

高效 液相色谱 基本原理 — 理论

成就
您的科学探索之路
安捷伦与您同行

安捷伦科技公司致力于为教育事业贡献力量，愿意无偿提供公司拥有的技术培训材料。

这组幻灯片是由安捷伦科技公司制作的。这些幻灯片的用途仅限于教学目的。

如果其中的图片、示意图或绘图要用于其他任何目的，请事先与安捷伦科技公司取得联系。

前言

高效液相色谱（HPLC，曾称为高压液相色谱）是分析化学领域的一项技术，可用于分离混合物中的多种组分、对每种组分进行鉴定，以及对组分进行定量分析。

HPLC 利用泵使含有样品混合物的加压液体溶剂通过填充有固体吸附材料的色谱柱。样品中的每种组分与吸附材料的相互作用都略有不同，这使不同组分具有不同流速，从而当它们流出色谱柱时即可实现分离。

来源：维基百科

目录 (ToC)

前言

- [色谱柱内部的作用原理](#)

关键参数

- [保留时间与峰宽](#)
- [分离度 — 基线分离](#)
- [分离度 — 基本公式](#)
- [柱效或理论塔板数](#)
- [保留因子](#)
- [选择性或分离因子](#)

影响选择性的因素

- [选择性 — 示例 1](#)
- [选择性 — 示例 2](#)
- [选择性 — 示例 3](#)
- [塔板数](#)

Van Deemter 方程

- [涡流扩散](#)
- [纵向扩散](#)
- [传质阻力](#)
- [有关 Van Deemter 方程的更多内容](#)

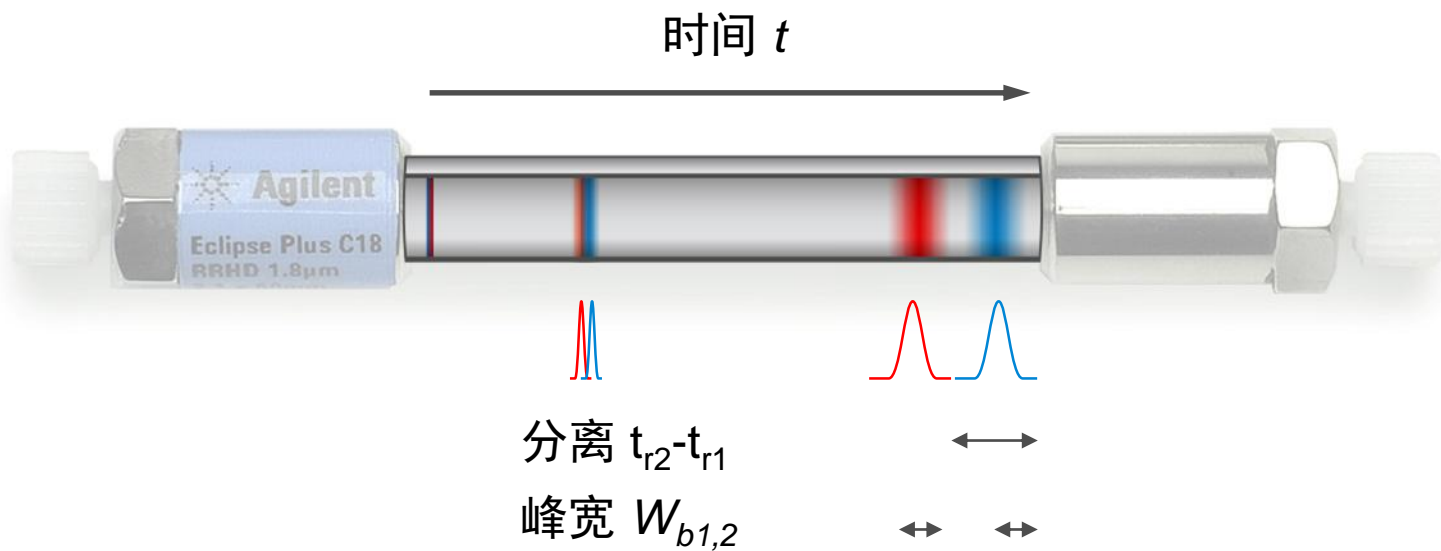
峰容量

- [梯度分析](#)
- [定义](#)
- [峰容量计算](#)
- [峰宽](#)
- [示例](#)



