

SEPU JISHU CONGSHU

色谱技术丛书

高效液相色谱方法及应用

第二版

于世林 编著



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

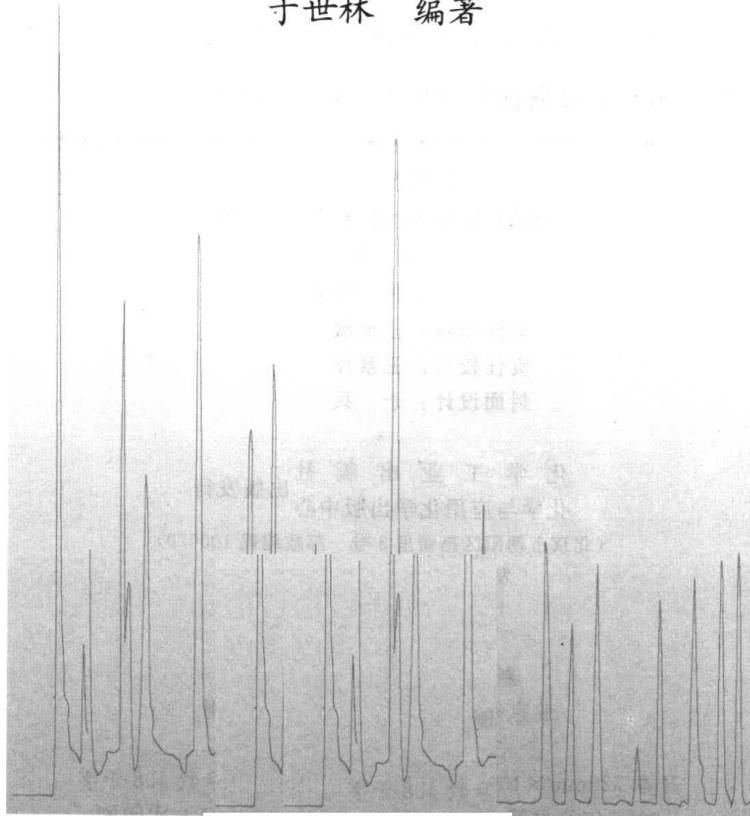
S P E C T R O M E T R Y C O N G S H U

色谱技术丛书

高效液相色谱方法及应用

第二版

于世林 编著



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

· 北京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

高效液相色谱方法及应用(第2版)/于世林编著.
北京: 化学工业出版社, 2005.4
(色谱技术丛书)
ISBN 7-5025-6906-5

I. 高… II. 于… III. 液相色谱仪 IV. TH833

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 029227 号

色谱技术丛书

高效液相色谱方法及应用

第二版

于世林 编著

责任编辑: 任惠敏

责任校对: 王素芹

封面设计: 于 兵

*

化 学 工 业 出 版 社 出 版 发 行
化 学 与 应 用 化 学 出 版 中 心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 22 字数 408 千字

2005 年 6 月第 2 版 2005 年 6 月北京第 6 次印刷

ISBN 7-5025-6906-5

定 价: 39.00 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

序

《色谱技术丛书》第一版是从 2000 年初开始出版的。由于这是一套较全面地介绍当代色谱技术的丛书，取材新颖，内容丰富，所以从一出版就受到了读者的普遍欢迎和肯定，同时也被众多的技术培训班选作教材，致使每一分册的发行量都突破了万册。但是，随着科学技术的突飞猛进和国家经济建设的快速发展，色谱作为主要的分离分析技术，需求与应用越来越广泛，从事色谱分析工作的人员也越来越多，年轻的和刚刚从事色谱分析的人员急需普及和提高色谱分析的理论和技术。再者，色谱技术本身也在不断的发展，新技术不断出现，有必要向广大读者尽早介绍这些知识。此次，化学工业出版社与丛书主编、作者合作，适时地将这套丛书重新修订，再版面世，是对普及并推动色谱技术发展的又一贡献。

