

高效液相色谱简介

原理，操作，分析

汇报人：罗邯予

日期：2018年3月9日

前言

高效液相色谱法(HPLC)是色谱法的一个重要分支，以液体为流动相，通过高压输液系统，把不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱，在柱内各成分被分离后，进入检测器进行检测，从而实现了对试样的分析。高效液相色谱已经有将近三十的发展历史，在色谱原理研究、仪器水平、离子分离分析方面有了很大的进步。



目录



1

HPLC的特点

2

几种常见的HPLC工作原理

3

岛津LC-10AT型HPLC的使用

4

LCsolution Lite 软件基本操作

高压

高效液相色谱以液体作为流动相，这种液体称为载体。由于载液流经色谱柱时，受到阻力较大，为了使载液迅速通过色谱柱，必须对载液施加高压，压力一般达15-30MPa。

高速

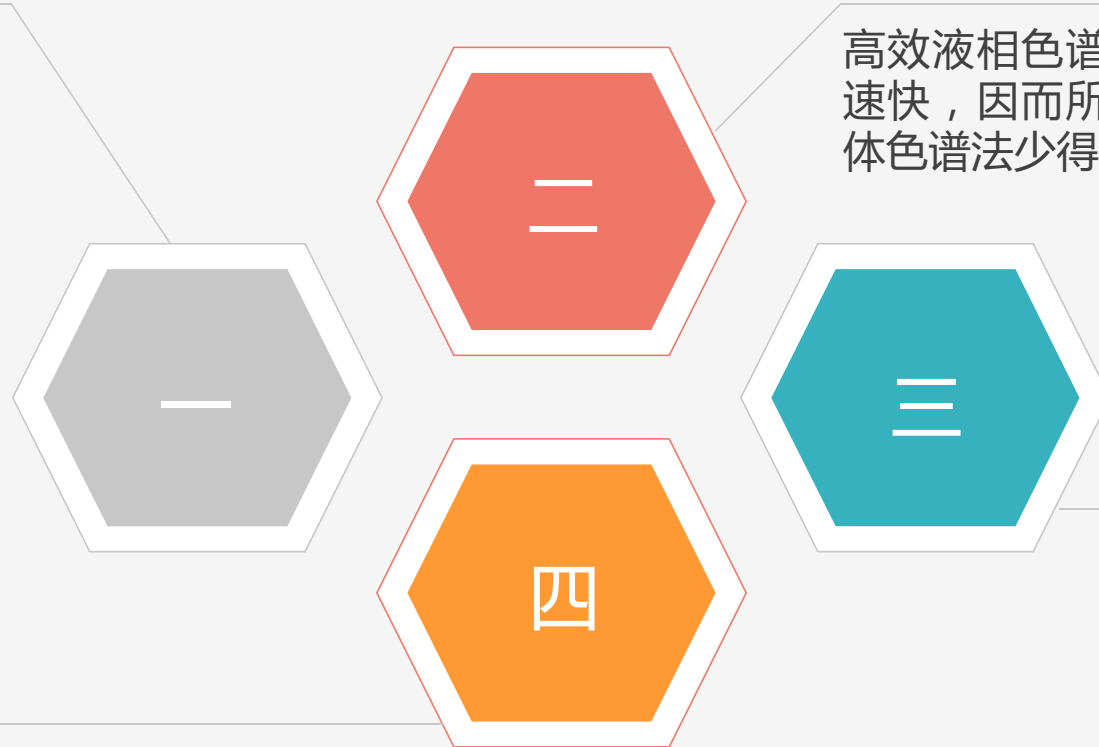
高效液相色谱由于采用了高压，载液流速快，因而所需的分析时间较之经典液体色谱法少得多。

高效

高效液相色谱法的柱效很高，一般大于3万塔板/m。

高灵敏度

由于采用高灵敏度的检测器，最小检测量可达 $10^{-9}g$ ，而所需试样量较少。



高效液相色谱法与气相色谱法异同

气相色谱法 (GC) VS 高效液相色谱法 (HPLC)

以气体为流动相的柱色谱分析技术

定义

以液体为流动相的柱色谱分析技术

都是利用物质在流动相和固定相中分配系数不同而分离的

都是根据色谱流出曲线的色谱峰位置 (保留值) 进行定性检定 ; 根据

“惰性”

气体 (氮气、氦气、氩气、氙气)

