


普通高等教育药学专业“十三五”规划教材

# 药物色谱分析的理论与应用

YAOWU SEPU FENXI DE LILUN YU YINGYONG

主编 周 婕 杜 斌

 郑州大学出版社


普通高等教育药学专业“十三五”规划教材

本项目由“一省一校”研究生课程建设专项资金资助

# 药物色谱分析的理论与应用

YAOWU SEPU FENXI DE LILUN YU YINGYONG

主编 周 婕 杜 斌

 郑州大学出版社

郑州

图书在版编目(CIP)数据

药物色谱分析的理论与应用/周婕,杜斌主编. —郑州:郑州大学出版社,  
2018. 1

ISBN 978-7-5645-3262-8

I. ①药… II. ①周…②杜… III. ①色谱法-应用-  
药物分析 IV. ①R917

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 175979 号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

出版人:张功员

全国新华书店经销

郑州市诚丰印刷有限公司印制

开本:787 mm×1 092 mm 1/16

印张:22

字数:524 千字

版次:2018 年 1 月第 1 版

邮政编码:450052

发行部电话:0371-66966070

印次:2018 年 1 月第 1 次印刷

---

书号:ISBN 978-7-5645-3262-8

定价:58.00 元

本书如有印装质量问题,由本社负责调换



## 作者名单

普通高等教育药学专业

“十三五”规划教材

主 编 周 婕 杜 斌

编 委 (以姓氏笔画为序)

王 蕾(郑州大学药学院)

史进进(郑州大学药学院)

刘 卫(郑州大学药学院)

杜 斌(郑州大学药学院)

李 杨(河南省食品药品检验所)

周 婕(郑州大学药学院)

姚寒春(郑州大学药学院)



## 前言

普通高等教育药学专业

“十三五”规划教材

色谱作为一种分离与分析技术,已有百年历史。半个多世纪以来,色谱技术发展迅速,无论是理论还是各种分离模式,都趋向成熟,已成为分析化学的一个重要分支。色谱技术为医药卫生、化工环保、材料科学、生物工程及基因工程等学科的发展作出了极大的贡献,尤其是在药学方面有着广阔的应用前景。作为这些学科必不可少的工具和手段,色谱技术愈发显示出其重要性,成为药学、化学、材料等相关专业高素质人才必须掌握的重要内容。多维色谱,如 LC-LC-MS 等用于药物、蛋白质、多肽结构的测定,并使其操作完全自动化,这是 21 世纪色谱分析的发展方向之一。可以说,色谱技术助推了药学、化学、生命科学等自然科学的积极良好发展。

有关色谱技术的各种书籍多是针对色谱专业人员编写的,以色谱技术的原理、操作及一般应用为主要内容,缺少以药物为色谱分析对象而编写的、能适应现代药学教育发展需要的色谱类书籍。本书在论述药物色谱技术原理及应用的基础上,更加着重介绍各种药物色谱分析的新技术和前沿应用。在查阅大量文献和参考大量书籍的基础上,我们编写了这本《药物色谱分析的理论与应用》,力求在内容的编排上做到“先易后难,简明扼要,举例新颖、广度与深度适宜”。

本书既可供高等学校各相关专业,尤其是药学专业学生阅读,也可为从事药学、化学及生物学等研究工作的研究生、教师和科技人员提供参考。全书共分 8 章,包括绪论、色谱分析理论基础、药物气相色谱分析法、药物高效液相色谱分析法、药物毛细管电泳分析法、药物超临界流体色谱分析法、药物手性色谱分析法和色谱联用技术。各章编写分工如下:周婕(前言、第二章和第七

