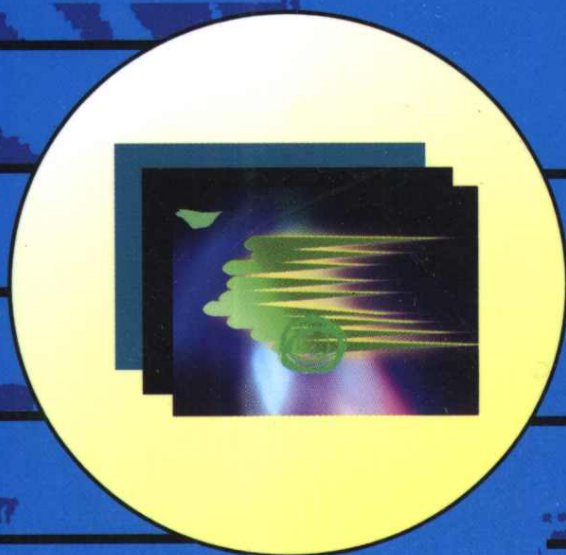


# 实用高效液相色谱法的建立

(第二版)



(美) L·R·森德尔 J·J·柯克兰 J·L·格莱吉克 著

张玉奎 王杰 张维冰 译

☐ 华 文 出 版 社

# 实用高效液相色谱法的建立

(第二版)

[美]L·R·森德尔 J·J·柯克兰 J·L·格莱吉克 著

张玉奎 王 杰 张维冰 译

华文出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

实用高效液相色谱法的建立/(美)森德尔(Snyder, L. R.)等著;张玉奎,王杰,张维冰译.—北京:华文出版社,2001.7

ISBN 7-5075-1184-7

I. 实… II. ①森… ②张… ③王… ④张…  
III. 液相色谱 IV. 0657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 040887 号

Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch

Practical HPLC method development 2nd.

Copyright 1997 by John Wiley & Sons, Inc.

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

本书中文简体字版由华文出版社独家获得,未经版权所有者书面许可,不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

版权所有 翻印必究

著作权合同登记号 图字 01—2001—2723

**华 文 出 版 社 出 版 发 行**

(邮编 100800 北京市西城区府右街 135 号)

网址: <http://www.hwcb.com>

电子信箱: [webmaster@hwcb.com](mailto:webmaster@hwcb.com)

电话 (010) 83086853 (010) 83086663

新华书店经销

河北望都县新华印刷厂印刷

850×1168 1/32 开本 25 印张 620 千字

2001 年 7 月第 1 版 2001 年 7 月第 1 次印刷

★

定价:98.00 元

## 译者的话

高效液相色谱法(HPLC)自20世纪60年代崛起,经过数十年的发展,在理论和实践等方面都日趋完善,应用范围已涉及医药、环保、生命科学、石油化工等几乎所有基础和应用研究领域。L. R. Snyder、J. J. Kirkland 和 J. L. Glajch 皆为当今国际色谱界造诣颇深的知名专家,他们积数十年从事色谱理论和实践研究的经验,合作完成了《实用高效液相色谱法的建立》这部专著。该书(第一版)于1988年出版,作者以当时的最新研究成果论述了HPLC方法建立的系统过程。9年后,他们在第一版的基础上,综合HPLC学科中取得的最新成就,对第一版中一些没有涉及或介绍不足的方面进行了详尽的补充和完善,出版了该书第二版。该书第一版中文版由王杰等翻译,并由科学出版社在国内出版后,深受广大读者的欢迎,已两次共印刷6000册。为了满足广大同仁的需要,我们再次将该书第二版翻译和整理,奉献给国内的同行和读者。

