

# 高压液相色谱法

金恒亮 编

原子能出版社

## 内 容 简 介

本书比较详细地阐述了高压液相色谱技术的基本理论和应用。从分液漏斗提取分离基本原理出发,介绍了塔板理论概念,并介绍了容量因子,相对保留值、理论塔板数、分离度、离时间等重要色谱参数及其在色谱分离中的作用和相互关系。从柱填料和移动相两方面讨论了谱柱特性和各分离类型的特点,着重讨论了分离工作中如何选择合适的溶剂,以达到好的分选择性和分离度。对实际分析工作中重要的定性和定量方法、痕量分析和制备分离等技术均一进行了讨论。书中简要地介绍了一些重要类型化合物的分离方法和应用实例。对高压液相色谱仪组成单的结构特点和应用原理也作了必要的说明。在附录中还列举了高压液相色谱分离操作中见的异常现象和排除方法。

本书适用于化学、化工、石油、动力、环境保护、生物、临床医学、原子能等部科技人员的进修与提高。对大专院校有关专业的师生也有参考价值。

### 高压液相色谱法

金恒亮 编

原子能出版社出版

(北京2108信箱)

原子能出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行·新华书店经售

☆

开本787×1092 1/16·印张 18.75·字数 474千字

1987年2月北京第一版·1987年2月北京第一次印刷

印数1—2630·统一书号: 15175·763

定价: 3.90 元

## 代 序

高压液相色谱分离技术的出现不过十几年的时间。虽然它没有跳出经典的液相色谱的范畴，但由于色谱柱填料上的突破，研制出小颗粒多孔填料并发展了与之相适应的填充柱的技术，获得了经典色谱柱无可比拟的效率，成为有机化学及生物化学中不可缺少的一种新技术，并且正向各个领域里推广，成为当前分离和分析中的一种有力的手段。

作者对这项技术进行了多年的实际工作。在理论部分的阐述上，由最原始的分液漏斗开始，重点地讨论了塔板理论概念；在实际操作方面，除了对一些重要类型化合物的分离方法作了概括的说明外，还对仪器装置的主要部件的结构和原理做了简要的介绍。因此本书作为刚刚开始从事高压液相色谱分析工作的入门向导，是比较合适的。本书初稿曾分别在石油部及化工部举办的“高压液相色谱训练班”中作为教材使用，取得较好的效果。它也是北京大学化学系有机教研室开设的“仪器分析”课程教材的一部分。在此基础上经不断改进及补充，现编写成书。我深信它将会受到各方面的欢迎，同时我也希望作者通过自己的工作，搜集更多的资料，发挥自己的见解，使本书日趋完善。

本书承程道南女士审阅，受作者委托，对此表示谢意。

邢其毅

1983年冬于北京大学化学系有机教研室

## 符号和缩写

$K$	分配系数	$k'$	容量因子
$N$	理论塔板数	$t_r$	组分的保留时间
$t_m$	移动相的保留时间	$V_r$	组分的保留体积
$V_m$	移动相在色谱柱中的体积	$V_s$	色谱柱中固定相的体积
$u_s$	组分的线速度	$u$	移动相的线速度
$R_f$	滞流因子(比移值)	$f_v$	移动相的体积流速(流量)
$\sigma$	色谱峰的标准偏差	$t_w$	峰宽
$t_{w\frac{1}{2}}$	半峰高处峰宽	$N_e$	有效理论塔板数
$H$	理论塔板高度	$H_e$	有效理论塔板高度
$L$	色谱柱长度	$t'_r$	调整保留时间(净保留时间)
$V'_r$	调整保留体积(净保留体积)	$d_p$	填料颗粒的直径
$d_f$	固定相的平均膜厚	$D_m$	溶质在移动相中的扩散系数
$D_s$	溶质在固定相中的扩散系数	$h$	折合塔板高度
$v$	折合流速	$\phi'$	柱阻参数
$l$	折合柱长	$\alpha$	相对保留值
$K_F$	柱穿透率	$d_c$	色谱柱直径
$R_s$	分离度	$V_i$	进样体积
$\eta$	粘度	$\delta$	溶解度参数
$\epsilon^0$	溶剂强度参数	$\delta_o$	取向溶解度参数
$\delta_d$	色散溶解度参数	$\delta_h$	给质子溶解度参数
$\delta_a$	接受质子溶解度参数	$\epsilon$	介电常数
$P'$	溶剂特性参数(极性指数)		
HPLC	高压液相色谱(高效液相色谱)	LC	液相色谱
LLC	液-液色谱	LSC	液-固色谱
IEC	离子交换色谱	BPC	键合相色谱
SEC	排除色谱	IPC(或PIC)	离子对色谱
GFC	凝胶过滤色谱	GPC	凝胶渗透色谱
		RPLC(或RPC)	反相液相色谱
TLC	薄层色谱	PC	纸色谱
GC	气相色谱	IR	红外光谱
FTIR	傅立叶变换红外光谱	MS	质谱
NMR	核磁共振	RI	折射率
UV	紫外吸收	FID	氢火焰离子化检测器
AHFS(或AU)	满标吸光度	RIU	折射率单位
MW	分子量	MACS	允许的最大化合物量

