

High Performance  
Liquid Chromatography

# 高效 液相 色谱

吴宁生 顾光华 编

中国科学技术大学出版社

# 高效液相色谱

吴宁生 顾光华 编

中国科学技术大学出版社

1989·合肥

## 内 容 简 介

高效液相色谱是现代重要的分离分析方法之一。本书即为此领域中的基本教材，体现了近期液相色谱发展的水平。作者简明而深入地阐述了高效液相色谱的基本理论、仪器部件和各种分离方法等。

本书可作高等院校分析专业的研究生、本科生的教材和教学参考书，也可供科研、企业等部门的色谱工作者阅读参考。

## 高 效 液 相 色 谱

吴宁生、顾光华 编

责任编辑：高哲峰 封面设计：王瑞荣

中国科学技术大学出版社出版

(安徽省合肥市金寨路96号)

中国科学技术大学印刷厂印刷

安徽省新华书店发行

\*

开本：850×1168/32 印张：3.375 字数：86千

1989年8月第1版 1989年8月第1次印刷

印数：1—2000册

ISBN7-312-00051-7/O·24 定价：0.90元

## 前 言

色谱法是现代分离和分析的一种重要方法，高效液相色谱则是其中的一个重要分支，与其他色谱法一样，得到了迅速的发展和广泛的应用。高效液相色谱在科研、生产和教学中的地位也就不言而喻了。

我们根据教学实践编写成此书，以提供一本高效液相柱色谱的基本教材，并愿其能起到抛砖引玉的作用。在编写中，我们力求做到简明扼要，着重于基本理论和基础知识的阐述，在气相色谱中已讲授过的内容不再重复；我们也力求使教材内容与高效液相色谱的发展相适应，但对于一些即使是重要但目前还不够成熟的论点和方法则不予列入，而作为补充教材讲授。本书旨在通过讲解，使同学们对高效液相色谱有较全面和系统的认识，并能运用基本理论和基础知识分析问题和解决问题。书中的图表和一些论述取自各家著作和有关期刊，对此不一一列出。

本书第四章中第一、第四和第六节由顾光华编写，其余部分由吴宁生编写。限于我们的学识水平，错误和缺点在所难免，热忱欢迎大家批评指正。

编 者

1987年2月

# 目 次

前言	( i )
第一章 绪论	( 1 )
第二章 理论问题	( 4 )
一、区带扩张	( 4 )
二、理论板高方程	( 5 )
三、柱外效应	( 8 )
四、折合板高方程	( 10 )
五、无限直径柱和管壁效应	( 13 )
六、梯度洗脱	( 14 )
第三章 仪器部件	( 18 )
第一节 高压输液系统	( 19 )
一、贮液器	( 19 )
二、高压输液泵	( 20 )
三、梯度洗脱装置	( 24 )
第二节 进样装置	( 25 )
一、进样器进样	( 25 )
二、高压六通阀进样和区带扩张	( 25 )
第三节 色谱柱	( 27 )
一、色谱柱的装填	( 27 )
二、柱的联接和使用	( 28 )
三、柱性能的评价	( 29 )
第四节 检测器	( 30 )
一、概述	( 30 )
二、性能指标	( 31 )

三、检测池体积对区带扩张的影响.....	(33)
四、紫外吸收式检测器.....	(34)
五、二极管阵列式检测器.....	(37)
六、荧光检测器.....	(39)
七、示差折光检测器.....	(41)
八、电化学检测器.....	(46)
九、反应检测器.....	(50)
<b>第四章 分离方法</b> .....	<b>(52)</b>
<b>第一节 吸附色谱</b> .....	<b>(52)</b>
一、固定相.....	(52)
二、流动相.....	(54)
三、样品分子结构对保留的影响.....	(56)
<b>第二节 化学键合相色谱</b> .....	<b>(58)</b>
一、键合相.....	(58)
二、流动相.....	(62)
三、保留机理.....	(65)
<b>第三节 离子对色谱</b> .....	<b>(71)</b>
一、分离机理.....	(71)
二、影响保留的因素.....	(72)
<b>第四节 离子交换色谱</b> .....	<b>(75)</b>
一、基本原理.....	(75)
二、离子交换剂.....	(76)
三、流动相.....	(80)
<b>第五节 离子色谱</b> .....	<b>(81)</b>
一、抑制型离子色谱—双柱法.....	(82)
二、非抑制型离子色谱—单柱法.....	(87)
三、检测方式.....	(87)
<b>第六节 空间排阻色谱</b> .....	<b>(88)</b>
一、基本原理.....	(88)