本书注重于实用方法的建立,系统地论述了液相色谱分析方法建立的基本策略和思路,无论对于从事液相色谱常规分析的工作人员,还是从事色谱理论和实践研究的科技工作者皆具有很高的参考价值。在内容的编排方面,本书与第一版有较大差别,由于增补较多,使篇幅增加了两倍有余。原书由多位作者合著,在写作风格及对于不同原理和方法的理解和观点等方面也存在些许差别。翻译过程中,我们在力求保持原书风格和特点的前提下,作了相应的规范化调整。对于原著中一些与国内色谱工作者的习惯表述方法有出入的基本概念和原理,我们也作了相应的替换。此外,

考虑到书中已给出了较详尽的标题目录，本书没有译出原书后的索引部分。

在我们将这本巨著介绍给国内读者的今天，原著已出版问世3年，但正像原作者在其序言中所陈述——“我们相信本书在未来的十年或二十年中，理应不会过时，并仍有很高的参考价值。”

衷心感谢安捷伦科技有限公司梁萍女士提供给我们原版样书。李彤博士审阅了翻译初稿，并提出了许多中肯的建议。参加本书翻译工作的还有平贵臣、丁洁、张博和杨沛，此外袁湘林、张庆合、尤进茂和梁振也参加了书稿的部分翻译和整理工作。由于我们的阅历和水平有限，本书的错误和不妥之处在所难免，恳请读者批评指正。

译者

2000年秋

## 作者序言

本书第一版出版于 1988 年,以当时的最佳研究资料论述了建立 HPLC 方法的系统过程。HPLC 方法的建立包含有数个基本步骤:样品预处理;样品峰检测;分离条件选择;定量和方法论证。该书前一版的重点放在选择分离条件上,而对其它的重要方面介绍较少。这次再版的目的是为了展现当代选择分离条件的卓识,更全面地对 HPLC 方法建立中的各个环节加以论述。新增加的内容包括:第 3 章介绍检测技术;第 4 章讨论样品的预处理方法;第 14 章探讨定量方法及第 15 章说明方法论证中的可能问题。

在本书第一版中,我们建议“最低限度地利用样品的结构信息,用一种通用方式,对大多数样品进行方法建立”。建议初始分离即采用优化条件,以该初始分离作为下一次实验的基础。然后用这二次分离的结果选择后续实验条件,并继续该过程直至分离结果可以被接受。这种系统的重复过程可称为“启蒙式试-凑法”。一般来说,采用这种方法能够解决典型实验室中遇到的大多数样品的分离分析问题。然而,重要的例外确有很多,尤其是对于生物样品、手性混合物以及样品制备的分离分析。自本书前一版问世以来,这些例外的相对重要性已越来越突出,因此在这一版中,我们对这些特殊应用将给予应有的重视(见第 11~13 章)。

全球有众多的研究小组从事 HPLC 分离科学的研究工作,近年来,已有大量的新的有价值的研究成果问世,使有关色谱柱或方法建立的知识更加丰富,而这些在本书第一版中均未涉及到。本书还着重加强了第一版中的不足部分,尽可能详细说明 HPLC 方法

建立中所涉及问题的各个方面,增补的内容取自 1987 年以来发表的重要文献资料。这些内容主要反映在第 5 ~ 10 章中对 HPLC 分离与色谱柱及其它分离条件的关系进行的论述。

对第一版的这些增补使本书的厚度增加了二倍有余。由于本版中各个部分之间相互关联,因此有必要对不同部分加以简单说明,以使不同层次的色谱工作者能够更有效地利用本书。第 1 章首先介绍对于实际未知样品进行方法建立的总体原则,因此应先通晓这些知识,再继续向下进行。第 2 章复习了 HPLC 分离的基础,以及色谱工作者在开始方法建立之前应该知晓的重要背景信息。经验不多的色谱工作者在深入阅读之前,首先学习第 2 章,并选读 3.1 和 3.2 节中有关 UV 检测部分将会有所裨益。通读第 1 ~ 3 章后,下面则需根据样品的性质有重点地选择精读某些部分。样品可分为以下几类:(a) 生物样品(多肽,蛋白质,低聚核苷酸等);(b) 对映体样品;(c) 需预处理的样品或(d) 其它样品。对于不能直接注入 HPLC 系统的样品,第 4 章全面论述了不同预处理过程的目的和手段。对生物样品感兴趣的读者有必要精读第 8 章(梯度洗脱)和第 11 章(生物样品)的内容。试图分离对映体化合物的工作者们则应精读第 12 章。

