



陕西师范大学  
SHAANXI NORMAL UNIVERSITY

研究生教育教学改革研究项目  
(研究生优质课程项目)

生物实验室安全及大型仪器应用

# 液相色谱

主讲教师 刘清梅

生命科学学院实验教学中心



# China Service Training Center --- Training Guide for Customer

Customer Enrollment Website (客户报名网址):

<http://www.thermo.com.cn/TrainingCenter>

On-line Training Video Entrance (在线视频自学网址):

<http://www.thermo.com.cn/TrainingCenter/VideoCourse-List.aspx>

On-line Training Registration (远程在线培训选课报名):

<http://www.thermo.com.cn/TrainingCenter/AirClassRoom.aspx>

Training Material Search and Download (资料下载专区):

<http://www.thermo.com.cn/TrainingCenter/DocumentSet.aspx>

联系我们: [training.china@thermofisher.com](mailto:training.china@thermofisher.com)/4006505118



	气相色谱	气相质谱	红外光谱	原子吸收	原子发射光谱	等离子体质谱	液相色谱	离子色谱	前处理设备	液相质谱
基础培训	√	√		√			√	√		√
进阶培训	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
高级培训	√	√	√	√	√	√	√	√		
远程在线培训	√	√	√	√	√	√	√	√		√
行业应用培训	√	√		√	√	√	√	√		√
NTC技术培训	√	√		√	√	√	√	√		
大学生培训	√	√		√	√	√	√	√		

- 20世纪初
- 俄国植物学家：M. S. Tswett(茨维特)
- 提出经典液相色谱法
- 正式命名“色谱”的文献

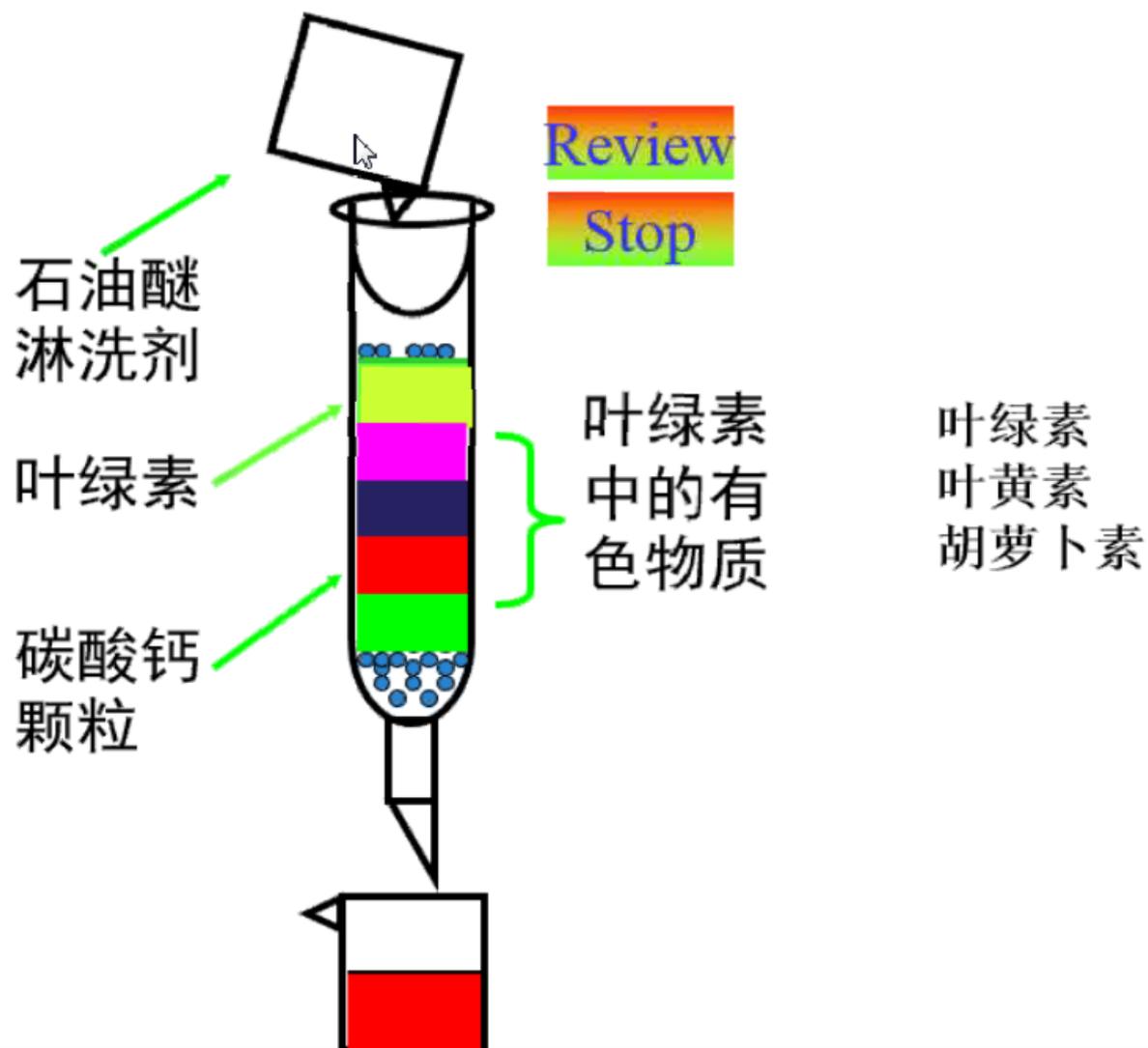
" ... the preparation obtained I name a *chromatogram* and the method proposed *chromatography* ... "

" ... it is obvious that the adsorption phenomena described are characteristic not only of chlorophyll pigments; it is evident that different coloured and colourless compounds follow the same regularities."

M. S. Tswett (1906)

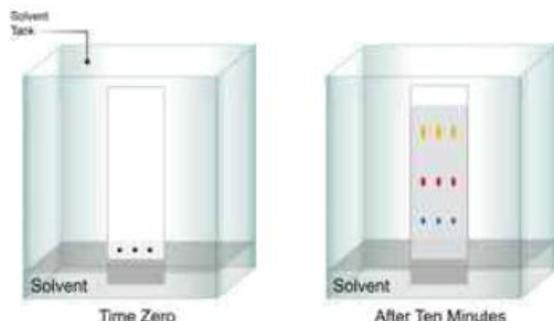
M.S. Tswett: Adsorption Analyse und Chromatographische Methode. Anwendung an die Chemie des Chlorophylls (1906)





# 液相色谱法的定义与原理

- **定义：**一种以液体为流动相，将待分离组分在固定相和流动相两相间进行分配的物理分离方法。
- **原理：**待测组分（混合物）在外力作用下经过固定相，由于混合物中各组分在性质和结构上有差异，导致其与固定相的相互作用力（分配系数/吸附能力/亲和能力等）存在微小差异，各组分在两个非互溶相间经过连续多次平衡分配，原来极小的分配差异被逐步放大，从而使不同组分获得分离。



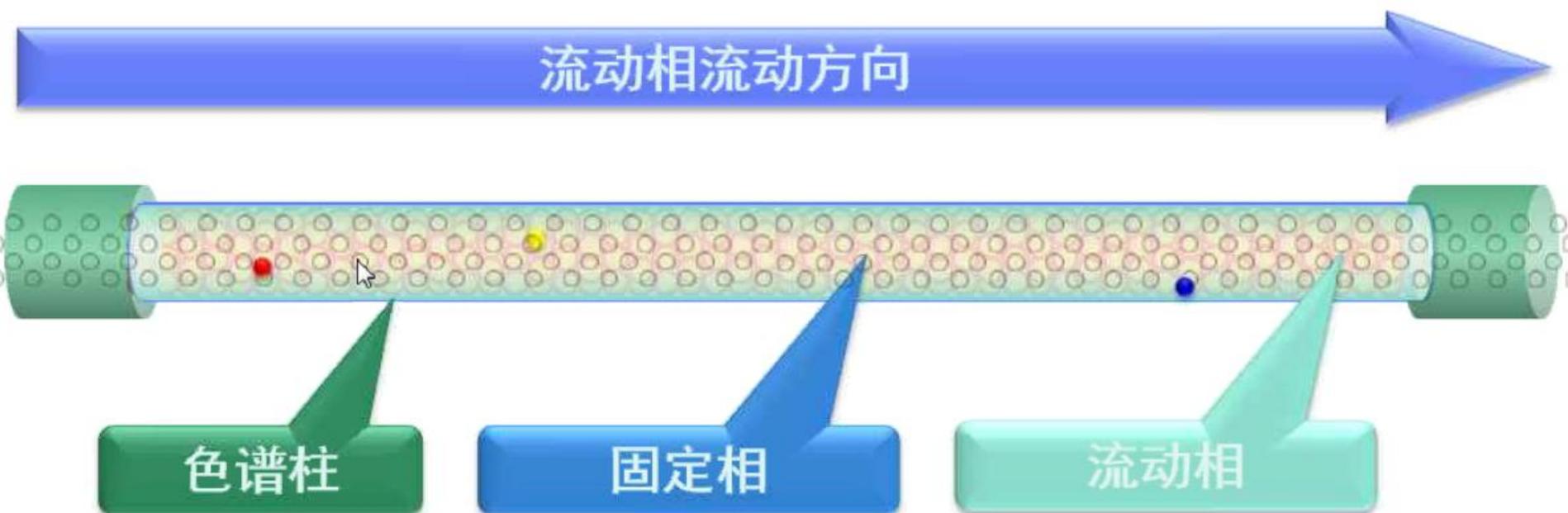
薄层色谱法 (TLC)



柱色谱法



高效液相色谱法 (HPLC)



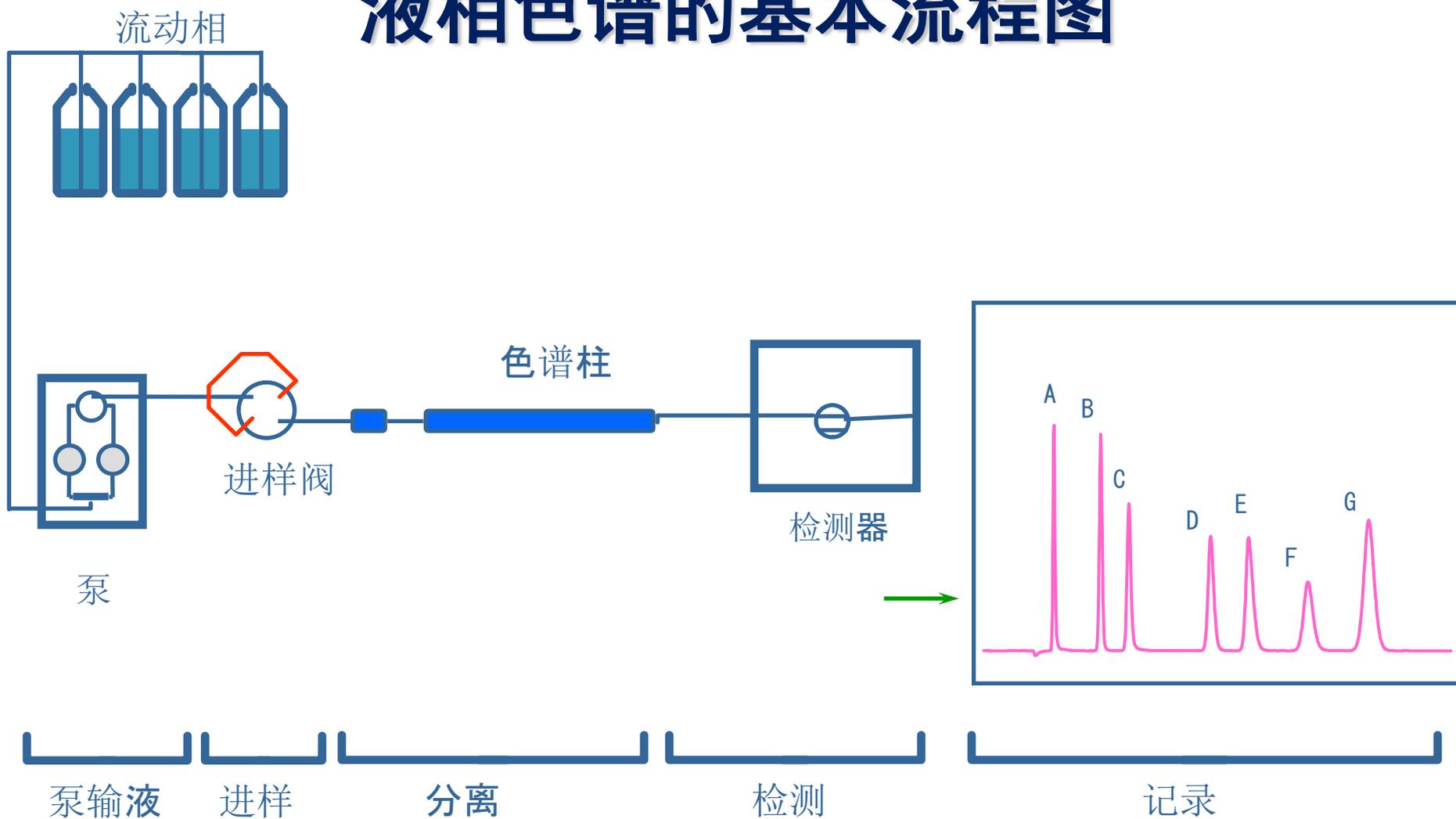
- 固定相根据不同的相互作用原理和强度保留分析物
- 由于不同化合物与固定相和流动相之间的相互作用强度和机理不同，所以当化物流经色谱柱时就会被分开。

- **主要优势:**

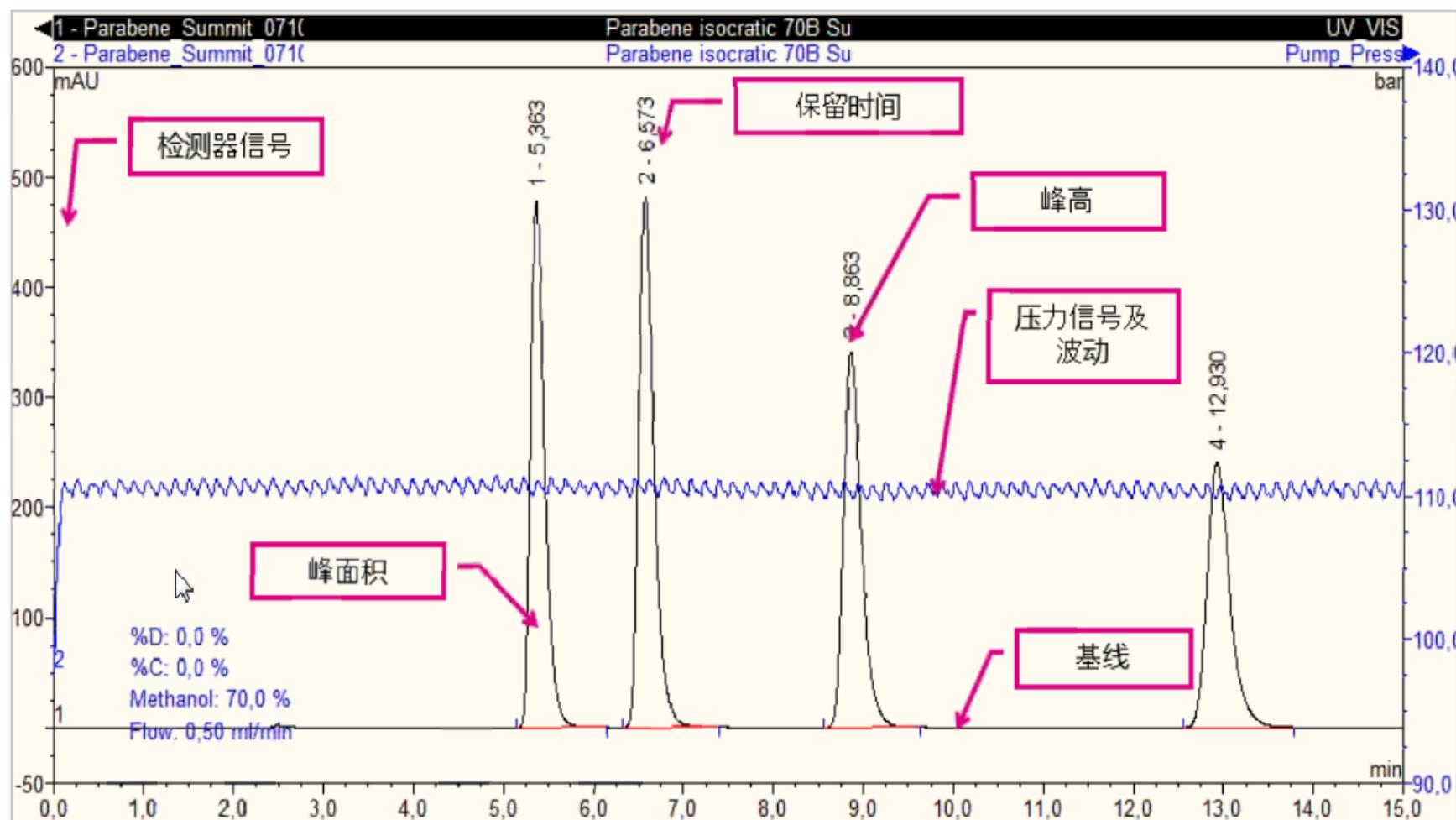
- (1) **分离效率高:**成为复杂样品组分分离分析的不可或缺的有力工具;
- (2) **选择性高:**通过改变固定相或流动相种类可提高分离过程的选择性;
- (3) **检测灵敏度高:**仅需少量或微量样品即可进行组分的定性或定量分析;
- (4) **分析速度快:**样品分析时间仅需几分钟至几十分钟;
- (5) **应用范围广:**特别适合分离分析高沸点、强极性和热稳定性差的化合物;



# 液相色谱的基本流程图



# 高效液相色谱基本概念及术语——色谱图



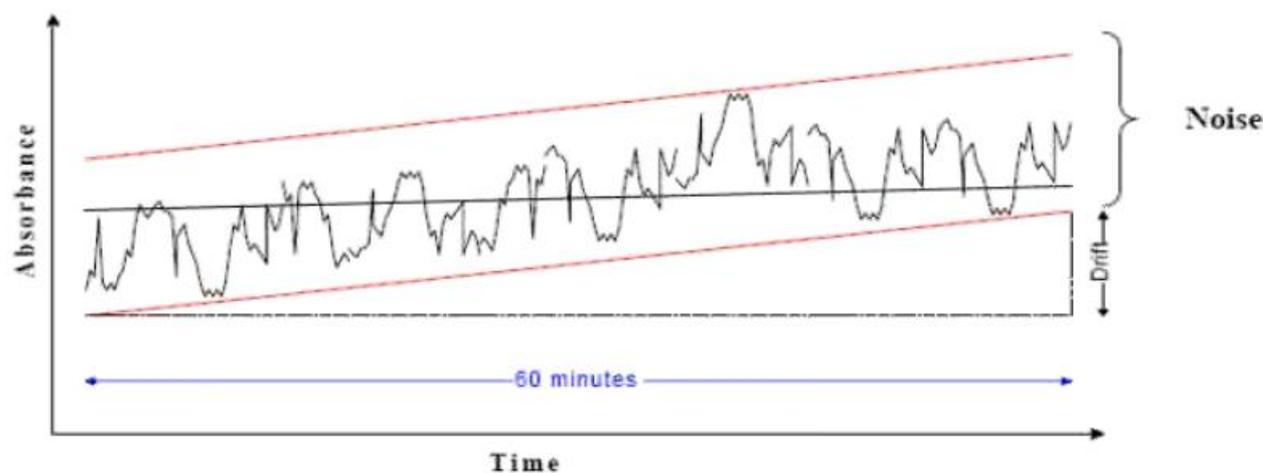
色谱图：即色谱柱流出物通过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图，其纵坐标为信号强度，横坐标为保留时间。

# 高效液相色谱基本概念与术语——基线、噪音、漂移

**基线:** 经流动相冲洗, 柱与流动相达到平衡后, 检测器测出一段时间的流出曲线。

**噪音:** 基线信号的波动。通常因电源接触不良或瞬时过载、检测器不稳定、流动相含有气泡或色谱柱被污染所致。

**漂移:** 基线随时间的缓缓变化。主要由于操作条件如电压、温度、流动相及流量的不稳定所引起, 柱内的污染物或固定相不断被洗脱下来也会产生漂移。



- 色谱峰 — Peak
  - 色谱柱流出组分通过检测器时产生的响应信号的微分曲线
- 峰底 — Peak Base
  - 峰的起点与终点之间连接的直线
- 峰高 — Peak Height
  - 峰最大值到峰底的距离

**Height**  
**mAU**  
49.364
- 峰宽 — Peak Width
  - 在峰两侧拐点处所作切线与峰底相交两点之间的距离

**Peak Width**  
**min**  
0.14
- 半（高）峰宽 — Peak Width at Half Height
  - 通过峰高的中点作平行于峰底的直线，其与峰两侧相交两点之间的距离

**Peak Width (50%)**  
**min**  
0.08

- 峰面积 — Peak Area 

Area
mAU*min

  - 峰与峰底之间的面积,  $\frac{4.257}{}$  又称响应值
- 标准偏差;  $\sigma$  — Standard Error 

Half Width (60.70%)
min
0.033

  - 0.607倍峰高处所对应峰宽的一半
- 拖尾峰 — Tailing Peak
  - 后沿较前沿平缓的不对称峰
- 前伸峰 — Leading Peak
  - 前沿较后沿平缓的不对称峰
- 鬼峰 — Ghost Peak
  - 并非由试样所产生的峰; 亦称假峰

- 死时间,  $t_0$  — Dead time
  - 不被固定相滞留的组分, 从进样到出现峰最大值所需的时间
- 保留时间,  $t_R$  — Retention time
  - 组分从进样到出现峰最大值所需的时间
- 调整保留时间,  $t'_R$  — Adjust retention time
  - 保留时间减去死时间
- 死体积,  $V_0$  — Dead volume
  - 不被固定相滞留的组分, 从进样到出现峰最大值所需的流动相体积
- 保留体积,  $V_R$  — Retention volume
  - 组分从进样到出现峰最大值所需的流动相体积
- 调整保留体积,  $V'_R$  — Adjust retention volume
  - 保留体积减去死体积



