

实用高效液相色谱分析

Shiyong Gaoxiao

Yexiang Sepu Fenxi

李岩 编著

广东科技出版社

实用高效液相 色谱分析

江苏工业学院图书馆
藏书章

李岩 编著

广东科技出版社

粤新登字04号

图书在版编目 (CIP) 数据

实用高效液相色谱分析/李岩编著。—

广州: 广东科技出版社, 1994. 2

ISBN 7-5359-1194-3

I. 实…

II. 李…

III. 高效液体色谱

IV. O652.53

实用高效液相色谱分析

Shiyong Gaoxiao Yixiang Sepu Fenxi

编著者: 李岩

出版发行: 广东科技出版社

(广州市环市东路水荫路11号)

经销: 广东省新华书店

印刷: 肇庆新华印刷厂

规格: 787×1092 1/32 10.5印张 235,000字数

版次: 1994年2月 第1版

1994年2月第1次印刷

印数: 1—2000册

ISBN 7-5359-1194-3

O·74 定价: 12.00元

内 容 简 介

本书简要地介绍了高效液相色谱分析的基本理论、仪器性能和实验技术；系统地收集了目前国内外高效液相色谱在食品营养成分分析、食品添加剂分析、食品有害物质分析、药物分析、农药与农药残留分析、兽药与兽药残留分析、肥料与水质分析等方面的 100 多个应用方法。

本书可供商检、卫检、药检等部门和食品、化工、农业、环保诸行业从事色谱分析的技术人员参考，也可作为操作人员上岗前的培训教材。

前 言

高效液相色谱法是60年代发展起来的现代分析方法，由于它具有分离效率高、分析速度快、试样用量少、容易收集被分离组分以及检测灵敏度高，可进行自动化操作等优点，因此得到迅速发展。目前，国内外在食品、化工、医药、农业、生化和环保等部门的应用越来越广泛。虽然高效液相色谱法已有20多年的历史，但这方面的专著不多，关于高效液相色谱应用方法的参考书也很少。为了适应高效液相色谱分析技术迅速发展的需要，方便操作人员了解高效液相色谱分析的基本理论和应用方法，特编写本书，以期对从事高效液相色谱分析的技术人员有一些参考价值。

本书分两大部分，第一部分介绍高效液相色谱的基本理论、仪器性能和实验技术；第二部分介绍高效液相色谱的应用方法。本书力求反映高效液相色谱分析领域的新技术、新方法和新成果。

由于编者水平有限，书中错误之处在所难免，恳切希望读者批评指正。

编 者

1993年6月

目 录

第一章 概述	1
一、高效液相色谱法简介	1
二、高效液相色谱法的特点	2
三、高效液相色谱的分类	3
第二章 高效液相色谱法基础理论	6
一、色谱图及有关术语	6
二、色谱分离的基本参数	7
三、液相色谱过程中的谱带扩展	11
四、高效液相色谱的固定相与流动相	14
五、定性分析	20
六、定量分析	22
第三章 高效液相色谱仪	28
一、溶剂输送系统	29
二、进样装置	31
三、色谱柱	33
四、检测器	36
五、数据处理系统	44
第四章 高效液相色谱实验技术	46
一、流动相的预处理	46
二、分离方法的选择	47
三、固定相的选择	48
四、流动相的选择	49
五、化学衍生法	52

