

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

制备色谱技术及应用/袁黎明编著. —北京:
化学工业出版社, 2004. 12
(色谱技术丛书)
ISBN 7-5025-6378-4

I. 制… II. 袁… III. 制备色谱 IV. 0657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 123617 号

色谱技术丛书

制备色谱技术及应用

袁黎明 编著

责任编辑: 任惠敏

责任校对: 于志岩

封面设计: 于 兵

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
化学与应用化学出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 13 字数 225 千字

2005 年 3 月第 2 版 2005 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6378-4/O · 83

定 价: 26.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

制备色谱是分离科学中最有效的制备性分离技术，是很多研究领域和生产车间必不可少的分离手段。但其技术性强、关键性操作较多，很多需要应用该技术的研究和生产人员并不是专门的色谱工作者，所以在分离过程中常常达不到预期的制备性分离目的。有一本从色谱科学的角度深入浅出地介绍制备色谱及其应用、比较详细地讲解具体的实验操作、技巧和必须注意的关键性技术的著作，是十分必要的。

据作者所知，一些专门从事有机合成的科研工作者往往一年可利用上百根色谱柱进行合成产物的制备性分离，如果目标物容易分离和易于流出，可以利用较短的色谱柱，一天之内可进行大约 3 次的经典柱色谱操作。有时我们直接进行一个合成反应也许只要几小时，但要从反应混合物中分离出纯的目标物往往要几天甚至数十天。植物化学工作者利用该技术的时间更多，要从非常复杂的植物浸膏中分离制备出一定量纯化合物供化合物的结构鉴定以及药理实验等之用，经典柱色谱、低压柱色谱、中压制备色谱甚至高压制备色谱几乎是必不可少的手段，也许一些植物化学研究工作者有 60% 以上的实验时间是花在使用制备色谱分离上，因此一个成功的有机化学或植物化学工作者往往具有很多宝贵的制备色谱的技术和经验，有些甚至同时就是一个制备色谱技术的研究者或者专家。

在我国虽然需要应用制备色谱技术的研究人员很多，但专门从事制备色谱研究的科研人员却相对较少，绝大多数的色谱工作者都是色谱分析研究者。由于色谱分析技术是在线性色谱的基础上开展工作的，而制备色谱在大多数情况下是在非线性条件下进行分离，它的进样量大，所需固定相和溶剂量多，两者往往有很大的不同，并且有些制备色谱技术本身只具备制备的特点，因此本书对很多色谱分析工作者也有参考价值。

本书只涉及《色谱技术丛书》中有关制备色谱的内容，要了解系统的色谱理论和知识，读者至少应该阅读本丛书的《色谱分析概论》分册。

本书是在作者科研和教学实践基础上写成的，部分内容得到云南省自然科学基金（No. 2000B0045M、No. 2004B0013R）、国家自然科学基金（No. 29 665 001、No. 30 160 092）以及国家教育部第三届“高校青年教师奖”课题的资助。书中的较多素材直接取材于作者的研究、或者与作者研究密切相关的科技文献及其专著，该书具有很强的可操作性。

作者衷心感谢自己的硕士生导师——云南大学宋文俊教授、博士生导师——北京理工大学傅若农教授、博士后导师——日本名古屋大学 Y. Okamoto 教授，是他们将我带入了“生化分离材料及技术研究”的殿堂，享受着科学创新的乐趣。我还想感谢北京市新技术应用研究所的张天佑教授在高速逆流色谱领域给我的悉心指导，感谢丛书编委会以及责任编辑的辛勤工作。

本书的撰写工作得到谌学先、艾萍、字敏及李正宇等同志的帮助和支持，在此一并表示感谢。

由于作者水平所限，书中错误和不足之处在所难免，敬请专家和读者给予批评指正。

袁黎明

2004 年 9 月 30 日

于昆明

目 录

第一章 制备色谱基础	1
第一节 非线性色谱的特点	2
一、线性色谱	2
二、非线性色谱	3
第二节 制备分离的目标和策略	5
一、分离目标	5
二、分离策略	6
(一) 分离因子 α	7
(二) 柱效 N	8
(三) 容量因子 k	10
(四) 条件优化	10
参考文献	11
第二章 制备薄层色谱	12
第一节 实验材料与装置	12
一、薄层板	12
二、展开槽	14
第二节 实验方法	15
一、上样	15
二、展开	16
三、检测	18
四、收集	19
第三节 离心薄层色谱	20
参考文献	21
第三章 经典柱色谱	22
第一节 吸附柱色谱	22
一、硅胶吸附柱色谱	22
(一) 操作步骤	22
(二) 硅胶吸附柱色谱的原理与技术	27

二、氧化铝吸附柱色谱	36
三、活性炭吸附柱色谱	38
四、聚酰胺吸附柱色谱	39
第二节 分配柱色谱	41
第三节 萃取柱色谱	43
第四节 离子交换柱色谱	47
一、离子交换色谱树脂	47
(一) 阳离子交换树脂	48
(二) 阴离子交换树脂	48
二、离子交换树脂的选用	49
(一) 种类的选定	49
(二) 树脂离子型式的选择	50
(三) 树脂颗粒、交联度及稳定性选择	50
三、离子交换柱的操作	51
(一) 离子交换树脂的处理	51
(二) 柱的操作	52
(三) 离子交换色谱的应用	54
第五节 凝胶柱色谱	56
一、原理	57
二、操作	60
第六节 亲和柱色谱	62
第七节 干柱色谱	64
参考文献	67
第四章 低压及中压制备色谱	68
第一节 低压制备色谱	68
一、减压柱色谱	69
(一) 短柱	69
(二) 常规柱	70
二、加压柱色谱	71
(一) 空气泵加压	72
(二) 双链球加压	73
(三) 氮气钢瓶加压	74
(四) 蠕动泵加压	75
(五) 快速色谱	75
第二节 中压制备色谱	77

一、恒流泵	78
二、色谱柱	79
三、检测器	81
四、自动馏分收集器和进样阀	81
五、分离	82
参考文献	85
第五章 高压制备液相色谱	86
第一节 制备液相色谱仪	86
一、高压输液泵	87
二、进样器	88
三、色谱柱	88
(一) 制备柱的尺寸	88
(二) 制备柱的类型	89
四、检测器	93
第二节 分离设计	94
一、峰接触法	94
二、峰重叠法	95
(一) 微量组分的分离	96
(二) 难分离物质对的分离	97
第三节 实验条件的选择	98
一、固定相	98
二、流动相	99
三、样品的溶解	101
四、制备性分离	102
第四节 色谱饼	104
第五节 大直径柱	105
参考文献	106
第六章 高速逆流色谱	107
第一节 逆流色谱	107
一、液滴逆流色谱	107
二、旋转小室逆流色谱	108
三、离心逆流色谱	109
(一) 非行星式逆流色谱仪	110
(二) 行星式逆流色谱仪	111
第二节 高速逆流色谱	113

一、色谱仪	114
(一) 恒流泵	114
(二) 进样阀	114
(三) 主机	114
(四) 检测器	115
(五) 记录仪	115
(六) 馏分收集器	115
二、分离原理	115
三、实验操作	119
(一) 两相溶剂系统的选择	119
(二) 样品溶液的制备	122
(三) 分离	122
(四) 检测	128
四、pH-区带 提取逆流色谱	129
(一) 原理	129
(二) 操作	131
五、手性分离	132
参考文献	135
第七章 模拟移动床色谱	137
第一节 模拟移动床色谱系统和基本原理	137
一、移动床色谱	137
二、模拟移动床色谱系统	138
(一) 大型模拟移动床色谱系统	138
(二) 模拟移动床色谱	139
三、模拟移动床色谱原理	142
第二节 模拟移动床工作参数的选择和优化	146
一、手性固定相的选择	146
(一) 多糖类手性固定相	146
(二) Pirkle 型手性固定相	149
(三) 环糊精类手性固定相	152
二、流动相的选择	153
三、分离柱	154
四、控制系统	154
五、操作参数的优化	155
六、模拟移动床的应用	157

参考文献	159
第八章 其他制备色谱方法	160
第一节 顶替色谱	160
一、填料类型	161
二、顶替剂的选择	162
三、操作参数	162
第二节 径向柱色谱	163
第三节 并联多柱色谱	165
第四节 制备气相色谱	167
一、原理	167
二、气固色谱	169
三、气液色谱	169
(一) 载体	169
(二) 固定液	170
四、操作	173
第五节 电泳技术	174
一、纸电泳	174
二、琼脂平板电泳	175
三、聚丙烯酰胺凝胶电泳	176
四、凝胶聚焦电泳	178
参考文献	179
第九章 生物代谢产物的提取	180
第一节 生物大分子的提取	180
一、材料选择及预处理	181
二、细胞的破碎	181
三、细胞器的分离	182
四、蛋白质和酶的提取	182
(一) 水溶液提取	182
(二) 有机溶剂提取	182
五、核酸的提取	183
(一) DNA 的提取	183
(二) RNA 的提取	183
六、包涵体产品的分离	184
第二节 生物工程药物的提取	184
第三节 天然产物的分离提取	185

一、浸渍法	185
(一) 冷浸法	185
(二) 温浸法	185
二、煎煮法	185
三、渗漉法	186
四、回流法	186
五、水蒸气蒸馏法	186
第四节 中草药系统提取分离方法	187
参考文献	188

第一章 制备色谱基础

色谱法在一开始就是以制备色谱出现的，并且在最初的几十年间，色谱也是主要以纯物质的制备为目的。在经历了一个较长的过程后，它在分析上得到了广泛应用，并发展成今天的必不可少的分离分析手段。下面是色谱发展的简明过程。

1903 年，茨维特在华沙自然科学学会生物学会会议上提出了应用吸附原理分离植物色素的新方法，宣读的论文题目为“一种新型吸附现象及其在生化分析上的应用”。三年后，他将这个方法命名为色谱法。

1931 年，Kuhn 与 Lederer 使用色谱法证实了蛋黄内的叶绿素系植物叶黄素与玉米黄质的混合物，使人们认识到色谱技术在分离科学中的重要性。

1937 年，纸电泳开始被应用。

1938 年，Izmailov 和 Shraiber 第一次使用薄层色谱法。

1938 年，Taylor 和 Uray 用离子交换分离锂和钾的同位素。20 世纪 40 年代后，合成离子交换树脂商品出现后，离子交换色谱得到了广泛应用。

1941 年，Martin 和 Synge 创立了分配色谱。他们采用水饱和的硅胶为固定相，以含有乙醇的氯仿为流动相分离乙酰基氨基酸。

1944 年，Martin 等发展了纸色谱。

1952 年，Martin 和 James 发展了气-液分配色谱。

1956 年，Van Deemter 等发表了关于色谱效率的速率理论，并应用到气相色谱。

1957 年，制作了离子交换色谱氨基酸分析仪。

1958 年，Golay 提出了毛细管柱气相色谱。

1959 年，在 Gordon Conference 上发表了第一篇凝胶过滤的报告。

1962 年，Klesper 等人提出了超临界流体色谱。

1963 年，Giddings 的理论工作为现代液相色谱奠定了理论基础。

1966 年，Ito 等提出了逆流色谱。

20 世纪 60 年代中期，凝胶渗透色谱出现。

20 世纪 60 年代后期，亲和色谱出现。

20 世纪 60 年代，美国 UOP 公司开发了模拟移动床色谱。

- 1969 年，现代液相色谱受到重视。
- 20 世纪 80 年代初，高速逆流色谱出现。
- 20 世纪 80 年代以后，毛细管柱应用于超临界流体色谱技术中。
- 20 世纪 80 年代末，毛细管电泳得到发展。
- 1992 年，模拟移动床色谱首次用于手性拆分。

第一节 非线性色谱的特点

一、线性色谱

线性色谱是指组分在固定相和流动相中的平衡浓度呈正比例关系，也即吸附（分配）等温线为一条直线。吸附（分配）等温线是组分分子由于吸附或者分配在两相之间达到平衡时的关系，若以组分在流动相中的浓度为横坐标，以其在固定相中的浓度为纵坐标，则吸附（分配）等温线可表示为图 1-1。

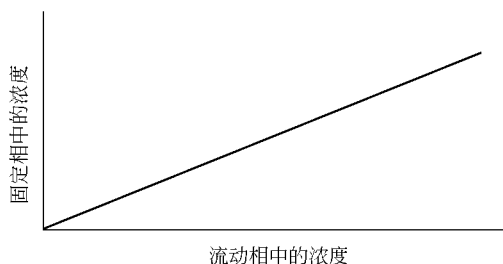


图 1-1 线性吸附（分配）等温线

在理想条件下的线性色谱方程为

$$(1 + Ff') \frac{\partial c}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial x} = 0$$

通常我们分析用的色谱进样量很小，例如在微克级范围，样品在流动相和固定相之间的浓度关系都呈现线性，因此我们的分析色谱基本上在线性色谱的范畴下工作。在这种情况下，线性色谱的峰可以用一个高斯分布函数表示为

$$C(t) = \frac{C_0 T}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp \left\{ -\frac{(t - t_R)^2}{2\sigma^2} \right\}$$

式中， $C(t)$ 为不同时间样品在柱出口的浓度， C_0 为进样浓度， T 为进样时间， t_R 为色谱峰浓度极大点时的时间，即保留时间， σ 为色谱峰的标准偏差，即峰高 h 0.607 倍时的色谱峰宽度的一半。该色谱峰型为图 1-2。

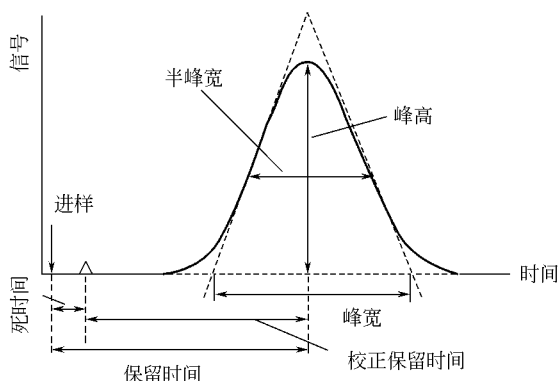


图 1-2 线性色谱峰

在色谱分离中的死时间，是和色谱柱不发生吸附或分配作用的情性组分在柱内停留的时间；调整保留时间是组分保留时间扣除死时间的值；半峰宽是峰高一半时的宽度；底峰宽它是通过色谱峰的拐点作切线在峰底部的截距。对于线性色谱它的峰型是对称的，保留时间是色谱流出峰定性的依据，其宽度则是衡量分离过程中柱效的基础，研究色谱峰保留时间及其宽度的变化规律是色谱动力学理论的重要内容。

二、非线性色谱

在制备色谱中进样量一般都比较大，例如在克量级范围，这时样品在流动相与固定相中的浓度关系不再是一条直线，也即样品在流动相中的浓度与样品在固定相中的比例不再是正比例的关系，相对应的吸附（分配）等温线将发生弯曲。这种情况比较复杂，较常见的两种类型为 Langmuirian 和 Anti-langmuirian 类型，它们的吸附等温线如图 1-3 所示。

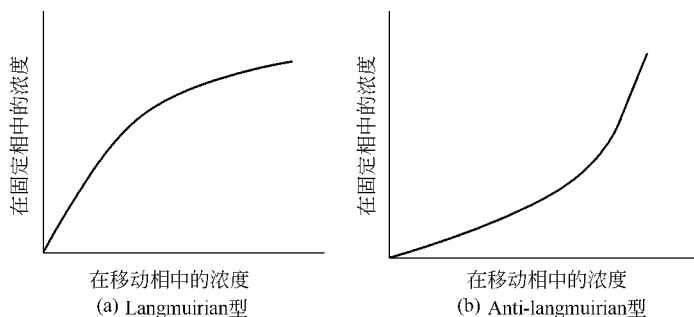


图 1-3 非线性吸附等温线

因此，在此种条件下所发生的色谱过程，就称它为非线性色谱。一个理想的非线性色谱方程为

$$(1+F \frac{df}{dc}) \frac{\partial c}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial x} = 0$$

在非线性色谱中，它们最显著的特点是：

1. 色谱流出峰型不对称

对于 Langmuirian 型，色谱峰出现“拖尾”现象，而对于 Anti-langmuirian-an 型，则色谱流出峰出现“伸舌”。图 1-4 分别表明了这两种情况。

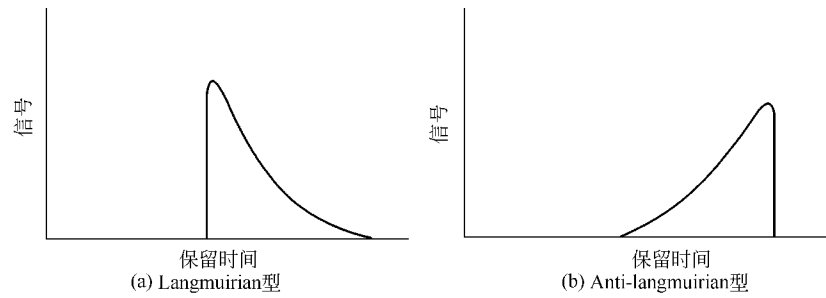


图 1-4 非线性色谱的流出峰示意图

由于色谱峰的“拖尾”或“伸舌”，使色谱峰的谱带变宽，造成色谱柱的柱效降低。

2. 色谱峰的保留时间随样品量的大小而发生变化

从图 1-5 我们可以清楚地看出，当样品量超过一定的数值后，色谱峰变得很宽。这种情况将会使本来可以分离开的组分的色谱峰产生重叠，让分离难以进行。

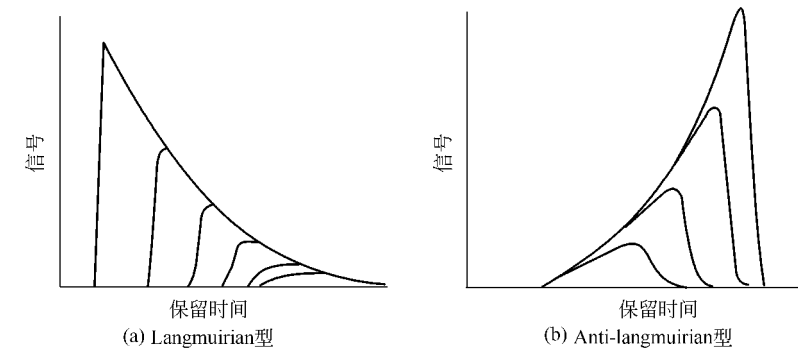


图 1-5 非线性色谱保留时间随进样量的变化示意图

3. 色谱峰高度与样品量的大小不呈正比例关系

此时再用色谱峰的高度进行定量是不准确的。

第二节 制备分离的目标和策略

通常我们在实验室所讲的制备性分离在 0.1~100g 这个范围，对于小于或者大于这个范围，我们一般称其为微量制备或者大量制备。

制备一定量的纯化合物是我们在研究和生产中经常遇到的实际问题，如我们需要提纯反应中间体供进一步的化学反应之用，需要一定量的纯物质进行化合物的结构鉴定，需要一定的纯品作为分析测试的标准化合物，需要一定量的纯化合物进行物理的、化学的或者生物方面的科学试验，以及需要生产出纯的物质作为产品出售等等。制备色谱是以分离、富集和纯化为目的的色谱分离方法。

一、分离目标

在制备性色谱分离中，需要把握住下列五点：

1. 样品性质

在实际工作中，我们处理的样品是各种各样的。为了进行有效的制备性分离，首先了解一些样品的性质是十分必要的。这些性质通常包括：

- ① 组成 该样品的组成是已知的或者是未知的；
- ② 基体 样品基体的物理或化学性质；
- ③ 复杂性 样品组成的复杂情况，如是合成产品，或者是天然产品；
- ④ 性质 样品中各组分的化学性质是否相似，或者相差甚远；
- ⑤ 相态 样品是固体、液体或者气体？它们的溶解性如何？
- ⑥ 浓度 待收集物在整个样品中的浓度是微量、大量或者是一般？
- ⑦ 价值 原料是否易得、是否昂贵，所分离的目标物的价值又如何？

只有掌握了样品的这些初步情况，才能使我们后面分离方法的建立有的放矢，节省大量的人力、物力以及时间。

2. 产品纯度

对于制备性分离，对产品通常都有一定的纯度要求，也即是说并不是所有的分离都要求产品纯度达到 100%，目标收集物只要能达到我们具体的科研或者生产的纯度指标就可以了。如微量的天然产物将其富集到大约 70% 的含量就可以进行初步鉴定；供核磁及红外测试的样品纯度只要达到 95% 就可以达到要求；做定量分析用的标准品其含量至少要在 99% 以上；而一些生物活性物质只需要除去其中的有害成分，并且它们的纯度并不用含量来表示，而是用活力这个概念。只有了解产品对纯度的要求，我们才能在制备性分离中，建立

起适当的方法。

3. 制备量

不同的制备性色谱方法都有自己适宜的制备量范围，不同大小直径的色谱柱都有自己最大的样品容量。在分离方法的建立中，我们还要考虑待收集物在样品中的含量大小以及价格，如果样品昂贵，我们还要考虑待分离物的回收率等等。

4. 时间

时间的长短在分离中也是一个重要的因素，例如有些制备性分离往往要求在一定的时间内，必须生产出多少重量的产品；也有一些物质不能较长时间经受分离过程中固定相的吸附作用，必须很快地完成分离过程等等。所有这些条件的满足，不仅关系到分离条件的优化，也涉及到分离装置规模大小的建立问题。

5. 成本

在大多数情况下，制备性分离最后都要考虑目标收集物的制备性成本，也许只有极少数的科学研究可以忽略这个因素。在一些化学产品的合成尤其是一些生物工程药物的生产中，产物的制备性分离费用很高，有些甚至可以占到整个产品成本的 80% 以上。

对于上述五个要素，它们之间的关系可以用图 1-6 进行表示。

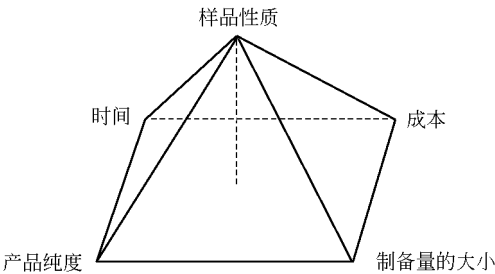


图 1-6 制备分离的五要素

二、分离策略

色谱法研究的基本点是要使混合物得到分离。为了判断待分离物质对在色谱过程中的分离情况，常用分离度作为柱的总分离效能指标，分离度又常称为分辨率，用 R 表示，定义为相邻两色谱峰保留时间之差的 2 倍与色谱峰峰基宽之和的比值，它的计算式为

$$R = \frac{2(t_{r(2)} - t_{r(1)})}{W_{b(2)} + W_{b(1)}}$$

对于待分离物的分离度还可以表示成如下的关系式：

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

式中， R 值越大，两个峰就分得越开，式中 α 表示分离因子， N 是塔板数代表柱效， k 是容量因子，可以反映出流出峰的出峰时间。该式很好地反映了几种因素对分离度的影响，对于我们进行制备性分离非常重要。

虽然制备色谱多数是在非线性情况下工作的，分离因子、柱效以及容量因子之间没有上述的等式关系，但该式仍然是指导我们进行制备色谱条件优化的重要关系式，它指出了改善分离应该努力的方向。图 1-7 清楚地表明了分离因子、柱效以及容量因子对分离的影响。

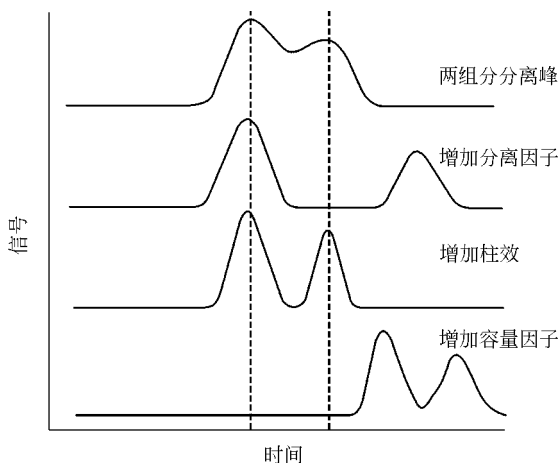


图 1-7 分离因子、柱效以及容量因子对分离的影响

图 1-7 中第一条曲线代表一对没有完全分开的组分。当我们增加它们的分离因子时，两个峰的峰值距离增大，使这对化合物达到了很好的分离；如果我们增加色谱柱的柱效，虽然两个峰的峰保留值没有发生变化，但两个色谱峰的峰宽却变窄，使本来未能完全分开的色谱峰也达到了较好的分离；增加色谱峰的容量因子，会使分离时间延长，但随着时间的增加，溶质分子在色谱柱中的被分离作用也增长，因此，总的效果也是促进分离。

（一）分离因子 α

在分离因子、柱效以及容量因子三个因素中，分离因子在制备色谱中最重要的。要想一次能分离较大量的样品，就要使它们的流出峰之间彼此相隔足够远。两物质流出峰之间距离的大小与它们在两相中的分配系数有关。在研究平

衡时物质在两相中的分配系数与物质的分子结构和物质性质间的关系时，必须首先研究分配过程的热力学以及相应的集聚态的配分函数，此即色谱过程热力学，它是进行有效地制备性分离的基础。

分离因子是两种组分的质量分配比之比，一般根据两个组分的色谱峰的调整保留时间相比而得，也可根据两者的容量因子之比而计算，它可以表示为

$$\alpha = K_2/K_1 = t_{R(2)}/t_{R(1)} = k'_2/k'_1$$

在色谱分离过程中，分离因子越大，色谱峰间的距离就越远，制备性分离时一次可以分离的样品量就越多。怎样才能获得高的分离因子呢？在样品性质不变的前提下，其主要取决于色谱固定相以及色谱的流动相的性质。

1. 固定相的选择

固定相的选择，首先要根据样品的性质选择固定相的类型，如对一般的疏水性样品我们可以选择反相色谱固定相，亲水性样品可选择正相色谱固定相，对于生物大分子可选择离子交换色谱固定相，碳水化合物可用疏水作用色谱固定相，无机离子最好使用离子色谱固定相，合成聚合物最好采用凝胶色谱固定相，立体异构样品可用环糊精固定相，而外消旋体样品最好考虑手性固定相。

在确定了采用哪一类型的固定相后，就要对具体的固定相种类进行筛选，如常见的商品化的反相固定相就有近 10 种，究竟哪一种对样品的分离因子最大，还要通过实验进行具体的筛选。为了增大样品的分离因子，我们甚至还可以考虑使用混合固定相，利用混合固定相的加和效应、尤其是一些特殊混合固定相的协同效应对样品实施制备性分离。

2. 流动相的选择

流动相的选择首先要根据固定相的类型进行选择，如果使用的是正相色谱则应该采用非极性有机溶剂+极性有机溶剂系统，如果使用的是反相系统就可以考虑使用水+极性有机溶剂的系统。在确定溶剂的类型后，再对具体的溶剂种类进行筛选。选择时首先考虑溶剂的极性，在确定了适宜的极性后，还可继续对溶剂的选择性进行筛选。

（二）柱效 N

在制备性分离中，除尽量让两个色谱峰之间具有更大的距离外，还需要让峰宽尽量不要分布太宽，也即让色谱柱具有一定的塔板数。峰形的预测是最佳条件选择的基础，色谱峰的宽窄与峰形和物质在色谱过程中的运动情况有关，这也是色谱过程动力学的问题。

人们从平衡色谱理论的基础上发展起来了塔板理论，认为统计地看两相间的平衡只能在一个小单元内达成，这个小单元的柱长度即理论板高 H 。理论板高 H 值是衡量色谱柱效率的一个很好的指标。为方便起见，人们还常用理论塔板数 N 来衡量一个色谱柱的效率：

$$N=L/H=(t_R/\sigma)^2=5.54(t_R/W_h)^2=16(t_R/W_b)^2$$

此后为了在实质上揭露谱线移动和峰形变化的规律，在大量的实验基础上提出了纵向扩散理论。1956年由 Van Deemter 等人得到了速率理论方程式，分析了影响柱效的多种因素。

总的来讲，在制备色谱中，影响柱效的主要因素可以归纳成以下几个方面：

1. 样品对柱效的影响

为了最大效率地制备目标产物，制备色谱总是在样品适当过载的情况下操作，也即在非线性的条件下进行制备性分离。但当色谱柱严重过载时，色谱柱的柱效将会类似于指数下降，使其分离能力急剧降低甚至基本上没有什么分离能力。图 1-8 可以粗略地表示上样量与柱效的这种关系。一些学者认为，制备色谱上样量应该控制在组分峰的容量因子下降 10% 左右比较适合。

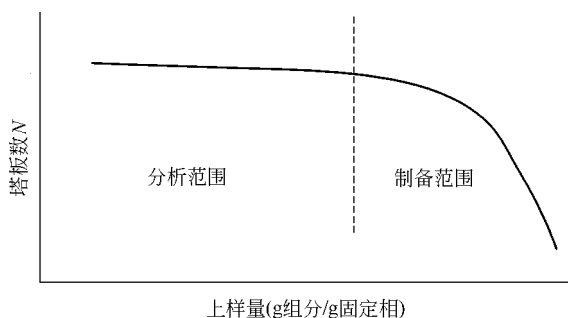


图 1-8 上样量与柱效的关系

另外，样品的化学性质、浓度大小、溶解样品的溶剂、样品在两相中的分配比、在两相中的扩散系数、两相间的质量转移比以及容量因子等对柱效都有影响。

2. 固定相的影响

固定相的性质对柱效也有很大的影响，这些因素主要包括固定相颗粒的直径大小、颗粒大小的分布范围、颗粒的形状、颗粒孔径的大小、颗粒表面积的大小以及固定相颗粒的表面化学性质。

3. 流动相的影响

流动相的影响包括流动相的组成、化学性质、黏度、扩散性质以及线速度等因素。

4. 色谱柱的影响

该影响主要包括柱本身的结构是否合理，如是否具有太大的死体积，另外是柱填充所带来的影响，如固定相是否填充均匀、是否填充紧密等因素。

（三）容量因子 k

容量因子通常可由调整保留时间与死时间之比而得，它可以反映溶质分子在柱中的移动速度。

$$k = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M$$

容量因子的增加可以改善分离的效果，它与分离度的关系可以用图 1-9 示意。

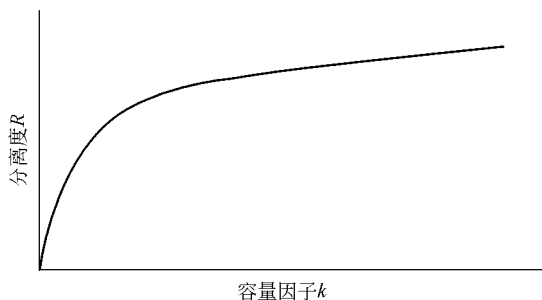


图 1-9 容量因子对分离度的影响示意图

从上图可见，当容量因子达到一定数值后，容量因子对分离度的影响并不是很大，所以我们在制备性分离中，并不是无限制地增大容量因子的数值，因为容量因子的增大是以时间和大量的溶剂消耗为代价的，除非待收集物是价值很高的物质，否则我们不采用过大增加容量因子的办法。

总之，在制备性分离的分离因子、柱效以及容量因子三元素中，我们是千方百计地增加分离因子，尽可能大地增加进样量。

当分离因子 $\alpha \geq 2$ 时，分离容易进行；

当分离因子 $\alpha \geq 1.5$ 时，能进行制备性分离；

当分离因子 $\alpha \geq 1.3$ 时，分离比较困难；

当分离因子 $\alpha \leq 1.3$ 时，制备性分离非常困难。

在制备性分离中我们也适当考虑柱效，因为在过载环境下，即使是使用粒度很小的离子，柱效都不会很高。通常增加柱效的最简捷方法，就是减少进样量，使其在接近线性的条件下操作；而对于容量因子一般是控制其在 1~5 这个范围就可以了。

（四）条件优化

由于制备性分离所上样品量大、需要固定相以及流动相多，因此成本也较高，所以对于制备色谱分离条件的优化我们总是在分析型规模的色谱条件下进行。在大多数情况下，我们采用薄层色谱或者高效液相色谱进行优化。优化步骤可以简单地归纳于图 1-10。

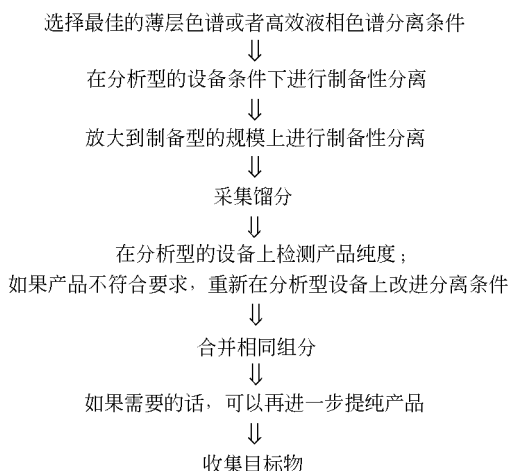


图 1-10 制备色谱操作条件优化的一般步骤

图 1-10 就是制备色谱分离的一般性步骤。在此作者还想说明的是：制备色谱分离方法毕竟是一门成本相对较高、操作比较麻烦并且技术性很强的分离技术。对于一个样品如果能用过滤、离心、溶剂萃取以及重结晶的方法达到制备性分离的目的，还是应该首选这些最常用的方法进行制备性分离。

参 考 文 献

- 1 傅若农, 顾峻岭. 近代色谱分析. 北京: 国防工业出版社, 1998
- 2 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章. 高效液相色谱法. 北京: 科学出版社, 1998
- 3 黄骏雄. 非线性色谱原理及其在蛋白质分离与纯化中的应用. 刘国詮, 陈因良, 苏天升, 张玉奎, 夏其昌, 耿信笃编. 生物工程下游技术. 北京: 化学工业出版社, 1993
- 4 林丙昌. 色谱模型理论导引. 北京: 科学出版社, 2004
- 5 Guiochen G. Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography. Boston: Academic press, Inc. 1994
- 6 斯奈德 L R, 柯克兰 J J 著, 陈新民, 高虹译. 现代液相色谱导论. 北京: 化学工业出版社, 1988
- 7 Yuan L M. Synergistic Effects of Mixed Stationary Phase in GC. J. Cazes (Editor). Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker, Inc. 2003

第二章 制备薄层色谱

薄层色谱始于 1938 年 N A. Izmailov 和 M S. Schraiber 在显微镜玻片上涂铺氧化铝薄层分离酞剂，但其后进展不大。1949 年 J E. Meinhard 和 N F. Hall 报道了以淀粉为黏合剂的氧化铝和硅藻土板进行无机离子的分离，随后 J G. Kirchner 等人使用硅胶为吸附剂，煅石膏为黏合剂，制成较牢固的薄层板，成功分离了挥发油成分，奠定了薄层色谱的基础。1956 年后，E. Stahl 在吸附剂硅胶的规格、性能、薄层厚度等对于分离的影响方面进行了较系统的研究，得到了总结性的结论，并于 1965 年出版了《薄层色谱手册》一书，从此该法被广泛使用。

第一节 实验材料与装置

薄层色谱属于液相色谱的范畴，对制作薄层色谱的材料适当处理或选择就可进行吸附、分配、离子交换或排阻等色谱分离。利用薄层色谱法快速、简便、高分辨效率的特点来制备分离纯物质的方法，称为制备色谱法。在制备色谱中，使用得最多的是硅胶吸附色谱，其次应该是氧化铝吸附薄层色谱。在多数情况下，它处理的样品量在 1mg~1g 之间。

一、薄层板

制备薄层色谱与一般的分析型薄层色谱在吸附剂、展开剂等方面没有什么本质的区别，只是为了增大上样量，在薄层上增加了吸附剂的用量，因为薄层板上吸附剂越多，吸附剂的总表面积越大，能与样品作用的有效表面积就越多，一次能分离的样品量就越大。

硅胶制备薄层板可以购买，但多数情况下是实验室自制，因为其商品较少，国产化的商品制备薄层板作者还未见报道。一般是将硅胶涂在平板玻璃块上，常见的玻璃板尺寸为 5cm×20cm、10cm×20cm、20cm×20cm、20cm×40cm 甚至 20cm×100cm。

典型的色谱用硅胶的表面积约为 300~500m²/g，平均孔径为 10nm，粒度

范围常在 $10\sim 40\mu\text{m}$ ，高效薄层色谱用硅胶常在 $5\sim 10\mu\text{m}$ 。吸附剂颗粒度小和颗粒分布范围窄可以提高薄层色谱的检出灵敏度和分离度。商品硅胶常用一些字母符号以表示其性质，如硅胶 H 表示不含黏合剂的硅胶，硅胶 G 表示含有煅石膏黏合剂，F 为含有荧光物质， F_{254} 表示在紫外光 254nm 照射下发荧光， F_{365} 则用 365nm 波长激发，P 表示制备用硅胶。

制备薄层硅胶中可以添加荧光剂。宽薄层板有利于制备量的增加，但长度一般不超过 20cm ，因为过长的薄层板一来展开太慢，将耗掉大量的时间，另外，由于扩散的原因，板长增加过多对分辨率的改进并不很明显。

薄层板的制备分干法制板和湿法制板两种，但湿法制板应用更广泛。干法制板可用金属的长方形浅盘松散地内装吸附剂作为制备薄层板，其厚度可以高达 7mm 而不需要黏合剂。湿法制板通常使用平铺法和涂铺法。平铺法是在待铺玻璃板两边用玻璃作边框，将调好的吸附剂糊倒在玻璃板上后刮平、去掉边框即成。涂铺法是用有关涂铺器进行铺层的方法。湿法铺层中常用的黏合剂有加入 $10\%\sim 15\%$ 的煅石膏、 $0.2\%\sim 10\%$ 的羧甲基纤维素钠水溶液、 5% 的聚丙烯酸水溶液或 5% 的淀粉中的一种。铺成的薄层板在室温下自然干燥后，一部分可以直接使用。如吸附力太弱，可在 $105\sim 120^\circ\text{C}$ 烘箱中活化。

对于具有直线型的吸附等温线的吸附，薄层分离后斑点对称；对于 Langmuirian 等温线，出现斑点拖尾，这种情况最多；而对于 Anti-langmuirian 型，则斑点出现伸舌头。对于薄层色谱理论塔板数的计算可采用：

$$N=16(d_1/w)^2$$

式中， d_1 为原点至组分斑点中心距离， w 为斑点宽度。图 2-1 是对应的

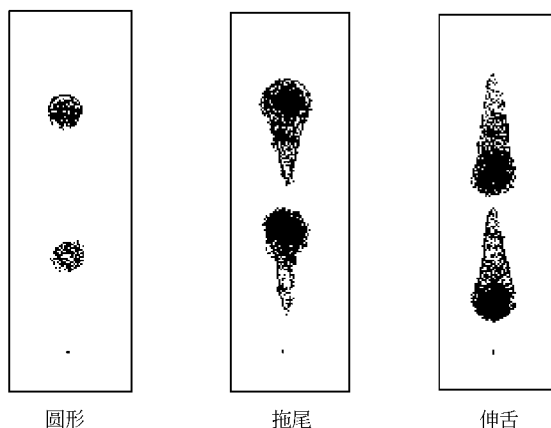


图 2-1 常见的三种薄层斑点图

三种情况下的薄层斑点图。

由于制备薄层较厚，因此流动相在薄层的表面与下面的移动速度是不一样的，上下流速的差异同样带来了薄层板分离能力的降低。

分析型的薄层板厚度一般为 0.25mm，制备薄层厚度通常要根据样品的复杂性、上样量、分辨率多方面综合考虑。一般认为在制备薄层分离中，展开后待分离组分边缘与杂质边缘之间的距离至少要多于 3mm。制备薄层的厚度不能太厚，因为太厚后很容易导致薄层裂口。在用湿法制板时，为了防止裂口的产生，常常减少水的用量和增加黏合剂的比例。在将其置于烘箱中干燥活化前，铺制的薄层板常需要静置自然干燥一夜以上。

综合以上各种因素，一些学者认为制备薄层厚度最好控制在 0.5~3.0mm 的范围。如果铺制 1mm 厚的 20cm×20cm 的薄层板，大约需要 20~25g 硅胶。较厚的薄层板当然也需要消耗更多的溶剂，也需要更长的干燥时间。也有人使用特殊硅胶和高比例的黏合剂制得了厚达 5~10mm 的制备板，但这种板的分辨率太低，只能用于样品的初步分离。

二、展开槽

图 2-2 是最常见的两种展开槽，一种是接近方形的，另一种是长方形的。有时如果自制的制备薄层板太大，作者实验室还曾利用玻璃干燥器代替展开槽进行展开，也能达到分离的效果，但选择玻璃干燥器时一定要选择底部非常平整的才能达到实验要求。

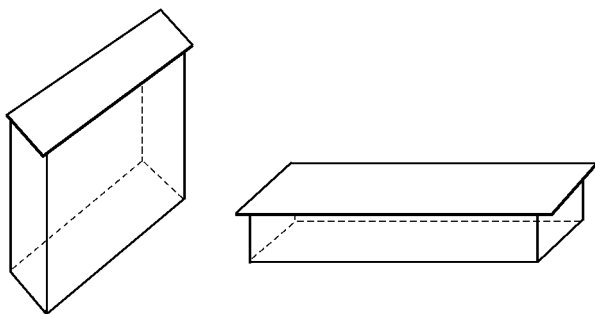


图 2-2 最常见的两种展开槽

图 2-3 是一个专门用于制备薄层色谱展开的展开槽，用它可以同时展开 10~20 块的 20cm×20cm 或者 20cm×40cm 的薄层板，十分有利于制备性分离。

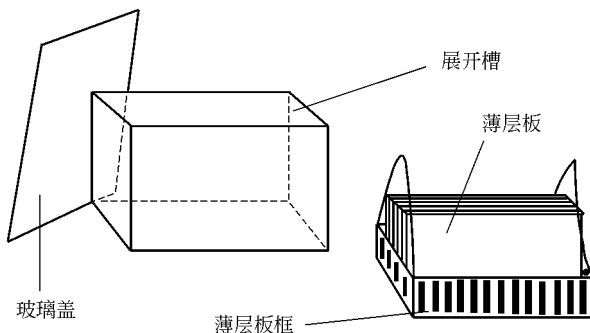


图 2-3 Desaga 制备分离展开槽

第二节 实验方法

一、上样

制备薄层板的上样量决定于薄层板的大小、薄层板的厚度、吸附剂的种类以及样品的性质。通常制备薄层板越厚，所上的样品量就越多，一般认为薄层板的容量与薄层厚度的平方根成正比，如 2.5mm 厚的薄层板的样品容量大约是 1mm 厚薄层板的两倍；但如果薄层板太厚，薄层板的分辨率会降低。实验表明：一块 20cm×20cm 的分析型厚度的薄层板可以上样 5mg 而没有出现过载，一块 1mm 厚的 20cm×20cm 制备薄层板可以上样 5~25mg 的样品，从薄层板展开后的谱带是否拖尾或者变形可以判断样品过载的情况。薄层板在上样前一定要反复实验该类薄层板对具体的某种样品的样品容量。

薄层板上样前应该先对薄层板进行预展开，方法是用氯仿-甲醇（1：1）或者乙醚（包含 1% 的氨水或者 1% 乙酸，根据后面的展开剂含碱或酸来选择）为展开剂在展开槽中展开，然后再将薄层板取出，一般通过真空干燥后供实验用，目的是除去薄层板吸附剂中的杂质。

样品应该溶解在挥发性尽可能大的溶剂中，并且溶剂的极性也应该尽可能小。样品溶液的浓度以上样后样品均匀地涂渍在吸附剂表面上而不是在吸附剂上以晶体析出为宜。因为晶体的析出使得晶体部分在展开剂中的溶解度发生变化，而使展开结果发生变化。制备薄层中典型的样品浓度范围为 2%~10%。

制备薄层的上样一般以距离薄层一端大约 2.5cm 的地方以条形上样，样品条的宽度为 3~5mm，条的长度以两端距薄层板两边边缘 1~3cm 为佳，因为边缘效应往往使薄层边缘的展开剂移动更快。条形上样不但上样方便、上样

量较高，而且分离效果通常也可优于制备薄层的点样上样，上样工具我们可用注射器或者小的滴管，当然有条件的实验室能购买商品上样器，如 Linomat 点样器则效果更好。图 2-4 是条状上样示意图。

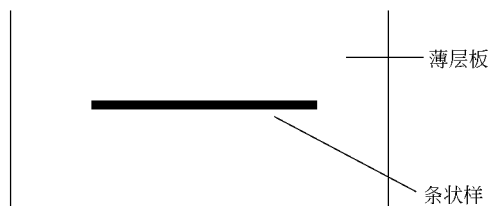


图 2-4 条状上样示意图

上样过程中我们可以重复上样，但在每一次上样后应该尽量挥发掉样品条中的溶剂，否则将会加宽样品条的宽度，挥发过程我们可以选择电吹风吹干。上样操作不能破坏薄层板吸附剂的表面，否则将影响样品的分离效果。上样后的样品条应该尽可能直和尽可能窄，如果样品条太宽，可用强极性溶剂，如甲醇展开 1~2cm，让样品条的宽度得到压缩，然后从展开槽中取出薄层板彻底挥发掉全部甲醇后，再在选择的展开条件下展开。

有文献报道先将薄层板的上样位置掏一个 V 型的条形小槽供上样用，小槽的上部大约 1~2mm 宽，深度是吸附剂厚度的一半。但该技术操作必须非常小心，不能让吸附剂除去太多而让玻璃板暴露在外，否则分离效果不佳；也有用一个一个的点紧挨着点样的方法上样，但该法操作麻烦并且效果也不是太好。还有将上样处的吸附剂吸去一条，使之成为沟槽，将样品溶液与吸附剂拌匀，干燥后再把样品小心地填充在沟槽内的方法。

松散吸附剂制备薄层板的上样一定要非常小心，上样不能破坏薄层板的表面。由于其上样操作困难，这也是松散吸附剂制备薄层板不太常用的主要原因之一。

二、展开

制备薄层色谱的展开系统通常先利用分析型薄层进行筛选。为了找到合适的极性溶剂系统，我们可以应用微量圆环技术：其方法是將一滴试样溶液点到薄层板上，让其干燥后形成一个点，然后滴少量溶剂于薄层的斑点，如果被试物质留在原点不动，则需增加溶剂的极性 or 增大洗脱剂的量；如果斑点向溶剂前沿扩散太快，甚至直至溶剂的前沿，则必须用较低极性的溶剂调整移动的距离。另外一种初步选择展开剂的方法是用微型薄层板，在实验工作中经常用显微镜载玻片为基片，手工涂铺薄层，一次分离只需几分钟。为了正确地将化合物的极性、吸附剂的活度及展开剂的极性配合起来，Stahl 还设计了一个用

以选择薄层条件的简图,该简图可参考有关薄层色谱的专著,其基本内容为:当被分离物质为非极性物质时,则应选择非极性展开剂,此时所需的吸附剂的活性较高;当被分离物质为强极性物质时,则应选择强极性展开剂,此时所需的吸附剂的活性较低;当被分离物质为中等极性物质时,则应选择中等极性展开剂,以及中等活性的吸附剂。

其实在实际分离中只用一种溶剂作为展开溶剂往往达不到好的分离效果,经常还需使用混合溶剂。在混合展开剂中,占比例较大的弱极性溶剂在展开剂中主要起溶解物质和基本分离的作用,占比例较小的强极性溶剂则起调整改善分离物质的 R_f 值及对某些物质的选择作用,中等极性的溶剂往往起着使极性相差较大溶剂混合均匀的作用。用黏度太大的溶剂时需要加入一种溶剂以降低展开剂的黏度、加快展开速度。一般主要溶剂选用不易形成氢键的溶剂,或极性比分离物质低的溶剂,否则将使被分离物质的 R_f 值太大或甚至跟随溶剂前沿移动。总之在展开剂的选择中一般 R_f 值要在 $0.1 \sim 0.7$ 的范围内为宜, R_f 值太高,则选用低强度极性的展开剂,反之则选用高强度的展开剂。展开剂极性强度等于组成该展开剂各溶剂组分的介电常数与体积分数乘积之和。在展开剂中还可加入少量酸或碱,它可以分别使某些极性的酸、碱物质斑点集中,提高分离度。

在溶剂的极性值选定后,如果目标产物仍然得不到满意的分离结果,可进一步考虑溶剂的选择性,所谓选择性是溶剂与待分离物的比较特殊的结合力。在我们薄层色谱的溶剂选择中,这种力通常是溶剂给出质子的能力、溶剂获得质子的能力以及溶剂的诱导力。所对应的最具有代表性的这些溶剂是氯仿(给质子)、甲醇及乙醚(获得质子)以及二氯甲烷(诱导力)。因此,在混合溶剂中,我们可以在保持溶剂总极性大致不变的情况下,利用上述溶剂替代混合溶剂中的其中一个组分,考察薄层色谱分离的情况。在展开剂中极性较大的组分浓度(体积分数) $< 5\%$ 或 $> 50\%$ 时往往会得到最大的选择性。

其实选择展开剂的最好方法还是利用文献资料的方法,通常有较多的专著、手册以及期刊论文报道不同类型的待分离物的薄层分离条件,必要时根据自己的待分离物性质利用上面我们讲述的原理加以改进,这样就可以较快地找到合适的展开剂,节省大量的溶剂优选的时间。

水蒸气及溶剂蒸气对分离有很大的影响,展开槽及薄层板在展开前都需要用溶剂饱和,实验中展开槽必须密闭。在用脂溶性流动相时,可在展开槽口和盖的边缘磨砂处涂以甘油淀粉糊使其密闭,当用水溶性展开剂时则应涂抹凡士林,展开过程中在盖上应压一重物,以免展开剂蒸气将槽盖顶起,改变槽内饱和情况而影响分离。

在分析型薄层上选好溶剂系统后，还应该先在小型的制备薄层板上实验这个溶剂系统的有效性，进行几次进一步的调整后，就可以进行制备性分离。由于制备薄层较厚，吸收的展开剂较多，当展开槽中流动相不够时，可以中途轻轻滑动展开槽的盖子露出一个小角再次添加展开剂，但一定非常小心不能搅起槽中液体。制备展开剂的溶剂一般都要使用分析纯。

在大多数情况下，制备薄层色谱都是用上行展开法，只有很少的例外。对于较复杂的样品，如果一种流动相不能满足制备性分离要求，还可以利用几种流动相进行多次展开。通常先用极性最低的溶剂系统展开，得到一些 R_f 值很低的分离，完全挥发掉溶剂后，选用极性较高的流动相进行再次展开，依次进行。一般以 2~3 次为佳。对于实在很难分开的组分，我们还可以将其洗脱、收集，进行制备薄层的再次分离。

三、检测

对于有色化合物，在白天我们能根据它们的颜色进行检测，具有荧光的化合物，我们也能在紫外光的照射下进行观察。如果薄层板本身含有荧光物质，则在 254nm 或者 366nm 的紫外灯下，样品组分在薄层板的荧光背景下产生黑色的谱带。一些薄层板中的荧光添加剂往往并不溶于展开剂以及最后的样品洗脱剂，因此不会造成对待分离物的污染。

由于制备薄层的显色不能破坏待分离物，也不能让其转变成其他化合物，当然更不能引入新的杂质，所以制备薄层的化学检测最好的方法要数利用碘蒸气进行显色了。元素碘是一种非破坏性显色剂，能检出的化合物很多，价廉易得，显色较快和灵敏。其方法是将展开后的薄层板挥发掉溶剂后置于一放置有少量固体颗粒碘的密闭玻璃容器中，由于碘容易升华，所以整个容器充满了碘的蒸气。大约 1~2min 后，我们就可以逐渐观察到浅棕色的薄层板上显现出亮褐色或深褐色的样品组分。从碘蒸气容器中取出薄层板，用铅笔或者针尖画出组分显现的带。薄层板在外面放置一段时间后，显现的谱带将逐渐消失，最后回到显色前的状态，因为碘蒸气的显色机理基本上是基于物理吸附，并且这种吸附在大多数情况下是可逆的。

水可以作为制备色谱的显色剂，当在薄层板上均匀地喷上水并使其透明后，在黑的背景下水不溶组分在薄层板上就会显现不透明的谱带。

如果上面的检测方法还不能满足检测的目的，我们就只有采用通常分析型薄层中使用的化学检测方法了，方法是先用一适当大小的玻璃板或者能抗显色剂浸湿和腐蚀的塑料板遮住薄层板的中间部分，让其两边各露出一小条，然后按照通常的显色方法进行喷雾显色，显色过程中不能加热，以免破坏样品。最后根据显色情况，用铅笔或者针尖连接两边，勾画出薄层上的谱带分布情况。

具体的通用显色剂和专用显色剂可参见有关薄层色谱的专著。图 2-5 是化学显色示意图。

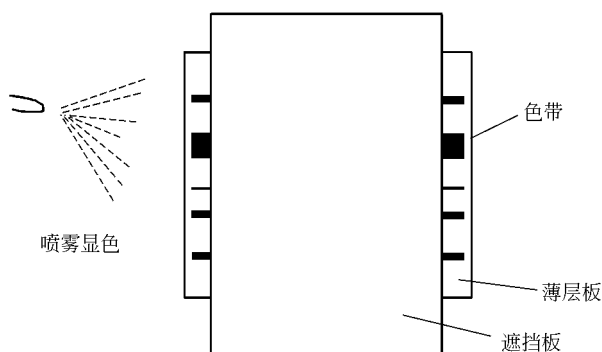


图 2-5 制备薄层化学显色示意图

四、收集

薄层板展开、显色并确定了所需要的谱带后，通常的办法就是用工具将所需要的谱带从薄层板上连同吸附剂刮下来置于适当大小的玻砂漏斗中。为了让其全部转移到漏斗中，刮取过程可以用刀片，也可以用后面的洗脱剂少许进行润湿洗涤，操作一定要小心，不要将非收集成分带入。然后选取溶剂将待收集成分从吸附剂上洗脱下来。洗脱剂很少选用水，因为水的沸点较高，后面的蒸发浓缩不方便；同时甲醇也不是很好的洗脱溶剂，因为它的洗脱能力太强，很容易将吸附剂上带有的微量强极性杂质也一起洗脱。较适宜的是丙酮、乙醇、氯仿以及一些好的展开剂系统。洗脱时需要的洗脱剂的体积大致可以应用下面的经验式粗略估计：

$$\text{洗脱剂体积} = (1.0 - R_f) \times 10 \times \text{刮下的吸附剂体积}$$

洗脱的方法可以采取少量多次添加洗脱剂到玻砂芯漏斗中的办法，原理类似于经典柱色谱，只是选择的洗脱剂对样品的洗脱能力较强，能比较方便地让待分离组分与吸附剂分离开来。

对于松散层薄层板的样品带也可以利用一个适当大小的玻管，一端用脱脂棉塞住，并将有脱脂棉的这端与真空泵相连接，利用玻管中的真空可以将薄层板上的吸附剂吸入玻管内，然后将脱脂棉端作为溶剂出口，用洗脱剂将待收集组分从吸附剂上洗脱下来。

洗脱液进行蒸发浓缩就可得到我们需要的目标物，根据需要，还可进一步对分离物进行重结晶提纯，以达到我们要求的纯度。

总之，一般的制备薄层色谱与一般的分析型薄层色谱在吸附剂、展开剂等

方面没有什么本质的区别,只不过围绕样品的处理量加大而进行了一定的技术变化。详细的分析型薄层色谱原理和技术我们在本书中不再介绍,对薄层色谱有兴趣的读者可参考本丛书中的《平面色谱方法及应用》分册。

第三节 离心薄层色谱

在经典制备薄层色谱基础上发展起来了离心薄层技术,该技术在 20 世纪 60 年代由 Dalcortivo 等人提出,又叫旋转薄层色谱。它可以克服经典制备薄层要将吸附剂从薄层板上刮下并洗脱的烦琐操作,并能缩短分离时间,薄层板也可以重复使用。分离的本质就是在经典的薄层色谱上加了一个离心力,增加了展开剂的流动速度,另外流动相用恒流泵持续泵入,可以将待分离组分连续洗脱出来。

离心薄层色谱仪的种类有多种,相对用得较多的有两种。一种是美国加州 Harrison Research 公司生产的 Chromatotron 型仪器,另一种是日本 Hitachi Koki 公司生产的 Hitachi CLC-5 型仪器。

对于 Chromatotron 型仪器,其薄层板需要实验室自己制备,一般制成 2mm 厚。它是在含有荧光剂的吸附剂中加入黏合剂,用水将其调成糊状,然后利用倾注法将吸附剂的混合物均匀地涂铺在与仪器相配的圆形玻板上。待吸附层固化后,色铺板置于烘箱中在 105℃ 干燥 30min 既可。实验时将薄层板固定在仪器的转轴上,色铺板的中央留一小面积的空白,供上样和泵入展开剂之用。

薄层板连接的转轴与电动机相连,薄层板在仪器中的安放呈一定的倾斜角度,上样后流动相连续地被泵入,冲洗出的馏分可以被分部收集。分离时,仪器上方还可加一个紫外灯,用来观察薄层板中谱带的移动情况。在展开室内还可以通入氮气,减少敏感物质的氧化。图 2-6 是该仪器及原理示意图。

Hitachi CLC-5 型仪器在使用时将吸附剂用展开剂调成糊状物,然后将其加入仪器中两块水平的圆板之间。离心力使过量的溶剂排除,样品溶液加到仍然潮湿的吸附剂薄层上,利用常规方法进行薄层展开。

除离心薄层色谱外,还有一些适合于制备的薄层技术,例如加压薄层色谱、厚层薄层色谱、移植薄层色谱等。但由于这些技术操作麻烦或者需要一定的设备,尤其是由于本书后面所介绍的一些制备色谱技术特有的优越性,使得在实际的制备性分离中,使用制备薄层技术进行制备性分离的人越来越少,利用特殊制备薄层技术的人就更少了。从本书实用性的角度考虑,在此就不再对这些技术作进一步的介绍。

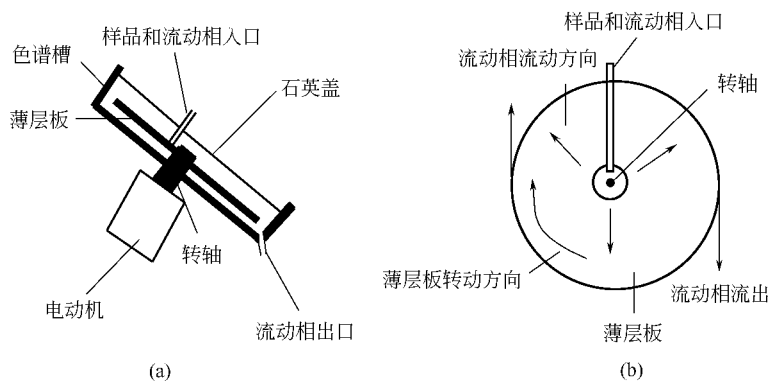


图 2-6 Chromatotron 型仪器及原理示意图

(a) 结构示意图；(b) 原理示意图

参 考 文 献

- 1 周同惠等. 纸色谱和薄层色谱. 北京: 科学出版社, 1989
- 2 Bidlingmeyer B A. Preparative Liquid Chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1987
- 3 Stahl E. Thin Layer Chromatography. 2nd Ed., Springer Verlag/Academic Press, 1969
- 4 中国医学科学院药物研究所. 薄层层离及其在中草药分析中的应用. 北京: 科学出版社, 1978

第三章 经典柱色谱

经典柱色谱的操作基本上还沿于色谱创始人茨维特 1903 年的工作，但经过 100 年的发展，出现了许多新的分离材料、一些新的分离模式和分离原理。总的来说，直到今日，应用该技术的研究者很多，但不断研究该领域的学者却较少，因为除新的分离材料的合成外，该领域的大多数技术已经趋于成熟。

经典柱色谱的类型有多种，主要有吸附柱色谱、分配柱色谱、离子交换色谱、凝胶色谱、亲和色谱、干柱色谱等。

第一节 吸附柱色谱

一、硅胶吸附柱色谱

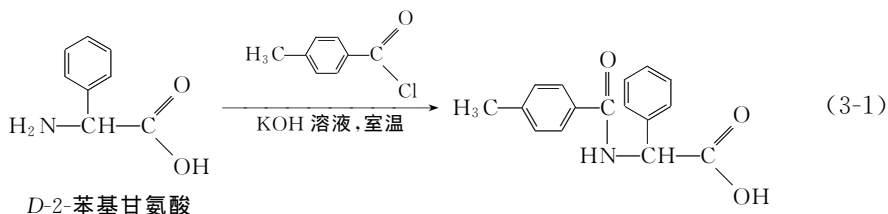
从国内外学术期刊上所发表的文章不难发现，在经典柱色谱中硅胶吸附柱色谱仍是目前应用最为广泛的柱色谱技术，在有机合成和植物化学等的常规分离中，至少 80% 以上的色谱制备性分离工作都是在硅胶柱上进行的。因此对于一般的常规性制备分离，作者向读者首推这种方法。

