

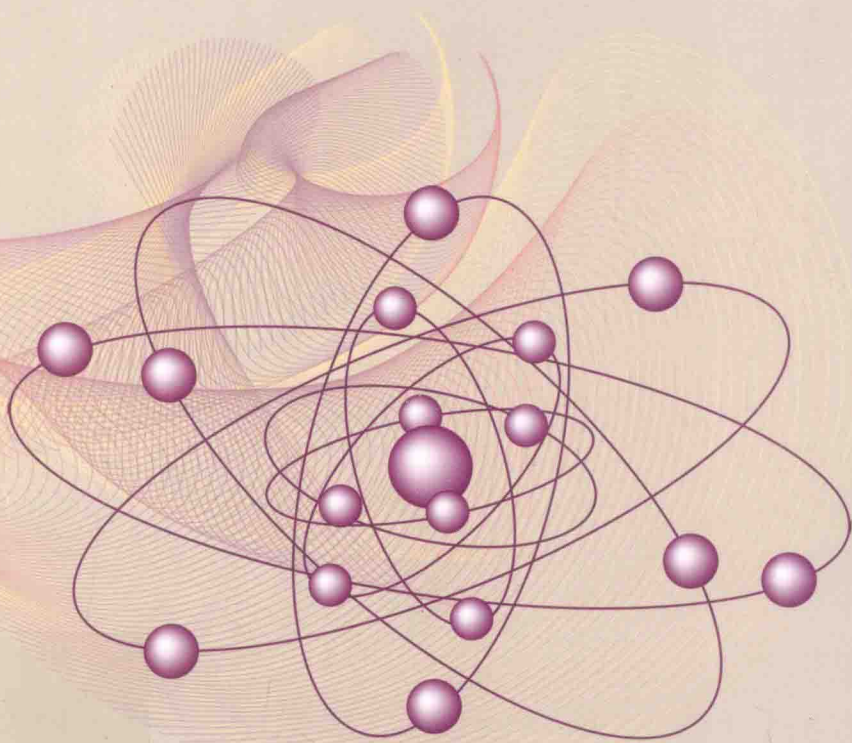
国家科技基础条件平台建设项目
“全国分析检测人员能力培训与考核体系”成果

全国分析检测人员能力培训委员会(NTC)系列培训教材

ATC 011

液相色谱分析技术

汪正范 主编



中国质检出版社
中国标准出版社



全国分析检测人员能力培训委员会 (NTC) 系列培训教材

ATC 011

液相色谱分析技术

汪正范 主编

中国质检出版社

中国标准出版社

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

ATC 011 液相色谱分析技术/汪正范主编. —北京:
中国标准出版社, 2016. 9

ISBN 978-7-5066-8314-2

I. ①A… II. ①全… III. ①液相色谱—化学分析—
技术培训—教材 IV. ①O657.63

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 167347 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)
北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010) 68533533 发行中心: (010) 51780238

读者服务部: (010) 68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 20 字数 452 千字
2016 年 9 月第一版 2016 年 9 月第一次印刷

*

定价 70.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 68510107

全国分析检测人员能力培训委员会 (NTC)

主 任 吴波尔

副主任 刘卓慧 吴学梯 张 泽

委 员 (按姓氏笔画排序)

马晋并 方 向 王海舟 乔 东 庄乾坤
许增德 宋桂兰 张渝英 李文龙 葛红梅

全国分析检测人员能力培训委员会 (NTC) 系列培训教材编审委员会

总 编 审 张渝英

副总编审 王海舟 乔 东

常务编审 符 斌 佟艳春

编 审 (按姓氏笔画排序)

马燕文	马振珠	于世林	邓 勃	邓星临	邓志威
王光辉	王明海	王春华	王 滨	王福生	王 蓬
尹 明	田 玲	白伟东	刘虎威	刘国詮	刘丽东
刘咸德	刘 正	刘 英	刘卫平	刘 挺	江超华
再帕尔	吕 杨	吴牟天	吴惠勤	吴淑琪	吴国平
冯先进	孙素琴	孙泽明	齐美玲	朱衍勇	朱跃进
朱林茂	朱生慧	朱锦艳	朱 斌	汪正范	汪聪慧
李 冰	李小佳	李丛笑	李红梅	李华昌	李重九
李继康	李寅彦	李国会	李万春	李美玲	沈学静
沈建忠	牟世芬	杨啸涛	杨春晟	邹汉法	罗立强
罗倩华	张 中	张 庄	张之果	张学敏	张锦茂
张伟光	张克顺	张东生	张夕虎	张慧贤	林崇熙
谢孟峡	者冬梅	周志恒	周巍松	周艳明	郑国经
卓尚军	屈文俊	贾云海	柯以侃	柯瑞华	柯晓涛
陈江韩	陈吉文	胡国栋	胡净宇	胡洛翡	胡晓燕
赵 雷	徐友宣	徐本平	徐经纬	高介平	高宏斌
高怡斐	唐凌天	谭晓东	郭永权	侯红霞	崔秋红
蒋士强	蒋仁贵	蒋子江	梁新帮	陶 琨	黄业茹
傅若农	詹秀春	蔡文河	臧慕文	魏若奇	

