

实用高效液相色谱法的建立



[美] L.R.施奈德 J.L.格莱吉克 J.J.柯克兰 著
王杰 赵岚峰 王树力 丁洁 译

58.1
6

科学出版社

0658.1
556

415366

实用高效液相色谱法的建立

[美] L.R. 施奈德 J.L. 格莱吉克 J.J. 柯克兰 著
王杰 赵岚峰 王树力 丁洁 译



00415366

科学出版社

1998

DV 47 / 12
内 容 简 介

高效液相色谱法 (HPLC) 是近些年发展较快的一门新的分析分离技术, 本书简明扼要地论述了 HPLC 的原理和基础, 同时介绍了许多新颖的实验方法、研究思路和工作经验。

本书适用于药品检验、化工、环保、卫生等部门从事仪器色谱分析的研究和应用人员, 以及高校分析化学、生物化学等专业的师生。

L. R. Snyder, et al.

PRACTICAL HPLC METHOD DEVELOPMENT

All Rights Reserved. Authorized translation from the English language edition
published by John Wiley & Sons, Inc.

Copyright ©1988 by John Wiley & Sons, Inc.

图书在版编目 (CIP) 数据

实用高效液相色谱法的建立 / (美) 施奈德 (Snyder, L. R.) 等著;
王杰等译. -北京: 科学出版社, 1998. 10

书名原文: Practical HPLC Method Development

ISBN 7-03-006615-4

I. 实... I. ①施... ②王... II. 液相色谱-色谱法 IV. 0657.7
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 08394 号

图字: 01-98-0409 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998 年 9 月 第 一 版 开本: 850×1168 1/32

1998 年 9 月 第 一 次 印 刷 印张: 8 1/2

印数: 1-3 000 字数: 215 000

定价: 17.00 元

译者的话

高效液相色谱法 (HPLC) 是近年来发展最快的一门新的分析分离技术, 正越来越多地用于质量检验、实验研究和制备分离, 已成为化学和生物化学实验室中不可缺少的高效、快速、灵敏的分析分离手段。L. R. Snyder 和 J. J. Kirkland 是当今国际色谱界造诣很深的知名学者, 曾出版过多本色谱专著, 发表的色谱文章也已难计其数。他们编著的这本《实用高效液相色谱法的建立》是一部在实用上独具特色的教学科研参考书。这本书在简明扼要地讲述 HPLC 原理和基础的同时, 叙述了许多新颖的实验方法、研究思路及工作经验; 书中图文并茂, 引用了众多有价值的参考文献, 许多分析实例和实验方法的介绍引人入胜, 使读者从中得到有益的启发; 同时本书对计算机辅助进行方法建立的新技术也作了简介。本书对于色谱工作者无疑是一本极有价值的教材和参考书。

由于本书出版以来, HPLC 技术仍处于蓬勃发展之中, 书中介绍的部分内容已不能代表当前的最新成就, 例如本书对 HPLC 方法建立中非常有用的二极管阵列检测器、已被证明颇有价值的专家系统均未作深入讨论, 但书中的基本内容、思路及方法是很有借鉴价值的, 所介绍的技术今天仍在广泛地应用, 其中有些对于我们还是新的知识。因此我们向读者推荐这本很有价值的参考书, 愿能对广大色谱工作者有所帮助。但由于我们的经历及水平有限,

虽竭尽全力，错误和不妥之处仍在所难免，敬请读者提出宝贵意见。

译者
1998年春

作者序言

高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, 简称 HPLC) 开始应用于 20 世纪 60 年代后期。从那时起, 人们对 HPLC 的分离机理及如何通过改变实验条件来进一步改善该方法有了长足的认识。众多的书籍、综述文章及不计其数的出版物已清晰地记述了人们不断发展和加深理解这些基础理论的历程。然而, 这一科学知识在实际应用中, 即使最乐观, 也会碰到许多难题。不过, 现在已有几种关于方法建立的系统方法制成了计算机软件。所以, 在有些情况下, 人们所要做的工作仅仅是将样品注入 HPLC 系统中, 而后面的工作则完全由计算机去执行, 直至其分离结果能令人满意为止。但令人遗憾的是当今这种“自动方法建立”系统的效能还不能完全令人信服^[1]。

在绝大多数实验室中, HPLC 方法的建立仍在靠经验进行。通常情况下, 首先进行反相色谱试验, 调整流动相中有机相的比例, 以求得到足够的分离度、合理的操作时间以及易于检测 (窄) 的谱带。由于仅用这种方法往往不可能一次便成功, 因而, 色谱工作者还要按自己的思路继续探索。许多人改用不同的色谱柱, 也有的人改变温度或流动相的 pH。还有人优化筛选溶剂的配比组成, 以其他溶剂代替原来的有机溶剂。或者试用别的 HPLC 方法, 例如离子对色谱法、正相色谱法或离子交换色谱法。

