

半製備高壓液相層析儀

(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

管理人： 胡念仁 助理教授

設置地點: 生科大樓1225室

層析定義

層析法：利用化合物在兩相間分配係數不同而進行分離的技術

流動相：攜帶樣品流過整個系統的流體

固定相：靜止不動的一相，層析柱



層析是一種分離技術

層析的主要目的是對混合物中的目標物分離和定量



➤ HPLC適用

- 1.半揮發性化合物
- 2.非揮發性化合物
- 3.樣品沸點過高
- 4.不宜加溫而不便使用氣相層析儀者的待測物

➤ 應用此方法進行分析的先決條件是待測物必須溶於作為流動相的溶劑中

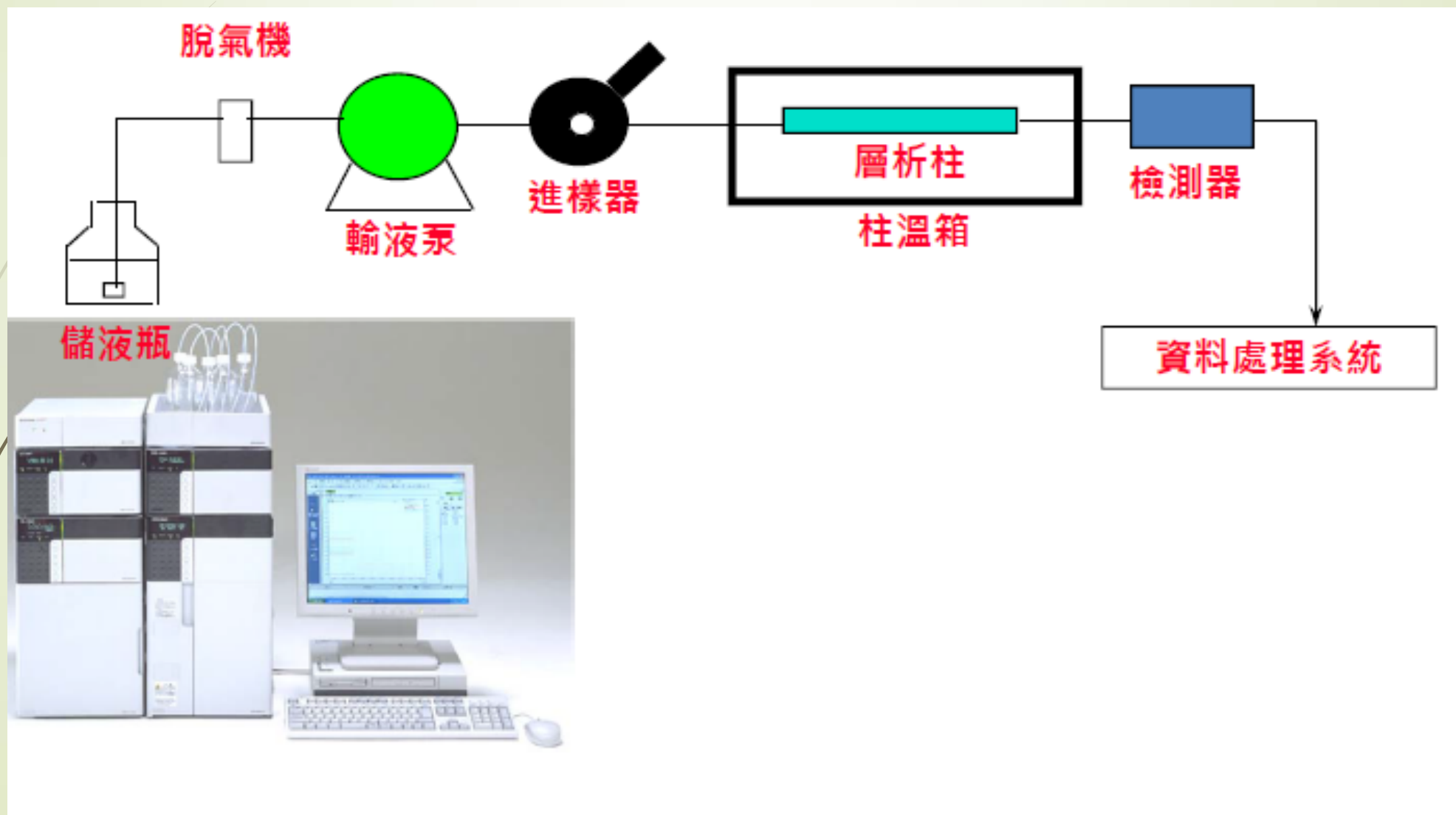
➤ HPLC可用於

- 1.液相樣品的定性及定量分析
- 2.製備純品之用途

HPLC 應用

- 1. 脂溶性維他命，膽固醇(steroids)，脂質(lipids)分析。
- 2. 水溶性維他命，碳氫化合物，酸類分析。
- 3. DNA 族群：如核酸(nucleic acids)，核苷(nucleotides)以及 RNA/DNA 等之分析工作。
- 4. 蛋白質家族：胺基酸，蛋白質，胜肽(peptides)。
- 5. 臨床藥物監測，毒物學，法醫學等之分析工作，例如毒品，麻醉藥劑，新陳代謝。
- 6. 環境監測及工業上制程之控制等，如環境中之胺基甲酸鹽農藥等之分析工作。

