

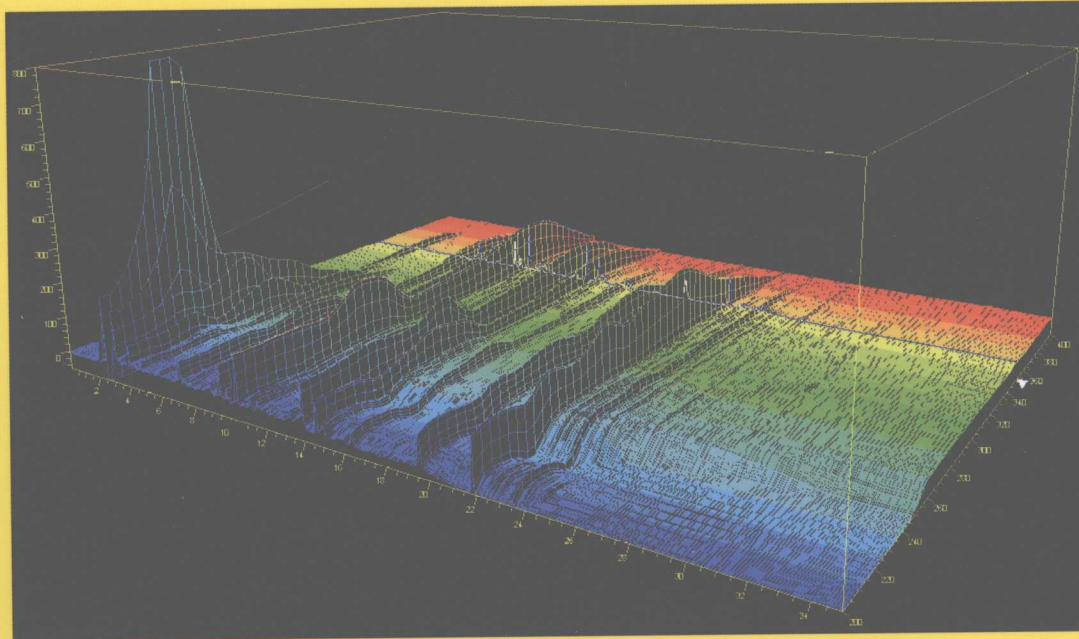


华夏英才基金学术文库

YEXIANG SEPU RONGJI XITONG DE
XUANZE YU YOUHUA

液相色谱溶剂系统的 选择与优化

孙毓庆 胡育筑 主编



化学工业出版社

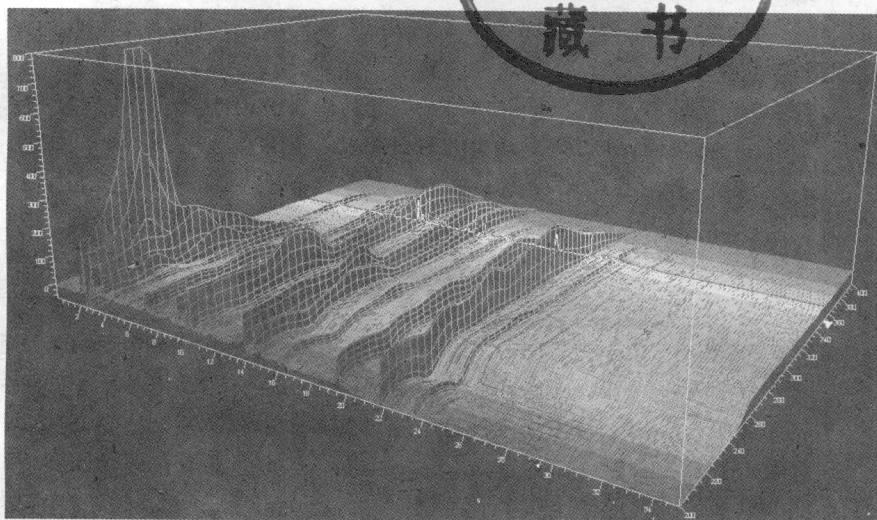
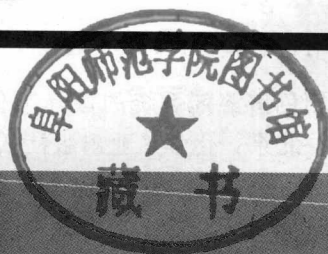