大多数样品既非生物样品也不是对映体化合物,所以先读讨论反相 HPLC 分离大多数样品的系统方法的第 9 章较为合适。这一章的内容与第一版相比,做了较大改动。我们相信这些新的方法建立的推荐模式比先前的那些模式更加有效和实用。

第 5 章综述了 HPLC 色谱柱的设计、规格、保养及故障排除方面的问题。如果采用第 9 章所述的方法建立不能达到满意的分离分析结果,第 6 ~ 8 章(中性样品和离子样品,梯度洗脱)中全面论述了通过改变第 9 章讨论问题之外的分离条件,以使样品能够分离更好。无论是由于样品复杂还是样品成分的化学相似性,使样品分离难于达到理想的结果,这些章节将非常有用。当需要用 HPLC

回收纯化样品时,可用第 13 章(制备 HPLC)中的信息按比例增加分析级别进行分离的某些参量,以完成制备相应量纯品的目的。不过,系统掌握了第 6~9 章的知识后,才会读好第 13 章。

第 10 章讨论了应用计算机程序辅助进行 HPLC 的方法建立模式。商用程序一般以少量的初始实验作基础,借助分离条件与结果的关系,通过计算机模拟预测不同条件下的分离结果。采用这种方法,使用者可利用计算机替代实验室中的那些既漫长又费力的工作,完成大多数方法建立实验。尽管计算机的这种应用开始于 70 年代后期,使用者却一直冷漠对待。不过,从 1990 年以来,这些程序的数量增加很快,今天它们已成为人们进行 HPLC 方法建立的重要工具。

我们在本书中进一步将计算机模拟方式应用于一些示例。在这些示例中,当一个或多个参数改变时,能够采用文献数据或实验室中的某些相关数据通过计算机模拟得到实验结果。由于计算机模拟记录的可靠性,这些示例可以与真实实验结果相当。

通过调整色谱条件达到可接受的分离结果后,还需完成一些附加工作方可使方法用于定量分析(第 14 章)。最后,建立的方法必须经论证表明可持续提供准确且精密的结果,并能为其它实验室和人员使用(第 15 章)。

本书的规模对那些以找出与特殊样品或问题有关资料的读者来说,确有一定难度。具体到某一问题,可能需到多个不同部分去寻找才能得到全部答案。为有助于资料查询,我们在书中相关部分给出了广泛的互见参考。其负面作用可能会打断为获得一般性知识与信息的读者阅读本书的连续性,鉴于此,我们建议除非对讨论的主题特别有兴趣,读者不必太依赖互见参考。我们还提供了一份全方位索引,这对有效地利用该书极为有利。

HPLC 技术问世已有 30 余年,已步入发展与应用的成熟时期,关于 HPLC 方法建立的研究目前已开始逐步趋向稳定。该领域



的许多先驱已转向了其它领域，比如毛细管电泳、超临界流体色谱、以及场流分级等新领域。因此，我们相信本书在未来的十年或二十年中，理应不会过时并仍有参考价值。同第一版一样，本书的撰稿人都是 HPLC 方法建立的热心实践者，书中的许多建议也都源于我们一些实验室的具体实验资料。

