



“十二五”
国家重点图书

Handbook of Analytical Chemistry

分析化学手册

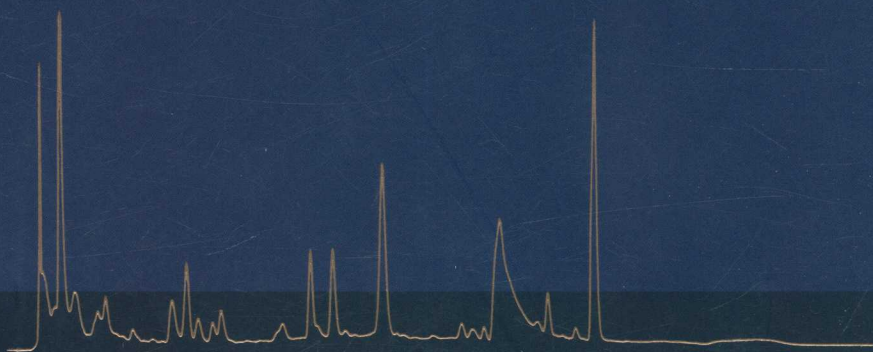
第三版

6

液相色谱分析

张玉奎 主编

张维冰 邹汉法 张丽华 副主编



化学工业出版社

分析化学手册

第三版

6

液相色谱分析

张玉奎 主编

张维冰 邹汉法 张丽华 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

《分析化学手册》第三版在第二版的基础上作了较大幅度的增补和删减,保持原手册 10 个分册的基础上,将其中 3 个分册进行拆分,扩充为 6 册,最终形成 13 册。

本分册内容由两篇组成,第一篇介绍有关液相色谱方法和各种分离模式的原理、仪器及参数、使用方法等,包括液相色谱基础、液相色谱固定相与色谱柱、高效液相色谱分离模式及仪器系统、多维色谱及联用技术、定性定量方法、毛细管电泳、毛细管电色谱、微流控芯片分析、平面分离技术以及样品预处理技术;第二篇为谱图选集,共分 5 章,精选了不同行业内 700 多张不同化合物的谱图。

与第二版相比,本分册在方法部分增加了近 10 年来发展迅速的多维液相色谱、联用技术、微流控芯片等多种方法和技术,对原有的方法也做了大规模的更新;谱图选集按化合物类别进行编排,比第二版按方法编排更利于有关行业的分析人员检索和参考。

本书适合化学及分析科学与技术相关领域的研究人员和技术人员学习与查阅。

图书在版编目(CIP)数据

分析化学手册. 6. 液相色谱分析/张玉奎主编. —3 版.
北京:化学工业出版社, 2016.1
ISBN 978-7-122-25726-0

I. ①分… II. ①张… III. ①分析化学-手册②液相色谱-光谱分析-手册 IV. ①O65-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 282259 号

责任编辑:李晓红 傅聪智 任惠敏
责任校对:宋 夏

装帧设计:王晓宇

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:三河市胜利装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 40¼ 字数 1050 千字 2016 年 10 月北京第 3 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:138.00 元

版权所有 违者必究

《分析化学手册》(第三版)编委会

主 任: 汪尔康

副主任: 江桂斌 陈洪渊 张玉奎

委 员 (按姓氏汉语拼音排序):

柴之芳	中国科学院院士 中国科学院高能物理研究所
陈洪渊	中国科学院院士 南京大学
陈焕文	东华理工大学
陈 义	中国科学院化学研究所
丛浦珠	中国医学科学院药用植物研究所
邓 勃	清华大学
董绍俊	发展中国家科学院院士 中国科学院长春应用化学研究所
郭伟强	浙江大学
江桂斌	中国科学院院士 中国科学院生态环境研究中心
江云宝	厦门大学
柯以侃	北京化工大学
梁逸曾	中南大学
刘振海	中国科学院长春应用化学研究所
庞代文	武汉大学
邵元华	北京大学
苏 彬	浙江大学
汪尔康	中国科学院院士 中国科学院长春应用化学研究所
王 敏	浙江大学