在经历了近五个年头的实践检验后，这套丛书的第二版除了对第一版原有的 13 个分册分别进行了修改和充实，增加了新的内容，包括新近发展的仪器、技术、方法与应用等的介绍，提高了丛书的质量；同时还进一步完善了整个丛书体系，增加了一些新的书目，特别是有关应用的书目，形成一套更完整的色谱技术丛书，以进一步满足广大读者的需求。增加的 10 本新的书目为：邓玉林等的《色谱手性分离技术及应用》，江桂斌、牟世芬等的《色谱在环境分析中的应用》，金熹高的《裂解气相色谱方法及应用》，廖杰、钱小红等的《色谱在生命科学中的应用》，田颂九等的《色谱在药物分析中的应用》，王绪卿、吴永宁等的《色谱在食品安全分析中的应用》，杨海鹰的《气相色谱在石油化工中的应用》，袁黎明的《制备色谱技术及应用》，于世林的《亲和色谱方法及应用》及胡净宇的《色谱在无机材料分析中的应用》。同第一版一样，这些分册的作者也都是长期在各自工作中

具有丰富经验的色谱专家。还应提出的是，此书也再次得到安捷伦科技有限公司的热情赞助。相信第二版《色谱技术丛书》会同第一版一样受到读者们的欢迎，特再为此序。

周同惠

2004年10月22日

第一版序

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。为此化学工业出版社提议，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》，刘国诠、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》，吴烈钩之《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

再 版 前 言

本书自 2000 年面世以来，受到广大读者的关爱，曾经 5 次重印，销售达 1.8 万册，在广大读者需求的驱动下，在经历近 5 年后，修订再版。

本书第二版在保持第一版编写体系的前提下，增加了梯度洗脱、微柱液相色谱法和二维高效液相色谱法 3 章，原书亲和色谱法一章，因拟另以单册出版，故在此版书中未予列入。另因篇幅所限，并因第二版丛书中增加了色谱在生命科学、医药、食品、环境等领域应用的专著，因此原书高效液相色谱法的分析应用一章，也未列入。

为了反映高效液相色谱领域在基本理论、新技术、新方法方面的进展，本次修订增添以下内容。

在绪论和仪器部分，对高效液相色谱方法发展过程作了简介，加强了对新型高压输液泵、保护柱、蒸发光散射检测器及当前常用的高效液相色谱仪的介绍。

在液固色谱、液液色谱和键合相色谱部分，增加了对新型固定相、流动相的介绍（如聚合物包覆硅胶、具有空间保护和静电屏蔽功能的键合固定相、整体色谱柱、超热水流动相等）。还简介了溶质在二元溶剂体系的色谱保留规律和化学键合固定相的分类方法。

在掌握表征溶剂特性参数和通过改变溶剂组成来提高分离选择性的基础上，梯度洗脱一章介绍了影响梯度洗脱的各种因素〔如梯度洗脱时间、 φ_B (%) 的变化范围、梯度陡度等〕、优化梯度洗脱方法和梯度洗脱的图示方法。其若与高效液相色谱分离条件的优化方法相结合，并使用 DryLab 等计算机程序软件，可大大加速高效液相分析方法的建立过程。

在高效液相色谱法基本理论一章，增加了对超高效液相色谱法的介绍。

在微柱液相色谱法部分介绍了基本理论、仪器装置、微柱制备方法、纳米液相色谱和超高压液相谱新技术。

在二维高效液相色谱法部分阐述了描述分离体系效能参数，二

维液相色谱的技术功能及具有中心切割或全二维液相色谱的通用流路，及在蛋白质组学研究中的应用。

在建立高效液相色谱分析方法的一般步骤中，增加了对溶剂纯化，色谱柱装填方法，色谱柱的平衡、保护和再生，梯度洗脱，色谱柱前、柱后衍生化检测，以及样品处理等实验技术的介绍。

