

Dionex液相色谱用户培训

张丽娟

2011年

液相色谱基础知识部分

- 液相色谱简介
- 液相色谱理论基础

高效液相色谱简介

色谱的发明人

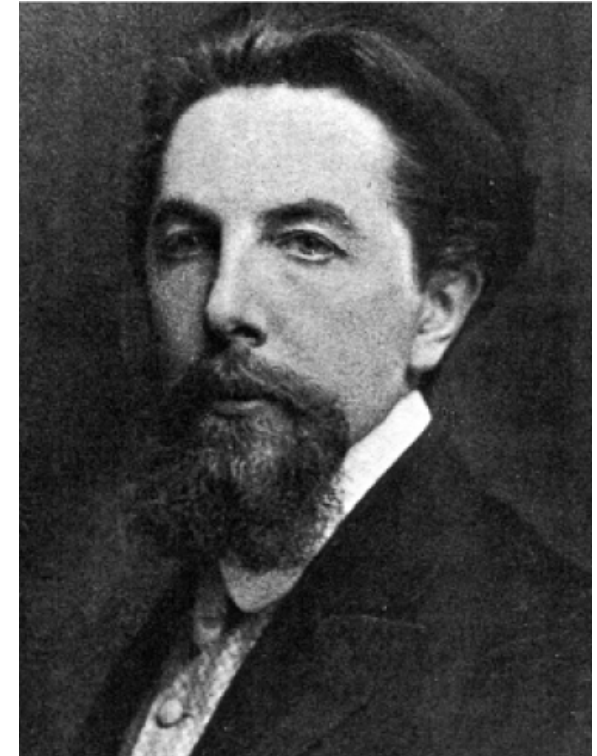
- 俄国科学家: **M. S. Tswett**
- 正式命名“色谱”的文献

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

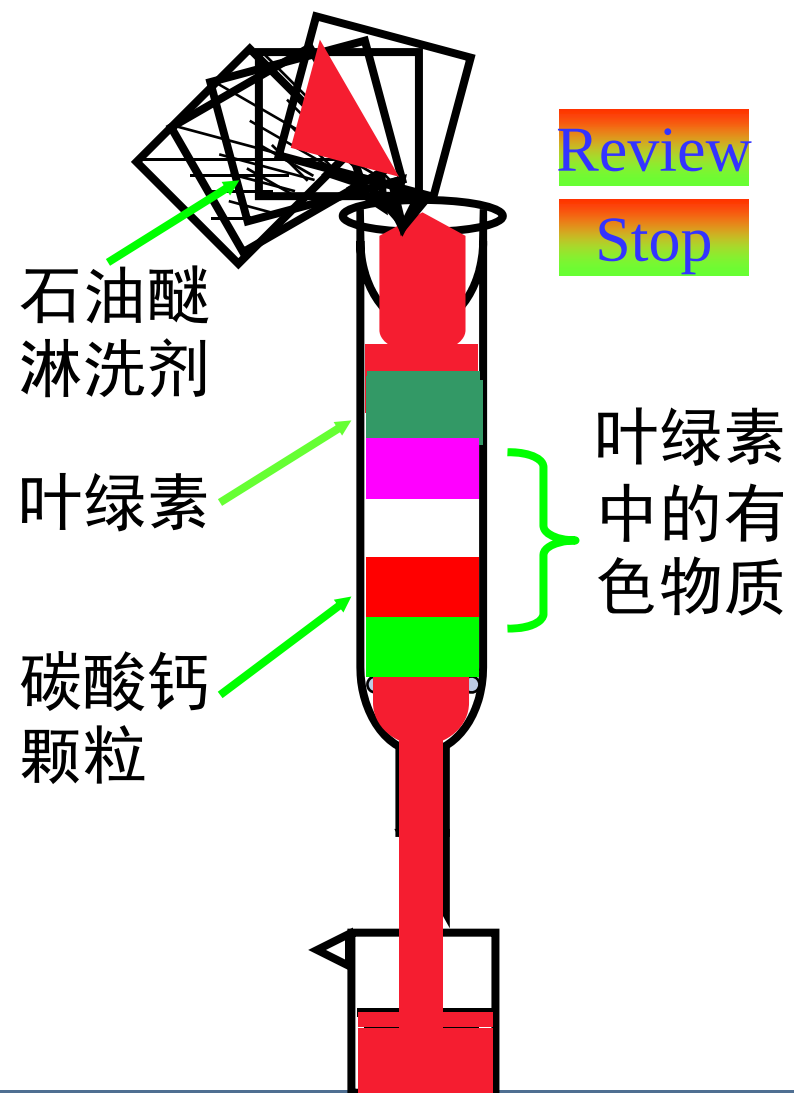
" ... it is obvious that the adsorption phenomena described are characteristic not only of chlorophyll pigments; it is evident that different coloured and colourless compounds follow the same regularities."

