

岛津液相色谱操作培训

---基础知识

岛津国际贸易（上海）有限公司

分析中心

任何问题请联系我们

免费咨询电话

800-810-0439

400-650-0439



维修部



010-85252375 (北京)

021-64451437 (上海)

020-87108631 (广州)

保文库

010-85252353

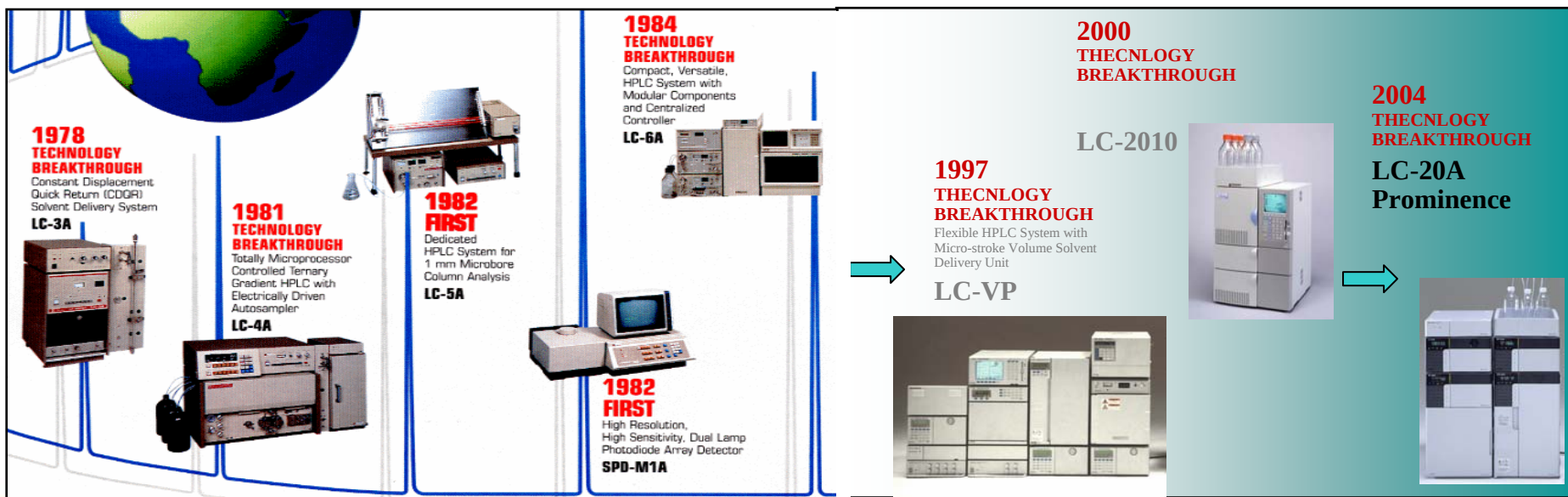
<http://www.shimadzu.com.cn>



岛津HPLC的历史

- 1969 GPC系统开发
- 1972 LC-1 (LC-830) 销售 < 与DuPont签订许可合同后制造销售 >
- 1978 LC-3A系列销售 < CDQR方式的单柱塞型送液单元为特征 >
- 1981 LC-4A系列销售 < 内置微型计算机的全自动HPLC >
- 1982 LC-5A系列销售 < 世界上首创的微量型LC对应HPLC >
- 1984 LC-6A系列销售 < 世界上最早的积木型HPLC、现在的HPLC的前身 >
- 1991 LC-10A系列销售 < 世界上最早采用微冲程送液单元和减低噪音技术的检测器 >
- 1997 LC-VP系列销售 < 采用有效性支持功能的积木型HPLC >
- 2000 LC-2010销售 < 追求性能和操作性更加完善的一体型HPLC >
- 2004 LC-20A Prominence销售 < 为分析实验室带来革新的HPLC >

Started in 1969



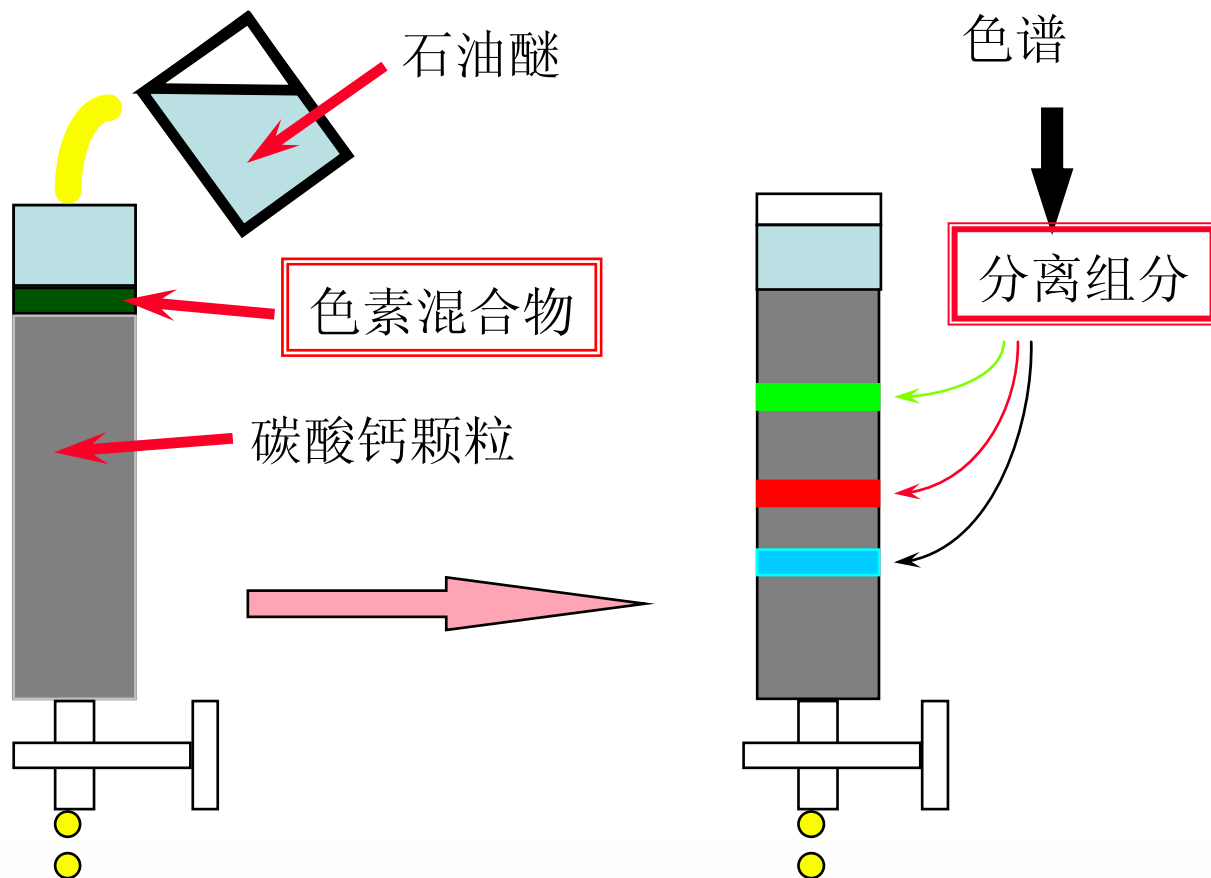
LC-20A Prominence



第一部分

色谱基础知识

色谱起源



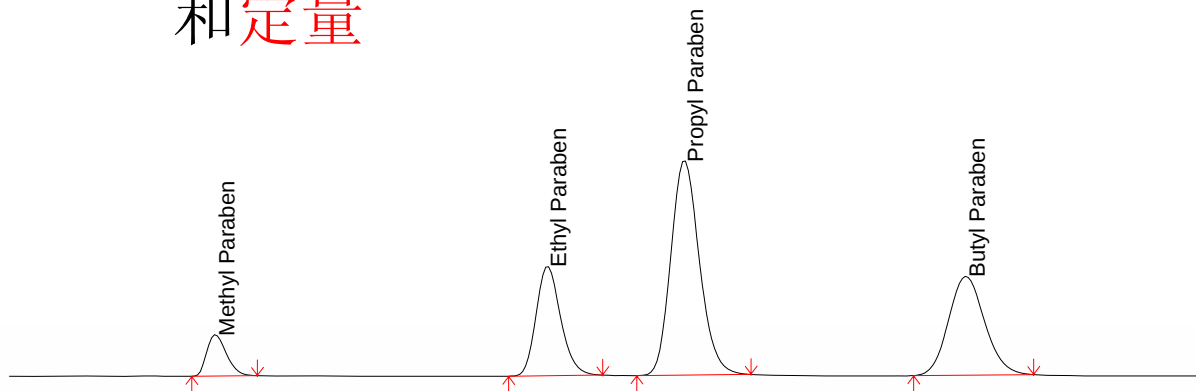
色谱定义

- 色谱法：利用组分在两相间分配系数不同而进行分离的技术
- 流动相：携带样品流过整个系统的流体
- 固定相：静止不动的一相，色谱柱



➡ 色谱是一种分离技术.

➡ 色谱的主要目的是对混合物中的目标物分离和定量



色谱分类

- ❖ 高效液相色谱

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- ❖ 气相色谱

Gas Chromatography (GC)

- ❖ 薄层色谱

Thin-Layer Chromatography (TLC)

- ❖ 毛细管电泳

Capillary Electrophoresis (CE)

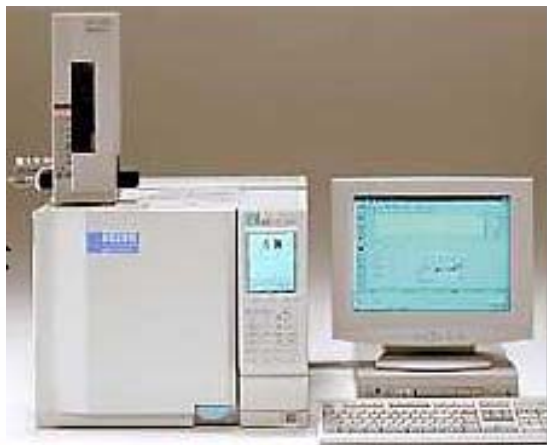
色谱优点

- 同时分析
- 分离性能好
- 灵敏度高 (ppm-ppb)
- 进样量小 (1-100uL)

HPLC vs GC

➡ 液相色谱：以液体作为流动相的色谱分离方法

- ✎ 适用于高沸点、大分子、强极性和热稳定性差的化合物的分析
- ✎ 流动相具有运载样品分子和选择性分离的双重作用



➡ 气相色谱：以气体作为流动相的色谱分离方法

- ✎ 适用于沸点较低、热稳定性好的中小分子化合物的分析
- ✎ 流动相只起运载样品分子的能力

HPLC分类

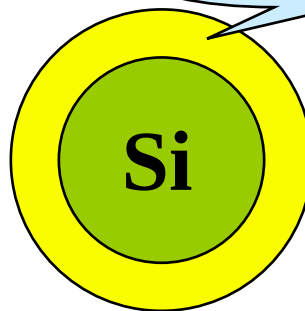
- ◆ 正相模式 (NP-LC)
- ◆ 反相模式 (RP-LC)
- ◆ 反相离子对色谱 (IPC)
- ◆ 离子交换色谱 (IEC)
- ◆ 尺寸排阻色谱 (GPC / GFC)

反相模式 (RP)

- C18 (ODS)
- C8 (octyl)
- C4 (butyl)
- 苯基
- TMS
- 氰基

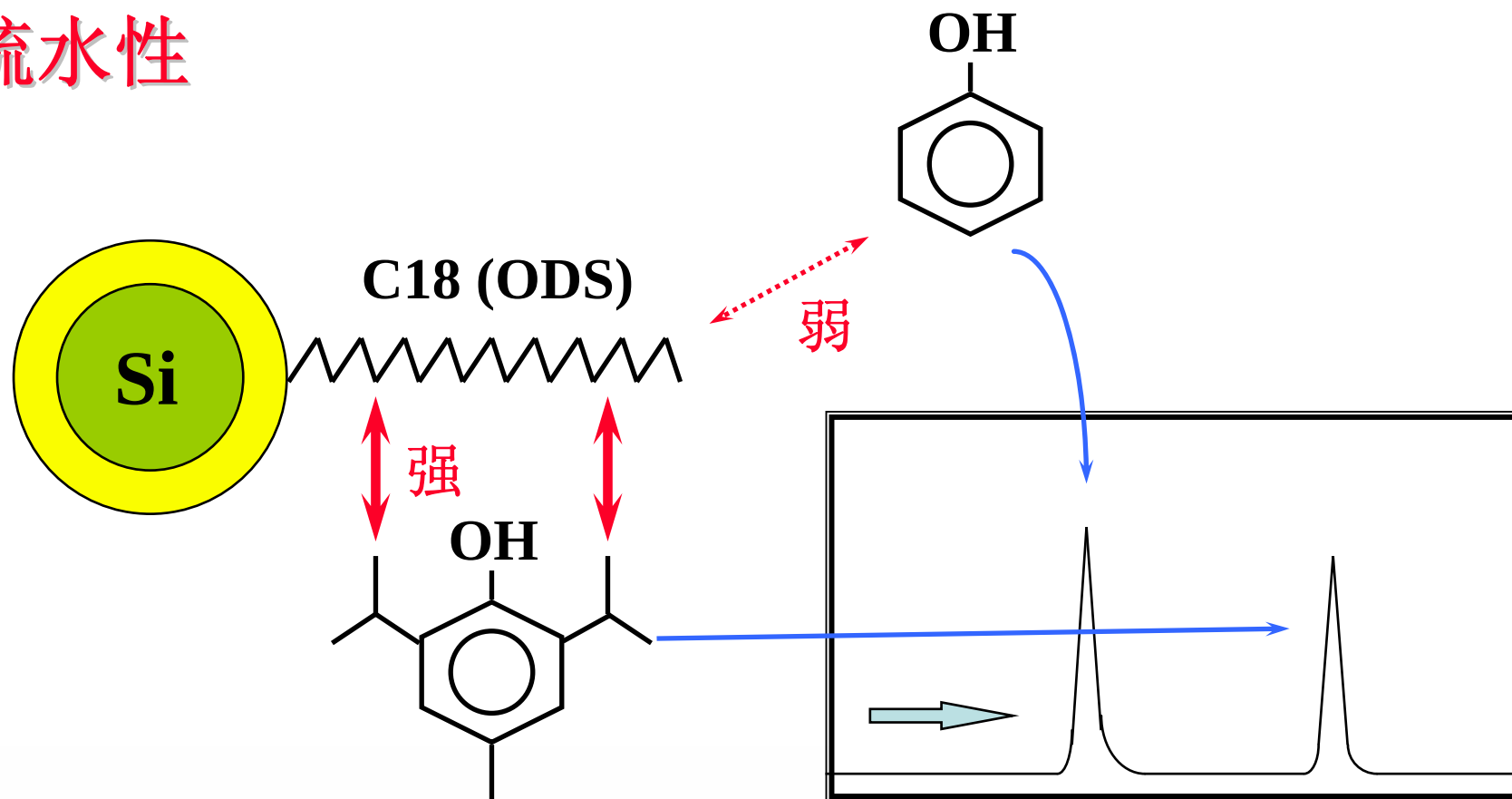
非极性

$-\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$

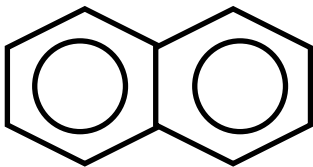


相互作用力是什么？

疏水性



疏水性

- 如果样品有
 - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{---}$: 碳链 $\longrightarrow$ 作用力强
 -  : 芳香基
- 如果样品有
 - -COOH : 羧基 $\longrightarrow$ 作用力弱
 - -NH_2 : 氨基
 - -OH : 羟基

