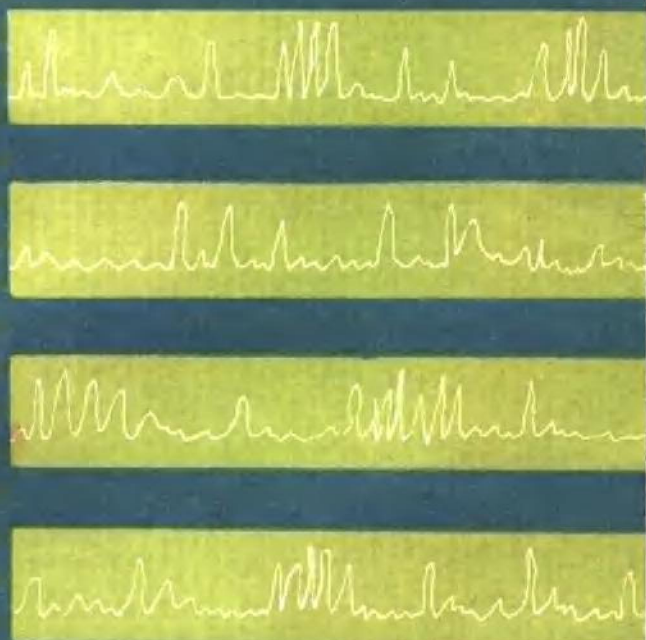


高效液相色谱法

王俊德 商振华 郁蕴璐 编著



中国石化出版社

高效液相色谱法

王俊德 商振华 郝蕴璐 等编

中国石化出版社

内 容 简 介

本书重点介绍了高效液相色谱(HPLC)的原理、方法、仪器及应用。具体内容为：液相色谱概貌及 HPLC 特点；基本原理及参数；液体输运系统；检测器；色谱分离系统；液-固吸附色谱；化学键合相色谱；离子交换和离子色谱；凝胶色谱；衍生化技术和浓缩柱；定性定量方法；色谱柱的装填及维修；HPLC 在生化医药、石油化工、环境污染等方面的应用；液相制备色谱。每章后附有参考文献，可供读者查阅。

本书可作为生产、科研和教学部门从事液相色谱工作的人员及在校大、中专学生的参考书。

高效液相色谱法

玉俊德 商振华 郁蕴璐 等编

中国石化出版社出版

(北京朝阳区太阳宫路甲1号 邮政编码：100029)

海丰印刷厂排版

海丰印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168毫米 32开本 12印张 273千字 印1—2500

1992年3月北京第1版 1992年3月北京第1次印刷

ISBN 7-80043-195-9/TQ·099 定价：6.80元

前 言

高效液相色谱是70年代以后发展最快的一个分析化学分支，和气相色谱一样成为化学家和生物化学家实验室不可缺少的重要的高效、快速、灵敏的分离分析手段。不仅如此，随着生物技术、制药工业和合成化学的发展，近十年来高效液相色谱朝着更大规模制备和纯化分离的方向发展。由于这种方法的分离和检测过程比较温和，所以对沸点高、分子量大、极性強、热稳定性差的化合物，特别是有生物活性的物质具有特别的处理能力。在生化、医学、药物临床、化学化工、食品卫生、环保检测、商检和法检等方面都有广泛的用途。

在我国，高效液相色谱技术已逐渐从开始时仅为少数研究实验室拥有发展到目前为更多的生产、研究、检验部门所掌握，广泛用于质量控制、分析化验和制备分离。为适应各方面的需要，自1984年以来，我们先后举办过多次色谱学习班。本书是在学习班上讲授高效液相色谱内容的基础上，经过较大的修改、增补、提高后整理而成的。我们在编写中侧重各种方法的详细介绍，注意实际经验的积累，在简明扼要讲述原理和基础的前提下，尽可能做到材料新颖、系统，内容深入浅出，面向广大色谱工作者。