M. S. Tswett (1906)

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



经典液相色谱



色谱法简介

- 色谱法（**Chromatography**）溯源
 - 俄国科学家**1903**年发现色谱的吸附原理，开创了应用吸附原理分离植物色素的新方法并见诸于俄文的文献
- **1906**年正式命名（见诸文献）
 - 色谱法；**Chromatography**
- **50**年代开始广泛研究和应用
 - 主要是气相色谱及薄层色谱
- 高效液相色谱法的广泛应用始于**70**年代

什么是高效液相色谱

- **High Performance Liquid Chromatography**
 - 高效液相色谱法，简称：**HPLC**
- 是一种区别于经典液相色谱,基于仪器方法的高效能分离手段：
 - 高性能的色谱柱，高精度、耐高压的输液泵以及高灵敏度的检测器
 -
- 在技术，理论及应用上处于迅速发展阶段

应用领域



HPLC技术的发展趋势

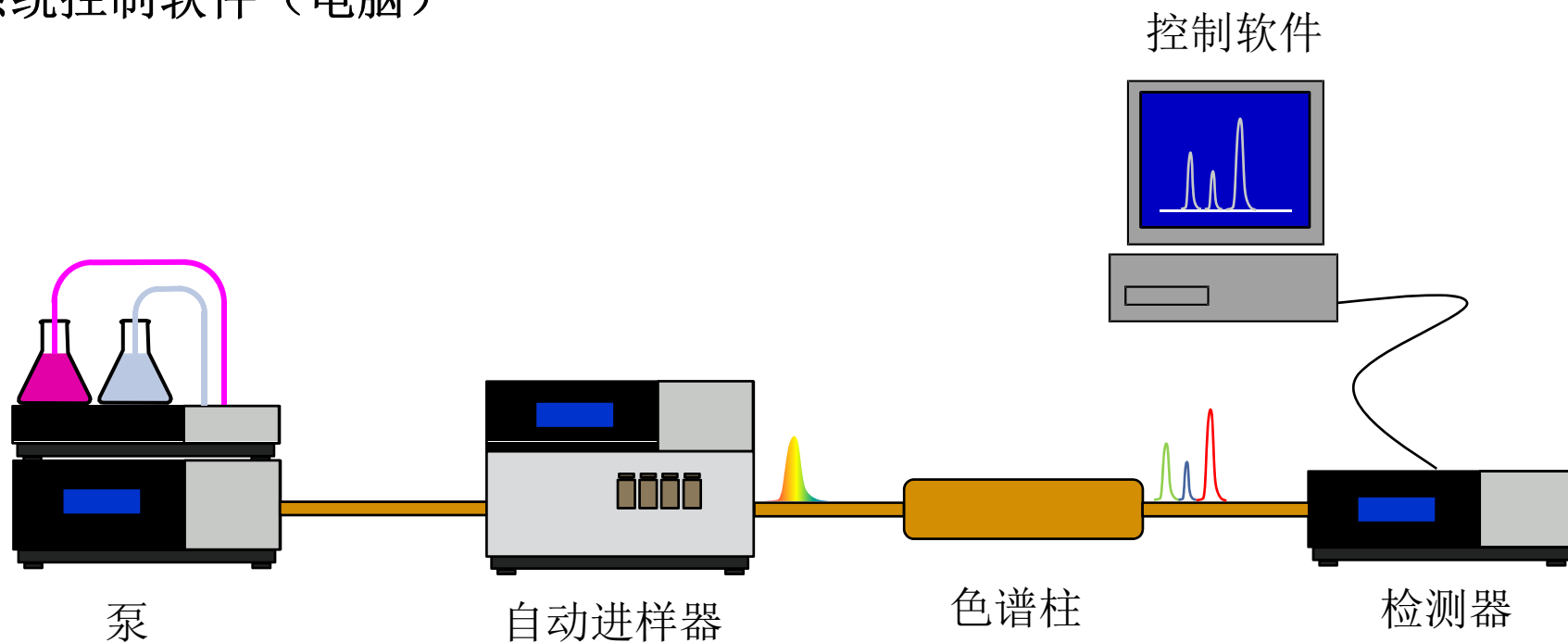
- 高速化、高效化
 - 高精度的高压泵、能走梯度洗脱；
 - 高灵敏度的检测器、紫外/可见光检测器,二极管阵列检测器 (**DAD**)，荧光检测器，电喷雾检测器 (**CAD**) 以及示差、蒸发光散射检测器等。
 - 微粒硅胶为**LC**发展奠定了基础，现在的填料粒度大多为**10 μ m**、**5 μ m** 甚至**3 μ m**、亚**2 μ m**，填料的微粒化产生了快速柱，微粒柱提高了分离效率和分析速度。
 - 键合相填料的出现拓宽了**LC**在多领域的实用能力。
 - 微径柱，毛细管柱，**Nano**柱提高灵敏度和分离效率
 - 特种柱，专用柱增强了色谱分离的选择性

