

凝胶色谱的仪器扩展效应*

程 镭 时

(中国科学院应用化学研究所)

摘 要

从对董履和积分方程作矩数分析的结果, 建议了两种对凝胶色谱扩展效应作改正的简便方法。引进了改正因子 ξ 以对实验谱图作改正。当色谱柱是线性柱时, 对校准关系作改正可以给出等同的结果。仪器扩展函数可以定义为

$$G(V, V_R) = \lim_{B_M^* \rightarrow 0} F(V),$$

其中 B_M^* 为多分散试样分子量的对数与淋出体积间实际关系的斜率。

凝胶色谱的实验谱图 $F(V)$ 与真实谱图 $W(V_R)$ 之间的关系可以用 Tung^[1] 提出的积分方程

$$F(V) = \int_{V_R} W(V_R) G(V, V_R) dV_R \quad (1)$$

表示, 其中 V_R 为单分散组分的保留体积, V 为实际淋出体积, $G(V, V_R)$ 是单分散组分的仪器扩展函数。关于怎样从 $F(V)$ 求取 $W(V_R)$ 的问题, 虽然已经建议了许多方法^[1-6], 但是都很复杂, 必须使用电子计算机。本工作从 Tung 方程的矩数分析的结果出发, 给出了两种非常简单的改正方法, 并进一步讨论了扩展函数的定义和测量方法。

矩 数 分 析

分布 $G(V, V_R)$ 、 $W(V_R)$ 和 $F(V)$ 的零次矩数 μ_0 分别是它们的归一化条件, 即

$$\int_V G(V, V_R) dV = 1,$$

$$\int_{V_R} W(V_R) dV_R = 1,$$

$$\int_V F(V) dV = 1.$$

一次矩数 μ_1 是各个分布的均值。从定义, $G(V, V_R)$ 的均值是单分散组分的保留体积

$$V_R = \int_V G(V, V_R) V dV,$$

$W(V_R)$ 的均值是

$$\bar{V}_R = \int_{V_R} W(V_R) V_R dV_R,$$

* 本刊于1980年3月26日收到。

而 $F(V)$ 的均值

$$\begin{aligned}\bar{V} &= \int_V F(V) V dV = \int_V \int_{V_R} W(V_R) G(V, V_R) dV_R \cdot V \cdot dV \\ &= \int_{V_R} W(V_R) \int_V G(V, V_R) V dV dV_R \\ &= \int_{V_R} W(V_R) V_R dV_R = \bar{V}_R,\end{aligned}\quad (2)$$

则与 $W(V_R)$ 的均值相等。

各个分布的二次矩数 μ_2 是它们的方差。 $G(V, V_R)$ 的方差 σ_0^2 是由仪器扩展效应所引起,

$$\sigma_0^2 = \int_V G(V, V_R) (V - V_R)^2 dV = \int_V G(V, V_R) V^2 dV - \bar{V}_R^2. \quad (3)$$

$W(V_R)$ 的方差 σ_M^2 是由于高聚物试样的多分散性所造成,

$$\sigma_M^2 = \int_{V_R} W(V_R) (V_R - \bar{V}_R)^2 dV_R = \int_{V_R} W(V_R) V_R^2 dV_R - \bar{V}_R^2. \quad (4)$$

$F(V)$ 的方差 σ_T^2 按定义可写成

$$\begin{aligned}\sigma_T^2 &= \int_V F(V) (V - \bar{V})^2 dV = \int_V F(V) V^2 dV - \bar{V}^2 \\ &= \int_{V_R} W(V_R) \int_V G(V, V_R) V^2 dV dV_R - \bar{V}^2.\end{aligned}$$

将式(2)式(3)和式(4)代入上式,得

$$\sigma_T^2 = \int_{V_R} W(V_R) \sigma_0^2 dV_R + \sigma_M^2.$$

当扩展函数与保留体积无关时, σ_0^2 是一个常数, 上式中的积分项

$$\int_{V_R} W(V_R) \sigma_0^2 dV_R = \sigma_0^2 \int_{V_R} W(V_R) dV_R = \sigma_0^2;$$