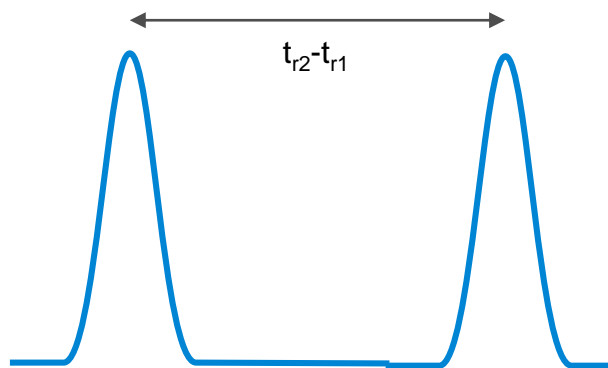
前言

色谱柱内部的作用原理



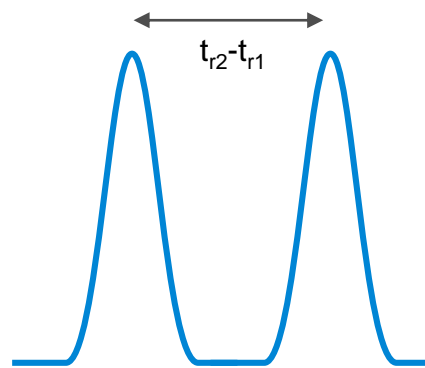
前言

色谱柱内部的作用原理

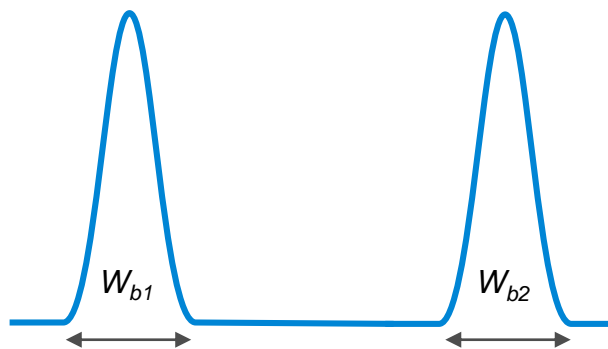


较好分离

对比

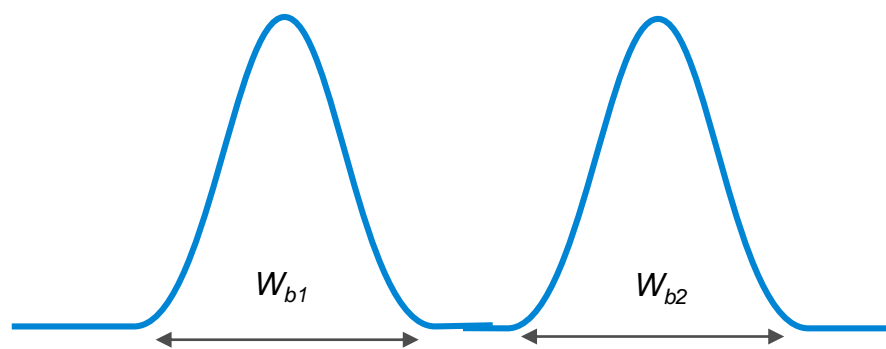


较差分离



较好分离

对比



较差分离

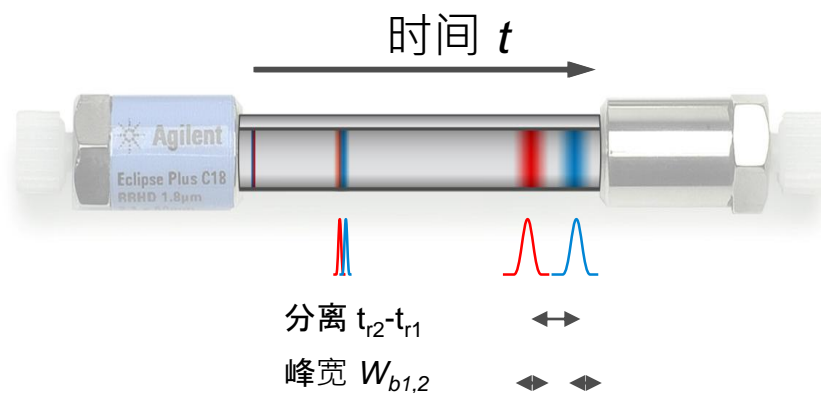
前言

色谱柱内部的作用原理

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})}$$

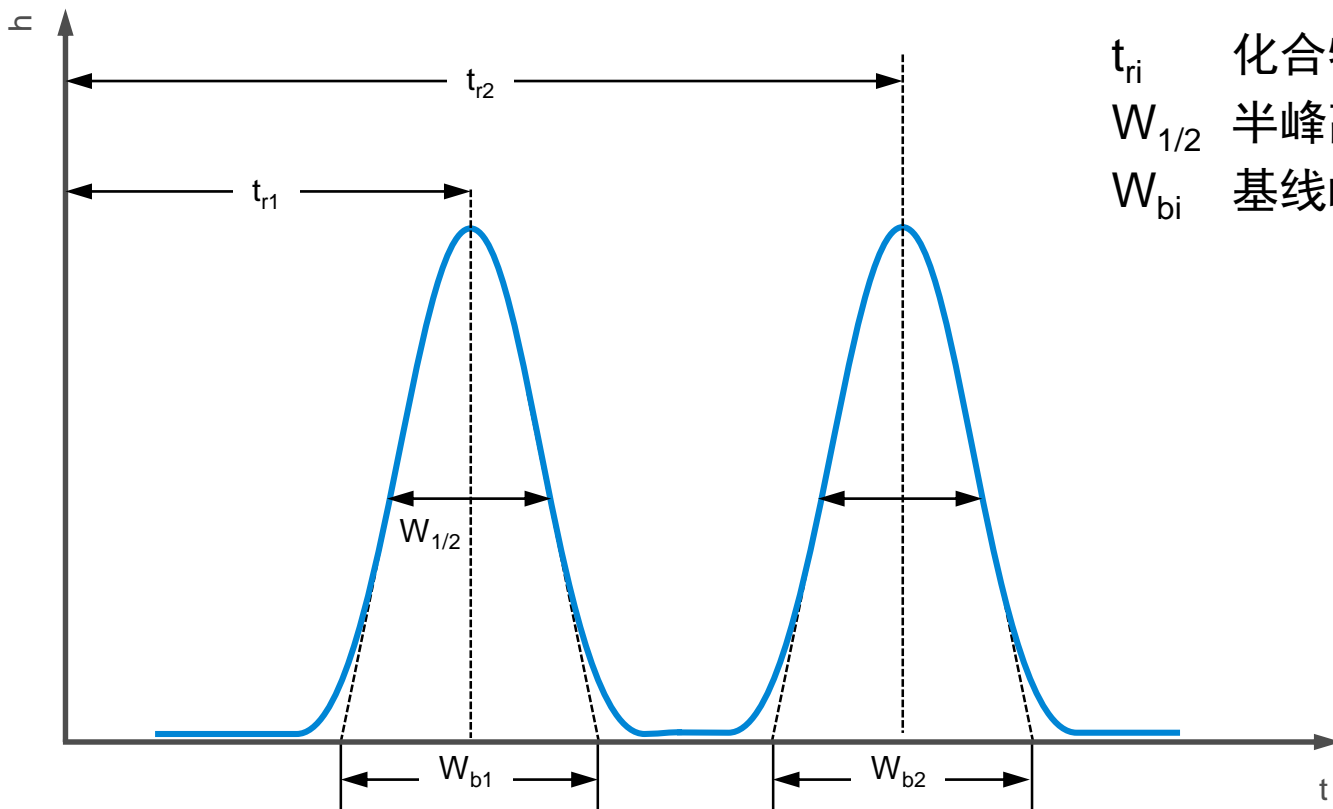
分离度是对色谱柱分离目标峰能力的描述。

分离度大小能表示是否实现了基线分离。



关键参数

保留时间与峰宽



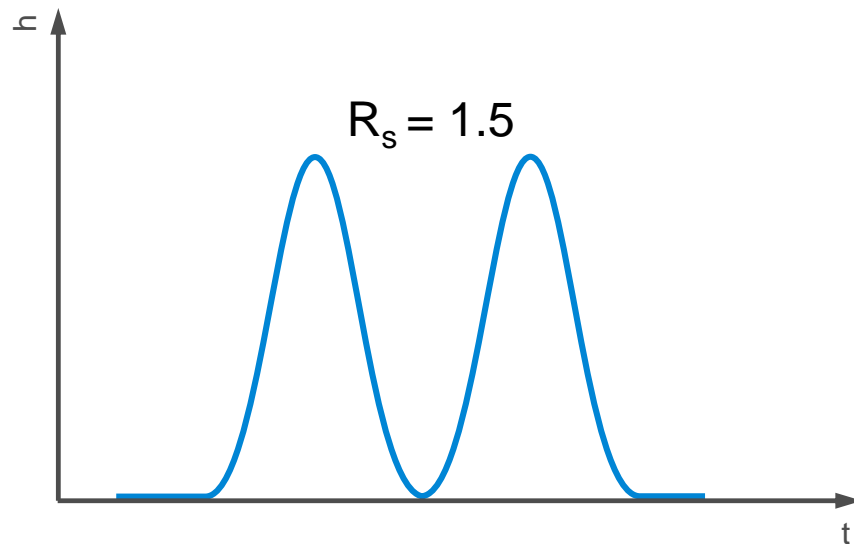
t_{ri} 化合物 i 的保留时间
 $W_{1/2}$ 半峰高处的峰宽
 W_{bi} 基线峰宽

关键参数

分离度 — 基线分离

分离度是对色谱柱分离目标峰能力的描述。分离度将受到柱效 (N)、选择性 (α) 和保留 (k) 的影响。

- 可以进行充分定量分析的可测分离的最小分离度为 1。
- 可辨别出两个等高峰之间峰谷的最低分离度为 0.6。
- 稳定的分析方法通常需要分离度达到 1.7 或更高。
- 1.6 被认为是达到基线分离，并且可确保获得最准确的定量分析结果的标准分离度。



关键参数

分离度 — (U)HPLC 的基本方程式

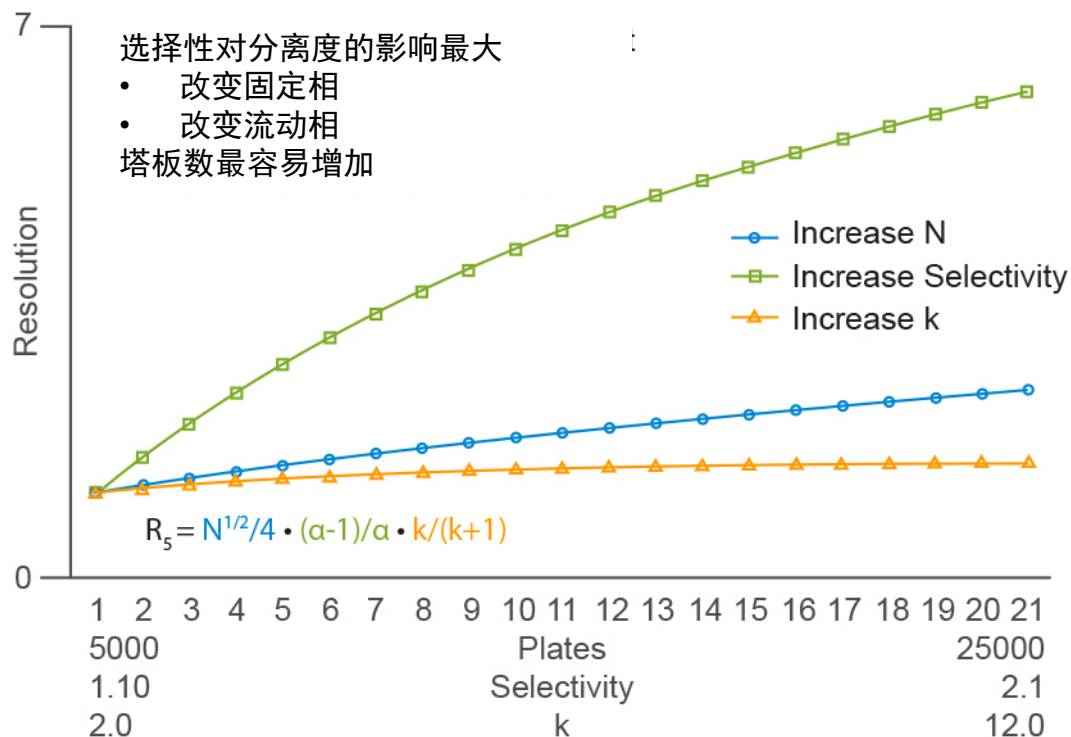
$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{柱效}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)}_{\text{选择性}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1 + k} \right)}_{\text{保留}}$$