二、柱填料.....	(90)
三、流动相.....	(96)
第七节 分离方式的选择.....	(96)
<b>附表</b> 常用溶剂的性质.....	(99)

# 第一章 绪 论

## 一、概述

高效液相色谱是色谱法的一个分支，是一种分离、分析方法。高效液相色谱的分离原理和其他色谱法相同，混合物中各组分由于它们在固定相和流动相之间的分配系数不同而被分离。

俄国植物学家茨维特于1906年提出色谱法，他的实验是属于液相柱色谱。在30年代中期以前，液相柱色谱是色谱法仅有的一种色谱技术。早期，液相色谱分离柱是用碳酸钙或氧化铝等吸附剂填充于玻璃柱管内，吸附剂粒径大于 $100\mu\text{m}$ ，柱的装填既不紧密也不均匀，分离效率不高，每根柱只能使用一次；流动相由柱管上端依靠重力向下流过柱子，分离速度慢；检测是依靠肉眼辨别颜色，或是将吸附剂从柱管内移出分段后进行分析，灵敏度不高，费时费事。

液相色谱虽有80多年的历史，但它只是在最近20年内随着气相色谱的发展而迅速发展起来。在60年代，人们将气相色谱的理论和实践经验应用到液相色谱领域，这对液相色谱的发展起了很大的促进作用。1969年出现了高性能液相色谱仪，它是由用薄壳型固定相填充的高效分离柱、高压输液泵和紫外检测器组装而成，它的分离效率、分析速度和灵敏度方面都远远超过早期的液相色谱，它的优越性得到广泛的重视，液相色谱从此得到极为迅速的发展。为了和早期的液相色谱相区别，人们先后称之为现代液相色谱、高速液相色谱、高压液相色谱和高效液相色谱(HPLC)，现普遍使用高效液相色谱这一术语。70年代，计算机技术应用于液相色谱仪，实现了仪器的自动化。概括地说，



早期的液相色谱演变成今日的高效液相色谱，除了因为液相色谱理论的建立和不断完善，还由于以下四个方面的改进：（1）使用颗粒均匀的细粒固定相，提高了分离效率，柱效可达每米几万理论板；（2）应用无脉动的高压泵，缩短了分析时间；（3）各种高灵敏度检测器的应用，可连续检测微量组分；（4）利用微处理机控制色谱操作条件和处理色谱数据，实现了高度自动化，免去了许多操作上的麻烦。

现行的液相色谱全是高效液相色谱，因此最近有人提出不必使用高效液相色谱这一术语，使用液相色谱这个术语也不会引起人们的误解。液相色谱的发展丰富了色谱法的内容，同时也促进了其他色谱法的发展。液相色谱现已达到与气相色谱相媲美的程度，今后仍将得到不断的发展。

高效液相色谱现有许多分支。它们是：主要以微粒硅胶为吸附剂的吸附色谱；以化学键合相为固定相的键合相色谱，用离子交换剂为固定相的离子交换色谱和在此基础上发展起来的离子色谱，用于高分子量化合物分离的空间排阻色谱。高效液相色谱已广泛应用于生理生化、医药卫生、能源环保和有机合成等领域中，以解决各种分离、分析课题。

