

化学工业出版社

色谱技术丛书

液相色谱检测方法

张晓彤 云自厚 编著



色谱技术丛书

液相色谱检测方法

张晓彤 云自厚 编著

化学工业出版社

·北京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

液相色谱检测方法/张晓彤, 云自厚编著. —北京:
化学工业出版社, 2000.5
(色谱技术丛书/傅若农主编)
ISBN 7-5025-2782-6

I. 液… II. ①张… ②云… III. 液相色谱仪
IV. TH833

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 03229 号

色谱技术丛书

液相色谱检测方法

张晓彤 云自厚 编著

责任编辑: 任惠敏

责任校对: 陈 静

封面设计: 于 兵

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

http: // www.cip.com.cn

新华书店北京发行所经销

化学工业出版社印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 11 字数 285 千字

2000 年 5 月第 1 版 2000 年 5 月北京第 1 次印刷

印 数: 1—4000

ISBN 7-5025-2782-6/TQ·1225

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

色谱技术丛书

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 | | | |
| 《色谱定性与定量》 | 汪正范 | | | |
| 《气相色谱检测方法》 | 吴烈钧 | | | |
| 《液相色谱检测方法》 | 张晓彤 | 云自厚 | | |
| 《气相色谱方法及应用》 | 刘虎威 | | | |
| 《高效液相色谱方法及应用》 | 于世林 | | | |
| 《平面色谱方法及应用》 | 何丽一 | | | |
| 《离子色谱方法及应用》 | 牟世芬 | 刘克纳 | | |
| 《毛细管电泳技术及应用》 | 陈义 | | | |
| 《色谱分析样品处理》 | 王立 | | | |
| 《色谱联用技术》 | 汪正范 | 杨树民 | 吴侔天 | 岳卫华 |
| 《色谱柱技术》 | 刘国铨 | 余兆楼 | | |
| 《色谱仪器维护与故障排除》 | 吴方迪 | | | |

序

色谱作为一种分离技术与方法，自本世纪初发表第一篇论文算起，已有 100 年的历史，虽然在前 30 多年间这种方法未受到应有的重视，但自 40 年代以后，逐渐得到发展，而且其势头越来越猛，从技术到理论，到各种分离模式，以及在各个科学领域内的应用，得到了突飞猛进的发展，现在已经成为分析化学学科中的一个重要分支。同时为许多重要学科的发展作出了极大的贡献。在人类进入 21 世纪之际，人们面临着在信息科学、生命科学、材料科学、环境科学等领域的快速发展的挑战，在这些领域人才的需求成为国家高度发展的至关重要的因素。而色谱技术是生命科学、材料科学、环境科学必不可少的手段和工具。根据最近的统计在全世界各类分析仪器中气相色谱仪和液相色谱仪的营销总额占 25% ~ 30%。2000 年对各类分析仪器的需求量也以液相色谱仪最多。可以毫不夸张地说，如果没有色谱技术的应用，自然科学和生命科学能发展到今天的这个样子是很难想象的。

有关色谱的各种专著国内外已经出版了许多种，其中多是针对色谱专业人员而写的专著，而缺少一套系统的比较全面的介绍当代色谱技术的丛书，供广大的工厂企业中从事色谱分析的初中级技术人员和科研院所的科技人员，大专院校的研究生，甚至管理人员及有关领导学习参考的书籍。为此化工出版社提议，由北京理化分析测试学会组织编写了这套‘简明扼要，深入浅出，通俗易懂，新颖实用’的色谱技术丛书。这套书以傅若农教授为主编，汪正范教授和刘虎威副教授作副主编。为联系方便，主要请在京的专家来编写，并自 1998 年初开始运作。从方便读者学习角度出发，将色谱技术的主要内容分为 13 册。分别为：傅若农之《色谱分析概论》，刘国詮、余兆楼等之《色谱柱技术》，陈义之《毛细管电泳技术及应用》，于世林之《高效