我们可以通过优化下述任何一个参数来改善分离度：

- 选择性对分离度影响最大。选择性的微小变化即可导致分离度的极大改变。
- 保留只在 k 值小的时候有显著影响。
- 柱效描述了色谱柱的分离能力。

关键参数

分离度 — (U)HPLC 的基本方程式



该图阐明了分离度是选择性、柱效和保留的函数。

关键参数

柱效或理论塔板数 (N)

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \quad N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

柱效用于比较不同色谱柱的性能。由理论塔板数 N 表示。

具有高塔板数的色谱柱柱效更高。与具有较低塔板数的色谱柱相比，具有高塔板数的色谱柱在给定保留时间处可以获得更窄的色谱峰。

影响柱效的参数：

- 柱长（增加柱长可以提高柱效）
- 填料粒径（减小填料粒径可以提高柱效）

关键参数

保留因子 (k)

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

保留因子测定了样品组分在固定相与流动相中的保留时间之比。它是用保留时间除以不保留峰的出峰时间 (t_0) 计算得出的。

影响保留因子的参数：

- 固定相
- 流动相
- 梯度斜率*
- 系统驻留体积*

*仅指梯度洗脱

关键参数

保留因子 (k) — 梯度洗脱

$$k' = \frac{t_G \cdot F}{S \cdot \Delta\Phi \cdot V_m}$$

该方程式显示出流速 (F)、梯度时间 (t_G)、梯度范围 ($\Delta\Phi$) 和柱体积 (V_m) 是如何影响保留因子的。

请记住：为使保留因子保持恒定，分母的改变需要由分子相应按比例改变来抵消，反之亦然。

关键参数

