



现代液相色谱法导论

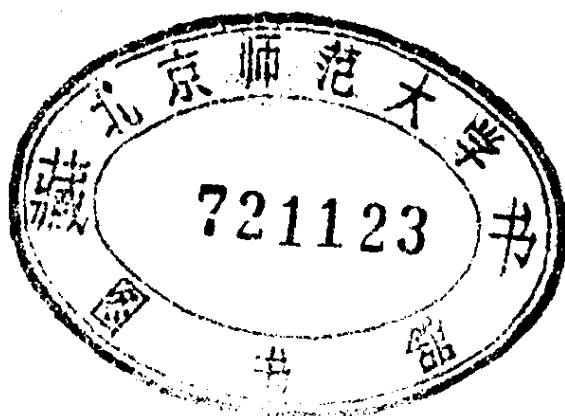
[美] L.R.斯奈德 J.J.柯克兰 著

化学工业出版社

现代液相色谱法导论

〔美〕 L. R. 斯奈德 著
J. J. 柯克兰 著
杨明彪 翟 纯 译

7/1A/54/15



化学工业出版社

近十年来, 高效液相色谱的发展是当前分析化学领域的一个新动向。在高效液相色谱的专著中, 本书是较有代表性的。全书分十三章, 系统地叙述了高效液相色谱的基础理论、仪器、检测器、固定相、流动相、各种色谱方法及其应用, 同时注重培养读者解决实际问题的能力。在理论叙述方面, 深入浅出; 在取材方面, 考虑了各种专业的需要。本书可供石油、化工、医药、环保、生化、农林等方面的色谱工作者阅读, 也可供高等院校、科研单位从事分析、有机、生化工作的同志参考。

L. R. Snyder J. J. Kirkland

Introduction to

MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY

John Wiley & Sons, Inc.

New York • London • Sydney • Toronto (1974)

现代液相色谱法导论

杨明彪 翟 纯 译

化学工业出版社出版

(北京和平里七区十六号楼)

化学工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

开本 $787 \times 1092^{1/32}$ 印张15插页1字数347千字印数1—4,350

1980年9月北京第1版1980年9月北京第1次印刷

书号15063·3205 定价1.55元

译 者 的 话

高效液相色谱（现代液相色谱）是近十年来发展起来的一种分析分离新技术。它具有高效、快速以及操作自动化等特点。由于其分析试样不受沸点和热稳定性的限制，因此可以广泛地用于各个领域。国内高效液相色谱也正在蓬勃发展之中。可以预料，不久的将来这一技术必将成为十分普及、行之有效的常规分析工具。

本书系统地叙述了高效液相色谱的基础理论、仪器、检测器、固定相、流动相、各种色谱方法及其应用。本书注重培养读者解决实际问题的能力，在处理理论和实践的关系上是比较出色的。作者还根据实践经验总结出了一些经验规律和挂表操作方式。因此，本书不仅对初学者可作为入门的向导，而且对已从事高效液相色谱工作的同志也具有一定参考和实用价值。为了方便，我们在书末附加了国内外液相色谱商品填充剂对照表（附录Ⅶ）和内容索引（英汉对照）。

本书的翻译是在陆婉珍同志的指导下进行的。初稿完成后，陆婉珍同志又审阅了全稿。周家骝、沙必时同志校核了全稿，作了必要的改正和文字修饰，特此致谢。

序 言

这是一本关于现代液相色谱法的书。所谓现代液相色谱，我们指的是在柱上进行的自动的、高压液相色谱。它对范围很宽的样品类型具有高的分离能力，并能在几分钟到大概一小时之内完成。现代液相色谱到现在约有五年的历史。装置和高性能的柱填充剂在一九六九年初就可买到，它使液相色谱沟通了经典液相色谱和气相色谱之间的鸿沟。从此，供应液相色谱装置和材料的公司活跃起来；近几年，液相色谱的理论和实践也有了很大的进展。目前，正在报导现代液相色谱在各方面的许多应用。现代液相色谱技术已达到了一位普通的色谱工作者就可取得在昨天看来是十分惊人的成果。

要从现代液相色谱得到最多的结果，需仔细最有效地选择正确的方法、最好的分离条件以及使用适当的装置。简单地说，实际工作人员必须知道他要作的是什么。此外，他的知识必须理论和实践兼备，即必须包括基本原理和实践两方面。遗憾的是，在色谱上有一种不是强调理论，就是强调实践的倾向。而且，色谱（以及现代液相色谱）的理论常常被描述得十分复杂，将它用于实际分离问题或是效果不显著或是十分枯燥。我们认为应有一个更好的方法。

