

# 岛津液相色谱

岛津国际贸易（上海）有限公司

分析仪器事业部 分析中心

潘峰云

# 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

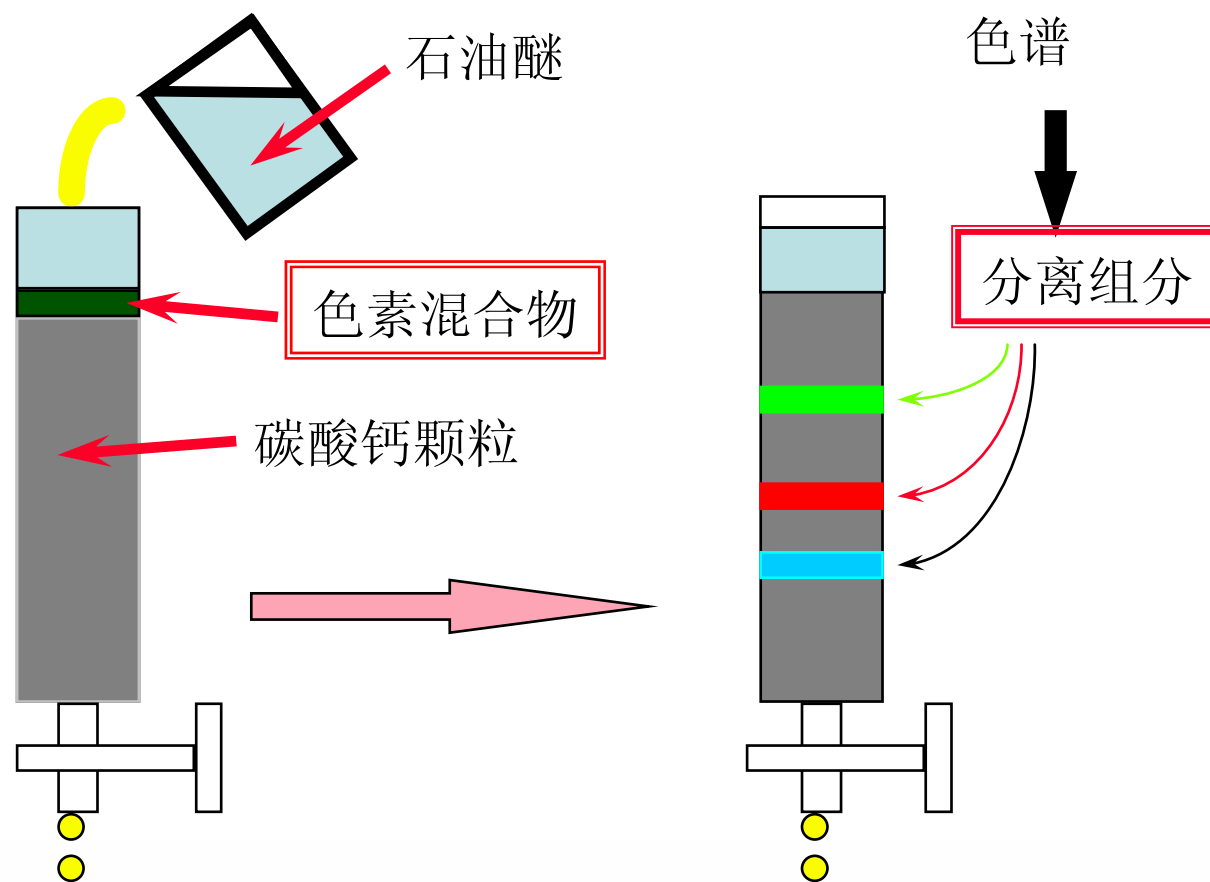
---



# 第一部分

## 色谱基础知识

# 色谱起源

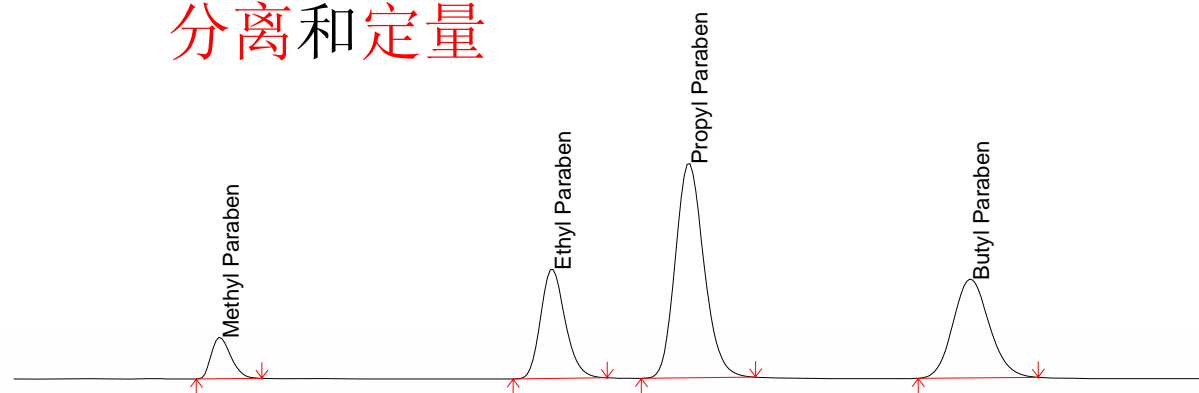


# 色谱定义

- ❖ 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)

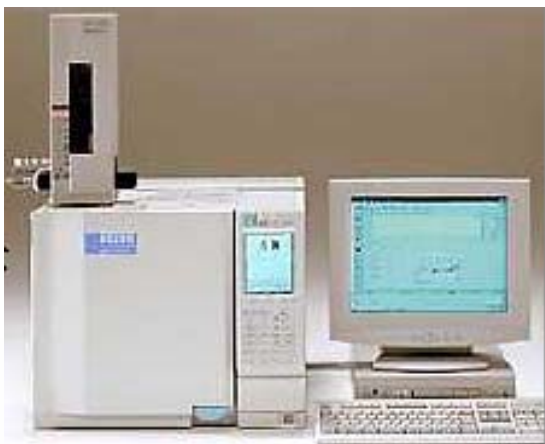
❖ 毛细管电泳

Capillary Electrophoresis (CE)



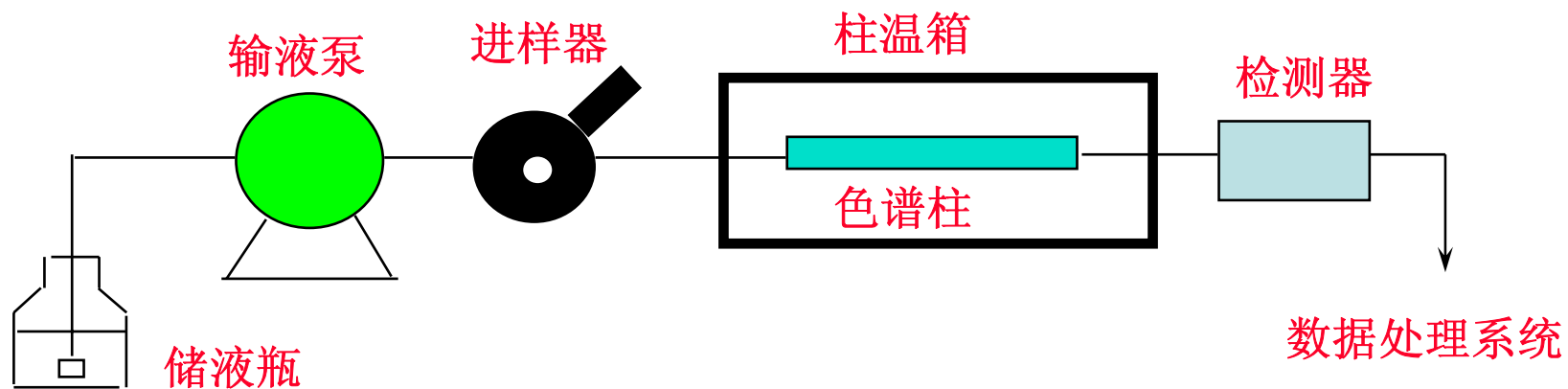
# HPLC vs GC

- ❖ 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  $\mu$ L)

# HPLC分类

---

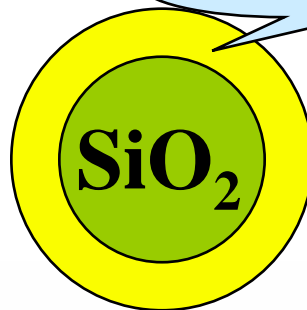
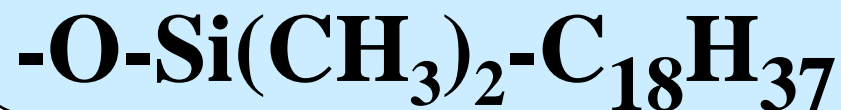
- ❖ 反相色谱 (reversed phase chromatography)
- ❖ 离子对色谱 (ion-pair chromatography)
- ❖ 正相色谱 (normal phase chromatography)
- ❖ 离子交换色谱 (ion exchange chromatography)
- ❖ 尺寸排阻色谱 (GPC / GFC)

# 反相色谱

——流动相的极性大于固定相的极性

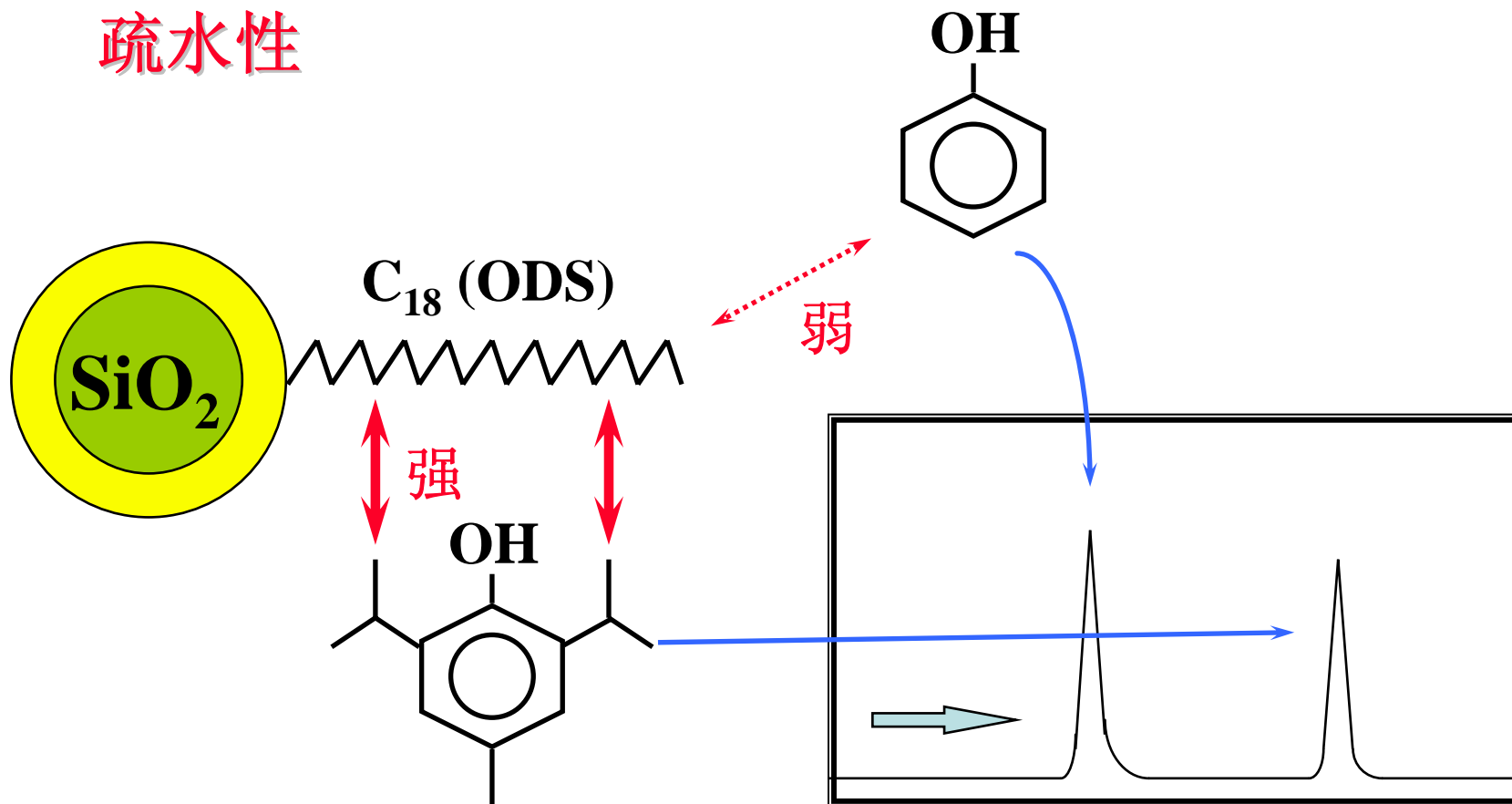
- ❖ C<sub>18</sub> (ODS)
- ❖ C<sub>8</sub> (octyl)
- ❖ C<sub>4</sub> (butyl)
- ❖ 苯基
- ❖ TMS
- ❖ 氰基

非极性



# 相互作用力是什么？

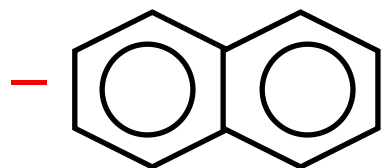
疏水性



# 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

-  $\text{COOH}$  : 羧基

-  $\text{NH}_2$  : 氨基

-  $\text{OH}$  : 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

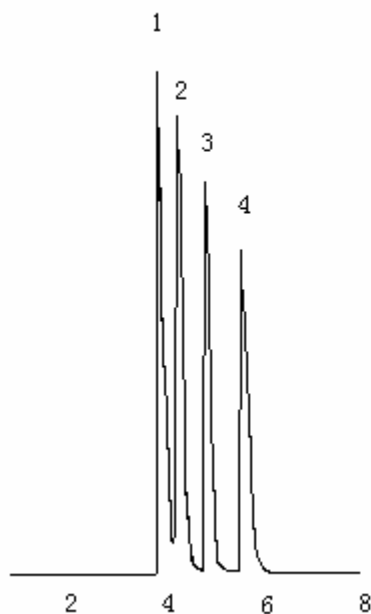
甲醇，乙腈和 THF 是常用的有机溶剂。

- ❖ 在有缓冲液的情况下，缓冲液的浓度和pH值非常重要。

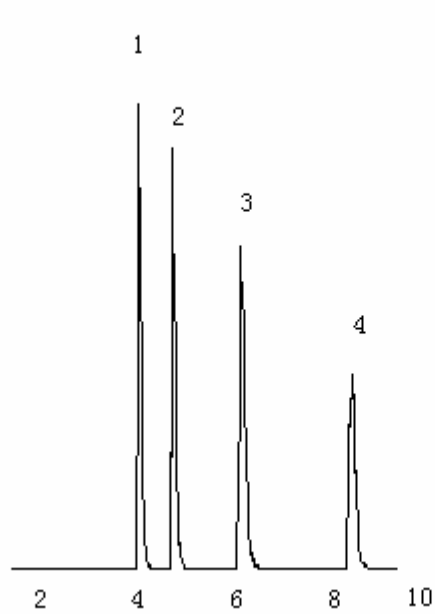


# 流动相极性变化对分离的影响

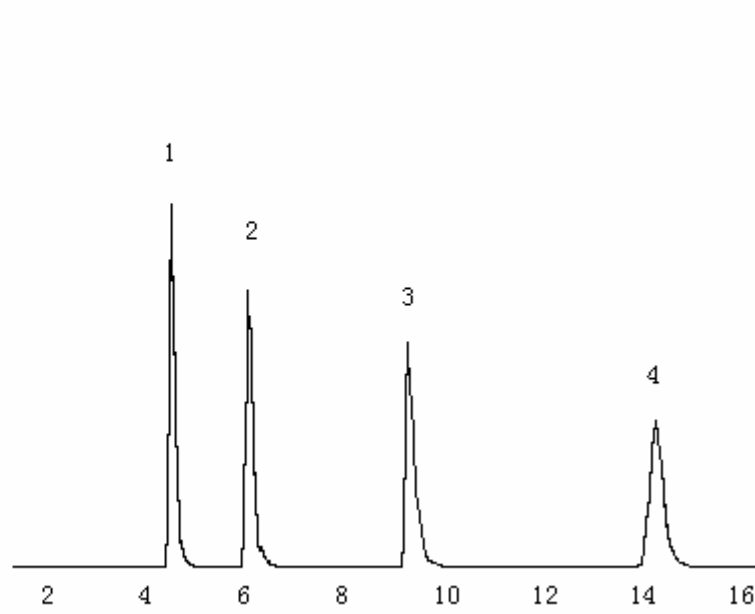
20% 水



30% 水



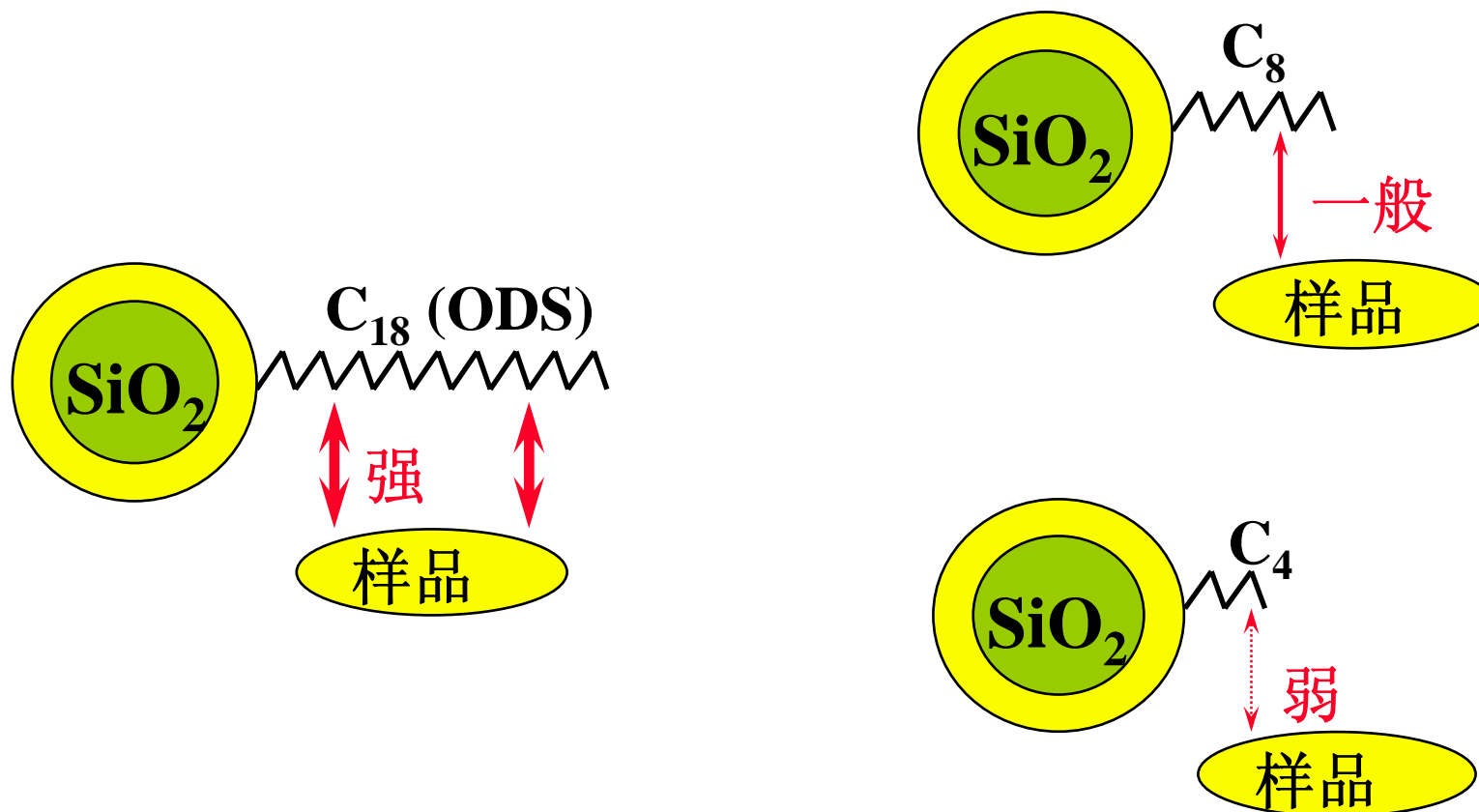
40% 水



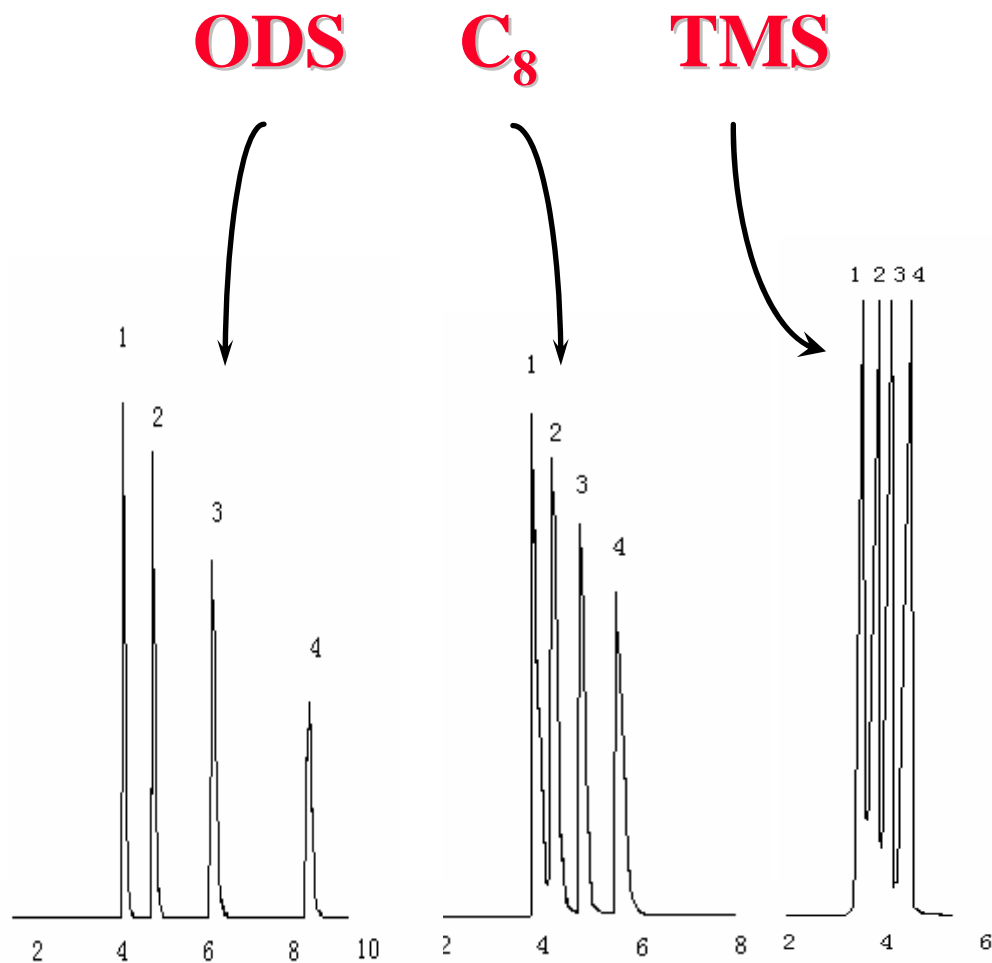
- 1：对羟基苯甲酸甲酯
- 2：对羟基苯甲酸乙酯
- 3：对羟基苯甲酸丙酯
- 4：对羟基苯甲酸丁酯