选择性或分离因子 (α)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

α	选择性
k_1	第一个峰的保留因子
k_{2i}	第二个峰的保留因子

选择性是两个峰顶点间时间或距离的量度。如果 $\alpha = 1$ ，则两个峰具有相同的保留时间，并且会被共洗脱。它被定义为容量因子之比。

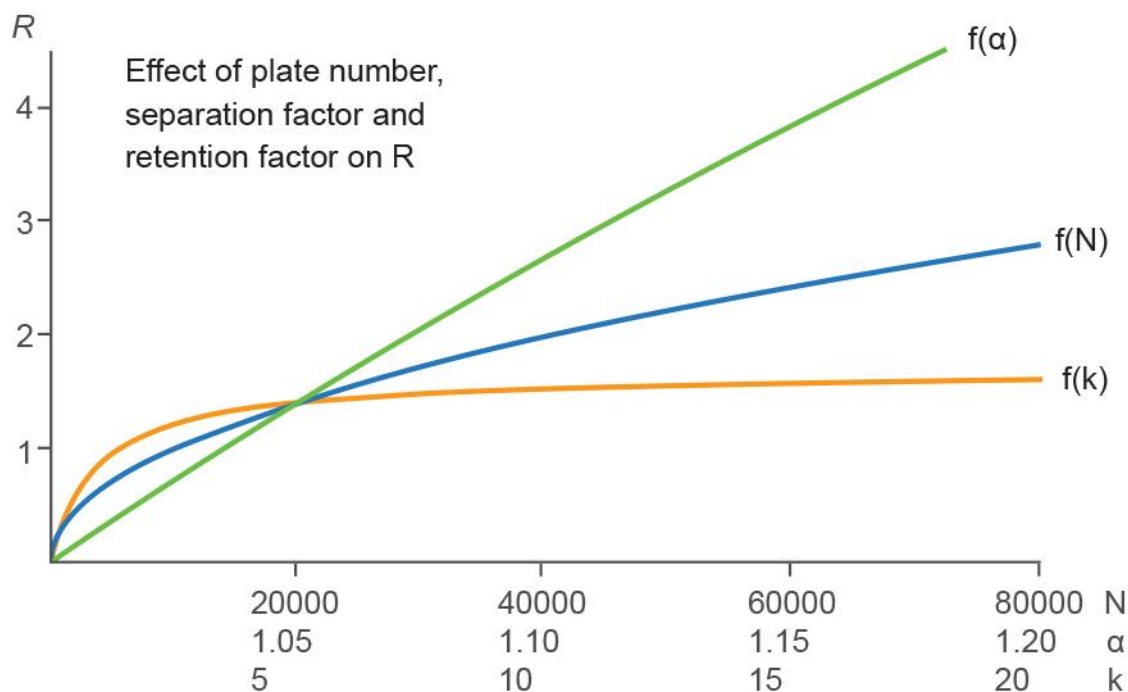
影响保留因子的参数：

- 固定相
- 流动相
- 柱温

关键参数

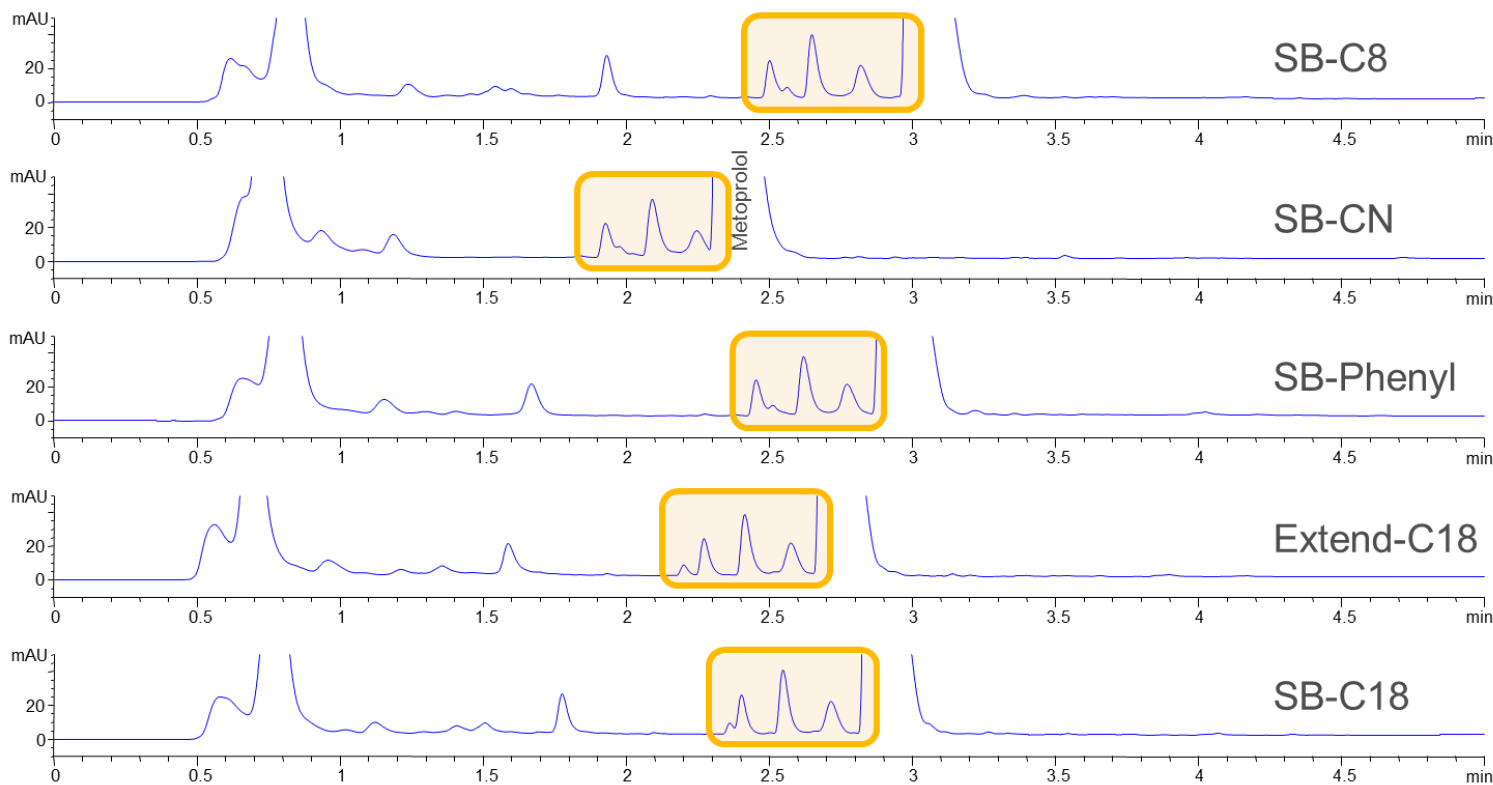
N、 α 及 k 对分离度的影响

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{1+k} \right)$$



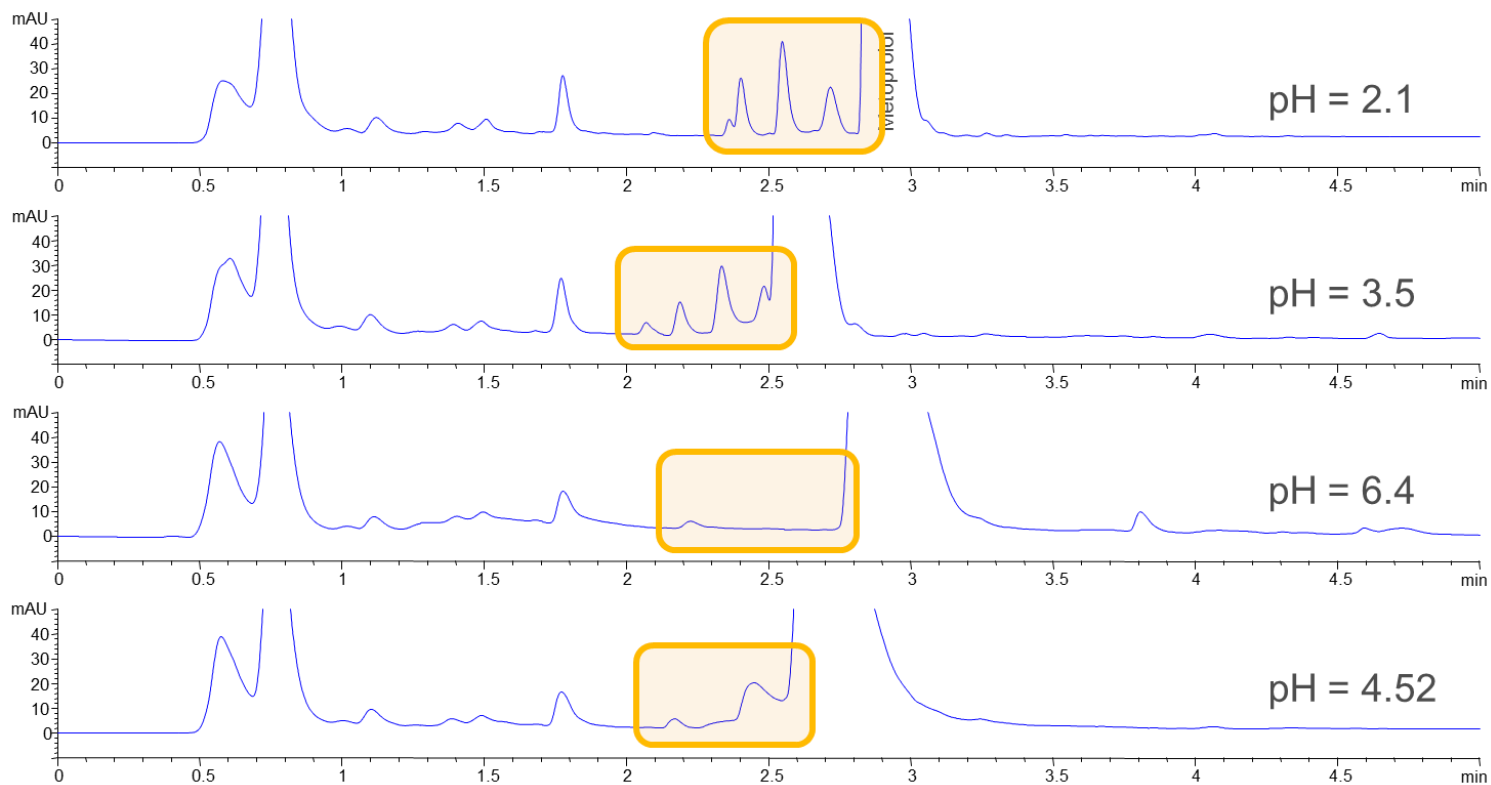
影响分离的因素

同一种样品采用不同固定相，但始终采用相同柱温、流动相和梯度进行分析。



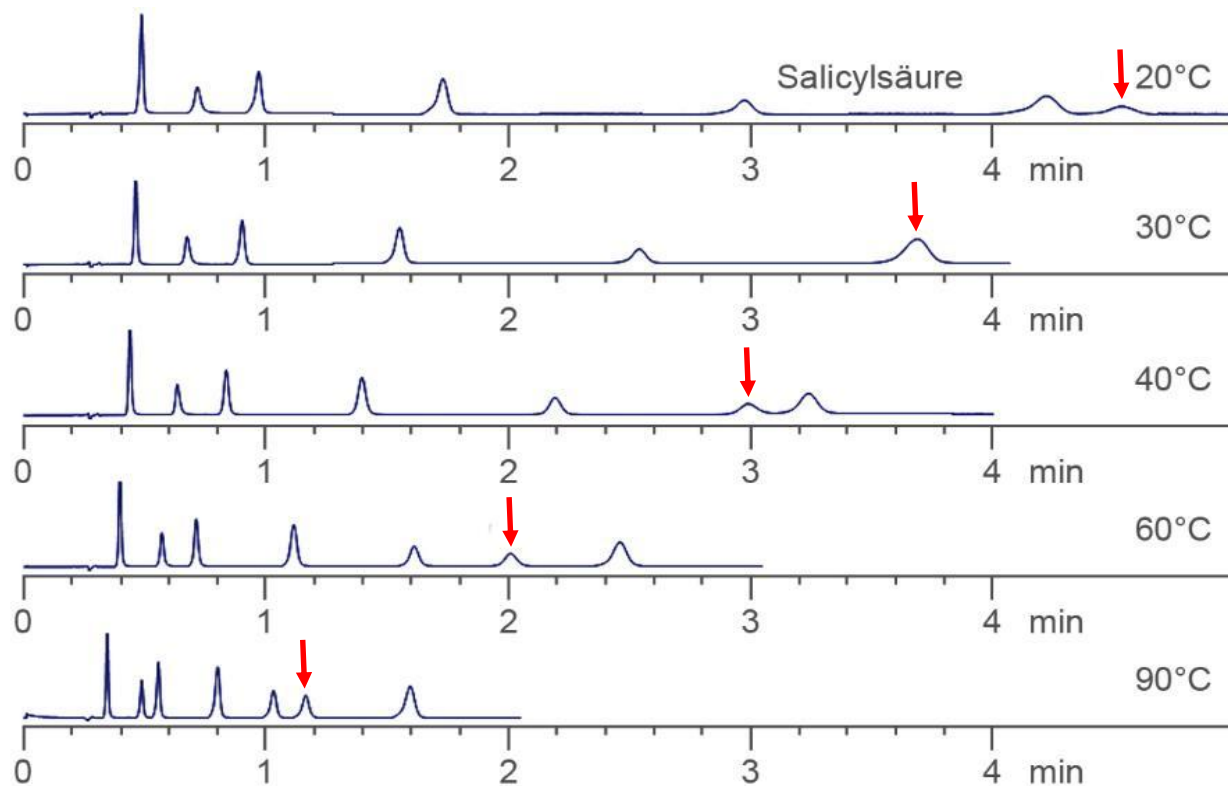
影响分离的因素

同一种样品采用相同固定相和柱温，但采用不同流动相进行分析（相同梯度）。



影响分离的因素

同一种样品采用相同固定相、流动相及相同梯度，但采用不同柱温进行分析。



影响分离的因素

HPLC 中“塔板”的含义

$$R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{N}$$

$$R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{H}} \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{h \cdot d_p}}$$

