

實驗十一 高效液相層析法

一、目的

學習使用高效液相層析儀並來測定飲料中的咖啡因的含量。

二、原理

A. 分離過程

分配層析法(partition chromatography)乃利用在動相液體中之混合物的不同組成分子，在靜相惰性固體顆粒之低揮發性、熱穩定和具化學惰性的液體薄膜中，有不同配份(溶解)的特性，而進行分離。如果 C_s 和 C_m 分別代表一個組成分子(亦即溶值)在靜相液體薄膜內和在動相液體內的濃度，則達平衡狀態時，其分配係數 K 定義如下：

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

依上述定義，若組成分子的分配係數較高，表示該分子在靜相中有較大的配份，則此分子滯留在靜相的時間將比低分配係數的組成分子還要長。若混合物之組成分子在平衡狀態下的分配係數類似，則這些分子在層析管柱中的移動性差異不大，致使這些組成分子無法層析分離。

B. 理論板數

由蒸餾塔的分離原理所衍伸得之層析管柱的理論板數 N ，可定義為

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

其中，如圖 11-1 所示， t_R 為組成分子在層析過程的滯留時間(以分為單位)， W 為該分子之層析峰之基底的峰寬(以分為單位)。為避免測量 W 的誤差，理論板數 N 可用下列方程式表示之：

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

其中， $W_{1/2}$ 為層析峰之半峰高的峰寬 (即半峰寬)。

C. 解析度

在層析管柱中，不同溶液會因移動速率的不同而被分離。兩溶液在層析中的分離程度可用選擇因數(selectivity factor, α) 描述之，其定義如下：

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

其中， t_{R1} 及 t_{R2} 分別表示溶質 1 及溶質 2 的滯留時間 (retention time)； t_m 為動相液體通過管柱時位置滯留所需時間； k' 稱為滯留因子(retention factor)或容量因子(capacity factor)，描述溶質在層析管中的移動率(migration rate)，其定義為

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

層析法的解析度(resolution, R_s)則定義為：

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) (N)^{\frac{1}{2}}$$

因此，在實驗操作上，可藉由改變溶劑組成，而改變 α 和 k' 值，或藉由改變管柱的本性或填充物，來改變 N 值，促使 R_s 提高。使用極細微之靜相特性顆粒，可使層析液的解析度提高，這種層析法稱為高效液相層析法 (high performance liquid chromatography)

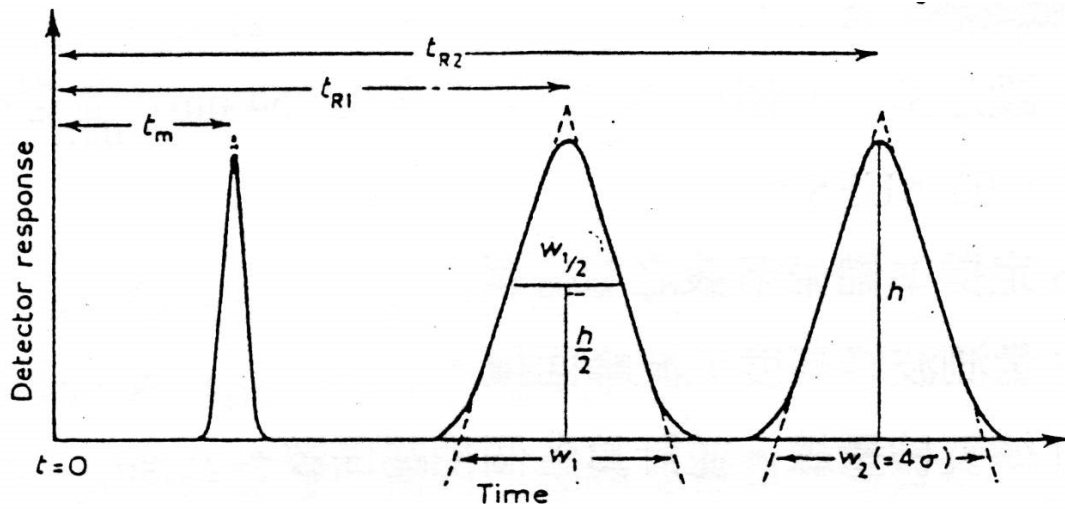


圖 11-1 含有兩個組成分子之混合物的層析圖

B. 儀器

層析管柱(C-18, 25cm×4.0mm, 5 μ m)		1 支
液相層析儀		1 台
HPLC 注射針		1 支
超音波震盪器		1 台
樣品瓶	50 毫升	1 個
容量瓶	10 毫升	6 個
刻度吸量管	10 毫升	1 支
0.45 微米濾膜		1 個
塑膠針管		1 支