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



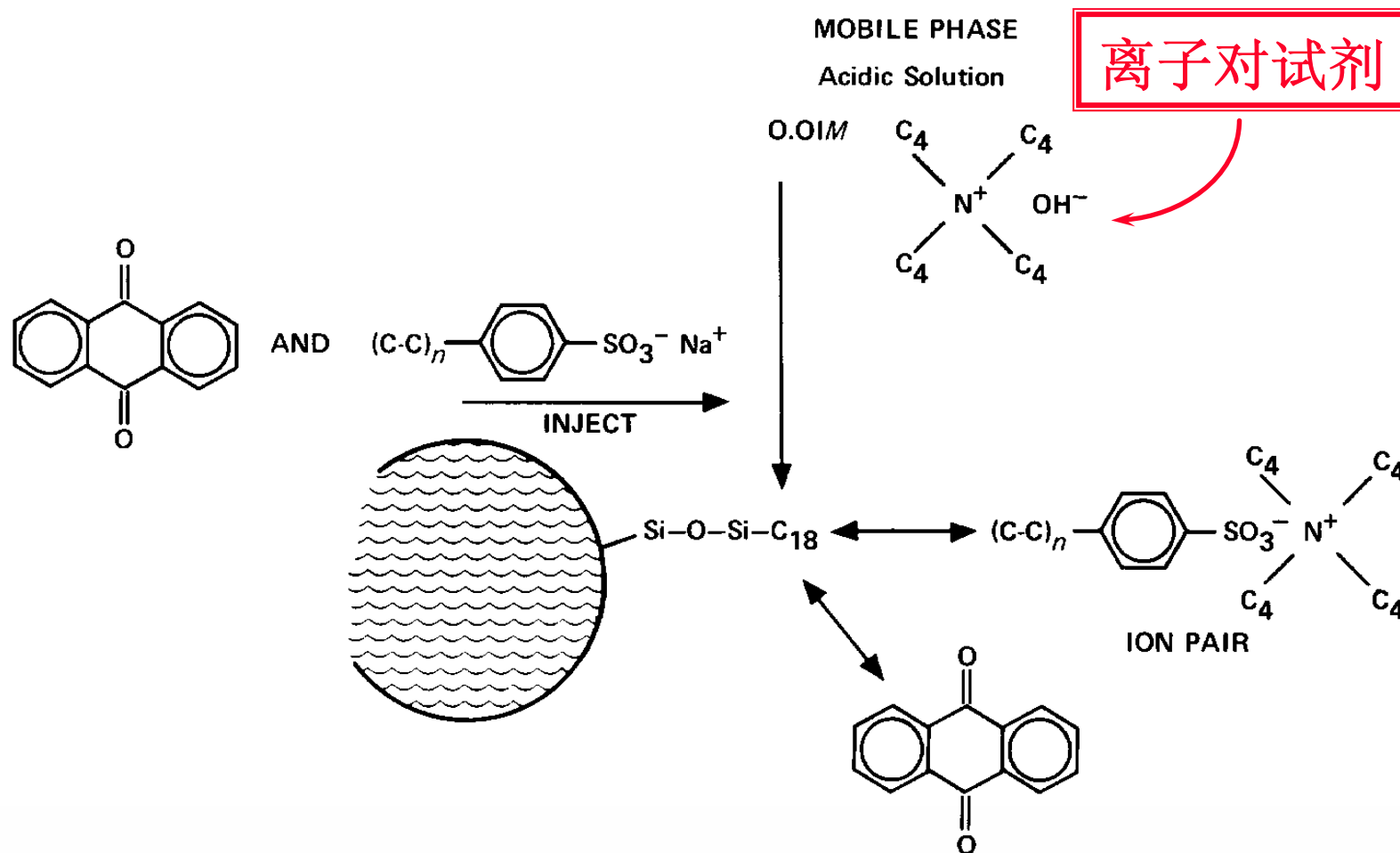
## ❖ 分析条件

- ❖ 柱: Shim-pack CLC-ODS
- ❖ 流动相: MeOH : H<sub>2</sub>O = 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



# 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/二乙烯基苯树脂或非极性键合相硅胶柱
- ❖ 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

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
- 烷基磺酸盐和芳香磺酸盐
- 含氮化合物
- 生物碱
- 酚类

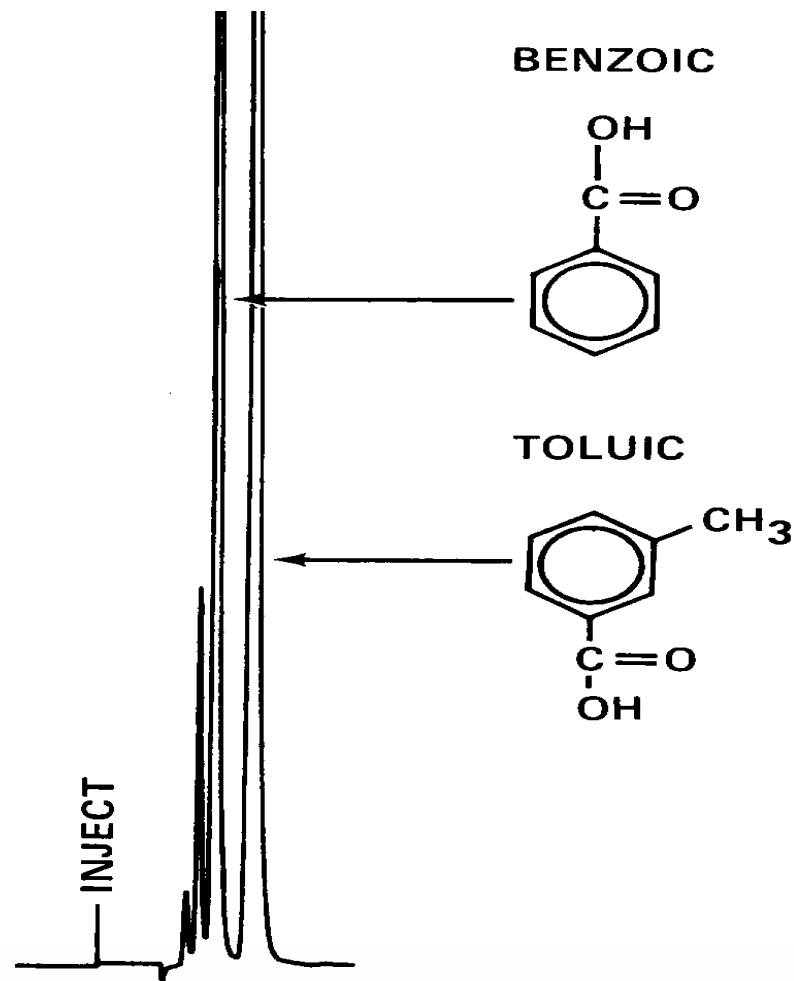


# 离子对色谱—酸性化合物

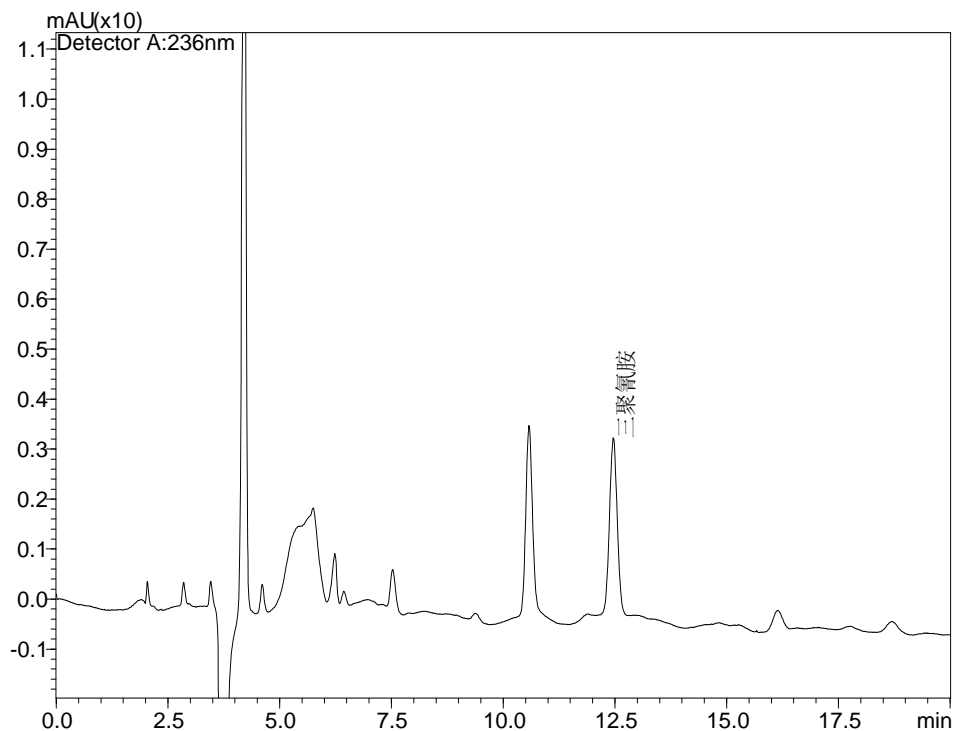
色谱柱: **C<sub>18</sub>**

流动相: 氢氧化四丁基铵

溶液/甲醇 = 1/1



# 离子对色谱—碱性化合物



- 色谱柱: GL Sciences Inertsil C18 4.6×250mm 5μm;
- 流动相: 10mM柠檬酸+10mM辛烷磺酸钠(pH3.0)/乙腈(90/10,v/v)
- 流速: 1mL/min,
- 柱温: 40 °C
- 检测波长: 240nm

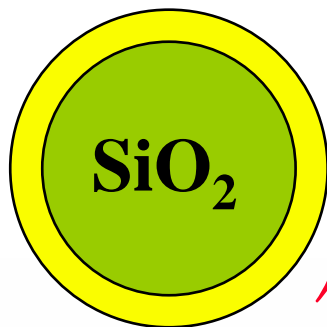
# 正相色谱

——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



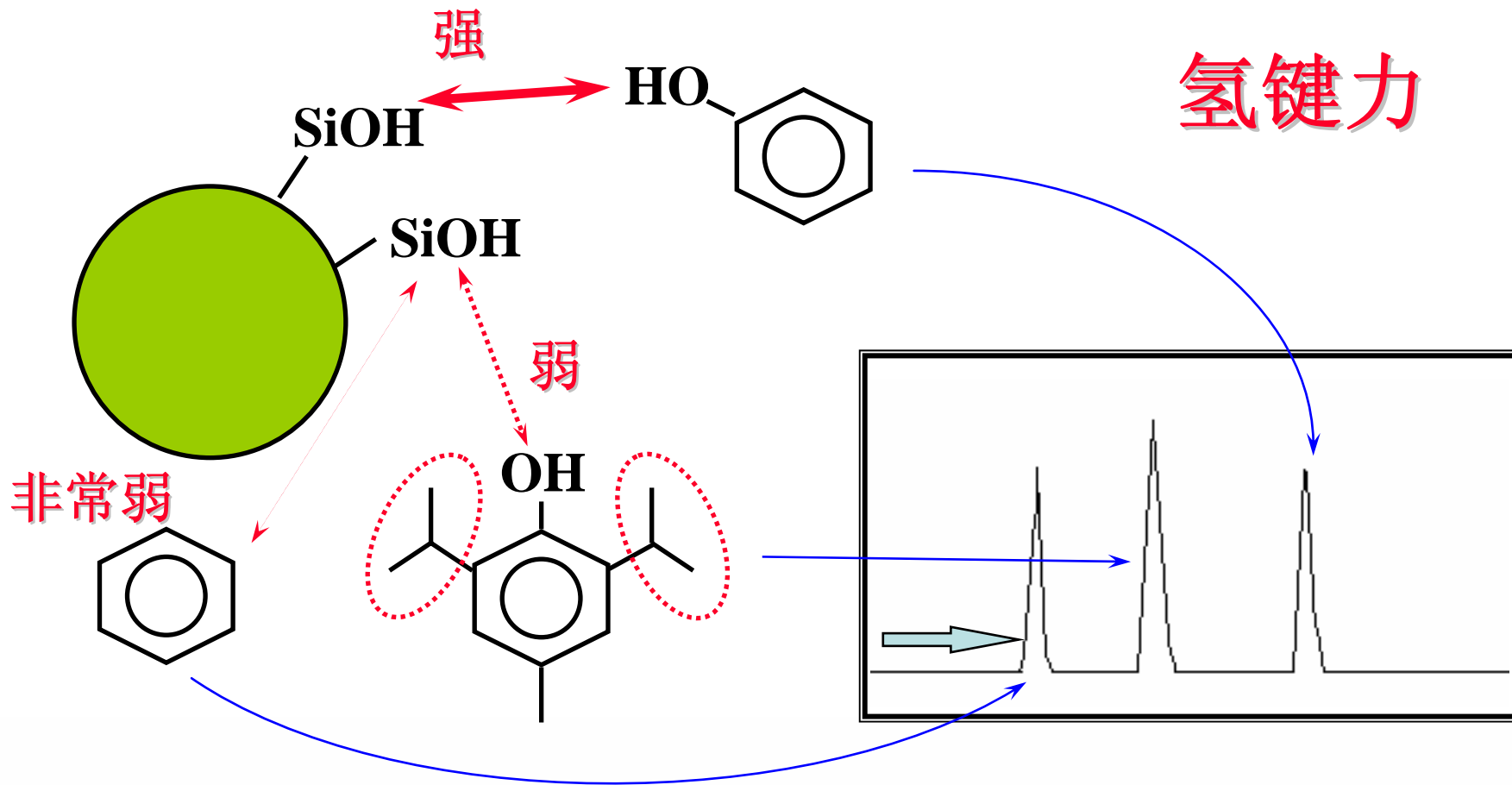
硅胶



化学键合相



# 相互作用力是什么？



# 氢键力

- ❖ 如果样品有
  - COOH : 羧基
  - NH<sub>2</sub> : 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

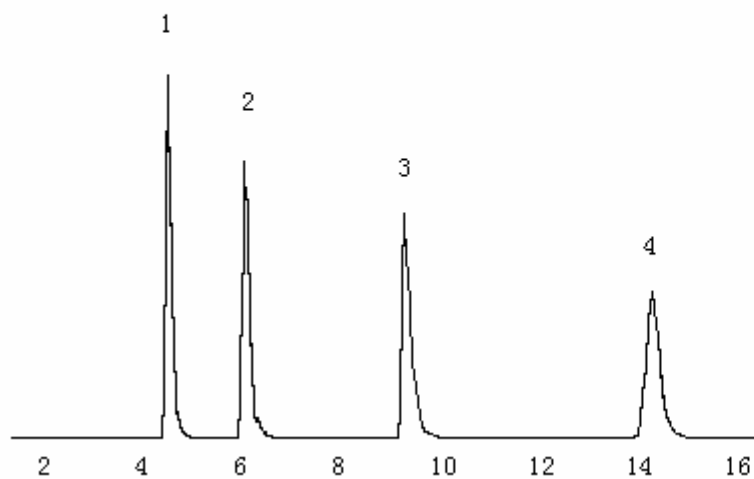
## ❖ 辅助试剂

- ❖ 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

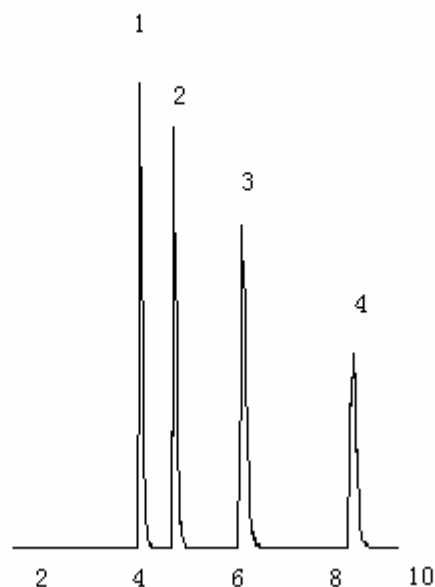
为了调整保留时间，可以选择主要试剂然后再加入辅助试剂。

# 流动相极性变化对分离的影响

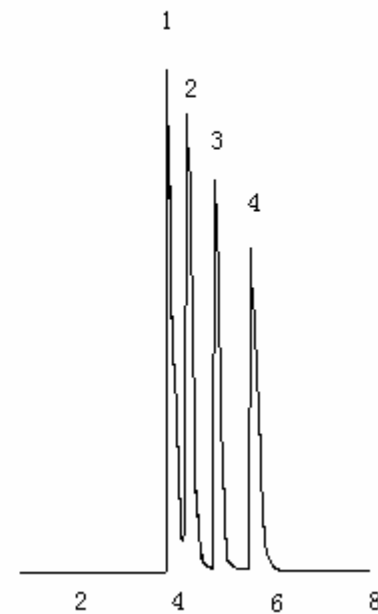
0% 甲醇



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

- 保留时间重现性好
- 固定相耐用

## ❖ 正相

- 保留时间重现性稍差
- 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



# 离子交换色谱

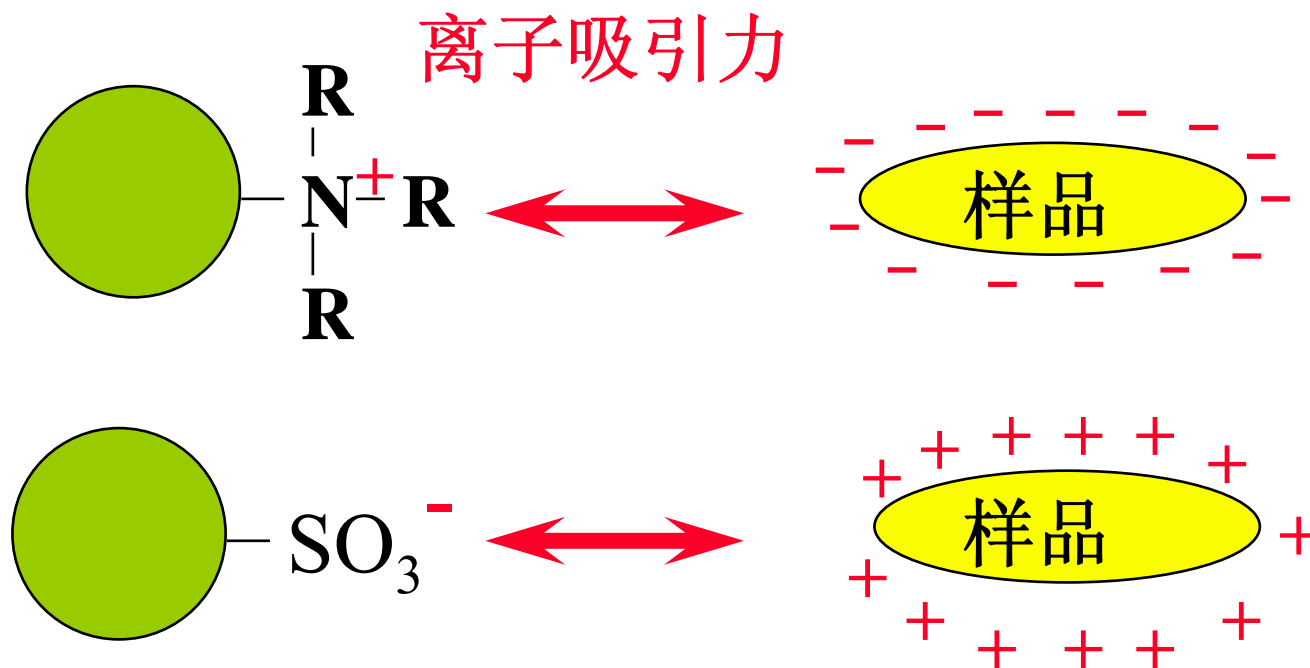
- ❖ 原理：利用被分离组分与固定相之间发生离子交换的能力差异来实现分离
- ❖ 固定相：离子交换树脂
- ❖ 流动相：水缓冲溶液（常用）或有机溶剂与水缓冲溶液的混合液

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) ( $\text{R-SO}_3^-$ )

- ❖ 弱阳离子交换剂 (WCX) ( $\text{R-COO}^-$ )

- ❖ 阴离子交换剂

- ❖ 强阴离子交换剂 (SAX) ( $\text{R}_4\text{N}^+$ )

- ❖ 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）

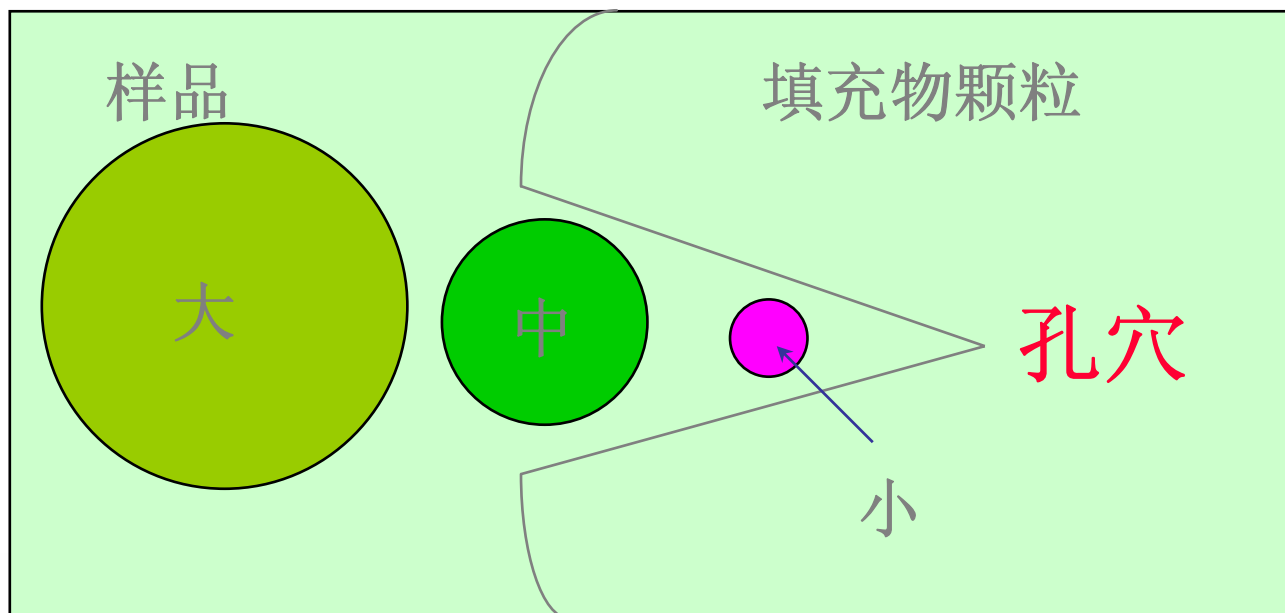
- ❖ 主要用于聚合物领域
- ❖ 以有机溶剂为流动相（氯仿，THF，DMF）
- ❖ 常用固定相填料：苯乙烯-二乙烯基苯共聚物

## ❖ 凝胶过滤色谱（GFC）

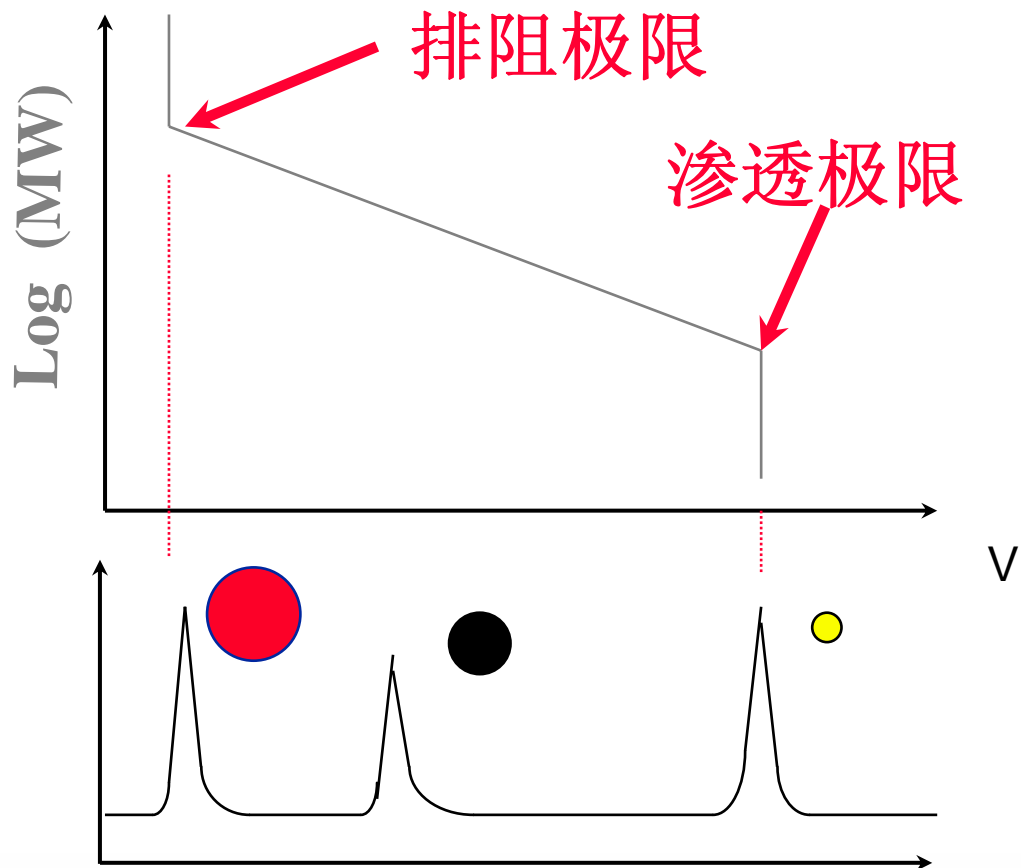
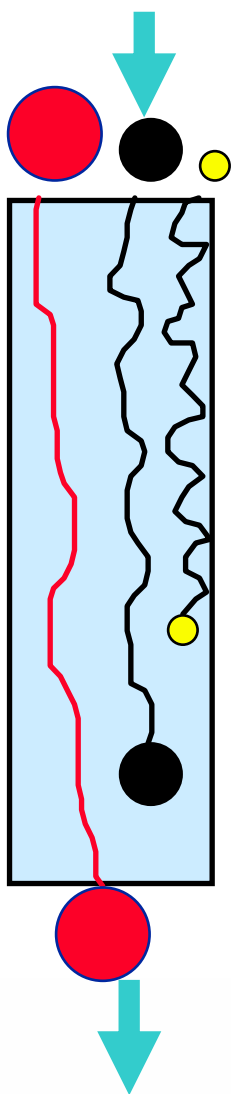
- ❖ 主要用于生命科学领域
- ❖ 以水溶液为流动相
- ❖ 常用固定相填料：亲水性有机凝胶（葡聚糖，琼脂糖，聚丙烯酰胺等）

