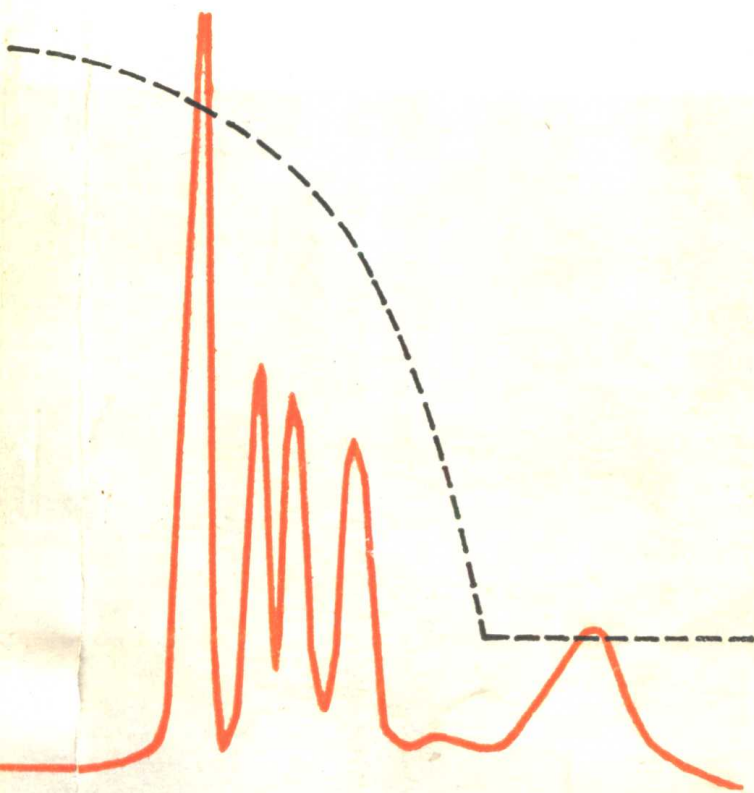


高效液相色谱法

High Performance Liquid Chromatography



[西德] H. 恩格哈特 著

机械工业出版社

高效液相色谱法

[西德] H·恩格哈特 著

杨文澜 马延林 译

张林群 校



机械工业出版社

高效液相色谱法是近年来迅速发展起来的一种新型分离分析技术。本书介绍了高效液相色谱法的原理、仪器、检测器、固定相、吸附色谱法、分配色谱法、离子交换色谱法、排阻色谱法、分离系统的选择及特殊技术和溶剂提纯等。

本书可供从事石油、化工、医药、生化、环保、农林等方面色谱工作的同志阅读，也可供高等院校有关师生参考。

High Performance Liquid Chromatography

Heinz Engelhardt

Springer-Verlag

Berlin Heidelberg New York 1979

* * *

高效液相色谱法

[西德] H·恩格哈特 著

杨文澜 马延林 译

张林群 校

*

机械工业出版社出版 (北京阜成门外百万庄南街一号)
(北京市书刊出版业营业许可证出字第117号)

重庆印制一厂印刷

新华书店北京发行所发行 · 新华书店经售

*

开本 787×1092 1/32 · 印张8¹/₈ · 字数173千字

1982年7月重庆第一版 · 1982年7月重庆第一次印刷

印数 0.001—6.000 · 定价 0.85 元

*

统一书号: 15033·5316

译者的话

在上世纪末期首先用于植物色素分离的方法，就属于液相色谱法。起初这种方法的发展是缓慢的，而仅仅在过去的十余年间才得到了真正的发展，成为一种新型的液相柱色谱法——高效液相色谱法。由于它具有分离效率高、速度快、灵敏度高、易于实现自动化等特点，因而得到了越来越广泛的应用。

本书是根据英文版本译出的，校对时参照了德文原版。在审校过程中，北京工业学院朱鹤荪教授，中国科学院北京化学研究所谢光华同志，作了认真的审校，在此表示衷心的感谢。

由于译者水平所限，错误一定不少，请读者批评指正。

1980年8月

德文原版序言

自 1969 年以来，现代液相柱色谱法得到了迅速的发展，已经成为一种标准的分离分析方法。由于高效液相色谱法比较简单，数据的获得和解释比较容易，因此在分析化学的各个领域中得到了普遍的应用。