华夏英才基金学术文库

YEXIANG SEPU RONGJI XITONG DE
XUANZE YU YOUHUA

液相色谱溶剂系统的 选择与优化

孙毓庆 胡育筑 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是液相色谱溶剂系统(流动相)选择与优化的专著。全书共三篇 12 章。主要内容有:各类高效液相色谱法、薄层色谱法、毛细管电泳法、毛细管电色谱法及液相色谱-质谱联用法的分离机制与溶剂系统、各种常用溶剂的物理与色谱性质、溶剂的选择、溶剂系统的组成原则与常用优化方法。本书理论与实践并重,书中还包括大量样品的色谱分析条件、《中华人民共和国药典》与《美国药典》品种的色谱分析方法等内容。

本书可作为液相色谱工作者、药学及化学专业研究生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

液相色谱溶剂系统的选择与优化/孙毓庆, 胡育筑主
编. —北京: 化学工业出版社, 2007. 4
ISBN 978-7-122-00075-0

I. 液… II. ①孙…②胡… III. 液相色谱-溶剂-研究 IV. TQ413

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 031194 号

责任编辑: 杜进祥
责任校对: 顾淑云

文字编辑: 杨欣欣
装帧设计: 韩 飞

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 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司
装 订: 三河市万龙印装有限公司
720mm×1000mm 1/16 印张 27 字数 467 千字 2008 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 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: 59.00 元

版权所有 违者必究

本书编委会

主编：孙毓庆（胡育筑）

编委：（以姓氏笔画为序）

王东援（沈阳药科大学）

刘袁媛（沈阳药科大学）

孙国祥（沈阳药科大学）

孙毓庆（沈阳药科大学）

陈 蓉（中国药科大学）

金 郁（中科院大连化学物理所）

胡育筑（中国药科大学）

郭怀忠（天津大学药学院）

前言

液相色谱法是应用最广的分离分析方法，特别是对于复杂样品的分析尤为重要。液相色谱法的分支很多，广义的液相色谱法包括：高效液相色谱法、薄层色谱法、超临界流体色谱法、毛细管电泳法及毛细管电色谱法等类别，而它们又各自包括多种方法。在诸多的色谱方法中，要想获得好的分析结果，只有好的实验设备是不够的，溶剂系统（或背景电解质溶液）常是分离成败的关键，可见，溶剂系统选择及优化的重要性。本书介绍的中心内容是如何根据样品性质与分析要求，按照分子间作用力的关系，正确地选择溶剂并组成溶剂系统并进行优化，选出最佳溶剂系统，以获得事半功倍的分析效果。

本书是沈阳药科大学孙毓庆教授与中国药科大学胡育筑教授、王东援教授等及其诸多研究生，根据多年从事液相色谱法溶剂系统的优化方法研究的成果及实践经验，并在参阅国外相关专著及大量国内外文献的基础上，编写而成的。

本书共三篇 12 章。第一篇各类液相色谱法的基础理论与溶剂系统。主要介绍液相色谱法分离基础，各类高效液相色谱法、薄层色谱法及液相色谱-质谱法（LC-MS）的溶剂系统，溶剂的基本性质与应用，以及溶剂的性质对色谱法分析结果的影响等；第二篇溶剂系统的优化方法。介绍溶剂系统的分类、选择、优化方法及色谱方法的标准化与验证；第三篇电动微分析法的基本原理与溶剂系统：简介毛细管电泳法（CE）及毛细管电色谱法（CEC）的溶剂系统的选择与优化方法。

各章中还包括大量分析样品的色谱分析条件，如《中华人民

共和国药典》与《美国药典》品种的法定高效液相色谱法分析方法以及某些应用实例，以供色谱实验条件选择的参考。

本书涵盖了各种色谱法常用溶剂的物理性质与色谱性质、溶剂系统的组成原则及最常用的优化方法等。CE 及 CEC 的溶剂系统的选择与优化，主要是编者近期科研的小结，仅供参考。