HPLC簡易流程圖





HPLC優點

分離性能好

靈敏度高 ($10^{-9} \sim 10^{-12}$ g)

選擇性高 (同分異構，旋光異構)

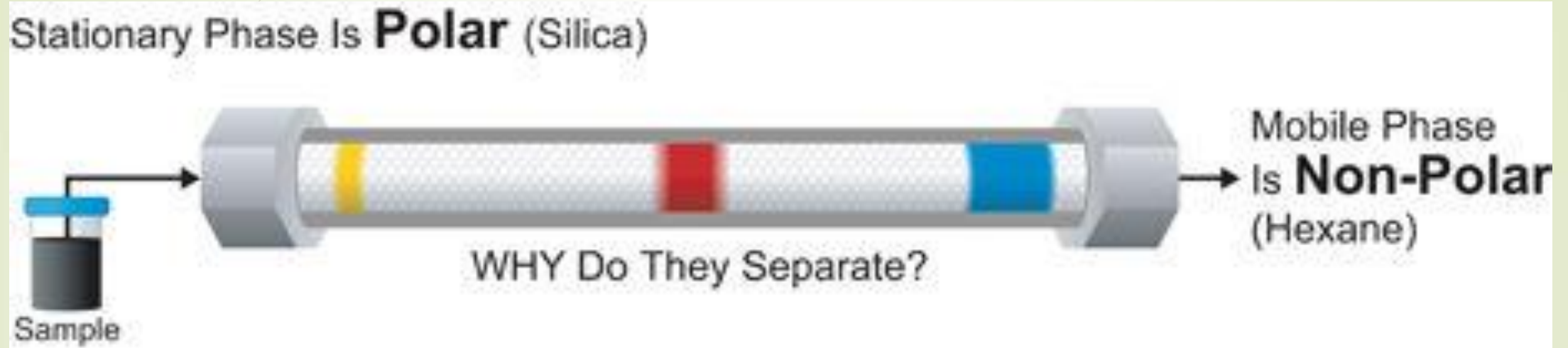
分析速度快

進樣量小 (1-100 μ L)

HPLC分類

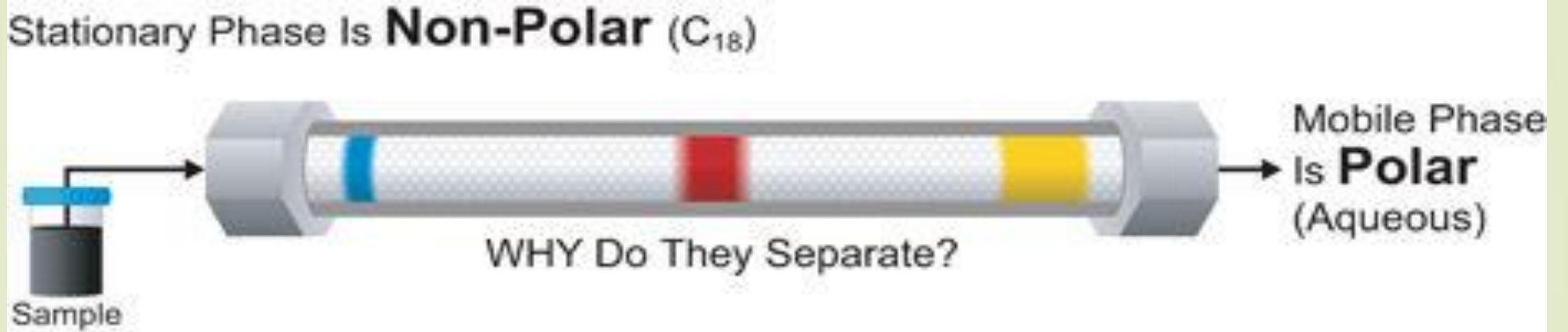
- **正相層析**：分離在水中絕對不溶解的物質或同分異構體，占>10%應用
- **反相層析**：用於常規分析，占~80%的應用。
- **離子對層析**：可看作是反相層析的一個特殊應用，需要在流動相中加入離子對試劑。
- **離子交換層析**：需要特殊的管柱和檢測器，與離子對層析的應用範圍相同但原理不同
- **體積排阻層析**：大分子先流出，小分子後流出。不同的管柱分離的分子量範圍不同。需要專門的軟體。
- **水相流動相**：凝膠斥瀉層析GFC (Gel Filtration Chromatography)
- **有機流動相**：凝膠透析層析GPC (Gel Permeation Chromatography)

