

液相色谱法的原理

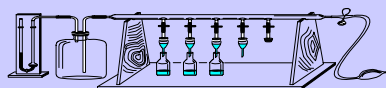
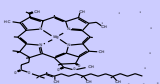
浙江省疾病预防控制中心
任一平

内 容

- 一、液相色谱的原理
- 二、液相色谱的实验
- 三、液相色谱的应用

历史回顾

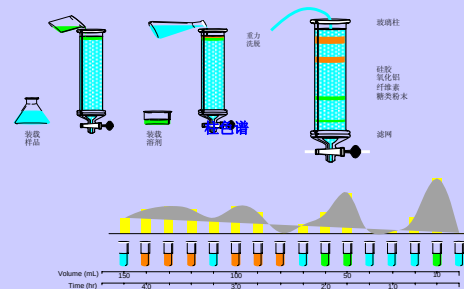
- 1906's - Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919)
碳酸钙吸附剂和石油醚
- 1940's - 分配色谱和纸色谱
- 1950's - 气相, 薄层, 凝胶过滤色谱
梯度洗脱色谱
- 1960's - 商业高效液相色谱.



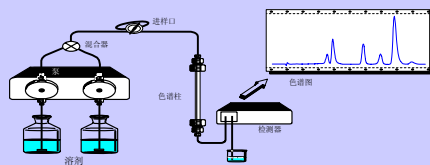
M.S. Tswett. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 24: 384-393 (1906)

柱色谱

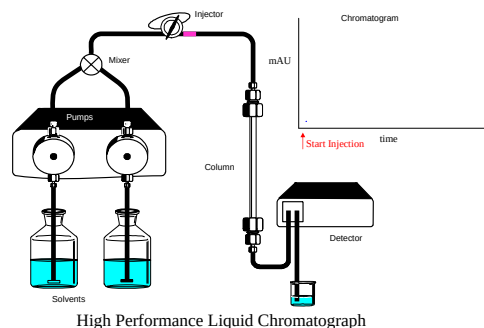
柱色谱

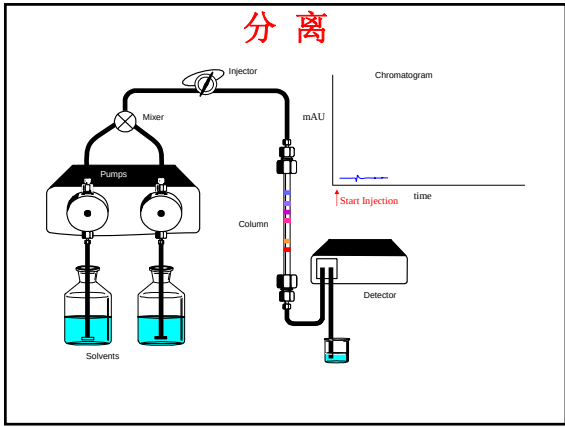
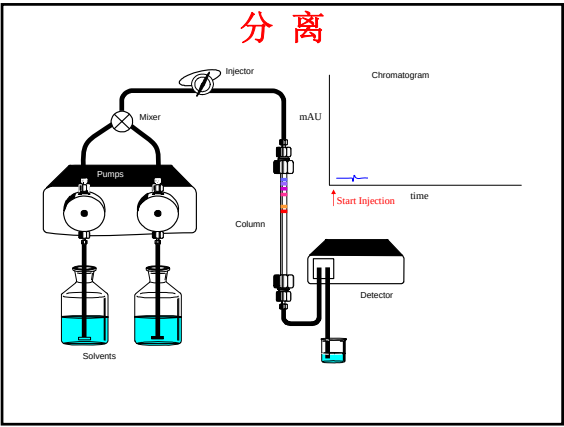
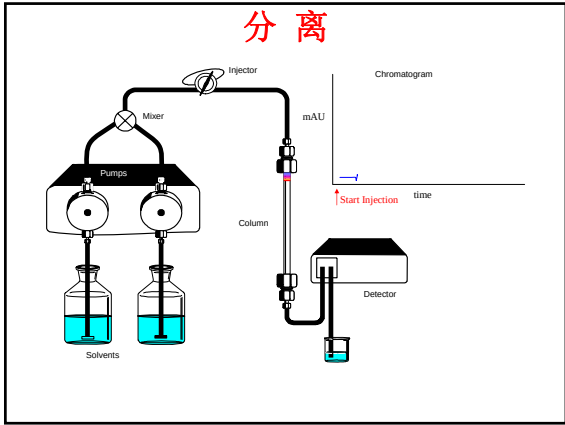
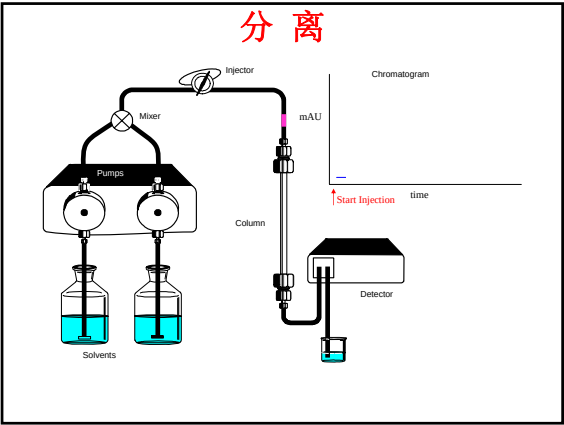
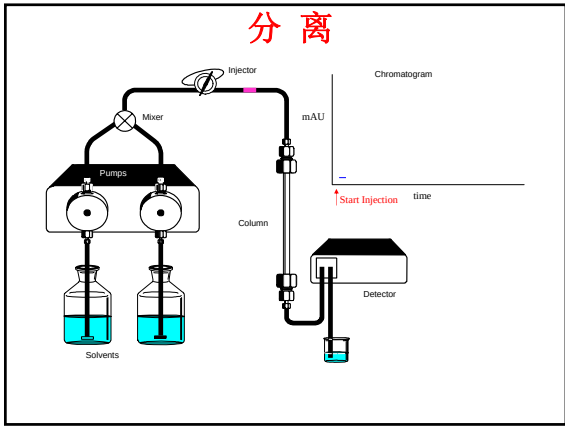
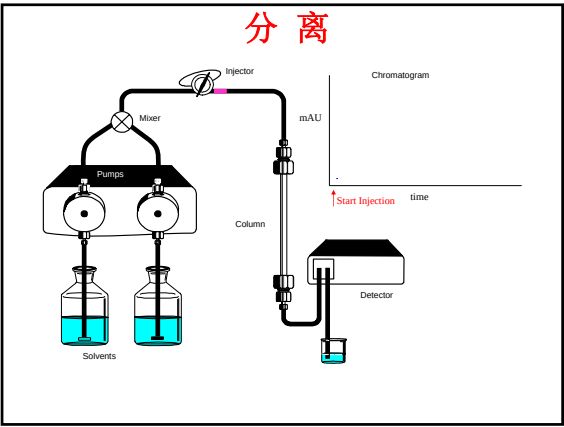


