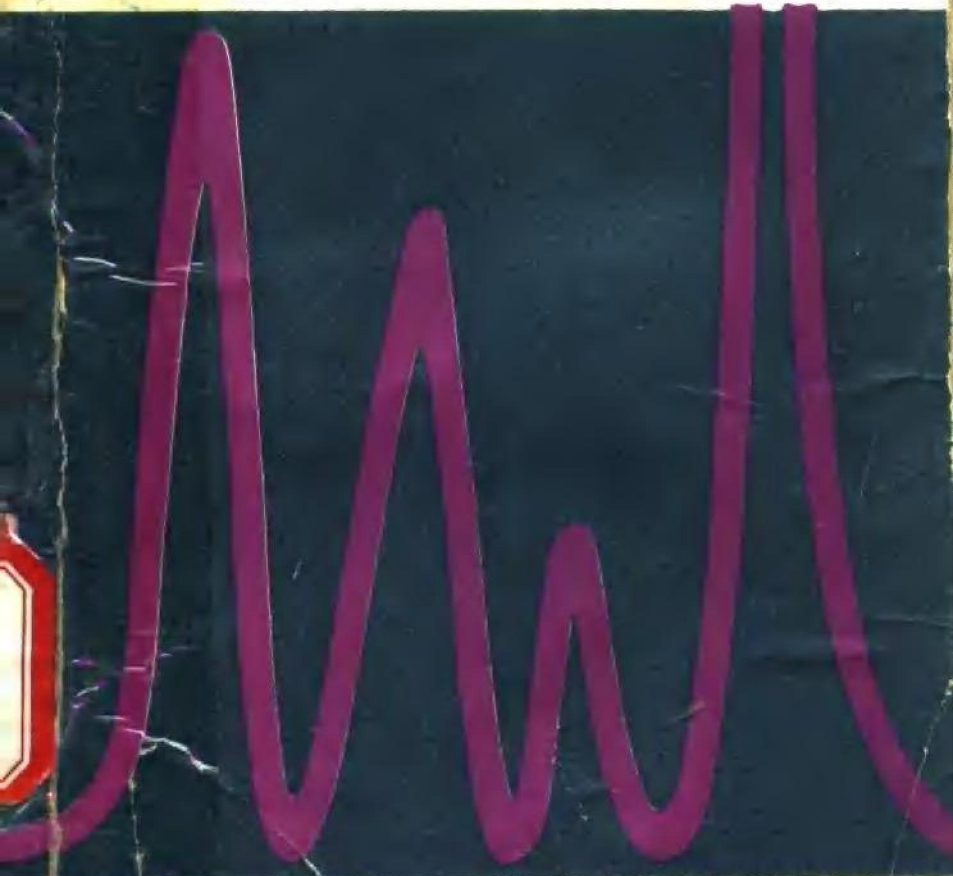


现代色谱分析法

——原理和实际应用

〔日〕原 昭二 森 定雄 花井俊彦 编著
邱宗荫 孙琢琰 译



科学技术文献出版社重庆分社

现代色谱分析法

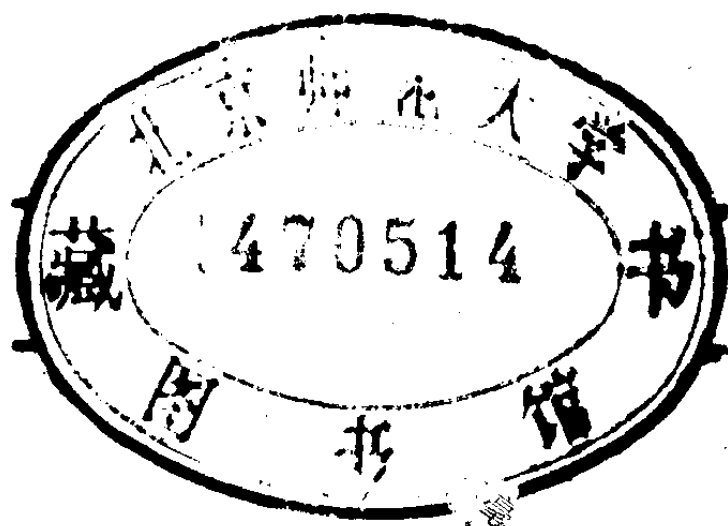
——原理和实际应用

——〔日〕原 昭二 森 定雄 花井俊彦 编著

邱宗荫 孙琢珽 译

居秉菁 邓新鉴 校

721/183/12



科学技术文献出版社重庆分社

クロマトグラフィー分離システム

考え方，選び方

原 昭二 森 定雄 花井俊彦

丸善株式会社

1981年6月

现代色谱分析法

——原理和实际应用

〔日〕原 昭二 森 定雄 花井俊彦编著

邱宗荫 孙琢琰译 居秉菁 邓新鉴校

科学技术文献出版社重庆分社出版

重庆市市中区胜利路132号

新华书店重庆发行所发行

中国科学技术情报研究所重庆分所印刷厂印刷

开本：787×1092 1/32 印张：12.5 字数：27万

1988年6月第1版 1988年6月第1次印刷

科技新书目：168—340 印数：1—4500

ISBN7-5023-0186-0/O·16

定价：2.95元

序

色谱法与化学及其有关的广泛领域——从理论化学到临床检查——有着各式各样的联系。从柱色谱法、气相色谱法 (GC) 发展到高效液相色谱法 (HPLC), 从吸附色谱法、离子交换色谱法进而到筛析色谱法, 许多种类的方法论已众所周知。最近, 已进展到研究不使用填料的液相色谱法以及兼备GC与HPLC两方面性质的色谱法的阶段。