六、仪器的维护	53
第五章 高效液相色谱应用方法	55
一、食品营养成分的分析	55
(一) 玉米糖浆中糖类的测定	55
(二) 蜂蜜中糖的分离和测定	59
(三) 西瓜中多糖成分的测定	61
(四) 乳糖纯度的测定	62
(五) 牛奶巧克力中果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖和蔗糖的测定	64
(六) 蜂王浆和蜂王浆冻干粉中10-羟基- δ -癸烯酸的测定	66
(七) 奶油中有机酸的测定	69
(八) 植物油中脂肪酸的测定	71
(九) 辣椒油脂中辣椒素的测定	73
(十) 氨基酸的测定	75
(十一) 强化奶和奶粉中维生素D的测定	78
(十二) 食品中维生素B ₁ 和维生素B ₂ 的测定	82
(十三) 食品中维生素E的测定	85
(十四) 维生素A和维生素E的测定	86
二、食品添加剂的分析	88
(十五) 饮料中咖啡因的测定	88
(十六) 可可制品中可可碱和咖啡碱的测定	90
(十七) 油和脂中抗氧化剂的测定	91
(十八) 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定	95
(十九) 桔汁鸡尾酒和苹果汁中奎尼酸、苹果酸和柠檬酸的测定	98
(二十) 食品中七种合成色素的测定	100
三、食品中有害物质分析	103
(二十一) 食品中氯霉素残留量的测定	103

(二十二) 水产品中吡啶的测定.....	105
(二十三) 玉米中 α -玉米烯醇和玉米烯酮的测定.....	107
(二十四) 食品中苯并芘的测定.....	110
(二十五) 液态牛奶中黄曲霉毒素 M_1 和 M_2 的测定.....	114
(二十六) 棉籽产品中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 和 G_1 、 G_2 的测定.....	119
四、药物分析.....	13
(二十七) 药片和注射药品中阿米替林的测定.....	123
(二十八) 药物中氨甲酸愈甘醚酯的测定.....	125
(二十九) 药片、溶液及软膏中磺胺异恶唑的测定.....	128
(三十) 复方药物的盐酸假麻黄碱和盐酸吡咯吡胺 或扑尔敏的测定.....	130
(三十一) 药液和药膏中水杨酸毒扁豆碱和硫酸毒 扁豆碱的测定.....	134
(三十二) 药物中毛果芸香碱、异毛果芸香碱和毛 果芸香酸的测定.....	136
(三十三) 药片及胶囊中去甲羟基安定的测定.....	138
(三十四) 药物中别嘌吟醇的测定.....	140
(三十五) 药物中磺胺甲基异恶唑的测定.....	142
(三十六) 药物中甲基多巴、甲基多巴-双氢氯噻嗪和 甲基多巴-氯噻嗪的测定.....	144
(三十七) 药物中扑痫酮的测定.....	146
(三十八) 药物中秋水仙碱的测定.....	148
(三十九) 药物中安定的测定.....	151
(四十) 药片中氯磺丙脲的测定.....	153
(四十一) 片剂和散装药物氢化保泰松的测定.....	155
(四十二) 甘草产品中甘草酸与甘草酸盐的测定.....	157
(四十三) 甘草提取物中糖的测定.....	158
(四十四) 复合维生素制剂中烟酸的测定.....	160

(四十五) 维生素制剂中维生素D的测定	161
(四十六) 复合维生素制剂中维生素D的测定	165
(四十七) 维生素AD浓缩物中维生素D的测定	171
五、农药与农药残留分析	175
(四十八) 农药制剂中鱼藤酮的测定	175
(四十九) 农药制剂中克菌丹的测定	177
(五十) 农药制剂中茅草枯(镁和钠盐)的测定	179
(五十一) 农药制剂中麦草畏、2,4-D和2甲乙氯丙 酸的测定	181
(五十二) 农药制剂中灭菌丹的测定	184
(五十三) 农药制剂中2-甲-4-氯酯和盐的测定	186
(五十四) 农药制剂中2,4,5-涕的测定	188
(五十五) 农药制剂中毒死蜱的测定	190
(五十六) 农药制剂中乙硫磷的测定	192
(五十七) 农药制剂中丰索磷的测定	194
(五十八) 农药制剂中草甘磷的测定	196
(五十九) 农药制剂中一六〇五的测定	198
(六十) 农药制剂中甲基一六〇五的测定	199
(六十一) 农药制剂中苯菌灵的测定	201
(六十二) 工业级灭虫威和农药制剂的测定	203
(六十三) 工业级残杀威和农药制剂的测定	205
(六十四) 工业级溴鼠香和农药制剂的测定	207
(六十五) 农药制剂中2,4-D的测定	209
(六十六) 农药制剂中二氟苯隆的测定	211
(六十七) 农药制剂中双硫磷的测定	213
(六十八) 农药制剂中灭害威的测定	216
(六十九) 农药制剂中丁三唑的测定	218
(七十) 农药制剂中三氯杀螨醇的测定	220
(七十一) 农药制剂中灭螨猛的测定	222