MASS	允许的最大样品量	DMF	二甲基甲酰胺
THF	四氢呋喃	MTBE	甲基特丁基醚
PS	聚苯乙烯	DVS	二乙烯苯
HMDS	六甲基乙硅醚	TMCS	三甲基氯硅烷
		PEG	聚乙二醇
OPN	氧丙腈	BOP	$\beta, \beta'$ -氧二丙腈
NBS	N-溴代丁二酰亚胺	TMG	丙二醇
TBA	四丁铵	BHT	丁基甲苯酚
EDTA	乙二胺四乙酸	DNPH	2,4-二硝基苯肼
ODS	十八硅烷	SAX	强阴离子交换剂
SCX	强阳离子交换剂	Tris	三(羟甲基)氨基甲烷
Val	缬氨酸	Gly	甘氨酸
Ala	丙氨酸	Phe	苯丙氨酸
Met	蛋氨酸	Tyr	酪氨酸
Asp	天门冬氨酸	Ser	丝氨酸
Glu	谷氨酸	Leu	亮氨酸
Ile	异亮氨酸	Trp或Try	色氨酸
Gln	谷氨酰胺	BZ	苄氧羰酰

## 计量单位符号

h 小时	min 分
s 秒	N 牛顿
kgf 公斤力	Pa 帕[斯卡]
bar 巴	atm 大气压
psi 磅/英寸 <sup>2</sup>	μm 微米
nm 纳米	ng 纳克
cP 厘泊	P 泊
Pa·s 帕[斯卡]·秒	S 西门子
mol 摩尔	L 升
mmol 毫摩尔	μmol 微摩尔
eq 克当量	meq 毫克当量
μeq 微克当量	Ω <sup>-1</sup> 姆欧

单位换算表

法定计量单位	非法定计量单位	换 算 因 数
Pa	kgf/cm <sup>2</sup>	1kgf/cm <sup>2</sup> =9.80665×10 <sup>4</sup> Pa
	atm	1atm=101325Pa
	bar	1bar=10 <sup>5</sup> Pa
	psi	1psi=6891Pa
	P	1P=0.1Pa·s
Pa·s	P	1P=0.1Pa·s
S	Ω <sup>-1</sup>	1Ω <sup>-1</sup> =1S
m	Å	1Å=10 <sup>-10</sup> m

$$1\text{m} = 100\text{cm} = 1000\text{mm} = 10^6\mu\text{m} = 10^9\text{nm}$$

$$1\text{g} = 1000\text{mg} = 10^6\mu\text{g} = 10^9\text{ng} = 10^{12}\text{pg}$$

$$1\text{bar} = 14.51\text{psi} = 0.987\text{atm}$$

$$1\text{kgf/cm}^2 = 14.23\text{psi} = 0.968\text{atm}$$

$$1\text{atm} = 14.7\text{psi} = 1.033\text{kgf/cm}^2$$

# 目 录

<b>第一章 绪言</b> .....	(1)
一、概述 .....	(1)
二、历史的回顾 .....	(2)
三、高压液相色谱法的特点 .....	(4)
参考文献 .....	(7)
<b>第二章 基本理论</b> .....	(8)
一、液相色谱过程 .....	(8)
二、塔板理论方程式 .....	(11)
三、保留值 .....	(15)
四、峰形和非线性等温线 .....	(18)
五、峰扩展 .....	(19)
1. 涡流扩散 .....	(21)
2. 分子扩散 .....	(22)
3. 传质 .....	(22)
(1) 固定相的传质 .....	(22)
(2) 移动相的传质 .....	(23)
六、柱效 .....	(24)
1. 理论塔板数 $N$ .....	(24)
2. 理论塔板高度 $H$ .....	(25)
3. 有效理论塔板数和有效理论塔板高度 .....	(26)
4. 峰扩展和塔板高度方程式 .....	(26)
5. 折合塔板高度和折合流速 .....	(29)
6. 柱阻参数和柱穿透率 .....	(32)
七、分离度 .....	(33)
1. 柱选择性, 相对保留值 $\alpha$ .....	(33)
2. 分离效能, 分离度 $R_s$ .....	(34)
3. 分离度与 $\alpha$ 值的关系 .....	(38)
4. 分离度与 $N$ 的关系 .....	(39)
5. 分离度与 $k'$ 的关系 .....	(41)
八、分离时间 .....	(43)
九、温度的影响 .....	(47)
十、样品量的影响, 峰容量 .....	(50)
参考文献 .....	(53)
<b>第三章 液相色谱装置</b> .....	(55)
一、高压泵 .....	(55)
1. 往复式柱塞泵 .....	(56)