# 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



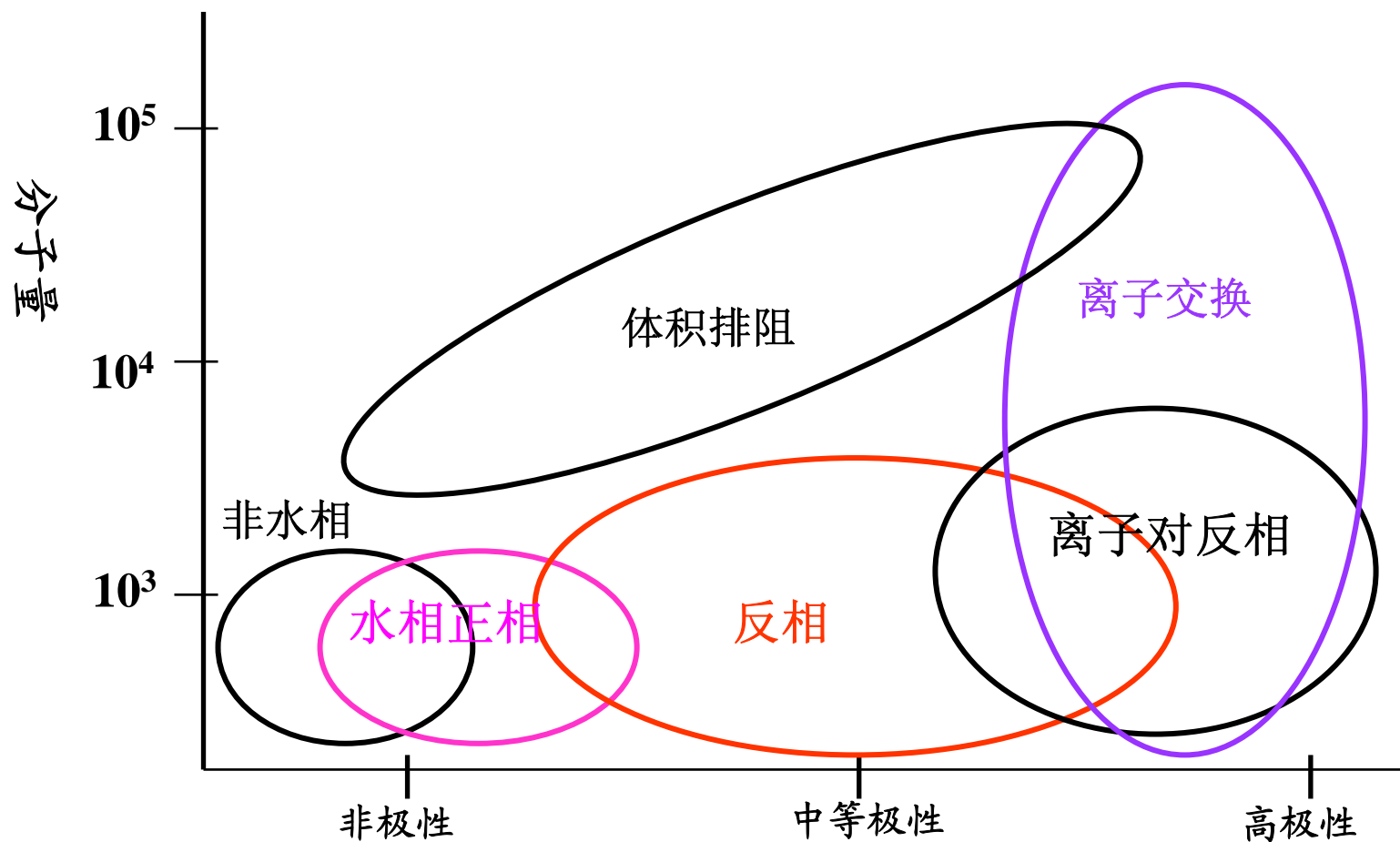
# 分离模式的选择

---

- ❖ 反相色谱：第一选择
- ❖ 反相离子对色谱/正相色谱：第二选择
- ❖ 特殊：
  - ❖ 高分子量化合物：聚合物、蛋白或糖类
  - ❖ 无机离子
  - ❖ 光学异构体



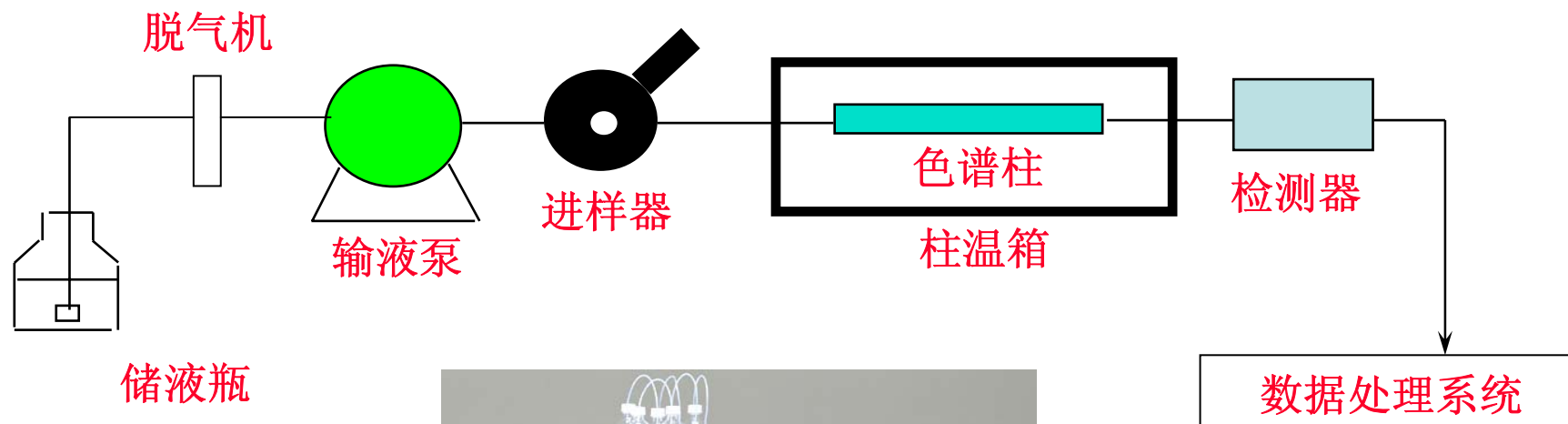
# 色谱柱的选择



## 第二部分

# 硬件基础知识

# HPLC简易流程图



# 储液瓶

---

- ❖ 由机械性能和化学稳定性好的不锈钢、玻璃或聚四氟乙烯材料制成
- ❖ 使用过程中储液瓶应适当密闭
- ❖ 所有溶剂应先过滤，再装入储液瓶

# 溶剂前处理-过滤

过滤：**0.45 μm**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

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DMF，THF，CHCl<sub>3</sub>等溶剂

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

# 常用脱气方法

❖ 超声脱气



❖ 减压脱气



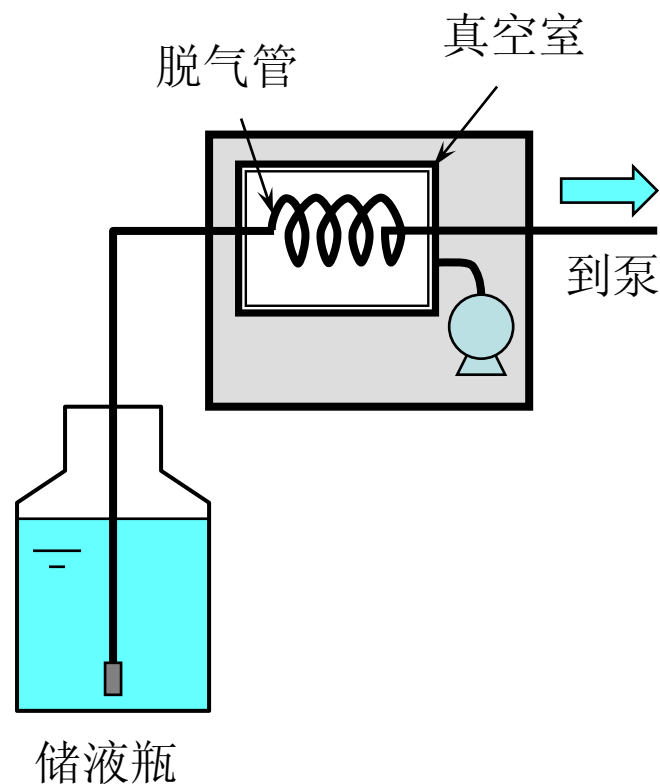
❖ 在线脱气



# 脱气机-在线真空脱气

脱气机主要由脱气管、真空室和真空泵组成。

真空室内的脱气管由特殊的透析材料制成，当溶剂流经脱气管时，溶解在溶剂中的气体穿过管壁被脱出。





# 输液泵

---

## 性能要求

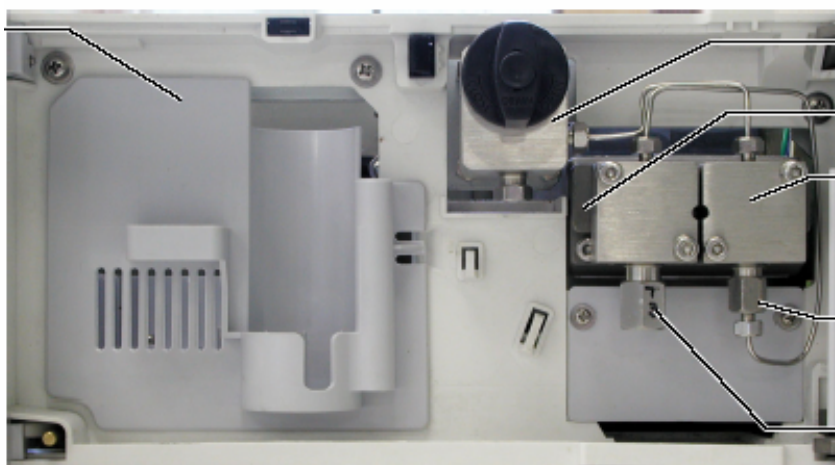
- 能在高压下连续工作
- 输出流量范围宽
- 输出流量稳定、精确度、重复性高

# 岛津输液泵系列

目的	单元	流速范围	特性和应用
分析	LC-20AT LC-15C	0.001-10ml/min	非凡的耐用性，适于常量分析
	LC-20AD LC-30A	0.0001-10ml/min 0.0001-5ml/min	极低脉动，适于半微量和 LC-MS分析
	LC-20AB	0.0001-10ml/min	极低脉动，适于半微量LC和 LC-MS分析

