

逆流法对凝胶色谱峰加宽效应的研究*

高玉书 桑明敏** 叶美玲 乐慧娟 丁幼康 应琦琮

(中国科学院化学研究所)

摘 要

在以无孔玻璃珠为填料的色谱柱上研究了流动相中的分离能力和峰加宽效应。得到一定的分离能力。根据 Kelley 和 Billmeyer 描述流动相中峰加宽效应的理论,塔板高度和溶液的分子量有关而和分子量分布无关。但实验表明,对于具有相同分子量,但分子量分布不同的样品峰宽不同。苯的逆流峰加宽因子 h 稍大于直流峰加宽因子 h' 。产生这个差别的原因可以用在逆转过程中流速场受到干扰来解释。

在以多孔硅胶为填料的柱中对一系列不同分子量、分子量分布和化学结构的样品考察了逆流峰加宽因子, h , 和淋出体积, V_e , 之间的关系。实验表明 h 和 V_e 之间的关系具有普适性,这个结果和 Tung 的一致。在多孔填料柱上对苯同样得到 $h > h'$ 。这个结果意味着用逆流法得到的 h 来校正 GPC 体系造成的峰加宽稍嫌不够。

只有对于分子量分布很窄的样品,其逆流淋出曲线的形状才非常接近高斯分布。

应用凝胶渗透色谱测定聚合物分子量分布时,从实验中得到的谱图 $F(V)$ 不仅反映了试样本身的分子量分布,而且还有溶液经色谱体系(色谱柱、连接管路、浓度检测器样品池等)造成的峰加宽效应。因此对于普通凝胶色谱实验得到的谱图必须进行改正才能得到样品的真正分子量分布。Tung^[1] 提出了一个对色谱图进行改正的方法

$$F(V) = \int_{-\infty}^{\infty} G(v - y)W(y)dy \quad (1)$$

式中 $F(V)$ 和 $W(y)$ 分别代表实验色谱图和真实的分子量分布, $G(v - y)$ 是仪器的加宽函数,通常以高斯函数表示

$$G(v - y) = \left(\frac{h}{\sqrt{\pi}} \right) \exp[-h^2(v - y)^2] \quad (2)$$

式中 h 为柱的峰加宽因子

$$h = \frac{1}{\sqrt{2} \sigma} \quad (3)$$

σ 是高斯分布曲线的标准偏差。Tung 以及许多作者^[2]提出了各种解积分方程(1)的方

* 1981年4月4日收到。 ** 北京化工研究所。

法,以从实验谱图 $F(V)$ 得到 $W(y)$ 。

为了解方程式(1),首先要知道峰加宽因子 h 。Tung^[3] 用逆流实验提出从实验上获得 h 的方法。因为逆流法可以消除试样分子量分布的影响,本文的目的是借助这一方法对于流动相中的分离作用,加宽效应和分子量,分子量分布的关系和在多孔填料上用逆流法获得 h 的准确性等问题进行研究。

实 验 部 分

1. 仪器: SNJ 75-1 型凝胶色谱仪,带有四通阀;

2. 填料: (1) 无孔玻璃珠(粒度 <300 目), 表面硅烷化处理; (2) 多孔硅胶(天津试剂二厂产品), 1L (粒度 <300 目), 2L (粒度 <300 目), 3L (粒度 <250 目), 5L (粒度 <250 目), 6L (粒度 <250 目), 表面硅烷化处理。

3. 色谱柱: 无孔玻璃珠柱三根, 每根长 1 米, 内径 10 毫米; 多孔硅胶柱五根, 每根长 1 米, 内径 10 毫米。

4. 检测器: 示差折光仪, 灵敏度 5×10^{-5} R. I. U/满刻度。

5. 实验条件: 温度: 20℃; 溶剂: 四氢呋喃; 流速: 1.5 毫升/分; 虹吸管体积: 2.2 毫升; 进样量: 无孔玻璃珠柱为 0.5 毫升; 多孔硅胶柱为 1.2 毫升。

