



# 生物化学实验

## 层析技术

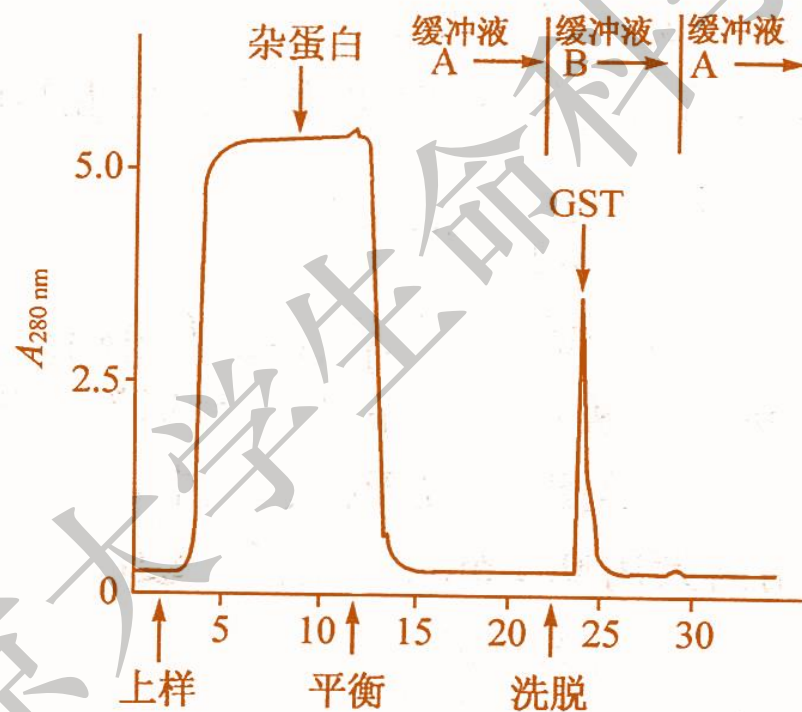
### 4.6 层析图谱

北京大学 王青松 胡晓倩

# 层析图谱

- 层析分离过程中，混合物样品溶液注入层析柱后，由于各组分的固定相的作用力不同，在随流动相移动过程中，逐渐在柱内得到分离并随流动相依次流出层析柱。层析柱出口连接的**紫外检测仪**将各组分的浓度（吸光值）信号转变为电信号，然后用**记录仪或电脑控制软件**将组分的信号记录下来，获得组分相应的信号大小随时间的变化曲线，称为**层析洗脱曲线**，也就是**层析图谱（chromatogram）**。
- 各组分信号大小或强度与物质的浓度成正比，层析洗脱曲线实际上是物质的量（或浓度）—时间曲线。

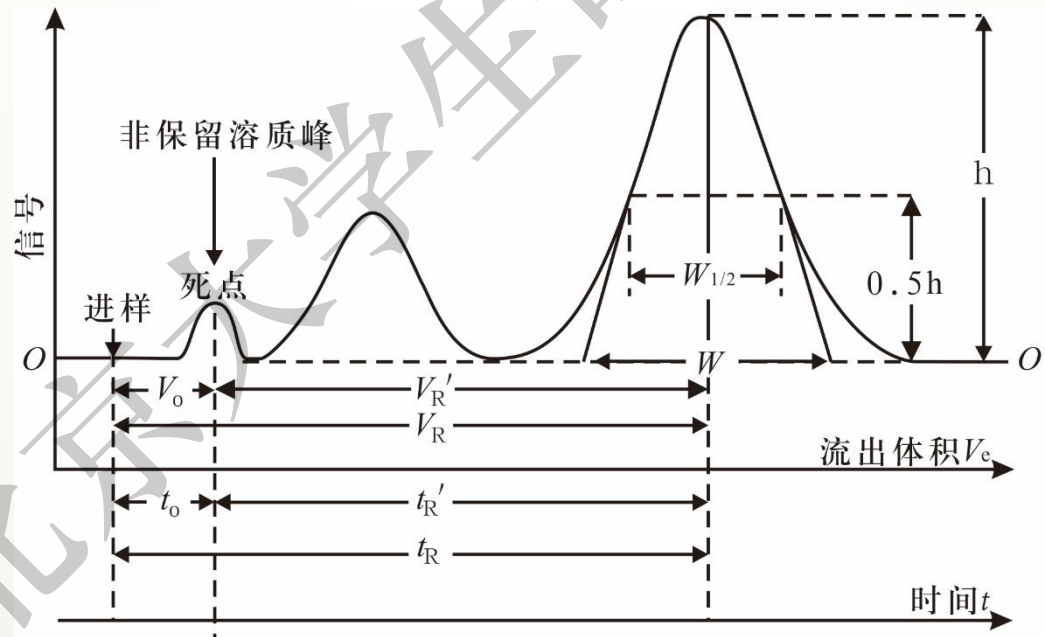
# 层析图谱举例



亲和层析法分离纯化谷胱甘肽转硫酶GST

# 层析峰

- 层析图谱中曲线突起的部分称为层析峰 (chromatographic peak) 。
- 理想的层析洗脱曲线应为正态分布曲线，正常的层析峰为对称峰。
- 不正常峰有两种（拖尾峰和前延峰）。



# 层析峰各部分的参数

- **基线 (base line)** : 实验操作时, 只有纯流动相经过检测器时记录下的信号-时间曲线。如图中的O→O' 线。稳定的基线应为一 条直线。**基线平稳是层析分离的最基本条件。**
- **峰高 (h)**: 自层析峰的顶点到基线的垂直距离。
- **峰底宽 (W)**: 层析峰的2个拐点处做切线与基线相交于2点, 这2点直接的直线距离称为峰底宽 (peak width)。
- **半峰宽 ( $W_{1/2}$ )** : 峰高的垂直距离1/2高度处对应的峰宽度, 称为半峰宽 (peak width half height)。

# 层析峰各部分的参数

- **死时间 ( $t_0$ )**：流动相中的溶质进入层析柱后，不被固定相所吸附，与固定相不发生任何作用，流过层析柱所需时间，称为死时间(dead time)。
- **死体积 ( $V_0$ )**：与死时间 $t_0$ 对应的流过层析柱所收集的体积，称为死体积(dead volume)。
- **保留时间 ( $t_R$ )**：从进样开始到出现某个组分的层析峰最高点时，所需要的时间称为保留时间 (retention time) 。
- **保留体积 ( $V_R$ )**：从进样开始到出现某个组分的层析峰最高点时，所收集流动相的体积，称为保留体积 (retention volume) 。

$$V_R = t_R \cdot F \quad F \text{为流速 (mL/min)}$$

# 层析峰各部分的参数

- **校正保留时间( $t'_R$ )**: 减去死体积后的保留时间, 反映组分在层析柱内的实际保留时间。

$$t'_R = t_R - t_0$$

- **校正保留体积( $V'_R$ )**: 减去死体积后的保留体积, 反映组分在层析柱内的实际保留体积。

$$V'_R = V_R - V_0$$

# 相对保留值

- 相对保留值 ( $K_{BA}$ )：当A、B 2个组分经层析柱分离后，得到2个层析峰。后流出组分B的校正保留值与先流出组分A的校正保留值之比，称为相对保留值。

$$K_{BA} = t'_{R_B} / t'_{R_A} = V'_{R_B} / V'_{R_A}$$

- 相对保留值用于分析固定相对组分的分离能力， $K_{BA}$ 值越大，固定相对组分的选择性越高，2个组分分离愈开。
- 相对保留值只与柱温和固定相性质有关，是层析分离中广泛用于定性的重要参数。