L_c 柱长

d_p 填料粒径

h 折合理论塔板高度

理论塔板是一种假设的分离阶段，其中一种物质的两相（液相和气相）达到平衡。

影响分离的因素

高塔板数 (N) 可提供:

- 尖锐的窄峰
- 更出色的检测能力
- 分离复杂样品的峰容量

但分离度只随塔板数平方根的增大而提高。

- $R_S \sim \sqrt{N}$

塔板数的增大受实验条件的限制

- 分析时间、柱压

影响分离的因素

将峰宽和折合理论塔板高度结合起来

$$R_s = \frac{t_{r1} - t_{r2}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})}$$
$$R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{h \cdot d_p}}$$

$h = f(w)$

$h = f(w_{eddy} + w_{ax} + w_C)$

h: 折合理论塔板高度

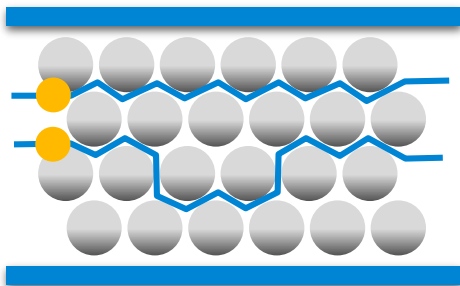
Van Deemter 方程

涡流扩散

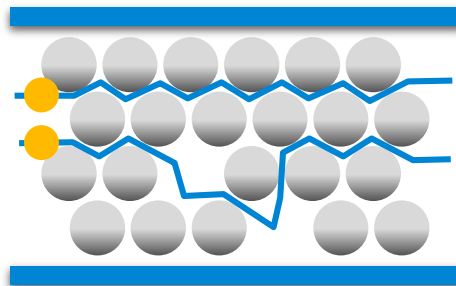
$$W_{eddy} \sim \lambda d_p$$

λ : 色谱柱填料的品质

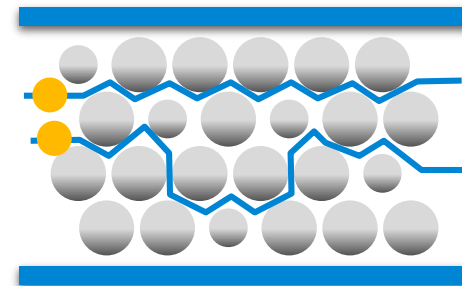
扩散路径的不同是由于:



不同的路径



色谱柱填充不佳



较宽的粒径分布

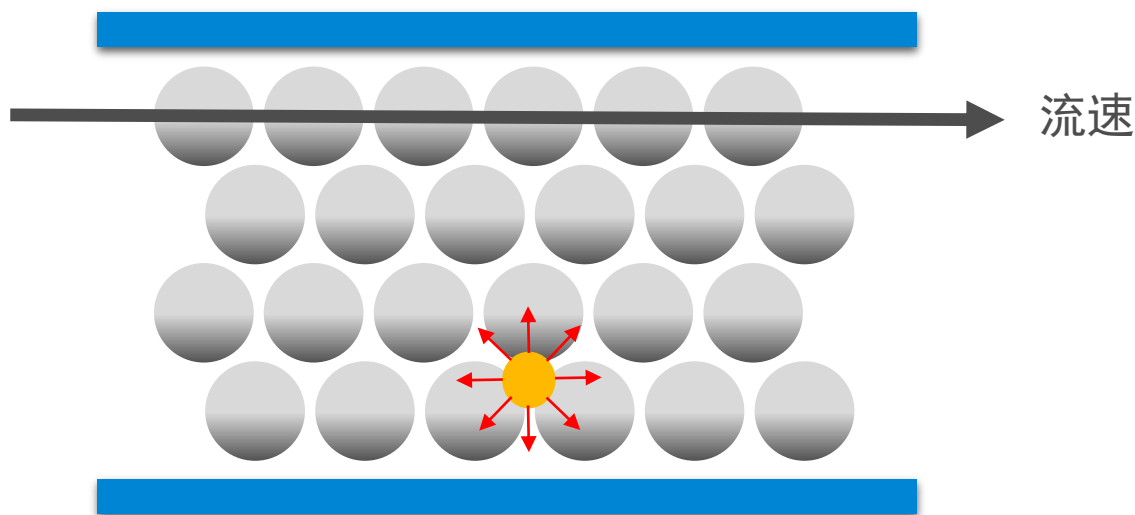
Van Deemter 方程

轴向或纵向扩散

由于分析物的自身扩散导致峰宽增大

低流速时，分析物会在流动相中保留很长时间

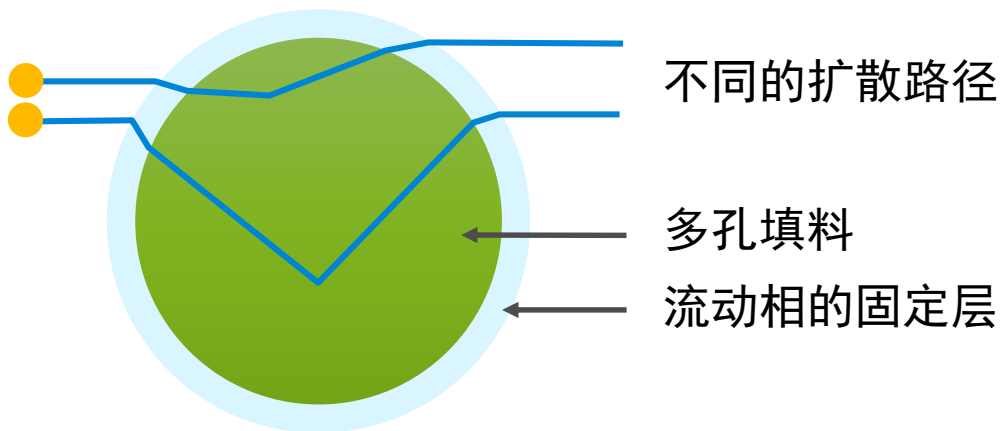
- 峰宽的显著增大
- 理论塔板高度的增大



Van Deemter 方程

“传质阻力”