色谱峰面积或峰高进行定量测定 ; 根据色谱峰的位置及其宽度对色谱

柱分离情况进行评价

组成部分

高压输液系统、进样系统、分离系统、检测系统、记录系统

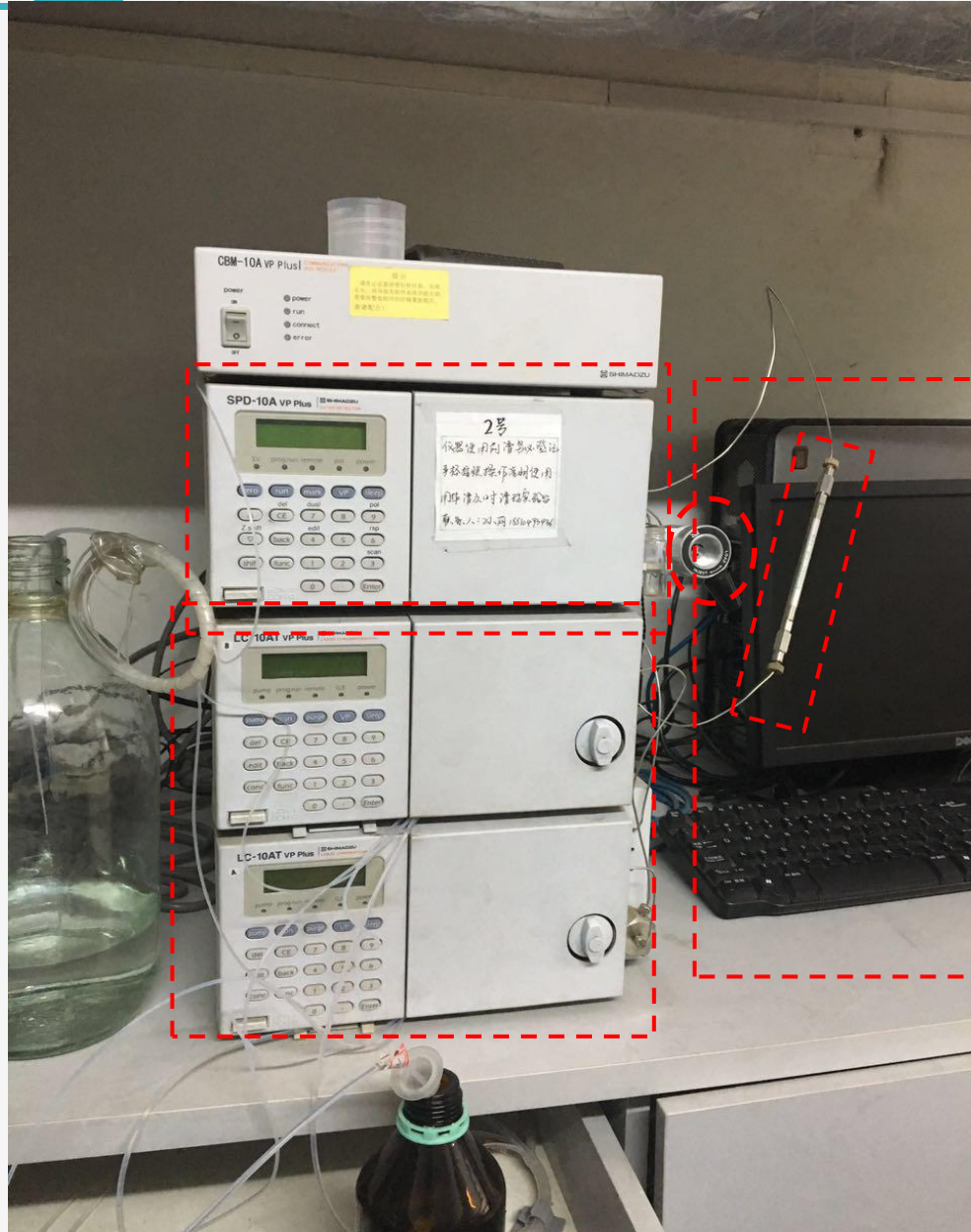
进行定量分析都可用外标法、内标法及归一化法等

沸色谱分离及色谱柱的分离效能可用塔板理论和速率理论进行解释

相对分子质量在 400 以下的物质

范围

相对分子质量大 (大于 400 以上) 的物质



色谱泵及控制器

色谱柱

检测器

进样器

数据处理及控制器

目录



1

HPLC的特点

2

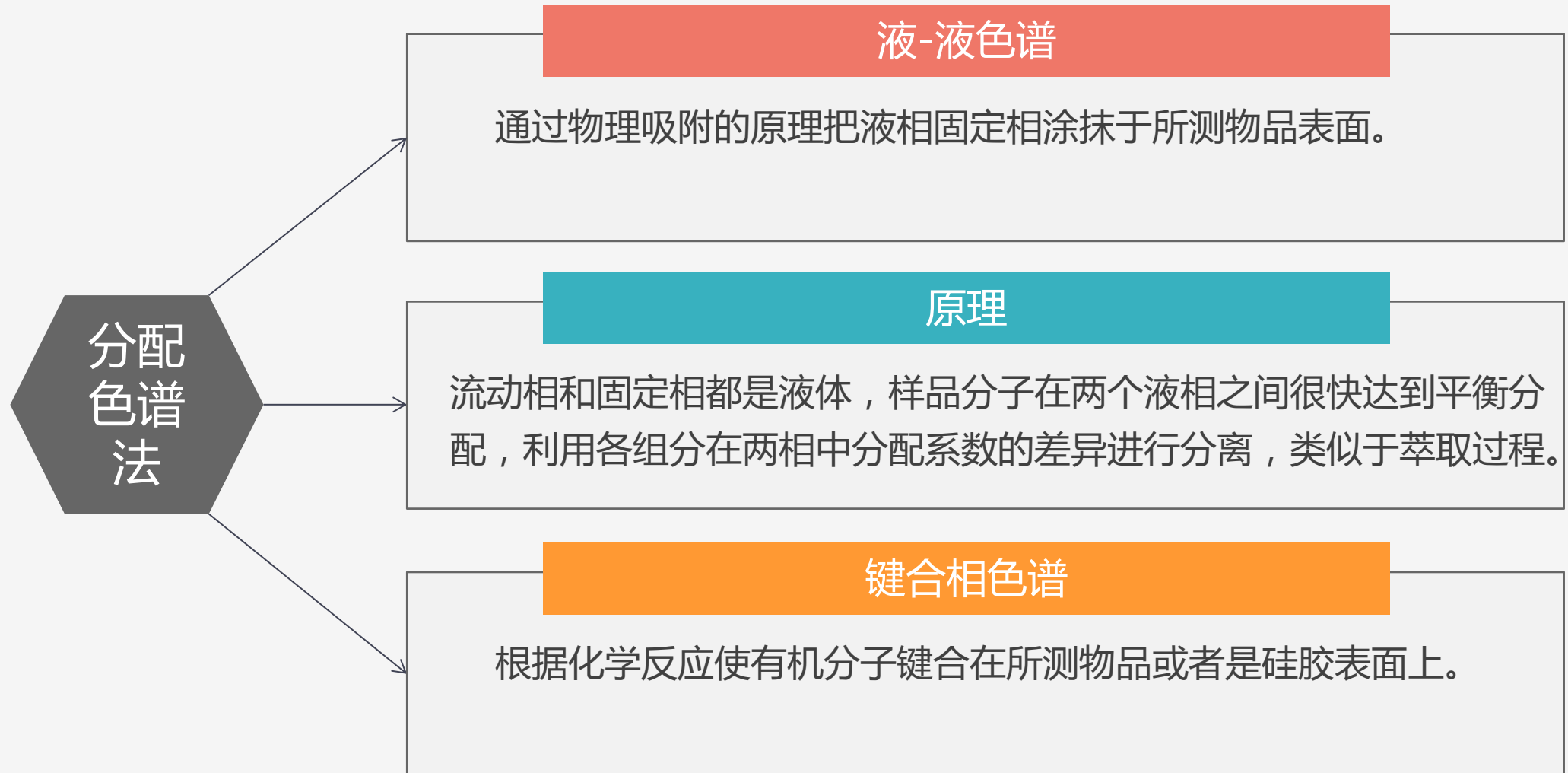
几种常见的HPLC工作原理

3

岛津LC-10AT型HPLC的使用

4

LCsolution Lite 软件基本操作



特点

操作简单，比较适用于分离一些溶解在非极性溶剂中并且具有中等相对分子质量是非离子性的物品分离，比如几何异构体。



原理

吸附色谱的工作原理是依据所测物品在固定相上的作用不同进行分离分析。

吸附色谱法的固定相为吸附剂，一般选用氧化铝、聚酰胺、硅胶等一些孔比较多的固体颗粒物。



原理

离子交换色谱通常用离子交换树脂作为固定相。一般是样品离子与固定相离子进行可逆交换，由于各组分离子的交换能力不同，从而达到色谱的分离。

应用

广泛用于氨基酸、蛋白质的分析，也适合于某些无机离子(NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 等无机阴离子和 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 等无机阳离子)的分离和分析，具有十分重要的作用。

原理

根据所测物品分子尺寸大小和形状的不同进行分离。
由于凝胶空穴的大小是与所测物品被分离分子的大小大致相吻合的，又称为尺寸排斥色谱。
如果分子太大就会被阻挡在空穴外面，被排斥在外面，而小分子就会进入空穴。