反相模式下流动相的选择

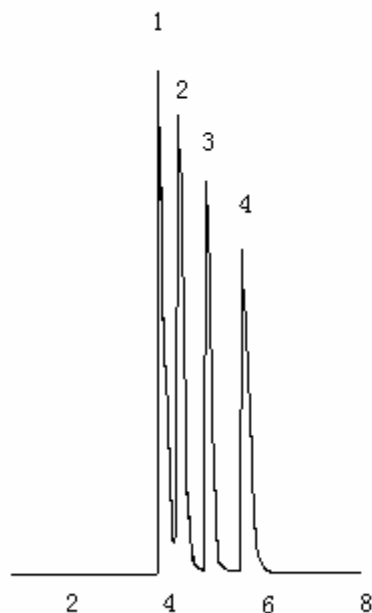
➡ 优化水相（缓冲液）和有机相的比例非常重要

甲醇，乙腈和 THF 是常用的有机溶剂

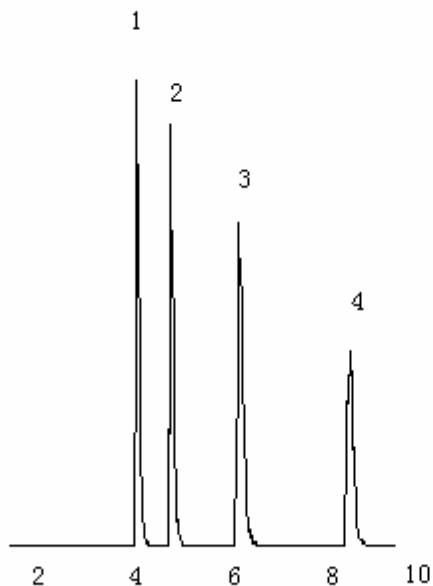
➡ 在有缓冲液的情况下，缓冲液的浓度和pH值非常重要

增加流动相极性

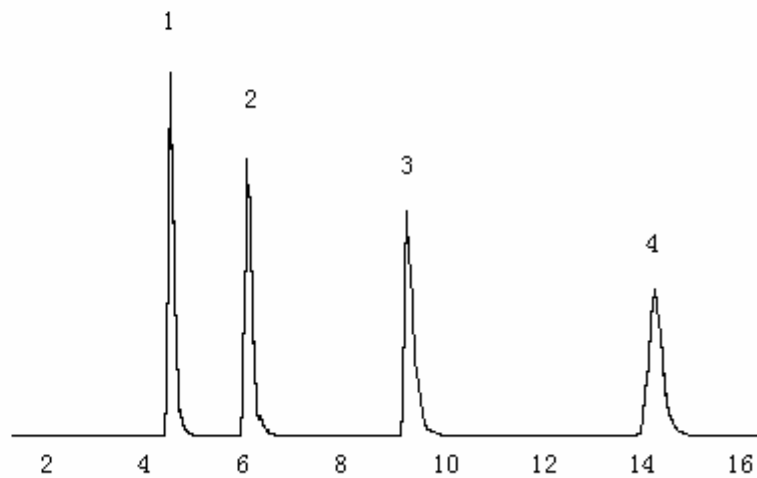
20 % H₂O



30 % H₂O



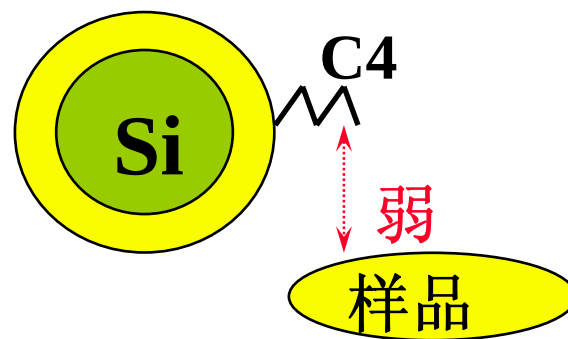
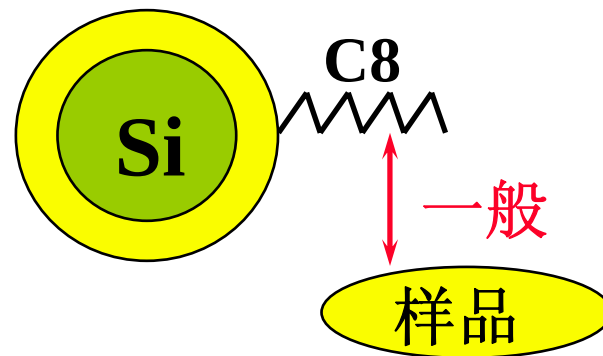
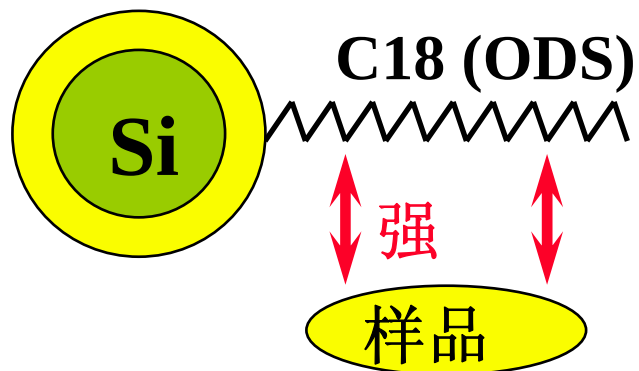
40% H₂O



- 1: 对羟基苯甲酸甲酯
- 2: 对羟基苯甲酸乙酯
- 3: 对羟基苯甲酸丙酯
- 4: 对羟基苯甲酸丁酯

有机相: MeOH

固定相极性变化对分离的影响

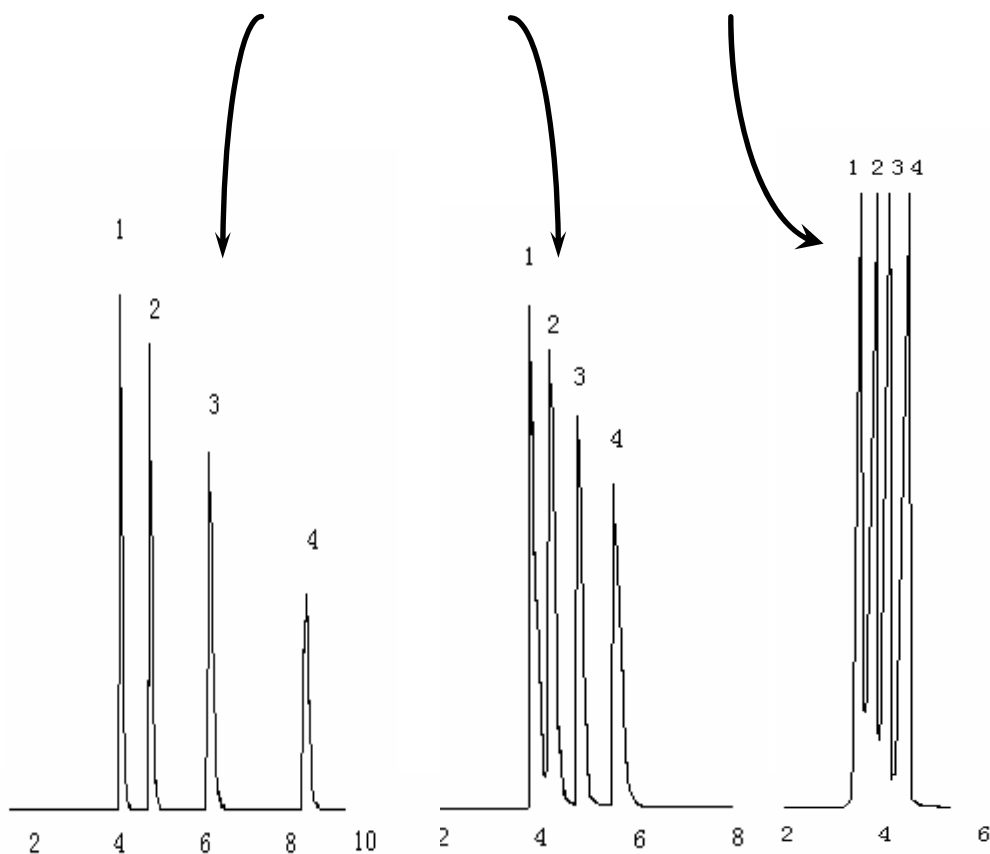


固定相极性变化对分离的影响

ODS

C8

TMS



◆ 分析条件

- ❖ 柱 : Shim-pack CLC-ODS
- ❖ 流动相 : MeOH : H₂O = 7 : 3
- ❖ 流速 : 1.0 mL/min
- ❖ 温度 : 40 C
- ❖ 进样体积 : 10 uL
- ❖ 检测器 : UV-254 nm

◆ 峰

1. 苯甲酸甲酯
2. 苯甲酸乙酯
3. n-苯甲酸丙酯
4. n-苯甲酸丁酯

离子对色谱

离子对试剂

➡ 阴离子化合物

- 氢氧化四丁基铵
- 溴化四丁基铵

➡ 阳离子化合物

- 丁烷基磺酸钠 (C4)
- 戊烷基磺酸钠 (C5)
- 己烷基磺酸钠 (C6)
- 庚烷基磺酸钠 (C7)
- 辛烷基磺酸钠 (C8)
- 癸烷基磺酸钠 (C10)
- 十二烷基磺酸钠 (SDS)

离子对色谱影响因素

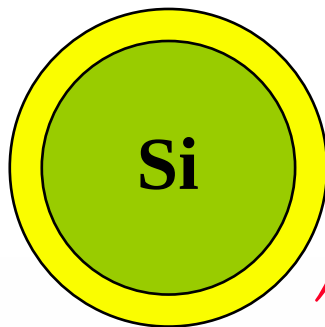
- 离子对试剂的类型
- 离子对试剂的浓度
- 流动相的 pH

正相色谱

- 硅胶柱 : 常用
- 氰基柱 : 常用
- 氨基柱 : 分析糖
- 二醇基柱 : 分析蛋白质



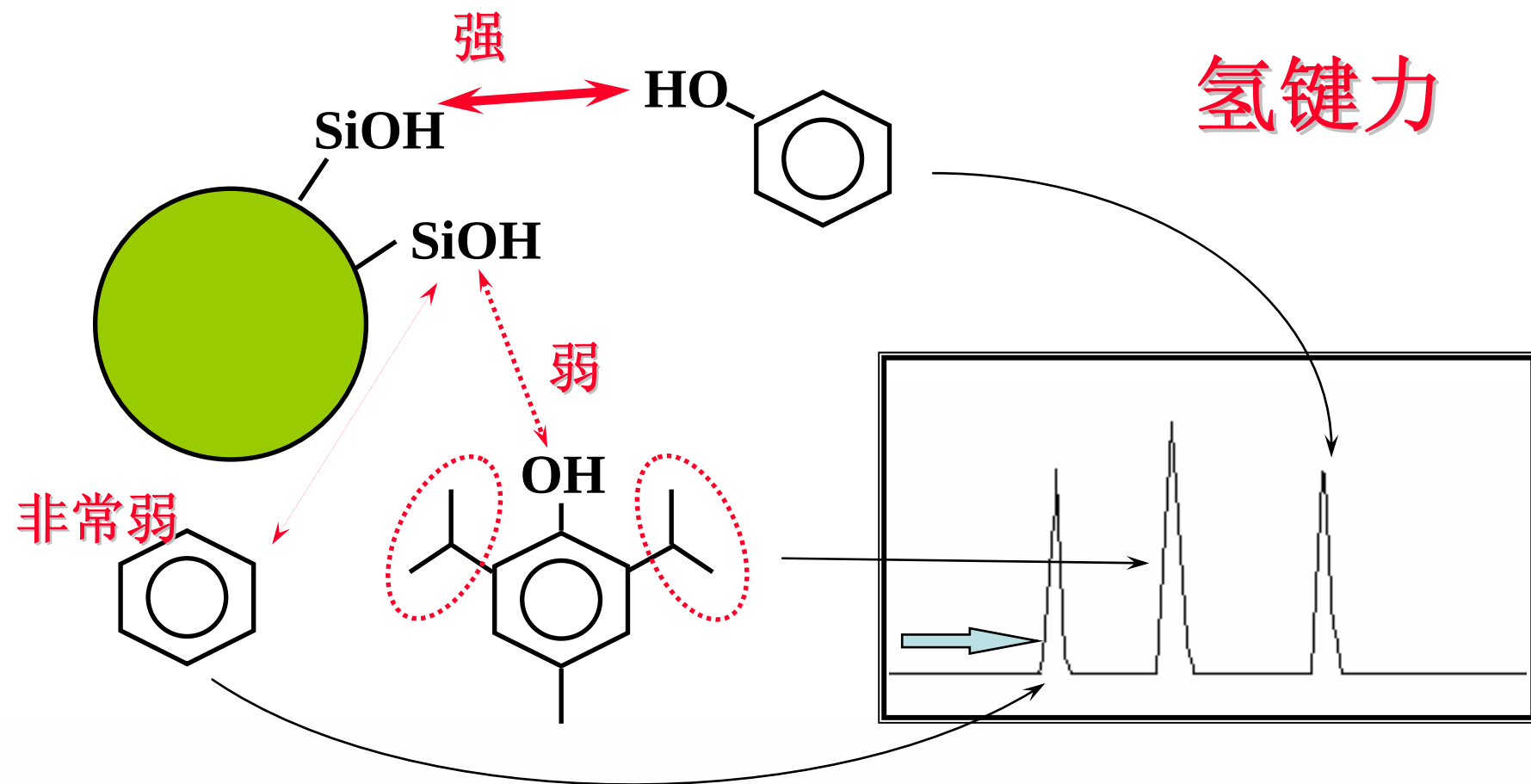
硅胶



化学键合相



相互作用力是什么？



氢键力

- 如果样品有
 - -COOH : 羧基
 - -NH₂ : 氨基
 - -OH : 羟基

氢键力强.

- 如果样品没有任何官能团, 象碳水化合物
- 如果样品有大的基团, 由于空间障碍

氢键力弱.