分析化学领域里所用的仪器设备（如液相色谱仪），通常要比在例行分析中应用的较为复杂。与气相色谱里的情况一样，柱子分离得不好是很难补救的。最近发展起来的毛细管色谱柱，有可能使分离变得更加完全和高速。

毫无疑问，越是复杂的分离，越需要现代化的仪器。然而，近年来在柱色谱法方面的进展不大。根据文献报道的情况表明：现在大多数的分离任务能在比较短的色谱柱上（压降低于 50 巴）顺利完成，而不需要很高级的仪器，由于这种仪器很有效，使高效液相色谱仪作为一种分析工具而得到了广泛应用。

作者希望本书能为读者提供一些注重实际应用的知识和指导，从而为解决分离分析问题，选择更合适的色谱方法。

I·哈拉矢

1978年8月于萨尔布吕肯

英文版本序言

本书的目的是为色谱工作者，提供有关高效液相色谱法的简明扼要的指导。因而，理论部分的叙述是简短的。为了说明这些理论问题，使用了通俗的语言，并列举了适当的例子。比较详细地讨论了那些能影响色谱分离的因素，并熟练地掌握它们，以得到最好的结果。尽管液相色谱法的重复性不如其他色谱方法，也要特别强调研究那些能导致误差或重复性不好的因素。

本书是根据德文版的第二版本译出的，在不超出该书内容的前提下，采用了较新的文献。

本书的内容包含了萨尔大学应用物理化学研究所富有成效的科学讨论会上的成果和经验。衷心地感谢我的同事——I·哈拉矢 (I. Halász) 教授及其他同事良好的合作并提出了很好的建议。还要特别感谢 G·古特尼可夫 (G. Gutnikov) 教授，在休假期间于萨尔布吕肯翻译了此书。

H·恩格哈特

1978年8月于萨尔布吕肯

目 录

第一章 色谱方法	1
参考文献	5
第二章 色谱法的基本原理	6
一、保留值	6
二、线速度、孔率、渗透率	9
三、谱带展宽	12
四、分辨率	13
五、谱带展宽与流速的关系	16
六、谱带展宽和粒度	20
七、柱外谱带展宽	24
八、最佳分析条件和分析时间	25
九、分离柱的适当选择	27
参考文献	30
第三章 高效液相色谱仪器	31
一、溶剂储存器, 洗脱液的脱气	32
二、泵	33
1. 注射式泵	34
2. 往复活塞泵和隔膜泵	34
3. 可变冲程频率的泵	35
4. 气体驱动的置换泵	36
三、脉动的阻尼	37
四、进样	38
1. 样品环管	38
2. 进样装置	39
五、柱	41

1. 柱材料	41
2. 柱形状	42
3. 柱连接	42
4. 柱填充	43
5. 柱子的特性和检验	46
六、恒温	50
七、流速的测量	50
八、馏分收集器	51
九、记录仪	51
十、梯度洗脱装置	52
十一、安全装置	55
参考文献	56
第四章 检测器	57
一、紫外检测器	58
二、差示折光仪	62
1. 菲涅尔(Fresnel)折光仪	62
2. 偏转式折光仪	64
三、微吸附检测器	66
四、迁移检测器(火焰离子化检测器)	67
五、荧光检测器	69
六、其他检测器	70
1. 电化学检测器	70
2. 电导检测器	71
3. 电容检测器	71
4. 放射性检测器	72
5. 高效液相色谱仪与质谱仪的直接联用	72
6. 红外检测器	73
7. 其他方法	74
七、几种主要检测器的比较	75
八、反应检测器	76

参考文献·····	77
第五章 载体和固定相·····	80
一、吸附色谱和分配色谱的填充物·····	81
1. 硅胶·····	82
2. 氧化铝·····	84
3. 聚酰胺·····	86
二、化学改性载体·····	87
三、离子交换剂·····	92
四、排阻色谱法用固定相·····	94
参考文献·····	95
第六章 吸附色谱法·····	97
第一节 极性固定相·····	97
一、总论·····	97
二、固定相·····	101
三、水分对分离的影响·····	102
四、洗脱液对分离的影响·····	112
1. 洗脱序列·····	112
2. 洗脱液的选择·····	115
3. 溶剂的混合物·····	116
五、样品结构的影响·····	121
第二节 非极性固定相·····	123
一、总论·····	123
二、反相的性质·····	124
三、溶剂对分离的影响·····	127
四、样品结构的影响·····	131
第三节 一般洗脱问题·····	135
一、程序控制压力或流量·····	136
二、程序控制温度·····	137
三、程序控制固定相·····	143
1. 改变吸附剂的活性·····	143