HPLC技术的发展趋势

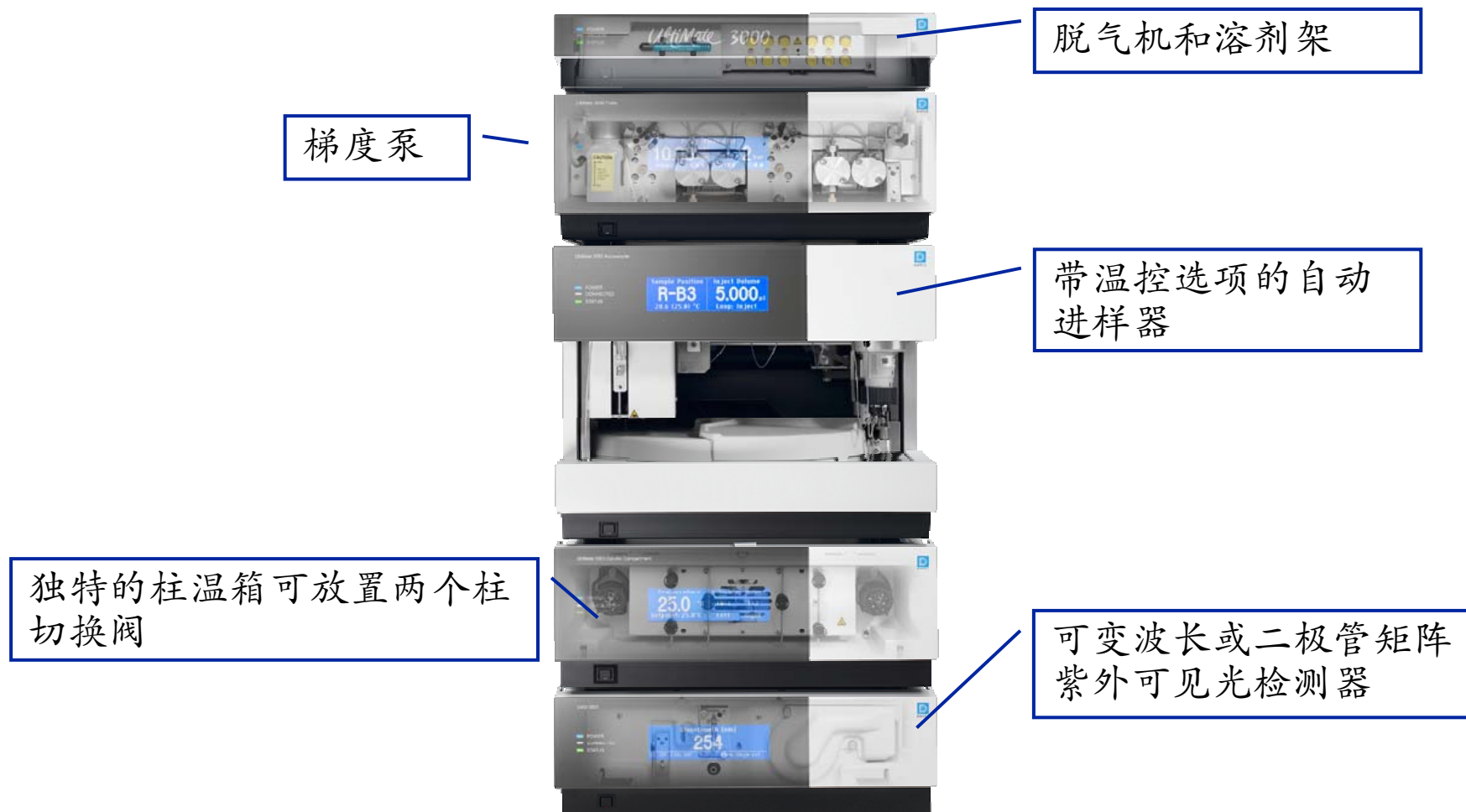
- 自动化、智能化
 - 由色谱工作站单点控制泵、自动进样器、检测器的操作程序并作色谱数据处理和光谱信息处理，从而实现**24**小时无人操作。
- 二极管阵列检测器的作用可在色谱分析的同时作光谱确认
- **HPLC**与质谱仪的联用技术