2. 往复式隔膜泵	(57)
3. 双头往复泵	(57)
4. 气动放大泵	(58)
5. 螺旋传动柱塞泵	(59)
<b>二、色谱柱和柱连接</b>	(59)
1. 柱材料	(60)
2. 色谱柱的形状和大小	(60)
3. 柱接头和连接管	(61)
<b>三、检测器</b>	(62)
1. 检测器的性能指标	(62)
(1) 检测器的灵敏度	(63)
(2) 检测器的噪音和检测限度	(63)
(3) 检测器的线性范围	(64)
2. 紫外吸收检测器 (UV检测器)	(64)
3. 示差折射率检测器 (RI检测器)	(67)
4. 溶质迁移氢火焰离子化检测器	(70)
5. 荧光检测器	(71)
<b>四、进样装置</b>	(75)
1. 注射器进样装置 (隔膜进样器)	(75)
2. 高压定量进样阀	(76)
(1) 六通定量进样阀	(76)
(2) 四通定量进样阀	(77)
3. 隔膜进样器与定量进样阀性能的比较	(79)
<b>五、管道过滤器</b>	(79)
<b>六、脉动阻尼器</b>	(80)
<b>七、梯度洗脱装置</b>	(80)
<b>参考文献</b>	(82)
<b>第四章 色谱柱</b>	(84)
<b>一、液相色谱的柱填料</b>	(84)
(一) 液-固色谱 (吸附色谱)	(86)
1. 原理和分离对象	(87)
2. 吸附剂	(91)
(二) 液-液色谱和键合相色谱	(99)
1. 原理和分离对象	(100)
2. 固定相	(101)
3. 化学键合相	(102)
4. 正相色谱与反相色谱的比较	(108)
(三) 离子交换色谱	(118)
1. 原理	(118)
2. 离子交换剂	(120)
3. 发生在离子交换剂上的其它色谱类型	(128)
(四) 离子对色谱	(129)



1. 原理	(129)
2. 离子对色谱的主要类型	(130)
(1) 正相离子对分配色谱	(130)
(2) 反相离子对分配色谱	(132)
(3) 键合相反相离子对色谱	(132)
(4) 反相离子对交换色谱	(133)
(5) 离子对吸附色谱	(135)
3. 配对离子 (反离子)	(136)
4. 影响保留值的其它因素	(138)
(五) 排除色谱	(139)
1. 原理和特点	(139)
2. 柱填料 (凝胶)	(142)
二、柱子的填装	(148)
(一) 干法填装	(148)
(二) 匀浆法填装	(149)
三、柱效考察	(153)
四、组合柱、色谱柱的保护和保护柱	(156)
(一) 组合柱	(156)
(二) 色谱柱的保护和保护柱	(158)
五、色谱柱的选择	(159)
参考文献	(162)
<b>第五章 移动相 (溶剂)</b>	(167)
一、溶剂的实用要求	(167)
1. 关于色谱过程的稳定性	(168)
2. 溶剂对样品各组分的溶解能力和粘度	(169)
3. 溶剂与检测器的匹配	(169)
4. 溶剂的脱气	(169)
二、溶剂的分离最佳化的要求	(171)
1. 液-固色谱的溶剂强度	(171)
(1) 溶剂强度的基本概念	(171)
(2) 改善分离的措施——混合溶剂的选用	(172)
(3) 在移动相中加水或极性改善剂	(175)
(4) 以薄层色谱作为LSC溶剂选择的先导	(177)
2. 液-液色谱和键合相色谱的溶剂选择	(179)
(1) 正相色谱的溶剂选择	(179)
(2) 反相色谱的移动相	(188)
(3) 三元或四元溶剂体系——三角形图解法确定溶剂体系的最佳化	(192)
3. 离子交换色谱的移动相	(196)
4. 离子对色谱的移动相	(198)
5. 排除色谱的移动相	(200)
6. 梯度洗脱	(201)
参考文献	(204)

<b>第六章 定性和定量分析</b> .....	(207)
<b>一、定性分析</b> .....	(207)
(一) 借保留值进行定性分析.....	(207)
(二) 分离度与定性分析	
——标准分离度曲线.....	(208)
(三) 按保留值经验规则进行定性分析.....	(211)
(四) 其它方法.....	(213)
1. 用不同的色谱体系进行定性分析.....	(213)
2. 检测器的相对响应.....	(213)
3. 离析色谱峰后用其它方法鉴定.....	(214)
(1) 色谱峰的离析.....	(214)
(2) 鉴定.....	(215)
<b>二、定量分析</b> .....	(216)
(一) 定量分析的误差.....	(217)
1. 样品的准备和进样技术.....	(217)
2. 检测器的线性范围.....	(217)
3. 分离度与定量误差.....	(217)
4. 色谱分离参数 $k'$ 、 $N$ 、 $u$ 对峰高和峰面积测量的影响.....	(219)
(二) 峰高和峰面积的测量方法.....	(219)
(三) 峰高和峰面积的校正.....	(221)
1. 标准物对照法(外标法).....	(221)
2. 归一化法.....	(222)
3. 内标法.....	(222)
<b>参考文献</b> .....	(224)
<b>第七章 痕量分析和制备分离</b> .....	(225)
<b>一、痕量分析</b> .....	(225)
<b>二、制备分离</b> .....	(229)
1. 分离中出现的几种情况和采取的对策.....	(230)
2. 制备分离对色谱仪装置的要求.....	(233)
3. 色谱柱和柱填料.....	(234)
4. 样品量和进样体积对柱效的影响.....	(236)
5. 分离的控制.....	(237)
6. 制备分离的移动相.....	(238)
<b>参考文献</b> .....	(238)
<b>第八章 高压液相色谱法的应用</b> .....	(240)
<b>一、醇、醛和酮</b> .....	(240)
<b>二、芳烃和稠环芳烃</b> .....	(242)
<b>三、维生素</b> .....	(243)
<b>四、甾族化合物</b> .....	(247)
<b>五、糖</b> .....	(250)
<b>六、氨基酸和肽</b> .....	(254)