在方法建立中仅仅达到分离并非是唯一挑战。实验开始所得到的峰常常较宽和/或拖尾, 所以应先加以改善再继续工

作，而许多人对此问题采取容忍的态度（应该说这是个错误）。还有一种情况是靠近色谱图开始部分 (t_0) 的色谱峰挤在一起，分不开，而后面的谱峰则保留时间太长且难以检测。这种情况应该用梯度洗脱法，但实际上色谱工作者却常常更喜欢尽可能地延长洗脱时间。偶尔情况下，由于检测灵敏度差与样品浓度太低，使主要问题成为能否检测到所分离的样品谱峰。这时，人们则不可能再退避了，因为方法建立的第一需要应该得到可测到的色谱图。

幸运的是，HPLC 是一种非常有效的手段，即无论使用下述哪种方法，一般均可分离开。但另一方面，这将会耗费大量时间，有些疑难品种需花数月时间。低效率的方法建立步骤经常会导致最终方法在质量上的妥协，即宁可使分离的质量下降，以免方法建立耗时过多。

本书的宗旨是以便捷的途径建立 HPLC 方法。卓有成效的工作方法应包括下列部分建议或全部建议：

1. 首先估价一下样品与分离目的（切不可低估此步骤的重要性）。
 2. 设计开始的分离条件，使之有可能在一两次试验中，便可得到有希望的色谱图。
 3. 预测可能发生的问题，当问题出现时，能用已经证明的办法解决之。
 4. 优先考虑试用最有希望的、能控制（或改善）分离的方法。
 5. 应避免随意的“试验—错误”法，应对每次试验进行设计，能提供有用信息，而不必过分注意分离结果如何。
 6. 应认识到 HPLC 法的目的是分离。不必使所需谱峰“过度分离”，但最终的方法必须满足分析的要求，方法建立所花费的时间与精力应减少到最低限度，但不应影响分离目的。
 7. 如有可能，从最初实验起就应用计算机处理数据，尽量减少方法建立所需的实验，评价并选用能帮助方法建立的商用软件。
- 本书将帮助你在 HPLC 方法建立中实施以上建议，并深入透彻地对这些建议的基本理论进行讨论。色谱工作者在实际工作中，

可借助这些方法去解决具体问题，在某些地方甚至可进一步发挥这些建议。我们假设本书的读者已熟悉 HPLC 的基础理论，我们曾在《现代液相色谱导论》^[2]中讨论过。本书中还引用了大量的参考文献。读者也有必要参考本书开始所列出的“色谱常用符号与术语表”，因为本书将通篇使用它们，而不再另行介绍。

本书另一个目的是将那些在 HPLC 方法建立中，有关计算机应用的实用工具介绍给读者。计算机在实际方法建立中虽并非必不可少，但确实可带给你更佳方案，使色谱工作者在方法探讨中更多地节省时间。Berridge^[3]和 Schoenmakers^[4]已对计算机辅助的方法建立作过评述，不过，他们所注重的乃是艺术式的软件，有商用化不足或使 HPLC 系统造价过高的缺憾。现在已有一些小巧灵活、价格适宜的计算机程序面市，它们以 HPLC 的基本理论为依据编制而成，正越来越多地、卓有成效地用于优化色谱分离的条件。

本书并未专门讨论如何处理生物来源的样品，但适用于所有化合物的总原则同样能指导这类样品的分离，但须重视的是，它们之间是存在着某些实际差异的。当前，人们对处理生物样品优选方法的认识迅速提高，只是尚未找到分离此类物质的统一模式。因此，我们选择了等待，待将来再版时再讨论 HPLC 分离用于生命科学的特殊情况。

很显然，本书的方法建立主要讨论那些小分子的反相分离法。由于当今大约有四分之三分离采用此法，所以这样的侧重是恰当的。不过，读者同样能了解到一些有关正相分离和离子对分离的进展情况，尽管关于这些方法的系统知识还很有限。由于尺寸排阻色谱法 (SEC) 包含一套完全不同的优化分离概念，本书暂不作讨论。SEC 主要用于分离和鉴定大分子物质，也不在本书的讨论范畴，有关这一专门知识的较充分的讨论，请参阅其它著作^[5]。

参考文献

- [1] S. A. Borman, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 1192A.

- [2] L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed. , Wiley-Interscience, New York, 1979.
- [3] J. C. Berridge, *Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations*, Wiley-Interscience, New York, 1985.
- [4] P. J. Schoenmakers, *Optimization of Chromatographic Selectivity*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [5] W. W. Yau, J. J. Kirkland, and D. D. Bly, *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1979.