## 二、与气相色谱的比较

高效液相色谱与气相色谱是色谱法的不同分支，所以它们之间在许多方面是相同和相似的，但同时也存在着不同和差异。高效液相色谱和气相色谱都是一种重要的分离和分析方法，在气相色谱中讨论过的塔板理论、定量分析方法和部分定性分析法适用于高效液相色谱，有关色谱参数、色谱图和色谱柱效等方面的基本术语和它们的定义也完全适用于高效液相色谱，这些都是相同的。它们的基本流程是相似的。它们的应用领域不同，气相色谱局限于易挥发和热稳定的化合物的分离和分析，高效液相色谱可分离和分析不挥发的或热不稳定的但具有一定溶解性的化合物，

包括离子型化合物、聚合物、生物物质和天然有机产物等，但高效液相色谱不适于分离和分析气体，所以它们在应用上是相互补充的。由于高效液相色谱和气相色谱使用的流动相的聚集态不同，这决定了它们之间存在着下列差别，这些差别在理论上和实际上都必须予以考虑。

(1) 气相色谱的流动相通常是惰性气体，其作用只是运载样品组分通过色谱柱后进入检测器，而对色谱分离的影响一般很小，故气相色谱主要是通过改变固定相和改变柱温来改善分离效果；而液相色谱的流动相为液体，它具有一定溶解性能，所以它除了运载样品组分通过色谱柱和进入检测器外，还参与和影响色谱分离过程，有时甚至起着主要作用，在液相色谱中除通过改变固定相外，通常还通过改变流动相组成来改善分离效果；液相色谱的柱温受流动相沸点的限制，很少用改变柱温的方法来改善分离效果，柱温通常为室温。

(2) 由于分子在液体中的扩散系数比在气体中的扩散系数小4—5个数量级，所以在高效液相色谱中必须特别注意柱外效应对分离的不良影响。

(3) 由于液体的粘度比气体的粘度大2—3个数量级，所以在气相色谱中可采用长柱，填充柱的长度通常不小于1m，空心柱柱长可达几十米，高效液相色谱的柱长通常不超过30cm。

(4) 液体实际上是不可压缩的，而气体易被压缩，因此在气相色谱中与载气体积有关的参数都必须进行校正。

(1-1)

... ..

## 第二章 理论问题

色谱理论是研究物质在色谱过程中的运动规律、解释色谱流出曲线；也可以说是研究影响保留和影响区带扩张的因素、研究各因素的影响规律，为混合物的色谱分析提供理论依据，以便控制和调整色谱操作条件、提高分离效率。对不同色谱法来说，它们都服从色谱法的一般规律，同时也分别具有自身的特殊规律。本章讨论高效液相色谱中基本理论问题，其余的将在以后有关章节中叙述。

### 一、区带扩张

在描述组分的浓度分布时，若组分仍在色谱柱内，使用谱带(band)这一术语；当组分离开色谱柱后，用峰(peak)这一术语；而区带(zone)则具有谱带和峰这两个术语的含义。

区带扩张是指由于柱内和柱外各种因素的影响而引起的色谱峰增宽和变形。区带扩张的结果是柱效降低和分离度下降。由于在高效液相色谱中区带扩张对柱效的不良影响比在气相色谱中显著，所以应使区带扩张减小到最低程度。在高效液相色谱中，使用常规柱时进样量为微升级，但经色谱柱分离后在色谱图上的峰体积为0.2—2ml，这表示样品中各组分的浓度在不同程度上被流动相稀释，或者说在色谱过程中产生区带扩张。

设色谱峰为高斯峰，峰面积 $A$ 为

$$A = \sqrt{2\pi} \sigma_v C_{\max} V_{\text{进样}} \quad (2-1)$$

式中， $C_{\text{进样}}$ 和 $V_{\text{进样}}$ 分别为样品浓度和进样体积； $\sigma_v$ 表示高斯峰的标准偏差，其下标 $v$ 表示以体积为单位； $C_{\max}$ 为峰极大值处的浓度。定义稀释因子 $\eta F$ 为

$$DF = \frac{C_{\text{进样}}}{C_{\text{max}}} \quad (2-2)$$

由式2-1:

$$DF = \frac{\sqrt{2\pi}\sigma_e}{V_{\text{进样}}} = \frac{\sqrt{2\pi}V_{\text{柱}}E(1+k')}{n^{1/2}V_{\text{进样}}} \quad (2-3)$$