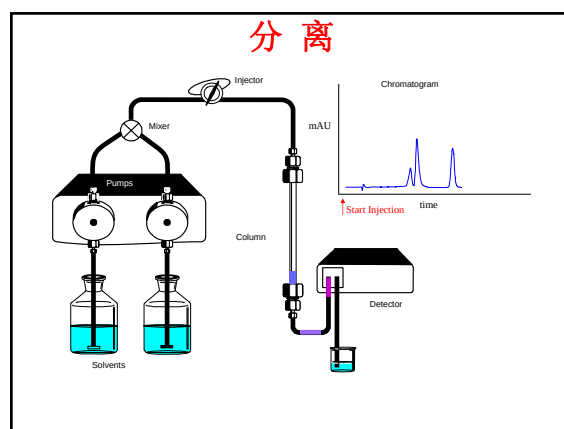
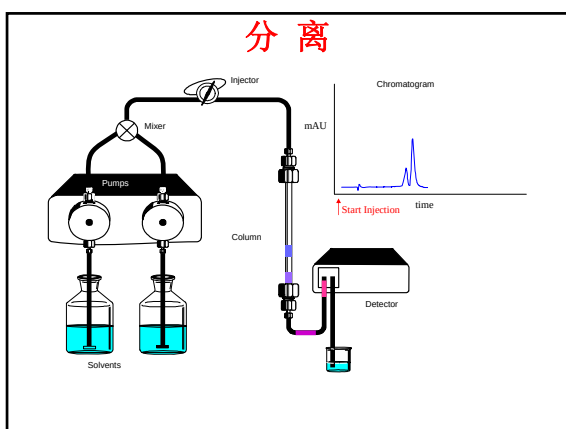
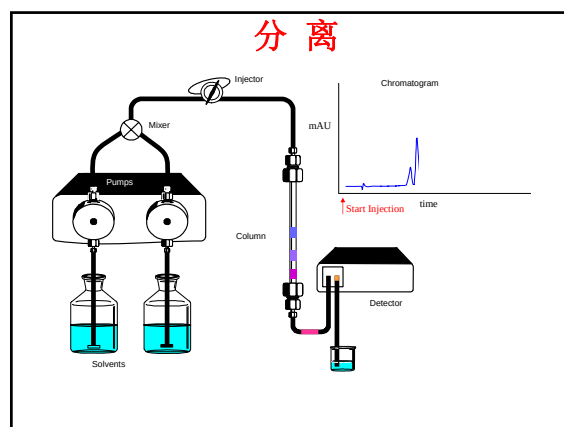
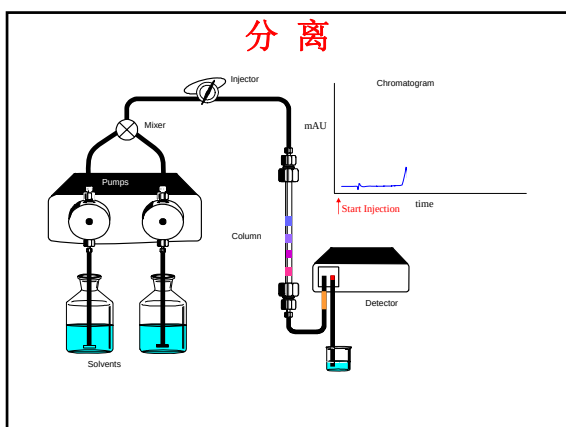
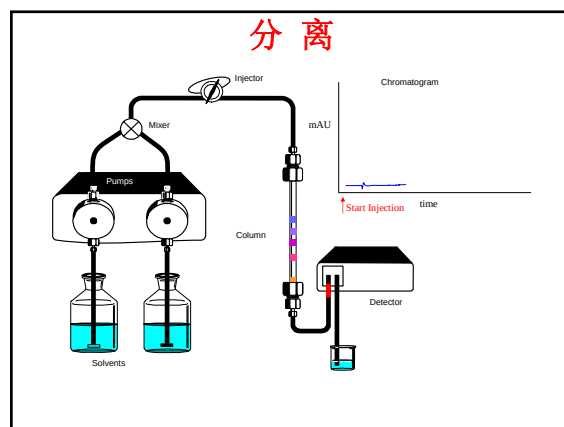
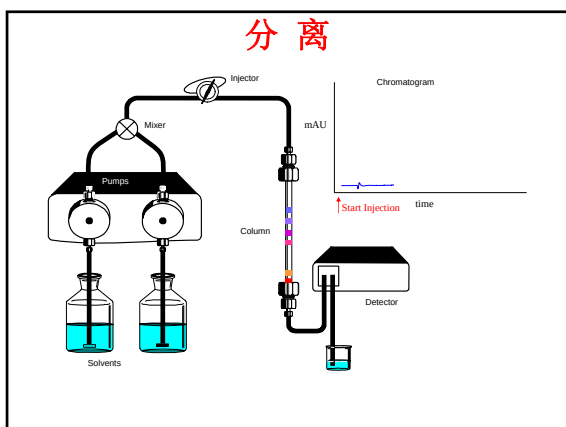
高效液相色谱 (HPLC)

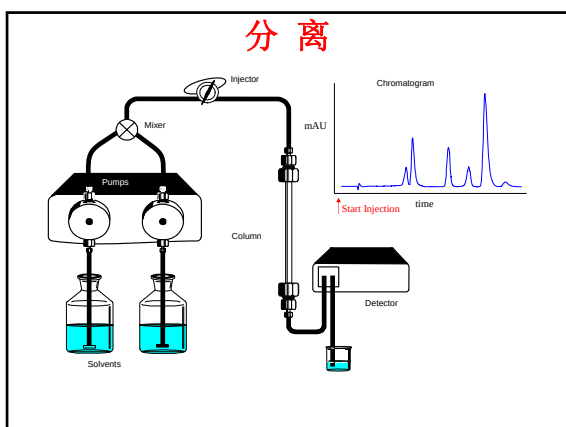
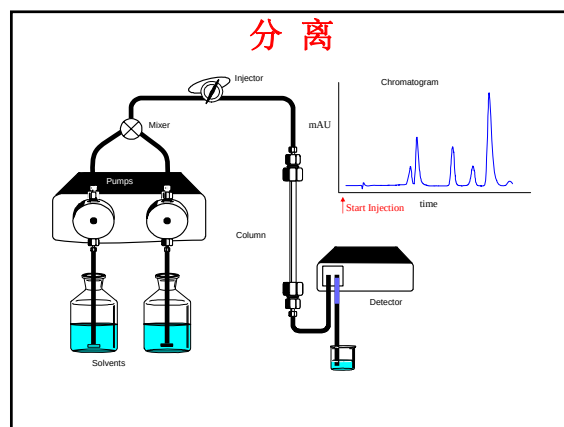
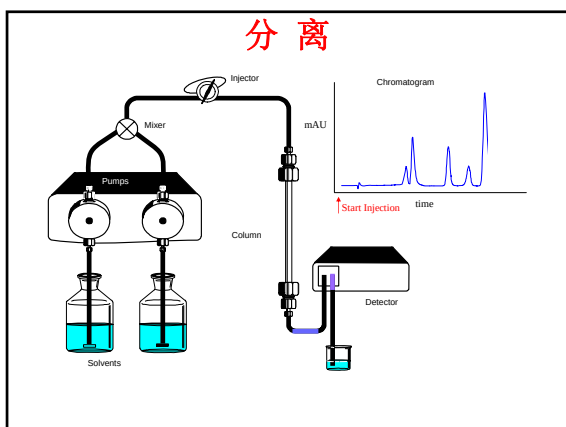


分离









基本概念

- 一、色谱流出曲线和色谱峰
- 二、定性参数
- 三、柱效参数
- 四、相平衡参数
- 五、分离参数

一、色谱流出曲线和色谱峰

1、色谱流出曲线

定义：样品被流动相冲洗，通过色谱柱，流经检测器，所得到信号-洗脱时间曲线

2、基线

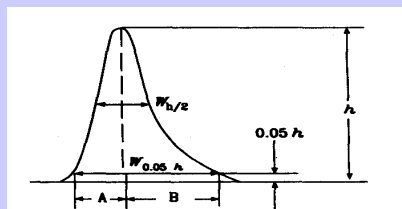
定义：检测器中只有流动相通过或虽有组分通过而不能为检测器所检出时，所给出的流出曲线称为基线。

A、噪音：各种未知的偶然因素引起的基线起伏现象。

B、漂移：基线随时间朝某一方向的缓慢变化。

3、色谱峰

定义：流出曲线上的突起部分称为色谱峰



$$F_s = \frac{W_{0.05h}}{2A} = \frac{A+B}{2A}$$

$F_s = 0.95 - 1.05$ 为正常峰, $F_s < 0.95$ 为前延峰, $F_s > 1.05$ 为拖尾峰。

二、定性参数

1、保留时间

保留时间: t_R 从进样开始到某一组分的色谱峰顶的时间间隔, 即从进样到柱后某一组分出现浓度极大值的时间间隔。

死时间: t_0 不被固定相保留的组分的保留时间。

调整保留时间: t'_R 组分由于溶解于固定相或被吸附等缘故, 而比不溶解或不吸附的组分在柱中多停留的时间。

$$t'_R = t_R - t_0$$

2、保留体积

保留体积: V_R 从进样开始到某个组分在柱后出现浓度极大值时所需流动相的体积。

死体积: V_0 由进样器到检测器出口未被固定相所占的空间。包括: 柱体积和柱外体积。

调整保留体积: V'_R 扣除死体积后的保留体积。

$$V'_R = V_R - V_0$$

三、柱效参数

1、区域宽度: σ

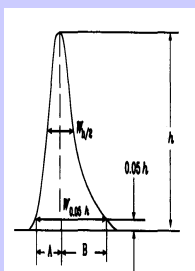
a、标准偏差: 讨论标准正态分布曲线时, 将 $X = \pm 1$ 时的峰宽之半为标准偏差。正常的标准偏差为峰高 0.607 倍 (0.607h) 处的峰宽之半。

b、半峰宽: $W_{h/2}$

$$W_{h/2} = 0.355 \sigma$$

c、峰宽: W

$$W = 4 \sigma = 1.699 W_{h/2}$$



2、理论 (塔) 板数与理论塔板高度

取决于固定相的种类、性质、填充状况、柱长、流动相的种类和流速及测定柱效的所用物质性质。

a、理论塔板数 n

$$n = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

b、理论塔板高度 H : 定义为每单位柱长的方差。

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{L}{n}$$

c、折合塔板高度 h : 折合塔板高度与固定相粒径 (d_p) 有关因素引起的峰展宽的衡量。

$$h = \frac{H}{d_p}$$

四、相平衡参数

1、分配系数 K (狭义分配系数):