# 色谱常用符号与术语表

下面列出了本书中所有符号的意义及单位(除非无量纲)。如书中已有定义式,方程序号则在说明后的括号中标出。

常用术语	
A	吸收度(式 3.1,3.2);也作面积
ACN	乙腈 (acetonitrile)
B(%B)	二元流动相中的强溶剂(% v/v)
B, BH <sup>+</sup>	碱性溶质(第 7 章)
C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub>	烷基键合相的链长度(八烷基或十八烷基)
CD	环糊精 (cyclodextrin)
CV	变异系数(通常以%表示);式 15.3
$d_c$	色谱柱内径(cm)
$d_p$	颗粒直径( $\mu\text{m}$ )
DAD	二极管阵列检测器
EC	电化学(检测器)
F	流速(mL/min)
FL	荧光(检测器)
$G_s$	梯度斜度参数(式 8.2a); $k^* = 20/G_s$
$h'$	峰高
HP	惠普公司(Hewlett - Packard)
HPLC	高效液相色谱
ID	内径, $d_c$
IEC	离子交换色谱(ion - exchange chromatography)
IPC	离子对色谱(ion - paire chromatography)
$k$	保留因子(式 2.4)
$k^*$	梯度洗脱中, $k$ 的有效值或平均值(式 8.1)

---

$k_a, k_z$	色谱图中,首峰( $a$ )和末峰( $z$ )的 $k$ 值
$L$	色谱柱长度(cm)
LC-MS	液相色谱-质谱
$M$	分子量
MC	二氯甲烷 (methylene chloride)
MeOH	甲醇 (methanol)
MS	质谱
MTBE	甲基-叔-丁醚 (methyl-t-butyl ether)
$N$	色谱柱塔板数(式 2.82.8b)
$N'$	噪音(式 3.3,图 3.3)
NARP	非水反相 HPLC
NPC	正相色谱
$P$	色谱柱压力降(通常以 psi 表示)(式 2.9)
$pK_a$	酸或供质子碱的酸性常数
PAH	多环芳烃 (polyaromatic hydrocarbon)
$R_s$	分离度(式 2.1)
RI	折光指数
RPC	反相色谱
$S$	信号;式 3.3;图 3.3;以及由式 6.1 定义的参数
$t_D$	延迟或滞留时间(min,用于梯度洗脱中);等于 $V_D/F$
$t_G$	梯度时间(min)
$t_R$	保留时间(min)(图 2.2);等于 $t_0(1+k)$
$t_{Ra}, t_{Rz}$	色谱图中首峰( $a$ )与末峰( $z$ )的保留时间 $t_R$ (min)(图 8.6a)
$t_0$	色谱柱死时间(min)(式 2.5)
$t_1, t_2$	相邻谱峰 1 与谱峰 2 的保留时间(min)
TEA	三乙胺 (triethylamine)
TFA	三氟醋酸 (trifluoroacetic acid)
THF	四氢呋喃 (tetrahydrofuran)
UV	紫外光谱
$V_D$	延迟或滞留体积(mL);为梯度混合器与色谱柱入口之间的体积(包括混合器的体积)
$V_m$	色谱柱死体积(mL)(式 2.6); $V_m$ 为色谱柱内部的流动相体积,不包括附于固定相上的溶剂

---

$V_{\max}$	最大样品体积(mL)(式 13.1)
$V_s$	样品体积(mL)
$w$	样品重量(mg);也作半峰高处的峰宽(min)
$w_{\max}$	不超载色谱柱的最大进样量(mg)(式 2.17)
$w_s$	色谱柱的饱和容量(mg)(式 13.4)
$W$	峰底宽(min)(图 2.2)
$W_{\text{th}}$	大进样量对峰底宽的贡献(min)(式 13.2)
$W_0$	小进样量的峰底宽(min)(式 13.2)
$W_1, W_2$	相邻谱峰的峰底宽(min)
$W_{1/2}$	半峰高处的峰宽(min)(图 1.1)
$\alpha$	分离因子,等于 $k_2/k_1$ ,其中 $k_2$ 与 $k_1$ 分别为相邻谱峰 2 和谱峰 1 的 $k$ 值
$\Delta t_R$	$t_{R2} - t_{R1}$ (min)
$\Delta\%B$	梯度洗脱期间,%B 的变化
$\epsilon$	摩尔吸收系数
$\epsilon^\circ$	正相 HPLC 中溶剂或溶剂混合液的强度
$\eta$	粘度(cP)