有效地介绍现代液相色谱法必须是具有详细的实用内容和深入浅出的理论。就是这种信念致使我们在一九七一年开办了美国化学协会“现代液相色谱法”短期训练班。在此后两年内，我们给大约八百名学员发了讲义，得到了十分热烈的欢迎。讲义在这期间是逐步形成的，大部分是解答问题和学员们的评论。到一九七二年末，已看出把我们的讲义变成课本形式很有必要了，本书就是这样产生的。

对本书，我们的目的是保留短期训练班的基本内容，并增加了两天一期的讲课中没有包括进去的一些材料。我们不希望在这篇篇幅的书中介紹液相色谱有关的所有内容，而我们也决定不忽视有实际意义的任何部分。援引其他原始参考资料对两方面的协调证明是必要的。本书是根据打算开展现代液相色谱工作的普通专业或技术的需要而写的，我们相信对大多数已开展液相色谱的实验室也将证明是有用的。

最后，我们想表达对编写本书过程中实现我们想法的许多专业同伴，对上过课的并帮助使下一班办得更好的数百名学员以及对帮助发起短期训练班的美国化学协会进修教育部的工作人员的感谢。我们尤其感谢特约作者 E. I. Du Pont de Nemours & Co. 生物化学部的 J. J. 德斯特法诺博士和 Technicon Instrument Corporation 研究部的 H. J. 艾德勒先生。他们在自己专长范围所写的材料填补了美国化学协会初期短训班的空白。我们也感谢同意审稿并作了很大修改的几位朋友：Union oil Company 的 D. L. 桑德斯博士，the Virginia Polytechnic Institute 的 H. M. 麦克奈尔博士和丹尼尔·马什先生，东北大学的 B. L. 卡格博士，耶鲁大学的 C. 霍维斯博士以及 J. J. 德斯特法诺博士。但是，必须补充的是有些意见我们可能始终没有注意到，对遗留下来的任何错误由我们负责。

十分感谢从事秘书工作的：Technicon Instrument Corporation 的伊丽莎白·吉尔夫人和埃斯特格伯夫人以及 Du Pont 的玛丽·林恩·爱德华兹夫人的努力。我们特别感激 Du Pont 的米尔德里德·赛弗森小姐最后复制了全稿。与我们有关系的各部门的支持，帮助也很大。最后还要归功于我们的家属，在完成本书的几个月中，他们给予了支持。

L. R. 斯奈德 J. J. 柯克兰 1973年10月

目 录

第一章 绪言	1
1.1 液相色谱和气相色谱的比较	2
1.2 现代液相色谱和传统液相色谱的比较	4
1.3 现代液相色谱的产生	10
1.4 液相色谱的文献	11
第二章 基本概念	14
2.1 色谱过程	14
2.2 液相色谱中的保留作用	21
2.3 谱带扩展	24
2.4 分离度	30
2.5 分离时间	33
2.6 样品量的影响	35
2.7 谱带拖尾	36
第三章 分离的控制	40
3.1 R_s 的估计	40
3.2 R_s 应该多大	46
3.3 分离度控制的一般原则	54
3.4 分离度与 k' 的关系	58
3.5 分离度与 N 的关系	63
3.6 分离度与 α 的关系	69
第四章 装置	78
4.1 引言	78
4.2 流动相贮罐	80
4.3 泵系统	83

4.4 高压流动相输送系统中的其它单元	90
4.5 梯度洗脱装置	92
4.6 进样装置	97
4.7 柱子和柱硬件	102
4.8 柱子恒温箱	105
4.9 馏分收集器	105
4.10 流量的测定	106
4.11 数据处理系统	107
4.12 液相色谱中的安全问题	107
第五章 液相色谱的检测器	111
5.1 引言	111
5.2 紫外和可见光度计	116
5.3 示差折光计	122
5.4 溶质传送检测器	126
5.5 放射性检测器	128
5.6 极谱检测器	129
5.7 红外光度计检测器	130
5.8 荧光检测器	132
5.9 电导检测器	132
5.10 其它检测器	133
5.11 检测器特征一览	135
第六章 柱子	138
6.1 引言	138
6.2 柱填充剂的特点	140
6.3 柱填充剂的性能	149
6.4 柱子的填充方法	150
第七章 液-液色谱	159
7.1 引言	159
7.2 柱填充剂	160