《全国分析检测人员能力培训委员会(NTC)系列培训教材》

序

分析测试技术作为科技创新的技术基础、国民经济发展和国际贸易的技术支撑,环境保护和人类健康的技术保障,正受到越来越多的关注,而分析测试体系的建设在科技进步和经济发展中正发挥着举足轻重的作用。国家科技部从1999年以来先后组织建设并形成了分析测试方法体系、全国检测资源共享平台,大型仪器共享平台,标准物质体系以及应急分析测试体系等分析测试相关的基础条件平台。2005年在科技基础条件平台建设中,又启动了《机制与人才队伍建设——全国分析测试人员分析测试技术能力考核确认与培训系统的建立与实施》的项目,从而形成了由“人员、方法、仪器、标准物质、资源”等组成的完整系统的分析测试平台体系。

为加强分析检测人员队伍的建设,确保分析检测人员技术能力的培训与考核工作的科学性、规范性、系统性和持续性,完成国家科技基础条件平台建设的相关任务,中华人民共和国科学技术部、国家认证认可监督管理委员会等部门共同推动成立了“全国分析检测人员能力培训委员会”(简称“NTC”),负责对分析检测人员技术能力的培训与考核工作。

NTC的宗旨是为提高我国分析检测人员整体的检测能力和水平,促进分析检测结果的准确性和可靠性,为国家科技进步、公共安全、经济社会又好又快发展服务。

NTC依据国家相关法律法规,按照分析检测的相关国际和国家标准、规范等开展培训工作,遵循客观公正、科学规范的工作原则开展考核工作。

NTC的分析检测技术的分类系以通用分析测试技术为基点,兼顾专用技术,根据相关学科分类标准及分析检测技术设备原理划分,

形成每项技术分别覆盖材料、环境资源、食品以及能源等领域化学成分和性能表征的分析测试技术能力分类系统,首批共纳入了 58 项技术。

每项分析检测技术由四个技术部分组成,即分析检测技术基础、仪器与操作技术、标准方法与应用以及数据处理。

通过相关技术四个部分考核的技术人员将由全国分析检测人员能力培训委员会颁发分析检测人员技术能力证书。证书是对分析检测人员具备相关分析检测技术(方法)或相关部分的技术能力的承认,可以胜任相关分析检测岗位的检测工作;该证书可作为计量认证、实验室认可、相关认证认可以及大型仪器共用共享的能力证明。

为规范各项技术考核基本要求,委员会正式发布了各项技术的考核培训大纲。为便于培训教师、分析检测人员进一步理解大纲的要求,在 NTC 的统一领导下,由 NTC 秘书处负责组织成立了 NTC 培训教材编写审定委员会,系统规划教材的系统设置方案、设计了教材的总体架构、与考核相结合规定了每项技术各部分内容的设置,并分别组织了各项技术分编委会,具体负责各项技术的培训教材的编写。NTC 拥有《全国分析检测人员能力培训委员会(NTC)系列培训教材》的著作权,并指定该套教材为由 NTC 组织的分析检测人员技术能力培训的唯一指定教材,并将其专有出版权授予中国质检出版社(中国标准出版社),由其出版发行,以服务于全国分析检测人员的技术培训与考核工作。