结 果 和 讨 论

1. 流动相中的峰加宽效应

Kelley 和 Billmeyer^[4] 和 Yau^[5] 等都对流动相中峰加宽问题进行过研究。本文的目的之一是研究逆流对这个效应的影响, 无孔玻璃珠为填料的柱三根, 每根长 1 米, 总理论塔板数为 13000 (用苯测试)。

(1) 进样量对色谱峰宽的影响: 表 1 是苯溶液 ($C = 0.12$ 克/100 毫升) 淋出曲线半峰宽 $W_{1/2}$ 和进样量的关系

表 1 无孔玻璃珠柱进样量对峰加宽的影响

定量管体积(毫升)	$W_{1/2}$ (毫米)
1.2	4.0
0.7	3.7
0.5	3.5
0.3	3.5

从表 1 看出, 由于进样量过大使峰变宽。当进样量小于 0.5 毫升后, 不再对色谱峰宽有显著影响, 下面的实验即选用 0.5 毫升的定量管。

2. 流动相中的分离效应

表 2 列出苯和不同分子量的窄分布聚苯乙烯标样的淋出曲线峰值 V_r 和分子量的关系。

图 1 是聚苯乙烯-7 ($M = 2.7 \times 10^6$) 和乙腈 ($M = 41$) 混合液的淋出曲线。虚线是这两个样品单独进样的淋出曲线, 虽然乙腈极性较强, 但从峰形和位置看, 并未产生吸附

表 2

样 品	分子量	浓 度 (克/100 毫升)	V_p (标记数)	h' (标记数) ⁻¹	h (标记数) ⁻¹	$\Delta(\%)^*$
苯	78.1	0.176	38.0	2.41	2.46	2.0
聚苯乙烯-1	2350	0.105	38.0	2.04	2.17	6.2
聚苯乙烯-4	1.1×10^5	0.100	38.6	1.78	1.93	8.0
聚苯乙烯-6	4.7×10^5	0.098	37.8	1.79	1.89	5.4
聚苯乙烯-7	2.7×10^6	0.102	37.6	1.21	1.45	18.0
聚苯乙烯-B	1.18×10^5	0.178	38.0	1.58	1.89	17.9

$$* \Delta = 2(h - h') / (h + h')$$

现象。由于聚苯乙烯的折光指数 ($n = 1.605$) 大于四氢呋喃的折光指数 ($n = 1.407$), 而乙腈的折光指数 ($n = 1.344$) 小于四氢呋喃的折光指数, 所以由示差折光检测器记录出的淋出曲线方向不同。从图 1 看出聚苯乙烯先于乙腈淋出, 表明柱子有一定的分离能力。这个结果和 Yau^[5] 的相反。为了进一步证实, 我们将聚苯乙烯-7 ($M = 2.7 \times 10^6$) 和聚苯乙烯-1 ($M = 2350$) 的混合溶液在这三根玻璃珠柱上做再循环实验^[11]。图 2 是经过 1 次,

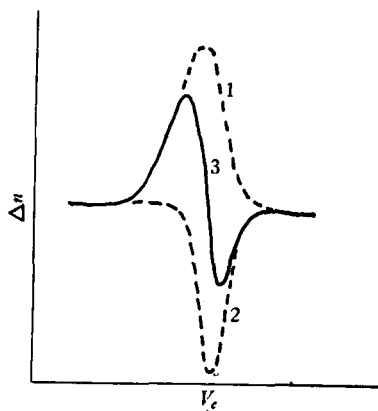


图 1 聚苯乙烯-7, 乙腈及其混合溶液的淋出曲线
1. 聚苯乙烯-7; 2. -乙腈; 3. 聚苯乙烯-7+乙腈。

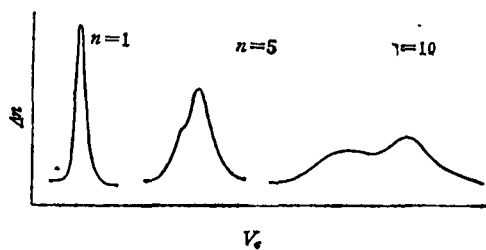


图 2 聚苯乙烯-1 和聚苯乙烯-7 混合溶液的再循环淋出曲线 (n 为循环次数)