参加本书编写工作的有王俊德（第一、二、三、五、六、七、十四、十五章及附录），商振华（第四、八、十三、十四章），郁蕴璐（第十、十一、十三、十四章），董声华（第九章）和王淑芬（第十二章）等。全书由王俊德负责汇总。

在本书编写过程中，曾得到周良模、张乐洋二位教授的热情支持和关怀，他们对本书的内容提出许多有益的建议和修改意见。在编写期间还得到中国科学院大连化物所分析化学研究室、

研究生部和仪器厂等有关部门的热情支持和大力协助，得到色谱同行们的鼓励和积极配合。在此作者一并表示衷心的感谢。

由于时间仓促，加之我们水平有限，书中的错误和不妥之处在所难免，敬请专家和广大读者提出批评指正，以便今后进一步完善之。

目 录

第一章 概论	1
§ 1-1 液相色谱的发展简史	1
§ 1-2 高效液相色谱的特点和与其他色谱方法的比较	2
§ 1-3 高效液相色谱流程和设备	5
第二章 基本原理和参数	10
§ 2-1 保留值	11
§ 2-2 柱效率	15
§ 2-3 分离效能总指标 K_1 和分离度 R	19
§ 2-4 谱带扩张	22
§ 2-5 渗透性 (K)	29
参考文献	30
第三章 液体输运系统	32
§ 3-1 泵	32
§ 3-2 进样器	41
§ 3-3 馏分收集器及其他	44
参考文献	45
第四章 检测器	46
§ 4-1 概述	46
§ 4-2 检测器的性能指标	47
§ 4-3 紫外吸收和紫外可见分光光度计	52
§ 4-4 示差折光检测器	59
§ 4-5 荧光检测器	61
§ 4-6 电化学检测器	63
§ 4-7 化学发光检测器	66
参考文献	69
第五章 色谱分离系统	71
§ 5-1 固定相	71

§ 5-2 流动相	76
§ 5-3 色谱柱	85
参考文献	92
第六章 液-固吸附色谱	93
§ 6-1 原理	93
§ 6-2 固定相和流动相	99
§ 6-3 液固色谱的应用	104
参考文献	106
第七章 化学键合相色谱	107
§ 7-1 意义和特点	107
§ 7-2 制备和表征	109
§ 7-3 分类	115
§ 7-4 反相色谱	119
§ 7-5 离子抑制和离子对色谱	132
参考文献	138
第八章 离子交换和离子色谱	140
§ 8-1 基本原理	140
§ 8-2 离子交换剂	143
§ 8-3 离子交换色谱所使用的移动相	150
§ 8-4 离子交换色谱的应用	153
§ 8-5 离子色谱的分离和检测原理	156
§ 8-6 电导阴离子色谱	166
§ 8-7 电导阳离子色谱	175
参考文献	183
第九章 凝胶色谱	185
§ 9-1 凝胶色谱法的分离特点	185
§ 9-2 凝胶色谱实验方法	189
§ 9-3 凝胶色谱图的解析及数据处理	194
§ 9-4 其他类型凝胶色谱	197
§ 9-5 凝胶色谱的应用	198
参考文献	200
第十章 衍生化技术和浓缩柱	202

§ 10-1 衍生化技术	202
§ 10-2 浓缩柱	219
参考文献	221
第十一章 定性定量方法	223
§ 11-1 定性分析	223
§ 11-2 定量分析	228
参考文献	232
第十二章 色谱柱的装填、维修与应用	233
§ 12-1 色谱柱的装填与维修	234
§ 12-2 色谱柱的应用	236
第十三章 高效液相色谱在生化医药方面的应用	246
§ 13-1 在生物化学领域的应用	246
§ 13-2 药物分析	270
参考文献	287
第十四章 高效液相色谱在石油、化工及其他方面的应用	291
§ 14-1 石油和化工分析	291
§ 14-2 在食品分析中的应用	308
§ 14-3 环境污染物分析	323
参考文献	335
第十五章 液相制备色谱	339
§ 15-1 制备分离的某些基本考虑	339
§ 15-2 设备和有关技术	344
参考文献	350
附录一 HPLC 用柱填料	351
附录二 国内外一些主要HPLC仪器生产厂家及所提供仪器的性能简介	367
附录三 HPLC分离模式选择指南	372
附录四 溶剂的互溶度数(M)	373
附录五 粒度的表示法——筛目与粒子直径	374

