，刘国詮、余兆楼等之《色谱柱技术》，陈义之《毛细管电泳技术及应用》，于世林之《高效

液相色谱方法及应用》，刘虎威之《气相色谱方法及应用》，云自厚、张晓彤之《液相色谱检测方法》，吴烈均之《气相色谱检测方法》，汪正范之《色谱定性定量》，汪正范等之《色谱联用技术》，牟世芬、刘克纳之《离子色谱方法及应用》，何丽一之《平面色谱方法及应用》，王立之《色谱分析样品处理》，吴方迪之《色谱仪器维护与故障排除》。这些编著者多是我国目前在教学与科研第一线为色谱科学努力奋进的中青年专家，在书中都反映了色谱领域的基本知识、基本方法和他们自己的宝贵经验以及有关领域的最新成果。这套丛书将给初学色谱的年轻科技工作者提供较完整的学习参考书，也为大中专学生提供一套有用的教学参考书。还应该提出的是，由于得到了安捷伦科技有限（原中国惠普）公司的赞助，这套书的出版才能顺利进行。值此书即将付梓之际，特书此以为序。

周同惠

1999年9月9日

前 言

本书是在多年的教学和科研的基础上写成的，也是在 1998 年我和顾峻岭教授编写的国防工业出版社出版的“近代色谱分析”（国防工业出版社出版）的基础上修改补充按本丛书的要求重新编写的。在书中融会了本研究组的教师和几十名研究生近 20 年的研究成果，同时把近年来色谱科学领域中的一些最新发展做了简要的介绍。虽然由于本书是这一丛书的第一本，只对色谱的各个分支做一简要地阐述，概论性地介绍有关色谱的基本知识、仪器概况、方法要点，但还是略有侧重，在气相色谱、液相色谱、毛细管电泳方面做了较多的叙述。

有关色谱的每一重要分支，本丛书都有专门分册论述，可供读者参考。由于字数的限制，书中未能提供大量的原始文献，只作内容上的阐述和少量文献介绍。

由于撰写本书的时间仓促，书中难免有疏漏、不足和错误之处，敬请有关专家和读者谅解并指正，作者表示衷心的感谢。

作 者

1999 年 7 月于北京理工大学

内 容 提 要

本书是《色谱技术丛书》的第一分册，是作者在多年教学和科研的基础上写成的。全书共 12 章，其中既有对色谱分析方法的历史发展、基本原理、方法分类等基础知识的综述性介绍及对各种色谱仪器的结构性能特点等方面的精要介绍，又有对毛细管气相色谱、裂解气相色谱、顶空气相色谱、高效液相色谱、超临界流体色谱、毛细管电泳、毛细管电色谱等色谱科学领域中重要技术与最新技术的重点介绍。

本书内容全面，综合性强，语言精炼，可供从事色谱分析与化学分析的工作人员阅读，也可用作本科和研究生教材。

目 录

第一章 绪论	1
第一节 色谱法发展简史	1
一、色谱法的出现	1
二、色谱法的发展	1
三、色谱法的现状和未来	2
第二节 色谱法在工业生产和科学研究中的作用	4
一、色谱法在经济建设和科学研究中的作用	4
二、色谱法在分析化学中的地位和作用	5
第三节 色谱法与其他方法的比较和配合	5
一、色谱法的特点和优点	5
二、色谱法和其他方法的配合	6
第四节 色谱法的定义与分类	6
一、按流动相和固定相的状态分类	6
二、按使用领域不同对色谱仪的分类	7
第五节 现代色谱法的应用领域和性能比较	8
一、色谱法的应用领域	8
二、各种色谱方法的性能比较	8
第六节 有关色谱的中文工具书和国内外的主要期刊	10
一、有关色谱的中文工具书	10
二、国内外主要的色谱期刊	10
参考文献	11
第二章 色谱法的原理	12
第一节 色谱分析的基本原理	12
一、色谱分离的本质	12
二、色谱分离的塔板理论	13
第二节 色谱法中常用的术语和参数	14
一、气相色谱中常用的术语和参数	14
二、液相色谱中常用的术语和参数	20
第三节 色谱的速率理论	21

一、气相色谱速率理论	21
二、液相色谱速率理论	25
参考文献	28
第三章 色谱仪	29
第一节 气相色谱仪	29
一、气相色谱仪的主要部件	29
二、气相色谱检测器的性能	32
三、气相色谱仪的生产厂家	33
四、典型气相色谱仪性能	34
五、便携式气相色谱仪	37
第二节 高效液相色谱仪	38
一、高效液相色谱仪的流程	38
二、现代高效液相色谱仪的性能	38
三、高效液相色谱仪的主要部件	39
四、高效液相色谱仪的检测器	44
五、高效液相色谱仪的生产厂家和仪器型号	46
六、典型的高效液相色谱仪的性能	47
第三节 离子色谱仪	48
一、离子色谱仪流程	48
二、离子色谱仪的部件	49
三、离子色谱仪的生产厂家和仪器型号	51
第四节 超临界流体色谱仪	51
一、超临界流体色谱仪的流程	51
二、超临界流体色谱仪的结构和性能	52
三、超临界流体色谱仪的生产厂家和仪器型号	53
第五节 毛细管电泳仪	54
一、毛细管电泳仪的流程	54
二、毛细管电泳仪的主要部件和性能	54
三、生产毛细管电泳仪的生产厂家和仪器型号	56
四、典型毛细管电泳仪的性能	57
参考文献	58
第四章 填充柱气相色谱	60
第一节 填充柱气液色谱用载体	60
一、气液色谱对载体的要求	60
二、载体的种类	60

第二节 气液色谱用固定液	64
一、气液色谱对固定液的要求	64
二、气液色谱用固定液的分类	64
三、常用的气液色谱固定液	67
四、耐高温的气液色谱固定液	70
五、选择性气液色谱固定液	71
六、含手性氨基酸的衍生物聚硅氧烷固定相	74
七、环糊精及其衍生物类手性固定相	75
第三节 气相色谱条件的选择	76
一、气相色谱条件	76
(一) 色谱柱材料、柱形和柱径	76
(二) 载气种类和流速	77
(三) 柱温的选择及对分析结果的影响	79
(四) 检测器和气化室温度的选择及对分析结果的影响	80
二、固定液的选择	81
(一) 选择固定液前对样品的了解	81
(二) 选择固定液的基本原则	81
第四节 气固色谱法	90
一、气固色谱法的理论依据和特点	90
二、气固色谱用固定相	92
参考文献	101
第五章 毛细管气相色谱	103
第一节 概述	103
一、毛细管气相色谱的发展历史	103
二、毛细管气相色谱柱的类型	104
第二节 毛细管气相色谱与填充柱气相色谱的比较	105
一、比渗透率 (B_0)	105
二、毛细管柱与一般填充柱性能的比较	106
三、毛细管气相色谱仪和填充柱气相色谱仪的比较	107
第三节 毛细管气相色谱柱的制备	109
一、毛细管气相色谱柱的材料	109
二、毛细管气相色谱柱的拉制	111
三、毛细管气相色谱柱的预处理	111
(一) 粗糙化	111
(二) 去活	113

四、毛细管气相色谱柱的涂渍	117
第四节 毛细管气相色谱柱的评价	121
一、评价色谱柱的指标和测试物	121
二、评价色谱柱的柱效	121
第五节 大内径厚液膜毛细管气相色谱柱	122
一、大内径毛细管柱的特点	122
二、大内径毛细管柱的主要柱参数	123
第六节 细内径毛细管气相色谱柱	123
一、细内径毛细管气相色谱柱的特点	123
二、细内径毛细管气相色谱柱的应用	125
第七节 气固色谱用毛细管柱	127
一、气固毛细管柱	127
二、分子筛 PLOT 柱	127
三、三氧化二铝 PLOT 柱	128
四、HP-PLOT Al_2O_3 KCl 柱	130
五、HP-PLOT Al_2O_3 “S” 和 “M” 柱	130
六、苯乙烯-二乙烯基苯的 PLOT 柱	131
参考文献	133
第六章 裂解气相色谱	135
第一节 裂解气相色谱的方法和原理	135
一、裂解气相色谱的发展过程	135
二、PyGC 的特点和局限性	136
三、PyGC 的基本原理及方法	137
第二节 裂解气相色谱的裂解器	138
一、PyGC 对裂解器的要求	138
二、PyGC 裂解器的分类	139
三、常用的 PyGC 裂解器	139
第三节 裂解气相色谱在材料科学中的应用	144
一、裂解色谱-质谱方法研究聚合物梯度折射材料	144
二、裂解色谱方法研究发射药的热分解	148
三、PyGC-MS 研究 GC 和 HPLC 固定相	148
参考文献	151
第七章 顶空气相色谱	152
第一节 顶空气相色谱法的概念和类别	152
一、顶空气相色谱的概念	152

二、顶空气相色谱的类别和特点	152
第二节 顶空气相色谱法的原理	154
一、色谱峰面积和样品蒸气分压的关系	154
二、顶空气相色谱分析中的校正因子	155
第三节 顶空气相色谱装置	155
一、静态顶空气相色谱分析装置	155
二、动态顶空气相色谱分析装置	156
三、固相萃取、膜渗透萃取与顶空气相色谱结合	156
第四节 顶空气相色谱法的应用	156
一、静态顶空气相色谱法分析体液中的苯类化合物	156
二、顶空气相色谱法分析血样中的酒精	157
三、动态顶空气相色谱法分析饮用水中的有机物	158
四、顶空气相色谱法分析固体样品中的挥发性有机物	158
参考文献	159
第八章 高效液相色谱	160
第一节 高效液相色谱法的发展	160
一、高效液相色谱的出现	160
二、高效液相色谱和古典液相色谱的比较	161
三、高效液相色谱和气相色谱的比较	161
第二节 反相高效液相色谱	162
一、液相色谱分类	162
二、反相高效液相色谱	162
第三节 正相高效液相色谱	167
一、正相高效液相色谱的概念	167
二、正相高效液相色谱的固定相	167
三、正相高效液相色谱的流动相	170
四、正相高效液相色谱的分离机理和应用	170
第四节 离子交换色谱	170
一、离子交换色谱的形成	170
二、离子交换色谱的色谱柱	170
三、离子交换色谱的流动相	171
四、离子交换色谱的分离机理和应用	171
第五节 离子色谱	173
一、离子色谱的概念	173
二、离子色谱的原理和特点	173

三、离子色谱的应用	174
第六节 离子对色谱	176
一、离子对色谱的概念	176
二、反相离子对色谱	176
三、反相离子对色谱的应用	178
第七节 体积排阻色谱	178
一、体积排阻色谱的含义	178
二、体积排阻色谱的发展过程和应用领域	179
三、体积排阻色谱的保留作用	179
四、体积排阻色谱的固定相和流动相	180
第八节 疏水作用色谱	181
一、疏水作用色谱的概念	181
二、疏水作用色谱的分离原理	181
三、疏水作用色谱的固定相	182
四、影响疏水作用色谱的色谱条件	182
第九节 胶束液相色谱	183
一、胶束液相色谱的概念	183
二、胶束液相色谱的分离机理	183
三、胶束液相色谱所用的表面活性剂	184
四、胶束液相色谱的应用	184
第九章 高效液相色谱的色谱柱和流动相	185
第一节 高效液相色谱的色谱柱	185
一、色谱柱柱效	185
二、高效液相色谱填料的基质	186
三、高效液相色谱固定相	188
四、高效液相色谱柱的填充	194
第二节 高效液相色谱的流动相	194
一、概述	194
二、高效液相色谱流动相溶剂的物理性质	195
第三节 高效液相色谱方法的选择	198
一、色谱模式的选择	198
(一) 样品性质	198
(二) 根据样品性质选择适当的模式	199
二、色谱条件的选择	201
参考文献	202

第十章 超临界流体色谱	203
第一节 超临界流体色谱的简史	203
一、概述	203
二、超临界流体色谱的发生和发展	203
三、超临界流体色谱的一般流程	204
第二节 超临界流体色谱原理和仪器	204
一、超临界流体色谱的原理	204
二、SFC 仪器的结构	205
三、SFC 仪器的性能	205
第三节 超临界流体色谱的色谱柱	206
一、超临界流体色谱填充柱	206
二、超临界流体色谱毛细管柱	206
第四节 超临界流体色谱的流动相和改性剂	207
一、超临界流体色谱的流动相	207
二、SFC 超临界流体的改性剂	210
第五节 超临界流体色谱的应用	211
一、填充柱和毛细管柱 SFC 的应用	211
二、SFC 的应用示例	211
参考文献	212
第十一章 高效毛细管电泳	213
第一节 概述	213
一、高效毛细管电泳的发展	213
二、高效毛细管电泳的特点	215
三、毛细管电泳的几种模式	216
第二节 高效毛细管电泳的理论	218
一、电泳法的基本原理	218
二、毛细管电泳中电渗现象和电渗流	219
(一) 电渗现象	219
(二) 电渗流	219
(三) 影响电渗流的因素	222
(四) 高效毛细管电泳中电渗流的控制	224
三、淌度	225
四、毛细管电泳的分析参数	226
第三节 毛细管电泳中影响柱效率的因素	229
一、由进样引起的峰加宽	230

二、焦耳热和温度梯度引起的峰加宽	231
三、由纵向扩散引起的峰加宽	233
四、由溶质与管壁间的相互作用引起的峰加宽	233
五、由电分散作用引起的峰加宽	235
六、由其他因素引起的峰加宽	235
第四节 胶束毛细管电动色谱	236
一、分离原理	236
二、MEKC 中使用的参数	237
三、MEKC 中常用的“准固定相”	241
四、环糊精改性 MEKC	242
第五节 毛细管电泳的手性分离	243
一、手性分离概况	243
二、毛细管电泳手性分离原理和方法	245
三、毛细管电泳手性分离的手性选择剂	246
(一) 手性选择剂的种类	246
(二) 环糊精及其衍生物作手性选择剂	247
(三) 非环糊精作手性选择剂	250
第六节 毛细管凝胶电泳	251
一、分离原理	251
二、毛细管凝胶电泳的特点	252
三、毛细管凝胶电泳的筛分介质	252
第七节 毛细管等电聚焦和等速电泳	253
一、毛细管等电聚焦	253
二、毛细管等速电泳	255
第八节 毛细管电泳分离操作条件的选择	256
一、缓冲溶液的选择	256
二、工作电压的选择	259
三、缓冲溶液添加剂	259
参考文献	260
第十二章 毛细管电色谱	261
第一节 概述	261
一、毛细管电色谱的发展	261
二、毛细管电色谱的类型	262
(一) 按毛细管柱的类型分类	262
(二) 按流动相的驱动方式分类	264

三、毛细管电色谱的特点	265
第二节 毛细管电色谱的基本原理	266
一、分离机理	266
二、保留机制	268
三、分离效率	269
第三节 毛细管电色谱实验条件的选择	269
一、操作电压	269
二、缓冲溶液 pH 值	270
三、背景电解质浓度	270
四、有机溶剂	270
第四节 毛细管电色谱柱	270
一、拉制法	270
二、填充法	271
三、填充毛细管柱塞子的制备	271
第五节 毛细管电色谱的应用	272
一、多环芳烃及药物中间体的分离分析	272
二、手性分离	272
三、样品富集和预浓缩	273
参考文献	274
符号表	275

第一章 绪 论

第一节 色谱法发展简史

一、色谱法的出现^[1]

俄国植物学家 Tswett (茨维特) 于 1903 年在波兰华沙大学研究植物叶子的组成时, 用碳酸钙作吸附剂, 分离植物干燥叶子的石油醚萃取物。他把干燥的碳酸钙粉末装到一根细长的玻璃管中, 然后把植物叶子的石油醚萃取液倒到管中的碳酸钙上, 萃取液中的色素就吸附在管内上部的碳酸钙里, 再用纯净的石油醚洗脱被吸附的色素, 于是在管内的碳酸钙上形成三种颜色的 6 个色带。当时茨维特把这种色带叫作“色谱”(Chromatographie, 茨维特于 1906 年发表在德国植物学杂志上用此名, 英译名为 Chromatography), 在这一方法中把玻璃管叫作“色谱柱”, 碳酸钙叫作“固定相”, 纯净的石油醚叫作“流动相”。把茨维特开创的方法叫液固色谱法 (Liquid-Solid Chromatography)。

二、色谱法的发展^[1]

在茨维特提出色谱概念后的 20 多年里没有人关注这一伟大的发明。直到 1931 年德国的 Kuhn 和 Lederer 才重复了茨维特的某些实验, 用氧化铝和碳酸钙分离了 α -, β -, 和 γ -胡萝卜素, 此后用这种方法分离了 60 多种这类色素。Martin 和 Synge 在 1940 年提出液液分配色谱法 (Liquid-Liquid Partition Chromatography), 即固定相是吸附在硅胶上的水, 流动相是某种有机溶剂。1941 年 Martin 和 Synge 提出用气体代替液体作流动相的可能性, 11 年之后 James 和 Martin 发表了从理论到实践比较完整的气液色谱方法 (Gas-Liquid Chromatography), 因而获得了 1952 年的诺贝尔化学奖。在此基础上 1957 年 Golay 开创了开管柱气相色谱法 (Open-Tubular Column Chromato-

graphy), 习惯上称为毛细管柱气相色谱法 (Capillary Column Chromatography)。1956 年 Van Deemter 等在前人研究的基础上发展了描述色谱过程的速率理论, 1965 年 Giddings 总结和扩展了前人的色谱理论, 为色谱的发展奠定了理论基础。另一方面早在 1944 年 Consden 等就发展了纸色谱, 1949 年 Maclean 等在氧化铝中加入淀粉粘合剂制作薄层板使薄层色谱法 (TLC) 得以实际应用, 而在 1956 年 Stahl 开发出薄层色谱板涂布器之后, 才使 TLC 得到广泛地应用。在 60 年代末把高压泵和化学键合固定相用于液相色谱, 出现了高效液相色谱 (HPLC)。80 年代初毛细管超临界流体色谱 (SFC) 得到发展, 但在 90 年代后未得到较广泛的应用。而在 80 年代初由 Jorgenson 等集前人经验而发展起来的毛细管电泳 (CZE), 在 90 年代得到广泛的发展和应用。同时集 HPLC 和 CZE 优点的毛细管电色谱在 90 年代后期受到重视。到 21 世纪色谱科学将在生命科学等前沿科学领域发挥他不可代替的重要作用。

三、色谱法的现状和未来^[2,3]

色谱法经过近一个世纪的发展, 各种方法发展不平衡。McNair 认为气相色谱 (GC) 可能是世界上应用最广的分析技术, 他仍处于上升的趋势, 有报告估计 GC 仪器和备件在世界市场上高达 10 亿美元, 并将以 3%~4% 逐年增长, 其中软件 35%, 硬件 65%。所以如此, 是因为气相色谱的灵敏度高, 分离度好, 分析速度快, 定量分析的精密度优于 1%。将来的发展趋势是增强自动化, 特别是计算机工作站的应用, 以及专门的进样装置与气相色谱仪的一体化, 包括顶空、吹扫捕集、固相萃取、超临界流体萃取和加速溶剂萃取。GC/MS 将以 5%~10% 的速度增加, GC/FTIR 会维持现状, GC/NMR 会有商品仪器问世。

高效液相色谱 (HPLC) 近年以 6%~8% 的速度增长, 其中活跃的领域是离子色谱 (IC), 疏水作用色谱 (HIC), 手性分离及普遍使用的反相色谱, HPLC 除具有 GC 的优点外, 还有应用面广, 可以进行制备分离, 在生命科学中有很大的应用前景。HPLC 的仪器市场尚未成熟, 他将持续增长, 主要在 LC/MS 系统以及开发更为简单便宜

的系统。

G. Guiochon^[3]认为 GC 和 HPLC 在分离分析领域发展最好，是极为成功的范例，而超临界流体色谱（SFC）和场流分离（FFF）则处于失利的境地，毛细管区带电泳（CZE）和电色谱则处于前途未卜的状态。关于超临界流体色谱（SFC）是 Giddings 和 Myers 早在 60 年代就进行了先驱性的研究工作，在 80 年代初期掀起 SFC 的热潮，而且当时认为 SFC 将掀起分析方法的革命，但是目前各大公司却纷纷撤消 SFC 的推销，放弃进一步开发 SFC 的计划。毫无疑问 SFC 具有一些独特用途，但是他被挤在气相色谱和高效液相色谱之间，而 GC 和 HPLC 已成为广泛应用的技术，所以 SFC 命中注定处于被束之高阁的地位。

毛细管区带电泳（CZE）于 80 年代初引起分析化学家极大的兴趣，由于它具有惊人的高柱效，使许多分析化学家趋之若鹜地奔向 CZE，许多色谱学家也都转向 CZE，希望他能解决一切分离问题。但是许多工业分析化学家现在沮丧了，因为虽然 CZE 具有很高的柱效，但是他失去了色谱方法灵活调节分离因子的机动性，他难以成为定量分析的手段，CZE 分析结果的偏差要比 HPLC 整整大一个数量级，这是一个极大的障碍。仪器制造商们眼巴巴地看着销售额的下降。CZE 只有他成为一个真正的定量分析方法之后才能获得广泛的应用。要解决这一困难的问题，需要付出十分艰辛的研究。

现在电色谱（EC）成为这一领域的新秀，很多人希望 EC 能获得成功，尽管要下一个结论还为时尚早，但是 EC 驱动流动相的方式和 CZE 相同，都是使用了电渗流，这种流动速度的波动造成 CZE 在定量分析中的误差来源，要克服这一困难是近期具有挑战性的研究任务。

有许多理由说明 SFC 和场流分离（FFF）是不够成功的，他们不能成为分析方法的主流。而 CZE 和 EC 是在苦难地挣扎之中，要使之成功和普及并成为定量分析方法必须具备：①易于使用，操作费用低；②能够得到准确、可重复的定量结果；③要能够解决至少一个分析化学中的重要问题。在所有这三个问题中，他的功能必须超过其他

技术。在 60 年代的 GC 和 70 年代的 HPLC 就是这样的。SFC, CZE 和 EC 是很重要的分析分离方法, 都有自己的某些特殊的优点, 他们如能满足上述要求就会得到广泛的应用。不过 CZE 还是具有极大的机遇的, 用他来分析生物大分子有非常突出的优点, 只要把他的定量分析精度明显地提高, 他会蓬勃发展, 成为极其重要的分析方法。

第二节 色谱法在工业生产和 科学研究中的作用^[1,4~11]

一、色谱法在经济建设和科学研究中的作用

世界性的科学技术和生产的发展、进步, 推动了分析化学的发展, 而色谱分析是分析化学的重要组成部分, 从一出现就对科学的进步和生产的发展起着重要的作用。在 30~40 年代他为揭开生物世界的奥秘, 为分离复杂的生物组成发挥了独特的作用; 50 年代为石油工业的研究和发展作出了贡献; 60~70 年代成为石油化工、化学工业等部门不可缺少的分析监测工具。目前色谱法是生命科学、材料科学、环境科学、医药科学、食品科学、法庭科学以及航天科学等研究领域的重要手段。各种色谱仪器已经成为各类研究室、实验室极为重要的仪器设备。

表 1-1 不同年代各种分析方法所占的比例

所 占 比 例 / % 方 法		年 代					
		1946	1955	1965	1975	1985	1995
仪器分析法							
光谱法		14.3	26.3	28.7	29.7	30.0	30
色谱分析法		1.4	2.3	12.0	26.7	35.0	36
电化学法		4.4	6.2	10.2	13.5	15.0	16
放射分析法		1.0	2.0	6.5	13.8	17.0	18
经典分析法							
比色法		23.0	20.0	15.2	9.2	2	
滴定法		25.6	22.0	12.6	5.1	1	
重量法		8.5	6.5	3.6	2.0	?	

二、色谱法在分析化学中的地位和作用

色谱分析法的特点是他具有高超的分离能力，而各种分析对象又大都是混合物，为了分析鉴定他们是由什么物质组成和含量是多少，必须进行分离，所以色谱法成为许多分析方法的先决条件和必需的步骤。从表 1-1 的数据可以看出色谱法在近年来各类分析化学方法中占有十分重要的地位。

第三节 色谱法与其他方法的比较和配合

一、色谱法的特点和优点^[4]

1. 色谱法的特点

色谱法是以其高超的分离能力为特点，他的分离效率远远高于其他分离技术如蒸馏、萃取、离心等方法。

2. 色谱法的优点

色谱法有许多优点：

(1) 分离效率高。例如毛细管气相色谱柱 ($0.1 \sim 0.25 \mu\text{m i.d.}$) $30 \sim 50\text{m}$ 其理论塔板数可以到 7 万 $\sim$ 12 万。而毛细管电泳柱一般都有几十万理论塔板数的柱效，至于凝胶毛细管电泳柱可达上千万理论塔板数的柱效。

(2) 应用范围广。他几乎可用于所有化合物的分离和测定，无论是有机物、无机物、低分子或高分子化合物，甚至有生物活性的生物大分子也可以进行分离和测定。

(3) 分析速度快。一般在几分钟到几十分钟就可以完成一次复杂样品的分离和分析。近来的小内径 (0.1mm i.d.)、薄液膜 ($0.2 \mu\text{m}$)、短毛细管柱 ($1 \sim 10\text{m}$) 比原来的方法提高速度 5 $\sim$ 10 倍。

(4) 样品用量少。用极少的样品就可以完成一次分离和测定。

(5) 灵敏度高。例如 GC 可以分析几纳克的样品，FID 可达 10^{-12}g/s ，ECD 达 10^{-13}g/s ；检测限为 10^{-9}g/L 和 10^{-12}g/L 的浓度。

(6) 分离和测定一次完成。可以和多种波谱分析仪器联用。

(7) 易于自动化，可在工业流程中使用。

二、色谱法和其他方法的配合^[5]

1. 色谱分析法的缺点

任何分析方法都有他的优点，同时也存在某些缺点。色谱分析法的优点是突出的，但是也有缺点，即对所分析对象的鉴别功能较差，一般来说色谱的定性分析是靠保留值定性，但在一定的色谱条件下，一个保留值可能对应许多个化合物，所以色谱方法要和其他的方法配合才能发挥他更大的作用。

2. 和其他方法的配合

为了分离和鉴定一个有机混合物，常常把色谱方法的高效分离能力和光谱方法的鉴别能力结合在一起，发展了各种各样的联用技术。如最常用的气相色谱/质谱联用、气相色谱/富利叶红外光谱联用，近年发展起来的高效液相色谱/电喷雾质谱联用、毛细管电泳/质谱联用、气相色谱/等离子发射光谱联用等等。

第四节 色谱法的定义与分类

色谱法或色谱分析 (chromatography) 也称之为色层法或层析法，是一种物理化学分析方法，他利用混合物中各物质在两相间分配系数的差别，当溶质在两相间做相对移动时，各物质在两相间进行多次分配，从而使各组分得到分离。可完成这种分离的仪器即色谱仪 (chromatograph)。

色谱法的分类可按两相的状态及应用领域的不同分为两大类。

一、按流动相和固定相的状态分类

1. 气相色谱

气相色谱又可分为气固色谱和气液色谱，前者是以气体为流动相，以固体为固定相的色谱，后者是以气体为流动相，以液体为固定相的色谱。

2. 液相色谱

液相色谱又可分为液固色谱和液液色谱，前者是以液体作流动相，以固体作固定相的色谱；后者是以一种液体作流动相，以另一种液体作固定相的色谱。在液相色谱中如把固定相装在一个管子里（色

谱柱), 液体流动相流过色谱柱中的固定相进行分配分离, 这种形式的色谱叫柱色谱, 一般柱色谱就不特别指明, 常以液相色谱代替液相柱色谱, 在液相柱色谱中还有多种模式, 如正相液相色谱、反相液相色谱、离子色谱、离子对色谱、疏水作用色谱等等。此外还有以下一些有别于柱色谱的液相色谱模式。

(1) 纸色谱和薄层色谱 如果是用滤纸或是涂在玻璃板(或铝箔)上的硅胶(或三氧化二铝等)作固定相, 就叫纸色谱和薄层色谱, 总称平面色谱。平面色谱是滤纸或硅胶层的毛细管作用把流动相(溶剂)从一端吸上来, 使混合物得到分离。

(2) 体积排阻色谱 是以一定尺寸的多孔固体作固定相, 以液体作流动相, 按分子尺寸大小进行分离的方法。多用于高聚物分子量分布和含量的测定。

(3) 超临界流体色谱 是以超临界流体作流动相, 以固体或液体作固定相的色谱。所谓超临界流体是指温度和压力在超临界温度和超临界压力之上的一种既不是气体也不是液体的流体。这种流体因其密度不同, 对各种物质具有不同的溶解能力。因而他更类似于液相色谱。

(4) 电色谱 这类色谱有多种模式, 有用电压(电渗流)驱动的毛细管电泳, 毛细管柱电色谱。而毛细管电泳又可分为五种模式(毛细管区带电泳, 毛细管凝胶电泳, 毛细管胶束电动色谱, 毛细管等电聚焦, 毛细管等速电泳)。还有用电压和泵同时驱动的电色谱。

凡要完成上述的色谱过程, 均使用了不同类型的色谱仪, 如气相色谱仪、液相色谱仪、薄层色谱扫描仪、体积排阻色谱仪(凝胶渗透色谱仪)、超临界流体色谱仪, 另外, 液相色谱仪中还有专用的离子色谱仪和氨基酸分析仪等。

二、按使用领域不同对色谱仪的分类

(1) 分析用色谱仪 又可分为实验室用色谱仪和便携式色谱仪。这类色谱仪主要用于各种样品的分析, 其特点是色谱柱较细, 分析的样品量少。

(2) 制备用色谱仪 又可分为实验室用制备型色谱仪和工业用大

型制造纯物质的制备色谱仪。制备型色谱仪可以完成一般分离方法难以完成的纯物质制备任务，如纯化学试剂的制备，蛋白质的纯化。

(3) 流程色谱仪 在工业生产流程中为在线连续使用的色谱仪。目前主要是工业气相色谱仪，用于化肥、石油精炼、石油化工及冶金工业中。

第五节 现代色谱法的应用领域和性能比较^[6~12]

一、色谱法的应用领域

自从色谱法问世以来快一个世纪了，但是最近 20 年是发展最快的时期，特别是 80 年代到本世纪末，有许多崭新的色谱法方法出现。如在气相色谱中的毛细管柱工艺的发展；毛细管超临界流体色谱和超临界流体萃取的兴起；毛细管电泳的发展；电色谱加入色谱的行列；场流分离为生物大分子的分离提供了新的途径等等。21 世纪将是生命科学，材料科学，信息科学的时代，而环境科学又是人们面临的重大课题，色谱法新方法的出现和发展正是服务于这些重要科学领域的新技术。为了生物大分子的分离和纯化，推动了毛细管电泳和全新的高效液相色谱的发展；为了解决药物对映异构体的拆分，发展了各种各样的手性分离介质；为了极微量环境污染物的检测，发展了各种色谱高灵敏检测器；为了适应石油化工的需要，出现了各种高温毛细管气相色谱法方法；为了能高选择性地分离生化分子，发展了选择性极强的亲和色谱柱和方法。

另一方面，为了弥补色谱法定性功能较差的弱点，大力发展了色谱和其他仪器的联用技术，特别是液相色谱和毛细管电泳与电喷雾质谱的联用技术近年已趋于成熟，他将对生物大分子的分离和鉴定发挥极大的作用，因此色谱仪和其他各种仪器的联合使用将成为分析化学的重要领域。

二、各种色谱方法的性能比较

我们这里涉及的色谱分析方法有：气相色谱 (GC)，高效液相色谱 (HPLC)，超临界流体色谱 (SFC)，薄层色谱 (TLC) 和毛细管电泳 (CE)，见表 1-2。

表 1-2 各种色谱方法的性能比较^[12]

色 谱 方 法	GC	HPLC	SFC	TLC	CE
流动相	气体	液体	高密度气体	液体	液体
密度/(g/mL)	0.001	1	0.2~0.3	1	1
扩散系数/(cm ² /s)	1~10 ⁻²	5×10 ⁻⁵ ~10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁵ ~10 ⁻⁶	10 ⁻⁵ ~10 ⁻⁶
使用压力/MPa	≈2.5	≈5	≈13	≈0.1	≈0.1
分子间作用力	无~微	有	弱	有	有
酸碱性	—	有	无~微 (有时改性剂呈酸碱性)	有	有
升温	可以	可以	可以	—	—
驱动方式	压力差	压力差	压力差	毛细现象	电渗流
线速度/(cm/s)	10~50	0.01~0.5	~10	~0.01	~0.5
固定相	粘稠液体 固体吸附剂 键合分子层	固体吸附剂 键合分子层	固体吸附剂 键合分子层	硅胶, 氧化铝, 键合分子层	胶束, 添加剂
扩散系数/(cm ² /s)	10 ⁻⁵ ~10 ⁻⁷	10 ⁻⁵ ~10 ⁻⁷	10 ⁻⁶ ~10 ⁻⁷	10 ⁻⁵ ~10 ⁻⁷	—
膜厚/μm	0.1~10	0.5~5	0.1~5	1 nm	—
分子间作用力	有	有	有	有	有
控制分离的因素					
分子量	分子量小的先流出	GPC 分子量大的先流出			分子量小的先流出
溶质的极性、官能团	有影响	影响大	有影响	影响大	有影响
分子量范围	≈1000	≈10000000	≈10000	≈10000	≈1000000
样品适应性					
气体	可以	—	—	—	—
液体	可以	可以	可以	可以	可以
固体(溶剂可溶的)	可以	可以	可以	可以	可以
专一性样品	气体样品 挥发性液体 异构体 化学安定的样品	液体样品 热不稳定样品 异构体 离子性样品	分子量 10000 左右的齐聚物	液体样品	离子或中性样品, 分子量大的样品
进样量/g	10 ⁻⁹ ~10 ⁻³	10 ⁻⁹ ~10 ⁻¹	10 ⁻⁹ ~10 ⁻³	10 ⁻⁶ ~10 ⁻³	10 ⁻⁷ ~10 ⁻¹³

续表

色 谱 方 法	GC	HPLC	SFC	TLC	CE
色谱柱					
分析用填充柱(内径 × 长)/(cm × cm)	0.2 × 500	(0.4 ~ 0.6) × (5 ~ 25)	(0.4 ~ 0.6) × (5 ~ 25)	平面	
分析用毛细柱(内径 × 长)/(cm × cm)	(0.01 ~ 0.053) × (500 ~ 6000)	(0.05 ~ 0.1) × (20 ~ 50)	(0.005 ~ 0.01) × (50 ~ 30)		(0.005 ~ 0.01) × (20 ~ 70)
检测器					
通用	TCD, FID	示差折光, 蒸发光散射	FID	碘或硫酸显 色	电导
选择性	ECD, FPD,	荧光	UV		UV, 荧光

第六节 有关色谱的中文工具书和 国内外的主要期刊

一、有关色谱的中文工具书

1. 李浩春, 卢佩章. 气相色谱法. 北京: 科学出版社, 1993.
(气相色谱的基础理论)
2. 李浩春主编. 分析化学手册 第二版 气相色谱分析, 北京:
化学工业出版社, 1999
3. 张玉奎主编. 分析化学手册 第二版 液相色谱分析, 北京:
化学工业出版社, 2000
4. 朱良漪主编. 分析仪器手册 北京: 化学工业出版社, 1997

二、国内外主要的色谱期刊

- ①分析化学, 1973 年创刊, 现为月刊, 有一定数量的色谱方面的
论文。
- ②色谱, 1984 年创刊, 现为双月刊, 有关色谱的专业性期刊。
- ③分析测试通报, 1982 年创刊, 现为双月刊, 有一定数量的色
谱方面的论文。
- ④药物分析杂志, 1980 年创刊, 现为双月刊, 有一定数量的色
谱方面的论文。

⑤J. of Chromatography, (荷兰出版的国际性色谱杂志), 1958 年创刊, 原为月刊, 1968 年 (32 卷) 起改为双周刊, 是目前国际上发表色谱文章最多的期刊。

⑥J. of Chromatographic Science (美国出版的国际性色谱杂志), 1963 年创刊, 原名为 J. of Gas Chromatography, 1969 年改为现名, 现为月刊。

⑦J. of High Resolution Chromatography, HRC, (在德国出版的国际性色谱杂志), 1978 年创刊, 现为月刊。开始刊名为 J. of High Resolution Chromatography & Chromatography Communication, HRC & CC) 1989 年改为现名。

⑧Chromatographia, (在德国出版的国际性色谱杂志), 1968 年创刊, 半月刊, 一年有多卷。

⑨J. of Liquid Chromatography & Related techniques, 1978 年创刊, 开始为一年 9 期, 后改为 14 期, 1996 年以前的刊名为: J. of Liquid Chromatography。论文以液相色谱为主, 也有毛细管电泳的论文。

⑩J. of Capillary Electrophoresis, 1984 年创刊, 双月刊。

⑪Analytical Chemistry, (美国化学会出版的分析化学), 1929 年创刊, 现为双周刊, 有一定数量色谱方面的创造性论文。

参 考 文 献

- 1 傅若农, 顾峻岭. 近代色谱分析, 北京: 国防工业出版社, 1998
- 2 H M McNair, International Lab. 1997, (11/12): 34~35
- 3 G Guiochon, Am Lab. 1998, (Sep.): 14~15
- 4 傅若农. 气相色谱近年的进展 (上), 国外分析仪器, 1996, (2): 1~12
- 5 傅若农, 常永福. 气相色谱和热分析技术, 北京: 国防工业出版社, 1989
- 6 傅若农. 国外分析仪器, 1996, (3): 1~11
- 7 傅若农. 国外分析仪器, 1997, (1): 10~20
- 8 傅若农. 国外分析仪器, 1997, (2): 1~10
- 9 傅若农. 国外分析仪器, 1998, (1): 1~8
- 10 傅若农. 国外分析仪器, 1998, (2): 10~17
- 11 傅若农. 国外分析仪器, 1998, (3): 6~17

第二章 色谱法的原理

第一节 色谱分析的基本原理

一、色谱分离的本质^[1]

为了从实际角度理解色谱的基本原理，我们从一个气相色谱分析的实例出发，研究色谱分离的基础和特点^[1]。

1. 气相色谱分离的实例

为了阐明色谱分离的实质，我们举一个最简单的气相色谱分析的例子加以说明。

(1) 苯和环己烷的气相色谱分离条件

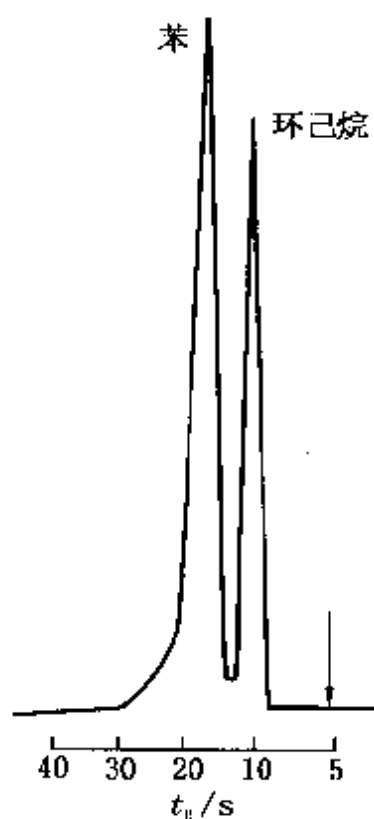


图 2-1 分离苯和环己烷的气相色谱图

色谱柱 50cm × 0.5cm i.d. 不锈钢柱，
在 Celite 载体（100~120 目）上涂渍 EGS
（丁二酸乙二醇聚酯）5%。

分离条件：柱温 90℃

载气 氢气 43 mL/min

检测器 热导池，桥电流
200mA

柱温 100℃

气化室温度 200℃

(2) 色谱图 如图 2-1 所示

2. 气相色谱分离的实质

从以上实例可以看出，苯和环己烷的沸点只差 0.6℃，如用分馏柱进行分离是根本不可能的，可是用气相色谱法只用半米长的色谱柱就可以很容易地把二者分开。这是因为苯和环己烷在丁二酸乙二醇聚酯固定相上

的分配系数有很大的差别。所以分配系数的差异是所有色谱分离的实质性的原因。

分配系数是在一定温度下，溶质在互不溶解的两相间浓度之比。色谱的分配系数是被分离组分在固定相和流动相之间浓度之比，以 K 表示如下式：

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (2-1)$$

式中 C_s ——每 1mL 固定相中溶解溶质的质量；

C_m ——每 1mL 流动相中含有溶质的质量。

表 2-1 中列出了在角鲨烷（异三十烷）固定液上，于 105℃ 下几种烷烃的 K 值。

表 2-1 几种烷烃在角鲨烷上的 K 值

化合物	异戊烷	正戊烷	环戊烷	正己烷	苯	环己烷
K	12.5	15	27	34	51.5	53

二、色谱分离的塔板理论^[2,3]

色谱理论始于 1941 年 Martin（马丁）和 Synge（辛格）建立的“塔板理论”模型，他们是把色谱柱看作一个有若干层塔板的分馏塔，通过物质在每层塔板中进行平衡的物理模型过程，而导引出一个描述色谱流出曲线（图 2-2）的数学表达式：

$$c = \frac{m \sqrt{n}}{V_R \sqrt{2\pi V_R}} \exp \frac{1}{2} n \left(\frac{V_R - V}{V_R} \right)^2 \quad (2-2)$$

式中 c ——色谱流出曲线上任意一点样品的浓度；

n ——理论塔板数；

m ——溶质的质量；

V_R ——溶质的保留体积，即从进样到色谱峰极大点出现时通入色谱柱中载气的体积；

V ——在色谱流出曲线上任意一点的保留体积。

图 2-3 是两个分配系数不同的物质的流出曲线，即色谱图。

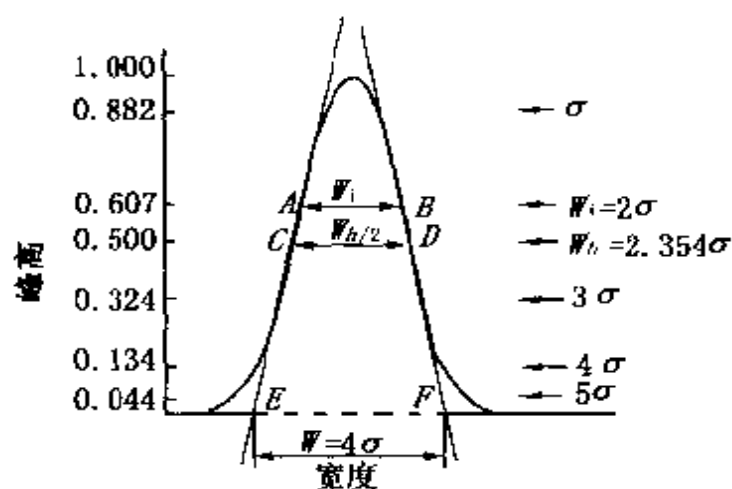


图 2-2 色谱的流出曲线

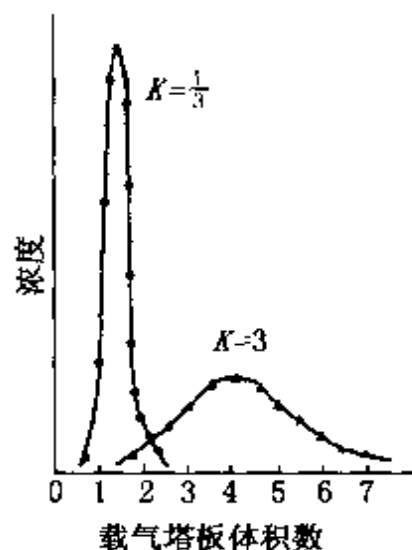


图 2-3 两个物质的流出曲线

第二节 色谱法中常用的术语和参数^[1-4]

一、气相色谱中常用的术语和参数

1. 典型的色谱图

在用热导检测器时，往色谱仪中注入带有少量空气的单一样品时，得到图 2-4 的典型气相色谱图。

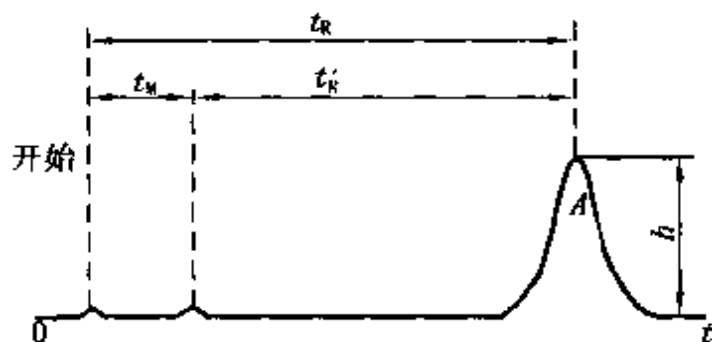


图 2-4 典型的气相色谱图

在图 2-4 中当没有样品进入色谱仪检测器时 $0t$ 是噪声随时间变化的曲线，一般是一条直线，叫作“基线”。 h 是峰高，其他符号将在后边解释。

2. 区域宽度

区域宽度是色谱流出曲线中很重要的参数，它的大小反映色谱柱或所选色谱条件的好坏。区域宽度有以下三种表示方法：

(1) 半高峰宽 (peak width at half height) ($W_{h/2}$) 是在峰高一半处的色谱峰的宽度，即图 2-2 中的 CD ，单位可用时间或距离表示。

(2) 峰宽 (peak width) (W) 是在流出曲线拐点处作切线，在图 2-2

中于基线上相交于 E, F 处, 此两点间的距离叫峰宽, 有些色谱书上叫做‘基线宽度’。

(3) 标准偏差 (σ) 在图 2-2 中 AB 距离的一半叫标准偏差。

在这三种表示方法中以前两者使用较多, 三者的关系是:

$$W = 4\sigma \quad (2-3)$$

$$W_{h/2} = 2\sqrt{2\ln 2}\sigma = 2.354820\sigma \quad (2-4)$$

3. 保留值 (retention value) 保留值是总称, 具体参数的名称有如下一些:

(1) 死时间 (dead time) (t_M) 一些不被固定相吸收或吸附的气体通过色谱柱的时间, 如用热导池作检测器时, 从注射空气样品到空气峰顶出现时的时间, 以 s 或 min 为单位表示。

(2) 死体积 (dead volume) (V_M) 指色谱柱中不被固定相占据的空间及进样系统管道和检测系统的总体积, 等于死时间乘以载气的流速。

(3) 死区域 (dead zone) (V_G) 指色谱柱中不被固定相占据的空间。

(4) 保留时间 (retention time) (t_R) 从注射样品到色谱峰顶出现时的时间, 以 s 或 min 为单位表示。

(5) 调整保留时间 (adjusted retention time) (t'_R) 保留时间减去死时间即为调整保留时间 ($t_R - t_M$)。

(6) 保留体积 (retention volume) (V_R) 从注射样品到色谱峰顶出现时, 通过色谱系统载气的体积, 一般可用保留时间乘载气流速求得, 以 mL 为单位表示。

(7) 调整保留体积 (adjusted retention volume) (V'_R) 保留体积减去死体积即为调整保留体积 ($V_R - V_M$)。

(8) 净保留体积 (net retention volume) (V_N) 经压力修正的调整保留体积,

即:

$$V_N = jV'_R \quad (2-5a)$$

式中 j ——色谱柱进口和出口之间的压力梯度校正系数。

$$j = \frac{3}{2} \left[\frac{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^2 - 1}{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^3 - 1} \right] \quad (2-5b)$$

式中 p_i ——色谱柱进口压力；

p_o ——色谱柱出口压力。

(9) 比保留体积 (specific retention volume) (V_g) 把净保留体积进一步校正到单位质量固定液和 273K 时的保留体积，如下式：

$$V_g = \frac{V_N}{V_L \rho_L} \times \frac{273}{T} \quad (2-6)$$

式中 V_L ——固定液的体积；

ρ_L ——固定液的密度；

$V_L \rho_L$ ——固定液的质量。

(10) 相对保留值 (Relative retention) ($r_{i,s}$) 在一定色谱条件下被测化合物和标准化合物调整保留时间之比。

$$r_{i,s} = t'_{R(i)} / t'_{R(s)} \quad (2-7)$$

式中 $t'_{R(i)}$ ——被测化合物的调整保留时间；

$t'_{R(s)}$ ——标准化合物的调整保留时间。

很多文献用分离因子 (Separation factor) α 来表示相对保留值，

$$\alpha = t'_{R(i)} / t'_{R(s)} \quad (2-8)$$

(11) 保留指数 (Retention index) (I) 保留指数是 1958 年克瓦茨 (Kovats) 提出来的，用以表示化合物在一定温度下在某种固定液上的相对保留值，具体说它是以一系列正构烷烃作标准的相对保留值，其定义如下：

$$I = \frac{\lg t'_{R(x)} - \lg t'_{R(n)}}{\lg t'_{R(n+1)} - \lg t'_{R(n)}} \times 100 + 100n \quad (2-9)$$

式中 t'_R ——某化合物在某一固定液上的调整保留时间；

$t'_{R(n)}$ 、 $t'_{R(n+1)}$ ——在同一固定液上，碳数为 n ，和 $n+1$ 的正构烷烃的调整保留时间，在测定时要求 $t'_{R(n+1)} > t'_{R(x)} > t'_{R(n)}$ ，规定在任何固定液上、任何温度下

正构烷烃的保留指数均为 $100n$ (n 为正构烷烃的碳数)。

(12) 保留指数差 (ΔI) 化合物 x 在某一固定液 s 上测得的保留指数 I_s^x 减去 x 在角鲨烷固定液上得到的保留指数 I_{sq}^x , 即 $\Delta I_s^x = I_s^x - I_{sq}^x$, ΔI_s^x 叫做化合物 x 在固定液 s 上的保留指数差。

【例】 求在 120°C 下正丁醇在 SE-30 固定液上的保留指数差。

在 SE-30 固定液上测得正丁醇的保留指数为 643;

在角鲨烷固定液上测得正丁醇的保留指数为 590。

求得 $\Delta I_{\text{SE-30}}^{\text{butanol}} = I_{\text{SE-30}}^{\text{butanol}} - I_{\text{Sq}}^{\text{butanol}} = 643 - 590 = 53$

4. 容量因子 (Capacity factor) K'

容量因子 (也称为分配容量) 的定义是在平衡状态下组分在固定相与流动相中质量之比, 即

$$K' = K \frac{V_L}{V_G} = \frac{K}{\beta} = \frac{t_R'}{t_M} \quad (2-10)$$

式中 V_L ——色谱柱内固定相的体积;

V_G ——色谱柱内流动相的体积。

从上述定义可导出下列的关系式:

$$K = K' (V_L/V_G) \quad (2-11)$$

$$K = K' / \beta \quad (2-12)$$

$$\beta = V_G/V_L \quad (2-13)$$

(2-12) 式中的 β 叫做“相比率”。其含义是在色谱柱中流动相体积和固定相体积之比。填充柱气相色谱柱的 β 值在 5~35 的范围, 而毛细管气相色谱柱的 β 值在 50~200 的范围。

5. 色谱柱的柱效率和分离度

(1) 柱效率 (Column efficiency) 和溶剂效率 (Solvent efficiency)

色谱理论主要包括两方面的问题, 即柱效率和溶剂效率。柱效率是指溶质通过色谱柱之后其区域宽度增加了多少, 它与溶质在两相中的扩散及传质情况有关, 这是所谓色谱的动力学过程。溶剂效率是与两个物质在固定相上的相对保留值大小有关, 从微观角度讲是与两个物质和固定相 (在液相色谱中还与流动相) 的分子间作用力不同有关。

这是所谓色谱的热力学过程。柱效率常以理论塔板数 (n) 或理论塔板高度 (H) 表示。而溶剂效率是以相对保留值 ($r_{i,s}$) 表示。要提高柱效率, 就得改善色谱柱性能和操作条件; 要提高溶剂效率就得提高固定相的选择性。

(2) 理论塔板数 (n) 的计算和测定 色谱柱的柱效率可以用理论板数 (n), 也可以用理论板高 (HEPT, height equivalent to one theoretical plate) (H) 表示。

$$H = L/n \quad (2-14)$$

式中 L 是色谱柱的柱长, L, H 均以 mm 表示。

计算理论塔板数 (n) 的计算公式是:

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad (2-15)$$

测定理论塔板数 (n) 是在一定的色谱条件下 (即一定的色谱柱, 一定的柱温、流速下), 注入某一测试样品, 记录色谱图, 测定色谱峰的半高峰宽 (或峰宽) 和进样点到色谱峰极大点的距离, 二者的单位要一致。如半高峰宽 ($W_{h/2}$) = 2mm, 进样点到色谱峰极大点的距离 $t_R = 18$ mm, 按公式 (2-15) 计算得

$$n = 5.54 \left(\frac{18}{2} \right)^2 = 449$$

(3) 有效板数 (n_{eff}) 为了消除色谱柱中死体积对柱效的影响, 人们常用有效理论塔板数 (n_{eff}) 表征色谱柱的实际柱效, 按下式计算

$$n_{\text{eff}} = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad (2-16)$$

相应的有效理论塔板高度 (H_{eff}) 为

$$H_{\text{eff}} = L/n_{\text{eff}} \quad (2-17)$$

(4) 溶剂效率 溶剂效率是固定相对某两个混合物分离能力的表征, 即用 $r_{i,s}$ 值表示:

$$r_{i,s} = \frac{K_i}{K_s} = \frac{K'_i}{K'_s} = \frac{t'_{R(i)}}{t'_{R(s)}} = \frac{V'_{R(i)}}{V'_{R(s)}} = \frac{V_{g(i)}}{V_{g(s)}} \neq \frac{t_{R(i)}}{t_{R(s)}} \quad (2-18)$$

$r_{i,s}$ 值又称作分离因子 (α)、"选择性因子", 是描述固定相分离

混合物能力的参数。

(5) 分离度 (Resolution) (R) 分离度又称作分辨率。是把柱效率和溶剂效率结合在一起的参数, 是表示色谱柱在一定的色谱条件下对混合物综合分离能力的指标。在色谱文献中有下列一些表示方法:

①分离度 (R) 如两个物质的峰高相当, 分离度 (R) 是 2 倍的峰顶距离除以两峰宽之和:

$$R = \frac{2(t_{R(2)} - t_{R(1)})}{W_{(1)} + W_{(2)}} \quad (2-19)$$

当 $R = 1$ 时, 两峰的峰面积有 5% 的重叠, 即两峰分开的程度为 95%。当 $R = 1.5$ 时, 分离程度可达到 99.7%, 可视为达到基线分离。

②半高峰宽分离度 ($R_{1/2}$) 和 R 近似, 只是用半高峰宽代替峰宽度。

$$R_{1/2} = \frac{2(t_{R(2)} - t_{R(1)})}{W_{h/2(1)} + W_{h/2(2)}} \quad (2-20)$$

③峰高分离度 (R_h) 当一对被分离物质分离较差时, 可用峰高分离度表示, 用下式进行计算

$$R_h = \frac{h_I - h_M}{h_I} \quad (2-21)$$

h_I 、 h_M 的定义如图 2-5。

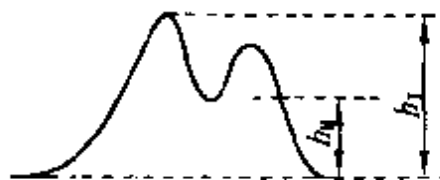


图 2-5 峰高分离度示意图

6. 各色谱参数间的关系

(1) 保留时间和分配容量的关系

$$t_R = t_M(1 + K') \quad (2-22)$$

这是一个在色谱中很重要的公式, 也可以写成下式:

$$t_R = \frac{L}{\bar{u}}(1 + K') \quad (2-23)$$

式中 $\bar{u}$ ——载气的平均流速;

L ——色谱柱柱长。

从(2-23)式可导出

$$K' = \frac{t_R}{t_M} \quad (2-24)$$

(2) 分离度、柱效率和容量因子间的关系 当某一物质对用某一色谱柱进行分离时, 此两物质的 α 和 K' 已知, 要使它们的分离度达到 R , 要求色谱柱的 n_{se} 为

$$n_{\text{se}} = 16R \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + K'}{K'} \right)^2 \quad (2-25)$$

把 (2-25) 改写一下, 又可得到下边的重要公式:

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'}{1 + K'} \right) \quad (2-26)$$

公式 (2-26) 可由前边的公式 (2-16), (2-17), (2-22) 和 (2-25) 导出。

二、液相色谱中常用的术语和参数

在高效液相色谱中有许多术语和参数与气相色谱相同, 下面只就高效液相色谱中特有的一些术语和参数加以说明。

1. 色谱图和保留值

其表示方法和参数与气相色谱几乎完全相同, 只有个别地方的表示略有差别。在高效液相色谱中容量因子用 k' 表示, 如下式:

$$k' = \frac{t_R}{t_M} \quad (2-27)$$

在高效液相色谱中没有比保留体积 (V_g) 和保留指数 (I) 的概念, 而有一些独有的参数^[4]:

(1) 粒间体积 (Interstitial volume) (V_o) 色谱柱填充剂颗粒间隙中流动相所占有的体积。

(2) (多孔填充剂的) 孔体积 (pore volume [of porous packing]) (V_p) 色谱柱中多孔填充剂的所有孔洞中流动相所占有的体积。

(3) 柱外体积 (Extra-column volume) (V_{ext}) 从进样系统到检测器之间色谱柱以外的液路部分中流动相所占有的体积。

(4) 液体总体积 (Total liquid volume) (V_{tot}) 粒间体积, 孔体积和柱外体积之和

$$V_{td} = V_o + V_p + V_{ext} \quad (2-28)$$

(5) 淋洗体积 (Elution volume) (V_e) 从进样开始计算的通过色谱柱的实际淋洗体积。

(6) 流体力学体积 (Hydrodynamic volume) (V_h) 每摩尔的高分子化合物在溶液中运动时所占的体积, 与高分子化合物的相对分子质量和特性粘度的乘积成正比。

2. 和柱效能有关的参数 大部分的参数表示方法和气相色谱相同, 如表示柱效率的理论板数 (n)、理论板高 (H)、有效板数 (n_{eff}) 等, 但在高效液相色谱中也有一些特有的参数:

(1) 折合板高 (Reduced plate height) (h_r) 折合成固定相单位粒径的理论板高。

(2) 折合流动相速度 (v_r) 见后边的 (2-48) 式。

第三节 色谱的速率理论

一、气相色谱速率理论

前面讨论的色谱塔板理论, 由于在建模过程中假定的条件 (溶质在气液两相的分配是瞬间完成的, 在塔板之间无纵向扩散) 和实际的分配过程有较大的差别, 所以这一理论只得到有限的成功, 不能说明和解释更多的实验现象, 也不能很好地指导色谱条件的选择。荷兰的 Van Deemter (范第姆特) 等人在 1956 年在总结前人工作的基础上, 推导出一个把理论板高 (H) 和载气流速联系在一起的公式 (2-29), 并在方程式中包括了在柱中纵向扩散和传质阻力对理论板高 (H) 影响的定量关系。这一关系叫范第姆特方程式, 即速率理论。

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (2-29)$$

式中 A ——涡流扩散项;

B ——纵向扩散项, 或叫分子扩散项;

C ——传质阻力项;

$\bar{u}$ ——载气的平均流速。

如把 (2-29) 式中的每一项写完全即成为

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_G}{u} + \left\{ \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{K'}{(1+K')^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_L} + \frac{0.01K'^2}{(1+K')^2} \cdot \frac{d_p^2}{D_G} \right\} u \quad (2-30)$$

式中 λ 是和色谱柱中载体颗粒大小及分布、填充均匀情况有关的常数， d_p 为载体颗粒的平均直径； γ 为色谱柱中载体填充情况有关的常数， D_G 为溶质在载气中的扩散系数， d_f 为固定液在载体上液膜的平均厚度。

把 (2-29) 和 (2-30) 两式比较一下可知

$$\text{涡流扩散项} \quad A = 2\lambda d_p \quad (2-31)$$

$$\text{分子扩散项} \quad B = 2\gamma D_G \quad (2-32)$$

$$\text{传质阻力项} \quad C = C_l + C_g \quad (2-33)$$

$$C_l = \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{K'}{(1+K')^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_L} \quad (2-34)$$

$$C_g = \frac{0.01K'^2}{(1+K')^2} \cdot \frac{d_p^2}{D_G} \quad (2-35)$$

式中 C_l ——液相传质阻力项；

C_g ——气相传质阻力项。

从式 (2-29) 可以看出，如果载体和固定相已定，而且把固定相已经装到色谱柱中，并安装到一台气相色谱仪上，在一定的色谱条件下把试样注入色谱仪中，那么其柱效率就和所用载气流速呈一双曲线的函数关系，如图 2-6 所示。A, B, C 三项反映载体性质，粒度大小及分布，色谱柱填充好坏，固定液性质、用量、涂渍的好坏等因素对柱效的影响。

(1) 涡流扩散项对色谱峰加宽的影响 涡流扩散项 $A = 2\lambda d_p$ 中， λ 值是和色谱柱中载体颗粒大小及分布、填充均匀情况有关的常数。如果粒度适中，粒

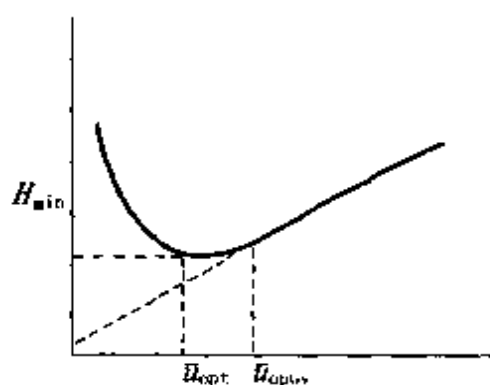


图 2-6 范第姆特方程
式的 $h \propto u$ 曲线

$H_{\min}$ ——最小理论塔板高度；

u_{opt} ——最佳载气流速；

u_{optV} ——实用最佳载气流速

度分布窄，填充又均匀， λ 值就小，因而 A 值也小，柱效就高。 d_p 是载体颗粒的平均直径，单从 $A = 2\lambda d_p$ 看， d_p 越小 A 值也越小。但是， d_p 和 λ 之间又存在一个相互制约关系，根据研究说明当颗粒较大时，装填时容易获得均匀密实的色谱柱，使 λ 减小，这样 d_p 和 λ 之间产生了矛盾。所以为使 A 值减小，要求 d_p 减小，但是它又不能太小，否则 λ 之值会增大，因而要求 d_p 适当地减小，如表 2-2 数据。

为了使 λ 和 d_p 之间得到协调，载体的粒度一般在 100~120 目左右为佳。例如有人使用 80~100 目的载体代替 35~50 目的载体，柱效可提高 3 倍。

经过进一步的研究得到这样的认识：对于小直径色谱柱（分析柱），载体颗粒度大小是主要矛盾；对于大直径柱（制备色谱柱），载体均匀性是主要矛盾。

表 2-2 载体粒度对 λ 的影响

λ	d_p/mm	粒度/目	$2\lambda d_p/\text{mm}$
1	0.4~0.8	20~40	0.12
3	0.15~0.3	50~100	0.14
8	0.04~0.07	200~400	0.09

在经典的范第姆特方程式中， $A = 2\lambda d_p$ 项与载气流速无关，但是许多研究者进一步研究认为，涡流扩散项和载气流速有一定的关系，Giddings 把这一项改为

$$A = \left(\frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{1}{C_G u} \right)^{-1} \quad (2-36)$$

Giddings 修改后的方程叫偶合方程，因为 (2-36) 式和计算并联电阻阻值的偶合公式类似。

(2) 分子扩散项对色谱峰加宽的影响 当载气带着溶质分子进入色谱柱中，在柱内形成一个高浓度带，根据扩散原理溶质就要从高浓度处向低浓度处扩散，这就是分子扩散或纵向扩散，于是就导致了色谱峰的加宽。从 $B = 2\gamma D_G$ 可知， γ 和 D_G 减小可使 B 降低。 γ 是和色谱柱中载体填充情况有关的常数，如为毛细管柱 $\gamma = 1$ ，用硅藻土

载体填充的色谱柱 $\gamma \approx 0.5 \sim 0.7$ 。因此在 γ 为定值的情况下, B 值主要决定于 D_G 的大小。 D_G 可用下式 (2-37) 估算

$$D_{AB} = \frac{T^{3/4} \left(\frac{1}{M_A} + \frac{1}{M_B} \right)^{0.5} \cdot 10^{-3}}{p (v_A^{1/3} + v_B^{1/3})^2} \quad (2-37)$$

式中 T ——热力学温度;

M_A, M_B ——气体 A 和 B 的摩尔质量;

p ——总压力;

v_A, v_B ——气体 A 和 B 的摩尔体积 (此值有加和性, 可以由计算得到)。

要使分子扩散项减小, 就应该用扩散系数小的重载气, 但是轻载气有利于提高热导检测器的灵敏度, 并可减小在气相中的传质阻力, 反而有利于提高柱效。因此 B 是一项相互矛盾的参数。

(3) 传质阻力项对色谱峰加宽的影响 气液色谱固定相是把固定

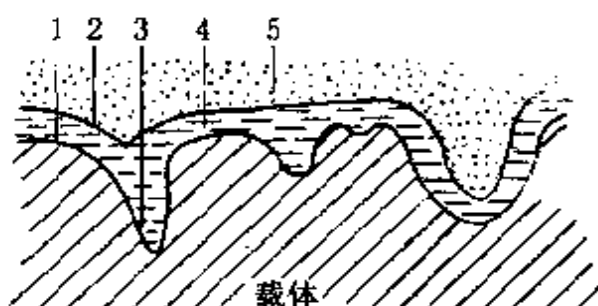


图 2-7 涂渍了固定液的载体

1—液固界面; 2—固定液液膜; 3—毛细深孔和渗入的固定液; 4—气液界面; 5—载气

液涂渍在载体表面和微孔中, 由于毛细管的吸附作用, 有些固定液凝聚在细小而较深的孔洞中, 如图 2-7。如果载体表面有比较多的毛细深孔, 那么在载体表面上的固定液膜厚不均匀, 增加了溶入和挥发出来的时间, 即增加了液相传质阻力, 使色谱峰加宽。

(4) 影响液相传质阻力项 (C_l) 的因素

①分配比例 K' 的影响 如把 $K' / (1 + K')^2$ 随 K' 的变化曲线画出来, 由曲线变化可知, 当 $K' < 1$ 时, $K' / (1 + K')^2$ 随 K' 的增加而增加, 当 $K' = 1$ 时, 达到极大值, 即 0.25; 而在 $K' > 1$ 时, $K' / (1 + K')^2$ 随 K' 的增加而迅速下降。所以 $K' > 2$ 后有利于 C_l 的降低。

②液膜厚度 d_f 的影响 因为 C_l 和 d_f^2 成比例关系, 所以液膜厚度略有增加, 就会使 C_l 明显的增加, 从而使色谱峰明显加宽。

③液相扩散系数的影响 C_l 随 D_l 的增加而降低, 所以希望所用固定液的粘度要小一些, 因为粘度小 D_l 就会增大, 有利于提高柱效。

(5) 影响气相传质阻力项 (C_g) 的因素

① β 值的影响 在使用填充柱时, 即它的 β 值 (气相与液相体积比) 较小时, C_g 与 C_l 相比要小的多, 传质阻力主要是 C_l 起作用, 但在使用毛细管柱时, 其 β 值常常有较大的数值 (如 100), 此时 C_g 与 C_l 就会同时都起作用, C_g 有不可忽视的影响。当 β 值小于 20 时 $h_{\min}$ 随 K' 的变化曲线有一个极大点, 在极大点之后 K' 增加 $h_{\min}$ 值就逐渐减小。

②分配比例 K' 的影响 在 (2-35) 式中, 随 K' 的增加 $K'^2/(1+K')^2$ 值增大, 在 $K'=10$ 以前迅速增大, 但在 $K'>10$ 以后就变化不大了。一般在毛细管气相色谱中 K' 在 2 左右为宜。

(6) 色谱柱几何尺寸对色谱峰加宽的影响 Giddings 在 1964 年对范第姆特方程式进行了修正, 增加了一项色谱柱几何尺寸对色谱峰加宽的影响, 即

$$H = A + \frac{B}{u} + C\bar{u} + \frac{7\bar{u}r_0^4}{12R_0^2\gamma D_G} \quad (2-38)$$

式中 r_0 , R_0 ——色谱柱内半径和色谱柱螺管半径;

D_G , γ ——定义同前。

从式 (2-38) 可知要提高柱效色谱柱内半径要小, 而色谱柱螺管半径要大。

二、液相色谱速率理论^[5]

1. 高效液相色谱的速率理论方程

在液相色谱中速率方程以下式 (2-39) 表示:

$$H = Au^{0.33} + B/u + Cu + Du \quad (2-39)$$

其中涡流扩散项为

$$C_e d_p \quad (2-40)$$

流动相传质阻力项是

$$C_m d_p^2 u / D_m \quad (2-41)$$

$$C_e d_p + C_m d_p^2 u / D_m = Au^{0.33} \quad (2-42)$$

纵向扩散项是 $C_d D_m / u \approx B / u$ (2-43)

停滞流动相扩散项是 $C_{sm} d_p^2 u / D_m \approx Cu$ (2-44)

固定相传质阻力项是 $C_s d_f^2 u / D_s \approx Du$ (2-45)

从式 (2-39) 到式 (2-44) 中, C_e 、 C_m 、 C_d 、 C_{sm} 、 C_s 是理论塔板高度系数, d_p 是填料平均粒径, d_f 是固定相膜厚, u 是流动相流速, D_s 是在固定相中的扩散系数, D_m 是在流动相中的扩散系数, A 、 B 、 C 、 D 是给定的柱常数。

当一支填充很好的色谱柱, 填料的粒径又比较大, 其固定相的膜厚 d_f 也很小, 使 $D=0$; B/u 一项也很小, 式 (2-39) 可简化为

$$H = Au^{0.33} + Cu \quad (2-46)$$

如果色谱柱填充不好, 如填料颗粒之间不均匀、不密实, 就会使 C_e 、 C_m 增加, 从而使涡流扩散项 A 增加, 导致柱效下降。所以色

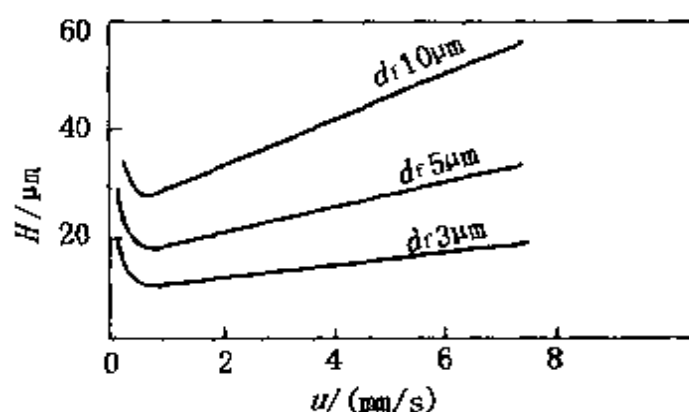


图 2-8 不同粒径 ODS 填料
色谱柱的 $H \sim u$ 曲线

谱柱的填充技术直接影响柱效的发挥。早期高效液相色谱的固定相用涂渍的方法制备, 液膜厚度 d_f 大, 这和气相色谱柱一样, 会大大降低色谱柱的柱效。现代高效液相色谱填料多使用键合固定相, 其固定相膜很薄, 因而大大提高了柱效。从 $C_{sm} d_p^2 u / D_m$ 项可知, 使用小粒径填料, 其 d_p 值小

(如 $5\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$) 可以使柱效大幅度提高。如图 2-8 是不同粒径 ODS 填料成色谱柱的 $H \sim u$ 曲线。

2. 高效液相色谱的折合参数

在高效液相色谱中 Giddings 提出折合参数, 即折合板高和折合流动相速度。

① 折合板高 (h_r) 用下式表示:

$$h_r = \frac{H}{d_p} \quad (2-47)$$

式中符号见前面的定义。

②折合流动相速度 (v_r) 用下式表示:

$$v_r = \frac{ud_p}{D_m} \quad (2-48)$$

用折合参数表示的速率理论方程如下:

$$h_r = \frac{1}{\frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_m v_r}} + \frac{C_d}{v_r} + C_{sm} v_r \quad (2-49)$$

式中, C_e 、 C_m 、 C_d 、 C_{sm} 是取决于色谱柱填充好坏的常数。性能优良的色谱柱这些参数的值很小, 而且与填料的粒径无关。因此, 对于任何一支好的色谱柱, 其 $h_r \sim v_r$ 曲线应基本相同。不过对薄壳型填料 C_{sm} 基本等于零, 对多孔型填料 C_{sm} 有一确定值, 所以对好的高效液相色谱柱有两条 $h_r \sim v_r$ 的曲线, 如图 2-9 所示。这两条理想曲线的方程式见式 (2-50) 和 (2-51)。

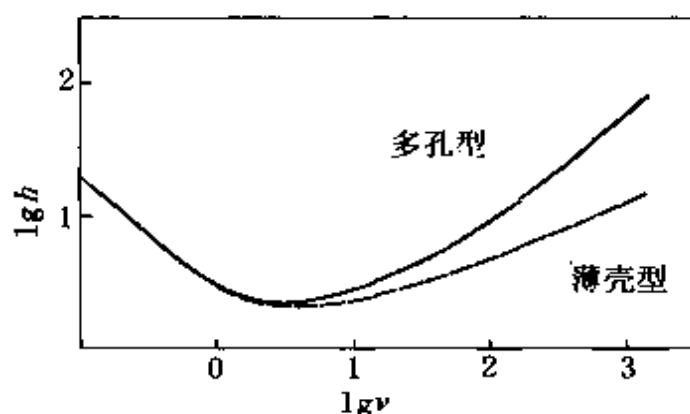


图 2-9 多孔和薄壳型填料的折合板高与折合流速的关系

用于薄壳型填料
$$h_r = v_r^{0.33} + \frac{2}{v_r} + 0.003 v_r \quad (2-50)$$

用于多孔填料
$$h_r = v_r^{0.33} + \frac{2}{v_r} + 0.05 v_r \quad (2-51)$$

3. 其他速率理论的表达方式

①吉汀斯的速率理论方程^[6] 1961年吉汀斯 (Giddings) 对范第姆特方程做了修正, 认为流动相流速对涡流扩散项是有影响的, 他的速率理论方程如式 (2-52)。

$$H = \frac{A}{1 + \frac{E}{u}} + \frac{B}{u} + Cu \quad (2-52)$$

式中的 $\frac{A}{1 + \frac{E}{\bar{u}}}$ 即相当于 (2-36) 式的 $\left(\frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{1}{C_G \bar{u}} \right)^{-1}$ 。

②Huber 的速率理论方程^[7] Huber 于 1967 年又进一步把吉汀斯方程修改为式 (2-53)。

$$H = \frac{A}{1 + \frac{E}{\bar{u}^{0.5}}} + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} + D\bar{u}^{0.5} \quad (2-53)$$

式中, A 、 B 、 C 、 D 、 E 均为常数。这些方程适用于各种色谱。

③Horvath 率理论方程^[8] 1976 年哈瓦施 (Horvath) 和 Lin 把哈伯的速率理论方程修正为

$$H = \frac{A}{1 + \frac{E}{\bar{u}^{1/3}}} + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} + D\bar{u}^{2/3} \quad (2-54)$$

式中, A 、 B 、 C 、 D 、 E 均为常数。这一方程适用于各种色谱。

④Knox 率理论方程^[9] 1976 年 Knox 等提出率理论的折合参数方程:

$$h_r = \frac{H}{v_r} + A v_r^{1/3} + C v_r \quad (2-55)$$

参 考 文 献

- 1 傅若农, 常永福, 气相色谱和热分析技术, 北京: 国防工业出版社, 1989
- 2 李浩春, 卢佩章, 气相色谱法, 北京: 科学出版社, 1993
- 3 塞德才 A S, 色谱理论与数学, 北京: 烃加工出版社, 1981
- 4 GB 9008—88 液相色谱法术语, 北京: 标准化出版社, 1988
- 5 [美] 斯奈德 L R, 柯克兰 J J, 陈新民, 高虹译, 现代液相色谱法导论, 第二版, 北京: 化学工业出版社
- 6 Giddings J C, J Chromatogr. 1961, 5: 46
- 7 Huber J F K, et al. Anal Chim Acta. 1967, 38: 305
- 8 Horvath C, Lin H J, J Chromatogr. 1976, 149: 401
- 9 Knox J H, et al, J Chromatogr Sci. 1972, 10: 549

第三章 色 谱 仪

第一节 气相色谱仪

一、气相色谱仪的主要部件^[1,2]

1. 气相色谱仪的流程

气相色谱仪主要部件的流程图见图 3-1。

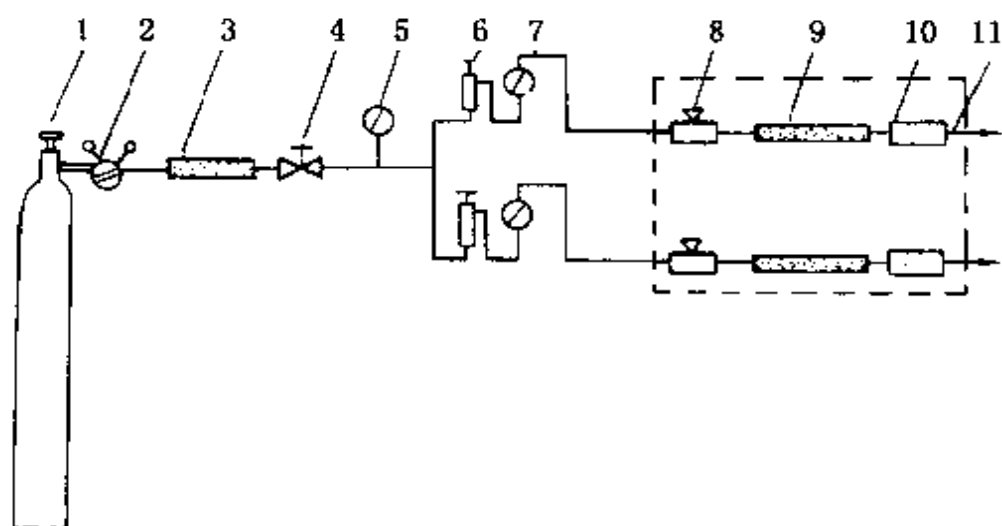


图 3-1 双气路填充柱气相色谱仪流程

1—高压气瓶（载气）；2—减压阀（氢气表或氧气表）；3—净化器；

4—稳压阀；5—压力表；6—针阀或稳流阀；7—压力表；

8—气化室；9—色谱柱；10—检测器；11—恒温箱

2. 仪器的主要部件

(1) 气路系统的部件 气相色谱仪的流动相多用高压气瓶做气源，经减压阀把气瓶中 15 MPa 左右的压力减低到 0.2~0.5 MPa，通过净化器（一般为 20~25 cm × 4 cm i.d. 的金属管或塑料管，内装 5A 分子筛，除去载气中的水分和杂质）到稳压阀，保持气流压力稳定。程序升温用气相色谱仪，还要有稳流阀，以便在柱温升降时可保持气

流稳定。压力表或流量计可指示载气的流量或流速。气化室是为液体或固体样品进行气化的装置。毛细管气相色谱仪与填充柱气相色谱仪不同之处是进样系统复杂,如在气化室中装分流/不分流系统,使用冷柱头进样系统。另外在毛细管色谱柱末端进入检测器时还要增加一个补充气的管线以保证检测器正常工作。

(2) 电路系统部件 气相色谱仪电路部件通常有电源部件、温控部件和微电流放大器等部件。电源部件,对仪器的检测系统、控制系统和数据处理系统各部件提供稳定的直流电压,同时也对仪器的各种检测器提供一些特殊的稳定电压或电流,以便获得稳定的电压,磁场或电流。温控部件、程序升温部件是对气相色谱仪的柱箱、检测器室和气化室或辅助加热区进行控制,它们将色谱仪中的气化室,柱箱及检测器室或辅助加热区控温在一定的范围。程序升温操作在气相色谱中经常使用。微电流放大器把检测器的信号放大,以便推动记录仪或数据处理系统工作。

(3) 检测器 研究过的气相色谱检测器有二三十种,但是在商品仪器上常用的气相色谱检测器只有六七种:

①热导检测器(TCD) 是基于各种物质有不同的导热系数而设计的检测器。

②氢火焰离子化检测器(FID) 是气相色谱中最常用的一种检测器。它的敏感度高,线性范围宽,易于掌握,应用范围广,特别适合于毛细管气相色谱使用。

③电子俘获检测器(ECD) 是一种用 ^{63}Ni 或氡做放射源的离子化检测器,它是气相色谱检测器中灵敏度最高的一种选择性检测器,在气相色谱仪中应用范围仅次于TCD和FID,占第三位。

④火焰光度检测器(FPD) 是基于样品在富氢火焰中燃烧,使含硫、磷化合物经燃烧后又被氢还原而得到特征光谱的检测器。

⑤热离子检测器(TID) 又称氮磷检测器(NPD),它是在FID的喷嘴和收集极之间放置一个含有硅酸铷的玻璃珠。适于测定氮、磷化合物的选择性的检测器。

⑥光离子化检测器(PID) 是利用紫外光能激发解离电位较低

($<10.2\text{ eV}$) 的化合物, 使之电离而产生信号的检测器。

气相色谱检测器的结构、性能和特点将在本丛书的专著详细论述。

(4) 数据处理系统 记录仪和色谱处理系统是记录色谱保留值和峰高或峰面积的设备, 记录仪就是常用的自动平衡电子电位差计, 它可以把从检测器来的电压信号记录成为电压随时间变化的曲线, 即色谱图。数据处理系统或色谱工作站是一种专用于色谱分析的微机系统。计算积分器则是现今更为普遍使用的色谱数据处理装置, 这种装置一般包括一个微处理器、前置放大器、自动量程切换电路、电压-频率转换器、采样控制电路、计数器及寄存器、打印机、键盘和状态指示器等。