式中,  $V_{\text{柱}}$  为柱管体积,  $E$  为柱空隙度,  $k'$  为容量因子,  $n$  为理论塔板数。式 2-3 说明, 在其它条件一定时, 柱效随区带扩张程度的增大而降低; 由于  $V_{\text{柱}}E$  代表柱内死体积, 所以区带扩张的程度随柱死体积增大而增大。

引起区带扩张的因素分柱内和柱外两种。色谱峰的方差等于从进样到记录色谱峰过程中每一个独立因素所产生的方差之和, 它可表示为:

$$\sigma_{\text{总}}^2 = \sigma_{\text{柱}}^2 + \sigma_{\text{进样}}^2 + \sigma_{\text{联接管}}^2 + \sigma_{\text{检测}}^2 + \sigma_{\text{其它}}^2 \quad (2-4)$$

式中, 等式右边各项依次代表由色谱柱、进样方式、联接管、检测器和其他因素所产生的方差。式中各项的单位相同。

## 二、理论板高方程

与气相色谱类似, 组分在色谱柱内移动过程中, 区带宽度的增加是由于涡流扩散、纵向扩散和传质阻力等因素引起的。理论板高方程描述了这些因素对板高的影响。

流动相在柱内流动有多种流路, 组分分子是随机地随流动相在不同流路里流动, 若遇到固定相颗粒, 液流将散开, 并沿着围绕固定相的流路流动, 形成涡流扩散, 这样, 区带就变宽。涡流扩散对板高的贡献  $H_e$  为:

$$H_e = 2\lambda d_p \quad (2-5)$$

式中,  $d_p$  为填料的平均粒度,  $\lambda$  与粒度分布范围和装填紧密度有关。填料的粒度愈小, 粒度分布范围愈窄, 装填愈紧密, 则涡流扩散项的影响愈小。

样品分子在柱内随流动相移动的同时，由于在轴向上存在浓度差引起的扩散叫纵向扩散或分子扩散。纵向扩散使区带增宽，它对板高的贡献为：

$$H_L = \frac{C_L D_m}{u} \quad (2-6)$$

式中， $C_L$  为常数， $D_m$  为分子的扩散系数， $u$  为流动相的线速度。由于分子在液体中的扩散系数比在气相中的小 4—5 个数量级，这一项在流动相停流和低流速的情况下才有意义，在线速度较大时可不考虑。

流动相传质可分为两项，“流动的”流动相传质项和滞留的流动相传质项。流动相在柱内某一流路内流动时，靠近填料表面的流速比流路中间的流速慢，即样品分子在同一流路内的迁移速度不同，产生区带扩张，见图 2-1。它对板高的贡献为：