(七十二) 工业级和可湿粉末状农药制剂中恶虫威的测定.....	224
(七十三) 农药制剂中虫螨威的测定.....	225
(七十四) 农药制剂中保棉磷的测定.....	227
(七十五) 农药制剂中灭草松的测定.....	229
(七十六) 农药制剂中对硫磷的测定.....	230
(七十七) 吡氟乙草灵乳油活性成分的测定.....	232
(七十八) 农药制剂中甲基对硫磷的测定.....	233
(七十九) 果尔农药中活性成分的测定.....	235
(八十) 农药制剂中敌菌灵的测定.....	236
(八十一) 百草敌片剂中麦草畏的测定.....	238
(八十二) 拿捕净乳油有效成分的测定.....	240
(八十三) 啶禾灵乳油有效成分的测定.....	242
(八十四) 农药制剂中精稳杀得的测定.....	243
(八十五) 尼索朗乳油有效成分的测定.....	245
(八十六) N-甲基氨基甲酸酯类杀虫剂和降解残留物的测定.....	246
(八十七) 鲜柑桔中西维因残留量的测定.....	253
(八十八) 菠萝罐头中灭多威和杀线威残留量的测定.....	256
(八十九) 玉米中甲萘威、呋喃丹残留量的测定.....	262
(九十) 动物组织、牛奶和蛋类中除虫脲残留量的测定.....	264
(九十一) 棉籽中灭草定残留量的测定.....	271
(九十二) 谷物、动物组织和牛奶中绿黄隆残留量的测定.....	273
(九十三) 水果中甲基托布津残留量的测定.....	284
六、兽药与兽药残留分析.....	287
(九十四) 饲料和预混饲料中呋喃唑酮的测定.....	287
(九十五) 饲料和饲料原料中卡巴因的测定.....	290

(九十六) 动物饲料中双硝苯脲二甲嘧啶醇的测定·····	294
(九十七) 混合饲料中维生素D的测定·····	295
(九十八) 预混饲料中杆菌肽的测定·····	300
(九十九) 饲料中氯氟苄腺嘌呤的测定·····	302
(一〇〇) 饲料中痢特灵的测定·····	304
(一〇一) 肉和肉罐头中西维因残留量的测定·····	308
(一〇二) 肉食品中磺胺二甲嘧啶的测定·····	310
七、肥料与水质分析·····	313
(一〇三) 肥料中尿素和亚甲基脲类的测定·····	313
(一〇四) 复合肥料中三氨基-S-三嗪的测定·····	315
(一〇五) 地下水和废水中TNT、RDX、HMX和2,4-DNT的测定·····	316
参考文献·····	322

第一章 概 述

一、高效液相色谱法简介

高效液相色谱亦称高压液相色谱、高速液相色谱或现代液相色谱，英文称High Performance Liquid Chromatography，简称HPLC。它是在60年代发展起来的分析技术，由于它综合了色谱分析的新成就，因此发展极快，成为现代分析技术的重要手段。

高效液相色谱法是在经典液相色谱法的基础上，引入气相色谱的理论和 技术发展起来的。在本世纪初，俄国植物学家茨维特（M. Tswett）首先用色谱法分离植物色素。他在一根竖直的装满碳酸钙颗粒的玻璃管中，从顶端倒入植物色素的石油醚抽提液，再加入纯石油醚，使其自然流下进行淋洗，这时植物色素的抽提液沿玻璃管流动，在管内形成具有不同颜色的色带，每个色带表示不同的色素，因此，把这种方法称为色谱法。玻璃管称为色谱柱，管内装填物称为固定相，淋洗剂叫流动相。以后色谱法不断发展，不仅可用于分离有色物质，而且也可用于分离无色物质。然而，这种经典液相色谱，液体流动相靠自身的重力由上往下流动，在色谱柱的下端分段收集流出液，再用其它方法进行测定，所以分析速度很慢，分离效率也很低。40年代发展的纸色谱和薄层色谱，虽然分析速度得到提高，但重现性差，不易自动化，