2. 复合柱	144
四、梯度洗脱, 程序控制洗脱液的组成	146
第四节 吸附色谱法的应用	154
一、极性固定相	154
二、非极性固定相	157
三、在聚酰胺上的分离	161
参考文献	162
第七章 分配色谱法	167
一、引言	167
二、载体和固定液	169
1. 载体	169
2. 固定液	174
3. 载体的涂渍	177
4. 涂渍量测定法	178
三、柱特性	179
1. 稳定性	179
2. 样品容量	180
3. 制备应用	180
4. 柱效	181
5. 程序技术	182
四、应用	183
五、离子对色谱法	186
参考文献	190
第八章 离子交换色谱法	192
一、原理	192
二、离子交换材料	194
1. 带有机聚合物骨架的离子交换剂	194
2. 多孔层微珠上聚合的离子交换剂	195
3. 刷子型离子交换剂	195
4. 液体离子交换剂	196

三、离子交换剂的特性	196
四、分离的最佳化	198
1. pH 值对保留值的影响	198
2. 离子强度对保留值的影响	200
3. 缓冲液的变化	201
4. 其他影响	202
5. 梯度洗脱	202
五、应用	203
1. 高效液相色谱用的经典离子交换剂	203
2. 多孔层微珠	205
3. 化学改性硅胶上的离子交换剂	206
参考文献	207
第九章 排阻色谱法、凝胶渗透色谱法	209
一、引言	209
二、排阻色谱法基础	209
三、排阻色谱法的固定相	213
四、排阻色谱法的应用	215
1. 聚合物分子量分布的测定	217
2. 快速排阻色谱法在生物化学方面的应用	221
参考文献	224
第十章 分离系统的选择	226
参考文献	235
第十一章 特殊技术	236
一、制备色谱法	236
二、定性分析	239
三、定量分析	240
四、痕量分析	242
参考文献	244
第十二章 溶剂提纯	245
参考文献	247

第一章 色谱方法

起初，色谱法所用的柱子，其内径大于1厘米[2~5]。用这种方法进行定性和定量分析，也可进行制备分离。通过填充柱流动相的流量是受重力作用的，有时利用液体的静压力也能得到加速。尽管如此，在柱子横截面每厘米²上的流量也小于60毫升/时（线速度低于0.02厘米/秒）。微粒的平均直径为100微米或更大一些，以便在液体的静压力作用下得到这样的流速。

因为微粒的尺寸大，所以这种柱子的效率不会特别好。效率不好的另一个原因或许是样品量的过载。后来发展起来的纸色谱法[6,7]和薄层色谱法[8,9]，在相当大地程度上取代了经典柱色谱技术。在多数情况下，它比在柱内分离得更好、更快，而且使用喷显剂对分离出的样品进行鉴定是相当简单的。

近年来，用液体作流动相的柱色谱法获得了新生，部分的原因是因为发展了灵敏的检测器，用以检测柱流出物中的样品组分；同时也是由于吸收了气相色谱法的知识，用于液相色谱法的结果[10]。

在高效液相色谱中，HPLC（有时也称为高速液相色谱法），使用内径2~8毫米的细口径的色谱柱。这些色谱柱填充微粒的平均直径小于50微米。采用很高的入口压力（10~400大气压），使流动相的速度增高，线速度一般在0.1~5厘米/秒之间，甚至更高一些。

色谱方法的分类

任何色谱分离，都是基于样品组分通过柱子时迁移速率的不同。不同的样品组分在固定相里消耗的时间是不同的，而所有的样品组分在流动相里消耗的时间是完全相同的。仅仅起输送作用的流动相，可以是气体，也可以是液体。色谱法的分类就是根据所用流动相和固定相来分的。如果用具有较大有效表面的固体作为固定相，那么在用气体作流动相时，我们就称之为气相吸附色谱法（或气-固色谱法，缩写为 GSC）。在用液体作流动相时，就称为液相吸附色谱法（或液-固色谱法，缩写为 LSC）。如果固定相是涂渍在大孔容的惰性载体上的液体，就称为气相分配色谱法（或气-液色谱法，GLC）；或液相分配色谱法（或液-液色谱法，LLC）。