正相模式下流动相的选择

- 主要试剂

- 烷烃 (戊烷, 己烷, 庚烷, 辛烷)
- 芳香烃 (苯, 甲苯, 二甲苯)
- 二氯甲烷
- 氯仿
- 四氯化碳

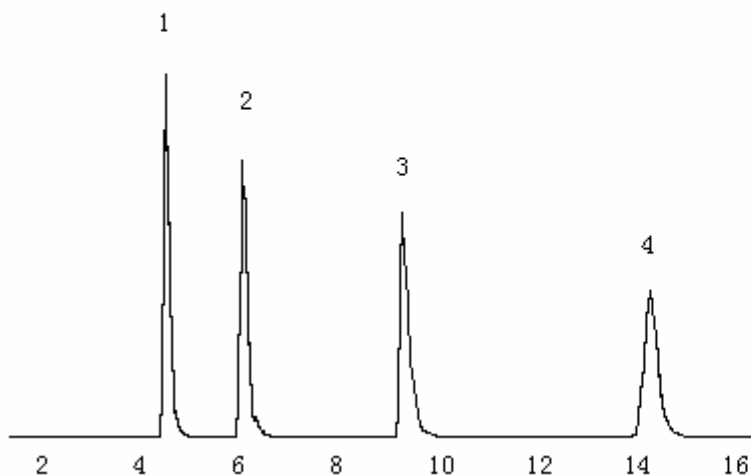
- 辅助试剂

- 甲基-t-丁基醚 (MTBE), 乙醚, 四氢呋喃 (THF), 二氧杂环乙烷, 嘧啶, 乙酸乙酯, 乙腈, 丙酮, 异丙醇, 乙醇, 甲醇

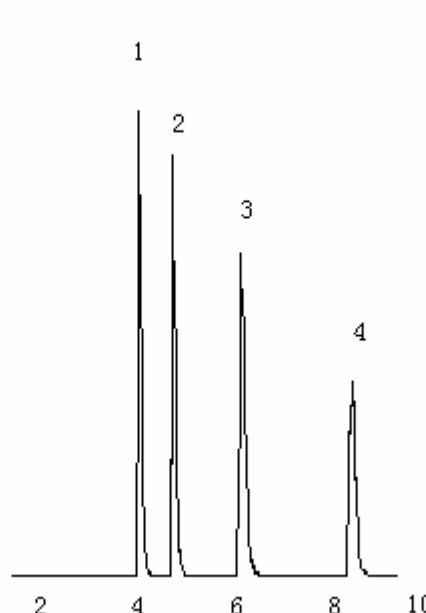
➡ 为了调整保留时间, 可以选择主要试剂然后再加入辅助试剂。

增加流动相极性

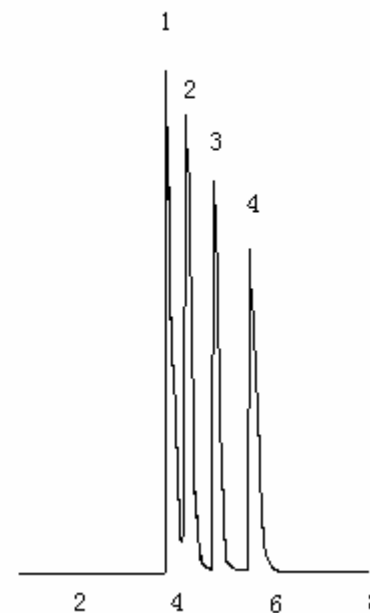
0 % MeOH



2 % MeOH



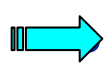
5% / MeOH



- 1 : 邻苯二甲酸二辛酯
- 2 : 邻苯二甲酸二丁酯
- 3 : 邻苯二甲酸二乙酯
- 4 : 邻苯二甲酸二甲酯

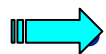
主要试剂：己烷

反相色谱与正相色谱的对比



反相

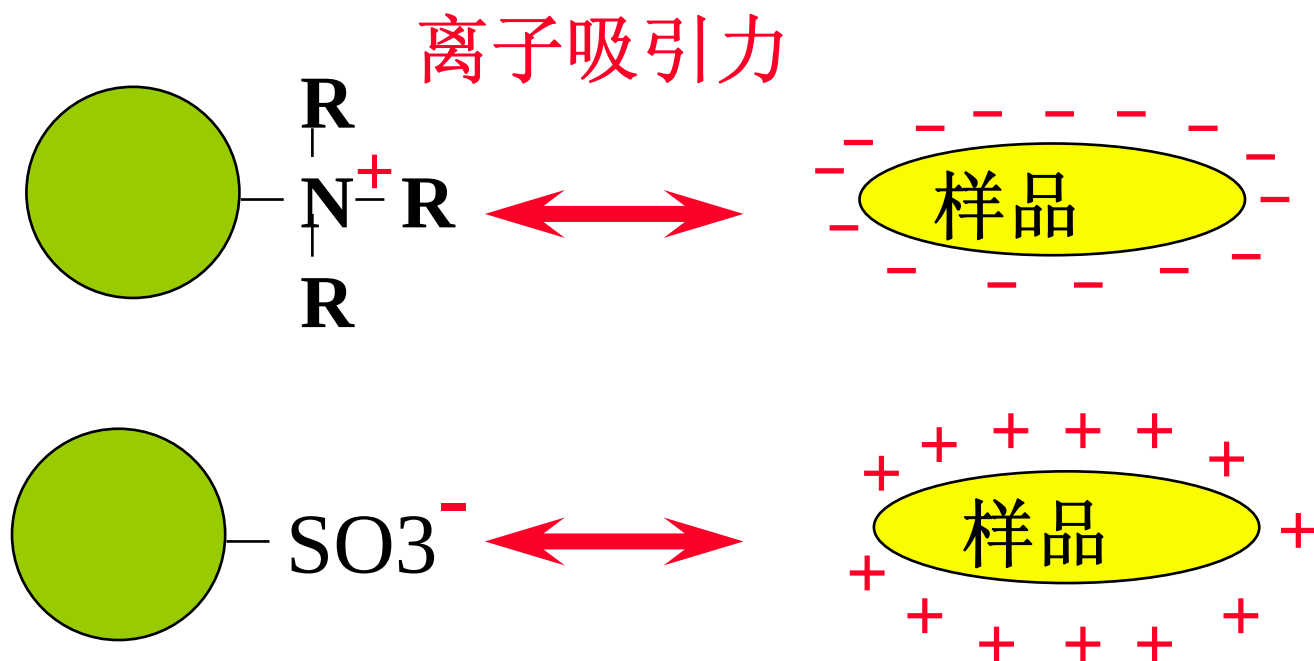
- 保留时间重复性好
- 固定相耐用



正相

- 对立体异构体有很好的分离 (Vitamin E等)
- 保留时间重复性稍差

离子交换色谱



离子交换色谱应用

➡生物领域

(蛋白质, 农药, 氨基酸分析)

➡离子分析

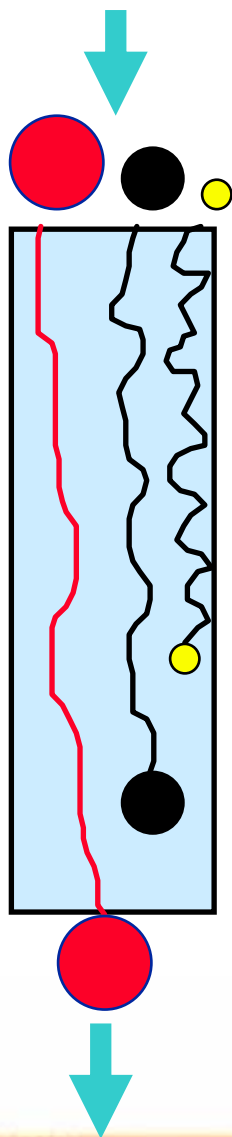
— 阳离子交换剂

- 强阳离子交换剂 (SCX) $(R-SO_3^-)$
- 弱阳离子交换剂 (WCX) $(R-COO^-)$

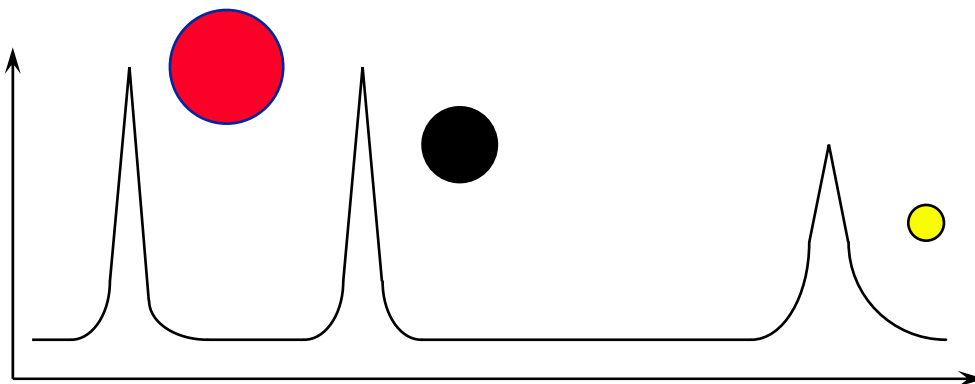
— 阴离子交换剂

- 强阴离子交换剂 (SAX) (R_4N^+)
- 弱阴离子交换剂 (WAX) (DEAE)

尺寸排阻色谱法 (SEC)



流出顺序



第二部分

柱子基本性能参数

表征色谱柱的参数

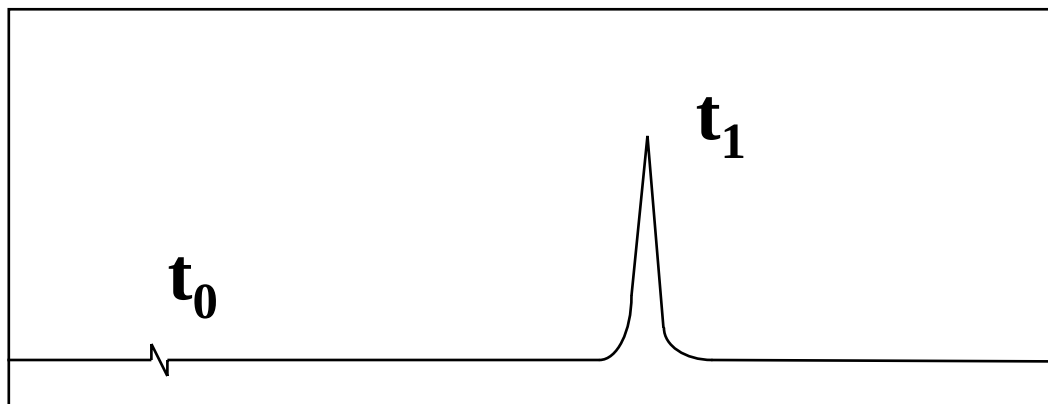
硅胶纯度	填料硅胶的纯度与残留金属离子浓度
色谱柱尺寸	填料床的长度和内径
颗粒形状	球型或不规则型
粒径	平均颗粒直径, 通常 $3-10\mu\text{m}$
表面积	颗粒外表面和内部孔表面的总和, 以 m^2/g 表示
孔径	颗粒的孔或腔的平均尺寸, 范围 $80-300\text{\AA}$
碳百分率	与基体物质相连的键合相的量
封尾	用短链将裸露的硅羟基键合后封闭起来

表征色谱柱性能的参数

- 容量因子
- 理论塔板数
- 理论塔板高度
- 分离度
- 拖尾因子

容量因子, k'

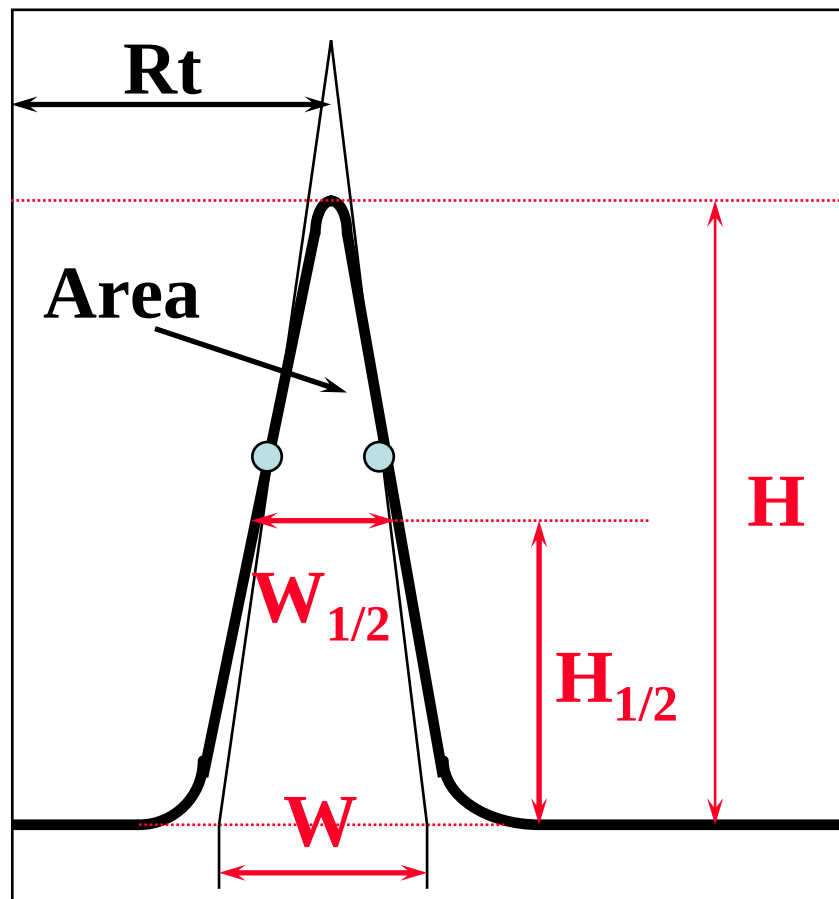
$$k' = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$



t_1 = 组分峰的保留时间

t_0 = 死时间 (非保留时间)

理论塔板数, N



中国/日本药典：

$$N = 5.54 \times (Rt / W_{1/2})^2$$

美国药典：

$$N = 16 \times (Rt / W)^2$$

理论塔板高度, H

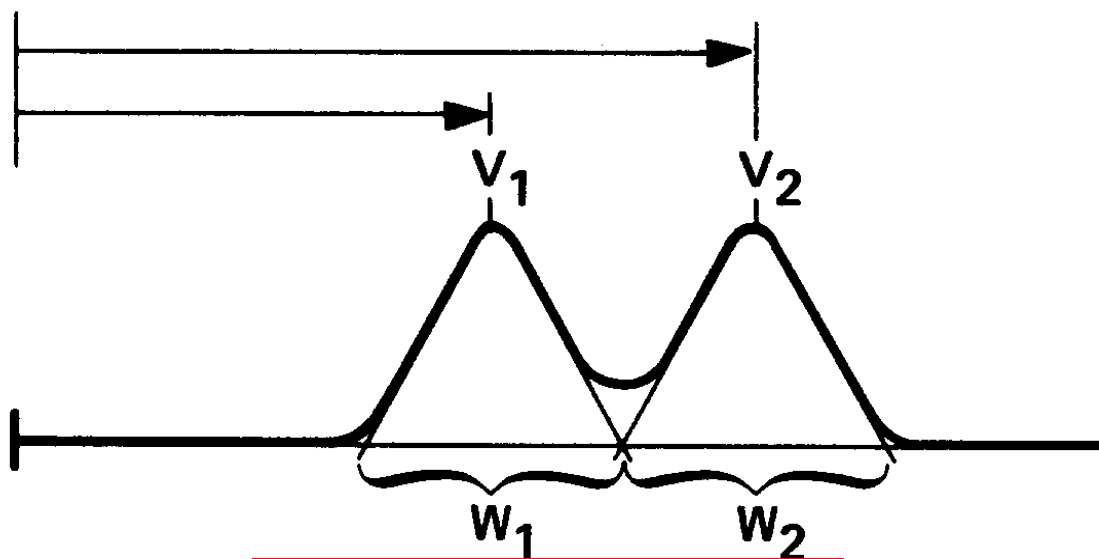
$$H = L / N$$

L: 色谱柱长

N: 理论塔板数

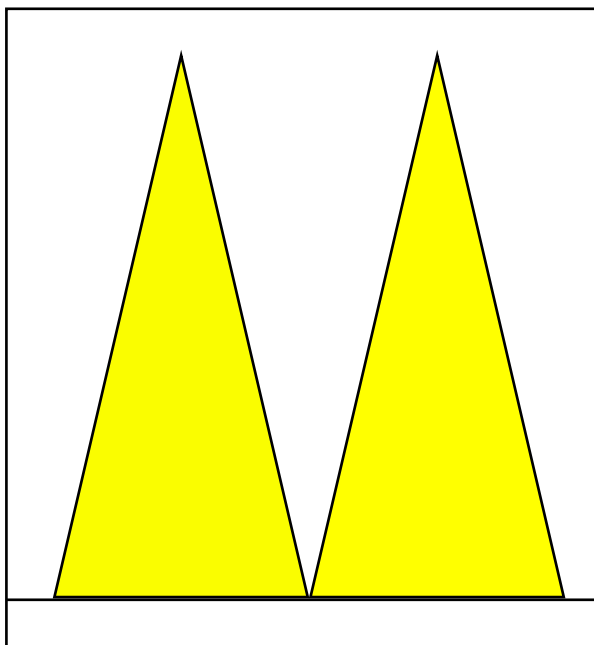
分离度, Resolution

相邻两峰完全分离其分离度 $R_s \geq 1.5$.