七、脂肪酸.....	(259)
八、生物碱.....	(263)
九、化学药品.....	(266)
1. 解热镇痛药.....	(267)
2. 巴比妥类药品.....	(269)
3. 抗菌素.....	(270)
(1) $\beta$ -内酰胺类抗菌素(青霉素和头孢菌素).....	(270)
(2) 四环素类抗菌素.....	(271)
(3) 氯霉素.....	(273)
4. 安定药.....	(275)
5. 心血管药.....	(278)
6. 磺胺类药物和其它药品.....	(279)
参考文献.....	(281)
<b>附录</b> .....	(288)
一、扩散系数的估算.....	(288)
二、分离度方程式的推导(Purnell).....	(288)
三、标准筛孔(目)与筛分直径的对照.....	(288)
四、不同溶剂的混合特性.....	(289)
五、乙腈/水二元溶剂的粘度和扩散系数.....	(289)
六、甲醇/水二元溶剂的粘度和扩散系数.....	(289)
七、常见的异常情况及其处理.....	(290)
附表I 色谱过程的异常情况及其处理.....	(290)
附表II 紫外检测器的异常情况及其处理.....	(292)
附表III 示差折射率检测器的异常情况及其处理.....	(293)
附表IV 移动丝氢火焰离子化检测器的异常情况及其处理.....	(294)

# 第一章 绪 言

## 一、概 述

高压液相色谱法，又叫高速液相色谱法、高效液相色谱法或现代液相色谱法，是一项较新的分析、分离技术，其过程可以简要地以图1.1表示。在一根封闭的空心细柱中紧密地填充固体颗粒填料（固定相），与固定相不相混溶的溶剂（移动相），通过泵的作用连续地按一定的速度流过柱子。如果在柱的顶端（移动相入口处）注入样品混合物[如用注射器通过密封胶垫（即隔膜）]，则混合物的各组分流经柱子时会逐渐地分离，以不同的时间从柱子下端的出口流出，通过检测部件和记录仪记录，可得到如图1.1中所示的色谱图。

我们把这种基于样品分子在不互溶的两相中平衡分配分离的技术，叫做色谱法。根据所使用的固定相和移动相的不同，可将色谱法区分为许多不同的类型。对于移动相来说，可以是气体或液体。固定相则可以是液体和固体。习惯上，把移动相为气体的色谱法叫做气相色谱法。气相色谱又因固定相的不同而分成气-固色谱和气-液色谱。移动相为液体的色谱法，则叫做液相色谱法。液相色谱又因固定相的不同而分为液-固色谱和液-液色谱。如果按色谱过程的机理进行分类，气-固色谱和液-固色谱又称为吸附色谱，气-液色谱和液-液色谱又叫做分配色谱。在液相色谱分离中，对于离子化合物或者可离子化的化合物，还可通过其在离子交换剂上的离子交换过程进行分离，这类色谱法叫做离子交换色谱。对于那些分子量较大，并且分子量有一定差别的化合物，则可以按照它们在胶粒上的不同渗透（或排除）而进行分离，这类色谱法称为排除色谱或凝胶色谱。排除色谱若以水为移动相，叫做凝胶滤过色谱；若以有机溶剂为移动相，则为凝胶渗透色谱。

色谱方法中的固定相床层，既可以是开放式的，也可以是密闭的。属于开放式床层的有纸色谱、薄层色谱和经典的柱色谱。填充柱的气相色谱和高压液相色谱则是密闭的固定相床层。

图1.2给出了色谱法的上述分类。高压液相色谱法的主要类型，如图1.3所示。

在液-液色谱中，如果固定相是极性的化合物，移动相为非极性的或者极性相对较弱的化合物，叫做正相色谱。正相色谱通常用于分离极性比较强的化合物。反之，若以非极性的或极性比较弱的化合物为固定相，而移动相为极性相对较强的化合物，则叫做反相色谱。由于反相色谱操作的多变性，此项技术可分离的样品种类就多了。

