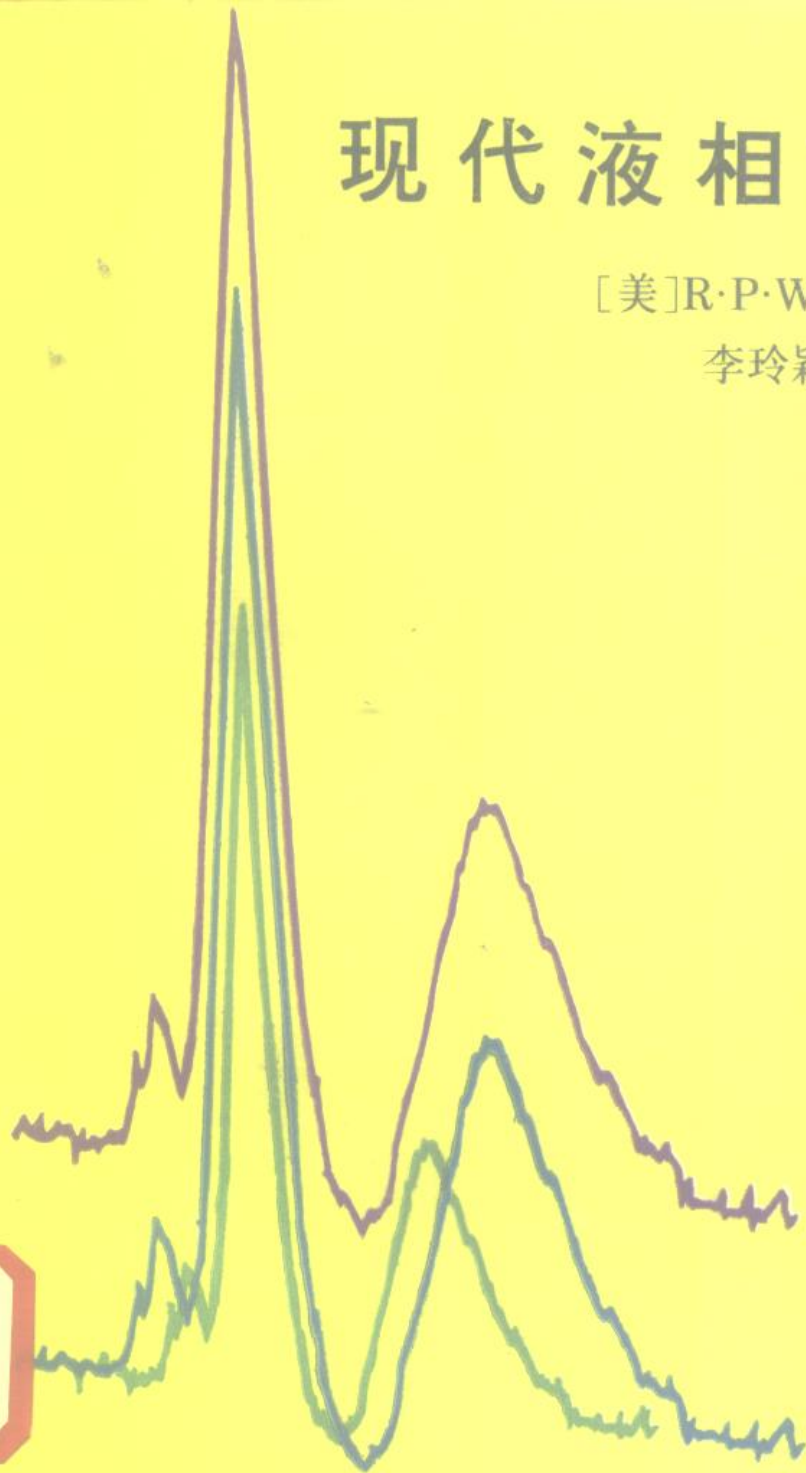


现代液相色谱

[美] R·P·W·Scott 著

李玲颖 等译



南开大学出版社

06127
S75

369394

现代液相色谱

〔美〕R.P.W. Scott 著

李玲颖 张书芑 孙元明 余素清 译

李玲颖 校

南开大学出版社

〔津〕新登字011号

内 容 简 介

本书是国外大学分离化学主要参考书之一。系统而严谨地论述现代液相色谱的基本理论,介绍各种类型仪器的结构、原理和使用方法。特别介绍了制备液相色谱,以及和液相色谱可能联用的各种波谱技术。