章)、杜斌(第一章)、王蕾(第三章)、史进进(第四章)、姚寒春(第五章)、刘卫(第六章)、李杨(第八章)。

由于编者水平有限,书中难免有不足甚至错误之处,敬请广大专家和读者批评指正。

编 者

2017年10月



# 目录

普通高等教育药学专业

“十三五”规划教材

第一章 绪论 .....	1
第一节 色谱法发展简史 .....	1
一、色谱法的产生 .....	1
二、色谱法的发展历程 .....	1
三、色谱法的进展 .....	2
第二节 色谱法的定义与分类 .....	5
一、色谱法的定义 .....	5
二、色谱法的分类 .....	5
第三节 色谱法与其他方法的比较 .....	8
一、色谱法的优点 .....	8
二、色谱法的不足 .....	9
三、色谱技术在药学领域的应用 .....	9
第二章 色谱分析理论基础 .....	11
第一节 色谱参数 .....	11
一、色谱流出曲线与色谱峰 .....	11
二、定性参数 .....	13
三、柱效参数 .....	15
四、相平衡参数 .....	17
五、分离参数 .....	18
六、色谱基本方程式 .....	19
第二节 色谱热力学理论 .....	21
一、塔板理论的基本假设 .....	22
二、塔板模型的分离过程 .....	23
三、理论塔板数和塔板高度的计算 .....	24
四、正态分布方程式 .....	24

五、塔板理论的作用与不足 .....	25
第三节 色谱动力学理论 .....	26
一、van Deemter 方程——气相色谱速率理论 .....	26
二、Giddings 方程——液相色谱速率理论 .....	30
第四节 分子间作用力 .....	34
一、取向力 .....	34
二、诱导力 .....	35
三、色散力 .....	35
四、特殊作用力 .....	35
第三章 药物气相色谱分析法 .....	37
第一节 概述 .....	37
一、气相色谱法发展简史 .....	37
二、气相色谱法的分类 .....	38
三、气相色谱法的特点及应用范围 .....	39
四、气相色谱法的一般流程 .....	40
第二节 气相色谱法原理及仪器 .....	41
一、气相色谱技术原理 .....	41
二、仪器装置 .....	42
三、气相色谱检测器 .....	43
四、分离条件的选择 .....	51
第三节 填充柱气相色谱法 .....	55
一、气-液色谱填充柱 .....	56
二、气-固色谱法 .....	65
三、填充柱气相色谱法在药物分析中的应用 .....	66
第四节 毛细管柱气相色谱法 .....	67
一、毛细管柱的种类 .....	67
二、毛细管柱的特点 .....	68
三、毛细管气相色谱系统 .....	69
四、毛细管柱性能评价 .....	70
五、毛细管柱气相色谱法在药物分析中的应用 .....	71
第五节 程序升温气相色谱法 .....	72
一、概述 .....	72
二、程序升温的原理 .....	73
三、程序升温气相色谱法在药物分析中的应用 .....	74
第六节 全二维气相色谱法 .....	75
一、全二维气相色谱法的原理 .....	75
二、全二维气相色谱的特点 .....	75
三、全二维气相色谱法的仪器 .....	76



四、全二维气相色谱法分离性能研究 .....	77
五、全二维气相色谱法在药物分析中的应用 .....	78
第七节 定性、定量分析 .....	79
一、定性分析方法 .....	79
二、定量分析方法 .....	82
第四章 药物高效液相色谱分析法 .....	90
第一节 概述 .....	90
一、高效液相色谱法发展简史 .....	90
二、高效液相色谱法的分类 .....	91
三、高效液相色谱法与其他分离方法的比较 .....	91
第二节 高效液相色谱法的分离机制 .....	92
一、液-固吸附色谱法 .....	92
二、液-液分配色谱法 .....	93
三、化学键合相色谱法 .....	94
四、离子对色谱法 .....	96
五、离子交换色谱法 .....	97
六、排阻色谱法 .....	98
第三节 高效液相色谱固定相 .....	100
一、液-固色谱固定相 .....	100
二、液-液色谱固定相 .....	101
三、离子交换键合相 .....	106
四、凝胶固定相 .....	108
第四节 高效液相色谱流动相 .....	109
一、液相色谱流动相的特征 .....	109
二、正相色谱流动相 .....	112
三、反相色谱流动相 .....	113
四、洗脱方式 .....	114
第五节 高效液相色谱法分离条件的选择 .....	116
一、高效液相色谱中的速率理论 .....	116
二、分离条件的选择 .....	118
第六节 高效液相色谱仪 .....	120
一、高压输液系统 .....	120
二、进样系统 .....	123
三、色谱柱 .....	125
四、检测器 .....	131
五、数据记录处理与计算机控制系统 .....	142
第七节 高效液相色谱分析方法 .....	143
一、定性和定量分析方法 .....	143