在一定温度时, 达到平衡后, 组分在固定相中浓度 (C_s) 与流动相中的浓度 (C_m) 之比。

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

a、分配系数与保留时间的关系:

$$t_R = t_0 \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right) \text{ 或 } \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} = K \frac{V_s}{V_m}$$

分配系数大的组分在色谱柱中停留时间长

b、分配系数与保留时间的关系:

$$V_R = V_0 \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right)$$

2、容量因子: K

定义: 在达到平衡后, 组分在固定相中的量 (W_s) 与流动相中的量 (W_m)。

$$K = \frac{W_s}{W_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{C_s V_s}{W_m}$$

$$t_R = t_0 (1 + K)$$

$$t'_R = t_0 K$$

K 取决于组分、固定相、流动相的性质及温度有关, 而与体积 V_s , V_m 无关。而 K 除与性质及温度有关外, 还与体积 V_s , V_m 有关。

3、选择性因子: α

定义: 相邻两组分的分配系数或容量因子之比。

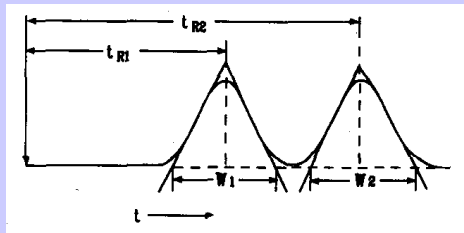
$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{\kappa_2}{\kappa_1}$$

五、分离参数

1、分离度 R

定义：相邻两峰分开的距离与平均峰宽的比值。

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



基本分离方程式

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{n} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{K' + 1} \right)$$

柱效 选择性 保留值

式中： R ----- 用于判断两个组分之间的分辨率。
n ----- 为理论塔板数。
 α ----- 用于测量柱子分离组分 1 和组分 2 的能力。
称为分离因子。
 K' ----- 为溶质保留的度量。称为容量因子。

以上方程式称之为基本方程式，是液相色谱中控制分离的关键。式中分离因子 α ，理论塔板数 N 和容量因子 K' 是独立的。可通过着三项的变化来控制分离度 R_s 。

基本方程式的意义

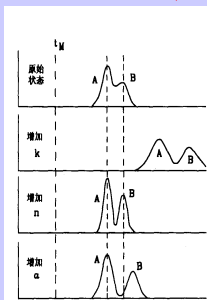


图 3-3 k, n 及 α 对 R 的影响

1、分离因子 α 的改变通过流动相和固定相的组成。这一改变主要是通过实验来实现。

2、容量因子 K' 的改变是通过改变流动相的溶剂强度。在反相分配色谱中常使用甲醇和水的不同配比来调节流动相的洗脱强度。又如正相吸附色谱中，选用正己烷和氯仿的配比来改变洗脱强度。 K' 值范围大约是：1 < K' < 10，其中最佳值为：2 < K' < 5。

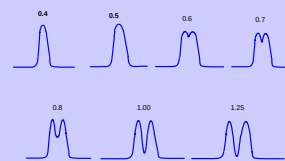
3、理论塔板数 N 的提高靠减小粒子填料的平均粒度，加长柱子和降低流动相的流动速度。增大 N 值使峰变窄，峰高增大。

A、柱子填料的改进。采用了小于 10 μm 的填料进入实用阶段，产生了高效柱子，最高可达 80000 块板/米以上。目前采用了 3 μm 的球型填料。

B、1973 年以后由于采用了湿法装柱技术，大大地改善了柱内填料的均匀度。

C、在柱子一定的情况下，设法降低 H 值。其中降低流动相的流速也是一种有效的方法。

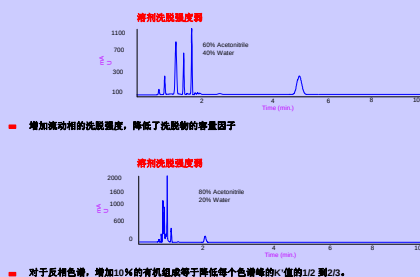
不同 R 值的两组分离



$R=1.5$ 可以得到基线分离

容量因子

各组分的容量因子 (K') 随溶剂洗脱强度的变化增大或缩小

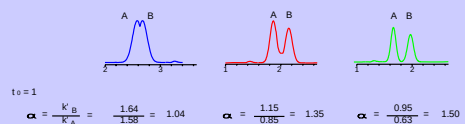


对于反相色谱，增加 10% 的有机组成等于降低每个色谱峰的 K' 值的 1/2 到 2/3。

分离选择性

(α)

$$\alpha = \frac{K'_B}{K'_A}$$

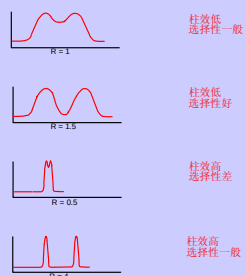


$$\alpha = \frac{K'_B}{K'_A} = \frac{1.64}{1.58} = 1.04 \quad \alpha = \frac{1.15}{0.85} = 1.35 \quad \alpha = \frac{0.95}{0.63} = 1.50$$

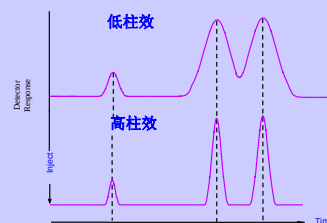
改变流动相的组成
改变不挥发助剂
改变流动相 pH 值
改变柱温
应用改变固定相特殊的化学效应

α Need Not Be Greater Than 1.2

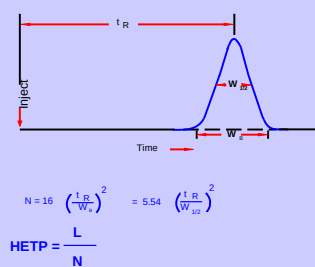
不同柱效与选择性的比较



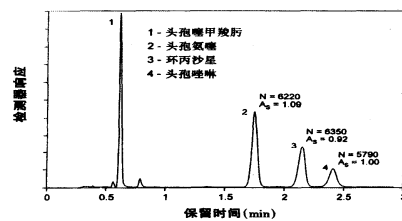
柱效



计算柱效



塔板数的测定



色谱柱: 8.0 × 0.46cm Zorbax SB-C₈ (3.5μm); 流动相: 乙腈-0.1% 三氟乙酸 (8:92); 流速: 3.0mL/min; 样品: 1μL 中含有 1~4 分别为 0.4、0.36、0.10、0.35μg; 60℃; 260nm 检测。

如何改善分离度

选择合适的分离参数

1、调节流动相的洗脱强度

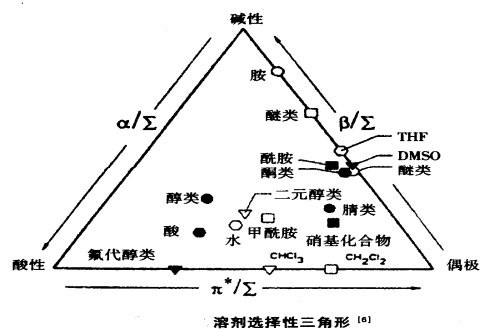
溶剂的种类

溶剂的强度变化

2、更换色谱柱

3、改变分离温度

更换流动相的种类



调节流动相的洗脱强度

通过改变溶剂强度控制样品的保留值

HPLC 方法	通常如何改变溶剂强度 ^a
反相	水(A)加有机溶剂(B)(如水-乙醇);增加%B, k 减小。
正相	非极性有机溶剂(A)加极性有机溶剂(B)(如己烷-异丙醇);增加%B, k 减小。
离子对	与反相的相同。
离子交换	水缓冲液加盐(如 5mM 醋酸钠加 50mM 氯化钠);增加离子强度(NaCl 浓度), k 减小。

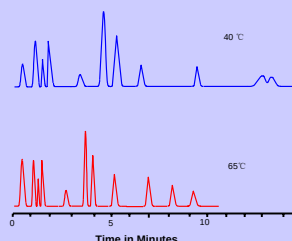
更换色谱柱

1. 键合相的化学性质或官能团[如 C_{18} 、苯基或氰基(反相 HPLC)]
2. 单位面积硅胶微粒上的键合相量(如 2 或 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
3. 键合相与硅胶表面的键合方式[如单官能团或多官能团硅烷反应]
4. 硅胶表面的性质,由于硅胶来源不同,硅胶表面性质也有差别