分类

采用水溶液为洗脱剂时，称为凝胶过滤色谱，其在生物界的应用比较多。
采用有机溶剂为洗脱剂时，称为凝胶渗透色谱，在高分子领域应用较多。

应用

由于凝胶色谱的分辨力很高，一般情况下不会发生变性，所以一般会被用来分离分子量比较高的化合物。

目录



1

HPLC的特点

2

几种常见的HPLC工作原理

3

岛津LC-10AT型HPLC的使用

4

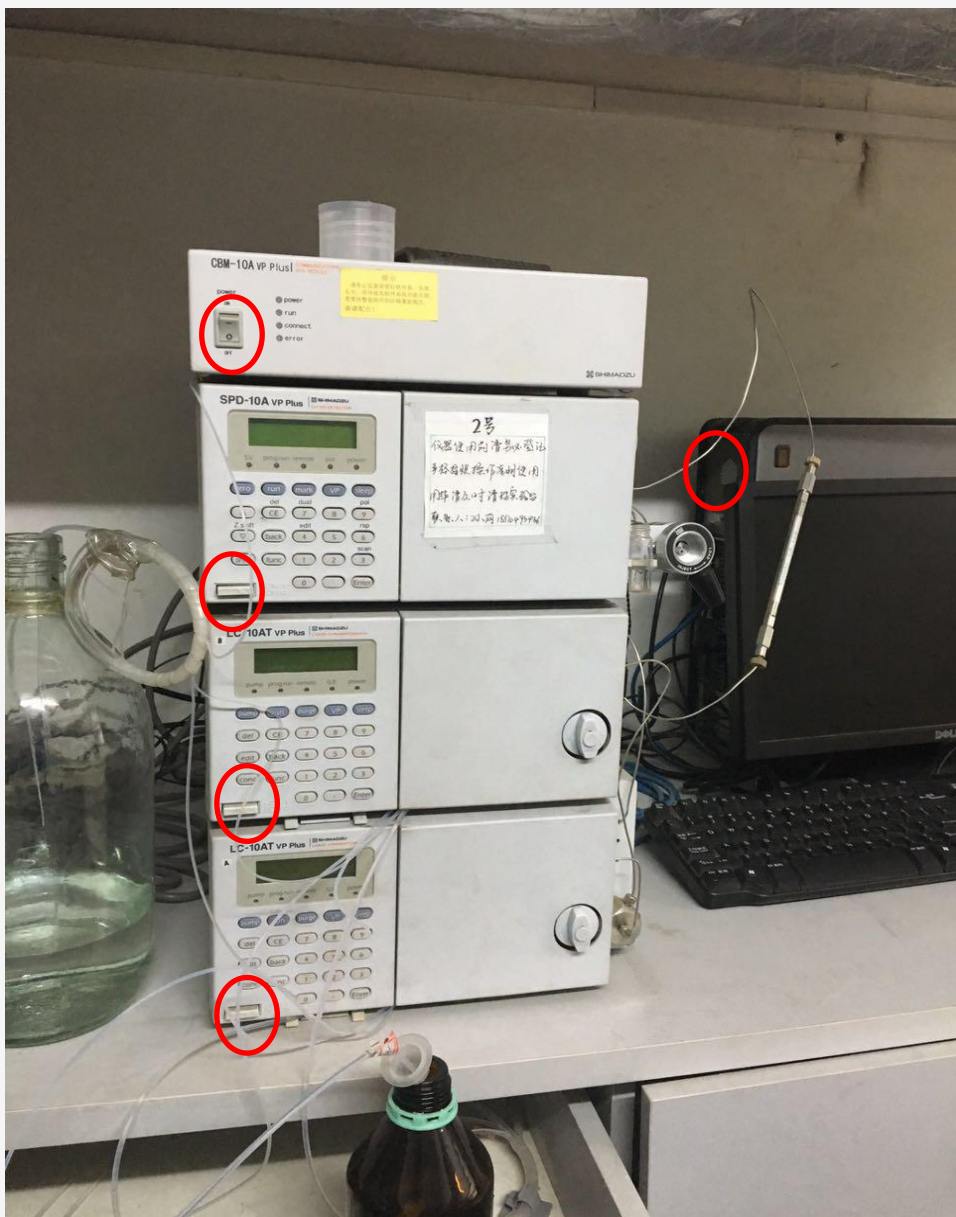
LCsolution Lite 软件基本操作

生产厂家	日本Shimatzu岛津公司
资产编号	20102704
使用范围	适合分离酸性、中性和碱性化合物， 以及药物、多肽等

器件	型号
紫外检测器	SPD-10A VP Plus
色谱柱	C18 (5*250*4.6)
液泵	LC-10AT 两个

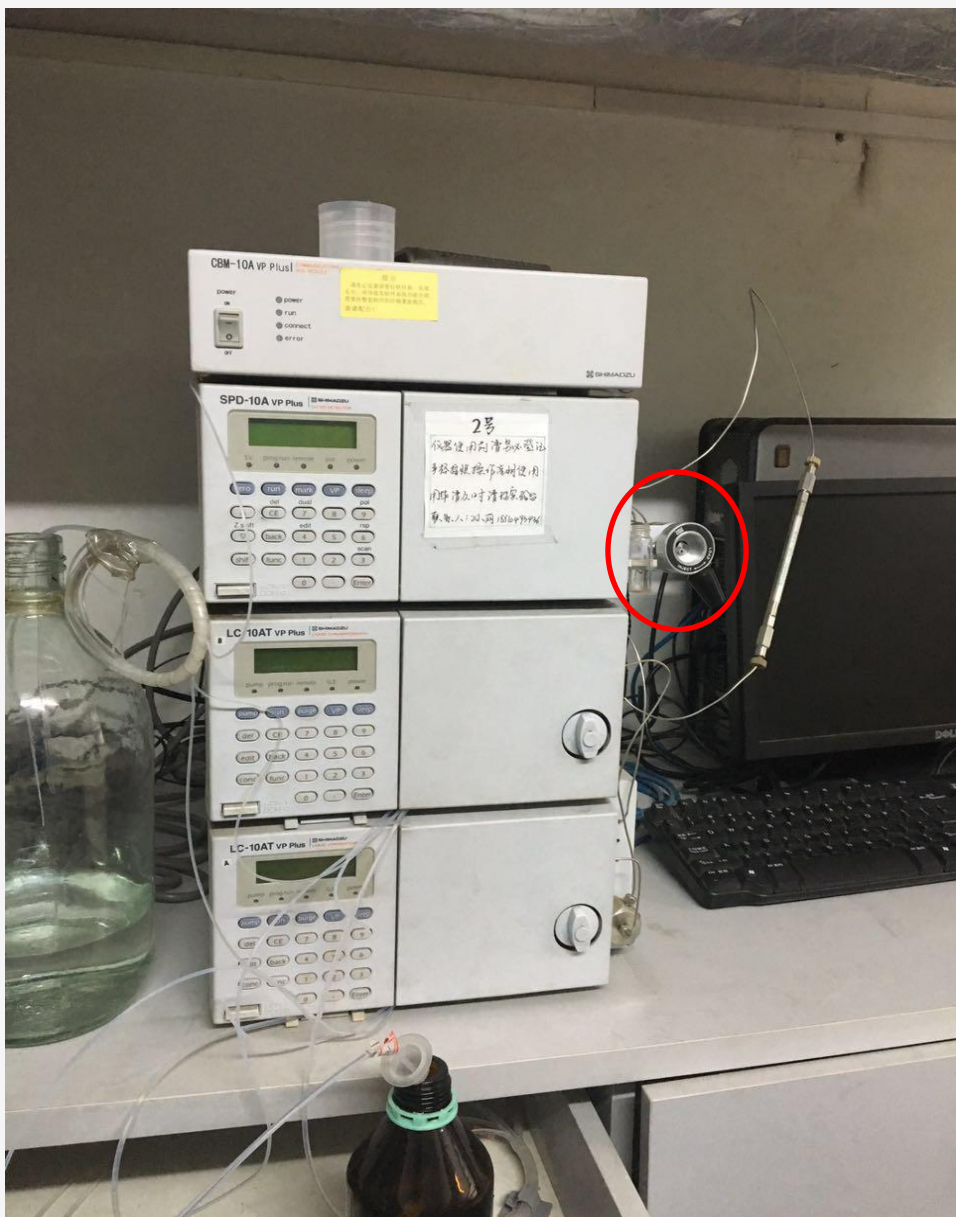
第一步：准备

- I. 使用前应根据待检样品的检验方法准备所需的流动相，用合适的 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤，超声脱气20min。
- II. 根据待检样品的需要更换合适的色谱柱（柱进出口位置应与流动相流向一致）和定量环。
- III. 配制样品和标准溶液（也可在平衡系统时配制），用合适的 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤。
- IV. 检查仪器各部件的电源线、数据线和输液管道是否连接正常。



○ 第二步：开机

- I. 接通电源，依次开启不间断电源、B泵、A泵、检测器。
- II. 对输液泵进行必要的Purge 操作，排出相应流路中的气泡，使新鲜溶剂在流路中得以置换；检查输液泵在动作前的压力显示值，必要时对此压力值进行调零。
- III. 待泵和检测器自检结束后，打开电脑显示器、主机。启动LCsolution工作站。
- IV. 设置分析参数，设置LC参数。



- **第三步：进样、采集运行**
用试样溶液清洗注射器，并排除气泡后抽取适量。
- **第四步：清洗系统和关机**
 - I. 数据采集完毕后，关闭检测器，继续以工作流动相冲洗10min后，换水冲洗。
 - II. 清洗进样阀。
 - III. 清洗柱。先用超纯水以1ml/min冲洗40min以上，再用甲醇或乙腈冲洗20min。
 - IV. 清洗完成后，先将流速降到0，再依次关闭泵、脱气机、UPS，断开电源。
- **第五步：填写使用记录本**