二、高效液相色谱分离方法的选择 .....	143
第八节 液相色谱新技术、新方法 .....	144
一、超高效液相色谱法 .....	144
二、高速逆流色谱法 .....	147
三、微流控芯片分析系统 .....	151
四、径向流色谱法 .....	156
五、细胞膜色谱法 .....	161
第九节 高效液相色谱法在药物分析中的应用 .....	164
一、合成药 .....	164
二、中药及中成药 .....	165
三、制剂分析 .....	166
四、药代动力学研究 .....	167
五、天然产物的分析 .....	169
六、手性药物的拆分 .....	173
第五章 药物毛细管电泳分析法 .....	176
第一节 概述 .....	176
一、毛细管电泳及其特点 .....	176
二、毛细管电泳发展简史 .....	177
第二节 毛细管电泳法原理及仪器 .....	179
一、毛细管电泳法的原理 .....	179
二、仪器装置 .....	188
第三节 毛细管区带电泳法 .....	196
一、毛细管区带电泳法的原理 .....	196
二、毛细管区带电泳法在药物分析中的应用 .....	201
第四节 毛细管电色谱法 .....	213
一、毛细管电色谱法的原理 .....	213
二、毛细管电色谱法在药物分析中的应用 .....	216
第五节 毛细管凝胶电泳法 .....	221
一、毛细管凝胶电泳法的原理 .....	221
二、分离条件的选择 .....	222
三、毛细管凝胶电泳法在药物分析中的应用 .....	225
第六节 胶束电动毛细管色谱法 .....	228
一、胶束电动毛细管色谱法的原理 .....	228
二、MEKC 分离条件的优化 .....	231
三、胶束电动毛细管色谱法在药物分析中的应用 .....	232
第六章 药物超临界流体色谱分析法 .....	240
第一节 概述 .....	240
一、超临界流体及其特性 .....	240

二、超临界流体色谱法的原理 .....	241
三、超临界流体色谱的特点及应用范围 .....	241
第二节 超临界流体色谱仪 .....	242
一、流程图 .....	242
二、压力效应 .....	243
三、流动相 .....	245
四、固定相 .....	245
五、限流器 .....	245
六、检测器 .....	246
第三节 超临界流体色谱在药物分析中的应用 .....	246
一、在药物检测中的应用 .....	246
二、在手性药物分离中的应用 .....	247
三、在天然产物及中药分析中的应用 .....	252
第七章 药物手性色谱分析法 .....	256
第一节 手性色谱法理论基础 .....	256
一、手性色谱法基础概念 .....	256
二、手性色谱法的种类 .....	264
三、手性色谱法的特点 .....	270
四、手性色谱拆分机制 .....	271
第二节 手性色谱固定相 .....	275
一、刷型手性固定相 .....	276
二、纤维素手性固定相 .....	278
三、淀粉手性固定相 .....	280
四、环糊精类手性固定相 .....	282
五、蛋白质手性固定相 .....	285
六、大环抗生素类手性固定相 .....	286
七、配体交换手性固定相 .....	287
八、分子印迹手性固定相 .....	288
第三节 手性色谱法在药物分析中的应用 .....	289
一、 $\beta$ -受体阻滞剂药物类及其结构类似物的对映体分离 .....	289
二、多手性中心药物对映体的分离 .....	292
三、人血和尿中双异丙吡胺及其代谢物——单-N-脱烷基异丙吡胺对映体的 分析 .....	296
四、用半制备 HPLC 法制备阿苯达唑亚砷单一对映体 .....	298
第八章 色谱联用技术 .....	302
第一节 色谱-质谱联用技术 .....	302
一、质谱简介 .....	302
二、气相色谱-质谱联用技术 .....	306

三、液相色谱-质谱联用技术 .....	312
第二节 色谱-光谱联用技术 .....	320
一、气相色谱-红外光谱联用技术 .....	320
二、液相色谱-红外光谱联用技术 .....	324
三、色谱-原子光谱联用技术 .....	325
第三节 色谱-ICP/MS 联用技术 .....	333
一、GC-ICP/MS 联用技术 .....	333
二、LC-ICP/MS 联用技术 .....	335
参考文献 .....	339