提高色谱柱的理论塔板数的因素

1. 色谱柱填充良好(用“优质”柱)
2. 色谱柱较长
3. 流速较低(但并非太低)
4. 柱填料的微粒较小
5. 流动相的粘度低,温度高
6. 样品分子小
7. 柱外效应小

温度对分离的影响



塔板理论

色谱过程是物质在相对运动着的两相间连续分配平衡的过程。若两组分的分配系数不等,则被流动相携带移动的速度不等,而实现分离

基本假设:

1. 色谱柱中存在许多塔板,组分在塔板间快速达到分配平衡。
2. 样品的组分都加在第0号塔板上,忽略扩散。
3. 流动相是间歇式进入色谱柱,一次一个塔板体积。
4. 在所有塔板上分配系数相等,与组分的量无关。

色谱流出曲线与定量参数

$$C = \frac{C_0}{\sigma \times (2\pi)^{1/2}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}}$$

或

$$C = \frac{C_0}{\sigma \times (2\pi)^{1/2}} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}}$$

式中:

C 为浓度
 C_0 为组分初始量
 σ 为标准偏差

色谱峰高: 当 $t=t_0$ 时, 浓度 C 为极大值, 此值为峰高 h

色谱峰面积:

$$A = 1.065 \times W_{1/2} \times h$$

提高理论塔板数的因素

- 1、柱子填充良好
- 2、较长的柱子
- 3、流速较低
- 4、柱填料颗粒较小
- 5、流动相粘度小（可提温）
- 6、样品分子小
- 7、柱外效应小

速率方程式的含义

$$H = A + B/u + C_m u + C_{sm} u + C_s u$$

涡流扩散 + 纵向分子扩散（在液相色谱中可忽略不计）+ 传质速率（流动相传质、停滞流动相传质、固定相内传质）

$$= A + C_m u + C_{sm} u + C_s u$$

板高曲线

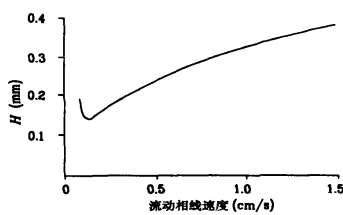
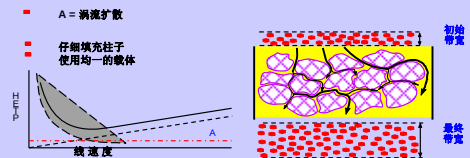


图 1-5 流动相线速度与柱效的关系示意图

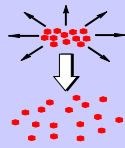
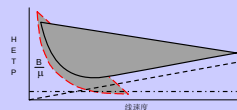
扩散1（涡流扩散）



扩散2（纵向扩散）

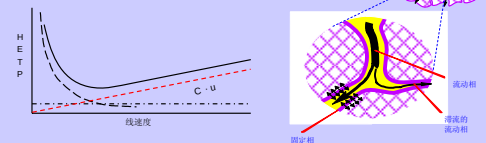
■ B = 纵向扩散

- 在液相中影响小
- 在低流速中影响大



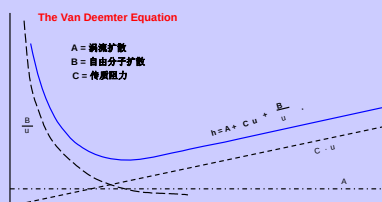
扩散3（传质阻抗）

- C = 传质阻力（流动相传质 + 停滞流动相传质 + 固定相内传质）
- 在低流速下可以降低传质阻力
- 使用小颗粒载体可以降低传质阻力



总扩散

总扩散=涡流扩散+纵向扩散+传质阻抗



通过下述方法降低谱带宽度

使用均一的载体（填料）

仔细填充柱子

选择粒度小的载体

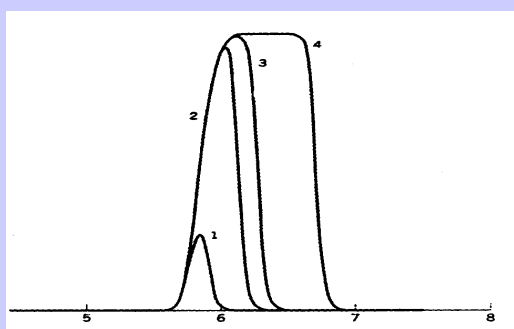
优化流速或粘度

减小进样量

降低系统死体积

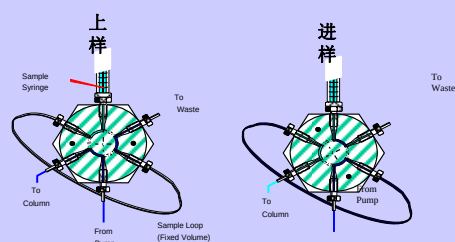
降低输出回路响应时间

进样体积 v_s 对峰形的影响



六通进样阀

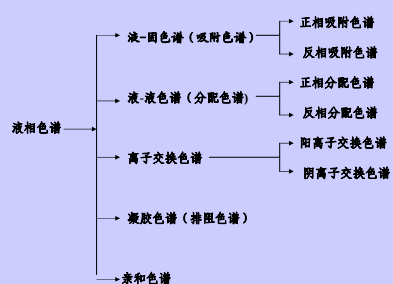
手动进样阀 - 六通阀



柱外效应

- 1、样品体积
- 2、连接管路的体积
- 3、色谱柱进口设计
- 4、色谱柱出口设计
- 5、检测池体积（ $< 10 \mu\text{L}$ ）
- 6、检测器/信号输出回路响应时间（ $< 1 \text{ sec}$ ）

液相色谱法的分类



吸附色谱

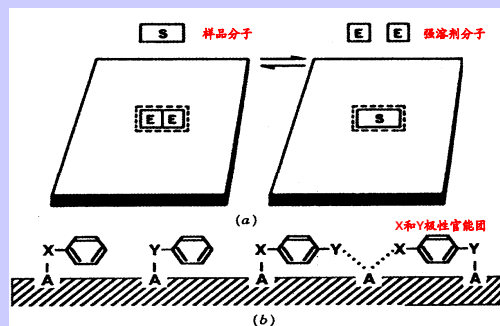
吸附色谱也称为液固色谱。(Absorption chromatography)

分离原理: 按溶质分子(样品)和溶剂分子(流动相)在吸附剂(固定相)的表面活性中心相互竞争吸附。这种竞争吸附同时表现在不同溶质分子的不同官能团对吸附剂(固定相)表面吸附-解吸作用的强弱上。

溶质在吸附剂上保留的强弱与溶质分子的官能团极性以及基团数量有关。因此吸附色谱极适用于组分分析。此外溶质吸附过程必然与吸附剂表面活性中心的分布有关, 当溶质分子的结构与吸附中心所分布的结构相吻合时, 吸附就很强, 吸附色谱的这一特点适用于分离几何异构体。

吸附色谱适用于分子量在 100-1000 之间的, 溶于有机溶剂的有机物及非离子型分子。

正相保留



使用正相色谱(NPC)的理由

- 1 样品在 RPC 中不保留(亲水性太强)
- 2 样品在 RPC 中保留太强(疏水性太强)
- 3 采用 RPC 分离不能获得足够的峰间距($\alpha \approx 1$)
- 4 样品含有空间异构体, 立体异构体或非对映异构体
- 5 期望回收大量疏水性样品组分(制备 HPLC, 见第 13 章)
- 6 样品溶于非极性溶剂(若采用 RPC 柱, 会对直接进样造成问题)

正相色谱的特征

优点	缺点
1. 通过改变流动相或柱填料(尤其是无机填料, 如硅胶), 分离选择性可改变很大。	1. 离子样品用 RPC 分离更容易。
2. 用非水流动相时, 色谱柱非常稳定。	2. 溶剂强度的控制比 RPC 中难预测且更冗长。
3. 许多有机化合物在正相溶剂中易溶(制备 HPLC 中的突出优点)。	3. NPC 柱的塔板数有时低于 RPC 柱。
4. 溶剂粘度低, 柱压降低。	4. 低沸点溶剂更易蒸发或产生气泡, 尤其在室温较高时(不方便)。
5. 适用于在水溶液中可能分解的样品。	5. 对于原硅胶: a. 柱填料吸收水后, 会导致保留值飘忽不定。 b. 由于溶剂分层及硅胶柱易吸水, 不能进行梯度洗脱。
	6. 有机溶剂的成本和处理费用较高

正相方法建立的推荐方法

- 1 调整 %B, 使 $0.5 < k < 20$ (氨基柱, 己烷-丙醇作流动相)
- 2 检查峰拖尾情况
- 3 如必要, 调节选择性
 - a 微调 %B
 - b 改变有机溶剂种类(MC, MTBE, ACN); 微调 %B
 - c 混合有机溶剂
 - d 改变柱类型(二醇、氨基、硅胶); 微调 %B
- 4 优化色谱柱条件(柱长, 微粒大小, 流速)