第一章 概 论

§ 1-1 液相色谱的发展简史

色谱是这样一个过程，即某一混合物中各组分在被称之为固定相和流动相的两相之间因具有不同的分配系数而进行的分离，所以当此混合物在从固定相床层的一端加入，并随流动相向前移动的过程中，各组分在两相间经过反复多次的分配，结果导致在固定相上有不同的保留而被分离。分配系数大的，保留时间长；分配系数小的，保留时间短。

历史上第一次提出“色谱”(chromatography)这个名词，并用来描述这种实验的人是俄国植物化学家茨维特(Tswett)，他在1906年发表的关于色谱的论文中写到：一植物色素的石油醚溶液从一根主要装有碳酸钙吸附剂的玻璃管上端加入，沿管滤下，后用纯石油醚淋洗，结果按照不同色素的吸附顺序在管内观察到它们相应的色带，就象光谱一样。茨维特把这些色带称为“色谱图”(chromatogram)，相应的方法叫做“色谱法”(chromatographic method)。这就是最初的液相色谱。在后来的20年间，这一技术并未得到人们的重视。直至30年代以后，相继出现了纸色谱、离子交换色谱和薄层色谱等液相色谱技术。特别是1952年英国学者Martin和Synge基于他们在分配色谱方面的研究工作，提出了关于气-液分配色谱的比较完整的理论和方法，把色谱技术向前推进了一大步，这是气相色谱在此后的十多年间发展十分迅速的原因。1958年基于Moore和Stein的工作，离子交换色谱的仪器化导致了氨基酸分析仪的出现，这是近代液相色谱的一个重要尝试，但分离效率尚不理想。

60年代中后期，由于把从气相色谱得到的广泛的理论和实践上的经验应用于液相色谱系统的设计，以及在机械、光学和电子等技术上的进步，沉寂多年的液相色谱技术开始受到重视。出现了包括高效分离柱、高压输液泵和高灵敏度检测器的近代高效液相色谱装置和仪器。在柱效、速度和灵敏度方面远远超过经典液相色谱。70年代中期以后，微处理机技术用于液相色谱，进一步提高了仪器的自动化水平和分析精度。由于高效液相色谱的实际分离时间可以是比较短的，但样品的预处理，操作条件的选择和定性定量分析是件费时、费力、麻烦的工作，因而发展能解决这类问题的具有某些人工智能的自动化色谱仪器是当前的重要特点。

近年来随着高技术项目，即生物工程和生命科学在国际和国内的迅速发展，为高效液相色谱技术提出了更多、更新的分离、分析、纯化、制备的课题，大大促进了这一技术的迅速发展。目前高效液相色谱已成为化学、生化、医学、工业、农业、环保、商检和法检等学科领域中重要的分离分析技术，是分析化学家和生物化学家手中用以解决他们面临的各种实际分析和分离课题必不可少的工具。国际市场的最近调查表明，液相色谱（包括高效液相色谱、柱色谱、氨基酸分析和离子交换色谱）是分析仪器行业中最大的市场，增长速度也是很快的。

§ 1-2 高效液相色谱的特点和与其他 色谱方法的比较

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 除了叫做高压或高速液相色谱外，又称为高分离度液相色谱或近代柱液相色谱，但我们推荐使用第一个术语，即高效液相色谱。通过以下同经典液相色谱和气相色谱相比较，可以看出高效液相色谱具有分离效能高、分析速度快、检测灵敏度高和应用范围广泛的特点，特别是适合于高沸点、大分子、强极性和热