如 σ_0^2 依赖于保留体积, 此积分代表试样的 σ_0^2 的平均值, 可记作

$$\int_{V_R} W(V_R) \sigma_0^2(V_R) dV_R = \langle \sigma_0^2 \rangle.$$

这样, $F(V)$ 的方差可以写成

$$\sigma_T^2 = \langle \sigma_0^2 \rangle + \sigma_M^2. \quad (5)$$

在上面的推导里, 完全没有牵涉到分布 $W(V_R)$ 、 $G(V, V_R)$ 和 $F(V)$ 的具体形式, 所以导得的结果都是具有普遍意义的规律。

实验谱图的改正

以相等的体积间隔 ΔV 将归一化的实验谱图 $F(V)$ 划分成多个区间, 则在曲线下面各个区间 i 的面积相当于在该区间内淋出高聚物的重量分数 $w(V_i)$, 如图 1 所示。 $F(V)$ 的各个矩数可分别写成

$$\begin{aligned}\int_V F(V) dV &= \sum_i w(V_i) = 1, \\ \bar{V} &= \int_V F(V) V dV = \sum_i w(V_i) V_i,\end{aligned}\quad (6)$$

$$\sigma_T^2 = \int_V F(V)(V - \bar{V})^2 dV = \sum_i W(V_i)(V_i - \bar{V})^2. \quad (7)$$

如果真实谱图 $W(V_R)$ 也以相同的分割数目划分成等间隔 ΔV_R 的体积区间, 它的各个矩数可写成

$$\begin{aligned} \int_{V_R} W(V_R) dV_R &= \sum_i W(V_{R,i}) = 1, \\ \bar{V}_R &= \int_{V_R} W(V_R) V_R dV_R = \sum_i W(V_{R,i}) V_{R,i}, \end{aligned} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \sigma_M^2 &= \int_{V_R} W(V_R)(V_R - \bar{V}_R)^2 dV_R \\ &= \sum_i W(V_{R,i})(V_{R,i} - \bar{V}_R)^2, \end{aligned} \quad (9)$$

其中 $W(V_{R,i})$ 为相应的重量分数。

令体积间隔 ΔV_R 和 ΔV 宽度的比值为

$$\xi = \frac{\Delta V_R}{\Delta V} = \frac{V_{R,i} - \bar{V}_R}{V_i - \bar{V}} \quad (10)$$

由于 $\bar{V}_R = \bar{V}$, 上式成为

$$V_{R,i} = \bar{V} + \xi(V_i - \bar{V}). \quad (11)$$

代入式(9)中得

$$\sigma_M^2 = \xi^2 \sum_i W(V_{R,i})(V_i - \bar{V})^2. \quad (12)$$

假定

$$W(V_{R,i}) = W(V_i), \quad (13)$$

这在物理意义上相当于构造一个模型分布 $W(V_{R,i})$ 作为真实分布 $W(V_R)$ 的一个近似, 则式(12)成为

$$\sigma_M^2 = \xi^2 \sum_i W(V_i)(V_i - \bar{V})^2. \quad (14)$$

将式(7)代入上式, 得

$$\sigma_M^2 = \xi^2 \sigma_T^2 \quad (15)$$

这样, 比值 ξ 可以看成是扩展效应的改正因子。将式(5)代入式(15), 得到

$$\xi^2 = (\sigma_T^2 - \langle \sigma_0^2 \rangle) / \sigma_T^2.$$

即

$$\xi = [1 - (\langle \sigma_0^2 \rangle / \sigma_T^2)]^{1/2}. \quad (16)$$

如果 $\langle \sigma_0^2 \rangle$ 的数值已知, 改正因子 ξ 很容易从实验谱图 $F(V)$ 的方差 σ_T^2 按式(16)计算得到。再从式(11)和式(13)即可作出改正谱图 $W(V_{R,i})$ 。由于这样得到的模型分布 $W(V_{R,i})$ 与真实分布 $W(V_R)$ 具有相等的一次矩数和二次矩数, 所以从 $W(V_{R,i})$ 和色谱柱的校准关系 $M(V_R)$ 可以计算得到数均分子量和重均分子量的真值。