$$W_C \sim d_p^2$$



Van Deemter 方程

Van Deemter 方程通过综合考虑分离过程中引起峰展宽的物理学、动力学和热力学因素，将分离柱单位长度的总峰展宽与流动相线性速率联系起来（维基百科）。

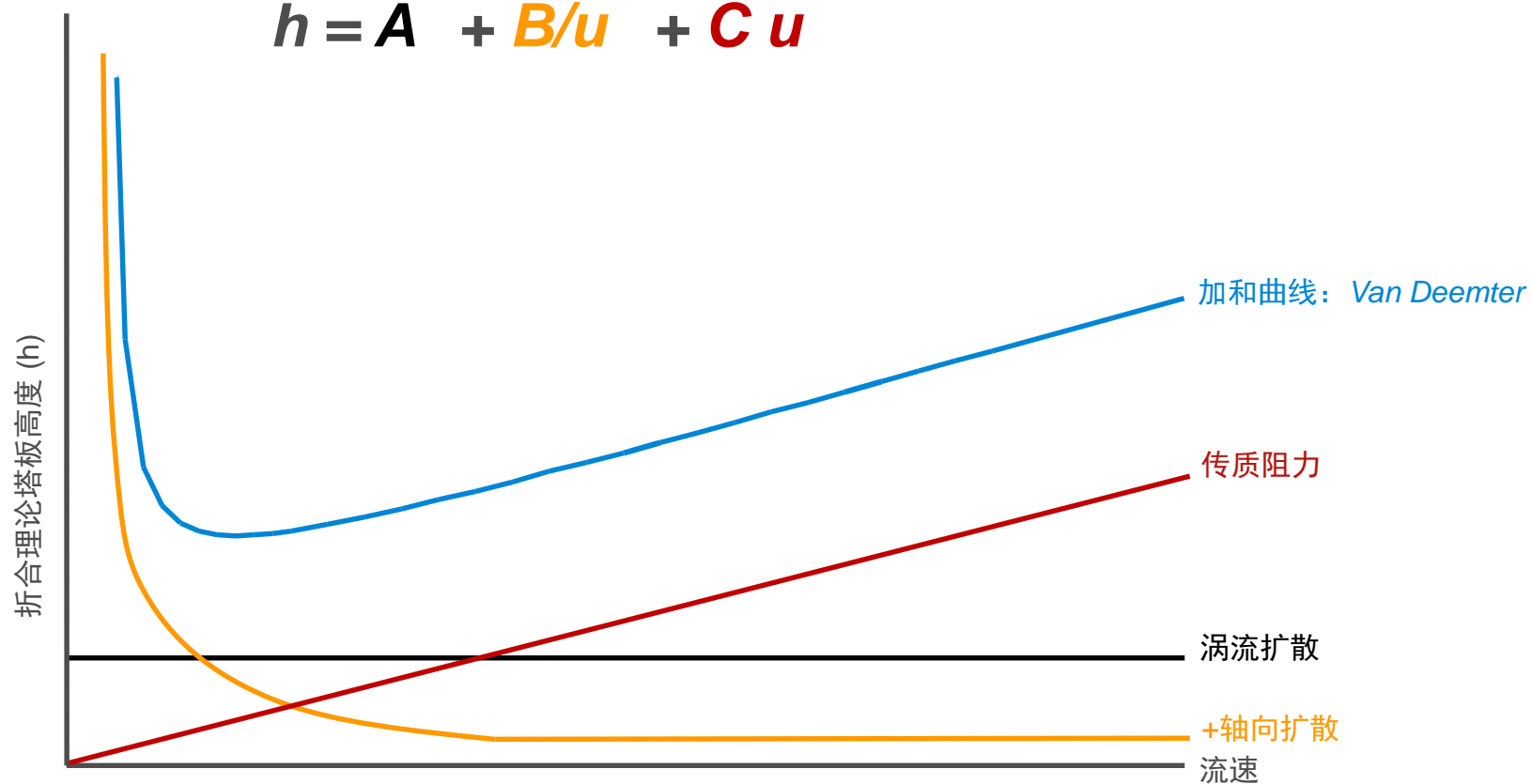
$$h = f (W_{\text{eddy}} + W_{\text{ax}} + W_{\text{C}})$$

- 涡流扩散
- 扩散系数
- 传质阻力

$$h = A + B/u + C u$$

Van Deemter 方程

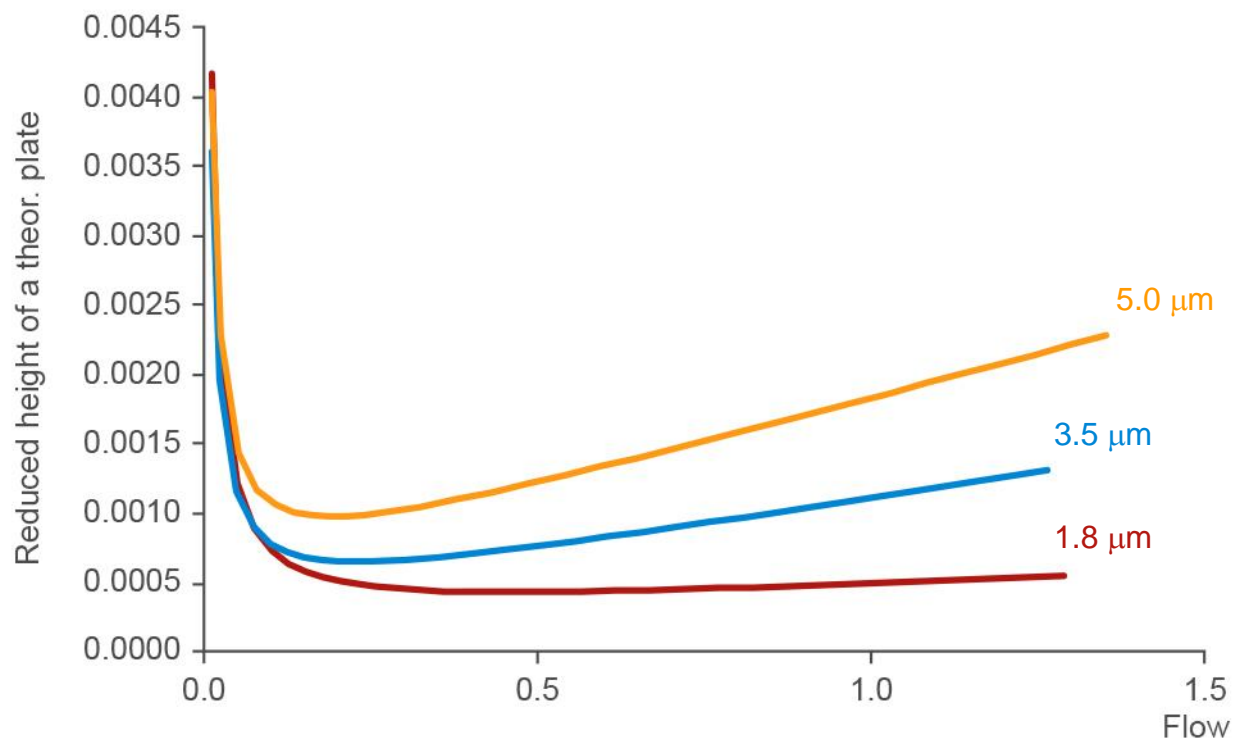
$$h = A + B/u + C u$$



Van Deemter 方程

针对不同填料粒径进行测定

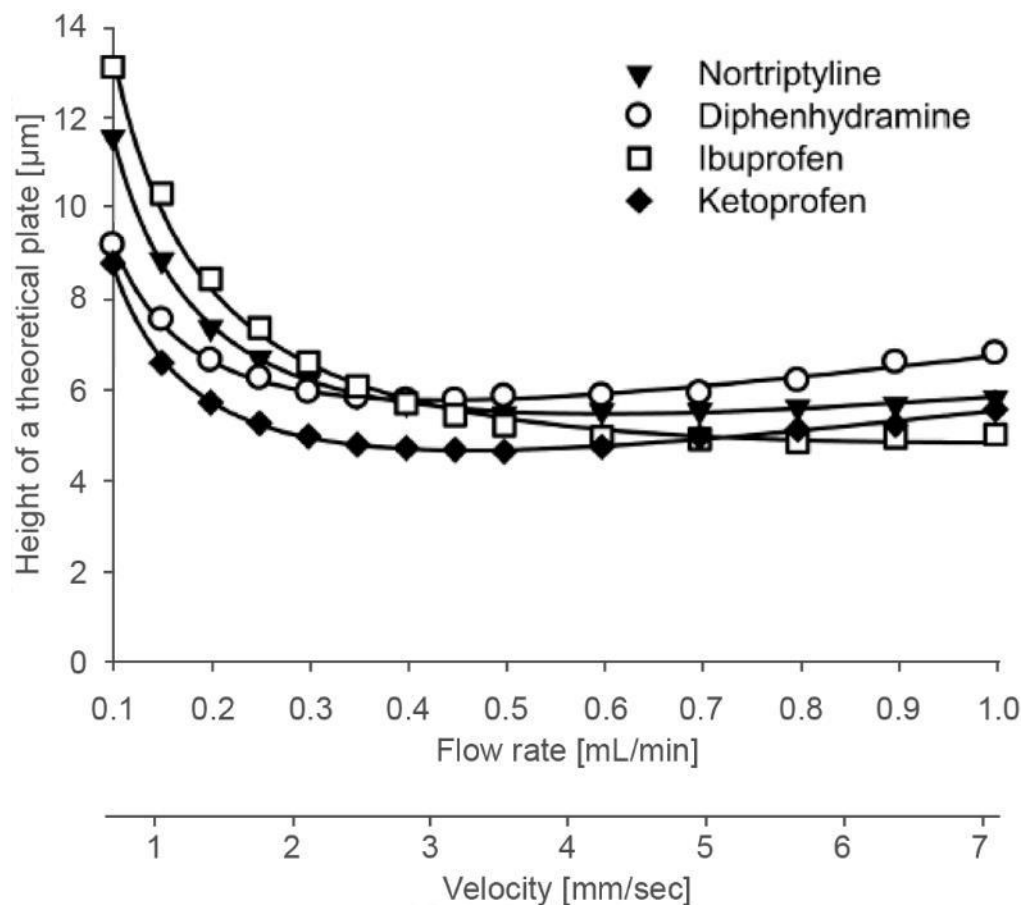
- 使用小粒径填料可以获得较小的理论塔板高度，从而实现更高的分离效率
- 对于更小粒径的填料，流速提高时分离效率的损失更少