在如此广阔的范围里应用的色谱法技术, 首先是经验的。即先要积累许多分离例, 然后再对此加以理论上的总结。这也是一般学科的发展规律。然而, 与其它物理分析方法不同, 色谱技术的入门是容易的, 深入下去, 却常感到茫然混杂。因此, 即使得到了许多数据, 却常不能成为分析者进行样品分离与结果解析的参考, 分析条件的选择还必须按照经验从事, 这就是当前色谱法的现状。

目前, GC、薄层色谱法 (TLC)、HPLC 这三种色谱方法作为分离分析的三个重要组成部分正在广泛普及。三者之间既有竞争之处, 又有互补之处。分析者若不精通这三种方法, 则很难对于自己的样品该用什么方法作出判断。而实际上, 要完全精通这三种方法是不可能的。本书就是试图超越这一障碍, 作为一本入门书而写成的。

本书以各种类型的色谱法及实例为中心进行叙述, 对此作出理论上的说明; 也考虑到使分析者能够从本书中选择适合自己样品的色谱法类型及实例作参考来达成分离、进行解析。对于已在从事色谱法工作的人以及打算从事该项工作的人, 该书均具有实际意义。关于色谱法的系统理论以及装置

等，请参阅其它专著及仪器说明书。

按照上述方针，本书由九名执笔者分担完成。全书由10章和附录组成。第1、2章叙述色谱法的全面情况，第3、4章分别对GC及TLC作出了概括的说明。由于HPLC的应用范围很广而且目前受到普遍重视，所以用了较大篇幅（第5~10章）予以介绍。

将来，随着色谱理论的系统化，会有更为适合于样品的性质、化学结构及分离目的分离系统出现，本书希望能成为这种发展的一个立足点。本书若在色谱法的应用方面对读者有所帮助的话，我们将感到不胜荣幸。