经典柱色谱分离是一项技术性很强的操作，初学者由于操作技术和经验的原因，往往并不能达到预期的分离结果。作者本人在刚学习作硅胶吸附柱色谱的时候，也曾分离一个水溶性的偶氮氯膦衍生物的混合物，前后经历了数十天，最终还是以失败而告终。很多有机合成的初学者，也常常因产物不能提纯而导致合成反应的最后失败。现以作者合成的一个目标物的分离为例，先叙述经典柱色谱（图 3-1）的一般操作步骤。

（一）操作步骤

1. 待分离物

作者曾经完成了一个有机合成反应，反应方程式如式（3-1）所示。反应混合物主要是产物、副产物以及未反应完的原料。当混合物进行适当的萃取处理后，得到仅包含有对甲基苯甲酸杂质的粗产物。分离 2g 该粗产物，在薄层色谱上利用乙酸乙酯作展开溶剂时， $R_{f,A}=0.8$ ， $R_{f,B}=0.5$ 。



2. 硅胶的准备

250~400 目（即 40~63 μm 直径的硅胶颗粒），Merck 公司产品。根据从薄层色谱探索冲洗溶剂系统所得的 $\Delta R_f = 0.3$ ，可以粗略地估计该分离有一定的难度，因此我们选用样品与硅胶重量比为 1 : 100 的比例，需要准备 200g 硅胶。通过一个 10mL 的小量筒量取 10mL 硅胶然后称重，计算出所使用的硅胶密度大约 0.4g/mL，因此可以直接用大烧杯量取 500mL 硅胶。

3. 实验仪器的准备

一支直径为 5cm $\times$ 长 100cm 的玻璃色谱柱，一个铁架台，100mL、500mL 的烧杯各一个，500mL 锥型瓶 2 个和 1L 的锥型瓶一个，一支较大的量筒，一支玻棒，一个径口直径较大（最好接近色谱柱直径的一半）的玻璃漏斗，10mL 的小试管 30~50 支置于一试管架上。

4. 装柱前的准备

将玻璃色谱柱用两个铁夹分上下将其固定在铁架上，用小烧杯量取大约 60mL 30~50 目的细砂，将其中 20mL 倒入色谱柱中，让其平整地铺在色谱柱内出口的筛板上（如色谱柱中无筛板，可先用脱脂棉或玻璃纤维少许堵住出口，然后再加入细砂并得到平整的细砂面），并放一个 500mL 的锥型瓶于色谱柱的下面。在 1L 的烧杯中盛 500mL 硅胶，1L 的锥型瓶中装 1L 乙酸乙酯，用大量筒量取乙酸乙酯 600mL 于硅胶烧杯中（留下约 80mL 最后洗涤盛硅胶的烧杯，500mL 硅胶大约吸收 400mL 左右的溶剂），用玻棒将其搅拌成糊状，再量取 400mL 乙酸乙酯轻轻地沿柱壁倒入色谱柱中（防止破坏柱中平整的细砂层），最后将玻璃漏斗置于色谱柱上面。

5. 装柱

将硅胶的乙酸乙酯悬浊液用玻棒搅匀，打开色谱柱下面的活塞，让柱中溶剂以一定的速度向下移动，用事先接好的锥型瓶收集流出的溶剂。然后沿色谱柱上面的漏斗在边加边搅拌下慢慢地、均匀地、连续地将硅胶乙酸乙酯浆倒入色谱柱中，最好能一次性加完（如由于色谱柱体积有限、且流动相的流速较

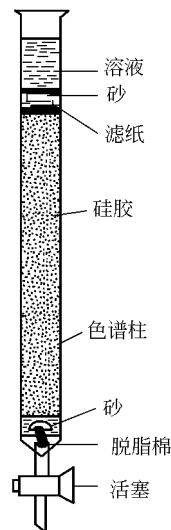


图 3-1 经典柱色谱装置示意图

慢实在不能一次性加入，可以分两次进行)。加入的硅胶浆在柱内溶剂中首先分散，同时随着下降的溶剂在柱中均匀地沉降。由于流动相的不断流出，当柱中溶剂层接近硅胶层大约 3~4cm 时，剪一张与柱直径大小的滤纸置于硅胶层表面，然后将剩下的大约 40mL 细砂均匀地铺在柱的上面，关闭色谱柱活塞，柱的填装即告完成。此时柱中含溶剂大约 450mL，整个色谱柱中无气泡且填充均匀（图 3-1），如果达不到上述要求，则该柱应该取出硅胶进行重新填装。

6. 上样

用一个空的 500mL 的锥型瓶置换出放于色谱柱下面收集流出液的锥型瓶，此时可取尽量少的装柱时流出的冲洗溶剂溶解样品，将色谱柱中的溶剂面调至与细砂面刚好一致后，用吸管小心地将样品液均匀地加到柱中，待样品液全部没入细砂层后，再用吸管吸取少许冲洗剂添加到色谱柱中，待所添溶剂全部没入后，再重复上述操作多次，使样品液以尽可能短的柱塞进入到柱中，从而使后面大量溶剂的添加不会让样品泛起。

7. 冲柱

在确定样品不会被大量添加冲洗溶剂泛起后，这时可以进行柱的冲洗，为了节省溶剂，可用前面装柱时所收集的流出液冲柱，添加溶剂时需要小心，防止下流的冲洗剂破坏色谱柱层。在样品从色谱柱中流出前，仍有一定体积的死体积溶剂，在我使用的这根硅胶柱中，死体积大约 350mL，因此这一部分流出的溶剂，同样可以返回再次作为冲洗溶剂使用。

第一次配制冲洗溶剂不宜过多，以免造成浪费，如果不够时可以利用量筒和大锥型瓶根据需要再次配制。该实验作者第一次配了 1.2L，第二次配了 300mL 就足够了。

8. 检测

(1) 初步检测

当冲洗溶剂流出大约 350mL 后，就可及时地对流出液进行初步检测，并且将锥型瓶更换成小试管进行收集。如果待分离物是有颜色的物质，则可以凭肉眼观察，分段收集。如果待分离物没有颜色，则需要利用物理或化学的方法进行检测。在冲洗过程中，一般只进行初步的快捷检测，看是否待分离物已经流出或者了解流出物的浓度大小等，因此通常是取一小薄层板，用铅笔和直尺将硅胶板分划成多个小方块，并且按一定的次序进行编号，用铅笔在每个小方块内标明，如图 3-2 所示。

1	3	5	7	9	11
2	4	6	8	10	12

图 3-2 用于初步检测的硅胶薄层板

取一根内径为 0.3mm 左右的玻璃毛细管蘸取少量流出液，点于薄层板的一个小格内，待斑点干后（如溶剂挥发较慢，可用电吹风吹干），然后用物理的或化学的方法检测。用一个小瓶装少量干净的冲洗溶剂，点样后的毛细管可蘸取冲洗溶剂进行洗涤，洗涤的方法是先蘸取冲洗溶剂，然后在滤纸上将吸入毛细管的溶剂吸出，重复此操作几次。洗涤后的毛细管可以反复使用，因为每次检测只使用了薄层板的一个小格，故该薄层板可以重复使用多次。

作者该实验的检测是直接利用玻璃毛细管在色谱柱出口采样，然后按小薄层板上标记的次序，在一方格内同一个位置重复点样几次，待溶剂挥发后，直接用紫外灯照射检出，看是否有待分离物质的斑点出现。采一次样，使用一个方格。如果待分离物已经流出，则小心分管收集；如果待分离物未有流出，则所收集的溶剂可以合并再次用于色谱柱的冲洗。该实验中仍然用同样的方法检测色谱柱的冲洗是否完成，看冲洗液中是否还有待分离物继续流出，判断冲洗是否应该结束。

（2）正式检测

① 点样：取分部收集的冲洗溶液进行分别直接点样，如果冲洗溶液太稀，浓度太小，可以事先利用旋转蒸发仪对冲洗液进行浓缩。点样容器一般用玻璃毛细管，点样量一般为几至几十微克，点样方式一般用点样。有人建议展开剂标准化深度为 0.5cm，样品位于离薄层底端 1.5cm，点样斑点的直径一般为 3~5mm 为宜。但作者由于习惯用高效薄层小板，所以各种指标都进行了缩小，如点样位置一般距离薄层板起始端 0.5cm，点样斑点不大于 3mm 等。

② 展开：在普通的展开槽中进行，展开方式常选用上行展开。由于水蒸气及溶剂蒸气对分离有很大的影响，展开槽及薄层板在展开前需要用溶剂饱和。常规薄层最长距离为 20cm，高效薄层展距最长为 10cm。一般情况下温度对薄层色谱的影响不明显。作者的工作是先购买高效薄层板，然后将其切割成小板，最后在一个平底的有密封瓶盖的小瓶中展开，如图 3-3 所示。

切割高效板的方法为：一块 20cm×20cm 的高效薄层板可以划分成 36 块大约 1.6cm×7cm 的薄层板或者 72 块 1.6cm×3.5cm 大小的薄层板。划分时应该用一大块平整的泡沫塑料垫在桌面上，将硅胶面面向塑料水平放置，操作在玻璃一面，利用三角尺和玻璃刀进行切割。划好的硅胶版可以保存在置有棉花的瓶中。

③ 展开剂：展开剂使用冲洗溶剂。

④ 显色：一般常用物理检测法和化学检测法。在物理检测法中首先有紫外光法，紫外光常用两种波长（254nm 与 365nm），可根据具体情况选择。其次是碘蒸气显色法，元素碘是一种非破坏性显色剂，能检出的化合物很多，价廉易得，显色迅速、灵敏。化学检出法通常进行显色剂直接喷雾。显色剂有通

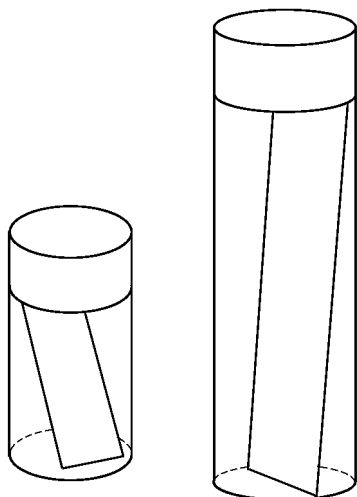


图 3-3 薄层展开示意图

用显色剂和专用显色剂。通用显色剂最常见的是硫酸-乙醇或甲醇（1：1）溶液，喷雾后，有的化合物立即反应，但大多数化合物需加热后历数分钟才显色，不同化合物的反应不同，所显颜色也往往各异，即使是同一种化合物随加热温度与时间不同，其显色也往往不同。专用显色剂是指对某个或某一类化合物显色的试剂，利用化合物本身的特有性质，或利用其所含的某些官能团的特殊反应。展开后根据斑点的大小，可以粗略地估计待分离物含量的大小。

9. 合并

根据上面薄层检测的结果，我们可以将具有相同 R_f 值的部分进行合并，然后利用旋转蒸发器对合并部分进行旋转蒸发，最后得到我们需要的目标产物。如果分离后仍有部分未分开，我们可取未分开的部分，再次重复上面的分离操作，进行第二次柱色谱分离。在必要的时候，我们还可以对最后所得成分进行进一步重结晶，以提高产品的纯度。

R_f 值在一定条件下为一常数，用其可以定性。但 R_f 值受一些因素的影响：①吸附剂的影响，吸附剂的活性对分离的影响很大。②展开剂的影响，若溶剂中含有少量比展开剂极性更强的杂质溶剂，则会对 R_f 值产生较大的影响。特别是在使用混合溶剂时，由于溶剂组分的挥发难易不尽相同，而极性溶剂的含量又很低的时候，很易造成展开剂组成的变化，致使 R_f 值的波动。除此之外，点样位置以及展开剂没过薄层板的深度对 R_f 值都会有影响。③展开的方式、点样的大小对 R_f 值会带来不同程度的影响。④其他影响：一般说来，薄层厚度可以影响展开剂的流速，致使物质的 R_f 值产生变化，薄层厚度一般控制在 0.25mm 比较理想。温度对吸附色谱影响不显著。展开的距离对 R_f 值的

影响也不明显。鉴于以上原因, 鉴定化合物时, 最好采用在同一薄层板上随行为对照, 这样实验条件基本相同, 可靠性大。

10. 色谱柱的洗涤

在绝大多数情况下, 硅胶分离柱中的硅胶是一次性使用, 原因是柱层析硅胶价格较低。如果要再生使用过的硅胶, 将需要大量的强极性溶剂如甲醇, 再加上处理所需要的其他人力和物力, 所以通常情况下, 再生硅胶并不合算。

在使用后的色谱柱中由于还含有冲洗溶剂, 所以要将里面的硅胶倒出是比较困难的, 尤其是色谱柱比较长的时候。取出硅胶的一种方法是该柱放置一段时间, 让溶剂自然挥发完后, 即可以方便地将硅胶倒出。但这种方法所需时间长, 一般需要好几天柱中的溶剂才能慢慢挥发掉, 而溶剂自然挥发出来后又污染环境; 第二种方法可以用一根比色谱柱稍长的木杆或塑料杆将含有溶剂的硅胶一段一段地掏出, 但这种办法也比较麻烦, 尤其是色谱柱又长又大时操作很不方便, 且还很易让硅胶散于收集容器之外; 第三种方法是利用一个一般的真空泵, 如真空水泵将色谱柱中剩余的溶剂进行减压抽出, 在色谱柱和真空水泵之间加一个冷阱, 这样抽出的溶剂既进行了有效的收集而不污染环境, 而色谱柱中的硅胶又能较快地得到干燥, 使柱中的硅胶能够方便地倒出。其装置与操作示意如图 3-4。

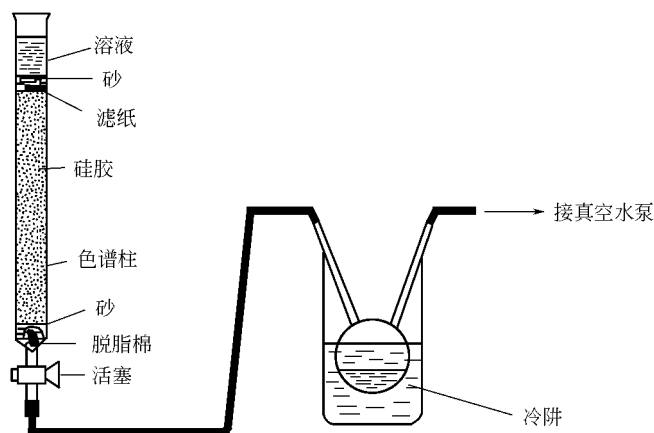


图 3-4 减压抽出色谱柱中有机溶剂装置图

最后的色谱柱可以采用洗涤通常玻璃器皿的方法进行洗涤。

(二) 硅胶吸附柱色谱的原理与技术

1. 吸附色谱的原理

在硅胶吸附柱色谱中, 使用的硅胶是一种坚硬无定型立体网状结构的硅酸聚合物颗粒, 硅胶的分子式是 $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 它的内部具有很多的小孔, 这种孔的存在使得硅胶具有很大的表面积。在硅胶颗粒的内部, 分子与分子之间的

相互作用力是对称的，其力量相互抵消，而处于固体表面的分子所受的力是不对称的，向内的一面受到固体内部分子的作用力大，表面层所受的作用力小，因此在硅胶固体的表面就存在着这种剩余的力。

在一定的条件下，硅胶与被分离物质之间产生作用，这种作用主要是物理作用和化学作用两种。物理作用来自于硅胶表面与溶质分子之间的范德华力，如静电力、诱导力、色散力，其特点是吸附速度快，在相同情况下，吸附过程和脱附过程是同时进行的，被吸附物质在一定条件下可以被解吸出来。化学作用主要是硅胶表面的硅羟基与待分离物质之间的氢键作用。硅胶表面的硅羟基结构如图 3-5 所示。

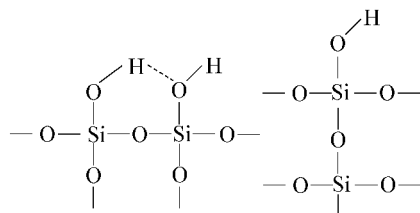


图 3-5 硅胶表面的硅羟基示意图

不同的化合物由于其分子结构不同，因此与硅胶表面作用力的大小也不同。同时，同一种冲洗溶剂对不同化合物也因分子结构而异使得它们的溶解度也不同。当实施色谱操作时，随着色谱柱冲洗溶剂的不断冲洗，致使不同的化合物组分在色谱柱中的流动速度不一样，最后使得一个复杂的混合物由于通过色谱柱的速率不同而达到分离。

2. 色谱柱的选择

经典柱色谱使用的色谱柱一般都是玻璃的（图 3-6），柱内径与柱长的比例一般在 $1:10 \sim 1:20$ 之间。如果待分离物易于分离，则可应用比 $1:10$ 更短的色谱柱，从而节省分离时间和药品的消耗；如果待分离物难于分离，则可应用比 $1:20$ 更长的柱子。有时我们还可以将二根甚至三根色谱柱串联起来，增加柱的总长度，以增加色谱柱的总分离效能。商品色谱柱在柱出口端可有一筛板，在出口小管上有一个玻璃活塞。而自制的色谱柱中可不要筛板，使用时用一团玻璃纤维或者脱脂纤维棉代替筛板在出口处堵住硅胶。在实验条件很有限的情况下，还可用酸式滴定管代替色谱柱，但作者的实验结果表明，酸式滴定管的柱效较低，可能是管的直径较小，管壁效应严重的原因。在我的研究工作中， $3 \sim 5\text{cm}$ 直径的色谱柱用得最多。

3. 硅胶的选择

硅胶的制备常以水玻璃与酸反应水解得到硅酸，单硅酸在水中发生自聚作用，随着时间的延长，聚合度增加。在适当的介质中，当 $\text{pH} = 7 \sim 10$ 且无盐

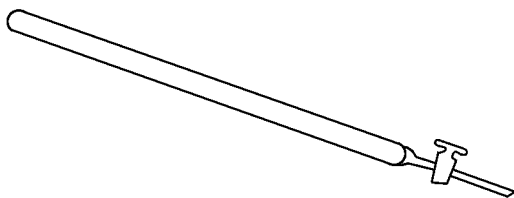


图 3-6 常用玻璃色谱柱示意图

存在时可聚合成硅溶胶，而在盐存在下则凝结成水凝胶。 SiO_2 浓度不同的溶胶在不同的 pH 值和温度下，也可以黏接成三维网状结构的凝胶。经固化和老化后的凝胶用水冲洗去掉其中包裹的盐类，最后脱水干燥制成硅胶。

由于硅胶的商品价格比较低廉，原则上我们不需要自己合成或者加工处理一般的硅胶产品，而是直接购买商品柱层析硅胶进行我们的分离工作。

国产硅胶要比进口产品价格廉许多。通常国产柱层析硅胶完全可以满足常规的分离要求。柱层析硅胶的种类很多，购买时主要考虑硅胶颗粒直径的大小和颗粒大小的分布范围。从分离的角度讲，颗粒直径的分布范围总是越窄越好，最好是单分散的，这样在填柱时就可以避免硅胶在柱中的分级分布，使分离柱具有较高的柱效。但单分散的硅胶价格很高，对于经典的柱色谱分离我们总是选取具有一定颗粒直径大小分布范围的硅胶，在硅胶价格相近的前提下，优先选取较窄分布范围的产品。

硅胶颗粒的大小直接关系到分离的好坏。同种规格的产品颗粒直径越小，所填色谱柱的分离效果越高，但如果硅胶颗粒直径太小，则又严重影响色谱柱中冲洗溶剂的流出，使冲洗溶剂流速太慢甚至不能流出色谱柱，从而达不到分离的结果。

作者在有机合成粗产品的分离以及植物有效成分的分离过程中，综合考虑产品价格和分离效率的关系。国产硅胶通常使用 200~300 目的硅胶，而进口硅胶通常使用 250~400 目规格（即 $40\sim 63\mu\text{m}$ 的硅胶，进口的用于制备性分离的柱层析硅胶多数是属于这个规格的）。有人认为，对于 200~300 目规格的硅胶在分离中其柱效大约相当于 200 目的单分散硅胶，而其在柱中对溶剂的阻力却接近单分散的 300 目的硅胶。

硅胶与待分离样品的重量比也是一个重要的因素。对于非常容易分离的样品，样品与硅胶的重量比可以高达 1:30；对于一般的分离，如两组分待分离物在薄层上的 $\Delta R_f > 0.4$ ，则可使用 1:(50~100) 的重量比较合适；对于较难分离的样品，可以使用 1:200 的比例；对于更难分离的样品，甚至可以考虑使用 1:(500~1000) 的比例。在装柱前一定要分别称量样品和硅胶的重量，选取正确的硅胶用量。硅胶用量的不足，常常是导致分离失败的重要原

因，因为样品的过载，会使色谱分离柱的分离效能成指数下降。

硅胶的活性与含水量的关系极大，其含水量越高，活性越低。当其含水量接近 20% 的时候，这时的硅胶基本上就不再具有什么吸附活性。在一定的温度下除去水分就可使硅胶活化。硅胶加入一定量水即可使活性改变。活性与水的关系如表 3-1。硅胶的活化一般采用在烘箱中在 110℃ 左右加温 0.5~1h 一次活化得到 II~III 级活性的硅胶。硅胶的活性太高，会使硅胶的吸附能力太强，造成一些成分吸附在色谱柱内不容易洗脱或者拖尾，影响分离效果，有些甚至造成待分离物分子结构的改变。硅胶的活性太低，又达不到利用硅胶的吸附性能进行分离的目的。

表 3-1 硅胶活性与含水量的关系

硅胶含水量/%	硅胶活性	硅胶含水量/%	硅胶活性
0	I 级	15	IV 级
10	II 级	20	V 级
12	III 级		

硅胶活性的标定，可分别称取偶氮苯、对甲氧基偶氮苯、苏丹黄、苏丹红（苏丹）和对氨基偶氮苯，分别溶于一定量的苯中，配成溶液。然后利用玻璃毛细管分别蘸取上述染料溶液点于待测活性的硅胶薄层板（干法制板）或者利用毛细滴管取一小滴加入装有硅胶的细玻璃管上，用苯展开后，测量 R_f 值或比移值，然后根据文献数据可以确定硅胶的活度级别。

但在我国大多数比较干燥的地区，如我国北方或者作者工作的地方昆明等地，由于空气中湿度较低，在多数情况下，商品硅胶可以事先不经干燥而直接使用，也能达到分离目的。

4. 溶剂的选择

溶剂的选择也许是整个柱色谱分离操作中最困难之处，也是实验成功的关键之处。它不只是决定分离效果的好坏，同时还决定分离的成本、后处理的难易以及废弃物对环境的污染等多种因素。

由于经典柱色谱的装柱、上样以及冲洗过程比较费时，每次所消耗的溶剂也较多，对于柱色谱溶剂系统的选择总是先利用简便易行的硅胶薄层色谱进行筛选。

但薄层色谱毕竟不是柱色谱，筛选出来的溶剂系统与柱色谱所需要的最佳溶剂系统是有一定的差距。主要原因在于薄层色谱所用的硅胶颗粒直径一般都小于 $40\mu\text{m}$ （即小于 400 目），分离效能要比柱色谱高出许多，并且在铺制薄层板时为了防止硅胶的脱落，在硅胶中往往添加了一定数量的黏合剂，有时为了便于检测，在薄层板中还加入荧光物质，所以用薄层色谱所筛选出的溶剂系统只能是我们重要的初选溶剂系统，决不是最佳的溶剂系统。

有时为了减少这种差距，我们可直接用柱层析硅胶进行干法制薄层板。方

法是先将被铺的薄层板玻璃板水平放置于实验台上，然后取一玻棒，两边分别套上一个橡皮圈，橡皮圈要比玻璃板略厚，用它控制所铺硅胶的厚度。两个橡皮圈的宽度与薄层版的宽度一致。先在玻板上尽量均匀地铺上一层柱层析干硅胶，然后按照图示的方法运动玻棒，让硅胶在板上分布均匀并变得紧密。使用这种板时一定要十分小心，因为硅胶非常容易脱落，一个大的呼吸或一个稍大的气流都会让硅胶运动。

干法制板示意图如图 3-7 所示。

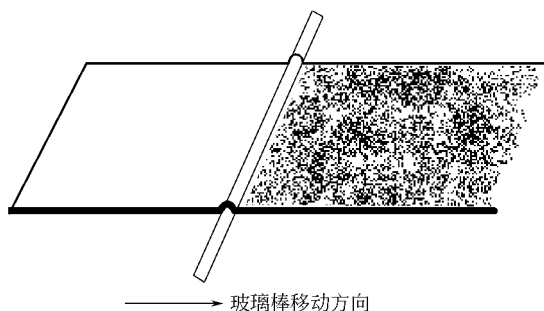


图 3-7 干法铺薄层板

溶剂的选择，原则上是让目标化合物与杂质在薄层上的斑点距离具有足够的差距，如 $\Delta R_f > 0.4$ 。选择时主要从两个方面考虑，一是溶剂的极性，二是溶剂的选择性。

溶剂的极性：常用洗脱溶剂的极性按如下次序递增：

己烷、石油醚 < 环己烷 < 四氯化碳 < 二硫化碳 < 甲苯 < 苯 < 二氯甲烷 < 氯仿 < 乙醚 < 乙酸乙酯 < 丙酮 < 丙醇 < 乙醇 < 甲醇 < 水。

在薄层色谱中，当溶剂的极性太大时，会使待分离物全部接近溶剂前沿，当溶剂的极性太小时，又会使得待分离物几乎全部保留在起点，这两种情况都使得待分离物得不到分离。

为了找到合适极性的溶剂系统，我们可以应用微量圆环技术，也可以用另一种初步选择展开剂的方法——利用微型薄层板。Stahl 的薄层条件简图，也为我们指明了展开剂的选择方向。并且我们实际分离中还经常使用混合溶剂，在展开剂中根据情况也还可加入少量酸或碱，在很多情况下我们还进一步考虑溶剂的选择性。如果能使目标产物的 R_f 值接近 1，而其他杂质与目标产物的 $\Delta R_f > 0.4$ 以上，则这个溶剂系统最适宜于柱色谱分离系统。分析型薄层色谱溶剂选择的较详细步骤前一章已经叙述，在此就不再重复。

选择展开剂的最好方法还是利用文献资料的方法，在表 3-2 中给出了一些常见类型的待分离物的溶剂系统，研究中我们就可以首先考虑这些系统，然后进行完善。

表 3-2 常见硅胶薄层色谱展开剂

化 合 物	展 开 剂 ^①
多环芳烃	戊烷 四氯化碳
酚	氯仿 环己烷-乙酸乙酯(4 : 1) 乙醇-水(8 : 3)含 2%乙酸钠 四氯化碳-乙酸(9 : 1) 环己烷-丁酮(7 : 3)
羧酸	苯-甲醇-乙酸(45 : 8 : 8) 甲醇、乙醇、乙醚
脂肪酸	石油醚-乙醚-乙酸[70 : 30 : 1(或 2)] 乙酸-乙腈(1 : 1)
胺	乙醇(95%) - 氨(25%)(4 : 1)
氨基酸	正丁醇-乙酸-水(3 : 1 : 1) 酚-水(75 : 25) 正丙醇-34%氨水(67 : 33) 正丁醇-乙酸-水(4 : 1 : 1) 正丁醇-乙酸-水(3 : 1 : 1) 吡啶-水(1 : 1)
糖	苯-乙酸-甲醇(1 : 1 : 3) 正丙醇-浓氨水(6 : 2 : 1) 丁醇-吡啶-水(6 : 4 : 3) 乙酸乙酯-吡啶-水(2 : 1 : 2) 乙酸乙酯-异丙醇-水 (5 : 2 : 0.5)
蛋白质	氯仿-甲醇或丙酮(9 : 1)
维生素	甲醇、四氯化碳、二甲苯、氯仿、石油醚、丙酮或丙酮-石蜡油(水饱和)(9 : 1)
嘌呤	丙酮-氯仿-正丁醇-25%氨水(3 : 3 : 4 : 1)
萜	苯、苯-石油醚(或乙醇)异丙醚、异丙醚-丙酮(9 : 1)
挥发油	苯-氯仿(1 : 1)
黄酮及香豆素	甲醇-水(8 : 2 或 6 : 4) 石油醚-乙酸乙酯(2 : 1)
甾体及甾醇	苯或苯-乙酸乙酯(9 : 1 或 2 : 1) 氯仿-乙醇(96 : 4) 苯-异丙醇
生物碱	苯-乙醇(9 : 1) 氯仿-丙酮-丁醇-氨水(3 : 3 : 4 : 1) 氯仿-丙酮-二乙胺(5 : 4 : 1)
叶绿素	异辛烷-丙酮-乙醚(3 : 1 : 1) 石油醚-丙酮(4 : 6)

① 括号内为体积比。

如果所要分离的产品出得很慢，在考虑完全分离的情况下可以逐渐增加流动相的极性，让其形成溶剂的极性梯度，有利于产品的流出。

冲柱的溶剂如果可以不用氯仿、甲醇和苯等时尽量不用，因为氯仿对肝脏

有很大的损害作用，而甲醇能损害眼睛，苯可导致白血病。氯仿还能溶解少量的硅胶，冲柱后最后所得到的分离物往往还需要用其他溶剂再溶解以便除去硅胶。在一般的有机溶剂中，丙酮、乙酸乙酯以及甲苯等的毒性相对较小。

除了上述因素外，在选择冲洗溶剂时我们还要尽量避免选择高黏度以及高沸点的溶剂。高黏度的溶剂会严重影响冲洗溶剂的流速，可使分离速度变得很慢；高沸点的溶剂会给后面所要收集馏分的浓缩带来麻烦，因为收集馏分少则几百毫升，多则数升乃至更多，而且有些目标分离物组分还并不一定耐高温。我们可以想像，即使要在实验室在较低温度下把 1~2L 水溶液中的水分通过减压蒸馏在较短的时间内除去都还是比较麻烦的，对于沸点更高的溶剂减压蒸馏就更麻烦了！

在样品能被充分分离的前提下，还要考虑尽量少用硅胶，因为硅胶会吸附一部分样品，使被分离的样品损失。

5. 上样

在柱色谱分离中，样品的溶解也是十分重要的。我们通常希望能用较少的溶剂溶解较多的样品。理想的情况是冲洗溶剂对样品有大的溶解度，这样就可以直接选取冲洗溶剂溶解样品。

但在很多情况下样品也许难溶于移动相，这时可以选择比移动相极性低的易溶有机溶剂对样品进行溶解，然后上样。由于溶解溶剂的极性比流动相低，因此其对流动相的极性影响很小，即使多用一点溶剂进行溶解样品进样，也不会对系统有大的影响。

但还有少数情况是冲洗溶剂及低极性溶剂对样品的溶解度都较小，不能满足制样的要求，这时只能选择高极性的易溶解溶剂了。由于溶解溶剂的极性比冲洗溶剂高，不能再用前面的方法进样了。因为少量高极性溶剂的引入，足以引起整个溶剂系统的性质发生大的变化。

正确的操作应该是：用一定量的极性强的良性溶剂溶解样品，然后加入样品质量 20 倍量的硅胶，使样品均匀涂渍在硅胶上，利用旋转蒸发仪让硅胶上的溶剂全部挥发去尽后，再将它装于色谱柱柱床的顶部。

无论上述按哪一种方式进样，进样的体积也是一个比较重要的因素。如果样品进样体积过大，会使色谱柱中样品柱塞太长，造成本来可以分开的成分部分重叠，甚至根本就分不开；如果样品浓度太大，尤其是一些植物有效成分的浸膏或者一些生物样品，其可以在柱中形成胶冻状，使冲洗溶剂很难通过样品柱塞，严重时甚至让冲洗溶剂在柱中根本无法流动。

6. 冲洗

通常总是选择比硅胶体积大 20% 以上的色谱柱进行层析。这是因为一般的柱色谱操作通常需要几个到十几个小时，所耗溶剂一般需要几百毫升到几

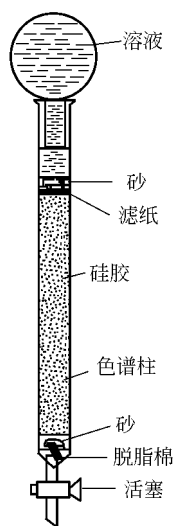


图 3-8 冲洗溶剂加入示意图

升。尤其是植物化学研究，有时将多达上百克的植物浸膏加于柱中，按照非极性、中等极性、高极性的溶剂顺序，用多种冲洗溶剂分别进行冲洗，溶剂消耗可超过 10L，冲洗时间常常长达一周、二周甚至更多。在分离操作中，始终应该保持流动相液面高于硅胶面，这样可以防止空气进入色谱柱，所以必须空出一定的色谱柱空间来装冲洗溶剂，否则会使我们寸步不能离开。为了在色谱分离操作中能有更多的空余时间，还可以利用下面操作（图 3-8）让装置能容纳更多的冲洗溶剂。

具体的操作为，先让色谱柱用冲洗溶剂接近填满（但不能填满，留出后面烧瓶倒置于柱中所需占用的体积），然后取一圆底烧瓶装满冲洗溶剂，随后将盛满溶剂的烧瓶迅速倒置于色谱柱上，平口保证没于柱中液面之下。这时通过大气压的作用，可以支撑烧瓶中的溶剂不会溢出色谱柱，当然也通过外面大气压的调节，将烧瓶中的溶剂缓缓地补充于色谱柱中。

7. 蒸发浓缩

由于经典柱色谱最后合并的溶剂量比较大，而有些组分又不耐高温，所以实验室有一台旋转蒸发仪是比较方便的。国产简易一点的该设备大约 3 千元左右，进口的较贵，一般要上万元，但进口设备往往在溶剂回收率以及连续十几个小时运转方面显现出较好的性能。尤其是做植物化学研究的科研人员，能投资一台进口设备还是值得的。图 3-9 是常见的旋转蒸发设备图。

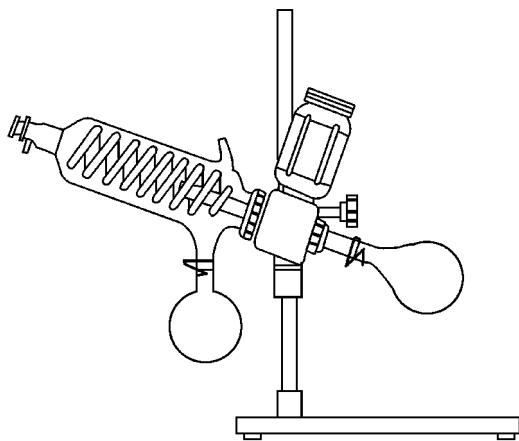


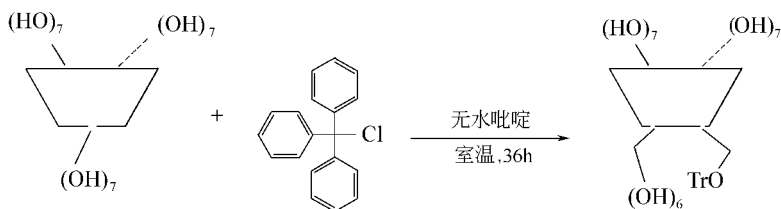
图 3-9 旋转蒸发仪

8. 重结晶

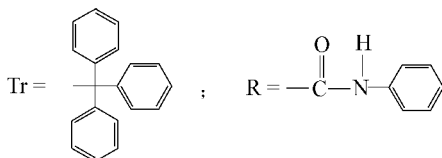
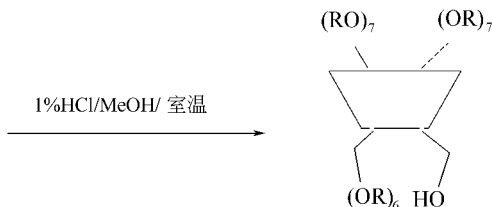
原则上通过硅胶柱色谱分离后的目标物已经具有相当高的纯度，但实际上可能种种原因使得产品并不是很纯，如由于大剂量的有机溶剂的浓缩，有机溶剂中原本含量很低的杂质浓度得到了积聚，使得在样品中得到检出；另外我们所购买的商品硅胶也可能含有一些不纯物，而硅胶的用量又比较大，这也可能引入杂质。因此在必要的时候可以考虑对所得成分进行重结晶，让待分离物达到我们希望得到的纯度。如果得到的样品还希望进一步作结构分析或元素分析，那得到的样品还需要进行干燥处理，需将样品置于真空干燥器中或在装有五氧化二磷的真空加热装置中进行干燥。

9. 硅胶柱色谱应用实例

作者曾合成单 (6-羟基)- β -环糊精的衍生物，反应方程式如下：



环糊精



最后的反应混合物经适当分离提纯后仍还有少量的双(6-羟基)- β -环糊精的衍生物,该粗产品利用硅胶为分离材料,流动相选用正己烷-乙酸乙酯(体积比=7:3),最后所得纯化合物经红外、核磁以及元素分析证实为单(6-羟基)- β -环糊精。

二、氧化铝吸附柱色谱

在吸附柱色谱中,除了硅胶吸附柱色谱外,应用最多的当数氧化铝吸附柱色谱。

氧化铝与硅胶色谱柱相比在性能上有如下优点:氧化铝的吸附能力通常比硅胶的吸附能力更强,因此非常适用于一些亲脂性成分的分离;氧化铝有比硅胶更大的样品处理量,相同重量的氧化铝可以上更多的样品。

在大多数情况下,我们所使用的是碱性氧化铝,它可直接由氢氧化铝高温脱水制得。一般事前筛去过粗及过细的颗粒,用水洗至提取液 pH 值为 9~10 为止,再经加热活化即可使用。碱性氧化铝常应用于碳氢化合物的分离,能从碳氢化合物中除去含氧化合物,它还能对某些色素、甾族化合物、生物碱、醇以及其他中性、碱性物质进行分离。中性氧化铝吸附剂的制备一般是采用酸处理法,在氧化铝中加入一定量的 5% 乙酸溶液,在搅拌下煮沸 10~20min,放置后倒去上层清液,再用水洗涤,除去多余的乙酸,最后在布氏漏斗上用水洗涤数次,抽干并干燥后,进行高温活化,残留的乙酸在活化过程中挥发。中性氧化铝水提取液的 pH 值为 7.5,适用于醛、酮、醌、某些苷及酸碱溶液中不稳定的化合物,如酯、内酯等化合物的分离,因此使用范围比较广泛。酸性氧化铝的生产是取工业氧化铝用 2mol/L 盐酸处理,使混合物呈酸性反应,倒去上层清液,用热水洗至溶液呈刚果红紫色,滤取氧化铝,加热活化即得。酸性氧化铝提取液 pH 值为 4~4.5,适用于天然及合成酸性色素以及某些醛、酸的分离。

氧化铝的活性与含水量的关系极大,在一定的温度下除去水分能使氧化铝活化,在氧化铝中加入一定量的水又可使其活性改变。氧化铝活性与含水量的关系如表 3-3 所示。实验室一般对氧化铝事先加热处理,得到所需要的活性氧化铝,然后供实验研究用。

表 3-3 氧化铝含水量与活性的关系

含水量/%	氧化铝活性	含水量/%	氧化铝活性
0	I 级	10	IV 级
3	II 级	15	V 级
6	III 级		

氧化铝活性的标定,通常用 Hermanek 法:分别称取偶氮苯、甲氧基偶氮

苯、苏丹黄、苏丹红（苏丹Ⅲ）和对氨基偶氮苯，分别溶于四氯化碳中，摇匀备用。

标定方法：取染料溶液点于待测活性的氧化铝薄层板（干法制板）上，用四氯化碳展开后，测量 R_f 值。只要在薄层板上测得被分离化合物的 R_f 值，将其与相关文献的标准数据进行对照，就可知道氧化铝的活度情况。在大多数情况下，需要控制氧化铝的活度范围在Ⅲ～Ⅳ级，因为太高的活性会使样品发生不可逆吸附，甚至导致化合物的结构变化；而太低的活性，会使样品很难发生吸附机理的分离。

在一般的实验情况下，都是直接购买商品氧化铝进行柱色谱分离，不再对商品氧化铝进行任何处理。在干燥的地方，商品氧化铝也不一定需要活化处理，可以直接使用就能满足一般分离的要求。对于湿度比较大的地区，如果将氧化铝在大约 120℃ 烘 0.5h 就基本上能保证一般的活度要求，也没有必要一定要对氧化铝的活性进行烦琐的测定。

氧化铝吸附色谱的操作基本上与硅胶相同，色谱柱的内径与柱长的比例一般在 (1 : 10) ~ (1 : 20) 之间。对于初学者装柱最好使用湿法，因为该法操作比较简单，并且重复性相对较好。一般是先量取一定体积的溶剂于色谱柱中，将色谱柱的活塞打开，使溶剂滴入接收器内，同时将氧化铝的悬浊液在搅拌下慢慢地、均匀地、连续地加入，直到加完为止。氧化铝加入速度不宜太快，否则会带入空气泡而破坏色谱柱，必要时可在色谱柱外轻轻给予振动。待氧化铝加完后，仍使柱内溶剂继续流动直至氧化铝柱上面的溶剂全部滴入接受器内（但一定不能让柱内液面低于氧化铝面，否则将会导致空气的进入，使柱子的填充失败），正确量取接受器内的溶剂量可以计算氧化铝柱内包含的溶剂体积。这样，在色谱操作过程中，就能主动掌握大致在啥时候开始收集馏分。当变换溶剂的时候，就可知道新溶剂大致从何馏分开始。氧化铝的用量一般采用样品量的 20~100 倍。一般将样品溶于有机溶剂中，轻轻注入已准备好的氧化铝柱上面，勿使氧化铝柱面受到扰动，否则将影响色谱分离效果。吸附在氧化铝上的物质的洗脱能力与氧化铝活性、被吸附物质的性质、温度及溶剂的性质和浓度有关。就溶剂而言，极性溶剂的洗脱能力较非极性溶剂大，所以逐渐增加溶剂的极性，可使吸附在氧化铝柱上的不同化合物逐个洗脱，达到分离的目的。为了防止溶剂的挥发及减少溶剂加入次数，色谱柱上覆以玻璃瓶，内储色谱用溶剂。从理论上讲，氧化铝柱色谱分离完成后，可以除去柱上端含有深颜色的氧化铝，用甲醇、稀乙酸、氢氧化钠溶液及水洗涤，再经高温活化处理，氧化铝柱填料可重复使用，活化后的氧化铝比使用后的颜色稍淡。但在实际操作过程中，由于层析用氧化铝的价格较低，通常一次性使用，一般并不进行再生处理。氧化铝柱层析的详细操作步骤和原理与硅胶吸附柱色谱基本上相同，若要

深入了解该部分的操作技术和技巧，请参考本章硅胶吸附柱色谱部分。

三、活性炭吸附柱色谱

活性炭一般以木材、果壳或煤等含碳物质为原料制备，也可将含有细孔结构的碳素材料和焦炭在惰性气体中高温下煅烧得到，还可把含有细孔结构的碳素物用二氧化碳、水以及空气等混合气体在较缓和的条件下活化制得。

活性炭的特点是具有非极性的表面，它的比表面积一般在 $700 \sim 1500 \text{ m}^2/\text{g}$ 之间，因此它的吸附容量比较大。活性炭孔径结构可分为微孔、中孔和大孔三种，有效半径分布分别在 $1 \sim 2000 \text{ nm}$ 的范围，活性炭的吸附性能与这些孔径结构以及它们的化学组成密切相关。常见的活性炭中一种为粉末状活性炭，色谱中一般采用化学纯的等级，其吸附力及吸附量特别大，但由于其颗粒太细，在色谱过程中对流动相的阻力太大，往往需要加压或减压操作，手续较繁。另外一种为颗粒状活性炭，颗粒状活性炭其颗粒较前者大，在色谱过程中流速易于控制，勿需加压或减压操作。

在色谱分离时，正确选择适当吸附力的活性炭比较重要。前面的二种活性炭类似于活性不同的一级、二级品。在大多数情况下，一般选择使用第二种，而尽量避免应用第一类活性炭。一方面颗粒太细操作不便，另一方面其吸附力太强，许多物质吸在上面极难洗脱。活性炭在水溶液中的吸附能力最强，在有机溶剂中的吸附力较弱。在一定条件下，对不同物质的吸附力也不一样，通常其对极性基团多的化合物的吸附力大于极性基团小的化合物，对芳香族化合物的吸附力大于脂肪族化合物，对分子量大的化合物的吸附力大于分子量小的化合物。

柱色谱的操作

(1) 装柱 通常利用湿法装柱，因活性炭在水中吸附力最强，所以装柱溶剂选为水。先在色谱柱中加入少量的砂，使砂面平整，然后加入一定量的水于柱中。活性炭以蒸馏水浸泡，不断搅拌除去活性炭中的气泡。打开色谱柱活塞，将活性炭连同水在搅拌下慢慢地倒入柱中，让其自然沉降，装至所需体积。粉末状活性炭因为柱中阻力太大，流速太慢，可将其与硅藻土按 $1:1$ 的比例混合后，再用蒸馏水调匀进行装柱。

(2) 上样 样品尽量用水溶解，浓度控制在 $25\% \sim 50\%$ 之间。由于活性炭的表面积很大，所以一般每 100 mL 活性炭可上样 $5 \sim 10 \text{ g}$ 。如果一些样品在水中的溶解度差，则可加入一些与水混溶的有机溶剂，如甲醇、乙醇或丙酮等，但这时样品体积不可太大，上样量也该相应地减少，否则影响分离效果。对于粉末状活性炭柱待样品上柱后，色谱管顶端应该连接一个加压泵或下端连一减压泵，以帮助色谱分离的顺利进行。

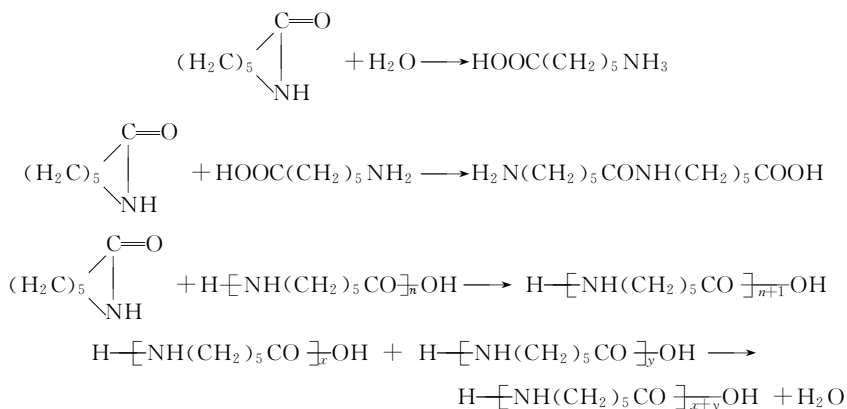
(3) 冲洗 洗脱溶液一般采用水或不同浓度的极性有机溶剂与水的混合液，

如乙醇水液、丙酮水液、乙酸水液以及苯酚水溶液等洗脱。对于强保留的组分，还可使用 3.5% 氨水洗脱。因活性炭来源较易，价格便宜，一般不回收使用。

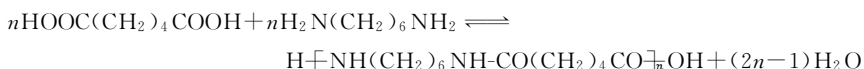
活性炭柱色谱尤其适用于分离水溶性物质如氨基酸、糖类及某些苷类，它是分离水溶性物质的主要方法之一。由于活性炭对样品负载量大，分离效果较好，制备较易，且价格便宜，所以适用于大剂量的制备性分离。但是，由于活性炭的生产原料种类很多，制备方法及工艺不一，产品的吸附力不像氧化铝、硅胶那样容易控制，并且目前仍无测定活性炭活性级别理想的方法，因而其在色谱分离中的应用并不广泛。

四、聚酰胺吸附柱色谱

聚酰胺是一类化学纤维，商品名：锦纶、尼龙。1955 年首先发现，聚酰胺色谱能分离酚类物质。聚酰胺的种类繁多，色谱中常用的有锦纶 6 和锦纶 66。锦纶 6 由己内酰胺单体聚合而成，聚合反应包括己内酰胺的水解开环、开环聚合以及和大分子官能团的缩聚反应：



锦纶 66 是由己二酸与己二胺聚合而成的：



锦纶 6（聚己内酰胺）和锦纶 66（聚己二酰己二胺）有较好的亲水、亲脂性能，可分离一些水溶性物质和一些脂溶性的物质，如酚类、硝基化合物、醌类、氨基酸、核酸、杂环化合物等等。锦纶 6 和锦纶 66 可溶于一些强酸，如浓盐酸、甲酸；微溶于一些弱酸，如乙酸、苯酚；但难溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、氯仿、苯等有机溶剂。其对碱较稳定，对酸的稳定性较差，尤其是温度高时会加快分解。色谱用的聚酰胺其分子量大小最好在 16 000~20 000 之间。分子量太小的聚酰胺，在常用有机溶剂中的溶解度较大，在处理过程中易被酸、碱破坏，因而不稳定，并且还易溶于洗脱剂污染被分离的样品。分子量太大

的聚酰胺，亲水性及可塑性较差，也不适合于色谱的分离应用。

聚酰胺分子中存在很多的酰胺基，其吸附机理主要来自于聚酰胺内的酰胺键，它们与酚类、酸类、醌类、硝基化合物等形成氢键，因而对这些物质产生吸附作用，这种作用可以用图 3-10 加以说明。

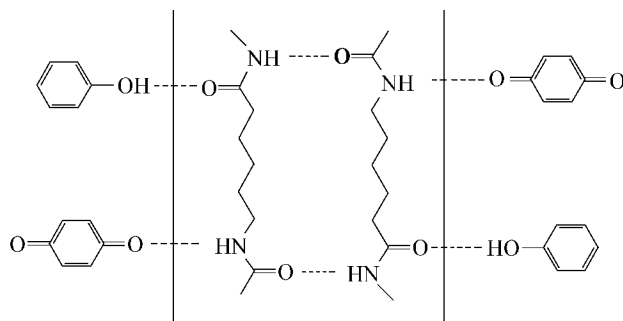


图 3-10 聚酰胺的氢键吸附作用

因此，酚类和酸类形成的氢键是靠其羟基（或羧基）与锦纶分子中酰胺键的羰基作用。芳香硝基化合物和醌类是靠其硝基（或醌基）于锦纶分子中酰胺键的游离氨基作用。一般在水中形成氢键的能力最大，在有机溶剂中较弱，在碱性溶剂中最弱。各种化合物由于与聚酰胺形成氢键的能力不同，聚酰胺对它们的吸附力的大小也不同。在含水溶剂系统中，一般认为有下列规律：①吸附能力的大小与形成氢键的基团的多少有关，基团越多，则吸附力越强。②氢键的位置与吸附力有很大关系。对位酚羟基的吸附力最大，其次是间位酚羟基，邻位酚羟基的吸附力最小。③羟基直接相连的共轭双键越多，则吸附力越大，反之吸附力越小。④分子内氢键的形成将减少化合物之间的吸附力。

除上述氢键吸附作用外，聚酰胺分子中的非极性的脂肪链也会在分离中发挥作用，例如，其可以分离一些很难与聚酰胺形成氢键的物质，如萜类、甾类、生物碱等，此时可以用极性的流动相，作用相当于反相色谱。当用非极性移动相，如氯仿-甲醇时，聚酰胺则作为极性固定相，其色谱行为类似正相色谱。因此用于聚酰胺色谱的溶剂系统主要分为两类：一类是水溶剂系统，另一类就是非极性溶剂系统。如果在各种溶剂系统中分别加入少量酸或碱，可分别克服分离酸碱时出现的“拖尾”现象，使色谱分离带变得集中。表 3-4 是一些用于聚酰胺的常见溶剂系统。

色谱用的聚酰胺粉一般直接购买商品使用。柱色谱操作为：

① 装柱：一般直接使用流动相进行湿法装柱。如果装柱溶剂的比重较大，则在装柱和分离过程中应该采用相应的措施，勿让聚酰胺粉上浮，因为聚酰胺的浮起会搅乱层带。

表 3-4 聚酰胺柱色谱常见的溶剂系统

被分离物	溶剂系统 ^①
黄酮类	氯仿-甲醇(94：6), 苯-甲醇-丁酮(60：20：20), 氯仿-甲醇-甲酸(60：38：2), 氯仿-甲醇-吡啶(70：20：10)
酚类	丙酮-水(50：50), 苯-甲醇-乙酸(45：10：5), 环己烷-乙酸(93：7), 10% 乙酸
糖类	正丁醇-丙酮-水-乙酸(6：2：1：1), 乙酸乙酯-甲醇(8：2)
生物碱	环己烷-乙酸乙酯-正丙醇-二甲基胺(30：2.5：0.8：0.2), 水-乙醇-二甲基胺(88：12：0.2)
氨基酸衍生物	苯-冰乙酸(9：1), 甲酸-水(2：98), 乙酸乙酯-甲醇-冰乙酸(20：1：1), 0.05mol/L 磷酸三钠-乙醇(3：1), 氯仿-乙酸(8：2)
甾、萜	己烷-丙酮(10：3), 氯仿-丙酮(5：1)

① 括号内为体积比。

② 加样：聚酰胺具有较高的样品容量，100mL 聚酰胺可上样 2.0g 左右。尤其是利用聚酰胺除去样品中鞣质的时候，样品可以加至鞣质形成的橙红色带达到柱的近底端。样品通常用流动相溶解，浓度最好控制在 20%~30%。对于难溶解的样品可以先用良溶剂如甲醇、乙醇、丙酮、乙醚等易挥发溶剂溶解，然后利用聚酰胺吸附，减压蒸去溶解的溶剂，最后将附有样品的聚酰胺装入柱中。

③ 洗脱：聚酰胺色谱的洗脱剂通常可以利用聚酰胺薄层进行筛选，使用得较多的流动相是水、由稀至浓的乙醇，或氯仿、氯仿-甲醇、甲醇依次洗脱。对于强保留的组分，可采用 5%氨水洗脱。若用聚酰胺分离芳香硝基化合物或 DNP-氨基酸，因其吸附很牢，可用二甲基甲酰胺-乙酸-水-乙醇（5：10：30：20）冲洗。

④ 聚酰胺粉的再生：聚酰胺粉的再生一般用 5%氢氧化钠溶液进行洗涤至溶液接近无色为止。

聚酰胺色谱的应用比较广泛。它是分离黄酮及某些酚类物质的最有效的方法之一。由于大分子鞣质在聚酰胺上的吸附是不可逆的吸附，因此其对鞣质的吸附性非常强，可以利用聚酰胺将植物粗提取物中的鞣质除去。

第二节 分配柱色谱

分配色谱通常是以一种多孔性的物质表面吸附一种具有一定黏度的有机液体相，此液体相在色谱过程中能始终固定在该多孔性支持体上，从而构成色谱

分离过程中的固定相，另用一互不相溶的溶剂作为流动相进行洗脱。分离物质的难易主要决定于待分离物质在两相中的分配系数的差值，分离的实质，与萃取分离相同。

分配色谱中使用得最多的多孔支持剂（又叫载体）仍是硅胶，除此之外，还可以使用硅藻土、纤维粉等。分配柱色谱的操作与一般吸附柱色谱操作并无本质的不同。首先是固定液在载体表面的涂渍，将预先根据待分离物性质选定的固定液，如水或者其他极性有机溶剂加入到载体中，让固定液均匀地涂渍在载体的表面，整个过程要防止载体的破裂、固定相颗粒的团聚以及涂渍的不均匀等。色谱柱通常利用湿法装柱，装柱使用的溶剂一般使用流动相，该流动相装柱前应用固定液饱和，饱和操作可将固定液和流动相置于一个分液漏斗中充分地振动，使两相充分接触直至饱和并达到平衡，这样可以避免装柱过程中流动相冲掉或者损坏固定相表面的固定液薄层。样品的溶解一般仍然是溶于流动相中，利用移动相洗脱色谱柱，按固定体积收集色谱柱中流出的溶剂，利用薄层分析检测后，将其分别进行合并和浓缩处理。

在分配色谱操作中，选择固定相和移动相的依据是样品在两相中的分配比，所谓分配比，是样品于移动相中的浓度/样品于固定相中的浓度，其含义是溶质在两相中的浓度比。流动相的选取的具体操作通常仍然是利用分配薄层色谱进行优化。实践证明，当分配比为 0.1~0.2 时分配色谱的分离效果较好。如果分配比太大，则样品很快从柱中洗脱，分离效果较差，如分配比太小，样品在柱中的移动速度又太慢，使分离时间加长、溶剂使用量增多，流出的组分浓度很低，甚至不经过浓缩难以检测。另外，在对色谱柱进行洗脱的时候，移动相溶剂务必用固定液事先饱和。固定相制备过程中，载体与固定液的比例常为 1: (0.5~1)，即色谱分离时载体有相当于本身重量 50%~100% 固定相溶剂，因为固定液在载体表面附着的量越多，其样品容量越大，越利于制备性分离；但如果固定液的量太高，又会使固定液在载体上的附着稳定性产生问题。样品的上样也根据具体的情况具有不同的形式，如样品能溶于移动相溶剂之中，可直接利用移动相溶解样品，加入柱顶进行洗脱。如果样品难溶于移动相，易溶于固定液，则可用少量固定液溶解样品，利用载体吸着，然后装于柱顶随后再冲洗。如果样品在两相中溶解均不大，则可溶于适当溶剂，拌于干燥的载体上，减压蒸发掉溶剂，再加入 50%~100% 的固定相混合均匀再上柱。由于分配色谱固定相的样品容量比吸附色谱的小，所以分离样品时支持剂的用量一般较吸附色谱大，通常为 1: (100~1 000)。并且移动相流速宜慢些，以免冲刷掉固定液层。待分离样品在两相溶剂中的分配系数受温度的影响较大，必要时可利用恒温装置，保持恒定的操作温度，得到好的分离结果。

对于分配色谱溶剂系统的选择，与前面几节介绍的一样，首先参考有关期

刊和手册中报道的溶剂系统，然后进行完善仍是首选办法。表 3-5 是一些常见分配色谱溶剂系统选择实例。

表 3-5 一些常见分配色谱溶剂系统

待分离物	固定液	冲洗溶剂
水溶性生物碱	水或磷酸缓冲溶液	丁醇
	磷酸缓冲溶液	乙酸乙酯
苷类	水	氯仿或乙酸乙酯
	水	乙酸乙酯
酚性化合物	水	环己烷
有机酸	0.025mol/L 硫酸	环己烷-氯仿
	磷酸缓冲溶液	氯仿-乙醚
甾体化合物	水	石油醚
	正丁醇	环己烷
	乙二醇	甲苯
	甲酰胺	异丙醚

分配色谱往往适用于水溶性及极性较大的生物碱、有机酸、酚、糖、氨基酸、强心苷、皂苷等，它在分离一些水溶性物质、亲水性物质以及一些极性较强的化合物时，尤其有效，因此分配色谱恰好能部分补充一般吸附色谱的一些不足。对于某些非极性化合物如甾体、油脂等，如果采用反向分配色谱的模式也能进行分离。由于分配色谱的互不相容的两相液体选择的范围较大，因此该方法赋予了它特有的灵活性，可以解决一些其他方法较难解决的分离问题。但毕竟分配色谱样品容量相对较小，固定相的制备以及流动相的饱和比较麻烦，因此在吸附色谱能解决问题时，一般还是优先使用硅胶或氧化铝吸附柱色谱。

第三节 萃取柱色谱

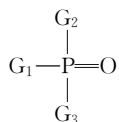
分配柱色谱的另外一种特殊的模式是萃取柱色谱，一般是将有机萃取剂或络合剂等吸附在惰性载体上，利用流动相，如酸、碱、盐等溶液作洗脱剂来分离物质的一种色谱法，它是将溶剂萃取法和色谱法相结合而成的分离技术之一。其首先应用是在 20 世纪 50 年代末把磷酸三丁酯涂在硅胶柱上，以 $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}$ 作为流动相，成功地分离了锆和铌，此后，萃取色谱就获得迅速发展，它非常适用于金属离子混合物的分离，是其他经典柱色谱的一个很好的补充。

在萃取柱色谱中，被分离物质从柱顶往下移动的过程，可看作分离组分不断在有机相和水相间进行萃取和反萃取的过程。分配比小的离子，优先被淋洗下来，而分配比大的离子后被淋洗下来。基于流动相和固定相的相对强度，萃取色谱可以分为两类。若固定相的极性较强，流动相的极性较弱，常称正相萃