有关数据处理系统的详细论述将再本丛书的专著中阐述。

3. 主要部件的结构和性能

(1) 气路系统各部件的结构和性能 稳定而可调节的气流是气相色谱仪正常运转的保证, 所以气路系统的各部件都是为提供稳定而具有一定流量(流速)载气气流的部件。

①气源 是气相色谱仪载气和辅助气的来源, 可以是高压气体钢瓶、氢气发生器及空气压缩机。通常使用的载气有氮气、氢气、氦气、氩气。TCD 多用氦气或氢气, FID 多用氢气、氦气或氮气。ECD 多用氮气或氩气(混以 5% 的甲烷气)。辅助气为空气、氮气等, 空气可以用空压机或压缩空气钢瓶。做载气的氢气可以用氢气发生器, 也可以用氢气钢瓶。在使用高压钢瓶时要通过一个减压阀把 10MPa 以上的压力减到 0.5MPa 以下。

②减压阀 用于氢气的减压阀俗称氢气表, 用于氮气、氧气的叫氧气表。

③稳压阀 又称压力调节器, 其功能是为它后边的针形阀提供稳定的气压, 为稳流阀提供恒定的参考压力。

④稳流阀 在程序升温气相色谱仪中为了在柱温变化时保持载气流速不变要装稳流阀。

⑤填充柱进样系统 填充柱的进样分为常压气体进样和液体进样。

常压气体样品可以用医用注射器 ($100\mu\text{L} \sim 5\text{mL}$) 进样, 简单、灵活, 其缺点是误差大, 偏差在 5% 左右。气体进样多用六通阀定体积进样, 这种方法操作方便、进样迅速、结果准确, 偏差较小, 只有 0.5% 或更低。液体进样一般是通过气化室把溶剂和样品转化为蒸气进入色谱柱中, 液体进样系统有多种多样。

二、气相色谱检测器的性能

表 3-1 中列出了几种常用检测器的性能和特点。更详细的介绍请参阅本丛书中的《气相色谱检测方法》一书。

表 3-1 常用气相色谱检测器性能比较

检测器	响应特性	噪声水平/ A	基流/ A	敏感度/ (g/s)	线性范围	响应时间/ s	最小检测量/ g
TCD	浓度型	$0.005 \sim 0.01 \text{ mV}$	无	$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ g/mL}$	$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	< 1	$1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-8}$
FID	质量型	$1 \sim 5 \times 10^{-14}$	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-12}$	$< 2 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$	< 0.1	$< 5 \times 10^{-13}$
ECD	一般为浓度型	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-12}$	$^3\text{H}_2: > 1 \times 10^{-8}$ $^{63}\text{Ni}: > 1 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-14} \text{ g/mL}$	$1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 与操作方式有关	< 1	1×10^{-14}
FPD	测磷为质量型, 测硫与浓度平方成正比	$1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-10}$ (与光电倍增管有关)	$1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-9}$ 与光电倍增管有关	磷: $\leq 1 \times 10^{-12}$ 硫: $\leq 5 \times 10^{-11}$	磷: $> 1 \times 10^3$ 硫: 5×10^2 (在双对数座标纸上)	< 0.1	$< 1 \times 10^{10}$
TID	质量型	$\leq 5 \times 10^{-14}$	$< 2 \times 10^{-11}$	氮: $< 1 \times 10^{-13}$ 磷: $< 1 \times 10^{-14}$	$10^4 \sim 10^5$	< 1	$< 1 \times 10^{-13}$
PID	质量型	$1 \sim 5 \times 10^{-14}$	$< 1 \times 10^{-10}$	1×10^{-13}	$1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$	< 0.1	$< 1 \times 10^{-11}$

三、气相色谱仪的生产厂家^[4]

自从 1955 年第一台商品气相色谱仪问世以来经过 40 多个春秋,气相色谱仪已经成为十分普及的仪器,所以国外有五六十个厂家供应各种类型的气相色谱仪;国内有 10 多个厂家供应不同类型及不同用途的气相色谱仪。

北京分析仪器厂是我国建国初期 156 项重大工程之一,是我国气相色谱仪主要生产厂家之一。上海分析仪器厂曾经是另外一家生产气相色谱仪的大厂。这两大厂家生产的仪器遍布全国。此外,南京分析仪器厂、四川仪表九厂、鲁南化工仪器厂、北京东西电子仪器研究所等也有较多的实验室用和流程用气相色谱仪供应市场。近年一些科研院所、大学所属的工厂也加入气相色谱仪生产的行列,航天工业部北京东方仪器厂、科学院科学仪器厂、上海科技大学科技开发总公司等单位也有少量仪器面世,见表 3-2。在国内几个有较大影响的国外公司所生产的气相色谱仪产品型号和特点列于表 3-3 中。

表 3-2 当前国内主要生产气相色谱仪的厂家及仪器型号

序号	厂 家	典型仪器型号	仪 器 的 特 点
1	北京北分瑞利分析仪器(集团)公司	SP-3400	仿瓦里安公司 3400 产品,性能同原产品
		SP-3420	国产化的 3400
		SP-3430	专用于分析酒的填充柱气相色谱仪
		SP-3440	专用于分析酒的毛细管气相色谱仪
		SP-3600	毛细管气相色谱仪
2	北京东西电子技术研究所	GC-4000	实验室用气相色谱仪
3	四川仪表九厂	SC-200 SC-2000	实验室用气相色谱仪
4	鲁南瑞虹化工仪器公司	SP-6800 SP-6801	实验室用气相色谱仪
5	上海科创色谱仪器公司	GC-900	实验室用气相色谱仪
6	南京分析仪器厂	CX-6800	防爆型箱体结构,用微机进行程序控制直接显示和打印出被测组分浓度值及单位。配 TCD 或 FID 可测气体、蒸气或液体

续表

序号	厂 家	典型仪器型号	仪 器 的 特 点
7	上海天美科学仪器公司	7890I 7890II	实验室用气相色谱仪
8	温岭福立分析仪器公司	GC-9790	实验室用气相色谱仪

表 3-3 在中国有影响的生产品相色谱仪的外国厂家

序号	厂 家	典型仪器型号	仪 器 的 特 点
1	Hewlett-Packard Co 惠普公司	HP-5890- II HP-6890 HP-4890 HP-4890D HP-6850	柱温可达 450℃, 有体积为 2.5 μ L 的单丝热导检测器 HP-6890 是最新一代产品 单通道简易型(保持 HP-5890 的性能) 双通道简易型(保持 HP-5890 的性能) 单通道最新一代产品
2	Perkin-Elmer Corp	8600 8700 AutoSystem VL	单通道气路 双通道气路可同时进样, 温达 420℃, 柱温可达 500℃ 柱有仪器自检功能, 结构紧凑, 可与离子阱质谱联用
3	Varian Instrument Group 瓦里安公司	3400, 3600 GC Star SP-3800	柱温 400℃, 体积小功能较全 最新一代多功能气相色谱仪
4	日本岛津公司	GC-14A GC-17A	专用于毛细管气相色谱的最新产品
5	Fison Instruments Carlo Erba 卡劳尔巴	(Mega)5000 系列	标准型柱温 420℃, 高温型柱温可达 500℃, 可与 SFE 及 HPLC 联用
6	Philips Analytical Chromatography	PU4410	柱温可达 450℃, 有多维色谱系统
7	HNU System, Inc	321 311	柱温 300℃, 可带电导和远紫外检测器, 柱温 200℃, 只带光离子化检测器

四、典型气相色谱仪性能

以惠普公司最新的 6890 + 气相色谱系统为例^[8], 它的主要性能

如下：

HP 6890 + 气相色谱系统

柱箱

尺寸 28cm × 31 cm × 16cm

操作温度范围 环境温度以上 4~450℃

- 80~450℃ (用液氮)

- 55~450℃ (用液态二氧化碳)

温度设定分辨率 1℃

最大升温速率 120℃/min (实际速率决定于温度和电压)

最大运行时间 999.9 min

程序温度的阶数/平台 6/7

环境干扰 <0.01℃/℃

两通道标准 柱流失补偿

进样口 (最多装两个进样口)

填充柱吹扫 (电子或手动压力和流量控制)

最高操作温度 400℃

压力设定范围 0~100 psi (1psi = 6.89kPa)

总流量设定范围 0~100 mL/min

分流/不分流 (电子或手动压力和流量控制)

最高操作温度 400℃

压力设定范围 0~100 psi (0~150 psi 选择)

总流量设定范围 0~200 mL/min, N₂

0~1000 mL/min, H₂ 或 He

程序升温 柱头冷却 (只有电子压力和流量控制)

最高操作温度 400℃

压力设定范围 0~100 psi

总流量设定范围 0~100 mL/min

程序升温气化室 (只有电子压力和流量控制)

最高操作温度 450℃

温度程序速度 3 阶

每阶温度速度 (0.1~120)℃/min

总流量设定范围 0~200 mL/min, N₂

0~1000 mL/min, H₂ 或 He

低温冷却液 液氮 (到 -160°C)

液态 CO_2 (到 -65°C)

检测器 (所有检测器都有对检测器气体的电子开/关)

氢火焰离子化检测器 (电子或手动压力/流量控制)

提供填充柱/毛细管柱或优化的毛细管柱

最高操作温度 450°C

采集数据速度 到 200 Hz

自动点火 可以, 用键盘或化学工作站, N_2 作载气 ($< + / - 10\%$)

火焰检测 可以

最小检测限 (MDL) $< 5\text{ pg C/s}$, 以丙烷测定, N_2 作载气, 喷口内径 0.29 mm

动态线性范围 10^7 ($< + / - 10\%$) N_2 作载气, 喷口内径 0.29 mm

热导检测器 (电子或手动压力/流量控制)

最高操作温度 400°C

最小检测限 (MDL) $< 400\text{ pg /mL}$ 丙烷, He 作载气 (MDL 受实验室环境的影响)

动态线性范围 10^5 ($< + / - 5\%$)

HP 6890 Micro-ECD (微型电子捕获检测器) (只有电子压力和流量控制)

装有隐形阳极, 柱停留, 和高流速装置, 有很高的稳定性

最高操作温度 400°C

采集数据速度 到 50 Hz

最小检测限 (MDL) $< 0.008\text{ pg}\cdot\text{C/s}$ 高丙体 666

动态线性范围 $> 10^4$ 对高丙体 666

放射源 $< 5\text{ mCi } ^{63}\text{Ni}$ 箔

电子捕获检测器 (电子或手动压力和流量控制)

装有阳极吹扫设施减少污染

最高操作温度 400°C

最小检测限 (MDL) $< 0.4\text{ pg}\cdot\text{C/s}$ 高丙体 666

动态线性范围 $> 10^4$ 对高丙体 666

放射源 $15\text{ mCi } ^{63}\text{Ni}$ 片

补充气 含 5% 甲烷或氮的氩

氮磷检测器 (电子或手动压力和流量控制)

提供填充柱/毛细管柱或优化的毛细管柱

最高操作温度 400℃

最小检测限 (MDL) $< 0.4 \text{ pg/s}$ (对 N), $< 0.4 \text{ pg/s}$ (对 P), 用偶氮苯和马拉硫磷混合物

动态线性范围 $> 10^5 \text{N}$, $> 10^5 \text{P}$, 用偶氮苯和马拉硫磷混合物

灵敏度 35 000:1 (N 与 C 的质量比), 75 000 (P 与 C 的质量比) 用偶氮苯和马拉硫磷混合物

火焰光度检测器 (只有电子压力和流量控制)

有单波长和双波长方式

最高操作温度 250℃

最小检测限 (MDL) $< 20 \text{ pg/s}$ (对 S), $< 0.9 \text{ pg/s}$ (对 P), 用十二硫醇和磷酸三丁酯混合物

灵敏度 1,000:1 (S 与 C 的质量比), 10,000:1 (P 与 C 的质量比), 十二硫醇和磷酸三丁酯混合物

五、便携式气相色谱仪^[9]

惠普公司 1998 年推出了一种用于石油工业和环境分析用的便携式气相色谱仪, 仪器小巧, 其特点是:

- ①进样系统是以微机械工艺光刻在硅片上, 只有不到 4cm 长。
- ②热导检测器也是以微机械工艺光刻在硅片上, 内腔只有 220nL, 灵敏度可变。
- ③可以装多种色谱柱, 如:
 - 1) Hay SepA 柱, $25\text{cm} \times 0.5\text{mm i.d.}$ 填充柱, 用于分析 C_1 到 C_3 的烃类;
 - 2) 5A 分子筛 PLOT 柱, $4\text{m} \times 0.32 \text{ mm i.d.}$, $30\mu\text{m}$ 多孔层柱, 用于分析永久性气体 (H_2 , O_2 , N_2 , CO , CH_4);
 - 3) OV-1 柱, $4\text{m} \times 0.15\text{mm i.d.}$, $1.2\mu\text{m}$, 用于分析 $> \text{C}_3$ 的非极性烃类。

第二节 高效液相色谱仪

一、高效液相色谱仪的流程

现代高效液相色谱仪的示意图如图 3-2 所示,这是一种简单的高效液相色谱仪,它由三个最主要的部件组成,即泵、色谱柱和检测器。泵是提供流动相移动的驱动力,图中的 3,4,5 是为得到干净、平稳、一定压力的流动相的辅助部件,一台高效液相色谱仪中泵是极为重要的部件,它和气相色谱仪的载气气源相同。色谱柱是高效液相色谱仪的核心,被分离的混合物是否能分离好决定于色谱柱的优劣,而色谱柱的好坏又取决于固定相的分离能力,所以高效液相色谱发展,固定相的研究一直是人们十分关注的课题。检测器是色谱仪的耳目,检测器的功能影响高效液相色谱仪的应用范围、灵敏度、定量精密度等重要性能,所以检测器的研究和改进也一直是高效液相色谱仪研究的重要项目。当然为了能分离极性范围宽的混合物,要采用梯度洗脱装置。为了使一台高效液相色谱仪能有效地、可重复地、甚至自动化地工作,还必须配以相应的电子器件和计算机进行控制和作数据处理。

二、现代高效液相色谱仪的性能^[3]

对现代高效液相色谱仪提出下列要求。其特点在于高分离性能、

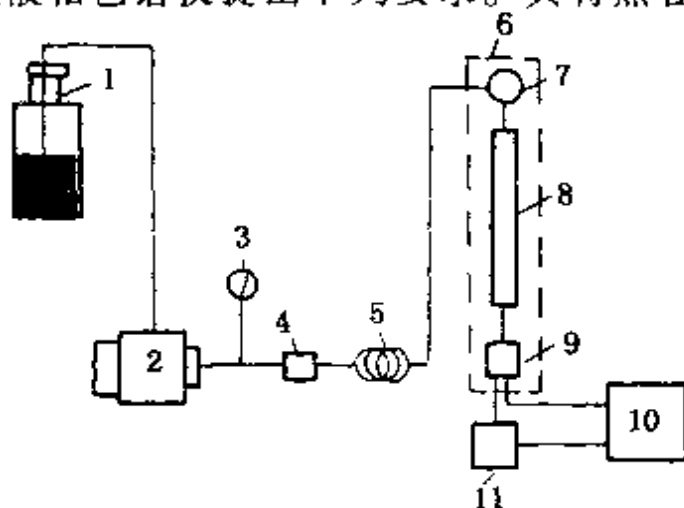


图 3-2 高效液相色谱仪示意图

1—流动相贮罐;2—泵;3—压力表;4—过滤器;5—脉冲阻尼;6—恒温箱;
7—进样器;8—色谱柱;9—检测器;10—记录仪;11—数据处理器

高灵敏度、高分析速度、可以自动化运行。

对高效液相色谱系统性能的要求：应用面宽；分析速度快；重复性好；灵敏度高。

对高效液相色谱系统的要求：

①可以测定多种样品；

②有高选择性的色谱柱，高流动相速度，记录速度快，数据处理自动化；

③各种操作条件可以精密控制和设定；

④有高灵敏度的检测器。

对高效液相色谱设备的要求：

①使用抗化学腐蚀的材料，有各种检测器，各种色谱柱；

②高性能高压泵，进样器、检测器和管线的死体积小，有快速记录和数据处理的设备；

③可精确控制色谱柱、检测器的温度，流动相的组成和流量；

④高的信噪比的检测系统。

三、高效液相色谱仪的主要部件

1. 流动相贮罐

分析用高效液相色谱仪的流动相贮罐，常使用 1L 的锥形瓶加一个电磁搅拌器，在连接到泵入口处的管线上时要加一个过滤器（例如 $2\mu\text{m}$ 的过滤芯），以防止溶剂中的固体颗粒进入泵内。为了使贮罐中的溶剂便于脱气，溶剂罐中常需要配备加热器、搅拌器和抽真空及吹入惰性气体的装置。脱去流动相中的溶解气体是非常必要的，尤其是用水和其他极性溶剂做流动相时，脱气更为重要（特别是在梯度洗脱时）。为了防止在检测器中产生气泡，可在装流动相贮罐中于强烈搅拌下抽真空几分钟。加热可提高抽气效率。不管用什么方法脱气，以不使流动相混合物浓度发生变化为原则。以氦气彻底吹扫流动相，被认为是较好的脱气办法。为了减少流动相和固定相可能发生的反应，除去流动相中的氧也是很必要的。用氦气吹扫流动相可以除去其中的痕量氧气。脱气后的流动相液面上应保持有惰性气体，这样可以防止氧再次溶解到流动相中，还可以避免易燃溶剂蒸气着火。图 3-3 是

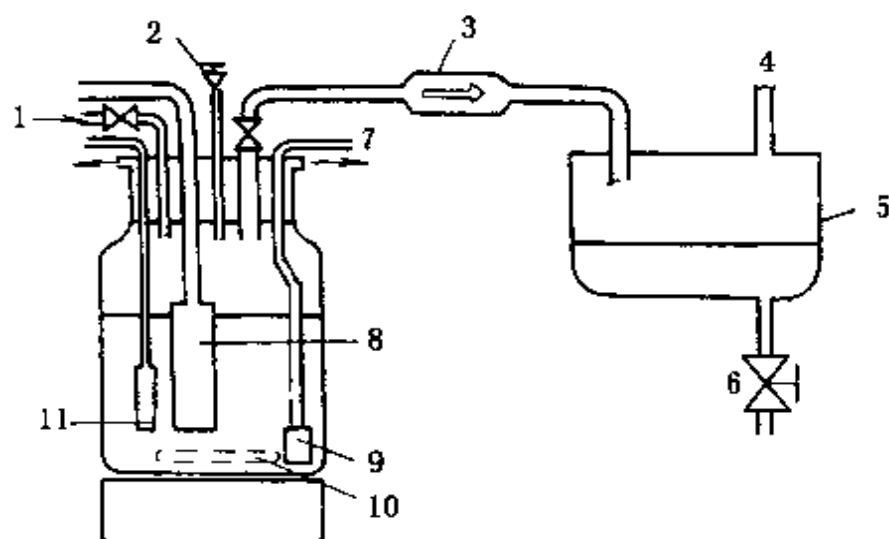


图 3-3 流动相贮罐示意图

- 1—清洗气入口；2—清洗气开放阀；3—真空泵；4—接排风口；
5—废液缸；6—排液阀；7—溶剂出口；8—浸入式加热器；
9—过滤器；10—搅拌器；11—温度传感器

HP 公司使用过的一种流动相贮罐示意图。

2. 泵

(1) 现代液相色谱对泵的要求 由于现代高效液相色谱都使用小颗粒的填料 ($7\mu\text{m}$, $5\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$ 等), 有很大的阻力, 因此需要高压泵, 现代液相色谱对泵的要求如下:

- ①泵的结构材料要能抗化学腐蚀;
- ②输出压力要能达到 $40\sim 50\text{MPa}$;
- ③无脉冲或加一个脉冲抑制器;
- ④流量可变, 流量稳定, 重现性大大优于 1% ;
- ⑤为了可以快速更换溶剂, 泵腔的体积要小。

(2) 泵的结构材料和一般性能

①结构材料 一般使用不锈钢和聚四氟乙烯做泵的材料, 泵的密封材料一般由加了填料的聚四氟乙烯 (例如, 加石墨填料的聚四氟乙烯) 制造, 这些材料可以适应液相色谱中的绝大多数流动相。有些往复泵的活塞和单项阀球是蓝宝石做成。当不能使用不锈钢时, 可完全用聚四氟乙烯和玻璃代替, 但是这样泵的压力限制在 3.5kPa 之内。

现代最新的高效液相色谱仪也有用精密陶瓷做泵的。

② 高压输液泵的一般性能

1) 可重复性 是指把泵重新调到某一流量的能力，即从较高或较低流量恢复到某一特定流量的能力。

2) 输出液体流量的短周期精密度 是指泵在短时间内（常指几分钟），输出液体体积恒定性的指标。精密度的变差是由于泵的某些故障所引起。例如，往复泵的单向阀无规则地泄漏所引起的输出液体流量不稳。

3) 泵噪音 一些类型的泵，如往复泵，有泵噪音是它所固有的特性，是由活塞的正常运动和单向阀的工作所引起的。

4) 漂移（长周期的测量精度） 是指在较长的时间里，泵流量的连续变化的情况，往往是由于室温的变化而引起输出流量的变化。

5) 准确度 是指按设定值输出准确流体的能力。

③ 输液泵的类型 商品的输液泵有两种类型，恒流泵和恒压泵。恒流泵使输出的液体流量稳定；而恒压泵则使输出的液体压力稳定。恒流泵中有往复泵，注射泵；恒压泵有气动放大泵。

1) 往复泵 在 HPLC 中应用最多的是往复泵，这种泵使用带有往复活塞或柔韧隔膜的小体积泵室（35~400 μ L）。往复泵有两类，一种是活塞式，另一种是隔膜式。前者的活塞直接和流动相接触；后者的活塞是通过某种介质推动隔膜，隔膜再压缩或吸入流动相。在泵头装有逆止阀，阀和活塞或隔膜同步动作，在活塞或隔膜作一次运动时可以泵出并吸入一个泵体积的流动相。其结构的示意图见图 3-4。

泵入口和出口处的逆止阀（单向阀）是靠泵头的液体压力控制的。在活塞泵出流动相时，泵头压力增加，使泵入口逆止阀关闭，同时泵出口逆止阀打开。在吸入流动相时，泵头减压，使出口逆止阀关闭，入口逆止阀打开。由于只有在活塞泵出流动相

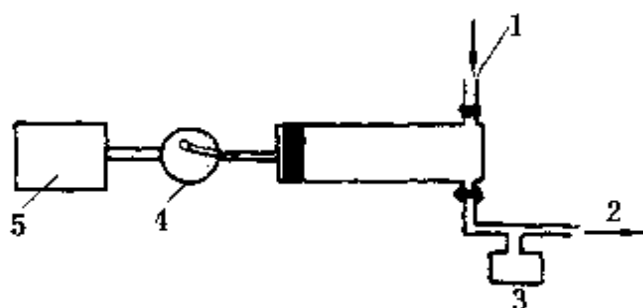


图 3-4 活塞式往复泵示意图

1—溶剂；2—到色谱柱；3—脉冲阻尼；

4—凸轮；5—电机

时才有液流进入色谱系统，在泵吸入流动相时，无液流输出，所以形成脉冲式供液。为了解决这一问题，人们设计了双柱塞和三柱塞泵，使液流脉动减小。

2) 累积型往复泵 累积型往复泵有两个泵头，以串联方式连接

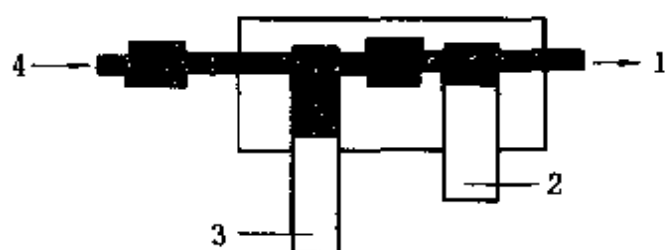


图 3-5 累积型往复泵示意图

1—高压流动相出口；2—二级活塞；
3—一级活塞；4—流动相

在一起，这样可以提供平稳的液流。所以如此是因为两个泵腔排液体积不同，第一级泵腔是第二级泵腔的 2 倍，如图 3-5 所示。两个活塞运动的方向呈 180° ，因此当第一级泵输出液流时，50% 进入色谱柱，50% 留存在第二级泵腔中（即从第一级泵中吸取液流）。

当第一级泵吸入液流时，第二级泵把已吸入的液流泵入色谱柱。这种泵造价较低，省去一些元件（例如它只用两个逆止阀）。

3) 注射泵 注射泵类似于注射器，用一台步进电机驱动注射泵的活塞把液流从泵腔中挤出，泵腔体积较大（250~500mL），密封性好的活塞使泵腔中的液体等速流出。注射泵的示意图见图 3-6。

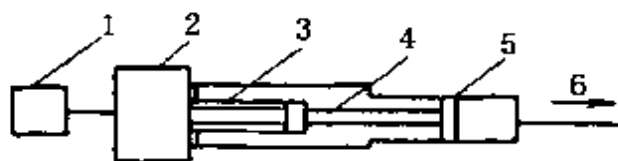


图 3-6 注射泵示意图

1—电机；2—蜗轮；3—螺旋；
4—螺杆；5—活塞；6—到色谱柱

4) 气动放大泵 气动放大泵是利用气体为动力源，通过帕斯卡原理把气体的压力放大成流动相的压力，即和气体直接接触的活塞面积大（ A_G ），和流动相接触的活塞面积小（ A_L ），压力放大的倍数（ x ）为

$$x = A_G / A_L \quad (3-1)$$

图 3-7 是这种泵的示意图。这种泵可以用较小的气体压力得到较高的流动相压力，所以它很适合于液相色谱柱的装填。近代的液相色谱仪不用这种泵。

3. 高效液相色谱仪的梯度洗脱

在分离分配比 (k') 悬殊的混合物时, 用同一浓度的流动相 (等度或均液) 进行洗脱难以实现分离, 但是如用梯度洗脱就可以很容易地解决这一问题。液相色谱的梯度洗脱与气相色谱的程序升温类似, 只是液相色谱的梯度洗脱是通过改变流动相的组成而不是改变温度实现的。由于流动相组成改变可使溶质的 k' 值改变。

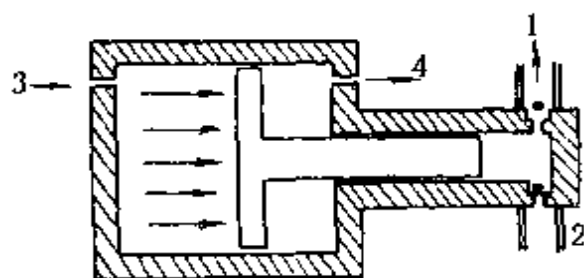


图 3-7 气动放大泵

1—到色谱柱；2—流动相入口；
3—高压气入口；4—气体放空

进行梯度洗脱的装置可以分为两类, 高压梯度形成器和低压梯度形成器。无论用哪种装置, 在梯度洗脱中流动相组成的变化均可以是分段的或连续的, 完全根据控制方式而定。溶剂组成的变化程序可以是线性的。但为了获得最佳的操作, 常常使用某些指数方式 (如凸形或凹形) 变化程序。目前用微处理机来控制这些程序。

图 3-8 是高压梯度和低压梯度洗脱装置的示意图。高压二元梯度

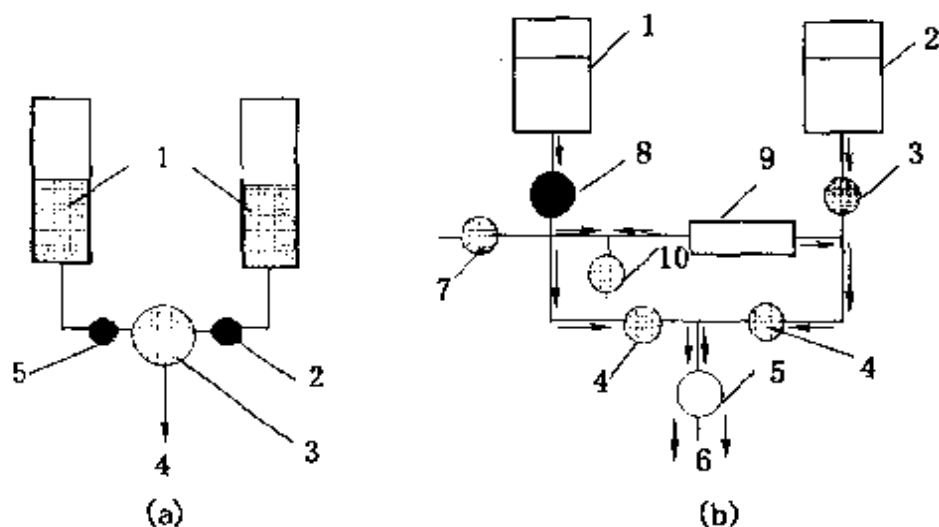


图 3-8 高压梯度和低压梯度洗脱装置示意图

(a) 低压梯度洗脱装置

1—溶剂；2—电磁阀；3—混合槽；4—到输液泵；5—电磁阀

(b) 高压梯度洗脱装置

1—溶剂 1；2—溶剂 2；3—电磁阀；4—比例阀；5—混合槽；

6—到色谱柱；7—次扫阀；8—泵；9—输液管；10—排液槽

洗脱常用两个泵进行，但也有用一个泵进行高压梯度洗脱的，图 3-8 (a) 就是这样。

四、高效液相色谱仪的检测器

和气相色谱一样高效液相色谱仪也有多种多样的检测器，最常用的有紫外可见分光光度检测器、荧光检测器、二极管阵列检测器、示差折光检测器、蒸发激光光散射检测器和电化学检测器等。

1. 紫外可见分光光度检测器

在现代高效液相色谱中最广泛使用的检测器是紫外可见分光光度检测器，这类检测器对许多溶质都有很高的灵敏度，但是样品必须在可见或紫外光区有吸收。紫外可见分光光度检测器具有以下特点：

- ①灵敏度高；
- ②线性范围宽；
- ③可做成很小池体积的流通；
- ④对流动相的流速和温度变化不太敏感（灵敏度高时除外）；
- ⑤易于操作，十分可靠；
- ⑥不破坏样品；
- ⑦波长可以选择；
- ⑧对不同的溶质响应有很大的差别；
- ⑨可用于梯度洗脱。

2. 示差折光检测器

除去紫外可见分光光度检测器外，示差折光检测器在高效液相色谱仪中是应用较多的一种检测器，这种检测器可以连续检测参比池流动相和样品池中流出物之间的折光指数差值，这一差值和样品的浓度成比例关系。折光指数是体积加和性参数，而各种物质都有不同的折光指数。这种检测器类似于气相色谱的热导检测器，是通用型检测器，特别是在溶质对紫外光和可见光无吸收的情况下，一般要用示差折光检测器。

示差折光检测器一般有以下的特点：

- ①是通用型检测器；
- ②灵敏度偏低，不能用于痕量分析；
- ③对温度变化敏感；
- ④不能用于梯度洗脱；
- ⑤不破坏样品。

3. 荧光检测器

荧光检测器是把荧光光度计用于高效液相色谱仪，它是一种灵敏度高、选择性好的检测器。荧光检测器的主要应用范围是生物样品、药物、食品、矿物燃料和环境样品。荧光检测器的特点是：

- ①灵敏度高，是高灵敏液相色谱检测器之一；
- ②本身可产生荧光的物质，或能用有荧光基团的试剂进行衍生化的物质；
- ③对有些物质的动态线性范围较小（10 倍），一般为 10^4 ；
- ④如用激光做激发光源可大大提高其灵敏度。

4. 二极管阵列检测器

从氙灯发出的紫外光通过一个消色差透镜系统，照射在流通池上，经过一个狭缝后光束照在一个全息光栅上，经色散分光后抵达一组光电二极管阵列上，在几毫秒内测定出光谱信息。与普通光谱检测器相比，二极管阵列检测器的分光系统和样品池的相对位置正好相反，因此这种光路结构称为“倒置光学”系统。二极管阵列检测器先让光束通过流通池，然后由分光系统分光后，使所有波长的光在二极管阵列检测器同时被检测。它的信号是用电子学方法快速扫描而获取，扫描速度非常快，远超出色谱的出峰速度，所以可以检测色谱流出物每个瞬间的吸收光谱图，即可以得到三维的时间-色谱信号-吸收光谱图。二极管阵列检测器的特点是：

- ①可进行全波长检测，一次进样可以检测到样品中不同吸收波长下的所有组分；
- ②光谱分辨率高，可以检测色谱峰的纯度；
- ③灵敏度高；
- ④线性范围宽；

⑤基线的噪声小。

5. 蒸发激光光散射检测器

蒸发激光光散射检测器 (ELSD) 是近年出现的通用型高效液相色谱检测器, 它可以检测挥发性低于流动相的任何样品, 是广泛地用于高效液相色谱 (HPLC)、超临界流体色谱 (SFC) 和逆流色谱的通用检测器。ELSD 曾成功地用于无生色团物质的检测, 如, 碳水化合物、类脂物、聚合物、不进行衍生化的脂肪酸和氨基酸、表面活性剂、药物以及结构不明又无标准样品的未知物。

ELSD 作为通用型检测器克服了 HPLC 常碰到的一些麻烦, 它不像紫外光和荧光检测器要依赖于被测化合物的光学性质, 所以任何化合物只要其挥发性低于流动相都可以用 ELSD 测定, 不管它的功能团是什么。而且 ELSD 的响应值和被测样品的质量有关, 因而它可以用于测定物质的纯度和测定未知物。示差折光检测器 (RI) 是一种通用检测器, 但是它不能用于梯度洗脱, 对温度的变化特别敏感, 会产生很大的溶剂峰而影响早流出峰的检测。ELSD 消除了这些弊端, 可以用于梯度洗脱, 当实验室和柱温变化时可保持基线稳定, 最早流出的溶剂峰不会干扰早流出的峰。质谱也是一种通用检测器, 但是它操作复杂而费用昂贵, 限制了它的应用。

ELSD 运行有三个过程: 一是用惰性气体把色谱流出物雾化, 二是在一个加热管 (漂移管) 中把流动相蒸发, 三是测定留下来样品颗粒的光散射。所有商品 ELSD 都用一种或两种模式完成这三个过程。类型 A 的操作是使全部柱流出物 (气溶胶) 都进入直的漂移管, 让流动相在其中蒸发, 类型 B 的 ELSD 的操作是使气溶胶通过一个弯管, 在此管中大的颗粒沉积下来流入废气管, 其余的小颗粒进入螺旋状的蒸发管。在这两种情况下, 样品颗粒都进入光管, 进行光散射的测定。

关于高效液相色谱的检测器的详细介绍请参见本丛书中《液相色谱检测方法》一书。

五、高效液相色谱仪的生产厂家和仪器型号

表 3-4 列出了一些主要生产厂和仪器型号。

表 3-4 主要生产高效液相色谱仪的厂家和型号

序号	厂 家	典型仪器型号	仪 器 的 特 点
1	大连依利特公司	P200	P200 高压恒流泵, Rheodyne7725I 进样阀, UV200 型紫外可变波长检测器, ZW 单柱恒温箱, 等度和梯度洗脱
2	北京东西电子研究所	LC-5500	紫外可变波长检测器, 波长自动扫描, 等度和梯度洗脱, 柱恒温箱
3	美国惠普公司	HP 1100 系列	见 (六)
4	美国瓦里安公司	LC Star	9002 恒容泵, 9012 三元泵, 9012Q 四元泵, 9050 可编程紫外可见光检测器, 9065 二极管阵列检测器, 9075 可编程/扫描荧光检测器, 9040 示差折光检测器
5	日本岛津	LC 10 A	等度和梯度洗脱, 紫外可见光检测器, 二极管阵列检测器, 示差折光检测器等
6	日本分光	LC-900 系列	等度和梯度洗脱, 紫外可见光检测器, 二极管阵列检测器, 示差折光检测器, 化学发光检测器

六、典型的高效液相色谱仪的性能

以惠普公司 HP 1100 系列高效液相色谱仪为例说明现代高效液相色谱仪的特点。

1. HP 1100 系列高效液相色谱仪四元泵的性能

液压系统	双活塞具有独特的伺服控制系统, 进行变冲程驱动
可设定的流速范围	0.001~10mL/min, 增量为 0.001mL/min
流量范围	0.2~10mL/min
流速精度	< 0.3% RSD (典型为 0.15%)
压力范围	0~40 MPa, 流速为 5mL/min; 0~20MPa, 流速为 10mL/min
压力脉动	<2% 振幅 (典型<1%) (流速 1mL/min 的异丙醇, 压力>1MPa)
pH 范围	1.0~12.5
组分范围	0~95% 或 (5~100)%
组分精度	<0.2% SD (在 0.20 和 1mL/min)

2. HP 1100 系列高效液相色谱仪可变波长检测器的性能

检测类型	双光束光度计
光源	氙灯
波长范围	196~600nm
短期噪声	$\pm 0.75 \times 10^{-5}$ AU, 在 254nm 处
飘移	1×10^{-4} AU, 在 254nm 处
线性	>2AU (5%) 上限
波长精度	1nm, 带氙灯的自校准, 用氧化钛滤光器校验
带宽	6.5nm, 典型值
流通池	标准池: 14 μ L, 池长 10mm, 最大压力 4MPa. 高压池: 14 μ L, 池长 10mm, 最大压力 40MPa, 微型池: 1 μ L, 池长 5mm, 最大压力 4MPa

3. HP 1100 系列高效液相色谱仪二极管阵列检测器的性能

检测类型	1024-单元光电二极管阵列
光源	氙灯和钨灯
波长范围	190~950nm
短期噪声	$\pm 1 \times 10^{-5}$ AU, 在 254nm 和 750nm 处
飘移	2×10^{-3} AU, 在 254nm 处
线性	>2AU (5%) 上限
波长精度	1nm, 带氙灯的自校准, 用氧化钛滤光器校验
狭缝宽度	1, 2, 4, 8, 16nm, 典型值
流通池	标准池: 13 μ L, 池长 10 mm, 最大压力 12 MPa; 半微型池: 5 μ L, 池长 6 mm, 最大压力 12 MPa; 微型池: 1.7 μ L, 池长 6 mm, 最大压力 40 MPa

第三节 离子色谱仪

一、离子色谱仪流程

离子色谱仪和高效液相色谱仪近似, 但也有它的特点, 一般带抑制柱的离子色谱仪 (双柱离子色谱仪) 流程如图 3-9 所示。

单柱离子色谱仪和双柱离子色谱仪基本部件相同, 只是使用一支

色谱柱。

二、离子色谱仪的部件

离子色谱仪的主要部件和高效液相色谱仪相近。

1. 液体贮罐

离子色谱仪所用的洗脱液、再生液和冲洗液的贮罐和高效液相色谱一样，其容积应大于 0.5L，可以用聚乙烯瓶或桶，如使用大量有机溶剂时可用硬质玻璃瓶，有的商品仪器带有 4 L 容积的可折叠聚乙烯塑料袋，

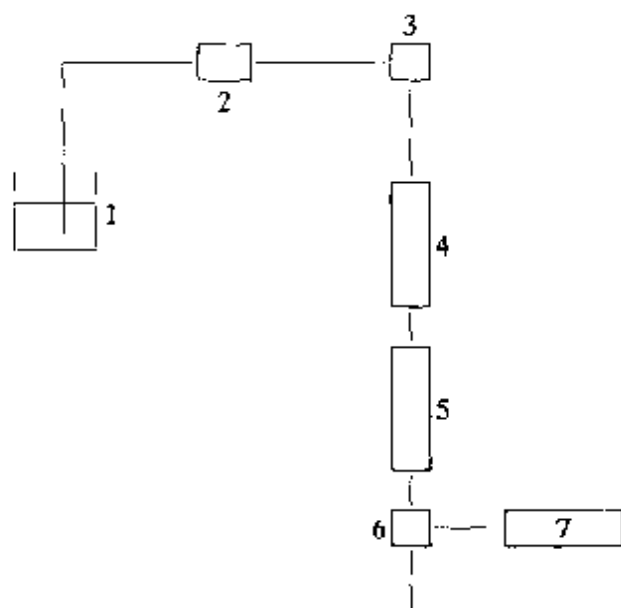


图 3-9 离子色谱仪流程图

袋的容积随着液体的减少而缩小，使液体与大气隔离。应使用去离子水配制洗脱液或再生液，去离子水的电导率应小于 $1\mu\text{S}/\text{cm}$ ，水中不应含有直径大于 $0.2\mu\text{m}$ 的颗粒和微生物。洗脱液应使用分析纯以上的试剂配制，有机溶剂应使用光谱纯的试剂。洗脱液配好后应再用 4 号玻璃沙芯漏斗过滤，并以真空方法脱气。

2. 离子色谱仪的泵和高效液相色谱仪的泵相同，只是泵的材料、流速范围和对压力的要求不同。高效液相色谱仪的流速准确度高，要达到 $0.001\text{mL}/\text{min}$ ，而离子色谱仪的流速要准确到 $0.01\text{mL}/\text{min}$ 。高效液相色谱仪经常要在大于 15MPa 的压力下工作，而离子色谱仪常在低于 15MPa 下工作。离子色谱的流动相一般是酸、碱、盐或络合剂，所以凡是流动相经过的部件均应由耐腐蚀的材料制成。目前国内外的离子色谱仪都使用全塑系统，从泵、管道、阀、色谱柱和接头都用 PEEK 制成。

3. 进样阀

为了保证分析的精密度几乎所有的离子色谱都用进样阀进样，一般用六通阀。有的商品仪器采用气动式流路转换阀。

4. 色谱柱

和其他色谱一样, 色谱柱是仪器的心脏, 将在后面阐述。

5. 检测器

离子色谱仪的通用检测器是电导检测器, 也可以使用高效液相色谱仪所用的其他类型检测器。有关检测器的详细论述可参阅本丛书的《液相色谱检测方法》和《离子色谱方法及应用》两书, 这里只把离子色谱仪中所用检测器的参数和比较列于表 3-5 中。

表 3-5 离子色谱仪所用检测器的参数^[10]

参 数	电 导		紫外可见	荧 光	电 流	脉冲电流
	抑制法	单柱法				
分 类	选择性	加合型	选择性	选择性	选择性	选择性
池体积/ μL	1.5~2.5	1.5~2.5	8~25	10~13	10~26	10~26
响应值	2×10^5 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^3/\text{g}$	根据实验 条件而定	4×10^5 $\text{ODU} \cdot \text{cm}^3/\text{g}$		$(1 \sim 2) \times$ 10^{-2} A/mol	$(1 \sim 2) \times$ 10^{-2} A/mol
噪 声	$\pm 5 \times 10^5 \mu\text{S}$		$2 \times 10^{-5} \text{ODU}$		2×10^{-11} A/mol	2×10^{-11} A/mol
检测限/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	3×10^{-10}	2×10^{-8}	10^{-10}	10^{-12}	10^{-12}	10^{-12}
线性动态范围	2×10^4	10^3	10^3	$\approx 10^3$	10^6	10^6
直接进样的浓 度范围/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	$10^{-4} \sim$ 10^{-9}	$10^{-4} \sim$ 10^{-7}	$10^{-4} \sim$ 10^{-10}	$10^{-8} \sim$ 10^{-12}	$10^{-5} \sim$ 10^{-11}	$10^{-5} \sim$ 10^{-11}
对流速敏感性	有	有	无	无	有	有
对温度敏感性	(2%)/ $^{\circ}\text{C}$	(2%)/ $^{\circ}\text{C}$	低	低	(1.5%)/ $^{\circ}\text{C}$	(1.5%)/ $^{\circ}\text{C}$
可否梯度洗脱	不能	不能	能	能	能	能
主要适用范围	pK_a 或 pK_b 小于 7 的各种离子	各种离 子、过渡金 属离子	硫离子、亚硫 酸根、亚硝酸 根、硝酸根、叠 氮酸根、溴离 子、碘离子、碘 酸根、溴酸根、 次氯酸根、硫代 硫酸根、硒酸 根、砷酸根、芳 香族化合物、不 饱和羧酸、过渡 金属离子等	芳香族 化合物、伯 胺和氨基 酸的荧光 衍生物	溴离子、 碘离子、硫 离子、 CN^- 、 硫代硫酸 根、亚砷 酸根、胂、抗 坏血酸、芳 香胺、硫醇 等	与安培 法相同, 醇、糖、酚、 伯胺、氨基 酸等

6. 数据处理系统

和其他色谱仪所用的数据处理系统相同。

三、离子色谱仪的生产厂家和仪器型号

国内离子色谱仪的生产厂家仪器型号和仪器特点见表 3-6。

国外离子色谱仪的生产厂家仪器型号和仪器特点见表 3-7。

表 3-6 国内生产离子色谱仪的厂家

序号	厂 家	型 号	仪 器 的 特 点
1	上海分析仪器厂	2001	积木式；聚酰亚胺全塑双往复恒流泵；化学抑制型电导、电导、紫外可见（波长连续可调）检测器
2	青岛崂山电子仪器实验所	ZIC-1 ZIC-3	双往复平流泵、五电极电导池、阴离子分析用抑制型电导、电渗抑制器，阳离子分析用非抑制型单柱仪器
3	北京理化分析测试中心	FIC-1 FIC-3	积木式；单柱泵；阴离子分析用抑制型电导、纤维抑制器；阳离子分析用非抑制型单柱仪器；电导和可见分光（干涉滤光片）检测器

表 3-7 在国内有影响的国外生产离子色谱仪的厂家

序号	厂 家	型 号	仪 器 的 特 点
1	Dionex Corp 美国戴安公司	DX-500	全塑（PEEK）系统；1—4 元梯度泵，每个单元可编程运行；化学抑制型电导检测器；自身再生抑制器
		DX-100	全塑（PEEK）系统，操作方便，适于常规分析
2	Waters Corp 美国沃特斯公司	Action	PEEK 材料，1—4 元梯度泵，非化学抑制型单柱系统
3	日本岛津公司	LC-10A	积木式，有 CDD-6A 电导检测器和 LC-10A 液相泵（1—4 元梯度泵），非化学抑制型单柱系统

第四节 超临界流体色谱仪

一、超临界流体色谱仪的流程^[4]

典型的超临界流体色谱（SFC）仪的流程见图 3-10。超临界状态流体源（CO₂ 在进入高压泵之前预冷却，高压泵把液态流体经脉冲抑制器注入在恒温箱中的预柱，进行压力和温度的平衡，形成超临界状态流体，进入色谱柱，要保持柱系统的压力，在排泄废气口处装限流

器（多用一定长度的毛细管）。最常用的 SFC 的流动相是 CO_2 ，也有用 N_2O 、 C_5H_{12} 、 SF_6 、 Xe 、 CCl_2F_2 、 CHF_3 、甲醇、乙醇、乙醚的。

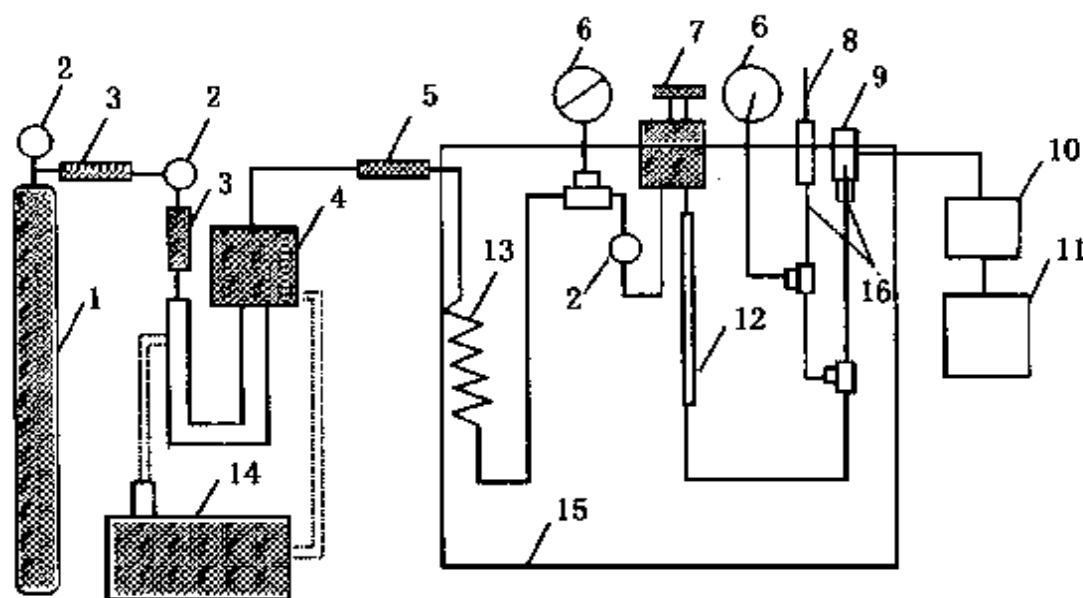


图 3-10 超临界流体色谱仪流程示意图

- 1—超临界流体源；2—控制阀；3—过滤器；4—高压泵；5—脉冲抑制器；
6—压力表；7—进样口；8—泄压口；9—检测器（FID）；10—放大器；
11—记录仪及数据处理装置；12—分离柱；13—预平衡柱；
14—冷冻装置；15—恒温箱；16——限流器

二、超临界流体色谱仪的结构和性能

(1) SFC 的高压泵 如为毛细管 SFC，需要低流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$) 无脉冲的注射泵，为了控制泵的流量和压力，通过电子压力传感器和流量检测器，用计算机控制，程序地改变流动相的密度和流量。

(2) SFC 的色谱柱 填充柱 SFC 可以用液相色谱柱；毛细管 SFC 可以用交联的气相毛细管色谱柱，一些厂家有专用于 SFC 的毛细管柱。

(3) SFC 的检测器 气相及液相色谱所用的检测器在一定条件下都可以使用，常用的是 FID。

①使用液相色谱检测器 在进入检测器之前把超临界状态转变为液态，可增加检测器的灵敏度，使谱带变窄，而且可以在室温下操作。UV 检测器是液相色谱中使用最多的检测器，在 SFC 中也使用较

多。如为毛细管 SFC，UV 检测器的流通池由一段熔融石英毛细管做成，管外的聚酰亚胺涂层剥去使光通过，这段毛细管柱的体积只有 200nL，这样就不会影响柱效，荧光检测器也可以这样使用。

②使用气相色谱检测器 多用 FID。超临界状态的流动相在进入 FID 之前要通过限流器变为气体，FID 对小分子量化合物可得到很好的结果，对分子量大的化合物常得不到单峰，而是一簇峰。如把检测器加热可使分子量大于 2000 的化合物获得满意的结果。在 SFC 中也可以使用氮磷检测器和火焰光度检测器。

(4) SFC 仪器的性能 用 90 年代商品 SFC 仪器做典型，列出它的性能：

①高压泵 容积为 150mL 的注射泵，用计算机控制流动相的密度梯度，还可以串联另一个泵使泵容积增大到 300mL，流量 1 ~ 4000 μ L/min。

②柱箱 室温 ~ 450 $^{\circ}$ C，配低温系统可在 - 50 $^{\circ}$ C 下工作。

③检测器 可以更换各种检测器，FID 和 NPD 配有陶瓷火焰喷嘴，适于高温下使用。

三、超临界流体色谱仪的生产厂家和仪器型号^[5]

国内目前只有北京先通科学仪器研究所和济南市精益仪器研究所共同研制生产的超临界流体色谱仪。国外有十多家生产 SFC 和 SFE 的公司，其中的一些列于表 3-8 中。

表 3-8 国内外生产 SFC 仪器的厂家和型号

序号	厂 家	仪器型号	仪 器 性 能
1	美国惠普公司	HP-G1205A	有双柱塞往复泵，最大压力 40MPa，最大压升 10MPa/min，毛细管入口端压力脉动小于 0.2 MPa，流量 0.001 ~ 5.00mL/min，柱箱温度 (- 40 ~ 450 $^{\circ}$ C) $\pm$ 1%，可配多种检测器
2	美国李科学公司 (Lee Scientific)	Lee Scientific600	165mL 注射泵，最大压力 42.2 MPa，最大压升 25.2MPa/min，压力重复性 0.01 MPa，柱箱温度室温 ~ 450 $^{\circ}$ C，精度 0.1 $^{\circ}$ C，配 FID
3	北京先通科学仪器研究所	SFC8000	80mL 注射泵，最大压力 40MPa，精度 < 1%，最大压升 3.0MPa/min，柱箱温度 20 ~ 350 $^{\circ}$ C，配 FID

第五节 毛细管电泳仪

一、毛细管电泳仪的流程^[4]

高效毛细管电泳仪器组成极其简单（图 3-11），只要有一个高压电源、一支内径为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的石英毛细管、一个检测器和两个缓冲溶液瓶，就能进行高效毛细管电泳实验。

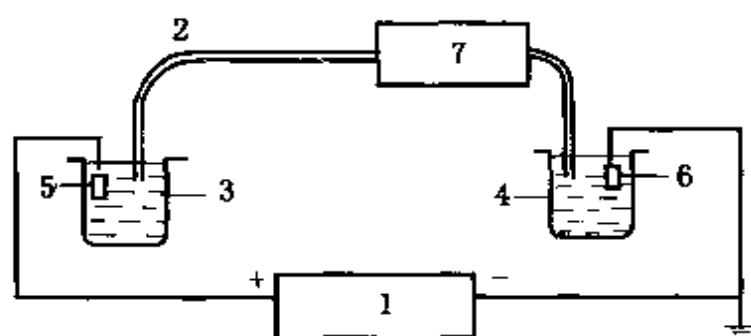


图 3-11 毛细管电泳仪的流程

1—高压电源；2—毛细管；3,4—缓冲溶液瓶；5,6—铂电极；7—检测器

二、毛细管电泳仪的主要部件和性能

1. 高压电源

0~30kV 稳定、连续可调的直流电源，具有恒压、恒流和恒功率输出，有些仪器还具有电场强度程序控制系统。

①为保证迁移时间的重现性，要求输出电压稳定在 $\pm 0.1\%$ 以内。

②电源极性可以转换。

2. 毛细管

(1) 材料 由于玻璃材料的电渗流较大，对紫外光有吸收，机械强度差，因此较少采用。有机高聚物，如聚四氟乙烯、聚乙烯等，机械及化学稳定性好，可以透过可见及紫外光，电渗流可以控制，但是散热性差并且对短波紫外光有较强吸收，使用也不多。熔融石英材料透光性好（远、近紫外光都能透过），化学惰性好，外壁涂聚酰亚胺大大增加了柔韧性，强度高并且价格便宜，故使用较多。

(2) 规格、形状 虽然相同容积的矩形管比圆形管有较大的比表面积，并且光散射小、容易增大检测光程，但是加工困难，所以目前

仍以圆形毛细管为多。兼顾毛细管散热性、检测灵敏度和减小溶质与壁表面间的相互作用力,目前最常用的毛细管内径是 $20 \sim 75 \mu\text{m}$ 、外径 $350 \sim 400 \mu\text{m}$ 。

从分离效果和分离时间考虑,在满足分离的前提下尽量用短柱,因为这样可以节省分析时间。一般而言,毛细管最长不超过 1m 。对于一定长度的毛细管,有效长度越长越有利于分离。

3. 缓冲液池

缓冲液池内装缓冲溶液,为电泳提供工作介质。要求缓冲液池化学惰性,机械稳定性好。

4. 检测器

因毛细管电泳仪 (HPCE) 中的毛细管内径很小,进样量很小,所以对检测器的灵敏度要求很高。目前大多数 HPCE 仪器都配有紫外检测器,实现柱上检测。为展宽检测范围,也有配两种或多种检测器的。毛细管电泳仪中常用检测器的主要类型及特点见表 3-9。

表 3-9 毛细管电泳检测器的性能特点

检测器	动态范围 ($S/N=2$)	质量最小检测限/ mol	应 用	优 点	缺 点
UV-VIS 吸收	$10^{-6} \sim 10^{-3}$	10^{-15}	肽、蛋白质、核酸药物、小分子	易于使用,通用	灵敏度较低
荧光检测	$10^{-8} \sim 10^{-5}$	10^{-17}	氨基酸、肽,蛋白质核酸	灵敏度和选择性高于 UV	非通用
激光诱导荧光检测	$10^{-12} \sim 10^{-9}$	10^{-21}	微量氨基酸、肽、蛋白质、核酸	灵敏度和选择性都很高	贵,非通用
电导检测	$10^{-6} \sim 10^{-3}$	10^{-16}	离子分析	峰面积和迁移时间线性相关	灵敏度较低,非通用
安培检测	$10^{-8} \sim 10^{-5}$	10^{-20}	复杂物质(如体液)中电活性化合物的定量分析	灵敏度和选择性很高	限于电活性物质的分析,难建装置
间接 UV-VIS 检测	$10^{-5} \sim 10^{-3}$	10^{-14}	离子分析,碳水化合物	通 用	灵敏度较低,缓冲溶液受限制

续表

检测器	动态范围 ($S/N=2$)	质量最小检测限/mol	应 用	优 点	缺 点
间接安培检测	$10^{-8} \sim 10^{-5}$	10^{-20}	同时测定电活性和非电活性物质	高灵敏度	难建装置
间接荧光检测	$10^{-7} \sim 10^{-5}$	10^{-17}	检测非荧光物质	通用、选择性好	缓冲溶液受限制

5. 数据采集记录装置、控温装置

最简单的是台式记录仪，许多 HPCE 仪器用计算机采集、记录，用色谱工作站处理数据。

三、生产毛细管电泳仪的生产厂家和仪器型号^[4]

国内没有大规模生产毛细管电泳仪的厂家，只有北京新技术应用研究所有少量简易的毛细管电泳仪供应市场，国外有 10 多家出售毛细管电泳仪的公司，见表 3-10。

表 3-10 毛细管电泳仪的一些厂家和型号

厂家及商品名	进样方法	检测方法	自动进样个数	柱温控制	冷却装置
Beckman Instrument 公司 “P/ACE 2010”	压力进样 电动进样	UV (滤光器) 激光荧光 (波长任选)	34 个位置	液体冷却 室温 - 40℃	任选
Bio-Rad 公司 “HPE100”	手动，电动进样	UV-Vis 190 ~ 800nm	无	无	无
Bio-Rad 公司 BioFocus 3000	压力，电动进样	UV-VIS 190 ~ 800nm 快速扫描	32 个位置	强制通空气	
HP 公司 “HP3D” 毛细管电泳系统	压力，电动进样	UV-VI, 190 ~ 600nm 加长检测池 光程二极管阵列检测器	48 个位置	强制通空气 低于气湿 10 ~ 60℃ 10 ~ 40℃，外加	馏分收集器水浴
ISCO 公司 “Model 3140”	真空，电动进样	UV 190~360nm	40 个位置	强制通空气 15~40℃	无

续表

厂家及商品名	进样方法	检测方法	自动进样个数	柱温控制	冷却装置
ISCO 公司 “Model 3850”	手动分流 进样	UV 190~360nm	无	风扇	无
SpectraPhysics 公司 ^① “Spectra- PHORESIS 500”	真空, 电 动进样	UV-VIS, 190 ~ 800nm 单波长选择	80 个位置	强制通空气 15 ~ 60℃ 用 液氮可到 5℃	无
SpectraPhysics 公司 “Spectra - PHORESIS 1000”	真空, 电 动进样	UV-VIS, 190 ~ 800nm 多波长选择	80 个位置	强制通空气 15 ~ 60℃ 用 液氮可到 5℃	无
Waters 公司 “Quanta 4000”	重力, 电 动进样	UV-VIS, 190 ~ 800nm	13 个位置	风扇	无

① 现为 TSP 公司。

四、典型毛细管电泳仪的性能

以 HP 公司 HP^{3D}毛细管电泳仪为例说明其性能^[6]。

仪器尺寸	宽 42.5cm 高 57.5cm 长 52cm 重量 52kg
工作环境	温度 5~40℃ 湿度 在 30℃ 时可到 80% (无冷凝)
电源要求	电压 100/120 220/240 VCA ; +5%, -10%, 650VA 频率 50 (48~55) Hz; 60 (57~66) Hz
压力系统	0~5.0kPa 程序升或降压 波动 0.1kPa 或在升或降压 样品瓶加压在高压时 0.2~1.2kPa
安全性能	漏短检测, 电流低限 有安全传感器, 在门、罩打开时高压无效诊断功能。
电泳电压	电压范围 可设置 0~30 kV 电流 可设置 0~300μA

	功率 可设置 0~6W
	可在恒电压、恒电流或恒功率下工作；有可编程的极性切换。
进样模式	自校正进样系统，可从两端进样
	编程范围 到 10000s
	压力进样 0~5.0MPa
	电动进样 0~30 kV
自动进样器	有 48 个样品位置，可从阴极或阳极端样品瓶中随机取样。用外部水浴。
馏分收集器	使样品瓶控温在 10~40℃（在无冷凝条件下）。
缓冲液补充	设有卫星站在自动连续操作时为阴极或阳极端样品瓶补充新缓冲液，可选择缓冲液、调整缓冲液。
样品瓶	100 μ L 样品瓶、1mL 或 2mL 样品瓶（聚丙烯或玻璃），带重新封口的密封盖。
毛细管卡套	用珀尔帖元件来控温的强制气流保持毛细管卡套温度
	温度范围 室温下 10~60℃（ $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ），最低 4℃
	毛细管最小长度 33cm
	毛细管外径 365 μm
检测器	实时紫外可见光检测器（190~600nm）
	波长准确度 1nm
	响应时间 0.1~10s（8 种选择）
	光源 预校正氘灯
	信号 同时可检测 5 个信号，用 HP 化学工作站采集全光谱。
原始数据通道	检测器信号，电压，电流，功率，毛细管温度和压力。
系统的控制	在微软 Windows 95 Windows NT 下使用图形用户见面操作。
时间编程参数	电压，电流，功率，极性，压力，进、出口样品瓶，毛细管温度，一次分析前、后用压力/或电压稳定系统，缓冲液补充，馏分收集。
CE 的特殊软件	计算淌度、时间校正面积、pl 校正和生物大分子的尺寸校正。

参 考 文 献

- 1 傅若农，常永福，气相色谱和热分析技术，北京：国防工业出版社，1989
- 2 庞增义，李洪盛，气相色谱仪及其应用，昆明：云南科技出版社，1989
- 3 [美] 斯奈德 L R, J J 柯克兰，现代液相色谱法导论，陈新民，高虹译，北京：化学

工业出版社,1988

- 4 傅若农, 顾峻岭. 近代色谱分析. 北京: 国防工业出版社, 1998
- 5 朱良漪, 主编. 分析仪器手册. 北京: 化学工业出版社, 1997
- 6 中国惠普公司. HP^{3D}毛细管电泳系统. 北京: 中国惠普公司, 1998
- 7 中国惠普公司. HP 1100 系列液相色谱系统. 北京: 中国惠普公司, 1998
- 8 中国惠普公司. HP 6890 系列气相色谱系统. 北京: 中国惠普公司, 1998
- 9 惠普公司. HP Micro GC Seminar. 1998
- 10 牟世芬, 刘开录. 离子色谱. 北京: 科学出版社, 1986

第四章 填充柱气相色谱

第一节 填充柱气液色谱用载体^[1]

一、气液色谱对载体的要求

载体过去也叫做担体 (Support)，是支撑固定液的惰性多孔固体。把固定液涂渍在载体上就成为气液色谱的固定相。气液色谱主要是通过溶质在气液两相之间的多次分配而达到分离的目的。为此载体应是：

- ①具有化学惰性，即在使用温度下不与固定液或样品发生反应。
- ②具有好的热稳定性，即在使用温度下不分解，不变形，无催化作用。
- ③有一定的机械强度，在处理过程中不易破碎。
- ④有适当的比表面，表面无深沟，以便使固定液成为均匀的薄膜；要有较大的孔隙率，以便减小柱压降。

到现在还没有完全附合上述要求的载体。目前使用极为普遍的硅藻土载体，也远未达到上述要求，只是比其他载体要接近上述要求而已。

二、载体的种类

气液色谱中主要是用硅藻土载体，其次是氟塑料载体和玻璃微球载体，使用过的载体如表 4-1。

1. 硅藻土载体

硅藻土载体是用硅藻土在高温下煅烧而成，所谓硅藻土，它是由单细胞海藻所依附的硅藻骨架构成，这种硅藻骨架是由微小的无定形含水二氧化硅和其他无机杂质组成。硅藻土的比表面积有 $20\text{m}^2/\text{g}$ 。它是一种多孔无机物。

表 4-1 气液色谱用载体的种类

无 机 载 体		有 机 载 体	
硅藻土类	白色载体及其改性产品	含氟塑料载体	聚四氟乙烯
	红色载体及其改性产品		聚三氟氯乙烯
玻璃类	硅石微球	其他聚合物载体	GDX 类
	玻璃粉末		聚乙烯载体
	玻璃多孔球		聚乙烯丙烯酸酯类
	玻璃实心球		多孔聚脲烷
金属类	金属粉末		
	金属微球		
	金属屑		
金属化合物类	金属络合物		
	金属盐		
其他吸附剂	气固色谱用吸附剂		

(1) 硅藻土载体种类和制备

①硅藻土载体的种类 硅藻土载体一般有两类,一种是白色载体,另一种是红色载体。白色载体表面呈白色,在制备时,往硅藻土中加入碳酸钠;红色载体外表呈红色,制备时不加碳酸钠到硅藻土中。还有一种载体为粉色,但其性能类似于白色载体,即 Chromosorb G。

②硅藻土载体的制备

1) 红色载体的制备 把天然硅藻土粉碎后,做成砖形,加热到 900℃ 以上进行煅烧,在煅烧过程中硅藻土熔融,一部分变成晶态白硅石,矿物质变成氧化物或硅酸盐,其中铁以红色的三氧化铁存在,煅烧后粉碎过筛即成红色载体。国产的 6201 和国外的 Chromosorb P 都属于红色载体。

2) 白色载体的制备 硅藻土在煅烧前掺入一定量的碳酸钠做助熔剂,加热到 900℃ 以上进行煅烧,在助熔剂的作用下,铁形成了硅铁酸钠络合物,呈白色,因而叫做白色载体。我国生产的 101 白色载体和 405 载体,都属于这一类;国外生产的 Celite 和 Chromosorb W

也属于这一类。

(2) 两类硅藻土载体的比较 硅藻土载体主要是由氧化硅(约占90%)和一些金属氧化物组成,几种典型硅藻土载体的化学组成见表4-2。从表4-2的数据看出在化学组成上各种载体之间没有太大的差别,它对色谱分离性能上的差别主要决定于物理性能。硅藻土载体的主要物理性能列于表4-3中。红色载体和白色载体总体性能的比较列于表4-4中。

表 4-2 硅藻土载体的化学组成

化学组成	红 色 载 体			白 色 载 体		
	C ₂₂	Chromosorb P	6201	Celite545	Chromosorb W	405
SiO ₂	89.6	89.2	74.3	89.9	91.2	89.9
Al ₂ O ₃	5.1	5.1	13.3	3.6	4.1	4.9
Fe ₂ O ₃	1.55	1.5	1.55	1.66	1.15	0.35
TiO ₂	0.30	0.30	0.47	0.30	0.25	0.40
CaO + MgO	2.20	1.90	4.26	2.45	1.05	3.95

表 4-3 硅藻土载体的主要物理性能

类 别	名 称	自由落下密度/ (g/cm ³)	装填密度/ (g/cm ³)	比表面/ (m ² /g)
红色载体	6201	0.47		5.0
	chromosorb P	0.38	0.47	4.0
白色载体	405	0.43		1.3
	chromosorb W	0.18	0.24	1.0
红白之间	chromosorb G ^①	0.47	0.58	0.5
聚四氟乙烯	chromosorb T	0.42	0.49	7.8

①chromosorb G 是一种硅藻土熔融的煅烧物,质地紧密坚硬,呈微粉色,要比通常的白色载体装填密度高2.5倍,涂渍5%的固定液相当于一般白色载体涂渍12%的固定液。

总起来讲红色载体适宜于分析非极性化合物,而白色载体适宜于分析极性化合物。

(3) 硅藻土载体的去活 如前所述,硅藻土载体表面存在活化点,给色谱分析带来许多问题,如拖尾、催化分解被测样品、改变保

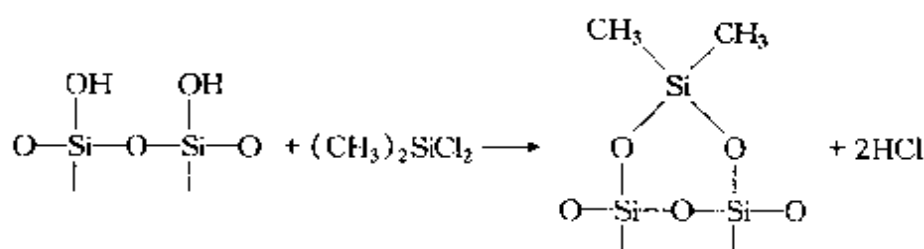
表 4-4 两类硅藻土载体的比较

载 体	红 色	白 色
化学性能	二者近似	NaO 多一些
pH	<7	>7
比表面/ m^2g^{-1}	4~6	1 左右
孔径分布	平均 $1\mu\text{m}$, 最多的是 $0.1\mu\text{m}$	$8\sim 9\mu\text{m}$, 最多的是 $4\mu\text{m}$
吸附性	较大	较小
催化性能	较大	较小
拖尾程度	易拖尾	拖尾较小

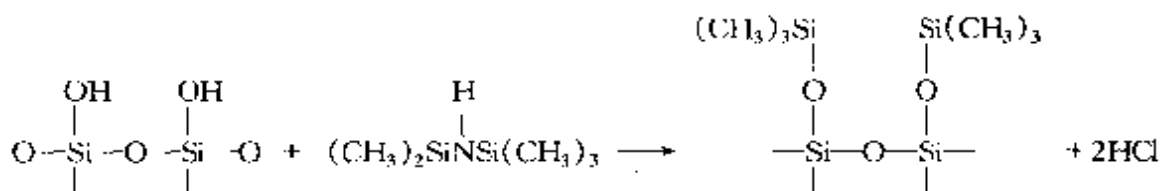
留值等, 所以人们想出了很多方法来消除或抑制活化点, 如酸洗、碱洗、釉化、硅烷化以及加減尾剂等办法。其中有效的方法是硅烷化法, 所谓硅烷化是用硅烷化试剂, 如二氯二甲基硅烷 (DMCS) 或六甲基二硅烷胺 (HMDS) 处理硅藻土载体, 使硅藻土载体上的硅羟基变为硅醚基, 消除硅羟基的活性。

①硅藻土载体的洗涤 在 James 和 Martin 早期的气相色谱研究中, 分离脂肪酸时就是用酸洗硅藻土载体, 消除载体对酸的吸附, 而在分离脂肪胺时用碱洗涤硅藻土载体, 消除载体对脂肪胺的吸附。有人认为载体上由矿物杂质造成的活化点, 用洗涤的方法可以消除, 但是酸洗和碱洗的效果如不经过硅烷化处理不易显示出来。

②硅藻土载体的硅烷化处理^[2] 把载体表面上的硅醇基进行反应是载体去活的有效措施, 主要的反应试剂是硅烷。硅烷化处理是 1958 年 Kwantes 和 Knight 提出的方法, 他们使用二氯二甲基硅烷 (DMCS) 做试剂, 虽然他们没有获得明显的成功, 但是 Horning 使用 DMCS 得到很好的效果。DMCS 和硅藻土载体表面硅醇基的反应如下:



另外可以用六甲基硅烷烷进行去活处理。例如当色谱柱变坏有拖尾时，可以用六甲基硅烷烷进行柱上去活，即往色谱柱中注射 $10\mu\text{L}$ 六甲基硅烷烷。它对消除拖尾很有用，其反应如下：



2. 非硅藻土载体

在 60 年代，非硅藻土载体占气液色谱载体的 5%~10% 的用量，其中氟碳化合物应用最广，其次是玻璃微球。促使人们研究非硅藻土载体的原因是硅藻土载体的吸附性，氟碳化合物的吸附性要比硅藻土载体小。但是今天在毛细管气相色谱逐步取代填充柱气相色谱的情况下，研究非硅藻土载体代替硅藻土载体的动力也就不大了。

第二节 气液色谱用固定液

一、气液色谱对固定液的要求

气相色谱固定液是色谱柱的核心，一个混合物样品是否能用气相色谱分析，主要决定于气相色谱固定液，具有下列性能的物质可以用作气相色谱固定液。

①在工作温度下为液体，具有很低的蒸气压（0.75kPa，即 0.1mm 汞柱）。

②在工作温度下要有较高的热稳定性和化学稳定性，即在进行色谱分析时固定液不与载体、样品和载气发生反应。

③在工作温度下固定液对载体有好的浸渍能力，使固定液形成均匀的液膜。

④固定液对所分离的混合物有选择性分离能力。

二、气液色谱用固定液的分类^[1]

1. 按分子间作用力分类

溶质在气液两相之间进行分配，溶质在液相中溶解量多少，决定于溶质分子和固定液分子间作用力的大小，而分子间的作用力有色散

力、静电力、诱导力和氢键力，氢键力又可分为给质子力、受质子力、给质子力与受质子力同时存在的分子力。因此按分子间作用力对固定液分类有助于固定液的选择。分类情况见表 4-5。

表 4-5 按分子间作用力对固定液的分类^[1]

固定液类别	典型固定液	色谱保留特性
I. 不易极化非极性固定液	角鲨烷、正三十六烷、聚二甲基硅氧烷	1. 非极性化合物按沸点次序洗脱出来 2. 同沸点极性化合物，偶极矩大的较快洗脱出来 3. 氢键型化合物类似于极性化合物，但同沸点、同偶极矩的极性化合物中，氢键型化合物较快洗脱出来
II. 易极化非极性固定液	含有芳香基的聚甲基硅氧烷，阿皮松-L、阿皮松-M	1. 非极性化合物按沸点次序洗脱出来 2. 同沸点极性化合物要比非极性化合物洗脱出来慢，偶极矩越大的洗脱出来越慢 3. 氢键型化合物类似于极性化合物，但同沸点、同偶极矩的极性化合物，氢键型化合物较快洗脱出来
III. 难成氢键的极性固定液	氟油，氟蜡	1. 不易极化的非极性化合物按沸点次序洗脱出，但易极化的非极性化合物要比不易极化的非极性化合物洗脱出来慢一些 2. 同沸点极性化合物按偶极矩大小决定洗脱出来得快慢，偶极矩大的洗脱出来要慢一些 3. 氢键型化合物也按偶极矩大小规律变化
IV. 能受质子的极性固定液	各种酯类固定液，如邻苯二甲酸二壬酯	1. 非极性和极性化合物的色谱特性与 III 同 2. 对氢键型化合物和能给质子化合物洗脱出来要慢一些
V ₁ . 给质子和受质子力同时存在的固定液	聚酯和聚醚固定液，如 PEG, DEGS	1. 不易极化的非极性化合物按沸点次序洗脱出来，但保留时间较短 2. 易极化的非极性化合物洗脱出来较慢 3. 同沸点极性化合物，偶极矩大的洗脱出来较慢 4. 氢键型化合物洗脱出来得较慢
V ₂ . 受质子力较强的固定液	如 THEED	1. 对非极性化合物色谱特性与 V ₁ 类似 2. 对能给质子的化合物洗脱出来较慢
V ₃ . 给质子力较强的固定液	如 OV-210、QF-1	1. 对非极性化合物色谱特性与 V ₁ 类似 2. 对受质子的化合物洗脱出较慢

2. 按极性分类^[1]

固定液的极性的表征不同于化合物极性的表征，化合物的极性可用偶极矩表征，而固定液的极性实际上是用典型化合物在固定液上的保留性能来表征，目前多用 McReynolds (麦克瑞诺) 常数表征固定液的极性，即测定五种典型化合物在某一固定液上的保留指数，同时测定这五种典型化合物在角鲨烷上的保留指数，用这两种固定液上保留指数之差来表征固定液的极性。

(1) 保留指数 (I) 保留指数是 1958 年 Kovats (克瓦茨) 出来的，用以表示化合物在一定温度下在某种固定液上的相对保留值，具体说它是以一系列正构烷烃作标准的相对保留值 (其定义在第二章的第二节已经讲过，见公式 2-9)。

(2) 保留指数差 (ΔI) 化合物 x 在某一固定液 s 上测得的保留指数 I_s^x 减去 x 在角鲨烷固定液上得到的保留指数 I_{sq}^x ，即 $\Delta I_s^x = I_s^x - I_{sq}^x$ 叫做化合物 x 在固定液 s 上的保留指数差。见第二章的第二节的计算举例。

(3) 用麦克瑞诺常数表示固定液的极性 麦克瑞诺用 10 种典型化合物，苯、正丁醇、2-戊酮、1-硝基丙烷、吡啶、2-甲基-2-戊醇、碘丁烷、2-辛炔、二氧六环和顺八氢化茚，在 120℃ 柱温下测定了 226 种固定液上的保留指数差 (ΔI)，以前五种化合物 ΔI 之和的大小来表示固定液的极性。现列举常用固定液的麦克瑞诺常数于表 4-6 中。

表 4-6 常用固定液的麦克瑞诺常数^[3]

固定液	X'	Y'	Z'	U'	S'	b	r	总极性	平均极性	固定液类别
角鲨烷	0	0	0	0	0	0.2891	1.945	0	0	I
阿皮松-L	32	22	15	32	42	0.2821	1.914	143	28.6	II
SE-30	15	53	44	64	41	0.2495	1.776	217	43.4	I
OV-1	16	55	44	65	42	0.2470	1.766	222	44.4	I
OV-3	44	86	81	124	88	0.2547	1.797	423	84.6	II
OV-7	69	113	111	171	128	0.2570	1.807	529	118.4	II
OV-11	102	142	145	219	175	0.2562	1.803	786	157.3	II

续表

固定液	X'	Y'	Z'	U'	S'	b	r	总极性	平均极性	固定液类别
邻苯二甲酸二壬酯	83	183	147	231	159	0.2804	1.907	803	160.6	IV
OV-17	119	158	162	243	202	0.2551	1.799	884	176.8	II
Versamide990	109	314	145	212	209	0.2592	1.815	989	197.8	V ₁
OV-22	160	189	191	283	253	0.2464	1.763	1075	215.0	II
OV-25	178	204	208	305	280	0.2428	1.749	1175	235.0	II
OV-210	146	238	358	468	310	0.2086	1.615	1520	304.0	V ₂
OV-225	228	369	338	492	386	0.2275	1.688	1813	362.6	V ₂
PEG 20M	322	536	368	572	510	0.2235	1.673	2308	461.3	V ₁
DEGA	378	603	460	665	658	0.2105	1.623	2764	552.8	V ₁
DEGS	492	733	581	833	791	0.1925	1.558	3430	686	V ₁
EGS	536	775	636	897	864	0.1844	1.529	3708	741.6	V ₁
THEED	463	942	626	801	893	0.1906	1.550	3725	745.0	V ₂
BCEP	690	991	853	1110	1000	0.1951	1.593	4644	928.8	V ₁

说明: X', Y', Z', U', S' 分别代表苯、正丁醇、2-戊酮、1-硝基丙烷、吡啶的

$$\Delta I; r = \sqrt{t'_{R(C_{12}^0)} / t'_{R(C_{10}^0)}} = t'_{R(n+1)} / t'_{R(n)}, b = \lg r_c$$

三、常用的气液色谱固定液

1. 最常用的气液色谱固定液

研究和用过的气相色谱固定液有 1000 余种, 但最常用的不到 10 种, 现把最常用的气液色谱固定液列于表 4-7 中。

表 4-7 最常用的气液色谱固定液

序号	名称	商品代号	结 构 式	类别
1	聚二甲基硅氧烷	OV-101, SP2100, SE-30, SF96	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 - \text{Si} - \text{O} - [\text{Si} - \text{O}]_n - \text{Si} - \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $	I
2	聚苯基甲基硅氧烷	OV-17, SP2250	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 - \text{Si} - \text{O} - [\text{Si} - \text{O}]_n - \text{Si} - \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{C}_6\text{H}_5 \quad \text{CH}_3 \end{array} $	II

续表

序号	名称	商品代号	结 构 式	类别
3	聚乙二醇 ($M_n > 4000$)	PEG 20M	$\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{OH}$	V_1
4	聚 醚	DEGS	$\text{HO}-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2$ $\text{HO}-\pi-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}_2\text{C}$	V_1
5	全氟基聚硅氧烷	Silar10C, SP2340	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \\ \\ (\text{CH}_3)_3\text{Si}-[\text{OSi}]_n-\text{OSi}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \end{array}$	V_3
6	三氟丙基聚硅氧烷	OV-210, SP2401	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ (\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{O}-[\text{Si}-\text{O}]_n-\text{Si}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3 \end{array}$	V_3

2. 较常用的气液色谱固定液

在千余种固定液中，使用比较多的有 20 多种，这 20 多种固定液中包括了 6 类最常用的气液色谱固定液。常规高性能气相色谱固定液有下列一些：

- ①聚二甲基硅氧烷 (OV-101, OV-1, SE-30);
- ②SE-54 (含 5% 苯基和 1% 乙烯基的聚甲基硅氧烷);
- ③OV-7 (含 20% 苯基的聚甲基硅氧烷);
- ④OV-1701 (含 7% 苯基和 7% 氟丙基的聚甲基硅氧烷);
- ⑤OV-17 [含 50% 苯基的聚甲基硅氧烷 (油)];
- ⑥OV-17 (gum) [含 50% 苯基, 2% 乙烯基的聚甲基硅氧烷 (橡胶)];
- ⑦OV-25 [含 75% 苯基的聚甲基硅氧烷 (油)];
- ⑧OV-210 [含 50% 三氟丙基的甲基硅氧烷 (油)];
- ⑨OV-215 [含 50% 苯基、2% 乙烯基的聚甲基硅氧烷 (橡胶)];
- ⑩UCON HB 5100 (约 50/50 的聚乙/丙基醚);
- ⑪OV-225 (含 25% 氟丙基、25% 苯基的聚甲基硅油或硅橡胶);

⑫Superox-4 (高分子量的聚乙二醇, 使用温度可到 300℃);

⑬Superox-0.1 (聚乙二醇, 使用温度可到 280℃);

⑭Superox 20M (聚乙二醇, 使用温度可到 300℃);

⑮PEG-20M;

⑯Silar 5CP (含 50% 氰丙基 50% 苯基的聚甲基硅油);

⑰SP-2340 (含 75% 氰丙基的聚甲基硅油);

⑱Silar 10 CP (含 100% 氰丙基的硅油);

⑲OV-275 (含 100% 氰乙基的硅油)。

80 年代中期出现一些为毛细管色谱柱合成的极性高、热稳定性好的苯基或氰基含量高又可以进行交联的、粘度高的固定液, 如:

①含 70% 苯基和 4% 乙烯基的聚甲基硅氧烷 (使用温度可达 400℃);

②含 50% 苄基的聚甲基硅橡胶;

③含 33% 苄基和 33% 氰丙基的聚甲基硅橡胶;

④含 95% 氰丙基的乙烯基硅橡胶;

⑤含 90% 氰丙基和 10% 苄基的聚硅氧烷硅橡胶。

近年又有人提出五类常用的固定液, 其名称和它们在填充和毛细管柱中的使用情况见表 4-8。这些固定相多用分子间作用力来表征 (见表 4-9 的数据)。在这些固定液中绝大多数是聚硅氧烷。

表 4-8 五类典型气相色谱固定液的使用情况^[5]

类别	固 定 相	使 用 情 况/%	
		毛细管柱	填充柱
1	聚二甲基硅氧烷	55	50
2	聚乙二醇	27	44
3	5% 苄基聚甲基硅氧烷	25	15
	50% 苄基聚甲基硅氧烷	21	29
4	7% 氰基、7% 苄基聚甲基硅氧烷	9	6
	25% 氰基、25% 苄基聚甲基硅氧烷	9	13
5	50% 三氟丙基聚硅氧烷	4	9

表 4-9 五类典型气相色谱固定液的作用力^[5]

固定相	色散力	可极化度	偶 极	氢键受体	羰基受体	非饱和键受体
聚二甲基硅氧烷	强	可忽略	可忽略	弱	—	—
聚乙二醇	强	中等	中等	强	—	—
含氟甲基硅氧烷	强	可忽略	中等	中等	最强	—
苯基甲基硅氧烷	最强	强	弱	弱	—	—
氰基甲基硅氧烷	最强	中等	强	—	中等	强

四、耐高温的气液色谱固定液

由于要分析分子量大、热稳定性好的样品，对气相色谱固定相的耐热性提出了更高的要求。例如，在石油分析中模拟蒸馏要分离 100 个碳以上的脂肪烃，分离原油中的有机金属化合物如金属卟啉类化合物，分析聚合物中的添加剂，分析食品中三甘油酸酯，分析环境中的多环芳烃等，都要求能耐 325℃ 以上柱温的色谱柱。通常在 325℃ 以下的色谱叫常温色谱，高于 325℃ 以上柱温的色谱叫高温色谱。在高温色谱固定相中最常用的是端羟基聚硅氧烷，在涂渍过程中进行缩合交联并与石英表面的硅羟基缩合而键合到毛细管壁上。SGE 公司在 1995 年展出三种耐高温毛细管柱 BPX-5 ($T_{\max} = 370^{\circ}\text{C}$)；BPX-35 ($T_{\max} = 360^{\circ}\text{C}$)；BPX-70 ($T_{\max} = 290^{\circ}\text{C}$)。Chrompack 公司的不锈钢高温柱 ST-SIMDIST CB 可用到 430℃。曾在市场上出现的耐高温气液色谱固定液见表 4-10。

表 4-10 耐高温的气液色谱固定液^[5]

厂 家	毛细管柱	所用固定液	温度范围/℃
Chrompack	耐高温聚酰亚胺涂层弹性石英毛细管柱	端羟基聚二甲基硅氧烷	0~430
		端羟基 50% 苯基甲基硅氧烷	0~430
		端羟基 65% 苯基甲基硅氧烷	0~70
Nihon Chroma-to Work Ltd	PAS 金属涂层弹性石英毛细管柱	聚二甲基硅氧烷	-20~450
		聚苯基甲基硅氧烷	-20~450
Quadrex Corp	铝涂层弹性石英毛细管柱	端羟基聚二甲基硅氧烷	0~430
		端羟基 5% 苯基甲基硅氧烷	0~430
		端羟基 50% 苯基甲基硅氧烷	0~400
		端羟基 65% 苯基甲基硅氧烷	0~400

续表

厂 家	毛细管柱	所用固定液	温度范围/℃
Scientific glass Engineering	铝涂层弹性石英毛细 管柱	聚硅氧烷-碳硼烷	10~480
Supelco	聚酰亚胺涂层弹性石 英毛细管柱	聚二甲基硅氧烷	-20~350

五、选择性气液色谱固定液^[3]

1. 概况

选择性固定液是近年来研究最多的气相色谱固定液，而且主要是针对手性异构体的分离。因为化合物的手性特征十分普遍，它在医药，农药中具有重要意义，所以对分析手性化合物提出迫切要求。而分离对映异构体的核心是寻找合适的手性固定相。气相色谱中手性固定相一般讲有三大类：第1类手性氨基酸的衍生物；第2类手性金属配合物；第3类环糊精衍生物。

第1类和第2类手性固定相曾经有不少好的固定相，但是近年来大量研究的手性固定相是第3类即环糊精衍生物。

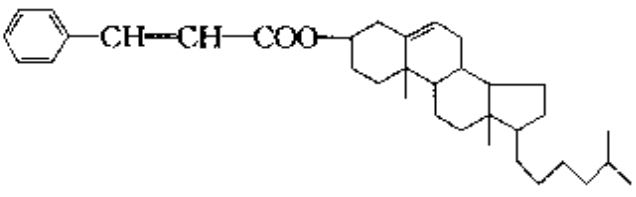
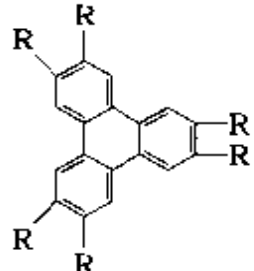
另一类选择性固定相是分离位置异构体的固定相，例如二元取代苯位置异构体（如二甲苯的间对异构体、甲酚的间对异构体、二甲酚的六个位置异构体等），在工业上有很重要的意义。曾经在60~70年代发展了低分子液晶固定相，在80年代初发展了高分子液晶固定相，在80年代中期发展了高分子冠醚固定相，90年代也采用环糊精衍生物作固定相可以很好地分离这些位置异构体。

2. 液晶和高分子液晶固定相

低分子液晶固定相是1963年Kelker首先提出的，成功地用于苯的二元取代异构体的分离，其后国内外有许多人研究这类固定相，国内发展了芳羧酸酯类液晶作气相色谱固定相在工业分析中的应用。在孙济庆等编纂的《中国液晶科技论文索引集》中汇集了国内从1983到1994年间发表的有关液晶的科技论文索引^[7]，其中有很多是在气相色谱固定液中的应用。80年代初发展了以聚硅氧烷为主链、以液晶为侧链的高分子液晶气相色谱固定液，在位置异构体和多环芳烃的

分离上有所突破,但是这种固定相在提纯和热稳定性方面还存在一些问题,所以多年来只有极少数商品柱。不过至今研究这种固定相的报告有不少。最近还有用主链液晶作气相色谱固定相涂在石英柱上用于环境样品的分析的报告。用做低分子液晶固定相的典型液晶列于表 4-11 中。典型的侧链聚硅氧烷液晶列于表 4-12 中。

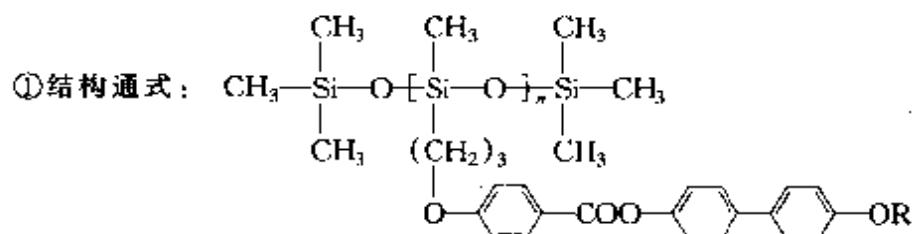
表 4-11 典型的液晶固定相^{①[3]}

类 别	结 构 式	相变温度/℃		
		S-Sm	S-N 或 Sm-N	N-L 或 C-L
偶氮苯类	$R-O-\text{C}_6\text{H}_4-N=N-\text{C}_6\text{H}_4-O-R$ 如 $R=C_6H_{11}$	96	100	110
氧化偶氮苯类	$R-O-\text{C}_6\text{H}_4-N(\text{O})=N-\text{C}_6\text{H}_4-O-R$ 如 $R=CH_3$	—	120	135
亚苄基类	$R-O-\text{C}_6\text{H}_4-CH=N-\text{C}_6\text{H}_4-CH_2CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-N(\text{O})=CH-O-R$ 如 $R=CH_3$	—	181	320
芳羧酸酯类	$R-O-\text{C}_6\text{H}_4-COO-\text{C}_6\text{H}_4-OOC-\text{C}_6\text{H}_4-O-R$ $R=C_6H_{13}$	—	124	213
胆甾醇类	 胆甾醇片桂酸酯	—	胆甾相 150	210
异氰酸酯	$C_6H_{13}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-CH_2-CH_2-\text{C}_6\text{H}_4-NCS$	55.8	98.5	130
盘状液晶	 $R = C_nH_{2n+1}$ $= OCOC_nH_{2n+1}$	—	—	—

①S—固态; Sm—近晶相; N—相列相; L—各相同性液体; C—晶体。

表 4-12 典型高分子液晶^[3]

高分子液晶 ^①	R	相变温度 ^② /℃	高分子液晶 ^①	R	相变温度 ^② /℃
MEPSIL-1	CH ₃	k138 n 267 i	MEPSIL-3	C ₃ H ₇	k180 n 280 i
MEPSIL-2	C ₂ H ₅	k176 n 286 i	MEPSIL-4	C ₄ H ₉	k175 n 271 i

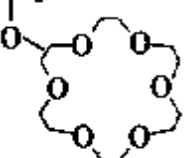
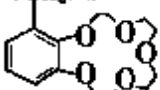


②k—结晶；n—相列相；i—各向同性。

3. 冠醚和高分子冠醚固定相^[3,5,6]

冠醚和高分子冠醚作气相色谱固定相始于 1985 年，高分子冠醚固定相虽然开始于国外，但是有关这类固定相的研究是我国做得最多。国内有武汉大学和北京理工大学做了较多的研究，这种高分子冠醚固定相分离某些位置异构体，如甲酚、二甲酚异构体等，十分有效。最近俄罗斯用二苯并 18-冠-6 和 OV-101 作成层状固定液的毛细管柱分离 25 种有机物很有效。但是冠醚和高分子冠醚的合成比较困难。目前还没有高分子冠醚的商品柱。我们研究的高分子冠醚和高分子液晶冠醚结构如表 4-13 所列。

表 4-13 高分子冠醚和高分子液晶冠醚^[3]

代 号	结 构
PSO-11-18C-6	$\text{CH}_3-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\left[\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OR}\right]_n-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_3$ 
PSO-B-15C-5O	$\text{CH}_3-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\left[\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OR}\right]_n-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_3$ 

代 号	结 构
PSO-B-15C-5M	
PSO-DB-14C4	
PSC-3	

六、含手性氨基酸的衍生物聚硅氧烷固定相^[5]

早在 1966 年 Gil-Av 等就用涂在玻璃毛细管柱上的 *N*-三氟乙酰基-L-异赖氨酸戊酯作手性固定液分离消旋的 *N*-三氟乙酰基氨基酸酯。1977 年 Frank 制备出二甲基硅氧烷和 (2-羧丙基) 甲基硅氧烷的共聚物固定相 CSP Chirasil-Val, 这一固定相具有很好的分离氨基酸对映异构体的性能, 并成为很有名的商品手性柱, 多年来得到广泛的应用, 此后在合成方法及手性基团的改变上都有一些研究报道。近来仍有对 Chirasil-Val 改进的研究, 如 Koppenboefer 等对 Chirasil-Val 的主链进行改造, 在主链中二甲基硅氧烷链段和带有 L-缬氨酸叔丁基酰胺基团的硅氧烷链段比例等于 7 的情况下分离效果最好。另外研究发现在 L-缬氨酸叔丁基酰胺基和硅氧烷链之间引入一个僵硬的环己基间隔基可缩短分析时间而对分离效果没有大的影响。

七、环糊精及其衍生物类手性固定相

环糊精及其衍生物早在 1961 年就用作气相色谱固定相，1987 年开始用于对映异构体的分离。90 年代初是环糊精及其衍生物作气相色谱固定相的大发展时期，合成和使用了几百种环糊精衍生物气相色谱固定相，积累了几百种手性化合物在各种环糊精衍生物固定相上的保留数据，为研究环糊精及其衍生物保留机理和实际应用分析提供了数据。

环糊精 (Cyclodextrin, 简称 CD) 是 6 个以上 D- (+) -葡萄糖分子单元通过 α -1,4 连接而形成的聚合体。最常用的 α 、 β 、 γ -环糊精分别含有六、七、八个葡萄糖单元。每个葡萄糖单体有五个手性中心。环糊精外形类似内空去顶的圆台。C (2) (葡萄糖单元上第二个碳，下同) 上的羟基位于圆台细口端。C (2) 上的羟基为顺时针方向，C (3)、C (6) 上的羟基为逆时针方向，这种结构因素在手性识别上起作用。由于内腔只有 C—H 键和 C—O 苷键，具有疏水性。环上具有多羟基，具有亲水性。O 原子的孤对电子朝向内腔，使内腔具有高电子密度，具有 Lewis 碱的特征，能和多种化合物形成包含化合物。

由于环糊精母体和一些衍生物有较高的熔点，很多人把它们溶于中等极性的聚硅氧烷 (如 OV-1701) 中形成混合固定液。但是 Koenig 使用低熔点的环糊精衍生物作气相色谱固定相，不用稀释剂直接涂渍在毛细管柱上分离对映异构体，所以文献中也有用纯的环糊精衍生物作手性固定相的报告。不过 Koenig 本人后来也把低熔点的环糊精衍生物溶在 OV-1701 中使用。环糊精衍生物的商品柱多为用在 OV-1701 稀释的混合固定相。1990 年 Schurig 把全甲基环糊精接枝到聚硅氧烷上，成为侧链甲基环糊精聚硅氧烷固定相，这种固定相容易涂渍，耐热性好，效仿 Chirasil-Val 的命名，把它叫作 Chirasil-Dex。它可以用于气相色谱或超临界流体色谱。后来又把三氟乙酰基引入环糊精中接枝到聚硅氧烷上，叫作 Chirasil-Dex-TFA，并使之固定化，用作手性分离固定相。近来 Armstrong 的研究组在这方面也进行了很好的研究。

环糊精的结构和性能如表 4-14 和图 4-1 所示。

表 4-14 CD 的物理数据及性质

CD	α -CD	β -CD	γ -CD
葡萄糖单元数	6	7	8
$M_r/(g/mol)$	972.86	1135.01	1297.15
空腔直径/nm	0.47~0.52	0.60~0.64	0.75~0.83
空腔高度/nm	0.79~0.80	0.79~0.80	0.79~0.80
比旋光度/ $(\alpha)_D^{25}$	150.5	162.5	177.4
水溶性(25℃)/(g/mL)	14.50	1.85	23.20
羟基 pK_a	12.33	12.20	12.08
空腔所容纳水分子数	6	11	17
容纳客体分子类型	苯	萘	蒽

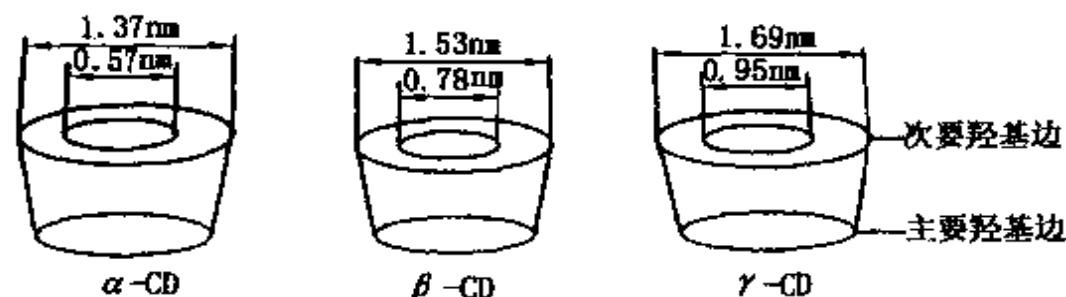


图 4-1 环糊精结构示意图

第三节 气相色谱条件的选择^[8,9]

一、气相色谱条件

所谓气相色谱条件是指进行色谱分析时所用的色谱柱(柱尺寸、填料)、柱温、载气和载气流速、检测器和检测器的温度、进样方式和温度等。气相色谱条件对色谱分离有很大的影响,本节就是讨论它对气相色谱分离的影响,以及这些色谱条件的选择。

(一) 色谱柱材料、柱形和柱径

1. 色谱柱材料的选择

(1) 不锈钢柱和其他金属柱 一般分析多用不锈钢柱,它的优点是机械强度好又有一定的惰性,如用它来分离烃类和脂肪酸酯类是足

够稳定的，但分析较为活性的物质时要避免使用不锈钢柱。在使用高分子小球时也不要使用不锈钢柱。其他金属柱现在很少使用。

(2) 玻璃柱 在分析较为活泼的物质时，多用玻璃柱，它透明便于观察柱内填充物的情况，光滑易于填充成密实的高效柱，其缺点是易碎。

2. 色谱柱的柱形和柱径

现代分析用填充柱气相色谱法，多用直径为 2~3 mm 的色谱柱，而微填充柱则使用内径 1mm 左右的色谱柱，小内径色谱柱可降低范氏方程式中涡流扩散项的 λ 值，从而提高柱效。

因为填充柱的阻力大，载气压力降 (Δp) 大，柱长受到限制，最长只有 7m 左右，一般多用 1~3m 的填充柱。具体使用多长的要看被分离物质对的 α 值大小，在达到分离的要求条件下，宜使用短色谱柱。这样可以降低柱温、缩短分析时间。

(二) 载气种类和流速

1. 载气种类

气相色谱用载气从范第姆特公式 (2-30) 可知，使用重载气（氮气、氩气）还是用轻载气（氢气、氦气），要根据具体情况作具体的分析，如主要是降低纵向扩散对柱效的影响，即降低载气的扩散系数，应使用重载气。但用重载气就要延长分析时间。用轻载气虽然会影响纵向扩散而降低柱效，但是也可以降低气相的传质阻力，有利于提高柱效，而且可以缩短分析时间。对 TCD 来说更应该使用轻载气。近年在用 FID 进行检测时多用轻载气。

2. 载气流速对柱效的影响

从范第姆特公式 (2-30) 知道，每一支色谱柱都有一个最佳流速点，在此流速下柱效最高。最佳流速是 $u_{opt} = \sqrt{BC}^{-1}$ ， B 和 C 是纵向扩散项和传质阻力项。因此当固定液含量高时传质阻力项 C 增加，无论用什么载气 u_{opt} 都要小，如要用高载气流速，柱效就要降低。而当固定液含量低时，轻载气和重载气得到的柱效相近，但是轻载气可缩短分析时间。例如当使用 10% 的固定液时，使用氢气或氦气要比氮气的流速大 3.5 倍。

3. 载气流速对保留时间的影响

载气流速和保留时间的关系决定于下式:

$$t_R = L(1 + K')\bar{u}^{-1} \quad (4-1)$$

对一个给定的色谱柱, 当柱温不变时, 对某一化合物其 K' 是一定的, 所以 (4-1) 式可写成:

$$t_R = C\bar{u}^{-1} \quad (4-2)$$

式中 C ——常数;

$\bar{u}$ ——载气流速。

所以保留时间和载气流速的倒数成直线关系。

4. 载气流速对定量结果的影响

(1) 载气流速对热导检测器信号值的影响 按一般检测器理论讲, TCD 是浓度型检测器, 载气流速对峰高或峰面积应该没有影响。但是实际上载气流速对峰高或峰面积有很大的影响, 这是因为当流速快时, 热传导未达平衡时被分析物就被洗脱出热导池, 如表 4-15 的实验数据。

表 4-15 载气流速对峰高或峰面积的影响

载气流速/(mL/min)	峰高/mm	半峰宽/mm	峰面积/mm ²
50	93.0	9.0	930
60	85.0	9.0	747
70	79.0	8.0	632
80	73.0	7.5	548
100	66.5	6.0	399
200	47.5	5.0	238

(2) 载气流速对其他检测器信号值的影响 载气流速对 FID, ECD, FPD 检测器信号值都有不同程度的影响, 如 FID 要使用三种气体 (如氮气、氢气和空气), 它们的流速都对信号有影响, 一般情况下氢气流速: 氮气流速 = 1:1 左右, 空气流量应大于氢气流量约 5~10 倍。

ECD 在气相色谱检测器中是灵敏度最高的一种, 载气的纯度和流速对信号值和稳定性有很大的影响, 所以要求载气的纯度在四个 9

以上。

载气、氢气和空气的流速对火焰光度检测器 (FPD) 有很大的影响, 所以各种气体流量控制要很稳定。测定含硫化合物时火焰温度宜在 390°C 左右, 可生成激发态的 S_2^* ; 测定含磷化合物时氢和氧的比例价应在 2~5 之间, 根据样品不同要改变氢氧比, 还要把载气和补充气量进行适当调节, 以便获得好的信噪比。

热离子检测器 (TID) 本质上是氢火焰离子化检测器的火焰上加碱金属盐, 使之产生微弱的电流, 电流的大小与火焰的温度有关, 火焰的温度又与氢气的流量有关, 所以必须很好地选择和控制在氢气的流量。厂家对 TID 所用氢气的流量有严格的规定, 据有人研究氢气变化 0.05% 将使 TID 的离子流改变 1%。TID 的灵敏度和基流还取决于空气和载气的流量, 一般来讲它们的流量增加灵敏度要降低。载气的种类也对灵敏度有一定的影响, 用氮做载气要比氦做载气灵敏度提高 10%, 其原因是用氮时使碱金属盐过冷, 造成样品分解不完全。

(三) 柱温的选择及对分析结果的影响

1. 柱温对柱效的影响

曾有人发现柱温对柱效的影响也呈双曲线的变化关系。

$$h = A + BT + CT \quad (4-3)$$

式中 T ——热力学温度;

A, B, C ——常数。

另外一些研究者发现理论塔板数的对数和温度倒数成直线关系。

$$\lg n = \lg \frac{L \cdot u}{2D_G} - \frac{\Delta H}{2.303RT} \quad (4-4)$$

式中 n ——柱效;

L ——是柱长;

u ——载气流速;

D_G ——扩散系数;

ΔH ——溶解焓;

R ——气体常数;

T ——热力学温度。

2. 柱温对保留值的影响

柱温对相对保留值 (α) 的影响可用下式 (4-5) 表示

$$\lg \alpha = aT^{-1} + b \quad (4-5)$$

式中 a, b ——常数, a 可以是正值, 也可能是负值;

T ——热力学温度。

3. 柱温对保留时间的影响

物质在两相间的分配系数 K 和温度之间的关系为

$$K = C \exp[-\Delta H_s(RT)^{-1}] \quad (4-6)$$

式中 C ——常数;

ΔH_s ——溶解焓;

R ——气体常数;

T ——热力学温度。

由 (4-6) 式可以推引出保留时间对数和温度的倒数成直线的关系。

$$\lg t_R = A + RT^{-1} \quad (4-7)$$

4. 柱温对峰高、峰面积的影响

气相色谱常用峰高或峰面积进行定量分析。一般讲柱温对峰高有很大的影响, 因为柱温升高保留时间就会缩短, 峰高自然就要升高, 相反则峰高就要降低。而柱温对峰面积没有什么影响, 这是因为当柱温升高时虽然峰高增加, 但同时它的半高峰宽降低, 二者的乘积 (即峰面积) 保持恒定。所以在定量分析时用峰面积定量不受柱温的影响。

(四) 检测器和气化室温度的选择及对分析结果的影响

1. 检测器温度的选择

热导检测器温度一般要比柱箱温度高一些, 以防被分析样品在检测器中冷凝, 对 TCD 来说更重要的是检测室要很好地控温, 最好控制在 0.05°C 以内。热导检测器温度升高时其灵敏度要下降。

氢火焰离子化检测器 (FID) 的温度一般要在 100°C 以上, 以防水汽冷凝, FID 对控温要求不严格, 不像 TCD 对温度那么敏感。

电子捕获检测器 (ECD), 检测室温度对基流和峰高有很大的影响, 而且样品不同在 ECD 上的电子捕获机理也不一样, 受检测室温度的影响也不同, 所以要具体的情况具体分析。

2. 气化室温度的选择

如气化室温度选择不当, 会使柱效下降, 当气化室温度低于样品的沸点时, 样品气化的时间变长, 使样品在柱内分布加宽, 因而柱效会下降。而当气化室温度升至足够高时, 样品可以瞬间气化, 其柱效恒定。

在进行峰高定量时, 气化室温度对分析结果有很大的影响, 如气化室温度低于样品的沸点时, 峰高就要降低, 所以在用峰高定量时, 气化室温度要尽可能高于样品各组分的沸点, 当然如果气化室温度太高会导致样品的分解。

二、固定液的选择^[1]

在填充柱气相色谱中由于色谱柱的柱长受到限制, 它的总柱效一般难以超过 6000 理论板数, 所以对难分离的混合物就必须提高固定相的选择性, 也就是要寻找相对保留值大的固定液, 因此在填充柱气相色谱中固定液的选择就十分重要。

在气相色谱发展的近半个世纪中, 人们研究过的固定液有 1000 多种, 直到现在新固定液的合成仍是气相色谱研究的热点, 其目的就是要解决难分离的物质对, 特别是手性异构体的分离^[3,5,6], 还是没有彻底解决的问题。

虽然有许许多多的研究涉及化合物在各种固定液上保留时间的预估, 但是要分离一个混合物, 单纯用计算的方法来选择固定液还是不行的。一般讲要利用选择固定液的基本原则, 结合自己及他人的实践经验, 经过为数不多的实验次数, 选出满意的气相色谱固定液来。

(一) 选择固定液前对样品的了解

在选择固定液前要对样品有足够的了解, 对已知组成混合物各组分的理化性能、分子式、结构、官能团、化合物类别等要有所了解。从而寻找出这些化合物之间有无沸点、极性、官能团等方面的差别, 也就是说要利用固定液和这些化合物之间作用力大小的不同来选择合适的固定液。

(二) 选择固定液的基本原则^[1]

在选择固定液时有几项最基本的原则可以遵循, 利用这些基本

的原则可以减少实验量，节约时间和精力。

1. “相似相溶”原则

这一原则是人们研究物质溶解过程时总结出来的规律，即溶质和溶剂在极性、官能团和化学性质等相似时，可以相互溶解。例如，石蜡可以溶于石油醚，因为它们全是烃类化合物；乙醇可以溶于水，因为它们都有羟基，可以生成氢键；硝基芳烃可以溶于硝基苯，因为它们都是硝基芳烃类化合物。人们在研究气相色谱固定液和被分离物质之间的作用时，也应用了这一原理，即被分离物质和固定液的极性、结构、官能团相似时，二者的作用力强，保留时间就长。在分离同类型的混合物时只要它们的沸点有差别，使用和样品类型相同的固定液就可以得到很好的分离。这一原则在气相色谱中使用十分普遍。例如我们统计了 20 篇分离石蜡中正构烃的研究报告，有 18 篇是利用像阿皮松、SE-30、SE-52 等非极性固定液。分离醇类混合物多用聚乙二醇、聚酯等氢键型固定液。分离脂肪酸（一般多衍生化为甲酯）使用聚酯固定液。分离游离脂肪酸时，如用三聚酸（ C_{54} 酸）可以把 $C_1 \sim C_4$ 的脂肪酸分离得很好，而且峰形对称。这些都是“相似相溶”原则的例证。

但是“相似相溶”原则不是在任何情况下都是有效的，即不能不考虑具体情况一概使用“极性混合物用极性固定液进行分离，非极性混合物用非极性固定液进行分离”的规律。例如分离苯和环己烷时使用非极性固定液反而不好，而使用极性固定液倒可以分离的很好，如前面讲过的用 EGS 做固定液用 0.5m 的色谱柱就可以把二者分离开。再如分离三硝酸甘油酯、二硝基甲苯、邻苯二甲酸二丁酯和二甲基二苯基尿素，这些极性化合物，如果使用极性固定液，像 OV-225 或 PEG 20M，并不能把这些化合物很好地分离开，而且保留时间太长，但是如使用非极性固定液（如 SE-30）却可以把它们完全分离开，分离度高，分析时间短。可见要使用“相似相溶”原则是有条件的，一般来说，在同系物或相同官能团的混合物各组分在沸点上有差别时，使用“相似相溶”原则有效。

2. 固定液和被分离物分子之间的特殊作用力

所谓特殊作用力是指除色散力以外的几种作用力。利用固定液和被分离物分子之间的特殊作用力是选择固定液十分的重要原则。

(1) 利用固定液的诱导力 如果难分离物质对中，一个是难极化的非极性化合物，而另一个是易极化的非极性化合物，二者沸点又相近，这时候不能利用沸点差别进行分离，而要用极性强的固定液分离它们。强极性固定液可以使易极化的非极性化合物产生诱导力，从而增强它们之间的作用力，使保留时间加长；而强极性固定液和难极化的非极性化合物作用力很弱，保留时间短，这样一来就可以把二者分离开。例如苯和环己烷的分离就是利用这一原理。如表 4-16 中的数据，在非极性固定液角鲨烷上苯和环己烷不能分离，而在 β , β -氧二丙腈上却可以十分容易地分离。

表 4-16 苯和环己烷在不同固定液上的分离情况

化合物	沸点/℃	相对保留值 α			
		角鲨烷	邻苯二甲酸二癸酯	PEG2000	β , β -氧二丙腈
苯	80.1	1.0	1.5	3.9	6.3
环己烷	80.7	1.0	1.0	1.0	1.0

(2) 利用固定液的氢键力 氢键力在气相色谱中有着十分重要的作用，利用氢键力的差别选择固定液十分有效。例如，二甲胺和三甲胺的分离就是靠氢键力的不同，二甲胺和三甲胺的沸点相近，但是二者的结构有明显的差别，二甲胺为仲胺，在氮原子上留有一个氢原子，它是一个活泼氢，有给质子的能力，也就是说二甲胺分子上的氮可以受质子，氮上的氢可以给质子，遇到氢键型固定液就有双重作用力；而三甲胺分子的 N 上没有氢，只是氮原子可以受质子，它和氢键型固定液的作用力不如二甲胺，因而保留时间就低于二甲胺。从表 4-17 中数据可以看出，二甲胺和三甲胺在甘油固定液上可以得到好的分离，因为它们的相对保留值相差一倍。

(3) 利用固定液的受质子力 有一些固定液，如邻苯二甲酸二酯类，它们具有受质子能力较强的特点，对于一些给质子力强的化合物有较强的保留能力。如四种氟里昂化合物的分离，见表 4-18，从表

中数据可以看出, F_{23} 和 F_{22} 是强给质子化合物, 它们和邻苯二甲酸二壬酯 (DNP) 有很强作用力, 而 F_{13} 和 F_{12} 没有给质子的能力, 和 DNP 作用力弱, 所以在 DNP 上 F_{23} 和 F_{13} 的 α 值有较大的差别 (F_{22} 和 F_{12} 也一样)。而在非极性 DC-703 固定液上这两组氟里昂不能分离。

表 4-17 用不同的氢键力分离二甲胺和三甲胺

化合物	偶极矩 D	沸点/°C	相对保留值 α		
			石蜡油	十一醇	甘油
氨	1.46	-33.4	1.00	1.00	1.00
甲胺	1.31	-6.5	1.65	3.4	1.0
二甲胺	1.03	7.4	2.70	5.2	1.0
三甲胺	0.61	3.5	2.70	4.2	0.47

表 4-18 四种氟里昂化合物的分离

氟里昂	结构式	沸点/°C	偶极矩 D	相对保留值 α	
				DNP	DC-703
F_{23}	CF_3H	-82.2	1.68	1.00	1.00
F_{13}	CF_3Cl	-81.5	0.46	0.60	1.00
F_{22}	CF_2CH_3	-40.8	1.4	6.60	10.05
F_{12}	CF_2Cl_2	-28	0.50	3.60	10.05

(4) 利用固定液给质子力 在众多的固定液中有为数不多的给质子力很强的固定液, 如 OV-210, QF-1 等, 这类固定液由于其结构特殊, 在聚硅氧烷侧链上的三氟丙基邻近的 β -C 上的两个氢呈活泼的状态, 非常容易和受质子的化合物形成氢键, 其作用力非常强。例如用 QF-1 固定液分离沸点相近的甲乙酮和乙醇, 由于 QF-1 和甲乙酮的羰基有很强作用力, 乙醇在甲乙酮之后出峰。二者在 QF-1 上的保留指数见表 4-19。甲乙酮和乙醇在 QF-1 柱上的保留性能有很大的差别, 非常容易分离。

(5) 利用形成超分子的固定液 1987 年 J.M. Lehn, D.J. Cram 和 C.J. Pederson 以其“对发展和应用具有特殊结构和高选择性的分子”的巨大贡献而获得了该年的诺贝尔化学奖, Lehn 的研究确立了

表 4-19 甲乙酮和乙醇在 QF-1 和其他固定液上的保留指数

化合物	结构式	沸点/℃	保留指数 <i>I</i>		
			PEG 20M	QF-1	SE-30
乙醇	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	78	893	589	460
甲乙酮	$\text{C}_2\text{H}_5\text{COCH}_3$	80	904	895	590

超分子化学 (Supramolecular Chemistry)。1991 年德国的 F.Voegtle 把上述概念和理论综合到一本名为“超分子化学” (Supramolecular Chemistry) 的书中^[8], 使人们开始对超分子化学体系有了较完整的认识。Lehn 曾把超分子化学定义为: “两个或两个以上化学实体 (entity) 之间相互作用的化学, 这种相互作用是生物体内高选择性作用过程的基础”, 而色谱中的手性识别正是基于主体与客体间的相互作用, 是典型的超分子化学问题。按照 F.Voegtle 的说法超分子化学的概念是: “超出单个分子的化学”, “按需要形状设计出的分子进行分子间相互作用的化学”。因而超分子化学对研究色谱的分离的机理以及设计特殊选择性分离介质具有重要的指导意义。从上述超分子化学的定义可知, 分子与分子之间的相互作用, 特别是由于主客体分子之间的选择性很强的相互作用是超分子化学的核心, 这一点也正是色谱分离问题的关键所在。所以色谱科学和超分子化学存在着密不可分的关系。固定液的选择可以充分利用它。

①用形成配合物或络合物进行混合物的选择性分离。很早人们就知道用银盐分离饱和烃及不饱和烃。用氯化镉分离三环芳烃。这是因为过渡金属离子可和不饱和烃的 π 键形成超分子的配合物, 如用乙二醇溶解硝酸银的色谱柱可以很好地分离烯烃和烷烃。表 4-20 是五碳烯烃的分离情况。

表 4-20 C_5 烯烃在乙二醇硝酸银柱上的 α 值

化合物	次甲基 环丁烷	1-甲基 环丁烯	3-甲基 环丁烯	2-甲基- 1-丁烯	2-甲基- 2-丁烯	异戊 二烯	顺-1, 3- 戊二烯	反-1, 3- 戊二烯	环戊 二烯
沸点/℃	41.2	37.3	37	31.2	38.6	34.1	44.1	42.0	42.5
α 值	0.70	0.059	0.12	0.15	0.058	0.32	0.63	0.46	0.97

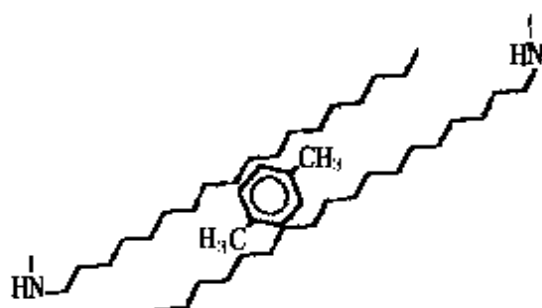


图 4-2 有机皂土和间二甲苯作用的示意图

②用有机皂土作固定液分离间、对二甲苯，是利用有机皂土的层状结构和被分离物质间产生超分子化学的效应，使间位异构体有较强的作用力，从而和对位异构体分离开。被分离化合物嵌在有机皂土脂肪胺的烷基链之间，其可示意如图 4-2。

③液晶和高分子液晶分离多种位置异构体表现出典型的超分子化学的效应。自从 1963 年 Kelker 把小分子液晶和 1982 年 Finkelmann 把高分子液晶用于色谱以来取得了很好的效果，这也和超分子化学有密切的关系。30 多年来发表了大量的文献^[7]，在实际工作中有很好的典型应用^[9]。

④用冠醚和高分子冠醚作 GC 固定液。利用冠醚作固定液或手性选择剂，是很好地发挥了分子识别的超分子化学作用，冠醚和客体分子形成如图 4-3 所示的超分子。所以高分子冠醚是选择性很突出的固定液。

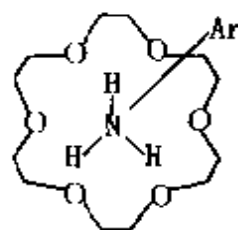


图 4-3 冠醚与一个芳胺形成超分子示意图

⑤环糊精 (CD) 及其衍生物作 GC、HPLC、SFC、CZE (MECC) 的分离介质。这是近几年十分

活跃的领域，人们明确地利用了它们形成包含化合物的效应，这也是很典型的选择性固定液。环糊精和客体化合物形成包含化合物是典型的超分子，如图 4-4 所示。

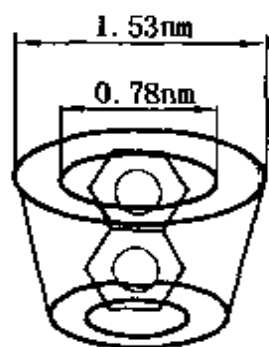


图 4-4 β -环糊精和蔡环形成包含化合物的示意图

3. 利用混合固定液

在分离三种以上组分的混合物时，常常发现这样的现象，即在某一种固定液上有一对物质分离不开，而在另一种固定液上这一对物质可以分离，但又有另外一对物质重叠，但是如果把这两种固定液以某一比例混合起来组成混合固定液，就可以使上述两个物质对都可以分离开。这就是利用混合固定液的作用。

为什么会有这样的现象呢？这是由于用混合固定液调节被分离物质保留性能到适合的选择性所致，对许多常规固定液来说，它们的保留性能具有“线性加和性”^[7,8]，可以用下式表示

$$K_{\text{mix}} = \sum \varphi_i K_i^0 \quad (4-8)$$

式中 K_{mix} ——在混合固定液上某化合物的分配系数；

φ_i —— i 固定液在混合固定液中所占的百分比；

K_i^0 ——某化合物在 i 固定液上的分配系数。

也可以用保留性能表示：

$$t_{R(\text{mix})} = \sum \varphi_i t_{R(i)} \quad (4-9)$$

式中 $t_{R(\text{mix})}$ ——在混合固定液上某化合物的保留时间；

φ_i —— i 固定液在混合固定液中所占的百分比；

$t_{R(i)}$ ——某化合物在 i 固定液上的保留时间。

利用 (4-9) 式很容易计算出什么样的混合比例可以把要分离的混合物分离开。

要计算混合固定液的比例，首先要用单一固定液的色谱柱在相同的色谱条件下测定单个化合物的保留值（保留时间，调整保留时间都可以），然后按公式 (4-9) 计算在什么配比下两个化合物的保留时间相差最大。

也可以用做图的方法求出混合固定液的比例。例如：用硝酸银（乙二醇）和三聚异丁烯作混合固定液，分离乙烯、乙烷、丙烯和丙烷。首先分别在单独的硝酸银（乙二醇）柱和三聚异丁烯柱上测定这四个化合物的保留性能，把所得数据在两个纵坐标上标出，并把这两个纵坐标以一个横坐标连接起来，把此横坐标分为 100 等分，把两个纵坐标上相同化合物的点用直线连接在一起，如图 4-5 所示。在图中 50% 处的垂直线是指两种固定液以 1:1 混合时所得的保留时间。在 25% 三聚异丁烯和 75% 硝酸银（乙二醇）处的垂直线表示在此混合固定液上所得的保留时间。图中 $\times$ 表示把混合固定相装在一支色谱柱中所得的数据，图中的小圆圈 $\bigcirc$ 表示把硝酸银色谱柱和三聚异丁烯色

谱柱串联在一起所得的数据。可见实际测定的数据和图解的数据基本一致。

所以用混合固定液来选择固定相是一种好的方法。但是这里所说

的是指混合固定相的保留性能具有加和性的情况，即图 4-5 中同一化合物在两种固定液上保留性能的连线为直线。最近我们发现在气相色谱中混合固定液的保留性能有不服从加和性的情况，也就是存在保留性能的“协同性”或“协同效应”。

4. 利用协同效应选择固定液

(1) 什么是协同效应 Kuhn^[10] 于 1992 年在毛细管电泳中发现了协同效应，

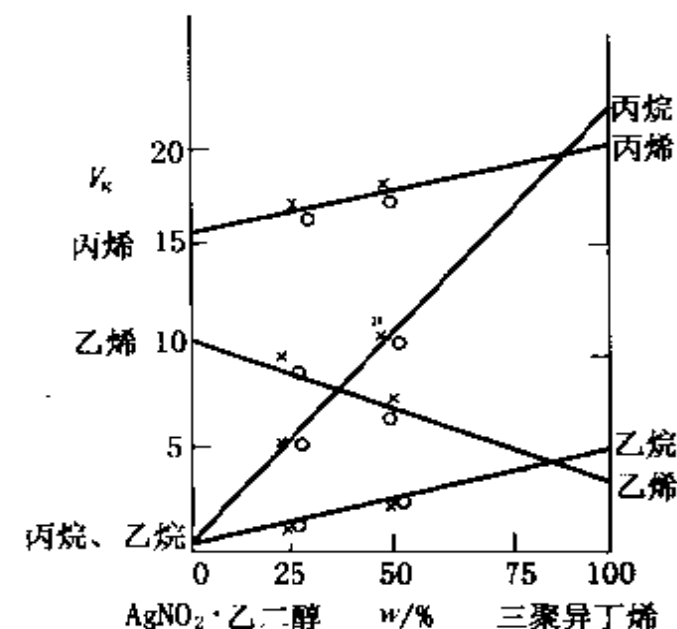


图 4-5 图解法求混合固定液的比例

他们用 18-冠-6 四羧酸和 α -环糊精组成的混合手性添加剂，分离 D, L-色氨酸，分离度远大于使用单独的 18-冠-6-四羧酸或 α -环糊精手性添加剂。在此情况下两个化合物在不同比例的混合固定液上的相对保留值 (α) 是向上弯曲或向下的弯曲的曲线。如图 4-6 所示。向上弯曲时是正协同效应 (图 4-6a)，向下的弯曲时是负协同效应 (图 4-6b)，也叫做“结抗效应”。

(2) 在气相色谱中混合固定液的典型协同效应^[13] 用全戊基 β -环糊精 (pp β -CD) 与 AgNO₃ (聚乙二醇 400 作溶剂) 组成混合固定液，分离二甲苯异构体，在 pp β -CD 为 2/3，AgNO₃ 为 1/3 的混合比例时，二者的 α 值最大，比在单独固定液柱上的 α 值都要大。见表 4-21 和图 4-6 中的数据。

(3) 产生协同效应的混合固定液^[11~14] 我们发现下列一些固定相作适当配合可以出现“协同效应”：

表 4-21 间、对二甲苯异构体的相对保留值 α

柱温/℃	CD 柱	Ag-CD _{1,2} 柱	AgNO ₃ 柱
50	1.06	1.18	1.06
60	1.05	1.14	1.03

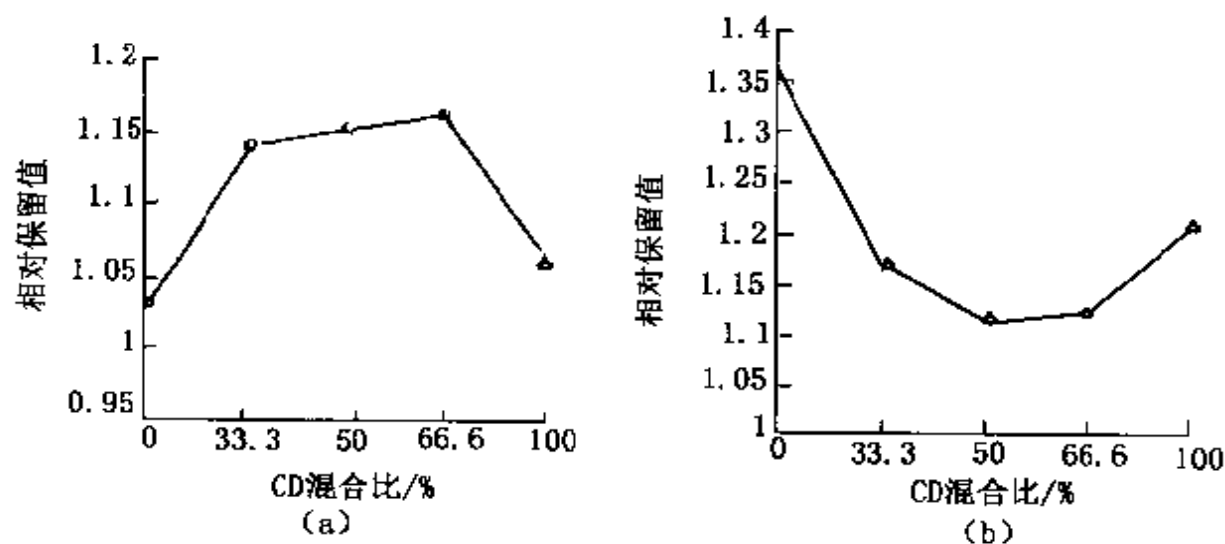
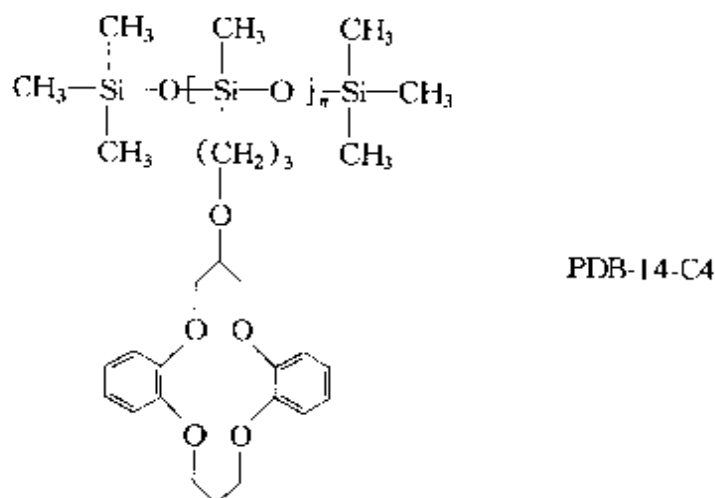


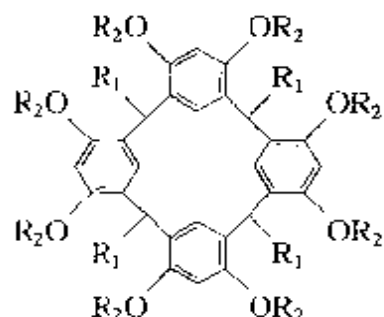
图 4-6 协同效应图

(a) 正协同效应图 (间、对二甲苯的 α 值);(b) 负协同效应图 (间、邻二甲苯的 α 值)

① 侧链冠醚聚硅氧烷和环糊精 (如 PDB-14-C4 + 全乙基 β -环糊精)



② 杯环芳烃和环糊精 [如乙基己基间苯二酚杯芳烃 + 七 (2,6-二-O-戊基-3-O-三氟乙酰基) β -环糊精]



(I) $R_1 = \text{苯基}$ $R_2 = \text{正戊基}$

(II) $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$; $R_2 = n\text{-C}_6\text{H}_{13}$

③液晶和冠醚 [如二苯并-18-冠-6 和 邻甲基对苯二酚二 (对庚氧基苯甲酸酯)]。

④环糊精和过渡金属化合物 [如七 (2,3,6-三-O-戊基- β -环糊精) 和硝酸银; 七 (2,3,6-三-O-戊基- β -环糊精) 和硝酸铯], 也就是说可以生成超分子的固定液有可能产生协同效应。

第四节 气固色谱法

一、气固色谱法的理论依据和特点

气固色谱法在气相色谱中虽然占的比例不大, 但是它广泛地用于永久气体和低沸点烃类的分析, 在化工、石油和石油化工领域应用很普遍。特别是在 60 年代中期以后高分子小球的出现, 使气固色谱法的重要性大为提高。

1. 吸附等温线

气固色谱法所遵循的规律是气体 (或蒸气) 在吸附剂表面上的吸附规律, 气体在吸附剂表面上的吸附平衡可用“吸附等温线”来描述。吸附等温线是在一定温度下气体 (或蒸气) 在吸附剂表面上的浓度随气体 (或蒸气) 在气相中的浓度而变化的规律。或者说: “在一定温度下所研究气体达到平衡时在吸附剂表面上的吸附量, 随该气体在气相中的分压大小变化的规律”, 可用下式表示:

$$\frac{x}{m} = \frac{abp}{1 + bp} \quad (4-10)$$

式中 x ——被吸附气体的量;

m ——吸附剂量;

p ——吸附平衡时被吸附物质的分压;

a, b ——常数 (对一定的吸附剂、被吸附物质在一定温度下是

常数)。

(1) 线性吸附等温线 公式 (4-10) 中, 如果气体压力很小, 它可以写成:

$$x/m = abp \quad (4-11)$$

(4-11) 式说明被吸附物质在吸附剂上的浓度与它在气相中的浓度之比是常数, 也就是说在这一情况下是线性吸附等温线。以线性吸附等温线方式进行的气固色谱峰是对称的高斯峰, 如图 4-7 的 (a) 所示。这是一种理想状态, 在气固色谱中很少见, 只有在浓度很低时才会出现。

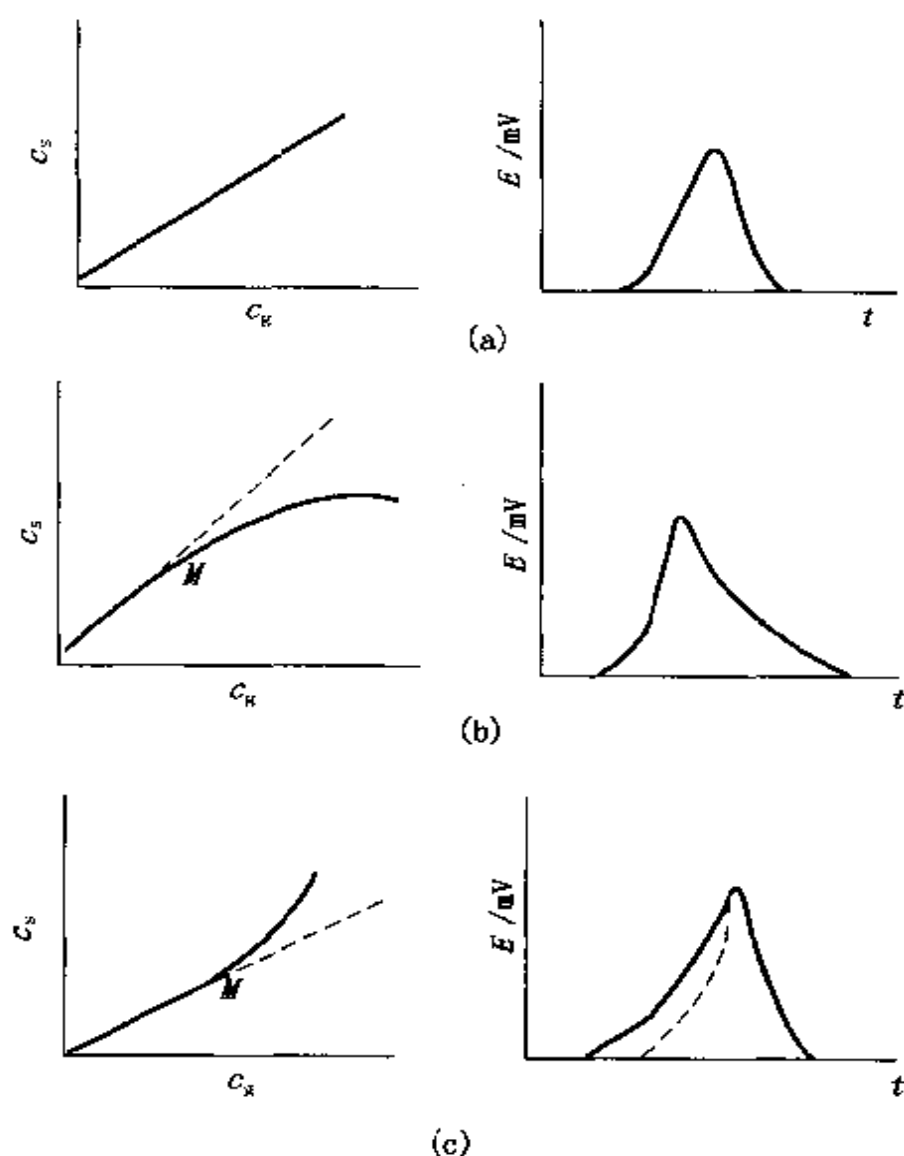


图 4-7 吸附等温线和对应的色谱峰

(2) 朗格缪尔吸附等温线 (向下弯曲的吸附等温线) 这种吸附等温线如图 4-7 中的 (b), 它的特点是当气相中被吸附物质的浓度高于 M 点时, 吸附剂上吸附的量不随气相中物质浓度的增加而增加, 即 c_g/c_s 不成常数。与其对应的色谱峰是所谓“拖尾峰”。

(3) 向上弯曲的吸附等温线 这种吸附等温线如图 4-7 中的 (c), 它的特点是当气相中被吸附物质的浓度高于 M 点时, 吸附剂上吸附的量随气相中物质浓度的增加而急剧增加, 与其对应的色谱峰是所谓“伸舌峰”。

2. 气固色谱的特点

气固色谱与气液色谱相比有许多特点, 表 4-22 中列出气固色谱的特点以及和气液色谱不同之处。

表 4-22 气固色谱与气液色谱的比较

气 液 色 谱	气 固 色 谱
①分配系数小, 保留时间短	吸附系数大, 保留时间长
②吸附等温线的直线部分范围大, 色谱峰对称	吸附等温线的直线部分范围很小, 色谱峰常常不对称
③重现性好, 固定液批与批之间差异小, 保留值重现性好	吸附剂批与批之间差异大, 保留值及分离性能不稳定
④固定液一般无催化性	高温下一般吸附剂有催化性
⑤可用于高沸点化合物的分离	一般情况下不适于高沸点化合物的分离, 适应于永久气体和低沸点化合物的分离
⑥品种多, 选择余地大	品种少, 选择余地不大
⑦高温下易流失	在较高的柱温下不易流失

二、气固色谱用固定相

目前在气固色谱中实用的固定相有各种形式的炭、无机分子筛、高分子小球。

1. 活性炭

活性炭是早期气固色谱使用的固定相, 用以分离低沸点烃类等混合物, 但是由于活性炭的表面活性大而不均一, 会造成色谱峰的严重

拖尾，使产品批与批之间的差异大，现在很少使用了。

2. 石墨化炭黑

为了克服活性炭的缺点，就把炭黑在真空中或在还原性气氛中进行高温处理，如加热到 3000°C ，结果在炭表面上形成石墨状的晶形。这样处理之后，表面均匀、活化点也大为减少了。比表面由几百 m^2/g 下降到低于 $30 \text{ m}^2/\text{g}$ 。所以大大改善了色谱峰形。提高了分析的再现性。据原苏联基先列夫的研究，认为在石墨化炭黑的表面上没有官能团，没有 π 键，所以它的吸附性主要靠色散力起作用，因而石墨化炭黑的极性比角鲨烷还小。

为了适应各种样品的分离，可对它进行各种表面处理，如：

- ①涂渍少量固定液消除残存的少量活化点；
- ②分离酸性化合物时可用磷酸处理石墨化炭黑；
- ③分离碱性化合物时可用有机碱处理石墨化炭黑；

④在 100°C 下用氢气处理石墨化炭黑可除去表面的氧，适于还原性物质的分离。

3. 碳多孔小球（碳分子筛）

(1) 什么是碳多孔小球 1968 年 Kaiser 制备出一种碳吸附剂叫“碳分子筛”，国外的商品名是 Carbosieve B，它是用偏聚氯乙烯小球进行热裂解，得到固体多孔状的碳，其比表面为 $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ，平均孔径为 1.2 nm 。

我国上海高桥化工厂、中科院化学所和天津试剂二厂相继研制成功这类碳分子筛，商品名叫做：碳多孔小球（TDX），具体的牌号有 TDX-01；TDX-02。它们的堆积密度为 0.6 g/mL ，比表面为 $800 \text{ m}^2/\text{g}$ 。

(2) 碳多孔小球的特点

①非极性很强，表面活化点少，疏水性强，可使水峰在甲烷前或后洗脱出。

②柱效高， 1 m 色谱柱可有 $1200 \sim 1500$ 理论塔板数。

③耐腐蚀、耐辐射。

④寿命长。

(3) 碳多孔小球的应用

①用于一些永久气体的分析。TDX 可用于 H_2 、 N_2 、 O_2 、 CO 、 CO_2 、 CH_4 、 C_2H_2 、 C_2H_4 、 C_2H_6 、以及 C_3 的烃类和 SO_2 等气体的分析。碳多孔小球即使在 $50^\circ C$ 的柱温下对 N_2 和 O_2 也有一定的分离能力。

②可很好地用于氮肥厂的半水煤气分析。在半水煤气中含有 N_2 、 O_2 、 CO 、 CO_2 和 CH_4 ，用 TDX-1 柱可把这些气体分开。

③可用于金属热处理气氛的分析。在金属热处理中为了控制渗碳或渗氮的量，要分析热处理炉子里的气氛，所含组分类似于半水煤气，可用 TDX-1 柱进行分析。

④由于碳多孔小球的非极性很突出，极性化合物在这一固定相上的保留时间很短，同时由于它的表面上活化点很少，一些氢键型化合物可得到对称色谱峰。所以它适于分析这类化合物。

⑤碳多孔小球的表面类似于石墨化炭黑，对水的保留作用极差，但对烃类有较强的保留作用，因此可用碳多孔小球分析低碳烃中的水分。

4. 分子筛

1925 年人们发现了天然泡沸石（如菱沸石）对水、甲醇、乙醇等蒸气有很强的吸附作用，而对丙酮、醚和苯等蒸气则不予吸附，这种泡沸石就是天然的分子筛。后来人们模仿天然泡沸石的生成条件，并不断改进合成工艺，合成了多种类型的人造分子筛。所以叫做分子筛，是因为泡沸石具有像笼子一样的结晶结构，笼子的孔穴大小一致，而且正好是与分子的尺寸大小相当，分子尺寸比泡沸石孔穴尺寸小的就容易吸附，相反就不吸附。

(1) 分子筛的选择性

①具有几何选择性。分子筛的结晶结构有一定的尺寸，不同类型的分子筛具有不同的尺寸，如表 4-23 中的数据。因而分子筛的选择性和所用分子筛类型及被分离化合物的临界尺寸有关。所谓临界尺寸是指垂直于其长度的最大横截面的直径，一些化合物的临界尺寸见表 4-24。

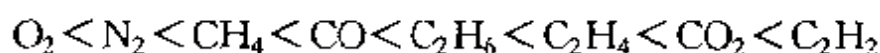
表 4-23 气固色谱用分子筛的几何尺寸

分子筛类型	组 成	孔 径/nm	分子筛类型	组 成	孔 径/nm
4A	硅铝酸钠	0.4	10X	硅铝酸钠钙	0.8~1.0
5A	硅铝酸钠钙	0.5	13X	硅铝酸钠	1.0

表 4-24 一些化合物的临界尺寸

化 合 物	临界尺寸/nm	化 合 物	临界尺寸/nm
H ₂	0.24	正丁烷	0.489
He	0.20	正戊烷	0.489
Ne	0.32	正己烷	0.49
Ar	0.38	1-丁烯	0.51
Kr	0.39	2-丁烯	0.51
Xe	0.44	噻吩	0.53
O ₂	0.28	乙醚	0.51~0.59
N ₂	0.30	异丁烷	0.56~0.59
CH ₄	0.40	正丁醇	0.58
C ₂ H ₆	0.44	环己烷	0.60~0.61
NH ₃	0.38	苯	0.65~0.68
C ₂ H ₄	0.44	甲苯	0.65~0.68
H ₂ O	0.26	对二甲苯	0.65~0.68
CO	0.28	邻二甲苯	0.70~0.74
C ₃ H ₈	0.49	间二甲苯	0.70
H ₂ S	0.37	四氯化碳	0.68~0.69
环氧乙烷	0.42	新戊烷	0.68
乙醛	0.44	异丙苯	0.76
甲醇	0.44	三乙胺	0.82~0.84
环丙烷	0.47~0.49	三丙胺	0.91
正庚烷	0.47~0.49	六甲基苯	1.00
乙醇	0.47~0.51	三苯甲醇	1.40

②对极性分子和极化率大的分子作用力强。分子筛对极性分子和不饱和烃分子有较大的亲和力，如在4A分子筛上吸附下列气体的能力依次加大：



③对有可成氢键的化合物有很强的作用力。如分子筛对水、CO₂、NO₂有不可逆吸附的作用。

(2) 分子筛的特点

①即使在低浓度下对被吸附物质也有较高的吸附容量。如在 30% 的相对湿度下, 分子筛的吸水量高于硅胶和氧化铝, 见表 4-25 中的数据。

表 4-25 在三种吸附剂上的吸湿量

吸 附 剂	活性氧化铝	硅胶	4A 分子筛
吸附水量/(g/100g)	3	3	18

②即使在高温下对被吸附物质也有较高的吸附容量。如在 100℃, 1.3% 的相对湿度下, 分子筛可吸附 15% (质量分数) 的水, 比在相同条件下的活性氧化铝大 10 倍, 比硅胶大 20 倍。

③即使在高流速下对被吸附物质也有较高的吸附能力。如在 25℃、0.1MPa 和 50% 相对湿度的气流中, 分子筛和硅胶吸水能力随气流速度的变化而改变的规律见表 4-26。

表 4-26 流速对吸附量的影响^①

吸 附 剂	线速度/(m/min)				
	15	20	25	30	35
分子筛 (绝热)	17.6	17.2	17.1	16.7	16.5
硅胶 (恒温)	15.2	13.0	11.6	10.4	9.6

①在大气压力、50% 相对湿度的气流、25℃ 不同线流速下的吸附量 (g/100g)。

(3) 使用分子筛应注意的问题

①使用分子筛之前一定要活化。一般是在真空下于 300~400℃ 干燥 3h, 或在 550℃ 干燥 2h。

②分子筛活化条件对分离效果有很大的影响。例如用分子筛分离 O₂ 和 Ar 时, 如果把分子筛在 450℃ 下通入空气和氦气, 把水驱除到 10⁻⁴g/mL, 对氧和氦分离不好, 可是在同样的温度下通氩气 5h, 却使氧和氦分离很好。

③分子筛的型号不同, 其分离性能也有很大的差异。

④分子筛对一些活性气体有不可逆吸附的特点。如 H₂O、CO₂、NO₂、H₂S、SO₂、Cl₂、HCl 等在分子筛上是可逆吸附。

⑤分子筛在高温下对某些有机物有催化作用等。

(4) 分子筛在气固色谱中的应用 分子筛在气固色谱中主要用于 O_2 、 N_2 、 CO 、 CH_4 等永久气体的分离，由于炭多孔小球的出现，分子筛的作用有一定程度的下降。

5. 高分子多孔小球 (GDX)

高分子多孔小球是 1966 年 Hollis 用苯乙烯和二乙烯基苯进行共聚而得到的，他对这类聚合物的色谱分离性能进行了详细的研究，把它们叫做 Porapak。他所研究的 Porapak Q 是一种色谱分离性能十分好的气固色谱固定相。不久出现了各种品牌的高分子多孔小球固定相。我国在 60 年代末也研究生产出这类高分子多孔小球固定相，把它们命名为 GDX (Gaofenzi Duokong Xiaoqiu)，是高分子多孔小球汉语拼音的字头。后来天津化学试剂二厂生产了 GDX 101、GDX 102、GDX 103、GDX 104、GDX 105、GDX 201、GDX 301、GDX 501 等牌号，上海化学试剂厂生产了叫做“401…404 有机载体”的高分子多孔小球。

(1) GDX 的特点

①GDX 的疏水性很强，水峰可以在乙烷后洗脱出，为有机物中微量水的测定提供了一种优良的色谱固定相。

②GDX 是球形，大小均匀，有利于色谱柱的填充，提高了柱效。

③改变聚合工艺条件，可改变 GDX 的极性和孔径，制出各种性能的高分子多孔小球来。

(2) GDX 的制备 GDX 是用二乙烯基苯和苯乙烯在水中悬浮聚合而得。即把要聚合的单体分散在水中，在引发剂的作用下进行共聚。由于在原料中加入一定量的溶剂作稀释剂，在聚合过程中稀释剂不起反应，但它会在小球中占据一定空间，待聚合后把稀释剂赶出来，在分子多孔小球中就形成了很多小孔。GDX 的结构如图 4-8。

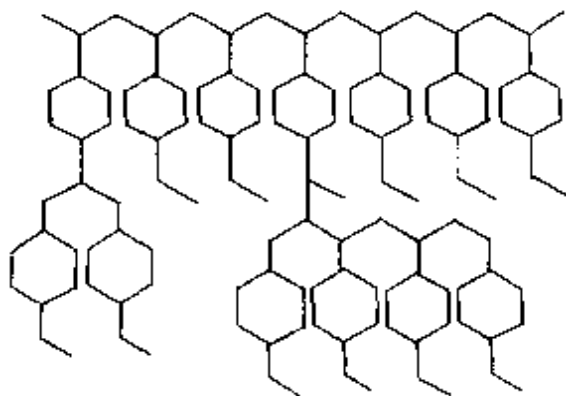


图 4-8 GDX 的结构

(3) GDX 的性质 GDX 是白色或微黄色的圆球, 比表面从几十到几百 m^2/g , 表观密度为 $0.1 \sim 0.5 \text{ g/mL}$, 一般可耐高温 $250 \sim 270^\circ\text{C}$ 。国内高分子多孔小球的性能见表 4-27, 国外高分子多孔小球的性能见表 4-28。

表 4-27 国内高分子多孔小球的性能

名 称	化学组成	颜色	表观密度 /(g/mL)	比表面 /(m^2/g)	极性	最高使用 温度/ $^\circ\text{C}$	分离对象	厂 家 ^①
GDX-101	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	0.28	330	很弱	270	适于轻气体和低 沸点化合物	(1)
GDX-102	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	0.20	680	很弱	270	通用型, 适于沸点 较高的化合物	(1)
GDX-103	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	0.18	670	很弱	270	通用型, 还可以分 析正丙醇-叔丁醇	(1)
GDX-104	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	半透明	0.22	590	很弱	270	通用型, 适于气体 分析, 如半水煤气	(1)
GDX-105	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	透明	0.44	610	很弱	270	适于气体中微量 水及永久气体的分 析	(1)
GDX-201	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	0.21	510	很弱	270	通用型, 适于高沸 点化合物, 水峰稍有 拖尾	(1)
GDX-202	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	0.18	480	很弱	270	通用型, 还可以分 析正丙醇-叔丁醇, 保留时间短	(1)
GDX-203	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	0.09	800	很弱	270	通用型, 还可以分 离乙酸-苯-乙醇, 保 留时间短	(1)
GDX-301	二乙烯苯、 三氯乙烯共聚	白	0.24	460	弱	250	适于分离乙烯-氯 化氢	(1)
GDX-401	二乙烯苯、 含氮杂环单体 共聚	乳白	0.21	370	中等	250	适于氯化氢中微 量水, 甲醛水溶液, 氨水等的分析	(1)
GDX-403	二乙烯苯、 含氮杂环单体 共聚	乳白	0.17	280	中等	250	适于分析水溶液 中氨、甲醛及低级胺 中的水	(1)

续表

名 称	化学组成	颜色	表观密度 /(g/mL)	比表面 /(m ² /g)	极性	最高使用 温度/℃	分离对象	厂 家 ^①
GDX-501	二乙烯苯、 含氮极性单体 共聚	淡黄	0.33	80	较强	270	适于 C ₄ 烃异构体 的分析	(1)
GDX-502	二乙烯苯、 含氮极性单体 共聚	白	—	—	较强	250	适于分析 C ₁ 、C ₂ 烃及 CO、CO ₂ 的分 析,能完全分离乙 烷、乙烯和乙炔	(1)
GDX-601	二乙烯苯、 含强极性单体 共聚	黄	0.3	90	强	200	能分离环己烷和 苯	实 验 品
401 有机 载体	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	—	—	很弱	270	相当于 GDX-101	(2)
402 有机 载体	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	—	—	很弱	270	相当于 GDX-102	(2)
403 有机 载体	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	—	—	很弱	270	相当于 GDX-103	(2)
404 有机 载体	二乙烯苯、 含氮极性单体 共聚	—	—	—	较强	270	相当于 GDX-501	(2)

① (1) 天津化学试剂二厂; (2) 上海试剂一厂。

表 4-28 国外高分子多孔小球的性能

名 称	化学组成	颜色	表观密度 /(g/mL)	比表面 /(m ² /g)	极 性	最高使用 温度 /℃	孔径 /nm	分离对象	产 地
porapak-P	二乙烯苯、 苯乙烯共聚	白	0.28	120	弱	250	1000	烷烃、芳烃、醇、酮、 醛、醚、酯、酸、胺、腈、 卤代烃等,乙烯-乙炔	美 国
porapak-Ps	porapak-P 硅烷化产品	白	—	—	弱	250	—	同上,拖尾减少	美 国
porapak-Q	乙基乙烯苯、 二乙烯苯共 聚	黄	0.25~ 0.35	600~ 800	很 弱	250	3.5~ 40	同 porapak-P, 分离 正丙醇-叔丁醇有特征 性	美 国

续表

名 称	化学组成	颜色	表观密度 /(g/mL)	比表面 /(m ² /g)	极性	最高使用 温度 /℃	孔径 /nm	分离对象	产地
porapak-Qs	porapak Q 硅烷化产品	白	—	—	很弱	250	—	同 porapak Q, 对某些极性化合物拖尾减少	美国
porapak-R	苯乙烯、二乙烯苯极性单体共聚	白	0.33	547~780	强	250	7.6	适于分析活性物质, 如氯化氢中的水	美国
porapak-S	苯乙烯、二乙烯苯极性单体共聚	白	0.35	536~470	中等	300	7.6	适于分析极性气体	美国
porapak-T	苯乙烯、二乙烯苯极性单体共聚	白	0.44	306~450	最强	200	9.1	适于分析极性气体	美国
porapak-N	苯乙烯、二乙烯苯极性单体共聚	白	0.39	437	中等	200	—	适于分析甲醛水溶液中的组分	美国
Chromosorb 101	苯乙烯、二乙烯苯共聚	白	0.30	30~40	弱	250	350	适于分离酸、二元醇、饱和醇、烷、酯、酮、醛、醚、氯化物	美国
Chromosorb 102	苯乙烯、二乙烯苯共聚	白	0.29	300~400	中等	275	8.5	适于分离永久气体, 低分子化合物	美国
Chromosorb 103	交联聚苯乙烯	白	0.32	15~25	中等	250	350	适于分离 C ₁ - C ₆ 胺类水溶液	美国
Chromosorb 104	丙烯腈、二乙烯苯共聚	白	0.32	100~200	强	250	60~80	适于分离水中微量 H ₂ S, NH ₃ , 含氮、硫、氧化合物, 腈, 硝基烃, 二酚	美国
Chromosorb 105	芳族高聚物	白	0.34	600~700	中等	250	40~60	适于分离烃中、乙炔、水及沸点在 200℃ 以下的有机物	美国
Chromosorb 106	芳族高聚物	白	—	—	弱	—	—	适于分离 C ₂ - C ₆ 脂肪酸和醇	美国
Chromosorb 107	交联聚苯醌	白	—	—	中等	—	—	适于分离甲醛水溶液	美国

续表

名 称	化学组成	颜色	表观密度 (g/mL)	比表面 (m ² /g)	极性	最高使用 温度 /℃	孔径 /nm	分离对象	产地
Par-1	苯乙烯、二 乙烯苯共聚	白	0.69	100~ 300	弱	250	20	适于分离微量强极 性化合物	美国
Par-2	苯乙烯、二 乙烯苯共聚	白	0.67	250~ 300	弱	250	9	适于分离微量强极 性化合物	美国

(4) GDX 的应用

①有机物中微量水的测定。如顺丁橡胶的合成中要求单体丁二烯含水量在 3×10^{-5} g/mL 以下, 用 100 cm $\times$ 0.4 cm i.d. GDX—105 色谱柱, 在 120℃ 柱温下, 载气流速 33 mL/min, 可很好地进行测定。有机溶剂和氯化氢中的微量水分可用 GDX—104 柱测定。

②半水煤气成分的测定。用 GDX—104 (3.7m) 和分子筛 (3.0m) 的串联柱, 通过阀切换在 GDX—104 柱上分离 CH₄、CO、CO₂, 在分子筛柱上分离 O₂ 和 N₂, 可避免 CO₂ 通过分子筛柱。

③CO₂ 和 N₂O 的分析。用 GDX-104 柱可以很好地把 CO₂ 和 N₂O 分开, 这一方法用于长期储存火药的安定性测定上。

④分离低碳烃和脂肪醇。用极性稍强的 GDX 分离 C₁~C₄ 的烃类, 可分离出 12 个峰。用 Chromosorb101 再涂以 5% 的 PEG20M 可以分离低碳烃。

参 考 文 献

- 1 傅若农, 常永福. 气相色谱和热分析技术. 北京: 国防工业出版社, 1989
- 2 Otensten D M. Advances in Chromatography, Vol.6 p.137
- 3 傅若农, 刘虎威. 高分辨气相色谱和高分辨裂解气相色谱. 北京: 北京理工大学出版社, 1993
- 4 (美) 苏皮纳 W R. 气相色谱填充柱. 詹益兴译. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1981
- 5 傅若农. 国外分析仪器, 1996 (2), 1~12
- 6 傅若农. 国外分析仪器, 1996 (3), 1~11
- 7 孙济庆, 李国镇, 孙政民主编. 中国液晶科技论文索引. 上海: 上海科技出版社,

1995

- 8 Voegtli F, et al. Supramolecular Chemistry. John & Sons, 1991
- 9 景鹏, 傅若农. 分析化学, 1995, 23 (1): 104
- 10 Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S. Chromatographia. 1992, 34 (9/10): 505
- 11 Jing P, et al. Chromatographia. 1996, 43 (9/10): 546
- 12 Xiao D, et al. Chromatographia. 1997, 46 (3/4): 177
- 13 Yuan L, et al. Chromatographia. 1997, 46 (5/6): 291
- 14 Yuan L, et al. Chromatographia. 1997, 46 (5/6): 291

第五章 毛细管气相色谱

第一节 概 述

一、毛细管气相色谱的发展历史^[1]

提高气相色谱柱的柱效，一直是人们研究的重要课题，1955年毛细管色谱的创始人高雷（M.J.E.Golay）从事提高色谱柱柱效的研究工作，进行了大量的理论研究，发现如果使用毛细管柱可以把柱效大大提高。他在1957年美国仪器学会组织的第一届气相色谱会议上发表了第一篇毛细管气相色谱的报告，介绍了他的第一张毛细管气相色谱图，是在一支91m长的毛细管气相色谱柱上进行的，得到了12000个理论塔板数。次年他在阿姆斯特丹的国际气相色谱会议上发表了著名的高雷方程，阐述了各种参数对柱性能的影响。阿姆斯特丹的会议为毛细管气相色谱的发展奠定了重要的基础。高雷的研究激发了许多色谱学家的极大兴趣，如英国的Desty, Scott；美国的Zlatkis, Lipsky, Lovelock；德国的Kaiser, Schomberg；意大利的liberti, bruner，都为毛细管气相色谱早期的发展做出了贡献。

我国从50年代后期对毛细管气相色谱进行了研究和应用，特别是在石油工业的研究和生产中起到很大的作用。

在毛细管气相色谱的发展过程中，一个核心的问题是高效毛细管气相色谱柱的制备工艺，高雷的第一支毛细管气相色谱柱是用聚乙烯做的，其后多采用不锈钢毛细管气相色谱柱。但是不锈钢柱柱效低、活性大，因而在60到70年代主要使用玻璃毛细管气相色谱柱。经过许多色谱专家的努力，在70年代中期可以涂渍出性能很好的玻璃毛细管气相色谱柱。

虽然玻璃毛细管气相色谱柱的性能大大优于不锈钢毛细管柱，但是它的活性和易碎性不能令人满意，1979年Dandeneau和Zerennner

制备出熔融二氧化硅毛细管气相色谱柱，我国习惯地称为“弹性石英毛细管柱”。很快这种毛细管柱成为毛细管气相色谱的主流，这是因为弹性石英柱具有柔韧性好，易于安装，机械强度较好；惰性好，吸附和催化性小；涂渍出来的色谱柱柱效高、热稳定性好等优点。70年代末毛细管柱工艺的重要进展是固定相的固定化（immobilization），即把固定相的线性分子交联为网状结构，或者键合到毛细管柱壁上。到80年代后期固定相固定化的商品毛细管柱已经很流行了。1983年10月惠普公司推出大孔径毛细管柱（megabore column），它可以直接代替填充柱，既有毛细管柱的高柱效，又有填充柱的大柱容量以及高重复性，在80年代末曾风靡一时。90年代中期由美国 Alltech 公司推出他们的专利产品“集束毛细管柱”（multicapillary column），它是由919支内径为 $40\mu\text{m}$ 的毛细管柱组成的毛细管束，有容量高分析速度快的特点，适于工业分析之用。90年代后期，为了适应石油工业中模拟蒸馏实验的要求，出现了可以耐高温的商品色谱柱，可以在 450°C ，甚至可以在 480°C 的柱温下工作。为了进行各种手性化合物的分离，有多种环糊精衍生物的商品手性毛细管柱出现。为了在工业分析中进行快速分析，90年代HP公司又倡导使用细内径毛细管色谱柱。同时为了适应环保、石油、电力等行业中的要求发展了小型便携式气相色谱仪。

二、毛细管气相色谱柱的类型

毛细管气相色谱柱，高雷称之为“开管柱”（open tubular column），因为这种色谱柱是中空的，他强调这种色谱柱的特点是它的“空心性”，而不是它的“细小性”，但是人们的习惯难以改变，多数人仍把这种色谱柱叫做毛细管气相色谱柱。

毛细管气相色谱柱的内径一般小于1mm，又可分为开管型和填充型两大类。

1. 填充型毛细管柱

(1) 填充毛细管柱 这种毛细管柱是先在较粗的厚壁玻璃管中装入松散的载体或吸附剂，然后再拉制成毛细管柱。如装入的是载体，可涂渍固定液成为气-液填充毛细管柱；如装入的是吸附剂，就成为

气-固毛细管柱。这种毛细管柱近年很少使用了。

(2) 微填充柱 这种毛细管柱与一般填充柱一样，只是它的内径较细（1mm 以下），它是把固定相直接填充到毛细管中。这种色谱柱在气相色谱中应用不多。

2. 开管型毛细管柱

(1) 常规毛细管柱 这类毛细管柱的内径为 0.1~0.3mm，一般为 0.25mm 左右，可以是玻璃柱也可以是弹性石英柱，它们按内壁处理方法不同又可分为：

① 壁涂毛细管柱 (Wall Coated Open Tubular Column) 简称 WCOT 柱，这种毛细管柱是把固定液直接涂渍到毛细管柱壁上，现在多数毛细管柱是这种类型的。

② 多孔层毛细管柱 (Porous-Layer Open Tubular Column) 简称 PLOT 柱，它是先在毛细管内壁上附着一层多孔固体，然后再在其上涂渍固定液。在这一类毛细管柱中使用最多的是“载体涂层毛细管柱” (Support Coated Open Tubular Column) 简称 SCOT 柱，它是先在毛细管壁上涂覆一层硅藻土载体，然后再在其上涂渍一层固定液。SCOT 柱目前已很少使用了。

(2) 小内径毛细管柱 (Microbore Column) 这类毛细管柱的内径是小于 100 μm 的弹性石英毛细管柱，多用来进行快速分析。

(3) 大内径毛细管柱 (Megaobore Column) 这类毛细管柱的内径为 320 μm 和 530 μm ，为了用这种色谱柱代替填充柱，常做成厚液膜柱，如液膜厚度为 5~8 μm 。

(4) 集束毛细管柱 (multicapillary column) 它是由许多支很小内径的毛细管柱组成的毛细管束，具有容量高分析速度快的特点，适于工业分析之用。

第二节 毛细管气相色谱与填充柱气相色谱的比较^[4]

一、比渗透率 (B_0)

1. 比渗透率定义

当气体通过一支色谱柱时，柱中填料（填充柱）或细小的通道

(毛细管柱), 对气体有一定的阻力, 描述这一阻力的参数叫比渗透率 (B_0) (Specific Permeability), 可用 (5-1) 式表示。

$$B_0 = \frac{L\eta u}{\Delta p j} \quad (5-1)$$

式中 L ——色谱柱柱长;
 η ——柱温下载气的粘度;
 u ——平均载气线流速;
 Δp ——柱出口和进口压力降;
 j ——压力校正因子。

对填充柱 B_0 可用 (5-2) 式估算

$$B_0 = \frac{d_p^2}{1012} \quad (5-2)$$

式中 d_p^2 是载体的平均粒度。

对毛细管柱 B_0 可用 (5-3) 式估算。

$$B_0 = \frac{d^2}{32} = \frac{r^2}{8} \quad (5-3)$$

式中 d, r 分别为毛细管的直径和半径。

2. 毛细管柱填充柱 B_0 的比较

表 5-1 中列出填充柱和毛细管柱的 B_0 。

表 5-1 毛细管柱与填充柱 B_0 的比较

色谱柱类型	柱内径/mm	$B_0/10^{-7}\text{cm}^2$
填充柱	2.2	2~3
壁涂毛细管柱 (WCOT)	0.25	200
	0.27	230
	0.50	780
载体涂层毛细管柱 (SCOT)	0.50	250~350