吴海龙	湖南大学
许国旺	中国科学院大连化学物理研究所
严秀平	南开大学
杨峻山	中国医学科学院药用植物研究所
杨芑原	复旦大学
杨秀荣	中国科学院院士
	中国科学院长春应用化学研究所
姚守拙	中国科学院院士
	湖南大学, 湖南师范大学
于德泉	中国工程院院士
	中国医学科学院药物研究所
俞汝勤	中国科学院院士
	湖南大学
张新荣	清华大学
张玉奎	中国科学院院士
	中国科学院大连化学物理研究所
赵墨田	中国计量科学研究院
郑国经	北京首钢冶金研究院
	(现北冶功能材料有限公司)
郑 健	中华人民共和国科学技术部
朱俊杰	南京大学
庄乾坤	国家自然科学基金委员会化学科学部

本分册编写人员

主 编：张玉奎

副主编：张维冰 邹汉法 张丽华

编 者（按姓氏汉语拼音排序）：

方 群 冯钰琦 谷 雪 李 彤 梁 振

钱俊红 施治国 苏立强 唐 涛 陶定银

王 彦 魏 芳 魏远隆 徐 丽 阎 超

杨长龙 张丽华 张凌怡 张庆合 张维冰

张养军 邹汉法

序

分析化学是人们获得物质组成、结构及相关信息的科学，即测量与表征的科学。其主要任务是鉴定物质的化学组成及含量测定、确定物质的结构形态及其与物质性质之间的关系。分析化学是一门社会和科技发展迫切需要的、多学科交叉结合的综合性科学。现代分析化学必须回答当代科学技术和社会需求对现存的方法和技术的挑战，因此实际上已发展成为“分析科学”。

《分析化学手册》是一套全面反映现代分析技术，供化学工作者使用的专业工具书。《分析化学手册》第一版于 1979 年出版，有 6 个分册；第二版扩充为 10 个分册，于 1996 年至 2000 年陆续出版。手册出版后，受到广大读者的欢迎，成为国内很多分析化验室和化学实验室的必备图书，对我国科技进步和社会发展都产生了重要作用。

进入 21 世纪，随着科技进步和社会发展对分析化学提出的种种要求，各种新的分析手段、仪器设备、信息技术的出现，极大地丰富了分析化学学科的内涵、促进了学科的发展。为更好总结这些进展，为广大读者服务，化学工业出版社自 2010 年起开始启动《分析化学手册》（第三版）的修订工作，成立了由分析化学界 30 余位专家组成的编委会，这些专家包括了 10 位中国科学院院士、中国工程院院士和发展中国家科学院院士，多位长江学者特聘教授和国家杰出青年基金获得者，以及各领域经验丰富的专家。在编委会的领导下，作者、编辑、编委通力合作，历时六年完成了这套 1800 余万字的大型工具书。

本次修订保持了第二版 10 分册的基本架构，将其中的 3 个分册进行拆分，扩充为 6 册，最终形成 10 分册 13 册的格局：

- | | | | |
|----|-----------|----|---------------|
| 1 | 基础知识与安全知识 | 7A | 氢-1 核磁共振波谱分析 |
| 2 | 化学分析 | 7B | 碳-13 核磁共振波谱分析 |
| 3A | 原子光谱分析 | 8 | 热分析与量热学 |
| 3B | 分子光谱分析 | 9A | 有机质谱分析 |
| 4 | 电分析化学 | 9B | 无机质谱分析 |
| 5 | 气相色谱分析 | 10 | 化学计量学 |
| 6 | 液相色谱分析 | | |

其中，原《光谱分析》拆分为《原子光谱分析》和《分子光谱分析》；《核磁共振波谱分析》拆分为《氢-1 核磁共振波谱分析》和《碳-13 核磁共振波谱分析》；《质谱分析》新增加了无机质谱分析的内容，拆分为《有机质谱分析》和《无机质谱分析》，并对仪器结构及方法原理进行了全面的更新。另外，《热分析》增加了量热学方面的内容，分册名变更为《热分析与量热学》。