Contemporary Liquid Chromatography

by R.P.W.Scott

John Wiley & Sons, Inc

现 代 液 相 色 谱

〔美〕R.P.W.Scott著

李玲颖 等译

南开大学出版社出版

(天津八里台南开大学校内)

邮政编码300071 电话349318

新华书店天津发行所发行

河北省邮电印刷厂印刷

1992年2月第1版 1992年2月第1次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 10.375

字数: 255千 印数: 1—5 000

ISBN 7-310-00505-8/C·70 定价: 7.50 元

译 者 的 话

本书作者R.P.W.Scott长期从事现代液相色谱研究，是一位声誉很高的色谱专家。书中全面详细介绍现代液相色谱的理论、仪器及其使用和液相色谱技术最新发展趋势，是同类著作中范围最广、内容最丰富的。本书特别注重提供深厚的理论基础，帮助读者在理解和掌握色谱理论上接受现代液相色谱新技术。作者在细致地论述实验技术的同时，又从理论上加以解释和论证，从而将理论与实践真正结合起来，赋予读者对色谱理论和技术真正有用的知识和解决问题的能力。书中很多内容是作者和他的同事宝贵的亲身经验，很有借鉴和参考价值。我们高兴地将它介绍给读者，使大家同受其益。

由于本书具有基础理论与实际应用并重的特点，所以一直是美国许多大学的指定参考书。对于我国从事液相色谱工作的科研人员，高等院校和专科学校的教师、研究生和学生也是一本很有价值的参考书。

鉴于译者水平有限，错误和不当之处在所难免，尚祈读者予以批评和指正。

译 者

序 言

液相色谱领域在60年代开始复兴。它的复兴既借鉴了气相色谱的成功经验，也因气相色谱的缺点与不足而促进。气相色谱在上世纪以惊人速度发展，为实际工作提供了理论根据，因而能解释色谱分离全部过程。同时，还可用经过改进的气相色谱知识，来改善采用液相色谱分离物质的效能。但是，气相色谱不适用于高极性物质和不挥发物质。这迫使色谱工作者必须发展液相色谱来解决该困难，同时还须解决与这些物质有关并且要花费很长时间才能分离的许多问题。结果，和首次使用薄壳式填充材料的同时，诞生了现代高效液相色谱。随后又发展了微粒填充材料，出现新型和改进的检测器和在数十万帕压力下使用的色谱柱。

在工业和高校的科学家所面临的问题中，需要分离的高极性和不挥发物质要比挥发性物质多得多。可见，液相色谱在实验室中的用途比气相色谱有更大潜力。3/4以上的实验室分离工作，不久可能要用某一类型的液相色谱进行。

编写此书的目的是为读者提供对色谱原理的基本认识、色谱仪器的知识和如何使用这些仪器，最后使他们能熟悉色谱技术的近期发展情况，给出了对主题的深入理论论述。它还给读者提供对液相色谱基本规律的真实评价，但涉及的数学则力求简单。很多有关的实验技术是来源于实际经验，其中有我自己的，也有我的同事的。

我很高兴地对我的同事C.G.Scott博士，P.Kucera先生和C.Reese先生对此书提出有益的建议；对Eli.Grushka教授和James Edwards博士审阅稿件及提出宝贵的意见；对C.Caso夫人 为我的稿件打字，一并致以衷心的感谢。

R.P.W.Scott

目 录

第一章	原理、分类和命名原则	(1)
1	色谱法简史.....	(1)
2	色谱法定义.....	(3)
3	不同类型色谱法的分类.....	(5)
4	不同类型色谱法的范围和应用.....	(7)
5	基本的液相色谱.....	(9)
6	液相色谱采用的各种展开方法.....	(11)
7	色谱图术语和命名原则.....	(16)
第二章	色谱理论	(22)
1	塔板理论.....	(23)
2	速率理论.....	(43)
3	径向分散.....	(69)
4	在毛细管连接管中的扩散过程.....	(73)
5	色谱体系的峰容量.....	(78)
第三章	液相色谱仪	(99)
1	流动相的供应系统.....	(100)
2	溶剂泵.....	(118)
3	流量程序系统.....	(122)
4	流动相平衡体系.....	(124)
5	进样系统.....	(125)
6	液相色谱柱.....	(131)
7	柱加热炉.....	(134)
8	色谱柱和检测器的连接.....	(135)
9	液相色谱检测器：分类和规格.....	(136)