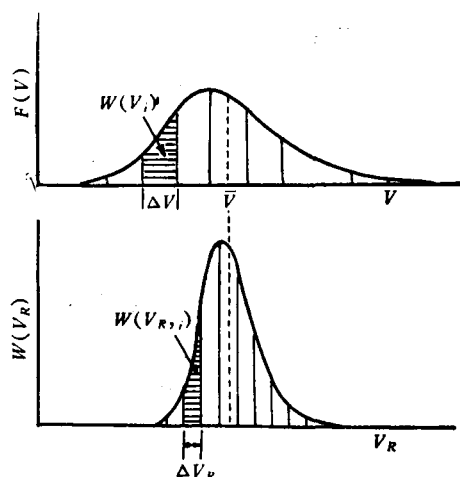


图1 实验谱图与真实谱图的分割

校准关系的改正

凝胶色谱的校准关系 $M(V_R)$ 指的是当色谱柱在理想工作状态下,即无扩展效应时单分散组分的分子量与保留体积的关系。当色谱柱存在扩展效应时,这一理想的校准关系并不反映淋出物的分子量与淋出体积间的实际关系。这可以用图 2 来说明。两个分子量分别为 M_1 和 M_2 真正的单分散标样的实验谱图 $F(V)$ 如图 2A 时,色谱柱的校准关系 $M(V_R)$ 则如图 2B 中的线 I, 它的斜率为 B_M 并通过 $(\ln M_1, V_{R1})$ 和 $(\ln M_2, V_{R2})$ 两点, V_{R1} 和 V_{R2} 分别是这两个单分散标样的保留体积。因为真正单分散标样的分子量是一个常数,实验测定的分子量与淋出体积间的实际关系必然是斜率 $B_M^* = 0$ 的水平直线,与色谱柱的校准关系 $M(V_R)$ 相交于点 $(\ln M, V_R)$ 处,如图 2B 中的线 II。可以断定,与多分散试样的实验谱图(图 2A 中的虚线)相应的分子量与淋出体积间的实际关系 $M^*(V)$ 将如图 2B 中的线 III, 它的斜率 B_M^* 应大于零而小于 B_M 。显然,斜率以及它与 $M(V_R)$ 的交点的坐标应与试样的分布有关。

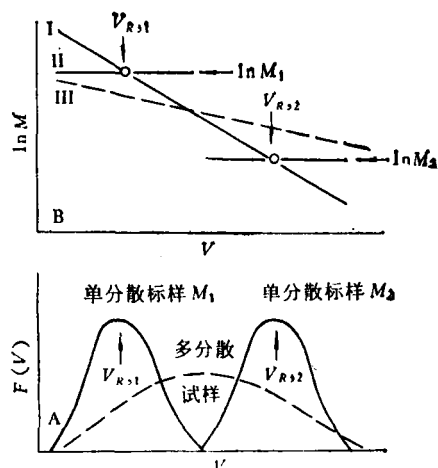


图 2 凝胶色谱的实验谱图和校准关系

A. 实验谱图; B. 校准关系;
I. $M(V_R)$; II. 单分散标样的 $M^*(V)$; III. 多分散试样的 $M^*(V)$ 。

如校准关系和实际的分子量与淋出体积关系分别是

$$M(V_R): \ln M = A_M - B_M V_R, \quad (17)$$

$$M^*(V): \ln M = A_M^* - B_M^* V. \quad (18)$$

从式 (11) 和式 (16) 可得出

$$V_R = \bar{V} + \xi(V - \bar{V}) = \bar{V} + [1 - (\langle \sigma_0^2 \rangle / \sigma_T^2)]^{\frac{1}{2}} \cdot (V - \bar{V}). \quad (19)$$

代入式 (17) 后得

$$\ln M = [A_M - [1 - (\sqrt{\sigma_T^2 - \langle \sigma_0^2 \rangle} / \sigma_T)] B_M \bar{V}] - [1 - (\langle \sigma_0^2 \rangle / \sigma_T^2)]^{\frac{1}{2}} B_M V. \quad (20)$$

与式 (18) 相比较,可知

$$A_M^* = A_M - [1 - (\sqrt{\sigma_T^2 - \langle \sigma_0^2 \rangle} / \sigma_T)] B_M \bar{V}, \quad (21)$$

$$B_M^* = [1 - (\langle \sigma_0^2 \rangle / \sigma_T^2)]^{\frac{1}{2}} B_M. \quad (22)$$