本书由孙毓庆、胡育筑、王东援、孙国祥、郭怀忠、陈蓉、金郁及刘袁媛等通力合作而成，全书由孙毓庆统稿。在编写过程中得到沈阳药科大学赵怀清教授、邸欣教授、洪福山高工及中国药科大学有关同志的大力支持，在此一并致谢。

本书得到华夏英才基金（第十一批）的资助，在此谨致以诚挚的谢意！

由于水平有限、资料繁多，且首次编写此种专著，不当之处在所难免，恳请读者指正，以便于再次印刷或再版时改正。

编者

2008.1

目录

第1章 绪论	1
1.1 概述	1
1.2 色谱法的发展简史	1
1.3 液相色谱法的分类	2
1.4 液相色谱法在国内外的应用概况	7
1.5 液相色谱溶剂系统的研究概况	8
参考文献	9
第一篇 各类液相色谱法的基础理论与溶剂系统	
第2章 液相色谱法的分离基础	13
2.1 色谱参数	13
2.1.1 相平衡参数	13
2.1.2 保留参数	15
2.1.3 柱效参数	17
2.1.4 分离参数	19
2.2 分离方程式	22
2.2.1 用于柱色谱的分离方程式	22
2.2.2 用于薄层色谱的分离方程式	22
2.2.3 用于毛细管电泳的分离方程式	23
2.3 速率理论	23
2.3.1 van Deemter 速率理论方程式	24
2.3.2 液相色谱速率理论方程式	24
参考文献	29
第3章 各类高效液相色谱法及其流动相	30
3.1 液-固吸附色谱法的分离机制与流动相	31
3.1.1 分离机制	31
3.1.2 流动相	33
3.2 正相色谱法的分离机制与流动相	34
3.2.1 分离机制	34

3.2.2	流动相	35
3.3	反相色谱法的分离机制与流动相	38
3.3.1	分离机制	38
3.3.2	反相色谱法的流动相	40
3.3.3	离子抑制色谱法的流动相	41
3.4	离子对色谱法的分离机制与流动相	42
3.4.1	分离机制	42
3.4.2	常用离子对试剂	44
3.4.3	离子对色谱法的流动相	44
3.4.4	离子对色谱法的优缺点与用途	47
3.5	离子交换色谱法的分离机制与流动相	48
3.5.1	离子交换反应	48
3.5.2	离子交换色谱法的流动相	50
3.6	离子色谱法的分离机制与流动相	51
3.6.1	双柱(抑制型)离子色谱法	52
3.6.2	单柱(非抑制型)离子色谱法	53
3.6.3	离子色谱法的流动相	54
3.7	空间排斥色谱法的分离机制与流动相	56
3.7.1	分离机制	56
3.7.2	空间排斥色谱的流动相	57
3.8	亲和色谱法的分离机制与流动相	58
3.8.1	亲和色谱的固定相	59
3.8.2	亲和色谱的分离机制	60
3.8.3	亲和色谱法的流动相	61
3.8.4	亲和色谱法的应用	62
3.9	胶束色谱法的分离机制与流动相	64
3.9.1	胶束色谱中常用表面活性剂	64
3.9.2	分离机制	65
3.9.3	胶束色谱法的流动相	66
3.9.4	胶束色谱法的应用	66
3.10	手性色谱法的分离机制与流动相	68
3.10.1	手性药物的拆分意义	68
3.10.2	手性固定相的分离机制	69
3.10.3	手性色谱法的流动相	71