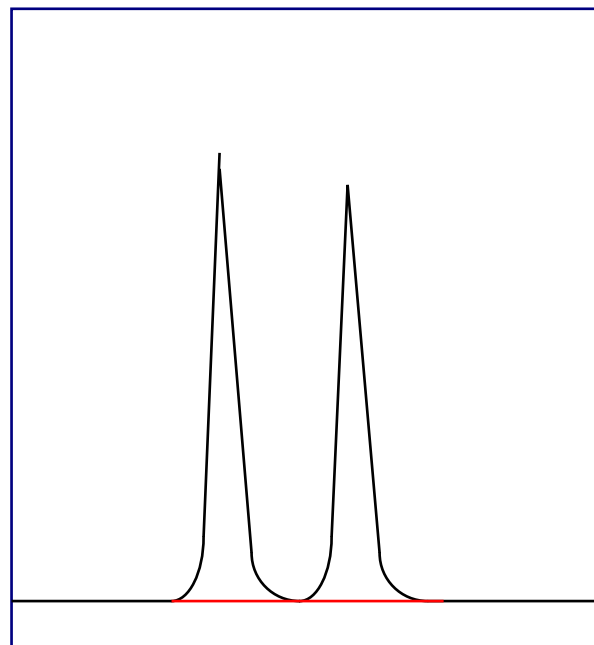


$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

完全分离时的分离度



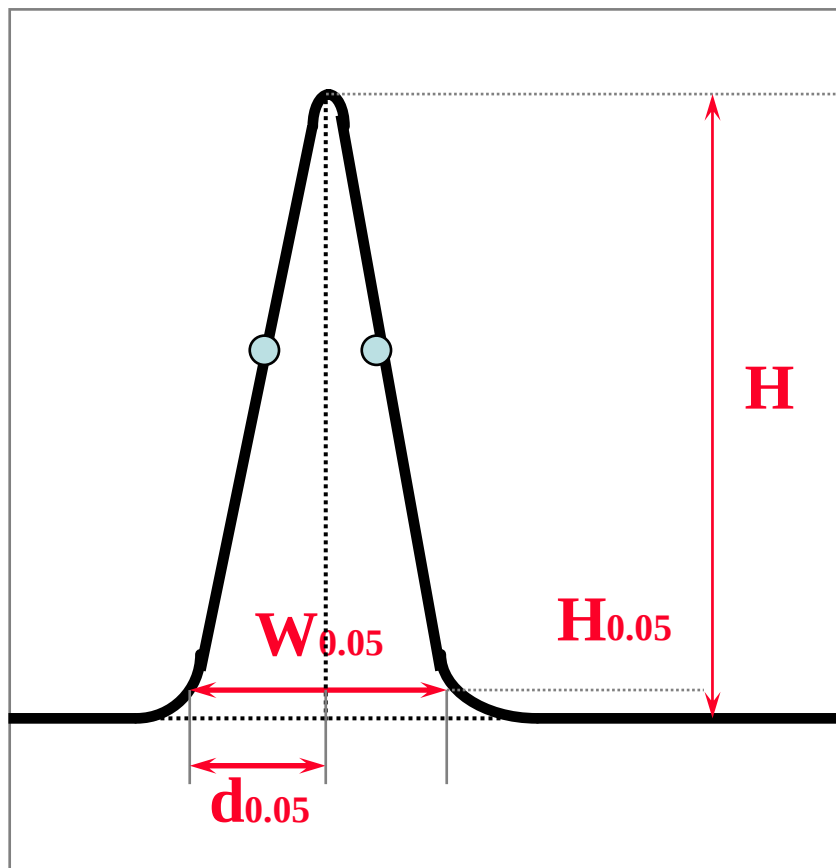
$$R_s = 1.0$$



$$R_s = 1.5$$

峰形不是三角形，而是高斯分布

拖尾因子, T



$$T = W_{0.05} / 2d_{0.05}$$

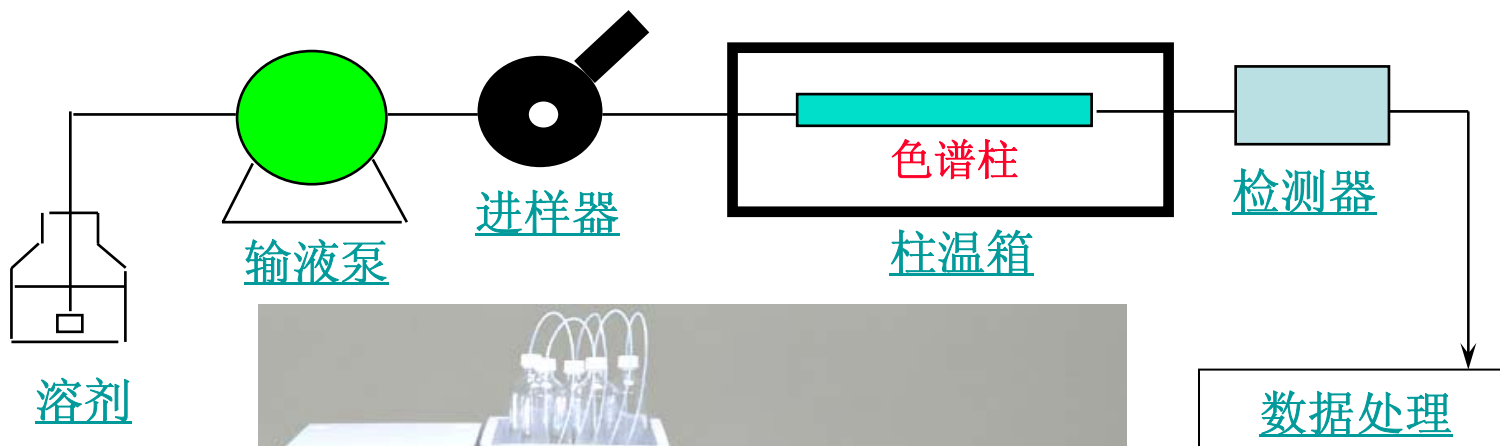
$W_{0.05}$: 5% 峰高处峰宽

$d_{0.05}$: 5% 峰高处的前半峰宽

第三部分

- HPLC硬件基础知识
- 日常分析注意点

液相色谱简易流程图

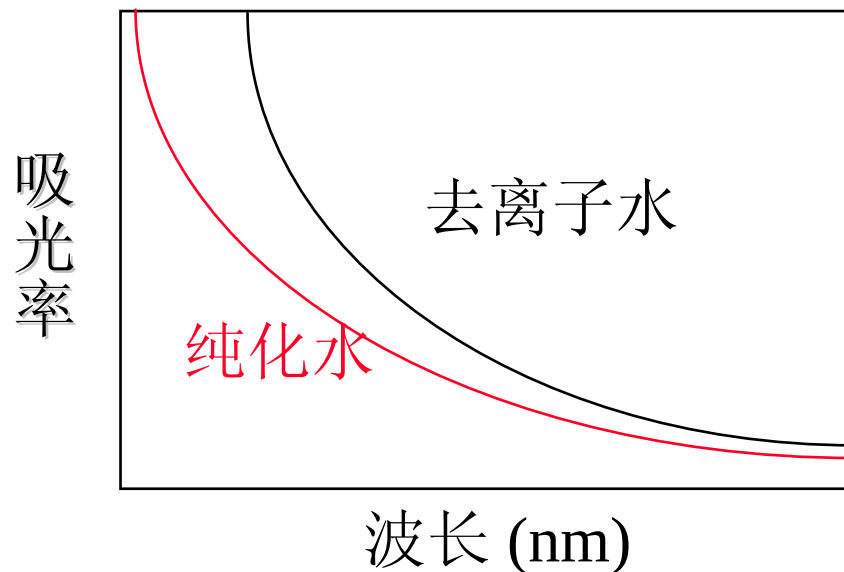


流动相的选择

- ➡ 采用 “HPLC” 级溶剂
- ➡ 避免使用会引起柱效损失或保留特性变化的溶剂
- ➡ 对试样有适宜的溶解度
- ➡ 溶剂粘度要小
- ➡ 与检测器相匹配

水的等级

- 水的等级
 - 纯化水
 - 蒸馏水
 - 去离子水



因为不纯物的存在，去离子的吸光率较高

纯化水中去除了无机和有机的污染物

水的等级

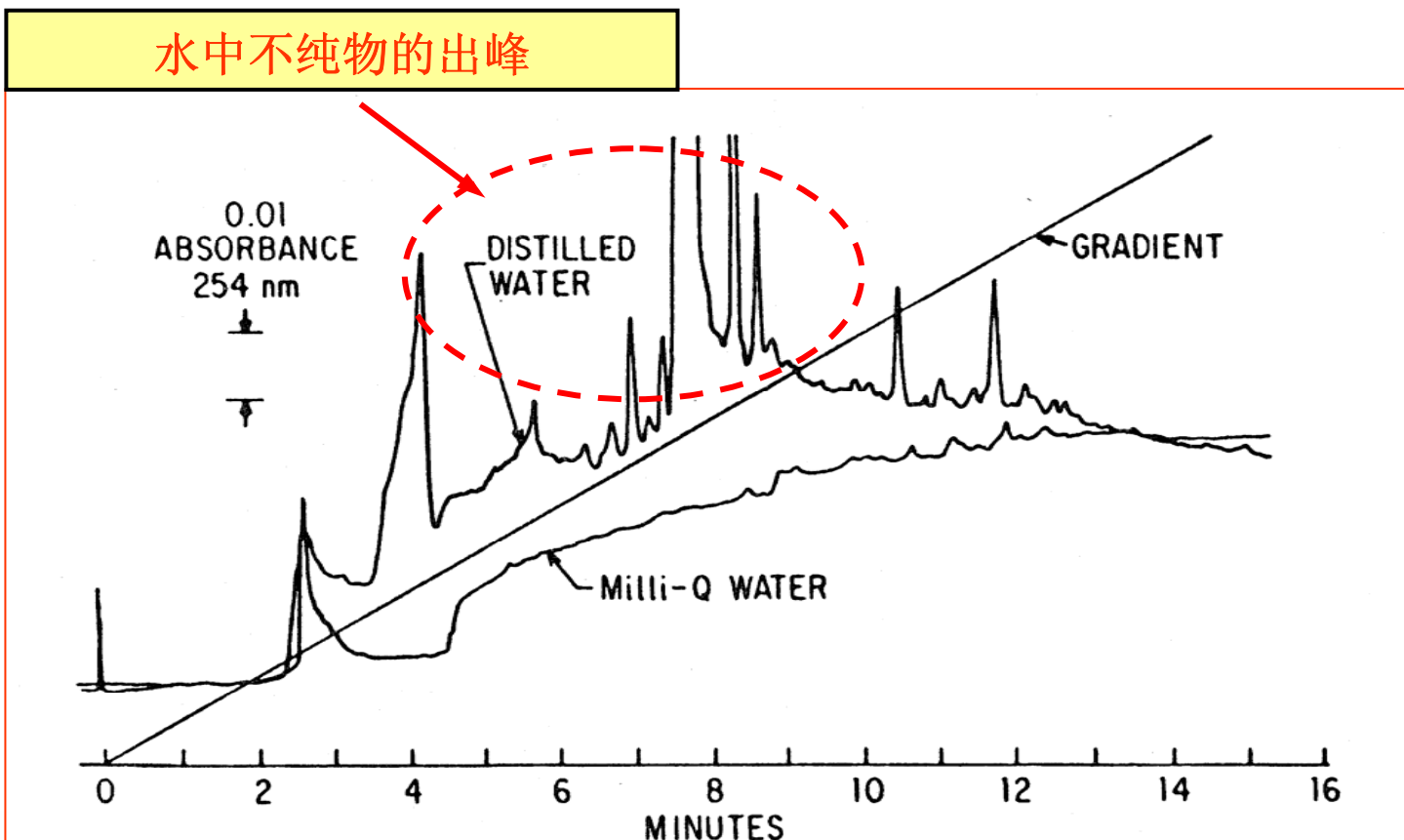
HPLC用水可以通过以下几个方法得到：

- ➡ 专门的纯水机或超纯水机:理想的HPLC用水应为 $18.2\text{M}\Omega$ 的超纯水，并通过 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜，除去热源、有机物、无机离子等。
- ➡ 去离子水重蒸；
- ➡ 二次或三次重蒸水；

不管采用何种途径，配制流动相应应用新鲜水。

水的等级

◆ 未注入样品时空白梯度的色谱图



水中的不纯物保留在柱中，随之被乙腈洗脱。

有机溶剂的等级

- 有机溶剂的等级

- HPLC级
- 优级纯
- 分析纯



微量分析、梯度洗脱

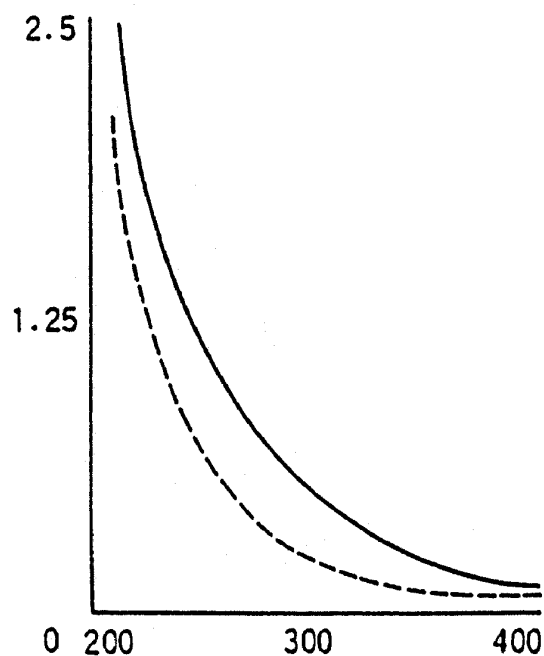
都经过蒸馏和0.45u的过滤(除纤维毛,未溶解的机械颗粒)

优级纯的纯度比分析纯大,但里面含有防腐剂和抗氧化剂

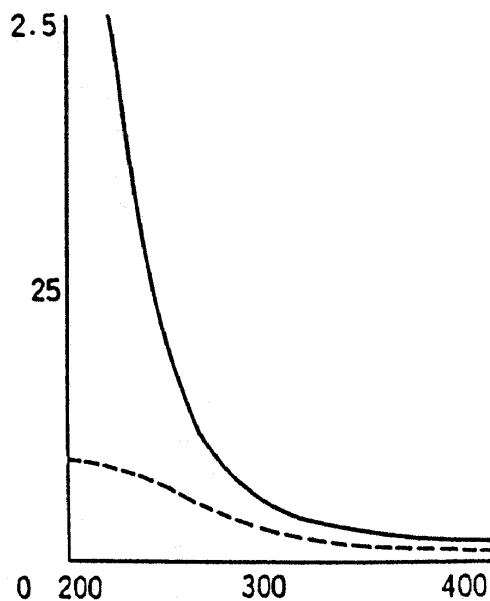
HPLC级经过0.2u的过滤,且除去有紫外吸收的杂质

有机溶剂的等级

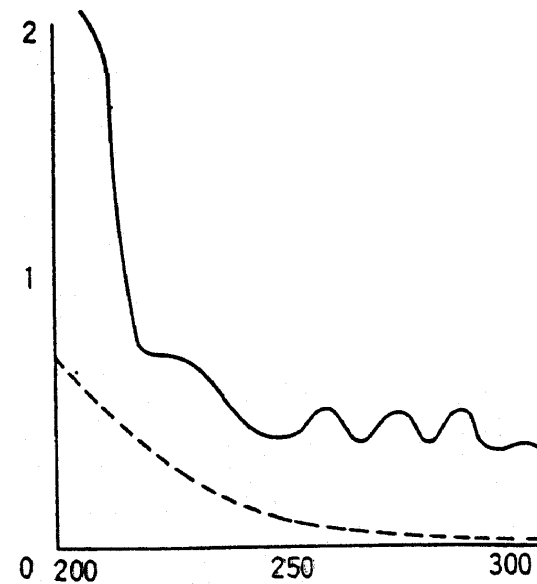
分析纯级和 HPLC 级溶剂的吸光度比较图



甲醇



乙腈



正己烷

缓冲盐

选择缓冲液的步骤

1. 确定最佳分离状态时的流动相pH
2. 选择具有与流动相pH相近的pKa 的缓冲液（即使浓度稀也具有较强能力的缓冲液）
3. 确认检测波长下缓冲液是否有大的吸收
（在波长210nm附近进行检测时，不能用醋酸和 柠檬酸的缓冲液）

缓冲盐

常用代表性的弱酸的pKa值

	pK1	pK2	pK3
醋酸	4.87		
柠檬酸	3.13	4.76	6.40
磷酸	2.16	7.21	12.32

缓冲液

缓冲液的使用

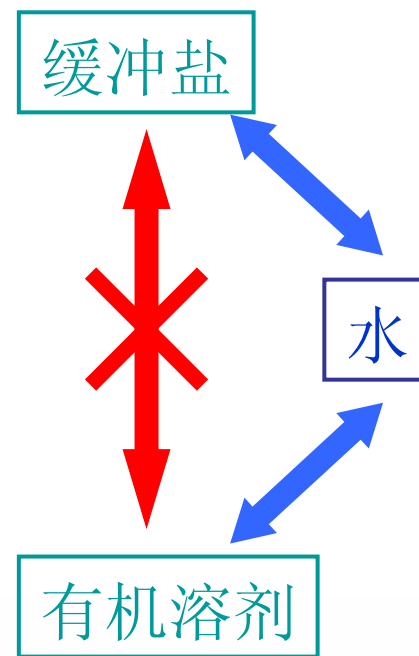
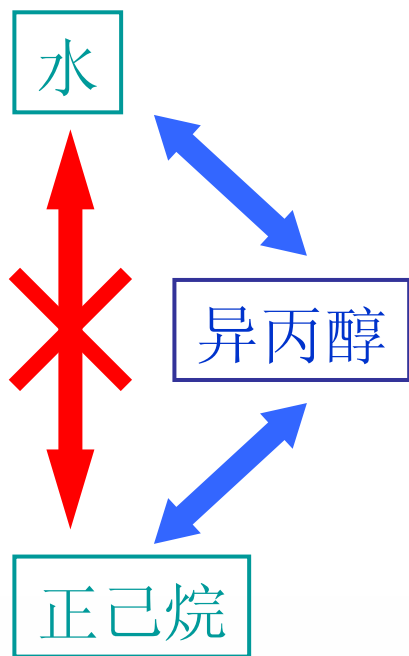
- ❧ 使用前必须过滤
- ❧ 使用后一定要进行清洗，以免造成腐蚀、磨损、阻塞：
用含5%甲醇的水溶液冲洗30min（1ml/min），再用甲醇冲洗30min
- ❧ 用纯水冲洗泵头清洗管路
- ❧ 易受到细菌和霉菌的影响