Normal-Phase HPLC

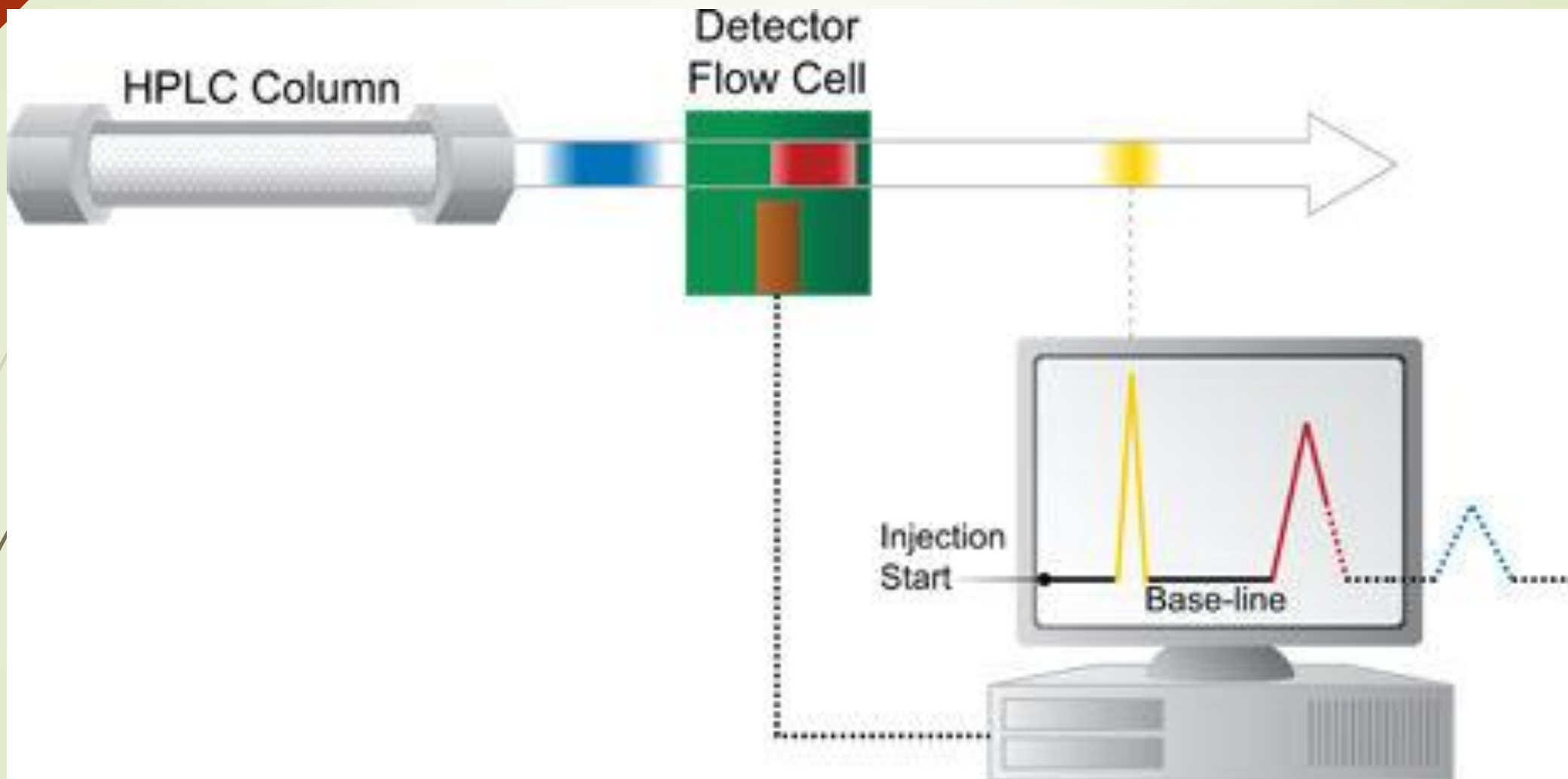



在正相層析法中，則是以非極性為流動相，固定相為高極性，極性小的樣品成分會先被沖提出來，極性大的較慢沖提出來，因而達到分離效果

Reversed-Phase HPLC



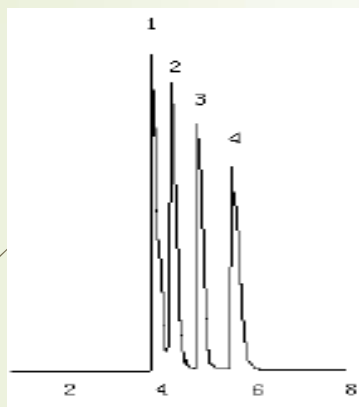
在逆相層析法中，通常以高極性作為流動相，固定相為非極性，極性大的樣品成分會先被沖提出來，極性小的較慢沖提出來，因而達到分離效果