常用的全多孔微粒硅胶

形状	商品名称	粒度 (μm)	比表面积 (m^2/g)	孔径 (nm)	生产厂家
1. 无定形	YWG	5, 10, 20	300	6~8	青岛海洋化工厂
	LiChrosorb Si-60	5, 10	500	6	E. Merk
	Partisil	5, 10	350	8.5	Whatman
2. 球形	YQG	5	4~500	8~10	青岛海洋化工
	μ Porasil	10	330	12.5	Waters
	LiChrospher Si-100	5, 10	300	6	E. Merk
	Nucleosil 50	5, 10	600	5	Macherey-Nagel
	Hypersil	3, 5, 10	170	12	Shandon
	Zorbax SIL	3, 5, 7	350	7~8	Du Pont
	Nova-Pak silica	4	120	6	Water
	Resolve Si	5, 10	200	9	Waters

NPC的溶剂强度和选择性

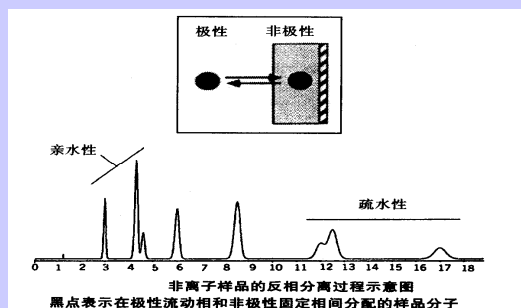
溶 剂	ϵ^a	定位	碱性	UV ^b
己烷、庚烷、辛烷	0.00	否	°	201
1,1,2-三氟三氯乙烷 (Freon FC-113)	0.02	否	°	235
氯仿	0.26	否	°	247
1-或2-氯丙烷	0.28	否	°	225
二氯甲烷	0.30	否	°	234
2-丙酮	0.32	少	°	217
1,2-二氯乙烷	0.34	否	°	234
乙醚	0.38	是	是	219
MTBE ^d	0.48	是	是	225
乙酸乙酯	0.48	是	否	256
二氧六环	0.51	是	是	215
乙腈	0.52	是	否	192
THF	0.53	是	是	230
1-或2-丙醇	0.60	是	°	214
甲醇	0.70	是	°	210

分配色谱

分配色谱也称为液液色谱
(Partition chromatography)
由 Martin 和 Synge 于 1941 年首先提出的。

分离原理：在液液色谱中，一个液相作为流动相，而另一个液相（固定相）分散在惰性载体上。这种分离是基于样品组分在固定液（涂布在载体上的液相）和流动相（流经固定相的液相）之间分配的不同。其基本原理是物质在两种液相之间的分配，如同互不相溶的液体在一个分液漏斗中进行简单的分批抽提相类似。

非离子样品反相分离示意图



改变保留值

减少保留时间

提高柱极性（氨基、C₄）
降低流动相极性
（提高%B-增加有机溶剂）
（减少极性有机溶剂）
提高温度

增加保留时间

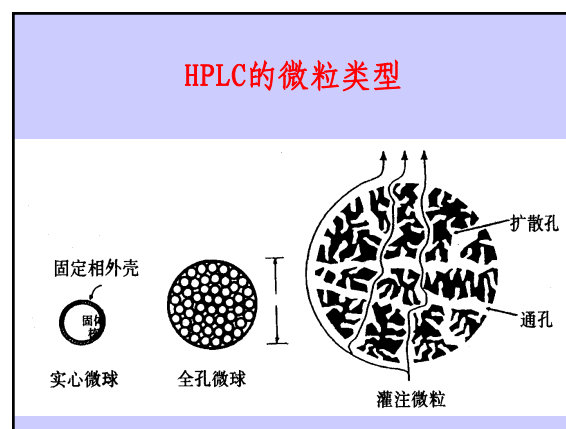
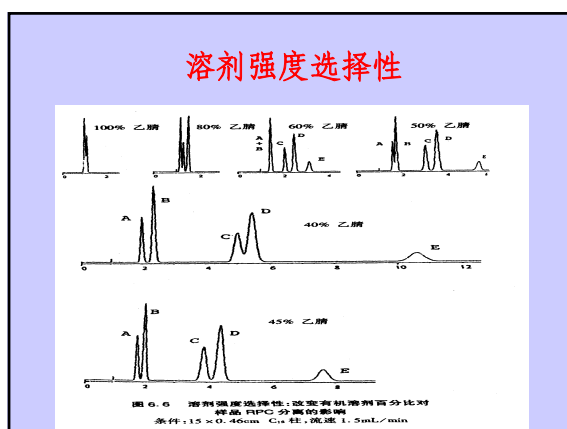
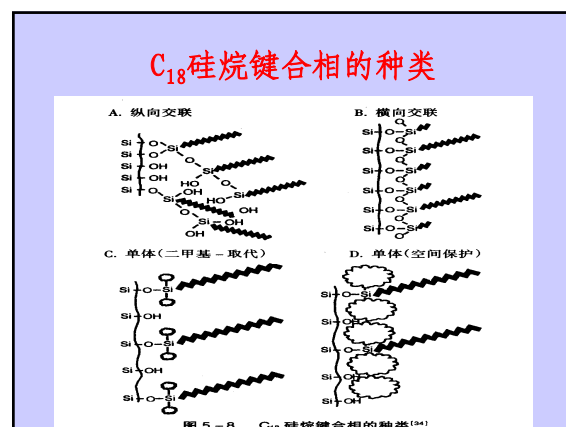
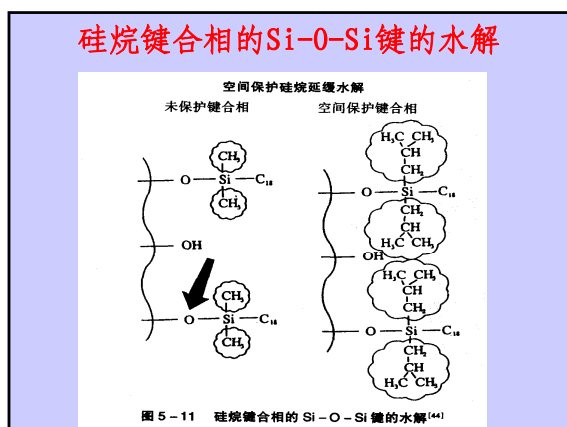
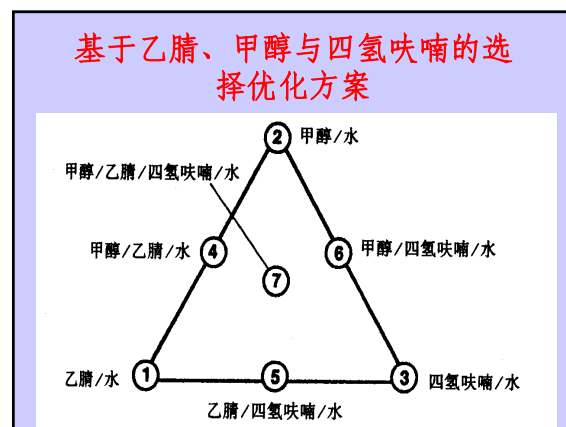
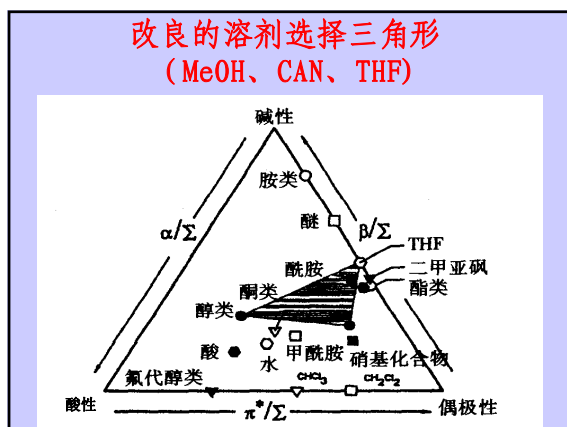
降低柱极性（C₈、C₁₈）
提高流动相极性
（降低%B-加水）
（增加极性有机溶剂）
减少温度

反相方法建立的推荐步骤

- 1、调增%B，使 $1 < k < 10$
- 2、检测峰拖尾活塔板数低的现象
- 3、如必要，调增选择性
 - a. 微调%B
 - b. 改变有机溶剂
 - c. 混合有机溶剂
 - e. 改变柱类型
 - d. 改变温度
- 4、优化柱条件（柱长、粒度、尺寸，流速）