Van Deemter 方程

不同分析物的实际曲线

- Van Deemter 方程仅适用于等度运行
- 化合物和仪器特异性
- 亚 2 μm 填料甚至也不水平
- 最佳流速取决于具体化合物



P. Petersson et al (AZ), *J.Sep.Sci*, 31, 2346-2357, 2008

峰容量 梯度分析

$h = f(w^2)$ 折合理论塔板高度是峰宽的函数

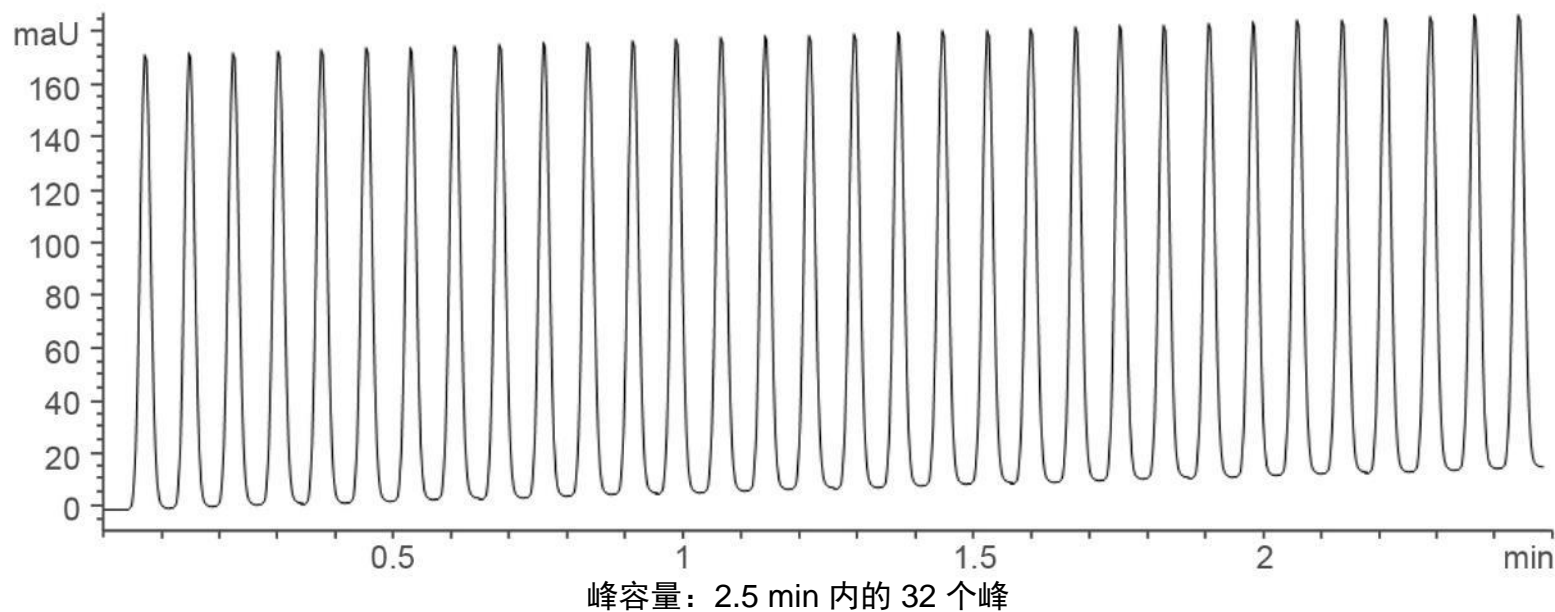
等度运行：
峰宽仅取决于扩散过程。

梯度运行：
峰宽取决于扩散过程和柱头梯度聚焦。

峰容量 定义

峰容量是指在给定时间和分离度条件下可以分离的色谱峰数目 (n)。

峰容量取决于柱长和填料粒径等不同的因素。



峰容量 意义

“...利用峰重叠的统计理论...”

“...当样品中的组分数超过峰容量的 1/3 时，峰分离度会急剧下降。”

J.M. DAVIS, J.C. GIDDINGS, ANAL. CHEM. 55 (1983) 418

“...为了分离 98% 的组分，峰容量必须超过组分数 100 倍。”

J.C. GIDDINGS, J. CHROMATOGR.A 703 (1995) 3

峰容量

峰容量的计算

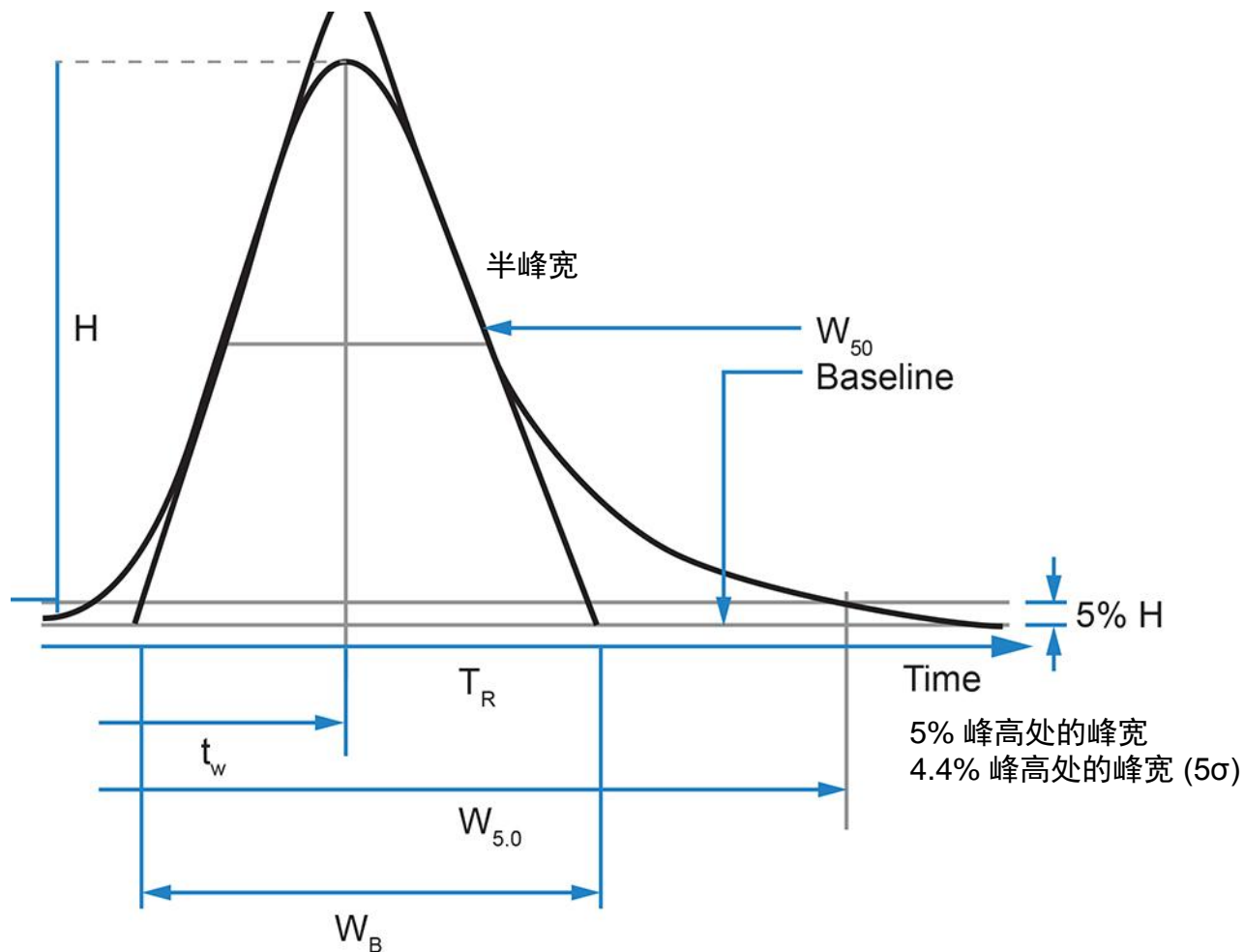
$$P = 1 + \frac{t_G}{\frac{1}{n} \sum_1^n w} = 1 + \frac{t_G}{W_{av}}$$