编 者
1981年6月

目 录

1. 色谱法系统的选择	(1)
1•1 前 言	(1)
1•2 色 谱 法	(3)
1.2.1 色谱法的分类.....	(3)
1.2.2 色谱法的特点.....	(5)
1•3 色 谱 法 的 比 较	(6)
1.3.1 气相色谱法.....	(6)
1.3.2 液相色谱法.....	(10)
1.3.3 薄层色谱法.....	(15)
1.3.4 色谱法的比较.....	(18)
1•4 色谱仪的 构 造	(21)
1•5 分 析 条 件的 确 定	(27)
1.5.1 流 动 相	(28)
1.5.2 固 定 相	(32)
1.5.3 检 测 器	(34)
1.6 结 语	(41)
2. 色谱法系统的应用	(44)
2.1 样 品 的 前 处 理 和 衍 生 化	(44)
2.1.1 样 品 的 前 处 理	(44)
2.1.2 样 品 的 衍 生 化	(46)
2.2 按 样 品 状 态 选 择 色 谱 系 统	(50)
2.3 根 据 分 析 目 的 选 择 色 谱 系 统	(58)
2.3.1 气 相 色 谱	(59)

2.3.2	液相色谱	(65)
2.3.3	薄层色谱	(66)
2.4	色谱法在 高分子添加剂分析中的 应用	(67)
2.4.1	高分子添加剂	(68)
2.4.2	样品的前处理	(68)
2.4.3	用气相色谱法和液相色谱法作添加剂分析	(68)
2.4.4	用薄层色谱法作添加剂分析	(71)
3.	气相色谱法固定相的性质和应用原则	(83)
3.1	前 言	(83)
3.2	哪些样品可以作为分析对象	(84)
3.3	色谱柱的必要性能——色谱柱形式的选择	(86)
3.4	填充柱的选择要点	(88)
3.5	载体	(91)
3.5.1	硅藻土微粒	(91)
3.5.2	对苯二甲酸微粒和氟树脂微粒	(98)
3.5.3	载体对色谱图的影响	(98)
3.6	固定液的选择	(102)
3.6.1	固定液—溶质间的相互作用	(103)
3.6.2	由样品—固定液组合引起的保留行为	(106)
3.6.3	对固定液的评价方法	(111)
3.7	应用实例	(125)
3.7.1	无机气体和低级碳氢化合物的分析	(126)
3.7.2	碳氢化合物的分析	(126)
3.7.3	醇类, 酚类	(130)
3.7.4	醛类	(130)
3.7.5	酯类	(130)
3.7.6	脂肪酸类	(133)

3.7.7	卤化物和磷化物.....	(136)
3.7.8	硫化物.....	(136)
3.7.9	胺类和含氮化合物.....	(136)
4.	薄层色谱法的基本参数.....	(146)
4.1	薄层色谱 (TLC)过程.....	(146)
4.1.1	TLC的毛细管流.....	(146)
4.1.2	溶剂的体积梯度.....	(147)
4.1.3	斑点的扩散.....	(150)
4.1.4	吸附等温线与斑点的形状.....	(153)
4.2	薄层色谱法的特性值.....	(156)
4.2.1	R_f 值的意义.....	(156)
4.2.2	R 值与容量因子 k'	(156)
4.2.3	R 值与 R_f 值的关系.....	(159)
4.2.4	TLC的分离度 R_s	(159)
4.2.5	多重展开与连续展开.....	(165)
4.3	吸附剂的活度.....	(166)
4.3.1	活度.....	(166)
4.3.2	作为活度调节因子的相对湿度.....	(166)
4.3.3	相对湿度的调节方法.....	(167)
4.3.4	展开槽中的湿度调节.....	(169)
4.4	气相中溶剂的影响.....	(169)
4.4.1	前言.....	(169)
4.4.2	由单一溶剂蒸气产生的前吸附.....	(171)
4.4.3	由混合溶剂蒸气产生的前吸附.....	(172)
4.4.4	关于前吸附的小结.....	(174)
4.5	TLC分离与 LCC.....	(174)
5.	液相色谱法中固定相和流动相的基本选择方法.....	(177)