很难进行定量分析。50年代气相色谱出现后，色谱技术得到了迅速发展，成为一种新型的分析技术，并得到了广泛的应用，气相色谱的发展大大促进了液相色谱的发展。60年代（1964-1965年），液相色谱引入气相色谱的理论和技術，建立了高速液液分配法。随着高速化所必需的一些装置，如高压定量泵、高压进样器、高灵敏度的检测器以及耐高压的表面多孔性填充剂和化学键合型填充剂的研制成功，使高效液相色谱技术有了突破，逐步发展成现代的先进分析方法。

二、高效液相色谱法的特点

高效液相色谱法具有高压、高速、高效和高灵敏度的特点。输液泵的压力一般达 $10\sim 30\text{MPa}$ ；流动相的流速达 $1\sim 10\text{mL/min}$ ；色谱柱的理论塔板数高达 $5000/\text{m}$ 以上；最小检测量达 $10^{-9}\sim 10^{-12}\text{g}$ 。

高效液相色谱法和气相色谱比较，具有应用范围广、流动相种类多、容易收集试样馏分的优越性。在气相色谱中，试样必须在气化状态下通过色谱柱和检测器，难于气化的不挥发性物质以及受热易分解易变质的物质，一般难于直接进行分离。在有机化合物中，能气化的化合物，连同能转化成易气化的衍生物的化合物，大约只占20%，其余大部分化合物不能用气相色谱法进行分析。高效液相色谱法则不同，试样不需要气化，不受挥发性和热稳定性的限制。从低分子到高分子，只要试样可溶于某些溶剂，都可列入高效液相色谱分析的范围。能用高效液相色谱进行分析的物质大约占有有机化合物总数的75%~80%。

气相色谱法用作流动相的载气只有三、四种，可供选择

的余地不大。而高效液相色谱法用作流动相的溶剂，种类繁多，十分丰富，可以用水、有机溶剂以及无机盐溶液作流动相，也可用两种或两种以上不同配比的溶剂作流动相，可供选择的范围很大。

用气相色谱法进行分析，试样是在气化状态下从柱上洗脱下来，不容易收集试样馏分。用高效液相色谱法进行分析，试样是从液体状态从柱上洗脱下来，只要在柱的出口放置一个容器，就可收集试样馏分，回收率高达80%—90%。因此，高效液相色谱法既可用于分析，也可用于制备。

三、高效液相色谱的分类

高效液相色谱根据不同的分离机理可分为液-固吸附色谱、液-液分配色谱、离子交换和离子对色谱、排阻色谱（凝胶渗透色谱）等类型。

（一）液-固吸附色谱

液-固吸附色谱是利用色谱柱中的填充剂对不同的试样组分具有不同的吸附能力，使试样组分进行分离。这种填充剂表面具有极性基团，当流动相带着试样组分进入色谱柱时，各组分分子之间以及各组分分子与流动相分子之间在填充剂表面发生吸附竞争，反复进行吸附与解吸，使试样组分得到分离。

液-固吸附色谱一般适用于非离子型化合物的分离，常用于分离异构体，偶氮染料、抗氧化剂、表面活性剂、石油烃类和硝基化合物等。

(二) 液-液分配色谱

液-液分配色谱利用试样组分在固定相与流动相之间相对溶解度的差异进行分离。在液-液分配色谱中，流动相和固定相均为液体，作为固定相的液体通过涂渍或化学键合的办法承载在载体上，这二种液体互不相溶。当试样组分进入色谱柱时，各组分在二相间进行平衡分配，由于试样各组分在二相之间分配系数不同，从而得到分离。

