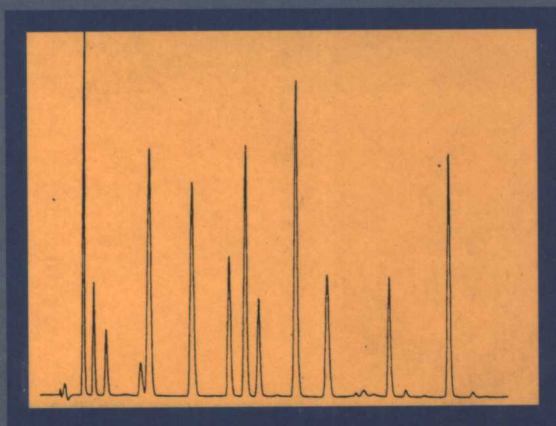


高效液相色谱 基础与实践

陈立仁 蒋生祥 著
刘霞 侯经国



科学出版社

高效液相色谱基础与实践

陈立仁 蒋生祥
刘霞 侯经国 著

科学出版社

2001

内 容 简 介

高效液相色谱是 20 世纪 70 年代以来发展最为迅速和应用最为广泛的分离分析技术之一。本书采用基础与实际应用并重的方式,对高效液相色谱的基本知识、仪器、检测器、固定相、分离模式及应用等方面做了系统的论述,特别是对新发展起来的包夹聚合固定相,多维高效液相色谱,手性分离等进行了比较详细的讨论。

本书可供从事高效液相色谱研究和相关分析工作人员参考,也可作为高等学校、中等专科学校相关专业的教师、学生、研究生的教学参考书。

图书在版编目(CIP)数据

高效液相色谱基础与实践/陈立仁等著. - 北京:科学出版社,2001.2

ISBN 7-03-008342-3

I. 高… II. 陈… III. 液相色谱-基本知识

IV. O657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 04264 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

科 地 亚 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001 年 2 月第 一 版 开本:850×1168 1/32

2001 年 2 月第一次印刷 印张:8 5/8

印数:1—1 800 字数:220 000

定价:22.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

前 言

高效液相色谱自 20 世纪 70 年代初问世以来,经过近 30 年的发展,在基础理论、仪器装置和色谱柱等方面的研究已趋于成熟,现在已成为化学学科中最有优势的分离分析方法之一。高效液相色谱的应用范围十分广泛,几乎能够分析所有的有机、高分子、生物样品。据估计,目前已知的化合物中,有 80% 的化合物需要用高效液相色谱法进行分离分析。此外,对无机物的分析也有很好的效果,特别是对生命活性物质的分离分析,有着其它分析方法不可替代的作用,已广泛应用于石油化工、生物化学、临床医学、食品卫生、环境监测、医药工业、商品检验、地质勘探、油田开发等领域的分离分析。

作者多年来一直从事高效液相色谱的科研和教学工作。近年来,又有较多与生产部门接触的机会。曾多次应邀在有生产第一线技术人员参加的高效液相色谱研讨班上讲课,并为中国科学院兰州化学物理研究所的研究生讲授。深感高效液相色谱这门技术在工业生产中的重要作用和巨大的应用前景。也感受到广大科技人员对高效液相色谱知识的渴求。为此,作者将讲稿更新、充实后,整理成这本书,奉献给读者,旨在为我国的高效液相色谱的发展、普及尽一点微薄之力。

本书采用基础理论知识与实际应用相结合的编撰方式,在叙述上力求深入浅出。其主要材料来源于我们实验室在高效液相色谱方面的研究成果,同时又吸收了国内外同行近年来研究的最新成就。

本书内容所涉及的有关本实验室的研究工作,得到国家计委的“七五”、“八五”和“九五”连续三个五年计划中“国家重点科技攻

关”项目、国家科委的“攀登计划 B”项目、国家自然科学基金委员会的三次基金项目、中国科学院应用与发展局重点项目、中国科学院技术条件局“大型仪器功能开发”项目的资助。在此深表感谢。

书中部分研究内容是由曾在本实验室学习、工作过的研究生完成的。他们是,博士生:左雄军、李永民、侯经国、凌凤香、魏芸、杨瑞琴、周志强、于兆文、刘月启、张虹、蔡青松、韩小茜;硕士生:胡云雁、张书胜、程松林、韦志明、刘照胜、李松。没有他们的辛勤劳动和聪明才智,本书的完成是难以想象的。

在编写过程中,中国科学院兰州化学物理研究所的领导和有关部门给予了很大的支持、研究生部还为本书的出版提供部分资助,俞惟乐研究员和王淇研究员提出了许多指导性意见和建议,在此一并表示感谢!