从上面的分析可以推知, $M^*(V)$ 与 $M(V_R)$ 相交于试样的实验谱图的均值 $\bar{V}$ 处。由于不同试样的均值和方差互不相同,所以每个试样均有它自己的 $M^*(V)$, 并不重叠。如果试样都是真正的单分散试样,由于它们的 σ_M^2 和 B_M^* 都等于零,它们的 $M^*(V)$ 是一组平行的线簇,如图 2 所示。如果色谱柱没有扩展效应,此时 $\sigma_0 = 0$,从而 $A_M^* = A_M$, $B_M^* = B_M$,即分子量与淋出体积的实际关系 $M^*(V)$ 就是色谱柱的校准关系 $M(V_R)$ 。由于 $M(V_R)$ 相应于真实分布 $W(V_R)$ 而 $M^*(V)$ 相应于实验谱图 $F(V)$, 因此当色谱柱是线性柱时,可以用修正校准线即先求得 $M^*(V)$ 然后计算各种平均分子量的方法对扩展效应作改正。

扩展函数和扩展因子

对凝胶色谱作扩展效应的改正,需要事先知道扩展函数 $G(V, V_R)$ 的具体形式,或至少要知道扩展因子即 $G(V, V_R)$ 的方差 σ_0^2 的具体数值。为了数据处理的方便,常假定给定色谱柱的扩展因子是一个常数。实际上扩展因子对保留体积有一定的依赖性。由于迄今没有合成出真正是单分散的高分子试样,目前还难于对扩展函数作直接的实验观测。为解决这一问题, Tung^[2] 首创了一种称为回转法的实验技术,以对色谱柱的扩展特性作校准。回转法需要将仪器改装,实验较为不便。前节理论分析的结果指示,这一问题还可通过另一途径得到解决。

一个真正的单分散试样流过色谱柱后所得实验谱图的数学描述称为这一单分散试样的扩展函数 $G(V, V_R)$ 。对单分散的高聚物试样言,实际测量的淋出物的分子量与淋出体积的关系中的斜率 $B_M^* = -(d \ln M / dV) = 0$, 而多分散试样的 B_M^* 值则与试样的分布宽度有关。因之,单分散组分的仪器扩展函数可以定义为

$$G(V, V_R) = \lim_{B_M^* \rightarrow 0} F(V). \quad (23)$$

这样,只要对几个分布宽度不等而淋出体积均值相近的试样,都同时测定 $F(V)$ 和 $M^*(V)$, 应可用外推法得到 $G(V, V_R)$ 。需要求得扩展因子 σ_0^2 的具体数值时,式 (22) 的改写形式

$$\langle \sigma_0^2 \rangle = \sigma_T^2 [1 - (B_M^* / B_M)^2]$$

和

$$1/\sigma_T^2 = (1/\langle \sigma_0^2 \rangle) - (1/\langle \sigma_0^2 \rangle B_M^2) B_M^{*2}$$

即可作为计算和外推的依据。实验测出各个试样的 $F(V)$ 和 $M^*(V)$ 后,从前者可以计算得到 σ_T^2 ,从后者直接得到 B_M^* 。

改正的步骤和例

从前面的讨论,凝胶色谱图的扩展改正的具体步骤可以归结为:

1. 以相等的体积间隔 ΔV 分割实验谱图为若干个区间,读出各区间中心的谱图高度 H_i ,各区间内淋出的聚合物的重量分数按

$$W(V_i) = H_i \Delta V / \sum_i H_i \Delta V = H_i / \sum_i H_i \quad (24)$$

计算。

2. 按式 (6) 和 (7) 计算实验谱图的均值 $\bar{V}$ 和方差 σ_T^2 。

3. 从事先订定的色谱柱的扩展因子 σ_0^2 按式 (16) 计算改正因子 ξ 。给定色谱柱的扩展因子可以看作是常数,或者更好些选用从事先订定的扩展因子的淋出体积依赖关系内插得到的试样淋出体积均值处的扩展因子值。

