

“十三五”国家重点出版物出版规划项目

色 谱 技 术 丛 书

# 高效液相色谱方法及应用

于世林 编著

第三版



化学工业出版社

“十三五”国家重点出版物出版规划项目

色谱技术丛书

# 高效液相色谱方法及应用

第三版

于世林 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是“色谱技术丛书”中专门介绍高效液相色谱的分册。书中从操作者的角度对高效液相色谱的分类发展与高效液相色谱仪器做了全面介绍,在此基础上对液固色谱法和液液色谱法、正相和反相键合相色谱法、亲水作用键合相色谱法、疏水作用键合相色谱法、微柱液相色谱法、二维高效液相色谱法等多种高效液相色谱方法的色谱分离条件、分析操作、实验技术和注意事项等进行了详细的阐述,并对梯度洗脱的原理和方法以及高效液相色谱法的基本理论做了系统介绍,总结了高效液相色谱新技术的进展。

本次修订根据高效液相色谱近年的发展对第二版内容做了大幅更新,新增了亲水作用键合相色谱法、疏水作用键合相色谱法以及高效液相色谱新技术的进展三章,删除了第二版中体积排阻色谱法和高效液相色谱分离条件的优化两章。对其他各章增补了仪器、填料、理论和应用方面的最新进展和技术资料。

本书适用于各领域中从事液相色谱分析工作的技术人员学习参考,也可作为高等院校分析化学及相关专业师生的教学参考书。

## 图书在版编目(CIP)数据

高效液相色谱方法及应用 / 于世林编著. —3版.

—北京: 化学工业出版社, 2018.8

(色谱技术丛书)

ISBN 978-7-122-32134-3

I. ①高… II. ①于… III. ①液相色谱

IV. ①O657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 096806 号

---

责任编辑: 傅聪智 任惠敏  
责任校对: 王 静

文字编辑: 向 东  
装帧设计: 刘丽华

---

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 河北鹏润印刷有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张 29 字数 603 千字 2019 年 1 月北京第 3 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 98.00 元

版权所有 违者必究

# 色谱技术丛书 (第三版)

傅若农 主 编

汪正范 刘虎威 副主编

## 各分册主要执笔者:

《色谱分析概论》	傅若农			
《气相色谱方法及应用》	刘虎威			
《毛细管电泳技术及应用》	陈 义			
《高效液相色谱方法及应用》	于世林			
《离子色谱方法及应用》	牟世芬	朱 岩	刘克纳	
《色谱柱技术》	赵 睿	刘国詮		
《色谱联用技术》	白玉	汪正范	吴侔天	
《样品制备方法及应用》	李攻科	汪正范	胡玉玲	肖小华
《色谱手性分离技术及应用》	袁黎明	刘虎威		
《液相色谱检测方法》	欧阳津	那 娜	秦卫东	云自厚
《色谱仪器维护与故障排除》	张庆合	李秀琴	吴方迪	
《色谱在环境分析中的应用》	蔡亚岐	江桂斌	牟世芬	
《色谱在食品安全分析中的应用》	吴永宁			
《色谱在药物分析中的应用》	胡昌勤	马双成	田颂九	
《色谱在生命科学中的应用》	宋德伟	董方霆	张养军	

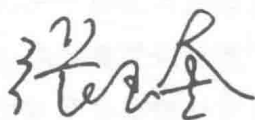
## 序

“色谱技术丛书”从2000年出版以来，受到读者的普遍欢迎。主要原因是这套丛书较全面地介绍了当代色谱技术，而且注重实用、语言朴实、内容丰富，对广大色谱工作者有很好的指导作用和参考价值。2004年起丛书第二版各分册陆续出版，从第一版的13个分册发展到23个分册（实际发行22个分册），对提高我国色谱技术人员的业务水平以及色谱仪器制造和应用行业的发展起了积极的作用。现在，10多年又过去了，色谱技术又有了长足的发展，在分析检测一线工作的技术人员迫切需要了解和应用新的技术，以提高分析测试水平，促进国民经济的发展。作为对这种社会需求的回应，化学工业出版社和丛书作者决定对第二版丛书的部分分册进行修订，这是完全必要的，也是非常有意义的。应出版社和丛书主编的邀请，我很乐意为丛书第三版作序。

