

化学工业出版社

色谱技术丛书

高效液相色谱方法及应用

于世林 编著

SHUOJISHU CONGSHU



1526/2
色谱技术丛书

高效液相色谱方法及应用

于世林 编著



化学工业出版社
·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/于世林编著. —北京: 化学工业出版社, 2000. 1

(色谱技术丛书/傅若农主编)

ISBN 7-5025-2724-9

I. 高… II. 于… III. ①液相色谱-方法②液相色谱-应用 IV. 0657. 7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 53069 号

色谱技术丛书

高效液相色谱方法及应用

于世林 编著

责任编辑: 任惠敏

责任校对: 马燕珠

封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

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

*

新华书店北京发行所经销

化学工业出版社印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 11 $\frac{1}{8}$ 字数 288 千字

2000 年 1 月第 1 版 2000 年 2 月北京第 1 次印刷

印 数: 1—4000

ISBN 7-5025-2724-9/TQ·1197

定 价: 23.00 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

色谱技术丛书

傅若农 主编

汪正范 刘虎威 副主编

各分册主要执笔者:

- | | | | | |
|---------------|-----|-----|-----|-----|
| 《色谱分析概论》 | 傅若农 | | | |
| 《色谱定性与定量》 | 汪正范 | | | |
| 《气相色谱检测方法》 | 吴烈钧 | | | |
| 《液相色谱检测方法》 | 张晓彤 | 云自厚 | | |
| 《气相色谱方法及应用》 | 刘虎威 | | | |
| 《高效液相色谱方法及应用》 | 于世林 | | | |
| 《平面色谱方法及应用》 | 何丽一 | | | |
| 《离子色谱方法及应用》 | 牟世芬 | 刘克纳 | | |
| 《毛细管电泳技术及应用》 | 陈义 | | | |
| 《色谱分析样品处理》 | 王立 | | | |
| 《色谱联用技术》 | 汪正范 | 杨树民 | 吴侔天 | 岳卫华 |
| 《色谱柱技术》 | 刘国铨 | 余兆楼 | | |
| 《色谱仪器维护与故障排除》 | 吴方迪 | | | |

54 427/
39

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。为此化工出版社提议，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》，刘国詮、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》，吴烈均之《气相色谱检测方法》，汪正范之《色谱定性定量》，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

前 言

“高效液相色谱方法及应用”系“色谱丛书”之一。本书在简介高效液相色谱的基础上,系统的介绍了高效液相色谱法中常用的液固色谱法、液液色谱法、键合相色谱法、亲和色谱法和体积排阻色谱法。在各种方法中重点介绍了固定相、流动相的构成以及通过调节流动相的组成(包括梯度洗脱)、添加改性剂以调节色谱分离选择性的方法。在高效液相色谱法的基本理论方面,扼要介绍了速率理论和诺克斯方程式以及对色谱柱操作参数进行优化的目的与图示表达方法,并强调了无限直径效应和柱外效应对高效液相色谱分离效能的影响。在高效液相色谱分离条件的优化方面,重点介绍了优化标准及色谱响应(优化)函数,以及用化学计量学进行分离条件优化的各种常用方法。为了帮助读者切实掌握用高效液相色谱方法去解决实际问题的能力,阐述了建立高效液相色谱方法的一般步骤。

全书最后介绍了高效液相色谱方法在生物化学和生物工程、医药研究、食品分析、环境监测、精细化工等领域的应用实例,以扩展读者的知识面,并增强感性认识。

由于本丛书系列另有《离子色谱方法及应用》、《色谱定性定量》和《色谱分析样品处理》等论著,因此本书中对离子色谱法、定性和定量分析方法、样品处理方法,未予介绍,望读者见谅。

鉴于作者的知识水平,不妥之处,欢迎读者的指教。

本书编写过程获得中国惠普公司王小芳女士、程广辉先生、张之旭工程师的热情帮助,他们提供的高效液相色谱在食品分析和环境分析中的应用及高效液相色谱硬件资料,为本书第十章和第二章的编写,提供了有力的支持。本书全部手稿承蒙本丛书主编傅若农教授的审阅,特此致谢。

于世林

1999. 7.

