

岛津液相色谱操作培训

岛津国际贸易（上海）有限公司
分析仪器事业部 分析中心

有任何问题请联系我们

免费咨询电话

800-810-0439

400-650-0439



分析中心电话

北京： 010-85252352

上海： 021-22013645

广州： 020-87108603

沈阳： 024-23255577



岛津网站地址

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

耗材购买电话

800-820-7730

【岛津技迹（上海）商贸有限公司】

岛津HPLC的历史

Started in 1969

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 >
2010	LC-15C销售	<为了让LC分析更为便捷>
2010	LC-30A Nexera销售	<130MPa耐压系统，低系统容量，高温分析和样品自动前处理>

在售产品

岛津HPLC的历史



LC-20A Prominence



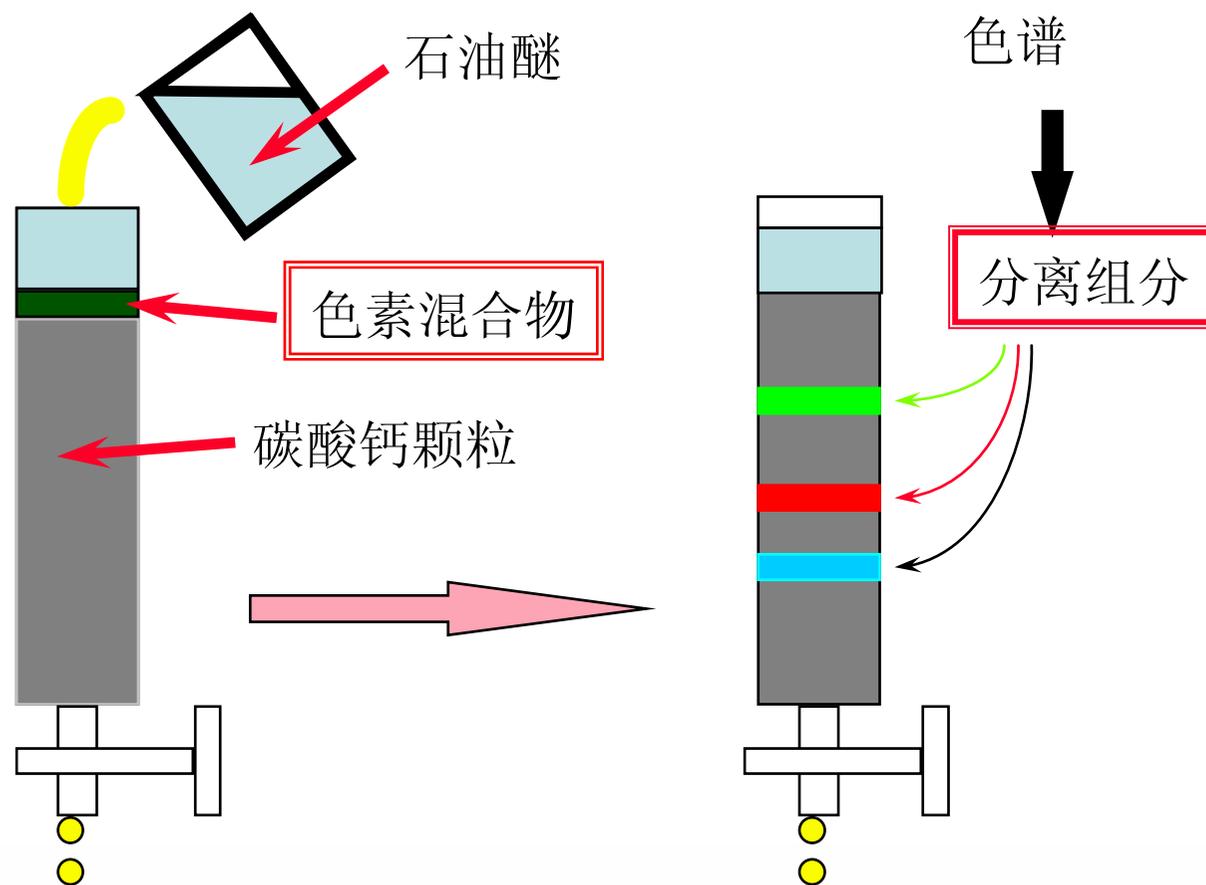
基础知识讲解内容

- 1、色谱基础知识
- 2、硬件基础知识
- 3、定量基础知识
- 4、维护基础知识

第一部分

色谱基础知识

色谱起源



色谱发展史

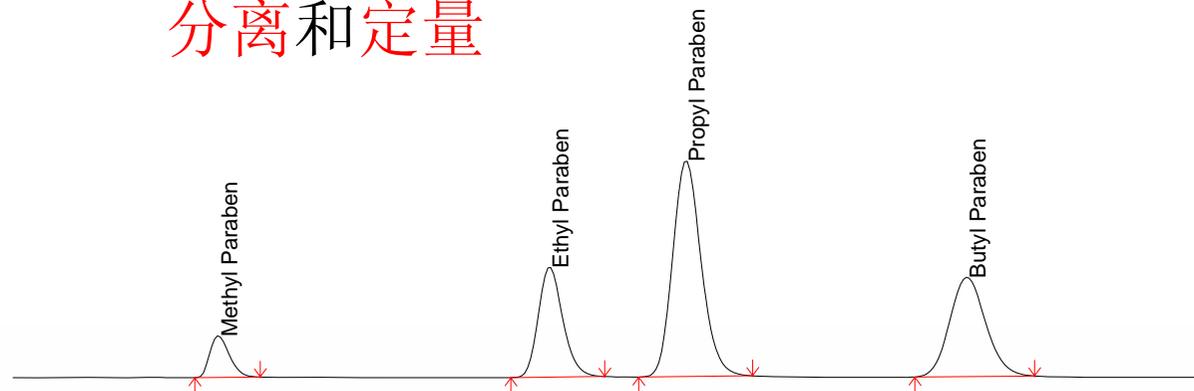
- ❖ 20世纪初，俄国植物学家M.S. Tswett提出经典液相色谱法；
- ❖ 20-30年代，柱分配色谱和纸色谱；
- ❖ 50年代，气相色谱，薄层色谱；
- ❖ 60年代，凝胶渗透色谱及高效液相色谱；
- ❖ 70年代，高效毛细管气相色谱法；
- ❖ 80年代，电色谱；
- ❖ 90年代，光色谱。