稳定性差的化合物的分离分析。

一、现代高效液相色谱与经典液相色谱的比较

经典液相色谱使用的柱填料通常是大于 $100\mu\text{m}$ 的粗粒度全孔吸附剂(硅胶或氧化铝等),固定相传质扩散缓慢,因而柱效率很低,分离能力差,只能进行简单混合物的分离;而高效液相色谱采用 $5\sim 10\mu\text{m}$ 微粒填料,传质快,柱效可比前者高 $2\sim 3$ 个数量级, 25cm 长的硅胶柱柱效可达2万理论塔板,可以分离上百个组分,有更高的峰容量(即一定时间内色谱图上所能容纳的色谱峰数目)。经典液相色谱中,填料通常是装在 $1\sim 2\text{m}$ 长, $1\sim 2\text{cm}$ 粗的玻璃管中,使用一次便丢掉,每次分离都要重新装柱,这就造成了人力物力上的浪费,而高效液相色谱使用尺寸小得多的封闭式可重复使用的色谱柱,能在同一根柱上进行数百次的进样操作。由于微粒填料传质扩散快,又使用了高压输液泵,因而快速分析有可能实现。例如在 2mm 内径, $5\mu\text{m}$ 硅胶柱上用己烷冲洗,在 30MPa 的压力下10秒钟分离了包括四氯乙烯在内的从苯到对三联苯7个芳烃的混合物。近代高效液相色谱实现高精度连续操作仪器化,使定性定量分析的准确度比经典液相色谱大为改善,特别是微处理机的使用更提高了分析精度(定量准确度可达 1%)。

HPLC是一类封闭式的柱液相色谱,和敞开式的薄层色谱(TLC)相比较,具有对环境污染小和受环境气氛影响小的优点。由于从进样到检测是封闭在一个系统中,易于实现仪器化、连续化,省时、省力,便于定量操作。近年来发展的采用 $7\mu\text{m}$ 左右的微粒硅胶及其非极性烷基键合相涂制薄板的高效薄层色谱(HP-TLC)和仪器化薄层色谱技术部分地克服了TLC固有的缺点,可以和高效柱液相色谱互为补充。

二、高效液相色谱与气相色谱的比较

气相色谱自50年代出现以来,获得了飞速发展,它的特点是高效、快速和灵敏,其分离分析复杂混合物的能力是以前其他色谱方法无法比拟的,应用相当广泛和普遍。但是由于气相色谱使

用气体流动相，被分析样品必须要有一定的蒸汽压，汽化后才能
在柱上分析，这使分离对象的范围受到一定的限制。对于那些挥发
性差的物质(高沸点化合物)，汽化温度和柱温必须很高，这不
仅给设备和仪器制造带来不少困难，更重要的是许多高分子化合
物和热稳定性差的化合物在汽化过程中分解，因而改变了原有的
结构和性质。尤其是一些具有生物活性的生化样品等物质，温度
过高会变性失活。这样的样品分析用气相色谱就难以胜任了。此
外对于一些极性化合物，如有机酸、有机碱等，气相色谱也遇到
麻烦。虽然有的可通过衍生化法解决，有的则无能为力。据估计
现在已知的化合物中，仅有20%的样品可不经预先的化学处理
而能满意地用气相色谱分离。

与此相反，液相色谱则不受样品挥发度和热稳定性的限制，
液相色谱一般在室温下操作，偶尔为了提高柱效或改善分离，在
较高的温度下操作，但最高也不超过流动相溶剂的沸点，所以只
要被分析物质在流动相溶剂(各式各样)中有一定的溶解度，便
可以分析。所以液相色谱特别适合于那些沸点高、极性高、热稳
定性差的化合物，例如生化物质和药物，离子型化合物，热稳定
性差的天然产物等等。事实上，在已知的化合物中大约有70%是
不挥发的，主要出现在生命科学、环境科学、高分子和无机化合
物中，在这方面高效液相色谱有着广阔的应用潜力。

