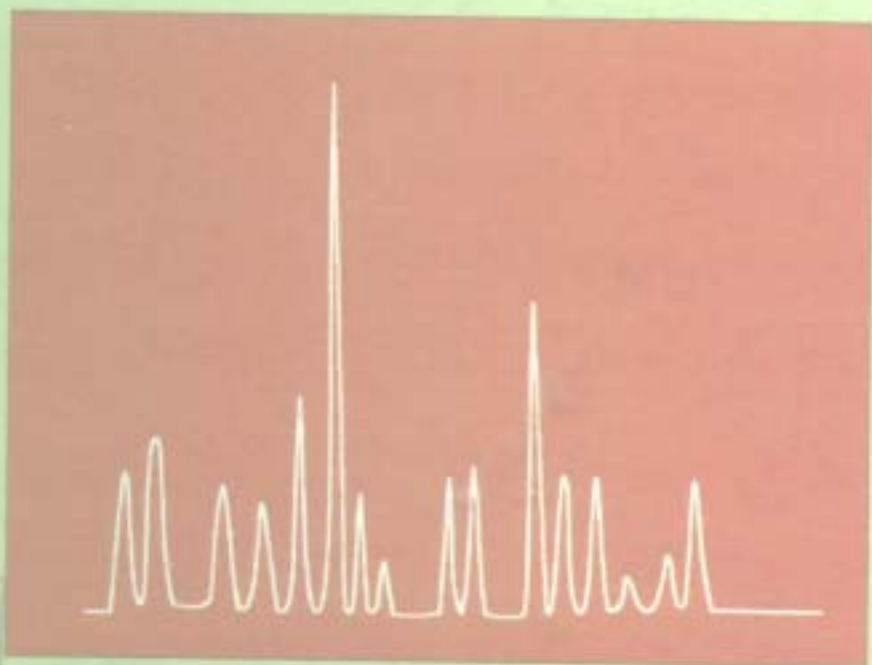


分析化学丛书

第三卷 第三册

高效液相色谱法

邹汉法 张玉奎 卢佩康 编著



科学出版社

分析化学丛书
第三卷 第三册

高效液相色谱法

邹汉法 张玉奎 卢佩章 编著



科学出版社

1998

《分析化学丛书》

编 委 会

顾 问	裘家奎	梁树权			
主 编	高小霞				
副主编	曾云鹗	周同惠	高 鸿		
编 委	梁晓天	史慧明	余仲建	赵藻藩	
	陈永兆	邓家祺	陈耀祖	罗文宗	
	黄贤智	童沈阳	操时杰		

54647
32

前 言

随着科学技术的迅速发展，分析化学得到了日益广泛的应用。新方法、新技术层出不穷，日新月异。为了更好地适应我国生产、教学和科学研究工作的需要，充分发挥分析化学界从事编著的积极性，科学出版社于1979年4月在北京召开了《分析化学丛书》筹备会议，酝酿编辑、出版一套比较系统、完整的《分析化学丛书》，并成立了编委会。同年10月在武昌召开了编委扩大会议，确定了编写这套丛书的方针和任务。内容分化学分析、有机分析、色谱分析、光学分析、电化学分析等六卷共二十九册，由有关高等院校和科学研究单位从事分析化学工作的同志分头编写，由科学出版社陆续出版。

本丛书着重阐述分析方法的基本原理，评述这些方法的应用及国内外的最新研究成果和发展趋向，力求做到立论严谨，叙述深入浅出，使在教学、科研和生产岗位上从事分析化学工作的广大读者，都能从中获得比较系统的理论和实践知识，对工作有所帮助，从而推动我国分析化学的进一步发展。

由于作者水平所限，经验不足，本丛书中难免会有缺点和错误，诚恳欢迎读者批评指正。

《分析化学丛书》

编 委 会

0002/01

序 言

高效液相色谱法是 70 年代以后发展最快的一个分析化学分支学科，现已成为生化、医学、药物临床、化学化工、食品卫生、环保检测、商检和法检等领域最常用的分离分析手段。高效液相色谱在生物样品纯化、手性药物拆分等方面也发挥了非常重要的作用。近年来，毛细管电色谱的出现有希望使液相色谱的分离效能成倍地提高；高灵敏度检测器如 CCD 技术的出现，可以检测到 1×10^{-21} mol 甚至 1×10^{-24} mol 被分离的物质。计算机技术的发展早已实现了液相色谱仪器的自动化，而智能化已成为液相色谱仪器的发展方向。

在我国，高效液相色谱技术发展很快，开始时仅为少数研究实验室所拥有。现在已为很多的生产、研究、质检部门所掌握，广泛应用于质量控制、分析化验和制备分离。中国科学院大连化学物理研究所是我国最早开展高效液相色谱研究的单位之一，在 70 年代末期研制出高效液相色谱柱装柱技术和色谱柱填料的生产工艺。1984 年，在国家科委的支持下，大连化学物理研究所组建了国家色谱研究分析中心。80 年代中期以来，国家色谱研究分析中心广泛开展了色谱专家系统的研究，研制成功 2030 型智能色谱仪，并在第三届北京分析测试展览会上获得金奖。近年来，国家色谱研究分析中心又开展了生物液相色谱和毛细管电色谱等高新技术的研究，并取得了阶段性成果。国家色谱研究分析中心还以极大的热情致力于高效液相色谱技术在国内的推广与使用，曾多次举办全国性的液相色谱学习班、讨论班，并为此编写了高效液相色谱法讲义。为了反映近 20 年来国家色谱研究分析中心所取得的成果，我们以过去编写的讲义和国家色谱研究分析中心的研究成果为基础，结合国内外的最新发展动态和大量的应

用实例编写了这本书。本书共分十四章，包括色谱理论基础（第二至第四章），液相色谱固定相和流动相（第五章），计算机在色谱分析中的应用（第六、七章），样品预处理（第八章），液相色谱仪器（第九章），液相色谱检测技术和色谱峰定性定量（第十章），液相色谱应用（第十一章），液相色谱手性化合物拆分（第十二章），生物大分子的液相色谱分离分析（第十三章）和毛细管电色谱（第十四章）。本书内容涉及面较广，难免有不妥之处，敬请广大读者批评指正。

在本书的编写过程中，承蒙中国科学院大连化学物理研究所和国家色谱研究分析中心的大力支持，中国科学院出版基金和大连市学术著作出版评审委员会为本书的出版提供了经费资助，作者的亲人姜波、赵瑞环及导师卢佩章先生长期以来对作者的科研事业给予了全心全意的支持与鼓励。在本书出版之际，对于各方面的支持与帮助，谨致以衷心的感谢。

作者

1998年3月于大连

符号表

除正文中特别注明以外，本书所用符号一般具有如下物理意义。

(一) 英文符号

A	常数；峰面积；溶质作用面积
A_s	电极表面积
a	常数
B	常数
b	常数
C	流出组分浓度
C_B, C_b	流动相强组分浓度
C_m	溶质在流动相中传质阻力项；溶质在流动相中浓度
C_{max}	峰极大值处流出组分浓度
C_Q	离子对试剂浓度
c	常数
D	液-液分配常数；扩散系数
D_m	溶质在流动相中扩散系数
D_s	溶质在固定相中扩散系数
d_f	固定液厚度
d_p	固定相填料粒度
F	法拉第常量
f	校正因子
G	自由能
H	自由焓；塔片高度
H_{eff}	有效塔片高度
h	Planck 常量；折合塔片高度
I	电离能；离子强度
J	溶质流通量
K	分配系数

K_1	总分离效能指标
K_3	峰高分离度
K_a	酸解离常数
K_b	碱解离常数
K_{ow}	正辛醇/水分配系数
K_w	水自解离常数
k	Boltzmann 常量
k'	容量因子
k_a	吸附速率常数
k_d	脱附速率常数
L	色谱柱长
l	分子跳跃步长
m	分子量
m_1	一级矩
N	分子个数
N_0	Avogadro 常量
N_s	吸附点数
n	分子跳跃次数, 塔板数
n_{eff}	有效塔片数
n_Q	离子对试剂在固定相表面吸附量
q, q'	柱结构参数
R	气体普适常量; 溶质在流动相中的体积分数
R_s	半峰宽分离度
r	分子间的有效距离
S	自由熵
S_m	传质变化速率
T	绝对温度
t	时间
t'	积分目标变量
t_0	死时间
t_a	溶质在流动相跳跃平衡时间

t_d	溶质在固定相跳跃平衡时间
t_R, t_r	保留时间
$t_{进}$	进样时间
u	流动相线速度
V	体积
V_0	死体积
V_R	保留体积
V'_R	校正保留体积
V_m	柱内流动相体积
V_s	柱内固定相体积
V_{eff}	检测池有效体积
V_w	范德华体积
v	折合线速度
W	峰基宽
$W_{1/2}$	峰半宽
$X_{1/2}$	以长度为量纲的谱带峰半宽
Z	距离

(二) 希文符号

α'	相对保留值
α	校正后的相对保留值
α_m	质量分配系数; 氢键作用参数
β	相比; 热力学补偿温度; 塔片高度变异系数
β_m	氢键作用参数
δ	分子层间距离; 溶解度参数; 双电层厚度
ϵ	介电常数
ϵ_e	柱填充间隙率
ϵ_i	固定相孔隙率
ϵ_m	溶质在流动相平衡偏离因子
ϵ_s	溶质在固定相平衡偏离因子
χ	分子间作用位能场

κ_0	与柱结构相关的参数
λ	与柱结构相关的参数; 填充规则因子; 光波长
λ_i	电导率
λ_p	固定相电荷密度
μ_k	k 阶中心矩
ρ	固定相密度
γ	与柱结构相关的参数
η	粘度
θ	与固定相结构相关的参数
σ	均方差
Ω	与固定相结构相关的参数
ω	与柱结构相关的参数
ζ	Zeta 电势

目 录

第一章 绪论	1
§ 1.1 色谱法的定义和历史	1
§ 1.2 色谱法的特点、原理和应用范围	3
§ 1.3 色谱法的分类	5
§ 1.3.1 体积排阻色谱	6
§ 1.3.2 离子交换色谱和离子色谱	6
§ 1.3.3 反相色谱	7
§ 1.3.4 离子对色谱	8
§ 1.3.5 疏水作用色谱	9
§ 1.3.6 亲和色谱	9
§ 1.4 高效液相色谱与其它色谱方法的比较	10
§ 1.4.1 现代高效液相色谱与经典液相色谱的比较	10
§ 1.4.2 高效液相色谱与气相色谱的比较	11
第二章 液相色谱过程动力学	13
§ 2.1 液相色谱动力学理论	13
§ 2.1.1 塔片理论	13
§ 2.1.2 随机模型理论	17
§ 2.1.3 非平衡理论	22
§ 2.1.4 质量平衡理论	27
§ 2.2 影响色谱柱塔片高度的因素	29
§ 2.3 色谱峰形参数的规律性	31
§ 2.3.1 色谱峰半宽度的规律性	31
§ 2.3.2 色谱指数修正模型中参数的规律性	35
参考文献	36
第三章 液相色谱的热力学过程	38
§ 3.1 中性化合物的物理化学模型	38

§ 3.1.1	顶替吸附模型	38
§ 3.1.2	溶质-溶剂相互作用模型	41
§ 3.1.3	溶解度理论	42
§ 3.1.4	顶替吸附-相互作用模型	44
§ 3.1.5	疏溶剂理论	46
§ 3.1.6	以分子作用力为基础的液相色谱理论模型的比较	48
§ 3.2	基于离子静电作用力的色谱保留机理	50
§ 3.3	液相色谱中各种参数对保留值的影响	56
§ 3.3.1	有机溶剂浓度的影响	56
§ 3.3.2	无机盐浓度的影响	60
§ 3.3.3	柱温的影响	63
§ 3.3.4	固定相性质对保留值的影响	65
§ 3.3.5	流动相酸度对保留值的影响	69
§ 3.3.6	流动相中离子对试剂的影响	75
	参考文献	77
第四章 高效液相色谱中溶质分子结构与保留值的定量		
	关系	79
§ 4.1	色谱中的分子间相互作用	80
§ 4.1.1	离子-偶极作用力	80
§ 4.1.2	定向作用力	81
§ 4.1.3	诱导作用力	81
§ 4.1.4	色散作用力	82
§ 4.1.5	疏水作用力	82
§ 4.1.6	氢键作用力	82
§ 4.1.7	电子对给体-电子对受体相互作用	83
§ 4.2	影响分子间作用力的因素	83
§ 4.2.1	偶极矩 (μ)	83
§ 4.2.2	极化率 (α)	85
§ 4.2.3	电离能 (I)	86
§ 4.2.4	分子间的距离 (r)	86
§ 4.3	分子结构参数	87

§ 4.3.1	与分子体积相关的结构参数	87
§ 4.3.2	反映溶质分子电子分布的结构参数	88
§ 4.3.3	分子形状的结构参数	89
§ 4.3.4	拓扑参数	90
§ 4.4	分子结构与保留值定量关系的应用	91
§ 4.4.1	高效液相色谱中的自由能关系	91
§ 4.4.2	分子结构色谱保留值定量关系用于色谱保留机理的研究和保留值预测	92
§ 4.4.3	色谱保留值用于疏水性的测定	112
§ 4.4.4	液相色谱保留值与生物活性和一些环境化学参数的关系	122
	参考文献	123
第五章	液相色谱固定相和流动相	126
§ 5.1	液相色谱流动相	126
§ 5.1.1	正相色谱常用冲洗剂	130
§ 5.1.2	反相色谱常用冲洗剂	133
§ 5.1.3	反相离子对色谱法常用冲洗剂	135
§ 5.2	高效液相色谱常用固定相	136
§ 5.2.1	液-固吸附色谱固定相	136
§ 5.2.2	化学键合固定相	141
§ 5.2.3	键合固定相的分类	152
§ 5.3	其它基质材料的液相色谱固定相	161
§ 5.3.1	有机高分子基质的液相色谱固定相	161
§ 5.3.2	其它无机基质的液相色谱固定相	166
	参考文献	167
第六章	液相色谱专家系统及其柱系统推荐	170
§ 6.1	专家系统的结构	171
§ 6.1.1	知识库和知识表达	171
§ 6.1.2	推理机	173
§ 6.2	液相色谱专家系统及其应用	174
§ 6.3	色谱专家系统中的柱系统推荐规则库	179
§ 6.3.1	分离模式选择的基本条件	179

§ 6.3.2	液相色谱保留值和选择性的一些基本规律	182
§ 6.3.3	液相色谱分离模式的推荐	184
§ 6.3.4	反相色谱流动相和固定相的选择性原则	194
§ 6.3.5	液相色谱流动相和添加剂的推荐	197
§ 6.3.6	实际样品对柱系统推荐规则的验证	200
	参考文献	204
第七章	液相色谱分离条件最优化	208
§ 7.1	优化参数与优化指标	208
§ 7.1.1	优化参数	208
§ 7.1.2	优化指标	210
§ 7.2	试验设计方法	217
§ 7.2.1	正交设计	217
§ 7.2.2	因子设计	218
§ 7.2.3	混合设计	219
§ 7.2.4	匀壳设计	221
§ 7.2.5	均匀设计	223
§ 7.3	优化方法及其应用	226
§ 7.3.1	单纯形优化方法	227
§ 7.3.2	复合形和重复设计优化方法	234
§ 7.3.3	“窗口图形法”和“重叠分辨分离度法”	245
	参考文献	259
第八章	样品预处理技术	262
§ 8.1	液-液萃取	262
§ 8.1.1	萃取溶剂的选择	263
§ 8.1.2	pH值的控制	264
§ 8.1.3	液-液萃取其它操作因素的控制	265
§ 8.2	液-固萃取	266
§ 8.2.1	液-固萃取固定相和流动相	267
§ 8.2.2	固相萃取的影响因素	269
§ 8.2.3	固相萃取方法的建立	275
§ 8.3	膜技术在样品预处理中的应用	277
§ 8.3.1	微渗析	278

§ 8.3.2 超滤膜技术·····	281
§ 8.4 衍生化和柱浓缩样品预处理·····	282
§ 8.4.1 衍生化技术·····	282
§ 8.4.2 液相色谱柱浓缩预处理技术·····	295
参考文献·····	299
第九章 高效液相色谱仪器 ·····	301
§ 9.1 高压输液系统·····	301
§ 9.1.1 贮液系统·····	301
§ 9.1.2 高压输液泵·····	302
§ 9.1.3 梯度淋洗装置·····	309
§ 9.2 进样系统·····	312
§ 9.2.1 注射器进样·····	312
§ 9.2.2 阀进样·····	312
§ 9.2.3 自动进样器·····	313
§ 9.3 色谱柱系统·····	317
§ 9.3.1 色谱柱的结构·····	317
§ 9.3.2 色谱柱的填充·····	318
§ 9.3.3 色谱柱的评价·····	319
§ 9.3.4 色谱柱的使用技术·····	321
§ 9.3.5 色谱柱恒温装置与馏分收集器·····	323
参考文献·····	325
第十章 液相色谱检测技术和色谱峰定性定量 ·····	326
§ 10.1 检测器的性能指标·····	327
§ 10.1.1 噪声和漂移·····	327
§ 10.1.2 灵敏度·····	328
§ 10.1.3 敏感度·····	330
§ 10.1.4 最小检测量 (M_{\min})·····	330
§ 10.1.5 线性范围·····	331
§ 10.1.6 谱峰的扩张·····	331
§ 10.2 液相色谱检测器·····	332
§ 10.2.1 紫外吸收和紫外可见分光光度计·····	332
§ 10.2.2 示差折光检测器·····	336

§ 10.2.3	荧光检测器	338
§ 10.2.4	电导检测器	339
§ 10.2.5	安培检测器	342
§ 10.3	离子对色谱的抑制柱反应	347
§ 10.4	间接检测方法	349
§ 10.4.1	间接检测方法的基本原理	350
§ 10.4.2	间接检测的理论基础	354
§ 10.4.3	间接检测系统的设计	357
§ 10.4.4	检测灵敏度	359
§ 10.5	定性分析	361
§ 10.5.1	利用已知标准样定性	361
§ 10.5.2	利用检测器的选择性定性	362
§ 10.5.3	利用紫外检测器全波长扫描功能定性	362
§ 10.5.4	利用改变流动相组成时被测组分的保留值变化规律 定性	365
§ 10.5.5	收集色谱柱流出各组分, 再用其它化学或物理方法 定性	367
§ 10.6	定量分析	367
§ 10.6.1	峰面积的测量	368
§ 10.6.2	定量计算的几种方法	368
	参考文献	371
第十一章	高效液相色谱法的应用	373
§ 11.1	正相色谱的应用	373
§ 11.2	反相色谱的应用	381
§ 11.2.1	反相色谱在生物学上的应用	381
§ 11.2.2	反相色谱在食品分析中的应用	389
§ 11.2.3	反相色谱在环境分析中的应用	394
§ 11.3	反相离子对色谱的应用	399
§ 11.3.1	反相离子对色谱分离分析无机离子	399
§ 11.3.2	离子对色谱在生物学分析中的应用	405
	参考文献	412
第十二章	手性对映体的 HPLC 拆分	415

§ 12.1 非对映异构化衍生拆分法	418
§ 12.1.1 异硫氰酸酯 (ITC) 及异氰酸酯 (IC)	422
§ 12.1.2 萘衍生物 (NAD) 类	424
§ 12.1.3 酰氯与磺酰氯类	428
§ 12.1.4 光学活性氨基酸类	431
§ 12.1.5 其它手性衍生试剂	433
§ 12.2 手性流动相拆分法	435
§ 12.2.1 配基交换型手性添加剂 (CLEC)	437
§ 12.2.2 手性离子型络合剂 (CIPC)	439
§ 12.2.3 环型葡聚糖 (CD) 添加法	444
§ 12.2.4 其它手性流动相添加剂	445
§ 12.3 手性固定相拆分法	446
§ 12.3.1 蛋白质手性固定相	449
§ 12.3.2 聚合碳水化合物衍生物手性固定相	454
§ 12.3.3 空穴型手性固定相	456
§ 12.3.4 π 电子给予体、 π 电子受体型手性固定相 (Pirkle 型)	458
§ 12.3.5 配基交换手性固定相	460
参考文献	461
第十三章 生物大分子的高效液相色谱分离分析	470
§ 13.1 生物大分子高效液相色谱的分离模式	471
§ 13.1.1 体积排阻色谱的分离机理	472
§ 13.1.2 离子交换色谱的分离机理	475
§ 13.1.3 疏水作用色谱的保留机理	477
§ 13.1.4 亲和色谱的理论模型	479
§ 13.1.5 金属络合亲和色谱	482
§ 13.1.6 共价色谱	483
§ 13.2 生物大分子分离分析用固定相	484
§ 13.2.1 有机高分子基质固定相	486
§ 13.2.2 无机基质生物大分子分离固定相	495
§ 13.3 生物大分子分离分析的影响因素	511
§ 13.3.1 尺寸排阻色谱的影响因素	511

§ 13.3.2	离子交换色谱的影响因素	515
§ 13.3.3	反相液相色谱的影响因素	520
§ 13.3.4	疏水作用色谱 (HIC) 的影响因素	522
§ 13.3.5	亲和色谱的影响因素	524
§ 13.4	高效液相色谱在生物大分子分离分析中的应用	527
参考文献		538
第十四章	毛细管电色谱	541
§ 14.1	毛细管电色谱的基本原理	541
§ 14.1.1	毛细管电色谱中自加热效应	543
§ 14.1.2	毛细管电色谱的谱带展宽	545
§ 14.1.3	电色谱的保留机理	550
§ 14.2	毛细管电色谱仪器和柱制备	552
§ 14.2.1	毛细管电色谱填充柱的制备	553
§ 14.2.2	开管毛细管电色谱柱的制备	554
§ 14.2.3	毛细管电色谱的梯度洗脱技术	557
§ 14.2.4	毛细管电色谱与质谱联用技术	559
§ 14.3	毛细管电色谱的应用	561
参考文献		570
主题索引		573

第一章 绪 论

色谱学是现代分离分析的一个重要方法，也是一门新兴学科，近 30 年来，色谱学各分支，如气相色谱、液相色谱、薄层色谱、凝胶渗透色谱和纸色谱等都得到深入的研究，并广泛地用于许多领域，如石油化工、有机合成、生理生化、医药卫生，乃至空间探索等，无不运用色谱技术以解决各种分析分离课题。各种与色谱有关的联用技术的出现，比如色谱-质谱联用和色谱-红外光谱联用等开辟了复杂混合物分析检测的新天地。新的色谱方法，例如毛细管电泳、毛细管电色谱、分子生物色谱、超临界流体色谱等不断涌现。作为一种简单而有效的技术，色谱还渗入到催化机理、吸附动力学、化学反应动力学、溶液理论研究等方面，揭示了物理化学领域内的某些基本现象和规律的微小差异，色谱法已经成为人们认识客观世界必不可少的分析工具，同时也已成为生物活性化合物分离纯化最重要的手段之一。色谱学在不断丰富、提高、发展的实践过程中，已经形成一门独立的学科。国内外都出版了许多有关色谱技术及原理的杂志与专著。

§ 1.1 色谱法的定义和历史

色谱法是一种分离方法，它利用物质在两相中分配系数的微小差异，当两相作相对移动时，使被测物质在两相之间进行反复多次分配，这样使原来的微小分配差异产生了很大的效果，使各组分分离，以达到分离、分析及测定一些物理化学常数的目的。

将一滴包含有混合色素的溶液滴在一块布或一片纸上，随着溶液的展开可以观察到一个个同心圆环出现，古代罗马人就是采用这样简单的方法来分析染料与色素的。大约在 100 多年前，德

国的化学家 Runge 对此方法又作了重要的改进，使其具有更好的重现性与定量能力，这项技术后来发展成了今天的纸上色谱技术。

但是，首先认识到这种层析现象在分离分析方面重大价值的是俄国植物学家 Цвет。Цвет 一生从事植物色素的提纯与分离工作，他关于色谱分离方法的研究始于 1901 年，在 1903 年 3 月 21 日华沙自然科学学会生物学会会议上，Цвет 在题为“一种新型吸附现象及其在生化分析上的应用”一文中提出了应用吸附原理分离植物色素的新方法。三年后，他命名这个方法为色谱法 (Chromatography)。在 1907 年德国生物学会会议上，Цвет 第一次向人们公开展示以色谱法提纯的植物色素溶液以及色谱图——即显示着彩色环带的柱管。

但是，当时的 Цвет 还不是一位著名的植物学家，他的色谱论文仅能以俄文发表。刚刚诞生的色谱分离技术并没有引起足够的重视。

20 多年后，Kuhn 与 Lederer 为了证实蛋黄内的叶黄素系植物叶黄素与玉米黄质的混合物，参考了 Цвет 的文章后，采用了色谱法，他们用粉碎的碳酸钙装填色谱柱，成功地从蛋黄中分离出了植物叶黄素。Kuhn 与 Lederer 工作的重要意义不仅在于证明了蛋黄叶黄素是氧化类胡萝卜素的混合物，更重要的是证实了 Цвет 的方法可以用来进行制备和分离。从此之后，色谱分离方法才迅速为各国科学工作者注意和应用，并更广泛地用于各种天然有机化合物的分析与分离。液-固色谱的进一步发展有赖于瑞典科学家 Tiselius 以及 Claesson 的努力，他们创立了液相色谱的迎头色谱分析与取代色谱技术。将吸附色谱法用于气体分析应归功于 Клубнин, М. Явич 等人，他们采用前缘分析方法分析了丙烷、戊烷、己烷及丙烷和空气的混合物。分配色谱是由著名的英国学者 Martin 及 Syngge 创立的。1941 年，Martin 与 Syngge 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。在他们的文章中曾指出：“采用气体代替液体作为

流动相分离各类化合物的可能性是存在的。”但是当时在实际工作中还未解决分离后物质的鉴定问题，部分原因可能是因为当时有战事，研究工作迟迟未能跟上。最后还是 Martin 与 James 采用了自动滴定仪作检测器分析脂肪酸，创立了气-液色谱法。在 1951 年牛津分析化学会议上，James 和 Martin 总结了他们的研究成果。在气-液色谱法中，采用涂渍在惰性载体上的高沸点液体为固定相，溶解分配原理代替了吸附剂种类不多的缺陷。因此 James 与 Martin 的文章在分析化学界产生了巨大的影响。特别是在 1958 年，Golay 又提出了分离效率极高的毛细管柱气相色谱法，从此以后，气相色谱技术才得以广泛应用，蓬勃发展起来。

液-固色谱是最先创立的色谱方法，但过去的液相色谱柱多是采用碳酸钙、硅胶、氧化铝填充的玻璃柱管。流动相加在柱管上端，受地球吸引力的作用顺流而下，组分的检测则依靠肉眼的观察或将吸附剂从柱管里面取出分析。自 Ивет 创立液-固色谱以后 50 多年的时间里，液-固色谱装置并无实质性的改进，其进展比较缓慢。但到 60 年代，随着人们在气相色谱方面知识的积累，采用高压输液泵及光学检测器，并制作出多种高效微粒填充剂，大大提高了液相色谱的分析能力，加快了液相色谱的分析速度。70 年代又出现了采用自动电导检测器的新型离子交换色谱法，从而使液相色谱无论是技术上，还是在仪器上，都产生了一个新的飞跃。目前，气相色谱与液相色谱并驾齐驱，相辅相成，二者各自有其驰骋的领域。80 年代末期，又产生了毛细管电泳分析技术。这几种分离分析方法已经成了化学家、生物学家分析复杂混合物不可缺少的手段。

§ 1.2 色谱法的特点、原理和应用范围

色谱作为一种分析方法，其最大特点在于能将一个复杂的混合物分离为各个有关的组成，然后一个个地检测出来，因此它是成分分析和结构测定的重要手段。那么究竟什么是色谱？它是一

个什么过程？是什么原因促使不同物质得以分离呢？一般地讲，色谱是一个分离过程，一个建立在吸附、分配、离子交换、亲和力和分子尺寸等基础上的分离过程，它利用不同组分在相对运动、相互不溶的两相中，其中相对静止的一相称固定相，而另一个相对运动的相称流动相，利用吸附能力、分配系数、离子交换能力、亲和力或分子大小等性质的微小差别，经过连续多次在两相间的质量交换，使不同组分得到分离。例如利用不同组分间分配系数的差别，用毛细管色谱法可以将含上百个成分的复杂混合物一一分离。不同组分性质上的微小差别是色谱分离的根本，即必要条件；而性质上微小差别的组分之所以能得到分离是因为它们在两相之间进行了上千次甚至上百万次的质量交换，这是色谱分离的充分条件。我们说色谱法是高效的，是因为它在许多过程中进行了成千上万次的质量交换，使性质上仅有微小差别的组分得以分离；它又是快速的，因为组分在两相的交换速度很快，通常仅千分之几秒，因此一个复杂样品的分析仅需几分钟到几十分钟；另外，色谱法还是很灵敏的，因为它采用近代光学或电子学的各种手段做检测器，一般可直接检测含量为百万分之几或更低的成分。色谱作为一种分离检测手段，可用于测定分子量很低的常量或痕量气体，又可分离测定分子量上百万的天然或合成物质；可分离性质非常接近的同位素、同分异构体、空间异构体、自旋异构体或光学异构的对映体，也广泛用于大分子或一些生物活性物质，如肽类、核酸、蛋白质以及阴阳离子的测定，它已经成为有机物和一些无机物分离测定的重要手段，是石油、化工、环保、医药、生化等部门科研和生产中分离检测的一个不可缺少的工具。色谱的重要性首先在于它使性质上非常接近的物质的分离测定成为可能。这一点正是近代化学、生物学研究与发展中一个极为重要和不可缺少的手段。

§ 1.3 色谱法的分类

色谱都有哪些种类呢？这需要了解一下色谱的分类方法。色谱的分类主要依据色谱过程中两相，即流动相和固定相的物理状态、作用原理和分离系统的物理特征，详见表1.1。

表1.1 色谱法的分类

按两相物质形态分			按作用原理分		按物理特征分	
流动相	固定相	名称	原理	名称	特征	名称
液体		液相色谱			固定相板状	平板色谱
	液体	液-液色谱	分配系数不同	液-液分配色谱	固定相是纸	纸色谱
	固体	液-固色谱	吸附能力差别 分子大小不同 离子交换能力不同 亲和力差别	液-固吸附色谱 凝胶渗透或排阻色谱 离子交换色谱 亲和色谱	固定相是薄层	薄层色谱
					固定相柱状	柱色谱
					固定相紧密填充	填充柱色谱
		电渗析淌度差别	电泳	色谱柱中空 流动相用高压液体 流动相用电压驱动	空心柱色谱 高压液体色谱 电色谱	
气体		气相色谱				
	液体	气-液色谱	分配系数不同	气-液分配色谱		
	固体	气-固色谱	吸附能力差别	气固吸附色谱		
超临界		超临界色谱				

另外，根据色谱展开即操作方式不同又分迎头色谱、顶替法

色谱和冲洗法色谱。以样品气体做流动相的色谱过程叫迎头法色谱；以含吸附能力或其它作用能力比被分析组分强的组分做流动相的叫顶替色谱；而以吸附能力或其它作用能力比被分离组分弱的物质做流动相的叫冲洗法色谱。最后一种方法容易获得单一的色谱峰，是目前使用最广的一种方法。还有按组分在两相间的浓度关系是否呈线性，又可分为线性或非线性色谱。

§ 1.3.1 体积排阻色谱

体积排阻色谱 (size exclusion chromatography, SEC) 是一种纯粹按照溶质分子在流动相溶液中的体积大小分离的色谱法。填料具有一定范围的孔径尺寸，大分子进不去而先流出色谱柱，小分子后流出。在用水系统作为流动相的情况下，又称为凝胶过滤色谱 (GPC)。用于生物大分子分离的传统 SEC 填料主要是多糖聚合物软胶，只能在低压下作慢速分离用。目前在很大程度上被微型型交联的亲水凝胶 (如交联琼脂糖 Superose 6 和 12)，乙烯共聚物 (如 TSK-Gel PW) 和亲水性键合硅胶 (如 Zorbax GF 250 和 450) 所取代。随所用填料的孔径大小不同，SEC 能分离的分子量级范围在 1 万到 200 万之间。对于分析分离或实验室小规模制备，平均粒度在 $3\sim 13\mu\text{m}$ 的规格较适用，有良好的柱效率和分离能力。但对大规模的制备分离和纯化，因要考虑成本和渗透性，可以采用较粗的粒度。体积排阻色谱一般用作原料液的初分离，获取几个分子量馏分，供进一步分离纯化使用。

§ 1.3.2 离子交换色谱和离子色谱

蛋白质的离子交换色谱 (ion exchange chromatography, IEC) 分离已被生物化学家使用许多年了，但至今仍是很受欢迎的一种方法。其原因在于 IEC 的介质材料，以及含盐的缓冲流动相系统都十分类似于蛋白质稳定存在的生理液条件，有利于增加活性回收率。生物大分子和离子交换固定相之间的相互作用主要是静电作用，导致介质表面的可交换离子与带相同电荷的蛋白

质分子发生交换。蛋白质分子表面上的大多数可解离部分并未同填料表面进行离子交换，而是通过盐桥联系在一起。那些没有交换的剩余部位将继续同填料表面发生多重的相互作用。所用的介质其基体主要是亲水共聚物，如苯乙烯-二乙烯基苯共聚物和大孔硅胶，孔径在 30~400nm 之间。最近 Regnier 等人用多缩甘油醚交联的聚乙烯亚胺 (PEI) 包覆微球硅胶，进一步制成强阴离子交换固定相和阳离子交换固定相，在蛋白质分离上有一定特色。用于生物大分子分离的商品离子交换固定相，以一价离子测定的交换容量差别不大，故一般更愿意用“蛋白质结合量”来表征。另外，羟基磷灰石也是一种受到重视并广泛应用的生物大分子分离用的离子交换介质。

1975 年，Small 等人创立了用于分离离子性化合物的一种新的液相色谱法，称之为离子色谱法。离子色谱法具有快速、灵敏、选择性好和同时测定多组分的优点。离子色谱的分离过程主要基于被分离组分静电作用力的差异，对于疏水性较大的离子，尤其是有机离子的分离效果不很理想。

§ 1.3.3 反相色谱

反相色谱 (reversed phase chromatography, RPC) 是基于溶质、极性流动相和非极性固定相表面间的疏水效应建立的一种色谱模式。任何一种有机分子的结构中都有非极性的疏水部分，这部分越大，一般保留值越高。在高效液相色谱中这是应用面最广的一种分离模式。在生物大分子的反相液相色谱条件下，流动相多采用酸性的、低离子强度的水溶液，并加一定比例的能与水互溶的异丙醇、乙腈或甲醇等有机改性剂。大量使用的填料为孔径在 30nm 以上的硅胶烷基键合相，除此之外，也有少量高聚物微球。实验表明，烷基链长对溶质的反相保留没有显著的影响，但对蛋白质的活性回收上短链烷基 (如 C_4 , C_8 , 苯基) 和长链烷基 (如 C_{18} , C_{22}) 反相填料是有区别的。表现在烷基链越长，固定相的疏水性越强，因而为使蛋白质较快洗脱下来，需要增加流

动相的有机成分。过强的疏水性和过多的有机溶剂会导致蛋白质的不可逆吸附和生物活性的损失。综合起来说，在烷基键合硅胶上的反相色谱，由于其柱效高、分离度好、保留机制清楚，是蛋白质的分离、分析、纯化和结构阐明以及许多低分子量成分广泛应用的一种方法。近年来在农业和食品科学领域又有一些新的应用。

§ 1.3.4 离子对色谱

现代离子对色谱法 (ion-pair chromatography) 从 70 年代初期发展起来，主要可分成两种类型：正相离子对色谱法和反相离子对色谱法。在正相离子对色谱中，含有离子对试剂的水溶液被涂渍到硅胶表面和孔隙中，流动相是与水不相溶的有机溶剂。早期的现代反相离子对色谱法选用的固定相为有机溶剂涂渍到载体表面上的非键合型固定相，流动相为极性很强的包含离子对试剂的含水有机溶液。70 年代中期起，各种液相色谱法都开始采用化学键合型固定相。早期发展起来的现代反相和正相离子对色谱法由于固定液涂渍过于麻烦且稳定性差，已被逐步淘汰。现在最常用的反相离子对色谱法，选用的固定相绝大部分是化学键合型的非极性表面固定相（如 C_{18} 和 C_8 等）。很显然，反相离子对色谱法兼有反相色谱和离子色谱的特点；它保持了反相液相色谱操作简便、分离柱效高所固有的优点，而且能同时分离离子性和中性化合物的混合样品。可以说离子对色谱法是离子色谱和反相色谱的拓展和延伸，因此在一些离子色谱书籍中，这一技术被称之为流动相离子色谱法予以介绍；而在高效液相色谱书籍中，这一技术被称之为反相离子对色谱法予以介绍。离子对色谱的流程和基本设备与最常用的反相色谱法的设备完全相同，操作过程也与反相色谱法相同，也可选用离子色谱法采用的抑制电导、电化学等检测器。反相离子对色谱法与反相色谱法不同之处只是在反相色谱采用的流动相中加入了适当的离子对试剂。

§ 1.3.5 疏水作用色谱

疏水作用色谱 (hydrophobic interaction chromatography, HIC) 的原理与反相色谱相同, 区别在于 HIC 填料表面疏水性没有反相色谱强。所用填料同样分有机聚合物 (交联琼脂糖 Superose 12, TSK-PW, 乙烯聚合物等) 和大孔硅胶键合相两类。疏水配基一般是低密度分布在填料表面上的苯基、戊基和丁基、丙基、羟丙基、乙基或甲基, 也有的是在硅胶表面键合聚乙二醇。流动相一般为 pH6~8 的盐水溶液 [如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 作盐浓度梯度冲洗, 在高盐浓度条件下, 蛋白质与固定相疏水缔合; 浓度降低时, 疏水作用减弱, 逐步被洗脱下来。和普通反相液相色谱相比, 这种表面带低密度疏水基团的填料对蛋白质的回收率高, 蛋白质变性可能性小。由于流动相中不使用有机溶剂, 也有利于蛋白质保持固有的活性。

§ 1.3.6 亲和色谱

亲和色谱 (affinity chromatography) 是利用生物大分子和固定相表面存在某种特异性吸附而进行选择分离的一种生物大分子分离方法。通常是在载体 (无机或有机填料) 表面先键合一种具有一般反应性能的所谓间隔臂 (如环氧、联氨等), 随后再连接上配基 (如酶、抗原或激素等)。这种固载化的配基将只能和与其有生物特异性吸附的生物大分子相互作用而被保留, 没有这种作用的分子不被保留而先流出色谱柱。此后改变流动相条件 (如 pH 值或组成), 将保留在柱上的大分子以纯品形态洗脱下来。例如, 若在间隔臂链段上分别加上抗原、蛋白质 A 或磷脂酰胆碱, 便可分离和回收到相应的抗体、免疫球蛋白或膜蛋白。亲和色谱选择性强、纯化效率高, 实际上也可以认为是一种选择性过滤, 往往可以一步法获得纯品。

§ 1.4 高效液相色谱与其它色谱方法的比较

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 除了叫做高压或高速液相色谱外, 又称为高分离度液相色谱或近代柱液相色谱, 但我们推荐使用第一个术语, 即高效液相色谱. 通过同经典液相色谱和气相色谱相比较, 可以看出高效液相色谱具有分离效率高、分析速度快、检测灵敏度高和应用范围广泛的特点, 特别适合于高沸点、大分子、强极性和热稳定性差的化合物的分离分析.

§ 1.4.1 现代高效液相色谱与经典液相色谱的比较

经典液相色谱使用的柱填料通常是大于 $100\mu\text{m}$ 的粗粒度多孔吸附剂 (硅胶或氧化铝等). 固定相传质扩散缓慢, 因而柱效率很低, 分离能力差, 只能进行简单混合物的分离; 而高效液相色谱采用 $5\sim 10\mu\text{m}$ 微球填料, 传质快, 柱效可比以前提高 $2\sim 3$ 个数量级, 25cm 长的硅胶柱柱效可达 2 万理论塔板, 可以分离上百个组分, 有更高的峰容量 (即一定时间内色谱图上所能容纳的色谱峰数目). 经典液相色谱中, 填料通常是装在 $1\sim 2\text{m}$ 长, $1\sim 2\text{cm}$ 粗的玻璃管中, 使用一次便丢掉, 每次分离都要重新装柱, 这造成了人力物力上的浪费; 高效液相色谱则采用尺寸小得多的封闭式可重复使用的色谱柱, 能在同一根柱上进行数百次数千次的进样操作. 由于微粒填料传质扩散快, 又使用了高压输液泵, 因而快速分析有可能实现. 例如在 2mm 内径, $5\mu\text{m}$ 硅胶柱上用己烷冲洗, 在 30MPa 的压力下 10s 分离了包括四氯乙烯在内的从苯到对三联苯 7 个芳烃的混合物. 近代高效液相色谱实现高精度连续操作仪器化, 使定性定量分析的准确度比经典液相色谱大为改善, 特别是微处理机的使用更提高了分析精度 (定量准确度可达 1%).

HPLC 是一类封闭式的柱液相色谱, 和敞开式的薄层色谱

(TLC) 相比较, 具有对环境污染小和受环境气氛影响小的优点. 由于从进样到检测是封闭在一个系统中, 易于实现仪器化、自动化, 省时、省力, 便于定量操作. 近年来发展采用的 $7\mu\text{m}$ 左右的微粒硅胶及其非极性烷基键合相涂制薄板的高效薄层色谱 (HP-TLC) 和仪器化薄层色谱技术部分地克服了 TLC 固有的缺点, 可以和高效液相色谱互为补充.

§ 1.4.2 高效液相色谱与气相色谱的比较

气相色谱自 50 年代出现以来, 获得了飞速发展, 它的特点是高效、快速和灵敏, 其分离分析复杂化合物的能力是以前其它色谱方法无法比拟的, 应用相当广泛和普遍. 但是由于气相色谱使用气体流动相, 被分析样品必须要有一定的蒸汽压, 汽化后才能能在柱上分析, 这使分离对象的范围受到一定的限制. 对于那些挥发性差的物质 (高沸点化合物), 汽化温度和柱温必须很高, 这不仅使设备和仪器制造带来不少困难, 更重要的是许多高分子化合物和热稳定性差的化合物在汽化过程中分解, 因而改变了原有的结构和性质. 尤其是一些具有生物活性的生化样品等物质, 温度过高会变性失活. 这样的样品分析用气相色谱就难以胜任了. 此外, 对于一些极性化合物, 如有机酸、有机碱等, 气相色谱也遇到困难. 虽然有的可以通过衍生化法解决, 有的则无能为力. 据估计现在已知的化合物中, 仅有 20% 的样品可不经预先的化学处理而能满意地用气相色谱分离.

与此相反, 液相色谱则不受样品挥发度和热稳定性的限制, 液相色谱一般在室温下操作, 偶尔为了提高柱效或改变分离, 在较高的温度下操作, 但是最高也不超过流动相溶剂的沸点, 所以只要被分析物质在流动相溶剂 (各式各样) 中有一定的溶解度, 便可以分析. 所以液相色谱特别适合于那些沸点高、极性高、热稳定性差的化合物, 例如生化物质和药物, 离子型化合物, 热稳定性差的天然产物等等. 事实上, 在已知的化合物中大约有 70% 是不挥发的, 主要出现在生命科学、环境科学、高分子和无

机化合物中，在这方面高效液相色谱有着广阔的应用潜力。

液相色谱中由于流动相也影响分离过程，这就对分离的控制和改善提供了额外的因素。气相色谱中的载气一般不影响分配，但要靠改变固定相来改变选择性，而在液相色谱中除了改变固定相外，还可以改变冲洗剂达到同一目的。所以液相色谱中的固定相不像气相色谱那样种类繁多，有限的几种或几十种固定相就可以解决相当范围的问题。

和气相色谱相比，高效液相色谱对样品的回收比较容易，而且是定量的，这对任何规模的制备目的特别有利。事实上，在很多情况下高效液相色谱不仅是作为一种分析方法，而更多的是作为一种分离手段，用以提纯和制备具有足够纯度的单一物质。例如在生化、制药、天然产物和精细化工等方面。

在高效液相色谱中必须特别注意“柱外效应”对柱效率及对色谱分离能力的影响。这是因为物质分子在液相中的扩散系数比在气相中小4~5个数量级，因此在从进样到检测之间，除柱子以外的任何死空间（进样器、柱接头、连接管和检测池等）中，如果流动相的流型有变化，被分离物质的任何扩散和滞留都会显著地导致色谱峰的加宽，柱效率降低。所以尽可能减小柱外死体积和精心的结构设计是很重要的。这就给仪器制造方面提出更高的要求。显然，随着柱型的发展（如柱子变细、变短）和填料的改进（如粒度变小或更加均匀），在柱内发生的色谱分离过程中的谱带宽度越来越狭窄，因而柱外效应的影响也越来越不容忽视。

应当指出，高效液相色谱是适应科学技术的发展而发展起来的，它和气相色谱各有所长，相互补充。在高效液相色谱越来越广泛地获得应用的同时，而气相色谱仍然发挥着它的重要作用。

第二章 液相色谱过程动力学

色谱过程动力学（简称色谱动力学）是研究物质在色谱过程中运动的科学，其主要目的是解释色谱流出曲线的形状，探求影响色谱区带扩张的因素和原因，从而为得到高效能色谱柱系统提供理论上的指导以及为色谱分离条件和色谱定量、色谱专家系统谱图库的建立奠定理论基础。

色谱动力学理论可分成塔片理论^[1,2]，速率理论^[3]，非平衡理论^[3]和质量平衡理论^[4]四种类型。由塔片理论中引出的塔片数和塔片高度的概念在表征柱效时是很有用的参数，但塔片理论不能把柱效与色谱参数定量地关联起来。速率理论和非平衡理论分别从微观和宏观的基点出发研究色谱分离动力学过程，而且把柱效与色谱参数关联起来，这对改善色谱柱结构，提高柱效是有指导意义的。但它们都不能给出色谱流出曲线形状，而质量平衡理论不仅能从物理意义上描述各种因素对色谱分离动力学过程的影响，而且能有效地给出色谱柱效与参数的关系及色谱流出曲线的信息。所以在色谱动力学理论中它始终是研究得很活跃、很广泛的模型。

§ 2.1 液相色谱动力学理论

§ 2.1.1 塔片理论

塔片理论（the plate model）是最早描述色谱动力学过程的理论。马丁（Martin）^[1,2]及其合作者首先提出并发展了塔片理论，以后 Glueckauf^[5]又对该理论作过详细的讨论。塔片理论的处理方法有随机法^[6]和质量平衡法^[7]，但它们的基本假设都是一样的，即：（1）整个色谱柱可看成由一个体积元或塔片所组

成；(2) 在每一塔片间，被分离组分在固定相与流动相间的分配非常快，以至当溶质运动到下块塔片以前溶质的分配已达到平衡；(3) 在所有塔片内，溶质的分配系数不随被分离组分浓度的变化而变化；(4) 溶质的轴向扩散非常小，可以忽略；(5) 流动相的流动是不连续的，是从一个塔片跳跃到另一个塔片的跳跃过程。

以上的假设对一个复杂的色谱分离过程来说，存在着很多问题。首先在气相色谱中溶质分子的轴向扩散对色谱的扩散有较大的贡献，忽略分子轴向扩散的作用是不合理的；其次是分配系数不随溶质浓度而变化的假设只能在一定的溶质浓度范围内成立；最不合理的假设是该理论认为流动相的运动是跳跃式的，不连续的，这与实际的色谱过程完全相违背，显然是不对的。该理论最大的缺点是无法把色谱参数对塔片高度的影响定量地关联起来，流动相的连续流动也表明在色谱分离过程中不会达到一个真正的平衡状态。由于在气相色谱中，流动相的流速大大高于液相色谱中的流速，所以在气相色谱中这种不平衡性更为显著。

尽管塔片理论存在着这些不合理之处，但在许多方面还有很大的应用价值。它能近似地给出色谱流出曲线的形状和给出色谱系统的分离效率，即理论塔片数的信息。

塔片模型的数学处理表明色谱峰是一个波松 (Poisson) 分布，在塔片数很大的情况下，色谱峰趋向于对称的高斯 (Gaussian) 分布：

$$C = C_{\max} \exp[-(V - V_R)^2 / 2\sigma^2(V)] \quad (2.1)$$

式中， C 是流出组分的浓度， C_{\max} 是峰极大处组分的浓度， V_R 表示保留体积， V 是流出色谱柱尾的流动相体积， $\sigma^2(V)$ 是以体积为单位的峰的离差。峰的离差是峰宽的量度，事实上高斯峰离差的开方根即色谱峰的标准偏差与峰宽成正比。如引入塔片数 N 后式 (2.1) 可写成：

$$C = C_{\max} \exp[-N(V - V_R)^2 / V_R^2] \quad (2.2)$$

从式 (2.1), (2.2) 的比较中可得到离差与塔片数 N 的关系为

$$N = \frac{V_R^2}{\sigma^2(V)} = \frac{t_r^2}{\sigma^2(t)} = \frac{16t_r^2}{W^2} \quad (2.3)$$

式中, W 代表峰宽, $W = 4\sigma$; $t_r, \sigma^2(t)$ 分别表示保留时间和以时间为单位的色谱峰的离差, 如用半峰宽 $W_{1/2}$ 来求塔片数, 则可得 N 的表达式为

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2.4)$$

值得指出的是色谱柱中没有真正的塔片存在, 塔片只是从蒸馏过程中借用来的概念. 塔片数 N 应认为是柱效的量度, 更精确地说 N 应被认为是相对于色谱峰移动距离的色谱峰展宽的量度. 塔片数 N 越大, 在给定时间内色谱峰的展宽越小, 则色谱分离系统越有效. 如图 2.1 所示, 当两种溶质的保留时间 (在图 A, B 中) 相同时, 谱峰较窄的色谱系统有较高的分离效率. 塔片理论在表征色谱系统的分离效率时是很方便的. 虽然塔片模型不能完全把色谱参数对峰展宽影响关联起来, 但从塔片理论中求得的 $W_{1/2}$ 表达式中可知道色谱柱长、色谱柱的填充结构和溶质的容量因子对峰的展宽有影响, 所以这个模型对了解溶质的色谱分离过程和获得高分离效率的分离系统有一定的意义.

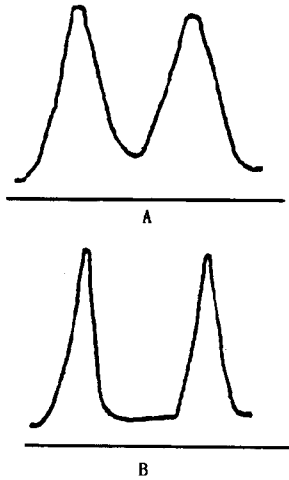


图 2.1 色谱峰展宽对分离度的影响

另一从塔片理论中引出的色谱参数是塔片高度 H (或理论塔片高度 HETP). 按定义, H 可以表示为^[3]

$$H = \frac{d\sigma^2(L)}{dL} \quad (2.5)$$

它的物理意义就是峰离差对色谱峰移动距离的变化率. 对于填充

均匀的色谱柱,塔片高度又可写成:

$$H = \frac{\sigma^2(L)}{L} = \frac{L}{N} \quad (2.6)$$

H 也是一个表示分离效率的参数, H 值越小, 色谱分离效率就越好。

60年代初, 卢佩章等^[8]提出了衡量柱效的一个新的参数 β 。这一参数的求得是建立在他们发现的在同一操作条件不同物质的色谱峰半宽度 ($W_{1/2}$) 与它们的保留时间 (t_r) 成线性关系。设线性关系为

$$W_{1/2} = a + bt_r \quad (2.7)$$

则有效塔片数:

$$n_{\text{eff}} = 5.54 \left(\frac{t'_r}{W_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t'_r}{a + bt_r} \right)^2 \quad (2.8)$$

而有效塔片高度 H_{eff} 为

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{n_{\text{eff}}} = \frac{L}{5.54} \left(\frac{t'_r}{a + bt_r} \right)^2 \quad (2.9)$$

由于

$$t'_r = t_r - t_r^0 = \frac{L}{u} (1 + k') - \frac{L}{u} = \frac{Lk'}{u} \quad (2.10)$$

所以有

$$H_{\text{eff}} = \frac{Lb^2}{5.54} \left(1 + \frac{au}{k' bL} \right)^2 \quad (2.11)$$

当 $k' = 1$ 时,

$$H_{\text{eff}}^1 = \frac{Lb^2}{5.54} \left(1 + \frac{au}{bL} \right)^2$$

当 $k' \rightarrow \infty$ 时,

$$H_{\text{eff}}^\infty = \frac{Lb^2}{5.54}$$

当 k' 取任意值时,

$$H_{\text{eff}}^{k'} = H_{\text{eff}}^\infty \left(1 + \frac{\beta}{k'} \right)^2 \quad (2.12)$$

由此可见 β 值为 H 随 k' 变化的系数.

式中

$$\beta = \frac{au}{bL} = \frac{H_{\text{eff}}^1}{H_{\text{eff}}^\infty} - 1 \quad (2.13)$$

式 (2.12), (2.13) 表明只要知道 H_{eff}^1 和 H_{eff}^∞ 就可求得该色谱柱对于具有任何 k' 物质组分的 H_{eff}^k 值, 而 H_{eff}^1 和 H_{eff}^∞ 又可根据不同物质的色谱峰半宽度变化规律中的二个经验式回归常数 a , b 来求得. 从式 (2.12) 中可以看到在色谱分离系统中如果两组分的 H_{eff}^∞ , k' 相同, β 值越小, H_{eff}^k 就越小, 所以 β 值也是一个衡量柱效的参数.

§ 2.1.2 随机模型理论

美国的吉丁斯 (J. C. Giddings) 在 1958 年首先提出了随机模型理论 (theory of random walk model)^[9], 以后吉丁斯本人又进一步发展和完善了该理论^[3], 使之成为一个处理色谱分离过程较为有效的方法. 随机理论模型是一个微观模型, 它所考虑的是每一个被分离溶质分子的运动情况, 而不是每一组分全体分子的运动情况. 随机理论认为溶质分子运动是无规则的, 但是这种运动是流动相的运动与溶质分子无规则运动的迭加. 因此, 从微观来看每个溶质分子有向前或向后的运动, 但从宏观角度来看溶质组分总是向前运动的. 从随机的含义中可以想象溶质分子的运动像大分子在溶液中的布朗运动一样, 是一系列的随机跳跃运动. 随机理论还认为总的色谱分离过程是由若干个独立的随机过程所组成, 每一随机过程有一特定的平均特征跳跃步长 l , 溶质分子的每一随机过程在保留时间内有 n 次这样的跳跃运动. 假定一溶质分子以步长为 l 开始跳动, 经过 n 次的随机跳动后, 该溶质分子以某一几率不再停留在开始跳动的位置, 而是运动了一定的距离. 如果有许多分子随机地开始运动, 经过一定的时间后, 它们在起始点的周围实现一定的分布, 显然随机过程的分布是高斯分布. 这个分布的离差为 $\sigma^2 = l^2 \cdot n$. 如果认为若干个随

机过程都是相互独立的，则总的色谱分离过程的离差是各个独立随机过程的离差的总和。因此，随机理论要解决的关键问题是如何从复杂的色谱分离系统中给出各个独立的随机过程，并决定每一随机过程的 l 与 n 值。下面我们对此问题的解决作一些简单的介绍。详细的数学处理可阅吉丁斯的专著^[3]。

1. 由分子扩散的随机过程而引起的峰展宽

进样后溶质分子存在着浓度梯度，这会导致溶质分子的轴向扩散。这一过程可发生在流动相和固定相中。但在气相色谱中溶质分子在流动相中的扩散大大快于固定相中的扩散，所以后者的扩散作用可以忽略。考虑气相色谱中的情况，设溶质分子在气相色谱柱的流动相中的停留时间（即死时间为 t_m ， $t_m = \frac{L}{u}$ （ L 是柱长， u 是流动相的线速度）。根据爱因斯坦的扩散方程，在时间 t_m 内溶质分子扩散距离的离差为 $\sigma^2 = 2D_m t_m = 2D_m L/u$ ， D_m 是溶质在流动相中的轴向扩散系数，考虑到填充载体的存在使溶质分子不能自由地轴向扩散，所以要引入一个柱参数 γ 对 D_m 进行校正，由此得到的扩散随机过程的离差为 $\sigma^2 = 2LD_m \gamma/u$ ， γ 的值一般在 0.6~0.7 左右，对于毛细管柱 $\gamma = 1$ 。

2. 由于固定相传质的随机过程而引起的峰展宽

定性地说，假定在色谱柱中有 R 分数溶质分子保留在流动相中，而有 $(1-R)$ 分数组分保留在固定相中，很显然保留在固定相中溶质分子的运动落后于流动相中的溶质分子。在保留时间内，溶质分子始终存在着吸附与脱附的平衡，一部分溶质分子从固定相脱附到流动相中，而一部分在流动相中的溶质分子被吸附在固定相上，这种作用的结果导致谱峰的展宽，而且使溶质分子全部以流动相线速度的某一比值向前流动。事实上，谱带在色谱柱中的移动速度与在流动相中溶质分子数成正比。所以有 R 组分溶质分子在流动相中运动，则整个色谱峰应以 Ru 的速度向前运动。按色谱的容量因子的定义可得 $R = \frac{1}{1+k} =$

$\frac{1}{1+K(V_s/V_m)}$. 随机理论认为每一次脱附是向前跳动. 设 t_a , t_d 分别为溶质分子在流动相、固定相中走完每一次跳跃 l 所需的平衡时间, 则溶质分子每一次跳动的步长为

$$l = t_a \cdot u \frac{1}{1+k'} - ut_a = (1-R)t_a u \quad (2.14)$$

而溶质分子在流动相中的跳动数为

$$n = \frac{2L}{t_a u} \quad (2.15)$$

式中乘以 2 是因为每一步长运动对应于二次跳跃. 由此可得该随机过程的离差为

$$\sigma^2 = l^2 n = 2L(1-R)^2 ut_a = L(1-R)Rut_d \quad (2.16)$$

式中,

$$t_d = k' t_a = \frac{(1-R)t_a}{R}$$

考虑到柱结构的影响, 式(2.16)可写为

$$\sigma^2 = qL(1-R)Rut_d = qL \frac{t_d k' u}{(1+k')^2} \quad (2.17)$$

式中, q 就是柱结构因子, 对毛细管柱 $q = 2/3$. 如固定液厚度为 d_f , 溶质分子在固定相中的扩散系数 D_s , 则由爱因斯坦规则 $t_d = d_f^2/2D_s$, 所以

$$\sigma^2 = q'L \frac{k'd_f^2 u}{(1+k')2D_s} \quad (2.18)$$

q' 是与式 (2.17) 不同值的柱结构参数. 这就是由固定相传质的随机过程所引起色谱峰的离差.

3. 在流动相中溶质分子传质过程而导致的峰展宽

在色谱柱中的流动相运动可看成由许多流线所组成, 流线在某点处的切线方向代表该点流动相的流动方向, 流线的模代表流速的大小, 所以每一条色谱柱中的流线有不同的速度矢量. 在毛细管柱中, 流动相在中心处的流速最大, 在管壁处的流速为 0.

在填充柱中，由于填充物的存在和不均匀的柱填充空隙，柱截面各点的流速显然是不一样的。溶质分子在不同的流线上以不同的速度运动，这会导致色谱峰的扩宽。减少这种峰扩宽的最重要因素之一就是溶质分子的从一流线向另一流线的横向扩散，溶质分子的扩散系数越大，速度不等性而引起的峰展宽的影响就越小。

随机模型认为溶质分子在不同流线间的横向扩散就是跳动。向前跳动就是扩散到流速较大的流线上，向后跳动指溶质分子扩散到流速较小的流线上。平均来说，溶质分子向前或向后跳动的扩散距离与填充载体的直径成正比。因此，该随机过程的跳跃步长是与溶质分子从一区域扩散到另一区域所费时间和流动相平均流速的乘积成正比。跳动数目是柱长与溶质分子从一流线扩散到另一流线所经过的横向距离的比值。这个随机过程的离差可写成

$$\sigma^2 = \frac{L\omega f(k')d_p^2 u}{D_m} \quad (2.19)$$

式中， $f(k')$ 是容量因子的函数， ω 是填充柱的结构因子。对于 $f(k')$ 人们一直不甚了解。对毛细管柱， $\omega f(k')$ 可被求得。Knox等^[10]在这方面曾作过一定的研究，所得结果只是在某些特殊的情况下定性地是正确的，关于 $f(k')$ 的具体表达式有待于进一步的研究。

4. 涡流扩散而引起的峰展宽

可以想象在填充柱中会存在这样的情况，某些溶质分子从某处出发直接运动到另一处，而另一部分溶质分子沿着填充物的弯曲表面经过较长的路程到达该处。由于所走的路程的不等性很显然会引起峰的展宽。而这一不等性现象是纯粹由流动相所引起的，与固定相毫无关系。影响的大小取决于柱的填充结构，主要取决于填充柱的粒度。从随机的观点来看，每一次跳动的步长与填充物的直径成正比，跳动的次数与流动相中溶质分子传质过程所讨论的一样。由此随机过程而引起的峰展宽可写成

$$\sigma^2 = 2\lambda L d_p \quad (2.20)$$

这里 λ 是柱填充结构参数， d_p 是填充载体直径，对毛细管柱不存

在此项的影响.

综合以上的讨论,如把每一随机过程都认为是相互独立的,则色谱分离过程的塔片高度为

$$H = \frac{\Sigma\sigma^2}{L} = 2\gamma d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + q \frac{k'd^2u}{(1+k')^2 D_s} + \frac{\omega f(k')d_p^2u}{D_m} \quad (2.21)$$

这个方程可简化成

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_m + C_s)u \quad (2.22)$$

这是大家熟知的 Van Deemter 方程. C_m, C_s 分别是溶质在流动相和固定相中的传质阻力项. 如果考虑到填充柱载体内空隙滞流的影响, H 还需加一项 $H_{\text{滞}}$. 关于 $H_{\text{滞}}$ 的表达式及详细讨论可参看有关文献[3,11].

事实上,影响峰展宽的各个随机过程有着某种程度的相互关联,吉丁斯认为相关最为显著的是涡流扩散和流动相传质谱峰展宽这两个随机过程^[3]. 这是因为溶质分子不可能始终保持在一条速度的流线上,而是可以径向移动到具有不同流速的流线上. 例如某一时刻的分子可在填充物弯曲表面的流线上运动,而在另一时刻,由于分子的径向扩散运动,溶质分子会被移动到填充物之间空隙中的流线上,由此使得溶质分子的迂回行程大大缩短,相反的现象同样可以发生. 其结果就导致涡流扩散与流动相传质过程的交联;所以吉丁斯又把 H 的表达式(2.22)写成

$$H = \frac{B}{u} + C_s u + \frac{1}{1/A + 1/C_m \cdot u} \quad (2.23)$$

式中, A, B, C_s, C_m 的意义与式(2.22)完全一致. 在毛细管色谱系统中, $A=0$, 所以式(2.22), (2.23)是一致的. 许多实验事实已证明相关的塔片高度表达式(2.23)与实际塔片高度更接近. Chen 和 Stephen 在考虑固定相扩散^[11], 内孔隙滞流影响的基础上,用随机理论的方法求得了液相色谱中塔片高度的表达式,并作了详尽的

讨论.

§ 2.1.3 非平衡理论

色谱过程的非平衡概念早在 40 年代就被提出, 但主要是经过吉丁斯的一系列工作, 使之成为一个处理色谱分离动力学过程的非平衡理论 (nonequilibrium theory)^[3,13]. 在 1965 年出版的《色谱动力学》专著中, 吉丁斯对该理论作了综合性的介绍和总结^[3]. 非平衡理论与随机理论的不同之处在于它所处理的是在给定柱截面积内溶质组分宏观变动的部分, 而不是一个溶质分子的运动情况. 由于传质项的峰扩宽对塔片高度的贡献占实际塔片高度的绝大部分, 所以非平衡理论所讨论的仅仅是这些与传质阻力过程所对应的塔片高度. 非平衡理论的优点在于对不同系统, 不同性质的传质过程, 都能进行独立的处理. 如非平衡理论可以处理气-固 (或液-固) 色谱中一元活性和多元活性吸附保留的传质过程, 它还可以求得简单柱结构, 如毛细管柱或球形填充载体的 C_s 项. 非平衡理论的缺点是数学处理较为复杂, 对一般的色谱工作者有一定的难度. 此外它不能全面地描述色谱分离过程, 所以获取的信息量也不全面. 下面我们对非平衡理论作一简要介绍, 详细处理请参阅文献 [3].

非平衡理论建立在溶质浓度本身的变化和由色谱动力学过程所引起浓度变化的基础之上. 假定 C 为单位填充柱体积内溶质的摩尔数, C 是停留在单位填充柱体积内流动相与固定相中的摩尔数 C_m 和 C_s 的和. 假定溶质在流动相与固定相间完全达到平衡时的浓度为 C_m^* 和 C_s^* . 但事实上由于溶质谱带浓度梯度的存在和不可能保持这种浓度不变化 (即浓度梯度的平衡), 色谱带在两相间的传质会稍微偏离平衡. 非平衡理论认为谱带的展宽是由这种偏离而引起的. 如引入平衡偏离因子 ϵ_m 和 ϵ_s , 则有

$$C_m = C_m^* (1 + \epsilon_m) \quad (2.24)$$

$$C_s = C_s^* (1 + \epsilon_s) \quad (2.25)$$

则

$$\epsilon_m = \frac{C_m - C_m^*}{C_m^*} = \frac{\Delta C_m}{C_m^*}, \quad \epsilon_s = \frac{C_s - C_s^*}{C_s^*} = \frac{\Delta C_s}{C_s^*}$$

ϵ_m, ϵ_s 是表征实际过程偏离平衡过程大小的量. 由非平衡的性质可知, ϵ_m 和 ϵ_s 存在着一定的关系. 如一相中的溶质浓度大于它的平衡浓度, 则另一相中的浓度必然小于它的平衡值, 也即存在着两相间非平衡. 事实上不管两相间的平衡与否, 溶质的总量是不变的, 即

$$C = C_m^* + C_s^* = C_m + C_s \quad (2.26)$$

将式(2.24), (2.25)代入式(2.26)中可得到 $C_m^* \epsilon_m + C_s^* \epsilon_s = 0$ (这就是“非平衡”的平衡的解释), 因此有

$$\epsilon_s = -C_m^* \epsilon_m / C_s^* = -R \epsilon_m / (1 - R) \quad (2.27)$$

一般来说偏离因子 ϵ 是很小的, $\epsilon < 1$. 任何有效的色谱系统中溶质在两相间的传质是很迅速的. 除了特殊情况外, 交换速率快到足以保持溶质组分接近平衡的状态. 有了平衡偏离因子的概念和表达式, 我们就可以用非平衡理论来求得单活性点动力学传质过程的塔片高度表达式.

1. 传质动力学与平衡的关系

溶质组分浓度偏离平衡值越严重, 两相间的传质就越迅速. 溶质在流动相中的传质变化速率为

$$S_m = \left(\frac{dC_m}{dt} \right)_{\text{mass transfer}} \quad (2.28)$$

S_m 仅仅是由传质过程而导致的 C_m 的增加速率. 对于一元活性的吸附脱附过程, S_m 可写成

$$S_m = k_d C_s - k_a C_m \quad (2.29)$$

这里 k_a, k_d 是吸附和脱附的一级速率常数. 当吸附脱附过程达到平衡时, 即两相的浓度都是平衡值时, $S_m = 0$, 由此可得

$$S_m = k_d C_s^* - k_a C_m^* = 0 \quad (2.30)$$

如将式(2.24), (2.25)代入式(2.29), 再由式(2.30)的意义可得

$$S_m = k_d C_s^* \epsilon_s - k_a C_m^* \epsilon_m \quad (2.31)$$

将式(2.27)代入式(2.31)后可得溶质组分在流动相中的传质变化速率为

$$S_m = -C_m^*(k_d + k_a)\epsilon_m \quad (2.32)$$

2. 传质变化速率与流动相运动的关系

传质速率 S_m 也与流动相的流动有关. 这是因为流动相的流动把新的溶质带入某一区域内而导致溶质在该区域内两相间新的分配. 很显然部分的传质变化速率由流动相把溶质带入该区域的速率所决定. 而总的传质变化速率可用质量平衡方程来描述

$$\frac{\partial C_m}{\partial t} = \left(\frac{dC_m}{dt} \right)_{\text{mass transfer}} + \left(\frac{dC_m}{dt} \right)_{\text{flow}} \quad (2.33)$$

式(2.33)中忽略了溶质组分扩散对传质速度变化的贡献. 对于式(2.33)中第二项又可写成

$$\left(\frac{dC_m}{dt} \right)_{\text{flow}} = -u \frac{\partial C_m}{\partial Z} \quad (2.34)$$

式中, $\frac{\partial C_m}{\partial Z}$ 是组分的轴向浓度梯度, 负号是由于在色谱峰前沿浓度梯度是负值时, 流动相带入溶质而导致的传质变化速率 $\left(\frac{dC_m}{dt} \right)_{\text{flow}}$ 是正的. 将式(2.28), (2.34)代入式(2.33)中得

$$\frac{\partial C_m}{\partial t} = S_m - u \frac{\partial C_m}{\partial Z} \quad (2.35)$$

所以有

$$S_m = \frac{\partial C_m}{\partial t} + u \frac{\partial C_m}{\partial Z} \quad (2.36)$$

由于 C_m^* 和 C_m 很相近, 式(2.36)又可近似地写成

$$S_m = \frac{\partial C_m^*}{\partial t} + u \frac{\partial C_m^*}{\partial Z} \quad (2.37)$$

在一定区域内 C 的变化来源于流动相带入带出的溶质的积累量, 由于流动相流动所导致 C 的变化值与流动相中浓度 C_m 的变化值完全相同, 所以有

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \left(\frac{dC_m}{dt} \right)_{\text{flow}} = -u \frac{\partial C_m}{\partial Z} \quad (2.38)$$

如果用 C_m^* 近似代替 C_m , 且有 $C_m^* = \frac{C}{1+k'} = RC$, 则式(2.38)可写成

$$\frac{\partial C_m^*}{\partial t} = -Ru \frac{\partial C_m^*}{\partial Z} \quad (2.39)$$

将式(2.39)代入式(2.37)中, 可得

$$S_m = -Ru \frac{\partial C_m^*}{\partial t} + u \frac{\partial C_m}{\partial t} \quad (2.40)$$

将式(2.40)与式(2.41)相比较可得 ϵ_m 为

$$\epsilon_m = \frac{(1+R)u}{k_a + k_d} \cdot \frac{1}{C_m^*} \cdot \frac{\partial C_m^*}{\partial t} \quad (2.41)$$

式(2.41)把平衡偏离因子 ϵ_m 与流速和色谱谱带的浓度梯度有机地关联起来。

3. 塔片高度表达式的导出

引起色谱峰扩宽的原因是由于在峰的前沿有较多的溶质向前输运, 而峰尾只有较少的溶质向前输运. 这个事实可用溶质流量 (即单位时间单位横截面积流过的溶质量) 来表征

$$J = C_m u \quad (u \text{ 是流动相的流速}) \quad (2.42)$$

因为 $C_m = C_m^* (1 + \epsilon_m)$, 式(2.42)可写成为

$$J = C_m^* u + \epsilon C_m^* u = J^* + \Delta J \quad (2.43)$$

式(2.43)的第一项表示达到平衡时溶质的流量. 如溶质以流量 J^* 传送, 色谱峰不会在色谱柱内展宽, 峰展宽的影响因素来源于 ΔJ 项, 由于 ΔJ 与 ϵ_m 成正比, 所以它在峰前沿是正的而在峰尾是负的, ΔJ 定量地可表达为

$$\Delta J = - \frac{(1-R)u^2}{k_d + k_a} \cdot \frac{\partial C_m}{\partial t} \quad (2.44)$$

因为 $\frac{\partial C_m^*}{\partial t} = R \frac{\partial C}{\partial Z}$, 式(2.44)又可写成为

$$\Delta J = - \frac{R(1-R)u^2}{k_d + k_a} \cdot \frac{\partial C}{\partial Z} \quad (2.45)$$

由浓度梯度扩散引起的溶质的流通量又可以写成 $-D \frac{\partial C}{\partial Z}$ 的形式, 式中 D 是扩散系数. 与该式相似, 式(2.45)的 ΔJ 也可以写成 $\Delta J = -D \frac{\partial C}{\partial Z}$ 的形式, 这里 D 是导致色谱峰扩宽的表观扩散系数, $D = \frac{R(1-R)u^2}{k_d + k_a}$. 由于有效扩散系数 D 所产生的塔片高度为 $H = 2D/Ru$, 所以有传质非平衡所引起的塔片高度为

$$H = \frac{2(1-R)u}{k_d + k_a} = \frac{2(1-R)Ru}{k_d} \quad (2.46)$$

这就是一元活性吸附附动力学传质过程的塔片高度表达式.

对于非平衡理论的一般塔片高度表达式, 利用 ΔJ 的表达式可很快推出

$$\Delta J = \epsilon_m^* u, \text{ 同时 } \Delta J = -D \frac{\partial C}{\partial Z}$$

比较两式可得:

$$D = -\epsilon_m^* u / (\partial C / \partial Z) \quad (2.47)$$

又因为 $H = 2D/Ru$, 所以有:

$$\begin{aligned} H &= \frac{2\epsilon_m C_m^*}{R \partial C / \partial Z} = -2(RC)\epsilon_m / R \frac{\partial C}{\partial Z} \\ &= -\frac{2\epsilon_m}{(\partial \ln C / \partial Z)} \end{aligned} \quad (2.48)$$

这就是通常所见到的非平衡理论塔片高度的一般表达式.

Konx^[13]曾用非平衡理论处理液相色谱填充柱中被分离组分浓度流型对塔片高度的贡献问题, 提出了所谓的“无限大直径”色谱柱和管壁效应的概念. 溶质浓度流型对柱效肯定有影响, 但在一般的液相色谱系统中柱外效应对柱效的影响远远大于“管壁效应”的影响, 这已被许多实验事实所证明^[14,15].

§ 2.1.4 质量平衡理论

质量平衡理论一直是最有吸引力的色谱理论研究课题之一^[16-20]。究其原因, 其一是因为它能较全面、真实地反映色谱分离过程的动力学机理。其二是从理论上讲人们可通过该理论所建立的数学模型中求出色谱流出曲线的解释解, 虽然在现阶段要精确的解释解仍不可能实现, 但随着计算机技术的发展, 由计算机代替人工来解决建立的色谱质量平衡数学模型从而求得色谱流出曲线的工作早已实现, 这方面的研究将会进一步地深入下去。其三是在现阶段人们仍可根据它的数学模型求得色谱流出曲线的统计矩, 从而获得塔片高度、色谱峰拖尾因子的表达式, 搞清它们的影响因素, 指导色谱工作者在实践中选择较佳的分离条件。其四是质量平衡理论的灵活性, 它可以根据不同的色谱动力学分离过程来建立不同的质量平衡数学模型, 而且它的物理意义也很清晰。质量平衡理论的缺点是数学处理比较复杂、繁琐, 要建立符合实际色谱分离过程的数学模型也有一定的难度。

质量平衡理论的基本原理就是在色谱柱的一个微体积元内流入的溶质量与流出量之差等于在该微体积元内的积累量。Lin 和 Horvath^[18,21]认为影响液相色谱峰流出曲线的因素有溶质在填充载体间的传质、填充载体边界上液膜的传质、填充载体内孔隙中的传质和载体表面吸脱附平衡过程四大部分。在这一基础上他们建立了液相色谱柱塔片高度影响因素的表达式。我们进一步考虑到液相色谱中柱外效应的影响, 导出了色谱流出曲线的统计矩为^[22]

$$\begin{aligned} m_1 &= \frac{T}{2} + \frac{L_1}{u_1} + \frac{L_3}{u_3} + \left(\frac{V_{\text{eff}}}{F} \right) + \frac{L_2}{u_2} (1+k_0)(1+k') \\ \mu_2 &= \frac{T^2}{12} + \frac{2L_1D_1}{u_1^3} + \frac{2L_3D_3}{u_3^3} + \left(\frac{V_{\text{eff}}}{F} \right)^2 + \frac{2L_2D_2}{u^3} (1+k_0)^2(1+k')^2 \\ &\quad + \frac{2L_2}{u} \left[\frac{(1+k_0)k'}{k_d} + \frac{d_p^2\theta}{12D_m k_0} (k_0 + k' + k_0k')^2 \right] \end{aligned}$$

$$\left(\frac{1}{5} + \frac{2\epsilon_i}{\Omega\theta v^{1/3}} \right)] \quad (2.49)$$

$$\begin{aligned} \mu_3 = & \frac{12D_1^2 L_1}{u_1^5} + \frac{12D_3^2 L_3}{u_3^5} + 2 \left(\frac{V_{\text{eff}}}{F} \right)^3 \\ & + \frac{12D_2^2 L_2}{u^5} (1+k_0)^3 (1+k')^3 + \frac{4D_2 L_2}{u^3} (1+k_0)(1+k') \\ & \times \left[\frac{3(1+k_0)k'}{k_d} + \frac{d_p^2 \theta}{4D_m k_0} (k_0 + k' + k_0 k')^2 \left(\frac{1}{5} + \frac{2\epsilon_i}{\Omega\theta v^{1/3}} \right) \right] \\ & + \frac{L_2(1+k_0)}{u} \left[\frac{6k'}{k_d^2} + \frac{d_p^2 k' \theta (k_0 + k' + k_0 k')}{5k_d k_0 D_m} \right. \\ & + \frac{d_p^4 \theta^2 (k_0 + k' + k_0 k')^3}{420 D_m^2 k_0^2 (1+k_0)} + \frac{d_p^4 \epsilon_i^2 (k_0 + k' + k_0 k')^3}{6\Omega^2 k_0^2 D_m^2 v^{2/3} (1+k_0)} \\ & \left. + \frac{2d_p^4 \epsilon_i k' (k_0 + k' + k_0 k')}{k_d k_0 \Omega D_m v^{1/3}} + \frac{d_p^4 \theta \epsilon_i k' (k_0 + k' + k_0 k')^3}{30k_0 \Omega D_m v^{1/3} (1+k_0)} \right] \end{aligned} \quad (2.50)$$

式中, D_1, D_2 和 D_3 是溶质在连接管 L_1, L_3 和填充柱 L_2 流动相中的有效扩散系数, 其中 $D_2 = rD_m + \lambda d_p u / (1 + \omega^{1/3})$, $d_p = 2R$ 是载体颗粒的直径; u_1, u_3 和 u 是流动相在连接管 L_1, L_3 和填充柱中的流速; L_1, L_3 和 L_2 是连接管和色谱柱的长度; D_m 是分子扩散分数; θ, r, k_0, λ 和 ω 是柱填充结构参数; θ 为填充载体的孔隙曲率因子; ϵ_e 和 ϵ_i 分别是柱填充空隙率和载体内孔隙率; V_{eff} 和 F 分别是检测池的有效体积和流动相在检测池中的流量。

m_1 代表色谱峰的保留时间, 从式(2.49)中可看出保留时间除与组分的容量因子相关外, 还与反应柱填充空隙和载体内孔隙的常数 k_0 有关, 柱外系统对保留时间也有一定的贡献。

在管连接处不存在在返混的假定下, 从质量平衡模型中导出的色谱系统流出曲线的二、三级中心矩与色谱系统各部分独立的二、三级中心矩的加和相一致, 这表明二、三级中心矩在色谱系统各部分不相关的情况下具有加和的性质, 但实际过程肯定比理论处理的要复杂得多。从式(2.50), (2.51) 中可看出影响二、

三级中心矩的因素很多,而二、三级中心矩分别表示峰的展宽和不对称性,因此影响峰的展宽和不对称性的因素主要可分成填充柱内的涡流扩散,载体外表面传质阻力项和载体内孔隙传质阻力项及固定相表面吸脱附动力学过程与柱外效应等部分。

从二、三级中心矩的表达式(2.50)和(2.51)中可以看出,当 D_1 和 D_3 取值为组分在流动相中的自扩散系数时,连接管 L_1 和 L_3 对二、三级中心矩几乎没有贡献,这与实际结果是不相符的。有许多工作表明^[23,24],采用有效扩散系数更能代表溶质在空管中的扩散过程。

§ 2.2 影响色谱柱塔片高度的因素

色谱分离过程中色谱柱塔片高度的定义为

$$H = \frac{\mu_2 L_2}{m_1^2} \quad (2.51)$$

将式(2.49)和(2.51)代入式(2.52)中,得液相色谱的塔片高度表达式为

$$H = H_{\text{inj}} + H_{\text{disp}} + H_{\text{e,diff}} + H_{\text{i,diff}} + H_{\text{kin}} + H_{\text{d}} \quad (2.52)$$

其中 $H_{\text{inj}} = \frac{T^2 u^2}{12L_2(1+k_0)^2(1+k)^2}$ 是由进样时间影响引起的对塔片高度的贡献。

$$H_{\text{disp}} = \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{2\lambda d_p u^{1/3}}{u^{1/3} + \omega(D_m/d_p)^{1/3}}$$
表示物质在填充载体孔

隙间轴向扩散对塔片高度的贡献。其中 $\frac{2\gamma D_m}{u}$ 是分子扩散项所引起的作用,第二项代表流场和吸附剂颗粒间隙空间物质分子扩散所起的作用。 λ, ω, γ 均为与填充结构有关的常数,因此其值与柱管的几何尺寸,填充工艺水平等因素有关。

$$H_{\text{e,diff}} = \frac{\kappa(k_0 + k' + k_0 k')^2 d_p^{5/3} u^{2/3}}{(1+k_0)^2(1+k')^2 D_m^{2/3}}$$
表示在填充载体颗粒边界

上液膜传质阻力对塔片高度的贡献。 κ 是与柱管和载体结构有关的参数,对于球形载体 κ 约为1/5, k_0 为固定相颗粒内孔隙体积与其颗粒间填充间隙体积之比。

$H_{i,\text{diff}} = \frac{\theta(k_0 + k' + k_0k')^2 d_p^2 u}{30D_m k_0(1 + k_0)^2(1 + k')^2}$ 表示在球形吸附剂颗粒内部孔隙中物质传质的阻力对塔片高度的影响,其中 θ 为载体颗粒内孔隙的曲折因子。

$H_{\text{kin}} = \frac{2k'u}{(1 + k_0)(1 + k')^2 k_d}$ 表示在载体吸附表面吸脱附动力学阻力对塔片高度的贡献, k_d 为脱附常数。

$H_d = \frac{V_{\text{eff}}^2 u^2}{F^2 L_2(1 + k_0)^2(1 + k')^2}$ 表示检测器对塔片高度的贡献; V_{eff} 为检测器有效体积, F 是流量, L 为柱长。

从这些塔片高度的影响关系式中可以看到要获得高效能的色谱分析,一般可采用以下几条措施。

1. 进样时间要短

从 H_{inj} 中可以看到,对于短的柱管和高的流动相线速度,进样时间 T 的降低对柱效的影响更为显著;对于不同 k' 的物质,进样时间对塔片高度的影响也不一样, k' 值小时, T 对 H 的影响较大。随着 k' 值的增大, T 对 H 值的影响将逐渐减少。

2. 填充柱载体的粒度要小

从 H_{disp} , $H_{e,\text{diff}}$ 和 $H_{i,\text{diff}}$ 中可知,填充载体的粒度对塔片高度有很大的影响,其中 H_{disp} 不仅与 d_p 有关,还与反应填充规则程度的因子 λ 有关,大而均匀的颗粒,比较容易实现规则填充,其 λ 值较小。总的说来,采用细而均的载体有助于柱效的提高。但过小的填充载体会妨碍流动相的流动,使柱压过高。为了克服柱压过高的问题,必须提高柱前压,从而给设备增添困难。目前在高效液相色谱柱中,常用的填充载体粒度为3~10 μm 范围之内。对于快速色谱分离,短的细粒度色谱柱比较有利,因为细粒度载体填充的短柱子压力不会很高,但柱效相对较高。

3. 改善传质过程

从 $H_{e,diff}$, H_{kin} 和 $H_{i,diff}$ 可以看到, 影响传质过程的因素有 d_p , θ , κ 和 k_d , 较小的 d_p 有利于加快传质过程, θ 和 κ 是与载体形状和内孔隙结构有关的参数, 理想的载体内孔隙和载体结构应使 κ 和 θ 值较小 ($k=1/15, \theta=2$). k_d 是与载体表面的吸附性质有关的参数, k_d 越大, 传质越快, 越有利于柱效的提高. k_d 取决于溶质在固定相表面的作用力大小. 因此过高的吸附作用力, 可导致严重的峰展宽和拖尾, 甚至不可逆吸附.

4. 选择适当的流动相

通过 H 和 u 作图, 则有一最佳线速度, 在此线速度 u_{opt} 时, H 值为最小, 即柱效最高. 一般在液相色谱中, u_{opt} 很小 (大约 $0.3 \sim 0.1 \text{ mm/s}$), 在这样的线速度下分析样品要耗费很多时间, 一般来说液相色谱中线速度都选在 1 mm/s 左右的条件下操作. 对于快速色谱分离过程, 其选择指标为 H/u 值, 因为快速色谱常用的线速度较大, 在此时 H/u 为一常数, 其影响因素如 2 和 3 所述.

5. 检测器死体积的影响

从 H_d 可以看到, 过大的柱检测体积 V_{df} , 会使 H_d 有很大的增加, 较小的死体积对提高柱效是很有利的.

§ 2.3 色谱峰形参数的规律性

§ 2.3.1 色谱峰半宽度的规律性

以前我们观察到色谱峰半峰宽 $W_{\frac{1}{2}}$ 与保留值间存在线性关系^[8]:

$$W_{\frac{1}{2}} = a + bt_r \quad (2.53)$$

以后我们从质量平衡理论和大量实验中发现: 在不同等度或梯度冲洗下的 $W_{\frac{1}{2}}$ 与保留值或虚拟保留值间同样存在线性关系. 这是因为在柱末端不同组分的谱带有基本相同的半宽度 (以长度为单

位)。表2.1列出的是饱和脂肪酸在毛细管液相色谱中实验测定的谱带展宽值^[25]。从表2.1中可以看到不同 k' 值的脂肪酸其谱带展宽值基本为常数。

表 2.1 不同碳数饱和脂肪酸在毛细管液相色谱中的谱带展宽值

碳数	k'	$\sigma(\text{mm})$
12	0.9	0.590
14	1.4	0.581
16	2.0	0.594
18	3.0	0.602
20	4.3	0.572
22	6.2	0.601
24	8.9	0.577

另一方面我们认为在色谱图中，不同 k' 组分具有不同的半峰宽这一现象主要来自组分脱离柱末端时所谓的柱末端效应。由于 k' 较大的组分离开柱末端的速度较慢，导致色谱图上有较大的色谱半峰宽；反之， k' 较小的组分脱离柱末端时，速度较快，因而在色谱图上的半峰宽较窄，如果不同 k' 的组分在色谱柱末端有相同的谱带半宽度 $\Delta X_{\frac{1}{2}}$ ，则组分容量因子为 k' 时在色谱图上的半峰宽为^[26~28]

$$\begin{aligned}
 W_{\frac{1}{2}} &= \frac{\Delta X_{\frac{1}{2}}}{\bar{u}} = \frac{\Delta X_{\frac{1}{2}}}{u} (1 + k_0)(1 + k') \\
 &= a' + b'k' = a + bt_r
 \end{aligned}
 \tag{2.54}$$

其中 \bar{u} 和 u 分别为在流动相中组分和流动相在色谱柱截面上的移动速度，式 (2.55) 就是我们常用的半峰宽规律。很显然对于不同等度和梯度冲洗情况下，如果被分离组分的 D_m 和 k_d 值变化不大及其它条件恒定时，则不同等度和梯度冲洗下的色谱峰

半宽度与保留值和梯度情况下组分流出色谱柱时所对应的保留值(我们称之为虚拟保留值)间仍存在线性关系^[29]. 表 2.2 和 2.3 列出的则是溶质在液-固正相色谱和反相色谱中改变冲洗剂强度

表 2.2 在正相色谱中样品已知组分在不同强组分浓度等度冲洗时的半峰宽值和保留时间

冲洗剂组成(乙醚%)	苯		苯甲醚		苯二甲醚		硝基苯		苯甲酸甲酯	
	$t_r(\text{min})$	$W_{1/2}(\text{s})$	$t_r(\text{min})$	$W_{1/2}(\text{s})$	$t_r(\text{min})$	$W_{1/2}(\text{s})$	$t_r(\text{min})$	$W_{1/2}(\text{s})$	$t_r(\text{min})$	$W_{1/2}(\text{s})$
0	3.68	5.88	4.42	6.83	7.07	9.63	11.17	16.63	×	×
0.75	3.27	5.92	3.73	6.20	5.62	7.02	7.50	10.58	×	×
2.0	3.08	5.03	3.42	5.03	4.02	7.70	5.37	8.15	26.18	36.0
5.0	2.85	4.80	3.08	5.08	4.21	7.15	4.68	7.22	11.68	15.25
10.0	*	*	2.93	5.10	4.96	6.20	*	*	7.47	10.55

注:色谱柱 250mm×2mm i.d., 内填充有 5 μm 醇羟基载体, 流量 0.3ml/min, 流动相为正己烷/乙醇; ×表示由于二峰重叠, 无法测定半峰宽值; *表示该组由于保留时间太长无法测定半峰宽和保留值.

表 2.3 反相色谱系统中样品各组分在不同强组分浓度冲洗下的保留值和半峰宽值

冲洗剂组成(甲醇/水)	苯		萘		茚烷		葱		芘		蒽	
	k'	$W_{1/2}(\text{s})$	k'	$W_{1/2}(\text{s})$	k'	$W_{1/2}(\text{s})$	k'	$W_{1/2}(\text{s})$	k'	$W_{1/2}(\text{s})$	k'	$W_{1/2}(\text{s})$
95/5	1.06	3.57	1.40	3.93	2.02	4.37	2.18	4.50	2.89	5.01	3.47	5.28
87/13	1.40	3.95	2.15	4.59	3.45	5.49	3.94	5.79	5.57	6.93	7.26	8.43
79/21	2.00	4.56	3.55	5.64	6.43	7.92	7.89	8.70	11.57	12.66	16.79	17.58
67/33	3.49	5.64	8.32	9.18	18.4	19.44	24.3	24.0	38.2	37.8	64.7	×
55/45	6.51	7.68	21.85	21.12	59.7	×	88.15	×	148.7	×	293.6	×

注:色谱柱为 125mm×4.6mm i.d., 内填充有 3 μm Nucleosil-C₁₅, 流动相流量 1.2 ml/min; ×由于色谱峰太宽无法测定.

时的保留值和半峰宽值.

把表中的半峰宽值与保留值作线性回归结果如图2.2和图

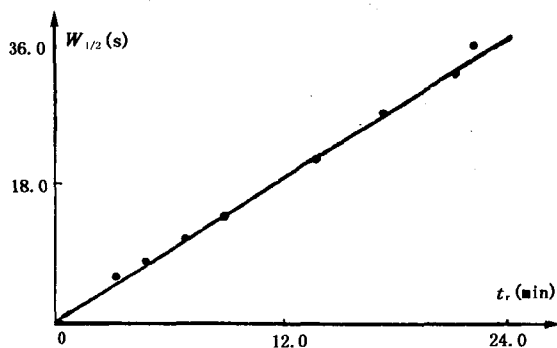


图2.2 表 2.2 中半峰宽值与保留时间的线性回归结果

$$W_{1/2} = 2.465 + 1.471 t_r$$

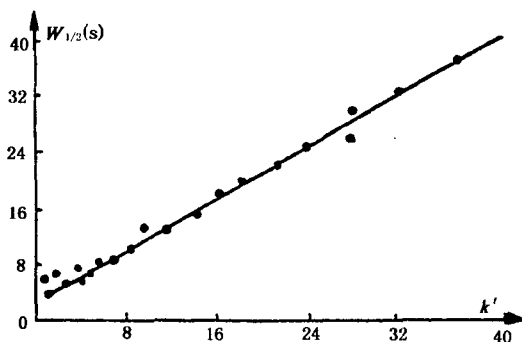


图2.3 表 2.3 中半峰宽值与容量因子 k' 间线性回归结果

$$W_{1/2} = 2.712 + 0.995 k'$$

2.3所示. 回归结果表明在其它操作条件保持不变, 只改变流动相中强组分浓度时的色谱峰半宽度与保留值间存在较好的线性关系. 表2.4 是样品各组分在反相色谱梯度冲洗流出柱末端时的虚拟保留值和实测的色谱峰宽. 把表2.3 与表2.4 中的半峰宽与保

留值和虚拟保留值一起线性回归, 结果如图2.4所示.

表 2.4 在梯度冲洗条件下的柱末端 k'_f 和 $W_{1/2}$ 值

梯度种类	样品	溶质流出 柱尾的时间 (s)	流出柱尾时的 冲洗剂组成 (甲醇/水)	流出柱尾时 的容量因 子 k'_f 值	$W_{1/2}$ (s)
20 min 线性梯度 从 40% A→90% A	苯	135	74.08/25.92	2.48	4.32
	萘	280	75.36/24.33	4.44	6.00
	萘烷	414	77.90/22.10	7.07	8.16
	葱	494	97.24/20.76	7.36	8.66
	茈	631	81.52/18.48	9.05	9.32
	蒎	775	83.95/16.05	9.97	10.02
15 min 线性梯度 从 50% →90% A	苯	177	78.10/21.90	2.08	4.20
	萘	244	79.25/20.75	3.52	5.04
	萘烷	346	81.15/18.85	5.46	6.42
	葱	398	82.10/17.90	5.96	7.12
	茈	495	93.90/16.10	7.43	8.28
	蒎	599	85.70/14.30	8.36	8.82

注: 实验条件与表 2.3 中相同;

A, B 泵的冲洗剂组成分别为 95/5 和 55/45 的甲醇/水.

§ 2.3.2 色谱指数修正模型中参数的规律性

人们通常认为色谱峰是对称的高斯峰, 其实在实验中很难获得真正的高斯峰, 一般都是拖尾的不对称峰, 拖尾色谱峰可用指数修正的高斯模型来描述^[28]:

$$h(t) = \frac{A}{\sigma\tau 2\pi} \exp\left[-\left(\frac{t_r - t_g - t'}{2\sigma}\right)^2 - \frac{t'}{\tau}\right] dt' \quad (2.55)$$

式中, A 为色谱峰面积, σ 是反映峰展宽的高斯峰的标准偏差, τ 是反映色谱峰拖尾程度的拖尾因子常数, t_r 是峰的保留时间, t_g

是峰质心点的保留时间, t' 是虚拟积分变量. 我们从实验中发现并从理论上证明 σ, τ 和保留值存在线性关系^[29~31]:

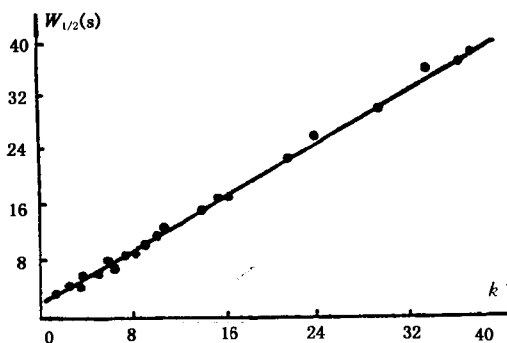


图2.4 表 2.3 和表 2.4 中半峰宽与 k_f' 和 k_t' 间的线性回归结果

$$W_{1/2} = 2.097 + 0.906 k' \quad (k_f')$$

$$\left. \begin{aligned} \sigma &= a_1 + 1) b_1 t_r \\ \tau &= a_2 + b_2 t_r \end{aligned} \right\} \quad (2.56)$$

利用这一结果可用于色谱全谱图的拟合, 还可用于不完全分离色谱峰的定量, 对提高非对称峰的定量精度也很有帮助.

影响色谱峰的不对称因素主要有以下几点: (1) 吸附等温线的非线性; (2) 溶质与固定相表面有较强的吸附作用力, 使得 k_d 很小, 传质很慢; (3) 柱外检测器体积对色谱峰的拖尾有很大影响; (4) 其它柱结构死体积也能产生色谱峰的拖尾现象.

参 考 文 献

- [1] A. J. P. Martin and R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941).
- [2] A. T. James and A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, **50**, 679 (1950).
- [3] J. C. Giddings, *Dynamics of Chromatography*, Marcel Dekker, New York, 1965.
- [4] 卢佩章、戴朝政著, 《色谱基础理论》, 科学出版社, 北京, 1997.
- [5] E. Glueckauf, *Trans. Faraday Soc.*, **51**, 34 (1955).

- [6] A. B. Littlewood, *Gas Chromatography*, 2nd edition, Academic Press, New York, 1970.
- [7] A. S. Said, *Theory and Mathematics of Chromatography*, Schwetzinger Verlag-drucberic GmbH, Schwetzinger, p. 161, 1981.
- [8] 卢佩章、王俊德整理,《气相色谱法》,旅大化学学会,1964.
- [9] J. C. Giddings, *J. Chem. Edu.*, **35**, 588 (1958).
- [10] J. H. Knox and M. Saleem, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 82 (1972).
- [11] J. C. Chen and S. G. Weber, *Anal. Chem.*, **55**, 127 (1983).
- [12] S. G. Weber and P. W. Carr, *High-Performance Liquid Chromatography*, P. R. Brown and R. A. Hartwick Ed., John Wiley and Son, New York, p. 1, 1989.
- [13] J. H. Knox, *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 352 (1977).
- [14] 卢佩章、张玉奎、包绵生, *中国科学 (B辑)*, **27**, 882 (1984).
- [15] R. P. W. Scott and P. Kucera, *J. Chromatogr.*, **169**, 51 (1979).
- [16] 卢佩章、周良模, *中国科学院大连化学物理研究所研究报告集刊, 第三集*, p. 16, 1964.
- [17] 陈诵英、彭少逸, *色谱*, **1**, 6 (1984).
- [18] Cs. Horvath and H. J. Lin, *J. Chromatogr.*, **149**, 43 (1978).
- [19] H. W. Hethcate and C. Deliss, *J. Chromatogr.*, **240**, 283 (1982).
- [20] H. Poppe and J. Paanakker, *J. Chromatogr.*, **204**, 77 (1981).
- [21] Cs. Horvath and H. J. Lin, *J. Chromatogr.*, **126**, 401 (1976).
- [22] 邹汉法、张玉奎、卢佩章, *色谱*, **4**, 328 (1986).
- [23] J. G. Atwood and M. J. E. Golay, *J. Chromatogr.*, **218**, 97 (1981).
- [24] K. Hoffmann and I. Halasz, *J. Chromatogr.*, **199**, 3 (1980).
- [25] C. E. Evans and V. L. McGuffin, *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 1907 (1988).
- [26] Zou Han-Fa, Zhang Yu-Kui, Dong Li-Fu and Lu Pei-Zhang, *Chinese J. Chemistry*, **9**, 237 (1991).
- [27] 邹汉法、张玉奎、董礼孚、包绵生、卢佩章, *色谱*, **6**, 1 (1988).
- [28] W. W. Yau, *Anal. Chem.*, **49**, 395 (1977).
- [29] 张玉奎、董礼孚、包绵生、周桂敏、卢佩章, *分析测试通报*, **3** (2), 16 (1984).
- [30] Li Haochun, Lin Binsheng, Luo Chunrong and Lu Peizhang, *Scientia Sinica (Series B)*, **12**, 1248 (1986).
- [31] 张玉奎、邹汉法、包绵生、董礼孚、卢佩章, *色谱*, **7**, 70 (1989)

第三章 液相色谱的热力学过程

与气相色谱不同，液相色谱主要通过改变流动相的组成来调节色谱柱的保留值范围和选择性，以适应不同样品分离分析的需求；同时，建立各种液相色谱操作参数影响保留值的定量关系式，对液相色谱柱系统的选择，分离条件的最优化和发展新的分离模式具有很大的指导意义。液相色谱热力学的本质就是研究色谱操作参数影响保留值的规律性。

§ 3.1 中性化合物的物理化学模型

中性化合物在液相色谱中的分离主要基于溶质与固定相和流动相间分子作用力的差别。分离中性化合物的液相色谱模式主要包括液固吸附、键合正相和反相色谱这三种模式。至今已有很多色谱分离的物化模型来表达中性化合物在这一大类液相色谱分离模式中的分离过程。图3.1是四种常见的液相色谱分离机理的示意图。

§ 3.1.1 顶替吸附模型

此模型假定在吸附剂表面的活性吸附点上溶质和溶剂分子竞争吸附，溶质分子与流动相溶剂分子间的作用不予考虑，因为在吸附相也有类似的作用，相互抵消。这个概念是 Snyder^[1]和 Soczewinski^[2]提出的。在进行色谱分离时，吸附剂表面首先被溶剂分子覆盖形成一单分子层。当溶质分子从流动相引入后，则会顶替掉吸附剂表面上原来覆盖的溶剂分子而被吸附（图3.1单层吸附模型所示）。假定吸附剂表面是均匀的，被吸附的分子是平躺在表面上，所以每个吸附分子所需要的吸附面积可以从它的分

子尺寸计算出来。因为溶质和溶剂的分子体积不一样，一般说来前者大于后者，所以每吸附一个溶质分子（E），便需顶替下来一个或几个溶剂分子（S）。如果用质量作用方程式表示这个顶替过程，则有：

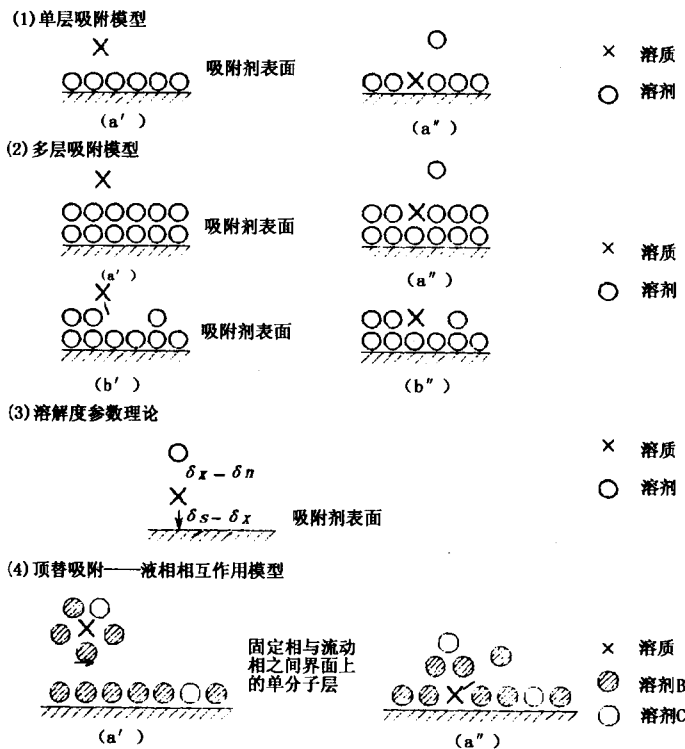


图3.1 液-固色谱中四种吸附模型的比较



式中 n 表示每吸附一个溶质分子需要顶替下来的溶剂分子数, 下标 M 和 S 分别表示流动相和固定相. 这个吸附平衡过程的净吸附自由能 ΔG 为

$$\Delta G = \Delta G_{E,S} + \Delta G_{S,M} - \Delta G_{E,M} - \Delta G_{S,S} \quad (3.2)$$

这里等号右端的四个 ΔG 分别表示溶质和溶剂在固定相和流动相的无量纲摩尔自由能。

在大多数液固吸附色谱系统中,流动相的自由能项 $\Delta G_{S,M}$, $\Delta G_{E,M}$ 远小于吸附相的自由能 $\Delta G_{S,S}$ 和 $\Delta G_{E,S}$ 。若不考虑流动相中各相互作用的影响,则式(3.2)可简化成

$$\Delta G = \Delta G_{E,S} - n\Delta G_{S,S} \quad (3.3)$$

令单位固定相表面积上溶质和溶剂的吸附自由能 $\Delta G_{E,S}$ 和 $\Delta G_{S,S}$ 分别用 S° 和 ϵ° 表示, n 即为在吸附态时一个溶质分子和一个溶剂分子所需要的表面积之比,若用 A_E 表示溶质分子的无量纲面积,则有:

$$\Delta G = S^\circ - A_E \epsilon^\circ \quad (3.4)$$

容量因子 k' 与单位质量吸附剂上被单分子层溶剂覆盖时的吸附体积 V_S (为吸附剂比表面积的函数) 和 ΔG 之间有如下关系:

$$\log k' = \log V_S + \alpha' \Delta G \quad (3.5)$$

α' 为吸附剂的活性系数,取决于吸附剂的化学性质和水的覆盖量。对于氧化铝, $\alpha' = 1$; 对于硅胶 $0.7 < \alpha' < 1$ 。由于 α' 不随实验条件而变化,故上式可写成:

$$\log k' = \log V_S + S^\circ - \epsilon^\circ A_E \quad (3.6)$$

这就说明液-固色谱中溶质的保留值与吸附剂的表面积,溶质的吸附能和溶剂强度(按定义,单位活性吸附剂表面上溶剂的吸附能 ϵ° , 即溶剂强度)等有关。考虑到溶质和溶剂间的相互作用, Snyder 后来又在上式中加入一个二级溶剂效应修正项 δ , 以弥补忽略溶剂效应之不足。

在 A, B 二元溶剂系统中,混合的溶剂强度 ϵ_{AB} 随其中极性较强组分 B 的摩尔浓度 X 而变化,此时:

$$\epsilon_{AB} = \epsilon_A + \frac{\log [X_B 10^{\alpha' n_B (\epsilon_B - \epsilon_A)} + 1 - X_B]}{\alpha' n_B} \quad (3.7)$$

式中, n_B 为 B 组分的分子面积。当 ϵ_A 和 ϵ_B 相差较大,且 X_B 不太小时,上式可简化为

$$\epsilon_{AB} = \epsilon_A + \frac{\log X_B}{\alpha' n_B} \quad (3.8)$$

将式(3.8)代入式(3.6),可得到:

$$\log k' = A' - B' \log X_B \quad (3.9)$$

式中 A', B' 为常数.

Snyder 的顶替吸附模型用于水去活化的吸附剂及弱吸附的溶质和溶剂系统是比较成功的,而 Soczewinski 模型对于吸附能力较强的吸附剂或溶剂及溶质吸附能力较强的分离体系作了较好的说明.但是他们的这种模型只考虑了或主要考虑了固定相表面的吸附作用能,忽略了溶剂的作用和溶质分子构型对保留值的影响,因而适用范围受局限,表现在实验测定的 $\log k'$ 与 $\log X_B$ 并不总是线性的.

§ 3.1.2 溶质-溶剂相互作用模型

Scott 等人^[3,4]提出的溶质-溶剂相互作用模型(solute-solvent interaction),假定吸附剂表面先被流动相中极性较强组分完全覆盖,这时固定相表面处于稳定状态,溶质在两相对其产生的平衡力场中通过色谱柱.显然,这个覆盖不是单分子层的,这个模型又称“多层吸附”模型(见图 3.1 中的多层吸附模型).在氧化物型吸附剂的液-固色谱中,溶质、溶剂和固定相之间的作用以极性作用力 (F_p) 和色散力 (F_D) 为主,溶质在两相间的分配系数可以表示为

$$\begin{aligned} K &= \frac{\text{溶质和固定相的作用力} \times \text{相互作用概率}}{\text{溶质和流动相的作用力} \times \text{相互作用概率}} \\ &= \frac{F_p' f_1(T) C_P + F_D' f_2(T) C_D}{F_P f_3(T) C_P + F_D f_4(T) C_D} \end{aligned} \quad (3.10)$$

式中 $f(T)$ 表示相互作用概率是温度的某种函数,它还与极性组分的浓度 C_P 和色散基团的浓度 C_D 有关.

因为校正保留体积为 $V' = K\Phi_S$ (这里 Φ_S 为固定相的体积或总表面积),在式(3.10)中若忽略溶质与固定相间的色散力并取倒数,则:

$$\frac{1}{V'} = \frac{1}{\Phi_S} \cdot \frac{F_P f_3(T) C_P + F_D f_4(T) C_D}{F_P f_1(T) C_P}$$

在吸附剂表面积被极性组分覆盖完全 (C'_P 为常数) 的情况下, 上式可简化为

$$\frac{1}{V'} = A + BC_P \quad (3.11)$$

这个关系式表明校正保留体积的倒数与冲洗剂中极性组分的浓度 C_P 成线性关系. 当 C_P 大于 3% 或 2% 时, 在一定范围内实验值与理论值是吻合的, 但当 C_P 很小时, 由于吸附剂表面活性中心不能完全被极性溶剂组分所掩盖, 使实验值偏离直线, 这正反映了该模型仅考虑了溶质与溶剂间的相互作用, 而忽略了吸附剂表面上溶质与溶剂间的竞争吸附效应所造成的偏差.

§ 3.1.3 溶解度理论

Hildebrand 从溶剂的沸点出发, 用热力学的方法计算了溶解度参数 δ 作为溶剂极性的指标, 极性组分易溶解于 δ 大的溶剂, 非极性组分易溶解于 δ 小的溶剂^[5]. 因此 δ 值也可以作为液相色谱溶剂的极性指标. 溶解度参数的定义如下:

$$\delta = \frac{-\Delta E}{V} \quad (3.12)$$

式(3.12)中 V 为液体的摩尔体积 (cm^3); ΔE 为内聚能, 即 1mol 理想气体冷却变为液体所需释放的能量 (cal), ΔE 总是小于零.

Schoenmakers 等^[6,7]把溶解度理论应用于液相色谱中溶质在液相与固定相的分配过程, 建立了液相色谱溶解度理论模型 (见图 3.1 溶解度参数理论). 认为溶质在液-固相的分配过程是液-液分配过程, 溶质在液相色谱中的容量因子可表达为

$$k' = \frac{r_{iM}}{r_{iS}} \cdot \frac{n_S}{n_M} \quad (3.13)$$

式中, r_{iM} 和 r_{iS} 分别为溶质在流动相和固定相中的活度系数, n_S 和 n_M 为溶质在固定相和流动相中的摩尔数. 若定义纯液体作为

标准态,溶质在流动相和固定相中具有相同的标准态,则溶质 i 在相 f 中活度系数为:

$$\ln r_{if} = \frac{V_i}{RT}(\delta_i - \delta_f)^2 \quad (3.14)$$

把式(3.14)代入式(3.13),整理后可得:

$$\begin{aligned} \ln k' &= \ln r_{iM} - \ln r_{iS} + \ln \frac{n_S}{n_M} \\ &= \frac{V_i}{RT}(\delta_M + \delta_S - 2\delta_i)(\delta_M - \delta_S) + \ln \frac{n_S}{n_M} \end{aligned} \quad (3.15)$$

由式(3.15)可知:(1)如果 $\delta_M = \delta_S$,该系统对所有溶质的 k' 值均相同,这样的分离系统不能进行色谱分离;(2)若选择的流动相满足 $\delta_i = \frac{1}{2}(\delta_M + \delta_S)$,则 $k' = \frac{n_S}{n_M}$,通常 $\frac{n_S}{n_M} \ll 1$,因此溶质的保留时间非常短,分离效果并不好.若采用混合溶剂流动相,流动相的极性随溶剂组成的改变而变化.混合溶剂的极性参数 δ_{mix} 为

$$\delta_{\text{mix}} = \sum_P \Phi_P \delta_P \quad (3.16)$$

式中, Φ_P 和 δ_P 为溶剂 P 的体积分数和溶解度参数.

对于二元系统来说,式(3.16)可写成:

$$\delta_{\text{mix}} = \Phi_1 \delta_1 + \Phi_2 \delta_2 = \Phi_2(\delta_1 - \delta_2) + \delta_2 \quad (3.17)$$

将式(3.17)代入式(3.15),可以得到描述二元流动相冲洗剂组成对保留值影响的关系为

$$\ln k' = A\Phi^2 + B\Phi + C \quad (3.18)$$

式中:

$$A = \frac{V_i}{RT}(\delta_1 - \delta_2)^2$$

$$B = \frac{2V_i}{RT}(\delta_1 - \delta_2)(\delta_2 - \delta_i)$$

$$C = \frac{V_i}{RT}(\delta_2 - \delta_S)(\delta_2 + \delta_S - 2\delta_1) + \ln \frac{n_S}{n_M}$$

这一关系式表明在液相色谱中流动相组成对保留值的影响不

是线性关系. 对于三元和四元流动相由溶解度理论得到的保留值变化规律关系式分别为

$$\ln k' = A_1\Phi_1^2 + A_2\Phi_2^2 + B_1\Phi_1 + B_2\Phi_2 + C + D\Phi_1\Phi_2 \quad (3.19)$$

$$\begin{aligned} \ln k' = & A_1\Phi_1^2 + A_2\Phi_2^2 + A_3\Phi_3^2 + B_1\Phi_1 + B_2\Phi_2 + B_3\Phi_3 + C \\ & + D_{12}\Phi_1\Phi_2 + D_{13}\Phi_1\Phi_3 + D_{23}\Phi_2\Phi_3 \end{aligned} \quad (3.20)$$

式(3.19)和式(3.20)中 $\Phi_i (i=1\sim 3)$ 是流动相中冲洗剂强组分浓度, $A_i, B_i (i=1\sim 3)$ 和 $D, D_{12}, D_{13}, D_{23}$ 是与溶质性质, 流动相和键合固定相性质相关的常数. 这一理论在一定范围内能较好地描述流动相组成对保留值的影响. 但是在反相色谱中水的浓度大于 90% 时, 误差较大.

§ 3.1.4 顶替吸附-相互作用模型

卢佩章等^[8,9]在 80 年代初期提出了顶替吸附-相互作用模型. 如图 3.1 所示, 顶替吸附-相互作用模型既考虑到溶质和溶剂在固定相表面的竞争顶替吸附效应, 又充分考虑到了溶剂和溶质的相互作用, 是一个比较合理的液相色谱保留过程的物理化学模型. 为了更好地揭示液相色谱分配过程中分子运动的本质和分子结构对微观运动的影响, 卢佩章等人采用统计热力学的方法推导出二元流动相液相色谱中溶质保留值变化规律式为

$$\ln k' = a + b \ln C_b + c C_b \quad (3.21)$$

式中:

$$\begin{aligned} a = & \ln \frac{N_S}{V_S} + \ln \beta + \frac{\partial N_{B1}}{\partial N_A} \ln \left[\left(\frac{h^2}{2\pi m_{B_1} kT} \right)^{2/3} / k_1 v_1 \right] \\ & + \frac{3}{2} \ln \frac{h^2}{2\pi m_A kT} + \frac{1}{kT} \left[(K_{AB_0} - K_{AB_0}^a) x_{AB_0} - x_A^a \right. \\ & \left. + \frac{\partial N_{B1}}{\partial N_A} (K_{B_1 B_0} - K_{B_1 B_0}^a) x_{B_1 B_0} - x_{B_1}^a \right] \\ b = & \left(1 - \frac{1}{n_1} \right) \frac{\partial N_{B_1}}{\partial N_A} \end{aligned}$$

$$c = \frac{1}{kT} \left\{ (K_{AB_1} - K_{AB_1}^a) x_{AB_1} - (K_{AB_0} - K_{AB_0}^a) x_{AB_0} + \frac{\partial N_{B_1}}{\partial N_A} \right. \\ \left. \left[(K_{B_1B_1} - K_{B_1B_1}^a) x_{B_1B_1} - (K_{B_1B_0} - K_{B_1B_0}^a) x_{B_1B_0} \right] \right\}$$

式中脚注 A 和 $B_i (i=0,1)$ 指溶质和溶剂 i , h 和 k 是 Planck 和 Boltzmann 常量, k_1 和 n_1 是 Freundlich 吸附等温线的参数, m_A 和 m_{B_1} 是溶质和强溶剂的分子量, T 是绝对温度, v_1 是强溶剂的摩尔体积, x_{AB_1} , x_{AB_0} , x_A^a , $x_{B_1B_1}$, $x_{B_1B_0}$ 和 $x_{B_1}^a$ 分别是溶质与强溶剂、溶质与弱溶剂、溶质与固定相、强溶剂与强溶剂、强溶剂与弱溶剂和强溶剂与固定相的相互作用, 这里假定了氢键作用能与溶剂浓度成正比例关系; β 是相比. 式(3.21)中 α 是溶质与固定相的相互作用能, 溶质同流动相中的溶剂 B_0, B_1 的相互作用能和溶质的分子体积相关的常数; b 是与固定相表面溶质分子顶替流动相中强溶剂 B_1 的分子数相关的常数; c 为溶质与流动相中溶剂的作用能相关的常数. 对于多元流动相液相色谱体积, 流动相中强组分浓度影响保留值的关系式为^[10]:

$$\ln k' = \alpha + \sum_i b_i \ln C_{B_i} + \sum_i C_{B_i} \quad (3.22)$$

式(3.21)和式(3.22)存在的问题是当冲洗剂强组分浓度 $C_B \rightarrow 0$ 时, 这两个基本关系式的物理意义不清楚. 近年来, 卢佩章等人又对这两个关系式作了修正, 得到以下的保留值变化规律式^[11]:

$$\ln k' = \alpha + b \ln \frac{C_B}{Q_B} + c C_B \quad (3.23)$$

式(3.23)中 Q_B 是代表在固定相表面吸附的强溶剂的摩尔体积分数. 当流动相的强溶剂浓度 C_B 不是太低时 $Q_B \approx 1$, 式(3.23)还原为式(3.21)的形式. 而在强溶剂浓度 C_B 趋于零时, 则有:

$$\lim_{C_B \rightarrow 0} \frac{C_B}{Q_B} = \lim_{\substack{C_B \rightarrow 0 \\ Q_B \rightarrow 0}} \left(\frac{1 - C_B}{1 - Q_B} \right) = \text{常数} \quad (3.24)$$

式(3.24)表明当流动相中强溶剂浓度趋于零时溶质的保留值 k' 为一常数.

§ 3.1.5 疏溶剂理论

当一个非极性溶质或分子中的非极性部分与极性溶剂相接触时,相互产生斥力,自由能(ΔG)增加,这是一个熵减小的过程.为了弥补熵的损失,溶质分子中的非极性部分的结构取向将导致在极性溶剂中形成一个“空腔”.这种效应称为疏水或疏溶剂效应. Sinanoglu 等^[12]讨论了疏溶剂效应的动力学过程.而 Horvath 等^[13]将这一原理用于反相高效液相色谱中,根据溶质、溶剂和固定相之间的能量平衡导出了利用物质的一般物理化学性质预测溶质保留值的表达式.就是说反相色谱中溶质保留主要不是由于溶质分子与键合相之间弱的非极性相互作用,而是由于溶质与极性溶剂间的排斥力,促使溶质与键合相烃基发生疏水缔合.

假定非离子型溶质(S)与键合相的非极性配位烃基(L)之间的疏溶剂缔合(SL)是可逆的:



这个过程的平衡常数(K)与自由能变化(ΔG)的关系为

$$\ln K = \frac{-\Delta G}{RT} \quad (3.26)$$

R 是通用气体常数, T 是绝对温度.当固定相与流动相的体积比为 β 时从色谱理论可知:

$$k' = \beta K \quad (3.27)$$

$$\ln k' = \Phi - \left(\frac{\Delta G}{RT} \right) \quad (3.28)$$

式中 $\Phi = \ln \beta$. 这个缔合过程的自由能变化在数学上可以考虑是两个主要部分的加合.一是在溶质中形成一个其大小和形状与溶质相适应的空腔所需要的能量(ΔG_c),二是溶质进入空腔后与周围溶剂之间的相互作用能(ΔG_{int}),同时还应考虑伴随有“自由体积”的变化, $RT \ln \left(\frac{RT}{P_0 V} \right)$, 这里 P_0 为标准大气压, V 为溶剂的摩尔体积,即

$$\Delta G = \Delta G_c + \Delta G_{\text{int}} + RT \ln \left(\frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (3.29)$$

其中

$$\Delta G_c = -N\gamma\Delta A - N\gamma A_S(\kappa_e - 1) \quad (3.30)$$

而

$$\Delta A = A_S + A_L - A_{\text{SL}} \quad (3.31)$$

这里 A_S, A_L 和 A_{SL} 为溶质、固定相配基和缔合物的表面积, ΔA 为 S 和 L 缔合时的表面积变化, γ 为溶剂的表面张力, N 为阿佛加德罗常量, κ_e 为把宏观表面张力转换为微观的一个因子。

ΔG_{int} 包括两项, 分子间范德华能对缔合的贡献 (ΔG_v 和静电能的贡献 (ΔG_z):

$$\Delta G_{\text{int}} = \Delta G_v + \Delta G_z \quad (3.32)$$

$$\Delta G_v = -\omega - \alpha\Delta A \quad (3.33)$$

$$\Delta G_z = \Delta Z/\epsilon \quad (3.34)$$

这里 ω 和 α 是与溶剂有关的参数, ϵ 为溶剂的介电常数, 而

$$\Delta Z = Z_{\text{SL}} - Z_S - Z_L \quad (3.35)$$

Z 为溶剂、溶剂和缔合物的偶极矩、电荷分布及分子大小等静电因素对缔合的综合贡献。

将式(3.28)到式(3.30), 式(3.32)到式(3.34)合并起来, 则得:

$$\begin{aligned} \ln k' = & \Phi + \frac{1}{RT} \left[\Delta A(N\gamma + a) + NA_S(\kappa_e - 1) \right. \\ & \left. + \omega - \frac{\Delta Z}{\epsilon} \right] + \ln \frac{RT}{P_0 V} \end{aligned} \quad (3.36)$$

就是说如果溶质和溶剂及固定相之间的作用是疏水作用, 原则上就可以按式(3.36)根据三方面的基本物化参数估计溶质的保留值。这个缔合过程可用图3.2表示。当非极性溶质或溶质分子中的非极性部分引入到极性的流动相中时, 分子中的非极性部分总是趋向与其它非极性部分簇集在一起, 这样可以减少与极性溶剂的接触面积, 使体系能量最低。这是由于如图3.2中黑箭头所示

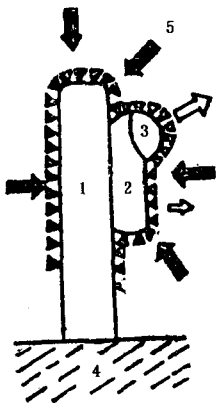


图3.2 疏溶剂缔合过程示意图

1. 配位羟基; 2. 溶质的非极性部分; 3. 溶质的极性部分; 4. 基体表面; 5. 溶剂相。

的疏溶剂力的缘故。流动相的表面张力越高，这种束缚力就越强。相反，若溶质分子中的极性官能团存在时，则和极性溶剂的作用力（图中空心箭头所示）增加，不利于缔合。

利用疏溶剂效应可以解释反相色谱中许多关于保留值和选择性的规律，例如同系物随烷基链长的增加， k' 有十分显著的增大。同理含不等量苯核的多环芳烃也是如此。即使是极性化合物，也可在反相模式中找到良好的分离条件。因为极性溶质分子中非极性骨架总是有差别，而极性基团与流动相之间的作用力也有差别。

§ 3.1.6 以分子作用力为基础的液相色谱理论模型的比较

随着色谱保留机理研究的不断深入，液-固吸附色谱被认为是以顶替吸附为主导的分离模式。因此一般认为顶替吸附模型就是液-固色谱保留值理论。但事实上，液-固色谱的顶替吸附理论在极性不太强的二元流动相中是比较成功的理论，因为此时的色谱分离过程是以溶质分子与固定相的表面相互作用为主，但随着溶剂B的极性变大，或者溶剂B、C的极性均增加的二元体系中，表面相互作用对保留值的支配作用逐渐下降，顶替模型的基本假设就会偏离实际色谱过程。另一方面，溶质在极性吸附剂表面的吸附方式与分子中的官能团结构，以及整个分子构型有关，也是顶替模型产生例外的原因之一。为了修正由于溶剂极性增加引起的偏差，Snyder^[14]在他的基本关系式中半经验地加上二级溶剂效应修正项 Δe_{as} ，以弥补由于忽略液相的相互作用引起的偏差，但这在实际工作中并没有起到明显的效果，因为即使是粗

略地估计 Δ_{eas} 的影响也有不少困难。顶替吸附模型描述以表面相互作用为主的色谱分离过程是成功的，但正如 Snyder 自己所述^[15]：由于（1）假设分子的吸附方式一样，（2）忽略了液相作用能，因此他的理论只能在一定范围内适用。

多层吸附模型反映了一些特殊的溶剂体系的色谱过程，多层吸附模型理论的主要优点是充分注意到溶质-溶剂相互作用对溶质保留行为的影响，从而打破了表面作用只能发生在硅胶表面的传统观念，并以概率的概念引入了流动相浓度参数。多层吸附理论的核心是强调液相作用能的某些流动相体系中对溶质的保留过程有支配作用，但是它忽略了顶替模型理论最成功的假设——发生在表面的顶替过程。由于溶质-溶剂间作用力只有在表面作用（无论是吸附理论中的硅胶表面，还是多层吸附理论中的第一层溶剂表面）的基础上才能影响到溶剂的保留行为。因此多层吸附模型在理论和实践上就存在一定的局限性。在液-固吸附和正相色谱中应用多层吸附理论的工作并不太多。

溶解度参数理论导出的保留值变化规律式(3.18)主要强调了液相色谱中溶质与固定相和流动相的相互作用，理论基础比较坚实，它能在一定范围内较好地解释色谱实验数据。其缺点是忽略了顶替吸附这一正相色谱中非常重要的特征，因此其在反相液相色谱中的应用比在吸附色谱中的效果更好。

疏溶剂理论从溶质与流动相和固定相作用的情况出发，能在一定范围内比较好地定性解释反相液相色谱中的实验现象。但这一理论不适用于正相色谱或液-固吸附色谱体系。疏溶剂理论的另一个缺点是对色谱保留现象都是定性解释，缺乏定量的关系式表达，因此其实用性不很强。

卢佩章等人提出的顶替吸附-相互作用模型，不但考虑到了正相色谱中的顶替吸附效应，而且考虑到了正相和反相色谱中普遍存在的分子间相互作用的影响，因此能比较好地解释正相色谱和反相色谱中的保留值的变化规律，具有普遍的适用性。在冲洗剂极性不太强的中等极性二元流动相中。由于 cC_b 项的影响较

小, 所以式(3.21)可以简化为顶替吸附理论得到的式(3.9). 在反相液相色谱中, 由于顶替吸附效应较小, 所以在一定的冲洗剂强组分浓度范围内, 式(3.21)中的 $b \ln C_b$ 项可以忽略. 因此式(3.21)又可以简化成:

$$\ln k' = a + cC_b \quad (3.37)$$

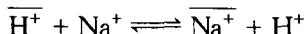
式(3.37)就是通常在反相色谱中所观察到的 $\ln k'$ 与冲洗剂强组分浓度 C_b 呈线性关系的现象.