二、毛细管柱与一般填充柱性能的比较

毛细管柱与一般填充柱在柱长、柱径、固定液膜厚及柱容量方面有较大的差别, 见表 5-2。由表 5-2 可见毛细管柱具有高效、快速、吸附及催化性小的特点。图 5-1 两种色谱柱的分离情况更形象地比较

WCOT 和填充柱总体性能。

表 5-2 毛细管柱与填充柱性能的比较

色谱柱种类	WCOT	SCOT	填充柱
长度/m	10~100	10~50	1~5
内径/mm	0.1~0.8	0.5~0.8	2~4
液膜厚度/ μm	0.1~5	0.5~0.8	10
每个峰的容量/ng	<100	50~300	10000
分离能力	高	中	低

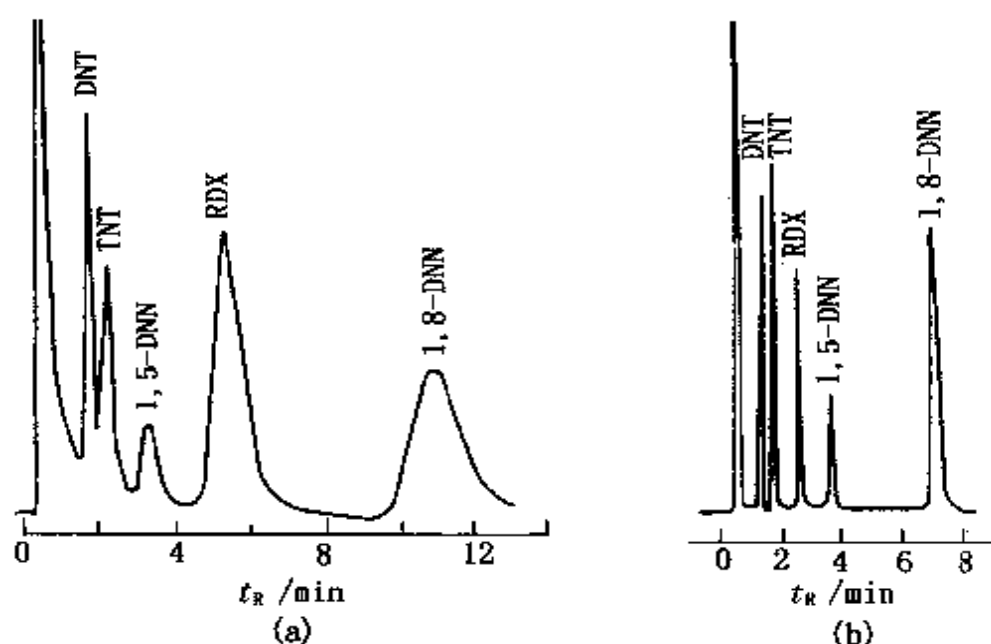


图 5-1 毛细管柱与填充柱分离一些硝基化合物的比较

(a) 填充柱 1.5m, 涂 QF-1, 恒温; (b) 毛细管柱, 21m, 涂 OV-101

三、毛细管气相色谱仪和填充柱气相色谱仪的比较^[2~4]

现代的实验室用气相色谱仪大都是既可做填充柱气相色谱又可以进行毛细管气相色谱的色谱仪, 在仪器设计上考虑了毛细管气相色谱仪的特殊要求。毛细管气相色谱仪的进样系统和填充柱气相色谱有较大的差别, 色谱柱出口到检测器的联接和填充柱也有些区别, 毛细管气相色谱仪的主要部件如图 5-2 所示。

1. 气源和流量控制系统

这一部分的部件和填充柱色谱仪没有太大的区别, 只是由于毛细管气相色谱要求的载气流量比填充柱小得多 (每分钟只有几毫升),

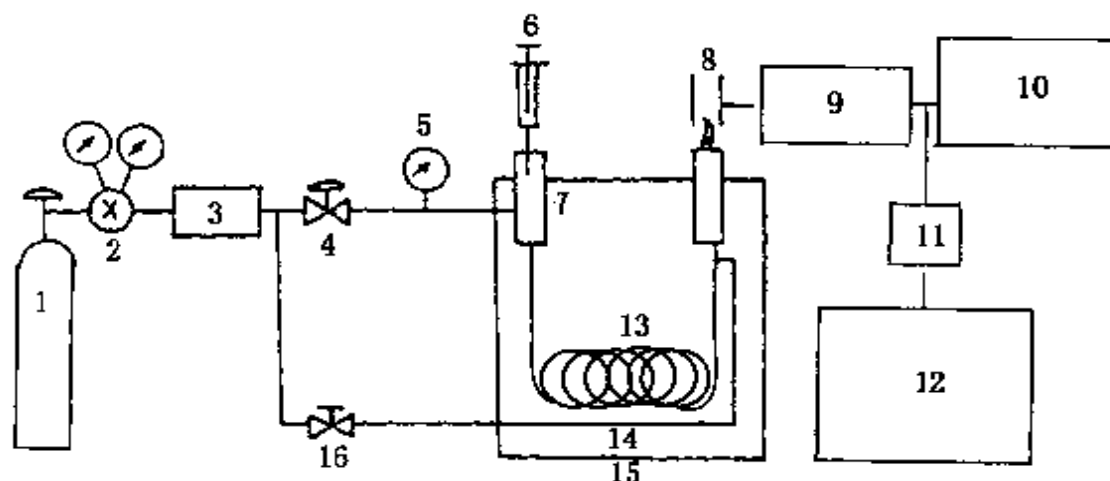


图 5-2 毛细管气相色谱仪示意图

1—载气钢瓶；2—减压阀；3—净化器；4—稳压阀；5—压力表；6—注射器；
7—气化室；8—检测器；9—静电计；10—记录仪；11—模数转换；12—数据处理
系统；13—毛细管色谱柱；14—补充气（尾吹气）；15—柱恒温箱；16—针形阀

如不用分流进样，则柱前压较小，流量指示部件的数值也很低，对控制和检测部件的要求要高，所以早期的毛细管色谱多用分流进样。目前的仪器多采用电子压力控制系统，大大提高了流量的精度。这种电子压力控制系统如图 5-3 所示。

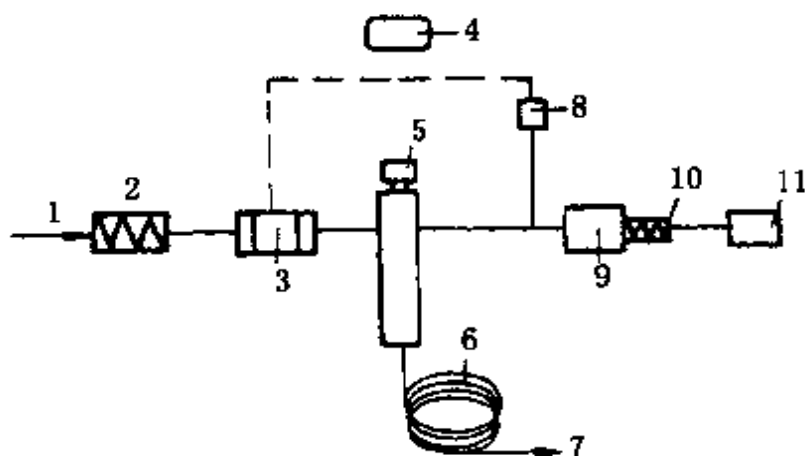


图 5-3 电子压力控制系统的示意图

1—载气；2—限流器（过滤器）；3—电子压力控制阀；4—电子压力控制部件；
5—程序控制柱头进样；6—色谱柱；7—到检测器；8—压力传感器；
9—密封垫吹扫调节器；10—限流器；11—密封垫吹扫气放空

2. 进样系统

毛细管气相色谱仪的进样系统和填充柱色谱仪有较大的差别，为了克服毛细管气相色谱在分流进样中带来的歧视（Discrimination）现

象,研究了多种进样方法和设备,如分流/不分流进样系统;保留间隙进样系统(Retention gap);程序升温进样系统。有关内容将在后面讲解。

3. 色谱柱系统

这一系统包括色谱柱柱箱,柱接头和色谱柱。柱箱和填充柱色谱仪的没有什么区别,柱接头是联结接进样系统的,要比填充柱色谱复杂一些。毛细管柱将在下面讨论。

4. 检测系统

毛细管气相色谱可以使用各种气相色谱检测器,最常用最主要的是FID,也可以和微型TCD,ECD,FPD以及TID相匹配。但是要和毛细管气相色谱仪匹配,检测器的死体积要尽可能的小,比如配微型TCD时,它的池体积小至 $2.5\mu\text{L}$,这样可大大提高其灵敏度。

5. 记录和数据处理系统

毛细管气相色谱的出峰时间短,有时不到1s,因为毛细管气相色谱的柱效高,峰形尖锐,区域宽度小,出峰时间有时很快。所以记录仪的响应速度要快。当然现在使用的数据处理系统是完全可以适应的。

第三节 毛细管气相色谱柱的制备^[1~2]

一、毛细管气相色谱柱的材料

自从毛细管气相色谱诞生以来,研究过多种柱材料,如塑料、铜、镍、金、银和不锈钢,但是70年代占统治地位的是玻璃,80年代占统治地位的是熔融二氧化硅(石英),90年代以后为了制备高温毛细管柱,又有部分使用不锈钢毛细管气相色谱柱的趋势。

1. 毛细管柱材料对柱性能的影响

目前主要毛细管柱材料是石英,我国多称作弹性石英毛细管柱。这种材料在体相中基本不含有金属杂质,所以表层成分不会有路易士酸的活化点。在石英表面上主要是和硅原子相连的羟基,表面上的硅原子以四面体形式和三个氧原子形成共价键,这三个氧原子位于体相中,这样在低温下表面的硅原子趋向于与一价的氢氧基连接实现其共

价结合。即形成自由羟基，在高温下则会形成脱水的有一定张力的氧桥。表面羟基如果被氧隔离，相距 0.31nm 时就不能在两个羟基之间形成氢键了，氢和氧之间相距 $0.24\sim 0.28\text{nm}$ 最适于形成氢键。据有人测定室温下在石英表面上每 1nm^2 面积上有 5 个羟基，在常温和常压下水会以氢键方式吸附在它的表面上，当加热时可以把物理吸附水除去，留下自由羟基，进一步加热会使相邻羟基脱水成氧桥。从室温到 165°C 只能把物理吸附水除去，约在 400°C 左右会使羟基脱水成氧桥，如把这样的二氧化硅冷却并暴露于水蒸气中，还可以恢复再形成硅醇基。所以在玻璃或石英表面上有硅醇基、硅氧桥和可能存在的金属氧化物，因而会和被分离物有一定的吸附作用。即：1) 路易氏酸活化点对一些电子云密度大的化合物，如醇、酮、胺以及 π 键化合物产生吸附作用；2) 表面硅醇基是质子给予体，它很容易和局部电子云密度大的化合物产生强烈的吸附作用；3) 硅氧桥是质子受体，易于和给质子的化合物产生吸附作用；4) 石英表面的硅氧四面体结构会产生色散力的吸附作用。

2. 毛细管柱表面的湿润性

在毛细管柱表面涂渍固定相，要得到高柱效，固定相必须形成一个均匀完整的液膜，要达到这一目的，固定相在柱表面上要有较好的湿润性。湿润性好坏的标准是固定相在柱表面上接触角的大小，接触角小则易于湿润，也就是易于成膜。要使接触角小则固定相的表面张力 (γ) 要小于固定相和毛细管表面的附着力。或者说固定相的表面张力要小于石英表面的临界表面张力 (CST, γ_c)。 γ_c 的定义是：当液体的表面张力大于某一固体表面的 γ_c 时，此液体在固体表面上的接触角就大于零。 γ_c 的测定是：在给定的固体上用一组同系化合物测定接触角 (θ)，把 $\cos\theta$ 对此同系物的表面张力作图，一般成一直线，在 $\cos\theta=1$ 时的表面张力即为该固体的临界表面张力 (γ_c)。如果液体的表面张力小于某固体的 γ_c ，其接触角就等于零，因此该固体就可以被液体所湿润。

玻璃或石英是一种高表面张力的固体，光滑干净玻璃表面的 $\gamma_c \leq 3 \times 10^{-4}\text{N/cm}$ ，而典型的固定相 $\gamma_c = (3\sim 5) \times 10^{-4}\text{N/cm}$ ，所以玻璃

表面如不处理就难以涂渍成均匀的液膜。聚二甲基硅氧烷的表面张力为 $(1.9 \sim 2.0) \times 10^{-4} \text{N/cm}$ ，所以它易于涂渍在毛细管柱上。

二、毛细管气相色谱柱的拉制

1. 弹性石英毛细管柱

目前主要使用的是弹性石英毛细管柱，这种色谱柱是 1979 年由 Dandeneau 和 Zereiner 首先制作成功的，是用光导纤维拉制机，拉成管壁很薄的毛细管柱，由于内径小、管壁薄，而石英表面又有很高的抗张强度，所以这种毛细管柱具有很好的柔韧性，卷曲成很小的圆圈（如 1cm 直径）不会折断。石英表面如被污染或不当的处理，其强度就会大大下降，所以拉制出来的石英毛细管柱必须立即在外边涂敷一层保护层，一般为聚酰亚胺，这一保护层应具有较好的强度和耐热性，在 300°C 下使用，流失不显著。但是，近年来耐高温毛细管柱的需求日增，比如要分离高达 100~120 个碳原子的烷烃，色谱柱要在 $400 \sim 450^\circ\text{C}$ 下工作，这样聚酰亚胺就难以胜任了，于是出现了柱外镀铝的石英毛细管柱。

2. 弹性石英毛细管柱的拉制

图 5-4 是弹性石英毛细管柱的拉制机示意图。这种拉制机是拉光导纤维用的，高温电炉可达 2000°C ，拉毛细管柱经聚酰亚胺槽，在柱外边涂覆一层聚酰亚胺保护层。

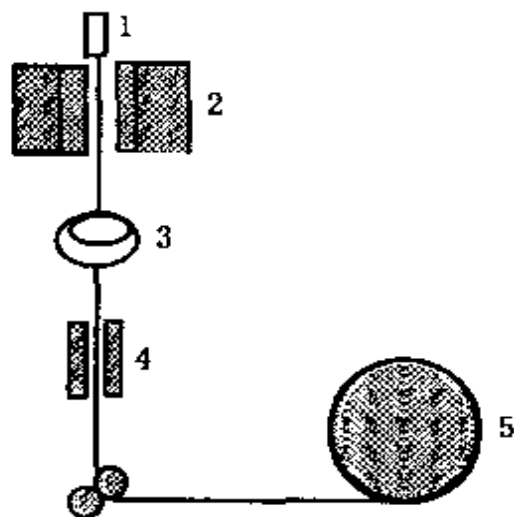


图 5-4 石英毛细管柱拉制机示意图
1—石英管；2—高温电炉；3—聚酰亚胺槽；4—管式电炉；5—转鼓

三、毛细管气相色谱柱的预处理

（一）粗糙化

由于玻璃或石英是一种高表面张力的固体，光滑干净玻璃表面的 $\gamma_c \leq 3 \times 10^{-4} \text{N/cm}$ ，而固定相的表面张力常常大于此数值，所以玻璃表面如不处理就难以涂渍成均匀的液膜，所以在涂渍固定相之前要进行粗糙化处理。对玻璃柱研究过多种粗糙化方法，对石英毛细管柱的粗糙化方法有下列一些。

1. 沉积石墨化炭黑

在 60 年代中期 Grob 就研究了几种在玻璃毛细管内壁上沉积石墨化炭黑的方法。到 70 年代中期, 可以用静态或动态法把石墨化炭黑的胶体溶液沉积到毛细管内壁上, 它的粘附力很好, 也可以把石墨化炭黑胶体溶液沉积到弹性石英毛细管内壁上。燕山石油化工研究院用石墨化炭黑的超细粉, 在有机溶剂中用大功率超声波制成胶体溶液, 涂渍到弹性石英毛细管柱上, 作气固色谱用。还可以把石墨化炭黑的超细粉和液晶混合在一起, 涂渍到弹性石英毛细管柱上(单纯液晶是很难涂渍的)。

2. 沉积氯化钠

70 年代中期就有人用 NaCl 的胶体溶液以动态法涂渍在毛细管内壁上。胶体溶液是往 NaCl 饱和水溶液中加入 1,1,1-三氯乙烷, 把此溶液通过毛细管柱, 等溶剂蒸发后再涂第二次, 第三次, 第四次, 这样可以增加 NaCl 的覆盖量, 最后在 350℃ 下加热 1h, 使之重结晶。要达到最大的 NaCl 覆盖量, 胶体溶液通过柱子的量最少为 $25\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的柱表面, 接触时间最少要 40min, 流动速度在 $1\sim 5\text{cm}/\text{s}$ 。

北京大学的黄爱今等改进了这一方法, 用三氯甲烷代替 1,1,1-三氯乙烷, 成功地制备出沉积氯化钠的玻璃和石英毛细管柱, 在这样粗糙化过的毛细管柱上可以涂渍多种极性固定相, 如 OV-17、PEG-20M、FFAP、OV-225 和 DEGS 等。

3. 沉积二氧化硅

70 年代中期有人开发出一种在固定相溶液中悬浮硅烷化二氧化硅, 进行涂渍固定相的方法, 在固定相溶液中加入硅烷化二氧化硅颗粒, 改变了固定相在柱内表面上的铺展性能, 可以大大改善液膜的稳定性。他们所用的二氧化硅称为 Silanox 101, 这是一种经过三甲基硅烷化的熔融二氧化硅。最初用的二氧化硅尺寸为 $7\mu\text{m}$, 这样的颗粒不能粘附在毛细管壁上, 也不会自行聚集, 必须和一种粘结剂一起涂渍。例如把固定相和一种表面活性剂, 如氯化苄基二苯基膦 (BTP-PC), 共同作粘结剂。涂渍分两步进行, 首先把 Silanox 101 悬浮于稀的固定相溶液中, 把此溶液通过毛细管柱, 二氧化硅颗粒被固定相粘

附在管壁上，然后，把较浓的固定相溶液再通过毛细管柱，使固定相的量达到所需的量。第一步所用的典型溶液是把 0.5g 的固定相用超声波与 2g Silanox 101 及 100mL 高密度溶剂（如四氯化碳或三氯甲烷）制成悬浮液。毛细管柱先用上述溶剂湿润一下，再把上述悬浮液通入毛细管柱，通入的悬浮液量为 25% 的柱长，以 5cm/s 的速度使悬浮液向前移动。等悬浮液的液柱离开毛细管，用氮气吹拂 3h 使之干燥。第二步是把固定相溶于粘度小的溶剂（如异辛烷）中，把此溶液通入经第一步处理过的毛细管柱中，速度为 2cm/s。但是这种方法不易于极性固定相的涂渍。目前使用粒度更小的二氧化硅进行涂渍。

（二）去活

1. 石英毛细管柱的水热处理

对弹性石英毛细管柱来说，由于它的表面上存在有硅醇基和硅氧桥，是有吸附性的活性基团。为了把石英毛细管柱去活，首先要把它进行水热处理。所谓水热处理就是把石英表面在高温下进行水化处理，即把石英表面上的硅醇基和硅氧桥都转化为自由的硅醇基。水热处理的步骤如下：

①在毛细管中装入 2% 的盐酸溶液，占毛细管长度的 25%，以大约 5cm/s 的速度让盐酸溶液向前移动，当液柱吹出毛细管后，用丁烷/氧火焰把柱两端封口。

②把封口的毛细管柱在 $(220 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下加热 6h。

③将 2% 的盐酸溶液装入加热后的毛细管柱（长度的 25%），以 1cm/s 的速度让盐酸溶液向前移动，并吹出毛细管柱。

④把毛细管柱装在色谱仪中，柱两端露在柱箱外，于 230°C 下由两端交替抽真空 1h。

2. 石英毛细管柱的去活

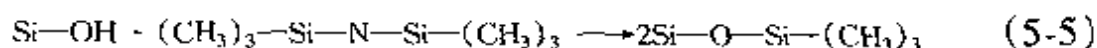
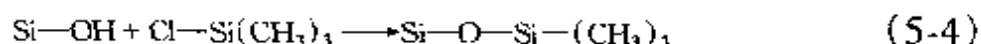
一支高性能的毛细管柱应具备四个方面的优良性能，即柱效高、活性低、热稳定性好和保留性能重复性好。而要想达到这样的性能，去活是必不可少的步骤。无论是玻璃柱还是石英柱都需要去活，为此人们进行了大量的研究工作，积累了丰富的经验，但是没有一种方法

是万能的，必须依柱材料和所涂固定相的不同，采取不同的去活方法。

(1) 早期的去活方法 早在 70 年代初 Aue 发现用 PEG20M 在 280℃ 下处理硅藻土载体，可使载体去活得到高柱效。之后有人把 Aue 的方法用于玻璃毛细管柱的去活，方法是：用 2% 的 PEG20M 溶液处理毛细管柱，把两端封口后在 280℃ 下加热 16h，然后用二氯甲烷和甲醇洗涤毛细管柱，这样就得到去活的效果。此后 Grob 家族又研究了这一方法，他们采用较稀的 PEG20M 溶液多次处理毛细管柱，然后再加热处理。用 PEG20M 去活的毛细管柱，当去活层很薄时，可以与非极性固定相相容；如果形成较厚的一层去活膜时，可以与极性固定相相容。这样去活的毛细管柱在高于 250℃ 使用时性能变坏。在低于此温度下使用其性能很好，所以至今仍有人使用。

(2) 硅烷化去活

①早期的硅烷化去活方法 前苏联的 Kiselev 等首次提出用硅烷化的方法去活，他们用三甲基氯硅烷 (TMCS) 作硅烷化试剂，和玻璃表面上的自由硅羟基反应，生成硅醚基。也有用六甲基二硅烷胺 (HMDS) 做硅烷化试剂的，它们的反应是



H

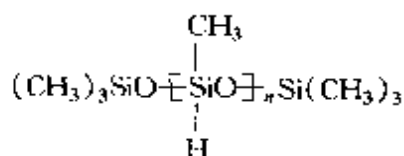
后来 Novotny 等人的研究工作指出：用取代基的硅烷化试剂进行去活，在毛细管柱表面引入与固定相相同的基团，可增进与固定相的相容性。例如在毛细管柱表面引入腈基基团，就可以容易地涂渍 β , β -氧二丙腈。因此在去活的方法中要考虑在去活之后的表面上要有与所涂渍固定相相容的基团。这样在改进表面的湿润性之后才可以涂渍出柱效高的色谱柱。

②高温硅烷化去活 1977 年 Welsch 等人首次提出高温硅烷化去活的方法，他们是：把 HMDS 试剂以动态法（液柱速度为 4~5cm/s）涂渍在毛细管内表面上，把柱两端封口后快速加热到 300℃，并在此温度下保持 20h。这样处理后的毛细管柱可获得很好的去活效

果。此后有人进一步研究发现,在更高的温度(400℃)下进行高温硅烷化处理可得到更好的效果。Grob 等人建议使用二苯基四甲基硅胺烷做去活试剂要优于 HDMS,前者有较大的分子体积,虽然它会阻碍硅烷化的进行,但是较大的分子体积可以掩盖未反应的硅醇基,起到保护伞的作用。

③聚硅氧烷高温裂解去活(HTS) 1979 年 Shomburg 提出一个把聚硅氧烷在高温下裂解去活的方法,用以为玻璃毛细管柱去活,即用动态法把 OV-101 涂渍在毛细管柱中,把柱两端封口后加热 2~20h。在加热过程中聚硅氧烷受热部分分解,一些分解产物和毛细管柱表面上的硅醇基反应,然后用溶剂把未分解的聚硅氧烷洗去。这种方法叫做聚硅氧烷降解法(PSD),这一方法要在高达 450℃ 的温度下进行。

④含氢硅油裂解去活 由于聚硅氧烷高温裂解去活需要在高温下处理,而弹性石英毛细管柱的外涂层聚酰亚胺又不能经受 450℃ 的高温,为此有人提出用含氢硅油作 PSD,含氢硅油的结构为



用含氢硅油可以在较低的温度下(250℃)去活,这一方法有以下的优点:

- 用动态法涂渍氢硅油到毛细管柱上,简单易行;
- 可在较低的温度下去活;
- 没有有害副产物出现,只有氢气。

⑤全硅烷化去活(Persilylation) 1979 年 Grob 提出用六甲基二硅氨烷(HMDS)对玻璃毛细管柱进行去活,称为全硅烷化去活。全硅烷化去活的方法既有去活的作用又有改进固定液湿润性的作用,因而在毛细管制造技术中十分令人满意的方法。全硅烷化去活不仅可以用于固定相的毛细管色谱柱,也可以用于涂固定相的弹性石英管,如 GC/MS 中的联接管,或保留间隙管。全硅烷化去活试剂大致分为三类,如表 5-3 所示。

表 5-3 全硅烷化去活试剂

分 类	试 剂	代 号
硅氮烷	六甲基硅氮烷 二苯基四甲基硅氮烷 四苯基二甲基硅氮烷	HMDS DPTMDS TPDMDS
硅氧烷	八甲基环四硅氧烷 八苯基环四硅氧烷 三苯基三甲基环三硅氧烷 二氰丙基六甲基环四硅氧烷	D ₄ OPCTS TMPCTS BCHMCTS
含氢聚硅氧烷	聚甲基氢硅氧烷 (含氢硅油) 含苯基聚甲基氢硅氧烷 聚氰丙基甲基氢硅氧烷	

1) 用硅氮烷进行全硅烷化去活。HMDS 是空间障碍最小的硅烷化试剂, 只适于涂渍聚二甲基硅氧烷类固定相。二苯基四甲基硅氮烷 (DPTMDS) 可在玻璃 (石英) 表面引入苯基, 所以可适应于含苯基量不高的苯基甲基聚硅氧烷 (如 OV-61) 的涂渍。四苯基二甲基硅氮烷 (TPDMDS), 可适应于从 OV-61 至 OV-17 固定相的涂渍 (即苯基含量小于 50% 的苯基甲基聚硅氧烷)。

2) 用环硅氧烷进行全硅烷化去活。八甲基环四硅氧烷 (D₄), 是使用最多的一种硅烷化试剂, 例如: 用 D₄ 动态涂渍在石英毛细管柱上, 充以氧气, 封死柱两端, 在 450℃ 下反应 1~2h, 得到很好的惰化层。高温 (450℃) 下得到的惰化层比低温 (320℃) 下得到的厚, 甚至可以直接作固定相。这样去活后的柱子对碱性物质 (如癸胺) 表现出很低的活性。D₄ 去活不适用于极性固定液的涂渍, 为了提高对极性固定液的湿润性 (见前面讲述的毛细管表面的湿润性一节), 可使用含有极性官能团的环硅烷试剂进行去活, 如: 氰丙基甲基环四硅氧烷, 甲基 (三氟丙基) 环四硅氧烷, 双氰丙基环四硅氧烷, 六苯基环三硅氧烷等。

八甲基环四硅氧烷 (OPCTS), 这种去活硅烷化试剂适于涂渍中等极性固定液 (如 OV-17) 的场合, 可以动态法将 OPCTS 涂在弹性石英毛细管柱中, 然后用静态法涂渍固定液。三苯基三甲基环三硅氧烷 (TMPCTS)。适于涂渍中等极性的端羟基聚硅氧烷, 如 OV-1701-OH 固定液。二氰丙基六甲基环四硅氧烷 (DCHMCTS), 用作涂渍极

性固定液的去活试剂。

3) 用含氢的聚硅氧烷进行全硅烷化去活。由于上述的各种去活试剂都要求在较高的温度 ($>400^{\circ}\text{C}$) 下进行反应, 在这样的温度下弹性石英柱的外涂层不稳定, 即使在去活时用惰性气体保护也不能完全避免被氧化。所以 M.L.Lee 及 Woolley 等提出用含氢硅油作去活试剂 (即聚甲基氢基硅氧烷), 可以在较低的温度下 ($250\sim350^{\circ}\text{C}$) 进行去活反应。聚甲基硅氧烷去活试剂有三种:

第一种, 含氢聚甲基硅氧烷。弹性石英毛细管柱用动态或静态法涂渍含氢硅油的纯液体或戊烷溶液, 用氮气吹 $5\sim10\text{min}$, 用火焰封口, 放入恒温箱中, 于 $250\sim350^{\circ}\text{C}$ 下加热一段时间, 加热用大约 10 个柱体积的二氯甲烷洗涤色谱柱, 然后在 280°C 老化 30min , 去活后, 用静态法涂渍固定液。近年来研究证明用含氢硅油去活后, 涂渍高分子液晶固定液也还可以得到较好的效果。

第二种, 含苯基聚甲基氢基硅氧烷。苄基二甲基硅烷, 二苯基甲基硅烷, 1,1,1-三苯基二甲基二硅烷, 高分子量的含苯基的聚甲基氢基硅氧烷等试剂可用纯试剂以动态法涂渍, 进行去活处理, 用最后一种去活可得更好的效果, 不仅可以去活而且可以使石英表面具有适应于涂渍极性固定液的湿润性。

第三种, 聚氰丙基甲基氢基硅氧烷。可以动态法对石英毛细管柱进行去活。

四、毛细管气相色谱柱的涂渍

1. 毛细管气相色谱柱用的固定相

在第二章中已经对气相色谱固定 (液) 相作了较多的阐述, 这里只就毛细管气相色谱柱最常用固定相和便于交联的固定相作一简要说明。

(1) 毛细管气相色谱柱最常用的固定相^[1,6] 为获得柱效高、稳定性好的毛细管气相色谱柱, 要求固定相具有以下性能:

- ①热稳定性好的高聚物, 其熔点要低, 粘度要高。
- ②对石英毛细管内壁有较好的湿润性。
- ③在制备中分子结构一致, 分子量分布窄而批与批之间尽可能

一致。

④最好在分子上有易于交联的基团，如乙烯基。

⑤有选择性高的基团，便于制备出分离异构体的固定相。

(2) 常用的常规聚硅氧烷毛细管气相色谱固定相

①聚二甲基硅氧烷 常用的聚二甲基硅氧烷牌号是：OV-1；SE-30GC。

②含苯基的聚硅氧烷 SE-54 是含有 5% 苯基和 1% 乙烯基的硅生胶，它很容易涂渍和交联。OV-17 硅生胶 (gum) 是粘度高的含 50% 苯基的聚硅氧烷；OV-25 是粘度较高的含 75% 苯基的聚硅氧烷，可制备出极性较高的毛细管气相色谱柱。

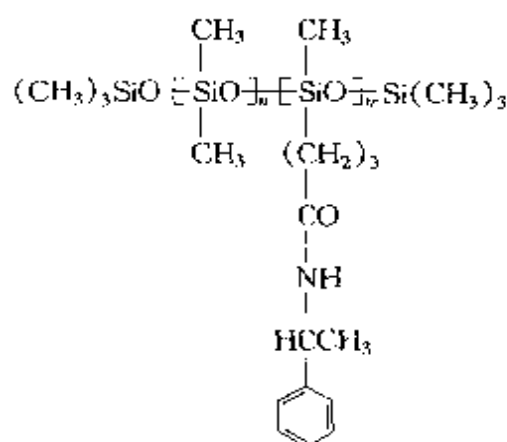
③含氰基的聚硅氧烷 使用较多的含氰基的聚硅氧烷有 OV-225、OV-275、OV-1701 (结构和基团在第二章已经讲过)。

④含氟聚硅氧烷 使用较多的含氟聚硅氧烷有 OV-210、OV-215。

(3) 聚乙二醇类固定相 聚乙二醇 20M 是最常用的极性氢键型固定相，但是它的热稳定性差，易受盐和少量水的催化而分解，对氧尤其敏感，有人发现这类固定相中残留的催化剂较多会造成它的分解，所以比利时的 Sandra 制备了一系列残留催化剂少分子量高的聚乙二醇，如 Superox20M；Superox4。据说后者可耐温到 300℃。

(4) 便于交联的聚硅氧烷固定相 在毛细管柱内使固定相原位交联 (固定化, immobilization) 或键合到毛细管壁上，是提高液膜稳定性和耐温性的重要途径，但是一些苯基含量高的聚硅氧烷，如 OV-17、OV-25 和 OV-225，难以用引发剂使之交联。但是如果在聚硅氧烷分子中引入一定量的乙烯基，通过乙烯基可以使这类固定相容易进行交联。所以往聚硅氧烷分子中引入乙烯基是提高固定相性能的重要手段。第二个提高固定相液膜坚固性和热稳定性的方法是使用端羟基聚硅氧烷固定相，由于聚硅氧烷分子两端有羟基，它在加热的情况下可以和毛细管壁上的硅醇基进行缩合，这样可制成键合固定相。第三个办法是往聚硅氧烷分子链与功能基团侧链之间引入间隔基 (spacer)，使分子易于交联。

(5) 特殊选择性固定相^[1,6~10] 手性固定相是近年来研究较多的课题。最出名的第一批手性固定相是 Frank 等把 L-缬氨酸-叔丁酰胺接枝到聚硅氧烷上, 商品名叫做 Chirasil-Val, 它通过氢键作用, 可以在宽广温度范围内分离一系列种类的手性化合物。手性氨基酸衍生物固定相可以通过氰烷基取代的聚硅氧烷 (如 XE-60, OV-225) 的改性得到。80 年代中期 M.L.Lee 实验室的 Brandsow 等人把含乙烯的手性分子, 以硅氢加成的方法合成了具有手性侧链的聚硅氧烷固定相, 如下式 ($n = 85\%$ $m = 15\%$)



近年手性固定相研究最多的是环糊精的各种衍生物 (见第四章)。

2. 毛细管气相色谱柱的涂渍

(1) 静态涂渍法

①根据所要求的液膜厚度计算所需固定液的浓度 (0.2~0.5g/100ml)。

②准备一洁净的充液容量瓶。

③在洁净的充液容量瓶内称取纯固定相, 并加入溶剂 (一般为二氯甲烷+正戊烷, 体积比为 1:1)。

④拧紧瓶塞, 剧烈摇晃。

⑤完全溶解后, 进行超声波脱气处理。

⑥将压缩气与充液瓶联接, 将溶液均匀地压入毛细柱。

⑦当溶液充满毛细管柱后, 将出口端用力插入到一块肥皂中。此时出口端已被大约 1cm 的肥皂封住。

⑧在水浴中于室温下或 30℃ 抽真空。对于 20m 以上的柱子, 水

温可在不少于 2h 内升至 40℃。

⑨当柱子抽真空后，先切去封口端，在 10~30s 后撤掉真空，将柱子从水浴中取出。

⑩老化。用 N_2 吹 1h 后，以 2℃/min 的速度程序升温至 220~280℃（根据固定相的热稳定性而定），并在高温下持续 8h。

（2）动态涂渍法

①根据所要求的液膜厚度计算所需固定液的浓度（5~20g/100ml），溶液配置步骤同上。

②用 N_2 以约 1cm/s 的速度将溶液均匀地压入毛细柱的 1/3 左右，并以相同速度将液柱推出柱子。

③继续吹 N_2 吹 4h。

④老化步骤同上。

3. 毛细管气相色谱柱的交联^[1]

（1）毛细管色谱柱交联的目的 使用最多的聚硅氧烷固定相一般是生胶，是线型分子，聚乙二醇也是线型分子，如果把涂渍在毛细管气相色谱柱上的线型分子固定相进行交联，使之变成网状结构，就可以使固定相的稳定性和耐热性提高，而且色谱柱被污染时还可以清洗。

（2）毛细管色谱柱交联的方法 让聚硅氧烷固定相交联的方法有两种，其一是使分子间形成 Si—O—Si 键，即通过高温缩合的方法使 Si—OH 和另一分子（或管壁上）的 Si—OH 进行缩合。另一个方法是聚硅氧烷上的甲基（或乙烯基）经引发剂而产生碳碳键之间的结合，形成 Si—C—C—Si 结合。前一方法普遍使用。

（3）毛细管色谱柱交联的引发剂

①过氧化物引发剂 过氧化物引发剂有叔丁基过氧化物（TBP）、过氧化苯甲酰（BP）、过氧化 2,4-二氯苯甲酰（DCBP）和过氧化异丙苯（DCP）。DCP 是使用最多的一种引发剂，因为它带来的副产物较少。DCP 的活泼氧含量为 5.7%，它的衰变温度是 136℃。它在苯中 140℃ 下半衰期是 30min，而在 160℃ 下是 3min。

②偶氮化合物引发剂 用做引发剂的偶氮化合物有偶氮叔丁烷（ATB）、偶氮叔辛烷（ATO）、偶氮叔十二烷（ATD）。偶氮化合物

引发剂优于过氧化物引发剂，它不会使固定相产生被氧化产物。偶氮叔丁烷是使用较多的一种。

③臭氧引发剂 瑞典的 Buijten 在 1984 年提出用臭氧作引发剂制备交联毛细管柱，这种方法很简单，含有少量乙烯基的聚硅氧烷在室温下可以用臭氧进行交联。但是由于臭氧要渗透到固定相中才能引发交联，因此这一方法适于液膜薄的毛细管柱的交联，用这一方法于 SE-54 和 SE-31 可以制备出性能很好的交联毛细管柱。

第四节 毛细管气相色谱柱的评价

一、评价色谱柱的指标和测试物^[1,2]

评定毛细管柱的性能有三项最为重要的指标，即柱效、表面惰性和热稳定性。这三项指标是分别测定的，但是它们也有一定的联系，如活性高时拖尾因子大，同时柱效也会降低。一般评价色谱柱的方法是在一定的色谱条件下分离一组测试混合物，测试混合物中含有各种官能团，以便考核色谱柱的各种性能，这些化合物有烷烃、芳烃、醇、二元醇、醛、酮、酚、胺、酯和游离酸，普遍实用的是所谓 Grob 试剂，其组成和浓度见表 5-4。

表 5-4 Grob 试剂的组成和浓度

组 成	浓度 / (mg/mL)	组 成	浓度 / (mg/mL)
十二酸甲酯	41.3	正醛	40
十一酸甲酯	41.8	2, 3-丁二醇	53
癸酸甲酯	42.3	2, 6-二甲基苯胺	32
癸烷	28.3	2, 6-二甲基苯酚	32
十一烷	28.7	二环己胺	31.3
1-辛醇	35.5	2-乙基己酸	38

用 Grob 试剂测试 SE-52 毛细管柱的色谱图如图 5-5 所示。

二、评价色谱柱的柱效

1. 柱分离能力的测量

每米柱长理论塔板

$$\frac{n}{L} = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 L^{-1} \quad (5-6)$$

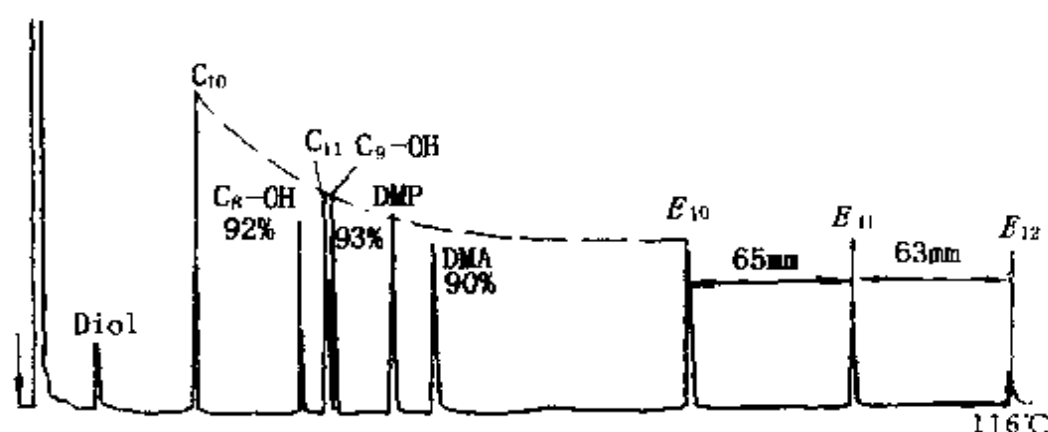


图 5-5 用 Grob 试剂测试 SE-52 柱的色谱图

Diol—2, 3-丁二醇; C₁₀—正癸烷; C₈-OH—正辛醇; C₁₁—正 11 烷;
C₉-OH—正壬醇; DMP—2, 6-二甲基苯酚; DMA—2, 6-二甲基苯胺; E₁₀—
癸酸甲酯; E₁₁—十一酸甲酯; E₁₂—十二酸甲酯

2. 涂渍效率

涂渍效率用 (5-7) 式进行计算。

$$CE = \frac{h}{h_{\min}} \quad (5-7)$$

式中 CE——涂渍效率;

$h_{\min}$ ——最小理论塔板高度;

h ——实际测定的理论塔高度。

第五节 大内径厚液膜毛细管气相色谱柱

一、大内径毛细管柱的特点^[1,2]

自从 1983 年 10 月 HP 公司推出一种大内径的毛细管柱, 取名为“megbore”熔融二氧化硅毛细管柱, 此后许多公司也相继出售这种大内径毛细管柱, 所谓大内径毛细管柱主要是指内径为 0.53 mm 的弹性石英毛细管柱, 其特点是:

- ①可直接取代填充柱, 即无须分流进样;
- ②分析速度快, 比填充柱分析速度快;
- ③吸附性小;
- ④在较低的载气流速下柱效大大优于填充柱;
- ⑤这种色谱柱多为交联型固定相, 所以它的化学稳定性和热稳定

性优于填充柱。

二、大内径毛细管柱的主要柱参数

大内径毛细管柱涉及柱内径和液膜厚度，它们都与色谱柱的柱效、柱容量、分配容量和分析时间有关系。

1. 柱内径

从毛细管色谱的理论可知，柱内径增加柱效会大幅度地下降，如表 5-5 所示。大内径毛细管柱是牺牲柱效来增加柱容量、提高流量，以便适应代替填充柱的要求。

表 5-5 柱径和理论塔板数间的关系

柱内径/mm	每米理论板数/ mm^{-1}	达 10 万理论塔板数所需柱长/m
0.53	2100	48
0.32	3400	29
0.25	4500	22
0.10	11000	9

2. 液膜厚度

液膜厚度对柱效的影响比较复杂，包括对固定相的传质阻力和容量因子的影响，当液相传质阻力 (C_L) 很小时，柱效高，分析时间短，这是薄液膜的两项优点。但是薄液膜也有三个缺点：

- ①薄液膜柱容量因子小，不利于高挥发性物质的分离；
- ②不利于痕量物质的分离；
- ③不足以掩蔽柱壁的活化点。

所以膜厚小于 $0.2\mu\text{m}$ 的毛细管柱很少有人使用，过去用不锈钢毛细管柱时，膜厚常为 $0.5\sim 0.6\mu\text{m}$ ；用玻璃毛细管柱时，膜厚常为 $0.2\sim 0.5\mu\text{m}$ 。但是也常用膜厚为 $1\mu\text{m}$ 的分离低沸点化合物。总之厚液膜柱可以增加柱容量、减低活性，适于低沸点化合物的分析。此外当固定相进行交联之后，可进一步提高液膜厚度到 $5\sim 6\mu\text{m}$ ，甚至可高达 $8\mu\text{m}$ 。以便适应于代替填充柱的要求。

第六节 细内径毛细管气相色谱柱^[11,12]

一、细内径毛细管气相色谱柱的特点

1. 概况

气相色谱分析方法的主要目的是在尽可能短的时间里对一个混合

物得到完全的分离, 对于痕量分析而言还要求灵敏度高、对样品的容量大, 要达到这一目的一般使用长度为 25~30m、内径为 0.25~0.32mm 的毛细管柱来进行常规分析, 这样的毛细管柱可以提供高的柱效 (1000000 理论塔板数) 和足够的样品容量和负载量。如果减小柱内径就会提高柱效, 所以可在维持分离度不变的情况下缩短柱长。例如一支 10m × 0.1mm i.d. 的毛细管柱可提供柱效等同于一支 25m × 0.25mm i.d. 柱的柱效。因为柱长缩短到 2/5, 分析时间也大大缩短。而且由于细内径毛细管柱的 Van Deemter 曲线比较平坦, 最佳流速较高, 所以在分离度不减低的情况下可以进一步提高分析速度。而提高分析速度的代价是柱容量减小, 因而样品的注入量要小, 实际应用中使用大的分流比。在许多化学、石油化学、食品、调味品和香料的分析中不需要很高的灵敏度, 所以在这些领域中使用细内径毛细管柱可以大大缩短分析时间, 在保持分离度不变的条件下增加每日的分析数量。

2. 理论依据

对毛细管柱的速率理论高雷提出用下列方程表示

$$h = \frac{B}{u} + C_G \bar{u} + C_L \bar{u} \quad (5-8)$$

式中 h ——理论塔板高度;

B ——纵向扩散项;

C_G ——气相传质阻力项;

C_L ——液相传质阻力项;

$\bar{u}$ ——载气平均线流速。

$$\text{在 (5-7) 式中} \quad B = 2D_G \quad (5-9)$$

$$C_G = \frac{1 + 6k + 11k^2}{24(1+k)^2} \left(\frac{r^2}{D_G} \right) \quad (5-10)$$

$$C_L = \frac{k^3}{6(1+k)^2} \cdot \frac{r^2}{K^2 D_L} \quad (5-11)$$

在上面三式中 D_G 和 D_L 分别为溶质在气相和液相中的扩散系数, r

为毛细管半径, K 为分配系数, k 为分配容量。

从 (5-10) 和 (5-11) 式可以看出毛细管半径减小可以大幅度提高色谱柱的柱效。而且在毛细管内径小时, 载气流速加大, 可以提高分析速度。

二、细内径毛细管气相色谱柱的应用

1. 用 HP6890 系列气相色谱仪进行香精油的毛细管快速气相色谱分析所用色谱条件见表 5-6。

表 5-6 用细内径毛细管气相色谱柱分析香精油的条件

气相色谱仪	HP6890 系列气相色谱系统
进样	分流/不分流
检测器	FID
自动进样器	HP 7673
衬管	分流/不分流衬管, 4mm i.d. 填充玻璃毛塞, (HP 零部件号 19251—60540)
数据采集	化学工作站
色谱柱	15m × 0.10mm × 0.1μm I-5
实验条件	
进样温度	250℃
进样体积	1μL
分流比	1/530
载气	氢
柱前压	29psi
流速	1.8mL/min (88cm/s)
分流流量	192mL/min
气体节约器	ON 1min
柱箱温度	40℃, 12℃/min 升温到 190℃
检测器温度	250℃
检测器气体	氢, 35mL/min; 空气 400mL/min; 氮 30mL/min

用常规毛细管气相色谱分析合成香料, 在 30 min 内得到很好的分离, 然而用一支细内径毛细管柱进行同样的实验可以得到同样的分离度, 而分析时间只有 12.5min。

使用相同的条件分析天然薰衣草油样品: 芳樟醇、樟脑、芳樟醇

乙酸酯和香叶醇乙酸酯，对这四个化合物进行 10 次测定计算它们的保留时间和峰面积重现性。结果表明：保留时间的标准偏差小于 0.002min ($RSD < 0.03\%$)，峰面积的标准偏差小于 1%。

2. 用细内径短毛细管柱在 7min 内完成 ASTM D 2887 气相色谱模拟蒸馏石油样品

这一研究使用 1m 色谱柱，使约为 $C_5 \sim C_{44}$ 的烃得以十分快速的分离，HP 6890 系列 GC 装备有快速程序升温的设施，能够从 $35^\circ\text{C} \sim 310^\circ\text{C}$ 之间以 $40^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温。所用色谱条件如表 5-7。

表 5-7 用细内径短毛细管柱进行模拟蒸馏的条件

HP 6890 系列 GC	
快速柱箱升温速率	
分流/不分流进样	
毛细管-优化 FID	
1m $\times$ 0.10mm i.d., 0.4 μ m HP-1 (从 10m 商品毛细管柱 (HP 零件号 19091Z-441) 上截取 1m)	
HP G2070AA	HP 化学工作站
模拟蒸馏软件	AC Analytical Controls
操作参数	
进样口温度	315 $^\circ\text{C}$
FID 温度	325 $^\circ\text{C}$
柱箱升温速率	以 $40^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率从 35°C 到 310°C
柱流速	以 1mL/min (0.1min) 速率从 90mL/min 到 3.5mL/min (保持)
最大压力	在 310°C 时 67psi
载气	氮
相比	175/1
进样量	0.5 μ L
采集数据速度	0.6 20Hz

模拟蒸馏的结果：表 5-8 列出 RGO no.1 lot2 的分析结果，在一周的比较分析时间里与 ASTM 的方法相一致。在所研究的沸程内平均偏差小于 1°C 。分析结果说明这一方法有很好的精度 (RSD 为 0.1%)，而且与常规方法非常一致。

表 5-8 参比用分析瓦斯油 (RGO) 的分析结果 (以℃表示)

蒸出百分数	ASTM D-2D 2887 ^①	快速第 1 天	快速第 2 天	快速第 7 天
起始沸点	115	115	114.5	113.5
5	151	151	151	151
10	176	176	175	174.5
20	224	224	114.5	174.5
30	259	259	260.5	174.5
40	289	290	290	290
50	312	312	312.5	313
60	332	331	332	332.5
70	354	354	353.5	332.5
80	378	378	353.5	332.5
90	407	407	406	332.5
96	428	428	427.5	332.5
最后沸点	475	475	474.5	475.5

① ASTM D-2 结果是对 RGO 多家测定的数据。

第七节 气固色谱用毛细管柱^[13]

一、气固毛细管柱

自从 1966 年 Hollis 使用高分子小球作气相色谱固定相以来, 气固色谱多使用填充柱, 但在 80 年代后期多孔层气固色谱毛细管柱 (PLOT 柱) 出现。使用多孔层开管柱 (PLOT) 分析气体具有高效、快速、重复性好的优点, PLOT 柱正在取代常规的填充柱。PLOT 柱是在熔融石英毛细管柱中涂渍一层吸附剂颗粒的开管柱。

气固毛细管柱有以下三种类型:

- 涂渍分子筛的 PLOT 柱;
- 涂渍各种三氧化二铝的 PLOT 柱;
- 键合苯乙烯二乙烯基苯的 PLOT 柱。

各种 PLOT 柱的应用如表 5-9。

二、分子筛 PLOT 柱

HP-PLOT 分子筛柱可以分析永久气体和惰性气体, 它是在柱内涂渍有固定化的 5A 分子筛, 涂层厚度为 12~50 μm 。这样可以保证对氮、氧、氩、甲烷和一氧化碳的分离。把分子筛键合到毛细管壁

表 5-9 HP-PLOT 柱的应用

色谱柱	固定相	典型应用
PLOT 分子筛柱 PLOT Al_2O_3 柱	分子筛, 5A 用 KCl, NaSO_4 或其他方法 脱活的三氧化二铝	永久气体, 惰性气体 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 烃异构体, 包括乙烯、丙烯 和丁二烯
PLOT Q 柱	聚苯乙烯-二乙烯基苯	所有 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ 的异构体, 到 C_4 的烃、 CO_2 、甲烷、空气/ CO 、水、含氧化合 物、硫化物、溶剂

上, 减少颗粒脱落的机会, 以免颗粒进入系统的阀或检测器里, 这样可以大大提高检测器的灵敏度和整个系统的精确性。例如, 惠普公司的 HP-PLOT 分子筛柱有足够的柱效和柱容量用以很好地分离氮、氧、甲烷和一氧化碳。这种色谱柱适合于多种气体分析样品阀所要求的时间选择。在进行等温 40°C 分析时, 氧和氮只能部分分离。如果要把它们完全分离, 可以用冷冻低温或使用厚膜 HP-PLOT 分子筛柱, 图 5-6 是在接近环境温度下分析周围环境中的惰性气体的色谱图。在 35°C 下可以把惰性气体及氧和氮很好地分离, 分析时间不到 10min。

HP-PLOT 分子筛柱的柱径规格为 0.32mm 和 0.53mm, 为了能在不使用冷冻低温下分离氧和氮气, 可以使用厚膜柱 HP-PLOT MoleSieve/5A 分子筛柱。经济的薄膜 HP-PLOT 分子筛柱是多种应用分析 (包括常规的空气监测) 理想的色谱柱, 分析时间小于 10s。使用薄膜 HP-PLOT 分子筛柱可以在低温下分离氧和氮。

三、三氧化二铝 PLOT 柱

PLOT 三氧化二铝柱是用三氧化二铝颗粒和各种脱活的三氧化二铝颗粒的涂层开管柱。所有 PLOT 三氧化二铝柱都适用于烃气流中 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 异构体的分离, 每种类型的 PLOT 三氧化二铝柱有其特点和优点, 表 5-10 是惠普公司的 3 种三氧化二铝柱的特点和应用范围。

HP-PLOT 三氧化二铝柱的柱径从 0.25mm 到 0.53mm, 0.53mm 柱的使用更为普遍, 因为它的柱容量大, 适合于大体积进样阀的应用。图 5-7 是用 0.53mm HP-PLOT 三氧化二铝 KCl 柱分析乙烯和丙

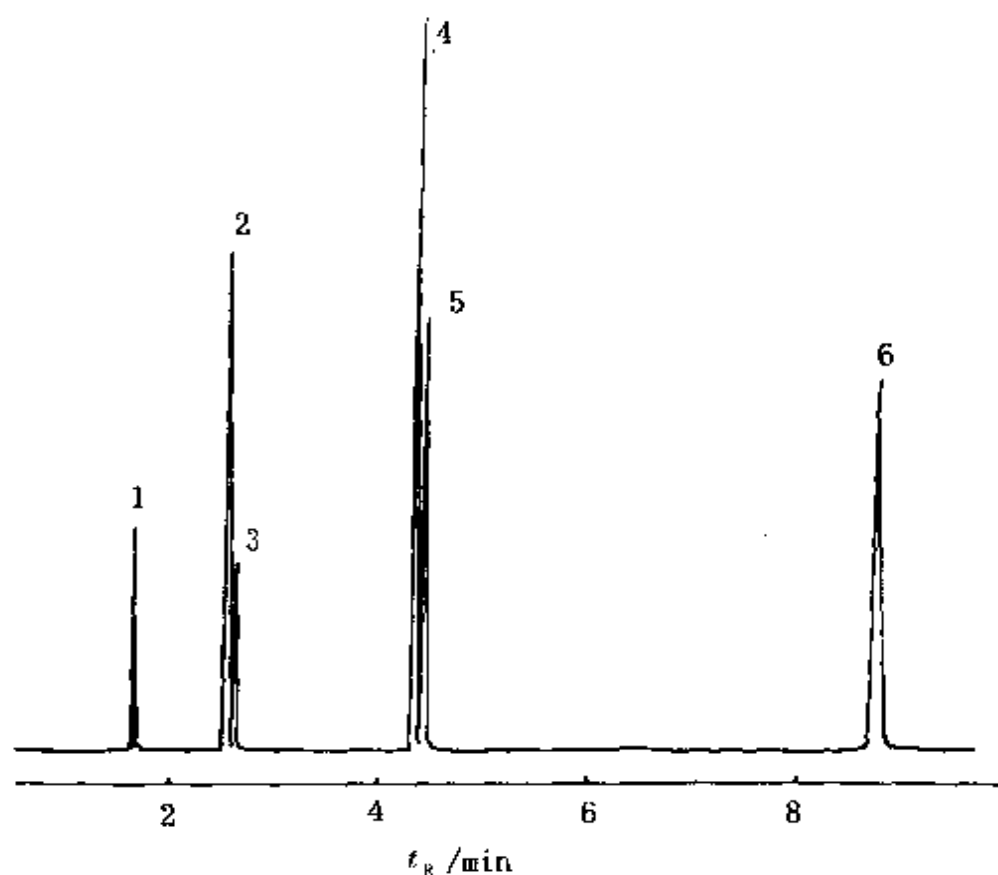


图 5-6 用 HP-PLOT 分子筛柱分析惰性气体的色谱图

色谱柱：HP-PLOT 分子筛柱，30m×0.53mm×50 μ m (HP 零件号 19095P-MSO)

载气：氮，4mL/min

柱箱：35℃ (3min) 到 120℃ (5min)，升温速度 25℃ /min

样品：250 μ L，分流比 50:1

GC 系统：HP5890 系列 HGC 带 EPC 和 TCD

色谱峰：1—氦；2—氩；3—氧；4—氮；5—氖；6—氪

表 5-10 HP-PLOT 三氧化二铝柱的特点和应用范围

色 谱 柱	脱活类型	极 性	应 用 范 围
HP-PLOT Al ₂ O ₃ KCl	KCl	极性最小的 Al ₂ O ₃ 固定相 (烯烃对烷烃的保留值比最小)	在精确定量中选择这种柱子，特别是分析乙烯和丙烯中的丙二烯和丁二烯
HP PLOT Al ₂ O ₃ "S"	硫酸钠	比 Al ₂ O ₃ KCl 的极性大一些	优良的通用柱是优良的 C ₂ ~ C ₄ 异构体分离柱，重复性很好，可以很好地从丁烷中分离乙炔，从异丁烷中分离丙烯
HP PLOT Al ₂ O ₃ "M"	专利产品	PLOT Al ₂ O ₃ 柱中极性最高 (烯烃对烷烃的保留值比最高)	优良的通用柱，C ₂ ~ C ₄ 异构体分离柱是优良，重复性很好，可以很好地从丙烯中分离环丙烷

烯气体的色谱图，用 HP-PLOT 三氧化二铝柱检测烃类的检测限为 10^{-5} g/mL。对 0.32mm 和 0.53mm 内径的所有 3 种色谱柱其温度上限均为 200℃，对 0.25mm 柱可以在 250℃ 下短时间使用。由于 0.25mm 柱的柱效高并且使用温度上限也较高，所以它可用于烃类（高达 C_{10} ）异构体的分离。0.25mm 柱也广泛地用于 GC-MS 的分析。

除去如上面的说明外，“S”和“M”柱具有十分相近的色谱性能。

四、HP-PLOT Al_2O_3 KCl 柱

因为 HP-PLOT Al_2O_3 KCl 柱是极性最小的 Al_2O_3 柱，由于它的吸附性很低，所以可用于二烯烃的定量分析，如图 5-7 的色谱。

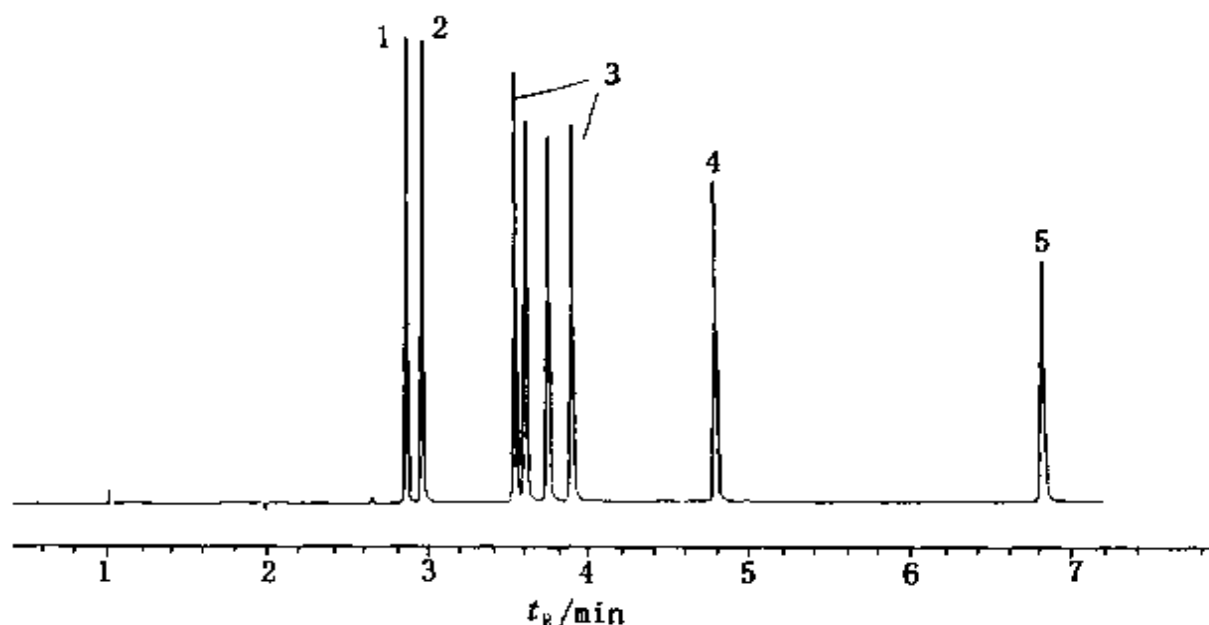


图 5-7 在 Al_2O_3 KCl 柱上低浓度烯烃的分析

色谱柱：HP-PLOT Al_2O_3 “KCl” 柱，50m $\times$ 0.53mm $\times$ 15 μ m (HP 零件号 19095P—K25)

柱箱：120℃ (3min)，以 10℃/min 到 180℃

载气：氢，34kPa 120℃

进样口：250℃ 分流 200mL/min

检测器：FID，250℃

样品：0.25mL 样品阀进样

1—异丁烷；2—正丁烷；3—丁烯；4—1,3-丁二烯；5—乙基乙炔

五、HP-PLOT Al_2O_3 “S” 和 “M” 柱

这种色谱柱是优良的通用性色谱柱，它不同于 Al_2O_3 KCl 柱，而是进行了优化专为烃类异构体分析用的专用型色谱柱。这些色谱柱可

以使 $C_1 \sim C_6$ 异构体达到基线分离，即使在超载的情况下也可以对乙烯、丙烷、环丙烷、丙烯、乙炔、丙二烯和1,3-丁二烯有选择性分离。图 5-8 是用 PLOT Al_2O_3 “S” 柱分析 98.5% 乙烯中主要杂质的色谱图，这种色谱柱的高柱容量表现在丙烷（进样 1.5mL）即使在严重超载下，它的峰形也没有发生畸变，所有的峰都尖锐而对称，分离度很好，表现出色谱柱具有独特的选择性。

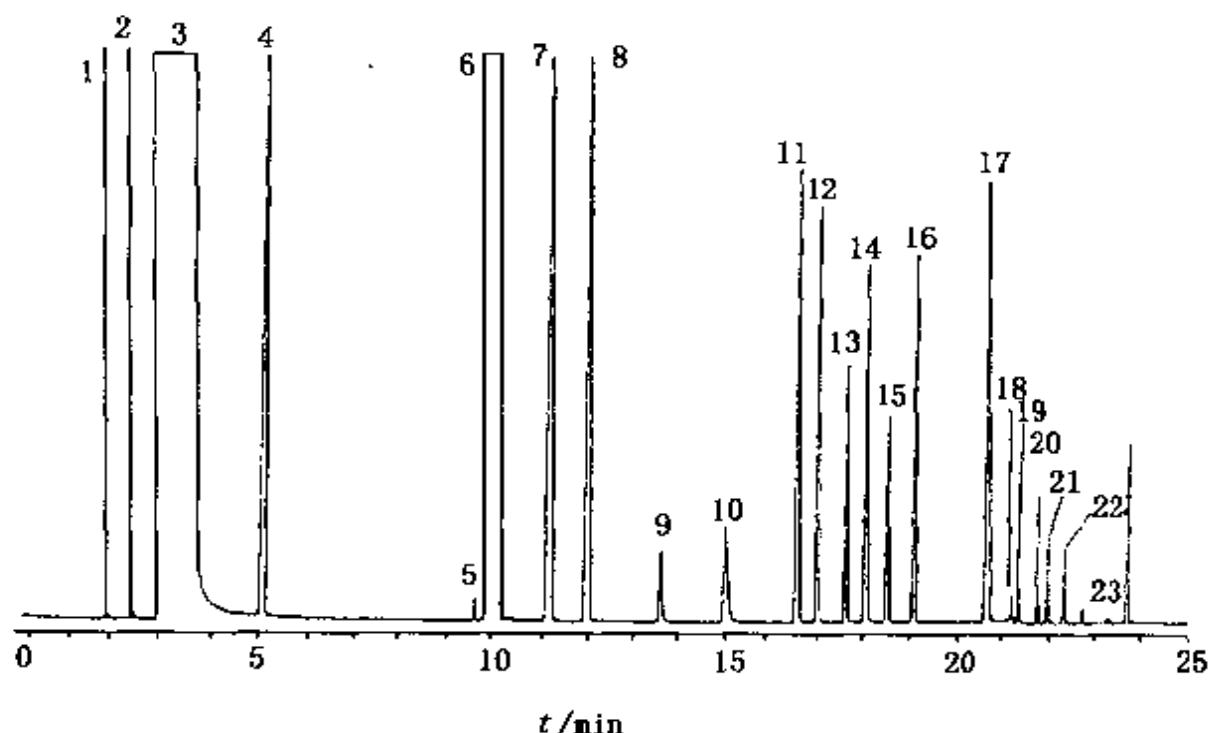


图 5-8 分析 98.5% 乙烯中主要杂质的色谱图

色谱柱：HP-PLOT Al_2O_3 “S” 和 “M” 柱，50m × 0.53mm

载气：氮，恒流模式，柱流量 6mL/min

柱箱：35℃ (2min)，以 5℃/min 到 100℃，以 10℃/min 到 180℃ (5min)

进样口：分流/不分流 250℃

检测器：FID，250℃

样品：1.5mL 乙烯 $C_1 \sim C_3$ 烃混合物，分流比 30:1

色谱峰：1—甲烷；2—乙烷；3—乙烯；4—丙烷；5—环丙烷；6—丙烯；7—异丁烷；8—正丁烷；9—丙二烯；10—乙炔；11—反-2-丁烯；12—1-丁烯；13—异丁烯；14—顺-2-丁烯；15—异戊烷；16—正戊烷；17—1,3-丁二烯；18—丙炔；19—反-2-戊烯；20—2-甲基丁烯；21—1-戊烯；22—反戊烯；23—己烷

六、苯乙烯二乙烯基苯的 PLOT 柱

这种色谱柱惠普公司的商品名为 HP-PLOT Q 柱，HP-PLOT Q 柱是 HP 公司 PLOT 柱中应用广泛的色谱柱，HP-PLOT Q 柱适合于

以下对象的分离：

①烃类——所有 $C_1 \sim C_3$ 异构体：一直到 C_{14} 的链烃、天然气、炼厂气、乙烯、丙烯气体)；

②二氧化碳、空气/一氧化碳、水；

③极性溶剂、含氧和含硫化合物。

HP-PLOT Q 柱的特点和应用见表 5-11。

表 5-11 HP-PLOT Q 柱的特点和应用

性 能	优 点	优 越 性
可在较高温度下进行分离	使 C_6 以前烃类在 60°C 基线分离，分离所有 $C_1 \sim C_3$ 异构体、空气、水、二氧化碳和其他极性化合物	提高分离度加快分析周期达 30%
优良的机械稳定性	不会脱落固定相碎片，不需要用捕集阱	适于带阀的、在线分析系统和 MS 的分析
低流失	—	提高灵敏度，缩短 DVB 型固定相的老化时间
优良的化学稳定性	进样几百次醇类峰形和保留时间没有变化	柱寿命长，重复性好
用途广	分离范围宽	可分离饱和烃、烯烃、芳烃、溶剂和含氧及含硫化合物
使用温度上限高	扩展了应用范围，省去阀的使用	加快分析周期
选择性与其他 DVB 固定相相同	—	易于进行方法的转换

HP-PLOT Q 柱应用范围广阔，它可用于烃类气体的分析，如乙烯和丙烯、天然气和极性化合物。新的 HP-PLOT Q 柱可以用于 C_{14} 以下烃类的分析，以及所有 C_2 和 C_3 异构体的分析。

在用 HP-PLOT Q 柱 (TCD) 分析天然气时，HP-PLOT Q 柱表现出：在起始柱温为 60°C 下，水和 H_2S ，空气/CO 和 CO_2 可以从甲烷中得到很好的分离，新戊烷和异戊烷得到分离。

在分析 1,3-丁二烯和芳烃时，使用 HP-PLOT Q 柱不会让 1,3-丁二烯聚合，而在使用其他商品 DVB-固定相的色谱柱时，有时会出现聚合的现象。

HP-PLOT Q 柱除去可以分离水和醇外也可以有效地分离其他含氧化合物，如从环氧乙烷合成标准物中分离氯代烯烃 (2-氯丙烯)。

也可以很好地分离极性溶剂，如：甲醇、丙酮、二氯甲烷和低沸点的醇类、酮类、酯类、醛类和芳烃类。

HP-PLOT Q 柱可以用于含硫化合物的分析，包括硫醇、 H_2S 、COS 和二硫化物，可以得到很好的分离，COS 的峰形很好。但值得注意的是：一般 DVB 柱是不适于分析低浓度的硫化物，因为它们有明显的吸附性，但是用 HP-PLOT Q 柱可以进 1mL 气体样品，使用 S 的化学发光检测器，测定 10^{-9}g/mL 的 COS，如图 5-9 所示。

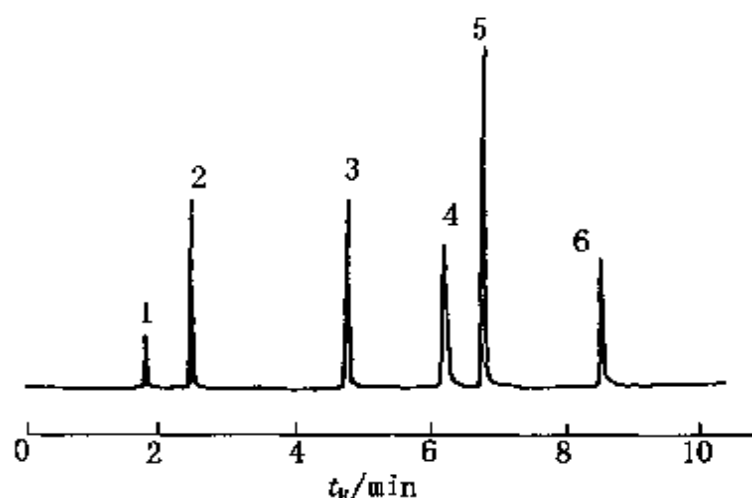


图 5-9 用 HP-PLOT Q 柱分离气味添加剂——硫醇和其他硫化物

色谱柱：HP-PLOT Q 柱 $0.53\text{mm} \times 30\text{m}$ (HP 零件号 19095P-Q04)

柱箱： 105°C (1min)，以 $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 到 240°C

载气：氢 60°C

进样： 250°C ，分流模式，进样 0.5mL

分流流量： $100\text{mL}/\text{min}$

检测器：FID

样品浓度： H_2S ，COS： $<1\%$ ；硫醇： $<10\%$

色谱峰：1— H_2S ；2—COS；3—乙硫醇；4—异丙基硫醇；5—正丙基硫醇；6—正丁基硫醇

参 考 文 献

- 1 傅若农，刘虎威，高分辨气相色谱和高分辨裂解气相色谱，北京：北京理工大学出版社，1993，第一章到第四章
- 2 吴采婴，曾昭睿，现代毛细管柱气相色谱法，武汉：武汉大学出版社，1990
- 3 孙传经，毛细管色谱法，北京：化学工业出版社，1991
- 4 [美] L S Ettre，开管柱入门，陈维杰，张铁垣译，北京：北京师范大学出版社，1982
- 5 周良模等，气相色谱新技术，北京：科学出版社，1994

- 6 傅若农, 国外分析仪器, 1996 (2): 1~12
- 7 傅若农, 国外分析仪器, 1996 (3): 1~11
- 8 傅若农, 色谱, 1990, 8 (1): 16
- 9 傅若农, 色谱, 1992 10 (1): 14~18
- 10 景鹏, 傅若农, 分析化学, 1995, 23 (1): 104~110
- 11 David F, Sandra F, and Wylie P. HP 公司 气相色谱应用札记 228~335 1995
- 12 Vince Giarracco, HP 公司 气相色谱应用札记 228~390, 1997
- 13 惠普公司有关 PLOT 色谱柱的说明, 1999

第六章 裂解气相色谱

第一节 裂解气相色谱的方法和原理

一、裂解气相色谱的发展过程

裂解气相色谱 (Pyrolysis Gas Chromatography PyGC) 是在热裂解和气相色谱两种技术基础上发展起来的。所谓热裂解是在热能的作用下, 物质发生的化学降解过程。裂解可分为“应用裂解”和“分析裂解”两大类。在分析化学领域中应用 PyGC 使一些分子量较大、结构复杂、难挥发的物质得到分离和鉴定, 称为分析裂解。

据文献记载, 早在 1862 年 Williams 就曾把裂解技术与化学分析结合起来研究天然橡胶, 并确定了其单体为异戊二烯。由于当时没有先进的仪器设备, 人们很难从非常复杂的裂解产物中获得满意的信息, 因此裂解技术发展缓慢, 直到本世纪 50 年代气相色谱仪出现, 此项技术有了新进展。1954 年 Davison 首先对高聚物的裂解产物进行了气相色谱分离, 记录了谱图并加以鉴别。但脱机分析只能检测到室温下具有良好挥发性的稳定产物, 因此会丢失许多聚合物结构和热裂解途径的信息。1959 年 Martin 等人把高聚物的裂解装置直接同气相色谱仪联机分析聚合物获得成功, 这是分析裂解技术的重大突破。1966 年 Sinnmon 等人实现了 PyGC-MS 联机分析, 鉴定了氨基酸的裂解碎片, 为进一步研究聚合物的结构和热分解机理奠定了基础。在裂解装置方面, 相继出现了热丝(带)裂解器、居里点裂解器、管式炉裂解器和激光裂解器, 这些裂解器一直沿用至今。新式裂解器的出现及其性能的提高, 促进了 PyGC 的发展, 1979 年开始出版国际学术性刊物《分析和应用裂解》杂志 (Journal of Analytical and Applied Pyrolysis)。

进入 80 年代以后 PyGC 理论研究更加深入, 因子分析、多变量

分析和模式识别等化学计量学方法在 PyGC 中获得越来越多的应用, PyGC 与质谱 (MS)、傅立叶红外 (FTIR) 及核磁共振 (NMR) 等联用技术日益成熟, 使 PyGC 获得的信息量大为增加, 现代计算机技术在其中的应用, 提高了数据处理功能和整个实验的自动化程度, 因此 PyGC 已成为研究高分子微观结构的强有力的方法。由于它具有快速、高效、耗样少、信息量大、样品物理状态不限等特点, 在分子、生物医学、环境科学、考古学、地球化学、矿物燃料、火炸药等领域中获得了广泛应用。

二、PyGC 的特点和局限性

1. PyGC 的特点

由于 PyGC 是把样品的裂解和高效气相色谱相结合, 所以它具有以下的特点:

①分离效率高。现时的 PyGC 大都是使用毛细管色谱柱, 它可以对复杂的裂解产物进行有效的分离, 尤其是高分子化合物之间的微小差异, 聚合物材料中的微量组分, 都能在裂解谱图上灵敏地反映出来, 找到相应的特征。

②灵敏度高, 样品用量少。PyGC 一般采用氢火焰离子化检测器, 有很高的灵敏度。样品用量一般为 μg 至 mg 量级, 这对只能获得微量样品的检测很有利。

③分析速度快, 信息量大。典型的分析周期为 0.5h, 当裂解产物很复杂时, 一个多小时也可以完成一次分析, 不仅可做定性分析, 还可以进行定量分析, 而且还可以进行高聚物的结构研究, 以及热稳定性和反应动力学研究。

④适合于各种形态样品, 不需要预处理。无论是粘稠液体、粉末、纤维及弹性体, 还是固化的树脂、涂料、硫化橡胶, 都可以直接进样分析。

⑤设备简单, 易于普及。把裂解器和气相色谱仪组合在一起就可以进行 PyGC 分析, 裂解器也可以看作是一个气相色谱的进样器, 它比较简单, 一般的实验室都可以做到。

⑥可以和各种光谱仪器在线联接。凡是可以和 GC 在线联接的仪

器都可以和 PyGC 在线联接, 使用最多的是 PyGC/MS, 近年 PyGC/FT-IR 联用也逐渐增多。

2. 裂解气相色谱的局限性

作为一种分析手段, PyGC 亦有其局限性, 首先是对大量裂解产物的鉴定比较麻烦, 其次是谱图特征不能完全反映样品的组成和结构, 因色谱柱流出的产物只是热稳定的, 分子量相对小的一些碎片, 这在研究结构和降解机理时往往导致重要信息的丢失, 因此只有将 PyGC 与其他适当的分析技术配合使用, 才能充分发挥其作用。

三、PyGC 的基本原理及方法

1. PyGC 的原理和分析对象

PyGC 分析的原理是在一定条件下高分子及非挥发性有机物遵循一定的规律裂解, 即特定的样品能够产生特征的裂解产物及产物分布, 据此可对原样品进行表征。把待测样品置于裂解器中, 在严格控制的条件下快速加热, 使之迅速分解成为可挥发的小分子产物, 然后将裂解产物送到色谱柱中进行分离分析, 通过对裂解产物的定性和定量分析, 以及和裂解温度、裂解时间等操作条件的关系, 可以研究裂解产物和原样品的组成、结构和物化性能的关系, 并可以研究裂解机理和反应动力学。由此可见 PyGC 是一个样品破坏性的仪器分析方法, 他的主要研究对象是天然和合成高聚物、生物大分子、地质有机

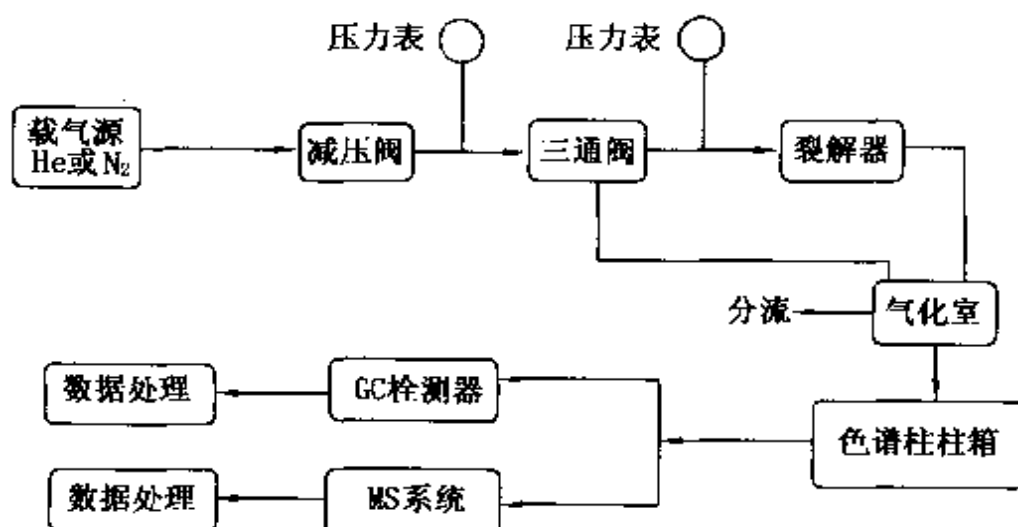


图 6-1 裂解色谱 (或 PyGC/MS) 系统的方块图

大分子和不挥发性有机物。

2. PyGC 的分析流程

图 6-1 是 PyGC 分析流程的示意图，一个 PyGC 系统主要由三部分组成，第一是裂解器；第二是气相色谱仪；第三是数据处理系统。如果是 PyGC/MS，那么还有第四部分是质谱分析系统。

第二节 裂解气相色谱的裂解器

一、PyGC 对裂解器的要求

1. 裂解反应的控制

裂解器是 PyGC 的关键部件，要求它在使一个样品裂解时，能满足 PyGC 的要求。因为样品的裂解常常依赖于裂解温度，裂解温度不同导致最终产物的差异，所以要控制裂解反应首先是控制裂解温度，这包括样品的实际裂解温度，达到这一温度所需的时间。一个理想的裂解器应在尽可能短的时间里达到精确控制的裂解温度，并能严格地重复这些条件。这样才能使重复分析获得相同的裂解产物分布。当然，影响裂解反应的因素很多，除裂解器的设计和选择外，还有样品的理化性质及进样量，裂解器与色谱仪的连接等。

2. PyGC 对裂解器的技术要求

①能精确控制和测定平衡温度 (T_{eq})，而且有较宽的调节范围。 T_{eq} 直接影响裂解产物的分布，如聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 的裂解，在较低的温度时甲醇是主要产物，而在较高的温度时几乎没有甲醇产生。一般来说，随着 T_{eq} 的提高裂解产物中分子量较小的、缺乏特征性的组分含量将增加。常用的 T_{eq} 范围为 400~800℃。裂解器的可调温度范围应在室温到 1000℃ 甚至到 1500℃ 之间。在平衡温度之前它就会完全裂解。

②升温时间^①，即从开始升温到达到平衡温度 (T_{eq}) 所需的时间，要尽可能短，而且能严格控制温度-时间曲线的重复性。之所以这样要求，是因为在裂解过程中发生的化学降解非常快，比如聚四氟

① 在裂解色谱条件表述中使用 TRT。

乙烯是一种很稳定的高聚物，但是在达到 T_{eq} 之前它就会完全裂解。所以要控制裂解的重复性就必须能重现样品的加热过程，而缩短升温时间是一个很重要的因素。

③裂解器和接口的体积要尽量小。这样使整个 PyGC 系统的死体积减小，同时可抑制二次反应。

④裂解器和进样装置（丝、带、管或舟）对裂解无催化反应。

⑤适应性强。既能适应于各种形态的样品，又易于和各种品牌色谱仪相连。

二、PyGC 裂解器的分类

裂解器的分类一般有两种方法，一是按照加热方法分为电阻加热型、感应加热型和辐射加热型。另一种分类是按照加热机制分为连续式和间歇式裂解器。

1. 按照加热方法分类

电阻加热型裂解器：热丝（带）裂解器和管式炉裂解器。

感应加热型裂解器：居里点裂解器。

辐射加热型裂解器：激光裂解器。

2. 按照加热机制分类

连续式裂解器：管式炉裂解器和微炉裂解器。

间歇式裂解器：热丝（带）裂解器、居里点裂解器和激光裂解器。

三、常用的 PyGC 裂解器

1. 管式炉裂解器

最常用的连续式裂解器是管式炉裂解器，一般是由一个外壁加热的圆管组成，当炉温达到 T_{eq} 时，将样品放在一个白金舟内送入加热管中，样品不与管壁接触，样品的实际温度低于管壁温度。其示意图见图 6-2。管式炉裂解器的优点是平衡温度连续可调，而且易于控制和测定，适用于各种类型的样品。缺点是 TRT 长，升温速率不可调，死体积大，二次反应突出。早期使用较多，现在使用的人少了。