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

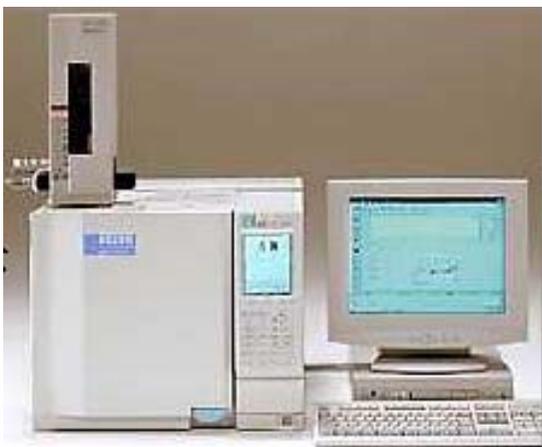
Thin-Layer Chromatography (TLC)

❖ 毛细管电泳

Capillary Electrophoresis (CE)

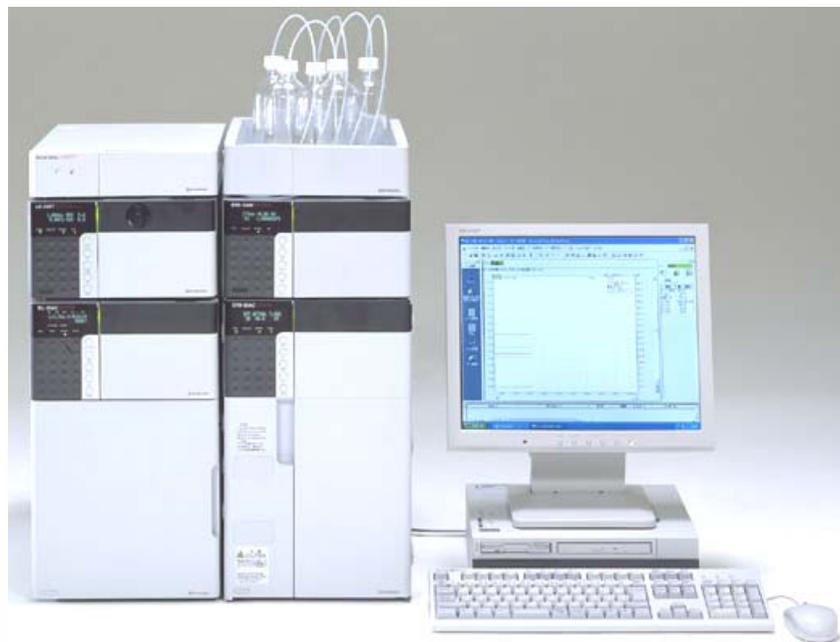
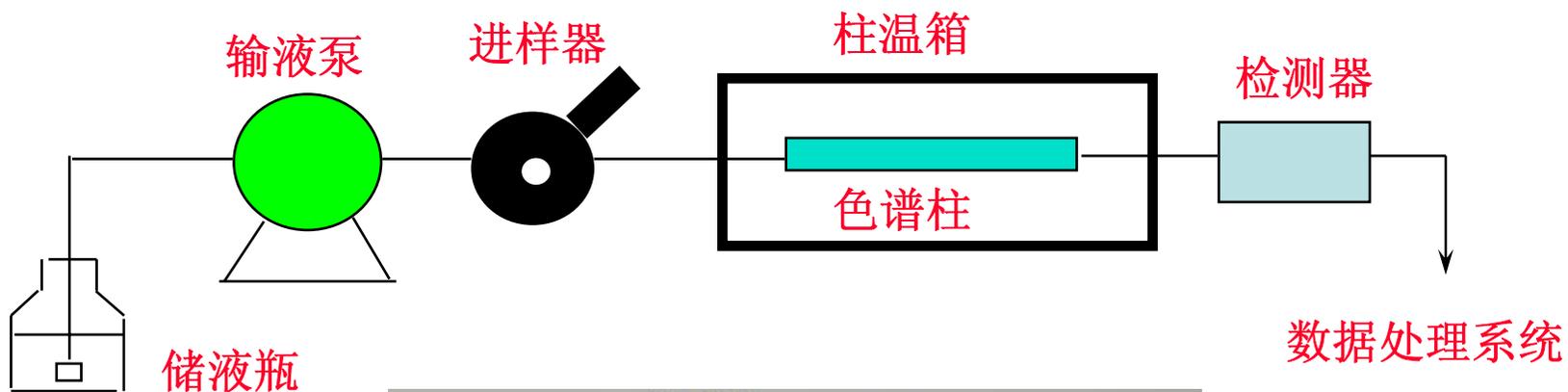
HPLC vs GC