§ 3.2 基于离子静电作用力的色谱保留机理

离子交换色谱、离子色谱和离子对色谱的分离过程主要是由离子间的静电作用力所决定, 相应的保留机理与分子作用力为基础的其它液相色谱分离模式的保留机理有很大差别. 为了定量表达流动相组成对以静电作用为基础的分离模式中溶质保留值的影响, 人们也发展出各种不同的理论模型.

离子交换平衡理论是用于解释静电作用为主导的离子交换和离子色谱分离模式中观察到的实验现象的理论体系.

当氢型阳离子交换树脂浸泡于氯化钠电解质溶液中, 将发生等当量离子交换反应:



式中离子符号上加一横线表示为树脂相内可交换离子. 该反应的平衡常数为

$$K = \frac{[\overline{H^+}][Na^+]}{[Na^+][H^+]}$$

阴离子交换树脂对阴离子具有相似的交换反应. 设在分离柱内有被测定的多价阴离子 A^{y-} , 它和 B^{x-} 相互竞争占领阴离子交换树脂功能基中的正电荷位置, 可把 B^{x-} 看作是另一个被测阴离子或者看作是洗脱液中的阴离子, 而且 B^{x-} 已占据于树脂中. A^{y-} 与 B^{x-} 的交换反应及平衡常数为



$$K_B^A = \frac{[A^{y-}]^x \cdot [B^{x-}]^y}{[A^{y-}]^x \cdot [B]^y} \quad (3.38)$$

其中方括弧代表离子浓度:溶液相为 mmol/ml,树脂相是 mmol/g. 平衡常数 K_B^A 表示了溶液中 A 离子及 B 离子对交换树脂的亲合力大小的衡量. 平衡常数随离子的性质(电荷、离子半径及水合离子半径、结构),离子交换剂的性质(交换基、骨架材质),洗脱液的种类、浓度、pH 值而变化.

若上述平衡发生于 1 价阴离子之间,平衡常数可简化为

$$K_B^A = \frac{[A][B]}{[A][B]}$$

$$K_B^A = \frac{[A]/[A]}{[B]/[B]} \quad (3.39)$$

式中 K_B^A 称为离子交换反应的选择系数,也是平衡常数. 由式(3.39)可知,选择系数反映了树脂对于离子 A 和 B 的亲合力的大小,若 $K_B^A = 1$,则:

$$\frac{[A]}{[A]} = \frac{[B]}{[B]}$$

这表示树脂对两种离子的亲合力相等. 若 $K_B^A > 1$,则

$$\frac{[A]}{[A]} > \frac{[B]}{[B]}$$

这表示树脂对 A 的亲合力大于树脂对 B 的亲合力. 反之,若 $K_B^A < 1$,则有

$$\frac{[A]}{[A]} < \frac{[B]}{[B]}$$

即表示树脂对 A 的亲合力小于树脂对 B 的亲合力.

尽管选择系数在不同实验条件下测到的数值不同,但仍能用它来表达离子交换平衡情况.

分配系数也能反映树脂对不同离子亲合力的大小,它有两种表示方式:一个是重量分配系数,另一个是容量分配系数.

重量分配系数用 K_d 来表示(也有用 D_g 的),其定义为

$$K_d = \frac{\text{在树脂相上离子的量} / \text{树脂重量(g, 干态)}}{\text{在溶液中离子的量} / \text{溶液体积(ml)}} \quad (3.40)$$

对于 1 价离子间的离子交换反应, 分配系数与平衡常数的关系为

$$K_d = [\overline{A}]/[A] = K \cdot [\overline{B}]/[B] \quad (3.41)$$

容量分配系数又称体积分配系数或柱分配系数, 用 D_V 表示(也有用 K_d 的), 其定义为

$$D_V = \frac{\text{在树脂相上离子的量} / \text{树脂体积(ml)}}{\text{在溶液中离子的量} / \text{溶液体积(ml)}} \quad (3.42)$$

重量分配系数和容量分配系数之间的关系是:

$$D_V = \rho K_d \quad (3.43)$$

式中 ρ 为树脂床层密度:

$$\rho = \frac{\text{干树脂重量(g)}}{\text{树脂床体积(ml)}} \quad (3.44)$$

树脂床密度随树脂种类和溶液组成而变化, 一般约为 2.5.

柱内树脂相中被交换离子总量(mmol)和溶液相中该离子总量(mmol)的比值, 被定义为容量因子 k' :

$$k' = \frac{\text{树脂相中离子总量}}{\text{溶液相中离子总量}} = K_d \cdot \frac{\text{树脂的总克数}}{\text{溶液的毫升数}} \quad (3.45)$$

在离子交换色谱中, 样品离子 A^{y-} 的量通常小于树脂总交换量的 2%, 树脂上主要是洗脱液的阴离子 B^{x-} 占据全部交换基, $[\overline{B}]^y \approx [\text{容量}]^y$, $[B]^y$ 是洗脱液浓度, 即 $[B]^y \approx [\text{洗脱液}]$. 把式(3.38)代入式(3.45), 得离子交换色谱中洗脱液盐浓度对溶质保留值影响的关系式为

$$\log k' = -\frac{y}{x} \log[\text{洗脱液}] + \text{常数} \quad (3.46)$$

式(3.46)表明在离子交换色谱中, 洗脱液浓度与溶质保留值以对数的线性关系存在, 这一关系式的斜率由溶质的电荷数与洗脱液同号离子电荷数的比值决定. 离子色谱与离子交换色谱的保留机理是一致的. 因此式(3.46)在离子交换和离子色谱的实际应用中已被普遍接受. 事实上式(3.46)与液-固色谱中顶替吸附理论所得

到的关系式(3.9)形式上完全相同。

近年来,Stahlberg 等^[16]从 Poisson-Boltzman 方程出发,推导出流动相中无机盐浓度影响保留值的基本关系式为

$$\ln k' = \frac{A_P \lambda_P^2}{F(2RT\epsilon_0\epsilon_T)^{1/2}} \cdot \frac{1}{I} + \ln \beta \quad (3.47)$$

式中, β 为离子交换或离子色谱中的相比, A_P 是溶质分子与固定相表面作用的有效表面积, R 是普适气体常量, T 是绝对温度, λ_P 是固定相表面的电荷密度, F 是法拉第常量, ϵ 和 ϵ_T 分别为流动相的介电常数和真空介电常数, I 是流动相的离子强度。式(3.47)表明 $\ln k'$ 与 I 的倒数存在线性关系。从理论上讲,式(3.47)的静电作用模型与实际过程更接近,其在离子交换和离子色谱中的实用性有待于进一步考察。

反相离子对色谱是在反相色谱系统中加入适当的带电荷离子对试剂后分离离子性和中性化合物的色谱分离分析技术^[17]。由此可知在这一体系中不但存在反相色谱中所具有的分子作用力特征,而且也引入了离子交换色谱中所具有的静电作用特征。可以推断反相离子对色谱是同时具有静电和分子作用力的分离模式。很多色谱工作者对离子对色谱的保留机理进行了广泛的研究。从已有的研究成果来看,其保留机理可以分成两大类^[18]:(1)计量模型主要包括离子对,动态离子交换和动态复合离子交换模型;(2)非计量模型包括离子作用,静电作用和统计热力学模型。以上这些模型都能在一定范围内解释离子对色谱中观察到的实验现象,这些模型的具体处理和应用可参阅相关文献。从模型的合理性和所得到的结果的实用性而言,由邹汉法等人^[19,20]建立的统计热力学模型具有更广泛的意义,这里我们对反相离子对色谱的统计热力学模型作一介绍。

考虑由溶质 A 和溶剂 B_0, B_1 组成的流动相中加入少许离子对试剂 Q,在推导反相离子对色谱的保留值变化规律时,提出几点假定:

1. 离子对试剂在固定相和流动相之间形成动态平衡,并在

固定相表面形成双电层.

2. 离子对试剂只覆盖部分固定相表面, 双电层产生的静电作用力和未覆盖的固定相表面产生的分子作用力同时对有机离子起保留作用.

3. 流动相内部溶质和离子对试剂的位能场是均一的. 位能场主要由离子与离子间和离子与分子间的静电和分子作用力所决定.

4. 由于溶质离子数目相对于溶剂分子和离子对试剂数目要少 6 至 8 个数量级, 故可忽略溶质 A 之间的相互作用.

在以上几个假定的基础上, 应用统计热力学的处理方法导出的离子对试剂浓度 C_Q 和有机溶剂浓度 C_b 影响离子对试剂在固定相表面吸附量 n_Q 的关系式为

$$\ln n_Q = a' + b' \ln C_b + c' C_b + d' \ln C_Q + e' C_Q \quad (3.48)$$

式中, 参数 a' 主要由离子对试剂与固定相和流动相弱溶剂、无机离子的静电和分子作用力所决定; 参数 b' 主要由强溶剂与离子对试剂在固定相表面的竞争顶替吸附过程所决定; 参数 c' 则取决于离子对试剂与流动相中溶剂的分子作用力. d' 主要由离子对试剂自身在固定相表面的顶替吸附过程相关, 而参数 e' 主要取决于离子对试剂相互间的静电和分子作用力的大小. 在恒定有机溶剂浓度 C_b , 且离子对试剂浓度 C_Q 较低时, 离子对试剂相互作用可以忽略, 亦即 $e' C_Q \rightarrow 0$, 因此式(3.48)可简化成:

$$\ln n_Q = a'_1 + d'_1 \ln C_Q \quad (3.49)$$

如恒定流动相中的离子对试剂浓度 C_Q , 由于反相色谱中以分子作用为主导的顶替吸附作用较弱, 亦即 $b' \ln C_b \rightarrow 0$, 式(3.48)又可简化成:

$$\ln n_Q = a'' + c' C_b \quad (3.50)$$

式(3.49)和(3.50)表明, 在恒定其它参数时, 离子对试剂在固定相表面的吸附量 $\ln n_Q$ 与 C_b 或 $\ln C_Q$ 存在线性关系. 图 3.3 和图 3.4 是实验数据按式(3.49)和(3.50)拟合结果的比较.

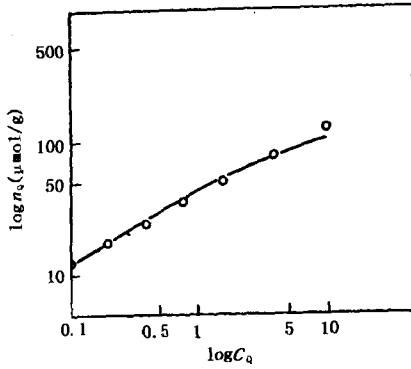


图 3.3 在柱温为 40℃ 和 C_{18} 为填充载体时, 计算所得的(曲线)和实验所得的(O)正辛磺酸钠的等温吸附线的比较
流动相为 50mol/L Na^+ 的磷酸缓冲液 (pH3.00).

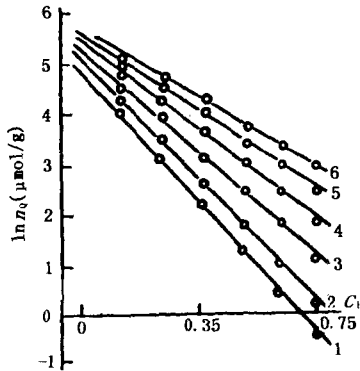


图 3.4 四丁基溴化铵(TBABr)在固定相表面的吸附量 $\ln n_Q$ 与有机溶剂浓度 C_b 按式(3.50)线性回归的结果

1. TBABr = 1 mmol/L, $\ln n_Q = 4.818 - 7.43 C_b$, $r = 0.997$;
2. TBABr = 2 mmol/L, $\ln n_Q = 4.988 - 6.64 C_b$, $r = 0.995$;
3. TBABr = 5 mmol/L, $\ln n_Q = 5.14 - 5.56 C_b$, $r = 0.991$;
4. TBABr = 10 mmol/L, $\ln n_Q = 5.24 - 4.74 C_b$, $r = 0.987$;
5. TBABr = 20 mmol/L, $\ln n_Q = 5.31 - 3.96 C_b$, $r = 0.984$;
6. TBABr = 35 mmol/L, $\ln n_Q = 5.61 - 3.88 C_b$, $r = 0.990$.

考虑到式(4.48)所示的离子对试剂在反相离子对色谱中的作用,采用统计热力学和 Gouy-Chapman 双电层理论相结合的方法,得到流动相中有机溶剂浓度 C_b 、离子对试剂浓度 C_Q 和无机盐浓度 (C_S)对保留值影响的基本关系式为

$$\ln k' = a + b \ln C_b + c C_b \quad (3.51)$$

$$\ln k' = d + e \ln C_Q + f C_Q \quad (3.52)$$

$$\ln k' = A + B \ln C_S \quad (3.53)$$

式中,参数 a, d 和 A 与溶质和离子对试剂与固定相和流动相的作用性质相关; b 主要由有机溶剂与离子对试剂和溶质在固定相表面的竞争顶替吸附相关; c 主要由溶质和离子对试剂与流动相的相互作用性质所决定; e 与离子对试剂本身对溶质和离子对试剂在固定相表面竞争顶替吸附相关; f 是由离子对试剂和溶质与离子对试剂和流动相相互作用的性质所决定; B 主要与溶质的电荷数和无机盐的性质相关.式(3.51)反映了离子对色谱中以分子作用力为主要因素的有机溶剂对溶质保留值的影响;与反相色谱不同,式(3.51)中的系数 a, b 和 c 包含了有机溶剂对离子对试剂吸附量的影响.式(3.52)则是离子对色谱中离子对试剂本身对保留值影响的表达.式(3.53)的形式与离子交换和离子色谱中的保留规律式(3.46)完全相同,主要表达了离子对色谱中静电作用力在离子对色谱中的影响.与式(3.49)和(3.50)的处理过程相同,在很多情况下式(3.51)和(3.52)可以简略为

$$\ln k' = a + c C_b \quad (3.54)$$

$$\ln k' = d + e \ln C_Q \quad (3.55)$$

上述变化规律式的正确性将在下一节中予以讨论.

§ 3.3 液相色谱中各种参数对保留值的影响

§ 3.3.1 有机溶剂浓度的影响

在液相色谱中,流动相有机溶剂浓度和种类的变化都会使溶

质与固定相和流动相的分子作用力发生很大的变化,从而改变溶质的保留值和分离选择性.液相色谱中的反相、正相(包括液-固吸附色谱)和反相离子对色谱的分离机理主要基于分子作用力或分子和静电作用力(离子对色谱中,静电和分子作用力同时存在),因此在这些液相色谱分离模式中,流动相组成的变化是最重要的操作参数之一.表3.1是一些氨基苯磺酸和氨基萘磺酸类化合物在反相液相色谱和反相离子对色谱的保留值按 $\ln k' = a + cC_b$ 关系式的回归结果.从表3.1中可以看到,其线性相关系数都在0.99以上,这充分证明这一线性关系在一定的有机溶剂浓度范围内可以很好地描述有机溶剂的影响.在反相离子对色谱中关系式 $\ln k' = a + cC_b$ 的系数 a , c 的绝对值远远大于反相色谱中测得的 a , c 值,这是离子对色谱中离子对试剂的作用所产生的.

在液-固吸附或正相色谱中,溶剂与溶质的顶替吸附成为重要的分离机制.因此,关系式 $\ln k' = a + b \ln C_b + cC_b$ 是描述有机溶剂强组分影响保留值

的正确选择.图3.5是一些PTH衍生化氨基酸的保留值随甲醇浓度的变化曲线.图3.5的结果表明关系式 $\ln k' = a + b \ln C_b + cC_b$ 的正确性.在离子交换色谱或离子色谱中,其保留机理主要基于静电作用力,流动相中有机溶剂的浓度和性质对保留值的影响没有

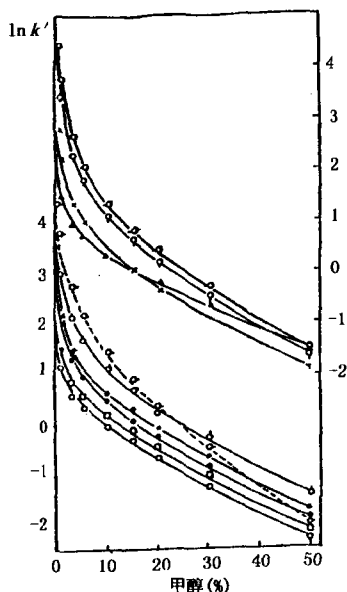


图3.5 10种PTH-氨基酸的拟合结果
流动相:正己烷/甲醇/乙醚(正己烷保持15%);图中点为实验值;线为计算值.

○为 PTH-Leu; △为 PTH-Val; □为 PTH-Pro; ●为 PTH-Met; *为 PTH-Phe; *为 PTH-Ala; ○为 PTH-Gly; ○为 PTH-Pro-OH; ○为 PTH-Thr; ○为 PTH-Typ.

表 3.1 一些磺酸在反相离子对色谱不同有机溶剂浓度下测定的 k' 值
按式(3.54)计算的 a_{ip} , c_{ip} , r 值及在反相色谱中带一个磺酸根的
磺酸的 a_{RP} 和 c_{RP} 值

溶 质	C_b (甲醇体积分数)						c_{ip}	r	a_{RP}	Δz	c_{RP}	Δc_{RP}
	0.325	0.281	0.239	0.198	a_{ip}							
3-氨基苯磺酸	0.26	0.35	0.84	1.34	2.887	-12.88	0.9946	-0.295	3.18	-5.18	-7.70	
6-甲基-3-氨基苯磺酸	0.70	1.45	2.35	4.00	4.135	-13.67	0.9973	0.338	3.80	-5.97	-7.70	
5-甲氧基-2-氨基苯磺酸	0.75	1.56	2.46	4.97	4.41	-14.48	0.9967	1.343	3.10	-6.89	-7.59	
5-硝基-2-氨基苯磺酸	1.41	3.23	5.38	10.25	5.351	-15.25	0.9963	1.802	3.55	-6.93	-8.32	
2-氨基萘磺酸	—	4.53	8.04	18.34	6.197	-16.83	0.9939	2.187	4.01	-8.36	-8.47	
6-氨基-2-萘磺酸	1.23	2.80	5.01	9.85	4.828	-15.57	0.994	1.899	2.93	-8.42	-7.15	
3-氨基-1,4-苯二磺酸	0.334	0.82	1.48	2.94	4.412	-16.74	0.9977	—	—	—	—	
2,4-二氨基-1,5-苯二磺酸	0.29	0.38	1.19	2.46	4.155	-16.46	0.9980	—	—	—	—	
7-氨基-1,5-萘二磺酸	0.63	1.63	3.34	9.66	6.399	-21.06	0.9971	—	—	—	—	
3-氨基-2,7-萘二磺酸	0.76	2.06	4.40	12.04	6.680	-21.38	0.9985	—	—	—	—	
7-氨基-1,3,5-萘三磺酸	1.09	3.04	6.98	16.79	7.062	-21.37	0.9995	—	—	—	—	
7-氨基-1,3,6-萘三磺酸	1.14	3.25	7.40	17.66	7.123	-21.39	0.9992	—	—	—	—	

规律性的变化. 图3.6 是离子交换色谱中有机溶剂浓度影响有机离子保留值的变化曲线, 值得注意的是在离子交换色谱中, 流动相中大量有机溶剂的存在有可能导致高聚物填料的溶胀, 大大降低填充柱的机械强度.

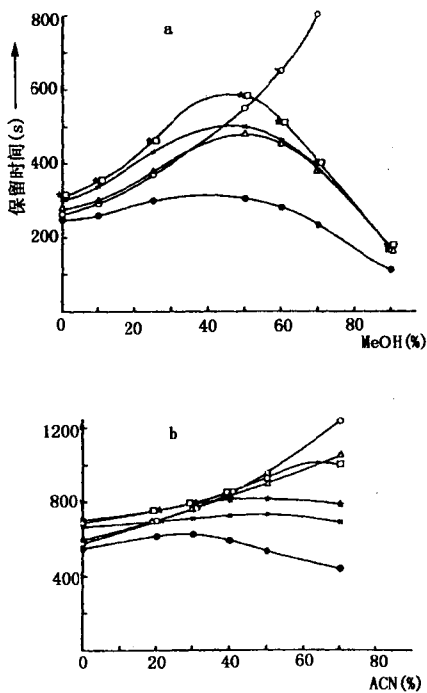


图 3.6 离子交换色谱中生物碱的保留时间与流动相有机溶剂浓度的关系

色谱柱: SpherisorbA10Y(三氧化二铝)固定相;
 流动相: 10mmol/L 柠檬酸和三甲基胺缓冲液(pH 6.0);
 溶质: ●为可卡因; ∗为二氢吗啡; □为吗啡; △为二氢
 可卡因; ○为麻黄碱; ×为二甲氧基马钱子碱.

§ 3.3.2 无机盐浓度的影响

无机盐浓度主要通过改变溶质与固定相和流动相的静电作用而实现对离子性化合物保留值的调节。由此可以知道这一参数只对静电作用为主要分离机理的色谱模式，如离子交换色谱、离子色谱和离子对色谱中溶质的保留值和选择性有重要影响。表3.2列出的是一些氨基苯磺酸和氨基萘磺酸类化合物在反相离子对色谱中的保留值与 NaNO_3 和 Na_2SO_4 浓度按关系式 $\ln k' = A + B \ln C_S$ 的回归结果。图3.7是一些无机阴离子在离子交换色谱中的保留值与流动相中邻苯二甲酸钾浓度按上述关系式的回归结果。图3.7与表3.2中的结果表明，反相离子对色谱和离子交换色谱中离子性化合物保留值与流动相中盐浓度的关系能很好地服从关系式 $\ln k' = A + B \ln C_S$ 。在这两种静电作用为主要分离机制的分离模式中，关系式中的系数 B 与溶质的电荷数相关，随着溶质电荷数的增加，系数 B 的绝对值也随之增加。但相同电荷

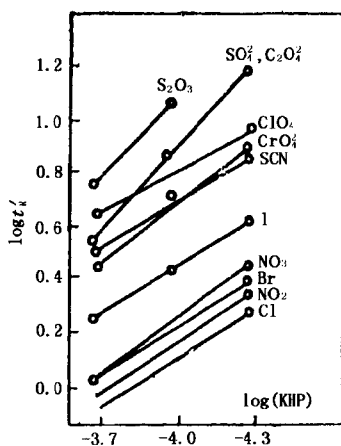


图3.7 在 XAD-1 离子交换柱上冲洗剂邻苯二甲酸钾 (KHP) 浓度对阴离子保留值的影响

数溶质在反相离子对色谱中获得的系数 B 值比离子交换色谱中获得的 B 值低一半左右. 这可能是离子对色谱中静电和分子作用力同时存在的影响所致.

表 3.2 一些氨基苯磺酸和氨基萘磺酸类化合物的保留值按 $\ln k' = A + B \ln C_S$ 回归结果

溶 质	NO_3^-			SO_4^{2-}		
	A	B	r	A	B	r
1-氨基-3-苯磺酸	-3.218	-0.753	0.9891	-2.285	-0.490	0.9934
1-氨基-4-甲氧基-2-苯磺酸	-2.108	-0.653	0.9932	-0.872	-0.328	0.9964
1-氨基-4-氯-3-苯磺酸	-1.095	-0.534	0.9989	-0.778	-0.452	0.9923
1-氨基-4-甲基-3-苯磺酸	-1.968	-0.618	0.9928	-1.121	-0.387	0.9986
1-氨基-5-萘磺酸	-1.115	-0.499	0.9948	-0.415	-0.308	0.9993
2-氨基-5-萘磺酸	0.109	-0.411	0.9951	0.540	-0.297	0.9959
1-氨基-2,4-苯二磺酸	-4.194	-1.124	0.9994	-3.508	-0.905	0.9960
1,3-二氨基-4,6-苯二磺酸	-5.506	-1.397	0.9964	-2.111	-0.934	0.9999
2-氨基-4,8-苯二磺酸	-2.578	-0.933	0.9974	-1.044	-0.511	0.9978
2-氨基-3,6-苯二磺酸	-2.172	-0.933	0.9985	-0.703	-0.521	0.9994
2-氨基-4,7-萘二磺酸	-2.543	-0.957	0.9975	-0.974	-0.509	0.9901
2-氨基-4,6,8-萘三磺酸	-4.097	-1.521	0.9939	-3.980	-0.957	0.9815

在反相色谱中, 无机盐浓度的变化也会对溶质的保留值有一定的影响. Horvath^[13]认为改变流动相中盐浓度相当于改变流动相的表面张力, 增加流动相的亲水性. 所以随着无机盐浓度的升高, 溶质的保留值有一定的增加, 并提出溶质的保留值与盐浓度 C_S 存在以下关系:

$$\ln k' = A_1 + B_1 C_S \quad (3.56)$$

图 3.8 是一些二肽在反相色谱中不同无机盐 KCl 浓度下的分离谱图. 从图中可以看到, 无机盐浓度的改变对二肽保留值的影响不大, 但对有些化合物如 Ser-Met 和 Leu-Ser 的分离有相当的影响^[21].

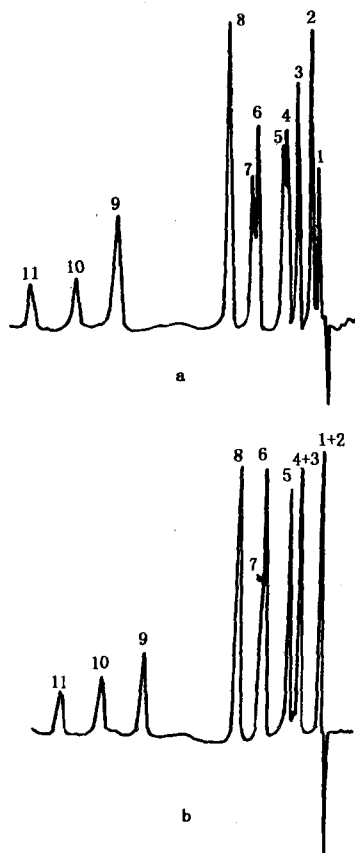


图 3.8 在恒定冲洗剂酸度 (pH=3.8) 的 NH_4Ac 20 mmol/L 缓冲液中改变无机盐

浓度对二肽分离情况的影响

a. $\text{KCl}=0.3\text{mol/L}$; b. $\text{KCl}=0.04\text{mol/L}$.

色谱峰: 1. Met-His; 2. Met-Asn; 3. Met-Thr; 4. His-Met; 5. Met-Asp; 6. Ser-Met; 7. Leu-Ser; 8. Met-Glu; 9. Leu-Gly; 10.

Ser-Leu; 11. Leu-Ala.

§ 3.3.3 柱温的影响

在高效液相色谱中,柱温对溶质保留值的影响可由 Van't Hoff 关系式来表达^[12]:

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \Phi \quad (3.57)$$

式中, $-\Delta H^0$ 和 ΔS^0 是溶质从流动相传质到固定相所需的标准自由焓和标准自由熵的变化. R 是气体普适常量, T 是绝对温度, Φ 是相比. 在绝大部分情况下, ΔH^0 是负值, 也就是溶质在液相色谱中的保留值随柱温的下降而增加, 但一般来说, 柱温对溶质的保留

表 3.3 一些氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在反相离子对色谱中的保留值按式(3.57)回归结果

溶质	甲醇/缓冲液/(V/V)					
	0.30/0.70			0.35/0.65		
	截矩	$-\Delta H^0$ (kJ/mol)	r	截矩	$-\Delta H^0$ (kJ/mol)	r
2-氨基苯磺酸	-6.35	15.80	0.999	-4.87	13.71	0.980
3-氨基苯磺酸	-6.60	15.38	1.000	-4.02	10.24	0.996
4-氨基苯磺酸	-7.40	16.64	0.997	-4.73	20.77	0.991
2-甲基-5-氨基苯磺酸	-6.24	16.34	1.000	-7.43	20.77	0.991
3-甲基-6-氨基苯磺酸	-6.23	16.45	0.999	-5.48	16.22	0.997
6-氨基萘磺酸	-6.70	10.06	0.998	-6.47	19.40	0.998
3-硝基-6-氨基苯磺酸	-4.79	12.25	0.996	-5.57	16.05	0.995
6-氨基-2-萘磺酸	-6.64	18.89	0.998	-5.01	15.92	0.988
5-氨基-2-萘磺酸	-5.21	13.13	0.996	-4.96	14.17	0.986
5-氨基萘磺酸	-6.87	18.60	0.991	-5.06	16.30	0.990
2-氨基-1,4-苯二磺酸	-4.93	12.46	0.999	-3.47	10.87	0.992
4,6-二氨基-1,5-苯二磺酸	-5.12	12.75	0.998	-4.17	12.29	0.974
4-氨基-1,5-苯二磺酸	-6.02	16.18	0.970	-5.93	18.14	0.996
3-氨基-2,7-苯二磺酸	-4.50	12.62	0.995	-6.36	19.65	0.997
7-氨基-1,4,5-苯三磺酸	-7.07	20.57	0.995	-6.29	21.74	0.995
7-氨基-1,4,6-苯三磺酸	-6.96	20.48	0.989	-6.96	23.49	0.997

值和选择性影响不太大。表3.3是一些氨基苯磺酸和氨基萘磺酸类化合物在反相离子对色谱中按式(3.57)回归得到的标准自由焓和截矩。图3.9是一些多环芳烃化合物在反相和正相色谱中的保留值与柱温按式(3.57)的回归结果。这些结果都充分表明式(3.57)能很好地表达柱温对液相色谱中溶质保留值的影响。

Horvath等^[23]认为溶质在液相色谱中从流动相传质到固定相的保留机理的差异可由下式来检验：

$$\ln k'_T = - \left(\frac{\Delta H^0}{R} \right) \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{\beta} \right) - \left(\frac{\Delta G^0_{\beta}}{R\beta} \right) + \ln \Phi \quad (3.58)$$

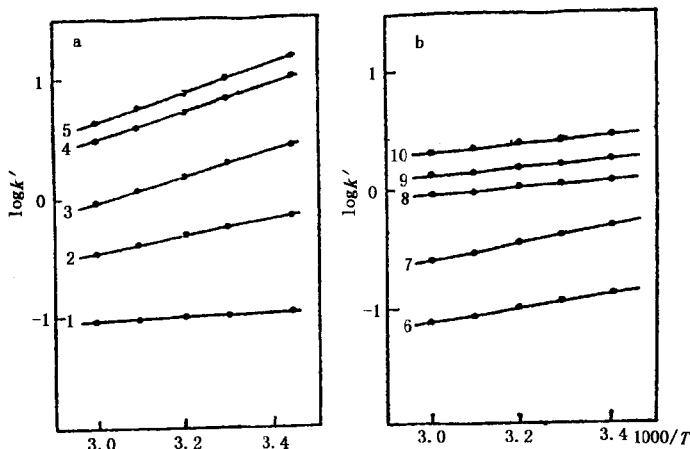


图 3.9 容量因子对数与柱温的关系

a. 流动相: 甲醇/水(40/60); 固定相: ODS;

b. 流动相: 正己烷/乙醇(99/1); 固定相: ETH.

1. 丙酮; 2. 苯; 3. 溴苯; 4. 邻苯二甲酸二丁酯; 5. 1,2,4-三氯代苯; 6. 乙酰苯;
7. 2,6-二甲酚; 8. 对甲酚; 9. 苯酚; 10. 对羟基联苯.

式中 k'_T 是在柱温 T 时溶质的容量因子, ΔG^0_{β} 是在补偿温度 β 时溶质的吉布斯自由能变化, β 是补偿温度. 如果一组溶质的保留机理相同, 则它们应具有自由焓/自由熵的补偿效应, 式(3.58)中的

β 和 ΔG_{β}^0 对这一组溶质来说是同一常数,亦即式(3.58)中 $\ln k'_T$ 与 ΔH^0 应有很好的线性关系;反之表示这一组溶质的保留机理存在较大的差异.例如把表 3.3 中所示的溶质在 18℃ 时实测的 k' 值与 ΔH^0 按式(3.58)回归,所得结果如下^[24]:

$$C_b = 0.40, \ln k' = -1.47 + 0.122(-\Delta H^0),$$

$$r = 0.638, n = 16$$

$$C_b = 0.35, \ln k' = -1.38 + 0.161(-\Delta H^0),$$

$$r = 0.868, n = 16$$

$$C_b = 0.30, \ln k' = -1.28 + 0.200(\Delta H^0),$$

$$r = 0.823, n = 16$$

这些回结果表明对于构型差别较大、电荷数不同的溶质,它们在反相离子对色谱中的保留机理和作用性质有较大的差别.对于以上 16 种磺酸类化合物的不同保留机理可由以下的事实来解释:(1) 被研究的 16 种溶质的分子构型差别较大,如一些溶质存在分子内氢键作用,一些溶质存在对有机离子的电性质影响较大的取代基团如硝基和甲氧基等.(2) 被分离的磺酸的疏水性有很大的差别,有些溶质在磷酸盐缓冲液作为流动相的反相色谱中无保留^[25],这些溶质在反相离子对色谱中的自由焓的变化主要由与溶质作用和络合的离子对试剂的自由焓变化所决定;而对另一些溶质,除离子对试剂的自由焓变化和贡献以外,还有自身的分子作用力对自由焓变化的贡献.(3) 被分离的溶质与离子对试剂电荷反号的电荷数不同,可以推想溶质的电荷数不同会引发溶质周围的微观环境的差别,进一步引起它们的保留机理的差别.

§ 3.3.4 固定相性质对保留值的影响

在液相色谱中,由于固定相结构的细微变化,有可能导致被分离化合物的保留值、选择性甚至峰形的改变.至今,液相色谱柱仍无法像气相色谱柱一样进行标准化,对于所有的液相色谱分离模式,固定相性质的改变都会对保留值产生一定的影响.

邹汉法等^[26]测定了14种苯磺酸和萘磺酸在 Spherisorb-C₁₈ (II), Nova-pak-C₁₈ (I), Nucleosil-C₁₈ (III) 和 Resolve-C₁₈ (IV) 载体上的保留值, 结果表明溶质在不同的载体上的保留值 k' 有较大的差别, 但它们的保留值 $\ln k'$ 间有良好的线性关系. 因此可以说在反相离子对色谱中载体种类的变化对被分离化合物的选择性改变影响不大. 在反相和正相液相色谱中, 已有色谱工作者研究固定相表面结合活性点浓度 N_S 对保留值的影响. 我们通过统计热力学方法导出固定相表面活性点浓度 N_S 影响保留值的关系式为^[27]

$$\ln k' = x + y \ln N_S \quad (3.59)$$

式中参数 y 是常数 1, x 是由溶质与固定相和流动相的作用性质相关的常数. 在反相离子对色谱中, 键合碳链浓度对保留值的影响也可由式(3.59)表示, 但参数 y 由 N_S 对溶质和离子对试剂的影响两部分组成. 如果采用 k' 值与 N_S 间的线性关系表示, 则有^[28]:

$$k' = X + Y N_S \quad (3.60)$$

在反相和正相液相色谱中参数 X 应是接近于 0 的常数, 参数 Y 与溶质及固定相和流动相的作用性质相关. 在反相离子对色谱中参数 X 是不等于 0 的常数, 而是与溶质和离子对试剂及固定相和流动相的作用性质相关. 图 3.10 和图 3.11 是苯乙酮和硝基苯在反相色谱中于不同甲醇/水配比下实测的 k' 值与 C₁₈ 浓度按式(3.60)回归结果. 图 3.12 是一些多环芳烃在液-固色谱中的保留值与固定相比表面积按式(3.60)回归的结果. 表 3.4 是反相离子对色谱中溶质的保留值与固定相表面碳含量浓度按式(3.60)回归的结果, 表中 X/k'_{\max} 是每一组分在式(3.60)中的参数 X 与该组分参与回归的最大保留值 k'_{\max} 的比值, 以便于评价每一组分的 X 值偏离原点的程度. 从以上的结果可以看到, 反相色谱中固定相表面键合碳链浓度和液-固吸附色谱硅羟基浓度对保留值的影响都可由式(3.60)很好地描述, k' 与 N_S 的线性关系基本通过原点.

分析表 3.4 中数据可以看到:(1)由式(3.59)线性回归所得的相关系数较式(3.60)所得的相关系数要好一些, 这表示式(3.59)能更好地描述离子对色谱固定相表面 C₁₈ 键合量对保留

值的影响。(2)由式(3.59)得到的参数 y 对绝大部分溶质大约

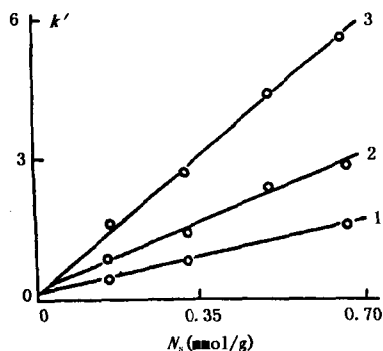


图 3.10 反相色谱中苯乙酮的 k' 值与键合 C_{18} 浓度间的线性关系

1. $C_b = 0.65, k' = 0.146 + 0.213N_s, r = 0.9999;$

2. $C_b = 0.55, k' = 0.215 + 0.399N_s, r = 0.9940;$

3. $C_b = 0.45, k' = 0.141 + 0.828N_s, r = 0.9960.$

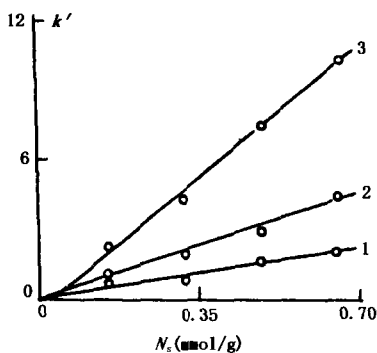


图 3.11 反相色谱中硝基苯的 k' 值与键合 C_{18} 浓度间的线性关系

1. $C_b = 0.65, k' = 0.039 + 0.321N_s, r = 0.9993;$

2. $C_b = 0.55, k' = 0.013 + 0.687N_s, r = 0.9955;$

3. $C_b = 0.45, k' = -0.639 + 1.667N_s, r = 0.9958.$

表 3.4 反相离子对色谱中取代基苯甲酸实测的 k' 值
按式(3.59)和(3.60)线性回归所得结果和 X/k'_{\max} (%) 值

取代基团	X	Y	r	x	y	r	X/k'_{\max} (%)
2-OH	-6.471	19.02	0.963	-1.484	1.684	0.982	-27.0
3-OH	-0.097	0.211	0.994	-1.846	4.405	0.988	-2.9
4-OH	0.356	0.106	0.927	-0.998	0.579	0.888	17.0
2-NH ₂	-1.306	0.954	0.945	-1.481	1.276	0.950	-15.7
3-NH ₂	0.018	0.120	0.968	-2.005	0.952	0.964	0.9
4-NH ₂	-0.015	0.083	0.988	-2.312	0.927	0.989	1.2
2-NO ₂	-0.853	0.441	0.990	-1.649	1.247	0.996	-14.2
3-NO ₂	-3.233	1.191	0.967	-1.112	1.384	0.983	-20.5
4-NO ₂	-3.587	1.200	0.954	-1.269	1.427	0.974	-22.6
2-Cl	-1.557	0.655	0.996	-1.750	1.433	0.993	-23.7
3-Cl	-8.591	2.794	0.962	-0.490	1.449	0.982	-21.0
4-Cl	-9.640	1.572	0.962	-1.083	1.457	0.983	-23.4
2-CH ₃	-2.315	0.846	0.981	-1.577	1.437	0.994	-21.0
3-CH ₃	-5.491	1.708	0.964	-1.159	1.514	0.985	-25.7
4-CH ₃	-4.833	1.572	0.962	-1.083	1.457	0.983	-23.4
-CH ₂ -	-1.836	0.739	0.963	-1.396	1.316	0.978	-18.4
-CH=CH-	-4.713	1.635	0.968	-0.914	1.420	0.986	-22.0
H	-2.124	0.766	0.956	-1.628	1.409	0.973	-20.8

为1.4左右,远大于反相色谱中的参数 $y = 1$, 这表示在反相离子对色谱中固定相表面 C_{18} 键合量对保留值的影响比在反相色谱中的影响要大得多。(3)式(3.60)是在式(3.59) $y = 1$ 时的一种特殊情况,因在反相色谱中 y 接近于1,所以式(3.59)和(3.60)回归所得的相关系数基本相近.离子对色谱中的保留值按式(3.60)线性回归所得的 X 值偏离原点较大,对大部分溶质

而言其 X/k'_{\max} 在 -20% 左右. 把表 3.4 中的 X 和 Y 值线性回归, 所得结果如下:

$$X = 0.579 + 3.419Y, r = 0.9971, n = 18$$

这表明 X 和 Y 间有良好的线性关系, 亦即反相离子对色谱中 k' 与 N_S 间线性关系的截矩有物理意义. 不像反相液相色谱中这一线性关系的截矩, 离子对色谱中的截矩主要由溶质与固定相和流动相的作用性质所决定. 以上三点事实充分说明反相离子对色谱的保留机理与反相色谱中的保留机理有所不同^[29], 同时也说明采用在流动相形成离子对缔合物的离子对保留机理来解释离子对色谱的保留行为是不妥当的.

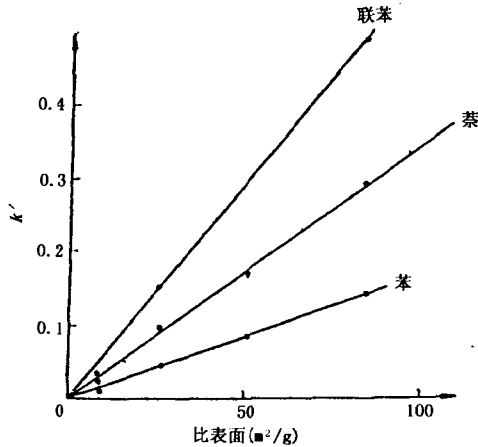
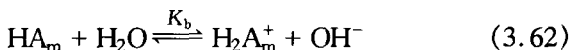


图 3.12 液-固吸附色谱中溶质保留值与固定相比表面积的关系

§ 3.3.5 流动相酸度对保留值的影响

假定有一两性溶质在液相色谱中发生保留过程, 则该物质在流动相中有以下几种解离平衡:





式中 K_a 和 K_b 分别是酸离解和碱离解平衡常数, 右下角 m 表示为流动相. 而在流动相和固定相间的吸脱附平衡过程可表达为



由于式(3.61)至(3.65)是平衡过程, 则有:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}_m^-]}{[\text{HA}_m]} \quad (3.66)$$

$$K_b = \frac{[\text{OH}^-][\text{H}_2\text{A}_m^+]}{[\text{HA}_m]} \quad (3.67)$$

$$K_1 = \frac{[\text{A}_a^-]}{[\text{A}_m^-]} \quad (3.68)$$

$$K_2 = \frac{[\text{HA}_a]}{[\text{HA}_m]} \quad (3.69)$$

$$K_3 = \frac{[\text{H}_2\text{A}_a^+]}{[\text{H}_2\text{A}_m^+]} \quad (3.70)$$

两性化合物在流动相和固定相间的质量分配系数 a_m 为

$$a_m = \frac{K_1 + K_2[\text{H}^+]/K_a + K_3[\text{H}^+]^2 K_b/K_a K_w}{1 + [\text{H}^+]/K_a + K_b[\text{H}^+]^2/K_a K_w} \quad (3.71)$$

式(3.71)中 K_w 为水的自解离平衡常数. 两性化合物的容量因子 k'_{am} 可表达为

$$k'_{am} = a_m \Phi = \frac{k'_1 + k'_2[\text{H}^+]/K_a + k'_3[\text{H}^+]^2 K_b/K_a K_w}{1 + [\text{H}^+]/K_a + K_b[\text{H}^+]^2/K_a K_w} \quad (3.72)$$

如果三种状态下的溶质同时对 k'_{am} 有较大的贡献, 则从式(3.72)可知, 流动相酸度对 k'_{am} 的影响是一个比较复杂的关系. 但在大多数离子色谱和离子对色谱中, 与离子对试剂电荷或固定相离子基

团反号状态下存在的溶质离子对 k'_{am} 起主导作用. 例如离子对试剂是正电荷的两性化合物时, 则式(3.72)中的 k'_1 远远大于 k'_2 和 k'_3 , 所以式(3.72)可简化成^[30]:

$$k'_{am} = \frac{k'_1}{1 + [H^+]/K_a + K_b[H^+]^2/K_aK_w} \quad (3.73)$$

同理, 当离子对试剂是负电荷时, 带正电荷的溶质离子对 k'_{am} 起主导作用, 式(3.72)可简化成:

$$k'_{am} = \frac{k'_3}{1 + K_aK_w/[H^+]K_b + K_w/K_b[H^+]} \quad (3.74)$$

对于一元酸或一元碱化合物, 其在流动相中的解离过程可由式(3.71)和(3.72)表达, 如果离子对试剂的电荷与溶质相反, 则离解状态存在的有机离子对保留值起主导作用, 因此流动相酸度对一元酸和一元碱的保留值(k'_a 和 k'_b)的影响分别可由以下两式表达:

$$k'_a = \frac{k'_1}{1 + [H^+]/K_a} \quad (3.75)$$

$$k'_b = \frac{k'_3}{1 + K_w/K_b[H^+]} \quad (3.76)$$

在反相液相色谱中, 对可解离性化合物的保留值起主导作用的是以中性状态存在的那部分溶质, 因此 k'_2 远远大于 k'_1 和 k'_3 . 此时由式(3.71)可得到流动相酸度对保留值影响的关系式为

$$k'_{am} = \frac{k'_2}{1 + K_a[H^+] + K_b[H^+]/K_w} \quad (3.77)$$

对于一元酸、碱的保留值(k'_a 和 k'_b)的影响分别可以由以下两式表达^[31]:

$$k'_a = \frac{k'_2}{1 + [H^+]/K_a} \quad (3.78)$$

$$k'_b = \frac{k'_2}{1 + K_b[H^+]/K_w} \quad (3.79)$$

图3.13 给出的是有机酸化合物在反相和反相离子对色谱中保留

值随流动相 pH 变化的关系曲线。从图 3.13 中可知，在反相色谱中随流动相 pH 的变化，溶质被解离的浓度越大，其保留值越小；而在反相离子对色谱中，pH 值对保留值的影响与反相色谱中 pH 值的影响恰好相反，溶质被解离的浓度越大，其保留值越大。

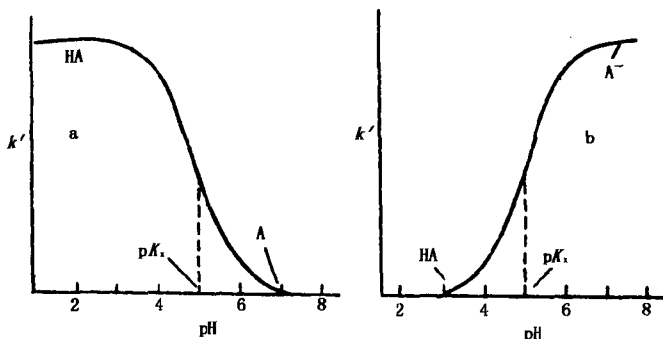


图 3.13 一元有机酸 HA 在反相和反相离子对色谱中保留值随流动相 pH 值变化的关系曲线的比较
a. 反相色谱; b. 反相离子对色谱。

图 3.14 是一些氨基苯磺酸类两性化合物按式(3.73)的拟合结果^[19],从图 3.14 中可以看到在冲洗剂 pH > 4.5 左右时,溶质 k' 值随 pH 值的变化不大;而当 pH < 4.5 左右时,冲洗剂 pH 值的变化对溶质的 k' 值有很显著的影响。这是因为溶质分子中氨基的 pK_b 在 3~4 左右,当冲洗剂 pH > 4.5 时,氨基以中性存在,进一步增大流动相 pH 值,对溶质的解离无影响,其保留值变化不大。而当流动相 pH < 4.5 时,氨基质子化形成正电荷基团,这将减少溶质与带正电荷的离子对试剂的静电作用;pH 值进一步下降,质子化氨基苯磺酸的比例增大,导致溶质的保留值不断下降。综上所述,在反相离子对色谱中,起保留作用的溶质离子主要是与离子对试剂电荷反号的一部分溶质组成,酸度对保留值的影响主要通过改变溶质在流动相中与离子对试剂电荷反号的溶质离子的浓度来实现的。可解离的有机酸或有机碱在离子交换和离子色谱中 pH 值对保留值的影响与离子色谱中的影响相似。

图 3.15 和图 3.16 是一元有机酸和有机碱在反相色谱中随流动相 pH 值变化的关系曲线. 从以上二图可以看到, 有机酸在反相色谱中的 k' 值随 pH 增加而减小, 而有机碱的 k' 值却随 pH 增加而增加, 这表明在反相色谱中中性化合物对保留值起主导作用.

一个值得注意的现象是在离子交换和离子色谱中, 流动相的 pH 值对固定相表面的性质会产生一定的影响. 对于强阴离子和阳离子交换固定相, 其表面的带电荷基团与流动相的 pH 值变化关系不大, 而对弱阴、阳离子交换固定相

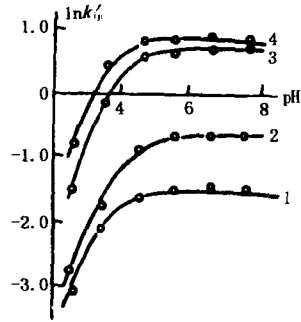


图 3.14 在流动相 KH_2PO_4 10 mmol/L, C_{18} 10 mmol/L, NaCl 0.4 mol/L 和 C_6 0.30 时, 一些氨基苯磺酸实测 k' 值按式(3.73)拟合结果
1. 邻氨基苯磺酸; 2. 对氨基苯磺酸;
3. 对氯间氨基苯磺酸; 4. 5-氨基-2-萘磺酸.

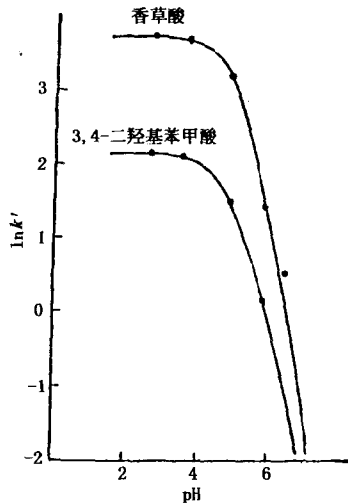


图 3.15 有机酸 $\ln k'$ 与 pH 的关系

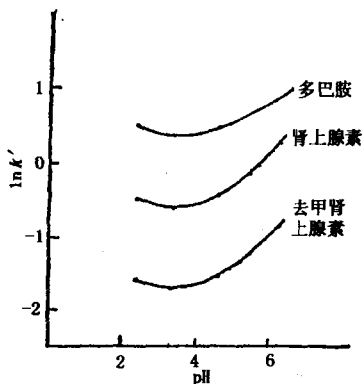


图 3.16 有机碱 $\ln k'$ 与 pH 的关系

却有较大的影响. 图3.17 是流动相 pH 值对离子性化合物在不同离子交换固定相上保留值影响的示意图. 由图3.17 中可以看到对于强和弱离子交换固定相, 在离子交换色谱中分离分析两性化合物所选定的流动相 pH 值有很大的不同.

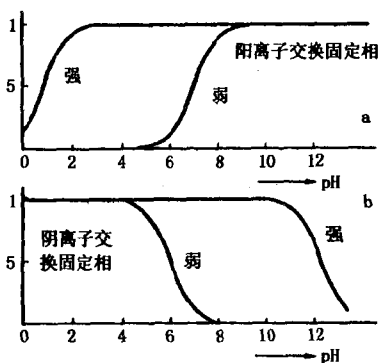


图3.17 流动相 pH 值对离子性化合物在离子交换色谱中保留值的影响

a. 阳离子交换固定相; b. 阴离子交换固定相.

§ 3.3.6 流动相中离子对试剂的影响

离子对试剂浓度的影响只有在离子对色谱这一分离模式中存在。图3.18是一些氨基苯磺酸和氨基萘磺酸的保留值与离子对试剂浓度按式(3.52)回归的结果,图3.18中的离子对试剂与溶质的电荷反号.从图3.18中可以看到关系式(3.52)能很好地描述离子对试剂浓度对保留值的影响.图3.19和图3.20分别是离子对试剂电荷与溶质电荷同号和溶质为中性时离子对试剂浓度对保留值的影响^[32].分析图3.18至图3.20的结果可以看到:(1)式(3.34)能很好地描述溶质电荷与离子对试剂同号或反号时离子对试剂浓度对保留值的影响.(2)当离子对试剂与溶质电荷同号时,随离子对试剂浓度的升高,溶质的保留值不断下降;当离子对试剂与溶质电荷反号时,随着离子对试剂浓度的升高,溶质的保留值不断增大.这表明与离子对试剂反号电荷的溶质存在静电吸引力,而同号电荷的溶质存在静电排斥力.(3)当离子对试剂浓度在0~40mmol/L范围内时,对中性化合物的保留值几乎没有影响;进一步升高离子对试剂浓度时中性化合物的

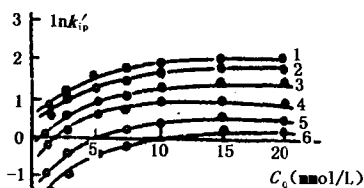


图3.18 在其它实验条件相同时,改变四丁基溴化铵离子对试剂浓度对保留值的影响按式(3.52)曲线拟合结果
1. 邻氨基苯磺酸; 2. 间氨基苯磺酸; 3. 对氨基苯磺酸; 4. 对氯间氨基苯磺酸;
5. 邻甲基对氨基苯磺酸; 6. 5-氨基-2-萘磺酸.

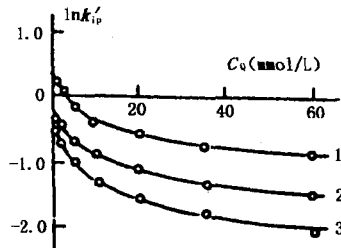


图3.19 在流动相甲醇浓度 $C_b = 0.375$ 和 $\text{pH} = 2.75$ 时,流动相中离子对试剂四丁基溴化铵浓度 C_q 对同号电荷溶质保留值的影响按式(3.52)曲线拟合结果

1. 三乙基苄基铵正离子; 2. N, N -二甲基苯胺; 3. 二苄基碘正离子.

保留值随离子对试剂浓度的升高缓慢地下降。这表明在离子对试剂浓度较低时离子对试剂与中性化合物的分子作用很弱；但当离子对试剂浓度达到一定值以后，离子对试剂与中性化合物仍存在相当程度的分子作用力。

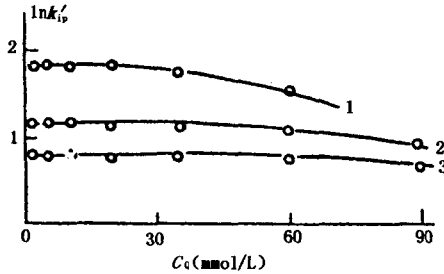


图3.20 在 $C_b=0.60$ 和 $\text{pH}=3.12$ 时,离子对试剂浓度 C_Q 的改变对中性溶质保留值的影响按式(3.52)拟合结果

1. 甲基; 2. 苯; 3. 碘甲烷.

表 3.5 反相离子对色谱中溶质保留值按式(3.55)线性回归结果

溶质	C	D	r
4-氨基苯磺酸	2.678	0.742	0.9775
3-氨基苯磺酸	2.627	0.583	0.9884
2-氨基苯磺酸	2.868	0.478	0.9867
2-甲基-5-氨基苯磺酸	3.691	0.546	0.9948
3-甲基-6-氨基苯磺酸	3.605	0.503	0.9915
2-甲氧基-5-氨基苯磺酸	1.840	0.647	0.9830
2-硝基-5-氨基苯磺酸	4.011	0.562	0.9980
2,5-二氨基苯磺酸	1.167	0.223	0.9866
6-氨基萘磺酸	4.564	0.557	0.9937
6-氨基-2-萘磺酸	6.356	0.773	0.9969

续表

溶质	C	D	r
2-氨基-1,4-苯二磺酸	5.228	1.095	0.9735
4,6-二氨基-1,3-苯二磺酸	5.477	1.062	0.9827
4-氨基-1,5-萘二磺酸	6.460	1.049	0.9957
3-氨基-2,7-萘二磺酸	6.312	0.964	0.9973
7-氨基-1,4,5-萘三磺酸	7.826	1.233	0.9896
7-氨基-1,4,6-萘三磺酸	7.920	1.299	0.2880

在离子对试剂浓度较低时(如0~20 mmol/L),离子对试剂与溶质的相互作用可以忽略.此时,式(3.52)可以简化成(3.55)式,也即 $\ln k'$ 与 $\ln C_Q$ 存在线性关系.表3.5列出的是一些氨基苯磺酸与氨基萘磺酸的保留值与离子对试剂浓度按式(3.55)回归结果.从表3.5中的数据可以看到线性相关系数绝大多数在0.99以上,这表明式(3.55)能较好地描述离子对试剂浓度对保留值的影响.式(3.55)中的系数 D 随溶质的电荷数增加而增大,这表明系数 D 主要由溶质的电荷数所决定.

参 考 文 献

- [1] L. R. Snyder, Principles of Adsorption Chromatography, Marcel Dekker, NY, 1968.
- [2] E. Soczewinski, *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 1781 (1980).
- [3] R. P. W. Scott and P. Kucera, *J. Chromatogr.*, **149**, 93 (1978).
- [4] R. P. W. Scott and P. Kucera, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 297 (1980).
- [5] J. H. Hildebrand and R. L. Scott, The Solubility of Non-electrolytes (3rd Ed.), Dover, NY, 1964.
- [6] P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, **149**, 519 (1978).
- [7] H. A. H. Billiet, P. J. Schoenmakers and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, **218**, 443 (1982).
- [8] 卢佩章、卢小明、李秀珍、张玉奎, 科学通报, **27**, 1175 (1982).
- [9] 卢佩章、卢小明、李秀珍、张玉奎, 科学通报, **27**, 1307 (1982).

- [10] 卢佩章、戴朝政、卢小明, 中国科学 (B辑), **28**, 87 (1985).
- [11] 戴朝政、卢佩章, 色谱, **12**, 157 (1994).
- [12] O. Sinanoglu, in "Molecular Associations in Biology" (B. Pullman, Ed.), p. 427, Academic Press, NY, 1968.
- [13] W. R. Melander and Cs. Horvath, in "High-Performance Liquid Chromatography-Advances and Perspectives" (Cs. Horvath, Ed.), Vol. 2, p. 113, Academic Press, NY, 1980.
- [14] L. R. Snyder, in "Selectivity and Detectability Optimizations in HPLC" (S. Ahuja, Ed.), p. 15, John Wiley & Sons, NY, 1989.
- [15] L. R. Snyder, *Chem Tech*, **9**, 750 (1979).
- [16] J. Stahlberg, *J. Chromatogr.*, **356**, 231 (1986).
- [17] M. T. W. Hearn, *Ion-Pair Chromatography-Theory and Biological and Pharmaceutical Applications*, Marcel Dekker, NY, 1985.
- [18] 邹汉法、张玉奎、卢佩章, 色谱, **10**, 329 (1992).
- [19] P. C. Lu, H. F. Zou and Y. K. Zhang, *Mikrochim. Acta*, **III**, 35 (1990).
- [20] H. F. Zou, Y. K. Zhang, M. F. Hong and P. C. Lu, *Chromatographia*, **34**, 14 (1992).
- [21] 张玉奎、邹汉法、洪名放、卢佩章, 色谱, **9**, 257 (1991).
- [22] Hanfa Zou, Yukui Zhang, Mingfang Hong and Peichang Lu, *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 2289 (1992).
- [23] A. Nahum and Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **203**, 53 (1981).
- [24] H. F. Zou, Y. K. Zhang, M. F. Hong and P. C. Lu, *Chromatographia*, **32**, 328 (1991).
- [25] Hanfa Zou, Yukui Zhang and Peichang Lu, *J. Chromatogr.*, **523**, 247 (1990).
- [26] Hanfa Zou, Yukui Zhang, Mingfang Hong and Peichang Lu, *J. Chromatogr.*, **644**, 269 (1990).
- [27] 卢佩章、邹汉法、张玉奎, 中国科学 (B辑), **34**, 347 (1991).
- [28] Hanfa Zou, Yukui Zhang, Mingfang Hong and Peichang Lu, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 3433 (1993).
- [29] 邹汉法、张玉奎、洪名放、卢佩章, 自然科学进展, **4**, 403 (1994).
- [30] 邹汉法、张玉奎、卢佩章, 色谱, **9**, 157 (1991).
- [31] 商振华、卢佩章、杜伟强, 中国科学 (B辑), **29**, 462 (1986).

第四章 高效液相色谱中溶质分子 结构与保留值的定量关系

采用经典热力学的方法研究高效液相色谱分离过程已有许多报道。但是就像 Prausnit^[1]所指出的，“经典热力学已被广泛的接受和敬崇，但事实上热力学是不合适的”。尽管在色谱中热力学能给出溶质在固定相和流动相之间分配的一些基本特征，但它很难从溶质的分子结构信息去预测保留值和其它参数，这是由于在一个给定的体系中热力学性质只是反映了一个体系中综合影响的结果。热力学只能反应色谱过程中的物理性质，而不能给出相关的化学信息^[2]。很显然，溶质的色谱行为取决于它们的结构特征，因此，从理论上讲通过溶质的分子结构信息去预测其色谱的保留行为或从色谱的保留值来推断溶质的结构信息是可能的，这对于帮助我们更好地理解色谱的分离过程是非常有意义的。事实上，色谱中涉及的分子相互作用与其它的物理化学作用，如活体中的药物作用、激素的活性甚至农药的环境毒性等很相似。因此，色谱保留值还可以用于研究、测定这些重要的化合物的性质参数，由此产生了化学计量学上一个重要的分支，即溶质结构保留值定量关系(QSRR)^[2]。

色谱提供了一个结构和物化性质定量关系研究的独特的基于分子相互作用的模型体系。在色谱实验中，所采用的操作条件可保持恒定或被有效地控制。这使溶质结构作为一个独立的参数被研究成为可能。相对于复杂的生化体系而言，通过色谱法可以很容易地获得大量的高精度的数据。热力学不能严格地解决色谱保留值与溶质结构定量关系问题，这样的定量关系应属于超热力学(extrathermodynamics)的范畴。超热力学是模型与热力学概念二者的组合^[3]。超热力学中模型的建立缺乏热力学的规范，但

超热力学能给出热力学很难获得的信息。超热力学关系的具体表现形式就是线性自由能关系。尽管线性自由能不是热力学的结果，但这一关系能把被关联的量真实地联系起来^[4,5]。在色谱方面，结构与保留值定量关系的研究至少可以达到以下几个目的^[6]：

1. 从分子水平上解释色谱的分离机理；
2. 在一些指定的条件可以预测各个组分的保留行为；
3. 对于一些感兴趣的化合物可以利用保留值估算化合物的生物活性等参数。

§ 4.1 色谱中的分子间相互作用

除离子交换色谱和离子对色谱涉及到静电作用力以外，其它的色谱模式其分离过程主要由分子作用力所决定。因此，分子间的相互作用力是了解色谱保留机理和进行溶质结构保留值定量关系研究的基本出发点。分子间的相互作用力，按其作用的性质，可以区分成两种类型，其一是使分子间相互吸引，其二则使分子间相互排斥。吸引力产生于分子的永久偶极矩、诱导偶极矩、电子摄动以及氢键的作用，而排斥力源于分子相互接近时电子云的重叠受到 Pauling 不相容原则的限制。由于在通常状况下分子间排斥力远远小于吸引力，而且人们对分子间相互吸引力有较深入的了解，以下将对分子间的吸引力作一较详细的介绍。

§ 4.1.1 离子-偶极作用力

离子-偶极作用力严格地讲不属于分子间作用力的范围。但这些库仑力在一些特定的色谱分离过程中可能会产生重要的影响，因此在这一节作适当的讨论。把化合物放入由离子产生的电场时，化合的偶极会自动定向，如化合末端的静电荷与离子相反，则该末端将趋向离子产生相互吸引；反之，如化合的末端的静电荷与离子相同，则会产生相互排斥。离子-偶极的相互作用

力 (E_{i-d}) 可由下式表达:

$$E_{i-d} = -W^2 Z \mu \frac{\cos \alpha'}{\epsilon r^2} \quad (4.1)$$

式中系数 W 取决于采用的量纲, 对于国际制量纲, 则 $W = 1/4\pi\epsilon_0$, Z 是离子的电荷数. μ 是中性化合物的偶极矩, r 是从离子到偶极中心间的距离, α' 是相对于离子与偶极中心间连线的偶极角度, ϵ 是介质(流动相)的相对介电常数. 由式(4.1)可知, ϵ 值越小, 离子-偶极间的相互吸引力越小, 因此如把乙醇 ($\epsilon = 27$) 加入到水 ($\epsilon = 80$) 中减少流动相的介电常数, 则溶质与流动相的静电作用会增加, 由此降低溶质在离子色谱中的保留值.

§ 4.1.2 定向作用力

由分子内部的电场而引发的作用力通常被称之为范德华作用力. 这些作用力可分成三类, 即定向作用力, 诱导作用力和色散作用力. 由分子偶极矩和偶极矩间产生的定向作用力 (E_{d-d}) 可表达为

$$E_{d-d} = -W^2 \frac{2}{3kT} \cdot \frac{\mu_1 \mu_2^2}{\epsilon r^6} \quad (4.2)$$

式中 μ_1 和 μ_2 是分子 1 和 2 的偶极矩.

§ 4.1.3 诱导作用力

一个分子中的电偶极可以诱发一个邻近分子的偶极矩, 被诱导的矩总是趋向于诱导它的偶极, 因此二者之间总是存在偶极与诱导偶极间的相互吸引力. 如果非极性化合物的极化率 α 越大, 则其诱导偶极矩也越大. 分子间偶极和诱导偶极的相互作用力 (E_{d-id}) 可以表达为

$$E_{d-id} = -W^2 \frac{\alpha_1 \mu_2^2 + \alpha_2 \mu_1^2}{\epsilon r^6} \quad (4.3)$$

从式(4.3)可以看到偶极和诱导偶极间作用力与温度无关, 而且没有加和性.

§ 4.1.4 色散作用力

对于没有固定偶极矩的原子或分子,在任何时刻其电子云密度的连续波动都会导致一个小的偶极矩. 这一个微小的偶极矩又可以随机地极化相近的分子或原子的电子云. 由此过程而产生的分子间的色散作用力 E_d 可近似地表达为

$$E_d = - \frac{W^2 3 I_1 I_2 \alpha_1 \alpha_2}{2(I_1 + I_2)(\epsilon r^6)} \quad (4.4)$$

式中 I_1, I_2 是分子 1 和 2 的电离能. 在式(4.4) 中分子极化率 (α_1 和 α_2) 具有加和性, 因此色散作用力也具有加和性. 以上三种范德华作用力是最常见的分子间相互作用力.

§ 4.1.5 疏水作用力

溶质在液相色谱流动相和固定相间的分配, 尤其是反相液相色谱的分配通常由疏水作用力(疏溶剂作用)来解释^[6]. 疏水作用力至今仍是一个有争论的课题^[7]. 但如把疏水作用力考虑复杂一些, 可以认为疏水作用力是决定物质状态的所有物理化学作用力的综合结果.

§ 4.1.6 氢键作用力

以上所讨论的分子间相互作用力在化学上被认为是非特征的作用力. 在色谱分离中还有一些作用力则更多地与分子的结构特征相关. 这一类作用力则主要包括氢键和电子对给体-电子对受体间的作用力. 范德华作用力可以被认为更具有物理的特征, 而后者则更具有化学的特征.

当共价键合的氢原子与其它原子形成第二个键时, 这第二个键被称之为氢键. 常见的氢质子给体的基团有 $-\text{O}-\text{H}$, $-\text{S}-\text{H}$, $\text{Cl}-\text{H}$, $\text{Br}-\text{H}$ 最重要的质子受体为醇、醚和羟基中的氧原子, 卤原子和离子, 胺中的氮原子和芳香化合物中的 π -电子. 氢键具有方向性和饱和性, 并且氢键的作用力往往比前三种

范德华作用力更强,其数值大约在 $1\sim 10\text{kcal/mol}$ 之间.

§ 4.1.7 电子对给体-电子对受体相互作用

当一个电子对给体分子中被电子对占据的分子轨道能量足够高,而电子对受体分子中存在能量足够低的空分子轨道时,这两个价态饱和分子间有可能产生结合作用. 在常见的化学键中,每一个原子给出一个电子形成一个共价键;但在电子对给体-电子对受体作用键中,一个分子提供一对电子,而另一分子则提供空的分子轨道. 高能量的分子轨道电子对包括 n 轨道孤对电子(如有机胺、醚等), σ 键电子对(如环丙烷、卤代物)和芳香化合物的 π 电子对(如多环芳烃). 而有低能量空分子轨道的电子对受体化合物则有:具有空共价轨道的分子原子(如金属有机化合物),具有非键合 σ 轨道的化合物卤代分子以及具有 π 键系统的化合物,如多硝基取代芳香化合物和四氟乙烯等.

§ 4.2 影响分子间作用力的因素

§ 4.2.1 偶极矩 (μ)

如果分子中具有电负性不同的原子时,则会产生正负电荷中心不相重合的现象,所带的电荷与正负电荷中心间距离的乘积为偶极矩. 分子中原子间的距离为 10^{-8}cm 数量级,而电荷的数量级为 10^{-10}e. s. u. ,所以偶极矩的数量级为 10^{-18} . 习惯上把 10^{-18}e. g. s 单位作为偶极矩的单位,称之为“德拜”,以 D 表示之,即 $1D=10^{-18}\text{e. g. s. 单位}$.

偶极矩的大小与元素的电负性有关,同时还与分子的对称性有关. 例如氯苯的偶极矩为 $1.70 D$,而对二氯苯的偶极矩为 0 . 对于同系物来说,由于不同大小的烷基具有基本相同的推电子效应,因而它们的偶极矩接近于常数. 例如正构醇类的偶极矩接近于 $1.67D$ (表4.1),表4.2列出了不同同系物的偶极矩. 表4.3、表4.4则给出了不同的官能团及官能团位置对分子偶极矩的影

响.

表 4.1 某些醇类的偶极矩

物质	偶极矩(D)
CH ₃ OH	1.68
C ₂ H ₅ OH	1.70
C ₃ H ₇ OH	1.69
C ₃ H ₁₁ OH	1.64
C ₇ H ₁₅ OH	1.66
平均值	1.67

表 4.2 某些同系物的偶极矩

同系物	偶极矩(D)
烷烃	0
R—O—R	1.3
R—OH	1.67
R—COOH	1.6
RCHO	2.5
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{R} \end{array}$	2.7
R—CN	3.4

表 4.3 官能团对分子偶极矩的影响

偶极矩(D) \ 官能团 \ 烃基	烃基					
	CH ₃ —	C ₂ H ₅ —	n-C ₃ H ₇ —	n-C ₅ H ₁₁ —	n-C ₇ H ₁₅ —	C ₆ H ₅ —
—Cl	1.87 ¹⁾	2.05 ¹⁾	2.16 ¹⁾	2.15 ¹⁾	—	1.70 ¹⁾
—Br	1.78 ¹⁾	2.12	1.93	1.97	1.85	1.54
—I	1.5	1.8	—	—	—	1.30

续表

偶极矩 (D)	烃基					
	CH ₃ -	C ₂ H ₅ -	n-C ₃ H ₇ -	n-C ₅ H ₁₁ -	n-C ₇ H ₁₅ -	C ₆ H ₅ -
H	0	0	0	0	0	0
-CH ₃	0	0	0	0	0	0
-OH	1.68	1.70	1.69	1.64	1.66	1.6
-CHO	2.49	2.40	2.46	—	2.64	2.76
-COOH	1.63	1.68	—	—	—	1.64
-OCH ₃	1.36 ¹⁾	1.22 ¹⁾	—	—	—	1.35 ¹⁾
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-CH}_3 \end{array}$	2.74	2.75	2.70	2.59	2.76	2.89
-COOCH ₃	1.75	1.9	—	—	—	1.83
-SCH ₃	1.40	—	—	—	—	1.27
-NH ₂	1.23 ¹⁾	1.2 ¹⁾	—	—	—	1.48 ¹⁾
-NO ₂	3.1	3.3	—	—	—	3.98
-CN	3.4	3.57	—	—	—	4.00

1)表示气相测定的结果,而其余均为溶液中测定的结果.

表 4.4 二元取代苯中取代基的位置对分子偶极矩的影响

取代基		邻位	间位	对位
1	2			
CH ₃	CH ₃	0.58	0.37	0
CH ₃	Cl	1.41	1.78	1.94
CH ₃	F	1.35	1.85	1.82
CH ₃	NO ₂	3.70	4.14	4.45
Cl	Cl	2.21	1.48	0

§ 4.2.2 极化率 (α)

分子极化率表示在电场作用下,分子中电子相对于分子骨架

(包括原子核和内层电子)发生的相对位移或骨架本身变形的程度。极化率具有加和性,即整个分子的极化率等于各个原子和化学键的极化率的总和。而实际应用时,通常采用各基团极化率的加和性进行计算。设某一分子A中为 n_i 个 i 种基团,各相应基团的极化率为 $\Delta\alpha_i$,则分子的极化率为

$$\alpha_A = \sum n_i \Delta\alpha_i \quad (4.5)$$

表 4.5 某些化合物的第一电离能

化合物	$I(\text{kcal/mol})$	化合物	$I(\text{kcal/mol})$
H ₂ O	289	(CH ₃) ₂ CO	233
C ₂ H ₅ OH	247	C ₃ H ₈	258
(CH ₃) ₂ O	235	CH ₃ CH=CH ₂	225
NH ₃	249	CH ₂ =CHCl	229
(CH ₃) ₂ NH	221	C ₆ H ₆	212
HCOOH	250	CH ₃ C≡CH	259
CH ₃ CHO	235		

§ 4.2.3 电离能(I)

电离能反映了分子对外层电子的制约能力,电离能可以通过紫外光谱的带系极限推算出来。各种有机化合物的电离能近似地视为常数,其值约为 230kcal/mol。大部分的有机化合物的电离能与此值相差不超过 10%。

§ 4.2.4 分子间的距离(r)

如果溶液的分子具有氢键结合能力,则分子可以彼此连结形成一个笼状结构,于是溶质分子可以进入笼中的孔洞中去。如果溶质是直链分子,当增加碳原子数目时,只增加链长度而不增加链的粗细,因此对于同系物来说,分子的质心间的距离 r 近于

保持常数。如果液相分子是链状的，而链状的溶质分子溶解时与它平行排列，这时分子质心间的距离也不随链长变化。在这两种情况下 r 值保持不变，因此在大多数情况下，同系物中链长基本上不影响溶质与溶剂分子间的质心距离。但是当分子带有支链时，则随着支链化程度的增加 r 值一般都变大，因而同族异构体分子与溶剂分子间的作用能有所不同。在气相色谱中这反映在同碳数的同类化合物中，异构体往往比正构化合物容易洗脱出来。为了全面研究 r 值对分子间作用能的影响，必须拟定更精细、更接近于真实情况的微观模型^[8]。

§ 4.3 分子结构参数

分析色谱过程中涉及的分子相互作用，可以看到主要有两种分子结构特征决定溶质的保留值。其一是与分子体积相关的非极性或非特异性作用力；另一种结构参数则是极性的或特异性的作用力。表4.6列出的是常用于分子结构与保留值定量关系研究的描述溶质分子结构的参数。

表 4.6 用于分子结构保留值定量关系研究的结构参数

具有加和性的参数	碳数、分子质量、摩尔体积、分子体积、分子折光指数、极化率、总能量
电子效应参数	偶极矩、取代基常数、各种量化指数
分子形状参数	拓扑指数
氢键作用参数	

§ 4.3.1 与分子体积相关的结构参数

对于同系物或结构相关的同类化合物而言，溶质的色谱保留值由溶质的分子体积相关的参数所决定。这类分子结构参数具有加和性，主要反映了溶质参与分子间非极性或色散作用力的能

力。这类参数有分子体积、分子比表面积、分子折光指数和分子总能量等，同时这一类参数间有良好的相关性。Kaliszan 认为最适合于反映色谱中色散作用力的分子结构参数是量化计算的分子总能量，它是分子作用能和分子（或原子）核与核排斥作用力的加和^[9]。

§ 4.3.2 反映溶质分子电子分布的结构参数

要正确确定溶质分子电子分布的状况比较困难，因此要得到描述电子分布状况的结构参数比与分子体积相关的结构参数困难得多。在一些特定的情况下，溶质的极性可以由一个或多个电子参数（如溶剂化结构参数的 π^* ）、拓扑参数和分子形状参数来表达。Kaliszan 认为最适合于反映一个分子电子分布的是量化计算的结构参数。他认为偶极矩很难正确地反映化合物的极性。图 4.1 是由量子化学计算分子中一些原子的电荷数分布 (Δ) 作为亚分子极性参数的示意图。Kaliszan 认为亚分子结构的极性是反映分子结构对保留值贡献的一个重要参数^[9]。例如，对于 1, 4-

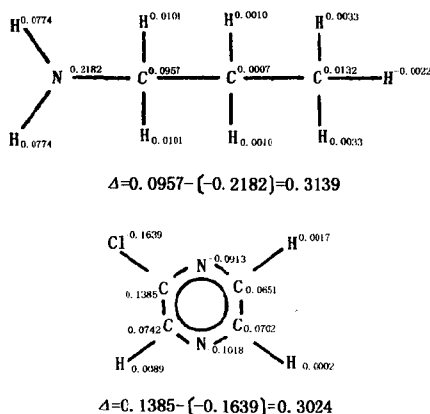


图4.1 化合物分子的过量电荷密度分布和亚结构极性参数的估算

二氧六环化合物^[10],它的偶极矩为0,但在色谱分离过程中,1,4-二氧六环保留值可以认为由二个极性的部分贡献所决定.半经验的电子效应参数还有 Hammett 常数、溶剂化结构参数 π^* 和 Hansch 或 Rekker 的基团疏水常数等.

§ 4.3.3 分子形状的结构参数

对于一组特定的溶质在指定的色谱条件下分离时,其保留有可能由分子形状所决定.分子形状很难由一个定量化的术语来表达.对于刚性的分子如多环芳烃(PAH),其分子形状参数被定义为能恰好放一个分子的长方体的长度(α)与宽度(β)的比值(η).图4.2是计算一个多环

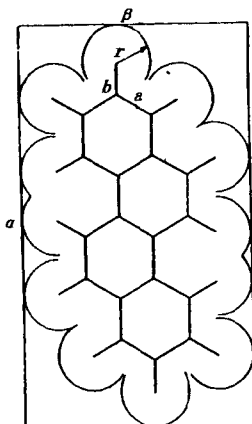


图 4.2 由萘作实例计算分子的形状参数 $\eta = \alpha / \beta$.

图中 a 和 b 表示 C—C 和 C—H 键的长度(约 0.14nm 和 0.11nm); r (0.12nm) 是原子的范德华半径^[11].

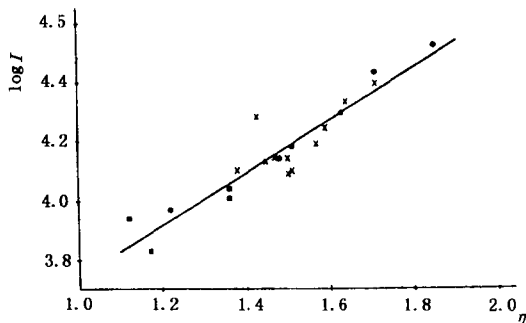


图 4.3 多环芳烃在反相色谱中的保留指数 $\log I$ 与溶质分子长度和宽度比值(η)的线性关系

■ 为甲基取代苯并[c]菲; × 为甲基取代苯并[a]蒽; ● 为甲基取代蒽.

芳烃形状参数的示意图。Wise 等人^[12]利用这一分子形状参数预测甲基取代多环芳烃异构体在反相色谱的中保留顺序。图4.3是溶质实测保留值与溶质形状参数的关系图。

§ 4.3.4 拓扑参数

把分子结构转化成各种数字化的结构参数，不仅在分子结构与保留值定量关系研究中有重要意义，而且对化学中的其它领域和医学方面也有同样重要的意义。化学图论的理论可以由一个数学图形来解释分子的化学结构式。这样的分子图形可以由一个矩阵、多项式、一序列数或拓扑学指数来表达。应用最多的应属

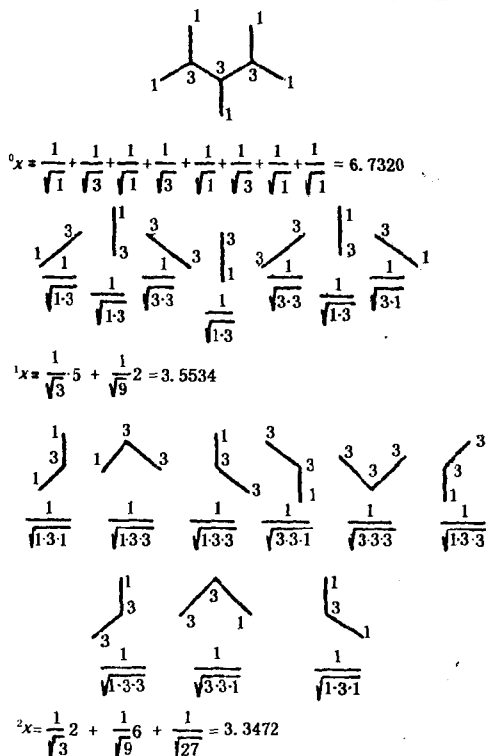


图 4.4 2,3,4-三甲基戊烷分子连通指数的计算

Randic 等人^[13]发展的定义分子支链情况的分子连通指数. 计算溶质分子连通指数的一个范例如图4.4所示. 分子中每一原子的连接性被定义为该原子的价态电子数与该原子连接的氢原子数的差值, 由此把每一个原子的连接性按一定方式计算可以得到的分子的连通指数. Wells 等人^[13]的研究结果表明, 对于同一类化合物或氢键作用力较弱的色谱体系中, 分子连通指数可以很好地与反相色谱的保留值相关联.

§ 4.4 分子结构与保留值定量 关系的应用

§ 4.4.1 高效液相色谱中的自由能关系

在线性自由能关系中, 液相色谱中保留值的对数被认为与色谱分配过程中的自由能变化呈线性关系. 但事实上, 并非所有的色谱数据都适合于分子结构保留值定量关系的研究. 众所周知, 与焓变 ΔH 和熵变 ΔS 相关的自由能变化可按 Gibbs 方程表达:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.6)$$

式中, T 是柱温. 如要使液相色谱中的线性自由能关系成立, 则式(4.6)中的焓或熵的变化必须为一常数, 或焓的变化与熵的变化必须线性相关, 亦即在 $T = \beta$ 时有:

$$\Delta H = \beta\Delta S + \Delta G_{\beta} \quad (4.7)$$

当一系列的化合物在色谱分配过程中存在熵与焓的补偿效应时, β 和 ΔG_{β} 值应为恒定值, 这里 β 值被称之为补偿温度. Melander 等人^[14]的研究结果表明, 如式(4.7)能成立, 则溶质在不同柱温下测定的保留值应与焓变存在线性关系. 但在大多数的分子结构保留值定量关系研究中, 很少检验熵与焓的补偿关系, 线性自由能关系被认为是更优先的.

在线性自由能关系研究中, 另一个值得注意的问题是如何使所得到的定量关系具有物理和统计意义. 因此在色谱保留值与分子结构定量关系式中应有表4.7所列出的一些评价关系式的统计

参数.

表 4.7 评价分子结构色谱保留值定量
关系所需的统计学参数

$\log(\text{保留值}) = f(ax_1, \dots, x_k)$
r : 相关系数
S : 标准偏差
$F\text{-检验值} = \frac{(n-k-1)R^2}{k(1-R^2)}$
P : 显著性水平
用于关联的分子结构参数间的相关性
相关系数的置信度(通常为 95%)

一些研究者在定量关系的回归中,只考虑相关系数,不考虑分子结构参数的统计显著性而把不是独立的尽可能多的参数用于定量关系式中,由此得到的定量关系式其相关系数和标准偏差可能有所提高,但这样的结果并没有很好地表达定量关系的真实物理意义.一般来说,应使定量关系式尽可能地简单和显著^[16];每一个用于关联的独立的结构参数至少有 4~5 个实验数据相对应.

§ 4.4.2 分子结构色谱保留值定量关系用于色谱保留机理的研究和保留值预测

Karger 等人^[17]研究了反相色谱中不同极性官能团的同系物的保留行为,发现不同官能团的同系物的溶解度随溶质的分子体积线性增加(如图 4.5 所示).由图 4.5 可见,除正构醇类同系物以外,其它类同系物的溶解度与分子体积的线性关系是平行的,这一结果表明当溶质的极性作用力相同时,溶质的非极性作用力主要取决于它们的分子体积.另一方面,考虑溶质分子体积相同而极性官能团不同的情况,可以预见溶质的溶解度应与溶质的极性呈线性关系.但要真正确定一个化合物的极性是非常困难的.对于 Karger 等人研究的单官能团极性化合物,如用溶质的偶极

矩作为化合物的极性，则溶质的溶解度与偶极矩间的关系如图4.6所示。以上的分析结果表明，溶质的非极性作用力主要取决于分子体积的大小，而极性作用力与溶质的偶极矩相关。

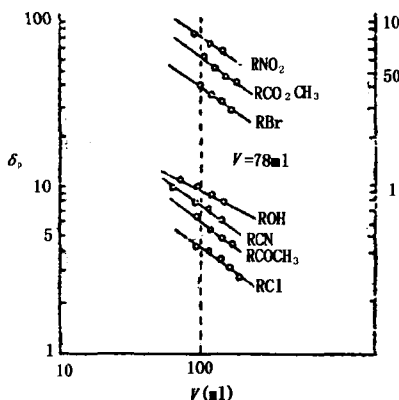


图 4.5 单官能团同系物的极性溶解度参数与溶质分子体积间的关系

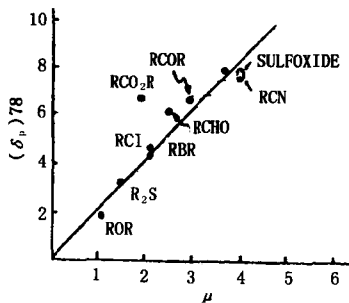


图4.6 分子体积规一化到 78ml/mol 的极性溶解度参数与单官能团化合物偶极矩的关系

邹汉法等人^[18,19]利用溶质分子结构参数研究溶质保留值与分子结构的定量关系。根据 Taft 等人^[20]的工作,溶质与溶剂的分

子间相互作用能 X 可表达为

$$X = X_0 + gV_w/100 + s\pi^* + b\beta_m + a\alpha_m \quad (4.8)$$

式中, $gV_w/100$ 是空穴项, 表示在溶液中提供放入一个溶质分子的空穴而分离溶剂分子所需的能量; $s\pi^*$ 表示溶剂分子与溶质分子间偶极-偶极和偶极-诱导偶极间的相互作用; $b\beta_m$ 和 $a\alpha_m$ 分别表示溶剂作为给质子酸(HBD)、溶质作为受质子碱(HBA)和溶剂作为受质子碱(HBA)、溶质作为给质子酸(HBD)间的相互作用能. 分子体积 V_w 可由 Bondi 方法^[21] 计算; π^* , β_m 和 α_m 是溶剂化参数, 可由有关文献中查阅^[22] 或由紫外、红外和核磁等方法测定^[23]. 从分子间相互作用的基本理论可知, 分子间的相互作用主要由色散、偶极和氢键作用力所决定, 而溶剂化结构参数是以上作用性质的正确表达形式.

在给定的液相色谱柱系统下, 溶质的保留值由溶质的分子结构所决定, 其保留值与溶质的溶剂化结构参数有以下的定量关系:

$$\ln k' = f_1 + f_2(V_w/100) + f_3\pi^* + f_4\beta_m + f_5\alpha_m \quad (4.9)$$

式中, f_1 为常数, f_2, f_3, f_4 和 f_5 是与固定相和流动相的疏水性、偶极性、给质子和接受质子能力相关的常数.

在反相色谱中溶质的 k' 值与冲洗剂中有机溶剂浓度间的关系为

$$\ln k' = a + cC_b \text{ 或 } \log k' = \log k_w - S\phi \quad (4.10)$$

式中 a, c 在给定的固定相和冲洗剂下只与溶质的分子结构性质相关, 即有:

$$\left. \begin{aligned} a &= p_1 + p_2(V_w/100) + p_3\pi^* + p_4\beta_m + p_5\alpha_m \\ c &= q_1 + q_2(V_w/100) + q_3\pi^* + q_4\beta_m + q_5\alpha_m \end{aligned} \right\} (4.11)$$

式中, p_i 和 q_i ($i=1\sim 5$) 是与流动相和固定相物化性质相关的常数. 如将式(4.11)代入式(4.10), 可从分子结构参数预测不同冲洗剂配比时溶质的保留值.

在给定的柱系统下, a 和 c 值间存在以下的线性关系:

$$a = u_1 + v_1c \quad (4.12)$$

式中, u_1 和 v_1 是与溶质、冲洗剂和固定相结构性质相关的常数. 对于溶质的结构性质差别较大的情况, 如在式(4.12) 中加入氢键作用参数的影响, 有可能提高相关性:

$$a = u_1 + v_1 c + x_1 \beta_m + y_1 \alpha_m \quad (4.13)$$

式中, x_1 和 y_1 是与固定相和流动相的给质子、接受质子能力相关的参数.

对于不同种类冲洗剂条件下测定的 a 和 c 值也应存在下述的关系:

$$a_{II} = u_2 + v_2 a_I + x_2 \beta_m + y_2 \alpha_m \quad (4.14)$$

$$c_{II} = u_3 + v_3 c_I + x_3 \beta_m + y_3 \alpha_m \quad (4.15)$$

式中, 角标 I 和 II 表示两种不同的有机溶剂. u_2, v_2, x_2, y_2 和 u_3, v_3, x_3, y_3 是与固定相和流动相物化性质相关的常数.

28 种不同取代苯和多环芳烃化合物的溶剂化结构参数列于表 4.8. 将不同冲洗剂组成下列 23 种溶质 (表 4.8 中 1~23 号溶

表 4.8 一些取代基苯环和多环芳烃化合物的溶剂化结构参数

序号	溶质	V_w	π^*	β_m	α_m
1	苯甲腈	0.590	0.90	0.40	0
2	2,6-二硝基甲苯	0.869	1.02	0.56	0
3	4-硝基苯酚	0.676	1.15	0.32	0.93
4	邻甲苯酚	0.634	0.68	0.34	0.58
5	对二苯酚	0.581	0.85	0.56	1.20
6	苯酚	0.536	0.72	0.33	0.61
7	苯胺	0.562	0.73	0.56	0.16
8	联苯胺	1.062	1.46	1.10	0.32
9	苯甲醇	0.634	0.99	0.52	0.39
10	α -苯丙醇	0.830	0.95	0.55	0.33
11	苯乙醚	0.727	0.69	0.30	0
12	苯乙酮	0.690	0.90	0.49	0.06
13	苯丁酮	0.886	0.86	0.49	0
14	苯甲酸甲酯	0.736	0.76	0.39	0

续表

序号	溶质	V_w	π^*	β_m	α_m
15	苯甲酸丁酯	1.030	0.70	0.43	0
16	硝基苯	0.630	0.73	0.32	0
17	氯苯	0.581	0.71	0.07	0
18	甲苯	0.592	0.55	0.11	0
19	乙苯	0.687	0.53	0.12	0
20	丙苯	0.785	0.51	0.12	0
21	苯	0.491	0.59	0.10	0
22	联苯	0.920	1.18	0.20	0
23	菲	1.015	0.80	0.20	0
24	对甲酚	0.634	0.68	0.34	0.58
25	对硝基苯胺	0.702	1.25	0.48	0.47
26	苯甲醛	0.630	0.73	0.32	0
27	苯丙酮	0.788	0.88	0.49	0
28	萘	0.753	0.70	0.15	0

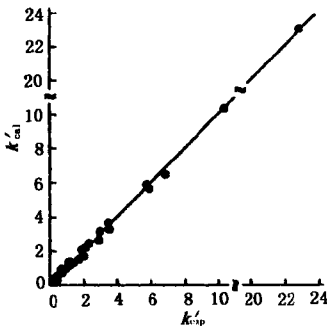


图4.7 5种溶质在不同甲醇/水配比如下实测的 k'_{exp} 与溶剂化结构参数预测的 k'_{cal} 值间的比较结果

$$k'_{\text{cal}} = 0.064 + 1.013k'_{\text{exp}}, r = 25, \\ r = 0.9996.$$

质) 实测的保留值按式(4.9) 关联, 所得的系数 f_i ($i = 1 \sim 5$) 和回归系数 r 值列于表4.9. 图4.7和图4.8是5种溶质(表4.8中24~28号溶质)由回归关系式预测的 k' 值与实测值 k' 值的比较结果. 由表4.9和图4.7, 图4.8的结果可以看出: 回归的相关系数 r 都在0.99左右, 表明关系式(4.9)能较好地描述结构性质相差较大的化合物的结构参数与保留值间的定量关系. 以甲醇/水和乙腈/水为冲洗剂时, 23种溶质的实测 k' 值与回归计算 k' 值间相

对误差大于10%的点占总实验点的40%左右, 5种溶质实测 k'

值与预测 k' 值间相对误差大于 10% 点也占总数的 40% 左右。考虑到许多相对误差大于 10% 的实测 k' 值在 0.5 以下, 这样的结果已能满足色谱峰的初步定性和分离条件的初始优化。

表 4.9 反相液相色谱中在冲洗剂中有机溶剂浓度不同时溶质的保留值与溶剂化结构参数按式(4.9)多元回归所得的结果

$C_b(\text{甲醇/水})$	f_1	f_2	f_3	f_4	f_5	r	n
0.80	-1.624	3.785	-0.171	-2.782	-1.310	0.991	23
0.72	-1.476	4.346	-0.276	-3.004	-1.363	0.993	23
0.64	-1.210	5.040	-0.324	-3.536	-1.405	0.994	23
0.56	-1.001	5.781	-0.496	-3.898	-1.349	0.994	23
0.48	-0.643	6.653	-0.701	-4.256	-1.388	0.995	23
$C_b(\text{乙腈/水})$	f_1	f_2	f_3	f_4	f_5	r	n
0.72	-1.198	3.797	-0.712	-2.589	-1.038	0.991	23
0.64	-1.050	4.393	-0.828	-3.846	-0.927	0.991	23
0.56	-0.732	4.625	-0.741	-2.999	-1.005	0.990	23
0.48	-0.560	5.105	-0.630	-3.381	-0.982	0.994	23
0.40	-0.085	5.715	-0.760	-3.720	-1.170	0.996	23

表 4.10 实测的参数 a, c 与溶剂化结构参数按式(4.11)多元回归结果

冲洗剂	q_1	q_2	q_3	q_4	q_5	r	n
甲醇/水	-2.713	-3.52	1.685	4.325	0.221	0.962	23
乙腈/水	-3.319	-6.926	0.069	3.450	0.504	0.978	23
冲洗剂	p_1	p_2	p_3	p_4	p_5	r	n
甲醇/水	0.775	11.09	-1.507	-6.489	-1.501	0.989	23
乙腈/水	1.042	8.060	-0.683	-5.054	-1.218	0.993	23

从表4.9可以得到如下结论:

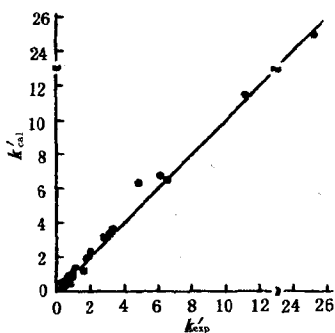


图4.8 5种溶质在不同乙腈/水配
比下实测的 k'_{op} 与溶剂化结构参
数预测的 k'_{cal} 值间的比较结果

$$k'_{cal} = -0.102 + 1.121k'_{op}, n = 25, r = 0.9981.$$

(1) 无论是以乙腈/水或甲醇/水为冲洗剂, f_2 均为正值, 亦即溶质保留值随着溶质的体积增大而增大; 同时 f_2 随着冲洗剂中乙腈或甲醇浓度的减小而增大, 说明溶质体积对保留值的贡献随着有机溶剂浓度的下降而增大; 这是因为溶质在反相色谱中的保留值随溶质的疏水性的增加而增加, 而溶质的疏水性与分子体积成比例关系。

(2) 随着有机溶剂浓度的改变, f_3 值的变化不大, 与 f_2, f_4 和 f_5 相比较, f_3 值的绝对值较

小, 这说明在本研究系统中偶极作用对溶质保留值的贡献较小, 溶质的保留值主要由与分子体积大小成比例的色散作用力和氢键作用力所决定. 比较乙腈/水为冲洗剂时 f_3 的绝对值和甲醇/水为冲洗剂时 f_3 的绝对值, 在同样的流动相配比中, 前者大于后者, 这与乙腈的偶极矩大于甲醇的偶极矩的现象相符。

(3) 参数 f_4 和 f_5 都是负值, 说明溶质的氢键作用力对保留值有负贡献; 同时 f_4 的绝对值在乙腈/水和甲醇/水作冲洗剂时随乙腈、甲醇浓度的下降而明显增大, 而 f_5 值的变化不大. 这说明随着乙腈或甲醇浓度的下降, 冲洗剂的给质子能力有所增大, 但接受质子的能力基本不变。

将实测的保留值按式(4.13)作线性回归, 求得参数 a 和 c 值, 所有溶质的回归相关系数 r 都大于0.99. 将求得的 a, c 参数与溶剂化结构参数按式(4.11)多元回归, 所得结构列于表4.10. 由于相关系数 r 值都在0.96以上, 故式(4.11)能较好地描述参数 a, c 与分子结构参数间的定量关系; 同时也表明参数 a, c 由溶质与固定相和流动相的多种分子作用力所决定. 参

数 q_2 在甲醇/水和乙腈/水为冲洗剂时为负值, 而 q_3, q_4 和 q_5 为正值, 这说明溶质体积对参数 c 值有负贡献, 而偶极和氢键作用对参数 c 值有正贡献; 即随溶质体积的增大, c 的绝对值增加, 而随偶极和氢键作用力的增大, 参数 c 绝对值不断下降. 参数 p_2, p_3, p_4 和 p_5 值的正负号与相对应的 q_i 值正好相反, 即溶质的结构参数对 a 值的贡献与对 c 值的贡献恰好相反.

将由式(4.11)计算的 a, c 参数代入式(4.10), 即可以从分子结构参数计算不同甲醇或乙腈浓度下溶质的保留值. 在甲醇/水为冲洗剂时, 实测 k' 值与计算 k' 值相对误差大于 10% 的点占总数的 51%; 在乙腈/水为冲洗剂时, 实测 k' 值与计算 k' 值的相对误差大于 10% 的点占总数的 53%, 其预测精度比等度预测的精度差, 但式(4.11)可以预测不同甲醇和乙腈浓度下的保留值, 对不同极性化合物的分离条件优化有帮助.

如把 23 种溶质的参数 a 和 c 值作线性回归, 所得结果如下:

$$\text{乙腈/水: } a = -4.821 - 1.451c, n = 23, r = 0.9750$$

$$\text{甲醇/水: } a = -3.753 - 1.341c, n = 23, r = 0.9741$$

如同时考虑氢键作用并按式(4.13)回归则得:

$$\begin{aligned} \text{乙腈/水: } a &= -3.039 - 1.2450c - 0.932\beta_m - 0.731\alpha_m, \\ n &= 23, r = 0.9900 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{甲醇/水: } a &= -1.990 - 1.151c - 0.748\beta_m - 1.333\alpha_m, \\ n &= 23, r = 0.9920 \end{aligned}$$

以上结果表明, 从回归系数 r 值来看, 考虑氢键作用后的 a 和 c 的相关性有所提高. 这说明对于极性不同的溶质, 氢键作用使它们的参数 a, c 值有较大的差别.

不同种类的冲洗剂下参数 a, c 的相互转换和预测是保留值预测的重要问题之一. 将甲醇/水为冲洗剂时测定的 a_{I} 和 c_{I} 与乙腈/水为冲洗剂时测定的 a_{II} 和 c_{II} 作线性回归, 结果如下:

$$a_{\text{II}} = 0.621 + 0.739a_{\text{I}}, n = 25, r = 0.9883$$

$$c_{\text{II}} = -1.974 + 0.676c_{\text{I}}, n = 25, r = 0.9576$$

如考虑氢键的影响,按式(4.14),(4.15)回归,结果如下:

$$a_{II} = 0.982 + 0.709a_I - 0.422\beta_m - 0.149\alpha_m, n = 25,$$

$$r = 0.9883$$

$$c_{II} = -2.322 + 0.618c_I - 0.123\beta_m - 0.668\alpha_m, n = 25,$$

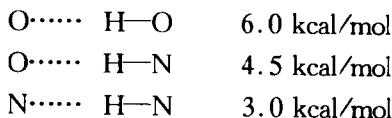
$$r = 0.9709$$

以上结果表明线性回归和多元回归的 a_I 与 a_{II} 和 c_I 与 c_{II} 的关系式都成立,但加入氢键影响因素后,不同冲洗剂下,这些参数相互转换的相关性有所提高.

卢佩章等^[24,25]从分子间相互作用原理出发,建立了式(4.10)中系数 $\log k_w$ 和 $-S$ 与溶质分子体积、偶极矩和氢键作用力的定量关系:

$$\left. \begin{aligned} \log k_w &= k'_1 + k'_2 V_w + k'_3 \mu^2 + k'_4 x_{AH} \\ -S &= k_1 + k_2 V_w + k_3 \mu^2 + k_4 x_{AH} \end{aligned} \right\} \quad (4.16)$$

溶质的分子体积可由 Bondi 方法估算^[21],偶极矩可由一些参考书查到,溶质的氢键作用力数据非常少. Franc 等人^[26]报道了几种形式的氢键作用力如下:



分子间的氢键作用力由溶质的母体结构和周围的环境影响^[27],此外还应考虑溶质和溶剂的给质子和受质子的几率^[26],由此可以根据溶质的分子结构粗略估算溶质的氢键作用能.表4.11,表4.12和表4.13分别列出了甲醇/水和乙腈/水为冲洗剂时22个和16个溶质的结构参数及实测参数 $\log k_w$, $-S$ 按式(4.16)相关联的结果.

如果溶质是非极性化合物,则 μ 和 χ_{AH} 为0,式(4.16)可简化成:

$$\left. \begin{aligned} -S &= k_1 + k_2 V_w \\ \log k_w &= k'_1 + k'_2 V_w \end{aligned} \right\} \quad (4.17)$$

表 4.11 一些苯环取代化合物的分子结构参数和实测的
参数 $-S(\text{exp})$ 与计算值 $-S(\text{cal})$ 的比较¹⁾

溶质	V_w	μ	χ_{AH}	$-S(\text{exp})$	$-S(\text{cal})$	误差
苯	43.36	0	0	-2.95	-2.95	0
氯 苯	57.48	1.58	0	-3.75	-3.45	0.39
甲 苯	59.51	0.43	0	-3.56	-3.56	0
溴 苯	60.96	1.53	0	-3.93	-3.64	0.29
碘 苯	65.48	1.28	0	-4.13	-3.89	0.24
乙 苯	69.74	0.35	0	-4.06	-4.13	-0.07
邻二甲苯	70.66	0	0	-3.87	-4.18	-0.31
苯 胺	56.38	1.56	15	-2.38	-2.28	0.10
苯 酚	53.88	1.55	12	-2.66	-2.36	0.30
苯 甲 醚	63.21	1.25	6	-3.16	-3.32	-0.16
苯 甲 醛	60.06	2.80	10	-2.62	-2.63	-0.01
苯 甲 醇	64.11	1.67	16	-2.79	-2.84	-0.05
硝基苯	62.64	3.93	8	-3.03	-3.12	-0.09
苯 腈	60.54	3.93	8	-3.05	-3.00	0.05
苯 乙 腈	70.77	3.50	12	-3.27	-3.27	0
1-氟-4-硝基苯	72.12	2.60	9	-3.45	-3.58	-0.13
1-溴-4-硝基苯	75.23	1.94	-	-3.63	-3.76	-0.13
4-硝基苯酚	38.14	4.76	16	-2.83	-2.82	0.01
1,4-苯二甲醚	77.06	1.70	16	-3.27	-3.34	-0.07
1,4-二硝基苯	88.07	4.33	20	-3.33	-3.62	-0.29
4-甲氧基苯甲醛	74.41	3.26	16	-3.17	-3.18	-0.01
4-羟基苯甲醛	65.58	4.22	20	-2.69	-2.39	0.30

1) 回归所得的定量关系为: $-S = -0.2887 + 0.07414\chi_{\text{AH}} - 0.05502V_w - 0.0015\mu^2$, A. E. = 0.1535.

表 4.12 一些取代基苯酚和苯甲酸化合物在乙腈/水为冲洗剂、
 ODS 为载体的反相色谱系统中分子结构参数和
 实测值 - S(exp)与计算值 - S(cal)的比较¹⁾

溶质	V _w	μ	χ _{AH}	- S(exp)	- S(cal)	误差
2-甲基苯酚	65.03	1.41	6.5	-3.11	-3.11	0
3-甲基苯酚	65.03	1.54	6.5	-3.17	-3.12	-0.05
4-甲基苯酚	65.03	1.54	6.5	-3.17	-3.12	-0.05
2,3-二甲基苯酚	76.18	1.25	7.0	-3.68	-3.67	-0.08
2,4-二甲基苯酚	76.18	1.39	7.0	-3.76	-3.77	-0.01
2,5-二甲基苯酚	76.18	1.44	7.0	-3.73	-3.78	-0.05
3,4-二甲基苯酚	76.18	1.53	7.0	-3.73	-3.79	-0.06
3,5-二甲基苯酚	76.18	1.76	7.0	-3.83	-3.82	0.01
苯甲酸	63.38	1.72	7.5	-3.34	-3.31	0.03
3-甲基苯甲酸	76.51	2.75	7.5	-4.09	-4.15	-0.06
2-甲基苯甲酸	76.51	1.70	7.5	-3.82	-3.95	-0.13
2-氯苯甲酸	74.84	2.49	7.5	-3.67	-4.01	-0.34
2-溴苯甲酸	77.96	1.91	7.5	-3.77	-4.06	-0.29
3-溴苯甲酸	77.96	2.17	7.5	-4.51	-4.19	0.32
4-溴苯甲酸	77.96	2.10	7.5	-4.59	-4.10	0.41
苯基-2-丙烯酸	82.32	2.26	7.5	-4.33	-4.33	0

1) 关系式为: $-S = 1.7794 = -0.2490\chi_{AH} - 0.04895V_w - 0.04216\mu^2$, A. E. = 0.1294.

表 4.13 22 个溶质在甲醇/水中实测的参数 $\log k_w(\text{exp})$ 和计算的 $\log k_w(\text{cal})$ 以及 16 个溶质在乙腈/水中实测的 $\log k_w(\text{exp})$ 和计算的 $\log k_w(\text{cal})$ 的比较结果¹⁾

甲醇/水				乙腈/水			
溶质	$\log k_w$ (exp)	$\log k_w$ (cal)	误差	溶质	$\log k_w$ (exp)	$\log k_w$ (cal)	误差
苯	2.45	2.53	0.08	2-甲基苯酚	1.67	1.68	0.01
氯苯	3.22	2.97	-0.25	3-甲基苯酚	1.65	1.67	0.02
甲苯	3.12	3.12	0	4-甲基苯酚	1.65	1.67	0.02
溴苯	3.42	3.16	-0.26	2,3-二甲基苯酚	2.10	2.09	-0.01
碘苯	3.68	3.42	-0.26	2,4-二甲基苯酚	2.14	2.09	-0.05
乙苯	3.68	3.67	-0.01	2,5-二甲基苯酚	2.14	2.09	-0.05
邻二甲苯	3.60	3.67	0.13	3,4-二甲基苯酚	2.12	2.07	-0.05
苯胺	1.36	1.43	0.07	3,5-二甲基苯酚	2.04	2.08	0.04
苯酚	1.56	1.59	0.03	苯甲酸	1.47	1.42	-0.05
苯甲醚	2.55	2.70	0.15	3-甲基苯甲酸	2.00	1.95	-0.05
苯甲醛	1.92	2.04	0.12	2-甲基苯甲酸	1.87	2.01	0.12
苯甲醇	1.57	1.74	0.17	2-氯苯甲酸	1.69	1.89	0.20
硝基苯	2.06	2.23	0.17	2-溴苯甲酸	1.80	2.03	0.26
苯腈	2.06	2.12	0.06	3-溴苯甲酸	2.33	2.05	-0.28
苯乙腈	2.15	2.67	0.52	4-溴苯甲酸	2.38	2.05	-0.33
1-氯-4-硝基苯	2.82	2.80	-0.02	苯基-2-丙烯酸	2.08	2.24	0.16
1-溴-4-硝基苯	3.00	3.01	0.01	—	—	—	—
4-硝基苯酚	1.77	1.61	-0.16	—	—	—	—
1,4-苯二甲醚	2.55	2.44	-0.11	—	—	—	—
2,4-二硝基苯	2.62	2.36	-0.26	—	—	—	—
4-甲氧基苯甲醛	2.23	2.32	0.09	—	—	—	—
4-羟基苯甲醛	1.36	1.16	-0.20	—	—	—	—

1) 溶质的结构参数与表 4.11 和 4.12 相同. 甲醇/水和乙腈/水冲洗剂所对应的回归方程分别为: $\log k_w = -0.07132 + 0.05372 V_w - 0.01747 \mu^2 - 0.09885 \chi_{\text{AH}}$; A. E. = 0.1400; $\log k_w = -0.1094 + 0.04441 V_w - 0.01305 \mu_{\text{A}}^2 + 0.07414 \chi_{\text{AH}}$; A. E. = 0.1389.

表 4.14 反相色谱中 6 个多环芳烃化合物由范德华
 体积预测参数 $-S, \log k_w$ 后计算不同冲洗剂配
 比下的 k' 值与实测值的比较结果¹⁾

甲醇/水(V/V)	95/5	90/10	85/15	80/20	70/30	60/40	50/50
$k_c^{(2)}$	0.38	0.53	0.74	1.02	1.95	3.73	7.14
苯 $k_c^{(2)}$	0.45	0.59	0.79	1.08	1.99	3.94	7.60
误差	0.07	0.06	0.05	0.06	0.04	0.21	0.46
k_c'	0.68	1.04	1.58	2.41	5.58	12.94	29.96
萘 k_c'	0.72	1.02	1.51	2.29	5.29	14.16	
误差	0.04	-0.02	-0.07	-0.13	-0.29	-1.22	
k_c'	0.84	1.36	2.22	3.60	9.52	25.13	66.35
联苯 k_c'	0.85	1.29	2.03	-3.40	9.24	27.90	
误差	0.01	-0.07	-0.19	-0.20	-0.28	2.77	
k_c'	1.18	1.97	3.29	5.50	15.35	42.86	119.7
菲 k_c'	1.23	1.94	3.17	5.40	15.58		
误差	0.08	-0.03	-0.12	-0.10	0.23		
k_c'	1.27	2.14	3.62	6.12	17.51	50.10	143.3
蒽 k_c'	1.32	2.08	3.47	5.91	17.29		
误差	0.05	-0.06	-0.16	-0.21	-0.22		
k_c'	2.10	3.87	7.13	13.14	44.66	151.7	515.4
蒾 k_c'	2.48	4.20	7.42	14.55	50.47		
误差	0.38	0.33	0.29	1.41	5.91		

1) 所用柱系统的固定相为 Nucleosil-C₁₈, 冲洗剂为甲醇/水. 参数 $\log k_w(\text{exp})$ 与 $-S$ 与范德华体积的关系式分别为 $\log k_w(\text{exp}) = 0.7104 + 0.9310V_w, -S = -2.871 - 0.7478V_w$;

2) k_c' 列出的是为计算值, k_c' 为实测值.

如果溶质为同系物, 由于同系物的偶极矩和氢键作用力非常

表 4.15 在反相色谱中 9 个正构醇同系物由碳数规律预测参数 $\log k_w$, -S 后进一步计算不同浓度下的 k'_c 值和实测值的比较结果¹⁾

溶质	乙醇/水 (V/V)											
	80/20			70/30			60/40			50/50		
	k'_c ²⁾	k'_c	误差	k'_c	k'_c	误差	k'_c	k'_c	误差	k'_c	k'_c	误差
正丁醇	0.20	0.20	0	0.29	0.30	0.01	0.42	0.40	-0.02	0.60	0.54	-0.06
正戊醇	0.23	0.22	-0.01	0.35	0.36	0.01	0.53	0.54	0.01	0.80	0.76	-0.04
正己醇	0.27	0.26	-0.01	0.43	0.44	0.02	0.68	0.69	0.01	1.08	1.07	-0.01
正庚醇	0.31	0.31	0	0.51	0.55	0.04	0.86	0.88	0.02	1.44	1.47	0.03
正辛醇	0.36	0.36	0	0.63	0.65	0.02	1.11	1.12	0.01	1.94	2.01	0.07
正癸醇	0.47	0.49	0.02	0.92	0.95	0.03	1.79	1.78	-0.01	3.49	3.70	0.21
正十二醇	0.58	0.65	0.07	1.27	1.36	0.09	2.76	2.81	0.05	5.99	6.64	0.65
正十四醇	0.84	0.87	0.03	2.00	1.93	-0.07	4.75	4.38	-0.37	11.3	11.8	-0.50
正十六醇	1.12	1.15	0.03	2.96	2.79	-0.17	7.78	6.88	-0.90	20.5	21.2	0.70

1) 所用柱系统的固定相为 YMC-phenyl, 流动相为乙醇/水. 参数 $\log k_w$, -S 与碳数 (n_c) 间线性关系分别为: $\log k_w = -0.8781 + 0.5459n_c$, -S = -1.633 - 0.5026 n_c ;

2) k'_c 为计算值, k'_c 为实测值。

接近, 则式 (4.16) 又可以简化成与同系物碳数 n_c 间的线性关系:

$$\left. \begin{aligned} -S &= a + bn_c \\ \log k_w &= a_1 + b_1 n_c \end{aligned} \right\} \quad (4.18)$$

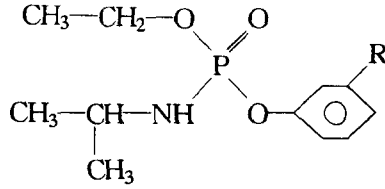
亦即溶质的保留值或保留值规律式中的系数与同系物的碳数存在良好的线性关系. 这与 Karger 等人观察到的实验结果是一致的.

如把非极性化合物由溶质分子体积或同系物碳数预测的 $\log k_w$ 和 $-S$ 值代入式(4.10)中, 则可由溶质的碳数或分子体积预测不同冲洗剂组成下溶质的保留值. 表4.14 和表 4.15 列出的是多环芳烃和正构醇同系物的保留值的预测结果. 从表中的结果可以看到保留值的预测精度绝大部分较好.

Kaliszan 等人^[28,29]采用 CNDO/ZMO 量化计算的方法计算出 12 种苯衍生物的三种结构参数, 包括溶质的分子总能量 E_T , 最大过量电荷差值 Δ 和偶极矩 μ , 其结构参数值列于表 4.16. 这些物化参数用于预测式 (4.10) 中的参数 $\log k_w$ 和 $-S$ 值, 进而预测不同冲洗剂组成下的保留值, 溶质在不同冲洗剂组成和固定相键合量 N_S 下:

$$\begin{aligned} \log k' &= [0.0454(\pm 0.0071)E_T + 2.6493(\pm 0.9187)\Delta \\ &\quad - 0.1053(\pm 0.06172)N_S - 0.4946(\pm 0.5828)]\varphi \\ &\quad + [-0.0381(\pm 0.0039)E_T + 2.1659(\pm 0.4914)\Delta \\ &\quad + 0.1696(\pm 0.0359)N_S + 1.2963(\pm 0.3120)] \end{aligned}$$

由分子结构预测的保留值和实验测定的保留值间存在良好的线性关系, 144 个数据的线性相关系数为 $r=0.986$. Zou 等人^[30]则研究了不同取代基磷酸酰胺类农药的液相色谱保留值与分子结构的定量关系. 不同取代基的 O—乙基, —O—芳香基和 —N—异丙基磷酸酰胺的分子结构式如下:



用于预测保留值的分子结构参数包括疏水性参数 π 、电效应常数 σ 、场效应参数 F 和取代基位置立体效应参数 E_S 。表4.17 是 15 种磷酸酰胺类化合物的取代基和分子结构参数。由表4.17 中的分子结构参数预测式 (4.10) 中的系数 a , c 的结果如下:

$$a = 5.199 - 0.996\pi + 2.929\sigma + 1.133F - 0.320E_S$$

$$c = 7.752 + 0.937\pi - 2.403\sigma - 1.068F + 0.260E_S$$

由分子结构参数预测的 a 和 c 值计算所得的不同冲洗剂组成下溶质的保留值与实测值的比较见表4.18。从表4.18 中可以看到 45 个实验数据, 计算值与实测值相对误差大于 10% 的数据点只占总数的 2.2%, 而相对误差大于 5% 也只占总数的 26.7%; 由此可以看到只要分子结构参数选得合适, 预测得到的保留值有相当高的精度。

表 4.16 CNDO/ZMO 量化计算的苯衍生物结构参数

化合物	总能量(E_T)	最大过量电荷 差值(Δ)	偶极矩(μ)
苯酚	-65.5548	0.4328	1.7492
苯乙酮	-81.1756	0.5077	3.0417
硝基苯	-94.8446	0.7774	5.0589
苯甲酸甲酯	-99.6184	0.6836	2.0376
对甲酚	-74.2375	0.4265	1.7379
对乙酚	-82.6639	0.4275	2.3324
对丙酚	-91.3479	0.4270	2.1472
对异丁基苯酚	-100.1758	0.4246	1.8457
苯胺	-59.5473	0.3737	1.5206

续表

化合物	总能量(E_T)	最大过量电荷 差值(Δ)	偶极矩(μ)
N-甲基苯胺	-68.2305	0.3564	1.1504
4-氯苯乙酮	-96.6241	0.5028	2.2894
3,4-二氯苯乙酮	-112.3142	0.4922	1.2809

表 4.17 磷酸酰胺类化合物的分子结构及分子
结构参数 π, σ, F 和 E_s [31]

化合物取代基(R)	代码	分子结构参数			
		π	E_s	F	σ
H	1	0.00	0.00	0.00	0.00
2-NO ₂	2	0.06	-1.01	0.67	0.82
3-NO ₂	3	-0.03	0.00	0.00	0.70
4-NO ₂	4	0.04	0.00	0.00	0.82
2-NO ₂ , 4-Cl	5	0.53	-1.01	0.67	1.09
2,5-di(Me)	6	0.92	-1.24	-0.04	-0.19
2,4-di(Cl)	7	1.23	-0.97	0.41	0.54
3-Me, 4-NO ₂	8	0.48	0.00	0.00	0.75
2-Cl, 4-NO ₂	9	0.06	-0.97	0.41	0.109
2,4-di(NO ₂)	10	-0.14	-1.01	0.67	1.64
2,6-di(NO ₂)	11	-0.34	-2.02	1.34	1.64
2-NO ₂ , 4,5-di(Me)	12	0.63	-1.01	0.67	0.63
2,6-di(NO ₂), 4-Me	13	0.00	-2.02	1.34	1.52
4,6-di(NO ₂), 2-Me	14	0.21	-2.25	0.63	1.52
3-Cl	15	0.69	0.00	0.00	0.37

表 4.18 利用分子结构参数预测不同甲醇浓度下磷酸酰胺类化合物的 k' 值与实测值的比较

溶质代码	甲醇/水(V/V)								
	80/20			30/70			60/40		
	k'_e	k'_e	误差(%)	k'_e	k'_e	误差(%)	k'_e	k'_e	误差(%)
1	0.378	0.357	2.93	0.749	0.797	-7.65	1.791	1.729	3.44
2	0.500	0.465	7.08	1.024	1.077	-5.17	2.545	2.496	1.91
3	0.453	0.432	4.59	0.925	1.004	-8.58	2.436	2.333	4.22
4	0.503	0.480	4.57	1.058	1.148	-8.53	2.868	2.747	4.21
5	0.815	0.803	1.43	2.085	2.146	-2.91	5.823	5.723	1.57
6	1.024	1.019	0.47	2.714	2.804	-3.31	7.727	7.713	0.17
7	1.500	1.481	1.28	4.364	4.517	-3.51	13.78	13.78	0
8	0.714	0.732	-2.56	1.714	1.933	-12.78	5.000	5.103	-2.06
9	1.000	0.916	8.41	2.524	2.548	-0.90	7.636	7.081	7.29
10	0.488	0.477	2.19	1.091	1.151	-5.50	2.815	2.775	1.41
11	0.381	0.371	2.75	0.810	0.821	-1.36	1.954	1.819	6.70
12	0.788	0.782	0.79	2.000	2.036	-1.82	5.500	5.305	3.55
13	0.476	0.505	-6.01	1.190	1.198	-0.66	2.618	2.843	-8.61
14	0.762	0.762	0	2.000	2.045	-2.26	5.545	5.490	0.98
15	0.833	0.815	2.20	2.167	2.172	-0.22	6.091	5.789	4.95

近年来, Wainer 和 Noctor^[32] 对分子生物色谱 (Molecular Biochromatography) 作了综述性的报道, 其中一部分工作是利用分子结构与保留值的定量关系来研究分子生物色谱的保留机理, 如 1, 4-苯并二氮杂萘类药物对映体在人血清白蛋白柱上分离机理的研究. 图4.9 是苯并二氮杂萘的分子结构式. 他们所选用的分子结构参数包括亚分子极性参数 P_{SM} 、聚合苯环上取代基和另一苯基的疏水性参数 f_y 和 f_x ; 二氮杂萘上 3 号碳原子的过量正电荷数 $C_{(3)}$, 分子的宽度 w 和二氮杂萘上 C-2, C-3 和 N-4

间的键角度 β_{cen} . 手性对映体中首先洗脱下来的化合物的保留值与分子结构数有以下的定量关系:

$$\log k'_1 = -1.7497 + 0.3895 \log f_y - 1.8392 C_{(3)} - 0.1609 w \\ + 0.0354 \beta_{\text{cen}} + 0.1736 f_x, n = 21, r = 0.8926, F = 10.5$$

而后洗脱的对映体的保留值与 k'_1 和 P_{SM} 有以下的定量关系:

$$\log k'_2 = -0.1049 + 1.0739 \log k'_1 + 0.5458 P_{\text{SM}}, \\ n = 16, r = 0.9884, F = 276$$

由此,他们认为 1,4-苯并二氮杂草类化合物以图 4.10 所示的 M 和 P 模型存在. 首先洗脱下来的对映体分子以 P 构型与人血清白蛋白发生作用, 其保留值可以表达为

$$\log k_P' = 2.4790 + 0.1834 f_{x+y} - 0.2779 w \\ n = 13, r = 0.8448, F = 12.46$$

这一结果表明 P 构型分子与人血清白蛋白的疏水性区域发生作用, 同时存在一些立体效应的限制. 后洗脱下来的 M 构型对映体的保留值可表达为

$$\log k_M' = 0.5558 + 0.8354 P_{\text{SM}} + 0.3645 f_{x+y} - 2.6904 C_{(3)} \\ n = 8, r = 0.9384, F = 9.88$$

这一结果表明, 对于 M 构型的对映体与人血清白蛋白的作用包括疏水区域和正电荷区域. 电荷作用主要来自亚分子偶极矩与人血清白蛋白正电荷区域的相互吸引力和 C-3 过量电荷的排斥作用力.