# 液相色谱实验所需的基本参数

## ❖ 液相色谱实验所需的基本参数

- 流动相：种类及配比，等度或梯度
- 固定相：色谱柱类型及内径、长短
- 流动相输送系统参数：流速
- 检测器参数：紫外检测波长，灵敏度等
- 温度控制
- 进样量

❖ 以上参数即构成一个具体的**HPLC**方法，亦称色谱条件

---

# 不对称因子计算及示意图

EP/USP标准:

Asym.  
(EP)

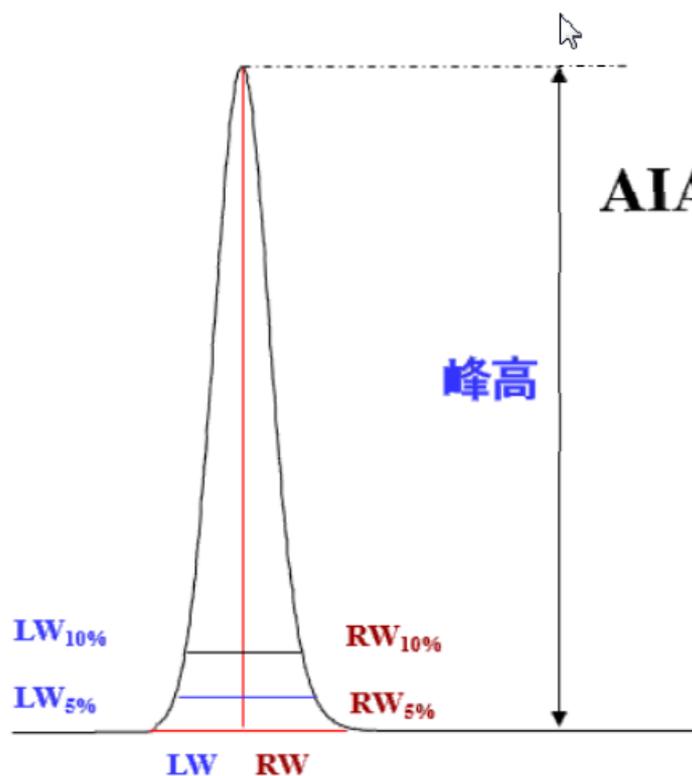
1.27

$$A = \frac{RW_{5\%} + LW_{5\%}}{2 * LW_{5\%}}$$

AIA标准:

$$A = \frac{RW_{10\%}}{LW_{10\%}}$$

峰高



Properties Report Column

Categories:

Sequence  
Sample  
Audit Trail  
Preconditions  
Chromatogram  
Detection Parameters  
Peak Results  
Peak Calibration  
Peak Table  
Peak Purity and Identifi  
Quantification Method  
Information Table

Variables:

Signal Value at Peak End  
Baseline Value at Peak St  
Baseline Value at Peak Re  
Baseline Value at Peak En  
Detection Code at Peak St  
Detection Code at Peak En  
Type  
Modified  
Manually Assigned  
Resolution  
Asymmetry  
Theoretical Plates

OK

Cancel

Customize...

plain Variable...

Parameter...

Formula... peak asymmetry("ep")

Header... "Asym. "

Dimension... "(EP)"

Format... 0.00

Channel

Selected Channel

Fixed Channel (|IV\_VIS\_1

Parameter Input for 'Peak Asymmetry'

Compute 'Peak Asymmetry' according to the

EP-Formula (default): same as USP

AIA-Formula

Formula using Statistical Moments

OK

Cancel

A = 0.95~1.05: 正常峰

A < 0.95: 前延峰

A > 1.05: 拖尾峰

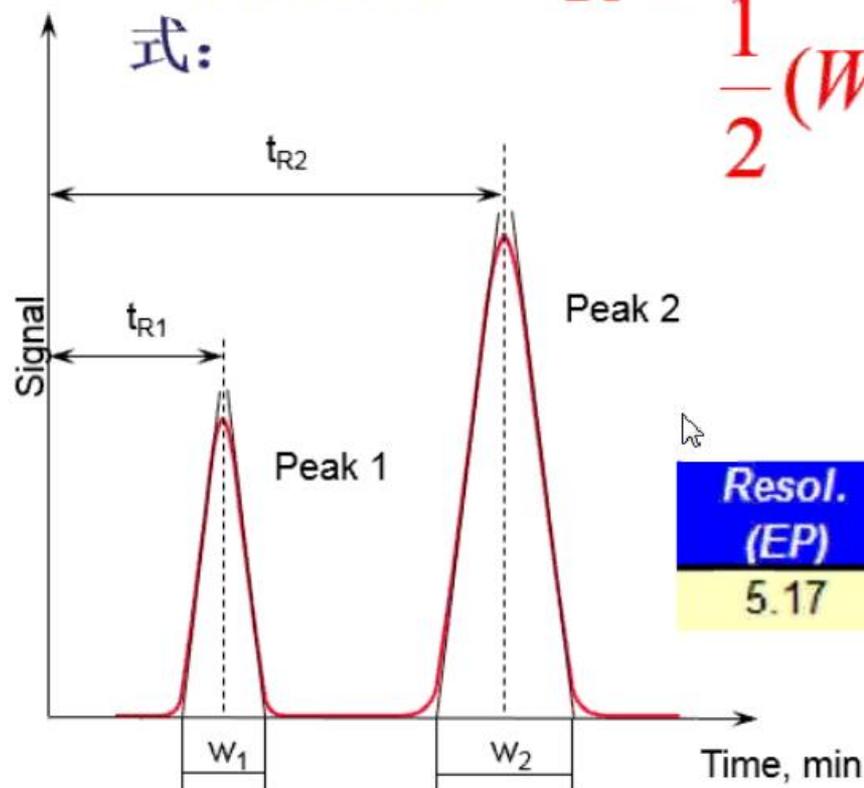
# 色谱的分离度

分离度的公式:

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_2 + W_1)}$$

R < 1.5: 未达到基线分离

R ≥ 1.5: 基线分离



色谱峰的完全分离是每一个色谱方法的目标。

Properties Report Column

Categories:

Sequence  
Sample  
Audit Trail  
Preconditions  
Chromatogram  
Detection Parameters  
Peak Results  
Peak Calibration  
Peak Table  
Peak Purity and Identifi  
Quantification Method  
Information Table

Variables:

Signal Value at Peak Rete  
Signal Value at Peak End  
Baseline Value at Peak St  
Baseline Value at Peak Re  
Baseline Value at Peak En  
Detection Code at Peak St  
Detection Code at Peak En  
Type  
Modified  
Manually Assigned  
Resolution  
Approximate

OK

Cancel

Customize...

Plain Variable

Formula... peak resolution ("ep")

Header... "Resol."

Dimension... "(EP)"

Format... 0.00

Channel

Selected Channel

Fixed Channel (UV\_VIS\_1)

Parameter Input for 'Peak Resolution'

Compute 'Peak Resolution' using

EP-Formula (default)

USP-Formula

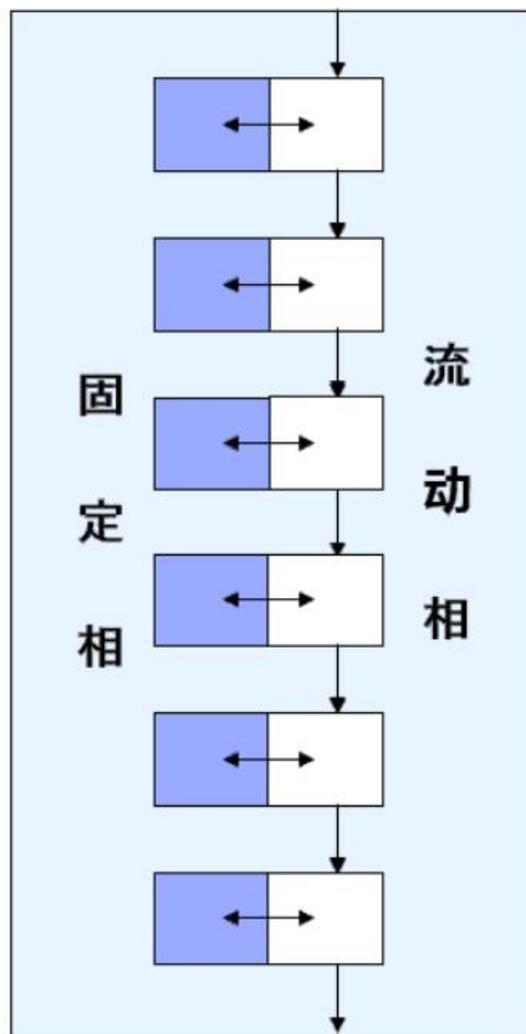
Statistical Moments

The second peak in the resolution formula is

the next main peak in the chromatogram (

the previous main peak in the chromatogr

the corresponding reference peak



➤ 塔板模型假设色谱柱是由大量分离层构成的，这些分离层称之为理论塔板

➤ 这些塔板实际是不存在的，他们只是一种假设用来帮助描述色谱柱里所发生的一切

➤ 在这些塔板里面，固定相和流动相之间存在着一种平衡

# 塔板理论数与柱效的关系

✓ 理论塔板数用来衡量色谱柱质量好坏

理论塔板数(N): 理论塔板数越高, 柱效越高

或者

理论塔板高度 (H): 理论塔板高度越大, 柱效越低

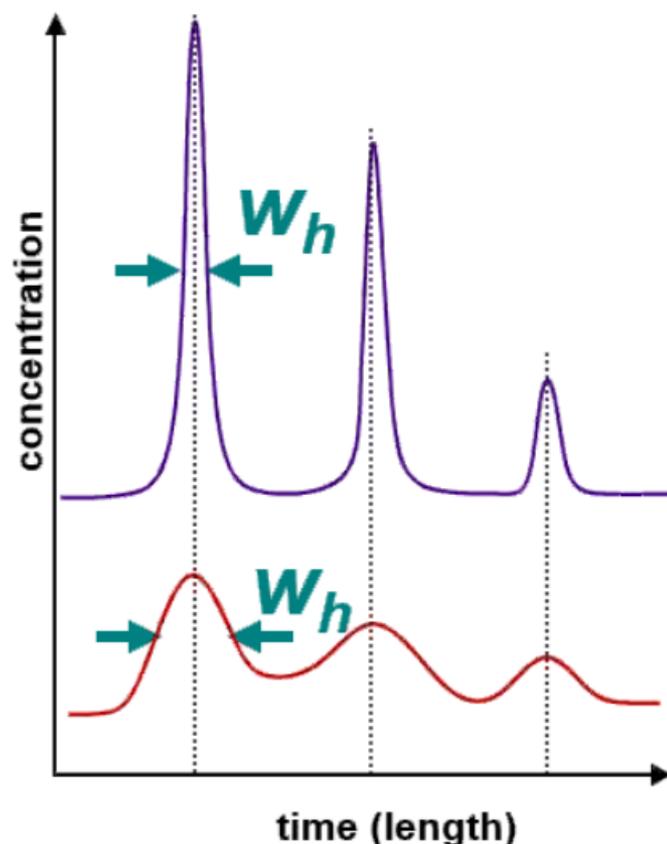
✓ 高柱效色谱柱比低柱效色谱柱在同一保留时间峰更窄  
理论塔板数越高, 柱效越高

$$N = \frac{L}{H}$$

理论塔板数 ←

色谱柱长 →

理论塔板高度 →



# 分配系数( $K$ )计算公式

在一定温度下，系统达到分配平衡时，组分在固定相中的浓度 ( $C_s$ ) 与在流动相中的浓度 ( $C_m$ ) 之比：

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

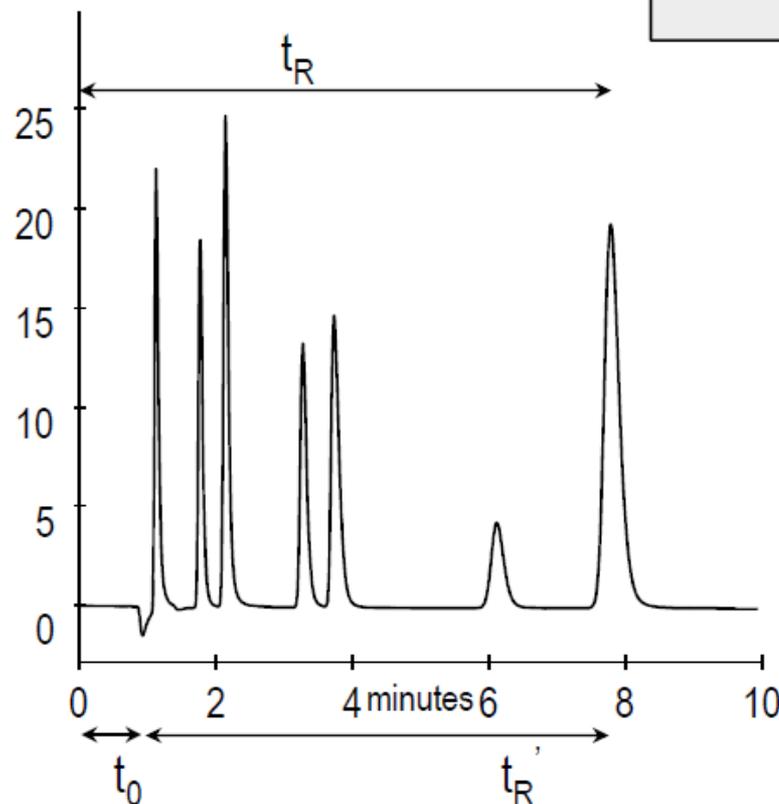
# 容量因子( $k$ )计算公式

容量因子指系统在达到分配平衡后，组分在固定相中的量 ( $W_s$ ) 与在流动相中的量 ( $W_m$ ) 之比，

$$k = t_R - t_0 / t_0$$

# 容量因子对分离度的影响

$$k' = \frac{t_{\text{固定相}}}{t_{\text{流动相}}} = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$



- $k'$ 值小
  - 组分流速快，接近死时间
  - 分离度差
- $k'$ 值大
  - 分离度好
- $k'$ 值更大
  - 保留时间更长
  - 峰会展宽，损失灵敏度
- 常用 $k'$ 值范围
  - $2 < k' < 10$

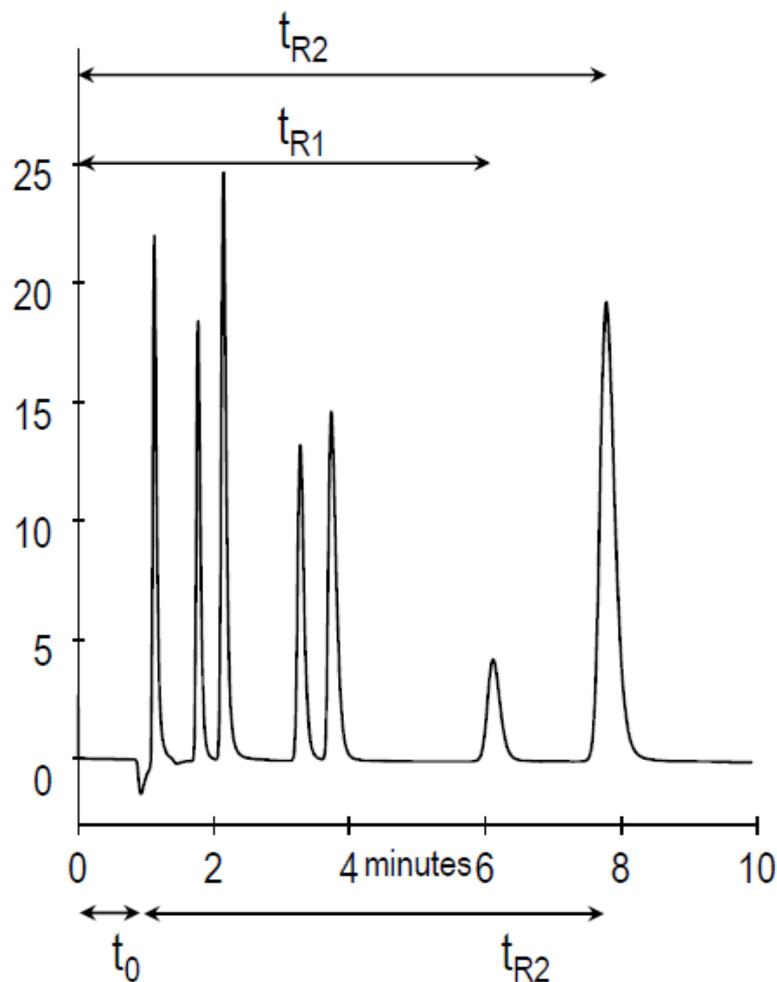
改变  $k'$  值的方法 : 调节流动相的极性（比例）、pH、离子强度;梯度淋洗

# 选择性因子( $\alpha$ )计算公式

两相邻组分的分配系数之比或容量因子之比称为选择性因子 ( $\alpha$ )。要使两组分获得分离， $\alpha \neq 1$ 。否则，两相邻组分没有分离。

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1}$$

# 选择因子对分离度的影响



$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

可以通过以下途径改变 $\alpha$ :

- 改变固定相
- 改变流动相或离子强度
- 改变柱温
- 改变化合物电离状态

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{k+1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

# 选择性是分离度的关键

$$R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k'}{1+k'} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

$R$  - 分离度

$N$  - 理论塔板数

$\alpha$  - 选择性

$k'$  - 容量因子

例如:

在5- $\mu\text{m}$ , 150 mm | C18 色谱柱上分离一对峰,

假如  $N = 10,000$  塔板/柱,  $k' \gg 1$  且  $\alpha = 1.01 \Rightarrow R_s = 1$

若将  $R$  提高到 2, 以达到基线分离

**方法 1 - 增加  $N$**                       需要提高  $N$  6400% ( $N = 640,000$ )

**方法 2 - 提高  $\alpha$**                       需要提高  $\alpha$  1% ( $\alpha = 1.02$ )

提高分离度最有效的方法就是更换不同固定相类型的色谱柱

# UltiMate 3000 的型号

[http://v.youku.com/v\\_show/id\\_XMjQ4MTYxNTY5Ng==.html?spm=a2hzp.8253869.0.0](http://v.youku.com/v_show/id_XMjQ4MTYxNTY5Ng==.html?spm=a2hzp.8253869.0.0)

- 泵
- 自动进样器
- 柱温箱
- 检测器

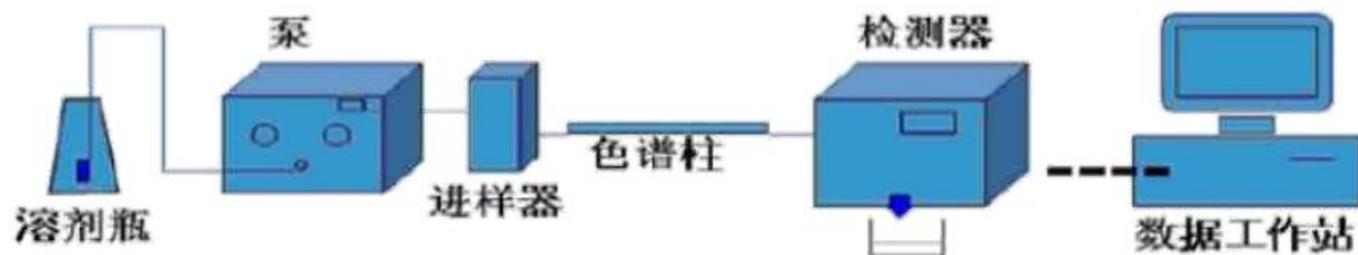
## 工作原理

泵



# U3000高效液相色谱仪的基本结构

- **输液系统:** 用于传递流动相, 包括贮液瓶、高压泵;
- **进样系统:** 用于外来样品的导入, 手动进样装置或自动进样装置;
- **分离系统:** 用于分离复杂的混合物, 包括色谱柱、连接管以及恒温器;
- **检测系统:** 用于检测色谱柱的流出物, 如UV、FLD、IR、ELSD、CAD、MS等;
- **数据处理系统:** 用于对原始数据进行处理, 得到色谱图, 并获得相应的定性定量数据, 从而实现分离分析的目的;