液相色谱中由于流动相也影响分离过程，这就对分离的控制
和改善提供了额外的因素。气相色谱中的载气一般不影响分配，
但要靠改变固定相来改变选择性，而在液相色谱中除了改变固定
相外，还可以改变冲洗剂达到同一目的。所以液相色谱中的固定
相不象气相色谱那样种类繁多，有限的几种或几十种固定相就可
以解决相当范围的问题。

和气相色谱相比，高效液相色谱对样品的回收比较容易，而
且是定量的，这对任何规模的制备目的特别有利。事实上，在很
多场合高效液相色谱不仅是作为一种分析方法，而更多的是作为

一种分离手段，用以提纯和制备具有足够纯度的单一物质。例如在生化、制药、天然产物和精细化工等方面。

在高效液相色谱中必须特别注意“柱外效应”对柱效率及对色谱分离能力的影响。这是因为物质分子在液相中的扩散系数比在气相中小4~5个数量级，流速也慢2~3个数量级，因此从进样到检测之间，除柱子以外的任何死空间(进样器、柱接头、连接管和检测池等)中，如果流动相的流型有变化，被分离物质的任何扩散和滞留都会显著地导致色谱峰的加宽，柱效率降低。所以尽可能减小柱外死体积和精心的结构设计是很重要的。这就给仪器制造方面提出了更高的要求。显然，随着柱型的发展(如柱子变细、变短)和填料的改进(如粒度变小或更加均匀)，在柱内发生的色谱分离过程中的谱带宽度越来越狭窄，因而柱外效应的影响也越来越不容忽视。

最后需要说明，目前高效液相色谱检测器的灵敏度尚不及气相色谱，这已经成为广大色谱工作者关注的课题。

应当指出，高效液相色谱是适应科学技术的发展而发展出来的，它和气相色谱各有所长，相互补充。在高效液相色谱越来越广泛地获得应用的同时，而气相色谱仍然发挥着它的重要作用。

§ 1-3 高效液相色谱流程和设备

图 1-1 表示了一台典型高效液相色谱仪的流程示意图。贮器(1)中的流动相溶剂被泵(2)吸入，然后输出，经压力和流量测量(4)后导入进样器(5)。被分析样品由进样器处注入，并随流动相一起依次通过保护柱(6)(非必须部件)、分离柱(7)后进入检测器(8)。检测信号用微处理机(10)采集和进行数据处理，或用积分仪(或记录仪)(11)记录色谱峰面积和色谱图。如果不是分析而是制备目的，可以使用馏分收集器(12)。遇到复杂样品可以采用梯度淋洗操作(借助于梯度控制器(3))，使样品各组分均得到最佳分离，而又不致花费更多的时间。整个仪器也可使用一台微处理