# LC-20AT

选配件  
支架



压力传感器

泵头固定座

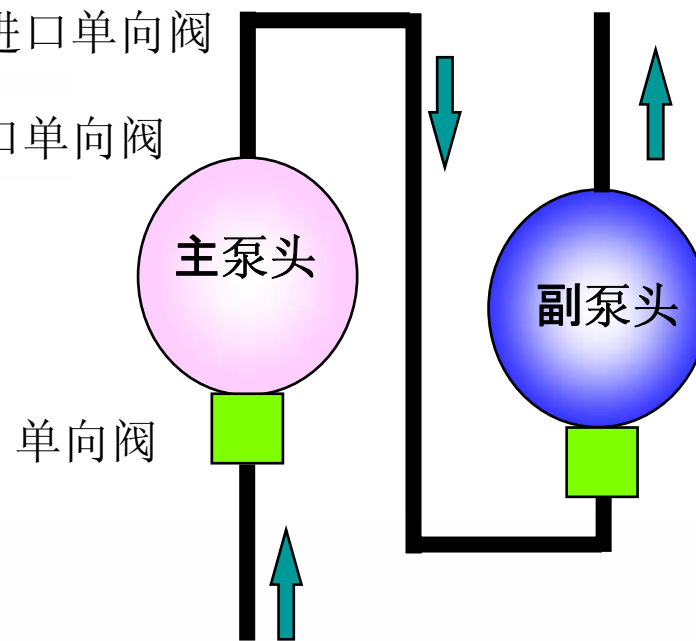
泵头

辅助进口单向阀

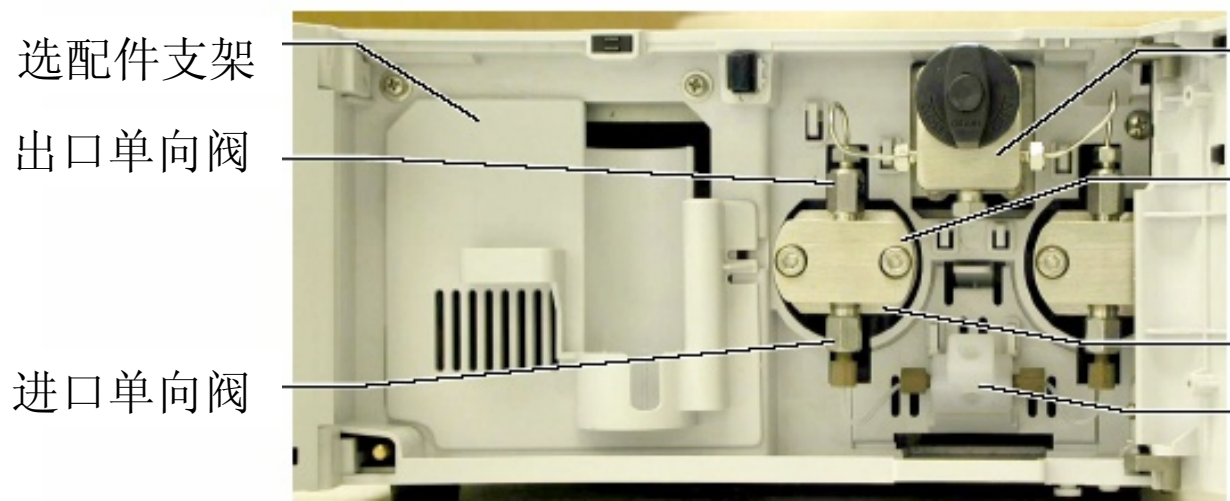
主进口单向阀

LC-20AT

## 串联式柱塞往复泵



# LC-20AD



LC-20AD

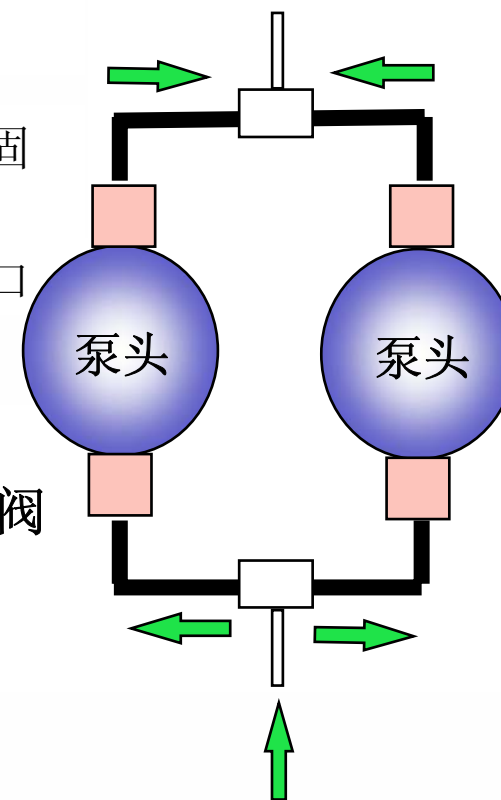
压力传感器

泵头

泵头固定座

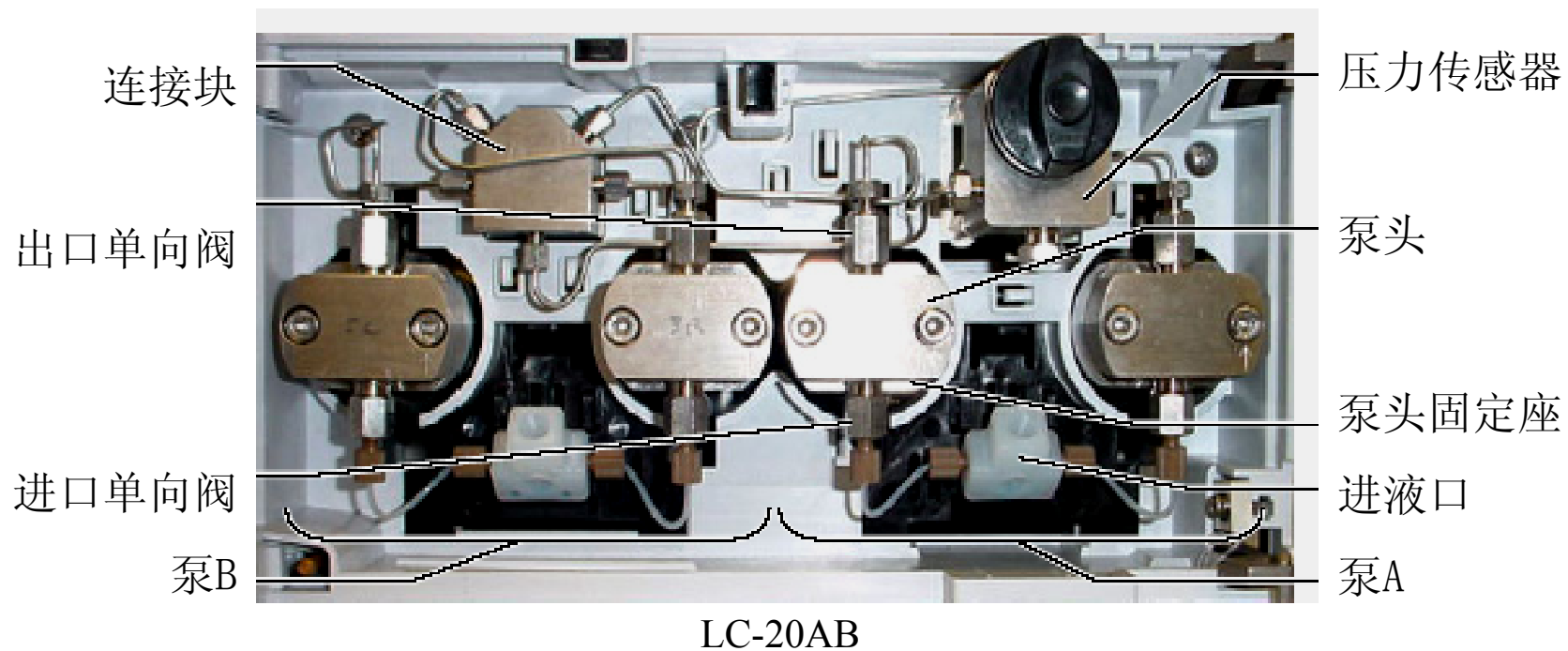
进液口

单向阀

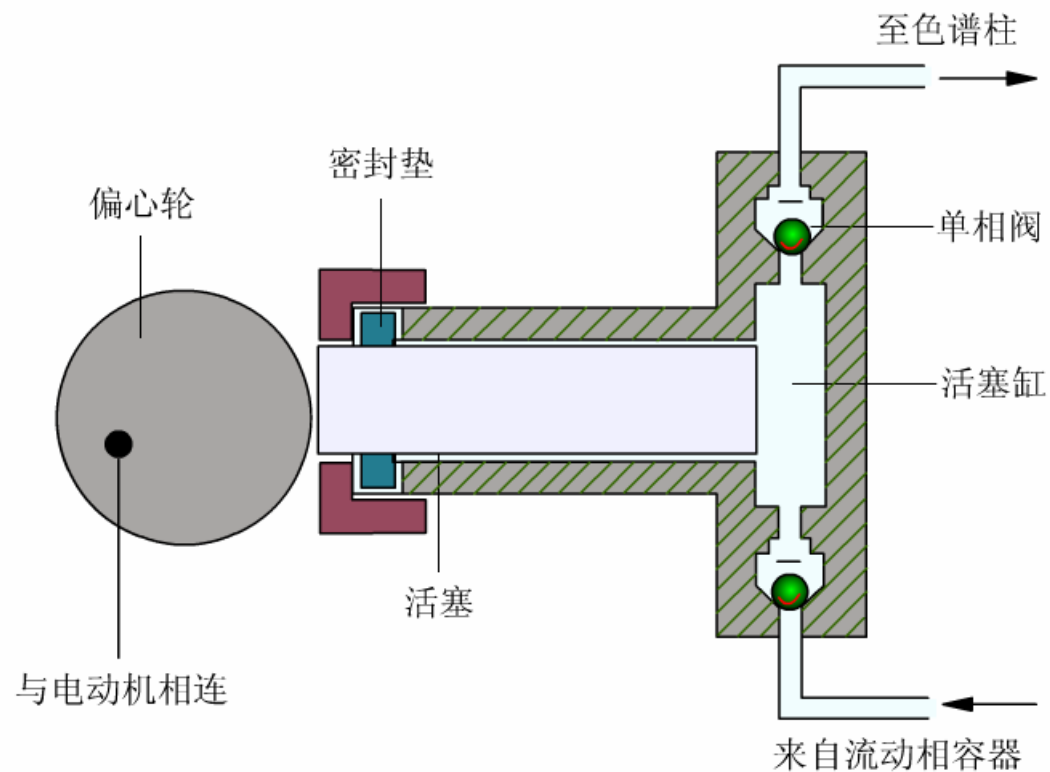


## 并联式微体积柱塞往复泵

# LC-20AB

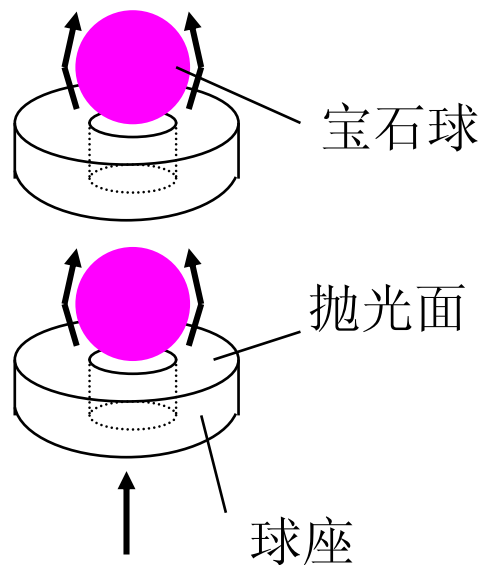


# 柱塞往复泵结构示意图

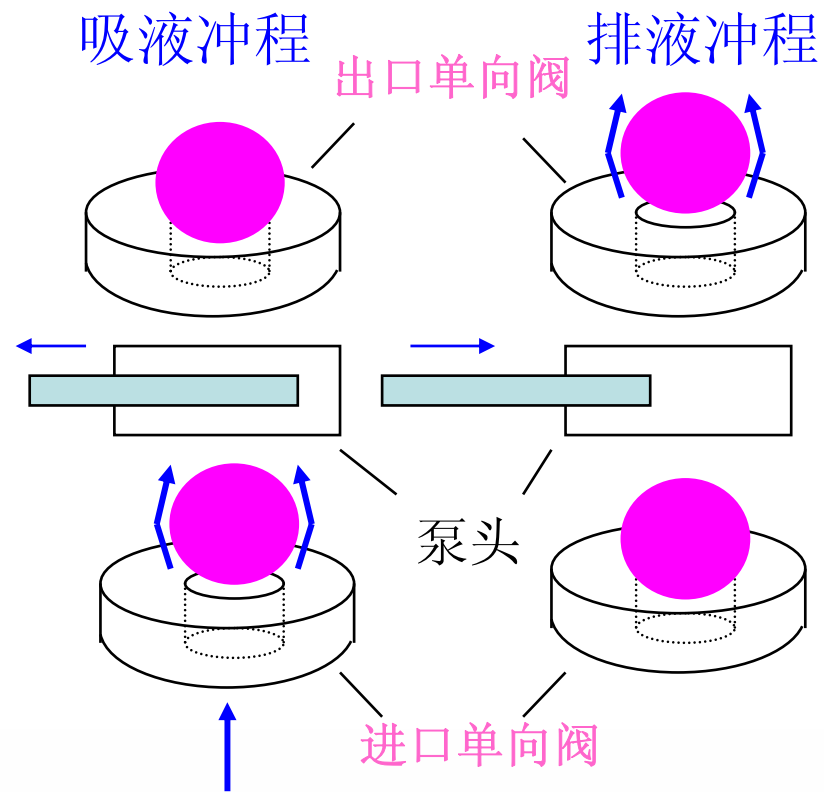


# 单向阀工作原理

## 单向阀结构



## 单向阀工作原理

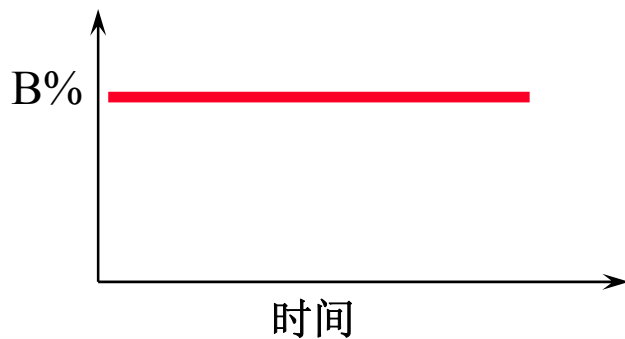


# 洗脱系统组成

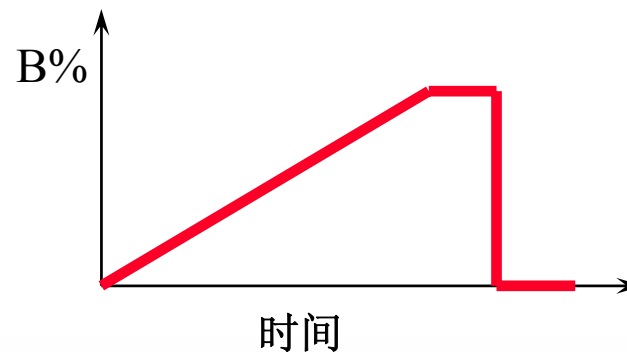
等度洗脱系统

梯度洗脱系统 { 高压梯度洗脱系统  
低压梯度洗脱系统

等度



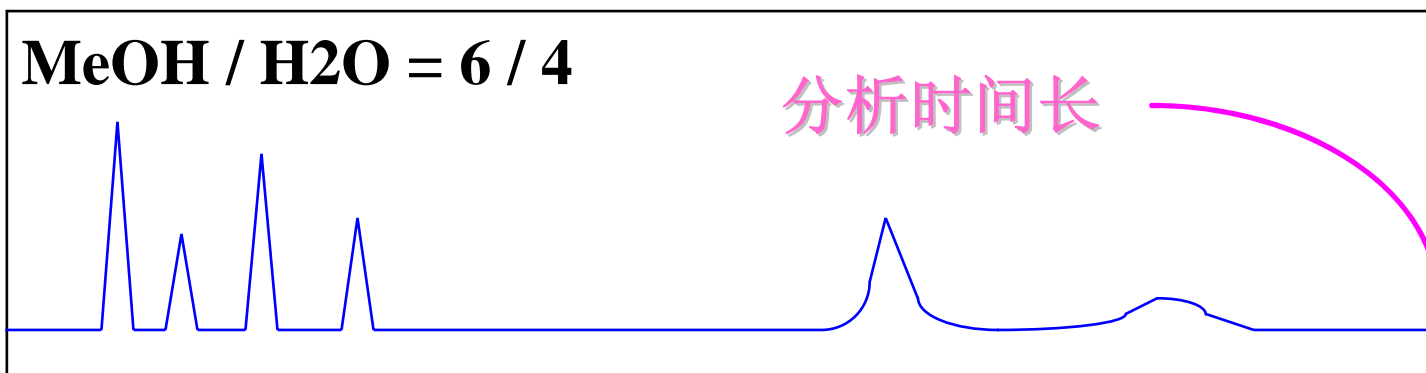
梯度





# 使用梯度洗脱的原因

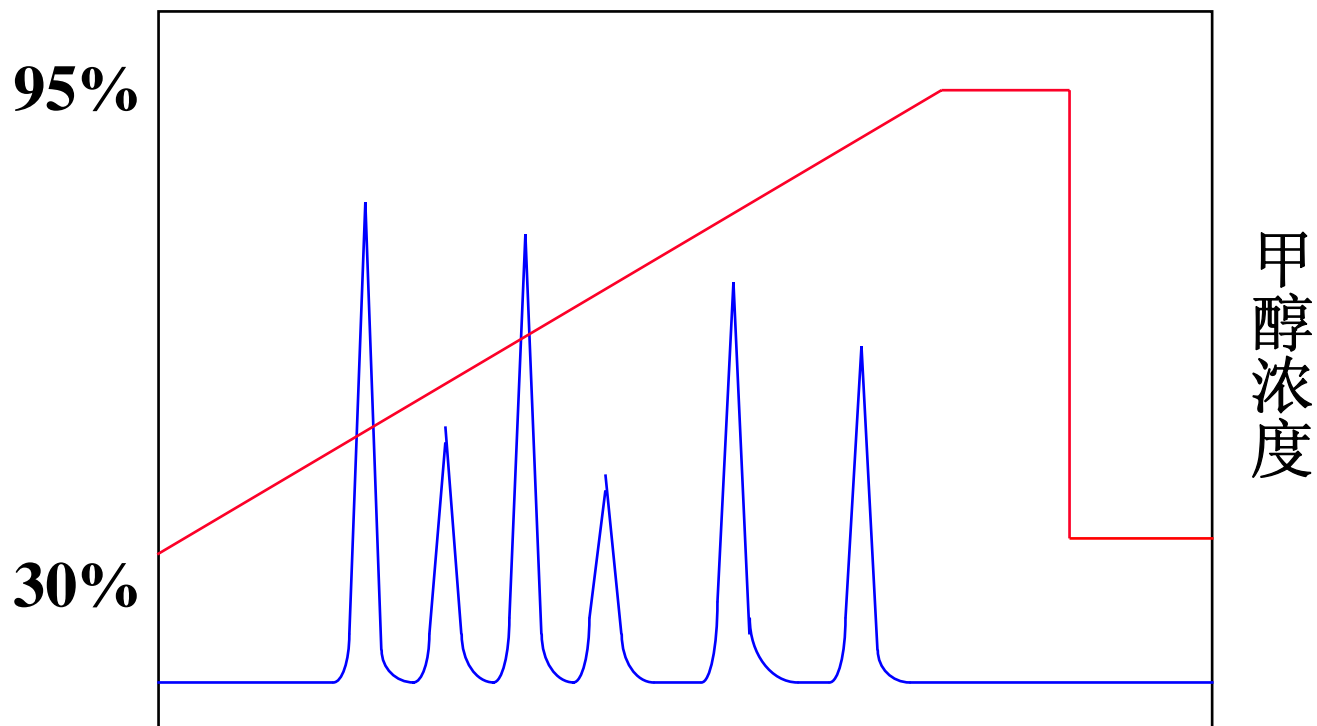
当采用等度洗脱时：



( 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

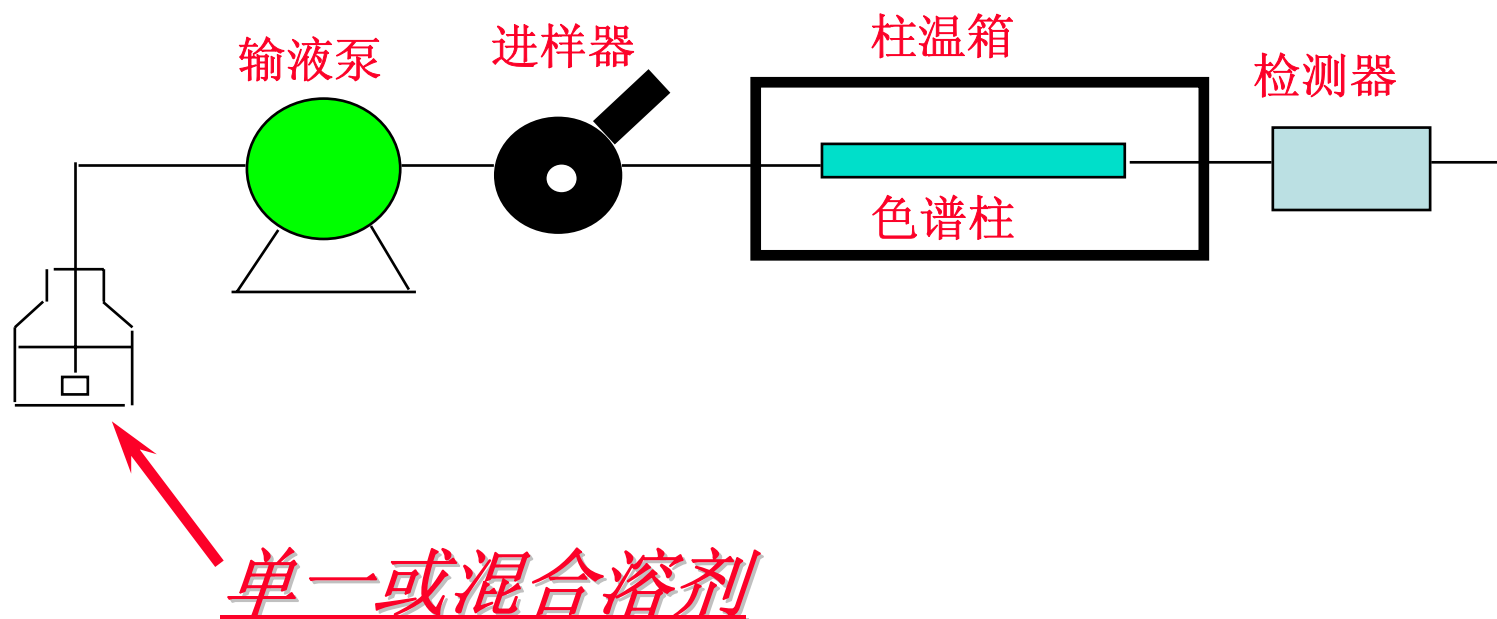
## 梯度洗脱：

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

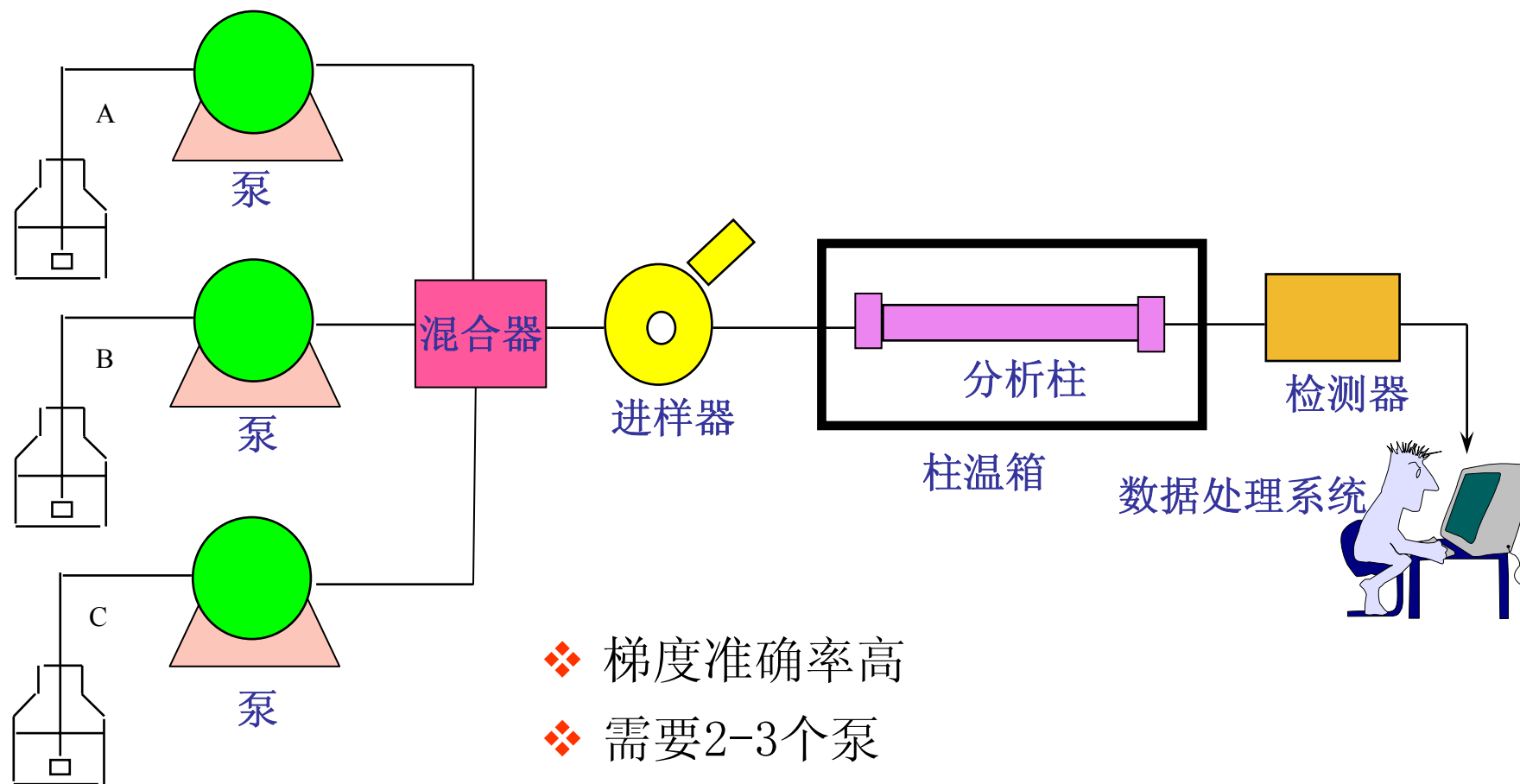
## 注意事项：

- ❖ 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）

# 等度洗脱

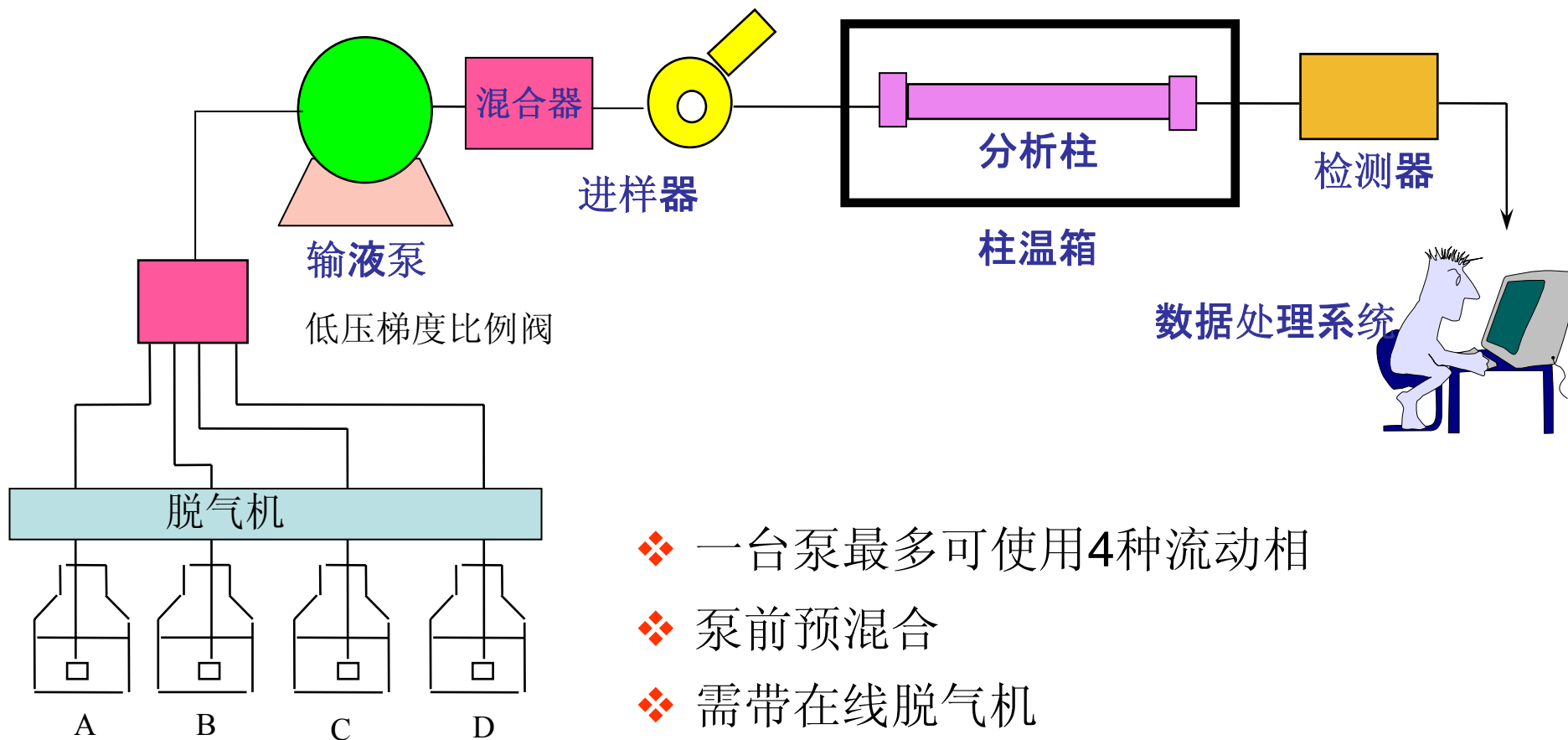


# 高压梯度系统



- ❖ 梯度准确率高
- ❖ 需要2-3个泵
- ❖ 可以不配在线脱气机

# 低压梯度系统



- ❖ 一台泵最多可使用4种流动相
- ❖ 泵前预混合
- ❖ 需带在线脱气机

# 流动相的选择

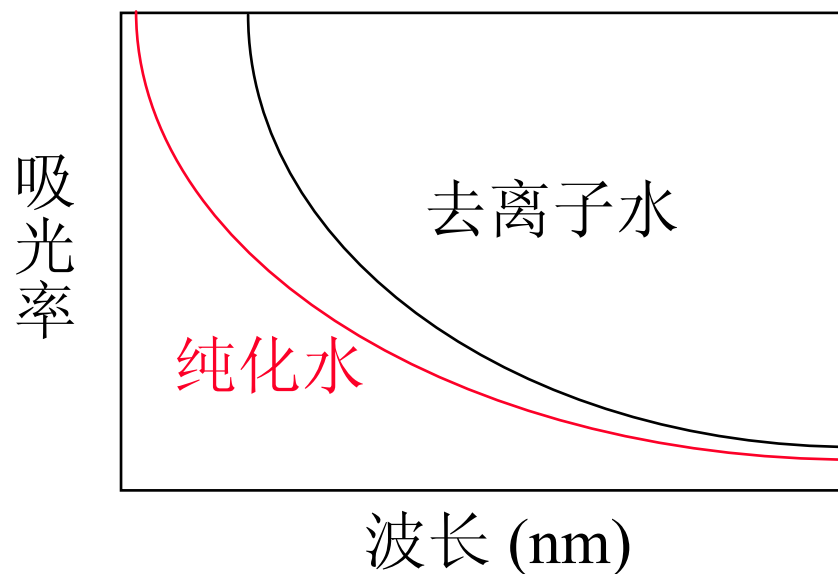
---

- ❖ 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

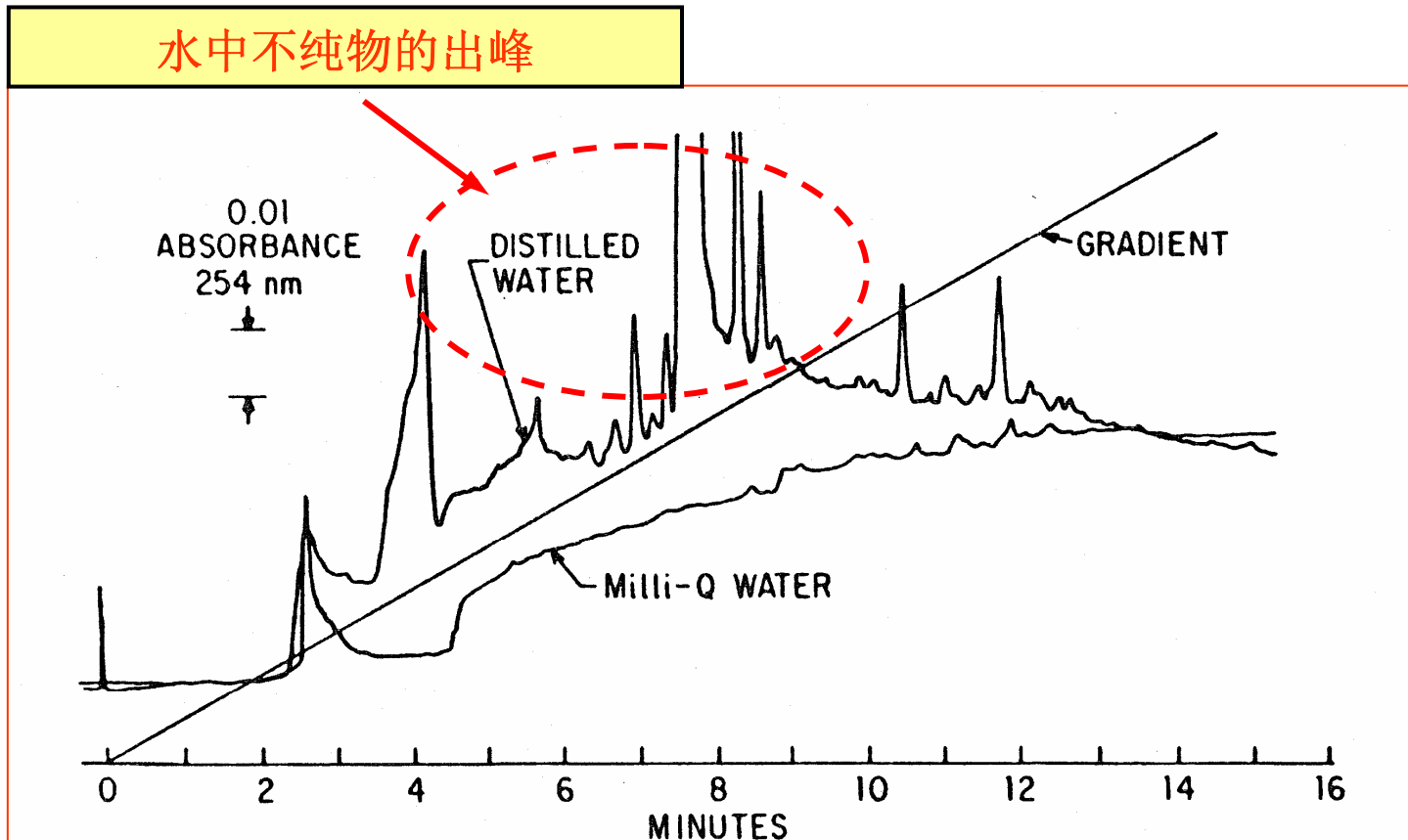
HPLC用水可以通过以下几个方法得到：

- ❖ 专门的纯水机或超纯水机:理想的HPLC用水应为18.2 MΩ的超纯水，并通过0.22 μm的滤膜，除去热源、有机物、无机离子及空气等。
- ❖ 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