全国分析检测人员能力培训委员会

NTC 通用理化性能分析检测能力技术分类

1 ATC——化学分析测试技术

- ATC 001 电感耦合等离子体原子发射光谱分析技术
- ATC 002 火花源原子发射光谱分析技术
- ATC 003 X 射线荧光光谱分析技术
- ATC 004 辉光放电发射光谱分析技术
- ATC 005 原子荧光光谱分析技术
- ATC 006 原子吸收光谱分析技术
- ATC 007 紫外-可见吸收光谱分析技术
- ATC 008 分子荧光光谱分析技术
- ATC 009 红外光谱分析技术
- ATC 010 气相色谱分析技术
- ATC 011 液相色谱分析技术
- ATC 012 毛细管电泳分析技术
- ATC 013 固体无机材料中碳硫分析技术
- ATC 014 固体无机材料中气体成分(O、N、H)分析技术
- ATC 015 核磁共振分析技术
- ATC 016 质谱分析技术
- ATC 017 电感耦合等离子体质谱分析技术
- ATC 018 电化学分析技术
- ATC 019 物相分离分析技术
- ATC 020 重量分析法
- ATC 021 滴定分析法
- ATC 022 有机物中元素(C、S、O、N、H)分析技术
- ATC 023 酶标分析技术

2 ATP——物理检测技术

- ATP 001 金相低倍检验技术
- ATP 002 金相高倍检验技术
- ATP 003 扫描电镜和电子探针分析技术
- ATP 004 透射电镜分析技术
- ATP 005 多晶 X 射线衍射技术
- ATP 006 俄歇电子能谱分析技术
- ATP 007 X 射线光电子能谱分析技术

ATP 008 扫描探针显微分析技术
ATP 009 密度测量技术
ATP 010 热分析技术
ATP 011 导热系数测量技术
ATP 012 热辐射特性参数测量技术
ATP 013 热膨胀系数测量技术
ATP 014 热电效应特征参数测量技术
ATP 015 电阻性能参数测量技术
ATP 016 磁性参数测量技术
ATP 017 弹性系数测量技术
ATP 018 声学性能特征参数测量技术
ATP 019 内耗阻尼性能参数测量技术
ATP 020 粒度分析技术
ATP 021 比表面分析技术
ATP 022 热模拟试验技术

3 ATM——力学性能测试技术

ATM 001 拉伸试验技术
ATM 002 弯曲试验技术
ATM 003 扭转试验技术
ATM 004 延性试验技术
ATM 005 硬度试验技术
ATM 006 断裂韧度试验技术
ATM 007 冲击试验技术
ATM 008 疲劳试验技术
ATM 009 磨损试验技术
ATM 010 剪切试验技术
ATM 011 压缩试验技术
ATM 012 撕裂试验技术
ATM 013 高温持久、蠕变、松弛试验技术

本书编委会

主 编 汪正范

编 委 刘国詮 牟世芬 于世林 张庆合

前 言

自 20 世纪初俄国植物学家茨维特(M. S. Tswett)提出经典液相色谱法后,色谱分析法取得迅速发展。但是,液相色谱法直到 20 世纪 60 年代末期,在高效液相色谱法出现后,才得到真正的快速发展。到 21 世纪初,高效液相色谱仪每年的增长数量在全球范围开始超过气相色谱仪,成为分析仪器市场上每年销售量最多的分析仪器。在我国,近年来每年增加的高效液相色谱仪也超过了气相色谱仪,年销售量已超过了一万台,成为发展最快、使用最多的分析技术。

为便于从事液相色谱分析的技术人员尽快地掌握液相色谱分析技术,我们从培训教材的角度编写了本书。本书依据全国分析检测人员能力培训委员会《ATC 011 液相色谱分析技术考核与培训大纲》编写,内容包括液相色谱分析技术的基础理论知识、仪器设备与操作、液相色谱分析方法与应用及液相色谱分析的数据处理四部分。本书以工厂、科研院所、学校、检验检疫、环境等领域实验室具有高中以上文化程度的检测人员为基本对象,希望通过以本书为教材的培训或学习,了解液相色谱分析技术的基本概念及基础理论知识,熟悉液相色谱仪器的组成结构及工作原理,具备液相色谱仪器的操作能力,掌握液相色谱分析技术在相关领域的应用。

液相色谱包括使用液体作为流动相的所有色谱分离、分析技术,目前最常用的有高效液相色谱、超高效液相色谱、离子色谱、平面色谱、凝胶色谱、中低压液相色谱等。本书内容涉及除中低压液相色谱以外的各种液相色谱,因为中低压液相色谱主要用于分离、制备,而