2. 热丝（带）裂解器

热丝裂解器是 1961 年出现的，其工作原理是把样品放在金属加热丝的螺旋管中，热丝通过电流发热，使样品裂解。图 6-3 是热丝裂

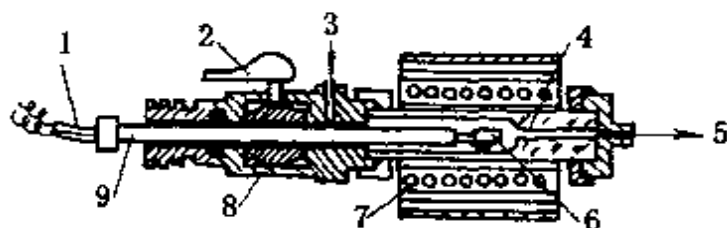


图 6-2 管式炉裂解器示意图

1—热电偶；2—手柄；3—载气；4—石英管；5—色谱柱；
6—铂舟；7—电热丝；8—球阀；9—推杆

解器的示意图，一般热丝为直径0.2~0.5mm、长度为50mm的铂丝或镍铬丝绕成的螺旋管，样品就附在热丝上，通电后样品裂解。

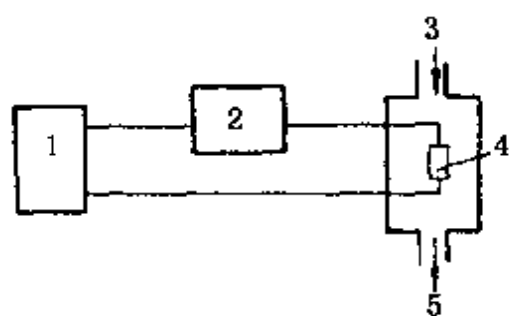


图 6-3 热丝裂解器的示意图

1—电源；2—计时器；3—载气；4—铂丝线圈（样品）；5—到色谱柱

1970年美国CDS公司推出了商品化的电桥平衡热丝裂解器，后来又一再改进，在市场上出现了CDS150, 190, 120, 122, 1000和2000等型号的热丝（带）裂解器。目前这类裂解器是世界上应用最广的一类裂解器。图6-4是这种裂解器的典型结构。

图 6-5 是电容放电的电路原理图。

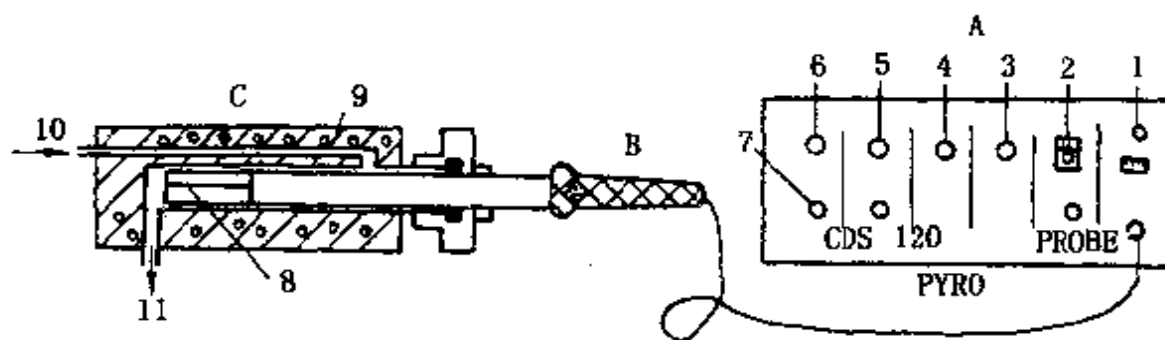


图 6-4 CDS热丝（带）裂解器的示意图

A—控制器；B—带（或热丝）式裂解器探头；C—接口

1—裂解开关；2—最终温度控制；3—裂解时间选择；4—升温速率选择；
5—接口温度控制；6—功能选择；7—电源开关；8—铂带（或铂丝线圈）；
9—加热丝；10—载气入口；11—连接色谱仪进样口

（CDS190型裂解器没有接口，其探头直接插入色谱仪气化室）

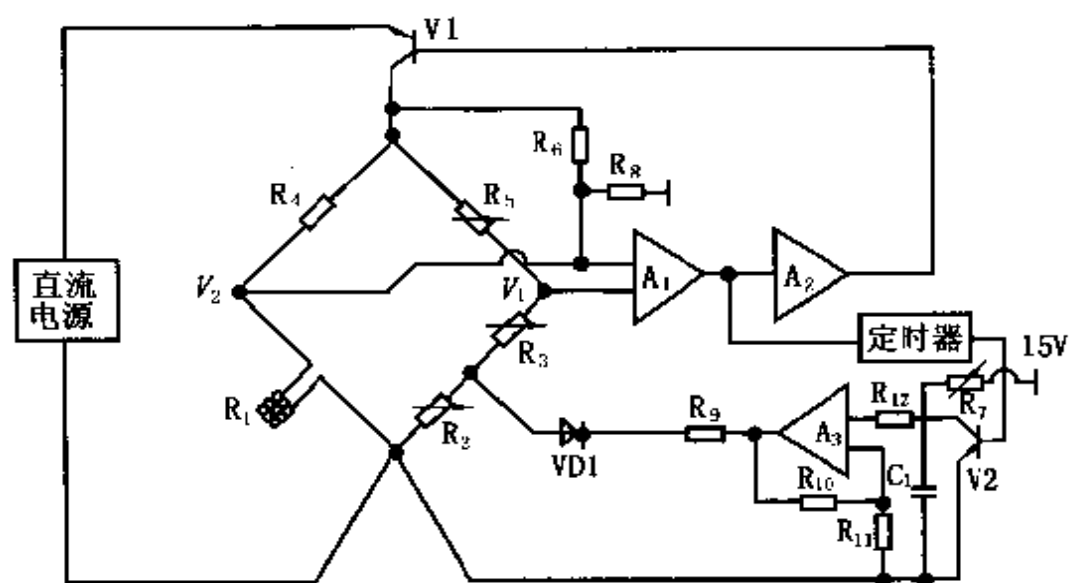


图 6-5 CDS 热丝（带）裂解器电容放电的电路原理图

在 CDS 裂解器中铂丝（带）既是加热元件又是温度传感器，它在电路中是惠斯顿电桥的一臂（图 6-5 中的 R_1 ），室温下其电阻值为 0.25Ω ， 500°C 时为 0.7Ω ， R_3 与 R_1 的室温电阻成比例， R_4 为温度系数很低的 0.2Ω 电阻， R_3 控制最终裂解温度， R_5 校正 R_2 ， A_1 、 A_3 为运算放大器， A_2 为功率放大器， V_1 和 V_2 为三极管， A_1 和 A_2 为 V_1 提供基流，从而控制整个桥路的电流。 R_6 产生反馈信号，以实现线性控制。定时器可以切断 V_1 基流，以便控制裂解时间。 V_2 ， A_3 ， VD_1 ， C_1 ， R_7 ， $R_9 \sim R_{12}$ 共同组成升温速率控制电路。

当 $R_1 / (R_2 + R_3) = R_4 / R_5$ 时，电桥平衡，电压 $V_1 - V_2 = 0$ ，操作时调节 R_2 （实际是一个经过校正的温度数字盘）设定平衡温度，当按下裂解开关后，定时器计时，同时通过 A_1 和 A_2 使 V_1 导通，于是一个大电流脉冲（约 24A ）通过 R_1 使之迅速加热（ 144W ），到达平衡温度。随着温度升高 R_1 阻值升高，导致电桥电压很快下降，同时也降低了 A_1 的偏压和 V_1 的基流。所以，到达平衡温度后只有小电流通过 R_1 ，从而使温度保持在平衡温度，一直到定时器切断 V_1 的基流，裂解过程结束。由于 R_1 的热容很小，可以迅速冷却。 A_1 上有一个小的永久偏压，使其能自行启动。由于采用反馈信号，可实现线性控制，所以裂解时样品的吸热过程并不改变热丝（带）的平衡

温度。

基于上述原理热丝（带）裂解器具有以下优点：

- ① TRT 短的丝式探头在 100~200ms 可升温到 500~800℃。
- ② 平衡温度范围宽。一般在室温到 1000℃，新型号可达 1400℃。
- ③ 裂解参数控制精度高，裂解重复性好。
- ④ 适应性宽，适于科研。
- ⑤ 二次反应小。
- ⑥ 功能多，除瞬间裂解功能外还有“闪蒸”功能。

3. 居里点裂解器

居里点裂解器是利用电磁感应加热的，它的工作原理是：把铁磁

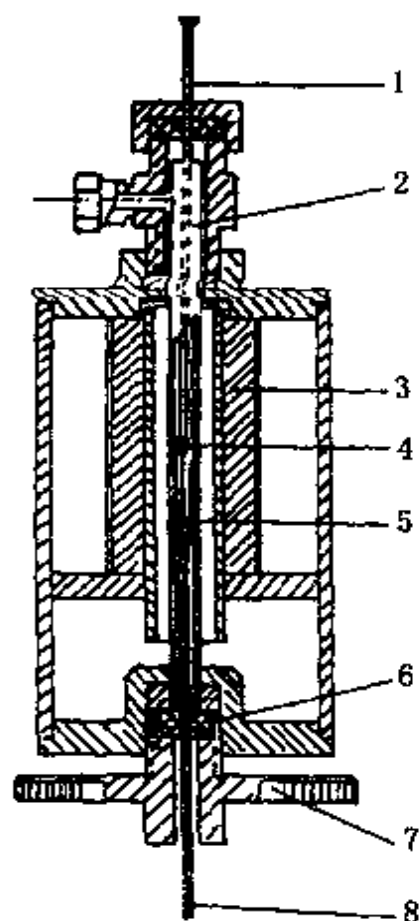


图 6-6 热丝居里点裂解器
1—铁磁丝；2—石英管；3—高频线圈；4—样品；5—锥形连接管；6—密封圈；7—连接环；8—接色谱柱

性材料置于高频电场中，这些铁磁性材料会吸收射频的能量而迅速升温，达到居里点温度时，铁磁质变为顺磁质，这时射频能量不再被吸收，温度随即稳定在该点上。切断高频电源后温度下降，铁磁性又恢复。据此把铁磁性材料作为加热元件，把样品附着在这一加热元件上，置于一个严格控制的高频磁场中，就可以使样品在居里点温度下裂解。不同的铁磁质居里点温度不同，居里点裂解器就是通过不同组成的铁磁质合金来调节裂解温度的。

居里点裂解器有丝式、管式和片式三种，图 6-6 是热丝居里点裂解器。

在居里点裂解器中，加热元件（即样品的载体）的几何形状和高频振荡器的功率直接影响居里点裂解器温度的重现性和精度，一般高频振荡器的频率为 400~600 kHz，输出功率

为 $1.0 \sim 1.5 \text{ kW}$ ，升温时间为 $10 \sim 100 \text{ ms}$ 。丝式居里点裂解器是把样品涂在铁磁丝上，然后置于石英管中，在外加电源产生的高频磁场中迅速升温裂解。平衡温度取决于铁磁丝的直径、高频振荡频率和磁场强度。

4. 激光裂解器

激光裂解器是电磁辐射型加热器，1966 年有人首先用这种激光裂解器进行了裂解质谱的研究，1969 年用于裂解气相色谱，做高聚物的裂解研究。他们用红宝石固体脉冲激光器，激光波长为 694.3 nm ，图 6-7 是这种固体激光裂解器的示意图。其工作原理是由红宝石固体脉冲激光器发出的激光束，经透镜聚光后射到样品上，样品吸收光能后迅速分解。切断光源后，裂解室很快降到室温，裂解产物被载气带到色谱柱中进行分离。

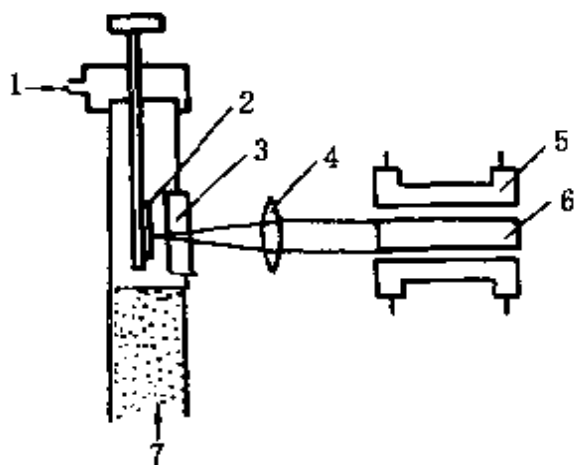


图 6-7 固体激光裂解器的示意图
1—载气；2—样品；3—窗片；4—透镜；5—氙灯；6—红宝石；7—色谱柱

在用激光裂解时，通常把样品置于石英管中，激光束一般给出 $2 \sim 10 \text{ J}$ 的能量，在激光束的聚焦点上，样品通过多光子吸收或电子隧道效应，吸收一部分激光光能，使样品迅速裂解为小分子碎片，裂解过程是一个复杂的过程，它具有以下一些特点：

- ①样品不必做特别的处理，如研成粉末等。
- ②能以很小体积的样品（如 0.01 cm^2 ）进行裂解。
- ③TRT 很短， 1 ms 可以升温到 3200°C 。
- ④样品裂解后冷却很快。
- ⑤样品的降解反应可以只限于表面进行。

但是固体激光裂解器也有它致命的弱点，限制了它的应用，其缺点如下：

- ①采用红宝石或钕固体激光裂解器时，透明或半透明样品不能很

好地吸收辐射能。

②即使是不透明的样品也因其颜色的不同使裂解反应有差异。

③由于 TRT 很短, 被裂解样品的平均温度很难测量。

④样品的裂解仅限于表面, 样品内部会形成温度梯度。

正因为这些原因, 激光裂解器未能实现商品化, 为了克服固体激光裂解器的这些缺点, 在 70 年代又发展了二氧化碳气体激光裂解器, 其激光波长为 $9.1 \sim 11.0 \mu\text{m}$, 处于近红外区域, 这样透明和半透明的样品也会有吸收。但是仍然存在裂解平衡温度难以测量的困难。所以在国际市场上仍没有商品化的二氧化碳气体激光裂解器。我国的四川分析仪器厂曾经生产过少量这种二氧化碳气体激光裂解器。

第三节 裂解气相色谱在材料科学中的应用

一、裂解色谱-质谱方法研究聚合物梯度折射材料

1. 研究目的

为了配合光学材料聚合物梯度折射棒的研究, 用裂解色谱/质谱方法分析测定了这种材料的宏观组成和微观结构, 确定工艺方法是否合理。并提供测定这类共聚物可靠的检测方法。

2. 研究方法

用裂解色谱/质谱方法测定 9 个不同配比的甲基丙烯酸甲酯-邻苯二甲酸二烷基酯 (MMA-DAP) 共聚物标准样的裂解色谱图, 各个裂解产物的质谱图, 一方面研究这种共聚物的裂解产物及规律, 一方面得到用于测定未知物的共聚物摩尔比和摩尔峰面积对应的校正曲线。

3. 所用仪器

(1) 裂解色谱装置 包括: HP 5890 II 气相色谱仪 (HP 公司); CDS 热丝裂解器 (美国 CDS 公司)。

(2) 裂解色谱气路系统 整个裂解色谱 (或 Py/MS) 系统的方块图如图 6-8 所示。

4. 裂解器和裂解条件

使用的 CDS 裂解器的参数如表 6-1 所示。

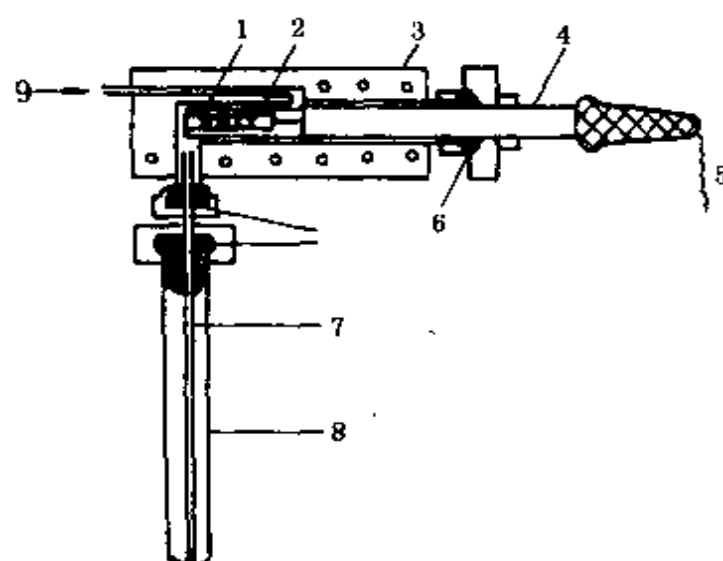


图 6-8 裂解器和气相色谱仪的连接

1—石英管；2—加热丝；3—连接器；4—裂解探头；5—电源；
6—硅橡胶垫；7—连接管；8—色谱仪气化室；9—载气

表 6-1 CDS 裂解器的参数

裂解温度 (T_p) / $^{\circ}\text{C}$	从室温到 1000 $^{\circ}\text{C}$ 连续可调
裂解时间 (t_p) /s	0.02~20s, 分 10 挡
升温速度 (R) / ($\text{K}\cdot\text{s}^{-1}$)	100~1000 $\text{K}\cdot\text{s}^{-1}$, 分 9 挡, 最高挡是 "off"
升温时间 (TRT) / $^{\circ}\text{C}$	从室温~600 $^{\circ}\text{C}$ 需 0.6s 左右
裂解环境温度/ $^{\circ}\text{C}$	从室温~300 $^{\circ}\text{C}$ 连续可调
热 丝	0.6mm 直径铂丝绕成直径为 3mm 长度为 15mm 的螺管
样品管	长度为 20mm、内径为 2mm 的石英管

裂解器和气相色谱仪的连接如图 6-8。裂解色谱所用条件列于表 6-2。

表 6-2 裂解色谱条件

裂 解 条 件		气 相 色 谱 条 件	
裂解温度 (T_p) / $^{\circ}\text{C}$	750 $^{\circ}\text{C}$	色谱柱	44m $\times$ 0.22mm i.d. 涂渍 OV-1
裂解时间 (t_p) /s	10s	柱温/ $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温室 10min, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温到 280 $^{\circ}\text{C}$
升温速度 (R) / (K/s)	"off"	载气	氮气, 柱前压 0.48MPa
裂解环境温度/ $^{\circ}\text{C}$	150 $^{\circ}\text{C}$	气化室	200 $^{\circ}\text{C}$
样品量	40 μg	检测室	200 $^{\circ}\text{C}$

5. 样品

标准样: PMMA 和 PDAP 的均聚物和 9 个已知组分的 MMA-

DAP 共聚物, 其组成配比见表 6-3。这些共聚物标样都是在 60℃ 下, 以过氧化二苯甲酰 (BPO) 为引发剂自由基聚合而成。梯度棒共聚物样品是用蒸气相转移-扩散共聚技术, 制备出一个长 12mm、直径为 10mm 的圆柱形棒, 然后沿着梯度棒的轴切成 14 个厚度为 0.47mm 的圆片。把这 14 个圆片分别作元素分析, 计算出在样品中 MMA 的摩尔分数列于表 6-4 中。

表 6-3 已知组分的 MMA-DAP 共聚物组成

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MMA/% ^①	95.68	90.77	85.16	78.68	71.10	62.12	51.32	38.08	21.46

① MMA 的摩尔分数。

表 6-4 14 个圆片样品的元素分析结果

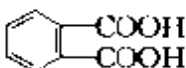
切片号	1	2	3	4	5	6	7
MMA/% ^①	96.44	94.40	93.45	91.46	89.45	86.68	81.36
切片号	8	9	10	11	12	13	14
MMA/% ^①	77.07	73.78	70.49	63.16	58.18	56.96	54.14

① MMA 的摩尔分数。

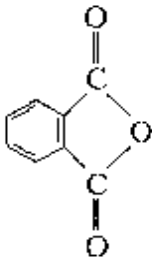
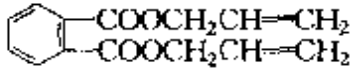
6. 测定结果

(1) PMMA 和 PDAP 的裂解色谱 在上述的裂解条件下进行 PMMA 和 PDAP 的裂解色谱实验, 经 PyGC/MS 研究这两种聚合物的 5 个主要裂解产物的结构和质量数列于表 6-5 中。

表 6-5 PMMA 和气 PDAP 的裂解产物结构和质量数

峰 号	分子式	结 构 式	质 量 数
1	C ₅ H ₈ O ₂	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{C}-\text{COOCH}_3 \end{array}$	100
2	C ₁₀ H ₁₀ O ₂		162
3	C ₈ H ₆ O ₂		166

续表

峰 号	分子式	结 构 式	质量数
4	$C_8H_4O_3$		148
5	$C_{14}H_{14}O_4$		246

(2) 共聚物梯度材料的组分分布 把每个标准样品进行测定, 找出裂解产物量与母体材料中单体量之间的关系, 并以此来确定各个切片的组成。定了 9 个标准样品的数据得到图 6-9 的校正曲线。

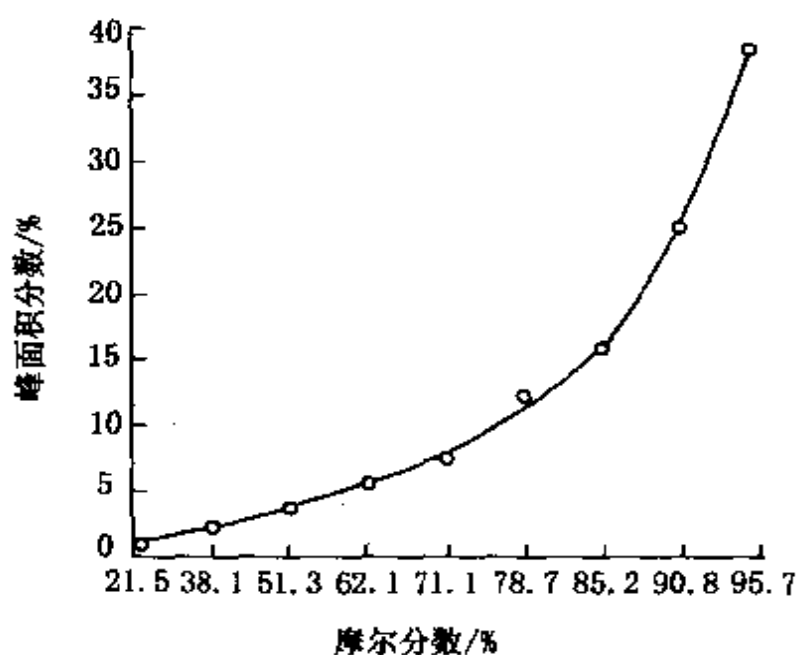


图 6-9 MMA-DAP 共聚物的标准工作曲线

用裂解色谱分析 14 个圆切片, 用图 6-9 工作曲线可以计算出 MMA 在共聚物中的摩尔分数, 结果列于表 6-6 中。

从上述结果可以看出, 裂解色谱/质谱可以很好地、简便地研究共聚物材料中嵌段结构, 并可测定其各个单体在共聚物中的比例, 对

研究梯度材料各个部位的成分简便易行。

表 6-6 14 个圆切片 MMA 在共聚物中的摩尔分数 (x)

切片	1	2	3	4	5	6	7
x	97.10	96.35	94.60	93.50	90.15	88.00	84.88
切片	8	9	10	11	12	13	14
x	78.20	74.65	71.20	65.80	60.05	57.10	55.10

二、裂解色谱方法研究发射药的热分解

可以利用 PyGC 技术 $F-T$ 曲线实验方法, 研究硝化棉 (NC)、硝化纤维素 (NG)、奥克托金 (HMX)、黑索金 (RDX) 及多组分硝酸

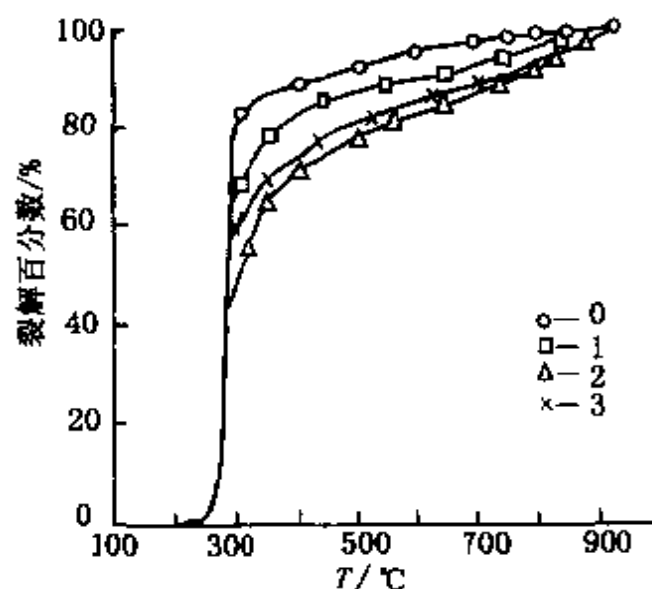


图 6-10 四种发射药的 $F-T$ 图

发射药热定性和热分解行为, 其结果与差示扫描量热分析研究结果有良好的一致性, 因此可以简易、可靠、经济地用于发射药筛选配方的预研工作。图 6-10 为一组发射药样品 (组成见表 6-7), 测得的 $F-T$ 曲线结果。

三、PyGC-MS 研究 GC 和 HPLC 固定相^[6]

众所周知气相色谱和高效液相色谱的固定相即使是同一厂家的产品, 批与批之间的质量也有所不同。高效液相色谱固定相的这一性质是由于孔径、粒径、烃类载量和未反应硅醇基量的不同而引起的。

表 6-7 发射药样品组成

编 号	0	1	2	3
2# 中定剂含量/%	0	5	10	15
基本组成	硝化纤维素、硝化甘油、黑索金			

这里是用裂解气相色谱 (PyGC)、裂解产物的定性和定量以及这

些产物的生成速率来表征 GC 和 HPLC 固定相。

1. 设备和条件

所用裂解器为热丝型，包括一个处理单元（裂解室和探头）、控制单元以及一个建立在 Windows 上的软件。处理单元可以直接装在气相色谱仪的进样口上，一支白金丝装在探头上，白金丝用两个脉冲电流加热，对一些不溶解的样品如纸张，有一个洞穴可盛放。此白金丝可以在 $\leq 8\text{ms}$ 时间内（或按梯度在较长些时间）升温到指定温度，裂解器温度可以从室温到 1400°C ，在实验中实际使用的条件如表 6-8，样品类型见表 6-9。

表 6-8 裂解条件

裂解条件	
裂解器	Pyrola [®] 2000
裂解温度	见图 6-11
裂解时间	2s
升温时间	8ms
裂解器室温度	150°C
样品量	见图 6-11
GC	Varian 3400, USA
载 气	He
流 量	$20\text{mL}/\text{min}$
分 流	20:1.25
色谱柱	DB-1, (J&W) 0.25μ , 30m, 0.25mm
柱 温	50°C ($15^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 300°C

表 6-9 聚硅氧烷样品的类型

样 品	类 型	样 品	类 型
A	甲基硅氧烷	D	苯基甲基硅氧烷，改性
B	甲基硅氧烷	E	苯基甲基硅氧烷，改性
C	苯基甲基硅氧烷		

2. GC 固定相样品和处理

所有 5 种样品都溶于庚烷中 ($7.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$)，取 $1\mu\text{L}$ 样品置于裂解丝上，在进行裂解之前把溶剂蒸发掉。

3. 结果

图 6-11 是两种甲基聚硅氧烷样品 A、B 的裂解气相色谱图，在 600℃ 下样品 A 的高沸点裂解产物多于样品 B，把残余物在 800℃ 下进行裂解，检查它是否有残留的物质，如图 6-11 (b) 所示，发现有大约有 10 倍量的物质在此温度下裂解出来。样品 A 仍有较多的分解产物。在 1000℃ 下进行裂解还是有残留物，样品 B 的裂解产物多于样品 A。

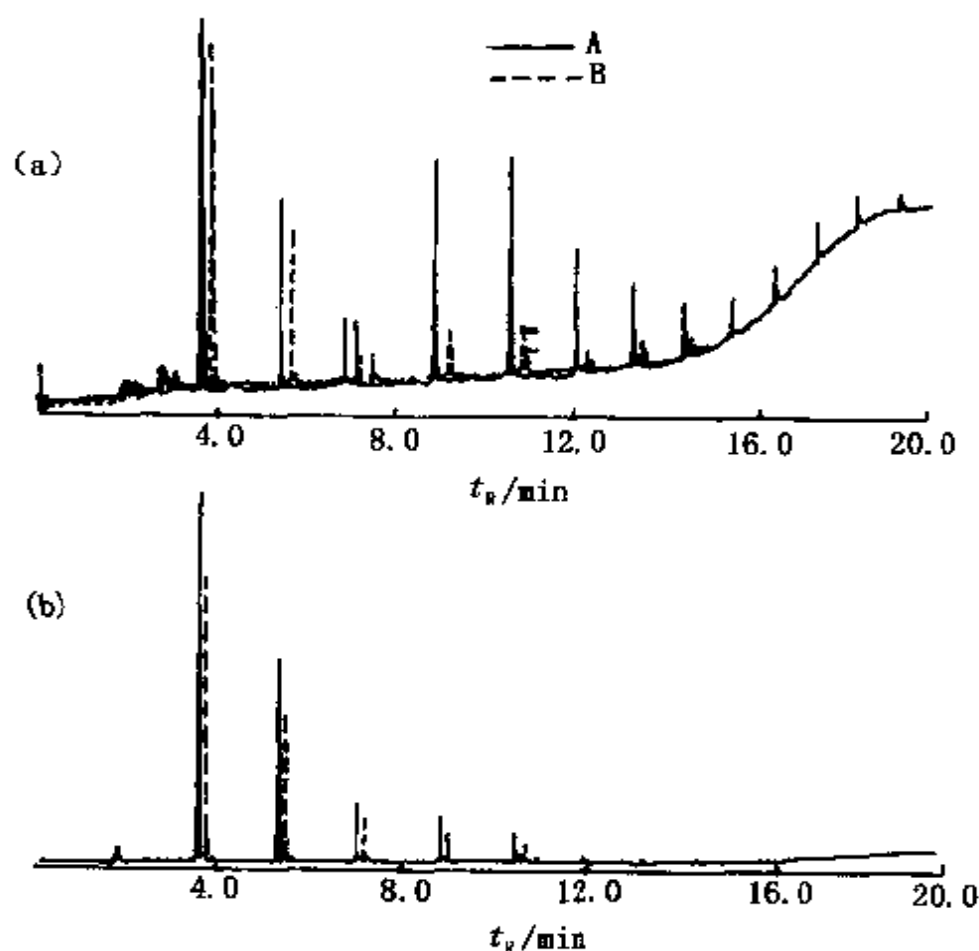


图 6-11 两种甲基聚硅氧烷样品 A、B 的裂解气相色谱图

——样品 A；---样品 B；(a) 600℃，2s；(b) 800℃，2s

在裂解室中进行热脱附时，高沸点的化合物流出，不发生裂解。三个含苯基的聚硅氧烷在 800℃ 时裂解，残余物在 800℃ 时再裂解，图 6-12 是它们再裂解的色谱图。和样品 A 一样，高沸点的化合物不发生裂解随同低分子量产物流出。

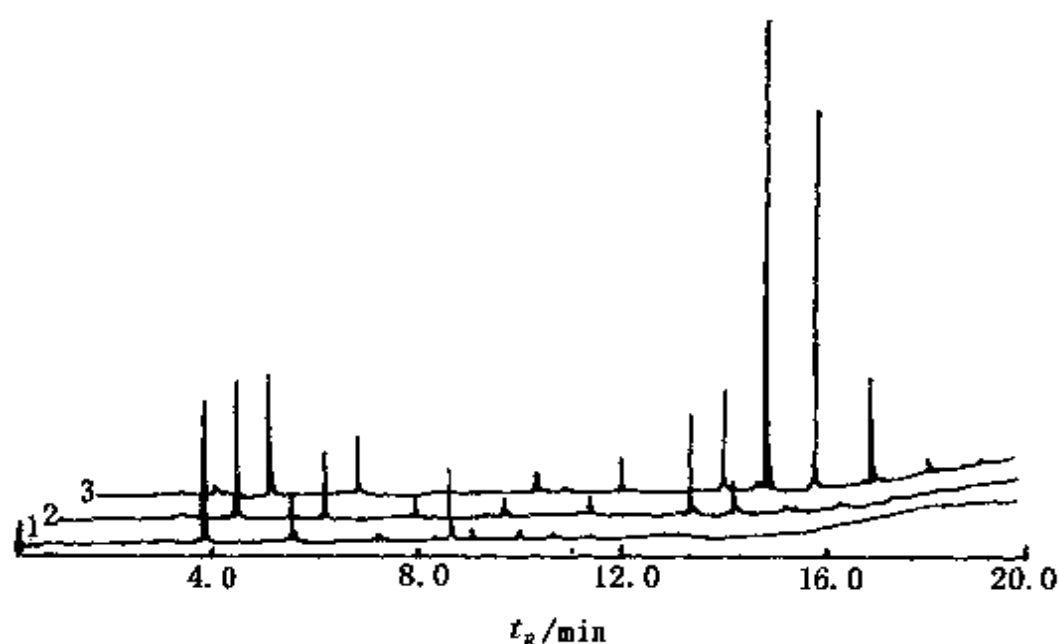


图 6-12 三个含苯基的聚硅氧烷气相色谱固定相裂解图
先在 600℃ 时裂解，之后残余物在 800℃ 时裂解

参 考 文 献

- 1 傅若农, 刘虎威. 高分辨气相色谱和高分辨裂解气相色谱. 北京: 北京理工大学出版社, 1993
- 2 叶玲, 罗爱芹. 傅若农. 色谱. 1995, 13 (2): 104~106
- 3 刘虎威, 傅若农. Thermochimica Acta. 1991, 191 (12): 131
- 4 刘虎威, 傅若农. J. of BIT. 1992, 1 (1), 13~18
- 5 罗爱芹, 傅若农. J Anal. Appl. Pyrolysis, 1991, 21 (11): 327
- 6 Ericsson I. Pittsburgh Conference in New Orleans March 1-5, 1998

第七章 顶空气相色谱

第一节 顶空气相色谱法的概念和类别

一、顶空气相色谱的概念

顶空气相色谱 (GC headspace Analysis, GC-HS analysis) 是指对液体或固体中的挥发性成分进行气相色谱分析的一种间接测定法, 它是在热力学平衡的蒸气相与被分析样品同时存在于一个密闭系统中进行的。例如测定血液中的乙醇, 把血样置于一个密闭恒温的样品瓶中, 测定恒温后样品瓶蒸气相中的乙醇浓度, 通过校准曲线计算血样

中的乙醇含量。这一方法从气相色谱仪角度讲, 是一种进样系统, 即“顶空进样系统”。有不少仪器公司有商品的顶空进样系统。有关顶空气相色谱分析的名称, 美国称为: GC headspace Analysis, 前苏联的文献称为: Equilibrium Vapour Analysis, 德国叫做 Dampfdruckanalyse (英文为: Vapour Volume Analysis)。我国一般称为: 顶空气相色谱分析, 但是有人称为: “液上气相色谱分析”, 这样的名称不全面, 因为有不少样品是固体。所以本书还是用顶空气相色谱分析。

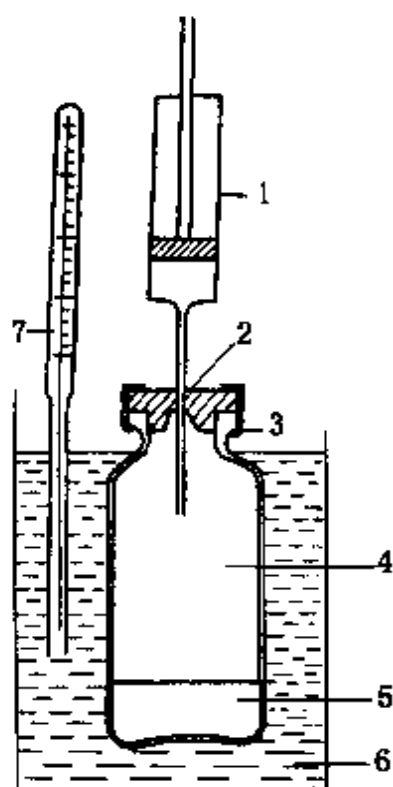


图 7-1 静态顶空气相色谱的典型装置

1—注射器; 2—密封隔垫;
3—螺帽; 4—容器; 5—样
品; 6—恒温浴; 7—温度计

二、顶空气相色谱的类别和特点

1. 静态和动态顶空气相色谱

一般顶空气相色谱分为静态和动态顶空气相色谱, 所谓静态顶空气相色谱是在一个密闭恒温体系中, 液气或固气达到平

衡时用气相色谱法分析蒸气相中的被测组分。静态顶空气相色谱的典型装置如图 7-1 所示。

动态顶空气相色谱也叫做吹扫-捕集 (Purge-Trap) 分析法, 这一方法是用惰性气体通入液体样品 (或固体表面), 把要分析的组分吹扫出来, 使之通过一个吸附剂进行富集, 然后再把吸附剂加热, 使被吸附的组分脱附, 用载气带到气相色谱仪中进行分析。其典型装置如图 7-2 所示。

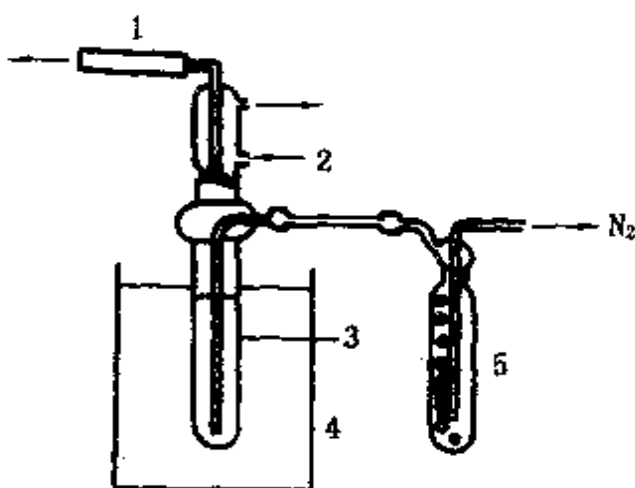


图 7-2 动态顶空气相色谱 (吹扫-捕集) 的典型装置

1—捕集管；2—冷却水；3—样品管；
4—水浴；5—洗气瓶

2. 静态和动态顶空气相色谱分析的比较

这两种顶空气相色谱分析方法有各自的优缺点, 静态顶空气相色谱分析用一个简单的玻璃瓶就可以进行分析, 要求的全部条件只是两相 (液-气, 或固-气) 间达到平衡, 以及在取样时仍能保持这种平衡。但一般来讲作定量分析时在每个顶空瓶只能取一次样。这就是静态顶空气相色谱分析的缺点, 即在日常分析时要处理大量的玻璃器皿, 另外要达到平衡就要有一定的等待时间。如果不考虑平衡时间, 分析时间的长短取于气相色谱的分析时间。

动态顶空气相色谱分析需要较多的仪器, 也要花更多的时间, 因此使用吹扫-捕集的顶空气相色谱分析的费用要高。其他的缺点是吹扫气中的杂质会带人样品, 把大量的水蒸气带人捕集器中, 还要选择吸附剂, 而且有吸附和脱附不完全的问题。

这两种方法的特点比较见表 7-1。

表 7-1 静态和动态顶空气相色谱分析的特点

静态顶空气相色谱分析	动态顶空气相色谱分析
两相间存在平衡的问题	没有两相间存在平衡的问题
不需要用气体吹扫	要用气体吹扫液相或固相
样品存在于平衡的气相中	用吸附剂吸附样品并浓缩 (或用冷阱富集)
样品用气密性注射器进样	样品从吸附剂上脱附进入色谱柱

第二节 顶空气相色谱法的原理

一、色谱峰面积和样品蒸气分压的关系

在顶空气相色谱分析时当顶空瓶中样品上面的蒸气压相当低时，峰面积 (F_i) 的大小与样品上面的挥发性组分 (i) 的蒸气压 (p_i) 成正比关系，即：

$$F_i \propto p_i \quad (7-1)$$

由 (7-1) 式可导出下式：

$$F_i = \bar{c}_i p_i \quad (7-2)$$

式中 $\bar{c}_i$ 是特定物质的校正因子，决定于检测器的性能。

在真实体系中蒸气分压通常用下式表示：

$$p_i = p_{0i} x_i \gamma_i \quad (7-3)$$

式中 p_{0i} ——组分 (i) 的摩尔分数；

x_i ——在样品中含有组分 (i) 的摩尔分数；

γ_i ——组分 (i) 的活度系数。

如果样品是一个理想的溶液（这种情况非常少见），其活度系数 (γ_i) 为 1，(7-3) 式即可用拉乌尔 (Raoult) 定律表示：

$$p_i = p_{0i} x_i \quad (7-4)$$

这种理想的溶液有：正庚烷/甲基环己烷；对二甲苯/间二甲苯，2-甲萘/1-甲萘，反十氢化萘/顺十氢化萘，邻硝基氯苯/对硝基氯苯，己烷/庚烷，苯/甲苯，氯苯/乙苯，乙醇/异丙醇等。

然而，在大多数情况下，样品为非理想溶液，非理想溶液的 γ_i 大于 1 或小于 1。大于 1 的非理想溶液有：庚烷/甲苯；辛烷/乙苯；乙醇/丁酮；环己烷/二氧六环；乙醚/乙醇；乙醇/乙酸乙酯；乙醇/庚烷；苯/苯胺；乙醇/水等。

γ_i 小于 1 的非理想溶液有：丙酮/1,1,2-三氯乙烷；反二氯乙烯/二异丙醚；反三氯乙烯/四氢呋喃；顺二氯乙烯/丁酮；丙酮/氯仿等。

活度系数 γ_i 不仅决定于溶液中 (i) 组分和其他组分的性质，也取决于所有组分的摩尔分数，同时也受温度和压力的影响。

二、顶空气相色谱分析中的校正因子

从 (7-2) 和 (7-3) 式可导出下式

$$x_i = \frac{F_i}{c_i p_{oi} \gamma_i} \quad (7-5)$$

式中 $\frac{1}{c_i p_{oi} \gamma_i}$ 为一常数，也就是校正因子，在分析中要经过实际测定。所以不管样品是否是理想溶液，甚至是固体样品，也可以通过校正因子的测定进行分析。在这里 γ_i 有很大的影响，有三种情况：

- ① $\gamma_i = 1$ (理想混合液)
- ② $\gamma_i = \text{常数}$ (理想稀溶液)
- ③ $\gamma_i = f(x)$ (真实混合液)

但是在顶空气相色谱分析中大都是低含量的分析，在这种情况下 $\gamma_i = \text{常数}$ ，如果所用检测器呈线性（即 $\bar{c}_i = \text{常数}$ ），那么 $\bar{c}_i p_{oi} \gamma_i$ 的乘积也是恒定的。例如：低浓度的丙烯腈水溶液就是一种理想的稀溶液，如图 7-3。

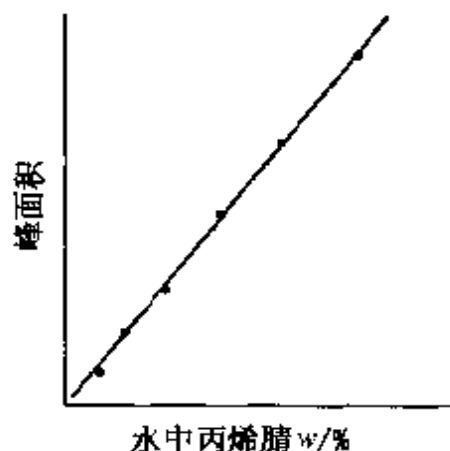


图 7-3 低浓度丙烯腈水溶液的校正曲线

如果需要研究较高浓度的样品 $\gamma_i = f(x)$ ，校准曲线必须用各种不同浓度的标准溶液进行测定来绘制。

第三节 顶空气相色谱装置

一、静态顶空气相色谱分析装置

最简单的静态顶空气相色谱分析装置如前一节的图 7-1 所示。在文献中也有各种不同的设计，如图 7-4 就是用循环恒温液体控制温度的一种静态顶空气相色谱分析的装置。这一装置可以测定液体样品，也可以测定固体中的挥发性物质。

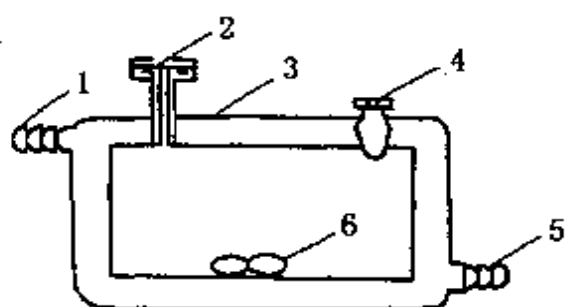


图 7-4 静态顶空气相色谱分析装置

- 1—恒温液出口；2—注射器取样口；
3—恒温器；4—放置样品口；5—
恒温液入口；6—样品

1967 年第一台顶空气相色谱仪

问世, 1983 年 PE 公司推出 HS-100 型自动顶空气相色谱进样装置, 装到 Sigma 型气相色谱仪上。这是一种静态顶空进样装置。此后 HP 公司, Varin 公司, 英国的 Pye 公司, 也相继推出各自的顶空气相色谱分析装置, 近年 PE 公司又有新的型号 HS-40 顶空气相色谱上市。

二、动态顶空气相色谱分析装置

动态顶空气相色谱装置的示意图见前一节的图 7-2。近年来在分析饮用水中挥发性有机物时多采用吹扫-捕集动态顶空气相色谱和质谱分析联用的方法。如美国环保局方法 (U.S.EPA) 502.2 和 524.2 就是用吹扫-捕集顶空进样, 以 GC/MS 分析水样中 60 种挥发性有机物 (见 Am.Lab.1993, (Jan). : 28N~28S)。

三、固相萃取、膜渗透萃取与顶空气相色谱结合

分离膜在分析化学中有广泛的应用, 如用一种亲油性硅橡胶中空管渗透膜, 可使挥发性有机物透过膜, 而其他气体透不过, 从而达到把有机物和水蒸气或其他气体分离的目的。图 7-5 就是一种用中空渗透膜管进行顶空吹扫-捕集的方法 (LC-GC, 1995, 8 (7): 375)。

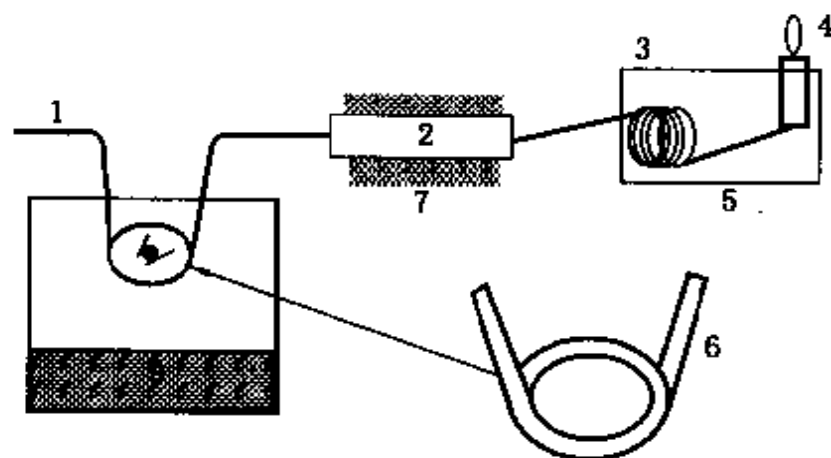


图 7-5 用渗透膜做顶空取样的动态顶空气相色谱

1—载气; 2—吸附阱; 3—毛细管柱; 4—FID; 5—气相色谱仪; 6—渗透膜; 7—加热器; 8—样品

第四节 顶空气相色谱法的应用

一、静态顶空气相色谱法分析体液中的苯类化合物

苯、甲苯和二甲苯是有毒溶剂, 在职业病和法庭分析中常要测定体液中的这类化合物, 用静态顶空气相色谱分析它们很方便, 下面是

我国司法部司法鉴定科学技术学院孙亚娟等制定的分析水、尿和血中苯类化合物的静态顶空气相色谱方法。

1. 顶空样品瓶

用 5mL 青霉素小瓶作样品瓶，取 1mL 样品（水、尿和或血样）于瓶中，0.4mL 内标物和约 1g 硫酸铵使之饱和，加盖密封。置于 80℃ 的恒温器中半小时，然后用 1mL 注射器取 0.6mL 顶空的气样进行气相色谱分析。

2. 色谱条件

气相色谱仪：HP-5890 气相色谱仪，FID。

色谱柱：2m×2mm i.d. 玻璃柱，固定相为 80~120 目 Carbowax-K 涂渍 5% PEG 20M。

柱温：110℃，以 10℃/min 程序升温到 100℃。

二、顶空气相色谱法分析血样中的酒精

分析血样中的酒精是顶空气相色谱法唯一应用最广泛的方法，检查汽车司机是否饮酒可把被怀疑对象的血样进行静态顶空气相色谱分析，本例是瓦里安公司 Z. Penton 用该公司生产的 Varian Genesis Autosampler 研究用静态顶空气相色谱法分析血液、尿和水中的乙醇含量。Genesis 自动顶空进样器带有 500μL 顶空样品管联接到 Varian 3400 气相色谱仪上，配以程序升温进样器和 FID。顶空分析的进样管直接连到程序升温进样器的入口处，以便使用 Genesis 自动顶空进样器的流量控制器，调节和控制载气流量。所用的分析条件如下。

色谱柱：30m×0.53mm i.d. 弹性石英毛细管柱，涂渍 1.5 μm 聚二甲基硅氧烷固定相。恒温 35℃。

载气：氮，27 mL/min。

检测器：FID 200℃。

顶空自动进样装置：22mL 样品安瓶，加压使之高于大气压，在样品瓶中的气体流速为 84mL/min。

气路系统的条件：在样品瓶中加压 0.2min；压力平衡 0.25min；在样品管中的平衡 0.2min；进样 0.3min。

测定条件：样品 50℃；阀温 150℃；连接管温 200℃；温度平衡

30min。

标准样品：0.1%乙醇和 *n*-丙醇的水溶液。每种溶液取 100mL 配制成 1000mL 用做标准样品。

三、动态顶空气相色谱法分析饮用水中的有机物

用吹扫-捕集动态顶空气相色谱法分析饮用水中的有机物已经成为美国环保局法定的方法，即方法 502.2（用光离子检测器 [PID] 或电导检测器 [ELCD] 进行检测），方法 524.2（用质谱检测器进行检测）。

1. VOC 分析系统（分析挥发性有机物的装置）

这一系统包括 Model 4560 吹扫-捕集 样品富集器；小死体积进样器；Model 5240 串联 PID/ELCD 检测器。HP5890 II 气相色谱仪配以 0.53mm i.d. 毛细管柱和相应的软件。

Model 4560 吹扫-捕集 样品富集器是用微处理器控制吹扫-捕集过程，其中存有方法 502.2 的操作条件，这一微处理器还可以在使用自动进样器时设定操作次序的程序。样品捕集装置可以进行“闪蒸”，即以 900℃/min 的速度升温，使捕集的样品很快脱附。为了减少水蒸气对分离的干扰，在系统中加一个 Cyclone Water Management™ 装置使水冷凝为液体。

2. 气相色谱条件^[3]

色谱仪：HP5890 II 气相色谱仪配以 0.53mm i.d. 毛细管柱。

Model 4560 富集器条件：11min 吹扫，40mL/min 流量；180℃ 脱附 4min。

吸附阱：装 Tenax，硅胶片和活性炭。

检测器：ELCD 用正丙醇作溶剂；反应器温度 925℃；PID 10.0eV 灯；强度 40%。

四、顶空气相色谱法分析固体样品中的挥发性有机物^[4]

一些固体（如塑料，食品等）样品中的挥发性有机物，用顶空气相色谱法进行分析很方便，下面一例是用这种方法分析塑料食品包装袋中的甲苯残留。

1. 顶空样品装置

100mL 注射器，把食品包装袋剪成 $30\text{mm} \times 10\text{mm}$ 的小片装入。在 $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下预热 20min，用空气稀释为 100mL，恒温 10min 后进样分析。

2. 色谱条件

色谱柱： $500\text{mm} \times 3\text{mm i.d.}$ 填充柱，于硅烷化 102 载体，80～100 目上涂渍 20% 的 PEG 20M；柱温 80°C ，气化室 150°C ，进样 $80\mu\text{L}$ 。最小检测浓度为 $0.031\text{mg}/\text{m}^2$ ，定量精度优于 4%。

参 考 文 献

- 1 [美] Hachenberg H, Schmidt A P. 李世壮等译. 液上气相色谱分析. 上海: 上海科学技术出版社, 1981
- 2 朱良漪主编. 分析仪器手册. 北京: 化学工业出版社, 1997
- 3 Vickers A K et al. Am lab, 1993, 25 (1): 28N～28S
- 4 叶芬等. 色谱, 1997, 15 (1): 89～90

第八章 高效液相色谱

第一节 高效液相色谱法的发展

一、高效液相色谱的出现

尽管液相色谱在 1903 年就出现了^[1,2,4]，但是首先发展和成熟起来的是气液色谱，高效液相色谱是在气相色谱比较成熟之后才又兴盛起来。早在 1931 年 Kuhn, Lederer 采用茨维特的液固色谱法，用氧化铝和碳酸钙作吸附剂分离植物色素，他们的应用取得很大的成功，并使用纤维状氧化铝和碳酸钙作吸附剂，把结晶状的胡萝卜素分离成 α 和 β 两种同分异构体，确定了它们的分子式，同年进一步扩大了吸附分离的应用范围，制得了叶黄素结晶，并从蛋黄中分离出叶黄素。他的成功大大鼓舞了其他研究者利用这一方法信心。1938 年他从维生素 B 中分离出 B₆，由于他的出色研究而获得了 1938 年的诺贝尔化学奖。但是由于古典的液固色谱法柱效低，未能发挥出它的潜在能力。在 60 年代初气相色谱高速发展，但由于它对高分子量的、热稳定性差的和极性强的物质不适用，这时人们才又把注意力转向液相色谱的研究。但是液相色谱所遇到的问题远远大于气相色谱所遇到的问题。因为液相色谱涉及到固定相的制备、小体积检测器的制备、高压泵的制造等一系列技术难题。不过由于气相色谱解决不了的问题一定要依靠高效液相色谱来解决，在生产和科研需求的推动下，从 60 年代中末期液相色谱得到了缓慢而扎实的发展，到目前为止国际上的高效液相色谱仪已经和高效气相色谱仪达到相同的水平，而它的用途远大于气相色谱，而且从研究角度还在发展。其中特别要提到的是 1958 年美国生物化学家 W.H.Stein 和 Moore 研制出氨基酸分析仪，用它确定了核糖核酸酶的分子结构，后来氨基酸分析仪成为研究蛋白质和酶结构的重要工具，Stein 和 Moore 因此而获得了 1972 年的诺贝尔化学奖。

二、高效液相色谱和古典液相色谱的比较

古典液相色谱的致命弱点是柱效低、分离时间长，难以解决复杂混合物的分离，与气相色谱相比有很大的差距。从气相色谱的速率理论知道，要提高柱效，就要把固定相的颗粒度减小，同时要加快传质速率；要缩短时间就要把流动相的速度加快。在把古典液相色谱向近代液相色谱的改造过程中，就是针对这三个关键问题开展的。所采取的措施就是研制出粒度小、传质速率快的薄壳型填料；使用了高压泵，加快了流动相的速度；同时吸取了气相色谱的类似的检测技术，从而使液相色谱和气相色谱一样，达到柱效高、分析时间短，色谱柱可连续使用。由于使用了高压泵，所以一开始把它叫做“高压液相色谱”（High Pressure Liquid Chromatography, HPLC），后来更为常用的名称是“高效液相色谱”（High Performance Liquid Chromatography, HPLC），早期也有叫高速液相色谱（High Speed Liquid Chromatography, HPLC）的，总起来看古典液相色谱和高效液相色谱相比有以下一些不同之处（见表 8-1）：

表 8-1 古典液相色谱和高效液相色谱的比较

古典液相色谱	高效液相色谱
常压或减压	高压，40~50MPa
填料颗粒大	填料颗粒小，2~50 μm
柱效低	柱效高，40000~60000 块/m
分析速度慢	分析速度快
色谱柱只用一次	色谱柱可重复多次使用
不能在线检测	能在线检测

三、高效液相色谱和气相色谱的比较

高效液相色谱与气相色谱相比，有许多优点，但是也有一定的弱点，二者的比较如下表 8-2。

表 8-2 气相色谱和高效液相色谱的比较

气相色谱	高效液相色谱
1. 只能分析挥发性的物质，只能分析 20% 的化合物	几乎可以分析各种物质
2. 不能用于热不稳定物质的分析	可以用于热不稳定物质的分析
3. 用毛细管柱色谱可得到很高的柱效	色谱柱不能很长，柱效不会很高

续表

气 相 色 谱	高效液相色谱
4. 有很灵敏的检测器如 ECD 和较灵敏的通用检测器 (FID 和 TCD)	没有较高灵敏的通用检测器 ^①
5. 流动相为气体, 无毒, 易于处理	流动相有毒, 费用较高
6. 运行和操作容易	运行和操比 GC 难一些
7. 仪器制造难度较小	仪器制造难度较大

① 近来出现的蒸发激光光散射检测器 (ELSD) 是灵敏度较高的通用检测器。

第二节 反相高效液相色谱

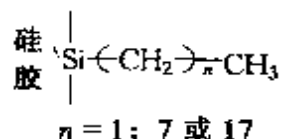
一、液相色谱分类

按目前文献的报道, 高效液相色谱依照流动相及固定相的状态或作用机制的不同, 可分为: 液固色谱 (主要是以硅胶为固定相的色谱), 液液色谱 (又分为正相色谱和反相色谱), 离子交换色谱, 离子色谱, 离子对色谱, 体积排阻色谱, 亲和色谱, 疏水作用色谱, 胶束色谱和电色谱等。在这些高效液相色谱模式中, 以反相色谱的应用最多, 占到高效液相色谱的 70% ~ 80%。近年由于立体化学的发展, 又兴起了手性分离的高效液相色谱。

二、反相高效液相色谱

1. 反相高效液相色谱的含义

所谓反相高效液相色谱是指以强疏水性的填料作固定相、以可以和水混溶的有机溶剂做流动相的液相色谱, 如在硅胶上键合 C_{18} 或 C_8 烷基的非极性固定相



以极性强的水、甲醇、乙腈作流动相的高效液相色谱。这一色谱模式在高效液相色谱中应用极广, 是一种通用性的液相色谱方法, 可以分离多种混合物。

2. 反相高效液相色谱的分离机理

反相液相色谱的分离主要有三种机制:

① 溶质在填料表面的烃类和流动相之间进行分配。

②溶质在吸附于填料表面烃类上的“改性固定相”和流动相之间进行分配。这一过程在添加了有机改性剂的情况下发生。

③溶质在吸附于填料表面烃类分子上，类似于吸附色谱。

到底哪个理论是正确的？有不少争论，但是一些研究者倾向于这几种作用都有。

3. 疏溶剂理论 (Solvophobic Theory)

要研究反相高效液相色谱的选择性，常常要涉及疏溶剂作用，按照这一理论，完全或部分疏水性溶质分子受到极性溶剂的排斥而被烃类固定相吸引，这一疏溶剂理论为处理反相高效液相色谱中的一些现象提供了一个理论构架，有助于考虑流动相的性质和固定相的表面性能。它对理解反相高效液相色谱的机理有很大的作用。

溶质分子和非极性固定相之间的作用是靠弱的色散力，作用的热力学平衡常数可用溶质的容量因子 (k) 可用固定相与流动相的相比 (ϕ) 来描述：

$$k = \phi K \quad (8-1)$$

当一个非极性或带有非极性集团的溶质进入一个极性溶剂的环境，溶解作用就会伴随有正的自由能 (ΔG) 出现，因而有负熵伴随。为了克服这一熵损失，在极性溶剂中的非极性溶质结构取向要发生改变，在极性溶剂中围绕着溶质就形成一个空穴，这一效应虽然不只是在水溶液中有，但是在水中更明显。Horvath 把疏水热力学（或更通俗的叫做疏溶作用热力学）用于反相高效液相色谱。按照这一理论，疏水作用的由来是极性溶剂和非极性溶质及非极性固定相之间的排斥力所致，溶质与固定相之间作用减弱了暴露于极性溶剂中溶质分子的非极性部分的面积。换句话说就是溶质和极性溶剂之间的斥力，而不是非极性溶质和固定相之间的微弱的非极性作用力，这样就造成溶质和固定相之间的结合。

4. 反相高效液相色谱的色谱柱

液相色谱柱（包括固定相）一直是液相色谱的主要研究和发展的主要内容，每年一度的美国匹兹堡分析仪器展览会上，都要展示各公司新推出的液相色谱柱，有关情况每年在《LC-GC Int.》杂志上有

R.E.Majors 作的详细报道。

(1) 以硅胶为基质的反相高效液相色谱柱 以硅胶为基质的液相色谱填料，多为反相柱，正相柱不太多。反相柱又分为：①常规硅胶键合 C_{18} ， C_8 等填料柱；②对硅胶做碱性脱活的反相柱（这类填料对碱性物质，如对胺有很小的吸附性）；③高覆盖量的柱（它们有较高的保留值）；④高稳定性反相柱（这种色谱柱可以经受酸和碱的作用）。在 1996 年的匹兹堡分析仪器展览会上许多厂家推出第三代反相 HPLC 填料，它们是使用高纯硅胶，它的残余硅醇基量低，键合基团覆盖均一，目前多推崇较细内径的色谱柱，而且多用球形填料，不规则填料只用于制备色谱了。一般十八烷基键合硅胶（ODS）多用 $3\mu\text{m}$ 或 $5\mu\text{m}$ 的填料，其柱效一般为 $60000 \sim 150000$ TP/m（每米色谱柱的理论塔板数）。在过去的 10 年中一些研究者主张使用 $1.5 \sim 3\mu\text{m}$ 的填料，Kirkland 等建议使用短色谱柱装填多孔微粒，用它来分离生物大分子。日本的 H.Moriyama 对 $2\mu\text{m}$ 多孔球形硅胶为基质的新反相色谱柱进行了研究，他们主要研究了日本生产的商品柱，做了性能比较，认为多孔球形硅胶 ODS 柱可得到高柱效（ 2×10^5 TP/m）的快速分离。为了得到高性能的反相柱，目前多对硅胶的硅醇基进行很好的封闭，Y. Suda 用高温硅烷化法对十八烷基硅胶封端，用 350°C 下封闭硅醇基的色谱柱分析碱性药物可以获得对称的峰形。A. Katev 等研究用聚三氟乙烯涂渍的硅胶作液相色谱填料，适于分离卤化物和肽及蛋白质，对含卤芳烃有很好的选择性。K. Jnno 研究了氟化物键合硅胶固定相的保留性能，它们可用于极性或非极性物质的分离。

(2) 以其他氧化物为基质的反相高效液相色谱柱 由于硅胶有一些突出的缺点：

- ①在碱性介质中（ $\text{pH} > 8$ ）不稳定；
- ②在孔隙中大分子扩散困难，降低柱效；
- ③硅胶表面上的剩余硅羟基有离子交换作用。

为此采取了以下一些措施：

- ①采用各种聚合物代替二氧化硅做基质；

②用二氧化钛或二氧化锆无机氧化物做基质；

③用非多孔基质，即单分散无孔基质。

有人通过硅烷化/硅氢化反应对氧化铝、氧化锆、氧化钽和氧化钛改性，他们认为这些基质有巨大的应用前景。

(3) 以聚合物为基质的反相高效液相色谱柱 虽然目前 HPLC 的填料仍以无机基质为主，特别是以硅胶基质为主，但近年以有机聚合物为基质的填料日益受到人们的重视。一类普遍使用的聚合物填料是苯乙烯-二乙烯基苯的共聚物。这类疏水性基质价格低、化学稳定性好，可代替硅胶作反相色谱填料，用以分离生物大分子有很好的效果。为了改善这种填料的性能，近年对高度交联的苯乙烯-二乙烯基苯的共聚物 (PS-DVB) 进行了各种化学改性，以便适应各种 HPLC 的模式。近年发展了更多类型的有机聚合物作 HPLC 固定相的基质，如聚丙烯酸酯类，甲基丙烯酸酯类，苯乙烯和甲基丙烯酸酯-二乙烯基苯的共聚物。在 1996 年的匹兹堡展览会上各公司推出 30 多种新的以硅胶等无机物为基质的反相色谱柱，以聚合物为基质的有四种。如以甲基丙烯酸酯类多孔聚合物为基质的 C_{18} 柱 (Biospher GMB100RP)，孔径为 15nm，适于小分子的核酸、核苷酸、多环芳烃等的分离。这种柱子被生物物质污染后可用氢氧化钠清洗。

5. 反相高效液相色谱的流动相

极性溶剂或它们的混合物用做反相高效液相色谱的流动相，例如水、甲醇和乙腈。为了提高检测的灵敏度，要求溶剂的纯度要高，这就要求对所用溶剂进行重新蒸馏和纯化，达到光谱纯。许多反相高效液相色谱的分离要求使用一定 pH 的缓冲溶液，选择一定 pH 的缓冲溶液对以反相高效液相色谱柱分离极性和离子型化合物有十分重要的意义。缓冲溶液中盐的浓度要适当的高，这样可避免出现不对称的峰和分叉的峰。所选择的缓冲溶液应具有以下一些性能：

①在 $pH=2\sim8$ 之间要有大的缓冲容量；

②能透过检测器使用的光波；

③能和有机溶剂相容；

④能促进平衡速度的提高；

⑤可以掩蔽吸附剂表面上的硅醇基。

通常不使用乙酸盐缓冲溶液，因为它和带阳离子的溶质会形成非极性络合物。也不要卤化物，以免腐蚀液相色谱仪。

反相高效液相色谱对水的要求很高，因为水中的杂质常带来许多麻烦，特别是在进行痕量的梯度洗脱时尤为明显。一些水中的极性杂质积累于色谱柱的头部，当洗脱剂强度增大时它们流出色谱柱，形成鬼峰，并且影响晚出峰的组分。一般要用蒸馏并进行离子交换的纯水，还要贮存在加盖的玻璃瓶中。有时还需要一些特殊的纯化手段，如反渗透、色谱柱分离等。

对流动相纯度的要求还要看应用检测器的类型，如荧光检

测器，有极少量的杂质就会引起它基线的漂移。一般来讲，均液分析（等度分析）对流动相纯度的要求要低一些。

在有机溶剂中反相高效液相色谱使用最多的是甲醇和乙腈，它们具有最高的洗脱能力和强度。

流动相的一些物理性质如粘度、表面张力和介电常数，对它们的色谱性能有影响，而混合物中它们的比例

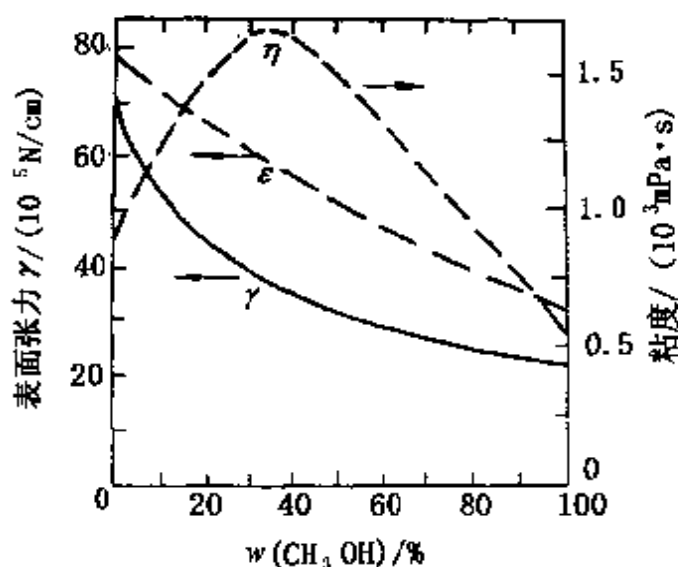


图 8-1 甲醇和水混合溶液的物理性能和配比之间的关系

不同也大大影响其性能，如图 8-1 中甲醇和水混合溶液的物理性能和配比之间的关系所示。表 8-3 是反相高效液相色谱常用流动相溶剂的物理性质。

6. 反相高效液相色谱的应用

反相高效液相色谱的应用十分广泛，是 HPLC 中应用最为普遍的一种模式，从一般小分子有机物到药物、农药、氨基酸、低聚核苷酸、肽和分子量不大的蛋白质 ($\leq 50\text{kD}$) 的分析均可应用。

表 8-3 反相高效液相色谱常用流动相溶剂的物理性质^①

溶 剂	M_r	b.p. /°C	n	UV /nm	ρ /gcm ⁻³	η /mPa·s	ϵ	μ /D	γ /N·cm ⁻¹ 10 ⁻⁵	E
丙 酮	58.1	56	1.357	330	0.791	0.322	20.7	2.72	23	0.56
乙 腈	41.0	82	1.342	190	0.787	0.358	38.8	3.37	29	0.65
二氧六环	88.1	101	1.420	215	1.034	1.26	2.20	0.45	33	0.56
乙 醇	46.1	78	1.359	205	0.789	1.19	24.5	1.60	22	0.88
甲 醇	32.0	65	1.326	205	0.792	0.584	32.7	1.66	22	0.95
异丙醇	60.1	82	1.375	205	0.785	2.39	19.9	1.68	21	0.32
正丙醇	60.1	97	1.383	205	0.804	2.20	20.3	1.65	23	0.82
四氢呋喃	72.1	66	1.404	210	0.889	0.50	7.58	1.70	27.6	0.45
水	18.0	100	1.333	170	0.998	1.00	78.5	1.84	73	

① M_r ——相对分子质量； n ——在 25°C 下的折光指数；UV——紫外光，在所列波长下于 1cm 样品池中纯溶剂的光密度为 1； ρ ——在 20°C 的密度； η ——在 20°C 下的粘度； ϵ ——介电常数； μ ——偶极矩，习惯上用 D 表示偶极矩的大小， $D = 3.34 \times 10^{-30} \text{C} \cdot \text{m}$ ； γ ——表面张力； E ——按照 Snyder 方法得到的洗脱值 (J Chromatogr Sci, 1977, 15; 393)。

第三节 正相高效液相色谱

一、正相高效液相色谱的概念

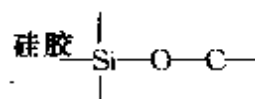
所谓正相高效液相色谱是指以亲水性的填料作固定相（如在硅胶上键合羟基、氨基或氰基的极性固定相），以疏水性溶剂或混合物作流动相（如己烷）的液相色谱。在液相色谱发展的早期，类似于气相色谱把含羟基、氨基或氰基的极性固定相涂渍在硅胶上，这样容易被流动相冲洗掉，现在几乎都使用键合固定相了。

二、正相高效液相色谱的固定相

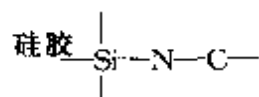
1. 键合固定相（包括反相色谱）的类型

键合固定相多半是在硅胶表面上通过化学反应以化学键结合的各种分子，形成像刷子一样的分子层。由于在硅胶表面原子之间结合方式的不同，键合固定相有四类：

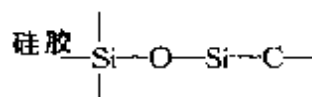
(1) 形成硅-氧-碳键的固定相



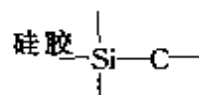
(2) 形成硅-氮-碳键的固定相



(3) 形成硅-氧-硅-碳键的固定相

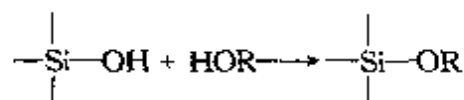


(4) 形成硅-碳键的固定相



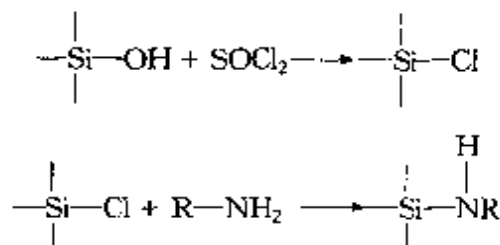
2. 键合固定相的合成

(1) 硅-氧-碳键固定相的合成 各种键合固定相的合成利用硅胶表面硅醇基和要键合基团的反应，完全水解的硅胶表面每平方米有 $8\mu\text{mol}$ 的硅醇基，由于有位阻存在，最多只有 $4.58\mu\text{mol}$ 的硅醇基可以进行反应。能够键合上去的固定相分子，就和硅胶的比表面积有很大的关系。这一类固定相的反应是：首先在加压的条件下用过量的醇于 280°C 下处理硅胶 12h，或者把硅胶在苯中用亚硫酸氯回流 12h 使其氯化，之后于 80°C 时在吡啶存在下用过量的醇反应 8h。反应如下：



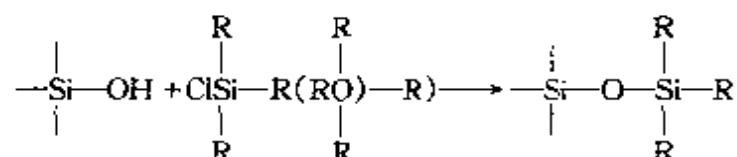
这样的产品容易被水解。

(2) 硅-氮-碳键的固定相的合成 在干燥的溶剂中于 $60\sim 120^\circ\text{C}$ 之间使伯胺与氯化硅胶反应 8 到 12h，用不同的胺反应产率不同。反应如下：



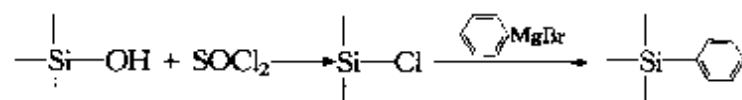
用这一方法合成的固定相对有机溶剂和 $\text{pH}=3\sim 8$ 的水介质是稳定的。

(3) 形成硅-氧-硅-碳键的固定相的合成 这一方法包括表面硅醇基与有机氯硅烷或有机烷氧基硅烷进行反应。如用 2mol 盐酸洗涤硅胶，之后于 200°C 下干燥 15h，然后和有机氯硅烷等试剂进行如下的反应。



这类固定相对有机溶剂和 $\text{pH} = 2 \sim 8.5$ 的水介质是稳定的。

(4) 形成硅-碳键的固定相 这一固定相是通过氯化硅胶和有机锂或格氏试剂反应而得到的，反应如下：



在此情况下每平方毫米表面有 4 个键合基团，由于是通过硅-碳键把固定相基团接到硅胶表面上的，所以它的稳定性优于硅-氧-碳键的固定相，但是利用格氏反应不方便，生成的反应物浓度较低，会留下一些无用的残渣在填料的表面上。

3. 键合固定相的性质

(1) 表面覆盖度 每平方毫米硅胶表面有 6 个羟基可供键合，但是由于有空间效应，并不是任何反应都会有 6 个羟基可以反应。已经研究过的反应中，三甲基氯硅烷和硅胶的反应可以达到最大的覆盖量，也只有 5 个羟基可供键合。一般来说许多反应都小于这一数字，例如每 1mm^2 硅胶表面上只有两个十八烷基基团键合，即只有 4 个羟基进行了反应，还有 2 个羟基是游离的，所以最近的研究表明，好的填料要把残留的羟基掩蔽起来，以免影响保留作用。

(2) 键合相链长的影响 键合相链长对保留值的影响是在反相高效液相色谱键合固定相方面研究的比较多的，研究表明被分离物质的保留值与键合固定相的链长有关，等覆盖度的键合固定相其链越长，保留能力也越强，但是一些溶质的选择性与链长无关，而对一些棒状分子例外。对正相键合固定相来说，链的长度只要不影响溶质的进入，链长短影响不明显。

(3) 键合固定相基质性质的影响 以硅胶为基质的键合固定相，硅胶的性质对保留能力有一定影响，特别是它的比表面积影响键合相的总覆盖量，而总覆盖量又影响绝对保留值。在大孔径硅胶上分配容量的对数 ($\lg k$) 与正构烷烃和正构烷醇的碳数成线性关系，而对孔

径为 6nm 的十八烷基硅胶却是非线性关系，这可能是由于十八烷基基团钻入硅胶的微孔中，限制了它的保留作用。

三、正相高效液相色谱的流动相

正相高效液相色谱的固定相是具有一定极性的填料，其流动相是不同极性的混合溶剂，常以己烷或环己烷做基础溶剂，为了洗脱极性较强的溶质，往基础溶剂中加入极性溶剂，如二氯甲烷，短链醇，四氢呋喃等。

四、正相高效液相色谱的分离机理和应用

一般来说正相高效液相色谱的分离是决定于溶质和固定相及流动相之间的分子间作用力，其中氢键力和静电力起着重要的作用。例如溶质是极性分子，它和固定相（比如是带羟基的基团键合到硅胶上）有很强的作用力，于是保留时间就很长，要把它洗脱出来就要用极性较强的流动相。

正相高效液相色谱主要应用于分离甾醇类、类脂化合物、磷脂类化合物、脂肪酸以及其他有机物。

第四节 离子交换色谱

一、离子交换色谱的形成

离子交换色谱（IEC）是各种高效液相色谱中最先得到广泛应用的现代液相色谱方法，1958 年美国 W.H.Stein 和 Moore 研制出氨基酸分析仪，就是离子交换色谱的方法。之后发展成为分离尿和血浆这类含有数百种组分体液的分离技术。不过这样的分离往往要 10~70h 的分离时间。在当时离子交换色谱被认为是生物化学领域中分离和分析蛋白质混合物最有力的方法，不过这类分离方法还是用低压液相色谱完成的。液相色谱在 60 年代开始复兴，正是以离子交换色谱的应用为标志的。但是由于各种实际问题，离子交换色谱不如其他高效液相色谱模式应用广泛，许多应用为离子对色谱和离子色谱所取代。

二、离子交换色谱的色谱柱

离子交换色谱柱的填料是阴、阳离子交换剂，是在有机高聚物或硅胶

上接枝有机季胺或磺酸基团。在高效离子色谱中曾用过的离子交换剂有：

① 聚合物多孔离子交换树脂；

② 在薄壳型填料上（有关填料的基质在以后叙述中阐明）键合离子交换剂；

③ 在多孔型填料上键合离子交换剂。

在历史上聚合物多孔离子交换树脂填料用于氨基酸、肽和碳水化合物的分离，这类填料一般为 $10\mu\text{m}$ 外径的小球，是苯乙烯和二乙烯基苯的共聚物上接枝离子型基团的产物。如图 8-2。

虽然这些多孔聚苯乙烯树脂现在还在高效液相色谱中使用，但是它的柱效低于其他类型的离子交换色谱柱，其原因是在这种填料的基质中有微孔，其扩散速度非常慢，增加了传质阻力。键合相离子交换剂是以硅胶为基质，在它上面覆盖一层如图 8-2 所示的离子交换树脂涂层，或者在硅胶上直接键合离子交换基团。

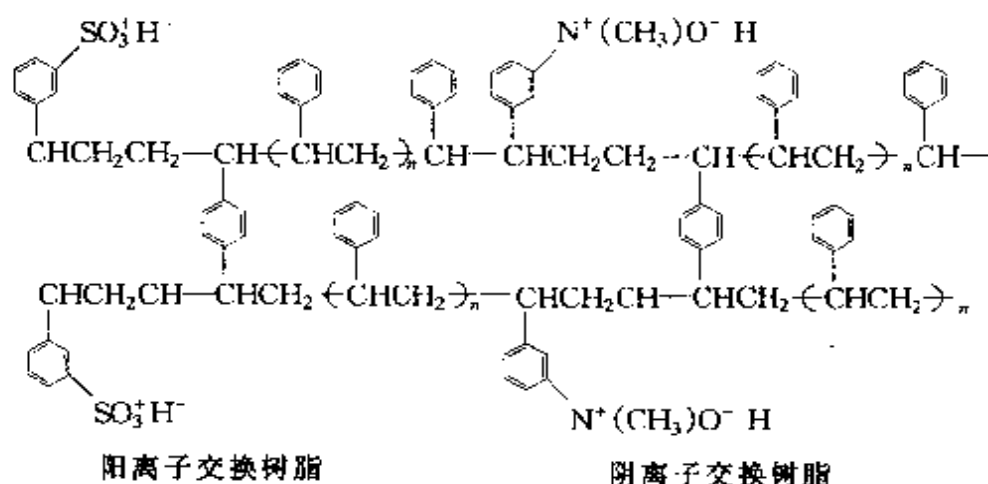


图 8-2 离子交换树脂的分子结构

目前使用最多的阴离子键合固定相的基团是季铵、二乙胺基乙基和聚乙亚胺。使用最多的阳离子键合固定相的基团是磺丙基和羧基。各公司有多种品牌的填料出售。

三、离子交换色谱的流动相

离子交换色谱一般用含盐的水溶液作为流动相。选择离子交换色谱的流动相应满足以下几个条件：

- ① 应能够充分溶解各种盐并提供离子交换必需的缓冲液；
- ② 具有合适的离子强度以便控制样品的保留值；

③对被分离的对象有选择性。

流动相通常是缓冲溶液，有时还加入适量的与水混溶的有机溶剂，如甲醇、乙腈等。流动相的离子强度、选择性与缓冲离子和其他盐的类型、浓度、pH值以及加入的有机溶剂的种类，都在不同程度上影响样品的保留值。

离子交换色谱常用的缓冲溶液见表 8-4。

表 8-4 离子交换色谱常用的缓冲溶液

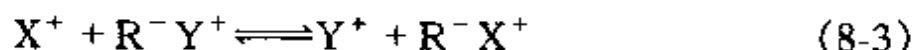
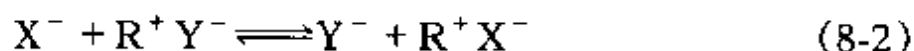
序号	缓冲溶液	pK _a	pH 缓冲范围
1	磷酸盐 pK ₁ pK ₂ pK ₃	2.1 7.2 12.3	1.1~3.1 6.2~8.2 11.5~13.3
2	柠檬酸盐 ^① pK ₁ pK ₂ pK ₃	3.1 4.7 5.4	2.1~4.1 3.7~4.7 4.4~6.4
3	甲酸盐 ^①	3.8	2.8~4.8
4	乙酸盐	4.8	3.8~5.8
5	三羟甲基氨基甲烷 ^①	8.3	7.3~9.3
6	硼酸盐 ^①	9.2	8.2~10.2
7	二乙胺	10.5	9.5~11.5