我们还要特别感谢科学出版社对本书的关心和支持。

高效液相色谱是一门应用面广而又在继续发展中的学科,本书一定会存在许多不足之处,希望同行专家和广大读者批评指正。

作者

1999年12月

目 录

第一章 绪论	1
1.1 高效液相色谱的发展	1
1.2 色谱法的分类	2
1.3 液相色谱与气相色谱	3
1.4 高效液相色谱与经典液相色谱	4
参考文献.....	4
第二章 基本概念	5
2.1 色谱过程	5
2.2 保留方程式	7
2.3 柱效率	9
2.3.1 理论塔板数和塔板高度	9
2.3.2 有效理论塔板数和有效塔板高度	13
2.4 分离度.....	13
2.4.1 定义和表达式	13
2.4.2 影响分离度的因素	14
2.4.3 分离度 R_s 与分离因子 α , 有效理论塔板数 $N_{\text{有效}}$ 之间 的关系	16
参考文献	17
第三章 液相色谱仪	18
3.1 贮液器.....	18
3.2 输液系统.....	19
3.3 进样器.....	21
3.3.1 注射器	21
3.3.2 进样阀	21

3.3.3 关于进样量的一般考虑	22
3.4 色谱柱	22
3.4.1 概述	22
3.4.2 色谱柱的装填方法	23
3.4.3 色谱柱的评价	24
参考文献	26
第四章 检测器	27
4.1 检测器的主要技术指标	27
4.1.1 基线稳定性	27
4.1.2 灵敏度	28
4.1.3 最小检测能力	29
4.1.4 线性范围	30
4.2 紫外吸收检测器	30
4.2.1 原理与应用范围	30
4.2.2 结构	31
4.3 荧光检测器	33
4.4 示差折光检测器	33
4.4.1 检测原理	34
4.4.2 光路系统	35
4.5 二极管阵列检测器	37
4.6 库仑检测器	39
4.6.1 检测原理	39
4.6.2 结构	40
4.7 安培检测器	41
4.8 电导检测器	42
参考文献	43
第五章 梯度洗脱	44
5.1 梯度洗脱的原理	44
5.2 梯度范围	47
5.3 最佳梯度方法	49

5.4	最佳梯度范围	50
5.5	最佳的峰分布	51
5.5.1	变更有机溶剂种类	51
5.5.2	流动相选择	52
5.6	梯度洗脱装置	57
5.6.1	低压梯度	57
5.6.2	高压梯度	59
5.7	梯度洗脱形式及选择	61
5.7.1	选择合适的 A 和 B 两种溶剂	62
5.7.2	初步分离	63
5.7.3	梯度形式选择	63
	参考文献	68
第六章	液相色谱固定相	69
6.1	引言	69
6.2	表层多孔固定相	70
6.3	全多孔微粒固定相	73
6.4	化学键合固定相	74
6.4.1	反应类型	75
6.4.2	硅烷化键合相的制备	76
	参考文献	80
第七章	包夹聚合固定相	81
7.1	引言	81
7.1.1	物理涂敷法	81
7.1.2	化学涂敷法	82
7.2	制备方法	83
7.2.1	聚丙烯酸酯类包夹聚合固定相	84
7.2.2	聚苯乙烯包夹聚合固定相	85
7.2.3	甲基乙烯基聚硅氧烷包夹聚合固定相	86
7.2.4	苯基乙烯基甲基聚硅氧烷包夹聚合固定相	87
7.2.5	苯乙烯和马来酸酐包夹聚合固定相	89