作者希望再版新书，既能帮助读者依据基本原理去解决实际分析问题，又能使读者了解高效液相色谱领域新方法、新技术的发展现状，以满足不同读者的需求。各章列出必要的原始文献，供读者进行深入探求。

本书承蒙本丛书主编傅若农教授审阅，并提出中肯的修改意见。责任编辑为本书出版做了大量工作，作者特此致谢。

本次修订中 Waters 公司应用部经理李浪先生提供了 Waters 公司最新产品的样本和相关资料，对本书第 2、7、9、10 章的修订提供了有力的支持。

鉴于作者水平，本书不妥之处欢迎读者指教。

于世林

2004 年 10 月

于北京化工大学

目 录

第一章 绪论	1
第一节 高效液相色谱法的特点	1
一、与经典液相（柱）色谱法比较	1
二、与气相色谱法比较	2
三、高效液相色谱法的优点	3
四、高效液相色谱方法发展简介	3
第二节 高效液相色谱法的分类	7
一、按溶质在两相分离过程的物理化学原理分类	7
二、按溶质在色谱柱洗脱的动力学过程分类	8
第三节 高效液相色谱法的应用范围和局限性	9
一、应用范围	9
二、方法的局限性	9
参考文献	10
第二章 高效液相色谱仪简介	12
第一节 流动相及储液罐	13
一、储液罐	13
二、流动相脱气	13
第二节 高压输液泵及梯度洗脱装置	14
一、高压输液泵	14
二、输液系统的辅助设备	22
三、梯度洗脱装置	23
第三节 进样装置	26
一、停流进样装置	26
二、六通阀进样装置	27
三、自动进样器	28
第四节 色谱柱	29
一、柱材料及规格	29
二、柱填料	29
三、保护柱	30
四、柱连接方式	31
五、柱温控制	31
第五节 检测器	32
一、检测器的分类和响应特性	32

二、紫外吸收检测器	33
三、折光指数检测器	36
四、电导检测器	38
五、荧光检测器	38
六、蒸发光散射检测器	39
第六节 色谱数据处理装置	41
一、微处理器	41
二、色谱工作站	41
参考文献	44
第三章 液固色谱法和液液色谱法	45
第一节 分离原理	45
一、吸附系数	45
二、分配系数	46
第二节 固定相	47
一、液固色谱固定相	47
二、液液色谱固定相	57
第三节 流动相	58
一、表征溶剂特性的重要参数	59
二、液固和液液色谱的流动相	66
第四节 二元溶剂体系中液固和液液色谱的保留规律	67
一、溶质保留值的基本方程式	67
二、液固色谱的保留值方程式	68
三、液液色谱的保留值方程式	68
参考文献	69
第四章 键合相色谱法	71
第一节 分离原理	71
一、正相键合相色谱法的分离原理	71
二、反相键合相色谱法的分离原理	72
第二节 固定相	73
一、键合固定相的制备及分类	75
二、键合固定相的性质	76
三、使用键合固定相应注意的问题	79
第三节 流动相	82
一、溶剂的选择性分组	82
二、在键合相色谱中选择流动相的一般原则	83
三、改善色谱分离选择性的方法	85
四、多元混合溶剂的多重选择性	87
五、溶质保留值随溶剂极性变化的一般保留规律	89
六、用线性溶剂化自由能关系 (LSER) 来表征反相液相色谱中溶质的 保留值方程式	90
第四节 新型高效液相色谱的固定相和流动相	91