- ❖ 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简易流程图



HPLC特点

- ❖ 分离性能好
- ❖ 灵敏度高 ($10^{-9} \sim 10^{-12}$ g)
- ❖ 选择性高 (同分异构, 旋光异构)
- ❖ 分析速度快
- ❖ 进样量小 (1-100 μ L)

HPLC分类

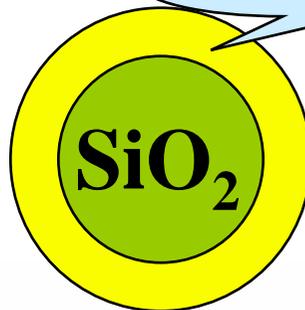
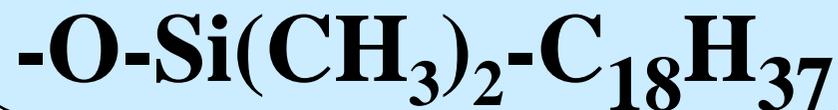
- ❖ 反相色谱 (reversed phase chromatography)
- ❖ 离子对色谱 (ion-pair chromatography)
- ❖ 正相色谱 (normal phase chromatography)
- ❖ 离子交换色谱 (ion exchange chromatography)
- ❖ 尺寸排阻色谱 (GPC / GFC)

反相色谱

——流动相的极性大于固定相的极性

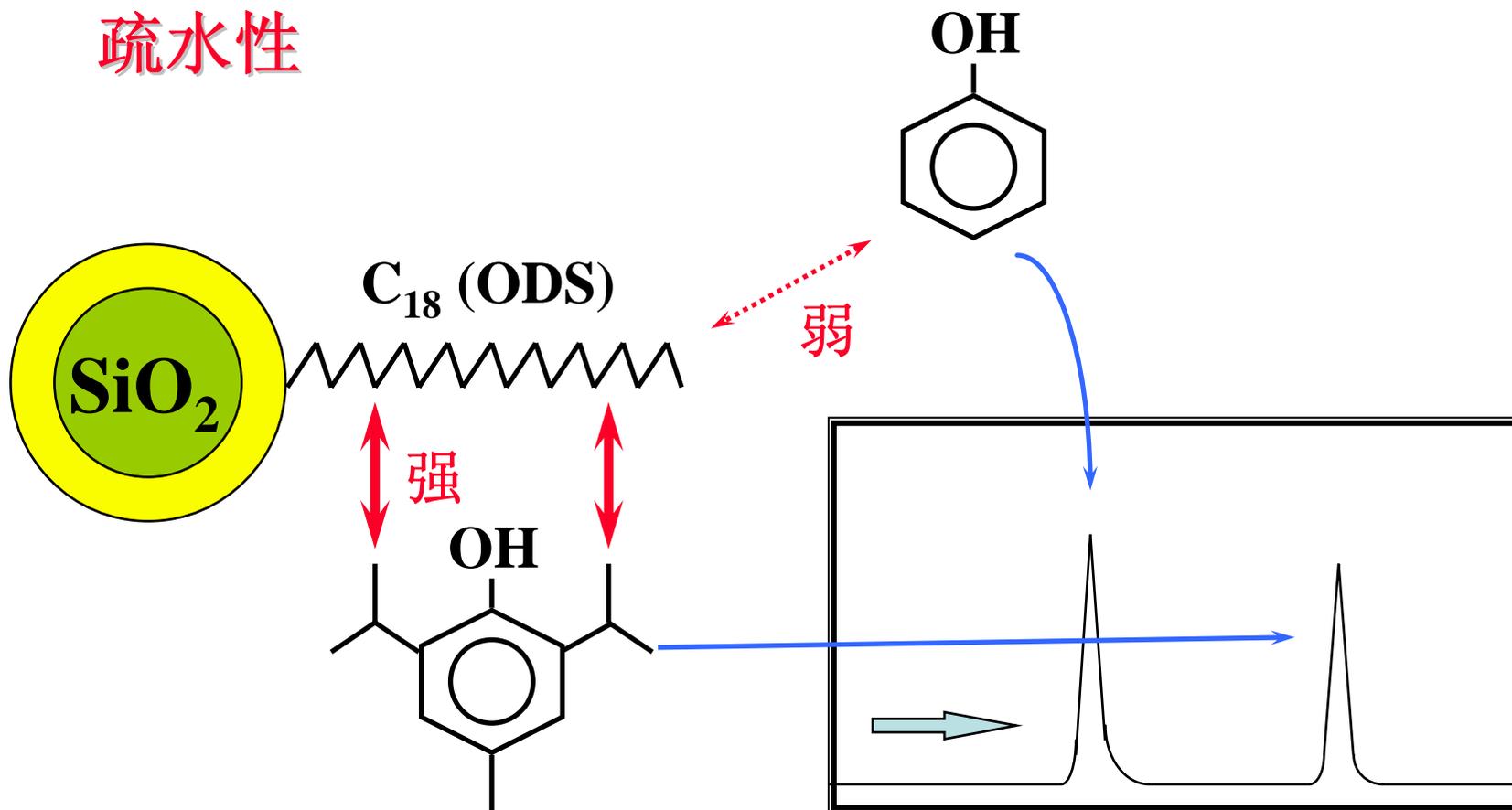
- ❖ C₁₈ (ODS)
- ❖ C₈ (octyl)
- ❖ C₄ (butyl)
- ❖ 苯基
- ❖ TMS
- ❖ 氰基