本版修订秉承的宗旨：一、保持手册一贯的权威性和典型性，体现预见性和前瞻性，突出新颖性和实用性；二、继承手册的数据查阅功能，同时注重对分析方法和技术的介绍；三、着重收录了基础性理论和发展较成熟的方法与技术，删除已废弃的或过时的内容，更新有关数据，增补各领域近十年来的新方法、新成果，特别是计算机的应用、多种分析技术联用、分析技术在生命科学中的应用等方面的内容；四、在编排方式上，突出手册的可查阅性，各分册均编排主题词索引，与目录相互补充，对于数据表格、图谱比较多的分册，增加表索引和谱图索引，部分分册增设了符号与缩略语对照。

手册第三版获得了国家出版基金项目的支持，编写与修订工作得到了我国分析化学界同仁的大力支持，全套书的修订出版凝聚了他们大量的心血和期望，在此谨向他们，以及在编写过程中曾给予我们热情支持与帮助的有关院校、科研院所及厂矿企业的专家和同行，致以诚挚的谢意。同时我们也真诚期待广大读者的热情关注和批评指正。

《分析化学手册》(第三版)编委会
2016年4月

前 言

本分册自 1984 年问世至今已有 30 余年,第二版 2000 年出书距今也有 10 余年的时间了。这期间,高效液相色谱得到了长足的进步,尤其在仪器性能和色谱分离介质等方面得到了更大的发展,目前已经成为几乎被应用于所有科研、生产、生活领域的经典工具。

任何一门科学的发展离不开其所处的时代背景和社会需求,分离科学的发展也不例外。随着材料科学、环境科学的发展,具有特殊结构高分离效能或者高选择性的新型固定相被研究与开发,新型样品预处理技术的发展,极大地丰富了高效液相色谱的研究手段。本次再版的目的既希望尽可能反映液相色谱的最新研究成果和进展,同时基于《分析化学手册》(以下简称《手册》)作为案头书的属性,也将对液相色谱的基本原理、基本方法进行系统地梳理,以使读者可以更便捷地查阅和使用。与前一版相比,本书结构上没有做太大的调整,这对于已经习惯于将本《手册》作为工具书的读者非常有利。然而,本次修订在内容上做了较大幅度的修改和增补,删除了一些过时的内容,也更多地补充了一些实用的、新的知识,以保证《手册》作为工具书的权威性。

值得一提的是,本书在色谱固定相、分离模式方面,以及对于谱图库的架构做了较大幅度的补充和完善。尽管液相色谱可以通过流动相体系的改变来便捷地调节分离选择性,然而随着材料科学的发展迅速,尤其是近年来纳米技术的发展,带动了新型固定相和分离介质的快速发展。随着新型固定相的不断问世,液相色谱不仅在分离模式的选择方面增加了发展的空间,在同一个分离模式下,也有更多的对选择性细微差别的固定相可供选择。

互联网时代的进步,对于所有学科的知识获取都带来了巨大的冲击,液相色谱也不例外。在本书的前两版中,第二篇的谱图库部分主要来源于发表的纸质版杂志、会议文集等。例如,第二版中,为了完成下篇的谱图库部分,当初共收集了 6000 余张纸质版谱图,并从中筛选出近千张编辑成册。本次修改中,这部分谱图大多来源于互联网,尤其是国际上比较大的仪器公司的应用谱图库。共收集了 2 万余张谱图,通过与版权人沟通,最终整理筛选出 700 余张谱图成册。在信息量、内容的完善程度上,显然这种方法具有更大的优越性,内容也较之前更加丰富和全面,具有更好的权威性和代表性。值得注意的是,这次收集的谱图中仅有少量经典的平面色谱、毛细管电色谱等内容,这主要是出于对于其应用范围、方法的稳定性和普适性的考虑。