00年7月10日

1/2000

内 容 提 要

本书简要介绍了高效液相色谱仪的组成,系统地介绍了高效液相色谱方法中常用的液固色谱、液液色谱、键合相色谱、亲和色谱与体积排阻色谱方法,并着重阐述了流动相在改善色谱分离选择性中的重要作用。对高效液相色谱的速率理论和色谱分离条件的优化方法及建立高效液相色谱方法的一般步骤等都作了扼要介绍。本书第十章以大量实例介绍了高效液相色谱方法在生化、医药、食品卫生、环境监测、化学化工等领域中的广泛应用。

本书适于在领域中从事高效液相色谱工作的初、中级技术人员及非本专业的科研技术人员学习。亦可作为大学本科生及硕士生学习高效液相色谱的入门教材。

分 类	编 号
登 记 号	

读 者 注 意

1. 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写,损坏或遗失照章赔偿。

2. 请在借书期限内送还以便他人阅读请勇于合作。

1107939

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	3
三、高效液相色谱法的特点	4
第二节 高效液相色谱法的分类	5
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	6
第三节 高效液相色谱法的应用范围和局限性	8
一、应用范围	8
二、方法的局限性	8
参考文献	9
第二章 高效液相色谱仪简介	11
第一节 流动相及贮液罐	12
一、贮液罐	12
二、流动相脱气	12
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	19
三、梯度洗脱装置	21
第三节 进样装置	25
一、停流进样装置	26
二、六通阀进样装置	26
三、自动进样器	27
第四节 色谱柱	27
一、柱材料及规格	27
二、柱连接方式	27

三、柱温控制	28
四、柱填充技术	28
第五节 检测器	30
一、检测器的分类和响应特性	31
二、紫外吸收检测器	33
三、折光指数检测器	36
四、电导检测器	37
五、荧光检测器	38
六、蒸发激光散射检测器	39
第六节 色谱数据处理装置	40
一、微处理机	40
二、色谱工作站	41
参考文献	42
第三章 液固色谱法和液液色谱法	43
第一节 分离原理	44
一、吸附系数	44
二、分配系数	45
第二节 固定相	46
一、液固色谱固定相	46
二、液液色谱固定相	53
第三节 流动相	55
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
参考文献	67
第四章 键合相色谱法	69
第一节 分离原理	69
一、正相键合相色谱法的分离原理	70
二、反相键合相色谱法的分离原理	70
第二节 固定相	72
一、键合固定相的制备及分类	73
二、键合固定相的性质	75
三、使用键合固定相应注意的问题	79
第三节 流动相	81

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	88
五、溶质保留值随溶剂极性变化的一般保留规律	90
第四节 离子对色谱法	91
一、分离原理	91
二、固定相、流动相和对(反)离子	92
三、影响离子对色谱分离选择性的因素	95
参考文献	99
第五章 亲和色谱法	101
第一节 分离原理	101
一、锁匙结构络合物的生成	101
二、亲和色谱法的分类	103
第二节 固定相	104
一、基体	104
(一) 基体的分类	104
(二) 基体材料的活化——功能化反应和偶联反应	113
二、间隔臂	116
三、配位体	118
(一) 染料配位体	118
(二) 定位金属离子配位体	120
(三) 包合配合物配位体	122
(四) 生物特效配位体	127
(五) 电荷转移配位体	131
(六) 共价配位体	134
第三节 流动相	136
一、缓冲溶液流动相的组成	136
二、洗脱方法	137
(一) 非选择性洗脱法	137
(二) 特效性洗脱法	139
(三) 特殊洗脱方法	139
参考文献	140

第六章 体积排阻色谱法	143
第一节 分离原理	143
一、分布系数	143
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	151
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	157
第四节 凝胶渗透色谱法测定聚合物分子量分布	157
一、聚合物分子量、分子量分布及测定的意义	157
二、凝胶渗透色谱图的解析及数据处理	159
参考文献	163
第七章 高效液相色谱法的基本理论	165
第一节 表征液相色谱柱填充性能的重要参数	167
一、总孔率	167
二、柱压力降	168
三、柱渗透率	169
第二节 高效液相色谱的速率理论	170
一、影响色谱峰形扩展的各种因素	171
二、范第姆特方程式的表达及图示	174
第三节 诺克斯方程式	176
一、描述色谱柱性能的折合参数	176
二、诺克斯方程式	177
第四节 色谱柱操作参数的优化	179
一、三个柱操作参数的表达式	179
二、HPLC 中实用柱操作参数的优化	180
三、柱操作参数优化的图示表达方法	184
第五节 “无限直径”效应和柱外效应	188
一、“无限直径”效应	188
二、柱外效应	191