① 常用于高效离子交换色谱。

四、离子交换色谱的分离机理和应用

1. 分离机理

用离子交换色谱进行分离是靠在一定酸度下被分离的离子和固定相上的离子交换剂基团的相互作用，被分离的离子的电荷密度和等电点（pI）值与色谱柱上的离子交换剂的离子容量大小决定保留能力的强弱。例如，样品离子 X 和流动相离子 Y 与固定相上的等电基团 R 之间的简单离子交换：



对（8-2）式为阴离子交换色谱，样品离子 X⁻ 与流动相离子 Y⁻ 争夺离子交换剂上的交换中心 R⁺；（8-3）式为阳离子交换色谱，样品离子 X⁺ 与流动相离子 Y⁺ 争夺离子交换剂上的交换中心 R⁻。与离子交

换剂上的交换中心作用力强的样品离子保留时间长，反之就短。

2. 应用

在生物医学领域里广泛地应用离子交换色谱，如氨基酸分析，肽和蛋白质的分离。也可作为有机和无机混和物的分离，还可用作对水、缓冲剂、尿、甲酰胺、丙烯酰胺的纯化手段，从有机物或溶液中去离子型杂质等。有关详细内容请参阅本丛书的《离子色谱法方法及应用》和《高效液相色谱法方法及应用》两书。

第五节 离子色谱

一、离子色谱的概念

离子交换色谱法由于没有与之相匹配的检测器，难以发挥更大的作用。无机离子与大多数有机离子不同，只有在远紫外区才有吸收，光度检测器不适于检测无机离子，而电导检测器却是可检测电解质溶液的通用型检测器，这种检测器简单易于操作，但是长时间以来没有一种可以和电导检测器相配合的分离模式。直到 1975 年 Small 才提出把电导检测器用于离子交换色谱，他为了克服洗脱液中的离子对电导检测器的干扰，在分析柱和检测器之间增加一个“抑制柱”，消除洗脱液中离子本身带来的本底电导，他把这一方法叫做“离子色谱”(Ion Chromatography)。这一方法提出之后受到普遍的重视，20 多年来得到了长足的发展，成为分析无机和有机离子十分重要的方法，在各领域中得到广泛的应用。

二、离子色谱的原理和特点

离子色谱有两种类型，一种是带有抑制柱的离子色谱（双柱离子色谱），另一种是单柱离子色谱。

离子交换色谱的流动相是电解质溶液，样品以电解质溶液为背景，而被测物的浓度又大大小于流动相电解质的浓度，这样难以测量由于样品离子的存在而产生的微小电导的变化。而在抑制柱离子色谱中，利用抑制柱可以除去流动相中的高浓度电解质，把背景电导加以抑制，从而解决了在离子色谱中使用电导检测器的问题。现以硫酸钠和硝酸钠的分离为例说明双柱离子色谱的分离原理：以阴离子交换树

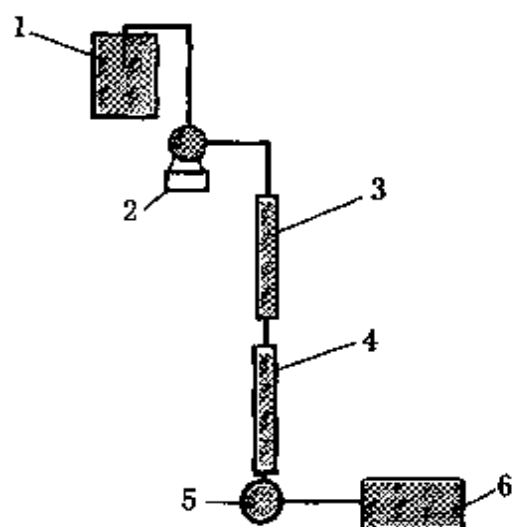


图 8-3 双柱离子色谱仪示意图
1—流动相瓶；2—高压泵；3—色
谱柱；4—抑制柱；5—电导检
测器；6—记录仪

脂做固定相，以碳酸钠溶液为流动相，可以有效地把两种阴离子分开。如在图 8-3 中所示，在分离柱 3 中，比较容易被碳酸根离子取代的硝酸根离子，先于硫酸根离子流出色谱柱，而洗脱液在进入检测器之前，经过抑制柱，在抑制柱（填充有氢离子型阳离子交换剂）中把洗脱液中的高电导碳酸钠交换为难离解的碳酸溶液；与此同时硝酸根离子和硫酸根离子在抑制柱中也转化为相应的酸。硝酸和硫酸与碳酸不同，比其盐类有更高的导电性，所以它们可以被电导检测器

检测到。

单柱离子色谱，省去了抑制柱，它的分离柱也和双柱离子色谱一样，用低容量离子交换剂。为了提高信噪比，洗脱液必须要用低电导物质，而且它的浓度要低，固定相的离子交换容量也降低，这样可使被测离子的保留时间在合理的范围之内。在单柱离子色谱中要考虑的另一个问题是洗脱剂的性质，在离子色谱中是用洗脱剂的离子置换结合到离子交换树脂上的被测离子，当以电导检测器指示洗脱过程时，检测灵敏度取决于被测离子和置换离子摩尔电导之差。一般样品离子具有中等的摩尔电导，为了提高灵敏度，洗脱剂中的置换离子应具有很高或很低的摩尔电导。在阴离子交换模式中，大分子量的有机酸和它的盐具有低的摩尔电导，而无机碱（ OH^- ）具有高的摩尔电导。在阳离子交换模式中，大分子量的季胺盐、乙二胺具有低的摩尔电导，而无机酸（ H^+ ）具有高的摩尔电导。但是大分子量的季胺盐在离子交换树脂上有强烈的吸附性，限制了它的应用。表 8-5 中列出单柱离子色谱中使用的洗脱剂。

三、离子色谱的应用

80年代之前离子色谱仅限于用电导检测器来分析简单的无机阴

表 8-5 在单柱离子色谱中使用的洗脱剂

离子交换类型	洗 脱 剂
阴离子交换柱离子色谱	苯甲酸、苯甲酸盐、烟酸、甲基磺酸盐、氯甲基磺酸盐、葡萄糖酸盐、邻苯二甲酸盐、对羟基苯甲酸盐、水杨酸、酒石酸盐、柠檬酸盐、均苯三酸盐、氢氧化钠
阳离子交换柱离子色谱	硝酸、高氯酸、乙二胺硝酸盐、乙二胺草酸盐、乙二胺盐 + α -羟基异丁酸

阳离子。目前离子色谱已经发展成为多种分离方式和多种检测方法，成为无机阴、阳离子和有机离子的分析中重要而灵敏的方法。近几年来发展了离子色谱用的新型高效分离柱，灵敏的电化学和光学检测器，梯度泵和耐腐蚀的全塑系统。使离子色谱跨进了一个新时代。

离子色谱目前在环境科学、生命科学、食品科学领域获得了广泛的应用。表 8-6 列出 1991~1995 年在国际离子色谱会议上发表论文涉及的应用领域。下面是用离子色谱分离单糖的例子。

分离柱：CarboPac PAI。

洗脱液：15mmol/L NaOH。

检测器：脉冲安培检测器，柱后加入 0.3mol/L NaOH。

色谱图：见图 8-4。

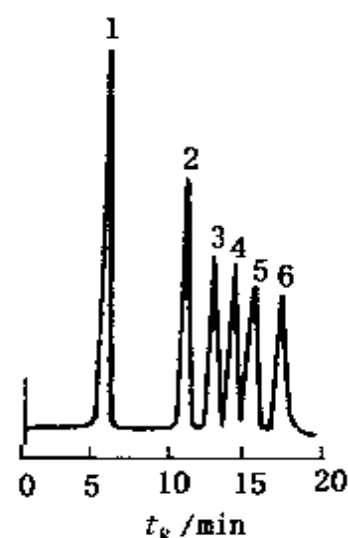


图 8-4 用离子色谱分离单糖的色谱图

(环境化学 1992, 11(1):76)

- 1—岩藻糖(浓度 4n mol/L);
 2—2-氨基半乳糖(浓度 5n mol/L);
 3—氨基葡萄糖(浓度 5n mol/L);
 4—半乳糖(浓度 5n mol/L);
 5—葡萄糖(浓度 5n mol/L);
 6—甘露糖(浓度 5n mol/L)

表 8-6 离子色谱应用领域的分布^①

应用 领域	所占的比例/%	应用 领域	所占的比例/%
环境科学	28	地质, 石油	7.7
产品分析	18	电 力	7
食品, 农业, 生物工程	14.7	饮用水	5.6
生物, 临床医学	10	药 物	4.9
工 业	7.8		4.2

^① 摘自 J. Chromatogr. 1996, 739: 5。

第六节 离子对色谱

一、离子对色谱的概念

离子交换色谱和离子色谱都是用离子交换剂做固定相分离离子型混合物的方法，而离子对色谱法是用正相或反相色谱柱分离离子和中性化合物混合物的方法。离子对色谱的出现源于离子对萃取。离子对萃取是一种液-液分配分离离子性化合物的技术，这种萃取方法是选择合适的反电荷离子加入到水相中，与被分离的化合物形成离子对，离子对表现为非离子性的中性物质，被萃取到有机相中。60 年代初期，Schill 等人系统地研究了离子对（两个相反电荷的离子相互作用形成一个中性化合物）的分离现象，并把它引入到液相色谱中。

现代离子对色谱是从 70 年代初期发展起来，它主要分为两类：正相离子对色谱和反相离子对色谱。在正相离子对色谱中，把含有离子对试剂的水溶液涂渍到硅胶表面和孔隙中，流动相是水和有机溶剂。早期的反相离子对色谱是用非键合的涂渍固定液于载体上的填料，流动相为含有离子试剂的强极性含水有机溶剂。70 年代中期后各种液相色谱法都采用化学键合固定相，离子对色谱也不再涂渍型填料。现在最常用的是反相离子对色谱，它使用反相色谱中常用的固定相，如 ODS。反相离子对色谱兼有反相色谱和离子色谱的特点，它保持了反相色谱的操作简便、柱效高的优点，而且能同时分离离子型化合物和中性化合物。

二、反相离子对色谱

1. 反相离子对色谱的分离过程

反相离子对色谱常以非极性疏水固定相如 ODS（或 C_2 ， C_8 ）做填料，流动相是含有对离子（如 B^- ）的极性溶液，当样品（含有被分离的离子 A^+ ）进入色谱柱之后， A^+ 和 B^- 相互作用生成中性化合物 AB，AB 就会被疏水性固定相分配或吸附，按照它和固定相及流动相之间的作用力大小被流动相洗脱下来。形成过程如图 8-5 的示意图。

2. 反相离子对色谱的流动相

反相离子对色谱常用的流动相是甲醇-水和乙腈-水，增加甲醇或

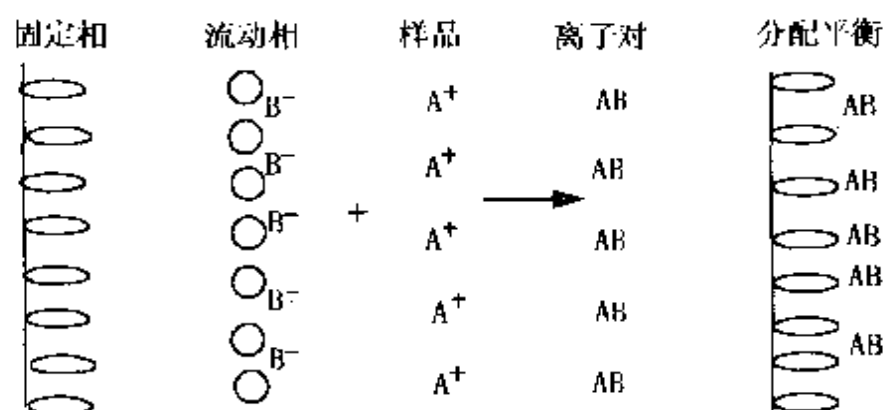


图 8-5 离子对色谱分离过程示意图

乙腈， k 值减小。在流动相中增加有机溶剂的比例，应考虑离子对试剂的溶解度，流动相的酸度对保留值有影响，一般 $pH=2\sim7.4$ 比较合适，表 8-7 为分离不同样品时酸度的选择。

表 8-7 反相离子对色谱流动相酸度的选择

样 品 类 型	pH 范围	说 明
强酸型 ($pK_a < 2$)，如磺酸类化合物	2~7.4	在整个 pH 范围样品都可以离子化
弱酸型 ($pK_a > 2$)，如氨基酸	6~7.4	样品可以离子化，其保留值决定于离子对性质
弱酸型 ($pK_a > 2$)	2~5	样品离子化被抑制，不生成离子对
强碱型 ($pK_a > 8$)，如季铵盐	2~8	在整个 pH 范围样品都可以离子化
弱碱型 ($pK_a < 8$)，如儿茶酚胺	6~7.4	样品离子化被抑制，不生成离子对
弱碱型 ($pK_a < 8$)	2~5	样品可以离子化，其保留值决定于离子对性质

3. 反相离子对色谱的离子对试剂

离子对试剂的种类、大小及浓度都对分离有很大的影响，选择离子对试剂的种类决定于被分离样品的性质。表 8-8 中列出反相离子对

表 8-8 反相离子对色谱的离子对试剂

序号	反离子种类	主要应用对象
1	季胺类 (如四甲铵、四丁铵、十六烷基三甲铵等)	强酸，弱酸，磺酸染料，羧酸，氢化考的松及其盐
2	叔胺 (如三辛胺)	磺酸盐、羧酸
3	烷基磺酸盐 (如甲基、戊基、己基、庚基、樟脑磺酸盐)	强碱、弱碱、儿茶酚胺、鸦片碱等
4	高氯酸	胺
5	烷基磺酸盐 (如辛基、癸基、十二烷基磺酸盐)	与 3 类似，选择性有不同

色谱的离子对试剂。

三、反相离子对色谱的应用

反相离子对色谱在许多领域中得到应用,如无机阴离子、阳离子、生物碱、维生素、抗菌素以及其他药物的分析,在生物化学、石油、石油化工等方面也有很多应用。图 8-6 是反相离子对色谱法分离维生素的图谱。

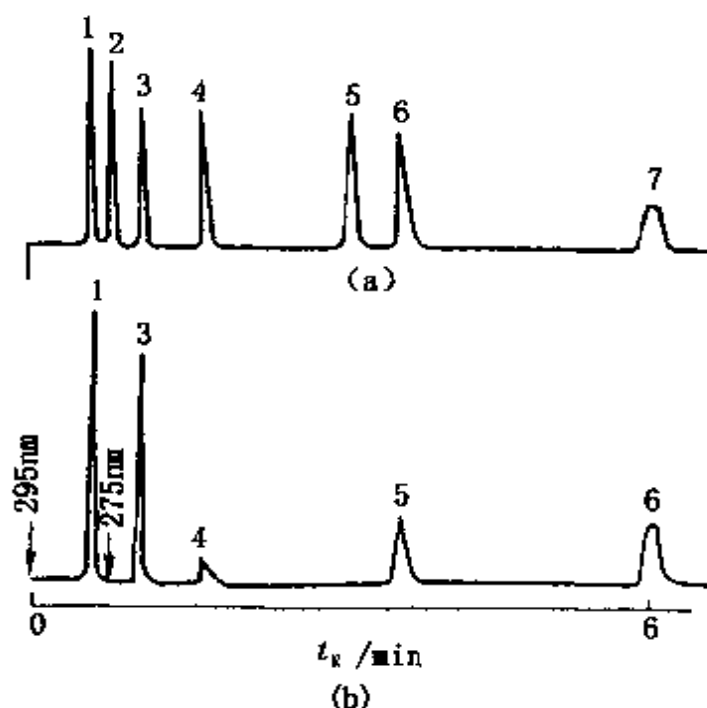


图 8-6 用反相离子对色谱分离 Vc 的色谱

色谱柱: Pecosphere-3CR C_{18} 柱

流动相: 甲醇/水 (15/85) 内含 5mmol/L 己磺酸和 0.1% TEA 以及 1% 的乙酸

检测: 紫外检测器 Vc 在 295nm 处检测, 其他组分在 275nm 处检测

(a) 维生素标样; (b) 维生素 C 丸

色谱峰: 1—Vc; 2—V_{B1}; 3—V_{B2}; 4—V_{B6}; 5—V_{B12}; 6—V_H; 7—泛酸

第七节 体积排阻色谱

一、体积排阻色谱的含义

体积排阻色谱 (Size-exclusion Chromatography, SEC) 是快速分离不同分子量混合物的色谱方法, SEC 可以快速确定样品混合物的复杂性, 而且可以同时给出各个组分的大概分子量及分布。SEC 的分离主要决定于样品中各个组分分子的尺寸。图 8-7 是体积排阻色

谱按分子尺寸分离的示意图。图中体积较小的1,2,3号分子其大小和固定相孔径相适应,有保留作用,而4,5号分子体积超过固定相孔径不被保留,随流动相流出色谱柱。

二、体积排阻色谱的发展过程和应用领域

60年代末 Porath 等使用一种低交联度的多孔聚合物作固定相,分离了水溶性的不同分子量的聚合物,这种方法被称为“凝胶过滤色谱”(Gel Fraction Chromatography, GFC)。这类聚合物交联度低,机械性能差,在有机溶剂中会溶胀,“Sephadex”葡聚糖就是这种聚合物。这一方法在生化物质的分离中起了重要作用。这一方法只适于水溶性物质的分离。1964年 Moore 制备了不同孔径的交联聚苯乙烯树脂,这种树脂在有机溶剂中溶胀性较小,可用于分子量从几千到几百万 D 高聚物分子的分离,不同分子量的高分子渗透到不同孔径的固定相中,用小分子溶剂洗脱时按分子大小顺序流出色谱柱,从而可以测定出高聚物的分子量分布来,这一方法叫作凝胶渗透色谱(Gel Permeation Chromatography, GPC)。体积排阻色谱包括了凝胶过滤色谱和凝胶渗透色谱,它们的分离原理是相同的。这种方法既可以快速测定高聚物的分子量分布和各种平均分子量,也可以研究高聚物的歧化度,不仅可以用于高聚物的测定也可以用于较小分子混合物的分离,在蛋白质的分离纯化上是一种很有用的方法。

三、体积排阻色谱的保留作用

体积排阻色谱的分离机理是分子的体积排阻,样品组分和固定相之间原则上不存在相互作用,色谱柱的固定相是具有不同孔径的多孔凝胶,只让临界直径小于凝胶孔开度的分子进入(保留),其孔径对溶剂分子来说是很大的,所以溶剂分子可以自由地出入。高聚物分子在溶液中呈无规的线团,线团的体积和分子量有一定的线性关系,对不同大小的溶质分子可以渗透到不同大小的凝胶孔内不同的深度,小

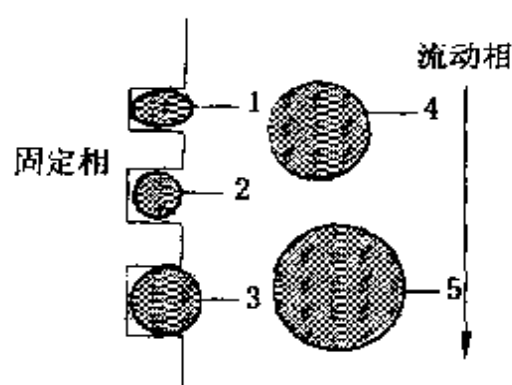


图 8-7 体积排阻色谱分离的示意图

的溶质分子，大孔小孔都可以进去，甚至渗透到很深的孔中。所以大的溶质分子保留时间短，洗脱体积小；而小的溶质分子保留时间长，洗脱体积大。按洗脱体积的定义：

$$V_R = V_o + K_S V_I \quad (8-4)$$

式中 V_R ——洗脱溶质的保留体积；

V_o ——色谱柱内凝胶颗粒之间的空间体积；

V_I ——凝胶内孔体积，即溶质分子可疑渗透进去的体积；

K_S ——体积排阻色谱的分配系数。

$$K_S = (V_R - V_o) / V_I \quad (8-5)$$

K_S 定义为溶质分子渗入凝胶内孔体积的分数，其数值介于 0~1 之间，对完全不能进入孔内的分子其 $K_S = 0$ ；对能自由出入的分子其 $K_S = 1$ 。因此所有的溶质分子只能在 V_o 和 $V_o + V_I$ 的洗脱体积之间洗脱出来。如图 8-8 所示：

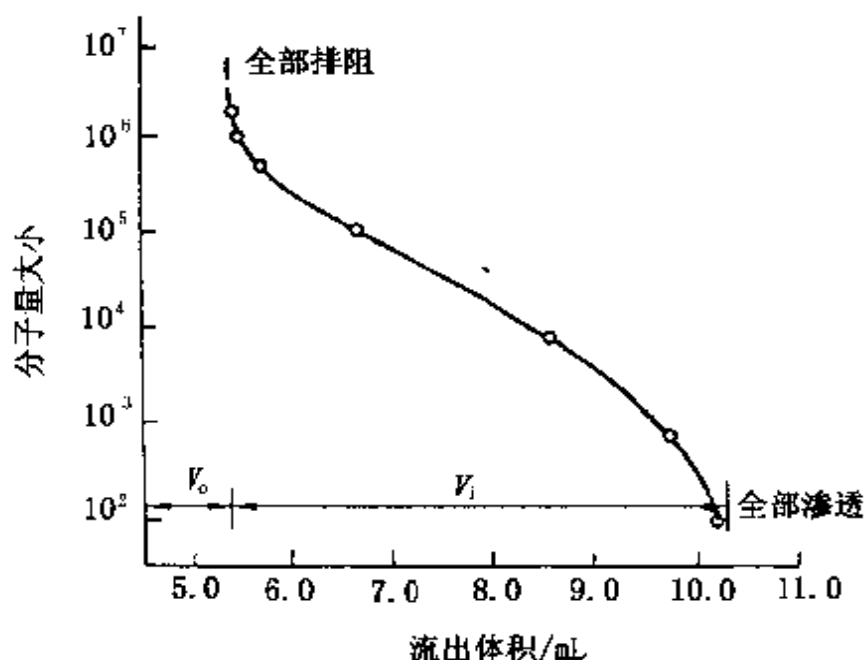


图 8-8 体积排阻色谱的洗脱（校准）曲线

四、体积排阻色谱的固定相和流动相

体积排阻色谱填料的孔径和样品分子的大小和分布相适应，目前使用的填料有亲水性凝胶、聚苯乙烯凝胶和无机填料。表 8-9 是体积

排阻色谱常用的填料、溶剂和适用的对象。

表 8-9 体积排阻色谱常用的填料和溶剂

典型的柱填料	典型的溶剂	应 用 对 象	柱填料的厂家
Zorbax Bio Series GF	缓冲溶液	多肽、蛋白质	Du pont
TSK-G-SW Superose	缓冲溶液	生物大分子、病毒、DNA、RNA	Toya Soda Pharmacia
TSK-G-SW	缓冲溶液	纤维素衍生物、聚乙烯醇、多糖类	Toya Soda
Ultra-Styrigel	四氢呋喃	多种极性非结晶合成聚合物，一些结晶合成聚合物，小分子聚合物	Waters
LiChrospher Si	甲苯（苯或氯仿）	非极性非结晶合成聚合物，烃类聚合物，低分子量聚合物	Merck
PL gel	间甲酚（热）或六氟异丙醇（冷）	极性、结晶合成聚合物（如聚酰胺，聚酯）	Polymer Labs
Zorbax PSM (bimodal)	1,2,4-三氯苯（热）或 1,2-二氯苯（热）	非极性、结晶合成聚合物（如聚乙烯、立体规整的多碳烃）	Du pont

第八节 疏水作用色谱

一、疏水作用色谱的概念

疏水作用色谱是利用样品中各组分具有不同的疏水作用的性质进行分离的方法，主要分离对象是蛋白质。蛋白质是生物大分子，它们的分子量大，有生理活性，要分离蛋白质就必须适应它们的这两个特性，也就是说在分离蛋白质时既要能把这些生物大分子分离开，又不能使它们失活。1961年 Gillam 用苯甲酰二乙氨基纤维素对核酸进行分步纯化，这是用疏水作用色谱分离生物大分子的开始。1973年 Hjerten 正式把这种方法命名为疏水作用色谱（Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC）。

二、疏水作用色谱的分离原理

疏水作用色谱的固定相表面为弱疏水性基团，它的疏水性要比反相色谱用的固定相低几十到几百倍，而流动相为高离子强度的盐溶液。蛋白质分子在这样的固定相和流动相中进行分配，蛋白质分子上的疏水性基团和固定相的疏水基团作用而被保留。当用流动相洗脱时逐渐降低流动相的离子强度，蛋白质分子按其疏水性的大小被依次洗

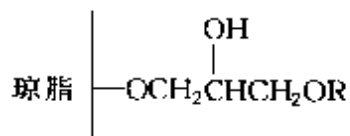
脱出来，疏水性小的先流出，疏水性大的后流出。在这样的高盐水溶液中，蛋白质不会失活。

三、疏水作用色谱的固定相

1. 经典疏水作用色谱的固定相

70 年代初的疏水作用色谱固定相是软性凝胶，它的颗粒大、刚性差、分离速度和柱效都比较低。当时使用的固定相有以下两种。

(1) 在琼脂糖凝胶上接枝弱疏水集团，例如：



(2) 甲基丙烯酸酯共聚物 例如，把 2-羟基甲基丙烯酸酯和乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚，合成了半刚性大孔共聚物，叫做 Spheron。

2. 高效疏水作用色谱的固定相

(1) 把排阻色谱中使用的固定相改性，用作疏水作用色谱固定相。1983 年 Kato 通过缩水甘油醚把丁基或苯基键合到亲水性的排阻色谱用固定相 TSK-GEL3000SW 上，制备出高效疏水作用色谱固定相。

(2) 以硅胶为基质，键合各种弱疏水基团。

①在硅胶表面上键合一层亲水性聚合物，再在亲水性聚合物上键和羟丙基、丙基、苄基、异丙基、苯基和戊基。蛋白质的保留值按上述次序递增。

②在硅胶表面上键合聚酰胺。

③在硅胶表面上键合长链醚。

④在硅胶表面上键合聚醚（如 PEG1500）。

四、影响疏水作用色谱的色谱条件

影响疏水作用色谱保留的条件有：

(1) 固定相的疏水性 疏水作用色谱固定相的疏水性要比反相色谱的疏水性低 10~100 倍，否则会引起不可逆吸附。

(2) 流动相的离子强度 洗脱剂的离子强度大则洗脱能力强。 k' 值大，选择性好，峰形尖锐。

(3) 酸度 pH 变化对蛋白质的溶解度和活性都不利, 现在疏水作用色谱都用中性缓冲溶液, 如磷酸盐、乙酸盐体系。

(4) 温度 对大多数蛋白质来说, 温度升高会增大保留作用, 但也会使它们的溶解度和生物活性降低。

第九节 胶束液相色谱

一、胶束液相色谱的概念

胶束液相色谱 (Micellar Liquid Chromatography, MLC) 是用高于临界胶束浓度的表面活性剂作流动相, 代替一般液相色谱的水和有机溶剂做流动相, 被分离溶质在固定相和胶束相及水相之间进行分配, 在水溶液中形成的胶束称为正相胶束, 可用于反相色谱; 在非极性溶液中形成反相胶束, 可用于正相色谱。目前胶束液相色谱一般指反相胶束液相色谱。这一方法是 1979 年 Armstrong 首先提出的。现在这一方法受到很多人的重视。因它有以下一些特点:

- ①可不使用有毒的流动相 (如甲醇和乙腈);
- ②在用梯度洗脱时不需要色谱柱和流动相之间进行平衡;
- ③不影响使用电化学检测器, 改进荧光检测器的灵敏度;
- ④分析血和尿样时不需要除去蛋白质可直接进样。

二、胶束液相色谱的分离机理

胶束液相色谱中的表面活性剂是流动相的改性剂, 增加了一个有选择性的假固定相, Arunyanart 等提出了反相胶束液相色谱的平衡关系, 他们认为在胶束液相色谱中存在两个基本平衡: 第一是流动相中溶质 E_M 与固定相活性部位 L_S 形成络合物 EL_S ; 第二是 E_M 与流动相中的胶束 M_M 形成络合物 EM_M , 此外还有一个平衡是胶束中的溶质向固定相中转移。以上三个平衡均为可逆平衡。



假定溶质独立地结合在固定相或胶束上，并且忽略第三个平衡，可以导出流动相浓度和容量因子之间的关系：

$$\frac{1}{k} = \frac{[M_M]K_2}{\phi[L_S]K_1} + \frac{1}{\phi[L_S]K_1} \quad (8-9)$$

式中 $[M_M]$ ——表面活性剂总浓度；

ϕ ——相比；

$[L_S]$ ——固定相活性部位的浓度。

用此方程可以通过作图法求出水相和胶束相之间的平衡常数 K_1 ，并预测不同胶束浓度下溶质的保留值。

三、胶束液相色谱所用的表面活性剂

在胶束液相色谱中形成胶束的表面活化剂主要是十二烷基硫酸钠(SDS)，也有其他一些表面活性剂，表 8-10 中列出了在胶束液相色谱中常用的表面活性剂。

表 8-10 在胶束液相色谱中常用的表面活性剂性能

类 型	名 称	简 称	CMC/mol	自聚数
阴离子	十二烷基硫酸钠	SDS	0.0081	62
阳离子	十六烷基三甲基溴化铵	CTAB	0.0013	78
中性分子	聚氧乙烯(23)十二烷醇	Brij-35	0.0001	40
非水反应胶束	丁二酸二辛酯磺酸钠	AOT	0.0006	—

四、胶束液相色谱的应用

胶束液相色谱主要应用于药物分析和环境监测中，从方法类型考虑主要分两大类，其一是模拟离子对色谱法，它的操作过程和反相离子对法一样；其二是直接测定血清及尿样中的药物。胶束液相色谱可以分离中性分子和带相反于胶束电荷的离子，与离子对色谱相比，避免了离子对色谱的两个缺点（重现性差和梯度平衡时间长），用这一方法可以分析有机金属化合物、无机阴离子、蛋白质和多种药物。把胶束液相色谱和 ICP/MS 联用可分析环境样品中的 pg 级一甲基砷酸、二甲基砷酸；分析甲基锡、丁基锡和苯基锡等。

第九章 高效液相色谱的色谱柱和流动相

第一节 高效液相色谱的色谱柱

一、色谱柱柱效

高效液相色谱的核心是色谱柱，把经典液相色谱改造成为现代液相色谱，重要的内容之一就是色谱柱的“现代化”，色谱柱“现代化”的关键内容是制备出高效的填料。近年来的高效填料是使用了小颗粒（10, 7, 5, 3 μm ）的无机氧化物，如硅胶，二氧化锆，三氧化二铝和有机多孔共聚微球作基质。在这些基质上键合各种化学基团或涂渍各种聚合物，形成各种具有选择性作用的高效固定相。这些填料装成的色谱柱既要有好的选择性，又要有高的柱效。要提高柱效是现代高效液相色谱的又一重要问题。所以填料和装柱技术是关键问题。

要提高柱效就要减小各种使样品谱带加宽的因素，表 9-1 中列出影响柱效的一些因素。这些因素的和就是总的使色峰加宽的因素，即增加理论塔板高度 H 的各种因素。这和气相色谱中的速率理论方程的概念是类似的。

表 9-1 各种使样品谱带加宽的因素

影 响 因 素	速率方程中的参数 ^①
涡流扩散	$C_e d_p$
流动相传质	$C_m d_p^2 u / D_m$, $C_e d_p + C_m d_p^2 u / D_m = A u^{0.33}$
纵向扩散	$C_d D_m / u = B / u$
停滞流动相扩散	$C_{sm} d_p^2 u / D_m = C u$
固定相传质	$C_s d_f^2 u / D_s = D u$

① C_e , C_m , C_d , C_{sm} , C_s 是理论塔板高度系数； d_p 是填料平均粒径； d_f 是固定相膜厚； u 是流动相流速； D_s 是在固定相中的扩散系数； D_m 是在流动相中的扩散系数； A , B , C , D 是给定的柱常数。

这样可以得到一个描述液相色谱速率理论方程：

$$H = Au^{0.33} + B/u + Cu + Du \quad (9-1)$$

当一支填充很好的色谱柱，填料的粒径又比较小，其固定相的膜厚 d_f 也很小时， $D=0$ ； B/u 一项也很小，所以 (9-1) 式可简化为

$$H = Au^{0.33} + Cu \quad (9-2)$$

如果色谱柱填充不好，如填料颗粒之间不均匀、不密实，就会使 C_e 、 C_m 增加，从而使涡流扩散项 A 的增加，导致柱效下降。所以

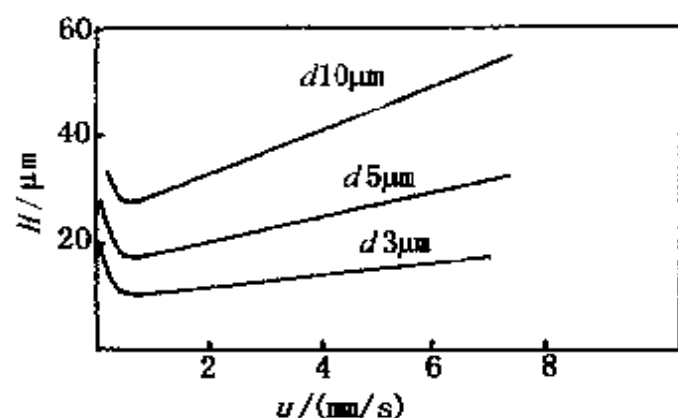


图 9-1 不同粒径 ODS 填料色谱柱的 $H \sim u$ 曲线

色谱柱的填充技术直接影响柱效的发挥。早期高效液相色谱的固定相用涂渍的方法制备，液膜厚度 d_f 大，这和气相色谱柱一样，会大大降低色谱柱的柱效。现代高效液相色谱填料多使用键合固定相，其固定相膜很薄，因而大大提高了柱效。从 $C_{sm}d_p2u/D_m$ 项可知，使用小粒径填料，其 d_p 值小

(如 $5\mu\text{m}$ ， $3\mu\text{m}$) 可以使柱效大幅度提高。如图 9-1 是不同粒径 ODS 填料色谱柱的 $H \sim u$ 曲线。

二、高效液相色谱填料的基质

1. 全多孔硅胶

现代高效液相色谱填料绝大多数用键合的方法把活性基团接枝到基质上，全多孔硅胶是使用最为普遍的基质。使用全多孔硅胶作基质有两大优点：

①目前可以制备出可控孔径、粒度、形状和表面性能均一的全多孔硅胶。

②积累了大量的有关全多孔硅胶的表面化学知识和有机硅化学知识，这样十分有利于制备液相色谱填料。现已制备出性能均一的填料，其批与批、柱与柱之间的性能一致性，主要决定于所使用全多孔硅胶。

在高效液相色谱的发展过程中曾使用过大颗粒全多孔硅胶、表面多孔的颗粒（即薄壳型填料）、小颗粒全多孔硅胶。如图 9-2 所示，

表面多孔颗粒的平均外径为 $30\mu\text{m}$ ，表面层厚度为 $2\mu\text{m}$ ，小颗粒全多孔硅胶的平均外径为 3, 5, 7, $10\mu\text{m}$ 。



图 9-2 现代液相色谱填料的类型

全多孔硅胶的孔径有三种类型：

- ①微孔全多孔硅胶 孔径 $< 2\text{nm}$ ；
- ②中孔全多孔硅胶 孔径 $< 50\text{nm}$ ， $> 2\text{nm}$ ；
- ③大孔全多孔硅胶 孔径 $> 50\text{nm}$ 。

高效液相色谱使用中孔和大孔全多孔硅胶，在分离低分子量的混合物时，选择 $6 \sim 15\text{nm}$ 孔径的全多孔硅胶，其比表面相当于 $500 \sim 200\text{m}^2/\text{g}$ 。在分离合成聚合物或生物大分子时，要使用 $15 \sim 100\text{nm}$ 的全多孔硅胶。如果使用 $< 2\text{nm}$ 的微孔全多孔硅胶，色谱峰就会拖尾。在表 9-2 中列出全多孔硅胶孔径和比表面的关系。

表 9-2 全多孔硅胶孔径和比表面的关系

孔径/nm	比表面/ (m^2/g)	每 1mL 色谱柱容积的比表面/ (m^2/mL)
6	约为 500	约为 $250^{①}$
10	约为 250	约为 $125^{①}$
30	约为 100	约为 $50^{①}$
50	约为 50	约为 $25^{①}$
100	约为 20	约为 $10^{①}$
400	5~10	$3 \sim 5^{①}$
无孔 $d_p \approx 1\mu\text{m}$	约为 3	约为 5

① 假定色谱柱的装填密度为 0.5g/mL 。

2. 其他金属氧化物基质

由于硅胶有一些缺点：在碱性介质中 ($\text{pH} > 8$) 不稳定；在孔隙中大分子扩散困难，降低柱效；硅胶表面上的剩余硅羟基有离子交换作用。为此采取了以下一些措施：

- 用二氧化钛或二氧化锆无机氧化物代替硅胶做基质；
- 用非多孔基质，即单分散无孔基质；
- 采用各种聚合物代替二氧化硅做基质。

近年来用氧化铝、氧化锆、氧化钽和氧化钛作为高效液相色谱填料的基质，并对它们的改性进行了许多研究，例如有人通过硅烷化/硅氢化反应对它们改性，认为这些基质有巨大的 HPLC 应用前景。

三、高效液相色谱固定相^[4]

1. 硅胶表面键合或涂渍各种聚合物

用聚合物涂渍包覆硅胶作 HPLC 的填料近几年日趋普遍，如聚烷基天冬酰胺、烷基聚硅氧烷、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯、聚（ α -磺乙基天冬酰胺）、聚乙烯亚胺、聚胺、聚丁二烯马来酸、聚乙烯咪唑。这种固定相与 ODS 填料相比，既可提高选择性，又增加了化学稳定性。如：E. Forgacs 用聚乙烯涂渍的硅胶作反相色谱的填料分离 16 种苯胺衍生物，并和十八烷基键合的硅胶进行比较，前者优于后者 M. Hansen 研究了具有可以控制疏水性涂渍聚合物的填料，可以分离蛋白质及多肽。最近 Kurganov 指出聚乙烯吡咯烷酮涂渍的硅胶在医学和药物分析中很有用，它的疏水性很强，适于分离蛋白质。有人用硅胶上涂渍聚三氟苯乙烯填料的液相色谱分离蛋白质得到好的结果。Chriswanto 等用聚吡咯涂渍硅胶制作新的 HPLC 固定相，它可以按平面性分离多环芳烃异构体。

2. 其他氧化物表面上涂渍聚合物

由于硅胶的稳定性不理想，近年许多研究者用三氧化二铝、二氧化钛和二氧化锆作基质，在其表面上涂渍各种聚合物作 HPLC 的填料。如用聚丁二烯涂渍三氧化二铝作反相 HPLC 固定相分离蛋白质、肽。把烷基键合到三氧化二铝上作固定相分离肽。用多孔二氧化钛和二氧化锆键合十八烷基作高效液相色谱的填料，并且和 ODS 填料进行比较。这种固定相适用于分离多环芳烃、烷基苯、低聚糖、丹磺酰化氨基酸、肽和蛋白质。也有把聚丁二烯涂渍在二氧化锆上作反相液相色谱的填料。Weber 把碳沉积在二氧化锆上或在二氧化锆上作成碳-高聚物复合物的固定相，对极性和非极性化合物都有好的选择性。

M. Tischler 等用聚丁二烯涂渍三氧化二铝做固定相, 建立了一种简单的分离三萜烯羧酸的方法。

3. 无孔单分散填料 (non-porous monodisperse packing)

为了适应分离生物大分子的需要, K.K. Unger 提出用 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 的无孔球做固定相, 大分子溶质在无孔小球之间的空隙中通过, 并和小球表面相互作用, 这样可以快速地分离生物大分子。近年也有人用无孔 C_{18} 硅胶填料的反相 HPLC 梯度洗脱分离小分子化合物。另一方面也发展了以树脂为基的无孔亲水性填料, 用以分离生物大分子。最近也有用二氧化锆作基质制成无孔反相填料的报告。

4. 有机高聚物填料

虽然目前 HPLC 的填料仍以无机基质为主, 特别是以硅胶基质为主, 但近年以有机聚合物为基质的填料日益受到人们的重视。一类普遍使用的聚合物填料是苯乙烯-二乙烯基苯的共聚物, 这类疏水性基质价格低、化学稳定性好, 可代替硅胶作反相色谱填料, 用以分离生物大分子有很好的效果。为了改善这种填料的性能, 近年对高度交联的苯乙烯-二乙烯基苯的共聚物 (PS-DVB) 进行了各种化学改性, 以便适应各种 HPLC 的模式。近年发展更多类型的有机聚合物作 HPLC 固定相的基质, 如聚丙烯酸酯类、甲基丙烯酸酯类、聚乙烯醇类、苯乙烯和甲基丙烯酸酯-二乙烯基苯的共聚物。在 1996 年的匹兹堡展览会上各公司推出 30 种新的以硅胶等无机物为基质的反相色谱柱, 以聚合物为基质的有四种, 如以甲基丙烯酸酯类多孔聚合物为基质的 C_{18} 柱 (BiospherGMB100RP), 孔径为 15nm , 适于小分子的核酸、核苷酸、多环芳烃等的分离, 这种柱子被生物物质污染后可用氢氧化钠清洗。

有不少研究是直接由高聚物小球作固定相的, 如 K. Hosoya 研究了交联大孔聚(乙烯-*t*-丁基苯甲酸酯)小球的制备和色谱性能, 这种色谱柱非常适合于从水介质中富集含卤化合物。K. Ogino 也考察了用于水介质 HPLC 的单分散乙二醇-二甲基丙烯酸酯齐聚物小球的制备方法和它们的表征, 它们适于做 GPC 的固定相分离多糖类、蛋白质和其他水溶性大分子。S. Yamauchi 把鱼精蛋白键合到有机聚合物小

球上，用做分离糖类化合物的色谱固定相，分离效率高，分析时间短。A. Denizli 把刚果红和 $\text{Cu}(\text{II})$ 结合到聚乙二醇二甲基丙烯酸酯-羟乙基甲基丙烯酸酯上，做成有特殊作用的色谱柱。P. E. Gustavsson 制备了一种新的色谱用超多孔琼脂糖固定相，用于灌注色谱分离生物分子。V. Smigol 在二维色谱中使用单分散聚合物小球装填的色谱柱，这种固定相在大孔中有二醇基基团，在小孔中有十八烷基基团，可分离疏水性和亲水性物质。K. Hosoya 研究了对温度敏感的聚合物小球，其含有对温度敏感的基团（聚 *N*-异丙基丙烯酸酰胺），以控制温度的方法选择性分离药物。

5. 灌注色谱填料

灌注色谱填料 (Perfusion chromatography packing) 是 1990 年 Afeyan 等提出的，用于生物大分子分离纯化的新型液相色谱技术，是为克服传统全多孔硅胶孔径小的缺点而设计的新型固定相，叫做“流通粒子” (Flow-through particle)，对这种固定相的颗粒内部的孔径形态进行了特殊设计，使之有两种尺寸的孔径，一种是大孔 (600~800nm)，叫做“流通孔” (through pores)，另一种是小孔 (80~150nm)，叫做“扩散孔” (diffuse pores)，后者把前者连通在一起。这种填料可以在高流速 (24cm/s) 下，在 12s 内分离出 5 个蛋白质 (核糖核酸酶 A、细胞色素 C、溶菌酶、 β -乳球蛋白、卵清蛋白)。近年有不少这方面的论文，如 McCoy 应用数学模型模拟二元灌注色谱；Kassel 等研究用填充毛细管灌注色谱/质谱/质谱确定酶消化液的基因图和排列次序。

6. 手性固定相填料^[4]

在生物分子和药物分子中有大量对映异构体，这些异构体在生理和药理中有时起着完全不同的作用，例如有 40% 的药物是手性化合物，在很多情况下只有某种对映异构体是有效成分，所以对映异构体的分离成为色谱的重要任务，而 HPLC 又是完成这一任务的重要手段。已经研究过的手性固定相有 700 多种，其中不少已成为商品柱。有不少的专著和综述文章讨论手性分离及其固定相。从 1973 年就开始使用纤维素衍生物的手性分离固定相，近年仍有用三 (3,5-二甲

基苯基氨基甲酸酯) 纤维素作手性固定相的研究报告。也有用支链淀粉三(苯基氨基甲酸酯)作手性固定相,用以分离各种芳香基醇的对映异构体。另外一类重要的手性固定相是环糊精及其衍生物,1984年由 Armstrong 的研究组首次把环糊精键合到二氧化硅上用作 HPLC 的手性分离固定相,目前成为十分普及的手性固定相,近年来有不少进一步的研究和应用报告。诺贝尔化学奖获得者 Cram 在 1978 年用手性冠醚作液相色谱固定相,开创了“主-客”体作用色谱原理,但是用手性冠醚作液相色谱固定相的研究远不如环糊精的应用广泛。另外一个重要的手性固定相是键合蛋白质的固定相,Allenmark 在 1982 年首先把牛血清白蛋白(BSA)用作手性固定相,这类亲和色谱用手性固定十多年来有了长足的发展,最近仍旧有新的研究和商品柱出现。

(1) 含肽或蛋白质手性固定相 把蛋白质、酶和抗体等生物大分子键合到硅胶上是 HPLC 手性固定相常用的方法,把这种手性固定相用于生物、医药、临床等方面的对映体的分离甚为重要,最近 Tittelbach 把血清蛋白固定到硅胶上作 HPLC 固定相并对这种固定相进行了研究和表征,Harada 用不同类型的固定化方法,把牛血清白蛋白固定到硅胶上,并研究了有机改性剂对手性分离的影响,Hagenaka 研究了不同牛血清白蛋白键合柱的手性选择性。Gilpin 等在硅胶上固定牛血清白蛋白,研究它在液相色谱的记忆效应,他们认为虽然牛血清白蛋白(BAS)是很稳定的蛋白质,它们以 17 个二硫键联系在一起,BAS 的固有的结合的结构是三次结构的函数,它有 1~5 种构象的变化,但当酸度改变时会影响它的三次结构变化,这是蛋白质研究较早涉及的内容。这样自然会影响到它的保留行为。在使用较多的商品固定相中还有 α_1 酸性糖蛋白(AGP)及卵类粘蛋白(OVM),AGP 使用的最多。有一些用其他类型蛋白质作手性固定相的报告。也有用氨基酸作手性基团的固定相,如用(S)-N-(3,5-二硝基苯甲酰酪氨酸)衍生物作手性固定相,以及用模拟抗体聚合物作 HPLC 的手性固定相的研究。

(2) 含碳水化合物手性固定相 Oguni 对含多糖类衍生物的手性固定相进行研究,讨论了醋酸纤维素和其他纤维素衍生物和直链淀

粉衍生物作手性固定相的问题。Chankvetadze 等讨论了直链淀粉的二甲基, 二氯和氯甲基苯基氨基甲酸酯作 HPLC 的手性固定相的分离性能。研究了 12 种手性固定相, 用红外光谱、核磁共振谱的数据证实了 NH 基团、氨基甲酸酯、甲基和氯基在手性识别中起作用。Booth 等人研究了在直链淀粉三 (3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) 手性固定相上, 分离相关化合物的色谱分离机理, 认为能不能分离决定于是否有第二氢键基团。同一研究组“以定量结构-手性选择保留关系”研究在直链淀粉三 (3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) 手性固定相上 α -烷基芳羧酸手性化合物的分离。Enomoto 用酶催化聚合的方法制备了在硅胶上化学键合直链淀粉的固定相, 研究对苯基氨基甲酸酯衍生物手性识别的能力。Chassing 比较了直链淀粉和支链淀粉衍生物作 HPLC 的手性固定相性能。

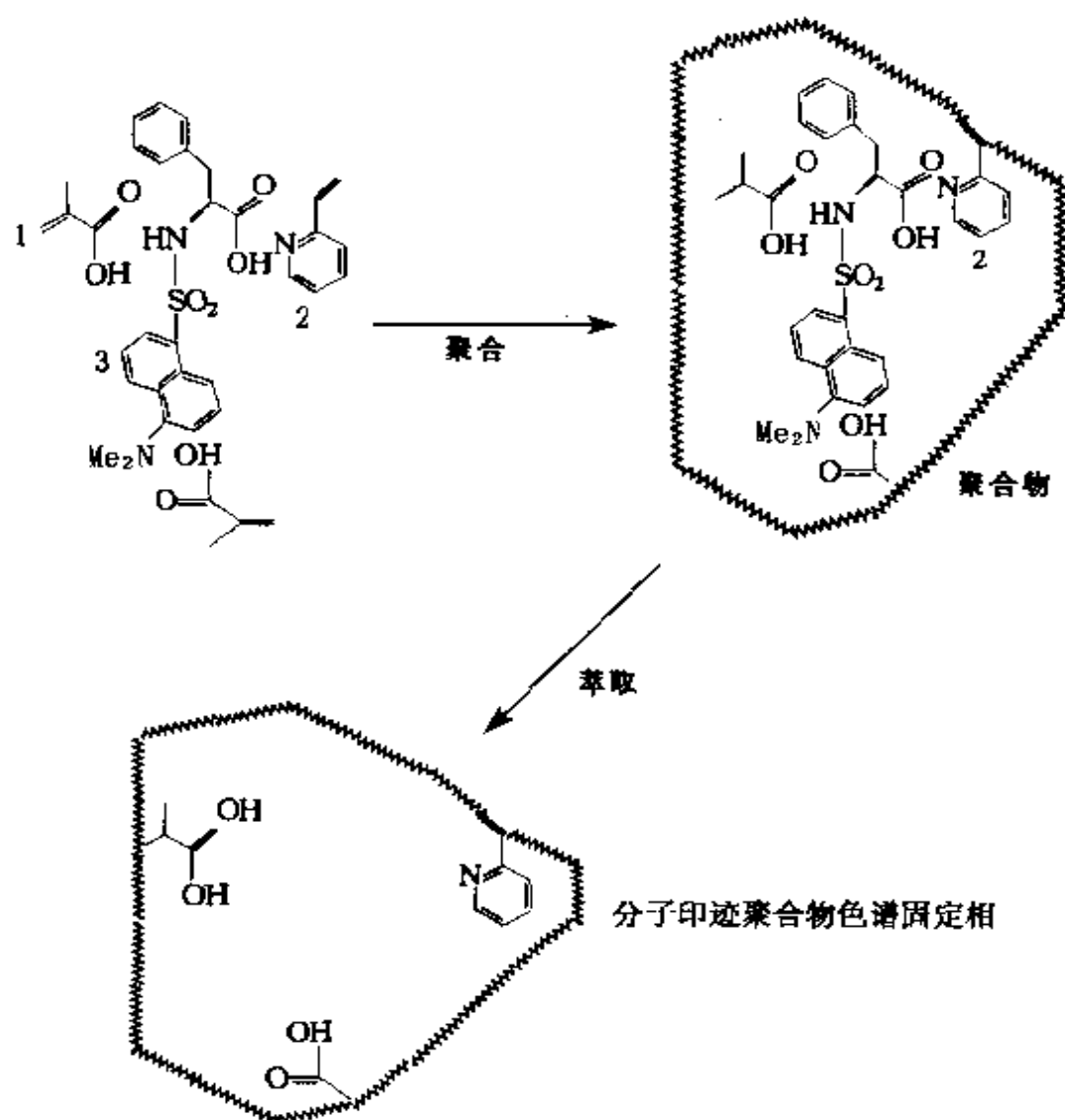
用纤维素衍生物做手性固定相的报道也有不少, Bargmann-Leyder 进行了纤维素和直链淀粉衍生物作 HPLC 手性固定相的比较。Chassing 比较了氨基甲酰化和苯甲酰化纤维素作 HPLC 的手性分离性能。Grieb 把纤维素三 (3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) 涂渍在多孔石墨化炭黑上作 HPLC 手性固定相, 研究其分离性能。

(3) 含环糊精及其衍生物的手性固定相 1984 年由 Armstrong 的研究组首次把环糊精键合到硅胶上, 用作 HPLC 的手性分离固定相, 目前成为十分普及的手性固定相, 近年来有不少进一步的研究和应用报告。如 Armstrong 的研究组目前仍在这方面进行研究, 他们用未衍生化环糊精手性固定相分离苄基甲氧基羰基氨基酸和肽的对映异构体。Nakamura 制备了全苯基环糊精柱, 研究了它的手性识别和色谱特性, 这种全苯基环糊精柱特别适合于分离氨基醇类 β -阻断剂, 这类手性药物在其他手性柱上难以分离, 而在全苯基环糊精柱上可以较好地分离。用环糊精柱和环糊精作流动相填加剂的研究报告也有不少。

(4) 其他类型的手性固定相 除去上述几大类以外, 还有各种各样的 HPLC 手性固定相, 如用手性尿素衍生物作 HPLC 固定相进行对映体的直接分离, 用手性二萘 HPLC 柱分离外消旋 benzeroline 衍生物的对映异构体。Pirkle 研究组改进了氟甲醇手性固定相, 并研究

其分离机理。Anderson 研究了以 N,N' -二烷基-L-酒石酸二酰胺为基础的网络聚合物手性固定相。Guehitz 用化学键合羟基铜-吡啶作手性固定相，以配体交换色谱分离 2-羟基二羧酸的对映异构体。Laemmerhofer 研究了用奎宁和奎尼定衍生物作手性选择剂。J. Y. Lin 研究了以 (s)-1-(-萘基) 乙胺制得的顺-反异构体手性固定相进行手性分离的性能。

(5) 分子印迹聚合物色谱固定相 (Molecularly imprinted polymer)^[6] 近年出现分子印迹聚合物色谱固定相，这种固定相是由功能性单体（如甲基丙烯酸和乙烯基吡啶）和分子印迹单体（如氨基酸）在一起聚合而成的聚合物。



四、高效液相色谱柱的填充

高效液相色谱柱的性能主要决定于固定相填料，但是色谱柱的填

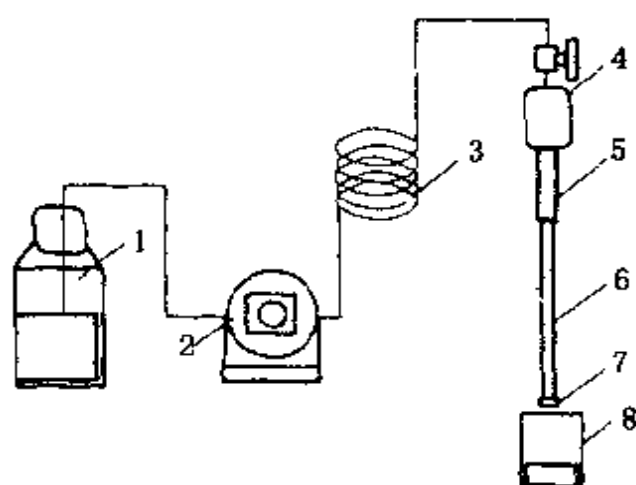


图 9-3 填充色谱柱装置示意图

- 1—溶剂槽；2—高压泵；3—贮压螺旋管；
4—高压阀；5—预柱；6—色谱柱；
7—过滤片；8—废液槽

充好坏也有很大的影响。填充色谱柱的方法有干法和湿法两种，一般大颗粒的（如外径 $> 20\mu\text{m}$ ）可以用干法填充，（但也有用于干法填充小颗粒柱的）；一般小粒径的填料宜用湿法填充。湿法填充也称作匀浆法，即用一密度和填料相近的液体或混合液作分散介质，用超声波处理此浆液，使之在介质中高度分散，形成均一的浆液，然后用高压泵快速压入色谱柱管中，这样就可以制备出

高效的色谱柱。装填色谱柱所用的装置如图 9-3 所示。

第二节 高效液相色谱的流动相

一、概述

高效液相色谱和气相色谱不同之处，在于流动相参与实际的分配过程，所以高效液相色谱中，流动相有比较丰富的研究内容。在研究制定一个高效液相色谱方法时，选择适宜的流动相也是很重要的内容。图 9-4 是选择高效液相色谱流动相中溶剂的三角形图。从图 9-4

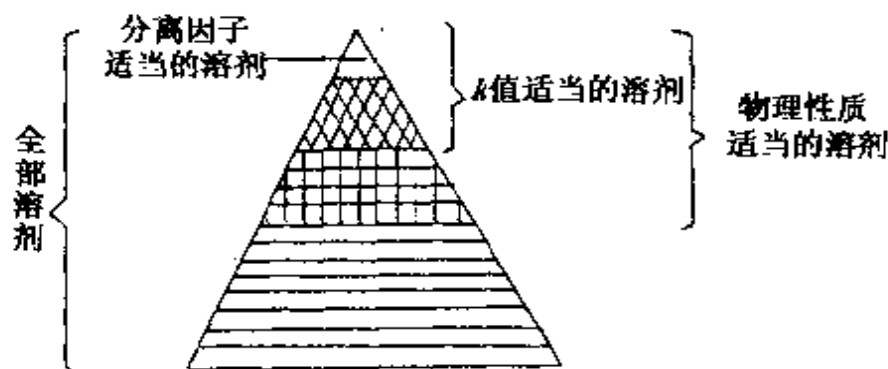


图 9-4 在高效液相色谱中溶剂选择的示意图

可以看出,在选择流动相溶剂时,首先要考虑的是溶剂的物理性质,如沸点、粘度、紫外光吸收的波长范围等;其次要考虑的是溶剂对所分离样品的容量因子(k),这样又把可使用的溶剂范围缩小了许多;最后要考虑所使用的溶剂要有分离能力,当然分离能力主要是由色谱柱起主要作用,但是在高效液相色谱中流动相也起着不可忽视的作用。

二、高效液相色谱流动相溶剂的物理性质

用作高效液相色谱流动相溶剂,首先要满足以下几点基本要求:①容易得到;②适合于所用的检测器;③纯净、有一定的惰性;④无毒、使用安全;⑤对所分离的样品有一定的溶解性能。

一般来说选择较低沸点和较低粘度的溶剂是有利的,应选用纯净、便宜又容易得到的溶剂。能够满足这些要求的溶剂,选最重要的列于表 9-3 中。

1. 溶剂对检测器的适应性

高效液相色谱在多数情况下要使用紫外检测器,所以必须考虑所用溶剂在紫外波段的吸收。如果要用间接紫外波长进行检测则应选用吸收强烈的溶剂或添加剂。如使用示差折光检测器,自然要考虑溶剂的折光率。因为示差折光检测器的灵敏度与流动相和样品折光率的差值成正比例。在表 9-3 中列出的紫外光截止波长是对高纯溶剂的数据,在溶剂中如含有紫外吸收的微量杂质就能使该值增大 50~100nm。

2. 溶剂的活性

有许多溶剂可能与样品发生反应,或在某些固定相的存在下产生聚合,它们就不能作为流动相使用。所以在高效液相色谱中几乎不使用醛、烯、含硫化合物作溶剂;酮和硝基化合物也很少使用。为了收集流出物作进一步鉴定,要使用沸点较低的溶剂。有些溶剂在使用前必须纯化,如醚类在存放中会产生过氧化物。

3. 溶剂的沸点和粘度

溶剂的沸点和粘度密切相关,低沸点的溶剂通常其粘度也低。通常选用沸点高于柱温 20~50℃、粘度不大于 $5 \times 10^{-4} \text{Pa} \cdot \text{s}$ 的流动相。

低沸点的溶剂难以使用往复泵，因为它在泵中容易形成气泡而影响泵的精度，甚至使泵吸入的溶剂减少，此外由低沸点溶剂组成的混合流动相又会因蒸发而改变其组成。

在其他因素相同的情况下，使用高沸点溶剂会因它的粘度而降低柱效。如要使用粘度较大的溶剂，可以加入稀释剂，因为混合溶剂的粘度往往在很大的程度上决定于低粘度溶剂的粘度。对于有缔合倾向的溶剂（特别是水和乙腈；水和甲醇），它们粘度随组成的变化是不规律的，例如水/乙腈比例为 35/65（体积比）时粘度最大。

4. 高效液相色谱流动相溶剂的极性

在气相色谱的固定相中，讲到了固定液的极性。在高效液相色谱中涉及流动相时，由于它在两相分配过程中起着重要的作用，涉及流动相和被分离物质的相互作用，为了描述它和溶质作用力的大小，有必要对流动相的综合作用力给以定量的表示，就给它一个用“极性”表示的量概念。在高效液相色谱中常用 Rohrschneider 的溶解度数据来描述溶剂的极性，以 P' 表示，在表 9-3 中列出了常用溶剂的 P' 值，从 2（一种含氟的溶剂）以下到 10.2（强极性溶剂水）。一般粗略地说 P' 值改变 2 个单位，容量因子就改变 10 倍。

表 9-3 在高效液相色谱适用的溶剂

溶 剂 ^①	紫外截止波长/ nm	折光指数 (25℃)	沸点 /℃	粘度/ mPa·s (25℃)	P'	ϵ ^②	介电常数 ϵ (20℃)	选择性 分组 ^③
异辛烷 (2, 2, 4-三甲基戊烷)	197	1.389	99	0.47	0.1	0.01	1.94	
正庚烷	195	1.385	98	0.40	0.2	0.01	1.92	
正己烷	190	1.372	69	0.30	0.1	0.01	1.88	
环戊烷	200	1.404	49	0.42	0.2	0.05	1.97	
1-氯丁烷	220	1.400	78	0.42	1.0	0.26	7.4	VIa
溴乙烷		1.421	38	0.38	2.0	0.35	9.4	VIa
四氢呋喃	212	1.405	66	0.46	4.0	0.57	7.6	III
丙胺		1.385	48	0.36	4.2		5.3	I
乙酸乙酯	256	1.370	77	0.43	4.4	0.53	6.0	VIa
氯仿	245	1.443	61	0.53	4.1	0.40	4.8	VII
甲乙酮	329	1.376	80	0.38	4.7	0.51	18.5	VIa

续表

溶 剂 ^①	紫外截止波长/ nm	折光指数 (25℃)	沸点 /℃	粘度/ mPa·s (25℃)	P'	$\epsilon^{\circ(2)}$	介电常数 ϵ (20℃)	选择性 分组 ^③
丙酮	330	1.356	56	0.3	5.1	0.56		VIa
乙腈	190	1.341	82	0.34	5.8	0.65	37.8	VIb
甲醇	205	1.326	65	0.54	5.1	0.95	32.7	II
水		1.333	100	0.89	10.2		80	VII

① 本表选择粘度 $\leq 0.5\text{mPa}\cdot\text{s}$ ；沸点 $>45^\circ\text{C}$ 的溶剂，水除外。

② 在氧化铝上液固色谱的溶剂强度参数。

③ 见图 9-5。

$$\lg \frac{k_2}{k_1} = (P_1 - P_2)/2 \quad (9-3)$$

式中， k_1 ， k_2 是给定化合物的初始和终止容量因子； P'_1 ， P'_2 是溶剂的初始和终止极性。

对反相色谱可以写成：

$$\lg \frac{k_2}{k_1} = (P_2 - P_1)/2 \quad (9-4)$$

据有人研究表明，在反相色谱中把水换成甲醇，样品的 k 值改变 1000 倍。从表 9-3 中查到的 P' 值分别为 5.1 和 10.2，用 (9-3) 式计算 k 值改变 $10^{2.6}$ 倍。

在吸附色谱中使用吸附色谱溶剂强度参数，图 9-5 是各种纯溶剂的 P' 值、 ϵ° 值和 Hildebrand 溶解度参数 δ 值的对应图。

5. 混合溶剂

在分配色谱和吸附色谱中，溶剂的极性（强度）是用混合溶剂的比例来调节的，一个极性强的溶剂和一个极性弱的溶剂经过适当的混合可以得到一定极性 P' 的混合溶剂。如有溶剂 A 和溶剂 B 组成二元混合溶剂，它的极性可由公式 (9-5) 计算得到。

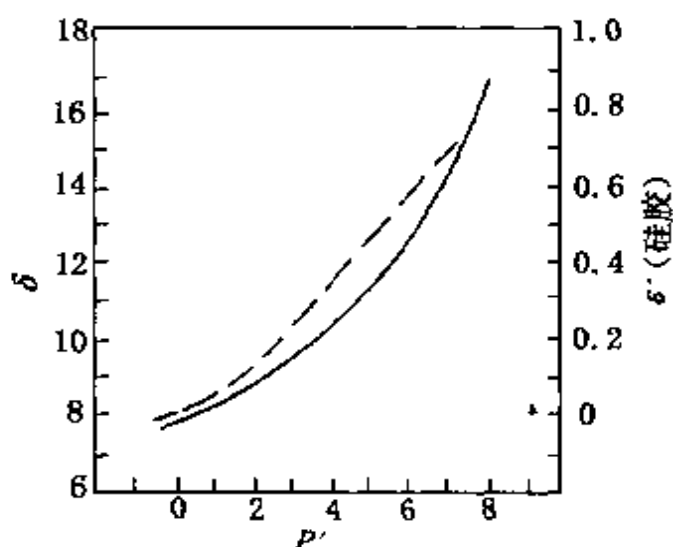


图 9-5 高效液相色谱溶剂极性参数之间的关系

$$p = \varphi_a P_a + \varphi_b P_b \quad (9-5)$$

式中, φ_a , φ_b 分别为溶剂 A 和溶剂 B 在混合溶剂中的体积分数;
 P_a , P_b 分别为溶剂 A 和溶剂 B 的 P' 值。

6. 溶剂的选择性和溶剂的分类

选择流动相的极性能使被分离样品的分配容量在 1~5 之间, 这时如果有两个或几个色谱峰重叠, 可以通过调节溶剂的选择性来解决, 调节溶剂的选择性要考察溶剂的类别, 对溶剂的分类, 也是按照 Rohrschneider 的数据分为 8 类。图 9-6 是溶剂选择性三角坐标图, 把每一个溶剂的三种作用力数据交汇标识在三角形的某一位置上。这三种作用力为静电力 (由偶极矩决定), (X_n), 给质子力 (X_d), 和受质子力 (X_a), 同类型的溶剂分在一组, 如 I 类是纯质子受体 (如醚类和胺类), VII 类是纯质子给予体 (如氯仿), V 类是偶极矩大的溶剂 (如 1,2-二氯乙烷)。选择方法类似于气相色谱固定液的选择原则。

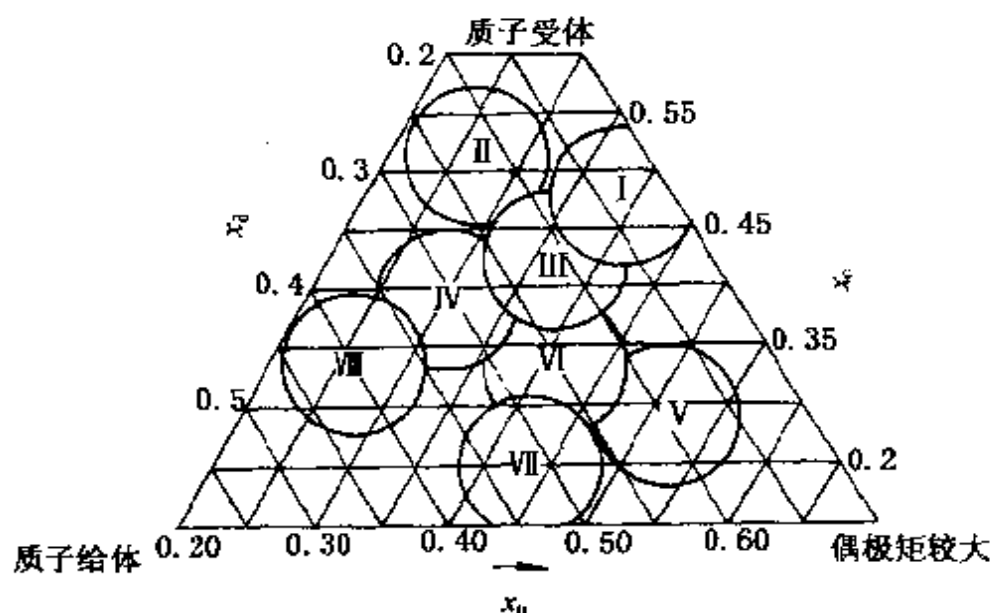


图 9-6 溶剂选择性三角坐标图

第三节 高效液相色谱方法的选择

一、色谱模式的选择

(一) 样品性质

高效液相色谱方法有多种模式, 选择哪种模式能满足分析的要

求，首先要考虑分析对象的物理和化学性质。也就是要考察：

①样品是大分子还是小分子？分子量在什么范围？

②样品是水溶性的还是有机溶剂可溶的？

③样品是离子状态的还是非离子状态的？

(二) 根据样品性质选择适当的模式

在选择高效液相色谱模式时，首先，要了解的是样品的溶解性，如果不知道它的溶解性能，可以用戊烷或氯仿和水作溶剂做一下溶解试验，如果知道所做样品的化学结构也可以估计它在水或有机溶剂中的溶解性能。其次，要了解的是样品的分子量大小，如果不知道样品的分子量，可以用体积排阻色谱法分离，很快得出数据。按照排阻色谱柱的性能，既可以用于水溶性又可以用于油溶性样品的分离。用排阻色谱法可以估计样品简单还是复杂。有可能用排阻色谱法分离分子量大小不一的组分。可用它来考察样品是否含有一些分子量很接近的组分，如果样品中只含有分子量大小差别不大的组分，就要使用高效液相色谱的其他模式进行分离。

1. 水溶性样品

如果是低分子量的样品，而且分子量相差较大，使用小孔填料的排阻色谱法进行分离是比较合适的。如果样品的分子量相差不大，就要考查样品中是否含有离子型或可电离的组分，如样品中的组分都是非离子型的，最好选用键合相色谱分离，而且应首先试用反相色谱。但在反相色谱中，极性较强的水溶性样品，由于保留值低，很快出峰，分离不好，对于这类样品应该用氨基、二醇基柱的正相色谱进行分离，并用有机溶剂和水的混合液进行洗脱。有些样品可以用硅胶柱的吸附色谱，并以含水或甲醇的溶剂进行洗脱。

如果是低分子量离子型（或是可电离的）样品，有几种方法可以利用，如为弱酸或弱碱，最为简单的办法是完全抑制的电离。例如羧酸样品使用 pH 值为 1~2 之间的流动相，就可以把样品作为非离子型样品进行分离。这样的方法要比使用离子交换色谱更简便，通常可以获得满意的结果。在键合相色谱中，对强碱性样品 ($pK_a > 6$) 不能使用离子抑制技术，因为不可能把流动相的 pH 值增大到足以抑制

样品电离而又不破坏固定相基质（以硅胶为基质的键合填料）的程度。强碱性样品应和强离子形样品一样，用离子对色谱进行分离。离子对色谱几乎适用于所有离子型或可电离的样品，但更适合于电离度较高的组分。

如为小分子的无机或有机离子，离子色谱是首选的方法，特别是一些无机阴离子，离子色谱法是很简便的分析方法。

分子量较大的水溶性样品，可根据它是离子型或非离子型进行不同的处理，对分子量较大的离子型组分也可以用离子抑制技术处理，这一方法往往是有效的。对于分子量在 2000~5000 的各类组分优先用体积排阻色谱进行分离。

强离子型水溶性大分子是目前高效液相色谱中的难题之一。像蛋白质、核酸的分离是近年来研究十分活跃的领域。

HPLC 是分离分析生物大分子生化样品应用最广泛的方法，各种分离模式（反相色谱、正相离子交换色谱、体积排阻色谱、疏水作用色谱和亲和色谱等）都有应用。在 HPLC 的各种模式中，反相高效液相色谱（RPLC）应用最为广泛，有 3/4 的工作是用 RPLC 进行的，在分离生物大分子中也是应用 RPLC 为最多。在肽谱的测定中 RPLC 仍然是首选的方法，因为它具有很好的分离效率和选择性。所用的反相色谱柱多为 C_{18} 或 C_8 的键合硅胶填料，这种填料有较大的微孔，并把键合以后残余的硅醇基用三甲基氯硅烷封闭。微孔为 30nm 的填料也可以使用，但是如在样品中有酶解不完全的蛋白质，在分离上将造成困难。近年也有人主张使用更小粒径的填料，如 Kirkland 等人建议使用短柱填充小粒径的填料分离肽和蛋白质。反相液相色谱除去用 C_{18} 、 C_8 和 C_4 键合硅胶作固定相以外，近年用氟代烷基键合硅胶作填料的 HPLC 也有不少研究。如 Itoh 用氟代烷基硅胶填料柱分离核酸；Kataev 以氟代聚苯乙烯涂渍硅胶作填料液相色谱的填料，分离肽和蛋白质。用二氧化钛或二氧化锆作基质的 RPLC 填料，在生物大分子的分离中也有不少应用。用各种聚合物涂渍的二氧化锆填料也颇受人们重视，如果使用单纯的聚合物作填料，在有机溶剂中会收缩或膨胀，影响分离性能，如把聚合物涂渍在二氧化锆上，既可耐酸和

碱，又可耐有机溶剂，用以分离生物大分子具有特殊的优点。但也存在表面上能量不均一的缺点。

离子交换色谱也是分离生物大分子的重要方法，有不少人研究用各种离子交换色谱填料分离蛋白质的性能。胶束液相色谱也广泛用于肽和蛋白质的分离。除去上述的液相色谱模式以外，像体积排斥色谱、亲和色谱、疏水作用和亲水作用色谱、免疫色谱也有所应用。

2. 油溶性样品

在分离油溶性样品时，开始的步骤与水溶性样品相似，首先应使用体积排阻色谱确定样品分子量大小的特征。分子量较大的样品可以用适当的大孔硅胶或有机凝胶填料，以有机溶剂为流动相作进一步的分离。对于分子量范围在 1000~5000 的样品，可以使用排阻色谱或硅胶吸附色谱。对于含有少量分子量相差很大的样品，宜优先使用排阻色谱进行分离。硅胶吸附色谱或极性键合相色谱也可以分离许多合成和天然的齐聚物混合物，尤其适于那些非离子型和分子量低于 2000 的齐聚物的分离。

对于分子量低于 2000 的样品，如果样品只有几个组分，而且分子量又相差较大，使用小孔硅胶或其他凝胶填料的排阻色谱柱进行分离，是较易实现的。在此情况下也可以用反相色谱进行分离。如果样品比较复杂而且分子量相近，则要考虑其他各种模式的高效液相色谱方法。对离子型或可电离的组分，较为适宜的方法是离子对色谱。

对非离子型样品，如果是强亲脂性的，可以使用以有机溶剂为流动相的硅胶吸附色谱。如果样品为弱亲脂性在极性溶剂中又有一定的溶解性，可以采用反相色谱进行分离。如果样品为含有位置异构体的混合物，可以考虑用硅胶为固定相的液固色谱。如果是手性异构体混合物，那就要用手性固定相的色谱方法，或在流动相中添加手性选择剂进行分离。

二、色谱条件的选择

在色谱模式选定之后，就要确定分离的色谱条件，各种色谱模式的条件虽各有特点，但是不外乎是：色谱柱、流动相、梯度或等度洗脱、流动相流速等，下边把选择的一般程序列于图 9-7 的流程中。

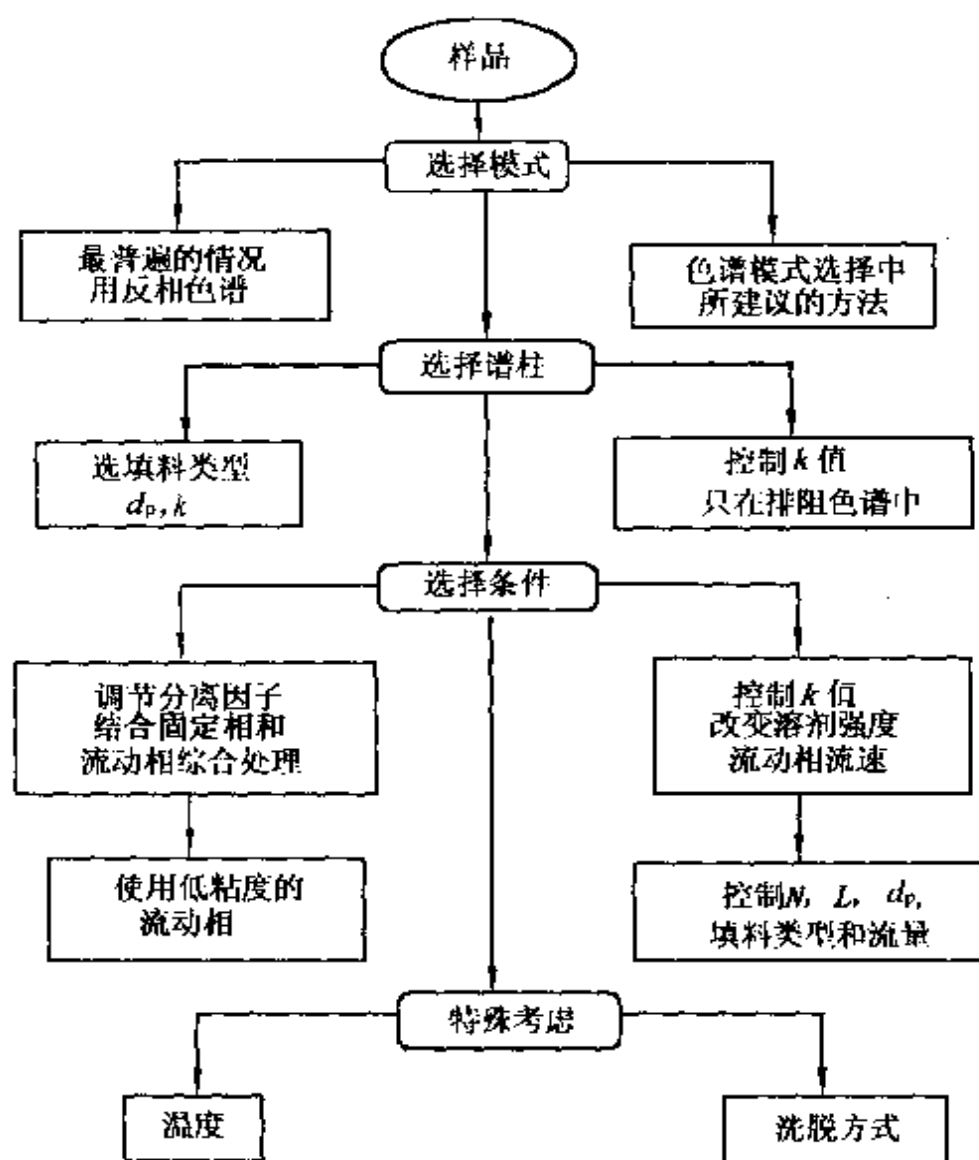


图 9-7 高效液相色谱条件选择程序^[1]

参 考 文 献

- 1 [美] 斯奈德 LR, 柯克兰 JJ, 陈新民, 高虹译. 现代液相色谱法导论. 北京: 化学工业出版社, 1988
- 2 朱彭龄, 云自厚, 谢光华. 现代液相色谱. 兰州: 兰州大学出版社, 1989
- 3 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章. 离子对高效液相色谱法. 郑州: 河南科技出版社, 1994
- 4 傅若农. 国外分析仪器-技术与应用. 1997, (1): 10~20; 1997, (2): 1~11
- 5 E Kuesters, et al. HRC. 1995, 18 (4): 217~220
- 6 O. Ramstroem, et al. J Org Chem. 1993, 58: 7562~7564

第十章 超临界流体色谱

第一节 超临界流体色谱的简史

一、概述

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 是 80 年代重新兴起的一个色谱分支^[1~4], 是以超临界流体作流动相的色谱方法, 所谓超临界流体是指在高于临界压力和临界温度时的一种物质的状态, 如图 10-1 所示, 它既不是气体, 也不是液体, 但是它兼有气体和液体的某些性质。即兼有气体的低粘度、液体的高密度以及介于气、液之间较高的扩散系数等特征, 见表 10-1 中的数据。从理论上说 SFC 既可以分析气相色谱难以处理的高沸点、不挥发性样品, 又有比高效液相色谱更高的柱效和更短的分析时间。超临界流体色谱可以使用气相色谱和高效液相色谱的检测器, 可与质谱、傅利叶红外光谱等仪器在线联接, 因而可方便地进行定性和定量分析。许多火炸药组分是热敏感物质, 用 SFC 可以方便地分析它们。

二、超临界流体色谱的发生和发展^[3]

用超临界流体作色谱的流动相是由 Klesper 等人于 1962 年首先提出来的, 他们用二氯二氟甲烷和一氯二氟甲烷超临界流体作流动相分离镍卟啉的异构体, 之后 Klesper 等人发展了填充柱 SFC 的技术, 用以分离聚苯乙烯的齐聚物。后来 Sie 和 Rijnderder 等人又进一步研究

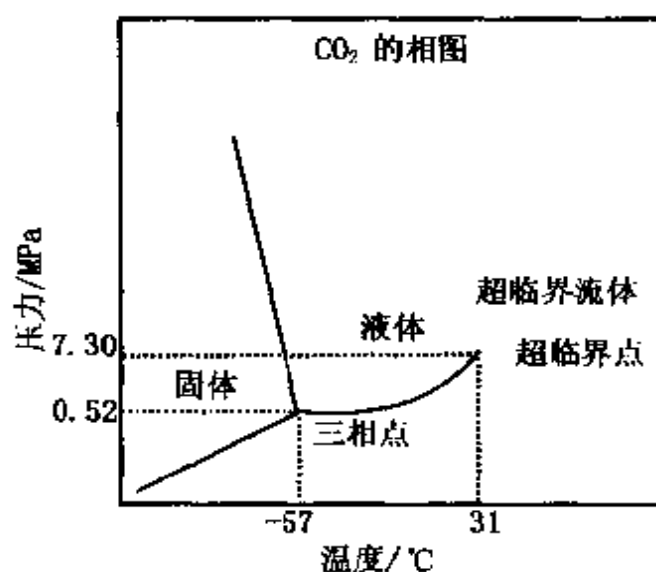


图 10-1 二氧化碳的超临界流体相图

表 10-1 超临界流体和气体某些物理性质的比较

物质的相态	密度 / (g/cm^3)	扩散系数 / (cm^2/s)	粘度 / ($\text{g}/\text{cm}\cdot\text{s}$)
在 21°C 和 0.1MPa 下的 气体	10^{-3}	10^{-1}	10^{-4}
超临界流体	$0.3 \sim 0.8$	$10^{-3} \sim 10^{-4}$	$10^{-4} \sim 10^{-2}$
液体	1	$< 10^{-5}$	10^{-2}