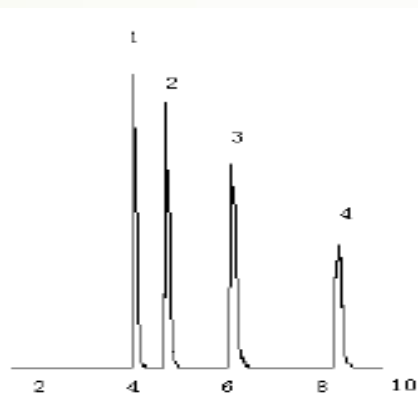
- 
- 優化水相（緩衝液）和有機相的比例非常重要
 - 甲醇、乙腈和THF是常用的有機溶劑。
 - 在有緩衝液的情況下，緩衝液的濃度和pH值非常重要。

流動相極性變化對分離的影響

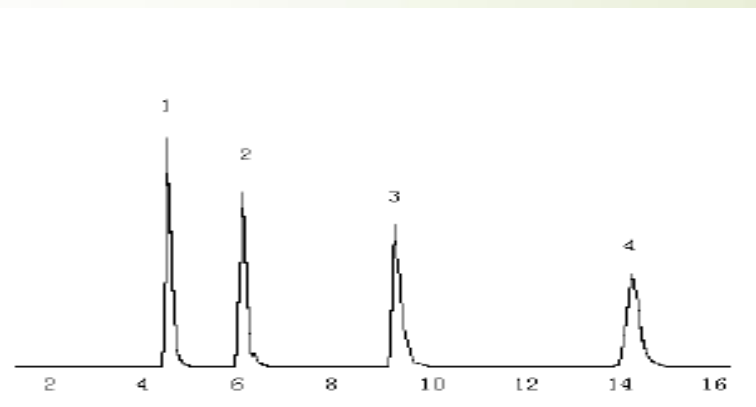
20 % 水



30 % 水



40% 水



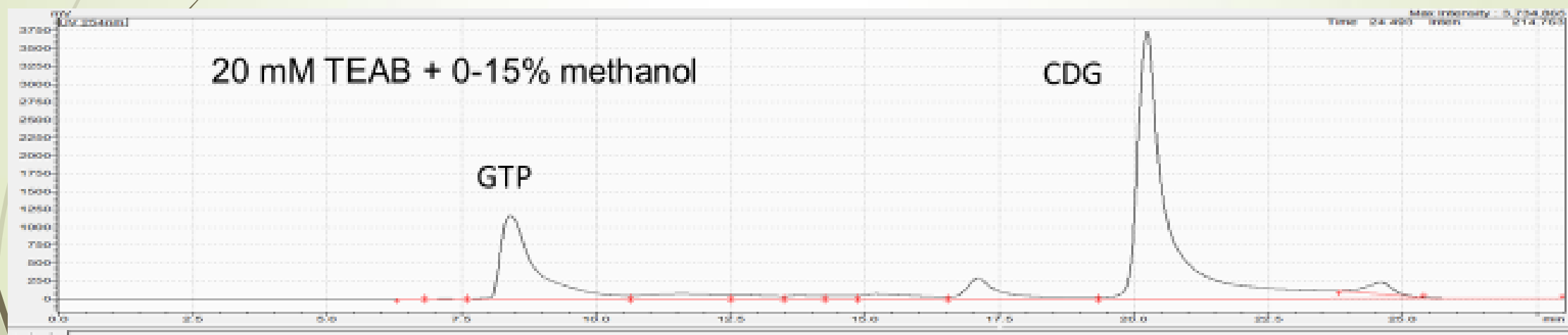
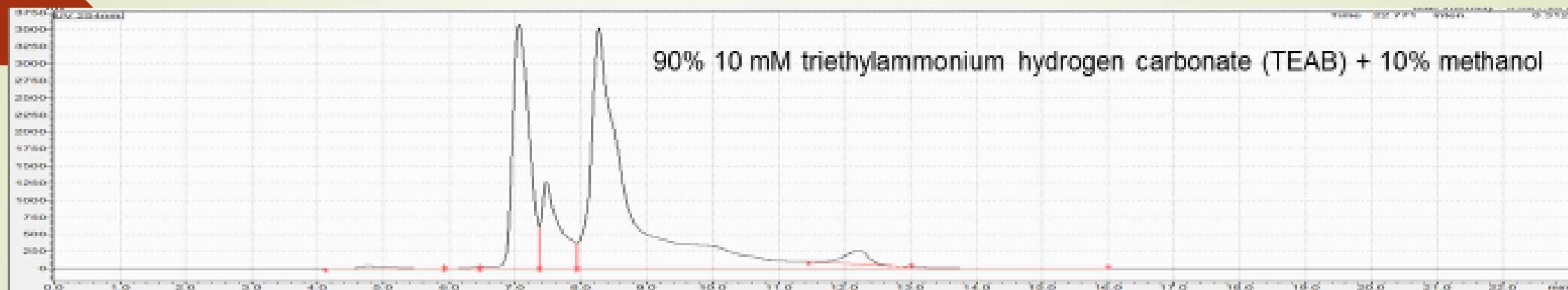
- 1 : 對羥基苯甲酸甲酯
- 2 : 對羥基苯甲酸乙酯
- 3 : 對羥基苯甲酸丙酯
- 4 : 對羥基苯甲酸丁酯
- 有機相: 甲醇