根据色谱技术的发展现状和读者的实际需求，丛书第三版与第二版相比，作了较大的修订，增加了不少新的内容，反映了色谱的发展现状。第三版包含了15个分册，分别是：傅若农的《色谱分析概论》，刘虎威的《气相色谱方法及应用》，陈义的《毛细管电泳技术及应用》，于世林的《高效液相色谱方法及应用》，牟世芬等的《离子色谱方法及应用》，赵睿、刘国詮等的《色谱柱技术》，白玉、汪正范等的《色谱联用技术》，李攻科、汪正范等的《样品制备方法及应用》，袁黎明等的《色谱手性分离技术及应用》，欧阳津等的《液相色谱检测方法》，张庆合等的《色谱仪器维护与故障排除》，蔡亚岐、江桂斌等的《色谱在环境分析中的应用》，吴永宁等的《色谱在食品安全分析中的应用》，胡昌勤等的《色谱在药物分析中的应用》，宋德伟等的《色谱在生命科学中的应用》。这些分册涵盖了色谱的主要技术和主要应用领域。特别是第三版中《样品制备方法及应用》是重新组织编写的，这也反映了随着仪器自动化的日臻完善，

色谱分析对样品制备的要求越来越高，而样品制备也越来越成为色谱分析、乃至整个分析化学方法的关键步骤。此外，《色谱手性分离技术及应用》的出版也使得这套丛书更为全面。总之，这套丛书的新老作者都是长期耕耘在色谱分析领域的专家学者，书中融入了他们广博的知识和丰富的经验，相信对于读者，特别是色谱分析行业的年轻工作者以及研究生会有很好的参考价值。

感谢丛书作者们的出色工作，感谢出版社编辑们的辛勤劳动，感谢安捷伦科技有限公司的再次热情赞助！中国拥有世界上最大的色谱市场和人数最多的色谱工作者，我们正在由色谱大国变成色谱强国。希望第三版丛书继续受到读者的欢迎，也祝福中国的色谱事业不断发展。是为序。

A handwritten signature in black ink, appearing to read '张倩' (Zhang Qian), written in a cursive style.

2017年12月于大连

本书第2版自2005年出版至今经9次重印,已销售12000余册。在过去的十多年中,高效液相色谱技术已获重大的进展,为了充分反映高效液相色谱方法和技术的现状,特对本书进行修订。

高效液相色谱(HPLC)是有机定量分析的重要手段,当前在生命科学、临床医学、药物研制、食品安全、环境监测等多个领域已获广泛的应用。由于高效液相色谱方法总在科技发展的关键时刻,能够有效地解决所面临的复杂样品的分析任务,从而受到科学研究、工农业产品生产、环境保护和质量保证等诸多方面的青睐。

近十年来,高效液相色谱方法和技术在以下几个方面获得重要进展:

(1)在液相色谱固定相研制上,继全多孔硅胶微粒(TPP)固定相之后,迅速研制出表面多孔硅胶微粒(SPP)固定相。

亚-2 $\mu\text{m}$  TPP(1.7 $\mu\text{m}$ )和亚-2 $\mu\text{m}$  SPP(1.3~1.7 $\mu\text{m}$ )的出现,使色谱柱的柱效由200000塔板/m提升到500000塔板/m,为超高效液相色谱(UPLC)或超高压液相色谱(UHPLC)的快速发展奠定了坚实的基础,也为解决复杂样品的分析任务开辟了新思路。

(2)在固定相研制上的另一个重要进展是第二代整体柱的出现,第二代聚合物整体柱不仅可以分离大分子,也解决了对小分子的分析问题。第二代,特别是第三代硅胶整体柱的出现可用于多种样品的分析。今后,随无机-有机杂化材料整体柱的出现,它在提高柱效(现已超过100000塔板/m)和选择性方面,仍有潜在发展的能力。