了 SFC 的方法，研究了二氧化碳、异丙醇、正戊烷等作流动相的问题，并以此技术分析了多环芳烃、抗氧化剂、染料和环氧树脂等样品。60 年代末由于 Giddings 的卓越的工作，揭示了 SFC 在各方面的应用潜力，使它显示出光辉的应用前景。但是由于当时 HPLC 正在发展，同时在使用超临界流体时遇到了一些实验方面的问题，所以发展较慢。直到 80 年代初出现了毛细管超临界流体色谱，使 SFC 焕发出新的光辉，得到了日趋完善的程度。

三、超临界流体色谱的一般流程

SFC 的一般流程及部件组成如图 3-10 所示^[4]，超临界状态流体源 (CO_2) 在进入高压泵之前要进行预冷却。高压泵把液态流体经脉冲抑制器注入在恒温箱中的预柱，在预柱中形成超临界状态流体，然后进入色谱柱。要保持 SFC 系统的压力，在排气口处装限流器（多用一定长度的毛细管）。最常用的 SFC 的流动相是 CO_2 ，也有用 N_2O 、 C_5H_{12} 、 SF_6 、 Xe 、 CCl_2F_2 、 CHF_3 、甲醇、乙醇、乙醚的。

第二节 超临界流体色谱原理和仪器

一、超临界流体色谱的原理

SFC 是指用超临界流体做流动相，以固体吸附剂（如硅胶）或键合到载体（或毛细管壁）上的高聚物为固定相的色谱，混合物在 SFC 上分离的机理和气相及液相色谱一样，即基于各化合物在两相间分配系数的不同而得到分离。SFC 也分为填充柱 SFC 和毛细管柱 SFC。

二、SFC 仪器的结构

1. 高压泵

如为毛细管 SFC, 需要低流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$) 无脉冲的注射泵, 为了控制泵的流量和压力, 通过电子压力传感器和流量检测器, 用计算机控制, 程序地改变流动相的密度和流量。

2. 色谱柱

填充柱 SFC 可以用液相色谱柱; 毛细管 SFC 可以用交联的气相毛细管色谱柱。一些厂家有专用于 SFEC 的毛细管柱。

3. 检测器

气相及液相色谱所用的检测器在一定条件下都可以使用。常用的是 FID。

(1) 使用液相色谱检测器 在进入检测器之前把超临界状态转变为液态, 可增加检测器的灵敏度, 使谱带变窄, 而且可以在室温下操作。UV 检测器是液相色谱中使用最多的检测器, 在 SFC 中也使用较多。如为毛细管 SFC, UV 检测器的流通池由一段熔融石英毛细管做成, 管外的聚亚胺涂层剥去使光通过, 这段毛细管柱的体积只有 200nL, 这样就不会影响柱效。荧光检测器也可以这样使用。

(2) 使用气相色谱检测器 多用 FID, 超临界状态的流动相在进入 FID 之前要通过限流器变为气体, FID 对小分子量化合物可得到很好的结果, 对分子量大的化合物常得不到单峰, 而是一簇峰。如把检测器加热可使分子量大于 2000 的化合物获得满意的结果。在 SFC 中也可以使用氮磷检测器和火焰光度检测器。

三、SFC 仪器的性能

用 90 年代商品 SFC 仪器做典型, 列出它的性能。

(1) 高压泵 容积为 150mL 的注射泵, 用计算机控制流动相的密度梯度, 还可以串联另一个泵使泵容积增大到 300mL, 流量 1~4000 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

(2) 柱箱 室温~450 $^{\circ}\text{C}$, 配低温系统可在 -50 $^{\circ}\text{C}$ 下工作。

(3) 检测器 可以更换各种检测器, FID、NPD 配有陶瓷火焰喷嘴, 适于高温下使用。

第三节 超临界流体色谱的色谱柱

一、超临界流体色谱填充柱

虽然在 80 年代初主要是发展了毛细管超临界流体色谱,但是填充柱超临界流体色谱也相应地得到发展。而填充柱超临界流体色谱柱,几乎使用了所有的反相和正相高效液相色谱键合相填料,硅胶和烷基键合硅胶是使用最多的,正相色谱填料中的二醇基、腈基键合硅胶也有不少应用。

在超临界流体色谱中,流动相的密度对保留值有很大的影响,溶质的保留性能要靠流动相的压力来调节。在填充柱超临界流体色谱中,由于它的柱压降很大,比毛细管柱要大 30 倍,因而在填充柱超临界流体色谱柱的入口和出口处,其保留值有很大差别。也就是说在柱头由于流动相的密度大,溶解能力大,而在柱尾则溶解能力变小。但是超临界流体密度受压力的影响在临界压力处最大,超过此点以后影响就不是太大,所以在超过临界压力 20% 的情况下,柱压降对填充柱超临界流体色谱结果的影响就不大了。

在填充柱超临界流体色谱中,由于色谱柱的相比小,固定相和样品接触和作用的几率比较大,所以要针对所分析的样品很好地选择固定相。在用填充柱超临界流体色谱分析极性和碱性样品时,常会出现不对称峰,这是由于填料的硅胶基质残余羟基所引起的吸附作用。如果使用“封端”填料制成的色谱柱就会在一定程度上解决这一问题。但是由于基团的立体效应,不可能把硅胶表面所有的硅醇基全部反应。有人用各种齐聚物和单体处理硅胶,并把这些齐聚物和单体聚合固定化到硅胶表面上,这样就大大改善了色谱峰的不对称现象。

在超临界流体色谱的填充柱中也有用微填充柱的,填充 $3 \sim 10\mu\text{m}$ 的填料,内径几个毫米。还有用内径为 0.25mm 的毛细管柱填充 $3 \sim 10\mu\text{m}$ 的填料的毛细填充柱。

常用的化学键合相的性质见表 10-2。

二、超临界流体色谱毛细管柱

在毛细管超临界流体色谱中使用的毛细管柱,主要是细内径的毛

表 10-2 常用的化学键合相的性质

填料性能	填 料 性 能 参 数
官能团	烷基 (C ₁₈ , C ₈ , C ₁)、苯基、氨基、腈基、二醇基、全氟烷基
粒 度	3~10 μ m
比表面	50~5000m ² /g
孔 径	5~50nm
孔隙度	20%~70%

细管柱, 内径为 50 μ m 和 100 μ m, 由于超临界流体色谱的流动相是有溶解能力的流体, 所以毛细管柱内的固定相必须进行交联。所涂渍的固定相有聚二甲基硅氧烷 (OV-1, OV-101, 键合相 BD-1 等); 苯基甲基聚硅氧烷; 二苯基甲基聚硅氧烷; 含乙烯基的聚硅氧烷 (如 SE-33, SE-54); 正辛基、正壬基聚硅氧烷。在手性分离中使用接枝了手性基团的聚硅氧烷。

第四节 超临界流体色谱的流动相和改性剂

一、超临界流体色谱的流动相

1. SFC 和 GC、HPLC 方法的比较

超临界流体色谱的特点就在于使用了超临界流体作流动相, 正是由于这一流体有它优越于一般气体或液体的地方, 就使超临界流体色谱具有自己的特点。我们比较一下气相色谱和液相色谱的优缺点, 再考察一下超临界流体色谱的特点, 就可以看出超临界流体色谱正好弥补了前二者的弱点。如图 10-2。

2. 超临界流体的溶解性能

超临界流体色谱流动相的特点, 主要在于它在不同压力下有不同的溶解各种样品的能力。溶剂的溶解能力常常用溶解度常数 δ 来描述。溶解度常数 δ 的定义是

$$\delta = \sqrt{\frac{E}{v}} \quad (10-1)$$

式中 E 是分子的摩尔内聚能; v 是分子的摩尔体积。

而 δ 和化合物的临界参数的关系为:

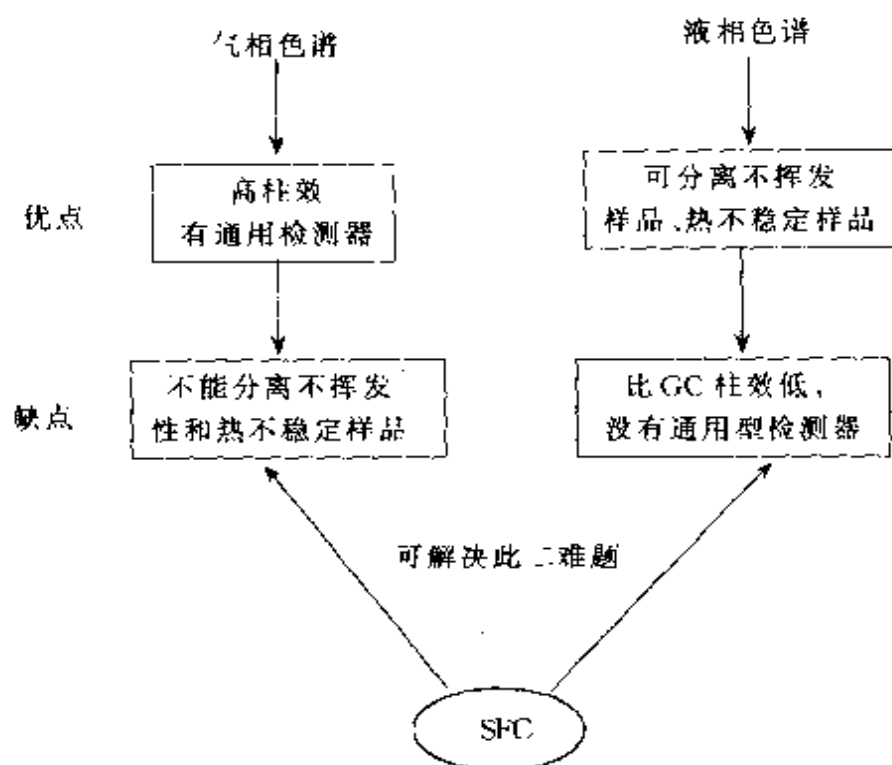


图 10-2 GC、HPLC和 SFC的优缺点

$$\delta = 1.25 \sqrt{P_c} \cdot \frac{\rho}{\rho_l} \quad (10-2)$$

式中, P_c 是临界压力; ρ 是和 P_c 对应的密度, ρ_l 是化合物在液态下的密度。

式 (10-2) 中的 $1.25 \sqrt{P_c}$ 项称化学效应项, 它和分子里内部作用力有关, 而 $\frac{\rho}{\rho_l}$ 项称为状态效应项, 它和分子的摩尔体积有关。从 (10-2) 式可以看出 δ 随超临界流体密度的增加而增加, 研究经验表明: 当两组分的 δ 之差的绝对值 $\leq 2.04 \text{MPa}^{\frac{1}{2}}$ 时, 二者的互溶性就好, 或者说二组分的 δ 越接近, 其互溶性就越好。对二氧化碳超临界流体的 δ 可用式 (10-3) 计算。

$$\delta = 8.54\rho \quad (10-3)$$

计算误差约为 10%。

3. SFC 使用的超临界流体

SFC 可以使用的超临界流体列于表 10-3 中。二氧化碳是最常用的超临界流体, 所以如此, 是因为它的临界温度低, 临界压力适中,

表 10-3 SFC 使用的超临界流体

超临界流体	$T_c/^\circ\text{C}$	P_c/MPa	$\rho_c/(\text{g}/\text{cm}^3)$	$\delta/\text{MPa}^{-0.5}$
二氧化碳	31.05	7.29	0.466	15.3
氧化亚氮	36.4	7.15	0.452	14.7
六氟化硫	45.5	3.71	0.738	11.3
氙	16.5	5.76	1.113	12.5
乙 烯	9.2	4.97	0.217	11.9
乙 烷	32.2	4.82	0.203	11.9
正丁烷	152.0	3.75	0.228	10.8
异丁烷	134.9	3.6	0.221	—
正丙烷	196.5	3.33	0.237	11.3
正己烷	234.2	2.93	0.233	10.0
乙 醚	193.5	3.59	0.265	15.1
四氢呋喃	267.0	5.12	0.322	—
乙酸乙酯	250.1	3.78	0.308	18.6
乙 腈	274.8	4.77	0.253	24.3
甲 醇	239.4	7.99	0.272	29.7
2-丙醇	235.1	4.70	0.273	—
氨	132.4	11.13	0.235	19.0
水	374.1	21.76	0.322	47.5

是无毒、不可燃又便宜的气体，但是二氧化碳并不是 SFC 理想的超临界流体，主要是它的极性太弱，对一些极性化合物溶解能力差，在表 10-3 的下半部分是极性的超临界流体。人们早就认识到氨是很有潜力的超临界流体，但在实际应用中不受人们重视，因为它的溶解能力太强，就连固定相和一些仪器的部件也能溶。在实际使用中仍然以二氧化碳为最多。有人进行过系统的研究认为下列的常用超临界流体的溶解能力在相同的压力下次序为：

乙烷 < 二氧化碳 < 氧化亚氮 < 三氟甲烷

在同样情况下分离能力按下列次序增加：

二氧化碳 < 氧化亚氮 < 三氟甲烷 $\approx$ 乙烷

早期的萃取研究表明，选择 SFC 流动相的另一个着眼点是和检测器相适应，如果使用 UV 检测器，上述超临界流体均可使用。如果考虑到使用 FID，流动相要不可燃，只有二氧化碳、六氟化硫和氙可

以使用。氙在使用红外检测器时合适，因为它是惰性气体在检测波长处无吸收。另外在 SFC/MS 联用可用氙作流动相。二氧化碳是一种非极性溶剂，低分子量和非极性化合物（密度到 400g/mol）可以在超临界二氧化碳流体中溶解，当极性和分子量增加时溶解度就下降。表 10-4 是各种物质在超临界二氧化碳流体中的溶解度。

表 10-4 各种物质在超临界二氧化碳流体中的溶解度

可溶解的化合物	可部分溶解	在 CO ₂ 中的溶解度 w/% ^①	不溶解的化合物
Sn (II) Cl	水	0.1	尿素
苯	碘	0.2	甘氨酸
吡啶	萘	2.0	苯乙酸
乙酸	苯胺	3.0	丁二酸
甘油二乙酸酯	邻硝基苯及醚	2.0	羟基丁二酸
乙醇	乳酸	0.5	酒石酸
己醇	甘油三乙酸酯	1.0	葡萄糖
苯甲醇	甘油	0.05	蔗糖
樟脑	正癸醇	1.0	
柠檬烯			

① w 为质量分数。

二、SFC 超临界流体的改性剂

由于 CO₂ 是非极性溶剂，为了在 SFC 中增加流动相对极性化合物的溶解和洗脱能力，常常往 CO₂ 中加入少量（1%～5%）极性溶剂，最常用的改性剂是甲醇，其次是其他脂肪醇，表 10-5 中列出的是有人研究过的 CO₂ 改性剂，以及与之匹配的检测器。

表 10-5 CO₂ 改性剂

CO ₂ 改性剂	检测方法	CO ₂ 改性剂	检测方法
甲醇 ^①	UV, MS, FID	乙 醇	UV, MS
脂肪醇	UV, MS	二氯甲烷	UV, MS
四氢呋喃	UV, MS	甲 酸	UV, MS, FID
2-甲氧基乙醇	UV	二硫化碳	UV, MS, FID
脂肪醚	UV	水	UV, MS, FID
二甲基亚砷	UV		

①流动相中甲醇含量小于 1% 时有用 FID 的。

第五节 超临界流体色谱的应用

一、填充柱和毛细管柱 SFC 的应用

经过多年的研究, 填充柱和毛细管柱 SFC 在许多方面得到应用, 如烷烃、多环芳烃混合物的分析, 石油和煤组分的分离, 聚苯乙烯齐聚物的分离, 聚硅氧烷类物质的分离, 汽油的族分离, 饮料中咖啡因的分析, 火药中安定剂的分析, 氨基酸的分离, 液晶的分离, 二茂铁衍生物和 β -二酮金属配合物的分离等。

二、SFC 的应用示例

1. 聚苯醚低聚物的分离

聚丙醚齐聚物样品的平均分子量为 25u, 分离用:

色谱柱: $10\text{m} \times 63\mu\text{m i.d.}$ 毛细管柱, 固定相是 DB-1 (键合二甲基聚硅氧烷), 固定相膜厚 $0.25\mu\text{m}$ 。

流动相: CO_2 。

柱温: 120°C 。

程序升压: 在 12MPa 10min 恒压后, 从 12MPa 以 0.15MPa/min 速度升压到 22MPa 。得到如图 10-3 的色谱图。

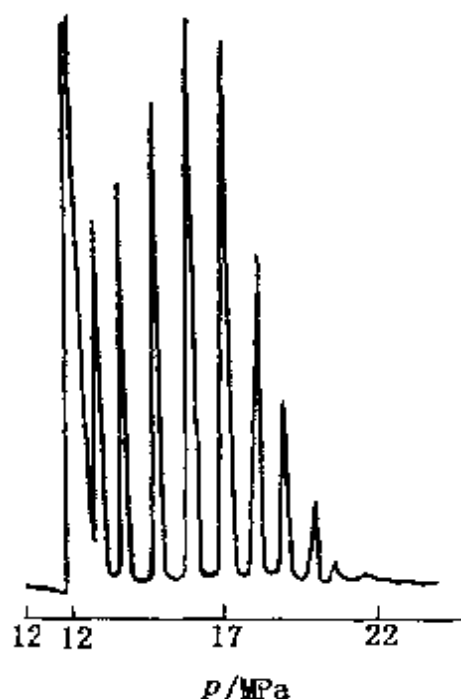


图 10-3 SFC 分离聚苯醚齐聚物的色谱

2. 分离柴油中的芳烃组分

色谱柱: $20\text{m} \times 50\mu\text{m i.d.}$, 固定液膜厚度 $0.25\mu\text{m}$ 。

柱温: 60°C 。

流动相: 二氧化碳。

检测器: FID。

色谱图: 见图 10-4。

3. 甘油三酸酯的分离

甘油三酸酯是较难分离的混合物, 图 10-5 是用毛细管 SFC 分离四种甘油三酸酯的色谱图。这四个甘油三酸酯分子上的羧基基团都是

18 个碳，只是双键的数目和位置不同。分离它们的色谱条件如下。

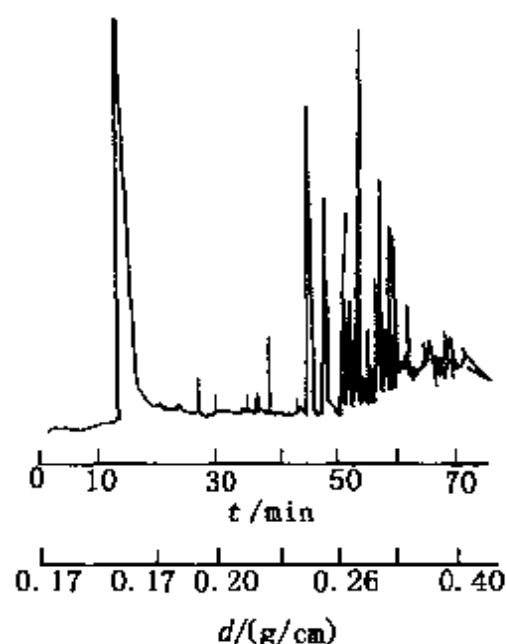


图 10-4 柴油中的芳烃
组分分离 SFC 色谱

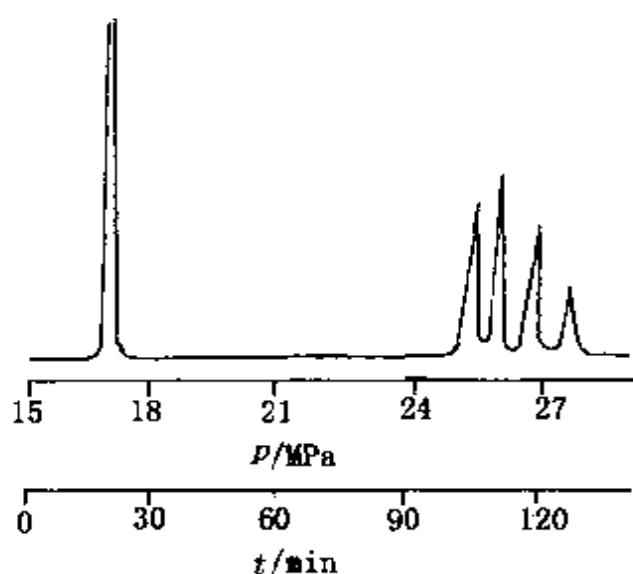


图 10-5 用毛细管 SFC 分离
四种甘油三酸酯

色 谱 柱：涂有 DB-225 的毛细管 SFC 色谱柱。

色谱条件：从 15MPa 程序升压到 27MPa，要 2.5h 才分离完。

参 考 文 献

- 1 孙传经. 毛细管色谱法. 北京: 化学工业出版社, 1991
- 2 周良模等. 气相色谱新技术. 北京: 科学出版社, 1994
- 3 傅若农. 国外分析仪器—技术与应用. 1995 (4): 1~9
- 4 Smish R M. Supercritical Fluid Chromatography. England: Royal Society of Chemistry, 1988

第十一章 高效毛细管电泳

第一节 概 述

色谱科学自从 1903 年俄国的茨维特发明了液固柱色谱之后,已有近 100 年的历史,但是在 20 世纪末的 20 年以前所未有的速度发展,特别是进入生命科学、材料科学和信息科学时代,对分离分析提出越来越高的要求。气相色谱法(GC)虽然分离效率、选择性、灵敏度都很高,但是它只适用于热稳定性好、易挥发的物质。高效液相色谱法(HPLC)虽然不受热稳定性及挥发性的限制,可以分析热稳定性差、难挥发的物质,但是和 GC 相比,缺乏灵敏的通用型检测器,实验中需消耗大量的有机溶剂,特别是对于大分子物质因其分子扩散系数小、传质阻力大,使柱效率大大降低,以至于难以分离分子量大于 2000 的物质。经典电泳技术虽然和离心法、色谱法一起成为分离生物高聚物最有效和最广泛应用的三大方法,对生物化学的发展起了重要的推动作用,但是这些电泳技术操作烦琐、费时、定量困难,也很难满足现代生命科学研究的要求。Jorgeson 和 Lukacs 在充分研究电泳理论、技术的基础上,将色谱理论和电泳技术相结合,于本世纪 80 年代初从理论和实际两个方面发展了高效毛细管电泳,并迅速在全球范围掀起研究热潮。现在,高效毛细管电泳已经成为分离科学领域中极为重要的前沿课题之一。

一、高效毛细管电泳的发展^[1,8]

早在 1808 年,俄国物理学家 Von Reus 首次发现粘土颗粒的电迁移现象,并开始研究带电粒子在电场中的电迁移行为,测定它们的迁移速度。但是,把电泳作为一种分离分析技术还是在 1907 年,Field 和 Teagua 用电泳理论作指导,研究设计出填充有琼脂糖凝胶的桥管,成功地分离了白喉毒素和它的抗体。1937 年,瑞典科学家 Tiselius 将

蛋白质混合液放在两段缓冲溶液之间，两端加电压进行自由溶液的电泳，第一次将从人血清提取的蛋白质混合液分离出白蛋白和 α -、 β -、 γ -球蛋白，并发现样品的迁移方向和速度决定于它所带的电荷和淌度。Tiselius 制成第一台电泳仪并进行了第一次自由溶液电泳，使电泳作为分离分析技术有了突破性的进展。Tiselius 对电泳技术的发展和應用所做的巨大贡献，使他获得了 1948 年诺贝尔化学奖。

自由溶液电泳的分离效率受焦耳热的限制，只能在低电场强度下进行操作，使分析时间和分离效率很低。为解决电泳的介质对流及散热问题，人们又进行了多方探索。Hjerter 最早提出了用小内径管在高电场下进行自由溶液的电泳，用以降低焦耳热，他在 1967 年的文章中报道了使用慢速旋转的内径为 3mm 的石英玻璃管进行自由溶液电泳，以 UV 进行检测，成功地分离了无机离子、有机离子、蛋白质、多肽、核酸、病毒以及细菌，证明了他的设想。Virtanen 系统地研究了在玻璃及聚四氟乙烯的 200~300 μ m 内径的毛细管中进行电泳分离，并指出用细内径柱进行电泳的优点，即可以减小对流和热扩散。Everaerts 在高电压下进行等速电泳并于 70 年代初发表了专著《等速电泳》，提出用毛细管进行电泳的基本原理和在线检测方法，并在等速电泳系统上获得了区带电泳的结果。1979 年 Everaerts 和 Mikker 又发表了有关区带电泳理论的文章，提出用毛细管来抑制对流和增强散热效果的方案，并用内径 200 μ m 的聚四氟乙烯管以毛细管区带电泳方式成功地分离了 16 种有机酸，用 UV 和电导进行检测，使理论塔板数达到 18 块/m。这实际上是毛细管电泳的开创性的工作。但是由于检测器灵敏度的限制，进样量大，导致峰形不好，他们的工作还没有引起人们的重视。1981 年 Jorgenson 和 Luckas 发表了划时代的研究工作，用 75 μ m 内径石英毛细管进行电泳，电迁移进样，以灵敏的荧光检测器进行柱上检测，使丹酰化氨基酸高效、快速分离，峰形对称，达到 400000 块/m 理论塔板数的高效率，并进一步研究了影响区带加宽的因素。Jorgenson 等人的开创性工作，使电泳这一古老技术发生了根本变革，从此跨入高效毛细管电泳的新时代。

毛细管电泳有影响的历程如表 11-1 所示。

表 11-1 毛细管电泳重要发展历程

年代	取得的成就	文献
1967	最早证明可以把高电场用于细内径 (3mm, i.d.) 的毛细管电泳	11
1974	阐明电渗流就像泵一样可驱动液体流过毛细管	12
1974	说明使用更细内径 (50~200 μm , i.d.) 的毛细管做毛细管电泳的优点	13
1979	使用细内径 (200 μm , i.d.) 太氟隆毛细管, 进行毛细管电泳, 获得小于 10 μm 理论塔板高度的柱效	14
1981	进一步使用细内径 (75 μm , i.d.) 的毛细管和高电场进行毛细管电泳, 首次获得了很高的柱效, 大大推动了毛细管电泳的发展	15
1984	提出了胶束毛细管电动色谱, 使毛细管电泳可以分离中性物质	16
1987	阐明用小内径毛细管可以进行毛细管凝胶电泳	17
1989	商品毛细管电泳问世	8

二、高效毛细管电泳的特点

高效毛细管电泳 (High Performance Capillary Electrophoresis, 缩写为 HPCE) 是指溶质以电场为推动力, 在毛细管中按淌度差别而实现的高效、快速分离的新型电泳技术。和传统电泳技术及现代色谱相比, HPCE 的突出特点是:

①仪器简单, 操作方便, 容易实现自动化。简易的高效毛细管电泳仪器组成极其简单 (如图 3-11), 只要有一个高压电源、一根毛细管、一个检测器和两个缓冲溶液瓶, 就能进行高效毛细管电泳实验。

②分离效率高, 分析速度快。由于毛细管能抑制溶液对流, 并具有良好的散热性, 允许在很高的电场下 (可达 400V/cm 以上) 进行电泳, 因此可在很短时间内完成高效分离。例如可以在 3.1min 内分离 36 种无机及有机阴离子。把碱金属和镧系元素的 24 种阳离子完全分离仅需 4.1min, 分离效率可达 $10^5 \sim 10^7$ 块/m。

③操作模式多, 分析方法开发容易。只要更换毛细管内填充溶液的种类、浓度、酸度或添加剂等, 就可以用同一台仪器实现多种分离模式。

④实验成本低, 消耗少。因为进样为纳升级或纳克级; 分离在水

介质中进行,消耗的大多是价格较低的无机盐类;毛细管长度仅50~70cm,内径20~75 μm ,容积仅几微升。

⑤应用范围极广。由于HPCE具有高效、快速、样品用量少等特点,所以广泛用于分子生物学、医学、药学、材料学以及与化学有关的化工、环保、食品、饮料等各个领域,从无机小分子到生物大分子,从带电物质到中性物质都可以用HPCE进行分离分析。

三、毛细管电泳的几种模式

1. 毛细管区带电泳

毛细管区带电泳(Capillary Zone Electrophoresis,简称CZE)是指溶质在毛细管内的背景电解质溶液中以不同速度迁移而形成一个独立的溶质带的电泳模式,其分离基础是淌度的差别。

毛细管区带电泳的突出特点是简单,但是因为中性物质的淌度差为零,所以不能分离中性物质。CZE模式是HPCE中最简单、应用最广的一种操作模式,是其他操作模式的基础。

2. 胶束电动色谱

胶束电动色谱(Micelle Electrokinetic Chromatography,简称MECC或MEKC)是1984年日本京都大学Terabe(寺部茂)创立的一种HPCE模式。这种模式把电泳与色谱相结合,其突出特点是只能分离离子型化合物的电泳变成不仅可分离离子型化合物,而且也能分离中性化合物。从而大大拓宽了电泳的应用范围。

MEKC的实验操作与CZE相同,唯一差别是在操作缓冲溶液中加入大于临界胶束浓度(C_{mc})的表面活性剂。

3. 毛细管凝胶电泳

毛细管凝胶电泳(Gel Capillary electrophoresis,简称GCE)是毛细管内填充凝胶或其他筛分介质,如交联或非交联的聚丙烯酰胺。电荷/质量之比相等但分子的大小不同的分子,在电场力的推动下经凝胶聚合物构成的网状介质中电泳,其运动受到网状结构的阻碍。大小不同的分子经过网状结构时受阻力不同,大分子受到的阻力大,在毛细管中迁移的速度慢;小分子受到的阻力小,在毛细管中迁移的速度快,从而使它们得以分离。

4. 毛细管等电聚焦

等电聚焦 (Capillary Isoelectric Focusing 简称 CIEF) 是一种根据等电点差别分离生物大分子的电泳技术, 等电聚焦电泳在毛细管中进行, 就是毛细管等电聚焦 (Capillary Isoelectric Focusing 简称 CIEF)。两性物质以电中性状态存在时的 pH 值叫等电点, 用 pI 表示。如氨基酸、蛋白质、多肽等在其等电点时为电中性, 淌度为零, 溶解度最小。当所处环境的 pH 值大于其等电点时, 两性物质以带负电形式存在; 当所处环境的 pH 值小于其等电点时, 两性物质以带正电形式存在。利用两性物质等电点时呈电中性、淌度等于零的特性, 建立了等电聚焦电泳。

所谓“聚焦”是当两性物质在毛细管中形成 pH 梯度时, 不同等电点的溶质在外电场的作用下, 分别向其等电点的 pH 范围迁移, 此过程叫聚焦。当溶质迁移到等于其等电点的 pH 范围时, 就不再移动, 形成一个很窄的溶质带。由于不同两性物质的等电点不同, 聚焦的 pH 范围不同, 可以形成一个个独立的溶质带而彼此分开。

5. 毛细管等速电泳

等速电泳 (ITP) 是 70 年代发展起来的一种电泳技术。用毛细管进行等速电泳, 就是毛细管等速电泳 (Capillary Isotachopheresis 简称 CITP)。用两种淌度差别大的缓冲体系分别构成前导离子和尾随离子, 将试样像夹心饼干一样夹在二者之间, 在一次电泳中可以同时分离正离子或负离子。

一般前导电解质用淌度大于试样中所有负离子的电解质组成, 尾随离子由淌度小于试样中所有负离子的电解质组成。所有溶质都按前导离子的速度等速前移。由阴极进样, 阳极检测。当加电压后, 所有负离子都向阳极迁移。因前导离子淌度最大, 迁移最快, 走在最前, 其后是淌度次之的负离子, 他们都以前导离子速度迁移, 并逐渐形成独立的溶质区带而得到分离。

6. 毛细管电色谱

毛细管电色谱 (Capillary electrochromatography 简称 CEC) 是把毛细管电泳和毛细管液相色谱结合起来的--种分离技术, 是用装有固

定相的毛细管柱（或有固定相涂层的空心毛细管柱）以电渗流为驱动力，使样品在两相间进行分配的色谱。普遍使用的是装 ODS 的毛细管填充柱（50~100 μm ）装在毛细管电泳仪上，以电渗流作驱动力，让样品在固定相和流动相之间进行分配。也有把泵和电渗流同时作驱动力的电色谱。

第二节 高效毛细管电泳的理论

一、电泳法的基本原理

当带电粒子以速度 v 在电场中移动时，所受的电场力为

$$F_E = qE \quad (11-1)$$

式中 F_E ——电场力；

q ——溶质粒子所带的有效电荷；

E ——电场强度。

带电粒子运动时所受的阻力，即为摩擦力，

$$F = fv \quad (11-2)$$

式中 F ——摩擦力；

f ●——摩擦系数；

v ——溶质粒子在电场中的迁移速度。

当平衡时，电场力和摩擦力相等而方向相反，

$$qE = fv \quad (11-3)$$

$$\text{所以} \quad v = \frac{qE}{f} = \frac{q}{4\pi r\eta} E \quad (11-4)$$

$$\text{或} \quad v = \frac{qE}{f} = \frac{q}{6\pi r\eta} E \quad (11-5)$$

从式 (11-4) 或 (11-5) 可知，荷电粒子的电泳速度除与电场强度成正比外，还与其有效电荷成正比，与其表观液态动力学半径 (r) 以及介质粘度 (η) 成反比。不同物质在同一电场中，由于它们

● f 的大小和荷电粒子的大小、形状以及介质粘度有关。对于球形粒子， $f = 6\pi r\eta$ ；对于棒状粒子， $f = 4\pi r\eta$ （其中 r 是溶质粒子的表观液态动力学半径； η 是电泳介质的粘度）。

的有效电荷、形状、大小的差异，它们的电泳迁移速度不同，所以可能分离。也就是说，物质粒子在电场中迁移速度的不同是电泳分离的基础。

二、毛细管电泳中电渗现象和电渗流

(一) 电渗现象

当固体与液体相接触时，如果固体表面因某种原因带一种电荷，则因静电引力使其周围液体带另一种电荷，在固液界面形成双电层，二者之间有电势差。当液体两端施加电压时，就会发生液体相对于固体表面的移动。把这种液体相对于固体表面移动的现象叫电渗现象。

电渗现象中液体的整体流动叫电渗流 (electroosmotic flow, 简称 EOF)。

(二) 电渗流

目前，高效毛细管电泳中所用的毛细管绝大多数是石英材料。当石英毛细管中充入 pH 大于或等于 3 的电解质溶液时，管壁的硅羟基 (—SiOH) 开始部分解离成 —SiO^- ，使管壁带负电荷。由于静电引力， —SiO^- 将把电解质溶液中的阳离子吸引到管壁附近，并在一定距离内形成阳离子相对过剩的扩散双电层，见图 11-1。这样，就好像带负电荷的毛细管内壁有一个圆桶形的阳离子鞘。

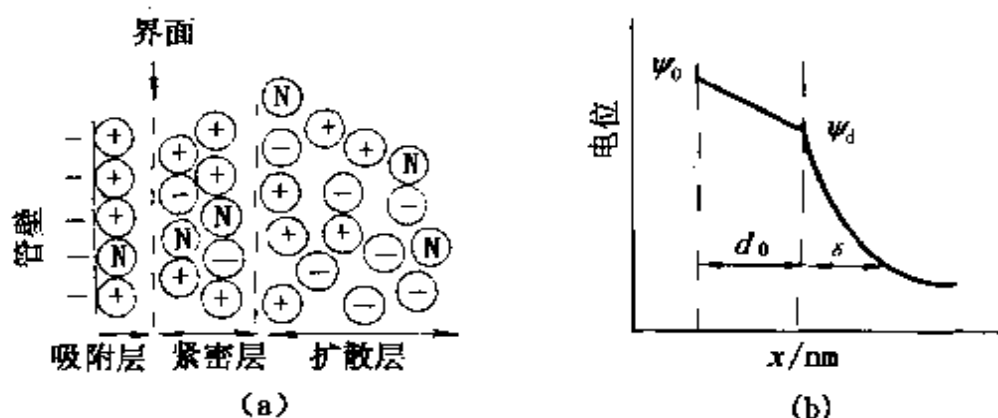


图 11-1 毛细管内壁的双电层 (a) 及其电势分布 (b)

在外电场的作用下，带正电荷的溶液表面及扩散层的阳离子向阴极移动。由于这些阳离子实际上是溶剂化的（水化的），它们将带着毛细管中的液体一起向阴极移动，这就是毛细管电泳中的电渗现象。

在电渗力驱动下毛细管中整个液体的流动，叫毛细管电泳中的电渗流。

电渗流是毛细管电泳中非常重要的物理现象，其大小直接影响分离情况和分析结果的精密度和准确度。

1. 电渗流的大小和方向

电渗流的大小用电渗流速度 v_{eo} 表示。电渗流速的大小决定于电渗淌度 μ_{eo} 和电场强度 E 。即：

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E \quad (11-6)$$

电渗淌度 μ_{eo} 决定于电泳介质及双电层的 Zeta 电势，即

$$\mu_{eo} = (\epsilon_0 \epsilon \xi) / \eta \quad (11-7)$$

式中 ϵ_0 ——真空介电常数；

ϵ ——电泳介质的介电常数；

ξ ——毛细管壁的 zeta 电势，它近似等于扩散层与吸附层界面上的电位。

zeta 电势为：

$$\xi = (4\pi\delta e) / \epsilon \quad (11-8)$$

式中 e 是毛细管内壁扩散层单位面积的过剩电荷数； δ 是扩散层厚度，其大小和溶液组成、离子强度有关。溶液离子强度越大，扩散层厚度越薄。对于二元电解质溶液，扩散层厚度和离子强度有如下近似关系：

$$\delta = 3 \times 10^7 \cdot \frac{1}{|Z| \times \sqrt{c}} \quad (11-9)$$

式中 c ——电解质溶液浓度；

Z ——价电子数。

在实际电泳分析中，电渗流速度 v_{eo} 可以通过实验测定，按下式计算：

$$v_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}} \quad (11-10)$$

式中 L_{ef} ——毛细管的有效长度，即毛细管的进样端到检测器的距离；

t_{eo} ——电渗流标记物（中性物质）的迁移时间。

电渗流的方向决定于毛细管内壁表面电荷的性质。一般情况下,石英毛细管内壁表面带负电荷,电渗流方向为由阴极到阳极。但是如果将毛细管壁表面改性,比如在壁表面涂渍或键合一层阳离子表面活性剂,或者在内充液中加入大量的阳离子表面活性剂,将使石英毛细管壁表面带正电荷。壁表面正电荷因静电引力吸引溶液中的阴离子,使溶液表面带负电荷,在外电场力的作用下,整个液体向阳极流动,即电渗流的方向由阴极流向阳极。

2. 电渗流的流型

由于毛细管内壁表面扩散层的过剩阳离子均匀分布,所以在外电场力驱动下产生的电渗流为平流,即塞式流动。液体流动速度除在管壁附近因摩擦力迅速减小到零以外,其余部分几乎处处相等。这一点和 HPLC 中靠泵驱动的流动相的流型完全不同,图 11-2 表示 HPCE 中电渗流与 HPLC 中流动相的流型及它们对区带展宽的影响。

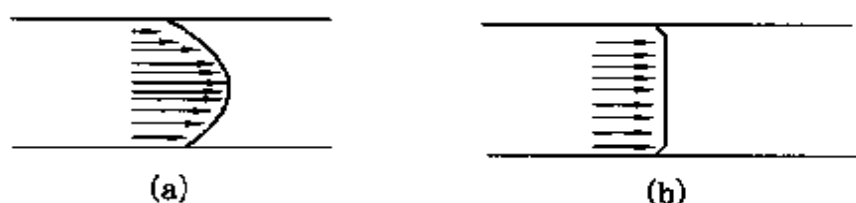


图 11-2 电渗流与高效液相色谱流动相的流型以及它们引起样品的区带展宽

(a) 压力驱动流型; (b) 电渗流驱动流型

从图 11-2 看出,高效液相色谱流动相的流型是抛物线形的层流,在管壁处的速度为零,管中心的速度为平均速度的 2 倍,所以层流引起的区带展宽明显。而毛细管电泳中的电渗流是平流流型,几乎不引起样品的区带展宽。电渗流呈平流是毛细管电泳能获得高分离效率的重要原因。

3. 电渗流的作用

电渗流是伴随电泳而产生的一种电动现象。一般情况下,电渗流流向阴极,电渗流速度约等于一般离子电泳速度的 5~7 倍。所以,各种电性物质在毛细管中的迁移速度为

$$v^+ = v_{eo} + v_{ef} \quad (11-11)$$

$$v = v_{eo} - v_{ef} \quad (11-12)$$

$$v^0 = v_{eo} \quad (11-13)$$

可见，在一般情况下电渗流可以带动阳离子、阴离子和中性物质以不同的速度从阴极端流出毛细管。所以说，电渗流在 HPCE 的分离中起着极其重要的作用：

①电渗流在毛细管电泳中起到像 HPLC 中泵一样的作用，在一次电泳操作中可以同时完成阳离子、阴离子的分离。

②改变电渗流的大小或方向，可以改变分离效率和选择性，这是 HPCE 中优化分离的重要因素。

③电渗流明显影响各种电性物质在毛细管中的迁移速度，电渗流的微小变化就会影响 HPCE 分离测定结果的重现性。而电泳中影响电渗流的因素很多，所以控制电渗流恒定是电泳分析中极其重要的任务。

(三) 影响电渗流的因素

把公式 (11-7) 代入公式 (11-6)，可使电渗流速度表达式写为

$$v_{eo} = \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta} \cdot E \quad (11-14)$$

由公式 (11-14) 可知电渗流速度 (v_{eo}) 与电场强度 (E)、管壁 zeta 电势 (ζ)、电泳介质的介电常数 (ϵ, ϵ_0) 成正比关系，和电泳介质的粘度 (η) 成反比关系。而管壁 ζ 电势和毛细管的材料、表面特性、电泳介质的组成及性质有关。

(1) pH 值对电渗流速度的影响 在电泳介质中溶液的 pH 对电渗流速度有很大的影响，电渗流正比毛细管内壁的 ζ 电势。对于相同材料毛细管，管中溶液的 pH 值不同时，它们的表面电荷特性不同，毛细管壁的 ζ 电势不同，其电渗流的大小也不同。以常用的石英毛细管为例：当内充液的 pH 增高时，壁表面的硅羟基电离为带负电荷的 Si-O^- 数增多，使壁表面的负电荷密度增大，管壁 ζ 电势增大，电渗流增大；当溶液的 pH 达到 7 时，壁表面的硅羟基完全电离，使壁表面的负电荷密度达到最大，电渗流达到最大。随着溶液的 pH 减小，壁表面的硅羟基电离受到抑制，使壁表面的负电荷密度减

小, 管壁 ζ 电势减小, 电渗流减小; 当 pH 减小至 3 以下时, 壁表面带负电荷的 Si-O^- 完全被氢离子中和, 使壁表面呈电中性, zeta 电势趋于零, 电渗流也趋于零。因此溶液 pH 值的稳定, 对于保持电渗流稳定、保证电泳分离分析结果的重现性极为重要。所以, HPCE 操作必须在适当的缓冲溶液中进行。

(2) 介质成分和浓度对电渗流的影响 电泳介质的成分和浓度对电渗流有明显的影响, 由于各种阴离子的形状、大小、带电荷多少不同, 它们的电导率也不同。由不同阴离子构成的相同浓度的缓冲溶液, 在相同工作电压下毛细管中的电流会有很大差别, 使毛细管中的焦耳热不同, 毛细管中缓冲溶液温度不同, 粘度不同, 导致电渗流的大小也不同。表 11-2 是各种阴离子构成的缓冲溶液对电渗淌度的影响。

表 11-2 各种阴离子构成的缓冲溶液对电渗淌度的影响^①

阴离子	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	Cit^{3-}	Ac^-	PO_4^{3-}	HCO_3^-
测得电流/ μA	137.4	246.5	74.5	162.0	69.0
测得电渗流/ $(10^{-5}\text{cm}^2/\text{Vs})$	41.2	47.7	49.0	49.7	51.8

①测定条件: 缓冲溶液浓度 50mmol/L, 工作电压 20V。

(3) 离子强度对电渗流的影响 电泳介质的溶液离子强度影响壁表面双电层的厚度、溶液粘度和工作电流, 因而明显影响电渗流的大小。一般讲随着缓冲溶液离子强度增加, 不同缓冲溶液的电渗流都呈下降趋势。

(4) 温度对电渗流的影响 毛细管内的温度升高, 使溶液的粘度下降, 电渗流增大。

(5) 添加剂对电渗流有影响 为改善电泳分离的效率和选择性, 常常往缓冲溶液中加入某些添加剂, 如中性盐类、两性离子、表面活性剂、有机溶剂等, 把加入的试剂统称为缓冲溶液添加剂。当往缓冲溶液中加入浓度较大的中性盐类 (如 K_2SO_4) 时, 溶液离子强度增大, 使双电层的厚度压缩、变薄, 使 ζ 电势减小, 电渗流下降; 当加入两性离子 (如四甲基氯化铵) 时, 两性离子可使溶液粘度增大、

溶液 pH 值减小, 使 ζ 电势减小, 电渗流下降。

缓冲溶液中加入表面活性剂能够明显改变毛细管内壁表面的电荷特性, 从而可能改变电渗流的大小和方向。因静电引力, 阳离子表面活性剂可能被吸附到毛细管内壁表面, 中和部分带负电荷的 SiO^- , 使 ζ 电势减小, 电渗流下降; 当阳离子表面活性剂浓度增加到能全部中和带负电荷的 SiO^- 时, 使壁表面呈电中性, ζ 电势为零, 电渗流等于零; 当再增大阳离子表面活性剂浓度时, 壁表面带净的正电荷, 形成流向阳极的电渗流, 并且电渗流随着阳离子表面活性剂浓度增大而增大。

不同阳离子表面活性剂对电渗流的影响不同。烷基链越长, 阳离子表面活性剂对电渗流的影响越大。所以, 常用不同烷基链长的阳离子表面活性剂作电渗流改性剂, 通过改变阳离子表面活性剂的浓度或种类, 控制电渗流大小及方向。

加入阴离子表面活性剂, 如十二烷基硫酸钠 (SDS), 可以使壁表面负电荷增加, 使 ζ 电势增大, 电渗流增加。

有机溶剂对电渗流的影响也十分明显。一些有机溶剂可以使溶液的离子强度下降, 使双电层变厚, ζ 电势增大; 另外一些有机溶剂如甲醇、乙腈可以使溶液粘度变小, 都使电渗流增大。但是有时有机溶剂也可能通过氢键或偶极作用键合到管壁上, 使壁表面的净负电荷减小或改变双电层的局部粘度, 这些作用的结果又往往使电渗流减小。

(四) 高效毛细管电泳中电渗流的控制

有效地控制电渗流, 对于提高分离效率、改善分离度、尤其是提高电泳分离的重现性具有非常重要的意义。高效毛细管电泳中常用来控制电渗流的方法有:

①调节缓冲液 pH 值、改变缓冲溶液浓度或种类。

②加入添加剂, 改变电泳介质。但是在加入表面活性剂控制电渗流的大小或方向时, 应注意加入的浓度必须小于该表面活性剂的临界胶束浓度, 否则将改变毛细管电泳的操作模式。

③改变电泳介质温度。

④处理毛细管壁表面。用物理或化学方法使毛细管内壁改性, 改

变壁表面硅羟基数目，使壁表面电荷特征变化，可明显改变电渗流的大小或方向。

⑤在毛细管外部加一个电场来控制电渗流的大小或方向。

三、淌度

在电化学中把单位电场强度下的平均电泳速度称为物质粒子的电泳淌度 (electrophoretic mobility)，简称淌度，用 μ 表示，即：

$$\mu = v/E \quad (11-15)$$

所以， $\mu = q/6\pi\eta r$ 或 $\mu = q/4\pi\eta r$ (11-16)

对于给定的介质，溶质粒子的电泳淌度是该物质的特征常数。因此，电泳中常用淌度描述荷电粒子的电泳行为。

物质粒子在电场中的迁移速度决定于粒子淌度和电场强度的乘积，所以淌度不同是电泳分离的内因。物质所处的环境不同，其形状、大小及所带电荷多少都可能有差别，则淌度也可能不同。

1. 绝对淌度

绝对淌度是指无限稀释溶液中荷电粒子在单位电场强度下的平均迁移速度，简称淌度，用 μ_{ab} 表示。绝对淌度表示一种离子在没有其他离子影响下的电泳能力，是该离子在无限稀释溶液中的特征物理量。各种离子的绝对淌度可以在物理化学手册中查到。

2. 有效淌度

在实际工作中，不可能在无限稀释溶液中进行电泳，某种离子在溶液中不是孤立存在的，必然会受到其他离子的影响，其形状、大小及所带电荷多少都可能发生变化。把物质在实际溶液中的淌度叫做有效淌度。所以，有效淌度是指实验中测得的离子淌度，用 μ_{ef} 表示。有效淌度 μ_{ef} 和离子形状、离子半径、溶剂化作用、介质的介电常数、溶剂的粘度、离子的电荷数、离子的解离度以及溶液酸度、温度等因素有关，其大小可以用下述公式表示：

$$\mu_{ef} = \sum a_i \mu_i \quad (11-17)$$

式中， a_i 是溶质在所处条件下某解离状态的解离度， μ_i 是该物质解离状态 i 的绝对淌度。

物质的离解常数和溶液的 pH 值有关, 并且溶液 pH 值对不同物质的离解常数的影响不同, 不同物质的解离程度对溶液 pH 值的依赖程度也不同。因而从绝对淌度 μ_{ab} 相同看来似乎不能电离的两种物质, 通过调节溶液的 pH 值就有可能分离, 许多例子都可以证明绝对淌度和有效淌度之间有联系也有差别, 溶液 pH 值对于电泳分离效果有着重大影响。

3. 表观淌度 μ_{ap}

在 HPCE 中, 离子在电场中的迁移速度不仅决定于离子的有效淌度和电场强度, 而且还与电渗流速度有关。把离子在实际电泳中的迁移速度叫做表观迁移速度, 用 u_{ap} 表示, 则

$$u_{ap} = \mu_{ap} \cdot E \quad (11-18)$$

μ_{ap} 为离子的表观淌度。其大小等于离子的有效淌度和电渗淌度的矢量和, 即:

$$\mu_{ap} = (\mu_{ef} \pm \mu_{eo}) \quad (11-19)$$

不同物质在电泳中的表观淌度不同, 使它们的表观迁移速度不同, 因而得以分离。所以, 在 HPCE 中想办法使溶质的表观淌度有差别是至关重要的。

四、毛细管电泳的分析参数

1. 迁移时间

从加电压开始电泳到溶质到达检测器所需的时间叫该溶质的迁移时间 (也有叫做保留时间), 用 t 表示, 其表达式为

$$t = \frac{L_{ef}}{u_{ap}} = \frac{L_{ef}}{\mu_{ap} \cdot E} = \frac{L_{ef} L}{\mu_{ap} V} \quad (11-20)$$

式中 V ——外加电压;

L ——毛细管的总长度。

所以, 某离子的表观淌度 μ_{ap} 为

$$\mu_{ap} = \frac{L_{ef} L}{t V} \quad (11-21)$$

对于中性物质，其迁移时间为

$$t = \frac{L_{ef}}{v_{eo}} = \frac{L_{ef}}{\mu_{eo} \cdot E} = \frac{L_{ef} L}{\mu_{eo} V} \quad (11-22)$$

当分别测出阴、阳离子及中性物质的迁移时间时，由 (11-21) 或 (11-22) 式求出它们的表观淌度，再用 (11-11)，(11-12) 式分别求出它们的淌度。图 11-3 是典型的电泳图，其中各种物质的淌度计算结果示于表 11-3。

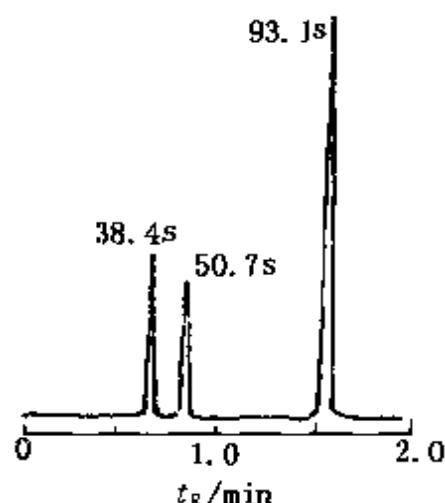


图 11-3 典型的电泳图

表 11-3 不同电性物质的 μ_{ap} 、 μ 计算示例

溶 质	迁移时间/s	$\mu_{ap}/(\text{cm}^2/\text{Vs})$	$\mu_{ef}/(\text{cm}^2/\text{Vs})$
阳离子	38.4	3.05×10^{-3}	7.40×10^{-4}
中性化合物	50.7	2.31×10^{-3}	2.31×10^{-3}
阴离子	93.1	1.25×10^{-3}	-1.06×10^{-3}

$$\text{阳离子 } \mu_{ap} = \frac{L_{ef} L}{t V} = \frac{50 \times 58.5}{38.4 \times 25000} \text{cm}^2/\text{Vs} = 3.05 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{Vs}$$

$$\text{中性物质 } \mu_{ap} = \mu_{eo} = \frac{L_{ef} L}{t V} = \frac{50 \times 58.5}{50.7 \times 25000} \text{cm}^2/\text{Vs} = 2.31 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{Vs}$$

2. 毛细管电泳柱效率

HPCE 中的柱效率用理论塔板数 N 表示。按色谱理论中的 Giddings 方程， N 定义为

$$N = \left(\frac{L_{ef}}{\sigma} \right)^2 \quad (11-23)$$

式中 L_{ef} ——溶质的迁移距离即毛细管的有效长度；

σ ——以标准偏差表示的组分峰宽度，它描述了溶质带在柱中展宽的程度。溶质的峰宽度也可用基线宽度 W 或半宽度 $W_{1/2}$ 表示。组分峰越窄，理论塔板数越高，塔板高度越小，表示分离效率越高。在理想的 HPCE 中。

①毛细管中的液流为平流，即塞式流动，溶质在柱中的径向（横

向) 扩散几乎可以忽略;

②毛细管本身具有抗对流性, 因对流引起的峰加宽不明显;

③没有或很少有溶质与管壁间的相互吸附作用, 可以忽略因吸附引起的峰加宽。

在这种情况下, 可以认为溶质的纵向扩散是高效毛细管电泳中引起溶质峰加宽的唯一因素, 这相当于色谱速率理论中的第二项即分子扩散项对板高的影响, 则:

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (11-24)$$

式中 D ——溶质的扩散系数。

将公式 (11-20) 代入 (11-24), 结合 (11-23) 式, 整理得

$$N = \frac{\mu_{ap} V L_{ef}}{2DL} = \frac{\mu_{ap} E L_{ef}}{2D} \quad (11-25)$$

公式 (11-25) 为理想情况下高效毛细管电泳的分离效率的表达式。从此公式可说明如下两点。

其一, 表观电渗淌度大、工作电压大、 L_{ef}/L 大、扩散系数小, 都可以使 N 大, 分离效率高。因此, 提高工作电压、增大电渗流, 有利于提高分离效率。因为对于一定长度的毛细管和溶质, 在高电场及较大的电渗流下, 溶质在毛细管中迁移速度快, 在管中停留时间短, 溶质扩散的机会减少, 峰加宽小, 理论塔板数多。

其二, 在相同电泳条件下, 扩散系数小的溶质比扩散系数大的溶质的分离效率高。这是由于溶质分子越大, 扩散系数越小, 因扩散引起的峰加宽越小, 分离效率越高。这就是 HPCE 能高效分离生物大分子 (如蛋白质、核酸等) 的理论依据。

所以, 公式 (8-24) 是选择电泳操作条件的依据。和一般色谱一样, 分离效率也可以直接由电泳图求出, 即

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (11-26)$$

$$\text{或} \quad N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2 \quad (11-27)$$

式中 t ——溶质迁移时间;

$W_{1/2}$ ——溶质峰半高度宽；

W ——溶质峰的峰宽。

3. 分离度

和一般色谱一样，毛细管电泳中的分离度也用 R_s 表示，它是指表观淌度相近的两组分分开的程度。按色谱理论的 Giddings 方程，组分 1、2 的分离度等于两峰中心之间的距离与两峰峰底宽度平均值之比，即：

$$R_s = \frac{\Delta L}{W} = \frac{\Delta L}{4\sigma} \quad (11-28)$$

式中 ΔL ——两峰中心之间的距离；

W ——两峰峰底宽度平均值；

σ ——两峰的标准偏差的平均值。

因为两峰中心之间的距离正比于两组分的迁移速度之差 (Δv)，所以两峰中心之间的距离与两组分迁移距离的平均值（即毛细管的有效长度 L_{ef} ）之比等于两组分的迁移速度之差与两组分迁移速度的平均值 (v) 之比。即

$$\frac{\Delta L}{L_{ef}} = \frac{\Delta v}{v} \quad (11-29)$$

故分离度可以写为

$$R_s = \frac{L_{ef}}{4\sigma} \cdot \frac{\Delta v}{v} \quad (11-30)$$

由 (8-24) 式 $N = \left(\frac{L_{ef}}{\sigma}\right)^2$

所以

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta v}{v} \quad (11-31)$$

由于 $\frac{\Delta v}{v} = \frac{\Delta \mu}{\mu}$ ，所以

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\Delta \mu}{\mu} \quad (11-32)$$

第三节 毛细管电泳中影响柱效率的因素

在毛细管电泳中一般也按理论塔板数的多少衡量其柱效，柱效是

反映毛细管电泳过程中溶质区带加宽的程度。在实际电泳分析中发现,用公式(11-26)、(11-27)计算出的理论塔板数明显低于式(11-25)的结果。这是由于式(11-25)是在理想情况下导出的,仅考虑了纵向扩散的影响。而公式(11-26)、(11-27)是按实际电泳图计算的结果。这就是说,在实际电泳过程中,除了溶质的纵向扩散外还存在着很多引起峰加宽的因素。研究发现,在高效毛细管电泳中引起峰加宽的因素除了纵向扩散外还有焦耳热引起的温度梯度、进样塞长度、溶质与毛细管壁间的吸附作用、溶质与缓冲溶液间的电导不匹配引起的电分散等等。考虑到各种因素的影响,用总方差表示系统中各因素对峰加宽的影响:

$$\sigma_T^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{dif}^2 + \sigma_{Tem}^2 + \sigma_{ads}^2 + \sigma_{Elec}^2 + \sigma_{oth}^2 \quad (11-33)$$

式中 σ_T^2 ——各因素对峰加宽的总方差;

σ_{inj}^2 ——由进样引起峰加宽的方差;

σ_{dif}^2 ——组分纵向扩散引起峰加宽的方差;

σ_{Tem}^2 ——由焦耳热引起峰加宽的方差;

σ_{ads}^2 ——由毛细管壁间的吸附作用引起峰加宽的方差;

σ_{Elec}^2 ——溶质与缓冲溶液间的电导不匹配引起的电分散的方差;

σ_{oth}^2 ——由其他因素引起峰加宽的方差。

一、由进样引起的峰加宽

进样引起的区带加宽和进样塞长度及形状有关。理想情况下,引入毛细管的样品应该是无限窄的圆柱形塞,此时进样塞长度引起的峰加宽可以用下式表示:

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{(q_{inj})^2}{12} \quad (11-34)$$

式中 q_{inj} ——进样塞体积。

另外要获得最大的柱效受毛细管柱体积和进样塞体积之比,用下式计算。

$$N_{max} = 12 \left(\frac{q_c}{q_{inj}} \right)^2 \quad (11-35)$$

式中 q_c ——毛细管柱体积。

当 q_{inj} 太大时, 由此而引起的峰的叠加, 引起的峰加宽, 将使分离效率明显下降。Grushka 等建立了进样塞长度和其他参数之间的关系,

$$l_{inj} = \sqrt{24De_h t} \quad (11-36)$$

式中 l_{inj} ——进样塞长度;

D ——溶质的扩散系数;

e_h ——相对于最小理论塔板高度可以允许的增值;

t ——溶质的迁移时间。

可见, 进样塞长度多大合适, 还与溶质的扩散系数、迁移时间有关, 毛细管电泳能够允许的进样体积很小, 一般为 $10 \sim 50 \text{ nL}$, 甚至小到 100 pL 。

二、焦耳热和温度梯度引起的峰加宽

焦耳热是指当毛细管两端施加电压, 毛细管中缓冲溶液有电流通过时, 产生的热量。产生的焦耳热量 (Q) 的大小可以用下式计算。

$$Q = \frac{VI}{\pi r^2 L} = \lambda C_b E^2 \quad (11-37)$$

式中 V ——毛细管两端的电压;

I ——工作电流;

L ——毛细管长度;

r ——毛细管内半径;

λ ——背景电解质溶液摩尔电导;

C_b ——背景电解质溶液浓度;

E ——电场强度。

公式 (11-37) 表明, HPCE 中的焦耳热与背景电解质的摩尔电导、背景电解质浓度及电场强度成正比。焦耳热通过管壁向周围环境散热过程中, 在毛细管内形成径向的温度梯度——管中心温度最高, 由中心向管壁温度逐渐下降。

研究表明, 温度每变化 1K 将引起背景电解质溶液粘度变化 $2\% \sim 3\%$ 。毛细管内的温度梯度导致背景电解质溶液的径向粘度梯度, 使溶质迁移速度在径向不均匀分布, 管中心的迁移速度最快, 管壁附近

的迁移速度最慢。溶质迁移速度随所处径向位置而不同，破坏了溶质带的扁平流形轮廓。导致溶质区带展宽。

管内温度梯度大小决定于管壁的散热情况。表 11-4 的数据表明毛细管内径越小，管壁的散热面积越大，使管内的温度梯度越小，管中心与管壁的温差越小。显然，小内径柱散热效果好，温度梯度小，使焦耳热引起的峰加宽小。这也正是使用细径柱的毛细管电泳比传统电泳效率高得多的重要原因。

表 11-4 不同内径毛细管中的温度差^①

内半径/ μm	温度/K	壁与中心的温差/K
25	299.0	0.53
60	301.2	1.35
75	304.2	3.14
100	307.7	5.58
125	311.6	8.72

① Grushka E, et al., Anal Chem. 1989, 61: 241。

虽然用细径毛细管可大大减少焦耳热，但是在高效毛细管电泳中的操作电压高达上万伏、十几万伏或二十几万伏，焦耳热引起的峰加宽仍是个需要十分关注的问题。那么在实际电泳中如何减小焦耳热引起的峰加宽呢？

毛细管电泳中常用来减小焦耳热引起的峰加宽的办法是：

①减小操作电压。减小操作电压可以使工作电流减小，生热源减小，因热效应引起的峰加宽减小，对提高分离效率有利。但是从公式(8-20)看，减小操作电压，使分离效率下降。

②降低缓冲溶液的浓度或离子强度，使在同样操作电压下的工作电流小，焦耳热减小。但这样同时又降低了缓冲容量、增加管壁与溶质间吸附的可能性。

③用低淌度的物质组成缓冲体系。如三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硼酸盐、组氨酸、3-(环己氨基)-1-丙磺酸(CAPS)等，因本身的淌度小，在相同操作电压下其工作电流比同浓度的其他物质要小，因而焦耳热小。

④减小毛细管的内径，使散热面积增大，减小温度梯度。但这样

同时又减小了光检测器的光程，使检测灵敏度下降。目前常用的毛细管内径为 $25 \sim 75 \mu\text{m}$ 。

⑤采用散热措施主动控温，如用风扇吹，加速散热或在毛细管周围用低温液流将毛细管内的热量带走，也可用半导体致冷。这种办法不仅有效地降低温度梯度，而且能有效地将毛细管的温度控制在设定的温度范围内，从而大大降低焦耳热引起的峰加宽，提高分离效率。

三、由纵向扩散引起的峰加宽

组分纵向扩散引起的峰加宽用 $\sigma_{\text{diff}}^2 = 2Dt$ 表示。其大小由溶质的扩散系数和它的迁移时间决定。

溶质的迁移时间与溶质的有效淌度及分离操作条件，如工作电压、毛细管长度、缓冲溶液种类、浓度及 pH 等有关。所以，正确选择分离操作条件对于减小纵向扩散引起的峰加宽非常重要。

溶质的扩散系数是溶质的一种物理特征。相同形状的不同物质，扩散系数大小与它们分子量的三次方成反比。大分子溶质的扩散系数小，所以在相同条件下电泳时大分子可以比小分子获得更高的分离效率。

四、由溶质与管壁间的相互作用引起的峰加宽

溶质与管壁间的相互作用，对于毛细管电泳的分离极其有害。溶质与管壁间的相互作用，包括溶质与管壁间的相互吸附及溶质与管壁间的疏水作用力。一般情况下，在背景电解质溶液 pH 大于 3 时石英毛细管壁带负电荷，这一方面产生电渗流，另一方面因静电引力会产生阳离子溶质与管壁间的相互吸附，即使在 pH 低于 3，管壁呈电中性时，也可能产生溶质与管壁间的疏水作用。这些程度不同的溶质与管壁间的相互作用将会引起溶质带的展宽，降低分离效率，使峰形变坏，严重时发生溶质与管壁间的不可逆吸附，使溶质不能出峰。由于蛋白质、多肽等生物大分子上带电荷较多，又有较多的疏水基团，所以吸附问题特别严重，是毛细管电泳分离分析这类物质的一大难题。再者，虽然用细内径的毛细管有利于管壁散热，可以减小焦耳热引起的峰加宽，但是，细内径毛细管的比表面积大，又增加了管壁对溶质

吸附的机会。

吸附是毛细管电泳中一个必须解决的问题，也是当前毛细管电泳中一个研究热点问题。目前减小吸附的主要办法有如下一些：

(1) 增加缓冲溶液的浓度或离子强度 增加缓冲溶液的浓度或离子强度，离子间有效距离减小，相互作用力增强，使溶质表面的有效电荷数减小，从而减小溶质与管壁间的相互吸附作用力。Jorgensen 等在研究中发现，用高离子强度的缓冲溶液能有效地减低管壁对蛋白质的吸附，并比较了加入不同碱金属盐增加离子强度使吸附减小的效果，指出加入 $0.25\text{mol/LK}_2\text{SO}_4$ 的效果最好。但是，增加缓冲溶液的浓度或离子强度不仅减小了电渗流，也使相同工作电压下的工作电流增大，焦耳热增大，使分离效率下降，这样就限制了用增加缓冲溶液的浓度或离子强度去减小吸附的办法。

(2) 在极端的 pH 下进行电泳 当缓冲溶液的 pH 值小于 3 时，毛细管表面的硅羟基以不带电的质子化形式存在，对带正电荷的蛋白质没有静电吸附。虽然，这时电渗流几乎接近于零，但因这时蛋白质带正电，仍可以向负极迁移；相反，当 pH 较高时，毛细管壁和大多数蛋白质都带负电，管壁与溶质间因静电斥力而限制了它们的相互作用。但是，在极端的 pH 下进行电泳易引起蛋白质等生物大分子结构变化而变性，故使用这种方法应慎重。

(3) 往缓冲溶液中加入两性离子 两性离子在溶液中以一端带正电、一端带负电的形式存在。用两性离子代替中性强电解质加入缓冲溶液，其带正电的一端与管壁上的负电中心作用。当两性离子浓度较大时（约为溶质的 100~1000 倍）可以有效地抑制管壁对蛋白质的吸附，并且又不增加溶液的导电性，对电渗流也影响不大。Jorgenson 最早提出并研究了 this 减小吸附的方法，指出选择两性离子的原则：

- ① 在校宽的 pH 范围内为两性物质；
- ② 在水中的溶解度高；
- ③ 在增加链长时不使其疏水性增加。

(4) 毛细管壁改性 一般在毛细管壁进行硅烷化处理，再键合或交联适当的基团，如：聚丙烯酰胺、无氟代芳烃等。

五、由电分散作用引起的峰加宽

当溶质区带与缓冲溶液带的电导不同时，可引起溶质峰型畸变，分离效率下降。把因为溶质区带与缓冲溶液带电导不同而引起分离效率下降的现象叫电分散作用。

当溶质有效淌度与浓度的乘积和背景电解质的有效淌度与浓度的乘积相等时，即溶质带与背景电解质带的电场强度相等时，则该溶质分子在溶质带中的迁移速度等于在背景电解质中的迁移速度，此时溶质峰形对称。当溶质有效淌度与浓度的乘积和背景电解质的有效淌度与浓度的乘积不相等时，溶质区带与缓冲溶液带的电场强度不同，使溶质在溶质带与缓冲溶液带的迁移速度不同，引起峰形畸变。

六、由其他因素引起的峰加宽

毛细管电泳中除了上述因素引起区带展宽外，还有许多其他因素能引起区带展宽。其中在实验中较经常遇到的是“层流”引起的区带展宽。

当由于某种原因在毛细管内形成压力差时，毛细管内的液流就会出现抛物线形的层流，这将引起区带展宽。在毛细管电泳中产生层流的原因主要有毛细管两端液面高度不同和场放大作用两种。在这里主要讲毛细管两端液面高度不同诱导产生的层流效应。

当毛细管两端背景电解质液面高度不同时，使毛细管轴向产生压力差，在毛细管内形成层流，使溶质区带加宽。表 11-5 示出层流对区带展宽的影响。

表 11-5 层流对区带展宽的影响

毛细管内径/ μm	扩散系数/ (cm^2/s)	允许的最大高度差/mm		
		N 下降 10%	N 下降 120%	N 下降 40%
25	1×10^{-6}	11.44	16.18	22.88
50	1×10^{-6}	1.43	2.02	2.86
75	1×10^{-6}	0.42	0.60	0.85
25	1×10^{-5}	114.40	161.80	228.80
50	1×10^{-5}	14.30	20.22	28.60
75	1×10^{-5}	4.24	5.99	8.47

表 11-5 数据表明：

①毛细管两端背景电解质液面高度差导致的层流对区带展宽的影响和所用毛细管的内径大小以及溶质扩散系数有关；

②用较大内径毛细管分离扩散系数小的物质时，层流引起的区带展宽更为严重。

因此，电泳时更应注意保持毛细管两端背景电解质液面高度一致。

第四节 胶束毛细管电动色谱

胶束电动色谱 (Micelle Capillary Electrokinetic Chromatography, 简称 MECC 或 MEKC)。

MEKC 或 MECC 是 1984 年日本京都大学 Terabe (寺部茂) 创立的一种毛细管电泳模式。这种模式把电泳技术与色谱技术相结合，其突出特点是将只能分离离子型化合物的电泳变成不仅可分离离子型化合物，而且也能分离中性化合物。从而大大展宽了电泳的应用范围。

MEKC 的实验操作与 CZE 相同，唯一差别是在操作缓冲溶液中加入超过临界胶束浓度 (C_{mc}) 的表面活性剂。

一、分离原理

表面活性剂分子是一端为亲水性、一端为疏水性的物质。当它们在水中的浓度达到其临界胶束浓度 (C_{mc}) 时，疏水性的一端聚在一起朝向里，避开亲水性的缓冲溶液，亲水端朝向缓冲溶液，形成胶束，离子型胶束如图 11-4。

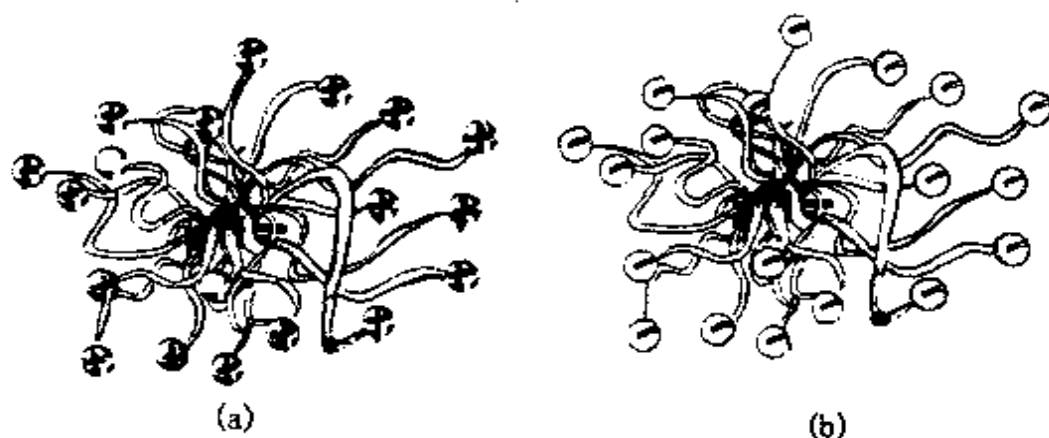


图 11-4 离子型胶束示意图

(a) 阳离子胶束；(b) 阴离子胶束

MEKC 中常用的阴离子表面活性剂是十二烷基硫酸钠 (SDS), 当浓度在 $8 \sim 9 \text{ mmol/L}$ 时 (25°C 时 C_{mc} 约为 8.1 mmol/L), SDS 单个分子靠彼此间的疏水性聚集形成网状结构的带负电胶束。带负电荷的 SDS 胶束不溶于水, 在毛细管中作为独立的一相向阳极迁移。由于在中性或碱性条件下电渗流淌度大于胶束淌度, 所以 SDS 胶束的实际移动方向和电渗流相同, 最终在阴极端流出。

在 MEKC 中, 中性溶质按其亲水性不同, 在缓冲溶液与胶束之间分配。疏水性大、亲水性弱的溶质分配在胶束中的多, 分配到缓冲溶液中的少; 反之, 亲水性强、疏水性弱的溶质, 分配到缓冲溶液中的多, 分到胶束中的少。当溶质进入胶束时, 以胶束的速度向阴极迁移; 溶质进入缓冲溶液时, 以电渗的速度前移。在胶束中分配系数越大的溶质, 在柱中迁移时间越长, 保留性越强。从而使亲水性稍有差别的中性物质在电泳中得以分离。所以, MEKC 实际上是以胶束做“准固定相”, 溶质在准固定相和水相间分配的以电渗流作驱动力的液液分配色谱与电泳的完美结合, 其分离过程如图 11-5。

二、MEKC 中使用的参数

1. 容量因子

因为 MEKC 的背景电解质中有“准固定相”(表面活性剂胶束), 比 CZE 模式增加了试样中的溶质在“准固定相”中的分配这个分离因素。按色谱分配理论的概念, 引入柱容量因子, 用 k 表示。

容量因子是表征溶质在“准固定相”胶束和背景电解质水相间分布特性的量, 其大小可用 k 表示。

$$k = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} = K_d \frac{V_{mc}}{V_{aq}} \quad (11-38)$$

式中 n_{mc} ——溶质进入“准固定相”中的量;

n_{aq} ——在背景电解质水相中的量;

V_{mc} ——胶束相的体积;

V_{aq} ——在背景电解质水相的体积;

K_d ——溶质在胶束相和背景电解质水相之间的分配系数。

k 的概念与色谱中的定义是一样的, 即溶质在胶束相和背景电解

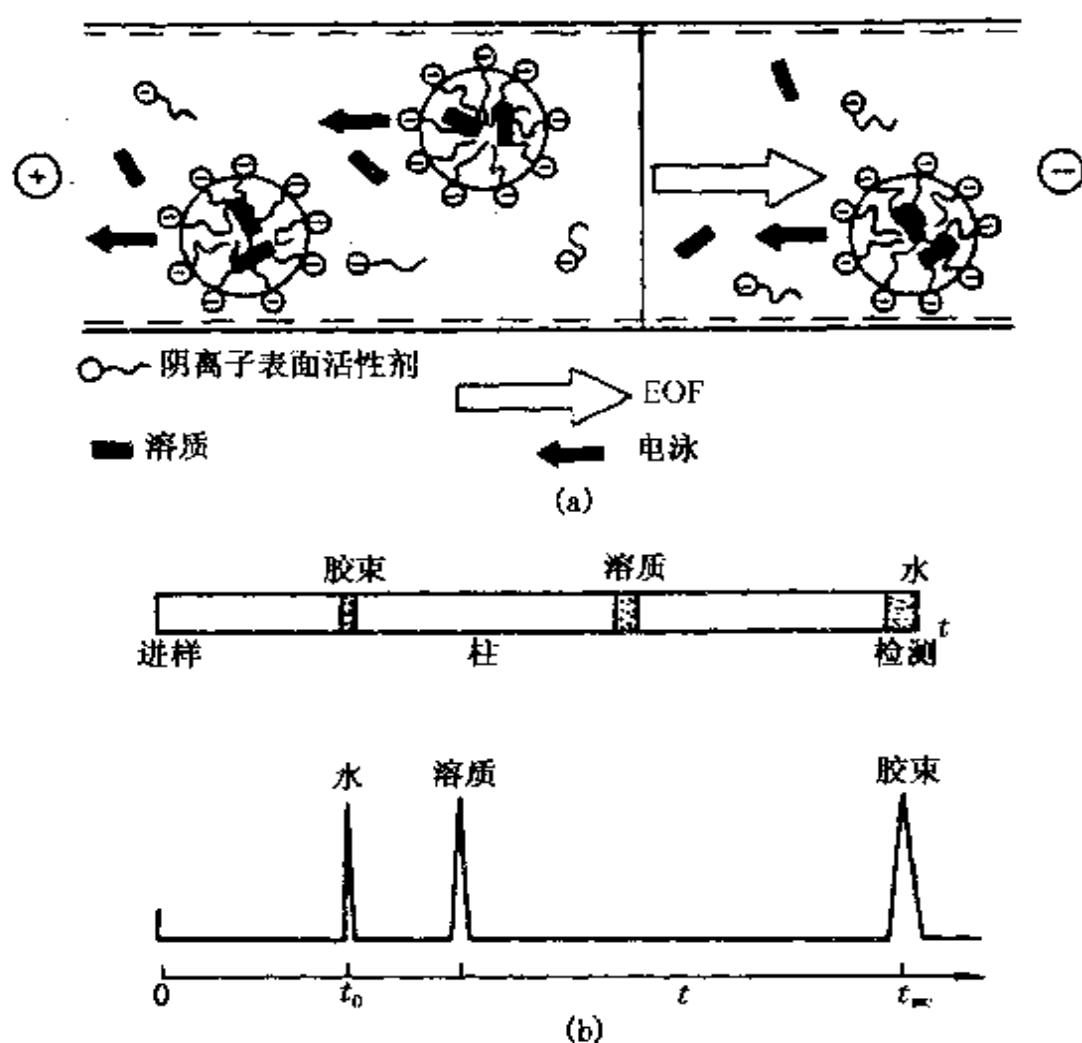


图 11-5 MEKC 的分离过程 (a) 和
时间窗口 (b) 示意图

质水相之间的分配系数越大或者胶束的浓度越大，表示溶质与胶束作用越强，该组分的柱容量因子越大，在毛细管中停留的时间越长。

2. 分离因子（选择性系数）

分离因子或选择性系数反映了两种溶质在胶束相和背景电解质水相之间分配系数的差别，用 α 表示。

$$\alpha = \frac{K_{d1}}{K_{d2}} = \frac{k_1}{k_2} \quad (11-39)$$

式中， k_1 、 k_2 、 K_1 、 K_2 分别代表试样中相邻两个组分的柱容量因子和在两相中的分配系数。与色谱中的定义是一样的，在体系中两组分

间分配系数的相对差异越大,两溶质在该体系中的选择性越高,越有利于分离。在大多数情况下,应将分离因子控制在 0.5~10 之间。

3. 迁移时间

根据毛细管电泳中溶质的迁移时间为 $t = \frac{L_{ef}}{v_{ap}}$, 在 MEKC 模式中, 中性溶质的迁移时间

$$t = \frac{L_{ef}}{v_{ap(n)}} = \frac{L_{ef}}{\mu_{ap(n)} \cdot E} = \frac{L_{ef} \cdot L}{(\mu_{av} + \mu_{ef(n)}) V} \quad (11-40)$$

式中, $v_{ap(n)}$ 、 $\mu_{ap(n)}$ 和 $\mu_{ef(n)}$ 分别表示中性溶质的表观迁移速度、表观淌度和有效淌度。

中性溶质有效淌度 $\mu_{ef(n)}$ 的大小决定于 SDS 胶束的表观淌度 $\mu_{ap(mc)}$ 及溶质其在体系中的柱容量因子, 即

$$\mu_{ef(n)} = \frac{k}{k+1} \cdot \mu_{ap(mc)} \quad (11-41)$$

可见, 溶质在体系中的柱容量因子越大, 该溶质和胶束作用越强, 其迁移速度越慢。因此, 中性溶质的迁移时间也可以用柱容量因子表示:

$$t = \frac{1+k}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}} \right) k} \cdot t_0 \quad (11-42)$$

式中 t_0 ——在胶束中无保留的中性溶质 (即完全不溶于胶束的) 的迁移时间, 一般用甲醇、二甲基亚砷作测试标记物;

t_{mc} ——胶束的迁移时间 (可以用完全被胶束保留的溶质的迁移时间表征, 如疏水性极强的中性物质苏丹 III, 其迁移速度和胶束完全相同, 可以作为测定胶束迁移时间的标记物);

t ——溶质的迁移时间。

所以, 在实际研究中通过测量溶质的迁移时间, 可以求出溶质在电泳体系中的容量因子

$$k = \frac{t - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t}{t_{mc}} \right)} \quad (11-43)$$

4. 柱效率

MEKC 中的柱效率定义和表达式与 CZE 模式相同, 但是其影响因素比 CZE 模式中要复杂的多。除了纵向扩散、焦耳热引起的温度梯度、进样塞长度、溶质与毛细管壁间的吸附、溶质与缓冲溶液间的电导不匹配的电分散等因素引起的峰展宽外, 还有胶束增溶中的吸附-解吸动力学、在背景电解质水相中胶束之间的质量传输、胶束的电泳分散等引起的峰展宽。目前, 诸多因素对分离效率影响的情况还很难准确、全面地讲清楚, 所以 MEKC 的分离效率大多用实验中的峰宽度和迁移时间, 由公式 (11-26) 或 (11-27) 求得。