非极性



相互作用力是什么？

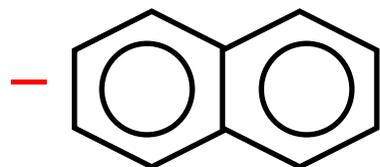
疏水性



疏水性

❖ 如果样品有

— $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{---}$: 碳链



: 芳香基

 作用力强

❖ 如果样品有

— COOH : 羧基

— NH_2 : 氨基

— OH : 羟基

 作用力弱

反相色谱流动相的选择

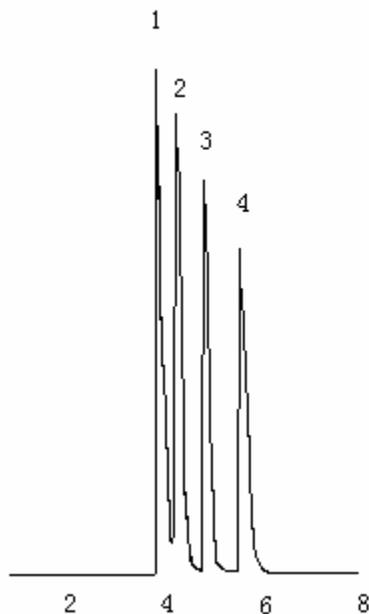
- ❖ 优化水相（缓冲液）和有机相的比例非常重要