7.2.6	氯甲基苯乙烯包夹聚合固定相	91
7.2.7	甲基丙烯酸羟乙基酯/乙烯基苯包夹聚合固定相	93
7.2.8	酰胺型包夹聚合固定相	95
7.2.9	二酸酰胺型包夹聚合固定相	96
7.3	保留机理	98
7.4	固定相的稳定性	101
	参考文献	102
第八章	液-固色谱	105
8.1	固定相	105
8.1.1	表层多孔型	105
8.1.2	全多孔微粒型	106
8.2	液-固色谱的吸附过程	108
8.3	流动相	110
8.3.1	流动相强度参数	110
8.3.2	流动相改性	113
	参考文献	113
第九章	化学键合相色谱	114
9.1	引言	114
9.2	固定相	115
9.3	反相液相色谱	117
9.4	反相离子对色谱	120
	参考文献	123
第十章	离子交换色谱	124
10.1	原理	124
10.2	离子交换固定相	125
10.3	交换平衡	128
10.4	pH 值对离子交换容量的影响	129
10.5	流动相对分离的影响	131
10.6	应用	133
	参考文献	138

第十一章	离子色谱	139
11.1	双柱离子色谱法.....	139
11.2	膜抑制器.....	143
11.3	单柱离子色谱法.....	144
11.3.1	原理和阳离子交换洗脱液.....	144
11.3.2	阴离子交换洗脱液.....	147
11.4	开链冠醚键合柱分离金属阳离子.....	148
11.5	光度检测器在单柱离子色谱中的应用.....	151
11.5.1	直接光度检测法.....	151
11.5.2	间接光度检测法.....	152
	参考文献.....	154
第十二章	排阻色谱	157
12.1	原理.....	157
12.2	固定相和流动相.....	158
12.3	保留行为.....	160
12.4	色谱柱的校正.....	162
12.5	应用.....	163
12.5.1	作为其他高效液相色谱法的补充.....	164
12.5.2	分离复杂混合物时可省去样品处理和净化步骤.....	164
12.5.3	测定分子量分布.....	166
12.5.4	生物样品的表征.....	166
12.5.5	可用于生产过程中产品质量的监控.....	167
12.6	液相色谱方法的选择.....	169
	参考文献.....	170
第十三章	手性分离	171
13.1	引言.....	171
13.2	拆分机理.....	172
13.3	手性固定相.....	173
13.3.1	纤维素衍生物手性固定相.....	174
13.3.2	淀粉类手性固定相.....	179

13.3.3	环糊精手性固定相	185
13.3.4	多模式环糊精固定相	187
13.3.5	刷型手性固定相	191
	参考文献	195
第十四章	多维高效液相色谱	198
14.1	引言	198
14.2	分类	199
14.3	仪器装置及操作技术	201
14.3.1	多维高效液相色谱技术	201
14.3.2	仪器装置	205
14.4	联用类型及应用	206
14.4.1	分子排阻色谱/反相色谱(SEC/RPLC)联用	206
14.4.2	离子交换色谱/反相色谱(IEC/RPLC)联用	207
14.4.3	液固吸附色谱/正相色谱(LSC/NBPC)联用	208
14.4.4	正相色谱/反相色谱(NBPC/RPLC)联用	208
14.4.5	分子排阻色谱/离子交换色谱(SEC/IEC)联用	209
14.4.6	液固色谱/反相色谱(LSC/RPLC)联用	209
14.4.7	亲合色谱/反相色谱(affinity/RPLC)联用	209
14.4.8	非手性/手性(anchiral/chiral)联用	210
14.5	拟多维高效液相色谱	211
	参考文献	214
第十五章	应用	216
15.1	油田化学剂的分析	216
15.1.1	驱油用石油磺酸盐的浓度测定	216
15.1.2	动态吸附试验中石油磺酸盐的测定	218
15.1.3	石油中微量石油磺酸盐的测定	220
15.1.4	反相色谱法分析烷基和烷基苯磺酸钠	222
15.1.5	分子排阻色谱法测定聚丙烯酰胺	226
15.2	水质分析	229
15.2.1	油田水质分析	229

15.2.2	冰川水样中无机离子的测定	234
15.3	化工过程分析	236
15.3.1	石油裂解气中痕量碱性氮化物的测定	236
15.3.2	不对称合成反应产物对映体过剩值(<i>ee</i>)的测定	238
15.3.3	反应过程中副产物微量醛的分析	243
15.4	临床医学分析	244
15.4.1	血浆中抗癌药物丝裂霉素 C 的测定	244
15.4.2	体液及组织中抗癌药物 HMBA 的测定	247
15.4.3	脑组织中氨基酸的分析	249
15.4.4	脑外伤脊液兴奋氨基酸的测定	252
15.4.5	鬼臼乙叉苷药代动力学研究	254
15.4.6	尿中游离皮质醇的直接进样测定	256
	参考文献	260

