



# 主线：研究目标成分（生命现象物质基础）的实验技术

## 三个模块

### 分离纯化实验技术

研究生物成分的结构、功能，  
阐明生命现象的本质

发现先导化合物，阐明  
生物功能，开发新药

### 分析检测实验技术

药品质量、食品品质检测

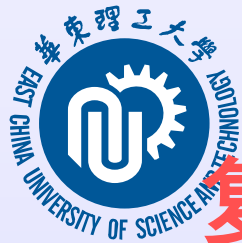
临床诊断、环境监测等

### 功能评价实验技术

分子水平评价技术

细胞水平评价技术

动物水平评价技术



# 复习 目标成分分离纯化常用技术

## 粗分级分离技术

- ✓按照溶解度差异：沉淀法、萃取法
- ✓按照分子量差异：透析、微滤、纳滤、电渗析等

## 细分级分离技术

- ✓薄层色谱 (TLC)
- ✓柱色谱 (CC)
- ✓高效液相色谱 (HPLC)

# 薄层色谱 (Thin-Layer Chromatography, TLC)

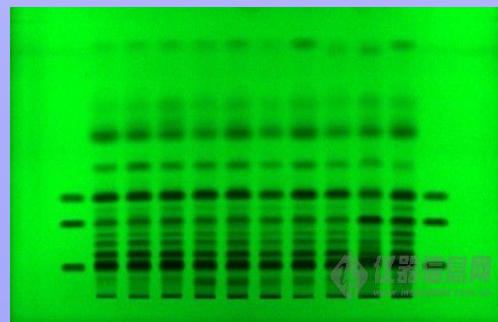
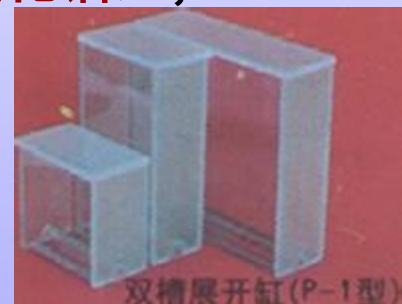
## 原理 ( Principle):

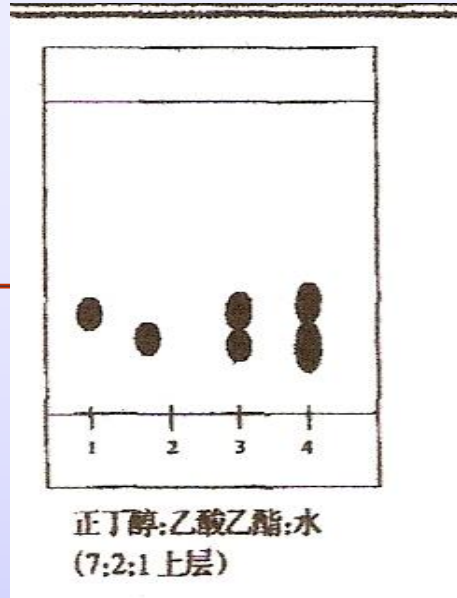
**吸附色谱 (Adsorption chromatography): 吸附力差异**

**固定相: 吸附剂 (硅胶、氧化铝、聚酰胺)**

**流动相: 两种或以上溶剂混合 (2种有机溶剂混合/硅胶、氧化铝);**

**(甲醇: 水/聚酰胺)**





## 比移值(Retardation factor value , Rf)

**Rf = 展开后，点样线至斑点中心的距离/展开后，点样线至溶剂前沿的距离**

各组分的位罝一般用**比移值Rf**（点样线到样品展开完毕后斑点的位罝之间的距离与点样线到展开溶剂前沿距离的比值）表示。

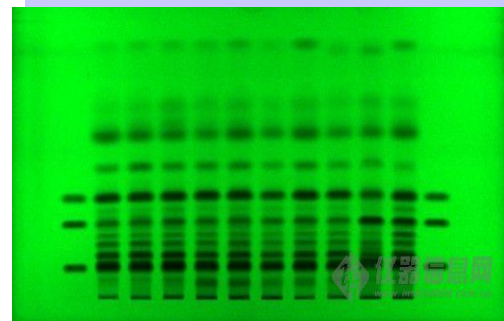
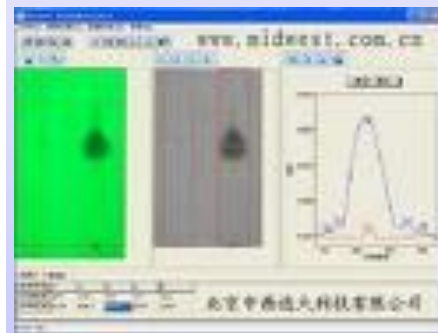
Rf 值的大小与化合物的结构、性质、展开的溶剂系统、温度、展开方式等有关。