**不能直接用有机溶剂
冲洗缓冲盐溶液**

流动相的更换

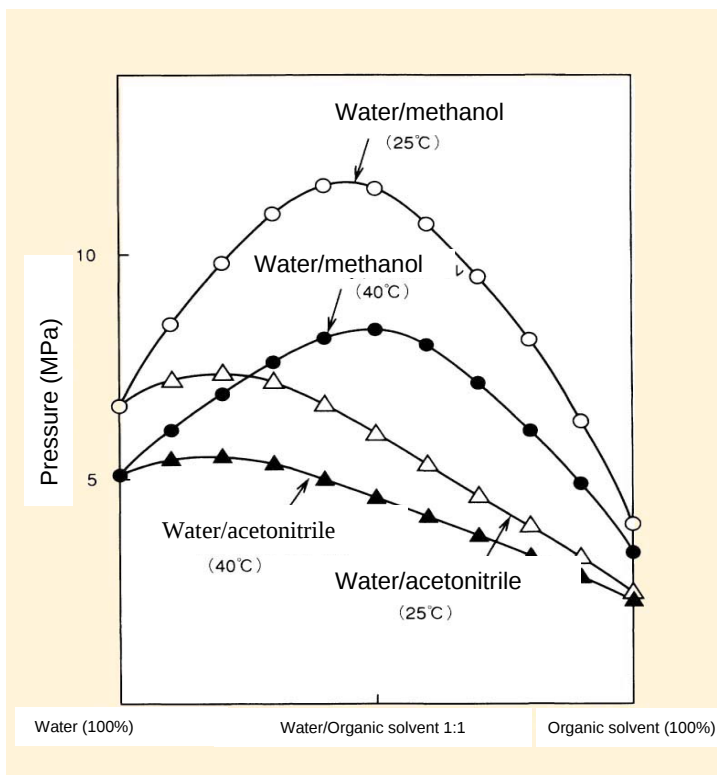
不互溶的流动相不能直接更换

缓冲盐不能直接用有机溶剂更换



溶剂的黏度

◆ 乙腈和甲醇 ... 黏度



- 乙腈黏度低

➡ 在相同流速时有较低的柱压

- 当和水混合时黏度有变化

➡ 柱压也相应变化

溶剂前处理-过滤

过滤：0.45um或更小孔径滤膜

目的：除去溶剂中的微小颗粒，避免堵塞色谱柱，尤其是使用无机盐配制的缓冲液时。

滤膜类型：

聚四氟乙烯滤膜：适用于所有溶剂，酸和盐。

醋酸纤维滤膜：不适用于有机溶剂，特别适用于水基溶剂。

尼龙66滤膜：适用于绝大多数有机溶剂和水溶液，可以用于强酸，不适用于二甲基甲酰胺。

再生纤维素滤膜：蛋白吸收低，同样适用于水溶性样品和有机溶剂

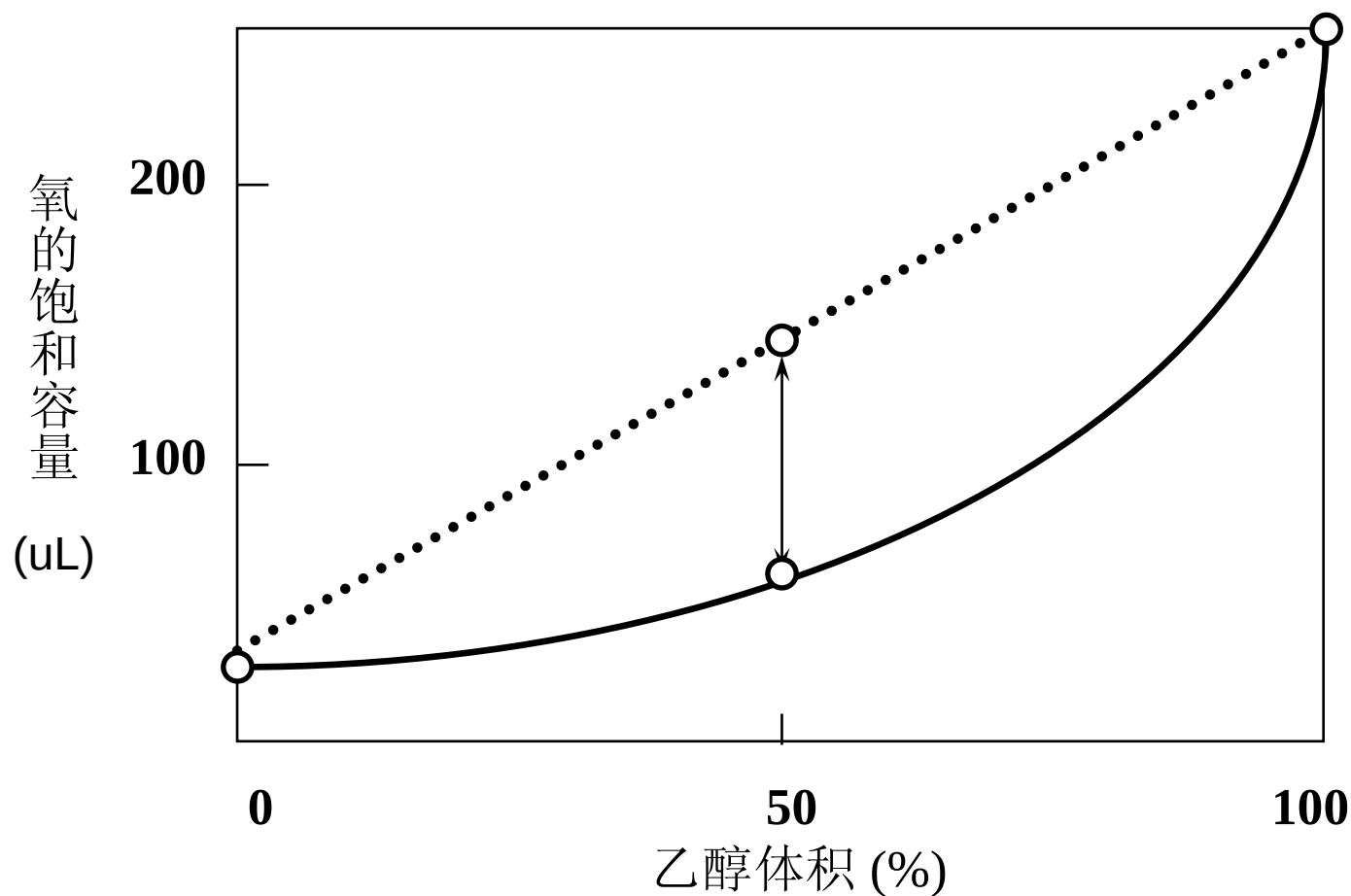
溶剂前处理-脱气

脱气：除去流动相中溶解或因混合而产生的气泡

气泡对测定的影响：

- 1) 泵中气泡使液流波动，改变保留时间和峰面积
- 2) 柱中气泡使流动相绕流，峰变形
- 3) 检测器中的气泡产生基线波动

溶剂前处理-脱气



氧气在1ml水-乙醇混合溶剂中的溶解度

常用脱气方法

- 超声脱气
- 减压脱气
- 在线脱气

岛津液相输液泵



目的	单元	流速范围	特性和应用
分析	LC-20AT LC-10ATvp	0.001-10ml/min 0.001-9.999ml/min	非凡的耐用性，适于常量分析
	LC-20AD LC-10ADvp	0.0001-10ml/min 0.001-9.999ml/min	无脉动，适于半微量LC和 LC-MS分析
	LC-20AB	0.0001-10ml/min	无脉动，适于半微量LC和 LC-MS分析

