

液相色谱分析法模块之 任务6 分离条件的选择与优化

教学任务

- 进行多环类芳烃类混合物测定的分离条件选择试验
- 根据实验数据，归纳总结条件选择的方法，选择的最佳分离条件
- 评价色谱柱的性能，了解色谱柱性能的评价方法

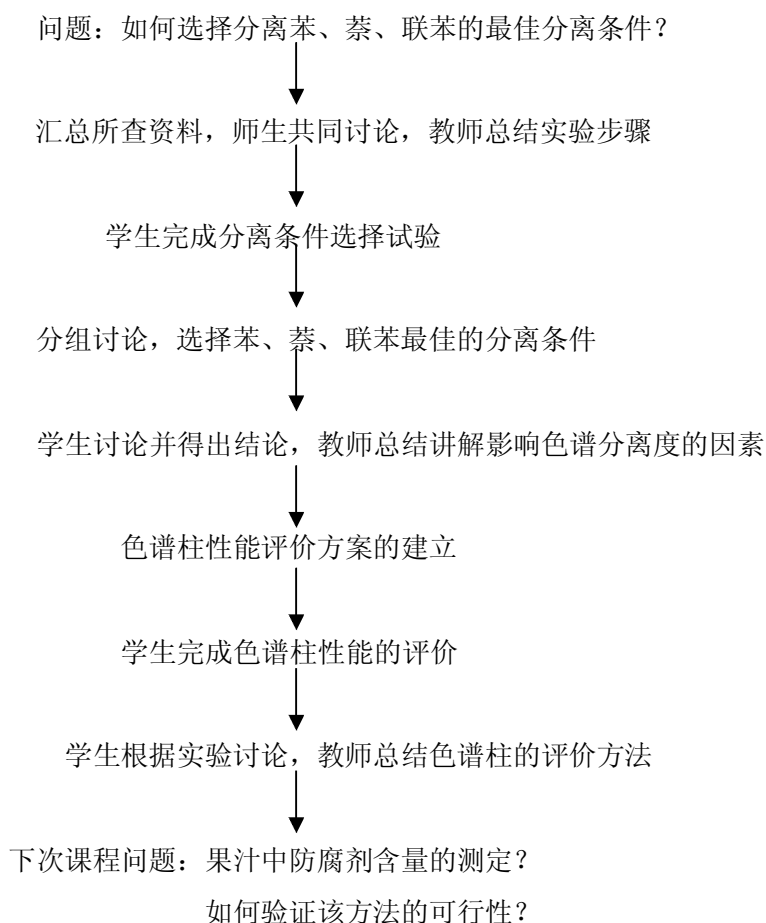
教学方法

- 引探和讲练结合

教学学时

- 每20人为一个学习组，4人一台液相色谱仪，分组循环操作，整个任务需6学时。

教学设计



课程引入

- 问题：苯、萘、联苯为芳烃类混合物，如何选择最佳的色谱分离条件，既能达到良好的分离度，又能在短时间内完成分析任务？

(上次课结束后即布置并安排学生在课后查阅资料)

- 学生根据所查资料提出解决方案并进行现场讨论以确定每组的实验方案。

(教师引导学生,指出分离条件包括的内容,如流动相比例、流速的调节、色谱柱的选择等。)

- 根据学生已能熟练操作液相色谱仪,并有了系统的液相色谱知识,因此,本项目经分组讨论后,直接进行操作。

学生操作: 苯、萘、联苯最佳分离条件的选择

(本过程教师学生自行操作,但在操作过程中,教师是辅导者,及时指正解惑)

- 改变流动相的比例,进行条件实验
- 改变流速,进行条件实验
- 记录下样品名对应的文件名,同时打印出经优化的色谱图和分析结果
- 通过处理数据,运用逻辑思维能力和判断能力对各组实验数据进行取舍

学生对测定过程提问、相互讨论与教师的阶段总结

(本过程教师对学生的疑惑进行解释)

- 在操作中,每改变一次流动相比例,仪器均需平衡后方可进样。
- 分离度、理论塔板数和分析时间,作为判断分离条件合适的参考参数。
- 学生根据实验数据,每组得出苯、萘、联苯最佳的分离条件。
- 其它注意事项:本项目的测定使用有毒有害的甲醇、苯溶剂,在操作时要注意安全。(教师分析液相色谱实验室内所有溶剂的危害性,以及实验室内可能存在的隐患,提醒学生注意试剂瓶的密封性、废液的及时处理等防患于未然的措施。)

影响分离度的因素

(教师可结合气相色谱的分离理论进行讲解)