**检识：**如果化合物本身有颜色，分离后可以直接在日光下观察它的斑点；如果化合物本身无颜色，但有紫外吸收，则紫外灯下观察荧光；如果既无颜色又无紫外吸收，则可以展开分离后置碘缸中显色，许多化合物都能与碘形成棕色斑点。碘蒸气挥发后，斑点颜色即褪色，所以，碘显色后应立即标出斑点位置。另外，还有许多种显色剂，可以根据不同的化合物，选用不同的显色剂。常用的显色方式有蒸气显色、喷雾显色、浸渍显色等。

**$R_f$  = 展开后，点样线至斑点中心的距离/展开后，点样线至溶剂前沿的距离**

$R_f$ 值随分离化合物的结构、固定相、流动相的性质、温度等多种因素的不同而变化。当各因素固定时， $R_f$ 就是一个特定的常数，因而可以作为定性分析的依据。

对于样品的分离制备，则可以直接将斑点化合物通过有机溶剂硅胶洗脱得到。



# 柱色谱 (Column Chromatography, CC)

✓ 液相色谱(Liquid chromatography):分离制备常用

吸附色谱法 (Adsorption chromatography)

分配色谱法 (Partition chromatography)

分子排阻色谱法 (Molecular Exclusion Chromatography)

离子交换柱色谱法 (Ion Exchange Chromatography)

亲和色谱法 (Affinity Chromatography)

✓ 气相色谱 (Gas chromatography)

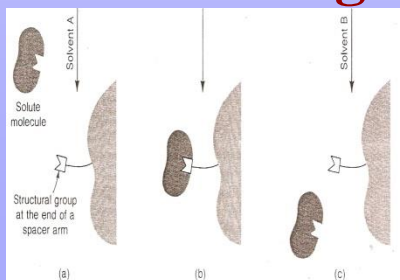
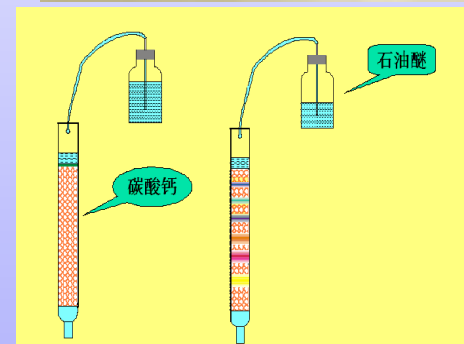


FIGURE 18.10 Affinity chromatography showing (a) solute introduced onto column in solvent A, (b) solute attached to specific binding group on column, and (c) solute eluted from column with solvent B. The binding group on the column is located at the end of a chain of carbon atoms called a spacer arm to avoid steric hindrance by the resin surface that could prevent the solute molecule from reaching the binding group.

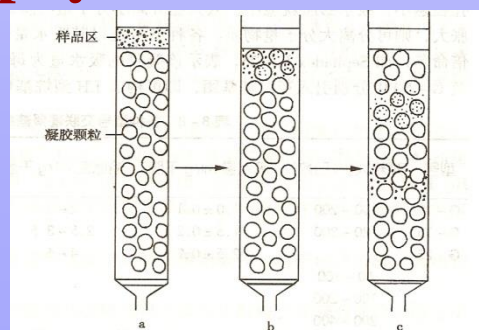


图 8-9 分子筛色谱分离示意图

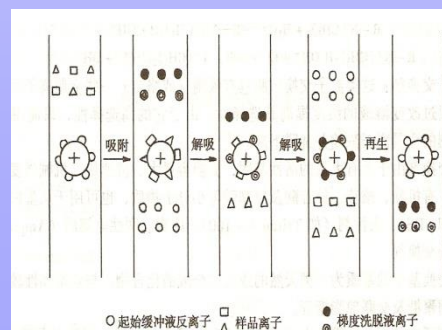
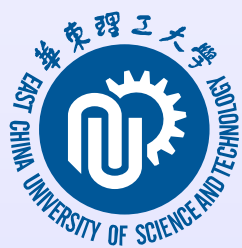


图 8-5 离子交换色谱原理示意图

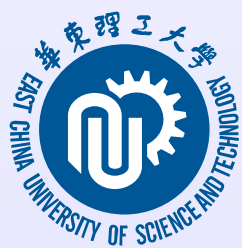


## 问题:

**下列物质中，请根据所学知识和物质性质选择合适的分离方法。**

- 1.胡萝卜素和叶绿素a**
- 2.苦参碱和氧化苦参碱**
- 3.麦冬多糖**
- 4.苦瓜过氧化物酶**
- 5.大黄素和大黄酸**
- 6.芦丁和槲皮素**
- 7.葡萄糖和鼠李糖**