# LPG-3400 内部构造



泵头



# LPG-3400 内部构造

蠕动泵

泵头

毛细管混合器

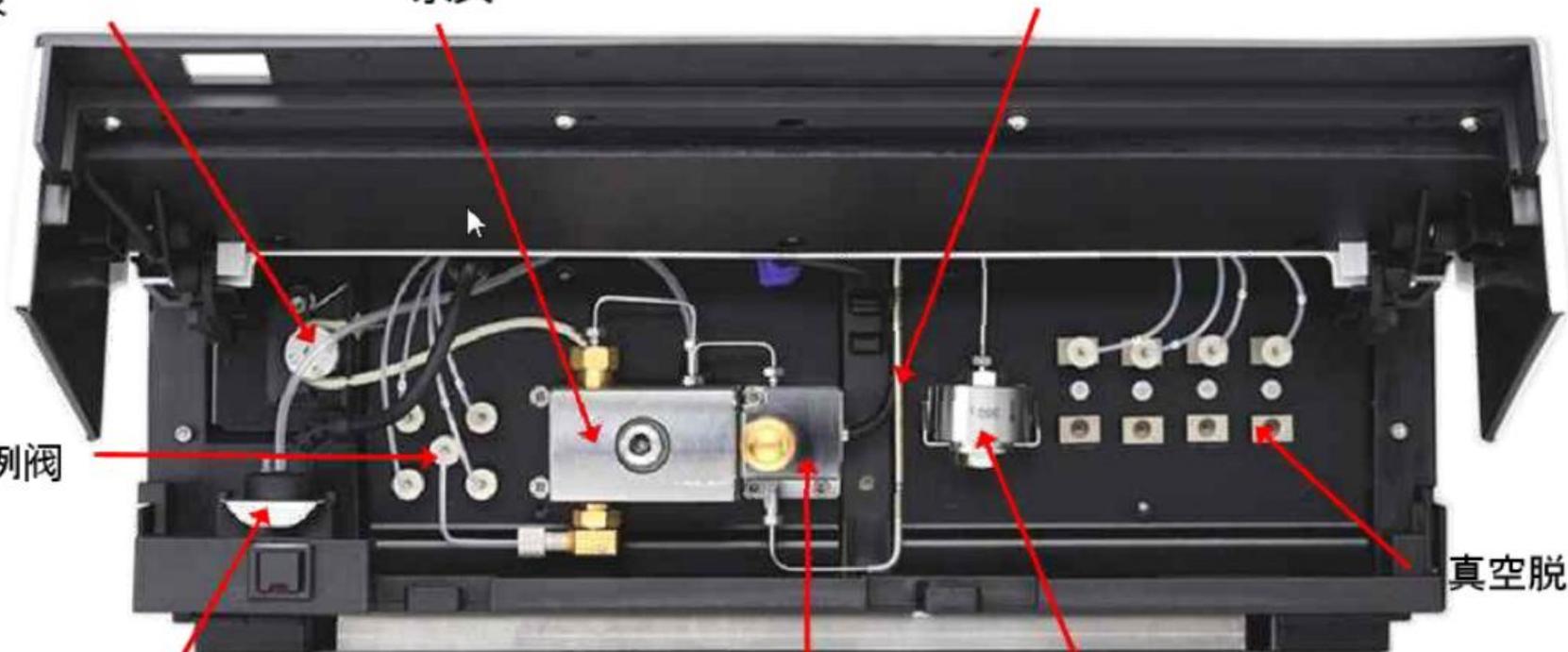
比例阀

滴数计

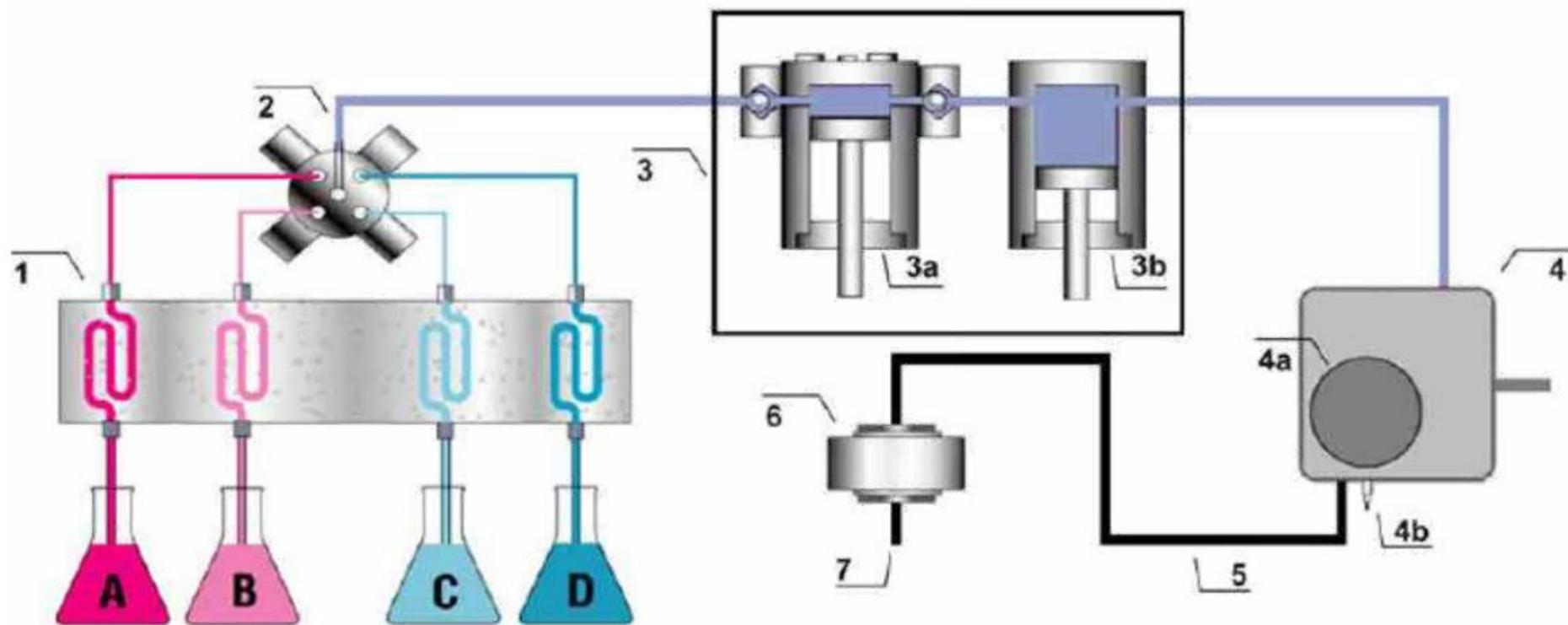
Purge 阀

静态混合器

真空脱气机



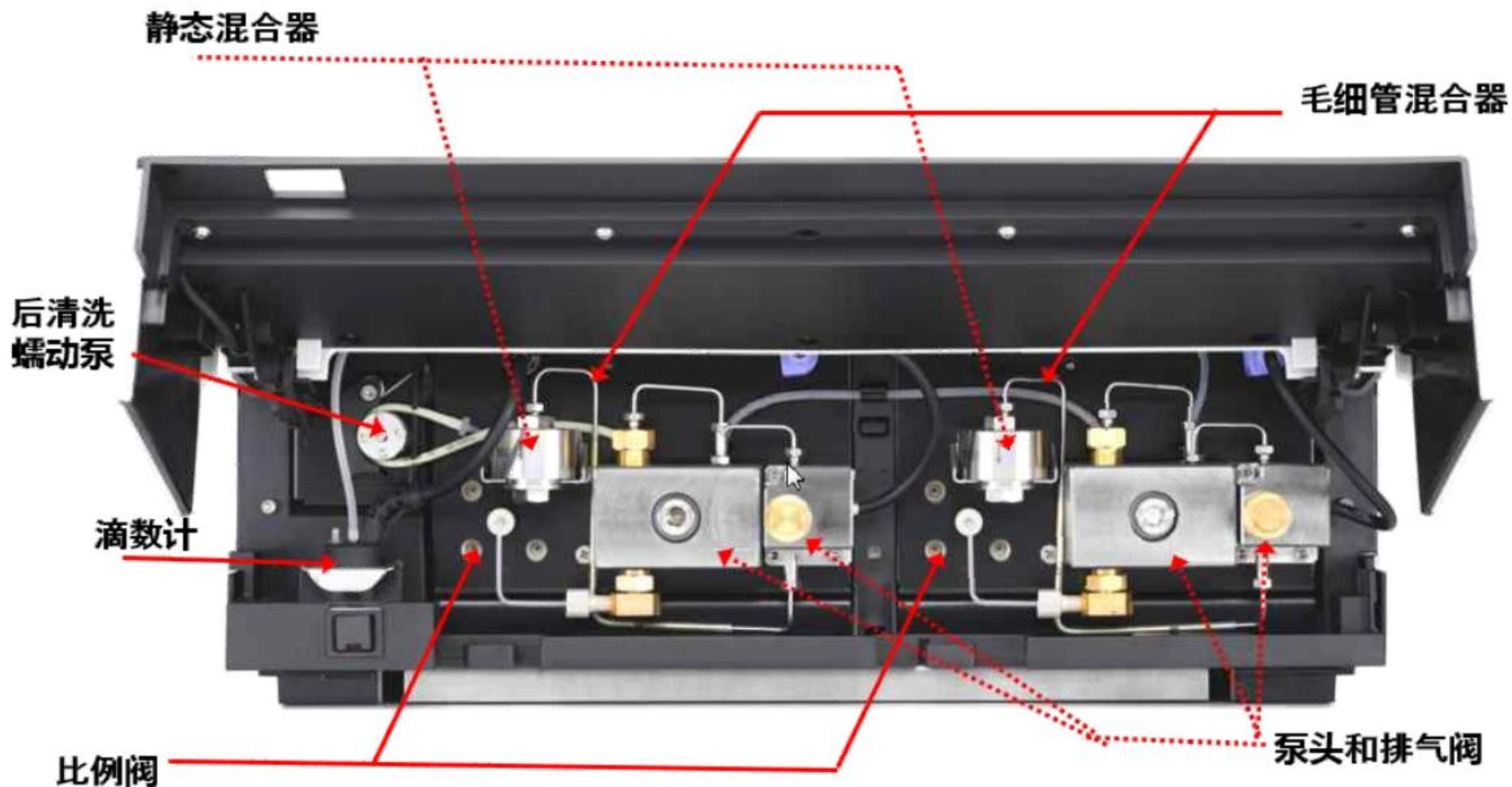
# LPG-3400流路



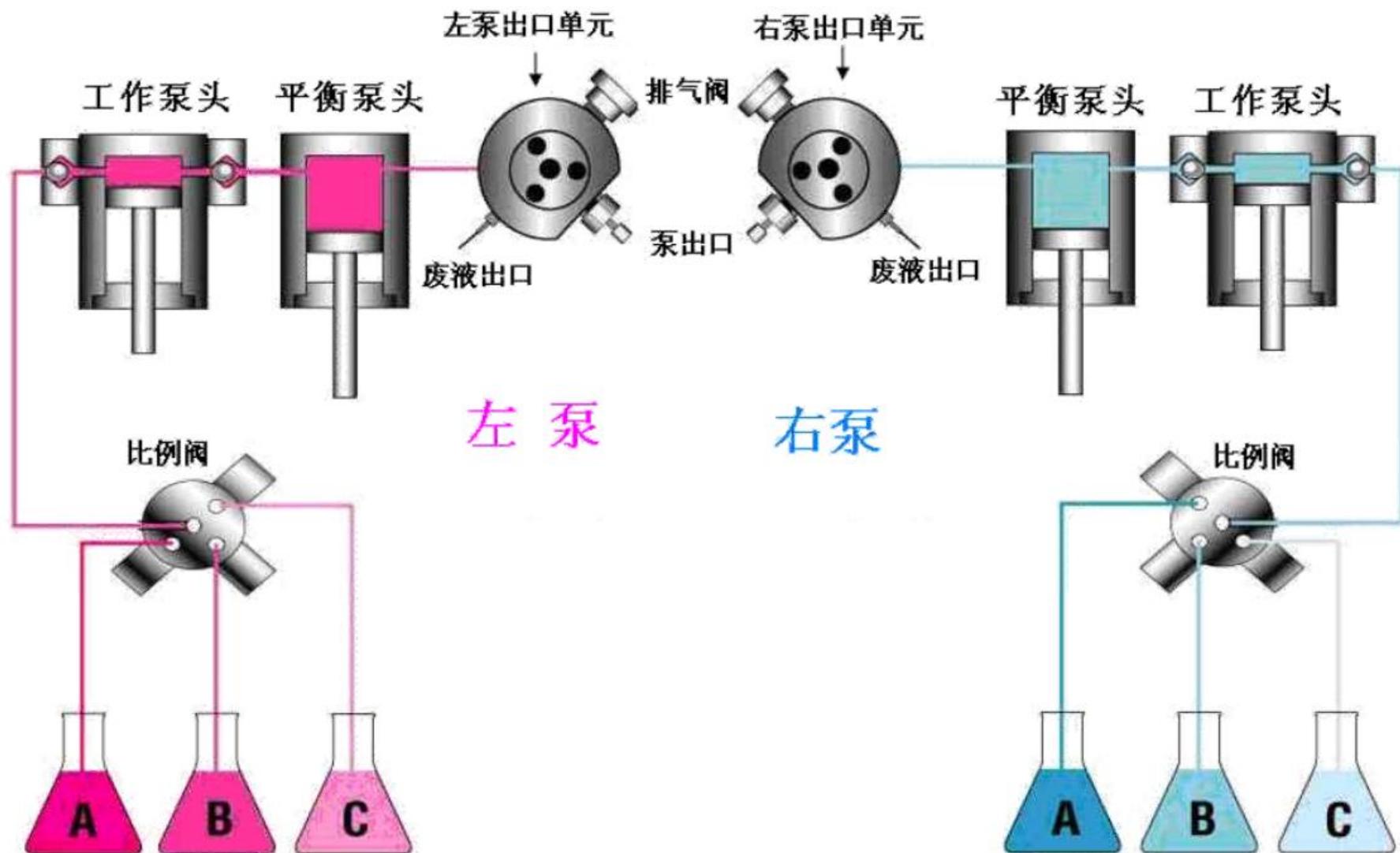
# DGP-3600 内部结构图



# DGP-3600 内部结构图



# DPG-3600 流路图



## 储液瓶、溶剂过滤头

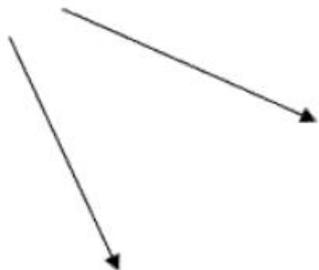


- 1.检查流动相和清洗液的存量、配置时间；
- 2.打开U3000泵电源开关，等待自检；
- 3.选择正确的流动相通道；
- 4.排气泡；
- 5.平衡系统。

溶剂充足，但长时间使用后出现压力低于下限报警-溶剂滤头，超声处理无效后更换新的滤片  
溶剂充足，脱气机前管道频繁出现大量的气泡-溶剂滤头，超声处理无效后更换新的滤片

# 储液瓶、溶剂过滤头

溶剂过滤头

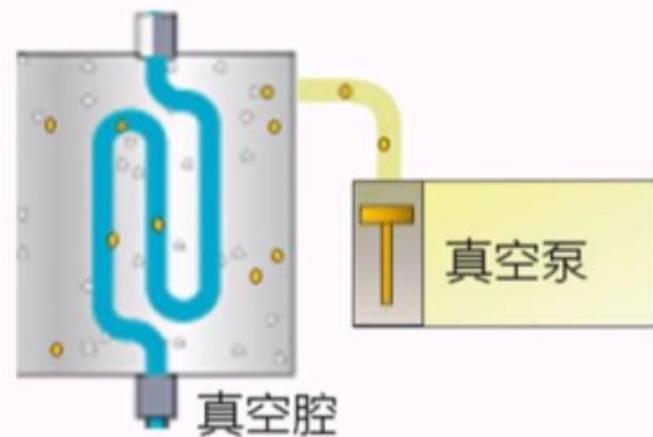
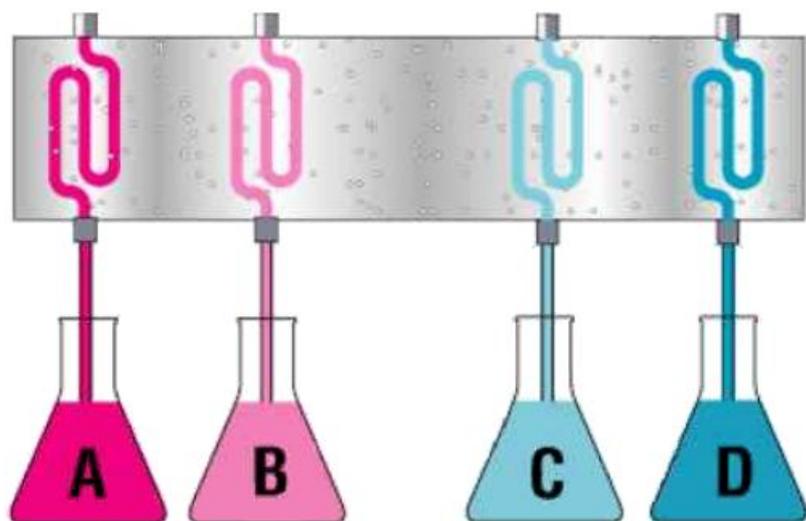


**溶剂过滤头堵塞常见现象:**

1. 溶剂充足，但长时间使用后出现压力低于下限报警；
2. 溶剂充足，脱气机前管道频繁出现大量的气泡。

1. 10%甲醇水溶液超声清洗 2. 5%稀硝酸水溶液超声清洗 3. 更换过滤片

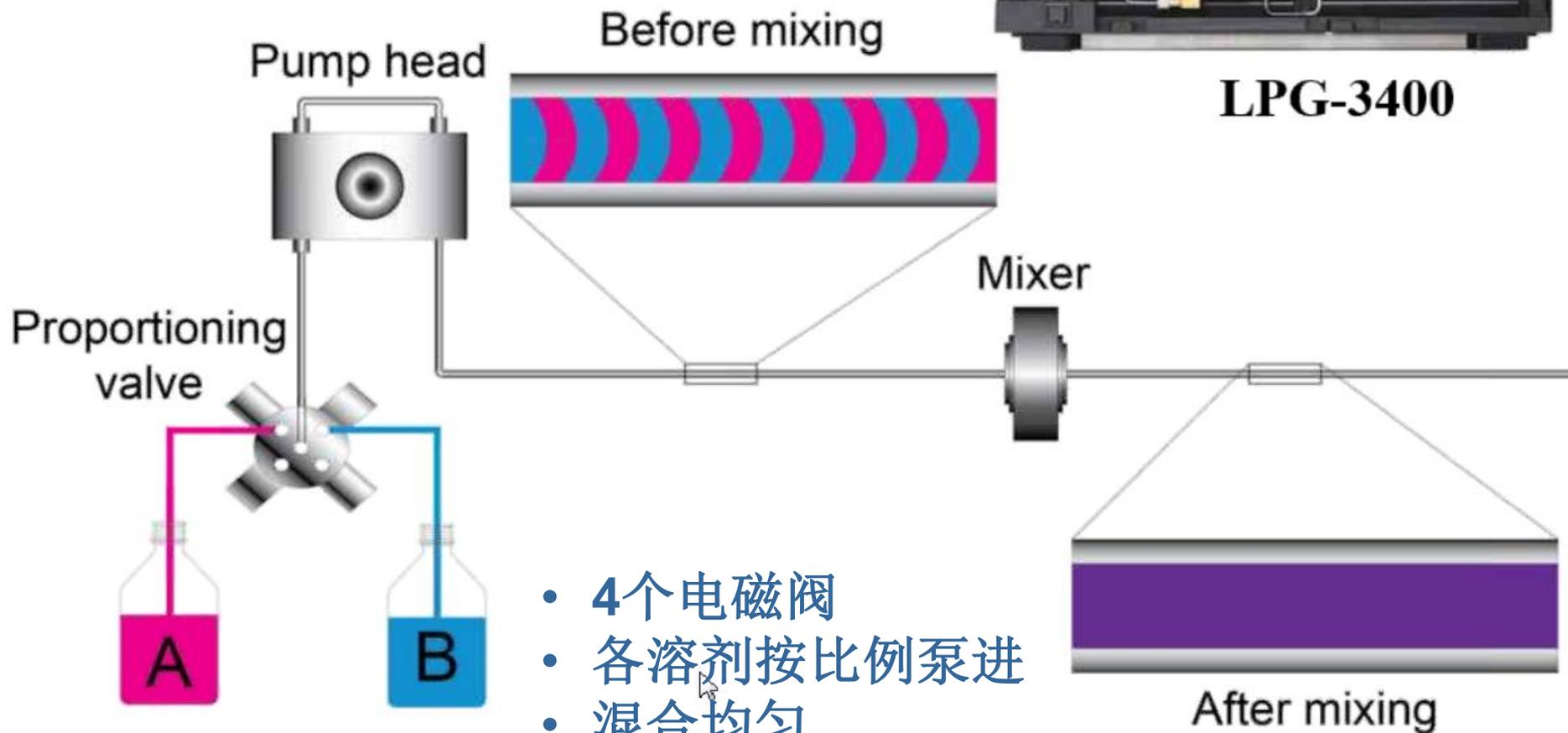
# 脱气机工作原理



# 比例阀工作原理

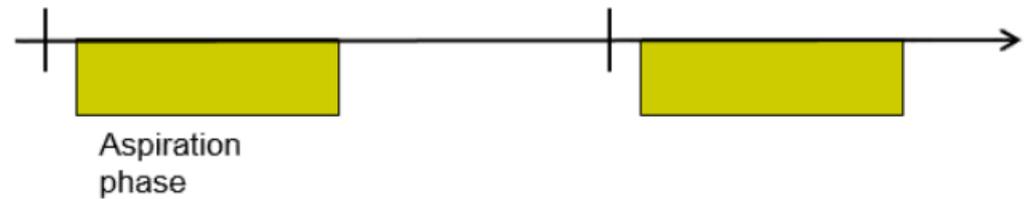
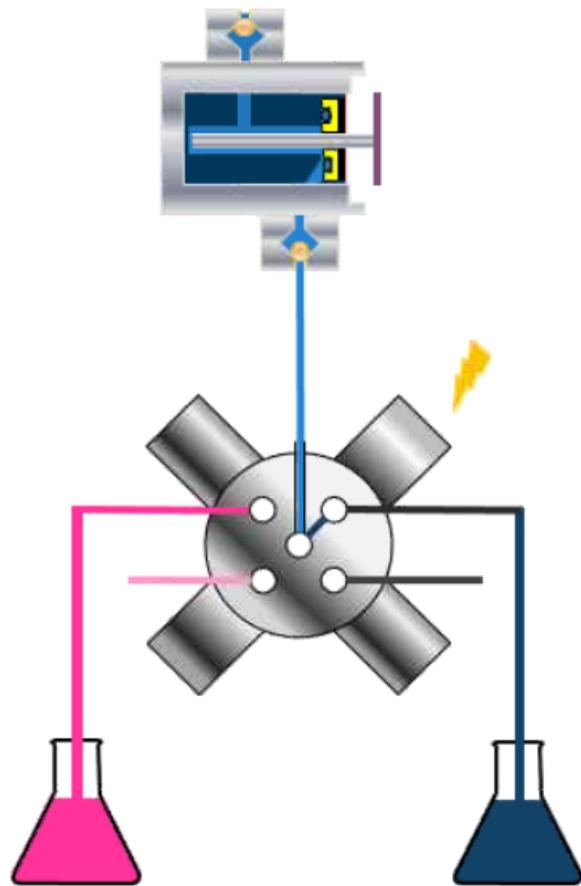