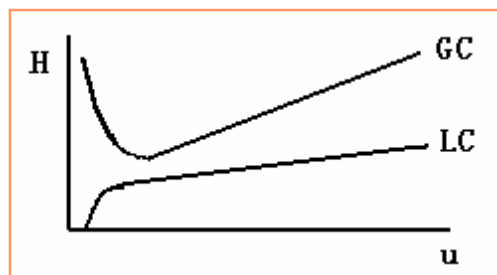
- 影响分离的因素与提高柱效的途径

在高效液相色谱中,液体的扩散系数仅为气体的万分之一,则速率方程中的分子扩散项 B/u 较小,可以忽略不计,即: $H = A + C u$

故液相色谱 $H-u$ 曲线与气相色谱的形状不同,如图所示。

- 液体的黏度比气体大一百倍,密度为气体的一千倍,故降低传质阻力是提高柱效主要途径。
- 由速率方程,降低固定相粒度可提高柱效。
- 柱温,影响不大。

- 等梯度洗脱的基本分离度公式

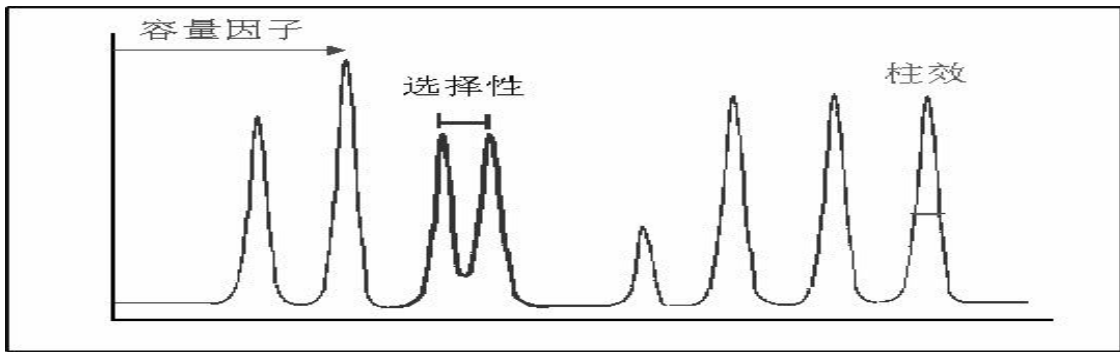


$$R = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{柱效}} \times \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{选择性}} \times \underbrace{\frac{k'}{1 + k'}}_{\text{容量因子}}$$

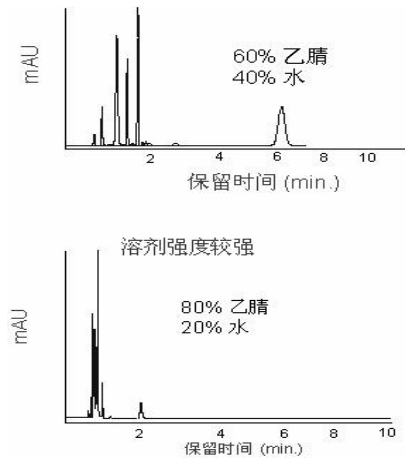
N: 总的理论塔板数; 柱效

k': 容量因子 (保留因子), 色谱峰的保留作用

α: 色谱峰的相对分离程度; 选择性作用



➤ 容量因子与分离度

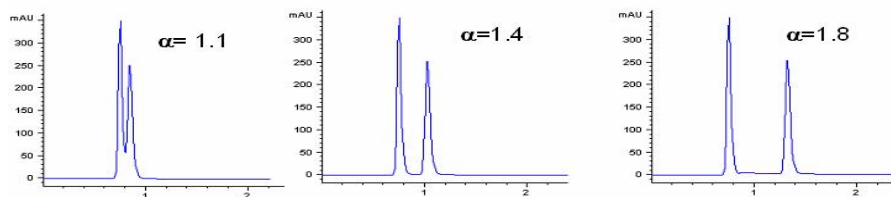


改变色谱峰容量因子的最重要的方法是改变流动相的组成.

- 增加流动相的强度可降低流出物的容量因子.
- 对于反相色谱, 有机相增加 10% 将使每个色谱峰的容量因子降低2到3倍.