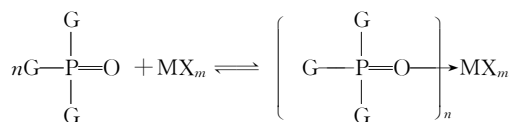
取色谱；若固定相极性较弱、流动相的极性较强，常称反相萃取色谱，其出峰顺序与正相萃取色谱相反。

在萃取色谱中常用的载体是疏水性硅胶、氧化铝、硅藻土、聚苯乙烯、聚四氟乙烯等，并且已经从溶剂萃取研究的大量资料中，获得了许多可作为固定相的萃取剂，其中包括高分子胺和酸性磷的萃取剂、中性萃取剂尤其是中性磷萃取剂以及螯合萃取剂。

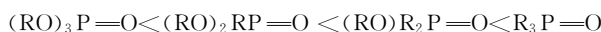
中性磷萃取剂的通式是：



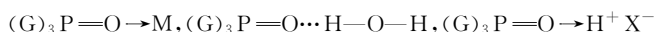
其中基团 G 代表烷基 R、烷氧基 RO 或芳香基， $-P=O$ 是萃取功能基团，它和金属盐类形成的萃合物是通过氧原子上的孤对电子和金属原子生成配位键。



配位键 $O \rightarrow M$ 越强，则 $(G)_3P=O$ 的萃取能力越强。并且上述反应为一可逆反应，在一定的酸度下，可以让反应向逆方向进行，这就使得被分离金属离子可以在色谱柱中进行多次萃取和反萃取，从而让金属离子的混合物得到分离。由于萃取剂中烷氧基中的氧有较大的电负性，所以中性磷萃取剂的萃取能力是按下列顺序增加的：



如果将 $(RO)_3P=O$ 中的 R 由烷基改为吸电子能力较强的芳香基，则其萃取能力减弱。中性磷萃取剂的萃取反应都是通过 $\equiv P=O$ 键的氧原子与金属原子或 H 配位或生成氢键



酸性萃取剂绝大多数是有机弱酸并常常能与金属离子生成螯合物，所以又叫螯合萃取剂，它是萃取化学中的又一类主要的萃取剂，它在两相中的平衡关系可以简单地概括于图 3-11 中。

图 3-11 中用 HA 表示酸性萃取剂，其在水相中离解出的酸根阴离子可以与水相的金属离子发生配位反应，反应方程式可表示为



因此易溶于有机相的酸性萃取剂可以与水相中的金属离子络合生成易溶于有机相的络合物。同时该反应也是一个可逆的反应，增加水相的酸性，又可以将有机相中的金属离子反萃入水相中，该类萃取剂的这种性质也正好适合于萃

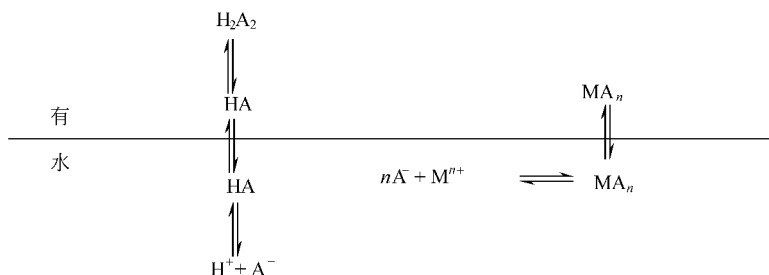


图 3-11 酸性萃取剂在两相中的平衡

取柱色谱。对于上述反应的平衡常数可表示为

$$K = (\text{MA}_n)_o [\text{H}^+]^n / (\text{HA})_o^n (\text{M}^{n+})$$

分配比表示为

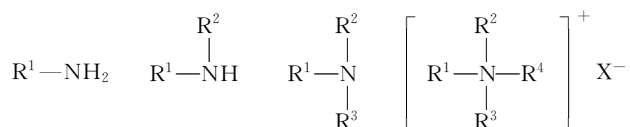
$$D = K (\text{HA})_o^n / [\text{H}^+]^n$$

对上式取对数为

$$\lg D = \lg K + n \lg (\text{HA})_o + npH$$

该对数式为酸性萃取体系最基本的关系式，用它可进行萃取反应的理论研究，确定萃取体系的萃取机理。由于酸性螯合剂大多是固体，若用其作固定相，必须将其先溶于合适的有机溶剂中，再涂渍于载体表面之上，但这种固定相的样品容量比较小。

胺性萃取剂是萃取化学中又一个大类的萃取剂，它们是氨的烷基分别取代物，即氨分子中三个氢逐步地被烷基取代，生成三种不同的胺及四级铵盐：



该类型属于离子缔合萃取反应机理，一般由萃取剂与酸作用生成的阳离子与被萃阴离子通过静电作用缔合而成为中性物能从水中转移至有机相。用作萃取剂的有机胺的相对分子质量通常控制在 250~600 之间。因为相对分子质量小于 250 的烷基胺在水中的溶解度较大，容易导致萃取剂在水相中的溶解损失。相对分子质量大于 600 的烷基胺则多数是固体，在有机溶剂中的溶解度较小，萃取的容量低。伯、仲、叔胺属于中等强度的碱性萃取剂，它们必须与强酸作用生成胺盐阳离子才能萃取阴离子，并且在伯、仲、叔胺萃取剂中以叔胺应用较多，这主要是叔胺在水中溶解度较小的缘故。该类萃取反应显然与溶液的酸度密切相关，只要掌握好流动相的酸度范围，也可很好地实行待分离物的萃取色谱分离。

萃取体系有多种分类方法，徐光宪院士提出的广泛采用的分类法如表 3-6

所示。

表 3-6 徐光宪萃取分类法

名 称	举 例
简单分子萃取体系	$I_2/H_2O/CS_2$
中性络合萃取体系	$Zr^{4+}/HNO_3-NaNO_3/TBP-C_6H_6$
螯合萃取体系	$Th^{4+}/pH=4\sim 5/HAn-CHCl_3$
离子缔合萃取体系	$Re(NO_3)_3/NH_4NO_3/R_3CH_3N^+NO_3^-$
协同萃取体系	$Th^{4+}/NaNO_3-HNO_3/\left. \begin{matrix} HnA \\ TBP \end{matrix} \right\}CHCl_3$
	$UO_2^{2+}/HNO_3/\left. \begin{matrix} HPMBP \\ TBP \\ (C_6H_5)_2SO \end{matrix} \right\}C_6H_6$
高温萃取体系	$RE(NO_3)_3/LiNO_3-KNO_3(熔融)/TBP-多联苯(150^{\circ}C)$

在固定相的制备中载体的涂渍可用溶剂蒸发法，方法适用于粒度大于 20 μm 的干装柱的填料的制备。操作可以在旋转蒸发器中进行，先将固定液或者溶有萃取剂的有机溶剂倒入旋转蒸发器中，然后加入载体，让彼此充分混合。所选溶剂应该具有较低的沸点，最好无毒、无臭。开动蒸发器，在适当的真空度下旋转蒸发，如果溶剂的沸点较高，可以适当加热，直至溶剂全部挥发掉即可。

展开剂的选择必须考虑到与固定相不互溶，冲洗溶剂系统的选择一般根据薄层色谱进行优化。另外，流动相的低黏度可以提高柱效，也可提高渗透性。流动相中酸的种类、酸的浓度、温度、进样量等对分离皆有影响。

萃取色谱柱的基本操作与前节的分配色谱相同。首先装柱，通常也是用湿法；然后加样，流动相最好对样品具有较大的溶解度，样品必须完全溶解后才能上柱。如果样品难溶，可选一良溶剂先溶解样品，然后用载体吸附于表面，挥发去溶剂后装入柱中。第三是淋洗，为了减少固定相因溶于流动相而引起的损失，与分配色谱一样，淋洗剂必须预先用体系中的固定相萃取剂预饱和之。详细的操作过程可参考前面的类似部分。表 3-7 是一些常见的萃取柱色谱分离实例。

表 3-7 一些常见的萃取柱色谱分离

被 分 离 物	固 定 相	流 动 相
Zr, Nb	磷酸三丁酯	HNO ₃ 水溶液
As, Se	磷酸三丁酯	HCl 水溶液
Zr, Ti	二壬基萘磺酸	9mol/L HCl
碱金属元素	2,6,8-三甲基-壬基磷酸	0.04mol/L LiNO ₃ -0.01mol/L HNO ₃
Ni, Co, Fe	三正辛胺	HNO ₃ 水溶液
Cu, Ag, Zn, Cd, Hg	三辛基氧膦	HClO ₄
Sb, Sn	甲基异丁基酮	8mol/L HCl
Pt, Pd, Au	苯甲酰丙酮	H ₂ SO ₄
Al, Ga, In, Tl	二-(2-乙基己基)磷酸	HCl
稀土	苯基膦酸单-(2-乙基己基)酯	HNO ₃ 水溶液

第四节 离子交换柱色谱

离子交换柱色谱是利用离子交换剂来进行分离的柱色谱方法。最早使用的离子交换剂是1903年使用的天然的无机化合物硅铝酸钠（泡沸石），但由于其交换容量、纯度及物理性质方面的一些缺陷以及高分子化学突飞猛进的发展，目前基本上都采用合成的离子交换树脂。1933年首先用人工方法制造了酚醛类型的阳、阴离子交换树脂，1945年美国人迪阿莱里坞（D. Alelio）发表了关于聚苯乙烯型强酸性阳离子交换树脂及聚丙烯酸型阳离子交换树脂的方法。另外也有在纤维素或多聚糖上人工引入交换基所形成的离子交换剂。离子交换色谱法除能用于复杂离子混合物的分离外，还能用于微量物质的富吸以及不纯水或污水的净化处理等。

一、离子交换色谱树脂

离子交换树脂一般呈球状或无定形粒状，每个树脂颗粒都由交联的具有三维空间立体结构的网络骨架构成，在骨架上连接许多可以活动的功能基，该功能基上带有相反电荷的可供交换的离子。其作用原理是利用固定在立体网络骨架上功能基所带的可交换离子，使其与相接近的外围离子进行可逆的反复交换。由于不同的离子在树脂上的交换能力不一样，因而使得被分离离子在色谱柱中随着流动相移动的速度也不一样，通过这种方法，就可使一个复杂的离子混合物得到分离。离子交换树脂主要分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂两大类，根据树脂酸碱强度的大小，各类树脂又可分为强、中、弱等类型。

离子交换树脂的合成主要是利用高分子化学的加聚反应。一般首先合成高分子离子交换树脂的骨架，然后在骨架上添加上功能基。如果需要得到大孔型树脂，则在聚合过程中加入致孔剂；如果不添加致孔剂，则得到凝胶型的树脂。

在高分子离子交换树脂中，其骨架大多数采用交联聚苯乙烯类，它是二乙烯苯交联的聚苯乙烯高聚物，结构稳定，骨架中的苯环可以通过磺化反应制备强酸性阳离子树脂；通过膦化制磷酸阳离子树脂；通过氯甲基化后，再与各种胺反应，可以得到各种阴离子树脂；交联的聚苯乙烯在氯甲基化后还可制得多种具有特殊性能的离子交换树脂。

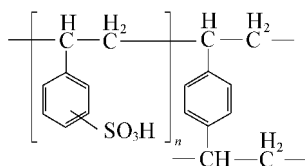
少数离子交换树脂的骨架可由交联聚丙烯酸类树脂构成。丙烯酸或甲基丙烯酸及其甲酯类可以与二乙烯苯或甲基丙烯酸乙二醇酯等交联剂进行悬浮共聚反应，得到性能良好的骨架结构。该骨架通过水解、胺解等功能基反应后，可以制得弱酸性阳离子树脂及各种阴离子树脂。

(一) 阳离子交换树脂

阳离子交换树脂分为强酸型、中强酸型以及弱酸型三种。强酸型阳离子交换树脂中的交换基团是磺酸 ($-\text{SO}_3\text{H}$)、中强酸型阳离子交换树脂的交换基团是磷酸 ($-\text{PO}_3\text{H}_2$)、弱酸型阳离子交换树脂的交换基团是羧酸 ($-\text{COOH}$) 或酚性羟基 ($-\text{OH}$) 等酸性基团。

1. 强酸型阳离子交换树脂

强酸型阳离子交换树脂主要是以聚苯乙烯为骨架，其以苯乙烯为单位在整个三维空间延伸而形成具有网状结构的母体，二乙烯苯作为其交联剂。母体的苯环上连接许多 $-\text{SO}_3\text{H}$ 而成为它的活性基团。树脂一般为黑褐色，其化学性能稳定，使用寿命可达 5~10 年，能较长时间抵抗稀氢氧化钠、高锰酸钾、过氧化氢水溶液或稀硝酸的侵蚀。其不溶于水和常见有机溶剂，耐热性可以高达 100°C 左右。

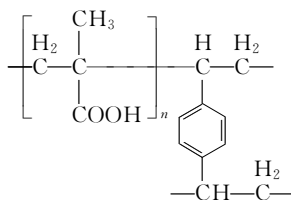


其交换反应可以表示为



2. 弱酸型阳离子交换树脂

弱酸型阳离子交换树脂的骨架有芳香簇和脂肪簇两种，但以脂肪簇的产品较多。脂肪簇类型常用甲基丙烯酸和二乙烯基苯聚合，其功能基团是 $-\text{COOH}$ 。



弱酸型阳离子交换树脂的交换反应为



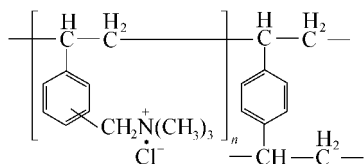
(二) 阴离子交换树脂

阴离子交换树脂通常包含有强碱型和弱碱型阴离子交换树脂，强碱及弱碱型阴离子交换树脂中的交换基团可分别是季胺、伯、仲或叔胺等碱性基团。

1. 强碱型阴离子交换树脂

强碱型阴离子交换树脂的骨架也为聚苯乙烯树脂，在骨架的苯环上连接有季铵作为离子交换的活性基团。这些强碱型树脂像强酸型阳离子交换树脂一样

对酸、碱和有机溶剂比较稳定，但不耐浓硝酸的氧化。其 OH 型比 Cl 型的耐热性差，超过 40℃ 就不稳定，所以一般商品都是以 Cl 型销售。

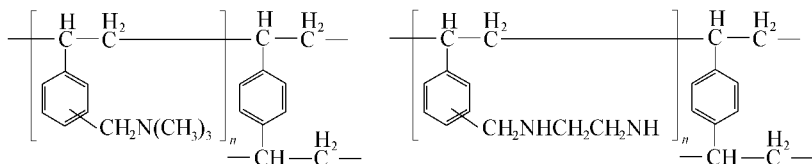


强碱型离子交换树脂的交换反应为

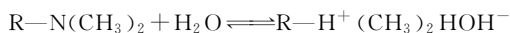


2. 弱碱型阴离子交换树脂

弱碱型阴离子交换树脂通常仍然是聚苯乙烯骨架，骨架的苯环上含有伯、仲或叔胺基团。含有叔胺基团的碱性较强，含有伯或仲胺基团的碱性较弱。强酸型及强碱型树脂的盐型较稳定，用水继续洗涤也不水解；但弱酸型及弱碱型树脂的盐型用水洗涤会逐渐水解。



弱碱型离子交换树脂的交换反应可表示为



除上述离子型交换树脂类型外，还有一些特殊类型的离子交换树脂，请参考其他的专著。

二、离子交换树脂的选用

在通常情况下，我们都是直接购买商品离子交换树脂进行的分离实验，树脂的合成需要专门的功能高分子合成技术。树脂的选用包括种类的选定、离子型式的选择以及交换量、颜色、形状、交联度、密度、化学和物理稳定性能的选择。

(一) 种类的选定

种类的选定就是阴或阳离子交换树脂种类的选定，如果被交换的是阳离子，则用阳离子交换树脂；如果被交换的是阴离子就用阴离子交换树脂。离子交换剂对交换化合物来说，解离常数大，酸碱性强者置换容易，但洗脱相对来说较难。解离离子价数愈高，电荷愈大，则它的吸附性愈强，愈易交换在交换树脂上。因此，我们还应对树脂交换功能基酸、碱强度进行选择。

(1) 对于中性盐体系，阴、阳离子的脱除要使用强酸、强碱树脂，要彻底

除去微量杂质离子时，也要用强型树脂。强碱树脂按功能碱性强弱分为Ⅰ、Ⅱ型两种，Ⅰ型碱性比Ⅱ型强，易与硅酸等弱酸作用，再生效率低。Ⅱ型强碱树脂不与比乙酸更弱的酸作用。

(2) 对于交换能力强的离子，因为洗脱再生困难，应采用弱酸性或弱碱性离子交换树脂。如一般有机碱交换能力都比较强，所以应使用弱酸性离子交换树脂。对于吸附能力强的多价金属、生物碱、链霉素等使用弱酸性树脂，既容易吸附，也容易洗脱。

(3) 在中性或碱性体系中，多价金属阳离子对于弱酸性阳离子交换树脂的交换能力比对强酸性阳离子交换树脂强，而且交换后用酸很容易洗脱。弱酸通常不能用弱碱性树脂处理，因为它们的盐水解度很大，逆反应容易发生，但能用强碱性树脂处理。

(4) 对于弱碱性体系中的阳离子交换，应该使用弱酸性阳离子交换树脂；反之，在弱酸中的阴离子，则可用弱碱性阴离子交换树脂。

总之，在树脂的选用过程中，既要重视离子的交换，还要重视离子的洗脱这两个方面的作用。

(二) 树脂离子型式的选择

对于中性盐溶液，如果在交换后体系生成盐，一般选用盐型弱酸或弱碱性离子交换树脂，因其有利于交换和洗脱，并且能保持体系中 pH 值不变。也可用混合的游离酸和游离碱型的离子交换树脂柱，但二者的总交换容量应该相等，这样产生的酸和碱可以刚好中和而被除去；在酸或碱存在下的离子，选用游离碱或游离酸型离子交换树脂比较有利于离子的分离；在盐存在下单独除去酸或碱，应该使用弱型树脂，因为使用强型，系统中的盐仍会继续交换生成酸或碱。

(三) 树脂颗粒、交联度及稳定性选择

第一，在柱色谱分离上，使用颜色较淡的树脂有利于分离过程中谱带的观察，树脂颜色的改变常常可以判断其性能的改变和含杂质的高低，因为一般在使用后，颜色变深。虽然离子交换树脂可以制备成无定形粒状、球状、棒、片、带、管、椭圆等，但商品合成树脂大部分制成珠状，色谱分离上应用的树脂应尽量圆润、均匀。一般的树脂产品粒度多在 20~80 目，特殊时也小到 200~400 目。树脂颗粒的大小亦会影响交换速度，颗粒小，表面积大，有利于与溶液中的离子接触，增加交换速度。实验室制备色谱所用的颗粒应该较小，而在工业色谱中，由于色谱柱直径很大，处理的样品量很多，可以使用较大颗粒度的树脂。

第二，聚苯乙烯树脂的交联度范围大多数在 1%~20%，一般常用的约为 8% 左右。交联度的大小可以改变交换树脂对交换物质的选择性，交联度

高,选择性好,但交换速度也显著减小。树脂的孔度也与交联度密切相关,孔度的含义一般包括孔容的多少和孔径的大小,其与树脂的一系列性能及应用都有密切关系。树脂的密度一般在 $0.4 \sim 0.8 \text{ g/mL}$ 。当处理相对密度较大的浓液体应特别注意选择合适的密度以免树脂会浮在液面。当阴、阳离子交换树脂组成混合床使用时,必须特别注意密度的选择,因树脂需要利用返洗法分别进行再生。如果树脂的粒度相同,则必须选择溶胀时密度差别约 20% 的树脂,有时两种树脂在水中差别不大,可以改变盐水或有机溶剂,使之分层。

第三,一般聚苯乙烯树脂对化学试剂的稳定性比缩聚方法得到的树脂好,阳离子比阴离子交换树脂好。聚苯乙烯树脂比缩聚方法得到的树脂耐热性也高,阳离子交换树脂比阴离子交换树脂耐热性也大,盐型树脂,特别是中性盐树脂耐热性比游离酸或碱型大。各种树脂耐氧化性差别很大,各种阴离子交换树脂尤其明显。阳离子交换树脂抗氧化能力随交联度增加而增加,而阴离子交换树脂影响并不明显。对于树脂的耐磨性,一般至少连续使用 $1 \sim 2$ 年,有的则要求使用 $5 \sim 10$ 年。在去离子水的制备中,其寿命要求有 10 年左右。树脂的储存寿命一般也需要 $30 \sim 50$ 年。总之,在离子交换树脂中,磺化的聚苯乙烯阳离子树脂是最稳定的,而伯、仲、叔胺弱碱性阴离子交换树脂通常是最不稳定的。

三、离子交换柱的操作

(一) 离子交换树脂的处理

1. 颗粒大小的处理

因为一般市面上的树脂产品粒度多在 $20 \sim 80$ 目,即使是 80 目的,对于一般的制备色谱来说,仍然是颗粒太大。实验室规模的经典离子交换色谱一般需要较细粒度的树脂,所以常常需要对它进行干燥、粉碎、过筛或沉降或浮选处理。

树脂干燥可在烘箱内进行,但要低于它的耐热温度;树脂的粉碎在碾钵或球磨机中进行,粉碎时尽量防止产生很细的粉末,应该适当粉碎后就过筛,把留下的粗粉再进行粉碎,这样反复操作,以免树脂损失较多。

利用沉降的方法筛选树脂是根据所选树脂的密度,正确地选择有机或无机溶剂,将粉碎后的树脂倒入其中,充分搅拌,回收、干燥、粉碎沉积较快部分的树脂,收集需静置一段时间后才能沉积的树脂,抛弃难于沉淀的部分。

也有利用 $1 \sim 2 \text{ L}$ 的分液漏斗对树脂进行浮选法筛选的,粉碎后的树脂控制小于漏斗体积的 $2/5$,从漏斗的下端通水。改变水的流速的大小,原则上可收集到不同大小的树脂,示意图为图 3-12。但由于从漏斗下端通入的水流容

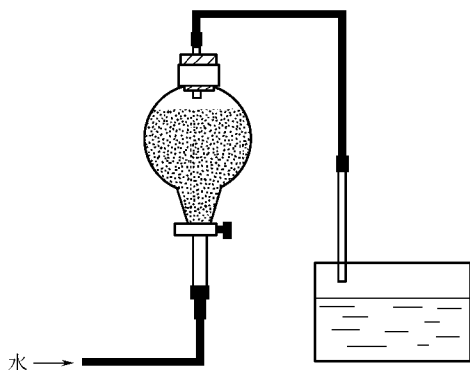


图 3-12 简易的树脂浮选示意图

易引起漏斗中的湍流，因此要得到分布较窄的树脂也并不容易。

2. 树脂的预处理

为了有效地除去树脂中的杂质，以及将其转换成我们需要的形式，对离子交换树脂进行预处理基本上是不可缺少的程序。

首先是把新树脂浸泡在蒸馏水中 1~2d，使它膨润后，然后按以下方法处理。

(1) 强酸型阳离子交换树脂

商品树脂一般是 Na 型。用树脂体积 4 倍的 5% 的盐酸搅拌 5h 进行交换，使它变为 H 型后除去酸液，用水洗到中性。然后用树脂体积 4 倍量的 5% 氢氧化钠或氯化钠进行交换，使它变为 Na 型，除去氢氧化钠或氯化钠后，再用水洗到流出液不含 Na^+ 为止。必要时可重复 1~2 次上述处理。最后用树脂体积 6 倍量的 5% 盐酸进行交换，使它变为 H 型，用蒸馏水洗到中性为止。

(2) 强碱型阴离子交换树脂 商品树脂一般是 Cl 型。先用树脂体积 4 倍量的 5% 的氢氧化钠溶液使它变为 OH 型，除去碱液，用水洗涤到中性。然后用树脂体积 4 倍量的 5% 盐酸溶液使它变为 Cl 型，倾去酸液后再用水洗到近中性时为止。必要时可重复上述处理 1~2 次，最后用树脂体积 6 倍量的 5% 氢氧化钠溶液进行交换，使它变为 OH 型。OH 型树脂最好现用现制备，因为它容易吸收空中二氧化碳。

(3) 弱酸型阳离子交换树脂 商品树脂一般是 Na 型。先用树脂体积 4 倍量的 5% 盐酸使它变为 H 型后，倾去酸液，用水洗到中性。然后用树脂体积 4 倍量的 5% 氢氧化钠使它变为 Na 型，再用水洗涤至呈弱碱性。必要时可重复上述操作 1~2 次，最后用树脂体积的 6 倍量的 5% 盐酸进行交换，使它变为 H 型，倒出酸液后用蒸馏水洗到中性。

(4) 弱碱型阴离子交换树脂 商品树脂一般是 Cl 型。可利用强碱型阴离子交换树脂相同的方法进行处理，最后将其洗至近中性即可，因为 Cl 型可水解。在预处理过程中，也可以使用稀硫酸和氯化氨。

(二) 柱的操作

1. 装柱

树脂的填充是把树脂放在烧杯中，加水充分搅拌使气泡全部被除去。在色谱柱中先倒入一些水并在柱中保持一定高度，打开活塞，将准备好的树脂随着少量水在搅拌下慢慢填于色谱柱中，方法类似于前面的湿法填柱。

2. 上样

离子交换色谱的上样量要根据每一种树脂的交换量进行确定。阳离子交换树脂，其交换量较大，样品量可加到整个柱交换量的 $1/2$ ；而阴离子树脂的交换量较小，一般只加到全交换量的 $1/4 \sim 1/3$ 。

3. 洗脱

洗脱液选用要根据具体的待分离物质的性质进行确定，一般是用一种比吸着物质更活泼的离子把吸着物顶替出来。由于不同的物质在离子交换柱中被吸附和被顶替的能力不一样，因此在柱中移动的速度也就不一样，容易交换的先流出来，这样我们就可以利用分步收集的方法来获得所需的单一物质。对于难顶替的组分我们还可以采用梯度洗脱的方法加快它们的流出。

4. 树脂的再生

离子交换树脂可以重复使用，让用过的树脂使其恢复原状的方法叫再生，因此离子交换树脂在用过后总要对其进行再生。对于干燥状态的树脂，可先用饱和氯化钠溶液润湿，然后再生，这样可以防止其龟裂。再生条件对树脂循环使用及工作中的稳定性有很大影响，其主要取决于再生剂选用、浓度、用量、流速、温度及方式等因素。

各种常见类型树脂再生方法如表 3-8 所示。

表 3-8 常见类型树脂再生方法

树 脂	要求的离子型式	再 生 剂
强酸	H^+	$HCl, NaCl$
	Na^+	
弱酸	H^+	$HCl, NaCl$
	Na^+	
强碱	OH^-	$NaOH$
弱碱	OH^-	$NaOH$
	Cl^-	HCl

由此可见，阴阳离子的强弱型树脂的再生方法基本相同，再生可以在色谱柱上进行，也可以在色谱柱外操作。

5. 影响离子交换的主要因素

(1) 流动相的酸度 离子交换剂可以简单地理解为一种高分子固体酸碱，对于强型离子交换树脂，pH 对其交换能力影响不大，而弱型树脂则很显著，因此溶液的酸碱度对离子的交换有很大的关系。通常强酸型交换剂的 pH 值应大于 2，弱酸型交换剂的流动相 pH 值应大于 6；而在阴离子交换剂中，强碱型交换剂流动相的 pH 值应小于 12，弱碱型应小于 7。

(2) 样品浓度 离子交换操作大多数是在水溶液或含有水的极性溶剂中进行的。当样品浓度比较高时，树脂的解离度会趋向减小，有时会影响吸附顺序

及选择性；当样品浓度很高时，会引起树脂表面、网孔的变化甚至改变，阻止一些离子进出网孔，使选择性发生较大变化。因此在可能的情况下，一般倾向于使用稍稀的样品溶液，此时分离的选择性较大，有利于提取分离。

(3) 温度 温度对稀溶液的交换性能影响不大，但当溶液浓度比较高时，温度升高对水合倾向大的离子容易交换吸附。对于弱酸或者弱碱，温度增高，离子交换速度增大，在洗脱时亦可提高交换能力。但有时温度太高，又易引起树脂的破坏。

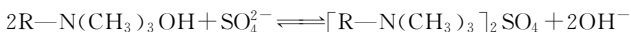
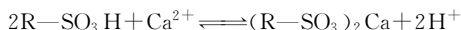
(4) 溶剂 离子交换色谱一般在水中进行交换，并可加入一定量的极性溶剂改变其选择性。但如果极性溶剂加入过多，又能使一些离子的交换难以进行或不进行交换，致使选择性减小甚至消失。

(三) 离子交换色谱的应用

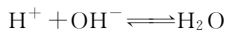
离子交换色谱的一个重要应用是利用离子交换树脂制取去离子水。纯净的水可以通过离子交换色谱进行制备，利用该方法制备的纯净水通常称为去离子水。

1. 原理

制备去离子水的方法与一般利用离子交换色谱分离复杂物的原理稍有不同，前者是利用离子交换树脂将杂离子全部交换吸附在色谱柱内部，使流出的始终是纯净水，而后者是通过复杂混合物在流动相的冲洗下在柱中的流动速度不同，而最后使各个组分得到分离的过程。因此我们选择离子交换色谱进行纯水制备的时候，所选离子交换树脂就应该选取具有强的吸附能力的阴阳离子交换树脂，强酸和强碱型的交换树脂交换基团的解离能力强，则容易与溶液中的离子交换，因此最好的选择是强酸型与强碱型离子交换树脂，并且是 H^+ 型和 OH^- 型的。如果我们假设水中的杂质是 $CaCl_2$ 和 Na_2SO_4 ，则交换原理可表示为



R 代表树脂骨架部分



2. 操作

(1) 树脂的预处理 取强酸型阳离子交换树脂放于塑料盆中，用自来水反复漂洗，去掉里面的水溶性杂质到水清无泡沫，并用纯水浸泡 1d。再用 5% 的盐酸溶液浸泡树脂 4h，适当搅拌。将盐酸溶液全部排除，以纯水反复洗至 $pH=3\sim4$ 为止。取与阳离子交换树脂相等交换容量的强碱型阴离子交换树脂放于塑料盆中，同样用自来水反复漂洗，去掉里面的水溶性杂质到水清无泡

沫，并用纯水浸泡 1d。用 5% 的氢氧化钠溶液浸泡树脂 4h，适当搅拌。将氢氧化钠溶液全部排除，以纯水反复洗至 $\text{pH}=8\sim 9$ 为止。

(2) 装柱 预处理好的离子交换树脂用纯水为流动相，进行湿法装柱。其中第一根柱为阳离子交换树脂柱，第二根柱为与第一根柱相等交换容量的阴离子交换柱，第三根柱是首先将阴阳离子混合后再填装混合离子交换柱，该混合柱也应该是使阳离子交换树脂与阴离子交换树脂总交换容量相等。装置示意图为图 3-13 所示。

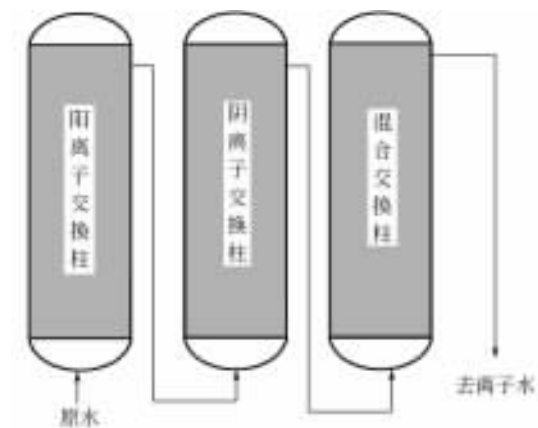


图 3-13 去离子水装置示意图

3. 水质的检测

离子交换水的质量如何，要经过检测才能确定。物理测定方法主要是测定其电阻率。化学测定方法主要是测定其 pH 值，氯离子、硫酸根离子、铁离子、钙离子、镁离子、可溶性硅是否会检出，以及易氧化物的检验、不挥发物的检验。

4. 树脂的再生

离子交换树脂的寿命较长，可进行多达数年的使用。但离子交换树脂的交换容量有限，当其内部的活性基团被全部交换后，就不再有离子交换的作用，水中的杂质就不能继续被保留，这时我们必须对离子交换树脂进行再生。

阳离子交换柱的再生：将 5% 的盐酸溶液置于高位瓶中，让其从进水口流入阳离子交换柱，控制一定的流速，持续 60~90min，再用水冲洗至 $\text{pH}=3\sim 4$ 为止。

阴离子交换柱的再生：将 5% 的氢氧化钠溶液置于高位瓶中，让其从进水口流入阴离子交换柱，控制一定的流速，持续 30~60min，再用水冲洗至 $\text{pH}=8\sim 9$ 为止。

混合床的再生：混合床的再生所需要的步骤较多，首先是混合床的碱洗，随后用水对混合床进行逆流冲洗使树脂处于运动状态，柱中树脂由于密度不同

达到分层的目的，最后分离阴阳离子树脂，分别按阴阳树脂单床进行再生处理。

另外，离子交换色谱可用于一些水溶性的能带电荷的植物有效成分的分离，这些化合物包括氨基酸、肽类、生物碱、有机酸、酚类等有效成分。首先利用煎煮法或温浸法提取得到植物有效成分的水溶液，然后让其通过强酸型阳离子交换柱、强碱型阴离子交换柱，分别进行洗脱，必要时可进行梯度洗脱，即可得到一些单一的植物有效成分。其分离过程可表示成图 3-14。

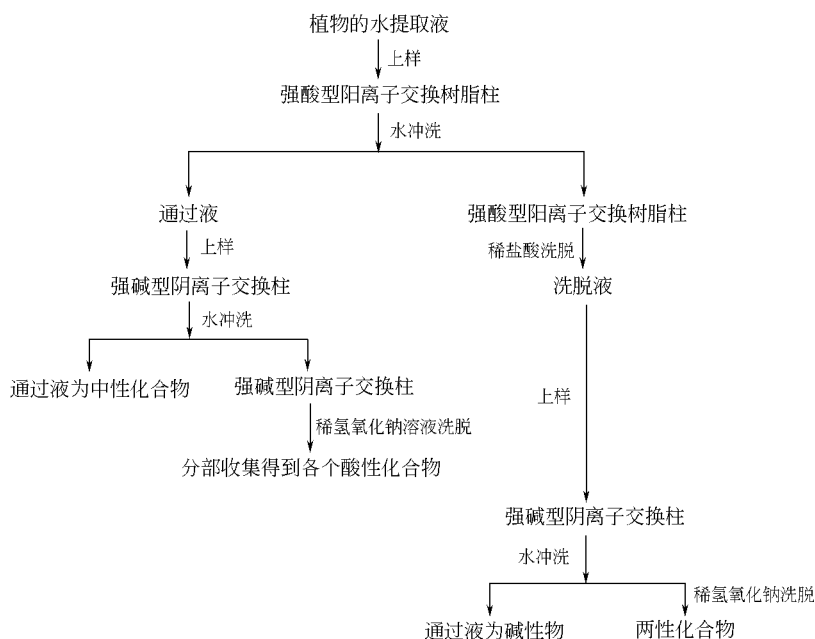


图 3-14 植物有效成分的离子交换分离

第五节 凝胶柱色谱

凝胶色谱是 20 世纪 60 年代初发展起来的一种快速而又简便的分离分析技术。它是指混合物随流动相流经装有凝胶作为固定相的色谱柱时，混合物中各物质因分子大小不同而被分离的技术。它的实质是筛分效应，故又叫尺寸排阻色谱。根据所用的流动相是有机溶剂或是水溶液，该方法又进一步分为凝胶渗透和凝胶过滤两大类。该方法常用于生物大分子的制备性分离中，在有机合成和植物化学方面也常有应用。

一、原理

凝胶是一类具有三维空间的多孔网状结构的物质，其中以有机凝胶应用得较多。无机填料中，有硅胶和玻璃珠。在有机凝胶中，适用于有机溶剂的主要有聚苯乙烯凝胶、聚乙酸乙烯酯凝胶、聚甲基丙烯酸酯凝胶等；适用于水相的凝胶有琼脂糖凝胶、交联葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶等。前者主要用于凝胶色谱仪测定高分子的分子量大小和分子量的分布范围。在经典柱色谱中最常见的是琼脂糖凝胶、交联葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。

琼脂糖从琼脂中分离得到。琼脂是从红藻类植物石花菜或类似红藻类植物中浸出的一种黏胶，经冻结和干燥而成。琼脂是混合物，主要成分是琼脂糖和琼脂胶二种多糖衍生物，各占大约 64% 和 36%。琼脂胶是一种磺化的酸性黏多糖，琼脂糖主要由 L-半乳糖（3,6 位脱水）和 D-半乳糖相间聚合而成的多糖（图 3-15）。其主要商品名为 Sepharose。

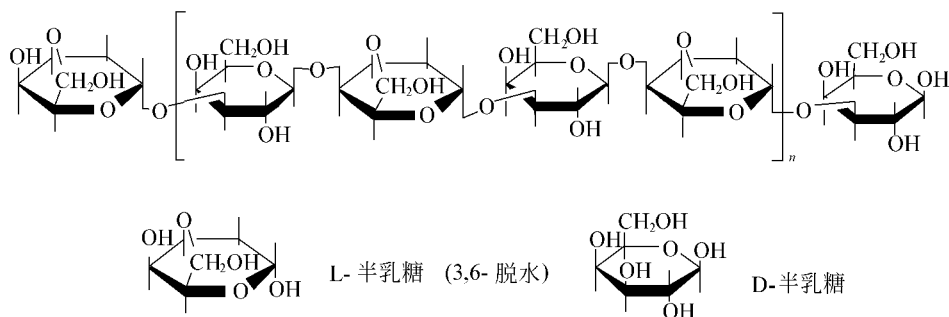


图 3-15 琼脂糖分子结构

交联葡聚糖凝胶常常是将葡聚糖与 3-氯-1,2-环氧乙烷交联而得，3-氯-1,2-环氧乙烷是交联剂。葡聚糖是由许多右旋葡萄糖单位通过 1,6-苷键连接成的聚合物，通常是借微生物厌氧培养法生产，培养基为蔗糖。图 3-16 是交联葡聚糖的反应式，其主要商品名为 Sephadex。

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺与亚甲基双丙烯酰胺聚合而成的网状聚合物，亚甲基双丙烯酰胺为交联剂。图 3-17 是聚丙烯酰胺的反应式，产品为颗粒状干粉，遇水溶胀成凝胶。其主要商品名为 Bio-Gel P。该凝胶的酰胺基团遇酸可水解生成羧酸，因此其不耐酸。

在凝胶色谱分离中，溶质与凝胶之间并不产生作用，它是根据凝胶内部孔径的大小，对溶质分子按照分子的大小尺寸进行分离。小的分子能进入凝胶的小孔穴，中等大小的分子只能进入到凝胶中中等大小的孔中，而大分子不能进入凝胶的孔内，因此小分子在柱内的路径长，最后流出，大分子在柱内的路程短，最先流出。凝胶分子与溶质分子之间的关系可表示为图 3-18。

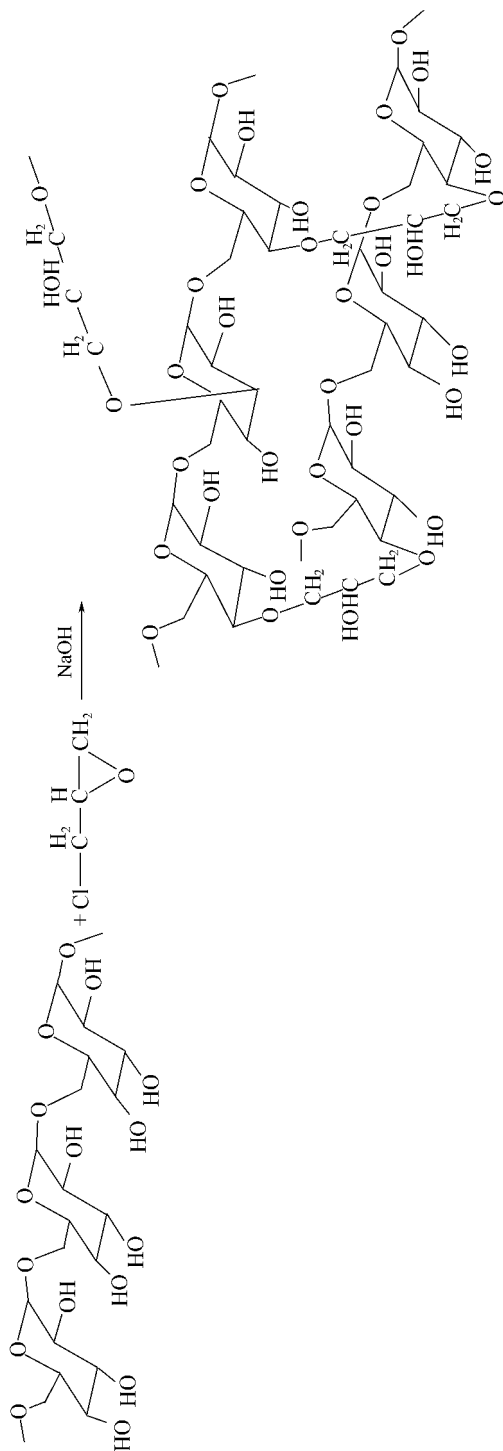


图 3-16 交联葡聚糖的反应式

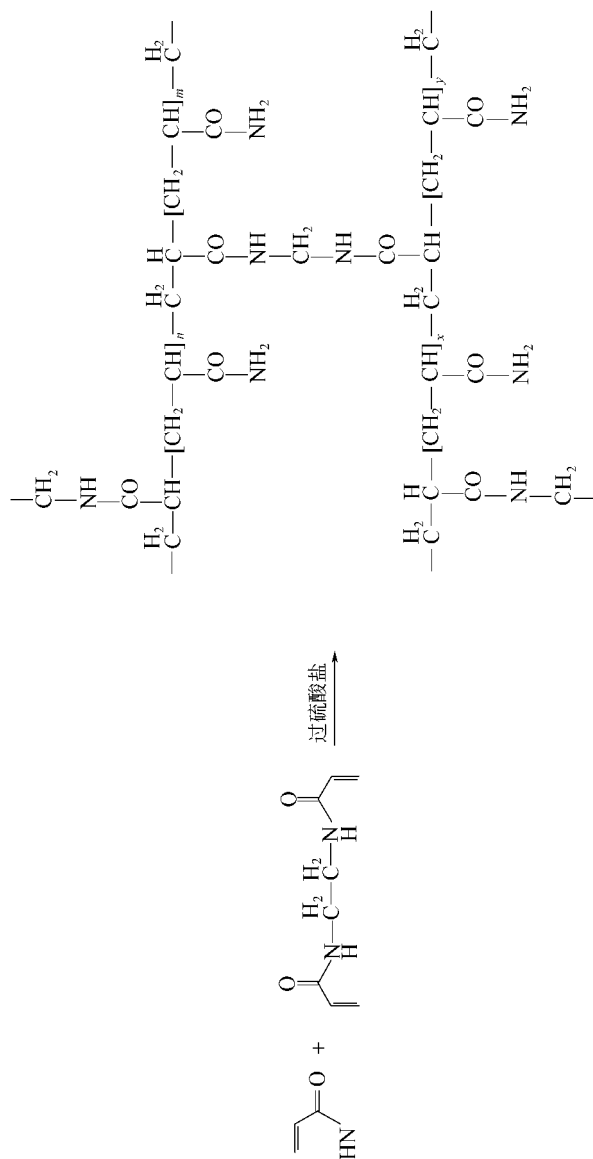


图 3-17 聚丙烯酰胺的反应式

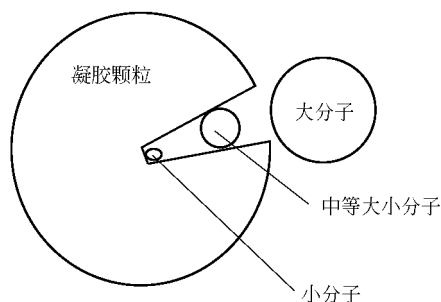


图 3-18 凝胶孔中的溶质分子

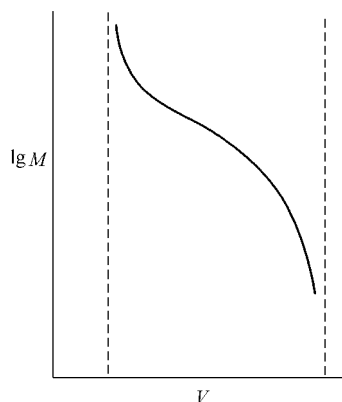


图 3-19 溶质分子量与其保留体积的关系曲线

从图 3-18 可见，凝胶分子分离溶质分子有一个分子量的范围，当溶质分子量大于或者小于该凝胶的分离范围时，在该凝胶柱内都得不到有效的分离。不同的凝胶产品有自己的分离范围，因此，我们必须针对待分离溶质分子量的大小，正确地选择凝胶的型号。溶质分子量与其保留体积的关系如图 3-19 所示。

二、操作

1. 溶胀

商品凝胶是干燥的颗粒，通常以 $40 \sim 63 \mu\text{m}$ 的使用最多。凝胶使用前需要在洗脱液中充分溶胀一至数天，如在沸水浴中将湿凝胶悬浮液逐渐升温到近沸，则溶胀时间可以缩短到 $1 \sim 2 \text{h}$ 。凝胶的溶胀一定要完全，否则会导致色谱柱的不均匀。热法溶胀还可杀死凝胶中产生的细菌、脱掉凝胶中的气泡。

2. 装柱

由于凝胶的分离是靠筛分作用，所以凝胶的填充要求很高，必须要使整个填充柱非常均匀，否则必须重填。凝胶在装柱前，可用水浮选法除去凝胶中的单体、粉末及杂质，并可用真空水泵抽气排除凝胶中的气泡。最好购买商品的玻璃或有机玻璃的凝胶空柱，在柱的两端皆有平整的筛网或筛板。将柱垂直固定，加入少量流动相以排除柱中底端的气泡，再加入一些流动相于柱中约 $1/4$ 的高度。柱顶部连接一个漏斗，颈直径约为柱颈的一半，然后在搅拌下、缓缓地、均匀地、连续地加入已经脱气的凝胶悬浮液，同时打开色谱柱的毛细管出口，维持适当的流速，凝胶粒将逐层水平式上升，在柱中均匀地沉积，直到所需高度为止。最后拆除漏斗，用较小的滤纸片轻轻盖住凝胶床的表面，再用大

量洗脱剂将凝胶床洗涤一段时间。图 3-20 是一个装柱的示意图。

3. 柱均匀性检查

凝胶色谱的分离效果主要决定于色谱柱装填得是否均匀，在对样品进行分离之前，对色谱柱必须进行是否均匀的检查。由于凝胶在色谱柱中是半透明的，检查方法可在柱旁放一支与柱平行的日光灯，用肉眼观察柱内是否有“纹路”或气泡。也可向色谱柱内加入有色大分子等，加入物质的分子量应在凝胶柱的分离范围，如果观察到柱内谱带窄、均匀、平整，即说明色谱柱性能良好；如果色带出现不规则、杂乱、很宽时必须重新装填凝胶柱。

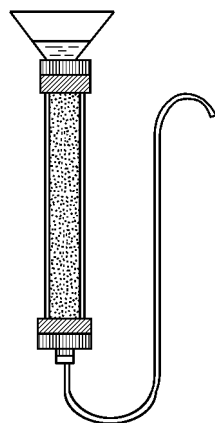


图 3-20 凝胶柱
填装示意图

如果要对色谱柱进行比较精确的校正，常使用一些能完全被凝胶排阻的标准物质，如蓝葡聚糖-2000。对琼脂糖凝胶还可使用有色大肠杆菌细胞。由于这些物质都是大分子，通常溶液的黏度较高，使用时以稀溶液较好。

4. 上样

凝胶柱装好后，一定要对柱用流动相进行很好的平衡处理，才能上样。凝胶柱的上样也是一个非常重要的因素，总的原则是要使样品柱塞尽可能的窄和平整。为了防止样品中的一些沉淀物污染色谱柱，一般在上柱前将样品过滤或离心。样品溶液的浓度应该尽可能地大一些，但如果样品的溶解度与温度有关时，必须将样品适当稀释，并使样品温度与色谱柱的温度一致。当一切都准备好后，这时可打开色谱柱的活塞，让流动相与凝胶床刚好平行，关闭出口。用滴管吸取样品溶液沿柱壁轻轻地加入到色谱柱中，打开流出口，使样品液渗入凝胶床内。当样品液面恰与凝胶床表面平时，再次加入少量的洗脱剂冲洗管壁。重复上述操作几次，每一次的关键是既要使样品恰好全部渗入凝胶床，又不致使凝胶床面干燥而发生裂缝。随后可慢慢地逐步加大洗脱剂的量进行洗脱。整个过程一定要仔细，避免破坏凝胶柱的床层。

5. 冲洗

凝胶色谱的流动相一般多采用水或者缓冲溶液，少数采用水与一些极性有机溶剂的混合溶液，除此之外，还有个别比较特殊的流动相系统，这要根据溶质分子的性质来决定。加完样品后，可将色谱床与洗脱液贮瓶及收集器相连，设置好一个适宜的流速，就可定量地分部收集洗脱液。然后根据溶质分子的性质选择光学、化学或生物学的方法进行定性和定量测定。

6. 再生

因为在凝胶色谱中凝胶与溶质分子之间原则上不会发生任何作用，因此在一次分离后用流动相稍加平衡就可进行下一次的色谱操作。但在实际应用中常有一定的污染物污染凝胶。对已沉积于凝胶床表面的不溶物可把表层凝胶去掉，再适当增补一些新的溶胀胶，并进行重新平衡处理；如果整个柱有微量污染，可用 0.5mol/L NaCl 溶液洗脱。在通常情况下，一根凝胶床可连续使用半年之久。

凝胶柱若经多次使用后，其色泽改变，流速减低，表面有污渍等就要对凝胶进行再生处理。凝胶的再生是指用适当的方法除去凝胶中的污染物，使其恢复其原来的性质。交联葡聚糖凝胶常用温热的 0.5mol/L 氢氧化钠和 0.5mol/L 的氯化钠的混合液浸泡，用水冲到中性；而对于聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶由于遇酸碱不稳定，则常用盐溶液浸泡，然后用水冲到中性。

7. 保存

经常使用的凝胶以湿态保存为主，为了避免凝胶床染菌，可加少许氯仿、苯酚或硝基苯等化学物质，它可以使色谱柱放置几个月至一年。凝胶的干燥应先对凝胶进行浮选，除去细小的颗粒，并用大量水洗涤，除去盐和污染物，然后逐步增加乙醇浓度使凝胶收缩，在 $60\sim 80^\circ\text{C}$ 干燥，在整个操作过程中的蒸馏水、器皿和房间都必须干净。琼脂糖凝胶的干燥操作比较麻烦，并且干燥后还不容易溶胀，所以一般仍以湿态保存为主。

第六节 亲和柱色谱

亲和色谱法是一种利用生物分子之间专一的亲合力进行分离纯化的色谱方法，一般在色谱柱中进行。从 1910 年开始，有人用不溶性淀粉亲合吸附生物组织抽提液中的淀粉酶，1955 年有人将抗原连接于聚苯乙烯，并用其亲合吸附与其相对应的抗体获得成功，1967 年采用了琼脂糖和葡聚糖凝胶作为固相酶的载体，1968 年 L-酪氨酰-D-色氨酸 共价偶联于经溴化氢活化的琼脂糖凝胶上分离纯化了羧肽酶 A。近几十年来亲和色谱技术发展十分迅速，它已成为制备性分离提纯生物活性物质的重要方法。

生物分子之间，如酶蛋白和辅酶、抗原和抗体、激素与细胞受体、核糖核酸与其互补的脱氧核糖核酸、维生素与结合蛋白、酶与抑制剂等体系，它们之间往往具有专一的结合力，能形成可逆的结合力，生物分子间的这种结合能力称为亲合力。当把一对亲合分子的一方固相化作为固定相时，另一方随流动相流经该固定相，双方即亲合络合，然后利用亲合络合物的可逆性质，选择适当的流动相将它们解离，从而得到与固定相有特异亲合能力的某一特定的物质。

利用生物分子间亲合吸附和解离的这种色谱方法就叫做亲和色谱技术。亲和色谱的工作及操作原理可以用图 3-21 表示。

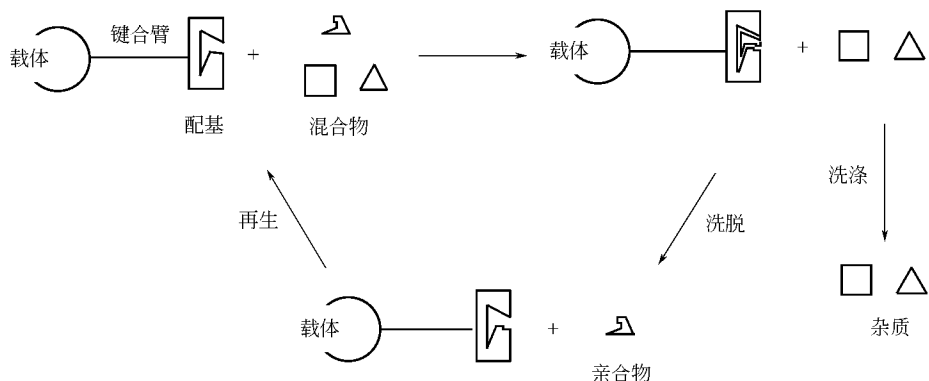


图 3-21 亲和色谱示意图

亲和色谱固定相由载体、键合臂和具有特殊选择性的亲合基团组成，该亲合基团称为“配基”，因为亲和色谱中结合的双方是互配的。常见的亲和色谱固定相载体主要有琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、硅胶等。键合臂的使用是为了消除空间障碍的影响，它是一个较小的双功能团的链状分子，可以与载体及配基作用，但该臂的长度应该适中，过长和过短都不利于分离作用。

亲和色谱使用的配基又常分为两大类，一类是前面叙述的配基与待分离物之间具有专一的亲合力的配基，如抗原与其相对应的抗体。这种类型的配基选择性很好，分离效果高，但它们在键合在载体的化学反应中常常不稳定，活性损失大，成本较高。另一类是可应用于一类物质的配基，这种配基与待分离物并没有上述的生物学上的关系，也没有专一的亲合力，所以也有人称其为假亲和色谱。这类配基的典型代表是染料配基和硼酸盐配基。染料配基中常含有较活泼的基团，可以直接与载体上的羟基或氨基作用而固载化，目前各种染料配基与待分离物之间的作用机理较复杂，可包含部分亲合力，但详细的仍不是很清楚。硼酸盐配基与待分离物之间没有亲合关系，它们间的作用主要是化学结构上的空间相容性。假亲和色谱虽然选择性较前者差，但其价格合理，使用方便，已经有不少商品。

琼脂糖常制备成珠状使用，其抗酸碱能力较强，但不耐有机溶剂，也不耐干燥。琼脂糖使用前先在碱性条件下与溴化氰反应引入活泼的亚氨基碳酸盐，然后直接与配基作用；也可进一步与二氨基类化合物反应后，再与丁二酸酐或对硝基苯甲酰叠氮反应生成更长的键合臂，最后才与配基作用。对于聚丙烯酰胺由于含有酰胺基，可将其转变成叠氮酸或氨基衍生物等，然后再连接上

配基。

制备好的亲和色谱固定相按照一般的湿法进行装柱，随后进行上样操作。样品一般利用柱的平衡液进行溶解，而柱的平衡液通常考虑了其组成、pH 值和离子强度等能有利于配基与待分离物之间的亲合作用、有利于可逆络合物的形成。为了让亲合反应进行完全，样品的上柱流速应该比较缓慢。对一些生物大分子如果耐温性能较差，分离操作可在 4°C 下进行，以防止生物大分子变性失活。在待分离的样品溶液全部加入到色谱柱中后，用一定量的平衡液冲洗柱子，去掉样品液中的杂质，只留下配基的亲合物在色谱柱内。

分离的下一步是利用洗脱液将色谱柱内的亲合物洗脱出来，洗脱液应选择其性质与平衡液的相反，它应该有利于亲合络合物的分解而使目标产物从配基上脱落。洗脱液与柱平衡液之间常有不同的离子强度、pH 值甚至化学组成等，但这种变化不能使亲合物失去活性，我们应该及时地检测待分离物的纯度以及活性两个方面。

但在实际操作中，一些亲合的可逆络合物的逆反应常常比较困难或者反应速度很慢，在保证目标物活性的前提下，可以考虑采用一些稀酸，如 0.1mol/L 乙酸、 0.01mol/L 盐酸或稀碱，如 0.1mol/L 的 NH_4OH 等。也可以用含有同种配基物质的洗脱液，它能洗脱和配基有专一性的亲合物，能提高纯度。在极端的情况下，还可采用盐酸胍、尿素和强酸之类，或者让载体“手臂”断裂最终得到纯的产品。

分离结束后，色谱柱需要继续用洗脱剂洗涤一段时间，然后再用平衡缓冲液进一步冲洗柱子，最后将色谱柱在低于 4°C 下保存，该柱可以多次使用。

第七节 干柱色谱

通常填充色谱柱的方法是用湿法，因为这种方法操作容易，重现性较好，对于初学者尤其适宜。但填充剂也可以用干的装填成柱，并且自 20 世纪 60 年代中期后人们普遍发现它的分离效果明显地优于湿法装柱。

普通的柱色谱方法其固定相颗粒不能太细，否则色谱柱对流动相的阻力较大，流速较慢，进行一次分离要花费较长的时间。另外湿法填装的经典柱其柱床紧密程度也非常有限，因为它是在流动相中自然沉积而成的，尤其是当流动相密度较高时，柱床的紧密度就更差了。

干柱色谱可以使用粒度很小的填充剂，在作者的实验室，常使用国产薄层板硅胶，粒度在 $10\sim 40\mu\text{m}$ 之间。并且在大多数情况下，都是使用硅胶，因为硅胶有一个非常广泛的应用范围。干法装填使用“轻叩装填”法。原则上讲，

只要用该硅胶自制的硅胶薄层板能够分离开的样品,在该干柱色谱上就有望得到分离。通常认为在薄层板上当两个待分离成分的 $\Delta R_f > 0.4$ 时,在经典色谱柱上比较容易分离;当两个待分离成分的 $\Delta R_f < 0.2$ 时,在经典色谱柱上就相当难分离。作者应用干柱色谱曾经成功分离过 $\Delta R_f \geq 0.06$ 的很难分离的物质对。干柱色谱因为所用填料的颗粒很小,填充时又容易将柱填紧密,这是干柱色谱分离效率明显高于湿法柱的最根本原因。但由于干法柱的填充技术性很强,如果柱填充得不好,其分离效果往往比湿法柱更差,尤其是对于初学经典柱色谱技术者,作者仍然强力推荐我们前面介绍的湿法柱。

作者干法填装色谱柱的操作步骤如下:

- ① 取一商品色谱柱,其两端都是平底并带有柱头;
- ② 分别用二氯甲烷、丙酮、水、甲醇洗涤色谱柱,并干燥;
- ③ 打开色谱柱的一端作硅胶填装的入口,另一端检查筛网或者筛板是否安装好,并将这一端充分旋紧;
- ④ 在安装好筛网的一端想办法平整地连接好一个橡皮塞;
- ⑤ 在一个支架上固定好一个玻璃漏斗,漏斗口直径以大一些为好,固定的高度比上述准备好的色谱柱长度稍低;
- ⑥ 用一个大量筒(如 500mL)量取需要量的粒度较细的硅胶;
- ⑦ 将色谱柱置于漏斗之下,这时一人专门从漏斗上方将量筒中的硅胶慢慢地、连续地、均匀地倒入漏斗中,防止硅胶在漏斗中积聚,也要防止硅胶“断流”;
- ⑧ 在此同时,一人左手持住色谱柱向上提起大约 3cm 左右,然后放下,让柱自由下落撞击地板,连续重复这个操作;并在每一次的提起操作中,使柱旋转大约 45° 的角度,让柱在填装过程中按照相同的方向每次转动一定的角度。另外,该人右手拿一个小木棒,不时均匀地、轻轻地敲打色谱柱的外臂。该步操作一直持续到硅胶加完后 3~5min。最后再安装上入口的筛网和柱头。总的填装原则是:既要让填料尽可能填紧密,但又要尽可能避免硅胶在色谱柱中分级分布。由于细粒硅胶操作过程中非常容易漂浮到空中,而硅胶又有很大的吸湿性,因此对人的身体危害很大,操作时一定要戴口罩防护!填柱操作示意图为图 3-22。