Zou 等人^[33]还利用分子结构与保留值定量关系研究胶束液相色谱的分离机理. 认为在胶束液相色谱中溶质的保留值主要由溶质的分子体积和氢键作用力所决定. 对于非极性溶质, 阳离子表面活性剂胶束液相色谱和阴离子表面活性剂胶束液相色谱具有相同的分离选择性, 而对于极性化合物, 特别是具有氢键作用能力的溶质, 二种模式的胶束液相色谱却具有不同的分离选择性. Jinno 等人^[34]则把代表电子取代效应的 Hammett 参数与反相色谱中苯酚类化合物的保留值进行定量关联. 总之, 色谱保留值与分子结构

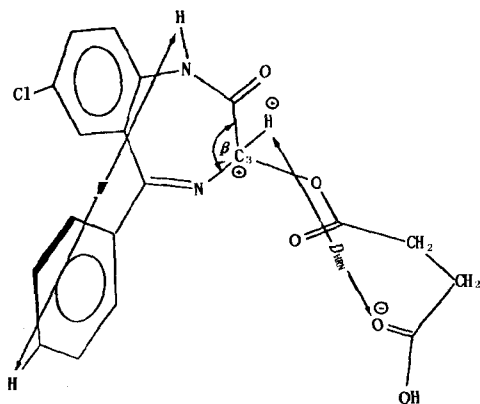


图4.9 在 HSA-CSP 固定相液相色谱中苯并二氮杂
草作为模型分子的结构参数计算

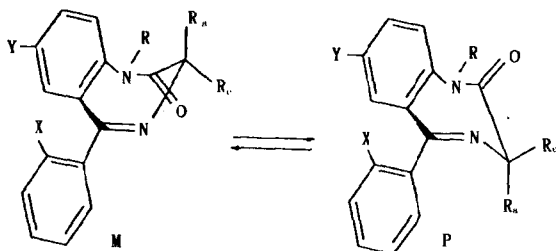


图4.10 1,4-benzodiazepine-2-one 分子的 M-和 P-构型,
 R_n 和 R_c 表示取代基的直立和平伏趋向

定量关系是一个被广泛研究的课题,总结已取得的成果,我们可以看到对于比较简单的系列样品分子(如同系物或分子结构相关的化合物),比较容易得到精度较好的分子结构与保留值的定量关系,所采用的结构参数也比较简单,如分子体积、分子表面积或连通指数等.但对于分子结构复杂或涉及的分子作用力较多的溶质,分子结构与保留值定量关系的研究较为困难,这是因为很难找到能描述分子结构真实情况的参数.从现有的研究水平来看,通过分子结构参数预测溶质保留值来定性是不现实的,但通过分子结构

与保留值定量关系研究色谱分离机理却具有重要的学术和实用价值。

§ 4.4.3 色谱保留值用于疏水性的测定

人们认识化合物疏水性的重要性始于本世纪初期 Overton 等人的研究工作^[2]，他们发现药物的药理活性与药物的疏水性有非常重要的关系。通常化合物的疏水性由其在正辛醇/水中分配系数的对数 ($\log K_{ow}$) 来表示。越来越多的研究结果表明 $\log K_{ow}$ 与药物相关结构的变化以及观察到的某些生物学、生物化学或毒性效果的变化有关^[35]。已经发现水溶性土壤沉积物吸附系数和生物富集因子与 K_{ow} 的相关性，因此又可能通过化合物的 K_{ow} 值来估算这些环境参数。正辛醇/水分配系数 (K_{ow}) 定义为一个有机化合物在正辛醇相与水相的浓度之比，即

$$K_{ow} = \frac{\text{溶质在正辛醇相中的浓度}}{\text{溶质在水相中的浓度}}$$

因此 K_{ow} 是无量纲的值。 K_{ow} 是在溶质浓度很低时进行测量的，所以 K_{ow} 是一个与溶质浓度相关性很小的参数。一般在常温 (20 ~ 25°C) 下测量 K_{ow} 值，温度对 K_{ow} 值的影响不大，每度引起的变动在 0.001 ~ 0.01 $\log K_{ow}$ 单位之间，其值可正可负。正辛醇/水分配系数经典的测定方法是摇瓶法。但由于摇瓶法测定分配系数存在以下两个缺点：(1) 操作繁琐、费时；(2) 在水相或正辛醇相中溶解度很小的化合物，分配系数测定误差很大。应用各种物理化学技术和方法测定 K_{ow} 值已引起广泛的关注。

基于大量实验数据计算的处理结果，Hansch 和 Leo^[35] 提出用溶质的碎片常数 f 和结构因子 F 来估算 $\log K_{ow}$ 值：

$$\log k_{ow} = f_{\text{总}} + F \quad (4.19)$$

由于碎片常数值和结构因子是已知的，故这一方法唯一要输入的信息是化合物的结构信息。大量研究结果表明，由 Hansch 方法计算的 $\log K_{ow}$ 值与实测值的误差在大多数情况下小于 10%。

液相色谱法已成为快速测定有机物 K_{ow} 值的重要方法之

[37-40]. 假设超热力学的线性自由能关系成立, 可以期望 $\log K_{ow}$ 与反相液相色谱中的保留值 $\log k'$ 线性相关:

$$\log K_{ow} = m \log k' + n \quad (4.20)$$

式中 m 和 n 为常数. 至今, 已有许多液相色谱法测定 $\log K_{ow}$ 值和色谱法测定的 $\log K_{ow}$ 值应用于药物化学的文献报道. 成功的实例之一是王连生等人采用反相色谱保留值测定环境污染物多芳烃的 $\log K_{ow}$ 值^[36], 液相色谱的实验条件为 C_{18} 固定相, 甲醇/水 (55/45, V/V) 为冲洗剂. 表 4.19 是液相色谱法测定的 $\log K_{ow}$ 值与 Hansch 方法的计算值. 将由 HPLC 法测定的分配系数与 Hansch 的碎片法计算值相比较, 发现测定值一般要比计算值略大一些, 但二者间有良好的线性相关性:

$$\log K_{ow(HPLC)} = 1.001 \log K_{ow(Hansch)} + 0.035$$

表 4.19 实验结果与文献值及计算值的对照表

编号	化合物名称	$\log k'$ (55%)	$\log K_{ow}$ (文献值)	$\log K_{ow}$ (测定值)	$\log K_{ow}$ (计算值)	熔点 (°C)
1	甲苯	0.785	2.74	2.77	2.79	液体
2	苯乙烯	0.852	2.95	2.90	2.99	液体
3	萘	1.056	3.38	3.29	3.29	81
4	β -甲基萘	1.463	4.11	4.09	3.95	35
5	蒽烯	1.418		3.99	3.74	93
6	联苯	1.490	4.06	4.13	4.00	70
7	芴	1.545	4.18	4.23	4.40	117
8	4-甲基联苯	1.768		4.66	4.66	
9	菲	1.686	4.53	4.50	4.45	101
10	蒽	1.754	4.54	4.63	4.45	216
11	1-甲基芴	1.929		4.97	5.06	
12	芘	1.986	5.09	5.08	4.90	156
13	1-甲基菲	1.986		5.08	5.11	123

续表

编号	化合物名称	$\log k'$ (55%)	$\log K_{ow}$ (文献值)	$\log K_{ow}$ (测定值)	$\log K_{ow}$ (计算值)	熔点 (°C)
14	3-甲基菲	2.024		5.15	5.11	65
15	9-甲基菲	1.995	5.07	5.10	5.11	81.5
16	2-甲基菲	2.07		5.24	5.11	
17	荧蒽	1.866		4.85	4.90	111
18	三亚苯	2.199		5.49	5.61	199
19	苯并[a]芴	2.297		5.68	5.56	190
20	苯并[b]芴	3.344		5.77	5.56	209
21	9,10-二甲基蒽	2.304		5.69	5.77	183
22	蒽	2.326		5.73	5.61	256
23	苯并[a]蒽	2.357		5.79	5.61	162
24	丁省	2.342	5.90	5.76	5.61	357
25	2-乙基蒽	2.388		5.85	5.77	
26	3,4-苯并荧蒽	2.345		5.78	5.71	
27	苯并[a]花	2.485	6.00	6.04	6.06	177
28	花	2.369		5.82	6.06	278
29	9-苯基蒽	2.471		6.01	6.32	153
30	苯并[a,h,i]	2.792		6.63	6.51	278
31	3,4-苯并丁省	2.886	6.82	6.42		

对于中性的化合物而言,用于测定 K_{ow} 的反相色谱系统采用硅胶为基质的填料(如硅胶 C_{18} 填料)。如果溶质是结构相近或相关的化合物,则 $\log k'$ 值与 $\log K_{ow}$ 值的相关性较好,预测精度也较高。但如果溶质的分子结构差别很大,往往预测精度较低。Brumann 等人^[41]采用式(4.10)中的参数 $\log k_w$ 值与 $\log K_{ow}$ 线性关联,其 $\log K_{ow}$ 的预测精度有所提高。陈农等人^[42]则把表示分子氢键作用力的分子结构参数 α_m 和 β_m 用于色谱保留值与 $\log K_{ow}$ 的定量关

系,使 $\log K_{ow}$ 的预测精度有较大的提高. 另一方面,提高 $\log K_{ow}$ 预测精度的途径是使所采用的反相色谱条件与正辛醇/水分配过程尽可能地相符合. 有人^[43]把正辛醇涂渍到固定相表面或选用正辛醇饱和的流动相液相色谱法测定溶质的 K_{ow} 值. 在以硅胶为基体的固定相液相色谱中,由于残余硅羟基的作用,使得有机胺类化合物的 $\log K_{ow}$ 的测定比较困难;即使选用所谓封尾的反相色谱填料,有时仍很难完全清除残余硅羟基的影响. 为了改善这一情况, Biasi 等人^[44]采用聚苯乙烯小球或石墨碳小球为基质的反相色谱法测定有机氮的 $\log K_{ow}$ 值,在聚苯乙烯类填料的液相色谱系统中,其 $\log k'$ 和 $\log K_{ow}$ 值间的相关系数为 0.906, 而石墨碳小球填料系统中两者的相关系数只有 0.2. Kaliszan 等人^[45]则采用聚丁烯铝新型的固定相液相色谱系统, 有效地克服这一缺陷. 表 4.20 是 24 种酸性、碱性和中性化合物在聚丁烯铝为填料的液相色谱系统中的保留值和由 Hansch 和 Leo 报道的 $\log K_{ow}$ 值^[35]. 图 4.11 是 $\log k'$ 值与 $\log K_{ow}$ 值间的线性回归结果, 两者的相关系数达 0.96. 表 4.20 中的化合物 1 和 12 由于在色谱中无保留, 不能用于 $\log K_{ow}$ 与 $\log k'$ 的关联. 而化合物 9 和 17 由于其在反相色谱中的保留值太小, 而严重偏离了 $\log K_{ow}$ 与 $\log k'$ 的线性关系.

表 4.20 24 种中性和酸、碱性化合物在反相色谱中的保留值 $\log k'$ 和 $\log K_{ow}$ 值^[35]

	化合物	$\log K_{ow}$	$\log k'$
1	安替比林	0.23	—
2	4-氯安替比林	1.28	-0.69
3	吡 啶	3.40	0.41
4	普鲁卡因	1.90	-0.64
5	(+)麻黄碱	1.02	-0.66
6	4-甲基苯甲酸	2.65	0.11
7	4-氯苯胺	1.64	-0.10

续表

	化合物	$\log K_{ow}$	$\log k'$
8	对甲苯胺	1.42	-0.51
9	苯甲酰胺	0.65	-1.55
10	阿托品	1.81	-0.33
11	9-氨基普鲁卡因	2.74	0.04
12	磺胺	-0.72	—
13	苯甲酸	1.95	-0.40
14	N-乙酰苯胺	1.16	-0.99
15	苯酚	1.48	-0.58
16	氯苯	2.83	0.63
17	咖啡因	-0.07	-1.14
18	苯胺	1.08	-0.86
19	二苯基胺	3.44	0.93
20	邻苯胺基苯甲酸	4.36	0.96
21	苯乙酮	1.66	-0.38
22	吩噻嗪	3.78	1.22
23	联苯	4.06	1.32
24	氯吩噻嗪	5.35	1.64

所使用的冲洗剂为甲醇/缓冲液(50/50),对于酸性化合物 1,6,12,13,15,17 和 20,缓冲液为 KCl/HCl 离子强度为 0.1(pH 1.65).对于其它中性和碱性化合物,缓冲液为 0.05mol Na₂HPO₄/0.1 mol NaOH(pH 10.7),离子强度为 0.1.

Kaliszan 的结果表明,如果溶质在反相色谱中的保留值很小或无保留,则不能由反相色谱法测定 $\log K_{ow}$ 值或 $\log K_{ow}$ 的测定精度很差.Zou 等人^[46,47]认为对于可以解离的有机离子,可以采用反相离子对色谱法测定这一类化合物的 $\log K_{ow}$ 值,他们提出的定量关系式为

$$\log K_{ow} = m \log k'_{ip} + l n_e + n \quad (4.21)$$

式中, m , n 和 l 为常数, $\log k'_{ip}$ 值为溶质在反相离子对色谱中的保

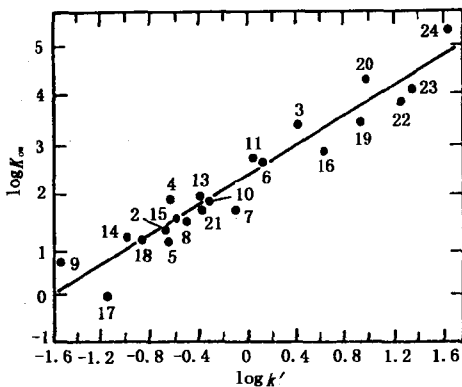


图4.11 表4.20中化合物的 $\log K_{ow}$ 与 $\log k'$ 间的线性关系

$$\log k_{ow} = 1.49 \log k' + 2.36, \quad n = 22, r = 0.96.$$

留值, n_e 为溶质与离子对试剂电荷相反的有效电荷数. 他们用 21 种氨基苯磺酸和萘磺酸为测定的溶质, 考察了式(4.21)的正确性. 表4.21 列出的是 21 种有机离子在反相色谱中的保留值 k'_{Rp} , Hansch方法估算的 $\log K_{ow}$ 值和有效负电荷数. 表4.22 列出的则是这 21 种有机离子在反相离子对色谱中恒定离子对试剂四丁基碘化铵 4mmol/L 时不同甲醇浓度下测定的保留值 k'_{ip} . 图4.12 是表4.21 中所列出的 $\log K_{ow}$ 与 $\log k'_{Rp}$ 线性回归结果, 两者的线性相关系数 r 只有 0.911. 如把表4.22 中的 $\log k'_{ip}$ 值与表4.21 中的 $\log K_{ow}$ 值及 n_e 按式(4.21) 回归, 所得的结果如下:

$$C_b = 0.325, \log K_{ow} = 1.595 + 1.258 \log k'_{ip} - 4.597 n_e, \\ r = 0.9947, n = 20;$$

$$C_b = 0.281, \log K_{ow} = 1.304 + 1.251 \log k'_{ip} - 4.694 n_e, \\ r = 0.9949, n = 21;$$

$$C_b = 0.239, \log K_{ow} = 1.127 + 1.283 \log k'_{ip} - 4.790 n_e, \\ r = 0.9951, n = 20;$$

$$C_b = 0.198, \log K_{ow} = 0.829 + 1.293 \log k'_{ip} - 4.869 n_e,$$

$$r = 0.9957, n = 20$$

从以上的回归结果可以看到 $\log K_{ow}$ 与 $\log k'_{ip}$ 和 n_e 的定量关系的相关系数都在 0.995 以上. 由 $\log K_{ow}$ 和 $\log k'_{Rp}$ 线性关系预测的 $\log K_{ow}$ 与 Hansch 方法估算的 $\log K_{ow}$ 误差大于 10% 的数据点有 80% 以上. 反之由式 (4.21) 预测的 $\log K_{ow}$ 与 Hansch 方法估算的 $\log K_{ow}$ 值间误差大于 10% 的数据点只占总数的 19.8%. 很显然, 由反相离子对色谱法测定在反相色谱中无保留或保留值很小的有机离子的 $\log K_{ow}$ 值是可行的. 对于电荷数相同, 取代基位置不同的有机离子异构体, Zou 等人^[48] 进一步把 Hammett 常数作为电子效应的结构参数用于 $\log k'_{ip}$ 值预测 $\log K_{ow}$ 值, 取得很好的结果.

表 4.21 氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在反相色谱中保留值 k'_{Rp} , Hansch 方法估算的 $\log K_{ow}$ 值以及它们的负电荷

溶 质	k'_{Rp}	$\log K_{ow}$	n_e
2-氨基苯磺酸	2.31	-3.42	1
3-氨基苯磺酸	1.01	-3.86	1
4-氨基苯磺酸	0.484	-3.86	1
2-氨基-4-甲基苯磺酸	8.29	-2.76	1
3-氨基-6-甲基苯磺酸	2.87	-3.20	1
3-氨基-4-氯苯磺酸	8.46	-3.15	1
3-氨基-6-氯苯磺酸	1.87	-3.15	1
2-氨基-5-甲氧基苯磺酸	6.62	-3.49	1
3-氨基-6-甲氧基苯磺酸	1.43	-3.52	1
2,4-二氨基苯磺酸	0.510	-4.65	1
2-氨基萘磺酸	15.66	-2.44	1

续表

溶 质	k'_{Rp}	$\log K_{ow}$	n_c
8-氨基萘磺酸	29.85	-1.99	1
5-氨基萘磺酸	4.27	-2.88	1
6-氨基萘磺酸	10.73	-2.88	1
6-氨基-2-萘磺酸	12.02	-2.88	1
4-氨基-1,3-苯二磺酸	0.078	-8.18	2
1,3-二氨基-4,6-苯二磺酸	0.093	-8.97	2
3-氨基-1,5-萘二磺酸	0.179	-7.90	2
3-氨基-2,7-萘二磺酸	1.07	-7.46	2
7-氨基-1,3,5-萘三磺酸	0.027	-12.40	3
7-氨基-1,3,6-萘三磺酸	0.032	-11.96	3

表 4.22 氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在反相离子对色谱不同甲醇浓度下实测的容量因子 k'_{Rp} 值

溶 质	C_b 甲醇体积分数 (V/V)			
	0.325	0.281	0.239	0.198
2-氨基苯磺酸	0.461	1.00	1.60	3.04
3-氨基苯磺酸	0.255	0.530	0.840	1.34
4-氨基苯磺酸	0.152	0.301	0.489	1.01
2-氨基-4-甲基苯磺酸	1.54	3.27	5.69	9.86
3-氨基-6-甲基苯磺酸	0.700	1.45	2.35	4.09
3-氨基-4-氯苯磺酸	1.45	3.15	5.29	9.65
3-氨基-6-氯苯磺酸	0.498	0.985	1.62	3.07
2-氨基-5-甲氧基苯磺酸	0.751	1.56	2.46	4.97
3-氨基-6-甲氧基苯磺酸	0.189	0.339	0.554	1.15
2,4-二氨基苯磺酸	0.142	2.83	0.433	0.948

续表

溶 质	C _b 甲醇体积分数(V/V)			
	0.325	0.281	0.239	0.198
2-氨基萘磺酸	—	4.53	8.04	18.34
8-氨基萘磺酸	8.67	17.41	—	—
5-氨基萘磺酸	0.620	1.26	2.20	4.21
6-氨基萘磺酸	0.779	1.63	2.94	5.75
6-氨基-2-萘磺酸	1.23	2.80	5.01	9.85
4-氨基-1,3-苯二磺酸	0.292	0.676	1.12	2.46
1,3-二氨基-4,6-苯二磺酸	0.284	0.687	1.24	2.35
3-氨基-1,5-萘二磺酸	0.629	1.63	3.34	9.66
3-氨基-2,7-萘二磺酸	0.760	2.06	4.40	12.04
7-氨基-1,3,5-萘三磺酸	1.09	3.04	6.98	16.79
7-氨基-1,3,6-萘三磺酸	1.14	3.25	7.40	17.66

Hansch 和 Leo^[35]以及 Rekker^[49]发展的溶质的疏水性估算方法都是基于溶质分子结构各个碎片和结构因子对疏水性的贡献。从分子结构液相色谱保留值定量关系研究来看,由于缺乏或很难找到合理描述分子结构的参数,因此一些色谱工作者从色谱保留值出发来测定各种取代基团对保留值的贡献。Tomlison 等人^[50]定义取代基团的保留值(τ)为

$$\tau = \log(k'_j/k'_i) \quad (4.22)$$

i 和 j 代表相同母体下的不同取代基团,通常情况 i 为氢原子作为其它基团对保留值贡献的参照。Feng 等人^[51]则把不同取代基团对保留值的贡献(τ)值与 Hansch 的基团疏水性参数进行定量关联,取得满意的结果。Riley 等人^[52]则把三嗪、偶氮嘌呤和苯甲酸

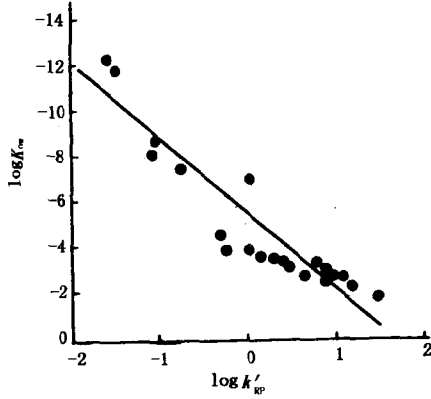


图4.12 由 Hansch 方法估算的 $\log K_{ow}$ 值与反相色谱保留值 $\log k'_{Rp}$ 的线性回归结果

$$\log K_{ow} = -4.971 + 0.636 \log k'_{Rp}, r = 0.9106, n = 21.$$

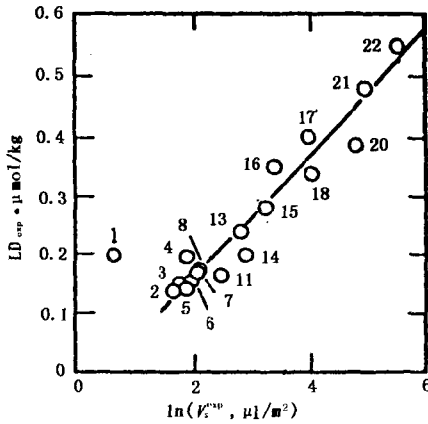


图 4.13 强心苷类药物的液相色谱保留值与毒性参数 LD 的定量关系

三类母体下测定的不同取代基对保留值的贡献值(τ)与 Rekker 的基团疏水性参数 π 值进行了定量关系,其结果如下:

苯甲酸类溶质, $\tau = 0.49\pi + 0.03$, $r = 0.940$, $n = 10$;

偶氮嘌呤类溶质, $\tau = 0.49\pi + 0.01$, $r = 0.983$, $n = 10$;

三嗪类溶质, $\tau = 0.51\pi + 0.05$, $r = 0.961$, $n = 20$;

所有三类化合物, $\tau = 0.49\pi - 0.02$, $r = 0.965$, $n = 40$

以上这些结果表明官能团的 τ 参数与其疏水性参数 π 值有良好的线性关系, 而与所采用的冲洗剂条件关系不大. 用取代基对保留值的贡献值测定疏水性参数的缺点是: 相同取代基团在分子中不同位置具有不同的作用能, 因此在某一位置上对保留值的贡献不能很好地转换到其它位置上对保留值的贡献, 也就是说测定的该基团对保留值的贡献值无普遍的适用性, 这也决定了用 τ 值测定基团的疏水性参数的正确度不可能很高.

§ 4.4.4 液相色谱保留值与生物活性和一些环境化学参数的关系

色谱中的保留值或从色谱中得到的溶质结构参数已被广泛用于结构与生物活性定量关系的研究^[2]. 在这些定量关系的研究中, 很多情况下色谱保留值被认为是与溶质在正辛醇/水分配系数相关的疏水性结构参数. 毫无疑问, 溶质在正辛酸/水间的分配是与溶质的生物传输过程和溶质与受体作用最相似的物理化学过程之一, 涉及到疏水、电子和立体效应等分子间的作用力. Baker 等人^[53]认为利用化合物在反相色谱中的保留指数^[54]预测巴比胺和 Propanolol 药物的生物活性, 比用正辛醇/水分配系数预测这两类药物的生物活性效果更好; 但对于邻氨基苯甲酸衍生物的抗炎活性的预测而言, 采用正辛醇/水分配系数比色谱保留值效果更好. Baker 等人的保留指数值还被成功地用于 4-羟基喹啉-3-羧酸类化合物的细胞呼吸抑制因子^[55]和喹啉有机胺类化合物抗血压活性的预测^[56]. Valko 等人^[57]把偶氮亚氨基吗啡类化合物的止痛活性与反相色谱保留值进行定量关联, 结果表明在冲洗剂中乙腈含量为 40% 时测定的 $\log k'$ 值预测止痛活性的精度最好. Davydov^[58]等人则研究了强心苷类药物分子毒性 LD 与

液相色谱保留值 $\ln V_s$ 的定量关系, 其结果如图4.13所示, 其HPLC系统所采用的填料为硅胶为基质的联苯键合固定相, V_s 值被定义为溶质在每克固定相上的保留体积 V_a 与固定相比表面积 S 的比值, 由此得到的预测结果相当好。

参 考 文 献

- [1] J. M. Prausnitz, *Science*, **205**, 759 (1979).
- [2] R. Kaliszan, *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*, Wiley, New York, 1987.
- [3] E. Tomlinson, British Pharmaceutical Conference Science Award Lecture, Brighton, UK, 1981.
- [4] C. Reichardt, *Solvent Effects in Organic Chemistry*, Verlag Chemie, p. 227, Weinheim, Germany, 1979.
- [5] R. Kaliszan, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **16**, 323 (1986).
- [6] J. H. Knox and R. Kaliszan, *J. Chromatogr.*, **349**, 211 (1985).
- [7] Cs. Horvath, W. Melander and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).
- [8] 卢佩章、张祥民、戴朝政, 色谱理论基础, 科学出版社, 北京, 1997.
- [9] R. Kaliszan, in "High-Performance Liquid Chromatography" (P. R. Brown and R. A. Hartwick, Ed.), John Wiley & Sons, p. 563, New York, 1989.
- [10] R. P. W. Scott, *J. Chromatogr.*, **122**, 35 (1976).
- [11] A. Radecki, H. Lamparczyk and R. Kaliszan, *Chromatographia*, **12**, 595 (1979).
- [12] S. A. Wise, W. J. Bonnett, F. R. Guenther and W. E. May, *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 457 (1981).
- [13] M. Randic, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6609 (1975).
- [14] B. Walczak, L. Morin-Allory, M. Lafosse, M. Dreux and J. R. Chretien, *J. Chromatogr.*, **395**, 183 (1987).
- [15] W. Melander, D. E. Campbell and Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **158**, 213 (1978).
- [16] J. K. Seydel and K. J. Schapter, *Chemische Struktur und Biologische Aktivitat von Wirkstoffen-Methoden der Quantitative Struktur-Wirkung-Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1979.
- [17] K. Osmialowski, J. Halkiewicz and R. Kaliszan, *J. Chromatogr.*, **361**, 63 (1986).

- [18] Hanfa Zou, Yukui Zhang and Peichang Lu, *J. Chromatogr.*, **522**, 49 (1990).
- [19] 邹汉法、张玉奎、洪名放、舒玉瑛、卢佩章, *化学学报*, **53**, 269 (1995).
- [20] M. H. Abraham, R. W. Doherty, M. J. Kamlet and R. W. Taft, *Chem. Britain*, **75**, 629 (1986).
- [21] A. Bondi, *J. Phys. Chem.*, **68**, 629 (1964).
- [22] M. J. Kamlet, J. L. Abboud, M. H. Abraham and R. W. Taft, *J. Org. Chem.*, **48**, 2877 (1983).
- [23] M. J. Kamlet, J. L. Abboud and R. W. Taft, *Prog. Phys. Org. Chem.*, **13**, 485 (1981).
- [24] 卢佩章、邹汉法、张玉奎, *中国科学 (B辑)*, **34**, 347 (1991).
- [25] Peichang Lu, Hanfa Zou and Yukui Zhang, *J. Chromatogr.*, **509**, 171 (1990).
- [26] J. Franc and J. Sechover, *J. Chromatogr.*, **212**, 139 (1981).
- [27] 邵美成, *结构化学*, 高等教育出版社, 北京, 1982.
- [28] R. Kalisz, *J. Chromatogr.*, **656**, 417 (1994).
- [29] R. Kalisz, S. H. Hsu and R. A. Hartwick, et al., *J. Chromatogr.*, **656**, 417 (1994).
- [30] H. F. Zou, Q. S. Wang and P. C. Lu, et al., *Chromatographia*, **31**, 140 (1991).
- [31] Z. Yang, J. Zhang and T. Fujita, et al., *Pesticide Biochem. and Physio.*, **26**, 275 (1986).
- [32] Hanfa Zou, Yukui Zhang and Peichang Lu, *Anal. Chim. Acta.*, **310**, 461 (1995).
- [33] I. W. Wainer and T. A. G. Noctor, *Adv. Chromatogr.* (P. R. Brown and E. Gruska, Ed.), **33**, 67 (1993).
- [34] K. Jinno and K. Kawaski, *Chromatographia*, **18**, 90 (1984).
- [35] C. Hansch and A. Leo, *Substitute Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley, New York, 1979.
- [36] 王连生, *有机污染物化学 (上册)*, 科学出版社, 北京, 1990.
- [37] T. Hafkenschied and E. Tomlinson, *Adv. Chromatogr.*, **25**, 1 (1986).
- [38] K. Miyake, F. Kitaura and H. Terada, *J. Chromatogr.*, **389**, 47 (1987).
- [39] M. C. Pietrogrande, F. Dondi and C. Bighi, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1065 (1987).
- [40] J. C. Kraak, H. H. van Rooji and J. L. G. Thus, *J. Chromatogr.*, **352**, 455 (1986).
- [41] Th. Braunmann, *J. Chromatogr.*, **373**, 191 (1986).

- [42] 陈农, 液相色谱谱图库的建立及作用指数定性, 中国科学院大连化物所博士论文, 1990.
- [43] S. J. Lewis, M. S. Mirrlees and P. J. Taylor, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **2**, 1 (1983).
- [44] V. de Biasi, W. J. Lough and M. B. Evans. *J. Chromatogr.*, **353**, 279 (1986).
- [45] R. Kaliszan, R. W. Blain and R. A. Hartwick. *Chromatographia*, **125**, 5 (1988).
- [46] Hanfa Zou, Yukui Zhang, Mingfang Hong and Peichang Lu, *J. Chromatogr.*, **625**, 169 (1992).
- [47] 邹汉法、张玉奎、洪名放、卢佩章, 自然科学进展, **5**, 562 (1995).
- [48] Hanfa Zou, Yukui Zhang, Mingfang Hong and Peichang Lu, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 3423 (1993).
- [49] C. Rekker, *The Hydrophobic Fragmental Constant*, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- [50] E. Tomlinson and H. Poppe. *J. Pharm.*, **7**, 225 (1978).
- [51] Y. Feng and P. Zhu. *Chromatographia*, **25**, 382 (1988).
- [52] C. MRiley and E. Tomlinson, *J. Chromotogr.*, **185**, 197 (1979).
- [53] J. K. Baker, D. O. Rauls and R. F. Bome, *J. Med. Chem.*, **22**, 1302 (1979).
- [54] R. M. Smith, *J. Chromatogr.*, **656**, 353 (1994).
- [55] E. A. Coats, K. J. Shah and J. K. Baker, et al., *J. Med. Chem.*, **25**, 57 (1982).
- [56] T. Sekiya, S. Yamada, S. Hata and S. I. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2779 (1983).
- [57] K. Valko, T. Friedmann, J. Bati and A. Nagykaladi, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 2073 (1984).
- [58] V. Ya Davydov, *J. Chromatogr.*, **365**, 123 (1986).

第五章 液相色谱固定相和流动相

液相色谱固定相和流动相是完成液相色谱样品分离分析最关键的因素之一。从液相色谱的分离模式来看，主要包括吸附色谱、正相色谱、反相色谱和离子对色谱。对应于每一种液相色谱分离模式，其所选用的色谱固定相和流动相也有所不同。为了能正确、有效地选择色谱固定相和流动相，有必要对它们加以介绍。

§ 5.1 液相色谱流动相

溶质在液相色谱中的保留值取决于溶质与流动相和固定相的作用强度。与气相色谱分离相比较，流动相是影响液相色谱分离分析一个非常重要的调节因素。一个理想的液相色谱流动相溶剂应具有低粘度，与检测器兼容性好，易于得到纯品和低毒性等特征。在正相色谱中，溶剂的冲洗强度随极性的增大而增加；而在反相色谱中，溶剂的冲洗强度则随极性的增大而减小。液相色谱常用的溶剂都是具有适当纯度的商品化有机溶剂。卤代有机溶剂可能包含有微量的酸性杂质，这些酸性杂质能与液相色谱系统中的不锈钢部件反应。卤代有机溶剂与水的混合物比较容易分解，不能存放太久。卤代有机溶剂有可能与各种醚类化合物，如乙醚反应，形成的产物对不锈钢材料有较大的腐蚀性。此外，卤代化合物，如二氯甲烷，易于与其它有机溶剂如乙腈反应形成结晶状物质。表5.1列出的是一些液相色谱常用冲洗剂的物化性质。

Snyder^[2,4]根据分子作用力情况对溶剂进行分类。常用的溶剂被分为八大类。表5.2列出的是液相色谱常用冲洗剂的极性指数 (P') 值和官能团选择性分类。表5.2中的 P' 值和选择性因

表 5.1 液相色谱中某些常用溶剂的性质

溶 剂	沸点(℃)	粘度(里泊)	毒性(μg/ml)
正己烷	68	0.32	500
正庚烷	98	—	500
二氯甲烷	40	0.44	—
氯仿	61	0.57	50
四氯化碳	77	0.97	—
丙酮	56	0.32	1 000
二氧六环	101	1.54	100
四氢呋喃	66	—	200
乙腈	80	0.29	40
甲醇	65	0.58	200
乙醇	78	1.19	1 000
异丙醇	82	2.30	400
水	100	1.01	—

子是从溶质乙醇、二巯烷和硝基甲烷的极性分配系数计算所得。溶质的分子体积，溶剂与溶质的色散和偶极作用力对溶质分配系数的影响得到了修正。因此， P' 值和溶剂选择性应能较好地反映溶剂的选择性作用的特性。乙醇、二巯烷和硝基甲烷被用于测定溶剂的质子接受、质子给予和偶极作用能力。对于被分析的样品，流动相的改变又可能导致选择性的重大改变。当冲洗剂中相对重要的分子作用力变化越大时，流动相的选择性变化越大。液相色谱分离选择性的调节可以通过利用有机溶剂的性质来实现：

质子给予体：醇类、碳酸类、酚类和氯仿；

质子受体：有机胺；

强偶极作用有机溶剂：二氯甲烷、硝基取代化合物和酮类。

表 5.2 液相色谱常用的有机溶剂的极性参数

溶 剂	极 性		溶剂强度
	$\delta^{1)}$	$P^{2)}$	
正己烷	7.3	0.1	0.00
乙醚	7.4	2.8	0.43
三乙胺	7.5	1.9	—
环己烷	8.2	0.2	0.03
四氯化碳	8.6	1.6	0.11
乙酸乙脂	8.9	4.4	0.48
四氢呋喃	9.1	4.1	0.53
苯	9.2	2.7	0.25
氯仿	9.3	4.1	0.26
二氯甲烷	9.6	3.1	0.30
丙酮	9.7	5.1	0.53
二硫化碳	10.2	0.3	—
二硫化烷	10.1	4.8	0.51
二甲基酰胺	11.8	6.4	—
异丙醇	12.0	3.9	0.60
二甲基砜	12.0	7.2	—
乙腈	12.1	5.8	0.52
乙醇	12.7	4.3	—
乙二醇	14.3	6.9	—
甲醇	14.5	5.1	0.70
甲酰胺	19.2	9.6	—
水	23.4	10.2	—

1) Hildebrand 溶解度参数来自文献 [1];

2) 极性指数 P' 来自文献 [2];

3) 硅胶为填料时的溶剂强度 [3].

如冲洗剂中的甲醇被其它醇类化合物如丙醇取代, 可以预见这二种冲洗剂的分离选择性不会有很大的变化, 因为冲洗剂中的有机溶剂都为质子给予体. 但是, 如用乙醚(质子受体)或二氯甲烷(强偶极作用)取代甲醇, 则冲洗剂的选择性会有很大的变化. 在绝大多数情况下, 液相色谱冲洗剂是多元溶剂的混合物. 对应二元冲洗剂, 流动相的冲洗强度随着二种有机溶剂配比的变化而改变. 正相色谱中, 溶剂冲洗强度的权重因子 S_i 与极性指数 P' 相同. 在反相色谱中, 各种不同的权重因子被用于计算二元冲洗剂的强度^[5]. 对于所有的二元冲洗剂, 其冲洗强度可表示为

$$S_T = \sum_i S_i \theta_i \quad (5.1)$$

式中, S_T 是冲洗剂的冲洗总强度, S_i 为溶剂的冲洗强度权重因子, θ_i 是溶剂的体积分数.

冲洗强度相同, 但选择性不同的冲洗剂有时被称为等冲洗强度冲洗剂^[6]. 为了使二元冲洗剂的选择性差别尽可能大, 应选用不同类型溶剂混合的混合冲洗剂. 例如, 在反相色谱中, 比较合理的选择是把甲醇、乙腈或四氢呋喃与水混合产生的二元流动相. 二元溶剂混合液是一个调节冲洗强度有效, 但调节冲洗剂选择性有限的冲洗剂. 三种和四种溶剂混合的冲洗剂有可能在冲洗剂强度恒定的情况下更好地调节冲洗剂的选择性^[7-9]. 同时, 只有少数几种有机溶剂能与水较好地互溶成为二元冲洗剂. 在许多情况下, 流动相中有机溶剂都按溶质与流动相和固定相的作用情况来选择.

对于某些种类化合物的分离, 流动相中必须加入一些添加剂, 如缓冲试剂、离子对试剂或其它的修饰剂(如三乙胺), 以改善色谱峰的重复性、分离选择性和色谱峰形. 缓冲试剂主要用于控制流动相的 pH 值和溶质在流动相的酸-碱平衡. 流动相 pH 值可以对可解离化合物的保留值产生重要的影响, 缓冲液应有适当的缓冲能力, 在大多数 HPLC 系统中, 流动相的 pH 值控制在

2~8 范围以内. 在反相色谱中流动相长碳链的离子表面活性剂对离子性化合物的分离有重要的影响. 在反相色谱流动相中加入有机胺, 如三乙胺, 可以消除有机胺溶质与残余硅羟基的强相互作用. 在流动相中加入乙酸对酸性化合物的分离具有相同的效果.

§ 5.1.1 正相色谱常用冲洗剂

所谓正相色谱, 就是指固定相的极性大于流动相的极性. 正相色谱包括硅胶吸附色谱和正相键合色谱.

在正相色谱中, 流动相与固定相间的相互作用越强, 溶质吸附就越弱. 反之亦然. 对于正相色谱中常用的冲洗剂可按其吸附强度进行分类. 这种分类称为洗脱能力序列, 通常以 ϵ^0 值作为溶剂强度参数, 它与溶剂强度成正比. Snyder 将其定义为单位面积标准吸附剂的吸附能. 对于给定溶剂和吸附剂, 溶质的保留值 $\log k'$ 以线性关系随 ϵ^0 而变化.

1. 等度冲洗

表5.3 列出了正相色谱中以硅胶为填料的一些溶剂的洗脱强度参数 (ϵ^0). 在正相色谱中, 样品分子的 k' 值随溶剂 ϵ^0 值的增加而下降, 因此溶剂洗脱能力序列可用于特定的分离问题寻找最佳的溶剂强度. 在等度冲洗中, 如果最初选用的溶剂强度太大使样品 k' 值过小, 则可改用 ϵ^0 值较小的溶剂代替. 反之, 如果最初选择的溶剂 ϵ^0 太小, 使样品 k' 值过大, 则可由表5.3 中改选 ϵ^0 较大的溶剂, 从而最终选出一种溶剂强度适合的冲洗条件.

当然, 改变溶剂种类也同时改变了样品的选择性 α 值. 为了进一步调整所需的 α 值, 达到改善分离选择性的目的, 在正相色谱中采用了多元流动相. 特别是二元流动相比纯溶剂用得较多, 这不仅能找到合适的 ϵ^0 值, 还可调节选择性. 表5.3 列出了某些二元流动相在硅胶上的 ϵ^0 值.

在二元流动相中, 溶剂强度能随其组成连续地变化. 例如, 如果用戊烷作流动相强度太弱 ($\epsilon^0 = 0.4$), 则表5.3 中两种溶剂的某一组成的混合物就能够提供一个合适的强度. 除了调节所要

求的 ϵ^0 值外，二元流动相又可保持溶剂的低粘度，从而既降低了柱压又提高柱效率。

表5.3 在硅胶上液固色谱冲洗剂的溶剂序列

ϵ^0	I	II	III
0.00	戊烷	戊烷	戊烷
0.05	4.2% 氯化异丙烷/戊烷	3% 二氯甲烷/戊烷	4% 苯/戊烷
0.10	10%	7%	11%
0.15	21%	14%	26%
0.20	4% 乙醚/戊烷	26%	4% 乙酸乙酯/戊烷
0.25	11%	50%	11%
0.30	23%	82%	23%
0.35	56%	3% 乙腈/苯	56%
0.40	2% 甲醇/乙醚	11%	
0.45	4%	31%	
0.50	8%	乙腈	
0.55	20%		
0.60	50%		

为了便于选择合适 ϵ^0 值的溶剂，Saunders 等人^[10]介绍了一种“混合溶剂在硅胶上的强度”图，如图5.1所示。该图的顶部水平方向表示溶剂强度，最上面的5条线代表了戊烷分别与其它5种溶剂（氯代异丙烷、二氯甲烷、乙醚、乙腈和甲醇）的混合物。5条线依次代表：氯代异丙烷/戊烷；二氯甲烷/戊烷、乙醚/戊烷、乙腈/戊烷和甲醇/戊烷；第二组4条线分别表示二氯甲烷、乙醚、乙腈、甲醇与氯代异丙烷的混合物；第三组3条线则表示二氯甲烷分别与乙醚、乙腈、甲醇的混合物；第四组2条线表示乙醚与乙腈和甲醇混合物；第五组1条线是乙腈中甲醇的含量，因此对给定的 ϵ^0 ，此图提供了多种不同的二元混合物的选择方法，但应注意不同的二元混合物其选择性也不同。目前直接

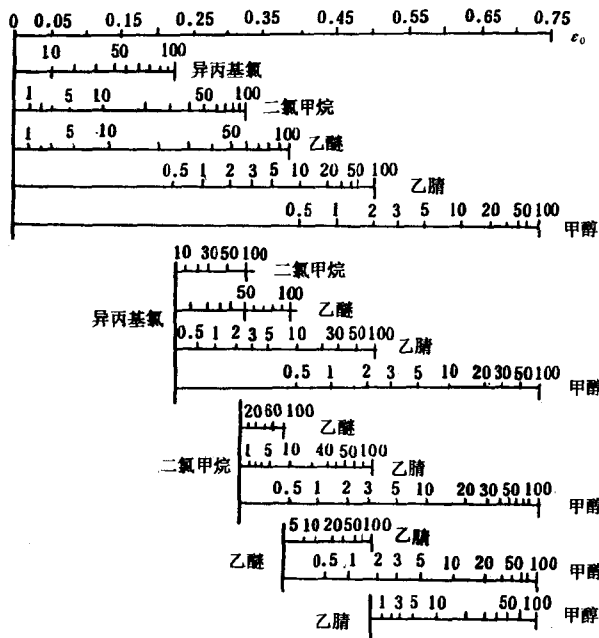


图5.1 在硅胶柱上某些二元混合溶剂的强度

用硅胶为固定相的正相色谱法实际上已很少应用。

2. 梯度冲洗

在正相色谱中，经常遇到的是多种组分的复杂样品中同时有极性差别很大的物质，采用等度冲洗很难找到一个合适的溶剂强度。梯度冲洗是随着时间的改变冲洗剂强度也发生变化的冲洗方法，它可使极性相差大的组分在合理的时间范围内全部流出色谱柱，同时具有良好的分离度。

总之，在正相色谱中，溶质和溶剂与固定相的作用对保留值和选择性均起重要作用。正己烷常用作冲洗剂的弱组分，因而冲洗剂的强组分不仅用于调节溶质的保留值使之在适当范围内，并且使分离选择性也发生了变化。

§ 5.1.2 反相色谱常用冲洗剂

反相色谱常用冲洗剂有水、乙腈、甲醇和四氢呋喃。一般情况下甲醇/水系统已能满足多数样品的分离要求。从表5.1可知, 甲醇的毒性比乙腈小5倍, 且价格便宜6~7倍, 是反相色谱中使用最多的冲洗剂强组分。表5.4列出了反相色谱中常用有机溶剂的结构参数, 其中 V_w 是溶剂的范德华体积, 它与分子的极化率或疏水作用力的强弱成比例, π^* 是偶极作用参数, β_m 和 α_m 分别表示溶剂分子接受质子和给予质子的能力。比较反相色谱中最常用的冲洗剂强组分, 可看到其范德华体积的大小顺序为

四氢呋喃 > 二氧六环 > 乙腈 > 甲醇

表5.4 反相色谱中几种最常用溶剂结构参数

溶剂名称	V_w	π^*	β_m	α_m
甲醇	0.205	0.60	0.62	0.93
乙腈	0.271	0.75	0.31	0.19
乙醇	0.305	0.54	0.77	0.83
丙酮	0.375	0.71	0.48	0.06
异丙酮	0.40	10.48	0.95	0.76
正丙酮	0.402	0.52	0.67	0.78
二氧六环	0.410	0.55	0.37	0
四氢呋喃	0.455	0.58	0.55	0

四氢呋喃的分子体积最大, 亦即其色散作用力最强, 疏水作用也最强, 故此四氢呋喃对样品的冲洗强度最大。比较上述三种溶剂 π^* 值可得其极性顺序为

甲醇 > 四氢呋喃 > 二氧六环

比较 β_m 和 α_m 值可知, 甲醇给予质子和接受质子的能力最强, 亦即氢键作用力最大。因此选择不同的有机溶剂作冲洗剂强组分, 不仅对分离物质的保留值有影响, 而且对溶质的选择性也

会有影响。表5.5列出的是一些有机溶剂在反相色谱中的冲洗强度和对保留值影响的情况。

表 5.5 反相色谱中溶剂的冲洗强度和对保留值的影响

溶剂	P' 值	在水中每增加 10% 有机溶剂, 溶质保留值 k' 的下降情况(倍数)
水	10.2	—
二甲基砒	7.2	1.5
乙二醇	6.9	1.5
乙腈	5.8	2.0
甲醇	5.1	2.0
丙酮	5.1	2.2
乙醇	4.3	2.3
四氢呋喃	4.0	2.8
异丙醇	3.9	3.0

与正相色谱相似, 反相色谱中甲醇、乙腈和四氢呋喃与水的混合物也有类似的定量转换关系. Schoenmakers 等人^[11]的研究表明, 反相色谱中, 如果要在相同的时间内分离同一组样品, 甲醇/水作为冲洗剂时其冲洗强度或配比与乙腈/水或四氢呋喃/水的冲洗强度或配比有如下关系:

$$\begin{aligned}
 C_{\text{乙腈}} &= 0.32C_{\text{甲醇}}^2 + 0.57C_{\text{甲醇}} \\
 C_{\text{四氢呋喃}} &= 0.66C_{\text{甲醇}}
 \end{aligned}
 \tag{5.2}$$

$C_{\text{乙腈}}$, $C_{\text{甲醇}}$ 和 $C_{\text{四氢呋喃}}$ 分别为乙腈、甲醇、四氢呋喃与水混合溶剂的体积百分含量. 从上式可知 100% 甲醇 ($C_{\text{甲醇}} = 1$) 的冲洗强度相当于 89% 的乙腈/水的冲洗强度和 66% 的四氢呋喃/水的冲洗强度, 这三种溶剂强度的顺序与分子范德华体积的顺序相同. 但这只是从 k' 值大小来考虑, 用溶剂强度的方法来选择冲洗剂是片面的, 必须同时考虑到对分离选择性的变化, 并且应在各自最佳条件下进行比较.

§ 5.1.3 反相离子对色谱法常用冲洗剂

以 C_{18} 或 C_8 等烷基键合相为固定相，以甲醇/水或乙腈/水为流动相的反相色谱系统适用于分离中性的样品，而对于弱电离组分如弱酸、弱碱，一般通过调节冲洗剂的 pH 值可达到分离目的，称为氢离子抑制法。但是对强酸、强碱及其它离子型化合物，为使其在 C_{18} 或 C_8 柱上有适当的保留，则需在冲洗剂中加入相应的反离子，即离子对试剂。这种在反相色谱体系中加入离子对试剂的方法通常称为反相离子对色谱法^[12]。

反相离子对色谱法常用冲洗剂的溶剂组成与反相色谱相同，这里不再赘述。而选择合适的离子对试剂是进行离子对色谱分离的首要条件。表5.6列出了常用的离子对试剂及主要应用对象。

表5.6 反相色谱常用的离子对试剂

离子对试剂	主要应用对象
季胺盐（如四甲铵、四丁铵、十六烷基三甲铵等）	强酸、弱酸、磺酸染料、羧酸氯化考地松及其盐类
叔胺（如三辛胺）	磺酸盐、羧酸
烷基磺酸盐（如甲基-、戊基-、己基-、庚基-、樟脑磺酸盐）	强碱、弱碱、Benzalkonium 盐、儿茶酚胺、肽、鸦片碱、烟酸、烟酰胺等
高氯酸	可与碱性物质（如有机胺、甲状腺碘代氨基酸、肽等）生成稳定的离子对
烷基硫酸盐（如辛基-、癸基-、十二烷基硫酸盐）	与烷基磺酸盐相似，选择性有所不同

一般来说，所选用的离子对试剂的电荷应与被分离样品的电荷相反。如对酸性或带负电荷的溶质，多用带有正电荷的季胺盐作为离子对试剂。对碱性或带正电荷的溶质，则多用带负电荷的烷基磺酸盐或硫酸盐作离子对试剂，这些是最常用的离子对试剂类型。除了选择合适的离子对试剂外，反相离子对色谱冲洗剂的 pH 值也应进行适当的控制。表5.7列出了某些类型样品离子对

色谱分离时其流动相 pH 值的调节范围。由于反相离子对色谱大多采用硅胶为基质的烷基键合固定相，pH 值范围应控制在 1.5~8.5 范围内，以防止硅胶的降解^[13]。

表5.7 反相离子对色谱冲洗剂的 pH 值范围

溶质类型	流动相 pH 值	说 明
强酸 ($pK_a > 2$) 如磷酸染料	2~7.4	此类溶质在该 pH 范围都解离，实际选择的 pH 值取决于共存的其它溶质类型
弱酸 ($pK_a < 2$) 如磷酸、氨基酸	6~7.4	溶质是解离的， k' 取决于离子对的性质
	2~5	溶质的解离被控制， k' 取决于未解离溶质的性质
强碱 ($pK_a > 8$) 如季胺	2~8	溶质在整个 pH 值范围内解离，类似于强酸
弱碱 ($pK_a < 8$) 如儿茶酚胺	6~7.4	溶质解离被控制， k' 取决于未解离溶质的性质
	2~5	溶质是解离的， k' 取决于离子对的性质

§ 5.2 高效液相色谱常用固定相

固定相亦称填料或吸附剂等，液相色谱所用的填料是经典的多孔无定形硅胶。到 60 年代中后期，发展出薄壳形填料。1972 年以后，发展出了多孔微球硅胶。由于细粒度有利于减小涡流扩散效应，缩短了溶质在两相间的传质扩散过程，从而提高了色谱柱的分离效率，因此，目前人们所采用的 HPLC 固定相绝大部分是这类填料。HPLC 固定相主要有液-固吸附、键合相和液-液分配固定相三种类型。液相色谱固定相是液相色谱分离的关键因素之一，也是色谱领域研究的重要课题^[14]。

§ 5.2.1 液-固吸附色谱固定相

液-固吸附色谱常用的吸附剂有硅胶、氧化铝、活性炭和聚

合物小球。硅胶是应用最广泛的吸附剂。随着 HPLC 在药物、生化方面的应用日益广泛，有机聚合物小球的应用有明显上升趋势。

硅胶色谱的保留行为与硅胶的表面特性直接相关。色谱用的硅胶通常是由硅酸钠与无机酸（例如盐酸）反应制备的。聚合的结果形成了三维空间排列的 SiO_4 四面体，这种聚硅酸脱水时形成稳定的多孔固体，表面终端呈硅羟键（ $\equiv\text{SiOH}$ ）或硅氧烷基（ $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ ）。在色谱分离中，硅羟基（或称表面硅羟基）起重要作用，而硅氧烷基影响甚微。

硅胶表面的羟基具有不同的酸性，其中酸性最强的而又位于相互邻接的硅羟基可以形成分子内氢键。这种内氢键常常引起化学吸附、峰形拖尾以及延长柱的再生周期等不良的色谱效应。为消除这种效应，常常在硅胶中加进极性改性剂如水等，以钝化吸附活性中心。

在硅胶吸附色谱中，决定样品分子相对吸附作用的主要是官能团。当官能团的极性和数目增加时，由于样品分子与极性吸附硅胶表面总的相互作用增加，因此相对吸附作用也随之增加。在吸附色谱中，保留特征和选择性决定于溶质分子与溶剂分子在吸附剂表面上某一位置的竞争吸附，样品分子带有的各种官能团与吸附剂表面硅羟基相互作用，以及样品分子与溶剂分子间的相互作用。这意味着硅胶色谱同系物的选择性较差，但有利于族分离。另外，硅胶吸附色谱在异构体的分离方面一般要比其它液相色谱方法有更高的选择性。

由于流动相分子与硅胶表面之间、流动相分子与样品分子以及样品分子与硅胶表面之间存在相互作用，因此样品在硅胶上的保留作用实际上受两方面因素的控制。一是样品分子和流动相分子对硅胶表面硅羟基的竞争吸附；二是流动相对样品的溶解能力。若硅胶对样品分子的吸附力大于流动相分子的吸附力，此时样品的保留较大。若流动相对样品有较大的溶解度，则样品易被溶解在流动相中，因而在柱上的保留就短，即保留值小；反之保

留值大。

表5.8 列出了某些常用的、国内外生产的硅胶固定相。

表 5.8 HPLC 中常用的部分微粒型吸附剂

商品名称	粒度 (μm)	比表面积 (m^2/g)	孔径 (nm)	形状	生产厂家
YWG	5,10,20	300	6—8	非球	青岛海洋化学厂
YQG	5	4—500	8—10	球	青岛海洋化工厂
GYQG	3,5	2—300	10	球	北京化学试剂厂研究所
Hypersil	3,5,10	170	10	球	Shandon
Lichrosorb SI60	5,10,20	500	6	非球	E. Merck
Lichrosorb SI100	5,20,20	370	10	球	B. Merck
Lichrospher SI100	3,5,10	250	10	球	
Nucleosil	3,5,10	300,500	50,100	球	Macherey-Nagel
Partisil	5,10,20	400	5	非球	Whatman
μ -Porasil	10	300	10	球	Waters
Sperisorb-Si	5,10,20	220	8	球	Phase Separation
Ultrasphere	5			球	Alltech
Vydac TP-101	10	100	33	球	Separation Group
Zorbax-sil	6—8	300	60	球	Du Pont
Lichrosorb Alox-7	5,10	150	15	非球	E. Merck
Spherisorb-A	1,10,20	150	15	球	Phase Separation

值得指出的是，当采用有机溶剂作冲洗剂时，由于硅胶（或氧化铝）的表面高度不均一，所以即使极少量的水或其它极性化合物吸附在其表面上时，也会使吸附活性大大降低。尽管水在非极性和弱极性的有机溶剂中溶解度很小，但如此微小的含水量的变化就会导致柱负荷和保留值的显著变化（见图5.2），因此在进行硅胶色谱操作时，流动相的含水量一定要严格控制，以获得重复的保留值。通常使用干燥剂（如已烷用分子筛脱水）与一定

量水饱和的溶剂（己烷与水摇匀）相混合等等。

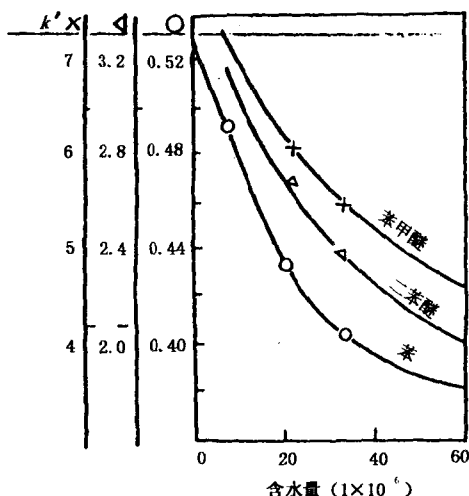


图5.2 流动相（己烷）含水量对 k' 的影响
 色谱柱：150×2.3mm i. d.，填充 5 μ m YWG 硅胶。

但是，对于具有强氢键结合能的多元醇及离子化的胺类、酸类等物质，只采用有机溶剂作冲洗剂时，它们就不能从柱中流出或保留太长，而且有严重的峰拖尾现象，可在流动相中加入适量的水或醇、酸、胺等改性剂。图5.4，图5.5和图5.6为应用于药物和生物样品的分析实例。其分离机理是：冲洗剂中水分（或加入适量的醇、酸、胺等）使硅胶表面硅羟基被水（醇、酸、胺）占据，既有分配色谱作用，同时还可能有吸附作用。

此外，硅胶还可用作离子交换色谱固定相。P. A. Aamus 等人发表的报告中^[15]采用了以 14 μ m 硅胶填充的 30cm×2.1mm i. d. 柱分析 16 种核苷酸，其中除 4 种核苷酸因 k' 太小，不能分离外，其余的都得以很好的分离。也有采用纯水作冲洗剂来分析丁醛与甲醇的缩合产物三甲醇基丙烷（TMP），结果如图5.6所示。

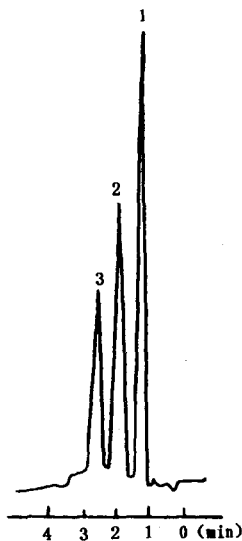


图5.3 有机磷杀虫剂
的分离^[1]

色谱柱: 25cm × 2.2mm i.
d., 填充 6~8 μ m 硅胶; 流动
相: 乙醇/正己烷 (10/90);
流速: 0.85 ml/min; 柱压:
30kg/cm²; 检测器: 氢火焰
离子化鉴定器; 峰序: 1. dy-
fonute; 2. 敌百虫; 3. 乐果.

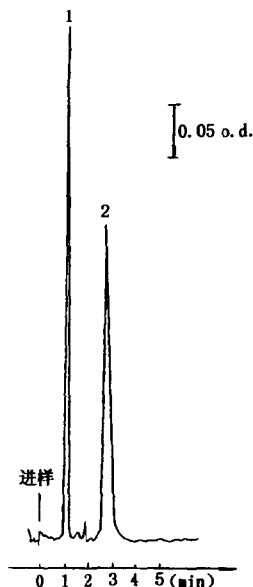


图5.4 安眠酮、
扑热息痛的分离^[2]

色谱柱: 15cm × 4.8 mm i.
d.; 流动相: 氯仿/异丙醇
(85/15); 水含量: 0.5%;
流速: 100ml/h; 检测器: 紫
外 254nm; 峰序: 1. 安眠酮;
2. 扑热息痛.

总之, 高效微粒硅胶, 当用有机溶剂作冲洗剂时, 可用于分析烷、烯、芳烃及含氯、含磷、含氧等化合物; 采用含水冲洗剂时, 可用于强极性化合物的分析; 如在冲洗剂或固定相中加入平衡离子化合物, 又可用于离子化合物酸、碱等分析; 甚至还可用离子交换色谱的条件对核苷酸进行分离, 特别是当用纯水作冲洗剂时, 可用来分离丁醛与甲醛缩合产物. 微粒硅胶是高效液相色谱中被广泛采用的一种高效固定相.

§ 5.2.2 化学键合固定相

以微粒硅胶为基质的化学键合相 (3~10 μm) 在高效液相色谱中获得了广泛的应用。由于采用了有机硅烷与硅胶表面化学键合反应^[16], 形成的 Si—O—Si—C 键是对溶剂、热和化学稳定的结构^[17], 因此这类微粒键合相的应用越来越受到人们的重视。下面我们将介绍有关以硅胶为基质的化学键合固定相。

化学键合相色谱使用的固定相是借助于化学反应的方法将有机分子以共价键连接在色谱载体上, 主要用于反相、正相和部分离子交换及空间排斥色谱中。据统计^[18], 键合相色谱在高效液相色谱的整个应用中占 80% 左右。表 5.9 的数据表明, 它是近代液相色谱中最重要的一个类型。

要形成化学键合固定相, 有两个必要条件: 一是所用的基质材料应有某种化学反应活性, 例如许多 3~5 价金属或非金属氧化物表面都具有化学反应的官能团, 像硅胶、氧化铝、硅藻土等, 但以硅胶最为理想和最为常用。二是有机固定相表面应含有易发生反应的官能团。硅胶 ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) 之所以是理想的化学键合相基体, 主要由它的表面性质所决定。硅胶的体相结构呈硅-氧四面体的晶体点阵, 而在表面相这种点阵突然中断, 表面硅原子可以通过硅羟基 ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) 和失水后的硅氧烷形成饱和键, 这种硅羟基是进行键合的活性官能团。

硅胶表面可能有 5 种形式:

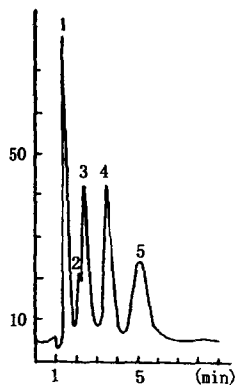


图 5.5 儿茶酚胺的 Dansyl 衍生物的分离^[2]

色谱柱: 25cm 预装柱填充 Micropak Si-10; 流动相: 乙酸乙酯/环己烷 (75/50); 流速: 0.72ml/min; 温度: 25 $^{\circ}\text{C}$; 检验器: 荧光检测器; 峰序: 1. 未知; 2. 未知; 3. 多巴胺; 4. 肾上腺素; 5. 去甲基肾上腺素。

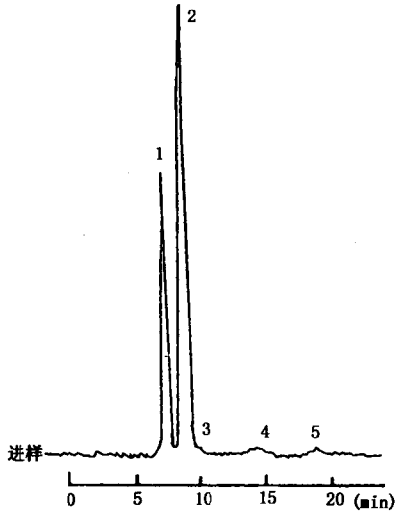
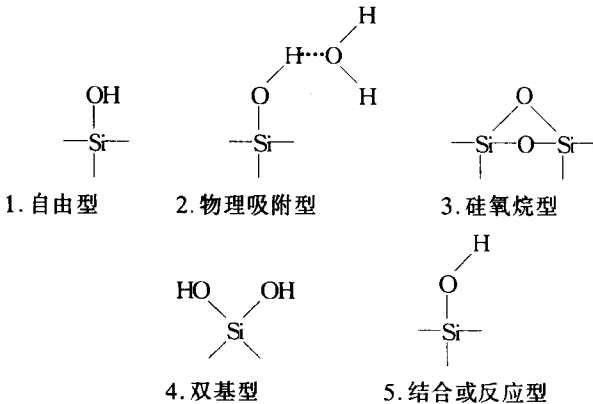


图5.6 TM缩合产物的分离^[3]

色谱柱: 20cm×2.6mm i. d., 填充 Merckosorb Si 60, 10 μ m; 流动相: 水 (流速 20ml/h);
峰序: 1. 甲酸钠; 2. 三羟甲基丙烷; 3. 新戊基乙二醇; 4. 双三羟甲基丙烷; 5. 未知.



对表面键合反应有利的是自由型或结合型的两种硅羟基. 实

验表明, 硅胶在 200℃ 以前烘干仅能失去物理吸附的水分子, 200~600℃ 之间, 结合水 (即羟基) 逐步脱除而出现硅氧烷结构, 但硅胶骨架不变化; 600℃ 以上骨架开始变化. 按照晶体点阵计算, 硅胶表面羟基数目是 8 个/nm². 但用化学方法测定的羟基数大约为 5 个/nm² 左右. 硅胶表面上存在着足够的可反应硅羟基, 再加上硅胶本身的许多特点, 例如强度好, 孔结构和表面积易于人为控制, 有较好的化学稳定性, 因而是各种化学键合相的理想基质材料^[7].

化学键合相在高效液相色谱中的应用, 被认为是革命性的变化. 以吸附剂和载体表面涂渍有机固定相的液-固吸附和液-液分配为主要操作模式的柱液相色谱大量地被键合相色谱所取代, 某些离子型的物质也从用传统的离子交换树脂分离改用离子交换键合相或反相离子对色谱操作. 不仅如此, 化学键合相也在气相色谱和薄层色谱中得到应用. 归纳起来, 化学键合相主要有以下三个优越性.

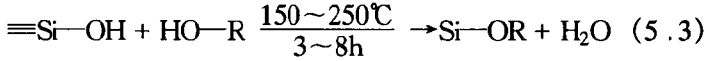
(1) 减弱了表面活性作用点, 清除了某些可能的催化活性. 这样就缓和了一些复杂样品在表面上的不可逆化学吸附, 使得操作简化, 峰形对称, 对溶剂中微量水分含量的变化要求不苛刻; 此外, 溶剂的残留效应小, 梯度冲洗平衡快, 和液-固吸附色谱相比较, 流动相性质可以比较缓和, 柱子不“娇”.

(2) 耐溶剂冲洗, 这是传统的液-液分配色谱 (LLC) 逐渐被键合相色谱取代的根本原因. 在近代液相色谱发展的初期, 常和气相色谱一样把有限的几种固定液, 例如 β , β' -氧二丙腈、聚乙二醇、三甲撑乙二醇和角鲨烷等涂渍在载体表面上, 用一种性质相差很大的溶剂冲洗, 进行分离. 实际上两种完全互不相溶的溶剂体系几乎不存在, 因而在 LLC 中固定液的流失就十分严重. 为了克服这个缺点, 曾采取溶剂预先用固定液饱和及柱前增加预饱和柱的方法, 但这样做既不方便, 柱系统的稳定性也差. 不可抽提的化学键合相的出现使这个弊病得到克服, 柱寿命大大延长, 并且扩大了可应用溶剂的范围.

(3) 表面改性灵活, 容易获得性能重复的产品. 改变键合用的有机硅烷, 可以得到不同键合相的填料; 控制硅胶的质量和键合工艺, 便于工业规模制备键合相.

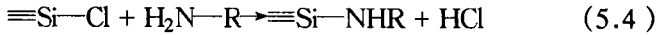
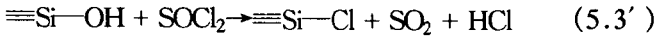
根据键合有机分子的结构, 可以有以下几种键合反应类型:

1. Si—O—C 键型 (硅胶与醇类的反应产物)



这个酯化产物的典型商品填料是 HPLC 发展初期使用的, 如国外的 Durapak 和天津的 HDG 系列. 在有水、醇存在下, 有水解和醇解的可能, 所以只能在正相条件下使用.

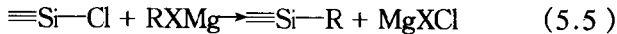
2. Si—N 键型 (硅胶与胺类的反应产物)



这种键合相的热和化学稳定性均比酯化型要好, 但不如 Si—O—Si—C 键型, 因而这个类型的填料至今尚无商品供应.

3. Si—C 键型 (硅胶与卤代烷反应产物)

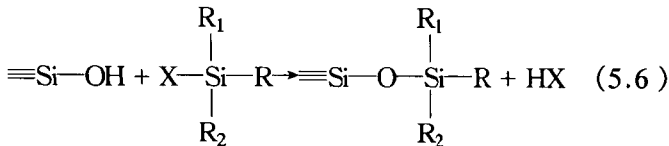
从氯化硅胶 [反应式 (5.3')] 开始, 利用格氏反应引入烷基:



从理论上讲, 这种结构有更好的稳定性, 特别是对微碱性的流动相, 而且 R 基可以按要求多次氯化, 形成聚烷基键合相, 但因制备上的困难, 也无商品出售. 以上三种均形成“刷子型”的键合相.

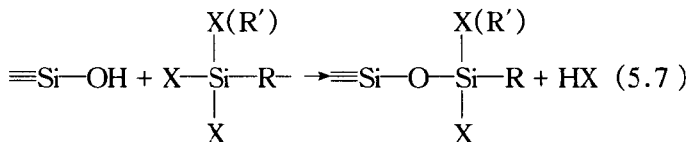
4. Si—O—Si—C 键型 (硅胶与有机硅烷反应产物)

这是一类目前占绝对优势的键合相类型, 具有良好的热和化学稳定性, 能在 pH=2~7.5 的介质中使用. 它是利用氯或烷氧基硅烷与硅胶发生化学反应:

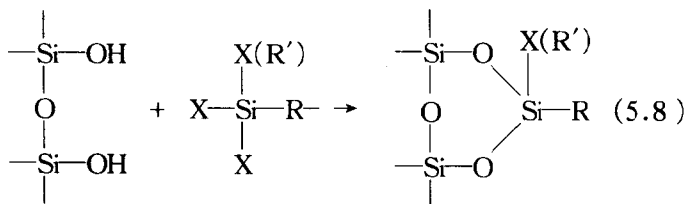


式中, X 为 Cl, CH₃O 或 C₂H₅O 基; R₁, R₂ 可以与 X 相同, 也可以是甲基. 即硅烷可以是单官能团或双、三官能团反应分子.

对双、三官能团硅烷有:



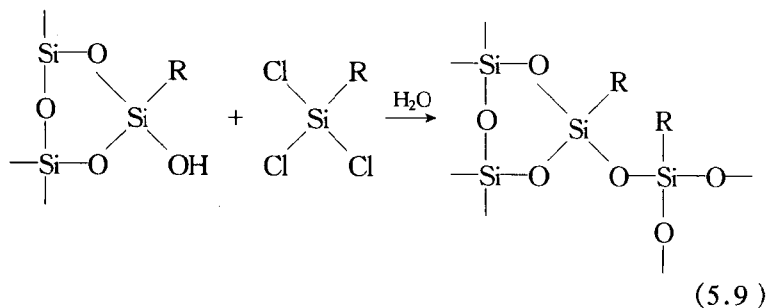
或

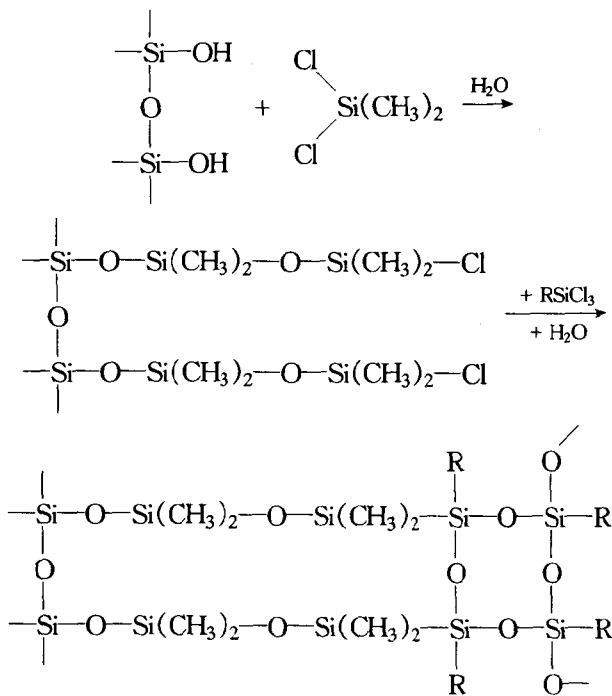


硅胶表面上已反应的硅羟基与反应的硅烷摩尔数之比, 在 1~2 之间. 由于结构原因三个 X 都与硅羟基反应的可能性几乎不存在. 未反应的 X 可以水解成羟基或与邻近键合有机分子交联, 也可以与所用硅烷聚合, 这取决于反应条件.

对单官能团硅烷, 只能有式 (5.6) 一种反应, 不可能产生聚合, 也不可能产生新的游离羟基, 是比较理想的一种硅烷化试剂.

反应体系中如控制适量水分, 对双、三官能团硅烷可能产生聚合型的键合相:





(5.10)

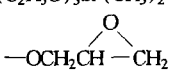
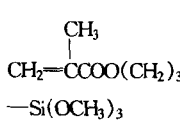
有机硅烷分子中 R 基是赖以区分不同类型键合相的基础，R 基可以是非极性的、极性的或离子交换基团，一般生产厂家都有明确标记。表 5.9 列出的是液相色谱固定相合成常用的硅烷化试剂。

在制备键合相时，硅胶一般需要酸处理，使表面的硅氧烷打开，形成尽可能多的自由硅羟基，有利于反应。酸处理也可以除去表面层的金属氧化物杂质和孔隙中的细粉。在 200℃ 下烘干除去物理吸附水。为了获得“刷子型”单分子层键合相，硅胶、硅烷、溶剂和反应器要严格脱水，反应一般在升温下进行，然后依次用苯、丙酮、甲醇洗涤或抽提。为了使键合有机分子完全覆盖硅胶表面，一般使用过量的硅烷试剂。三氯、二氯和一氯硅烷的

表5.9 常用硅烷化试剂

名称	分子式	分子量	沸点 (°C /kPa)	备注
三甲基氯硅烷 (Trimethylchlorosilane)	$(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$	108.7	57/101.3	残余 Si—OH 封尾剂, C ₁ 相
丁基二甲基氯硅烷 (Butyldimethylchlorosilane)	$\text{C}_4\text{H}_9(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	150.7	140/101.3	C ₈ 反相, 单层 分子键合层
辛基二甲基氯硅烷 (Octyldimethylchlorosilane)	$\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	206.7	105/2	C ₄ 反相, 单层 分子键合层
十八烷基二甲基氯硅烷 (Octadecyldimethylchloro- silane)	$\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	346.7	140~145 /0.013	C ₁₈ , ODS 型反 相
苯基二甲基氯硅烷 (Phenyldimethylchlorosil- ane)	$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	170.5	87/2.4	苯基反相
二甲基二氯硅烷 (Dimethyldichlorosilane)	$(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$	129.1	70	C ₁ 反相, 单层 及多层
二丁基二氯硅烷 (Dibutyldichlorosilane)	$(\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{SiCl}_2$	213.2	212	C ₄ 反相, 单层 及多层
正辛基甲基二氯硅烷 (<i>n</i> -Octylmethyldichlorosil- ane)	$\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{CH}_3)\text{SiCl}_2$	227.3	94/4.8	C ₈ 反相, 单层 及多层
十八烷基甲基二氯硅烷 (<i>n</i> -Oct decylmethyldichlo- rosilane)	$\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{CH}_3)\text{SiCl}_2$	367.5	185/0.33	C ₁₈ , ODS 反相, 单层及多层
苯基甲基二氯硅烷 (Phenylmethyldichlorosila- ne)	$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_3)\text{SiCl}_2$	191.1	205	苯基反相, 多层
甲基三氯硅烷 (Methyltrichlorosilane)	CH_3SiCl_3	149.0	66	C ₁ 反相, 多层
丁基三氯硅烷 (Butyltrichlorosilane)	$\text{C}_4\text{H}_9\text{SiCl}_3$	191.6	142~143	C ₄ 反相
辛基三氯硅烷 (Octyltrichlorosilane)	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SiCl}_3$	247.7	224~226 /97.3	C ₈ 反相

续表

名称	分子式	分子量	沸点 (°C /kPa)	备注
十八烷基三氯硅烷 (Octadecyltrichlorosilane)	$C_{18}H_{37}SiCl_3$	388.0	160~162 /0.4	C_{18} 反相
苯基三氯硅烷 (Phenyltrichlorosilane)	$C_6H_5SiCl_3$	211.6	201	苯基反相
环氧丙氧基丙基 三乙氧基硅烷 (3-Glycidoxypropyltriethoxysilane)	$(C_2H_5O)_3Si(CH_2)_2$ 	263.3	260~226	凝胶、离子交换、疏水、亲和等
氰基乙基二甲基氯硅烷 (Cyanethyl dimethylchlorosilane)	$(CNC_2H_4)(CH_3)_2$ SiCl	146.6	83/2.4	CN键合正相， 离子交换
氨丙基三乙氧基硅烷 (Aminopropyltriethoxysilane)	$NH_2(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$	221.4	122~123 /4	键合正相，离子交换、亲和
γ -甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷 (Methacrylpropyltrimethoxysilane)		248.3		复合介质
γ -巯基丙基三乙氧基硅烷 (Mercaptopropyltriethoxysilane)	$HS(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$	238.3		亲和，疏水等
六甲基二硅氮烷 (Hexamethyldisilazane)	$(CH_3)_3SiNHSi(CH_3)_3$	151.3		残余 Si-OH 基封尾

反应活性依次降低；而氯硅烷一般又比烷氧基硅烷活泼得多。硅烷和硅胶的反应程度随反应温度和时间而改变，一般在制备中容易找出反应完全又易于重复的反应条件。例如表5.10列出了十八烷基键合硅胶（ODS）性能与反应条件的关系。所用硅胶为Partisil，比表面积 $402m^2/g$ ，硅烷为十八烷基三氯硅烷，干燥甲苯做反应溶剂，浓度10%。由表5.10可见，在一定范围内延长

反应时间和提高反应温度有利于提高键合量。

表 5.10 硅烷化反应时间和温度对产物含量的影响

反应时间(h)	0.8	2.5	5	6.5	18	24
碳含量(%C)	3.0	3.6	4.2	6.5	10.5	11
					11.3	
表面浓度($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	0.36	0.45	0.52	0.84	1.46	1.54
					1.60	
反应温度($^{\circ}\text{C}$)	110		138		170	
反应溶剂	甲苯		二甲苯		硅烷本身	
碳含量(%C)	10		15		23	
所需反应时间(h)	18		15		2	

由于空间位阻效应，较大的硅烷分子不可能与载体表面上较小的硅羟基全部发生反应，因而残余羟基是不可避免的，加之当使用双或三官能团硅烷化试剂时，还能有新生的硅羟基产生。这些残余羟基，特别是在反相填料的情况下，对产品的性能影响很大，它可以减小表面的疏水性，对极性化合物，特别是碱性溶质产生二次化学吸附，使溶质在两相间的平衡速度减慢，降低了键合相填料的稳定性，而残余羟基浓度的变化又是产品性能不重复的重要原因。所以除对键合反应本身进行改进之外，键合反应结束后，一般都要用三甲基氯硅烷(TMCS)或六甲基二硅胺(HMDS)等小分子硅烷进行处理，即封尾(end-capping)，以尽量减少残余硅羟基，这对提高键合相填料的稳定性是很重要的。另一方面，也有一些 ODS 商品填料是不封尾的，以使其与水系统流动相有更好的“湿润”性能。

十八烷基键合硅胶固定相是反相高效液相色谱中应用最广泛的一个品种。为了改进其性能，一是选择粒度分布范围窄、孔结构规整和化学纯度高的硅胶基体；二是优化反应条件，使硅胶表面键合均匀，有机层覆盖完全。国产 YWG-O DS 系列产品由于

改进了键合方法和柱填充技术^[16]，在键合的完全性、均一性、制备的重复性和色谱柱效率等方面获得了较好的结果。

硅烷化试剂与硅胶表面硅羟基之间容易发生反应，但由于硅胶表面的几何结构复杂，往往导致产物性能多变，使得批号不同的烷基键合硅胶性能有较大的差异。叔胺一类的有机碱（如咪唑、吡啶等）可以通过形成过渡络合物使硅烷分子活化，这已为均相体系的有机硅化学所证明^[20]。在氯硅烷和硅胶的反应中加入适量的有机碱，能显著地提高化学键合量和硅胶表面的有机覆盖度^[21]。其次，选择具有适当比重的非极性溶剂作反应介质，在整个键合过程中使固定相处于悬浮状态，有利于表面化学反应的均匀化。

对残余的硅羟基，首先进行甲醚化，随后再用小分子的硅烷化试剂 DMCS 或 HMDS 处理，有更好的封尾效果。表 5.11 列出了连续五次键合所得产品的色谱性能。其中，No. 6-000 键合相是按传统方法合成的以作对照。所用硅胶为青岛海洋化工厂 YWG-10 μ m 产品。表 5.11 中的数据清楚表明，改进后的方法制备的反相填料键合量高，碳含量和保留值有较好的重复性。以硅胶为基质的化学键合固定相可以认为是一种改性硅胶（其它基体键合相也一样），表面改性的完全程度和重复性（通过残余硅羟基、覆盖度和覆盖均匀性表示）是色谱用户和制造厂家共同关心的。测定和表征的方法有微量元素分析、色谱、光谱、核磁共振

表 5.11 文献中制备的几批键合相柱性能¹⁾

批号	1-730	2-925	3-82	4-331	5-430	6-000
% (W)	16.3	17.6	17.9	16.6	18.3	10.5
k' (萘)	1.43	1.65	1.42	1.48	1.51	0.91
k' (菲)	3.60	4.60	3.69	4.21	3.90	2.01
$N^2)$	10 080	10 050	8 400	9 600	9 800	6 000

1) 色谱条件: 200 \times 5mm i. d., MeOH/H₂O(83/17), 1.0ml/min;

2) N 为苯、萘、联苯、菲四芳烃的平均柱效率, 数据摘自文献^[19]。

振等, 简单介绍如下.

微量元素分析或热失重法可以直接测定键合相的碳含量 (% C), 对商品化键合相, 碳含量在 2% ~ 29% 之间变化. 由于碳含量随基质比表面积 (S) 和键合有机基团的分子量 (M) 变化, 因此在研究和比较工作中多采用表面键合相浓度 C_s 表示, 其定义为

$$C_s = \frac{W}{M \cdot S} (\mu\text{mol}/\text{m}^2) \quad (5.11)$$

式中 W 为每克载体含有机物的重量 (μg), 用碳含量表示亦可写成

$$W = \frac{C\%}{12N_c} \times M \times 10^6 (\mu\text{g})$$

式中 N_c 为键合有机基团的碳数, 12 为 C 原子量, 文献报道的键合相浓度大部分为 $C_s = 2 \sim 4$. 有时也用表面覆盖度表示键合量:

$$\begin{aligned} \text{表面覆盖度} &= \frac{\text{单位表面键合有机基团的微摩尔数}}{\text{单位表面上含有可反应硅羟基的微摩尔数}} \\ &= \frac{C_s}{5 \times 10^{18} / (6.02 \times 10^{17})} = \frac{C_s}{8.3} \end{aligned} \quad (5.12)$$

这里假定硅胶表面可反应的硅羟基数目为 5 个/ nm^2 , 6.02×10^{17} 为以微摩尔为基准的阿佛加德罗常量.

用色谱方法评价键合相的性能更为广泛, 因为这是它的最终用途所在, 生产厂家一般都附上特定标准物的保留值和柱效或其它参数的测试结果. 例如, 反相填料在甲醇/水条件下考察分离稠芳香烃的情况. 同时人们也提出许多色谱评价方法, 以发现不同键合相填料性质差异的原因.

Unger^[22] 提出用非极性键合相填料正相冲洗的方法检查残余硅羟基的含量, 即用庚烷做流动相, 若残余硅羟基少, 则像甲醇、乙醚、丙酮等极性化合物的保留时间与 t_0 相近, 且峰形比较对称, 溶质的保留时间对庚烷中微量水的多寡不敏感; 若残余硅羟基多, 则情况相反. Verzele^[23] 提出对反相填料用甲醇/水 (60/40) + 0.5 %

CH₃COONa 做流动相，用 α -硝基萘、萘和乙酰丙酮作为测试物，分别考察反相填料的残余硅羟基、柱效和微量金属含量。对于一种良好封尾的反相固定相，萘和 α -硝基萘的保留值之比应在 1.4 以上。例如在上述条件下，在 YWG-C₁₈H₃₇，YQG-C₁₆ 及 YMC-ODS 柱上，这个比值分别为 1.097，1.702 和 1.707，说明一氯硅烷键合的填料（后两种）比三氯硅烷（第一种）残余硅羟基少。

光谱法也是考察填料表面硅羟基含量的重要手段。这是基于 Si-OH 基在 3 750cm⁻¹ 处有特征的红外吸收谱带^[24]。Lochmuller 等人^[25]用荧光光谱考察了含有荧光发色基团的有机硅烷与硅胶制备的键合相。发现键合基团在填料表面覆盖并不均匀，键合的有机分子簇拥在某些活性中心密集的地方。因此提出了在制备键合相时首先应当使硅胶表面预钝化，以获得均匀表面覆盖层。

Bayer 等人^[16]用²Si 和¹³C 交互极化和魔角旋转固态核磁共振谱考察了若干化学键合相填料的表面特征，能对填料的键合方法和后处理（封尾）做出判断。

§ 5.2.3 键合固定相的分类

化学键合相的分类可以有不同的依据，例如按键合相基质分，有硅胶的和非硅胶载体，有多孔的和表面多孔层。仅就目前用得最广的多孔微粒硅胶基质为例，也有形状（球形和非球形）、粒度、孔结构的区别。5~10 μ m 粒度、6~10nm 孔径的球形和无定形硅胶是键合相的主要基体原料。按键合有机硅烷的官能团分类，可分为非极性、极性和离子交换键合相等。表 5.12 列出了常用的一些键合固定相和它们的理化性质。

1. 极性键合相

极性键合相一般指键合的有机分子中含有某种极性基团，与空白硅胶相比，这种极性键合相的表面上能量分布相对均匀，因而吸附活性也比硅胶低，可以看成一种改性过的硅胶。这一类固

表5.12 HPLC常用的部分化学键合固定相

类型	牌号名称	官能团	粒度 (μm)	简要说明	
弱极性	LiChrosorb Diol	二醇基	10	用于强极性化合物分离	
	Polygosil-60-D-N(CH ₃) ₂	三烷基胺	5,10	也可用于弱阴离子交换填料	
	Nucleosil N(CH ₃) ₂	三烷基胺	5,10	也可用于弱阴离子交换填料,具有弱碱性,可用于弱酸和苯类分离	
	Polygosil NO ₂	硝基	5,10	主要用于芳香化合物分离	
	Nucleosil NO ₂	硝基	5,10	—	
	RSIL NO ₂	硝基	5,10	5%碳键合量	
	Nucleosil OH	醇羟基	7.5	水湿润性好	
	Separon Si CN	乙基腈	5,10	封尾,比表面积 300m ² /g	
极性键合固定相	中性	Partisil 10-PAC	腈氨基	10	氨基与腈基比例 2:1
		Chromosorb LC-8	—CN	5,10	比表面积 350m ² /g, 平均孔径 110Å
		Spherisorb CN	丙腈基	5±2	比表面积 220m ² /g, 键合量 0.6mmol/g
		LiChrosorb CN	—CN	5,10	—
		RSIL CN	丙腈基	5,10	5%碳含量
		Nucleosil CN	—CN	5,10	键合量 6 $\mu\text{eq}/\text{m}^2$
		μ Bondapak CN	—CN	10	9%重量键合量
	弱极性	Polygosil CN	—CN	5,10	键合量 6 $\mu\text{eq}/\text{m}^2$
		Vydc 501 TP	—CN	10	—
		Alltech CN	—CN	10	—
		Zorbax CN	—CN	6	—
		Ultraspher-Cyano	—CN	5	—
		CPS-Hypersil	丙腈基	3,5,10	单层键合, pH3~8
		Spheri-5-Cyano	丙腈基	5	—
YWG-CN	丙腈基	10	8%碳含量		

续表

类型	牌号名称	官能团	粒度 (μm)	简要说明
极性键合固定相	强极性	Finepak NH	10	单层键合
		LiChrosorb NH ₂	10	—
		Spherisorb NH ₂	5, 10	键合量 0.6mmol/g, pH < 8
		Polygosil NH ₂	5, 10	—
		Nucleosil NH ₂	5, 10	弱碱性
		μ Bondapak NH ₂	10	9% 键合量, pH 2~8
		Alltech NH ₂	10	—
		Microsil NH ₂	10	单层键合, 比表面大于 250m ² /g
		Zorbax NH ₂	6	单层键合
		APS-Hypersil	3, 5, 10	—
		Spheri-5-NH ₂	5	—
		YWG-NH ₂	10	—
		非极性固定相	长链	Techsphere C ₂₂
Finepak sil C ₁₈	10			—
Partisil-ODS-1	5, 10			5% 碳含量
Partisil-ODS-2	10			15% 碳含量
Partisil-ODS-3	10			10% 碳含量
LiChrosorb RP-18	5, 10			22% 碳含量
Spherisorb-ODS	5, 10			7% 碳含量
RSIL C ₁₈ HL	5, 10			18% 碳含量
RSIL C ₁₈ LL	5, 10			9% 碳含量
Polygosil C ₁₈	3, 7, 5, 10			11% 碳含量
μ Bondapak C ₁₈	10			10% 碳含量
Zorbax ODS	6			15% 碳含量
Vydac 201 C ₁₈	5, 10			10% 碳含量/100m ² 比表面
Nucleosil C ₁₈	3, 7, 5, 10			15%~16% 碳含量
YGG-C ₁₆	5			15% 碳含量
Hypersil ODS	3, 5			9% 碳含量
Spelcosil LC-C ₁₈	5			11.3% 碳含量
Ultrasphere-ODS	3, 5			12% 碳含量
YWG-C ₁₈	10			—
Spheri-5RP-18	5			7% 碳含量
Radial-Pak C ₁₈	10	—		

续表

类型	牌号名称	官能团	粒度 (μm)	简要说明	
非极性固定相	Techsphere	C ₈	5,10	10%碳含量	
	LiChrosorb RP-8	C ₈	—	13%~14%碳含量	
	Nucleosil C ₈	C ₈	3,7,5,10	10%~11%碳含量	
	Alltech	C ₈	10	—	
	Polygosil C ₈	C ₈	3,7,5,10	10%~11%碳含量	
	Zorbax C ₈	C ₈	6	15%碳含量	
	MOS-Hyporsil	C ₈	3,5,10	—	
	Supelcosil LC-8	C ₈	5	6.6%碳含量	
其它非极性固定相	短碳链	LiChrosorb RP-2	C ₂	5,10	—
		RSIL C ₃	C ₃	5,10	7%碳含量
		Zorbax TMS	三甲基	6	—
		Apex C ₂	C ₂	5	3%碳含量
		Supelcosil LC-1	C ₁	5	2.5%碳含量
		Techsil C ₂	C ₂	5,10	10%碳含量
	C ₆	Spherisorb C ₆	C ₆	5±2	0.6mmol/g
		Hchrom C ₆	C ₆	5	0.6mmol/g
		Chromegabond	C ₆	5	10%碳含量
		苯基	Spherisorb P	苯基	5±10
μ -Bondapak Phenyl	苯基		10	10%碳含量	
RISL Phengl	苯基		5,10	5%碳含量	
Nucleosil Phenyl	苯基		7,5	10%碳含量	
Apex Phenyl	苯基		5	5%碳含量	
YWG-苯基	苯基		10	7%碳含量	

定相通常在正相条件下操作，即用比键合相本身极性小的流动相冲洗。最常用的固定相有氰基（—CN 或 cyano-）、二醇基（Diol）和氨基（—NH₂，amino-）等。氰基键合相的分离选择性与硅胶相似，但因极性比硅胶弱，所以在相同流动相条件下

的保留值较硅胶小，或者要维持相似的保留值，可用极性更小的流动相冲洗。许多在硅胶上的分离可用氰基键合相完成。它的优点是在梯度冲洗或流动相组成改变时平衡快。由于键合过程中许多 Si—OH 基被 —CN 基取代，因而和溶质间的不可逆化学吸附或副反应减少。氰基键合相与某些有双键的化合物发生选择性的相互作用，因而对双键异构体或含有不等量双键数的环状化合物有更好的分离能力。

二醇基键合相一般是缩甘油氧丙基硅烷键合相的水解产物 ($\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$)，对有机酸和某些共聚物有希望获得好的分离，二醇基的另一个用途是可进行某些蛋白质的水系体积排斥色谱。和硅胶表面“硬”的硅羟基相比，二醇基起到一种当蛋白质分子与填料表面相互作用时的“软”接触。蛋白质分子与键合相链中两个非极性部分之间的相互作用对保留值的影响并不大，但键合相的残余硅羟基对蛋白质的吸附却是要尽可能避免的。

氨基键合相与硅胶之间在性质上有较大的差异。Si—OH 基呈酸性，而 —NH₂ 基呈碱性，所以当用于正相冲洗时表现出不同的选择性。因 —NH₂ 基具有强的氢键结合能力，所以对某些多官能团化合物，如甾体、强心苷等化合物有较好的正相分离作用。鉴于氨基的碱性，故在酸性介质中，表现为弱阴离子交换固定相，可用于分离核苷酸。氨基还和糖类分子中的羟基间有选择性的相互作用，因而当用乙腈/水做流动相时可以分离单、双和多糖，并成为—个常规方法。这时尽管用的流动相是反相条件，但从机理上讲还属正相，因为流动相中增加水的含量会使保留值减少。使用氨基键合相时要注意几点：伯胺与醛形成 Schiff 碱，流动相中切忌加羰基化合物组分，如丙酮等。其次因氨基易氧化，在升温操作中流动相一定要脱气，当用醚或四氢呋喃做流动相时，如其中含有过氧化物也对氨基键合相不利。最后，不要用氨基柱分离羰基化合物，如酮类或比较强的还原糖。在分离某些化合物的丹酰氯或荧光胺衍生物时，进柱前应将未反应的试剂

消除干净。氨基键合相的另一个用途是利用氨基的反应活性，作为进一步衍生化的基质填料。

Partisil 10 PAC 是氰基和仲胺基的双官能团键合硅胶，在分离糖类上有一定特色。硝基硅烷键合相是另一种极性填料，在分离多环芳烃时有不同的选择性，不过使用得并不普通。

极性键合相所用的溶剂种类一般说来与硅胶相同，例如在庚烷中加一定比例的极性溶剂。为了获得具有大致相同的保留和分离，所用溶剂的极性比硅胶用的溶剂极性弱。在此情况下，流动相的极性一般都比固定相表面极性小，溶质在柱上的保留值随溶质极性的增大而增大。例如邻、间、对硝基甲苯的偶极矩依次为 3.94, 4.36 和 4.72D，在极性的氰基柱上，当用正己烷冲洗时， k' 依次增加，分别是 1.61, 1.71 和 2.13。在保证分离的前提下，为了缩短时间或改善峰形，可以在己烷中增加适量的二氯甲烷、乙酸乙酯或甲醇等极性溶剂。当然极性溶剂的种类和含量不同，分离的选择性也不一样。在极性键合相柱上，也可以使用水溶液流动相。

在极性键合相上的分离机理，一般认为是溶质通过与填料表面极性基团的偶极诱导、氢键和静电作用以及与溶剂分子发生相互作用，达到混合物的分离目的。

2. 离子交换键合相

在化学键合的有机硅烷分子中带上固定的离子交换基团，便形成离子交换键合相。和普通的离子交换树脂一样，若带上磺酸基（ $-\text{SO}_3\text{H}$ ）、羧基（ $-\text{COOH}$ ）就是阳离子交换填料；若带上季胺基（ $-\text{R}_4\text{N}^+$ ）或氨基（ $-\text{NH}_2$ ），就是阴离子交换填料。硅胶基质的离子交换键合相的主要特点是它的刚性、耐压，克服了树脂的溶胀和收缩现象，因而同一根柱上可以按照分析对象的具体要求在一般宽范围内改变流动相的离子强度、pH 值以及有机溶剂的种类和含量，不会对柱性能带来任何损伤。其次，由于硅胶基质粒度细、均匀，离子交换键合相表面传质过程快，因而一般柱效比离子交换树脂柱高。第三，大多数情况下，

离子交换键合相柱在室温下操作即可获得良好的分离，因而比树脂柱简单。硅胶化学键合离子交换剂在核苷酸、碳水化合物、有机酸等分离分析方面用得较多。近年来出现的大孔径硅胶离子交换键合相在蛋白质、酶等生物大分子分离分析方面很有发展前途。例如 Synchron AX-300 就是一种以 30nm 孔径硅胶为基质表面键合聚氮型的阴离子交换剂，这种交换剂的选择性类似于 DEAE，用于蛋白质分离。

作为离子交换色谱用的树脂型填料，大多数都为苯乙烯/二乙烯苯共聚物基体。近年来新的发展主要是减小粒度和孔结构及发展新品种。和键合相比较，树脂型离子交换填料有耐 pH 范围广（1~14）的特点，而化学键合相一般为 2~7.5（或 9），取决于表面覆盖的完全程度。另外离子交换树脂受污染后，可以从柱内退出，洗涤，再生后重新装柱，这样就延长了它的使用寿命。

在离子交换色谱中，所用的流动相都是缓冲液，在键合相离子交换色谱的情况下，流动相中往往还有有机溶剂作为改性剂，此时溶质的保留值受流动相溶液的 pH 值、离子强度以及有机改性剂的影响。溶质的保留兼有离子交换和吸附的双重机理。

3. 反相色谱键合相

反相色谱通常是以具有非极性表面的载体为固定相，以比固定相极性更强的溶液为流动相的色谱分离系统。一个典型的例子就是在十八烷基硅烷键合相上用甲醇/水混合剂冲洗。“反相色谱”是相对于“正相色谱”而言的，在后一种情况下，使用极性固定相（如硅胶）和非或弱极性的流动相（如己烷）。这两种操作模式的主要区别可参见表 5.13。图 5.7 表示了几种不同极性的化合物在正反相两种操作模式下保留值的变化情况。

当流动相为正相冲洗时，从偶氮苯到苯胺， k' 值随溶质极性的增加而增加；反之，在相同的固定相上，当流动相为反相冲洗时，从偶氮苯到苯胺 k' 值随极性变大而减小，并可观察到，在正相操作时随键合相极性官能团的变化，选择性变化非常显著。特别是极性较强组分，其保留值变化更大。这些键合相在反相操

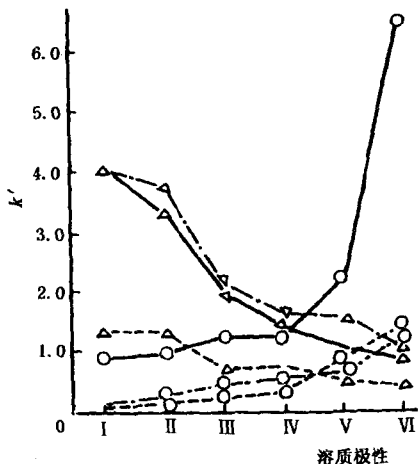


图5.7 不同柱上正相和反相冲洗时 k' 与溶剂极性的关系

I. 偶氮苯; II. 氧化偶氮苯; III. 氯化偶氮苯; IV. 硝基苯; V. 联苯胺; VI. 苯胺。
 (---YWG-C₆H₅柱; - · - YWG-CN柱; ··· YWG-NH₂柱; ○为正相冲洗; △为反相冲洗。

作时，随着键合相极性官能团的变更，对极性小的保留值影响较大，对极性较大的组分保留值影响较小。

表5.13 正相和反相色谱的区别

比较项目	正相色谱	反相色谱
固定相	极性	非(弱)极性
流动相	非(弱)极性	极性
流出次序	极性组分 k' 大	极性组分 k' 小
流动相极性的影响	极性增加, k' 减少	极性增加, k' 增大

反相色谱是高效液相色谱中应用最广泛的一个分支，其主要

原因是操作简单和灵活。无论是大量商品化的烷基键合相，还是某些聚合物或多孔碳填料，其表面的非极性特性都很强。而用作流动相的水和能与水互溶的有机溶剂，从价格和获得的方便程度上都远较烃类溶剂容易。此外，由于非极性填料，特别是化学键合固定相上样品的不可逆吸附和溶剂的记忆效应小，所以更换溶剂或进行梯度淋洗非常方便。

在反相高效液相色谱中使用的固定相，大量的各种烷基硅烷的化学键合硅胶。烷基链长可以是 C_2 , C_4 , C_8 , C_{16} , C_{18} , C_{22} 等，而最常用的是 C_{18} ，又称 ODS，即十八烷基硅烷键合硅胶。键合烷基的链长对键合相的样品负荷量、溶质的 k' 值和其选择性都有不同的影响，当烷基键合相的表面浓度 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) 相同时，烷基链长增加，碳含量成比例增加，溶质的保留值增大。当表面覆盖度不一样时，一般说来，溶质在长碳链烷基键合相上有较大的 k' ，但不一定成比例。烷基链长对选择性的影响目前尚有不同的看法，一些作者认为选择性只与溶质的分子结构和流动相组成有关，很少与链长有关。但许多文章表明键合相链长在 $C_6 \sim C_{12}$ 之间时，小分子溶质的选择性随链长增加而增加；在 C_{12} 以后选择性趋于常数^[27]，因为键合烷基链之间的距离大约是 $0.90 \sim 0.95 \text{ nm}$ ，当烷基链较长时至少对于小分子的溶质来说可以钻进液珠状的键合烷基簇内，溶质在这种键合层与流动相之间分配则与链长无关，但在烷基链较短的情况下，吸附的因素变化较大，从而引起选择性的变化。而溶质分子的结构对选择性的影响是很明显的。

短链烷基 (C_8 , C_6 等) 硅烷由于分子尺寸较小，与硅胶表面键合时可以有比长链烷基更高的覆盖度和较少的残余羟基，因此适合于极性样品或需做离子抑制的样品分离分析，或者说有利于使用酸性较强的流动相。而长链烷基键合相 C_{18} , C_{16} , C_{22} 等，因为具有较高的碳含量和更好的疏水性，所以对于各种类型的样品有更强的适应能力，可用于非极性的芳烃以及氨基酸、肽、儿茶酚胺等多种药物分析。

苯基键合相和短链烷基键合相性质相近，新发展的多环芳烃键合相与长链烷基相接近，在分离芳香化合物时有一定特色。

§ 5.3 其它基质材料的液相色谱固定相

现今，70%以上的高效液相色谱分离是在硅胶为基质的液相色谱固定相上进行的。但以硅胶为基质的固定相存在一些不可克服的缺点，如在含水，尤其在 pH 值较高或较低的流动相中稳定性较差，与一些蛋白质活性的兼容性较差等^[28,29]。近年来，为了克服硅胶基质的这些缺点，各种以新的材料为基质的固定相不断产生。本节将对这些新的色谱填料的发展作简要的介绍。

§ 5.3.1 有机高分子基质的液相色谱固定相

同硅胶基质的 HPLC 填料相比较，高分子类型填料的普遍特征主要表现在：

(1) 它们的基质微球可以广泛选择各种单体和交联剂来聚合，并且这些聚合物容易进行化学改性处理，所合成的产品普遍有良好的色谱选择性；

(2) 它们对于样品的负载能力强，有较高的色谱容量；

(3) 它们具有良好的化学稳定性，可以在广泛的 pH 值范围内使用；

(4) 它们不易产生不可逆的吸附作用，特别对于生物物质的分离能够较好地保存其生物活性。

诸多优点，决定了高分子类型填料广阔的发展前景，尤其对于分离纯化活性生物物质所表现的良好性能，已越来越受到研究者和应用者的重视。有人曾预计，在今后一些年里，有机高分子基质的填料将可能成为主要的发展方向^[28]。需要指出的是高分子微球的颗粒刚性还不如硅胶，孔结构也比较复杂，在淋洗体系的变化过程中可能会产生膨胀或收缩。这些影响色谱柱效率的主要因素，仍有待于研究解决。

基质微球是 HPLC 填料的支撑骨架, 它将直接决定填料的颗粒大小、刚性程度和孔结构形态, 也会直接影响到能否有效地引入具有分离选择性的官能基团。因此, 欲获得高柱效、高选择性、高分离度的柱填料, 对于基质微球的合成以及结构性能的研究是至关重要的。目前所使用的基质材料最主要的是交联聚苯乙烯, 其它交联共聚物如交联聚乙酸乙烯酯、交联聚乙烯、交联聚甲基丙烯酸及其脂类、交联聚乙烯吡啶、交联聚乙二醇以及高交联琼脂糖等也得到广泛的应用。

基质微球的合成如果采用经典的悬浮聚合方法, 所得颗粒通常大于 $100\mu\text{m}$, 而且粒度分布范围比较宽; 如果采用经典的乳液聚合方法, 则只能得到小于 $1\mu\text{m}$ 的微粒。于是人们试图寻找一种介乎于悬浮和乳液聚合之间的新方法。实验证明, 选择适当的分散稳定剂通常都是几种组分(有机和无机)的复合体, 它们既可提高聚合体系的悬浮分散作用, 又能抑制反应过程中的乳化作用, 兼备了两种聚合方法的特点。所合成的产品经分级和处理即能满足要求。目前许多商品化 HPLC 填料的基质微球就是用这种方法获得的。

在过去的一些年中, 对于颗粒单分散的高聚物基质微球的研究已取得了显著进展。Ugelstad^[30,31]使用二步溶胀法制出了粒度单分散的交联聚苯乙烯微球。该方法首先是合成粒度小于 $1\mu\text{m}$ 的高聚物胶乳作为“种子”, 让其“种子”在水相中吸附不溶于水的低分子有机物进行溶胀, 然后吸附单体进一步溶胀并聚合。用此原理所合成的粒度约 $10\mu\text{m}$ 的单分散微球, 经化学修饰后已成为性能优异的填料, 并在高效离子交换色谱中得到应用。Vanderhoff^[32]研究了微重力环境中连续溶胀聚合方法, 制备出了较大颗粒的单分散高分子微球。Matijdevic^[33]报道了使用单体气溶胶的阳离子聚合制备 $10\sim 20\mu\text{m}$ 单分散高聚物颗粒的方法。Calvin 等^[34]描述了一种喷射-冷冻成形和辐射聚合的技术路线, 合成出较大颗粒的单分散微球。柴志宽等^[35]介绍了一种静态的相分离聚合方法, 其原理是在液相介质中单体聚合成低聚体, 当

其分子量达到某一限度时不再能溶于介质而产生相分离，被分离出来的低聚体由于表面张力作用，成为液珠悬浮在液相介质中，液珠继续以比较高的速度聚合，交联硬化，并以较低速率沉降，这样可以避免硬化前的碰撞、粘结，从而得到颗粒较为均匀的微球。该方法虽然达不到颗粒单分散，但是操作简便，易于控制，合成物的粒度适宜并无需筛分。

所合成的基质微球，按其物理-化学结构特征，有一些产品可以直接作为色谱填料使用，但是在大多数情况下还需经过化学改性处理。化学改性是根据不同色谱方法的需要，在基质微球上引入适量的带有特定官能基团的物质，以达到所期望的色谱选择性。在不同 HPLC 分支技术中，一些常见填料所携带的选择性基团或化合物分别为：

离子交换色谱填料含有 $-N^+(CH_3)_3$ ， $-CH_2CH_2N(C_2H_5)$ ， $-SO_3^-$ ， $-COOH$ 等离子交换基团。

反相色谱填料含有 C_{18} ， C_8 烷基以及苯基等强疏水性基团。

正相色谱填料含有 $-OH$ ， $-NH_2$ ， $-CN$ ， $-COOH$ ，醚链等极性基团或链段。

疏水性相互作用色谱填料含有 $C_1 \sim C_4$ 烷基、苯基、聚乙二醇等弱疏水性基团或链段。

空间排除色谱填料，其中用作水相体系的凝胶过滤填料含有 $-OH$ 等亲水性基团。

亲和色谱填料携带有抗体、激素、抗菌素、酶等具备生物特异性的配基。

应当指出，在化学改性过程中，一般应当先将基质微球进行亲水性处理。因为除凝胶渗透色谱使用油相体系外，其它色谱方法的流动相都有水参与，所以，为了增强固定相与流动相的匹配能力，对于基质微球（尤其是非极性基球）进行亲水性处理是很必要的。处理方法是在基质微球表面首先引入亲水性基团或链段，然后再引入适当的选择性基团或化合物。这样一来将有一部分亲水性基团或链段会成为起连接作用的间隔臂。实践证明，合

适的间隔臂对于改善色谱传质、提高分离选择性是甚为有利的。

通常用作 HPLC 填料的高聚物树脂大都是具有多孔结构的微球，其孔径为几纳米、几十以至上百纳米。为了增强颗粒刚性和改善孔结构形态，以提高填料的色谱传质性能，近几年来对于树脂的合成出现了两种明显的分支趋势。第一，向小颗粒非多孔结构分支，有关这方面的研究已有许多报道。例如，以 $2.5\ \mu\text{m}$ 亲水性高聚物为基质所制得的非多孔型反相、离子交换和疏水性相互作用色谱填料，其柱效、选择性、分离度以及对活性样品的回收率等指标都是令人满意的，用于快速分离蛋白质、核酸等生物大分子是很成功的^[36]。第二，向贯通性超大孔结构分支，最近报道的所谓灌注色谱（perfusion chromatography）填料就具有这种结构特性^[37]。它的基质是高交联的聚苯乙烯微球，粒度为 $10\ \mu\text{m}$ 或 $20\ \mu\text{m}$ ，在 $600\sim 800\text{nm}$ 的孔径内连接着 $80\sim 150\text{nm}$ 的贯通性孔。用这种结构的树脂所发展的反相、离子交换、疏水性相互作用以及亲和色谱填料，对于生物大分子样品的色谱传质十分有利，流速适应范围相当宽，柱效高而柱压降很小，并有较高的色谱容量^[38]。

高分子基质的反相色谱（RPC）填料，目前较为广泛适宜的是微球型交联聚苯乙烯树脂。这类树脂的表面具有烷基键合相那种非极性的特征，因此无需化学改性就可以直接用作 RPC 填料。近年来也提出了一些其它类型（包括烷基衍生）的高分子基质 RPC 填料，例如醋酸乙烯酯共聚物^[35]、带有 C_{18} 烷基侧链的聚丙烯酰胺^[38]、聚甲基丙烯酸酯的烷基酯化物和聚乙烯醇的酯化物^[39]、 C_{18} 烷基键合的聚乙烯醇以及 C_{18} 烷基衍生的交联聚苯乙烯等。表 5.14 给出了一部分商品化了的高分子类型 RPC 填料。这类填料都可以在广泛的 pH 值（ $2\sim 12$ ，甚至 $1\sim 13$ ）范围内使用。从化学结构来看，树脂表面均有较强疏水性作用，其色谱性能基本上类似于硅胶基质的烷基键合相填料。

表 5.14 部分常见的高分子类型高效反相色谱填料

名称	基质材料	粒度(μm)	孔径(nm)	官能团
TSK gel Phenyl-5PW RP	亲水高聚物	10	100	C_6H_5
TSK gel Octadecyl-4PW	亲水高聚物	10	50	C_{18}
TSK gel Styrene-250	PS-DVB	5,10		—
TSK gel Octadecyl-NPR	聚丙烯酸脂类	2,5	多孔	C_{18}
Hamilton PRP-1	PS-DVB	10	7.5	C_1
Hamilton PRP-3	PS-DVB	10	30	C_3
ARPP	PS-DVB	5,10	8	—
PLRP-S	PS-DVB	8,10	30,100	—
ACT-1	PS-DVB- C_{18}	10		C_{18}
Shodex RS pak DS-613	PS-DVB			C_{18}
Shodex RS pak DS-613	聚丙烯酸脂类			C_{18}
Polypore phenyl RP	PS-DVB	10	30	C_6H_5
Polypore RP	PS-DVB	10	8	—
Bio Gel PRP 70-5	含 Benzyl 高聚物	5	7	—
Bio Gel PRP+	含 Benzyl 高聚物	70	100	—

目前,常见的高分子类型反相色谱填料主要是多孔型树脂,但非多孔型树脂作为反相色谱分离柱填料的新发展,在 HPLC 中也已得到相当广泛的应用^[41,42]。

高分子类型正相填料一般是在基质树脂上引入极性基团链段,或者由极性单体直接共聚而制得。例如商品填料 TSK gel Acetate-60 是含醋酸脂类基团的高聚物,TSK gel Ether-250 是带有醚链的高聚物,Hitachi Gel 3020 是甲基丙烯酸脂类共聚物,ACT-2 是乙烯砘烷的共聚物,RSpakDC-613 是聚苯乙烯基质的性能类似于氨基键合相的亲水性树脂等。有人把一些专用色谱填料,诸如用于糖、酸、醇类以及光学异构体等分离的树脂也划归为正相色谱填料范围。

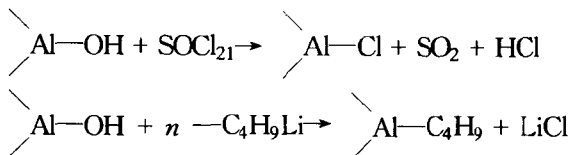
极性填料尤其是极性高分子树脂型填料的应用范围相当广泛。除了正相色谱以外，在 HPLC 的其它分支技术中，如离子交换、水相空间排除、亲和以及各种专用色谱等，使用的都是极性填料。有些填料还可以在两种色谱方法上兼备使用，例如，甲基丙烯乙二醇脂交联共聚树脂^[43,44]和乙烯砒咯烷酮共聚树脂^[45]，既可作为正相色谱填料，也可用于空间排除色谱。所以对极性填料的分类方法，可按填料的组成、结构、性能、分离机理、色谱应用等情况并根据自己的需要进行。

以高聚物为基质的液相色谱固定相在离子交换、疏水色谱、亲和色谱和凝胶色谱的分离分析中也得到很广泛的应用^[28,29]。

§ 5.3.2 其它无机基质的液相色谱固定相

Al_2O_3 ， ZrO_2 ， TiO_2 以及碳微球等，均曾被研究用以制备耐高 pH 值或具有特殊分离性能的介质。

用作分离材料的氧化铝，主要是 $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ，其表面羟基浓度约为 $3\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，孔最大可达 10nm 左右，但常含大量小于 2nm 的孔，其比表面积约为 $50\sim 200\text{m}^2/\text{g}$ ^[46,47]，作为色谱固定相，主要用于小分子有机物等的分离。限制它更广泛应用的主要因素是，它难以像 SiO_2 那样通过键合而得到适应不同分离模式的固定相。最近，有人利用 Al-OH 基的氯化反应，再与丁基锂反应生成烷基化氧化铝：



从光谱分析和元素分析可知，丁基键合密度相当于 $2.6\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，所用原料 Al_2O_3 直径为 $10\mu\text{m}$ ，比表面积约为 $100\text{m}^2/\text{g}$ 。键合相经试验，在甲醇、乙腈、己烷、甲苯等溶剂中可长期使用，在 pH1~12 范围内未见异常。经装柱分离细胞色素 C、醛缩酶、木瓜蛋白酶及尿素酶等蛋白质，各峰均窄而对

称, 理论塔板数 $1.3\sim 1.6$ 万/ $m^{[48]}$ 。看来只要解决键合问题, 氧化铝有可能发展成为耐受碱性介质的固定相材料。

ZrO_2 可以通过二氯化锆 ($ZrOCl_2$) 或烷氧基锆的水解, 以及水合二氯化锆的热裂解来制备^[49]。利用与硅胶键合相类似的方法, 可以对氧化锆进行表面修饰。用这种方法制备的键合反相 (C_{18}) 氧化锆, 可以用至 pH13; 聚合物包覆型亦可达 pH12。含金属铜离子的亲和色谱介质, 在 pH1 0.5 时仍很稳定^[50]。以 ZrO_2 作为涂层或添加剂改进硅胶的 pH 值稳定性的工作也获得了某种程度的成功^[51,52]。

参 考 文 献

- [1] L. R. Snyder, *Chem. Tech.*, **9**, 750 (1979).
- [2] L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 223 (1978).
- [3] L. R. Snyder, in *High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, Vol. 3, Cs. Horvath, Ed., Academic Press, New York, p. 157, 1983.
- [4] L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **92**, 223 (1974).
- [5] L. R. Snyder, J. W. Dolan and J. R. Gant, *J. Chromatogr.*, **165**, 3 (1979).
- [6] L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 223 (1978).
- [7] C. F. Simpson, *Techniques in Liquid Chromatogr.*, Wiley, NY, 1982.
- [8] P. A. Bristow and J. H. Knox, *Chromatographia*, **10**, 279 (1977).
- [9] J. C. Chen and S. G. Weker, *J. Chromatogr.*, **248**, 434 (1982).
- [10] D. L. Saunders, *Anal. Chem.*, **46**, 470 (1974).
- [11] P. J. Schoemakers, *Optimization of Chromatographic Selectivity*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [12] 邹汉法、张玉奎、洪名放、卢佩章, *自然科学进展*, **4**, 403 (1994).
- [13] 邹汉法、张玉奎、卢佩章, *色谱*, **10**, 329 (1992).
- [14] 刘国诠编, 《生物工程下游技术》, 化学工业出版社, 北京, p. 15, 1993.
- [15] P. A. Asmus, C. E. Low and M. Novotny, *J. Chromatogr.*, **119**, 251 (1976).
- [16] 卢佩章、孙日明等, 《高效液相色谱的微粒型固定相论文集》, p. 4, 1980.
- [17] K. Karch, I. Sebastian and I. Halasz, *J. Chromatogr.*, **122**, 3 (1976).

- [18] R. E. Majors, *Anal. Chem.*, **56**, 300R (1984).
- [19] 王俊德、丛润滋、郁蕴璐, 《第八届全国色谱学术报告会文集》, p. 313, 大连, 1991.
- [20] R. J. P. Corria and C. Guerin, *J. Organomet. Chem.*, **198**, 231 (1980).
- [21] J. N. Kinkel and K. K. Unger, *J. Chromatogr.*, **316**, 193 (1984).
- [22] K. K. Unger, N. Becker and R. Rouveliotis, *J. Chromatogr.*, **125**, 115 (1976).
- [23] M. Verzele and C. Dewaele, *Chromatographia*, **18**, 84 (1984).
- [24] H. Hemetsberger et al., *Chromatographia*, **7**, 303 (1976).
- [25] C. H. Lochmaller, *Anal. Chem.*, **55**, 1344 (1984).
- [26] E. Bageretal, *J. Chromatogr.*, **264**, 197 (1983).
- [27] A. M. Kriatulovic and P. R. Brown, "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", John Wiley and Sons, NY, 1992.
- [28] 刘国途主编, 《生物工程下游技术》, 化学工业出版社, p. 193, 1993.
- [29] N. Tanaka and M. Araki, *Adv. in Chromatogr.* (ed. by P. R. Brown and E. Gruska), p. 81.
- [30] J. Ugelstad, European Patent 0003905, 1979.
- [31] J. Ugelstad, P. C. Mork, K. H. Kaggerud, T. Ellingsen, and A. Berge, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **13**, 101 (1980).
- [32] J. W. Vanderhoff, M. S. El-Asser, F. J. Micele, E. D. Sudd, C. J. Tseng, A. Silowanowicz and H. R. Shen, *ACS Polym. Mat. Sci. Eng.*, **54**, 587 (1986).
- [33] K. Nakamura, R. E. Partch and E. Matijevic, *J. Colloid Interface Sci.*, **99**-**1**, 118 (1986).
- [34] M. Colvin, S. K. Chung, M. T. Hyson, M. Chang and W. K. Rhin, *J. Polym. Sci, Part A: Polym. Chem.*, **28**, 2085 (1990).
- [35] 柴志宽等, 中国专利 CN 86101723A.
- [36] 王俊德, 李晓红, 董鹏, 色谱, **13**, 361 (1995).
- [37] N. B. Afeyan, S. P. Fulton and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, **544**, 267 (1991).
- [38] Hanfa Zou, Yukui Zhang and Peichang Lu, *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 126 (1996).
- [39] N. Tanaka, T. Ebata, K. Hashizume, K. Hosoya and M. Araki, *J. Chromatogr.*, **475**, 195 (1989).
- [40] K. Yasukawa, Y. Tamura, T. Uchida, Y. Yanagihara and K. Noguch, *J. Chromatogr.*, **401**, 129 (1987).

- [41] D. P. Lee, *J. Chromatogr.*, **443**, 143 (1988).
- [42] G. P. Rozing, and H. Goetz, *J. Chromatogr.*, **476**, 3 (1989).
- [43] 邓礼儒、苏天升、王玉梅, *分析化学*, **10**, 82 (1982).
- [44] 苏天生, 邓礼儒, 中国专利 85100893. 3.
- [45] 苏天生、孟庆成、王玉梅, *化学通报*, **7**, 13 (1982).
- [46] W. K. Kreis and K. K. Unger, *Adsorption at the Gas-Solid and Liquid-Solid Interface*, Amsterdam, Elsevier, p. 373, 1982.
- [47] T. Ono, et al., *Preparation of Catalysis 3*, Amsterdam, Elsevier, p. 631, 1983.
- [48] J. J. Pesek and H. D. Lin, *Chromatographia*, **28**, 565 (1989).
- [49] H. Th. Rijnnten, *Physical and Chemical Aspects of Adsorbents and Catalysis* (B. G. Linsen, ed.), London, Academic Press, p. 355, 1970.
- [50] Hans Jürgen Wirth, M. T. W. Hearn, et al., *12th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides*. (Sydney, Australia) No. 113, 1992.
- [51] Sivakoff, *J. Chromatogr.*, **352**, 381 (1986).
- [52] Gyula Szabo, et al., *Anal. Chem.*, **60**, 213 (1988).