改变选择性的方法

改变溶剂强度	优点：简单方便，在 $1 < k < 10$ 范围内通过改变%B寻找合适的 α 。 缺点：控制（时）改变溶剂有效，尤其对于等度洗脱时 k （末峰） $\gg k$ （首峰）的样品。
改变溶剂类型	优点：当仅改变%B不足时，改变 α 值的有效办法（ α 值的变化可能比仅改变%B要大）。 缺点：由于需要更多的实验，故不如改变%B方便。
混合不同溶剂	优点：分离一对以上的关键峰时，可提供中间选择性；扩散了改变溶剂类型的应用范围。 缺点：需要大量实验—不方便。
改变柱类型	优点：在改变选择性方面与改变%B的效果相当。当仅有一种溶剂类型（如CAN）可用时，改变柱类型则非常有用。 缺点：不方便，因为必须安装新柱，并需要重新平衡。
改变柱温	优点：如柱温可控，则非常方便。 缺点： α 随柱温的变化通常小于其他条件。



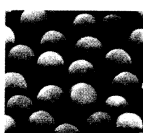
不同类型的填料



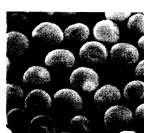
VYDAC™ - 214 - TP5



ULTRAPORE™ - 5 - RPSC



ZORBAX® - PSM - 300



NUCLEOSIL™ - 7 - 300

常用的化学键合相

种类与型号	键合基团	形状	粒度 (μm)	说明	生产厂家
1. 极性键合相					
YWG-CN	氰基	无定形	10		天津试剂二厂
MicroPak CN	氰基	无定形	5, 10	用于非水系统	Varian
μBondapak CN	氰基	无定形	10	6% C, 封端	Waters
μBondapak NH ₂	氨基	无定形	10	3.5% C, 不封端	Waters
YWG-NH ₂	氨基	无定形	10		天津试剂二厂
LiChrosorb NH ₂	氨基	无定形	5, 10	3.5% C, 不封端	E. Merk
LiChrosorb DIOL	二醇基	无定形	5, 10	7.1% C, 不封端	E. Merk
2. 非极性键合相					
YWG-C ₁₈ H ₃₇	十八烷基	无定形	10		天津试剂二厂
MicroPak MCH	十八烷基	无定形	5, 10	不封端	Varian
μBondapak C ₁₈	十八烷基	无定形	10	10% C, 封端	Waters
Zorbax ODS	十八烷基	球形	3, 5, 7	16% C	Du Pont
Waters Spherisorb ODS 1	十八烷基	球形	3, 5, 10	6.2% C, 不封端	Waters
Supelcosil LC-18	十八烷基	球形	3, 5	11% C, 封端	Supleo
Nucleosil C ₁₈	十八烷基	球形	3, 5, 10	14% C, 封端	Macherey-Nagel
Nucleosil C ₈	辛基	球形	3, 5, 10	9% C, 不封端	Macherey-Nagel
LiChrosorb RP-18	十八烷基	无定形	5, 10	16.2% C, 不封端	E. Merk
LiChrosorb RP-8	辛基	无定形	5, 10	9.5% C, 不封端	E. Merk
LiChrospher RP-18	十八烷基	球形	5, 10	21.0% C, 不封端	E. Merk
LiChrospher RP-8	辛基	球形	5, 10	12.5% C, 不封端	E. Merk
Novapak C ₁₈	十八烷基	球形	4	7% C, 封端	Waters
Utrasphere-ODS	十八烷基	球形	3, 5	封端	Buckman
Hypersil ODS	十八烷基	球形	3, 5, 10	10% C, 封端	Shandon
Partisil ODS	十八烷基	无定形	10	5% C, 不封端	Whatman
Resolve C ₁₈	十八烷基	球形	5, 10	10% C, 不封端	Waters
Symmetry C ₁₈	十八烷基	球形	3.5, 5	19% C, 封端	Waters
Kromasil 100 C ₁₈	十八烷基	球形	5, 10	19% C, 封端	Akzo Nobel
YWG-C ₆ H ₅	苯基	无定形	10	7% C	天津试剂二厂
μBondapak Phenyl	苯基	无定形	10	8% C, 封端	Waters

常用溶剂的极性参数

溶剂	P'	γ _e	γ _d	γ _a	溶剂	P'	γ _e	γ _d	γ _a
正己烷	0.1				乙醇	4.3	0.52	0.19	0.29
苯	2.7	0.23	0.32	0.45	醋酸乙酯	4.4	0.34	0.23	0.43
乙醚	2.8	0.53	0.13	0.34	丙酮	5.1	0.35	0.23	0.42
二氯甲烷	3.1	0.29	0.18	0.53	甲醇	5.1	0.48	0.22	0.31
正丙醇	4.0	0.54	0.19	0.27	乙腈	5.8	0.31	0.27	0.42
四氢呋喃	4.0	0.38	0.20	0.42	醋酸	6.0	0.39	0.31	0.30
氯仿	4.1	0.25	0.41	0.33	水	10.2	0.37	0.37	0.25

混合溶剂的 P' 值可由下式计算:

$$P' = \phi_1 P'_1 + \phi_2 P'_2$$

Snyder的溶剂选择分组

组别	溶剂
I	脂肪族醚、四甲基硅、六甲基磷酰胺 (三烷基胺)
II	脂肪族醇
III	吡啶衍生物、四氢呋喃、酰胺 (甲酸胺除外)、乙二醇醚、亚砷
IV	乙二醇、苯甲醇、醋酸、甲酸胺
V	二氯甲烷、二氯乙烷
VI	(a) 三甲苯基磷酸酯、脂肪族酮和酯、羧酸、二氧六环 (b) 醚、腈、内酯、碳酸酯
VII	芳烃、卤代芳烃、硝基化合物、芳醚
VIII	氟代烃、间苯二甲酸、水、氯仿

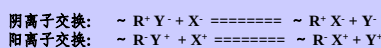
离子交换色谱

离子交换色谱 (Ion-Exchange chromatography)

离子交换色谱离子交换色谱是一种应用较早的色谱技术, 在二十年代初就被采用, 如沸石等用于水的软化 and 处理。由于交联聚苯乙烯离子交换树脂的出现而得以发展。

它是在分析核酸物质、氨基酸和糖类等的应用中逐渐发展起来的。

原理: 典型的离子交换剂, 或是有着酸性基团, 如磺酸或羧酸 (分离阳离子); 或是含有碱性基团, 如氨基或四级铵盐 (分离阴离子)。离子交换过程, 可以表示如下:



反应式中: X⁻ (X⁺) ----- 被交换离子
Y⁻ (Y⁺) ----- 流动相中的反离子
R⁻ (R⁺) ----- 离子交换剂上的交换基 (离子基)

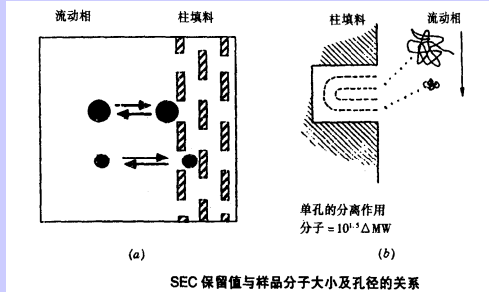
凝胶色谱

凝胶色谱 (Gel-Permeation chromatography)

原理:

它按分子量的大小进行分离, 填料由多孔材料组成, 被分离的物质中的小分子化合物可进入小孔, 导致在柱子中停留较长时间。而大分子化合物因其完全不能进入填料的多孔中, 便很快地流出。那些中等分子化合物因其只能进入填料的较大孔中而在小分子流出后流出柱子。

凝胶排阻色谱机理



亲和色谱

亲和色谱 (Affinity Chromatography)

一、原理：亲和色谱法是将配体固定在固定载体上，并且将其装入色谱柱中，当样品（被分离物）通过色谱柱时，由于配体与相对应的蛋白质分子具有专一性的亲合作用，将这种蛋白质吸附在柱中，而其它组分不产生这种专一的结合被直接流出色谱柱。后再利用洗脱液将吸附在柱中的蛋白质洗脱下来。

二、固定载体与配体

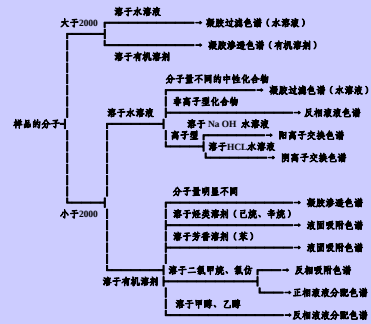
固定载体一般采用纤维素、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等多孔玻璃等。