梯度洗脫：

- 優點：可提高分離度、縮短分離時間、降低最小檢測量和提高分離精度

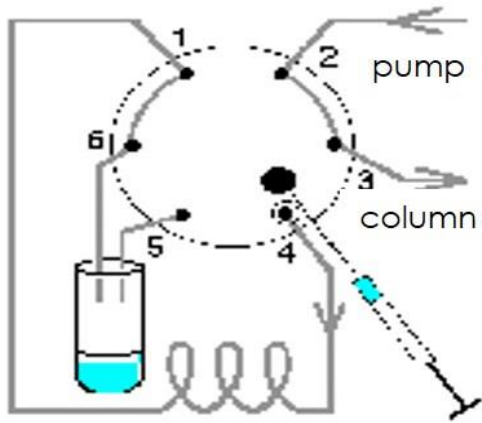
注意事項：

- 溶劑的純度要高，否則梯度洗脫的重現性差
- 梯度混合的溶劑互溶性要好
- 梯度洗脫應使用對流動相組成變化不敏感的選擇性檢測器（如紫外吸收檢測器或螢光檢測器），而不能使用對流動相組成變化敏

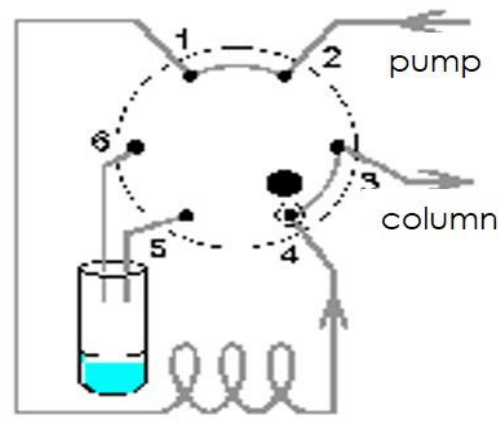


六通切换閥 (6-Way Switching Valve)

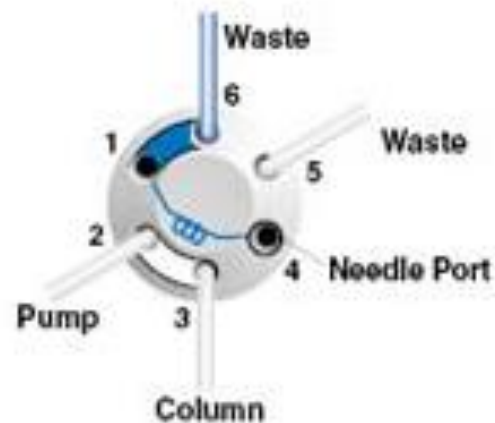
聚醚醚酮 (PEEK)



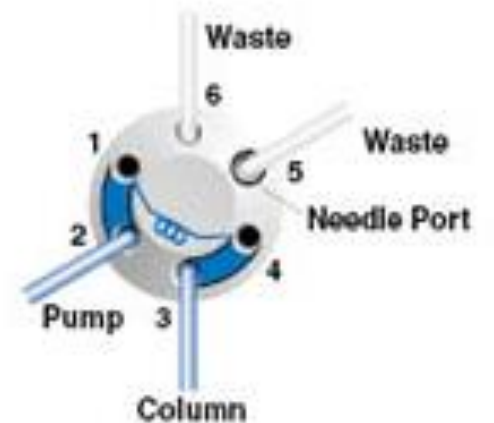
Position A (LOAD)