LPG-3400



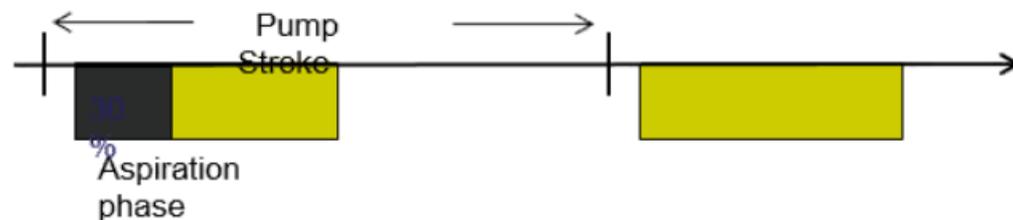
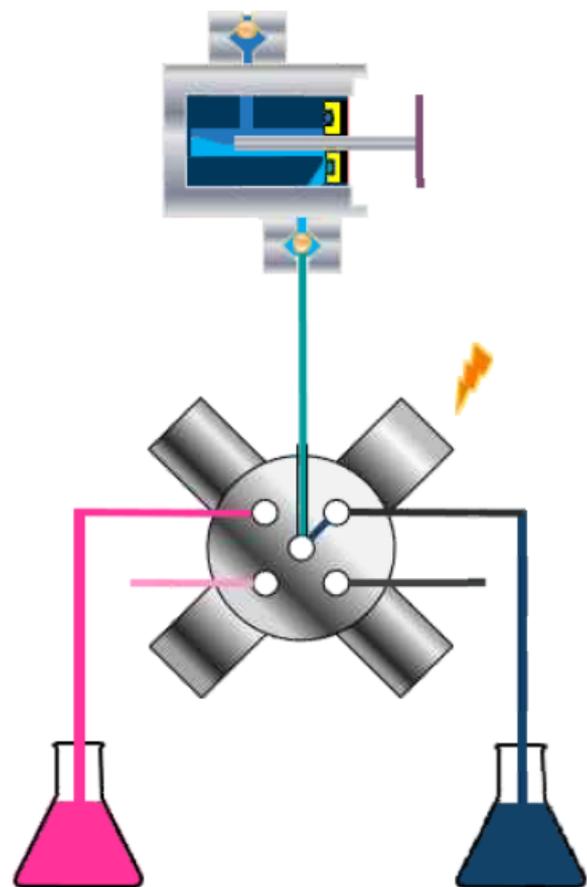
# 比例阀工作原理

focused



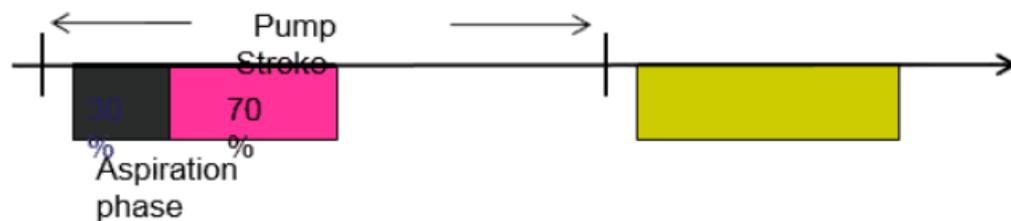
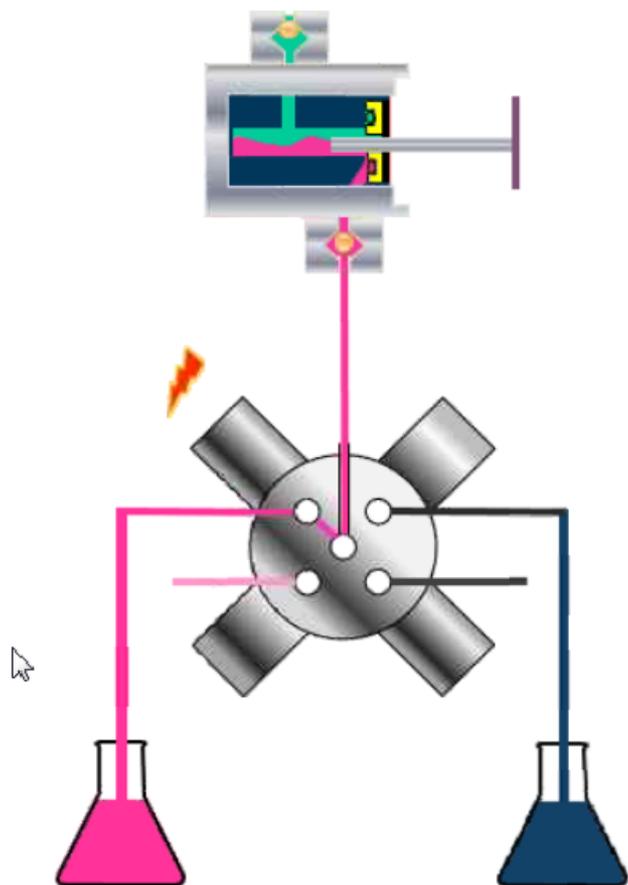
# 比例阀工作原理

ocused



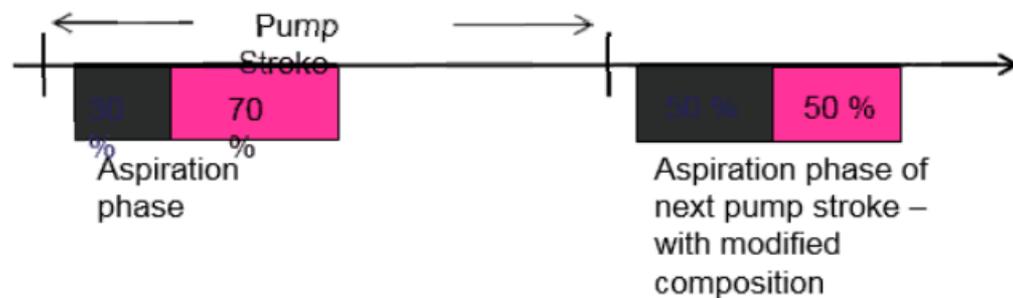
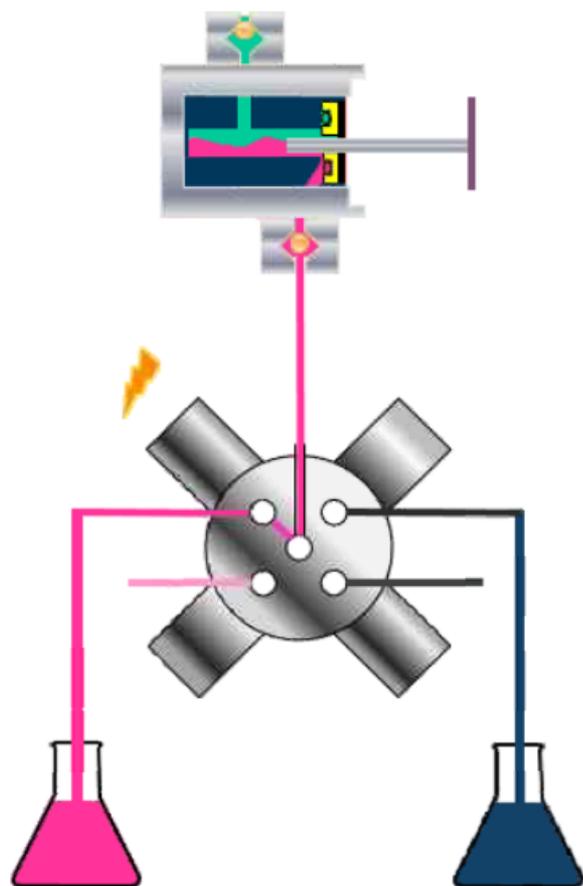
# 比例阀工作原理

ocused



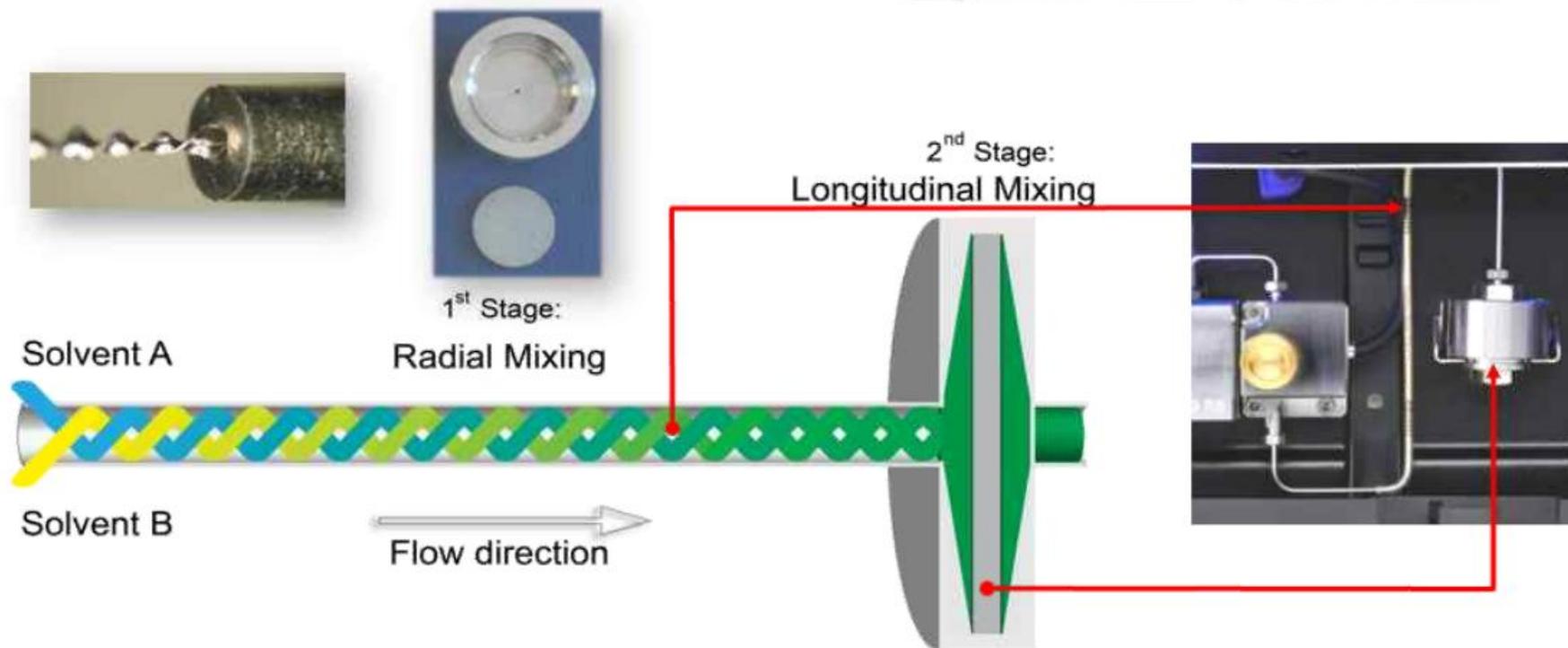
# 比例阀工作原理

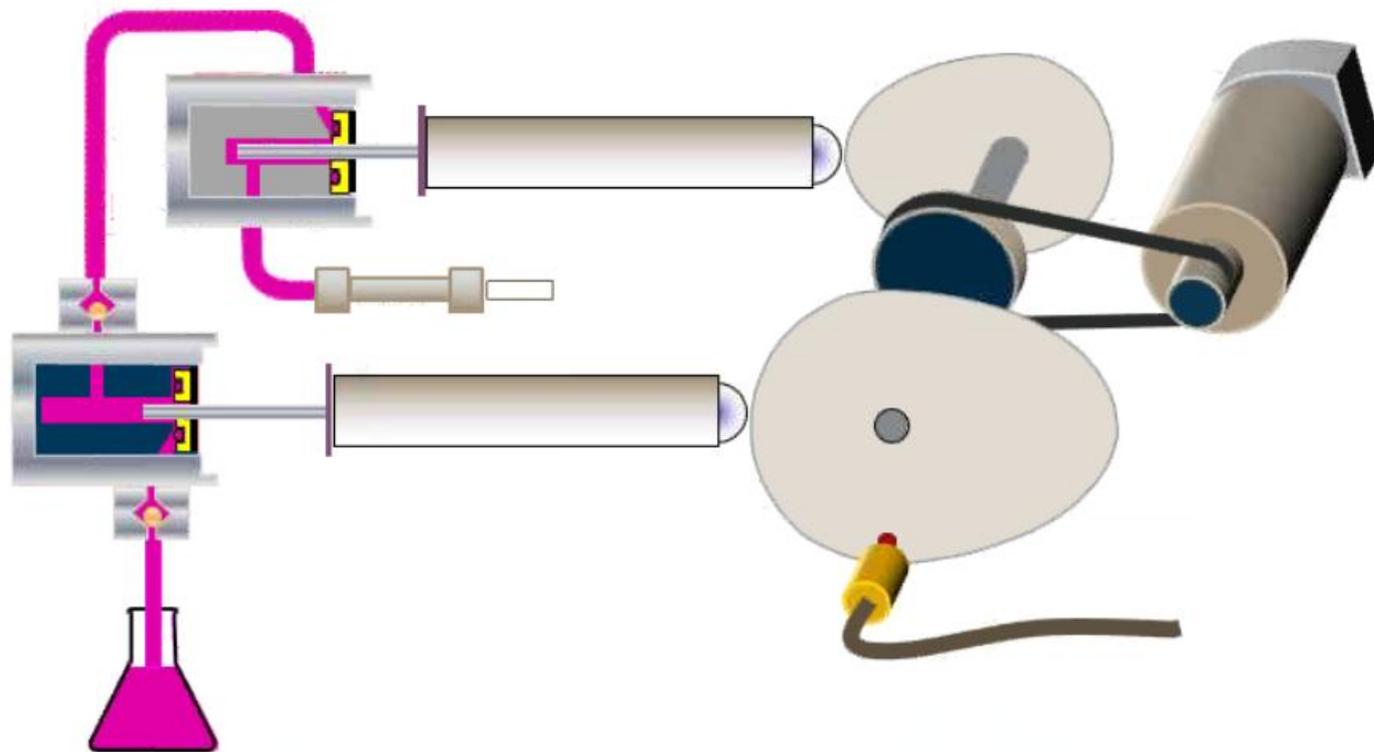
focused



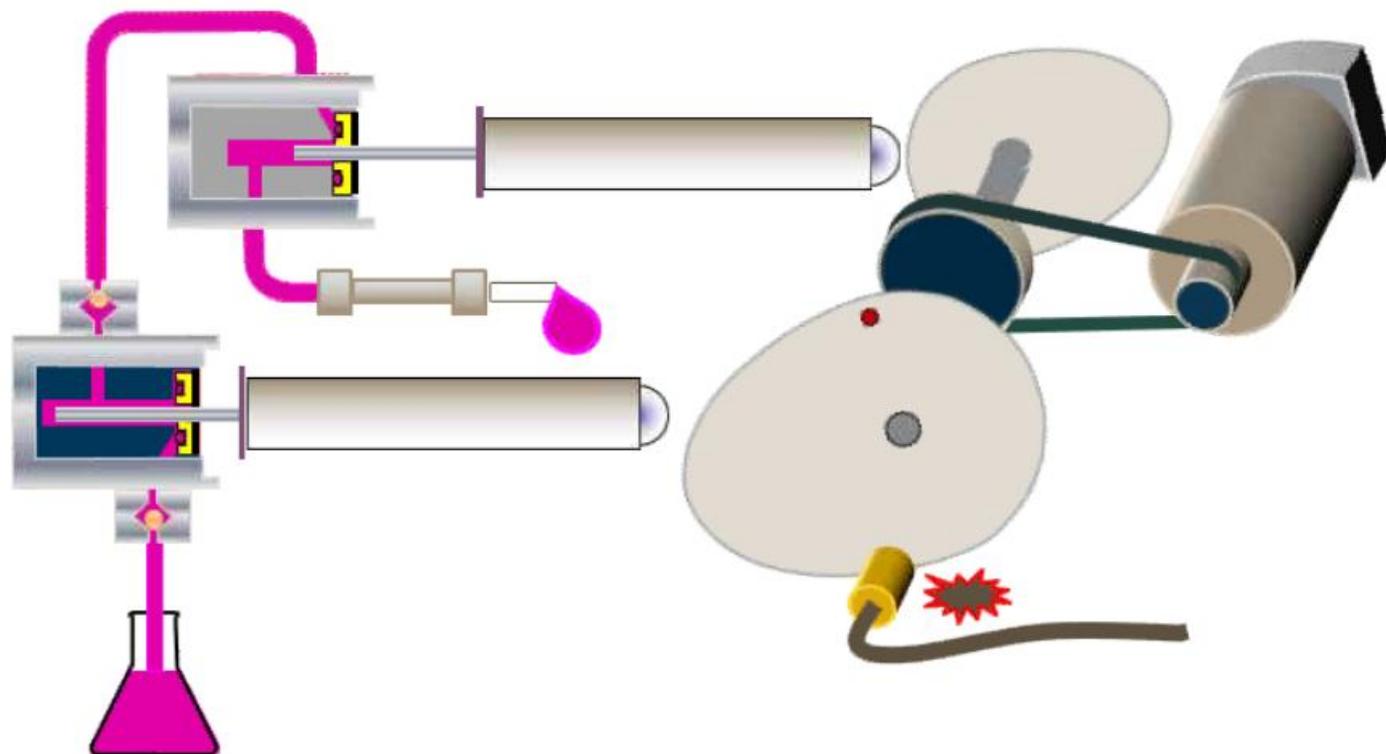
# 溶液的混合

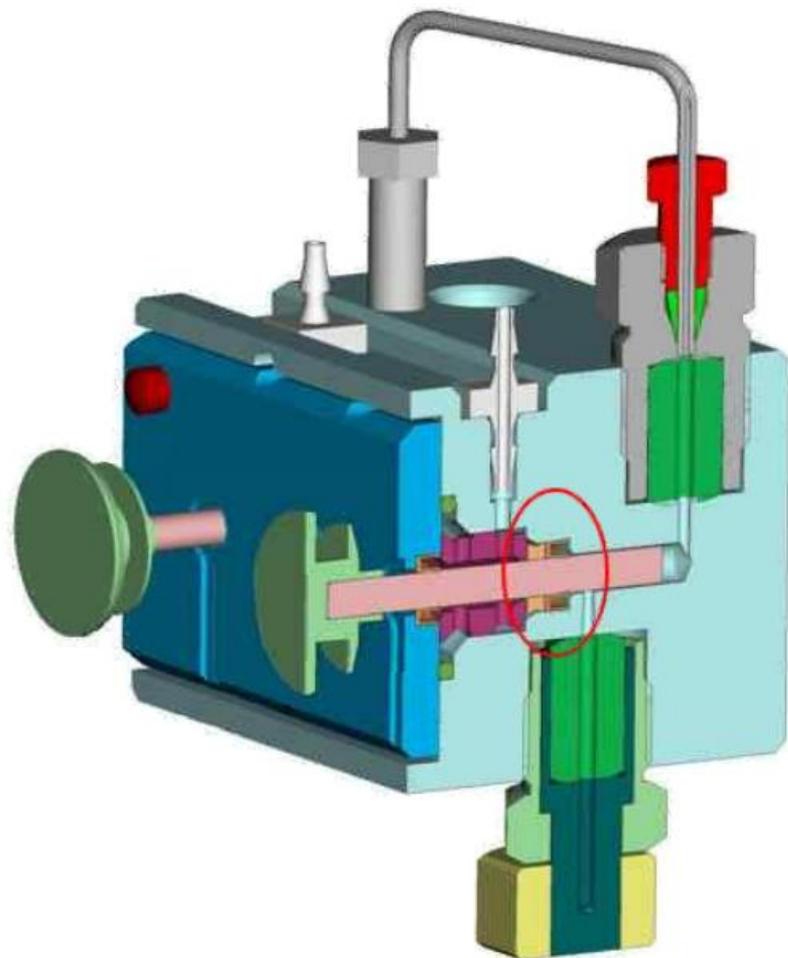
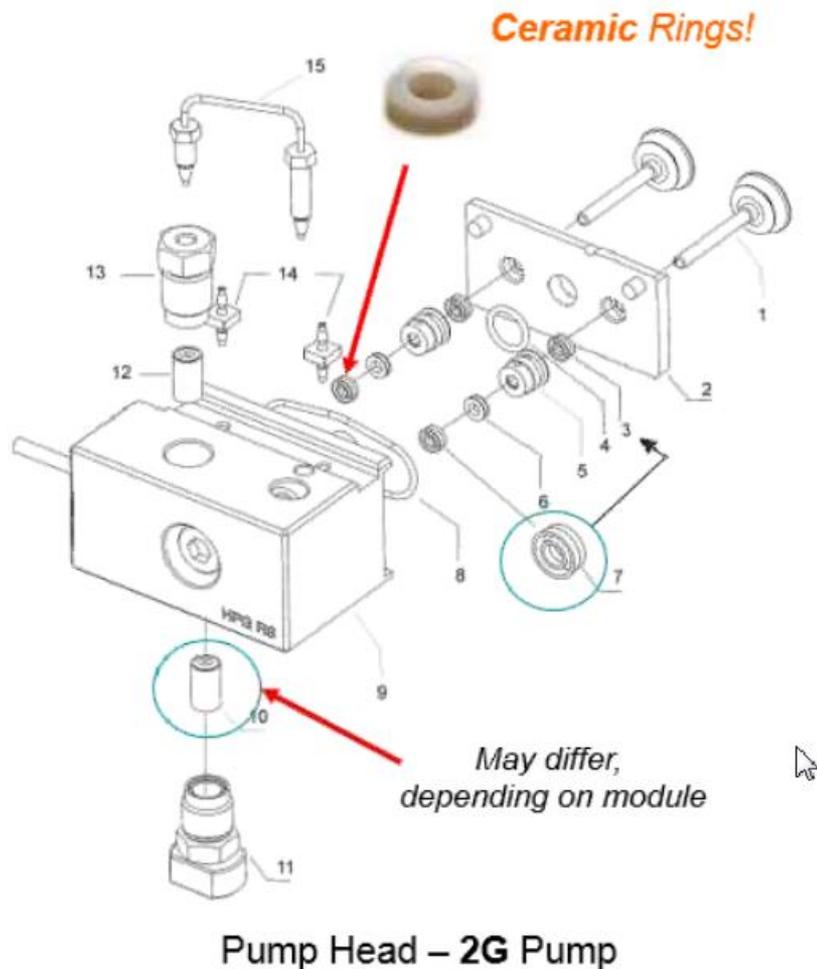
- 2G泵配备静态混合器
- 它包含2部分
  - 毛细管混合管 (25 或 50  $\mu\text{L}$ )
  - 静态混合器 (10 – 1400  $\mu\text{L}$ )