5 次和 10 次循环的淋出曲线。结果是毋庸置疑的。

Guttman 和 DiMarzio^[6] 以及 Vorhoff 和 Sylverster^[7] 都曾提出过凝胶色谱的流动分离理论。其基本点是在毛细管内由于流速场之存在以及管壁效应, 使尺寸大的分子被集中到靠近毛细管的中心部位, 这里的流速较大, 因此先流出来。Mori 等^[8]曾把细玻璃棒烧结在一起作为色谱柱, 细棒之间形成一组平行的毛细管。他们的实验结果表明, 对于不同分子量的聚苯乙烯样品, V_p 值有差别, 说明有分离能力, 但对于混合样品没有得到双峰。球形粒子作为填料时, 在粒子之间的狭缝也构成不同尺寸(截面、长度)排列杂乱的毛细管, 在这些毛细管中存在着流速场。然而除了流场的作用外, 由于粒子堆积很紧密, 在粒子和粒子相互接触的部位附近一定会形成一些特殊的空间, 在这些空间内不同尺寸的溶质分子能够活动的范围不同, 即这部分空间有孔的体积排除作用。所以在无孔玻璃珠柱中的

分离可能这两种效应都在一定程度上起作用。

3. 在流动相中峰加宽效应的分子量和分子量分布依赖性

在这组无孔玻璃珠柱中对苯、聚氯乙烯-B ($\bar{M}_w/\bar{M}_n \approx 2.9$) 和四种窄分布的聚苯乙烯标样进行了直流和逆流实验, 其结果列于表 2 的第 5 和第 6 列。 h' 是从直流实验淋出曲线按 (3) 式计算的峰加宽因子, h 是由逆流实验淋出曲线按 (4) 式计算的值

$$h = \left(\frac{2}{\frac{1}{h_{1 \rightarrow 2}^2} + \frac{1}{h_{2 \rightarrow 1}^2}} \right)^{1/2} \quad (4)$$

式中 $h_{1 \rightarrow 2}$ 和 $h_{2 \rightarrow 1}$ 分别表示由逆流法得到的柱子两部分加宽因子。

按照 Kelley 和 Billmeyer^[4,9] 的理论, 在流动相中峰的加宽由三个因素组成: 纵向分子扩散, 涡流扩散和由于在柱截面上填料粒子堆积密度不均匀而导致在柱内存在流速场。在流动相内形成的塔板高度, H_M 的表示式为

$$H_M = \frac{2\phi D_m}{U} + 2\lambda d_p + \frac{2KR_c^2}{\phi \frac{D_m}{U} + \lambda d_p} \quad (5)$$

式中 ϕ 是扰动因子, λ 是涡流扩散因子, d_p 是填料粒子的直径, D_m 是分子扩散系数, U 是流速, K 是流型常数(和柱子的纵横比有关), R_c 是柱半径。

塔板高度 H_M 和峰加宽因子 h' 的关系是

$$H_M = \frac{L}{V_p^2} \frac{1}{2h'^2}$$

式中 V_p 是淋出曲线峰值, L 是柱长。

(5) 式右方第一项是纵向分子扩散项, 可以忽略不计。Cooper 等^[10]曾用聚苯乙烯胶为填料的柱分离窄分布聚苯乙烯 ($M = 2,030$), 样品在柱中停留 17 天后的淋出曲线和直接得到的非常接近。我们也在三根无孔玻璃珠柱中以苯为溶质, 停流 17 小时后继续进行淋洗, 所得谱图和未停流的也很相似。这都说明纵向分子扩散作用是很小的。