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	198
一、难分离物质对的峰对分离优化标准	198
二、整体色谱图的优化标准	199
第三节 色谱响应函数和色谱优化函数	201
一、摩尔根 (Morgan S. L.) 和戴明 (Deming S. N.) 提出的色谱响应函数	202
二、沃特森 (Watson M. W.) 和卡尔 (Carr P. W.) 提出的色谱响应函数	202
三、格拉基 (Glajch J. L.) 和柯克兰 (Kirkland J. J.) 提出的色谱优化函数	203
四、柏日芝 (Berridge J. C.) 提出的色谱响应函数	203
第四节 色谱分离条件的优化方法	205
一、单纯形法	205
二、窗图法	208
三、混合液设计实验法	211
四、重叠分离度图法	215
五、等强度洗脱和梯度洗脱的优化图示法	218
第五节 高效液相色谱专家系统简介	224
一、专家系统的组成	225
二、专家系统的使用方法	225
参考文献	228
第九章 建立高效液相色谱分析方法的一般步骤	230
第一节 样品的性质及柱分离模式的选择	231
一、样品的溶解度	231
二、样品的分子量范围	232
三、样品的分子结构和分析特性	233
第二节 分离操作条件的选择	239
一、容量因子和死时间的测量	239

二、色谱柱操作参数的选择	240
三、样品组分保留值和容量因子的选择	241
四、相邻组分的选择性系数和分离度的选择	242
参考文献	244
第十章 高效液相色谱法的分析应用	245
第一节 在生物化学和生物工程中的应用	245
一、氨基酸、多肽和蛋白质的分析研究	245
(一) 氨基酸	246
(二) 多肽	251
(三) 蛋白质	253
二、核碱、核苷、核苷酸和核酸的分析研究	259
(一) 核碱和核苷	259
(二) 核苷酸	262
(三) 寡聚核苷酸、核酸及其碎片	266
三、生物胺的分析研究	272
第二节 在医药研究中的应用	273
一、常用药物研究中的应用	274
二、甾体药物研究中的应用	277
三、抗菌素类药物研究中的应用	278
四、生物碱类药物研究中的应用	280
五、手性药物研究中的应用	281
第三节 在食品分析中的应用	283
一、糖类的分离分析	283
二、有机酸及酸味剂的分离分析	284
三、维生素的分离分析	286
四、食品添加剂的分离分析	288
(一) 防腐剂	288
(二) 抗氧化剂	290
(三) 甜味剂和香料	292
(四) 人工合成色素	295
五、食品污染物的分析	297
第四节 在环境污染分析中的应用	300
一、多环芳烃的检测	300

二、多氯联苯的检测	303
三、农药残留的检测	306
四、酚类和胺类的检测	308
第五节 在精细化工分析中的应用	310
一、醇、醛和酮、醚的分离分析	310
二、酸和酯的分离分析	312
三、表面活性剂的分析	316
四、聚合物的分析研究	317
参考文献	318
附录	323
一、吸附色谱固定相	323
二、键合固定相	324
三、亲合色谱固定相	330
四、体积排阻色谱固定相	331
符号表	334

第一章 绪 论

色谱分析法是分析化学中获得广泛应用的一个重要分支,从本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,30~40年代发展了柱分配色谱、纸色谱;50年代发展了气相色谱法,薄层色谱法;60年代发展了凝胶色谱法及高效液相色谱法;70年代发展了高效毛细管气相色谱法;80年代发展了毛细管电泳和电色谱;90年代又出现了光色谱。

所有上述各种色谱技术的发展过程,都表明了色谱分析法是一个具有强大生命力的分离分析技术。

第一节 高效液相色谱法的特点

作为色谱分析法的一个分支,高效液相色谱法是在本世纪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。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。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。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。

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。经过近30年的发展,现在高效液相色谱法在分析速度、分离效能、检测灵敏度和操

作自动化方面,都达到了和气相色谱法相媲美的程度,并保持了经典液相色谱对样品适用范围广、可供选择的流动相种类多和便于用作制备色谱等优点。至今,高效液相色谱法已在生物工程、制药工业、食品工业、环境监测、石油化工等领域获得广泛的应用。

高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography) 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), 它的独特之处可通过以下比较加以说明。

一、与经典液相(柱)色谱法比较^[1,5]

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

项 目 \ 方 法	高效液相色谱法	经典液相(柱)色谱法
色谱柱:柱长/cm	10~25	10~200
柱内径/mm	2~10	10~50
固定相粒度:粒径/ μm	5~50	75~600
筛孔/目	2500~300	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