# 第一章 绪 论

## 第一节 色谱法发展简史

### 一、色谱法的产生

1906年,俄国植物学家米哈伊尔·茨维特(Tswett),在研究植物叶子的组成时,以碳酸钙为吸附剂,把干燥的碳酸钙粉末装在竖立的玻璃柱中,将植物叶子的石油醚萃取液倒入管中,萃取液所含的色素吸附在管内上部的碳酸钙上,再用纯净的石油醚洗脱被吸附的色素,经过一段时间的洗脱,植物色素在碳酸钙柱中实现分离,由一条色带分散为数条平行的色带,当时 Tswett 把这种色带称为“色谱”。在这一方法中,玻璃管被称为“色谱柱”,管内填充物碳酸钙称为固定相(stationary phase),冲洗剂石油醚称为流动相(mobile phase),茨维特开创的方法称为液-固色谱法(liquid-solid chromatography, LSC)。将具有不同颜色的色带填充剂挤压出来,分段切割,然后对已分开的组分加以鉴定,这就形成了经典色谱法的源头。随着色谱法的不断发展,这种技术不仅被用于分离有色物质,而且还用于无色物质的分离,色谱的“色”字虽已失去原有意义,但色谱名词仍沿用至今。

### 二、色谱法的发展历程

色谱法从20世纪初发明以来,经历了一个多世纪的发展,到今天已经成为最重要的分离分析手段,广泛地应用于诸多领域,如石油化工、有机合成、生理生化、医药卫生、环境保护,乃至空间探索等。将一滴含有混合色素的溶液滴在一块布或一片纸上,随着溶液的展开可以观察到一个个同心圆环出现,这种层析现象虽然古人就已有初步认识并有一些简单的应用,但首先认识到这种层析现象在分离分析方面具有重大价值的是俄国植物学家 Tswett。Tswett 关于色谱分离方法的研究始于1901年,两年后他发表了研究成果“一种新型吸附现象及其在生化分析上的应用”,提出了应用吸附原理分离植物色素的新方法。三年后,他将这种方法命名为色谱法。色谱法这个词是由颜色(color)和图谱(graph)这两个词根组成的。由于 Tswett 的开创性工作,因此人们尊称他为“色谱学之父”,而以他的名字命名的 Tswett 奖也成为色谱界的最高荣誉奖。

Tswett 并非著名科学家,他对色谱的研究以俄文发表在俄国的学术杂志之后不久,第一次世界大战爆发,欧洲正常的学术交流被迫终止。这些因素使得色谱法问世后20余年间发展非常缓慢,直到1931年,德国柏林威廉皇帝研究所的库恩(Kuhn)将 Tswett 的方法应用于叶红素和叶黄素的研究,此后用这种方法分离了60多种此类色素,kuhn 的研究获

得了广泛的承认,也让科学界接受了色谱法。以后的一段时间内,以氧化铝为固定相的色谱法在有色物质的分离中取得了广泛应用,这就是今天的吸附色谱。液-固吸附色谱的进一步发展有赖于瑞典科学家 Tiselius (1948 年诺贝尔化学奖获得者) 和 Claesson 的努力,他们创立了液相色谱的迎头法和顶替法。

分配色谱法是由英国著名科学家 Martin 和 Synge 创立的,他们因此而获得 1952 年的诺贝尔化学奖。1941 年, Martin 和 Synge 采用水饱和的硅胶为固定相,含乙醇的氯仿为流动相分离乙酰基氨基酸,在此基础上提出塔板概念并建立了塔板理论,他们在这一工作的论文中预言用气体代替液体作为流动相分离各类化合物的可能性。1951 年, Martin 和 James 报道了用自动滴定仪做检测器分析脂肪酸,创立了气-液色谱法。1956 年, van Deemter 等在前人研究的基础上发展了描述色谱过程的速率理论。1958 年, Golay 首先提出了分离效能极高的毛细管柱气相色谱法,发明了玻璃毛细管控制机,从此气相色谱法超过最先发明的液相色谱法而迅速发展起来,今天我们常用的气相色谱检测器也几乎是在 20 世纪 50 年代发展起来的。1965 年, Giddings 总结和发展了前人的理论,为色谱的发展奠定了理论基础。20 世纪 70 年代发明了石英毛细管柱和固定液的交联技术。