第一章 绪 论

1.1 高效液相色谱的发展

自俄国植物学家 Tswett 创立色谱法以来,已有近 100 年的历史. 1903 年 Tswett 在华沙自然科学协会提出论述吸附色谱的论文,详尽的研究了叶绿素在 100 多种吸附剂上的吸附现象,提出了色谱法的概念. 虽然他所用的方法分离效率不高,分离速度缓慢,一次分离需要几小时甚至几天的时间,但一直到 20 世纪 40 年代中期,仍然是人们所采用的惟一的一种色谱方法.

20 世纪 40 年代到 50 年代初,先后出现了纸色谱法 (paper chromatography, PC) 和薄层色谱法 (thin-layer chromatography, TLC). 这两种方法的特点是简单,分离时间短,用样量也比经典的柱色谱法少得多.

1952 年,James 和 Martin 提出了气相色谱法 (gas chromatography, GC). 使色谱法的发展大大前进了一步. 由于应用面广泛而受到人们的重视. 特别是 20 世纪 60 年代初 Giddings 等人对色谱理论的研究成果,为高效液相色谱的发展奠定了理论基础.

虽然气相色谱的应用领域十分广泛,但仍不能解决大量的挥发性差和热不稳定的化合物的分离难题. 经典的液相色谱仍然是用于分析这类化合物的手段. 直到 20 世纪 60 年代后期由于新型柱填料、高压输液泵和高灵敏度检测器的出现,才使液相色谱快速地发展起来,并发展成为高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC).

1.2 色谱法的分类

色谱法是一种很有用的分离分析技术,可用于复杂样品的分离分析。其原理是利用待分离混合物中各组分物理和化学性质的差异,不同程度地分配在互不相溶的两个相中。当两相相对运动时,各组分在两相中反复多次重新分配,结果使混合物得到分离。两相中固定的一相称为固定相,移动的一相称为流动相。

迄今为止,色谱法已派生出许多分支技术。对这些技术有多种分类的方法,不过通常是按两相的物理状态,固定相附着的几何形状、操作方式、分离机理及两相极性的相对强弱进行分类。

色谱法所用的流动相有气体和液体两种,以气体为流动相的称为气相色谱,以液体作为流动相的称为液相色谱。每种流动相又可以与固体或液体固定相搭配。因此,气相色谱又可分为气-固色谱和气-液色谱两种;液相色谱也可分为液-固色谱和液-液色谱两种。当流动相是在接近它的临界温度和压力下工作的液体时,称为超临界色谱(super critical fluid chromatography)。

固定相的附着方式,可以有不同的几何形状。把固定相装填在圆筒形柱管中的称为柱色谱(column chromatography)。把固体固定相涂敷在玻璃或金属板上的叫做薄层色谱(thin layer chromatography),把液体固定相涂敷在纸上的叫做纸色谱(paper chromatography)。薄层色谱和纸色谱又称为平板色谱(planar chromatography)。

依据分离机理的不同,我们可以把色谱分为四种类型。分配色谱(partition chromatography)是基于被分离组分在两相中分配系数的不同。吸附色谱(adsorption chromatography)是基于被分离组分对活性的固定相表面吸附力的不同。离子交换色谱(ion exchange chromatography)是利用不同离子与固定相上的相反荷电离子间作用力大小的不同进行分离的。排阻色谱(size exclusion chromatography)则是利用固定相孔径的不同,把被分离的组分按

分子大小分开的一种分离方法。

色谱的另一种分类法是按照使用的固定相和流动相相对极性大小的不同。流动相的极性比固定相的极性小的色谱体系称为正相色谱(normal phase chromatography),流动相的极性大于固定相极性的色谱体系,称为反相色谱(reversed phase chromatography)。