不用于分析。

本书可作为有关部门培训分析检测人员的教材,也可供企业、科研以及商检质检等部门分析检验人员参考和使用,同时亦可作为相关院校师生的参考书。

本书在全国分析检测人员能力培训委员会指导下,组织各方面专家撰写,几易其稿而成。主要编写人员为:中科院化学所刘国詮研究员、中科院环境生态中心牟世芬研究员、北京化工大学于世林教授、中国计量科学院张庆合研究员、中国分析测试协会汪正范研究员。解放军 301 医院廖杰教授和解放军军事医学科学院董方霆教授对书稿进行了审阅,NTC 秘书处符斌教授等人对全书进行校阅,并提出了一些宝贵的修改意见,在此表示感谢。

由于编者水平有限,书中存在不少疏漏、不足和错误,敬请专家、同仁、读者批评指正。

编 者

2016 年 3 月

目 录

1 基础理论知识

1.1 概述	1
1.2 液相色谱基础知识	2
1.3 液相色谱基本原理	11
思考题	20
参考文献	20

2 仪器设备与操作

2.1 高效液相色谱仪器	22
思考题	117
参考文献	118
2.2 离子色谱仪器	118
思考题	149
参考文献	150
2.3 凝胶渗透色谱仪	150
思考题	166
参考文献	166
2.4 薄层色谱仪器	166
思考题	180
参考文献	180

3 液相色谱分析方法与应用

3.1 样品的预处理	181
3.2 液相色谱分析方法的建立	211
3.3 液相色谱分析的应用实例	222
思考题	288
参考文献	288

4 液相色谱分析的数据处理

4.1 LC 定性、定量分析的依据和数据的获取	290
4.2 LC 定性分析方法	293
4.3 LC 定量分析的数据处理及计算方法	295
4.4 LC 测定结果的准确度和精密度评价方法	301
4.5 LC 方法测定结果的不确定度评定	301
思考题	305

基础理论知识

1.1 概述

1.1.1 液相色谱分析技术的发展

20 世纪初俄国植物学家茨维特 (M. S. Tswett) 在华沙大学研究植物色素的过程中, 将有色植物叶子的石油醚提取物, 倾注到一根填入粉末吸附剂 (如碳酸钙) 的玻璃管内, 然后用纯净的石油醚洗脱, 植物叶子中的几种色素在玻璃管内的粉末吸附剂上形成了几种颜色的色带, 茨维特将这种色带称为“色谱”, 这就是最早的液相色谱分析技术。

随着液相色谱填料的粒度由粗逐渐变细, 柱效不断提高, 使流动相通过色谱柱的柱压也不断提高, 由最早使用 $40\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 填料的低、中压液相色谱, 发展到使用 $3\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$ 填料的高效 (压) 液相色谱, 而目前超高效 (压) 液相色谱用的填料已在 $2\mu\text{m}$ 以下。

随着液相色谱填料的种类不断扩大, 出现了不同分离模式的液相色谱分析技术, 如正相色谱、反相色谱、亲水色谱、疏水色谱、离子交换色谱、体积排阻色谱、亲和色谱等。分离模式不断增加, 也使得液相色谱分析技术的应用领域越来越扩大, 使得液相色谱分析技术成为目前应用最广的现代分析分离技术。

1.1.2 常用液相色谱分析技术和应用范围

目前常用的液相色谱分析技术是高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 包括超高效液相色谱 (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)、离子色谱 (Ion Chromatography, IC)、凝胶色谱 (Gel Permeation Chromatography, GPC) 和薄层色谱 (Thin Layer Chromatography, TLC) 等, 以下对这几种液相色谱分析技术及其主要应用范围作简单介绍。

高效液相色谱 (HPLC, 包括 UHPLC) 是目前应用最多、应用范围最广的液相色谱分析技术, 它可以有多种分离模式, 主要有正相、反相、亲水、疏水等, 可用于各类小分子有机化合物及蛋白质和多肽的分离和分析。

离子色谱 (IC) 是以离子交换为分离模式的一种液相色谱分析技术, 主要用于在水溶液中可形成离子的化合物的分离和分析。

凝胶色谱 (GPC) 是以分子大小为分离模式的一种液相色谱分析技术, 主要用于高分子化合物和生物大分子的分离和分析。用于高分子化合物分离和分析的凝胶是不同孔径交联的聚苯乙烯树脂, 可分离分子量几千到几百万道尔顿 (Dalton) 的高分子化合物, 称为