甲醇，乙腈和 THF 是常用的有机溶剂。

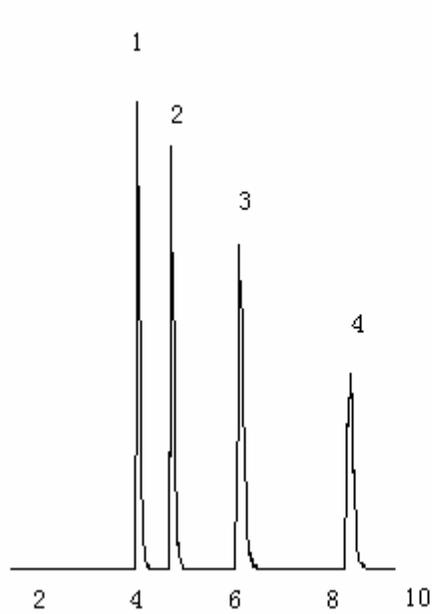
- ❖ 在有缓冲液的情况下，缓冲液的浓度和pH值非常重要。

流动相极性变化对分离的影响

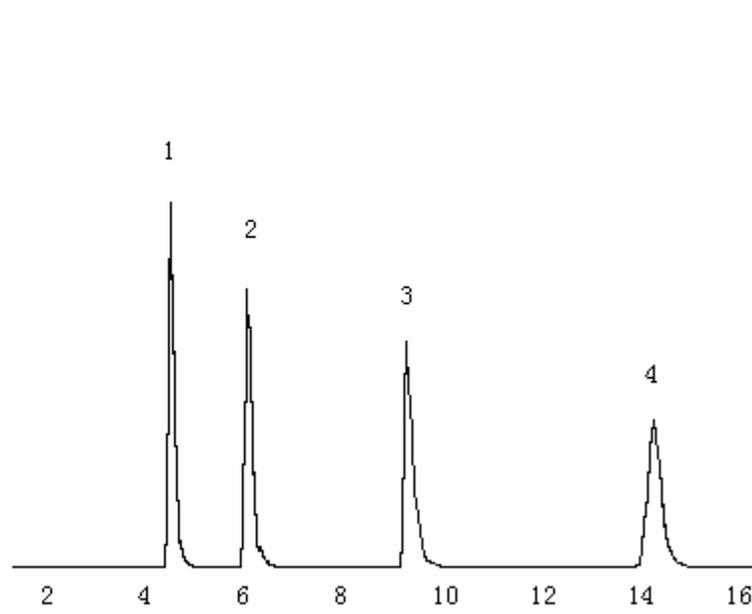
20% 水



30% 水



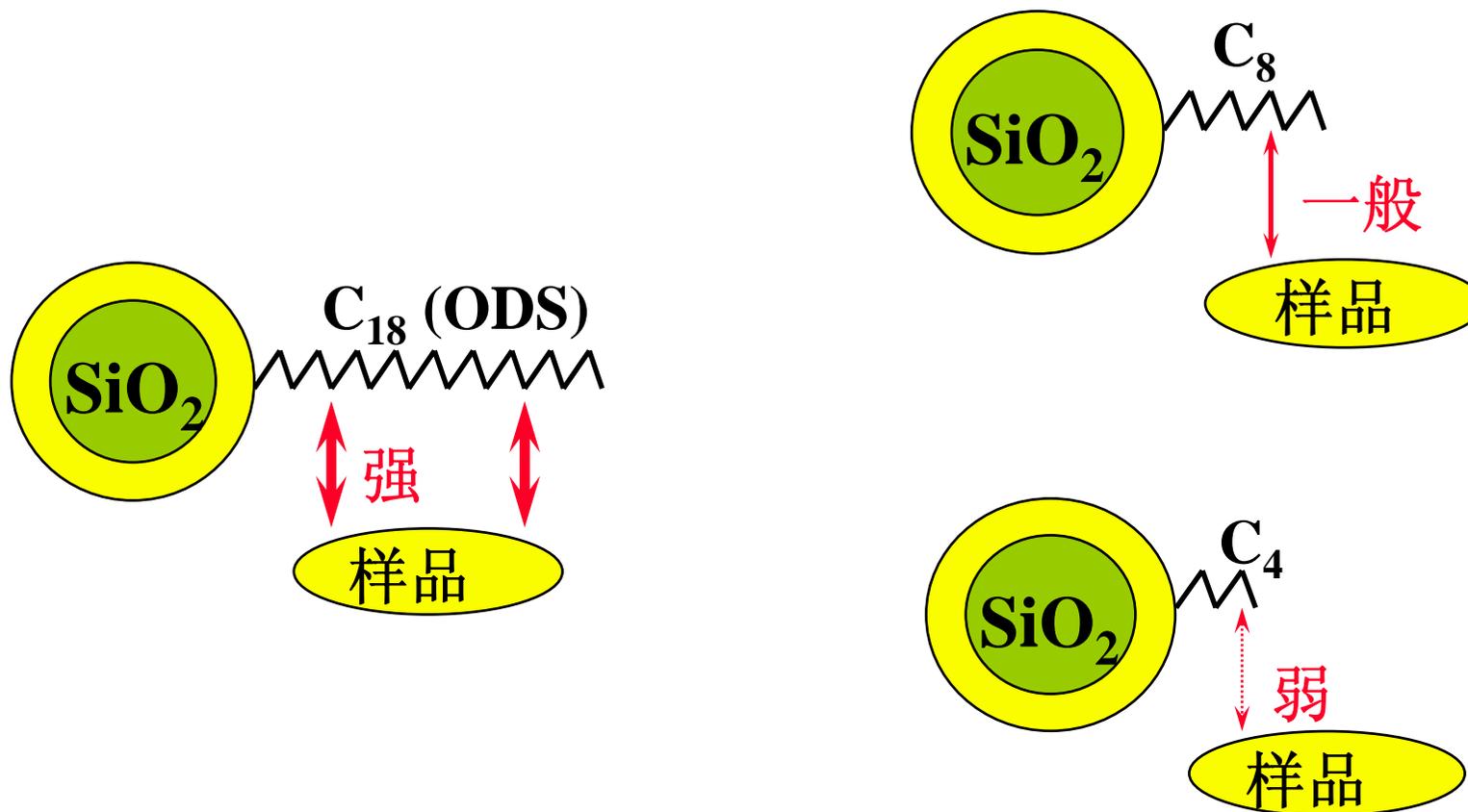
40% 水



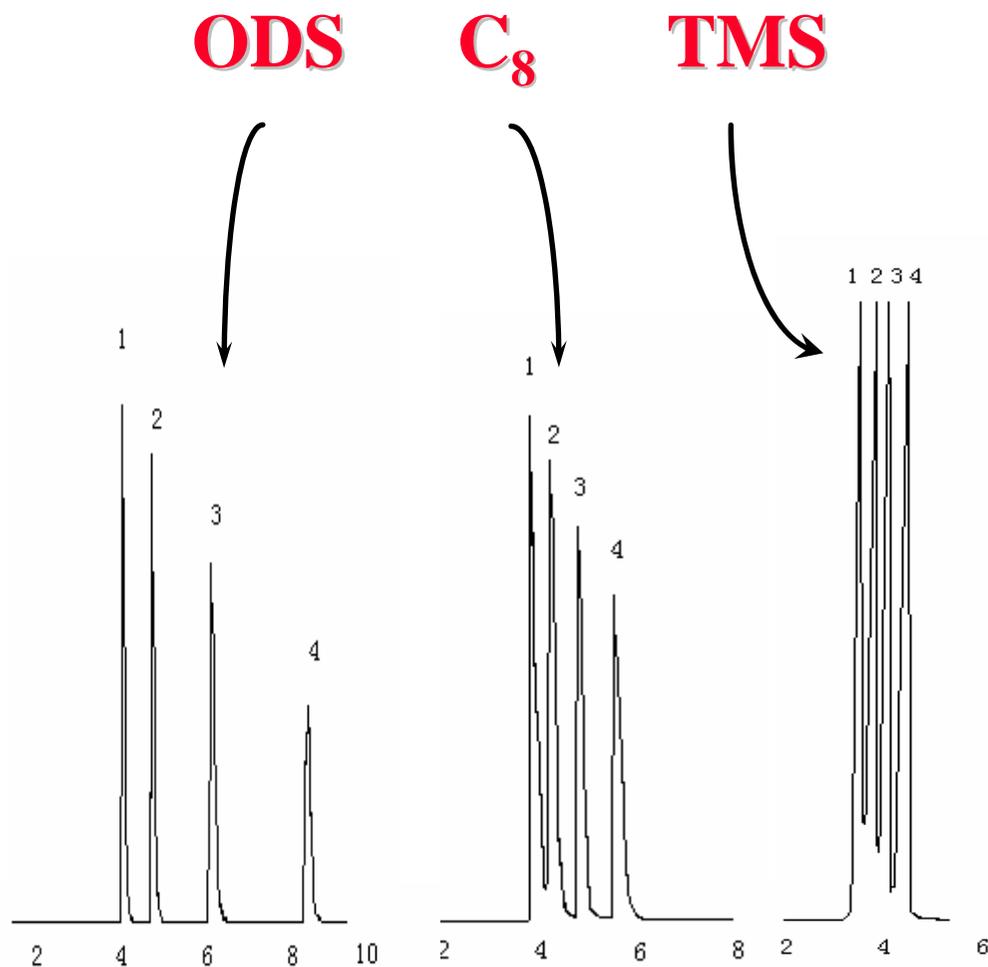
- 1：对羟基苯甲酸甲酯
- 2：对羟基苯甲酸乙酯
- 3：对羟基苯甲酸丙酯
- 4：对羟基苯甲酸丁酯