如果用活性固体作固定相，那么一般就称为吸附色谱法。如果把液体涂渍在非活性的固体载体上作为固定相，就称为分配色谱法。这二者之间没有明显的界限。经常使用的预先涂渍的吸附剂的吸附色谱法，能出现从纯吸附到多少有点分配的连续转变 [11]。同样，在分配法中，载体对保留值的影响也是不可忽略的，尤其是在它的表面积大的时候。

这样分类只有在离子交换色谱法和排阻色谱法（也称为凝胶过滤色谱法或凝胶渗透色谱法）才是明显的。离子交换剂 [12、13] 是难溶解的多孔型物质（目前多数是有机高聚物），在其表面上有阴离子或阳离子基团，从而能从流动相里吸收阳离子或阴离子，并能重新释放出去。在排阻色谱法中 [14、15]，用的是具有窄而确定的孔径分布的多孔型固体。有效直径比孔大的分子不能渗透到固体里面去，从而比能渗透到孔里去的较小的分子较快地通过柱子。因为在孔中不存

在柱子的轴向输送过程，所以这种分子要比被排阻的滞后。

气相色谱法只能用于可气化物质的分离。在正常压力下不能气化的许多物质，可以简单而定量地转变为可气化的衍生物，从而能用气相色谱法进行分离。因此，适用于气相色谱法的分子量的上限是不能精确确定的。

液相色谱法特别适用于气化时易分解的物质的分离。小而非极性分子的液相色谱分离是困难的，因为它们能吸附在固定相上，与大的溶剂分子相对抗。大分子的排阻机理是明显的。液相色谱法能连续地转变到排阻色谱法，排阻色谱法的分离仅取决于分子的大小。图1-1表示出这三种色谱法的应用范围。

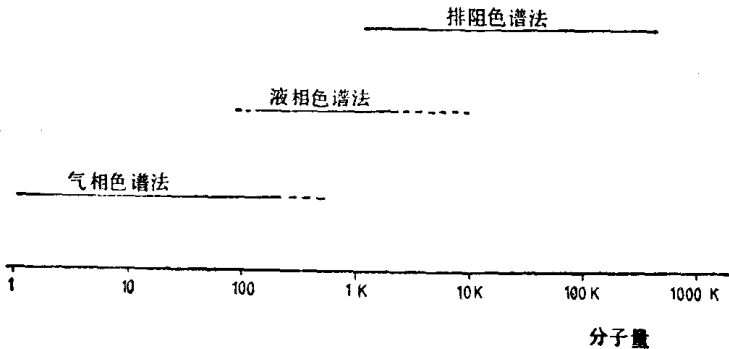


图 1-1 色谱法的应用范围

可以用不同的方法来实现色谱分离。根据所用的进样法，可分为下述几种[16]。

1. 连续样品导入法

样品或它的溶液连续地注入色谱柱，这种方法就是所谓的前沿分析法[17]或吸附过滤法。如果要使用溶剂，它与柱子填充剂之间的相互作用一定要小。采用这种方法，只有

弱保留物质能离析为纯组分，其他的全以混合物的形式出现。此法只能断续地使用，因为在柱子末端出现了混合物时，就要报废这根柱子。因此它很少用于高效液相色谱法，然而它常用于色谱溶剂的提纯 [5] 和富集液体里的痕量组分 [21]。

2. 断续样品导入法

1) 洗脱分析法。样品注入到连续流动的洗脱液中。样品注入前和注入后，洗脱液的组成保持恒定。如果在整个分离过程中都保持不变，而且洗脱液与固定相之间的相互作用又小于它和样品之间的相互作用，就称之为洗脱分析法或洗脱色谱法 [18]。典型的洗脱色谱图是这样得到的：在理想情况下，每个峰都是用一段纯洗脱液与下一个峰分开的。

2) 梯度洗脱法。如果在分析过程中，洗脱液与固定相之间的相互作用是增大的，即洗脱液的组成是连续变化的，并因此而增加其洗脱强度，就称之为梯度洗脱 [19]。梯度洗脱的优点在于缩短了分析时间。较强保留的样品组分，能在恒定洗脱强度分析时，得到更尖，即更窄的峰。