液-液分配色谱根据固定相与流动相的不同组合可分为二类。采用极性固定相（固定液）和非极性流动相，称为正相液-液分配色谱；采用非极性固定相和极性流动相，称为反相液-液分配色谱。前者适用于分离极性化合物，后者适用于分离非极性和低极性化合物。

(三) 离子交换和离子对色谱

1. 离子交换色谱

离子交换色谱是利用离子交换树脂上可电离的离子，与溶于流动相的试样组分中具有相同电荷的溶质离子进行可逆交换，离子在交换剂上有不同的亲和力而使试样组分进行分离。

离子交换色谱采用具有离子性官能团的离子交换剂作填充剂，这种填充剂在电解质溶液中离解，将离子释放到溶液中，本身成为离子化状态，处在这种离子化状态的固定相官能团对试样离子具有离子交换作用，当试样组分进入色谱柱时，通过离子交换作用从而得到分离。

凡是在溶剂中能够离解的物质一般都可以用离子交换色谱法进行分离。离子交换色谱通常用于分析生化物质，如氨

基酸、核酸和蛋白质等。另外，在食品和医药等方面的应用也比较多。

2. 离子对色谱

离子对色谱法是分离离子型化合物或离子化物质的又一种方法。其原理是：在固定相或流动相中加入与试样离子带相反电荷的平衡离子（配对离子），它们与试样形成中性的离子对，这些离子对不易在水中离解而易溶于有机溶剂，从而使试样组分得到分离。

离子对色谱法具有分离效能高、分析速度快、操作简便等优点。在很多情况下，可以取代离子交换色谱法。

离子对色谱法适用于分离药物、羧酸、维生素、染料、生物胺及代谢产物，也适用于无机离子（如镧系和铜系化合物）的分析。

（四）排阻色谱

排阻色谱也称凝胶渗透色谱或凝胶过滤色谱，是按试样中各种分子在流动相中的大小不同来进行分离的。在排阻色谱中，色谱柱内填充具有大小不同孔穴的凝胶，当试样组分进入色谱柱时，随流动相在凝胶外部间隙以及凝胶孔穴旁流过，体积大的分子不能渗透进凝胶孔穴而受到排阻，因此最早被冲洗出来。体积小的分子能全部渗透进凝胶的孔穴，最后从色谱柱中流出，中等体积的分子有一部分渗透进凝胶孔穴，则在大分子和小分子之间流出，因此，使试样组分得到了分离。

排阻色谱适用于测定高聚物的分子量分布，在油品、肽类、糖类和酶等物质的测定与纯化中得到广泛的应用。

第二章 高效液相色谱法基础理论

一、色谱图及有关术语

(一) 色谱图

色谱柱流出物通过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图称为色谱图。色谱图描述了被测组分浓度随时间变化的情况，是进行定性和定量分析的依据。典型的色谱图如图 2-1 所示。

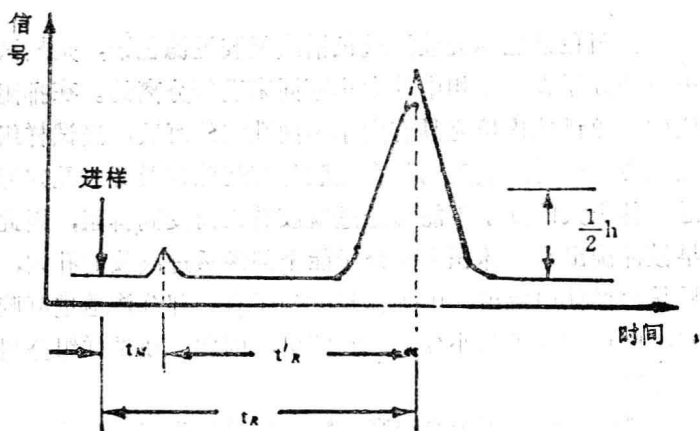


图 2-1 典型的色谱图