本书的编者中部分为前一版的作者,对于手册内容的整体延续性极为有利;同时也邀请了多位在液相色谱领域长期工作的专家和热心实践者参与,书中的诸多成果可能就来自于其

自己实验室的研究工作。

液相色谱的发展很大程度上得益于近期材料科学、微电子技术、微加工技术的发展。对复杂环境样品、生物样品研究的需求也是其外在的强大驱动力。HPLC 从理论、分离模式、方法发展等方面已经趋于成熟,甚至一些研究先驱也将研究重点和方向转入质谱、微流控芯片等其他领域,也因此可以相信基于编者的知识储备和经验完成的这本手册将在较长的一段时间内不会过时,仍有较高的参考价值。

本书第一篇中第一章由中国科学院大连化学物理研究所张玉奎编写;第二章由中国计量科学研究院张庆合和张权青编写;第三章由华东理工大学张凌怡和中国科学院大连化学物理研究所邹汉法编写;第四章由大连依利特分析仪器有限公司李彤、唐涛和四川出入境检验检疫局检验检疫技术中心魏远隆编写;第五章由华东理工大学张维冰和美国 Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health 陶定银编写;第六章由华东理工大学钱俊红和张维冰编写;第七章由华中科技大学徐丽、中国农业科学院武汉油料作物研究所魏芳、武汉大学施治国和冯钰琦编写;第八章由上海交通大学阎超、王彦和谷雪编写;第九章由浙江大学方群编写;第十章由军事医学科学院张养军编写;第十一章由中国科学院大连化学物理研究所张丽华和梁振编写;第二篇由齐齐哈尔大学苏立强和韩爽、中国计量科学研究院陶红及华东理工大学张维冰收集整理。全书最终由张玉奎和张维冰统筹定稿。

在本书的编写过程中,得到了编者所在单位及其同仁的鼎力支持和帮助,卢佩章院士对本书的出版给予了热情关注。MERCK 公司的 Wen Jiang 博士在 HILIC 模式色谱柱及方法发展方面给出了一些有益的指导,化学工业出版社三位编辑在书的整体设计、内容选择、结构设计等提出了诸多宝贵建议,在此一并表示由衷的感谢。

由于时间较为仓促,谬误和不当之处在所难免,恳请读者批评指正。

张玉奎
2016 年春于大连

目 录

第一篇 液相色谱方法

第一章 液相色谱基础.....2	一、色谱柱的分类.....33
第一节 概述.....2	二、色谱柱的结构.....33
一、液相色谱发展简史.....2	三、柱性能评价.....34
二、液相色谱基本原理.....4	第二节 液相色谱固定相基质.....36
三、液相色谱分类.....5	一、固定相基质的特征.....36
第二节 液相色谱术语.....7	二、基质的形态.....37
一、一般术语.....7	三、常用固定相基质.....38
二、色谱曲线.....9	第三节 不同分离模式的液相色谱固定相.....42
三、分离模式.....10	一、反相色谱固定相.....42
四、仪器.....11	二、正相色谱固定相.....45
五、固定相和流动相.....13	三、离子交换色谱固定相.....46
六、色谱参数.....13	四、体积排阻色谱固定相.....48
七、其他概念.....15	五、亲水作用色谱固定相.....53
第三节 几个重要色谱参数的计算及 测定方法.....17	六、疏水相互作用固定相.....54
一、保留时间和保留体积.....17	七、高效亲和色谱固定相.....55
二、柱效能指标.....18	八、灌流色谱固定相.....57
第四节 液相色谱基础理论.....20	九、手性色谱固定相.....58
一、相平衡理论.....20	第四节 色谱柱常见问题.....62
二、塔板理论.....21	一、键合硅胶固定相的稳定性.....62
三、速率理论.....23	二、色谱柱性能下降或失效.....62
四、几个重要的理论关系式.....25	三、色谱柱的清洗与再生.....64
第五节 常用液相色谱参考资料及 相关网站.....26	参考文献.....66
一、国内出版的图书类参考资料.....26	第三章 高效液相色谱分离模式.....68
二、国内期刊及联系方式.....27	第一节 分离模式与洗脱溶剂.....68
三、国外期刊及网址.....30	一、分离模式的选择.....68
四、国内外其他相关网站.....31	二、洗脱溶剂的特征.....68
参考文献.....32	第二节 反相液相色谱法.....69
第二章 液相色谱固定相与色谱柱.....33	一、原理及色谱柱推荐.....69
第一节 液相色谱柱的结构与特征.....33	二、流动相.....71
	三、方法发展.....72
	第三节 正相液相色谱法.....73