早在 1938 年, N. A. Izmailov 和 M. S. Schraiber 首次在显微镜载玻片上涂布的氧化铝薄层上,用微量圆环技术分离了多种植物酊剂中的成分,而成为最早的薄层色谱法。20 世纪 50 年代, J. G. Kirchner 及 J. M. Miller 等在上述方法的基础上以硅胶为吸附剂,煅石膏为黏合剂涂布于玻璃板上制成硅胶薄层,成功地分离了挥发油,从而发展了薄层色谱法。此后, E. Stahl 对薄层色谱法的标准化、规范化以及扩大应用范围等方面进行了大量工作,其于 1965 年出版了《薄层色谱》一书,使薄层色谱法日趋成熟。20 世纪 80 年代以来,随着薄层色谱法的仪器化,出现了高效薄层色谱法 (high performance thin-layer chromatography, HPTLC), 也称现代薄层色谱 (Modern TLC), 这是在经典 TLC 基础上发展起来的一种更为灵敏的定量薄层分析技术。同时, 20 世纪 60 年代末,把高压泵和化学键合相用于液相色谱,出现了高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)。20 世纪 80 年代初超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography, SFC) 兴起。而在 20 世纪 90 年代毛细管区带电泳 (capillary zone electrophoresis, CZE) 得到广泛应用。同时集 HPLC 和 CZE 优点的毛细管电色谱在 20 世纪 90 年代后期受到关注。自 Tswett 提出色谱名词之后,至气相色谱法 (含毛细管色谱法) 的创立是现代色谱法的第一个里程碑, 色谱-光谱联用技术、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, 21 世纪色谱技术在生命科学与医药领域中也发挥着重要作用。

### 三、色谱法的进展

色谱法和分析化学领域中发展最快、应用最广的分析方法之一,这是因为现代色谱法具有分离与分析两种功能,能排除组分间的相互干扰,逐个将组分进行定性、定量分析,而且还可制备纯组分。因此,在药物分析中,对于成分复杂的药品 (如中药材、中成药、复方制剂等) 分析、杂质检查、痕量分析或含量相差悬殊成分的分析课题,通常都首选色谱法,在各国药典中都大量收载色谱法,并呈明显上升趋势,是有力的证明。有报道显示:气相色谱仪的销售在世界市场上高达 10 亿美元,并将以 3%~4% 的速度逐年增长。之所以如

此,是由于气相色谱的灵敏度高、分析速度快、定量精度高,尤其是毛细管气相色谱法在分析更为复杂的混合物时,将能发挥重要作用,未来的发展趋势是增强自动化和各种联用技术。气相色谱-质谱联用仪(GC/MS)将以5%~10%的速度递增,气相色谱/傅氏红外光谱联用仪(GC/FTIR)会维持现状,气相色谱/核磁共振波谱联用仪(GC/NMR)有商品仪器问世。

21世纪,HPLC已发展成为包括中国药典在内的各国药典中使用频率最高的一种仪器分析方法,以6%~8%的速度增长,其中较活跃的领域是离子对色谱、疏水作用色谱、手性分离及反相色谱。HPLC除具有GC的优点外,还具有应用广,可进行制备分离的特点。多维色谱,如LC-LC-MS等用于药物、蛋白质、多肽结构测定,并使整个操作完全自动化,这是21世纪色谱分析的发展方向之一。在某种程度上,没有色谱法就没有人类社会发展的今天。

GC和HPLC在分离分析领域发展最好,是极为成功的范例,而SFC则处于失利的境地,SFC是Giddings和Myers早在20世纪60年代就进行了先驱性的研究工作,在20世纪80年代初期掀起SFC的热潮,而且当时认为SFC将掀起分析方法的革命,但是目前各大公司却纷纷撤销SFC的推销,放弃进一步开发SFC的计划,毫无疑问SFC具有一些独特用途,但是它被挤在气相色谱和高效液相色谱之间,而GC和HPLC已成为广泛应用的技术。薄层色谱法在自动化程度、分辨率及重现性等方面仍不如GC和HPLC,被认为只是一种定性和半定量的方法。但近年来,薄层色谱法操作正走向标准化、仪器化和自动化,如自动点样仪、自动程序多次展开仪、薄层扫描仪等多种仪器出现,还引入了强制流动技术,使薄层色谱法发展成为具有相当好的重现性、准确性和精密度的定量分析方法。