$$H_m = \frac{C_m d_p^2 u}{D_m} \quad (2-7)$$

式中， $C_m$  为与  $k'$  有关的常数。在采用多孔性填料时，填料孔内充满的流动相静止不动，这称为滞留的流动相。样品分子先扩散

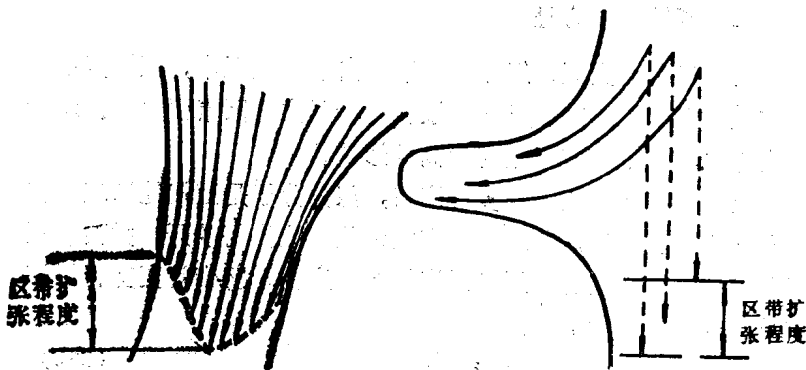


图 2-1 “流动的”流动相传质

图 2-2 滞留的流动相传质

进入此滞留区再到达填料表面，然后由滞留区扩散出来，扩散

距离长的分子较扩散距离短分子后回到“流动的”流动相中，使样品在柱内分布变宽，产生区带扩张，见图 2-2。此项对板高的贡献为：

$$H_{2,m} = \frac{C_m d_p^2}{D_m} u \quad (2-8)$$

式中， $C_m$  为与  $k'$  有关的常数。若填料粒度大、孔深、孔径小，则样品分子由孔内扩散出来所需的时间长，致使区带扩张的程度大；反之，区带扩张的程度小。据此，导致薄壳型和细粒大孔固定相的研制和出现。

固定相传质项主要是由样品分子在固定相中停留时间不同而引起的。进入固定相较深处的分子比进入浅表处的分子后回到流动相中，见图 2-3。此外被表面活性吸附点吸附的样品分子将在表面停留较长时间，较其它分子滞后。这些都导致区带扩张。此项对板高的贡献  $H_3$  为

$$H_3 = \frac{C_s d_f^2 u}{D_s} \quad (2-9)$$

式中， $C_s$  为与  $k'$  有关的常数， $D_s$  为在固定相中的扩散系数，

$d_f$  为固定相膜层厚度。所以固定相膜层厚度应尽可能小，表面应无活性吸附点以减小此项的影响。

设各项对板高的贡献是独立的，则它们的加和等于理论板高  $H$ 。

$$H = 2\lambda d_p + \frac{C_i D_m}{u} + \frac{C_m d_p^2 u}{D_m} + \frac{C_s d_f^2 u}{D_s} + \frac{C_r d_f^2 u}{D_s}$$

$$= A + \frac{B}{u} + C_m u + C_s u + C_r u$$

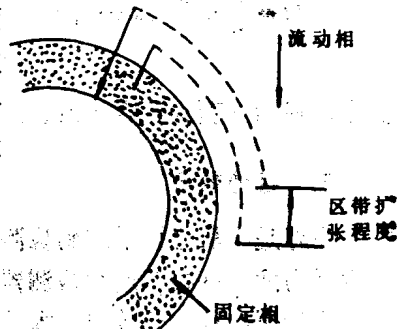


图 2-3 固定相传质

$$= A + \frac{B}{u} + Cu. \quad (2-10)$$

式 2-10 称为理论板高方程，是高效液相色谱中最基本的方程之一。式 2-10 说明， $H$  近似地与  $d_p^2$  成正比，填料粒度减小 10 倍，柱效约提高 100 倍；它还说明具有大孔径和浅孔道的填料的传质速度快，柱效提高。高效液相色谱是在这些思想指导下产生的。

吉丁斯 (Giddings) 认为涡流扩散项与“流动的”流动相传质项不是彼此独立无关的。涡流扩散可以使同一流路中不同流线的速度趋于一致，而同一流路中各流线速度的不同可使涡流扩散的影响减小，这两项相互影响的结果象两个电阻并联一样，总电阻减小。表示为偶合板高方程：

$$H = \frac{B}{u} + C_m u + C_s u + \frac{1}{\left(\frac{1}{A}\right) + \left(\frac{1}{C_m u}\right)}. \quad (2-11)$$

式中，最后一项称偶合涡流扩散项。

### 三、柱外效应

柱外是指从进样系统到检测器之间色谱柱以外的流路部分，由进样方式、联接管道和检测器等因素引起的区带扩张对柱效能所产生的影响称柱外效应。本节仅叙述联接管对区带扩张的影响，其余的将在下一章讨论。