## 问题解答

**下列物质中，请根据所学知识和物质性质选择合适的分离方法。**

- 1.胡萝卜素和叶绿素a**
- 2.苦参碱和氧化苦参碱**
- 3.麦冬多糖**
- 4.苦瓜过氧化物酶**
- 5.大黄素和大黄酸**
- 6.芦丁和槲皮素**
- 7.葡萄糖和鼠李糖**

**硅胶-吸附色谱**

**阳离子交换树脂-离子交换色谱**

**凝胶-分子排阻色谱**

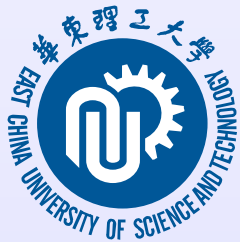
**凝胶-分子排阻色谱; 亲和色谱**

**ODS-分配色谱**

**聚酰胺-吸附色谱**

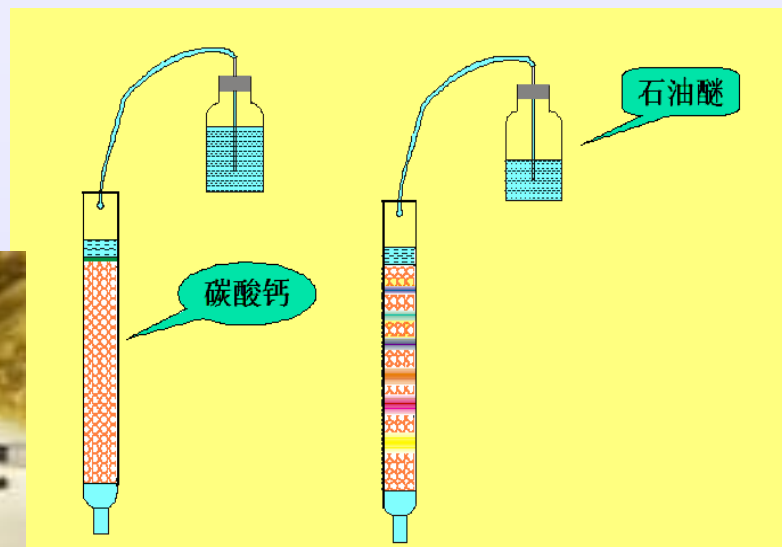
**纸色谱-亲和色谱**





# 柱子流出液中目标成分的检测

- ✓ 显色法
- ✓ 分光光度法测OD
- ✓ 薄层色谱 (TLC) / 小分子常用 / 亦可制备
- ✓ 纸色谱 (PC) / 小分子常用
- ✓ 电泳 (electrophoresis, EP) / 大分子常用
- ✓ 高效液相色谱法 (HPLC) : 除了检测, 还可制备



**经典液相色谱：** 固定相颗粒较大 (常用150–350 $\mu\text{m}$ )，且不均匀  
(自主填柱)

常压下输送流动相 (重力)

柱效较低

分析周期长 (常几个小时)

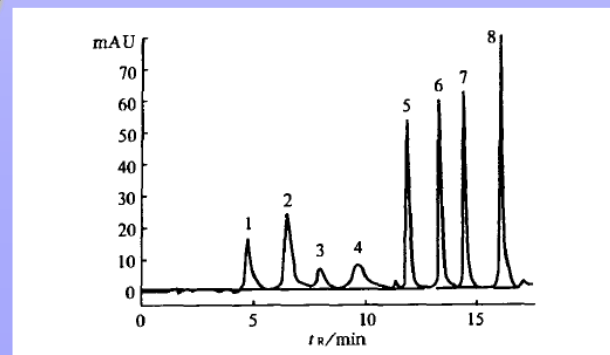
**高效液相色谱：** 固定相颗粒小 (常用5 $\mu\text{m}$ )，且均匀  
(色谱仪操作)

高压下输送流动相 (高压泵)

柱效较高

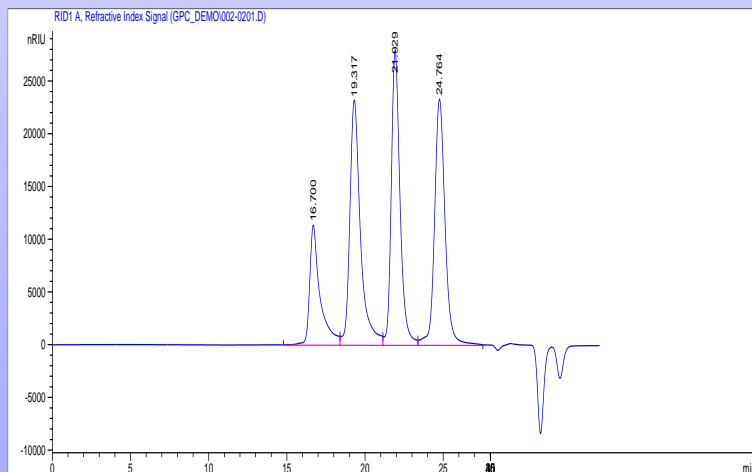
分析周期短 (常几分钟)