10	检测器测量的灵敏度和线性的校准	(137)
11	整体性质检测器	(141)
12	溶质性质检测器	(155)
13	检测器的选择	(184)
14	附属设备	(185)
第四章	液相色谱的固定相和流动相	(196)
1	评价固定相的方法	(196)
2	吸附剂	(209)
3	液相色谱的载体	(223)
4	固定相的选择	(224)
5	液-液色谱相系统的选择	(225)
6	流动相	(227)
7	用作增量梯度洗脱溶剂系列的色谱性质	(233)
第五章	色谱分析程序	(245)
1	柱填充	(245)
2	柱长和流动相的线速	(250)
3	柱效能, 保留比和峰面积的测定	(258)
4	操作液相色谱仪过程中应注意的实际问题	(263)
5	定性和定量分析	(266)
第六章	液相色谱与波谱技术联用	(271)
1	液相色谱与紫外光谱联机系统(LC/UV)	(272)
2	液相色谱与质谱联机系统(LC/MS)	(276)
3	直接进样的液相色谱与质谱联用(LC/MS)	(278)
4	用金属丝传送引进样品方法的色质联用 (LC/MS)	(281)
5	液相色谱与质谱联用的展望	(292)
6	液相色谱与其它波谱技术联用	(293)
第七章	制备液相色谱	(296)
1	影响某一给定液相色谱柱负载的因素	(297)

2	柱的超载·····	(300)
3	制备液相色谱的仪器·····	(307)
4	制备液相色谱的固定相·····	(312)
5	填充制备柱·····	(315)
6	制备色谱操作程序·····	(316)
7	制备液相色谱的未来·····	(319)

第一章 原理、分类和命名原则

1. 色谱法简史

第一位认识到色谱法是一种有效的分离方法的科学家是俄国植物学家Tswett。他用原始的液-固色谱法分离出各种植物色素。他在1903年发表的文章中描述了用100多种不同吸附剂得到的实验结果。这以后没有进行进一步的工作，直到1931年Kuhn和Lederer又用色谱法分离植物色素，重复了Tswett的某些实验，Kuhn和Lederer用氧化铝和碳酸钙作吸附剂。他们的实验结果鼓舞了别的工作者去研究色谱法这一新的分离方法。

Reichstein于1930年末首次有效地应用洗脱色谱法，Martin和Synge于1940年初提出用负载水的硅球作固定相的液-液分配色谱法。实际上，Martin和Synge实现的这种分离是一种吸附和分配色谱法的结合。与此同时，Tiselius提出了迎头法和顶替展开法。Martin和Synge于1941年发表的文章中提出气相色谱的可能性。Martin认为，假如用气体代替液体流动相，可增加溶质在流动相中的迁移速度，从而产生更有效的分离。

在这期间，Martin和他的同事们提出了用纸作载体的液-液分配色谱法，奇怪的是并没有人采取Martin关于气相色谱法的建议。1939年Brown提出了将一种吸附剂置于两玻板之间，让通过的流动相渗透，是一种有效的色谱系统。1946年Williams把这一想法发展成实用的分离系统。许多工作者精心地研究这一新的想法，都未实现。直到1949年，Maclean和Hall推荐将淀粉粘合剂引入氧化铝吸附剂中，才首次促成有效薄层法（TLC）的出现。

人们发现TLC优于纸色谱法，因为溶质分子和吸附剂之间的作用力相对于溶质分子和液体来说要大一些。

随着Stahl于1956年引入有效的TLC涂布器后，TLC更加广泛地发展起来，它变为具有广泛应用领域的非常有效的分离技术，直到此时，液相柱色谱法的进展较慢，有些进展多局限于引入新的相系统和某些粗糙的检测器。新的和很有力的色谱方法——气相色谱法的引进，也使这个领域的工作大为逊色。

1950年初，James和Martin将其注意力转向可能借助溶质在气相和液相之间的分配来分离物质。1952年在他们发表的文章中首次描述了气相色谱。这结果是了不起的，引起了很大的注意。对挥发性物质感兴趣的每个主要的石油公司和大学都着手于发展这方面的技术。在几年内GLC完全代替分析中的低温蒸馏而被用于溶剂工业、香精油工业和生物化学领域中去，这种技术的进展速度在分析仪器史中是无以比拟的，吸引了各方面的科学家，这些科学家来自各种国际学术团体和一些富于想象的小机件设计者。这有几方面原因：第一，基本的色谱仪简单和造价低，假如操作者用手绘制洗脱曲线，造价低于100美元。第二，检测问题较简单，因为溶质以蒸气存在于载气中，改进了载气的物理性能，如热导、密度、热值的测量，提供了非常有效，而又是简单的检测方法。最后，即使缺乏经验，涂布载体和填充柱也是很简单的事，并能获得满意的分离结果。1954~1962年期间GLC的发展速度之快几乎使人眼花缭乱，但1962年以后又慢下来，大多限于气相色谱法与辅助技术——如质谱法、红外光谱和热解的联合使用。