有机相： 甲醇

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



❖ 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 μL
- ❖ 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

反相离子对色谱

- ❖ 原理：样品离子与流动相中离子对试剂的反离子生成疏水性离子对，而为反相色谱固定相保留
- ❖ 固定相：疏水性的苯乙烯/二乙烯基苯树脂或键合的硅胶
- ❖ 流动相：水（缓冲液） + 离子对试剂 + 有机溶剂
- ❖ 离子对试剂：所带电荷与待测离子相反

常用离子对试剂

❖ 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)

反相离子对色谱流动相的选择

- ❖ 离子对试剂的类型
所带电荷与待测物质相反
- ❖ 离子对试剂的浓度
 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ mol/L
在一定范围内，浓度越大，被分离物的保留值越大
- ❖ 流动相的 pH

反相离子对色谱应用

❖ 有机酸、碱、盐的分离

包括：

- 阴阳离子表面活性剂
- 大分子脂肪酸
- 烷基磺酸盐和芳香硫酸盐
- 含氮化合物
- 生物碱
- 水溶性维生素
- 酚类

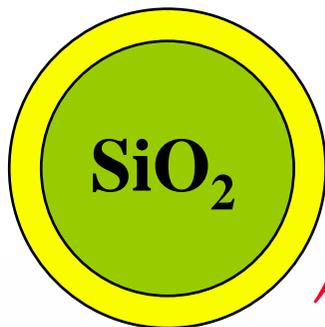
正相色谱

——流动相的极性小于固定相的极性

- ❖ 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



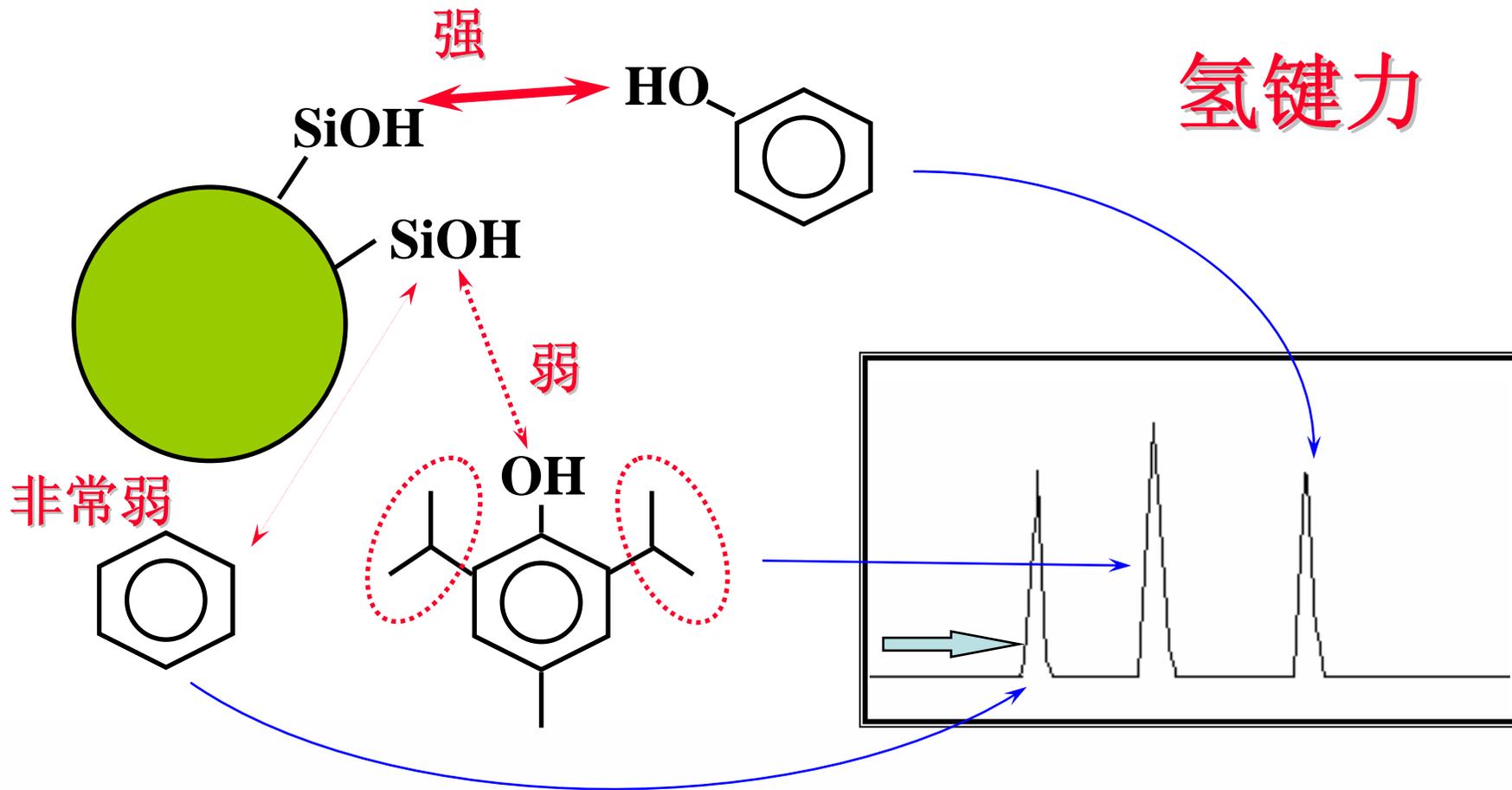
硅胶



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, 如碳水化合物
- ❖ 如果样品有大的基团, 由于空间位阻