一、原理与色谱柱推荐	73
二、流动相	74
三、方法发展	75
第四节 离子交换液相色谱法	76
一、原理与色谱柱推荐	76
二、流动相	77
三、方法发展	78
第五节 体积排阻色谱法	79
一、原理与色谱柱推荐	79
二、流动相	80
三、方法发展	80
第六节 亲和色谱法	81
一、原理与色谱柱推荐	81
二、流动相	82
三、方法发展	83
第七节 其他分离模式	83
一、离子对液相色谱	83
二、离子色谱	83
三、亲水作用色谱	84
四、疏水作用色谱	84
参考文献	85

第四章 高效液相色谱仪器系统 86

第一节 高效液相色谱输液系统	86
一、输液系统的构成及要求	86
二、储液装置及吸液组件	86
三、流动相脱气装置	87
四、输液泵	87
第二节 梯度洗脱系统	92
一、高压梯度装置	93
二、低压梯度装置	94
第三节 进样系统	94
一、手动进样阀	95
二、自动进样器	96
三、进样对峰扩展的影响	98
第四节 检测系统	98
一、检测器的基本特性	98
二、检测器的分类	98
三、检测器的性能指标	99
四、几种常见 HPLC 检测器	102
第五节 色谱配件	112

一、管路和连接件	112
二、其他配件	112
第六节 液相色谱仪器常见问题及解决方法	113
一、液相色谱输液泵常见故障	113
二、自动进样器常见故障	114
三、根据色谱图的变化判断仪器故障	115
四、液相色谱仪日常维护及注意事项	118
参考文献	119

第五章 多维液相色谱及 LC-MS 联用技术 120

第一节 二维液相色谱的原理与仪器构造	120
一、二维液相色谱基本原理	120
二、二维液相色谱的组成	122
第二节 二维液相色谱接口技术	123
一、柱内转移形式	123
二、柱间转移接口	124
三、富集式接口	126
四、稀释式接口	128
第三节 液相色谱-质谱联用仪	129
一、液相色谱用质谱检测器的特征	129
二、液相色谱-质谱联用中的常用质谱	129
第四节 HPLC-MS 接口技术	132
一、电喷雾离子化	132
二、大气压化学离子化	134
三、大气压光离子化	134
四、基质辅助激光解吸离子化	135
第五节 多维液相色谱-质谱联用技术的应用	136
一、多维液相色谱质谱应用于蛋白质及其酶解产物分析	136
二、多维液相色谱应用于天然产物分析	140
三、中药分析	142
四、磷脂、有机物分析	143
参考文献	144