干柱样品容量的大小由样品中待收集物与杂质之间的分离因子所决定。由于干柱色谱中样品只能与吸附剂的外部表面接触,其内部表面积很难利用,因此它的样品容量与湿柱相比要小一些。上样通常是以适量展开剂溶解,打开色谱柱出口迅速全部加于柱顶。根据情况也可将样品溶于溶解度较大的有机溶剂中,用 5 倍于样品量的填充剂吸收,然后减压抽干,将其加于柱顶。展开时溶剂前沿必须保持整齐,如不整齐说明装柱不均匀或加样操作不当,导致层带的重叠。

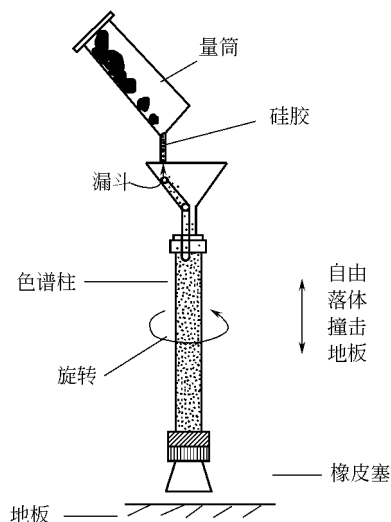


图 3-22 干法填柱操作示意图

干柱色谱的分离条件最好的方法是采用相同硅胶自制的薄层板进行冲洗溶剂的优化，然后采用与薄层色谱最佳分离条件完全相同的展开剂进行干柱色谱分离，因为它们的分离原理完全相同，都是通过毛细管作用使溶剂流动。当冲洗溶剂为多组分溶剂系统时，需要考虑混合溶剂系统的脱混，尤其是极性相差很大的两种或多种溶剂混合冲洗时。因为在冲洗过程中，极性较大的组分会优先被硅胶所吸附，随着冲洗的进行，前沿的溶剂含极性成分越来越少，而吸附剂中离前沿越远则吸附极性成分越多，使本来优化好的冲洗溶剂系统发生变化，当达到一定程度时，则溶剂能解混而形成第二个溶剂前沿。解决的方法通常有两种：一种是使用溶剂极性相差相对较小的溶剂系统，如用石油醚-乙醇和氯仿-乙醇取代石油醚-乙醇和氯仿-甲醇。另一种方法是在色谱柱填充前向硅胶中加入 10% 的展开剂，然后将其置于旋转蒸发器中转动 3h 左右，使硅胶充分预饱和。

在干柱色谱过程中，一般常用 50cm 的柱，一般展开至柱底即告结束。对于难分离的样品，也可使用更长的柱，或者冲洗到柱底后再继续冲洗至适当体积。

展开完毕时，可将填充剂分段掏出，并将它们分别置于玻砂漏斗中以强的极性溶剂，如甲醇洗脱，将各个部分的洗脱液浓缩，再用薄层或其他方法检查各段洗脱液中所含成分及纯度，合并成分相同的组分，必要时还可以选用适当溶剂进行重结晶。

除此之外，还有一些研究者习惯于用聚乙烯薄膜柱代替玻璃柱，将硅胶直

接填入聚乙烯的柱型薄膜袋中，然后按照相同的方法进行分离。该法的优点在于冲洗结束后，可以按照柱中的色带颜色或荧光颜色利用一般的刀将色谱柱直接切成一段一段的，然后分段进行处理。其缺点在于色谱柱很难填出高效柱，所以较多研究者往往把这种方法作为复杂样品的初步分离。

干柱色谱主要用于吸附柱色谱，对于分配柱色谱或者其他色谱也可以应用。

参 考 文 献

- 1 中国医学科学院药物研究所. 中草药有效成分的研究. 北京: 人民卫生出版社, 1972
- 2 钱庭宝. 离子交换剂应用技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1984
- 3 徐光宪等. 萃取化学原理. 上海: 上海科学技术出版社, 1984
- 4 胡之德, 关祖京. 分析化学中的溶剂萃取. 北京: 科学出版社, 1994

第四章 低压及中压制备色谱

对于待分离物的制备，应该首先了解样品的物理化学性质，然后围绕分离效率、制备量的大小、时间和成本这几个因素设计分离方法和步骤。在前一章的经典柱色谱分离技术中，因为所采用的分离材料的颗粒较大，它们的分离效率往往较低；又由于是在常压下操作，它们的分离速度往往也较慢。另外，有些待分离物不能经受分离材料的长时间的吸附作用或者在空气中暴露的时间不能太长。为了解决分离过程中的这些问题，逐渐发展了压力制备色谱。目前不同的文献对压力制备色谱的分类各不相同。在本书中，作者采用低压制备色谱、中压制备色谱以及高压制备色谱的三级分类法。将压力低于 0.5MPa 的称为低压制备色谱，中压制备色谱的压力为 $0.5\sim 2\text{MPa}$ ，高压制备色谱的压力大于 2MPa 。本章将介绍低压及中压制备色谱。

第一节 低压制备色谱

在液相色谱中，根据 Van Deemter 方程可知色谱柱的理论塔板高度与流动相在色谱柱的线速度具有图 4-1 所示的关系。

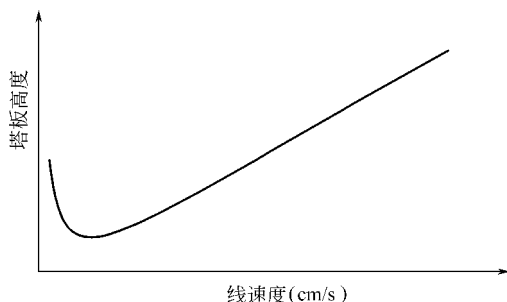


图 4-1 理论塔板高度与线速度的关系示意图

从图 4-1 可见，只有当移动相在色谱柱中的线速度达到一定数值时才具有最佳柱效，当移动相流速继续增加时色谱柱的柱效又随着降低。为了节省时

间，同时又考虑到柱效，最佳流速通常应该选择在略大于最低点的线速度进行制备性分离。

在经典柱色谱中，所用的色谱柱直径一般都较大，流动相的流速主要靠重力的作用，因此色谱柱中流动相的线速度一般都比图 4-1 中的最佳流速低，尤其是当色谱柱比较长或者是流动相的黏度比较大的时候。使用一定的压力增加流动相的线速度，不但不会降低分离效果，而且还可以大大地节省分离时间。

低压制备色谱通常有两种操作模式，一种是从色谱柱的上方施加压力，促使流动相的快速移动；另一种操作与第一种方式恰恰相反，是从色谱柱的下方进行减压操作，因为减压最多不超过一个大气压，所以将它归为低压制备色谱的类型。

在低压制备色谱中所用的分离材料的种类、材料颗粒大小以及颗粒的分散度与经典柱色谱基本一样，色谱柱的填充方法以及上样方法也基本上不发生变化，所以本章在这些方面不再作详细叙述。

一、减压柱色谱

（一）短柱

该方法通常是采用一个高度不超过 5cm 的色谱柱对样品进行快速分离。根据实验室的实际情况，通常可以用一个玻璃砂芯漏斗甚至布氏漏斗作为色谱分离柱，实验装置可以按照图 4-2 的方式进行连接。

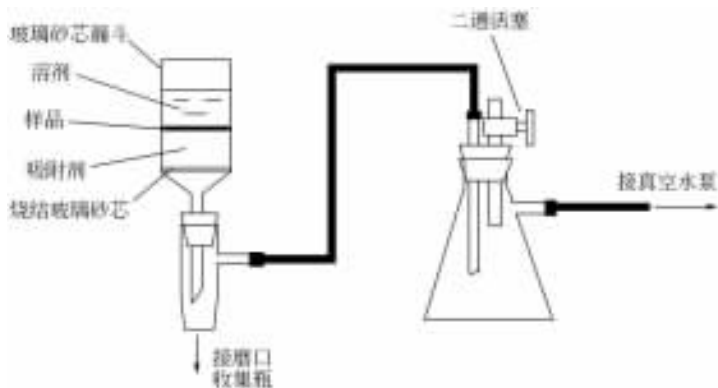


图 4-2 短柱减压制备色谱装置示意图

吸附剂以硅胶为例，先将硅胶均匀地置于玻璃砂芯漏斗之中，如果采用的是布氏漏斗，应该先在漏斗的底部铺上一张大小刚好合适的滤纸。利用真空泵抽吸硅胶层，并用一端有平整面的塑料棒将吸附剂压紧。在水泵与色谱柱之间有一个缓冲瓶，一方面它可以让气流更稳定一些，另一方面它可以防止水泵

中的水倒流到收集瓶中，利用缓冲瓶上的二通活塞还可以调节水泵的真空度。在分离前，一般先加入一定量的低极性的有机溶剂到分离柱中，然后将其抽干，作用是进一步让硅胶层更紧密，当然其对硅胶层也有一定的洗涤作用。

样品溶于极性尽可能低的溶剂之中，将其加到色谱柱上，用水泵将它抽吸进硅胶层中。如果低极性的溶剂对样品的溶解度太小，可用高极性的良溶剂溶解样品，然后用一定量的硅胶吸附，挥发掉溶剂后再作为样品加入到色谱柱硅胶层的上部。组分的洗脱，采用间隙式，先将一定量的低极性的溶剂加于色谱柱中，用水泵减压，使冲洗剂通过色谱柱，用收集瓶收集流出的液体，水泵连续减压直到色谱柱硅胶层中的液体抽干为止。接着再在色谱柱中加入第二种极性较上一种更强一些的溶剂，重复上面的操作；然后再选择极性更强一些的溶剂，依次重复操作，直到我们需要收集的组分被洗脱为止。

该方法简便、快速，每种冲洗剂最后都要抽干后再才调换另一种溶剂。溶剂的选择也很方便，只需逐渐增加洗脱液的极性即可。该方法尤其适用于在硅胶柱色谱中容易产生结构变化的物质的分离。但该方法分离中要注意防止色谱柱硅胶之间的裂口，也要防止硅胶与柱之间的裂口，整个分离柱必须均匀、紧密，否则将达不到分离的结果。另外，该法毕竟所用色谱柱硅胶层太短，所以它只适应一些比较容易分离的混合物的制备性分离，或者只适应于一个复杂混合物的初步分离等。

（二）常规柱

利用常规柱进行减压制备液相色谱的例子比应用短柱减压制备色谱的例子更多，因为常规柱具有适当的柱长，比短柱有更高的柱效，能适应的样品范围更宽。图 4-3 是常规柱减压柱色谱装置示意图。

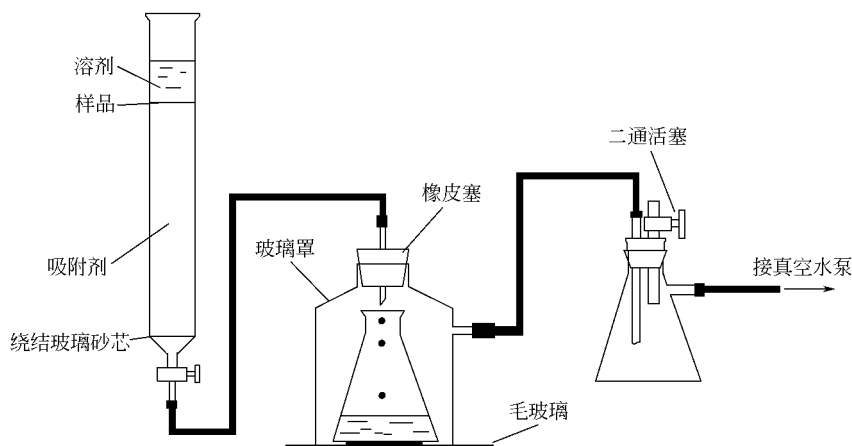


图 4-3 常规柱减压柱色谱装置示意图

该装置除了有一个常规的制备色谱柱和一个接真空泵的缓冲瓶外，就多加了一个玻璃罩。该玻璃罩上面有一个入口，旁边有一个小的支管，其没有底部，而是与一块毛玻璃相配，该毛玻璃与玻璃罩之间有很好的密闭性。在玻璃罩的上面入口用一个橡皮塞堵住，在橡皮塞的中间打一个小孔并插入一个小玻璃管。减压开始前，在玻璃罩内放置一个馏分收集瓶。减压开始时，将该小玻璃管与色谱柱的出口相连，玻璃罩旁边的支管与接水泵的缓冲瓶相连接。玻璃罩可以从市面购买或者找玻璃加工厂订制。

分离操作像经典柱色谱一样，先填好色谱柱，然后上样，接着将色谱柱出口与玻璃罩的入口连接管相连，将玻璃罩提起放入一个收集瓶，然后打开水泵，关闭缓冲瓶上的两通活塞，开始减压色谱分离。流出的馏分收集于玻璃罩中的锥型瓶中。如果需要更换锥型瓶，先关闭色谱柱出口活塞，然后打开缓冲瓶上的两通活塞，使玻璃罩中压力与外界平衡，这时就可以提起玻璃罩调换收集器。接着先关闭缓冲瓶两通活塞，随后打开色谱柱出口，馏分收集又可以继续进行，如此重复进行，直到待分离物全部流出。

常规减压柱的最大优点在于对普通色谱柱不需要进行任何改进，另外，其与后面的加压低压制备色谱相比，添加冲洗剂更加方便。

二、加压柱色谱

这里的加压制备色谱一般都习惯地称为低压制备色谱，因为低压制备色谱在实验室用得很多。常规经典柱色谱的分离时间较长，在经典柱色谱的基础上适当进行一点改进就可以完成该操作，不需要进行太多的设备投资，就能带来分离时间上的大量节省，尤其是一些生物活性样品不能经受吸附剂较长时间作用的时候，该方法就显得更加重要。

低压制备色谱的装置要求有一些最基本的组件，这些组件表示在图 4-4 中。

该装置中首先是色谱柱，这个色谱柱与一般的色谱柱相比主要有两点不同，第一是该色谱柱上面的入口是磨口，因为我们一般用压缩空气或者氮气作为压力，需要色谱柱具有一定的密闭性，能防止气体的泄漏，保持柱内的压力恒定；第二，由于色谱柱内要保持一定的压力，因此需要保证装置的连接处能承受一定的压力而不至于脱离，所以在色谱柱上一般有 2~3 个连接钉。当色谱柱与其他组件连接后，可以利用橡胶圈把相连的两个组件固定。除此之外，当色谱柱的直径较大时，柱中没有玻璃砂筛板，操作中一般用玻璃纤维或者脱脂棉堵住出口，防止吸附剂的流失。

装置的第二个部分就是溶剂的储瓶。因为实验是在色谱柱的顶部加压，如果色谱分离时装置中留给流动相的空间太小，势必频繁地减压、拆开装置向色谱柱中添加溶剂，给分离带来很大的不便。

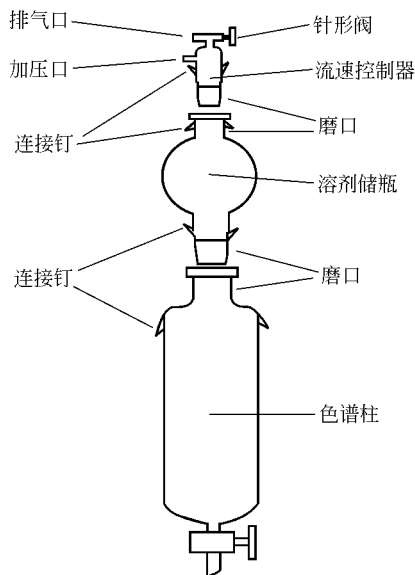


图 4-4 低压制备色谱装置的基本组成

如果在色谱柱上配置一个 500mL 或者 1L 的溶剂储瓶，再加上色谱柱中除硅胶以外的空间，则该装置就能储存一定量的流动相，一定程度上解决了添加移动相带来的不便。储瓶两端的进口和出口也都是磨口的，是为了让装置有好的气密性。在储瓶的两端也有连接钉，目的是通过橡胶圈的固定使上下组件的连接处能承受一定的压力。

装置最上面的一个组件是流速控制器，也即是压力控制器。在控制器的上面有一个气体入口和一个气体的出口。气体出口的大小可以通过针形阀进行控制。在压缩空气的输入压力不变的情况下，通过调节出口针形阀就可控制色谱柱内压力的大小，通过压力大小的控制，也就实施了对色谱分离过程中移动相线速度的控制，因为压力越大，移动相的线速度就越大，反之越小。流速控制器的接头同样也是磨口的，在磨口上面也有连接钉供固定用。

当按经典柱色谱的方法填好色谱柱、上好样后，就可以在色谱柱上加上溶剂储液瓶、流速控制器，连接上加压管，进行低压制备色谱操作。

低压制备色谱的加压手段有多种，常见的有下面几种。

(一) 空气泵加压

利用空气泵加压是较常见的一种。图 4-4 的基本装置就是为空气泵加压所设计的。一般的空气压力泵的输出压力是不能控制的，当其与低压制备色谱的流速控制器相连接后，通过流速控制器的针型阀就可以调节色谱柱内压力的大

小。开启空气泵前，一定要先将针型阀开到最大位置，等空气进入色谱柱并稳定后，再调节针型阀让移动相达到我们选择的流速，防止压缩气体的压力过大造成装置组件的脱落。

(二) 双链球加压

如果没有空气泵也可以利用双链球进行简易的加压操作。图 4-5 是一般使用的双链球示意图。

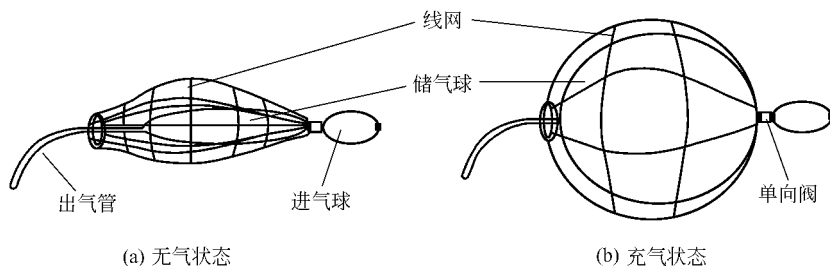
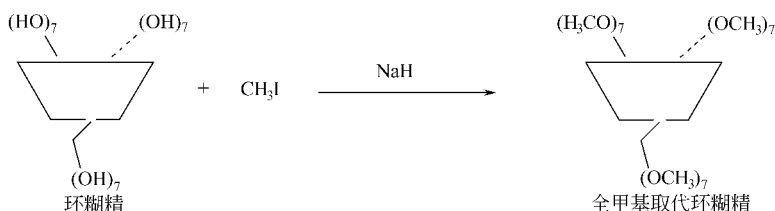


图 4-5 双链球示意图

图 4-5 双链球中的两个球是由橡胶制成的。第一个球的一端有一个单向阀控制进气口，另一端与第二个球相连，两球之间又有一个单向阀。当捏压第一个球时，该球的进气口单向阀关闭，与第二球相连的出口单向阀打开，第一个球中的气体被压入第二个球中；当放松第一个球时，此时球体复原，里面的压力低于外面的压力，出口单向阀由于第二个球中的压力大于第一个球而关闭，这时进气口单向阀打开，外面的气体被吸入。因此，只要堵住第二个球的出口，不断地用手捏放第一个球，就可以让第二个球充气胀大而达到一定的压力。为了防止第二个球过大而爆裂，在该球外面还有一个线网，用来控制该球的过度膨胀。

分离时，由于双链球的压力较小，图 4-4 中流速控制器的针形阀应该关闭。由于流动相的流出以及气体在装置连接处的泄漏而使压力降低时，我们可以及时地补充双链球中的气体，以保证装置中压力的基本恒定。

作者曾利用 β -环糊精与碘甲烷在氢化钠存在下合成全甲基 β -环糊精，反应方程式如下：



反应混合物经过氯仿水萃取后,利用 TLC 检测表明,粗产物中还含有少量 2,6-二甲基- β -环糊精和很少量的其他极性更强的杂质。在薄层色谱上筛选得适宜溶剂系统为氯仿:甲醇(95:5),全甲基- β -环糊精与 2,6-二甲基- β -环糊精的 $\Delta R_f \approx 0.13$ 。

作者在图 4-4 装置上,利用双链球对该混合物进行了分离。待分离样品量 5g,所用吸附剂为硅胶,硅胶颗粒直径为 $40 \sim 63 \mu\text{m}$,硅胶量为 500g,所选色谱柱直径为 10cm。

首先将硅胶用冲洗剂调成糊状,然后湿法装柱。接着将样品用尽可能少的流动相溶解后小心地上样,使样品层在柱中尽可能短。然后连接上溶剂储瓶、流速控制器以及双链球,进行低压色谱操作。分部收集馏分,利用薄层检测后,合并、浓缩及干燥后得全甲基- β -环糊精。产品经过红外、核磁检测,纯度合格。

(三) 氮气钢瓶加压

利用氮气钢瓶作为低压制备色谱的压力系统也是经常采用的办法。该方法没有空气压力泵的噪声,也无双链球的压力不稳定。但由于氮气钢瓶是高压容器,所以操作一定要小心,并且要懂得使用高压钢瓶的一些基本知识。图 4-6 是实验室高压钢瓶压力表示意图。

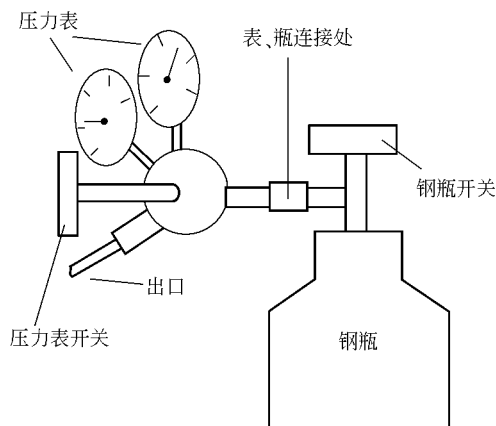


图 4-6 钢瓶压力表示意图

氮气钢瓶内的压力很高,新装钢瓶压力可达 15MPa。从工厂运来的钢瓶需要连上压力表,一方面它可以对输出气体减压,另一方面它又可显示钢瓶内的压力和输出气体的压力大小。打开钢瓶开关时一定要站在与压力表相反的一面。反时针旋转钢瓶开关打开钢瓶,此时离钢瓶近的那个压力表将显示钢瓶中

氮气的压力。若按顺时针方向旋转压力表上的开关，可以调节输出氮气的压力，该压力的大小显现在第二个压力表上。使用钢瓶时，一定要注意输出气体压力的大小，避免高压造成色谱装置被破坏。

（四）蠕动泵加压

如果应用蠕动泵（也叫恒流泵）来输送流动相则低压柱色谱的溶剂储瓶以及流速控制器都可以去掉，直接将蠕动泵的入口管没入移动相瓶中，蠕动泵的出口管与色谱柱顶端通过橡皮塞相连即可。流动相的线速度大小直接通过设置蠕动泵的流量大小来进行控制。在上述几个方法中，该方法最简便。只是相对于其他方法来讲，需要购买专门的蠕动泵。图 4-7 就是上海生产的压力可达 0.3MPa、流量最大分别为 20mL/min 和 100mL/min 的蠕动泵。

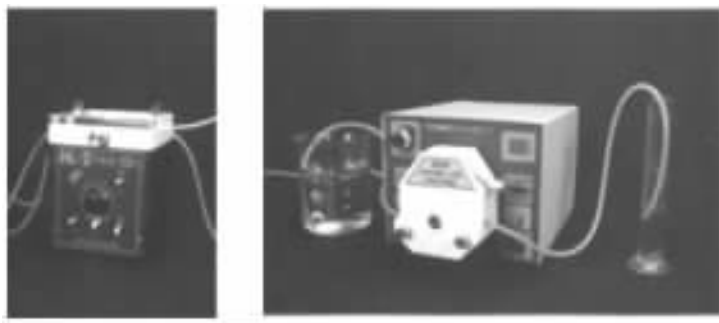


图 4-7 国产蠕动泵

低压柱色谱除了自己填充外，国外还有一些已经填好的成品柱出售，其中以 Lobar 成品柱最著名。图 4-8 是 Lobar 成品柱的示意图。

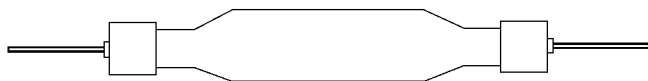


图 4-8 Lobar 成品柱的示意图

分离柱由玻璃构成，柱中分离材料被两端的玻璃砂筛板封闭，由分离柱的两头分别各引出一个金属管。利用蠕动泵直接与分离柱一端的金属管相连，可对待分离物进行制备性分离，使用相当方便。

（五）快速色谱

在图 4-4 的低压柱色谱装置中，当使用的色谱柱较短时，如大约在 7~15cm 的范围时，人们常称此时的低压色谱为快速色谱。该方法最初由

Still. WC 提出, 最初所使用的设备除了图 4-4 装置中的溶剂储瓶外, 其他的完全相同。由于其使用的色谱柱短, 可以使用粒度较细的填料, 如制备薄层填料, 因此其不但保证了一定的分辨率, 而且大大增加了分离的速度, 可以分离在填料柱上易分解的一些生物活性物质, 同时也节省大量的制备性分离时间, 可谓是一种价廉物美的方法。从大量的原始文献不难发现, 目前该方法在有机合成以及植化分离等研究领域仍然被大量地使用。

下面是快速色谱分离生物活性成分以及合成中间体的实例:

以硅胶为固定相, 己烷-乙酸乙酯梯度为流动相分离真菌 *Penicillium verucosum* 中的生物碱;

以硅胶为固定相, 氯仿-甲醇 (7 : 93→20 : 80) 为流动相, 分离 *Salix lasiandra* 中的酚苷;

以硅胶为固定相, 石油醚-乙醚 (9 : 1) 为流动相, 分离 *Ulex europaeus* 中的异黄酮;

以硅胶为固定相, 甲苯-乙酸乙酯 (3 : 2) 为流动相分离 *Ocotea veraguensis* 中的木脂素;

以 C_{18} 为固定相, 甲醇-水 (75 : 25) 为流动相, 分离 *Ileostylus micranthus* 中的去甲二萜内酯;

以 C_{18} 为固定相, 甲醇-水 (9 : 1) 为流动相, 分离 *Leiopathes* sp. 中的脂肪酸;

以 C_{18} 为固定相, 甲醇为流动相, 分离 *Allium cepa* 中的有机硫化物;

以硅胶固定相, 正己烷-氯仿 (1 : 4) 为流动相, 分离 heptakis- (6- azido-6-deoxy-2, 3-di-*O*-perphenyl carbamoylated) - β -cyclodextrin 的合成粗产品;

以硅胶为固定相, 环己烷→二氯甲烷梯度, 分离合成的 6, 7-dimethyl-1-naphthyl-4-pentenyl ketone 粗产品;

以硅胶为固定相, 乙酸乙酯为流动相, 分离合成的 (R) -N-pivaloyl- α -(6, 7-dimethyl-1-naphthyl) - (12-triethoxy-silyldodecyl) amine 的粗产品。

其实图 4-4 的流速控制器也可以用一端带磨口的三通活塞代替, 磨口的一端与溶剂储瓶相连, 横着的一端与压缩气体相连, 向上的一端供调节活塞进行放气用。图 4-9 是磨口三通活塞的示意图。

图 4-4 中的溶剂储瓶也可以利用分液漏斗代替, 漏斗与色谱柱的连接利用一个打孔的橡皮塞, 此时的色谱柱使用一般的无磨口的色谱柱就可以了。

一个更简便的方法是将溶剂置于一个大的试剂瓶中, 将其放在高处, 通过一个管子直接将溶剂瓶与色谱柱相连, 如图 4-10 所示, 系统压力的大小通过二者的相对高低来进行控制。

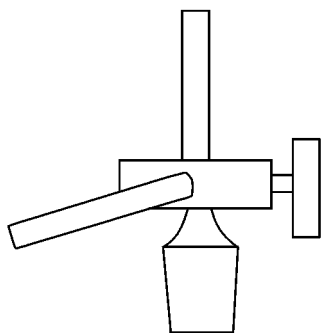


图 4-9 磨口三通活塞的示意图

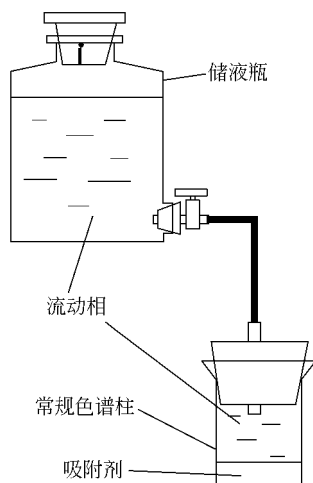


图 4-10 简易加压制备色谱示意图

第二节 中压制备色谱

经典柱色谱与低压制备色谱的分辨率一般还是很有限的，因为它们所用的分离材料的颗粒一般都较大。如果要进一步提高制备色谱的分辨率，通常只有进一步减小材料的颗粒大小或者增加色谱柱的长度，这样无疑将会进一步增大色谱柱的阻力以及降低流动相的流速。另外，不同的冲洗溶剂所造成的流动相流速也有很大的差别，如采用正相，如正己烷作流动相时，流动相的流速较快；而用反相，如水作流动相时则流动相的流速就较慢，使用一些黏度大的有机溶剂，如正丁醇等也有同样结果。为了进一步提高制备色谱的分辨率又能保证有较快的分离速度，使用中压制备色谱是行之有效的办法。

中压制备色谱与经典柱色谱或者低压制备色谱相比需要投资更多的组件。最简单的配置是除色谱柱外，再加上一台能提供几十公斤压力的恒流泵，但对于一台配置比较完整的中压制备色谱，即使是国产的也要几万元左右，全套进口的就更贵了。图 4-11 是 Pharmacia Biotech 公司的中压制备色谱产品。

从该图可见系统的中间有一根较大的色谱柱，色谱柱的下面是一台馏分收集器。系统的右下面是两台恒流泵，可以进行梯度洗脱操作。右上面是检测器，其顶部是溶剂瓶。紧靠色谱柱的右边有进样阀，色谱柱的左边是微机，可以对检测器的信号进行记录 and 数据处理。对中压制备色谱可以用图 4-12 进行



图 4-11 Pharmacia Biotech 公司生产的中压制备色谱

简单的示意。

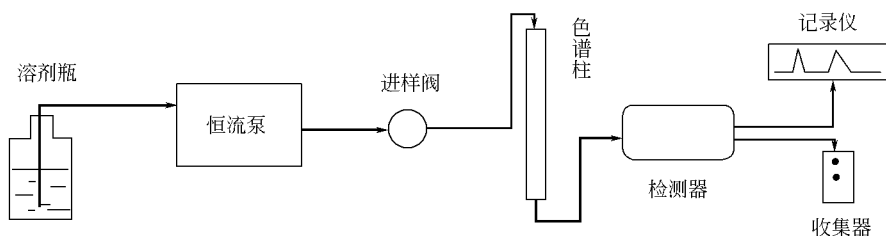


图 4-12 中压制备色谱示意图

中压制备色谱的工作原理是由恒流泵输送移动相，通过进样阀上样，在色谱柱对样品实行分离后，利用检测器检测、记录仪记录，并同时收集各个馏分。

其实，在我们的实际工作中，往往并不一定需要购买成套的装置，而是根据自己的研究需要和经费状况，分别购买适宜的组件自己进行组装。下面介绍中压制备色谱中最主要的几个部件。

一、恒流泵

中压制备色谱中除色谱柱外，唯一不能省掉的就是恒流泵。恒流泵的类型和产品很多，从高效液相色谱常规使用的泵到上节介绍到的蠕动泵都是恒流泵，也即都能以恒定的流量输出液体。所不同的是高效液相色谱所使用的泵通常要求最高压力能达 40MPa，最大流量能达 10mL/min，流量的精确度和准确度也要求很高。而低压色谱用的恒流泵最大压力可达 0.3~0.5MPa，有较大

的流量和一定的输出稳定性就能满足要求。中压柱色谱对泵的要求则在它们之间。一个恒流泵能达到的压力越高，输出流量的精度和准确度要求也高，则仪器在对制造材料的要求方面、生产技术和工艺方面也就越高，仪器的价格就越昂贵。如一台国产的高效液相色谱恒流泵大约需人民币 2 万多元，而一台供低压色谱用的一般蠕动泵也许只需 1~3 千元。对于一台能达 2MPa 以上压力的恒流泵大约在 5~8 千元左右。所以在选择购买恒流泵时，主要考虑的是其能达到的最大压力，最大流量，其次才是考虑流量的准确度和精度。目前使用的恒流泵多数是柱塞式往复泵。实验中我们常常可以利用量筒测定一定时间内恒流泵输出的液体体积，用其检查恒流泵的准确度和精密度。

有用压缩气体代替中压制备色谱恒流泵的报道，但作者认为压缩气体在比较高的压力下使用是相当危险的，因为此时气体具有很大的膨胀系数，所以在可能的情况下应尽量避免该方法的使用。

图 4-13 是作者实验室使用的购于北京生产的恒流泵产品。



图 4-13 国产中压制备色谱恒流泵

二、色谱柱

在绝大多数情况下，中压制备色谱的色谱柱都是由耐压的强化玻璃制成，并且基本上都是由自己装填柱子。最常用的分离材料颗粒的大小为 $15\sim 25\mu\text{m}$ 和 $25\sim 40\mu\text{m}$ ，金欧亚公司的系列填料产品是国家科技部的攻关课题成果。作者实验室一般是选择 $10\sim 40\mu\text{m}$ 的国产薄层硅胶。色谱柱的填装可以选择湿法或者干法。

在中压制备色谱中，湿法填充技术除了使用一般的经典柱色谱的湿法填充技术外，对于颗粒较小的，如小于 $20\mu\text{m}$ 的分离材料通常采用匀浆法进行装柱。该方法需要购买专门的匀浆法装柱机，而目前国内基本上无该产品生产，作者实验室购买的是美国 Alltech 公司的产品，价格大约人民币 3.5 万元左

右。该仪器除主机外，还有一个配套的匀浆罐。图 4-14 是该产品的图片。



图 4-14 Alltech 公司生产的装柱机

装柱时，先选好密度及极性适宜的溶剂，将填料加入到该溶剂中摇匀，此时填料在该溶剂中在一定的时间内不会因为重力的作用而沉积，否则应重新选择溶剂系统。将配好的匀浆液倒入预先处理好的并连接上色谱柱的匀浆罐中，然后迅速将匀浆罐与主机连接好，打开主机开关，使主机填充压力很快达到一个较高的压力，整个操作要迅速、准确、连贯、一气呵成。随后将压力降到一定数值，保持一段时间，最后拆下色谱柱，将连接一端的填料铲平，装上柱头即成。该方法需要较贵的设备，填充技术要求也很高，因此对于非专门研究色谱柱技术的研究人员，短时间掌握该技术有一定困难。

最简单的干法装柱是先按照上一章介绍的干柱色谱的装柱方法填好色谱柱，然后将装好的色谱柱与一氮气钢瓶相连，打开氮气钢瓶开关以及色谱柱出口后，小心地调接压力表上的开关，使氮气瓶输出压力在 1.5MPa 左右，让高压气体将色谱柱进一步压紧。压紧后，先关闭钢瓶开关，让色谱柱内压力回到常压后再取下柱子。利用该方法填装的柱子密度比湿法至少提高 20%，因而更有利于难分离物的分离。

但作者再次强调，该方法的操作一定要小心仔细，因为压缩气体的膨胀系数很大，容易胀裂劣质玻璃色谱柱，操作时至少应带能抗一定碎片冲击的护目镜。

另外还有使用轴向压缩技术填充色谱柱的，该方法需要特制的色谱柱，该色谱柱是在柱的一端或者两端有气动活塞可以挤压色谱柱中的分离材料，防止柱中死空间的出现。

除此之外，还有径向压缩柱和环行挤压柱出现，它们也有将色谱柱填均匀、填紧密的优点。但在实际应用中见到的很少，所以就不再进一步介绍，读者可以参考相关的专著。

三、检测器

检测器的使用可以使样品的收集变得有的放矢，根据检测器信号的变化可以进行及时的收集。但检测器的检测范围、检测的灵敏度、基线稳定性等参数决定了检测器的价格。例如一台供高效液相色谱使用的国产紫外检测器的价格大约在 3 万元以上，而一台只有少数几个检测波长的国产紫外检测器的价格就可能在 1 万元左右。在购买这些组件的时候，应该根据自己的分离目的和经费条件进行正确的选择。图 4-15 是作者实验室使用的可供中压制备色谱使用的具有 2~4 个检测波长的北京和上海生产的紫外检测器。



图 4-15 国产可供中压制备色谱使用的紫外检测器

四、自动馏分收集器和进样阀

在配置较完备的中压制备色谱中，一般都有自动馏分收集器和进样阀，如图 4-16 所示。

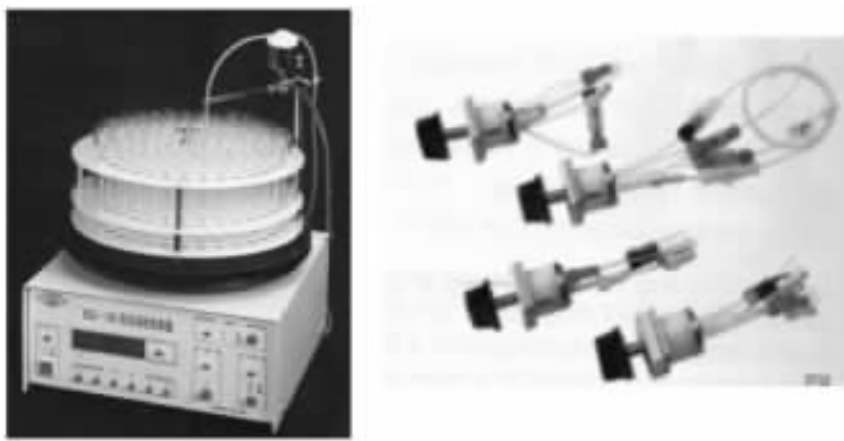


图 4-16 自动馏分收集器和进样阀

三尖杉磷碱的分子结构。

分离首先从红豆杉树皮中提取浸膏，如图 4-18 所示

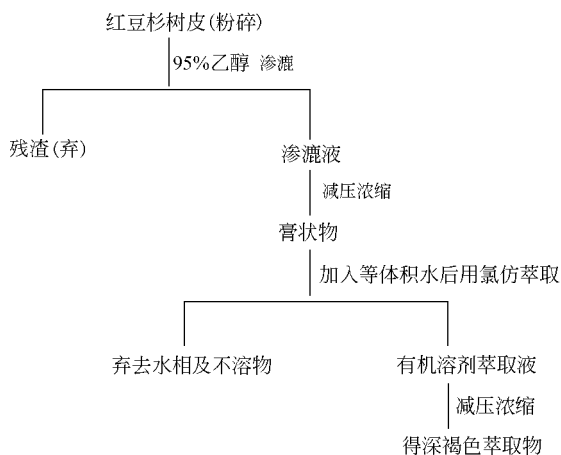


图 4-18 红豆杉树皮中紫杉烷类二萜生物碱的溶剂提取

将此深褐色萃取物取样进行反相 HPLC 分析得如图 4-19 所示色谱图。

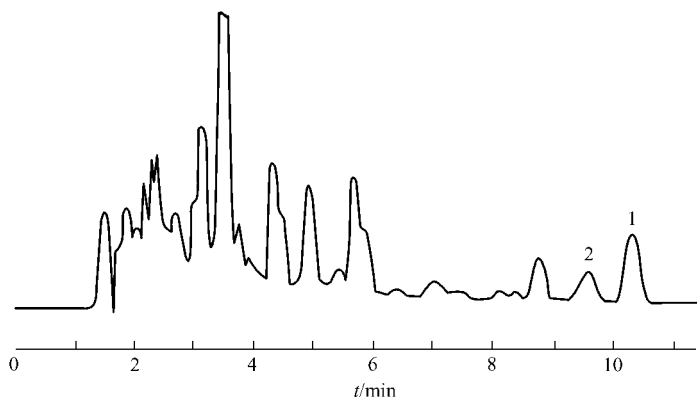


图 4-19 红豆杉树皮粗提物的反相 HPLC 分析图谱

分析柱：100mm×0.8mm i. d. C_{18} 柱

溶剂系统：乙腈-水

图中峰 1 为目标物紫杉醇，峰 2 为此分离提取中众所公认的最难除去的干扰物三尖杉磷碱。

由于粗提物中组分十分复杂，因此先用硅胶低压柱色谱对样品进行初分，冲洗溶剂的选取尽量满足紫杉醇的 k 值较小，让它比大多数杂质较快流出。通

过薄层色谱，筛选出适宜的溶剂系统为乙腈，并采用湿法填装国产 200~300 目的硅胶色谱柱。

选取极性较小的氯仿先将样品溶解，并在适当范围内可尽量让色谱柱过载。实验采用图 4-4 的装置，加压采用双链球，初分收集物的薄层展开为图 4-20。

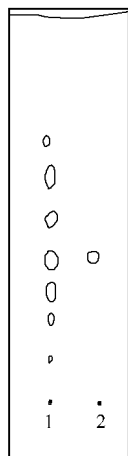


图 4-20 初分收集物的薄层展开图

自制硅胶板，展开溶剂为氯仿-甲醇 (100 : 6)

1—初分收集物；2—紫杉醇标样

当紫杉醇浸膏经初分后，其样品量大大减少，干扰物的种类也大大减少。紫杉醇浸膏是否能提纯到 98% 以上的纯度，制备技术的关键在于两点：一是柱效的高低；二是溶剂选择性的大小。

第二步利用中压制备色谱对初分收集物进行分离。实验采用干法装柱，所用硅胶为 10~40 μm 的薄层色谱硅胶，加压为国产恒流泵，筛选出的适宜溶剂系统为氯仿-甲醇 (100 : 6)。中压制备色谱分离后的收集物的反相 HPLC 分析图谱如图 4-21 所示。

从图 4-21 可知，通过两步的分离除去了样品中最难除去的三尖杉磷碱。此时我们再用溶剂系统环己烷-乙酸乙酯 (1 : 1) 进行第二次中压柱色谱分离，收集物的反相 HPLC 分析结果如图 4-22 所示。

从图 4-22 可知，所分离的紫杉醇已达到了所要求提纯的纯度 $\geq 98\%$ 。因此，一个复杂的抗癌药物，通过一次硅胶低压制备色谱，二次硅胶中压制备色谱，就将其从植物浸膏中分离出来。

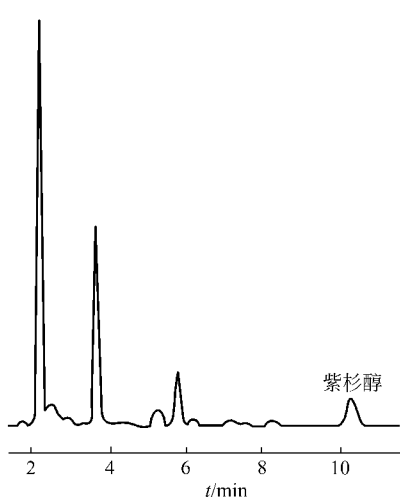


图 4-21 收集物的反相 HPLC 分析图谱

分析柱: 100mm×0.8mm i. d. C₁₈ 柱,

溶剂系统: 乙腈-水

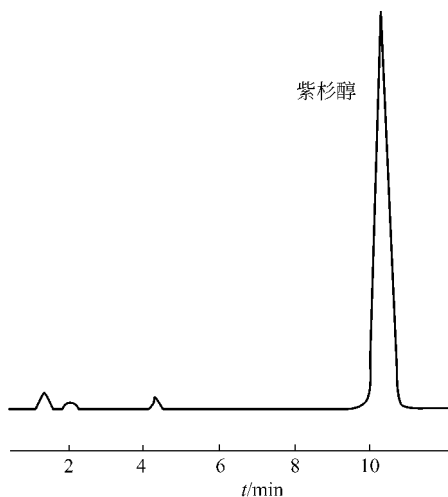


图 4-22 收集物的反相 HPLC 分析图谱

分析柱: 100mm×0.8mm i. d. C₁₈ 柱

溶剂系统: 乙腈-水

参 考 文 献

- 1 霍斯泰特曼 K, 马斯顿 A, 霍斯泰特曼 M 著, 赵维民, 张天佑译. 制备色谱技术. 北京: 科学出版社, 2000
- 2 林启寿. 中草药成分化学. 北京: 科学出版社, 1977
- 3 袁黎明. 植物有效成分的色谱分离及气相色谱中协同效应研究 (博士学位论文). 北京: 北京理工大学化工与材料学院, 1997
- 4 Still WC, Kahn M and Mitra A. J Org Chem. 1978, 43: 14

第五章 高压制备液相色谱

高压制备液相色谱与经典柱色谱没有本质的差别，不同点主要是高压制备液相色谱比经典液相色谱有较高的效率和实现了自动化操作。这是因为色谱柱是以特殊的方法用较小颗粒的填料填充而成，从而使柱效大大高于经典柱制备色谱；在仪器方面，它采用了高压泵输送流动相，同时在色谱柱后连有检测器，可以对流出物进行连续检测。目前的高压制备色谱总的来讲有如下三个特征：第一是柱长短（大多数在 20~50cm）、内径大（大多在 1~100cm）；第二是填料颗粒小（多数在 10~30 μ m）；第三是流速高（通常在 5~10cm/min）。高压制备液相色谱又叫高效制备液相色谱。

第一节 制备液相色谱仪

高压制备液相色谱具有柱效高、分离迅速等特点，是制备、纯化难分离物质的极好手段。它制备量可以达到半克量和克量级、甚至更多。一般制备色谱柱的柱效要比分析柱低些，即便是使用分析柱做小量制备，在增加样品负载的情况下也会降低分辨率。在线性条件下，溶质的保留方程式可表示为

$$t_R = t_M(1+k) \quad (5-1)$$

$$V_R = V_M(1+k) \quad (5-2)$$

理论塔板数 (n) 及塔板高度 (H) 为

$$n = 5.54(t_R/w_b)^2 \quad (5-3)$$

$$H = L/n \quad (5-4)$$

其对待分离物质的分离度 (R) 为

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k-1} \quad (5-5)$$

在色谱过程中的 Van Deemter 方程式为

$$H = \frac{1}{\frac{1}{A} + \frac{1}{C_m u}} + \frac{B}{u} + C_m u + C_s u \quad (5-6)$$

高压制备色谱仪基本结构的方框图如图 5-1 所示。

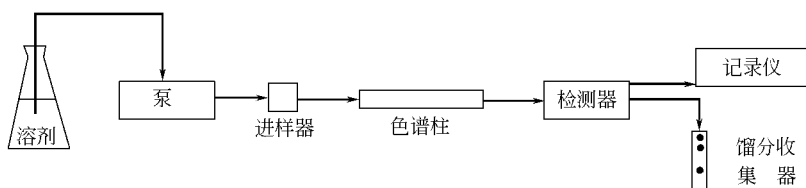


图 5-1 高压制备色谱仪基本结构的方框图

图 5-2 是日本岛津公司生产的高压制备色谱仪。



图 5-2 岛津高压制备色谱仪

高压制备液相色谱仪与分析型的高效液相色谱仪一样，在大多数情况下是积木式的，可以根据自己的制备需要和经费条件进行合理地选择组件并在实验室由自己进行组装。为满足大量制备需求，相对于一般的高效液相色谱仪需要对制备色谱主要部件提出一些专门的要求。

一、高压输液泵

制备色谱的高压输液泵要求流量大，耐一定的压力。分析型高压泵的最大流量一般是 10 mL/min，但对制备色谱尚显不够，因为它采用了更大的色谱柱，一般流量需要 30 mL/min 左右，对于直径大于 2.5 cm 以上的色谱柱，通常希望压力泵的供液能力最高可达 100 mL/min，对于工业制备色谱则要求泵的液流量可达 1 L/min。制备色谱泵的工作压力不需太高，一般最高能达 20 MPa 左右就可以了，因为制备柱填料颗粒一般比分析型填料的颗粒大，制备柱的压降不会太大。由于制备色谱的目的不是为了获得好的色谱谱图，所以

对泵的精确度和准确度要求也不是很严格。泵的形式目前大多数还是柱塞式往复泵，其次是使用气动放大泵。但对于流量很大的泵，也有使用隔膜泵的。图 5-3 是大连依利特公司生产的制备型恒流泵，其最大流量为 50 mL/min，最大压力为 20MPa。



图 5-3 依利特 P260 型制备型恒流泵

二、进样器

上样结果的好坏对分离的影响较大，要求样品能均匀地分布于色谱柱的入口端，形成一个较短的柱塞。为适应大量样品的注入，大多数情况下使用具有大样品环的六通进样阀。样品环的大小可以根据自己的需要进行调换，但一般不超过 10mL。样品环管要细而长，而不是短而粗，以免增加色谱峰的扩展。

如果样品的量较大，也可采用“停流技术”，即在停止压力泵的情况下，用注射器进行常压进样，然后再启动压力泵。如果样品的体积很大 ($>100\text{mL}$)，则应该使用一台小型的压力泵，用“停流技术”上样后，再进行液体的输送。

样品溶液以浓度稀一点、体积大一些为好，以免色谱柱的局部过浓导致局部过载现象，降低分离效率。一般样品液体积不超过色谱峰淋出体积的 $1/3$ 是不会损失分离度的。

三、色谱柱

在高压制备色谱中由于压力较大，玻璃柱容易破裂，所以色谱柱材料一般都是采用不锈钢柱。

(一) 制备柱的尺寸

对于样品的制备一般采用下面几种尺寸的色谱柱进行分离：

1. 分析型色谱柱

这种柱的内径一般为 $4\sim 5\text{mm}$ ，长 $25\sim 50\text{cm}$ ，每次进样量可以从几十至几百微克，重复进样并收集所得组分。这种方法非常耗时，分析柱在过载较严

重的情况下工作，柱性能迅速下降。如果不是样品极难分离，或者没有较大制备柱的情况下，一般不采用这种方法。

2. 半制备柱

这种柱的内径为 $8\sim 10\text{mm}$ ，长 $25\sim 50\text{cm}$ ，往往装填颗粒直径为 $5\sim 10\mu\text{m}$ 的高效液相色谱柱填料，柱效可达 15 000 左右，每次可注入 $5\sim 50\text{mg}$ 的样品，其分辨率和分离速度都不错，对于毫克级样品的制备比较方便，但成本较高。

3. 制备柱

通常这种色谱柱内径为 $20\sim 22\text{mm}$ ，长 $25\sim 50\text{cm}$ ，一般填装颗粒直径为 $5\sim 20\mu\text{m}$ 的填料，它的柱效较前面两种低，但样品处理量大，且成本较低。

4. 大制备柱

这种柱的内径通常大于 25mm ，可以达到 50mm ，长度范围在 $25\sim 50\text{cm}$ ，一般填装颗粒直径为 $10\mu\text{m}$ 以上的填料，它的柱效较前面的更低一些，但它的样品处理量更大。图 5-4 是金欧亚公司的几种制备色谱柱产品，该公司生产的 Sunchrom 系列硅胶和键合相填料为国家科技攻关项目成果。



图 5-4 金欧亚公司的制备色谱柱

(二) 制备柱的类型

原则上能用于高效液相色谱的所有液相色谱类型都可用于高压制备色谱。但实际上由于制备色谱空柱出售的较少，实验室掌握制备柱填充技术的也很少，所以高压制备色谱柱通常都是购买商品，并且价格很高。在商品制备色谱柱中，用得较多的主要有三种，一种是硅胶吸附柱色谱，一种是键合相柱色谱，还有一种是手性柱色谱。前两种是因为其应用的广泛性，而后一种是因为手性化合物的制备性拆分非常困难的缘故。

1. 液固吸附色谱

液固吸附色谱适用于分离中等分子量的油溶性的样品，对具有不同官能团的化合物和异构体有较高的选择性，其对强极性分子或离子型化合物有时会发生不可逆吸附，分离同系物的能力也较差。

现代液固色谱使用的填料主要是全多孔型硅胶填料，全多孔型又分为无定型和球型两种。在色谱分离过程中，硅胶表面上起吸附作用的是游离型硅羟基，溶质分子从溶剂中被吸附剂所吸附，是通过取代被吸附剂吸附的溶剂分子而达到的。在液固吸附色谱中，复杂混合物的分离很难以纯溶剂来实现，而常采用二元甚至三元的混合溶剂体系来提高分离的选择性。在混合溶剂的选取过程中，溶剂强度能随其组成而连续变化，在保持一定的溶剂强度的情况下，可以选择低黏度溶剂体系，以降低柱压和提高柱效。使用不同的混合溶剂，还可以提高选择性，改善分离。另外值得注意的是，硅胶柱的减活处理是十分必要的，在使用过程中需要维持硅胶含水量恒定。已有的经验表明，利用薄层色谱作为吸附色谱溶剂选择的先导是比较方便的。

2. 键合相色谱

在现代液相色谱中应用最为广泛的柱填料是经化学键合的有机固定相。在高效液相色谱中，约 80% 的分析任务是在键合相色谱柱上进行的，因此它也决定了它在高压制备色谱中应用的广泛性。键合相色谱柱的使用与液-液色谱柱差别很大，并且键合相色谱柱的分离基础与液-液色谱相比显然不同。

在硅胶表面键合极性有机基团的称为极性键合相，最常见的有氰基、氨基、二醇基键合相。极性键合相一般都作正相色谱，即用比键合相极性小的非极性或弱极性有机溶剂，如己烷或庚烷作流动相，并在其中加入一定量的极性溶剂，如氯仿、乙醇、乙腈等以调节其洗脱强度。通常极性弱的组分先出峰，极性强的组分后出峰。一般认为正相键合相色谱的分离机制更多的是分配色谱。

在硅胶表面键合烷基硅烷，所得到的就是非极性键合相。目前商品化的非极性键合填料主要有：甲基、丙基、己基、辛基、十六烷基、十八烷基、二十二烷基及苯基等键合相。其中以十八烷基键合相（简称 ODS 或 C_{18} ）应用最广。非极性键合相通常都作反相色谱，反相色谱一般用水做基础溶剂，加入与水互溶的称为有机调节剂的有机溶剂，如甲醇、乙腈、四氢呋喃、二氧六环等。在反相系统中，固定相是非极性的，流动相是极性的，样品的保留顺序是非极性的组分保留值大，极性组分先流出。水是极性最强的溶剂，也是反相色谱中最弱的溶剂。目前，对反相色谱的保留机制还没有一致的看法，大致有两种论点：一种认为属于分配色谱，另一种认为属于吸附色谱。也有人认为对单分子层固定相是以吸附为主，对多分子层固定相则偏向分配色谱的作用机制。

在高效液相色谱的键合相色谱中，反相色谱大约又占整个分析任务的 80%，所以反相键合相色谱也是高压制备色谱中重要的制备方法。

3. 手性色谱

手性一词是从希腊语衍生而来的，它相当于左、右手的关系。一个分子，如果不能与其镜像叠合，即分子本身与其镜像不同，则此分子称手性分子；与此相反，如果分子本身和其镜像相同，则称非手性分子。

分子与其镜像是否相互叠合决定于它本身的对称性，即是否缺少某些对称元素。手性分子中的手性中心可以是碳，也可以是碳以外的原子，如硅、氮、硫、磷及过渡金属原子等。但判断分子有无手性的可靠方法是看有没有对称面和对称中心。

手性化合物在生命科学、农业科学、香料科学、材料科学、精细化工、石油工业、考古学等诸多方面有很重要的用途，但手性化合物的拆分主要还是来自药物化学的推动。现用于临床的原料药世界上总共有 3 500~4 000 种，其中约 50% 是合成药物。在合成药物中，又约有 40% 是外消旋体。在外消旋体药物中，它们往往一种立体异构体有药效，而它的镜像分子则具有毒副作用、或具有相反的药效或根本就没有药效。如氯霉素，现在在临床上只用其左旋体，其外消旋体的产品现在已被淘汰；巴比妥酸盐 *S*-（-）异构体具有抑制神经活动的作用，而 *R*-（+）异构体却具有兴奋作用；苯并吗啡烷的两个对映体都有镇痛作用，但（-）的异构体服用后会成瘾，而（+）的异构体则不会；右旋甲状腺素钠可作为降血脂药物应用，但左旋体对心脏具有严重的副作用；抗菌药氧氟沙星的右旋体能损害肝、肾功能，但左旋的氧氟沙星药效很高，且毒性极小，其在各国上市后，深受人们的欢迎。1990 年，美国食品药品监督管理局作出第一个政策性规定：凡研制具有不对称中心的药物，必须对其各个对映体进行测定和评价。1992 年美国 FDA 已经明确规定对于新药专利必须分别给出外消旋体药物左旋体及右旋体的药效及药物动力学的有关资料。近年来，单一手性药物的销售呈连续增长的趋势，手性药物正成为国外药物研究、开发和销售的热点。最近模拟移动床色谱的发展，已经使手性药物可以进行吨量级的制备性拆分生产。

手性只能在手性条件下识别，就像左手只能适合左手套一样。实验室常用的识别手性的手段是测定旋光性，因为所有手性分子都是具有旋光性的光活性分子，所有光活性分子都是手性分子。手性和光活性二者是一一对应关系。

对手性化合物进行拆分研究目前主要有机械拆分法、晶体接种拆分法、生物拆分法、化学拆分法以及色谱拆分法。在这些分离方法中，色谱拆分法是最简便、最有效的方法之一。

要开展手性化合物的色谱分离研究，必须首先设法创造一个手性分离的环境。在制备色谱中最简单的和最有效的方法就是使用手性色谱柱，也即色谱柱中的填料是手性的。此时，手性分离的关键是手性固定相的选择。

到目前为止，已经商品化的高效液相色谱手性固定相有上百种，作者认为可将它们粗略地分为 9 个大类：① Pirkle 型 CSP；② 配体交换色谱 (LEC) 型 CSP；③ 大环 CSP，包括环糊精、手性冠醚 CSP；④ 多糖类 CSP，包括纤维素和直链淀粉等；⑤ 糖肽类；⑥ 含肽或蛋白质 CSP；⑦ 分子印迹 CSP；⑧ 合成手性高分子类；⑨ DNA 类。在这 9 个大类中，具有好的性能价格比的应该是多糖类手性固定相，Pirkle 型手性固定相以及环糊精类手性固定相。

各种不同的手性固定相具有不同的分离模式，从理论上讲，不管选择何种固定相，分离何种对映体，手性分离或手性识别都必须同时有三个相互作用点，这些作用中至少一个是立体化学性质的，这个原理 1952 年首次由 Dalglish 提出，称“三点作用原理”。该原理可用下面的简单图形（图 5-5）加以说明。

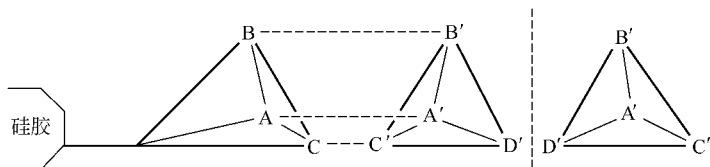


图 5-5 三点作用模式

只有一个溶质对映体具有合适的手性，能与拆分剂同时具有三个相互作用点

该图的手性材料固定在硅胶的表面上，其中含有 A、B、C 三个作用点，能与溶质相应的三个点 A'、B'、C' 作用，虽然溶质中两对映体都有两点能与手性固定相作用，但只有其中一种对映体可以同时有三种作用，而另一个不能。同时三点与手性固定相有作用的对映体被保留的时间较长。如果第三点作用不是吸引，而是排斥，被保留的时间反而短。因此，只有通过固定相与对映异构体的三维空间分子的“三点作用”，才能确立立体的选择性。

“三点作用”的作用力可以是氢键，偶极-偶极相互作用，范德华力，包含作用以及立体阻碍等。由于固定相（相当于溶剂）和流动相中的对映体（相当于溶质）都是光活性的，它们之间的作用点可以有两点相同，但第三作用点需存在差别，使溶质和溶剂之间相互作用所形成的缔合物在稳定性上有差别，在通过多次地交换后，达到对映体的分离。

读者欲掌握系统的色谱柱以及手性分离的理论和知识，请阅读本丛书

《色谱柱技术》和《色谱手性分离技术及应用》分册。

四、检测器

制备色谱流出液的流量大，浓度高，不需要高灵敏的检测器，但用于制备液相色谱的检测器应能适应高流速移动相的通过。有少量为制备色谱专门设计的检测器，它的光程较短，有大内径的管路。但通常分析型的检测器加上一个分流器后也能满足制备色谱的要求。

高压制备色谱中最常用的是示差折光检测器，它的适应样品类型很宽，灵敏度对于制备色谱来说也已足够。如果分离中流量过大，解决的办法是采用分流器，如以总流量的十分之一流过检测池，但示差的缺点是对温度变化比较敏感。有一点要注意的是，峰面积大小不仅仅取决于组分量的大小，还同检测器的响应有关，有些物质的折射率小，在色谱图上以小峰形式出现易被人们忽视，但实际上却是主要成分。