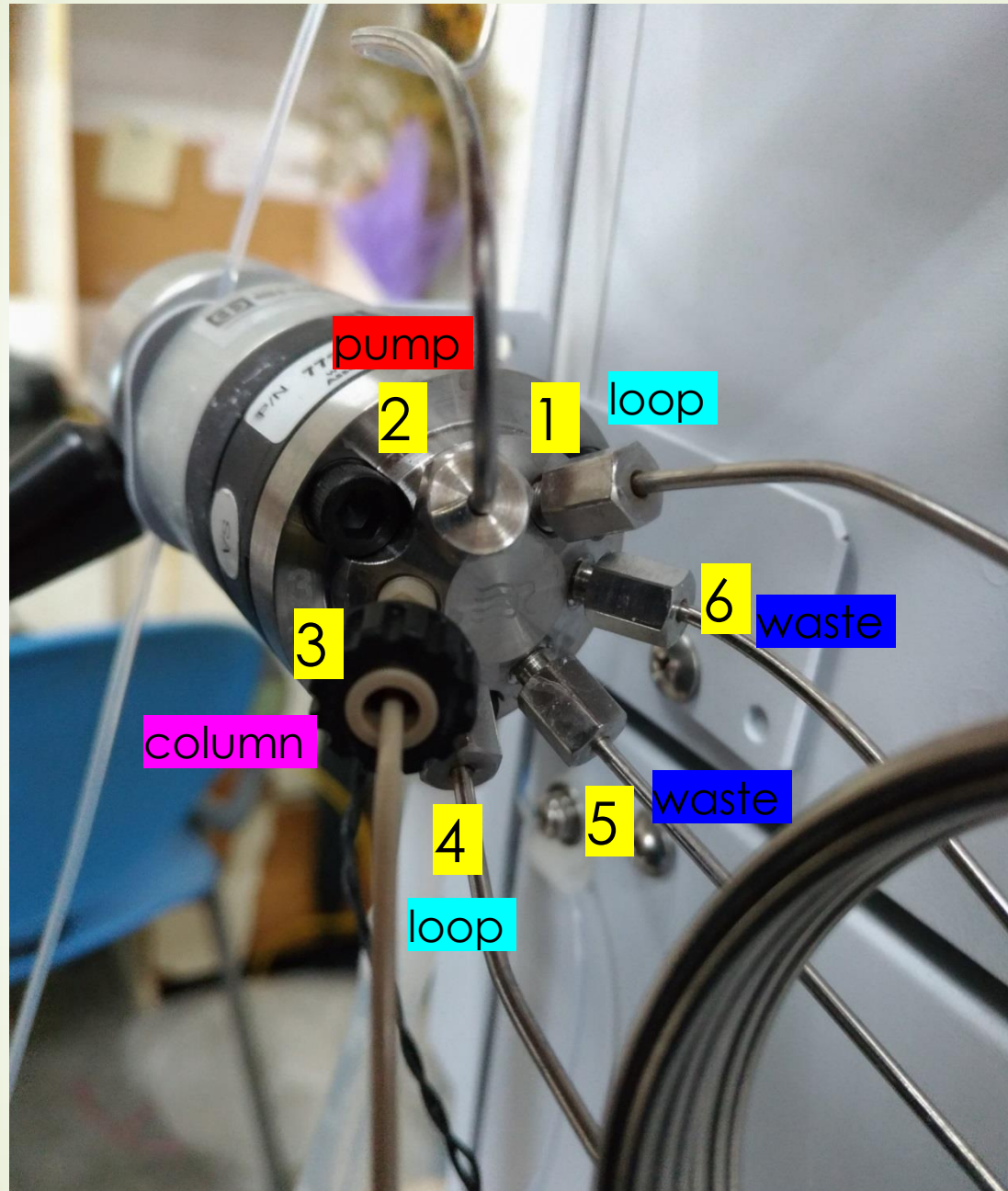
Position A (INJECT)



Position A (LOAD)



Position B (INJECT)