第六章 定性定量方法	146
第一节 液相色谱定性分析.....	146
一、利用已知标准样品定性.....	146
二、利用检测器的选择性定性.....	147
三、利用 DAD 三维图谱检测器 定性.....	147
四、利用保留值规律定性.....	149
五、联用技术结合定性.....	150
六、化学方法定性.....	153
第二节 定量分析方法.....	153
一、信号的测量.....	153
二、定量方法.....	159
第三节 方法论证.....	164
一、方法论证规范.....	164
二、方法论证中的问题.....	165
三、准确度、精密度和线性范围.....	165
四、检测限和定量限.....	166
参考文献.....	167
第七章 毛细管电泳	168
第一节 毛细管电泳原理.....	168
一、概述.....	168
二、基本理论.....	169
第二节 毛细管电泳分离模式.....	173
一、毛细管区带电泳.....	173
二、胶束电动毛细管电泳.....	175
三、毛细管凝胶电泳.....	177
四、毛细管等电聚焦.....	179
五、毛细管等速电泳.....	180
第三节 毛细管电泳仪器.....	180
一、高压电源.....	180
二、分离毛细管.....	181
三、进样系统.....	181
四、恒温系统.....	182
五、检测器.....	183
第四节 毛细管电泳-质谱联用技术.....	187
一、CE-MS 接口的基本构成.....	187
二、鞘液接口.....	187
三、无鞘液接口.....	188
第五节 进样富集技术.....	189
一、场放大富集.....	190

二、等速电泳聚焦.....	190
三、pH 调制堆积.....	191
四、动态 pH 连接.....	192
五、扫集技术.....	192
六、固相萃取.....	193
参考文献.....	193

第八章 毛细管电色谱	194
第一节 毛细管电色谱基本原理.....	194
一、毛细管电色谱的发展.....	194
二、毛细管电色谱的电动分离机理.....	195
三、毛细管电色谱的色谱保留 机理.....	196
四、毛细管电色谱的谱带展宽 和柱效评估.....	197
第二节 毛细管电色谱仪器.....	202
一、概述.....	202
二、毛细管电色谱的进样及富集 技术.....	203
三、CEC 联用检测器.....	205
第三节 毛细管电色谱柱.....	208
一、毛细管开管柱.....	209
二、毛细管填充柱.....	211
三、毛细管整体柱.....	212
第四节 加压毛细管电色谱.....	215
一、pCEC 的基本原理.....	216
二、仪器构造.....	216
三、加压毛细管电色谱多维分离 技术.....	218
第五节 毛细管电色谱的应用.....	219
一、毛细管电色谱在生物样品中的 应用.....	219
二、毛细管电色谱在药物分析中的 应用.....	222
三、CEC 在食品安全与环境安全中的 应用.....	225
参考文献.....	228

第九章 微流控芯片分析	234
第一节 微流控芯片.....	234
一、微流控芯片的加工.....	234

二、微流体的驱动和控制	235	二、实验材料、设备与基本操作	276
第二节 微流控芯片分析系统	237	三、应用	277
一、微流控进样系统	237	第五节 薄层电泳	278
二、微流控试样预处理系统	237	第六节 凝胶电泳	279
三、高分辨分离系统	239	一、原理	279
四、检测系统	241	二、实验材料、设备与基本操作	280
第三节 微流控芯片分析系统的应用	244	参考文献	283
参考文献	250		

第十章 平面分离技术	252
第一节 概述	252
第二节 纸色谱法	253
一、原理与基本理论	253
二、影响分离的因素	255
三、实验材料(滤纸)与设备 (展开室等)	256
四、定性与定量	259
五、应用——氨基酸分析	261
第三节 薄层色谱法	264
一、原理与基本理论	264
二、实验材料与操作技术	268
三、薄层色谱定量分析	273
四、应用	274
第四节 纸电泳法	274
一、原理与基本理论	275

第十一章 样品预处理技术	285
第一节 概述	285
第二节 液体样品的预处理	288
一、液-液萃取	288
二、高压冷冻萃取技术	290
三、固相萃取	291
四、固相微萃取	295
五、膜分离	296
六、分子印迹法	298
第三节 固体、半固体样品的预处理	299
一、传统萃取方法	299
二、新型萃取方法	299
第四节 柱上富集	303
第五节 衍生化方法	304
一、基于检测技术的衍生化方法	304
二、衍生化技术	308
参考文献	309