其次使用的是紫外检测器，它可在溶质紫外吸收较弱的波长处进行检测，避免超过检测器的最大负荷。另外也可采用分流器只将少量流出液导入检测器。

对于很多分离来讲，如果将示差折光检测器与紫外检测器串联使用是一个比较理想的方法，因为二者的记录信息可以互补，为正确地判断分离情况提供更多的数据。图 5-6 是同时利用示差折光检测器与紫外检测器的串联装置检测流出物的示意图谱。

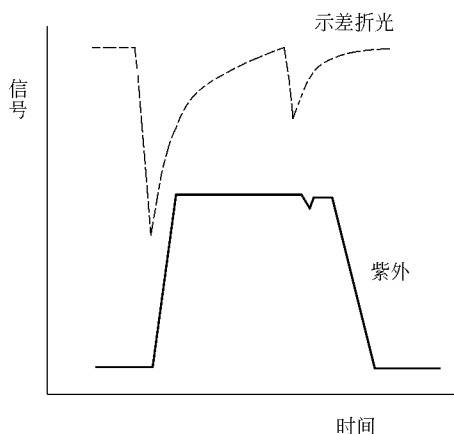


图 5-6 示差折光检测器与紫外检测器同时检测图谱

由于两检测器是串联使用，所以图中的两图谱有一定的时间差；另外，由于两个检测器的检测原理不一样，它们的峰大小也不一致。

第二节 分离设计

在制备色谱中，虽然加大进样量甚至过载时柱效难免要下降，但我们通常还是在过载情况下进行，只要柱效不是下降得太大即可。制备色谱的选择准则是成本低，容量大，效率高。在制备色谱的分离方法的建立中，基本上还是基于实验尝试和经验，目前的理论计算和预期离实际应用还有相当一段路程，并且理论计算本身也非常耗时、耗力。在实际工作中，通常将分离策略设计成两种：一种是峰接触法；另一种是峰重叠法。

一、峰接触法

峰接触法就是在制备色谱分离方法的建立中，增加待分离物的进样量，直到待收集物的色谱峰与最邻近杂质的色谱峰刚好接触为止。也许增大的样品量已经使色谱柱过载，但此时收集的待分离物仍然是达到要求纯度的产品。图 5-7 是峰接触法的原理示意图。

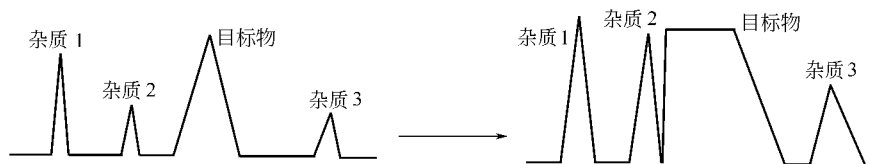


图 5-7 峰接触法的原理示意图

图左边是分析型的色谱分离图，待收集组分是图中的目标物峰，另外三个是杂质。为了制备目标物，必须增大进样量。在这些杂质中，杂质 2 离目标物的色谱峰最近，因此，样品增加的最高限量将是目标物的色谱峰与杂质 2 的色谱峰刚好接触时的进样量。这个进样量的大小可以利用下面的等式进行粗略地估计：

$$w \approx \frac{1}{9} w_s \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)^2 \quad (5-7)$$

式中 w ——进样量；

w_s ——色谱柱的样品饱和容量；

α ——分离因子。

式 (5-7) 非常清楚地表明，当色谱柱的饱和容量越高、分离因子越大时，则允许所上的样品量就越大。色谱柱的饱和容量是指在基本上不降低柱分辨率

的情况下所能分离的样品量。色谱柱容量直接取决于填料的性质和容量,柱容量还同样品特性及分子量和保留值有关。对于色谱柱饱和容量的大小,可以根据下面的经验式(5-8)进行粗略地估计:

$$w_s(\text{mg}) \approx 0.4 \times \text{柱分离材料的总表面积}(\text{m}^2) \quad (5-8)$$

从式(5-8)也可看出,分离材料的表面积越大,则色谱柱的样品容量越高。例如对于一个 $25\text{cm} \times 0.46\text{cm}$ 的色谱柱,如果柱中填料的质量为 3.5g ,填料的孔径为 12nm ,填料的表面积为 $400\text{m}^2/\text{g}$,则根据上式就可计算出色谱柱的饱和容量大约为 560mg 。通常填料颗粒的直径越小,表面积越大。所以较小粒度的分离材料有利于色谱柱样品容量的提高。

如果溶解样品的溶剂与移动相相同,则样品溶液的最大进样体积也可根据下面的关系式进行粗略地估计:

$$V_{\max} \approx 0.5F(t_2 - t_1) \quad (5-9)$$

式中 F ——流动相的流量, mL/min ;

t ——在接近线性的条件下目标物与最邻近的一个杂质峰的保留时间。

在上面的进样量和进样体积下,目标物的色谱峰宽可以利用下面的等式进行计算:

$$W^2 = \underbrace{\frac{16}{N}t_0^2(1+k)^2}_{\text{柱效影响}} + \underbrace{6t_0^2k^2 \frac{w}{w_s}}_{\text{样品量的影响}} \quad (5-10)$$

式(5-10)表明峰接触法的色谱峰宽的大小受两个方面的影响,一方面来自于色谱柱的柱效,另一方面来自于样品重量的影响。式中 N 、 t_0 、 k 分别为在线性条件下的塔板数、死时间和容量因子, w_s 为色谱柱的样品容量, w 为实际上样量。

因此,在峰接触法中,完成预计的制备性分离所需要的色谱柱的最小塔板数(N_{opt})可以计算为:

$$N_{\text{opt}} \approx 40 \left(\frac{1+k}{k} \right)^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \quad (5-11)$$

式中, k 和 α 分别为线性时的容量因子和分离因子。

从式(5-11)可见,增大分离因子,不但可以增加样品进样量,而且还可以减少所需的塔板数、使用较短的色谱柱进行制备性分离。其既降低了填料和流动相的消耗,也节省了大量的时间和人力。

二、峰重叠法

所谓峰重叠法,是指增大进样量直至待分离物的色谱峰与最邻近的杂质色谱峰发生重叠的一种方法。峰重叠法常针对的对象为两种:一种是微量组分的

分离；另一种是难分离物质对的分离。

（一）微量组分的分离

利用峰重叠法分离微量组分的策略分两步：首先进行大剂量进样，使待收集物峰与最邻近杂质峰进行重叠，同时收集该重叠峰；第二步是再按照峰接触法原理分离待收集物。

如果微量组分位于重叠主峰的前面，由于主峰成分对微量成分具有一定的顶替作用，则随着进样量的增加，微量组分的色谱峰宽没有明显的增加，如图 5-8 所示。

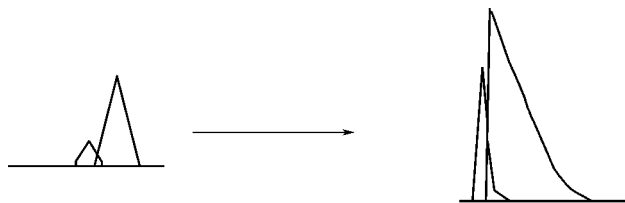


图 5-8 样品量对主峰前面微量组分峰宽的影响

反之，如果微量组分峰位于重叠主峰的后面，则主峰成分对于微量组分峰具有拖带效应，随着进样量的增加，微量组分峰的峰高增加很慢，但峰宽变得很宽，如图 5-9 所示。

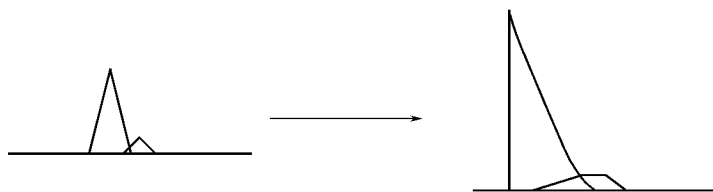


图 5-9 样品量对主峰后面微量组分峰宽的影响

因此，当微量组分峰位于重叠主峰前面时更有利于微量组分的制备性分离。反之，却比较麻烦。

现在以微量组分在杂质主峰之后的情况为例来说明该微量组分的制备。图 5-10 为该分离的示意图。

图 5-10 中 (a) 为分析型的色谱图，图中第二个峰为要收集的微量组分，从峰面积看其显著地小于两个杂质峰，并属于在主峰后面的微量组分类型。

分离的第一步就是大剂量地进样，使微量组分峰与杂质主峰大量地重叠，如图 5-10 中 (b) 所示。同时按照图中虚线收集重叠峰的馏分。

分离的第二步是将收集的馏分再次在该条件下进行分离。在第一步中重叠

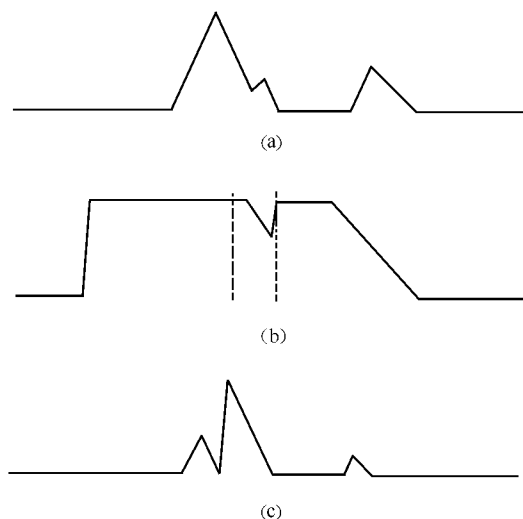


图 5-10 峰重叠法进行微量组分的制备性分离

峰重叠的程度以及收集馏分的范围大小最好使在分离的第二步中恰好让微量组分峰与杂质峰之间呈现峰刚好接触的状态，如图 5-10 (c) 所示。此时按照峰接触法直接收集微量组分峰即得待收集产物。

(二) 难分离物质对的分离

在制备性分离中另一种经常遇到的情况就是待收集物是两个峰位置非常接近的两个组分。在这种情况下，则也可以采取峰重叠法。分离的第一步是大剂量进样让两个峰重叠，同时收集重叠峰馏分。第二步是将重叠峰进行双组分循环回收。制备性分离过程如图 5-11 所示。

图 5-11 (a) 为分析型的色谱图，待收集物为峰 1 和峰 2。制备性分离的第一步就是大剂量地进样，让峰 1 和峰 2 重叠，并使该重叠带与最接近的杂质带刚好接触，此时为最大进样量。同时收集重叠带的馏分，如图 5-11 (b) 所示的虚线之间的部分。分离的第二步是将收集所得到的馏分进行再一次的分离。由于两个组分的峰位置距离得很近，在该实验条件下不可能让两组分达到完全分离，因此产品的收集按照图 5-11 (c) 的两个阴影部分分别收集得到产物 1 和 2，中间带部分可使用手动或者自动循环技术，将柱流出液重新倒入色谱柱再次进行分离。再循环技术通常是使用一个四通阀，用以切换柱流出液使之不流入检测器而重新回到色谱柱。由于这种技术不可避免地会带来峰扩展，所以循环次数不宜多，以 4~5 次为限，每次再循环可提高柱效 1.41 倍。也可采用柱切换方式实现再循环，最后达到完全分离的目的。

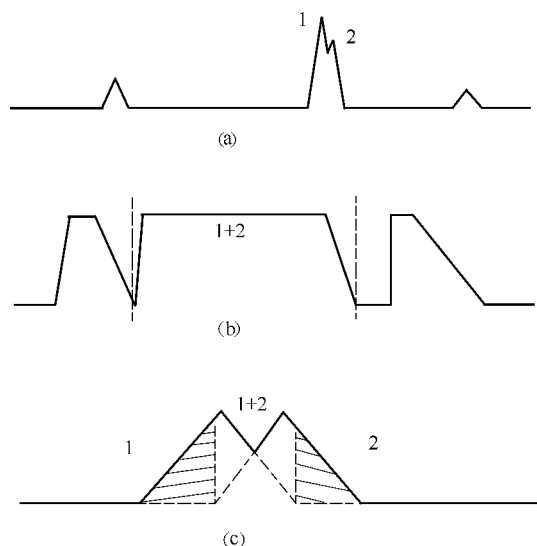


图 5-11 峰重叠法分离难分离物质对示意图

第三节 实验条件的选择

为了节省时间和溶剂，一般先在分析型高效色谱柱上寻找混合物样品的分离条件，使得各组分之间有足够的分离度，然后再扩大应用到同类型的制备柱。制备柱的柱效比分析柱低些，色谱柱的负载能力正比于柱的内径、柱长和分离材料的总表面积，制备柱虽然允许过载，但过载一般应该以上节介绍的峰接触法或者峰重叠法为标准。也有研究者认为过载应该以柱效降至原有的一半或容量因子 k 减少 10% 为限。各类色谱柱的负载能力大不一样，硅胶柱比反相烷基键合相柱高 10 倍，离子交换柱与填料的交换容量有关，而分子排阻色谱柱则与孔径分布及洗脱液的流量有关。图 5-12 是制备色谱实验条件选择示意图。

高压制备色谱实验条件的选择一般涉及到色谱固定相的选择、流动相的选择、样品溶剂的选择等。

一、固定相

针对待分离物的性质，首先应该选择适宜的固定相类型。在大多数情况下，一般化合物的制备性分离是在正相或者反相的条件下进行分离。如果样品

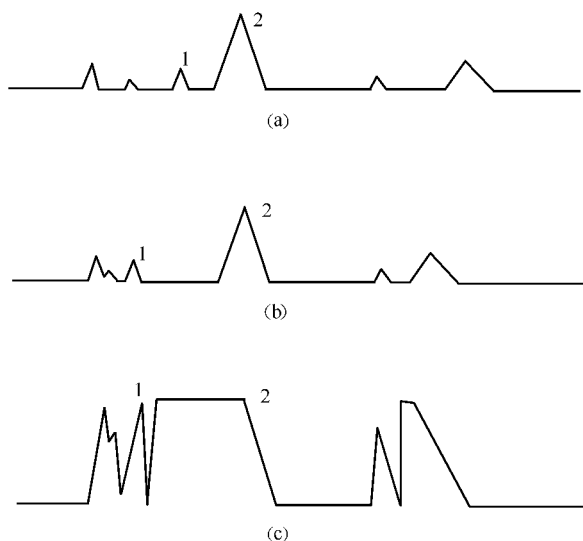


图 5-12 制备色谱实验条件选择示意图

是极性分子，一般应用硅胶固定相；如果样品的非极性较强，则应该选择反相键合相，多数情况下是选择 C_{18} 或者 C_8 固定相。当然如果分离的是外消旋化合物，则应该选择手性固定相。所选择的分析型色谱柱中的填料最好与后面使用的制备型色谱柱中的填料是同一批次生产的产品，这样更有利于实验条件的放大。另外，填料表面的吸附物质或化学键的脱落也会严重影响样品的制备。

在选择好固定相的种类后，就可以选择分析型规格的色谱柱考察对待分离样品的分离情况，如图 5-12 中的 (a) 所示，峰 1 是最邻近杂质，峰 2 是待收集组分，此时该系统对所有的峰都有很好的分离效果，是很好的色谱分析状态，但此时不是最好的制备性分离峰 2 组分的色谱条件。

二、流动相

流动相的选择应该根据待收集组分与最邻近杂质达到尽可能大的分辨率为标准。在制备色谱中，仍然可以参考下面的关系式 (5-12)，尽管在非线性的条件下，它们偏离等式关系。

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right) \quad (5-12)$$

由式 (5-12) 可知，要获得好的分离 R ，应该具有尽可能大的分离因子 α ，好的柱效 N ，增加容量因子 k 也可以增大分辨率。在这三个因素中，尽可能地增加分离因子 α 是最重要的。

分离因子 α 的数值主要决定于两个方面，一方面来自于色谱分离材料本身

的性质；另一方面来自于流动相的正确选择。

色谱分离材料本身的性质主要决定于分离材料的化学结构，为了获得好的分离材料，色谱工作者在这方面已经作了大量的工作，获得了很多优秀的色谱填料。作者在新型手性固定相的合成以及混合固定相的加合效应与协同效应方面也作过一些探索。

流动相的选择主要是选择流动相的极性和选择性两个方面。通过大量的实践，对于正相色谱可以考虑按照下面的示意图（图 5-13）获得有效的溶剂系统。

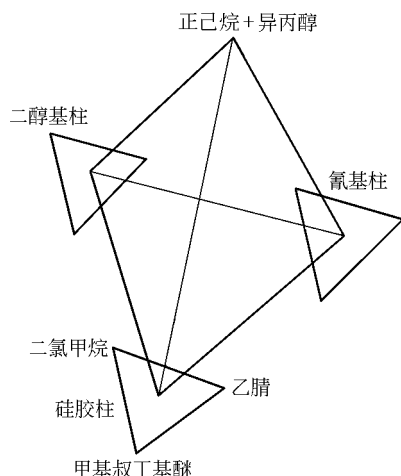


图 5-13 正相色谱溶剂系统的选择

该图表明，在正相色谱中，最常用的色谱柱是硅胶柱、二醇基柱以及氰基柱。通常正己烷与异丙醇的混合物是最基本的溶剂系统，调节二者的比例可以改变溶剂系统的极性。如果基本溶剂系统不能满足分离的需要，则可以在基本溶剂系统中再添加其他溶剂，如甲基叔丁基醚、二氯甲烷以及乙腈中的一种，或者它们的混合物等，以改变它们的选择性。

对于反相色谱可以考虑根据下面的示意图（图 5-14）进行溶剂的筛选。

该图表明反相色谱中 C_{18} 或者 C_8 柱、氰基柱以及苯基柱是最常见的色谱柱。水与有机溶剂的混合物是反相色谱的基本溶剂，常见的有机溶剂是甲醇、乙腈以及四氢呋喃，调节它们与水之间的比例可以改变溶剂的极性。为了达到好的选择性，可以将上述每种有机溶剂与水分别组成的混合物进行分离性质考察，必要时甚至可以将其中的两种甚至三种有机溶剂按照一定的比例同时与水混合，筛选出最佳的溶剂系统。

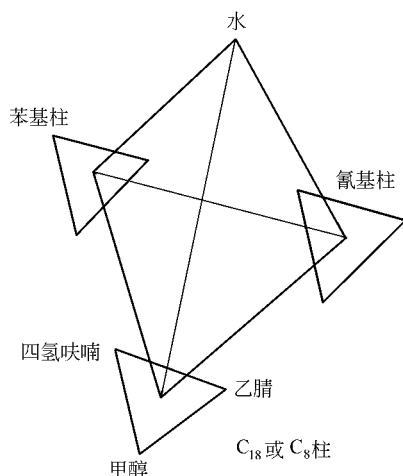


图 5-14 反相色谱溶剂系统的选择

手性色谱一般也是在常见的正相或者反相色谱的条件下进行工作。

如果待收集组分与最邻近杂质峰的分因子 $\alpha > 1.5$ ，则将有利于制备性分离。

另外就是在可能的情况下让分离柱有较高的柱效，柱效与柱长、柱径、分离材料的颗粒大小及分布范围等因素有关，并且在制备色谱中柱效还是进样量的函数，随着进样量的增加，色谱柱效要降低。

原则上容量因子数值的增加会增大分辨率，但实际上在制备色谱中在可能的情况下，容量因子 k 不宜太高，因为过大的容量因子将需要消耗大量的时间、溶剂以及收集馏分的浓度太低，造成大量的稀溶液浓缩工作。通常制备色谱的容量因子 k 控制在 $1 \sim 5$ 的范围之内。图 5-12 中 (b) 为优选流动相尽量提高收集组分与最邻近杂质的分离度的示意图，此时虽然一些峰的分离效果变坏，但对于制备性分离峰 2 组分来讲，该溶剂系统才是较好的。

在制备色谱中，在可能的情况下，一般应尽量避免使用梯度洗脱技术。

制备色谱中选用的流动相除要考虑是否能把混合物样品分离开外，其次还要考虑溶剂的沸点要尽量低，让待分离物收集后溶剂容易挥发除去。所以在制备性色谱中，我们往往是优先考虑正相色谱分离系统，因为正相色谱通常使用的有机溶剂比反相色谱中使用的水的混合溶液更容易挥发除去。

另外用作流动相的有机溶剂纯度也是很重要的，若溶剂不纯会留下大量的杂质，污染已经分离纯化好的样品。

三、样品的溶解

在制备性分离中样品的溶解性不是很重要的，但在制备色谱中，样品在移动相中的溶解度却非常重要，因为实验需要将大剂量的样品溶解在有限量的移动相中。选择的移动相不但需要其有好的分辨率，而且还应该对待分离物具有高的溶解度。经常由于样品在移动相中的溶解度太小而成为制约制备性分离的重要因素。

如果样品在流动相中的溶解度有限，应该将溶解样品的溶剂体积增大到上一节介绍的最大进样体积。如果此时还不能满足完全溶解样品的要求，对于离子样品，可以考虑改变溶剂的 pH 值或者改变缓冲溶液的浓度；对于正相色谱可以考虑利用极性较低的溶剂组分溶解样品甚至可以考虑使用具有相同溶剂极性的其他类似溶剂代替移动相溶解样品。

此外，还可以考虑增加进样温度和柱温的办法，加入表面活性剂增大溶解度等办法。但所有这些办法，都应该避免溶质在色谱柱中的沉淀或者结晶析出。

样品的前处理很重要，粗制品预先用萃取、蒸馏或重结晶等方法净化，然后用薄层色谱检查纯度。必要时，在制备色谱前加一保护柱，避免杂质损害制备柱。

四、制备性分离

在解决好待收集组分的高分辨率和高的样品溶解性后，就可以按照图 5-12 中的 (c) 进行峰接触法增大进样量制备待收集成分。因此，到现在为止，我们讨论了在分析柱上如何根据峰接触法进行制备性分离。如果待分离物是微量组分或者是难分离的两组分，则按照峰重叠法根据上述类似的方法处理。

但在制备色谱中，仅利用分析型柱常常是远远不能达到我们的制备规模的，我们在多数情况下不得不使用较大的分离柱。因此制备性分离的最后一步就是将在分析型柱上探索的最佳制备性分离条件放大到所采用的制备色谱柱上。把分析型柱的上柱量按比例放大到制备柱，而不损失分辨率，可按式计算：

$$\text{制备柱上柱量} = \text{分析柱上柱量} \times \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2 \times \left(\frac{L_2}{L_1}\right) \quad (5-13)$$

流量的放大比则为：

$$\text{制备柱流量} = \text{分析柱流量} \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2 \quad (5-14)$$

上面式 (5-13) 或式 (5-14) 中, d_2 是制备柱的直径, d_1 是分析型柱的直径;
 L_2 是制备柱的长度, L_1 是分析型柱的长度。只要分析柱的填料颗粒大小与制

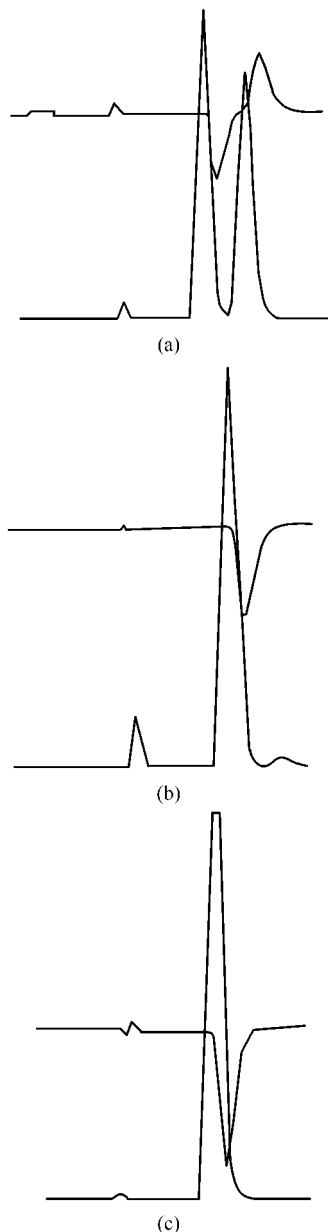


图 5-15 N -(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸的手性分离图

色谱柱: 2.0mm (i. d.) $\times$ 250mm 的纤维素三 (3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)

手性柱 (OD), 流动相: 正己烷-异丙醇-三氟乙酸 (90:10:0.5), 流量 0.1mL/min

(a) (±)- N -(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸; (b) 95% 的 (−)- N -(4-甲基苯甲酰基)

苯基甘氨酸和 5% 的 (+)- N -(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸混合物;

备型柱的填料颗粒大小一致，则在此放大的条件下可以得到比较满意的大剂量制备性分离的效果。

作者曾经利用 (—)-苯基甘氨酸为原料合成了 (—)-*N*-(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸，但利用手性 OD 柱进行 HPLC 测试表明，其中还含有 (+)-*N*-(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸大约 5%，如图 5-15 (b) 所示。作者利用上述介绍的高压制备色谱的分离方法，采用 21.2mm (i. d.) × 250mm 的制备性手性柱纤维素三 (3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯) (OD)，流动相正己烷-异丙醇-三氟乙酸 (90 : 10 : 0.5)，流动相流量为 10mL/min，每次进样 5mg，制备性分离了 (—)-*N*-(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸，产品纯度如图 5-15 (c) 所示。

图 5-15 (a) 是 (±)-*N*-(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸的色谱分离图，图 5-15 (b) 是 95% 的 (—)-*N*-(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸和 5% 的 (+)-*N*-(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸混合物，图 5-15 (c) 是提纯后的 (—)-*N*-(4-甲基苯甲酰基)苯基甘氨酸产品。在每一个图谱中，上面一条曲线是旋光检测器的检测曲线，下一条曲线是紫外检测器的检测曲线。分离中旋光检测器与紫外检测器串联使用。

第四节 色 谱 饼

在科研及生产过程中，蛋白质、多肽、核酸以及一些生物活性物质的分离提取需要高效、快速的方法，对它们的纯化不但需要很高的纯度，而且还需要在分离过程中最大限度地保持它们的生物活性。

在常规的制备性色谱分离中，通常样品在柱中的作用时间长，系统的压力降增大，制备规模的放大对设备的要求较多。为了在制备色谱中减少生物大分子的失活，实行生物大分子的快速分离，有学者探索了色谱饼的制备性分离方法。该方法是在保持色谱柱的总体积不变的情况下，改变柱的长度和直径，使其由柱状变为饼状，具有大的直径和薄的厚度。

该方法通常可使用如 5mm × 50mm (i. d.) 的中空不锈钢饼，利用匀浆法在 40MPa 的高压下装填粒度直径为 5 μ m 的高效液相色谱填料。该饼由于薄的厚度，使得其比相同体积的制备色谱柱能容纳更多的填料，也即它有比相同体积的色谱柱更高的填充密度。然后将其连接到高压制备色谱系统中，用流动相对色谱饼进行平衡。

将生物活性成分配制成一定浓度的样品溶液后即可进样，由于色谱饼的直径较大以及其厚度很薄，再加上饼中填料小的颗粒直径，所以可以对样品进行

大流量的移动相冲洗。这种分离方法既保证了样品在柱中短的作用时间，又保持了分离所必需的分辨率。

该方法具有处理量较大，分辨率较高的优点。将其应用于生物活性物质的分离，有利于保持高的生物活性，同时还可以用高流速的移动相进行洗脱，节省大量的分离时间。

第五节 大直径柱

由于石油化学工业、食品工业、药物工业、湿法冶金以及精细化工等工业的迅速发展，使得工业化的高压制备液相色谱也得到了一定的发展。固定床色谱柱有其悠久的色谱历史，成熟的色谱理论，一定的数学模型，大量的实践经验，这些都为高压制备液相色谱的工业化打下了很好的基础。

内径大于 10cm 的大直径高压制备液相色谱柱通常有三种类型，第一种是径向压缩柱，该柱的填料是装在管壁可压缩的塑料柱内，这个塑料柱的外面有一个不锈钢的外套，通过气体或者液体向外套与塑料柱之间施压，可以压紧柱中填料，提高柱效。这种柱目前主要是 Waters 公司生产的。第二种是环行膨胀柱，它是通过柱中心的一个楔型杆推动活塞向上移动产生挤压柱床的径向和轴向而使柱填充紧密，这种柱目前还处于实验阶段。真正在工业化的高压制备液相色谱中起主导作用的是第三种柱——轴向压缩柱。

轴向压缩柱技术是 Godbille 和 Devaux 于 1974 年首先提出来的，到 20 世纪 90 年代发展基本成熟。图 5-16 是 Novasep 公司生产的商品化的大直径轴向压缩色谱柱，该柱的最大特点是柱内有一个可以移动的与柱壁有很好密闭性的活塞。柱的填充是先向柱内装入填料的匀浆混合物，然后推动活塞使柱中的填料层被压缩，在柱内的两端皆配有多孔不锈钢滤板以及能使样品和洗脱液在柱截面上均匀分布的分散器，溶剂从另一端的筛板滤过而排除。根据在分离过程中，是否给活塞加上持续的压力又分为两种：系统始终产生一定的压力让活塞持续压缩填料的称为动态轴向压缩柱，它可以随时消除柱内的死空间；而系统只是间歇性地让活塞压缩填料的称为静态轴向压缩柱，它的效果比动态的差，但设备要比动态的价廉。该柱更换柱填料时只需打开柱的另一端，推动活塞，将填料推出色谱柱即可。

现在世界上安装的最大的轴向压缩高压制备色谱柱的内径达到 1.6m，柱长 4m，柱中填料用量达 4 000kg，流动相用量为 6 000L，整个系统的重量达到 36 000kg，是 Novasep 公司在 2002 年成功安装的。



图 5-16 Novasep 公司的大直径轴向压缩色谱柱

参 考 文 献

- 1 Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L. Practical HPLC Method Development. Second Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997
- 2 Yuan L M, Fu R N, Gui S H, et al. Chromatographia. 1997, 46: 291
- 3 师治贤, 王俊德. 生物大分子的液相色谱分离和制备. 北京: 科学出版社, 1992
- 4 李瑞萍, 黄骏雄. 化学进展, 2004, 16 (2): 273
- 5 李翔, 张养军, 耿信笃. 色谱, 2002, 20 (3): 133
- 6 袁黎明, 傅若农, 戴荣继等. 高等学校化学学报, 1998, 19: 207
- 7 朱彭龄, 云自厚, 谢光华. 现代液相色谱. 兰州: 兰州大学出版社, 1988
- 8 Snyder L R., Cox G B. and Antle P E.. Chromatographia, 1987, 24: 82
- 9 Yuan L M., Ai P, Zi M, et al. J Chromatogr Sci., 1999, 37: 395
- 10 Knox J H. and Pyper H M. J Chromatogr. 1986, 363: 1

第六章 高速逆流色谱

1966 年第一台逆流色谱仪问世, 至今已经历了近 40 年的历程, 逆流色谱仪及其逆流色谱理论已经日趋完善和实用。20 世纪 80 年代初期, 高速逆流色谱的出现, 开始了逆流色谱的现代化进程, 美国、中国、日本、法国、俄罗斯、德国、瑞士、英国等国的科学家相继开展了此项技术的研究, 它的发展受到了国际范围的关注。我国从 20 世纪 70 年代开始逆流色谱仪及其应用的研究, 目前不仅在高速逆流色谱 (HSCCC) 仪器研制方面紧紧同国际最新发展相匹配, 而且在天然产物有效成分的分离制备方面也做出了具有创新特色的工作。

第一节 逆流色谱

逆流色谱是一种不用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术, 它的创始人一般认为是 Y. Ito, 典型特征是互不相溶的两相在分离过程中做逆流运动, 溶质组分由于在两相中的分配系数不同而得到分离。

逆流色谱具有两大突出的优点: ①分离柱中固定相不需要载体, 消除了液固色谱由于使用载体而带来的吸附现象, 特别适合于分离极性物质和具有生物活性的物质; ②特有的分离方式尤其适用于制备性分离, 每次进样量及进样体积较大, 同时具有高样品回收率。

逆流色谱仪经过了一代又一代的变化, 衍生出了一类又一类型的产品, 研究过的仪器种类非常繁多。按照目前的文献资料以及实际得到应用的情况, 作者粗略地将最具有代表性的分为三个大的类型。

一、液滴逆流色谱

液滴逆流色谱装置可由 100~1 000 根分离管组成, 分离管的直径一般为 2cm 左右, 长为 20~40cm, 材料可以是玻璃、聚四氟乙烯以及金属, 但玻璃分离管能较好地观察分离管中的液滴形成情况。分离管之间一般用直径为 0.5mm 的聚四氟乙烯管连接。在分离管的前面连接有进样阀, 在进样阀前面是恒流泵; 在分离管的后面可以连接检测器和样品的分步收集器。图 6-1 是液滴逆流色谱装置示意图。

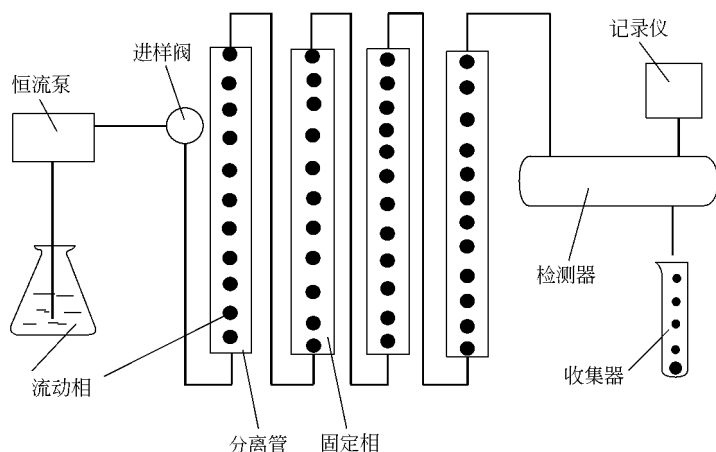


图 6-1 液滴逆流色谱装置示意图

实验前首先要选择好互不相溶的两相溶剂系统，此系统的两相要能在液滴逆流色谱装置中形成液滴。当两相溶剂系统充分混合、平衡和静置后，对于图 6-1 的装置，先将下相利用恒流泵输入分离管中，从进样阀进行进样，最后利用恒流泵将上相稳定地输入设备中。由于上相的比重比下相轻，流动相就会在分离管中形成液滴，带着样品从下向上上升，液滴上升的过程中，样品连续地在两相中分配。由于不同的组分在两相中的分配比不一样，因此它们在分离管中移动的速度也不一样，对于一个复杂的样品，在该设备中，经过一定时间的分离，最后达到分离。

该实验也可以将上相作为固定相，下相作为移动相，流动相在分离管中先形成液滴，接着是靠重力的作用在分离管中从上向下移动。这时由于流动相在分离管中的流动方向相反，所以图 6-1 中的进样阀与恒流泵要连接在装置的右面，而检测器以及收集器应该连接到装置的左边。

二、旋转小室逆流色谱

液滴逆流色谱的分离效率并不高，因为仅靠流动相形成液滴而在分离管中简单地上升或者下降所带来的溶质在两相中的反复分配是很有限的。而旋转小室逆流色谱的发展在一定程度上改善了这种情况。

旋转小室逆流色谱实验装置的中心部分是由多根装设在转轴周围的玻璃分离柱组成，每根柱之间利用 1mm 直径的聚四氟乙烯管串联连接，这些柱的倾斜度可以调节，旋转的速度也可以变化。每根分离柱长 50cm 左右，直径为 1.2cm 左右，在管内应用聚四氟乙烯的小圆盘将空柱分成多个小室，这些小室少则可为几十个，多则可上百个。小圆盘的中心有一个直径大约为 1mm 的小

孔，其作用是可以让流动相通过分离柱。图 6-2 是旋转小室逆流色谱装置示意图。

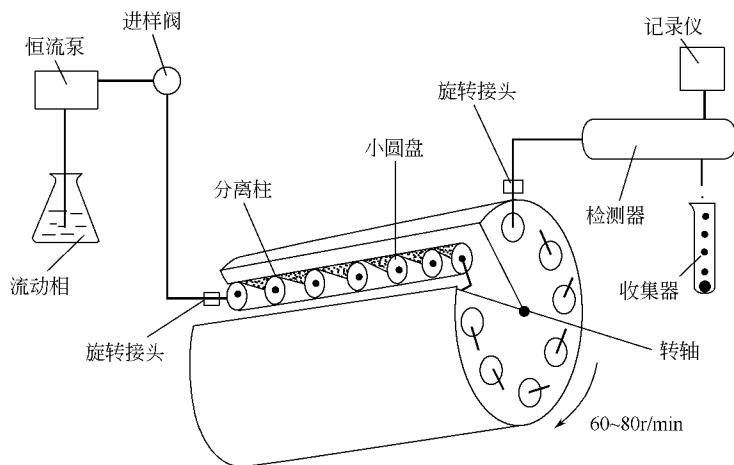


图 6-2 旋转小室逆流色谱装置示意图

该方法与液滴逆流色谱一样，首先要选取互不相溶的两相，并让其预先混合、平衡、静置、分层。但该方法不要求流动相在固定相中一定能形成小的液滴，所以其大大扩展了流动相的选择范围，也拓展了该法的应用领域。对于图 6-2 方式的连接，应该选取下相作为固定相，先将分离柱保持在垂直状态，然后利用恒流泵将固定相泵入到分离柱中，同时分离柱开始转动；接着进行上样，并将分离柱调节到同水平线呈 $20^{\circ} \sim 40^{\circ}$ 的倾斜程度；最后就可利用恒流泵将流动相输入到系统中。各分离管绕中心轴转动的速率一般控制在 $60 \sim 80 \text{ r/min}$ ，流动相输入的流量一般为 $15 \sim 50 \text{ mL/h}$ 。当流动相进入分离管后，由于流动相的密度比固定相小，因此就会沿着分离管从下向上流动，使每一个分离小室含有一定量的流动相，同时由于分离管在不停地转动，其与液滴逆流色谱相比，大大增加了两相溶剂系统的相互接触，也就增加了溶质在两相中的分配次数，使得该法的分离效果得到了较大程度的提高。

同样原理，如果我们利用两相溶剂系统的上相作为固定相，则流动相在分离柱中的运动是由上向下靠重力运动，图 6-2 系统中的进样阀及恒流泵应该连接在分离柱的上端，而检测器等只能连接在分离柱的下面一端。

三、离心逆流色谱

在逆流色谱中，离心逆流色谱的内容是最丰富的，各种不同的设备类型多达数十种，它们最根本的特征是仪器工作时分离柱都要绕中心轴在设备中高速

转动，分离过程充分利用了高速转动过程中的离心力。

根据分离柱在仪器中的高速旋转，又可分为其分为两个大类：一个大类是分离柱直接绕中心轴高速旋转的模式，即是只具有公转的模式；而另一个大类是分离柱除了绕中心轴旋转外，分离柱本身还在作自转运动，即既有公转又有自转的模式，就像我们的地球在绕太阳作公转的同时，本身也在做自转一样。

（一）非行星式逆流色谱仪

非行星式的逆流色谱仪也有多种类型，主要包括分离柱是螺旋管式和非螺旋管式。在众多的这些种类中，目前真正还在应用的主要是匣盒式离心逆流色谱。

匣盒式离心逆流色谱仪由日本的 Sanki Engineering 公司生产，它又叫离心液滴逆流色谱。在该仪器的典型装配中，对称地安装有 12 个匣盒，在每个匣盒中安置有几十到几百个小的分离管，整台仪器分离管的总体积可从 200mL 到数千毫升，每个匣盒之间用聚四氟乙烯小管串联，在每个匣盒内的小分离管之间仍然利用聚四氟乙烯小管首尾相连。如果待分离物比较容易分离，则可以减少匣盒的数目，但一定要保持仪器内匣盒的对称，使仪器内的转子处于平衡状态。图 6-3 是匣盒式离心逆流色谱的装置示意图。

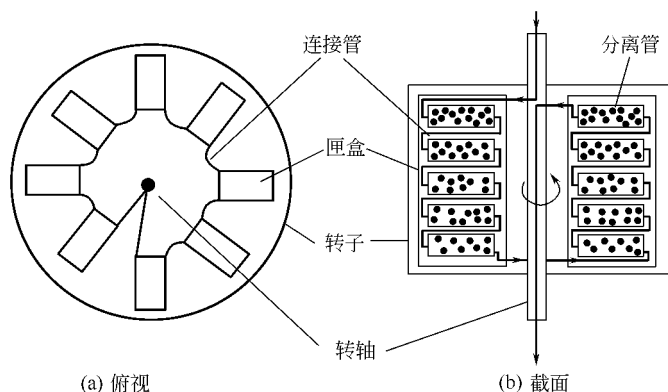


图 6-3 匣盒式离心逆流色谱装置示意图

仪器工作前仍然是选择好互不相溶的两相溶剂系统，彼此混合、平衡、静置、分层。然后选取其中的一相作为固定相，利用恒流泵将其泵入仪器中。通过进样阀上样后，让仪器的转子转动，同时流动相利用恒流泵连续稳定地泵入，载着样品穿过固定相，使其在两相间不断地分配。不同的组分分配系数不同，在分离管中移动的速度也不一样，最后使得一个复杂的混合物在该过程中达到分离。

如果两相溶剂系统的下相做固定相时，移动相应按转子的顺时针方向泵

入，反之应该按逆时针方向泵入。转子的高速转动能让固定相较多地被保存而不被移动相顶出，有利于分离的高效率。

（二）行星式逆流色谱仪

在行星式逆流色谱中，分离柱几乎全是利用聚四氟乙烯管绕成的螺旋线圈。根据自转轴与公转轴的位置关系其又可以分为多种类型，如自转轴与公转轴平行，自转轴与公转轴正交，自转轴与公转轴呈一定的角度，以及转动轴与地面是平行还是垂直，转动是正转还是反转等。另外自转与公转还有同步与不同步之分，线圈的绕法是平行还是盘绕、是单层线圈还是多层线圈，以及仪器中采用的是单分离柱或者多分离柱等。所以该种类型的仪器种类有几十种之多，是逆流色谱仪中种类最多的。图 6-4 是分离柱的自转与公转轴之间的最基本的三种转动关系示意图。(a) 是自转轴与公转轴平行，(b) 是自转轴与公转轴正交，(c) 是自转轴同公转轴保持一定的倾斜角度。

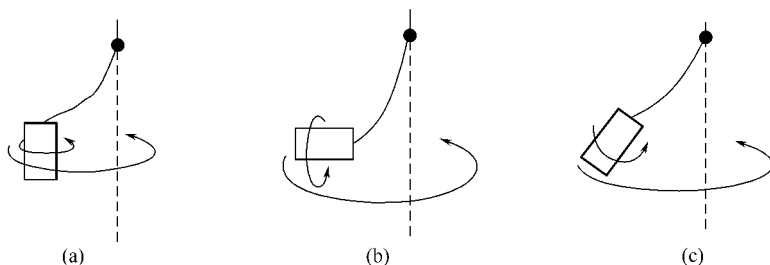


图 6-4 分离柱自转与公转轴之间的转动关系示意图

尽管行星型逆流色谱仪的种类非常繁多，但到今天真正被广泛使用的只有高速逆流色谱仪，在我国绝大多数的研究、应用以及国产仪器的生产也主要集中在该类型上，所以高速逆流色谱成为本章的主题，在后面将专门详细地叙述，它属于图 6-4 中的类型 (a)。本节只将另一种行星型逆流色谱仪——正交逆流色谱仪作一简单介绍，因为该种仪器目前也有一定的应用，它尤其适用于双水相体系对一些生物活性成分，如蛋白质的制备性分离，它的制备能力比通常的高速逆流色谱更大，在部分文献中，甚至也将其作为高速逆流色谱的一个分支，它属于图 6-4 中的类型 (b)。

正交逆流色谱仪根据其公转半径的大小、自转轴与公转轴是否在同一个平面以及分离柱与公转轴的相对位置，使得该仪器又有好几种类型，这些类型的关系可用图 6-5 表示。

在图 6-5 中， R 是分离柱的公转半径， L 是分离柱中心与公转轴的垂直距离。类型 (a) 是 $R=0$ ，类型 (b) 是 $L=0$ ，类型 (c) 是 R 和 L 都不为零，通常 $L=R$ 、 $2R$ 、 $3R$ 。图 6-6 是图 6-5 中 (b) 类的仪器示意图。

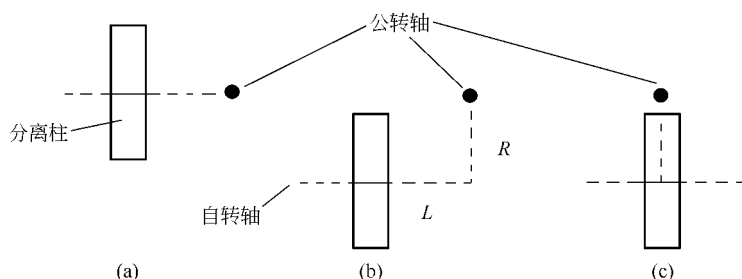


图 6-5 正交逆流色谱类型示意图

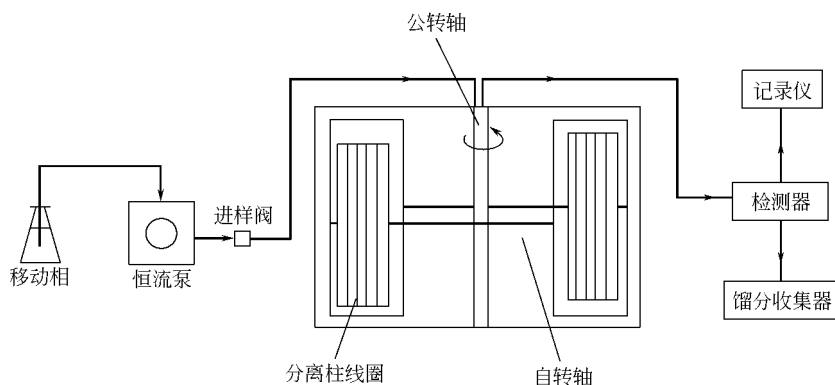


图 6-6 正交逆流色谱仪器示意图

该仪器中含有两个分离柱线圈，线圈由聚四氟乙烯管绕制而成，这种管的典型直径为 2.6mm。当仪器工作时，由电动机带动公转轴使分离柱做公转，同时公转轴通过齿轮传动再带动分离柱又作垂直于公转轴的自转，通常这种仪器的公转与自转具有相同的角速度。

当选择好互不相溶的两相溶剂系统后，将作为固定相的一相首先用恒流泵泵入到仪器线圈中，然后进样，随后转动仪器并用恒流泵将流动相输入，这时流动相就可带着样品在两相溶剂系统中做多次分配，由于混合组分分配系数的不同，使得复杂组分在该过程中得到分离。其详细的分离机理与高速逆流色谱类似，请参考本章第二节。

图 6-7 是利用液滴逆流色谱、旋转小室逆流色谱、匣盒式离心逆流色谱以及高速逆流色谱分别分离陈皮素、山柰黄素以及槲皮黄素混合物的色谱谱图，两相溶剂系统都是使用氯仿-甲醇-水 (33 : 40 : 27)，从图中我们可以看出 4 种方法皆能对该混合物进行有效的分离，4 个色谱图的出峰顺序也完全一样，但是液滴逆流色谱与旋转小室逆流色谱需要更长的分离时间。

其实液滴逆流色谱以及旋转小室逆流色谱不但分离能力较低，而且分离一

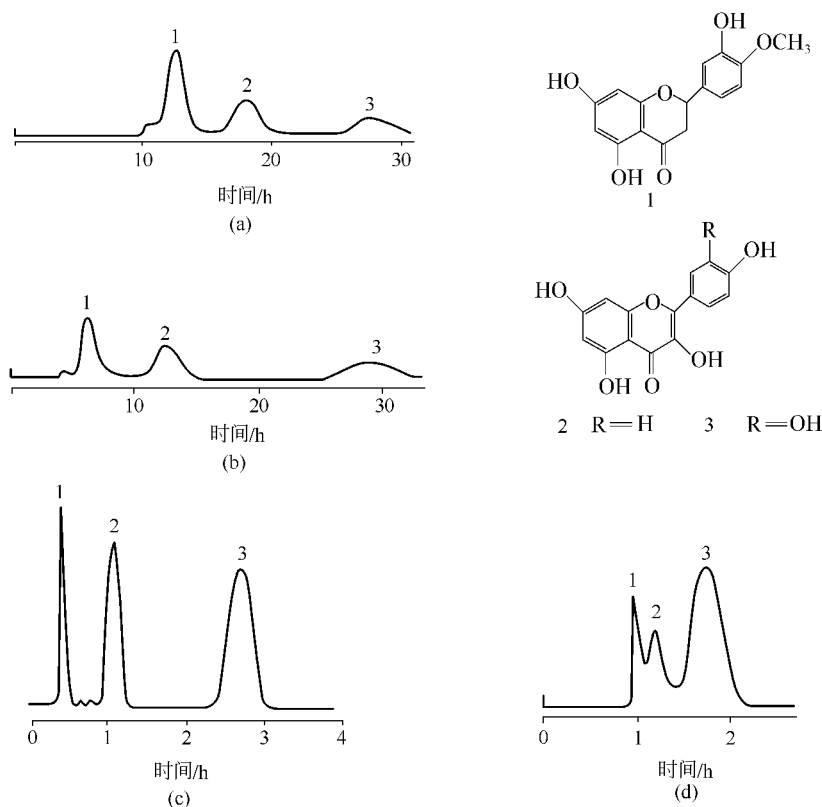


图 6-7 逆流色谱分离陈皮素山柰黄素及槲皮黄素混合物色谱图^[9,10]

(a) 液滴逆流色谱；(b) 旋转小室逆流色谱；(c) 高速逆流色谱；(d) 匣盒式离心逆流色谱

1—陈皮素；2—山柰黄素；3—槲皮黄素

溶剂系统：氯仿-甲醇-水 (33 : 40 : 27)

次所花的时间也很长，通常需要两天或者更长的分离时间。逆流色谱发展到今天，仍然还在应用这两种分离方法的已经非常少。而对于匣盒式离心逆流色谱，由于其分离过程中容易产生高压，有时甚至高达 6MPa，容易产生流动相及固定相的泄漏，尤其是连接塑料管的破裂，所以应用也相对较少。到目前为止，正交逆流色谱常有研究报道，但在逆流色谱领域真正应用和研究得最普遍的只有高速逆流色谱。

第二节 高速逆流色谱

到目前为止，发展最完善的最具有实用意义的当属高速逆流色谱。由于北

京市新技术研究所张天佑研究员早在 20 世纪 70 年代就开展了逆流色谱的研究，多次与该法创始人 Y. Ito 进行科研合作，并于 20 世纪 90 年代初研制开发出商品国产高速逆流色谱仪，这无疑推动了高速逆流色谱在我国的研究和应用，使得该法在我国有了长足的发展，并取得了一些具有国际先进水平的研究成果。

一、色谱仪

到目前为止，就作者了解国内大多数都是使用北京市新技术研究所生产的 GSIOA2 型高速逆流色谱仪，基本上还未见使用国外高速逆流色谱仪的报道，本节就该机型进行较详细的介绍。

图 6-8 是高速逆流色谱示意图，它主要由恒流泵、进样阀、主机、检测器、记录仪以及馏分收集器组成。

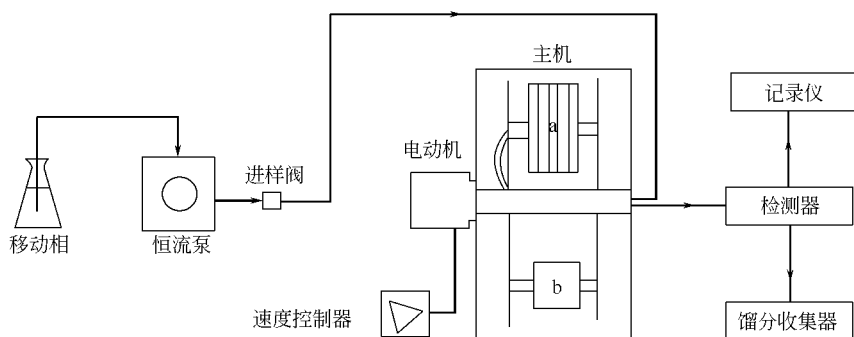


图 6-8 高速逆流色谱示意图

（一）恒流泵

在高速逆流色谱分离过程中。由于两相运动的特殊规律，使得固定相的运动方向与移动相相反。为了让流动相带着样品穿过固定相，必须克服固定相带来的阻力，高速逆流色谱使用的恒流泵要求能以一定的压力方式输送液体。由于固定相的逆运动压力不是太大，而且色谱仪的聚四氟乙烯管也不耐高压，所以一般使用国产的最高压力不低于 1MPa 的恒流泵就能满足仪器的要求。

（二）进样阀

进样阀一般采用六通进样阀，由于整个系统的压力低于 1MPa，所以也没有必要采用耐高压的六通进样阀，使用进口的塑料进样阀就能满足仪器需求。只是该进样阀的样品环一般要几个毫升，有时需要高达数十毫升。进样器通常使用一般的医用注射器。

（三）主机

高速逆流色谱的主机是它的核心，也是价格最高的部分。主机的外壳通常是一个铝合金的金属箱，该箱的上面可以打开，供观察、配重、上润滑油以及主机的检查和修理等用。在该主机箱的内部中央有一根中空转轴，在该转轴两边分别是分离柱 a 与平衡器 b。分离柱 a 是由长 100~200m，内径为 1.6mm 左右的聚四氟乙烯管沿具有适当内径的内轴共绕成十多层而成的分离柱，柱上绕成的线圈一般称 Ito 多层线圈，它的管内总体积可达 300mL 左右。平衡器 b 是一个金属制成的转轴，通过向上面增减金属配件可以调节它的重量，它的作用是让 a、b 相对于中心轴两边重量平衡。当仪器工作时，电动机的轴直接带动主机中心轴转动，使仪器作离心公转运动，但该转速和转动方向又可以通过速度控制器调节。同时主机中心轴通过齿轮传动装置又使 a、b 绕自转轴作顺时针或反时针方向的自转运动，此时 a、b 本身既在自转，同时又在绕中心轴公转，公转转速可从 0~4 000r/min，大多数情况下控制在 600~900r/min。从 Ito 线圈分离柱中通过中空的中心轴还同时牵引出了线圈的两端，一端供泵入液体，一端输出液体。

该仪器分离柱中引出的线圈两端在仪器工作时不相互打绞是该装置的精妙之处，详细的原因可参考后面的文献。另外，该仪器的平衡器部分也可以用另一个线圈取代，还有主机里面同时对称地装有三个分离线圈的仪器生产，因为它们可以进一步增大仪器的分离量。

（四）检测器

该仪器一般都装配具有固定波长的紫外检测器。使用的灯一般是原子吸收光谱分析仪的空心阴极灯，最常见的固定波长是 254nm，如果在该灯的前面放上一个滤光片，该波长可以变为 280nm。检测器内的吸光池是一个与入射光垂直的石英管，管直径大约 3~5mm。

（五）记录仪

该记录仪没有什么特殊要求，只是其应该与检测器的信号输出的毫伏数相匹配。另外，仪器的最慢走纸速度不能太快，因为一次高速逆流色谱分离实验往往需要几个小时的时间。

（六）馏分收集器

通常可以直接利用试管手工分部收集流出物即可。如果实验室条件许可，可以配馏分收集器，这样可以减少实验的劳动强度。

当然该套仪器也可以利用微机设置操作参数、控制各个部件、显示和记录分离图谱，处理实验数据。

二、分离原理

高速逆流色谱的分离柱是由聚四氟乙烯管绕成的螺旋柱，我们首先介绍互

不相溶的两相在螺旋管中的运动状态，用它来说明高速逆流色谱的分离原理。图 6-9 是在一定的条件下互不相溶的两相在螺旋管中的状况。

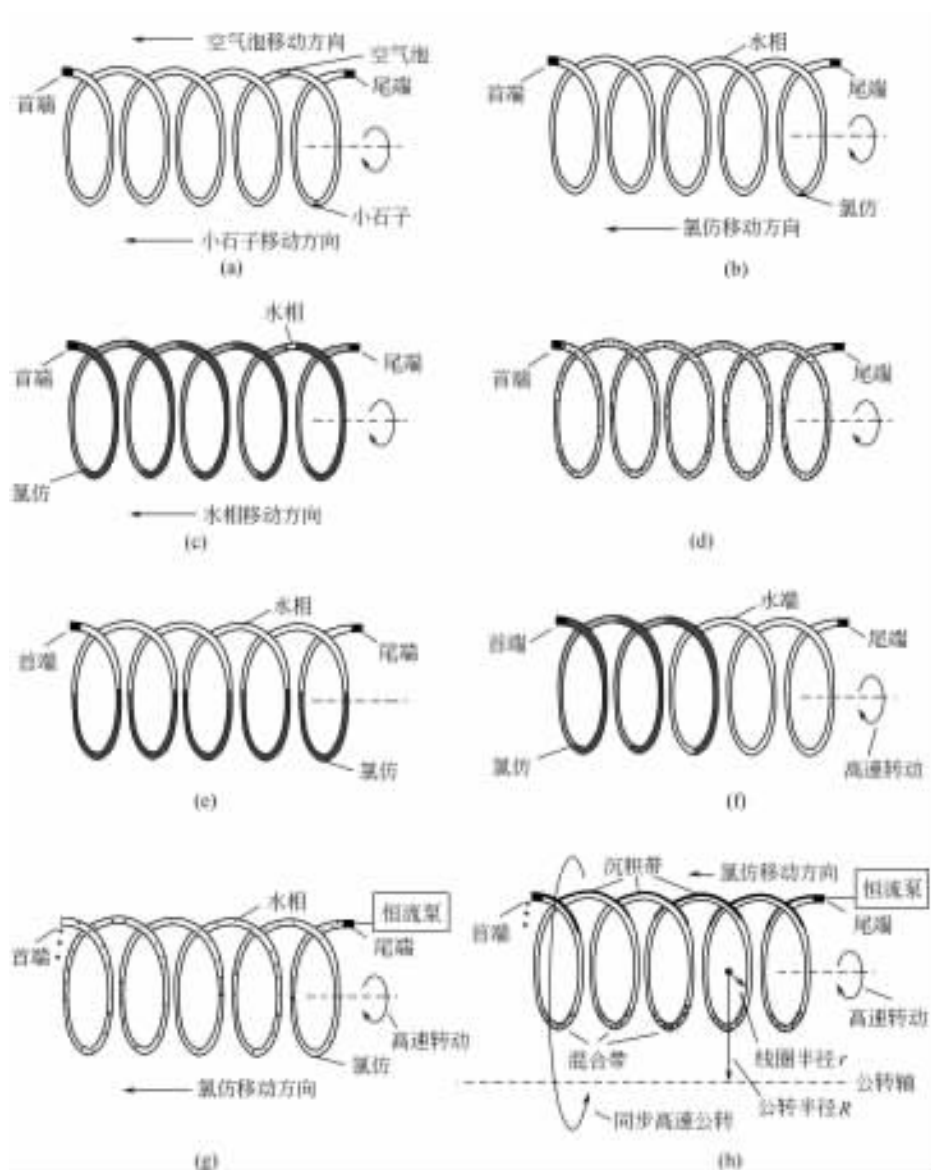


图 6-9 互不相溶的两相在螺旋管中的运动状态

图 6-9 (a) 是一个充满水的两端用橡皮塞封闭的螺旋线圈，让一个小石子和一个空气泡从右端进入管中，由于二者与水的密度不同，因此小石子处于螺旋管的底部，而空气泡处于它的顶部。按照图中所示慢慢旋转螺旋管，则空气

泡与小石子皆从右向左移动, 据此, 我们称螺旋管左端为首端, 而右端为尾端。

图 6-9 (b) 是一个充满水的两端用橡皮塞封闭的螺旋线圈, 如果让一滴互不相溶的氯仿从右端进入螺旋管, 氯仿由于密度比水大, 这一滴氯仿就沉在螺旋管的下面。如果按图所示慢慢转动螺旋管, 这一滴氯仿也会从右向左移动。

将上述螺旋管换成一个充满氯仿的两端用橡皮塞封闭的螺旋线圈, 如果让一滴互不相溶的水从右端进入螺旋管, 则水由于密度比氯仿小, 这一滴水就浮在螺旋管的上面。如果按图所示慢慢转动螺旋管, 则这一滴水也会从右向左移动 [图 6-9 (c)]。

如果将上述螺旋管同时各充满 50% 的氯仿和水, 两端仍用橡皮塞封闭, 当按图所示转动螺旋管时, 则互不相溶的两相都从右向左移动, 相互竞争。在经历一段时间并达平衡后, 氯仿以小的液滴均匀地分散在螺旋管中, 如图 6-9 (d) 所示。如果此时停止转动管的转动, 让其静置, 则可以观察到在螺旋管的每一圈中, 水在上面, 氯仿在下面, 并各占 50%, 如图 6-9 (e) 所示。