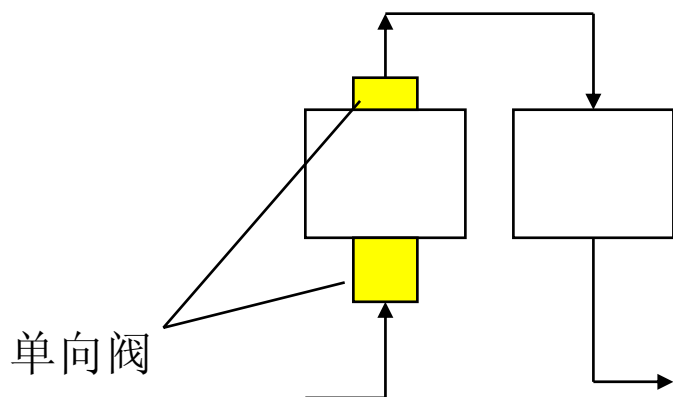
柱塞泵的基本结构

LC-10ATvp

LC-2010

LC-20AT

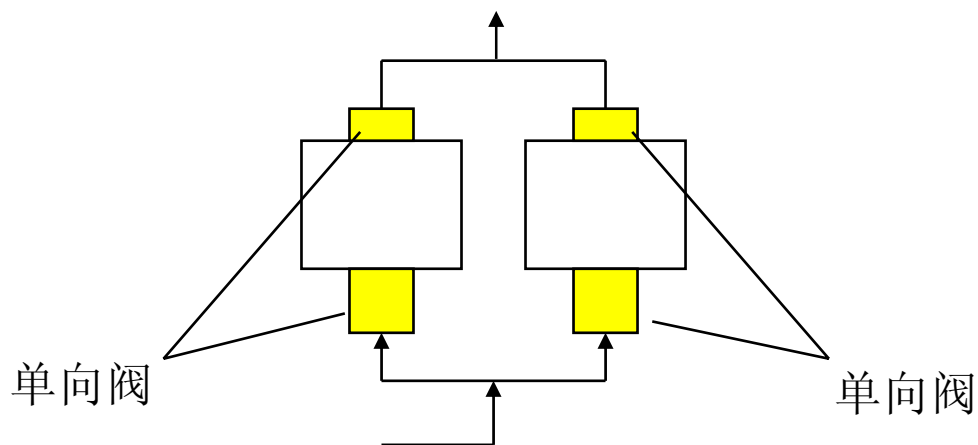
串联式柱塞往复泵



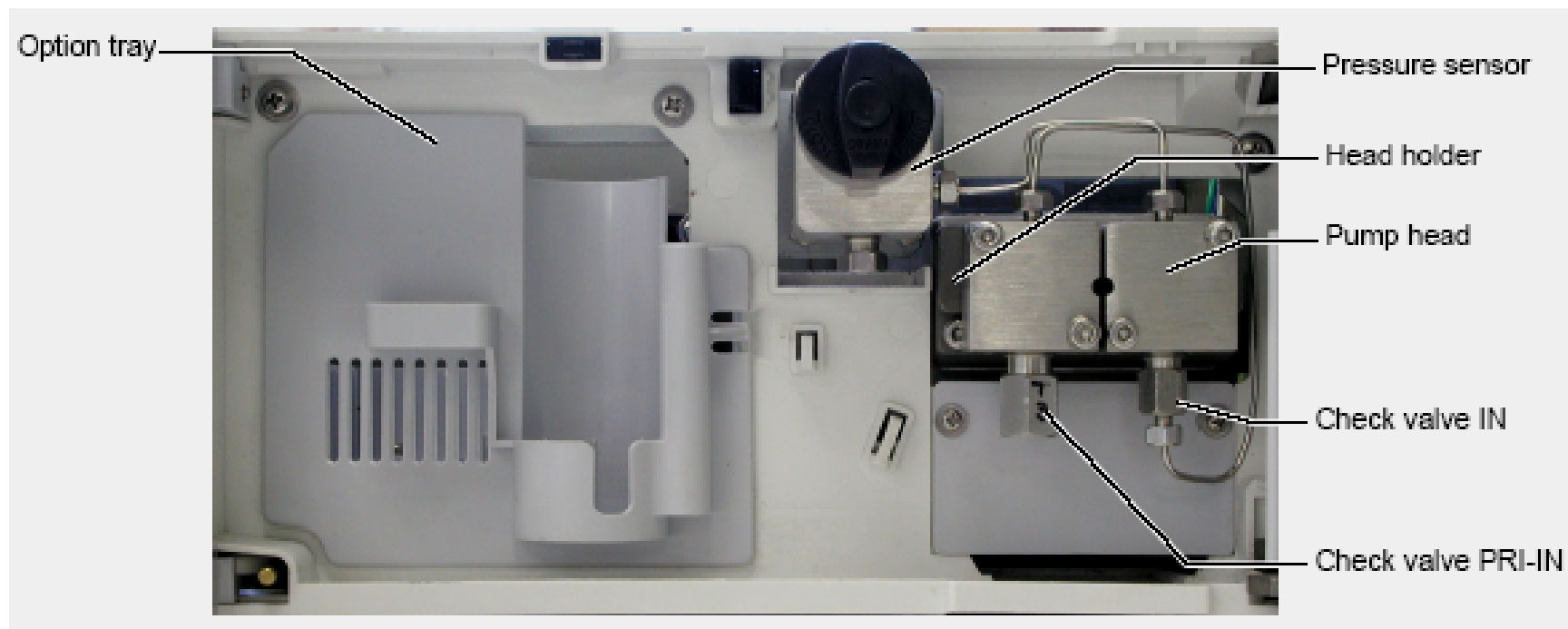
LC-10ADvp

LC-20AD

并联式微体积柱塞往复泵

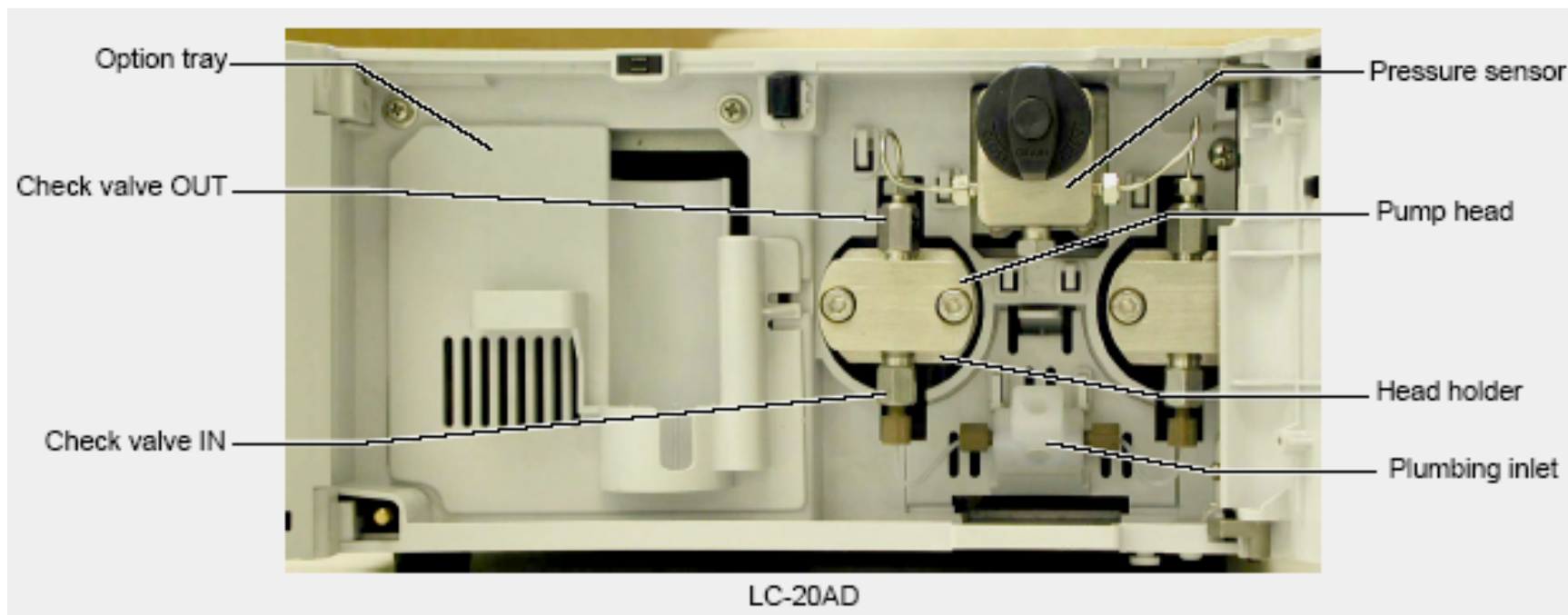


LC-20AT

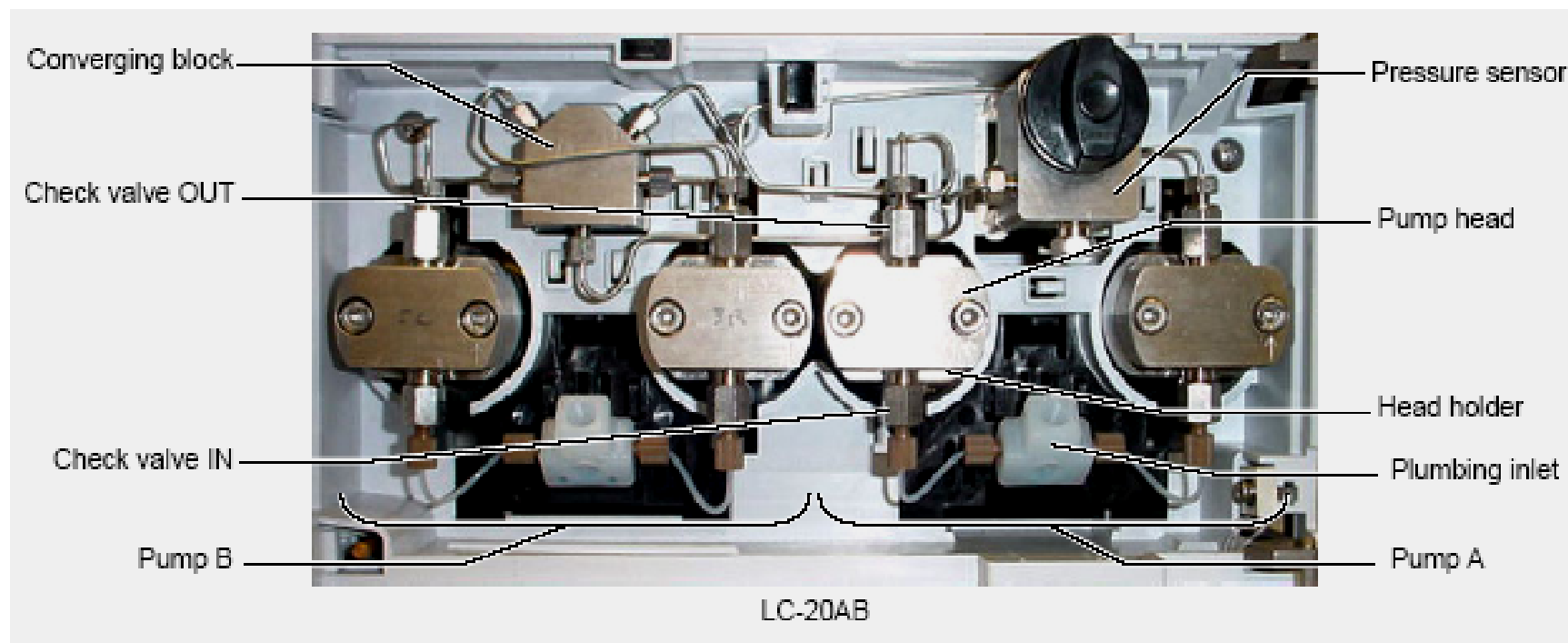


LC-20AT

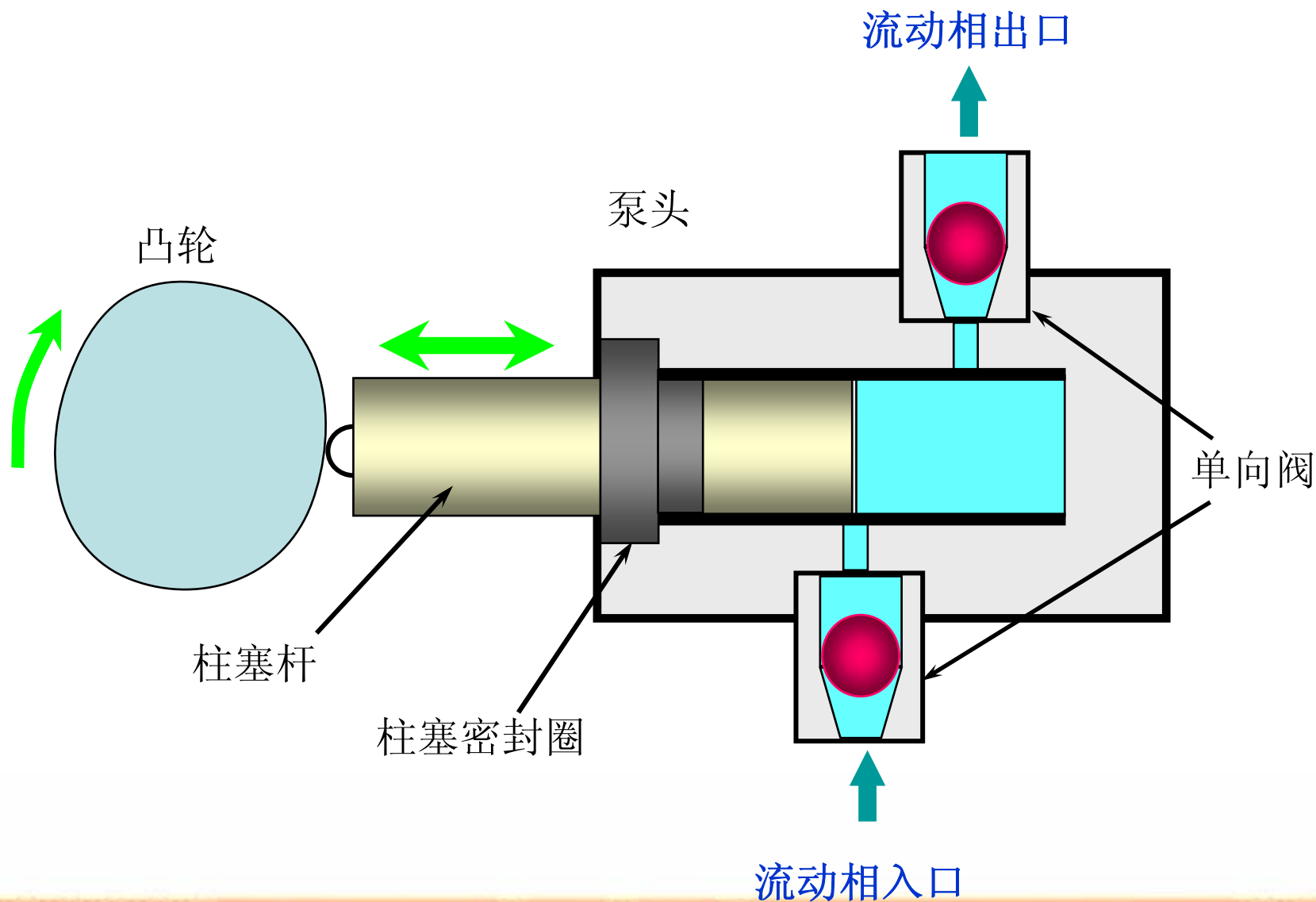
LC-20AD



LC-20AB

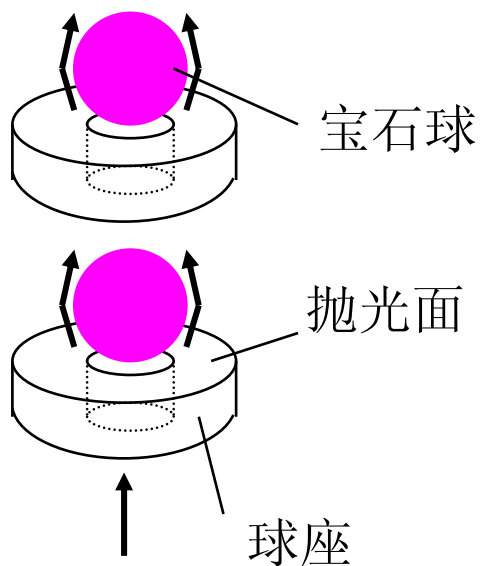


泵工作示意图

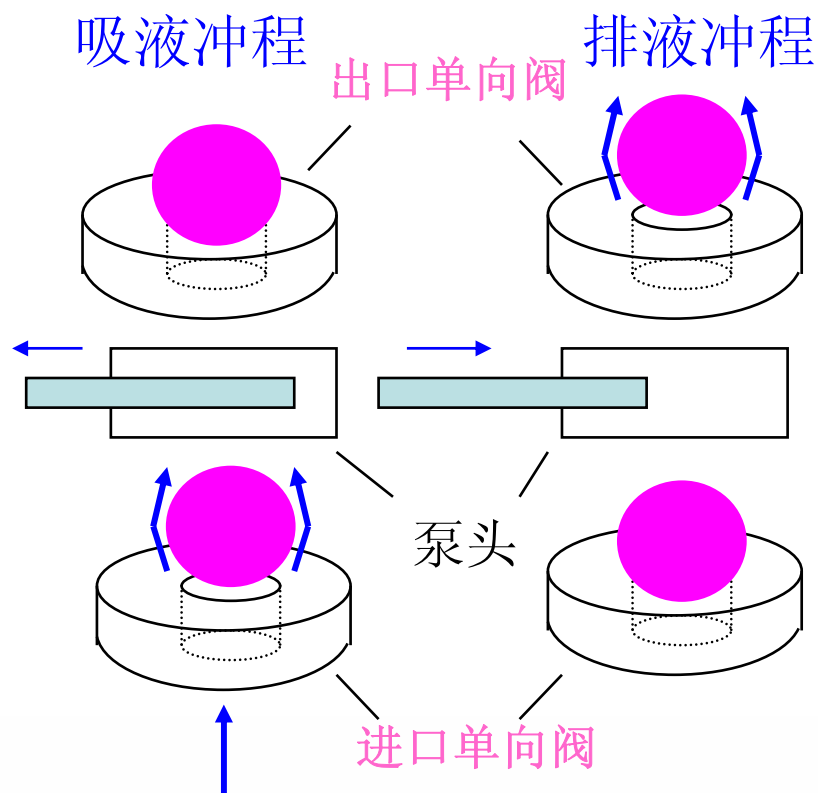


单向阀工作原理

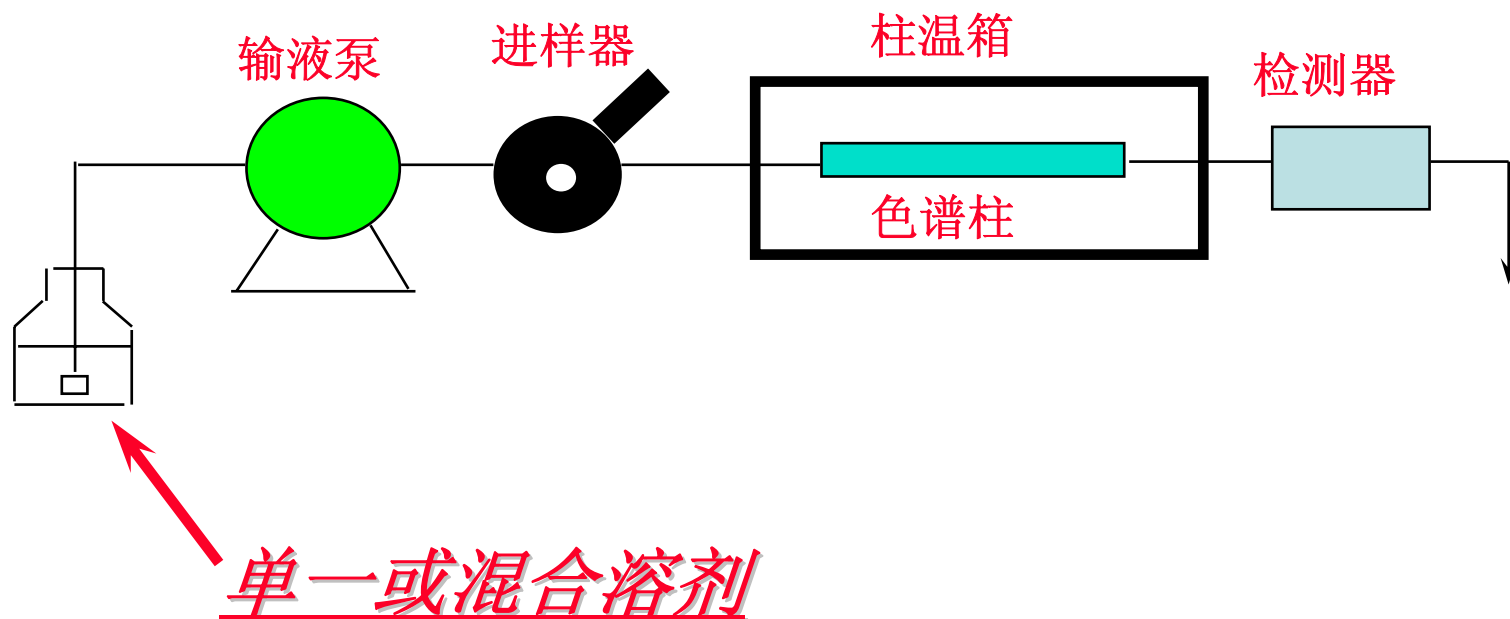
单向阀结构



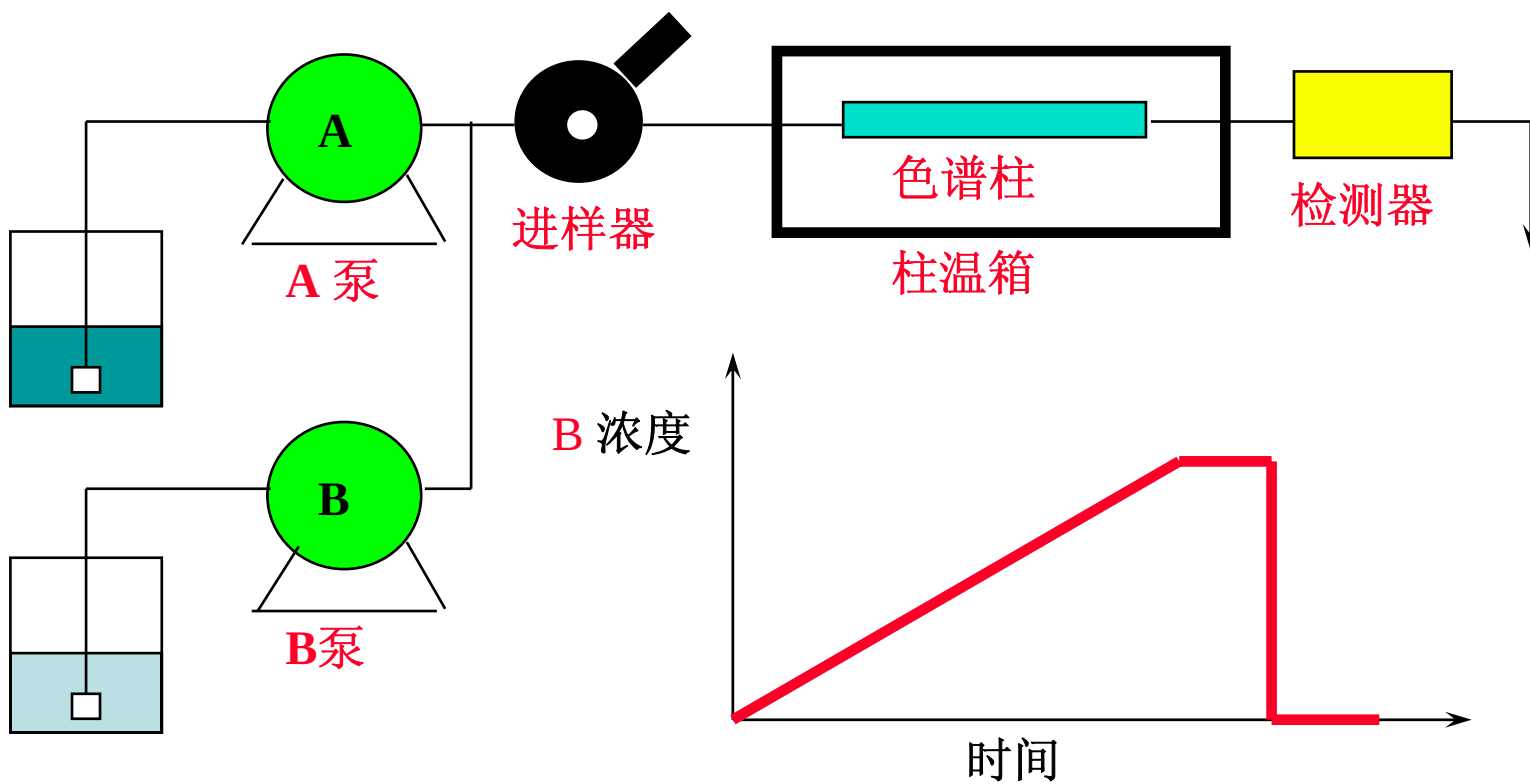
单向阀工作原理



等度洗脱



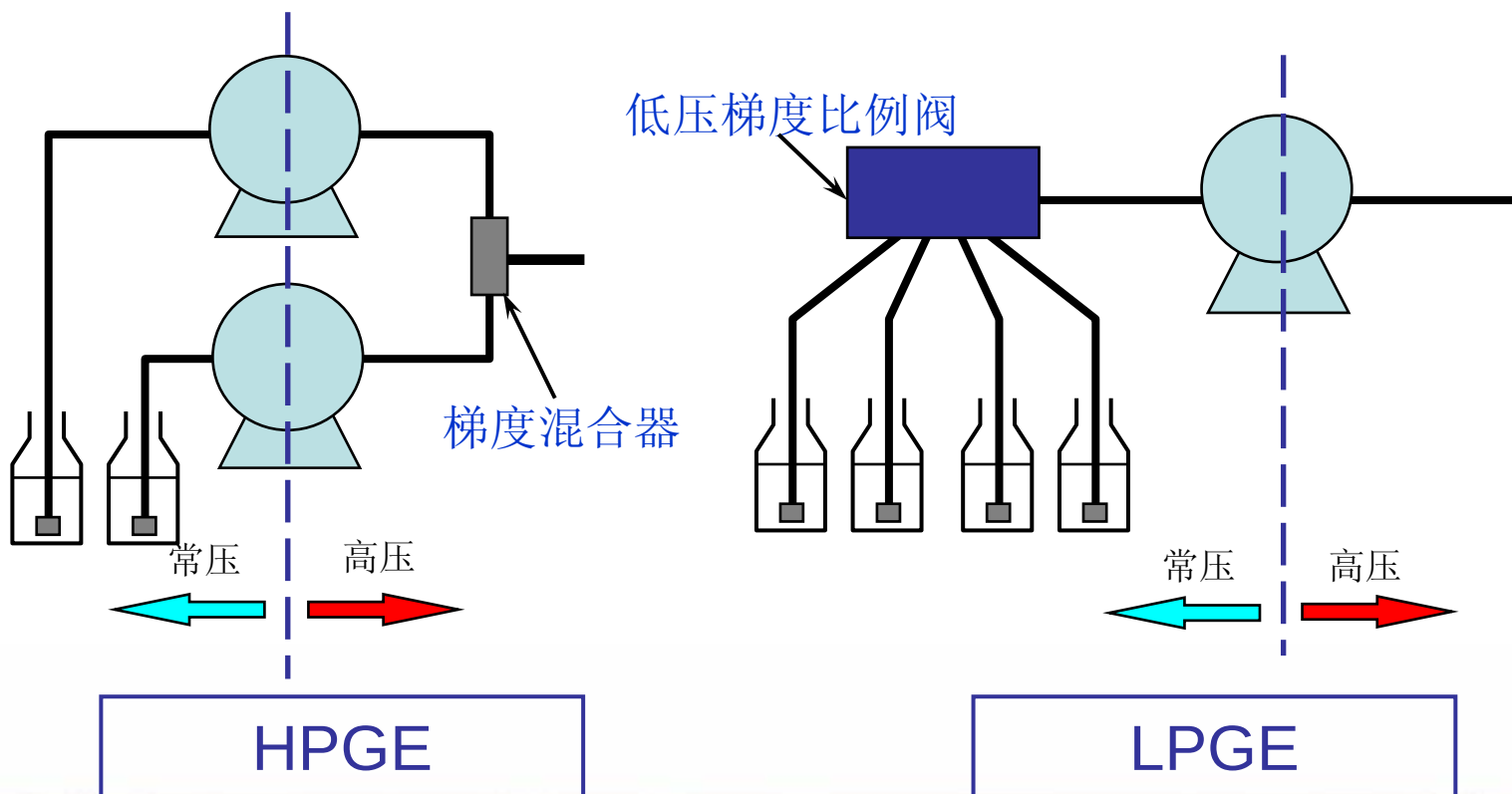
梯度洗脱



高压/低压梯度系统