液相色谱方法及应用》，刘虎威之《气相色谱方法及应用》，云自厚、张晓彤之《液相色谱检测方法》，吴烈均之《气相色谱检测方法》，汪正范之《色谱定性与定量》，汪正范等之《色谱联用技术》，牟世芬、刘克纳之《离子色谱方法及应用》，何丽一之《平面色谱方法及应用》，王立之《色谱分析样品处理》，吴方迪之《色谱仪器维护与故障排除》。这些编著者多是我国目前在教学与科研第一线为色谱科学努力奋进的中青年专家，在书中都反映了色谱领域的基本知识、基本方法和他们自己的宝贵经验以及有关领域的最新成果。这套丛书将给初学色谱的年轻科技工作者提供较完整的学习参考书，也为大中专学生提供一套有用的教学参考书。还应该提出的是，由于得到了安捷伦科技有限（原中国惠普）公司的赞助，这套书的出版才能顺利进行。值此书即将付梓之际，特书此以为序。

周同惠

1999年9月9日

前 言

高效液相色谱是重要的现代分析手段之一。它具有分离效率高、分析速度快和应用范围广的特点，尤其适用于目前最活跃的研究领域之一——生命科学中的多肽、蛋白质及核酸等生物大分子的分离分析及制备提纯，是分析化学家和生物化学家解决各种实际分析和分离课题必不可少的工具。检测器是液相色谱仪的三大关键部件之一，在液相色谱系统中起着非常重要的作用，因此在实际应用中特别需要选择合适的检测器和检测方法。

目前国内已有一批优秀的色谱法专著和参考书，但还没有全面介绍液相色谱检测器和检测方法的教材及参考书，给液相色谱工作者带来了困难。为了促进液相色谱技术的普及、推广和应用，我们编写了《液相色谱检测方法》一书，为读者提供对液相色谱检测器的基本认识和操作，了解检测技术的近期发展情况。

本书系统地叙述了高效液相色谱检测器的基本原理、仪器构造及应用。全书共分七章，第一章概述，第二章紫外-可见光检测器，第三章荧光检测器，第四章示差折光检测器，第五章电化学检测器，第六章其它类型液相色谱检测器，第七章液相色谱检测技术。

本书承傅若农先生审阅，另外在该书的编写中参阅了许多专家的著作，在此一并表示感谢。

由于编者学识水平和经验有限，书中缺点和错误在所难免，恳请读者批评指正。

编者

1999. 11

目 录

第一章 液相色谱检测器概述	1
第一节 检测器的发展简史	1
第二节 检测器的分类	2
一、按检测器性质或应用范围分类	3
二、按测量信号性质分类	4
三、按测量原理分类	5
四、其它分类	5
第三节 检测器的性能指标	6
一、噪声和漂移	6
二、灵敏度	9
三、检测限	12
四、线性范围	13
五、色谱系统的最小检测量和最低检测浓度	14
六、影响色谱峰扩展的因素	16
七、其它参数	17
参考文献	18
第二章 紫外-可见光检测器	19
第一节 工作原理和主要性能	19
一、工作原理	19
二、检测器的性能	24
(一) 噪声和漂移	24
(二) 线性范围	26
(三) 温度影响	27
(四) 其它	27
第二节 仪器结构	28
一、分类	28
二、结构	30

(一) 固定波长紫外-可见光检测器	30
(二) 可变波长紫外-可见光检测器	37
第三节 光电二极管阵列检测器	45
一、工作原理和仪器结构	47
二、主要特点和功能	52
(一) 色谱峰的准确定性	53
(二) 峰纯度检验	54
(三) 峰抑制	56
(四) 宽谱带检测	57
(五) 选择最佳波长	57
三、主要应用	58
(一) 在药物学和毒物学中的应用	59
(二) 在生物学中的应用	61
(三) 在环境科学中的应用	62
(四) 在其它方面的应用	64
参考文献	66
第三章 荧光检测器	67
第一节 工作原理和仪器结构	67
一、工作原理	67
(一) 荧光的产生	67
(二) 定量基础	67
(三) 激发光谱和发射光谱	69
二、仪器结构	70
(一) 基本结构	70
(二) 常用的荧光检测器	78
三、荧光化合物的检测	80
第二节 荧光检测器的特点和适用范围	82
一、荧光检测器的特点	82
二、荧光化合物及影响荧光强度的因素	84
(一) 荧光化合物	84
(二) 影响荧光强度的因素	87
三、荧光检测器在环境及生物科学等方面的应用	87
第三节 激光诱导荧光检测器	91