以上都是在螺旋管慢速转动 (或不转动) 的情况下螺旋管中两相的特性, 其主要作用来自于重力, 慢速转动的离心力完全可以忽略不计。

当我们将一个充满氯仿和水各 50% 的两端用橡皮塞封闭的螺旋线圈进行高速自转时, 离心力将增加对螺旋管底部的作用, 相对减少对螺旋管顶部的作用。在这种不对称力的作用下, 使得氯仿从右向左移动的倾向比水更大, 因为氯仿倾向于沉在螺旋管的下部。这种状况的最后结果是氯仿相完全分布在螺旋管的左边, 而水相则完全分布在螺旋管的右边 [图 6-9 (f)]。

由于高速自转的螺旋管中互不相溶的两相具有图 6-9 (f) 的性质, 因此当我们将螺旋管右端与一恒流泵相连, 将水相首先充满螺旋管并高速转动时, 管中水相将向恒流泵的方向移动。但由于恒流泵的输液出口由单向阀控制, 阻止了水相在螺旋管中的右移而被固定在螺旋管中。此时我们再用恒流泵以一定的速度从螺旋管的右边泵入氯仿, 因为氯仿/水体系中的氯仿有向螺旋管左方移动的趋势, 氯仿相就能以小液滴的方式穿过螺旋管中的水相段。如果将此系统作为分配色谱系统, 则水就起到了固定相的作用, 氯仿就是移动相, 如图 6-9 (g) 所示。

图 6-9 (g) 所示的情况还只是螺旋管只有高速自转的状态, 当给该螺旋管再加上一个与自转轴平行且同步的公转时, 则氯仿与水之间出现了混合态与沉积态两种状态。混合带总是集中在靠近公转轴的一边, 它的长度大约相当于线圈的 $1/4$ 。对于一个转速为 800r/min 的螺旋圈中这种混合大约达到 13 次/秒。而沉积态总是发生在背离公转轴的螺旋管一边 [图 6-9 (h)]。螺旋圈中

的这种状态与螺旋管的半径 r 以及公转半径 R 关系很大, 定义二者的比值为仪器参数 β 。即

$$\beta = r/R$$

图 6-9 (h) 就是我们最终要介绍的高速逆流色谱螺旋管中两相溶剂系统的运动状态和分离原理图。

通过上面的分析不难看出, 高速逆流色谱是建立在单向性流体动力平衡体系之上的一种逆流色谱分离方法, 这种现象是在研究旋转螺旋管的流体动力平衡时偶然发现的。当螺旋管在慢速转动时, 管中主要是重力作用, 螺旋管中的两相都从一端分布到另一端。用某一相作移动相从一端向另一端洗脱时, 另一相在螺旋管里的保留值大约是管柱容积的 50%, 但这一保留量会随着移动相流速的加大而减小, 使分离效率降低。前面的液滴逆流色谱以及旋转小室逆流色谱就是基于这个原理进行分离的。当使螺旋管的转速加快时, 离心力在管中的作用占主导, 两相的分布发生变化。当转速达到临界范围时, 两相就会沿螺旋管长度完全分开, 其中一相全部占据首端的一段, 称为首端相, 另一相全部占据尾端的一段, 称为尾端相。高速逆流色谱正是利用了两相的这种单向性分布特性, 在高的螺旋管转动速度下, 如果从尾端送入首端相, 它将穿过尾端相而移向首端, 同样, 如果从首端送入尾端相, 它会穿过首端相而移向螺旋管的尾端。分离时, 在螺旋管内首先注入其中的一相 (固定相), 然后从适合的一端泵入移动相, 让它载着样品在螺旋管中无限次的分配。仪器转速越快, 固定相保留越多, 分离效果越好, 这极大地提高了逆流色谱的分离速度, 故将此种分离方法称为“高速逆流色谱”。

仪器工作需要互不相溶的两相液体, 一相作固定相, 一相作移动相。仪器工作前, 先将作固定相的液体通过恒流泵压入 Ito 线圈, 然后用进样器将待分离的样品进样, 最后用恒流泵压入移动相, 同时启动主机部分运转直到转速大于 600r/min。此时, 固移两相在 Ito 线圈中具有相对运动之势。由于移动相的源源不断的输入, 而恒流泵的单向阀又阻止了固定相的逆向流出, 移动相就带着样品在 Ito 线圈中进行无限次的分配而使复杂样品因在两相中的分配系数不同而得到分离。当移动相经过检测器时, 由于不同的样品组分会产生不同大小的信号, 用记录仪记录就能得到逆流色谱图谱, 同时用馏分收集器分部收集流出的液体就会得到复杂样品被分开的组分。

到目前为止, 离心力场对两相在螺旋管里的分布的影响还没能从理论上予以预测, 关于两相在运动螺旋管的流体动力平衡状态都是通过一种叫频闪仪的仪器拍下照片来观察而得到。通过频闪仪观察到的两溶剂相在螺旋管公转时的流体动力学特征表明, 在螺旋管中移动相不断地穿过固定相, 并且在穿过过程中移动相不断地进行着混合和沉积两种状态, 而混合状态始终发生在靠近公转

轴的位置，沉积状态始终发生在背离公转轴的位置，对于这种现象的理论解释也还有待于进一步研究解决。

高速逆流色谱与常见的气相色谱和液相色谱谱图并无本质的区别。混合物的分离主要决定于固定相和移动相的性质以及混合物各组分在两相之间的分配能力。它的柱效仍然可用理论塔板数表示：

$$N = 5.54(t_R/W_h)^2$$

分离效果也可用分离度表示：

$$R_S = 2(t_{R,2} - t_{R,1}) / (W_{b,1} + W_{b,2})$$

三、实验操作

前面我们介绍了高速逆流色谱的仪器以及分离原理，下面介绍高速逆流色谱的具体操作。

（一）两相溶剂系统的选择

高速逆流色谱的溶剂选择是本分离方法的中心，也是最重要和最困难的部分。众所周知，一个好的色谱分离一定要正确选择色谱固定相和移动相才能达到预期的分离目的，而对于高速逆流色谱溶剂系统的选择意味着色谱固定相和移动相的同时选择。

1. 两相溶剂

首先选择的溶剂系统需要能分成两相，这是逆流色谱进行逆流的先决条件。对于互不相溶的两相，还要求它们有比较快的分层时间，如不超过 30s。两相溶剂系统可以是二组分或者多组分，但最好分层后两相的体积大约相等，这样有利于节省溶剂。当然，选择的溶剂系统不能造成待分离样品的分解或变性，对样品也应该具有足够高的溶解度。

2. 固定相的足够高保留

如果高速逆流色谱仪主机工作时是正转（即顺时针方向旋转），则应该利用两相溶剂系统的上相作固定相，下相作移动相，作者简单地将它记忆成“上固下移”。在作者的实验室也基本上只利用仪器的正转，因为一方面制造商在生产仪器时从正转方面考虑较多，在反转的情况下，常常得不到好的效果；另一方面，如果频繁地改变方向，也容易造成操作不当而损坏电动机。

大量的实验已经表明，在仪器工作时，由于移动相的泵入，总是要从分离螺旋管中排挤出一部分固定相。在一般情况下，如果分离螺旋管中所能保持的固定相越多，该溶剂系统对待分离物的分离效果就越好。对于一个好的溶剂系统，固定相的保留百分数往往大于 50%。它的测量是先准确测量分离柱的总体积，然后当仪器运转时，利用量筒量取流动相刚好流出时流出的固定相的体积，最后按照下面的公式计算：

$$\text{固定相保留百分数} = \frac{100(\text{分离螺旋管体积} - \text{流出的固定相体积})}{\text{分离螺旋管的体积}}$$

固定相在螺旋管中的保留百分数主要受两相溶剂系统的溶剂种类以及各组分之间比例的影响，其次还受仪器参数 β 以及仪器的转速大小的影响。

3. 样品在溶剂中合适的分配系数

在高速逆流色谱分离中组分在两相中适当的分配系数是成功的关键。在此可用溶质在上相与下相中的浓度之比（也即溶质在固定相与移动相中的浓度之比）表示分配系数 K ：

$$K = C_{\text{上}} / C_{\text{下}}$$

研究表明，高速逆流色谱中组分合适的分配比在 0.5~2 这个范围。当 K 大大地小于 0.5 时，溶质在流动相中的溶解度太大，导致色谱的分辨率大大地降低，如果样品随着溶剂前沿同时流出，此时该系统对该样品几乎没有分离能力；当 K 大大地大于 2 时，则样品在固定相中的溶解度太大，分离该样品需要花很长的时间，浪费大量的溶剂，且流出的峰很宽。

化合物在两相中的分配系数可以进行如下的简单测定：取两相溶剂系统上相及下相各 1mL 于试管中，加入一定量的待测样品，充分振荡后静置。取毛细管分别蘸取上相及下相于一硅胶薄层板上，挥发掉溶剂后直接用物理或化学的方法显色，观察两个斑点的面积大小和颜色的深浅，就可初步估计该化合物在此溶剂系统的分配系数。

当然对于一个很复杂的未知混合物，我们可以采取将薄层色谱展开后进行分析的方法，也可应用高效液相色谱等来进行比较准确的测定。

4. 两相溶剂系统的初步筛选

到目前为止，利用逆流色谱已经成功分离了大量的各种类型的混合物，在此基础上积累了大量的两相溶剂选择的原始经验。对于高速逆流色谱的初学者，作者推荐如下的溶剂系统初步筛选方案（图 6-10），因为这些溶剂系统都是被证实具有好的分离特性的。

图 6-10 表明，对于一个待分离物可以首选氯仿-甲醇-水体系（2:1:1）。如果分配系数在 $K=0.2\sim5$ 这个范围的中间部位，则可以通过进一步改变三者的比例达到较佳的溶剂体系，如果 K 在上述范围的两边一点，则可以考虑用乙酸取代甲醇、用二氯甲烷取代氯仿或者用四氯化碳取代氯仿。

如果氯仿-甲醇-水体系对样品的分配比小于 0.2，则可以考虑采用正己烷-乙酸乙酯-/甲醇-水，如果该体系的分配比还较小，可以继续实验正己烷-甲醇-水体系。

如果氯仿-甲醇-水体系对样品的分配比大于 5，则可以考虑采用乙酸乙酯-正丁醇-水或者正丁醇-水体系。根据需要，可以进一步在其中加入乙酸或者用

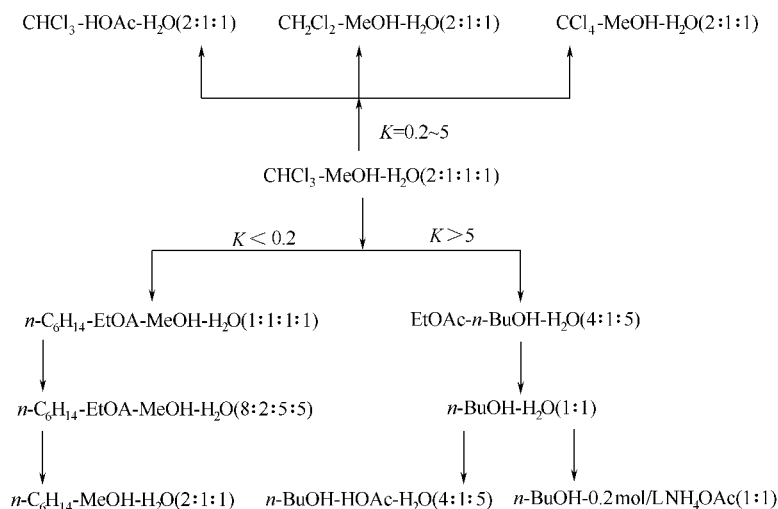


图 6-10 两相溶剂系统初步筛选方案

缓冲溶液取代水等。

另外对于生物大分子或生物活性成分的分离，还可以考虑采用双水相体系。目前效果较好的双水相体系主要有 PEG-磷酸钾、PEG-磷酸钠。通过改变 PEG 的分子量大小和磷酸盐的 pH 值可以改变溶剂系统的选择性。

总之，在改变上述溶剂系统的类型或者改变它们的比例时，记住适宜的分配系数 $K=0.5\sim 2$ 。分配系数太小，色谱峰出得太快；分配系数太大，色谱峰出得太慢。

5. 一些通用的溶剂分离系统

作者的课题组曾经对一些植物有效成分的通用溶剂分离系统进行研究。如我们提出了分离植物生物碱的通用溶剂分离系统。首先选择氯仿-甲醇-水作为我们基本的溶剂系统，因为该系统的两相具有短的分层时间，大致相等的上下相，比较适中的溶剂极性等优点。研究根据生物碱的分子结构中都含有氮原子，它们的绝大多数具有一定的碱性，能溶于一定的酸性水溶液的这一特点，提出将氯仿-甲醇-水的比例固定在 $4:3:2$ ，仅仅对水的 pH 值进行调节，就能达到总生物碱的分离，使难于确定的分离生物碱的溶剂系统的筛选变得非常简单、易于操作。图 6-11 是作者课题组利用该通用溶剂系统对太子参、茶叶、苦参、黄柏、洋金花、马钱子中总生物碱的高速逆流色谱分离图。

作者课题组仍然利用氯仿-甲醇-水这一优秀的高速逆流色谱溶剂系统，针对大多数黄酮、蒽醌类易溶于甲醇这一特点，再考虑到在氯仿-甲醇-水体系中，甲醇能同时溶于水相和氯仿相、通过改变甲醇的比例可以同时改变两相的

溶解性能。提出将氯仿-甲醇-水的比例固定在 $4 : x : 2$ ，仅仅对甲醇的比例 $x=2.5 \sim 4.5$ 的范围进行调节，就能进行黄酮、蒽醌的初步分离，使难于确定的分离黄酮、蒽醌的溶剂系统的筛选变得非常简单、易于操作。图 6-12 是作者课题组利用该通用溶剂系统得到的主要含黄酮的甘草、陈皮、葛根、黄芩、芫花的高速逆流色谱分离图，图 6-13 是主要含蒽醌类的大黄、芦荟、茜草、虎杖、决明子的高速逆流色谱分离图。

6. 一些已有的文献报道

与其他的色谱分离方法一样，参考一些已有的文献报道，从类似样品的分离溶剂中进行筛选，也同样是一种很好的溶剂筛选捷径。例如作者就黄酮类的逆流色谱分离就收集到表 6-1 中的一些溶剂方案。

由于本书的主题以及篇幅的限制，不详细列出每一类化合物已有的一些溶剂系统，有兴趣的读者请参考本章所列的高速逆流色谱的专著或者文献。

(二) 样品溶液的制备

样品溶液的制备主要考虑溶解样品的溶剂、样品量的大小以及样品体积大小三个方面。在大多数情况下，我们推荐选择等量的已经预先达到平衡的上下相作为样品的溶解溶剂。因为逆流色谱的进样量一般都较大，利用相等量的上下相作为溶剂不易引起溶剂系统两相状态的改变，如由两相变为单相以及减少固定相的保留。另外，它也有利于复杂样品的溶解，往往可以减少溶解样品所需的溶剂体积。但对于分配系数比较小的待分离物，样品可以溶解在固定相中，这时对分离结果的影响较小。

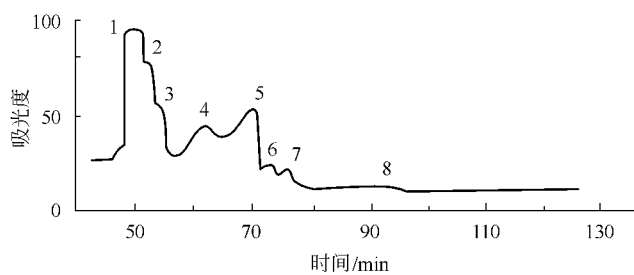
样品量受样品的性质、两相组成、溶解度的大小以及非线性等温线等的影响。一般增加进样量会使固定相的保留逐渐降低、分离效率也逐渐降低，进样量的大小往往以所收集组分能达到较好分离或者柱效没有明显降低为标准。在多数情况下，一般高速逆流色谱的单次制备量范围在几毫克到几千毫克之间。在开始试验进样量的大小时，可以首先选择 $20 \sim 50\text{mg}$ 进行尝试。高速逆流色谱是一个比较好的制备性分离方法。

高速逆流色谱允许的样品体积也较大，通常可从几毫升到几十毫升。在溶解溶剂能较好溶解样品的前提下，还是应该考虑较小的样品体积。高速逆流色谱也允许样品溶液是悬浮液，但如果样品中固体颗粒太多，则可能影响固定相的保留，在这种情况下，过滤或者离心样品可以改善分离效果。

(三) 分离

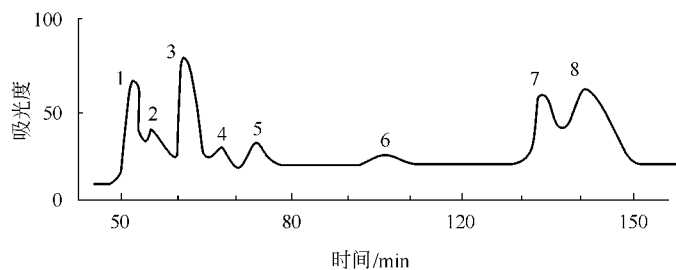
高速逆流色谱分离操作的第一步是将两相溶剂系统进行预平衡。预平衡的方法是：由于国产高速逆流色谱的分离柱线圈的溶剂大约 300mL ，因此作该实验一次至少需要约 600mL 的两相溶剂系统。取 1L 的分液漏斗一个，用量筒准确量取设计的两相溶剂，将它们加入到分液漏斗中，进行充分的振荡如 15min

氯仿-甲醇-0.05mol/L 盐酸 (4:3:2)



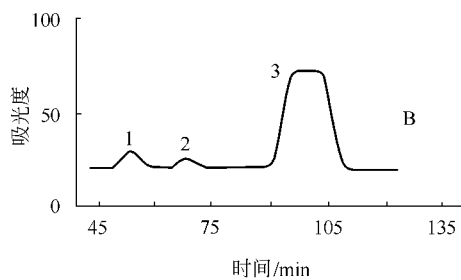
(a) 黄柏

氯仿-甲醇-0.008mol/L 盐酸 (4:3:2)



(b) 马钱子

氯仿-甲醇-pH5.6 磷酸二氢盐 (4:3:2)



(c) 绿茶

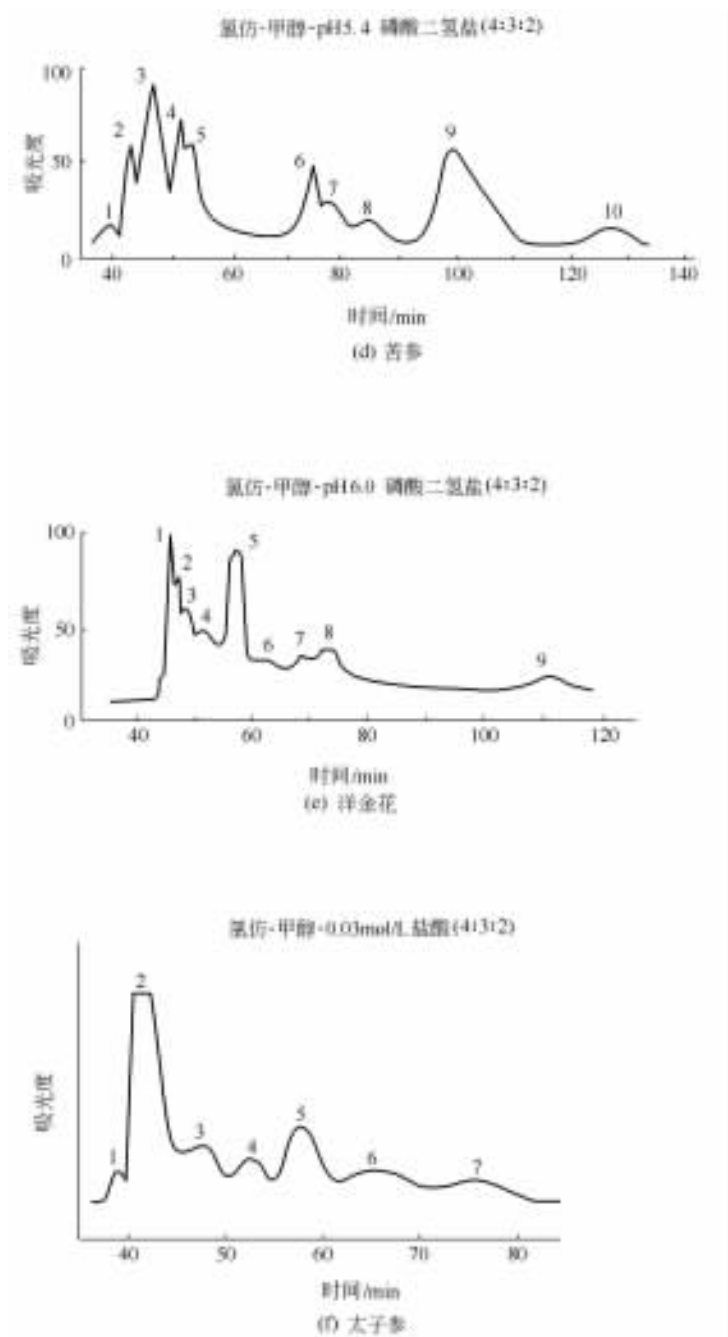


图 6-11 黄柏、马钱子、茶叶、苦参、洋金花、太子参中总生物碱的高速逆流色谱分离图

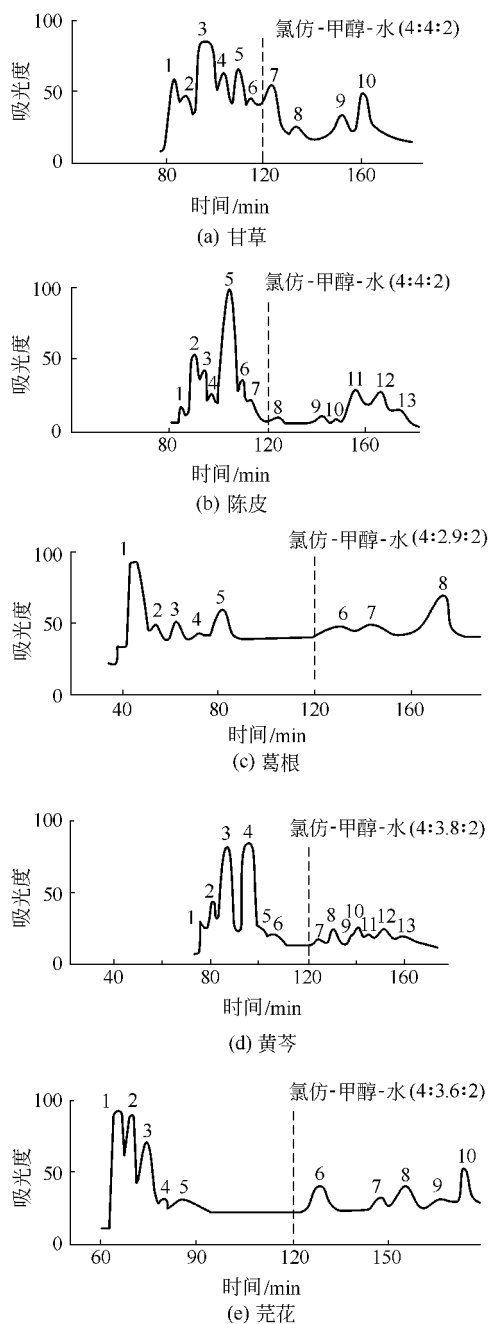


图 6-12 主要含黄酮的甘草、陈皮、葛根、黄芩、芫花的高速逆流色谱分离图

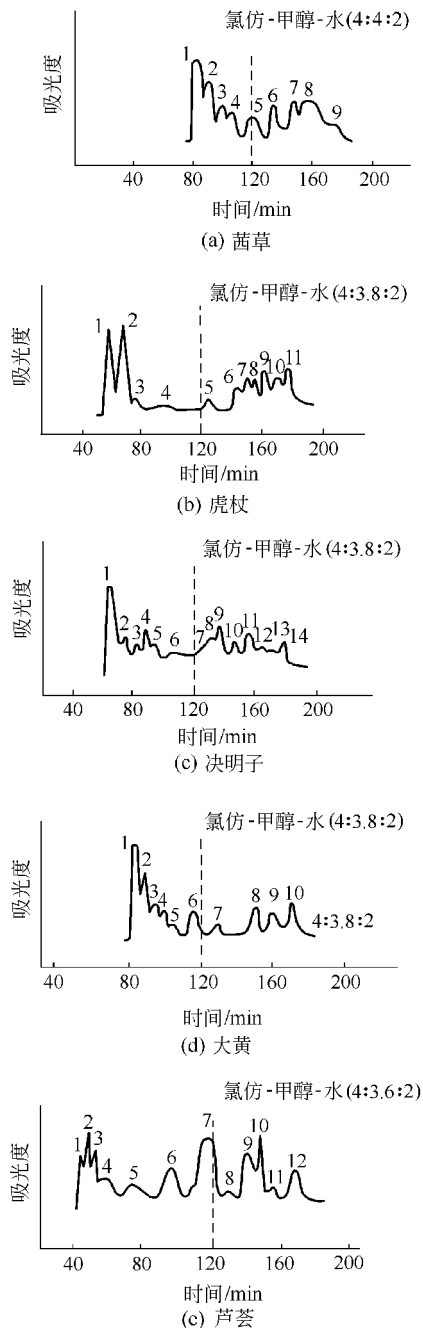


图 6-13 主要含蒽醌类的茜草、虎杖、决明子、大黄、芦荟的高速逆流色谱分离图

表 6-1 黄酮类的逆流色谱分离溶剂系统

样 品	溶剂系统(体积比)
flavonoids	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 3 : 2) CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(7 : 13 : 8) CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(33 : 40 : 27) CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(5 : 6 : 4)
flavonol glycosides	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(7 : 13 : 8)
isoflavonol glycosides	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(7 : 13 : 8)
baccharis trimera	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(13 : 7 : 4)
orthosiphon spicatus	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(13 : 7 : 4)
epilobium parviflorum	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(7 : 13 : 8)
licorice	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(7 : 13 : 8)
sea buckchorn	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 3 : 2)
daphne genkwa sieb. et zucc	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 3 : 2)
strychnos variabilis	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(5 : 6 : 4)
Pericarpium citri reticulatae	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 4 : 2)
radix puerariae	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 2.9 : 2)
radix glycyrrhizae	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 4 : 2)
radix scutellariae	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 3.8 : 2)
flos genkwa	CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O(4 : 3.6 : 2)
flavonoids	CHCl ₃ -CH ₃ OH-5% HCl(5 : 5 : 3)
flavonoid glycosides	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>n</i> BuOH-H ₂ O(10 : 10 : 1 : 6)
flavonol glycosides	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>n</i> BuOH-H ₂ O(7 : 6 : 3 : 4) CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>n</i> BuOH-H ₂ O(10 : 10 : 1 : 6)
galipea trifoliata	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>n</i> BuOH-H ₂ O(10 : 10 : 2 : 6)
arnica species	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>n</i> BuOH-H ₂ O(10 : 10 : 1 : 6)
flavonol glycosides	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>i</i> PrOH-H ₂ O(5 : 6 : 1 : 4)
bidens pilosa	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>i</i> PrOH-H ₂ O(5 : 6 : 1 : 4)
picea abies	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>i</i> PrOH-H ₂ O(5 : 6 : 1 : 4)
alangium premnifolium	CHCl ₃ -CH ₃ OH- <i>i</i> PrOH-H ₂ O(9 : 12 : 2 : 8)
ginkgo biloba	CHCl ₃ -CH ₃ OH-PrOH-H ₂ O(5 : 6 : 1 : 4)
vaccinium uliginosum	CHCl ₃ -CH ₃ OH-PrOH-5% HOAc(31.2 : 37.5 : 6.25 : 25)
oxyrtopis ochrocephala	CHCl ₃ -CH ₃ OH-EtOH-H ₂ O(2 : 5 : 8 : 5)
tephrosia vogelii	CHCl ₃ -CH ₃ OH-EtOH-H ₂ O(7 : 3 : 3 : 4)
flavonoid glycosides	EtOA-PrOH-H ₂ O(4 : 2 : 7)
arnica montana	EtOA-PrOH-H ₂ O(4 : 2 : 7)
stryphnodendron adstringens	EtOA-PrOH-H ₂ O(35 : 2 : 2)
anthocyanidins	EtOA-PrOH-H ₂ O(140 : 8 : 80)
flavonoid glycosides	EtOA-BuOH-H ₂ O(2 : 1 : 2)
crossopteryx febrifuga	EtOA-BuOH-H ₂ O(2 : 1 : 2)

续表

样 品	溶剂系统(体积比)
tephrosia vogelii	EtOA-EtOH-H ₂ O(2 : 1 : 2)
flavonoid glycosides	EtOA-94%EtOH-H ₂ O(2 : 1 : 2)
anthocyanidins glycosides	BuOH-HOAc-H ₂ O(4 : 1 : 5)
sambucus nigra	BuOH-HOAc-H ₂ O(4 : 1 : 5)
pavetta owariensis	BuOH-PrOH-H ₂ O(4 : 1 : 5)
arnica species	CH ₂ Cl ₂ -PrOH-H ₂ O(7 : 13 : 8)
biflavonoids	<i>n</i> C ₆ H ₁₄ -EtOAc-CH ₃ OH-H ₂ O(2 : 8 : 5 : 5)
brackenridgea zanguebarica	<i>n</i> C ₆ H ₁₄ -EtOAc-CH ₃ OH-H ₂ O(8 : 8 : 6 : 6)
anthocyanidins	<i>n</i> C ₆ H ₁₄ -EtOAc-CH ₃ OH-H ₂ O(8 : 6 : 7 : 10)
	<i>n</i> C ₆ H ₁₄ -EtOAc-BuOH-HAc-1% HCl(2 : 1 : 3 : 1 : 5)

后, 静置让两相分层。大约再过 15min 左右, 用两个 500mL 的试剂瓶, 分别收集上相和下相。分离溶剂的纯度以分析纯较好。

取一个带磨口的小锥型瓶, 将样品准确称重后置于其中, 用医用注射器分别吸取相等量的上相与下相加入到样品锥型瓶中, 溶解样品。

在大多数情况下应该选择仪器的正转(即顺时针方向旋转)进行工作。在这种情况下, 上相为固定相。高速逆流色谱的操作条件比较宽松, 两相溶剂系统不必脱气, 可直接将上相利用恒流泵泵入分离线圈中, 但在输入管的入口处, 应该连接一个过滤器, 阻止固体颗粒进入恒流泵损坏仪器, 同时也应该防止空气泡进入输液管中。

在泵入固定相进入分离线圈的过程中, 由于仪器线圈没有转动, 因此柱内的阻力较小, 为了节省时间, 可以用比较高的输送流量如 10mL/min 输送固定相。但此时一定要仔细观察流出端是否有液体(如果原线圈中装满了液体)或气泡(如果原线圈中没有液体, 此时可将出口端没入一液体中观察是否有气泡)放出。如果没有液体或气体放出, 应该马上停止输送固定相, 检查整个管路是否堵塞。否则有胀暴聚四氟乙烯管的危险。目前国内最长的聚四氟乙烯管产品的长度绝大多数都只有 10m 左右, 而高速逆流色谱中需要长达 100m 以上的产品, 如购买国外产品价格就相当昂贵。

当固定相完全充满分离线圈后, 必须要记住打开主机上盖, 在分离线圈进口管和出口管的同时引出处滴加几滴润滑油, 因为此处两根塑料管每分钟要进行 600~800 次的摩擦, 如果不添加润滑剂极易磨穿两根引出管, 使仪器损坏。另外还要检查分离线圈与平衡体重量是否基本相等, 可以用手让主机转动进行初步的判断。如果二者相差太大, 应该在平衡体上增加或者减少重量让它们保持平衡。然后盖上主机的上盖, 并且一定要盖紧。以防止高速旋转的分离柱和平衡器脱出造成伤害。

接下来的步骤就可以进样了。该分离仪器并不需要像高效液相色谱那样，先将流动相泵入使固定相与流动相达到平衡后再进样。进样一般是利用医用注射器从进样阀上注射进样，该进样阀的特殊之处在于需要大的样品环与之相配。进样时操作要慢，防止样品溶液的漏出。

上面一切工作准备就绪后，就可以泵入移动相（下相）了，泵入移动相的同时开始让主机转动。移动相的流量大小可以通过实验进行选择，大多数情况下是 $2\text{mL}/\text{min}$ 左右。主机的转速通过调速器让其逐渐增加，几分钟后让其达到恒定的转速。在大多数情况下仪器的转速控制在 $600\sim 900\text{r}/\text{min}$ 的范围，仪器的转速可以影响固定相的保留。转速与固定相的保留有下面的图示关系（图 6-14）。

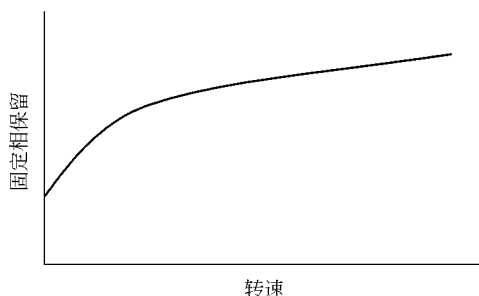


图 6-14 固定相保留与转速的关系示意图

综合考虑多方面的因素，作者实验室一般选择 $800\text{r}/\text{min}$ 的转速。

除了用等度洗脱外，也还有一些利用梯度洗脱的文献报道。

在分离工作完成后，可以用水将分离柱中的液体全部顶出，再用甲醇洗涤分离管，最后用氮气将管内吹干待下次使用。但对于一个复杂的未知样品，当进行一段时间的分选后，往往并不知道是否所有的成分都流出，因此在停止主机转动后，一定要继续用剩余的流动相或者水将分离管中的两相全部顶出，并且继续利用检测器和记录仪观察流出液体中是否还含有待分离成分，切不可漏掉这一部分的实验操作。

（四）检测

目前高速逆流色谱绝大多数都是用紫外检测器进行检测，也有少量用其他检测器的，还有与其他仪器联机的。由于在紫外检测器中的石英测试管是竖直地安装，它可以吸附固定相在管壁从而使色谱的基线不稳定，如果是用上相作固定相，一定要让流动相从检测器的下端进入，上端作为流动相的出口，这样才能阻止固定相在测定管中的积聚，保证基线的稳定。

另外，高速逆流色谱的两相平衡也是比较敏感的，检测器入口与主机中温度的不同，以及由于出口处压力的突然减少等都会影响到检测器信号的稳定性。这些情况可以通过对流动相在进入检测器前进行恒温以及在检测器的出口

处连接细口径的聚四氟乙烯管得到改善。

利用一般的记录仪或者色谱数据工作站可以将检测器的信号记录下来，根据记录信号可以对待收集物进行分部接收。收集好的部分可以进一步利用薄层色谱或者高效液相色谱分析纯度。

四、pH-区带-提取逆流色谱

pH-区带-提取逆流色谱是属于高速逆流色谱中的一项特殊的技术，目前的文献报道都是在一般的高速逆流色谱仪上完成的。它于 20 世纪 90 年代初期开始逐渐发展起来，最大的优点在于能在一般高速逆流色谱的基础上成 10 倍地增加样品进样量而不用对常见设备作任何改进。就作者的了解，对于一个分离线圈体积大约 300mL 的一台设备，目前报道的最大单次进样量可以高达 15g 左右。

(一) 原理

pH-区带-提取逆流色谱技术目前都是用于有机酸或者碱的分离。以分离有机酸为例，先选择高速逆流色谱的两相溶剂系统，将两相平衡、静置、分层、分离后，在上相中加入一定量的有机酸，下相（水相）中加入一定量的强碱。首先将上相作为固定相充满分离柱线圈，接着进样，随后稳定地泵入流动相（下相），同时让主机转动。这时每一种待分离物在高 pH 值和低 pH 值两种情况下，分别有一个分配系数 $K_{\text{高pH}}$ 和 $K_{\text{低pH}}$ ，上相中的有机酸在该两相溶剂系统中也有一个分配系数 $K_{\text{碱}}$ ，如果此时有机酸的分配系数的数值在某一组分的两个分配系数的值之间，则在分离柱的两相中发生图 6-15 所示的作用过程：

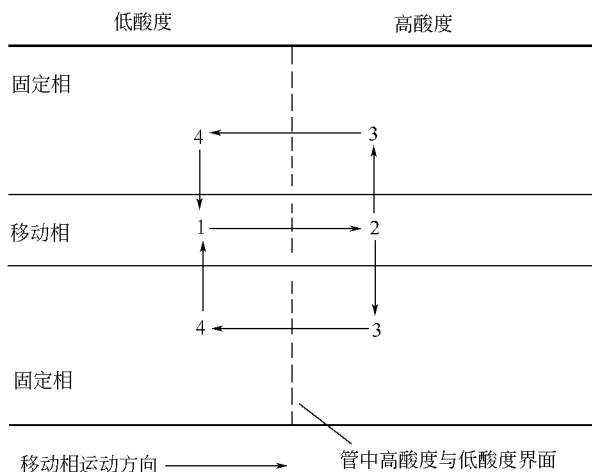


图 6-15 溶质组分在 pH-区带-提取逆流色谱中的作用示意图

图 6-15 代表在分离管中的一小段，移动相正带着样品穿过固定相。由于固定相中含有有机酸，移动相中含有强碱，所以随着移动相的进入，在管中具有一个高酸度与低酸度的界面，并且该界面随着移动相的移动而向前移动。待分离的样品是有机弱酸，当它与移动相接触时将发生酸碱反应而生成盐易溶于移动相中（位置 1），但当它随着移动相向前移动越过高酸度与低酸度的界面后，处于一个高的酸度环境（位置 2），这使其与酸反应，使它又变成原来的弱酸，该弱酸在有机相中将有更大的溶解度，因此其被萃入固定相（位置 3）；溶质进入固定相后由于固定相在柱中相对不动，随着移动相和高酸度与低酸度界面的不断推进，使其在柱中的相对位置落后，进入低酸度环境（位置 4）并与碱作用生成盐，此时它的水溶性又大增，又被萃入移动相中（位置 1）。因此待分离物始终围绕这个高酸度与低酸度的界面发生着上述循环。

假设分离的有机酸是一个四组分的混合物，其中：

$$\text{组分 1 } K_{\text{高pH-1}} < K_{\text{低pH-1}} < K_{\text{酸}}$$

$$\text{组分 2 } K_{\text{高pH-2}} \ll K_{\text{酸}} < K_{\text{低pH-2}}$$

$$\text{组分 3 } K_{\text{高pH-3}} < K_{\text{酸}} \ll K_{\text{低pH-3}}$$

$$\text{组分 4 } K_{\text{低pH-4}} > K_{\text{高pH-4}} > K_{\text{酸}}$$

由于有机酸的分配系数在组分 2 和 3 的分配系数之间，所以组分 2 和 3 始终围绕分离柱中的高酸度与低酸度的界面发生着上述循环，在色谱图上显现出尖峰，组分 1 的分配系数小于有机酸的分配系数，而组分 4 的分配系数又大于有机酸的分配系数，它们在分离柱中所处的位置远离高酸度与低酸度的这个界面，因此组分 1 和 4 就没有尖峰出现，显现的色谱峰与一般的色谱峰一样。在组分 2、3 峰出现的区域，流动相的 pH 值还有一个突跃。如图 6-16 所示。

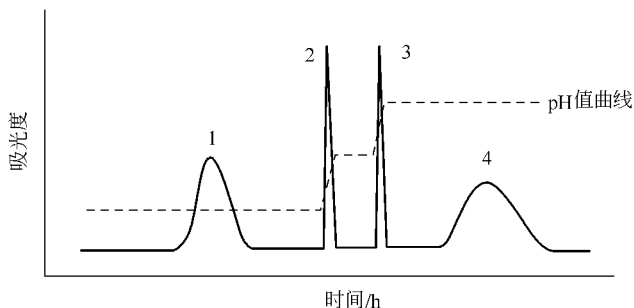


图 6-16 pH-区带-提取逆流色谱中的尖峰和 pH 值突跃

如果有一样品刚好是组分 2 和 3 的混合物，当我们进一步增大样品的上样量时，组分 2 和 3 将由尖峰变成矩形峰，并在一定范围内，随着样品量的继续

增加, 矩形峰也随着增宽, 但却并不影响组分 2 与 3 之间的分离效果, 这就是该方法可以显著增加高速逆流色谱的制备量的原理 (图 6-17)。

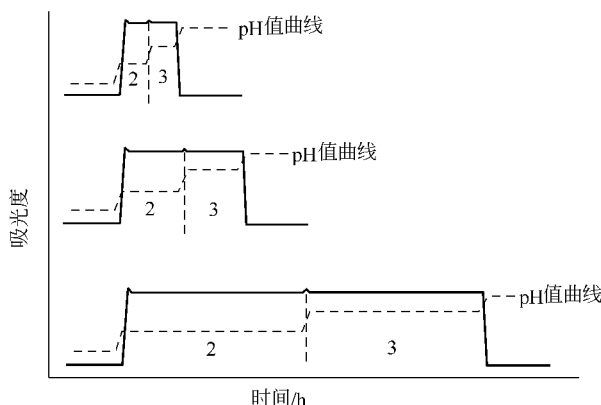


图 6-17 pH-区带-提取逆流色谱中的矩形峰和 pH 值突跃

(二) 操作

在作者的课题组曾利用 pH-区带-提取逆流色谱技术对茶叶中的生物碱进行了克量级分离, 并对收集物作了 TLC 分析, 下面以它的分离为例说明该方法的的操作。

GSIOA2 型高速逆流色谱仪, NS-1007 单活塞往复恒流泵以及 8823—UV 紫外检测器皆为北京市新技术应用研究所产品。两相溶剂系统选择为甲基叔丁基醚-水。在室温下, 600mL 甲基叔丁基醚和 600mL 蒸馏水混合振荡 15min, 在分液漏斗中达到平衡后, 分开两相。在上相 (甲基叔丁基醚) 加三乙胺 10mmol/L 使溶液呈碱性, 在下相 (水相) 中加 HCl 10mmol/L 使溶液呈酸性。

将 3g 绿茶总生物碱溶于 50mL 等量的上下相的两相溶液中, 进样前对样品溶液进行超声波溶解。

首先把作为固定相的甲基叔丁基醚相通过恒流泵输入逆流色谱仪的 Ito 线圈中, 然后用注射器将样品通过进样阀进样, 用恒流泵以 2.0mL/min 的流速泵入, 作为移动相的水相, 同时启动色谱仪的主机速度控制器, 使分离柱转速达 800r/min。此时固、移两相在 Ito 线圈中相对运动, 移动相带着样品在 Ito 线圈中进行无限次的分配而使复杂样品得到分离。当移动相经过检测器时, 由于不同样品组分产生不同大小的信号, 用记录仪记录, 就能得到色谱图, 根据谱图的变化收集移动相得到复杂样品被分离的组分馏分。

各馏分的鉴定用硅胶薄层色谱方法, 展开剂为 $\text{CCl}_4\text{-CH}_3\text{OH}$ (100 : 6), 利用碘蒸气显色。同时用酸度计测定收集的每一份流出液的 pH 值。图 6-18

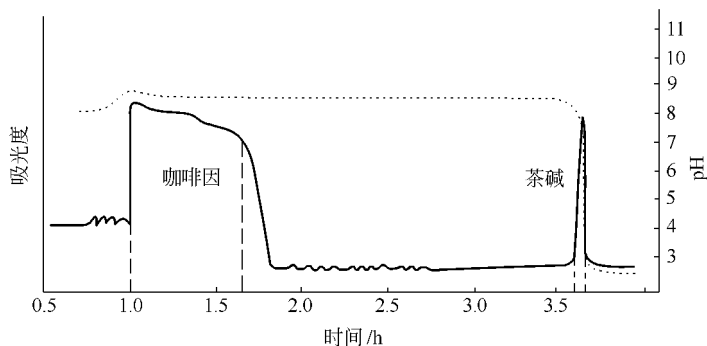


图 6-18 绿茶生物碱的 pH-区带-提取逆流色谱图

是 pH-区带-提取逆流色谱分离绿茶生物碱的色谱图。

图中实线是色谱分离曲线，虚线是流动相流出液的 pH 曲线。一次进样 3g 粗绿茶生物碱，经过 4h 的分离，收集得到 2.2g 咖啡因和 0.07g 茶碱，产品纯度通过薄层色谱检测，其中茶碱峰是典型的 pH-区带-提取逆流色谱的尖峰，在该尖峰区域流动相的 pH 值有一突然的降低。

因此，以甲基叔丁基醚-水 (1:1) 为溶剂系统，平衡后上相加 TEA，下相加 HCl，可利用 pH-区带-提取逆流色谱对茶叶生物碱进行克量级的制备性分离。

五、手性分离

手性问题与我们的日常生活密切相关，如它牵涉到生命的起源以及各种动植物的生存和演化，牵涉到农业化学、食品添加剂、饮料、药物、材料、催化剂等诸多领域。

人类的新陈代谢过程是由一系列相互衔接的化学反应组成的，从分子水平来看，手性代表着生命过程中最本质的性质。氨基酸具有手性，小分子糖具有手性，多肽具有手性，蛋白质具有手性，多聚糖也具有手性，我们常常可以观察到生物系统中不同的手性体在代谢与调节过程中具有明显的不同的生理活性，而且生命体中的每一步反应都是在高度立体专一性的催化剂—酶的催化下进行的。

目前主要用于对映异构体分离的技术可以图 6-19 表示。

色谱分离法具有非常优秀的分辨能力，目前手性拆分属于色谱研究领域的热点和前沿，在这方面已有大量的文献报道，但它们主要局限在高效毛细管电泳、毛细管气相色谱、高效液相色谱，它们的分辨率很高，但其分离量常在微克级，只能作为分析测试手段。制备液相色谱可以满足一般性制备拆分的需

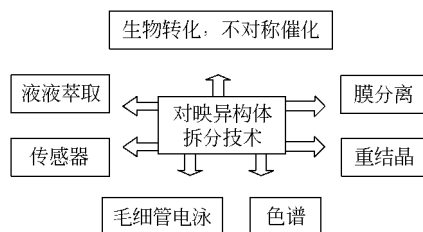


图 6-19 主要用于对映异构体分离的技术

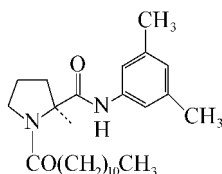
要, 可用于药理及毒理实验, 但制备液相色谱仪价格昂贵, 一根较大的手性制备柱可高达几万到数十万元, 且进样量大严重影响柱的寿命, 并且每种柱的适应范围也有限, 这就造成手性制备的成本很高, 即使制备较少量的手性物质很多研究工作者都难以承受。

众所周知, 一些手性酸可以用于马钱子碱、麻黄碱的拆分, 一些手性胺可以用于酒石酸或樟脑-10-磺酸的拆分。在色谱分离领域, 有环糊精类、纤维素类、氨基酸类、蛋白质类以及金属络合物类等手性固定相, 以它们为母体可以合成出高选择性的专一手性分离材料。已有利用分子印迹技术合成的手性固定相其对手性化合物的分离因子 (α) 高达 682 的资料报道, 在通常的液相色谱的手性固定相研究中, 对手性化合物的分离因子常可达到 1.1~5。当分离因子大于 1.4 时就易于利用高速逆流色谱对被分物进行制备性分离, 这为手性药物的制备性拆分创造了极好的条件。高速逆流色谱仪价格便宜, 操作方便, 分离柱中没有载体存在, 在互不相溶的两相中可方便地分别溶入具有上述特殊选择性的不同的分离材料, 有时还可在一相中同时溶入两种甚至多种手性分离材料, 能实现手性药物的制备性分离。

但不幸的是, 目前整个高速逆流色谱领域对手性分离的起步很晚, 即整个逆流色谱领域就作者掌握的文献资料也不会超过 25 篇。所以将高速逆流色谱用于手性化合物的制备性拆分, 也是目前作者课题组的主要研究方向之一。

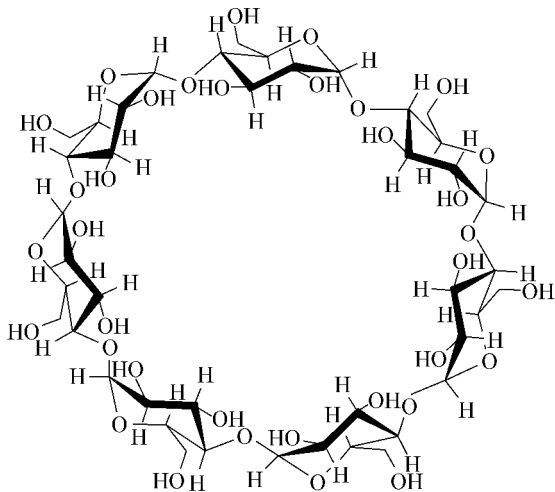
高速逆流色谱中手性分离材料的选择非常重要, 最好它只溶解于固定相或者只溶于移动相, 前者相当于手性柱液相色谱, 后者相当于在流动相中含有手性添加剂的液相色谱。如果手性添加剂在两相中都有一定的溶解, 则不利于手性分离, 因它将造成固定相或流动相中手性材料的流失, 并且使手性分离材料的添加量增大。高速逆流色谱的手性作用机理与在制备液相色谱中介绍的类似。

目前已报道的用于逆流色谱的手性分离材料种类非常有限, 大约只有几种。用得较多的是 3,5-二甲基苯胺-*N*-十二烷酰基-L-脯氨酸, 其分子结构式为



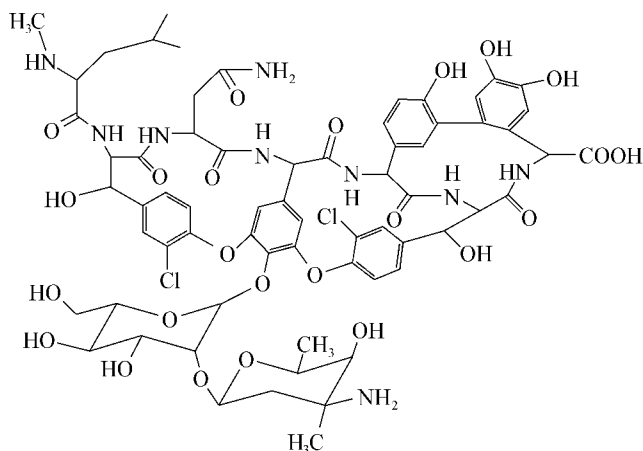
利用该试剂可以分离部分氨基酸或它们的衍生物，同时还可以将它用于 pH-区带-提取逆流色谱技术。

另外就是应用环糊精的衍生物，如磺酸基- β -环糊精对手性化合物进行拆分。在环糊精的环状结构中吡喃葡萄糖单元以 α -1,4-糖苷键结合，互为椅式结构，这样的结构使环糊精分子中的官能团形成特殊的排列，整个分子呈一头大，一头小的圆台状结构，并形成具有一定孔径，一定深度的笼形化合物。每个单糖 C-2、C-3 上的羟基处于开口较大的这面圆周上，C-2 在圆周外，C-3 在圆周内。C-6 上的羟基以 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基处于截锥较小的一面，可以转动到部分遮住截锥较小的一面形成一个洞穴，由于环糊精含有多个羟基，故能溶于水。在笼形圆筒内侧只有两圈碳氢键的氢原子和夹在中间的葡萄糖苷氧原子，每个葡萄糖单元的氧原子的孤对电子朝着内腔，产生高电子云密度，与多种有机化合物有偶极-偶极作用，因而能与许多有机物形成包含化合物。该空腔内相对比较疏水。下面是 β -环糊精的分子结构式：



作者课题组应用羧甲基环糊精成功地对氨鲁米特和扑尔敏的外消旋体进行了制备性分离。

除此之外，还有将喹啉类生物碱、牛血清白蛋白和万古霉素用于逆流色谱手性分离的报道，下面是万古霉素的分子结构图。



总之，高速逆流色谱目前已经越来越受到各国科学家的关注。在生化科学方面，已被用于分离氨基酸、多肽、蛋白质、DNA；在医学方面，已被广泛用于细菌、红细胞、药物代谢产物的研究；在药学方面，也已用于天然药物的开发，抗生素合成药物的分离。它不但可用于有机物质、外消旋体，而且在一些重金属如 Co、Cu、Fe (II)、Fe (III)、Mg、Ni 之间的分离，稀土元素同其他元素的分离以及单个稀土元素的分离也显示出良好的分离能力。美国 FDA 最近已经用这种新方法制备食品以及化妆品中有机酸染料的标准纯物质，进一步证实了它的实用价值。高速逆流色谱已经成为色谱科学中的一个分支，随着这一技术的进一步研究和普及，正在成为分离科学中一种新颖、有效和常用的手段。

参 考 文 献

- 1 张天佑. 逆流色谱技术. 北京: 北京科学技术出版社, 1991
- 2 Ito Y, Conway W D. High-Speed Countercurrent Chromatography. John Wiley & Sons, Inc., 1996
- 3 Yuan L M. Separation of Flavonoids by CCC. J. Cazes (Editor). Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker, Inc., 2004
- 4 Ito Y. CRC Crit. Rev. Anal. Chem, 1986, 65: 17
- 5 Yuan L M, Ai P, Chen X X, et al. J. Liq. Chromatogr. & Related Technology, 2002, 25: 889
- 6 Marston A, Slacanin I, Hostettmann K. Phytochemical Analysis, 1990, 1: 3
- 7 Yuan Y M, Zi M, Ai P. Chen, X X, et al. J. Chromatogr. A, 2001, 927: 91
- 8 Weisz A, Scher AL, Shinomiya K, et al. J. Am. Chem. Soc, 1994, 116 (2): 704

- 9 Slacanin I, Marston A, Hostettmann K. J. Chromatogr, 1989, 482, 234
- 10 Marston A, Borel C, Hostettmann K. J. Chromatogr, 1988, 450, 919
- 11 Yuan L M, Chen X X, Ai P, et al. J. Liq. Chromatogr & Related Technology, 2001, 24: 2961
- 12 Marston A, Hostettmann K J. Chromatogr. A, 1994, 658: 315
- 13 Yuan L M, Fu R N, Tan N H, et al. Analytical Letters, 2002, 35: 203
- 14 Fuquan Yang, Jiang Quan, Tianyou Zhang, Yoichiro Ito. J. Chromatogr. A, 1998, 828: 316
- 15 Yuan L M, Chen X X, Ai P, et al. J. Liq. Chromatogr. & Rela. Tech, 2004, 27 (2): 147
- 16 Zhang T Y, Xiao R, Xiao Z Y, et al. Y. J. Chromatogr, 1988, 445: 199~206
- 17 Foucault A P. J. Chromatogr. A, 2001, 906: 365
- 18 Franco P, Blanc J, Oberleitner W R, et al. Anal. Chem, 2002, 74: 4175

第七章 模拟移动床色谱

模拟移动床色谱 (simulated moving bed chromatography) 又可简称为 SMB 色谱, 它是 20 世纪 60 年代美国 UOP 公司首先用于石油化学工业的一种色谱技术。由于通常的色谱分离技术不能进行连续操作、冲洗溶剂以及分离柱材料的利用率低、所得的流出组分被高度稀释等多种缺点, 因此该技术被广泛地用于石油化学和糖工业, 每年进行数吨级别的工业色谱分离。

由于模拟移动床系统设计的发展、手性分离材料的成功合成以及非线性色谱模型的进一步完善, 1992 年第一次将模拟移动床色谱用于手性分离。公开发表的文献表明, 模拟移动床色谱与经典柱色谱相比, 对于同样量的分离材料, 模拟移动床的生产力可增加 60 倍, 而冲洗溶剂的消耗量可减少 80 倍。每天每千克分离材料可拆分 10~1 000g 量的外消旋体。该技术尤其适用于两组分的分离。

第一节 模拟移动床色谱系统和基本原理

一、移动床色谱

一般的色谱技术都是固定床色谱, 色谱柱中的固定相是相对固定不动的。在石油化工、食品工业和精细化工中, 为了利用资源、节约能源和降低成本, 常常采用移动床分离技术。所谓移动床分离技术是在色谱柱中让分离固体材料在重力作用下自上而下地移动, 而另一相气体或者液体逆着固体材料运动的方向向上流动, 分离材料连续地与逆流上升的另一相相遇, 使之发生分离过程, 达到循环操作。该技术可以解决固定床色谱中真正起作用的分离时间占整个操作时间的比例小的缺点, 能实现连续进样和连续出料的操作过程, 提高生产效率, 降低生产成本。

模拟移动床色谱是在移动床色谱的基础上发展起来的, 其示意图见图 7-1。

在色谱分离柱中, 柱中固体分离材料从上向下运动, 液相从下向上移动, 二者形成逆向并进行着各自的不断循环。整个系统有一个流动相进口、一个进样口、一个抽出物出口、一个剩余物出口。流动相与样品溶剂的流入速度与抽

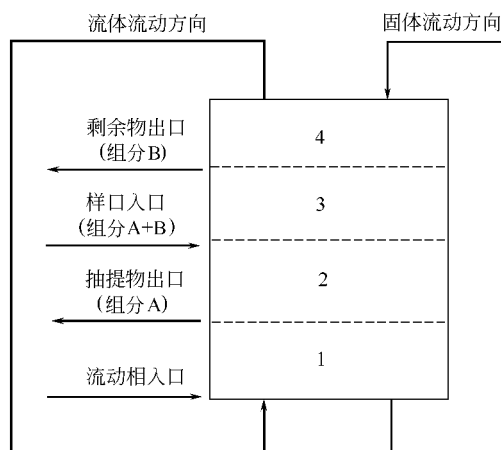


图 7-1 移动床色谱示意图

出物（组分 A）及剩余物（组分 B）的流出速度各不相同，具体的每一个的流量大小需要进行优化选择；分离柱中呈现 1、2、3、4 四个带，带 1 是分离材料出口与组分 A 出口之间，带 2 是紧跟着的一个带与样品入口之间，带 3 是样品入口与组分 B 之间，带 4 是组分 B 出口与流动相出口之间。每一个带在分离过程中起着各自的作用。在带 1 分离材料得到再生，组分 A 向着出口输送；在带 2、3 起着分离的作用，它使保留值大的组分 A 移向组分 A 的出口，而使保留值小的 B 组分输送到组分 B 的出口；而在最后一个带 4 中，流动相得到再生。在整个过程中，始终保持着：

流动相的流量 + 进样的流量 = 组分 A 的流量 + 组分 B 的流量
 这样一个平衡等式。

实际上，移动床色谱在生产过程中有一些严重的缺点，首先是分离材料的运动会造成材料本身的磨损，分离材料的消耗使生产成本迅速增加，磨损产生的残渣还会堵塞管道及阀门。尤其是一些常见的用于模拟移动床色谱的手性分离材料，它们的很多类型是将功能手性高分子涂渍在硅胶表面，或者将手性小分子键合在硅胶的表面，材料的成本非常高，耐磨性非常差。另外，分离材料的不断运动，使床层的填充状态不断改变，也干扰了另一相的流动分布，使分离再现性受到很大的影响。为了继承移动床色谱的优点，同时又能解决这种方法的不足，因此产生了模拟移动床色谱。

二、模拟移动床色谱系统

（一）大型模拟移动床色谱系统

图 7-2 是一个工业上使用的模拟移动床色谱的装置示意图：在这个装

置中，多个分离柱串联，流动相在一个压力泵的作用下从上到下在柱中循环。为了克服移动床的缺点，在该系统中分离材料不再在分离柱中移动，而是运用了一个旋转阀，通过定时逆时针转动该阀，导致系统中的两个进口和两个出口的位置每隔一定的时间同时向下移动一次。由于转动阀的逆时针旋转造成的进口和出口的不断向下变动，使得柱中的分离材料相对于进出口发生了相对移动，故将该系统称之为模拟移动床色谱。它既保存了移动床能连续操作等多种优点，同时又克服了由于移动床中分离材料的移动所造成的缺点。

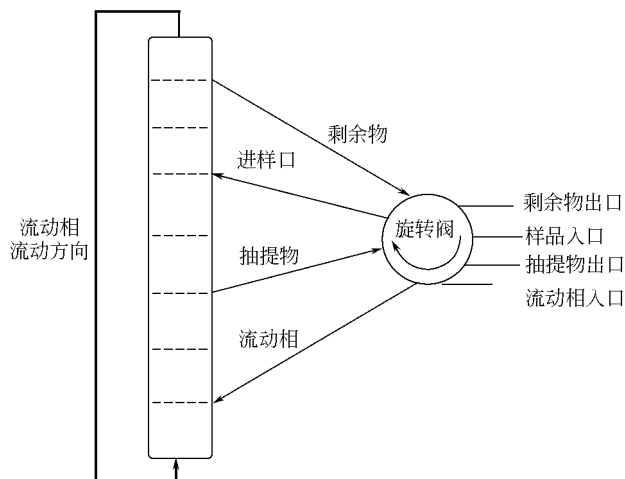


图 7-2 大型模拟移动床色谱示意图

但在手性药物工业和很多精细化工中，并不需要使用石油化工和糖工业的每天能处理数吨级的大型模拟移动床的装置，在很多情况下，每天能处理千克级的样品就非常满意了。所以，在现在制备色谱领域的模拟移动床研究中，主要是考虑怎样将能处理数吨级的模拟移动床色谱缩小成能处理千克级规模的模拟移动床色谱的仪器。