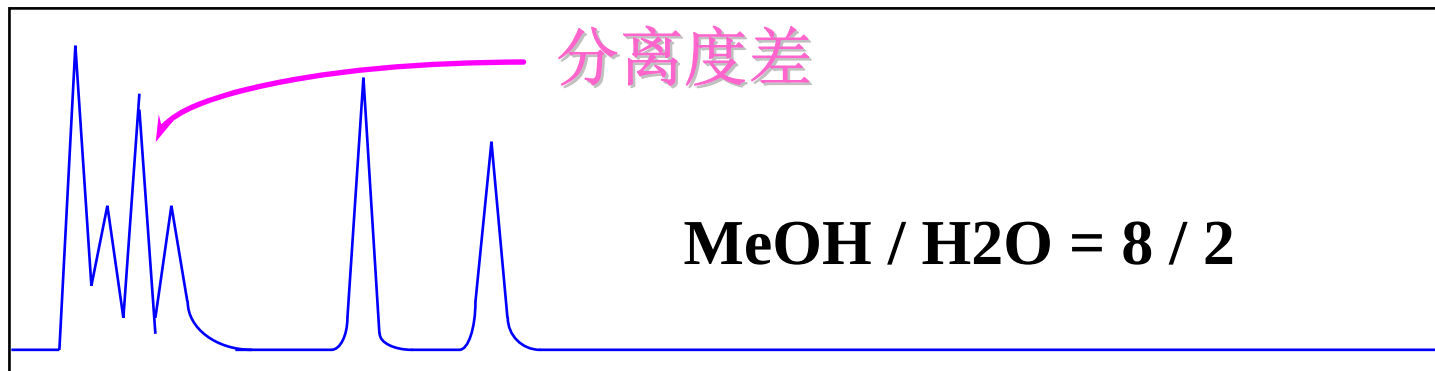
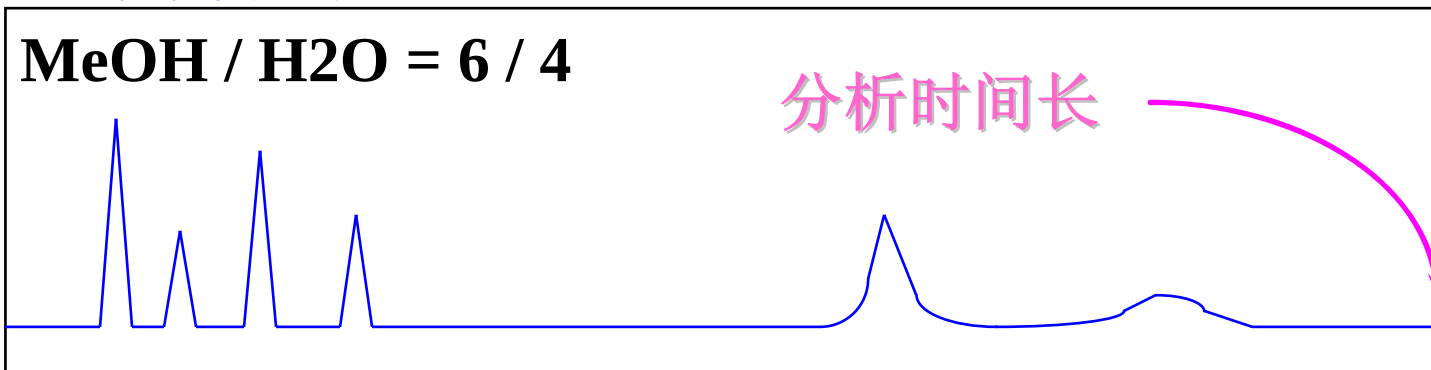
梯度洗脱装置:

- ❖ 高压梯度：用两台高压输液泵将两种溶剂输入
- ❖ 低压梯度：在常压下将两种溶剂（或多元溶剂）混合，然后用高压输液泵将流动相输入到色谱柱中。



使用梯度洗脱的原因

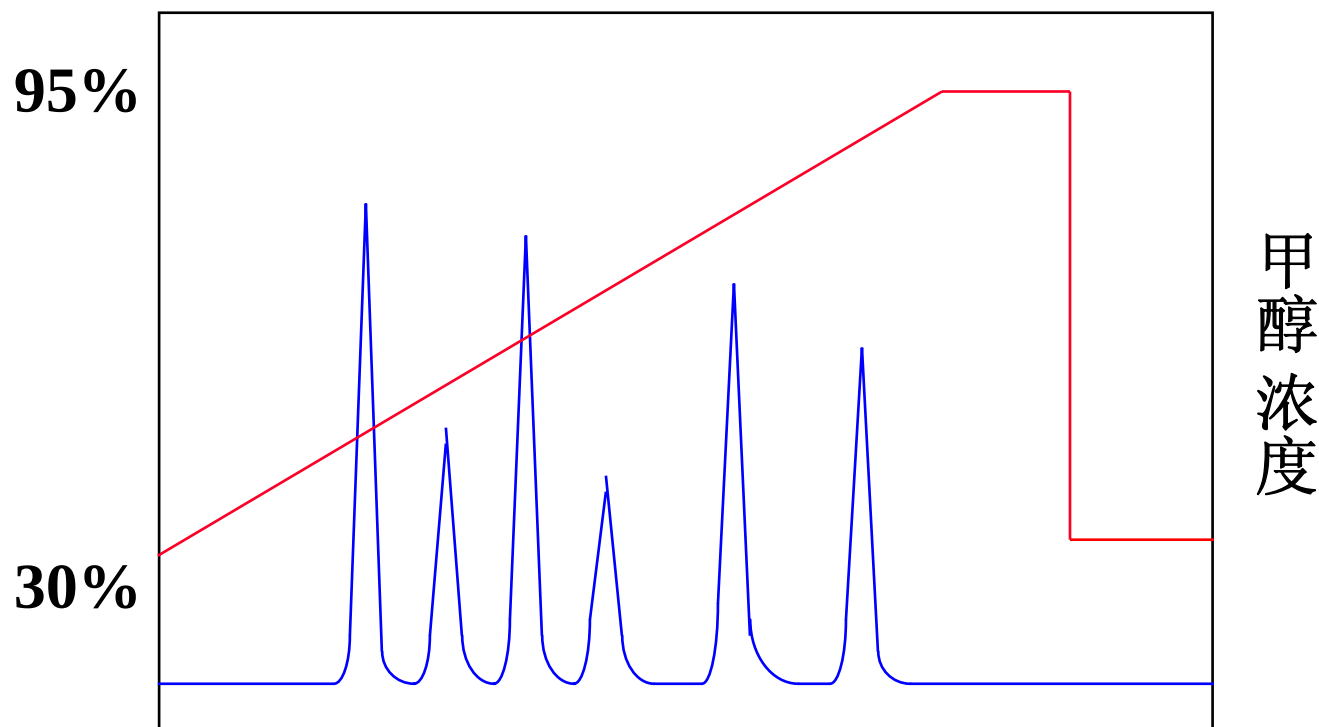
当等度洗脱时:



(column : ODS)

使用梯度洗脱的原因

当采用梯度洗脱时：



在最短时间内获得最佳的分离

梯度洗脱要点

梯度洗脱：

优点：可提高分离度、缩短分离时间、降低最小检测量和提高分离精度

注意事项：

- ❖ 溶剂的纯度要高，否则梯度洗脱的重现性差
- ❖ 梯度混合的溶剂互溶性要好
- ❖ 梯度洗脱应使用对流动相组成变化不敏感的选择性检测器（如紫外吸收检测器或荧光检测器），而不能使用对流动相组成变化敏感的通用型检测器（如示差折光检测器）
- ❖ 查看空白实验的数据
- ❖ 遵守分析周期（最初的分析数据不采用）

样品前处理

1. 使用流动相溶解样品
 - 减少溶剂峰，尤其是组分峰靠近溶剂峰时尤为重要
 - 保证样品在流动相中的溶解度，避免样品在系统中，尤其在柱中产生沉淀
2. 进样前最好使用0.45um 的滤膜进行过滤
如果样品很脏，要使用0.22um的滤膜进行过滤
3. 对于含有复杂基质的样品，最好前处理后再进样。