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

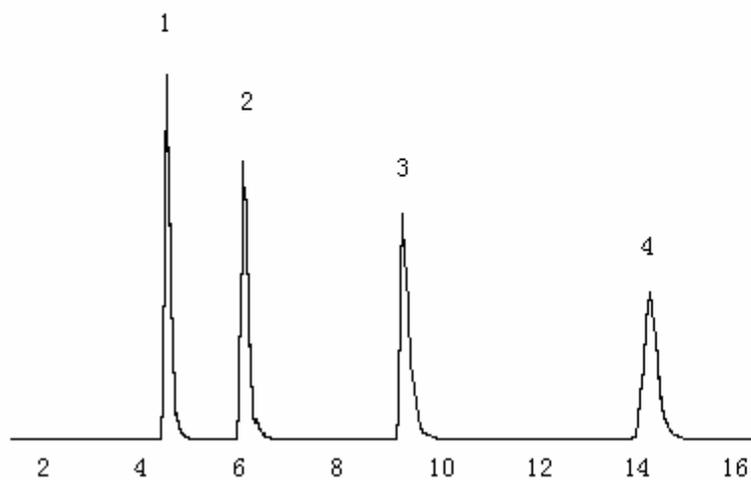
❖ 辅助试剂

- ❖ 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

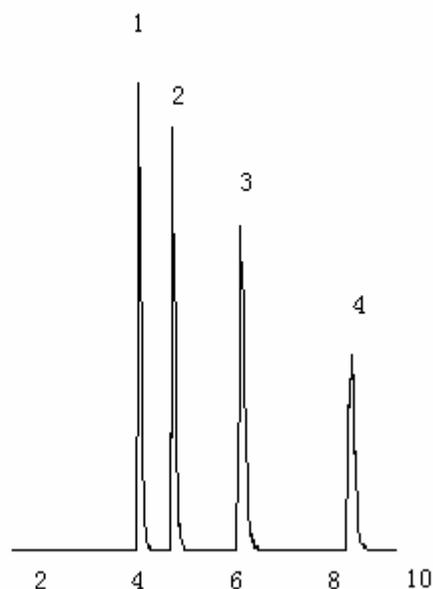
为了调整保留时间，可以选择主要试剂然后再加入辅助试剂。

流动相极性变化对分离的影响

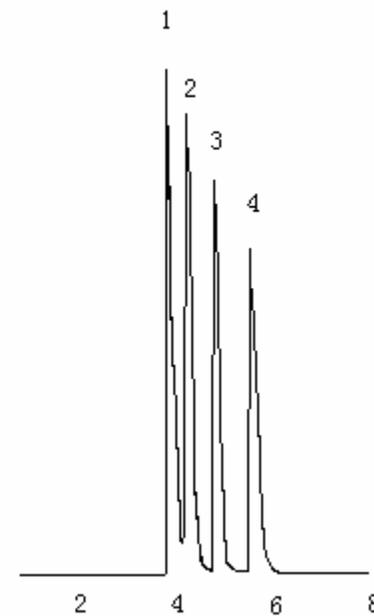
0% 甲醇



2% 甲醇



5% 甲醇



- 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

❖ 反相色谱

流动相极性大于固定相极性

适用于能溶于水/有机混合物的中性或非离子化合物分离

❖ 正相色谱

流动相极性小于固定相极性

适用于不溶于水/有机混合液的亲脂样品、异构体混合物的分离和制备HPLC

反相色谱与正相色谱的对比

❖ 反相

- 保留时间重现性好
- 固定相耐用

❖ 正相

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

离子交换色谱

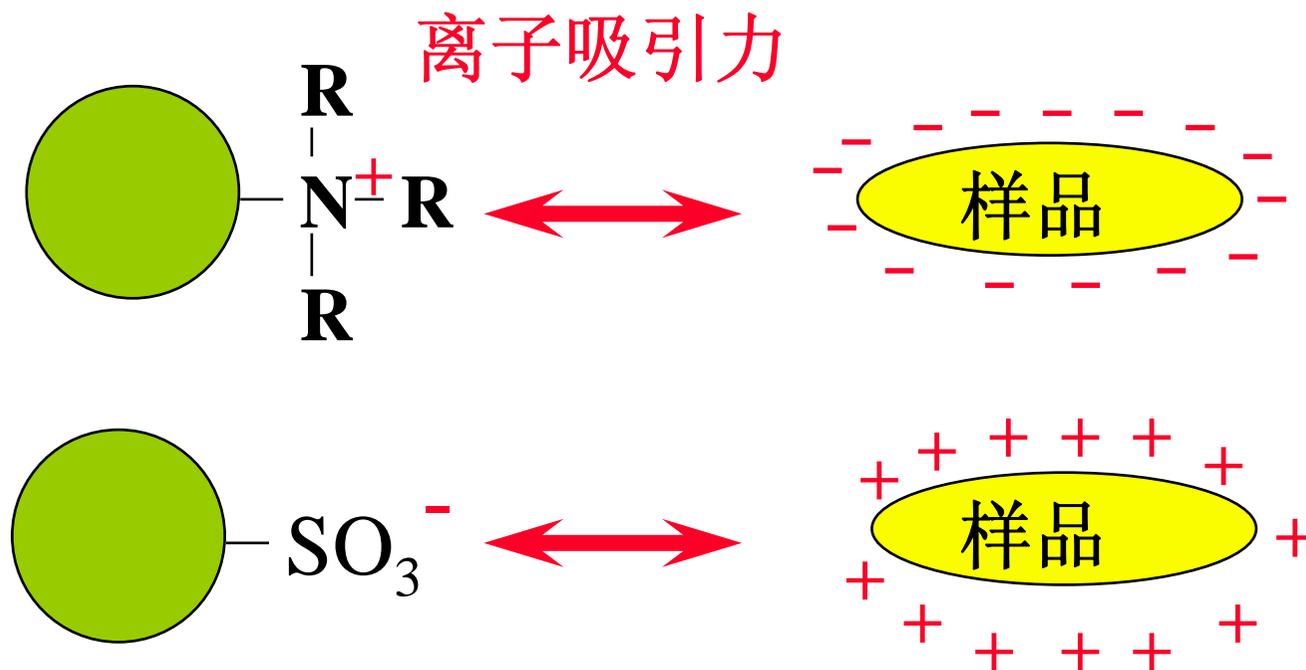