样品随流动相在直径为  $d$ 、长度为  $L$  的联接管内流动时，由于流动相线速度在柱管内同一横断面上的非均匀性而导致区带扩张。把细径联接管看作是一个没有固定相的空心柱，对此可利用空心柱色谱中的戈雷方程来处理。

$$H = \frac{2D_e}{u} + \frac{1 + 6k' + 11k'^2}{24(1 + k')^2} \cdot \frac{r_0^2}{D_e} u + \frac{2k'}{3(1 + k')^2} \cdot \frac{d_j^2}{D_i} u \quad (2-12)$$

式中,  $r_0$  为空心柱半径,  $D_g$  为分子在气体中的扩散系数。由于管内没有固定相, 所以  $k' = 0$ , 又由于流动相的线速度在细管内比在柱内大得多, 故可忽略纵向扩散项的影响。因此, 联接管对板高的贡献为

$$H = \frac{d^2 u}{96 D_m} \quad (2-13)$$

式中,  $D_m$  为分子在液体中扩散系数。因为

$$\sigma_l^2 = H L \quad (2-14)$$

式中, 下标  $l$  表示  $\sigma$  以长度为单位。由式 2-13 和式 2-14, 可得联接管引起区带扩张对色谱峰方差的贡献为:

$$\sigma_l^2 = \frac{d^2 u}{96 D_m} L \quad (2-15)$$

将  $\sigma$  的单位改换为用体积来表示, 由式 2-15 可得

$$\sigma_v^2 = \frac{\pi d^4 L}{384 D_m} F \quad (2-16)$$

式中,  $F$  为流动相的体积流速。

在气相色谱中, 峰宽增加 5% 不影响分离度, 设这在高效液相色谱中也适用, 以  $\sigma_{0,v}^2$  表示不存在联接管影响时色谱峰的方差,  $\sigma_{总,v}^2$  表示存在联接管影响时色谱峰的总方差,  $\sigma_{联接管,v}^2$  表示联接管对总方差的贡献, 则

$$\sigma_{总,v}^2 = 1.05 \sigma_{0,v}^2 \quad (2-17)$$

因为

$$\sigma_{总,v}^2 = \sigma_{0,v}^2 + \sigma_{联接管,v}^2 \quad (2-18)$$

那末, 由式 2-17 和式 2-18 可得,

$$(1.05 \sigma_{0,v}^2)^2 = \sigma_{0,v}^2 + \sigma_{联接管,v}^2 \quad (2-19)$$

由式 2-16:

$$(1.05 \sigma_{0,v}^2)^2 = \sigma_{0,v}^2 + \frac{\pi d^4 L}{384 D_m} F \quad (2-20)$$



在液相色谱中，使用常规柱时峰体积一般为0.2—2ml。若峰体积以100 $\mu$ l计，则

$$\sigma_{0.05} = 25\mu\text{l} \quad (2-21)$$

在高效液相色谱中， $F$ 和 $D_m$ 的典型数据为 $F = 20\mu\text{l/s}$ ， $D_m = 10^{-3}\text{mm}^2/\text{s}$ ，由式2-19和式2-20可得：

$$d^4 L \leq 0.39\text{mm}^5 \quad (2-22)$$

若要求柱外联接管使最窄峰的区域扩张不超过5%，联接管的管径和长度 $L$ 应满足式2-22。具体数值见表2-1。

表 2-1 联接管的最大长度

直径 (mm)	最大长度 (mm)
0.125	1500
0.15	800
0.25	100
0.5	6

因此，在高效液相色谱中不能使用直径为0.5mm的联接管。对于直径为0.125mm的联接管，长度可达1500mm，但会使柱压降增加。例如水以20 $\mu\text{l/s}$ 的流速流过长为1500mm，直径为0.125mm的细管时，压降大约为5KPa。

#### 四、折合板高方程

为了比较填料粒度不同时的柱效，提出了三个折合参量：折合板高 $h$ 定义为，

$$h = H/d_p \quad (2-23)$$

折合流速 $v$ 定义为，