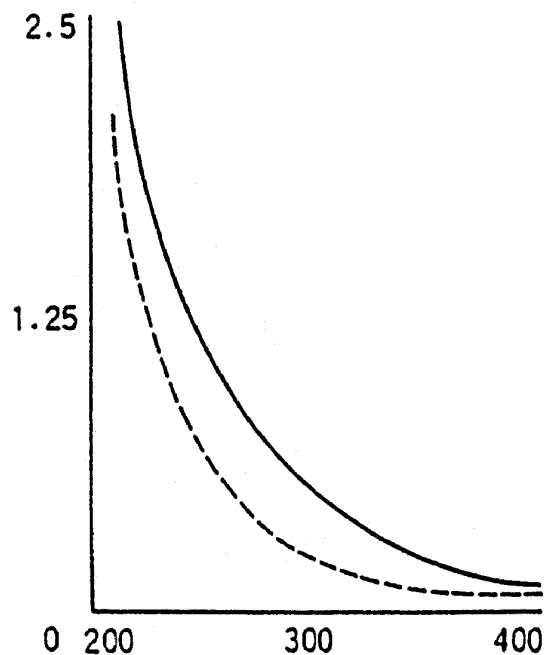
都经过蒸馏和 $0.45\ \mu\text{m}$ 的过滤(除纤维毛,未溶解的机械颗粒)

优级纯的纯度比分析纯大,但里面含有防腐剂和抗氧化剂

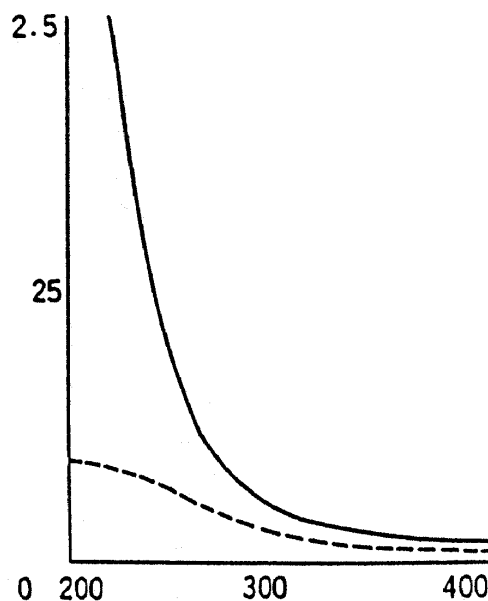
HPLC级经过 $0.2\ \mu\text{m}$ 的过滤,且除去有紫外吸收的杂质

# 有机溶剂的等级

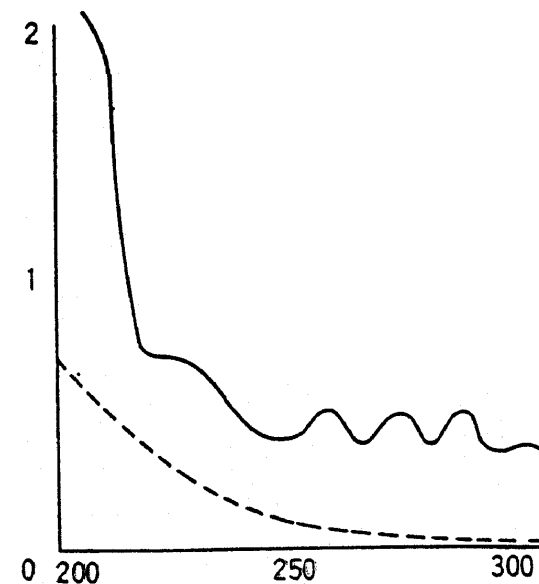
分析纯级和 HPLC 级溶剂的吸光度比较图



甲醇



乙腈



正己烷

# 选择缓冲液的步骤

---

1. 确定最佳分离状态时的流动相pH
2. 选择具有与流动相的pH相近的pKa的缓冲液  
(即使浓度稀也具有较强的缓冲能力)
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)

# 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：用纯水冲洗30-60 min（1 ml/min），再用甲醇冲洗30 min
- ❖ 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

# 进样器

---

- ❖ 手动进样器
- ❖ 自动进样器

要求:

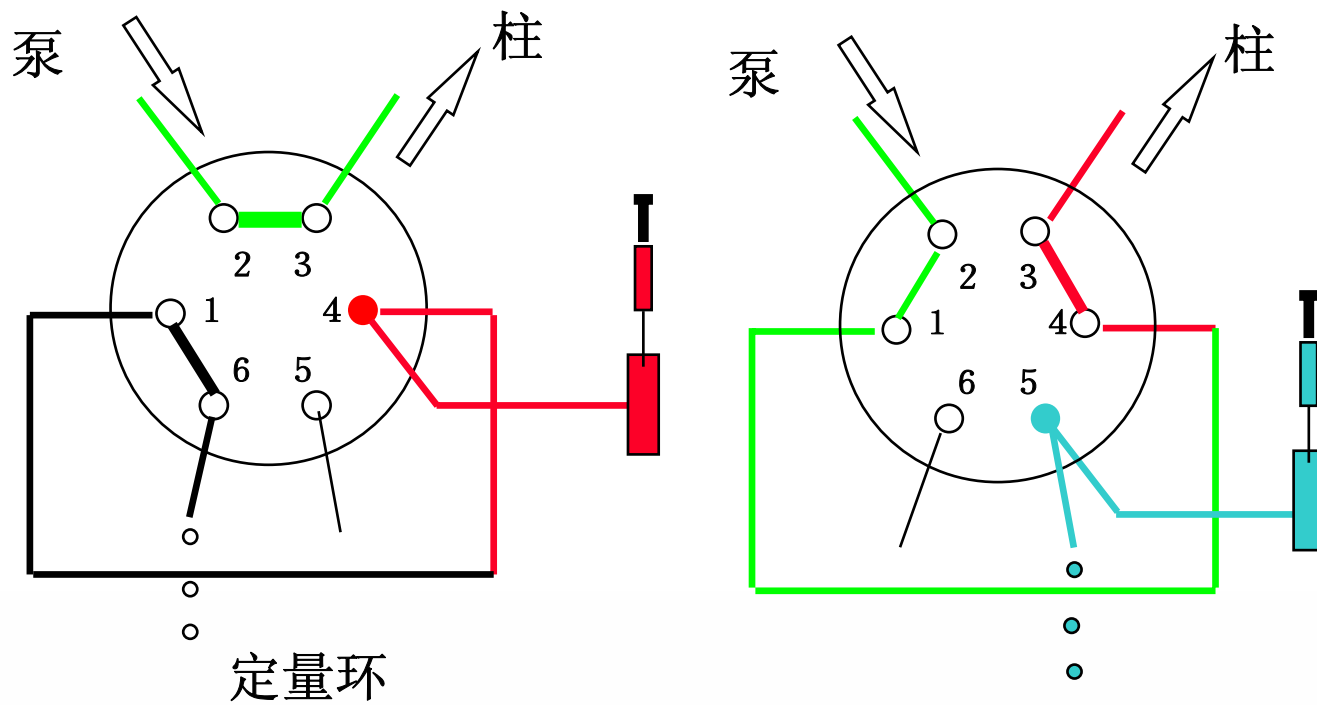
- ❖ 无残留
- ❖ 扩散小
- ❖ 进样体积可变
- ❖ 可承受高压



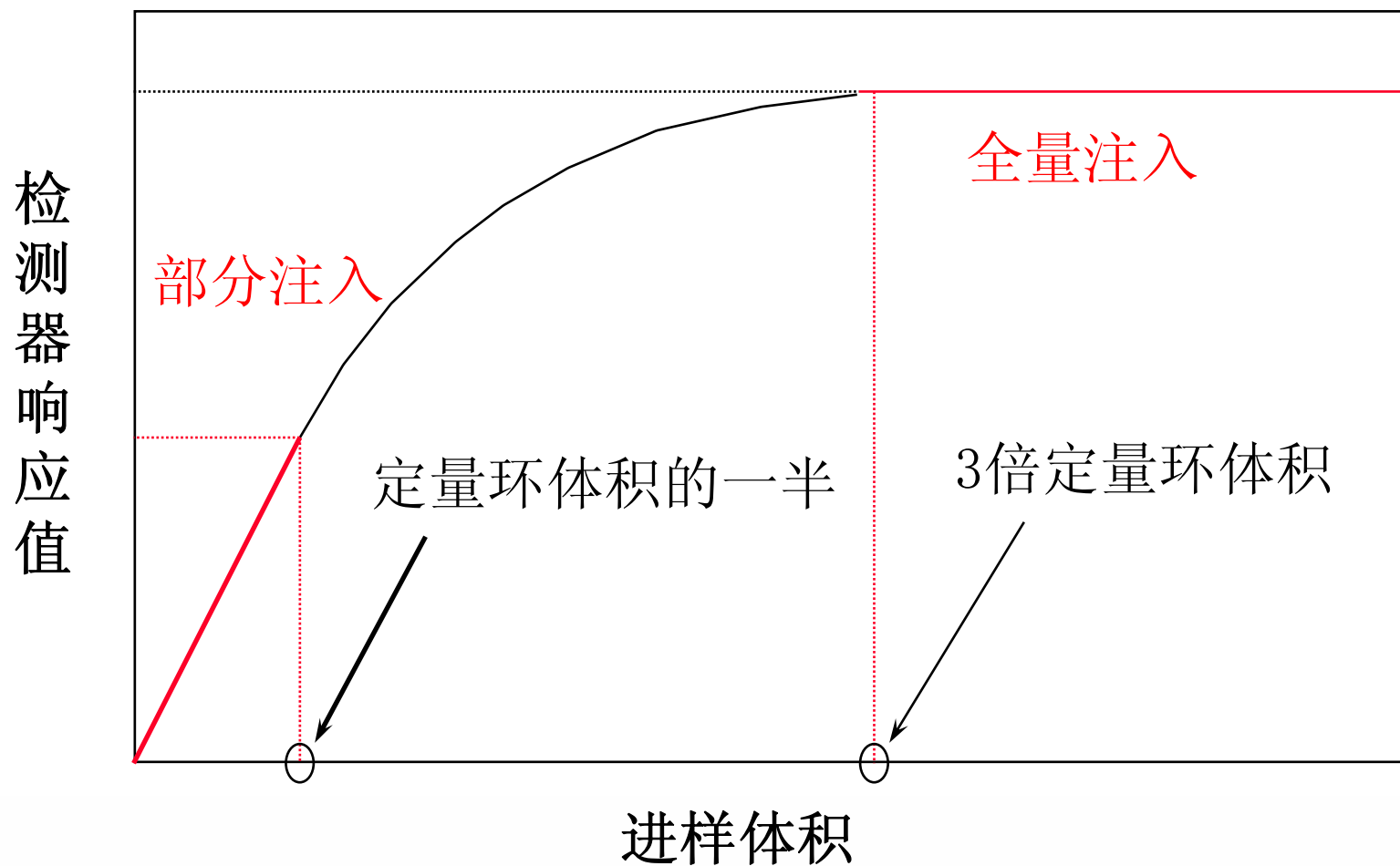
# 手动进样器的原理图

load 位置

inject 位置



# 进样量和检测器响应的关系示意图



# 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  $\mu$  l的定量环最多进样10  $\mu$  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  $\mu$  l的定量环最少进样60至100  $\mu$  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。

# 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.切到装填状态
- 3.注入样品
- 4.切回到进样状态

# 自动进样器



由计算机自动控制定量阀，按预先编制注射样品的操作程序工作

# 自动进样器

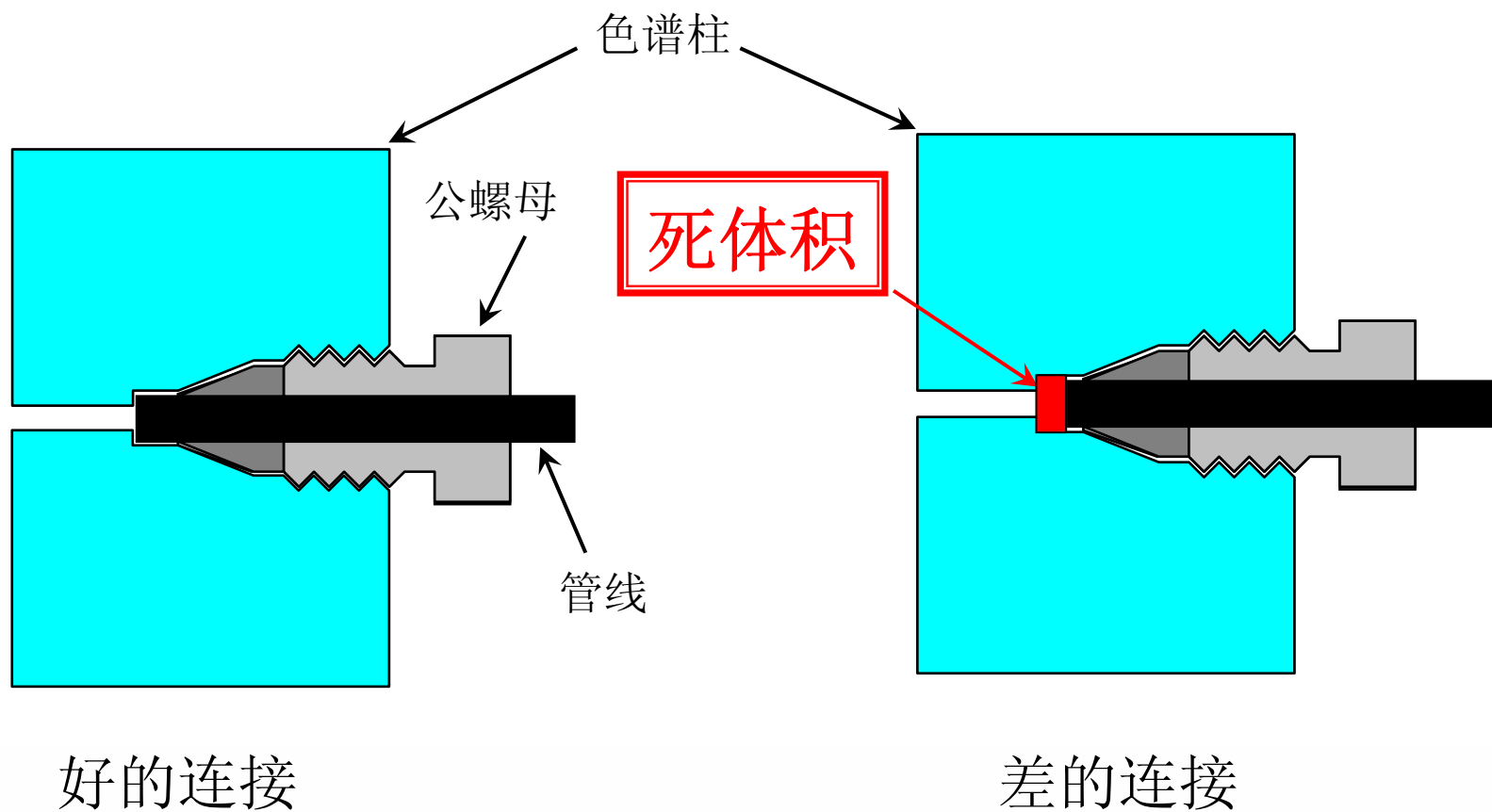
---

清洗（Rinse）：进样针移动到清洗口，针的外壁被清洗液清洗的过程

排气（Purge）：排除管路中的气泡和更换旧流动相的过程

# 色谱柱的连接

死体积可能会引起分离度变差和重现性变差等问题





# 色谱柱的使用

---

新色谱柱使用前:

- ❖ 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
- ❖ 新色谱柱先测柱效, 并保留色谱图和实验条件。  
定期检测柱效

# 色谱柱的使用

---

1. 流动相：高纯度，过滤  
pH范围  
有机溶剂与色谱柱匹配  
互溶、并能溶解样品
2. 净化样品
3. 使用保护柱：与色谱柱填料、内径一致  
避免色谱柱污染

# 色谱柱的使用

---

4. 分离条件—流速、柱温、梯度的变化幅度
5. 定期使用强溶剂冲洗柱子。
6. 使用缓冲盐后，要先用含10%甲醇的水溶液冲洗，再用有机溶剂冲洗。
7. 流动相正相反相转换时用异丙醇过渡

# 色谱柱的存放

---

- ❖ 存放前充分冲洗
- ❖ 合适的存放溶剂
- ❖ 接好堵头，避免固定相干涸
- ❖ 存放环境

# 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

# 柱温箱

CTO-20A/AC 空气强制循环式



CTO-15C

模块加热式

CTO-30A



CTO-10AS



# 液相色谱检测器的选择

---

- ❖ 样品的性质
- ❖ 分离目的不同，对检测的要求不同
  - ❖ 定量：高选择性、高灵敏度
  - ❖ 定性或制备：通用性

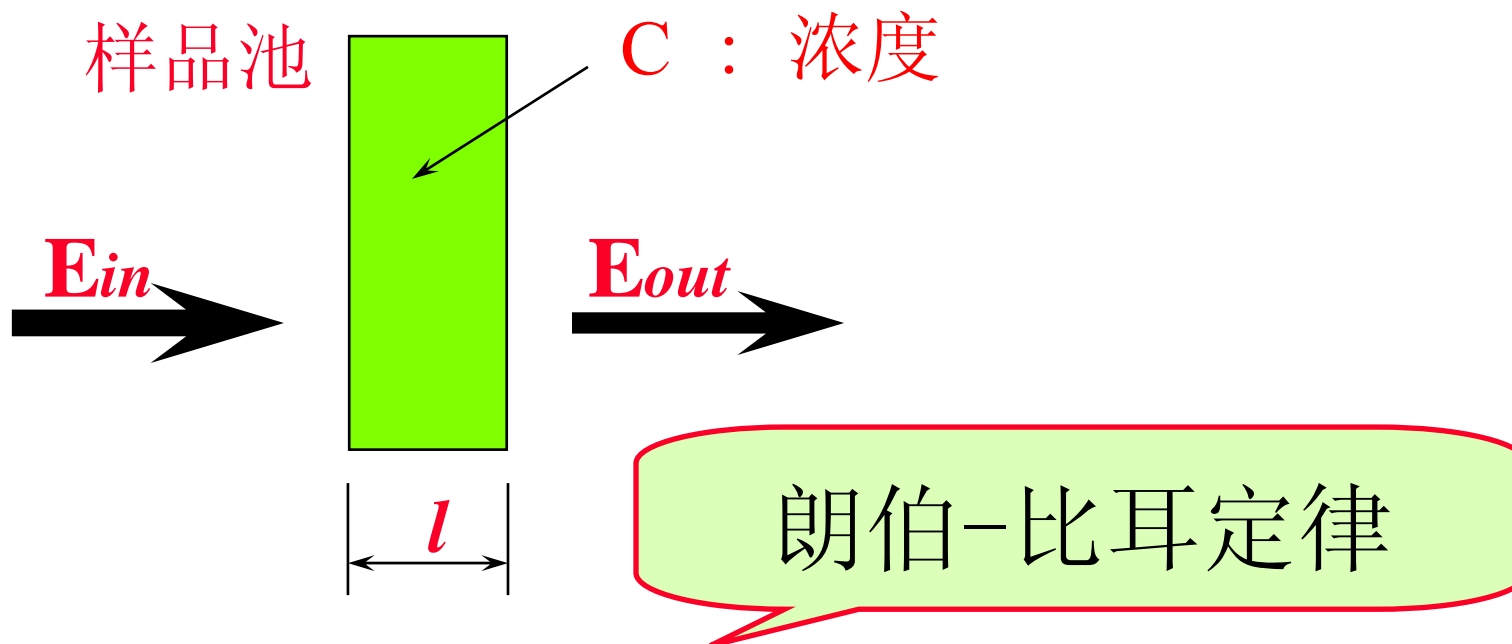
# 常用检测器

---

- ❖ 紫外可见光检测器 (UV)
- ❖ 二极管阵列检测器 (PDA)
- ❖ 荧光检测器 (RF)
- ❖ 示差折光检测器 (RID)
- ❖ 电导检测器 (CDD)
- ❖ 蒸发光散射检测器 (ELSD)
- ❖ 质谱检测器 (LCMS)