➤ 选择性与分离度

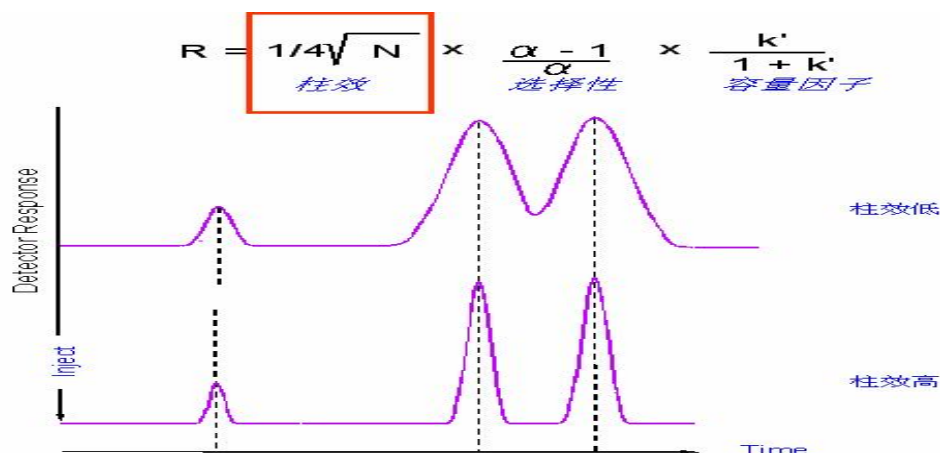
$$R = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{柱效}} \times \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{选择性}} \times \underbrace{\frac{k'}{1 + k'}}_{\text{容量因子}}$$



$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

- 流动相组成
- 流动相种类
- 流动相的 pH
- 色谱柱温度
- 化学作用 - 添加剂
- 固定相

➤ 柱效与分离度



改变流动相组成、极性（pH值、强度或梯度洗脱）是改善柱效的最直接的因素。

□ 梯度洗脱技术

➤ 作用

在分离保留值范围较宽的复杂混合物时，随着保留值的增大，色谱峰变宽，使峰的检测发生困难，如果保留值太大，会发生样品洗脱不下来的情况，采用梯度洗脱可以解决这一类的问题。梯度洗脱可以改进复杂样品的分离，改善峰形，减少拖尾并缩短分析时间。

➤ 种类

(1) 线性梯度：在某一段时间内连续而均匀增加流动相强度。

(2) 阶梯梯度：直接从某一低强度的流动相改变为另一较高强度的流动相。

学生完成色谱柱的评价实验

- 在选定的分离条件下，进行色谱柱的评价实验
- 要求每位学生独立完成进样，独立处理数据，合理安排时间。
- 废液的处理必须有专门的容器。

色谱柱性能的评价

一支色谱柱的好坏要用一定的指标来进行评价，一个合格的色谱柱评价报告应给出色谱柱的基本参数，如柱长内径、填充载体的种类、粒度、柱效等。评价液相色谱柱的仪器系统应满足相当高的要求，一是液相色谱仪器系统的死体积应尽可能小，二是采用的样品及操作条件应当合理，在此合理的条件下，评价色谱柱的样品可以完全分离并有适当的保留时间。下表列出了评价各种液相色谱柱的样品及操作条件。

评价各种液相色谱柱的样品及操作条件

| 柱 | 样 品 | 流动相(体积比) | 进样量/ μg | 检测器 |
|---------------------------------------|---------------------|---|--------------------|----------|
| 烷基键合相柱($\text{C}_8, \text{C}_{18}$) | 苯、萘、联苯、菲 | 甲醇-水(83/17) | 10 | UV 254nm |
| 苯基键合相柱 | 苯、萘、联苯、菲 | 甲醇-水(57/43) | 10 | UV 254nm |
| 氰基键合相柱 | 三苯甲醇、苯乙醇、苯甲醇 | 正庚烷-异丙醇(93/7) | 10 | UV 254nm |
| 氨基键合相柱(极性固定相) | 苯、萘、联苯、菲 | 正庚烷-异丙醇(93/7) | 10 | UV 254nm |
| 氨基键合相柱(弱阴离子交换剂) | 核糖、鼠李糖、木糖、果糖、葡萄糖 | 水-乙腈(98.5/1.5) | 10 | 示差折光检测 |
| SO_3H 键合相柱(强阳离子交换剂) | 阿司匹林、咖啡因、非那西汀 | $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸胺-乙醇(90/10) | 10 | UV 254nm |
| RNCl 键合相柱(强阴离子交换剂) | 尿苷、胞苷、脱氧胸腺苷、腺苷、脱氧腺苷 | $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸盐溶液(加 KCl)(pH9.2) | 10 | UV 254nm |
| 硅胶柱 | 苯、萘、联苯、菲 | 正己烷 | 10 | UV 254nm |

① 流速为 $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, 对柱内径为 5.0 mm 的色谱柱最大流量大约为 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

下次课程问题

- 苯甲酸和山梨酸是我国目前最常用的食品防腐剂，广泛应用于各种果汁饮料中，以防止其变质。但如果防腐剂的含量超过标准限度，或者长期饮用含有防腐剂的饮料，则会对人体健康造成不良影响，因此检测果汁中的苯甲酸和山梨酸含量是非常有必要的，请设计方案检测果汁中的苯甲酸和山梨酸?并对选定的分析方法予以验证。