目录

1

HPLC的特点

2

几种常见的HPLC工作原理


3

岛津LC-10AT型HPLC的使用

4

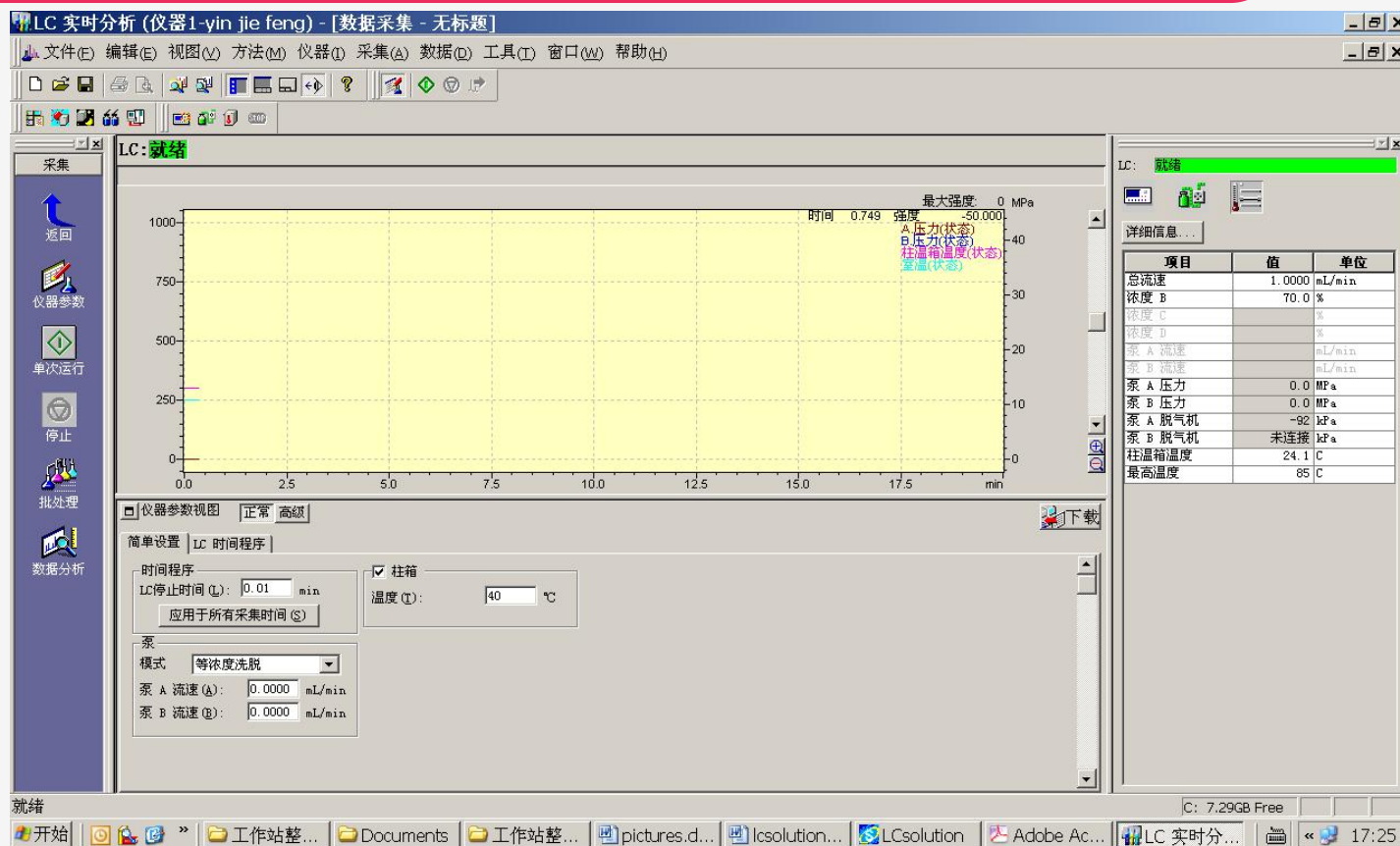
LCsolution Lite 软件基本操作



- I. 打开 PC 电源、待正常进入 Windows 操作系统。
- II. 双击桌面上  图标，此后会弹出以下窗口。



- I. 单击 LC 所对应的分析图标
- II. 听见 LC 发出“哔”的声音，表示工作站与 LC 联机正常。



仪器参数设定

打开一个已建立的方法

自行填入分析参数

**设定完方法后点击下载
传送参数**

LC: 就绪

LC 运行时间: 22:68 / 50:00 min 检测器 A 通道 1 (254nm) 0.0 V

检测器 A 通道 1: 254nm (1.00) 时间 34.169 强度 -40.893 最大强度: 1

仪器参数视图 正常 高级

简单设置 LC 时间程序

时间程序
LC 停止时间 (L): 0.01 min
应用于所有采集时间 (S)

泵
模式 等浓度洗脱

泵 A 流速 (A): 0.000 mL/min
泵 B 流速 (B): 0.000 mL/min

检测器 A
波长通道 1 (L): 254 nm
波长通道 2 (Q): 254 nm
结束时间 (E): 60.00 min

柱箱
温度 (T): 40 °C

下载

项目	值	单位
总流速	1.200	mL/min
浓度 B	5.0	%
浓度 C		%
浓度 D		%
泵 A 流速		mL/min
泵 B 流速		mL/min
泵 A 压力	0.0	MPa
泵 B 压力	0.0	MPa
柱温箱温度	17.7	C
最高温度	85.0	C
波长通道 1	254	nm
波长通道 2		nm

就绪

C: 7.29GB Free

开始 LCsolution LC 实时分析 (仪... 工作站整理资料 pictures.doc - M... lcsolution Lite软...