**HPLC特点：** 高压、高速、高效

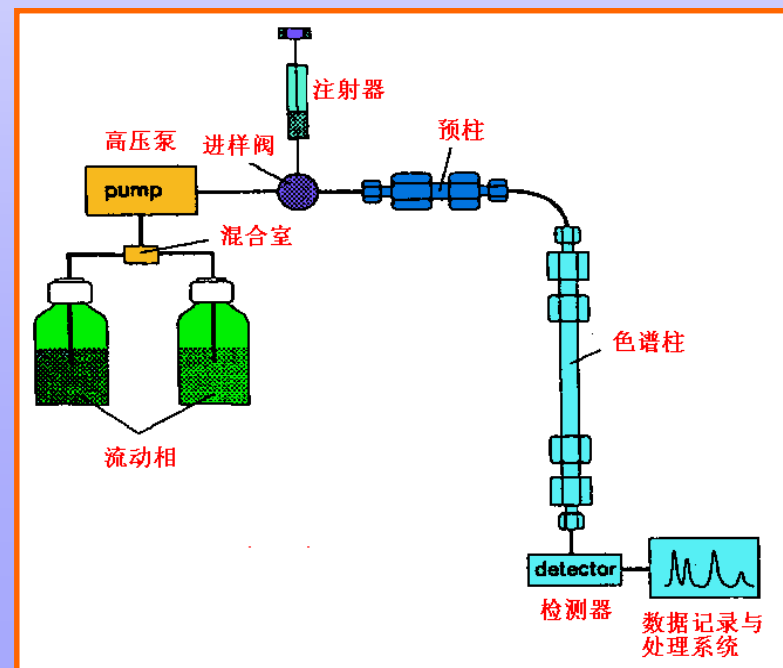


## HPLC工作原理:

通过**高压泵**, 连续地将流动相按照一定流速流过**柱子**, 通过进样器, 将混合物样品注入。由于各组份性质差异, 在柱上的保留时间不同而分离。通过**检测器**检测, 得到组份的电信号放大。记录仪将信号以图谱形式记录下来。



**高压泵、柱子、检测器是关键部件**



# 高压泵与洗脱方式

- 输送连续、恒定的流动相到柱中。
- 常有四元泵、二元泵和单元泵，分别能同时控制流路是4, 2, 1
- **等度洗脱**：同一分析周期内，流动相组成保持恒定。适合组分数目较少，性质差异不大的样品。
- **梯度洗脱**：同一分析周期内，程序控制流动相的组成（如溶剂的极性、离子强度等），使在整个分离过程中，溶剂强度按照特定的变化规律增加。适合组分数目多，性质差异较大的复杂样品。**缩短时间、提高分离度、改善峰形。**

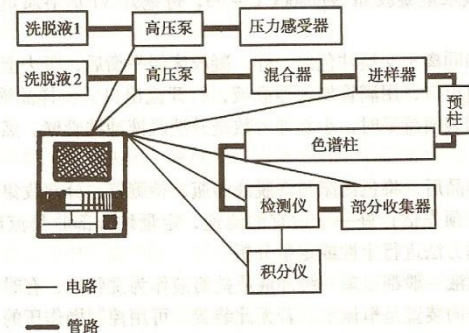
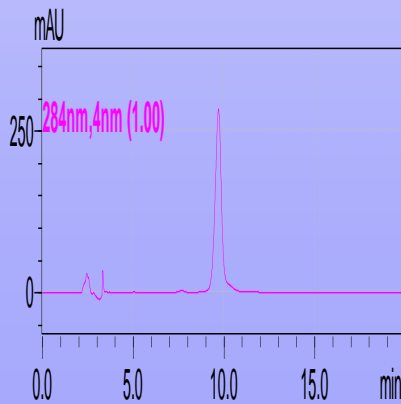
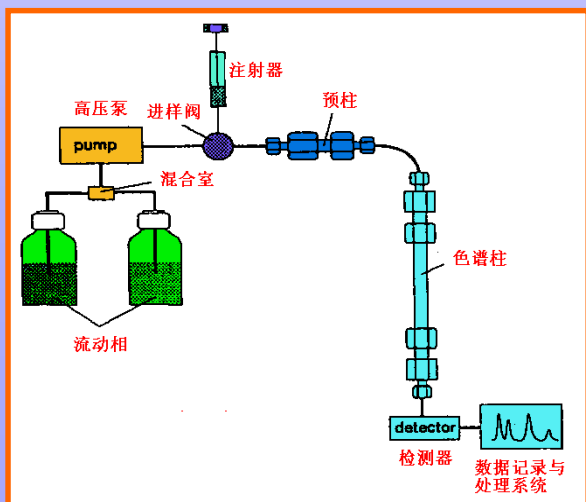
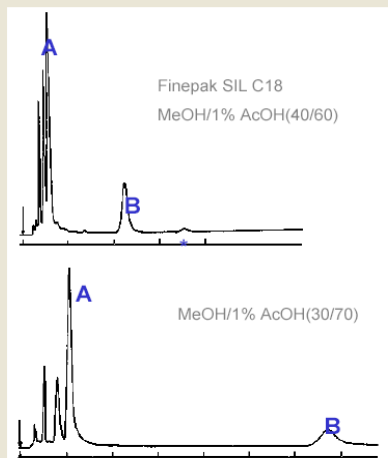