毛细管电泳是20世纪80年代崛起的一种新的高效分离技术,具有高效、低耗、快速等特点。1981年,Torgenson和Lukaest提出了内径小于80 $\mu\text{m}$ 的毛细管中,轴向扩散是影响柱效的主要因素。他们使用75 $\mu\text{m}$ 内径,100cm长的毛细管,柱上荧光检测,30kV的高压,分离氨基酸与多肽物质,获得了40万理论塔板数,并实现了正负离子的同时分离,此项工作被认为是当今毛细管电泳技术发展的里程碑。由于具有惊人的高柱效,自问世以来引起了分析工作者的极大兴趣,许多色谱学家希望它能解决一切分离问题。但他们失望了,虽然其中CZE具有很高的柱效,但分离因子不能灵活调节,使其难以成为定量分析的手段,其分析结果的偏差比HPLC大一个数量级,这阻碍了它大规模使用,目前主要处于研究阶段。

现代电色谱(electro-chromatography,EC)成为这一领域的奇葩,研究者们希望能够成功,但EC和CZE驱动流动相的方法一样,均使用电渗流,其流动速度的不稳定造成定量分析的误差,要使其达到成熟的应用阶段必须具备:①便于使用,操作成本低;②可解决至少一个分析化学中的重要问题;③可获得准确,可重复的定量分析结果。20世纪60年代的GC和70年代的HPLC即是如此,SFC,CZE和EC均是重要的分离分析技术,都有各自独特的优点,它们若能满足上述要求将会得到广泛的应用。CZE还是具有极大的发展空间的,它在分析生物大分子中有非常突出的优点,只要能明显提高其定量分析精度,将成为极其重要的分析方法。

联用技术已成为药物分析领域一个主要的发展方向。色谱联用技术一般分为色谱-



光谱联用与色谱-色谱联用两大类。在色谱-光谱联用仪器中,色谱部分“司分离”,光谱部分“司鉴定”,两者互为补充,各取其长。因而色谱-光谱联用技术成为当今最重要的分离、分析方法。自20世纪60年代出现第一台气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)后,许多联用仪相继问世,尤其在80年代,各种联用技术、联用仪逐渐成熟。已经商品化的联用仪除GC-MS外,常见的还有气相色谱-傅里叶变换红外吸收光谱联用仪(GC-FTIR)、高效液相色谱-紫外吸收光谱联用仪(HPLC-DAD)、高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)、超临界流体色谱-质谱联用仪(SFC-MS)、薄层色谱-紫外吸收光谱联用仪(TLC-UV)及毛细管电泳-质谱联用仪(CE-MS)等。近年来又出现了毛细管电色谱-质谱联用及高效液相色谱-核磁共振波谱联用仪(HPLC-NMR)等联用技术或联用仪商品。其中高效液相色谱-光谱联用技术是20世纪80年代初出现的二极管阵列检测器,它能给出每个色谱峰的HPLC-UV三维谱,并可同时获得定性定量信息。20世纪90年代初,出现的软电离源接口:电喷雾离子源(ESI)及大气压化学电离源(APCI)接口,使HPLC-MS联用技术成熟。HPLC-MS能提供色谱组分丰富的定性与结构信息,已成为当今应用最多的联用技术,是生物样品、医学研究及中药分析最重要的分析手段之一。

毛细管电泳-质谱联用技术是20世纪90年代末期才发展起来的最新联用技术,利用毛细管电泳的高分离能力与质谱的高灵敏性相结合,是强-强联合的仪器。该联用装置与液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)有许多相似之处,主要区别是:CE背景电解质的流量远小于HPLC流动相的流量,故CE-MS与LC-MS的接口有较大差异。CE对于复杂成分微量样品的分离已显示巨大的潜力,但对于定性分析一直是个难题。CE-MS商品仪器的出现,为毛细管电泳的定性问题,提供了有力的手段。但由于质谱仪接口的限制,在联用时,只能用含有挥发性缓冲盐的背景电解质,因而严重影响了CE的分离效果,此缺点是CE-MS联用亟待解决的问题。20世纪末,毛细管电色谱-质谱联用技术(CEC-MS)兴起,虽然CEC-MS刚刚起步,但就CEC可以不用含有非挥发性缓冲盐的流动相仍然具有高选择性及高分离能力的特点而言,有望解决CE-MS的难题。

20世纪末推出600~800 MHz的超导核磁共振波谱仪,检测灵敏度大幅度提高,才使高效液相色谱-核磁共振波谱联用技术成为可能,因此出现了数种商品仪器。由于核磁共振波谱联用仪(NMR)具有最好的定性特征性与重复性,理论上也应是最重要的联用技术。但事实上,由于NMR的检测速率大多低于HPLC的出峰速率,因此目前多是将色谱组分采取“回路收集”后再检测的方法,故应视为“准在线联用”仪器。