（二）模拟移动床色谱

模拟移动床色谱的发展主要是手性药物的推动。目前国内外原料药约 4 000 种，其中约 50% 是合成药物。在合成药物中，又约有 40% 是外消旋体。在外消旋体药物中，它们很多一种立体异构体有药效，而它的镜像分子则具有毒副作用、或具有另外的药效或根本就没有药效。目前以单一手性体上市的合成药物只占整个外消旋体药物的 5% 左右，其原因在于一方面不对称合成属有机合成前沿，还有较多需进一步研究的问题，如需要较多的手性催化剂、最终手性产率往往偏低、合成成本很高等；另一方面外消旋体药物要进行制备性的

拆分也比较困难，要进行千克级乃至更大规模的生产就非常困难了，这就为模拟移动床的发展提供了很好的发展机遇。

首先将模拟移动床色谱用于手性分离的是 Negawa 和 Shoji，时间是 1992 年，所使用的手性分离材料是 3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯纤维素，被分离的外消旋体是苯乙醇。

将大型模拟移动床色谱缩小成较小规模甚至实验室使用的模拟移动床色谱的关键问题在于柱外影响效应，色谱仪的尺寸越小，柱外效应越严重，柱外效应通常包括柱结构的影响、管道的影响、阀门的影响以及泵的影响等。1993 年法国 Separex 公司利用大型模拟移动床原理，缩小系统尺寸，开发了第一台适合于分离外消旋体的模拟移动床系统（LicoSep 8-200），其照片如图 7-3 所示。

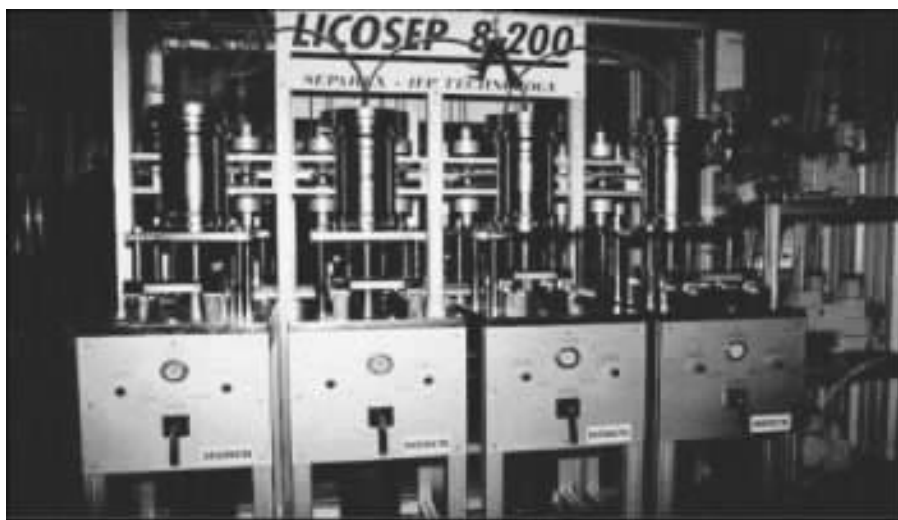


图 7-3 LicoSep 8-200 SMB 系统照片

该系统由 8 根直径为 200mm 的色谱柱组成，需要大约 15kg 的手性固定相，每天每千克手性分离材料可制取 250g 的对映异构体，该系统每天可拆分 7.5kg 外消旋体，得到两个 3.75kg 的各自的对映异构体，其每个月可以生产 80~100kg 的手性药物。这对于利用模拟移动床色谱第一次拆分外消旋体来说，这个产量是相当优秀的。

1996 年 Separex 公司的色谱部整合成了一个新的公司 Novasep，目前国际上商品模拟移动床色谱仪主要来源于 Navasep 和 UOP 公司，每套仪器的价格（所需的分离材料除外）在几十万美元以上，所用的手性分离材料大多数为多糖类手性固定相，少数采用 Pirkle 型分离材料。

首先安装模拟移动床色谱进行药物生产的是比利时的 UCB-Pharma 公司, 药物年产量达到数吨。该系统使用了 6 根直径为 450mm 的色谱柱。1999 年 Novasep 公司在美国加利福尼亚州的萨克拉曼多成功安装了一套柱直径为 800mm 的模拟移动床色谱装置。

实验室规模的模拟移动床色谱柱直径一般在 25~50mm, 而中试规模的一般为 100~200mm。图 7-4 和图 7-5 分别为 Navasep 公司的 LicoSep LAB 和 LicoSep 6-800 模拟移动床色谱的照片。前者主要适用于实验室规模的分离, 而后者则是适用于工厂的大规模的生产。



图 7-4 Navasep 公司的 LicoSep LAB 模拟移动床色谱系统

从图 7-4 可以清楚地看见该装置的柱系统、柱上下的阀系统、5 台压力泵组成的输送系统, 以及以计算机为中心的整个装置的控制系统, 在该系统中柱的直径大约在 25~50mm 之间。

从图 7-5 清楚可见 6 个比较大的色谱分离柱, 我们从柱的高度和直径不难估计该装置的生产规模比实验室型的大多了。

在大多数情况下, 模拟移动床色谱可由 6~12 根色谱柱组成, 它们依次连接。在分离柱连接成的环路上, 有一个计量泵专门负责输送流动相在回路中通过所有的色谱柱而循环; 两个计量泵分别负责连续地输送新鲜的流动相和样品溶剂进入模拟移动床系统; 还有两个计量泵负责连续地分别抽取组分 A 和组分 B, 因此 5 个计量泵一个负责内部循环, 另外 4 个负责进出。图 7-6 是模拟移动床色谱原理示意图。

该系统是由 2-2-2 根分离柱组成, 包含有 5 个计量泵, 这些泵不但要求要有高的流量精度、比较大的流量范围, 还要求能耐较高的压力, 因此这些泵

的价格比较昂贵。整个系统中色谱分离分为四个区域 1、2、3、4，与前面叙述的移动床的四个区域是完全一样的，每一个区域的流动相流速通常并不相等。



图 7-5 Navasep 公司的 LicoSep 6-800 模拟移动床色谱系统

为了能模拟移动床的功能，在它们的每根柱的两端实际上有 4 个耐压阀，这些耐压阀通过控制系统能分别被打开或者关闭。固定相与流动相之间的逆流运动通过阀门的不断开闭、这种开闭的顺序依次变换并不断地向着内部流动相移动的方向向前移动而被模拟，这也是该方法被称为模拟移动床色谱的原因。将图 7-6 进一步具体化，则模拟移动床色谱的柱、阀以及泵的连接可示意如图 7-7。

在有些模拟移动床的设备中，是使用一个旋转阀来代替这里的所有耐压阀，就像图 7-2 中的旋转阀那样。

三、模拟移动床色谱原理

为了清楚地说明模拟移动床色谱的原理，我们先简化一下系统中的设备连接，假设系统中的色谱柱首尾相连成为一个圆形的闭合柱，在内部计量泵的作用下，流动相沿顺时针方向流动，另一方面，由于系统中阀门有

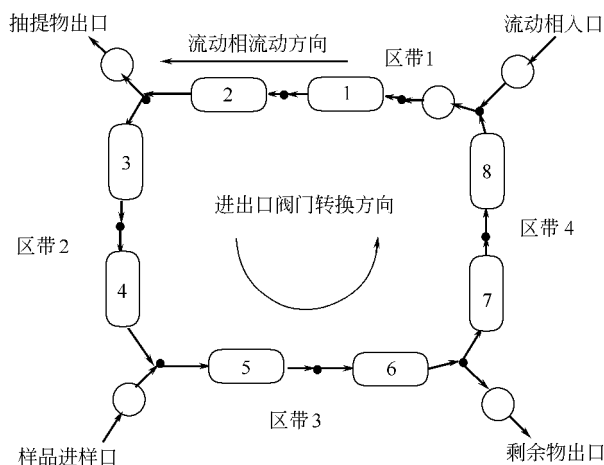


图 7-6 模拟移动床色谱原理示意图

○ 代表恒流泵 □ 代表色谱柱

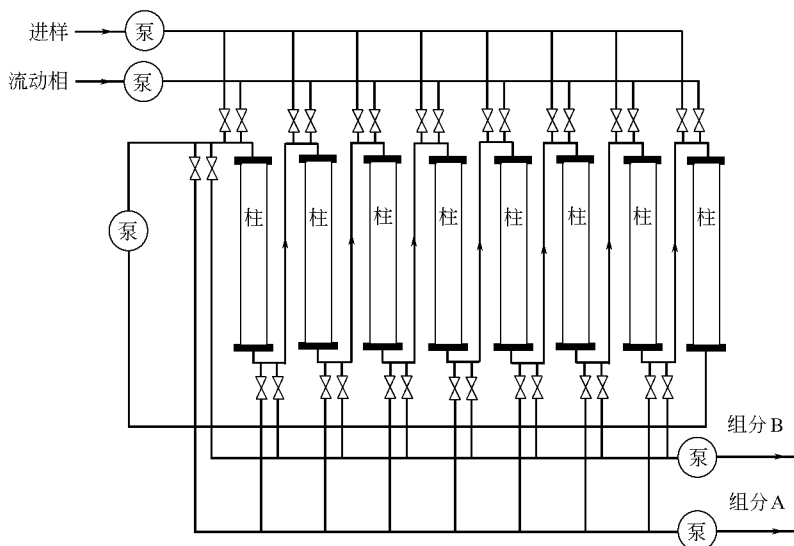


图 7-7 模拟移动床色谱的柱、阀以及泵的连接示意图

规律地旋转以及适当的间隔，使得系统中两个进口和两个出口每隔一定时间同时也向着顺时针方向移动，移动的结果类似于色谱柱中的固定床向逆时针方向移动。

当系统开始工作时，样品溶液也同时开始进行连续地输入，在刚开始的一个点，混合样品液还未有得到丝毫的分离，示意图如图 7-8。

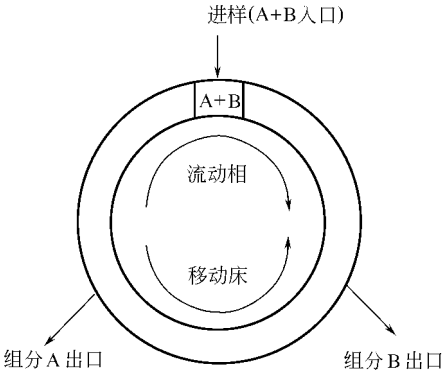


图 7-8 模拟移动床刚进样时的分离状态

当系统工作一段时间后，样品在流动相的冲洗下不断地向前移动，样品组分也开始慢慢地得到部分的分离，进样口和出样口通过系统中阀门的关闭也同时向前移动，但移动的速度和每次间隔的时间应该始终保证进样点在双组分还没有得到分离而仍然重合的区间范围，如图 7-9 所示。

只要优化好阀门每次转换开闭的间隔时间，调节好进出口同时向前移动的速度大小，优化好两个进口和两个出口单位时间内进入和抽出的溶液的量，当系统持续工作一定的时间后，柱中的混合物就会达到相当程度的分离，并且能保持柱中的浓度分离曲线始终为一个不变的分布状态。这时就能连续不断地进样，同时在系统的两个出口连续不断的得到被分离的两个组分的产品。其分离示意图 7-10。

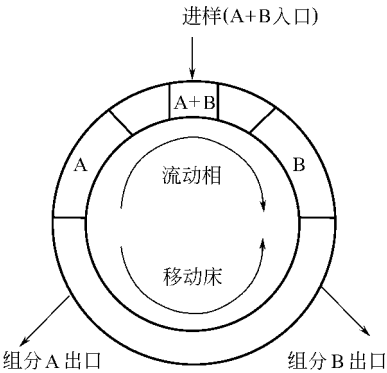


图 7-9 模拟移动床进样后的初步分离状态

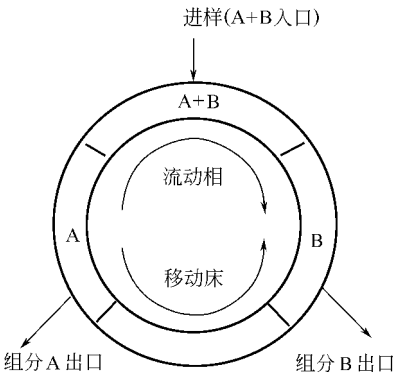


图 7-10 模拟移动床进样一段时间后达到的稳定状态

因此，模拟移动床在工作时的关键问题是如何优化和调节各种操作参数，

恰当地同时移动系统的两个进口和出口，始终保持柱中的组分分布情况为一不变的浓度分布状态，这样就可以连续地进样，连续地得到产品。

关于模拟移动床分离过程中双组分的浓度分布曲线，还可以清楚地表示为图 7-11。

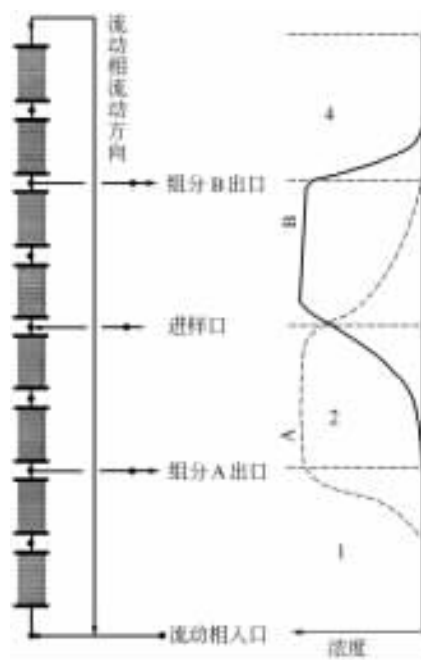


图 7-11 模拟移动床色谱的操作原理和内部的样品浓度分布情况

在图 7-11 中可以看到色谱柱中的四个区域，第一个区域是流动相入口与抽提物出口之间的范围，在这个区间，流动相对吸附剂进行脱吸附而使分离材料得到再生；第二个区域是抽提液出口与样品液入口之间，第三个区域是样品液入口与剩余液出口之间，这两个区间主要完成混合物的分离，容易被吸附的组分在柱中移动速度较慢，慢慢地积累于第二区带，而吸附能力弱的另一组分在色谱柱中有较快的移动速度，因此慢慢地集中在第三区域，这两个区域对混合物的分离起着非常重要的作用；第四区域是剩余液出口与流动相入口之间，其作用是使流动相得到再生。在整个过程中，始终保持在第二和第三区域的交叉处进样，始终可以在第一区域和第二区域得到我们所需要的产品。

从图 7-11 可见，被分开的组分可以及时地将它抽出收集，而没有得到分开的混合物始终在柱中循环。柱中每一个部分的分离材料和流动相都在同时发挥着各自的作用，在分离过程中基本上没有浪费的部分和环节，这也是该方法

高产率、低消耗的根本原因。

第二节 模拟移动床工作参数的选择和优化

一、手性固定相的选择

前面已经叙述, 模拟移动床色谱最大的优势是分离两组分混合物, 在两组分混合物中, 在通常情况下最有价值的拆分应该是外消旋体了。手性化合物的分离离不开手性环境, 对于模拟移动床来说, 手性固定相的选择显得至关重要。

具有不对称手性中心或手性识别能力的手性固定相 (CSP) 的开发与研究, 是手性色谱的前沿, 也是手性色谱发展的关键和核心。自第一根手性色谱柱问世至今已经有 20 余年的历史, 现在用于色谱分离的手性固定相被大量研究, 已有 100 多种液相色谱固定相被商品化。目前所研究的高效液相色谱手性固定相主要有以下 9 大类: ① Pirkle 型 CSP; ② 配体交换色谱 (LEC) 型 CSP; ③ 大环 CSP, 包括环糊精、手性冠醚 CSP; ④ 多糖类 CSP, 包括纤维素和直链淀粉等; ⑤ 糖肽类; ⑥ 含肽或蛋白质 CSP; ⑦ 分子印迹 CSP; ⑧ 合成手性高分子类; ⑨ DNA 类。虽然手性固定相的种类很多, 但目前能用于模拟移动床色谱的手性分离材料却较少, 因为模拟移动床只需要一个选择性适中的手性固定相, 如分离因子 $\alpha = 1.3 \sim 2.0$, 太小的选择性使生产率太低, 太高的选择性也反而不利于外消旋体的模拟移动床拆分, 尤其当目标物是抽提物的时候。模拟移动床还要求手性分离材料有较高的样品容量, 它必须能承担一定的机械压力、一定的流动相冲刷以及一些化学试剂的腐蚀等。手性分离材料所能使用的溶剂范围也是一个重要的因素, 它直接关系到车间的停工期以及生产成本。由于模拟移动床主要是以生产性分离为目的, 待分离物相对固定, 所用手性分离材料的量很大, 因此, 当模拟移动床真正作为一种生产设备的时候, 最好的手性分离材料并不一定是最广泛使用的已经商品化的高效液相色谱手性分离材料, 而应该是针对某一个具体的外消旋体、考虑到综合生产成本等多种因素、专门研究出的手性分离材料, 这种专一的研究是必要的, 也是值得的, 因为它可以产生更高的经济效益。作者根据文献统计的结果表明: 70% 以上是多糖类手性分离材料, 20% 是 Pirkle 型材料, 少数用环糊精类或其他。使用多糖类的主要原因在于其样品的负载量高, 适用的样品范围广。

(一) 多糖类手性固定相

在模拟移动床中最多使用的多糖类是纤维素和直链淀粉类手性固定相。

1973 年 Hesse 和 Hagel 首先制备出了具有实用价值的多糖衍生物——微晶三乙酸纤维素 (图 7-12)

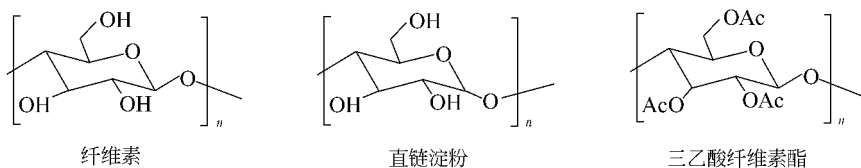


图 7-12 纤维素、直链淀粉和三乙酸纤维素酯的分子结构

随后, Y. Okamoto 进行了大量的研究, 先后合成了 200 余个多糖类的衍生物, 成功开发了 10 多个商品化的手性分离材料, 成为该领域最杰出的科学家。其最具有代表性的是苯甲酸酯和苯基氨基甲酸酯两大类, 如表 7-1 和表 7-2 中的一些纤维素类衍生物。

三苯甲酸纤维素酯类的分子结构如图 7-13 所示。

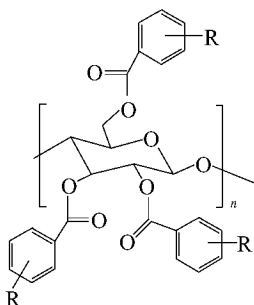


图 7-13 三苯甲酸酯纤维素类的分子结构

表 7-1 一些常见的三取代酸纤维素酯类衍生物

名 称	商 品 名	名 称	商 品 名
三乙酸纤维素酯	Chiralcel OA	三(4-甲基苯甲酸)纤维素酯	Chiralcel OJ
三苯甲酸纤维素酯	Chiralcel OB	三(3-苯基丙烯酸)纤维素酯	Chiralcel OK

表 7-2 一些三苯基氨基甲酸纤维素酯类衍生物

名 称	商 品 名	名 称	商 品 名
三(4-甲基苯基氨基甲酸)纤维素酯	Chiralcel OG	三(4-氯苯基氨基甲酸)纤维素酯	Chiralcel OF
三(苯基氨基甲酸纤维素)酯	Chiralcel OC	三(3,5-二甲苯基氨基甲酸纤维素)酯	Chiralcel OD

三苯基氨基甲酸纤维素酯类的分子结构和常见的取代基团如图 7-14

所示。

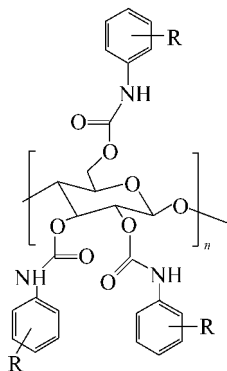


图 7-14 三苯基氨基甲酸纤维素酯类的分子结构

在这些衍生物中，三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸)纤维素酯(Chiralcel OD)对各种外消旋体显示了尤其优秀的分辨能力。其他的手性固定相的特殊选择性主要依靠对映异构体的性质。

类似地，直链淀粉也进行了一些衍生化，其中直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸)酯(Chiralcel AD)(图 7-15)对各种外消旋体也显示了尤其优秀的分辨能力。

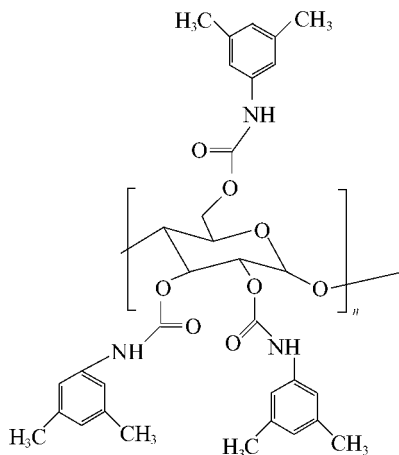


图 7-15 直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸)酯的分子结构

以上这些手性固定相的广泛用途，在文献 Y. Okamoto, E. Yashima. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, 37: 1021 中进行了详细描述。

另外，三(S)-1-苯基乙基氨基甲酸酯直链淀粉(Chiracel AS)(图 7-16)展示了一个高的手性拆分能力，有时甚至超过了 Chiracel OD 和 Chiracel AD。

其他聚多糖, 如壳聚糖 (chitosan)、氨基半乳糖 (galactosamine)、木聚糖 (xylan)、凝胶多糖 (curdlan)、右旋糖苷 (dextran) 和菊淀粉 (inulin) 的 3,5-二甲基或 3,5-二氯苯基氨基甲酸酯也被合成和评价, 它们的分子结构式见图 7-17, 其手性识别能力明显地受单糖单元、连接位置、连接类型的影响。在这些衍生物当中, 壳聚糖和木聚糖的 3,5-二甲基或 3,5-二氯苯基氨基甲酸酯显示了相对较高的手性识别能力, 并且一些外消旋体在这些柱上的拆分也可优于常见的 Chiracel OD 和 Chiracel AD。

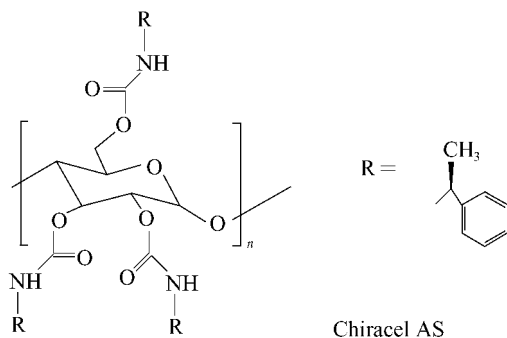


图 7-16 三(S)-1-苯基乙基氨基甲酸酯直链淀粉的分子结构

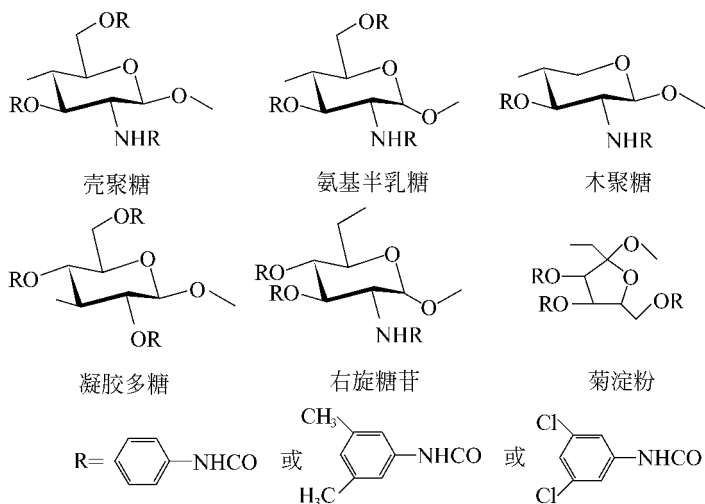


图 7-17 各种多糖类的分子结构

(二) Pirkle 型手性固定相

将小分子量的手性物质键合到硅胶上, 可称为低分子量手性固定相, 也称

之为 Pirkle 型手性固定相, 该类手性柱还被称为给体-受体柱或刷型柱。

在低分子量的合成手性固定相中, Pirkle 研究组的贡献是最杰出、最重要的。该研究组在该方向上的研究起于 20 世纪 70 年代后期, 制备出的第一代 Pirkle 型手性固定相如图 7-18 所示。

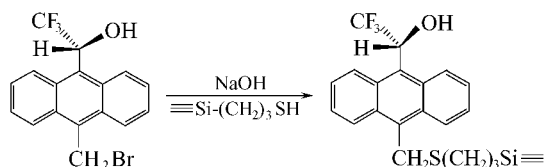


图 7-18 第一代 Pirkle 型手性固定相

第二代 Pirkle 型手性固定相如图 7-19 所示。

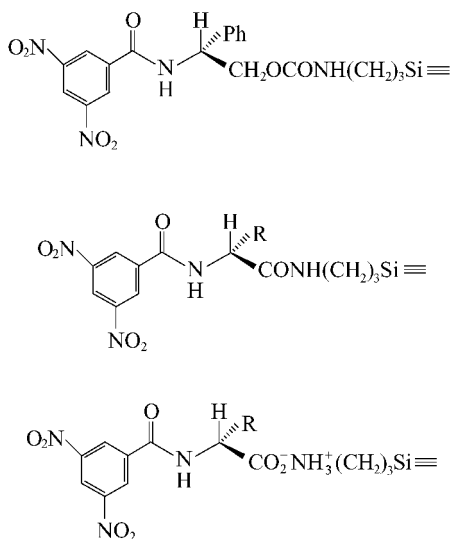
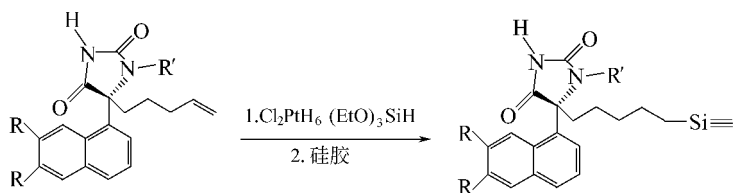


图 7-19 第二代 Pirkle 型手性固定相

第三代 Pirkle 型手性固定相如图 7-20 所示。



(a) 5-芳基己内酰脲型

图 7-20

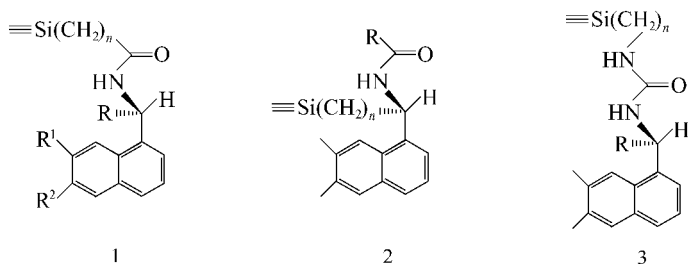
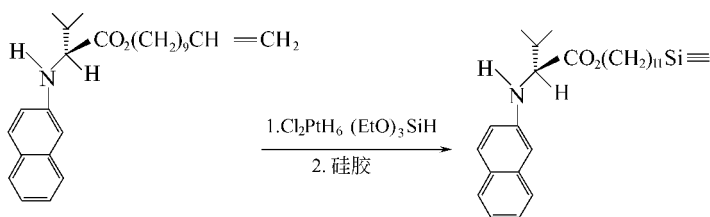
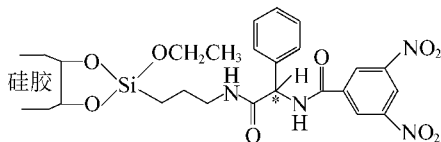
(b) *N*-酰化-1-芳基-1-氨基烷型(c) *N*-芳基氨基酸酯型

图 7-20 第三代 Pirkle 型手性固定相

自 1980 年 Regis 生产商品手性柱以来,最广泛使用的 Pirkle 型手性固定相是 *N*-(3,5-二硝基苯甲酰基)苯基甘氨酸 (DNBPG) 手性固定相(图 7-21),该固定相终端有一个 π -电子接受体,与具有 π -电子给体的芳香对映异构体产生 π - π 作用。该固定相还含有二个酸性氢原子和两个碱性羰基,它们能与一些溶质分子,如酰胺、胺或羟基生成氢键。其能分离一个宽范围的对映异构体。这种柱称 π -电子接受柱。

图 7-21 *N*-(3,5-二硝基苯甲酰基)苯基
甘氨酸手性固定相的结构式

其次广泛使用的 Pirkle 柱在手性固定相中含有一个萘环(少量的是含有苯环),它是强的 π -电子给予体。 π -电子给予体手性固定相被合理地设计去拆分胺、氨基醇、氨基酸、醇、羧酸和硫醇。这些手性固定相尤其善于拆分醇和胺的 3,5-二硝基苯基氨基甲酰基或脲衍生物。图 7-22 是萘基丙氨酸 Pirkle 型

手性固定相的结构式。

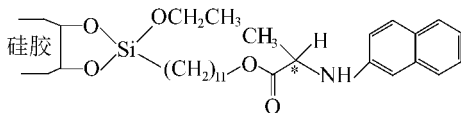


图 7-22 是萘基丙氨酸 Pirkle 型手性固定相的结构式

第三种类型的 Pirkle 柱是“杂化”了 π -电子给体-受体的手性固定相。如 Whelk-O1，它当初是为分离萘普生的对映异构体而设计的，是很少的几个能直接分离非衍生化的萘普生对映异构体的手性固定相之一。由于该固定相中含有 π -酸和 π -碱，因此它可以拆分含有 π -酸或 π -碱的对映异构体（图 7-23）。

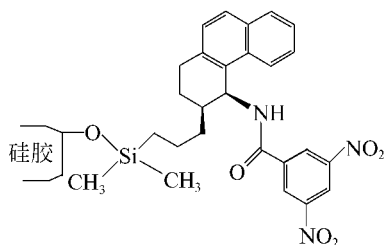


图 7-23 Whelk-O1 手性固定相的分子结构

除此之外，一个商品名叫 α -Burke 1 的固定相已经被发现具有相当宽的应用范围，其为二甲基-*N*-3,5-二硝基苯甲酰基- α -氨基-2,2-二甲基-4-戊基磷酸酯，尤其是其对非衍生化的 β 受体阻断剂的拆分具有较好的效果（图 7-24）。

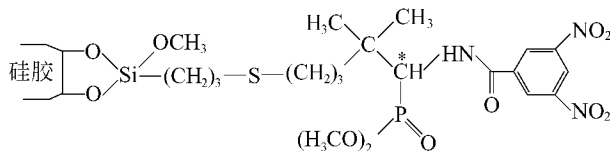


图 7-24 α -Burke 1 手性固定相的分子结构

以上 4 种手性固定相在高效液相色谱中的使用频率为
 Whelk-O1 > α -Burke 1 > DNBP > 萘基丙氨酸

（三）环糊精类手性固定相

环糊精已经作为高效液相色谱的手性固定相，环糊精分子的空腔是疏水性的，它主要包含包合作用和氢键两种。环糊精空腔的大小也确定着它对不同溶质的分离。在环糊精的衍生物中，由于取代基的引入，改变了一些色谱性

能, 并且往往能增强分离的选择性。我们可以合成很多类型的环糊精, 几乎每一种都有自己独特的性质, 也许它们能强化一定的各自对应的对映异构体的分离能力。但到目前为止, 真正已经商品化并能较广泛地拆分手性化合物的环糊精衍生物并不多。图 7-25 是已经商品化的较多使用的环糊精类液相色谱固定相。

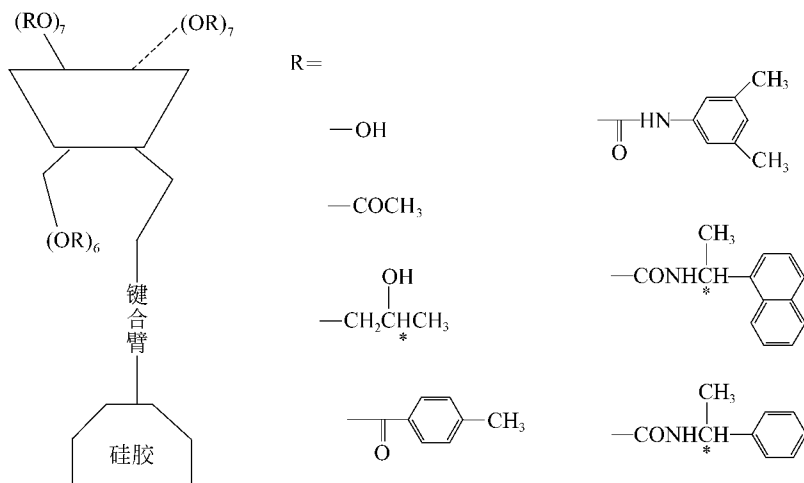


图 7-25 环糊精类液相色谱固定相

这些键合固定相的名称分别为: α -环糊精; β -环糊精; γ -环糊精; 乙酰化 β -环糊精; *S*-羟丙基醚 β -环糊精; *R*-羟丙基醚 β -环糊精; 对甲基苯甲酸酯 β -环糊精; 3,5-二甲基苯基氨基苯甲酸酯 β -环糊精; *S*-萘乙基氨基苯甲酸酯 β -环糊精; *R*-萘乙基氨基苯甲酸酯 β -环糊精; *S*-苯基氨基苯甲酸酯 β -环糊精; *R*-苯基氨基苯甲酸酯 β -环糊精。

推广模拟移动床拆分外消旋体的困难之一在于目前只能借用高效液相色谱的手性分离材料, 但分析型的手性分离材料的价格太高, 如广泛使用的日本 Dancel 公司的一根纤维素三 (3, 5-二甲基苯基氨基甲酸酯) 柱 [4.6 mm(i. d.) $\times$ 25cm, 又叫 OD 柱] 的人民币价格大约在 1.3 万元左右, 而柱中的手性分离材料还不到 4g。所以研究出具有自主知识产权的、专门针对模拟移动床色谱的、具有高的性能价格比的手性分离材料, 是一项非常有意义的研究工作。

二、流动相的选择

对于模拟移动床的流动相首先要考虑的是它对样品溶解度的问题, 一个经济的外消旋体分离过程必须要求样品在流动相中具有足够高的溶解度, 粗略地

估计该技术需要的最小溶解度通常要大于 10g /L。

在考虑了流动相对样品的溶解度后，还要考虑流动相与手性分离材料的适应性。如广泛使用的由日本 Dancel 公司生产的 Chiralpak OD 和 Chiralpak AD 手性分离材料，就不耐四氢呋喃、氯仿甚至丙酮等的冲洗。这些溶剂的使用，会使起手性分离作用的纤维素三（3，5-二甲基苯基氨基甲酸酯）脱离支持体硅胶而流出柱外，导致手性固定相彻底被破坏。因此仅仅能够在具有高溶解度的溶剂中选择适合于固定相的流动相。

我们还应针对样品特性进行分离的选择性研究，筛选出好的流动相与分离材料的组合。通常希望分离的容量因子 k'_1 ：2~6，溶解度 >10 g/L，表示选择性的分离因子 $\alpha=1.3\sim2.0$ 。

在满足选择性的前提下，流动相最好是单一组分的溶剂系统，这样不但有利于操作参数的控制，也有利于产品的收取以及流动相的再利用处理。

流动相的纯度常常也是一个非常重要的因素，如在非水流动相中，有时哪怕 0.1% 的水的引入，都会破坏整个流动相的原有特性，足以使系统中保持常态的浓度分布曲线发生改变。

我们还应该像其他制备色谱方法一样，考虑流动相的黏度以减小系统工作阻力，考虑沸点较低的溶剂有利于抽提液和剩余液的蒸发浓缩，考虑毒性低的溶剂减少对环境的污染等等。

三、分离柱

该技术所使用的分离柱基本上是玻璃和不锈钢两种。根据分离的要求，要求对柱的直径以及长度进行选择。手性材料的填充是一项技术性很强的工作，根据材料粒度的大小不同，如颗粒直径 $\geq 20\mu\text{m}$ 应该选取干法进行填充；颗粒直径小于 $20\mu\text{m}$ 的材料，其表面积较大，表面静电很多，非常容易产生团聚，则应选择湿法进行装柱。填好的柱要均匀、紧密，能抵抗流动相的高速冲洗和压力。尤其是柱与柱之间要有好的再现性和稳定性，这一点在模拟移动床色谱中显得非常重要。在该系统中，每根柱可以通过分别脉冲进样考察柱的理论塔板数以及柱之间的再现性。

输送进入系统的样品溶液最好不要含有其他杂质，尤其是极性很强的化学杂质，这些强极性物非常容易被吸附在手性分离材料上，要将其从柱中冲洗出去往往非常困难。随着杂质吸附量的不断增多，必将降低样品容量，改变材料特性，最后失去手性分离能力。

四、控制系统

模拟移动床通常包含有一个控制系统，这个系统往往有一个控制这个系统

的软件，用于整个装置中阀门、泵、流量以及压力等的控制。

五、操作参数的优化

在模拟移动床色谱的操作过程中，有很多因素和条件必须考虑，如我们是希望得到一个对映异构体或者是两个对映异构体、产品的纯度要求、目标物的产率要求、样品中的杂质以及对目标物是否进行进一步的处理；根据上面的需求，要设计分离柱的直径、柱的长度、总共所需的柱的数目、每个区域所需要的柱数目。尤其是在系统工作前，必须正确地选择样品溶液的浓度、样品溶液的输入流量、流动相的输入流量、抽提液的抽出流量、残余液的抽出流量、循环流动相的流速以及阀门的切换时间这 7 大参数。只有对这些参数进行正确的选择，才能保证模拟移动床系统中的浓度分布曲线是一个常态，才能进行样品的连续进样以及抽提液和残余液的不连续收集。

前面已经讲到，模拟移动床色谱中有四个区域，在这四个区域中它们的流量并不相等，而是呈现下面的关系：

$$Q_1 = Q_{\text{流动相}} + Q_4$$

$$Q_2 = Q_1 - Q_{\text{抽提}}$$

$$Q_3 = Q_2 + Q_{\text{样品液}}$$

$$Q_4 = Q_3 - Q_{\text{剩余液}}$$

阀门的转换时间：

$$t = V_{\text{固定相}} / Q_{\text{固定相}}$$

在通常情况下，还定义了每个区域的流速比：

$$m_j = \text{某个区域的净流动相流速} / \text{某个区域的固定相流速}$$

$j=1、2、3$ 或 4 ，因此我们可以分别得到 m_1 、 m_2 、 m_3 和 m_4 四个区域的流速比，在这些流速比中， m_2 和 m_3 最重要。

在上面的等式中， Q 代表流量， V 代表体积。固定相的流速概念是将它作为移动床色谱中的固定相来考虑的。

这些参数的优化一般有两种方法，一种是尝试法，这种方法是靠已经掌握的实验数据和我们积累的实践经验，进行大量的尝试，最后找到合适的各种具体参数，在生产过程中，及时地再根据分离情况进行调整。该方法很麻烦，并且将花掉大量的时间和人力。

另一种方法就是利用计算机进行模拟优化，该方法通常需要购买一定的相关软件才能开展工作。到目前为止已经有多个优化模型和模拟程序被相关公司或者大学建立和编写。利用计算机软件去优化各种参数，比仅靠经验去尝试，将节省大量的时间。图 7-26 是模拟移动床内组分浓度分布形态的实验和计算

机模拟的结果比较。

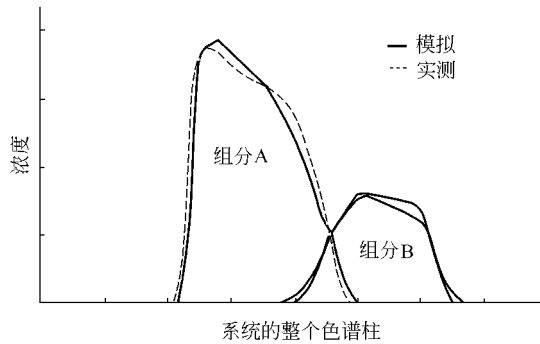


图 7-26 模拟移动床内组分浓度分布形态的实验和计算机模拟的结果比较

但不管应用上面两种方法中哪一种进行操作条件的优化，总的来讲都还是比较麻烦的。有作者基于平衡理论建议的三角形操作图表法是一种很有效的捷径，它可以使参数的优化变得简化，在此我们对该方法进行一下简单的介绍。

首先，需要通过过载进样所得到的实验数据，得到双组分的吸附等温线。其次，以 m_3 为纵坐标， m_2 为横坐标作二维平面图。图中的三角形由吸附等温线和对角线上的两个点确定。对角线上的两个点等价于亨利常数。在非线性情况下得出的平面三角形图示意图为图 7-27：

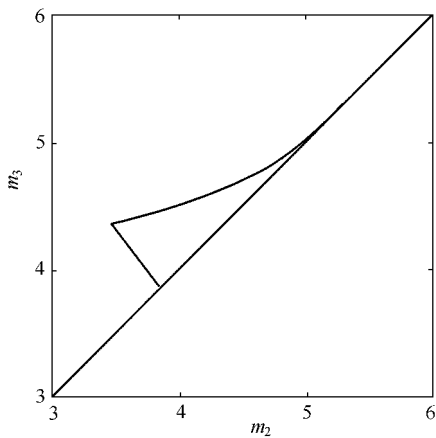


图 7-27 非线性情况下得出的平面三角形示意图

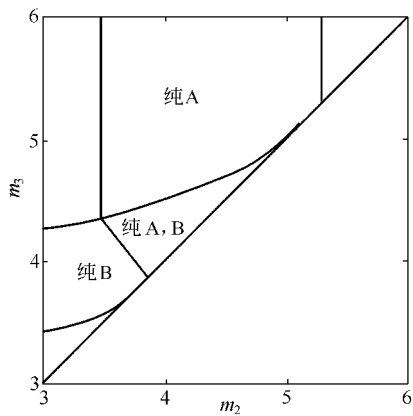


图 7-28 三角形图中的各个区域分布

在三角形的上面区域可以得到纯的抽提物，三角形的左面可以得到纯的剩余物，而在三角形的顶点所对应的区域不能得到任何纯的产品。其分区表示为图 7-28。

因此，在操作的时候就可以根据这个三角形图所代表的“三角理论”，从现在系统所处的操作点，有效地调节所需要的新的操作点，优化操作参数。该理论还建议在移动操作点的时候可以沿着平行于对角线的直线移动，这时保持了流动相流量和样品溶液的进样量不变。可以避免同一时间多个参数的变化。当模拟移动床中 m_2 的数值改变时，对抽提物和剩余物产率的影响示意图可表示为图 7-29。

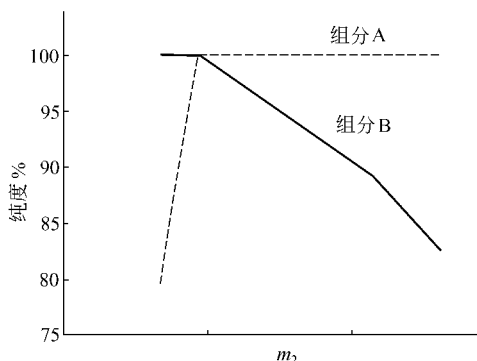


图 7-29 产物纯度与 m_2 的关系曲线

以上只是对“三角理论”的最粗略的一点介绍，如果读者有兴趣进行较深入地了解，请阅读后面所列的参考文献。

到目前为止，一些模拟移动床色谱还主要靠手动操作，对于该过程的在线检测、了解色谱柱内的浓度分布曲线、及时调整操作参数、并实现整个过程的自动化是该领域的发展方向。

模拟移动床色谱技术不只是能应用于液相色谱，还有将其应用于超临界流体色谱甚至气相色谱之中的报道，但这些方法目前毕竟还处于研究阶段，与实际生产应用还有一段距离。

六、模拟移动床的应用

在我国模拟移动床色谱的研究也已经兴起。中国科学院大连化学物理研究所的张玉奎院士领导的课题组承担了国家科技部有关模拟移动床色谱仪的国产化的攻关课题。鞍山科技大学林丙昌教授领导的课题组也在国家科技部的小企业创新基金资助下研制出了大、中、小三个不同规格的模拟移动床色谱仪，图 7-30 是该课题组研制的中型模拟移动床色谱仪。



图 7-30 鞍山科技大学研制的模拟移动床色谱仪

表 7-3 是一些文献报道的模拟移动床色谱分离实例。

表 7-3 一些文献报道的模拟移动床色谱分离

待分离物	固定相	选择性 (α)	柱(柱数目, 柱长 $\times$ 直径/mm)	样品浓 度/(L/g)	产品量/(g/d, 固定相)
sandoz-epoxide	CTA	1.28	12,110 $\times$ 26	10.0	35.3
D/L-苏氨酸	Chirosol prolin	1.60	8,1000 $\times$ 26	5.0	4.01
WEB 2170	CTA		8,100 $\times$ 90	100.0	1453
顺/反叶绿醇	LiChronspher Si	1.16	8,400 $\times$ 200	105.0	549
L-苯乙醇	Chiralcel OD		8,150 $\times$ 20	39.1	70
praziquantel	CTA	3.42	4,445 $\times$ 12.5	50.0	123
sandoz-epoxide	Chiralcel OD	1.53	12,100 $\times$ 16	20.0	37
1,1'联萘-2,2'-二醇	Chiralsep DNBPG	1.24	8,80 $\times$ 200	0.30	2.13
aminogluthimide	Chiralcel OJ	2.07	8,80 $\times$ 26	16.0	160
guafenesin	Chiralcel OD	2.43	16,60 $\times$ 21	30.0	77
formoterol	Chiralcel OJ	1.43	16,60 $\times$ 16	2.50	11
CGS26214	Chiralcel OJ		8,80 $\times$ 26	5.0	47.4
EMD 53986	Polyacrylamide	2.82	8,54 $\times$ 26	12.0	319

续表

待分离物	固定相	选择性 (α)	柱(柱数目, 柱长 $\times$ 直径/mm)	样品浓 度/(L/g)	产品量/(g/d, 固定相)
EMD 53986	Chiralpak AD	3.1	8,50 $\times$ 26	6.0	432
seebach-oxazolidinone	Chiralspher	1.87	8,131 $\times$ 26	15.0	1.3
choropropiophenone	Chiralcel OD	1.3			
EMD 53986	Chiralpak AD	3.1	6,79 $\times$ 200	7.60	375
EMD 77697	Chiralcel OD	2.3	8,54 $\times$ 26	30.0	451
SB 202026	Chiralpak AD	1.8	8,105 $\times$ 26	20.0	258
Tramadol	Chiralpak AD		12,100 $\times$ 21.25	20.0	600
环孢霉素 A	LiChrospher Si		8,100 $\times$ 50	5.80	44
环孢霉素 A	LiChrospher RP		8,100 $\times$ 50	1.0	19
DOLE	Chiralcel OF	1.23	8,100 $\times$ 100	24.0	272
EMD 122 347	Chiralcel AD	1.47	8,93 $\times$ 50	20.31	311
Cycloalkanone	Chiralcel OC	5.26	8,103 $\times$ 25	20.0	1082
wieland-mieschler-ketone	Chiralpak AD	1.30	8,82 $\times$ 26	40.0	84
sandoz-epoxide	CTA		8,100 $\times$ 26	10.0	59

参 考 文 献

- 1 Schulte M and Strube J. Journal of Chromatography A, 2001, 906 (1~2): 399
- 2 Jupke A, Epping A and Schmidt-Traub H. Journal of Chromatography A, 2002, 944 (1~2): 93
- 3 Yuan L M, Fu R N, Chen X X, et al. Chromatographia, 1998, 47: 575
- 4 Okamoto Y, Yashima E. Angew Chem Int Ed, 1998, 37: 1020
- 5 Juza M. Journal of Chromatography A, 1999, 865 (1~2): 35
- 6 Lorenz H, Sheehan P and Seidel-Morgenstern A. Journal of Chromatography A, 2001, 908 (1~2): 201
- 7 Mazzotti M, Storti G, Morbidelli. M. J Chromatogr A, 1997, 769: 3
- 8 Yuan L M, Fu RN, Chen X X, et al. Chemistry Letters, 1998. 141
- 9 Cavoy E, Deltent M F, Lehoucq S, et al. J Chromatogr A, 1997, 769: 49
- 10 尤田 耙. 手性化合物的现代研究方法. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993
- 11 Khattabi S, Cherrak D E, Mihlbachler K, et al. J. Chromatogr. A, 2000, 893: 307
- 12 Nicolaos A., Muhr L, Gottelland P, et al. J. Chromatogr. A, 2001, 908: 71
- 13 Yuan L M, Fu R N, Gui S H, et al. Chinese Chemical Letters, 1998, 9 (2): 151
- 14 Schulte M and Dingenen J. J Chromatogr A, 2001, 923: 17
- 15 Mihlbachler K, Jupke A, Seidel-Morgenstern A, et al. J Chromatogr A, 2002, 944: 3

第八章 其他制备色谱方法

色谱技术按相态可分为气相色谱、液相色谱、超临界流体色谱、毛细管电泳；按分离原理可以分为吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、排阻色谱、亲和色谱、毛细管电泳、场级分级法；按分离形式可分为柱色谱、纸色谱、薄层色谱、棒色谱；按动力学可分为冲洗法、顶替法和迎头法。前面介绍了目前广泛使用的一些制备性色谱方法，在本章再介绍几种其他方法，因为它们也具有自己特有的一些优点。

第一节 顶替色谱

正如上面所述，色谱技术按动力学可分为迎头法、冲洗法和顶替法。迎头法又叫前沿法，是指应用样品溶液作为流动相的色谱分离方法。操作时连续地在色谱柱的顶端输入样品溶液，样品溶液同时充当了流动相的作用，被分离组分按与色谱固定相的作用力的大小顺序分离开来，作用力小的首先流出，作用力大的在后面流出。若以流出组分的浓度对流出体积作图，所得曲线呈现一个台阶，如图 8-1 所示。

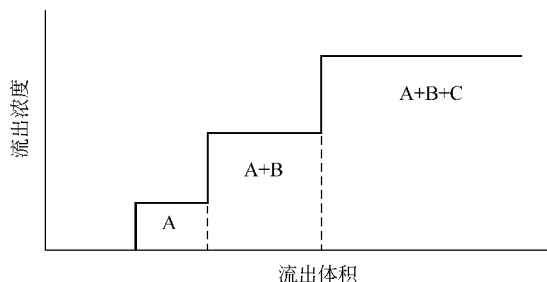


图 8-1 迎头法流出曲线示意图

从图 8-1 中可见，第一个台阶是纯组分 A，第二个台阶是组分 A 与组分 B 的混合物，第三个台阶是组分 A、组分 B 和组分 C 的混合物，依次类推。待分离物有多少组分，就将会出现多少个台阶。因此迎头法不可能纯化每一个组

分，但它能浓缩痕量组分。也许迎头法最多的应用还是用其测定样品的吸附等温线。

在色谱技术中最广泛使用的是冲洗色谱技术，操作时对色谱柱上样后，就用一种或几种溶剂的混合液进行冲洗。本书前面介绍的所有章节几乎都是应用的这种色谱技术，所以在此就不再叙述。

顶替色谱是本节要介绍的主要内容，它又叫置换色谱或取代色谱。该技术是在流动相中包含有一种溶质，这种溶质比样品中任何一种组分在色谱柱上的作用力都强。当样品上样后，利用该流动相进行洗脱，流动相中的溶质会对色谱柱中的样品组分按照它们与色谱固定相的作用力大小依次被顶替。作用力小的样品组分被先顶替，作用力大的被后顶替。如果以样品组分的流出浓度对移动相的流出体积作图，则得到图 8-2 所示的流出曲线。

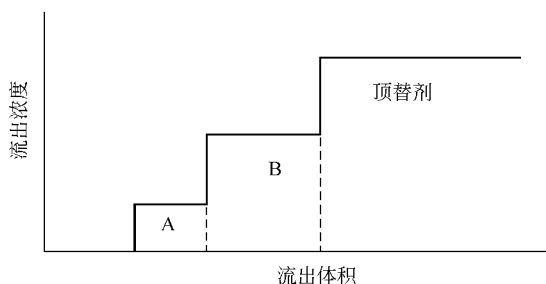


图 8-2 顶替色谱法的流出曲线

从图 8-2 中可见，样品中作用力小的 A 组分先流出，作用力大的 B 后流出，当所有的组分都流出后，最后流出的是顶替剂。它的特点是每个组分的曲线是矩形的，并且是紧密相连的。

一、填料类型

顶替色谱主要用于键合相色谱，如 C_{18} 、 C_8 、 C_4 ，离子交换色谱，吸附色谱以及分配色谱等。由于色谱柱中所用的填料种类不同，或者同一种类的填料制备方法的不同，甚至用同一种方法制备但制备的批次不同都会造成分离结果的不一致。

该方法的最大优点在于能消除 Langmuir 吸附等温线式的吸附所带来的色谱峰的拖尾；其比一般的冲洗法具有更大的上样量，能防止色谱分离和制备时谱带的展宽。样品中各组分的浓度在展开过程中不但不会降低，往往还能提高，起到浓缩的作用，这也是冲洗法模式所不能达到的。因此该方法十分有利于制备性分离。

二、顶替剂的选择

顶替法与冲洗法的不同点在于顶替法的移动相中还含有顶替剂，而冲洗法的移动相中没有顶替剂。因此，相对于冲洗法，顶替法的关键就在于顶替剂的选择。但真正优秀的顶替剂的选择还是相当困难的，因为该方法要求顶替剂的吸附等温线是 Langmuir 型的，它在柱中与填料的作用力要大于样品中任何一个组分（图 8-3 所示）；它在流动相中有高的溶解度、不与样品和流动相发生任何化学反应；它还要易于从色谱柱中洗脱，以利于色谱柱的再生等等。尤其是对于制备性分离，还要考虑到顶替剂的纯度和价格因素。

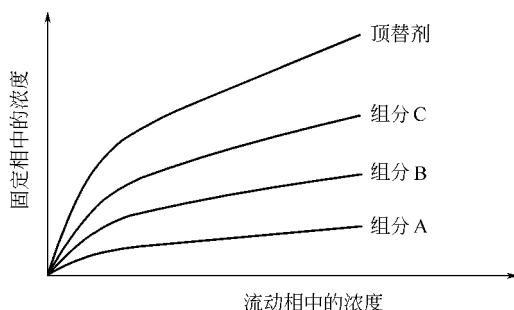


图 8-3 顶替剂选择示意图

因此，该方法在实际的应用过程中，对较理想的固定相、移动相、顶替剂以及最后色谱柱再生剂的选择都是相当麻烦的。另外，分离峰一个连接一个，峰之间的界限并不明显，因此分离也并不是很理想。这些就是该方法远不如冲洗法应用得广泛的根本原因。

三、操作参数

在顶替色谱的操作过程中主要有移动相溶剂的种类、移动相的流速以及顶替剂浓度参数的选择。

在顶替色谱中移动相溶剂的极性相对于冲洗色谱要弱，否则样品组分还来不及被顶替剂顶替就被移动相中的溶剂冲洗而移动，这将大大地影响顶替效果。另外流动相的流速对顶替色谱的顶替效果也有较大的影响，随着流动相流速的增加，开始时顶替效果也逐渐增加，当流速增加到一定值后，顶替效果达到一最佳值，随着流动相流速的继续增加，顶替效果却反而下降，如图 8-4 所示。

按照平衡移动原理可知，当增加顶替剂的浓度时，有利于被分离组分的顶替，当其增大到一定的浓度后，顶替达到平衡，这时再继续增大就不再有更大

的意义,反而会造成一定的顶替剂浪费,增大制备成本。图 8-5 是顶替效果与顶替剂浓度的关系示意图。

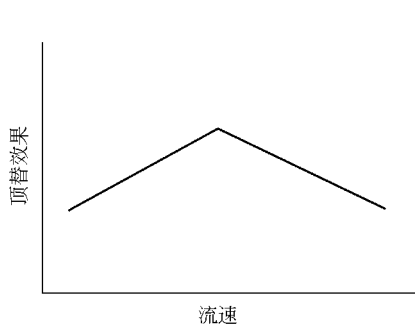


图 8-4 顶替效果与流速关系示意图

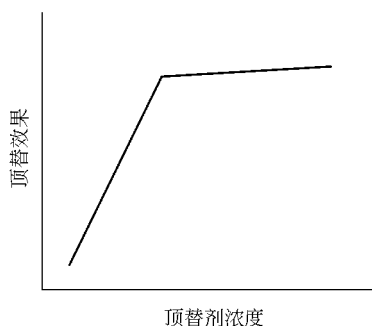


图 8-5 顶替效果与顶替剂浓度关系示意图

顶替色谱的实际操作为：先将样品溶液进行脉冲进样，然后再用含有顶替剂的流动相对柱中样品组分进行顶替，并在流出口根据检测器检测信号进行分部收集。当顶替完成后，再用比流动相极性更大的溶剂系统冲洗色谱柱，让柱子得到再生，以便色谱柱能重复多次使用。

第二节 径向柱色谱

大型液相色谱设备已经工业化，直径 1m 以上的色谱柱和整套附属设备已经定型。更大型如直径为 4m 的色谱柱已用于制糖工业和石油工业。在液相色谱的制备性分离中，当分离因子小于 1.2，常需要用 $10\sim 15\mu\text{m}$ 直径的填料，当分离因子在 1.2~1.5 之间，需要用 $20\sim 40\mu\text{m}$ 直径的填料，当分离因子在 1.5~2.0 之间，需要用 $35\sim 70\mu\text{m}$ 直径的填料，当分离因子大于 2.0，则可用 $60\sim 200\mu\text{m}$ 直径的填料。在实际的分离过程中，我们常可以优化分离系统，使被分离组分与杂质的分离因子达到 1.5 以上，在这种情况下，只要采用 $35\sim 70\mu\text{m}$ 直径填料的色谱柱子就非常容易对该化合物实施有效的分离，并且分离因子越大，分离量就越多，填料直径也可以进一步加大，分离装置压力也可以进一步减低，其越易于工业化。

但前面介绍的所有方法几乎都是流动相沿着色谱柱的轴向运动，轴向色谱往往让待分离组分在柱中的停留时间较长，使得一些生物样品在该环境下容易失活，再考虑到制备量大的需求，因此，又发展了一种新型的制备色谱技术——径向柱色谱。

径向柱色谱的色谱柱采用了新的设计，图 8-6 是径向柱的结构示意图。

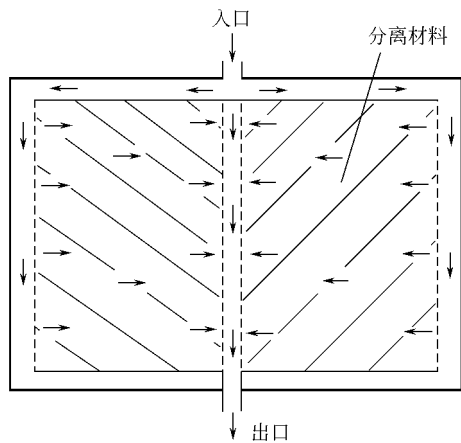


图 8-6 径向柱截面结构示意图

从上图可见，当样品溶液从进样口引入，溶液将分布到圆筒状色谱柱的外侧，流动相随后经过柱入口泵入后，就会带着样品溶液通过色谱柱的多孔滤膜进入填料的填充床并开始选择性地分离。流动相的流动方向始终是从圆筒状柱的外围沿水平方向向柱的中心流动，最后通过内层滤膜，进入位于中心位置的小通道而流出。

径向柱的外表面很大，因此其能承担的样品量较多；如果增加色谱柱的长度，可以成线性地增大色谱柱的制备量，而各组分的分辨率及保留时间基本上没有大的变化；径向柱色谱由于流量很大，其色谱柱的半径较小，因此样品在柱中的保留时间很短，非常适合于生物活性成分的制备。正由于色谱柱的半径较小，因此色谱柱的压力降也很小，所以大多数操作可以在低压下操作，这样对设备的要求就低。该法的不足之处是色谱柱的装填比较麻烦，要求也较高。图 8-7 是径向柱色谱的装置示意图。