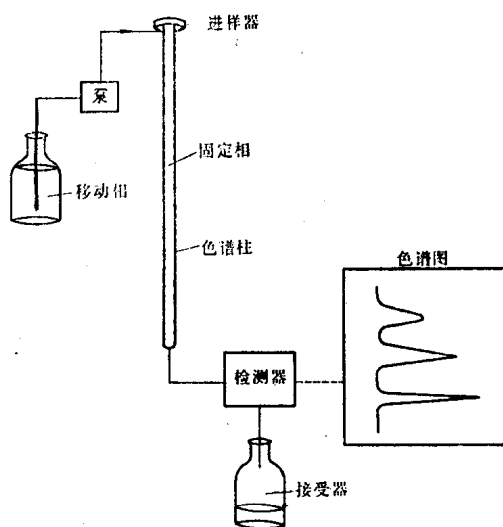


图1.1 高压液相色谱过程简图

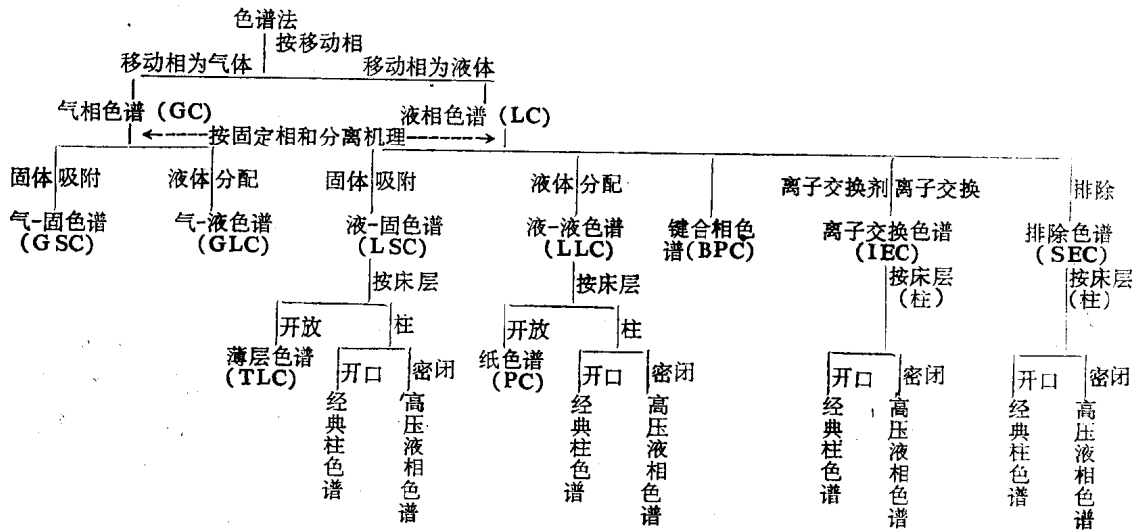


图1.2 色谱法分类

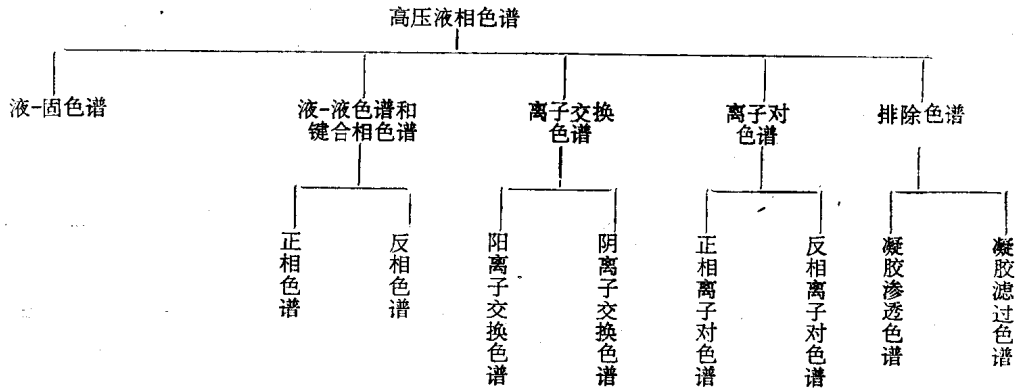


图1.3 高压液相色谱的类型

## 二、历史的回顾

色谱法是在本世纪初由俄国植物学家M. C. Цвет[注释(1)]提出来的。1903年，他在华沙作了叶绿素色素在碳酸钙柱子上分离的演讲。1906年，他发表了第一篇关于色谱法的论文<sup>[1]</sup>。“色谱法”这个名词是由他首先提出的，意思为在无色的柱子上出现了彩色的谱带。

从Цвет出色谱法至今，这个方法虽已广泛地应用于各个领域，但在开始相当长的一段时间内，色谱法未被大家所注意而被搁置了许多年。并且，在这方面进展的少量有限的工作亦只局限于液-固色谱法，即用吸附色谱法分离某些天然产物<sup>[2, 8]</sup>。即使如此，业已显示出色谱法是分离化合物的一种有力的手段。早期的色谱方法，其色谱柱的内径都大于1cm，填料为粒径大于100 $\mu\text{m}$ 或者更大的吸附剂(如硅胶、氧化铝和活性炭等)。移动相通常依靠重力从柱子顶端向下流过柱子。个别工作者亦有用静态水压来加速移动相流速的，不过，其每平方厘米柱截面的流量总是小于60ml/h(相应的线速度为0.02cm/s)。分离后的各组分从柱下端流出，需人工方法进行分段收集。然后，用常规的方法，如测定沸点和熔点、化学分析、光谱分析等进行鉴定。