7.3 分配相	172
7.4 其它分离变量	179
7.5 特殊问题	180
7.6 应用	180
第八章 液-固 色 谱	191
8.1 引言	191
8.2 柱填充剂	196
8.3 流动相	203
8.4 其它分离变量	216
8.5 特殊问题	217
8.6 应用	219
第九章 离子交换色谱	224
9.1 引言	224
9.2 柱填充剂	227
9.3 流动相	238
9.4 在氨基酸分离中溶剂的选择性	243
9.5 其它分离变量	251
9.6 特殊问题	252
9.7 应用	253
第十章 凝胶色谱	264
10.1 引言	264
10.2 柱填充剂	268
10.3 流动相	278
10.4 其它分离变量	280
10.5 特殊问题	283
10.6 应用	287
第十一章 四种液相色谱方法的选择和建立	297
11.1 引言	297
11.2 特定分离方法的建立	303

11.3 选择不同方法的组合	307
11.4 不同技术的应用	311
第十二章 大规模分离	316
12.1 引言	316
12.2 制备分离的对策	318
12.3 装置	321
12.4 柱子	323
12.5 操作参数	329
12.6 应用	335
第十三章 其它课题	339
13.1 定量液相色谱法	339
13.2 再谈溶剂	349
13.3 解决一般洗脱问题所用的方法	364
符号表	381
附录	384
I. H对实验条件的依赖关系	384
II. 液相色谱法中流动的关系	387
III. 作为柱压P, 分离时间t和柱性质(K,D,n) 函数的分离度 R_s	389
IV. 作为N的函数的分离度: 增加 R_s 的各种选择	390
V. 现代液相色谱的商品装置	392
VI. 柱效对比	404
VII. 国内外液相色谱商品填充剂	408
内容索引 (汉英对照)	449

第一章 绪 言

四十年来，色谱技术不论在色谱工作者的人数、发表著作的数量，还是在所分离的样品的种类和复杂性、以及分离速度和操作方便等方面，都在不断地增长和发展。然而，这条增长曲线并不是逐年平滑上升的。说得更确切一些，色谱法的历史是随某些重大革新而周期性地迸发式向上发展的。不难看出表征这种发展的几个重大的里程碑是：四十年代分配色谱和纸色谱的出现，五十年代气相色谱和薄层色谱的问世，以及六十年代早期各种凝胶或排阻色谱的采用。几年以后，又得以预期到还有另外一个重大的发展会引起色谱技术的革命，这个发展就是称为**现代液相色谱**的技术。

所谓“现代液相色谱”是什么意思呢？相对于以**气体**为流动相的气相色谱来说，以**液体**为流动相的任何一种色谱过程都是液相色谱。液相色谱包括传统的柱色谱（无论是吸附、分配或离子交换），薄层色谱，纸色谱以及现代液相色谱。现代液相色谱与这些老方法之间在装置、材料、方法和理论上都有所不同。但总的来说，现代液相色谱的主要优点在于操作方便、精确、迅速以及能够解决困难的分离问题。从以下两方面加以比较，就可看出现代液相色谱的独特价值。

- 液相色谱和气相色谱的比较；
- 现代液相色谱和传统液相色谱的比较。

1.1 液相色谱和气相色谱的比较

气相色谱分离和分析复杂混合物的惊人的能力，现已广泛得到人们的称赏。和以前的色谱方法相比，气相色谱的特点在于它的分离既快又好；再者，气相色谱很快就有了自动装置，因此操作方便、不需要照看。但是有很多样品不能用气相色谱进行分析，这是因为它们或者挥发性差而不能通过柱子，或者热稳定性不好以致在分离条件下会发生分解。据估计，在现在已知的有机化合物中，仅有20%的样品可不经预先的化学处理，而能满意地用气相色谱进行分离。

另一方面，液相色谱却并不受样品的挥发度和热稳定性的限制。所以液相色谱非常适合于分离生物药品的大分子和离子型化合物、不稳定的天然产物以及其他各种高分子量的或不稳定的化合物。例如

蛋白质	多糖	药物
核酸	植物色素	染料
氨基酸	极性类脂	表面活性剂
药品和农药	甾族	合成共轭聚合物
嘌呤	维生素	抗氧剂

与气相色谱相比较，液相色谱还具有一些其他优点。对于很难分离的样品用液相色谱常比用气相色谱容易完成分离。这是因为：

- 在液相色谱中，有两个相与样品分子发生选择性的相互作用；而在气相色谱中，仅有一个相有这种作用；
- 液相色谱中具有独特效能的柱填充剂（固定相）的种类较多；
- 液相色谱使用较低的分温度。