(3)2009年以后,在分离方法上,亲水作用色谱获得重要的发展,解决了对强极性、易电离化合物,特别是对极性小分子的分析问题,对制药工业的发展起到重要的推动作用。

(4)在检测器研制方面,迅速发展和推广了蒸发光散射检测器(ELSD)、带电荷气溶胶检测器(CAD)、多角度光散射检测器(MALSD)

的使用，并且快速普及了液相色谱-质谱（LC-MS）和液相色谱-串联质谱（LC-MS/MS）联用技术，为解决组成复杂样品的分析提供了强有力的检测手段。

（5）随着超高压液相色谱（UHPLC）技术的快速普及，高效液相色谱仪的压力上限逐步提高，已由 6000psi(400bar)→9000psi(600bar)→15000psi(1050bar)→19000psi(1400bar)→22000psi(1500bar)；色谱仪体系的柱外效应提供的方差也大大减小，已由  $100\mu\text{L}^2$ → $50\mu\text{L}^2$ → $10\mu\text{L}^2$ ，高效液相色谱仪器的制作工艺已发生质的变化；分离性能优良、操作简便的超高压液相色谱仪已逐步取代经典的高效液相色谱仪器，由于流动相消耗的降低，节约了分析成本，分析工作的效率大大提高。

（6）由于高效液相色谱工作者智慧的充分发挥和勇于创新的精神，在色谱理论的应用中，发展了用动力学图示法来评价液相色谱柱的分离性能；创建了剪切驱动色谱分离方法；完善了微型芯片液相色谱实验技术，提出了与超临界流体色谱（SFC）相组合的超高效合相色谱（UPC<sup>2</sup>）方法。

高效液相色谱领域的上述重要进展，大大开拓了高效液相色谱方法和技术的应用，并解决了当代在有机分析实践中遇到的多种难题。

本书第三版增补了与上述重要进展相对应的内容，全书共分十二章，内容变动如下：

（1）重新撰写了第一章绪论、第二章高效液相色谱仪器简介、第三章液固色谱法和液液色谱法、第四章正相和反相键合相色谱法。

（2）增加了第五章亲水作用键合相色谱法、第六章疏水作用键合相色谱法和第十一章高效液相色谱新技术进展。

（3）部分修订了第七章梯度洗脱、第八章高效液相色谱法的基本理论、第九章微柱液相色谱法、第十章二维高效液相色谱法和第十二章建立高效液相色谱分析方法的一般步骤和实验技术。

（4）由于全书篇幅所限，删除了“体积排阻色谱法”和“高效液相色谱分离条件的优化”两章。

本次修订笔者参阅了相关文献资料，尤其是在“LC-GC North Am”



或“LC-GC Europe”杂志上，由 Ronald E Majors、John Dolan 和 Michael W Dong 撰写的文献综述，对笔者有很大的启发和帮助。

笔者希望本书第三版能够帮助刚刚进入高效液相色谱领域的“新手”，使其在较短的时间了解高效液相色谱领域的现状，并能在掌握高效液相色谱分离原理的基础上，去解决科研和工业生产中的实际问题，在了解高效液相色谱新进展的过程中开阔思路，勇于创新，为高效液相色谱方法和技术的未来发展，贡献自己的智慧和力量。

本书承蒙丛书副主编刘虎威教授审阅，责任编辑也为本书顺利出版做了大量工作，特此致谢。

本次修订得到 Agilent 公司的大力支持，应用支持部张之旭经理、李浪工程师提供了大量仪器说明书资料，Thermo Fisher Science 公司商务经理王国强提供了多种仪器说明书，Waters 公司提供了合相色谱技术资料，特此表示感谢，上述各种资料对本书的修订提供了有力的帮助。