液相色谱系统：总体设计

- 泵（含脱气机）
- 自动进样器
- 色谱柱（放于柱温箱中）
- 检测器
- 系统控制软件（电脑）

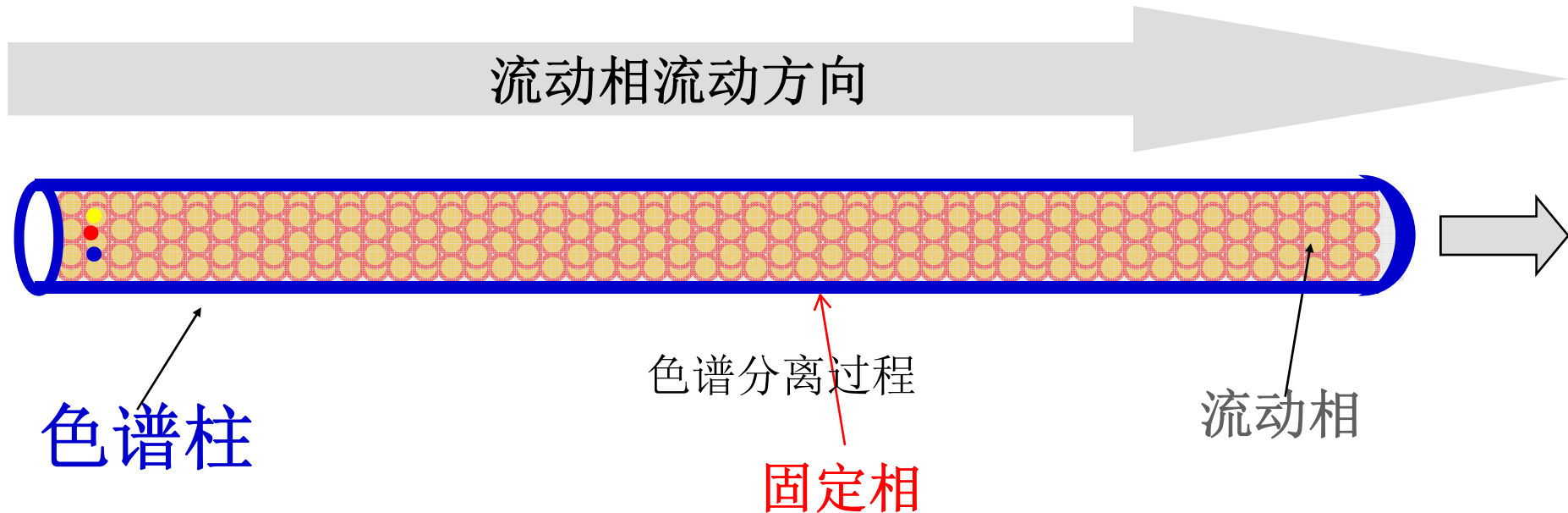


UltiMate 3000仪器配置



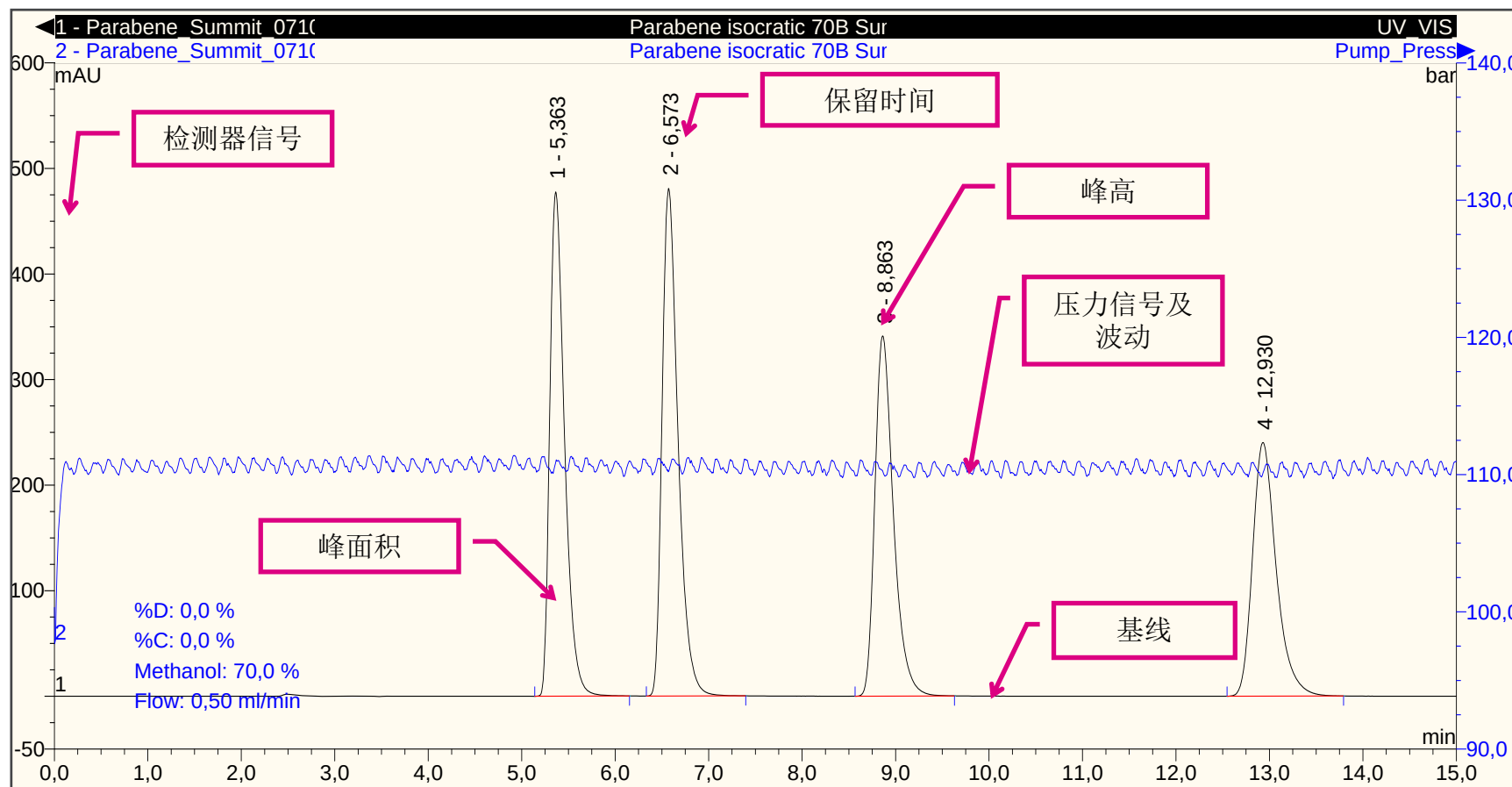
高效液相色谱基础理论

色谱分离过程



- 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，所以当化合物流经色谱柱时就会被分分开。

液相色谱图简介



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。

基础理论：术语介绍

- 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
- 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
- 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

基础理论：术语介绍

- 峰面积 — **Peak Area**