第六章 液相色谱专家系统 及其柱系统推荐

为了能准确、快速和有效地分析测定实际样品，必须建立一个适当的分析方法。色谱分析方法的建立由很多步骤所组成。首先必须选择合适的柱分离模式如正相、反相、离子交换、离子对色谱和仪器操作条件。其次是流动相的选择，通过流动相的选择使被分析的样品的分析时间控制在可接受的范围之内。这一步通常被称之为保留值最优化。在很多情况下，虽然被分离的样品分析时已被控制在适当的范围内，但其分离选择性并不理想，由此通过调节流动相的配比和组成达到分离选择性的优化。同时还可以对柱长、填充物粒度和流速等参数进行优化。最后再由实验确证所发展的方法的正确性。图6.1是以上这些步骤中一些典型的色谱分离示意图。这样的色谱分析方法发展过程，只有对于具有足够经验和知识的色谱专家才能信任。但对于绝大部分操作人员而言，往往需要消耗大量的时间才有可能发展出一个适合的分析

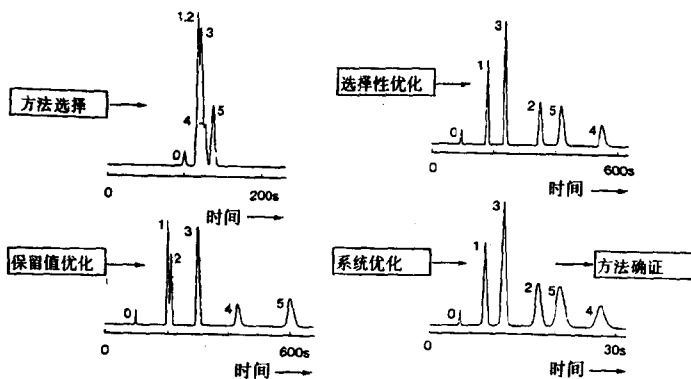


图6.1 液相色谱方法发展中每一步骤所对应的典型色谱图

方法。色谱专家系统是为了解决这一问题，亦即使非色谱专家能很好地完成分析方法发展和分析任务而发展起来的，它是色谱理论的研究成果和计算机技术的结晶。

§ 6.1 专家系统的结构

一个专家系统主要由知识库和推理机所组成。知识库是规则和事实的集合，在知识库中知识的因果关系的表达也很重要。推理机对提出的问题通过知识库推理得到解决问题的结论。专家系统的另一个特征是它的解释系统、用户界面和外设。解释系统用于对专家系统得到结论的演绎过程进行解释。用户界面允许用户与专家系统进行交流，还可以对专家系统的操作和使用提供咨询。外设主要用于从数据库中抽提信息或完成专家系统推理过程中的数学计算。专家系统中各个模块间的关系如图6.2所示。

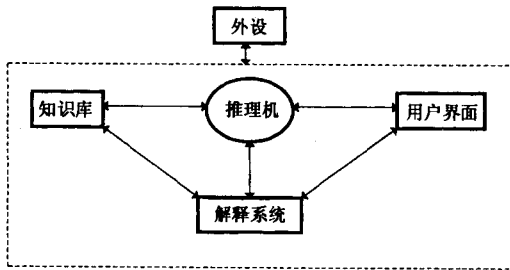


图6.2 专家系统的结构

§ 6.1.1 知识库和知识表达

计算机语言编写专家系统时，人们必须决定知识库中知识的表达方式。在大部分情况下，人们通常以产生式规则或构架来表达知识，如规则的表达方式为

IF (conditions) THEN (conclusions)
或 IF (antecedent) THEN (consequent)

以下是产生式规则决定液相色谱流动相流速的例子^[3]：

```
IF column type = microbore
  and column length = 200 mm
  and column diameter = 2.1 mm
THEN flow rate = 0.3 ml/min
```

构架型知识表达的一个应用实例是高效液相色谱中流动相组成的选择，由此需要获得被分析化合物的相关信息如化学式、酸碱性和疏水性等。这些知识可以被构筑成许多构架，每一个构架表达一个概念和相关信息的属性，而每一个属性又与可能的参数值相关联。

Compound

```
chemical family
acid-base properties
log P value
```

A β -blocker

```
is a compound
chemical family = the  $\beta$ -blockers
acid-base properties = strong basic
log P value
```

Propranolol

```
is a  $\beta$ -blocker
chemical family = the  $\beta$ -blockers
acid-base properties = strong basic
log P value (to be derived from the molecular structure using Rekker's procedure)
```

总构架“COMPOUND”和确定的子构架都被包容在一个逆阶构架中。总构架由相关的属性所识别，这些属性又被支构架继承。每一个构架中的属性还可继承更高级构架中的参数。例如，propranolol的酸碱属性继承了“strong basic”的属性。属性的参数还可由外部输入。IF…THEN型表达方式尤其适用于一些重

要规则和启发式知识的表达，而构架型表达方式比较适用于结构分类型知识的表达。Buydens 等^[4]对高效液相色谱知识库的知识表达方法进行了研究和比较，认为二种表达方式都不是最好的表达方式，而规则型和构架型的表达方式的组合最适合于液相色谱知识的表达。Massart 等^[5]则认为规则生成型的表达方式更有效。

§ 6.1.2 推理机

为了表达推理机的功能，我们可以考虑有以下二条规则组成的知识库：

1. IF functional-group = COOH
THEN acid-base status = ACID
2. IF acid-base status = ACID
THEN mobile-phase-additive = ACETIC ACID

这两条规则又可被组成为

IF functional-group = COOH
THEN mobile-phase-additive = ACETIC ACID

以这种方式推理机可以产生新的规则并最终获得结论。如把条件和结果由 A、B 和 C 来表示。我们可以得到 IF...THEN 型规则的一般表达方式为

$$\begin{array}{c} \text{IF A THEN B} \\ + \\ \text{IF B THEN C} \\ \downarrow \\ \text{IF A THEN C} \end{array}$$

这一过程可以在没有特定知识的情况下构筑一个通用型的推理机。

推理机可以利用知识存储的知识以正向或逆向方式得出结论。所谓正向方式，推理机首先检验被研究的问题的所有合适的事实和知识，然后把这些事实和知识与知识库中规则的 IF 部分相比较，由此所产生的信息触发其它规则并最终得到问题的结

论。例如，为了选择流动相中减少色谱峰拖尾的添加剂，推理需要化合物的结构信息。对于化合物如乙基水杨酸，可以被判别为一个强酸。推理机可以推断水杨酸是酸性，由此得到添加剂为乙酸。逆向方式则从问题的一个可能的结论出发，由于咨询的目标在规则的 THEN 部分，IF 部分中的参数成为次目标。这一推理过程一直到与条件相符合的一条规则被发现后才结束。如对于以上正向推理的化合物乙基水杨酸，逆向方式会考察乙酸是否是一个合适的添加剂，而乙酸是适合于酸性化合物的添加剂，这又需要化合物中酸性基团的存在。

专家系统可以由常用的人工智能计算机语言如 Prolog, Lisp 或其它语言编写^[6]，但这不但需要较高的软件技巧，而且需要投入大量的时间。另一可能性是在专家系统商业软件上发展专家系统^[7,8]。

§ 6.2 液相色谱专家系统及其应用

至今，国内外已经报道的液相色谱专家系统至少有 19 个以上，表 6.1 是有关这些专家系统的基本信息。从已报道的这些专家系统来看，国家色谱研究分析中心和欧洲共同体所支持的色谱专家系统是综合性的，包括了液相色谱的每一个方面；其次是关于分离条件最优化的专家系统，共有 7 个，可见液相色谱分离条件最优化在液相色谱中的重要性。下面对现有的一些专家系统的主要内容和应用范围有选择性地作一介绍。Bach 等^[9]首先发展出液相色谱方法发展的专家系统，英文简称为 ECAT。这一专家系统包含四个模块，并与 Varian 的推理系统相兼容。第一模块主要根据被分析样品的性质推荐柱填料、柱结构和流动相组成，而化合物的性质可由第一模块中化合物的类型或数据库中化合物的物化参数所确定。如这一模块中没有相关化合物的物化性质的信息，则可以通过与用户交流获得化合物的酸、碱性和疏水性参数。由此，根据化合物的性质推荐液相色谱分离模式、柱类型、

流动相的添加剂等。ECAT的另一模块则根据溶剂线性梯度模型发展的优化方法。另外二个模块是根据用户提供的信息和需求对样品的液-固萃取和衍生化等样品预处理的方法进行推荐。Gunasingham等^[10]则建立了液相色谱分离分析甾类化合物的专家系统,这一专家系统的发展主要基于43种甾类化合物在反相和正相液相色谱中的保留行为。这一系统主要用于甾类化合物分离分析的色谱柱、流动相和检测器的推荐。

表6.1 液相色谱专家系统及其应用范围

专家系统	应用范围	发展者	文献
ECAT	流动相,固定相推荐,条件优化	Bach 等人	[9]
甾类化合物分离分析专家系统	甾类化合物分离	Gunasingham 等人	[10]
ESP	方法发展	Tischler 和 Fox	[11]
Optimization	分离条件优化	Fell 等人	[12, 13]
ESC	综合	国家色谱研究分析中心	[14, 15]
ESCA: Intergration I	方法发展和选择性优化	Massart 等人	[16~18]
Intergration II	重复性检验		
Intergration III	可靠性检验		
HPLC Doctor Troubleshooting	液相色谱故障诊断和处理	Tsuji 和 Jenkins	[19]
离子对色谱专家系统	离子对色谱方法发展	Yuzhu 等人, Bartha 和 Stahlberg	[20, 21]
CRIPES	液相色谱保留指数预测	Smith 和 Burr	[22]
HPLC-METABOLEXPRT	代谢产物保留值预测	Valko 等人	[23]
EluEx	初始条件选择	Valko 和 Szepesi	[24]
Thin Layer Chromatography	薄层色谱分离和定性	Moll	[6]

续表

专家系统	应用范围	发展者	文献
Solid-Phase Extraction	液固萃取方法发展	Moors 和 Ma- ssart	[25]
Dry Lab	多元组分优化系统	Snyder 等人	[26, 27]
Optochrom	流动相组成最优化	Doornbos 和 Coenegrach	[28]
WISE	流动相组成最优化	Waters	29
PESOS	流动相优化系统	Gant 等人	[30]
ICOS	分离条件优化和保留值 模拟	HP 公司	[31]
DIAMOND	四元流动相等度优化	Lynch 等人	[32]

Tischler 和 Fox^[11]发展的专家系统被称之为 ESP, 这一专家系统主要根据化合物的性质选择适当的分离方法. 该专家系统可以根据被分离样品的性质如分子量、溶解度、极性、离子性质、酸碱性、异构体信息和分子官能团等推荐许多初始的分离方法. 在此基础上, 加入样品分离分析的限制条件, 可以得到一个最终的分离分析方法. ESP 同时还对方法选择的每一个过程进行解释, 因此有可能用于液相色谱的教学. 这一系统的缺点是给出的分析方法很笼统. 在专家系统的研究方面, 由欧共体资助的化学分析专家系统 (ESCA) 最为庞大, 涉及的领域也最多, 在 ESCA 中最重要的部分之一是色谱方法发展的专家系统^[16~18]. 首先, 他们发展出包含了所有色谱方法发展的许多独立的专家系统, 然后这些独立的专家系统被集成为三大部分. 第一集成部分由初始方法选择和分离选择性最优化组成, 被分成三个不同的应用领域 (即 LABEL, DASH 和 LIR). LABEL 专家系统主要用于丙氨基柱分离分析药物初始色谱分离条件的选择, 可应用的分离模式包括缓冲液作为冲洗剂和水作为冲洗剂的反相色谱和正相色谱. DASH 系统用于中枢神经活性药物和心血管药物纯度控制的色谱分析方法发展. LIR 系统则主要从文献资料中选择用户需要的液相色谱分离分析方法. 这三个系统对用户提供色谱分析的

初始条件。如果实验结果表明被分析化合物的保留值超过规定的范围，保留值优化模块 LABEL'，DASH'和 LIR'可以根据用户的要求给出进行新实验的指令。由此可以获得在适当保留时间范围内的色谱分离谱图。所得到的这一谱图可能分离效果并不理想，则可以进一步采用选择性优化专家系统 SLOPES 提高样品分离的选择性。ESCA 专家系统的第二和第三集成部分被称之为重复性 REPS 和可靠性 RES 评估系统。REPS 主要用于所发展的方法的重复性检验和问题诊断，RES 部分主要用于考察一些环境微小变化对分析方法可靠性的影响。

Tsuji 和 Jenkins^[19]则发展了液相色谱故障解决专家系统，用户通过与该专家系统问答对话可以获得处理液相色谱故障的建议。另外，Yuzhu^[20]和 Barth 等^[21]则发展了离子对色谱方法的建立和分离条件最优化的专家系统。Smith 等^[22]建立了从溶质分子结构预测液相色谱保留指数的专家系统。Valko 等^[23]发展的专家系统 HPLCMETABOLEXPRT 主要用于预测代谢产物的保留值，为了预测保留值，专家系统需要代谢产物母体的保留值和正辛醇/水分配系数。在此基础上，Valko^[24]进一步建立了液相色谱初始条件预测的专家系统。

国家色谱研究分析中心所发展的专家系统主要包括六大部分：

- (1) 柱系统的推荐；
- (2) 样品预处理方法及流动相、检测器系统的推荐；
- (3) 分离条件的最佳化；
- (4) 在线定性、定量；
- (5) 硬件系统的自诊断；
- (6) 离线计算。

同时建立了实现以上这些功能的知识库、谱图库、推理机、用户接口及某些先进的算法的软件包。

我们以保留值规律为基础首次发展出 HPLC 柱系统推荐的专家系统，该系统可从分子结构及样品名通道入手进行合理的分

离模式推荐以及样品预处理、流动相、检测器的推荐，其中柱系统的推荐是专家系统的主要部分。

通过分析各种作用力对保留值的影响，我们提出了从分子结构参数入手推荐合理的分离柱模式的方法。样品名通道则是根据溶质的作用指数是溶质的特征参数这个基本原理出发，来系统的总结推荐各类样品合理的分析方法。我们通过对 3 000 多篇文献的总结，并在结合我们的保留值方程的基础上建立了常见的 10 大类样品组分的分析方法的推荐知识库，并已用于用户的实际样品分析方法发展。在这样的基础上建立起来的知识库是极为可靠的，有实用性的，并且保证了推理的正确性。

在条件优化中，我们以峰高分离度为指标，采用计算机仿真-全谱图拟合发展了包括已知样品、未知样品在内的等度及梯度下的优化条件的选择，同时再结合以先进的智能搜索技术，使优化条件选择更具特色。

在线定性，我们发展了紫外光谱与作用指数联合定性的方法，在一定条件下单独采用作用指数定性也能获得满意的结果。同时还发展了双柱定性及不同柱温下定性等多种定性方法。

专家系统中硬件的自我诊断是保证色谱仪正常运转的先决条件，我们首先将色谱理论与丰富的专家实践经验相结合，发展了在线柱系统等硬件的自我诊断知识库，这是智能型色谱仪的标志之一。

在专家系统中建立的 200 多张色谱谱图库是我们在 2 000 多张谱图中，经精心选择而建立起来的，反映了各类化合物分离的合理分析方法。

在推理机中，我们还首次采用不确定推理的方式，提高了推理结果的合理性。

专家系统各部分相互独立，使用时还附有必要的解释系统以及自助系统，对用户具有极大的灵活性。

此外，还有许多优化方法的专家系统，我们将在第七章作比较详细的介绍。总体而言，色谱专家系统是发展智能色谱所必须

的。把专家系统应用到色谱日常工作中，不仅可以提高色谱分析的自动化程度，而且可以帮助色谱专家解决更加困难的色谱问题，因此具有良好的发展前景。从现阶段来看，色谱专家系统中的某些部分已开始进入商品化，如色谱优化软件，色谱数据采集和处理系统等。发展色谱专家系统存在的困难是如何得到正确而又广泛的色谱知识，并把它们很好地表达达到知识库中。色谱是在不断发展和完善的科学，如何把不断产生的新知识和规则动态吸收到知识库中是发展色谱专家系统的另一大问题。我们坚信在不久的将来肯定会有商品化的智能型色谱仪器推向市场。

§ 6.3 色谱专家系统中的柱系统推荐规则库

如上所述，色谱专家系统中最关键的是知识库中知识的水平和正确性。而在使用专家系统时，人们很难真正了解知识库中的知识。事实上，知识库中的知识对色谱的应用和方法发展也有很好的指导作用。本节我们将介绍液相色谱柱系统推荐的理论基础和柱系统推荐的规则。

§ 6.3.1 分离模式选择的基本条件

对于低分子量化合物（分子量小于 2 000）的分离分析，常用的色谱分离模式为正相（包括吸附和键合固定相）、反相、离子和手性固定相液相色谱这几种分离系统；此外还有在流动相中加入少量添加剂改变溶质在流动相和固定相中的作用性质的离子对色谱和手性流动相色谱系统^[33]。对于分子量大于 2 000 的样品的分离分析，则主要有反相、疏水、亲和、尺寸排阻和离子交换色谱这几种模式^[34]。

对于低分子量样品的分离测定而言，正确的液相色谱柱系统选择应满足以下两个基本条件。

1. 有满意的分离度

影响溶质分离度的关系式为^[35]

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{2.36}(\alpha' - 1) \quad (6.1)$$

式中

$$\alpha' = \frac{1 + k'_{(2)}}{1 + k'_{(1)}} = \frac{ak'_{(1)} + 1}{k'_{(1)} + 1} \quad (6.2)$$

式(6.2)中的 $\alpha = k'_{(2)}/k'_{(1)}$ 称为相对保留值。从式(6.1)中可以看到分离度主要由选择性 α' 和塔片数平方根 N 所决定。影响塔片数的各种动力学因素已经比较清楚, 并可由一些基本关系式计算出来。在实际应用中, 给定的色谱柱其柱效也基本恒定。常用的高效液相色谱柱的柱效在 1 万理论塔片数左右, 其峰容量因子在 $k' = 5$ 时为 46; 因此对于具有 10~20 个组分的样品的分离来说, 色谱柱容量因子已能满足要求, 关键问题是合理调节色谱峰在柱内的位置分布, 也就是要解决溶质的选择性问题。通常通过调节冲洗剂组成、种类, 或在流动相中加入少量改性剂改变选择性 α' 来实现。从式(6.2)中可以看到, α 和 α' 有以下关系

$$\alpha = \alpha' + (\alpha' - 1)/k' \quad (6.3)$$

表 6.2 为达到对称峰基线分离的分离度 ($R_s = 1.91$) 时的选择性 (α' 相同), 在 k' 变化时所需的 α 值

$\alpha' \backslash N$	1 000	5 000	10 000	100 000	1 000 000
k'	1.142	1.094	1.045	1.014	1.0045
0.1	2.56	1.70	1.50	1.150	1.050
0.2	1.85	1.38	1.27	1.085	1.027
0.4	1.50	1.22	1.16	1.050	1.016
0.6	1.38	1.17	1.12	1.038	1.012
0.8	1.32	1.14	1.10	1.032	1.009
1.0	1.28	1.13	1.09	1.028	1.008
2.0	1.21	1.10	1.07	1.021	1.006
3.0	1.19	1.09	1.06	1.019	1.006
4.0	1.18	1.08	1.06	1.019	1.006
5.0	1.17	1.08	1.05	1.017	1.005

表6.2 列出的是在不同 k' 和 N 时, 为保持分离度 R_s (或 α') 恒定所需的 α 值. 从表6.2 中可以看到 k' 越小时, 要求 α 值越大; 但当 k' 接近于 4~5 时, α 和 α' 基本相近. α 主要由不同溶质与固定相和流动相作用力的差别所决定, 因此必须从分子作用力的角度来讨论选择性和柱系统的选择.

2. 有合适的保留值范围

在液相色谱中, 有等度和梯度冲洗两种方法分离分析实际样品. 在等度冲洗的理想状态下, 溶质的色谱峰半宽度 $W_{1/2} = \sqrt{\frac{5.54}{N}} (1+k') t_0^{[36,37]}$. 合适的 k' 范围应使样品具有足够的检测灵敏度和适当的分离时间, 同时也应保持所需的分离度. 很显然, 色谱峰的检测灵敏度与 $W_{1/2}$ 成反比, $W_{1/2}$ 越大, 色谱峰越平坦, 检测灵敏度越低. $W_{1/2}$ 除了与 k' 和 t_0 有关外, 还与 N 有关. N 越小时, $W_{1/2}$ 越大, 检测灵敏度越低. 对于常用的 1 万塔片数柱效的色谱柱, 当 $k' > 30$ 时, 色谱峰半宽比 $k' = 0$ 时的峰半宽增加 30 倍以上, 检测灵敏度也降低为原来的 1/30, 且分析时间过长; 因此在等度冲洗时保留值范围的上限应在 $k' < 30$. 但 k' 的下限也不应太小, 从表6.2 中可以看到在 1 万理论塔片数的色谱柱中, 为获得对称峰的基线分离, 在 $k' = 0.4$ 时 α 值必须大于 1.16, 而在 $k' = 0.2$ 时则必须大于 1.27. 所需的 α 值越大, 选择的色谱分离条件越困难, 因此选择合适的保留值范围的下限为 $k' > 0.4$. 也就是说我们定义合适的保留值范围为 $0.4 < k' < 30$. 如果样品的 k' 值超过 $0.4 < k' < 30$ 的范围, 则应选择梯度或其它分离模式来分离样品. 如果色谱柱的柱效更高, 其保留值范围还可适当放宽.

由于常用的高效液相色谱柱的柱效在 1 万理论塔片数左右, 从而可知选择液相色谱柱系统和分离模式的两个基本要求是: (1) 相对保留值 α 在 $k' = 0.4$ 时应大于 1.16; 如果把 k' 调到 4~5, 则 α 大于 1.06 就可以满足要求. (2) 样品的 k' 值应控制在 $0.4 < k' < 30$ 的范围之内.

§ 6.3.2 液相色谱保留值和选择性的一些基本规律

在液相色谱中，我们考虑到分子作用力和静电作用力的影响，应用统计热力学的方法推导出液相色谱保留值随冲洗剂组成变化的基本规律式为^[38]

$$\ln k' = a + b \ln C_b + c C_b \quad (6.4)$$

式中参数 a 、 b 和 c 的物理性质和与分子结构参数的定量关系已有报道。结果表明在反相色谱中 $b \ln C_b$ 趋向于一个很小的常数而可以忽略， a 和 c 与溶质的结构参数范德华体积、偶极矩和氢键作用能存在定量或半定量关系^[39]

$$\left. \begin{aligned} a &= m_1 + m_2 V_w + m_3 \mu^2 + m_4 \chi_{AH} \\ c &= l_1 + l_2 V_w + l_3 \mu^2 + l_4 \chi_{AH} \end{aligned} \right\} \quad (6.5)$$

表6.3 一些苯环和脂肪烃类化合物取代基团可能产生的偶极矩和在甲醇/水冲洗剂中可能存在的氢键作用能

取代基团	χ_{AH} (氢键作用能)	μ (苯环取代基)	μ (脂肪烃取代基)	ΔV_w (范德华体积)
—NH ₂	15	1.48	1.23	10.54
OH	12	1.6	1.63	8.04
—OME	6	1.35	1.36	17.37
—CHO	10	2.756	2.49	13.67
—NO ₂	8	3.98	3.10	16.8
CN	8	4.00	3.4	14.70
—COO—	10	1.83	1.75	16.90
—COOH	20	1.64	1.63	19.14
—NH(Me)	9	—	—	21.75
—CO(Me)	8.5	2.89	2.74	25.37
—Cl	0	1.70	2.05	12.00
—Br	0	1.54	1.97	14.60
—I	0	1.30	1.65	19.64
—CH ₃	0	0	0	13.67

表6.3 列出的是一些苯环和脂肪烃类化合物极性取代基团的偶极矩和在甲醇/水冲洗剂中的氢键作用能。在甲醇/水为冲洗剂、ODS 为载体的反相色谱系统中，我们已经得到了式 (6.5) 中的 l_1, l_2, l_3, l_4 和 m_1, m_2, m_3, m_4 值。式 (6.5) 可在一级近似 $b \ln C_b$ 为很小常数的情况下得到相对保留值 α 的表达式为

$$\ln \alpha = (m_2 + l_2 C_b) \Delta V_w + (m_3 + l_3 C_b) \Delta \mu^2 A + (m_4 + l_4 C_b \Delta \chi_{AH}) \quad (6.6)$$

从式 (6.6) 和已知的 l_i, m_i 值可获得在其它两个溶质结构参数差值为 0 时，达到不同 k' 所需的 α 值时溶质间的另一个结构参数的差值。表6.4 列出了这一结果。从表6.4 中可以看到对于经常遇到的同系物，其 α 主要由 CH_2 色散作用力所决定，由于一个 CH_2 的范德华体积为 10.23；因此除 $k' = 0.4$ 和甲醇浓度为 0.9 体积分数以上外，其它情况都很容易获得分离。例如，烷基取代苯^[40]和脂肪酸衍生物^[41]的同系物在反相色谱中的分离情况证实了表6.4 中的推论。对于偶极矩差别的情况，在 $k' = 0.4$ 时，要满足 $\alpha' = 1.045$ 的 $\Delta \mu^2$ 应大于 4.8。这对于大多数的异构体是很困难的。但在 $k' = 2.0$ 情况下， $\Delta \mu^2 > 2.2$ 就可获得所需的分离度。硝基苯异构体^[42]的分离情况与这一结果相符。如只有氢键作用决定 α 值，则氢键作用能只要有 4.18 kJ/mol 的差别就可由反相色谱获得满意的分离。例如文献中报道的红霉素及其相关化合物^[43]，其作用力的差别在于一个 $-\text{OH}$ 的氢键作用力或 $-\text{OH}$ 与 $-\text{O}-$ 氢键作用力的差别，在反相色谱中获得了很好的分离。又如胆汁酸类化合物^[42]，其异构体由于立体结构的不同导致氢键作用能的差别，可用反相色谱获得满意的分离。对三种或二种作用力同时决定 α 值的情况，则应综合考虑各种作用力的作用情况，因此比较复杂些。但从以上的结果可以看到，由范德华体积和氢键作用力的差别决定 α 值并获得理想分离是反相色谱分离的主要特征。

表 6.4 在其它两个分子结构参数相等时,为获得 1.91 的分离度,在 1 万理论塔片柱效时的不同甲醇/水冲洗剂组成下物质对所必须具有的分子结构参数的差值

分子结构参数差值	在 $k' = 0.4$ 所应有的 $\alpha = 1.16$				
	50/50	60/40	70/30	80/20	90/10
ΔV_w	2.24	3.09	4.21	6.60	15.23
$\Delta \mu^2$	4.83	4.78	4.73	4.63	4.63
$\Delta \chi_{AH}$	1.04	1.18	1.36	1.58	1.93
在 $k' = 2.0$ 所应有的 $\alpha = 1.07$					
ΔV_w	1.12	1.42	1.93	3.03	7.00
$\Delta \mu^2$	2.21	2.19	2.17	2.15	2.13
$\Delta \chi_{AH}$	0.476	0.541	0.626	0.744	0.915

§ 6.3.3 液相色谱分离模式的推荐

现在常用的有四种液相色谱分离模式,即正相(包括吸附和键合固定相)、反相、离子和手性固定相色谱分离系统。另外还有两种常用的通过在流动相中加入少量添加剂改变溶质在流动相和(或)固定相作用性质的离子对色谱和手性流动相色谱分离模式。由于反相色谱操作简便,是应用最广泛的一种分离模式,因此从实用的观点出发,能用反相色谱分离的样品应尽可能由反相色谱来完成。

1. 大于临界碳数与极性取代基比值的脂肪类有机样品应选用反相色谱

溶质在反相色谱中的保留值规律式中的参数 α 和 c 已由式(6.5)表示。对于同类极性取代基的脂肪类有机样品,粗略估算出的氢键作用能 χ_{AH} 和偶极矩如表 6.2 所示,范德华体积可由 Bondi 方法计算获得^[45]。由此可在已知 l_i 和 m_i 的反相色谱中估算出 α 和 c 值,进一步估算出反相色谱中 k' 大于 0.4 所需的碳数与同类极性取代基团的临界比值 M_{al} , 当样品组分的碳数与极性

基团的比值大于临界值时，可由反相色谱分离。表6.5列出了各种极性基团的临界比值 M_{al} 值。

表 6.5 各种不同类极性取代基脂肪类化合物在不同甲醇/水冲洗剂组成下碳数与极性基团的临界比值 M_{al} [在计算 M_{al} 时，式(6.5)中所用的参数 l_i 和 m_i 来自文献[38]]

极性基团	M_{al} 值		
	20/80	50/50	80/20
COOH	2	3	5
—OH	2	3	5
—NH ₂	2	3	5
—NH—	2	3	4
=CO	2	3	4
—O—	2	3	4
—COO—	2	3	4
—CN	2	3	4
—NO ₂	2	3	4
—Cl, Br and I	1	1	2

表 6.6 不同极性取代基苯环化合物在不同甲醇/水冲洗剂组成下的苯环数与极性取代基团的临界比值 M_{al} (计算所用的参数 l_i 和 m_i 与表 6.5 相同)

极性基团	M_{al} 值		
	20/80	50/50	80/20
—COOH	1/2	1/1	1/1
—OH	1/2	1/2	1/1
—NH ₂	1/2	1/2	1/1
NH(Me)	1/3	1/2	1/2
=CO	1/5	1/4	1/3

续表

极性基团	M_{al} 值		
	20/80	50/50	80/20
—O—(Me)	1/5	1/4	1/3
COOMe—	1/5	1/4	1/3
—CN	1/6	1/5	1/3
—NO ₂	1/4	1/3	1/2
—Cl, Br and I	1/6	1/6	1/6

2. 大于苯环与极性取代基团临界比值的芳香烃类样品选用反相色谱

由规则 1 中的相同理由, 可获得苯环与极性基团的临界比值 M_{al} , 当芳香类样品的苯环与极性基团的比值大于临界比值时, 可由反相色谱进行分离. 表 6.6 列出的是在反相色谱不同甲醇/水流动相组成下苯环与不同种类极性取代基团的临界比值.

3. 相同数目极性取代基团、碳数差值大于临界值的脂肪类样品选择反相色谱梯度冲洗

当样品溶质组分的色散作用力相差过大, 而其它作用相近时, 其在反相色谱中的保留值范围将很宽, 应当选用反相色谱中梯度冲洗来分离这类样品. 由规则 1 中的相同理由, 可粗略估算在反相色谱 ODS 为载体、甲醇/水为冲洗剂的系统中, 如样品所含溶质的极性基团数目相同, 碳数差值大于临界值的脂肪类样品应选用反相色谱梯度冲洗, 我们定义这一临界值为 20 个碳数.

4. 相同数目极性取代基团、苯环数差值大于临界值的芳香类混合样品选用反相色谱梯度冲洗

其理由与规则 3 相同, 我们定义临界值为 5 个苯环.

5. 多元极性基团取代化合物的极性基团与碳数和苯环的比例大于总临界比值时选择反相色谱

对于多元极性基团取代化合物, 其临界比值具有加和性. 例如, 在 20/80 甲醇/水冲洗剂下, 由表 6.4 可得 —COOH 取代基

脂肪类化合物的碳数临界比值为 2， $-\text{NH}_2$ 也为 2，如果脂肪类化合物同时含有一个 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 基团，则其临界比值为 4，也就是说碳数大于 4 时才可由反相色谱分离。

6. 碳数或苯环与极性基团的比值小于临界比值的样品选择键合正相色谱

当样品所含的组分其碳数与极性基团的比值或苯环与极性基团的比值小于表 6.5、表 6.6 所示的临界比值或总临界比值时，溶质的极性作用力太强，在反相色谱的保留值太小，因此不能选用反相色谱进行分离。如选用硅胶吸附色谱，可能与固定相的作用力太强，保留值太大；另一方面硅胶吸附色谱分离条件过于严格，选择极性作用力适中的键合正相色谱分离这一类化合物是比较合理的。

7. 反相色谱分离不理想的立体异构体选用硅胶吸附色谱

由于立体异构体在硅胶表面的吸附会产生不同的立体吸附构型，导致与固定相表面的作用距离和作用力的差别，由此使得立体异构体的参数 α 不同而获得满意的分离选择性。硅胶吸附色谱对立体异构体具有很高的分离选择性，反相色谱分离不好的立体异构体样品可由硅胶吸附色谱分离。

8. 对映体分离选择手性色谱分离系统

对于手性对映体样品，其在非手性色谱系统中 D, L 构型对映体具有相同的作用力，这意味着 D, L 构型分子具有相同的 a , b 和 c 参数以及保留值，同时无分离选择性。因此，对映体的分离必须选择对 D, L 对映体产生作用力差别的手性色谱分离系统。

该分离系统有两条途径：其一是选择非手性固定相而在流动相中加入适量的手性试剂的分离模式；其二是选择手性固定相和非手性流动相的分离系统。对于手性固定相色谱分离模式，对映体的选择性主要由对映体与固定相的作用力的差别导致 a 和 b 的差别而决定。对于手性流动相色谱分离模式，在流动相中加入的手性试剂使手性对映体与流动相的作用力发生差别，导致参数 c

的差别而获得分离；也有可能手性试剂在固定相表面发生吸脱附平衡，这样不仅使流动相作用力发生差别，也使与固定相的作用力发生差别，由此获得对映体的分离。

除对映体的分离选择性外，还必须使保留值在 $0.4 < k' < 30$ 的范围之内。由于对映体的分离大多数情况下由分子作用力起主导作用，总体上说，根据选用的固定相和流动相的极性强弱，也可分成正相和反相手性固定相色谱系统。对映体分离选择是正相还是反相手性固定相色谱，原则上可以参考规则1至6。

9. 无机离子选择离子或离子对色谱

无机离子样品其静电作用力成为主要分离因素，因此必须选择以静电作用力为分离机制的离子色谱或离子对色谱。在离子色谱中，溶质与固定相和流动相的静电作用力的差别以及顶替吸附效应使 a 、 b 和 c 参数都发生差别而获得分离。在离子对色谱中，由于离子对试剂吸附在固定相表面使固定相具有静电作用，这一静电作用也可能使无机离子获得理想的分离。

10. 大于碳数或苯环与极性取代基和离子基团临界比值的样品选择反相或离子对色谱

对于有机离子样品，静电作用和分子作用力在分离过程中会同时对保留值和选择性发生作用。如果有有机离子的色散作用力足够强，也可选择反相色谱来分离。我们确定脂肪类有机离子碳数与离子基团的临界比值为3，芳香类有机离子的苯环与离子基团的临界比值为1；大于临界比值的样品可由反相色谱分离。对于同时具有极性和离子多元取代基团的样品，它们的临界比值也具有加和性。因此，脂肪类和芳香类有机离子的碳数或苯环与极性取代基和离子基团的比值大于总临界比值，则也可由反相色谱进行分离。当然，离子对色谱也可用于这一类样品的分离。

11. 小于临界比值的有机离子选择离子交换或离子对色谱分离

有机离子其碳数或苯环与离子取代基的比值小于临界比值或总临界比值，表示有机离子没有足够的色散作用力，此时离子静

电作用力成为分离的主要因素，因此只能选择离子交换或离子对色谱分离这一类样品。

12. 离子和大于临界比值的中性分子的混合样品选择离子对色谱

由于离子对色谱同时存在足够强的分子和静电作用力，如果样品中同时含有离子和中性的大于临界比值的样品分子，则选择离子对色谱是最理想的。

13. 有机样品中同时含有 $-\text{COOH}$ ， $-\text{H}_2\text{PO}_4$ ， $-\text{SO}_3\text{H}$ 类

基团和 $-\text{NH}_2$ ， $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{NH} \\ \diagdown \end{array}$ ， $=\text{N}-$ 类基团

有机样品中同时含有 $-\text{COOH}$ ， $-\text{H}_2\text{PO}_4$ ， $-\text{SO}_3\text{H}$ 这类基团和 $-\text{NH}_2$ ， $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{NH} \\ \diagdown \end{array}$ ， $=\text{N}-$ 一类基团时，样品为两性物质，在冲洗剂中总有一类基团解离，必须按离子性基团推荐分离模式。

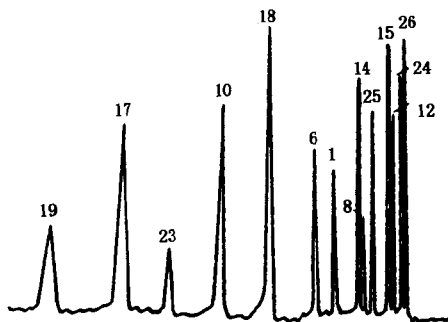


图6.3 14个氨基苯磺酸和氨基苯磺酸

标准样在反相色谱中的分离图

实验条件：色谱柱是 200×4 mm i. d. 不锈钢柱填充有 Polygosil- C_{18} ($7\mu\text{m}$) 载体；冲洗剂为 0.01 mol/L NaH_2PO_4 195ml 与 0.01 mol/L NaH_2PO_4 305ml 的混合缓冲液水溶液。由盐酸调节到 $\text{pH} = 6.98$ 。流动相流量为 $1.0\text{mL}/\text{min}$ ，检测波长 254nm 。图中数字所标的溶质与表 6.7 中相同。

14. 样品的族类化合物分离

如果样品是族类化合物分离, 则应选用液-固吸附或键合正相色谱.

以下是根据离子性有机化合物的性质选择分离模式的实例. 表6.7中所示的是有机离子性化合物氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在反相色谱中的保留时间. 图6.3是14个氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在反相色谱中的分离图. 从表6.7中所示的溶质保留时间可以得出以下几点结论:

(1) 对于具有相同数目取代氨基和磺酸基的异构体, 如在反相色谱中都有一定的保留, 则可得到满意的分离. 表6.7中1, 2, 3号和17至23号异构体的保留值证实了这一结论.

表 6.7 在 10mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.98) 为冲洗剂的反相色谱中实验测定的 27 个氨基苯磺酸和氨基萘磺酸的保留时间

溶质编号	溶质化学名称	保留时间(min)
1	2-氨基苯磺酸	6.52
2	3-氨基苯磺酸	3.97
3	3-氨基苯磺酸	2.92
4	2-氨基-1,4-苯二磺酸	2.12
5	2-氨基-5-甲基苯磺酸	18.28
6	2-氨基-6-甲基苯磺酸	7.62
7	2-氨基-5-甲氧基苯磺酸	14.00
8	3-氨基-6-甲氧基苯磺酸	4.77
9	2-氨基-4-硝基苯磺酸	18.53
10	3-氨基-4-氯苯磺酸	18.97
11	3-氨基-6-氯苯磺酸	5.65
12	2,4-二氨基苯磺酸	2.97
13	2,4-二氨基-1,5-苯二磺酸	15
14	3,5-二氨基-2,4,6-三甲基苯磺酸	35

续表

溶质编号	溶质化学名称	保留时间(min)
15	2,5-二氨基苯磺酸	3.17
16	4,4'-二氨基-2,2'-联苯二磺酸	4.10
17	4-氨基萘磺酸	30.67
18	5-氨基萘磺酸	10.57
19	5-氨基-2-萘磺酸	38.47
20	8-氨基萘磺酸	60.47
21	2-氨基萘磺酸	32.77
22	6-氨基萘磺酸	23.08
23	6-氨基-2-萘磺酸	24.03
24	3-氨基-1,5-萘二磺酸	2.32
25	3-氨基-2,7-萘二磺酸	4.08
26	7-氨基-1,3,5-萘三磺酸	2.20
27	7-氨基-1,3,6-萘三磺酸	2.03

表 6.8 19 个常用氨基酸的疏水性参数^[48]

氨基酸	R'	氨基酸	R'
Trp	2.280	Phe	1.792
Leu	1.313	Ileu	1.270
Tyr	1.305	Met	0.938
Val	0.741	Arg	0.119
Lys	-0.073	His	0.033
Pro	0.395	Ala	0.052
Gln	0.024	Thr	0.024
Glu	0.119	Gly	0.084
Asp	-0.017	Ser	-0.084
Cys	0.070		

表 6.9 一些小肽在反相色谱不同填充载体下实测的 k' 值 [流动相为 10mmol/L KH_2PO_4 缓冲液 (pH = 2.10); 色谱柱填充载体分别为 Spherisorb- C_{18} (I), YWG- C_{18} (II) 和 Nucleosil- C_{18} (III)]

小肽	Spherisorb- C_{18}	YWG- C_{18}	Nucleosil- C_{18}
Gly-Gly	0.100	0.082	0.057
Gly-Gly-Gly	0.156	0.156	0.128
Gly-Gly-Gly-Gly	0.211	0.202	0.185
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	0.278	0.312	0.256
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	0.356	0.394	0.328
Thr-Gly	0.344	0.376	0.328
Asp-Gly	0.189	0.165	0.157
Gly-His	0.356	0.119	0.100
Gly-Asp	0.111	0.037	0.043
Ser-Gly	0.122	0.073	0.057
Lys-Asp	0.189	0.119	0.096
Arg-Ser	0.222	0.202	0.171
Cys-Gly	0.422	0.413	0.300
Gly-Ser	0.089	0.027	0.028
Ala-Gly	0.222	0.293	0.228
Gly-Ala	0.278	0.396	0.328
Val-Gly	3.07	3.01	2.70
Gly-Val	4.42	4.51	3.89
Met-Gly	5.06	4.92	4.60
Gly-Met	5.49	5.62	5.13
Leu-Gly	12.91	12.03	10.37
Gly-Leu	19.23	18.54	16.28
Phe-Gly	42.17	38.38	34.16
Gly-Phe	44.40	41.83	38.91
Tyr-Gly	17.78	18.01	17.37

续表

小肽	Spherisorb-C ₁₈	YWG-C ₁₈	Nucleosil-C ₁₈
Gly-Tyr	18.11	18.69	19.07
Gly-Glu	0.553	0.632	0.618
Pro-Gly	1.12	1.19	1.11
Gly-Pro	1.66	1.74	1.57
Hyp-Gly	0.494	0.528	0.510
Met-Ser	2.16	2.08	2.15
Gly-Ileu	16.08	15.68	13.32
Val-Ala	2.42	3.28	2.22
Met-Thr	3.41	3.21	3.28
Met-Asp	2.91	2.87	2.99

(2) 对于邻、间、对位氨基苯磺酸或氨基萘磺酸异构体, 其保留值的顺序为邻>间>对. 邻位异构体的保留值最大是因为相邻的氨基与磺酸基发生内氢键作用而产生. 间位异构体大于对位异构体可能是取代效应的电荷作用所致.

(3) 在无分子内氢键作用情况下, 一个苯环上有两个磺酸取代基时几乎无保留, 但有一个氨基和磺酸基取代时仍有一定的保留. 一个萘环上有三个磺酸基取代时, 其保留值处于临界状态, 如再增加一个氨基或磺酸基, 则几乎无保留, 必须选用反相离子对色谱法分离; 反之增加一个非极性基团, 则溶质有一定的保留, 可采用反相色谱分离.

另一例子是小肽在反相色谱中的保留行为^[47]. 表6.8是Jinno等^[48]测定的氨基酸疏水性常数 R' 值. 表6.9列出的是35种小肽在反相色谱三种不同填充载体下的保留值 k' . 把21种组分在色谱柱 I 下测定的 $\ln k'_I$ 与柱 II 和 III 下的 $\ln k'_II$ 和 $\ln k'_III$ 线性回归, 结果如下:

$$\ln k'_II = 0.322 + 1.051 \ln k'_I, \quad r = 0.9982, n = 21$$

$$\ln k_{\text{III}}' = 0.032 + 1.032 \ln k_{\text{I}}', \quad r = 0.9984, n = 21$$

分析表 6.9 中的数据可知：(1) Gly 基团对小肽的保留值的贡献很小；(2) 由疏水性小于 Cys 的氨基酸组成的二肽、三肽，其保留值都小于 $k' = 0.4$ ，不宜用反相色谱分离。同时这两个结论可由 $\ln k_{\text{I}}'$ 与 $\ln k_{\text{II}}'$ ， $\ln k_{\text{III}}'$ 间的线性关系推断到其它不同填充载体的反相色谱系统中。

§ 6.3.4 反相色谱流动相和固定相的选择性原则

对于含有 10~20 个组分的普通样品，如其范德华体积相差一个 CH_2 ，很容易由反相色谱分离；只有在分离很复杂的样品或含有性质很相近的组分的混合物时，选择合适的流动相和固定相才显得很重要。以下讨论的是从分子作用力观点出发选择反相色谱流动相和固定相的基本原则^[49]。

1. 非极性无 π 电子作用样品的选择规则

对于非极性无 π 电子作用的样品，其选择性和保留值都由色散作用力所决定。因此改变冲洗剂强组分的浓度或种类，保留值和 α 值都将同时发生变化；也就是说，不同种类的强冲洗剂组分其效果是相同的。所以选择安全便宜的冲洗剂强组分比较合理，如在选定的冲洗剂全浓度范围下达不到理想的分离选择性，则选择色散作用力较小的冲洗剂或色散作用力较强的固定相是必要的。

2. α 值由色散作用力决定，保留值由多种作用力决定时的选择原则

这类情况最典型的是含有极性取代基团的同系物，溶质的分离选择性 α 由亚甲基与流动相和固定相的色散作用力的差值所决定^[50]，而保留值 k' 则同时由色散和其它作用力所决定。为了获得尽可能大的 α 和尽可能小的 k' 值，应选择色散作用力较强，其它作用力较弱或没有的固定相及色散作用力较弱，其它作用力较强的流动相。如果选择的固定相色散作用力较弱，则选择色散作用力较强、其它作用力适当的流动相比较合理。

例如 3, 5-二硝基苯甲酸正构饱和醇酯同系物^[51], 在 ODS 为固定相、甲醇/水 (0.9/0.10) 为流动相的柱系统中, 亚甲基的 $\ln \alpha$ 值分别为 0.259 和 0.277, 保留值则为 $k' = 0.74$ 和 0.93; 而在二噁烷/水 (0.75/0.25) 流动相中亚甲基的选择性 $\ln \alpha$ 为 0.272 和 0.270, 而保留值却为 $k' = 1.48$ 和 1.69. 比较两个冲洗剂下的结果, 其亚甲基的选择性 $\ln \alpha$ 基本相同, 但保留值相差很大. 这是因为这两个冲洗剂的色散作用力基本相近, 但甲醇比二噁烷有更强的氢键作用力所致. 这一结果与理论推断是相符合的.

3. α 值由偶极作用力决定, 保留值由多种作用力决定的样品的选择原则

这一类情况主要是一些立体异构体的物质对. 为了选择尽可能大的选择性和尽可能小的保留值的柱系统, 应选用偶极作用力较强, 其它作用力适当的固定相和偶极作用力较弱, 其它作用力适当的冲洗剂. 如选择的固定相无偶极作用或偶极作用力较弱, 则选择的冲洗剂应具有较强的偶极作用力.

例如, 1, 2-二氯苯和 1, 3-二氯苯物质对以及 1, 2, 4-三氯苯和 1, 3, 5-三氯苯物质对^[52], 在用相同的 ODS 固定相时, 当冲洗剂为乙腈/水 (0.7/0.3) 时, 其选择性 α 值分别为 1.383 和 1.600, 保留值较大组分的 k' 为 3.34 和 5.89; 而四氢呋喃/水 (0.5/0.5) 为冲洗剂时, 其 α 值分别为 1.084 和 1.285, 但对应的保留值 k' 分别为 3.84 和 6.83. 从这一结果可以看到选择四氢呋喃/水为冲洗剂时, 不仅选择性低而且保留值还大, 因此选择乙腈/水作为冲洗剂比较合理. 因为这两对物质对的 α 值主要由偶极作用力所决定, 而乙腈/水的偶极作用力远远大于四氢呋喃/水的偶极作用力, 所以这一结果与理论推导相符合.

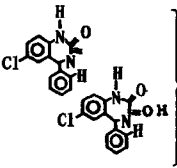
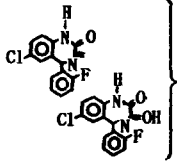
4. 选择性 α 由氢键使用力差别决定, 保留值由多种作用力决定时的选择原则

这一类样品应选择氢键作用力较强, 其它作用力较弱的固定相和氢键作用力较弱, 其它作用力较强的冲洗剂比较合理. 如果选择的固定相无氢键作用或氢键作用较弱, 则选用氢键作用力较

强，其它作用力适当的流动相比较合理。在大多数情况下，氢键作用力差别与其它几种作用力相比较要大得多，因此一般情况下这类样品比较容易分离。

例如，对于化合物 *N*-demethyldiazepam 和 tenazepam 以及另一对如表6.10所示的物质对^[53]。其在相同种类冲洗剂下，在三种不同固定相（ODS, Phenyl 和 Cyano）的填充柱中保持 $\log \alpha = 0.15$ 和 0.30 时，保留值较大的溶质和 $\log k'$ 列于表6.10中。从表6.10中可以看到，物质对的选择性主要由氢键作用力所决定，但保留值则由其它多种作用力所决定，而由氢键作用力决定选择性的物质对同一类冲洗剂时，在 Cyano 固定相填充柱中最有利，Phenyl 填充柱次之，ODS 填充柱最差；这与固定相的氢键作用力的强弱顺序相同。这一结果与理论结果相符合。

表6.10 由氢键作用力主要决定选择性 α 的物质对在相同流动相的三种不同固定相填充柱上的保留值和选择性
(实验数据来自文献[53])

溶质	固定相		
	ODS	Phenyl	Cyano
	$\log \alpha = 0.15$	$\log \alpha = 0.15$	$\log \alpha = 0.15$
	$\log k' = 3.25$	$\log k' = 1.20$	$\log k' = -0.24$
	$\log \alpha = 0.30$	$\log \alpha = 0.30$	$\log \alpha = 0.30$
	$\log k' = 3.20$	$\log k' = 1.62$	$\log k' = -1.88$

5. 选择性 α 由 π 电子作用力决定, 保留值由多种作用力决定时的选择原则

这一类样品从原则上讲, 选择 π 电子作用力较强, 其它作用力适当的固定相和 π 电子作用力较弱或没有, 其它作用力较强的冲洗剂比较合理. 如果选择的固定相无 π 电子作用, 选用的冲洗剂应当具有较强的 π 电子作用力, 也能很好地提高分离选择性.

6. 选择性和保留值由多种作用力决定时的选择原则

从理论上讲, 对于多种作用力同时决定选择性和保留值的样品, 则应选择这几种作用力都较强的固定相和这几种作用力适当的流动相. 为了获得理想的分离条件, 对于这一类样品还必须进行最优化分离条件的处理.

§ 6.3.5 液相色谱流动相和添加剂的推荐

1. 反相色谱流动相和添加剂的选择

在反相色谱中, 水是常用的冲洗剂弱组分, C_{18} 是常用的填充载体, 重要的是选择冲洗剂的强组分. 常用的强组分有甲醇、乙腈和四氢呋喃, 我们认为在大多数情况下, 甲醇可满足要求. 反相色谱流动相和添加剂的推荐规则如下^[54]:

(1) 含有两个以下氢键作用基团 (如 $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ 等) 的芳香烃邻、对或邻、间位异构体, 由于这些基团氢键作用力的差别较大, 因此可以甲醇/水为冲洗剂.

(2) 含有两个以上 Cl, I, Br 邻、间、对位异构体或极性取代基的间、对位异构体以及双键位置不同的异构体, 可选用苯基或 C_{18} 键合固定相、乙腈/水为流动相. 因为这样的位置异构体, 可使分子的 π 电子作用力发生一定的差别, 所以选择乙腈/水为流动相或苯基固定相分离比较合理.

(3) 当分子结构通道中获得溶质的 k' 值大于 30 时, 应在反相色谱系统的甲醇/水流动相中加入适量的色散作用力较强的溶剂 (诸如四氢呋喃、氯仿和丙酮), 以使被分离溶质的 k' 值保持在适当范围内. 同时还可从减少固定相表面键合碳链浓度或缩短

碳链长度来获得这一效果。

(4) 如果样品中含有 —NH_2 , >NH 或 >N— 这一类基团, 所选用的分离模式是反相色谱时, 就应在流动相中加入适量添加剂有机胺以抑制氨基与残余硅羟基的相互作用, 从而提高样品保留值的重现性和色谱峰的对称性。

(5) 如果样品中含有 —COOH , $\text{—SO}_3\text{H}$, $\text{—H}_2\text{PO}_4$ 及酚羟基或 —NH_2 , >NH 这一类官能团, 则在流动相中加入适量磷酸盐、乙酸盐或有机胺试剂, 以控制这些基团的解离。

2. 反相离子对色谱的流动相选择

反相离子对色谱是分离分析有机离子的有效方法^[55,56]。下面简要地提出反相离子对色谱中离子对试剂和其它添加剂的选用原则:

(1) 样品中含有 —COOH , $\text{—H}_2\text{PO}_4$, $\text{—SO}_3\text{H}$ 基团或其它无机阴离子时, 选用的离子对试剂应是带正电荷的有机铵盐^[55], 以增加样品阴离子在反相色谱中的保留值。选用的流动相一般都是为甲醇/水。

(2) 规则(1)中除加入离子对试剂外, 还要加入磷酸盐或其它缓冲液, 以控制流动相酸度, 从而使这些酸性官能团获得解离。

(3) 样品中含有 —NH_2 , >NH 或 >N— , >N 基团和其它阳离子时, 选择的离子对试剂应是烷基磺酸盐或硫酸盐。其选用原则与规则(1)相同。

(4) 在规则(3)选定的系统中, 还须加入适量缓冲试剂, 以控制流动相酸度, 以使有机胺类化合物适当的解离。

(5) 样品中同时含有 —NH_2 , >NH , >N— , >N 和 —COOH , $\text{—H}_2\text{PO}_4$, $\text{—SO}_3\text{H}$ 这两类不同性质的基团时, 则规则(1), (2) 或 (3), (4) 选用的离子对试剂和添加剂都合理。

3. 硅胶吸附色谱的流动相选择

在硅胶吸附色谱中，对保留值和选择性起主导作用的是溶质与固定相的作用，流动相主要是调节溶质的保留值在适当范围内，当然对选择性也有一定的影响^[57]。在液-固吸附色谱中，流动相的弱组分是正己烷，溶质与固定相的作用主要由溶质的极性基团与硅羟基的相互作用所决定，因此，根据溶质所包含的官能团信息，可选择流动相的强组分。

(1) 样品中只含有 $-\text{OH}$ ， $-\text{COOH}$ ， $-\text{NH}_2$ ， $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{NH} \\ \diagdown \end{array}$ 这类质子给予体基团时，可选用异丙醇作为流动相的强组分。

(2) 样品中的溶质含有 $-\text{COO}-$ ， $-\text{CO}$ ， $-\text{NO}_2$ 和 $-\text{C}=\text{O}$ 这类只接受质子的基团，则可选用乙酸乙酯，丙酮或乙腈作用冲洗剂强组分。

(3) 样品的溶质中只含有 $-\text{O}-$ 和苯基这类极性作用较弱的基团，可选用乙醚作为冲洗剂的弱组分。

(4) 样品中的溶质同时包含有规则 (1)，(2) 和 (3) 中两种或两种以上不同类的基团，则按规则 (1)，(2) 和 (3) 的顺序优先选择冲洗剂的强组分。

(5) 样品中的溶质同时含有多个 $-\text{H}_2\text{PO}_4$ ， $-\text{COOH}$ ， $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 等氢键作用力较强的基团，则在规则 (1) 选择的流动相中加入适量的乙醇、乙腈甚至用含水有机溶液作为流动相也是必要的。

(6) 反相色谱中双键位置不同的异构体不能理想分离时，可选用硅胶表面吸附或涂渍银离子的硅胶吸附色谱分离。

4. 键合正相色谱固定相和流动相的选择

键合正相色谱分离机理与硅胶吸附色谱分离机理相似，流动相的选择可引用硅胶吸附色谱中的规则，固定相选择原则如下：

(1) 如果样品中溶质含有 $-\text{COO}-$ ， $-\text{NO}_2$ ， $-\text{CN}$ 这一类质子接受体基团，则可选择氨基、二醇基这一类具有质子给予能力的固定相。

(2) 样品的溶质含有 $-\text{NH}_2$ ， $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{NH} \\ \diagdown \end{array}$ ， $-\text{OH}$ ， $-\text{COOH}$ 等这

一类具有质子给予能力的基团，则可选用腈基、氨基和醇基键合固定相。

(3) 如果样品中同时包含有规则 (1), (2) 中所示的两类基团，则可选择规则 (1) 中推荐的键合固定相。

5. 离子色谱固定相、流动相的推荐原则

由于对离子色谱的研究还有局限性，这里只讨论离子色谱固定相、流动相推荐的基本规则，更详细的原则有待于进一步归纳总结。

(1) 如果样品是阴离子，应该选用带正电荷的键合铵盐固定相，以使样品阴离子与固定相有相当的作用，因而引起一定的保留值和选择性。

(2) 阴离子样品所选择的冲洗剂应含有适当冲洗能力的阴离子水溶液或有机溶剂水缓冲液，同时应控制一定的 pH 值。

(3) 如果样品是阳离子，就应选用带负电荷的键合磺酸盐或羧酸盐固定相。

(4) 阳离子样品选用的冲洗剂为有适当冲洗能力的阳离子水溶液或有机溶剂水缓冲液，同时应适当控制 pH 值。

§ 6.3.6 实际样品对柱系统推荐规则的验证

把上述讨论的规则与分离模式推荐原则同时用计算机的 Quick Basic 和 Lisp 语言编写成柱系统推荐软件，溶质的结构信息可由计算机屏幕显示的基团输入。下面主要讨论分子结构信息推荐柱系统的几个典型例子^[58-60]。

图6.5至图6.9分别列出了胆汁酸、脂溶性维生素、自由氨基酸、一元糖和维生素D异构体的分子结构式，表6.11至表6.15则是这五类样品由推理机软件推荐出的液相色谱分离柱系统。从结果可知：推理机推荐的分离条件，就是实际样品分析时常用的、较为理想的柱系统；因此进一步说明了所建立的规则的正确性。此工作正在进一步发展完善和改进中。

表6.11 分子结构通道对胆汁酸推荐的液相色谱柱系统

分离模式：反相色谱	添加剂：适量磷酸盐或乙酸盐缓冲液
色谱柱：ODS 键合固定相	检测器：()
流动相：甲醇/水	

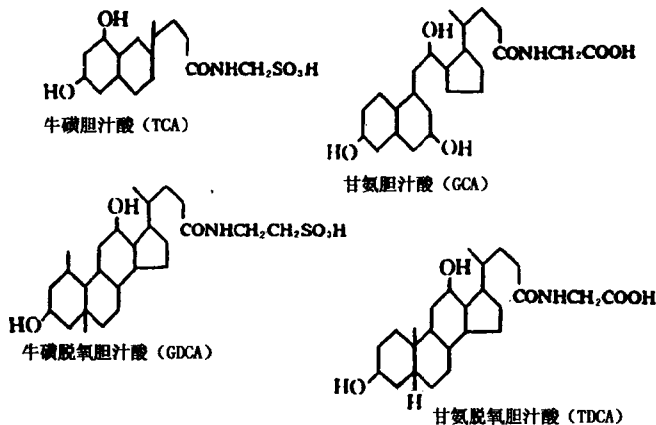


图6.4 四种胆汁酸的名称和分子结构式

表6.12 分子结构通道对脂溶性维生素推荐的液相色谱柱系统

分离模式：反相色谱	添加剂：***
色谱柱：ODS 键合固定相	检测器：()
流动相：甲醇与色散作用力较强的溶剂如四氢呋喃、丙酮的混合溶液	

表6.13 分子结构通道对自由氨基酸推荐的液相色谱柱系统

分离模式：离子色谱	流动相：甲醇/水与阳离子缓冲液混合溶液
色谱柱：硅胶键合或高分子小球键合的磺酸盐或羧酸盐载体填充柱	添加剂：***
	检测器：()

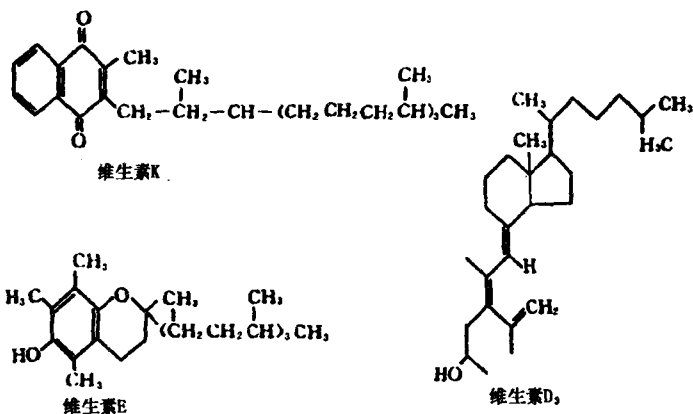


图6.5 脂溶性维生素的名称和分子结构式

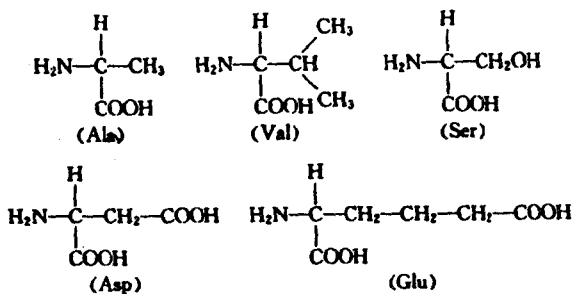


图6.6 自由氨基酸的名称和分子结构式

表6.14 分子结构通道对一元糖推荐的液相色谱柱系统

分离模式: 键合正相色谱	添加剂: 适当的缓冲液试剂
色谱柱: 键合氨基或醇基载体填充柱	检测器: ()
流动相: 甲醇/乙腈/适量的水混合溶液	

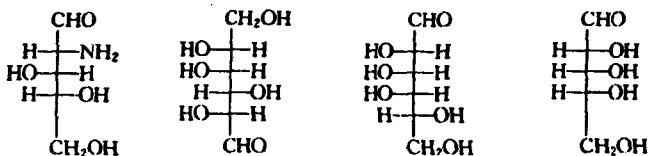


图6.7 一元糖的分子结构式

表6.15 分子结构通道对维生素 D 异构体推荐的液相色谱柱系统

分离模式：液固吸附色谱	添加剂：***
色谱柱：硅胶或涂渍银离子的硅胶固定相	检测器：()
流动相：正己烷/异丙醇	

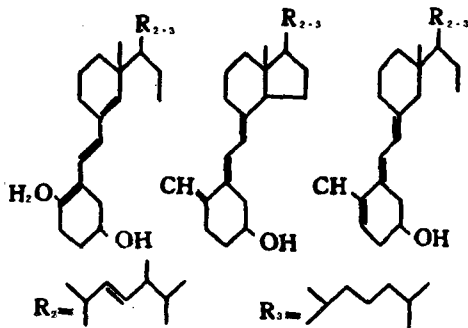


图6.8 维生素 D 异构体的分子结构

从这些选择原则可以知道：对于极性很大的离子性化合物，其在反相色谱中几乎无保留，而在正相色谱中又很难被冲洗下来，或被分离的样品中同时包含有离子性和中性的化合物时，这样的样品必须选用离子对色谱来分离；另一种情况是，虽然溶质是离子性化合物，仍有一定疏水性，而反相色谱中仍有适当的保留，在选用离子对色谱分离后，样品的分离选择性有很大的提高，此时也应选用离子对色谱进行分离。前一种情况可以通过适当的估算方法确定是否由反相离子对色谱分离；而后一种情况只

能由实验结果的比较才能作出正确的选择。值得指出的是本章讨论的原则都是普遍性的情况，如被分离的样品有各种特殊的要求，则实际工作中的分离条件有可能与本章讨论的原则所推荐结果不同。

离子对色谱法主要包括正相和反相离子对色谱法两种类型。在正相离子对色谱法中，溶解有离子对试剂的含水溶液作为固定相被涂渍到硅胶或其它诸如纤维素等载体上，冲洗剂是极性较弱的有机溶剂。正相离子对色谱法的缺点是载体固定相涂渍比较复杂，同时很难控制冲洗过程中固定液的流失。此外载体的表面的吸附活性点可能对溶质的保留过程产生一定的作用。这一因素可能导致色谱峰的峰形不对称和保留值不重复。正相色谱的最大优点是对一些在水中不稳定的有机离子，如血管扩张试剂的分离效果良好。在反相离子对色谱中，离子对试剂溶解在含有有机溶剂的溶液中，固定相大多是非极性的键合 C_{18} 、 C_8 填料。因此这一色谱分离方法包含了反相色谱法固有的优点，同时补充了反相色谱法不能分离强极性的离子性样品或离子性化合物与中性化合物的混合样品的缺陷。但反相离子对色谱法也有一些固有的缺点：(1) 色谱柱的使用寿命相对较短；(2) 每一次进样前的柱平衡时间较长；(3) 由于使用冲洗剂盐含量较高，对仪器的损害较大。但只要使用者能比较好地掌握离子对色谱法的使用技术和基本知识，离子对色谱法对于离子性化合物分离测定仍不失为一个最有效的分离分析手段。

参 考 文 献

- [1] 卢佩章、张玉奎、梁鑫淼，高效液相色谱法及其专家系统，辽宁科学技术出版社，沈阳，1993。
- [2] T. Hamoor, D. L. Massart, *Adv. Chromatogr.*, **33**, 97 (1993).
- [3] 2030 型智能高效液相色谱仪鉴定会技术资料，中国科学院大连化学物理研究所，1989 年 9 月。
- [4] L. Buydens, A. Peeters and D. L. Massart, *Chem. Intell. Lab. Syst.*, **5**, 73 (1988).

- [5] M. De Smet, G. Musch, A. Peeters, L. Buydens and D. L. Massart, *J. Chromatogr.*, **485**, 237 (1989).
- [6] H. Moll, Ph. D. Thesis, University of Bern, 1991.
- [7] W. A. Schlieper, T. L. Isenhour and J. C. Marshall, *Anal. Chem.*, **60**, 1142 (1988).
- [8] G. Klopman, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7315 (1984).
- [9] R. Bach, J. Karnicky and S. Abbott, *Artificial Intelligence Applications in Chemistry*, p. 278, Marceh Dekker N Y, 1986.
- [10] H. Gunasingham, B. Srinivasan and A. L. Ananda, *Anal. Chim. Acta.*, **193**, 182 (1986).
- [11] M. A. Tischler and E. A. Fox, *Comput. Chem.*, **11**, 235 (1987).
- [12] A. F. Fell, J. G. Berridge and M. H. Williams, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **6**, 55 (1988).
- [13] J. C. Berridge, *Analyst*, **109**, 291 (1984).
- [14] P. Lu and H. Huang, *J. Chromatogr.*, **452**, 175 (1988).
- [15] D. Goulder, T. Blaffert and A. Blokland, *et al.*, *Chromatographia*, **26**, 237 (1988).
- [16] T. Hamoir, M. De Smet and H. Piryns, *J. Chromatogr.*, **589**, 31 (1992).
- [17] P. Conti, T. Hamoir and M. De Smet, *et al.*, *Chem. Intell. Lab. Syst.*, **11**, 27 (1991).
- [18] M. Mulholland, J. A. van Leeuwen and B. Vandeginste, *Anal. Chim. Acta.*, **223**, 183 (1991).
- [19] K. Tsuji and K. M. Jenkins, *J. Chromatogr.*, **485**, 297 (1989).
- [20] H. Yuzhu, A. Peeters, G. Musch and D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta.*, **223**, 1 (1989).
- [21] A. Bartha and J. Stahlberg, Presented at 15th International Symposium on Column Liquid Chromatography, Basel, Abstract, p. 114, 1991.
- [22] R. M. Smith and C. M. Burr, *J. Chromatogr.*, **485**, 325 (1989).
- [23] K. Valko, G. Szabo and J. Rohricht, *et al.*, *J. Chromatogr.*, **485**, 349 (1989).
- [24] G. Szepesi and K. Valko, *J. Chromatogr.*, **550**, 87 (1991).
- [25] M. Moors and D. L. Massart, *TrAC*, **9** (5), 164 (1990).
- [26] L. R. Snyder and J. W. Dolan and D. C. Lommen, *J. Chromatogr.*, **485**, 65 (1989).
- [27] J. W. Dolan and L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 379 (1990).

- [28] Optochrom, Product Brief, Betron Scientific b. v., Rotterdam, Netherland.
- [29] WISE, Product brief, Waters, Millipore, Milford, Massachusetts.
- [30] J. R. Gant, F. L. Vandemark and A. F. Poile, *Am. Lab.*, **22**, 15 (1990).
- [31] ICOS, Product brief, Hewlett-Packard publication number 12-5091-0325E.
- [32] P. J. Naish-Chamberlain and R. J. Lynch, *Chromatographia*, **29**, 79 (1990).
- [33] 邹汉法、黄红心、张玉奎、卢佩章, 色谱, **8**, 133 (1989).
- [34] Zhang Yukui, Zou Hanfa, Lu Peichang and Yao Zhijian, *Chinese J. Chemistry*, **5**, 441 (1991).
- [35] 卢佩章, 中国科学 (B辑), No. **2**, 161 (1979).
- [36] 邹汉法、张玉奎、董礼孚、包绵生、卢佩章, 分析测试通报, **7**, 17 (1988).
- [37] Zou Hanfa, Zhang Yukui and Lu Peichang, *Chinese J. Chemistry*, **3**, 237 (1991).
- [38] Peichang Lu, Hanfa Zou and Yukui Zhang, *J. Chromatogr.*, **179**, 509 (1990).
- [39] 卢佩章、邹汉法、张玉奎, 中国科学 (B辑), No. **4**, 347 (1991).
- [40] R. M. Smith and D. R. Garside, *J. Chromatogr.*, **407**, 19 (1987).
- [41] Y. Tanaka and H. Sato, et al., *J. Chromatogr.*, **407**, 197 (1987).
- [42] Zou Hanfa, Zhang Yukui and Lu Peichang, *Acta Chimica Sinica*, **6**, 511 (1989).
- [43] Th. Cachet and I. O. Kibwage, et al., *J. Chromatogr.*, **409**, 91 (1987).
- [44] 王恩琪、李佩芳, 色谱, **6**, 370 (1988).
- [45] A. Bondi, *J. Phys. Chem.*, **58**, 411 (1964).
- [46] Hanfa Zou, Yukui Zhang, Xibing Wen and Peichang Lu, *J. Chromatogr.*, **523**, 59 (1991).
- [47] Hanfa Zou, Yukui Zhang, Mingfang Hong and Peichan Lu, *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 1797 (1992).
- [48] K. Jinno and Y. Ban, *Chromatographia*, **30**, 51 (1990).
- [49] 张玉奎、邹汉法、卢佩章, 色谱, **8**, 285 (1990).
- [50] 卢佩章、卢小明、李秀珍、张玉奎, 科学通报, No. **9**, 1175 (1982).
- [51] P. Jandera, *J. Chromatogr.*, **314**, 13 (1984).
- [52] T. Hanai and J. Hubert, *J. Chromatogr.*, **290**, 197 (1984).

- [53] M. C. Pirtogrande and F. Dondi, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1065 (1987).
- [54] Yukui Zhang, Hanfa Zou and Peichang Lu, *J. Chromatogr.*, **515**, 13 (1990).
- [55] Peichang Lu, Hanfa Zou and Yukui Zhang, *Mikrochim. Acta.*, **III**, 35 (1990).
- [56] 邹汉法、李喜来、张玉奎、卢佩章, 科学通报, No. 2, 113 (1991).
- [57] M. A. Quarry and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **384**, 163 (1987).
- [58] 梁鑫森、邹汉法、黄红心、张玉奎、卢佩章, 色谱, **8**, 210 (1990).
- [59] B. F. ransson, K. G. Wahlund and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **125**, 326 (1976).
- [60] 张玉奎、邹汉法、梁鑫森、卢佩章, 分析测试通报, No. 1, 7 (1992).

第七章 液相色谱分离条件最优化

自从本世纪 70 年代以来, 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 技术得到了迅猛的发展, 取得了长足的进步, 如色谱基础理论的进一步完善和仪器性能的显著提高. 在此基础上, 今后 HPLC 的发展方向之一就是仪器的自动化和人工智能的实现, 在这些方面国内外的色谱工作者都已进行了许多有益的工作, 现阶段高效液相色谱的智能优化仍是当前的热点之一. 智能优化包括两部分, 一部分是色谱分离模式选择、柱系统选择、流动相选择、检测器选择等所谓的系统优化 (system optimization); 另一部分就是在最佳柱系统条件下, 操作条件的优化. 操作条件 (色谱分离条件) 优化是指在给定的柱系统条件下, 优化所选的色谱参数的值, 找出最佳的操作条件, 使得样品组分在此条件下达到满意的分离, 并使分析时间最短.

色谱分离条件优化可分为设计和寻优两个过程, 设计过程指色谱参数和优化指标的选择和实验设计, 寻优过程指由实验设计得到初始实验点, 按照一定的优化方法预测优化可能方向, 寻找最优点.

§ 7.1 优化参数与优化指标

§ 7.1.1 优化参数

对于一个样品的色谱分离条件优化, 首先要做的是选择对样品的分离具有显著影响的色谱参数作为优化参数, 这是优化的首要问题.

在液相色谱中, 对应于不同的目标和要求, 有许多参数可供优化, 图 7.1 表示了高效液相色谱中各个色谱参数间的相互关系^[1].

其中包括了影响仪器性能、柱性能的色谱参数和分离条件参数。在现阶段，许多影响仪器性能的参数，如柱压 ΔP ，流动相流速 u 等参数，随着仪器的发展已获得圆满的解决，而影响柱效的动力学参数诸如填料粒径 d_p ，柱长 L 等参数对分离性能的影响也已相当清楚，可由一些基础的关系式求得，因此优化意义比较大

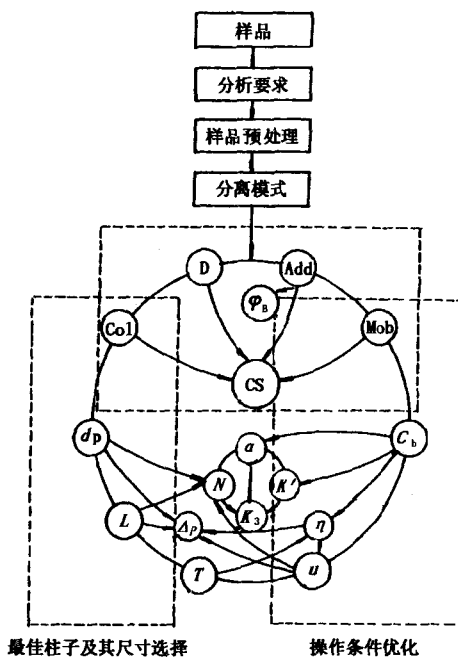


图7.1 可供优化考虑的色谱参数的关系图

Col. 柱子; Mob. 流动相; D. 检测器; Add. 添加剂;
 C_b . 流动相强组分的浓度; φ_B . 改性剂的浓度; T .
 温度; u . 流速; d_p . 粒度; L . 柱长; k' . 容量因子;
 N . 柱效; η . 溶剂粘度; α . 选择性; K_3 . 分离度; ΔP .
 压差; CS. 柱系统.

的是那些影响溶质保留值和选择性的分离条件参数。在高效液相色谱中主要是流动相的组成，即流动相中各种有机溶剂的浓度、

缓冲液的种类和浓度以及添加剂的种类和浓度等；在反相离子对色谱中主要是流动相中有机溶剂的浓度、离子对试剂的种类和浓度、缓冲液的种类和浓度、流动相的 pH 值和离子强度等等；在新兴的毛细管电泳技术中主要是缓冲液的种类和浓度、pH 值、离子强度、操作温度等等。分离条件优化就是在仪器条件和柱条件一定的情况下，对这些分离条件参数进行优化，找出最佳的分离条件。

§ 7.1.2 优化指标

所谓优化指标（或者称为评价函数，或目标函数）就是在优化的过程中，用来评价色谱分离质量的指标（或称函数）。选择一个合适的优化指标，就是为了在优化过程中，将通过实验获得的有用的分析信息尽量地压缩到一个数值形式的函数中去，用来评价色谱分离结果的质量，指导优化进行的方向。由于优化过程的进行，最佳条件的定位都是由优化指标的大小决定的，因此优化指标的选择对于样品的优化分离具有决定性的意义。一个理想的色谱优化指标必须满足的基本要求是：

- (1) 能够以有效的手段比较和衡量色谱分离的质量；
- (2) 能够定量地描述色谱分离的结果；
- (3) 只受色谱工作者可以控制的参数的影响；
- (4) 能够表达出与可控制参数间可理解的关系以便可以直观地指导色谱工作者改善下一次实验的条件；
- (5) 不受数学表达的限制，是连续而且尽可能平滑的；
- (6) 能够有效地服务于色谱工作者的优化目的。

当然在实际工作中，很难找到能够同时满足以上所有要求的优化指标。选择合适的优化指标就是在满足优化目标的前提下，尽量地满足上述要求，尽量多地具有以上特征。表 7.1 列出了文献中曾经报道过的一些优化指标。

因为一个理想的优化指标，必须能够有效地服务于色谱工作者的优化目的，所以在评价这些指标以前，有必要先阐明我们对

表7.1 优化指标¹⁾

名称	表达式	文献
(1)基本指标		[2,3]
1. 分辨率(resolution)	$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_{b(1)} + W_{b(2)}}$	
2. 选择性(selectivity)	$\alpha = k'_2/k'_1$	
3. 峰谷比(peak-valley ratio)	$P = f/g$	
4. 谷峰比(valley-to-top ratio)	$P_v = 1 - v/h_i$	
5. 分离因子(separation factor)	$S = \frac{t_2 - t_1}{t_2 + t_1} = \frac{k_2 - k_1}{k_2 + k_1 + 2}$	
6. 总分离效能指标	$K_1 = \frac{2(t_2 - t_1)}{(W_{1/2(1)} + W_{1/2(2)})} \approx 1.699R_s$	[4]
7. 峰高分离度	$K_3 = \frac{C_{max} - C_i}{C_{max}}$	[4]
(2)最小指标(minimum criteria)		
8. 最小分辨率	$R_{s_{min}}$	[5]
9. 最小选择性	α_{min}	[6]
10. 最小分离因子	S_{min}	[7]
(3)信息参量(informing power)和分离数(separation number)		
11. 信息参量(informing power)	$P_{inf} = \sum_{i=1}^n \ln S_i$	[2]
12. 信息参量(informing power)	$P_{inf} = \frac{1}{t} \sum_{i=1}^n \ln S_i$	[2]
13. 相关信息函数(FUMI, function of mutual information)	$\Phi = \sum_{j=1}^n \frac{1}{2} \left[\log \frac{A_j^2}{2\pi^{1/2}\sigma_j^2} - \log \left(\frac{K_{f(j)} - \tau_j}{\pi^{1/2}\sigma_j} + \frac{K'_{f(j)} - \tau_j}{\pi^{1/2}\sigma_j} \right) \right]$	[2]
14. 分离数(separation)	$S_N = \sum_{i=1}^n \ln P_i$	[2]
(4)色谱响应函数(CRF, chromatography response function)和色谱优化函数(COF, chromatography optimization function)		
15. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum R_s$	[8]
16. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum S_i$	[7]

续表

名称	表达式	文献
17. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = P_i$	[9]
18. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \frac{1}{t} \sum P_i$	[9]
19. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum \ln P_i$	[10]
20. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum a_i \ln P_i$	[9]
21. 色谱优化函数(COF)	$COF = \sum a \ln(R_i/R_d) + b(t_m - t_n)$	[11]
22. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum R_s + n^a - b t_m - t_n - c(t_0 - t_1)$	[12]
23. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum \ln(P_1/P_0) + c(t_m - t_n)$	[13]
24. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = t_m - t_m^* /t_m + R_s - R_s^* /R_s$	[14]
25. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \frac{1}{t} \prod_{i=1}^n f_i / (g_i + 2n_i)$	[15]
26. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum \ln(f_i/g_i) - 100(M - n)$	[16]
27. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \sum \exp[\alpha(R_d/R_j)] + \exp[\beta(T_1 - T_m)] + \exp[\gamma(T_0 - T_1)]$	[17]
28. 色谱响应函数(CRF)	$CRF = \prod_{i=1}^{n-1} K_i / \left[\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} K_i \right]^{n-1}$	[18]
29. 分离函数(separation function)	$SEP_p = n + \sum P_i + 0.5N_s$ $SEP_v = n + \sum(1 - v_i) + 0.5N_s$	[19]
30. 色谱评价函数(chromatography evaluate function)	$CEF = \sum_{i=1}^n A_i + \sum_{j=1}^{n-1} B_j P_j / (n-1)$	[20]
(5) 目标函数(objective function)		
31. 目标函数(F_{obj})	$F_{obj} = \sum [10(1.5 - R_i)]^2$	[21]
32. 目标函数(F_{obj})	$F_{obj} = \sum 100 \exp(1.5 - R_i) + (t_m - t_n)^3$	[22]
(6) 分离度积(resolution product)		
33. 分离度积(resolution product)	$R_s = \prod R_{s+1,i}$	[23]
34. 相对分离度积(relative resolution product)	$\gamma^* = \prod_{i=1}^{n-1} R_{s+1,i} / \left[\sum_{i=0}^{n-1} R_{s+1,i} / (n-1) \right]^{n-1}$	[24]

续表

名 称	表 达 式	文 献
35. 校正分离度积(calibrated normalized resolution product)	$\gamma^* = \prod_{i=1}^{n-1} (R_{s_{i+1,i}}/R_s) = \prod_{i=1}^{n-1} (S_{i+1,i}/S)$	[25]
(7)其它指标		
36. 色谱优化系数(COC, chromatographic optimization coefficient)	$COC = \sum_{i=1}^n \sum_{i \neq j}^n A_i A_j \log \frac{R_{i,j}}{R_{i,jd}}$ $+ \sum_{i=1}^n B \sqrt{A_i \frac{T_m - T_i}{T_m}}$	[26]
37. 串行色谱响应函数(HCRF, hierarchical chromatography response function)	$HCRF = 100000 \times n + 10000 \times K_{3mn} + (100 - T)$	[27]

1)表中各个符号的意义参见原文献,表中的加和符号 \sum 一般代表 $\sum_{i=1}^n$.

最佳分离条件的理解。在一般情况下,色谱分离的目的是在平行看待样品中各个组分的前提下,分离出样品中所有的组分,因此我们认为最佳分离条件应该满足以下三点:

- (1) 样品中所有的组分都能被检测出或者检测出的组分(峰)数目应尽量地多;
- (2) 样品中所有的组分都能得出比较满意的分离;
- (3) 分析时间尽量的短。

表7.1所示的基本指标(1)中的1~7一般是用来衡量某两个峰的分离情况,而不被用作色谱优化指标,但是几乎所有的优化指标,都是由这些基本指标构成的。

表7.1中最小指标(2)中的8~10只是关心谱图中最难分离峰对的分离情况,却没有考虑其它峰的分离情况和时间因素。

表7.1中信息参量(3)中的11,12,14和表7.1中色谱响应函数(4)中的19,20,21,23,26以及指标36的函数值的大小主要由谱图中最难分离峰对决定。因为在这些函数中包含了 $\ln(x)$ 项(其中 x 代表各函数中的 $S_i, P_i, R_i/R_d, P_i/P_0, F_i/(g_i +$

$2n_i$), F_i/g_i , $R_{ij}/R_{j,d}$ 等等), 当谱图中有一分离很差的峰对时函数便趋于负无穷大 ($-\infty$), 这时其它峰对的分离情况对函数值的贡献便很微不足道了, 但是如果这一峰对的分离质量更差一点, 以至于两个峰完全重叠, 只能检测出一个峰时, 函数值却有明显的改善 [指标 27 中的 $\exp(x)$ 项与 $\ln(x)$ 项类似, 只是信号相反]. 也就是说分离出的峰数目越小函数值反而越优, 很显然这与色谱优化的目的是背道而驰的. 在已知样品的优化中, 组分数目是已知的, 若考虑到每个组分的分离对指标的影响, 使重叠峰的分离度为 0, 这样可以避免出峰越少, 函数值越优的不合理情况, 但此时出峰数目少一个和少多个的函数值没有差别 (都是 $-\infty$).

表 7.1 目标函数 (5) 中的 31 和 32 以及 30 也可能出现分离出的峰数目越少函数值反而越优的问题.

表 7.1 色谱响应函数 (4) 中的 15, 16, 17, 18 的函数值与谱图中各个峰分离情况总和有关, 可以说这些指标对于色谱优化的意义不大, 因为某些分离很差的峰对造成的实际影响, 不能依靠提高其它峰的分离度来弥补, 并且这些函数的大小主要是由谱图中分离情况最好的峰对决定, 也就是说, 函数值是由一个与分离的实现最不相干的峰对决定.

表 7.1 分离度积 (6) 是 Schoenmakers 等人设计的优化指标, 与色谱响应函数中的 25, 28 相似, 谱图中的色谱峰分布得越均匀, 则这些指标值越优 (函数值越小). 它们追求的是色谱峰都能均匀分布的色谱分离条件, 这与一般的优化目的是不相符合的. 一般情况下, 我们最关心的是样品中的所有组分是否都被分离出来, 是否得到满意的分离, 而这些指标只关心色谱峰的分布是否均匀, 却不关心分离出的色谱峰的数目和分离度如何.

表 7.1 (4) 中的 24, 关心的是分析时间 t_m 和分离度 R_s 与所要求的 t_m 和 R_s 之间的差距, 其函数值 (CRF) 在很大程度上是由分析者的主观愿望决定的, 并且在某些情况下比要求的分离质量更好的谱图 (R_s 更大, t_m 更小) 与更差的谱图 (R_s 更

小, t_m 更大) 的函数值却有可能是相同的, 并且可能会出现与信息参量 (3) 相似的分离出的峰数目越少函数值反而越优的不合理情况, 显然这样的指标无法正确地衡量和评价色谱分离的质量.

分离函数 29 的进步在于考虑到了峰数目 (n) 和肩峰数目对分离质量的影响. 但是多一个基线分离峰 (n 加 1) 和多两个肩峰 ($0.5 N_s$ 加 1) 的色谱图的质量差别是很大的, 而它们对函数值的贡献却相同, 这显然是不合理的.

目前, 国外应用比较广泛, 影响比较大的优化指标是 Berridge 设计的色谱响应函数 22 及其改正后的各种函数, 这个指标的优点是既考虑到了峰数目的影响, 又考虑到了各个峰对分离度的贡献, 既有最大时间限制, 又有最小时间限制. 但是此函数也有几个方面的不足:

(1) 用 R_s 加和是不合理的, 分离出的色谱峰数目少和分离很差的峰对造成的影响不能依靠提高其它峰的分离度来弥补, 有时可以发现, CRF 函数值大的色谱图, 其最难分离物质对的分离效果却很差, 相同的 CRF 值却对应着分离效果相差甚远的色谱图.

(2) 在对未知样品的优化中, 由于根本不知样品的性质, 要定义允许最大分析时间 t_m 是很困难的, 而不同的 t_m 值对 CRF 值却有很大的影响.

(3) 此函数把峰数目、峰分离度、分析时间看作是并行因素, 即等同看待三个因素对色谱分离的影响.

卢佩章等人^[4]认为出峰数目、峰分离度、分析时间这三者串行因素, 应该串行分步地加以考虑, 也就是说:

(1) 不管对未知样品还是已知样品, 能分离出的峰数目越多越好是首要条件, 出峰数目越多, 提供的样品信息越多, 反之亦然.

(2) 在出峰数目相同的情况下, 应使最难分离物质对的分离度满足分析要求.

(3) 在最难分离物质对的分离度满足要求的情况下, 使分析

时间越短越好。

卢佩章、黄红心等人^[27]把串行优化思想公式化,设计出串行色谱响应函数:

$$HCRF = 100\,000 \times n + 10\,000 \times K_{3\min} + (100 - T) \quad (7.1)$$

式中, n 是出峰数目, $K_{3\min}$ 是最难分离物质对的峰分离度。

此函数吸取了并行优化指标 CRF 的优点,首次把出峰个数、分离度和分析时间三个因素串联起来考虑,避免了用并行优化方法对待这些不并行因素的不合理性。它可以应用于不同分析目的的色谱条件优化,既可用于未知样品的优化,又可用于已知样品的优化,既可作为串行优化法的优化指标,也可用于并行优化法,并且 $HCRF$ 值可以直观地反映一张色谱图的分离结果。

虽然这个函数基本上可以满足色谱优化指标的各项要求,但是从根本上讲,它还是给各个因素人为地加上不同数量级的权重因子,因而导致它的函数界面极不平滑,是一个“跳跃性”的界面,用在未知样品单纯形寻优的过程中,仍然无法克服由于出峰交错而导致的单纯形局部优化问题。

另外,对于色谱优化指标,仍然有两个值得研究之处:

其一,“最难分离物质对”的提法已经得到普遍承认,但我们认为在 $HCRF$ 上峰分离度一项仅用最难分离物质对的峰分离度表示,还有不足之处,如能找出一个指标,既可以反映色谱图中最难分离物质对的分离情况,又能反映其它难分离物质对的分离情况对优化指标的贡献则更为合理。

其二,可以认为出峰数目与峰分离度、分析时间两项是“串行”的关系,但是峰分离度与分析时间之间的关系,我们认为并不能简单地用“并行”或者“串行”来表示。在实践中针对某些优化目的,必须在先达到一定的分离度时考虑分析时间才有意义,从这个意义上讲两者之间的关系中存在着某些“串行”的含义;而从理论上讲,两者有着很必然的联系,对于一组色谱峰,在不考虑其它因素(如柱效等)的情况下,如果分离得越开(R_s 越大),则其保留时间相差越大,分析时间也越长,反之时

间越短,也就是说两者之间的关系中还存在着某些“并行”的含义.至于如何找到两者之间比较满意的折衷关系,设计出一个更加理想的优化指标,还有利于进一步的研究.

§ 7.2 试验设计方法

在优化参数及其范围与优化指标都确定以后,接下来要做的就是找出优化指标与各个优化参数之间的相互关系,以寻找最优的指标值所对应的各参数值.要找到这一关系,就需要做一定数量的实验以获得一些必要的信息.

试验设计技术就是研究如何科学地安排色谱实验,以最少的试验次数取得最多的有关被测试样品的分析信息.从这些信息出发,通过一定的优化步骤,便可以找出最佳的色谱分离条件.试验安排得好,事半功倍,很容易找到最佳分离条件;反之则事倍功半,甚至找不到最优条件或者找到的只是局部优化条件.因此可以说试验设计方法对于色谱分离条件的优化具有很重要的意义,是色谱分离条件优化的一个重要环节.

§ 7.2.1 正交设计

正交设计又称正交试验,它是用来科学地设计多因素试验的一种方法.是目前国内工农业生产、科学实验中应用最广泛、最普遍的试验设计方法^[28,29].正交设计用一套规格化的正交表安排试验,得到的试验点既具有均匀分散性,又具有整齐可比性.

正交设计所遵循的规格化的正交表用 $L_m(q^n)$ 表示,其中: L 是正交表的意思, m 为试验次数, q 为各因素水平数, n 为最大可容纳的因子个数.

正交设计具有许多优点:

(1) 得到的实验点具有均匀分散性,即各因素各水平之间都搭配均匀,试验点均匀地分布在所考察的整个空间,得到的是全局分布.

(2) 得到的试验点具有整齐可比性, 即正交设计在比较每个因素水平变化时, 其它因素各水平出现的次数都是相同的, 因此可以很好地估计和比较各因素对试验指标影响的大小.

(3) 用表 $L_m(q^n)$ 可在保证其正交性的情况下, 变换成具有不同水平数的正交表, 用它可以安排不同水平的实验.

(4) 常用正交设计包括正交表和交互作用列表, 用这类正交表安排试验, 能够考虑到各因素之间的交互效应, 可对各种效应关系做出安排, 因此它适用于数据结构变化较多的情况.

正交设计的一个最大缺点是试验次数比较多, 正交设计中试验次数 m 与因子数 n , 各因素水平数 q 存在以下关系:

$$m = r \cdot q^2$$

式中 r 为一自然数. 由此可见, 各因素的试验水平数以算术级数增加时, 试验次数将以几何级数急剧增加, 当水平数大于 5 时, 试验次数便相当可观. 而在色谱分离条件优化中, 一般对参数都要求在 5 水平以上, 这样通过正交设计得到的试验次数是色谱工作者难以承受的.

§ 7.2.2 因子设计

因子设计技术在色谱分离条件的优化中应用比较多^[30,31], 它为所选的参数(因子)确定一个高值(+)和一个低值(-), 这些因子的高值和低值的任意组合, 便是因子设计的试验点, 比如对于两个因子的因子设计, 得到的试验点如图 7.2 a 所示. 当中心点为试验点时, 被称为星型设计(图 7.2 b); 当图 7.2a 和图 7.2b 设计的点都为试验点时, 则称为中心组成设计(图 7.2c).

因子设计的优点是:

- (1) 对于两因子和三因子的实验设计比较简便易行.
- (2) 因子设计在发现各种因素的影响和相互作用方面特别有用, 从因子设计的分析结果可以看出多变量之间是否存在依赖性.
- (3) 可以为回归分析的实验提供理想的数据.

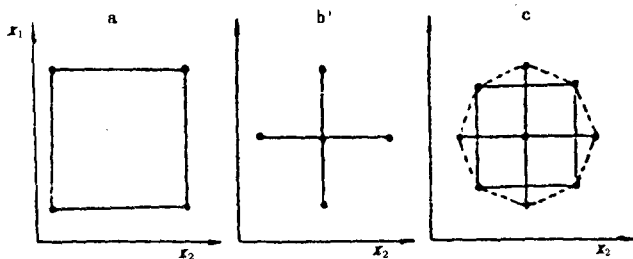


图7.2 二因子因子设计示意图

a. 二水平设计; b. 星型设计; c. 中心组成设计.

因子设计用在色谱分离的多元条件优化, 也有许多不足之处:

(1) 因子设计只对二因子或三因子的试验设计比较适用, 对三因子以上的试验设计则比较困难.

(2) 因子设计对每个因子一般只能选择两个水平 (+ 和 -), 如果这两个水平相距太远, 可能会得到没有变化的结果, 这种结构尤其容易发生于流动相优化中存在的一些独立变量和经常出现的峰交叉的情况中; 如果两个水平相距太近则其它区域有可能被忽略.

(3) 对于二因子和三因子的因子设计, 中心空白区的分析信息可能会丢失, 而中心组成设计可以在某种程度上克服这一缺点.

(4) 但是对于中心组成设计, 试验点数量比较大, 与其得到的效果不太相称, 试验次数 $m_n = 2^n + 2n + 1$, 其中 n 为因子数, 从 m_n 的计算式可以看出对于一个简单的三因素两水平的实验, 便需 15 次试验之多.

§7.2.3 混合设计

混合液设计方法又称为“Simplex Lattice Design”, 是 Glajch 等人^[11,32]提出的溶剂系统优化方法, 该法基于在三元流动相中

三种溶剂的体积分数加和为 1 以及不同溶剂的选择性不同来设计试验. 7 点混合液设计如图 7.3 所示.

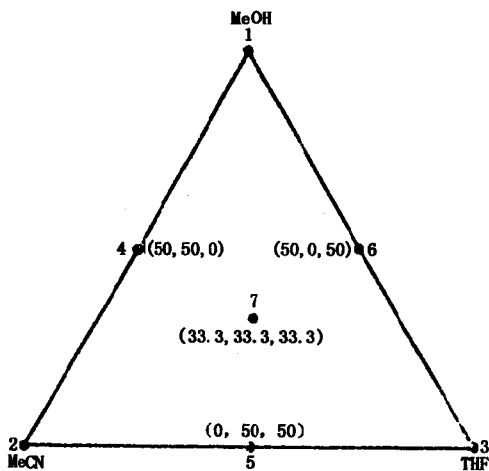


图 7.3 7 点混合液设计图

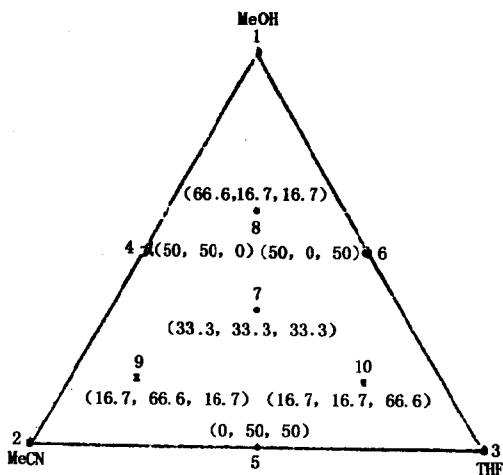


图 7.4 10 点混合液设计图

还有人用 10 点混合液设计技术, 即在图 7.3 的三角形中, 再加三个实验点 (如图 7.4)。

文献中混合液设计的三角型顶点通常是由水溶液等调节至相等或相近洗脱强度的甲醇、乙腈、四氢呋喃溶液而构成的。但是高效液相色谱溶剂系统优化涉及两个主要因素, 即溶剂洗脱强度和溶剂选择性, 而以等强度溶剂为三角形顶点的混合液设计实际上是在预先确定溶剂强度后再考虑分离的选择性, 由此设计所进行的优化只是区域性的, 并没有达到多因素的同时优化。

§ 7.2.4 匀壳设计

匀壳设计是由 Doehlert^[33]提出的, 它使试验点均匀地分布于球面 (圆周) 上, 具有均匀分散的特性。Doehlert 描述了如何进行多达 10 个因素的试验设计, 在此我们简单地介绍进行匀壳设计的方法。

两因子的匀壳设计可以由二维空间 (x_1, x_2) 内的单纯形, 即由以下三个点构成的等边三角形开始:

(0.000, 0.000)

(1.000, 0.000)

(0.500, 0.866)

如图 7.5a 所示, 初始单纯形的顶点用 S 标出。

将初始单纯形的三个顶点的坐标值两两互减, 得到其它的试验点的坐标值:

(-1.000, 0.000)

(-0.500, -0.866)

(-0.500, 0.866)

(0.500, -0.866)

这四个点是图 7.5a 中未标 S 的点。

多因子 (如 n 个因子) 的匀壳设计可以由 n 维空间内的有 $n+1$ 个顶点的初始单纯形开始, 这样的初始单纯形是通过向比它少一个因子 ($n-1$) 的匀壳设计的初始单纯形中加入点:

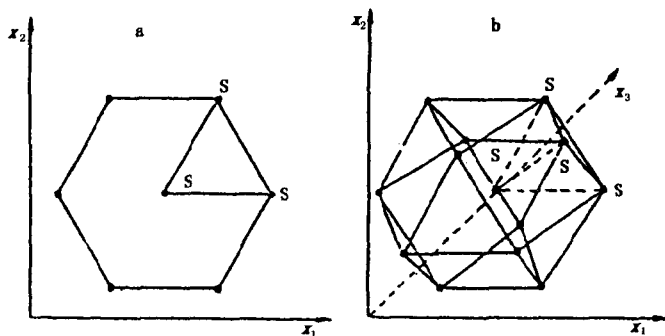


图7.5 Doehlert 均匀外壳设计示意图

a. 二因子; b. 三因子, 初始单纯形分别为
三角形和正四边形标以“s”。

$$\left[\frac{1}{2}, \frac{1}{2 \times 3}, \dots, \frac{1}{2(n-2)(n-1)}, \frac{1}{2(n-1)n}, \frac{n+1}{2n} \right]$$

构成的, 这一行必须从右边读起。比如要做三因子匀壳设计须构造三维空间 (x_1, x_2, x_3) 内有 4 个顶点的初始单纯形。先令二因子设计的初始单纯形的三个顶点的坐标 S 的值为 0.000, 构成三因子单纯形的三个顶点, 最后一个顶点的坐标由计算得到:

$$x_1 = \frac{n+1}{2n} = \frac{3+1}{2 \times 3} = 0.816$$

$$x_2 = \frac{1}{2n(n-1)} = 0.289$$

$$x_3 = \frac{1}{2(n-2)(n-1)} = 0.500$$

由此我们得到三因子匀壳设计的初始单纯形为:

$$(0.000, 0.000, 0.000)$$

$$(1.000, 0.000, 0.000)$$

$$(0.500, 0.866, 0.000)$$

$$(0.500, 0.289, 0.816)$$

将其中每一个点与此单纯形中的其它点两两互减, 则得到三因子

匀壳设计的其它点 (如图7.5 b).

匀壳设计所得到的试验点的数目只与因子的数目 (n) 有关, 试验点数 m 与因子数的关系为: $m = n^2 + n + 1$.

匀壳设计法可以对任意多的因素进行试验设计, 操作也很容易, 并且可以使试验点均匀地分布于参数空间内, 但此设计法的缺点是: 各因素的水平是固定的, 无论是水平数还是水平值都是不可调的, 并且对每个因素并不等同对待, 如对 x_1 是 5 水平, 对 x_2 却是 3 水平的 (图7.5a).

目前匀壳设计法在色谱优化中的应用并不多^[34], 但有一定的应用前景.

§ 7.2.5 均匀设计

前面述及的试验设计方法都存在着一些难以克服的缺陷, 要么试验次数太多; 要么试验点分布不够均匀, 难以代表整个参数空间的特征; 要么难以安排多因素多水平的实验. 均匀设计法却可以在很大程度上克服以上试验设计方法的这些不足之处.

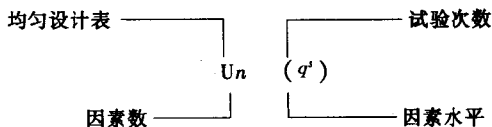
正交设计的特点是“均匀分散, 整齐可比”, 为了照顾“整齐可比”, 它的试验点并没有做到充分“均匀分散”; 为了达到“整齐可比”, 试验点的数目就必须安排很多.

在数值积分中, 当维数较高时, 数论方法是目前最好的方法, 它的出发点是点在积分范围内均匀分布, 使所布点距离被积函数的值充分地接近 (平均而言), 所以用的点不多却能使积分值得到很好的近似.

我国数学家方开泰^[35]基于以上两点思想, 将数论方法和多元统计理论相结合提出了完全从均匀性出发的试验设计方法——均匀设计法. 这一方法不仅考虑正交设计的“整齐可比”性, 而且让试验点在试验范围内充分“均匀分散”, 从而使所得的试验点具有充分的代表性, 虽然安排的试验点很少, 但仍能反映出试验范围内事物变化的主要规律.

均匀设计法与正交设计法一样, 也需要按照规格化的表格设

计实验，均匀设计法使用的表称为 U 表，其符号为



均匀设计表 (U 表) 列出了各因素的各个水平安排规则，U 表中的列列出了根据因素数的不同应该选择哪些列来安排实验。若不考虑均匀设计表列与列之间的相关性，用表 $U_n(q^s)$ 最多允许安排 $s/2+1$ 个因素的实验，若考虑这一相关性则最多允许安排 s 个因素的实验。

表7.2a 均匀设计表 $U_7(7^6)$

列 试验号	1	2	3	4	5	6
1	1	2	3	4	5	6
2	2	4	6	1	3	5
3	3	6	2	5	1	4
4	4	1	5	2	6	3
5	5	3	1	6	4	2
6	6	5	4	3	2	1
7	7	7	7	7	7	7

表7.2b $U_7(7^6)$ 表的使用表

因素数	列 号					
2	1	3				
3	1	2	3			
4	1	2	3	6	6	
5	1	2	3	4	5	
6	1	2	3	4	5	6

表7.2a是均匀设计表 $U_7(7^6)$, 可按排 6 因素 7 水平的实验, 共进行 7 次实验, 表7.2 b 是表 $U_7(7^6)$ 的使用表. 文献中只给出了试验次数为奇数的均匀设计表, 使用时应根据因素的水平数选用, 例如做 7 水平的实验用 $U_7(7^6)$ 表, 做 5 水平的实验选用 $U_5(5^4)$ 表等等, 当水平数为偶数时用比它大一的奇数表划去最后一行即可, 例如 $U_6(6^6)$ 是通过 $U_7(7^6)$ 表划去最后一行得到的. 图 7.6 是对 2 因素 11 水平试验设计的试验布点情况, 从布点图可以直观地看出布点是均匀分散的.

均匀设计法的特点:

(1) 每个因素的每个水平做一次且仅做一次试验, 如果将任何两个因素的试验点点在平面的格子上, 每行每列有且仅有一个试验点. 这一性质反映了试验安排的“均衡性”, 即对每个因素水平都一视同仁.

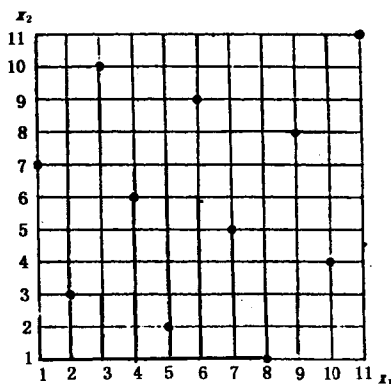


图 7.6 两因素均匀设计布点图

(2) 均匀设计表任何两列的试验方案一般并不等价, 使用均匀设计表不能随意选择列, 而应按照均匀性原则选择均匀性最好的列, 因此每个均匀设计表都有一个附加的使用表.

(3) 均匀设计表的试验次数 n 与因素水平数 q 相等, 例如做一个 5 因素 31 水平的实验, 若用正交设计试验总数至少需

961次以上 (q^2), 而用均匀设计, 只需 31 次试验便可达到相同的效果。

(4) 当因素的水平数增加时, 试验数按水平数的增加量增加, 这一特点使均匀设计法更便于使用。

均匀设计法也有其缺点, 就是试验数据的分析比较麻烦一些, 但是有计算机作为试验分析的工具, 这一问题就变得格外简单了。

每种试验设计技术都有各自的优点和缺点, 有其擅长的应用领域, 应用哪一种试验设计技术应根据实际工作的需要来选择。

§ 7.3 优化方法及其应用

优化方法就是指从选择哪些参数为优化参数, 选择什么样的优化指标, 如何设计实验方案, 一直到如何找到最优分离条件的思路和步骤。迄今为止, 国内外的色谱工作者已经发展出多种优化方法, 这些方法可以按照不同的特征来进行分类。

(1) 按照样品的可知性来分可分为:

- a. 已知样品的分离条件优化法;
- b. 未知样品的分离条件优化法。

所谓已知样品的优化是指知道样品中所含组分的个数, 并且已知或测得它们的保留值方程, 在此基础上进行等度或梯度的条件优化。而对于所含组分数目、保留值分布范围以及各组分保留值方程均属未知的未知样品的优化。这种优化有两种方案, 一种是采用所谓的“黑箱方法”, 另一种就是先通过有限次数的实验, 把未知样品转化为已知样品, 再采用与已知样品相同的优化方法进行条件优化。

(2) 按照液相色谱的冲洗方式可分为:

- a. 等度分离条件优化;
- b. 梯度分离条件优化。

这种分类方法是针对液相色谱的两种操作方式等度冲洗和梯

度冲洗而言的。

(3) 按色谱分离条件（优化参数）与分离目标（优化指标）之间的关系可分为三类：

- a. 解析方法；
- b. 半解析方法；
- c. 黑箱方法。

解析方法是利用已知的分离条件与分离目标之间精确的解析表达式进行优化，其优化精度理论上可以达到无限高，但实际上很难找到这样的解析表达式，其代表为“窗口图形法”。

半解析方法是利用多项式（一般是二元二次多项式）逼近分离条件与分离目标之间的关系来进行优化，其优化精度取决于多项式逼近的精度，在难于找到分离条件与分离目标之间的精确表达式时，可以考虑使用该类方法，其代表是“重叠分辨率图法”。

“黑箱方法”是不管分离条件与分离目标之间的关系，直接采用数学上的优化方法进行优化，其优化精度取决于实验的次数，其代表是“单纯形法”。

(4) 按试验和设计的先后来分类则可分为^[36]：

- a. 串行优化法；
- b. 并行优化法。

串行优化法在实验前仅设计少量实验，通过实验预测优化可能的方向，然后设计新的实验，故实验在前设计在后，重复实验和设计的步骤直至最佳。属于串行优化法的有：单纯形法，复合形法以及重复设计法等等。

并行优化法在实验前确定全部实验方案，设计在前，实验在后，然后根据实验结果，拟合样品中各组分的保留值方程，求得优化指标的响应值界面，由响应值界面得到最佳分离条件。属于并行优化法的方法有：重叠图形法、窗口图法、临界带法等等。

§ 7.3.1 单纯形优化方法

单纯形优化方法（simplex）是串行优化方法中应用最为广

泛的方法，最初是在1962年由 Spendley 等人^[37]提出的。所谓单纯形被定义为比被优化变量数（多维空间的维数）多一个顶点的最简单的封闭几何图形，在二维空间（两个因素）中的单纯形是一个三角形；三维空间中是一个四面体； n 维空间中是由 $n + 1$ 个顶点构成的多面体。

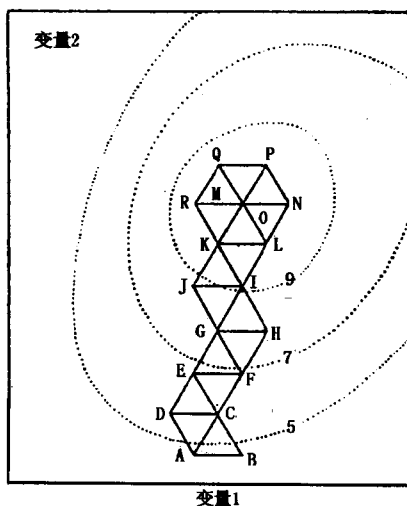


图7.7 二维单纯形优化示意图
点线是优化指标等高线。

以两个变量的单纯形寻优为例（如图7.7所示），其基本原理为：在初始单纯形的三个顶点A，B，C做实验确定了初始单纯形，得到A，B，C三点的优化指标的值，然后选出其响应值最差的点B，假设更优的点在这一点相反方向，以B点以外的其余点的重心为反射中心，将B向其相反方向反射，得出点D，舍弃点B，由A，C，D三点构成新的单纯形，重复上述步骤直到找不到更优的点为止，即得最优优点M。如对其数学原理感兴趣，可参阅相关文献[38]。

在完成单纯形的优化过程中，必须具有一个高质量的优化指

标来评价实验所得到的色谱图的好坏，保证搜索方法能迅速达到最优点。在过去的单纯形优化实验中，广泛采用 CRF 作为优化指标，其定义为：

$$\left. \begin{aligned} \text{CRF} &= \sum_{i=1}^{n-1} K_1 + n^2 - a |T_m - T_n| - b(T_1 - T_0) \\ \text{或} \quad \text{CRF} &= \sum_{i=1}^{n-1} K_3 + n^2 - a |T_m - T_n| - b(T_1 - T_0) \end{aligned} \right\} \quad (7.1)$$

其中 K_1 和 K_3 分别为相邻峰的总分离指标和峰分离度； n 为出峰个数； T_m 和 T_0 分别是最长允许分析时间和最小允许保留时间； T_n 和 T_1 分别为最后一个峰和第一个峰的保留时间。由此可见，并行 CRF 值有几个方面是不合理的：首先，用色谱峰分离度加和是不正确的，也就是说峰数目少和对分离度很差的峰造成的实际影响不能依靠提高其它峰的分离度来弥补。有时可以发现 CRF 值大的色谱图而最难分离物质对分离效果却很差，相同的 CRF 却对应着分离效果相差甚远的色谱图^[39]。第二，在对未知样品的优化中由于根本不知样品的性质，要定义允许最长分析时间是很困难的，定义不同的 T_m 对 CRF 值有直接的影响。第三，用并行 CRF 值无法解决峰交叉而导致的单纯形局部优化的问题。我们知道，各种不同溶质的容量因子 k' 随洗脱剂浓度的变化率是不同的，这就导致保留值曲线相互交叉，而使寻优产生困难。最常见的问题就是响应函数表面的局部优化。

Berridge^[12]采用式 (7.1) 作为色谱响应函数用于离子对色谱分离条件的最优化，被优化色谱参数包括流动相组成、柱温和流速。表 7.3 列出的是 Simplex 最优化方法的初始条件。图 7.8 给出的是色谱参数和式 (7.1) 中的 CRF 值与实验次数的关系图。图中当 CRF 值为 -50 时，表示没有检测到色谱峰；当 CRF 值小于 -100 时，则表示至少有一个色谱参数被设定到所允许的数值范围以外。经过 32 次实验，被分离的有机碱所找到的最优化条件为溶剂 A/溶剂 B/溶剂 C = 43/31/26，流量

2.35 ml/min 和柱温 38℃. 在优化条件下, 样品分离的色谱图如图 7.9 所示.

表 7.3 离子对色谱 Simplex 最优化方法的初始条件

色谱参数	范围	实验次数				
		1	2	3	4	5
溶剂 A% (5mol/L KH ₂ PO ₄ 缓冲液, pH3)	0~100	0	10	90	10	10
溶剂 B(甲醇)	0~99.9	99	81	1	19	81
溶剂 C% (溶剂 A 包含 300mg/L 正庚烷磺酸)	—	1	9	9	71	9
流量(mL/min)	0.5~3.5	3.5	0.9	3.2	3.2	3.2
柱温(℃)	30~65	30	35	35	35	60

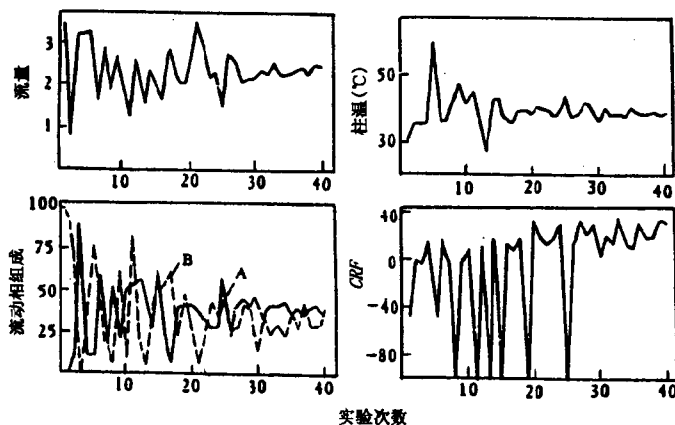


图 7.8 CRF 值和色谱参数与实验次数的关系

三氯乙酸不仅可以作为离子对试剂, 而且还可以用作 pH 缓冲剂. Berridge^[12]采用 Simplex 优化方法用于三氯乙酸作为离子对试剂的离子对色谱的分离条件最优化. 得到的最优化条件为

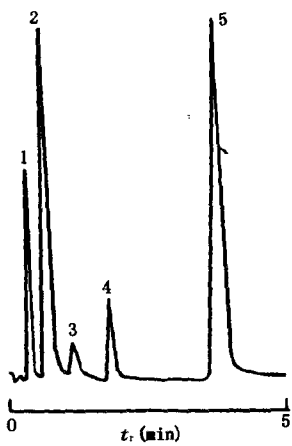


图7.9 在 Simplex 方法选择的优化条件下有机碱的分离色谱峰: 1. α -氨基苯乙酮; 2. 2, 4-二甲氧基苯甲氨; 3. 2, 4-二甲基苯胺; 4. 吡碱; 5. 2-甲基吡碱.

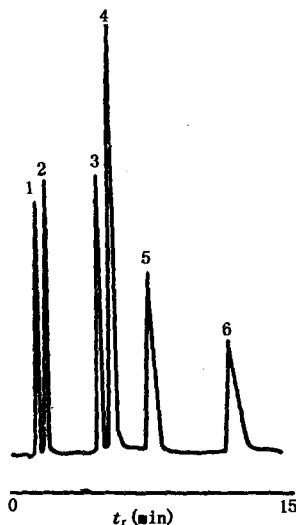


图7.10 在 Simplex 方法选定的优化条件下, 芳香酸、正己酸和碱混合物的分离情况
色谱峰: 1. 去甲肾上腺素; 2. DOPA; 3. 3, 4-二羟基苯丙酸; 4. 5-羟基吡啶碱-2-羧酸; 5. 色氨酸酰胺; 6. 色氨酸.

溶剂 A/溶剂 B/溶剂 C = 40/23/37, 流量 1.2 ml/min 和柱温 38°C. 在最优化条件下, 6 种有机酸碱混合物的分离谱图如图 7.10 所示.

单纯形法是“黑箱法”的一种, 可以用于未知样品的色谱分离条件的最优化. 其主要优点有:

- (1) 不需要有关分离模式和样品复杂性的预备知识, 就可以优化许多互相依赖的变量.
- (2) 不要求任何预先构造的溶质的保留行为模型, 也不要求样品组分的识别和确定.

这两点是“黑箱法”的特性, 决定了单纯形法可以用于未知

样品的优化.

(3) 允许在优化的过程中引入新的变量, 为此每引入一个新变量只需多做一次附加实验.

(4) 可以在实验的过程中估价优化的进展, 而不是在实验完成以后.

(5) 容易实现优化过程的自动化.

(6) 优化结果的精度比较高.

同时, 单纯形法也存在许多缺陷:

(1) 单纯形法是一个“盲目的”(blind)优化方法, 一般不能确定所定位的最优点(optimum)的质量. 所以当色谱参数改变引起组分色谱峰次序颠倒时(即目标函数存在多个极值时), 它将选择最幸运的一个极值点, 而不是继续寻找最大的极值点, 因此常常导致局部优化(local optimum). 这是单纯形法最致命的缺陷.

(2) 单纯形法一般需要很多次的实验才能得到最优点.

(3) 能够获得的有关响应值界面的信息很少.

为了克服单纯形优化方法的缺点和提高单纯形优化方法的计算速度. 许多色谱工作者对单纯形优化方法的计算方法作了修正. 如 Nelder 和 Mead^[40] 在 Spendly 提出的基本单纯形法(BSM)的基础上, 提出了改进单纯形法(MSM), 变固定步长为可变步长, 并引入了反射(reflection), 扩展(expansion)和压缩(contraction)规则, 加快了优化进程, 改进了BSM的许多不足之处. 此后单纯形法在色谱条件优化领域得到了广泛的应用, 并在应用的过程中提出了许多种改进型的单纯形优化方法^[41~44]. 黄红心、卢佩章等人^[45]提出智能搜索的单纯形法, 将人工智能的深度优先和宽度优先的原理与单纯形法的多种逻辑算法结合起来应用于液相色谱分离条件的优化, 在很大程度上改善了单纯形法搜索的效率和寻优的可靠性. 现分述如下:

(1) 不管对未知样品还是已知样品, 色谱峰越多越好是首要条件. 在对未知样品优化过程中, 就是把混合物中所有组分都分

开, 因此峰数目越多, 提供的样品信息必然也越多, 反之亦然.

(2) 在色谱峰相同的情况下, 应使最难分离物质对的峰分离度满足分析要求, 在未知样品中, 最难分离物质对可能随着分离条件的不同而改变, 但在已知样品的优化过程中, 可根据要求跟踪某物质对的优化. 采用峰高分离度 K_3 作为分离指标而不用总分离效能指标 K_1 , 在于 K_3 更能反映峰高不一致样品和峰形不对称的分离情形.

(3) 在色谱峰相同和 K_3 满足分析要求的情况下, 使分析时间越短越好.

为了使用方便, 我们可把串行优化的思想公式化, 也就是用一个数值来反映一张色谱图的质量. 我们知道, 峰数是一个整数, 最难分离的物质对 K_3 可用三位数表示, 分析时间可用四位数来表示, 也就是说, 多因子串形色谱响应函数 $HCRF$ 可表示为等于或者大于 8 位的数值:

即 $HCRF$ 值: 8 7 6 5 4 3 2 1

其中 7 位以上表示峰数对 $HCRF$ 值的贡献, 7~5 位表示分离度对 $HCRF$ 值的贡献, 4~1 位表示分析时间对 $HCRF$ 值的贡献, 3 与 2 位之间是小数点. 因为分析时间越长, 则 $HCRF$ 值应越小, 因此对 $HCRF$ 的贡献可表示为 $100 - T$. 对峰数、最难分离物质对 K_3 及分析时间之间分别乘以权重系数 100 000, 10 000 和 1, 则得串行多因素色谱响应函数 $HCRF$ 的表达式为:

$$HCRF = 100\,000 \times n + 10\,000 \times K_3 + (100 - T) \quad (7.2)$$

由此可见, $HCRF$ 值吸取了并行 CRF 值的优点, 首次提出峰个数、分离度和分析时间三个不同的因素串联起来考虑应用于未知样品的优化, 避免了用并行方法对待这些不并行因素的缺点, 能够根据不同的分析目的进行不同的优化. 采用 $HCRF$ 的另一个优点是每个 $HCRF$ 都可直观地反映一张色谱图的分离情况. 比如 $HCRF = 80\,559\,211$ 则知峰数 $n = 8$, 最难分离物质对 $K_3 = 0.55$, 分析时间 $T = 100 - 92.11 = 7.89$ min.

在此优化指标的基础上, 卢佩章等人还发展出深度和宽度搜

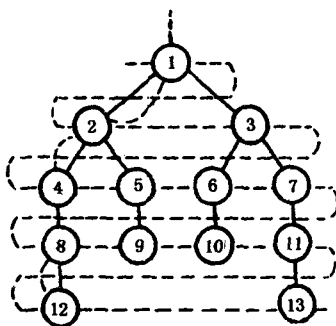


图7.11 液相色谱未知样品优化的搜索策略流程图

——深度优化搜索方法；
 ----宽度优先搜索方法。

索相结合的智能搜索方法。例如以图7.11中的13为搜索的最终目标，则最佳搜索途径是采用深度优先搜索，即1→3→7→13而得到最佳点，但如果采用搜索途径1→2→5→9则不能达到最佳点，这就是为什么单纯形优化不能找到最佳条件而产生局部优化的根本原因。单纯形搜索法实际上是一种深度优先的方法。要避免这种现象可采用宽度优先的策略，即以源头1开始，沿着1→2→3→…→13而一级一级地搜索下去。当所有的点搜索完，则

最佳条件也就找到了，但这样做的结果是实验太多，时间太长。如把深度优先和宽度优先的智能搜索方法结合起来，比如从1开始用深度优先搜索法到2，此时如果2是最差的响应点，则采用宽度优先而搜索实验点3。在实验点3如果发现响应函数最好，再采用深度优先的办法搜索实验点7，直至到达目标13。这种方法一方面避免了实验点太多的毛病，另一方面又能有效地避免单纯形局部优化的缺点。

§ 7.3.2 复合形和重复设计优化方法

复合形优化法^[46]是与单纯形优化法类似的一种方法，基本原理是在非线性约束的 n 维变量空间内，取 $n+2$ （或以上）个顶点构成复合形，然后对复合形各顶点目标函数值逐一进行比较，不断地丢掉最坏点，代之以既能使目标函数有所改进，又满足约束条件的新点，逐步逼近最优解。焦庆才等人^[17]将复合形算法进行改良，并引入组分的保留值方程建立了改良复合形优化法，并将其应用于液相色谱流动相最佳配比的计算机预测。

复合形优化法的原理、步骤及其特点都与单纯形优化法相

似，与单纯形法的不同点在于：

(1) 复合形的顶点数多于单纯形；

(2) 改良的复合形法利用初始复合形顶点的实验结果，拟合得到各组分的保留值方程，并通过计算机预测新的复合形顶点的分离结果以代替具体的色谱实验。

以上两点不同导致了一方面复合形法的重复迭代的次数比单纯形法显著增加，但改良后的复合形法的实验次数却大为减少，并在一定程度上减小了单纯形法局部优化的可能性；另一方面改良复合形法也失掉了单纯形法的“黑箱法”特性，不能对未知样品进行优化。

虽然改良复合形优化法引入了样品组分的保留方程进行寻优，在一定程度上减小了单纯形法导致局部优化的可能性，但是它对初始复合形顶点的选择只要求流动相浓度配比尽量大，而对实验点在参数空间内的分布情况不加限制，因此通过这些实验点的结果拟合得到的保留方程并不能精确地描述整个参数空间内组分的保留行为，得不到整个参数空间内精确的响应值界面。并且这一方法仍然是一种“爬山式”的寻优方法，当响应值界面存在多个极值的情况下仍然有可能只选择一个最幸运的极值点为最优点，导致局部优化。

Sdoenmakers 和 Drouen 等人^[23,24]提出的重复设计法，在色谱条件优化中也得到了比较广泛的应用^[47,48]，其基本原理可用图7.12表示。

这一方法从尽量少的初始实验点（在单变量优化中，初始实验点为两个边界点，在两个变量的优化中，初始实验点为4个边界点和一个中心点）开始，用一个简单的各个数据点间线性插入的保留值模型，计算求得某一优化指标的响应值界面，然后通过预测定位一个最优点，如果此点满足条件，则结束优化，否则在这一点条件下做一次实验，将结果线性插入保留值界面，再预测新的最优点，直至找到最佳分离条件。

重复设计法在单变量优化和双变量优化中的应用可分别参照

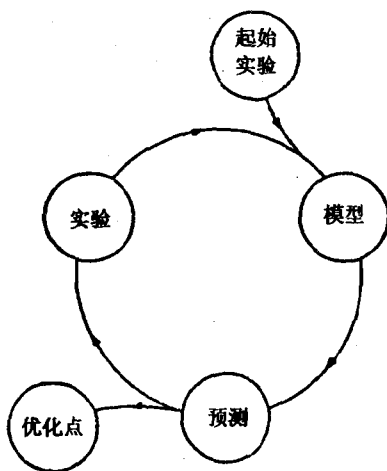


图7.12 重复设计法的操作示意图

图7.13 和图 7.14 .