在GLC发展期间，液相色谱法变为色谱技术中的久被轻视忽逢幸运而名噪一时的角色，虽有几种新相系统被提出，却无重大进展。尽管GLC应用领域广泛，但分离问题仍大量存在，特别是分离高分子量、热稳定和强极性物质时问题更多，这时又才把注意力转向于发展液相柱色谱法，但液相色谱法所遇到的问题远远大于气相色谱法所遇到的问题。基于柱洗脱液性质的检测系统是不灵敏的，因为

溶质对流动相的总性质无多大影响，高灵敏度的检测器得到设计（即：紫外吸收），它具有高选择性并限定了流动相的选择。而且，流动相是液体，高纯气体可从钢瓶中直接获得，但液体必须纯化以后才能使用。可能更难的问题是由下列事实引起的，即在气相色谱中分配系数是溶质与吸附剂之间作用力的函数，因为在气相不发生作用。而在液相色谱中分配系数依赖于一种液体和另一种液体对于溶质分子作用力之间的相对差别或一种液体和一固体表面对于溶质分子作用力之间的相对差别。在液体之间可获得有效分配系数的地方，在流动相中的溶质的绝对溶解度是如此之小以致用现有灵敏度水平的仪器来检测变得很难。虽然如此，柱色谱法已获得缓慢而扎实的发展，对柱内谱带扩展的理论已了解得相当清楚。检测器的灵敏度已有增加，虽然仍比气相色谱法的检测器低许多数量级，并且液相色谱仪现在的性能已接近于初期的气相色谱仪。在技术上仍不能比得上现代气相色谱的先进技术和性能时，有许多方面仍然要发展。此外，液相柱色谱法将不会同样迅速发展，因仪器方面遇到的问题远远较难克服。然而，过去几年已做出了重大的贡献，同时现在已有许多合用的液相色谱仪商品。

2. 色谱法定义

色谱法经典的定义是物质在流动相和固定相之间进行分配来达到分离的一种方法。对于优先在流动相分配的物质比优先在固定相分配的移动得快些。

虽然从科学角度来说是正确的，但这定义颇为含糊：当提出流动相和固定相的基本概念时，它含糊了分配引起分离这一基本现象。溶质在两相的分配是溶质分子和两相分子之间力的平衡所引起的，就性质来说这种力可能是极性的，起因于与溶质和溶剂分子有关的固有的或诱导的电场，或由于 London 的扩展力（van der Waals 力），它依赖于溶质和溶剂分子的相对质量。在离子交换树脂

中，就性质来说作用于溶质分子上的力可能是离子的力，但同时也包含极性和非极性的力。因此，色谱中的分离是利用发生在每种溶质和两相中分子力的差异来达到的。

如需分离不同极性的物质，那末利用极性力来达到分离，固定相的作用就变得明显，因此应当选择一种极性的固定相，同时保证固定相有优先的选择性，应当用毫无极性的流动相。反之，如需分离相同极性、但分子量有差异的物质，那末，由于London的扩展力用非极性的固定相才有选择性，而流动相现在是极性或半极性的。评价色谱的全部基础（像许多其它分离系统那样），依赖于利用分子间力的差异是实质性的。需要获得使达到两种物质分离的分子间力差异的大小还依赖于色谱仪的柱效能，虽然仪器是有效率的，如流动相和固定相分子作用于两溶质的力是完全相同时，那末分离将永远无效。

能影响分子间力的色谱系统环境中的任何变化皆可用来改变或增大分离作用，要考虑温度对分子间力的影响。严格地说，所有的分配系统是动态的并应以统计的方法去处理。然而，简易地说，可以认为一个相中吸着分子的净剩力就是分子间的静态力与动态力（由于分子的振动）之间的差异，而动态力又倾向于破坏分子的缔合，升高系统的温度将加大每个分子的动能和减小在特殊相吸着它的净剩力，此种影响发生在溶质分子和两相分子之间。但由于温度的变化净剩力作用一种类型溶质不同于另一种类型的溶质，即可增进分离。由此可见，对任何色谱仪必须提供温度作为操作参数。