 - 峰与峰底之间的面积,又称响应值
- 标准偏差; σ — **Standard Error**
 - **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

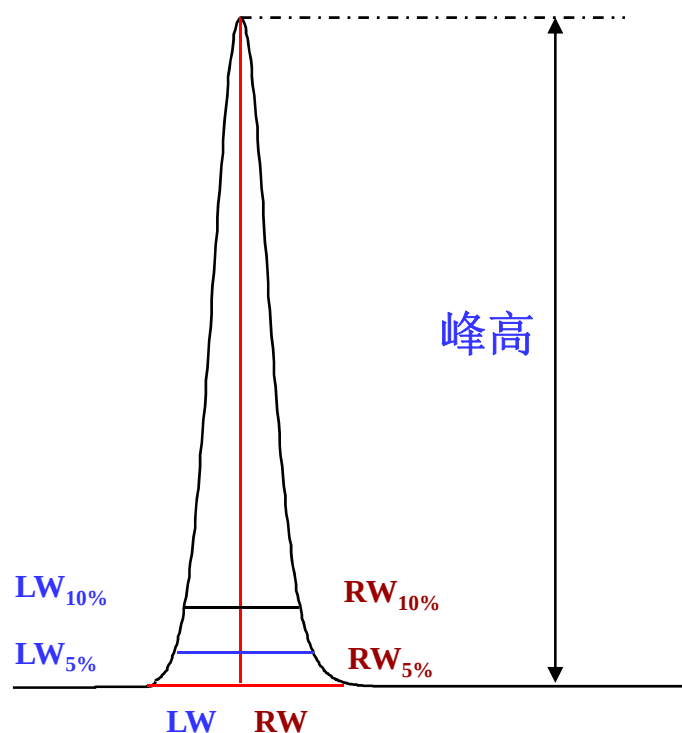
基础理论：术语介绍

- 基线 — **Baseline**
 - 在正常操作条件下，仅由流动相所产生的响应信号的曲线
- 基线飘移 — **Baseline Drift**
 - 基线随时间定向的缓慢变化
- 基线噪声；**N — Baseline Noise**
 - 由各种因素所引起的基线波动
- 谱带扩展 — **Band Broadening**
 - 由于纵向扩散,传质阻力等因素的影响,使组分在色谱柱内移动过程中谱带宽度增加的现象

基础理论：术语介绍

- 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

不对称因子计算示意图



EP/USP标准:

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

AIA标准:

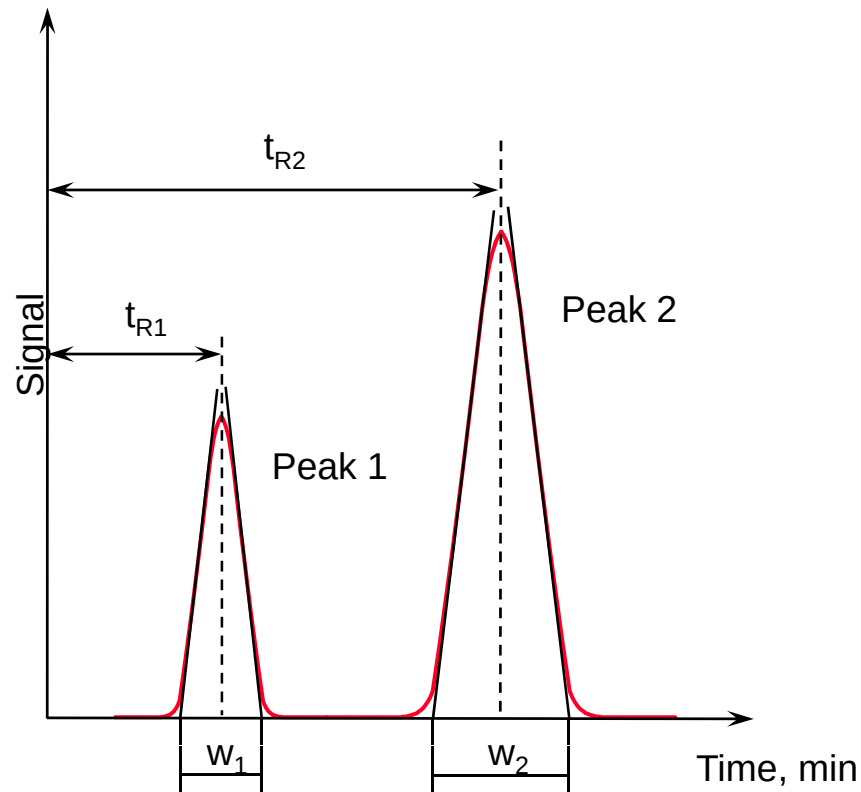
$$A = \frac{RW_{10\%}}{LW_{10\%}}$$

$A = 0.95 \sim 1.05$: 正常峰

$A < 0.95$: 前延峰

$A > 1.05$: 拖尾峰

色谱的分离度



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

$R < 1.5$: 未达到基线分离

$R \geq 1.5$: 基线分离

色谱峰的完全分离是每一个色谱方法的目标。

分离度方程

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

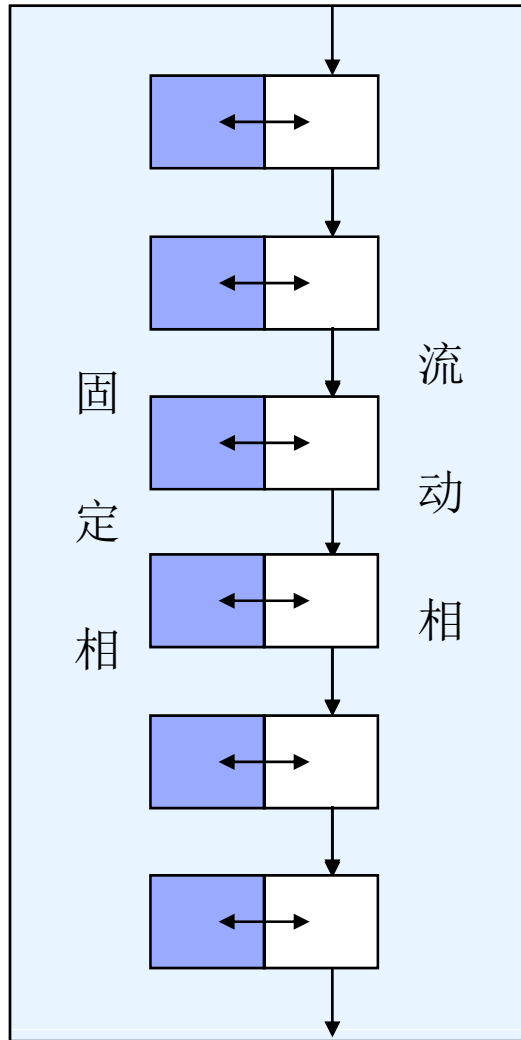
柱效

容量因子

选择因子

- k' 是容量因子，表达了被分离组分与柱填料之间作用的强弱
- α 是选择因子，描述两个被分离组份分离的好坏程度，是化学因素
- N 是理论塔板数，描述色谱峰谱带展宽的程度