配体的选择需符合两个条件：其一与被分离物具有适合的亲和力；其二具有与固定载体牢固结合的基团。

五种类型色谱的应用

色谱类型	应用
液固色谱	杀虫剂、激素、染料、石油化工、植物提取物、前列腺素、抗氧化剂、激素对映体、止痛药、镇定剂、芳香族异构体、血液类脂物、有机酸、有机碱。
液液色谱	各种维生素、芳香多环类、甾体化合物、杀虫剂、除草剂、稀土金属、抗菌素、环氧化物、种草药成分、糖醇、医药产品原料、多氯联苯、石油化工添加剂、硝基化合物、偶氮化合物、激素。
离子交换	胺类、羧酸、氨基酸、核酸、酚类、金属元素、细胞代谢物、糖类、生物碱、嘌呤化合物、有机碱、核酸。
凝胶色谱	蛋白质、酶的纯化、肽类、激素、高聚物、尼龙多聚体、色素、芳香族、类脂体、酚类、烃类、维生素。
亲和色谱	抑制剂、辅酶、抗原、病毒细胞、多糖、糖蛋白、超蛋白、受体和载体蛋白、互补碱基序列、活性的氨基酸、肽类、蛋白质、核酸、核苷、核苷酸、核糖核酸和脱氧核糖核酸。

根据分子量选择色谱分离类

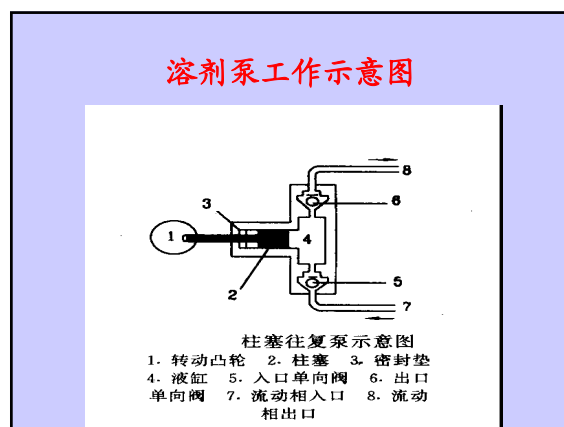
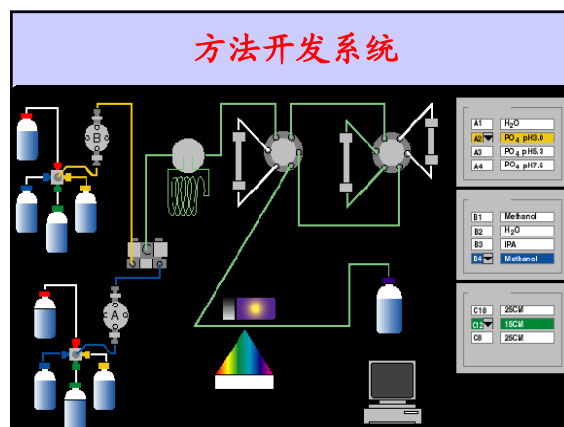


根据分子量选择柱子

HPLC 柱选择指南		色谱分离机理	推荐色谱柱		
样品性质					
分子量 ≤ 2000	油相	正己烷 溶解	Inertsil SIL-100		
		醇/水 溶解	Inertsil CN-3, NH2		
		四氢呋喃 溶解	Diamonsil C18, Inertsil RP phase		
		反相键合	PLGel 50A, 100A		
		反相	Diamonsil C18, Inertsil RP phase		
	水相	非离子型	Diamonsil C18, Inertsil RP phase		
		离子型	反相离子对 离子交换 SCX, SAX		
		肽、蛋白质	Diamonsil C18, Vydac 201TP		
		分子量 > 2000	油相	GPC	分子筛未知 分子筛已知 Pl-gel Pl-gel
				反相	Nucleosil GPC, TSK SW
水相/醇相/水 GPC/SEC	pH 2-7.5		Shodex OHpak SB		
	pH > 7.5		Shodex OHpak SB		
离子交换	阴离子交换		Vydac 400 VHP		
	阳离子交换		Vydac 301 DEAE Vydac 300 VHP (Q)		
反相	pH 3-7.5		Vydac C4, C8, C10		
	pH > 7.5		Vydac 250 VHP		
疏水作用 (HIC) 亲和/生化亲和			Vydac C4, C8, C18 Shodex AP06		

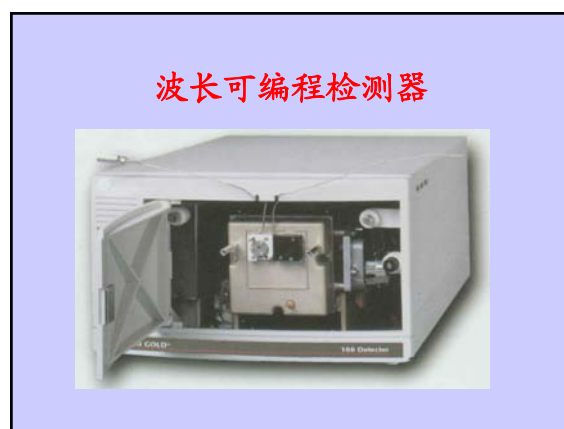
液相色谱



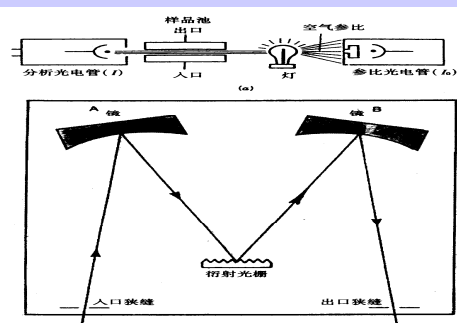


溶剂泵性能指标

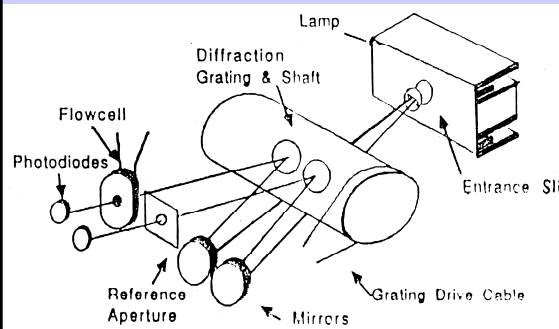
- 具有高性能数字反馈控制3200微步
- 从0.001至30毫升/分钟的宽流速范围
- 具有极佳重复性的梯度微流色谱
- 维持在线脱气或不需要溶剂脱气
- 双溶剂泵，高压混合保证了每次均有最佳梯度性能动态的均匀混合
- 在0-6,000磅/平方英寸的压力下保持 $\pm 0.1\%$ 的重现性



紫外检测器光学原理



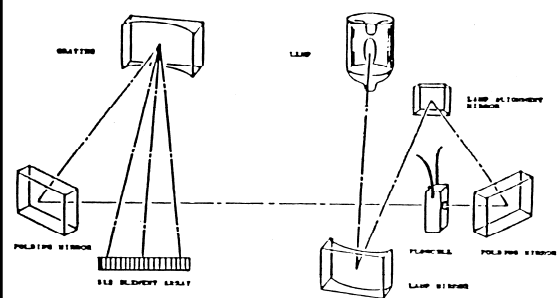
波长可编程检测器光学原理



166 可编程紫外/可见光检测器

- ★ 190-700 纳米波长范围。
- ★ 配有氘灯和可选择的钨灯光源。
- ★ 经自动校准后，具有 ± 2 纳米波长的精确度。
- ★ 波长的重现性为 ± 0.05 纳米。
- ★ 在 254 纳米处，波宽为 < 5 纳米。
- ★ 信号噪音为 $< 2 \times 10^{-5}$ 吸收单位（分析流动池，1 毫升/分甲醇）。
- ★ 基线漂移 $< 1 \times 10^{-4}$ 吸收单位/小时。
- ★ 可通过带有数字模拟输出系统控制中心或带有数字数据采集的 32 克拉软件控制。

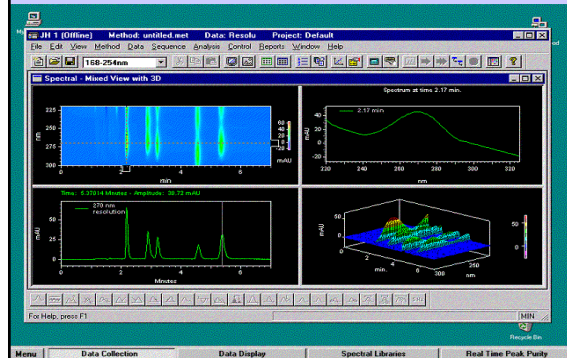
二极管阵列检测器光学原理



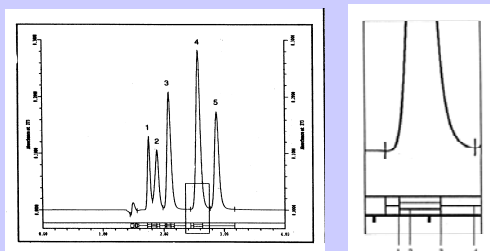
168 二极管阵列紫外/可见光检测器

- ★ 波长范围：190-600 纳米。
- ★ 配有氘灯光源。
- ★ 经自动校准后，波长精确度为 ± 1 纳米。
- ★ ± 0.02 纳米波长的重现性。
- ★ 可编程波宽为 4-410 纳米。
- ★ 信号噪音 $< 1 \times 10^{-4}$ 吸收单位，（分析流动池，1 毫升/分甲醇）。基线漂移： $< 2 \times 10^{-3}$ 吸收单位/小时。
- ★ 共有 512 个二极管，1 纳米/二极管。
- ★ 在运行或者完成后分析期间，即时峰纯度检测功能提供鉴定峰纯度的生动显示。