重复设计法的优点为：

- (1) 实验次数比较少，而精度比较高；
- (2) 相对来说，计算量比较小；
- (3) 对响应函数的要求不高；
- (4) 可以用于多变量优化。

重复设计法也存在很多缺陷，如

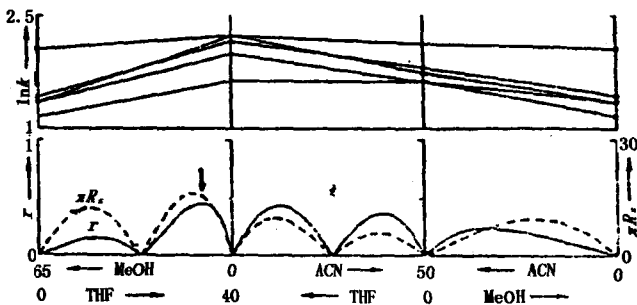


图7.13a 单变量重复设计优化初始设计图

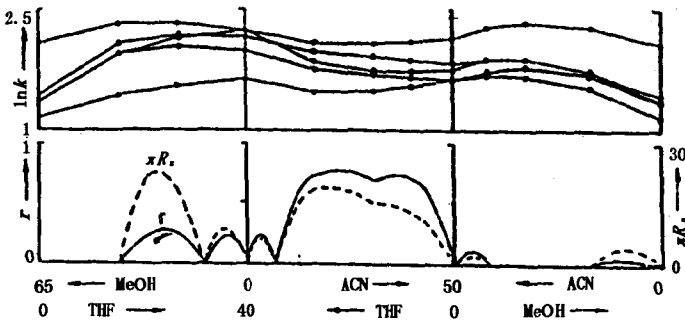


图7.13b 单变量重复设计优化结果示意图

(1) 要求峰组分离别, 不能对未知样品优化;

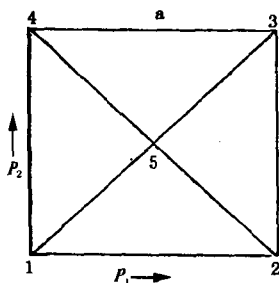


图7.14a 双变量重复设计
优化初始设计图

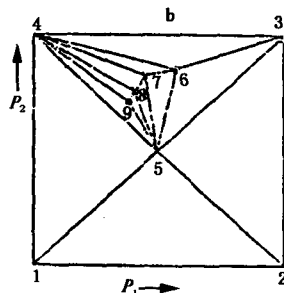


图7.14b 双变量重复设计
优化结果示意图

(2) 自动优化比较困难;

(3) 只能用于简单样品 (组分比较少的样品) 的优化;

(4) 有可能存在大面积的参数空间未被搜索到, 在这种情况下, 全局优化可能被忽略, 只能得到局部优化;

(5) 在多数情况下, 组分保留值与色谱参数间并不是线性关系, 通过线性插入得到的保留值界面与实际的保留值界面有一定的差别, 求得的响应值界面与实际的保留值界面有一定的距离,

因此求得的响应值界面与实际情况可能会相去甚远，这就决定了由此方法得到的最优点很可能是一个局部优化点。

因此，重复设计法也是一个局部优化方法。

李瑞江和邹汉法等人^[49,50]利用均匀设计方法的特点，结合并行优化和串行优化方法的思想，建立了均匀-重复设计优化方法用于液相色谱多元流动相组成的优化。图7.15是均匀-重复设计优化方法的流程示意图。均匀-重复设计的具体操作步骤如下：

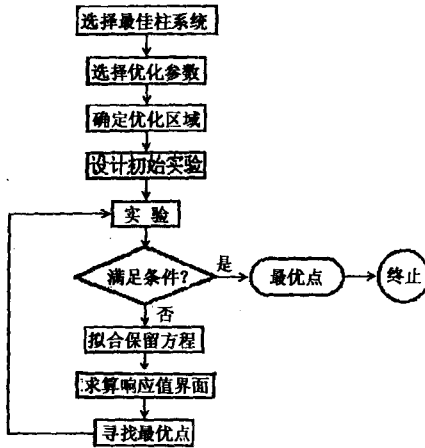


图7.15 均匀-重复设计优化法的原理示意图

1. 选择最佳的柱系统

液相色谱操作条件的优化，只有在最佳的柱系统条件下进行才有意义^[4,38]，因此在进行条件优化以前，首先需要选择对样品的分离最为合适的柱系统。最佳柱系统的获得可以通过以下途径：

- (1) 通过文献或色谱专家的经验获得；
- (2) 通过实验的比较和筛选；
- (3) 利用有关柱系统推荐的色谱专家系统的知识和计算机软件获得。

2. 选择优化参数

在高效液相色谱中，优化意义比较大的色谱参数有流动相中有机溶剂的浓度、添加剂的浓度、缓冲液浓度、pH值等等，而在反相离子对色谱中则主要是为流动相有机溶剂浓度、离子对试剂的浓度、缓冲液浓度、pH值、离子强度等等。在优化工作中，实际选择哪些参数进行优化需要根据待分析样品的组成和性质，选择与样品组分保留关系最直接，对组分的保留值和选择性影响最大的色谱参数作为优化参数。

3. 确定优化区域

在优化参数选定以后，需要为各个参数确定合适的范围，以确定优化区域。所谓合适的范围，就是指在此范围内样品组分的保留值不致太大，也不会太小，太大则分析时间太长，太小则所有的组分都在很短的时间内流出色谱柱，大多都重叠在一起。确定优化区域的原则是在可能的条件（能够准确地测出各组分的保留值）下，使参数的范围尽可能的宽，以期全面地考察样品在整个参数空间内的分离情况，确保最优点在优化区域以内。优化参数的合适范围（优化区域）的确定，可以通过以下几条途径：

- (1) 有关被分离样品的文献资料；
- (2) 色谱专家的知识 and 经验；
- (3) 通过预先的线性梯度实验（或等度实验）获得有机溶剂强度等参数与各优化参数间的基本关系，来确定各参数合适的范围。

4. 设计初始实验

为了以尽量少的实验全面地考察优化指标在整个优化区域内的变化情况，需要知道能够比较准确地描述样品在优化区域内保留值规律的方程。这就要求初始实验点均匀地分布于整个优化区域内，每一个点都具有充分的代表性，通过这些有代表性的实验可以获得样品保留值在优化区域内随各参数变化的规律。为此，需要以均匀性出发的科学试验设计方法来设计初始实验，诸如均匀设计法和匀壳设计技术等等。

5. 在设计的实验点做初始实验

6. 拟合保留方程

由初始实验得到的实验数据,按照一定的保留值模型拟合样品中各个组分的保留值方程.由卢佩章等人提出的液相色谱多元保留值方程可以很好地描述溶质的液相色谱保留行为,比较准确地预测溶质的保留值;而由邹汉法等人^[51,52]提出的反相离子对色谱保留值方程可以很好地描述溶质在反相离子对色谱(RP-IPC)中的保留行为.

另外,由初始实验的实验结果,还可以计算出色谱半峰宽规律式^[53] $W_{1/2} = a_w + b_w \cdot t_r$ 中 a_w 和 b_w 的值,由此规律式使可以预测出不同条件下组分峰的半峰宽.

7. 求算响应值界面

使每个参数按一定的步长变化,将优化区域分成许多大小相等的网格,按拟合得到的组分保留值方程和半峰宽规律式预测各组分在网格交叉点的保留值和半峰宽,模拟样品中各组分的流出情况(谱图模拟),依次计算各相邻峰之间的总分离效能指标 K_1 的值,若 $K_1 > 1.0$,那么两组分有一定的分离,在谱图上出现两个峰,若 $K_1 \leq 1.0$ 则两组完全重叠,在谱图上只出现一个峰.按下式计算出串行色谱响应函数(HCRF)的数值:

$$HCRF = 100\,000 \times n + 10\,000 \times K_{1\min} + (T_D - T_L) \quad (7.3)$$

式中 n 为出峰的数目; $K_{1\min}$ 是已分出的峰中最难分离物质对(K_1 最小)的 K_1 值,当 $K_{1\min} > 3.0$ 时,最难分离物质已得到满意分离,继续追求更大的分离度意义不大,此时应该更多地考虑分析时间因素对HCRF的贡献,因此令 $K_{1\min} = 3.0$; T_L 是最后一个峰的出峰时间, T_D 是为完成某一分析任务可以接受的时间限制,如果分析时间超过这一限制,那么再好的分离条件也没有实际意义,所以当 $T_L < T_D$,则令 $HCRF = 100\,000.00$ (HCRF的最小值), T_D 的设定除对分析时间加以限制外,一般对优化结果的影响不大.

计算出每个点的HCRF值,便得到了整个优化区域的HCRF

响应值界面。

8. 寻找最优点

在得到的响应值界面上，找出 $HCRF$ 最大的点，此点所对应的色谱分离条件就是得出的第一个最佳分离条件，我们称之为优化点 (optimization point)。

9. 重复优化循环

如果得到的第一个优化点不能满足优化终止条件，则重复步骤 5~8，在这点对应的条件下做实验，将实验结果与初始实验的结果加到一起，重新拟合各组分的保留值方程（相当于用这点的结果修正原有的方程），在修正后的响应值界面上找出新的优化点，判断这个优化点是否满足优化终止条件，若不满足则继续 5~8 的优化循环，直到满足优化为止。如果优化点已满足优化终止条件，则终止优化过程，这些点中 $HCRF$ 值最优的点就是最优化的分离条件，我们称之为最优点 (optimum)。优化终止的条件如下：

- (1) 得到的优化点的响应值差于前一个优化点；
- (2) 得到的优化点的位置（所对应的优化参数值）与前一个优化点相同；
- (3) 得到的优化点的分离效果已经满足分析要求，分析者认为没有必要继续寻找更优的分离条件。

只要其中一个条件得到满足，则优化过程可以终止。

我们以氨基苯磺酸和氨基萘磺酸类样品分离条件最优化来说明均匀-重复设计优化方法的应用。根据色谱专家系统柱系统推荐的规则，这一类样品应选用反相离子对色谱模式，选用的流动相应为甲醇/水缓冲液加入适当的离子对试剂四丁基碘化铵。由于甲醇浓度和离子对试剂浓度对分离过程有重大影响，因此选用这二种参数为优化参数。由原来的研究结果可以确定甲醇浓度 (C_b) 范围为 13%~34%，离子对试剂浓度 (C_Q) 范围为 0.20~12.00mmol/L，以此构成优化区域。按照均匀-重复设计的思想和方法，设计 8 个初始实验点，其冲洗剂组成见表 7.4。由 8

个初始实验结果得到的保留值和色谱峰半峰宽，可由式 (7.4) 拟合得到各组分的保留值方程系数 a , b , c , d 和 e 值:

表7.4 氨基苯磺酸和氨基萘磺酸优化中各实验点优化参数值及各点的响应值

实验		$C_b(\%)$	$C_Q(\text{mmol/L})$	HCRF
初 始 实 验 点	1	34.0	10.00	1 110 881.32
	2	31.0	4.00	1 213 189.51
	3	28.0	12.00	1 214 255.22
	4	25.0	6.00	1 311 245.91
	5	22.0	0.20	718 193.00
	6	19.0	8.00	100 000.00
	7	16.0	2.00	100 000.00
	8	13.0	0.60	1 218 457.43
优化点	9	15.0	1.00	1 414 049.04
	10	14.0	0.80	1 515 853.59
最优点	11	14.0	0.73	1 517 257.98
结束点	12	14.0	0.75	15 172 573.98

$$\ln k' = a + b \ln C_b + c C_b + d \ln C_Q + e C_Q \quad (7.4)$$

同时可按半峰宽规律得到色谱峰的半宽度与保留值的线性关系为

$$W_{1/2} = 0.061 + 0.027 t_r \quad (7.5)$$

由此，可以利用式 (7.4) 和 (7.5) 预测不同甲醇和离子对试剂浓度下溶质的保留值和半峰宽，进一步可计算出式 (7.3) 中的 HCRF 值，得到整个优化区域的 HCRF 的响应界面。

比较各点的响应值，找出 HCRF 值最大的点（第一个优化点）对应的流动相组成为甲醇的体积分数 $C_b = 15.0\%$ ；TBAI 的浓度 $C_Q = 1.00 \text{ mmol/L}$ ，其中 HCRF 值为 1 414 050.90，即在此条件下，可以分出 14 个峰，已分出的峰中的最难分离物质对

的分离度 $K_{1\min} = 1.40$ ，最后一个峰（15号峰）的保留时间为 49.10 min. 在这一点进行第 9 次实验，图 7.16 是此条件下的实验谱图。

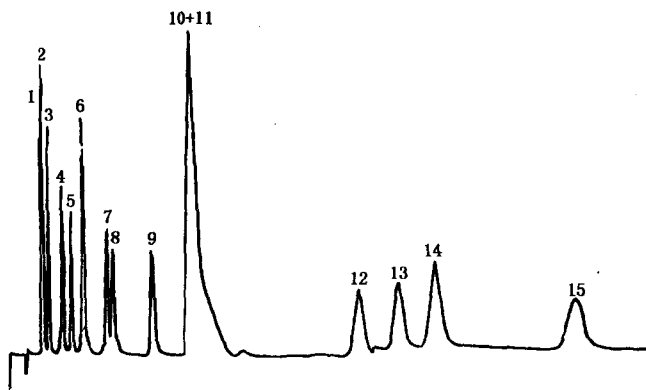


图 7.16 氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在优化点 9 的实验谱图

色谱柱：150mm×4.6mm i. d. 填充 $5\mu\text{m}$ Spherisorb ODS 不锈钢柱；

流速：1.0 ml/min； $\lambda = 254\text{nm}$ ；MeOH (15.0%)，TBAI (1.00mmol/L)； KH_2PO_4 (10mmol/L)，KCl (15mmol/L)；pH=7.0

色谱峰：1. 2, 4-二氨基苯磺酸；2. 4-氨基苯磺酸；3. 3-氨基-6-甲氧基苯磺酸；4. 3-氨基苯磺酸；5. 2, 4-二氨基-1, 5-苯二磺酸；6. 2-氨基-1, 4-苯二磺酸；7. 3-氨基苯磺酸；8. 3-氨基-6-甲氧基苯磺酸；9. 5-氨基萘磺酸；10. 3-氨基-1, 5-萘二磺酸；11. 2-氨基-5-甲氧基苯磺酸；12. 3-氨基-2, 7-萘二磺酸；13. 2-氨基-5-甲氧基苯磺酸；14. 5-氨基-2-萘磺酸；15. 7-氨基-1, 3, 5-萘三磺酸。

将实验 9 得到的实验结果与初始实验的实验结果合并，由式 (7.4) 拟合各组分新的保留值方程，按照相同的步骤，求算响应值界面，得到第二个优化点，其流动相组成为 $C_b = 14.0\%$ ； $C_Q = 0.80\text{ mmol/L}$ ，做第 10 次实验。

优化点 10 的 HCRF 值为 1 515 853.59，大于优化点 9 的响应值，不满足优化终止的条件，继续优化循环，得到第三个优化点，其流动相组成为 $C_b = 14.0\%$ ； $C_Q = 0.75\text{ mmol/L}$ ，在此条

件下的实验（第 11 次实验）谱图见图 7.17。

优化点 11 的 $HCRF$ 值为 1 517 257.43，不满足终止条件，继续进行优化循环，预测得到的优化点 12 与优化点 11 的流动相组成完全相同，满足优化终止条件 (2)，优化过程终止，优化点 11 为最优点，最优分离条件为甲醇体积分数 14.0%，TBAI 的浓度为 0.75 mmol/L。

表 7.4 列出了在初始实验点，优化点和最优点甲醇的体积分数 C_b ，TBAI 的浓度 C_Q 以及响应值 ($HCRF$)。

均匀-重复设计优化方法对氨基苯磺酸和氨基萘磺酸经过四次优化循环，得到两个优化点 9 和 10 最终得到最优点 11。

结果表明随着优化过程 (9→10→11) 的进行，无论是最大偏差还是平均偏差，都在逐渐减小，说明预测的准确度越来越好，由保留方程计算出的响应值界面与实际界面符合得越来越好，预测的优化点与实际最优点越来越接近，优化的精度随优化过程的进行而逐渐提高。

均匀-重复设计优化法有两个原则：一是“均匀”，本法以均匀性出发的试验设计方法安排初始实验点，使其均匀地分布于整个优化区域内，具有充分的代表性，通过这些具有代表性的实验点的实验结果拟合得到的组分的保留值方程基本上可以很好地描述样品各组分在优化区域内的保留值规律，可以对组分在优化区域内的保留值做出比较准确的预测，因此经过第一次优化很容易找出全局最优优化区域，从而克服了串行优化法中的单纯形法盲目地选择一个最幸运的极值区域去寻找优化点、重复设计法经常导致大面积区域未被优化，从而可能导致局部优化的缺点；二是“重复”在找到第一个优化点后，以此点为新的起点，重复优化过程，不断地修正保留值方程和响应值界面使得预测保留值越来越准确，最优优化区域内的响应值界面与实际情况越来越符合，优化结果与实际最优点越来越接近，优化精度也越来越高。从而克服了传统的并行优化法优化精度低的缺点。

均匀-重复设计优化法的步骤 1→8，与传统的并行优化法的

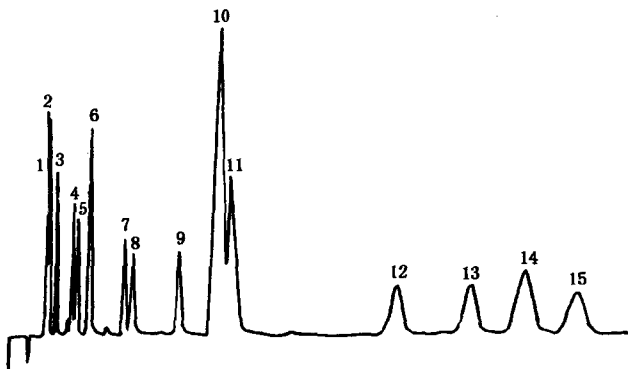


图7.17 氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在最优点(11)的实验谱图
 色谱柱: 150mm×4.6mm i. d. 5 μ m Spherisorb ODS 不锈钢柱;
 流速: 1.0 mL/min; $\lambda = 254\text{nm}$; MeOH(14.0%), TBAI(0.75mmol/L);
 KH₂PO₄(10mmol/L), KCl (15mmol/L); pH=7.0
 图7.17中数目所代表的色谱峰与图7.16相同。

思想和步骤类似, 通过这些步骤很容易找到全局最优化区域(global optimal area). 在原理上, 本法与传统并行优化法的区别在于传统的并行优化法在找到第一个优化点后, 便终止优化, 把这一点当作最优点(optimum); 而本法只是把这个优化点当作寻找最优点的一个新起点, 在这点的基础上寻找全局最优化区域精确的极值点. 步骤9的优化循环类似于传统的串行优化法的思想, 通过循环逐渐逼近精确的最优点. 本法与传统串行优化法的区别在于本法是根据样品组分的色谱保留值方程, 从优化得到的全局最优化区域开始优化循环的, 优化结果是比较可靠的全局最优点; 而传统的串行优化方法(如单纯形法)是在不考虑色谱保留值关系的情况下, 从几乎任选的实验点开始的, 优化结果有可能只是一个局部优化点.

§ 7.3.3 “窗口图形法”和“重叠分辨率法”

Simplex 优化方法采用一个单一的响应值指标的数值来反映

色谱图的分离质量，对于未知样品的分离条件优化往往会产生局部优化，而且相同的 CRF 值的色谱图，它们的分离情况差别很大。因此，对于已知样品的分离条件的最优化，许多色谱工作者都选“窗口图形”和“重叠分辨分离度”优化方法。

1. 窗口图形法

窗口图形法最初由 Laub 和 Purnell 提出，用于气液色谱中二元固定液组成的选择^[52]。基于单个地比较每个峰对的分离因子 α ，选出最难分离物质对的分离因子使之达到最大值，以最小的分离因子对固定液组成作图可得到所谓的“窗口图形”（window diagram），从窗口图形可以确定最佳的固定液组成。这里以 Laub 和 Purnell 最初提出的窗口图形法的例子说明该方法的具体步骤。至于在液相色谱中使用，其原理相同。

如图 7.18 所示， K_R 是样品组分在二元固定液中的分配系数，它与二元固定液的组成成线性关系。图中假定有 4 个样品组分 X, Y, Z 和 W。组分 Z 的直线与其它三条线都交叉（交叉点的保留值），这表现为随着二元固定液的组成 φ 从 0 到 1 改变，组分 Z 的保留值变化最大，它与其它三个峰的出峰顺序随着 φ 的改变而颠倒。

α 为峰对间的相对保留值， $\alpha = K_{R_1}/K_{R_2}$ ($K_{R_1} > K_{R_2}$)。图 7.19 是所有峰对间 (XY, XZ, XW, YZ, YW, WZ, 共 6 对) 的 α 值与二元固定液组成的关系图。按通常习惯，总有 $\alpha > 1$ ，因此当由于 φ 的变化，引起峰对的二峰顺序变化时（峰序的翻转）， α 的定义改为， $\alpha = K_{R_2}/K_{R_1}$ ($K_{R_1} < K_{R_2}$) 以保证仍有 $\alpha > 1$ 。图 7.19 表明峰序翻转时， α 对 φ 的曲线呈现“V”形。

窗口图形法所感兴趣的在于图 7.19 中的阴影部分，Laub 和 Purnell 称之为“窗口”。最佳二元固定液的组成必定在这样一个窗口上，该窗口有最大的 α 值。例如图 7.19 中在 $\varphi_A = 0.12$ 时对应的窗口有最大的 α 值 ($\alpha = 1.23$)，此 α 值是所有二元固定液组成下最难分离物质对所具有的最好分离度；其它 φ_A 值下，最难分离峰对的 α 值都小于此值。因此， $\varphi_A = 0.12$ 被认为是最佳

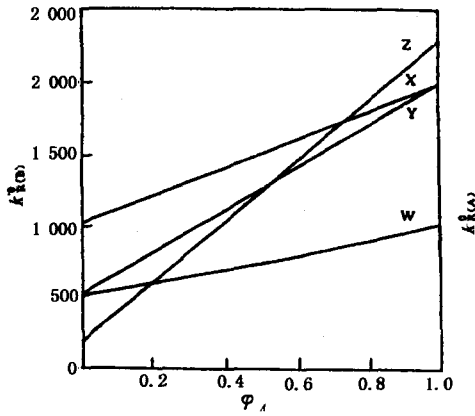


图7.18 K_R 对 φ_A 的线性关系图

的二元固定液组成。

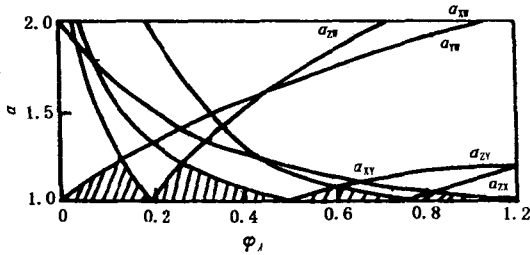


图7.19 α 对 φ_A 的关系图

窗口图形的法从最难分离物质对的分离着眼，充分考虑了样品组分的分离情况，选择的最佳浓度点能使各组分得到最大限度的分离，这正是 HPLC 分离的目标之一。除了使用分离因子 α 来衡量峰对的分离不妥外，该方法还是可以实用的。它不仅可以选择出最佳的组成点，而且能指出在某一色谱体系下，某组样品所能达到的最好分离效果。

应当指出的是，使用分离因子 α 来衡量峰对的分离是不妥

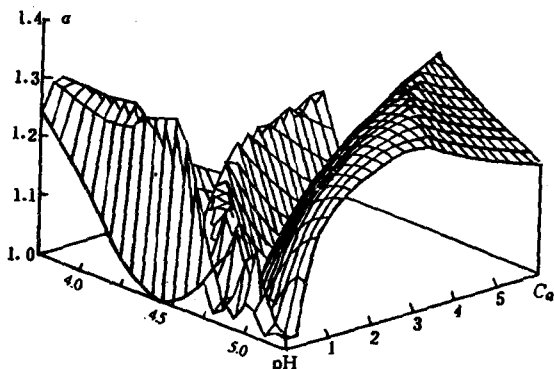


图7.20 9种组分的二维窗口图形

的。 α 是两相邻峰的容量因子 k' 的比值 ($\alpha = k'_{i+1}/k'_i$)。当 k' 不同时 (即出峰时间不同), 相同的 α 值, 则 k'_{i+1} 与 k'_i 差值相差很大。例如, 为满足 $\alpha = 1.1$, 当 $k'_i = 0.02$ 时, $k'_{i+1} = 0.022$, $\Delta k' = 0.002$; 而当 $k'_i = 2$ 时, $k'_{i+1} = 2.2$, $\Delta k' = 0.2$, 这两种情况下分离标准受两峰的实际出峰时间影响很大, 相同的 α 值, 得到的是不同的分离。

对于稍复杂的样品, 确定窗口图形 (即各组分的分离度随浓度改变的图形) 是困难的。认为 k' 与组成之间的关系为线性关系也不够准确。窗口图形法只是考虑了分离效果, 并没有同时考虑分析时间。情况往往是这样的, 窗口图形法所预测的最佳组成点可以提供好的分离, 但是分析时间却相当长, 而存在另一些组成点, 分析时间短, 分离也较好, 但该方法的结果却不在这一点。

1978年, Deming 等人将窗口图形法用于液相色谱分离条件的最优化^[53], 以后, 又有大量的窗口图形法用于 HPLC 优化的报道。有兴趣的读者可参阅文献 [54]。以下给出的是窗口图形法用于离子对色谱中流动相 pH 值和离子对试剂浓度最优化的实例。图7.20 给出的是 9 种有机酸的 α 值与流动相和离子对试剂

浓度的二维窗口图形。从图7.20中可以看出当流动相的 pH 5.6 和 $C_Q = 0$ mmol/L 时, 至少有一对溶质的分离非常差。图7.21给出的是在此条件下实验得到的色谱图, 从图7.21中可以看到9种组分只有6个色谱峰, 没有得到良好的分离, 这与预测结果是一致的。图7.20的结果还表明在 pH 5.8 和 C_Q 3.2mmol/L 时, 9种组分能获得良好的分离, 其实验所得的色谱图如图7.22所示。从图7.22可以看到9种组分得到较好的分离, 这与预测结果相同。

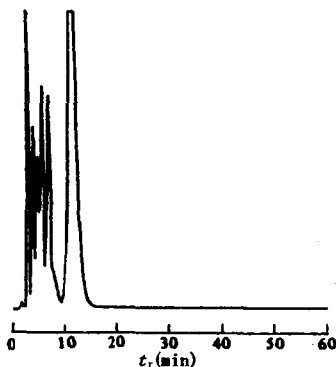


图7.21 9种有机酸在甲醇/水(20/80)内含 10mmol/L 乙酸盐(pH5.6)和离子对试剂辛胺 $C_Q=0$ mmol/L 为流动相时的分离情况

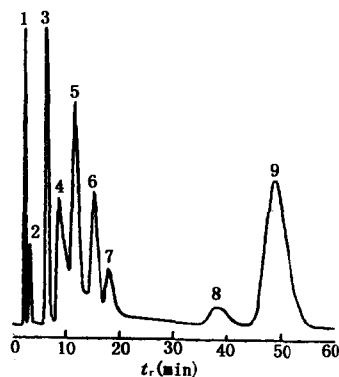


图7.22 在窗口图形法预测的优化条件 pH=5.8 和 $C_Q=3.2$ mmol/L(其它条件与图 7.21 相同)时的 9 种有机酸、碱的色谱分离图

色谱峰: 1. 苯乙胺; 2. 苯丙氨酸; 3. 香草酸; 4. 反式咖啡酸; 5. 对反式香豆酸; 6. 反式阿魏酸; 7. 苯基乙酸; 8. 苯基丙酸; 9. 反式肉桂酸。

2. 重叠分辨图法 (Overlapping Resolution Mapping, ORM)

重叠分辨图法 (ORM) 是 Glajch 等在 1980 年提出的选择 HPLC 中最佳流动相组成的一种方法^[55]。使用该方法最少可以通过 7 次实验确定出最佳流动相组成。1982 年 Antle^[56]发表的工作采用 ORM 法对 5 种甾类化合物的分离进行了优化。现对

ORM法简述如下：

(1) Glajch 的实验工作采用了反相色谱法，使用的溶剂是 MeOH, ACN 和 THF (可分别在这种溶剂中加入水以调节溶剂强度)。三种溶剂分别标记为 A, B 和 C。

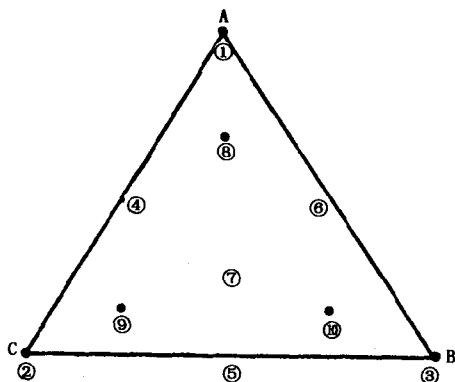


图7.23 实验浓度点

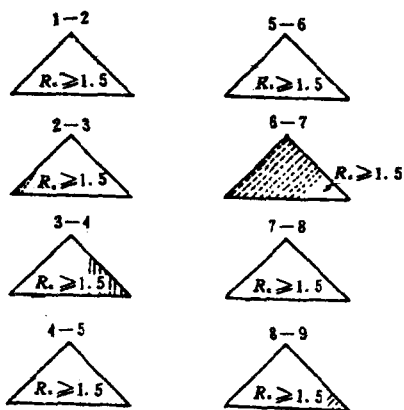


图7.24 9种溶质的8个峰对的 R_s 图

(2) 首先在选定的若干个浓度点进行实验，如在图7.23中

10个点的条件下测定溶质的保留值。

(3) 由下式计算出所有相邻峰的分离度 R_s 值

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} (\alpha - 1) k' / (k' + 1)$$

式中 $\alpha = k'_{i+1} / k'_i$, $k' = \frac{1}{2} (k'_{i+1} + k'_i)$ 。

(4) 按照已知的经验关系式计算出非实验浓度点上样品组分的保留值, 进而求出在这些点上样品组分峰的分辨率。

(5) 在整个溶剂浓度变化范围内画出所有峰对的 R_s 图。例如图7.24是9种取代苯的8个峰对的 R_s 图。

(6) 选取 R_s^* 值作为标准, 如取 $R_s^* = 1.5$ 时, 峰对4-5, 5-6, 7-8在所有的溶剂组成下均能很好地分离。将其它峰对分辨图(峰1-2, 2-3, 3-4, 6-7, 8-9)重叠起来, 如图7.25所示, 可见在区域A内, 所有峰对的 R_s 大于1.5, 则该区域的溶剂组成为可用组成。在每个浓度点上, 都可以获得这样一张重叠分辨图, 使用计算机可以获得任意浓度下的重叠分辨图。选取一张重叠分辨图, 使得该图中某区域 $R_s > R_s^*$, 则该区域的溶剂组成可作为最佳组成, 能提供最好的分离。

Kirkland等^[57]又把重叠分辨图法用于梯度冲洗剂条件的最优化。

ORM法能够以少量的实验获得较好的流动相组成点, 使之提供样品的较好分离, 由于ORM是分别地考虑了所有峰对在整个浓度范围内的分辨率 R_s , 而不是采用 R_s 的加和或乘积, 因而与色谱响应函数 CRF 相比, ORM法能够得到较精确的结果。当流动相组成变化引起出峰顺序的颠倒时, ORM法处理较 CRF 法容易也是由于ORM法把每个峰对都单独处理的结果。ORM法的缺点是在确定峰对 R_s 值随流动相组成的变化曲线时, 由于只有很少的实验点, 不可避免地造成较大的偏差, 这给确定最佳流动相的组成带来一定的误差。另外, 该法没有考虑分析时间的要求, 往往在很多流动相组成下, 样品能得到较好的分离, 但分

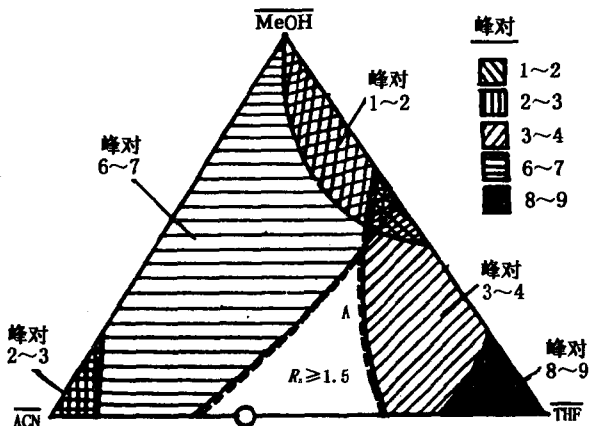


图7.25 峰对的 R_s 重叠图

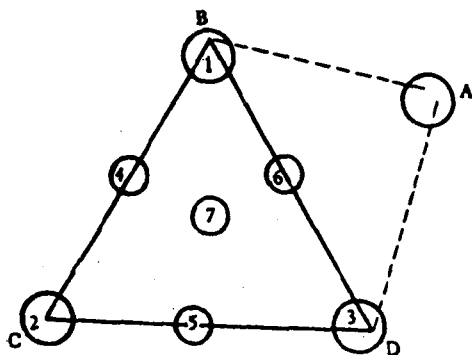


图7.26 用于 ORM 优化的初始实验点的流动相组成

流动相 A: 甲醇; 流动相 B: 100mmol/L 柠檬酸和 20mmol/L 三乙胺水溶液 (pH2); 流动相 C: 流动相 B 由 NaOH 调至 pH7.5; 流动相 D: 200mmol/L 正己磺酸和 20mmol/L 三乙胺水溶液, pH 值由柠檬酸调到 5.4.

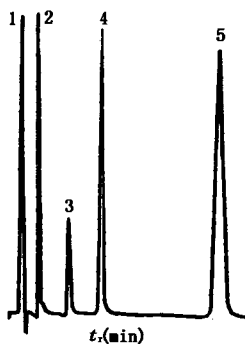


图7.27 反相离子对色谱中5种水溶性维生素在ORM优化方法预测的分离条件下的色谱图

固定相: $150 \times 4.6\text{mm i. d.}$ 填充 Zorbax- C_8 载体;流量: 3mL/min ;柱温: 50°C .ORM 预测的流动相组成为 $13.1\% \text{A}$, $59.5\% \text{B}$, $5.2\% \text{C}$ 和 $22.2\% \text{D}$.

色谱峰: 1. V_C ; 2. 烟酰胺; 3. 吡醇;
4. V_{12} ; 5. V_{BI} .



图7.28 抗抑郁药物在ORM预测的优化条件下的色谱分离图(除预测的流动相为 66.7% , $4.1\% \text{C}$ 和 $29.2\% \text{D}$ 以外, 其它条件与图7.27 相同)

色谱峰: 1. Protryptiline; 2. 去郁敏; 3. nortryptiline; 4. doxepin; 5. 丙咪嗪; 6. 阿米替啉.

析时间相差很大. ORM 法没有提供选择分析时间较短的冲洗到组成的方法.

Goldberg 等人^[58]对 ORM 优化方法在离子对色谱分离中的应用作了很好的研究工作, 被优化的色谱参数包括有机溶剂浓度、离子对试剂浓度和流动相 pH 值. 所选用的起始 7 个实验点的组成如图 7.26 所示. 图 7.27 给出的是 5 种水溶性维生素在 ORM 预测的优化条件下的色谱分离图. 图 7.28 则是 6 种抗抑郁药物在 ORM 方法预测的优化条件下的分离结果, 这两类化合物都获得良好的分离.

邹汉法等^[59,60]发展出“移动重叠分辨分离度”方法用于多阶梯梯度曲线的分离条件最优化. 该方法具有两大优点, 一是采

用了多阶梯梯度淋洗方法，二是考虑了每一阶梯组分在柱内的运动过程对分离度和保留时间的影响。该优化方法选择以半峰宽分离度 R_s 作为评价色谱分离情况的指标。设样品含有 N 个组分，考虑分离度要求和分析时间这两个因素，提出多阶梯梯度最佳流动相浓度的指标是：

(1) 所有相邻峰的分离度无论在等度、台阶梯度或线性梯度时，都必须满足以下要求：

$$R_{sh} \geq R_{sreq} \quad h = 1, 2, 3, \dots, N-1 \quad (7.6)$$

式中 R_{sreq} 是定量分析精度所要求的半峰宽分离度指标。

(2) 使最后一个组分的出峰时间尽可能短，从而达到最短分析时间内完成样品的分离。

众所周知，在液相色谱等度冲洗下，半峰宽的分离度可写成：

$$\begin{aligned} R_{sh} &= \frac{t_0(1+k'_{h+1}) - t_0(1+k'_h)}{1/2[W_{1/2(h+1)} + W_{1/2(h)}]} \\ &= \frac{t_0(k'_{h+1} - k'_h)}{1/2[W_{1/2(h+1)} + W_{1/2(h)}]} \end{aligned} \quad (7.7)$$

但是在多阶梯梯度冲洗的液相色谱分离过程中， R_s 的表达式会更加复杂。我们不仅要考虑下一阶梯选择的浓度对分离度 R_s 和保留时间的影响，还必须考虑溶质在已经走过色谱柱内位置的差别对分离度 R_s 的影响。因此对多阶梯梯度液相色谱用于选择最佳分离条件的分离度指标的表达式为

$$R_{sh} = \frac{[1+k'_{h+1}] \cdot t_0 \theta_{(h+1)} - [1+k'_{(h)}] \cdot t_0 \cdot \theta_{(h)}}{\frac{1}{2}[W_{1/2(h+1)} + W_{1/2(h)}]} \quad (7.8)$$

式中 t_0 ， $k'_{(h)}$ ， $W_{1/2(h)}$ 和 $\theta_{(h)}$ 分别是第 h 号组分在某一浓度时的死时间、容量因子、半峰宽和剩余柱长百分比。

对于半峰宽可由半峰宽与容量因子的线性关系来求得：

$$W_{1/2} = a' + b'k' \quad (7.9)$$

式中 a' , b' 为常数, k' 为容量因子, 对于等度, 则 k' 就是该浓度下的组分的容量因子, 对于梯度, 则 k' 为虚拟容量因子.

对于剩余柱长百分比 θ :

$$\theta = 1 - M \quad (7.10)$$

其中 M 的求得可参阅文献 [63].

根据优化指标, 我们的优化思想是, 在流动相有机溶剂 C_m 浓度时使从 j_{m-1} 到 j_m 的组分都在大于分离度指标 R_{req} 下流出柱子, 并使总的分离时间尽可能短, 这意味着在使各组分得到满足要求的分离度前提下, 使浓度 C_m 尽可能高, 而在最后一个组分 C_m 流出色谱柱时马上就跳到下一浓度阶梯. 由此一步步地推下去, 就可获得最佳多阶梯梯度曲线. 由此可知, 这里已采用了“重叠分辨分离度”法来选择每一可接受的阶梯浓度, 但从整个多阶梯曲线的选择来看, 我们是不断追踪各组分在色谱柱内的位置的情况下, 来选择最佳浓度变化曲线, 因此, 把这一方法叫做“移动重叠分辨分离度”法.

这里以胆汁酸的多阶梯分离条件最优化说明“移动重叠分辨分离度”法在实际样品中的应用^[61]. 首先确定反相色谱为分离分析胆汁酸的分离模式, 选定流动相 pH 值为 5.6, 测定不同甲醇/水缓冲液配比下胆汁酸的保留值和色谱峰半宽度, 由关系式 $\ln k' = a + cC_b$ 和 $W_{1/2} = a' + b'k'$ 线性回归可以得以上二式中的系数 a , c 值和 a' , b' 值, 从而可由以上二式预测不同甲醇浓度下溶质的保留值和半峰宽. 进而把预测的保留值和半峰宽值代入式 (7.6) 中可以选择每一阶梯的最佳甲醇浓度. 这一优化过程可由计算机自动完成. 图 7.29 是由计算机运算得到的每一物质对可分离的甲醇浓度范围. 图 7.30 是由图 7.29 选择得到的最佳多阶梯线性梯度曲线. 图 7.31 是在图 7.30 选定的梯度曲线下胆汁酸各组分在色谱柱内的运动轨迹. 在图 7.31 中要指出的是最后一个流出色谱柱的溶质 GLC 与 TLC 其保留值相差甚大, 事实上可用增加梯度淋洗速率来缩短 GLC 的保留时间, 但由于在实际工作中选定的波长为 210nm, 淋洗速率过高, 会使基线吸光度

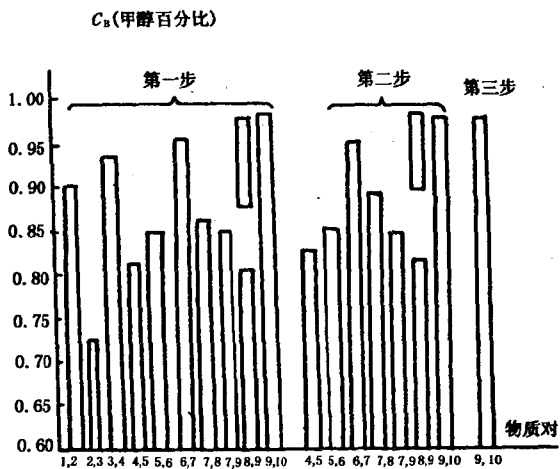


图7.29 10个胆汁酸组分的相邻物质对可分离的甲醇浓度范围
 1. TUDC; 2. GUDC; 3. TC; 4. GC; 5. TCDC; 6. GCDC;
 7. GDC; 8. TDC; 9. TLC; 10. GLC.

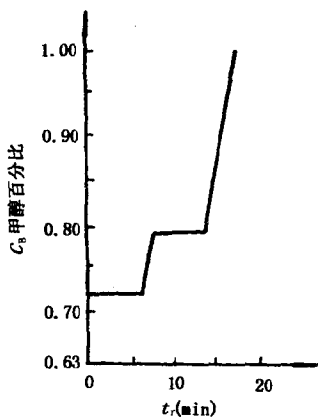


图7.30 理论预测的最佳二元溶剂多阶梯线性梯度曲线

的变化太大，导致样品检测有困难，所以在实验中冲洗 GLC 时选用的梯度速率为每分钟 0.06 甲醇体积分数。

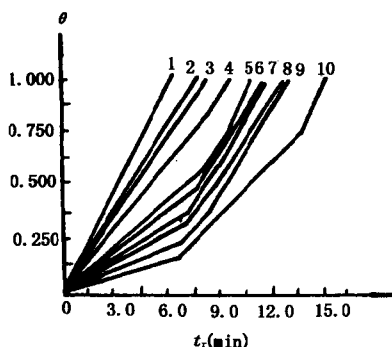


图7.31 10个胆汁酸组分在图7.30所示的梯度曲线下在色谱柱内的运动轨迹
1. TUDC; 2. GUDC; 3. TC; 4. GC;
5. TCDC; 6. GCDC; 7. GDC; 8. TDC; 9. TLC; 10. GLC.

表7.5 10个胆汁酸组分的实测保留值与理论预测值的误差情况

样品	实测值(min)	预测值(min)	相对误差(%)
TUDC	5.75	6.05	4.96
GUDC	6.82	7.50	9.07
TC	7.57	7.88	3.93
GC	9.12	9.50	4.00
TCDC	10.39	10.26	-1.27
TDC	10.92	10.73	-1.77
GCDC	11.80	11.68	-1.03
GDC	12.54	12.58	-0.16
TLC	13.77	13.06	-5.44
GLC	16.25	15.11	-7.54

图7.32是10个胆汁酸混合样品在预测得到的最佳梯度曲线下的实际分离图。在实际操作过程中，考虑到梯度滞后时间的影响，实际进样是在仪器执行梯度命令3.20 min以后进行的。表

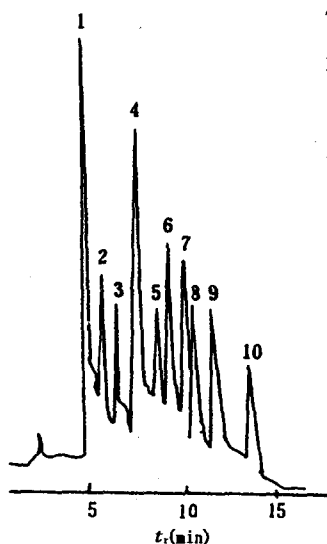


图7.32 10个胆汁酸组分在预测实验条件下的实际分离图

分离条件：色谱柱：250×4mm i.

d. 填充 10 μ m YWG-C₁₈；

流量：1.0 ml/min；A泵组成：甲醇/水（98/2）；B泵组成：甲醇/水（60/40）；A、B泵的冲洗剂 pH值和 KH₂PO₄ 浓度分别为 5.6 和 0.01mol/L；检测波长 210nm.

峰号同图7.31.

7.5列出的是各组分在实际梯度曲线下测定的保留值与理论预测值的比较结果。图7.32中的基线很不稳定，这是因为在210nm检测波长下，检测器对流动相中各成分的改变有很大贡献，尽管Waters-490紫外可见光检测器有基线扣除的功能，但由于实验和仪器本身存在一定的误差，仍使得基线不能重复，导致实际色谱分离图的基线不稳定。把图7.32中的分离结果与分离条件相近的等度分离结果进行比较，分析时间缩短了近三分之二，这充分说明了优化工作有很大的优越性。

从表7.5中可以看到，溶质GUDC和GLC的预测值与实测值误差较大，引起这一现象的原因除保留值方程的预测精度较差以外，还有一点是这两个胆汁酸组分对酸度的变化比较敏感，而所用酸度计的误差在 ± 0.1 pH范围内，且要真正测定有机溶剂水溶液中的酸度是相当困难的，所以由于冲洗剂酸度和测量误差会导致这两个溶质的实测保留值与理论值的较大误差。

本章我们介绍了几种比较成熟的，也是最常用的液相色谱分离条件最优化方法，对于已知样品，利用这些优化方法和计算机技术可以比较好地找到最佳化的液相色谱分离条件。国家色谱研

究分析中心已成功地发展出色谱分离条件优化软件包,在不久的将来会推向市场,以满足我国色谱研究和分析工作的需求. 色谱分离条件最优化所面临的挑战是未知样品的分离条件最佳化,但由于单纯形优化方法的缺陷,很多情况下有可能得不到理想的结果. 我们认为把未知样品转化为已知样品是解决未知样品分离条件最优化的最佳途径. 这里所指的已知样并非要知道化合物的结构,而是完成对色谱图每一个色谱峰的识别与跟踪就可以. 从未知样品色谱峰的跟踪可以得到每一个色谱峰所对应的保留值变化规律和色谱峰半峰宽规律,由此可以由介绍的各种优化方法实现对未知样品分离条件的最优化. 因此,在未知样品转化成已知样品过程中,色谱峰跟踪是关键问题. 我们正在尝试利用二极管阵列检测器,色谱峰面积、色谱峰形变化规律和保留值变化规律等实现色谱峰的跟踪.

参 考 文 献

- [1] J. P. Bounine, G. Guiochon and H. Colin, *J. Chromatogr.*, **298**, 1 (1984).
- [2] P. J. Schoenmakers, *Optimization of Chromatographic Selectivity*, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [3] L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd Ed., Wiley-Interscience, NY, p. 36, 1979.
- [4] 卢佩章、戴朝政, *色谱理论基础*, 科学出版社, 北京, 1989.
- [5] J. W. Weyland, C. H. P. Bruins and D. A. Doornbos, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 31 (1984).
- [6] D. R. Jenke and G. K. Pagenkopf, *Anal. Chem.*, **56**, 85 (1984).
- [7] P. Jones and A. Wellington, *J. Chromatogr.*, **213**, 357 (1981).
- [8] J. C. Berridge, *J. Chromatogr.*, **244**, 1 (1982).
- [9] S. L. Morgan and S. N. Deming, *J. Chromatogr.*, **112**, 267 (1975).
- [10] S. L. Morgan and Ch. A. Jacues, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 501 (1978).
- [11] J. L. Glajch, J. J. Kirkland, K. M. Squire and J. M. Minor, *J. Chromatogr.*, **199**, 57 (1980).
- [12] J. C. Berridge, *Analyst*, **109**, 291 (1984).
- [13] M. W. Watson and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, **51**, 1835 (1981).

- [14] K. Jinno and K. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **298**, 326 (1984).
- [15] W. Wegscheider, E. P. Lankmayr and K. W. Budna, *Chromatographia*, **15**, 498 (1982).
- [16] J. H. Nickel and S. N. Deming, *J. Liq. Chromatogr.*, **1**, 414 (1983).
- [17] 焦庆才、陈耀祖, *药学报*, **27**, 213 (1992).
- [18] 侯镜德、徐广通, *色谱*, **9**, 162 (1991).
- [19] D. R. Van Hare and L. B. Rogers, *Anal. Chem.*, **57**, 628 (1985).
- [20] J. Vajda and L. Leisztner, in H. Kalasz (ed.), *New Approaches in Liquid Chromatography*, Analytical Symposium Series, Vol. 16, Elsevier, Amsterdam, p. 103, 1983.
- [21] A. S. Kester and R. E. Thompson, *J. Chromatogr.*, **310**, 372 (1984).
- [22] D. L. Dunn and R. E. Thompson, *J. Chromatogr.*, **264**, 264 (1984).
- [23] P. J. Schoenmakers, A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet and L. de Galan, *Chromatographia*, **15**, 688 (1982).
- [24] A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet, P. J. Schoenmakers and L. de Galan, *Chromatographia*, **16**, 48 (1982).
- [25] P. J. Schoenmakers, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1865 (1987).
- [26] G. d. Agostino, L. Castagnetta, F. Mitchell and M. J. O' Hare, *J. Chromatogr.*, **338**, 1 (1985).
- [27] 黄红心、张玉奎、林丛敬、卢佩章, *色谱*, **10**, 125 (1992).
- [28] 曾秋成, *技术数理统计方法*, 安徽科技出版社, 合肥, 1982.
- [29] 秦建候、邓勃、王小芹, *分析实验室*, **4** (10), 45 (1983).
- [30] W. Lindberg, E. Johansson and K. Johansson, *J. Chromatogr.*, **211**, 201 (1981).
- [31] M. L. Cotton and G. R. B. Down, *J. Chromatogr.*, **259**, 17 (1983).
- [32] J. L. Glajch, J. J. Kirkland and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **238**, 269 (1982).
- [33] D. H. Doehlert, *Appl. Statist.*, **19**, 231 (1970).
- [34] Yuzhu Hu and D. L. Massart, *J. Chromatogr.*, **485**, 311 (1989).
- [35] 方开泰, *应用数学学报*, **3**, 363 (1980).
- [36] 薛娥娥、陈诵英, *色谱*, **7**, 253 (1989).
- [37] W. Spendley, G. R. Hext and F. R. Hinsworth, *Technometrics*, **4**, 411 (1962).
- [38] 卢佩章、张玉奎、梁鑫淼, *高效液相色谱法及其专家系统*, 辽宁科技出版社, 沈阳, 1992.
- [39] J. C. Berridge, *Anal. Chim. Acta*, **191**, 243 (1986).

- [40] J. A. Nelder and R. Mead, *Comput. J.*, **7**, 308 (1965).
- [41] Q. S. Wang, R. Y. Gao and B. W. Yang, *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 3111 (1991).
- [42] P. B. Ryan, R. L. Barr and H. D. Todd, *Anal. Chem.*, **52**, 1460 (1980).
- [43] 蔡小嘉、邓勃、白文敏, 高等学校化学学报, **12**, 1015 (1991).
- [44] 徐广通、侯镜德, 色谱, **10**, 1989 (1992).
- [45] P. C. Lu and H. X. Huang, *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 690 (1989).
- [46] 万耀青等编著, 最优化计算方法, 工人出版社, 北京, p. 258, 1983.
- [47] A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, **352**, 127 (1986).
- [48] J. K. Strasters, S. T. Kim and M. G. Khaledi, *J. Chromatogr.*, **586**, 221 (1991).
- [49] 李瑞江、邹汉法、赵瑞环、张玉奎, 中国科学 (B辑), **36**, 355 (1996).
- [50] 李瑞江, 高效液相色谱多元分离条件优化, 中国科学院大连化学物理研究所毕业论文, 1995.
- [51] H. F. Zou, Y. K. Zhang and P. C. Lu, *J. Chromatogr.*, **523**, 247 (1990).
- [52] 邹汉法、张玉奎、卢佩章, 离子对高效液相色谱法, 河南科学出版社, 郑州, 1994.
- [53] Zou Hanfa, Zhang Yukui and Lu Peichang, *Chinese J. Chemistry*, **9**, 238 (1991).
- [54] R. J. Laub and J. H. Purnell, *J. Chromatogr.*, **112**, 71 (1975).
- [55] S. N. Deming and N. L. H. Turoff, *Anal. Chem.*, **50**, 546 (1978).
- [56] S. N. Deming and L. F. Sun, et al., *J. Chromatogr.*, **485**, 15 (1989).
- [57] J. L. Glajch and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.*, **199**, 57 (1980).
- [58] P. E. Antle, *Chromatographia*, **15**, 277 (1982).
- [59] J. J. Kirkland and J. L. Glajch, *J. Chromatogr.*, **255**, 27 (1982).
- [60] A. F. Goldberg and L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **316**, 241 (1984).
- [61] 邹汉法、张玉奎、赖光德、卢佩章, 中国科学 (B辑), **3**, 158 (1989).
- [62] 邹汉法, 色谱专家系统的理论基础研究. 中国科学院大连化学物理研究所博士研究生毕业论文, 1989.
- [63] Zou Hanfa, Zhang Yukui and Lu Peichang, *Acta Chimica Sinica*, No. **6**, 511, (1989).

第八章 样品预处理技术

在复杂基体中低浓度有机化合物的分离和测定是分析化学所面临的一个挑战。虽然分析仪器的自动化程度日益提高，但在发展分析方法的同时，人们或多或少忽视了样品的预处理问题。然而在分析复杂样品，如血清或废水时，由于样品预处理不当，会发生定性定量错误和色谱柱寿命缩短等问题。因此样品预处理已成为分析方法发展的一个重要内容。一般说来，样品预处理要达到的目标如下^[1,2]：

1. 去除基体中干扰样品分析的杂质，提高分析精度和分离效果；
2. 提高被测定化合物检测灵敏度；
3. 提高样品与流动相的兼容性，从而改善定性定量分析的重复性。

样品预处理的内容繁多，如浓缩、稀释、超滤等。本章将介绍液相色谱分析中最常用的几种重要的样品预处理技术。

§ 8.1 液-液萃取

液-液萃取最早被用于样品预处理，这一方法可把有机化合物直接萃取到与水不相容的有机相中。液-液萃取的基本原理是Nernst在1891年提出的分配定律^[3]：在一定温度下，溶质在二种互不相溶的溶剂分配时，平衡浓度之比为一常数，这个常数称为分配常数 d ，在水-有机溶剂体系中：

$$[A]_0/[A] = d_A \quad (8.1)$$

式中 $[A]_0$ 和 $[A]$ 为有机相和水相中 A 的平均浓度。严格地讲，式 (8.1) 中的 d_A 应为活度之比。当溶质在二相中的形式

相同时，分配定律才适用。只有中性分子才可被萃取，而中性分子的活度受介质的影响较小，所以在应用分配定律时可用浓度代替活度。

实际工作中并不关心两相中溶质的存在形式，而是着眼于溶质分别在两相中的总浓度。两相中溶质的总浓度之比叫作分配系数 D 。溶质在两相中的分配系数与选用的萃取溶剂，水相的 pH 值和有机溶剂与水相的体积比值相关。液-液萃取的初始条件应尽可能选用溶质有较大溶解度的有机溶剂。如果溶质的液-液萃取回收率较低，可以通过连续几次的液-液萃取提高样品的回收率^[1,4]。但在实际应用中，通常采用过量的有机溶剂进行萃取，以节省操作时间。

§ 8.1.1 萃取溶剂的选择

被测定化合物的相对疏水性将决定萃取溶剂的选择。用于液-液萃取的有机溶剂必须满足：(1) 沸点低，以便可以在完成液-液萃取后很快可将有机溶剂挥发掉；(2) 溶剂的粘度低，以使与样品的基体相混合。表 8.1 列出的是按溶剂极性排序的一些常用

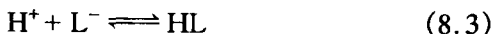
表 8.1 一些常用液-液萃取有机溶剂的物化性质

溶剂	沸点(℃)	溶剂极性(p')	水中溶解度(%)
正己烷	69	0	<0.01
四氯化碳	77	1.7	0.08
环己烷	81	0	0.01
氯仿	61	4.4	0.82
二氯甲烷	40	3.4	1.30
1,1-二氯乙烷	57		5.03
乙醚	35		6.04
乙酸乙酯	77	4.3	8.08

液-液萃取的有机溶剂^[1]。表8.1中有机溶剂在水中的溶解度是一个重要的因素，溶剂在水中的溶解度对萃取液中的共萃取干扰物质的含量有重要影响。一般来说，萃取的有机溶剂极性越小，萃取的选择性越好。因此，选择液-液萃取的有机溶剂在能溶解样品的前提下，极性应尽可能低。

§ 8.1.2 pH 值的控制

在液-液萃取中，萃取液的 pH 值范围很宽，但所采用的 pH 值应使被萃取的样品和萃取的有机溶剂（如乙酸乙酯）具有良好的稳定性。为了使萃取过程有良好的回收率，应当调节水相的 pH 值使溶质以中性状态存在。如以有机酸为例，其在水相和有机相的分配过程存在以下平衡：



有机酸在二相的分配系数可表示为

$$D = \frac{[\text{HL}_0]}{[\text{HL}] + [\text{L}^-]} = \frac{[\text{HL}_0]}{[\text{HL}] \left(1 + \frac{1}{K_a [\text{H}^+]} \right)} \quad (8.4)$$

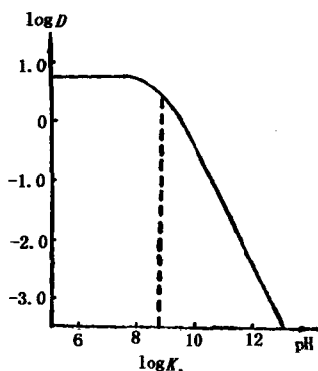


图8.1 乙酰丙酮在水及苯中分配与pH的关系

图8.1是液-液萃取过程中水相 pH 值影响乙酰丙酮分配系数的示意图。从图8.1中可以看出，当水相的 pH 值大于 pK_a 时，分配系数迅速下降。有实验结果表明，一元羧酸在水相 pH 值低于 3.0 时可以很好地被萃取到有机相中，而当 pH 值大于 5 时，则主要溶解在水相中，很难被有机相萃取^[4]。利用 pH 值对分配系数的影响，可以将有机酸或有机碱从水相萃取到有机相中，反之也可以把有机相中的弱

酸、弱碱萃取到水相中。此外，还可以通过 pH 值的调节，把样品分成酸性、中性和碱性馏分^[5]。

§ 8.1.3 液-液萃取其它操作因素的控制

液-液萃取并不能对所有的化合物，例加强极性化合物取得良好的萃取效果。但如果利用各种物理化学原理，有可能进一步扩展液-液萃取的应用范围。如强有机酸或有机碱，可以在水相中加入适当的反电荷离子对试剂，达到液-液萃取强有机酸或有机碱的目的。又如金属离子，通过在水相中加入螯合剂与金属离子形成疏水性的络合物达到萃取金属离子的效果。

在液-液萃取中经常遇到的问题是乳状液的生成。通常乳状液很难破碎，也很难由超声波和超滤分离。由于乳状液中溶解一定量的样品，因而往往会降低样品的回收率和重复性。通过严格控制二相的混合过程和增加有机相溶剂的体积可以部分或完全消除乳状液的生成。

液-液萃取的萃取液含有大量的有机溶剂，在很多情况下应将有机溶剂除去。通常通过加温或常温将有机溶剂挥发掉。由此产生的问题是：(1) 污染大气环境；(2) 在加热挥发时有可能导致被分析样品的热分解。因此在有些情况下可通过盐析效应分离水和水溶性有机溶剂的原理处理萃取液。如盐析效应已成功地应用组胺 H₂ 受体的拮抗物西米替丁^[6]，oxmetidine^[7] 的样品预处理。把萃取后的有机相重新萃取到酸性水相中，加入大约 200 μ l 乙腈，再加入 5 g 碳酸钾。加入的碳酸钾将增加水相的离子强度和极性，迫使含有溶质的乙腈在盐水相表面分层。将乙腈相回收后再进行分析。

在液-液萃取中，为了防止样品和溶剂的分解和氧化，某些情况下可在萃取液中加入适当的保护剂。如为了防止在氯仿中产生光气，在溶剂中加入 2% 的乙醇。另一值得注意的问题是所选用的有机溶剂中存在干扰分析的杂质，因此在某些情况下有必要对有机溶剂进行蒸馏^[8]。

§ 8.2 液-固萃取

液-液萃取 (LLE) 有许多局限性, 例如需要大量不互溶溶剂; 样品处理步骤复杂; 样品回收率和精密度不理想; 处理过程中乳胶的形成和溶剂蒸发时的样品降解生成的样品损失等等。

固相萃取 (SPE) 方法采用高效、高选择性的固定相, 能显著减少溶剂用量, 简化样品预处理过程, 同时所需费用也有所减少。一般说来, 固相萃取所需时间为液-液萃取的 1/12, 费用为液-液萃取的 1/5。固相萃取能用于气相色谱、液相色谱、红外光谱、质谱、核磁、紫外和原子吸收等各种分析方法的样品预处理。正因为固相萃取柱独特的性能, 自 70 年代问世以来, 其全球需求量迅速增长^[9]。

固相萃取主要用于样品分析前净化和/或富集。其一般步骤是: 液态或溶解后的固态样品倒入活化过的固相萃取柱, 然后利用抽真空或加压使样品进入固定相。为了同时处理多个样品, 往往需要一个固相萃取柱歧管真空装置。一般, 固相萃取步骤中将保留感兴趣的组分和类似的其它组分, 并尽量减少不需要的样品组分的保留。弱保留的样品组分可用一溶剂冲洗掉, 然后用另一溶剂把感兴趣的分析物从固定相上洗脱下来。

有时候, 可以让感兴趣的组分 (分析物) 直接通过固定相而不被保留, 同时大部分干扰物被保留在固定相上, 从而得到分离。在多数情况下, 使分析物得到保留更有利于样品净化。

一个固相萃取柱由三部分组成: (1) 柱管; (2) 烧结垫; (3) 固定相。

柱管由血清级的聚丙烯制成, 一般做成注射器形状。一些厂家也提供玻璃的柱管。柱管下端有一突出的头, 此头的尺寸已标准化, 可用于各种不同的固相萃取歧管真空装置。

烧结垫除能固定固定相外, 也能起一些过滤作用。聚乙烯是常见的烧结垫材料, 对于特殊要求也可采用特氟隆或不锈钢片。

固定相是固相萃取柱中最重要的部分。最常见的固相萃取固定相是键合的硅胶材料。不规则形状的孔径 60 Å 的 40 μm 硅胶微粒作为原材料，然后用各种硅烷将官能团键合上去。也有一些非硅胶基质的固定相被广泛应用。

固定相的分离选择性决定于可被保留的组分的保留强度。所以固定相的选择将取决于分析物质、样品基体和样品溶剂的性质。固定相重量一般为 100, 200, 500 和 1 000 mg。为保证样品完全净化和充分保留，对脏的、复杂的或高浓度的样品处理应采用较大量的固定相。

储样器用于增加柱管上方的容器体积，能提高一次上样量（可达 75~100 ml）。接头用于连接柱管和储样器，针对某些特殊样品预处理技术，接头也用于连接两个固相萃取柱。

§ 8.2.1 液-固萃取固定相和流动相

液-固萃取采用的固定相与液相色谱常用的固定相类型相同^[1]。表8.2 列出的是液-固萃取常用的固定相。

表8.2 常用的固相萃取固定相及其保留机理

固定相	简称	主要机理	次要机理	Si-OH 活性
乙基	C ₂	非极性/极性	—	阳离子交换
辛烷基	C ₈	非极性	极性	阳离子交换
十八烷基	C ₁₈ (ODS)	非极性	极性	阳离子交换
环己烷基	CH	非极性	极性	阳离子交换
苯基	PH	非极性	极性	阳离子交换
腈基	CN	非极性/极性	—	阳离子交换
二醇基	2OH(DIOL)	非极性/极性	—	阳离子交换
氨基	NH ₂	极性/阴离子	非极性	阳离子交换
硅胶	Si	极性	—	阳离子交换
一元和二元胺基	PSA	极性/阴离子	非极性	—
苯丙磺酸	SCX	极性/阳离子	非极性	—

续表

固定期	简称	主要机理	次要机理	Si-OH 活性
丙磺酸	PRS	阳离子交换	极性/非极性	—
甲羧酸	CBA	阳离子交换	极性/非极性	—
二乙基丙基胺	DEX	极性/阴离子	非极性	阳离子交换
三甲基丙基铵	SAX	阳离子交换	极性/非极性	阳离子交换

在表8.2中, CN, DIOL, Si, NH₂ 都可作为正相的固定相. 正相固定相都是极性的, 用来保留(萃取)极性物质. 对于正相和反相来说, 组分在固定相上的保留或洗脱直接与溶剂极性有关, 溶剂的极性决定溶剂的强度. 在洗脱被保留组分时, 强溶剂的用量比弱溶剂小. 对于正极固定相, 溶剂强度随其极性增加而增加. 表8.3中给出了固相萃取流动相常用的几种溶剂. 实际工作中经常使用一些溶剂的混合物来改善溶剂强度以得到最佳的样品净化和分析物回收率. 一些常用溶剂的冲洗强度次序见表8.3.

表8.3 溶剂强度

正相		反相
己烷		水
异辛烷		甲醇
甲苯	弱	异丙醇
氯仿		乙腈
二氯甲烷		丙酮
四氢呋喃		乙酸
乙醚		乙醚
乙酸		四氯呋喃
丙酮		二氯甲烷
乙腈		氯仿
异丙醇		甲苯
甲醇		异辛烷
		强

表8.2中所列出的 C₁₈ (ODS), C₈, C₂, CH, PH 都是反相固定相。用来保留(萃取)非极性的分析物。对于反相固定相, 溶剂强度随其非极性增加而增加。通常使用水、甲醇、异丙醇和乙腈作为反相分离的溶剂。有些时候, 对强保留物质也用丙酮或二氯甲烷洗脱。

离子交换固定相上的行为更多地取决于溶剂的 pH 值、离子强度和反离子强度, 而与溶剂强度关系不大。鉴于离子交换更复杂的相互作用, 我们将在以下章节专门讨论。

选择固相萃取最佳固定相时, 须考虑以下几点^[10]:

1. 分析物在极性或非极性溶剂中的溶解度;
2. 分析物有无可能离子化, 从而决定可否用离子交换固定相;
3. 分析物有无可能与固定相形成共价键;
4. 不要的组分与分析物在固定相结合点上的竞争程度。

分析物的极性与固定相极性非常相似时, 可得到分析物的最佳保留。两者极性越相似, 保留越好, 所以要尽量选择极性相似的固定相。例如, 萃取碳氢化合物(非极性)时要采用反相柱(非极性)。当分析物极性适中时, 正、反相固定相都可使用。

固定相选择还受样品溶剂强度的制约。样品溶剂强度相对该固定相应较弱, 弱溶剂会增强分析物在吸附剂上的保留。如果溶剂太强, 将得不到保留或保留很弱。举例来说, 样品溶剂是正己烷时, 用反相柱就不合适, 因为正己烷是强溶剂, 分析物不会有保留; 当样品溶剂是水时, 就可以用反相柱, 因为水是弱溶剂, 不影响分析物的保留。

§ 8.2.2 固相萃取的影响因素

固相萃取一般有四个基本步骤: 固定相活化、样品上柱、淋洗和分析物洗脱。

活化的目的是创造一个与样品溶剂相容的环境并除去柱内所有杂质。通常需要两种溶剂来完成上述任务, 第一个溶剂(初溶

剂)用于净化固定相,另一个溶剂(终溶剂)用于建立一个合适的固定相环境使样品分析物得到适当的保留.每一活化溶剂用量约1~2 ml/100 mg 固定相.

无论固相萃取柱的来源或质量,未经活化都有可观的杂质存在.由于许多杂质能污染萃取后的分析物,故在样品萃取前必须除去这些杂质.除去杂质的最好方法就是用初溶剂洗去.初溶剂应该与洗脱溶剂一样强或强于洗脱溶剂,这样就可以除去所有可能与分析物一起洗出的物质;杂质除去不彻底,将导致最终色谱图上额外峰的干扰.

终溶剂不应强于样品溶剂,若使用太强的溶剂,将降低回收率.通常采用一个弱于样品溶液的溶剂不会有什么问题.在理想情况下,终溶剂应该与样品溶剂性质相似.例如,一个水样被HCl调节到pH2,终溶剂(水)也应用HCl调节到pH2.

值得注意的是,在活化的过程中和结束时,固定相都不能抽干,因为这将导致填料床出现裂缝,从而得到低的回收率和重现性,样品也没得到应有的净化.如果在活化步骤中出现干裂,所有活化步骤都得重复.

在建立固相萃取方法时,柱的活化经常被忽视.其实不当的活化经常是低回收率、失败的样品净化或重现性差的来源.

上样步骤指的是样品加入到固相萃取柱并迫使样品溶剂通过固定相的过程,这时分析物和一些样品干扰物保留在固定相上.为了保留分析物,溶解样品的溶剂必须较弱.如果溶剂太强,分析物将不被保留,结果回收率将会很低,这一现象叫穿漏(breakthrough)^[11].尽可能使用最弱的样品溶剂,可以使溶质得到最强的保留或者说最窄的谱带.上样时若有强保留,洗脱所需溶剂量小,也可减少杂质的洗出量,只要不出现穿漏,允许采用大体积(0.5~1 L)的上样量.

分析物得到保留后,通常需要淋洗固定相以洗掉不需要的样品组分.淋洗溶剂的洗脱强度是略强于或等于上样溶剂.淋洗溶剂必须尽量地弱以洗掉尽量多的干扰组分,但不能强到可以洗脱

任何一个分析物的程度。溶剂体积可为0.5~0.8 ml/100 mg 固定相。淋洗步骤也能确保全部样品与固定相接触，因为上样时部分样品溶剂的小液滴可能还沾在管壁上，淋洗溶剂可把液滴全部洗入固定相。

有时候淋洗步骤也许并不十分必要，但淋洗总能得到更干净的样品，从而得到更简单的谱图和更长的 GC, HPLC 柱寿命。

淋洗过后，将分析物从固定相上洗脱。洗脱溶剂用量一般是0.5~0.8 ml/100 mg 固定相，而溶剂必须进行认真选择。溶剂太强，一些更强保留的不必要组分将被洗出来；溶剂太弱，就需要更多的洗脱液来洗出分析物，这样固相萃取柱的浓缩功效就会削弱。

收集起来的洗脱液可以直接向色谱柱进样，也可以把它浓缩后溶于另一溶剂中进样和进一步净化。

在溶剂选择上还有几点值得注意，有时在上样、淋洗和洗脱时，一个溶剂太强，而另一个溶剂太弱，使用混合溶剂可以解决这一问题。通过改变互溶性溶剂配比，混合溶剂强度可以恰当地满足要求。

另一值得注意的问题是溶剂互溶性，后一种流过柱床的溶剂必须与前一溶剂互溶。一个不与柱内残留溶剂互溶的溶剂是不能与固定相充分作用的，当然也不会出现适当的液-固分配，这就会导致差的回收率和不理想的净化效果。如果使用互溶的溶剂有困难，就必须干燥柱床。干燥的方法是让氮气或空气通过柱床10~15 min；把固相萃取管在1 000~1 500g/min 下离心5 min 将产生比通氮或空气更好的干燥效果。

有时候固体样品必须用一个很强的溶剂进行萃取，这样的萃取液是不能直接上样的。所以萃取液要用一个弱溶剂稀释以得到一个合适的溶剂总强度进行上样。例如一个土壤样品，采用50%甲醇萃取，得到2 ml 萃取液，用8 ml 水稀释，得到10%的甲醇溶液，这样就可以直接上反相固相萃取柱而不存在穿漏问题。

离子交换固相萃取把离子相互作用作为首要保留机理，当分析物分子带有正或负电荷而固定相带相反电荷时，就会发生离子相互作用。常用的有两类离子交换固定相，阳离子交换相可保留带正电荷的或阳离子化合物；有机胺和羧酸并不带电荷，但可改变溶液 pH 值使之离子化。阴离子交换相与阳离子交换相相反，它保留带负电荷的或阴离子化合物。

离子交换法三个主要的影响参数为 pH、离子强度和反离子强度^[12]。

首先必须知道固定相和分析物官能团的 pK_a 。分析物的 pK_a 值可以在文献上查到，或根据类似化合物的 pK_a 值估计。常用离子交换固定相的 pK_a 如表 8.4 所示。

表 8.4 离子交换固定相的性质

	主要机理	次要机理	pK_a
SCX	阳离子交换/非极性	极性	2~3
SAX	阴离子交换	非极性/极性	11~12
NH ₂	阴离子交换/极性	非极性	9.5~10

在离子交换色谱中存在一个阴阳离子对：一个是固定相，另一个是带相反电荷的分析物。为使分析物产生保留，溶液 pH 必须低于正离子的 pK_a （以得到正电荷），而高于负离子的 pK_a （以得到负电荷）。要得到最好结果，溶液 pH 和阴离子或阳离子的 pK_a 差值必须达到两个单位或更大。在这一 pH 下，大约 99% 的适当离子基团将带上电荷。pH 与 pK_a 之差小于 2 时，由于分析物和固定相被部分中和，保留将受到影响。基于以上考虑，分析物和固定相的 pK_a 差别应该是 4 个单位或更大。而对洗脱过程来说，洗脱溶剂 pH 必须高于阳离子的 pK_a 或低于阴离子的 pK_a 。同样 pH 与 pK_a 之差值也应是两个单位以上以得到最好结果。

离子强度是溶液中所有离子总浓度的量度。因为离子交换是

一个竞争机制，分析物的保留和洗脱受同种电荷的其它离子浓度的影响，这些竞争离子通常叫做反离子。低离子浓度溶剂可以促进分析物的保留，因为分析物不必同反离子在固定相有限的结合点上竞争。高离子强度溶剂则破坏分析物的保留，而促进洗脱，所以洗脱溶剂中一般加入大量反离子，以得到快速的选择性的洗脱。

除离子强度外，也应注意反离子强度（选择性）。反离子强度是反离子对固定相的亲力的量度，高强度的反离子能强有力地同固定相的带电基团结合。表8.5是一个阴离子和阳离子交换固定相的相对反离子强度表。对每一类固定相来说，最强选择性的反离子强度定为10，其它为相对于它的值。

表8.5 相对反离子强度

阳离子		阴离子	
Li^+, H^+	0.5	OH^-, F^- , 丙酸根	0.1
Na^+	1.5	乙酸根, 甲酸根	0.2
$(\text{NH}_4)^+$	2.0	$\text{HPO}_4^{2-}, \text{HCO}^-$	0.4
$\text{Mn}^{2+}, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	2.5	$\text{Cl}^-, \text{NO}_2^-$	1.0
$\text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Cd}^{2+}$	3.3	$\text{HSO}_3^-, \text{CN}^-$	1.5
Ca^{2+}	4.5	NO_3^-	4.0
Cu^{2+}	6.0	ClO_3^-	4.5
$\text{Pb}^{2+}, \text{Ag}^+$	8.5	HSO_4^-	5.0
Ba^{2+}	10.0	citrate	9.5
		苯磺酸根	10.0

在上样前，固定相要用最低强度反离子活化，这样分析物能轻易交换掉反离子而得到保留。如果样品的pH值需要调整，必须采用含有最弱反离子的酸或碱调节。相反，洗脱剂中必须含有强的反离子，这些反离子能轻易交换分析物，从而增强了分析物的洗脱能力。

由于硅羟基的存在，所有硅胶基质的固定相都有次要相互作用存在，带有胺基或羟基的化合物对这种强相互作用尤为敏感。由于这种次相互作用，会产生比预想的要更强的保留。这时候要由更高一些的离子强度或反离子强度的洗脱剂来克服由硅羟基引起的相互作用。有些离子交换固定相有较弱的极性（正相）或非极性（反相）相互作用，洗脱液中少量有机溶剂的作用将克服由此带来的额外保留。

离子交换中保留、淋洗和洗脱条件优化应包括以下几方面：

(1) 活化：用不含或含弱反离子的低离子强度的溶剂活化固定相，活化溶剂必须有合适的 pH 值以使固定相和分析物带上相反电荷。

(2) 保留：调节样品液的 pH 值，使分析物和固定相仍保持离子状态，样品液的离子强度和反离子强度要尽可能低。

(3) 淋洗：使用不至洗脱分析物的最强溶剂体系，同样，淋洗溶剂的 pH 值要保证分析物和固定相仍带电荷。

表8.6 离子交换固相萃取法的要求

	目的	离子强度 ¹⁾	反离子强度	pH ²⁾
阴离子交换要求	保留	低	低	低于固定相 pK_a 高于分析物 pK_a
	洗脱 ³⁾	高	高	高于固定相 pK_a 低于分析物 pK_a
阳离子交换要求	保留	低	低	高于固定相 pK_a 低于分析物 pK_a
	洗脱 ³⁾	高	高	低于固定相 pK_a 高于分析物 pK_a

1) 低： $<0.1\text{ M}$ ；高： $>0.1\text{ M}$ ；

2) pH 应至少与相应 pK_a 相差两个单位；

3) 不必同时满足四个条件。

(4) 洗脱: 洗脱剂 pH 值要高于阳离子的 pK_a 或低于阴离子的 pK_a , 离子强度和反离子强度都必须很高。

表8.6 给出了离子交换固相萃取的条件选择所应满足的要求。

§ 8.2.3 固相萃取方法的建立

一般地讲, 溶剂流过固相萃取柱的流速越低, 效果越好。在整个固相萃取过程中通常采用 3~10 ml/min 的流速。离子交换动力学比极性或非极性相互作用动力学稍慢, 因此建议采用较低的流速以保证充分的交换。

流速与所有溶液流过柱子所需时间之间有时存在矛盾, 应均衡考虑。对上样步骤来说更是这样, 0.5~1 L 的样品并不少见。采用 10 ml/min 的流速, 0.5 L 样品上柱就需要 50 min。为了加快上样, 可使用 25~50 ml/min 的流速。虽然损失了分析物的保留, 但节约了大量的操作时间。

对于每种固相萃取方法, 流速的稳定性是非常重要的。如果流速发生大的变动, 特别是对于大体积高流速的情况, 将导致较低的回收率和重复性。由于各个固相萃取柱间的细微差异引起的流速微小变动不会明显影响结果。

一个正相或反相固相萃取柱的容量为固定相重量的 1%~3%。也就是说, 一个 100 mg 柱根据分析物和样品基质的不同能保留 1~3 mg 样品物质, 样品溶液的重量与容量无关。对于离子交换固定相, 样品容量就小得多。因为其容量取决于硅胶颗粒上离子交换基团数目, 离子交换柱容量大约是 1 meq/mg 固定相。

当样品中分析物有强保留和/或极少样品干扰时, 可得到高容量。由于样品的不确定性, 要确切得到对已知样品采用多大的柱子是困难的。通常的原则是样品越脏, 量越大, 固定相重量就应越大。

如果溶剂选择合适, 样品的净化程度和分析物的回收率都会有较大提高。但是, 即使已经知道样品和分析物的许多信息, 最

佳的溶剂和固定相也不能一目了然。如果随意选择溶剂，实验效率就会更低。

应用洗脱分布图来选择最佳溶剂和固定相可以快速建立固相萃取方法。把一个已知量的分析物溶于一个与实际样品溶剂类似的溶剂中，然后上固相萃取柱，让一系列已知浓度、逐渐增强的溶剂或溶剂混合物（等间隙）通过固定相并收集起来；然后用适当的分析技术检测。各馏分分析物相对于溶剂的量算出来后，就可以得到一张洗脱分布图。

以下是针对一个 500 mg 反相固定相作洗脱分布图的例子（见图8.2）：

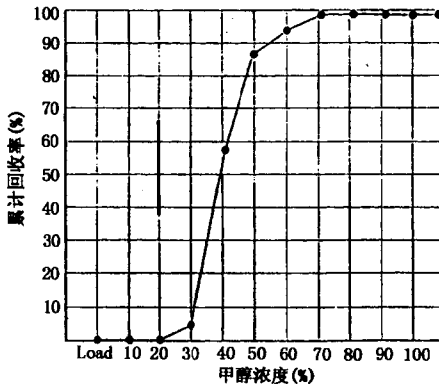


图8.2 洗脱分布图实例

活化：先甲醇，后水（不必收集这些溶液）；

上样：3 ml 分析物水溶液；

淋洗/洗脱：3 ml 水，10%，20%，30%直到
100%的甲醇各 3 ml，然后加入 3 ml 丙酮。

收集并分析每一个上样和淋洗/洗脱溶液。如果分析物的浓度足够大，就可以直接分析每一部分的浓度；如果分析物浓度较低，就必须浓缩后分析。浓缩将引入另一些影响结果的不利因素。

从图中可以得到一些重要的信息。上样液中没有分析物，说明上样溶剂足够的弱，适于上样。如果在上样液中检测到分析物，就必须采用更弱的上样溶剂或更换另外的固定相。淋洗溶剂应为 20% 甲醇，因为 30% 甲醇能洗出一些分析物。70% 甲醇则洗出所有分析物。实际采用的洗脱溶剂比分布图中所指出的溶剂强度略高。对于这个例子，80% 甲醇将是一个很好的洗脱溶剂，采用比 80% 更强的溶剂会洗出一些不必要的杂质。

用以上建立的方法萃取含有已知量分析物的空白（溶剂）样，分析洗脱液来测定萃取过程的回收率。如果结果满意，还需继续测试含样品基质的标准样品（控制样）；此步骤是为了检测方法对于样品的净化程度。控制样品的萃取和分析空白样相同。如果存在干扰，则应调整方法，或更换固定相。有时为了样品的净化必须牺牲回收率，所以回收率与净化程度之间有一个最佳平衡。

最后，还要测一个加入样。把已知量的分析物加到控制样中，如果没有控制样，可采用标准加入法。加入样的回收率是方法的最后测试指标。几个不同浓度分析物回收率的标准偏差决定方法的合理性，加入样的回收率一般比空白样的偏低。如果回收率、标准偏差和样品净化程度都可接受，固相萃取方法就建立起来了。

固相萃取的应用可参考相关的文献资料 [10, 15~19]。

§ 8.3 膜技术在样品预处理中的应用

人们对利用膜技术去除溶剂或样品中的颗粒比较熟悉。事实上，膜技术已经开始广泛地应用于其它领域，如化学、微生物和工业纯化。膜技术的应用包括生物样品中细菌的去除、细胞培养液中细胞和菌种的去除等。近年来膜技术已渗透到分析化学中的样品预处理^[20]。在这一节中我们将主要介绍微渗析膜和超滤膜在样品预处理中的应用。

§ 8.3.1 微渗析

膜渗析的基本原理为利用二相中样品浓度差别使样品通过渗析膜从一相传质到另一相。在渗析中，含有感兴趣样品的溶剂称之为原料，收集样品的流体称为渗析液。膜渗析技术一般被用于样品溶液中盐和低分子量的去除，反之也可从被测定的低分子量样品中去除高分子的干扰物。微渗析技术是利用渗析原理动态测定活体中细胞外化学过程的新兴技术，微渗析最重要的组成部分是由半渗析膜制备的探针。

微渗析系统基本上是由微渗析探针、连接管、灌流液和微量注射泵组成（见图8.3）。注射泵比活塞式或蠕动泵更为准确。微渗析探针通常是由一管式渗析膜装于由钢、石英毛细管或其它材料制成的双层套管内构成^[21]，见图8.4。灌流液由微量注射泵以低流速（ $1\sim 5\ \mu\text{l}/\text{min}$ ）注入探针，到达探针的顶端渗析管处，与被取样的基体发生物质交换，进入膜的化学物质为继续流动的灌流液带出探针。这种取样方式是一种动态连续的过程。灌流液从某种意义上讲是一种生理溶液，与细胞外液体的渗透压相等。探针的大小、膜长度、内径以及切割分子量的大小可根据实际应用的要求选定。微渗析探针有多种形式，按其构造可分为四类：（1）线状；（2）环状；（3）背靠背；（4）同心圆式。其中，同心圆式较为常用。图8.4中即为同心圆式探针。

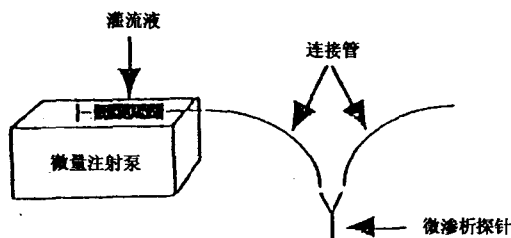


图8.3 微渗析系统的基本组成

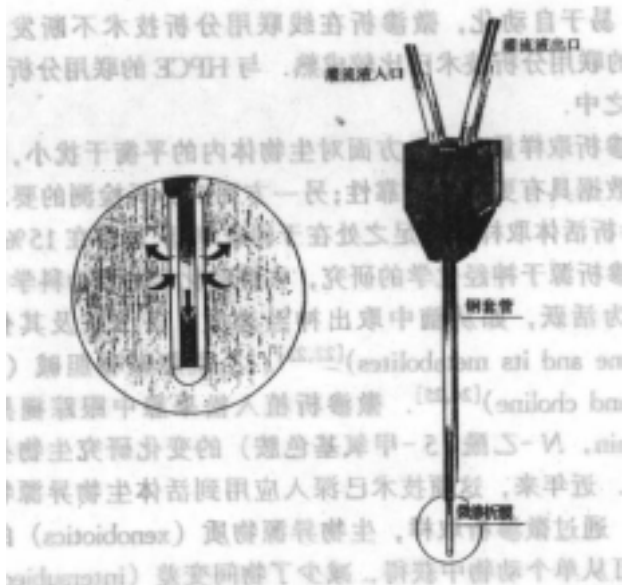


图8.4 微渗析探针的基本构造

微渗析活体取样具有以下显著特点：

1. 时间分辨性，可连续跟踪多种化合物随时间的变化，与HPCE，HPLC等以分离为基础的分析技术联用，可同时提供多种化合物的浓度-时间曲线图，对阐明发生在体内的代谢和生物转化过程有积极意义。
2. 空间分辨性，微渗析取样无匀浆过程，可真实代表取样位点目标化合物的浓度。同时在不同部分分别插入探针可研究生化物质的分布。
3. 微渗析取样可直接测定生物体内游离态药物浓度（非蛋白结合部分），这在药物研究中更富有意义。
4. 微渗析提供的样品中不含蛋白质、酶等大分子，可不经预处理直接进行HPLC分析。由于蛋白质、酶与所要分析的小分子物质分离，因而与之相关的各种生化反应将不再继续，可真实反应体内生化物质的变化。

5. 易于自动化, 微渗析在线联用分析技术不断发展, 与 HPLC 的联用分析技术已比较成熟. 与 HPCE 的联用分析技术正在发展之中.

微渗析取样量小, 一方面对生物体内的平衡干扰小, 因而所取得的数据具有更高的可靠性; 另一方面对分析检测的要求也愈高. 微渗析活体取样的不足之处在于回收率低, 通常在 15% 左右.

微渗析源于神经化学的研究, 在神经化学、行为科学的研究中也最为活跃, 如从脑中取出神经递质、多巴胺及其代谢物 (dopamine and its metabolites)^[22,23]、乙酰胆碱和胆碱 (acetylcholine and choline)^[24,25]. 微渗析植入松果腺中跟踪褪黑激素 (melatonin, *N*-乙酰-5-甲氧基色胺) 的变化研究生物昼夜节律^[26]等. 近年来, 这项技术已深入应用到活体生物异源物质的取样中. 通过微渗析取样, 生物异源物质 (xenobiotics) 的动力学数据可从单个动物中获得, 减少了物间变差 (intersubject variation) 及所需要的实验动物的总数. 微渗析应用于多种药物的药物动力学和代谢研究中, 其中令人瞩目的有: 血液和肝脏中的邻乙酰氨基苯酚^[27,28]; 血液、肝脏和胆汁中的苯酚 (phenol)^[29]; 两种结构相似的化合物咖啡因 (coffeine) 和茶碱 (theophylline), 由于它们不同的药物动力学分布图及微渗析特征得到广泛研究^[30,31].

作为活体取样技术的微渗析在国外已得到广泛应用, 在国内已受到几家科研单位的重视, 然而它的实际应用范围要大得多. 微渗析可作为液相色谱分析的样品预处理技术, 具有简单、快速且可适用于微量样品的处理等优点; 可应用于细胞培养液和体外复杂生物样品中小分子目标化合物. 微渗析作为液相色谱分析的预处理方法的操作规程与活体取样过程相似, 可提供无蛋白质、酶和细胞及其碎片等大分子和颗粒的极性小分子的水溶液, 可直接注射进行液相色谱分析. 我们成功地利用微渗析动态取样技术发展了微渗析-高效液相色谱法测定病人血清中肌酐含量^[32]. 肌酐是人体的一种代谢产物, 血清中肌酐含量的测定具有重要意

义. 并将新方法与甲醇沉淀-高效液相色谱方法作了比较, 显示了微渗析作为液相色谱样品预处理的可行性. 对于某些复杂的生物样品, 由于蛋白质的存在, 一些与蛋白质结合的样品分子, 回收率较低. 对于这类化合物, 需要改变酸度或加入适当的转换剂使结合的分子完全从蛋白质中游离出来, 从而提高回收率^[33].

在血浆中, 一些药物与蛋白质如入血清白蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白存在在不同程度的结合. 蛋白质结合是一快速可逆过程, 可很快达到平衡状态, 蛋白质结合在药理学中扮演了重要角色, 游离药物可以从血液中扩散到血管外的药物作用位点发挥药物活性或产生副作用. 一些重要的药物选择性, 诸如肝脏代谢速率、肾排泄速率、生物膜渗透率和稳态分布体积均依赖于游离药物的浓度. 因而药物-蛋白质结合的研究不但在临床治疗而且在药物动力学和药效学的研究中具有重要意义. 发展新的简单方法测定游离药物的浓度可为药物-蛋白质结合的研究作出重要贡献. 目前, 已有多种方法应用于药物-蛋白质结合研究. 如平衡渗析、超滤、前沿色谱法等, 微渗析用于测定药物-蛋白结合研究尚鲜见. 1991年, Lunte等人^[33]发表了一篇论文采用微渗析测定药物与血浆蛋白结合, 共测定了9种药物的血浆蛋白结合率, 范围从10%至98%. 实际上, 微渗析技术可用于研究药物与蛋白质的相互作用, 可得到结合常数和结合位点数. 我们用微渗析技术成功地研究了新诺明、卡马西平和乙酰唑胺三种药物与人血清白蛋白的相互作用^[34,35]. 其中, 卡马西平与人血清白蛋白的结合常数和结合数目与文献相当. 这是首次明确地提出以微渗析研究药物与蛋白质的相互作用. 实质上, 微渗析这种技术可应用于测定多种小分子化合物(药物、毒物、染料等)与大分子(如蛋白质、酶、DNA等)的亲合力的研究. 我们实验室正在进行这方面的研究.

§ 8.3.2 超滤膜技术

与渗析膜相似, 毛细管超滤是利用半渗透膜防止分子量大于

3 万 da. 透过的样品预处理技术. 与渗析膜不同, 超滤膜不是利用二相溶液中溶质浓度的差别的扩散达到样品预处理的目的. 超滤膜样品预处理是通过抽真空把组织周围的液体传质到超滤膜探针达到样品预处理的. 由于没有微渗析灌流液的稀释, 超滤膜探针对样品的浓度回收率高于微渗析的回收率. 但超滤膜外表面易于被高分子量化合物堵塞, 很容易导致样品处理量的下降. 因此超滤膜探针的尺寸一般都比微渗析探针大. 利用超滤膜探针很容易测定样品中溶质的绝对浓度. 由于通过超滤膜探针得到的是没有稀释的细胞外的液体, 超滤膜过滤液中样品的浓度与组织中细胞外液体中的样品浓度相同. 超滤膜探针的应用实例包括唾液中茶碱的监测和皮下组织中 acetaminophen 的监测等^[36].

§ 8.4 衍生化和柱浓缩样品预处理

§ 8.4.1 衍生化技术

目前, 在高效液相色谱法中, 最常用的高灵敏检测器是紫外和荧光检测器. 近年来灵敏的电化学检测器也得到了较快的发展. 但是它们均属于选择性检测器, 只能检测某些化学结构的化合物.

为了使在这些检测器上响应很小的化合物也能被检测出来, 近年来发展了多种衍生化方法, 使带有氨基($-\text{NH}_2$), 羟基($-\text{OH}$), 羰基(>C=O), 羧基($-\text{COOH}$)的化合物及氨基酸, 通过与各种带有发色基团的衍生化试剂反应, 生成有紫外或荧光吸收的衍生化产物, 就能用现有的这几种高灵敏度检测器检测.

除此之外, 通过被测化合物能否与特定的衍生化试剂的反应, 也有利于鉴别这些化合物的结构. 因此, 近年来, 液相色谱法中的衍生化方法已得到广泛的应用, 并随着各种新的衍生化试剂的出现, 及各种衍生化技术的深入研究, 这种方法将得到进一步的发展^[37].

对于衍生化技术, 从以下两个方面进行讨论.

1. 衍生化反应的分类

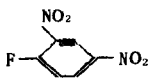


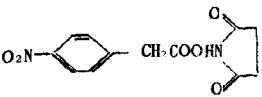
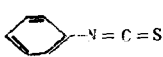
首先，在衍生化过程中选择的化学反应一定要满足以下几个条件：(1) 反应速度要快；(2) 要发生定量反应，至少要有良好的重复性；(3) 经过衍生反应生成的反应产物是单一产物；(4)：所用的衍生化试剂与其衍生化产物能在色谱柱上被分离。

按衍生化反应类别可以分为三大类。

(1) 衍生化反应产物可用紫外-可见光检测器检测

在液相色谱法中紫外-可见光检测器是最常见的一种高灵敏检测器。但是有很多化合物在紫外光谱区没有吸收，而不能被检测。将它们与带有紫外吸收基团的衍生化试剂在一定条件下发生反应，由于反应产物带有发色基团而能被检测。现将常用的紫外衍生化试剂及其应用列于表8.7。

表8.7 常用紫外衍生化试剂

化合物类型	衍生化试剂		最大吸收 波长(nm) λ_{max}	摩尔吸收 系数 ϵ_{254}
	名称	结构		
RNH ₂ 及 RR'NH	2,4-二硝基氟苯		350	$>10^4$
	对硝基苯甲酰氯		254	$>10^4$
	对甲苯磺酰氯		224	10^4
	N-琥珀酰亚胺 对硝基苯乙酸酯			
$\begin{matrix} \text{RCH-NH}_2 \\ \\ \text{CCOH} \end{matrix}$	异硫氰酸苯酯		244	10^4

续表

化合物类型	衍生化试剂		最大吸收 波长(nm) λ_{max}	摩尔吸收 系数 ϵ_{254}
	名称	结构		
RCOOH	对硝基苄基溴		265	6 200
	对溴代苯甲酰甲基溴		260	1.8×10^4
	萘酰甲基溴		248	1.2×10^4
	对硝基苄基-N,N-异丙基异脲		265	6 200
ROH	2,5-二硝基苯甲酰氯			10^4
	对甲氧基苯甲酰氯		262	1.6×10^4
RCOR'	2,4-二硝基苯肼		254	
	对硝基苯甲酰胺盐酸盐		254	6 200

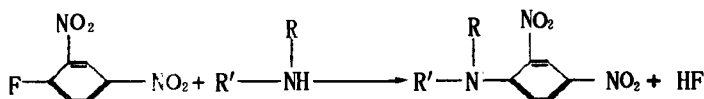
表8.7 中各类化合物衍生化反应如下:

a. 胺类化合物的衍生化

胺的化学性质与其氮原子上有两个未成对的电子有关. 胺具有亲核性, 能与亲电性的化合物发生反应, 容易与卤代烃、羰基、酰基化合物、酸等发生反应. 因此这些化合物经常是胺类的衍生化试剂.

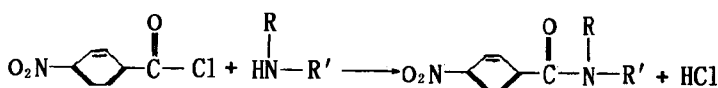
(a) 卤代烃衍生化试剂: 2, 4-二硝基氟苯 (FDNB) 的对

位、邻位上有了硝基，卤原子就更加活泼，容易发生反应。

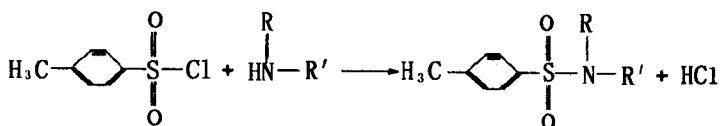


这种试剂主要与仲胺发生衍生化反应，因此常用于仲胺的鉴别。

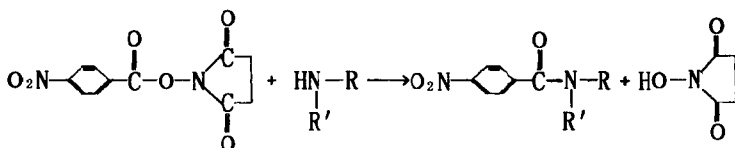
(b) 酰氯类衍生化试剂：对硝基苯甲酰氯适用于伯胺及仲胺的衍生化反应^[38]。



对甲基苯磺酰氯为

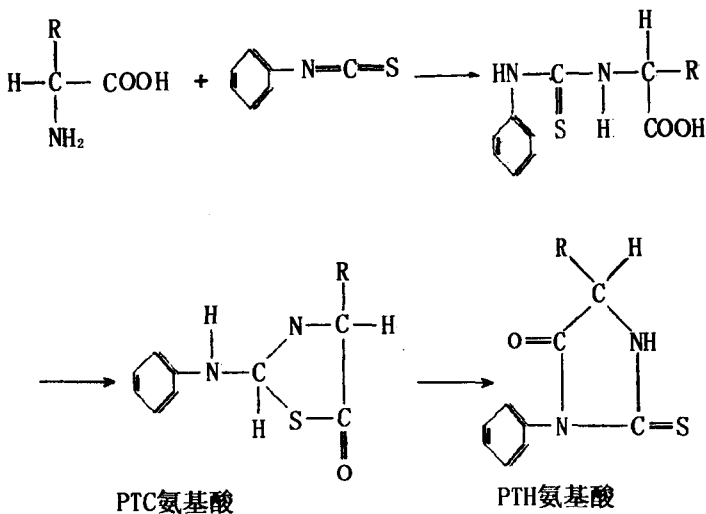


(c) *N*-琥珀酰亚胺-对硝基苯乙酸酯：它与仲胺反应生成对硝基苯乙酰胺。



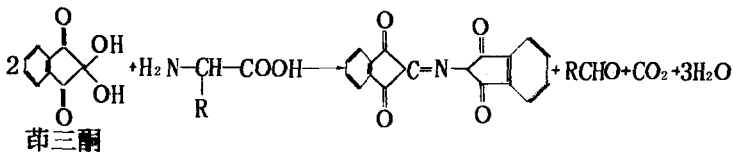
b. α -氨基酸的衍生化

(a) 异硫氰酸苯酯：它与 α -氨基酸中氨基反应，形成PTH氨基酸，具有很高的紫外吸收。紫外检测器对于PTH氨基酸的检测极限大约是 50×10^{-12} mol。在用Edman降解法进行肽或蛋白质的序列分析时，异硫氰酸苯酯也是一个很重要的试剂。在用液相色谱法分析单个氨基酸时，也常用这个试剂。它能与伯胺或仲胺氨基酸反应，反应方程式如下^[39]：



实验操作是这样的，将氨基酸溶于含 60% 吡啶及适量异硫氰酸苯酯的水溶液中，并在 40℃ 加温 1 h，即生成 PTH 氨基酸。然后在反相 C₁₈ 柱上或正相硅胶柱上被分离。因为整个反应过程时间较长，用这种衍生化试剂时一般都采用柱前衍生化方式。

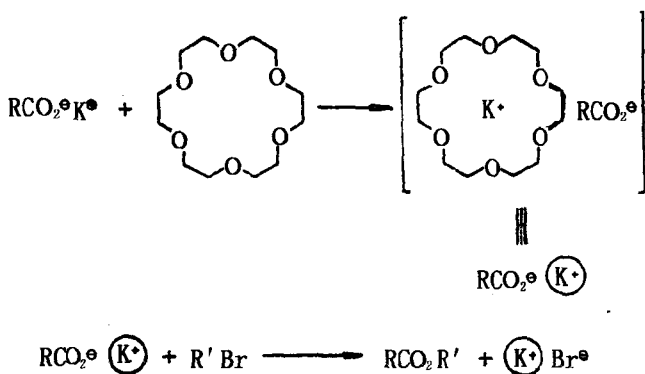
(b) 茚三酮：在定量测定氨基酸的方法中，茚三酮仍是较常用的氨基酸衍生化试剂，主要是被用于柱后衍生。在经离子交换色谱柱分离后的氨基酸与茚三酮相遇却发生反应，反应温度是 130℃，所有伯胺氨基酸生成的衍生物在 570 nm 有最大吸收，茚三酮与所有蛋白质及肽等带有氨基的化合物也能形成这种发色衍生物。其反应式如下：



茚三酮与仲胺氨基酸，如脯氨酸及羟基脯氨酸反应，生成的黄色衍生物在 440 nm 有最大吸收。

c. 羧酸的衍生化

羧酸的衍生化反应主要是由有机酸与带有紫外吸收基团的卤代烃反应，产物是它的酯。表8.7中列出的卤代烃有：对硝基苯基溴，对溴代苯甲酰甲基溴，萘酰甲基溴。羧酸的衍生化条件与一般酸的酯化有些不同，先将欲衍生的酸制成它的钾盐，然后，在以冠醚作催化剂的条件下，使钾离子进入冠醚结构中去。只有在冠醚外边的 RCO_2^- 基可以与卤代烃反应，这样形成酯的产率在 90% 以上，反应式如下：



d. 羟基的衍生化

由于酰氯的化学性质很活泼，容易与亲核试剂，如醇、胺、水发生反应，所以它不仅是胺类的衍生化试剂，同时也是羟基化合物的衍生化试剂。

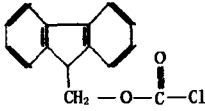
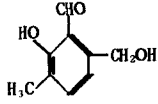
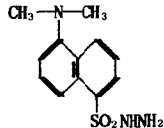
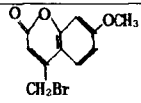


常用的衍生化试剂有 3, 5-二硝基甲酰氯，对甲氧基苯甲酰氯。

e. 羰基化合物（酮、醛）的衍生化

对于羰基化合物最典型的衍生化试剂是 2, 4-二硝基苯肼，它的衍生化产物是 2, 4-二硝基苯腙，其反应式如下：

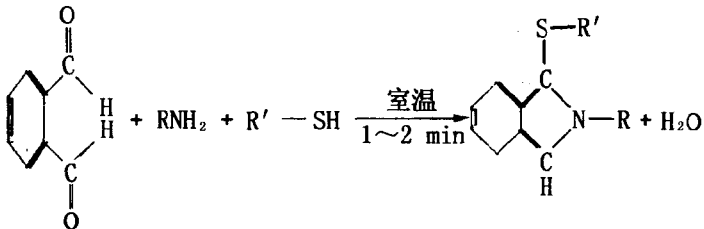
续表

化合物类型	衍生化试剂		激发波长	发射波长
	名称	结构	nm	nm
$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \\ \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH} \end{array}$	芴二甲 氧苯酰 氯 FMOC		260	310
$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	吡哆醛		332	400
$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{R}' \end{array}$	丹酰肼		340	525
RCOOH	4-溴甲 基-7-甲氧 基香豆素		365	420

由表8.8可见，常用的荧光衍生化试剂有下列几种：

a. 邻苯二甲醛 (OPA)

在碱性条件下，OPA 易于与伯胺反应，形成荧光化合物，但是在反应中必须加入硫醇作为辅助性试剂。这一衍生化反应简单表示如下：

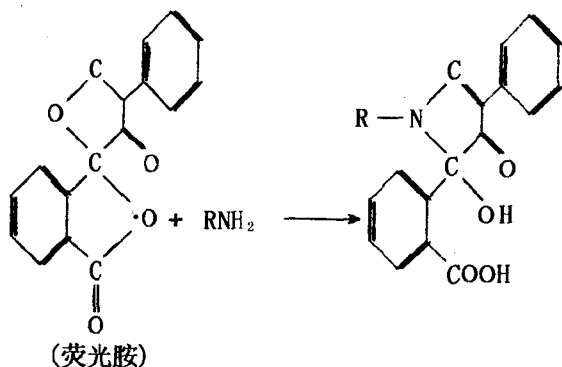


OPA 也能与伯胺氨基酸发生上列反应,但是它不能与仲胺氨基酸如脯氨酸、羟基脯氨酸反应.当 OPA 与伯胺氨基酸反应时,常用的辅助剂是乙基硫醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$)或巯基乙醇($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$),以乙基硫醇较好.

此反应的特点是反应温度低,完成反应所需时间短,所产生的衍生化产物有强的荧光.不仅适用于柱前衍生,也适用于柱后衍生;不仅适用于荧光检测器检测(灵敏度 $10^{-12} \sim 10^{-15} \text{ mol}$),也能用紫外检测器在 230nm 检测(灵敏度 $5 \times 10^{-12} \text{ mol}$).因此 OPA 是至今最通用的伯胺氨基酸衍生化试剂.

b. 荧光胺

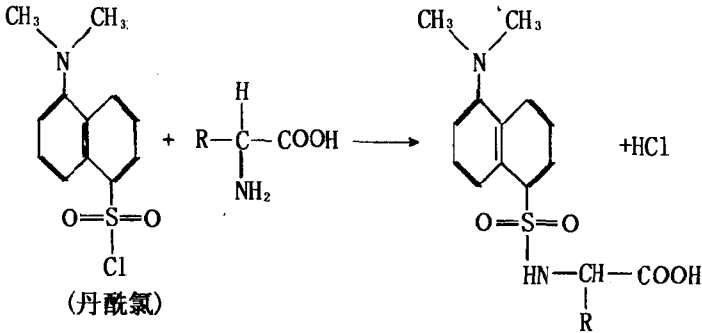
荧光胺也适于作伯胺及伯胺氨基酸的衍生化试剂.虽然荧光胺本身没有荧光,但是在碱性条件下,它与伯胺能很快反应形成具有荧光的产物,而过剩的试剂在几秒钟内就会被分解,不干扰测定.荧光胺与伯胺的反应式如下:



衍生化产物的荧光强度决定于反应系统的 pH 值.例如肽类在 $\text{pH}=7$ 荧光最强;氨基酸则在 $\text{pH}=9$ 荧光最强,而在 $\text{pH}=7.4$ 时,只有很低的荧光强度.由于这一反应在室温下几秒钟内即可完成,荧光胺可以用作为氨基酸的柱后衍生化试剂.由于它与氨基酸的衍生化反应要求在碱性的反应系统中进行,这就不利于使用以硅胶为基体的固定相,因此不常用于柱前衍生.

c. 丹酰氯

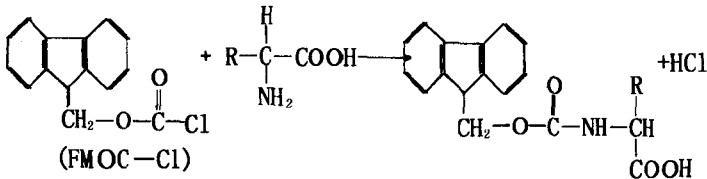
丹酰氯是另一种应用最广泛的荧光衍生化试剂。它可以与氨基酸、胺类以及酚类化合物反应，生成强荧光衍生物。它同伯胺、仲胺都能起反应，但反应速度比较慢，因此需要较长的衍生化反应时间，一般需要 20~40 min，因此只能采用柱前衍生化方式。荧光检测器对于丹酰氯-氨基酸衍生化产物的检测极限可达到 10 pg。丹酰氯与氨基酸的反应式如下：



另外，丹酰氯也被用于蛋白质及肽的末端基团分析^[40]。

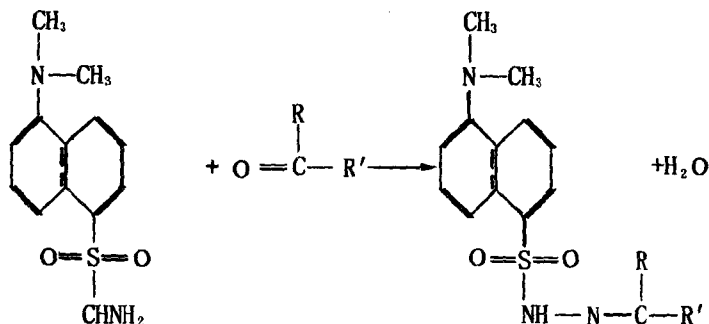
d. 芴代甲氧基酰氯 (FMOC-Cl)

FMOC-Cl 是一种较新的氨基酸衍生化试剂，1983 年 Josefs-son 首次以它作氨基酸的柱前衍生化试剂。它具有与 OPA 同样的灵敏度并易于反应。不仅适用于伯胺氨基酸，同样也适用于仲胺氨基酸的衍生。在合成肽的过程中可用它来保护氨基。它的另一优点是其氨基酸衍生物具有很稳定的荧光强度，特别适用于柱前衍生。由于 FMOC-Cl 本身也具有强的荧光，所以在衍生化反应后必须除去多余的试剂才能进入色谱柱。其反应式如下：



e. 丹酰肼

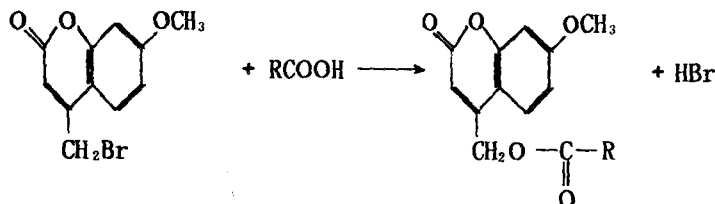
丹酰肼与酮反应生成具有强荧光吸收的腙，其反应式如下：



(丹酰肼)

f. 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素 (BrMC)

它是一种卤代烃，与羧酸反应生成具有强荧光吸收的酯。其反应式如下：

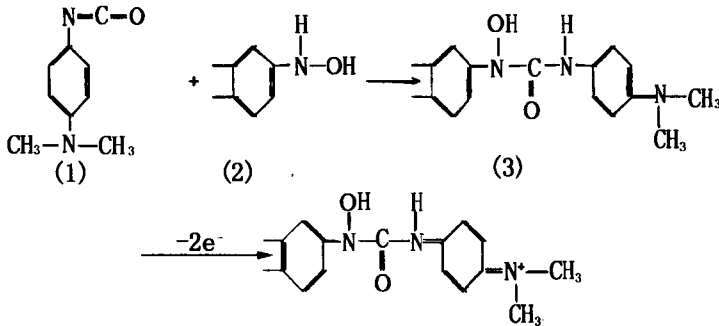


此衍生化反应在有碳酸钾的丙酮溶液中进行，或以皇冠醚作为相转移催化剂，也能加速这一酯化反应。

(3) 衍生化反应产物可用电化学检测器检测

液相色谱的电化学检测器有多种，有测量电量的库仑检测器，测量电导的电导检测器，及测量电流的安培型电化学检测器等。近年来，安培型电化学检测器发展较快，其基本原理是在特定的电压下，被测化合物在电极上被氧化或被还原，从而引起电流的变化而被检测。一些原来在电化学检测器上没有响应的化合物与某些衍生化试剂反应后，产物的电活性物质在检测器电极上发生氧化或还原反应而被检测。

例如，对二甲基氨基异氰酸苯酯 (1) 作为一种电活性衍生化试剂 (它本身并不具有电活性)，能与被检测化合物苯基羟胺 (2) 快速而且定量地发生反应，产生电活性物质羟基脲 (3)。产物 (3) 容易在碳糊电极表面被氧化，放出二个电子，而被灵敏的检测出来 (5 nmol 芳香羟胺)。



由于电化学检测器正处于发展阶段，因而关于这方面的衍生化反应的研究还在广泛进行中。

2. 衍生化的方式分类

衍生化样品预处理可分为柱前和柱后衍生化检测。

(1) 柱前衍生

被测组分先通过衍生化反应，转化成衍生化产物，然后再经过色谱柱进行分离、测定。在液相色谱法中柱前衍生的目的有下列几个方面：

- a. 靠接上带有发色基团的衍生化试剂使本来不能被检测的组分被检测出来；
- b. 使被测组分与衍生化试剂有选择地参加反应，而与样品中的其它组分分离开；
- c. 改变被测组分在色谱柱上的出峰次序，使之更有利于分离。

柱前衍生的优点是不必严格限制衍生化反应条件，允许较长的反应时间及使用各种形式的反应器。其缺点是当一个复杂组分样品经过衍生化反应后，有可能产生多种衍生化产物给色谱分离

带来困难。

(2) 柱后衍生

针对柱前衍生的某些缺点，近年来发展了柱后衍生的方法。即把多组分样品先注入色谱柱，按选定的色谱条件使之在色谱柱上得以分离，当各种组分从色谱柱流出后，分别与衍生化试剂相遇，在一定的反应条件下，生成带有发色功能团的衍生化产物再进入检测器。这种方法的优点是不会因增加衍生化反应步骤给色谱分离带来困难，柱后衍生最典型的例子是氨基酸分析仪，氨基酸分别从色谱柱流出后，与茚三酮相遇，在一定条件下，发生反应，生成的衍生物在 440 或 570 nm 下被检测，柱后衍生的装置见图 8.5。

在柱后衍生过程中要注意流动相组成与反应介质的一致性，特别是当流动相组成作梯度变化时，更要注意到这一点。另外的困难是要求被测组分从色谱柱出来后到达检测器之间体积要非常小，否则会引起组分的色谱谱带变宽而影响分离。而且要选择反应速度快的衍生化试剂，否则在短时间内反应不能完全。由于这些严格的要求，近年来对于柱后衍生用的反应器的设计作了很多理论上的研究，提出了多种方案，归纳起来有三大类。

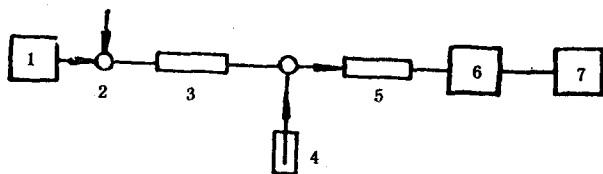


图 8.5 柱后衍生流程图

1 泵；2. 进样阀；3. 色谱柱；4. 衍生化试剂泵；5. 反应器；6. 检测器；7. 记录仪。

a. 毛细管式柱后反应器，如图 8.6 (a) 所示。毛细管内径为 0.25mm，以减少色谱峰在反应器中的扩散，适用于反应时间小于 30 s 的衍生反应。

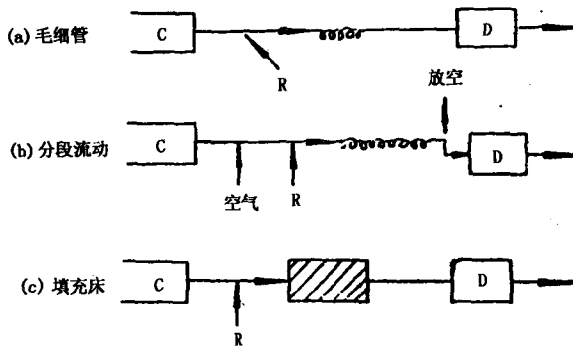


图8.6 柱后反应器的三种设计形式

C. 色谱柱; R. 衍生化试剂; D. 检测器.

b. 分段流动柱后反应器, 如图8.6 (b) 所示. 在操作过程中, 空气不断地进入系统, 使流体的流动被分割 (见图8.7). 由于空气的隔离, 减少了液体在流动时的扩散, 在进入检测池前这些空气泡再被放空. 当衍生化反应所需时间较长, 例如小于 120 s, 因而需要较长的螺旋管反应器时, 采用这种形式的反应器较为理想, 将能得到较好的色谱峰形.



图8.7 液体被空气分割的状态

c. 填充床柱后反应器, 如图8.6 (c) 所示, 这种反应器的优点是谱带扩散较前两种小, 但缺点是压降较大.

§ 8.4.2 液相色谱柱浓缩预处理技术

以上所述是通过衍生化反应方法来解决液相色谱法中遇到的样品的检测问题. 现在要讨论的是提高检测灵敏度问题. 由于欲测组分的浓度过稀, 而不能被检测出来, 使用柱浓缩技术, 欲测组分被浓缩在柱子上, 然后在较短时间内被冲出, 而能被检测^[41]. 利用浓缩柱进行浓缩的具体装置如图8.8 所示.

柱浓缩的原理: 先将欲浓缩的稀溶液, 用泵注入浓缩柱. 对

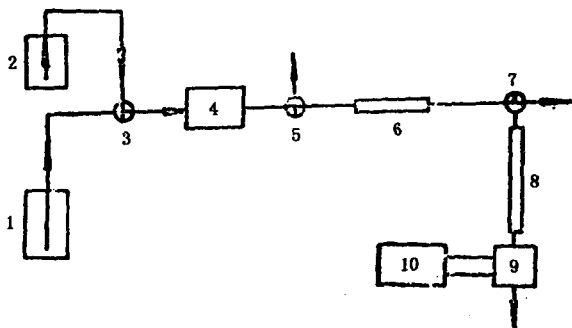


图8.8 使用浓缩柱的流程图

1. 流动相; 2. 样品; 3. 阀 1; 4. 泵; 5. 放空支路; 6. 浓缩柱; 7. 阀 2; 8. 分析柱; 9. 检测器; 10. 记录仪.

于浓缩柱的填料有一定要求，即当以此溶液的溶剂作流动相的条件下，溶质在固定相上有强的保留。例如，含有痕量菲的水溶液被泵注入装有十八烷基键合相的浓缩柱内，水中的其它极性样品首先流出，而非被保留在固定相上。此时阀 2 处于放空位置，当通过足够量含菲的水溶液后，除去样品瓶，换成其它流动相（如甲醇），开泵，通过支路排空管以甲醇置换管路。然后将阀 2 转向通入分析柱方向，由于菲在甲醇流动相条件下，在 ODS 柱上保留很弱，以比较快的脉冲形式进入分析柱而被检测。这种方法已被成功地用于测定水中的多环芳烃及苯甲酸酯类。据报道，经浓缩后对样品溶液中被测组分的最低检测浓度能降低 50 倍。

另一种在线浓缩装置使用了六通阀，见图 8.9^[43]。在这些在线浓缩装置中，要得到较好浓缩效果的关键是：

(1) 要注意浓缩柱的结构及它与分析柱的连结，要尽量减少这两部分的死体积，这种浓缩柱的结构有 $5 \times 2\text{mm i. d.}$ ， $5 \times 15\text{mm i. d.}$ ， $5 \times 50\text{mm i. d.}$ ，尽量使用短柱。

(2) 要注意选择合适的洗脱剂。当转动阀的手柄转到洗脱位置后，被浓缩的组分能尽快被洗脱出来。当柱子填料采用非极性的键合固定相时，常采用甲醇或四氢呋喃作为洗脱液。只有注意

了这些因素后，才能使被浓缩组分色谱图的峰宽不至于有明显变宽，才能达到提高检测灵敏度的目的。

根据柱浓缩的原理，改变不同固定相及流动相，可以有选择地浓缩欲测组分，这种方法特别适用于环保监测中某些组分的浓缩检测。

在液相色谱柱浓缩预处理技术中，除采用传统的反相、离子交换填料的预柱外，有两类新兴的预处理技术值得关注。

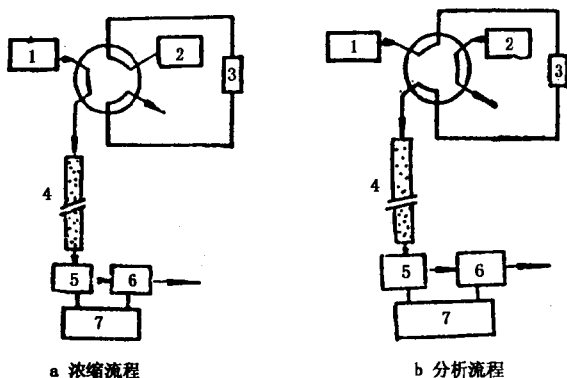


图8.9 在线富集 HPLC 流程

1. HPLC 泵；2. 取样泵；3. 富集柱；4. 分析柱；
5. 紫外检测器；6. 荧光检测器；7. 数据处理器。

1. 浸透限制固定相预柱

所谓浸透限制固定相 (restricted access stationary phase) 或浸透限制介质 (restricted access media)^[44~46]，是指蛋白质等大分子不能穿透进入其疏水孔内或袋中，而药物及其代谢产物等小分子则可以不受限制地自由出入填料孔内的固定相。使用这种固定相，大分子物质如蛋白质，在色谱的死体积中被排阻出来，避免了对色谱柱的破坏和对低分子量化合物测定的干扰；但是药物及其代谢产物等小分子量化合物，可以进入固定相的疏水部分而得到分离。因而血清样品可以直接注入浸透限制固定相色谱柱分离

测定,不必经过除蛋白质和萃取等步骤.这一类固定相包括内表面反相固定相,屏蔽疏水相固定相和混合功能固定相等.这一类固定相对药物的分离效率相对较低,在很多情况下都是通过柱切换技术来提高分离效率和定量的重复性.

2. 免疫萃取技术

免疫反应已广泛应用于生理、生化、医学等领域,近年来这一技术也逐步延伸到分析化学中的样品预处理^[47].生物大分子的抗体制备已被广泛接受,对于药物、环境毒物等低分子量化合物抗体的制备,通常把低分子量化合物与牛血清白蛋白共价交联的衍生物注入动物体内,产生抗低分子量化合物的免疫球蛋白.把产生的抗体连接到适当的固定相后,就可以用于低分子量化合物的免疫萃取.一般来说,有两种免疫萃取预处理方法:其一是离线萃取,这与以上介绍的固相萃取很相似,应用实例如黄曲霉素的免疫萃取预处理等^[48].其二是联线的柱切换免疫萃取预处理技术,预柱填充的免疫固定相不仅可以有效地吸附和浓缩样品分子,而且通过柱切换到分析柱可以很有效地分离测定被分离的化合物,应用实例如 β -19-nortestosterone的测定等^[49].

免疫萃取的最大优点是萃取选择性高,同时可以利用生物技术对抗体的特异性进行修饰,由此实现一种样品分子或一类样品分子(如药物及其代谢产物)的免疫萃取.免疫萃取的抗体分子较大,有可能存在较强的非特异性吸附和抗体的价格过高等缺陷是免疫萃取进入日常使用阶段的障碍.但随着科学技术的发展,这些新兴的技术和产品通过不断的改善和提高,必将被人们所广泛接受.

参考文献

- [1] R. O. McDowall, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **492**, 3(1989).
- [2] R. W. Frei and K. Zech(Editors), *Selective Sample Handling and Detection in High-Performance Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [3] 张锡瑜等编著, *化学分析原理*, 科学出版社, 北京, p. 249, 1991.
- [4] G. Schill, in *Separation Methods for Drugs and Related Organic Compounds*, Swedish Academy of Pharmaceutical sciences, Stockholm, p. 23, 1978.
- [5] C. F. Poole and S. A. Schutte, *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, p. 429, 1984.
- [6] R. M. Lee and P. M. Osborne, *J. Chromatogr.*, **146**, 178(1978).
- [7] R. M. Lee and R. D. McDowall, *J. Chromatogr.*, **273**, 335(1983).
- [8] J. M. Bonicamp, *J. Chromatogr. Sci.*, **20**, 389(1982).
- [9] R. E. Majors, *LC. GC.*, **13**, 82(1995).
- [10] *Waters Sep-Pak cartridge Application Bibliography*, Waters Chromatography Division, Millipore, Milford, M A, 4 th ed., 1986.
- [11] E. S. P. Bouvier, *LC and GC.*, **13**, 852(1995).
- [12] T. Schunk and M. F. Burke, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **25**, 81(1986).
- [13] C. K. Lim and T. J. Peters, *J. Chromatogr.*, **316**, 397(1984).
- [14] K. D. Sketchell, M. B. Walsh, M. J. Klooster, W. F. Balistreri and C. K. Lim, *J. Chromatogr.*, **385**, 267(1987).
- [15] E. Woolf and B. Matuszewski, *J. Chromatogr.*, **577**, 129(1992).
- [16] D. D. Blevins and S. K. Schultheis, *LC and GC.*, **12**, 12(1994).
- [17] G. A. Junk, M. J. Avery and J. J. Richard, *Anal. Chem.*, **60**, 1347(1988).
- [18] D. F. Hagen, C. G. Markell, G. A. Schmitt and D. D. Blevins, *Anal. Chim. Acta.*, **236**, 157(1990).
- [19] V. Coquart and M. C. Hennon, *J. Chromatogr.*, **585**, 67(1991).
- [20] R. E. Majors, *LC. GC.*, **13**(5), 364(1995).
- [21] 汪海林、邹汉法、张玉奎, *色谱*, **14**, 441(1996).
- [22] B. M. C. Westerink and M. J. H. Tuinte, *J. Neuro. Chem.*, **46**, 181(1986).
- [23] S. A. Wages, W. H. Church and J. B. Jr. Justice, *Anal. Chem.*, **58**, 1649(1986)
- [24] L. Stahle, P. Arner and U. Ungerstedt, *Life Science.*, **49**, 1853(1991).
- [25] T. P. Durkin, C. Messier, J. B. DeVries and B. H. C. Westerink, *Behav. Brain. Res.*, **49**, 181(1992).
- [26] T. Azekawa, A. Sano, K. Aoi, H. Sei and Y. Morita, *J. Chromatogr.*, **530**, 47(1990).