3) 顶替色谱法 [20]。在这种方法里，样品注入后，洗脱液也是变化的，洗脱液与固定相之间的相互作用大大超过所有的样品组分与固定相之间的相互作用，从而把它们从固定相里完全顶替出来。按照样品组分在固定相上保留值的增强为顺序，顶替剂把它们在自己的前面推压出去。在柱流出物中，它们先后以纯组分的形式出现，最后是顶替剂。与洗脱色谱相反，单个组分之间不是用纯洗脱液分开的。在过渡区域，由于扩散而相互混合，所以顶替色谱法未能获得广泛的应用。然而，常常要加入顶替剂来结束梯度洗脱。如果顶替剂能用另一种洗脱液从柱子里冲洗出来，柱子就可以得

到再生。

在分离过程中，几乎只采用洗脱展开法，因为在理想的情况下，分离了的峰是用纯洗脱液分开的，因而能以纯组分的形式而单独地存在。对称峰最高点的位置，可用于样品组分的定性鉴定。高效液相色谱法较之常规液相色谱法的优点在于分析的速度快，以及对分离了的组分的定性和定量测定简单。

参 考 文 献

1. Tawett, M.S.: Ber. Dtsch. botan. Ges. 24, 316, 384 (1906). Vgl. Hesse, G., Weil, H., in: Woelm-Mitteilungen A1 1, Eschwege 1954
2. Lederer, E., Lederer, M.: Chromatography 2nd ed. Amsterdam: Elsevier 1957
3. Lederer, E. (Ed.): Chromatographie en chimie organique et biologique. Vol: I und II. Paris: Masson 1959, 1960
4. Heftmann, E. (Ed.): Chromatography. New York: Reinhold 1969
5. Hesse, G.: Chromatographisches Praktikum. Frankfurt/Main: Akad. Verlagsges. 1968
6. Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie 1958
7. Hais, J., Macek, K.: Handbuch der Papierchromatographie. Bd. I. Jena: Gustav-Fischer-Verlag 1958
8. Stahl, E. (Ed.): Handbuch der Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
9. Randerrath, K.: Dünnschichtchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie 1966
10. Giddings, J.C.: Dynamics of Chromatography. New York: Marcel Dekker 1965
11. Engelhardt, H., Weigand, N.: Anal. Chem. 45, 1149 (1973)
12. Helfferich, F.: Ionenaustauscher. Weinheim: Verlag Chemie 1959
13. Dorfner, K.: Ionenaustauscher. Berlin: DeGruyter 1964
14. Determan, H.: Gelchromatographie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
15. Altgelt, K.H., Segal, L. (Eds.): Gel Permeation Chromatography. New York: Marcel Dekker 1971
16. Halász, I.: Lecture notes, University of Nice, 1971
17. Tiselius, A.: Arkiv Kemi Min. Geol. 14b, 22 (1941); cf. Endeavor 11, 5 (1952)
18. Reichstein, T., van Euw, J.: Helv. Chim. Acta 21, 1197 (1938)
19. Alm, R.S., Williams, R.J.P., Tiselius, A.: Acta Chem. Scand. 6, 826 (1952)
20. Tiselius, A.: Arkiv Kemi Min. Geol. 16a, 18 (1943)
21. Thesis; Aufsatz, M.: Saarbrücken, 1976

第二章 色谱法的基本原理

一、保留值

两种物质在柱子上实现洗脱色谱分离在于：物质到达柱末端所需要的时间取决于它们的滞留程度（在固定相上的保留程度）。各物质的差别仅仅在于它们在固定相里或在其上所消耗的时间，即它们的净保留时间 t_R' 是不相同的。总保留时间 t_R 是由在固定相上的这个净保留时间和在流动相上所消耗的时间 t_0 组成的， t_0 又称为死时间。

$$t_R = t_0 + t_R' \quad (1)$$

对所有物质来说，死时间都是相同的，它也就是溶剂分子的洗脱时间。

在本章里，用于表征柱性能的术语，可以用图 2-1 来说明。如果色谱是用来对不同的物质进行定性分析，保留时间应与样品量无关。换句话说，样品在固定相里的量与它在洗脱液中的量之比，应该与样品浓度无关。只有在这种情况下，才能得到用高斯曲线所描绘的峰。出现了非对称的峰，可能是非线性的等温吸附线的标志。

因为保留时间取决于洗脱液的流速，所以最好采用保留体积。保留体积等于保留时间和洗脱液体积流速 F （厘米³/分）的乘积。

$$V_R = t_R F \quad (2)$$

同样，柱子中流动相的体积 V_M 可由死时间来确定。

$$V_M = t_0 F \quad (3)$$

净保留体积 V_N 则为总保留体积减去流动相体积。