3.10.4	手性色谱法的应用	71
3.11	环糊精色谱法的分离机制与流动相	72
3.11.1	环糊精的结构	72
3.11.2	以环糊精为流动相的环糊精色谱法	73
3.11.3	以环糊精为固定相的环糊精色谱法	75
3.12	液相色谱-质谱联用法的分离机制及其溶剂系统	77
3.12.1	LC-ESI-MS 的原理与其溶剂系统	78
3.12.2	LC-APCI-MS 的原理与其溶剂系统	87
3.12.3	液相色谱-质谱联用技术的应用简介	88
	参考文献	96
第4章	各类薄层色谱法及溶剂系统	98
4.1	概述	98
4.2	经典薄层色谱技术	100
4.2.1	常用的展开方式与装置	100
4.2.2	有关薄层色谱法的基本理论和概念	101
4.2.3	实际薄层色谱过程与理想过程的差异	108
4.2.4	薄层色谱法的流动相	112
4.2.5	其他薄层色谱展开方法	114
4.2.6	有关薄层色谱操作技术的讨论	116
4.3	几种薄层色谱新技术	118
4.3.1	水平展开与斜坡式输液分配器	118
4.3.2	中途展开与接力展开	121
4.3.3	漏斗式输液分配器	123
4.3.4	二维展开的改进	124
4.3.5	多维接力展开	126
4.3.6	下行展开的改进	128
4.3.7	在线洗脱与原位洗脱	129
4.4	一种新的溶剂系统优化方法——染料外标索引法	133
4.4.1	基本原理	133
4.4.2	建立方法	134
4.4.3	染料 R_f 值索引表	134
4.4.4	应用示例	137
	参考文献	145
第5章	溶剂的基本性质及其对色谱的影响	147

5.1 常用溶剂的基本性质	147
5.1.1 常用溶剂的紫外截止波长	147
5.1.2 反相溶剂及其改性剂	148
5.1.3 正相色谱溶剂	151
5.1.4 系统峰	154
5.1.5 黏度	155
5.1.6 混溶性和溶解度	156
5.1.7 缓冲剂及其他添加剂	159
5.1.8 挥发性	162
5.2 流动相性质对色谱结果的影响	164
5.2.1 不同种类溶剂的影响	164
5.2.2 杂质对流动相的影响	168
5.2.3 流动相和固定相的相互作用	169
5.2.4 样品溶液的稳定性	170
参考文献	171
第6章 液相色谱各类常用溶剂的性质与应用	172
6.1 脂肪醇类溶剂	172
6.1.1 脂肪醇类溶剂的性质	172
6.1.2 脂肪醇类溶剂的规格与杂质	176
6.1.3 脂肪醇类流动相的应用	179
6.2 腈类与胺类等溶剂	187
6.2.1 腈类与胺类等溶剂的性质	188
6.2.2 腈类与胺类等溶剂的规格与杂质	190
6.2.3 腈类与胺类流动相的应用	192
6.3 醚类溶剂	201
6.3.1 醚类溶剂的性质	201
6.3.2 醚类溶剂的规格与杂质	204
6.3.3 醚类流动相的应用	206
6.4 脂肪烃类与芳香烃类溶剂	209
6.4.1 烃类溶剂的性质	210
6.4.2 脂肪烃类与芳香烃类溶剂的规格与杂质	212
6.4.3 脂肪烃类与芳香烃类流动相的应用	215
6.5 氯代烃类与氯代苯类	219
6.5.1 氯代烃类与氯代苯类溶剂的性质	219

6.5.2	氯代烷烃类与氯代苯类溶剂的规格与杂质	222
6.5.3	氯代烃类与氯代苯类流动相的应用	225
6.6	酮类与酯类溶剂	227
6.6.1	酮类与酯类溶剂的性质	227
6.6.2	酮类与酯类溶剂的规格与杂质	230
6.6.3	酮类与酯类流动相的应用	231
6.7	水与常用酸性改性剂	233
6.7.1	水与常用酸性改性剂的性质	233
6.7.2	水与常用酸性改性剂的杂质与规格	234
6.7.3	水与常用酸性改性剂的应用	236
	参考文献	236

第二篇 溶剂系统的分类与优化方法

第7章	溶剂系统的分类和选择	243
7.1	溶剂的洗脱参数	243
7.1.1	洗脱序数	243
7.1.2	溶剂强度参数	246
7.1.3	洗脱强度因数	250
7.2	溶剂选择性三角形及相关应用	252
7.2.1	Snyder 溶剂选择性三角形	252
7.2.2	用于溶剂系统组成选择的三角形法	254
7.2.3	四面体优化法	258
7.3	溶剂系统的模糊聚类分类法	258
7.3.1	溶剂分类问题的提出	258
7.3.2	溶剂选择性参数的计算	259
7.3.3	模糊聚类分类方法	260
7.3.4	常用溶剂模糊聚类分析的特点	262
	参考文献	263
第8章	液相色谱的选择性优化方法	265
8.1	实验设计和优化方法基础	265
8.1.1	变量、因素及试验指标	265
8.1.2	响应面和实验设计的关系	266
8.1.3	实验设计和优化方法的分类	268
8.2	液相色谱的选择性优化法	269