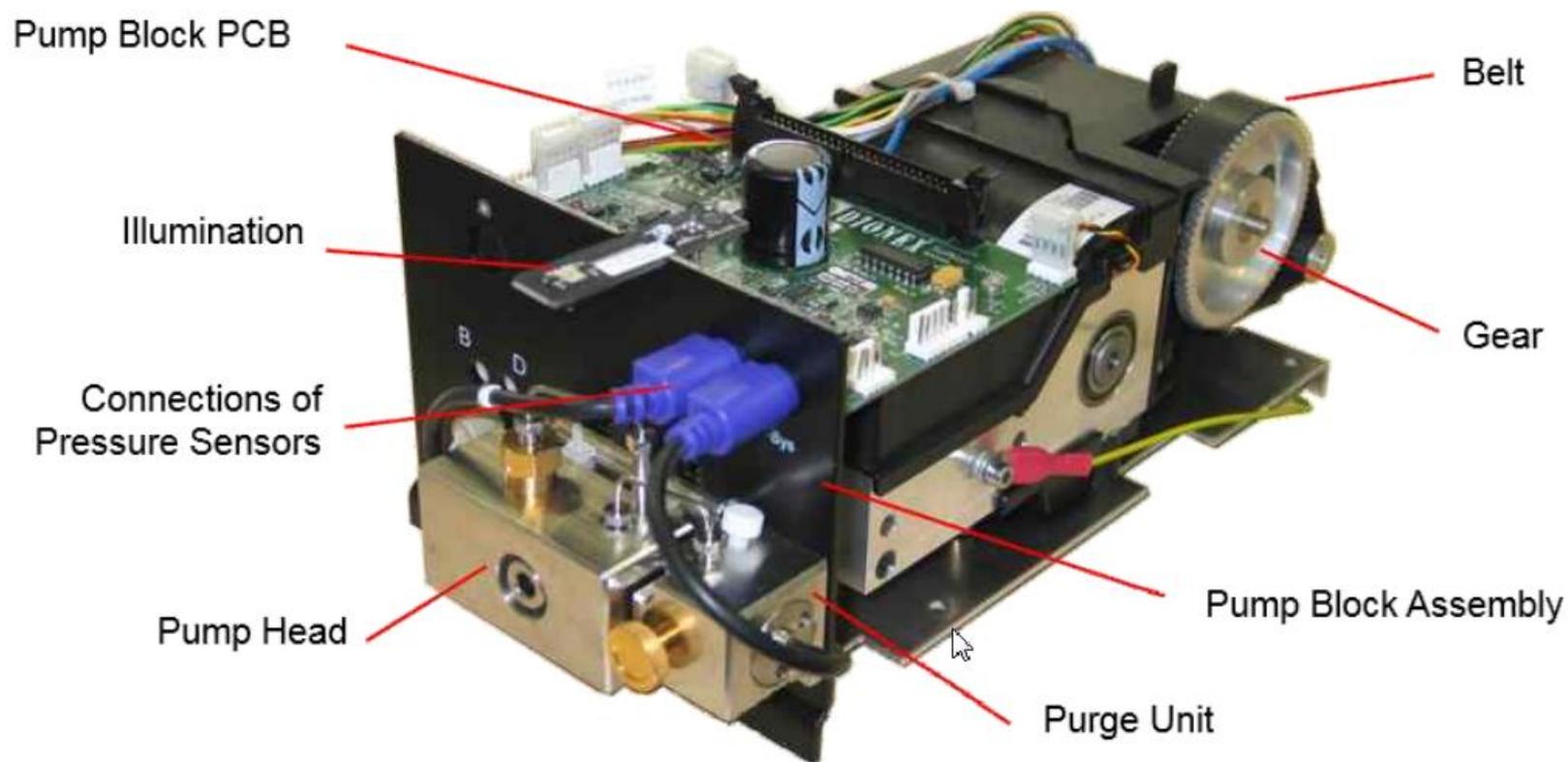
1. 工作泵头、平衡泵头
2. 带电马达、2个凸轮轴、柱塞杆





Consult the (service) manuals for the correct part number!

- Pump block „2<sup>nd</sup> Generation“ (2G)



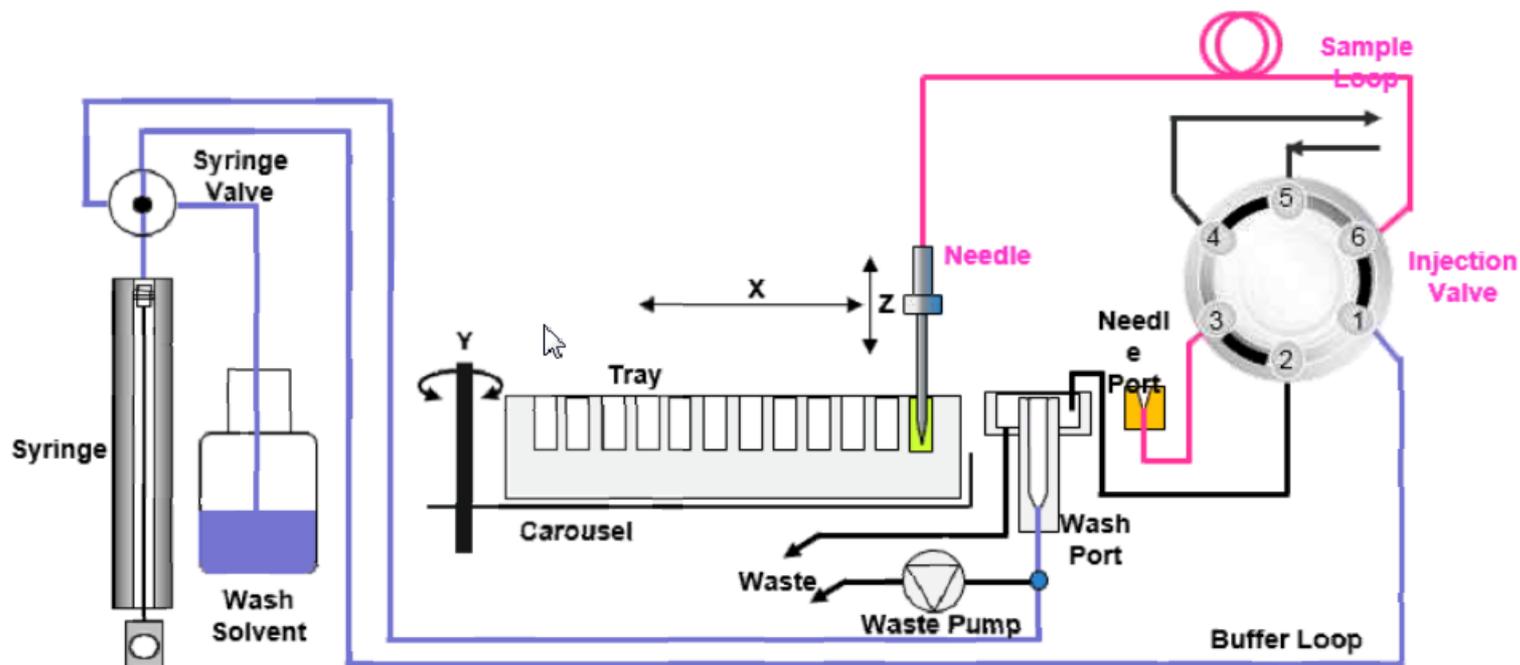
# 后密封清洗系统



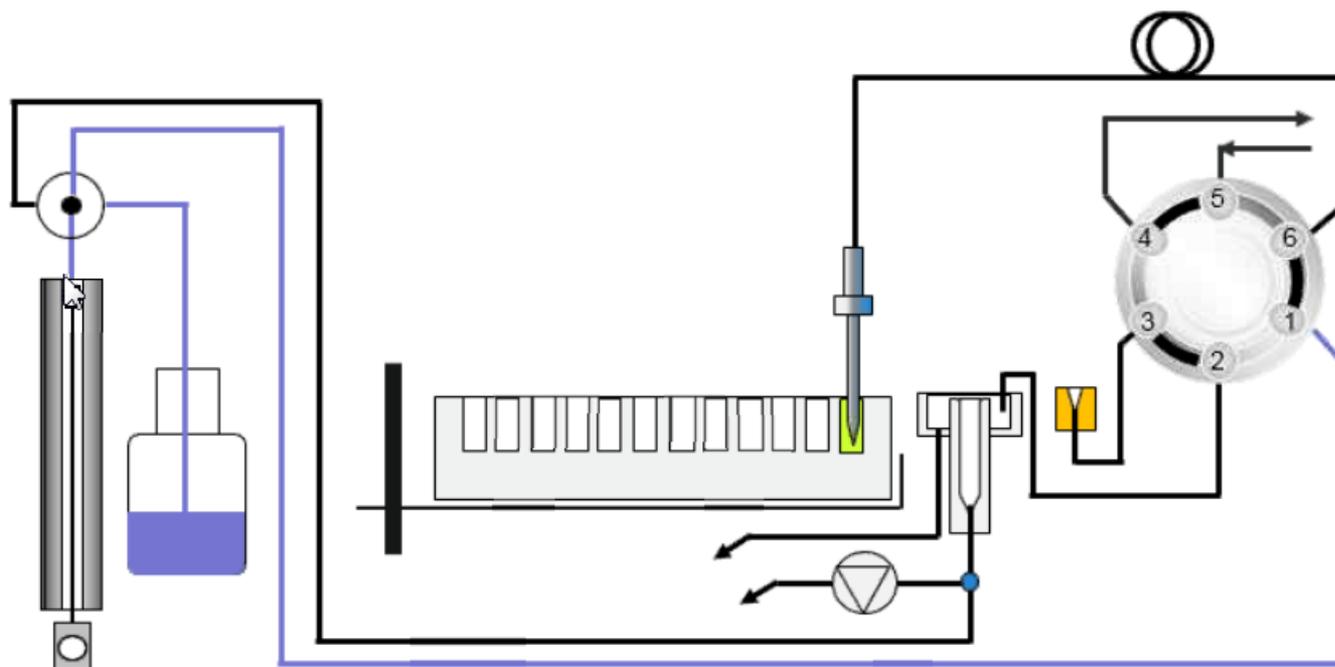
# WPS-3000 SL构造

WPS-3000 SL 包括以下部件

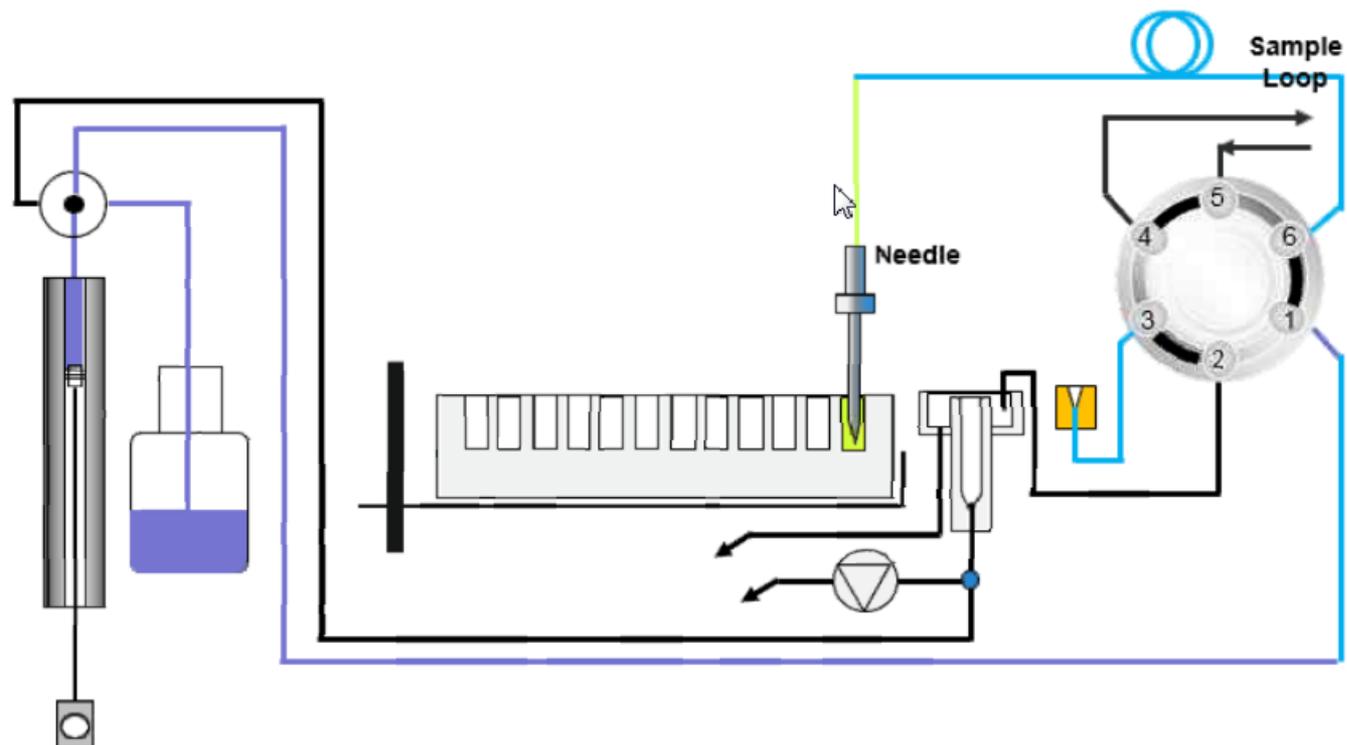
- 进样针和样品环、针座
- 进样阀、缓冲环
- 注射器和注射器阀，清洗口，废液泵
- 转盘传送、托盘、针驱动