色谱常用符号与术语表

ACN	乙腈 Acetonitrile
AUFS	满量程的吸光度单位 Absorbance units, full scale
A_s	峰不对称因子 (见图 3-7)
B	二元流动相中的强溶剂; 例如: 反相 HPLC 的甲醇/水混合液中的甲醇
BSA	牛血清白蛋白(一种蛋白质) Bovine serum albumin
CAF	咖啡因(中性溶质) Caffeine
CRF	色谱响应函数 Chromatographic response function; 色谱图总分离度的定量指标
d_c	色谱柱内径 (cm)
DMOA	二甲基辛胺 Dimethyloctylamine
DNB	2, 4-二硝基甲酰(基) 2, 4-Dinitrobenzoyl
d_p	色谱柱填料的粒度 (μm)
DRYLAB [®]	液相资源公司(LC Resources Inc.)的计算机模拟软件。DRYLAB I 用于等度预测, DRYLAB G 用于梯度预测 (见 8.4 节)
F	流动相的流速 (mL/min)
FC-113	1, 1, 2-三氟-1, 2, 2-三氯乙烷
GPC	凝胶渗透色谱法 Gel-permeation chromatogra-

	phy
HA	酸性溶质, 能电离出 A^-
Hex	己烷 Hexane
h_r	二相邻谱带之间的谷高 (见图 2-8)
HVA	高香草酸 Homovanillic acid
h'	峰高 (单位任意)
h_1, h_2	相邻谱峰 1 和谱峰 2 的峰高 (见图 2-8)
IEC	离子交换色谱法 Ion-exchange chromatography
IP	离子对 Ion-pair
IPC	离子对色谱法 Ion-pair chromatography
J	色谱柱强度参数 (见表 5-2)
K'	所给谱峰的容量因子, $k' = (t_R - t_0) / t_0 = \frac{t_R'}{t_0}$, $t_R = t_0 (1 + k')$
\bar{k}	梯度洗脱过程中, 某溶质的 k' 的平均值或有效值 [见图 6-4 (b) 和式 (6-2)]
k_w	以水作流动相 k' 的外推值 [反相 HPLC; 见式 (8-1)]
k_1, k_2	相邻谱峰 1 和谱峰 2 的容量因子 k'
L	色谱柱长度 (cm)
L_c	检测器流动池光路的长度 (cm)
M	溶质的分子量
MC	二氯甲烷 Methylene chloride
MDST	混合设计统计技术 Mixture-design statistical technique; 一种优化流动相的软件 (见 8.4 节)
MeOH	甲醇 Methanol
MTBE	甲基叔丁醚 Methyl-t-butyl ether
MW	溶质的分子量
N	色谱柱塔板数 [见式 (2-3a)]
NAPA	N-乙酰普鲁卡因胺 N-Acetylprocainamide (碱性)

	溶质)
N_0	检测器的基线噪音 [见式 (4-1)]
ODS	十八烷基硅烷 Octadecylsilyl
P	色谱柱的压力降 [通常以巴 (bar) 表示, 也用 psi (见式 3-1)]; 另外, 也用作柱极性参数 (见表 5-2)
PA	普鲁卡因胺 Procainamide (碱性物质)
PAH	聚芳香烃 Polyaromatic Hydrocarbon
PESOS [®]	优化流动相的计算机软件 (美国 Perkin-Elmer 产品; 见 8.4 节)
pK_a	溶质酸性常数的负对数; 当 $pH=pK_a$ 时, 溶质中有一半是电离的
R_s	保留值范围, $R_s = (\text{最末谱峰 } k') / (\text{最初谱峰 } k')$
RRM	相对分离度图 (通常 $N=10000$; 如图 2-10)
R	相邻二谱峰的分度 [见式 (2-1) ~ (2-3)]
S	当流动相中的 %B 改变时, 测量溶质保留值的变化速率的参数 [见式 (8-1)]
SAL	水杨酸 Salicylic Acid
SEC	尺寸排阻色谱法 Size-exclusion chromatography
S/N	信噪比 Signal to noise ratio
t	分离时间 (min) (样品进样时 $t=0$)
t_D	梯度系统的滞后时间 (min) (见图 6-10)
TBA	四丁基铵离子 Tetrabutylammonium ion
TEA	三乙胺 Triethylamine
THF	四氢呋喃 Tetrahydrofuran
t_k	在用于校正等度洗脱溶剂强度的流动相离开梯度混合器时, 梯度洗脱的时间 [见式 (2-4) 的讨论]
TLC	薄层色谱法 Thin-layer chromatography
TMA	四甲基铵 Tetramethylammonium (盐)