五、實驗步驟

1. 配製標準儲備溶液：咖啡因 200 ppm。(助教配置)
2. 配製甲醇動相溶液 1L：甲醇：去離子水(50：50，v/v)。(助教配置)
3. 配置咖啡因檢量線溶液：取適量的 200 ppm 咖啡因標準液，並加入去離子水使其成為 20、40、60、80、100 ppm 之咖啡因標準液。
4. 樣品前處理及樣品溶液之取得：
 - a. 取適量 zero 可樂樣品溶液，將其置入樣品瓶中，瓶蓋勿封緊，並進行超音波振盪 30 分鐘。
 - b. 將可樂過濾，並取 5 毫升置入 10 毫升容量瓶以去離子水稀釋至標線。

5. 儀器操作步驟：

a. 開機順序：儀器→電腦→軟體。

b. 啟動儀器：

- (1) 打開除氣器 (degasser) 電源，至除氣器的燈源亮綠燈。
- (2) 打開高壓幫浦 (Pump) 電源，並啟動高壓幫浦。
- (3) 打開偵測器 (detector) 電源，並調整波長為 210nm、Absorbance 為 0.5AUFS (absorbance full-scale unit)。
- (4) 調整幫補流速為 1 mL/min，並調整幫浦壓力為 9~13 MPa 之間。
- (5) 將系統 USB 連接筆電的 "Peak ABC" 的 USB 插槽後，開啟電腦。
- (6) 點選桌面 "Peak ABC" 軟體。
- (7) 等待偵測器吸收值達穩定後，按偵測器面板 "Auto Zeor" 將其歸零即可開始實驗。

c. 注射樣品：確定手動注射閥在 Load 位置後(圖 11-3)，注射樣品，然後轉至 Inject，開始實驗。

d.

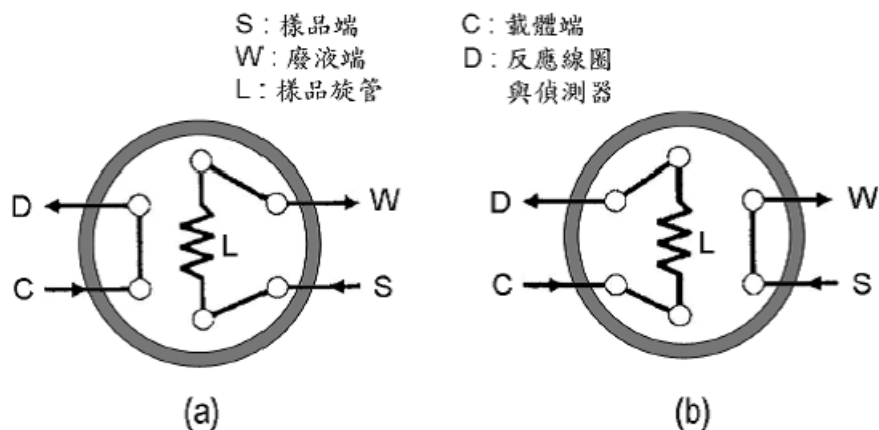


圖 11-3 HPLC 注射器構造示意圖：(a)樣品載入(Load)、(b)樣品注射(Inject)

- e. 紀錄層析圖之時間和波峰面積。
- f. 關機順序：軟體→電腦→儀器。
- g. 繪製檢量線：以濃度對波峰面積作圖。

五、問題與討論：

1. 說明溶劑極性在逆相層析分離的效應。
2. 說明流析液 pH 值對層析分離的效應。
3. 實驗上如何確認層析圖的一個層析峰僅含單一溶質？
4. 試說明分配層析法與吸附層析法(adsorption chromatography)的差異。