- ❖ 原理：利用被分离组分与固定相之间发生离子交换的能力差异来实现分离
- ❖ 固定相：离子交换树脂
- ❖ 流动相：水缓冲溶液（常用）或有机溶剂与水缓冲溶液的混合液

离子交换色谱所用的缓冲液：

阴离子分离：氢氧化物、硼酸盐、碳酸盐、酚盐和两性离子等

阳离子分离：矿物酸，如硝酸、盐酸、硫酸和甲基磺酸等

离子交换色谱作用力



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）

- ❖ **原理：** 利用多孔凝胶固定相的独特特性，而产生的一种主要依据分子尺寸大小的差异来分离的液相色谱方法
- ❖ **固定相：** 一种表面惰性、具有一定孔径的多孔凝胶
- ❖ **应用：** 聚合物及生命科学领域

SEC分类

❖ 凝胶渗透色谱（GPC）

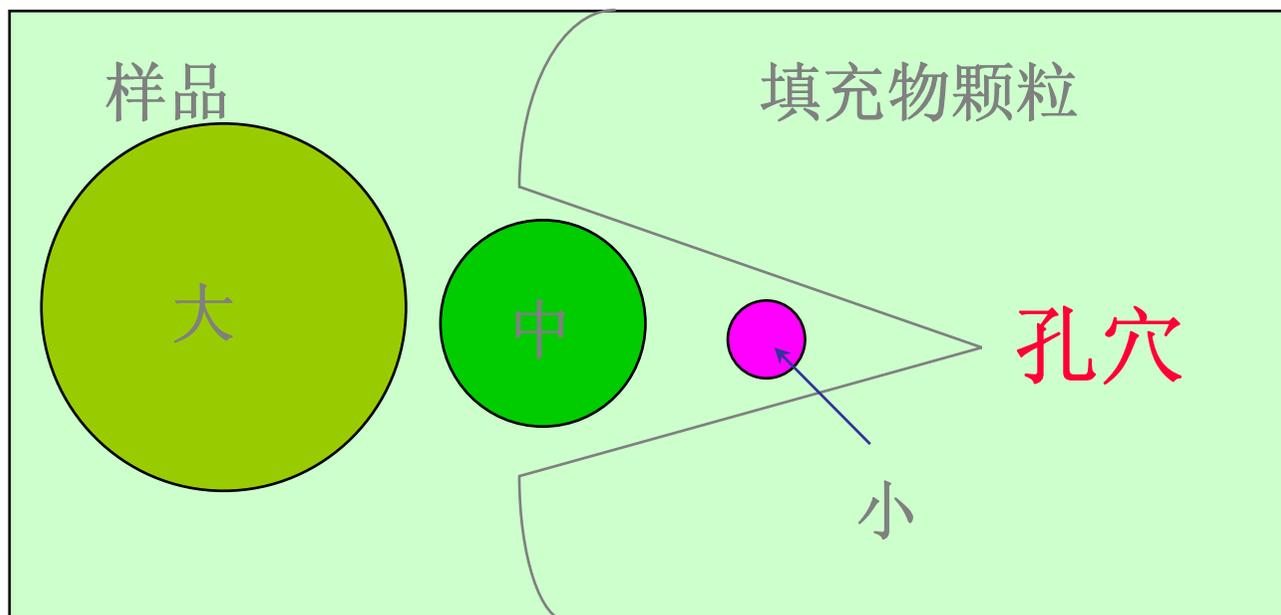
- ❖ 主要用于聚合物领域
- ❖ 以有机溶剂为流动相（氯仿，THF，DMF）
- ❖ 常用固定相填料：苯乙烯-二乙烯基苯共聚物

❖ 凝胶过滤色谱（GFC）

- ❖ 主要用于生命科学领域
- ❖ 以水溶液为流动相
- ❖ 常用固定相填料：亲水性有机凝胶（葡聚糖，琼脂糖，聚丙烯酰胺等）

GPC分离原理

- ❖ 固定相是**多孔填料**，小分子样品可以进入孔径内部
- ❖ 样品与固定相之间**无作用力**
- ❖ **保留时间**不同



GPC分离原理