这个方法可用于定性和定量分析（配合其它手段），特别适合于制备性的分离。但是，由于填料的颗粒直径大，进样量常常超负荷，故柱的分离效能不好。另外，柱填充的重复性亦差，并且费力费时，一般进行一次典型的分离需要几个小时。为了区别于后来发展起来的高压液相色谱法，我们称这种柱色谱法为经典的柱色谱法。

1941年，Martin〔注释（2）〕和Synge〔注释（3）〕发展了这个方法，他们使用吸附在硅胶上的水作固定相，氯仿为移动相，成功地分离了某些乙酰化的氨基酸〔4〕。这个方法叫做分配柱色谱，它把上述经典柱色谱的应用范围大大地扩展了。Martin等还巧妙地把描述分馏过程的塔板理论移植并应用于色谱过程，获得了很大的成功。他们还指出，使用小颗粒填料和高的移动相压力，可以改善液相色谱的效能；并且还预言，液相移动相亦可为气体所代替。这不仅大大地促进了液相色谱的发展，同时也为气相色谱的出现奠定了基础。

这种经典的液相色谱法，对有机和生物物质的分析、分离起了不少的作用。一些用其学方法难以解决的分离问题，在色谱柱上得到了完满的解决。因此，它引起化学界和生物化学界很大的兴趣和重视。三十多年来，色谱法发展十分迅速，取得了惊人的进展。

1938年，Измаилов〔注释（4）〕和Шрайбер〔注释（5）〕发展了纸色谱〔5〕。特别是1951年Kirchner〔注释（6）〕发展了薄层色谱〔6〕，后经Stahl〔注释（7）〕（1958）简化了操作，并使吸附剂标准化，从而使其成为有效的分离系统〔7, 8〕。薄层色谱具有分离效率高、速度快、操作简单等特点，至今仍然是化学工作者和生物化学工作者所广泛使用的一种分离手段。

虽然，Martin和Synge在他们提出分配色谱概念的论文（于1941年发表）中，就预见性地指出了移动相亦可采用气体的论据。但是，在十年之后（1952年）才得以实现。气相色谱的产生，可以说是色谱法的一项革命性进展，它具有分析速度快、分离效率和灵敏度高以及定量准确等特点，引起了各方面的重视和兴趣。自从Martin和James〔注释（8）〕于1952年发表了有关气相色谱的第一篇论文之后〔9〕，二十多年来，气相色谱的发展是卓有成效的，无论在理论上还是仪器设备及应用方面都已达到了相当完善的程度。目前，它不仅广泛地应用于石油、化工、食品、临床医学、环境保护等部门，作为一项重要的分离鉴定手段，还在化学、生物、医学、农业、地质、地球物理、原子能等科学部门广泛使用。

气相色谱法只能分析可以气化的物质，或者在分析温度下具有足够蒸气压的物质。对于离子型化合物（大部分的无机化合物），分子量很大的化合物（高分子聚合物），受热易分解的物质以及许多有着生物活性的物质的分析，却无能为力。因此，它只能分析有机化合物中大约20%的物质，故其应用范围受到很大的限制。许多学者采取了一些化学衍生的方法，使难气化的物质转化为易气化的物质，用气相色谱进行分析。例如，把羧酸酯化成挥发性大的酯，把一些金属离子型的化合物转化成可气化的有机螯合物。此外，还可将高分子聚合物进行高温裂解，然后用气相色谱分析裂解产物。所有这些方法，虽然可以扩大气相色谱的应用范围，但却不能从根本上解决气相色谱法的不足之处。因此，一种可以分析、分离几乎所有有机化合物的方法——高压液相色谱法，就应运而生了。

高压液相色谱法的出现并非偶然，它是色谱法发展到今天这样水平而出现的必然结果，是广大色谱工作者智慧的结晶。特别是气相色谱法的产生和发展，为高压液相色谱法的出现奠定了基础。

高压液相色谱法为广大的化学、生物化学和其它分析工作者所认识和重视，获得较大的

发展, 还只有十多年的历史。不过, 其基础工作却可追溯至更远。在1950年, Moore[注释(9)]和Stein[注释(10)]用离子交换法分离氨基酸, 尔后, 在1957年, 他们进一步将其发展成为氨基酸的自动分析<sup>[10]</sup>, 这个方法的分离速度和分离度又经Hamilton作了改进<sup>[11]</sup>。1963年, Anderson等人又将自动离子交换色谱法扩大到核苷酸的分离方面。数年之后, Green (1966), Huber和Hulsman (1967), Scott (1967), Horvath (1967), Horvath和Lipsky (1969), Snyder[注释(11)] (1967), Uziel (1968), 以及Kirkland[注释(12)] (1968)等, 使用了优良的颗粒填料、细的柱子, 提高了柱进口的压力, 这样, 就初步形成今天的高压液相色谱方法的基本特征了。