5.1	液相色谱法的名称与参数	(177)
5.2	溶质、流动相和固定相间的相互作用模型	(185)
5.3	pH与平衡离子的影响	(187)
5.4	离子交换基的作用	(189)
5.5	填料及其参数	(193)
5.6	有机溶剂系中填料的比较	(195)
5.7	疏水性的利用	(199)
5.7.1	疏水性的计算	(200)
5.7.2	疏水性的计算值与色谱行为	(200)
5.7.3	预测保留时间的方法	(202)
5.7.4	分离中必需的有机溶剂浓度的求法	(202)
5.8	水体系中填料的比较	(206)
5.9	离解与色谱行为	(207)
5.9.1	芳香族羧酸的疏水性与填料	(209)
5.9.2	容量因子与电离	(209)
5.10	溶剂的选择性	(214)
5.10.1	有机溶剂与水的混合比的影响	(214)
5.10.2	有机溶剂的选择性	(216)
5.11	应用实例	(219)
6.	液相色谱法中硅胶填料的应用	(230)
6.1	前言	(230)
6.2	LSC的模型	(231)
6.3	溶剂强度参数	(232)
6.3.1	混合系的溶剂强度	(233)
6.3.2	选择性的概念	(234)
6.4	溶剂组成与容量因子间的定量关系	(235)
6.5	溶剂体系设计的实践	(242)

6.5.1	等洗脱溶剂体系的设计·····	(243)
6.5.2	TLC与LCC的关连·····	(244)
6.6	溶剂体系最佳化的实验例·····	(245)
6.6.1	倍半萜烯醇异构体的分离·····	(245)
6.6.2	吡啶生物碱的分离鉴定·····	(247)
6.7	后记·····	(249)
6.7.1	以涂渍法对硅胶的修饰·····	(249)
6.7.2	硅胶在液-液分配系中的应用·····	(249)
6.7.3	硅胶在筛析色谱中的应用·····	(251)
7.	液相色谱法中化学键合型硅胶填料的应用 ·····	(253)
7.1	烷基键合型硅胶·····	(254)
7.2	氨基及氰基键合型硅胶·····	(253)
7.3	其它的化学键合型硅胶·····	(263)
7.4	应用实例·····	(266)
7.4.1	芳香族有机酸的分离·····	(266)
7.4.2	低聚糖的分离·····	(271)
7.4.3	脂肪酸的分析·····	(273)
7.4.4	其它·····	(274)
8.	多孔性聚合物填料在液相色谱法中的应用 ·····	(280)
8.1	前言·····	(280)
8.2	流动相与分离方式·····	(281)
8.3	热力学处理·····	(286)
8.4	基本公式与实践·····	(289)
8.5	筛析色谱法 (SEC)与移动相·····	(291)
8.6	吸附及分配色谱与流动相·····	(298)
8.7	其它·····	(303)
9.	具有离子交换基团的填料在液相色谱法中的应用	

.....	(306)
9.1 前言	(306)
9.2 按离子交换方式进行分离的概念	(307)
9.3 离子交换以外的吸附力的影响	(311)
9.4 具有离子交换基团的填料的种类	(313)
9.5 离子交换色谱法中的流动相	(318)
9.6 从应用例引出的说明	(320)
9.6.1 复杂的混合样品的分离	(320)
9.6.2 用非电解质生成络合物的分离	(327)
9.6.3 用离子交换树脂的吸附色谱分离	(328)
9.6.4 用离子交换树脂的筛析色谱分离	(330)
9.6.5 无机离子的分离	(331)
9.6.6 离子色谱法	(332)
9.7 实验操作上的注意事项	(336)
9.8 结语	(338)
10. 反相色谱法的保留与分离机理	(341)
10.1 反相色谱用填料	(431)
10.2 疏水性相互作用	(343)
10.3 固定相烷基链长的影响	(348)
10.4 流动相的作用与样品的立体效应	(352)
附录 色谱法基础用语	(366)

1. 色谱法系统的选择*

1.1 前言

分析仪器发展的方向是(1)高速,(2)高灵敏度,(3)高精度,(4)自动化和省力。在色谱法领域中,本世纪60年代后半期,气相色谱法理论的应用使柱色谱法得到显著发展,而柱色谱法中开发的技术和方法又被薄层色谱法和气相色谱法采用。这样,不但重新掀起对这些方法的研究兴趣,同时也使色谱法的功能大大提高,应用领域日益扩大。现在,为把这些现代色谱法和过去的方法相区别,把它们称为高效色谱法。高效色谱法的建立,使色谱法在分析化学中的地位得到提高。