一、激光诱导荧光检测器的组成	91
(一) 激光器	91
(二) 光学系统	93
(三) 检测池	94
(四) 光检测元器件	97
二、双光子激发荧光检测技术	98
第四节 液相色谱的长寿命发光检测	101
一、磷光检测法	101
二、镧系离子溶液发光检测法	104
参考文献	108
第四章 示差折光检测器	110
第一节 工作原理	110
一、示差折光检测器的工作原理	110
二、示差折光检测器的特点	112
三、示差折光检测器对色谱系统的稳定要求	114
四、示差折光检测器的校正	116
第二节 仪器结构	116
一、折射式——偏转式示差折光检测器	116
二、反射式示差折光检测器——弗列斯涅耳折光仪	119
三、干涉式示差折光检测器	123
四、克里斯琴效应示差折光检测法	126
第三节 无标准定量法	130
参考文献	131
第五章 电化学检测器	133
第一节 安培检测器	133
一、工作原理	135
(一) 基本工作原理	135
(二) 扩散电流	136
二、仪器结构	137
(一) 电极	138
(二) 电化学检测池	141
三、测量技术	147
四、对流动相的要求	150

五、安培检测器的应用和发展	150
第二节 电导检测器	153
一、基本原理和仪器结构	153
(一) 基本概念	153
(二) 电导池的导电过程	155
(三) 测量电路	156
(四) 电导检测器	157
二、电导检测器的发展、应用和使用注意事项	158
(一) 发展及应用	158
(二) 使用注意事项	160
第三节 其它电化学检测器	161
一、库仑检测器类	161
(一) 库仑检测器	161
(二) 库仑电极阵列检测器	162
二、电势检测器	164
(一) 离子选择性电极	164
(二) 应用	165
三、极谱检测器	166
四、介电常数检测器	167
五、电化学检测器的应用和展望	168
参考文献	169
第六章 其它类型液相色谱检测器	170
第一节 蒸发光散射检测器	170
一、工作原理和仪器结构	170
二、蒸发光散射检测器的优点及限制	174
三、应用	178
第二节 化学发光检测器	179
一、化学发光法的检测原理和仪器结构	180
二、化学发光反应及应用	182
(一) 过氧化草酸酯化学发光反应	182
(二) 鲁米诺化学发光反应	185
(三) 光泽精化学发光反应	187
(四) 生物发光反应	189

(五) 电致化学发光反应	190
(六) 其它化学发光反应	191
第三节 手性检测器	192
一、旋光检测器	194
(一) 工作原理	194
(二) 基本结构	197
(三) 应用	197
二、圆二色检测器	202
(一) 检测原理	202
(二) 基本结构	204
(三) 应用与发展	205
第四节 分子量检测器	211
一、间接法检测器	211
二、直接法检测器	213
(一) 自动粘度计检测器	213
(二) 小角度激光散射检测器	216
(三) 激光光散射检测器的发展	219
第五节 放射性检测器	220
一、检测原理	220
二、离线和在线检测	222
三、均相和非均相计数系统	222
四、特点和发展	224
五、应用	225
第六节 热学性质检测器	226
一、光声检测器 (PAD)	226
二、热透镜检测器 (TL)	229
三、光热偏转检测器 (PTD)	234
第七节 光电导检测器	236
第八节 磁旋光检测器	237
参考文献	239
第七章 液相色谱检测技术	241
第一节 液相色谱检测器的联用	241
一、串联	242