一种相似的情况是：在强电场中操作色谱系统可加大分子间的极性力而影响分离结果。虽然此种步骤在理论上是可能的，事实上，接近分子的电场是如此之大以致产生足够强的外电场，不可能带来任何明显的效果而介质不被电场破坏。

如流动相是气体，因此是可以压缩的，那末溶质和气体分子之间的分子间力可用增加绝对压力的方法使之增大。标准压力下，气相中分子相互作用力小，但高压下它们变得很大，能够影响分离结

果〔1〕。用在临界温度以上的挥发性液体作流动相方面的近年来工作〔2〕，引起有趣的气相和液相色谱法的融合。在这条件下，流动相中分子间力变大到足以使溶质提高选择性和增加通常是非挥发性物质的绝对溶解度，同时保留了某些所要求的气体的传递特性。

因此，色谱法也可定义为当溶质在流动相和固定相分配的时候作用于溶质分子间力的差异而达到分离的一种方法。在流动相被强烈吸着的物质比在固定相被强烈吸着的物质通过柱子快些。因此，个别物质将按照它们在固定相中的吸着力的增加次序从柱系统内分离出来。

3. 不同类型色谱法的分类

固、气、液三个基本相中，取其中任何两个相便可组成不同类型的色谱，只要所选取的这两个相不互溶，并且两相中之一是可以流动的就可以了。这里提出三种基本相色谱法中的两种：气相色谱法和液相色谱法。它们的流动相是气体或液体，每种流动相又可与液体的或固体的固定相配对，这样一来，上述两种基本色谱法还可分为两类，就气相色谱而言有气-液色谱和气-固色谱，再就液相色谱而言又有液-液色谱和液-固色谱两种。当流动相在接近它的临界温度和压力下工作的液体时，流动相就不能说是液体或气体，这种过程已定名为临界状态色谱。把上述这种色谱叫第三种基本色谱系统还是比较合适的，这样一来，它又导出临界状态液-固色谱和临界状态液-液色谱。

表1-1表明不同类型色谱是如何分类的，表本身是自明的，但关于LSC和LLC应作一些注释。利用有不同几何形状的分配体系的这两种色谱已经得到发展，如果分配是在薄层上的固体吸附剂上进行的，就叫做薄层色谱法(TLC)；如果分配发生在吸附于纸上的液体吸附剂上的，就叫做纸色谱法(PC)。当在柱系统中进行分离时，则上述两种液体色谱统称为液-液柱色谱法(LLC(C))或

表 1.1

色 谱 法 分 类

GC	
气相色谱法	
流动相：气体	
GSC	GLC
气-固色谱法	气-液色谱法
固定相：固体	固定相：液体
CSC	
临界状态色谱法	
流动相：临界状态液体	
CSSC	CSLC
临界状态固体色谱法	临界状态液体色谱法
固定相：固体	固定相：液体
LC	
液相色谱法	
流动相：液体	
LSC	LLC
液-固色谱法	液-液色谱法
固定相：固体	固定相：液体

液-固柱色谱法(LSC(C))。唯一明显的不一致是纸色谱是作为液-液色谱而分类的。这是因为纸通常是作为液体(通常为水)的载体而已,这时吸收在纸上的液体作固定液相。包括离子交换树脂在内的任何一种分离均归类为液-固色谱法。可是不能把凝胶渗透法归类入色谱,因为凝胶渗透法并不是因为分子间作用力而导致分离,而是基于分子大小不同而达到分离的,事实上,凝胶渗透仅仅是一种过滤或过筛的手段而已。凝胶渗透这名词是使用不当的,用原来的名词凝胶过滤才比较正确地描述这种分离技术。因为凝胶渗透法不是一种色谱方法,本书将不讨论它。

4. 不同类型色谱法的范围和应用

气-固色谱法

使用硅胶、氧化铝或分子筛作为固定相的气-固色谱，几乎全部用于永久性气体和低沸点烃类的分析中。其原因是，当高分子量的物质或甚至只有轻微极性的物质，在气体和固体吸附剂之间分配时，溶质和固定相间的作用力极强，以至不能在适宜的时间里使物质流过色谱系统。已经作了一些努力来降低吸附剂的活性。例如，氧化铝在300~400°C的操作条件下，已可用它来分离碳数达到40或50的正链烃类。然而降低活性的方法对于减少极性物质的保留时间却不很有效。这样，除以上所述，气-固色谱的应用仍然很有限。用固体吸附剂色谱分离极性化合物最成功的尝试是使用苯乙烯二乙烯苯共聚物，在此情况下，此共聚物有高的非极性表面活性，当它强烈地吸附烃类时，实际上它就排斥了如水、醋酸和乙醇一类的极性化合物。