一、新型高效化学键合固定相	92
二、化学键合固定相分类方法简介	97
三、整体色谱柱	104
四、超热水流动相	110
第五节 离子对色谱法	113
一、分离原理	114
二、固定相、流动相和对(反)离子	114
三、影响离子对色谱分离选择性的因素	117
参考文献	119
第五章 梯度洗脱	122
第一节 基本原理	123
一、等度洗脱	123
二、梯度洗脱	124
第二节 影响梯度洗脱的各种因素	126
一、梯度洗脱时间(t_G)对分离的影响	126
二、强洗脱溶剂组分B浓度变化范围的影响	127
三、梯度陡度对保留值的影响	129
四、柱温变化对保留值的影响	129
五、梯度洗脱程序曲线形状的影响	129
六、影响梯度洗脱的其他变量	131
第三节 优化梯度洗脱的方法	131
一、建立梯度洗脱方法的一般步骤	131
二、梯度洗脱中的实验条件	134
第四节 梯度洗脱的图示方法	136
一、二元溶剂梯度洗脱	136
二、三元溶剂梯度洗脱	137
三、四元溶剂梯度洗脱	139
四、用极坐标和球面坐标描述梯度洗脱	141
参考文献	143
第六章 体积排阻色谱法	144
第一节 分离原理	144
一、分布系数	144
二、体积排阻色谱法的特点	145
第二节 固定相	146
一、固定相的分类	146
二、凝胶固定相的特性参数	150
三、凝胶色谱柱的制备及谱图特点	153
第三节 流动相	154
一、凝胶渗透色谱的流动相	155
二、凝胶过滤色谱的流动相	156
第四节 凝胶渗透色谱法测定聚合物分子量分布	156

一、聚合物分子量、分子量分布及测定的意义	156
二、凝胶渗透色谱图的解析及数据处理	158
参考文献	161
第七章 高效液相色谱法的基本理论	162
第一节 表征液相色谱柱填充性能的重要参数	163
一、总孔率	163
二、柱压力降	164
三、柱渗透率	164
第二节 高效液相色谱的速率理论	165
一、影响色谱峰形扩展的各种因素	166
二、范第姆特方程式的表达及图示	169
第三节 诺克斯方程式	170
一、描述色谱柱性能的折合参数	170
二、诺克斯方程式	171
第四节 色谱柱操作参数的优化	172
一、三个柱操作参数的表达式	172
二、HPLC 中实用柱操作参数的优化	173
三、柱操作参数优化的图示表达方法	176
第五节 “无限直径”效应和柱外效应	181
一、“无限直径”效应	181
二、柱外效应	183
第六节 超高效液相色谱	185
一、超高效液相色谱的理论基础	186
二、实现超高效液相色谱的必要条件	187
三、超高效液相色谱的应用	192
参考文献	194
第八章 高效液相色谱分离条件的优化	195
第一节 高效液相色谱中色谱参数的相关性	195
一、色谱参数的分类	195
二、色谱参数的相关性	196
第二节 色谱分离条件优化标准的选择	197
一、难分离物质对的峰对分离优化标准	197
二、整体色谱图的优化标准	198
第三节 色谱响应函数和色谱优化函数	200
一、Morgan 和 Deming 提出的色谱响应函数	200
二、Watson 和 Carr 提出的色谱响应函数	200
三、Glajch 和 Kirkland 提出的色谱优化函数	201
四、Berridge 提出的色谱响应函数	201
第四节 色谱分离条件的优化方法	202
一、单纯形法	203
二、窗图法	205

三、混合液设计实验法	208
四、重叠分离度图法	211
五、等强度洗脱和梯度洗脱的优化图示法	214
第五节 优化 HPLC 分离的计算机辅助方法	218
一、实验设计系统	218
二、人工智能系统	221
第六节 高效液相色谱专家系统简介	222
一、专家系统的组成	222
二、专家系统的使用方法	223
参考文献	224
第九章 微柱液相色谱法	226
第一节 方法简介	226
一、微型柱的分类	227
二、微柱液相色谱法的优点和缺点	228
第二节 基本理论	229
一、柱外效应	229
二、管壁效应	232
三、稀释效应	234
四、分离阻抗	234
第三节 仪器装置	235
一、输液泵系统	236
二、进样系统	238
三、柱系统	241
四、检测器系统	243
五、连接管和接头	245
第四节 微柱的制备	247
一、评价微柱性能的重要参数	247
二、影响微柱分离效率的相关参数	248
三、微柱的制备方法	249
第五节 微柱液相色谱的新技术	255
一、纳米液相色谱技术	255
二、超高压液相色谱技术	263
参考文献	270
第十章 二维高效液相色谱法	273
第一节 描述分离体系效能的参数	273
一、峰容量	273
二、信息量	275
第二节 二维高效液相色谱的技术功能	276
一、切割功能	277
二、反冲洗脱功能	278
三、痕量组分的富集功能	278