二、并联	244
三、一体化设计	245
(一) 一体化检测器	245
(二) 微型池一体化检测器	252
第二节 检测器的联用技术	254
一、液相色谱仪与质谱仪的联用	255
(一) LC-MS 联机技术	256
(二) LC-MS 能够提供的质谱信息	259
(三) LC-MS 联用的应用	260
二、液相色谱仪与其它仪器的联用	265
(一) 与红外光谱仪的联用	266
(二) 与核磁共振的联用	269
(三) 与原子吸收、原子发射光谱仪的联用	270
(四) 与电子自旋共振光谱仪的联用	275
(五) 与表面增强的拉曼光谱仪的联用	278
第三节 气相色谱检测器在液相色谱检测中的应用	279
一、液相色谱仪和气相色谱检测器的连接	280
二、氢火焰离子化检测器的应用	281
三、热离子化检测器的应用	283
(一) 火焰热离子化检测器	283
(二) 无火焰热离子化检测器	284
四、火焰光度检测器的应用	286
五、光离子化检测器的应用	286
六、电子捕获检测器的应用	289
七、气相化学发光检测器的应用	292
八、总结与展望	294
第四节 间接光度液相色谱检测法	295
一、检测原理	296
二、应用	297
(一) 含芳基的胺类及季铵盐	297
(二) 芳香磺酸盐	298
(三) 金属络离子	301
第五节 化学衍生液相色谱法	302

一、衍生反应	304
(一) 紫外衍生反应	304
(二) 荧光衍生反应	310
(三) 电化学衍生反应	315
(四) 手性衍生法	319
二、柱后衍生技术	325
三、固定化酶反应器	327
(一) 固定化方法	327
(二) 固定化酶反应器在液相色谱中的应用	328
参考文献	329
符号表	332

第一章 液相色谱检测器概述

第一节 检测器的发展简史

色谱法是近代分析化学中发展最快、应用最广的分离分析技术,在化学、生物学等领域发挥着越来越重要的作用,并正在发展成为一门新兴学科。现代色谱分析将分离和连续测定结合,也可以浓缩、分离、测定联用,对复杂体系中组分、价态、化学性质相近的元素和化合物进行分析。色谱在制备分离及提纯方面也是一种有力手段。20世纪70年代以来的现代色谱时期是以高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)为代表。在已知化合物中70%以上为不挥发性化合物,某些化合物通过衍生技术虽然能提高挥发性,然后用气相色谱分析,但却不如液相色谱直接简便。高效液相色谱具有分离效率高、分析速度快和应用范围广泛的特点,特别适合于高沸点、大分子、强极性和热稳定性差的化合物的分离分析。目前,高效液相色谱已成为化学、生化、医学、工业、农业、环保、商检和法检等学科领域中重要的分离分析技术,是分析化学家和生物化学家手中用以解决他们面临的各种实际分析和分离课题必不可缺的工具之一。液相色谱检测器(liquid chromatography detector)作为液相色谱仪的核心部件之一,在液相色谱系统中起着非常重要的作用。

具体地说,液相色谱检测器是用于连续监测被色谱系统分离后的柱流出物的组成和含量变化的装置。液相色谱检测器是液相色谱仪的“眼睛”,它的作用是将色谱柱流出物中样品组成和含量变化转化为可供检测的信号,完成定性定量及判断分离情况的任务。因此,液相色谱检测器是一种与色谱柱联用的信号接收和信号转换装置。如只在色谱柱中进行分离,却不进行检测,就达不到分析的目的。检测器性能的好坏直接关系着定性定量分析结果的可靠性和准确性。在1906年首

创的色谱分离实验中, M. Tswett 观察到在碳酸钙上混合色素被分成不同色带的现象, 因此, 人眼就是最初的色谱检测器。在现代薄层色谱分离中, 人眼仍是广泛应用的色谱检测器之一。但是, 人眼作为检测器有着严重的缺陷: 大多数被测样品是无色的; 人眼不能做精确的定量分析。液相色谱检测器的最初发展是分别收集各组分的柱后流出液, 然后用光度计或滴定计测定。后来建立的色谱柱与柱后检测器的直接连接, 使在线分析成为现实。系统输出的信号随时在记录仪上记录下来, 得到了样品组分分离的色谱图。根据色谱峰的位置、形状和大小进行定性、定量分析及判断分离情况的优劣。色谱柱与检测器的连接, 对于液相色谱的发展起了很大的促进作用。