- [27] D. O. Scott, L. R. Sorensen and C. E. Lunte, *J. Chromatogr.*, **506**, 461 (1989).
- [28] D. O. Scott, M. A. Bell and C. E. Lunte, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 1249 (1989).
- [29] D. O. Scott and C. E. Lunte, *Pharm. Res.*, **10**, 335 (1993).
- [30] L. Stahle, S. Sergersvard and U. Ungerstedt, *J. Pharm. Meth.*, **25**, 41 (1991).
- [31] P. Sjoberg, I. M. Olofsson and T. Landgrist, *Pharm. Res.*, **9**, 1592 (1992).
- [32] 汪海林、邹汉法、冯爱生、张玉奎, *分析化学*, **25**, 2121 (1997).
- [33] C. E. Lunte, D. O. Scott and A. M. Herrera, *Curr. Sep.*, **10**, 41 (1991).
- [34] Hailin Wang, Hanfa Zou and Yukui Zhang, *Chromatographia*, **44**, 205 (1997).
- [35] Hailin Wang, Hanfa Zou and Yukui Zhang, *Anal. Chem.*, **70**, 373 (1998).
- [36] M. C. Linhares and P. T. Kissinger, *Anal. Chem.*, **64**, 1831 (1994).
- [37] 王俊德、商振华、郁蕴璐, *高效液相色谱法*, 中国石油化学工业出版社, 北京, p. 22, 1992.
- [38] 张仁斌等, *高效液相色谱在医学研究中的应用*, 上海科技出版社, 1983.
- [39] R. W. Frei and J. J. Lawrence, "Chemical Derivatization in Analytical Chemistry", Vol. 1, Plenum Press, London, 1981.
- [40] S. Einarsson, *J. Chromatogr.*, **348**, 213 (1985).
- [41] W. Roth and K. Beschke, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2**, 289 (1984).
- [42] W. Roth, *J. Chromatogr.*, **278**, 347 (1983).
- [43] H. Yoshida, I. Morita, G. Tamai and H. Imai, *Chromatographia*, **19**, 466 (1984).
- [44] I. H. Hagerstam and T. C. Pinkerton, *Anal. Chem.*, **57**, 1757 (1985).
- [45] T. C. Pinkerton, *J. Chromatogr.*, **544**, 12 (1991).
- [46] 李修禄, *生物医学色谱进展*, 第二卷(周同惠主编), 西北大学出版社, 西安, p. 37, 1994.
- [47] M. de Frutos, *Trends in Anal. Chem.*, **14**, 133 (1995).
- [48] 王光华、何才云、鲁长豪、赵建中、王勇, *色谱*, **13**, 238 (1995).
- [49] A. Farjam, G. J. de Dong and R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, **452**, 433 (1988).

第九章 高效液相色谱仪器

高效液相色谱仪是实现液相色谱分析的仪器设备，其基本单元组成如图9.1所示。高效液相色谱系统至少应包括贮液器、泵、进样器、分离柱、检测器和记录仪。先进的液相色谱仪器都由微机实现仪器控制和数据处理的全自动液相色谱仪。中国科学院大连化学物理研究所所属的国家色谱研究分析中心在国内完成了全盘自动化高效液相色谱仪器原理样机及其专家系统，二者结合形成了智能高效液相色谱仪，感兴趣的读者可参阅有关专著^[1]。本章主要介绍贮液器、泵、进样器和色谱柱的基本构造及性能。检测器将在第十章叙述。

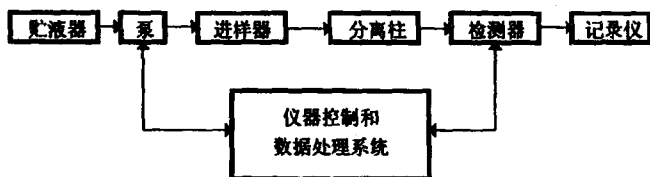


图9.1 高效液相色谱仪器的组成

§ 9.1 高压输液系统

高效液相色谱仪器的输液系统包括贮液罐、高压输液泵、梯度淋洗装置等。

§ 9.1.1 贮液系统

溶剂贮存器主要用来供给足够数量的符合要求的流动相以完成分析工作。对于溶剂贮存器的要求是：

- (1) 必须有足够的容积，以备重复分析时保证供液；
- (2) 脱气方便；
- (3) 能耐一定的压力；
- (4) 所选用的材质对所使用的溶剂都是惰性的。

溶剂贮存器一般是以不锈钢、玻璃或聚四氟乙烯衬里为材料。容积一般为0.5~2L为宜。溶剂使用前必须脱气。因为色谱柱是带压力操作的，而检测器是在常压下工作。若流动相中所含有的空气不除去，则流动相通过柱子时其中的气泡受到压力而压缩，流出柱子后到检测器时因常压而将气泡释放出来，造成检测器噪声增大，使基线不稳，仪器不能正常工作，这在梯度淋洗时尤其突出。常用的脱气方法有：

(1) 低压脱气法：电磁搅拌、水泵抽真空，可同时加温或向溶剂吹氮。由于抽真空或加热过程中可能引起流动相中低沸点溶剂的挥发而影响其组成，此法不适于二元以上冲洗剂组成的流动相脱气。

(2) 吹氮脱气法：氮气经由一圆筒过滤器通入冲洗剂中，在0.5 kg/cm²压力下保持10~15 min，氮气的小气泡可将溶于流动相中的空气带出，此法简单方便，适用于所有冲洗剂脱气，但由于氮气价格昂贵，在国内尚难于普及。

(3) 超声波脱气法：将冲洗剂瓶置于超声波清洗槽中，以水为介质超声脱气。一般500 ml溶液均需超声20~30 min方可达到脱气目的。此法方便，不影响溶剂组成，并适用于各种溶剂，目前国内使用较为普遍。使用此法时应注意避免将溶剂瓶与超声波清洗槽底或壁的接触，以免瓶子破裂。

§9.1.2 高压输液泵

高压输液泵是液相色谱仪的重要部件，它将流动相输入到柱系统，使样品在柱系统中完成分离过程。高效液相色谱用的高压泵应具备下述性能：

- (1) 流量稳定：通常要求流量精度应为±1%左右，以保证

保留时间的重复和定性定量的精度；

(2) 输出压力高：要求最高压力 35~50 MPa/cm²；

(3) 流量范围宽：一般在0.001~10 ml/min 范围任选；

(4) 耐酸、碱和缓冲液腐蚀；

(5) 压力波动小，更换溶剂方便，死体积小，易于清洗和更换溶剂；

(6) 具有梯度淋洗功能。

高压泵的分类，按输液性能可分为恒压泵和恒流泵。按机械结构又可分为液压隔膜泵、气动放大泵、螺旋注射泵和往复柱塞泵四种，前两种为恒压泵，后两种为恒流泵。恒压泵可以输出一个稳定不变的压力。在一般的系统中，由于系统的阻力不变，恒压亦可达到恒流的效果。但当系统阻力变化时，输入压力虽然不变，但流量却随阻力而变化。恒流泵则无论柱系统阻力如何变化都可保证其流量基本不变。在色谱实际操作中，柱系统的阻力总是有所变化的。例如填料装填不均匀由高压装柱造成的缝隙逐渐减小，填料变形，环境温度变化及梯度冲洗时流动相粘度的变化等都会造成柱系统阻力的改变。从这个角度来看，恒流泵比恒压泵显得优越，目前使用很普遍。然而，恒压操作对于在泵和柱系统所允许的最大压力下冲洗柱系统很方便且安全，因此有些恒流泵亦带有恒压输液的功能，以满足多种需要。

四种高压输液的特点和结构如下：

1. 液压隔膜泵

这种泵的特点是制备工艺要求低，高压密封易于解决。缺点是排吸液切换时压力波动较大，其结构如图9.2所示。

2. 气动放大泵

其特点是制备容易，输液时压力稳定无脉动。缺点是流量调节不方便，很少用于梯度淋洗。在柱系统流路阻力变化时，流量亦随之改变。目前多用于装柱。其结构如图9.3所示。

3. 螺旋注射泵（或电动螺旋泵）

这种泵流量稳定，属恒流泵。缺点是间断式供液，更换溶剂

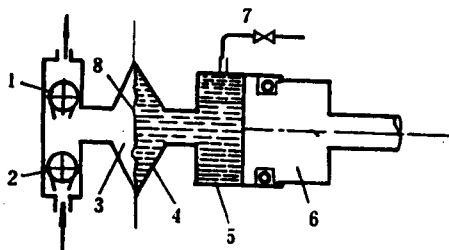


图9.2 液压隔膜泵结构示意图

1, 2. 进出口单向阀; 3. 非载液缸; 4. 压力传递介质缸; 5. 压力传递介质; 6. 柱塞; 7. 压力传递传质输入阀; 8. 压力传递隔膜.

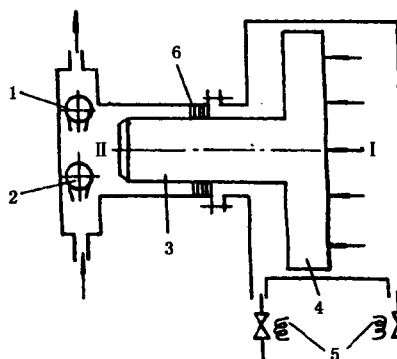


图9.3 气动放大泵结构示意图

I. 气缸; II. 液缸; 1, 2. 进出口单向阀; 3. 柱塞; 4. 气缸活塞; 5. 电磁阀; 6. 密封环.

时清洗不方便. 采用双缸结构解决了间歇供水的问题, 但清洗困难仍无法克服. 目前多用于超临界色谱. 其结构如图9.4所示.

4. 往复柱塞泵

这是目前在高效液相色谱仪中采用最广泛的一种泵, 其结构原理如图9.5所示. 由于这种泵的柱塞往复运动频率较高, 所以

对密封环的耐磨性及单向阀的刚性和精度要求都很高。密封环一般采用聚四氟乙烯添加剂材料制造，单向阀的球、阀座及柱塞则用人造宝石材料。往复泵有单柱塞、双柱塞（又分为并联式、补偿式或串联式、压吸入式等）和三柱塞泵等。一般来说，柱塞增加，其流量更平衡，脉动小。但构造也相应复杂，故障几率明显增加。

(1) 单柱塞泵：其结构如图9.5所示。这种泵的压力和流量波动大。采取一些必要的措施如增加阻尼器，对凸轮形状作特别设计以及利用先进的电子技术也可获得满意的结果，

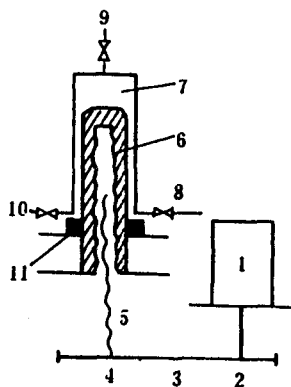


图9.4 螺旋注射泵

结构示意图

1. 电极；2, 3, 4. 传动齿轮；5. 丝杠；6. 柱塞；7. 液缸；8, 9, 10. 高压针形阀；11. 密封环。

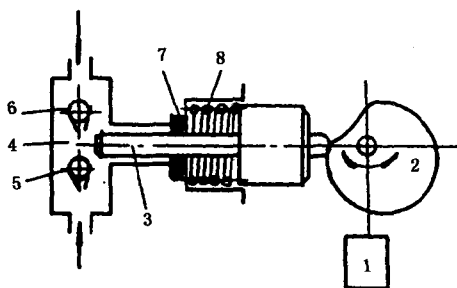


图9.5 单柱塞泵结构示意图

1. 电机；2. 凸轮；3. 柱塞；4. 泵腔；5, 6. 吸、排液单向阀；7. 密封环；8. 弹簧。

如岛津公司的 LC-3A 液相色谱仪所用的单柱塞泵，采取在排液冲程结束瞬间突然加速吸液，然后立即高速排液，使压力很快恢复到原有状态后，再匀速排液。其排液特征如图9.6所示。

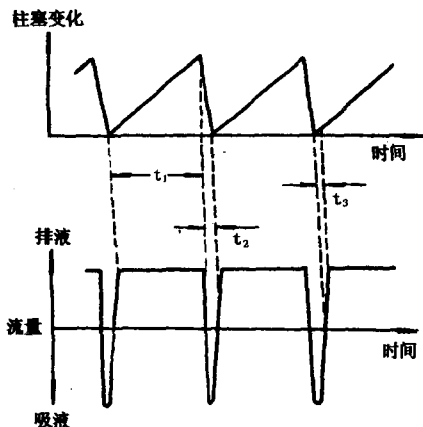


图9.6 单柱塞泵柱塞变位与流量特性曲线图

(2) 双柱塞并联泵：即两个泵头并联使用，凸轮相差 180° 。其排液特征如图9.7所示。为进一步改进泵的性能，把凸轮 360° 曲线分为匀加速、匀速、匀减速三段。凸轮相差 90° ，排液特性如图9.8所示。图9.9是P. E公司系列-3液相色谱仪所采用的双塞并联泵结构示意图。

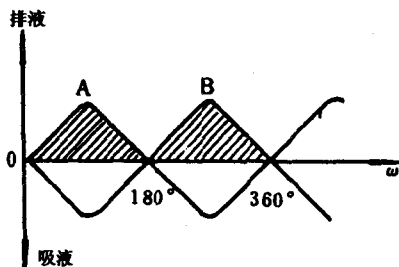


图9.7 双柱塞并联泵排液特性

(3) 双柱塞补偿泵：其结构如图9.10所示。主、副泵腔容积比为 $2:1$ 。当主泵头排液时，其50%的液体被副泵头吸入，另50%输入柱系统；当主泵头吸液时，副泵头将原先吸入的50%

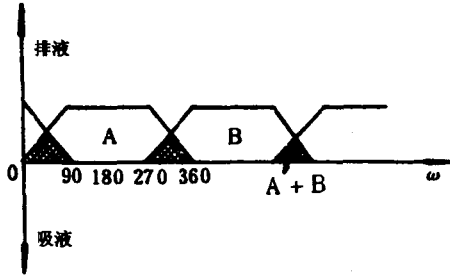


图9.8 特殊设计的双柱塞并联泵排液特性

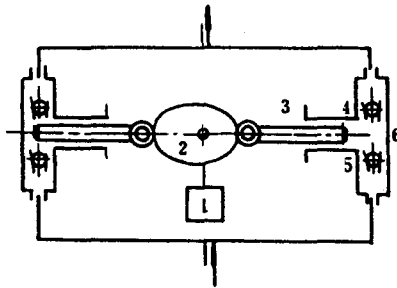


图9.9 双柱塞并联泵结构示意图

1. 电极；2. 凸轮；3. 柱塞；
4, 5. 单向阀；6. 泵腔。

液体再供给柱系统。其排液特征如图9.11所示。

这种结构又叫往复串联式泵，它比并联式泵的结构少用两组单向阀。由于单向阀的沾污往往是泵恒流输液性能下降的主要原因，因此一台泵所用的单向阀越少，发生故障的机会也越少，这种串联式补偿结构的高压泵流量精度高，压力波动小，更换溶剂方便，易于清洗，很适合于梯度淋洗。全自动高效液相色谱仪即采用这种结构的泵。

(4) 双柱塞正压吸入式恒流泵（或称双柱塞同步泵）：这是一种比较新颖的泵，它与上述各种泵的区别在于其吸液过程是在正压下进行的，从而避免了负压吸液吸入空气的可能性，其结构

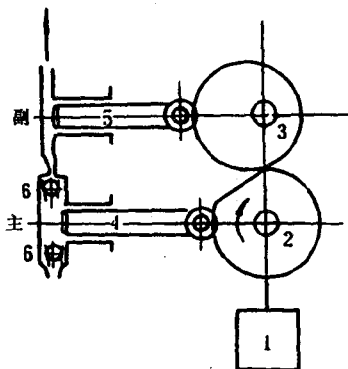


图9.10 双柱塞补偿式

恒流泵结构示意图

1. 电机; 2. 主凸轮; 3. 副凸轮; 4. 主
柱塞; 5. 副柱塞; 6. 排、吸液单向阀.

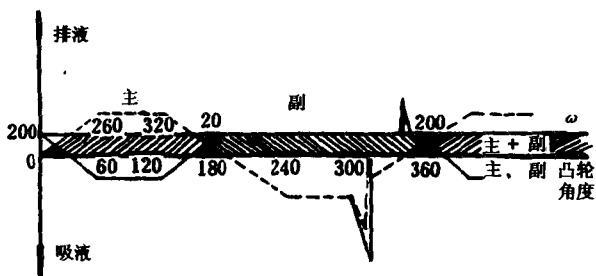


图9.11 双柱塞补偿式恒流泵排液特性

如图9.12所示, P. E公司的系列-4即用此种泵结构.

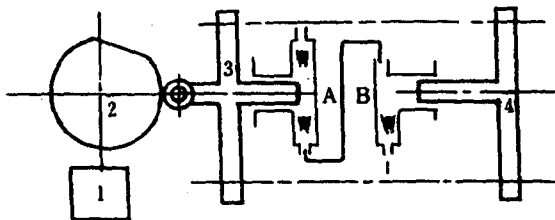


图9.12 双柱塞正压吸入式泵结构示意图

1. 电机; 2. 凸轮; 3. 高压柱塞; 4. 低压柱塞.

(5) 三柱塞泵: 这种泵由一个端面凸轮驱动三个同样的柱塞, 在三个相同的泵腔中作往复运动, 其相差为 120° . 该泵输入液

流平稳,流量精度高.由于结构复杂,商品仪器中并不普遍.

§ 9.1.3 梯度淋洗装置

梯度淋洗和气相色谱中的程序升温一样,给色谱分离带来很大的方便,已成为高效液相色谱仪不可缺少的部分,所谓梯度淋洗就是有两种(或多种)不同极性的溶剂,在分离过程中按一定程序连续地改变流动相的浓度配比和极性.通过流动相极性的变化来改变被分离样品的选择因子 α 值和保留时间,以使柱系统具有最好的选择性(即 $\alpha_{1,2} = \alpha_{2,3} = \dots = \alpha_{n-1,n}$)和最大的峰容量.采用梯度淋洗技术可以提高分离度,缩短分析时间,降低最小检测量和提高分析精度.梯度淋洗对于复杂混合物,特别是保留性能相差较大的混合物的分离是极为重要的手段.

梯度淋洗可分为低压梯度(又称外梯度)和高压梯度(又称内梯度).下面将分别予以介绍.

(1) 低压梯度装置:低压梯度是采用在常压下预先按一定的程序将溶剂混合后再用泵输入色谱柱系统,亦称为泵前混合.最简单的低压梯度装置,是利用两个直角三角形容器,其几何位置不同,两种冲洗剂的混合比例曲线不同.这种方法重复性较差,现已很少采用.

图9.13是一种目前较为广泛采用的低压梯度装置,可进行三元梯度淋洗,重复性较好.其中电磁比例阀的开关频率由控制器控制,改变控制器程序即可得一任意混合浓度曲线.

(2) 高压梯度装置:由两台高压输液泵、梯度程序控制器(或计算机及接口板控制)、混合器等部件所组成.两台泵分别将两种极性不同的溶剂输入混合器,经充分混合后进入色谱柱系统.这是一种泵后高压混合形式.图9.14是高压梯度淋洗流程示意图.

高压梯度所采用的泵多为往复柱塞泵,由此获得流量精度高,梯度淋洗曲线重复性好.

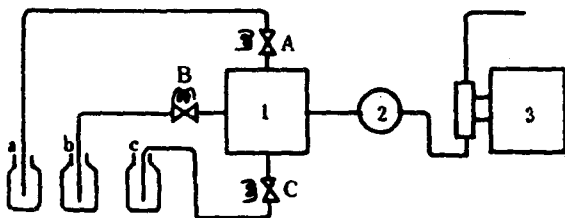


图9.13 三元低压梯度装置流程示意图

1. 四通; 2. 混合器; 3. 高压输液泵;
A, B, C. 电磁比例阀; a, b, c. 溶剂瓶.

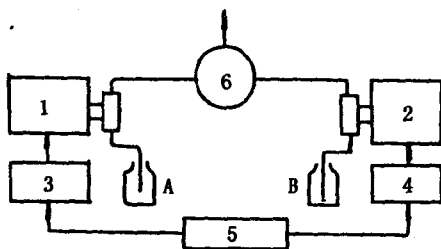


图9.14 高压梯度淋洗装置流程示意图

1. A泵; 2. B泵; 3. A泵控制器; 4. B
泵控制器; 5. 梯度程序控制器; 6. 混合器.

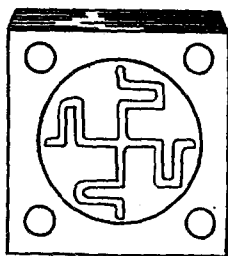


图9.15 微升级容器
混合器示意图

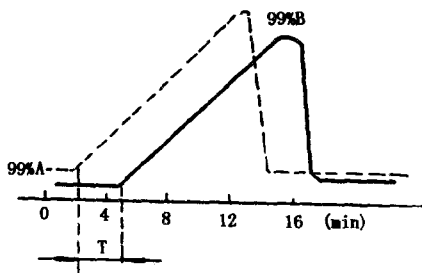


图9.16 用图9.15 混合器所得梯度曲线

A. 甲醇; B. 甲醇 + 300 $\mu\text{g/ml}$ 苯;
流量. 100 $\mu\text{l/min}$; T. 滞后时间.

梯度淋洗的溶剂混合器应具备容积小、无死区、清洗方便、混合效率高、性能稳定，才能获得重复的滞后时间短的梯度淋洗曲线。图9.15是HP公司1090液相色谱仪采用的混合器，可用于三元溶剂梯度洗脱，容积为9 μl ，专门为细内径高效柱设计。当流量为100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 时，梯度淋洗曲线滞后时间小于3 min，其理论值和实测值比较见图9.16。

在实际工作中，输液系统往往会发生各种各样故障，表9.1列出的是液相色谱输液泵常见的故障及其判断和排除方法。

表9.1 液相色谱输液泵常见的故障
及其故障的判断和排除方法^[2]

现象	判断	排除方法
压力高于正常值	泵出口过滤器堵塞(不连接色谱系统)测定流量是否正常	
	正常	拆下过滤器用硝酸超声清洗
	不正常	流量设定位是否有误
压力低于正常值,或者流量小于设定值	某联接处泄漏,堵住泵的出口,开泵压力升到300~400 bar.利用暂定键或超压保护停机的办法停泵,观察压力指示下降情况同时用一小片滤纸检查各连接处是否有泄漏	将泄漏处重新拧紧或更换密封刃环与管子接触处缠一点四氟薄膜临时解决待以后再作处理
	柱塞密封处泄漏,检查方法同上	拆下泵更换新柱塞密封圈
压力波动增大	单向阀被污染观察柱塞推杆的动作;向前推压力下降,入口阀有问题;向后退压力下降,出口阀有问题	拆下单向阀用硝酸超声反复清洗直到正常

续表

现象	判断	排除方法
压力波动增大	泵腔有气泡. 首先检查溶剂瓶中入口过滤器是否堵塞. 将溶剂瓶中入口过滤器提出液面吸入一小段气泡约 10 mm 长, 观察气泡运动情况. 泵吸液时气泡随液体前进, 排液时气泡不后退证明泵腔中存在气泡	如是堵塞, 用超声硝酸清洗入口过滤器. 在泵的出口接一只 10 ml 注射器, 抽动注射器用产生负压方法将气体吸出, 如果不成功可反复多次直到气泡排净为止

§ 9.2 进样系统

进样系统是将待分析样品引入色谱柱的装置. 对于液相色谱进样装置, 要求重复性好, 死体积小, 保证柱中心进样, 进样时对色谱柱系统流量波动要小, 便于实现自动化等.

进样系统包括取样、进样两个功能. 而实现这两个功能又有手动和自动两种方式.

§ 9.2.1 注射器进样

用 1~10 μl 微量注射器将样品注入专门设计的与色谱柱相联的进样头内. 这种进样方式可以获得比其它任何一种进样方式都要高的柱效, 而且价格便宜、操作方便. 但操作压力不能过高, 一般在 10 MPa/cm² 以下使用. 此外隔垫容易因吸附样品而产生记忆效应, 进样重复性只能达到 1%~2%.

§ 9.2.2 阀进样

进样阀分为定体积和不定体积两种. 可以直接用于高压 (35~40 MPa/cm²) 下, 把样品送入色谱柱, 不需要停流. 进样量由固定体积的定量管或微量注射器控制 (常压), 所以重复性好. 如果装上电动或气动驱动装置, 可做到简单地自动进样. 阀进样比注射器进样柱效下降 5%~10% 左右, 但重复性好. 图

9.17是几种进样阀的结构示意图.

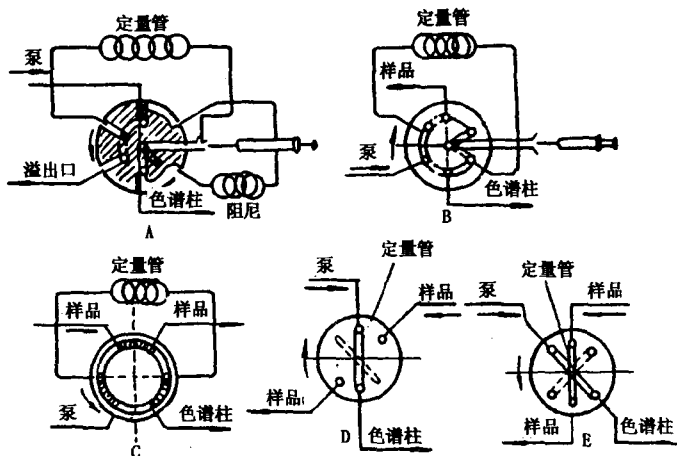


图9.17 各种进样阀结构示意图

§ 9.2.3 自动进样器

在程序控制器或微机控制下,可自动进行取样、进样、清洗等一系列操作.操作者只须将样品按顺序装入贮样装置.

下面介绍几种比较典型的自动进样装置.

圆盘式自动进样的工作步骤(如图9.18所示):

- (1) 电机带动贮样盘旋转,将待分析样品置于取样针下方.
- (2) 电机正转丝杆带动滑块向下移,把取样针插入样品瓶塑料盖,滑块继续下移,将瓶盖推入瓶内(如图9.19所示),在瓶盖挤压下样品经管道注入进样阀定量管,完成取样动作.
- (3) 进样阀切换,完成进样.
- (4) 电机反转,丝杆带动滑块上移,取样针恢复原位.

类似这种结构的进样器有 Micromeritics 的 MODEL725 和岛津 STL-2AS 等型号.

链式自动进样器的工作步骤(图9.20):

- (1) 链轮拨动样品链,将待分析样品瓶置于取样针下;

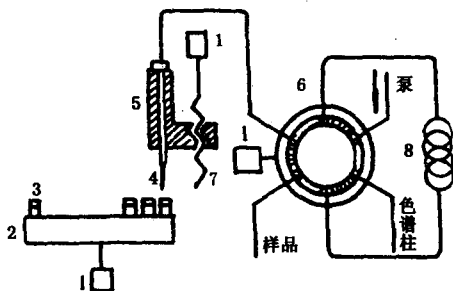


图9.18 圆盘式自动进样示意图

1. 电机; 2. 贮样圆盘; 3. 样品瓶; 4. 取样针;
5. 滑块; 6. 进样阀; 7. 丝杆; 8. 定体积量管.

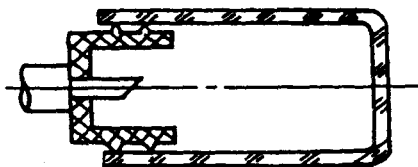


图9.19 进样瓶结构示意图

(2)转角机构由虚线位置转到实线位置,并下降插入样品瓶内;

(3)蠕动泵正转将样品吸入定体积量管,完成取样动作;

(4)进样切换,完成进样;

(5)转角机构退回虚线位置;

(6)蠕动泵反转输入清洗液,清洗取样系统;

(7)进样阀复原;

(8)蠕动泵正转吸入空气,干燥取样管路.

坐标式自动进样器工作步骤(图9.21):

(1) 取样针升起;

(2) 微机控制坐标, 贮样盘将待分析样品瓶置于取样针下;

(3) 取样针下降, 插入样品瓶内;

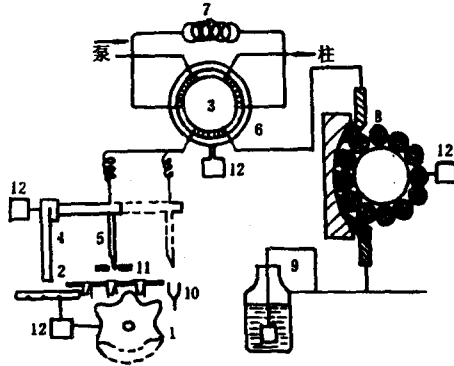


图9.20 链式自动进样器示意图

1. 链轮; 2. 样品链; 3. 样品瓶; 4. 转角机构; 5. 取样针; 6. 进样阀; 7. 定体积累量管;
8. 蠕动泵; 9. 清洗液瓶; 10. 排废液口; 11. 取样针定位; 12. 电机.

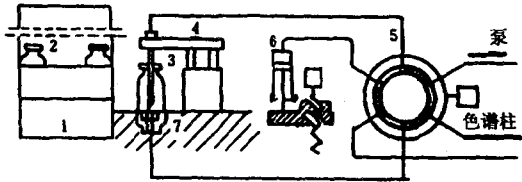


图9.21 坐标式自动进样器示意图

1. 坐标式贮样盘; 2. 试样瓶; 3. 取样针; 4. 取样针升降机构; 5. 方式切换阀; 6. 吸样泵; 7. 取样针插入口.

- (4) 自动吸样泵，取样量由微机控制；
- (5) 取样针下降插入取样插入口；
- (6) 方式阀切换，由流动相将样品载入色谱柱系统；
- (7) 吸样泵复位，方式阀复位。

自动进样器是智能色谱仪的组成部件，只有采用准确而可靠的自动进样装置，才能真正地实现仪器的全盘自动化及其闭环控制。在我们所研制的全自动色谱仪中分别采用了与上海科仪厂共

同研制的自动进样装置及 Micromeritics 的 MODEL725 自动进样器，通过自行设计的接口板由微机控制。

表9.2 列出的是液相色谱进样阀常见的故障及其故障的判断和排除方法。

表9.2 高效液相色谱进样阀常见故障及其故障的判断和排除方法^[2]

现象	判断	排除方法
进样不出峰或者峰高不正常	<ol style="list-style-type: none"> 1. 注射器泄漏 2. 阀转子上针头密封垫磨损导致泄漏 3. 选用的注射器针头与阀不匹配 配 7123 阀针头直径为0.7mm 4. 定子与转子接触密封面损坏引起内通道断路 5. 定体积量管堵塞 	<p>更换新注射器</p> <p>更换新的零件</p> <p>更换合适的针管，国产 7 号长针头比较合适。但需加工成适当长度</p> <p>国产微量注射器不能用，它的针头直径多是 0.5mm</p> <p>损坏不严重经重新研磨要恢复性能。否则更换新的转子</p> <p>设法打通，或者更换新的</p>
出现无名峰	<ol style="list-style-type: none"> 1. 转子针头密封垫及进样针导管污染 2. 阀样品通路清洗不干净 	<p>清洗阀的样品通路，方法是把阀切换到进样位置并倒置，用一只容积较大的注射器吸满清洁溶剂插入进样针导管一半处，将溶剂推出，任其从导针口流出，反复多次。如果仍无效果必须将被污染零件拆下，浸泡在溶剂中一段时间，然后重新装配好</p> <p>方法同上，但必须让注射器插到底，使清洗溶剂从排空口流出</p>
峰形拖尾	<ol style="list-style-type: none"> 1. 定体积量管与阀连接出现死区 2. 色谱柱与阀的连接管连接过程出现死区 	<p>更换新管消除死区</p> <p>方法同上</p>

§ 9.3 色谱柱系统

色谱是一种分离分析手段，分离是核心，因此担负分离作用的色谱柱是色谱仪的心脏。对色谱柱的要求是柱效高、选择性好、分析速度快等。市售的用于 HPLC 的各种微粒填料如硅胶，以及硅胶为基质的键合相、氧化铝、有机聚合物微球（包括离子交换树脂），其粒度一般为 3, 5, 7, 10 μm 范围，其柱效的理论值可达到 50 000/m 到 160 000/m 理论塔板数。对于一般的分析任务，只需 5000 理论塔板数的柱效，对于同系物分析，只要 500 塔片数即可，对于较难分离物质对则可采用高达 2 万理论塔板数柱效的柱子，因此一般用 100~300 mm 左右的柱长就能满足复杂混合物分析的需要。由于柱效受柱内外因素、特别是柱外因素影响，因此为使色谱柱达到其应有的效率，除系统的死体积要小外，需要有合理的柱结构及柱装填方法。本节主要介绍柱子结构、填充以及使用技术等。至于如何选择合适的柱系统已在第六章作过介绍。

§ 9.3.1 色谱柱的结构

(1) 色谱柱的长度：在日常分析中，普遍采用微粒高效固定相，100 mm 长柱子即可满足分析要求，如果采用 3 μm 的填料时，30 mm 长即可，如样品中有杂质时，易将柱子堵塞，其柱效率高，但柱压降亦大。因此，采用 5 μm 或 10 μm 粒度的载体为更佳。对于难分离样品，柱长可增加到 250 mm，如再增加柱长，尽管柱效高，但柱前压力太大，只在特殊情况下采用。

(2) 色谱柱内径：常用的分析柱内径是 4.6 mm，国内有 4 mm 和 5 mm 内径的，随着柱技术的发展，细内径柱受到人们的重视，内径 2 mm 柱已作为常用柱，只要将柱外效应减至最小，细内径柱亦可获得与粗柱基本相同的柱效，而溶剂消耗量却大为下降，目前，1 mm 甚至更细内径的高效填充柱都有商品出售，

特别在与质谱联用时，为减小溶剂用量，常采用内径为0.5 mm以下的毛细管柱。6 mm内径以上的柱主要用作半制备或制备目的。习惯上，人们采用的柱内壁是经过抛光的，尽管实验已经证明影响柱效的主要因素是柱外效应，但从消除柱内壁纵向沟槽目的来说，内壁抛光是有益的。

§ 9.3.2 色谱柱的填充

根据填料粒度的大小，高效液相色谱柱可分为干法和湿法装填两种方法。

对于直径大于20 μm 的填料，一般采用经典的干法填充技术，即将填料通过漏斗加入到垂直放置的柱管中，同时，进行敲打或振动柱管，以得到填充紧密而均匀的填充床。

目前高效液相色谱所采用的填料粒度多在3~10 μm 范围内(3 μm , 4 μm , 5 μm , 7 μm , 10 μm)，这类微粒填料由于其表面活性很强，容易结团，干法装柱无法使填料填充紧密，必须采用湿法装柱技术——淤浆装柱法。

所谓淤浆装柱法，即以—种或数种溶剂配制成悬浮液，以超声处理使填料粒子在悬液中高度分散并呈现悬浮状态即匀浆。然后用加压介质（己烷或甲醇等）在高压下将匀浆压入柱管中，制备成具有均匀、紧密填充床的高效液相色谱柱。

淤浆装柱方法较多，有“平衡密度法”、“粘度法”、“稳定淤浆法”和“非平衡密度法”等，淤浆装柱必须满足下述条件：

(1) 制备成的匀浆，其固定相粒子应在介质中高度分散悬浮。

(2) 匀浆配制稠度，即固定相与匀浆介质的比例，在匀浆罐容积允许范围内宜大一些。

(3) 装填压力由固定相粒度、柱长等因素而定。对于常规柱控制在35~60 MPa/cm²。柱管越长则要求的填充压力也越高。

值得注意的是，加压介质应尽可能选择与分析冲洗条件接近的溶剂，以便省略溶剂转换和柱性能调整等步骤。

必须指出，高效液相色谱柱的获得，装填技术是重要环节。然而根本问题还在于填料本身的性能优劣，以及与其相匹配的色谱仪柱系统的结构是否合理，图9.22为装柱流程示意图。

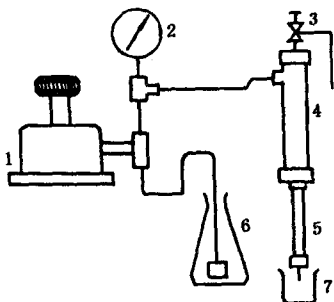


图9.22 装柱流程示意图

1. 高压泵；2. 压力表；3. 排空气阀；4. 匀浆罐；5. 色谱柱；6. 加压介质瓶；7. 废液杯。

§ 9.3.3 色谱柱的评价

一支色谱柱的好坏必须有一定的指标进行评价。一个合格的色谱柱评价报告应给出色谱柱的基本参数，如色谱柱长度、内径、填充载体的种类、粒度、色谱柱的柱效、不对称度和柱压降等。评价液相色谱柱的仪器系统有相当高的要求，一是液相色谱仪器系统的死体积应该尽可能小，这包括进样阀、连接管和检测器的池体积等因素。二是采用的样品及操作条件应当合理，在此合理的条件下，评价色谱柱的样品可以完全分离并有适当的保留时间。以下是评价各种常用的色谱柱的样品及其操作条件。

1. 烷基键合相柱的评价 (C_8 , C_{18})

这是目前应用最广泛的色谱柱，其评价方法为：

操作条件：(1) 流动相：甲醇/水 (83/17)；(2) 线速：1 mm/s, 对柱内径为5.0 mm 的色谱柱流量大约为 1 ml/min；(3) 检测器：紫外检测波长 254 nm；(4) 进样量：10 μ g。

样品：苯、萘、联苯、菲。

2. 苯基键合相色谱柱的评价

除流动相浓度与烷基键合相色谱柱不同外，其它均相同。

流动相：甲醇/水 (57/43)。

3. 氨基键合相柱的评价

操作条件：(1) 流动相：正庚烷/异丙醇 (93/7)；(2) 线速：1 mm/s；(3) 检测器：紫外检测波长 254 nm；(4) 进样

量: 10 μg .

样品: 三苯甲醇、苯乙醇、苯甲醇.

4. 氨基键合相色谱柱的评价

(1) $-\text{NH}_2$ 作为极性固定相

操作条件: (1) 流动相: 正庚烷/异丙醇 (93/7); (2) 流速: 1 mm/s; (3) 检测器: 紫外检测波长 254 nm; (4) 进样量: 10 μg .

样品: 苯、萘、联苯、菲.

(2) $-\text{NH}_2$ 作为弱阴离子交换剂

操作条件: (1) 流动相: 水/乙腈 (98.5/1.5); (2) 流速: 1 mm/s; (3) 检测器: 示差折光检测; (4) 进样量: 10 μg .

样品: 核糖、鼠李糖、木糖、果糖、葡萄糖.

5. $-\text{SO}_3\text{H}$ 键合相色谱柱的评价

$-\text{SO}_3\text{H}$ 是强阳离子交换剂

操作条件: (1) 流动相: 0.05 mol/L 甲酸胺/乙醇 (90/10); (2) 流速: 1 mm/s; (3) 检测器: 紫外检测波长 254 nm; (4) 进样量: 10 μg .

样品: 阿斯匹林、咖啡因、非那西汀.

6. $-\text{R}_4\text{NCl}$ 键合相色谱柱的评价

$-\text{R}_4\text{NCl}$ 是强阴离子交换剂

操作条件: (1) 流动相: 0.1 mol/L 硼酸盐溶液 (加 KCl) (pH 9.2); (2) 流速: 1 mm/s; (3) 检测器: 紫外检测波长 254 nm; (4) 进样量: 10 μg .

样品: 尿苷、胞苷、脱氧胸腺苷、腺苷、脱氧腺苷.

7. 硅胶柱的评价

操作条件: (1) 流动相: 正己烷; (2) 流速: 1 mm/s, 对柱内径为 5.0mm 的色谱柱大约为 1 ml/min; (3) 检测器: 紫外检测波长 254 nm; (4) 进样量: 10 μg .

样品: 苯、萘、联苯、菲.

上述是一些普通色谱柱的评价方法, 当然也可以用其它适当

的样品及条件来评价高效液相色谱柱。

在液相色谱柱的使用过程中，会出现各种各样的故障，表9.3列出的是高效液相色谱柱常见的故障及其排除的方法。

表9.3 高效液相色谱柱常见故障的判断及排除方法^[2,3]

现象	判断	排除方法
柱压高于正常值	1. 柱端过滤器堵塞 2. 长期使用柱端固定相板结 3. 分析生化、染料等易污染固定相的样品	1. 拆下过滤器用硝酸超声清洗 2. 挖掉板结部分修补柱端 3. 方法同上,采用保护柱
柱压低于正常值	某连接处泄漏	打高压 300 bar 查找泄漏处 拆下柱子加适当力拧紧 或衬四氟薄膜
分离度变差	1. 柱端固定相板结 2. 柱端床层塌陷 3. 柱子寿命已到	1. 挖掉修补,重填固定相 2. 修补柱端 3. 更换新柱
保留时间不重复	1. 更换流动相新流动相未完全顶替掉 2. 正相柱,流动相脱水不完全	1. 延长平衡时间 2. 重新脱水
出现无规律色谱峰	长期进样滞留在柱中的组分被洗脱出来	用强极性溶剂冲洗 再用流动相平衡

§ 9.3.4 色谱柱的使用技术

1. 柱子连接

对于 k' 值很接近的两个以上组分，用通常高效柱无法分离时，如果柱系统不变，除了改变流动相的组成可能有一定效果外，唯一方法只有增加色谱柱的理论塔片数。为此通过减小固定相粒度和增加柱长可达到目的。但因装填设备及技术所限，不能

超出常规的极限。因此设想将两根或多根高效柱连接起来，从而获得两倍以至于几倍柱效，理论上似乎没有问题，实际得到的结果是4根 2×250 mm i. d. ($N = 80\,000/m$ 理论塔板数) 柱效的高效柱，连接后的柱效为 $N = 70\,000/m$ 理论塔板数。说明连接是可行的，结果比较满意。不过对每根单一色谱柱而言，柱效的损失达 $10\% \sim 15\%$ 。连接方法如图9.23所示。

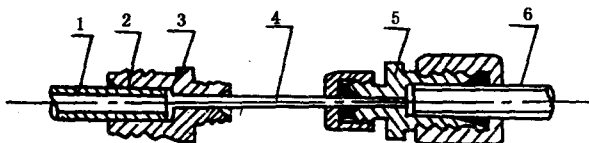


图9.23 柱子连接示意图

1. 色谱柱 I；
2. 色谱柱 I 出口接头；
3. 网片；
4. 连接管；
5. 色谱柱 II 入口接头；
6. 色谱柱 II。

2. 保护柱

即在分析柱的入口端，装有与分析柱相同固定相的短柱（ $5 \sim 30$ mm长），可以经常而且方便地更换，因此起到保护、延长分析柱寿命的作用。

由于采用保护柱使分析柱损失一定的柱效。可是，换一根分析柱不仅浪费（柱子失效是柱端部分），而且费事，而保护柱对色谱系统的影响则可以忽略不计。即使损失一点柱效也是可取的。

3. 色谱柱的切换

柱切换技术是近10年所发展起来的液相色谱应用技术。如图9.24所示。

用两只结构相同、操作同步的切换阀，在对应的位置联接不同性能、不同规格的分析柱。根据需要可以完成更换色谱柱、改变冲洗条件、反冲及馏分切割等流程。配合以微机控制便使之成为智能型液相色谱仪的又一重要部分。

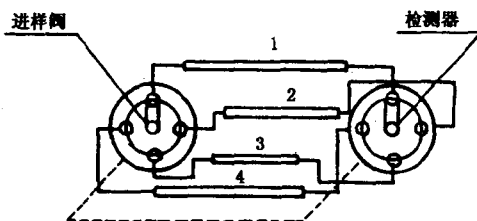


图9.24 柱子切换示意图

§ 9.3.5 色谱柱恒温装置与馏分收集器

1. 色谱柱恒温装置

提高柱温有利于降低溶剂粘度和提高样品溶解度，改变分离度，也是保留值重复稳定的必要条件。特别对需要高精度测定保留体积的样品分析尤其重要。

以下介绍几种常用恒温装置：

(1) 水浴式：用恒温水浴槽给色谱柱夹套内注入所需温度的循环水，借助水的温度使色谱柱恒定于某温度。夹套如图9.25所示。

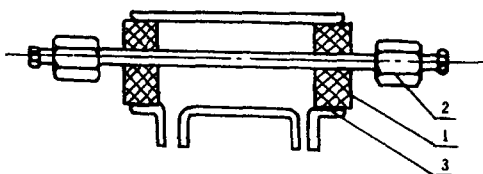


图9.25 水浴式恒温装置示意图

1. 橡胶塞；2. 色谱柱；3. 恒温夹套（材料：金属或玻璃）。

(2) 电加热式：在金属块（常用铝）上安装电加热元件，温度控制器控制电加热元件电流大小，可以使金属块恒定温度，将色谱柱置于两块金属之间，由金属块传递温度到恒温。

(3) 恒温箱式：即把电加热式中所用的装有电加热元件的金属块，安装在具有保温性能的箱内，使整个箱内恒定在所需要的温度。为保证安全，运转时以一定的流速向箱内吹氮，以免万一有机溶剂泄漏浓度过高时发生危险。

用于液相色谱柱恒温装置的最高温度不超过 100°C ，否则流动相气化会使分析工作无法进行。

2. 馏分收集器

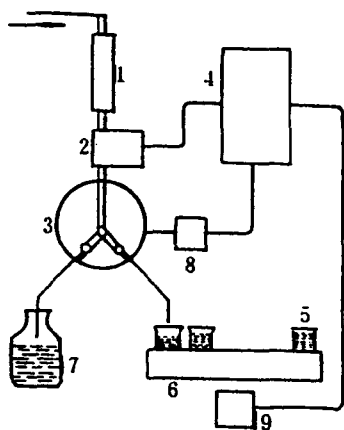


图9.26 馏分收集器

1. 色谱柱；2. 检测器；3. 切换阀；4. 程序控制器；5. 收集试管；6. 试管放置盘；7. 冲洗液回收瓶；8, 9. 电机。

对于以分离为目的的制备色谱，馏分收集器是必不可少的。现代的馏分收集器，可以按样品分离后组分流出的先后次序，或按时间，或按色谱峰的起止信号，根据预先设定好的程序，自动完成收集工作。图9.26是馏分收集器的结构流程示意图。

工作原理：在无组分流出现时，切换阀3与冲洗液回收瓶连接，可回收一部分冲洗剂。

当第一个组分流出现时，检测器2通过控制器4将阀3切换至收集位置，令试管盘前移一格，收集一个组分。

当第一个组分收集结束时，检测器通过控制器令试管盘前移一格。

当第二个组分流出现时，检测器将试管盘前移一格，收集第二个组分，以此重复，直至最后一个组分收集结束后，控制器才将阀3切回原处，完成一个样品的收集工作。

参 考 文 献

- [1] 卢佩章、张玉奎、梁鑫淼, 高效液相色谱法及其专家系统, 辽宁科技出版社, 沈阳, 1992.
- [2] 中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心编著, 高效液相色谱讲义, 1990.
- [3] 袁倚盛. HPLC系统的故障排除, 南京大学出版社, 南京, 1991.

第十章 液相色谱检测技术和 色谱峰定性定量

HPLC 检测器是用于连续监测被色谱系统分离后的柱流出物组成和含量变化的装置。其作用是将柱流出物中样品组成和含量的变化转化为可供检测的信号，完成定性定量的任务。因此，检测器是一种信号接收和能量转换装置。由于在 HPLC 中冲洗剂的性质在大多数情况下与样品的物理性质相近，因此要测定在大量冲洗剂中痕量分析物质的含量是艰巨的，迄今还没有一种通用型高灵敏度的检测器能完成所有各类物质的定性定量任务。

对 HPLC 检测器要满足以下几个方面的要求^[1,2]：

- (1) 灵敏度高，以便能检测出 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下溶质的含量；
- (2) 线性范围宽，在样品含量有几个数量级变化时，也能落在检测器的线性动态范围之内，以便准确、方便地进行定量测定；
- (3) 响应快，以便能快速、精确地将流出物转换成能记录下来的电信号；
- (4) 稳定性好，对流量、温度的变化不敏感；
- (5) 可靠性高，操作简单，维修方便；
- (6) 噪声低，漂移小，对冲洗剂组分的变化不敏感，从而在进行梯度淋洗时也能测定；
- (7) 价格便宜；
- (8) 不破坏溶质，以便能将样品接收下来，必要时作它用；
- (9) 不引起很大的柱外谱带扩张效应，以保持高的分离效能。

HPLC 的检测器很多，分类方法也很多，按照用途分类，可分为通用型和选择性两类。属于通用型的有示差折光（有时也称

为折射指数, RI)、火焰离子化、电容等。它能连续地测定柱后流出物某些物理参数如折射指数、含碳量、介电常数等的变化。这是任何有机物溶液都存在的物理量, 因此具有广泛的适应性。但因其灵敏度低, 且由于对流动相也有响应, 因此容易受流动相组成、流速、温度等的影响, 引起较大的噪声和波动, 也不能使梯度洗脱, 因此限制了使用范围。属于选择性检测器的有紫外吸收、紫外可见分光、荧光、化学发光、安培、光导、极谱等。它们对被检测物质的响应有特异性, 而对流动相则没有响应或响应很小, 因此灵敏度很高, 受操作条件变化和外界环境影响很小, 可用作梯度淋洗。

按测量性质分类, 可分为浓度型和质量型。前者与溶质在溶液中的浓度有关, 是总体性质的检测器。紫外吸收、示差折光、荧光等属于这类。后者与待测物的质量有关, 氢火焰、库仑、同位素及质谱中的总离子流等属于质量型。

按测量原理又可分为光学检测器和电学检测器, 此外还有利用热学原理检测的吸附热检测器。

目前正在积极开发 HPLC 与傅里叶变换红外、质谱、核磁共振、电感偶合等离子体光谱等联用技术的研究, 并已取得了很大的进展, 以便从根本上解决色谱流出物的定性问题, 有些联用仪器已有商品仪器出售。

§ 10.1 检测器的性能指标

§ 10.1.1 噪声和漂移

噪声和漂移是检测器稳定性的主要表现。噪声是指与被测物无关的检测器输出信号的随机扰动变化, 分短期噪声和长期噪声两种, 如图10.1a 和 b 所示。

短期噪声使基线呈“绒毛状”, 因信号频率的波动而引起, 由有关电子部件的质量和泵的脉动等产生。长期噪声是输出信号随机的和低频的变化情况, 是不规则的变化, 大部分情况是由于

检测器本身组件不稳定或溶剂不纯，温度和流速等的波动所引起的。只有通过改进结构和设计，更换部件，控制周围环境等来加以消除。

噪声通常用最高灵敏度下记录器满量程的百分比来表示，也可用检测器自身的物理量来表示。

基线随时间的增加而产生的偏离称为漂移。如图10.1c所示。它反映的是信号的连续递增与递减，可用一定时间范围内（如1h）信号的变化作为漂移大小的量度。它是由于电源电压不稳、色谱系统没有达到平衡、固定相的流失、冲洗剂的变化、温度和流量等的波动所引起的，要根据不同情况采取相应措施加以消除。

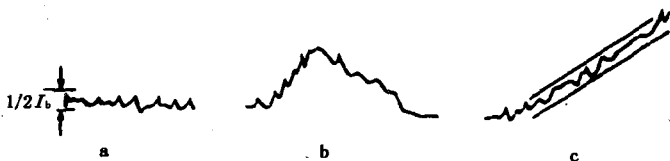
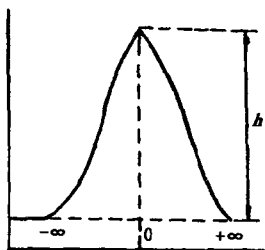


图10.1 噪声和漂移

§ 10.1.2 灵敏度

灵敏度是检测器最主要的性能指标。它表示一定量的样品物质通过检测器时所给出的信号大小。假如所得的分离谱图是如图10.2所示的高斯型分布。对于微分型检测器，此时进入检测器的样品量是随时间或冲洗剂体积而变化的，当以冲洗剂体积为计算单位时，通过检测器的样品量（ m_i 等于它在冲洗剂中的浓度 C (g/ml) 在全部冲洗剂体积下的积分值：



$$m_i = \int_{-\infty}^{+\infty} Cdv \quad (10.1)$$

图10.2 色谱流出曲线图

设 u_1 为记录器纸速 (cm/min); u_2 为

记录器灵敏度 (mV/cm); h 为峰高. 则浓度 C 为

$$C = \frac{hu_2}{S_i} \quad (10.2)$$

式中 S_i 定义为检测器的灵敏度, 它表示单位浓度的样品所产生的电信号的大小 (mV·ml/g). 若冲洗剂的流速为 F_c , 则在时间 t 内, 冲洗剂流过的体积为

$$V = F_c \cdot t = F_c \cdot \frac{x}{u_1}$$

这里 x 为记录纸所走的距离, u_1 为记录器的纸速, 所以:

$$dV = \frac{F_c}{u_1} dx \quad (10.3)$$

将式 (10.2), (10.3) 代入式 (10.1), 得:

$$m_i = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{hu_2}{S_i} \cdot \frac{F_c}{u_1} dx = \frac{u_2}{u_1} \cdot \frac{F_c}{S_i} \cdot A_i$$

此式中 A_i 为样品组分 i 的峰面积, 由上式可得:

$$S_i = \frac{u_2}{u_1} \cdot \frac{F_c}{m_i} \cdot A_i \text{ (mV} \cdot \text{ml/g)} \quad (10.4)$$

若横坐标以时间为单位, 则有:

$$m_i = \int_{-\infty}^{+\infty} C dx = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{hu_2}{S_i} dt$$

将 $t = x/u_1$, $dt = dx/u_1$ 代入上式, 得:

$$m_i = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{hu_2}{S_i u_1} dx = \frac{u_2}{u_1} \cdot \frac{1}{S_i} \int_{-\infty}^{+\infty} h dx = \frac{u_2 A_i}{u_1 S_i}$$

故

$$S_i = \frac{u_2}{u_1} \cdot \frac{A_i}{m_i}$$

注意, 在此式中时间为秒 (s), 若考虑到常用的纸速单位为 cm/min, 则应加进 1 min = 60 s 的换算系数, 则:

$$S_i = \frac{60 u_2 A_i}{u_1 m_i} \text{ (mV} \cdot \text{s/g)} \quad (10.5)$$

式 (10.4) 适用于前面所说的浓度型检测器, 如紫外、荧光、示

差折光等. 式 (10.5) 则适用于质量型检测器, 如库仑、氢火焰等.

§ 10.1.3 敏感度

检测器灵敏度的高低, 并不等于它检测最小样品量或最低样品浓度能力的高低. 因为在定义检测器灵敏度 S 值时, 并没有考虑噪声的大小, 而敏感度与噪声的大小是直接有关的, 通常以 2 倍的基线浓度 (或噪声) I_b 作为可检测出的最小测定信号. 敏感度的定义为

$$M = \frac{I_b}{S} \quad (10.6)$$

其物理意义为每 ml 冲洗剂中含有多少克的样品进入检测器时产生的信号, 恰好等于噪声的 2 倍. 对于浓度型检测器, 其单位为 g/ml (或 mg/ml), 对于质量型检测器, 其单位为 g/s (或 mg/s).

值得注意的是, 敏感度除与检测器的噪声和灵敏度有关外, 还与色谱分离条件及各种柱外因素引起的峰的展宽有关. 通常是把一个已知量的标准溶液直接注入到检测器中来测定其敏感度的大小.

§ 10.1.4 最小检测量 (M_{\min})

要使样品所产生的信号能从记录器的谱图上观测出来, 必须使这一信号大于 2 倍的基线波动. 根据式 (10.4) 得:

$$m_i = \frac{u_2 F_c A_i}{u_1 S_i} = \frac{F_c}{u_1} \cdot W_{1/2} \cdot \frac{hu_2}{S_i}$$

这里, $W_{1/2}$ 是以长度为单位的色谱峰的半宽度. 根据上面的定义, hu_2 应大于 I_b , 其最低极限为 $hu_2 = I_b$, 因此最小检测量为

$$m_i = \frac{W_{1/2} F_c}{u_1} \cdot \frac{I_b}{S_g} = W_{1/2} \cdot M_g \quad (10.7)$$

这里, $W_{1/2}$ 为以冲洗剂流出体积表示的峰的半宽度, 由式 (10.7) 可以看出, 最小检测量不仅与检测器本身的性质有关, 而

且与色谱操作条件有关，它随 M 值的减小而减小，但不等于 M 值，它还与色谱峰的半宽度有关，而 M 值与色谱操作条件相关。为简便起见：

$$M_{\min} = \frac{m_i}{h/I_b} \quad (10.8)$$

式中 m_i 为进样量 (g)， h/I_b 称为信噪比。采用同样的方式可计算最小检知浓度 (C_{\min})：

$$C_{\min} = \frac{M_{\min}}{m_i} \quad (10.9)$$

§ 10.1.5 线性范围

色谱法的最大优点在于，对于一个复杂的混合物样品可以进行分离和定量测定。定量分析的准确与否，关键在于检测器所产生的信号是否与被测样品的浓度始终呈一定的函数关系。输出信号与样品浓度之间最好呈线性关系，这样进行定量测定时既准确又方便。实际上没有一台检测器能在任何浓度范围内呈线性响应，一般检测器的输出信号与样品浓度之间可用下面的方程来关联：

$$A_i(\text{或 } h_i) = BC^x \quad (10.10)$$

式中 B 为比例常数，称作响应因子， x 为响应指数， C 为冲洗剂中的样品浓度。当 $x=1$ 时，则线性响应。但对大多数检测器来说， x 只在一定的范围内才接近于 1，实际上通常只要 $x=0.98$ 至 1.02 就认为它是呈线性的。图 10.3 是一般检测器的响应曲线。

线性范围一般都可通过实验确定。然而由于在下限时样品含量太低会引起大的实验误差，加之一般检测器的非线性范围都在高浓度区域，因此其下限就由输出信号等于 2 倍噪声时的试样浓度来确定。

§ 10.1.6 谱峰的扩张

近年来由于 HPLC 微型柱和毛细管柱的出现和发展，加之

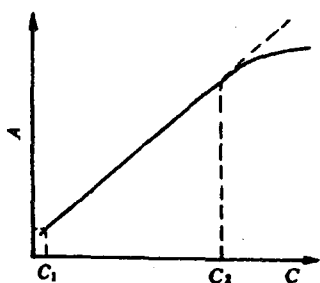


图10.3 检测器的响应曲线

色谱柱的柱效不断改进和提高，在检测器中所造成的色谱峰的扩展变得越来越明显，因此对检测器的要求越来越高。除制备色谱外，大多数 HPLC 的池体积都小于 $10 \mu\text{l}$ 。在使用毛细管填充柱或细管径高效液相柱时，池体积应减小到 $1 \sim 2 \mu\text{l}$ 甚至更低，不然检测系统所带来的峰扩张问题就会变得很严重。因此这时池体、

检测器与色谱柱的连接、接头等都要精心设计，不然就会严重影响柱效能和灵敏度。

上述 6 项性能指标是影响 HPLC 检测器质量的主要因素，使用者在选择检测器时需要把它们综合起来考虑。此外，检测器对周围环境的适应性、操作维修的简易性、使用时的耐用可靠性、成本价格的合理性等都是需要考虑的因素。

§ 10.2 液相色谱检测器

§ 10.2.1 紫外吸收和紫外可见分光光度计

紫外吸收检测器 (UV) 是 HPLC 中用得最早而又最广的检测器之一。直到现在，几乎所有色谱仪都配有这种检测器。它不仅有高的选择性和灵敏度，而且对环境温度、流速波动、冲洗剂组成的变化不甚敏感，因此无论等度或梯度冲洗，都可使用。对强吸收物质的检测下限可达 1 ng 。

这种检测器是通过测定物质在流动池中吸收紫外光的大小来确定其含量的。对于单色光，物质在流动池中的吸收服从 Beer 定律：

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon CL \quad (10.11)$$

$$T = I/I_0$$

式中 A 为消光度 [或吸光度, 或光密度 (OD)]; I_0 是入射光强度; I 为透射光强度; ϵ 为摩尔吸光系数; C 是溶质的浓度; L 是流通池的光程长度; T 是透过率.

由式 (10.11) 右边可以看出, 对于给定的池体积, 在固定的波长下, 待测物的消光度正比于其浓度.

一般都选择对欲分析物有最大吸收的波长进行工作, 以获得最大的灵敏度和抗干扰能力. 测定波长的选择取决于待测物的成分和分子结构, 分子中光吸收性强的基团叫发色基团, 它与分子的外层电子或价电子有关. 表10.1 列出了一些典型发色基团的摩尔吸光系数和相应的最大吸收波长^[3].

表10.1 一些发色基团的最大吸收波长
 λ_{\max} (nm) 和摩尔吸光系数 ϵ

发色团系统		λ_{\max}	ϵ	λ_{\max}	ϵ
醚基	—O—	185	1000		
硫醚基	—S—	194	4000	215	1000
胺基	—NH ₂	195	2800		
硫醇基	—SH	195	1400		
二硫化基	—S—S—	194	5500	255	400
溴化物	—Br	208	300		
碘化物	I	260	400		
腈	—CN	160			
乙炔化物	—C≡C—	175~180	6000		
砜	—SO ₂	180			
肟	—NOH	190	5000		
叠氮化物	>C=N—	190	5000		
烯烃类	>C=C<	190	8000		
酮	>C=O	195	1000	270~285	18~30
硫酮	>C=S	205	强		
酯	—COOR	205	50		
醛	CHO	210	强	280~300	11~18

续表

发色团系统		λ_{\max}	ϵ	λ_{\max}	ϵ
羧酸	—COOH	200~210	50~70		
亚砷	>S=O	210	1500		
硝基化合物	—NO ₂	210	强		
亚硝酸酯	—ONO	220~230	1000~2000	300~400	10
偶氮	—N=N—	285~400	3~25		
苯		184	46700	202	6900
联苯				246	20000
萘		220	112000	275	7900
蒽		252	199000	375	7900

表10.2 常用溶剂透过波长 (nm) 的下限

溶剂名称	透过波长下限	溶剂名称	透过波长下限
丙酮	330	甲酸乙酯	260
乙腈	210	乙酸乙酯	260
苯	280	甘油	220
三溴甲烷	360	庚烷	210
醋酸丁酯	255	乙烷	210
丁醚	235	甲醇	210
二硫化碳	380	甲基环己烷	210
四氯化碳	265	甲酸甲酯	265
氯仿	245	硝基甲烷	265
环己烷	210	正戊烷	210
二氯乙烷	230	异丙醇	210
二氯甲烷	230	吡啶	305
甲酰胺二胺	270	四氯代乙烯	290
二氧六环	220	甲苯	285
二乙醚	260	间二甲苯	290
环戊烷	210	2,2,4-三甲基戊烷	210

续表

溶剂名称	透过波长下限	溶剂名称	透过波长下限
甲乙酮	223	异辛烷	210
二甲苯	290	乙醚	220
异丙醚	220	甲基异丁酮	330
氯代丙烷	225	四氢呋喃	220
二乙胺	275	戊醇	210

在选择测定波长时，必须考虑到所使用的流动相组成，因为各种溶剂都有一定的透过波长下限值，超过了这个波长，溶剂的吸收会变得很强，就不能很好地测出待测物质的吸收强度。表 10.2 列出了 HPLC 中常用试剂透过波长的下限。下限值一般是指溶剂在以空气为参考，样品池厚度（即光程长）为 1 cm 的条件下，恰好产生 1.0 消光度 (OD) 时相应的波长 (nm)。也就是在溶剂透过率 (T) 为 10% 时相应的波长。表 10.3 列出的是一些可用紫外光检测的无机阴离子。

表 10.3 在 200 nm 波长以上有紫外吸收的无机阴离子

S^{2-}	NO_2^-	(非常弱)	
SO_3^{2-}	NO_3^-		
SCN^-	N_3^-		
$S_2O_3^{2-}$	Cl^-		
SeO_3^{2-}	Br^-		
SeO_4^{2-}	I^-		
$SeCN^-$	IO_3^-		
ASO_3^{2-}	BrO_3^-		
AsO_4^{3-}	ClO_3^-		(非常弱)
	ClO_4^-		

§ 10.2.2 示差折光检测器

示差折光检测器也称光折射检测器，是一种通用型检测器。基于连续测定色谱柱流出物光折射率的变化而用于测定样品浓度。溶液的光折射率是溶剂（冲洗剂）和溶质（样品）各自的折射率乘以各自的摩尔浓度之和。溶有样品的流动相和流动相本身之间光折射率之差即表示样品在流动相中的浓度。原则上凡是与流动相光折射指数有差别的样品都可用它来测定，其检测限可达 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ g/ml。表10.4 是常用溶剂在 20℃ 时的折射率。

表10.4 常用溶剂在 20℃ 时的光折射率

溶剂	折射率	溶剂	折射率
水	1.333	苯	1.501
乙醇	1.362	甲苯	1.496
丙酮	1.358	己烷	1.375
四氢呋喃	1.404	环己烷	1.462
乙烯乙二醇	1.427	庚烷	1.388
四氯化碳	1.463	乙醚	1.353
氯仿	1.446	甲醇	1.329
乙酸乙酯	1.370	乙酸	1.329
乙腈	1.344	苯胺	1.358
异辛烷	1.404	氯代苯	1.525
甲基异丁酮	1.594	二甲苯	1.500
氯代丙烷	1.389	二乙胺	1.387
甲乙酮	1.381	溴乙烷	1.424

按其结构来说，这种检测器有两种类型，反射式和偏转式。偏转式的折光指数测量范围较宽（1.00~1.75），池体积较大，一般只在制备色谱和凝胶渗透色谱中使用。通常的 HPLC 都使用反射式，因其体积很小（一般为 5 μ l 左右），可获得较高的灵

敏度。

如图 10.4 所示，当入射光 (I_0) 通过两种介质时，便分成两束光：反射光 I'_0 和透射光 I ，由于两种介质折射率不同，透射光会发生一定的偏转，根据 Snell 定律：

$$n \sin \theta = n' \sin \theta'$$

或

$$\frac{n}{n'} = \frac{\sin \theta}{\sin \theta'} \quad (10.12)$$

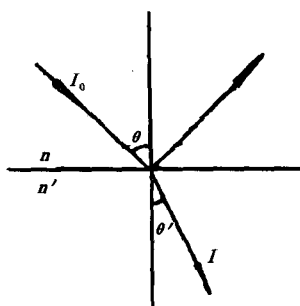


图10.4 光线在界面的折射

式中 n 和 n' 分别为两种介质的折射

率， θ 和 θ' 为入射角及折射角。根据 Fresnel 反射定律，透射光强度 I 是入射角和两种介质折射率的函数：

$$\frac{I}{I_0} = \frac{1}{2} \left(\frac{2 \sin \theta' \cos \theta}{\sin(\theta + \theta')} \right)^2 + \left(\frac{2 \sin \theta' \cos \theta}{\sin(\theta + \theta') \cos(\theta - \theta')} \right)^2 \quad (10.13)$$

从式 (10.13) 可以看出，只要两种介质中任何一种的折射率发生变化就会引起折射光强度的改变。采用电子学方法测定这种光强度的变化，就可以知道样品在流动相中的浓度。图 10.5 是这种检测器的结构图。由光源 SL 发出的光经光栏 M_1 ，红外线滤光片 F，光栏 M_2 及透镜 L_1 后分成两束平行光，然后射到三角棱镜上，棱镜上装有样品池及参考池，它们的底面是经专门抛光的不锈钢镜面，池体的液槽是由夹在棱镜和不锈钢之间的聚四氟乙烯垫片经挖空后形成的。透射光在界面上经反射回来后，再经透镜 L_2 聚焦在光敏电阻 D 上，这样就可将光信号转变成可记录的电信号，光源装在一个可调的支架上，以便调节入射角使之接近于临界角，以获得尽可能高的灵敏度。

由于折射率对温度的变化非常敏感，大多数溶剂折射率的温度系数约为 5×10^{-4} ，因此检测器必须恒温，以便获得精确的结果。

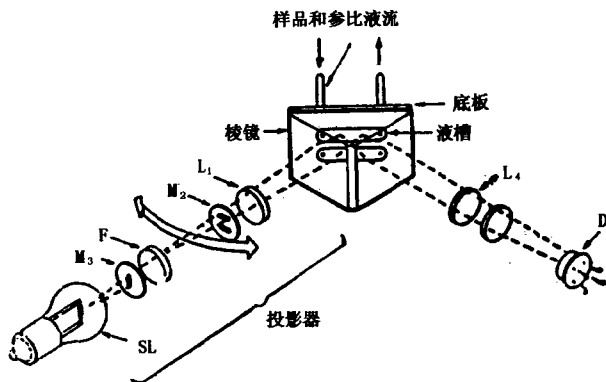


图10.5 弗雷斯内尔折光计

§ 10.2.3 荧光检测器

许多化合物，特别是芳香族的化合物、生物物质，如有机胺、维生素、激素、酶等被入射的紫外光照射后，能吸收一定波长的光，使原子中的某些电子从基态中的最低振动能级跃迁到较高电子能态的某些振动能级。之后，由于电子在分子中的碰撞，消耗一定的能量而下降到第一电子激发态的最低振动能级，再跃回到基态中的某些不同振动能级，同时发射出比原来所吸收的频率较低、波长较长的光，即荧光。被这些物质吸收的光称为激发光 (λ_{ex})，产生的荧光称为发射光 λ_{em} 。荧光的强度与入射光强度、量子效率和样品浓度成正比。图10.6是固定波长荧光检测器示意图。

光源发出的光经半透镜分成两束后，分别通过吸收池和参比池，再经滤光片后，照射到光电倍增管上，变成可测量的信号。参比池有助于消除外界的影响和流动相所发射的本底荧光。一般采用氙灯作光源，以便获得宽波长范围 (250~600 nm) 的连续强光谱。若在半透镜前置一单色器分光，测量池后也采用单色器选择测定波长，这种结构即为荧光分光检测器。

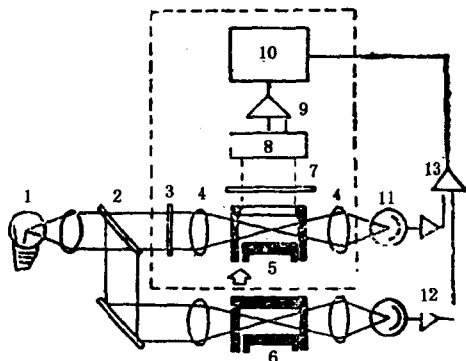


图10.6 荧光检测器示意图

1. 中压汞灯光源; 2. 10%反射棱镜; 3. 激发光滤光片; 4. 透镜; 5. 测量池; 6. 参比池; 7. 发射光滤光片; 8. 光电倍增管; 9. 放大器; 10. 记录器; 11. 光电管; 12. 对数放大器; 13. 线性放大器.

某些物质虽然本身不能产生荧光, 但含有适当的官能团可与荧光试剂发生衍生反应, 生成荧光衍生物, 它们也可用荧光检测。衍生方法有两种, 其一为柱前衍生, 此法较简单, 但定量重复性较差; 其二为柱后衍生, 此法重复性好, 但会造成谱峰的扩展。在氨基酸和肽的分析中, 经常采用荧光胺作为衍生试剂。邻苯二甲醛、胆酰氯也是常采用的衍生试剂。

荧光检测器的最大优点是有极高的灵敏度和良好的选择性。一般来说, 它比紫外吸收检测器的灵敏度要高10~1000倍, 可达 $\mu\text{g/L}$ 级, 而且它所需要的试样很少, 因此在药物和生化分析中有着广泛的用途。

§ 10.2.4 电导检测器

电导检测器是离子色谱中使用最广泛的检测器。其作用原理是用两个相对电极测量水溶液中离子型溶质的电导, 由电导的变

化测定淋洗液中溶质浓度。此检测器的死体积小，如采用抑制电导法，其敏感度可达 10^{-9} g/ml，线性动态范围达 10^4 ；用五极电导仪作单柱离子色谱检测器，其敏感率达 10^{-8} g/ml，线性动态范围为 10^3 。本节只讨论与电导测量有关的物理化学原理及电导检测器的结构。

将电解质溶液置于施加电场的两个电极间，则溶液将导电，其电导值（电阻值 R 的倒数） $1/R$ 与电极截面积 A_1 、两极间的距离 L 和各离子电导的总和 $\sum C_i \lambda_i$ 之间有以下关系：

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{1000} \cdot \frac{A_1}{L} \sum C_i \lambda_i \quad (10.14)$$

式中 C_i 表示某一离子的摩尔浓度， λ_i 表示该离子的摩尔电导。

离子的摩尔电导随着浓度的改变而变化。在无限稀释的情况下，离子的摩尔电导达到最大值，称为极限摩尔电导，在表10.5中列出了常见离子在水中的极限摩尔电导值。

表10.5 水溶液中离子的极限摩尔电导

阴离子	λ^-	阴离子	λ^-	阳离子	λ^+	阳离子	λ^+
OH ⁻	198	乙酸盐	41	H ⁺	350	Zn ²⁺	53
F ⁻	54	丙酸盐	36	Li ⁺	39	Hg ²⁺	53
Cl ⁻	76	SCN ⁻	66	Na ⁺	50	Cu ²⁺	55
Br ⁻	78	SO ₄ ²⁻	50	K ⁺	74	Pb ²⁺	71
I ⁻	77	CO ₃ ²⁻	72	NH ₄ ⁺	73	Co ²⁺	53
NO ₃ ⁻	71	CrO ₄ ²⁻	74	Ag ⁺	62	Fe ³⁺	68
HCO ₃ ⁻	45	CrO ₂ ²⁻	85	Ti ⁺	75	La ³⁺	70
IO ₃ ⁻	41	PO ₄ ³⁻	69	Mg ²⁺	53	Ce ³⁺	70
ClO ₃ ⁻	65	Fe(CN) ₄ ⁴⁻	101	Ca ²⁺	60	CH ₃ NH ₃ ⁺	58
ClO ₄ ⁻	67	Fe(CN) ₂ ⁻	111	Sr ²⁺	59	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	52
甲酸盐	55	BrO ₃ ⁻	56	Ba ²⁺	64	(CH ₃) ₃ NH ⁺	47

电导测量中， A_1 和 L 是固定的， L/A_1 称为电导池常数 K ，

即

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{1000} \cdot \frac{1}{K} \sum C_i \lambda_i \quad (10.15)$$

电导池常数为 1 时，测定出的电导值称为比电导率，其单位为 Ω/cm ，水溶液的电导值常用单位为 $\text{m}\Omega/\text{cm}$ 。

比电导率仅与溶液中离子浓度有关。对于 10^{-3} mol/L 浓度以下的稀溶液，其离子摩尔电导值接近极限摩尔电导值，可以用表 10.5 中的数据和公式 (10.15) 计算溶液的电导值。

常用电导检测器的电导池结构如图 10.7 所示^[4]，可以通过调整两电极之间的距离来调整池常数，其死体积小于 $2 \mu\text{l}$ 。

测量电导过程中的物理化学原理如图 10.8 所示^[5]。

当电场施加于两电极时，溶液中阴离子趋向阳极，阳离子趋向阴极。溶液中离子数目和迁移速度的大小决定溶液的电导值，离子的相对迁移率由其极限摩尔电导值决定。离子在电场作用下的运动速度，除受离子电荷和离子的大小等因素影响外，还与温度、介质的性质及施加电压的大小有关。两极间可以施加直流电压，但通常是施加正弦波或方波型交流电压。当施加的有效电压确定后，测量出电路的电流值，即能测出电导值。然而，正如图 10.8 所示，由于电极表面附近形成的双电层极化电容（或称法拉第交流阻抗）的影响，会引起有效电压的改变，因而电路施加于两极的电压不等于有效电压。双电层形成机理的解释如下：当电极两端的电压低于离子的分解电压时，电极附近的溶液层将吸引反电荷的离子形成一双电层，此双电层由两部分组成：（1）内壁薄层，在此层内离子浓度随电极距离的增加而减

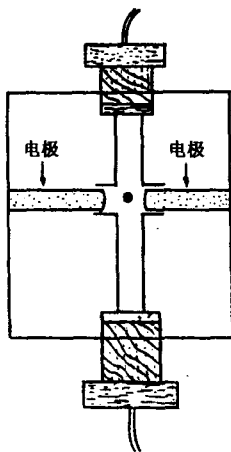


图 10.7 微型电导池结构

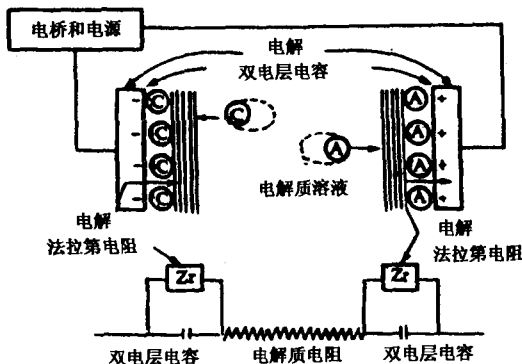


图10.8 电导池中电化学过程

少，呈线性关系；(2) 扩散层，在此层内离子浓度随电极距离的增加而减少，呈指数关系。双电层的存在，亦会产生电压降，实际上施加电压为有效电压（由溶液电阻产生的电压降）和双电层电压降的总和。

如果施加电压大于分解电压，则将发生电解，电流通过时阳极表面发生氧化反应，阴极表面发生还原反应。这种过程产生的法拉第交流阻抗也会延迟电子的转移过程，在电极的表面将发生离子的增加或消耗部分离子，也同样改变了有效电压。

§ 10.2.5 安培检测器

安培检测器由恒电位器和三电极电化学池组成。这三个电极是工作电极、参比电极和对电极。在工作电极与参比电极(Ag/AgCl)之间加一个为产生氧化或还原反应的工作电位，也称施加电位(E_{app})。电极的材料通常为玻璃碳，用以确保施加电位的恒定，并阻止电流通过参比电极以避免参比电位的漂移。

在电化学池中所产生的电流是溶液中的分子在工作电极表面被氧化或还原而产生的。在氧化反应时，电子从电活性组分的分子转移到工作电极上，产生正的电流或称为阳极电流。还原反应

时电子从工作电极转移到电活性分子上，产生负的电流或称阴极电流。在电化学池中 E_{app} 的大小和极性决定是否能发生电化学反应，适宜的施加电位应使被测组分发生氧化或还原反应，而淋洗液及样品中其它组分不发生氧化或还原反应。

伏安法 (voltammetry) 是选择施加电位 E_{app} 常用的方法，在一电化学池内，在很大范围内改变施加电位，同时测量由电化学反应产生的电流，作出施加电位对电流的关系曲线，即得伏安图 (voltammogram)，可以用来确定安培检测法的最佳施加电位值。最近更多的是采用流动伏安法 (hydrodynamic voltammetry) 和脉冲伏安法 (pulse voltammetry) 来测定伏安图。被测组分 A 配制在支持电解质溶液中。支持电解质 (如 KClO_4) 本身不参与电化学反应，仅用于增加溶液的电导。组分 A 在电极上发生下述反应：



当反应向右进行时，A 将 n 个电子转移到工作电极，并氧化成 B，反应反向进行时则 B 还原成 A。氧化-还原物的浓度与施加电位的关系可用 Nernst 方程表示：

$$E_{\text{app}} = E_0 - \frac{0.059}{n} \log \frac{[\text{B}]}{[\text{A}]} \quad (10.17)$$

式中， $[\text{A}]$ 和 $[\text{B}]$ 是工作电极表面 A、B 两种成分的平衡浓度。 E_0 是 A 和 B 浓度相等时的电位。每个氧化-还原反应都有特定的 E_0 。当 $E_{\text{app}} = E_0$ 时， $[\text{B}]$ 等于 $[\text{A}]$ 。 $E_{\text{app}} > E_0$ ，则 $[\text{B}] > [\text{A}]$ ，反应向右进行，A 被氧化成 B，产生阳极电流。反之，B 还原成 A，产生阴极电流。因此，为了使 A 完全氧化成 B，必须使 E_{app} 大于 E_0 。

在流动伏安法中，用泵使标准溶液连续流过电化学池，逐渐改变外加电压，并测量所产生的电流，作电流对电压的伏安曲线，这种 S 型的曲线表示了物质 A 的电化学选择性 (见图 10.9)。

此伏安图形状可以用在三个不同的施加电位下邻近电极表面组分 A 浓度的变化情况来解释，见图 10.10。图中横坐标表示组

分 A 与电极表面之间的距离，纵坐标表示相应的浓度。

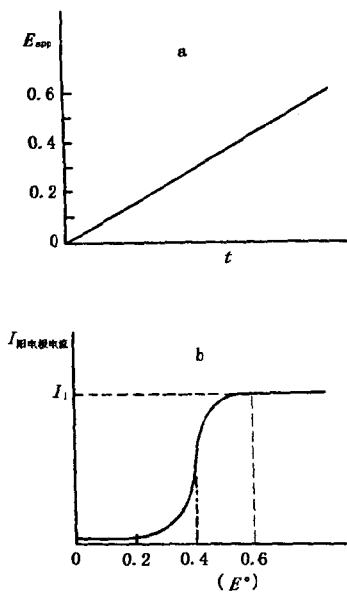


图10.9 流动伏安法中施加电位和时间的关系曲线 a 以及伏安图 b

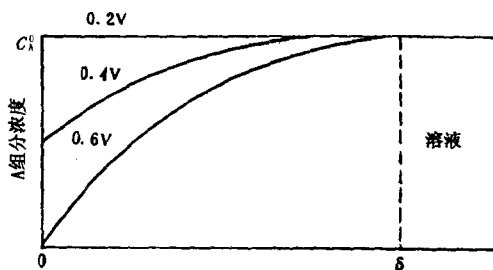


图10.10 电极附近溶质 A 的浓度随电极表面距离变化的关系曲线

从图10.10 中可见，当外加电压为0.2V 时，组分 A 不发生

氧化反应，电极表面 A 的浓度等于溶液内部 A 的浓度，此时氧化-还原电流为零。施加电压增加时，[B] 对 [A] 的比率亦随之增加。当外加电压增加到 0.4V 时， $E_{app} = E_0$ ，这时，在电极表面的 [A] 恰等于 [B]。离电极表面几微米范围内 [A] 将形成一浓度梯度，池体内溶液中 A 组分不断向电极表面扩散。此浓度梯度维持的距离称为扩散层厚度 δ 。当外加电压增加至 0.6V 时，在电极表面 [A] 等于零，因而达到电极表面的 A，立即被氧化成 B。只是由于 A 扩散到电极表面的速度限制了 A 被氧化成 B 的数量，因此氧化电流也为一定值，这个电流称为极限电流 i ，它与 A 的浓度成正比。

$$i = \frac{nFA_2DC_A^B}{\delta} \quad (10.18)$$

式中 C_A^B 为组分 A 在溶液中的浓度， F 为法拉第常量 (96 485 coul/mol)， A_2 为电极表面面积， D 是组分 A 的扩散系数。

脉冲伏安法在充满溶液的三电极电化学池中进行。溶液中含有电活性组分 A 和支持电解质。测量一定幅度脉冲后产生的分离电流，得出伏安图。图 10.11 为脉冲伏安法中施加电位和时间的关系及所得的伏安图。

图 10.11 所示的伏安曲线与流动伏安法相似。当脉冲电压为 0~0.2V 时，不产生化学反应；0~0.4V 的脉冲电压引起 A 组分氧化，在电极表面处 A 和 B 的浓度相等，此刻氧化电流为极限电流的二分之一。当 0~0.6V 的脉冲施加于电极表面时，电极表面 A 组分的浓度为零，每个脉冲电位刚施加到电极的瞬间，由于电极附近分子被氧化，产生的电流强度最大。而当远离电极表面的分子扩散到电极表面并被氧化时，产生的电流就降低，跟随一个脉冲之后电流的衰减情况见图 10.12。A 氧化成 B 时，产生了两种电流：充电电流和法拉第电流（即感应电流）。充电电流是由电极和溶剂的界面的电容产生的，感应电流是 A 氧化成 B 时电子转移产生的。充电电流随时间的衰减呈指数形式，感应电流随时间的衰减由 Cottrell 方程式表示：

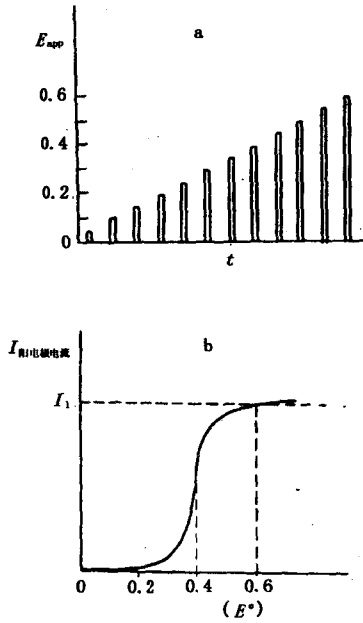


图10.11 脉冲伏安法中施加电位与时间的关系 a 及所得的伏安图 b

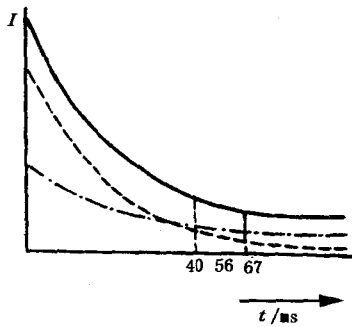


图10.12 0~0.6V 脉冲电压所产生的感应电流、充电电流和总电流随时间的衰减曲线

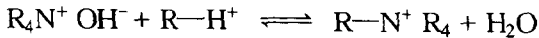
$$i(t) = \frac{nFA_i D^{1/2} C_A^B}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (10.19)$$

式中 t 是时间，虽然电流与时间是复杂的函数关系，但它与被分析物质的浓度 C_A^B 是正比关系。脉冲伏安法测定的是总电流。一般情况下充电电流显著大于感应电流，但充电电流随时间的衰减比感应电流快得多，使用现代电子学中的“采样和保留”技术，在每个脉冲开始后，推迟一个短的时间（40 ms）后，再测定所产生的电流，就可减小充电电流的影响（图10.12）。

§ 10.3 离子对色谱的抑制柱反应

离子对色谱抑制柱反应检测法与普通离子对色谱法的主要区别在于它采用了化学抑制型电导检测器。抑制柱的作用是从淋洗液中除去离子对试剂，同时将待测离子转变为对应的酸型或碱型。例如，在阴离子检测中，在 H^+ 型抑制柱发生两个重要反应：

(1) 离子对试剂 ($R_4N^+ OH^-$) 中的阳离子 (R_4N^+) 被除去， OH^- 离子被树脂的 H^+ 离子中和成水：

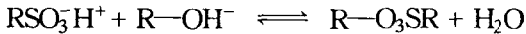


(2) 转变样品离子 A^- 成对应的酸：

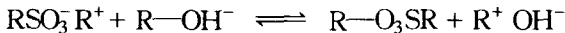


在阳离子检测中，在 OH^- 型抑制柱的反应为：

(1) 离子对试剂 ($RSO_3^- H^+$) 中的阴离子 (RSO_3^-) 被抑制柱树脂除去， H^+ 离子被树脂的 OH^- 基团中和生成水：



(2) 转变样品离子 A^- 成对应的碱：

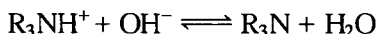


抑制柱树脂在工作过程中累积了淋洗液离子，必须周期性地再生。对阴、阳离子抑制柱的再生液分别为 0.25 mol/L

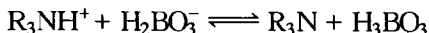
H₂SO₄ 和 0.1 mol/L NaOH.

离子对色谱中可用纤维抑制柱或填充抑制柱. 对浓度大于 2 mmol/L 的较大分子季铵离子, 如四丁基铵或烷基磺酸(如辛烷磺酸的淋洗液), 宜用填充抑制柱. 离子对色谱的淋洗液浓度很少超过 5 mmol/L, 流速一般为 1 ml/min, 因此所用填充抑制柱的寿命较标准离子色谱长, 用较小的抑制柱, 如 6×60 mm i. d. 即可.

测定胺时, 如用 OH⁻ 型抑制柱, 存在下述平衡:



由于胺的游离碱不带电荷, 电导较低, 使弱碱性胺(如三乙醇胺)的检出受到影响, 但不影响强碱性胺(如三甲胺)的检测, 解决这个问题的方法是用硼酸型抑制柱, 相应的反应为



此平衡也生成中性胺, 但因硼酸较水的酸性强, 平衡一般向左进行. 硼酸盐型抑制柱能减少胺以游离碱存在时所发生的排斥现象. 但须注意, OH⁻ 离子的淌度是硼酸盐离子的 3 倍. 因此只有当阳离子的 pK_a 值 ≥ 5 时, 才推荐使用硼酸型抑制柱.

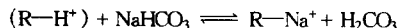
三种分离方式的抑制柱反应总结于表 10.6 中^[6].

表 10.6 三种分离方式的抑制柱反应

离子色谱阴离子抑制柱



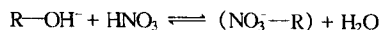
树脂相 淋洗液 树脂相 柱洗脱液

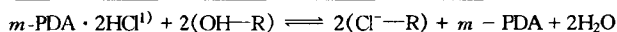


增加被测离子电导

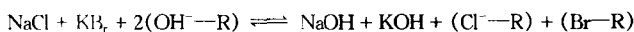


离子色谱阳离子抑制柱

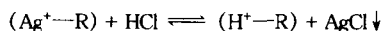




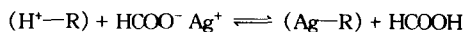
增加被测离子电导



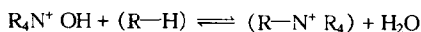
离子交换抑制柱



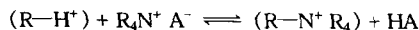
增加被测离子电导



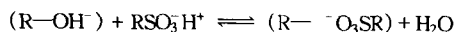
离子对色谱阴离子抑制柱



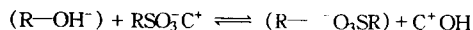
增加被测离子电导



离子对色谱阳离子抑制柱



增加被测离子电导



1) *m*-PDA 为间苯二胺二盐酸。

§ 10.4 间接检测方法

液相色谱已成为一种高分离效率、高检测灵敏度的分离分析方法。但是被分离物质的检测灵敏度与它们的性质相关。只有在溶质含有较高的紫外吸光度、荧光吸光度或电化学活性的结构单元时，紫外检测、荧光检测或电化学检测这些高灵敏度的检测方法才可用于这些被分离物质的检测。如被分离物质没有这样的结构单元，可以通过柱前或柱后衍生化反应来解决检测问题^[7]。这将使分析方法耗费较多的时间，而且操作更加复杂；有些化合

物很难与衍生试剂发生衍生化反应，因此衍生化技术也很难解决它们的检测问题。在流动相中加入适量的有检测器响应的物质检测无响应的被分离测定化合物的方法被称为间接检测方法，这是一种在技术和操作上更加简便的方法^[8,9]。

§ 10.4.1 间接检测方法的基本原理

间接检测方法很早已被用于液-液分配色谱中离子性化合物的检测；在这一系统中，只有响应信号的离子被溶解在含水溶液的固定相中，而所选择的流动相是低极性的有机溶剂。反电荷的溶质与固定相中的离子形成离子对后在液-固二相分配得到分离，而溶质的检测主要基于与溶质反电荷离子的信号响应物质。液-液分配色谱间接检测方法的设计和性质已有很多作者讨论，图 10.13 给出的是液-液色谱分离检测二肽的实例。

反相色谱（包括反相离子对色谱）是间接检测技术的主要应用领域，被检测的化合物可以是离子或非离子性化合物。间接检测法的基本原理很简单，在液相色谱流动相中加入一个具有可检测响应信号的与固定相有一定亲和力的物质，通常称之为探针试剂；注入的被分离样品由于对可检测的探针试剂的二相分配过程的影响，导致检测器对被分离物质的间接信号响应。

在液相色谱系统中，被分离物质的响应模式与溶质的性质和探针试剂的性质相关，而与具有可检测信号结构单元的溶质的响应模式完全不同。紫外吸收是应用最广泛的液相色谱检测方法之一，图 10.14 是间接紫外光吸收检测液相色谱法分离有机羧酸的应用实例^[11]。

在这一系统中，流动相内含有季铵盐 1-苄乙甲基吡啶翁作为检测器响应的探针试剂；被分离的化合物主要是以阴离子状态存在的羧酸。在色谱图图 10.14 中，有二类色谱峰出现：一类是每一个色谱峰代表一个溶质，另一类是一个（或多于一个）例外的色谱峰表征色谱系统的特征称之为系统峰。此外，在系统峰以前流出的溶质峰都是负峰，而在系统峰以后流出的则是正响应



图10.13 二肽的紫外光
间接检测

固定相: Lichorsorb SI - 100 涂渍
0.1 ml/L 萘二磺酸水溶液(pH 2.3);
流动相: 氯仿/正戊醇(95/5);
紫外检测波长: 254 nm.
色谱峰: 1. Leu-Leu; 2. Phe-Val;
3. Val-Phe; 4. Leu-Val; 5. Met-Val.

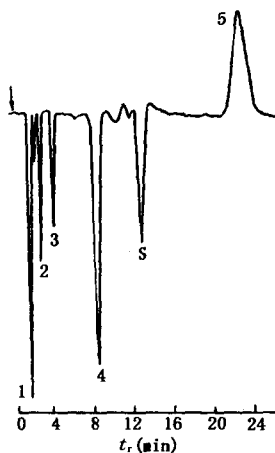


图10.14 有机酸的间接
紫外光检测

固定相: μ Bondapak- C_6H_5 ;
流动相: 乙酸缓冲液 (pH 4.6)
内含 3 mmol/L 1-苯乙甲基
吡啶翁; 紫外检测波长: 254 nm.
色谱峰: 1. 乙酸; 2. 丙酸; 3. 丁
酸; 4. 戊酸; 5. 系统峰.

峰. 这种响应模式当溶质和探针试剂的电荷相反时是一定的. 如被分离的溶质与探针试剂电荷同号或是中性化合物, 它们的响应模式则与图10.14的响应模式恰好相反; 即在系统峰以前流出的溶质为正峰, 在系统峰以后流出的溶质为负峰. 图10.15给出的是醇类化合物在中性物质为探针试剂时的色谱分离图^[12]. 系统峰的保留值只与系统的性质有关, 而与分离溶质的性质无关, 但系统峰的响应方法与样品溶液的组成相关. 每一种流动相组分, 除了主要溶剂以外, 都会产生一个系统峰, 而系统峰的保留只与该组分的性质相关. 如图10.16所示, 系统峰可以通过注入流动相溶剂很容易辨认出来. 在图10.16中, 流动相中含有苄基三甲铵作为正离子探针试剂, 把水注入柱系统后给出了三个色

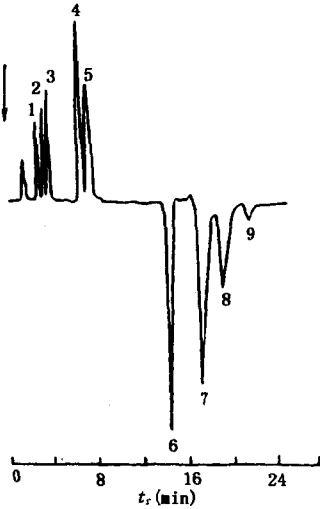


图10.15 脂肪醇的紫外光间接检测

固定相: Ultrasphere-C₁₈;
 流动相: 0.4 mmol/L 烟酰胺水溶液;
 紫外检测波长: 268 nm.

色谱峰: 1. 甲醇; 2. 丙二醇; 3. 乙醇;
 4. 丙醇; 5. 系统峰; 6. 系统峰; 7. 2-丁醇;
 8. 2-甲基-1-丙醇; 9. 1-丁醇.

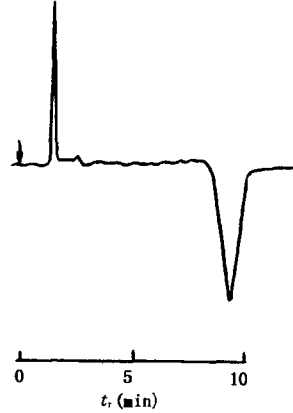


图10.16 间接紫外检测的系统峰

固定相: μ Bondapak-C₆H₅;
 流动相: 0.12 mmol/L 苯基三甲胺、1.2 mmol/L 甲基磷酸和1.1 mmol/L Na⁺ 水溶液(pH6.1);
 紫外检测波长: 254 nm; 样品: 水.

谱峰的色谱图。主系统峰有较大的保留值且是负信号响应，其它二个峰都是正响应，而其中的一个峰有一定的保留值。当只有一个具有一

定保留值的色谱系统峰出现时，它表示的是探针试剂的系统峰，因为探针试剂是流动相中疏水性最强的组分。

表10.7列出的是检测器对稳定的探针试剂（如上一例中的紫外检测器）信号响应的基本规则^[13]。当只有一种疏水性的探针试剂被溶解在高亲水性组分的含水缓冲液作为流动相时，表10.7中的规则无一例外都能成立。样品中被分离溶质的含量和性质对一个稳定的色谱系统的间接响应规则没有影响。图10.17

表10.7 流动相中有疏水的可检测的探针试剂存在时，
溶质信号响应的基本规则

溶质的电荷	色谱峰响应的方向	
	$k'_x < k'_s$	$k'_x > k'_s$
与探针试剂 S 电荷反号	负峰	正峰
与探针试剂 S 电荷反号或中性化合物	正峰	负峰

k'_s 表示流动相中疏水性的探针试剂的容量因子；

k'_x 表示溶质的容量因子。

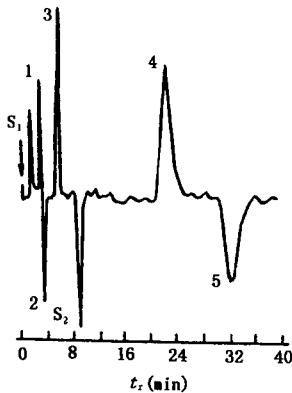


图10.17 有机胺和烷基磺酸的
间接紫外检测

固定相: μ Bondapak- C_6H_5 ;
流动相: 50 mmol/L 磷酸缓冲液
含0.4 mmol/L 萘-2-磺酸; 紫外
检测器波长: 254 nm.

色谱峰: 1. 戊磺酸; 2. 二异丙
胺; 3. 己磺酸; 4. 庚胺; 5. 辛
磺酸; S_1 和 S_2 都为系统峰.

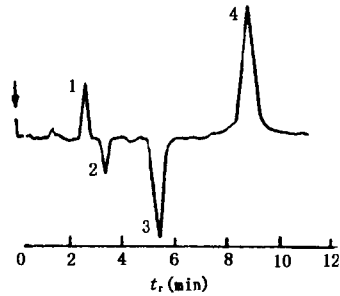


图10.18 氨基酸的间接紫外光检测
(分离条件与图10.17相同)

色谱峰: 1. DOPA; 2. 酪氨酸;
3. 苯丙氨酸; 4. 系统峰.

给出的是分离有机阴、阳离子的实例^[13], 在这一例子中选用的探针试剂是萘-2-磺酸阴离子, 样品是具有不同疏水性的脂肪胺和烷基磺酸. 而当流动相中同时包含有几个有保留的组分或色谱系统不稳定时, 被分离溶质的信号响应有可能偏离表

10.7 中的基本规则. 在间接检测分离过程中溶质的色谱峰响应方向与溶质相对于探针试剂的电荷和保留值相关, 但与溶质的进

样量无关，色谱峰的大小却与进样量成正比关系。当一个被分离的溶质存在固有的信号响应基团时，间接检测到的信号与间接作用的方向相关，有可能降低或增加观察到的响应值。图10.18是一个实例^[11]，在图10.18中探针试剂是具有强紫外吸收的萘-2-磺酸，被分离的溶质是以正离子状态存在的三个羧酸。在系统峰以前流出的溶质，其间接检测效应是负方向的，酪氨酸和苯丙氨酸有较低的固有的紫外摩尔吸光系数，从而给出负的色谱峰，在这种情况下，间接检测效应起主导作用。另一方面具有很高摩尔吸光系数的溶质 DOPA 给出的是正峰，这说明溶质固有的吸光响应超过了间接检测效应。

§ 10.4.2 间接检测的理论基础

当一个样品被注入到色谱系统中时，将对在固定相和流动相间已建立的平衡产生干扰，这种干扰将涉及所有的与相互作用效应相关的物质。在反相色谱或反相离子对色谱中，这一普遍效应则是对固定相的有限吸附容量的竞争。存在于进样区带的所有组分会形成迁移谱带，每一个谱带对应于一个溶质和除流动相中主溶剂以外的每一个组分。在这些谱带中的流动相组成与输液泵输入的流动相组成不同，这些谱带在色谱图中以对应于溶质和流动相组分（系统峰）的色谱峰出现。必须注意的是每一次进样都会产生这样的微扰，但这些微扰谱带只有在流动相中含有可检测的探针试剂时才会以色谱峰出现。

保留值和检测信号响应值的数学表达式可由以上这些原则获得。当流动相中只有一种被保留组分存在时，这些表达式很简单。Helfferich 和 Klein^[14]，Riedo 和 Kovats^[15]以及 Horvath 等人^[16]对间接检测分离过程的基本原理作了阐明。Crommen 等人^[17,18]和 Schill 及 Crommen^[19]把这些理论基础用于阐明离子性和中性化合物的保留值和响应模式。

如一个流动相组分 k 和进样的溶质 j 都是中性化合物并在分析条件下按 Langmuir 模型竞争与固定相表面的结合，则容量因

子为

$$k'_k = AK_k(1 - Q_k) \quad (10.20)$$

$$k'_j = AK_j(1 - Q_k)^2 \quad (10.21)$$

式中 Q_k 是 k 吸附在固定相表面的覆盖面积分数, A 是固定相的亲和能力与相体积比的乘积, K_k 和 K_j 是组分 k 和 j 的分配常数. 由于紫外吸收是最常用的间接检测方法, 以下的表达式的推导都基于紫外检测技术. 但值得指出的是这些表达式中得出的结果对其它特定的检测技术和探针试剂同样适用.

一个溶质的检测灵敏度可由表观摩尔吸光度 ϵ^* 表示; 摩尔吸光度 ϵ^* 以峰面积为单位, 是吸光度单位与被进样溶质的摩尔体积的乘积. 基于系统中 Langmuir 分配平衡, 我们定义溶质 j 的相对响应值为溶质 j 的表观摩尔吸光度 ϵ_j^* 与探针试剂已知摩尔吸光度 ϵ_k 的比值, 相对响应值可表达为

$$\frac{\epsilon_j^*}{\epsilon_k} = Q_k \frac{\alpha_s}{1 - \alpha_s} \quad (10.22)$$

式中 $\alpha_2 = k'_s/k'_k$, 即溶质 j 相对于探针试剂 k 都是中性物质. 对于离子性溶质和探针试剂, 也可得到式 (10.22) 相似的推论. 当溶质 j 和探针试剂 k 的电荷同号时, 它们在固定相表面竞争吸附, 相对响应值同样可由式 (10.22) 计算. 当 j 和 k 的电荷相反时, 它们通过相互吸引促进在固定相表面的吸附, 相对响应值可表达为

$$\frac{\epsilon_j^*}{\epsilon_k} = - (1 - Q_k) \frac{\alpha_s}{1 - \alpha_s} \quad (10.23)$$

当在流动相中的亲水缓冲液组分大大过量于探针试剂时, 式 (10.22) 和式 (10.23) 可用于估算离子性溶质的相对响应值. 对于例外的情况, 应加入其它校正项. 但是, 对于高稳定性的色谱分离系统而言, 缓冲液中盐组分浓度远远高于探针试剂浓度是必要的.

这些关系式表明溶质的相对响应值取决于二个因素: 溶质的相对保留值 (以探针试剂为参考物) 和探针试剂在固定相表面的

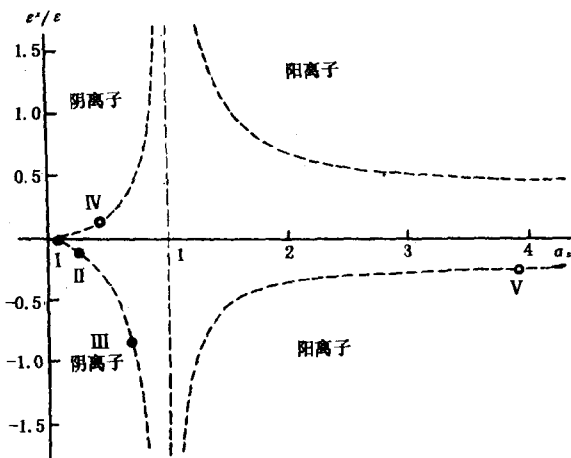


图10.19 以阴离子作为紫外检测探针
试剂的系统中溶质响应信号值与 α_s 的关系

固定相: μ Bondapak- C_6H_5 ; 流动相: 50 mmol/L 磷酸水
溶液含 0.1 mmol/L 萘-2-磺酸; 紫外检测波长: 254 nm.
色谱峰: I. 三乙胺; II. 二己胺;
III. 三丙胺; IV. 己磺酸; V. 辛磺酸.

吸附面积分数. 关系式 (10.22) 和 (10.23) 的估算结果如图 10.19 和 10.20 所示. 图 10.19 是以萘-2-磺酸阴离子为探针试剂的系统, 虚线给出的是阳离子和阴离子的估算相对响应值. 估算所必须的 Q_k 和 $(1-Q_k)$ 值可由 ϵ_j^*/ϵ_k 与 $\alpha_s/(1-\alpha_s)$ 线性作图所求得. 图 10.19 和 10.20 表明在 α_s 从 0 到 1 的范围内, 相对响应值从 0 变到极大值; 在更高的 α_s 值时, 相对响应值趋向于常数. Takeuchi 等人^[20] 基于模拟技术提出一个诱发溶质峰面积变化的表达式. 这一表达式与式 (10.22) 相似, 但所得的结果显示甚至是无保留的中性溶质仍存在间接响应信号, 这与实验观察到的现象不符合. 对于在固定相表面无竞争吸附的组分, 只要有其它种类的共同作用如络合作用或质子迁移的存在, 同样有可能产生间接检测效应.

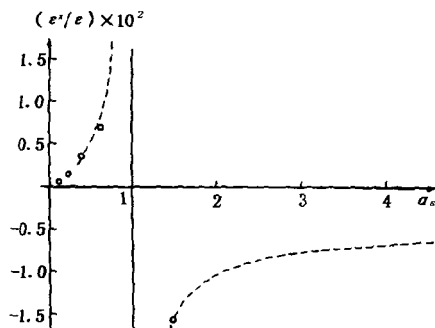


图10.20 以中性化合物作为紫外检测探针试剂的系统中溶质的信号响应值与 α_r 的关系
 固定相: Nucleosil-C₁₈; 流动相: 甲醇/水(10/90)
 含0.3 mmol/L 水杨酰胺; 紫外检测波长: 315 nm.
 溶质随保留值增大的顺序为乙腈;
 N, N-二甲基甲酰胺; 甲酸乙酯; 2-丁醇;
 乙酸乙酯; 1-戊醇. 虚线为计算曲线.

§ 10.4.3 间接检测系统的设计

根据响应值的表达关系式, 检测灵敏度的优化应基于以下三个因素: (1) 探针试剂的吸光强度; (2) 加入的探针试剂在固定相表面吸附的表面积分数; (3) 溶质的相对保留值. 高吸光度的探针试剂很明显对提高检测灵敏度是有利的, 但通过保留值的优化使溶质在探针试剂附近流出对提高检测灵敏度更为重要. 对于一个给定的溶质来说, 这可以通过改变探针试剂的性质和浓度或固定相的疏水性来获得. 表10.8列出的是在UV为检测信号的色谱系统中离子性溶质提高检测灵敏度的各种途径^[21]. 优化的原理很简单: 即溶质的疏水性越大, 选择的探针试剂疏水性应越大, 而固定相表面的疏水性应越低.

所选择的液相色谱系统应尽可能的简单和稳定, 流动相中应尽可能只包含一种有保留的组分, 即探针试剂. 如果流动相的组

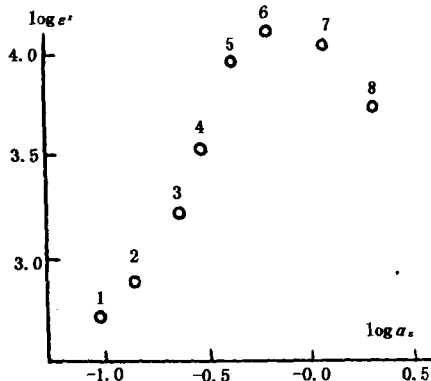


图10.21 疏水性阳离子和阴离子的
表观摩尔吸光系数

固定相: Nucleosil-CN;

流动相: 10 mmol/L 乙酸水溶液内含 0.18
mmol/L *N, N*-Dimethyl protriptyline;

紫外检测波长: 292 nm.

溶质: 1. 辛胺; 2. 辛磺酸; 3. 辛硫酸; 4.
壬胺; 5. 四丁基铵; 6. 十一烷基胺; 7. 十
二烷基胺; 8. 四戊基铵.

分产生几个有保留的系统峰, 将会严重地影响溶质的响应信号, 有可能降低检测灵敏度甚至改变溶质检测信号的方向. 如果溶质是可离解的, 流动相中必须包含有一定缓冲容量的缓冲液, 以致 pH 值的变化不会影响色谱系统中溶质的分配平衡过程. 如缓冲液的缓冲容量不够, 可能产生溶质峰变形甚至出现例外的色谱峰. 缓冲试剂应该是亲水的和无固有检测器响应信号的试剂. 为避免质子迁移引起对溶质检测信号的干扰, 探针试剂应是对质子惰性的有机试剂.

由于亲水性和中性的添加剂通常不会干扰系统峰, 因此对于选用的流动相可以加入这一类添加剂. 但应注意到这类添加剂会降低探针试剂在固定相表面的吸附量, 进一步导致检测灵敏度的

表10.8 对应于不同的探针试剂较合适的离子性化合物的疏水性

探针试剂	固定相	溶质的 CH ₂ 数	
		脂肪胺	烷基磺酸
6-羟基萘-2-磺酸	PRP-1	2~3	5
萘-2-磺酸	μ Bondapak-C ₆ H ₅	5~7	6~8
1-苯乙基-2-甲基吡啶翁	μ Bondapak-C ₆ H ₅	7~8	5~6
<i>N,N</i> -dimethylprotriptyline	Nucleosil-CN	9~12	9~12

下降^[22,24]。但在流动相中加入这类有机溶剂(如甲醇)可提高色谱峰的对称性,降低溶质的保留值和提高色谱峰高度^[24]。从本质上来说,采用任何种类的检测器都有可能获得足够高的灵敏度和稳定性。至今占优势的检测器仍是紫外检测法;但也有采用荧光检测^[13,25]、电化学检测^[26]、原子吸收光谱^[27]、极谱检测^[28]和放射活性检测法^[29]等各种间接检测方法的报道。间接检测通过改变背景信号而实现背景信号的改变常为1%的数量级或更小;所以选用的色谱系统应当是稳定的,色谱柱流动相保持恒温是必要的。流动相中的背景信号可能相当高,在紫外吸收检测系统中,流动相的背景吸光度可能达1.5单位或更高。为了避免微扰噪声信号和非线性的信号响应,高质量的检测器是必要的。

§ 10.4.4 检测灵敏度

选用高摩尔吸光度的探针试剂并把溶质的相对保留值调节到1附近是获得高检测灵敏度的主要手段。图10.21是一系列无紫外吸收的阴离子和阳离子溶质在离子*N,N*-dimethylprotriptyline(摩尔吸光系数 ϵ^* 在219 nm时为1400)为探针试剂时的表观摩尔吸光度。具有最大表观摩尔吸光度的溶质是十二烷基胺,它的相对保留值 $\alpha_s=0.8$ 。从关系式(10.22)和(10.23)中可以知道,当溶质在非常接近于探针的系统峰流出时,溶质的相对响应值可以超过1。表10.9列出的实验测定结果证明了这一结论的正确性。

表10.9 在以1-苯乙基-2-甲基吡啶翁为探针试剂的系统中
一些离子性化合物的检测响应值 ϵ^*/ϵ 和保留值

溶 质	α_s	ϵ^*/ϵ
二丁胺	0.28	0.031
三丙胺	0.38	0.091
辛胺	1.27	-1.48
壬胺	3.70	-0.52
癸胺	10.4	-0.53
甲基硫酸	0.41	-0.11
丙基硫酸	0.89	-1.41
丁基硫酸	1.74	0.95
戊基硫酸	2.47	0.55
己基硫酸	5.3	0.57

固定相: μ Bondapak- C_4H_5 ; 流动相: 0.1 mol/L 乙酸 (C_H^+ 0.13 mol/L) 内含 0.3 mmol/L 1-苯乙基-2-甲基吡啶翁(Q). $k'_Q=4.3$, $\epsilon_Q=3.03 \times 10^3$.

当溶质是中性或与探针试剂电荷同号的化合物时, 根据式(10.22)可知溶质的间接响应值随探针试剂在固定相表面吸附的表面积分数 Q 的增大而增大. 研究表明对于中性的探针试剂有可能增加它在流动相中的浓度而提高溶质的检测灵敏度. 但在离子对色谱中没有得到相似的实验结果. 在离子性探针试剂的系统中, 中性溶质的检测灵敏度远远低于具有相近相对保留值的离子性溶质的检测灵敏度^[13,17]. 表10.10 给出的是一个实例, 非离子性的庚酸与辛烷磺酸阴离子具有相近的相对保留值 α_s , 但后者的相对响应值比前者大 10 倍^[17]. 引起相对响应值这么大的差别可能是由于它们对固定相的亲和能力不同所产生. 中性溶质在中性探针试剂的系统中的响应值较低可能是由于探针试剂在固定相表面的吸附表面积分数较低所产生^[18,24].

表10.10 非离子性溶质在萘-2-磺酸作为探针试剂的
系统中的检测信号响应情况

溶 质	α_s	$\epsilon^* / \epsilon_{NS}$
正丁醇	0.20	0.005
正戊醇	0.55	0.043
甲基异丁基酮	1.15	-0.069
己酸	1.41	-0.057
己醇	1.61	-0.038
丁酸乙酯	1.93	-0.028
庚酸	3.97	-0.028
辛磺酸	3.72	-0.279

固定相: μ Bondapak- C_4H_9 ; 流动相: 0.2 mmol/L 萘-2-磺酸(NS)和 50 mmol/L 磷酸缓冲液. $k'_{NS} = 8.3$, $\epsilon_{NS} = 3.0 \times 10^3$.

§ 10.5 定性分析

色谱法, 包括气相色谱、液相色谱、薄层色谱, 是一种重要的分析方法, 更确切地说, 是一种重要的分离手段. 多组分的混合物通过色谱柱被分离, 但是, 如何对这些色谱柱的流出物作出定性鉴定, 一直是色谱工作者为之努力的一项重要工作. 在液相色谱法中最常用的定性方法有下列几种.

§ 10.5.1 利用已知标准样定性

在色谱法中, 利用标准样对未知化合物定性是最常用的定性方法. 由于每一种化合物在一特定的色谱条件下(流动相组成、色谱柱、柱温等不变), 有其特定的保留值, 如果在相同的色谱条件下被测化合物与标样的保留值一致, 就可以初步认为被测化合物与标样相同. 如果多次改变流动相组成后, 被测化合物的保留值均与标准样的保留值相一致, 那么就能进一步证明被测化合物与标样相同. 这就是使用标准样来鉴别未知化合物的方法.

§ 10.5.2 利用检测器的选择性定性

在以上几节中已谈到了最常用的几种检测器，每种检测器均有其特殊性能。如示差折光检测器是一种通用性的检测器，但是灵敏度比较低。而紫外、荧光及电化学检测器则为选择性检测器，灵敏度比较高。所以如果将一定量的未知化合物经分离后进入并联或串联着的这几种检测器（二种或二种以上），视其响应情况可以初步判别此未知化合物为何类别。例如饱和烃及其衍生物在紫外光谱区（190~400 nm）吸收很小；而以共轭双键结合的分子如芳香烃，在紫外区有吸收；分子中苯环愈多吸收愈强。所以如果将含有几个组分的混合物，同时注入色谱柱，流出物同时进入并联的二种检测器，或按顺序依次进入串联的二种检测器，则可以通过所得的二张色谱图，由各组分在不同检测器上的相对峰高而判别它们可能为何类化合物。图10.22就是二张由三组分同时进入并联的紫外和示差折光检测器后所得的色谱图。

比较图10.22a和b，就能对这三个组分作一初步判断，峰1很可能是带有芳环的化合物，峰2则不大可能带芳环，峰3则不能确定为何类化合物。总之，比较各组分在不同检测器上的相对响应值，有可能精确地推测其结构或否定某种结构。

§ 10.5.3 利用紫外检测器全波长扫描功能定性

目前，在液相色谱中，使用最广泛的仍是紫外检测器。人们曾设计了多种型号的紫外检测器，欲根据被测化合物的紫外光谱图提供定性信息，如70年代日立公司生产的635-A型液相色谱仪所带的全波长扫描紫外检测器就具有这种功能。当色谱图上某组分的色谱峰顶出现时，即最高浓度谱带进入检测器时，停泵，然后对滞留在检测器中的组分进行全波长（180~800 nm）扫描，得到该组分的紫外-可见光谱图，再取某一标准品按同样方法处理，也得一光谱图，比较这二张光谱图即能鉴别该组分是否与标准品相同。对于某些有特征紫外光谱图的化合物，也可以参

看标准谱图来识别未知化合物。

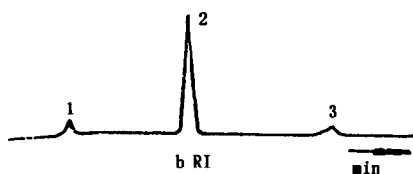
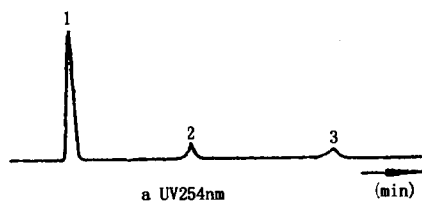


图10.22 样品等量分流后
进入并联检测器的色谱图

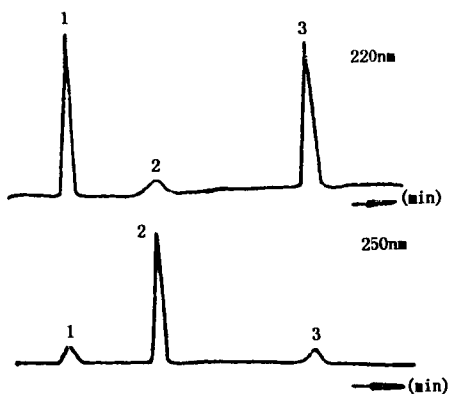


图10.23 组分 1, 2, 3 分别在
220 nm, 250 nm 下的色谱图

到 80 年代初，日立公司生产的多波长紫外检测器配双笔记录仪，它是一种带有双通道的检测器，每个通道有 8 个不同波长的按钮（由 210~280 nm）。当某一组分进入检测器后，有二束被选择的特定波长的光同时射到该组分分子上，在双笔记录仪上即能同时记录下该组分在这二个波长下的吸收率，即得到二张色谱图，如图 10.23 所示。在固定的色谱条件下，每个化合物均有其特定的在不同波长下的吸收率比值，如当组分 1 进入检测器后，可得到该组分在一组不同波长下的吸收率比值。例如：

$$\frac{A_{220 \text{ nm}}}{A_{230 \text{ nm}}}, \frac{A_{240 \text{ nm}}}{A_{250 \text{ nm}}}, \frac{A_{230 \text{ nm}}}{A_{270 \text{ nm}}}, \dots$$

其中 $A_{220 \text{ nm}}$ 表示该化合物在 220 nm 下的吸收率，即色谱图的峰面积。当然对于组分 2 和 3，也有其不同波长下的特定的吸收率比值。取某些纯化合物在相同的色谱条件下作出不同波长下特定的吸收率比值，以组合 1, 2, 3 与纯化合物相比较，将有利于对组分 1, 2, 3 作出肯定或否定的定性结论。除此之外，比较色谱峰各点的吸收率比值是否相同，可以鉴别色谱峰内是否夹杂另一种化合物，即检查峰的不纯度。

人们从 80 年代开始研制与液相色谱联用的紫外光电二极管阵列检测器，国外一些知名的 HPLC 仪器公司如 Waters, HP 都有商品化仪器出售。液相色谱-紫外光电二极管阵列检测器联用的基本特点是在一次色谱操作中可同时获得吸光度、时间和各组分 UV 光谱图一起的三维谱图，图 10.24 是一组化合物的三维谱图。有关利用液相色谱-光电二极管阵列检测器进行色谱峰定性研究的工作有很多报道^[30~32]，其中多数采用标样定性，也有对色谱峰纯度、重叠峰的分解和识别，紫外光谱和跟踪识别等，也即研究的实用性明显。但真正在液相色谱和紫外光谱联用定性方面本质上仍未有重大的突破。

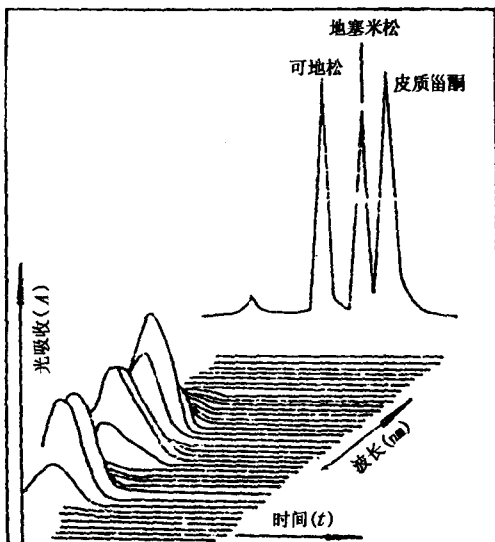


图 10.24 一组化合物的色光谱图

§ 10.5.4 利用改变流动相组成时被测组分的保留值变化规律定性

在液相色谱法中，每种化合物的保留值将随流动相组成的变化、固定相的不同而改变，不同的化合物其变化规律是不同的。因此人们常靠改变流动相组成等参数，使一组化合物得到好的分离。那么应该说也可以根据某一化合物在特定条件下的保留值变化规律反过来推测它为何类化合物，例如保留指数和 a ， c 指数定性等^[33,34]。但是，由于液相色谱是一个包含三个或三个以上因素相互作用的系统，整个系统比较复杂，近年来很多色谱工作者想通过流动相组成的改变与化合物的保留值变化之间的关系来得出定性结论。在以硅胶为固定相的吸附色谱方面，人们已经做了大量工作，得到了一系列在局部范围内有参考价值的关系式，但离实际应用还有距离。在以键合相为固定相的反相系统中，由

于固定相本身就是由两部分组成的，更增加了复杂性。另外，在反相系统中，由于一个中性分子的保留值随流动相组成变动而变化的规律受该分子上的功能团及其碳数双重影响，因此对于一个未知化合物既不知道碳数，又不知道官能团的情况下，只凭其保留值的变化规律仍很难作出定性推断。

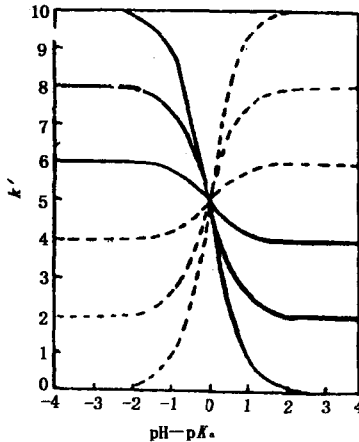


图10.25 有机一元酸（实线）有机碱（虚线）的容量因子与流动相 $\text{pH} - \text{pK}_a$ 的关系曲线

然而在反相系统中，不同类可解离化合物，如有机酸类、有机碱类，在改变流动相 pH 值条件下，它们的保留值变化有其独特的规律，如图10.25所示。

有机酸类的 k' 值（容量因子）随流动相的 pH 与 pK_a 差值的减小而增加（图中实线）。对于某一种有机酸其解离常数 pK_a 为一常数，所以也就是说，随着流动相中 pH 值的减小， k' 值逐渐增加，这是由于流动相中增加氢离子浓度后，抑制了有机酸的解离所致。而有机碱类的 k' 随流动相的 $\text{pH} - \text{pK}_a$ 值的增加而增加（图上虚线）。也就是说随着流动相中 pH 值增加， k' 逐渐增

加，这是由于流动相中增加氢氧离子浓度后，抑制了有机碱的解离所致。

因此，对于一个未知化合物来说，测得其流动相 pH 值变化后的 k' 变化规律，即可判断其为有机酸类或有机碱类^[35]。

§ 10.5.5 收集色谱柱流出各组分，再用其它化学或物理方法定性

液相色谱仪常常采用光学检测器，被测化合物通过检测器不受破坏，所以可以很方便地收集各个组分，然后再用其它方法，如红外光谱、质谱、核磁共振等方法作定性鉴定。

§ 10.6 定量分析

色谱法不仅是一种有效的分离方法，而且通过被分离组分分别进入检测器，能精确测得各组分在样品中的含量。

当一定量化合物被注入色谱柱后，由流动相携带在固定相与流动相之间进行多次分配，最后离开色谱柱，进入检测器而产生响应。由于该化合物在柱内运行过程中，受传质、扩散等因素的影响，化合物离开色谱柱时，其浓度随时间变化的规律是接近高斯分布曲线的形式在记录仪上被记录下来的。因此进入检测器的物质量等于它在流动相中的浓度的积分值，这一点在 § 10.1 中已作了详细的讨论，这里只是引用其结论，将物质量 m_i 与峰面积 A 关联起来，其关系式如下：

$$m_i = \frac{u_2}{u_1} \times \frac{F_c}{S_i} \times A_i \quad (10.24)$$

当纸速 u_1 ，记录器灵敏度 u_2 ，流速 F_c ，检测器灵敏度 S_i 均为常数时，色谱峰面积 A 与进入色谱柱的物质量 m_i 之间有着线性的正比关系（在检测器响应值的线性范围以内）。这就是色谱法利用被测化合物的峰面积进行定量的基础。因此准确测量色谱峰面积就成为色谱定量工作中的重要问题，下面分别讨论定量工作

中的几个方法。

§ 10.6.1 峰面积的测量

随着科学技术的进步，峰面积的测量方法日益完善，下面逐一介绍测量方法。

1. 峰高乘峰半宽法

对于对称峰形，可按下列公式计算峰面积：

$$A = 1.065 \times h \times W_{1/2} \quad (10.25)$$

式中 A 是峰面积； h 为峰高； $W_{1/2}$ 是半峰高处的峰宽；1.065 是峰面积与三角形面积之间的校正系数。

按公式 (10.25) 计算峰面积时，要特别注意峰宽测量的准确性。对于峰宽小于 2 mm 的色谱峰，经常采用放慢记录纸纸速，并用读数显微镜（可测到 0.01 mm）测量峰半宽，以减少测量误差。当峰宽不随进样量变化时，也可以用峰高代替峰面积作定量计量。

对于不对称峰形，按公式 (10.25) 来计算峰面积误差较大，可采用面积仪测出峰面积，或将峰面积印在已知面积与重量关系的纸上，剪下峰形，称其重量而计算得峰面积。

2. 积分仪法

积分仪将检测器给出的微电流或电压信号进行积分，并将峰面积打印出来。

3. 微处理机法

80 年代以来生产的液相色谱仪几乎都带有微机，微机不仅能将检测器给出的微电流或微电压信号经处理后打印出峰面积，并能根据所给指令按外标法或内标法，根据标样和各组分的峰面积，打印出各组分的定量结果^[36]。

§ 10.6.2 定量计算的几种方法

1. 外标法

外标法是以被测化合物的纯品（或已知其含量的标样）作为

标准品，取一定量该标准品（即一定量已知浓度的溶液）注入色谱柱得到其响应值（峰面积或峰高），在一定浓度范围内，标样量与响应值之间有比较好的线性关系，可用下式表示：

$$A_0 = f_0 C_0 V_0 \quad (10.26)$$

式中 A_0 是峰面积； C_0 为标样溶液浓度； V_0 为注入的标样溶液体积。因此由已知的 A_0 ， C_0 ， V_0 值即能求得系数 f_0 值。然后，在完全相同的色谱条件下，注入欲测的某组分（与标样组分相同）体积为 V_1 ，得面积 A_1 。根据式 (10.26)，由已知 A_1 ， V_1 及 f_0 值，即能求出 C_1 ，即欲测组分的浓度。在检测器的灵敏度不是很稳定的情况下，测定样品期间需要经常注入标样以得到不同时间的 f_0 值。

由于这种方法操作和计算都比较简单，它是常用的一种定量方法。但是该方法要求在分析样品的整个操作过程中，操作条件要稳定。如检测器灵敏度、流速、流动相组成等不发生变化；标样溶液及被测溶液要求密封好，使溶液浓度保持恒定；以及每次进样体积要有好的重复性。否则将会影响定量结果的准确性。

2. 内标法

由于外标法所必须的要求有时难以实现，为了得到更准确的定量结果，发展了内标定量方法。

内标法是利用在同一操作中，被测物的摩尔响应值与内标物的摩尔响应值的比值是恒定的，此比值不随进样体积或操作期间所配制的溶液浓度的变化而变化，因此能得到较准确的定量结果。

内标法定量，首先要选择合适的内标物，内标物要具有与被测物相近的保留值，当样品中有几个被测组分时，要求内标物的保留值介于几个被测组分之间，当然不能与其它组分峰重叠。

用内标定量的具体操作方法如下：

(1) 先用分析天平准确称取被测组分 a 的标样 W_a g，再称取内标物 W_2 g，再加入一定量溶剂混合，这样就得到一混合标样。取任意体积混合标样注入色谱柱，得色谱峰面积 A_a （被测

组分 a 标样面积) 及峰面积 A_2 (内标物峰面积), 由此得到相对摩尔响应值 S_a , 计算公式如下:

$$S_a = \frac{A_a/W_a}{A_2/W_2} \quad (10.27)$$

要强调的是公式 (10.27) 中 W_a , W_2 分别是混合标样溶液中所含有的总的被测组分 a 标样与内标物的绝对重量. 另外, 相对摩尔响应值 S_a 是一常数.