5. 分离度

由于 MEKC 是一个分配过程, 其分离度表达式更接近色谱分离度表达式:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \left(\frac{1 - (t_0/t_{mc})}{1 + (t_0/t_{mc})k_2} \right) \quad (11-44)$$

和色谱的分离度表达式相比, MEKC 的分离度表达式多了最后一项。但是, 当胶束的迁移时间 t_{mc} 为无穷大即胶束为固定不动时, 胶束就成为真正的固定相, 最后一项等于 1, 上式变得与色谱分离度表达式完全相同。

可见, 通过优化分离效率、选择性 $\frac{\alpha - 1}{\alpha}$ 和保留性能, 可以提高 MEKC 的分离度。具体办法是:

(1) 提高分离效率 除了像 CZE 中那样正确选择分离操作条件使分离效率高外, 还应注意使电渗流速度比较高 (大于 1mm/s) 和柱容量因子不太大 (如小于 5), 以便减小 MEKC 中的纵向扩散引起的峰展宽, 提高分离效率。

(2) 增大分离因子 MEKC 中影响分离因子的因素主要是溶质在准固定相和背景电解质水相间的分配系数。所以, 更换表面活性剂的类型, 改变体系的组成、温度和 pH 值, 都可以改变溶质在准固定相和背景电解质水相间的分配系数, 从而改变分离因子。

(3) 改变柱容量因子 容量因子大小反映了溶质和胶束间的作用

强弱。容量因子大，说明溶质和胶束间的作用强，溶质在柱中停留时间长，溶质在两相间分配次数多，有利于分离。但是，分离度和容量因子间并没有线性关系，不是容量因子越大，分离度越高。就分离度而言，最佳容量因子的大小可以用体系的时间窗口求得：

$$k_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{t_{\text{mc}}}{t_0}} \quad (11-45)$$

(4) 扩大体系的时间窗口 时间窗口是指 MEKC 中完全溶于背景电解质水相的中性溶质的迁移时间 t_0 和完全溶于胶束准固定相中的中性溶质迁移时间 t_{mc} 之间的时间间隔 ($t_0 - t_{\text{mc}}$)，也可以用 $\frac{t_0}{t_{\text{mc}}}$ 的比值表示。时间间隔越大，或 $\frac{t_0}{t_{\text{mc}}}$ 比值越小，表示时间窗口越大。扩大体系的时间窗口，不但可以增加峰容量（在 t_0 和 t_{mc} 之间能够分辨中性物质的最大数目），而且可以提高分离度。MEKC 体系的时间窗口主要由体系的电渗流和胶束的迁移速度决定。因此，扩大体系的时间窗口的途径有两个：

① 改变胶束的迁移速度。通过改变体系的温度、改变表面活性剂种类以及往体系中加入添加剂等，可以改变胶束的迁移速度。比如，在背景电解质中加入高浓度的尿素，可以改变胶束的迁移速度，使 $\frac{t_0}{t_{\text{mc}}}$ 减小、时间窗口增大；辛基葡糖苷两性表面活性剂在硼酸盐缓冲溶液形成胶束的体系中，增大体系的 pH 值，可以扩大体系的时间窗口。

② 减小体系的电渗流速度，能有效地扩大体系的时间窗口。改变胶束种类或者改变电渗流的大小，可以改变 MEKC 的时间窗口。

三、MEKC 中常用的“准固定相”

1. 表面活性剂

当溶液中表面活性剂的浓度达到临界胶束浓度时，表面活性分子的疏水端聚集在一起形成胶束，构成 MEKC 中最常用的“准固定相”。按表面活性剂亲水一端基团的性质可分为以下几类：

(1) 阴离子表面活性剂 分子的亲水端带负电荷, 如十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠等。

(2) 阳离子表面活性剂 分子的亲水端带正电荷, 一般为有机胺的衍生物, 最常用的是季铵盐, 如十六烷基三甲基溴化铵等。阳离子表面活性剂容易吸附在石英毛细管内壁, 常用作电渗流改性剂, 可以有效地减小电渗流或者使电渗流反向。

(3) 两性离子表面活性剂 分子中同时存在酸性基(如羧基、磺酸基或磷酸基)和碱性基(如胺基或季铵基), 在等电点(pI)时, 为电中性; 当 $pH > pI$ 时, 表面活性剂呈阴离子型; 当 $pH < pI$ 时表面活性剂呈阳离子型。

(4) 非离子型表面活性剂 表面活性剂分子不明显带电荷, 亲水基主要由一定数量的含氧基团, 如醚基或羟基, 组成。

电泳中常用的表面活性剂见表 11-6。

表 11-6 电泳中常用的表面活性剂及其特性参数

表 面 活 性 剂	$C_{mc}/(\text{mmol/L})$	聚集数
十二烷基硫酸钠 (SDS)	8.1	62
十四烷基硫酸钠 (STS)	2.1	138
<i>N</i> -月桂基- <i>N</i> -甲基牛磺酸钠 (LMT)	8.7	
聚氧乙烯醚基十二烷基硫酸钠	2.8	66
<i>N</i> -十二酰基- <i>L</i> -缬氨酸钠 (SDVal)	5.7	
十二烷基三甲基氯化铵 (DTAC)	16	
十二烷基三甲基溴化铵 (DTAB)	15	56
十四烷基三甲基溴化铵 (TTAB)	3.5	75
十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)	0.92	61

2. 天然生物活性剂——胆汁盐

胆汁盐是一种天然的生物活性剂, 它们也可以像烷基类表面活性剂一样作 MEKC 中的准固定相。其突出特点是:

①具有手性中心, 可以分离光活性的异构体;

②极性较高, 对于一般溶质的柱容量较小。常用的胆汁盐有胆酸钠、脱氧胆酸钠和脱氧牛磺胆酸钠。

四、环糊精改性 MEKC

环糊精 (CD) 已在第四章的气相色谱固定相中讲述过, CD 的空

腔内壁为弱疏水性，所有羟基在空腔的外沿呈亲水性。这种结构使它们能与各种极性、非极性分子、离子形成包含化合物（主客体配合物）。环糊精是非离子型化合物，呈电中性，当将它加到 MEKC 的胶束溶液中时，以电渗流的速度随体相溶液一起向阴极迁移。溶质在三相（SDS 胶束、水相、CD 相）间进行分配，按溶质疏水性及分子大小不同与 CD 形成稳定性不同的包含化合物，从而使溶质以不同速度迁移。由于 CD 空腔外沿上的多个二级醇羟基有手性碳，使它们具有高度立体选择性，因此可广泛用于手性化合物的拆分。

为改变 CD 的水溶性及电性，常将 CD 衍生化。在 MEKC 的背景电解质中加入环糊精及其衍生物，可大大提高了 MEKC 的选择性，扩宽其应用范围，使 MEKC 模式不仅可以分离离子型、电中性疏水性化合物，而且可以分离光学异构体。把加入环糊精及其衍生物的 MEKC 叫做 CD 改性的 MEKC，用 CD-MEKC 表示。

第五节 毛细管电泳的手性分离

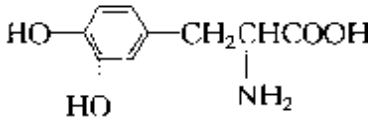
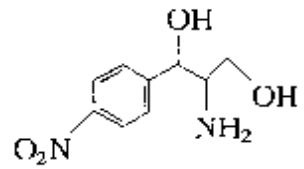
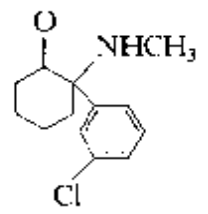
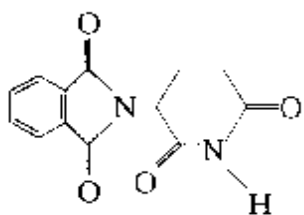
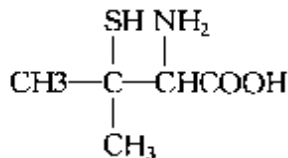
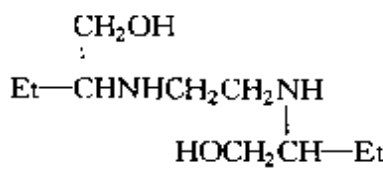
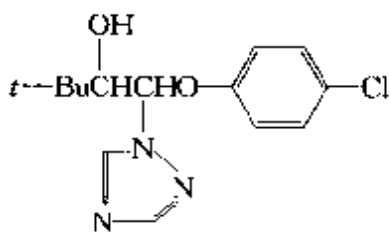
一、手性分离概况

毛细管电泳的手性分离是近年来颇受重视和欢迎的方法。因为在生物的手性环境中，生命物质的分子，药物分子，农药分子的手性不同会表现出截然不同的生理、药理、毒性作用。多巴胺（DoPa）是治疗帕金森症的有效药物，临床实验证明仅（S）-异构体有效，（R）-异构体则产生严重的副作用。镇静剂沙利度胺（Thalidomide）曾在欧洲广泛使用，但它只有（R）-异构体具有镇静作用，一些孕妇服用此药后引起胎儿畸变，实验证明，这是（S）-异构体副作用的结果。在农用化学品中，手性与杀虫剂、除草剂以及植物生长调节剂等的生物活性也有着十分密切的关系，如溴氰菊酯，它有三个手性中心八个异构体，活性最高的异构体（3R, 1R, S）的杀虫活性是最差的（3S, 1S, R）的 70 多倍。表 11-7 中列出部分手性药物和农药不同异构体的生物活性实例。

在大量的事实面前，使人们不得不对具有光学活性的手性药物给以特别的重视，美国 FDA 在 1992 年提出的法规就要求申报手性药物

时, 应对其不同异构体的作用叙述清楚。在医药工业中, 已知药物中

表 11-7 手性药物和农药的不同异构体的活性实例

名 称	结 构 式	有效异构体	副作用异构体
多帕胺 (Dopa)		(S)-异构体 治疗帕金森症	(R)-异构体 严重副作用
氯霉素, 合霉素		(1R, 2R)- 异构体高药效	消旋体为合霉素 (1S, 2R 异构体无活性)
麻醉剂 (Ketamine)		(S)-异构体 麻醉作用	(R)-异构体 致幻作用
镇静剂 (Thalidomide)		(R)-异构体 镇静作用	(S)-异构体 致畸作用
消炎药 (Penicillamine)		(S)-异构体 消炎作用	(R)-异构体 致突变作用
结核病药 (Ethambutol)		(S, S)-异构体有效	(R, R)-异构体致盲
三唑类杀菌剂 (Paclobutrazol)		(2R, 3R)- 构型高杀菌作用, 低植物生长控制作用	(2S, 3S)- 构型作用与 (2R, 3R) 构型相反

约有 30%~40% 是光活性的手性药物, 销售份额已超过药物总量的 50%。农药工业中, 农用天然杀虫剂全为手性, 合成杀虫剂中 17% 为手性杀虫剂。随着生命科学, 特别是生物化学和药物化学的发展, 对光学活性的手性药物的需要越来越大, 手性对映体的分离和光学纯度的确定已普遍引起人们的重视, 欧、美以及日本等发达国家的一些厂家已把生产高效的光学纯药物制品作为市场竞争的法宝。

获得高光学纯度的手性化合物的方法很多, 但不外乎通过不对称合成的方法和对映体分离的方法获得。在分离和检验光学对映体纯度的方法中, 色谱法已成为一种重要的手段。特别是毛细管电泳是分离手性化合物最为有效和最简便经济的方法。

二、毛细管电泳手性分离原理和方法

1. 手性分离方法的分类

分离手性异构体主要有两种方法^[5], 一种是间接法, 另一种是直接法。

(1) 间接法 间接法的要点是手性异构体分子通过共价键和一反应试剂作用, 形成一对非手性异构体。这一方法既不导致外消旋, 也不会出现动力学上的歧视, 而形成的两个非手性异构体具有不同的物理和化学性质, 从而可以使用一般的非手性分离技术把他们分离开。这一方法是否成功决定于找到一个好的衍生化试剂, 而且手性分子上要有可以反应的官能团。

(2) 直接法 直接法的要点是利用手性选择剂或手性固定相和手性异构体分子作用, 形成暂时的过渡性非手性异构体分子的络合物, 因它们在固定相上的分配系数不同或与手性选择剂的结合常数不同而得到分离。在 CE 中手性选择剂大多是以添加剂形式加入到背景电解质中, 但是也可以掺杂在凝胶基体中或用键合到毛细管壁上的手性固定相进行分离。手性选择剂不必要光学纯, 这是一个很大的优点。

2. 手性分离的原理

在毛细管电泳中一般遵循“三点原则”(这一原则首先由 Dalglish 提出, 后经国际上富有盛名的手性分离专家 Pirkle 和 Pochasky 进一步研究和阐明): 手性识别要求手性选择剂和被分离物之间至少

要有三个作用点,而且至少要有-一个点是和立体化学有关,即有手性选择作用。这三个点不一定是相互吸引,也可以是相互排斥的立体作用点,从几何意义上讲三个点不一定是“点”,也可以是面或轴。Pirkle 是开发手性固定相的早期的先驱者,他依据这一理论合成出多种液相色谱固定相^[7]这一理论为许多色谱学者认同。

在实际的分离条件选择中,Wren 和 Rowe^[8,9],建立了 CD-CZE 进行手性分离的数学模型,推导得出对映异构体淌度的差异 ($\Delta\mu$) 是其与 CD 形成的包含络合物的平衡常数及 CD 浓度的函数。

$$\Delta\mu = \frac{[C](\mu_1 - \mu_2)(K_2 - K_1)}{1 + [C](K_1 + K_2) + K_1K_2[C]^2} \quad (11-46)$$

式中, μ_1 , μ_2 分别为对映异构体在自由溶液中以及与 CD 形成的包含络合物的电泳淌度; K_1 , K_2 分别为对映异构体和手性选择剂形成的包含络合物的平衡常数; $[C]$ 表示 CD 的浓度。显然,如 $K_1 = K_2$, 即对映异构体和手性选择剂形成的包含络合物的平衡常数相等,或 $\mu_1 = \mu_2$, 即对映异构体在自由溶液中以及与 CD 形成的包含络合物的电泳淌度相同,则 $\Delta\mu = 0$, 对映体不能被分离。CD 的浓度对分离也有很大影响,当 $[C] = 0$ 或 $[C]$ 为无穷大时, $\Delta\mu = 0$, 对映体不能被分离; $[C]$ 在 0 到无穷大之间存在一个最佳浓度 $[C]_{opt}$, 使 $\Delta\mu$ 达最大值。

$$[C]_{opt} = \sqrt{\frac{1}{K_1K_2}} \quad (11-47)$$

三、毛细管电泳手性分离的手性选择剂

(一) 手性选择剂的种类

在 CE 中使用了大量的手性选择剂,其中的一些在实际分析中得到了广泛的应用,由于分离机理的不同,可以把手性选择剂分为以下 5 类。

①用形成主-客体包含化合物分离手性化合物。这一类中主要是环糊精及其衍生物和冠醚。

②用手性胶束的 MEKC 分离手性化合物。这一类中或是用手性表面活性剂的 MEKC,或是在非手性表面活性剂中加入手性选择添

加剂。

- ③用形成金属配合物的手性选择剂分离手性化合物。
- ④用手性聚合物作手性选择剂分离手性化合物。
- ⑤用大抗菌素作手性选择剂分离手性化合物。

(二) 环糊精及其衍生物作手性选择剂

1. 最重要的手性选择剂——环糊精 (CD) 及其衍生物

最早成功地使用 CD 作为手性选择剂的是等速电泳, 之后 CD 在 CZE 及 MEKC 中都得到了广泛应用。一般 α -CD 适用于像氨基酸、无机离子等小分子的手性分离, β -CD 适用于比苯环大比苯并芘小的分子的手性分离, γ -CD 适用于更大分子的分离。然而实验表明 β -CD 能分离更多的化合物, β -CD 价格便宜。因此, β -CD 的应用最为广泛, 但是它也有一个水溶性差的缺点。

Armstrong 等认为 CD 进行手性识别需具备四个必要条件: ①形成包含化合物; ②客体分子大小与环糊精的空腔相匹配; ③手性中心能够与环边沿羟基形成强烈作用; ④大环一侧的 2,3 位羟基官能团对手性识别十分重要。所以为增强 CD 的选择性, 衍生化 CD 有更为广泛的应用。常用的是 β -CD 的衍生物, 如 2,6-二甲基- β -环糊精 (DM- β -CD)、全甲基- β -环糊精 (TM- β -CD)、羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD)、羧甲基- β -环糊精 (CM- β -CD) 及乙酸基取代 β -环糊精、氨基取代 β -环糊精、羧乙基氨基取代 β -环糊精、磺酸基取代 β -环糊精, 明胶 β -环糊精等。对 α -CD 和 γ -CD 进行衍生化及应用的文献较少。环糊精衍生化后水溶性增强, 并改变了环糊精的空腔尺寸和物理化学性质, 手性识别能力一般有所增强。

环糊精及其衍生物具有立体选择性, 主要是与大小、立体构型合适的分子形成主-客体包含化合物, 由于对映体与环糊精所形成的包含化合物的稳定常数不同而得以分离。一般认为形成包含化合物的稳定性主要依靠客体分子的侧链极性与环糊精疏水空腔的匹配程度。另外, 在手性分子手性中心处于适当空间取向时与 CD 环边缘的羟基所形成的氢键也可以增加包含化合物的稳定性。

环糊精及其衍生物在 CE 中有中性分子, 如未衍生化的 α -CD、

β -CD、 γ -CD、Me- β -CD、DM- β -CD、TM- β -CD，也有可以生成离子的环糊精及其衍生物，如羧甲基环糊精，环糊精磺酸盐，环糊精磷酸盐等。环糊精及其衍生物在手性化合物分离中的应用有许多综述评论，近年国外有代表性的权威综述提供了多种环糊精及其衍生物、被分离的对象、电泳操作条件等。在手性分离中使用较多的是 β -CD、 γ -CD、羟丙基 β -CD、二甲基 β -CD。所以 Guttman 等人提出在分离手性化合物时选择使用“环糊精组合” (Cyclodextrin Array)，这一组环糊精及其衍生物有四种 CDs，其种类和浓度见表 11-8。利用这一 CD 组合一步一步地进行实验，改变条件，逐步优化从而确定可以拆分手性异构体的电泳条件。

表 11-8 环糊精组合

缓冲溶液	环糊精及其衍生物	浓度/mmol
1	低浓度 β -CD	3
2	高浓度 β -CD	15
3	低浓度 γ -CD	10
4	高浓度 γ -CD	50
5	低浓度羟丙基 β -CD	10
6	高浓度羟丙基 β -CD	100
7	低浓度二甲基 β -CD	10
8	高浓度二甲基 β -CD	50

2. 用环糊精及其衍生物分离手性药物

环糊精及其衍生物应用最多的领域是药物的手性分离，Fanali 的许多研究工作和综述报告主要集中在药物的手性分离上。

①对氨基酸的手性分离使用 γ -CD；也有用 β -CD，甲基 β -CD，羟丙基 β -CD、 β -CD 磺酸盐等分离氨基酸的手性异构体。

②分离拟交感神经药物对映异构体使用 β -CD、二甲基- β -CD 和羟丙基- β -CD 等环糊精及其衍生物进行分离的居多。

③分析麻醉剂和镇静剂的对映异构体也是多用 β -CD 和羟丙基- β -CD 作手性选择剂的比较多。

④在抗凝血药物对映异构体的分离中，使用 β -CD、甲基、二甲基和羟丙基- β -CD 作手性选择剂。

⑤在分离抗抑郁药的手性异构体中,多用 β -CD 和羟丙基- β -CD 作手性选择剂。

⑥分离镇静止痛和多芳香环药物的手性选择剂使用了各种 β -CD 衍生物做手性剂。

3. 环糊精及其衍生物作添加剂在 CE 中其他方面的应用

利用以环糊精为添加剂的自由毛细管电泳或用改性毛细管胶束电动色谱 (MEKC) 分离对映异构体的研究报告有很多。如甲基氨基- β -CD 在手性分离中的应用; CD 改性毛细管电泳在食品防腐剂分析中的应用; 用带电荷及中性环糊精使手性对映体反相洗脱; 用带电荷及不带电荷环糊精衍生物一起作添加剂分离药物; 在环糊精改性的毛细管电泳中使用非手性剂改善手性分离, 如叔丁醇、甲酸叔丁酯、乙酸叔丁酯等; 用带电荷的环糊精衍生物做手性选择剂进行手性毛细管电泳-电喷雾质谱分析。最近的文献又有许多用环糊精作手性选择剂的研究报道。

为了提高环糊精及其衍生物在毛细管电泳中应用的有效性,一方面用波谱法研究形成包含化合物的机制,另一方面研究单一异构体的环糊精衍生物。如 Vincent 等研究合成了单一异构体的 6-磺酸基-2,3-乙酰基的 β -环糊精和 6-磺酸基-2,3-羟基的 β -环糊精,以及 6-磺酸基-2,3-甲基化的 β -环糊精。

4. 用环糊精及其衍生物和其他添加剂组成混合手性选择剂

在 1992 年, Kuhn 在毛细管电泳中发现了协同效应 (Synergistic Effect)。他们用 18-冠-6-四羧酸和 α -环糊精组成的混合手性添加剂,分离 D, L-色氨酸,分离度远大于使用单独的手性添加剂 18-冠-6-四羧酸或 α -环糊精手性添加剂。此后又有一些人研究这一重要的现象。Armstrong 的研究组把磺酸基- β -CD 和 α -CD 混合在一起作手性分离剂,分离 α -和 β -萘烯的效果明显高于单独的磺酸基- β -CD。他们在用毛细管电泳分离茚, 1,2,3,4-四氢化萘和苯并环庚烷衍生物时把磺酸基- β -CD 和羟丙基- β -CD 作混合手性分离剂,有协同效应^[67]。Armstrong 的研究组进一步研究了混合手性分离剂的分离机理,针对 18-冠-6 四羧酸和 β -环糊精组成的混合手性添加剂,所以有协同效应

是由于形成三元络合物 (“three body complex”), 也就是我们研究的形成“超分子”。Horimai 等把 γ -CD 和 Zn (II) 盐与氨基酸组成毛细管电泳的工作溶液可使对映体的分离次序倒转。Jira 等在分离核苷酸时使用硼酸盐和 β -CD 组成工作溶液, 可使对映体的分离优于单独使用硼酸盐或 β -CD。有关协同效应在气相色谱和毛细管电泳中的现象, 我们已进行了几年的研究。

5. 用环糊精及其衍生物作添加剂的 CE 的量分析

毛细管电泳的定量分析一直是人们关心的问题, 在缓冲溶液中再加上环糊精之后是否在对映体分析中会受到影响? 有不少研究报告作出回答。Altria 等的研究表明: 在用毛细管电泳的手性分析中其检测限可小于 0.1%, 如使用内标法定量其精度可以达到要求。

(三) 非环糊精作手性选择剂

如上所述环糊精类手性选择剂是使用最多的, 但是非环糊精作手性选择剂也受到人们的重视, 有许多文献报道。由于篇幅限制对这一大类手性选择剂只做一简要概述。

1. 冠醚类手性选择剂

手性冠醚首先由 Kuhn 引入毛细管电泳中, 他们使用 18-冠-6-四羧酸做手性分离剂, 发表了多篇论文。此后有少数研究者效仿。冠醚作为手性分离剂主要用于胺类化合物对映体的分离, 手性拆分主要基于冠醚环上的氧原子和胺分子上的活泼氢形成氢键所致。冠醚的构型很灵活, 它有适应客体化合物的能力, 有很好的溶解性能, 不仅可以溶于亲水性溶剂, 也可以溶于憎水性溶剂, 如苯和氯仿, 所以 Y. Mori 等用手性冠醚的非水毛细管区带电泳分离了手性伯胺化合物。

2. 蛋白质作手性分离剂

蛋白质本身是手性化合物, 但并非所有的蛋白质都可以做手性分离剂, 在 CE 中应用自然首先选择的是在 HPLC 中用过的, 在 CE 中使用较多的是牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵粘蛋白、卵糖蛋白等。

3. 多糖类化合物作手性分离剂

用碳水化合物单独作为毛细管电泳的手性分离剂开始于 1992 年,

他们用各种聚合度的麦芽糖糊精作手性分离剂,发现聚合度愈高分离度越好。此后有许多使用离子或中性多糖类化合物作手性分离剂的报告。以肝素作手性选择剂有不少应用。

4. 大环抗生素作手性分离剂

1994年 Armstrong 把大环抗生素用作 HPLC, TLC, CE 和 SFC 的手性选择剂,他的研究组工作最多,其中利福霉素 B 可以分离多种对映异构体,万古霉素是一种高效的手性选择剂,适于分离含有羧基的化合物。最近他又提出一个新的大环家族,二(苄基异唑啉)生物碱中的 *d*-(+)-管箭毒碱盐酸盐 (DTC),分离了 18 个异构体。

5. 手性杯环芳烃作手性分离剂

杯芳烃从结构类似于环糊精和冠醚的洞穴结构,洞穴的内部是苯环电子云高度集中区域,杯的上缘开口小,是强极性的羟基,杯的下部是烃基部分,是亲脂性。通过其上部羟基的修饰和底部烃基官能团的变化。可得到各种结构的主体化合物。因此,这类化合物被称为继环糊精和冠醚之后的第三代主体化合物,具有良好的识别能力。1994年 D. Shohat 等就把 *p*-磺酸基杯 [6] 芳烃用于毛细管电泳; Baechmann 用间苯二酚环芳烃作电动毛细管色谱假固定相提高它的选择性; Hailey 基于手性环芳烃的荧光淬灭来测定手性胺的手性组分。

第六节 毛细管凝胶电泳

在毛细管内进行凝胶电泳的操作,称为毛细管凝胶电泳。一些生物大分子如 DNA 及被 SDS 饱和的蛋白质,它们的电荷/质量之比与分子的大小无关,在自由溶液中的淌度几乎没有差别,用 CZE 模式很难分离,而用凝胶电泳就能较好地分离。

一、分离原理

在毛细管凝胶电泳中,毛细管内充有凝胶或其他筛分介质,如交联或非交联的聚丙烯酰胺。电荷/质量之比相等但分子的大小不同的分子,在电场力的推动下经凝胶聚合物构成的网状介质电泳,其运动受到网状结构的阻碍。大小不同的分子经过网状结构时受阻力不同,大分子受到的阻力大,在毛细管中迁移的速度慢,小分子受到的阻力

小，在毛细管中迁移的速度快，从而使它们得以分离。

二、毛细管凝胶电泳的特点

毛细管凝胶电泳的抗对流性好，具有大的比表面积，散热性好，可以加比传统凝胶电泳高 10~20 倍的电压，所以毛细管凝胶电泳与传统板凝胶电泳相比，分析速度快、效率高。CGE 是当今分离度极高的一种电泳分离技术，是 DNA 排序的重要手段。毛细管凝胶电泳中的难题是难以制备性能良好、寿命较长的凝胶毛细管柱以及电泳过程中的气泡问题。现在研究了用非线性形聚合物溶液代替传统凝胶，进行无胶筛分，以求解决这个难题。

三、毛细管凝胶电泳的筛分介质

筛分介质是毛细管凝胶电泳分离的关键，也是毛细管凝胶电泳研究的热点问题之一。

1. 聚丙烯酰胺凝胶 (PAG)

Hjerten 首先将传统的聚丙烯酰胺凝胶引进毛细管凝胶电泳，他发现用聚丙烯酰胺凝胶电泳可以很好地分离多种蛋白质。在以后的研究中，聚丙烯酰胺凝胶也被证明是能实现单碱基分辨 DNA 聚核苷酸的高效筛分介质。但是交联聚丙烯酰胺筛孔小，限于分离较小的生物高聚物，并且制柱困难；丙烯酰胺单体在毛细管中聚合时及电泳中都极易产生气泡，影响柱子的稳定性和寿命。非交联线性聚丙烯酰胺筛孔较大，可以分析摩尔质量在 20 万的生物高聚物，装柱比较容易，但是仍有稳定性差、寿命有限的问题。

到目前为止，人们仍在广泛实验，以求找出更好的筛分剂。

2. 琼脂糖凝胶 (AG)

琼脂糖抗对流能力强，很早就用于板电泳，1988 年被用于毛细管凝胶电泳。琼脂糖凝胶的突出特点是空隙大、机械强度高、生物惰性好。

3. HydroLink 胶

HydroLink 胶早已在板电泳中获广泛应用。近年来被作为毛细管凝胶电泳的筛分介质，成功地分离了 DNA 限制片段。和聚丙烯酰胺凝胶相比，HydroLink 胶的机械强度好，可以进较大量的样品。

4. 高聚物筛分溶液

为克服传统凝胶装柱的困难,近年来进行了用非交联的高聚物溶液作筛分介质的无胶筛分毛细管电泳研究。无胶筛分的突出特点是装柱容易,不会出现气泡,电泳后可以很方便地从毛细管柱中排出,可以重复装柱。

葡聚糖是分枝形的高聚物溶液,分子量范围从 $10^4 \sim 2 \times 10^6$ 。用分子量 2×10^6 的 0.1mg/mL 葡聚糖溶液作筛分介质,按 SDS-蛋白质配合物的大小,可以分离摩尔质量很大的蛋白质,其选择性及分离效率都能与聚丙烯酰胺凝胶柱相媲美。

葡甘露聚糖是一种天然多糖,分子为线性,具有凝胶和溶液两种物理状态。在碱性溶液中煮沸呈溶液状态,分子间为绕结状态,可以用于分离较大的 DNA 片段。

此外,聚乙二醇、纤维素及其衍生物也可以用来进行无胶筛分。

第七节 毛细管等电聚焦和等速电泳

一、毛细管等电聚焦

毛细管等电聚焦是一种根据等电点差别分离生物大分子的高分辨电泳技术,等电聚焦电泳在毛细管中进行,就是毛细管等电聚焦。

1. 毛细管等电聚焦原理

两性物质的状态(以正离子、负离子或中性状态)与所处环境的酸度有关。两性物质以电中性状态存在时的 pH 值叫等电点,用 pI 表示。如氨基酸、蛋白质、多肽等在其等电点时,为电中性,淌度为零,溶解度最小。当所处环境的 pH 值大于其等电点时,两性物质以带负电形式存在;当所处环境的 pH 值小于其等电点时,两性物质以带正电形式存在。利用两性物质等电点时呈电中性、淌度等于零的特性,开发出等电聚焦电泳。

当两性物质在毛细管中形成 pH 梯度时,不同等电点的溶质在外电场的作用下,分别向其等电点的 pH 范围迁移,此过程叫聚焦。当溶质迁移到等于其等电点的 pH 范围时,就不再移动,形成一个很窄的溶质带。

由于不同两性物质的等电点不同，聚焦的 pI 范围不同，可以形成一个个独立的溶质带而彼此分开。这就是等电聚焦电泳的基本原理。

2. 毛细管等电聚焦的操作

(1) 准备

①选择等电点在适当 pH 范围的两性物质混合物，如由丙烯酸-多乙烯多胺构成的混合物，按其摩尔质量范围不同，等电点的 pH 范围在 $3 \sim 10$ ， $5 \sim 8$ ， $2 \sim 5$ 不等。根据试样组分等电点的 pH 范围去选混合物的组成，使试样各组分的等电点全部在所选混合物的 pH 范围，并使这个范围越窄越好（形成的溶质带越窄，效率高）。

②将试样以 $1\% \sim 2\%$ 的比例与所选的两性电解质溶液混合，用压力将它们压进毛细管。毛细管内溶液的 pH 等于样品与混合电解质等电点的平均值。

③将毛细管两端插入电极槽，阳极槽内装稀磷酸溶液，阴极槽装稀的氢氧化钠溶液。

(2) 开始电泳 毛细管两端加电压 ($6 \sim 8V$)，开始电泳、形成 pH 梯度、溶质聚焦。由于 pI 小于所处环境 pH 的两性电解质，带负电； pI 大于所处环境 pH 的两性电解质，带正电； pI 等于所处环境 pH 的两性电解质，为电中性。所以：

① pI 最小的电解质在毛细管中溶液平均 pH 条件下，比其他电解质带更多的负电荷，向阳极迁移最快。当移动到阳极附近磷酸界面时，溶质 pH 值突然下降至等于其等电点，使它不能再前移而停留于此。因两性物质都有一定的缓冲能力，使其周围一定范围的 pH 等于其等电点，此范围的 pH 为 pH_1 。

②等电点稍高的另一种电解质，所带负电荷比前者稍低，向阳极迁移的速度也稍慢，直至移动到 pH 等于其 pI 时，定位于前一种电解质之后，此时的 pH 范围为 pH_2 。依次类推，经过一段时间，混合电解质各组分按等电点由低到高从阳极到阴极依次排列，形成由阳极到阴极 pH 递增的梯度。与此同时，要分离的溶质也按其等电点的大小移动到等于其等电点的 pH 范围，形成独立的溶质带而彼此分离。

此时电流几乎等于零，预示着聚焦完成。

(3) 毛细管等电聚焦的迁移 通过加压或更换电解质溶液，将完成聚焦的电解质推出毛细管，使不同等电点的溶质带依次经过检测器。

注意，较大的电渗流会使两性物质及溶质在未完成聚焦以前就流出色谱柱，所以电渗流在 CIEF 中是有害的，应消除或减小。

二、毛细管等速电泳

等速电泳 (ITP) 是 70 年代发展起来的一种电泳技术。用毛细管进行等速电泳，就是毛细管等速电泳。早在 70 年代初期，荷兰爱因侯温工业大学仪器分析系教授 Everaerts 已致力于等速电泳的研究，并出版专著“等速电泳”，成为 CITP 这一分支的权威。

1. 毛细管等速电泳的原理

用两种淌度差别大的缓冲体系分别构成前导离子和尾随离子，将试样像夹心面包一样夹在二者之间，在一次电泳中可以同时分离正离子或负离子。下边以分离负离子为例说明。

前导电解质由淌度大于试样中所有负离子的电解质组成，尾随离子由淌度小于试样中所有负离子的电解质组成。所有溶质都按前导离子的速度等速前移。由阴极进样，阳极检测。当加电压后，所有负离子都向阳极迁移。因前导离子淌度最大，迁移最快，走在最前，其后是淌度次之的负离子，他们都以前导离子速度迁移，并逐渐形成独立的溶质区带而分离。

因等速电泳中常用恒流操作，不同溶质淌度不同，它们的溶质带的电场强度不同 ($v = \mu E$)，淌度大的离子区带电场强度小。所以，等速电泳中，沿毛细管出口到进口溶质排序为 1, 2, 3, …，电场强度依次增大。假如“2”号离子扩散到与之相邻的“3”号区，因 3 号区的电场强度大于 2 号区，使该离子加速迅速反回到 2 号带区；当 2 号离子误入 1 号区时，因 1 号区电场强度小于 2 号区，使此离子速度减慢，迅速归队。

2. 毛细管等速电泳的特点

①等速电泳中常用恒流操作，各溶质带保持明显的界限。

②等速电泳可以实现溶质浓缩，在其他操作模式中用来将样品预浓缩。

等速电泳和 CZE 相比，峰容量小，所以用来进行分离分析的较少，但是可利用等速电泳能使溶质在柱上堆积的特点，将样品富集、浓缩。

第八节 毛细管电泳分离操作条件的选择

毛细管电泳中分离操作条件的选择主要围绕提高分离效率和选择性考虑。在不同的毛细管电泳操作模式中，分离操作条件的选择有所不同。下边以 CZE 操作模式为例，简单说明毛细管电泳分离操作条件选择的一些共性问题。

一、缓冲溶液的选择

由毛细管电泳的原理知道，背景电解质溶液的酸度明显影响电渗流大小，影响两性物质及弱电解质的带电状况（荷电量及电性）。同时，随着电泳的进行，电极反应不断地改变两个电极附近电泳介质的氢离子或氢氧根离子的浓度，使电泳介质的酸度发生变化，从而明显影响溶质迁移时间的重现性及分离状况。从提高分离效率及分离度考虑，应该在适当酸度条件下进行电泳；从保证溶质迁移时间及分离的重现性考虑，必须保持电泳介质酸度稳定，必须在缓冲溶液中进行电泳。所以，在毛细管电泳研究中，首先要合理选择缓冲溶液。

1. 缓冲溶液的种类

缓冲溶液的种类对于电泳分离效率和分离度都有很大影响，是 CE 分离条件选择中首先要考虑的问题。但是，目前缓冲溶液的选择尚无严格的规律可循。一般而言，应考虑以下问题：

①要充分考虑到缓冲溶液的有效缓冲范围是： $pK_a \pm 1$ $pK_b \pm 1$ 。应该使缓冲溶液在所选的 pH 范围内有较强的缓冲能力。

②组成缓冲溶液的物质在所用检测波长处紫外吸收较小。这样使背景吸收小、检测灵敏度高。

③组成缓冲溶液的物质电泳淌度小。带电荷少而体积大的电解质，如三羟甲基氨基甲烷（Tris）、硼酸盐、组氨酸等本身的淌度小，

在一定工作电压下使工作电流小、焦耳热小，效率高。

④尽量选用淌度与溶质相近的物质组成缓冲溶液，有利于减小电分散作用引起的区带展宽，提高分离效率。

⑤组成缓冲溶液的物质对溶质有配位性，可提高分离的选择性。如硼砂对多元醇有配位性，在分离多元醇，如儿茶酚、糖类时，应选用硼砂缓冲溶液。

毛细管电泳中最常用来构成缓冲溶液的物质及其 pK 值如下：

名称	pK 值
磷酸盐	2.12, 7.21, 12.31
Tris	8.30
硼砂	9.24

2. 缓冲溶液的 pH 值

在 pH = 4~7 范围内，石英毛细管的电渗流随 pH 值增加而明显加大。从 $N = \frac{\mu_{sp} V L_{ef}}{2DL}$ ， $\mu_{sp} = \mu_{ef} + \mu_{eo}$ 知，提高缓冲溶液的 pH 值，使电渗流增加，表观淌度增加，缩短分离时间，有利于提高分离效率。

从提高选择性看，改变缓冲溶液的 pH 值，可改变溶质所带电荷的性质或数量，使溶质淌度改变，从而改变 CE 分离的选择性。尤其在分离等电点相近的溶质，如肽、蛋白质时，调节缓冲溶液的 pH 值对分离特别有用。当缓冲溶液的 pH 值大于溶质的等电点时，溶质带负电荷，表观迁移速度低于电渗流，在电渗流的后边流出；当缓冲溶液的 pH 值小于溶质的等电点时，溶质带正电荷，溶质的表观迁移速度大于电渗流，在电渗流的前边流出。同时，缓冲溶液的 pH 值变化又会引起电渗流变化，也明显影响分离结果。因此应该正确选择缓冲溶液 pH 值。

Terabe 研究认为，CE 分离的最合适 pH 值可以按下式计算：

$$pH = pK_a - \lg 2$$

其中 K_a 为被分离化合物的解离常数。当分离淌度相近的化合物时，可以选用 pH 略低于其解离常数的缓冲溶液，诱导产生电荷差异使溶

质的有效淌度产生差别而分离。

3. 缓冲溶液的离子强度或浓度

缓冲溶液的离子强度或浓度影响电渗流。一般来说，缓冲溶液的离子强度增加使双电层压缩、变薄，电渗流减小。缓冲溶液离子强度和电渗流的定量关系为

$$\mu_{ef} \approx \frac{e}{3.7 \times 10^7 Z \eta \sqrt{c}} \quad (11-48)$$

式中 e ——溶液中单位面积总的过剩电荷；

Z ——离子的价电子数；

c ——缓冲溶液的离子浓度；

η ——溶液的粘度。

许多实验也证明，在有效淌度和 $1/\sqrt{c}$ 之间有线性关系。

缓冲溶液离子强度对分离效率和分离度有一定的影响。

缓冲溶液离子强度变化将引起溶液粘度、扩散系数以及 ζ 电势的变化，引起电渗流变化、分离效率变化。我们在研究磷酸盐浓度对分离氯霉素中间体对映体的影响时发现，磷酸盐浓度对分离度的影响也很明显。在一定浓度范围内，分离度随着缓冲溶液浓度增大而增大，这可能由于磷酸盐浓度增加使电渗流下降，使对映体表观淌度差增加的结果。当磷酸盐浓度超过某一浓度时，分离度随磷酸盐浓度增加而增大的趋势明显减弱，这可能是磷酸盐浓度增大到一定程度时，工作电流较大，使焦耳热迅速增加，较大的焦耳热明显地引起区带展宽、分离效率下降，从而引起分离度下降的结果。

缓冲溶液的离子强度对迁移时间有一定的影响。

电渗淌度随溶液离子强度增加而减小。由 $\mu_{ap} = \mu_{eo} + \mu_{ef}$ 知，一般溶质的表观淌度也减小。由 $t = \frac{L_{ef}}{v_{ap}} = \frac{L_{ef}}{\mu_{ap} \cdot E} = \frac{L_{ef} L}{\mu_{ap} V}$ 知，在工作电压一定的情况下，迁移时间增大。在焦耳热可以忽略的情况下，迁移时间和缓冲溶液离子强度之间有如下关系：

$$t = M + B\sqrt{c} \quad (11-49)$$

式中, M 和 B 分别为与试验条件有关的常数。

上述讨论说明, 离子强度对分离效率、分离度以及迁移时间的影响是通过影响电渗流、工作电流的大小及管壁与溶质间的吸附作用等来实现的, 这是个复杂而又相互矛盾的过程。所以, 应综合考虑离子强度对分离效率、分离度及分析时间的影响, 通过实验确定合适的缓冲溶液浓度。总的选择原则是以增大离子强度, 不使工作电流明显地非线性增加为限。

二、工作电压的选择

由 $N = \frac{\mu_{app} VL_{eff}}{2DL}$ 知, 工作电压越大, 分离效率越高。但是, 工作电压越大, 使工作电流也越大, 焦耳热也越大, 焦耳热引起的区带展宽增大, 又会引起分离效率下降。所以分离体系的最佳工作电压值和体系的组成、离子强度及所用的毛细管内径、长度等因素有关。实际工作中, 到底多大工作电压合适, 要通过实验确定。即在确定的分离体系中, 测定体系的 $I-V$ 曲线, 当工作电压使工作电流非线性增大时, 表明焦耳热引起的区带展宽导致的分离效率降低, 已经超过因工作电压增大而引起的分离效率增大。所以工作电压不能太大。

三、缓冲溶液添加剂

在缓冲溶液中适当添加其他试剂, 如表面活性剂、有机溶剂、中性盐类、两性物质、手性选择剂等, 以求改善分离效率, 改变选择性, 进而改善分离度。电泳中常把这些添加的试剂统称为缓冲溶液添加剂。

表面活性剂是电泳中使用最多的一类缓冲溶液添加剂。表面活性剂单体可通过带电或亲水的一端与溶质分子的亲水端作用, 或通过其疏水端与溶质分子的疏水端发生疏水作用, 也可以与离子性溶质形成离子对或使疏水性溶质增溶, 从而改变体系的选择性。表面活性剂也能以上述方式与毛细管壁表面作用, 减小壁表面对溶质的吸附, 提高分离效率。同时, 表面活性剂吸附到壁表面, 也可能改变壁表面的电量或电性, 改变电渗流大小或方向。

当表面活性剂浓度超过其临界胶束浓度 (C_{mc}) 时, 将改变电泳

的分离机理, 形成 HPCE 的另一种操作模式——MEKC。所以此处加入表面活性剂的浓度应在其 C_{cmc} 以下。

背景电解质溶液中表面活性剂的浓度对分离有很大影响, 在实际工作中加入表面活性剂的浓度究竟多大合适, 要通过实验确定。

关于手性选择剂见第五节讲述的内容。

参 考 文 献

- 1 傅若农, 顾峻岭. 近代色谱分析. 北京: 国防工业出版社, 1998
- 2 邓延棹, 柯金兰. 高效毛细管电泳. 北京: 科学出版社, 1996
- 3 林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社, 1996
- 4 傅小芸, 吕建德. 高效毛细管电泳. 杭州: 浙江大学出版社, 1997
- 5 傅若农. 国外分析仪器. 1998, (1): 1~8
- 6 傅若农. 国外分析仪器. 1998, (2): 10~17
- 7 傅若农. 国外分析仪器. 1998, (3): 6~17
- 8 Li S F Y. Capillary Electrophoresis——Principles Practice and Application. Amsterdam: Elsevier, 1992
- 9 Braun T, et al. Trends in Anal Chem. 1991, 10: 266
- 10 Olechno J D, et al. Am Laboratory. 1990, (Dec): 30
- 11 Hijerten S. Chromatogr Rev. 1967, 9: 122
- 12 Pretorius V, et al. J Chromatogr. 1974, 23: 99
- 13 Virtanen R. Acta Polytech Scand. 1974, 123: 1
- 14 Mikker F E P, et al. J Chromatogr. 1979, 169: 11
- 15 Jorgenson J, et al. Anal Chem. 1981, 53: 1298 Science, 1993, 222, 266
- 16 Terabe S, et al. Anal Chem. 1984, 56: 111
- 17 Cohen A, et al. J Chromatogr. 1987, 397: 409

第十二章 毛细管电色谱

第一节 概 述

毛细管电色谱 (Capillary Electrochromatography, 简称 CEC) 是毛细管电泳和液相色谱的融合技术, 其柱效几乎比 HPLC 高一个数量级。包括填充柱电色谱 (Packed Capillary Electrochromatography), 开管柱电色谱 (Open Tubular Electrochromatography), 平面层电色谱 (Planar Electrochromatography) 等多种形式, 近几年在国际上引起了广泛的重视。所谓毛细管电色谱是采用电渗流来推动流动相, 不仅克服了高效液相色谱中压力流本身流速不均匀引起的峰扩展, 而且柱内无压降, 使得峰扩展只与溶质扩散系数有关, 因而使毛细管电色谱的理论塔板数远远高于高效液相色谱, 能达到接近于毛细管电泳的高理论塔板数。同时由于引入了高效液相色谱的固定相, 使毛细管电色谱具备了高效液相色谱固定相所具有的选择性, 使它不仅能分离带电物质, 也能分离中性化合物。用毛细管电色谱进行手性分离时, 既能避免高效毛细管电泳操作中频繁更换手性选择剂的缺陷, 又能达到高效率及降低操作费用。

一、毛细管电色谱的发展

早在 50 年代初期, Muold 等就将电场引入薄层色谱系统, 利用电渗流作薄层色谱流动相的推动力, 分离了胶棉中的多糖成分。1974 年, Pretorius 将电场引入毛细管填充柱色谱, 并显示了 CEC 对不保留溶质的分离效率明显高于 HPLC。但是, 由于他采用的柱直径较大, 没有能把毛细管电色谱的优越性充分发挥出来。1981 年, Jorgenson 等发表了在毛细管电泳史上具有里程碑意义的论文, 将 10 μm ODS 填料填入 170 μm i. d. 的 Pyrex 玻璃柱, 成功地分离了 9-甲基蒽等多环芳烃, 第一次向世人展示了毛细管电色谱的巨大潜力。次

年, Tsuda (津田孝雄) 采用 $30\ \mu\text{m i. d.}$ ODS 键合的钠钙玻璃开管柱, 在 13kV 电压下成功分离了 CZE 难以分离的苯、萘、联苯、蒽等芳香化合物, 进一步证明了毛细管电色谱的高效性。Martin 等研究了开管柱电色谱的轴向扩展及峰展宽, 从理论上证实了用电渗流推动流动相的优越性。1985 年, O' Farrell 讨论了在毛细管电色谱中使溶质在柱内富集的前提条件。后来, Knox 进一步研究了大量有关填充柱电色谱的理论问题, 弄清了影响填充柱电色谱中峰展宽的因素, 从理论和实验上证明了 CEC 的分离效率明显高于 HPLC, 指出了制约毛细管电色谱发展及应用的一些关键问题。1991 年, 他纠正了早期电色谱工作中的一些缺陷, 从理论上讨论了填料大小、电解质溶液浓度和电渗流速度与柱效间的关系。Yamamoto 在研究中进一步验证了 Knox 的理论。Tsuda 研究了电色谱中的色谱行为, 设计了连续进样电色谱, 并实现了 CEC 对样品的富集。至此, 有关电色谱的理论基础已全部建立, 电色谱也被越来越多的人所接受。近年来, 人们进一步探讨了各实验参数对毛细管电色谱分离的影响, Knox 于 1994 年又进一步规范了电色谱的有关术语。

二、毛细管电色谱的类型

(一) 按毛细管柱的类型分类

按毛细管柱的类型, 毛细管电色谱可以分为填充柱毛细管电色谱和开管柱毛细管电色谱。

1. 填充柱毛细管电色谱

将 HPLC 填料用适当的方法填入毛细管柱, 用电渗流或电渗流结合压力流推动流动相进行分离分析的技术, 就叫填充柱毛细管电色谱。

在填充柱毛细管电色谱中, 固定相填料往往使毛细管中的流通通道与轴向呈一夹角, 使溶质在柱内的移动距离增加, 柱内有效电场强度下降; 并且由于只能多孔填料外面才能产生电渗流, 故填充柱毛细管的电渗流速度比较小, 约为开管柱的 $40\% \sim 60\%$ 。不过, 填料的巨大比表面使填充柱对柱表面污染不敏感, 所以填充柱电色谱的流速及分离结果都比较稳定, 重复性好。

由于紫外光难以穿透硅胶颗粒, 必须把 UV 检测器装在没有填料的毛细管部分才能实现 CEC 柱上检测。所以填充柱毛细管电色谱的检测比开管柱电色谱要麻烦一些。用电渗流驱动的填充柱毛细管电色谱基本装置类似于毛细管电泳的装置, 用电渗流和压力驱动的毛细管电色谱就要复杂一些。

在填充柱毛细管电色谱中, 因柱内无压降, 流动相的流型基本为塞式流动, 和 HPLC 靠压力驱动的流动相为层流相比, 区带加宽小, 理论塔板数要高得多。近来的研究表明, 填充柱毛细管电色谱对非保留溶质的塔板数高达 40 万/m, 对保留溶质也能达到为每米 15 万~20 万。

不过目前填充柱毛细管电色谱也还存在一些问题, 阻碍它广泛地使用。

①在柱的装填中, 沙芯塞的制作非常重要, 沙芯塞的烧制技术性很强, 使用者自己制备毛细管电色谱的填充柱比较困难, 如果买商品柱, 目前的价格太高, 又易于损坏, 因此大大影响了这一方法的推广。

②在进行填充柱毛细管电色谱分离时, 电极反应及填料与空柱间存在的速度差很容易使柱内产生气泡, 造成电流中断, 使分离失败。此外, 当电解质浓度超过 6mmol/L 时, 柱内也容易产生气泡。所以, 填充柱毛细管电色谱的操作中, 选择缓冲液的浓度格外重要。Knox 研究指出, 缓冲液浓度在 2mmol/L 左右时比较合适, 不容易产生气泡。但是, 当采用低电导的缓冲体系时, 可以使用较高浓度的缓冲溶液, 并且能增加分离的重现性。

③由于在运行电渗流驱动的毛细管电泳时柱内产生气泡, 所以有人主张辅以压力驱动, 但是这样一来使仪器复杂化, 也影响柱效。近来 HP 公司的 HP^{3D}毛细管电泳系统把色谱柱两端施加压力, 可以使 CEC 柱坚固而长时间的使用。

2. 开管柱毛细管电色谱

将 HPLC 固定相用化学的或物理的方法涂渍在毛细管内壁上, 用电渗流或电渗流与压力一起驱动流动相的分离技术, 就叫开管柱毛

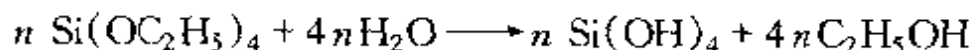
细管电色谱。

如果不加压力驱动,在普通毛细管电泳仪上就可以进行开管柱毛细管电色谱操作。所以,开管柱毛细管电色谱的仪器、特别是检测比填充毛细管电色谱简单。因把固定相交联或键合在毛细管柱内壁上,涂层稳定,不易被流动相冲掉。同时,因为柱表面硅羟基被屏蔽了一些,电渗流比毛细管区带电泳明显减小。所以开管柱毛细管电色谱分离度高、分离的重复性比较好。

早在1982年Tsuda就用开管柱毛细管电色谱成功地分离了CZE难以分离的苯、萘、联苯、蒽等芳香化合物。后来,Mayer将环糊精聚硅氧烷固定相在柱内交联并分离了手性化合物。Guo用溶胶-凝胶法制备的C₈-涂层柱来分离多环芳烃;Chevolleau用C₁₈-键合柱分离了β-兴奋剂混合物。证明了开管柱毛细管电色谱具有良好的应用前景。

近来有人采用溶胶-凝胶技术制备开管柱用于电色谱分离,如C₈开管柱。溶胶-凝胶技术是指金属有机或无机化合物经过溶液、溶胶、凝胶而固化,再经热处理而成氧化物或其他化合物固体的方法。近几年来,采用溶胶-凝胶技术制备有机-无机杂化材料在功能材料领域受到了很大的重视。这种技术也被成功用于制备色谱开管柱。用溶胶-凝胶法制备色谱柱的实质是混合金属硅醇盐的共水解。

一般情况下,采用单一原料正硅酸乙酯TEOS进行水解时可以用酸催化加速水解,缩短凝胶化时间(用碱催化则由于水解迅速而产生硅酸沉淀)。TEOS在酸性条件下,经水解-缩合生成SiO₂的化学反应如下:



(二) 按流动相的驱动方式分类

按照流动相的驱动力,毛细管电色谱分为电渗流驱动的电色谱和电渗流与压力联合驱动的毛细管电色谱。

1. 电渗流驱动的毛细管电色谱

电渗流驱动的毛细管电色谱可以在一般HPCE商品仪器上进行,是目前研究较多的电色谱。在这种电色谱中,既引入了高选择性的

HPLC 固定相, 提高了电泳的分离能力, 又克服了压力驱动的流体引起的区带展宽, 可以实现高效、高选择性分离。但是, 因电渗力的限制, 难以驱赶出在电泳过程中产生的气泡, 电泳操作常因气泡而中断, 使实验失败。

2. 电渗流和压力联合驱动的毛细管电色谱

在电渗流和压力联合驱动的毛细管电色谱中, 液相泵产生的压力流可以使操作中产生的气泡冲出毛细管或者使气体在高压下溶解, 从而解决了填充柱电色谱在电泳过程中产生气泡的问题。用电渗流和压力联合驱动的流动相, 不仅使流动相的平均线速比相同条件下的 HPLC 中的大, 缩短了分析时间, 而且能减小压力流引起的区带展宽, 使分离效率比 HPLC 明显提高, 操作的稳定性及重复性也更好。并且, 在电渗流和压力联合驱动的毛细管电色谱中还能像 HPLC 那样进行梯度洗脱。除了用泵来产生压力流外, 还可以采用在柱两端加压的方式给系统加压, 在这种情况下可以使用较高浓度的缓冲液和较高的操作电压。但是, 在电渗流和压力联合驱动的毛细管电色谱中, 需要加泵或加压装置, 还要特别注意防止高电压对泵可能造成损伤的问题。现在, Tsuda 用一根毛细管已经较好地解决了高电压对泵的损伤问题。

三、毛细管电色谱的特点

图 12-1 是分别用 CZE、电渗流驱动的毛细管电色谱和开管微柱液相色谱方法分离同一个样品的图谱。

从图 12-1 的结果充分说明, CEC 的突出特点是:

- ①分离效率比 HPLC 高;
- ②选择性比毛细管电泳高;
- ③分析速度快, 分析结果重复性好;
- ④能实现样品的富集和预浓缩。

毛细管电色谱, 随着 CEC 理论、技术的不断完善, 毛细管电色谱有可能成为毛细管电泳和 HPLC 的完美结合, 将成为非常有发展前途的、将高效、高速、高选择性和富集、预浓缩样品集于一身的新型分离分析技术。

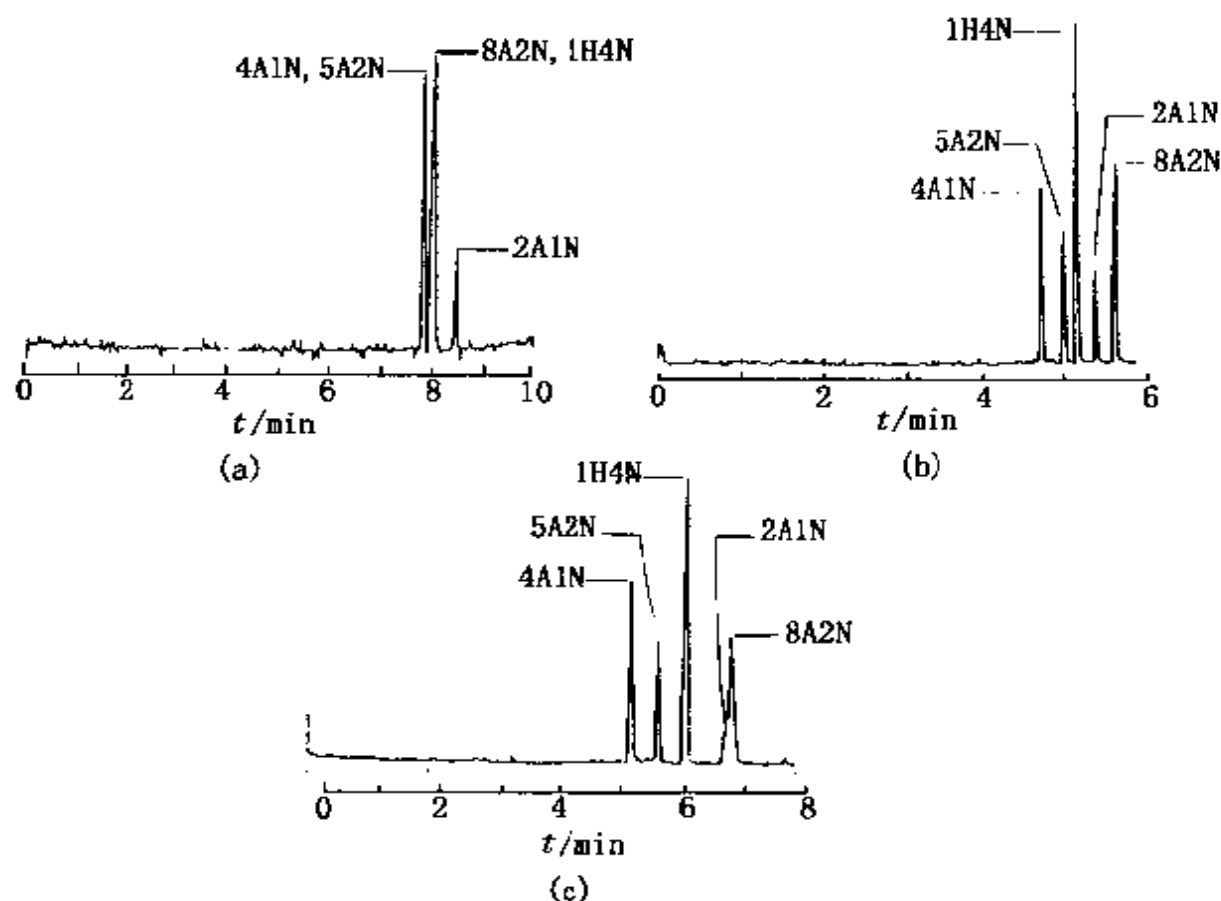


图 12-1 毛细管电泳、电渗流驱动的毛细管电色谱和开管微柱液相色谱的分离结果比较 (LC-GC INTL, 5 (9): 26)

(a) CZE: 未涂渍的弹性石英柱, $50\text{cm} \times 10\mu\text{m i.d.}$ 、有效长度 40cm ; 背景电解质溶液: 10mmol/L 缓冲溶液, $\text{pH}7.0$, 加入 1.25mmol/L

四丁基氢氧化铵; 操作电压: 21kV

(b) 电渗流驱动的毛细管电色谱: 毛细管 $50\text{cm} \times 10\mu\text{m i.d.}$,

壁涂 PS-264 固定相; 其他条件同 (a)

(c) 开管微柱液相色谱: 色谱柱同 (b) 洗脱液同 (a) 施加电压为零。

溶质: 4A1N—4-氨基-1-萘亚磺酸; 5A2N—5-氨基-2-萘亚磺酸,

1H4N—1-萘酚-4-亚磺酸; 2A1N—4-氨基-1-萘亚磺酸;

8A2N—8-氨基-2-萘亚磺酸

第二节 毛细管电色谱的基本原理

一、分离机理

毛细管电色谱是将毛细管电泳和高效液相色谱技术相结合的分析技术。它的分离机制包含有电泳迁移和色谱固定相的保留机理。

电渗流在 CEC 中有很重要的作用, 在毛细管电色谱中和毛细管

电泳一样电渗流对分离结果及分析的重现性有重大影响。当毛细管开管柱中背景电解质溶液的 pH 值等于或大于 3 时，毛细管内表面的硅羟基开始解离，解离的硅羟基因静电引力吸引背景电解质溶液中的阳离子，在毛细管内壁形成双电层。当毛细管两端施加高电压时，产生流向阴极的电渗流。

在填充了液相色谱固定相填料（如硅胶）的毛细管中，也有电渗流产生。在背景电解质溶液中，填料表面残留硅羟基解离和静电吸附两种作用，使硅胶颗粒周围形成双电层，在高压电场下形成流向阴极的电渗流，如图 12-2 所示。

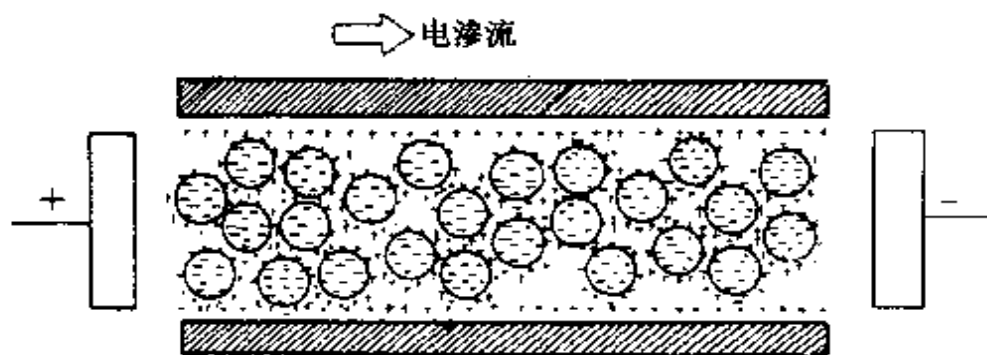


图 12-2 填充毛细管中的电渗流

Pretorius 研究指出，填充毛细管中的电渗流速度大小为

$$v_{eo} = \frac{\gamma E \epsilon \zeta}{4 \pi \eta} = \frac{V \epsilon \zeta}{4 L \pi \eta} \quad (12-1)$$

式中 E ——电场强度；

ϵ ——流动相介电常数；

η ——流动相粘度；

V ——电场电压；

γ ——无量纲的因数，根据填充床的弯曲度和疏松度不同，其范围为 0.4~0.7；

ζ ——填料颗粒表面与电解质溶液界面双电层的 Zeta 电势，

其大小为 $\zeta = \frac{\delta e}{\epsilon \epsilon_0}$ ；

δ ——填料颗粒表面与电解质溶液界面双电层的厚度。

对于二元电解质溶液，其双电层的厚度为

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 RT}{2cF^2}} \quad (12-2)$$

式中 ϵ_0 ——真空介电常数；
 R ——气体常数；
 T ——实验时的绝对温度；
 c ——背景电解质溶液的浓度；
 F ——法拉第常数。

Knox 的研究表明，只要填料颗粒表面的双电层不重叠（填料粒径 $\geq 0.5\mu\text{m}$ ），电渗流速度就与填料大小无关。对于既定的背景电解质溶液，在操作电压一定的情况下，填充毛细管中的电渗流为一定值，流动相的线速度一定，不像 HPLC 的流动相线速度明显受填料粒度大小的影响。所以，CEC 中作为流动相的背景电解质溶液线速度不受填料粒度、填充均匀程度等的影响，因而分离效率高，重复性好。

像毛细管电泳中一样，毛细管电色谱中的电渗流大于大多数溶质离子的电泳淌度。因而，电渗流带动溶质离子一起向阴极移动。

二、保留机制

溶质在电色谱中的迁移速度 v 和电渗流速度、溶质的电泳速度以及溶质在流动相、固定相之间的分配情况有关。其大小可用 (12-3) (12-4) 式表示。

$$v = \frac{1}{k+1} (v_{ef} + v_{eo}) \quad (12-3)$$

$$k = \frac{n_s}{n_m} = K_d \frac{V_s}{V_m} \quad (12-4)$$

式中 v_{eo} 、 v_{ef} ——分别为系统的电渗流速度和溶质的电泳速度；
 k ——溶质在毛细管系统中的柱容量因子，其大小决定于溶质在固定相与流动相间的分配系数。

中性物质在 CEC 中的迁移速度为

$$v = \frac{v_{eo}}{k+1} \quad (12-5)$$

公式(12-3)、(12-4)、(12-5)说明,溶质在CEC中的保留性能与它在系统的固定相与流动相间的分配系数有关。所以,在CEC中离子型化合物的保留机制既有电泳机制,也有色谱的分配机制;而对于中性化合物溶质,就仅有色谱分配机制了。

三、分离效率

在CEC中,分离效率仍用理论塔板数 N 或理论塔板高度 H 表示。影响分离效率的因素可用 Van Deemter 方程描述:

$$H = A d_p + \frac{B D_m}{v} + \frac{C v d_p^2}{D_s} \quad (12-6)$$

式中 D_m 、 D_s ——分别代表溶质在流动相和填充颗粒内部的扩散系数;

v 、 d_p ——分别代表流动相的线速度和填充颗粒的粒度;

A 、 B 、 C ——分别代表 Van Deemter 方程常数。

对于开管柱毛细管电色谱,涡流扩散项 $A d_p$ 等于零。对于填充毛细管电色谱,由于流动相是塞式平流,填料颗粒直径一般仅在 $1.5 \sim 3.0 \mu\text{m}$, 所以涡流扩散项 $A d_p$ 和在 HPLC 中的相比很小,可以忽略。(12-6) 式中的第三项为传质阻力项,其大小主要由溶质在填充颗粒内部的扩散系数决定。在 CEC 的一般操作条件下,传质阻力引起的区带展宽很小,对塔板高度的贡献可以忽略。

所以,在理想情况下影响 CEC 分离效率的因素就只有纵向扩散项。这是 CEC 分离效率大大高于 HPLC 的根本原因。再者,CEC 采用柱上检测和电动进样,死体积和进样量都比 HPLC 小得多,这也是 CEC 分离效率高的主要原因。

第三节 毛细管电色谱实验条件的选择

一、操作电压

由式(12-1),增加操作电压可以增大电渗流速度,缩短分析时间。由于填充毛细管电色谱中的电渗流比开管柱电色谱的电渗流低很多(仅是开管柱的 $40\% \sim 60\%$),工作电流很小,柱中的热效应小,焦耳热可以忽略。所以,从提高电渗流速度、缩短分析时间考虑,可以选用很高的工作电压。但是,过高的工作电压,比如在 $1000\text{V}/\text{cm}$

以上时,柱内易产生气泡,使实验中断,严重时可能使柱子报废。

二、缓冲溶液 pH 值

缓冲溶液 pH 值明显影响电渗流。一般而言,随着缓冲溶液 pH 值增大,系统的电渗流增大,溶质表观迁移速度加快,而柱容量因子基本不变。因此,通过提高缓冲溶液 pH 值,可以达到提高分析速度的目的。

三、背景电解质浓度

背景电解质浓度增加,使双电层压缩、变薄,并且使电解质离子间形成离子对的几率增大,溶质表面有效电荷减小。所以,提高背景电解质浓度,可使电渗流速度下降。但另一方面,背景电解质浓度增加,使工作电流增大,热效应增大,过高的焦耳热极易使填充柱电色谱系统产生气泡。所以,填充柱电色谱中背景电解质浓度一般不超过 6mmol/L ,以 2mmol/L^{-1} 为宜。如果采用低电导的电解质体系如 Tris,工作电流比同浓度下的高电导电解质体系要低得多,热效应引起的气泡问题就小得多。此时可以采用高浓度的背景电解质体系。

四、有机溶剂

往缓冲溶液中加入有机溶剂时,引起溶液粘度、介电常数变化,必然引起电渗流速度和溶质迁移时间的改变。在毛细管电泳中,一般来说,加入乙腈和增加乙腈在缓冲溶液中的比例,使电渗流减小。但是在毛细管电色谱的实验中却发现与之相反,随着加入乙腈浓度的增加,电渗流线性增大。所以,提高乙腈浓度,电渗流速度增加,可以提高冲洗能力;降低乙腈浓度,电渗流速度减小,可以提高 CEC 的分离度。

第四节 毛细管电色谱柱

制备毛细管电色谱柱是 CEC 分离的关键和前提。目前,制备毛细管电色谱柱的方法有拉制法和填充法两种。

一、拉制法

拉制法制备毛细管电色谱柱的方法是:将选择好的色谱填料在 400°C 干燥过夜后,将其装入一端封闭的直径 $1\sim 2\text{mm}$ 的玻璃管中,

用拉伸机将玻璃管拉至所需的长度，另一端用玻璃棉封口。

拉制法制备毛细管电色谱柱成功率较低，柱内壁不均匀，分离的重现性较差。并且，由于键合相填料不能拉制，所以对键合相填料不能用拉制法制备毛细管电色谱柱。

二、填充法

填充法制备毛细管电色谱柱的方法又分为压力法和电填充法两种。

选择适当的有机溶剂和所用的 HPLC 填料（粒度在 $1\sim 10\mu\text{m}$ ）混匀，经超声制成匀浆，灌入不锈钢柱，边振荡边用高压泵或电泳力将其填充入一端有塞子的毛细管，用适当的方法做塞子封住毛细管口，完成填充法制备毛细管电色谱柱。

配制匀浆的有机溶剂大多用甲醇或乙腈。

压力法制备填充毛细管柱需用高压泵，装置复杂，过程繁琐，填料易堆积，重现性差；电泳力填充法需用时间短，填充均匀，效果较好，是目前比较成功的制备填充毛细管电色谱柱的方法。

三、填充毛细管柱塞子的制备

像 HPLC 柱一样，在 CEC 毛细管填充柱的两端也需要有沙芯塞。目前，一般采用烧结的办法制备塞子。先将 $3\sim 5\mu\text{m}$ 的硅胶或硅酸钠（水玻璃）装入毛细管一端至适当长度，再用火焰将硅胶或硅酸钠烧结固化，制成塞子。研究中发现，用硅胶作原料、以水玻璃作烧凝剂制备的塞子，在重现性及均匀性方面与填入的固定相填料制作塞子相比有较大差距。因此，现在人们先用上述方法烧结出第一个塞子，再将填入固定相填料的毛细管另一端烧结，直接将固定相填料烧结成真正的进口塞子。为使进、出口塞子同质，将第一个塞子截去，再将这一端的固定相填料烧结成和进口塞子一样的出口塞子。这样制得的塞子无论在强度、均匀性及重现性上都比较满意。

塞子的制作质量不仅对 CEC 的分离效率影响很大，而且质量差的塞子还会导致 CEC 操作失败。理想的塞子应该具有良好的透气性，对流动相的阻力应尽可能小，能使流动相和分析物顺利通过；强度足够大，保证固定相不流失；有一定的化学惰性，不受流动相中有机溶

剂的影响,在一定 pH 范围内性能稳定;死体积尽可能小。

现在,采用通常的烧结法制作的塞子还远不能满足上述要求。所以,研究制备方法简单、性能优良的塞子,仍是制备 CEC 填充柱中需要解决的一个大问题。

第五节 毛细管电色谱的应用

毛细管电色谱作为一种新的高效微柱分离技术,自 80 年代末建立以来,已经进行了多方面的应用研究。从目前文献报道的情况看,毛细管电色谱的应用研究主要围绕以下方面。

一、多环芳烃及药物中间体的分离分析

在对电色谱理论、仪器研究的同时,已经在许多方面,尤其是在医药工业中进行了大量的应用研究。表 12-1 列出 CEC 在分离多环芳烃及药物中间体中的一部分应用研究。

二、手性分离

用手性毛细管电色谱柱或将手性选择剂加到 CEC 流动相中,可以实现手性分离。自从 Mayer 和 Schurig 将 Chirasil-Dex 热交联,制得了毛细管电色谱手性柱并分离了 1-苯基乙醇等手性化合物,第一次实现了毛细管电色谱的手性分离以来,许多研究者在 CEC 的手性分离理论、手性选择剂及实验研究方面做了大量工作,表明 CEC 不仅能高效、高速分离带电荷的旋光异构体,而且可以分离中性及疏水性光活性物质。比如:

表 12-1 CEC 分离多环芳烃及药物中间体

分 析 物	色 谱 柱	测 定 条 件
丙酮、苯乙醇、苯乙醚、 肽酸二甲酯、苯甲醚、苯甲 酸甲酯、甲苯、苯甲酸苯酯	50cm × 50 μ m id., 填充 C18-Exsil 填料, 1.5 μ m	流动相: 1mmol/L 硼酸 盐缓冲溶液, 水 + 乙腈 = 30 + 70 电场强度: 50kV/cm
Fluticatione Propionate 及 其相关的杂质	60cm × 50 μ m id., Spherisorb ODS 填料, 3 μ m	流动相: 1mmol/L 硼酸 盐缓冲溶液, 水 + 乙腈 = 20 + 80 电场强度: 40kV/cm

续表

分 析 物	色 谱 柱	测 定 条 件
苯甲醇、苯乙醇和苯丙醇 及杂质	28.1cm $\times$ 100 μ m id., ODS 填料, 3 μ m, 填充长度 16.5cm	流动相: 7.13mmol/L 硼 酸盐缓冲溶液, 水 + 乙腈 = 55 + 45 操作电压: 13kV
苯胺、联苯胺、间硝基苯 胺、对硝基苯胺	28.1cm $\times$ 100 μ m id., ODS 填料, 3 μ m, 填充长度 16.5cm	流动相: 7.13mmol/L 硼 酸盐缓冲溶液, 水 + 乙腈 = 10 + 90 操作电压: 13kV
硫脲、苯甲醛、苯乙醇	27cm $\times$ 75 μ m id., 填料为 3 μ m ODS, 填充长度 20cm	流动相: 5mmol/L 磷酸 盐缓冲溶液, 水 + 乙腈 = 20 + 80 操作电压: 10kV
间苯二酚、萘、芴、蒽、 蒾、蒹	35.3cm $\times$ 100 μ m id., Nucleosil 100-3-C18 填 料, 3 μ m, 填充长度 30.5cm	流动相: 乙腈、硼酸盐缓 冲溶液, 水 + 乙腈 = 10 + 90 操作电压: 30kV

1. CEC 分离光活性物质利尿剂氯噻酮

色谱柱: 58cm $\times$ 50 μ m, id., 27cm 键合到硅胶上的 HP- β -CD 填料, 粒度为 5 μ m, 填充长度 27cm; 背景电解质溶液: 5mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH6.5, 水 + 乙腈 = 70 + 30, 操作电压: 15kV。

2. 分离 8 种 DNP-氨基酸消旋体

Lloyd 用 50 μ m 弹性石英毛细管填充 β -CD 手性固定相制成手性柱, 对中性物二苯乙醇酮、己巴比妥及阴离子 DL-苏氨酸、8 种 DNP-氨基酸消旋体进行了分离研究, 考察了缓冲溶液组成、酸度、浓度、有机溶剂浓度、电渗流改性剂、工作电压等对分离的影响, 优化了分离条件, 使研究对象都很好地分离。用大量事实再次证明 CEC 手性分离的巨大潜力。

三、样品富集和预浓缩

Tsuda 在用压力驱动电色谱分离 N-甲基苯基吡啶时, 发现在柱两端加上电压时, 溶质不出峰, 而不加电压时, 溶质就被压力流冲出色谱柱, 由此揭示了电色谱可以作为富集技术对样品进行浓缩的可能性。此后, 他一直致力于这方面的研究。近来 Tsuda 用 CEC 技术、

以 0.1~0.4mL/min 流量, 在 15mm×1.5mm 柱上施加 300~800V/cm 的电压, 对萘磺酸、鲑鱼 DNA 等进行富集。富集后浓度为原浓度的 10~47 倍, 进一步证实了电色谱作为富集技术的潜力。

参 考 文 献

- 1 傅若农, 顾峻岭. 近代色谱分析. 北京: 国防工业出版社, 1998
- 2 李方, 顾峻岭, 傅若农. 色谱. 1997, 15 (5): 392
- 3 Knox J H, et al. Chromatographia. 1991, 32 (7/8): 317
- 4 施维, 邹汉法, 张津等. 色谱. 1996, 14: 351
- 5 傅若农. 国外分析仪器. 1998, (2): 10
- 6 GuoY, et al. Anal Chem. 1996, 67 (15): 2511
- 7 李方等. 科学通报. 1998, 45 (4): 446

符 号 表

A	气相色谱速率理论中的涡流扩散项
B	气相色谱速率理论中的纵向扩散项, 或叫分子扩散项
B_0	比渗透率
Brij 35	聚氧乙烯 (23) 十二烷醇
CD	环糊精
c	色谱流出曲线上任意一点的浓度
C	气相色谱速率理论中的传质阻力项
C_l	液相传质阻力项
CE	毛细管电泳
CE	毛细管气相色谱柱涂渍效率
CEC	毛细管电色谱
C_g	气相色谱速率理论中的气相传质阻力项
C_m	每 1mL 流动相中含有溶质的质量
C_s	每 1mL 固定相中溶解溶质的质量
CTAB	十六烷基三甲基溴化铵
CZE	毛细管区带电泳
D_4	八甲基环四硅氧烷
d_f	气相色谱中固定液在载体上的平均厚度
D_G	气相色谱中溶质在载气中的扩散系数
D_L	气相色谱中溶质在固定相中的扩散系数
DMCS	二氯二甲基硅烷
d_p	气相色谱载体颗粒的平均直径
EC	电色谱
ECD	电子俘获检测器
ELSD	蒸发激光光散射检测器
EOF	电渗流
EPC	电子压力控制
FFF	场流分离

FID	氢火焰离子化检测器
FPD	火焰光度检测器
GC	气相色谱
GCE	毛细管凝胶电泳
GDX	高分子多孔小球
H	理论塔板高度
h	峰高
h_r	折合板高, 折合成固定相单位粒径的理论板高
HMDS	六甲基硅氮烷
HPLC	高效液相色谱
I	保留指数
IC	离子色谱
CITP	毛细管等速电泳
ITP	等速电泳
ΔI	保留指数差
j	色谱柱进口和出口之间的压力梯度校正系数
K	分配系数
K'	气相色谱容量因子
k	液相色谱容量因子
L	色谱柱的柱长
L_{eff}	毛细管电泳中毛细管的有效长度
MECC, MEKC	胶束电动色谱
MLC	胶束液相色谱
M_r	相对分子质量
n	理论塔板数, 折光指数
n_{eff}	有效板数
n_{te}	分离所需的理论塔板数
NPD	氮磷检测器
ODS	十八烷基键合硅胶
p_i	色谱柱进口压力;
PLOT	多孔层毛细管柱
PID	光离子化检测器
p_0	色谱柱出口压力
PyGC	裂解气相色谱

R	气相色谱分离度; 裂解气相色谱裂解器升温速度
R_h	峰高分离度
$R_{h/2}$	半高峰宽分离度
$r_{i,s}$	相对保留值
S'	麦克瑞诺常数中代表吡啶的 ΔI
SCOT	载体涂层毛细管柱
SFC	超临界流体色谱
SDS	十二烷基硫酸钠
TCD	热导检测器
t_{cs}	电渗流标记物 (中性物质) 的迁移时间
T_{eq}	平衡温度
TID	热离子检测器, 又叫氮磷检测器 (NPD)
T_p	裂解气相色谱裂解器裂解温度
TRT	裂解气相色谱裂解器的升温时间
t_M	死时间
t'_R	调整保留时间
TDX	碳多孔小球
TLC	薄层色谱法
$\bar{u}$	气相色谱中载气的平均流速
U	麦克瑞诺常数中代表 1-硝基丙烷的 ΔI
V	在色谱流出曲线上任意一点的保留体积
V_p	从进样开始计算的通过色谱柱的实际洗脱体积
V_{ext}	进样系统到检测器之间色谱柱以外的液路部分流动相所占有的 体积
V_R	气相色谱比保留体积
V_G	死区域, 色谱柱内流动相的体积
V_h	液相色谱的流体力学体积
V_L	固定液的体积
V_M	死体积
V_N	净保留体积
V_p	液相色谱填料中所有孔洞中流动相所占有的体积
v_r	液相色谱的折合流动相速度
V_R	保留体积

V_R'	调整保留体积
V_0	粒间体积; 液相色谱填料颗粒间隙中流动相所占有的体积
V_{tot}	液相色谱液系统中粒间体积、孔体积和柱外体积之和
W	峰宽
WCOT	壁涂毛细管柱
$W_{h/2}$	半高峰宽
w	质量分数
X'	麦克瑞诺常数中代表苯的 ΔI
Y'	麦克瑞诺常数中代表正丁醇的 ΔI
Z'	麦克瑞诺常数中代表 2-戊酮的 ΔI
α	分离因子
β	气相色谱的相比率
γ	气相色谱速率理论中和气相色谱柱中与载体填充情况有关的常数; 液体的表面张力
δ	溶解度常数; 双电层的厚度
ϵ	介电常数
λ	气相色谱速率理论中和载体颗粒大小及分布、填充均匀情况有关的常数
μ	电泳淌度, 简称淌度
μ_{ab}	绝对淌度, 是指无限稀释溶液中荷电粒子在单位电场强度下的平均迁移速度
μ_{ap}	表观淌度
μ_{ef}	有效淌度, 是指实验中测得的离子淌度
μ_{eo}	电渗淌度
U_{ap}	表观迁移速度; 离子在实际电泳中的迁移速度
U_{eo}	电渗流速度
ξ	毛细管壁的 zeta 电势
ρ_L	固定液的密度
σ	标准偏差
φ	体积分数