图 8-10 高效液相色谱系统组成示意图

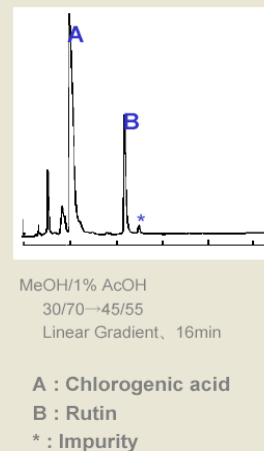


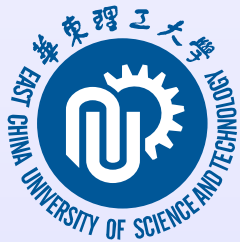
## Advantage of gradient elution method

### Isocratic elution method



### Gradient elution method





## 色谱柱 (Column)



是HPLC色谱仪的心脏

常用内径：分析柱2-5mm (4.6mm);

制备柱内径较大,可达25mm 以上

填料颗粒度：

颗粒度5-10  $\mu\text{m}$  (5 $\mu\text{m}$ )

颗粒度10-40  $\mu\text{m}$

分析

制备



常用柱长：

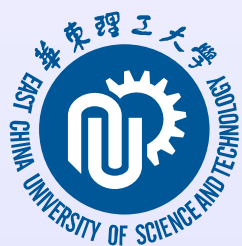
颗粒度 5-10  $\mu\text{m}$  (5 $\mu\text{m}$ ) ,15-30cm (15, 25cm)

颗粒度 3-5  $\mu\text{m}$  (3.5 $\mu\text{m}$ ) ,7.5-15cm (15cm)