鉴于笔者水平所限，本书不妥之处，欢迎读者指教。

北京化工大学 于世林

2018年8月于北京

“高效液相色谱方法及应用”系“色谱技术丛书”之一。本书在简介高效液相色谱仪的基础上，系统地介绍了高效液相色谱法中常用的液固色谱法、液液色谱法、键合相色谱法、亲和色谱法和体积排阻色谱法。在各种方法中重点介绍了固定相、流动相的构成以及通过调节流动相的组成（包括梯度洗脱）、添加改性剂以调节色谱分离选择性的方法。在高效液相色谱法的基本理论方面，扼要介绍了速率理论和诺克斯方程式以及对色谱柱操作参数进行优化的目的与图示表达方法，并强调了无限直径效应和柱外效应对高效液相色谱分离效能的影响。在高效液相色谱分离条件的优化方面，重点介绍了优化标准及色谱响应（优化）函数，以及用化学计量学进行分离条件优化的各种常用方法。为了帮助读者切实掌握用高效液相色谱方法去解决实际问题的能力，阐述了建立高效液相色谱方法的一般步骤。

全书最后介绍了高效液相色谱方法在生物化学和生物工程、医药研究、食品分析、环境监测、精细化工等领域的应用实例，以扩展读者的知识面，并增强感性认识。

由于本丛书系列另有《离子色谱方法及应用》《色谱定性与定量》和《色谱分析样品处理》等论著，因此本书中对离子色谱法、定性和定量分析方法、样品处理方法，未予介绍，望读者见谅。

鉴于作者的知识水平，不妥之处，欢迎读者的指教。

本书编写过程获得中国惠普公司王小芳女士、程广辉先生、张之旭工程师的热情帮助，他们提供的高效液相色谱在食品分析和环境分析中的应用及高效液相色谱硬件资料，为本书第十章和第二章的编写，提供了有力的支持。本书全部手稿承蒙本丛书主编傅若农教授的审阅，特此致谢。

于世林

1999年7月

本书自 2000 年面世以来,受到广大读者的关爱,曾经 5 次重印,销售达 1.8 万册,在广大读者需求的驱动下,在经历近 5 年后,修订再版。

本书第二版在保持第一版编写体系的前提下,增加了梯度洗脱、微柱液相色谱法和二维高效液相色谱法 3 章,原书亲和色谱法一章,因拟另以单册出版,故在此版书中未予列入。另因篇幅所限,并因第二版从书中增加了色谱在生命科学、医药、食品、环境等领域应用的专著,因此原书高效液相色谱法的分析应用一章,也未列入。

为了反映高效液相色谱领域在基本理论、新技术、新方法方面的进展,本次修订增添以下内容。

在绪论和仪器部分,对高效液相色谱方法发展过程作了简介,加强了对新型高压输液泵、保护柱、蒸发光散射检测器及当前常用的高效液相色谱仪的介绍。

在液固色谱、液液色谱和键合相色谱部分,增加了对新型固定相、流动相的介绍(如聚合物包覆硅胶、具有空间保护和静电屏蔽功能的键合固定相、整体色谱柱、超热水流动相等)。还简介了溶质在二元溶剂体系的色谱保留规律和化学键合固定相的分类方法。

在掌握表征溶剂特性参数和通过改变溶剂组成来提高分离选择性的基础上,梯度洗脱一章介绍了影响梯度洗脱的各种因素[如梯度洗脱时间、 $\phi_B(\%)$ 的变化范围、梯度陡度等]、优化梯度洗脱方法和梯度洗脱的图示方法。其若与高效液相色谱分离条件的优化方法相结合,并使用 DryLab 等计算机程序软件,可大大加速高效液相分析方法的建立过程。

在高效液相色谱法基本理论一章,增加了对超高效液相色谱法的介绍。

在微柱液相色谱法部分介绍了基本理论、仪器装置、微柱制备方法、

纳米液相色谱和超高压液相色谱新技术。

在二维高效液相色谱法部分阐述了描述分离体系效能参数，二维液相色谱的技术功能及具有中心切割或全二维液相色谱的通用流路，及在蛋白质组学研究中的应用。

在建立高效液相色谱分析方法的一般步骤中，增加了对溶剂纯化，色谱柱装填方法，色谱柱的平衡、保护和再生，梯度洗脱，色谱柱前、柱后衍生化检测，以及样品处理等实验技术的介绍。