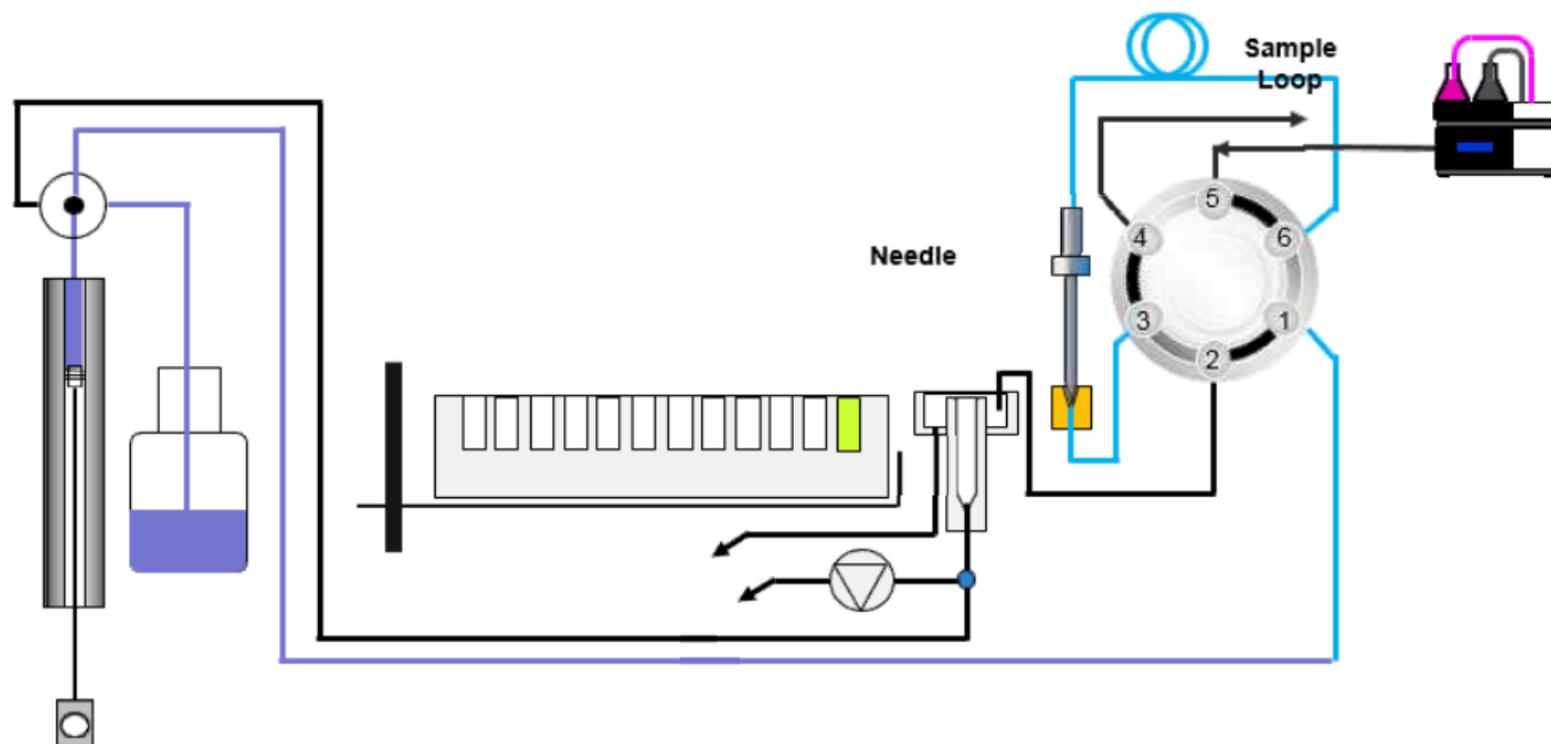
# WPS-3000 SL 进样原理



# WPS-3000 SL 进样原理

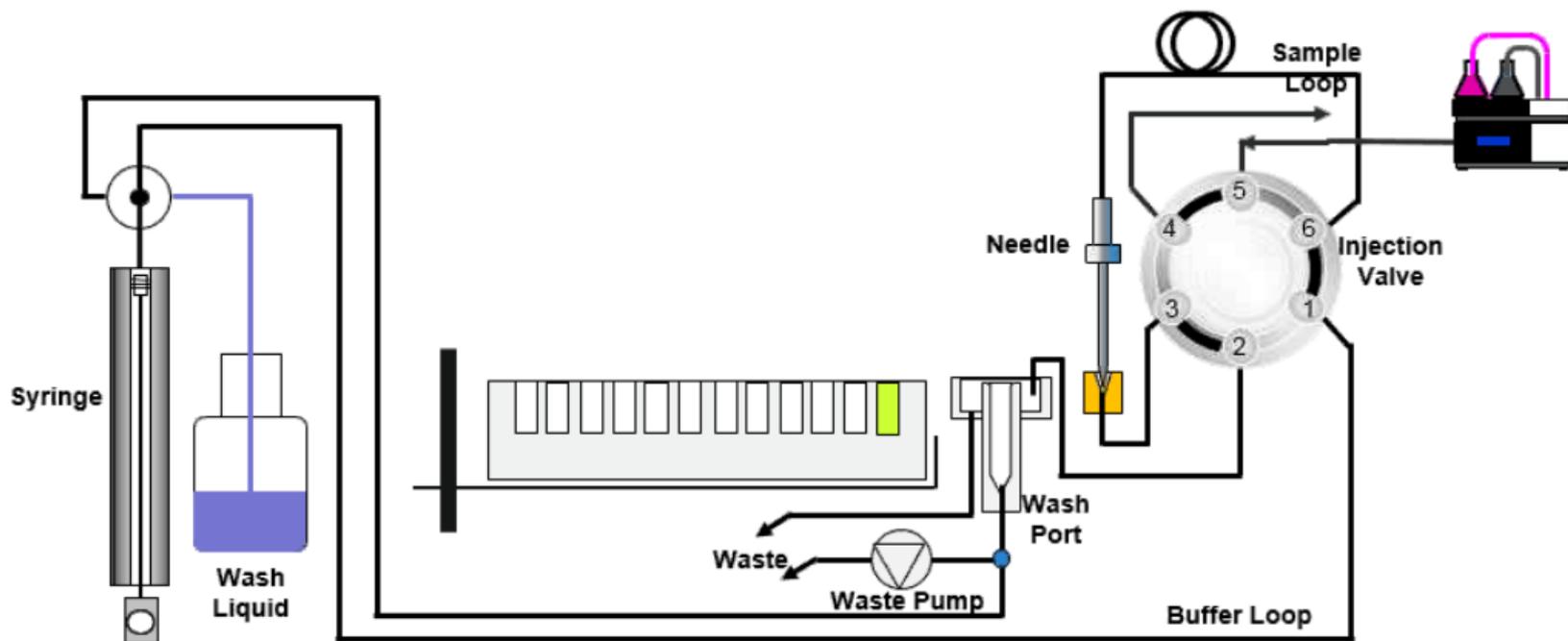


# WPS-3000 SL 进样原理

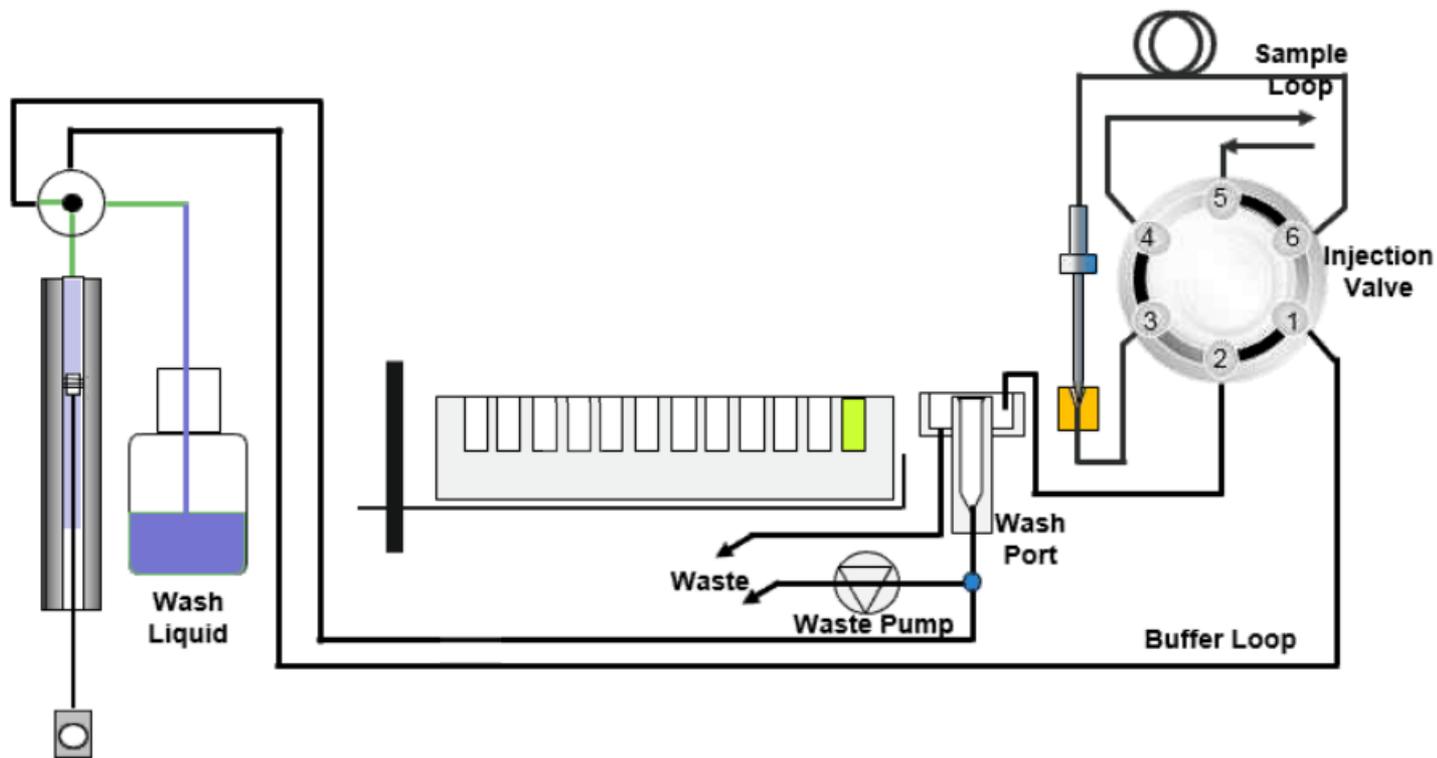


# WPS-3000 SL的清洗

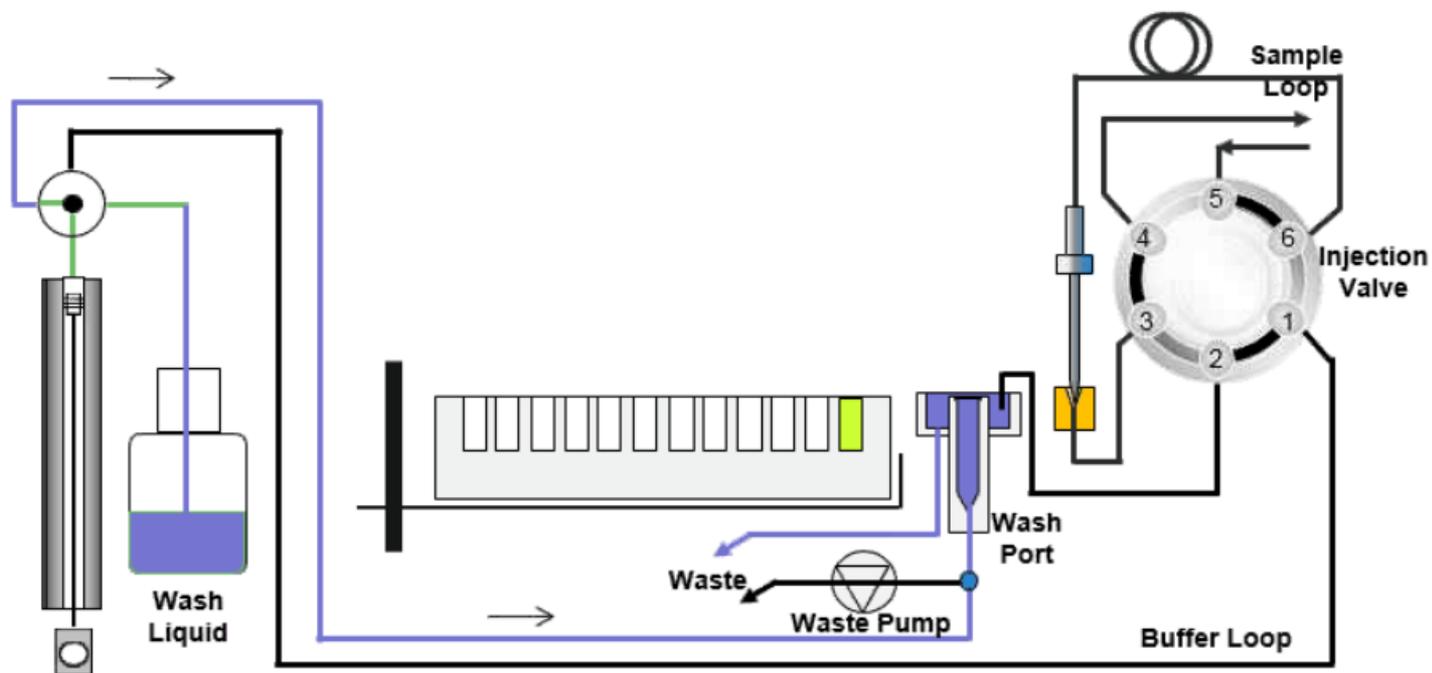
- 清洗注射器
- 清洗缓冲环
- 清洗针外壁



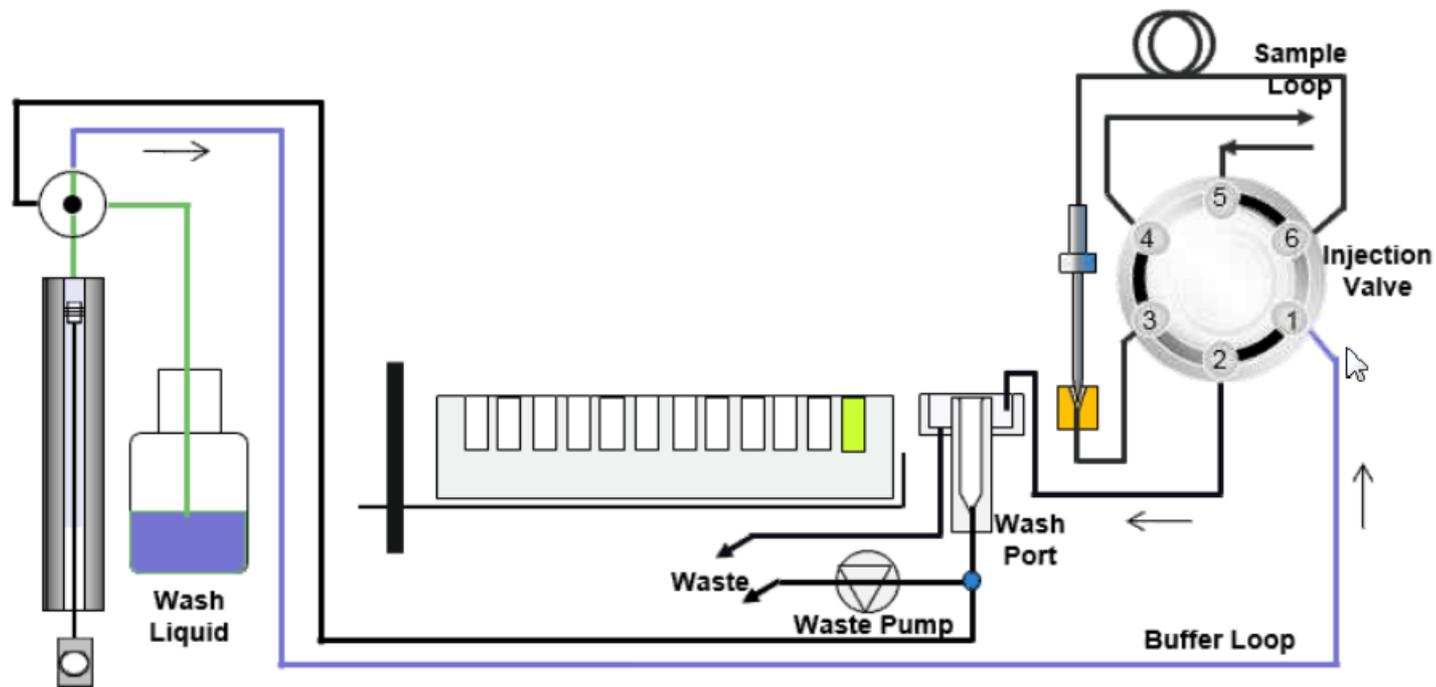
# 清洗注射器



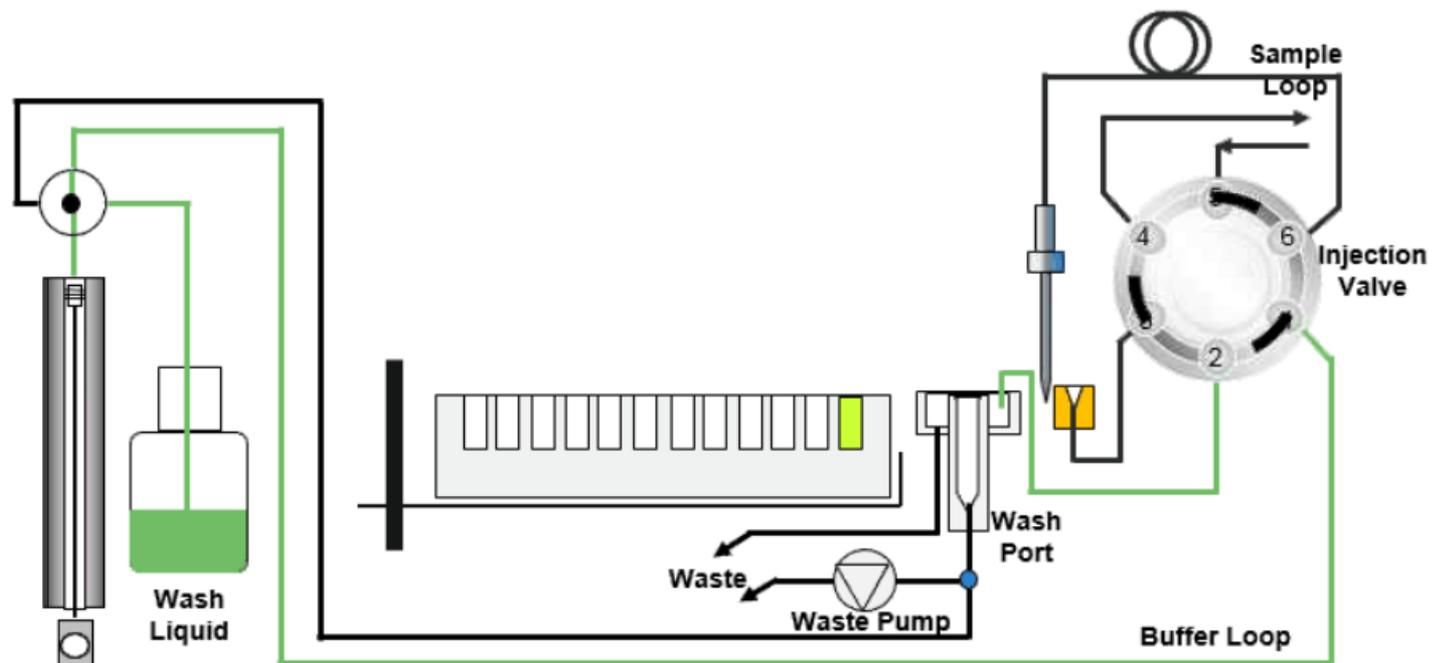
# 清洗注射器



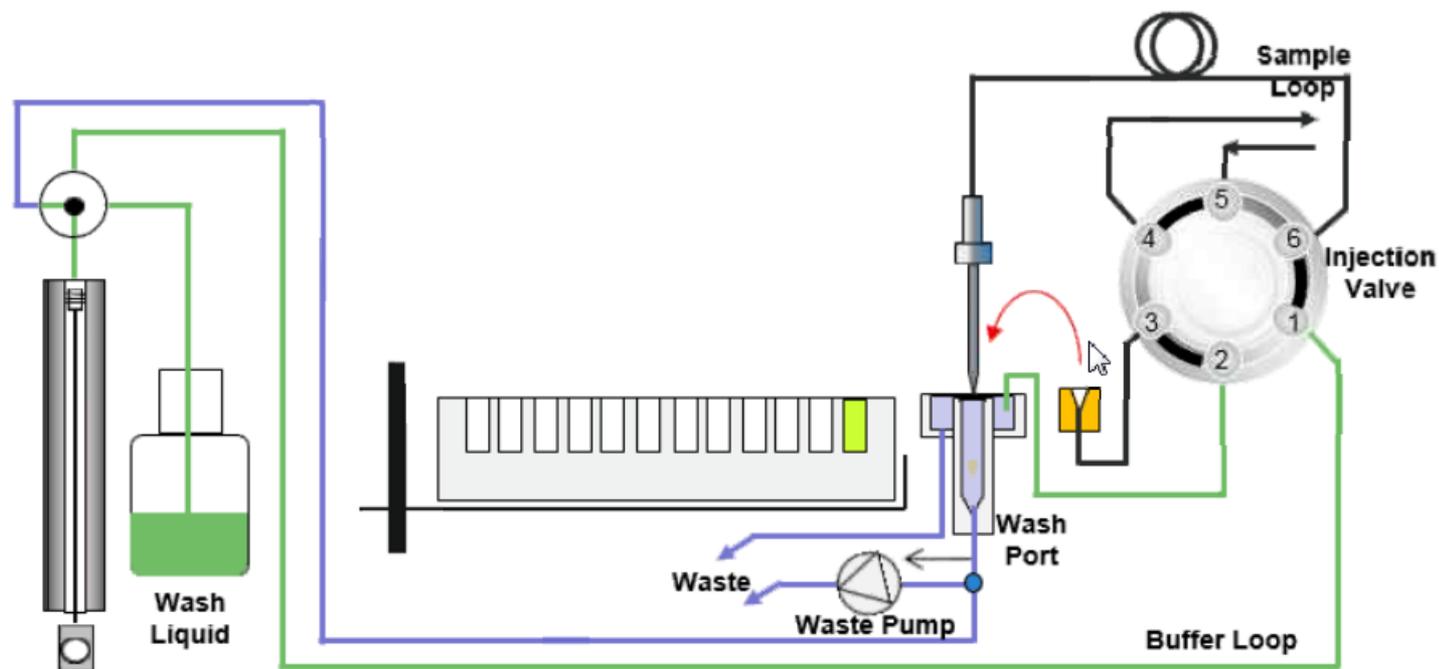
# 清洗缓冲环



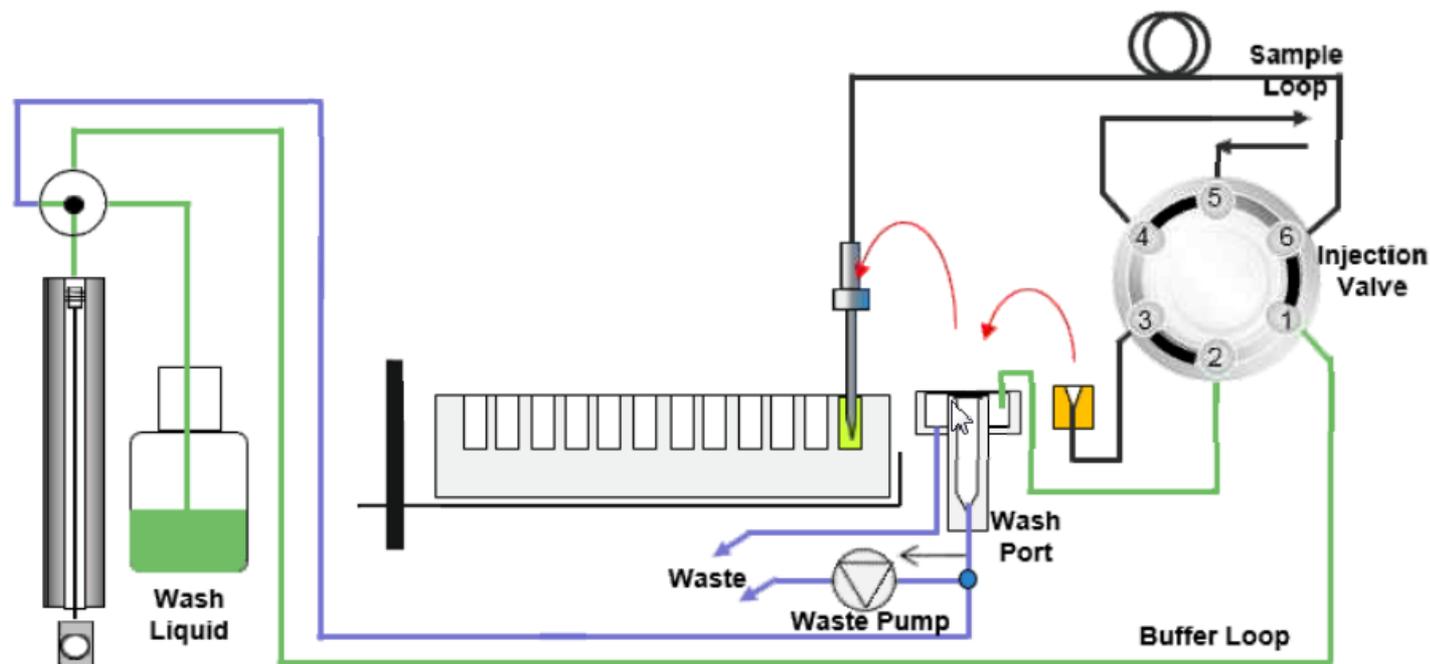
# 清洗针外壁( before injection )



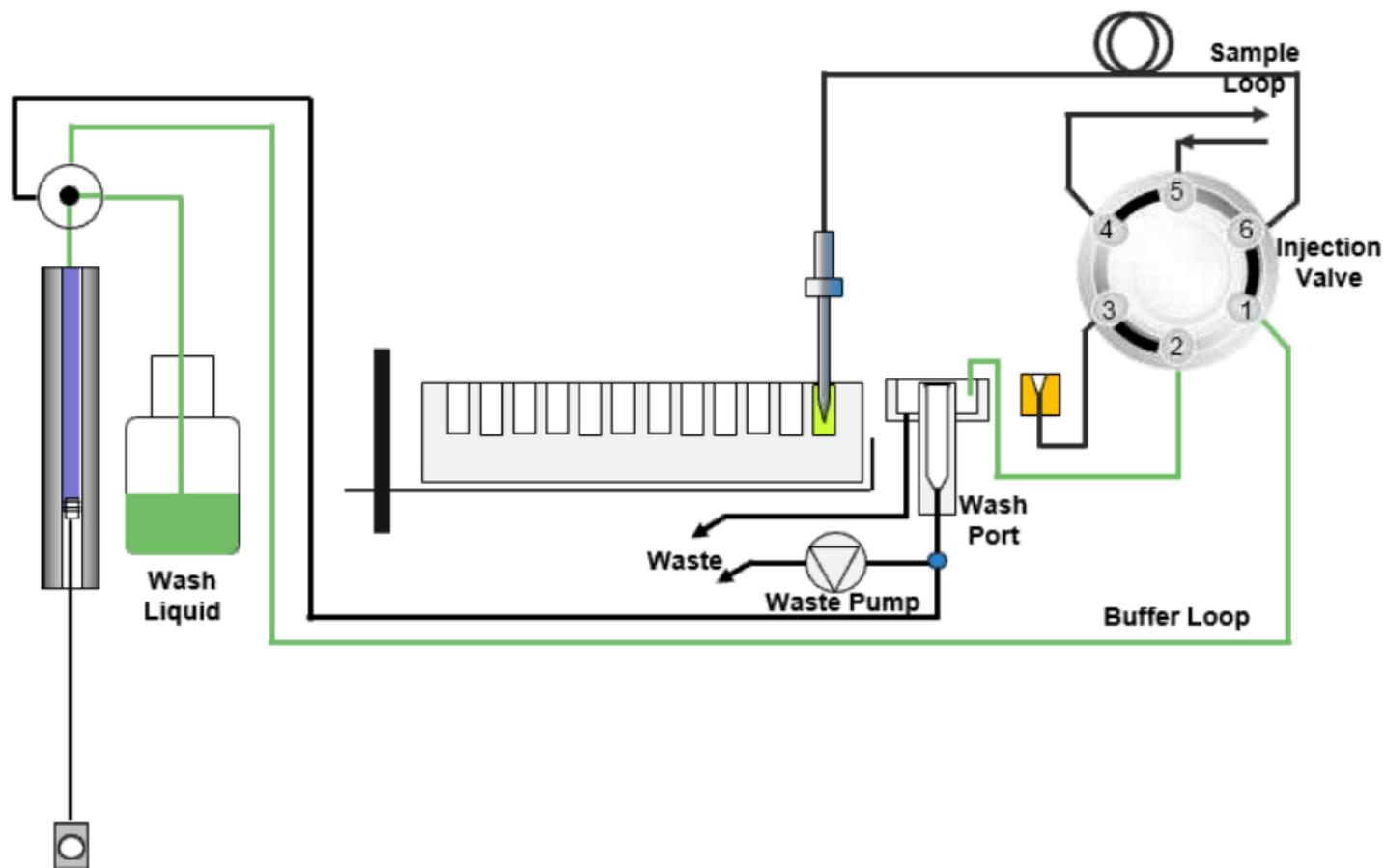
# 清洗针外壁( before injection )