(2) 称取含 a 组分的被测物若干克 (W g), 再用分析天平准确称取内标物 W'_3 g, 混合之, 用一定量溶剂配成混合溶液, 取任意体积注入色谱柱, 得被测组分 a 的峰面积为 A'_a , 内标物峰面积为 A'_3 , 按式 (10.28) 即可算出在被测物中的 a 组分的重量 W'_a :

$$S_a = \frac{A'_a/W'_a}{A'_3/W'_3}, \text{ 即 } W'_a = \frac{A'_a \times W'_3}{A'_3 \times S_a} \quad (10.28)$$

a 组分在被测物中的含量为:

$$a\% = \frac{W'_3}{W} \times 100\% \quad (10.29)$$

如果被测物中除 a 组分外, 还有组分 b, c, ..., 均可按此方法, 先求得 S_b, S_c, \dots , 然后分别求得组分 b, c, ... 在被测物中的含量.

内标法是通过式 (10.27) 及 (10.29) 来进行计算得到定量结果的, 操作过程中样品和内标物是混在一起注入色谱柱的, 因此只要混合溶液中被测组分量与内标物量的比值是恒定的, 溶剂体积的变化不会影响定量结果. 进样体积的不重复所造成的对于峰面积的影响, 在计算过程中均被抵消. 由此可见, 内标法较之外标法准确度高, 但是操作和计算均较复杂.

外标法和内标法是液相色谱中常用的两种定量方法. 至于其它方法, 如气相色谱中, 用氢火焰离子化检测器时常采用的归一化法, 在液相色谱中一般不被采用. 这是因为在液相色谱中所使用的检测器均为选择性检测器, 如紫外、荧光检测器等, 它们对

不同结构的化合物的响应值差别较大,有时甚至能相差几个数量级,所以一般不能采用归一化的定量方法.

参 考 文 献

- [1] E. S. Yeung, *Detectors for Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1986.
- [2] 王俊德、商振华、郁蕴璐, 高效液相色谱法, 中国石油化工出版社, 北京, 1992.
- [3] 卢佩章、张玉奎、梁鑫淼, 高效液相色谱法及其专家系统, 辽宁科技出版社, 沈阳, 1993.
- [4] Dionex Corporation, "Basic Ion Chromatography", Dionex Corporation, 1983.
- [5] J. S. Fritz, D. T. Gjerde and C. Pohlanelt, *Ion Chromatography*, Huthig, 1982.
- [6] 牟世芬、刘开录, 离子色谱, 科学出版社, 北京, 1986.
- [7] R. W. Frei and J. F. Lawrence, *Chemical Derivation in Analytical Chemistry*, Pleum, New York, 1981.
- [8] G. Schill and E. Arvidsson, *J. Chromatogr.*, **495**, 299 (1989).
- [9] 达世禄, *分析化学*, **17**, 372 (1989).
- [10] J. Crommen and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **142**, 283 (1977).
- [11] M. Denkert and L. Hackzell, *J. Chromatogr.*, **218**, 31 (1981).
- [12] J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1**, 549 (1983).
- [13] L. Hackzell and G. Schill, *Chromatographia*, **24**, 252 (1982).
- [14] F. Helfferich and G. Klein, *Multicomponent Chromatography*, Marcel Dekker, NY, 1970.
- [15] F. Riedo and E. Kovats, *J. Chromatogr.*, **329**, 1 (1982).
- [16] W. R. Melander and Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **282**, 229 (1983).
- [17] J. Crommen and D. Westerlund, *Chromatographia*, **24**, 252 (1987).
- [18] J. Crommen and G. Schill, *Chromatographia*, **25**, 397 (1988).
- [19] G. Schill and J. Crommen, *Trends in Anal. Chem.*, **6**, 444 (1987).
- [20] T. Takeuchi and D. Tshii, *Chromatographia*, **25**, 107 (1988).
- [21] L. Hackzell and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **282**, 197 (1983).
- [22] J. Crommen and P. Herne, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2**, 24 (1984).
- [23] E. Arvidsson and D. Westerlund, *J. Chromatogr.*, **461**, 429 (1989).
- [24] P. Herne and M. Renson, *Chromatographia*, **19**, 274 (1984).
- [25] S. Rapsomanikis and R. M. Harrison, *Anal. Chim. Acta*, **199**, 41 (1987).
- [26] J. Ye and R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **58**, 2337 (1986).

- [27] S. Maketon and J. G. Tarter, *J. Chromatogr.*, **368**, 395 (1986).
- [28] D. R. Bobbitt and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **56**, 1577 (1984).
- [29] S. Banerjee and J. R. Steimers, *Anal. Chem.*, **57**, 1476 (1985).
- [30] M. Bogusz and M. Erkens, *J. Chromatogr.*, **674**, 97 (1994).
- [31] H. Engelhardt and Th. Kong, *Chromatographia*, **28**, 341 (1989).
- [32] F. V. J. Warren and B. A. Bidlingmeyer, *Anal. Chem.*, **59**, 1890 (1987).
- [33] R. M. Smith, *J. Chromatogr.*, **656**, 331 (1993).
- [34] Nong Chen, Peichang Lu and Yukui Zhang, *J. Chromatogr.*, **606**, 1 (1992).
- [35] A. Bartha, G. Vigh and J. Szahberger, *J. Chromatogr.*, **485**, 403 (1989).
- [36] WDL-95 色谱工作站, 国家色谱研究分析中心研究报告, 1995.

第十一章 高效液相色谱法的应用

高效液相色谱由于对挥发小或无挥发性、热稳定性差、极性很强，特别是那些具有某种生物活性的物质提供了非常适合的分离分析环境，因而广泛应用于生物化学、生物医学、药物临床、石油化工、合成化学、环境检测、食品卫生以及商检、法检和质检等许多分析检验部门。高效液相色谱不仅仅是一种有效的分析工具，而且日益成为高价位的生化工程产品、手性药物等分离制备和纯化的手段。如果说在 50~60 年代是石油化工的突起促进了气相色谱技术的大发展，那在 70~80 年代，则是生命科学、特别是化学医学和制药工业的需要，推动了高效液相色谱技术的迅速发展。

在高效液相色谱法分析实际样品时，所涉及的操作和分离条件很多，如液相色谱的分离模式、固定相、流动相组成、分离温度和流动相 pH 值等^[1]，对于一个特定的实际样品有可能可以选择多种高效液相色谱分离条件进行分离分析^[2,3]，甚至是一些从文献上得到的实际样品的分离条件的重复也是比较困难的，必须通过对文献中的操作条件进行适当的修正后才可能获得满意的分离结果。因此要很好地实现实际样品分离条件的选择，最重要的还是要掌握高效液相色谱分离分析的基本原理。本章将对高效液相色谱的反相、正相和离子对分离模式的特点进行介绍，并列举一些典型的应用实例。有关高效液相色谱分离分析手性化合物和生物大分子的应用可参阅第十二和第十章。

§ 11.1 正相色谱的应用

正相色谱是指流动相的极性小于固定相的分离分析体系。正

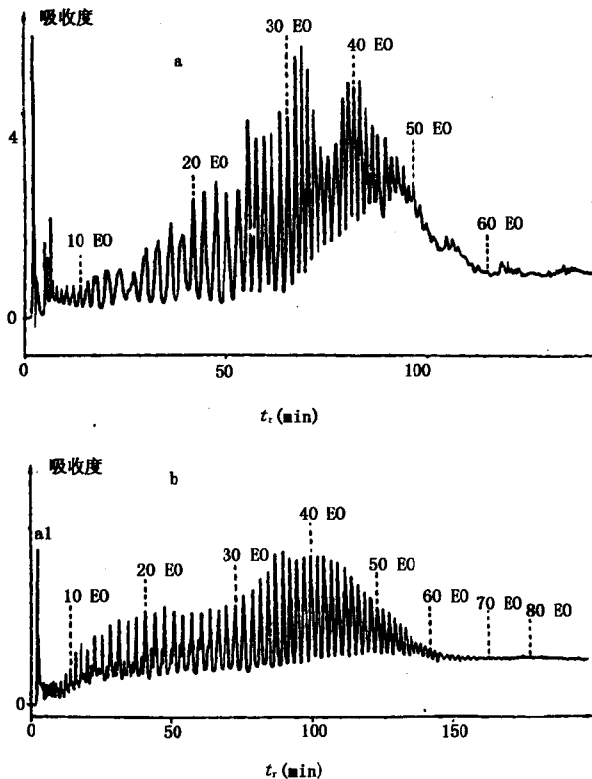


图11.1 非离子型聚氧乙烯表面活性剂的正相色谱分析
 色谱柱: $250 \times 3\text{mm i, d.}$ 填充 $5\mu\text{m}$ 对硝基苯键合固定相;
 流动相: 正戊烷/二氯甲烷/甲醇的配比从 90/5/5 190min 梯度程升到
 65/17.5/17.5, 再在此配比下等度冲洗 30min; 流量: 0.6mL/min ;
 柱温: a. 25°C , b. 45°C ;
 样品: KM25 与 Cetalox AT (十八烷基氧乙烯表面活性剂, 平均氧乙
 烯聚合度分别为 25 和 50) 的含量各为 $10^4\mu\text{g/g}$ 的混合物.

相色谱所采用的固定相为极性较高的填料, 如硅胶、三氧化二铝、二醇基、氨基和氰基键合固定相等. 其流动相通常是非极性的有机溶剂加入适当的极性有机溶剂的混合溶液. 正相色谱的分

离机理主要基于被分离化合物的极性基团与固定相极性基团相互作用的差别。基于正相色谱的特点可以推断正相色谱比较适用于以下几类样品的分离分析：(1) 由反相色谱法很难分离的异构体可以采用以硅胶为固定相的正相色谱分离分析；(2) 根据被分离样品的极性差别进行族类分离；(3) 易于水解样品的分离分析；(4) 在极性有机溶液中溶解度很小的高油性样品的分离分析。

表面活性剂种类繁多，主要的化学类型有阴离子型（如烷基和烷基苯磺酸盐），阳离子型（如烷基、苯基或吡啶基季胺盐）和非离子型（如烷基酚聚氧乙烯醚、聚乙二醇、甘油酯等），应用十分广泛，除了人人皆知的洗涤剂外，在工业乳化、印染、采油、选矿、建材等行业都有重要应用。表面活性剂产品有一个共同特点，即它们都不是一个纯净的化合物，而是有一定分子量分布范围的同系混合物。例如在烷基磺酸盐、烷基硫酸盐或烷基季胺盐工业产品中，烷基链长有一个分布范围；烷基苯磺酸盐包含有烷基与苯基连接位置不同的异构体。至于非离子型表面活性剂，如最常见的壬基酚聚氧乙烯醚，由于工业原料和生产工艺的缘故，烷基可能是 C_8 ， C_9 ， C_{10} ，甚至 C_{16} 和 C_{18} ，氧乙烯 (EO) 聚合度从零到几十甚至上百。所以表面活性剂的分析，不仅有总含量的测定，还有分子量分布范围的测定问题。一般来说，对于离子型表面活性剂由于亲水性较好，较多地使用反相色谱模式进行分离分析。而对于非离子型表面活性剂，除了使用反相柱外，还常使用氰基、氨基和二醇基极性固定相色谱柱和极性较强的有机溶剂的正相色谱分离测定，特别是对氧乙烯 (EO) 的聚合度测定特别有利^[3~5]。而对于高碳数烷基、宽氧乙烯 (EO) 聚合度的非离子型表面活性剂，Desbene 和 Desmazieres^[6] 以对硝基苯键合固定相的正相色谱系统分离分析高碳数 C_{16} 和 C_{18} 的非离子型表面活性剂，其氧乙烯聚合度的测定范围从 1 到 80 以上。图 11.1 是该正相色谱系统分离分析高碳数高氧乙烯 (EO) 聚合度非离子型表面活性剂的典型谱图。

2, 4, 6-三硝基甲苯 (TNT) 是火炸药中的主要成分。

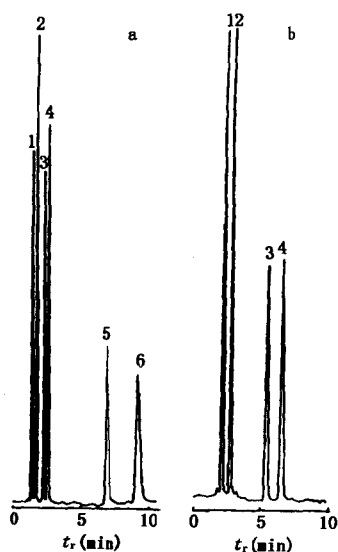


图11.2 以硅胶为固定相的正相色谱分离分析TNT及其降解产物异构体色谱柱:300×4mm i.d.填充5 μ m

Spherisorb-Si;

流动相:a.正己烷/异丙醇(79/21);

b.正己烷/异丙醇(90/10);流量:

1.0ml/min;紫外检测波长:254nm;

色谱峰:1.TNT;2.2,4-二硝基甲苯;

3.4-氨基-2,6-二硝基甲苯;4.2-氨基-

4,6-二硝基甲苯;5.4,6-二氨基

-2-硝基甲苯;6.2,4-二氨基-6-硝

基甲苯.

TNT及其降解产物已对生产TNT工厂的环境造成严重的污染。TNT的生物降解产物包括2-和4-氨基二硝基甲基,2,4-和2,6-二氨基硝基甲苯等异构体。同时植物也可以吸收TNT并把它们代谢为2-和4-氨基硝基甲苯。由于TNT及其降解产物具有至癌的毒性,TNT及其降解产物的分析测定已成为环境和生物医学的重要问题。高效反相液相色谱法已被广泛用于TNT及其降解产物的分离分析^[7,8]。但是,反相色谱很难对

单氨基二硝基甲基异构体进行基线分离。Walsch^[9]采用C₁₈柱与CN柱连接的混合柱系统才使TNT及其降解产物达到基线分离。以硅胶为固定相的正相色谱对异构体的分离具有特殊的选择性,图11.2是硅胶为固定相的正相色谱分离TNT及其降解产物异构体的典型谱图^[10]。

四氯二苯并-*p*-二恶噁(tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TC-

DD)是一类极毒的环境污染物。在化学合成TCDD标样时产生的是TCDD异构体的混合物,一般采用HPLC技术来纯化合成的TCDD样品而获得每一异构体的纯品。但有些TCDD异构体在反相色谱和硅胶柱上都很难获得分离^[11]。Pyell等人^[12]采用电荷转移固定相的填充色谱柱,考察了极性和非极性流动相时13种

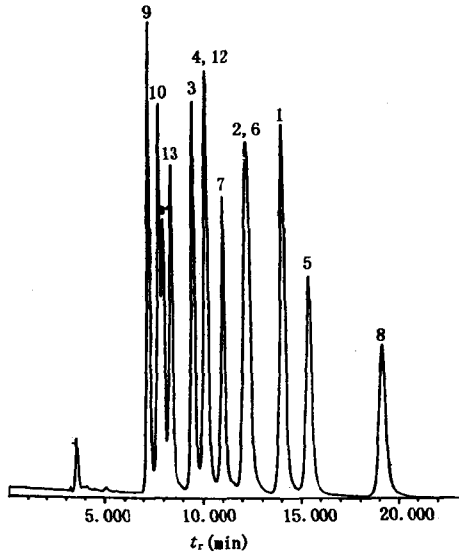


图11.3 13种 TCDD 异构体在
正相色谱中的分离

色谱柱：邻苯二甲酰胺丙基硅胶键合固定相柱；

流动相：正己烷；柱温 25℃；

紫外检测波长：235nm；流量：1ml/min，

色谱峰：1. 1234 - TCDD；2. 1236 - TCDD；3.

1237 - TCDD；4. 1238 - TCDD；5. 1239 - TCDD；

6. 1267 - TCDD；7. 1278 - TCDD；8. 1289 -

TCDD；9. 1368 - TCDD；10. 1378 - TCDD；11.

1379 - TCDD；12. 1478 - TCDD；13.

2378 - TCDD.

TCDD 异构体的分离结果，表明在以正己烷为流动相的正相色谱体系的分离效果大大优于甲醇为流动相的反相色谱体系。图11.3是13种 TCDD 异构体在正相色谱中的分离图。TCDD 异构体其疏水作用力基本相近，主要差别在于偶极矩的不同，采用极性冲洗剂的反相色谱很大程度上抑制 TCDD 异构体偶极矩差别的分离选择性。

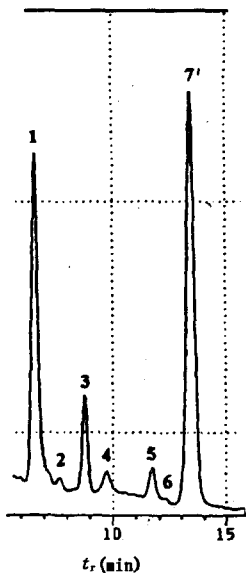


图11.4 V_A 各种顺反异构体的
正相色谱分离分析

色谱柱: $100 \times 2 \text{mm i. d.}$ 填充 $3 \mu\text{m}$ 硅胶; 流动相: 正己烷/正辛醇 (99.7/0.3, V/V); 紫外检测波长: 325nm ; 流量: 0.4ml/min .

色谱峰: 1. 11-烯-顺式- V_A ; 2. 11, 13-二烯-顺式- V_A ; 3. 13-烯-顺式- V_A ; 4. 9, 13-二烯-顺式- V_A ; 5. 9-烯-顺式- V_A ; 6. 7-烯-顺式- V_A ; 7. 所有反式- V_A .

维生素是维持人体正常生理功能所不可缺少的物质, 虽然人体每天对它的需要量不多, 但由于人体不能自身合成, 因此必须借助于食物获取. 近年来在食品加工工业中, 出现了多种强化食品, 一些维生素如 V_C , V_B , V_A 和 V_E 等被作为添加剂加入到一些食品中去, 以改善食品的质量. 特别是 V_C 用得较为广泛, 因为它还是食品中的一种抗氧化剂. 无论是水溶性维生素, 还是脂溶性维生素, 都可采用 HPLC 分析, 只是所使用的分离柱和流动相不同而已. 水溶性维生素一般都选用反相色谱或离子对色谱测定, 而脂溶性维生素可选用反相或正相色谱测定. 维生素 A (V_A) 具有多种几何异构体, 在大多数情况下, 反相色谱可以快速测食品中维生素 A, 但反相色谱只能对 13-烯-顺式- V_A 与其它的反式 V_A 进行分离^[13]. 由于顺式 V_A 对紫外光的吸收弱于反式 V_A , 因此采用反相色谱测定 V_A 的问题在顺式 V_A 存在时可能使结果偏低. 另一方面, V_A 异构体的生物活性也有很大的差别, 假定所有的反式 V_A 的生物活性为 100%, 则 11, 13-二烯-顺式- V_A 的活性只为 15%, 而 13-烯-顺式- V_A 的活性为 75%. 因此, 正确测定各种 V_A 几何异构体对正确评价添加 V_A 食品的质量很重要. Brinkmann 等人^[14]采用硅胶为固定

相的正相色谱系统成功地分离测定了食品中的 6 种 V_A 顺式异构体,其分离色谱图如图 11.4 .

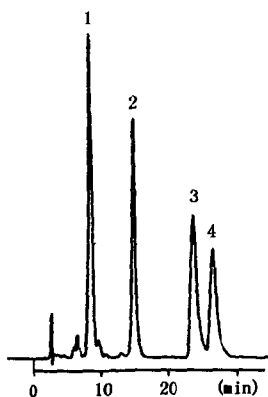


图 11.5 正相色谱分离分析在位置 3 或 22 上修饰的蜕化激素混合物

色谱柱: 250×4.6 mm i. d.

填充 Zorbax-Sil (5 μ m);

流动相: 氯仿/异丙醇/水

(125/30/2); 流量: 1ml/min.

色谱峰: 1. 3-脱氢-20-羟基蜕化激素; 2. 22-氧代-20-羟基蜕化激素; 3. 3-表-20-羟基蜕化激素; 4. 20-羟基蜕化激素.

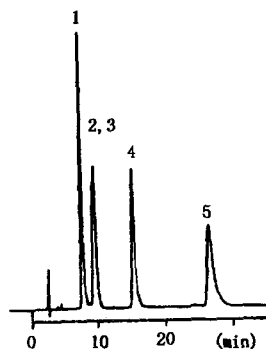


图 11.6 正相色谱分离分析 20-羟基蜕化激素的单乙酯化混合物

实验条件与图 11.4 相同.

色谱峰: 1. 20-羟基蜕化激素-25-乙酸酯; 2. 20-羟基蜕化激素-2-乙酸酯; 3. 20-羟基蜕化激素-3-乙酸酯; 4. 20-羟基蜕化激素-22-乙酸酯; 5. 20-羟基蜕化激素.

高效液相色谱已被广泛应用于天然化合物的分离分析中. 植物蜕化激素 (phytoecdysteroids) 是天然化合物中一类重要的化合物. 一般认为采用单纯的反相色谱或正相色谱分离模式不能完全测定植物中所有的蜕化激素成分. 一般来说, 植物中存在一种或几种含量较高的蜕化激素的主成分和多种含量较低的次成分. 至今已在植物中发现了 150 多种蜕化激素. 由于蜕化激素化学结构上的改变有可能在反相或正相色谱的保留行为发生较大的变化, 把反相色谱分离所得的色谱峰的分流进行正相色谱的再分离, 没有被分

离的成分可以获得进一步的分离. 因此在反相和正相色谱中与蜕化激素标样具有相同保留时间的物质通常被认为是该蜕化激素标样物质^[15,16]. 以硅胶为固定相的正相色谱通常可以很好地分离反相色谱很难分离的蜕化激素位置异构体, 图 11.5 和图 11.6 是正相色谱分离蜕化激素类化合物的典型谱图^[16].

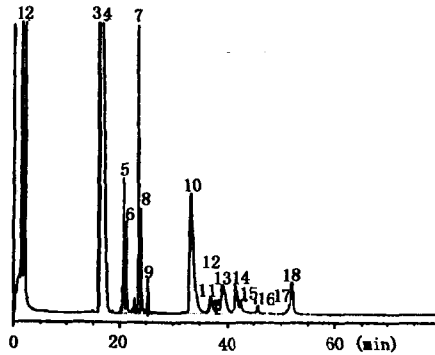


图11.7 正相色谱分离分析面粉中
非淀粉脂族类化合物

色谱柱: 100 × 3mm i. d 填充 7 μ m Lichrosorb-Si;
流动相: 见表11.1; 挥发光散射检测器.

色谱峰: 1. SE + TG; 2. TG; 3. ST; 4.
FFA; 5. 未知物; 6. ASG; 7. MGDG; 8.
MGMG; 9. SG; 10. DGDG; 11. NALPE;
12. NAPE; 13. PE; 14. PG; 15. LPE;
16. PC; 17. LPG; 18. LPD.

此外, 在一些特殊情况下, 正相色谱也可以用于极性较高的样品分离分析, 为了缩短强极性化合物的保留时间, 有时可在流动相中加入适量的强组分水. 图11.7 是以硅胶为固定相的正相色谱分离分析小麦粉中非淀粉脂族类化合物的典型谱图^[17], 所采用的梯度冲洗条件列于表11.1 中. 由于脂类化合物紫外吸收和对其它的光学检测器响应不灵敏, 因此采用了挥发光散射检测器这一新兴的通用型高灵敏检测技术.

表11.1 用于脂类化合物族类分析的正相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	流量 (ml/min)	冲洗剂组成		
		正己烷/THF(99/1)	异丙醇	水
0	0.5	100	0	0
5	0.5	95	5	0
10	0.5	85	15	0
15	0.5	40	60	0
33	0.5	40	51	9
48	0.5	40	51	9
53	0.5	40	60	0
58	0.5	100	0	0
80	0.5	100	0	0

§ 11.2 反相色谱的应用

反相色谱是指流动相的极性大于固定相的分离体系。反相色谱最常用的固定相是 C_{18} 、 C_8 和苯基键合相的填料；在分离极性很大的化合物时，也可以采用氨基、氰基等极性基团键合固定相。反相色谱所采用的流动相通常是水或缓冲液与极性有机溶剂如甲醇、乙腈的混合溶液；在分离分析疏水性很强的实际样品时，也可采用非水流动相而提高其洗脱能力。反相色谱的分离机理主要基于被分离溶质与固定相疏水作用力的差别。通过调节固定相和流动相的性质，反相色谱可分离分析的样品非常多，通过查阅文献可以发现 70% ~ 80% 的高效液相色谱分离分析是在反相色谱上完成的。

§ 11.2.1 反相色谱在生物医学上的应用

中枢单胺递质从神经末梢释放后，由于被迅速代谢和神经

元的重摄取作用，使这些递质在脑内微透析实验的收集液（即微透析液）中的浓度非常低，难以用常规柱液相色谱法分析检测，

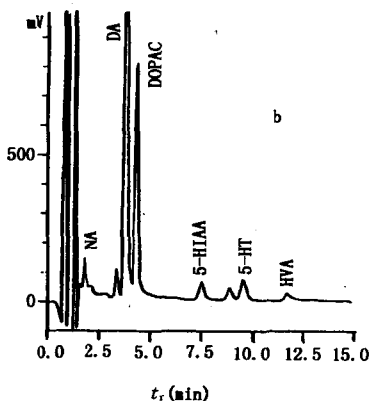
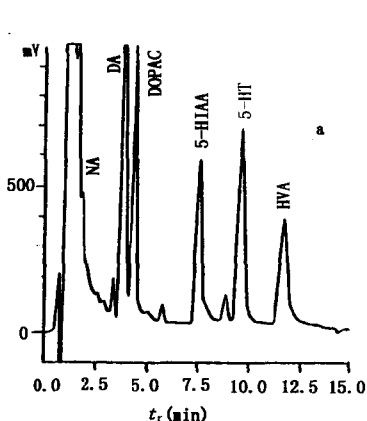


图11.8 微柱-双电极电化学检测分析大鼠纹状体透液的单胺类递质
 色谱柱: $100 \times 1 \text{ mm}$ i. d. 填充 Sepstik C_{18}
 微柱, 填料粒度 $5 \mu\text{m}$; 双电极电化学检测: 施加电位(对 Ag/AgCl), a. $+0.72 \text{ V}$ (氧化), b. $+0.05 \text{ V}$ (还原).

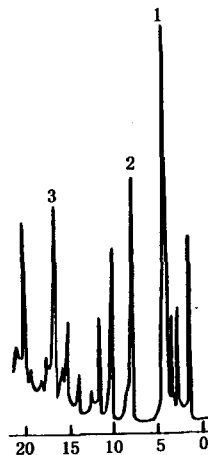


图11.9 人脑脊液 (CSF) γ -氨基丁酸的色谱分离分析
 色谱柱: $250 \times 4.6 \text{ mm}$ i. d. 填充 YWG- C_{18} ; 流动相: A 为甲醇; B 为四氢呋喃/甲醇/ 0.05 mol/L 乙酸钠 ($\text{pH} 6.2$) ($5/745/420, \text{V/V}$); 线性梯度洗脱为: $0 \sim 6 \text{ min}$, $80\% \text{ B}$; $6 \sim 20 \text{ min}$, $80\% \sim 50\% \text{ B}$; $20 \sim 30 \text{ min}$; 维持 $0\% \text{ B}$; $30 \sim 40 \text{ min}$, 返回 $80\% \text{ B}$; 紫外检测波长: 254 nm ; 流量: 1.0 ml/min .
 色谱峰: 1. Dns-Glu;
 2. Dns-Cl; 3. Dns-Gabal.

叶惟冷等^[18]采用微柱液相色谱-双工作电极电化学检测分析了麻醉大白鼠纹状体微透

析样品中的单胺类递质及其代谢产物的含量，检测下限可达 1pg 以下。图11.8 是大鼠纹状体透析液的色谱分离图。γ-氨基丁酸 (Gaba) 是抑制性神经递质，而它的前体为谷氨酸，是最重要的兴奋性神经递质。中枢神经元的兴奋程度与脑脊液 (CSF) 中 Glu 和 Gaba 的含量有密切关系。陈希贤等^[19]采用丹酰氯柱前衍生的 HPLC 方法，紫外检测人 CSF 中的 Glu 和 Gaba 含量，最低检测限可达 2pmol/L。图11.9 是人 CSF 中 Glu 和 Gaba 的色谱分离分析谱图。

胆汁酸的分离分析问题一直受到人们的广泛关注。主要因为其重要的生理作用，胆汁酸可以减少胆固醇在体内的沉积，可以促进肠内磷脂的增溶和吸收，故其含量多少常与各种肝病和胃功能失调相关联。其中关注的焦点主要来自胆汁酸的检测，RP-HPLC 紫外检测法曾被用于分析胆汁中的胆汁酸，但此法不适于血清中胆汁酸的直接测定，因为血清中胆汁酸含量太低。用 RP-HPLC 柱后酶反应衍生荧光检测分析血清中的胆汁酸，此法要求在色谱柱后接一酶柱，降低了色谱柱的分离效果。用 RP-HPLC 荧光检测分析血清中的胆汁酸，此法要求柱前衍生，耗时稍长。通用型的挥发光散射检测器 (ELSD) 则可以克服上述缺点，ELSD 检测器的响应值与被检测物的官能团和光吸收性质无关，因而无需衍生化，使样品处理过程大为简化。同时由于流动相在进入 ELSD 后全部挥发除去，在梯度洗脱时基线平稳。冯爱生等^[20]采用反相色谱 ELSD 检测分析了人血清中的胆汁酸，检测下限可达 20ng，其分离分析谱图见图11.10。

许多蛋白质含有无基团密码子的改性氨基酸，为了充分了解改性蛋白质片段的转录的生物功能，化学合成糖基化和磷基化肽分离检测已成为生物技术的关键问题之一。与在磷基化蛋白质中单一的磷酸基相比较，N 端和 O 端糖基化的蛋白质其结构变化更为复杂。蛋白质中的糖链一般具有很高的生物识别功能。高效液相色谱已被广泛应用于寡糖的分析测定。就糖基化的肽片段而言，从复杂的具有生物信息糖链中去除第一或前二个单糖单元所

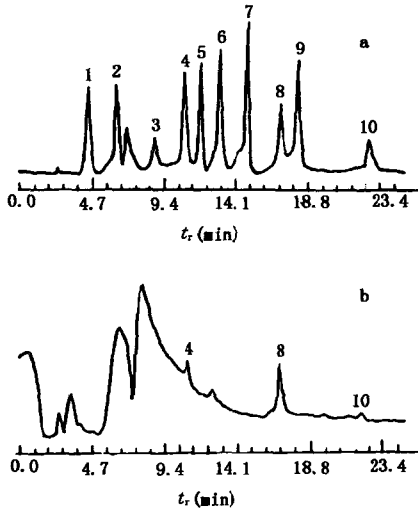


图11.10 高效液相色谱 ELSD

检测分离测定胆汁酸

色谱柱: 250 × 2mm i. d. 填充 5 μ m Hypersil-
C₁₈;

流动相: 溶剂 A 为甲醇/水 (75/25, V/V),
溶剂 B 为甲醇/水 (62.5/3.75 V/V), 流动相
A 和 B 中都含 5mmol/L NH₄Ac (pH 5.40); 梯
度洗脱为: 0 ~ 10min, 100% B; 10 ~ 25min,
100%; ELSD 检测; 流量: 0.2 ml/min;

样品: a. 标样; b. 肝硬化病人血清样.

色谱峰: 1. TUDCA; 2. TCA; 3. GUD-
CA; 4. TCDCA; 5. TDCA; 6. GCA; 7.
TLCA; 8. GCDCA; 9. GDCA; 10. GLCA.

产生的构型和免疫功能的变化往往比去除剩余的糖基的变化还要大. 因此, 糖基化的氨基酸和肽的分析测定已成为生物工程中一个重要的难题之一. Gorbics 等人^[21] 采用高效液相色谱法, DABS 衍生化测定 N 端和 O 端糖基化肽合成中的氨基酸和糖基化氨基酸, 获得较好的结果. 图11.11 是一个典型的液相色谱分

离谱图.

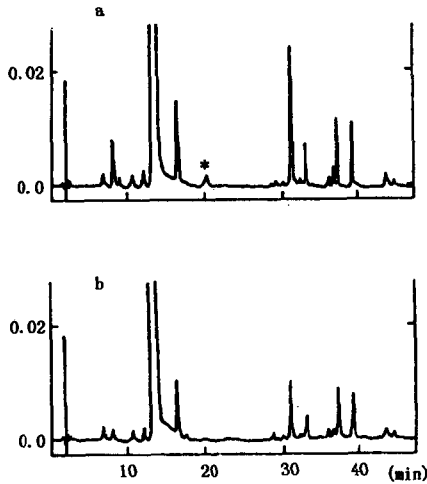


图11.11 糖基化肽 T5 酶解产物分离分析

色谱柱: C₁₈Ultraspher-DASB 柱;

流动相: 梯度冲洗条件参阅文献 [21]; 紫外检

测波长: 436nm; 流量: 1.4 ml/min. a. 8% 的

2.4 μg N 端糖基化肽 NGlcNAcT5 酶解产物; b.

8% 的 1.9 μg 非糖基化肽 T5 酶解产物; 图中 *

表示糖基化的氨基酸成分.

为了测定具有生理活性寡糖的结构, 糖的组成分析也是非常重要的方面. 已有多种常规的色谱方法测定糖的组成, 例如在高 pH 流动相下离子交换色谱分离分析糖的水解产物, 或通过对水解产物衍生化后由反相液相色谱法测定^[22]. Honda 等人^[23]发现了 HPLC 糖成分分析的高灵敏度衍生化试剂 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP). Strydom^[24]则应用这一衍生试剂, 建立了中性、酸性和碱性寡聚糖水解产物色谱分离分析方法. 图11.12 是反相色谱分离分析糖的 PMP 衍生物的典型谱图.

很多天然产物具有重要的生理或药理作用, 受到人们的广泛

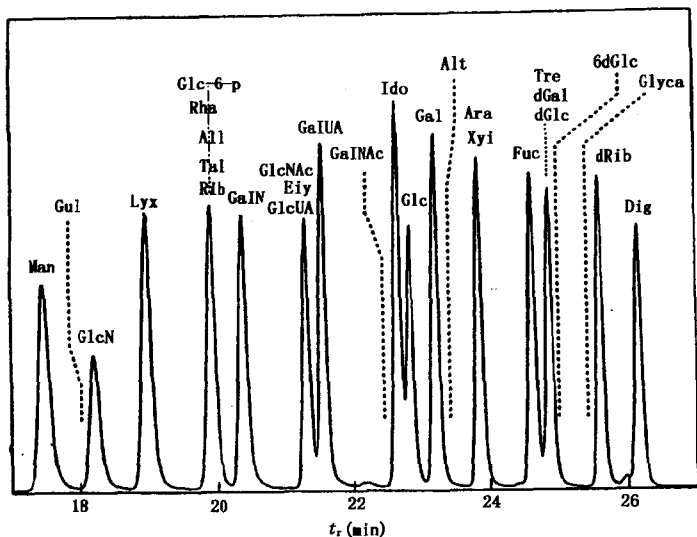


图11.12 反相色谱法分离分析糖的PNP衍生物

色谱柱: 300×3.9 mm i. d. 填充 Novapak-C₁₈;

流动相: 溶剂A, 0.4%三乙胺缓冲液 (pH4.86) / 乙腈 (90/10, V/V);

溶剂B, 乙腈/水 (60/40, V/V); 梯度冲洗, 10% B $\xrightarrow{9\text{min}}$ 14% B $\xrightarrow{21\text{min}}$

64% B; 柱温: 26°C; 紫外检测波长: 254nm; 流量: 1ml/min.

重视。甾类化合物就是天然产物中的一大类。高效液相色谱法已被广泛应用于甾类化合物的分离分析, 但甾类化合物中很大一部分在紫外光吸收区没有很强的吸收, 大大降低了这些甾类化合物的检测灵敏度。冯爱生等^[25]采用反相色谱 ELSD 检测法分离分析甾类化合物, 使检测灵敏度获得较大的改善和提高。图11.13 是 12 种甾体化合物标样的典型分离图。

前列腺素 (prostaglandins, 简称 PG) 是一族具有多种生理功能的不饱和脂肪酸, 其基本骨架为 20 个碳原子, 骨架上有一个五元环和两条侧键, 根据环上取代基的不同和键上双键位置和数目的不同, 前列腺素可有多种不同类型, 而它的生理功能与它

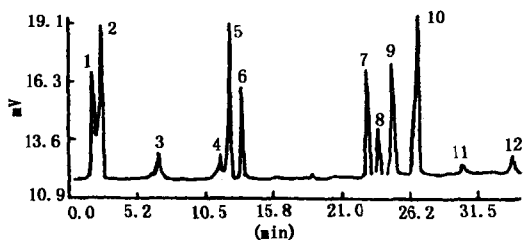


图11.13 12种甾体化合物的分离分析

色谱柱: 150×2.0mm i. d. 填充 Hypersid-BDS 5 μ m;
 流动相: 溶剂 A, 甲醇/水(72.5/27.5, V/V); 溶剂 B, 甲醇;
 梯度洗脱: 0~10min 为 100% A; 10~35min 为 100% B;

ELSD 检测; 流量: 0.2 ml/min.

色谱峰: 1. HA; 2. EA; 3. MKAT; 4. MAT; 5. MACT; 6. MET;
 7. 4CO; 8. 1CO; 9. COL; 10. MCO; 11. COE; 12. DME.

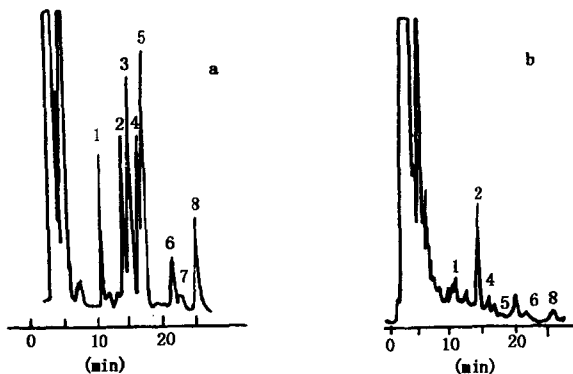


图11.14 高效液相色谱分离分析前列腺素的 BMC 衍生物

色谱柱: 150×6mm i. d. 填充 Shim-Pak CLC-C₈;

流动相: 甲醇/水 (70/30, V/V); 柱温: 30℃; 荧光检测: λ_{ex}

325nm, λ_{em} nm; 流量: 1.5 ml/min.

色谱峰: 1. 未知物; 2. PGE₂; 3. PGE_{2a}; 4. PGE₁; 5.

PGF_{2a}; 6. PGA₂; 7. PGB₂; 8. PGA₁.

的分子结构密切相关。例如 PGF 型可以刺激输卵管的收缩，而 PGE 型则起抑制作用。为了研究生物体内各种 PG 原位水平及消涨情况，建立一种灵敏、准确测定痕量前列腺素的方法十分必要。分析 PG 的方法曾有酶法、放射免疫法、衍生化的色谱法等。陈培榕等^[26]用 4-溴甲基-7-甲氧基香豆素 (BMC) 荧光标记前列腺素，建立了高效液相色谱法测定生物体内痕量前列腺素的方法。图 11.14 是蚕蛹中痕量前列腺素的分离分析谱图。

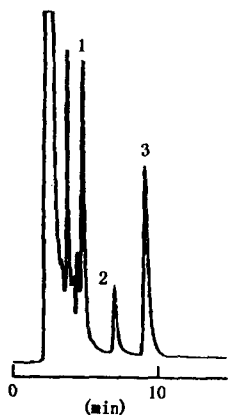


图 11.15 浸透限制固定相液相色谱法直接测定血清中的药物
 色谱柱: 在 Lichrosphere 100Diol 填料内孔烷基化的浸透限制固定相填充的色谱柱;
 流动相: 乙腈/50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.9) (12/88, V/V); 紫外检测波长: 254nm; 流量: 0.6ml/min; 进样体积: 5 μ l 血清样品。
 色谱峰: 1. 苯基巴比妥 (18 μ g/ml); 2. Phenyntion (20 μ g/ml); 3. 卡马西平 (18 μ g/ml)。



图 11.16 血清中马烯雌酮和马萘雌酮及其代谢产物经免疫萃取预处理后的色谱分离分析
 色谱柱: 150 \times 4.6 mm i. d. 填充 Cosmosil-AR;
 流动相: 60mmol/L 乙酸缓冲液 (pH 5)/ 甲醇/乙腈 (60/9/30, V/V/V);
 双电极电化学检测: 第一电极加电压 +0.1V; 第二电极加电压 +0.8V; 流量: 1ml/min。
 色谱峰: 1. 二羟基马烯雌酮; 2. 2-甲氧基二羟基马烯雌酮; 3. 马萘雌酮; 4. 马烯雌酮; 5. 2-甲氧基马烯雌酮; 6. 1-甲萘雌酮。

HPLC 在药物分析中的应用更为广泛, 绝大部分药物生产的质量控制及其药代过程测定都由 HPLC 完成. 在传统的 HPLC 测定血清样品中的药物及其代谢产物时, 必须对样品进行繁琐的预处理. 浸透限制固定相 (restricted access stationary phase)^[27] 可以使蛋白质等生物大分子不能穿透进入固定相和疏水孔内或袋中, 而药物及代谢产物等小分子可以不受限制自由出入填料孔内的固定相, 由此避免生物大分子对药物及代谢产物测定的干扰, 达到血清样直接进样测定血清中药物和代谢产物含量的目的. 图 11.15 是这一类固定相填充的色谱柱分离分析血清中药物的典型谱图^[28].

在药代动力学的研究中, 测定生物基体中痕量药物及其代谢产物成为重要难题之一. 马烯雌酮 (Eq) 与马萘雌酮 (Equ) 和 B 环不饱和的雌激素以及它们的硫酸酯很久以来被应用于妇女雌激素缺乏症的治疗. Ikegawa 等人^[29] 建立了高效液相-电化学检测分离分析马烯雌酮及其代谢产物的方法, 该分析方法的预处理费时又复杂. 近年来, 抗体固定化的免疫亲和萃取技术已被应用于复杂的生物体液中的样品预处理. Ikegawa 等人^[30] 采用免疫萃取技术进行人血清中马烯雌酮和马萘雌酮的样品预处理, 进而进行 HPLC 分析, 大大提高了样品预处理的选择性和速度. 图 11.16 是马烯雌酮和马萘雌酮及其代谢产物的典型分离分析谱图.

§ 11.2.2 反相色谱在食品分析中的应用

HPLC 在食品分析中的应用主要包括三个方面: (1) 食品本身组成, 尤其是营养成分的分析, 如蛋白质、氨基酸、糖类、色素、维生素、脂肪酸、香料、有机酸、有机胺、矿物质等; (2) 人工加入的食品添加剂分析, 如甜味剂、防腐剂、着色剂、抗氧化剂等; (3) 在食品的加工、储运、保存过程中由周围环境引起的污染物分析, 如农药残留、霉菌毒素、病原微生物等. 对于这些成分中的绝大多数, 都可采用 HPLC 进行分析. 由于上述物质有些与生物医学和环境样品分析中的物质相同或基本相近, 本节

只介绍若干个食品分析的应用实例。

反相液相色谱在类黄酮成分分析方面已有很多报道^[31]，近几年来人们认为通过植物中类黄酮的分析可以表征植物的类别和

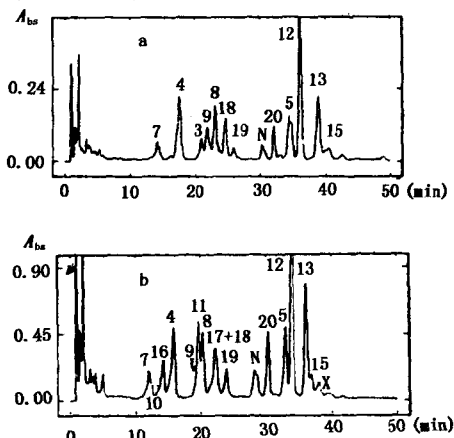


图11.17 源自柑桔花 a 和玫瑰花 b 的

蜂蜜中类黄酮化合物的测定

色谱柱: 250×4mm i.d. 填充 3 μ m Spherisorb-C₁₈;

流动相: 溶剂 A. 5% 甲酸水溶液; 溶剂 B. 乙腈;

梯度冲洗: 20% B $\xrightarrow{5\text{min}}$ 20% $\xrightarrow{15\text{min}}$ 25% B $\xrightarrow{30\text{min}}$

35% B $\xrightarrow{50\text{min}}$ 35% B;

紫外检测波长: 340nm;

流量: 1ml/min.

色谱峰: 3. 5, 7, 3'-三羟基-4'-甲氧基黄酮; 4. 3, 5, 7-三羟基黄酮; 5. 5, 7-二羟基黄酮; 7. 3, 5, 7, 3', 4'-五羟基黄酮; 8. 3, 5, 7, 4'-四羟基黄酮; 9. 3, 5, 7, 4'-四羟基-8-甲氧基黄酮; 10. 5, 7, 3', 4'-四羟基黄酮; 11. 4, 7, 4'-三羟基黄酮; 12. 5, 7-二羟基黄酮; 13. 3, 5, 7-三羟基黄酮; 15. 5, 4'-二羟基-7-甲氧基黄酮; 16. 5, 7, 3', 4'-四羟基-3-甲氧基黄酮; 17. 5, 7, 4'-三羟基-3-甲氧基黄酮; 18. 3, 5, 7, 4'-四羟基-3-甲氧基黄酮; 19. 5, 7, 4'-三羟基-3, 3'-二甲氧基黄酮.

产地^[32,33]。很显然蜂蜜中类黄酮类化合物的测定对蜂蜜源自何地何种植物的确定也有重要的价值。F. A. Tomas-Barberan 等人^[34]发展了反相色谱测定蜂蜜中类黄酮的方法。图11.17是蜂蜜中类黄酮化合物典型的分离分析谱图。

许多脂肪酸可以在动物体内合成，但也有些多价不饱和脂肪酸，如亚油酸、亚麻酸等在体内不能合成的，必须由食物供给。这些不饱和脂肪酸存在着顺、反异构体，一般来说，异构体的分离测定采用硅胶为固定相的正相色谱较好。由于不饱和双键与金

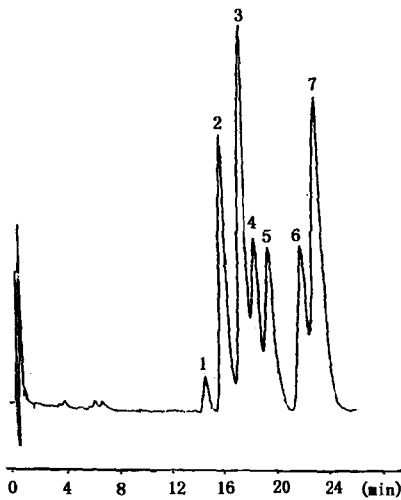


图11.18 银离子络合反相色谱分离分析维生素A的顺反异构体

色谱柱：150 × 4.6 mm i. d. 填充 3 μ m Spherisorb-C₁₈；紫外检测波长：345nm；流量：1.0ml/min。

色谱峰：1. 9,11,13-三烯-反式-维生素A；2. 11,13-二烯-反式-维生素A；3. 13-烯-反式-维生素A；4. 9,13-二烯-反式-维生素A；5. 11-烯-反式-维生素A；6. 9-烯-反式-维生素A；7. 顺式-维生素A。

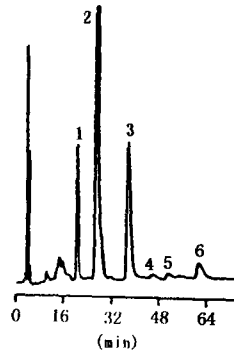


图11.19 反相色谱分离分析大豆中的卵磷脂类化合物

色谱柱：250 × 4.6 mm i. d. 填充聚乙稀醇 C₁₈键合固定相(5 μ m)；

流动相：乙腈/甲醇/水 (45/45/10, V/V/V)；ELSD 检测；

流量：1ml/min。

色谱峰：1. 18:2—18:3；2. 18:2—18:2；3. 16:0—18:1；4. 16:0—18:1；5. 18:0—18:2；6. 18:0—18:1。

属离子具有络合性质，因此金属络合液相色谱也能对一些脂肪酸的顺、反异构体提供特殊的分离选择性^[35,36]。图11.18是银离子络合反相色谱分离分析维生素A顺、反异构体的谱图^[37]。

磷脂是动物和植物细胞的重要组成成分，细胞膜的性质与磷脂种类及亚类的组成密切相关。由于植物油的质量与植物成分的相关性，植物种子中磷脂的测定可对磷脂在植物油中的分布提供有价值的信息。由于磷脂化合物中存在碱性的氨基和离子性基团，由传统的ODS固定相反相色谱分离测定存在以下缺点：样品需求量大、峰展宽和拖尾严重、分析时间长、低检测灵敏度和可操作的流动相pH范围（pH2~7）窄等困难。Abid和Mounts^[38]则采用聚乙烯醇微球键合C₁₈的固定相分离分析磷脂，并用通用型的ELSD检测器检测，取得较好的结果。图11.19是分离分析大豆中卵磷脂的典型谱图。

生物胺和氨基酸是各种食品，如鱼、海鲜产品和酒中的天然产物。生物胺是在食品发酵和变质时氨基酸脱羧基而产生的。因此，生物胺也是食品质量的重要指标，发展氨基酸存在的情况下

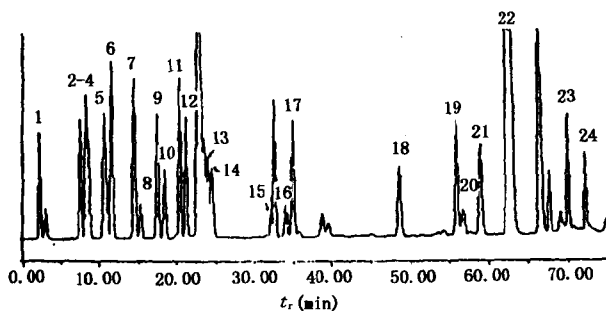


图11.20 反相液相色谱分离分析氨基酸和生物胺的
FMOC-Cl 衍生物实验条件见文献 [40]

色谱峰：1. Cys; 2. Asp; 3. Ser; 4. Glu; 5. Thr; 6. Gly; 7. Ala; 8. Tyr; 9. Pro; 10. Met; 11. Val; 12. Phe; 13. Ileu; 14. Leu; 15. His; 16. Tyr; 17. Lys; 18. 苯乙基胺; 19. 腐胺; 20. 组胺; 21. 尸胺; 22. 庚胺; 23. 亚精胺; 24. 精胺。

生物胺含量的分析测定方法成为食品质量评价的重要内容。1981, Karmas^[39]引入生物胺指数 (BAI) 进行鱼类及其加工产品的质量控。大多数生物胺没有紫外和荧光吸收, 采用 HPLC 分离测定这些生物胺必须进行衍生化处理。Kirschbaum 等人^[4]用 FMOC-Cl 衍生化处理, 测定食品中的氨基酸和生物胺, 其分离谱图如图 11.20 所示。

糖和有机酸的测定在食品工业中非常重要, 分析测定的目的可能千差万别, 但主要应用于食品生产过程中各个阶段的质量控制。HPLC 技术已广泛应用于糖和有机酸的分析测定。糖类化合物主要由氨基柱 HPLC 分离测定, 而有机酸则主要由离子交换或 C₁₈ 键合固定相液相色谱分离分析。由于食品生产中质量控制对这些化合物测定的灵敏度要求不高, 通常由紫外和示差折光检测器检测。在食品生产中阻碍质量控制的重要问题是样品的预处理, Verette 等人^[41]采用膜渗析全自动样品预处理器去除影响 HPLC 分析的微颗粒和大分子化合物, 处理后的样品可直接由 HPLC 分离测定。图 11.21 是氨基柱液相色谱分离分析食品中糖类化合物的谱图。

Capsicum 属类的果实作为天然着色素和味素被广泛应用于食品工业中, 这类天然的食品添加剂的亮红色主要源于辣椒红和辣椒玉红素类化合物的存在。

在成熟的辣椒中, 辣椒红和辣椒玉红素类化合物分别以醇、单酯和双酯状态存在。因此这类天然色素添加剂成分的测定成为重要的分析。由于这一类化合物的脂溶性很强, 采用含水有机溶

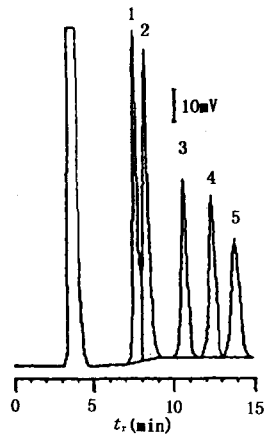


图 11.21 食品中单糖类化合物的分离分析

色谱柱: 250 × 4.6 mm i. d.

填充 5 μ m Zorbax-NH₂;

流动相: 水/乙腈 (25/75, V/V);

柱温: 25 $^{\circ}$ C; 示差折光检测;

流量: 1ml/min.

色谱峰: 1. 果糖; 2. 葡萄糖; 3. 蔗糖; 4. 麦芽糖; 5. 乳糖。

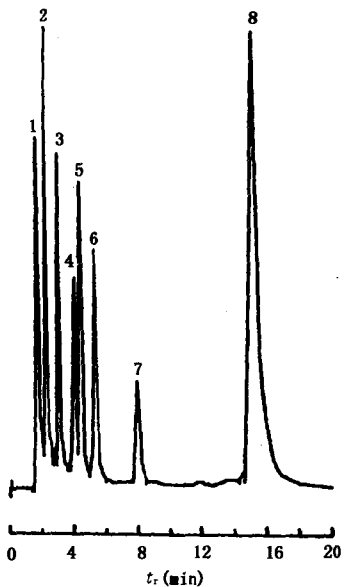


图11.22 非水溶液反相液相色谱分离分析辣椒红和辣椒红素天然色素色谱柱: 150×4.0 mm i. d. 填充 $5\mu\text{m}$ Supersphere- C_{18} ; 流动相: 乙腈/异丙醇/乙酸乙酯 (80/10/10, V/V/V); 紫外检测波长: 450nm; 流量: 0.8 ml/min.

色谱峰: 1. 甲基红; 2. 辣椒红; 3. 辣椒红玉素; 4. Canthaxanthin + 叶黄素; 5. 玉米黄质; 6. 隐花品; 7. 隐黄质; 8. β 胡萝卜素氧化物.

液作为流动相的反相色谱很难洗脱. Weissenberg 等人^[42] 发展出非水溶液反相色谱法分离分析方法, 取得较好的效果. 图 11. 22 是这一类天然色素典型的色谱分离图.

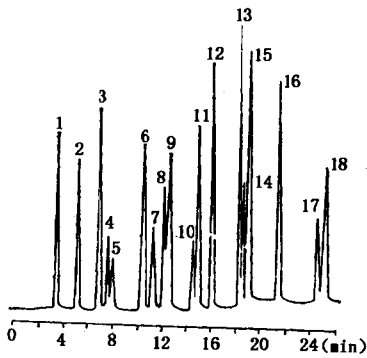
§ 11.2.3 反相色谱在环境分析中的应用

由于化学合成工业的发展和天然化合物的开发, 使得环境污染越来越严重. 据报道, 被确认为环境污染物的已超过 350 种, 人们能在水中、空气中、污泥里、鱼、禽体内发现这些污染物. 通过食物链, 它们将进一步污染肉类、蛋类、粮食、蔬菜等. 因此, 环境污染的检测早已成为分析化学中重要的研究课题之一, 高效液相色谱法在环境分析中获得较为广泛的应用, 下面列举几类典型的污染物的反相色谱分析实例.

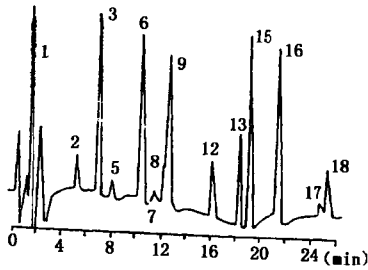
苯基脲类化合物首先被用作除草剂, 进而又被作为杀虫剂和农作物的生长调节剂而获得广泛应用, 因此这一类化合物在食品

中残留量的测定十分重要. 由于苯基脲类化合物的热不稳定性, HPLC 测定成为首选的方法. Walters 等^[43] 发展了反相液相色谱紫外 (UV) 和光导检测 (PCD) 分离测定这一类化合物的方法, 其典型的分离谱图见图 11. 23 .

液相色谱-质谱联用技术对复杂环境样品分析是非常有效的,



a 紫外线检测器250nm



b 光导检测量

图11.23 18种苯基脲类农药在UV
及PCD上色谱图

色谱柱: 100×4.6 mm i. d. 填充 3 μ m Microsorb-C₁₈;

流动相: 甲醇/水配比从48/52至65/35梯度淋洗; 柱温: 35℃.

色谱峰: 1. 非草隆; 2. 甲氧隆; 3. 来草隆; 4. 卡草灵; 5. thiazuron; 6. 绿谷隆; 7. 伏草隆; 8. 绿麦隆; 9. 秀谷隆; 10. 枯秀隆; 11. isoproturon; 12. 敌草隆; 13. 利谷隆; 14. 环草隆; 15. 氯溴隆; 16. 枯草隆; 17. difluzuron; 18. 草不隆.

它不仅可以提供被分离化合物的结构信息,而且又可能提供比常规检测器,如 UV 更高的检测灵敏度.在液相色谱-质谱联用技术中,通常采用细管径液相色谱柱进行样品分离.图11.24 是 250 μm 内径填充柱分离分析 17 种酸性农药的分离谱图^[44].

酚类化合物是重要的一类环境污染物,主要的污染源来自工

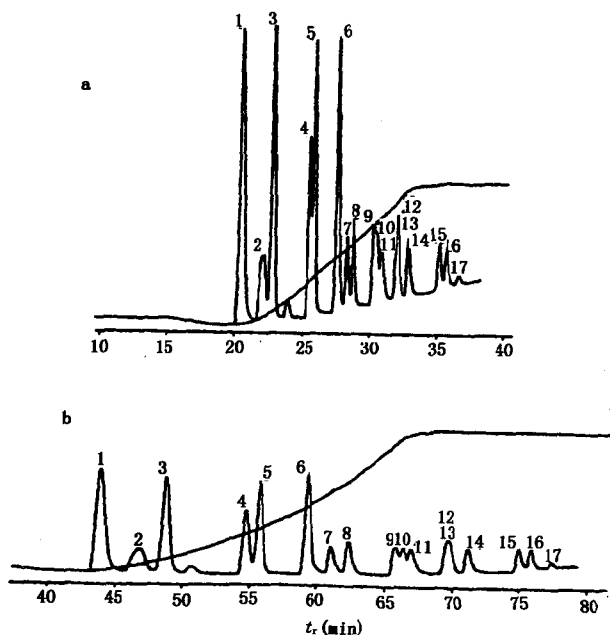


图11.24 毛细管填充液相色谱分离分析酸性农药

色谱柱:250 \times 0.25mm i.d. 填充 Spherisorb-C₁₈;

流动相:0.05% TFA 水溶液/0.025 TFA 甲醇配比从 100/240min

梯度程升到 20/80;

紫外检测波长: 225nm; 流量: 2 $\mu\text{l}/\text{min}$.

色谱峰: 1. Picloram; 2. 4-硝基苯酚; 3. chloramben; 4. 2, 4-二硝基苯酚; 5. dicamba; 6. bentazone; 7. 2, 4-D; 8. MCPA; 9. mecoprop; 10. dichlorprop; 11. 2, 4, 5-T; 12. 2, 4-DB; 13. MCPB; 14. 2, 4, 5-TP; 15. dinoseb; 16. dinoterb; 17. 五氟苯酚.

业废水的排放和其它有机污染物如农药的降解。在饮用水中也有痕量的酚类物质的存在，它具有致癌、致畸和致突变的毒性，因此酚类化合物测定方法的研究已成为环境分析方法研究的重要课题之一。在表面水层中，酚类化合物的含量通常只有 $1\sim 3\mu\text{g/L}$ 。为了检测这样低含量的污染物，必须进行柱前浓缩或衍生样品预处理。Brouwer 和 Brinkman^[45]发展出柱上浓缩反相色谱测定酚类化合物的方法，其最低检测下限低于 $\mu\text{g/L}$ 水平。图11.25是酚类化合物柱上浓缩后的色谱分离图。徐承光^[46]则研究了5种硝基酚类化合物的电化学检测灵敏度，表明这些化合物的最低检测限为 $0.02\sim 0.09\text{ng}$ ，该方法还被用于环境水样分析。

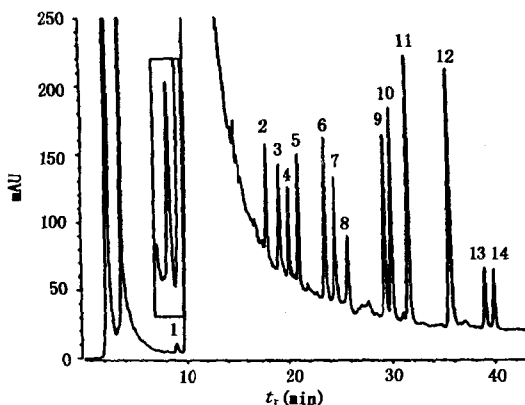


图11.25 酚类化合物柱上浓缩后的色谱分离分析
 色谱柱： $10\times 3\text{mm}$ i. d. PLRP-S 预柱；分析柱 $250\times 4.6\text{mm}$
 i. d. 填充 C_{18} 填料；
 流动相：溶剂 A. 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH3)；溶剂 B. 乙腈；
 梯度洗脱： $80\% \text{A} \xrightarrow{45\text{min}} 39\% \text{A}$ ；
 柱温： 40°C ；流量： 1ml/min 。
 色谱峰：1. 苯酚；2. 2,3-二硝基苯酚；3. 2,4-二硝基苯酚；
 4. 4-氯苯酚；5. 2,3-二甲基苯酚；6. 2,6-二氯苯酚；7.
 bronoxynil；8. 4,6-二硝基邻甲酚；9. 2,3,6-三氯苯酚；10. 2,
 3,4-三氯苯酚；11. 2,3,5-三氯苯酚；12. 2,3,5,6-四氯苯
 酚；13. dinoseb；14. dinoterb.

带硝基的有机化合物被广泛地用于制造火炸药,这类化合物

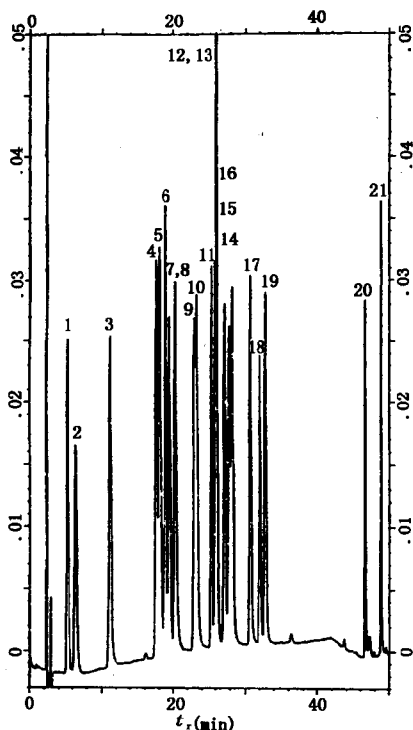


图11.26 RDX和TNT及其衍生物的反相色谱分离图
 色谱柱: 250×4mm i. d. 填充4 μ m载体 Merck LiChrospher
 100RP-18柱;
 流动相: 甲醇/水配比30min从35/65线性程升到70/30, 再
 由10min程升到100/0;

紫外检测波长: 254nm; 流量: 1ml/min.

色谱峰: 1. 2,6-二氨基-4-硝基甲苯; 2. 2,4-二氨基-6-硝基甲苯; 3. RDX; 4. 4-氨基-2-硝基甲苯; 5. 1,4-二硝基苯; 6. 2-氨基-4-硝基甲苯; 7. 1,2-二硝基苯; 8. 1,3-二硝基苯; 9. TNT; 10. 硝基苯; 11. 4-氨基-2,6-二硝基甲苯; 12. 2-氨基-4,6-二硝基甲苯; 13. 3,4-二硝基甲苯; 14. 2,6-二硝基甲苯; 15. 2,3-二硝基甲苯; 16. 2,4-二硝基甲苯; 17. 2-硝基甲苯; 18. 4-硝基甲苯; 19. 3-硝基甲苯; 20. 4,4'-Azoxy; 21. 2,2'-Azoxy.

的大量使用已对环境造成严重的污染.虽然气相色谱法中常用的各类选择性检测器对于这类化合物的检测有很好的选择性及很高的灵敏度,但由于这类化合物的热不稳定性给定量测定带来困难,因此常选用液相色谱法分离检测. Emmrich 等人^[47]发展出 TNT 和六氢-1,3,5-三硝基-1,3,5-三嗪(RDX)及其重要衍生物的 HPLC 二极管阵列分离测定方法,这一方法不仅可以对这些化合物定量,而且可以对被测定的化合物提供定性信息.图11.26 是 TNT 和 RDX 及其衍生物的典型分离色谱图.此外, Lewin 等^[48]进一步考察了氨基和硝基取代化合物的紫外和电化学检测性能的差别,认为电化学检测器对硝基酚类化合物和二氨基芳香化合物的检测比紫外检测器灵敏度更高,选择性更好.

§ 11.3 反相离子对色谱的应用

在反相离子对色谱技术的发展初期,它主要被用于有机离子性化合物的分离分析.但通过近 20 来年的发展和研究,反相离子对色谱法可以分离分析 30 多种无机离子.从原理上讲,反相离子对色谱法可以分离离子色谱法能分离的绝大部分无机离子.实现这一目标的主要障碍是无机离子的检测和反相离子对色谱柱交换容量的问题,由于离子对色谱中填充载体表面的离子对试剂吸附量有限,对亲水性很强的阴离子很难达到满意的分离效果.离子对色谱的另一重要特征是由于静电和分子作用力的同时存在,可用于离子性和中性化合物混合样品的分离分析.本节将对反相离子对色谱法的一些应用实例进行介绍.

§ 11.3.1 反相离子对色谱分离分析无机离子

有些无机阴离子在 210nm 以上有相当强的紫外吸收,这样的离子用一般的反相色谱装置的离子对色谱法就可以完成分离和检测^[49].无机阴离子的检测波长可通过测定流动相和流动相含待测样品的紫外光谱图来确定.图11.27 中的曲线 1 是在甲醇/

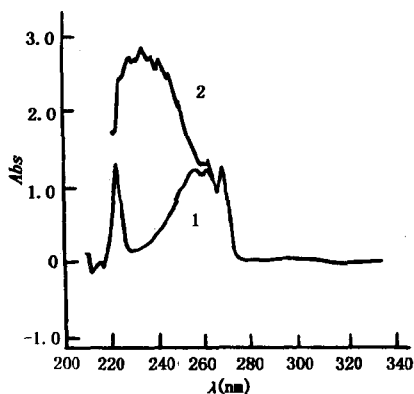


图11.27 紫外吸收光谱图

1. 流动相: 甲醇/水 (2.5/97.5) 内含少量三甲苄基溴化铵; 2. 流动相 + KI.

水中加入少量离子对试剂三甲苄基溴化铵的紫外光谱图, 曲线

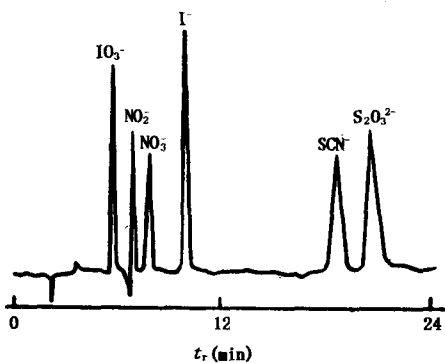


图11.28 反相离子对色谱法

分离6种无机阴离子

色谱柱: 300×3.9 mm i. d. 填充 $5\mu\text{m}$ μ -Bondapak- C_{18} ; 流动相: 甲醇/水 (2.59/7.5) 含离子对试剂苄基三甲苄基溴化铵 0.01 mol/L; 紫外检测波长: 231 nm; 流量: 1.0 ml/min.

2是在上述流动相基础上加入 KI 盐后的光谱图。由于一价碱金属离子的紫外吸收很弱，因此紫外光谱的变化主要由 I^- 的紫外吸收所致。为使检测灵敏度尽可能高和基线尽可能稳定，应选择流动相吸光度小而阴离子样品吸光度强的波长范围。从图 11.27 可以看到，230~235nm 的波长范围较好。图 11.28 是反相离子对色谱紫外检测法分离 6 种无机阴离子的色谱图，选用的紫外检测波长为 231nm，溶质的检测灵敏度可达 1~10ng，这与离子色谱中常用的电导检测器相当。

连多硫酸是在酸性和中性条件下硫矿中硫原子氧化的中间产物，这一氧化产物对河流和湖泊的酸化有重要的影响。另一方面，连多硫酸的测定一直是分析工作者关注的问题，经典的测定方法采用氰化或硫化处理，生成硫代硫酸根或硫氰酸根，再由光谱法测定。近年来，离子色谱法也被用于连多硫酸根分离测定，但当多硫酸根中硫原子较多时，离子色谱分离所得的色谱峰形并不理想。应用反相离子对色谱测定这一类化合物则效果很好。图 11.29 是反相离子对色谱分离分析连多硫酸根阴离子的色谱图^[50]。

对于在 210nm 波长以上紫外吸收很弱的无机阴离子，如仍希望用紫外检测器检测，则可采用间接检测方法。关于离子对色谱中间接检测技术的原理已在 § 10.4 中作了详细介绍。人们可以选用各种离子对试剂或在流动相中加入某一种组分使检测器对

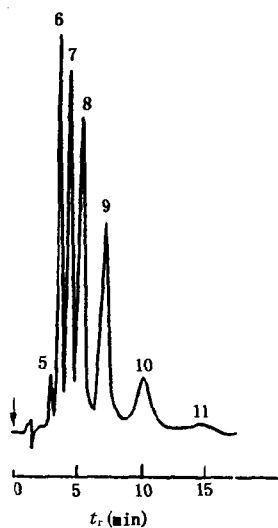


图 11.29 反相离子对色谱法分离连多硫酸根阴离子
 色谱柱: 250×5mm i. d. 填充 Dionex MPIC-NSI;
 流动相: 乙腈/甲醇/水 (27/4/69, V/V/V) 内含 2mmol/L TBAOH 和 1 mmol/L Na_2CO_3 ;
 紫外检测波长: 254nm.
 色谱峰: 色谱峰所标的数字与 $S_5O_6^{2-}$ 到 $S_{11}O_6^{2-}$ 中硫原子数相同。

流动相有相当高的本底信号响应值。如被分离的无机离子的响应较弱，间接检测技术同样可使这些无机离子产生一定的检测器响应信号。在正常的色谱图记录系统中间接检测技术使被分离的物质出负峰；但如反接记录器的正反极，则记录的色谱峰与正常的色谱峰一样。图11.30 是以罂粟碱阳离子为间接紫外吸光探针试剂的离子对色谱法分离测定无机阴离子的色谱图。在反相离子对色谱中，除间接吸光度检测技术外，其它用于离子色谱中无机离子检测的方法，如电导、电化学等方法同样可用于反相离子对色谱中被分离物质的检测。图11.31 是反相离子对色谱电导检测法分离测定无机阴离子的色谱图。Krull 等人^[51]采用离子对色谱电化学检测 I^- 和 $S_2O_3^{2-}$ 取得满意的结果。与离子色谱中的检测技术一样，为了提高电导的检测灵敏度，可以在分离柱后接一根抑制反应柱，用于减低流动相的本底电导响应值^[52]，例如用反相离子对色谱抑制电导法监测环境中的重要污染物 CrO_4^{2-} ，检测下限可

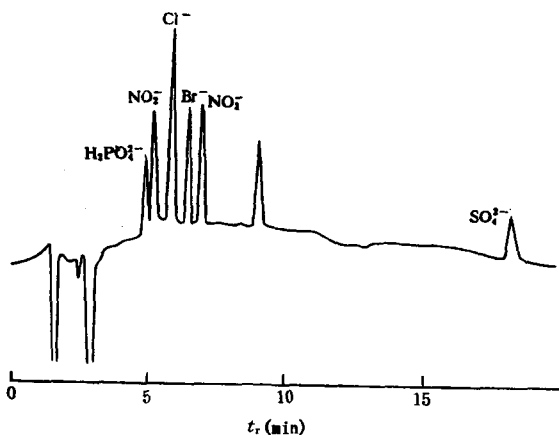


图11.30 反相离子对色谱间接紫外
吸收检测法测定无机阴离子

色谱柱: $250 \times 4.6 \text{ mm i. d.}$ 填充 $10 \mu\text{m}$ $\mu\text{Bondapak-C}_{18}$; 流动相:
乙腈/水(15/85, V/V)溶液含 1.75 g/L TBAOH 和 50 mg/L 罂
粟碱间接紫外吸光试剂(pH 3.5); 紫外检测波长: 325 nm .

达 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。^[51]

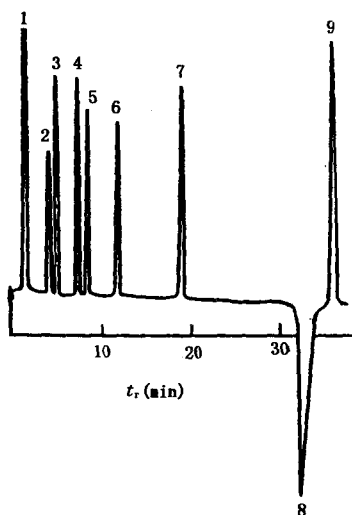


图11.31 离子对色谱电导检测法
分离测定无机阴离子

色谱柱: $240 \times 4\text{mm i. d.}$ 填充 Zorbax- C_{18} ; 流动相: 10mmol/L 四丁基邻苯二甲酸铵盐溶液. 电导检测.

色谱峰: 1. 阳离子峰; 2. CO_3^{2-} ($0.6\mu\text{g}$); 3. Cl^- ($0.36\mu\text{g}$); 4. NO_2^- ($0.92\mu\text{g}$); 5. Br^- ($1.58\mu\text{g}$); 6. NO_3^- ($1.24\mu\text{g}$); 7. SO_4^{2-} ($0.96\mu\text{g}$); 8.

系统峰; 9. I^- ($2.52\mu\text{g}$).

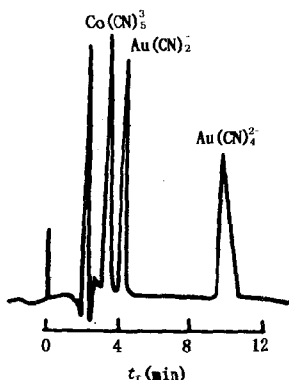


图11.32 钴和金氰化
络合物的分离

色谱柱: MPIC-NGI 和 NSI; 流动相: 2mmol/L TBAOH, 40% CH_3CN , 0.02mmol/L Na_2CO_3 ; 抑制型电导检测; 流量: $1\text{ml}/\text{min}$; 进样体积: $50\mu\text{l}$, 每个离子各 $10\mu\text{g}/\text{mL}$.

离子对色谱对于金属离子络合物的分离分析比较有效,对于碱金属和碱土金属离子,由于很难与其它化合物形成络合物,因此选用离子色谱法分离测定比较合适.一些过渡金属和重金属离子可与无机阴离子如 CN^- , Cl^- 和 Br^- 等形成稳定的络合物,采用反相离子对色谱法分离分析这一类化合物是最佳的选择.图11.32 是离子对色谱法测定不同价态金离子氰化物的色谱图^[53],如与其它浓缩技术相结合,其检测下限可达 $5\text{ng}/\text{ml}$.

反相离子对色谱法还可以分离不同络合剂与金属离子生成的

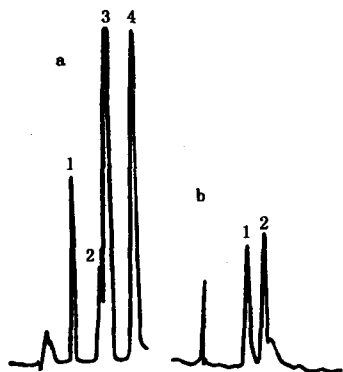


图11.33 不同络合剂络合物和络合物的顺反异构体的分离

色谱柱: 250×4.6 mm i. d. 填充 C₁₈;

流动相: a. 25mmol/L C₈H₁₇NH₂HCl 和 25mmol/L 柠檬酸钠水溶液.

色谱峰: 1. [Co(CN)₆]³⁻; 2. [Co(CN)₅Cl]³⁻; 3. [Co(CN)₅Br]³⁻; 4. [Co(CN)₅I]³⁻.

流动相: b. 甲醇/水(17/83)含 25mmol/L C₆H₁₁SO₃Na 和 (C₂H₅)₂NH₂HCl.

色谱峰:

1. 顺式[Cr(CH₃NHCH₂CH₂NH₂)₂Cl₂]⁺;
2. 反式[Cr(CH₃NHCH₂CH₂NH₂)₂Cl₂]⁺.

共同络合物和它们的顺、反异构体, 尤其是一些贵金属的络合物是抗癌药物, 但顺式和反式异构体的抗癌药性有很大的差别. 因此建立一个良好的分析方法对生产过程中的质量控制是非常必要的. 图 11.33 给出的是 [Co(CN)₅X]³⁻ 以及 [Cr(X)₂Cl₂]⁺ (X = CN⁻, Cl⁻, Br⁻ 和 I⁻) 顺反异构体的分离结果^[54].

稀土元素的测定在一些工业领域, 如核电工业中放射性燃料的核聚变产物和采矿业中岩石样的稀土元素含量的评估有非常重要的意义. 同时稀土元素的测定, 尤其是同族稀土元素各个组分的测定是个非常复杂和困难的工作. 早在 1972 年就已经有人应用液相色谱柱后反应检测法分离测定稀土元素. 近年来的研究结果表明, 反

相离子对色谱分离稀土元素的络合物是一个快速、准确的测定方法^[55]. 一般来说, 用于稀土元素反相离子对色谱分离的络合试剂主要有草酸、酒石酸、EDTA、乳酸和 α-羟基异丁酸等. Jones 等^[56]发现离子对色谱分离测定稀土元素络合物时, 使用的化学试剂的纯度对分离结果有一定的影响, 认为采用新鲜的蒸馏水和新制备的试剂比较好. 图 11.34 是离子对色谱法分离稀土元素 α-羟基异丁酸络合物的色谱图^[56]. 在这一方法中, 选用偶氮胂Ⅲ作为反应试剂柱后反应紫外检测, 被测定离子的检测下限低于 0.5 μg.

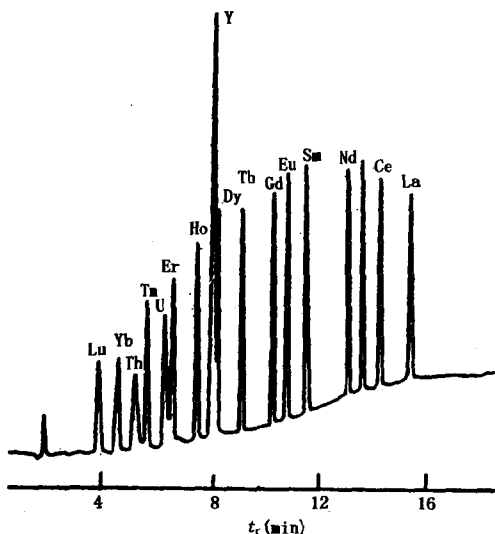


图11.34 稀土元素 α -羟基

异丁酸络合物的分离

色谱柱: 150×4.6 mm i. d. 填充 Supelcosil-C₁₈; 流动相梯度冲洗: 从 0.95 mol/L α -羟基异丁酸 10 min 梯度到 0.4 mol/L, 再保持 5 min 等度冲洗, 流动相其它条件为 30 mmol/L 辛酸水溶液/甲醇 (92.5/7.5) (pH 4.2); 柱后偶氮胂 III 试剂反应检测, 检测波长: 658 nm.

§ 11.3.2 离子对色谱在生物医学分析中的应用

核苷酸、核苷和碱基在许多生化和生理代谢过程中起着重要作用: (1) 核苷酸是 DNA 和 RNA 合成的初始物质; (2) 核苷酸的衍生物作为许多生物合成的中间产物出现; (3) 腺嘌呤核苷酸是生物系统的主要能量来源, 胞苷三磷酸与生物大分子的运动如在核糖体内新合成肽链的移植和信使蛋白质的活化直接相关;

(4) 腺嘌呤是同功酶 NAD^+ ， FAD 和 ConA 的组成部分；(5) 核苷酸调节生物的代谢过程，环腺苷、磷酸激发很多激素的生物活性，酶的活性则受腺苷三磷酸共价修饰的影响。因此核苷、核苷酸和碱基的分离是一个重要的工作。自从 1949 年开始，核苷酸、核苷和碱基都用离子交换色谱进行分离。但离子色谱的操作比较烦琐，平衡时间很长，同时离子色谱的分离效率没有反相或反相离子对色谱高，所以许多色谱和生化工作者都希望能用反相色谱来解决核苷酸、核苷和碱基及其衍生物分离问题。另一方面，如仅用纯反相色谱分离这一类样品，则离子性化合物，如核苷酸和一些极性的碱基在很多反相色谱系统中没有适当的保留，反相色谱法很难同时分离核苷酸、核苷和碱基这三类核酸的降解产物。而离子对色谱拥有这些优点，同时存在静电和分子作用力，可分离中性和离子性的混合样品。因此，反相离子对色谱法已成为分离检测核苷酸、碱基和核苷的最常用的分析方法之一。迄今，至少有几百篇文献报道离子对色谱测定核苷酸、核苷和碱基的应用实例。由于碱基、核苷和核苷酸中存在氮元素取代的共轭环，它们在紫外光区内有很强的吸收，因此可用各种液相色谱紫外检测器检测。

在溶液的 pH 大于 3 时，核苷酸以阴离子化合物存在，可以想象这一类化合物的离子对色谱法分离应选用季铵盐为离子对试剂。Juengling 等^[57]采用反相离子对色谱等度分离 10 种吡啶核苷酸。使用的分离条件为 C_{18} 柱，乙腈/水 (pH 5.8) 内含四丁基磷酸铵作为流动相。这一分离系统的优点是分离速度快和等度冲洗，但分离的效果不是很理想。图 11.35 给出的是离子对色谱法测定肌肉中的核苷酸的谱图^[58]。

在很多情况下，被分离样品同时含有核苷酸、核苷和碱基，在碱性冲洗剂时核苷酸以阴离子存在，而核苷和碱基则以中性化合物存在。此时，可选用季铵盐作为离子对试剂同时分离这一类化合物。如被分离的物质比较简单，包含的组分较少，一般选用等度冲洗就可获得很好的分离结果。Werher^[59]对离子对色谱梯

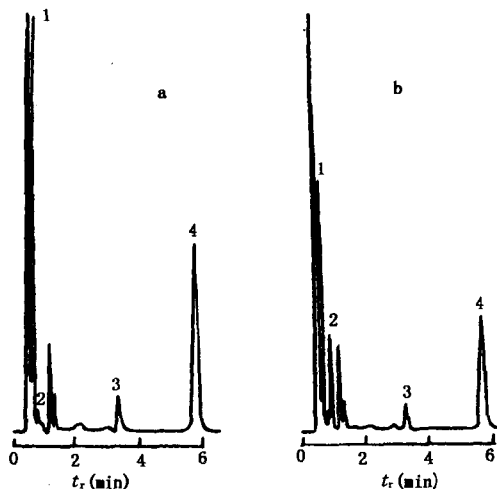


图11.35 肌肉中核苷酸的测定

色谱柱: 70×4.6 mm i. d. Backman 公司的 3-PR-
C₁₈柱;

流动相: 乙腈/水(2/98)内含0.1mmol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 和
0.02%的TBAOH (pH 7.0);

紫外检测波长: 212nm. a. 放松肌肉; b. 运动肌肉.

色谱峰: 1. PC; 2. IMP; 3. ADP; 4. ATP.

度冲洗分离测定细胞中的核苷酸、核苷和碱基作了很好的综述. 图11.36 给出的是反相离子对色谱法分离分析 21 种标样和肝细胞经 60min 重新充氧后萃取物的分离谱图. 从图可以看到不同极性和电荷数的化合物在反相离子对色谱中获得很好的分离, 选用的离子对试剂为 TBAH_2PO_4 盐. Ristow^[60] 则采用离子对色谱梯度冲洗分离标准、脱氧和多磷酸取代的核苷酸, 其分离结果如图 11.37 所示.

维生素是维持人体正常生理功能所不可缺少的物质, 虽然人体每天对它的需要量不多, 但由于人体不能自身合成, 因此必须借助于食物或药物获取. 一般来说脂溶性的维生素可由一般的反

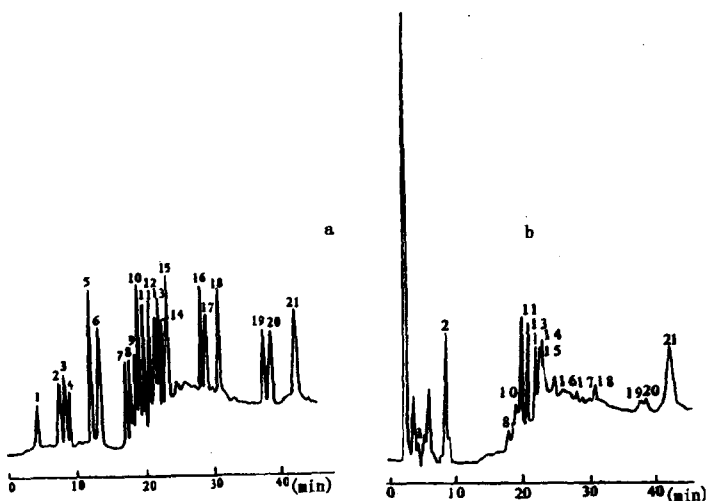


图11.36 离子对色谱梯度冲洗分离

核苷酸、核苷和碱基的混合物

色谱柱: 250×4.6 mm i. d. 填充 C₁₈ Sil-X-5 载体连接 25×4.5 mm i. d. 预柱; 冲洗条件: 5min 线性梯度从 0% B 到 70% B, 30min 凸形梯度冲洗到 100% B; 缓冲液 A: 10mmol/L NH₄H₂PO₄ 和 2mmol/L 四丁基季铵盐缓冲液; 缓冲液 B: 缓冲液 A 中包含 20% 乙腈。

a. 标准样; b. 60min 充氧后的肝细胞萃取物。

色谱峰: 1. 尿嘧啶; 2. 次黄嘌呤; 3. 尿苷; 4. 黄嘌呤; 5. 嘌呤醇; 6. 别嘌呤醇; 7. 肌苷; 8. 鸟苷; 9. 腺嘌呤; 10. 腺苷; 11. NAD⁺; 12. IMP; 13. GMP; 14. UMP; 15. AMP; 16. GDP; 17. UDP; 18. ADP; 19. GTP; 20. UTP; 21. ATP。

相色谱或正相色谱分离分析, 维生素异构体可由硅胶正相色谱分离分析; 而水溶性的维生素的分析都选用反相或反相离子对色谱法完成^[61,62]。水溶性维生素包括维生素 C、维生素 B₁, B₂, B₆ 和 B₁₂、维生素 H、维生素 BC、维生素 PP 和泛酸。Dong 等^[63]研究了反相离子对色谱中各种因素对分离水溶性维生素的影响, 认为在 C₈ 或 C₁₈ 为固定相, 选用的流动相包含 5mmol/L 己磺酸盐、15% 甲醇、1% 乙酸和 0.10% ~ 0.13% 三乙胺时产生非常好

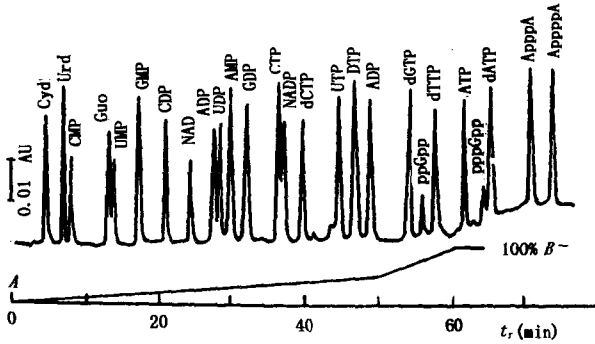


图11.37 离子对色谱梯度冲洗分离

标准、脱氧和多元磷酸聚合的核苷酸

色谱柱: 分析柱 (250×4mm i. d.) 连接预柱 (30×4mm i. d.)

填充 Hypersil-C₁₈载体;

梯度冲洗: 缓冲液 A 为 50mmol/L KH₂PO₄ 和 1.75 mmol/L

TBAH₂PO₄ 水溶液 (pH5); 缓冲液 B 为 甲醇/水 (10/90) 内含

200mmol/L KH₂PO₄, 50mmol/L H₂HPO₄ 和 1.75 mmol/L

TBAH₂PO₄ (pH 6.5).

梯度曲线和色谱峰所示物质见图中, 紫外检测波长: 254nm.

的分离效果. 图11.38 是反相离子对色谱法分离水溶性维生素的谱图.

蝶呤 (pterin) 是另一类重要的维生素类化合物. 研究结果表明蝶呤的存在和含量的高低与免疫功能的变化和神经性疾病直接相关. Montalvo 等^[64]报道了反相离子对色谱法分离蝶呤及其相关化合物的方法, 这些化合物包括新蝶呤、半日蝶呤 (monapterin)、生物蝶呤、6-羟甲基蝶呤、蝶呤、2, 4-二氧四氢蝶呤、黄蝶呤和异黄蝶呤. 图11.39 是分离检测尿中的蝶呤的谱图.

生物碱是含氮碱性杂环结构的有机化合物, 也是一类重要的天然药物, 绝大多数存在于植物之中. 它们在植物中的含量一般都很少, 但具有特殊而显著的生理作用. 因为生物碱是碱性的,

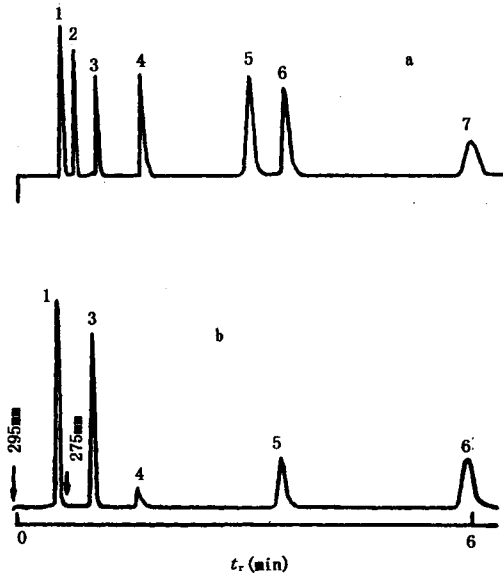


图11.38 水溶性维生素分析

色谱柱: Pecosphere-3CR C₈;

流动相: 甲醇/水 (15/85) 内含 5mmol/L 己磺酸和0.1% TEA 以及 1% 乙酸;

紫外检测: 组分 V_C 检测波长, 295nm; 其它组分 275nm.

a. 维生素标样; b. 维生素 C 丸.

色谱峰: 1. V_C; 2. V_{B1}; 3. V_{B2}; 4. V_{B6}; 5. V_{B12}; 6. V_{H1}; 7. 泛酸.

在色谱分离时, 常用碱性流动相, 如碳酸铵溶液、三乙醇胺或直接使用氨水作为流动相组分。但是碱性流动相对于硅胶或以硅胶为基体的化学键合固定相是很不利的, 会导致硅胶结构的变化而降低柱效, 因此很大一部分生物碱选用离子对色谱法分离分析。

Oshima 等人^[65]应用反相离子对色谱法测定茄科类原生药物中的莨菪胺和天仙子胺, 选用的离子对试剂是十二烷基磺酸钠。He 等人^[66]则应用反相离子对色谱法测定中国茄科类植物中的托品碱。

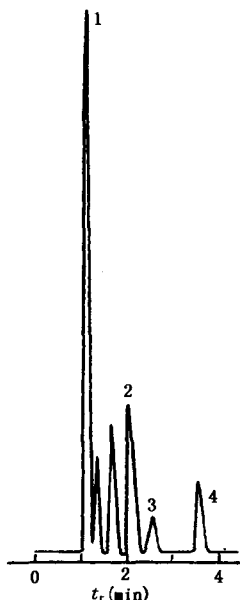


图11.39 反相离子对色谱法测定尿中喋呤

色谱柱:100×4mm i. d. 填充 Hypersil-ODS 载体; 5mmol/L CTABr 溶液冲洗 16min, 用 200ml 的 1.5 mmol/L 磷酸缓冲液(pH=7.2)冲洗柱子后可进行样分析;

荧光检测: λ_{ex} 365nm, λ_{em} 420nm.

色谱峰:1. 新喋呤; 2. 生物喋呤; 3. 二喋呤; 4. 二异黄喋呤.

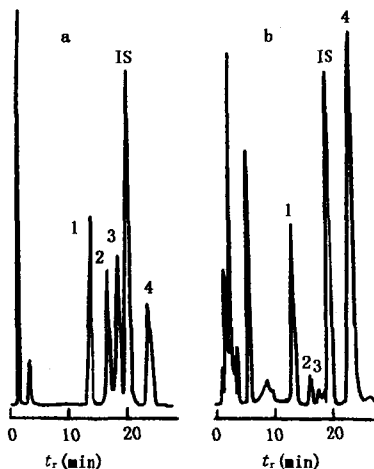


图11.40 西藏 *S. tangutica* 植物中托品碱的测定

色谱柱: 150×4mm i. d. 填充 Tskgel-120-C₁₈载体;

流动相: 1/15mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 3.5)/甲醇(48/52)内含 17.5 mmol/L 十二烷基磺酸钠;

紫外检测波长: 210nm. a. 标准样;

b. 西藏 *S. tangutica* 植物.

色谱峰: 1. anisidine; 2. anisodanime; 3. 莨菪胺; IS. 内标(霞胺氯化氢); 4. 天仙子胺.

Ayyangar^[67]则用离子对色谱法测定鸦片胶中的生物碱和袂康酸, 选用的离子对试剂是三乙基磷酸氢铵盐. 加入这一离子对试剂, 一方面是为了增加酸性化合物的保留值, 另一方面是为了抑制生物碱中氨基与硅胶表面残余羟基的相互作用, 消除氨类

化合物的色谱峰拖尾。图11.41 是测定鸦片胶中生物碱的谱图。

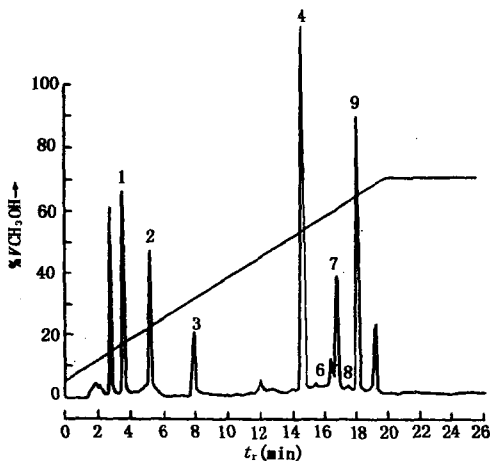


图11.41 鸦片胶中生物碱的测定

色谱柱:250×4mm i. d. 填充 Nucleosil-C₆H₅ 载体;

梯度冲洗剂条件见文献^[61];

紫外检测波长:280nm.

色谱峰:1. 吗啡;2. 袂康酸;3. 可待因;4. 蒂巴因;5. 劳丹素;6. 隐品碱;7. 那可汀;8. 那碎因;9. 罂粟碱.

参 考 文 献

- [1] S. Ahuja, Selectivity and Detectability Optimizations in HPLC, John Wiley and Sons, NY, 1989.
- [2] 卢佩章、张玉奎、梁鑫淼, 高效液相色谱及其专家系统, 辽宁省科技出版社, 沈阳, 1992.
- [3] B. F. Bogatzki and L. H. Lippmann, *Acta Polymer.*, **34**, 219(1983).
- [4] M. Ahel and W. Giger, *Anal. Chem.*, **57**, 1577(1985).
- [5] M. Ahel and W. Giger, *Anal. Chem.*, **57**, 2584(1985).
- [6] P. L. Desbene and B. Desmazieres, *J. Chromatogr.*, **661**, 207(1994).
- [7] D. L. Kaplan and A. M. Kaplan, *Anal. Chim. Acta*, **136**, 425(1987).
- [8] J. Felters and K. Levsen, *J. HRC CC.*, **12**, 613(1989).
- [9] M. E. Walsh and T. F. Jenkins, *Anal. Chim. Acta.*, **231**, 313(1990).

- [10] Hanfa Zou, Shifen Zhou and Xin Hu, et al. , *Anal. Chim. Acta.* , **291**, 205(1994).
- [11] E. R. Banhart, D. G. Patterson, Jr N. Tanak and M. Ayaki, *J. Chromatogr.* , **445**, 145 (1988).
- [12] U. Pyell, P. Garrigues and G. Felix, et al. , *J. Chromatogr.* , **634**, 169(1993).
- [13] E. Brinkman, *Mop-Hefte.* , **1**, 40(1994).
- [14] E. Brinkman, L. Dehne and W. Baltes. *J. Chromatogr.* , **693**, 271(1995).
- [15] M. Bathori, K. Szendri and I. Herke, *Chromatographia* , **21**, 234(1986).
- [16] R. Lafont, N. Kaouadji, E. D. Morgan and I. D. Wilson, *J. Chromatogr.* , **658**, 55 (1994).
- [17] F. D. Conforti, C. H. Harris and J. T. Rinehart, *J. Chromatogr.* , **645**, 83(1993).
- [18] 叶惟冷、尹萍波、梅镇彤, 色谱, **15**, 185(1997).
- [19] 陈希贤、李东、吕建新、方芳, 色谱, **15**, 237(1997).
- [20] 冯爱生、邹汉法、李瑞江等, 分析化学, **25**, 258(1997).
- [21] L. Gorbics, L. Urge and E. Otvos-Papp, et al. , *J. Chromatogr.* , **637**, 43(1993).
- [22] M. R. Hardy, R. R. Townsend and Y. C. Lee, *Anal. Biochem.* , **134**, 483(1988).
- [23] S. Honda, E. Akao and S. Suzuki, et al. , *Anal. Biochem.* , **183**, 351(1989).
- [24] D. J. Strydom, *J. Chromatogr.* , **678**, 17(1994).
- [25] 冯爱生、邹汉法、张冰等, 色谱, **15**, 102(1997).
- [26] 陈培榕、邢志、曹林法、蔡剑萍, 分析化学, **25**, 1369(1997).
- [27] T. C. Pinkerton, *J. Chromatogr.* , **544**, 12(1991).
- [28] N. Nimura, H. Itoh and T. Kinoshita, *J. Chromatogr.* , **689**, 203(1995).
- [29] S. Ikegawa, M. Itoh and J. Goto, *J. Liq. Chromatogr.* , **17**, 223(1994).
- [30] S. Ikegawa, M. Itoh and J. Goto, et al. , *Biomed. Chromatogr.* , **10**, 73(1996).
- [31] D. J. Daigle and E. J. Conkerton, *J. Liq. Chromatogr.* , **11**, 309(1988).
- [32] F. Ferreres, F. A. Tomas-Barberan and M. I. Gell, *J. Sci. Food Agric.* , **56**, 49 (1991).
- [33] M. J. Amiot, S. Aubert and M. Gonnet, *Apidologie* , **20**, 115(1989).
- [34] F. A. Tomas-Barberan, F. Ferreres and M. A. Blazquez, *J. Chromatogr.* , **634**, 41 (1993).
- [35] C. R. Vogt, J. T. Baxter and T. R. Ryan, *J. Chromatogr.* , **150**, 93(1978).
- [36] R. M. Smith, S. J. Bale and S. G. Westcott, *Analyst* , **112**, 1209(1987).
- [37] A. Baillet, L. Corbeau, P. Rafidison and D. Ferrier, *J. Chromatogr.* , **634**, 251 (1993).
- [38] S. L. Abidi and T. L. Mounts, *J. Chromatogr.* , **773**, 93(1997).
- [39] E. Karmas, *Lebensm. Wiss. Technol.* , **14**, 273(1981).
- [40] J. Kirschbaum, B. Luckas and W. D. Beinert, *J. Chromatogr.* , **705**, 195(1995).

- [41] E. Verette, F. Qian and F. Mangani, *J. Chromatogr.*, **705**, 195(1995).
- [42] M. Weissenberg, I. Schaeffler and E. Menagem, et al., *J. Chromatogr.*, **757**, 89 (1997).
- [43] S. M. Walters, B. C. Westerby and D. M. Gilvydis, *J. Chromatogr.*, **317**, 533 (1984).
- [44] A. Cappiello, G. Faniglini and A. Berloni, *J. Chromatogr.*, **768**, 215(1997).
- [45] E. R. Brouwer and U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, **378**, 223(1994).
- [46] 蒋淑敏、傅承光, 分析化学, **25**, 286(1997).
- [47] M. Emmrich, M. Kaiser, H. Ruden and S. Sollinger, *J. Chromatogr.*, **645**, 89 (1993).
- [48] U. Lewin, L. Wennrich, J. Efer and W. Engewald, *Chromatographia*, **45**, 91(1997).
- [49] Hanfa Zou, Yuaku Zhang and Peichang Lu, *Mikrochim. Acta*, **1**, 139(1991).
- [50] H. F. Zou, Z. Jia and P. C. Lu, *Anal. Chim. Acta.*, **284**, 59(1993).
- [51] 牟世芬、刘开录, 离子色谱, 科学出版社, 北京, 1986年.
- [52] R. Steudel and G. Hodlt, *J. Chromatogr.*, **361**, 379(1986)
- [53] P. R. Haddad and N. E. Rochester, *J. Chromatogr.*, **439**, 23(1988).
- [54] A. D. Kirk and A. K. Hewavitharana, *Anal. Chem.*, **60**, 797(1988).
- [55] R. mcassidy and M. Blanchette, et al., *Anal. Chem.*, **58**, 1181(1986).
- [56] E. A. Jones and J. F. Van Staden, *J. Chromatogr.*, **537**, 277(1991).
- [57] E. Juengling and H. Kammermeier, *Anal. Biochem.*, **102**, 358(1980).
- [58] J. E. V. Doom and A. Dehean, *J. Chromatogr.*, **496**, 441(1989).
- [59] A. Werher, *Chromatographia*, **31**, 401(1991).
- [60] H. Federn and H. Ristow, *Chromatographia*, **22**, 287(1986).
- [61] S. Lowes and M. E. Rose, *Tr. Anal. Chem.*, **8**, 184(1989).
- [62] K. Hyland and D. W. Howells, *J. Chromatogr.*, **429**, 95(1988).
- [63] M. W. Dong and J. Lepore, *J. Chromatogr.*, **458**, 217(1988).
- [64] B. X. Montalvo and C. T. Villar, *J. Chromatogr.*, **429**, 95(1988).
- [65] T. Oshima and K. Sagara, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2456(1989).
- [66] L. Y. He and G. D. Zhang, et al., *J. Chromatogr.*, **481**, 428(1989).
- [67] N. R. Ayyangar and S. R. Bhide, *J. Chromatogr.*, **436**, 455(1988).

第十二章 手性对映体的 HPLC 拆分

具有相同分子式,但具有不同结构式和物化性质的化合物称为异构体.异构体主要分为两大类:构造异构体与立体结构异构体.构造异构是指具有相同的分子式,但由于分子中原子结构的顺序不同而产生的异构,构造异构体可分为碳架异构、取代位置异构、官能团异构和互变异构四大类.立体异构是指具有相同的分子式、相同的构造,但是由于分子内的原子在空间排布的位置不同而产生的异构,立体异构又可分为顺反异构、构象异构两大类.在立体异构、顺反异构和构象异构中,凡是和它的镜像不能复合的异构体可以有旋光性,称为旋光异构或光活性物质.这一对互为镜像而又不能复合的异构体称为一对手性对映体^[1].如果分子中一种碳原子具有四个不同的取代基团,这一个碳原子称之为手征性碳原子,包含有手征性碳原子的分子一定具有手性对映体.如乳酸的碳原子上有四个不同的取代基团,因此有一对不能复合的手性对映体(图12.1).此外,还有许多分子的立体结构因素导致手性对映体.以下是一些可导致手性对映体的因素^[2]:

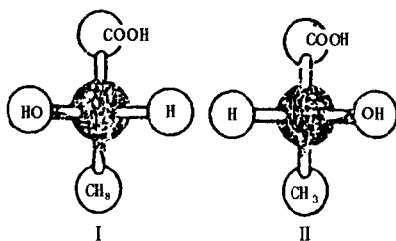


图12.1 乳酸的一对手性对映体

1. 具有一个或多个手征性碳原子;

2. 具有螺旋性(如蛋白质四级结构和多糖、核酸等的螺旋性);
3. 平面手征性(如 paracycloptases);
4. 轴向手征性(如有环状骨架的螺烷);
5. 扭转手征性(如顺、反异构体中单键和双键的扭力产生的对映体);
6. 拓朴型非对称性(如 catenanes).

具有一个手征碳原子的化合物具有一对对映体,以相等各占一半的一对对映体组成的混合物称为外消旋体,常用 DL 表示.为了避免在确定构型上的混乱,通常采用 D, L 或 R, S 来标记手性对映体.

将光学异构消旋体引入人体,则其对映异构体(enantiomer, ENTM)均由体内的手性受体、酶及蛋白以两个完全不同的分子处理.这一性质被用于对映异构体的拆分(如以血浆蛋白、AGP 等为拆分剂),更引起人们重视的是对映异构药物在体内代谢、分布和药理作用的差异.研究与临床实践表明,不仅其治疗效果不同,如熟知的 DL-(±)氯霉素的疗效仅为 D(-)氯霉素的一半;普萘洛尔(propranolol) L-异构体的药理活性比 D-异构体大 100 倍^[3]; D-天门冬素是甜味,而 L-则是苦味;(-)美沙酮是强止痛剂而(+)无效,且毒性也存在差别,如沙立度胺(thalidomide)的致畸危害,据研究认为完全由于其(S)-(-)异构体所致^[4].据报道,在美国常用的 20 种药物中,12 种药物是具有一个或一个以上手征性中心的化合物.在美国医药药物名称词典所列出的 2050 种药物中,大约有一半药物分子中至少包括一个以上手征性中心,大约有 400 种药物以外消体或非对映异构化形式服用^[2].因此在医学工业中,药物对映体含量的测定其重要性是不言而喻的.

为研究光学异构药物的药理、代谢动力学,改进其生产和质量控制,经典分析方法已不可思议.快速、准确、微量的光学异构的 HPLC 拆分及测定方法的建立和发展,只是近 20 年的事.

手性 HPLC 拆分法通常分为直接和非直接两大类。对映体混合物以手性试剂作柱前衍生，形成一非对映异构体，然后以常规(偶也见手性)固定相分离，称为非直接法，也称手性衍生

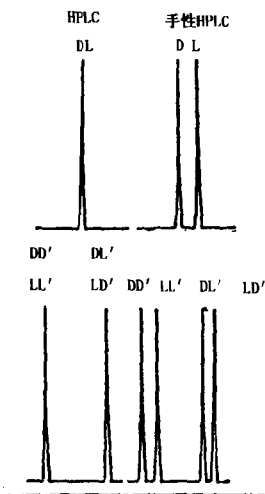
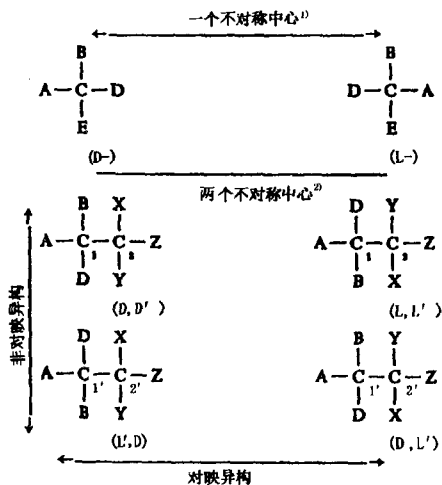


图12.2 光活性分子的立体化学和色谱性质
 1) 可有两个立体异构体: 其物理性质相同且成对映异构或镜像体(D, L)对; 2) 可四个立体异构体: 两个物理性质不同并各有一个对映异构体的非对映异构体。

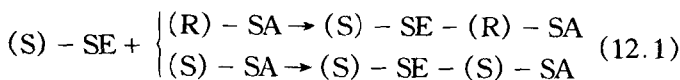
(CDR)法；未作上述处理，使用手性流动相（CMP）或固定相（CSP）拆分者即是直接法。其共同特点是，均以现代 HPLC 技术为基础，并引入不对称中心（或光活性分子）；不同的是手性衍生法是将不对称中心引入分子（溶质）内，而手性流动相和手性固定相则引入分子间。引入手性环境使对映体间呈现物理特征的差异是手性 HPLC 作光学异构拆分的基础，详见图 12.2 所示。

手性衍生法反应物通常可直接进样，以常规 HPLC 分离，并因手性衍生同时引入各种发色团，使检测灵敏度高达纳克（ng）级。本章将常见于药理学中应用的手性衍生根据其化学性质分五类介绍。CMP 也称手性流动相添加剂，它们与溶质大都通过氢键、离子键或有金属离子参与的配位键生成非对映异构络合物，不同于前者的共价键化学反应，但相似的是 CMP 也以常规的 HPLC 固定相分离。许多情况下，将 CMP 中的手性试剂固载于固定相上即为 CSP，或以相同于手性固定相上的手性键合分子作为 CMP。这一交互关系在研究和应用中常常可见。

§ 12.1 非对映异构化衍生拆分法

对映异构化衍生色谱拆分法是最古老而应用又最广泛的手性对映体拆分法。

对映异构体（ENTM）与手性试剂反应，如醇类与手性酸或酰氯酯化、胺或氨基酸与手性异硫氰酸酯类或硫脲反应等，其产物为相应的非对映异构体（diastereomer, DSTM）对，所以也称为非对映异构化衍生 [如式 (12.1)]:



SE 为光活性试剂，也称“选择器”，SA 为手性溶质，也称选择靶^[4]。

选用 CDR 法拆分通常由于下列理由：（1）不宜直接拆分，如游离胺类在 CSP 上往往具有较弱的色谱性质，生成中性化合

物后则获显著改善^[5]；(2) 添加某些基团，以增加色谱系统的对映异构体的选择性；(3) 提高紫外 (UV) 或荧光 (FL) 检测的效果。CDR 法在胺类药物中采用最早 (尤以伯胺)，因为它们既易于衍生 (如转变成酰胺或氨基甲酸酯)，拆分效果也好^[5]。对 CDR 的要求通常包括：(1) 溶质分子至少须有一个 (多个时则其性质各不相同) 功能团供衍生 (多为 $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ 或 $-\text{COOH}$)；(2) 光活性试剂 [式 (12.1) 中的 SE]，必须是手性高纯度；(3) 反应条件必须温和、简便，在 SE 或 SA 的手性中心无消旋化发生，反应必须完全；(4) SE 和 SA 分子中手性中心与其反应基团间的距离须恰当，产物的立体构型及其极性宜于色谱分离；(5) SE 宜附带有发色或荧光基团^[4]。

采用非对映异构化衍生拆分法具有以下优点：(1) 这一方法已被广泛地研究，使该方法的应用相对容易；(2) 在标准的 HPLC 条件下可以拆分对映体；(3) 如溶质具有检测问题，则可利用具有强紫外吸收或荧光生色基团的衍生试剂提高检测灵敏度。该方法存在的缺点为：(1) 非对映异构化衍生物的合成需要对被分离物质进行初分离和衍生化，这对大量样品的自动化处理有一定的困难；(2) 手性衍生试剂的杂质污染经常干扰分析结果。如 Silber 和 Riegelman^[6] 在测定生化样品中的 propranolol 含量时采用 (-)-N-三氟乙酰脯胺酰氯 (TPC) 衍生化，结果他们发现商品化的 TPC 含有 4%~15% 的 (+) 对映体，同时衍生试剂本身很易外消旋化；(3) 对映体与另一个手性分子反应的速率不相同，这可能使生成的非对映异构化衍生物的比例与对映体的起始比例不同^[7]。

表12.1 列出的是各种非对映异构化衍生试剂及在拆分对映体中的应用。

表12.1 各种非对映异构化衍生试剂及其应用

类 别	光学异构体药物	固定相	文献
(一)异硫氰酸酯(ITC)及异氰酸酯(IC)类			
2,3,4,6-tetra- <i>o</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl-isothiocyanate(GITC)	amino acid	RP(C ₁₈)	[8~9]
	propranolol, pindolol, alprenolol, bupranolol	RP(C ₁₈)	[17]
	practolol, atenolol, pronethalol, metoprolol	RP(C ₁₈)	[17]
	4-Hydroxypropranolol	RP(C ₁₈)	[17]
	Deacetylpractolol, sotalol, 2-aminalcohols	RP(C ₁₈)	[16]
2,3,4-tri- <i>o</i> -acetyl- α -D-arabinopyranosylisothiocyanate(AITC)	Epinephrine, norepinephrine	RP(C ₁₈)	[15]
	Amphetamines	RP(C ₁₈)	[12]
	Ephedrine, norephedrine, pseudoephedrine	RP(C ₁₈)	[13]
	Oxiranes	RP(C ₁₈)	[20]
(-)-1,7-dimethyl-7-norbomyl-isothiocyanate(NITC)			
(+)neomenthyl-isothiocyanate(MITC)	Amino acid	NP(sil)	[11]
R- α -methylbenzyl-isothiocyanate(BITC)	Ephedrine, propranolol, phenylglycine	RP(C ₁₈)	[10]
	Phen-ala-methylester, phen-gly, phen-aminopropane	RP(C ₁₈)	[10]
3,5-dinitrophenyl-isocyanate(NPIC)	Alcohol derivatives	CSP	[14]
(+)-1-phenylethyl-isocyanate(PEIC)	Propranolol, 4-hydroxypropranolol, amphetamines	RP 或 NP	[12,18]
R-(-)-naphthylethyl-isocyanate(NEIC)	Betoxolol, cicloprolol, oxprenolol		[19]
(二)萘衍生物(NAD)类			

续表

类 别	光学异构体药物	固定相	文献
(-)- α -methoxy-naphthalene-acetic acid(NAA)	Dopa amino acid	NP 或 RP	[21]
(-)- α -methoxy-naphthalene-acetyl-succinimidylester	2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine(DOM)	NP(Nil)	[22]
β -naphthylchloroformate(NCF)	amphetamine, ephedrine	CSP	[5,23,24]
naphthalene-methylamine(NMA)	ibuprofen, naproxen, fenoprofen, benoxaprofen	CSP	[25,26]
naphthalene ethylamin(NEA)	naproxen, indoprofen, ibuprofen, <i>dl</i> -2-[2-(chlorophenoxyphenyl)propionic acid]	NP 或 RP NP(sil)	[27,28 54]
naphthaldehydes(NDH)	Ephedrine, pseudoephedrine, methoxyephedrine, halostachine	CSP	[29,30]
naphthoxyl chlorides(NYC)	Amphetamines and its preparations	CSP	[31,32]
Binaphthalene carbonylnitriles(BNCN)	β -Adrenergic blocking agent, methyl mandelate, alcohol	NP(Sil)	[33]
(三) 酰氯及磺酰氯类			
D-10-Camphorsulphonyl chloride(CASP·Cl)	Amino acid	NP(Sil)	[40,55]
	Methoxy- α -methylbenzylamines		
phosgene(COCl ₂)	Norephedrine, propranolol	CSP	[35,36]
(-)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl) phenylacetyl chloride (MT-PA·Cl)	Amphetamines	RP(C ₁₈)	[38]
thionyl chloride(SOCl ₂)	fenoprofen, ketoprofen, phenyl-propionic acid	RP(C ₁₈) NP(Sil)	[39]
(-)-methoxyacetyl chloride	benzo[a]pyrene derivatives	NP(Sil)	[54]
(S)O-methylmandelyl chloride	α -phenylethylamine	NP(Sil)	[54]
mandeloyl chloride	amines	NP(Sil)	[56]
(四) 光学活性氨基酸类			

续表

类 别	光学异构体药物	固定相	文献
<i>N</i> -trifluoroacetyl-(-)-prolyl chloride(TFAP·Cl)	propranolol	RP(C ₁₈)	[42,45,47]
carbobenzyloxy-L-Proline(CBOP)	warfarin	RP(C ₁₈)	[43]
4-nitrophenylsulphonyl-(S)-prolyl chloride(NPSP·Cl)	amphetamines	RP(C ₁₈)	[42]
<i>N</i> -carboxyl-L-Leu-anhydride(NCA)	amino acid	RP(C ₁₈)	[46,59]
<i>N</i> -carboxyl-L-Phe-anhydride(NCA)	amino acid		
<i>tert</i> -butyloxy-L-Leu-anhydride	alpronolol, metoprolol	RP(C ₁₈)	[57]
<i>tert</i> -butyloxy-L-Ala-anhydride	propranolol	RP(C ₁₈)	[58]
<i>tert</i> -butyloxy-L-Leu- <i>N</i> -hydroxy-succinimide ester(OSU)	amino acid	RP(C ₁₈)	[49,50]
ethyloxy-carbonyl-L-leucinamide(EO-CO-Leu AM)	indoprofen	RP(C ₁₈)	[51]
<i>O</i> -(4-nitrobenzyl-L-tyr-methyleste)(NB-Tyr-Me)	amino acid	NP(Sil)	[52]
OPA- <i>N</i> -acetyl-L-cys	amino acid	RP(C ₁₈)	[53]
OPA- <i>tert</i> -butyloxycarbonyl-L-cys(OPA- <i>t</i> -BOC-L-cys)	amino acid		[44]

RP: 反相色谱; C₁₈: (ODS); NP: 正相色谱; Sil: 硅胶; CSP: 手性固定相.