作者希望再版新书，既能帮助读者依据基本原理去解决实际分析问题，又能使读者了解高效液相色谱领域新方法、新技术的发展现状，以满足不同读者的需求。各章列出必要的原始文献，供读者进行深入探求。

本书承蒙本丛书主编傅若农教授审阅，并提出中肯的修改意见。责任编辑为本书出版做了大量工作，作者特此致谢。

本次修订中 Waters 公司应用部经理李浪先生提供了 Waters 公司最新产品的样本和相关资料，对本书第 2、7、9、10 章的修订提供了有力的支持。

鉴于作者水平，本书不妥之处欢迎读者指教。

于世林

2004 年 10 月

于北京化工大学

## 第一章 绪论

◀◀◀◀◀◀

第一节 高效液相色谱方法简介	2
一、液相色谱技术的初现——茨维特的经典实验	2
二、高效液相色谱方法的显现	3
三、高效液相色谱方法的发展现状	6
第二节 高效液相色谱方法的特点	13
一、与经典液相(柱)色谱法比较	13
二、与气相色谱法比较	14
三、高效液相色谱法的特点	15
第三节 高效液相色谱方法的分类	15
一、按溶质在两相分离过程的物理化学原理分类	15
二、按溶质在色谱柱洗脱的动力学过程分类	17
第四节 高效液相色谱法的应用范围和局限性	19
一、应用范围	19
二、方法的局限性	19
参考文献	20

## 第二章 高效液相色谱仪简介

◀◀◀◀◀◀

第一节 流动相及储液罐	23
一、储液罐	23
二、流动相脱气	24
第二节 高压输液泵及梯度洗脱装置	26
一、高压输液泵	26
二、输液系统的辅助设备	39
三、梯度洗脱装置	41
第三节 进样装置	44
一、停流进样装置	44
二、六通阀进样装置	45
三、自动进样器	47

第四节 色谱柱	48
一、柱材料及规格	48
二、柱填料和柱寿命	49
三、保护柱	50
四、柱连接方式	51
五、柱温控制	51
第五节 检测器	52
一、检测器的分类和响应特性	52
二、紫外吸收检测器	54
三、折光指数检测器	60
四、电导检测器	62
五、荧光检测器	63
六、蒸发光散射检测器	64
七、带电荷气溶胶检测器	68
八、多角度光散射检测器	70
九、质谱检测器	72
第六节 色谱数据处理装置	81
一、手持控制器	81
二、化学工作站	81
第七节 高效液相色谱仪器的发展趋势	82
一、从 1969 年到 1992 年	82
二、从 1992 年到 2002 年	83
三、从 2002 年到 2012 年	83
四、2012 年到现在	84
参考文献	88

### 第三章 液固色谱法和液液色谱法



第一节 分离原理	90
一、吸附系数	90
二、分配系数	91
第二节 固定相	92
一、液固色谱固定相	92
二、液液色谱固定相	106
第三节 流动相	107
一、表征溶剂特性的重要参数	109
二、液固和液液色谱的流动相	116
第四节 二元溶剂体系中液固和液液色谱的保留规律	117