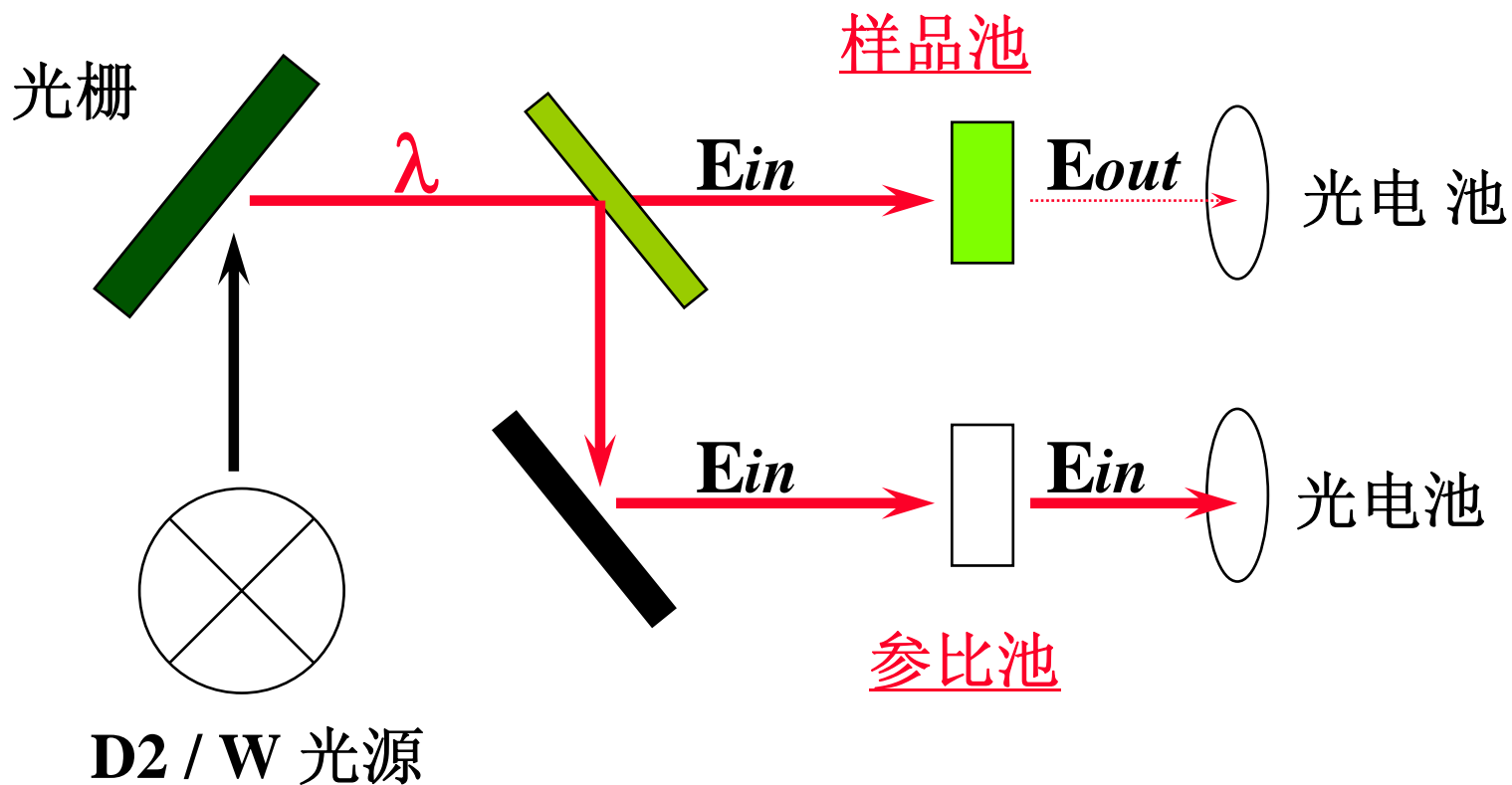
# 紫外可见光检测器



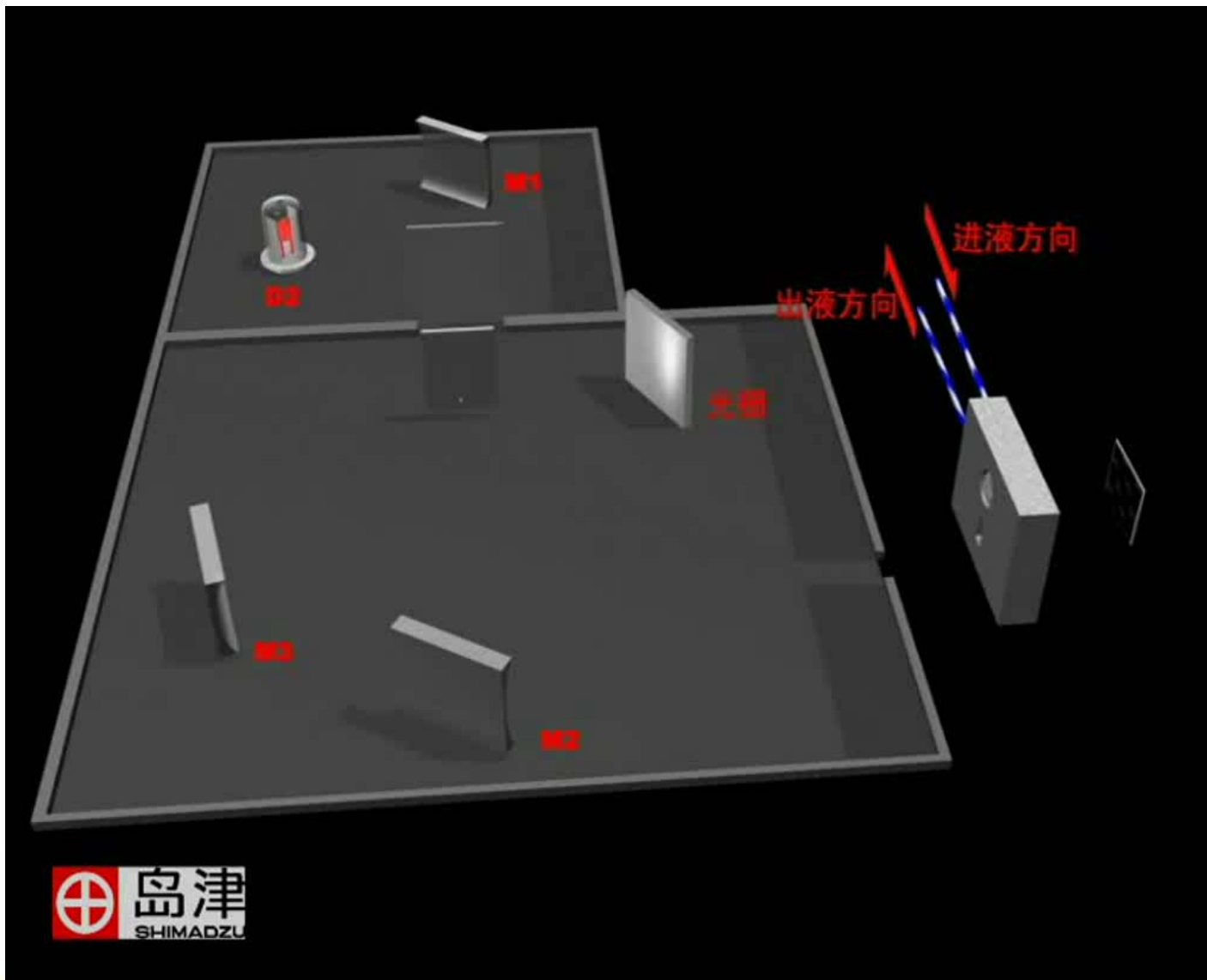
$$A = \epsilon Cl = -\log (E_{out} / E_{in})$$

(A : 吸光度)

# 紫外可见光检测器



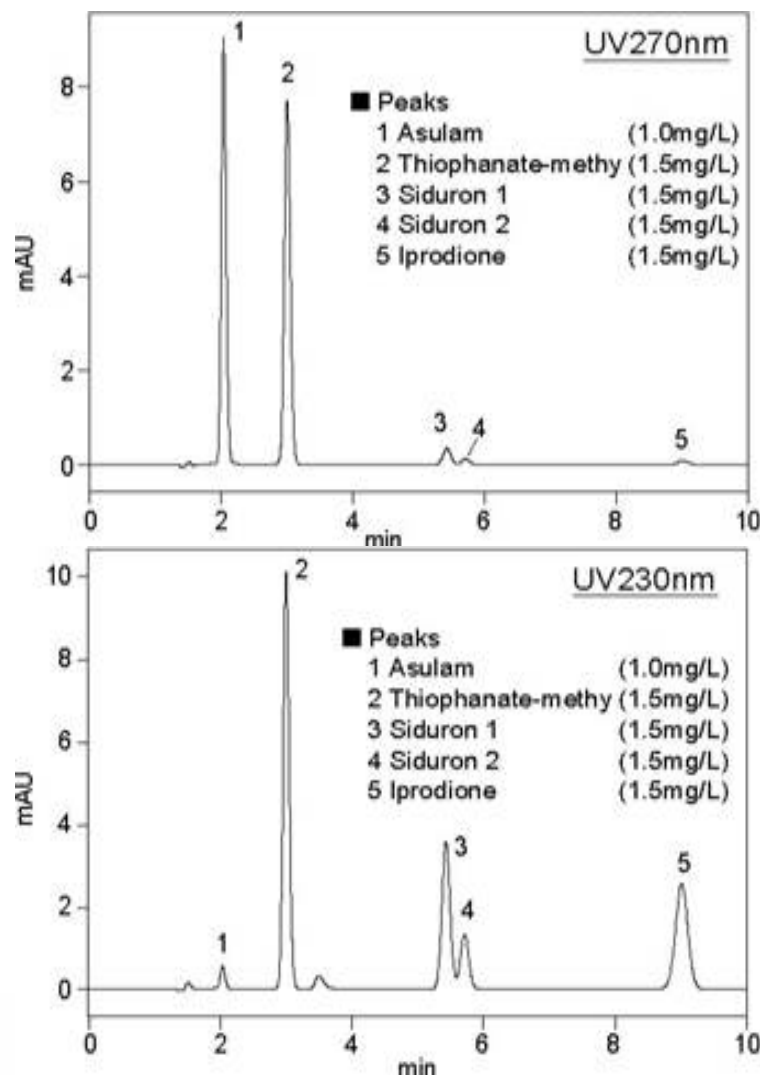
# 紫外可见光检测器



# 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， $A = \epsilon CL$
- ❖ 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

# 双波长检测



饮用水中4种农药残留双波长分析

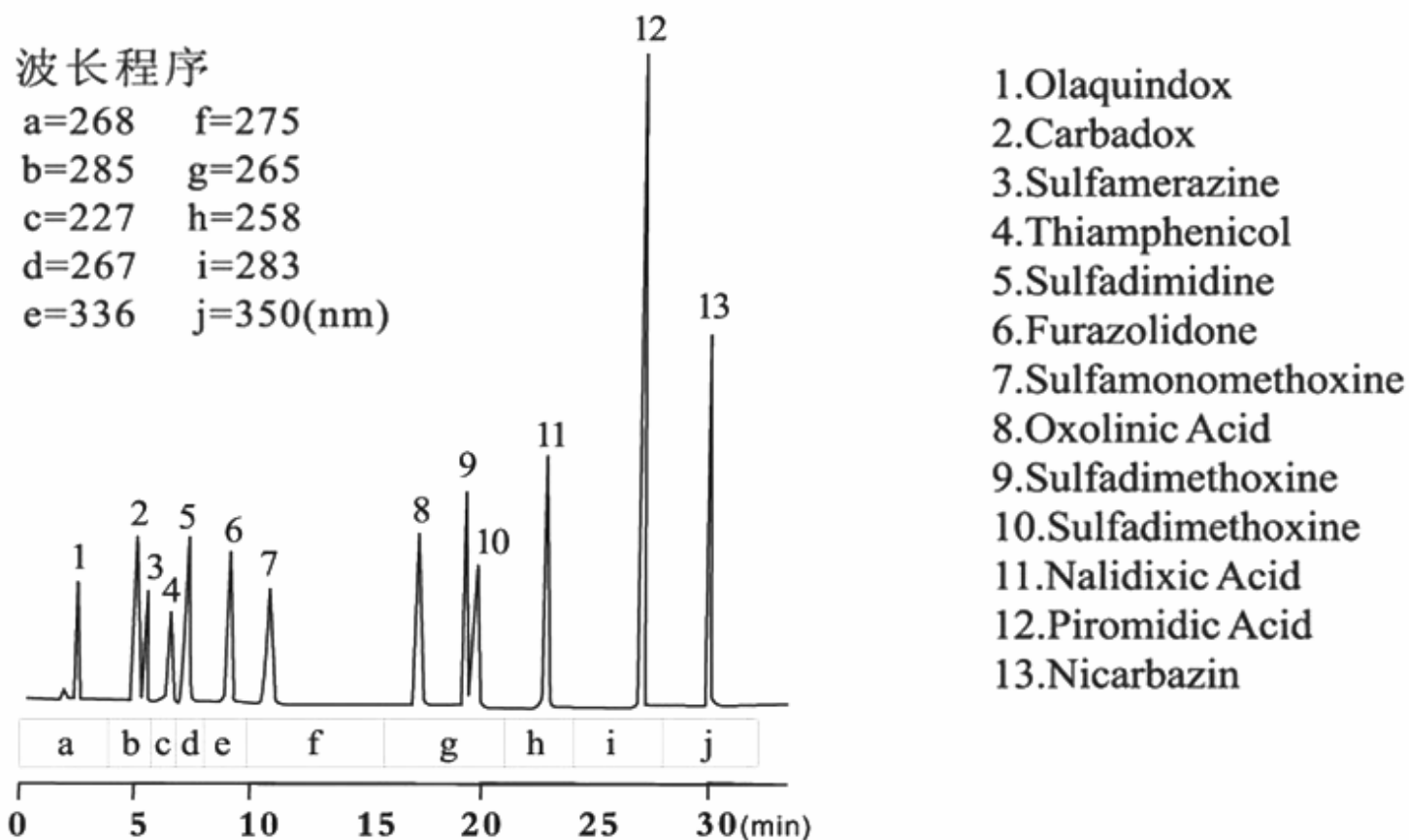
日本饮用水标准（2004年4月起实施）

1. 磺草灵 (asulam)
2. 甲基硫菌灵 (thiophanate-methyl)
3. 环草隆1 (siduron)
4. 环草隆2 (siduron)
5. 依普同 (iprodione)

分析条件:

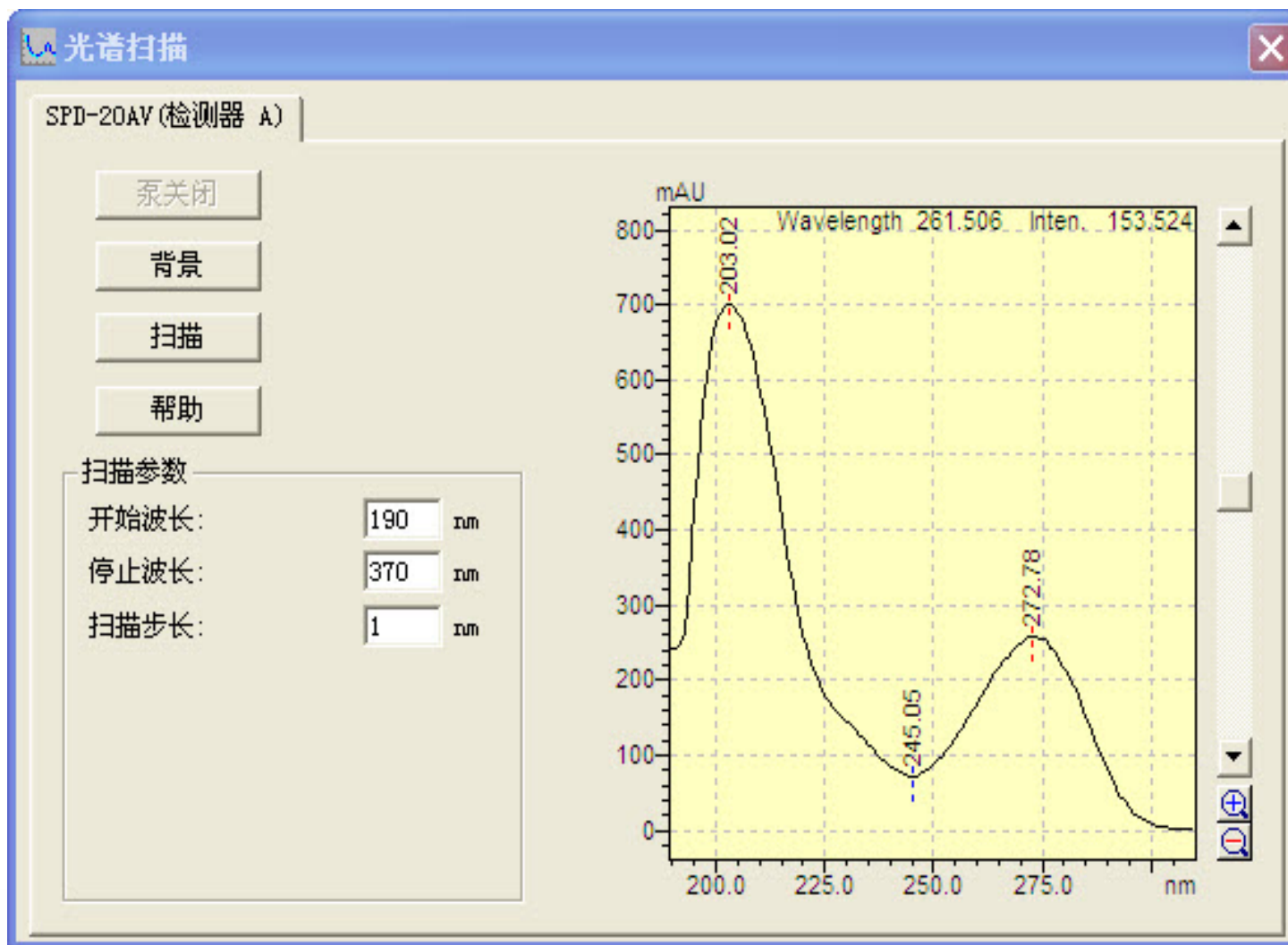
- ❖ 色谱柱: Shim-pack VP-ODS (150 mmL. × 4.6 mmI.D.)
- ❖ 流动相: Acetonitrile/ 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH3.0) =55/45(v/v%)
- ❖ 流速: 1.0 mL/min
- ❖ 柱温: 40°C
- ❖ 检测: 230 nm, 270 nm
- ❖ 进样: 10  $\mu\text{L}$

# 波长切换



抗菌素的时间程序测定

# 波长扫描

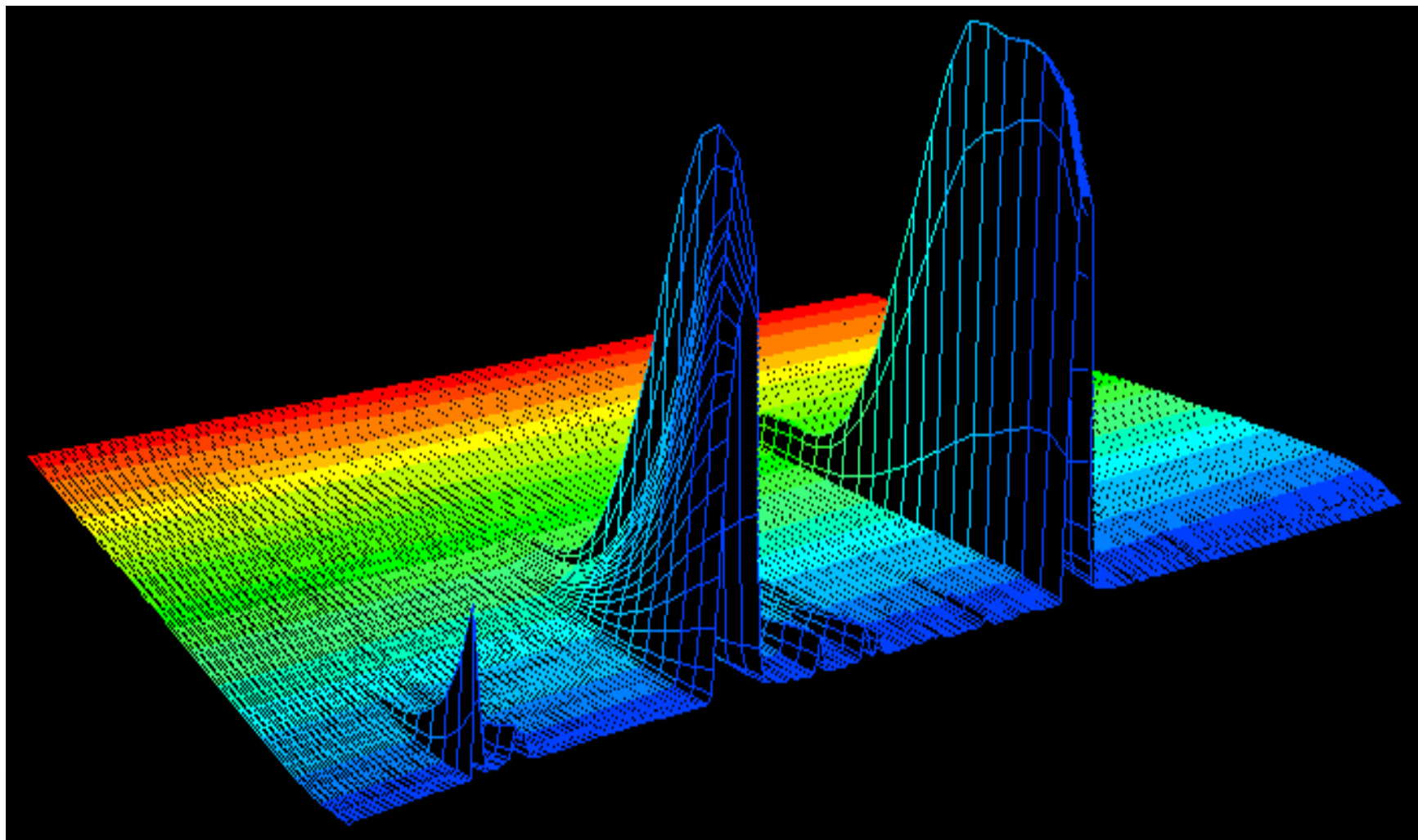


# 紫外检测器

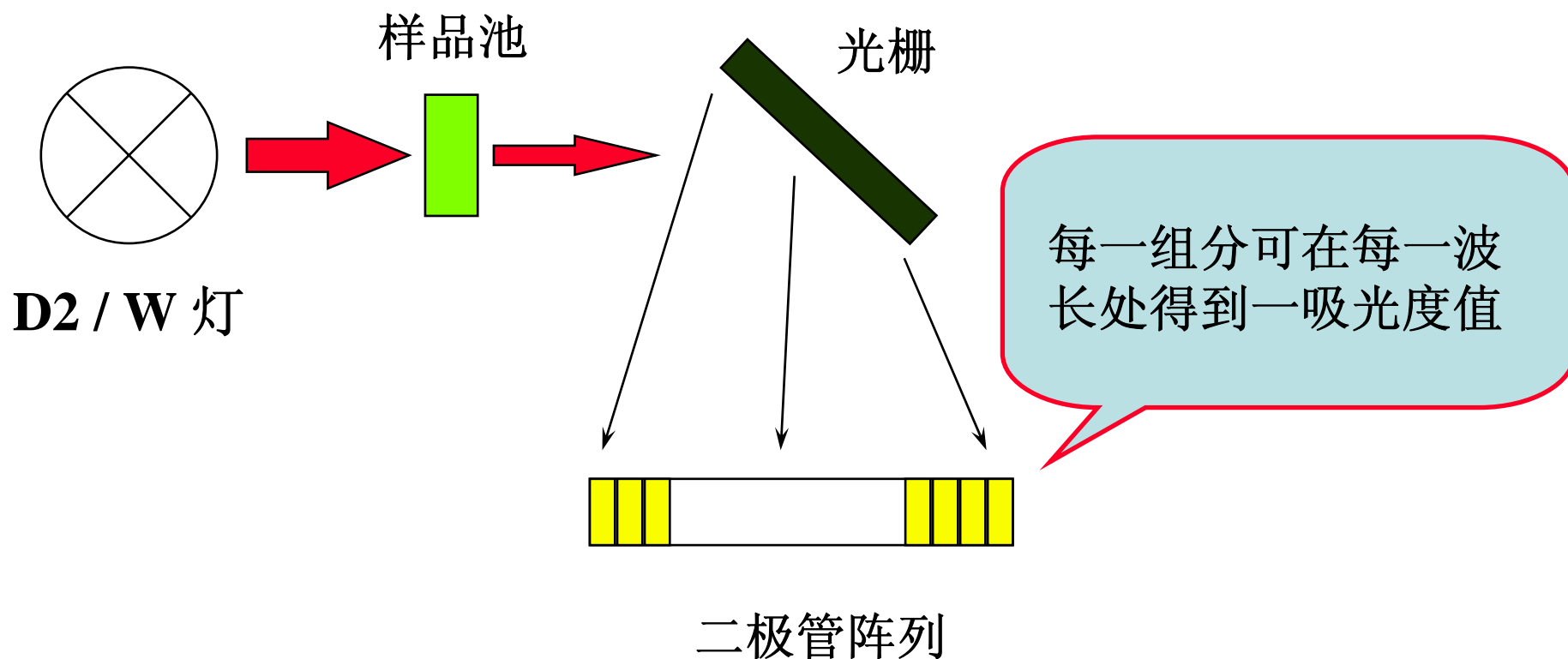
- ❖ 启动仪器或开灯后，需要一定的时间使基线稳定
- ❖ 检查流通池与管路有无漏液
- ❖ 检测时，请关闭前面板
- ❖ 清洗流通池，防止堵塞
- ❖ 标准流通池：12  $\mu\text{L}$ ，耐压12 MPa  
(半微量流通池：2.5  $\mu\text{L}$ )
- ❖ 氙灯：2000小时，不要频繁的开关（3小时）