第二篇 谱图选集

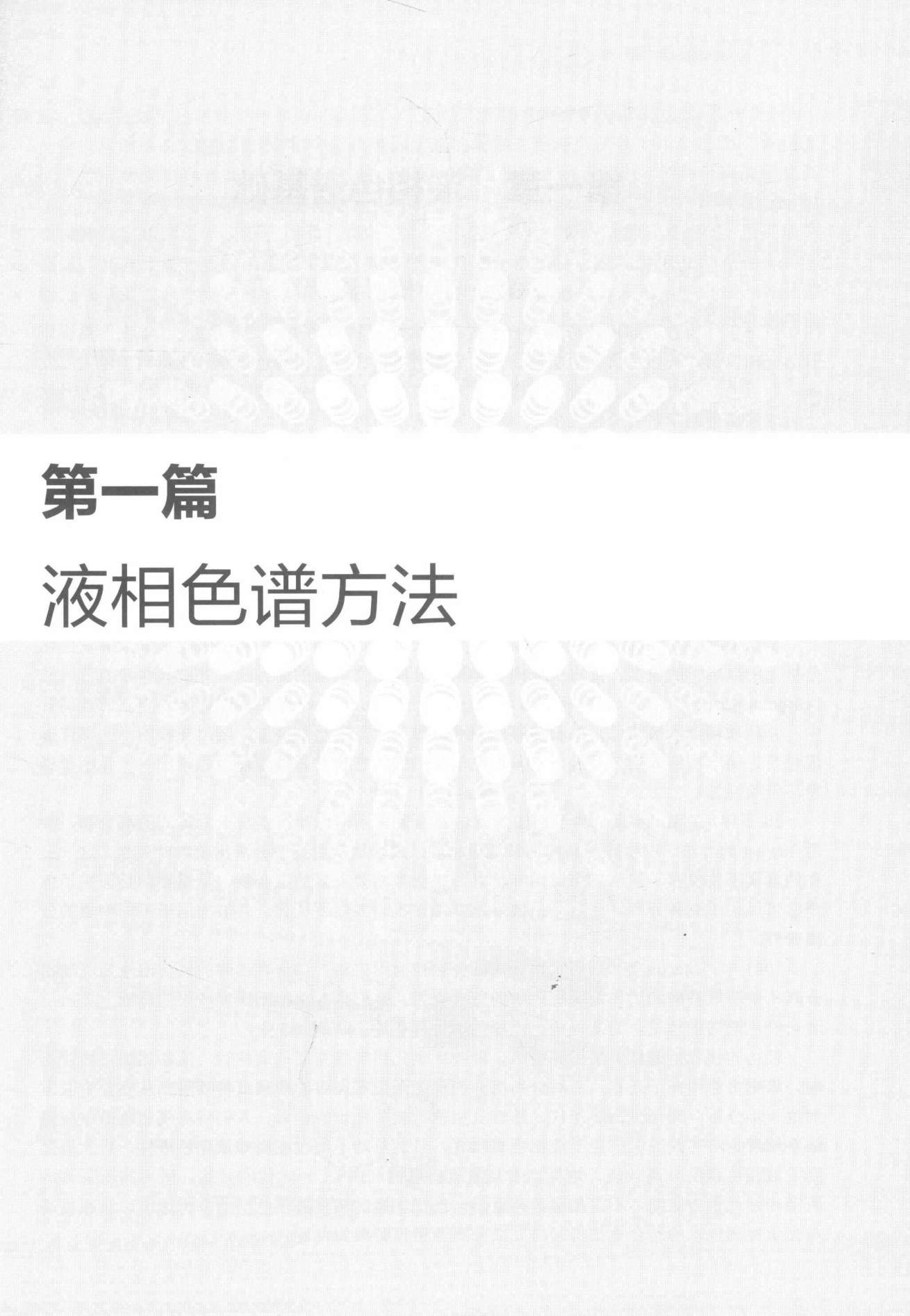
第十二章 生物样品	312
一、蛋白质	312
二、氨基酸	333
三、肽	350
四、核酸与核苷酸	358
五、酶类	364
资料来源	379
第十三章 天然产物样品谱图	380
资料来源	395