第二项是涡流扩散, 它的作用较大。从式中可以看出, 它和溶质的分子量无关。

第三项是流速场的作用, 通过分母上的扩散系数和分子量有关。表 2 中的 h' 随分子量的增加而单调地减小, 表明实验和理论定性地相符。

由式 (5) 表示的流动相中产生的塔板高度没有反映溶质分子量分布的影响。表 2 中 h 是逆流实验的峰加宽因子, 它是通过两次独立测试, 由 (4) 式计算的。前面已经证明, 溶质分子在流经粒间狭缝时有一定的分离作用, 因此在描述流动相中的峰加宽作用时应当在 (5) 式右方再加上一个能反映分子量分布的因子, 这个结论还可从下述实验结果进一步证实。分布比较宽的聚氯乙烯-B、和窄分布聚苯乙烯-4 的淋出体积峰值和 h 值都很接近 $V_p = 38.0$ (聚苯乙烯-4), $V_p = 38.0_1$ (聚氯乙烯-B), h (聚苯乙烯-4) = 1.93, h (聚氯乙烯-B) = 1.89, 但 h' 值相差很大即 h' (聚苯乙烯-4) = 1.79, h' (聚氯乙烯-B) = 1.58。 h 值接近是由于在逆流过程中, 消除了多分散性的作用, h' 的差别反映了这两个样品分子量分布宽度的不同。

苯是单分散的, 其 h, h' 值应相等, 但在这组无孔玻璃珠柱上的 $h' = 2.41$ 和 $h = 2.47$ 相差约 2%, 它和下面从多孔硅胶柱中得到的结果是一致的。在逆流实验中, 涡流扩散的作用和流动方向无关。流速场的贡献是: 在柱内液体先沿某一方向流动(直流), 形成一

定的速度梯度场。逆流开始时破坏了流速场, 干扰了溶质的分布, 在反向流动过程中形成的流速场内溶质层继续加宽, 结果是 $h > h'$ 。

4. 多孔硅胶柱中的峰加宽效应

本文用一组多孔硅胶柱的 $\log M - V_p$ 标定曲线如图 3 所示。分子量最大的两个聚苯乙烯标样 ($2.7 \times 10^6, 3.7 \times 10^6$) 都已超过渗透极限, 而低分子量部分自 35000 以下也偏离于线性关系。总柱效为 12000 理论塔板数 (苯测定)。

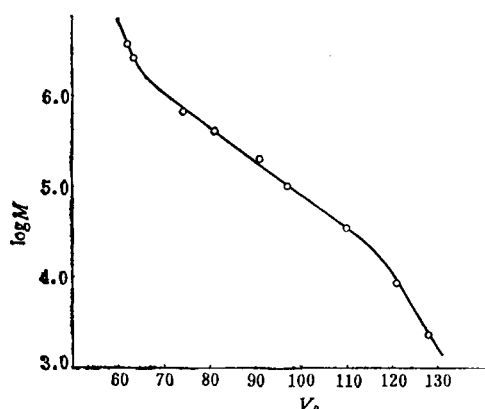


图 3 多孔硅胶柱 $\log M - V_p$ 标定曲线

(1) A 峰加宽因子 h 的浓度依赖性

图 4 表明聚苯乙烯分子量大的样品, 当浓度大于 0.1 克/100 毫升时, 随着浓度增大 h 减小 (淋出曲线的峰值基本未变)。当聚苯乙烯浓度为 0.1 克/100 毫升左右时, h 没有浓度依赖性。

(2) B 峰加宽因子 h 的普适性

对一系列不同化学结构, 不同分子量, 不同分子量分布的样品在多孔硅胶柱上进行了直流和逆流实验, 结果列于表 3。从图 5 看出几乎所有的实验点都集中到一条曲线附近, 表明了 h 的普适性。