新型的、小颗粒柱填料的发展, 又进一步提高了分离效率、缩短了分析时间。七十年代中期, 一种具有分离效率高和分析快速的、新型的表面多孔填料(又叫薄壳填料), 获得了广泛的应用。同时, 由于装柱技术的革新, 使用小颗粒的多孔填料(直径5—10 $\mu\text{m}$ ), 的分离效率有所突破。今天, 小颗粒的多孔填料, 无论是柱子的分离效率还是分离速度方面都不比表面多孔填料逊色, 特别是它具有大的柱容量, 可用于制备性分离, 用途大大地超过薄壳填料。

自从Halasz和Sebastian制备了第一个化学键合相柱填料之后<sup>[12, 13]</sup>, 这种柱填料的迅速发展, 为高压液相色谱开辟了新的天地。特别是类型众多的反相色谱技术用于种类繁多的化合物的分离, 在高压液相色谱应用中已占了压倒的优势。

虽然, 高压液相色谱法是在经典柱色谱基础上发展起来的一项分离技术, 它们都是属于柱色谱的范畴, 而高压液相色谱的优点又恰好是经典柱色谱的不足之处。高压液相色谱一出现, 就引起广大分析工作者, 特别是气相色谱工作者的注意, 使这项新技术得到了惊人的进展。Giddings[注释(13)]在六十年代初就指出, 气相色谱的理论基础同样适用于液相色谱。多年来气相色谱所积累的理论知识, 几乎都成功地用于液相色谱<sup>[14]</sup>。

### 三、高压液相色谱法的特点

为了更好地了解高压液相色谱法的特点, 就需要将它与当前实验室中常用的分析、分离方法作一比较。

实验室中选用何种分离方法, 当然要视分离对象的具体情况而定, 笼统地作比较是困难的, 因为它们的类型和特点不同。譬如, 甲方法的优点可能就是乙方法的缺点, 而乙方的优点有可能弥补甲方法的缺点。并且, 有些方法本身就具有局限性, 如蒸馏用于液体, 结晶用于固体, 它们之间就不大好比较。不过, 从分离本身所要求的方面做一些比较, 是可以更好地看出各种方法的特点, 以便掌握各种方法的专长, 用来选择合适的分析方法。

我们将实验室中的三种常规的分方法: 蒸馏(包括分馏)、重结晶和提取, 连同色谱法中经典的柱色谱、薄层色谱、气相色谱及高压液相色谱一起作比较。表1·1列出了扼要的比较结果。

分离效率主要是指一次处理所达到的分离情况。如果用理论塔板数来衡量, 分液漏斗为1, 高效分馏柱约可达100/m, 可以分离沸点差别仅为1 $^{\circ}\text{C}$ 的化合物, 经典柱色谱约为50/m, 气相色谱约为2000/m, 高压液相色谱通常为5000—50000/m。

分析速度是相对的概念, 如进行一次分馏通常要几个小时。经典柱色谱作一次分离亦要

表1·1 高压液相色谱法与其它分离方法的比较

	分馏	结晶	提取	经典柱色谱	TLC	GC	HPLC
分离效率	低	低	低	低	高	高	高
分离速度	慢	慢	慢	慢	较快	快	快
应用范围	窄	窄	广	广	广	较窄	广
样品用量	多	多	多	多	少	少 <sup>1)</sup>	少 <sup>2)</sup>
可否用于制备分离	可	可	可	可	尚可	可 <sup>1)</sup>	可 <sup>2)</sup>
可否用于痕量分离	否	否	否 <sup>3)</sup>	否 <sup>3)</sup>	可	可	可
分析鉴定	可	可	否	否	可	可	可
分析灵敏度	低	低	—	—	高	高	高

1) 需使用制备型气相色谱仪。

2) 制备量大时需使用制备型液相色谱仪。

3) 除非样品足够多时,才可用于分离其中的痕量组分。

几个小时,算是长的,薄层色谱分离需几十分钟。气相色谱和高压液相色谱作一次分离通常为几分钟到十几分钟。这些都是指经典柱色谱、气相色谱和高压液相色谱一次进样,薄层色谱点一次样至得到结果的时间而言。气相色谱和高压液相色谱的快速也就是从这一点上说的。如果对一个未知样品作条件选择试验,则需要花费较多的时间,这与操作者的经验及实验室设备条件有关。

经典方法(包括蒸馏、重结晶、提取及柱色谱)的分离量都是常量或半微量的。最小是毫克数量级(重结晶有时还可小一些),最多为几十克或更多一些。薄层色谱、气相色谱和高压液相色谱则适于作痕量分析,它们的进样量为微克或纳克数量级。对高压液相色谱来说,制备型的柱子,最大进样量达到克数量级;分析型柱子通常是微克数量级,最多也不过数毫克。

经典分离方法最大的缺点是分离效率低和不能处理的微量样品,而高压液相色谱法的优点恰好弥补了它们的不足。可以说,高效、高灵敏度、高速、定量准确和应用范围广,是高压液相色谱法的主要特点。