4. 按式 (11) 计算 $V_{R,i}$ 。改正谱图的高度按

$$H_{i,改正} = H_i \Delta V / \Delta V_R = H_i / \xi \quad (25)$$

计算, $H_{i,改正}$ 对 $V_{R,i}$ 作的图即改正谱图。

5. 在校准线上读出与各 $V_{R,i}$ 相应的分子量值,按定义计算各种平均分子量。

当色谱柱是线性柱时,步骤 4 和 5 可以改为对校准线作改正的方法,即按式 (20) 计

表 1 合成凝胶色谱图 1A 和 2A^[6] 的改正系数和平均分子量

F(V)		1A				2A			
$\bar{V}$		30.90				23.73			
σ^2		6.07				3.39			
ξ		0.914				0.840			
平均分子量		$\langle M \rangle_w \cdot 10^{-3}$	$\langle M \rangle_n \cdot 10^{-3}$	$\langle M \rangle_z \cdot 10^{-3}$	$\frac{\langle M \rangle_w}{\langle M \rangle_n}$	$\langle M \rangle_w \cdot 10^{-3}$	$\langle M \rangle_n \cdot 10^{-3}$	$\langle M \rangle_z \cdot 10^{-3}$	$\frac{\langle M \rangle_w}{\langle M \rangle_n}$
真 值		14.6	3.23	47.7	4.52	572	252	1512	2.28
未改正计算值 Ishige		17.2	2.74	78.4	6.28	675	214	2486	3.15
本工作		17.2	2.73	77.8	6.30	673	213	2466	3.13
改正值	Ishige 方法 1	15.0	3.28	31.2	4.57	574	254	2206	2.26
	方法 2	15.0	3.18	52.7	4.72	586	242	1864	2.42
	本工作	14.5	3.06	55.6	4.74	565	251	1419	2.25

算得到经改正后的校准关系,并从原实验谱图计算各种平均分子量。在上述处理数据的过程中,由于计算都比较简单,没有使用电子计算机的绝对必要。如果使用可编程序的袖珍计算器,一个试样的整个计算过程可以在几分钟内完成。

对 Ishige 等人^[6]报道的一组数据重新计算的结果可以作为一个例子。他们给出了两个合成多峰谱图 (1A 和 2A) $F(V)$ 的详细数据,所给色谱柱的校准关系和扩展函数分别是

$$\log M = (46.0 - V_R)/4.0,$$

$$G(V, V_R) = (h/\pi)^{\frac{1}{2}} \exp\{-h(V - V_R)^2\}$$

其中扩展因子 h 取值为 0.5。用本文的符号即

$$\sigma_0^2 = 1/2h = 1.0$$

用上述方法处理数据,所得均值、方差、改正因子和各种平均分子量的结果如表 1, Ishige 等人的结果也一并列入以资比较。从 $F(V)$ 不作改正直接计算平均分子量,重新计算的结果与 Ishige 等的结果相符,说明分子量的计算过程是类同的。用本文所述方法对扩展效应作改正后,所得重均和数均分子量与真值相比,偏差在 1% 左右,与 Ishige 等的结果相似。改正后的 Z 均分子量与真值的偏差在 10% 左右,值得注意的是 Ishige 方法计算的 Z 均分子量与真值的偏差最高达 46%,这倒是出乎原先的估计的。

参 考 文 献

- [1] Tung, L. H., *J. Appl. Polym. Sci.*, **10**, 375(1967).
- [2] Tung, L. H., Moore, J. C., Knight, G. W., *ibid.*, **10**, 1261(1966).
- [3] Tung, L. H., *ibid.*, **10**, 1271(1966).
- [4] Tung, L. H., *ibid.*, **13**, 775(1969).
- [5] Chang, K., S., Huang, Y. M., *ibid.*, **13**, 1459(1969).
- [6] Ishige, T., Lee, S.-I., Hamielec, A. E., *ibid.*, **15**, 1607(1971).

INSTRUMENTAL SPREADING IN GEL CHROMATOGRAPHY

Cheng Rongshi (Cheng Yung-shih)

(*Institute of Applied Chemistry, Academia Sinica*)

ABSTRACT

Two simple methods for correcting instrumental spreading in gel chromatography are suggested on the basis of the result of the moment analysis of Tung's integral equation. A correction factor ξ is introduced for correcting the experimental chromatogram. In the case of linear gel chromatographic column, identical results will be obtained by the way of correcting the calibration curve. It is shown that the instrumental spreading function can be defined as $G(V, V_R) = \lim_{B_M^* \rightarrow 0} F(V)$, in which B_M^* represents the slope

of the real relationship between the logarithm of molecular weight and elution volume of a polydisperse sample.