9:52

仪器参数设定

LC 实时分析 (仪器1-yin jie feng) - [数据采集 - 无标题]

文件(E) 编辑(E) 视图(V) 方法(M) 仪器(I) 采集(A) 数据(D) 工具(T) 窗口(W) 帮助(H)

LC: 就绪

LC 运行时间: 24.28 / 60.00 min 检测器 A 通道1 (254nm): 0mV

检测器 A 通道1: 254nm(1.00)

最大强度: 1

时间 39.174 强度 2,404.264

仪器参数视图 正常 高级

简单设置 LC 时间程序

时间程序

LC 停止时间 (L): 0.01 min

应用于所有采集时间 (S)

泵

模式 等浓度洗脱

泵 A 流速 (A): 0.000 mL/min

泵 B 流速 (B): 0.000 mL/min

检测器 A

波长通道1 (1): 254 nm

波长通道2 (2): 254 nm

结束时间 (E): 60.00 min

柱箱

温度 (T): 40 °C

项目	值	单位
总流速	1.200	mL/min
浓度 B	5.0	%
浓度 C		%
浓度 D		%
泵 A 流速		mL/min
泵 B 流速		mL/min
泵 A 压力	0.0	MPa
泵 B 压力	0.0	MPa
柱温箱温度	17.8	C
最高温度	85.0	C
波长通道1	254	nm
波长通道2		nm

就绪

C: 7.29GB Free

开始 LCsolution LC 实时分析 (仪... 工作站整理资料 pictures.doc - M... lcsolution Lite软... 9:53

仪器参数设定

LC: 就绪

LC 运行时间: 11.75 / 30.00 min 检测器 A 通道1 (254nm): 0mV

最大强度: 2

时间: 23.399 强度: 4.060

检测器 A 通道1: 254nm (1.00)

检测器调零按钮

项目	值	单位
总流速	1.000	mL/min
浓度 B	20.0	%
浓度 C		%
浓度 D		%
泵 A 流速		mL/min
泵 B 流速		mL/min
泵 A 压力	0.0	MPa
泵 B 压力	0.0	MPa
柱温箱温度	18.6	C
最高温度	85.0	C
波长通道1	254	nm
波长通道2		nm

简单设置 | LC 时间程序

时间程序
LC 停止时间 (L): 0.01 min
应用于所有采集时间 (S)

泵
模式: 二元高压梯度
总流速 (T): 1.000 mL/min
泵 B 浓度 (B): 20.0 %

检测器 A
波长通道1 (1): 272 nm
波长通道2 (2): 254 nm
结束时间 (E): 30.00 min

柱箱
温度 (T): 40 °C

- I. 系统开始运行，检查各单元参数应与方法设定一致。等待系统平衡。
- II. 观察检测器输出信号变化,如果输出信号稳定不变，即认为接近平衡，可以调零等待，确认系统平衡后，准备进样分析。

就绪

C: 7.29GB Free

开始 | LCsolution | 工作站整理资料 | pictures.doc - ... | lcsolution Lite... | LC 再解析 (yin... | LC 实时分析 (... | 10:37

LC 实时分析 (仪器1-yin jie feng) - [数据采集 - test.lcm]

文件(E) 编辑(E) 视图(V) 方法(M) 仪器(I) 采集(A) 数据(D) 工具(T) 窗口(W) 帮助(H)

采集

返回

仪器参数

单次运行

停止

批处理

数据分析

LC:就绪

LC 运行时间: 14.71 / 30.00 min 检测器 A 通道1 (254nm): 0mV

单次运行

采集信息

样品名 (S):

样品 ID (I):

选择 (C)...

方法文件 (M): C:\LabSolutions\LC\software\sample\test.lcm

数据文件 (D):

自动进样 (A):

前置文件 (P):

数据路径 (L):

进样器

样品架 (S):

样品瓶 (B):

进样体积 (V):

高级 (A) >> 确定 取消 帮助

简单设置 LC 时间程序

时间程序

LC 停止时间 (T): 0.01

应用于所有采集时间 (S)

泵

模式 二元高压梯度

总流速 (F): 1.000 mL/min

泵 B 浓度 (C): 20.0 %

温度 (T): 40 °C

详细...