凝胶渗透色谱；而用于生物大分子分离和分析的是低交联度的聚合物（如葡聚糖），它们在有机溶剂中会溶胀，只能分离和分析水溶性大分子，称为凝胶过滤色谱。

薄层色谱（TLC）是将液相色谱的固定相，即液相色谱填料，在加入一定的粘结剂后涂布在支持载体（玻璃片、铝箔、塑料片等）上，形成固定相的薄层，将欲分离、分析的样品点在该薄层上，然后将此薄层板放入已加入展开剂（相当于液相色谱的流动相）的 TLC 专用展开槽内展开，样品中的不同组分在薄层板上移动的距离不一样，得到分离。将展开后的薄层板显色后放到薄层扫描仪上进行扫描，即可得到相应的色谱图，由此可进行定性、定量分析。所有的液相色谱分离模式都可以在 TLC 上实现，TLC 的主要应用领域在药物分析，药典中收录了很多 TLC 方法。

IC 和 GPC 实质上也是 HPLC 中的一种分离模式，一般情况下也将其列入 HPLC 范畴。

1.2 液相色谱基础知识

1.2.1 液相色谱常用术语及定义

在色谱文献中所用的术语不太统一，本书以国家标准气相和液相色谱术语为准，并参照 IUPAC1998 年公布的解释加以说明，以下结合图 1-1 介绍液相色谱常用术语。

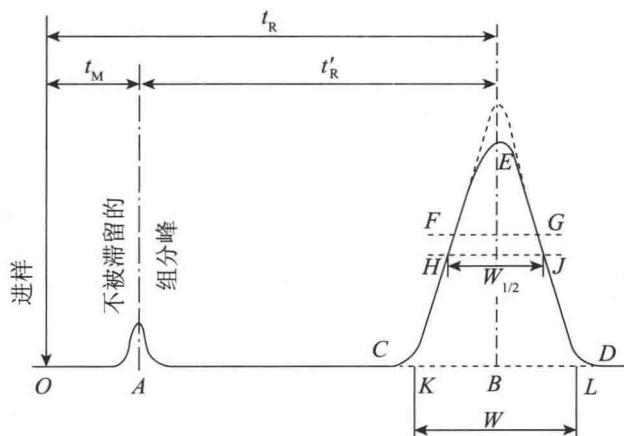


图 1-1 标准液相色谱图

固定相：在色谱分离中固定不动、对样品产生保留的一相，即柱色谱或平板色谱中既起分离作用又不移动的那一相。液相色谱中的固定相为各种键合型的硅胶小球，离子交换色谱中的固定相为各种离子交换剂，排阻色谱中的固定相为各种不同类型的凝胶等。固定相的选择对样品的分离起着重要作用，有时甚至是决定性的作用。

流动相：色谱过程中携带待测组分向前移动的物质称为流动相。待测组分在流动相与固定相中处于平衡状态，并随流动相向前移动。液相色谱中的流动相是液体。

梯度洗脱：在液相色谱的同一个分析周期中，按一定程序不断改变流动相的浓度配比，称为梯度洗脱。梯度洗脱可以使一个复杂样品中性质差异较大的组分能按各自适宜的保留因子（又称容量因子） k 达到良好的分离目的。梯度洗脱的优点：①缩短分析周期；②提高分离能力；③峰形得到改善，减少拖尾；④增加灵敏度。但梯度洗脱有时可引起基

线漂移, 此时就不可以使用梯度洗脱。

保留值: 在液相色谱分析时, 当仪器的操作条件保持不变时, 任一物质的色谱峰总是在色谱图上固定的位置出现, 即有一定的保留值, 通常用保留时间、保留体积来表示。在薄层色谱分析中, 保留值常以移动距离来表示。

保留时间 t_R : 组分从进样到出现峰最大值时所需的时间 (见图 1-1 中 t_R)。

死时间 t_M : 不被固定相滞留的组分, 从进样到出现峰最大值时所需的时间 (见图 1-1 中 t_M)。

调整保留时间 t'_R : 减去死时间的保留时间 (见图 1-1 中 t'_R)。

保留体积 V_R : 组分从进样到出现峰最大值时所需的流动相体积。

死体积 V_M : 不被固定相滞留的组分, 从进样到出现峰最大值时所需的流动相体积。

调整保留体积 V'_R : 减去死体积的保留体积。

移动距离: 薄层色谱展开后, 组分距离点样点的距离。

比移值 R_f : 组分移动距离与流动相移动距离之比。

峰底: 从峰的起点到终点之间的连接直线 (见图 1-1 中 CD)。

峰高 h : 从峰高最大值到峰底的距离 (见图 1-1 中 BE)。

峰宽 W : 在峰两侧拐点 (见图 1-1 中的 F 、 G) 处所作切线与峰底相交两点间的距离 (见图 1-1 中 KL)。

半高峰宽 $W_{1/2}$: 通过峰高的中点作平行于峰底的直线, 此直线与峰两侧相交两点间的距离 (见图 1-1 中 HJ)。

峰面积 A : 峰与峰底之间的面积 (见图 1-1 中 $CHEJDC$)