第十四章 生化医药和手性分子谱图	396
-------------------------	-----

资料来源	454
第十五章 环境与安全样品色谱图	455
一、水中农药残留	455
二、环境及食品中的农药残留	461
三、激素	470
四、塑化剂	471
五、农药	476
六、芳香类化合物	483
资料来源	496

第十六章 食品及食品添加剂	497
----------------------	-----

一、食品添加剂.....	497	第十七章 其他	563
二、食品成分分析.....	521	资料来源.....	594
三、糖分离	535		
资料来源	562		
符号与缩略语			595
主题词索引			598
表索引			605
谱图索引			608

The background of the entire page is a light gray with a repeating pattern of white footprints. The footprints are arranged in a grid-like fashion, with some rows being more prominent than others, creating a subtle texture.

第一篇

液相色谱方法

第一章 液相色谱基础

第一节 概 述

色谱学作为最强的现代分离分析手段，已经走过百年历史。尤其是近 30 年来，不仅原有的气相色谱、液相色谱、薄层色谱、凝胶渗透色谱和纸色谱等色谱学分支得到了较大的发展，而且毛细管电泳、毛细管电色谱、逆流色谱等新型色谱分离模式也不断问世，标志着这一古老又新型的学科有着强大生命力和重要的应用价值。

色谱法的发展得益于微电子、微加工等现代科学技术的发展，以及石油化工、有机合成、生理生化、医药卫生，乃至空间探索等诸多领域的应用需求。色谱-质谱联用、色谱-红外光谱联用、多维色谱技术等各种联用技术的出现，更开辟了复杂混合物分析检测的新天地。目前，色谱法已经成为人们认识客观世界必不可少的工具，并在不断丰富、提高和发展。

一、液相色谱发展简史

早在 1903 年，俄国植物学家 Tsweet^[1~3]发表了一篇题为“一种新型吸附现象及其在生化分析上的应用”的论文，提出了应用吸附原理分离植物色素的新方法，并被其命名为色谱法(chromatography)，这一工作标志着现代色谱学的开始。Tsweet 将碳酸钙装入竖立的玻璃管中，并从顶端倒入植物色素的石油醚浸取液，进一步采用溶剂冲洗，溶质在柱的不同部位形成色带，第一次向人们公开展示了采用色谱法提纯的植物色素溶液以及色谱图——显示着彩色环带的柱管。

20 多年后，Kuhn 等^[4]为了证实蛋黄内的叶黄素系植物叶黄素与玉米黄质的混合物，参考 Tsweet 的方法，以粉碎的碳酸钙装填色谱柱，成功地从蛋黄中分离出植物叶黄素。这一工作的意义不仅仅在于证明了蛋黄内叶黄素是氧化类胡萝卜素的混合物，更重要的是证实了色谱法可以用于制备分离。此后，色谱分离方法逐步为人们所认识，并被应用于不同物质的分离研究。

1941 年，Martin 等^[5]采用水饱和的硅胶颗粒为固定相，以含有乙醇的氯仿溶液为流动相分离乙酰基氨基酸的工作是分配色谱的首次应用。他们也在总结其研究成果的基础上提出了著名的色谱塔板理论，为从理论上诠释色谱过程奠定了基础。

最初的液相色谱柱多采用碳酸钙、硅胶、氧化铝等填充的玻璃柱管，流动相加在柱管上端，靠重力作用向下迁移，而对分离组分的检测则依靠肉眼的观察或将吸附剂从柱管中取出后进一步分析。20 世纪 60 年代，随着气相色谱相关知识的积累，人们将在气相色谱中获得的系统理论与实践经验应用于液相色谱研究，研制成功了细粒度高效填充色谱柱，极大地提高了液相色谱的分离效能，也标志着高效液相色谱(HPLC)时代的开始。采用高压泵输送流动相替代重力驱动，不仅使柱效率更高，也极大地加快了液相色谱的分析速度。液相色谱与光学检测技术的结合更使得同时完成分离分析任务成为可能。