基础理论：塔板理论



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

分析物在这种平衡里面存在着一种平衡系数**K**，定义为：

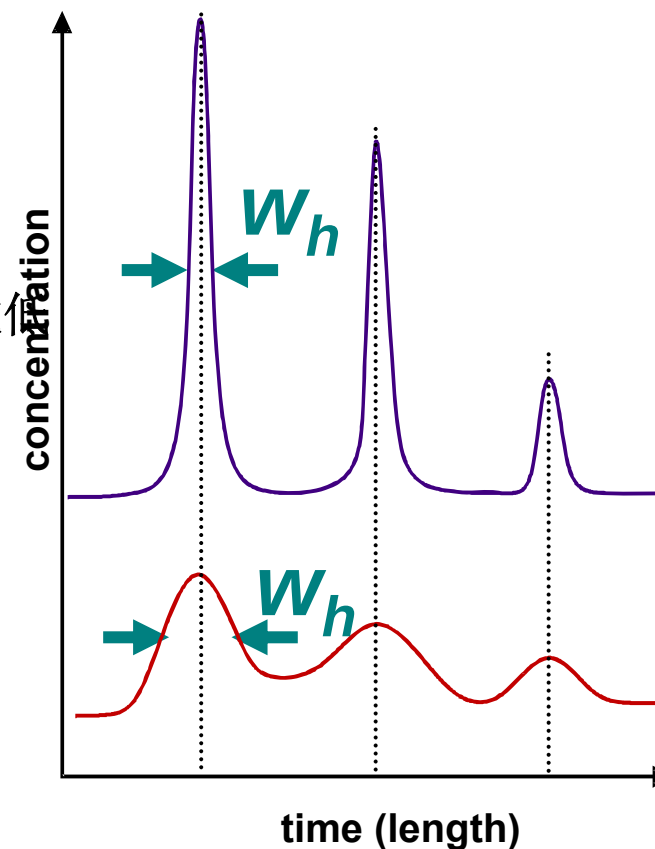
$$K = C_{\text{固定相}} / C_{\text{流动相}}$$

随着**K**的增加，分析物从色谱柱中的流出时间就越长，即分析物的在色谱柱内的保留时间越长

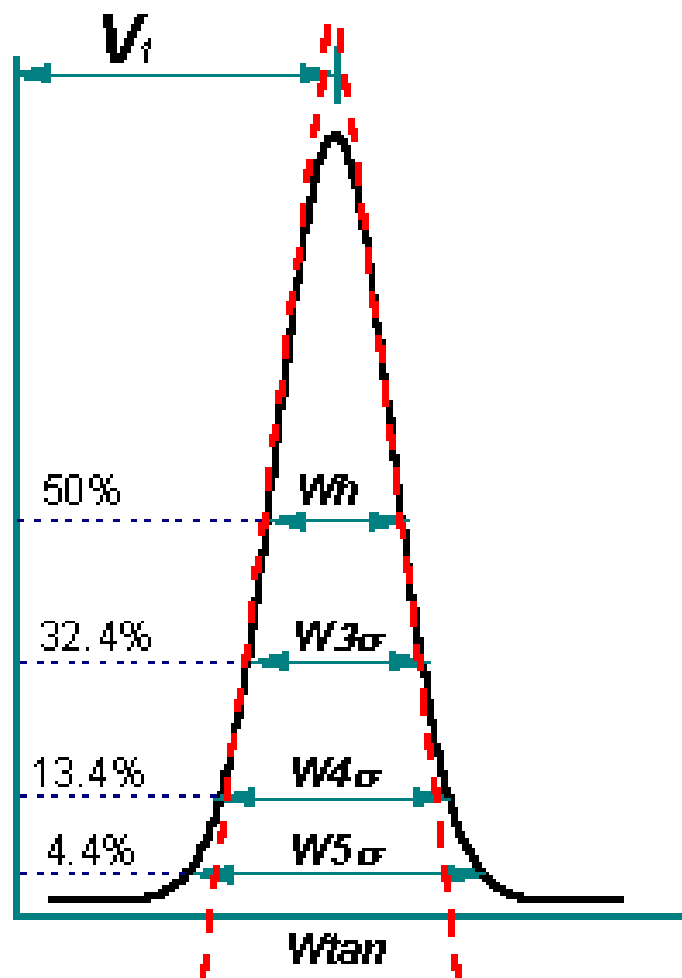
塔板理论数与柱效的关系

- 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

理论塔板数 ←
$$N = \frac{L}{H}$$
 → 色谱柱长
→ 理论塔板高度



理论塔板数 (N) 计算方法



理论塔板数计算方法：

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

$$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{\tan}} \right)^2$$

$W_{\tan}$ 16 切线法

W_h 5.54 半峰宽