色谱分离是样品分子与固定相和流动相之间特殊的相互作用的结果。这类相互作用在气相色谱的流动气相中本质上是不存在的，而在液相色谱的液相中却存在，这就对分离的控制和改善提供了一个额外的可变因素。而且，液相色谱中固定相的种类较多也是很有用的，因为这样就使得这类选择性的相互作用具有更为广泛的变更余地，从而增加了分离的可能性。最后，较低的温度一般也有利于色谱分离，因为这时分子间的相互作用变得更为有效。这对于液相色谱是有利的，因为它通常是在接近室温的温度下操作。

液相色谱还能提供一些独特的检测器，这些检测器至今在气相色谱中还很少见或者完全没有应用。

- 被分离的样品组分的显色反应与比色计相结合；
- 紫外吸收和荧光检测器；
- 放射计检测器；
- 电导检测器；
- 极谱检测器；
- 折光指数检测器。

在以后将要介绍的一些液相色谱分析中，只要适当地选择检测器，就可不必进行完全的分。

和气相色谱相比较，液相色谱的最后一个优点是样品的回收比较容易。在液相色谱中，只要把一个开口容器放在柱的末端，就可容易地将所分离出的各个馏分加以收集。回收是定量的，并且所分离出的各样品组分也很容易分离开来。在气相色谱中，所分离出的各样品组分虽也可以回收，但一般都不大方便，而且定量性不好。

液相色谱尽管比气相色谱具有这些更为有利之点，但当对某一指定样品不致出现特殊的问题时，通常仍都选用气相色

谱。用气相色谱进行的分离，常常更快、更灵敏和更方便。另外，大多数实验室都已完善地配备了气相色谱的仪器和操作人员。但是，大多数样品的分离自然地首先选用气相色谱的时期将会很快过去。在不久的将来，我们就可看到用现代液相色谱分析的样品将比用气相色谱分析的样品为多。

1.2 现代液相色谱和传统液相色谱的比较

现在来看一看现代液相色谱与经典液相色谱或开床色谱之间的区别。这三种方法的一般程序如图 1.1 所示。在**经典液相色谱**中，柱通常都只使用一次即行丢掉。因此，每次分离都要重新填充一次柱子（图1.1的第1步“床的制备”），这就造成了人力和物力上的重大浪费。经典液相色谱中的正确进样（第2步），对操作人员来说，需要一定的技巧和时间的。经典液相色谱的溶剂流动（第3步），是靠重力作用来实现的，并且样品的各个馏分是用人工收集的。通常经典液相色谱的分离需要几小时才能完成，所以这是很枯燥和费时的操作。检测和定量（第4步）都是靠各个馏分的人工分析来完成的。一般都要收集许多馏分，还要耗费很多时间和人力对它们进行处理。最后，把分离的结果记录成一个**色谱图**：样品浓度对馏分号数的棒式图。

四十年代纸色谱以及五十年代薄层色谱的出现，大大地简化了液相色谱分析技术。这点也可由图 1.1 中看出。在薄层色谱和纸色谱中，床的制备（第1步）比在经典液相色谱中要简单和便宜得多。纸或涂好了吸附剂的板只要很少的费用就可买到现成的。进样比较容易，并且只要把点好样品的纸或板放入盛有少量溶剂的密闭容器中，即可实现溶剂的流动。由于毛细作用溶剂会自动地流上纸或板，而不需操作者进行处理。最

后，往干了的纸或板上喷上某些显色剂，就可得到所分离出的每个样品组分的可视斑点，从而完成检测和定量。

纸色谱技术和薄层色谱技术大大简化了液相色谱，并且操作也方便得多。另一个优点，尤其是薄层色谱，其分离结果比经典液相色谱的分离结果要好得多，而且分离时间一般为30~60分钟，比经典液相色谱的几小时短得多。但是，这些开床色谱仍存在某些局限性：

- 定量困难而且重复性差；
- 难以自动化；
- 与气相色谱比较，分离时间较长而且分离较差。
- 对制备分离，样品容量有限（最大样品量仅几毫克）。

尽管具有这些局限性，但大多数液相色谱分离仍然选用薄层色谱和纸色谱来完成。

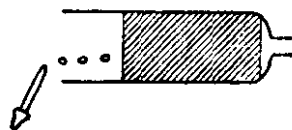
现在，我们再来看一看现代液相色谱。现代液相色谱使用了封闭的、可重复使用的柱子（图1.1第1步），因而能在同一根柱上进行成百次的分离。于是，由于一根柱子的费用可以分摊在大量数目的样品上，就有可能使用昂贵的高效柱填充剂，以及为了得到最好的结果而可以耗费较多的时间对柱子进行细心填充。现代液相色谱中的正确进样（第2步），无论是使用注射器还是使用进样阀都很容易并能很快地完成。溶剂的流动（第3步）是借助高压泵实现的。这具有一个关键性的优点，即流量可以控制而且溶剂能很快地通过难渗透的柱子。控制流量的结果使操作的重复性改善，这就意味着液相色谱分析的精度较高。高压操作导致了较快、较好的分离，这将在第三章说明。现代液相色谱的检测和定量是用各种类型的连续性检测器实现的。这样，不需操作者动手就能得到一个连续的色谱图。这种色谱图是用最少的人力得到分离的准确记录。