色谱法有迎头法、顶替法和冲洗法三种展开方式。迎头色谱法(frontal chromatography)是将要分离的混合物连续注入色谱柱中,而不加入流动相。用这种展开方法仅能得到纯的第一个流出物,后面流出的组分则是混合的。现在除了纯化溶剂外,这种方法已不常采用。顶替色谱法(displacement chromatography)是一种组分被另一种组分或试剂在固定相中顶替出来的分离方式。用顶替法分离时,各个被分离组分的谱带是紧靠在一起的,很难得到100%的定量回收,因此,这种方法主要用于大规模的制备分离。与顶替法不同,在冲洗色谱法(elution chromatography)的分离中,各组分谱带之间被流动相隔开,所以冲洗色谱法是色谱中分离最完全的展开方法,因而这是目前采用最多的分离方式。

1.3 液相色谱与气相色谱

气相色谱,特别是毛细管气相色谱有很高的分离能力。但是它仅适用于沸点较低、热稳定性好的中小分子化合物的分析。这类化合物仅占已知化合物总数的15%~20%左右。液相色谱则没有此种限制,它可以广泛的用于天然产物、生命活性物质、生物大分子、高聚物、离子型化合物以及无机物的分离分析。

液相色谱的另一个显著特点是流动相除起运载被分离样品的作用外,还有选择性分离的作用。因此,改变流动相的组成,对复杂组分的样品可以有效地进行分离。而气相色谱的流动相,只有运载样品分子的能力,不起分离作用,因而称之为载气(carrier gas)。

可供液相色谱使用的检测器的种类要比气相色谱多。一般常

用的分析方法如紫外、荧光、示差折光、库仑、安培、电导等,都可用
来作为液相色谱检测器。

1.4 高效液相色谱与经典液相色谱

与经典液相色谱相比,高效液相色谱有很大的优越性。

(1)经典液相色谱的色谱柱通常只能进行一次分离,需要进行第二次分离时,必须更换新的固定相。而高效液相色谱的色谱柱可以反复使用,重复进样次数可多达几百次仍不损坏分离效能,柱寿命可达一年以上。

(2)高效液相色谱具有分离效能高,分析速度快等特点。一般在几分钟或10多分钟内就可完成一次分离。而经典液相色谱进行一次分离往往需要几小时甚至10多小时。

(3)经典液相色谱是将分离的馏分逐一收集,然后进行离线检测。高效液相色谱的检测器紧接在色谱柱之后,经色谱柱分离的样品,直接进入检测器进行在线检测,不但方便而且大大提高了检出灵敏度。

(4)在样品用量方面,高效液相色谱的用样量比经典液相色谱少得多。前者一般的进样量为几微升或几十微升,而后者往往是几毫升到几十毫升。

参 考 文 献

[1] R. P. W. Scottl 著,李玲颖等译,现代液相色谱,南开大学出版社,1992.

第二章 基本概念

2.1 色谱过程

图 2.1 表示组分 A,B,C 假想分离过程中的四个连续步骤. 步骤 a 是把样品注入柱中, 在步骤 b 流动相开始进入柱中, A,B,C 三个组分开始分离. 在步骤 c 中, 流动相继续下移, 而在 d 中, 三个组分已基本上达到分离. 由图 2.1 的步骤 d 中, 我们可以认识到液相色谱的两个特征, 即样品组分的差速迁移和每个组分的谱带扩散. 如组分 A 移动最快, 组分 B 次之, 组分 C 移动最慢. 这种差速迁移是由样品组分在固定相与移动相之间的平衡分布不同引起的, 它是液相色谱分离的基础.

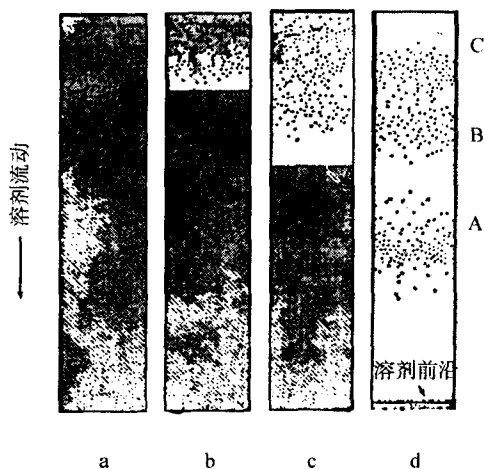


图 2.1 三组分样品的假想分离