简化式：
$$P = 1 + \frac{t_G}{W}$$

W_{av}	平均峰宽
n	峰数
t_G	梯度运行时间
w	所选峰的峰宽

峰容量

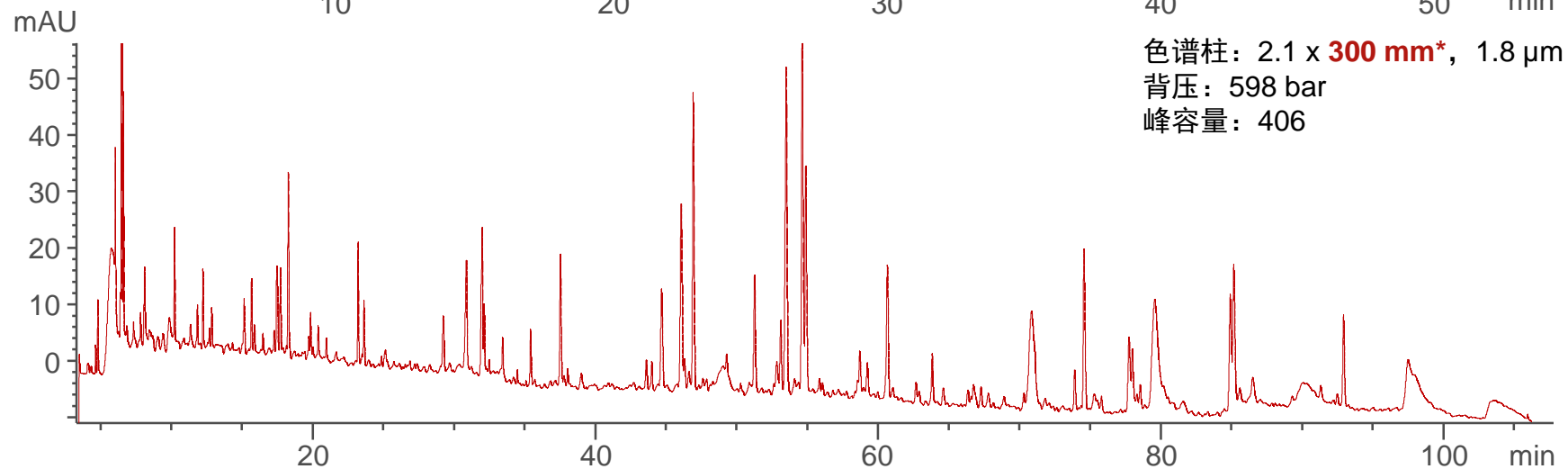
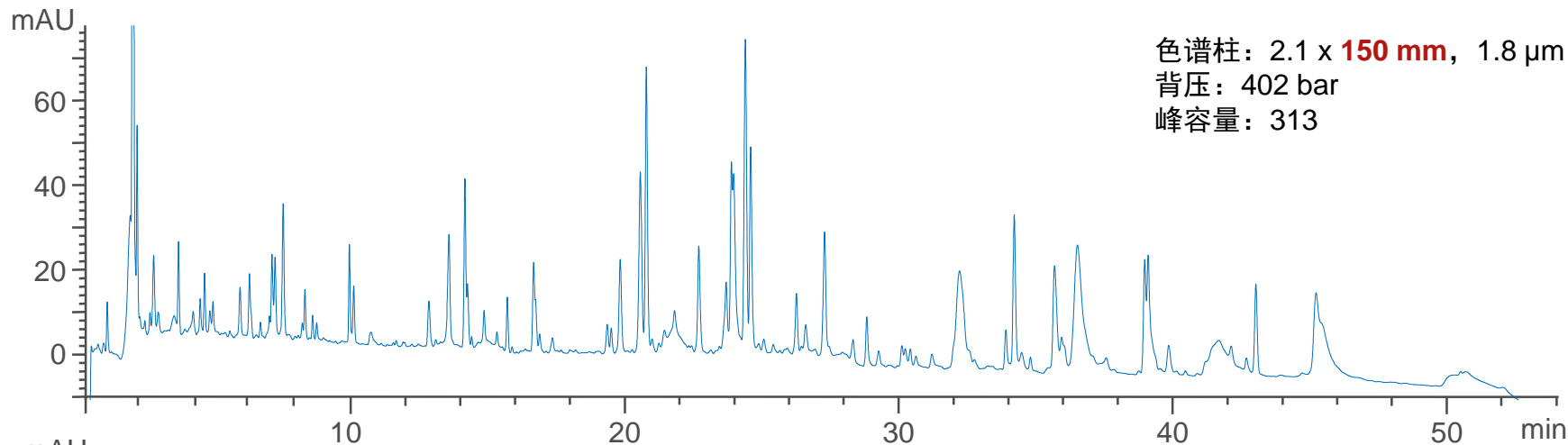
峰宽



5% 峰高处的峰宽
4.4% 峰高处的峰宽 (5σ)

根据切线法得出的峰宽

峰容量 示例



*两根 150 mm 色谱柱连接而成的 300 mm 色谱柱

更多信息

如需了解安捷伦产品的更多信息，请访问 www.agilent.com 或 www.agilent.com/chem/academia

对此幻灯片演示有问题或建议？
请联系 andrea_zenker@agilent.com

出版物	标题	出版号
基础导论	液相色谱手册	5990-7595CHCN
应用简报	The influence of silica pore size on efficiency, resolution and loading in Reversed-Phase HPLC (硅胶孔径对反相 HPLC 柱效、分离度和载样量的影响)	5990-8298EN
应用简报	Increasing resolution using longer columns while maintaining analysis time (在保持分析时间不变的条件下采用更长色谱柱提高分离度)	5991-0513EN
文献转载	A simple approach to performance optimization in HPLC and its application in ultrafast separation development (HPLC 性能优化的简单方法及其在超快速分离方法开发中的应用)	
海报	Study of physical properties of superficially porous silica on its superior chromatographic performance (表面多孔硅胶物理性质在其优异色谱性能方面的研究)	
应用简报	Maximizing chromatographic peak capacity with the Agilent 1290 Infinity LC system using gradient parameters (利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的梯度参数达到色谱峰容量的最大化)	5990-6933EN
应用简报	Maximizing chromatographic peak capacity with the Agilent 1290 Infinity LC (采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱使色谱峰容量最大化)	5990-6932EN
应用简报	Increased peak capacity for peptide analysis with the Agilent 1290 Infinity LC system (采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统提高多肽分析的峰容量)	5990-6313EN
网页	CHROMacademy – free access for students and university staff to online courses (CHROMacademy — 学生和大学教职工可免费访问在线课程)	

谢谢

< ToC

5991-5411CHCN

仅用于教学目的
2014年12月4日

37

缩写词

缩写	释义
α	选择性
d_p	填料粒径
$\Delta\Phi$	梯度范围
F	流速
h	折合理论塔板高度，色谱柱分离性能的度量
k	保留因子（旧称为： k' — 容量因子）
L_c	柱长
λ	色谱柱填料的品质
N	柱效或色谱柱塔板数
P	峰容量
R	分离度

缩写	释义
t	时间
t_r	保留时间
t_0	色谱柱死时间
t_G	梯度时间
V_m	色谱柱体积
w	峰宽
$W_{1/2}$	半峰宽
W_{bi}	基线峰宽
W_{eddy}	涡流扩散
W_{ax}	轴向或纵向扩散
W_C	传质阻力
W_{av}	平均峰宽