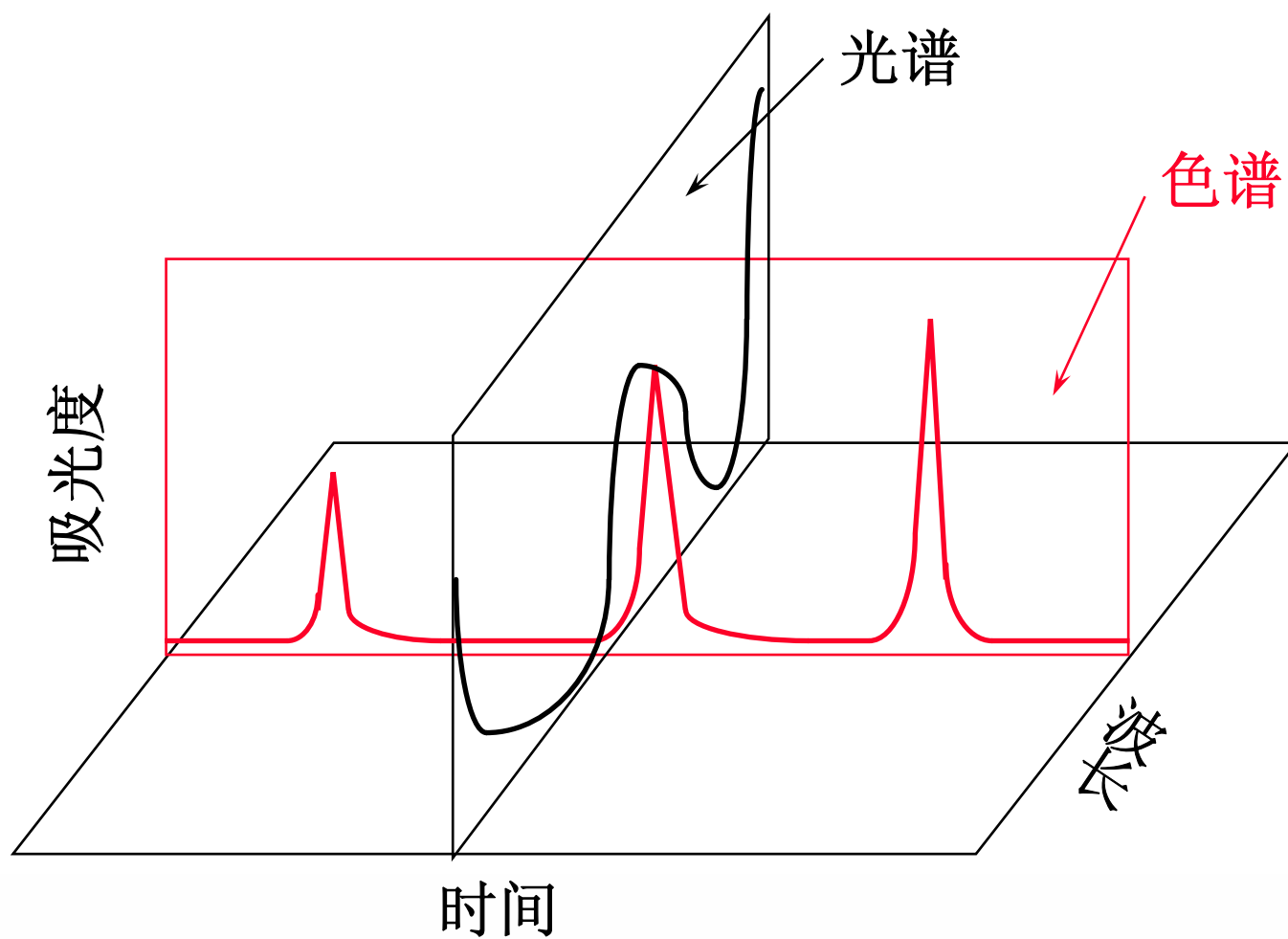
# 二极管阵列检测器



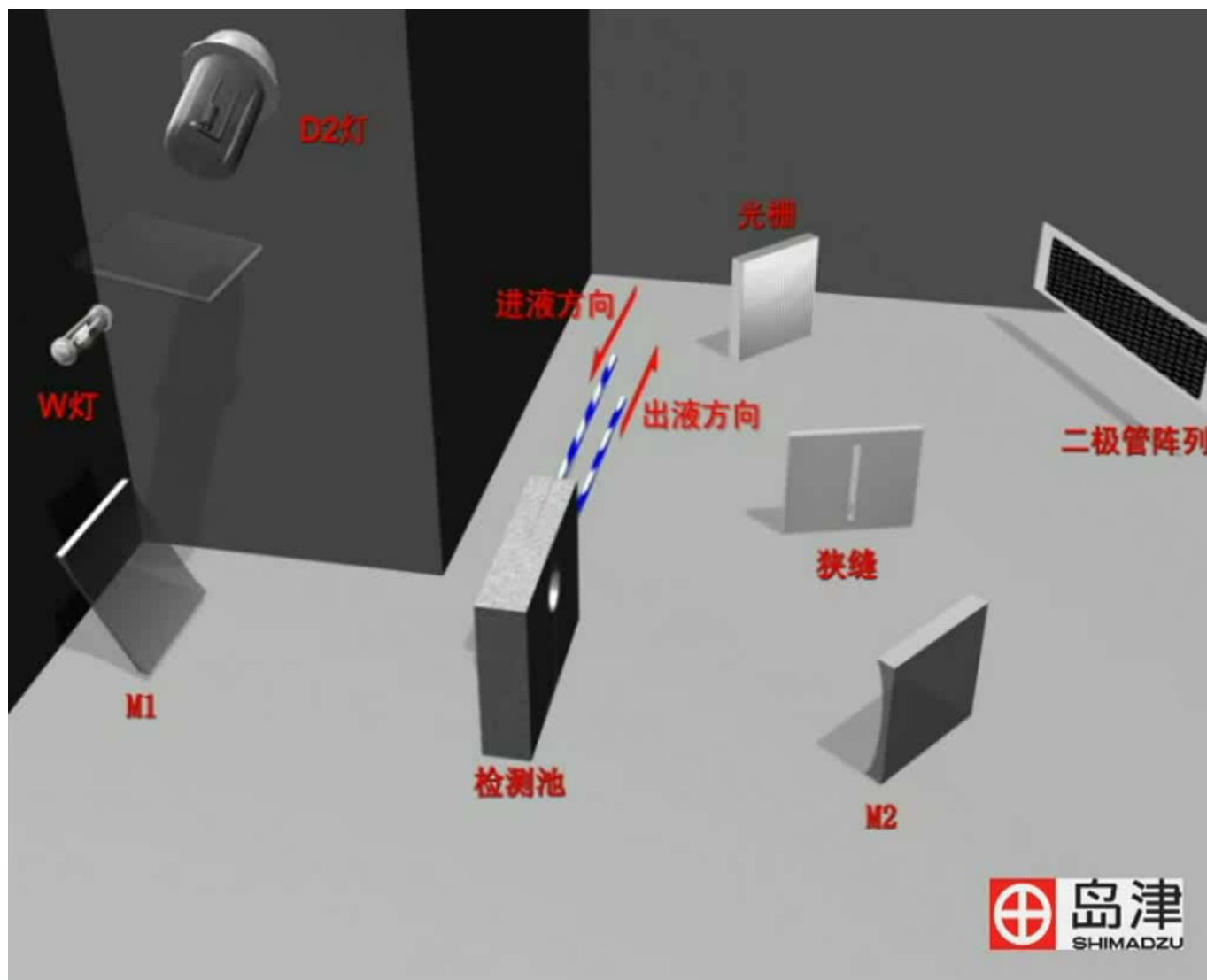
# 二极管阵列检测器



# 二极管阵列检测器



# 二极管阵列检测器



# 二极管阵列检测器

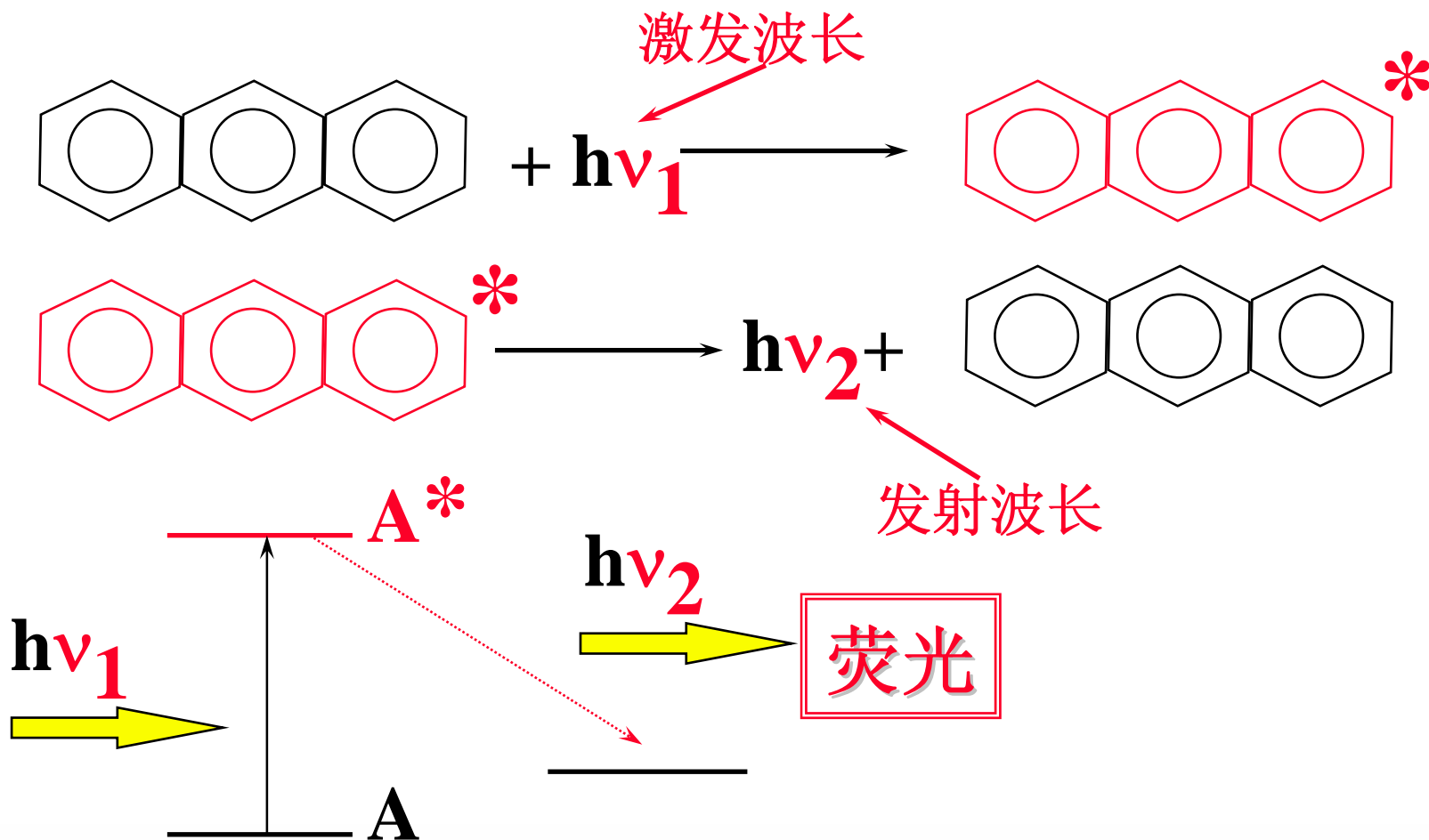
---

- ❖ 采集三维谱图，可以发现单波长检测时未检测到的峰
- ❖ 光谱定性，谱库搜索
- ❖ 峰纯度检验

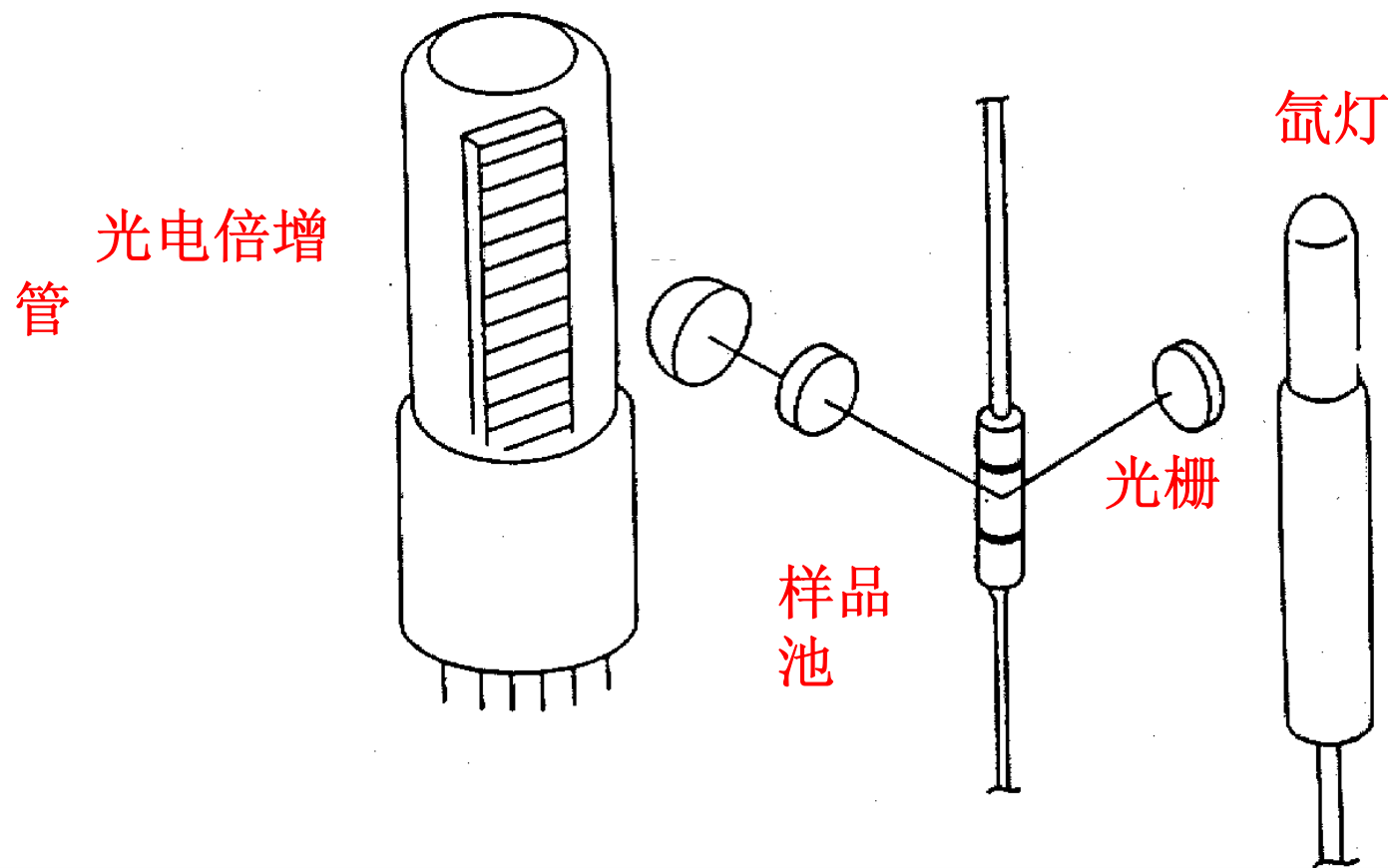
# 二极管阵列检测器

- ❖ 启动仪器或开灯后，需要一定的时间使基线稳定
- ❖ 检查流通池与管路有无漏液
- ❖ 检测时，请关闭前面板
- ❖ 清洗流通池，防止堵塞
- ❖ 标准流通池：10  $\mu\text{L}$ ，耐压12 MPa  
(半微量流通池：2.5  $\mu\text{L}$ )
- ❖ 氙灯：2000小时，不要频繁的开关（3小时）

# 荧光检测器



# 荧光检测器





# 荧光检测器

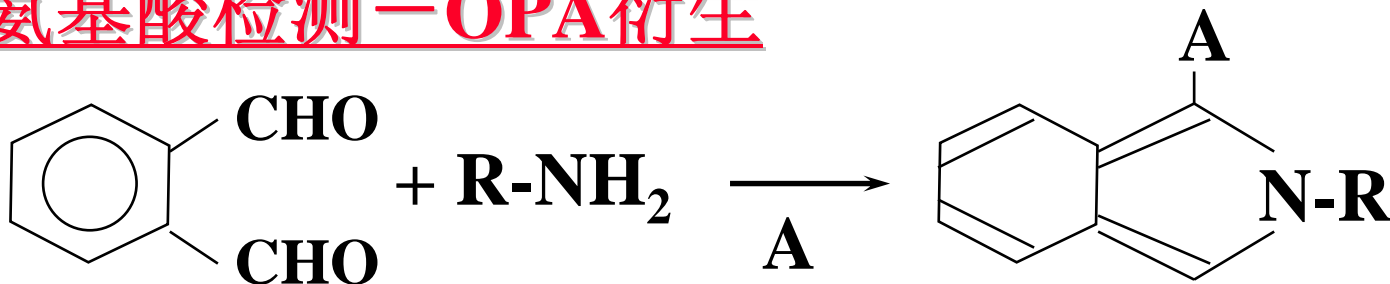
- ❖ 原理：基于被分析组分发射的荧光强度进行检测
- ❖ 优点：
  - 1) 灵敏度高，是最灵敏的检测器之一
  - 2) 选择性好
  - 3) 对温度和流速不敏感，可用于梯度洗脱
- ❖ 缺点：仅适用于测定可产生荧光的物质或能经过衍生化反应产生荧光的物质
- ❖ 可检测物质：多环芳烃、霉菌毒素、卟啉、儿茶酚氨等（具有对称共轭体系）或氨基酸、脂肪酸等需衍生后检测样品

# 荧光检测器

- ❖ 启动仪器或开灯后，需要一定的时间使基线稳定
- ❖ 检查流通池与管路有无漏液
- ❖ 检测时，请关闭前面板
- ❖ 清洗流通池，防止堵塞
- ❖ 温度上升，荧光强度下降（常温附近温度变化超过1°C时，有些化合物强度变化达到5%）
- ❖ 标准流通池：12  $\mu\text{L}$ ，耐压2 MPa
- ❖ 氙灯：2000小时（RF-20AxL），不要频繁的开关

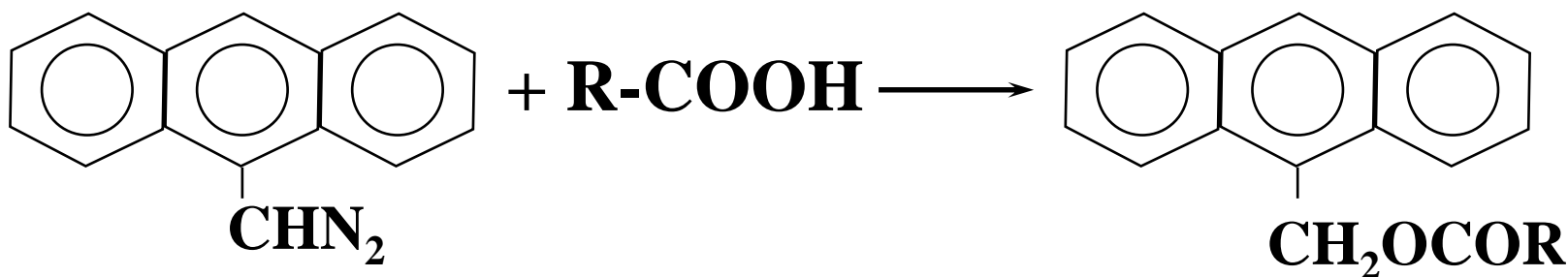
# 荧光检测器应用

## 氨基酸检测—OPA衍生



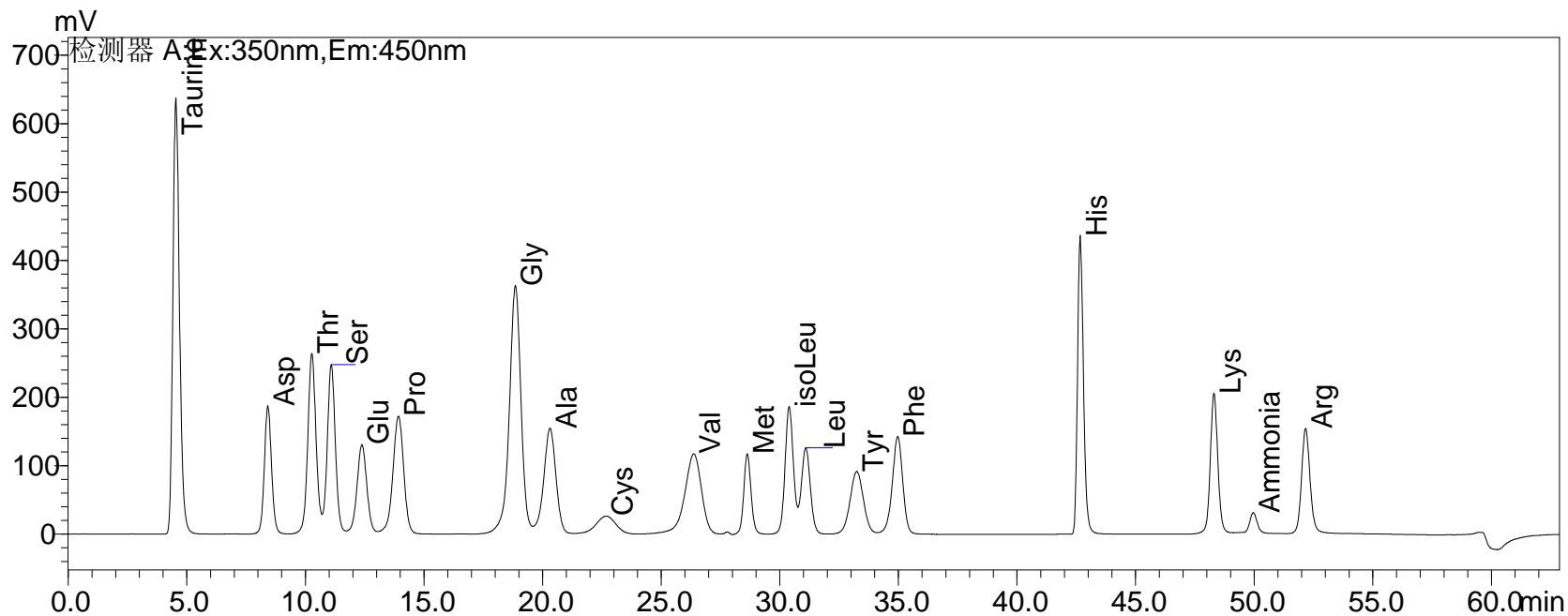
**o-phthalaldehyde  
(OPA)**

## 脂肪酸检测—ADAM衍生



**9-anthryldiazomethane  
(ADAM)**

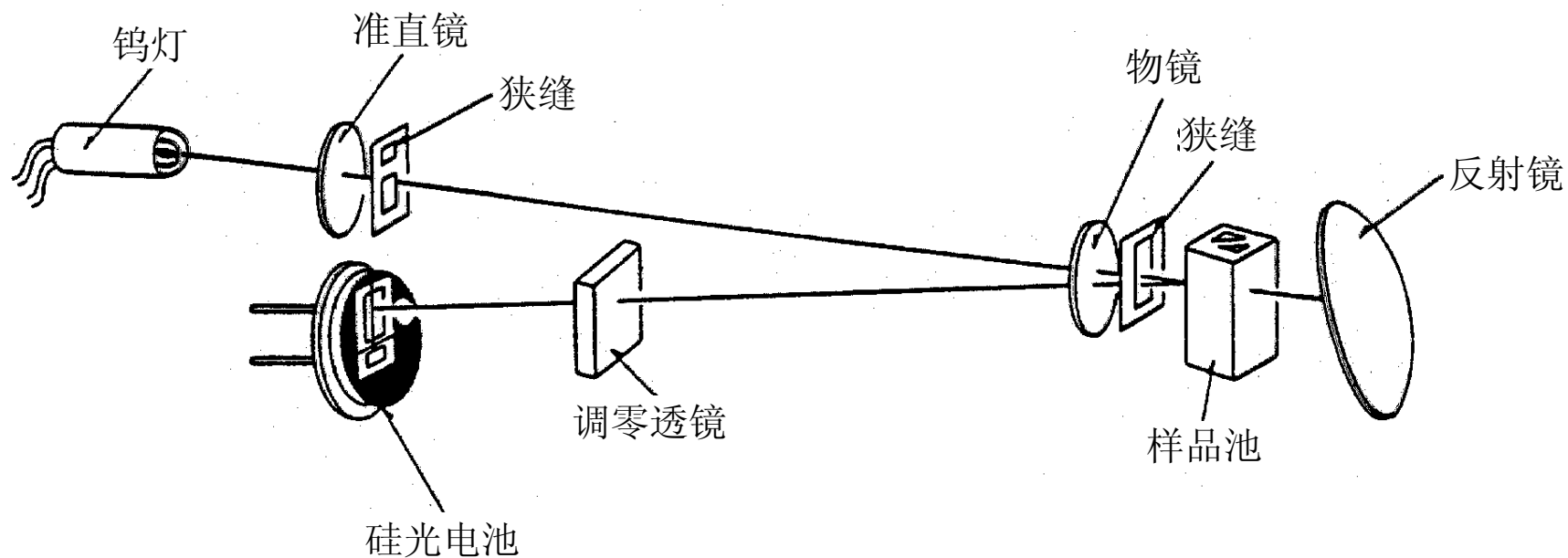
# 氨基酸检测—OPA柱后衍生



各组分浓度：0.02  $\mu\text{mol/mL}$ ，进样10  $\mu\text{L}$

# 示差折光检测器

## 光学系统



# 示差折光检测器

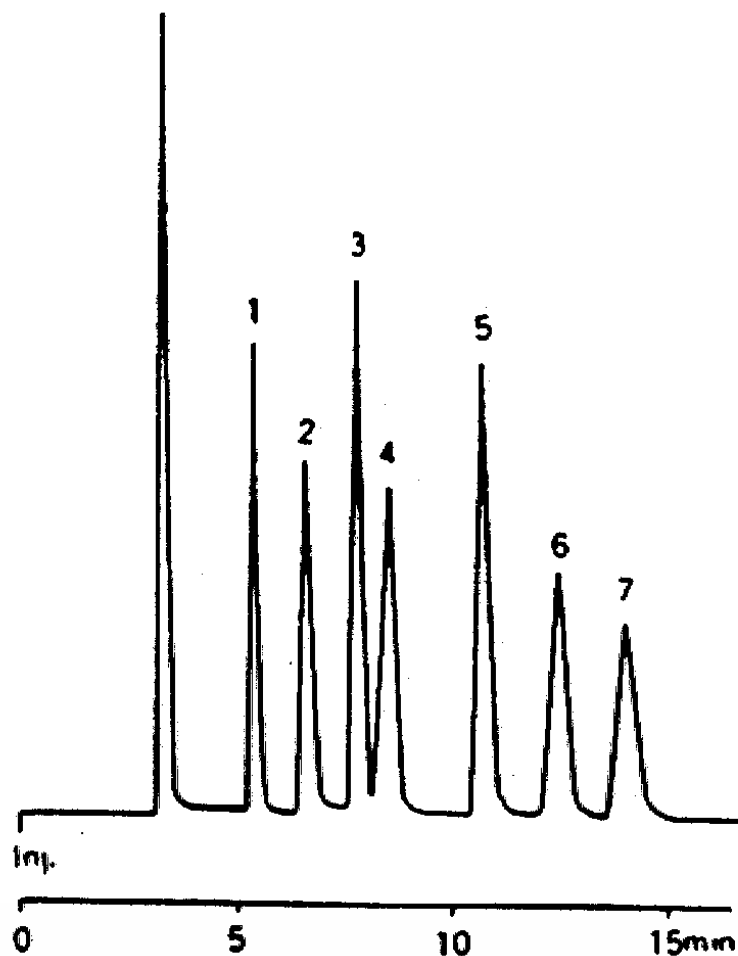
- ❖ 原理：连续测定流通池中溶液折射率来测定试样中各组分浓度。
- ❖ 优点：通用型检测器，
- ❖ 缺点：
  - 1) 对温度变化敏感
  - 2) 对溶剂组成变化敏感，不能用于梯度检测
  - 3) 属于中等灵敏度的检测器