机操纵，包括数据处理和操作控制。

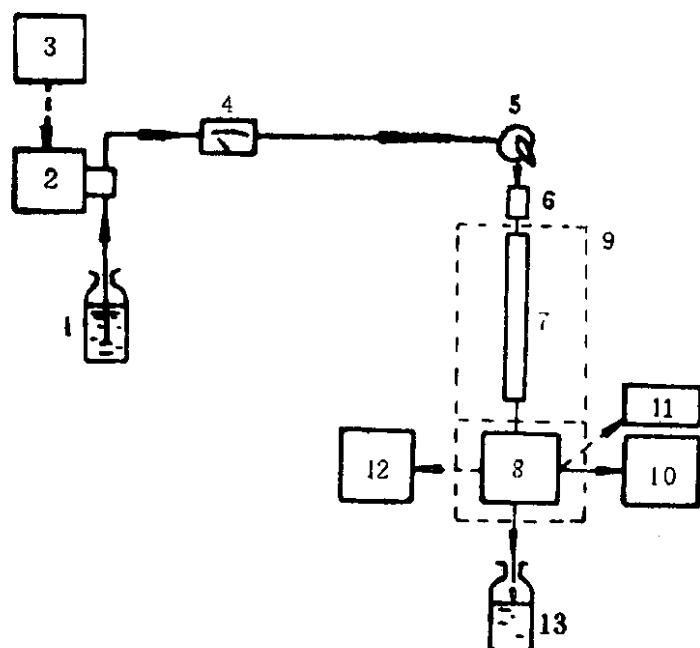


图 1-1 高效液相色谱流程示意图

- 1—溶剂贮器；2—泵；3—梯度控制器；4—压力、流量测量；
5—进样阀(器)；6—保护柱；7—分离柱；8—检测器；9—温控设备；
10—数据处理设备；11—记录仪；12—馏分收集器；13—废液瓶

需要特别指出的是，关于色谱仪的几个主要部件的性能问题，如泵的耐压性，流量的稳定性，检测器的灵敏度和整机的稳定性等，生产厂家一般都能给予足够的重视，但往往容易忽略“柱外效应”的影响。过大的柱外死体积会明显地损失柱效，从而导致总的分离能力下降，特别是当柱径减小到2mm或更小时。下面简要介绍高效液相色谱设备中各部件的基本特点，以了解其概貌。至于各部分的细节将是以后各章讨论的主要内容。

1. 输液泵

泵是一套高效液相色谱设备中重要的单元部件，是驱动溶剂和样品通过色谱分离柱和检测系统的高压源，其性能好坏直接影响整个仪器和分析结果的可靠性。用于分析目的的泵应当流量稳定(±1%)，耐高压(30~60MPa)，能耐各种流动相，如有机溶剂、水和缓冲液。目前，商品高效液相色谱仪普遍采用体积小、

方便多用的往复泵和隔膜泵。以往复泵为例，又有单、双和三泵头结构之分，显然，在单泵头的情况下，如果没有必要的补偿机构，脉动较大；若改为双泵头或三泵头，交替动作的柱塞分别以 180° 和 120° 的相位差排液和吸液，则输出液流的脉动大为改善。因而后两种往复泵更受欢迎。对于分析极性范围宽或分子体积相差较大的复杂混合物，为了能在较短的时间内对所有各组分均实现满意的分离，常采用梯度淋洗操作。这时需要使用两台泵，按一定的程序逐步增加混合溶剂中的极性成分，以提高单位时间内的峰容量。

用于刚性微粒柱装柱的高压泵多是气动泵和往复泵，主要恒量指标是能产生高压（ $40\sim 100\text{MPa}$ ）和较大的排液量（ 10 至数十 mL/min ）。这是自行装柱的实验室所必需设备。

2. 色谱柱

人们常说色谱柱是色谱仪的心脏，因为色谱的核心问题——分离，是在这里进行的。在色谱发展史上，色谱柱填料与柱技术的发展一直是色谱工作者共同关心的问题，可以说，液相色谱的每一个重大发展都和色谱柱的每一次突破密切相关。为适应不同的分离分析要求，可有不同的柱型，内装不同性质的填料。最常用的色谱柱是 $10\sim 30\text{cm}$ 长， $2\sim 5\text{mm}$ 内径的内壁抛光的不锈钢管柱，内装 $5\sim 10\mu\text{m}$ 高效微粒固定相。采用高压匀浆装柱技术填充。相同柱长的效率远远高于气相色谱，以 2mm 细内径柱为例， 250cm 长的 $5\mu\text{m}$ YWG硅胶柱柱效可达 20000 理论塔板，而 $5\mu\text{m}$ YQG—CH反相键合相柱可达 14000 理论塔板。高效柱的填充需要特殊的设备和技术，国际上各色谱仪和色谱产品厂家均提供预装柱。