所谓分析,就是要确定是什么(定性)和有多少(定量)。定性分析中,若只要求确定元素组成(如无机定性分析),则用象发射光谱分析那样的方法一次测定就可以得到多种元素的分析结果。但一般而言,分析对象是由各种元素组成的化合物,为数不多的几种元素即可组成许多化合物,尤其在有机化合物中,由碳、氢、氮、氧、硫和卤素等几种元素可以组成几百万种化合物。仅用一种分析装置就能分析这些混合物的仪器现在还没有发明。为分析混合物,必须利用组分之间某种物理和化学行为的差异,逐一分离各组分,测定其构成元素的种类和数目、结合状态、立体构型和分子量等,再鉴定其组分。若能分离出需要量(几十毫克)的纯化合物组

*执笔:井垣浩信 翻译:孙琢琰

分，则用现代鉴定方法（质谱分析、核磁共振分析、红外吸收分析、元素分析、X射线分析等）就能确定结构。反之，当有多种化合物共存于测定样品时，即使用上述的方法，也不可能对各种组分进行识别和鉴定。因此，在使用这些分析仪器之前，除去干扰物，分离出分析仪器鉴定极限以上的纯品量的前处理工作是必不可少的。能做前处理的分析方法可谓分离分析法的色谱法。因此，色谱法在分析组成复杂的物质和多组分混合物时，是极为重要的分析方法。在这个意义上，除气相色谱法之外，过去的色谱法不一定都能满足要求。然而，由于开发了高效液相色谱法并用之于医学化学、药学、环境化学等领域，近年来色谱法已成为极其有效的分析方法，对科学的发展作出了重大的贡献。

应用色谱法的目的是进行定量分析和单个分离出纯物质。实际研究工作者根据分析目的，可采用气相色谱法、液相色谱法和薄层色谱法中的一种或相互联用之。由于色谱法分析技术的进步，这些方法所得信息的差别逐渐消失。例如，气相色谱法中填充柱的理论塔板数为1000~2000塔板/米，柱长一般用2~3米。高效液相色谱仪的理论塔板数为20000~60000塔板/米，柱长一般用15~30厘米。所以，实际上两者大体上均用理论板数为4000塔板左右的色谱柱分离组分，仅从色谱峰的形状看，所得到的色谱图也没有太大差别。但是在适于分析的物质、检测方法及与其它分析仪器联用等方面，每种方法各有特点。

本章的目的是对分析研究室内常用的气相色谱仪、液相色谱仪和薄层色谱仪进行比较，明确其特点，以便帮助选择色谱法的最佳系统。对每种方法都出版了很多参考书以资参阅。

1.2 色谱法

1.2.1 色谱法的分类

色谱法是利用在固定相和流动相之间相互作用的平衡场内物质行为的差异，从多组分混合物中使单一组分互相分离，继进行定性检出和鉴定，定量测定和记录的分析方法。按照用作固定相和流动相的物质状态的组合，可分类如表1.1。

表1.1

流动相	固定相	固 体	液 体
气 体	气 相 色 谱 法		
		GSC	GLC
液 体	液 相 色 谱 法		
		LSC	LLC

G: 气体 L: 液体 S: 固体 C: 色谱法

用气体作流动相的方法称为气相色谱法 (Gas Chromatography, GC)，用液体作流动相的方法称为液相色谱法 (Liquid Chromatography, LC)。

常用固定相的形状为柱状和板状 (层状)。前者用于气相色谱法或高速 (高效) 液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)，后者是薄层色谱法 (Thin Layer Chromatography, TLC)。固定相为柱状的液相色谱法称为狭义柱色谱法 (Column Chromatography)。

CC)。而且,从与薄层色谱法对比的意义上讲,只把柱色谱法称为液相色谱法。另外,高速(高效)色谱法要冠以表示 High Performance 意义的 HP,用 HPLC 或 HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) 表示,以便和过去的液相色谱法及薄层色谱法相区别。