1 床的制备

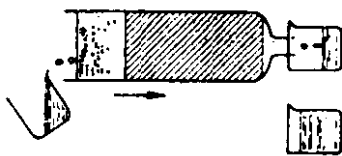


经典液相色谱法

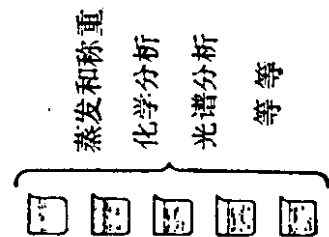
2 进样



3 溶剂流动



4 检测和定量

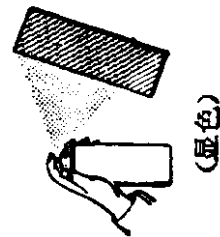
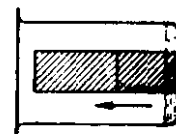
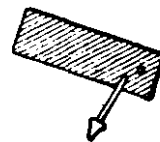


蒸发和称重
化学分析
光谱分析
等等

结果



薄层色谱法
和纸色谱法



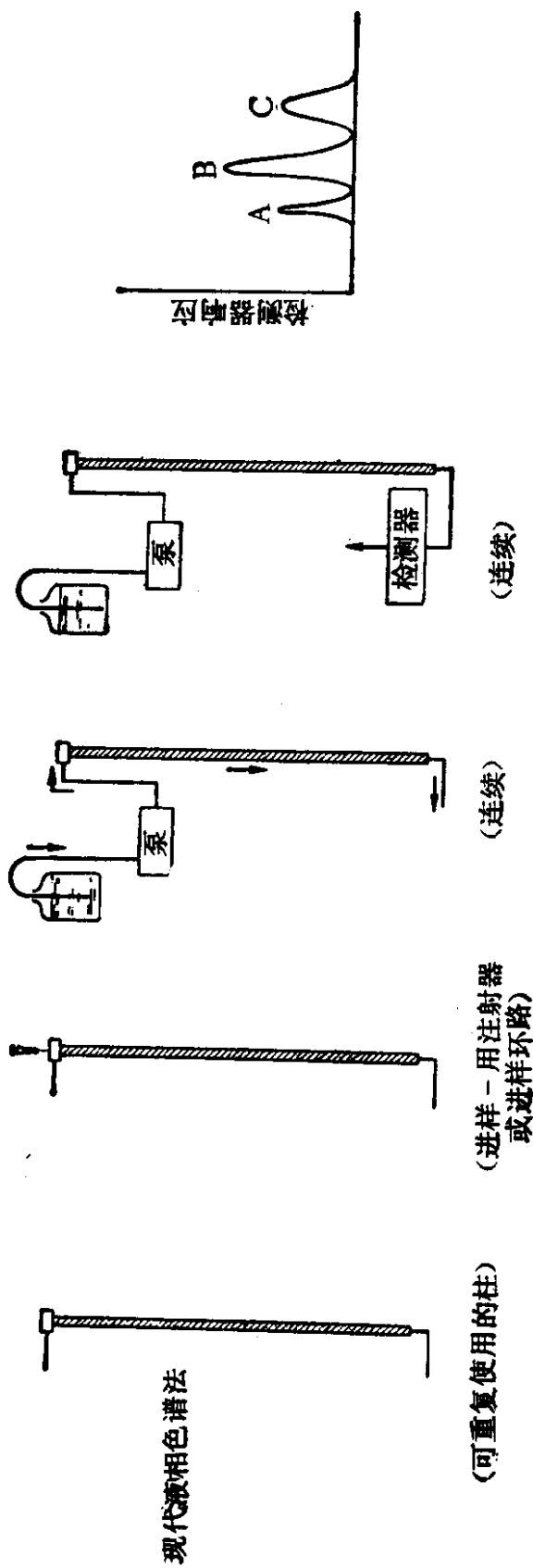


图 1.1 液相色谱的各种形式