进样器

- 自动进样器
- 手动进样器

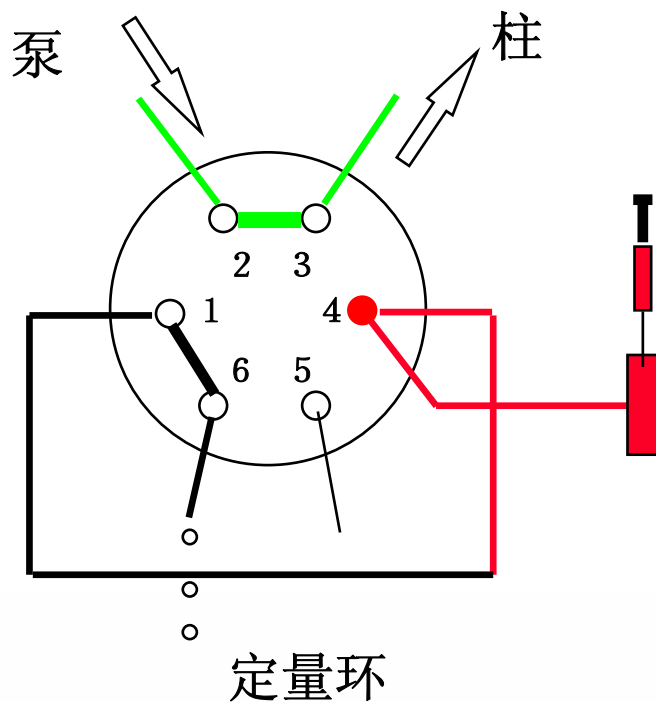
原理：（六通阀）

注入方式：

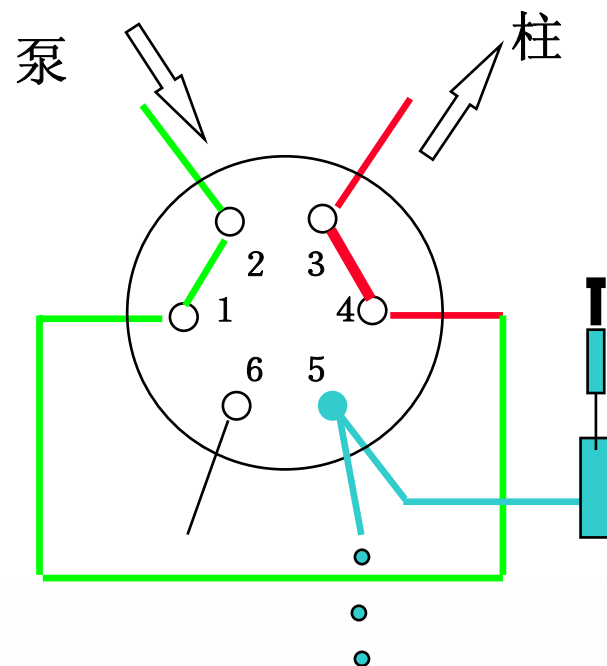
- 1) 全量注入
- 2) 部分注入

手动进样器的原理图

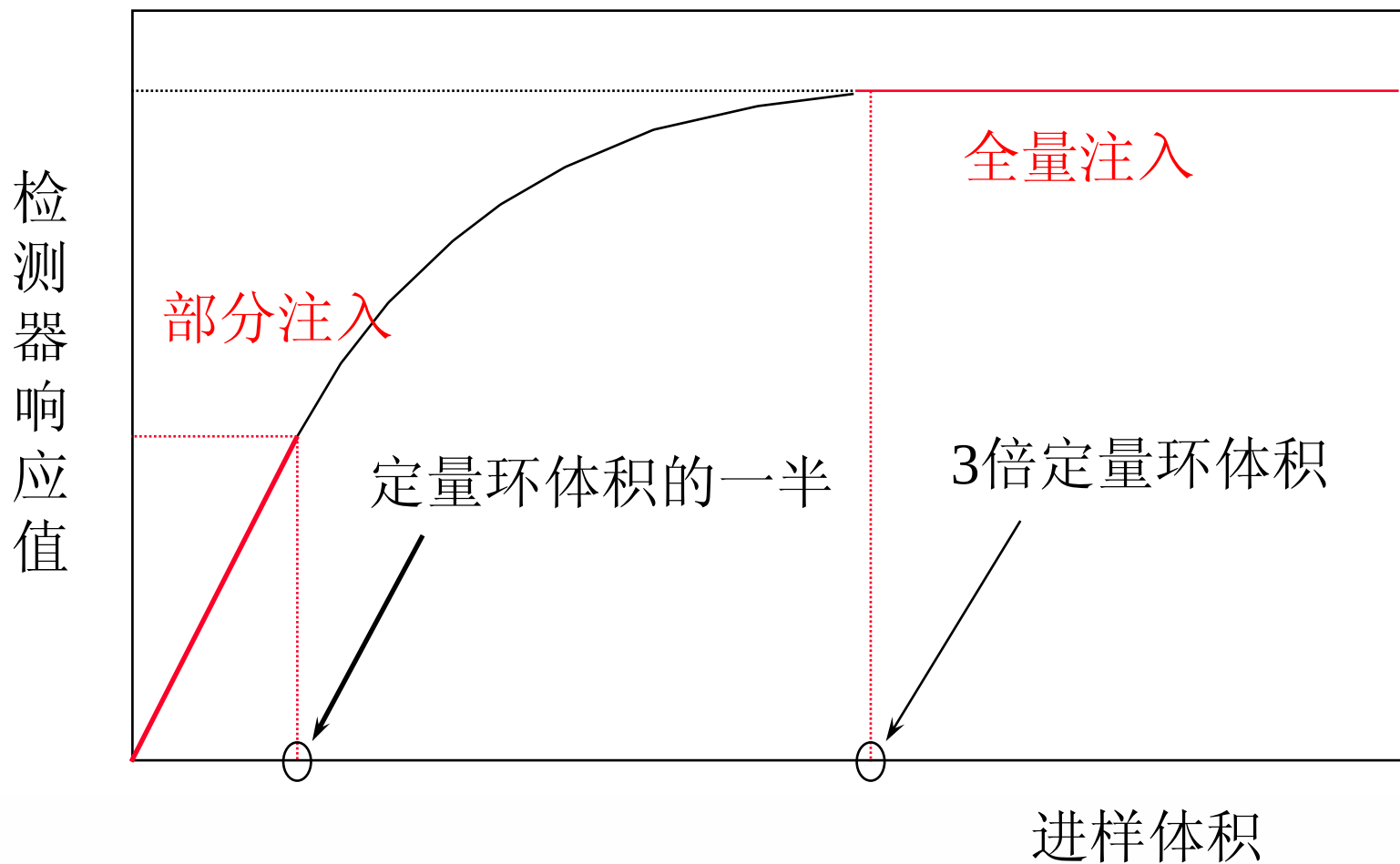
load 位置



inject 位置



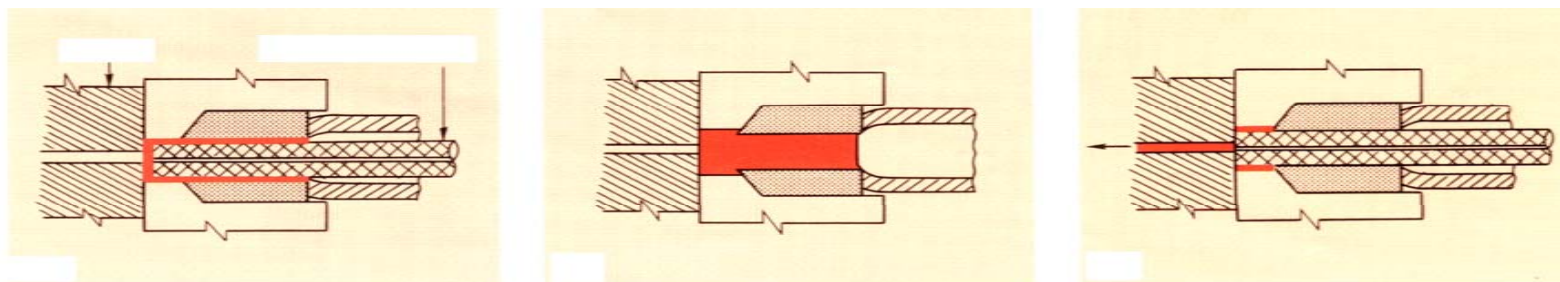
手动进样器的进样体积



部分注入和全量注入

- **部分注入：**一般要求进样量最多为定量环体积的一半，如20 μ l的定量环最多进样10 μ l的样品，并且要求每次进样体积准确、相同
- **全量注入：**进样量最少为定量环体积的3至5倍，即20 μ l的定量环最少进样60至100 μ l的样品，这样才能完全置换样品定量环内残留的溶液，达到所要求的精密度及重现性。

交叉污染的原因



红色表示残留样品

手动进样方法

- 一般的方法
 - 1.在进样状态下清洗针口
 - 2.在装填状态下插入微量注射器
 - 3.注入样品
 - 4.切到进样状态

手动进样方法

- 便捷的方法（不需清洗）
 - 1.进样状态下插入微量注射器
 - 2.切换到装填状态
 - 3.注入样品
 - 4.切换回进样状态

柱温箱

- 分析结果重现性好
- 提高柱效
- 降低柱压
- 保证检测稳定性

ODS柱的使用注意点

- ❖ 柱压低于20MPa
- ❖ 柱温在40℃左右，最高使用温度为50℃
- ❖ 缓冲液pH使用范围为2~7.5
- ❖ 流动相有机溶剂比例过低, 柱效下降快

硅胶在pH为3~4时稳定性最好

碱浓度越低，流动相含水量越低，硅胶越稳定。

色谱柱的类型及适用范围

	硅胶基底	聚合物基底
pH 范围	2 - 7.5	宽范围
有机溶剂	所有	有限制
压力	< 20MPa	低压
温度	<50 °C	宽范围

分析柱的维护

1. 在使用新柱之前，最好用强溶剂在低流量下 (0.2-0.3 ml/min) 冲洗 30 min，长时间未用的分析柱也要同样处理
2. 定期使用强溶剂冲洗柱子
3. 使用缓冲盐时，要先用含5%甲醇的水溶液冲洗，再用有机溶剂冲洗
4. 净化样品
5. 分离条件
6. 不使用时，要盖上盖子，避免固定相干涸

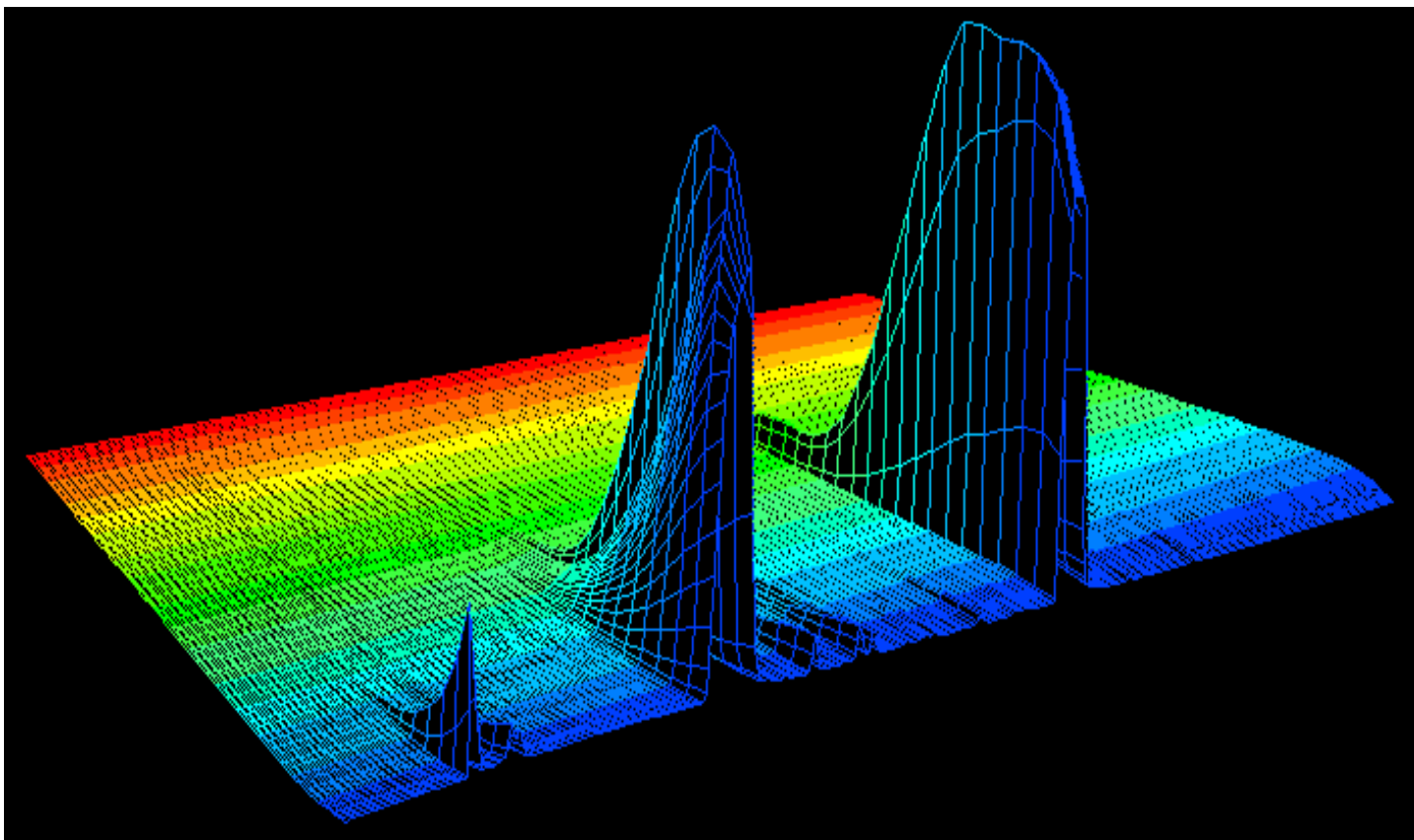
常用检测器

- ❖ 紫外检测器（包括二极管阵列检测器）
- ❖ 荧光检测器
- ❖ 示差折光检测器
- ❖ 电导检测器
- ❖ 蒸发光散射检测器
- ❖ 质谱检测器

紫外检测器

- ❖ 原理：基于被分析组分对特定波长紫外光的选择性吸收
- ❖ 定量基础：朗伯-比耳定律， $A=kCL$
- ❖ 优点：
 - 1) 灵敏度高
 - 2) 对温度和流速不敏感
 - 3) 可用于梯度洗脱
- ❖ 缺点：仅适用于测定有紫外吸收的物质

二极管阵列检测器



二极管阵列检测器

二极管阵列检测器（SPD-M20A）

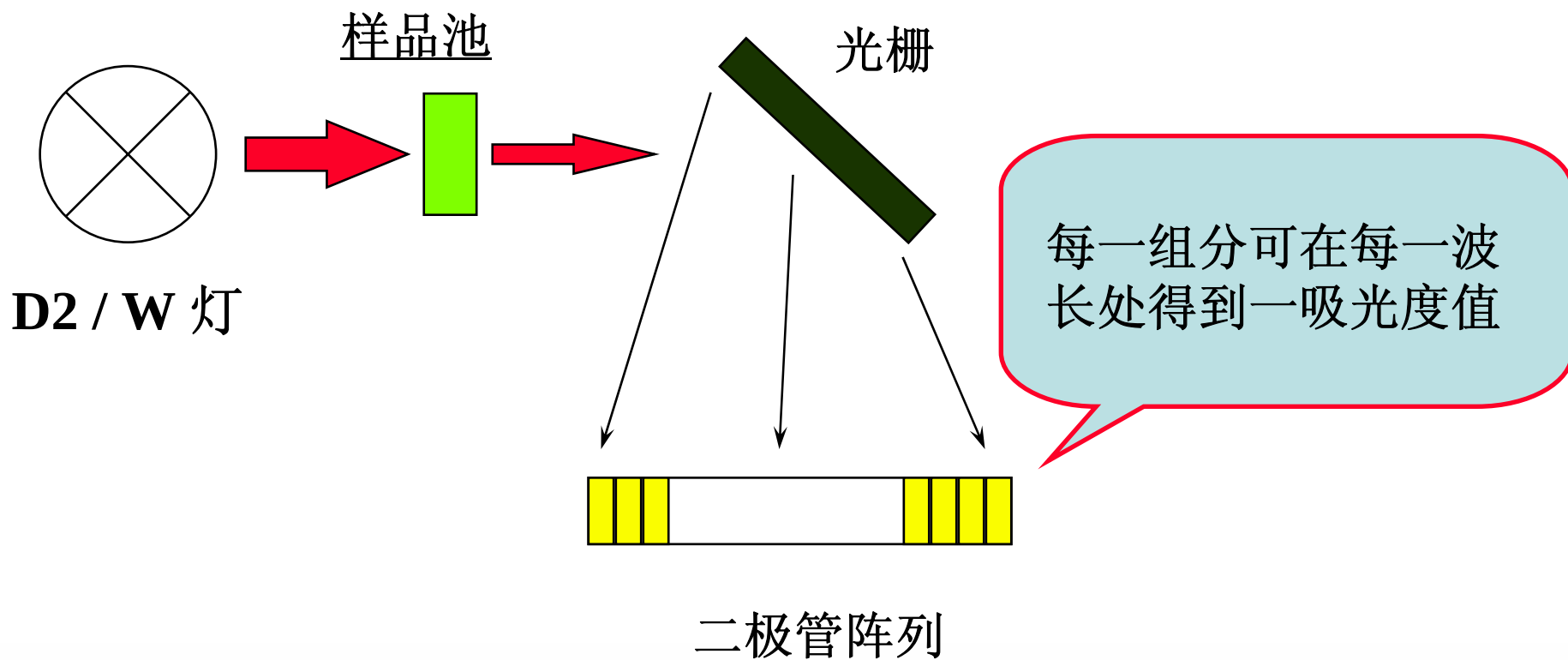
-二十一世纪标准紫外检测器

色谱定性依据：

保留时间 ←—— 常规紫外检测器

峰纯度 ←—— 二极管阵列检测器

二极管阵列检测器



二极管阵列检测器的优点

- 1) 采集三维谱图
- 2) 峰纯度检验
- 3) 光谱库检索
- 4) 可以发现单波长检测时未检测到的峰

荧光检测器

原理：基于被分析组分发射的荧光强度进行检测

- ❖ 优点：
 - 1) 灵敏度高，是最灵敏的检测器之一
 - 2) 选择性好
 - 3) 对温度和流速不敏感，可用于梯度洗脱
- ❖ 缺点：仅适用于测定可产生荧光的物质
- ❖ 可检测物质：多环芳烃、霉菌毒素、酪氨酸、色氨酸、卟啉、儿茶酚氨等（具有对称共轭体系）

示差折光检测器

- ❖ 原理：连续测定流通池中溶液折射率来测定试样中各组分浓度。
- ❖ 优点：通用型检测器，
- ❖ 缺点：
 - 1) 对温度变化敏感
 - 2) 对溶剂组成变化敏感，不能用于梯度检测
 - 3) 属于中等灵敏度的检测器

电导检测器

原理：根据物质在某些介质中电离后所产生的电导率的变化来测定电离物质含量，广泛应用于离子色谱法。

- ❖ 优点：对流动相流速和压力的改变不敏感，可用于梯度洗脱
- ❖ 缺点：对温度变化敏感（温度每升高1度，电导率增加2%-2.5%）
- ❖ 用途：主要用于离子色谱，检测无机和有机离子

蒸发光散射检测器

原理： 流出物在检测器中被高速氮气喷成雾状液滴，溶剂挥发后，溶质形成微小颗粒，被载气带到检测系统，进入散射室中，检验散射光的强度。

优点： 消除了溶剂干扰以及温度变化带来的基线漂移，可梯度洗脱，灵敏度高，是HPLC的通用型检测器

缺点： 不能使用不挥发性盐作流动相，如磷酸盐

质谱检测器

- 强大的定性和选择性能力
 - 多组份样品的准确定性；
 - 未充分分离组份峰的鉴别；
 - 消除杂质干扰；
- 可作为便捷的定性分析
 - 用于合成和衍生反应的研究；
 - 作NMR预分析的质谱鉴定；