样品的分离机理以吸附、分配、离子交换和筛析为主。应用这些分离机理的色谱法分别称为吸附色谱法 (Adsorption Chromatography), 分配色谱法 (Partition Chromatography), 离子交换色谱法 (Ion Exchange Chromatography) 和筛析色谱法 (Size Exclusion Chromatography)。分配色谱法适用的样品范围很广,无论极性物质或非极性物质均可适用。若用极性物质作固定相,则用比固定相极性小得多的物质作流动相,一般对分离极性物质是有效的。相反,在分离非极性物质时,用弱极性物质作固定相,用强极性物质作流动相。为区别这两种情况,前者称为正相分配色谱法 (Normal Phase Partition Chromatography), 后者称为反相分配色谱法 (Reversed Phase Partition Chromatography)。

色谱法和常用分离机理见表1.2。

表1.2

色谱法 \ 分离机理	吸 附	分 配	离子交换	空间排阻
GC	○	◎	×	×
LC	○	◎	○	○
TLC	◎	○	○	△

(◎使用频度大 ○使用频度中等 △使用频度小 ×不用)

气相色谱法仅在分离惰性气体、无机气体和 $C_1 \sim C_4$ 碳氢化合物时用吸附剂，其余全部用分配型填料。

在液相色谱法中，自从化学键合型硅胶填料引入高效液相色谱法之后，分配色谱法的应用实例迅速增加。多用吸附色谱法作异构体分离或前处理法，用离子交换色谱法作以氨基酸为代表的离子性物质或离子的分析。用筛析色谱法(SEC)作合成高分子的分子量分布、低聚物、蛋白质和肽等的分析。

几乎所有薄层色谱法的应用实例，均使用硅胶吸附色谱法*。

1.2.2 色谱法的特点

色谱法其它分析方法相比，其特点是能在分析过程中分离出纯物质，并测定该物质的含量。所以，对一种组分，用色谱法可以得到该组分的两种信息，即是从注入到检出的保留值和质量。当然，所采用的分析条件对定性也是有用的信息。但一般而言，色谱的定性能力差，作为定量方法却是非常重要的手段。最近，研究了色谱仪与质谱仪或傅里叶变换-红外分光光度计联用，以提高其定性能力。气相色谱法已有十分完善的联用仪器在市场上出售。

固定相	使用频度(%)	固定相	使用频度(%)
硅胶G	53.8	硅藻土	0.6
硅胶H	10.1	聚酰胺	2.4
氧化铝	3.1	其 它	21.1
纤维素	8.9		

色谱法在使用上的特点是：仅用所购置的仪器还不能得到满意的数据。但如红外分光光度计和质谱仪等，若制备好样品并置于样品架，开动仪器就能得到有用的数据。即是说，对于这些仪器，即使完全不懂分析仪器的工作原理，只要操作方法没有错误，就能得到要求的信息。但是，色谱仪本身和上述仪器不同。分析工作者必须自己根据分析目的，选择流动相的种类和组成、填料的种类和检测器，并组成分析系统。此外，不能从理论上保证所选择的分析系统是最佳的，只能通过大量实验加以证实。更有甚者，即使重复试验文献记载的分析条件，有时也得不到完全相同的分离能力和灵敏度。这是因为，往往有未记载的分析条件或不可能记载的分析条件，以及分析工作者没有认识到的事项，例如流动相不纯物含量、化学键合硅胶中残余的硅醇基含量、柱外死体积、标准样品的纯度，调制液的稳定性、仪器的温度差异、配管系统的污染程度等，均会影响分离。所以，在重复试验文献的方法而得不到满意结果时，分析工作者必须具备改善分析条件，取得良好数据的能力。为此，要求分析者完全理解色谱法的理论，从逻辑上探讨错误的原因，并不断积累有关的经验。

1.3 色谱法的比较

本节简介气相色谱法、液相色谱法和薄层色谱法，并比较三者的特点。

1.3.1 气相色谱法

如图1.1所示，气相色谱一般由载气钢瓶和气路、进样部件、色谱柱、检测器和温度控制炉组成。