8.2.1	液相色谱选择性优化的基本思路	269
8.2.2	色谱优化因素	270
8.2.3	色谱优化指标	271
8.2.4	优化方法	273
8.3	常用基本优化方法	274
8.3.1	析因设计	274
8.3.2	正交设计	277
8.3.3	均匀设计	279
8.3.4	黄金分割法和单纯形法	282
8.3.5	人工神经网络技术	288
8.4	色谱专用优化方法	289
8.4.1	窗口图解技术	290
8.4.2	因子设计-叠加分辨率图	290
8.4.3	多指标决策判定法	292
8.5	基于模型的优化方法	293
8.5.1	基于线性梯度洗脱模型的反相高效液相色谱方法优化	293
8.5.2	基于色谱参数模型的优化方法	294
8.5.3	基于组分理化性质参数模型的优化方法	294
	参考文献	295
第9章	梯度洗脱的优化方法	296
9.1	梯度洗脱的基本知识	296
9.1.1	梯度洗脱的特点及应用范围	296
9.1.2	梯度洗脱模式的分类	298
9.2	应用线性梯度洗脱预测等度洗脱的优化方法	299
9.2.1	应用梯度洗脱确定等度洗脱的流动相组成	299
9.2.2	流动相配比优化的系统方法	302
9.3	梯度洗脱优化的基本原理	304
9.3.1	梯度洗脱优化的类型	304
9.3.2	线性梯度洗脱的优化基础	305
9.3.3	预测线性梯度洗脱条件的简易方法	306
9.3.4	预测线性梯度洗脱条件的系统方法	307
9.3.5	混合梯度的优化	308
9.4	计算机辅助的梯度优化	309
	参考文献	309

第 10 章 色谱分析方法的标准化及其验证	311
10.1 色谱仪器的检定及质量保证	311
10.1.1 色谱仪器质量保证的基本要求	311
10.1.2 色谱仪器质量保证的方法	312
10.2 色谱系统适用性的评价	313
10.2.1 色谱系统适用性的定义	313
10.2.2 色谱系统适用性的评价方法	314
10.3 色谱分析方法的验证	315
10.3.1 分析方法的验证及其标准化的重要性	316
10.3.2 方法验证的内容、方法和要求	317

第三篇 电动微分析法的基本原理与溶剂系统

第 11 章 毛细管电泳法及其溶剂系统	333
11.1 毛细管电泳的基本原理	333
11.2 毛细管电泳的分离模式	335
11.2.1 毛细管区带电泳	335
11.2.2 毛细管凝胶电泳	335
11.2.3 毛细管胶束电动色谱	335
11.2.4 毛细管等电聚焦电泳	336
11.2.5 毛细管等速电泳	336
11.2.6 毛细管电色谱	337
11.3 影响电渗速度的因素	337
11.3.1 电解质浓度对电渗速度的影响	337
11.3.2 有机溶剂对电渗速度的影响	337
11.3.3 pH 对电渗速度的影响	338
11.3.4 温度对电渗速度的影响	338
11.3.5 毛细管电泳分离因素相关图	339
11.4 非水毛细管电泳	339
11.4.1 非水毛细管电泳的检测系统	340
11.4.2 非水毛细管电泳技术在药物分析中的应用	341
11.5 亲和毛细管电泳技术	341
11.6 微流控芯片分析法	342
11.7 毛细管电泳的背景电解质溶液的优化方法	342
11.7.1 色谱指纹图谱指数 (F) 和相对指数 (F_r) 的应用	342