早期出现的紫外-可见光检测器和示差折光率检测器仍是目前应用最为广泛的检测器。示差折光率检测器是通用型检测器, 但灵敏度较低, 适用于对灵敏度要求不很高的分析; 紫外-可见光检测器有比较高的灵敏度, 但只能检出在仪器特定波长下有光吸收的化合物。近年来发展的光电二极管阵列检测器允许对柱流出物进行不停流的瞬间波长快速扫描, 通过微处理机控制, 获得光吸收、波长和时间的三维色谱-光谱图, 从而获得更多的定性和色谱峰纯度鉴定信息, 是一种比较理想的检测器。荧光检测器有较高的灵敏度, 一般说来可比紫外-可见光检测器高 10~1000 倍, 但有更专一的选择性。对于一些电活性物质, 电化学检测器是一类较好的选择性检测器, 例如对有机胺类化合物, 安培型电化学检测器的灵敏度可比紫外-可见光检测器高 2~3 个数量级。较常用的液相色谱检测器还有光散射检测器、化学反应检测器、手性检测器和放射性检测器等。光散射检测器是新兴的通用型检测器, 化学反应检测器、手性检测器和放射性检测器在各自应用领域中具有独特的优点。

在液相色谱检测器的发展过程中, 出现过三四十种检测器。例如: 移动丝式氢火焰离子化检测器、微吸附热检测器、反应热检测器、喷射碰撞检测器、隔膜检测器、压电石英晶体质量检测器、蒸气相渗透压计检测器、密度检测器等。它们中许多是为了满足特殊的需要或者扩大某些应用领域而研制的, 一直处于改进和试用阶段, 或者曾获得

重要的地位，但因用途专一等原因，逐渐被淘汰。

目前正在积极开发的液相色谱与质谱、傅里叶变换红外、核磁共振、电感耦合等离子体等联用技术的研究，以便从根本上解决色谱流出物的定性问题，其中有些技术已取得了很大的进展，并有商品仪器出售。

在近代分析测试仪器的发展中，高效液相色谱一直处于领先地位。但是，缺乏令人满意的检测器成为液相色谱发展的主要障碍。相比较而言，气相色谱的快速发展很大程度上得益于气相色谱检测器的发展。液相色谱检测器缓慢进展的主要原因是大多数条件下，流动相与样品的物理性质相似，在大量流动相中测定痕量组分有一定困难。解决这一困难可以采取以下三种办法：

- ① 在检测之前除去流动相；
- ② 对样品和流动相两者都具有的性质采用差分测量法；
- ③ 选择一项可测量的但为流动相所不具有的样品性质。

迄今还没有一种通用型高灵敏度的液相色谱检测器能与气相色谱中的氢火焰离子化检测器相比，即能完成所有各类物质的定性定量任务。因此，检测器是现代液相色谱中有待进一步发展的薄弱环节。发展通用、灵敏、更专一的检测器是今后探索的重要方向。

第二节 检测器的分类

液相色谱的检测器很多，分类方法也很多。

一、按检测器性质或应用范围分类

液相色谱检测器按其性质或应用范围可以分为总体性能检测器 (bulk property detector) 和溶质性能检测器 (solute property detector) 两大类。

总体性能检测器，是响应值取决于流出物 (包括样品和流动相) 某些物理性质的总的变化的检测器。属于该类检测器的有示差折光率检测器、介电常数检测器、电导检测器等。常常采用差示测量法，即将含有被测物质的流动相与不含被测物质的流动相的同一物理性质进行比较测量。因为总体性能检测器所测量的是任何液体都存在的物理量，