颗粒度 10-40  $\mu\text{m}$ , 15-50cm

} 分析

制备



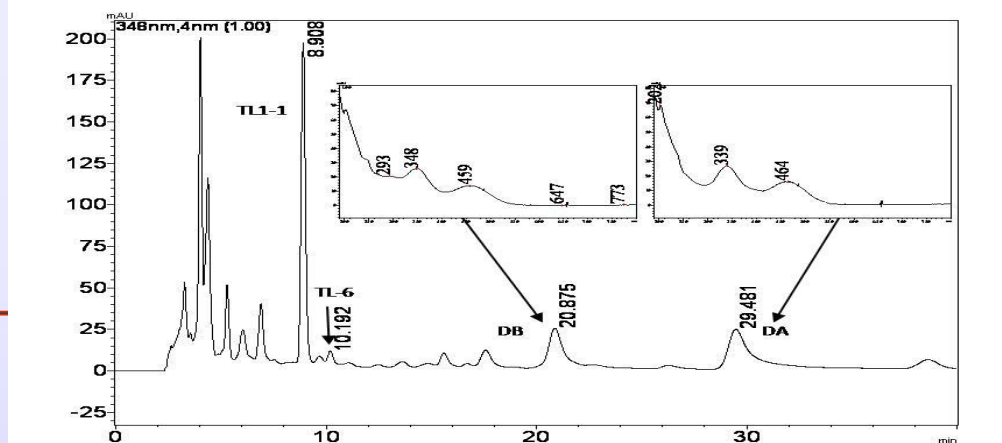
# 常用的HPLC柱---液液分配HPLC

**原理：**根据被分离物质在两相不相混容的溶剂间溶解度不同，而具有不同分配系数，从而达到分离。液-液分配。

早期将固定相涂布式涂抹在担体上，易流失，不太用了。

现在多采用将固定相化学键合于担体表面（化学键合相色谱）

- 反相高效液相色谱（Reverse Phase HPLC, RP-HPLC）
- 正相高效液相色谱（Normal Phase HPLC, NP-HPLC）

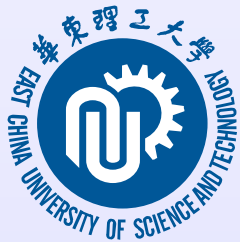


## 反相高效液相色谱 (Reverse Phase HPLC, RP-HPLC)

非极性或弱极性固定相和极性流动相构成的HPLC系统。占应用的80%左右

- 常用固定相: 十八烷基硅烷键合硅胶 (Octadecylsilyl, 简称ODS), 八烷基硅烷键合硅胶 (Octyl Silyl, 简称OTS)
- 最常用的流动相: 甲醇:H<sub>2</sub>O 或 乙腈:H<sub>2</sub>O; 由于乙腈的剧毒性, 通常优先考虑甲醇:H<sub>2</sub>O流动相。固定相极性<流动相极性
- 化合物出峰顺序: 溶质按其疏水性大小进行分离, 极性越大疏水性越小的溶质, 越不易溶解于固定相, 所以先被洗脱下来。极性越小, 后出峰。
- 常用的流动相及其洗脱强度: H<sub>2</sub>O<甲醇<乙腈<乙醇<丙醇<异丙醇<四氢呋喃, 甲醇:H<sub>2</sub>O (甲醇比例越大, 水比例越小, 洗脱力越大)
- 适用范围: 用于非极性和弱极性组分的分离。





## 正相高效液相色谱 (Normal Phase HPLC, NP-HPLC)

极性固定相和非极性或非极性流动相构成的HPLC系统。

**固定相极性 > 流动相极性**

常用的固定相：硅胶与**氰基、氨基**键合。

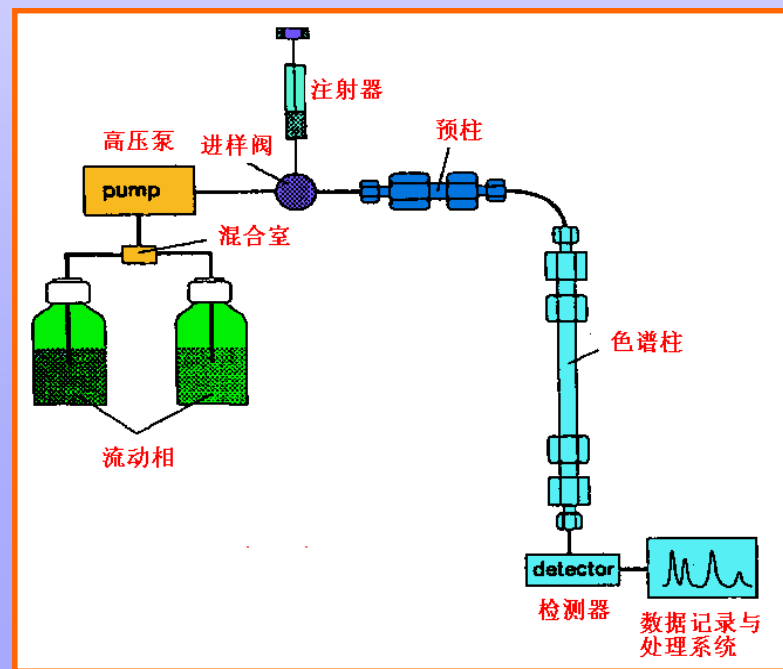
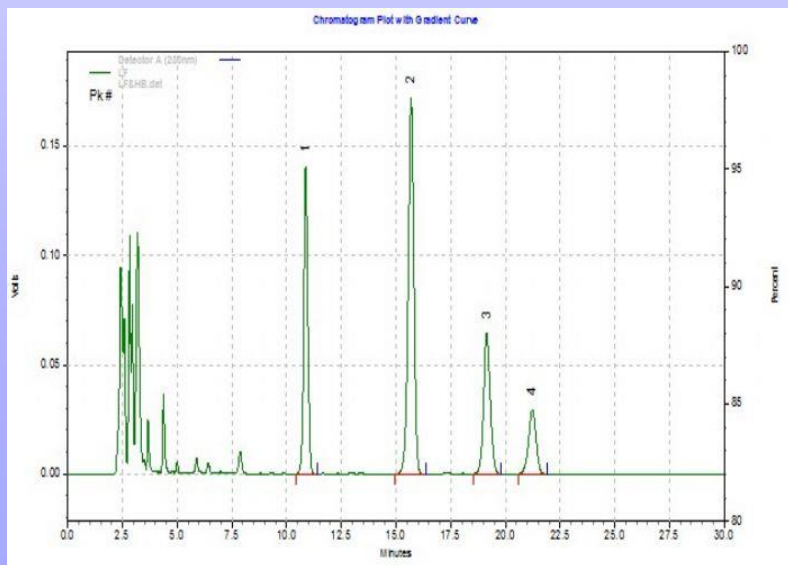
常用的流动相：己烷等有机溶剂或配比。