#### 不常用符号

$A, B, C$	式 2.11 中的常数;数值 $A, B$ 与 $C$ 随 $k$ 值而变化,但改变其它条件或溶质时基本不变
$A', B', C'$	式 2.10 中的常数;数值 $A', B'$ 与 $C'$ 随条件和样品而变化
$A'', B'', C''$	式 2.10a 中的常数;数值 $A'', B''$ 与 $C''$ 随条件和样品而变化
$C$	谱峰最大值处的浓度(mol/L)
$C_0$	注入样品中溶质的浓度(mol/L)
CI	化学电离(MS)
DCA	直流电流分析法
DMA	$N, N$ -二甲基-1-萘酰胺;(也作二甲基苯胺 dimethylaniline)
EI	电子电离(MS)
ELS	蒸发光散射 (Evaporative light scattering)
EtOAc	乙酸乙酯(ethyl acetate)
FAB	快速原子轰击(MS)
FD	场解吸附(MS)

$h$	折合板高, 等于 $H/d_p$ (式 2.11)
HB	羟基苯甲酸( hydrxybenzoic acid )(图 7.8, 7.17 与 7.19)
HFBA	七氟丁酸( heptafluorobutyric acid)
IPA	异丙醇( isopropanol)
$k_w$	以水作为流动相的 $k$ 值(式 6.1)
LCEC	液相色谱电化学检测器
LD	激光解吸( MS)
LSIMS	液态二级离子质谱
MALDI	基质辅助激光解吸电离
MP	对羟苯甲酸甲酯
$[P^-]_m$	流动相中离子对试剂 $P^-$ 的浓度( mmol/L)
PAD	脉冲电流分析检测器
PBP	极性键合相
PD	等离子解吸( MS)
PP	对羟苯甲酸丙酯
PTH	乙内酰苯硫脲
$R^+, R^-$	分别为阴离子与阳离子离子交换色谱柱中的荷电功能基团 (式 7.4 和 7.5)[如 $-N(CH_3)_3^+$ 和 $-SO_3^-$ ]
RF	响应因子
TBA <sup>+</sup>	四丁基铵离子
tBME	见 MTBE
TMS	三甲基硅烷( trimethylsilyl; 也为 $C_1$ )
TNB	1,3,5-三硝基苯( 1,3,5-trinitrobenzene)
TOF MS	时间飞行质谱
TSP	热喷雾( MS)
$u$	流动相通过色谱柱的速度( cm/s); 等于 $L/t_0$
$V$	峰底宽( mL)
$V_c$	色谱柱内峰展宽对 $V$ 的贡献; 也作小样品量峰底宽( mL)(式 2.16)
$V_R$	保留体积( mL)(式 2.14); 也等于 $t_R F$
$W$	峰宽( min)(式 2.12)
$W_c, W_s,$	分别为色谱柱, 进样器, 连接管和流通池对 $W$ 的贡献( min)
$W_k, W_{fc}$	(式 2.12)

---

$X, X_1,$	无特征结构的溶质(图 7.8,7.17 和 7.19)
$X_2, X_3$	
$X_B$	流动相中 B 溶剂的摩尔分数
$V$	折合速度,等于 $ud_p/D_m$ (式 2.11)
$\sigma$	高斯曲线的标准偏差;等于峰底宽的 1/4
$l$	检测器响应时间常数(s)
$\emptyset$	流动相中 B 溶剂的体积分数;等于 0.01%B