一、溶质保留值的基本方程式	117
二、液固色谱的保留值方程式	118
三、液液色谱的保留值方程式	118
参考文献	119

## 第四章 正相和反相键合相色谱法

◀◀◀◀◀◀

第一节 分离原理	120
一、正相键合相色谱法的分离原理	121
二、反相键合相色谱法的分离原理	121
第二节 固定相	123
一、键合固定相的制备及分类	123
二、键合固定相的性质	129
三、使用键合固定相应注意的问题	131
第三节 流动相	133
一、溶剂的选择性分组	133
二、在键合相色谱分析中选择流动相的一般原则	134
三、改善色谱分离选择性的方法	138
四、多元混合溶剂的多重选择性	140
五、由溶剂选择性三角形描述混合溶剂组成的特性	143
六、溶质保留值随溶剂极性变化的一般保留规律	143
七、用线性溶剂化自由能关系 (LSER) 来表征反相液相色谱中溶质的保留值方程式	144
第四节 新型高效化学键合固定相	146
一、新型单齿键合固定相	146
二、新型双齿键合固定相	148
三、杂化有机/无机粒子材料	149
四、氟化烷基和苯基固定相	152
五、反相/离子交换混合模式固定相	154
第五节 化学键合固定相分类方法简介	157
一、Tanaka 分类方法	158
二、Tanaka 分类表征方法	160
三、扩展 Tanaka 分类方法	161
第六节 离子对色谱法	166
一、分离原理	166
二、固定相、流动相和对 (反) 离子	167
三、影响离子对色谱分离选择性的因素	168
参考文献	171

## 第五章 亲水作用键合相色谱法

◀◀◀◀◀◀

第一节 亲水作用液相色谱的分离机理	176
一、分子极性	176
二、分离机理	176
第二节 固定相	178
一、固定相的分类	178
二、固定相保留特性及选择性的评价标准	188
第三节 流动相	197
一、流动相的组成	197
二、流动相对保留值和选择性的影响	197
三、流动相各种影响因素的图示方法	205
第四节 静电排斥亲水作用液相色谱	207
参考文献	209

## 第六章 疏水作用键合相色谱法

◀◀◀◀◀◀

第一节 疏水作用液相色谱的分离原理	211
一、蛋白质结构特点	212
二、疏水作用机理	212
三、两亲作用色谱	213
第二节 固定相	214
一、固定相载体	214
二、疏水配位体	215
第三节 流动相	215
一、流动相的组成	215
二、影响 HIC 分离选择性的因素	216
第四节 疏水作用色谱的应用	217
一、疏水作用色谱的操作过程	217
二、蛋白质混合物的分离	218
参考文献	219

## 第七章 梯度洗脱

◀◀◀◀◀◀

第一节 基本原理	221
一、等度洗脱	221
二、梯度洗脱	222
第二节 影响梯度洗脱的各种因素	224
一、梯度洗脱时间 ( $t_G$ ) 对分离的影响	224



二、梯度陡度 ( $T$ ) 对保留值的影响	224
三、强洗脱溶剂组分 $B$ 浓度变化范围 ( $\Delta\varphi$ ) 的影响	225
四、柱温变化对保留值的影响	227
五、梯度洗脱程序曲线形状的影响	228
六、流动相流速 ( $F$ ) 对梯度洗脱的影响	229
七、色谱柱死体积 ( $V_m$ ) 对梯度洗脱时间 ( $t_G$ ) 的影响	231
八、色谱系统的滞留体积 ( $V_D$ ) 对梯度洗脱时间 ( $t_G$ ) 的影响	231
第三节 优化梯度洗脱的方法	232
一、建立梯度洗脱方法的一般步骤	232
二、梯度洗脱中的实验条件	234
第四节 梯度洗脱的图示方法	237
一、二元溶剂梯度洗脱	237
二、三元溶剂梯度洗脱	238
三、四元溶剂梯度洗脱	240
四、用极坐标和球面坐标描述梯度洗脱	241
参考文献	243

## 第八章 高效液相色谱法的基本理论

◀◀◀◀◀◀

第一节 表征液相色谱柱填充性能的重要参数	245
一、总孔率	246
二、柱压力降	246
三、柱渗透率	247
第二节 高效液相色谱的速率理论	247
一、影响色谱峰形扩展的各种因素	248
二、范第姆特方程式的表达及图示	251
第三节 诺克斯方程式	252
一、描述色谱柱性能的折合参数	252
二、诺克斯方程式	253
三、诺克斯方程式在表面多孔粒子 (SPP) 填充色谱柱中的应用	255
第四节 色谱柱的操作参数、“无限直径”效应和柱外效应	257
一、三个柱操作参数的表达式	257
二、“无限直径”效应	257
三、柱外效应	259
第五节 分离阻抗和动力学图	261
一、分离阻抗	261
二、动力学图	262
第六节 超高效液相色谱	269