# 示差折光检测器

---

- ❖ 检测时，请关闭前面板
- ❖ 清洗流通池，防止堵塞
- ❖ 流通池：9  $\mu\text{L}$ ，耐压2 MPa
  - 进口：63.5  $\mu\text{L}$
  - 出口：280.2  $\mu\text{L}$
- ❖ 钨灯：20000小时

# 糖分析例



## 分析条件

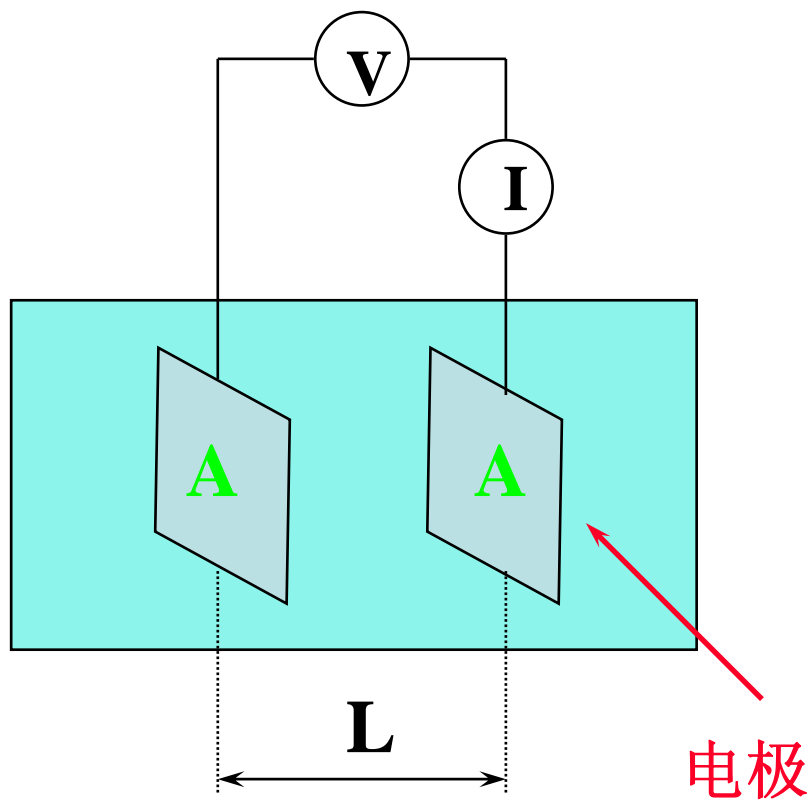
- ❖ 色谱柱：Shim-pack CLC-NH<sub>2</sub>
- ❖ 流动相：乙腈 / 水 = 7 / 3
- ❖ 流速：1.0 mL/min
- ❖ 温度：室温

## 峰

1. 甘油
2. 木糖
3. 果糖
4. 葡萄糖
5. 蔗糖
6. 甘露糖
7. 乳糖



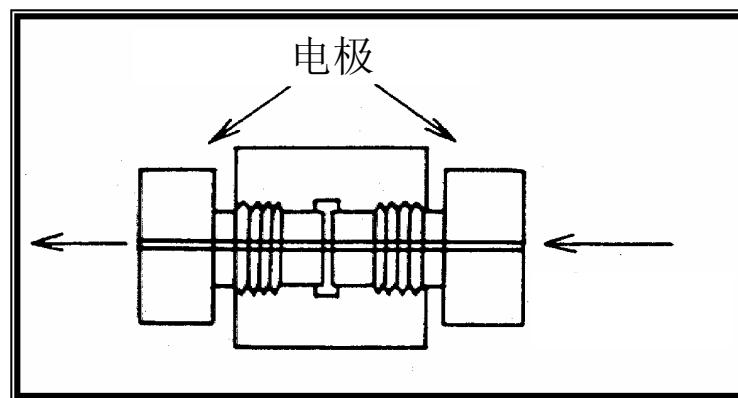
# 电导检测器



$$K \text{ (电导)} = I \text{ [A]} / E \text{ [V]}$$
$$= A \text{ [cm}^2\text{]} / L \text{ [cm]} \times k$$

(k : 电导率)

$$k = (I/E) \times (L/A)$$



# 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
- ❖ 缺点：对温度变化敏感  
(温度每升高1℃，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

# 电导检测器

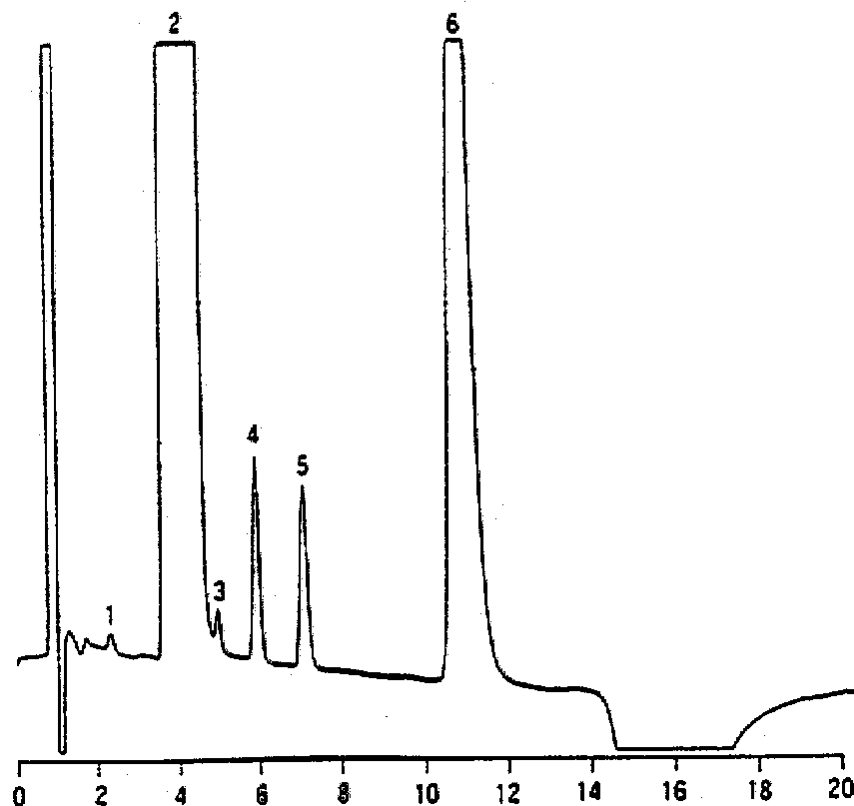
---

- ❖ 清洗流通池，防止堵塞
- ❖ 流通池：0.25  $\mu\text{L}$ ，耐压2.9 MPa

# 海水中阴离子分析例

## 分析条件

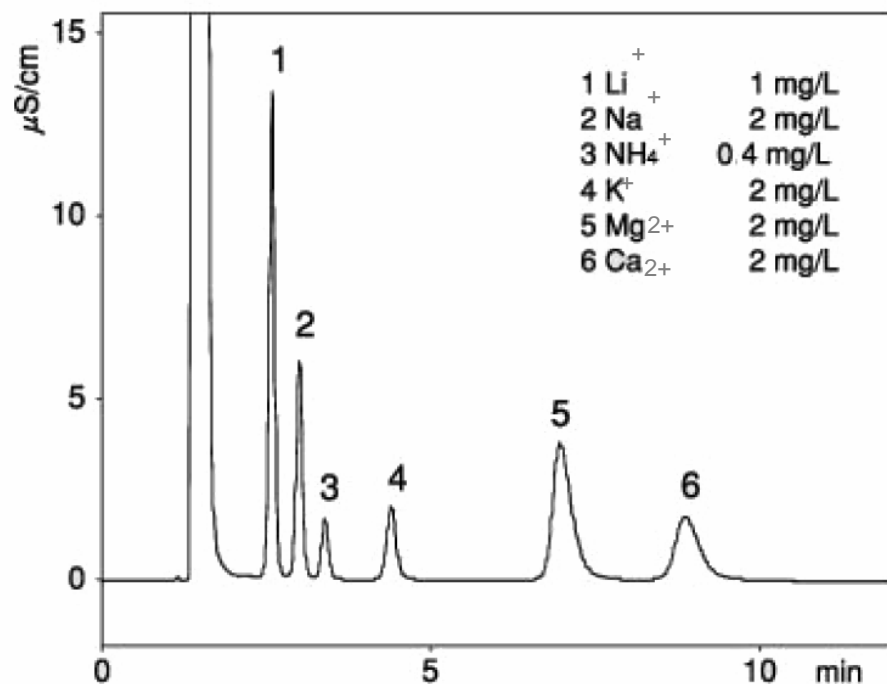
- ❖ 色谱柱 : Shim-pack IC-A3
- ❖ 流动相 : 8.0 mM p-hydroxybenzoic acid  
3.2 mM Bis-Tris
- ❖ 流速 : 1.5 mL/min
- ❖ 温度 : 40°C
- ❖ 进样体积 : 100  $\mu$ L



## 峰

- |                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| 1. F <sup>-</sup>                | (1.4 ppm)   |
| 2. Cl <sup>-</sup>               | (10200 ppm) |
| 3. NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | (10 ppm)    |
| 4. Br <sup>-</sup>               | (43 ppm)    |
| 5. NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  | (44 ppm)    |
| 6. SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | (431 ppm)   |

# 阳离子分析例

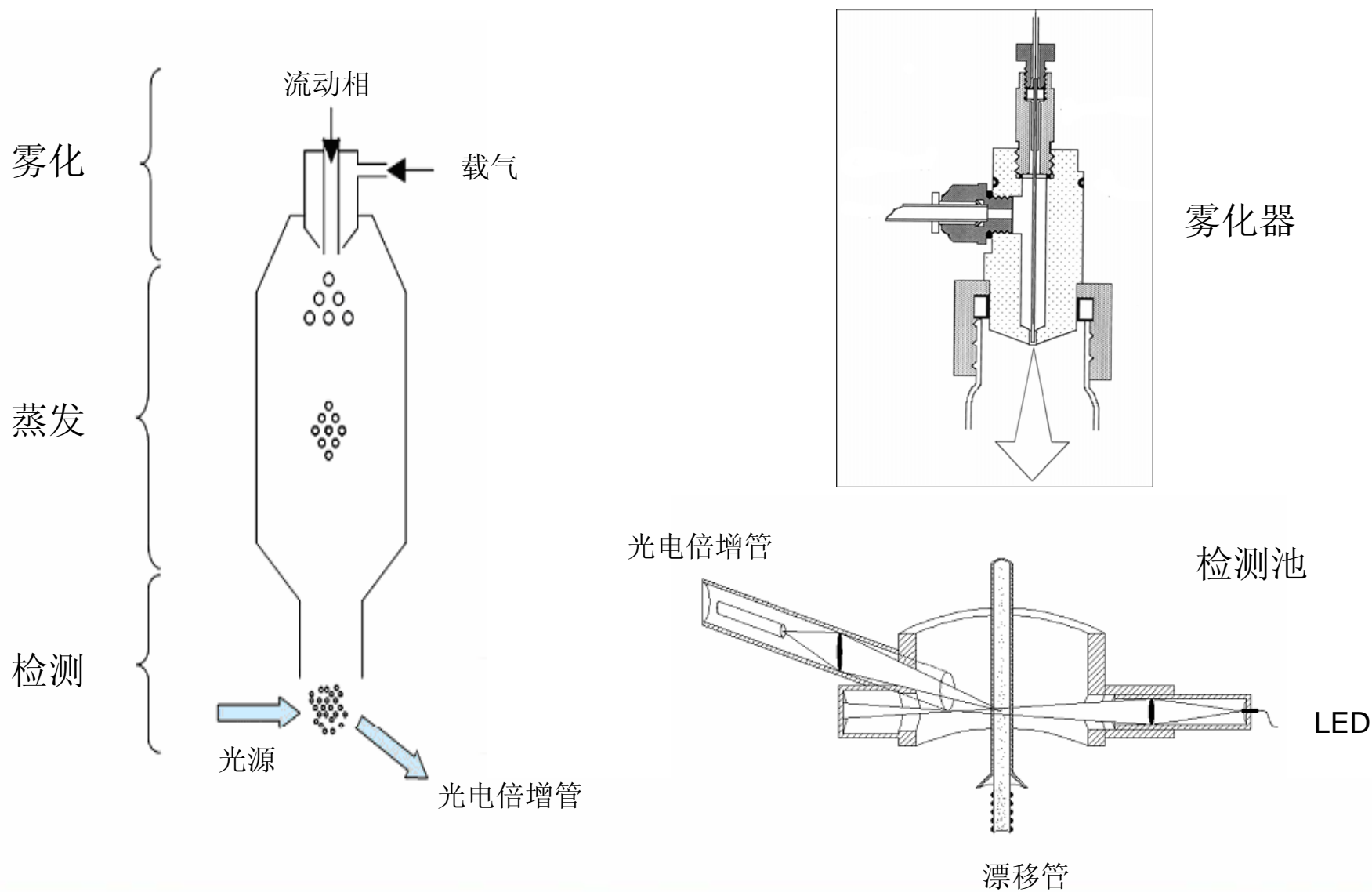


阳离子标准试样的色谱图

## 分析条件

- ❖ 色谱柱：Shim-pack IC-C1
- ❖ 流动相：5 nM 硝酸溶液
- ❖ 流速：1.5 mL/min
- ❖ 温度：40°C
- ❖ 进样：50  $\mu\text{L}$

# 蒸发光散射检测器



# 蒸发光散射检测器

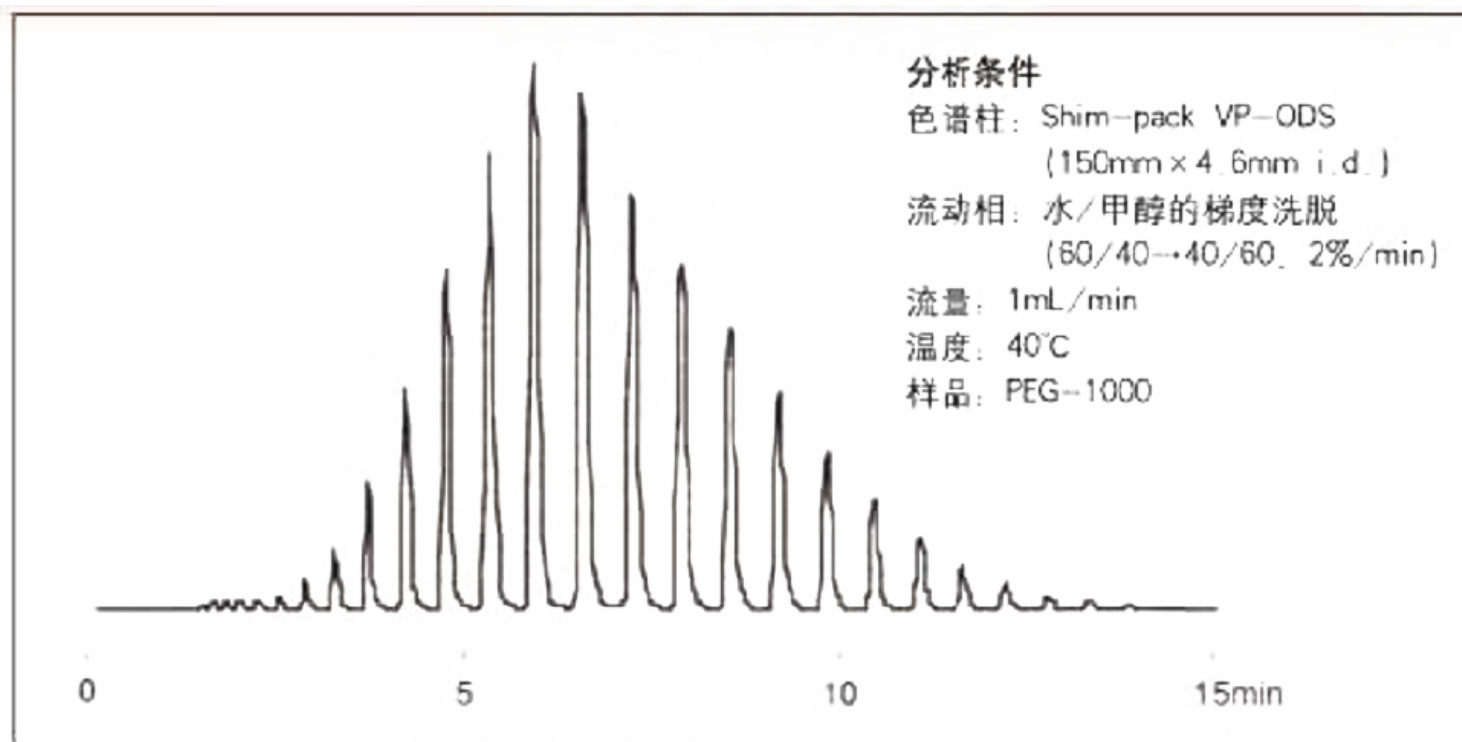
- ❖ 原理： 流出物在检测器中被高速氮气喷成雾状液滴，溶剂挥发后，溶质形成微小颗粒，被载气带到检测系统，进入散射室中，检验散射光的强度。
- ❖ 优点： 消除了溶剂干扰以及温度变化带来的基线漂移，可梯度洗脱，灵敏度高，是HPLC的通用型检测器
- ❖ 缺点： 不能使用非挥发性缓冲盐做流动相，如磷酸盐

# 蒸发光散射检测器

- ❖ 废气不能直接排放在室内
- ❖ 如果流动相中含有有机溶剂，使用惰性气体做雾化气
- ❖ 避免使用在工作温度下能引起爆炸的溶剂和雾化气
- ❖ 流动相中不使用非挥发性盐
- ❖ 雾化气压力不要超过**450 kPa**
- ❖ 先开气，后开泵
- ❖ 保证雾化器虹吸出口充满液体
- ❖ 不要打开前门
- ❖ **LED灯：5000小时**



# PEG-1000分析例



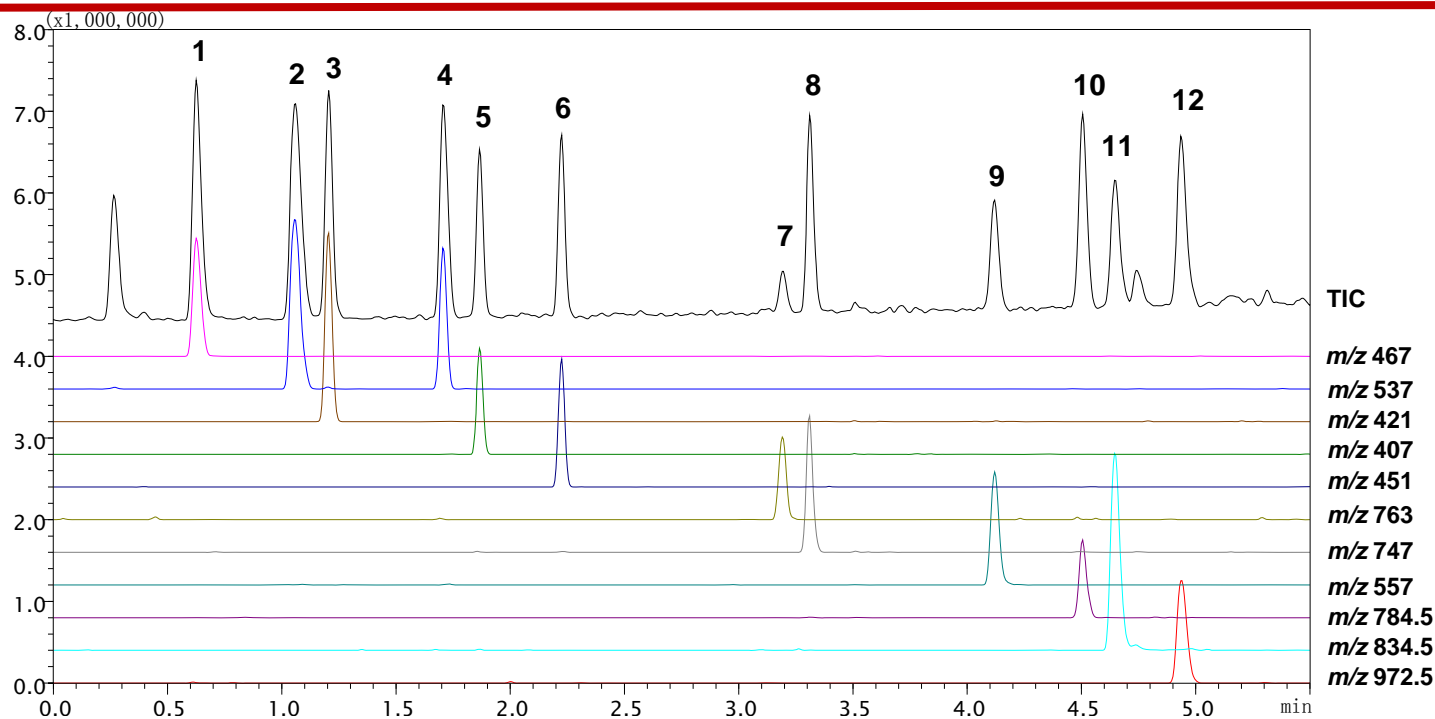
无紫外吸收化合物的色谱图

# 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

# 人造色素质谱图



色谱柱: Shim-pack XR-ODS (50 mmL x 2.0 mmI.D. Particle size: 2.2 μm)  
 流动相: A; 20mmol/L NH<sub>4</sub>Ac (pH 4.7)  
 B; 20mmol/L NH<sub>4</sub>Ac (pH 4.7)  
 /A CN=1/1  
 时间程序: 10%B (0 min) - 100%B (5.0 min)  
 流速: 0.5 mL/min  
 进样体积: 5 μL  
 柱温: 40 °C

扫描范围 *m/z* 200-1200

1: tartrazine	7: fast green FCF
2: amaranth	8: brilliant blue FCF
3: indigo carmine,	9: acid red
4: new cocchine	10: phloxine B
5: sunset yellow FCF	11: erythrosine
6: allura red AC	12: rose bengal