气-液色谱法

气-液色谱 (GLC) 用于分离所有种类的挥发性物质，假如它们是稳定的，并且没有过高的极性。气-液色谱不能分离高极性的挥发性物质，主要是由于载体的吸附性。在气-液色谱中，必须在载体上涂固定液。载体通常是惰性的硅藻土，例如 Celit。尽管 Celit 比较惰性，但它仍然具有某些残留吸附性能，它吸着体系中的极性物质，使其不能分离，或者至少使分离特性变坏。然而，通过形成低极性的衍生物以及在某些例子中使用特殊的吸附剂，在分离高极性物质方面还是获得了一些成功。

临界状态色谱法 (Critical-State Chromatography)

临界状态色谱技术在它的初期是很盛行的。实际上有关这个题

目所发表的文章相当少。到目前为止，它的应用范围还没有明确的界限。它现在已经成功地应用于多核芳烃和氯代烃的分离方面。

薄层色谱法

薄层色谱现已广泛应用，尤其在生物化学领域。它涉及不同的应用，范围从类脂化合物、脂溶性染料、多核芳烃到肽和氨基酸的分离。在这方面它现已代替了纸色谱。

纸色谱法

纸色谱的应用，现在几乎完全局限于蔗糖、核苷酸、多肽和无机离子。其中某些应用可能最终将会被薄层色谱代替，或者在适当时候被柱色谱代替。

液-固色谱法

在氨基酸、多核芳烃和范围广大的高分子量，高极性物质的分离中，使用硅胶、氧化铝、葡聚糖凝胶和离子交换剂小球作为固定相的液-固色谱已经应用了一段时间。液-固色谱还没有广泛应用，因为它的技术和设备还正在发展中。

液-液色谱法

液-液色谱已经应用于分离许多生物的原生物质，包括游离的脂肪酸，但它还没有像液-固色谱那样地广泛应用。此体系遇到的困难之一是要在载体物质上获得一个持久的固定相涂层。如果做不到这一点，则在流动相中会存在固定相而影响检测器的检测工作。这个问题已经在某种程度上由使用新的“键合相”而克服了。呈现液相特性的“键合相”是以化学键键合在适当的载体表面上。然而“键合相”不是严格的液体固定相，而是介于固相和液相之间的混合态。应用这样的物质作为固定相的色谱，因而在某种程度上显示出液-固和液-液两种体系的特性。

5. 基本的液相色谱

基本的液相色谱图解表示在图1.1中，此体系的各个部分将在第三章中详细论述。然而为了连贯起见，对设备的个别部分作一些简单的注释如下。

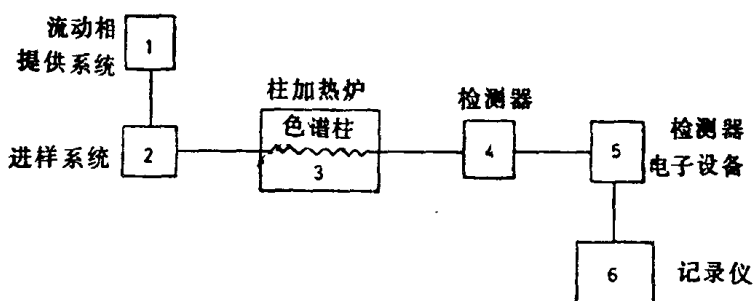


图 1.1 基本的液相色谱流动相的提供系统

此系统以适当流速向色谱柱提供流动相。根据整个柱子的压力降的不同，流动相的驱动力范围可以从重力进料装置到高压泵。在一些实例中使用很小直径的柱子，长度很长的柱子和在某些情况下由细小粒子装填的柱子时，压力必须高达 $3.5 \times 10^7 \text{ Pa}$ 。

进样系统

这是一个将被分离的混合试样引入流动相液流中的装置。在此过程中，可能延滞柱流，也可能不延滞柱流，使试样形成一个界线分明的谱带而进入色谱柱。一种普通形式的进样系统是使用一个合适的有支承的塑料隔膜和皮下注射器。经恰当地制作，这样的系统可以满意地在很高的入口压力下操作。

色谱柱和柱加热炉

色谱柱是一个管子，事实上可以做成任何长度和直径，且可以用从玻璃到金属的任何材料来制造。为了获得重现性的分析结果，