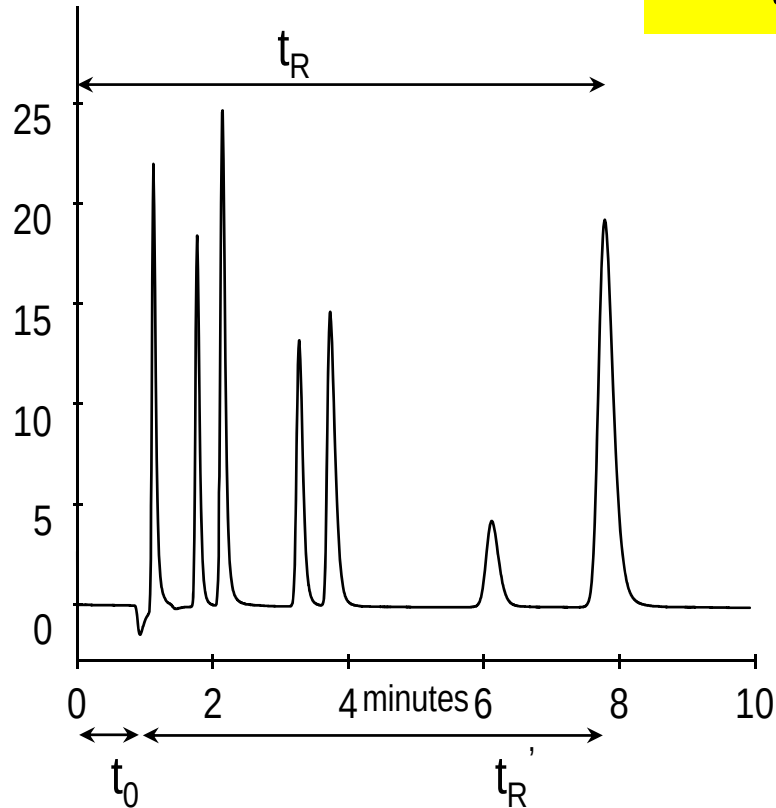
$W_{3\sigma}$ 9 3σ

$W_{4\sigma}$ 16 4σ

$W_{5\sigma}$ 25 5σ

容量因子对分离度的影响

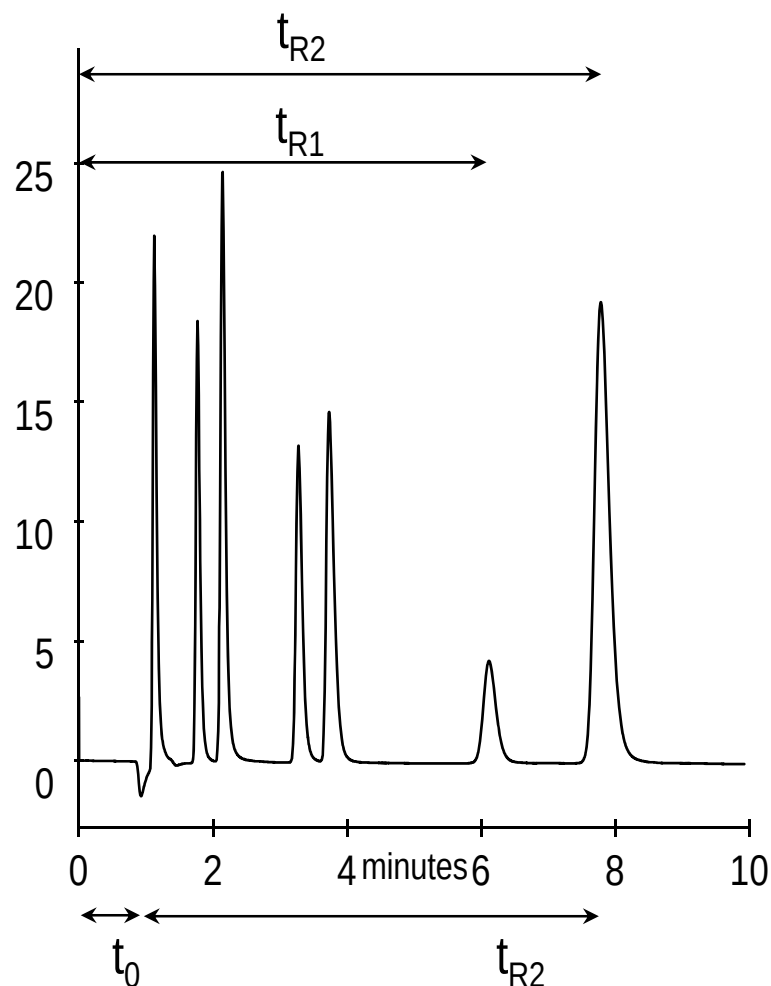
$$k' = \frac{t_{\text{固定相}}}{t_{\text{流动相}}} = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$



- **k' 值小**
 - 组分流出快，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 α :

- 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

α – 选择性

k' – 容量因子

例如:

在5- μ 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 ($N = 640,000$)

方法 2 – 提高 α 需要提高 α ($\alpha = 1.02$)

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

R_s 与 N 、 K' 及 α 的关系图示