项目	值	单位
总流速	1.000	mL/min
浓度 B	20.0	%
浓度 C		%
浓度 D		%
泵 A 流速		mL/min
泵 B 流速		mL/min
泵 A 压力	0.0	MPa
泵 B 压力	0.0	MPa
柱温箱温度	18.7	C
最高温度	85.0	C
波长通道1	254	nm
波长通道2		nm

时间 10.442 强度 3.918

最大强度: 2

下载

就绪

C: 7.29GB Free

开始

LCsolution

工作站整理资料

pictures.doc - ...

lcsolution Lite...

LC 再解析 (yin ...

LC 实时分析 (...

10:40

I. 编辑样品参数：样品名，样品批号，选择方法文件，数据命名，样品瓶号，样品架号，进样量等。

II. 点击确定后，开始进样操作。

进样分析

LC 实时分析 (仪器1-yin jie feng) - [数据采集 - test.lcm(只读), test001.lcd]

文件(E) 编辑(E) 视图(V) 方法(M) 仪器(I) 采集(A) 数据(D) 工具(T) 窗口(W) 帮助(H)

采集

LC: 正在运行

LC 运行时间: 4.25 / 30.00 min 检测器 A 通道1 (272nm): -1mV

最大强度: 1,140
时间 7.828 强度 1,837.222

每个样到时间即自动结束。
根据方法中的积分参数，
所有色谱数据会自动进行
积分处理。

详细...

项目	值	单位
总流速	1.000	mL/min
浓度 B	20.0	%
浓度 C		%
浓度 D		%
泵 A 流速		mL/min
泵 B 流速		mL/min
泵 A 压力	0.0	MPa
泵 B 压力	0.0	MPa
柱温箱温度	18.8	C
最高温度	65.0	C
波长通道1	272	nm
波长通道2		nm

仪器参数视图 正常 高级

简单设置 LC 时间程序

时间程序
LC 停止时间 (L): 0.01 min
应用于所有采集时间 (S)

泵
模式 二元高压梯度

检测器 A
波长通道1 (1): 272 nm
波长通道2 (2): 254 nm
结束时间 (E): 30.00 min

就绪

C: 7.29GB Free

开始 LCsolution 工作站整理资料 pictures.doc - ... lcsolution Lite... LC 再解析 (yin ... LC 实时分析 (... 10:46



单击再解析，打开样品的图谱。

数据结果处理

The screenshot displays the LC software interface with the following components:

- Top Bar:** Window title "LC 再解析 (yin jie feng) - [LC 数据分析 - Demo_Data-001.lcd]".
- Menu Bar:** 文件(F), 表编辑(E), 视图(V), 方法(M), 布局(O), 工具(T), 窗口(W), 帮助(H).
- Toolbar:** Includes icons for file operations and a dropdown menu set to "Detector A".
- Left Panel (LC 数据):** A file list under "项目: ... \LCsolution\Sample" with files like "Background.lcd" and "Demo_Data-001.lcd". A "向导" (Wizard) icon is circled in red.
- Main View (色谱图视图):** Shows a chromatogram plot with a peak at 1.625 minutes. A "化合物表向导 1/5" (Compound Table Wizard) dialog box is open, with the "下一步(N) >" button circled in red. The dialog includes fields for "通道" (Detector A - Ch1 (25nm)), "分辨率" (5), "速率" (5000), "延迟" (0), "T. 25L" (0), and "最小峰面积/高度" (5000).
- Right Panel:** Metadata including [方法文件] Demo_Method.lcm, [样品名] STD, [样品 ID] 1, [采集者] SHIMADZU, [采集日期] 2003-1-16 21:26:02, [样品类型] 标准, [级别#] 1, and [描述] LCsolution Demo Data.
- Bottom Panel:** A "校准曲线视图" (Calibration Curve View) showing a graph of intensity vs. area.
- Taskbar:** Shows the Windows taskbar with the system clock at 23:30 and several open applications including "LC 再解析...".

The screenshot displays the LC software interface with a chromatogram and a peak selection table. A red arrow points to the table, and a red box highlights a text instruction.

化合物表向导 2/5

选择	保留时间	面积
<input checked="" type="checkbox"/>	2.838	74802.8
<input type="checkbox"/>	3.218	85234.8
<input type="checkbox"/>	3.808	84141.2
<input type="checkbox"/>	4.819	87983.9

选择要定量的峰后,记录面积值即可。

最大强度: 16,087
时间: 4.115 保留: 2.827

最大强度: 16,087
时间: 0.878 保留: 20.366

最大强度: 16,087

Detector A - Ch1 (254nm)

最大强度: 16,087

时间: 0.00 保留: 0.001

类型: 通道: 保留时间: 精度:

名称: Detector A - 0.001

参数/结果/组参数/组

23:38

高效液相色谱简介

汇报完毕 感谢观看

汇报人：罗邯予

日期：2018年3月9日