第三节 二维高效液相色谱的流路系统	278
一、多通路切换阀	278
二、二维高效液相色谱的流路系统	279
第四节 二维高效液相色谱在蛋白质组学研究中的应用	286
参考文献	297
第十一章 建立高效液相色谱分析方法的一般步骤和实验技术	299
第一节 样品的性质及柱分离模式的选择	300
一、样品的溶解度	300
二、样品的分子量范围	301
三、样品的分子结构和分析特性	301
第二节 分离操作条件的选择	307
一、容量因子和死时间的测量	307
二、色谱柱操作参数的选择	308
三、样品组分保留值和容量因子的选择	309
四、相邻组分的选择性系数和分离度的选择	309
第三节 高效液相色谱法的实验技术	310
一、溶剂的纯化技术	311
二、色谱柱的装填技术	311
三、色谱柱的平衡、保护与清洗、再生技术	315
四、梯度洗脱技术	320
五、色谱柱前和柱后的衍生化技术	321
六、样品的预处理技术	324
参考文献	329
符号表	331

第一章 绪 论

第一节 高效液相色谱法的特点

色谱分析法是分析化学中获得广泛应用的一个重要分支，从 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。作为色谱分析法的一个分支，高效液相色谱法是在 20 世纪 60 年代末期，在经典液相色谱法和气相色谱法的基础上，发展起来的新型分离分析技术。液相色谱包括传统的柱色谱、薄层色谱和纸色谱。20 世纪 50 年代后气相色谱法在色谱理论研究和实验技术上迅速崛起，而液相色谱技术仍停留在经典操作方式，其操作繁琐，分析时间冗长，因而未受到重视。20 世纪 60 年代以后，随气相色谱法对高沸点有机物分析局限性的逐渐显现，人们又重新认识到液相色谱法可弥补气相色谱法的不足之处。20 世纪 60 年代末随色谱理论的发展，色谱工作者已认识到采用微粒固定相是提高柱效的重要途径，随着微粒固定相的研制成功，液相色谱仪制造商在借鉴了气相色谱仪研制经验的基础上，成功地制造了高压输液泵和高灵敏度检测器，从而使液相色谱法获得新生。

高效液相色谱（high performance liquid chromatography, HPLC）还可称为高压液相色谱（high pressure liquid chromatography）、高速液相色谱（high speed liquid chromatography）、高分离度液相色谱（high resolution liquid chromatography）或现代液相色谱（modern liquid chromatography）。

一、与经典液相（柱）色谱法比较^[1.5]

从分析原理上讲，高效液相色谱法和经典液相（柱）色谱法没有本质的差别，但由于它采用了新型高压输液泵、高灵敏度检测器和高效微粒固定相，而使经典的液相色谱法焕发出新的活力。

经典液相（柱）色谱法使用粗粒多孔固定相，装填在大口径、长玻璃柱管内，流动相仅靠重力流经色谱柱，溶质在固定相的传质、扩散速度缓慢，柱入口压力低，仅有低柱效，分析时间冗长。

高效液相色谱法使用了全多孔微粒固定相，装填在小口径、短不锈钢柱内，流动相通过高压输液泵进入高柱压的色谱柱，溶质在固定相的传质，扩散速度大大加快，从而在短的分析时间内获得高柱效和高分离能力。