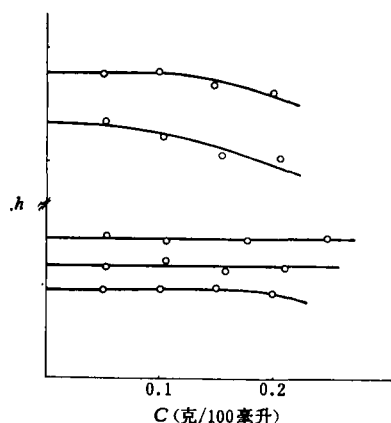


图 4 多孔硅胶的峰加宽因子 h 的浓度依赖性
曲线自下至上的顺序为: PS-4、PS-1、苯、PS-7、PS-6。

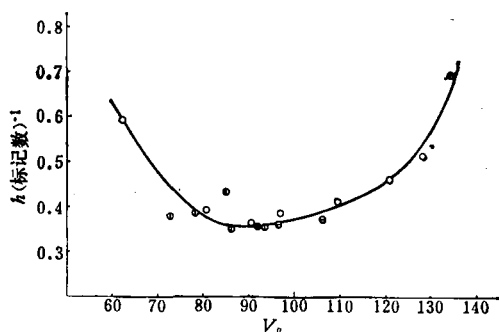


图 5 多孔硅胶柱峰加宽因子 h 和 V_p 的关系

(3) 小分子溶质在多孔硅胶柱中直流和逆流的加宽因子

Tung^[3] 用苯乙烯二聚体的直流加宽因子 h' 代替逆流加宽因子 h , 即认为二者是相同的。表 4 表明, 在此浓度范围内 h 和 h' 没有浓度依赖性, 但有差别, $h > h'$, 平均相差约 6%。我们认为是逆转过程中流速场受到干扰, 使在流动相中流速场效应对峰加宽的贡献有改变而产生差别。加宽因子和峰宽成反比, $h > h'$ 表明用逆流法得到的关于峰加宽的效应比真实的要低, 即用逆流加宽因子 h 对实验谱图进行峰加宽改正仍稍有不够。

(4) 淋出曲线的峰形

表 3

样 品	M	V_r (标记数)	$\frac{h}{(标记数)^{-1}}$
聚苯乙烯-1*	2350	128.0	0.41
聚苯乙烯-2	8500	120.8	0.36
聚苯乙烯-3	3.5×10^4	109.3	0.31
聚苯乙烯-4	1.1×10^5	96.6	0.28
聚苯乙烯-5	2.0×10^5	90.4	0.26
聚苯乙烯-6	4.7×10^5	80.4	0.29
聚苯乙烯-7	2.7×10^6	62.7	0.49
聚苯乙烯-8	3.7×10^6	62.0	—
NBS-706		84.8	0.33
聚甲基丙烯酸甲酯-a	—	78.0	0.29
聚甲基丙烯酸甲酯-b	—	93.3	0.25
聚甲基丙烯酸甲酯-c	—	86.0	0.25
聚甲基丙烯酸甲酯-d	—	72.5	0.28
聚氯乙烯-A**	6.8×10^4	106.0	0.27
聚氯乙烯-B**	1.18×10^5	96.3	0.26
SBSTR-1101	—	91.7	0.26
苯	78.1	134.0	0.59

* 聚苯乙烯-1-8 为窄分布标样

** 表中的分子量为重均, $\bar{M}_w$ 。(聚氯乙烯-A) = 25.500 $\bar{M}_w$ 。(聚氯乙烯-B) = 4.1×10^4

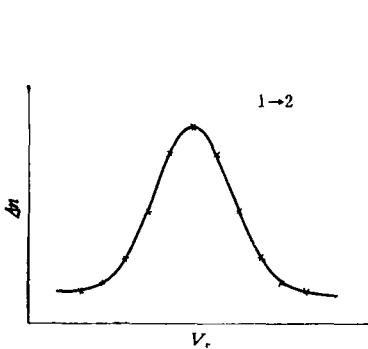


图 6 聚苯乙烯-3($M = 35000$)的逆流淋出曲线

× 是按高斯分布计算的点 1→2 表示液流方向
是从小孔径部分向大孔径部分。

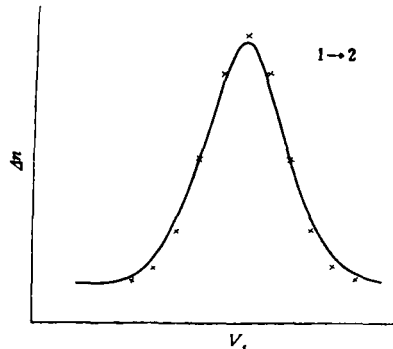


图 7 NBS-706 的逆流淋出曲线

图 6 是聚苯乙烯-3($M = 35000$)的逆流淋出曲线和高斯分布曲线的比较,二者比较符合。图 7 是 NBS-706 的逆流淋出曲线,虽然峰形是对称的,但稍偏离于高斯分布。