---

# 目 录

译者的话 .....	(1)
作者序言 .....	(3)
色谱常用符号与术语表 .....	(7)
<b>第 1 章 绪论 .....</b>	<b>(1)</b>
1.1 引言 .....	(1)
1.2 开始前应知道 .....	(2)
1.2.1 样品的性质 .....	(2)
1.2.2 分离的目的 .....	(4)
1.3 样品的预处理与检测 .....	(5)
1.4 建立分离 .....	(6)
1.4.1 选择 HPLC 分离模式与起始条件 .....	(6)
1.4.2 开始方法建立 .....	(9)
1.4.3 改善分离 .....	(12)
1.4.4 可重现的分离 .....	(14)
1.5 完善 HPLC 方法 .....	(15)
1.5.1 定量与方法论证 .....	(15)
1.5.2 解决出现的问题 .....	(16)
1.5.3 方法的普适性 .....	(17)
<b>第 2 章 分离的基础 .....</b>	<b>(21)</b>
2.1 引言 .....	(21)
2.2 分离度: 总论 .....	(21)

2.2.1	分离度的测量	(23)
2.2.2	最小的分离度	(25)
2.3	分离度与各种条件的关系	(28)
2.3.1	溶剂强度的影响	(30)
2.3.2	选择性的影响	(33)
2.3.2.1	改变流动相	(33)
2.3.2.2	更换色谱柱	(38)
2.3.2.3	改变温度	(38)
2.3.3	色谱柱理论板数的影响	(39)
2.3.3.1	色谱柱的条件与分离	(42)
2.3.3.2	理论板数与各种条件的关系	(45)
2.3.3.3	柱外效应	(48)
2.4	进样量的影响	(50)
2.4.1	体积超载: 样品体积对分离的影响	(50)
2.4.2	质量超载: 样品重量对分离的影响	(53)
2.4.3	避免由于样品量太大引起的问题	(54)
2.4.3.1	样品浓度太大	(54)
2.4.3.2	痕量分析	(55)

### 第3章 检测灵敏度与选择性 (59)

3.1	引言	(59)
3.2	UV 检测	(60)
3.2.1	总论	(60)
3.2.2	波长的选择	(62)
3.2.2.1	样品吸收值与其分结构的关系	(64)
3.2.2.2	流动相吸收值与其组分的关系	(68)
3.2.3	信号、噪音与检测精度	(71)
3.2.4	提高信噪比, 以获得更好的检测精度	(74)



3.2.5	检测器的线性范围 .....	(76)
3.2.6	二极管阵列 UV 检测器 .....	(77)
3.3	其它 HPLC 检测器 .....	(81)
3.3.1	通用型检测器 .....	(81)
3.3.2	荧光检测器 .....	(83)
3.3.3	电化学检测器 .....	(86)
3.3.4	质谱检测器(LC - MS) .....	(91)
3.3.5	选择质谱检测器 .....	(98)
3.3.6	不常用类型检测器 .....	(100)
<b>第 4 章</b>	<b>样品的制备 .....</b>	<b>(105)</b>
4.1	引言 .....	(105)
4.2	样品的类型 .....	(107)
4.3	固体与半固体样品的预处理 .....	(113)
4.3.1	降低样品颗粒粒度 .....	(113)
4.3.2	干燥样品 .....	(113)
4.3.3	滤过 .....	(115)
4.4	液体样品的预处理 .....	(115)
4.4.1	液 - 液萃取 (Liquid - Liquid Extraction, LLE) .....	(117)
4.4.1.1	理论 .....	(119)
4.4.1.2	实践 .....	(120)
4.4.1.3	问题 .....	(123)
4.4.2	固相萃取 (Solid - Phase Extraction, SPE) .....	(125)
4.4.2.1	SPE 与 LLE .....	(125)
4.4.2.2	SPE 与 HPLC .....	(126)
4.4.2.3	SPE 的应用 .....	(126)
4.4.2.4	SPE 装置 .....	(127)
4.4.2.5	SPE 仪器 .....	(131)