pump

2

1

loop

3

6

waste

column

4

5

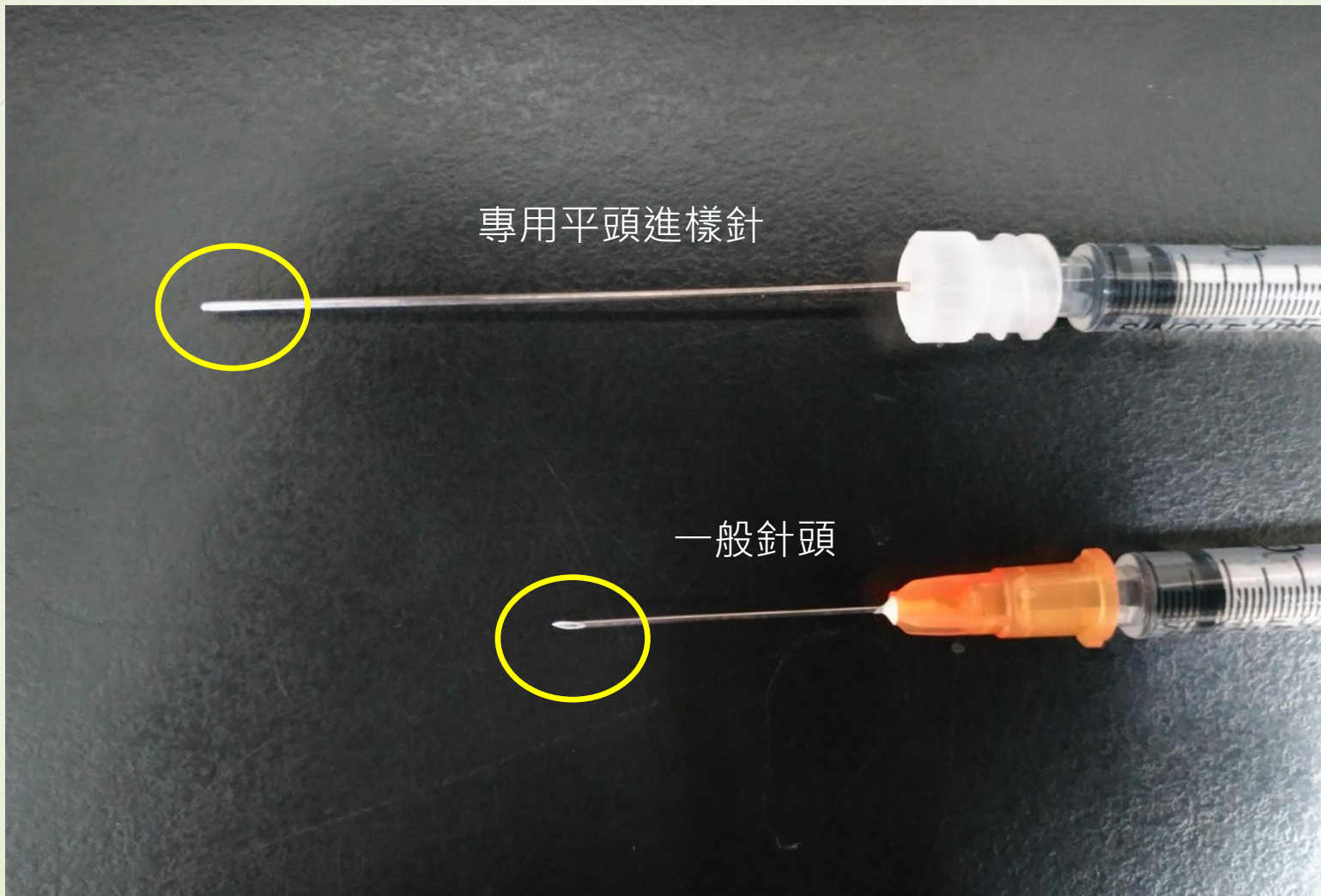
waste

loop

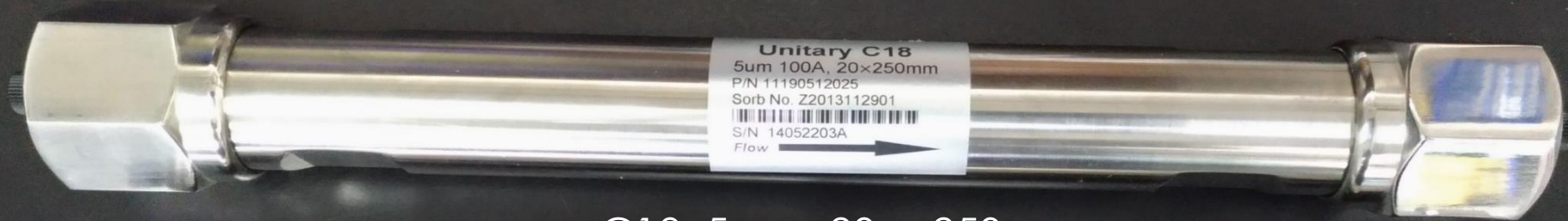
專用平頭進樣針



一般針頭

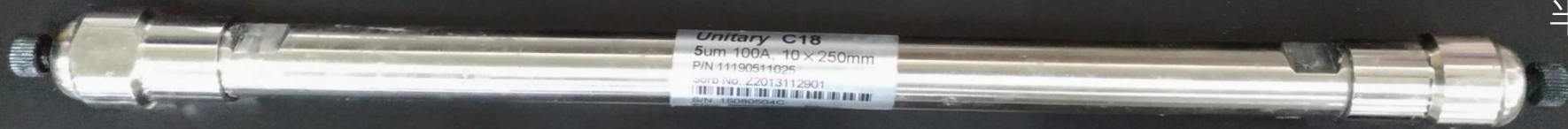


層析管柱的選擇



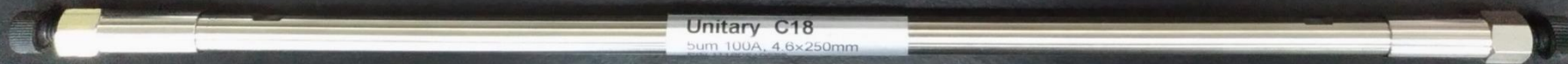
製備級

C18, 5 μ m, 20 \times 250 mm



半製備級

C18, 5 μ m, 10 \times 250 mm



分析級

C18, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm

上機注意事項

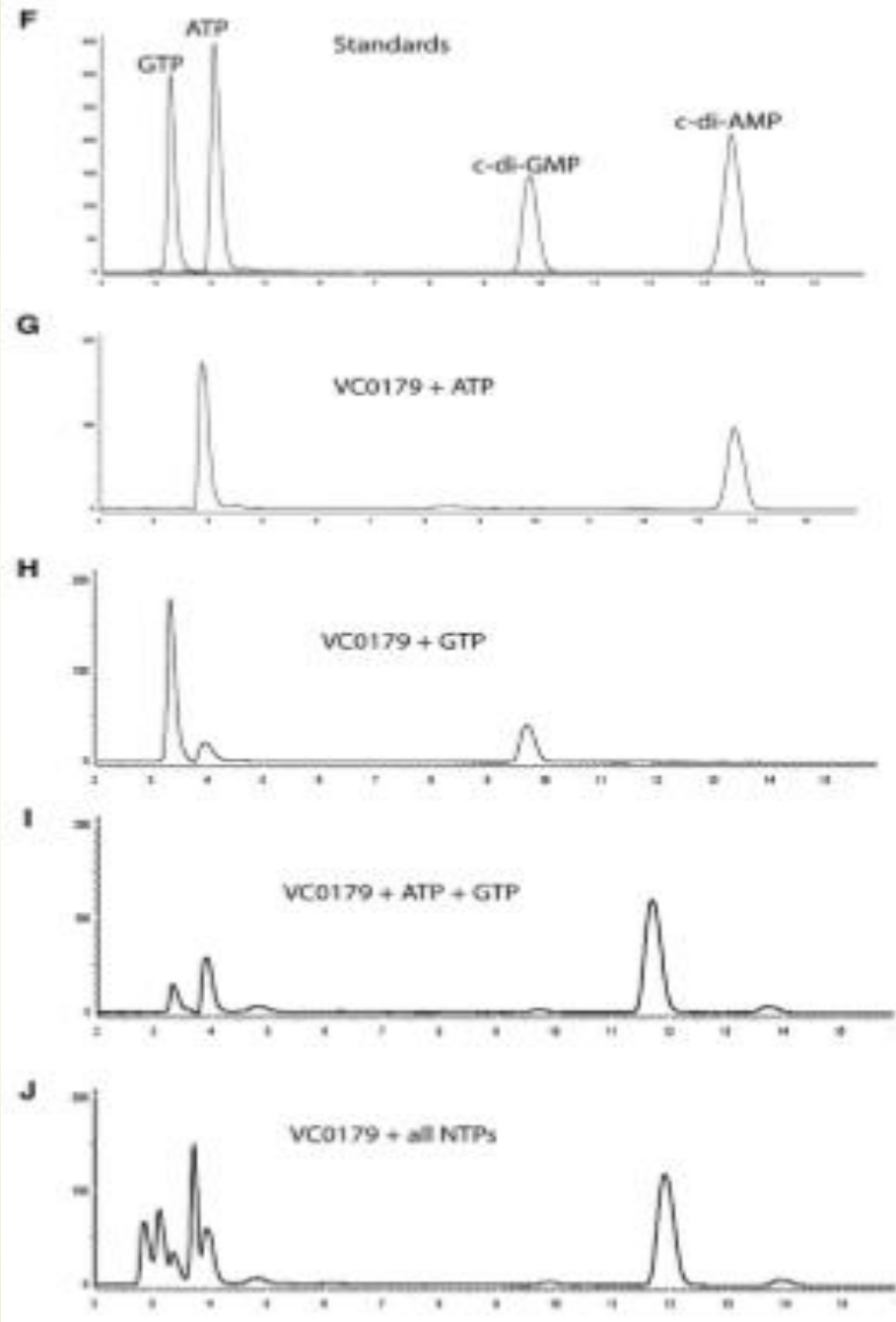
忌諱: **氣泡**及無法溶解的**雜質** (或鹽類結晶)

氣泡: 針筒裡未排除的空氣、buffer (mobile phase)、