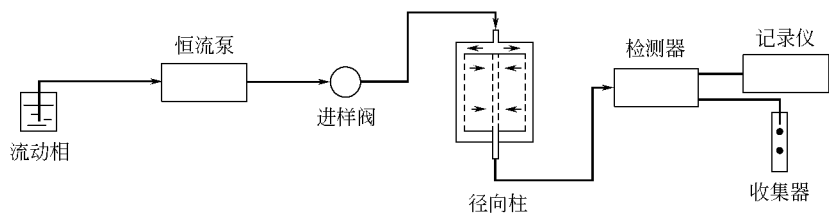


图 8-7 径向柱色谱装置示意图

径向柱色谱目前主要用于生物活性物质的制备，所用填料主要集中在离子交换色谱以及亲和色谱两大领域，填料的基质主要是多糖类产品。

第三节 并联多柱色谱

经典柱色谱已经广泛用于天然产物化学、药物化学、食品化学、有机合成、精细化工等领域中难分离物的制备性分离。但随着科技的发展,一些研究需要一次能制备性分离较大数量的难分离物,甚至考虑是否可以吧色谱分离大型化,使之成为工业生产中的一个过程和单元设备。在经典的制备色谱中,色谱柱所能承担的样品量是同柱中固定相的量成正比的,为了增大色谱柱的分离量,研究工作中人们往往靠增加色谱柱直径的方法来增大固定相的用量而达到增加分离量的目的。但是,随着经典色谱柱直径的增大,分离中所使用的固定相出于资金和条件的限制,往往不可能使用很小粒度的单分散颗粒固定相,而是使用较大颗粒的具有一定粒度范围的分离材料,这就使得在色谱柱的填充过程中,很难避免地出现固定相的分级现象,并且色谱柱的直径越大,分级现象就越严重,色谱柱就越难填充均匀,所填充的色谱柱柱效就越低。在现代色谱技术中,开管柱气相色谱和毛细管电泳因为采用了小直径的毛细管柱而产生了很高的分离柱效,使很多的难分离物质的拆分成为可能,但是它们每次能引入的样品量很小,使定量分析的准确度往往受到较大的影响。为了克服该方面的不足,近年来在毛细管气相色谱和毛细管电泳中已经分别出现了毛细束管柱和阵列毛细管柱,其方法是将多根同样规格和大小的毛细管柱进行并联,其目的就是在毛细管柱的高柱效下增大分离柱的柱容量。作者的课题组近年来借用现代色谱中毛细束管和阵列毛细管柱的技术思想,利用直径较小的经典色谱柱柱效较高且易于填充的特点,将多根经典色谱柱进行并联,增大并联色谱柱的柱容量,研究了并联多柱色谱。

该研究采用硅胶为固定相,样品采用偶氮苯、4-甲氧基偶氮苯和苏丹Ⅱ(1:1:1)的混合物,溶剂采用流动相苯:石油醚(2:3),样品浓度配成0.3mg/mL。对于1.2cm i. d. ×40cm的柱一次上样2mL。对于其他柱,根据其所用硅胶量的增大倍数,上样量增大同样的倍数。在整个研究过程中,流动相的线速度尽量保持在0.7cm/min。

取一定量的偶氮苯、4-甲氧基偶氮苯和苏丹Ⅱ分别配成0.1mg/mL的溶液,用水作参比,在分光光度计上分别测得三种物质的最大吸收波长为:偶氮苯500nm,4-甲氧基偶氮苯450nm,苏丹Ⅱ545nm。

将分段收集的洗脱液分别在其最大吸收波长处测定其吸光度,以吸光度为纵坐标,时间为横坐标,作吸光度-时间曲线图。根据图中保留时间和半峰宽,利用理论塔板数计算公式计算柱效。

实验中采用玻璃色谱柱和有色化合物的混合样品，是因为考虑其有利于实验的观察和初步实验参数的选定，减少实验中的盲目性。色谱柱按照第三章中介绍的湿法填充。图 8-8 是三个染料的混合物在单柱（1.2cm i. d. $\times$ 40cm）上的色谱分离图。

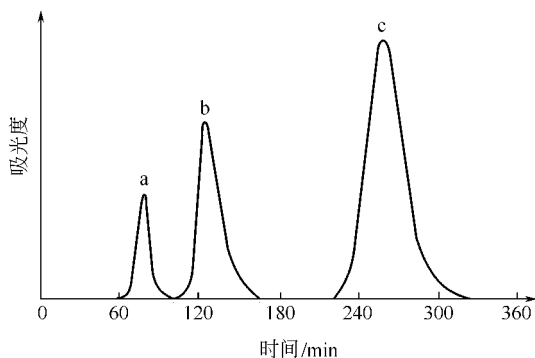


图 8-8 染料混合物在单柱（40cm $\times$ 1.2cm i. d.）上的色谱分离图

a—偶氮苯；b—4-甲氧基偶氮苯；c—苏丹Ⅱ

从图 8-8 中可见，三种染料混合物在单柱上皆能达到基线分离，彼此的容量因子也不是间隔太大，在此条件下，可方便并联多柱色谱的研究。

实验分别将 1.2cm i. d. $\times$ 40cm 型号的玻璃柱按照湿法进行填充后，对其进行并联，分别组成双柱、三柱、四柱、五柱、六柱、七柱。图 8-9 是并联多柱色谱装置的示意图。

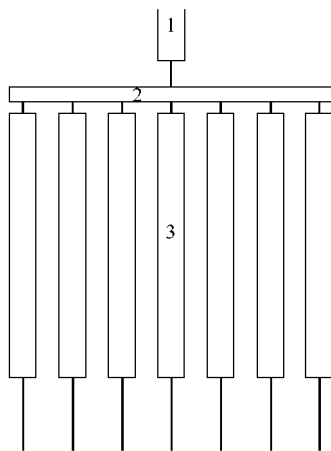


图 8-9 并联多柱色谱的装置图

1—储液罐；2—分布器；3—色谱柱

实验按照前面的叙述上样后，用流动相进行冲洗。随着冲洗的进行，可以明显地观察到混合染料在柱中的分别移动情况。按一定的时间间隔分别收集被分开的三个染料成分，测定它们的吸光度，绘制吸光度-时间曲线。根据所得曲线，计算色谱柱的柱效。研究中每根不同的柱皆分别平行实验了 3 次，并将 3 次实验结果数值进行平均计算处理。现将所得实验结果的平均值列于表 8-1。

表 8-1 并联多柱色谱柱效

柱	单柱			双柱			三柱			四柱			五柱			六柱			七柱		
样品	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
容量因子 k	0.4	1.3	4.0	0.4	1.4	3.9	0.4	1.4	4.0	0.4	1.4	3.9	0.4	1.5	4.0	0.4	1.4	4.0	0.4	1.3	3.9
柱效 N	312	241	394	298	293	359	275	239	348	278	191	359	234	214	346	246	216	302	239	163	324

注：样品分别为 1. 偶氮苯；2. 4-甲氧基偶氮苯；3. 苏丹 II

从表 8-1 中数据可以看出：随着柱数的增多，塔板数逐渐降低，柱效也有一定的下降趋势。但这种减少非常有限，这种差异往往小于不同的研究者之间、或在不同的条件下装柱所带来的柱效差异。

上述的研究表明：将经典色谱柱进行并联增加色谱柱的柱容量是行之有效的。尽管我们研究中的色谱柱的装填是研究者用手工湿法装填的，不同时间和不同批次的装填不可避免地有一定程度的误差，研究中也未对实验温度进行控制，与现代色谱的研究相比所得实验数据也算不上严密，但是对于经典柱色谱来讲，它更接近我们研究者的实际，在绝大多数的情况下，研究者就是在此条件下进行经典柱色谱的应用，它对经典柱色谱的并联应用具有一定的指导意义。

第四节 制备气相色谱

现代色谱技术目前主要有气相色谱、高效液相色谱、高效毛细管电泳、超临界色谱和高速逆流色谱等，并且各具特色。

气相色谱有多种类型，最主要的有填充柱气相色谱和毛细管气相色谱。气相色谱也可用于制备，其目的在于分离制备一种或多种纯组分，用于进一步的定性鉴定、化学合成或高纯标准物的生产。用于这种目的的气相色谱叫制备气相色谱，在绝大多数情况下，它是属于填充柱气相色谱的类型。

一、原理

气相色谱是利用气体作为流动相，其最基本的流程图可表示于图 8-10。

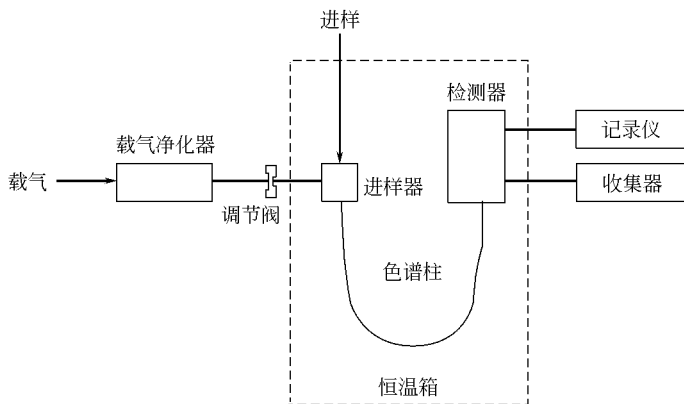


图 8-10 制备气相色谱流程示意图

气相色谱仪大体上可分为三个部分：①气流系统，主要是控制载气和检测器用的助燃气与燃料气等用的阀件、测量用的流量计、压力表以及净化用的干燥管、脱氧管等。②分离系统，包括分离用的色谱柱、进样器以及色谱柱恒温炉和有关电器控制系统。③检测、记录、收集和数据处理系统，包括检测器、记录仪、积分仪、收集器、微处理机及有关电气部分。

气相色谱的速率理论方程式为

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D}{u} + \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{k}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_l^2}{D_l} u + \frac{0.01k^2}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_p^2}{D} u$$

但在制备气相色谱中，由于所用色谱柱的半径较大，在其速率方程中又增加了制备项：

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_g}{u} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_l^2}{D_l} u + \frac{0.01k}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_p^2}{D_g} u + \frac{Cr^2}{D_g} u$$

上面两等式右边第一项称“涡流”扩散项， λ 为涡流扩散因子， d_p 是色谱载体的颗粒直径。“涡流”扩散项是由于样品分子在载气流中与填充的颗粒不断碰撞，不断改变其流向，是紊乱的样品产生的宽度扩张。颗粒直径越小，填充越均匀，“涡流”扩散项的影响越小。等式右边第二项称分子扩散项， γ 为曲折因子， γ 值一般都小于 1。 D_g 为气相分子扩散系数。分子扩散项是组分在柱的填充空隙因浓差引起的宽度扩张， D 值越小，载气线速越大，则分子扩散项就越小。 u 是载气线速度。等式右边第三项称液相传质项， d_l 是液膜厚度， D_l 是液相的扩散系数。这是由于样品分子在两相间进行分配、交换、平衡时，样品分子进入液相，并从液相返回气液界面。这个过程不是瞬间完成的，是需要一定时间，这就是传质速率的有限性。既然在两相分配交换中，在液相要消耗一定的时间，这就使随机地进入液相和随机地留在气相的样品分子间的距离拉

宽,造成谱带变宽。固定液的液膜越厚,液膜越不均匀,液相扩散系数越小,则液相传质相的影响越大。等式右边第四项是气相传质项的影响,它表示气液或气固两相进行质量交换时所受的传质阻力。上面第二等式的最后一项是由于色谱柱直径增大所引起的柱效降低, C 是制备项系数, r 是色谱柱半径。

在制备色谱过程中两组分分离好坏仍然要用分离度 R 来表示:

$$R = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{W_{b,2} + W_{b,1}}$$

分离度仍可表示为

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

其中, $\alpha = K_2/K_1 = k_2/k_1 = t'_{R_2}/t'_{R_1}$, 等式右边 $(\alpha - 1)/\alpha$ 称为热力学因素, N 称动力学因素, 第三项 $k/(1 + k)$ 称容量因素。

要达到一定的分离, 即一定的 R 值时所需的必须柱长为

$$L_{\text{必须}} = N_{\text{必须}} H = 16 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \cdot R^2 \cdot \left(\frac{1 + k}{k} \right)^2 H$$

因此, 制备色谱法的关键问题, 仍然是固定相的选用和色谱柱的效率问题。另外还要把分析速度、分离效能和样品容量协调起来全面考虑。

二、气固色谱

在填充柱色谱中, 又分为气固色谱和气液色谱两大类。对于气固色谱可用的固定相主要有以下几类: ① 碳类物质, 主要包括活性炭; 碳分子筛(TDX); 石墨化炭黑。② 分子筛有沸石。③ 苯乙烯-二乙烯苯共聚物, 国内叫 GDX, 相当于国外的 Chromosorb 系列和 Porapak 系列。高分子多孔小球的样品容量颇大, 在 250℃ 以下稳定性好, 能较好地满足制备色谱的要求, 只是价格较贵。

三、气液色谱

(一) 载体

气液色谱的固定相一般是将固定液涂渍在载体表面而成。关于色谱分离中所用的载体 95% 是硅藻土载体。硅藻土是由无定型的二氧化硅及少量无机盐组成的单细胞海藻骨架构成的。红色硅藻土载体是将天然硅藻土在黏合剂等作用下于 900℃ 左右煅烧而成, 国产 6201 载体及国外的 Chromosorb P 属于这一类。白色硅藻土载体是将天然硅藻土经工业盐酸处理后, 在干燥条件下加入一些助熔剂 Na_2CO_3 , 成型后在大于 900℃ 煅烧而成, 国产 101 白色载体、405 载体和国外 Celite 及 Chromosorb W 载体属于这一类。红色载体基本保持原有

的细孔结构，表面孔穴密集，孔径较小，结构紧密，机械强度好，而且表面积较大，能够负荷较多的固定液，柱效较高。但缺点是有活性吸附中心，不适用高温分离。白色载体由于助熔剂的作用，破坏了硅藻土中大部分细孔结构，再由硅酸钠玻璃体把它们黏结为较大的疏松颗粒，孔径大、表面积小、机械强度较差，但其表面吸附作用和催化作用较小，能用于高温分析，经适当处理后，可分析强极性组分。通常红色载体的表面积比白色载体大 4 倍，密度大一倍，如果固定液含量都是 10%（质量），则红色载体的固定液用量要大一倍，组分的保留时间也大一倍左右。除硅藻土载体外，主要还有聚四氟乙烯载体，国外有 Teflon、Chromosorb T；苯乙烯-二乙烯苯共聚物；玻璃微球等。

载体表面由于有硅醇基、酸性活性点，在分离中往往需要对载体表面进行处理。①通过酸洗或碱洗是去除无机杂质调整表面 pH 值的重要方法之一，但产生一定的副作用。②硅烷化是去除硅醇基的最有效方法，常用的硅烷化试剂有：三甲基氯硅烷（TMCS）、二甲基二氯硅烷（DMCS）和六甲基二硅氮烷（HMDS）。③釉化法，主要是改善载体的表面吸附和微孔结构。④加入减尾剂是饱和表面吸附中心，减少极性组分的拖尾。对于处理后载体的评价是用裸载体对丙酮、苯的保留值进行测定，或在载体上涂上非极性固定液，看分析极性物质所得峰形的对称性。

选择载体的原则大体是：

- （1）当固定液含量大于 5%，可选用硅藻土型白色或红色载体。
- （2）当固定液含量小于 5%，应选用处理过的载体，如仍拖尾可加减尾剂。
- （3）对于高沸点组分，可选用玻璃微球载体。
- （4）对于强腐蚀性的组分，可选用氟载体。

制备色谱对载体的性能要求不高，主要考虑的是其成本、消耗和粒度范围。制备色谱常用 30~60 目的载体。大量数据表明，对于制备色谱，当进样量小时，细粒度柱效高，但随进样量增高不同筛目的载体柱效却差不多是相等的。不过粒度范围却对柱效有影响，特别是短而粗的柱子，在填充时粒度范围宽的载体易产生分凝效应，大粒度的易集中于管壁附近，小粒度集中于管中心，造成粒度梯度使柱效降低。

（二）固定液

气相色谱固定液现有近千种，1959 年罗胥耐德（Rohrschneider）曾应用相对极性将固定液分成强极性、极性、中等极性、弱极性 & 非极性 5 级。为了更全面地衡量不同固定相的相对极性，1966 年罗胥耐德选用了 5 种代表不同作用力的物质，即苯（电子给予体）、乙醇（质子给予体）、甲乙酮（偶极定向力）、硝基甲烷（电子接受体）、吡啶（质子接受体），以角鲨烷固定相为基准

来表征不同固定液的相对极性。1970 年麦克里诺德 (McReynolds) 在罗氏常数的基础上, 在 25 种固定液上测定了 68 种化合物的保留指数, 经过对数据的回归分析, 选出 5 种标准物质 (苯、1-丁醇、2-戊酮、1-硝基丙烷、吡啶) 和 5 种副标准物质 (2-甲基-2-戊醇、1-碘丁烷、2-辛炔、1,4-二氧六环、顺-八氢化茚) 来表征固定液的相对极性。麦氏常数也以角鲨烷固定液为基准, 在 120℃ 测定了 226 种固定液与角鲨烷固定液之间的保留指数差值, 实际工作中通常选用麦氏的前 5 个相常数, 其计算方法如下:

$$x' = I_{p, \text{苯}} - I_{s, \text{苯}}, \quad y' = I_{p, 1\text{-丁醇}} - I_{s, 1\text{-丁醇}}, \quad z' = I_{p, 2\text{-戊酮}} - I_{s, 2\text{-戊酮}},$$

$$u' = I_{p, 1\text{-硝基丙烷}} - I_{s, 1\text{-硝基丙烷}}, \quad v' = I_{p, \text{吡啶}} - I_{s, \text{吡啶}}$$

式中 x' 、 y' 、 z' 、 u' 、 v' 为麦氏的相常数, 下标 p 为待测固定液, s 为角鲨烷固定液。保留指数的计算公式为

$$I = 100z + 100 \frac{\lg t'_{R,i} - \lg t'_{R,z}}{\lg t'_{R,z+1} - \lg t'_{R,z}}$$

式中, z 为正构烷烃的碳原子数, $t'_{R,z}$ 为碳原子为 z 的正构烷烃的调整保留时间, $t'_{R,z+1}$ 为碳原子为 $z+1$ 的正构烷烃的调整保留时间, 组分 i 的调整保留时间必须在碳原子数为 z 和 $z+1$ 的两正构烷烃的调整保留时间之间。

按化学结构可将固定相分为 8 类。

(1) 烃类 包括烷烃、芳烃及其聚合物, 如角鲨烷、烷基苯、聚苯乙烯等。

(2) 聚硅氧烷类 包括聚甲基硅氧烷、聚甲基苯基硅氧烷、聚氰烷基硅氧烷、聚卤烷基硅氧烷等。常用的有: SE 系列、OV 系列、DC 系列、XE 系列等。

(3) 醇类和醚类 包括一元醇、多元醇及其聚合物、糖类及其衍生物等, 如正十八烷、聚乙二醇等。

(4) 酯类 包括有机酸酯和无机酸酯以及它们的聚酯, 如邻苯二甲酸二辛酯等。

(5) 胺类 包括胺、酰胺及其聚合物。

(6) 腈类 包括腈和腈醚等。如氧二丙腈。

(7) 金属化合物 包括有机盐、无机盐和金属络合物等。

(8) 其他种类。

从理论上讲, 组分在两相间的平衡都可以表示为它在两相间的化学势的等式, 若溶质在液相是稀溶液, 则其可用拉乌尔定律 (Raoult Law) 描述。色谱柱对不同组分的选择性体现在它对不同组分的保留值是否有差别。由于理论上至今还不能满意地解释某些热力学参数和分子结构参数间的一些关系, 因此固

定液的选择还要借助一些经验和实验的方法。现在较常用的基本规律和实践经验有：①利用相似相溶规律；②利用麦氏常数表；③利用优选固定液；④利用特殊选择性固定液；⑤利用混合固定液。

制备色谱对固定相的要求和选择原则与分析色谱是一样的，但要强调的是热稳定性一定要好、而且经济易于取得。制备色谱一般可在低于固定相的温度上限约 15℃ 下进行。虽然气相色谱所用的固定液很多，但其价格贵，所以只有少数固定液适于制备分离。最常见的非极性固定液是 SE-30 甲基硅橡胶（温度上限 300℃），按沸点顺序分离。极性固定液如 PEG-20M，分离极性物质。中等极性的酯类固定液，如磷酸三丁酯、聚乙二醇酯等。

在此作者要特别指出，利用特殊选择性混合固定相的协同效应去提高待分离物的分离因子非常适宜于一些难分离物质对的制备性分离。从 20 世纪 50 年代初气相色谱诞生到 1996 年之间，色谱工作者一致认为气相色谱混合固定相具有加和效应。北京理工大学傅若农教授课题组在国内外首次提出并实施把超分子化学的概念用于气相色谱分析，在国际上首次发现了气相色谱混合固定相的协同效应现象，并在国际学术界首次提出了气相色谱“协同效应”概念。他将具有特殊选择性的单一固定相配合成各种混合固定相进行气相色谱分离的研究，找到了许多可以产生协同效应的混合固定相。该课题组在填充柱气相色谱中研究的混合固定相体系主要有：①全戊基- β -环糊精与 AgNO_3 混合固定相；②全戊基- β -环糊精与 TINO_3 混合固定相；③ AgNO_3 与有机皂土-34 混合固定相；④全戊基- β -环糊精与 BPBHPB 液晶混合固定相；⑤全戊基- β -环糊精与邻苯二甲酸二丁酯混合固定相。在石英毛细管柱中研究的混合固定相体系（采用静态法制柱）主要有：①冠醚与液晶混合固定相的协同效应研究；②全戊基- β -环糊精与 PEG-20M 混合固定相的协同效应研究；③全戊基- β -环糊精与液晶混合固定相的协同效应研究；④冠醚与全戊基- β -环糊精混合固定相的协同效应研究；⑤全戊基- β -环糊精与杯环芳烃混合固定相的协同效应研究；⑥冠醚与杯环芳烃混合固定相的协同效应研究；⑦液晶与杯环芳烃混合固定相的协同效应研究；⑧杯芳烃与环糊精混合固定相的协同效应研究；⑨环糊精与边链冠醚聚硅氧烷混合固定相的协同效应研究；⑩环糊精与边链液晶聚硅氧烷混合固定相的协同效应研究。该项目还进行了混合固定相比、固定相的混合方式、柱温以及流速对协同效应的影响研究，找出了特殊混合固定相产生协同现象的一般规律，并利用超分子化学对协同效应现象进行了初步解释。解决了一些用其他方法较难解决的实际问题，将气相色谱混合固定相的研究推到了一个新的高度，促进了气相色谱的进一步发展。

关于制备柱固定液的含量问题，一般是固定液含量越高，则制备容量越大，但同时保留时间也长，而且每一种载体有其最高允许固定液涂量，所以为

了兼顾容量和分析时间，一般对于红色载体，固定液含量在 15%~20%，白色载体为 10%~15%。

固定液的涂渍和色谱柱的填充是重要的色谱操作技术。最常规的固定液的涂渍法是：以 20%SE-30 固定相的涂渍为例，在旋转蒸发器的圆底烧瓶内装入 10g30~60 目的 6201 载体，在天平上称取 2gSE-30，将其溶解于一定量的二氯甲烷中，将此溶液倒入烧瓶内，旋转蒸发掉二氯甲烷即成。色谱柱的填充通常多用泵抽填充法，即用色谱柱的尾端（即接检测器的一端）塞上玻璃棉接真空泵，另一端接一漏斗，在抽吸下加入固定相，然后轻轻敲打色谱柱至固定相不再进入为止，塞上玻璃棉。整个过程要求填充得均匀紧密。色谱柱的老化是在低的载气流速下在高于柱温 5~10℃ 老化 4~8h，老化时柱子要和检测器断开。

四、操作

制备色谱一般采用价廉气体，如氮气作载气，由于制备色谱进样量大，汽化室必须要有足够大的热容量以使样品汽化。为了减少体内热负荷，载气进入汽化室前必须先经过足够长的蛇行管预热，再经过一单向阀或叫止逆阀进入汽化室。进样的方法主要有闪蒸汽法和柱上进样法。关于进样时间一般认为其少于或等于色谱峰宽的 1/3 时，进样时间对峰宽没有明显的影响。进样量与三个因素有关，即色谱柱的分离能力、选择性和组分分离时间。制备色谱为了制取纯物质，常常在超负荷下工作，而不管峰型前伸后拖。

制备色谱的检测系统最常用的是氢焰离子化器。因制备柱进样量大，故柱后必须接一分流器使大部分样品去收集系统收集，极少部分进入检测器进行检测指示。而对于收集系统主要包括分离后各组分的切割和收集，前者通过转动阀来实现，后者用冷阱来收集。

综合考虑制备气相色谱中的各种因素，对于一个具体的实验条件的选择应该考虑如下几方面：

- (1) 载气的选择 一般选择氮气。
- (2) 汽化室温度 对一般分析色谱，汽化温度比柱温高 10~50℃ 左右即可。但制备色谱汽化温度应保持在沸点左右。
- (3) 进样量 色谱柱内径越粗、柱子越长、固定液含量越高、同时样品组分的 k 越大，则允许进样量越多。
- (4) 色谱柱 一般选择不锈钢或玻璃柱。根据被分离物的难易考虑选择柱径和柱长。
- (5) 载体 一般选择硅藻土载体，特别是红色载体。还要选择载体的粒度和范围大小。
- (6) 固定液 一般根据相似性原则选择。另外还要考虑固定液与载体的配

比。对于难分离物质对，可以考虑应用特殊选择性混合固定相的协同效应。

(7) 柱温 选择柱温是根据混合物的沸点范围、柱效、固定液的配比和检测器的灵敏度。

(8) 检测器 主要考虑灵敏度进行选取。

到目前为止，制备气相色谱除了用于一般挥发性物质的分离，还被用于外消旋体的拆分。环糊精类手性固定相对于个别手性物质的拆分有分离因子 α 高达 8 的报道。

读者欲掌握系统的气相色谱理论和知识，请参阅本丛书的《气相色谱方法及应用》分册。

第五节 电泳技术

1937 年 Konig 用滤纸进行了第一次电泳。电泳是带电粒子在电场中向其与自身带相反电荷的电极移动的过程，由于混合物中各组分所带电荷的正负、电荷数的多少以及粒子质量的不同，在相同的电场作用下，各自移动的方向和速度不同，因此在一定的时间内各自移动的距离也不同。电泳具有快速、准确、易重复、可洗脱的特点，除可以用于分离鉴定外，也常用于少量样品的制备。

一、纸电泳

以纸作为带电质点溶液的支持物来进行电泳，称为纸电泳。

1. 装置

调压稳定整流器一台，0~800V，0~50mA；电泳槽常为有机玻璃或者玻璃槽。

2. 缓冲液的选择

缓冲液在电解过程中用于控制电泳速度的恒定，其最适合的离子强度在 0.02~0.2 之间，较常用的是巴比妥、磷酸盐、硼酸和乙酸缓冲溶液。

3. 点样

样品原点应在滤纸中央，点样形状有原点、带状两种。其方法和操作类似于第二章中的薄层点样法。

4. 电泳

注意控制电压、电流及电泳时间。电压的升高不能太快，如果只有电压而无电流通过，可能是电极或滤纸条与缓冲液接触不良。如果电压、电流均无，说明电流没有接通。一般使用的电场强度为 10V/cm，电泳 2h。其像薄层色谱

一样，合适的操作条件最终只能用实验确定。图 8-11 是纸电泳示意图。

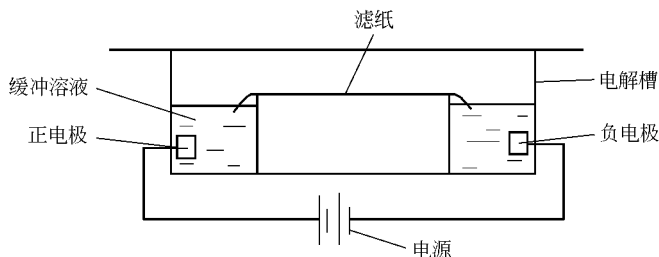


图 8-11 纸电泳示意图

5. 显色

电泳完毕，将滤纸烘干或吹干后，即可剪下边上一小条显色，确定区带位置，剪下相应部位，用溶液洗脱。显色方法可用紫外灯、碘蒸气以及特效显色反应等。

二、琼脂平板电泳

以琼脂板作为电泳支持物的凝胶电泳。因为琼脂含液体量高达 98%，所以其近似于自由电泳。

1. 电泳装置

0~1 000V 的调压稳压整流器，有机玻璃电泳槽，其与纸电泳电解槽相同。

2. 琼脂的处理

将市售琼脂切成小段，用蒸馏水浸洗两天，倾去上清液，加水煮沸使最后浓度为 3% 左右。待全部溶解后，趁热离心除去杂质及颗粒状物，再溶解后倒入搪瓷盘中凝固，控制厚度为 3~5mm，切成小块，移入大烧杯中再用蒸馏水浸洗 2~3d，每天换水 2~3 次。洗好的琼脂块放入密闭容器中，加含有少量抗菌剂（如 0.01% 柳硫汞）的水浸泡，将其置于冰箱中可以保存 2 周以上。

3. 缓冲液的配制

常用缓冲液有硼砂盐缓冲液与巴比妥缓冲液，但硼酸盐缓冲液更佳（pH8.6，离子强度 0.05），因为不易长菌，价格便宜。琼脂电泳适宜的缓冲液 pH 值范围为 6~9，离子强度为 0.02~0.05。为减少电泳后两边缓冲液槽内 pH 值、离子强度的改变，可采用每次电泳时调换正负极方向的方法。

4. 制板

取一定量的琼脂块，首先在水浴上热溶，然后趁热加入等体积预热至 60℃ 左右的缓冲液。继续加热至表面无气泡，此时琼脂的浓度为 1.5% 左右，在此浓度下形成的凝胶板质量较好。利用涂铺薄层板的方法将琼脂均匀地分布

在水平的洁净的玻璃片上，待冷后凝固即得到实验需要的缓冲液琼脂板。操作中应注意缓冲液的离子强度应比实验时槽内缓冲液离子强度高一倍，这样与等体积的琼脂混合后，制成的缓冲液琼脂与槽内缓冲液离子强度相同。缓冲液的离子强度与电泳时的离子强度要尽量一致，过高或者过低都会导致琼脂板的下陷。

5. 点样

对未知样品点样通常都点在琼脂板的中央，然后根据电泳结果进行调整，样品浓度以 4%~5% 为宜。上样可以是圆点或者带状，方法分别是挖空法和滤纸法。挖孔法是将样品注入预先挖好的小孔内；而滤纸法是将样品点于滤纸上，然后将滤纸夹入预先在琼脂板中央垂直于电场方向用窄刀片划入的一段裂缝内。样品溶液离子强度也应尽量与电解质的离子强度一致，以免发生琼脂面高低不平现象。样品 pH 值也不应过高或过低，否则影响电泳速度。

6. 电泳

加样完毕，将琼脂板置于电解槽中，用几层厚滤纸让琼脂板两端与电解质溶液保持接触，然后开始电泳，一般控制电位降为 6V/cm 左右，温度在 4~20℃ 范围。在实际操作中，电场强度的实际数值与计算结果往往相差较大，最好用伏特计直接测两端电压。

7. 区带检出

电泳完毕，将琼脂板浸入以 70% 酒精配置的 2% 乙酸固定溶液中 15~20min 进行固定，以增强检出区带的不溶性，使之方便检测，固定后的电泳板，必须用蒸馏水漂洗数次，除去酸性固定液及盐类。然后将琼脂板在 40℃ 左右烘干或吹干，则琼脂成一膜附在玻片上。最后再使用特效显色手段，使电泳区带被检出，收集待分离组分。

三、聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳技术是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持体的凝胶电泳技术，主要有圆盘电泳和薄片电泳两种形式。其非常适用于蛋白质、多肽和酶的提取、分离及鉴定。这里只介绍圆盘电泳。

1. 装置

电泳槽一般用的为篮式电泳槽，上槽可以上下移动，能适用不同长度的胶柱。直流稳压电源一般采用 0~600V，50mA。一般配置一些内径 5mm、长 10cm 的玻璃管供制胶柱用。图 8-12 是圆盘电泳装置示意图。

2. 原理

电泳在不连续系统（凝胶孔径不同，缓冲液离子成分不连续，电位梯度不连续）中进行，使样品浓缩成一个较狭窄的起始区带，再通过电泳过程，从上

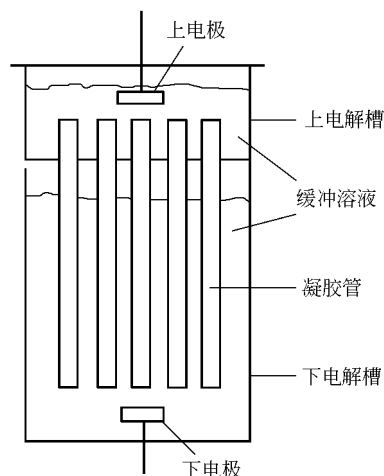


图 8-12 圆盘电泳装置示意图

到下产生三个物理效应：浓缩效应、电荷效应、分子筛效应，使分辨率提高。其不连续过程，主要通过制胶浓度、配制不同离子的缓冲液，以及电泳过程自动形成的电位梯度的不连续性实现的。

凝胶在玻璃管内聚合后，与上、下两电极槽的缓冲液相连，电泳方向自上而下。在通电之前，有三种胶接在一起的胶柱，至上而下顺序为：样品胶、浓缩胶、分离胶。样品胶，包括有样品在内的大孔胶，其主要作用是固定样品，防止与上槽缓冲液对流。浓缩胶（间隔胶），也是大孔胶，其主要作用是当电泳开始后，从样品胶走下来的样品，在此层胶内，按其迁移率递减的顺序，逐次在分离胶的界面上形成区带。分离胶（小孔胶），适当孔径的胶，样品在此胶层内进行电泳，并进行分子筛分离。样品本来在大孔胶中受阻力小，速度快，下行到小孔胶受到阻力大，速度减低。因此，在大孔胶和小孔胶界面上压成狭窄的区带。配制三种胶缓冲液均含有电泳时迁移率最大的离子，如 K^+ 、 Cl^- ，称为先行离子；而在上、下二电极槽内的缓冲液中则含有符号相同，但有效迁移率小的离子，称为尾随离子。一般尾随离子为氨基酸，或弱酸、弱碱。再选择适当 pH 值使样品有效迁移率介于二者之间。这样，在电泳时，先行离子走在前面，尾随离子走在后面，样品分子则夹在中间。在电泳开始后，先行离子自样品胶的最上端开始下降，来自电泳槽的尾随离子接着进入胶内。在先行离子离开之后，电导度降低，电位梯度变大，使尾随离子被迫加速而赶上先行离子，样品则被两种离子所夹，浓缩成薄层。移动界面进入分离胶时，因 pH 值与上面的浓缩胶不同，尾随离子成分的解离度发生了变化，迁移率大于样品的每个成分，结果便越过样品成分，与先行离子一起移动，并使样品处

于均一的电位梯度和 pH 值的区域中电泳移动。各种组分在分离胶内按分子大小和电荷差别而分离,其分离程度由凝胶所含的丙烯酰胺浓度所决定。有关具体的各种凝胶溶液配方可参考其他文献。

3. 缓冲溶液

常采用 pH8.9 左右(适用于酸性和中性成分),pH7.5 左右(适用于酸性或中性蛋白质、酶)和 pH4.3 左右(适用于碱性或中性蛋白质)三类。

4. 制备凝胶柱

从冰箱中取出储备液,将洁净干燥的玻璃管垂直插入圆盘电泳装置中。先配制分离胶:按分离胶的配方取储备液和过硫酸铵溶液混合并脱气处理。然后吸取此溶液于玻璃管中,每支玻璃管加 5~6cm 高,然后轻轻加入 2~3mm 厚的水层,聚合 30~60min 后,除去上面的水层。再配制浓缩胶:按配方加入浓缩胶混合液于上述玻璃管中约 0.5~1cm 高度,上面再徐徐加入一薄层水,待聚合 30min 后即可。

5. 加样

将样品溶解在大孔胶溶液中后,加入上述已装好二层凝胶的玻璃管中,上面再复一薄层水,待聚合 0.5h 后即可电泳。如果样品溶液太稀,加样体积太大时,样品胶的体积,玻璃管的长度均应增加,浓缩胶也要相应地加长。

6. 电泳

上样结束后即可在上下电解槽中加入缓冲溶液开始电泳。实验刚开始时,电流应不超过 2mA/管,待样品进入浓缩胶后,电流可控制 2~4mA/管。如果电流超过 5mA/管,电泳过程会产生欧姆热,在室温条件下,样品区域温度为 35~40℃,温度过高可导致电泳区带弯曲,分离失败。当指标染料已下行至管长的 3/4 时,即停止电泳。

7. 检测

将凝胶柱从玻璃管中取出后,可根据凝胶和样品的性质,对分离情况进行检测,然后将待收集物与其他杂质分离开来。

四、凝胶聚焦电泳

该方法是在制备聚丙烯酰胺凝胶柱时,在胶的混合液中加入载体两性电解质。含有载体两性电解质的凝胶柱,当通以直流电时,载体两性电解质即形成一个从阳极到阴极连续增加的 pH 梯度。如果把蛋白质加入此体系中电泳时,不同的蛋白质即移动并聚焦于相当其等电点的位置,它是按等电点的不同来分离蛋白质。

凝胶聚焦电泳操作可分为配制各种实验溶液、制备电泳的胶体分离柱、上样、电泳、求等电点、样品的收集和测定等步骤。

如果读者欲掌握系统的现代毛细管电泳的理论和知识，请阅读本丛书的《毛细管电泳技术及应用》分册。

参 考 文 献

- 1 张玉奎, 李彤, 姚志建等. 径向色谱柱的发展及应用. 见: 刘国诠, 陈因良, 苏天升等编. 生物工程下游技术. 北京: 化学工业出版社, 1993
- 2 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1978
- 3 傅若农, 刘虎威. 高分辨气相色谱及高分辨裂解气相色谱. 北京: 北京理工大学出版社, 1992
- 4 许国旺. 现代实用气相色谱法. 北京: 化学工业出版社, 2004
- 5 袁黎明, 凌云, 傅若农. 高等学校化学学报, 2000, 21 (2): 213
- 6 叶振华, 宋清, 朱建华. 工业色谱基础理论和应用. 北京: 中国石化出版社, 1998
- 7 孙传经. 气相色谱分析原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 1981
- 8 McNair H M and Bonelli E J. Basic Gas Chromatography. California: Varian aerograph, 1968
- 9 Yuan L M, Fu R N, Chen X X, et al. Chinese Chemical Letters, 1999, 10 (3): 223
- 10 Schurig V. J. Chromatogr. A, 2001, 906: 275

第九章 生物代谢产物的提取

生物科学与生物技术的发展非常迅速，已从整体水平进入细胞和分子水平。自 1944 年青霉素发酵成功以来，相继出现了基因工程、酶工程、细胞工程、微生物发酵、动植物细胞培养技术等前所未有的新技术。生物代谢产物的纯化是制备色谱技术的主要用武之地之一，其与生物代谢产物的提取技术是上下游的关系。

生命过程中的初生代谢指在植物、昆虫或微生物体内的生物细胞通过光合作用，碳水化合物代谢和柠檬酸代谢，生成生物体生存繁殖所必需的化合物，如糖类、氨基酸、脂肪酸、蛋白质、酯类、核糖核酸和脱氧核糖核酸、乙酰辅酶 A 等的代谢过程，这些化合物称为初生代谢产物。酶是催化剂，核酸是遗传信息的携带者。核酸在生物体内决定着蛋白质的合成，而蛋白质又影响着核酸的活动。蛋白质、酶和核酸是生命现象基本体现者。蛋白质、酶和核酸已成为现在科学研究和探索的焦点之一。

次生代谢是从某些初生代谢产物作为起始原料，通过一系列特殊生物化学反应，生成表面看来似乎对生物本身无用的化合物，如萜类、甾类、生物碱、多酚类等，这些次生代谢产物就是人们熟知的天然产物。次生代谢及其产物对于不同族、种的生物来说，常具有不同的特征，而且，次生代谢产物的体内分布具有局限性，不像初生代谢产物那样分布广泛。次生代谢产物是初生代谢产物的继续，两者又是相互联系的。

各种初生或者次生代谢物质的提取分离原理主要有两个方面：第一，利用混合物中几个组分分配率的差别，把它们分配到可用机械方法分离的两个或几个物相中，如盐析、有机溶剂抽提、层析和结晶等。第二，将混合物置于单一物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于不同区域而达到分离目的，如电泳、超离心、超滤等。整个实验过程各种方法的优劣，选择的条件其效果的好坏，均需通过分析鉴定来判别。

第一节 生物大分子的提取

生物大分子一般指蛋白质、酶及核酸。生物大分子的提取分离过程一般可

分为五个阶段：第一，材料的选择和预处理；第二，细胞的破碎；第三，提取；第四，纯化（包括盐析、有机溶剂沉淀、有机溶剂抽提、吸附、层析、超离心、结晶等）；第五，浓缩、干燥和保存。

一、材料选择及预处理

动物、植物及微生物都是制备生物大分子的材料。选材时，还应注意植物的季节性、微生物的生长期和动物的生理状态之间的差异。对于各种生物体和同一生物体不同组织细胞的蛋白质、酶和核酸含量的分布情况，前人做了许多工作，可以借鉴和参考。

材料选定以后，通常要进行预处理。动物组织先要剔除结缔组织、脂肪组织等非活性部位；植物种子先行去壳、除脂；微生物需将菌体和发酵液分离开。所得材料则应冷冻保存。制备一些易在体内被分解的活性生物大分子，一般宜用新鲜材料。

二、细胞的破碎

除了提取体液、细菌胞外某些多肽激素、蛋白质、酶不需要破碎细胞外，其余的都需要事先将细胞和组织破碎。如动物胰脏、肝脏、脑组织一般比较柔软，用普通匀浆器磨研即可，肌肉及心脏组织较韧，需预先绞碎再作成匀浆。植物肉质组织可用一般研磨方法，含纤维较多组织则必须在高速捣碎器内破碎或加砂研磨。许多微生物均具有坚韧的细胞壁，常用自溶、冷热交替、加砂研磨、超声波和加压处理等方法。生物大分子制备中组织细胞破碎的主要方法有：

1. 机械法

通过机械切力的作用使细胞破碎的方法，常用的器械有：高速组织捣碎机、玻璃匀浆器、研钵和研磨。

2. 物理法

主要通过各种物理因素的作用使组织细胞破碎的方法。应用于生物大分子制备的有：反复冻融法、冷热交替法、超声波处理法、加压破碎法。

3. 化学及生物化学法

这类方法主要包括自溶法：将待破碎的新鲜生物材料存放在一定的 pH 值和适当的温度下，利用组织细胞中自身的酶系将细胞破坏，使细胞内含物释放出来的方法，称为自溶法。溶菌酶处理法：溶菌酶可用蛋清或微生物发酵方法制得，具有专一地破坏细菌细胞壁的功能。溶菌酶的作用专一性强，适用于多种微生物，人们较喜欢使用。除溶菌酶外，蜗牛酶、纤维素酶也常被选为破坏细菌及植物细胞之用。表面活性剂处理法：较常用的有十二烷基磺酸钠、氯化十二烷基吡啶、去氧胆酸钠等。

除上述方法外,应用较多的还有真空干燥和用丙酮处理制成丙酮粉的方法。在酶的制备中,用丙酮干燥,不仅是使细胞破碎的有效方法,而且可以制成具有酶活力的干粉,长时间保存。无论用哪一种方法破碎组织细胞时,都在一定的稀盐溶液或缓冲溶液中进行,一般还需加入保护剂,以防止生物大分子的变性及降解。

三、细胞器的分离

各类生物大分子在细胞内的分布是不同的,DNA几乎全部集中在细胞核内,RNA则大部分分布于细胞质,各种酶在细胞内的分布也有一定的位置。因此,制备细胞器上的生物大分子时,必须对整个细胞结构及各类生物大分子在细胞内分布有所了解。动物细胞的结构比较清楚,微生物细胞形态比较复杂,植物细胞的特点是普遍存在叶绿体和各种质体。

细胞器的分离,一般采用差速离心法。细胞经过破碎后,在适当的介质中进行差速离心,利用细胞各组分质量大小不同,沉降于离心管内不同区域,分离后即得所需要的组分。细胞器的分离制备,介质的选择十分重要。最早使用的介质是生理盐水,现一般改用蔗糖、蔗糖多聚物或葡萄糖-聚乙二醇等高分子溶液。分离后的各种细胞器,其纯度可用电子显微镜法、免疫学法或测定标志酶活力法进行鉴定。其中测定标志酶活力方法简单易行,要求设备不高,一般实验室均可进行。

四、蛋白质和酶的提取

根据酶和蛋白质在各种溶剂中溶解度的不同,可分别采用不同溶剂予以提取、分离和纯化。

(一) 水溶液提取

蛋白质的提取一般以水溶液为主,其中稀盐酸和缓冲溶液对蛋白质稳定性好、溶解度大,是提取蛋白质最常用的溶剂。对于盐浓度常用等渗盐溶液,尤其以 $0.02\sim 0.05\text{mol/L}$ 的磷酸缓冲液和碳酸缓冲液、 0.15mol/L 氯化钠溶液应用较多。提取溶液pH值的选择首先要保证在蛋白质、酶和核酸的稳定范围之内,选择在偏离等电点两侧。如碱性蛋白质则选在偏酸一侧,酸性蛋白质则选在偏碱一侧,以增大蛋白质的溶解度,提高提取的效果。另外,考虑到在提取时某些蛋白质或酶与其他物质结合常以离子键形式存在,选择 $\text{pH}=3\sim 6$ 范围对于分离离子键是有益的。为了防止蛋白质和酶的变性与降解,提取时一般需在低温,如 5°C 以下操作。

(二) 有机溶剂提取

一些和酯质结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶,不溶于

水、稀盐、稀酸或稀碱，常用不同比例的有机溶剂提取。如 60% 的酸性乙醇、80% 乙醇、丁醇等。对于某些与脂质结合的蛋白质和酶，也有采用表面活性剂，如胆酸盐、十二烷基磺酸钠等处理的。

五、核酸的提取

核酸分为两大类，一类称为核糖核酸（RNA），另一类称为脱氧核糖核酸（DNA）。碱基、磷酸和核糖或脱氧核糖组成一个个核苷酸，每个核苷酸再通过磷酸二酯键聚合而成高分子化合物核酸。核酸分子量很大，从数万（转移 RNA）至数千万甚至亿万（染色体 DNA），其分子高度不对称。在细胞内核酸和蛋白质结合以核蛋白形式存在。

（一）DNA 的提取

DNA 含有生物体的全部基因。一般情况下，DNA 的分子量按病毒、细菌、高等植物、真核细胞，如人的顺序递增。天然状态的 DNA 绝大多数是以脱氧核糖核蛋白形式存在。从细胞中提取 DNA 时，一般先获得脱氧核糖核蛋白，再将蛋白质除去，从中分离 DNA。制备不同类型或不同材料来源的 DNA 时，分离和纯化的方法不完全相同。从微生物中的分离过程可以分为以下三步。

1. 破碎细胞

破碎细胞常用溶菌酶来完成，溶解 DNA 的介质是一个含有 EDTA 的钠盐溶液，弱碱性环境（ $\text{pH}=8$ ）能减弱 DNA 与组蛋白、多胺之间的电荷作用力。

2. 蛋白质-DNA 复合物的解离

阴离子 SDS 常被采用以破坏带正电荷的组蛋白与带负电荷的 DNA 骨架间的离子作用。有利于蛋白质-DNA 复合物解离的是高 pH 值，它能减少组蛋白的正电荷性质。

3. DNA 与其他可溶性细胞成分的分离

在沉淀 DNA 之前，要先去掉蛋白。经过氯仿/异戊醇的处理后离心即可达此目的。含核酸的上层水相在加入乙醇后 DNA 就会沉淀出来。RNA 的去除可采用去蛋白后进行核糖核酸酶的消化，再经异丙醇沉淀，RNA 就会在溶液中出现。经过多步的去蛋白质和乙醇沉淀可获得较高纯度的 DNA。

DNA 的纯度可根据 DNA 的结构特点，它在 260nm 有最大吸收峰，而蛋白质的吸收峰主要在 280nm，通过 A_{260}/A_{280} 比值可以确定 DNA 样品中核酸与蛋白质的分量。分离的 DNA A_{260}/A_{280} 的典型值为 1.9，比值越低，蛋白质污染越厉害。

（二）RNA 的提取

RNA 在细胞中主要有三种类型，即 rRNA（核微粒核糖核酸）、tRNA

(转移核糖核酸)和 mRNA (信使核糖核酸)。mRNA 代谢极不稳定,提取时要求条件较严格;tRNA 在 pH5 沉淀;rRNA 代谢比较稳定,且占 RNA80% 以上。现在常用的提取 RNA 的方法之一是在破碎细胞做成匀浆时直接加入含水苯酚与匀浆一起振荡,DNA 与蛋白质沉淀于酚层中,水层中含有 RNA 和多糖,然后用乙醇使 RNA 沉淀,这样 4 种物质一步便可初步分离开。

六、包涵体产品的分离

许多重组蛋白产物如干扰素 γ 、白细胞介素、人生长激素等在原核细胞内凝结成没有活性的不溶性固体颗粒,这称为包涵体。这些产物的一级结构是正确的,但其立体结构却与天然产物有很大的差别,没有生物活性。包涵体大小一般为 $0.5\sim 1\mu\text{m}$,比较坚硬,在水溶液中很难溶解,只有在变性剂溶液中,如盐酸和尿素等中才能溶解。在变性剂中,重组蛋白质呈变性状态,但其一级结构不被破坏,除去变性剂后,重组蛋白质可自动折叠成具有活性的天然构型,这称为蛋白质的复性。包涵体中除了含有重组蛋白外,还含有宿主细胞蛋白以及膜蛋白片段,也还含有 DNA、RNA 和质粒编码蛋白以及脂多糖。从包涵体中分离具有活性的重组蛋白可以采用以下程序:

机械破碎法→离心法提取包涵体→加变性剂溶解包涵体→除去变性剂→蛋白复性。

包涵体中目标产物的复性率非常低,一般不超过 20%。为了减少复性的损失,在复性时就必须使操作处于复性界限以上,以提高复性率。

第二节 生物工程药物的提取

生物工程药物的提取与生物大分子的提取类似,在生物工程药物中,其有些是生物大分子,但有些代谢产物的分子量却并不很大,对于生物药物提取分离工艺流程的基本模式可以简单地归纳为下面几步。

第一步:将发酵或培养液进行加热、调 pH 值和絮凝等预处理;

第二步:将预处理好的上述悬浊液进行沉降、离心、过滤。所得细胞灭活处理,上清液含胞外产品;

第三步:高压均质、研磨或者溶菌技术使细胞破碎;

第四步:离心分离、萃取或者过滤使细胞碎片分离;

第五步:收集上一步中的清液或者包涵体;

第六步:将上一步收集物进行沉淀、吸附、萃取或者超滤,进行初步纯化;

第七步：利用本书中的制备色谱技术进行高度纯化；

第八步：将所得产品进行无菌过滤、超滤、冷冻干燥、喷雾干燥、结晶，将它们加工为成品。

第三节 天然产物的分离提取

天然产物中有效成分的提取，在此主要是指植物次生代谢产物的提取。对于它们的提取方法目前主要是用溶剂法，常用的溶剂提取方法有浸渍法、渗漉法、回流法和水蒸气蒸馏法。

一、浸渍法

（一）冷浸法

将中草药粉末，置于一般的容器内，加入 6~12 倍量的溶剂，于室温下放置数日，过滤，药渣再加溶剂适量，如此反复提取 2~3 次。最后过滤后所得药渣可压榨，并收集残存液与提取液合并备用。此法适用于有效成分遇热容易破坏和含挥发性成分以及含多量淀粉、黏液质、树胶、果胶等成分的中草药。本法最大优点是操作简便，但需时间较长，提取效果差。用水作溶剂时，易发霉变质，需加注意。

（二）温浸法

取中草药粗粉，加 6~12 倍量的溶剂，于规定温度下浸取，并时加搅拌，然后过滤。药渣加新溶剂后继续浸渍，如此反复 2~3 次。药渣可挤压，收集残存液合并到 3 次浸液中备用。此法适用于花、叶和质地松泡、含淀粉较多的中草药。温浸比冷浸省时间，提取效率高。但若以水为溶剂时容易发霉变质，尤应注意。

二、煎煮法

煎煮法一般多用水为溶剂，操作类似于煎中药。取中草药薄片或碎块放入适宜容器内，加入 6~12 倍量的冷水，直火加热或者采用高压蒸气加热直至沸腾一段时间，时加搅拌，过滤，药渣可挤压并收集残存液。重复提取 2~3 次，合并 3 次煎液备用。此法煎煮时，不宜用铁锅，煎煮时宜用冷水，这样可防止中草药粉粒表面的蛋白质凝固，形成薄膜，影响水分浸入，不利有效成分浸出。

煎煮法操作简便，一般提取效率较高，但选择性差，不需要的化学成分和杂质等也同时被提取出来。含挥发性成分和有效成分遇热易被破坏的中草药，

不宜采用煎煮法。

三、渗漉法

渗漉法是采用动态浸出有效成分的提取方法。渗漉器多为玻璃制品，在实验室可以使用大直径的经典制备色谱柱充当。

渗漉的操作方法为：取中草药粗粉，加入一定量的溶剂使药粉呈糊状，让药粉充分湿润 1~4h，然后取脱脂棉塞住渗漉器底部出口处，在容器中加入一定量的溶剂，打开渗漉器活塞，让溶剂以一定速度向下流出，紧接着将糊状的药物在搅拌下均匀地慢慢倒入渗漉器中，使药粉在柱内溶剂中均匀沉降。在药粉不再随溶剂下沉后，在药粉上覆盖滤纸一张并用洁净的、与溶剂不起反应的，如玻璃球或石子等物压住。关闭活塞，将流出的溶剂倒入柱中。同时添加溶剂至高出药面 3~5cm，放置规定时间。

打开活塞，开始渗漉，渗漉液流出速度一般每分钟流出 1~5mL。在渗漉过程中需随时添加溶剂，渗漉至无色或无臭无味时，即可停止渗漉。

在渗漉过程中为了保证提取效率，药粉在渗漉器内必须保持一定的高度。装填药粉时如果松紧不匀，易造成溶剂从松处通过较多，甚至发生粉层断裂，造成提取不完全。在填装之前使药粉和溶剂充分浸润膨胀是非常必要的，它有助于药粉填充的均匀。在渗漉过程中，必须注意随时添加溶剂使液面保持一定高度。如果较多的空气进入渗漉器，将导致提取失败。

渗漉法提取效率高，节省溶剂，是较常用的提取方法，但不适于挥发性很强的溶剂，最常用的溶剂为乙醇。

四、回流法

中草药中一些有效成分的提取可以采用有机合成中的回流操作。简易的回流提取装置可由烧瓶、冷凝器、水浴锅组成。操作方法为在烧瓶中加入中草药粉末和没过药粉的溶剂，接上冷凝管，通入冷凝水。水浴锅内加水至稍高出烧瓶内的药液面，加热，沸后继续加热至规定时间。停止加热，取下烧瓶，倒出药液，过滤。该提取方法重复 2~3 次，每次回流时间一般为 1~2h。药渣用力挤压得残液，与回流提取液合并后备用。

回流提取过程中溶剂装量通常不得超过烧瓶总容量的三分之二，多数有机溶剂容易燃烧，不可直火加热。尽量避免使用毒性较大的溶剂。

回流法提取效率高，速度快，并可节约溶剂，故较常采用。

五、水蒸气蒸馏法

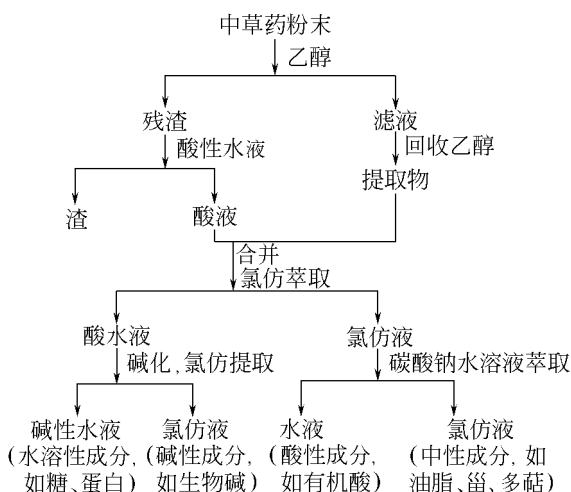
该法是利用水蒸气加热中草药，使所含挥发性有效成分随水蒸气一起蒸

馏出来，其常用于挥发油类的提取。提取装置可参考有机化学实验中的水蒸气蒸馏装置，由水蒸气发生器、烧瓶、冷凝器和接收瓶所组成。操作时水蒸气发生器和烧瓶，应同时直火加热，至沸腾后，烧瓶可断续加热或使用小火加热。蒸馏至馏出液不显混浊时，表明蒸馏完毕，停止加热，收集馏出液分层备用。

装置中的提取烧瓶应向水蒸气发生器方向倾斜，以免飞溅起来的泡沫、药渣等进入冷凝器而流入接收瓶。通水蒸气的玻管应插至提取烧瓶的液体正中，与瓶底相距 3~5mm 处，使中草药受热均匀。蒸气发生器的装水量不得超过其容量的三分之二；烧瓶内的装样以达到其容量的三分之一为宜。

第四节 中草药系统提取分离方法

中草药系统提取分离方法的报道较多，在此只介绍作者课题组经常采用的一种系统提取方法。



该方案是先将植物粉碎，然后用乙醇浸取或者渗漉，必要时也可利用回流法提取。提取后的残渣利用酸性的盐酸或者乙酸水溶液提取。将乙醇提取的浸膏与酸性水液合并后，调节 pH 值至酸性。接着再用氯仿、乙醚或者氯仿与乙醚的混合溶剂萃取。此时有机相经碳酸钠水溶液萃取后从两相中分别获得酸性成分和中性成分。上面氯仿萃取后的水相再经碱化、氯仿萃取后可分别获得碱性成分和水溶性成分。若要对某一类成分进一步分离，则可应用本书中的制备色谱技术。

参 考 文 献

- 1 陶慰孙等. 蛋白质分子基础. 北京: 高等教育出版社, 1980
- 2 蔡良琬. 核酸研究技术. 上册. 北京: 科学出版社, 1993
- 3 熊振平. 酶工程. 北京: 化学工业出版社, 1989
- 4 严希康. 生化分离技术. 上海: 华东理工大学出版社, 1996
- 5 张豁中, 温玉麟. 动物活性成分化学. 天津: 天津科学技术出版社, 1988
- 6 李如亮. 生物化学实验. 武汉: 武汉大学出版社, 1998
- 7 郭勇. 生物制药技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2000
- 8 姚新生. 天然药物化学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2001

符 号 表

c 浓度, 物质的量浓度

C_8 碳八柱

C_{18} 碳十八柱

CSP 手性固定相

d 柱直径

d_f 液膜厚度

d_p 色谱载体的颗粒直径

D 分配比

D_g 气相分子扩散系数

D_l 液相的扩散系数

H 理论板高

HA 酸性萃取剂

HPLC 高效液相色谱

HSCCC 高速逆流色谱

k 容量因子

K 分配系数

L 柱长

m 流速比

N 塔板数

Q 流量

r 螺旋管的半径

R 螺旋管的公转半径

R_f 比移值

R_s 分离度, 分辨率

SMB 模拟移动床

t_M 死时间

t_R 保留时间

t'_R 校正保留时间

u 线速度

V 体积

w 进样量

W_b 峰底宽

W_h 半峰宽

w_s 色谱柱的样品饱和容量

α 分离因子

β 仪器参数

γ 曲折因子

σ 标准偏差

λ 涡流扩散因子

内 容 提 要

本书从色谱科学的角度详细地阐述制备色谱的关键性技术、技巧、重要的实验操作、原理及其应用。内容包括制备色谱的基础知识、制备薄层色谱、经典柱色谱、低压及中压柱色谱、高压制备液相色谱、高速逆流色谱、模拟移动床色谱、顶替色谱、径向柱色谱、并联柱色谱、制备气相色谱、电泳以及与制备色谱技术紧密相关的生物代谢产物的提取技术。

本书具有很强的可操作性，尤其适用于有机合成、植物化学、生物工程、精细化工、药物化学、生命科学以及色谱领域的读者学习、参考。也可供有机化学、分析化学、农业、环境、食品、医学、材料等不同领域的科研人员、研究生、大学生、技术员和实验员学习或者参考。