拖尾峰: 后沿较前沿平缓的不对称峰。

前伸峰: 前沿较后沿平缓的不对称峰。

假峰: 并非由试样所产生的峰。

基线: 在正常操作条件下仅有流动相通过检测系统时产生的响应值信号的曲线。

基线漂移: 基线随时间定向的缓慢变化。

基线噪声 N : 由于各种因素所引起的基线波动。

响应值 R : 组分通过检测器系统所产生的信号值。

灵敏度 S : 通过检测器的物质量变化 ΔQ 时响应信号的变化率。

$$S = \Delta R / \Delta Q$$

检测限 D : 随单位体积的流动相或在单位时间内进入检测器的组分所产生的信号等于基线噪声二倍时的量。

$$D = 2N / S$$

式中: S 为灵敏度; N 为基线噪声。

柱效 (能): 色谱柱在色谱分离过程中主要由动力学因素 (操作参数) 所决定的分离效能。通常用理论板数、理论板高或有效板数来表示。

①理论塔板数 n : 表示柱效 (能) 的物理量:

$$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

式中: t_R 为某一组分的保留时间, min; $W_{h/2}$ 、 W 分别为该组分的半峰宽和峰宽。

②理论塔板高度 (H): 单位理论塔板的长度:

$$H = \frac{L}{n}$$

式中: n 为理论板数; L 为柱长。

③有效塔板数 n_{eff}

$$n_{\text{eff}} = 5.54 \left(\frac{t'_R}{W_{h/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t'_R}{W} \right)^2$$

式中: t'_R 为组分的调整保留时间, min; $W_{h/2}$ 、 W 分别为该组分的半峰宽和峰宽。

分离度 R : 两个相邻色谱峰的分离程度, 以两个组分的保留值之差与其平均峰宽值之比表示 (见图 1-2)。

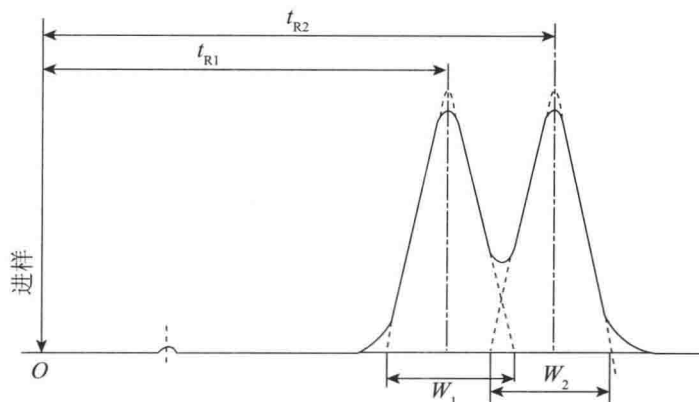


图 1-2 分离度表示方法

$$R = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \right)$$

式中: t_{R1} 、 t_{R2} 分别为峰 1、峰 2 的保留时间, min; W_1 、 W_2 分别为峰 1、峰 2 的峰宽。

保留因子 (又称容量因子) k : 在平衡状态时, 组分在固定相与流动相中的质量比。

$$k = K \frac{V_1}{V_m} = \frac{K}{\beta} = \frac{t'_R}{t_M}$$

式中: K 为分配系数; V_1 为柱内固定相体积, mL; V_m 为柱内流动相体积, mL; β 为相比率, 柱中流动相与固定相体积之比 $\beta = V_m/V_1$; t'_R 为调整保留时间, min; t_M 为死时间, min。

1.2.2 液相色谱的分离模式

液相色谱按固定相的不同, 分离模式可分为正相色谱、反相色谱、体积排阻色谱、离子交换色谱、亲水色谱和疏水色谱。

正相色谱: 流动相极性小于固定相极性的液相色谱。

反相色谱: 流动相极性大于固定相极性的液相色谱。

体积排阻色谱: 固定相为不同孔径的多孔材料, 按分子大小分离的液相色谱。

离子交换色谱: 固定相为离子交换树脂, 通过离子交换分离的液相色谱。

亲水色谱: 强极性固定相表面因吸水而造成一个富含水环境的液相色谱。