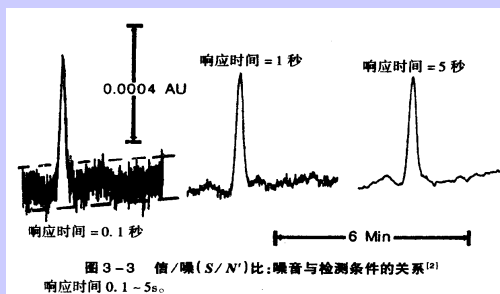
DAD检测器的三维分析



即时峰纯度检测



响应时间与噪音的关系



检测精度与响应时间的关系

表 3-5 响应时间对检测灵敏度的影响^a

响应时间 τ (s)	信号(峰高) (10^{-5} A)	噪音 (10^{-5} A)	S/N' 比值
0.1	46	11.0	4.2
1.0	46	3.0	15.3
2.0	43	2.0	21.5
4.0	39	2.0	19.5
5.0	38	2.0	19.0

^a与图 2-3 中系统相同

紫外检测器对流动相UV吸收的要求

在 $\geq 220\text{nm}$ 时, 低背景吸收 ($< 0.5\text{AU}$) 的溶剂混合物

水性流动相混合物

0 ~ 26% 甲醇 - 水

0 ~ 28% 异丙醇

0 ~ 20% THF

0 ~ 100% 乙腈 - 水

乙腈 - 水以及添加剂

0.2% 醋酸

0.4% 三氟醋酸

250mM NaCl

> 25mM 磷酸钾(或钠)(pH < 5)

25mM 磷酸钠(或钾)(pH 6.8)

其他检测器

★荧光检测器

★电化学检测器

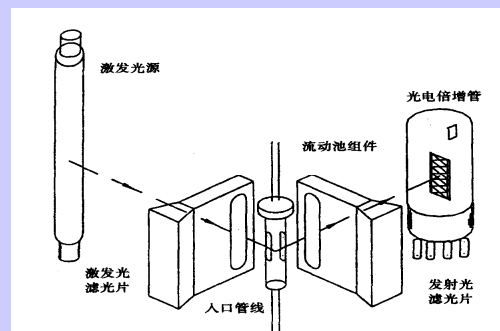
★化学发光检测器

★蒸发光散射检测器

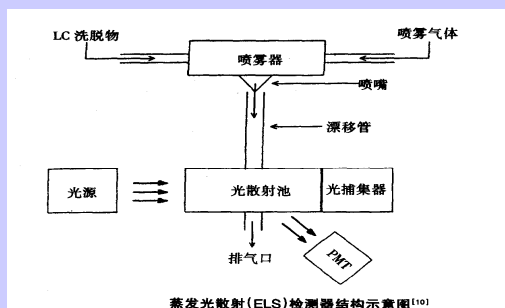
★示差折光检测器

★质谱检测器

荧光检测器



蒸发光散射检测器



MICRO BORE 微流色谱

什么是微流色谱

* 分为：微内径1.0mm(microbore),窄内径2.0mm(narrowbore)。

* 标准的工作量：50-100 μ L/min。

* 所使用的管道内径：0.003-0.007英寸。

* 所使用的流动池体积：2-5微升。

优点

高分辨率：可达10000的理论塔板数

高灵敏度：可检测100 fmol 肽类。

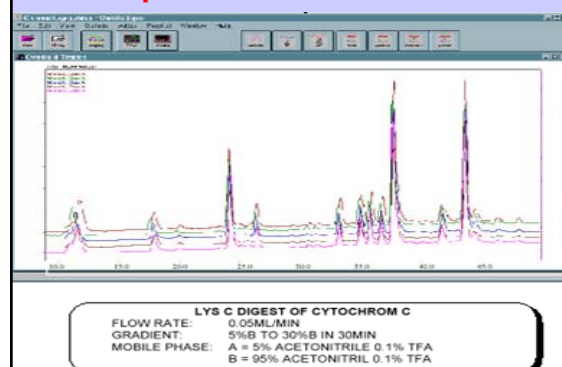
良好的重现性：RSD（变异系数）：0.25%。
STD.（标准偏差）：0.15%。

高分离速度：比一般分离快30%。

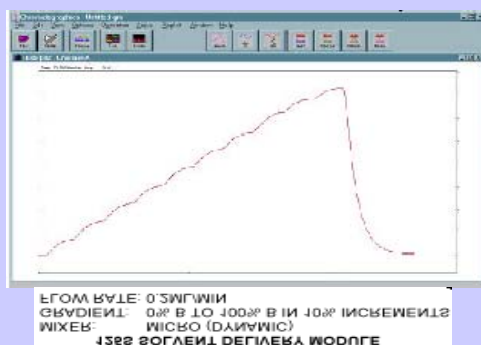
低成本消耗：节约流动相成本90%以上。

有利环保：少使用有毒溶剂。

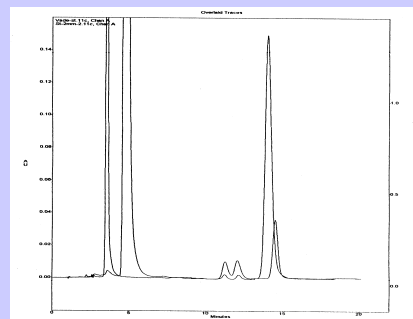
50 μ L/min流量下的蛋白分离



200 μ L/min流量下的梯度洗脱



微流技术



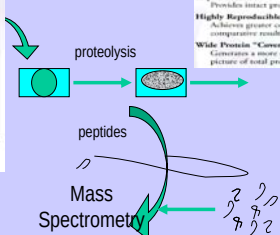
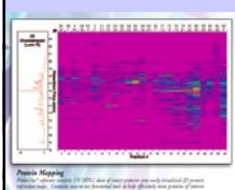
二维蛋白质分离制备系统 (HPLC- 2D Protein Prep)

- 灵敏度高，有利于低丰度蛋白质的检测
- 容易自动化，可直接与质谱连接
- 分辨率高，可获得蛋白质表达谱比较的更精细信息；
- 配上收集器可进行馏分收集
- 重现性很好
- 可获得覆盖面广的蛋白质信息

System Gold HPLC- 2D Protein Prep 系统

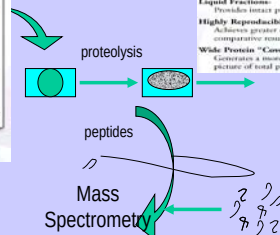
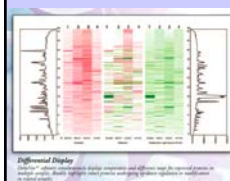


System Gold HPLC- 2D Protein Prep 系统



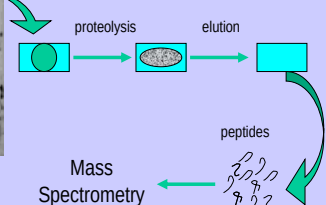
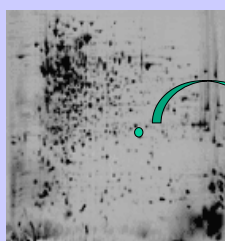
Wide Dynamic Range:
Facilitates detection of low abundance proteins.
Easily Automated:
Connects directly to mass spectrometer.
High Resolution:
Provides greater detail for protein expression profile comparisons.
Liquid Fractions:
Provides intact proteins for analysis.
Highly Reproducible:
Achieves greater confidence in comparative results.
Wide Protein "Coverage":
Generates a more complete picture of total proteome.

System Gold HPLC- 2D Protein Prep 系统



Wide Dynamic Range:
Facilitates detection of low abundance proteins.
Easily Automated:
Connects directly to mass spectrometer.
High Resolution:
Provides greater detail for protein expression profile comparisons.
Liquid Fractions:
Provides intact proteins for analysis.
Highly Reproducible:
Achieves greater confidence in comparative results.
Wide Protein "Coverage":
Generates a more complete picture of total proteome.

传统的2-D Protein Gel Electrophoresis



System Gold HPLC- 2D Protein Prep 系统