TMS	三甲基硅烷 Trimethylsilyl
t_0	色谱柱的死时间 (min)
t_R	溶质的保留时间 (min)
t_G	梯度时间 (min), 即梯度开始至结束的时间
t_1, t_2	相邻谱峰 1 和谱峰 2 的保留时间 (min) [见式 (2-1)]
t_i	色谱图中第一峰的保留时间 (min)
t_f	色谱图中最末峰的保留时间 (min)
Δt_g	$t_f - t_i$
t_x	$(t_f - t_i) / 2$ (见图 9-6)
UV	紫外光
V_m	色谱柱的死体积 (mL), $V_m = t_0 F$
VMA	香草扁桃酸 Vanillymandelic acid
w_m	化合物的进样量 [见式 (4-1)]
w_1, w_2	相邻谱峰 1 和谱峰 2 于半峰高处 ($w_{1/2}$) 的宽度 (min)
W_1, W_2	相邻谱峰 1 和谱峰 2 的基线宽度 (min) [见式 (2-1)]
$W_{1/2}$	半峰高处的谱带宽度
x_d, x_e, x_n	溶剂选择参数, 分别用于测定溶剂的酸度、碱度和偶极性的程度 (见图 2-16)
α	分离因子, $\alpha = k_2/k_1$
$\Delta\Phi$	梯度洗脱期间流动相成分 (Φ) 的变化
ϵ°	溶剂强度参数 (见表 2-4)
ϵ	化合物的克分子吸收系数 (见 4.1 节)
η	流动相的粘度 (Pa · s)
Φ	流动相中强溶剂的体积份数
%B	二元流动相中强溶剂的体积百分比 (%v)

目 录

译者的话	
作者序言	
色谱常用符号与术语表	(xi)
第 1 章 绪论	(1)
1.1 引言	(2)
1.2 建立分离	(6)
参考文献	(15)
第 2 章 分离的基础：流动相的作用	(16)
2.1 分离度：总的考虑	(17)
2.2 分离度与溶剂强度 (k') 的关系	(28)
2.3 分离度与流动相选择性 (α) 的关系	(34)
2.4 分离度与色谱柱类型和温度选择性 (α) 的 关系	(43)
2.5 分离度与色谱柱塔板数 (N) 的关系	(47)
参考文献	(51)
第 3 章 色谱柱的作用	(53)
3.1 色谱柱与柱填料的特性	(54)
3.2 色谱柱的性能指标	(66)
3.3 色谱柱问题与解决办法	(70)
参考文献	(81)
第 4 章 系统方法的建立	(83)

4.1	检测条件的选择	(85)
4.2	开始分离的首要步骤	(90)
4.3	反相 HPLC 中的溶剂优化	(98)
4.4	离子对 HPLC 中的溶剂优化	(108)
4.5	正相 HPLC 中的溶剂优化	(113)
	参考文献	(118)
第 5 章	困难的分离：其它分离条件和步骤的应用	(120)
5.1	应用另一种 HPLC 方法	(122)
5.2	反相 HPLC	(123)
5.3	离子对 HPLC	(135)
5.4	正相 HPLC	(140)
5.5	多维分离技术	(143)
	参考文献	(149)
第 6 章	梯度洗脱	(151)
6.1	梯度洗脱的应用	(153)
6.2	梯度分离的原理	(158)
6.3	优化梯度方法	(165)
6.4	实验条件	(172)
	参考文献	(176)
第 7 章	特殊样品及技术	(178)
7.1	无机离子和离子交换色谱法	(179)
7.2	尺寸排阻色谱法	(182)
7.3	对映体	(183)
7.4	痕量分析	(189)
	参考文献	(194)
第 8 章	计算机辅助的方法建立	(196)
8.1	引言	(196)
8.2	仪器控制	(197)
8.3	数据分析	(198)
8.4	预测性软件	(198)

参考文献.....	(221)
第9章 方法建立的步骤.....	(223)
9.1 引言	(223)
9.2 等度反相分离	(228)
9.3 梯度洗脱的反相分离	(235)
9.4 等度正相分离	(241)
9.5 离子对分离	(243)
索引.....	(247)

1

绪 论

1.1 引言

分离目的

样品的性质和需要的预处理

检测

1.2 建立分离

选择一种 HPLC 方法

开始建立方法

改善分离

检查问题

完善方法

参考文献

随着 HPLC 这一新型分离分析技术的广泛应用,现在几乎每天都有许多色谱工作者在研究使用 HPLC。某一特定样品的最佳分离条件,只有通过试验才能得到,若从比较正确的初始条件开始,往往可在较短时间内得到满意的结果,相反,若胡乱试验,则只能是事倍功半。尽管各种方法的本身有很大差异,但图 1-1 总结的流程图却是方法建立中常常遵循的。本章将讨论这些步骤中每一步的重要性,为后面章节中更加深入的探讨作好准备。