11.7.2	背景电解质的三角形优化法一般步骤	344
11.7.3	背景电解质优化实例	347
11.8	毛细管电泳-质谱联用及其溶剂系统	350
11.8.1	毛细管电泳-质谱联用分析原理及进展	350
11.8.2	CE-ESI-MS 联用的溶剂选择原则	351
11.8.3	毛细管电泳-质谱联用法的应用	352
	参考文献	356
第 12 章	毛细管电色谱法及其流动相	360
12.1	毛细管电色谱简介	360
12.1.1	基本原理与概念	360
12.1.2	毛细管电色谱法的应用及展望	361
12.2	毛细管电色谱的溶剂系统的选择	365
12.2.1	毛细管电色谱的分类	365
12.2.2	实验参数对电渗流的影响	366
12.2.3	实验参数对溶质保留值的影响	368
12.3	毛细管无胶筛分法的溶剂系统	373
12.3.1	毛细管无胶筛分概述	373
12.3.2	无胶筛分理论	374
12.3.3	无胶筛分的操作条件优化	375
12.4	应用实例	377
	参考文献	384
附录		387
附录 I	81 种溶剂的溶剂参数	387
附录 II	81 种溶剂的 5 种选择性参数 (X) 与溶剂强度参数 (P') 表	389
附录 III	以甲醇为流动相主要成分的《中国药典》(2005 版, 二部) 法	391
附录 IV	以乙腈为流动相主要成分的《中国药典》(2005 年版, 二部) 法	402
附录 V	以甲醇+乙腈为流动相主要成分的《中国药典》(2005 版, 二部) 法	412
附录 VI	其他溶剂系统的《中国药典》(2005 版, 二部) 法	415

第 1 章

绪 论^[1]

1.1 概述

(1) 色谱法

利用组分在固定相与流动相间的分配系数差异,而分离、分析的方法称为色谱法(chromatography)。色谱法(或称层析法)是一种物理或物理化学的分离分析方法。以液体为流动相的色谱法称为液相色谱法(liquid chromatography, LC)。

广义的液相色谱法还包含以电场为驱动力的毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)和毛细管电色谱法(capillary electrochromatography, CEC)。首先,因为 CE 与 CEC 的实验方法与 HPLC(高效液相色谱)相似;其次,因为毛细管电泳法中的胶束毛细管电动色谱法(micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC)、毛细管凝胶电泳法(capillary gel electrophoresis, CGE)和电色谱法等,都具有电泳与色谱两种分离行为,因此广义的 LC 应包括 CE 与 CEC。

(2) 分离原理

典型的色谱法是利用物质在流动相与固定相两相中的分配系数差异而被分离。当两相相对运动时,样品中的各组分,将在两相中多次分配,分配系数大的组分迁移速率慢,反之迁移速率快,因迁移速率不同而分离。

在近 50 年中,由于气相色谱法、高效液相色谱法、薄层扫描法、毛细管电泳及色谱-光谱联用技术的飞速发展,已经形成一门专门的科学——色谱学。色谱法已广泛用于各个领域,已成为多组分混合物的最重要的分离分析方法。

1.2 色谱法的发展简史^[2]

1850 年,Runge 在纸上分离盐溶液;1869 年,Goettschneider 在长条纸上分析染料和动植物色素,产生了纸色谱法的雏形。1906 年 Tsweet 提出色

谱术语,但20多年后才产生固-液吸附色谱法。20世纪30年代产生了薄层色谱法,40年代,液-液分配色谱法与纸色谱法兴起,使色谱法形成一门分离技术。20世纪50年代,James与Martin创立了气相色谱法(GC)^[3]。GC的出现,把色谱法由分离技术提高到分离与“在线”分析的新水平,为色谱法成为现代分离-分析方法奠定了基础。1956年Golay提出了开口色谱柱理论,次年诞生了毛细管气相色谱法。20世纪60年代,推出了气相色谱-质谱联用技术(GC-MS),有效地弥补了气相色谱法定性分析特征性差的弱点,成为最重要的分离分析方法之一。20世纪60年代是气相色谱法的鼎盛时期。20世纪70年代,高效液相色谱法崛起,克服了气相色谱法不能直接用于分析难挥发、热不稳定及高分子化合物等的弱点,大大扩大了色谱法的应用范围,把色谱法推进到一个新水平。在此期间还出现了薄层扫描仪,把薄层色谱法提高到“准在线”分析的新水平。20世纪80年代,出现了超临界流体色谱法,这种方法兼有气相色谱与高效液相色谱法的优点,是有前途的分离方法。20世纪80年代末,飞速发展起来的毛细管电泳法最引人注目。由于毛细管电泳法的柱效高、应用广、快速、经济,已成为生命科学最重要的分析方法之一。20世纪90年代,飞速崛起的电色谱法,兼有毛细管电泳法与微填充柱色谱法的优点。