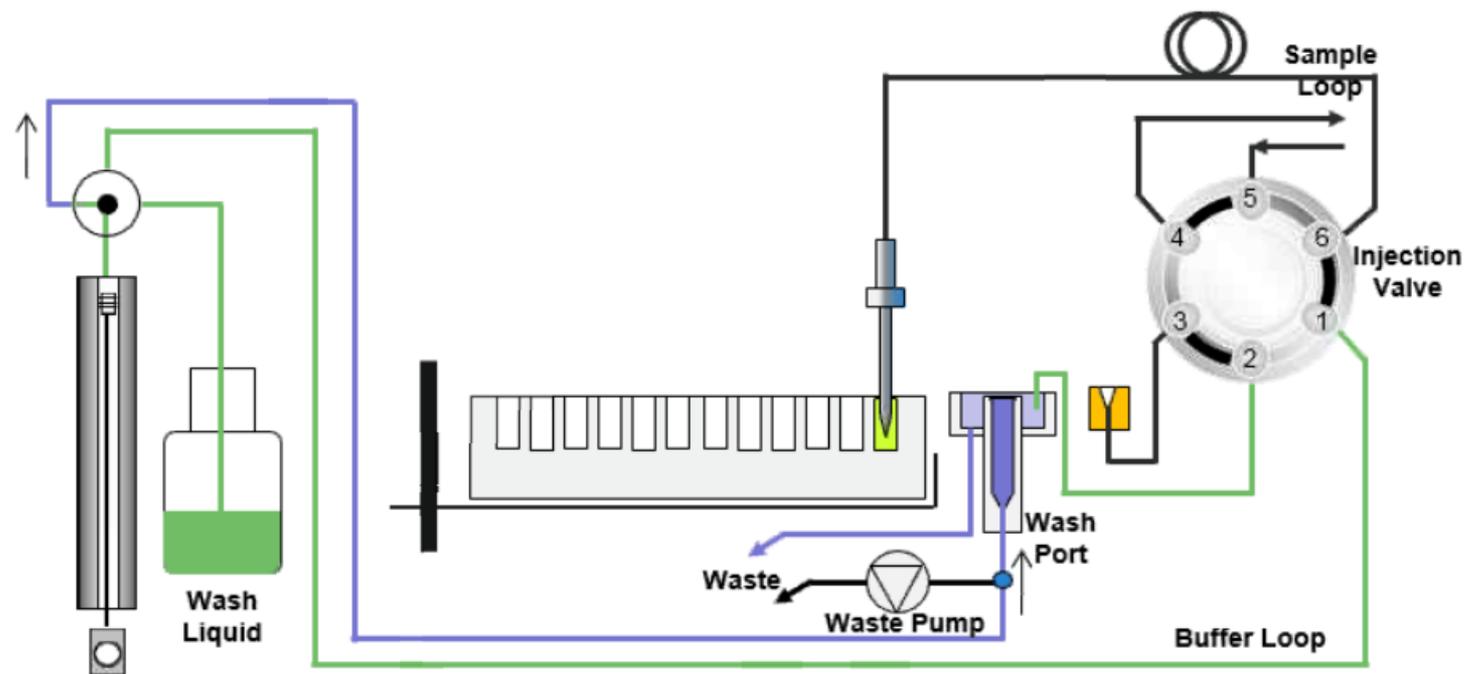
# 清洗针外壁( before injection )



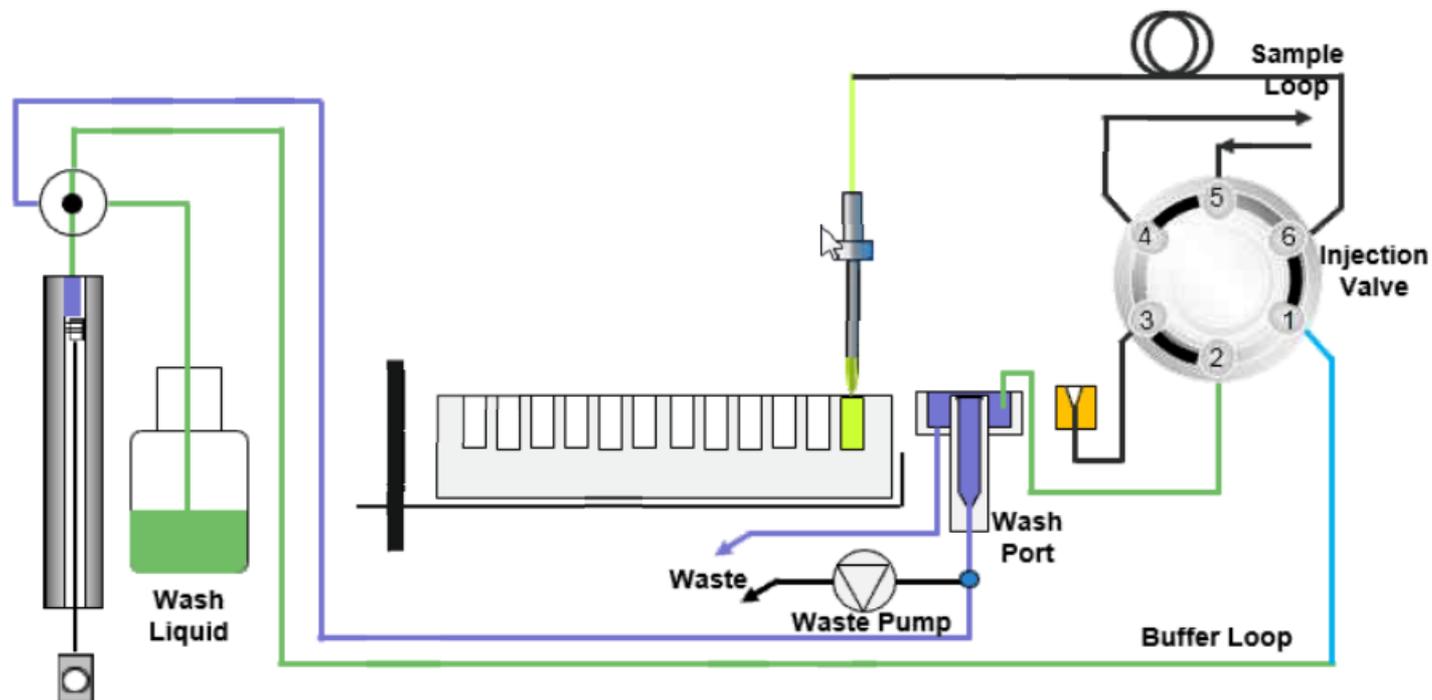
# 清洗针外壁(after injection )



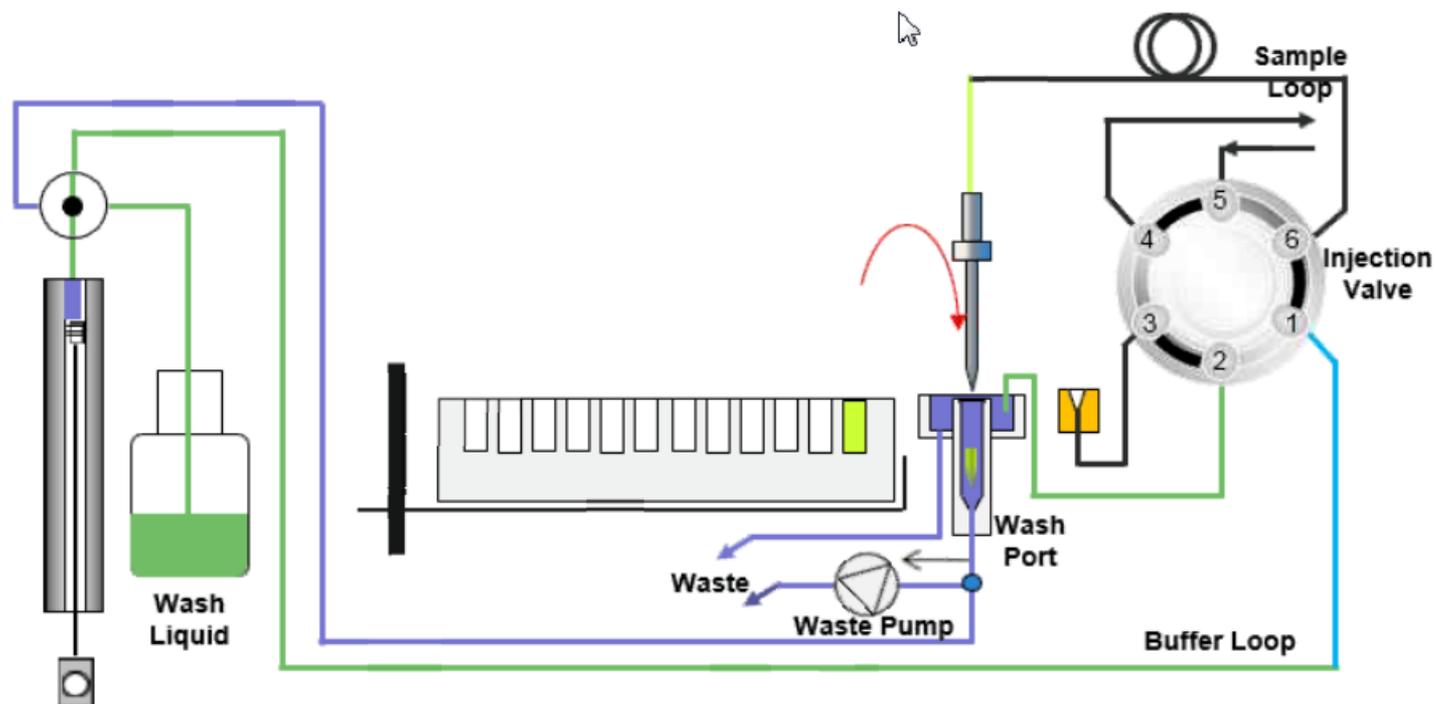
# 清洗针外壁(after injection )



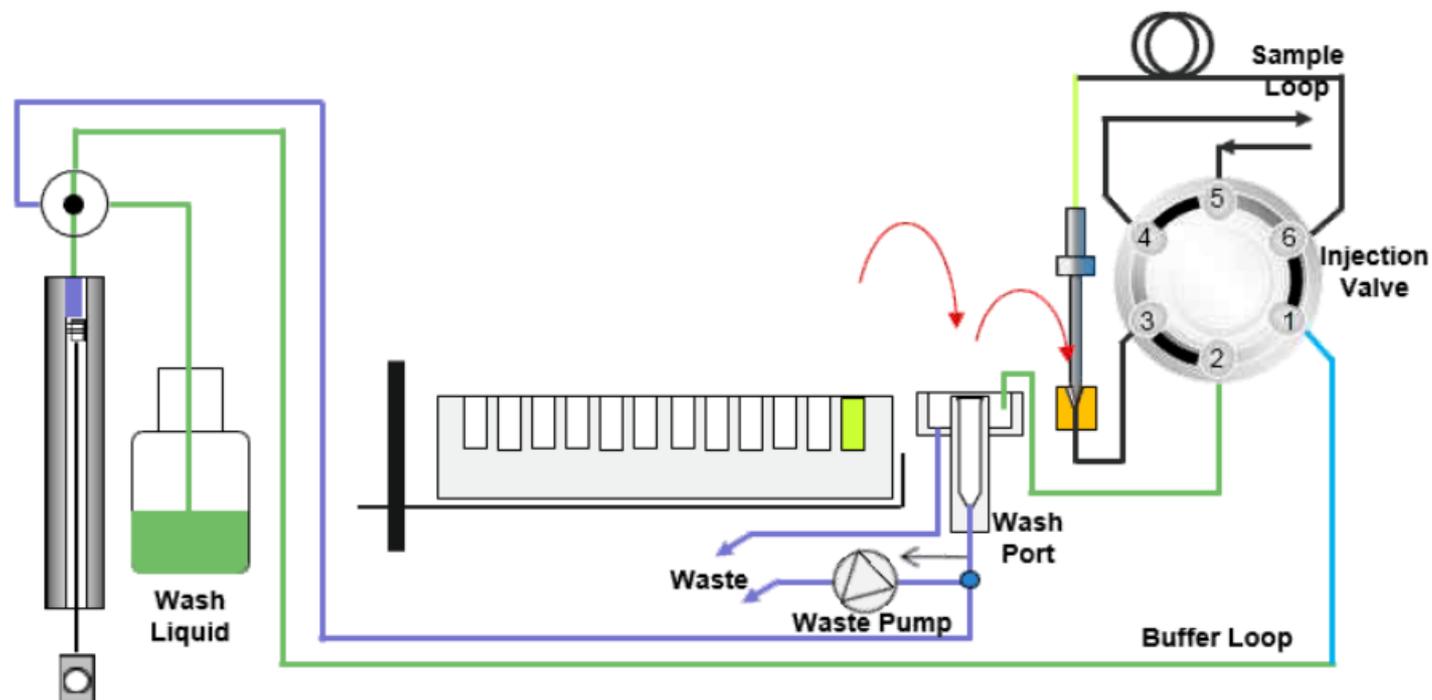
# 清洗针外壁(after injection )



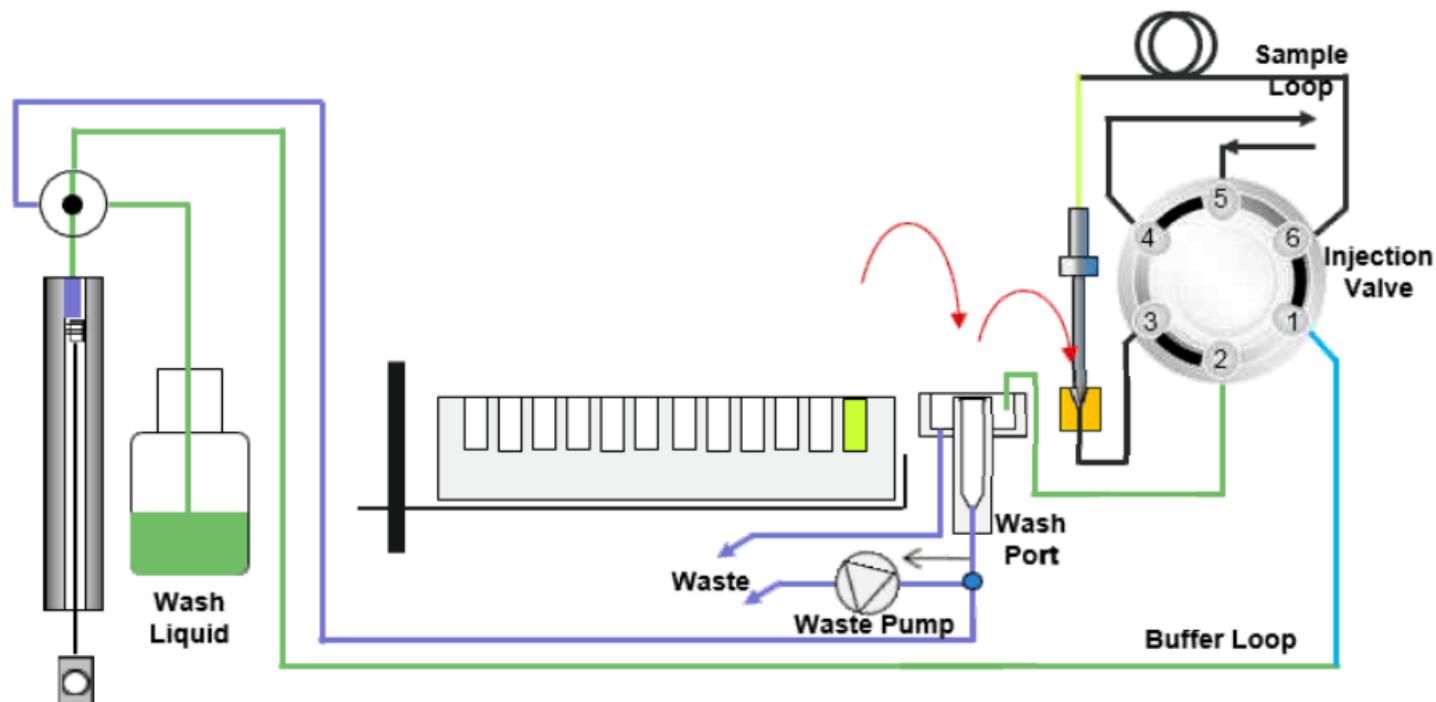
# 清洗针外壁(after injection )



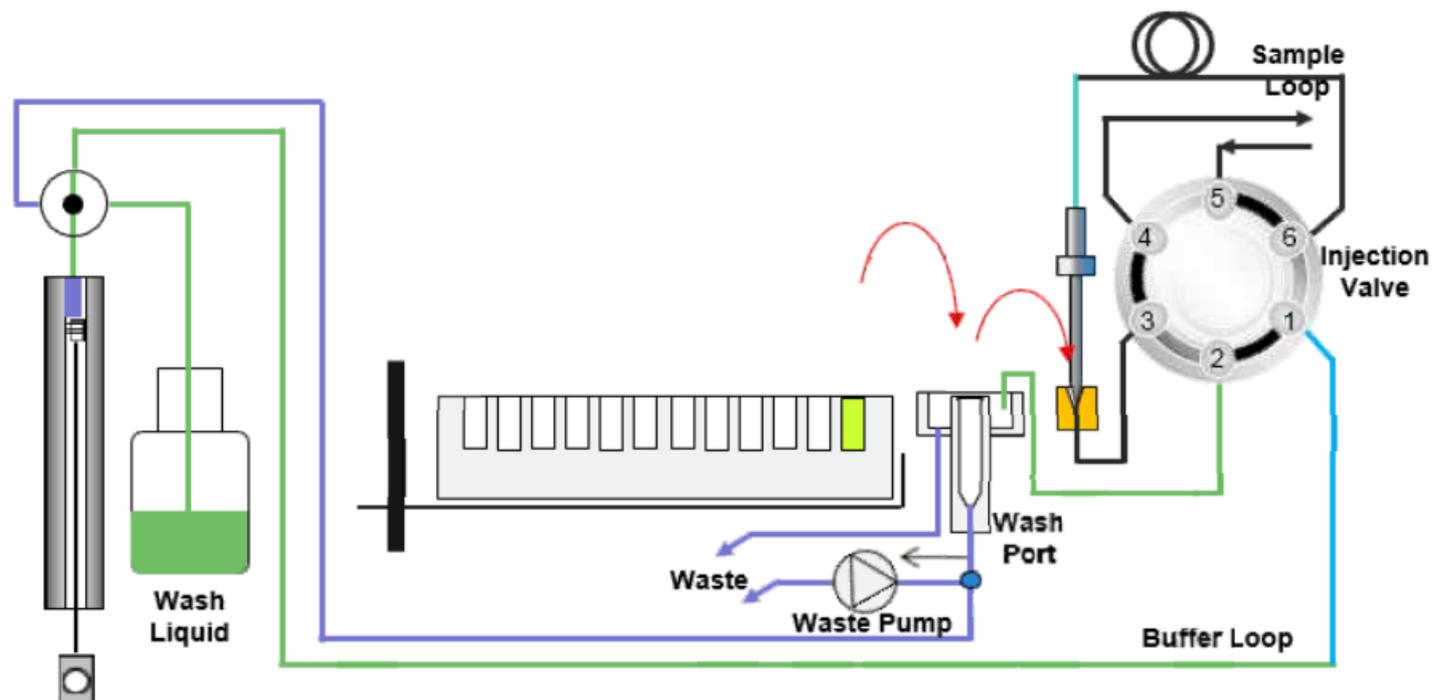
# 清洗针外壁(after injection )