色谱-色谱联用法是指两种色谱方法的联用,也称为二维色谱法。其目的是用一种色谱法补充另一种色谱分离效果上的不足。常见的有全二维气相色谱法(GC-GC)、高效液相色谱-气相色谱联用(HPLC-GC)、高效液相色谱-高效液相色谱联用(如ODS-SEC、ODS-IEC等,也称为柱切换技术)、高效液相色谱-薄层色谱联用法(HPLC-TLC)及二维薄层色谱法(双向展开或两种薄层板)。由于有的联用装置具有绘制三维图谱的功能,因此可以得到色谱-色谱联用法的二维谱(虽然为三维坐标图谱,因是两种色谱法联用,故习惯上称为二维谱)。色谱-色谱联用法可以提高分离效果,获得更多的定性分析信息。如用薄层色谱法研究人参成分,一维展开仅得19个斑点,而用双向展开,则可获得35个斑点,用CS-9000薄层扫描仪扫描,可得到很漂亮的薄层色谱二维谱。



全二维气相色谱法是 20 世纪 90 年代初才发展起来的一种新技术。它是将两根气相色谱柱通过调制器以串联方式结合而成的多纤维气相色谱技术。该技术不仅提高了色谱系统的分辨率,而且其峰容量是 2 根色谱峰容量的乘积。全二维气相色谱法特别适用于具有一定挥发性的复杂成分样品的分离分析,如石油化工样品、中药样品等。

微流控芯片(microfluidic chip, MFC)分析系统是 1992 年 Manz 与 Harrison 等发表了首篇在芯片上完成毛细管电泳分离的论文被命名的。1995 年,美国加州大学 Berkeley 分校的 Mathies 研究组,在微流控芯片上成功地实现了高速 DNA 测序。1996 年,Mathies 等又实现了在微流控芯片上多通道毛细管电泳 DNA 测序。1999 年,Agilent 公司与 Caliper 联合研制出首台微流控芯片商品化仪器。近年来,MFC 分析技术飞速发展,备受重视,已成为生命科学研究的最重要手段。

## 第二节 色谱法的定义与分类

### 一、色谱法的定义

色谱法或色谱分析也称之为层析法,是一种非自发、需耗能(由高压气体或液体提供)的物理或物理化学分离分析方法。特别是在近 20 多年中,由于气相色谱法、高效液相色谱法及薄层扫描法的飞速发展,而形成一门专门的学科——色谱学,已被广泛用于各个领域,成为多组分混合物最重要的分离分析方法。它利用混合物中不同组分在互不相溶的固定相与流动相之间的吸附、溶解或离子交换等相互作用存在的差异进行分离,当溶质在两相间相对移动时,各组分在两相间进行多次分配,使得性质不同的各个组分随流动相移动的速度产生差异而被分离。可完成这种分离的仪器即色谱仪,分配系数大的组分迁移速度慢,反之则迁移速度快而被分离。

### 二、色谱法的分类

色谱法从不同的角度,有不同的分类方法,通常可按分子聚集状态、固定相使用方式、分离机制及使用领域进行分类。

#### 1. 按流动相和固定相的聚集状态分类

(1) 按流动相的聚集状态分类 在色谱中流动相可以是气体、液体或超临界流体,相应分为气相色谱法(gas chromatography, GC)、液相色谱法(liquid chromatography, LC)和超临界流体色谱法(supercritical fluid chromatography, SFC)。

(2) 按固定相的聚集状态分类 色谱中的固定相可以是固体或液体。因此,气相色谱法又可分为气-固色谱法(gas-solid chromatography, GSC)与气-液色谱法(gas-liquid chromatography, GLC),前者是以气体为流动相,固体为固定相的色谱,后者是以气体为流动相,液体为固定相的色谱。液相色谱又可分为液-固色谱(liquid-solid chromatography, LSC)和液-液色谱(liquid-liquid chromatography, LLC),前者是以液体为流动相,固体为固定相的色谱;后者是以一种液体为流动相,另一种液体为固定相的色谱。

#### 2. 按固定相使用的方式分类