致谢: 本文中所用的无孔玻璃珠由杨亚君同志进行表面处理,深表感谢。

参 考 文 献

- [1] Tung, L. H., *J. Appl. Poly. Sci.*, **10**, 375(1966).
- [2] Rosen, E. M. and Provder, T., *Separation Sci.*, **5**, 485(1970); Vladimirff, T., *J. Appl. Polym. Sci.*, **14**, 1397(1970); *J. Chromatog.*, **55**, 175(1971).

- [3] Tung, L. H. and Ruryon, J. R., *J. Appl. Polym. Sci.*, **13**, 2397(1969); Tung, L. H., Moore, J. C. and Knight, C. W., *J. Appl. Polym. Sci.*, **10**, 1261(1966); Tung, L. H., *Separation Sci.*, **5**, 339(1970); Tung, L. H. and Moore, J. C., In *Fractionation of Synthetic Polymers* (Tung, L. H., ed.) Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1977, Chap. 6.
- [4] Kelley, R. N. and Billmeyer, F. W., *Anal. Chem.*, **41**, 874(1969).
- [5] Yau, W. W., Malone, C. P. and Suchan, H. L., *Separation Sci.*, **5**, 259(1970).
- [6] Guttman, C. M. and DiMarzio, E. A., *Macromolecules*, **3**, 681(1970); DiMarzio, E. A. and Guttman, C. M., *J. Polym. Sci.*, Part B, **7**, 267(1969).
- [7] Verhoff, H. F. and Sylvester, N. D., *Macromol. Sci. Chem.*, **A4**, 979(1970).
- [8] Mori, S., Porter, R. S. and Johnson, J. F., *Anal. Chem.*, **46**, 1599(1974).
- [9] Kelley, R. N. and Billmeyer, F. W., *Sep. Sci.*, **5**, 291(1970).
- [10] Cooper, A. R., Bruzzzone, A. R. and Johnson, J. F., *Appl. Polym. Sci.*, **13**, 2029(1969).
- [11] 高玉书等特发表

STUDY OF GPC ZONE BROADENING EFFECT BY MEANS OF REVERSE FLOW METHOD

Gao Yushu, San Mingmin, Ye Meiling, Le Huijian,
Ding Youkang and Ying Qicong
(Institute of Chemistry, Academia Sinica)

ABSTRACT

The separation ability and zone broadening effect in mobile phase have been studied by using GPC columns packed with nonporous glass beads. Polymer samples of different molecular weight could be separated to some extent on these columns. Kelley and Billmeyer indicated that the theoretical plate height describing zone broadening effect in mobile phase depends on the molecular weight of solute only. However, the width of peak was found to be different in samples of the same molecular weight but of different molecular weight distribution in the present investigation. The reverse flow zone broadening factor, h , of benzene is somewhat larger than the straight through flow zone broadening factor, h' . This may be explained by the fact that the velocity profile of flow was disturbed during reverse flowing.

In GPC columns packed with porous silica beads the dependence of reverse flow zone broadening factor, h , on elution volume, V_e , has been examined for a series of samples of different chemical structure, different molecular weight and different molecular weight distribution. Experimental results showed that the relation between h and V_e is universal, independent of chemical structure of polymer samples in agreement with Tung's. $h > h'$ was also found for benzene in columns with porous packing. This indicates that the use of h value obtained from the reverse flow method may lead to slight underestimation of the zone broadening effect in GPC.

The shape of reverse flow elution curve was found to be very close to Gaussian only for polymer samples with narrow molecular weight distribution within the pre-meation limit of the column used.