经典液相(柱)色谱法和高效液相色谱法的比较可见表1-1。

表1-1 高效液相色谱法与经典液相(柱)色谱法的比较

方法 项 目	高效液相色谱法	经典液相(柱)色谱法
色谱柱:柱长/cm 柱内径/mm	10~25 2~10	10~200 10~50
固定相粒度:粒径/ μm 筛孔/目	5~50 2500~300	75~600 200~30
色谱柱入口压力/MPa	2~20	0.001~0.1
色谱柱柱效/(理论塔板数/m)	$2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$	2~50
进样量/g	$10^{-6} \sim 10^{-2}$	1~10
分析时间/h	0.05~1.0	1~20

二、与气相色谱法比较^[1.5]

高效液相色谱法与气相色谱法有许多相似之处。气相色谱法具有选择性高、分离效率高、灵敏度高,分析速度快的特点,但它仅适于分析蒸气压低、沸点低的样品,而不适用于分析高沸点有机物、高分子和热稳定性差的化合物以及生物活性物质,因而使其应用受到限制。在全部有机化合物中仅有20%的样品适用于气相色谱分析。高效液相色谱法却恰可弥补气相色谱法的不足之处,可对80%的有机化合物进行分离和分析,此两种方法的比较可见图1-1和表1-2。

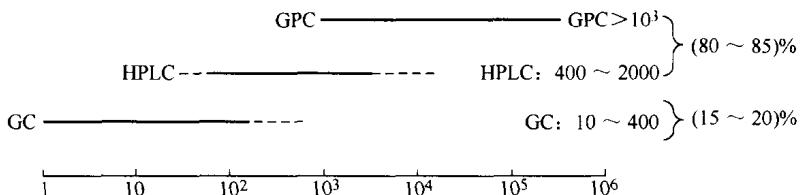


图1-1 不同色谱方法适用的分子量范围
GC—气相色谱法; HPLC—高效液相色谱法; GPC—凝胶渗透色谱

表1-2 高效液相色谱法与气相色谱法的比较

方法 项 目	高效液相色谱法	气相色谱法
进样方式	样品制成溶液	样品需加热气化或裂解
流动相	1. 液体流动相可为离子型、极性、弱极性、非极性溶液,可与被分析样品产生相互作用,并能改善分离的选择性 2. 液体流动相动力黏度为 $10^{-3}\text{Pa}\cdot\text{s}$,输送流动相压力高达2~20MPa	1. 气体流动相为惰性气体,不与被分析的样品发生相互作用 2. 气体流动相动力黏度为 $10^{-5}\text{Pa}\cdot\text{s}$,输送流动相压力仅为0.1~0.5MPa
固定相	1. 分离机理:可依据吸附、分配、筛析、离子交换、亲和等多种原理进行样品分离,可供选用的固定相种类繁多 2. 色谱柱:固定相粒度小为 $5\sim 10\mu\text{m}$;填充柱内径为 $3\sim 6\text{mm}$,柱长 $10\sim 25\text{cm}$,柱效为 $10^3\sim 10^4$;毛细管柱内径为 $0.01\sim 0.03\text{mm}$,柱长 $5\sim 10\text{m}$,柱效为 $10^4\sim 10^5$;柱温为常温	1. 分离机理:依据吸附、分配两种原理进行样品分离,可供选用的固定相种类较多 2. 色谱柱:固定相粒度大 $0.1\sim 0.5\text{mm}$;填充柱内径为 $1\sim 4\text{mm}$,柱长 $1\sim 4\text{m}$,柱效为 $10^2\sim 10^3$;毛细管柱内径为 $0.1\sim 0.3\text{mm}$,柱长 $10\sim 100\text{m}$,柱效为 $10^3\sim 10^4$;柱温为常温~ 300°C