化合物出峰顺序：极性小的先出。

适用范围：用于分离中等极性或极性较强的分子。如，生物碱、苷类、糖类、有机酸等。

## 检测器 (Detector):

检测器是液相色谱仪的**关键部件**之一。它的作用是连续地将色谱柱中流出的样品组分含量随时间的变化，转变成易于测量的电信号，以便在记录仪上记录下来，得到样品组分分离的色谱图 (**chromatogram**)。



## 检测器类型(Types of detector):

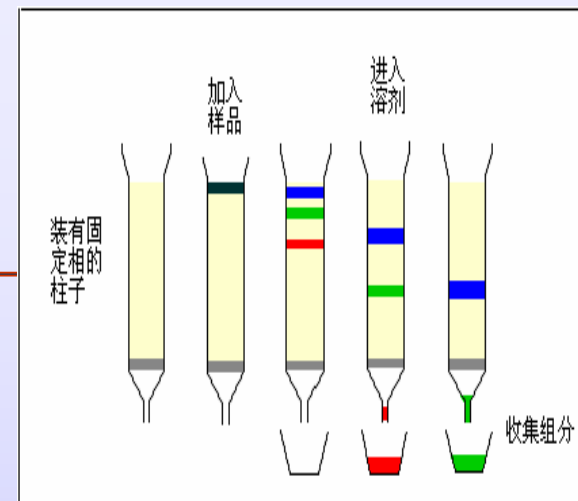
√ 紫外检测器 (UV detector) : 选择型

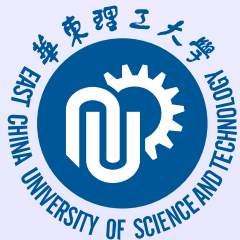
√ 示差折光检测器 : 通用型

(Refractive Index detector , RI detector)

√ 蒸发光散射检测器: 通用型

(Evaporative Light Scattering Detector , ELSD )

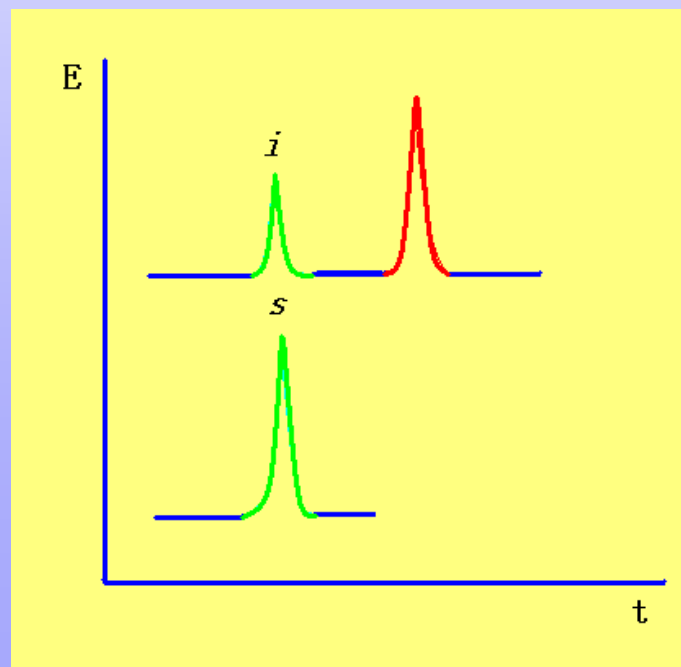




## HPLC法定性鉴别的依据:

HPLC定性鉴别依据是相同的物质在**相同的HPLC色谱条件下**, 具有相同的色谱行为, 应该有**相同的**保留时间 (Retention time, **RT**)