#### 注 释

(1) M. C. H<sub>Б</sub>ET (1872—1919), 1872年出生在意大利, 1896年在日内瓦奖得博士学位, 1901年和1910年先后获得俄国硕士和博士学位。1911年获得俄国科学院H. A<sub>xa</sub>MaT<sub>CB</sub>奖金。1919年病逝于沃罗涅日城〔15〕。

(2) A. J. P. Martin, 1910年出生于英国伦敦, 1936年在剑桥大学获得博士学位, 1941年与R. L. M. Synge一起提出了分配色谱。1952年他与A. T. James创立了气液分配色谱。同年他与Synge一起, 由于发明了分配色谱而荣获诺贝尔化学奖金。他是好几个实验室和大学的顾问和名誉博士。Martin曾被数个科学组织授于名誉会员称号及奖章。1974年后, 他是美国休斯顿大学化学教授。

(3) R. L. M. Synge, 1914年出生在英国利物浦。曾先后在温切斯特学院、特里尼蒂学院及剑桥大学攻读, 是N. W. Pirie的研究生。1941年在剑桥大学获得博士学位。他不仅是分配色谱的发明者之一, 而且是色谱法在生物化学领域应用的先驱。他从1945年后, 主要研究大肽分子的分析问题。他的研究工作涉及抗菌素肽、吸附作用、分子筛、电泳和植物



化学等领域。1952年，他与Martin共享诺贝尔化学奖金。

(4) Н. А. Измаилов(1907—1961), 苏联化学家, 化学博士。曾任哈尔科夫大学物理化学系主任和教授, 哈尔科夫化学和药物研究院物理化学研究室主任, 乌克兰苏维埃加盟共和国科学院院士。他的主要研究领域是物理化学、溶液电化学、吸附和色谱等。他曾荣获苏联科学院门捷列夫奖金。

(5) М. С. Шрайбер, 生于1904年, 苏联女化学家, 博士。她曾在Измаилов教授指导下完成学位论文, 并一起发展了薄层色谱。她的主要研究领域为药物分析, 如非水络合滴定、纸色谱、薄层色谱。

(6) J. G. Kirchner, 生于1911年, 美国化学家。1939年在衣阿华州立大学获得博士学位。Kirchner创立了薄层色谱的现代体系, 他在1951—1954年间首先提出的薄层色谱的重要技术, 至今仍被广泛使用。他共发表了三十多篇论文, 编著了五本书(其中三本是合编的)。1967年出版的“薄层色谱法”一书论述很广, 1978年经修订, 再版发行。

(7) E. Stahl, 生于1924年, 联邦德国药物学家。1952年获得博士学位。Stahl自五十年代从事薄层色谱分离以来, 在简化薄层色谱操作、吸附剂的标准化、提高分离效果等方面, 做出了重大的贡献。他发表的科学论文超过150篇, 并编著了三本书。其中“薄层色谱”一书为色谱工作者所熟知。由于他在色谱工作方面的贡献, 曾荣获一些学会、大学的奖金、奖章和荣誉称号。

(8) A. T. James, 生于1922年, 英国化学家。1946年获得博士学位。他曾与Synge和Martin共事, 从事药物研究。1950年他与Martin一起创立了气-液分配色谱技术。在色谱方面, 他主要从事气相色谱和液相色谱检测器以及气相色谱在生物化学方面应用的研究。

(9) S. Moore, 生于1913年, 美国生物化学家。1938年他在威斯康星大学的毕业论文获得博士学位。从1945年开始, 他与Stein博士合作, 主要从事蛋白质化学和应用色谱法鉴定氨基酸的研究。1972年, Moore和Stein, Christian共享了诺贝尔奖金化学奖。

(10) W. H. Stein, 生于1911年, 美国生物化学家。1938年获得生物化学博士学位。曾任“生物化学杂志”(Journal of Biological Chemistry)的主编(1968)。他是1972年度诺贝尔化学奖金得奖人之一。

(11) L. R. Snyder, 生于1931年, 美国化学家。1952年在加利福尼亚大学获得博士学位。他在色谱、石油分析和临床化学等方面发表了130多篇论文。他还编有“吸附色谱原理”(1968), “现代液相色谱导论”(1979年第二版)和“分离的科学”(1973)等三本书。1957年后, 他的主要研究领域为液相色谱和临床分析。

(12) J. J. Kirkland, 生于1925年, 美国化学家、博士。他已发表六十多篇色谱方面的论文。在高效液相色谱填料方面有重要的贡献。他主编有“液相色谱的现代实践”一书(1971), 还和Snyder合编“现代液相色谱导论”(1974年初版, 1979年第二版), 及为美国化学学会编写“现代液相色谱教程”。

(13) J. C. Giddings, 生于1930年, 美国化学家。1954年在犹他大学获得博士学位。他的科学论文达180篇以上。他的研究课题十分广泛, 早期研究燃烧理论、量子力学和化学动力学, 目前主要从事色谱及其方法等方面的研究。他的“色谱动力学”一书, 奠定了色谱的理论基础。