由Tsweet提出色谱名词之后,至气相色谱法(含毛细管色谱法)的创立,应是现代色谱法的第一个里程碑,气相色谱-质谱联用技术、高效液相色谱法及毛细管电泳法可分别视为色谱法的第二、第三及第四个里程碑。

1.3 液相色谱法的分类

按流动相或固定相的分子聚集状态、色谱系统的分离原理及固定相的形态,可将液相色谱分为不同类别。

(1) 按流动相分子的聚集状态分类

在液相色谱法中,流动相可以是液体或超临界流体。按流动相的不同,可分为液相色谱法(liquid chromatography, LC)和超临界流体色谱法(supercritical fluid chromatography, SFC)等。

(2) 按固定相的分子聚集状态分类

液相色谱法的固定相可为固体或液体。由此,可分为液-固色谱法(liquid-solid chromatography, LSC)及液-液色谱法(liquid-liquid chromatography, LLC)两类。

(3) 按固定相的形态分类

按固定相的形态分为柱色谱法、平面色谱法及逆流分配法等类别。

① 柱色谱法 (column chromatography) 将固定相装于色谱柱内, 色谱过程在色谱柱内进行, 称为柱色谱法。

按色谱柱粗细, 可分为一般柱色谱法、毛细管 (柱) 色谱法 (capillary chromatography) 及制备色谱法 (preparative chromatography) 等类别。

按柱固定相填充情况, 可分为填充 (柱) 色谱法 (packing chromatography, PC)、整体柱 (monolithic column, MLC) 色谱法及开口柱 (open tubular column, OTC) 色谱法等。

a. 填充 (柱) 色谱法 又可分为常规填充液相色谱法 (packing liquid chromatography) 及微填充色谱法 (micro-packing chromatography, μ -PC) 等。

b. 整体柱色谱法 用化学反应的方法使固定相形成一个网状整体, 称为整体色谱柱。用整体色谱柱的色谱法为整体色谱法。

② 平面色谱法 (plane chromatography) 色谱过程在固定相构成的平面层内进行的色谱法, 称为平面或平板色谱法。平面色谱法又分为纸色谱法 (paper chromatography, PC)、薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC) 及薄膜色谱法 (thin film chromatography, TFC) 等。

用滤纸作固定液载体的色谱法称为纸色谱法。将固定相铺在玻璃板或铝箔板等上, 构成一定厚度的薄层板, 用这种薄层板进行分离分析的方法称为薄层色谱法。薄膜色谱法与薄层色谱法类似, 但其主要区别是它的固定相是用高分子材料制成的薄膜。

(4) 按色谱过程的分离机制分类

按色谱过程的分离机制可将液相色谱法分为吸附色谱法、分配色谱法、空间排阻色谱法、离子交换色谱法、化学键合相色谱法、亲和色谱法、毛细管电泳法及毛细管电色谱法等类别。前四种为基本类型色谱法。

① 吸附色谱法 (adsorption chromatography) 所用固定相为吸附剂, 靠样品组分在吸附剂上的吸附系数 (吸附能力) 差别而分离。

② 分配色谱法 (partition chromatography) 分配色谱法的固定相为液体, 利用样品组分在固定相与流动相中的溶解度不同, 所造成的分配系数差别而分离。LLC 属于分配色谱法范围。

流动相的极性大于固定相的极性的液相色谱法, 称为反相 (reversed phase, RP 或 R) 色谱法; 反之, 称为正相 (normal phase, NP 或 N) 色谱法。

分配色谱法的固定液的涂渍, 有两种方法: 物理法与化学法, 前者多用