- ✓ 利用纯物质(标准品)对照定性
- ✓ 利用文献值对照定性
- ✓ 和质谱/红外光谱仪联用



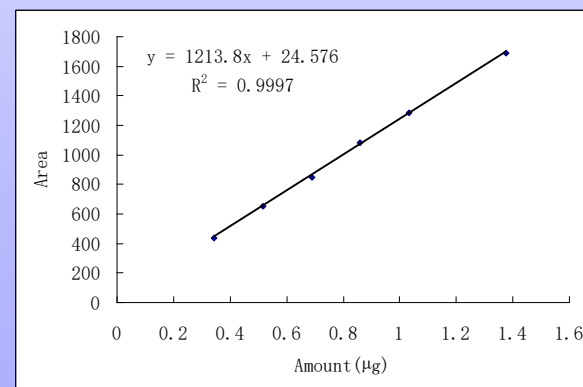
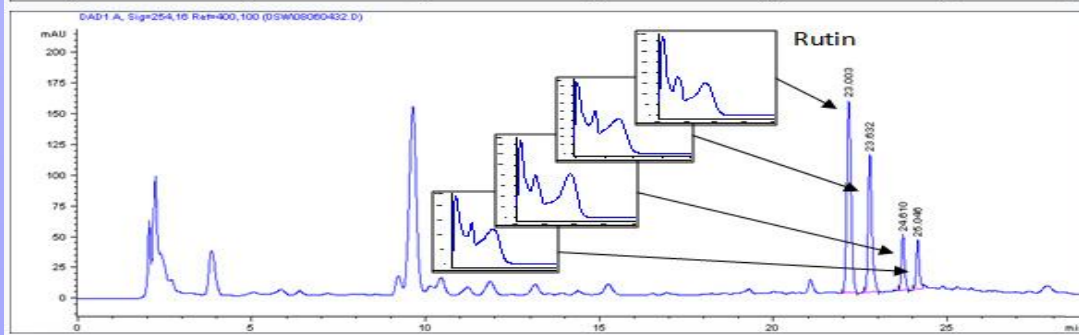
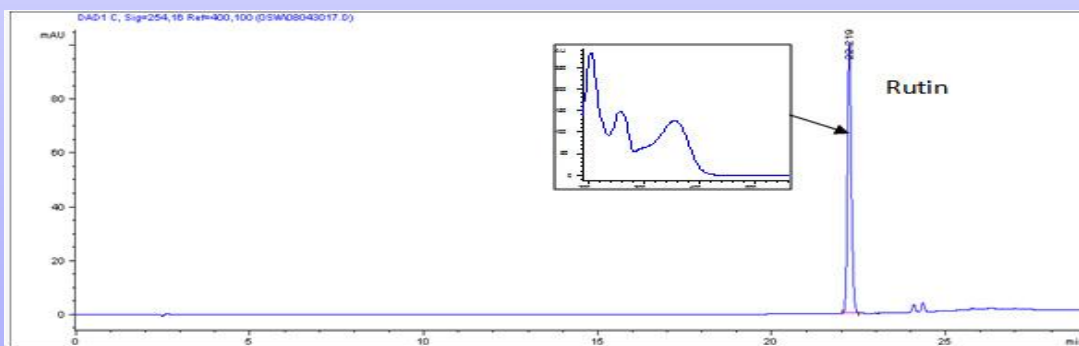
## HPLC法定量的依据:

被测组分的量 (W) 与响应值 (A) (峰高或峰面积) 成正比,  $W=f \times A$ 。

定量校正因子 (f)

由已知标准样品的量及其响应值可以求得定量校正因子。

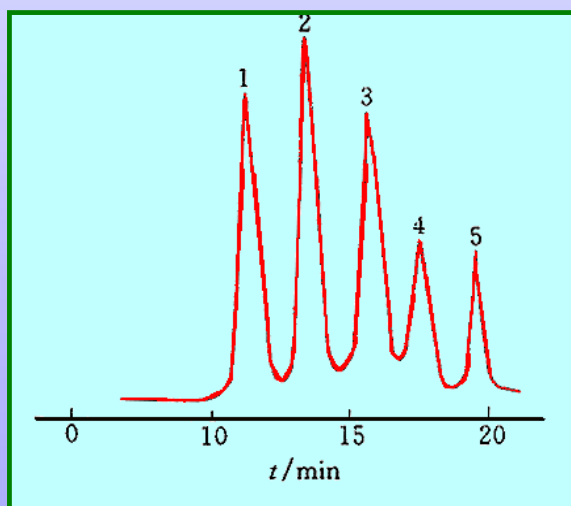
测定未知组分的响应值, 通过定量校正因子即可求得该组分的量。



桑葚中芦丁的  
含量测定

# HPLC应用

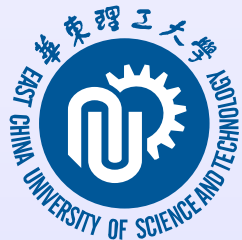
- 定性和定量分析检测：选用分析柱
- 目标成分的分离制备：选用制备柱
- 化合物分子量的测定：选用凝胶柱



1. 聚乙二醇40000    2. 聚乙二醇10000  
3. 聚乙二醇3000    4. 聚乙二醇1000    5. 聚乙二醇600



颗粒度 10-40  $\mu\text{m}$   
制备柱内径可达25mm 以上  
柱长15-50cm



1. 薄层色谱常用显色剂？溶剂前沿如何判断？能超过边缘吗？展开剂超过点样线，可以？
2. 柱色谱类型？根据颜色判断是否出柱靠谱吗？常用哪些方法判断目标产物是否出柱？
3. HPLC的C18， CN柱分别如何延长出峰时间？