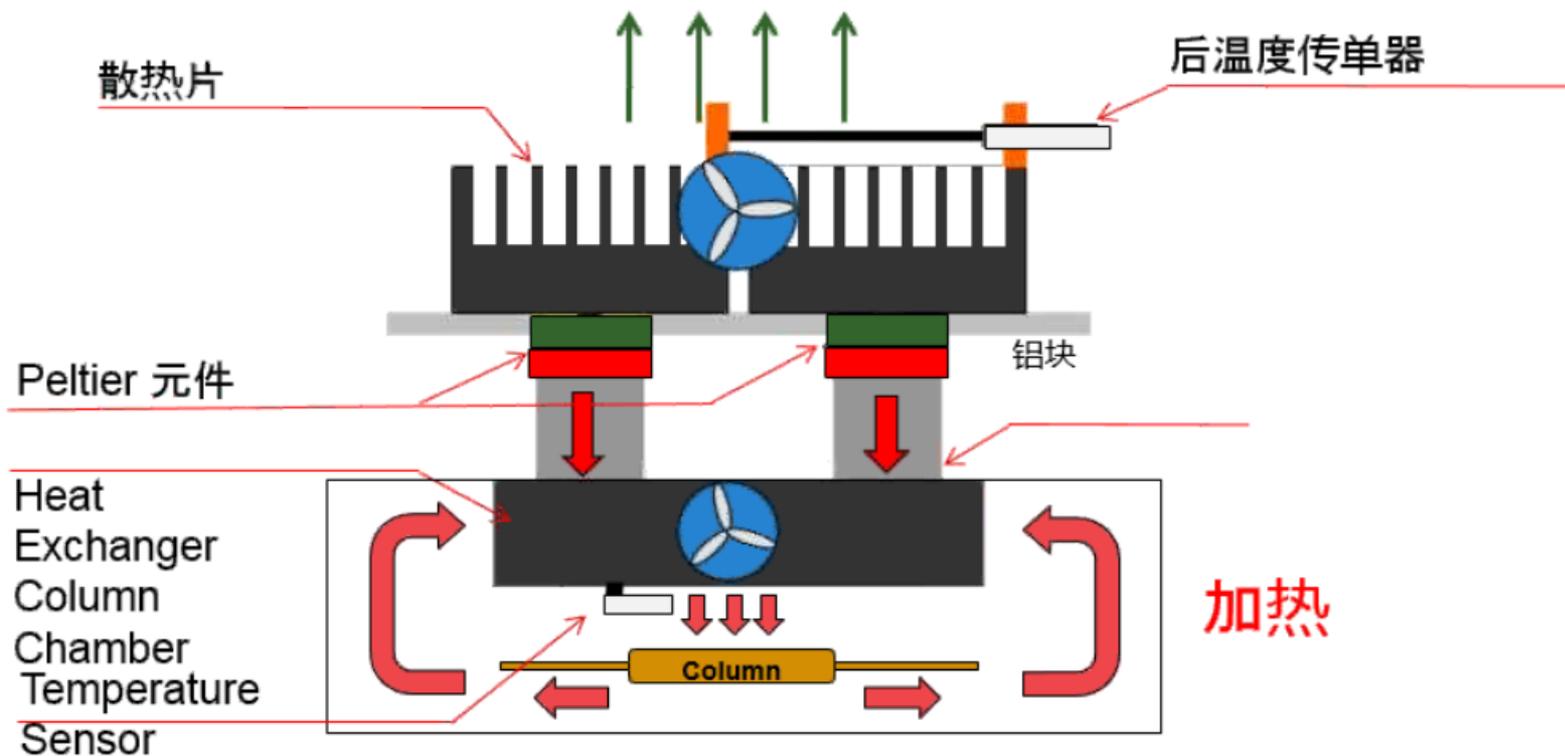


# 清洗针外壁(after injection )



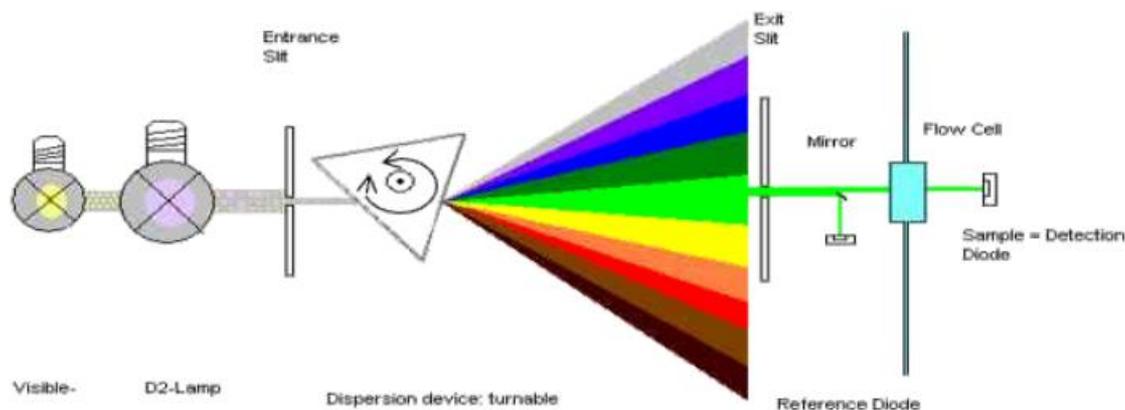
# 清洗针外壁(after injection )

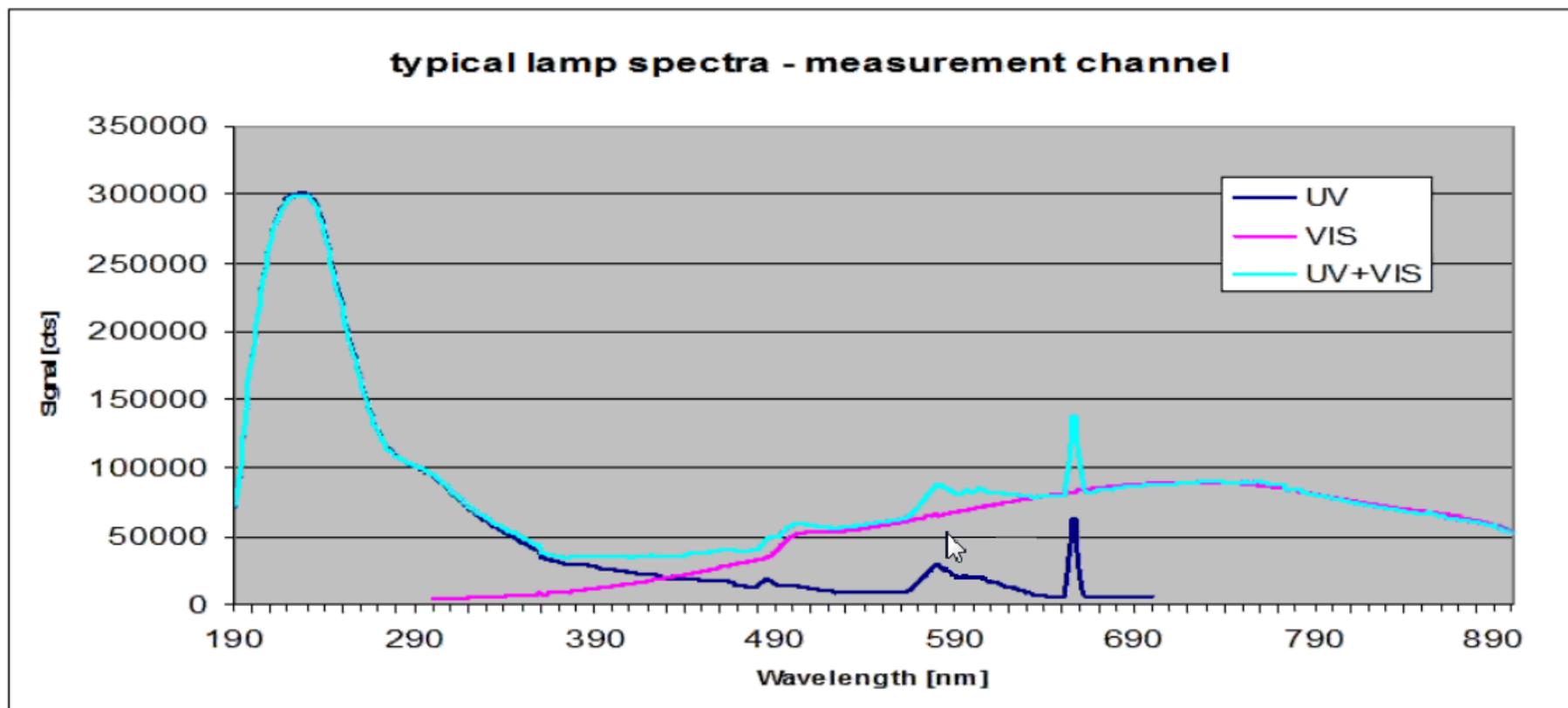




# VWD检测原理

- 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：比耳定律， $A=KCL$
- 优点：
  - 1) 对温度和流速不敏感
  - 2) 可用于梯度洗脱
  - 3) 灵敏度较高，ng级检测
- 缺点：选择性检测器，仅适用于测定有紫外吸收的物质

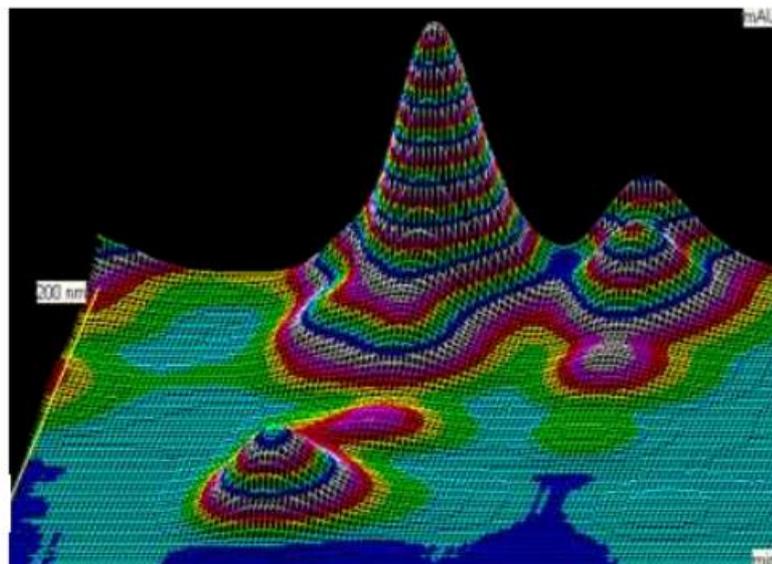
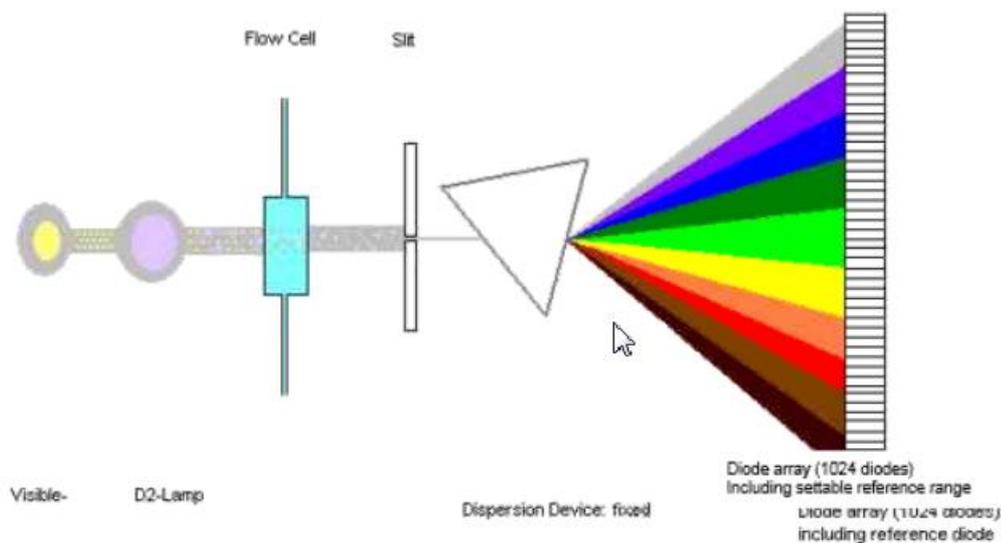




- 紫外灯：负责紫外区的波长采集（190–350nm）小于340nm 紫外灯必须开。
- 可见灯：负责可见区的波长采集（345–800nm）大于670nm可见灯必须开。
- 建议在开泵稳定5分钟以后再开紫外检测器的灯。开灯后，检测器会自动进行波长校正和能量校正。仪器若长期未使用，则检测器中可能有残留的气泡存在，这样，紫外光透过率就会降低，检测到的灯的能量也很不稳定，造成漂移和噪音值较大，自检就无法通过。

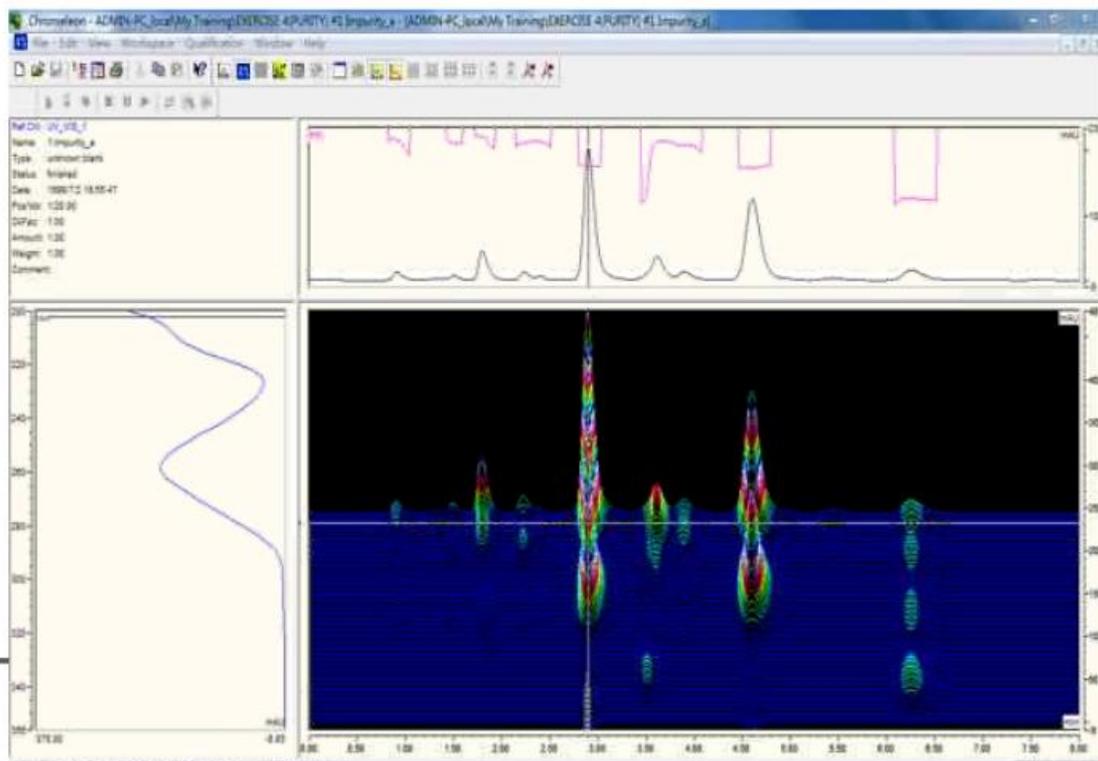
# DAD检测原理

- 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：比耳定律， $A=KCL$



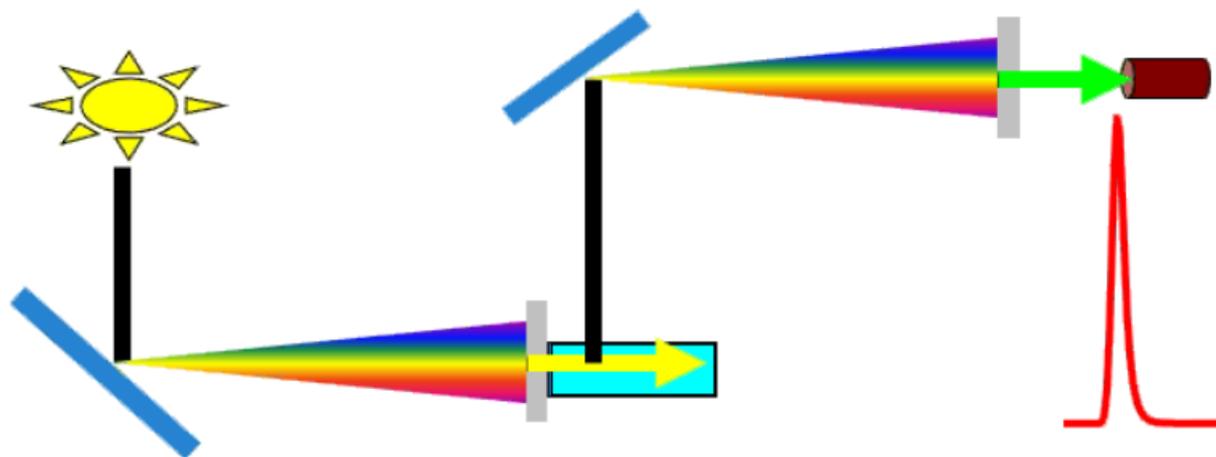
# DAD 的特点和用途

- 一种三维水平的吸光度检测器—采集三维谱图
- 兼顾紫外检测器及可见分光光度计的信息
- 在收集色谱图的同时，得到光谱图
- 提供许多有用的功能
  - 峰纯度鉴定
  - 可以发现单波长检测时未测到的峰
  - 任意波长的色谱再处理
  - 光谱信息
  - 光谱库的建立检索和拟合

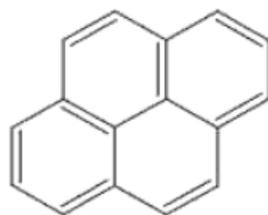


# 荧光 (Fluorescence) 检测原理

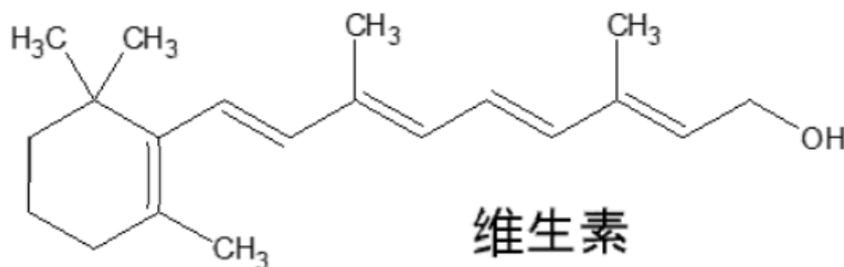
- 原理：发荧光的化合物吸收光 (UV或VIS) 使其分子达到激发态，当其返回到基态时发射光的现象即荧光
- 优点：荧光检测器灵敏度高, pg级检测
- 缺点：不是所有化合物都有荧光，必要时需要衍生



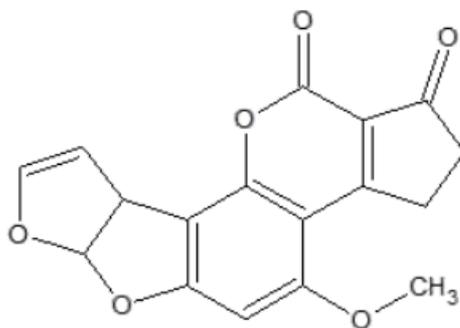
- 环境中的污染物
- 多环芳烃(PAH), 多酚, 氨基甲酸酯等
- 食品、饮料
- 食品中的毒素; 例如: 黄曲霉毒素
- 染料
- 维生素及衍生氨基酸
- 生物技术及制药



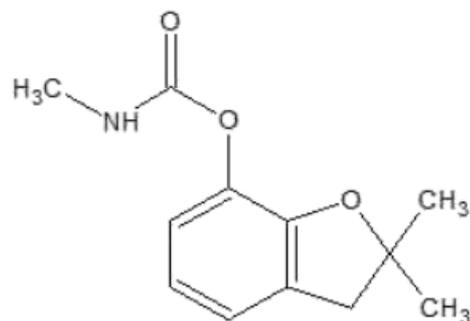
多环芳烃(PAH)



维生素



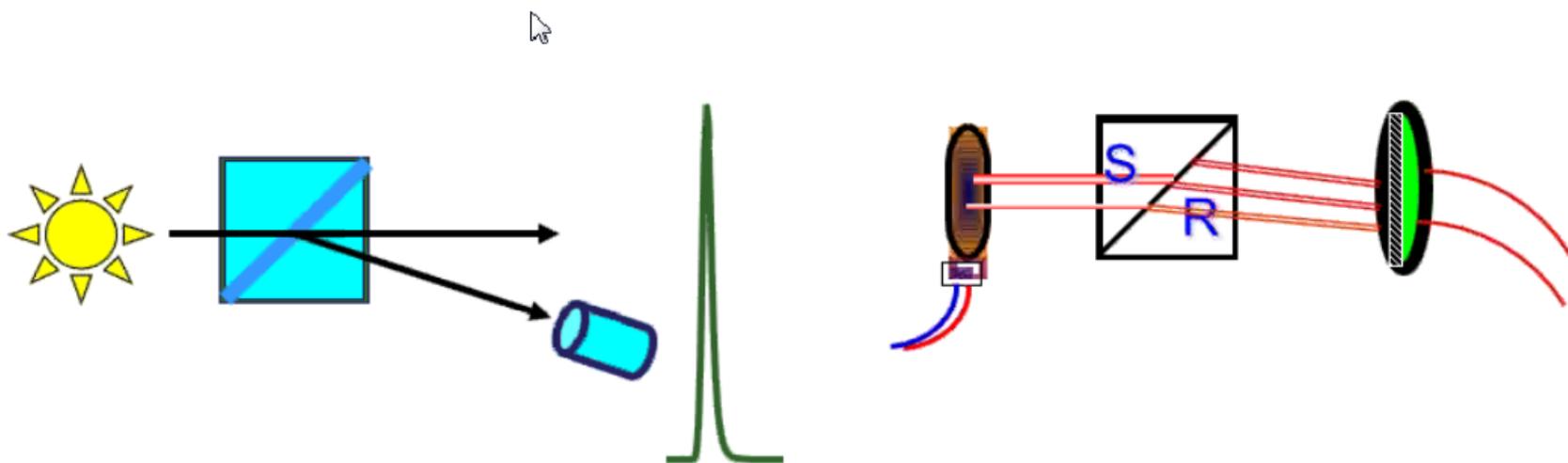
黄曲霉毒素



氨基甲酸酯类杀虫剂

# 示差折光 (Refractive Index) 检测

- 示差折光检测器 (RI) 是第一个商品化的液相色谱检测器 (上世纪六十年代末、七十年代初)
  - 通常被认为是一种通用检测器
  - 检测溶液中所有被溶解的溶质 — 非特异性
- 任何光学介质的折光率都被定义为光在该介质中与真空中的速度之比值



# 示差折光 (RI) 检测的原理

- 原理：连续测定流通池中溶液折射率来测定试样各组分浓度
- 优点：通用型检测器
- 缺点：
  - 1) 对温度变化敏感
  - 2) 不能用于梯度检测
  - 3) 灵敏度低， $\mu\text{g}$ 级检测

[返回](#)

# 示差检测器的应用

- 示差折光检测器是通用型检测器,如果选择合适的溶剂,几乎所有的物质都可以检测
- 特别适用于检测没有紫外吸收的化合物,例如糖类,醇类,酯类以及脂肪酸等
- 高分子化合物GPC,GFC分析以及复杂样品纯化