置換column、buffer用盡

上樣前針頭要排氣，配置好之buffer要用超音波震盪排出空氣，或是利用脫氣機

雜質: 樣品及buffer裡的雜質

樣品及配置之buffer使用0.45 μm filter過濾，做完實驗要用水清洗column，不可以有鹽類殘留，且**不可以直接用有機溶劑沖洗緩衝鹽溶液**





Thank you for your attention

極性溶劑是指含有羥基(-OH)或羰基(Carbonyl group)等極性基團的溶劑，其極性強，介電常數大。

常用溶劑的極性順序

水(最大) > 甲醯胺 > 三氟乙酸 > DMSO > 乙腈 > DMF > 六甲基磷醯胺 > 甲醇 > 乙醇 > 乙酸 > 異丙醇 > 吡啶 > 四甲基乙二胺 > 丙酮 > 三乙胺 > 正丁醇 > 二氧六環 > 四氫呋喃 > 甲酸甲酯 > 三丁胺 > 甲乙酮 > 乙酸乙酯 > 三辛胺 > 碳酸二甲酯 > 乙醚 > 異丙醚 > 正丁醚 > 三氯乙烯 > 二苯醚 > 二氯甲烷 > 氯仿 > 二氯乙烷 > 甲苯 > 苯 > 四氯化碳 > 二硫化碳 > 環己烷 > 己烷 > 煤油 (石油醚) (最小)