3. 进样器

待分析样品从柱头进样器引入的方式可分为注射器进样、停流进样、阀进样和自动进样器进样四种，其中注射器和阀进样为最常用。在 10MPa 以下的进口压力可用 $1\sim 10\mu\text{L}$ 的微量注射器进样，在这种情况下一般能获得最高的柱效率，但进样重复性不佳，

特别是在较高压力下。阀进样是比较理想的，进样体积可变，也可以固定，但一般说来，柱效受些影响。自动进样器适合于多样品重复操作，便于用微处理机控制，实现自动化。

4. 检测器

被分析组分在柱流出液中浓度的变化可通过检测器转化为光学的或电学的信号而被检出，是色谱仪的“眼睛”。检测器性能的好坏直接关系着定性定量分析结果的可靠性和准确性。在高效液相色谱中最常用的检测器是光学检测器，例如示差折光、紫外吸收或分光光度检测器。前者是通用型的检测器，但灵敏度较低，适合于常量分析；后者中，紫外吸收有比较高的灵敏度，但只能检出在仪器特定波长下有吸收的化合物。紫外-可见分光光度检测器可适用较宽的范围，可以弥补单波长吸收检测器选择性太强的缺陷，因而是一种应用面较广的高效液相色谱检测器。近年来发展的二极管阵列紫外检测器允许对柱流出物进行不停流的瞬间的波长快速扫描，通过微处理机控制，获得光吸收、波长和时间的三维色谱/光谱图，从而取得更多的定性和色谱峰纯度鉴定的信息，是一种比较理想的检测器。荧光检测器有较高的灵敏度，一般说来可比紫外吸收高10~1000倍，但也有更专一的选择性。对于一些电活性物质(如无机离子、有机酸、碱和两性离子)，电化学检测器是一类较好的选择性检测器，例如对有机胺，安培型电化学检测器的灵敏度可比紫外吸收高2~3个数量级。

但总的说来，高效液相色谱的检测器目前尚不理想，灵敏度不及气相色谱。发展通用、灵敏和更专一的检测器是今后应探索的一个重要课题。

色谱柱的恒温控制不象气相色谱仪那样每台必配，许多场合下色谱柱和检测器在环境温度下使用即能满足要求。必要时在较高温度下恒温操作，或者是为了增加柱效，改善分离，或者是为了取得更准确的热力学数据。大部分检测器也不一定精确恒温。受温度影响大的是示差折光检测器，因为折光指数随温度变化很

大，温度不恒定，噪音和灵敏度显著受损，所以这种检测器必须恒温。紫外检测器经恒温控制后有利于增加稳定性。

5. 馏分收集器

如果所进行的色谱分离不是为了纯粹的色谱分析，而是为了做其他波谱鉴定，或获取少量试验样品的小型制备，馏分收集是必要的。用小试管收集，手工操作只适合于少数几个馏分，手续麻烦，易出差错。馏分收集器比较理想，因为便于用微处理机控制，按预先规定好的程序，或按时间，或按色谱峰的起落信号逐一收集和重复多次收集。

6. 数据获取和处理系统

把检测器的信号显示出来的数据系统可以有多种形式。最简单的是电位差式长图记录器，记录信号随时间的变化，得到色谱流出曲线或色谱图。而对定性定量较有利的是采用积分仪，记录保留时间或峰号，以及峰面积。先进的高效液相色谱仪多用微处理机控制，这通常是一台专用的微计算机，其功能有二，一是作为数据处理机，例如输入定量校正因子，按预先选定的定量方法（归一化、内标法和外标法等），将面积积分分数换算成实际的成分分析结果，或者给出某些色谱参数；二是作为控制机，控制整个仪器的运转，例如按预先编好的程序控制冲洗剂的选择、梯度淋洗、流速、柱温、检测波长、进样和数据处理。所有指令和数据通过键盘输入，结果在阴极射线管或绘图打印机上显示出来。更新一代的色谱仪，应当具有某些人工智能的特点，即能根据已有的规律自动选择操作条件，根据规律和已知的数据、信息，进行判断，给出定性定量结果。