§ 12.1.1 异硫氰酸酯 (ITC) 及异氰酸酯 (IC)

这一类衍生试剂很容易与大多数醇类及胺类化合物反应, 生成非对映异构体进而被分离. 此类试剂的应用研究仍很活跃. 它们广泛应用于氨基酸及其衍生物^[8~10]、儿茶酚胺类^[11]、苯丙胺类^[12]、麻黄素类^[10,13]、醇类^[14]、肾上腺素类^[15]、肾上腺素拮抗剂^[10,11,16~19]及环氧化合物^[20]等, 归纳如表12.1. ITC及IC与胺(或氨基)反应迅速, 具立体选择性, 反应条件亦较温和, 生成的硫脲非对映异构体通常可直接以常规RP或NP分离^[7],

图12.3是 GITC 手性衍生化测定 (±) 对氯苯丙胺[(RS)-(±)

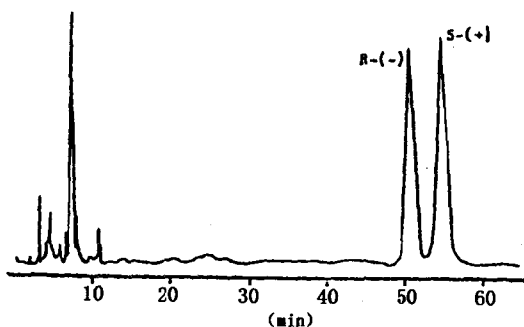


图12.3 RS (±) -对氯苯丙胺以 GITC 衍生成
非对映异构体后用 RP-ODS, MeOH-H₂O (55/45) 分离

- *p*-chloroamphetamine]的示意图. 过量试剂的干扰, 可添加乙醇胺 (monoethanolamine)^[8]、水合肼 (hydrazine hydrate)^[15] 或以萃取法^[12] 除去. Nimura 等^[15] 指出反应溶剂选择的重要性, 他们比较了二甲基甲酰胺与乙腈, 结果表明, 在儿茶酚胺类的衍生反应中, 前者仅 10min 即已完全, 而后者至 50min 仍只完成 50%. Kinoshita^[8,9] 和 Gal 等^[9,12,18,20] 对该类 CDR 手性试剂衍生化反应的研究报道最多. 他们在论述具有代表性的 GITC 与 AITC (见表12.1) 的化学结构特征中指出, 其非对映异构体之色谱分离效果与乙酰化部分的亲脂性及其构型的刚性度相关^[8,9]. Nambara 等^[11] 早期用于分离 DL-氨基酸时采用了脂环衍生物, 如降冰片烷及薄荷烷, 均取得良好拆分效果, 但二者中又都显然以特丁基侧链比甲基更好, 可见引入大体积基团增加了刚性和立体效应, 导致分离度的提高, 其乙酯衍生物据称亦有类似效果^[8]. 鉴于 GITC 和 AITC 的价格较高, 且不易制备, Gal 等^[10] 以 BITC 代替, 认为对某些对象如麻黄碱 (ephedrine) 的分离度达到或优于 GITC, 但对普萘洛尔则不然, 然而二者的代价相比 (GITC 高于 BITC 50 倍) 仍有意义. 以后, 又发展了异腈酸酯 (IC) 衍生物, 它们

与醇类生成氨基甲酸酯衍生物 ($-\text{NH}-\text{COOR}$)^[6,14]、与胺类生成脲衍生物 ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{NR}$)，其结构均经 FAB-MS 法研究确证^[18,19]。据 Darmon 等^[19]报道，用 NEIC 对于倍他索洛尔 (betaxolol) 等新型的 β -肾上腺受体阻滞剂之药代动力学研究，可测浓度达 0.5ng/ml，定量的线性范围为 1~50ng/ml，相关系数 >0.9992 ，CV 2.1%~3.4%。对 IC 类作比较后，Gal^[20]认为 PEIC 较稳定。Wilson^[18]曾用于普萘洛尔代谢研究，同时测定尿液中普萘洛尔及其代谢产物，认为其拆分效果和稳定性尚不及 BITC。Miller 等^[12]以苯丙胺 (amphetamine) 及其类似衍生物 (5 种)，分别以上述各种试剂反应，表明均可用于生物样品的分析，显著比 GC 法优越，曾用于制备性拆分，结果良好。

§ 12.1.2 萘衍生物 (NAD) 类

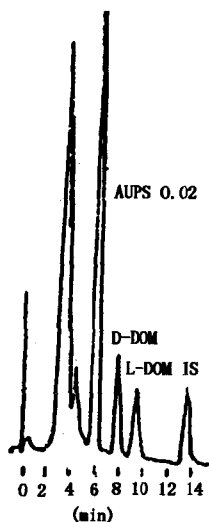


图12.4 以 α -NAA-琥珀酰亚胺酯衍生测定血浆中 DOM 的光学异构体 (IS: 内标)

萘的各种衍生物用作手性试剂十分普遍，显然由于其结构特征用于提高立体选择性和检则灵敏度。虽然它们的化学性质分属于酸、醛、胺、酯或酰氯等，但由于最显著特征仍在于萘基，故均作为萘衍生物类介绍(见表12.1)。Goto 等^[21]较早报道此类手性试剂，他们合成了 α 及 β -萘乙酸的甲氧基衍生物 (NAA)，与氨基酸 (甲酯) 生成非对映异构体酰胺，并比较了 α -NAA 与 β -NAA 衍生的拆分效果。结果表明，它们均可用于多巴及 20 种氨基酸分析； α -NAA 的分离度显著优于 β -NAA，可能由于前者的 α 位萘取代基与萘核 8 位氢相互作用， β 位则不可能有类似作用。这与它们的 HPLC 分离度以 NP 明显地优于 RP 相符；结果还表明其 L-氨基酸的结构相关性比 D-型明显。其后，Goto^[22]又将 NAA 改

成 α -NAA-琥珀酰亚胺酯, 研究测定了血浆中 D 及 L-二甲氧基-4-甲基苯丙胺 (DOM), 生成的非对映异构体以 NP-HPLC (硅胶柱, 流动相为乙烷/乙酸乙酯 (3/1)) 分离, 得到满意的 k' 与 R_s 值, 有效地研究了 D-及 L-DOM 的血药浓度变化特征 (图12.4)。

萘氮甲酸酯 (NCF) 与胺生成氨基甲酸酯, 从合成化学观点看, NCF 比 NAA 更易与胺反应. 其特点是不仅适合于伯和仲胺, 亦可用于叔胺, 衍生反应可选择性地取代于氮原子^[23], 对于双功能基团化合物如羟基胺, 可准确地控制以获所需产物^[24], 与对羟基苯丙胺的反应见图12.5. Doyle 等^[5]认为, 游离胺类在 CSP 柱上往往呈较弱的色谱性质, 经以 NCF 衍生后 (成中性化合物) 显著改善了分离, 并增加了对映异构体的选择性。

Wainer 等^[25] 研究了一系列带有 α -甲基芳基的重要消炎药

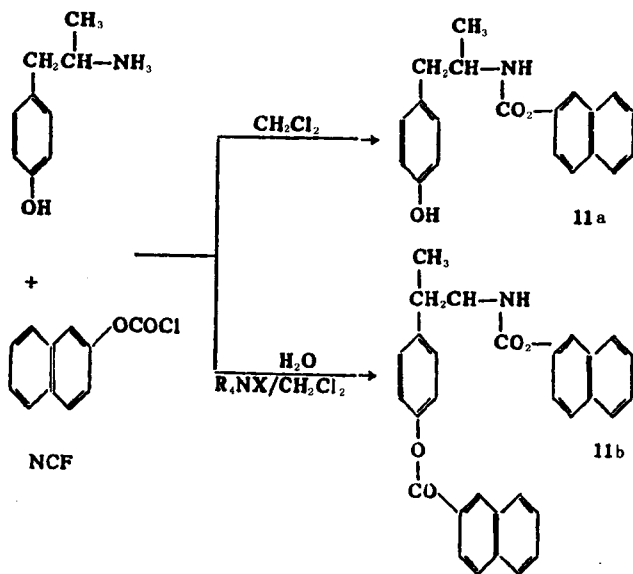


图12.5 以反应条件控制对羟基苯丙胺与 NCF 的衍生反应, 可得单衍生物 11a 或双衍生物 11b

物, 如布洛芬 (ibuprofen)、萘普生 (naproxen)、苯噁洛芬 (beoxaprofen) 和非诺洛芬 (fenoprofen) 等, 以萘甲基胺衍生成酰胺, 然后以 CSP 柱分离, 作者还以上述药物的带有各种取代基的同系物作比较, 结果表明, 仲或叔酰胺均可完成其对映体的拆分, 并阐明了手性识别作用与溶质的非对映异构体的立体因素相关. Goto 等^[26,27]则以萘乙基胺 (NEA) 衍生物研究了酸性药物的消旋体拆分, 所合成的酰胺内消旋异构体以普通的正或反相色谱分离, 灵敏度可达 0.1 ng, 用于多种 DL-氨基酸及 DL- α -芳基丙酸类药物, 如布洛芬、萘普生和吲哚洛芬 (indoprofen) 等, 均可很好地拆分 [硅胶柱, 流动相为己烷/乙酸乙酯 (10/3), FL 检测]. 这一方法的缺点在于成肽键缩合的衍生化反应, 为取得良好重现性, 条件较为苛刻, 且反应步骤较多. 以后, 他们又以蕙代替 NEA 中的萘, 用作乙酰化氨基酸及萘普生等药物的光学异构体拆分和测定, 方法的灵敏度虽不亚于 NEA, 但蕙衍生物的反应活性则略为降低^[28].

鉴于麻黄碱等氨基醇类药物在各种制剂中使用较普遍, 其光学异构体的活性有显著差异, Wainer 等^[29,30]曾作了长期研究, 他们选用萘甲醛 (NDH) 为手性试剂, 与其缩合成噁唑烷 (oxazolidine) 衍生物 (见图 12.6), 然后以 CSP 分离. Yang 等人以麻黄碱、4-甲氧基麻黄碱、伪麻黄碱及 halostachine 等, 比较研究了以多种芳醛, 如苯甲醛、硝基苯甲醛及 NDH 等反应所生成的非对映异构体的拆分效果, 显然以 NDH 类最好, 并藉此论证手性识别“一点作用”的新概念.

萘酰氯 (NYC) 如萘甲酰氯、萘丙酰氯, 由 Wainer 等^[31]用于苯丙胺的原料、缓释剂、糖浆、胶囊等多种剂型的对映体分析测定, 从市售标示为 (+) 异构体的制剂中几乎大都检测出 (-) 异构体. 本法可准确测出 <1% 含量的异构体, 有效地监督这类制剂的质量, 但他们采用了 CSP 柱分离. Shimizu 等^[32]对冠脉扩张剂地尔硫草 (diltiazem) 以萘丙酰氯反应生成酯衍生物, 然后以反相色谱法 [C_{18} 柱, 流动相为 0.01 mol/L 乙酸铵/乙

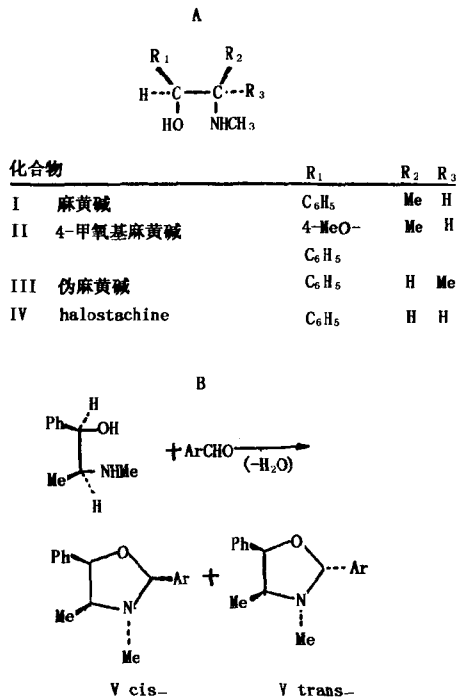


图12.6 A. 各种氨基醇的结构; B. 以NDH与氨基醇缩合成(噁)唑烷衍生物, 以供分离

睛(1/9), FL检测]分离, 可从D-型中检测出低至0.1%无效的L-异构体。

为了提高醇羟基类药物代谢分析的灵敏度及衍生试剂的反应活性, Goto等^[33,34]合成了萘酰氟衍生物(4-二甲基氨基-1-萘甲酰氟), 可与羟基化合物在三乙基胺存在下以温和的条件缩合, 曾用于与睾丸素(testosterone)、去氢表雄甾酮(dehydroepiandrosterone)、氢化可的松(cortisol)、雌酮(estrone)及胆酸甲酯等衍生反应, 所生成的酯类化合物荧光响应灵敏度较高, 检测限为200pg. 以后, 他们又合成了连萘酰氟(BNCN). 据称, 对

映体醇类很容易与它缩合成酯（条件如前），然后以正相色谱（硅胶柱，流动相为戊烷/乙酸乙酯）分离，其检测灵敏度较前者更高，可低于 200pg.

§ 12.1.3 酰氯与磺酰氯类

手性酰氯或磺酰氯衍生物试剂多用于胺、氨基酸及醇类药物（见表12.1），其非对映异构化衍生通常有两种情况：（1）直接与样品缩合，生成酰胺或酯后以 RP-或 NP-HPLC 分离（也可采用 CSP）；（2）将样品先与酰氯或磺酰氯反应，然后再引入其它基团（多为芳基，如苯胺、硝基苯等具有 π 电子的化合物），合成更有利于拆分与检测的非对映异构体衍生物。Wainer 等^[35,36]滴加甲酰氯的甲苯溶液于去甲麻黄碱及普萘洛尔的消旋体中，使缩合成噁唑烷酮衍生物，然后以手性固定相 [流动相为 己烷/乙醇/乙腈 (97/2/1)] 分离其内消旋异构体。去甲麻黄碱可以毫克 (mg) 及至克 (g) 取量作此环合反应，拆分后收集单体，易于再生而不致消旋化，因而又可用于制备。此法用于普萘洛尔血浆样品测定，灵敏度达纳克 (ng) 级 (0.5ng/ml 信噪比为 11.3)，CV=4.3%。

环境毒物苯并芘经人体代谢转变成 (-)-R-7, t-8-二羟基-7, 8-二氢苯并 [a] 芘，由此进而代谢并呈致突变性。杨宪桂等^[37]对它们及其母体的光学异构体分析作了大量研究。他们曾以薄荷氧乙酰氯与上述二醇衍生成相应的酯（见图12.7），然后以正相色谱（硅胶柱，流动相为二氯甲烷/乙酸乙酯）分离其非对映异构体，为光学异构体的代谢研究提供了重要手段。

Miller 等^[12]报道了用苯乙酰氯衍生物 (MPA·Cl) 为手性试剂，与苯丙胺及苯乙胺在氯仿溶液中 (70℃, 20min) 反应生成酰胺衍生物，产物稳定并可直接取样以反相色谱 (C₁₈柱，甲醇/水) 分离，其分离度可与用 GITC 或 AITC 为试剂的结果相当，其 UV254nm 检测可定量低于 10ng 的产物，改以 200nm 则灵敏度更高。Shimizu 等^[38]早期曾以萘丙酰氯为试剂，研究了对

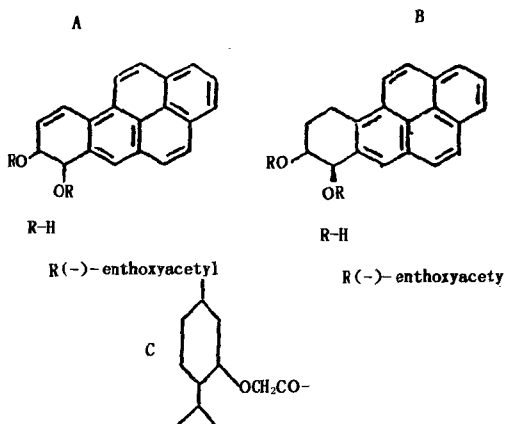


图12.7 苯并 [a] 芘代谢产物 (A, B) 与薄荷氧乙酰氯 (C) 生成衍生物

地尔硫草的内消旋异构体拆分 (见前), 以后他们又合成了一系列衍生试剂, 认为以 NSPC·Cl 最好, 样品经 1mol/L NaOH 溶液处理后, 用 CHCl_3 萃取, 加入吡啶和定量的衍生试剂、室温反应 15min 即可进样正相色谱分离测定 [硅胶柱, 流动相为氯仿/二氯甲烷/甲醇 (20/50/30)], 其两对光学异构体均可获完全分离, 过量试剂先被洗脱而不干扰测定 (见图12.8), 异构体检测下限为0.1%。Sallustio 等^[39]以 SOCl_2 与苯丙酸类消炎痛药如 2-苯丙酸、酮基布洛芬 (ketoprofen) 及非诺洛芬的血浆样品提取物反应, 然后再与 R-2-苯乙胺生成酰胺衍生物, 产物以正相色谱 [硅胶柱, 流动相为乙腈/二氯甲烷 (5/95)] 分离, 异构体均可完全拆分。Furukawa 等^[40]对胺类化合物的手性拆分衍生试剂从早期的芳基脂肪胺至氨基酸均作了不少研究, 并首先使用 CASP·Cl 类试剂进行氨基酸消旋体拆分, CASP·Cl 与之反应后, 再与对硝基苄基溴合成成为酯, 然后以正相色谱 (硅胶或其键合-NH₂柱, 流动相为梯度洗脱, 1. 异辛烷/二氯甲烷/异丙醇; 2. 异辛烷/二氯甲烷) 分离混合氨基酸中各对映体对。

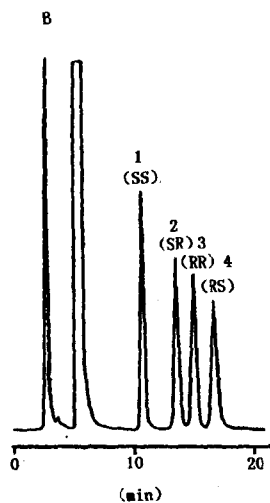
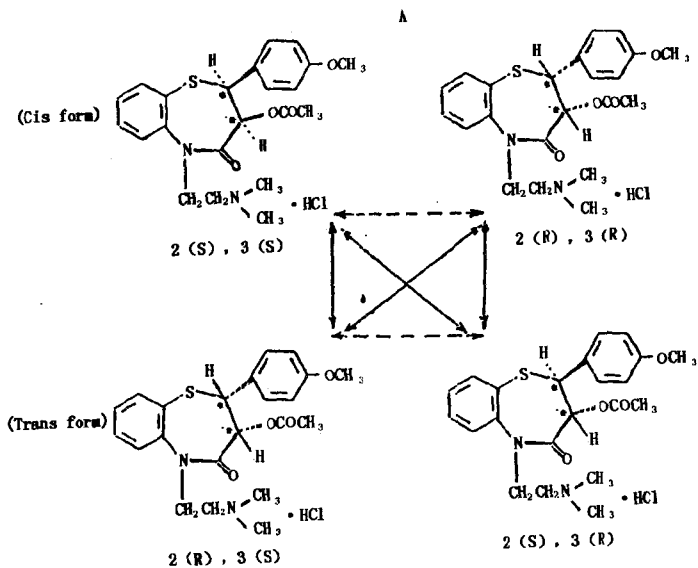


图12.8 A. diltiazem 与 NSPC 衍生所生成二对非对映异构(\longleftrightarrow)(\longleftrightarrow);
B. 非对映异构体的分离 (正相 HPLC)

§ 12.1.4 光学活性氨基酸类

光学纯氨基酸及其衍生物系最早采用的色谱手性试剂,先在 GC 法中应用^[41],80 年代始迅速发展为 HPLC 法,广泛用于胺、羧酸及醇类药物,尤以氨基酸应用最广泛,其衍生化反应多基于肽合成原理.此类试剂以 L-脯氨酸、L-亮氨酸和 L-半胱氨酸及其衍生物为多,以后又有 L-酪氨酸等.为改善检测灵敏度常引入芳基,如硝基苯^[42]、苄酯^[43]或 OPA^[44]等,为提高反应活性和定量的回收率,常将羧基转化成酰氯^[42,45]、酸酐^[46]等(均见表 12.1).

在普萘洛尔的代谢与临床药理研究中, Hermansson^[45], Silber^[47]及 Dieterle^[48]等均以三氟乙酰丙酰氯 (TFAP·Cl) (见表 12.1) 衍生,并测定血浆中的 D 和 L-异构体,产物经 MS 分析确定,并以反相色谱 (C₈ 柱,流动相为甲醇/水) 分离更好.

Barksdale^[42]则以 NPSP·Cl (见表 12.1) 为衍生试剂,测定苯丙胺及其类似物,其非对映异构体衍生物如图 12.9. 以正相

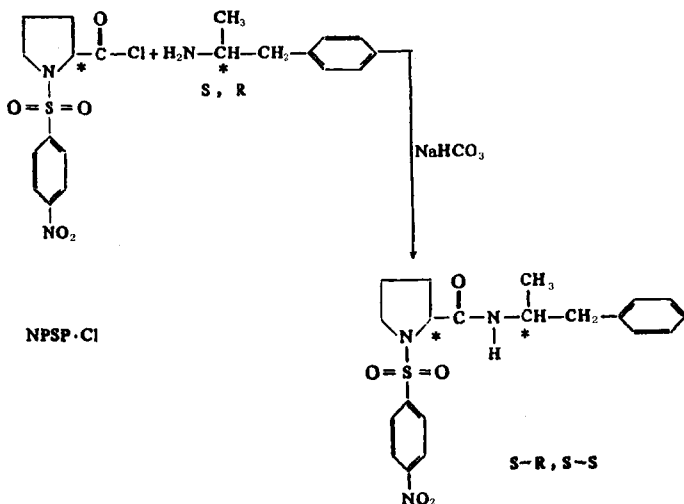


图 12.9 苯丙胺与 NPSP·Cl 衍生的反应,
所得非对映异构体以正相 HPLC 分离

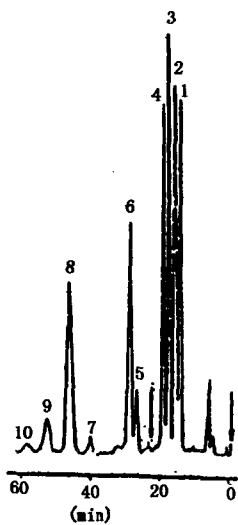


图12.10 华法林代谢产物以CBOP衍生后以正相色谱(硅胶柱, 酸乙酯/己烷/甲醇/乙酸)分离

1. S-华法林; 2, 4. 内标; 3. R-华法林; 5. S, S-羟基华法林; 6. R, S-羟基华法林; 7. 6-S-羟基华法林; 8. 7-S-羟基华法林; 9. 6-R-羟基华法林; 10. 7-R-羟基华法林.

色谱(硅胶柱, 流动相为氯仿/庚烷, UV254nm)分离良好, 但甲基苯丙胺的衍生物则以反相色谱(C_{18} 柱, 流动相为甲醇/水)分离更好.

Banfield等^[48]用CBOP(见表12.1)同时测定血浆或尿液中华法林(warfarin)及其代谢产物, 其非对映异构体均以正相色谱(硅胶柱, 流动相为乙酸乙酯/己烷/甲醇/乙酸)分离后, 用丁基氨作柱后衍生, 用FL检测, 浓度范围为50~100ng/ml(见图12.10).

Mitchell^[43]与Chen等^[50]改进了前人方法, 以BO-L-Leu-N-OSu(见表12.1)代替了相应的NCA, 将被测氨基酸合成亮酰二肽, 经反相色谱(C_8 柱, 流动相为pH7磷酸盐缓冲液/乙腈, UV210nm)分离, 分离度多大于2, 回收率>98%, 异构体检测限为0.5%. 其后, Bjorkman^[51]则以EO-CO-L-Leu AM(见表12.1)为试剂, 测定了血浆中吲哚洛分的对映体, 用以研究其药物代谢动力学. 据称, 该方法反应仅需3min(室温), 直接进样反相色谱(C_{18} 柱, 流动相为乙腈/pH6.5的磷酸盐缓冲液, FL检测). 分析结果表明, 其(+)-异构体的分布

量及排出速率低于(-)-异构体. 鉴于与氨基反应的试剂不适合于氨基受保护的氨基酸, 因此也难以用于肽合成之商业试剂分析. Gorg等^[52]以NB-L-Tyr-ME(见表12.1), 用dicyclohexylcarbodiimide(DCC)为衍生试剂, 可简洁地完成反应, 直接进样正相色谱(硅胶柱, 流动相为己烷/丙醇, UV270nm)分析, 试剂

不干扰测定,可检测低于5%异构体,不产生消旋化,分离度好.最近,对氨基酸的对映体手性拆分试剂研究已发展至与常规分析相结合的地步,如将其色谱的OPA衍生法中硫基乙醇(或乙硫醇)以手性硫基-L-半胱氨酸代替,出现了OPA-N-乙酰基-L-半胱氨酸^[53]、OPA-N-丁酰羧基-L-半胱氨酸^[44](均见表12.1)等优良试剂(见图12.11). Nimrua等^[53]已对该试剂取得了专利,据称该试剂既可用于柱前衍生,如同常规操作,反相色谱(C₁₈柱,流动相为梯度冲洗,0.05mol/L乙酸钠/甲醇,FL检测)70min完成14对对映体的拆分;也可用反相离子对法分离(C₁₈柱,流动相为40mmol/L十二烷基磺酸钠/乙腈),然后以该试剂衍生,作氨基酸的常规分析.

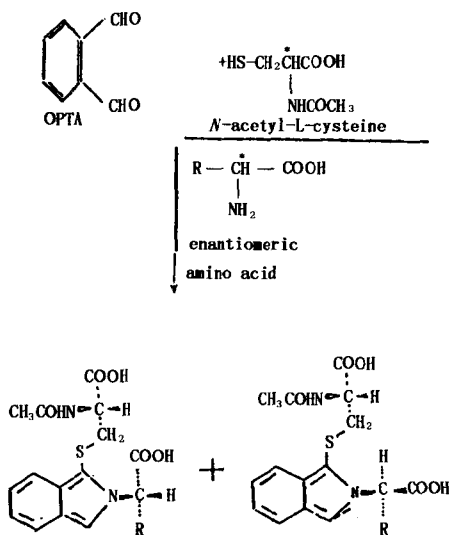


图12.11 OPA-N-乙酰基-L-半胱氨酸与氨基酸所生成非对映异构体衍生物

§ 12.1.5 其它手性衍生试剂

手性衍生试剂很多,除上述各类外,还有以拆分对象的化学

性质或反应原理进行选择的衍生试剂，如 Wainer^[60]曾根据羧酸可用冠醚催化与 L-2-溴辛烷酯化的方法，以 19 冠醚为催化剂，使扁桃酸生成非对映酯，可直接进样分析（硅胶柱，流动相为二氯甲烷/己烷，UV254nm），认为反应条件温和、快速、准确。Johnson 等^[61]以 (S) - (+) - 2 - 辛醇，在硫酸酸性和高温下与萘普反应生成酯，以正相色谱（硅胶柱，流动相为己烷/乙酸乙酯，UV332nm）分离，测定其对映体比例，结果重现性良好。此外，值得介绍的进展还有 Lindner^[5]在酒石酸衍生物方面所致力研究的结果，酒石酸具有天然易得的光学纯手性特征。在研究它用于 CMP 的同时，他们以 (RR) 或 (SS) - 酒石酸酐 (TAAN) 衍生物对烷基醇胺类药物立体选择性进行了研究，与 -OH 基衍生(成酯)而保护 -NH₂ 基；为使稳定的共价衍生物的形成，乃

表 12.2 醇胺类药物以 TAAN 为手性剂拆分

烷基醇胺类药物	$k'(R)$	$k'(S)$	$\alpha = \frac{k'(R)}{k'(S)}$
propranolol	4.00	1.0	2.75
bupranolol	3.25	10.9	3.35
oxprenolol	2.40	6.8	2.83
carazolol	2.38	6.38	2.68
alprenolol	2.38	6.38	2.68
timolol	2.33	6.22	2.67
methylpranolol	2.13	5.38	3.93
pindolol	1.88	4.88	2.59
methoprolol	1.38	4.63	3.35
labetolol	1.28	6.39	4.66
celiprolol	1.13	3.0	2.65
acerbutolol	0.88	2.75	3.13
bunitolol	0.88	3.13	3.55
nifenalol	0.63	3.0	4.80
atenolol	0.35	1.10	3.11

乃以质子化方法，加强酸（如三氯乙酸，生成稳定的离子对），在此条件下可得 —OH 基与 O，O-二取代酒石酸酐的非对映异构体单酯衍生物（见图12.12）。他们以二苯酰酒石酸酐研究了该类物质中 15 种重要的心血管药物（见表12.2），所得非对映异构体衍生物均可方便地以正相或反相色谱甚至 TLC 方法予以分离，其 α 值均大于 2.5，可在(S)-普萘洛尔中检测出 0.3% 的(R)-异构体。据称，所生成衍生物易由氘代溶剂分解，以制备各光活性单体，收率为 70%。

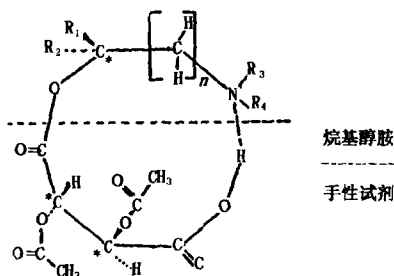
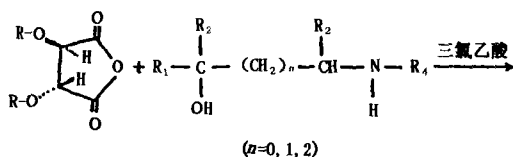


图12.12 以 TAAN 为手性剂与烷基醇胺类药物反应生成的衍生物

§ 12.2 手性流动相拆分法

手性流动相 (CMP) 拆分法也称手性洗脱法或手性流动相添加剂法。它与手性试剂衍生法不同之处首先在于不必事先将样品制备成衍生物，而只须将手性试剂加入流动相中。手性添加剂与样品所形成的各种手性络合物虽然不及手性试剂衍生法那

样牢固，然而它所依据的手性识别作用和络合物的非对映异构性质却基本类同。

在众多的手性添加剂 (chiral additives, CA) 中以手性配基交换络合剂 (chiral ligand-exchange complexes, CLEC) 的基础理论研究较成熟，应用也较广泛。它的奠基者 Davankov 等^[62]的长期研究已使它发展至包括手性固定相在内均占重要地位的方法。此外，这里还将介绍离子型络合剂如离子对拆分试剂。它与 HPLC 中的离子对法的差别主要在于前者是手性的离子对 (CIP)。根据手性添加剂的性质分成四类介绍。在 CMP 拆分法中还将介绍发源于经典柱色谱法的环糊精 (cyclodextrins, CD)，它也可键合于基质上作为 CSP，对溶质分子基团体积 (直径) 的选择性及其手性识别作用，颇引起学者们的兴趣。

作为手性添加的化合物大多为相应的 CSP 上的键合配基，如在手性配基交换添加剂中最普通的 L-proline-Cu²⁺ (见表 12.3)，也是最早出现的配基键合手性固定相^[63]。在 CMP 中，消旋络合物多在两相中分配，而在 CSP 的场合下则认为仅吸附于固定相的键合基上。Davankov^[79]曾以反相柱添加手性剂后用以拆分消旋异构体，甚至在使用了的流动相中不再含该手性剂，用色谱数据可以推算消旋异构体的结合常数。

表 12.3 手性配基交换络合剂

光学活性氨基酸(AA)SE	金属离子	拆分对象 SA ⁽¹⁾	固定相 ⁽²⁾	文献
L-2-Isopropyl-4-octyl-diethylene triamine	Zn ²⁺	Dns-AA	RP(C ₈)	[64]
L-Pro-n-octylamide	Zn ²⁺ , Cd ²⁺ Ni ²⁺ , Hg ²⁺	Dns-AA, dipeptide	RP(C ₈)	[65]
L-Pro(D-pro)	Cu ²⁺	AA	Ion Excha.	[66]
L-Pro	Cu ²⁺	thyroid hormones	NP(Sil)	[67]
L-Arg	Cu ²⁺	AA	RP(C ₈)	[68]
L-His, L-His-O-CH ₃	Cu ²⁺	AA, Dns-AA	RP(C ₁₈)	[69]

续表

光学活性氨基酸(AA)SE	金属离子	拆分对象 SA ⁽¹⁾	固定相 ⁽²⁾	文献
L-Phe [*]	Cu ²⁺	Dopa, Trp dihydroxy butyl-quinine	RP(C ₁₈)	[70]
L-Asp	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Dopa	RP(C ₁₈)	
L-Phe-OCH ₃	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Dopa	RP(C ₁₈)	[71]
Di- <i>n</i> -propyl-L-Ala	Cu ²⁺	Dns-Aa	RP(C ₁₈)	[72]
tetramethyl-(R)-propane diamine	Cu ²⁺	Dopa, mandelic acid	RP(C ₁₈)	[73]
L-phenylalanine	Cu ²⁺	Levodopa methyl-dopa, Carbidopa, tryptophen	RP(C ₁₈)	[74]
N (P-toluenesulfonyl) L- phenylalanine	Cu ²⁺	Aliphatic-2-hydroxy acid	RP(C ₁₈)	[77]
<i>N,N</i> -dialkyl-L-AA	Cu ²⁺	Aliphatic-2-hydroxy acid	RP(C ₁₈)	[76]
L-Pro, L-Arg	Cu ²⁺	Aromatic-2-hydroxy acid		[77]
L-His-methyl ester	Cu ²⁺ , Ni ²⁺	OPA-AA	RP(C ₁₈)	[78]
R,R-tartaric acid		Amine piccolic acid		
mono- <i>n</i> -octylamide	Cu ²⁺ , Ni ²⁺	AA, norepinephrin	RP(C ₁₈)	[75]

1) Dns: Dansyl (丹黄酰氯); OPA: 邻苯二甲醛; AA: 氨基酸;

2) RP: 反相色谱; NP: 正相色谱; C₈: 辛烷键合硅胶; C₁₈: ODS; Sil: 硅胶。

尽管有关机理之争仍在继续, 然而 CMP 与 CSP 间种种密切的交互关系则是明白无疑的。

§ 12.2.1 配基交换型手性添加剂 (CLEC)

手性配基交换型流动相添加剂中, 手性配基 (或称选择器 SE^[80]) 多为光活性氨基酸 (AA) 或其衍生物。它们和二价金属离子形成螯合的络合物, 以适当的浓度分布于流动相中, 被拆分的溶质消旋体也称选择靶 SA^[76]。SE 与 SA 基于对映异构选择性与金属离子共同形成消旋异构体的配位络合物, 然后在 RP 或 NP 柱上完成其拆分过程。典型的络合-交换过程可用图 12.13 表

示. 图12.14 中式 D 与 L 即为图12.13 中的 SE-M-SA (也称“三元络合物”) 两个非对映异构络合物构型. Davankov^[80,81] 认为, 根据金属离子 (M) 是固着于固定相的配基 (\overline{SE}) 还是与流动相中 SE 形成络合物而随流动相沿柱移动, 可分成配基色谱法和络合物色谱法.

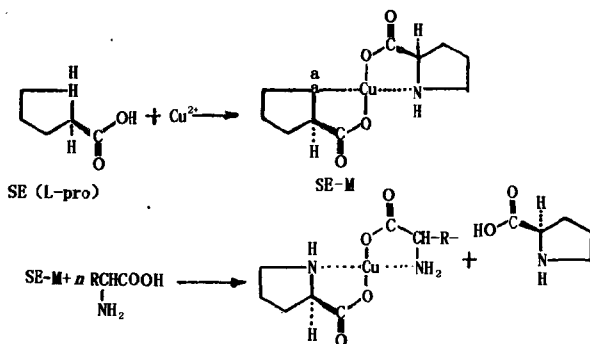


图12.13 L-脯氨酸- Cu^{2+} 配基交换型手性移动相添加剂



图12.14 配基交换剂 L-脯氨酸- Cu^{2+} 与氨基酸所成的非对映异构 (SE-M-SA 三元络合物)

Lindner 等^[64] 首先用 L-2-isopropyl-4-N-octyl-diethylene triamine- Zn^{2+} 添加于流动相, 用离子交换柱分离了未衍生化氨基酸对映体. Nakagawa^[82] 与 Gil-Av 等^[66] 同时以 L-或 D-Pro- Cu^{2+} 添加到流动相中, 用离子交换柱分离了未衍生的氨基酸对映体. Lindner^[75] 认为手性络合物添加剂有如为常规柱创造了一种动态的吸附性涂复手性固定相, 这与前述 Davankov^[79] 的实验和判断不谋而合. 由表12.3 可见, SE 多为氨基酸对映体或其

烷基衍生物。配位螯合的金属离子虽亦见用 Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , 但显然以 Cu^{2+} 最为常用。CLEC 的吸附固定相仅在早期偶见用离子交换树脂和硅胶^[66,67], 如今几乎都采用 RP 的 C_{18} 或 C_8 柱, 检测方法多为 UV 法, 但 Dns-AA 或 OPA-AA 则用 FL, 也有以 Fe^{3+} 作络合试剂, 反应后可见光吸收检测^[77]。本法除用于 AA 外, 还逐步扩大至其它药物, 如多巴类^[71,73,74]、奎宁生物碱类^[67,70]、甲状腺激素类^[67] 及各种脂族与芳香族羧酸及羟羧酸类^[76,77], 均获良好结果 (均见表 12.3)。据 Gelber^[74] 报道, 本法用于各种多巴的片剂、胶囊剂的对映体纯度测定, D 与 L 分离度 >1.3 , 回收率 $SD < 0.7$, D-多巴的最低检测量为 0.03%。

§ 12.2.2 手性离子型络合剂 (CIPC)

离子型络合剂根据其类型和溶质的化学性质归纳如表 12.4。

手性离子对添加剂是在离子对 HPLC 基础上发展起来的, 近年还引入了手性络合剂, 大大增加了对映体选择性与色谱行为的可调性, 显示了颇有价值的前景。

表 12.4 手性离子型络合剂的分类

对映异构体溶质	手性试剂	流动相	固定相	文献
具有氢键基团的阳或阴离子型化合物	流动相中的离子对试剂	疏水性	DIOL	[84~85]
手性生物碱			键合氨基	[86,87]
羧酸型离子	流动相中的蛋白(磷酸盐为离子对试剂)	亲水性	RP(C_8, C_{18})	[88~90]
1,2-氨基醇型阳离子	在流动相(或固定相)中的手性烷基酒石酸衍生物	亲水性	键合苯基	[91,92]
		疏水性	NP(Sil)	[93,94]
两性化合物	流动相中的两性配对试剂	亲水性	RP(C_{18})	[93,95]

荷电溶质 ([S]) 与手性离子对试剂 ([C]) 缔合成电中性络合物, 即离子对 ([SC]) 保留在固定相上, 其保留特征 (如

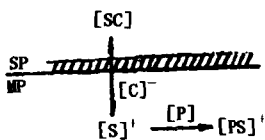


图12.15 手性离子对的二相(流动相及固定相)分配和手性络合剂对离子对生成的影响
S. 溶质; C. 手性对离子; P. 手性络合剂; MP. 流动相; SP. 固定相.

k') 可由 [C] 浓度及其性质调节外, 同时还可由外加的手性络合剂([P]) 控制^[80] (见图 12.15). Pettersson 等^[84,95,91]对 CIPC 做了许多有价值的研究, 并用于若干药物的光学拆分和测定. 根据表12.4 所列手性试剂性质, 分类介绍如下:

1. 基于手性离子对试剂能与对映体溶质结合, 生成非对映异构体的

离子对, 其结合力多由静电吸附与氢键协同组成. 由于所形成离子对在流动相中(溶剂化作用)稳定性差异, 或与吸附剂(固定相)的亲合力不同而具有不同的保留特征^[89]. Pettersson 等^[84]以樟脑磺酸钠为离子对试剂, 分离了一系列有机胺衍生物(见表12.5). Pettersson 等^[85]还以奎宁为手性离子对试剂, 完全分离了诸如托品酸、樟脑磺酸及萘普生等对映体.

表12.5 以樟脑磺酸钠为离子对试剂分离有机胺类药物

胺类药物	α	氨基侧链	色谱系统
alprenolol	1.20	$\text{—O—CH}_2\text{—CH(OH)CH}_2\text{NHCH(CH}_3)_2$	流动相
metoprolol	1.11	同上	(+)-10-camphor-sulphonate
oxeprenolol	1.10	同上	$2.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$,
propranolol	1.12	同上	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}(1911)$
terodiline	1.00	$\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{CH(CH}_2\text{)NHC(CH}_3)_2$	固定相
hyoscyamine	1.00	>N—CH_3	Lichrosorb Diol

Szepesi 等^[86]提出以二(2-乙基己烷)磺酸或(+)-10-樟脑磺酸(CSA)作为手性添加剂, 以硅胶键合-CN基为固定相,

研究了麦角及 eburnane 生物碱的分离. 认为本法为极有希望的离子型有机化合物光学异构体的分析方法. 其后^[87], 他们又以相同的手性络合剂对 18 种长春花胺型 (vincamine-type) 及阿朴长春花胺型 (apovincamine-type) 生物碱的光学异构体作了颇为详尽的拆分研究, 认为只需通过流动相的所谓低、中、高“三溶剂组合”的变化, 就可方便地调节它们的保留值. 图 12.16 是以此法对 vincamine 8 个光学异构体拆分的色谱图, 结果表明, 本法对天然药物的绝对构型研究有重要价值.

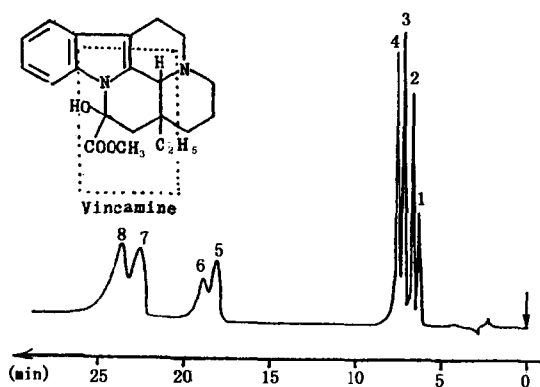


图 12.16 长春花胺的四对光学异构体及其手性离子对法拆分
(硅胶柱, 乙烷/氯仿/乙醇 (70/27/3), $CSA 2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 为
手性添加剂)

有关机制的探讨认为, 氨基与羟基间多于二个烷基碳或仅有氨基的结构, 其拆分效果降低 (如表 12.5), 认为非对映异构性离子对的立体选择性保留作用是“二点相互作用”理论的验证^[89]. 关于 k' 及立体选择性研究表明: k' 随 $[C]$ 浓度上升而下降, 可能由于在固定相之间相同吸附位置上, $[C]$ 与 $[SC]$ 作分配竞争所致. 在表 12.5 的例子中, 流动相中戊醇之微小增加即可导致 k' 与立体选择性下降, 这是因为它与 $[SC]$ 中的氢

键基团竞争所造成，因此，流动相中水分须严格控制于 80~90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[85]以下。

2. 血浆蛋白 albumin (HSA) 的立体选择性结合性质应用于 HPLC 拆分光学异构体由来已久，最近已由其所键合的固定相发展为流动相添加剂^[90]。Pettersson 等^[89]以 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ HSA 加于磷酸缓冲液流动相中，以 RP-C₂ 柱 (UV 280nm 检测) 分离了 D, L-色氨酸，以 RP-C₁₈ 柱分离了 2-苯氧基丙酸，均获良好结果 (见图 12.17)。HSA 及 [C] 浓度与色谱特征关系为：HSA 浓度增加使 [C] 与流动相结合增加，使 k' 降低；增加

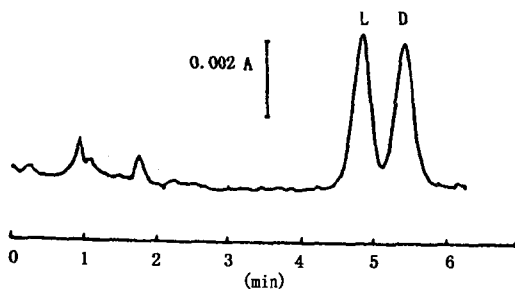


图12.17 以蛋白为添加剂的
手性离子对色谱法分离 D, L-色氨酸

[C] 浓度及其疏水性,使 [SC] 在固定相的保留增强, k' 变大. Hermansson^[88]在这这方面的工作给本法赋予新的价值,他在研究 α -酸性糖蛋白 (α -AGP) 的 CSP 分离手性药物基础上,近年又将 α -AGP 用于 CMP 法,研究了若干药物的光学异构体拆分,如以 Lichrosorb DIOL 柱对精神病药物异丙嗪 (promethazine)、阿利马嗪 (alimemazine)、丙酰马嗪 (propiomazine)、甲硫吡嗪 (thioridazine)、三甲丙咪嗪 (trimipramine) 及吡二丙胺 (disopyramide) 等的拆分,就 α -AGP 的用量、离子对磷酸盐浓度及叔胺类的添加等因素对它们的色谱行为的影响,分别作了细致观察;并导出了各项参数的关系式:

$$k' = qK_0 K_{LHZA} [Z^-]^m / (1 + K_{LHP} \cdot C_P) \quad (12.2)$$

式(12.2)中 qK_0 , K_{LHZA} 为离子对浓度及其在二相中分配比, $[Z^-]^m$ 为离子对试剂浓度, K_{LHP} 为对映体与蛋白亲和常数, C_P 为 α -AGP 浓度. 由式(12.2)可见, 通过对映体色谱保留值的测定, 可以计算各异构体与蛋白结合的亲和常数, 筛选其立体选择性, 免除了经典放射性同位素标记法的繁杂, 为药物的构效关系研究提供了重要途径.

3. Bowman^[93]发现了酒石酸衍生物对对映体的手性识别作用, 当时以溶剂提取法拆分对映体. Prelog^[92]利用这一原理使氨基醇类对映体用液-液分配色谱成功地作了拆分(含烷基酒石酸酯的有机相和 hexafluorophosphate 离子的水相). Pettersson 等^[91]将 (+)-di-*n*-butyltartrate(DBT)液通过疏水固定相柱, 形成类似涂复固定有机相, 添加相同离子对试剂, 分离了氨基醇类药物, 如麻黄碱、去甲麻黄碱、伪麻黄碱及非尼拉多等光学异构体, 并比较了其结构与立体选择性的关系. 日本药学家 Dobashi^[94]据 Bowman 的原理, 发展了 Pettersson 的方法, 提出以 (R, R)-*N, N'*-二异丙基酒石酸酰胺 (DIPTA) 为手性试剂 (CMPA II, 图 12.18) 添加到有机流动相(硅胶柱为固定相), 认为 DIPTA 具有弹性 (—OH) 与刚性 (NH) 两种与手性溶质相作用的位置, 因而具有广泛适应性; 可与多种类型化合物发生氢键缔合, 有效地传递手性环境予对映体. Dobashi 还对它们的 *N*-及 *O*-取代烷基大小对对映体选择性影响作了详细研究; 结果表明, 如增大 *N*-烷基- β -羟羧酰胺, 或 *N*-酰基氨基酸酰胺, 或酯的 *N*-及 *O*-取代烷基, 则其 α 值随之增大; β -羟基羧酸衍生物的分离度以 α 位不对称中心者优于 β 位; 无环 1, 2-二醇类可通过二个 —OH 基与 DIPTA 成氢键缔合, 可成功地用于如阿托品-2- β -萘酚等化合物之拆分, CMPA II 还为新的 CSP 发展提供基础.

4. 二性配对色谱 (zwitterion-pair-chromatography) 由 Knox^[95]等提出, 他们以长链氨基酸 (如 1, 1-氨基十一烷酸)

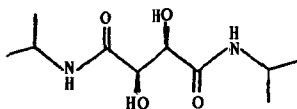


图12.18 酒石酸衍生物
为手性剂 (CMPA II)

为手性的两性配对剂，分离两性化合物，如核苷酸、辅酶和药物。他们以亮氨三肽成功地拆分了色氨酸和甘酰苯丙氨酸对映体 (C₁₈柱，流动相为 H₂O/CH₃OH)，称生成的络合物为“四极离子对” (quadrupolar ion pair, OIP)，认为本法有发展希望。

§ 12.2.3 环型葡聚糖 (CD) 添加法

含有 6~12 葡萄糖单元，以 α (1.4) 连接而成的手性环糊精类化合物 (cyclodextrins, CD) 的结构特征，使它们具有重要的色谱应用价值，早已用于经典柱色谱法^[96]。通常将 CD 分子视为锥形筒体，筒腔内部呈相对疏水性，可容纳较低极性的分子或基团 (也称“客体”) “寓居”，筒口则由于 CD 分子的 α -OH 基呈顺时针向排列，可与客体的极性部分成氢键缔合，客体-受体形成所谓包埋络合物 (inclusion complexes)，因而具有良好的手性识别特征^[97,98]，并可据溶质的结构特征分别选用 CD 的同系物 (α , β , γ)。作为手性 CD 流动相，由波兰学者 Debowski 等^[97]先作报道，用以拆分扁桃酸的对映体。他们选择了各种不同性质及不同取代位置的扁桃酸衍生物 (如 *o*, *m*, 及 *p*-OH, *o*-CH₃, *o*-OCH₃, *o* 及 *m*-Cl 等)，研究了包埋络合物结构与对映异构体选择性的关系，发现扁桃酸-Cl 衍生物与 β -CD 所形成的络合物具有很高的对映体选择性 ($\alpha=1.8$)；反之， α -CD 与扁桃酸及其衍生物的络合物的选择性较低。Nobuhara^[100]测以新型退热药 1-[2-(3-hydroxyphenyl)-1-phenylethyl]-4-(3-methyl-2-butenyl)piperazine 为“客体”，研究了最佳流动相组成，认为 CD 的溶解度在 CH₃OH/CH₃CN 缓冲液的流动相中不

如 EtOH/缓冲液 (pH 6.2) 好, 发现添加二乙胺对峰形改善有良好效果。

Gazdag 等^[101]用 γ -CD 详细观察了添加剂浓度、流动相不同组成及不同厂商牌号的 C₁₈ 柱对 D, L-乙基炔诺酮拆分的影响, 分离效果良好。Sybilska^[102]等以 β -CD 对甲基苯妥因酮及手性巴比妥类药物如美芬妥因 (mephentoin)、西可巴土妥 (secobarbital)、甲基苯巴比妥、戊巴比妥、硫 (渍) 妥及巴锁巴比妥 (hexobarbital) 等, 作反相 HPLC 拆分研究。他们认为, 手性分子上含羰基 (羟基) 或其它极性基团如 $-\text{NH}_2$, 可与 β -CD 的仲 $-\text{OH}$ 基形成氢键, 其立体选择性显著提高; 苯基进入 CD 腔内, 由此也验证了 Dagliesh “三点手性识别理论”。

§ 12.2.4 其它手性流动相添加剂

除上述各类手性试剂以外, 还有一些值得介绍的研究报道, 如 Szepesi 等^[103]提出以 di (2-ethylhexyl) phosphoric acid 或 d-camphor-10-sulphonic acid 作为阴离子型络合添加剂, 用于非离子型 (不荷电子) 手性化合物的分析, 由极性键合型固定相 (如 $-\text{CN}$ 键合硅胶)、低极性有机流动相 (如正己烷/异丙醇添加上述阴离子型络合剂), 组成所谓动态离子交换系统, 并以该系统对伊布宁 (eburnane) 族生物碱 (占 17 种) 及几乎所有主要麦角生物碱 (16 种), 作了大量的比较研究: 如流动相组成与分离度的关系及分配机理等, 认为电中性的生物碱与离子交换剂间的分子络合作用 (molecular complexation) 制约着保留值的变化, 在流动相中形成比游离的中性生物碱极性稍大的络合物。本法对

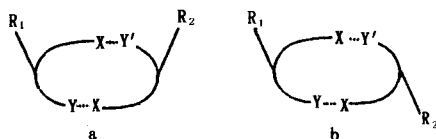


图12.19 氢键分子缔合的非对映异构结构

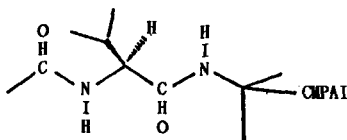


图12.20 N-Ac-L-Val-t-丁基酰胺氢键缔合手性剂

天然的光学异构研究颇有价值。

目前还有一些不同于配基交换络合原理的手性氨基酸衍生物用于CMP，如Dobashi等^[104]基于两个氨基酸衍生物的聚集作用形成分子内氢键的分子缔合为手性识别原理（见图12.19），将N-acetyl-L-valine-tertbutylamide（CMPA I，见图12.20）添加于氯仿/正己烷中，在硅胶柱上拆分各种氨基酸。

研究还表明，将样品制备成硝基苄酰烷基酯衍生物（DNB-AA-alkylester）则显著改善其拆分效果。

§ 12.3 手性固定相拆分法

如把手性化合物键合到固定相表面，样品中的对映体由于与键合的手性分子形成非对映异构体络合物的结合能力的差别达到拆分的目的。这样的固定相被称为手性固定相（chiral stationary phase, CSP）^[105,106]。由手性固定相液相色谱分离测定对映体已成为对映体分离发展最迅速的领域，表12.6给出的是一些商品化的手性固定相。这些商品化的手性固定相可分为：

1. 蛋白质手性亲和固定相（如血清白蛋白， α -酸性糖蛋白，卵类粘朊和胰凝乳朊酶）；
2. 具有立体选择性作用的螺旋型手性高聚物固定相（如衍生化或自由型多聚糖）；
3. 具有 π -电子给予体与 π -电子受体立体作用的手性芳香酰胺类固定相（Pirkle型）；
4. 在手性空穴内发生客体-受体相互作用的固定相（如环糊精、冠醚和分子刻印高聚物等）；
5. 配体交换型固定相（如 Cu^{2+} 与手性试剂形成的络合物等）。

手性固定相液相色谱法拆分手性对映体保留了液相色谱技术的所有优点，是今后手性对映体分离主要的发展方向。

表12.6 各类手性固定相的手性成分与商品名称

手性化合物 ¹⁾	CSP 分类	商品名称	厂商 ²⁾
(R)-DNB-苯甘氨酸(离子键合)	CSP-IC	Pirkle type 1A	R
		Sumipax OA-2000	ST
		Bakerbond chiral ionic DNBPG	B
(R)-DNB-苯甘氨酸(共价键合)	CSP-1C	Covalent D-phenyl glycine	R
		Chiral DNBPG-C= silopolyol	SE
		Sumipax OA-2000 A	ST
		Baker bond chiral covalent DNBPG	B
(S)-DNB-苯甘氨酸(共价)	CSP-1C	Covalent L-Phenyl glycine	R
(R,S)-DNB-苯甘氨酸(共价)	CSP-1	Covalent D,L-phenyl glycine	R
(S)-DNB-亮氨酸(离子)	CSP-1C	Ionic L-leucine	R
(S)-DNB-亮氨酸(共价)	CSP-1C	Covalent L-leucine	R
		Chiral DNBLL-C= silopolyol	SE
		Bakerbond chiral covalent DNB Leu	B
(R)-DNB-亮氨酸(共价)	CSP-1C	Chiral DNBDL-C= silopolyol	R
D-萘基丙氨酸	CSP-1D	D-Naphthylalanine	R
L-萘基丙氨酸	CSP-1D	L-Naphthylalanine	R
α -萘乙酰胺	CSP-1D	Sumipax OA-1000	ST
		Sumipax OA-1000A	
(R)-(+)-萘基乙基胺	CSP-1D		Y,SE
氯化苯基异戊酰苯甘氨酸		Sumipax OA-2100	ST
菊酰胺苯甘氨酸	CSP-E	Sumipax OA-2200	ST
特戊基氨基酰缬氨酸	CSP-1E	Sumipax OA-3000	ST
(S),(S)- α -萘乙基胺酰缬氨酸	CSP-1F	Sumipax OA-4000	ST

续表

手性化合物 ¹⁾	CSP 分类	商品名称	厂商 ²⁾
(R),(R)- α -萘乙基苯酰缬氨酸	CSP-1F	Sumipax OA-4100	ST
(R)- α -甲基苄基脒	CSP-1F	Supelcosil LC-(R)urea	SU
β -环状葡聚糖	CSP-III	Chiral B DEX = Siloopolyol	SE A
γ -环状葡聚糖	CSP-III	Cyclobond I	A
羟脯氨酸-Cu ²⁺	CSP-II	Chiral hypro cu = siloopoluol	SE
脯氨酸-Cu ²⁺	CSP-II	Nucleosil chiral- I	M
		Achiral pro Cu = siloopolyol	SE
		Chirapak WH	SE
缬氨酸-Cu ²⁺	CSP-II	Chiral val Cu = siloopolyol	SE
氨基酸-Cu ²⁺	CSP-II	Chiralpak WM	D,B
α -酸性糖蛋白	CSP-IV	Enantio Pac	L
牛血清球蛋白	CSP-IV	Resolvosil	M,AN
纤维素三乙酸酯	CSP-V	Cellulose CEL-AC-40 XF	M
		Chiralcel OA	D,B
纤维素三苯甲酸酯	CSP-V	Chiralcel OB	D,B
纤维素三苄基氨基甲酸酯	CSP-V	Chiralcel OC	D,B
纤维素三苄基醚	CSP-V	Chiralcel OE	D
纤维素三肉桂酸酯	CSP-V	Chiralcel OK	D,B
微晶纤维三乙酸酯	CSP-V		
聚三苯甲基丙烯酸酯	CSP-V	Chiralpak OT(+)	D,B
聚三吡啶基二苯甲基丙烯酸酯	CSP-V	Chiralpak OP(+)	D

1) DNB=3, 5-二硝基苯酰基;

2) A = Advanced Separations Technologies, Inc, USA; AN = Anspec Co Inc. USA; B=J. T Baker Chemical Co, USA; D=Daicel (Europa) Gmb H, FRG; E=E. Merck, FRG; L=LKB, Sweden; M=Mechery Nagel and Co, USA; R=Regis Chemical Co, USA; SE=Serva, FRG; ST=Sumitomo, Japan; Su=Supelco Inc, USA; Y=YMC Inc, USA.

§ 12.3.1 蛋白质手性固定相

将蛋白质键合到硅胶或其它基质上的手性固定相是一类很有发展前途的手性固定相。许多小的手性分子与血清白蛋白、 α -酸性糖蛋白等具有立体选择性的亲和力。在选用这一类手性固定相分离手性对映体时，其流动相在绝大多数情况下是含有低浓度的有机溶剂的缓冲液。当蛋白质手性固定相的柱效很好时，与蛋白质的亲和力差别很小的对映体都可得到良好的分离。蛋白质手性固定相色谱的另一优点是在键合蛋白质保持其原有的结合能力和流动相不影响其手性作用性质时，通过色谱参数的测定可以推断蛋白质与药物相互作用的信息。

1. 血清蛋白固定相

血清白蛋白是血液中最丰富的蛋白质，它被认为是非特异性的结合体和运输体。与血清蛋白结合的化合物的生物兼容性比自

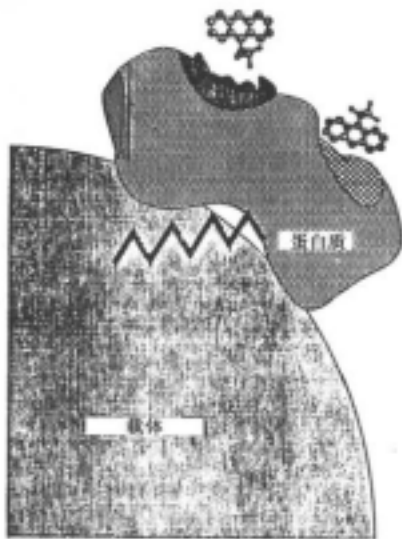


图 12.21 两个对映体分子与键合在固定相表面的蛋白质发生作用的示意图

由分子大，因为前者不易被代谢和排泄。因此药物与血液中蛋白的立体选择性结合对药物功效的发挥是至关重要的，这一立体性作用有可能采用键合蛋白固定相手性对映体的分离来获得。将血液白蛋白键合到硅胶表面需要精细的化学合成步骤、适当的臂键和固定化试剂^[107~111]。图12.21是固定相表面键合蛋白质的示意图，在蛋白质中又可能存在一个以上可用于手性分离的手性活

表12.7 血清白蛋白键合手性固定相色谱分离药物的情况

药 物	来 源	参考文献
Alfuzosin	人血清	[112]
Betamethasone	血清,尿	[113]
Chlorpheniramine	鼠血清	[114]
5,6 - Dihydro - 4 - [(2 - methylpropyl) amino] - 4 H - thieno[2,3 - b]thiopyran - 2 - sulfonamide - 7,7 - dioxide	人血	[115]
Disopyramide, mono - N - desisopropylidisopyramide	人血清,尿	[116]
Flurbiprofen	人血清	[117]
Hexobarbital	鼠血清	[118]
Ketamine and its major metabolite, norketamine	血清	[119]
Ketoprofen, ibuprofen, fenoprofen, 2 - arylpropionic acid (profens)	血清	[120] [121]
Leuconorin, 5 - methyltetrahydrofolate	血清	[122~124]
Ofloxacin	生物液	[125]
Oxazepam, hemisuccinate(OXH)	— a	[126]
Oxazepam, lorazepam, hemisuccinic derivatives, benzodiazepin, hemisuccinate derivatives	— a	[127]
1,4 - Benzodiazepines	— a	[128]
D, L - Thyronine, D, L - tryprophan, D, L - phenylalanine, D, L - warfarin	药丸	[128]
Warfarin	血清	[129]

a. 一般性应用.

性点. 表12.7列出的是利用血清蛋白手性固定相拆分的一些手性对映体. 已有许多文献报道利用这一手性固定相液相色谱研究药物-蛋白质的相互作用^[109,126,128]. 例如, warfarin 和 diazepam 在血清白蛋白上具有二个作用活性点, Domenici 等人^[128]研究了在人血清白蛋白上 benzodiazepine 和 warfarine 立体选择性作用的差别, 结果表明硅胶键合的血清白蛋白手性固定相色谱可以测定这些药物蛋白质的活性点间的作用. 同时, 这一类手性固定相也被用于 benzodiazepine 或 warfarine 类手性对映体的分离测定. 2-芳香基丙酸衍生物是常用的消炎药物, 这一类化合物的对映体也可在血清白蛋白手性固定相上得到很好的分离^[117,120,121]. 这一类化合物同时还给予我们一个有意义的立体选择性代谢作用的例子. 对映体在体内进行无方向性的立体化学转换, 即 R(-) 构型对映体通过酶催化机理转变成具有活性的 S(+) 构型对映体. 因此 R(-) 构型对映体应是 S(+) 构型对映体的前药物, S(+) 和 S(-) 构型的混合物可以作为药物服用.

2. α -酸性糖蛋白

血液中的 α -酸性糖蛋白浓度比人血清白蛋白要低很多, 因此 α -酸性糖蛋白的结合容量也较低. 但一些碱性化合物对 α -酸性糖蛋白有很强的亲和力, 碱性化合物与 α -酸性糖蛋白结合的立体选择性对碱性化合物的药物代谢动力学行为又可能产生重要影响. 至今尚未完全搞清 α -酸性糖蛋白上的结合点的性质. 可以预见利用色谱参数研究结合过程将对蛋白质手性认知机理的了解产生很大的帮助^[131~133]. 用 α -酸性糖蛋白手性固定相分离手性化合物在医药分析中得到很广泛的应用, 但这一手性固定相的拆分机理只有在蛋白质的结构完全搞清楚后才有可能被了解. 表12.8是 α -酸性糖蛋白手性固定相拆分手性药物的应用实例^[133~135]. 其中 disopyramide 和 ketamine 是碱性药物^[143~145]. (+)-ketamine 具有安眠和止痛的功效, 而(-)-ketamine 却对中枢神经系统具有刺激功能的副作用. 另一个例子是安眠药和止痛药 hexobarbital 的对映体分析对其立体选择性代谢过程的了解. 只

有(S)构型对映体表现出抗抑郁功效。这一药物在体内的清除主要通过氧化代谢过程,例如在肝脏内的立体选择性氧化而实现。因此,血清水平和药物功效的差别可主要归结为它们的代谢过程的差别。在血清白蛋白手性柱上可以获得分离的2-芳香基丙酸类衍生物也可在 α -酸性糖蛋白上获得有效分离^[133~135],同时 α -酸性糖蛋白柱还被用于ketoprofen, ibuprofen和fenoprofen立体选择性药代动力学过程的研究^[135]。

表 12.8 α -酸性糖蛋白手性固定相用于拆分手性药物

药 物	来源	参考文献
2-Arylpropionic acids, ketoprofen, ibuprofen, fenoprofen	血清	[133]
Flrubiprofen	人血清	[134]
Ibuprofen, metabolic intermediate, ibuprofenyl-CoA	鼠肝脏	[135]
Alfuzosin	人血清	[136]
Aminoglutethimide, acetylated metabolite	— a	[137]
Antiplatelet, [α , α]-bis [3-(N, N-diethylcarbamoyl) piperidino]-p-xylene dihydrobromide	— a	[138]
Betamethasone, betamethasone phosphate ester	血清	[139]
Chlorquine, desethylchlorquine	血清和尿	[140]
Hydroxychloroquine, metabolites	生物体液	[141]
Dihydropyridines with amine, acid and hydroxyl groups	— a	[142]
Disopyramide	人血清	[143]
Disopyramide, mono-N-desisopropyl-disopyramide	人血清	[144]
Disopyramide	血清	[145]
Hexobarbital	鼠血清	[146]
Ketamine, norketamine	血清	[147]
Oxamniquine	肝脏处理液	[148]
Salbutamol	人血清	[149]
Verapamil, norverapamil	— a	[150]
Verapamil	血清	[151]
Tazifylline, ranolazine, sotalol	— a	[152]
Oxyphenonium	— a	[153]

a. 一般性应用。

3. 卵类粘朊和胰凝乳朊酶

另一类比较有前景的手性亲和固定相是把卵类粘朊键合到硅胶上,这一固定相已被证明对一些药物的分离非常有效,此外胰凝乳朊酶手性固定相对一些特定的手性底物具有良好的分离效果.表12.9列出的是这两种手性固定相在拆分手性对映体药物中的应用^[154~160].也有人把卵类粘朊键合到有机高聚物基质上^[155].类卵粘朊手性固定相的应用使得有可能进行某些药物学研究.例如,采用类卵粘朊手性固定相液相色谱法研究(±)-氯苯丙胺与鼠血清蛋白结合的选择性和药物代谢动力学参数(血清水平,清理速率)^[154],研究结果表明药物代谢动力学参数的立体选择性可能来源于药物与血清蛋白结合能力的差别.另一例子是采用类卵粘朊柱分析(S),(R)-terfenadine,证明在鼠体内(R)构型对映体更容易被氧化^[156].有人还研究了冲洗剂pH值,离子浓度和有机溶剂对propranolol和酯化衍生物内消旋物的流出顺序的影响^[157],结果表明在一些情况下,(R),(S)构型对映体的流动顺序发生倒位,这可能归结于蛋白质内至少有两个手性结合活性点或蛋白质上手性活性点部分构型发生变化所致.

表12.9 卵类粘朊和胰凝乳朊酶手性固定相用于
药物对映体的拆分

药	物	来源	参考文献
Chlorpheniramine		鼠血清	[154]
Chlorprenaline		血清	[155]
Terfenadine		鼠血清	[156]
Verapamil,metabolites		血清	[157]
Propranolol (PP) and its O-acetyl,-propionyl,-butanoyl and valeryl ester derivatives		— a	[158]
Dipeptides		— a	[159]
N- α -Aspartyl-phenylalanine-1-methyl ester		— a	[160]

a. 一般性应用.

Wainer 等人^[159,160]发展了胰凝乳蛋白酶键合手性固定相, 这一手性固定相被用于 D, D-和 L, L-构型的二肽对映体及 D, D-/L, L-与 L, D-/D, L-构型二肽非对映异构体的拆分. 研究表明二肽与胰凝乳蛋白酶的酶活性点或其它疏水性活性点发生结合. 另一个探索二肽与固定化胰凝乳蛋白酶的结合认为二肽对映体在固定相上的立体选择性主要源自两个结合点上结合亲和力的差异, 而不是在一个活性点上结合力的差异^[160].

§ 12.3.2 聚合碳水化合物衍生物手性固定相

聚合碳水化合物, 如纤维和淀粉是含有 D-葡萄糖, 通过葡萄糖的 1, 4-糖苷键形成的具有高度有序螺旋结构的高聚物. 葡萄糖中三个羟基可以被衍生化而围绕手性葡萄糖形成链状结构. 衍生化的葡萄糖单元可以作为手性活性点用于拆分手性对映体. 有些手性拆分可以在天然的纤维素上完成, 但固定化的纤维素具有更好的拆分效果^[161,162]. 葡萄糖的乙酸酯、苯甲酸酯的氨基甲酸苯酯衍生物具有较好性能. 所使用的流动相通常是正相色谱用的有机溶液, 在有些情况下含水有机溶液也可用于对映体的拆分. 图12.22 是葡萄糖与二甲基氨基苯甲酸酯衍生物的结构图. 这一结构通过在手性活性点酰胺基连接的芳香基团提供 π - π 相互作用. Wainer 等人^[163]考察了芳香醇在纤维素三苯甲酸酯衍生物固定相上的保留行为, 认为芳香基团的插入和氢键增强了对映体在手性空穴中的稳定性, 空穴中的立体匹配性能直接影响对映体的拆分效果. Aboul-Einen 和 Islam^[164]总结了药物内消旋体分子结构对在几种纤维素衍生物手性固定相上拆分效果的影响. 表 12.10 列出的是一些药物在这一类手性固定相的拆分情况^[165~182]. 纤维素类手性固定相高效率拆分对映体的实例之一是 metoprolol 的拆分^[179~182], 利用荧光检测的高灵敏度分离测定 metoprolol 对映体的方法已被建立, 并用于非常低浓度下 metoprolol 的药物动力学参数的研究. 另一应用例子是对映体 SK F 96365 [1 - (β - [3 - (*p*-methoxyphenyl-propyloxy)] -*p*-

methoxyphenethyl)] - IH-inidazole hydrochloride) 与蛋白质立体选择性结合的研究^[170]。

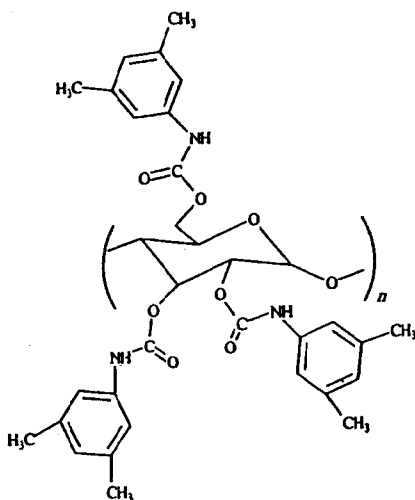


图12.22 三(3,5-二甲基苯胺甲酸酯)
淀粉的分子结构

表 12.10 纤维素衍生物手性固定相用于药物对映体的拆分

药	物	来源	参考文献
(<i>p</i> -Hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin(<i>p</i> -HPPH)		— a	[165]
Amides		— a	[166]
Benzodiazepinone derivative		— a	[167]
<i>N</i> -Isopropyl-3-aryloxy-2-hydroxypropylamine, beta-blockers		— a	[168]
Betaxolol		肝脏悬浮液	[169]
Calcium channel blocker		Calmodulin solution	[170]
Celiprolol		人血清,尿	[171]
Disopyramide, mono- <i>N</i> -dealkyldisopyramide		血清,尿	[172]
Relodipine, dihydropyridine calcium entry blockers		人血清	[173]
Glutethimide, 4-hydroxyglutethimide metabolites		— a	[174]

续表

药 物	来源	参考文献
Glycidyl tosylate	— a	[175]
Halazepam	Rat liver microsomes	[176]
Ifosfamide, cyclophosphamide, trofosfamide	血清	[177]
Isopropyl-5- <i>p</i> -toluenesulfonyloxy-methyloxazolidin-2-one	合成物	[178]
Metoprolol	人血清	[179]
Metoprolol, its α -hydroxy metabolite	人血清, 尿	[180]
Metoprolol	血清	[181]
Metoprolol	血清	[182]
Propafenone, diprafenone, thier major metabolites	— a	[183]
Propranolol	血清	[184]
Prostaglandin precursors, prostaglandins	— a	[185]
<i>sec</i> [4-(6-Methoxy-2-benzoxazolyl)]phenethyl alcohol	— a	[186]
Timolol	— a	[187]
Verapamil, its major metabolite norverapamil, gallopamil	血清	[188]
Zopiclone	血清	[189]

a. 一般性应用.

§ 12.3.3 空穴型手性固定相

手性固定相拆分对映体的另一途径是将手性空穴键合到固定相表面, 由此产生的客体-受体间的相互作用决定对映体的拆分效果. 因此, 在这类固定相拆分对映体时, 首先要考虑的是被分离的对映体分子与手性空穴的匹配性. 这一类固定相中键合的手性空穴包括冠醚、分子刻印高聚物和环糊精. 最为常用的则是环糊精手性固定相.

环糊精是由 6~8 个葡萄糖连接而成的锥形筒体. 在圆锥型筒体内由亚甲基和 1, 4-糖苷键形成一个相对疏水性的手性空穴. 锥形筒体的外部则是由羟基环绕的亲水性表面. 环糊精手性

固定相液相色谱拆分对映体时，常用的流动相是水与有机溶剂的混合物，但正相色谱的有机溶剂也可作为流动相。当采用含水溶液作为流动相时，环糊精手性固定相的分离机理主要基于包含型

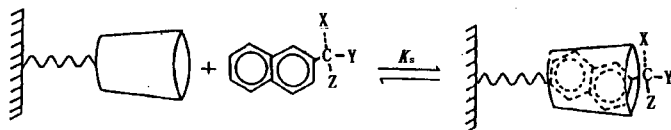


图12.23 环糊精手性固定相的包含络合作用

络合过程，图12.23 是这一过程的示意图。这一机理表示分子的非极性部分被吸引到非极性空穴中。当被分离的分子存在芳香基团时，由于芳香基团与糖苷键上氧原子的作用产生立体选择的趋向，而线性或无环的烷烃以随机方式占据环糊精的空穴。因此要在反相模式下分离对映体，对映体分子至少要有一个芳香基团，在锥形筒体环沿上高密度的羟基可与被分离的化合物产生氢键。因此溶质中的氨基和羰基可与这些羟基产生很强的氢键作用，这一作用与溶质的 pK_a 和流动相中的 pH 值有很大的关系。表12.11 列出的是环糊精手性固定相用于药物对映体拆分的实例，Casy 等

表12.11 环糊精手性固定相用于药物对映体的拆分

药	物	来源	参考文献
Anti-inflammatory agent		鼠血清	[190]
Cyclic and linear dipeptides		— a	[191]
Dipeptides and modified amino acids		— a	[192]
Glutamate		大肠杆菌液	[193]
Ibuprofen and its major metabolites		血清，尿，胆汁	[194]
Quinone methides adducts		— a	[195]
Rotenoids and the hydroxy analogs		— a	[196]

a. 一般性应用。

人^[197]研究了环糊精手性流动相和手性固定相液相色谱中手性拆分机理，由色谱参数和二维核磁共振得到的手性作用参数并不相符。这一结果表明在液相色谱系统中，手性拆分过程并不完全由包含络合作用所决定。值得注意的是将糊精衍生化，如将 2-羟基的甲基或乙酰化，对较低极性的对映体的拆分效果有显著提高。

§ 12.3.4 π 电子给予体、 π 电子受体型手性固定相 (Pirkle 型)

这一类固定相是把具有手性活性的单链分子通过酰胺键连接到丙胺硅胶基质上所生成的手性固定相，图 12.24 是两种此类固定相的分子结构图。在这一类固定相中，固定化的手性基团包含有 π 电子给予或受体的芳香基团以及氢键的偶极叠合 (dipole stacking) 的基团。由于 Pirkle 对这一类手性固定相的创立和发展作出非常重要的贡献^[198~200]，因此也以 Pirkle 命名这一类固定相。在这类手性固定相发展的初期，选用的手性试剂是具有 π 电子给予能力的苄基胺基酸衍生物，然后又变换到二硝基苯甲酰苯基氨基酸的衍生物作为 π 电子受体的手性固定相试剂。这两种

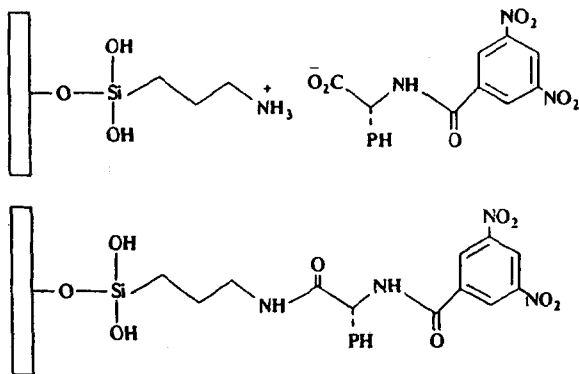


图 12.24 两种最常用的 Pirkle 型手性固定相的分子结构，离子型键合和共价键合到丙胺硅胶的 N-3, 5-二硝基苯甲酰苯基甘氨酸

固定相分离对映体的成功标志手性固定相液相色谱的开端^[202,203]。Pirkle 等人^[201~203]广泛研究了这一类手性固定相拆分对映体的机理，Alembik^[204]和 Krull^[205]也研究了二硝基苯甲酰苯基类手性固定相分离对映体的立体选择性。由于二硝基苯甲酰苯基手性固定相是 π 电子受体型的固定相，因此被拆分的对映体应具有 π 电子给予基团如烷基、醚基或氨基取代的芳香环，同时溶质还应有形成氢键或与手性固定相上的酰胺基发生偶极叠合作用的基团。

表12.12 Pirkle 型手性固定相拆分手性对映体

药	物	来源	参考文献
Alanine		生物组织和液体	[206]
Albendazole sulfoxide		血清	[207]
Alkylarylcarbinols		— a	[208]
Amino acid derivatives		— a	[209]
Beta-blockers		— a	[210]
Benz [α] anthracene and derivatives		— a	[211]
Dimethylbenz [α] anthracene and dihydrodiol derivatives		— a	[212]
Diol and monool of phenanthrene, benz [α] anthracene, and chrysene		— a	[213]
Diol enantiomers of chrysene		鼠肝脏染色体	[214]
Glutamates		大肠杆菌	[215]
Methylcholanthrene derivatives		鼠肝脏染色体	[216, 217]
Epoxide and dihydrodiol of dibenzanthracene		鼠肝脏染色体	[218]
Oxazepam and derivatives		鼠肝脏染色体	[219]
Ibuprofen amides		— a	[220]
Ibuprofen derivatives		尿成分	[221]
2-Naphthoyl derivatives of mexiletine		血清, 尿	[222]
Dipeptides and modified amino acids		— a	[223]
Rotenoids and the hydroxy analogs		— a	[224]
Psychotropic compounds		— a	[225]
Abscisic acid and metabolites		植物组织	[226]
Phenylpropanolamine		血清	[227]
Diaclyglycerols		玉米油等	[228]

a. 一般性应用.

表12.12 列出的是这一类手性固定相拆分手性对映体的情况。这一类手性固定相的应用例子之一是药物 oxazepam 和衍生物的代谢过程的立体选择性研究^[219]。Yang 和 Lu 测定了鼠染色体和鼠脑匀浆中酯酶水解 oxazepam 内消旋体和 3-O-acyl oxazepam 速率的差别, 结果表明两种组织中水解速率是不同的。(R) 构型对映体在鼠肝脏染色体中的水解速率比在脑匀浆中的高, 而 (S) 构型对映体却在脑匀浆中的水解速率较高。

环境致癌物, 如苯并芘、菲、苯并蒽和(蒽)的毒性与它们在体内的立体选择性转换过程相关。这些化合物首先被转化成二醇类对映体, 然后进一步立体选择性地环氧化。Yang 等人^[211~214, 216~219]也利用这一类 Pirkle 型柱广泛地研究了这类致癌物在鼠肝脏上染色体中的代谢过程。

§ 12.3.5 配基交换手性固定相

这一类手性固定相拆分对映体与手性配体流动相的拆分机理相同, 只是手性配体键合到固定相基质成为手性固定相而已。其配体分子亦为具有手性活性的氨基酸如脯氨酸, 金属离子多用 Cu^{2+} 。Cübitz 等人^[229]以 3-脱水葡萄糖氧丙基将 L-脯氨酸键合到硅胶上, 再经硫酸铜处理成为配基交换型的手性固定相, 其分子结构如图12.25 所示。Davankov 等人^[230]曾将络合着手性氨基酸(酸基)的聚苯乙烯键合于硅胶表面上, 并用于天门冬酸、谷氨酸及组氨酸等多种氨基酸的拆分制备, 效果良好。迄今研究表明, 溶质分子中在适当位置上具有两个极性基团时, 它们可同时作为 Cu^{2+} 的配基。因此这一类手性固定相大多可用于氨基酸或肽类的拆分。这类手性固定相液相色谱多用含水流动相, 并加入适量螯合的金属离子或配基化合物, 以防固定相的流失。对于脂肪氨基化合物, 因其保留和手性均较弱, 亦见报道使用非水流动相^[231], 如正己烷/醇类混合物, 添加适量的氨对改善分离度和峰形均有明显效果。

随着人们对手性化合物在医学工业和人体代谢方面重要性的

了解，手性对映体的分离分析将会越来越重要。近几年来灵敏的液相色谱直接拆分和制备对映体已被广泛地应用，这一方法具有很大的优越性。种类繁多的手性固定相的出现将进一步促进手性液相色谱法在医学工业和临床医学中的应用。但迄今，有关手性对映体的拆分机理仍不很清楚，因此对于特定的手性对映体的液相色谱的分离柱系统选择和条件优化都通过系统的实验摸索得到。可以预见将会有更多的研究工作用于了解手性认知的机理和手性液相色谱的拆分机理。

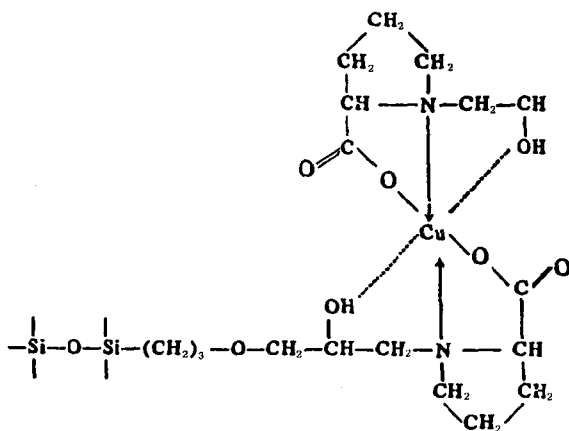


图12.25 L-脯氨酸配基交换手性固定相的分子结构

参考文献

- [1] S. Allenmark, *Chiral Liquid Chromatography in Chromatographic Enantioseparation*, Ellis Horwood Series in Analytical chemistry, Chichester, 2nd Ed., 1991.
- [2] S. Ahuja, *Selectivity and Detectability Optimization in HPLC*, John Wiley and Sons, New York, p. 395.
- [3] V. A. Davankov, *Adv. Chromatogr.*, **22**, 71 (1983).
- [4] 吕湘林、杨宪桂, *药学报*, **22**, 790 (1987).
- [5] T. D. Doyle, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 455 (1986).
- [6] S. Silker and S. Riegelman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **215**, 643 (1986).

- [7] I. S. Krull, *Adv. Chromatogr.*, **16**, 146 (1977).
- [8] T. Kinoshita, et al, *J. Chromatogr.*, **210**, 77 (1981).
- [9] N. Nimura and T. Kinoshita, *ibid.*, **316**, 547 (1984).
- [10] J. Gal, *ibid.*, **314**, 275 (1984).
- [11] T. Nambara, et al, *Anal. Chim. Acta.*, **101**, 111 (1978).
- [12] K., Miller, *J. Chromatogr.*, **307**, 335 (1984).
- [13] J. Gal, *ibid.*, **307**, 220 (1984).
- [14] O. I. Neobumi, et al, *ibid.*, **265**, 117 (1983).
- [15] N. Nimura and T. Kinoshita, *ibid.*, **213**, 7 (1981).
- [16] J. Gal, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 673 (1986).
- [17] A. J. Sedman, *J. Chromatogr.*, **279**, 199 (1983).
- [18] M. J. Wilson, *ibid.*, **310**, 424 (1984).
- [19] A. Darmon and J. P. Thenot, *ibid.*, **374**, 321 (1986).
- [20] J. Gal, *ibid.*, **331**, 349 (1985).
- [21] J. Goto, et al, *Anal. Chim. Acta.*, **152**, 413 (1978).
- [22] J. Goto, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 1179 (1979).
- [23] G. Gubitz, et al, *J. Chromatogr.*, **218**, 51 (1981).
- [24] N. Ahufelt, et al, *Acta. Pharm. Sci.*, **19**, 355 (1982).
- [25] I. W. Wainer and T. D. Doyle, *J. Chromatogr.*, **284**, 117 (1984).
- [26] J. Goto, et al, *Anal. Chim. Acta.*, **120**, 187 (1980).
- [27] J. Goto, et al, *J. Chromatogr.*, **239**, 559 (1982).
- [28] J. Goto, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 683 (1986).
- [29] I. W. Wainer and T. D. Doyle, *J. Chromatogr.*, **261**, 123 (1983).
- [30] I. W. Wainer and T. D. Doyle, *ibid.*, **355**, 149 (1986).
- [31] I. W. Wainer and T. D. Doyle, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1162 (1984).
- [32] R. Shimizu, et al, *J. Chromatogr.*, **253**, 101 (1982).
- [33] J. Goto, et al, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4597 (1982).
- [34] J. Goto, *ibid.*, **20**, 809 (1981).
- [35] I. W. Wainer and T. D. Doyle, *J. Chromatogr.*, **268**, 107 (1983).
- [36] I. W. Wainer and T. D. Doyle, *ibid.*, **306**, 405 (1984).
- [37] S. K. Yang, et al, *Anal. Biochem.*, **78**, 520 (1977).
- [38] R. Shimizu, et al, *J. Chromatogr.*, **375**, 119 (1986).
- [39] B. C. Sallustio, et al, *ibid.*, **374**, 329 (1986).
- [40] H. Furukawa, et al, *ibid.*, **136**, 428 (1977).
- [41] S. B. Martin, et al, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 821 (1973).
- [42] J. M. Barksdale, et al, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 176 (1985).

- [43] C. Banfiled and M. Rowland, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1392 (1984).
- [44] R. H. Buck and K. Krummen, *J. Chromatogr.*, **315**, 279 (1984).
- [45] J. Hermansson, *ibid.*, **221**, 109 (1980).
- [46] T. Takaya, et al, *ibid.*, **215**, 279 (1981).
- [47] S. Siber, et al, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **215**, 279 (1980).
- [48] W. Dieterle and J. W. Faigle, *J. Chromatogr.*, **242**, 289 (1982).
- [49] R. Mitchell, et al, *Anal. Chem.*, **50**, 673 (1978).
- [50] T. M. Chen and J. J. Contario, *J. Chromatogr.*, **314**, 495 (1984).
- [51] S. Bjorkman, *ibid.*, **339**, 339 (1985).
- [52] S. Gorog, et al. *ibid.*, **335**, 417 (1986).
- [53] N. Nimura and T. Kinoshita, *ibid.*, **352**, 169 (1986).
- [54] W. H. Pirkle and D. L. Sikkenga, *ibid.*, **123**, 400 (1976).
- [55] W. H. Pirkle, et al. *J. Org. Chem*, **48**, 5022 (1983).
- [56] G. Helmchen and W. Strubert, *Chromatographia.*, **7**, 713 (1974).
- [57] D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 353 (1984).
- [58] W. H. Pirkle and D. M. House, *J. Org. Chem.*, **44**, 1957 (1979).
- [59] M. M. Manning, *J. Biochem.*, **243**, 5591 (1968).
- [60] I. W. Waniner, *J. Chromatogr.*, **202**, 478 (1980).
- [61] M. D. Johnson, et al. *J. Pharm. Sci.* **68**, 112 (1979).
- [62] V. A. Davankov, *Adv. Chromatogr*, **22**, 71 (1983).
- [63] A. Dobashi, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 243 (1986).
- [64] W. Lindner, et al, *Anal. Chem.*, **51**, 433 (1979).
- [65] W. Lindner, *Chemical Derivatives in Analytical Chemistry*, Vol 2, New York, Plenum Press, p. 145, 1982.
- [66] P. E. Hare and A. V. Egil, *Science*, **204**, 1226 (1979).
- [67] E. Oelrich, et al, *J. High. Resol Chromatogr.*, **3**, 269 (1980).
- [68] S. Lam, et al, *J. Chromatogr.*, **199**, 295 (1980).
- [69] S. Lam, et al, *J. Chromatogr.*, **22**, 416 (1984).
- [70] U. Forsman, *J. Chromatogr.*, **303**, 217 (1984).
- [71] C. Gilon, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7612 (1979).
- [72] S. Weinstein, et al. *Anal. Biochem.*, **121**, 370 (1982).
- [73] A. Kurganov and V. A. Davankov, *J. Chromatogr.*, **218**, 559 (1981).
- [74] L. R. Gelber and J. L. Neumeyer, *ibid.*, **257**, 317 (1983).
- [75] W. F. Lindner and I. Hirschbock, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 551 (1986).
- [76] I. Benecke, *J. Chromatogr.*, **291**, 155 (1984).
- [77] R. Horikawa, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 537 (1986).

- [78] S. Lam and A. Karman, *ibid.*, **9**, 291 (1986).
- [79] V. A. Davankov, *J. Chromatogr.*, **218**, 547 (1981).
- [80] S. V. Rogozhin and V. A. Davakov, *Russ. Chem Rev.*, **37**, 565 (1968).
- [81] V. A. Davankov and A. V. Semechkin, *J. Chromatogr.*, **141**, 313 (1977).
- [82] H. Nakazawa and H. Yoneda, *ibid.*, **160**, 89 (1987).
- [83] 邹汉法、张玉奎、卢佩章, 《离子对高效液相色谱法》, 河南科技出版社, p. 211, 1994.
- [84] C. Pettersson and G. Schill, *Chromatographia*, **16**, 192 (1982).
- [85] C. Pettersson, et al, *J. Chromatogr.*, **316**, 553 (1984).
- [86] G. Szepesi, et al, *ibid.*, **241**, 153 (1982).
- [87] G. Szepesi, et al. *ibid.*, **244**, 33 (1982).
- [88] J. Hermansson, *J. Chromatogr. Sci.*, **316**, 537 (1984).
- [89] C. Pettersson and G. Schill, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 269 (1986).
- [90] B. Sebill, et al, *ibid.*, **3**, 299 (1980).
- [91] C. Pettersson and H. W. Stuurman, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 441 (1984).
- [92] V. Prelog, et al, *Helv. Chim. Acta.*, **65**, 377 (1982).
- [93] N. S. Bowman, et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3848 (1968).
- [94] Y. Dobashi, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 243 (1986).
- [95] J. H. Knox and J. Jurand, *J. Chromatogr.*, **218**, 355 (1981).
- [96] J. L. Hoffman, *Anal. Biochem.*, **33**, 209 (1970).
- [97] J. Debowski and D. Sybilski, *J. Chromatogr.*, **237**, 303 (1982).
- [98] J. Debowski and D. Sybilski, *ibid.*, **282**, 83 (1983).
- [99] D. W. Armstrong, *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 895 (1980).
- [100] Y. Nobukarb, et al. *J. Chromatogr.*, **258**, 276 (1983).
- [101] M. Gazdag, et al. *ibid.*, **315**, 128 (1986).
- [102] D. Sybilska, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 591 (1986).
- [103] G. Szepesi, et al. *J. Chromatogr.*, **241**, 153 (1982).
- [104] A. Dobashi et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 243 (1986).
- [105] W. H. Pirkle and J. L. Schreiner, *J. Org. Chem.*, **45**, 4988 (1981).
- [106] Hanfa Zou, Yakui, Zhang, Peochang Lu, *Chinese J. Chemistry*, **9**, 231 (1991).
- [107] S. G. Allenmark, B. Bomgren and H. Boren, *J. Chromatogr.*, **316**, 617 (1984).
- [108] S. Andersson, R. A. Thompson and S. G. Allenmark, *J. Chromatogr.*, **591**, 65 (1992).
- [109] A. Noctor and I. W. Wainer, *Pharm. Res.*, **9**, 480 (1992).
- [110] I. W. Wainer and Y. Q. Chu, *J. Chromatogr.*, **455**, 316 (1988).
- [111] E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, et al, *Chromatographia*, **29**, 170 (1990).

- [112] A. Rouchouse, M. Manoha, A. Durand and J. P. Thenot, *J. Chromatogr.* , **506**, 601 (1990).
- [113] M. C. Petersen, C. B. Collier and J. J. Ashley, et al, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* , **25**, 803(1983).
- [114] E. Sakurai, S. Yamasaki and Y. Iizuka, *J. Chromatogr.* , **44**, 44(1992).
- [115] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer and G. A. Hessey, et al, *J. Chromatogr.* , **526**, 461(1990).
- [116] C. P. Le, D. Gibassier and P. Sado, et al, *J. Chromatogr.* , **450**, 211(1988).
- [117] G. Giesslinger, S. S. Menzel and O. Schuster, et al, *J. Chromatogr.* , **573**, 163 (1992).
- [118] A. M. Vermeulen, M. T. Rosseel and F. M. Belpaire, *J. Chromatogr.* , **567**, 472 (1991).
- [119] G. Geisslinger, S. S. Mezel and H. D. Kamp, et al, *J. Chromatogr.* , **568**, 165 (1991).
- [120] S. S. Menzel, G. Geisslinger and K. Brune, *J. Chromatogr.* , **532**, 295(1990).
- [121] T. A. G. Noctor, G. Felix and I. W. Wainer, *Chromatographia* , **31**, 55(1991).
- [122] S. L. Lin, P. Jadaud and L. R. Whitfield, et al, *J. Chromatogr.* , **532**, 227(1990).
- [123] I. W. Wainer and R. M. Stiffin, *J. Chromatogr.* , **424**, 158(1988).
- [124] K. E. Cboi and R. L. Schilsky, *Anal. Biochem.* , **168**, 398(1988).
- [125] K. H. Lehr and P. Damm, *J. Chromatogr.* , **425**, 153(1988).
- [126] E. Domenici, C. Bertucci and P. Salvadori, et al, *Chirality* , **2**, 263(1990).
- [127] R. Kaliszan T. A. G. Noctor and I. W. Wainer, *Chromatographia* , **33**, 546(1992).
- [128] E. Domenici, D. Bertucci and P. Salvadori, et al, *J. Pharm. Sci.* , **80**, 164(1991).
- [129] L. Dalgaard, I. J. Hansen and J. L. Pederson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **7**, 361 (1989).
- [130] Y. Q. Chu and I. W. Wainer, *Pharm. Res.* , **5**, 680(1988).
- [131] C. Jewell, K. L. Brouwer and P. J. McNamara, *J. Chromatogr.* , **487**, 257(1989).
- [132] E. Arvidsson, S. O. Jansson and Schill, *J. Chromatogr.* , **591**, 55(1992).
- [133] S. S. Menzel, G. Geisslinger and K. Brune, *J. Chromatogr.* , **591**, 55(1992).
- [134] G. Giesslinger, S. S. Menzel, O. Schuster, et al, *J. Chromatogr.* , **573**, 163(1992).
- [135] T. S. Tracy and S. D. Hall, *Anal. Biochem.* , **195**, 24(1991).
- [136] A. Rouchouse, M. Manoha and A. Durand, et al, *J. Chromatogr.* , **506**, 610(1990).
- [137] E. H. Aboul and M. R. Islam, *J. Chromatogr. Sci.* , **26**, 616(1988).
- [138] R. Gollamudi and Z. X. Feng, *Chirality* , **3**, 480(1991).
- [139] M. C. Petersen, C. B. Collier and J. J. Ashley, et al, *J. Clin. Pharmacol.* , **25**, 803 (1983).

- [140] A. D. Ofori, O. Ericsson and B. Lindstrom, *Ther. Drug Monit* , **8**, 457(1986).
- [141] A. J. McLachlan, S. E. Tett and D. J. Cutler, *Chromatographia* , **570**, 119(1991).
- [142] E. Delee, I. Jullien and G. I. Le, *J. Chromatogr.* , **450**, 1991(1988).
- [143] J. Hermansson, M. Eriksson and O. Nyquist, *J. Chromatogr.* , **336**, 321(1984).
- [144] C. P. Le, D. Gilbassier and P. Sado, *J. Chromatogr.* , **450**, 221(1988).
- [145] M. Enquits and J. Hermansson, *J. Chromatogr.* , **494**, 143(1989).
- [146] A. M. Verneulen, M. T. Rossell and F. M. Belpaire, *J. Chromatogr.* , **567**, 472 (1991).
- [147] G. Geisslinger, S. S. Menzel and H. D. Kamp, et al, *J. Chromatogr.* , **568**, 165 (1991).
- [148] T. A. Noctor, A. F. Fell and B. Kaye, *Chirality* , **2**, 269(1990).
- [149] Y. K. Tan and S. J. Soldin, *J. Chromatogr.* , **422**, 187(1987).
- [150] Y. Q. Chu and I. W. Wainer, *J. Chromatogr.* , **497**, 191(1989).
- [151] H. Fieger and G. Blaschke, *J. Chromatogr.* , **575**, 255(1992).
- [152] E. Delee and G. L. Le and I. Julline, et al, *Chromatographia* , **26**, 281(1988).
- [153] B. F. H. Drenth, J. Bosman and K. G. Feitsma, *Chromatographia* , **26**, 281(1988).
- [154] E. Sakurai, S. Yamasaki and Y. Iizuka, et al, *J. Pharm. Pharmacol.* , **44**, 44 (1992).
- [155] T. Miwa, S. Sakashita and H. Ozawa, et al, *J. Chromatogr.* , **566**, 163(1991).
- [156] K. Zamani, D. P. Conner and H. B. Weems, et al. , *Chirality* , **3**, 467(1991).
- [157] Y. Oda, N. Asakawa and T. Kajima, et al, *Pharm. Res.* , **8**, 997(1991).
- [158] J. Haginaka, J. Wakai and K. Takahashi, et al, *Chromatographia* , **29**, 587(1990).
- [159] P. Jadaud and I. W. Wainer, *Chirality* , **2**, 32(1990).
- [160] P. Jadaud and I. W. Wainer, *J. Chromatogr.* , **476**, 165(1989).
- [161] Y. Okamoto, M. Kawashima and K. Hatada, *J. Am. Chem. Soc.* , **106**, 5357 (1984).
- [162] Y. Okamoto and Y. Kaida, *J. High Res. Chromatogr.* , **106**, 5357(1984).
- [163] I. W. Wainer, R. M. Stiffin and T. Shibata, *J. Chromatogr.* , **411**, 139(1988).
- [164] H. Y. Aboul-Einen and M. R. Islam, *J. Liq. Chromatogr.* , **13**, 485(1990).
- [165] S. Eto, H. Noda and A. Noda, *J. Chromatogr.* , **568**, 157(1991).
- [166] I. W. Wainer, M. C. Alembil and E. Smith, *J. Chromatogr.* , **38**, 65(1987).
- [167] A. Katti, P. Erlandsson and R. Dappen, *J. Chromatogr.* , **590**, 127(1992).
- [168] C. B. Ching, B. G. Lim and E. J. Lee, et al. *Chirality* , **4**, 174(1992).
- [169] A. M. Krstulovic, M. H. Rouchet and J. T. Burke, et al, *J. Chromatogr.* , **452**, 477 (1988).
- [170] D. G. Reid, L. K. MacLachlan and S. P. Robinson, *Chirality* , **2**, 229(1990).

- [171] C. Hartmann, D. Krauss and H. Spahn, *J. Chromatogr.*, **496**, 387(1989).
- [172] H. Echizen, K. Ochiai, Y. Kato and K. Chiba, et al, *Clin. Chem.*, **36**, 1300(1990).
- [173] P. A. Soons, M. C. Roosemalen and D. D. Breimer, *J. Chromatogr.*, **528**, 343 (1990).
- [174] E. H. Aboul and M. R. Islam, *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 307(1991).
- [175] C. J. Shaw and D. L. Barton, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 793(1991).
- [176] X. L. Lu and S. K. Yang, *Chirality*, **2**, 1(1990).
- [177] D. Masurel and I. W. Wainer, *J. Chromatogr.*, **490**, 133(1989).
- [178] M. Krstulovic, G. Rossey and J. P. Porziemsky, et al, *J. Chromatogr.*, **411**, 461 (1987).
- [179] R. J. Straka, K. A. Johnson and P. S. Marshal, et al, *J. Chromatogr.*, **530**, 83 (1990).
- [180] K. Balmer, A. Persson and P. O. Lagerstrom. et al, *J. Chromatogr.*, **553**, 391 (1991).
- [181] V. L. Herring, T. L. Bastian and R. L. Lalonde, *J. Chromatogr.*, **567**, 221(1991).
- [182] D. R. Rutledge and C. Garrick, *J. Chromatogr.*, **497**, 181(1989).
- [183] T. Hollenhorst and G. Blaschke, *J. Chromatogr.*, **585**, 329(1991).
- [184] R. J. Straka, R. L. Lalonde and I. W. Wainer, *Pharm. Res.*, **5**, 187(1988).
- [185] L. Miller and C. Weyker, *J. Chromatogr.*, **511**, 97(1990).
- [186] H. Naganuma, J. Kondo and Y. Kawahara, *J. Chromatogr.*, **532**, 65(1990).
- [187] E. H. Aboul and M. R. Islam, *J. Chromatogr.*, **511**, 109(1990).
- [188] H. Fieger and G. Blaschke, *J. Chromatogr.*, **575**, 255(1992).
- [189] C. Fernandez, B. Baune and F. Gimenez, et al, *J. Chromatogr.*, **572**, 195(1991).
- [190] A. M. Krstulovic, J. M. Gianviti and J. T. Burke, et al, *J. Chromatogr.*, **426**, 417 (1988).
- [191] J. France and Z. Konteatis, *J. Chromatogr.*, **543**, 299(1991).
- [192] J. Florance, A. Galdes, Z. Konteatis and Z. Kosarych, et al, *J. Chromatogr.*, **414**, 313(1987).
- [193] J. Ferone, M. H. Hanlon and S. C. Singer, et al, *J. Viol. Chem.*, **261**, 16356 (1986).
- [194] G. Geisslinger, K. Dietzel and D. Loew, et al, *J. Chromatogr.*, **491**, 139(1989).
- [195] M. Sugumaran, S. Saul and V. Semensi., *Lett.*, **252**, 135(1989).
- [196] S. L. Abidi, *J. Chromatogr.*, **404**, 133 (1987).
- [197] A. F. Casy, A. D. Cooper and T. M. Jefferies, et al, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 787 (1991).
- [198] W. H. Pirkle and T. C. Pochapsky, *Adv. Chromatogr.*, **27**, (1987).

- [199] W. H. Pirkle, F. M. Finn, J. L. Schreiner and B. G. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3964 (1981).
- [200] W. H. Pirkle, D. W. House and J. M. Finn, *J. Chromatogr.*, **192**, 143 (1980).
- [201] W. H. Pirkle, D. W. House and J. M. Fing, *J. Chromatogr.*, **192**, 143 (1980).
- [202] W. H. Pirkle, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2**, 173 (1984).
- [203] W. M. Pirkle and R. Dappen, *J. Chromatogr.*, **404**, 107 (1987).
- [204] W. Wainer and M. C. Alenbik, *J. Chromatogr.*, **367**, 59 (1986).
- [205] J. Bourque and I. S. Krull, *J. Chromatogr.*, **537**, 123 (1991).
- [206] O. W. Griffith, E. B. Campbel and W. H. Pirkle, et al, *J. Chromatogr.*, **362**, 345 (1986).
- [207] M. Lienne, M. Carde and R. Rosset, et al, *Chirality.*, **1**, 142 (1989).
- [208] Y. L. Hu and H. Ziffer, *Chirality.*, **3**, 196 (1991).
- [209] G. Kruger, J. Grotzinger and H. Bernde, *J. Chromatogr.*, **397**, 223 (1987).
- [210] W. H. Pirkle and J. A. Burke, *J. Chromatogr.*, **557**, 173 (1991).
- [211] S. K. Yang, M. Mushtaq and P. P. Fu, *J. Chromatogr.*, **371**, 195 (1986).
- [212] S. K. Yang, M. Mushtaq and P. P. Fu, *Chirality*, **2**, 58 (1990).
- [213] H. B. Weems, M. Mushtaq and P. P. Fu, et al, *J. Chromatogr.*, **371**, 211 (1986).
- [214] H. B. Weems, P. P. Fu and S. K. Yang, *Carcinogenesis*, **7**, 1221 (1986).
- [215] R. Ferone, M. H. Hanlon and S. C. Singer, et al, *Escherichia adi J. Bio. Chem.*, **261**, 16356 (1986).
- [216] M. G. Shou and S. K. Yang, *Chirality*, **2**, 141 (1990).
- [217] M. Shou and S. K. Yang, *Carcinogenesis*, **11**, 933 (1990).
- [218] M. Mushtaq, H. B. Weems and S. K. Yang, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 84 (1989).
- [219] S. K. Yang and X. L. Lu, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 789 (1989).
- [220] G. D. Nicoll, *J. Chromatogr.*, **402**, 179 (1987).
- [221] G. D. Nicoll, T. Inaba and B. K. Tang, et al, *J. Chromatogr.*, **428**, 103 (1988).
- [222] K. M. McErlane, L. Igwemezie and C. R. Kerr, *J. Chromatogr.*, **415**, 335 (1987).

- [223] J. Florance, A. Galdes and Z. Konteatis, *J. Chromatogr.*, **414**, 313 (1987).
- [224] S. L. Abidi, *J. Chromatogr.*, **404**, 133 (1987).
- [225] D. F. Smith and W. H. Pirkle, *Psychopharmac. Berl.*, **89**, 392 (1986).
- [226] G. T. Vaughan and B. V. Milborrow, *J. Chromatogr.*, **336**, 221 (1984).
- [227] T. D. Doyle, C. A. Brunner and J. A. Vick, *Biomed. Chromatogr.*, **5**, 43 (1991).
- [228] Y. Itabashi, A. Kukis and L. Marai, et al, *J. Lipid Res.*, **31**, 171 (1990).
- [229] G. Gubitz, et al, *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 701 (1981).
- [230] V. A. Davankov, et al, *J. Chromatogr.*, **261**, 223 (1983).
- [231] H. Takayangi, et al, *J. Chromatogr.*, **356**, 15 (1986).

第十三章 生物大分子的高效 液相色谱分离分析

蛋白质和核酸等物质是生命科学中一类重要的复杂的生物大分子 (biopolymer, biomolecule)。它不仅存在于体内, 而且随着生物技术的迅速发展, 越来越多地在体外通过各种工程的途径被人工制造出来, 造福于人类。无论在揭示生命奥秘的生命科学领域, 还是在求得人类生存和发展的农业、食品和环境等方面都有十分重要意义。以蛋白质为例, 虽然它们的水解产物都不过是 20 几种氨基酸的小分子, 但在人体中的蛋白质分子总计有 10 万余种, 并且极少与其它生物体内的相同。生物分子的复杂性不仅表现在本身的结构 (组成、序列、构象) 上, 而且还表现在这些物质所处的环境往往是各种各样大小分子的混杂体。所以生物大分子的分离纯化是广大生物学、化学和医学工作者十分关心并长期研究开拓的课题。色谱被认为是迄今人类已掌握的对复杂混合物分离能力最强的手段。特别是在液相色谱的条件下, 大都在室温下操作, 所用流动相可以是与生理液相似的具有一定 pH 值、含盐的缓冲水溶液, 有时也可以采用某些与水互溶的有机溶剂; 所用固定相的表面都经过各种相应的化学修饰和覆盖。这样就为生物大分子的分离分析提供了温和的条件和良好的生物兼容性, 有利于保持生物大分子原有的构象和生理活性。因此液相色谱已成为分离、纯化生物大分子应用最广泛的手段之一。

经典的液相色谱分离纯化生物大分子都采用多糖类凝胶 (如 Sephadex 和 Agarose 系列) 作为固定相, 由于固定相的机械强度差, 填料粒度大, 只能在低压下操作。对于目前人们更感兴趣的快速或中、高压色谱分离生物大分子的意义不大。这一章将主要讨论高效液相色谱在生物大分子分离分析中的应用。对经典液相

色谱分离纯化生物大分子感兴趣的读者可参阅文献 [1, 2].

§ 13.1 生物大分子高效液相色谱的分离模式

根据生物大分子的作用力和生物活性的性质, 可用于分离分析生物大分子的液相色谱分离模式如表13.1所示. 凝胶色谱主要基于生物大分子的尺寸和构型的差别达到分离纯化的目的. 该分离模式的分离效率和柱容量都较低, 但能很好地保持被分离物质的生物活性. 如生物大分子表面电荷或疏水性的不同, 则可以选择离子交换色谱或疏水和反相液相色谱进行分离纯化. 离子交换和疏水色谱对生物大分子的分离纯化因子基本相近, 而且能很好地保持被分离生物大分子的生物活性, 因此是生物大分子分离纯化最常用的分离模式. 反相液相色谱和疏水色谱对生物大分子的分离都基于生物大分子与流动相和固定相的疏水作用力的差别, 但反相色谱通常采用改变流动相中有机溶剂浓度来完成分离纯化的目的, 而疏水作用色谱主要是改变流动相中盐浓度以改变分离结果. 因此疏水作用色谱的操作条件比反相液相色谱温和得多. 尽管反相液相色谱的分离纯化因子较疏水作用和离子交换色谱要高得多, 但由于在分离过程中采用了大量的有机溶剂, 往往会使许多生物大分子失去生物活性. 另一类色谱分离技术主要基于折叠蛋白质表面氨基酸分布的不均匀性, 如利用表面暴露的组氨酸或与金属离子配位活性点结合达到生物大分子分离纯化的金属络合和络合亲和色谱. 羟基磷灰石色谱、凝集素和染料亲和色谱以及共价色谱也都是基于生物大分子可接触表面的一些特异性的官能团或空间结构差异达到分离纯化的分离技术. 最后一类色谱分离模式为利用生物大分子的生物活性进行分离纯化的生物亲和及免疫亲和色谱技术. 生物亲和及免疫亲和色谱的分离选择性在所有的色谱模式中是最高的. 因此, 根据被分离纯化生物大分子的性质和可以接受的操作成本, 可以选择各种色谱分离模式或多种模式集成技术实现对生物大分子的分离纯化.

表 13.1 生物大分子的性质及相应的高效液相色谱分离模式

分类	分离模式	生物活性保持	纯化因子	生物大分子性质
尺寸排斥	凝胶色谱	高	2~20	尺寸和形状
静电和分子作用	离子交换色谱	高	2~40	静电荷
	疏水作用色谱	高	2~30	疏水性
	反相液相色谱	低	2~200	疏水性
亲和	生物亲和色谱	高	50~10000	生物活性
	免疫亲和色谱	高	20~2000	抗原性
	凝集素亲和色谱	高	2~10	糖基含量
	共价色谱	高	2~10	自由巯基含量
	金属络合亲和色谱	高	2~20	表面组氨酸
	络合亲和色谱	高	2~10	表面金属活性点
	羟基磷灰石色谱	高	2~10	表面结构
	染料亲和色谱	高	2~40	表面结构

§ 13.1.1 体积排阻色谱的分离机理

在体积排阻色谱中，溶质分子的保留是由于小分子化合物进入填满溶剂的填料微孔，而较大的分子，根据它们体积大小而被排阻，大分子优先于小分子被洗脱出来，由此提供了根据分子大小和形状差别进行分离的基础，其分离基础可用以下色谱方程式表示

$$V_c = V_0 + V_1 + V \quad (13.1)$$

式中， V_0 是柱空隙体积(填充固定相间隙体积)； V_1 为固定相微孔体积； V 为固定相的体积； V_c 是整个柱体积。

生物大分子在体积排阻色谱中的保留值可由下式表达：

$$V_E = V_0 + K_d V_1 \quad (13.2)$$

式中， V_E 是溶质洗脱体积； K_d 为体积排阻色谱的分配系数，由 0 变到 1。

只有当溶质和填料表面之间没有任何相互作用出现时,体积排阻色谱才能严格按照分子的大小进行分离.如果出现如吸附等作用现象,则体积排阻色谱就会因吸附作用的影响而呈现非理想状态分离,图13.1是标准体积排阻色谱图.

溶质在色谱柱中是在流动相和填料之间移动,溶质本身在两相中按照热力学平衡原理是一个不断进行再分配的过程.因此,在标准的色谱条件下,溶质在两相中的分配过程,非常近似于热力学平衡的过程.按照热力学平衡的定义,每一个溶质组分的化学势在两相中是相同的;对于稀溶液来说,平衡时,溶质的分配在恒温恒压下进行,标准自由能的变化为

$$\begin{aligned}\Delta G^0 &= -RT \ln K \\ \Delta G &= \Delta H - T\Delta S\end{aligned}\quad (13.3)$$

式中, K 为溶质的分配系数; T 是绝对温度; R 是气体常数, ΔH 和 ΔS 是在此分配过程中自由焓和熵的变化.

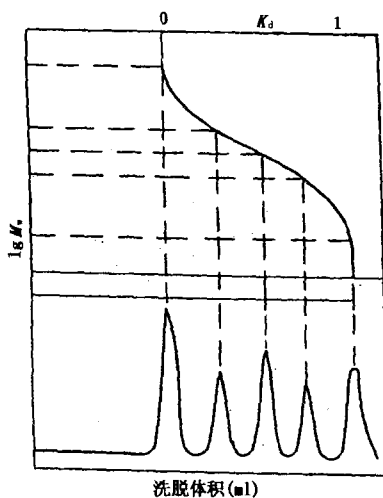


图13.1 体积排阻色谱标准计算色谱图

在其它形式的液相色谱中,溶质在流动相和填料之间进行分

配. 不管是吸附还是解吸都涉及到两相之间的移动, 伴随着分子间的实际存在着的热焓变化, 而熵在这种色谱分离过程中变化十分小, 常常忽略不计; 因此

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT}$$

在液相色谱中则有

$$K_{LC} = e^{-\Delta H/RT} \quad (13.4)$$

ΔH 值一般为负值, 因为溶质与填料的作用是放热吸附过程. 在液相色谱中 K 值大于 1, 因此溶剂峰先于溶质峰流出.

体积排阻色谱中主要是熵的变化:

$$-RT \ln K_d = \Delta H - T\Delta S \quad (13.5)$$

式中, $\Delta H \approx 0$, 所以

$$\begin{aligned} \ln K_d &= \frac{-T\Delta S}{-RT} \\ K_d &= e^{\Delta S/R} \end{aligned} \quad (13.6)$$

体积排阻色谱运行时, 溶质在填料微孔中的流动有一定的限制, 因而溶质的渗透伴随着熵的降低. 由于溶质峰是先于溶剂峰洗脱, K_d 值自然小于 1.

这样, 体积排阻色谱(包括凝胶渗透、凝胶过滤)的保留机理与其它液相色谱, 如分配色谱、吸附色谱和离子交换色谱是完全不相同的.

$$K_d = e^{-\Delta G/RT} = e^{\Delta S/R} \quad (13.7)$$

ΔS 对一切溶质均为负值, 同时在分离过程中可以进行控制. 在体积排阻色谱中, $\Delta S(\text{固定相}) < \Delta S(\text{流动相})$.

由于溶质峰先于溶剂峰洗脱, 因此, $K_d < 1$, 并显示负值, 而 K_d 值是不受温度影响的一个参数.

在一般液相色谱中

$$K_{LC} = e^{\Delta S^*/RT} \times e^{-\Delta H/RT} \quad (13.8)$$

ΔH 对大多数溶质峰是负值, 这是个热焓控制着的分离过程.

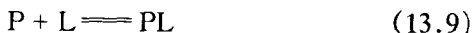
$$\Delta H(\text{固定相}) < \Delta H(\text{流动相})$$

由于溶剂峰先于溶质峰洗出, K_{LC} 为正值, 而 K_{LC} 的变化是一个受温度影响的参数.

温度、流速和静电引力等影响, 使体积排阻色谱中溶质的保留平衡过程是受熵的大小来支配的. 从这个机理考虑可以得知溶质在填料微孔外的扩散是迅速的, 这样的迅速扩散显然是与流速的大小有关. 不同的溶质类型, 在平衡分配过程中参数的影响也不同, 因此, 在分离定量过程中必须考虑用标准的校正曲线(如图 13.1) .

§ 13.1.2 离子交换色谱的分离机理

离子交换色谱分离和纯化生物大分子, 一直受到生物化学家的重视和应用, 但是离子交换分离蛋白质的模型直到今天并不十分清楚. 一般认为, 离子交换填料表面上的静电作用点与蛋白质两性三维结构反应而形成了一种复合物, 这个形成过程随着静电荷的减少而减少, 而且一般蛋白质带有大于等电点时的静电荷, 因此, 可以将离子交换色谱用下式表示:



很明显这一简单的模型忽略了在填料表面上形成复合物时溶质被流动相中的小分子饱和并不断地进行计量置换反应这一重要因素. 考虑到这一因素, Regnier 等提出的反应形式为^[14]:



P_0 是流动相中溶质的浓度, P_b 是填料表面上被吸附的溶质浓度, D_0 是流动相中洗脱剂的浓度, D_b 是填料表面上洗脱剂的浓度, D_b 与填料表面上的配位密度成比例, Z 是蛋白质在吸附过程中从填料表面上被置换的洗脱剂的数目. 其反应常数可写成下式:

$$K_\varphi = \frac{P_b \times (D_b)^Z}{P_0 \times (D_0)^Z} \quad (13.11)$$

在离子交换色谱体系中, 如 Z 值可以小到忽略不计, 反应常数

变为分配系数：

$$K_d = \frac{P_b}{P_0} \quad (13.12)$$

一般在 Z 值不能忽略时，则有：

$$K_\varphi = K_d \times \frac{(D_b)^Z}{(D_0)^Z} \quad (13.13)$$

在等度洗脱蛋白质的过程中，容量因子 k' 与保留体积成比例，同时洗脱过程中， K_d ， D_b 是常数，二者的关系，用 K_Z 来表示，所以有

$$k' = K_Z \frac{1}{(D_0)^Z}$$

$$\log k' = \log K_Z + Z \log \frac{1}{D_0} \quad (13.14)$$

式中 D_0 实际上是流动相中盐的浓度，也为置换剂的浓度。

表 13.2 不同盐作为置换剂对某些核苷酸 Z 值的影响

溶质	NaCl	MgCl ₂	Na ₂ SO ₄	MgSO ₄
CAMP	1.20	1.0	1.0	0.9
5-AMP	1.90	2.2	1.8	2.3
dT	5.4	5.3	5.6	6.0

这是一个简单的在离子交换色谱上分离蛋白质的模型，一般蛋白质的分离和纯化多采用梯度洗脱，因此，在线性分析色谱过程中， Z 值与盐的浓度无关，它的测定往往是通过 $\log k'$ 与 $\frac{1}{D_0}$ 作图算出斜率，即为 Z 值。盐的类型不同，其 Z 值也有变化，如表13.2所示。在不同的 pH 条件下， β -乳球蛋白在强阴离子交换柱上用 NaCl 作为置换剂，而得到的 D_0 和 k' 的关系图如 13.2，由此图可计算 Z 值。

Kopaciewie 等^[5]在研究离子交换分离蛋白质的保留模型后指

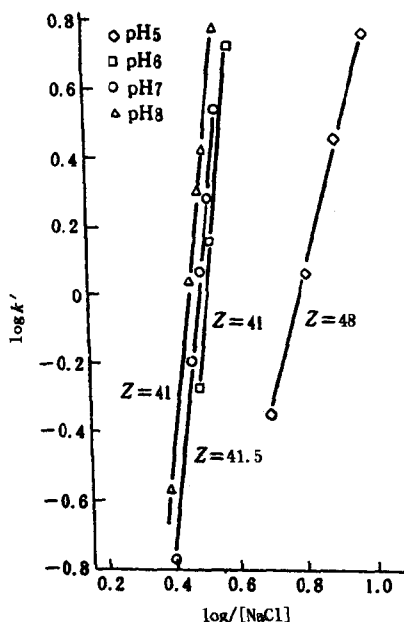


图 13.2 在不同的 pH 条件下 β -乳球蛋白的
Z 值的变化
色谱柱: (250×4.1mm) 填有强阴离子交换填
料(SAX), 等度洗脱

出: (1) 仅有部分而不是全部蛋白质表面与离子交换填料表面之间发生相互作用; (2) 蛋白质在吸附过程中由于带电的不对称性, 因此, 引起蛋白质分子的定向排列; (3) 蛋白质在离子交换柱上的保留时间明显地与填料上反应活性点的多少成比例; (4) 蛋白质的保留能够随置换盐的类型不同而改变.

§ 13.1.3 疏水作用色谱的保留机理

疏水作用色谱和反相液相色谱的分离都是基于生物大分子与固定相配基的疏水相互作用. 有关反相液相色谱的分离机理已在

第三章中阐述过。本节将主要介绍疏水作用色谱的分离机理。

蛋白质分子是一个外部有一层亲水层包围、内部有疏水核并具有四级结构的复杂体系。尽管蛋白质表面亲水性很强，但也存在一些非极性的疏水基团或疏水区域，还有比较多的裂隙疏水基团。蛋白质分子表面的疏水基团是含非极性侧链的氨基酸残基，如亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、色氨酸、丙氨酸和脯氨酸等疏水基团所组成。在不同的介质中，裂隙的伸展和收缩程度不同，疏水基团暴露的多少就有差异。溶液中的蛋白质表面存在一层结构有序的水分子，在与疏水作用色谱固定相作用时必须去除蛋白质疏水基团周围的水分子层。把蛋白质表面有序的水分子脱附到无序的流动相是一个熵增加过程 ($\Delta S > 0$)。蛋白质从流动相到固定相表面的吸附过程的自由能变化可由式 (13.3) 表示，由于疏水作用色谱中的自由焓 ΔH 非常小，其自由能变化是由熵变化决定的负值^[6]。疏水作用色谱中的疏水作用力由于在流动相中离子水合化捕捉从蛋白质表面解吸的水分子而得到加强。因此疏水作用色谱中无机盐的作用与盐析沉淀蛋白质的作用很相似。

Sinanoglu 及其合作者^[7]研究了疏水色谱 (HIC) 的各参数之间的关系而提出了“疏溶剂理论”。此后，Horvath 等^[8]用这个理论阐述了高效反相液相色谱中溶质的保留行为。按照“疏溶剂理论”，蛋白质与配基的结合，是因为溶质分子有产生一个减少其与水接触的非极性表面的倾向，溶质与烃类配基的结合是伴随着它们暴露在溶剂中的非极性表面面积的减少而进行的。在 HIC 上存在以下关系式：

$$\ln k' = \ln k'_0 - \frac{B''(m^{\frac{1}{2}})}{1 + C'(m^{\frac{1}{2}})} - A'm + \Omega\sigma m \quad (13.15)$$

式中， m 为盐溶液的摩尔浓度， k'_0 为纯水作流动相时蛋白质的容量因子， $B'' = B'/RT$ ， B' 和 C' 分别是低离子强度下的有关常数， A' 是蛋白质盐溶系数； Ω ， σ 为蛋白质盐析有关的系数，其中 σ 是流动相的摩尔表面张力增量。当流动相离子强度增大时，

式中右端第二、三项均为负值，结果使溶质的保留值减小。这时， $\ln k'$ 与 m 不存在线性关系。当离子强度超过一定值时，式中的第二项变为常数，而 A' 值远较 Ω ， σ 值小，因此， $\ln k'$ 与 m 呈线性关系。用 $\ln k'$ 与 m 作图，得一斜率为负值的直线，其斜率的大小与蛋白质分子和疏水配基间的接触面积有关。所以，盐的摩尔浓度和流动相的表面张力增量控制着蛋白质在柱上的保留行为。

流动相中盐的组成对蛋白质在疏水作用色谱填料上保留值的影响是一个非常复杂的过程，它涉及到溶液的表面张力，蛋白质和盐离子的特殊反应，以及蛋白质的水合作用等。亲水和疏水的氨基酸同样影响填料表面上的疏水作用，而亲水氨基酸的存在及填料表面上电荷的改变，使得蛋白质保留值明显降低。

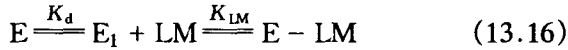
§ 13.1.4 亲和色谱的理论模型

亲和色谱的概念可以理解为配位体以共价键形式与不溶性载体连接作为色谱介质，高选择性地吸附分离具有生物活性的物质。这里的配体指底物、抑制剂、辅酶、变构效应物质或其它可特异性地与被纯化的蛋白质或生物大分子发生可逆性结合的化合物。蛋白质的生物学功能在于它们能够特异性地与这些配体相互作用。酶能与底物、产物、抑制剂、辅酶结合，抗体可与互补的抗原结合，基因可与核酸和阻遏蛋白质相互作用，这种特异性相互作用可被用来分离和纯化生物大分子。

在亲和色谱中，生物活性大分子只与配体作用而被吸附在固定相上，其它无亲和作用的生物大分子很快通过色谱柱流出，被吸附的生物大分子只有改变流动相组成时才被洗脱。因此，亲和色谱可应用于任何两种有特异性相互作用的生物大分子。正是因为亲和色谱基于生物活性而不是依赖于物理化学性质，因此，非常适合于低浓度的蛋白质，如血清结合物和转运蛋白分离纯化，一次性完成操作，稳定了蛋白质的结构，而且产率高。

目前建立的有关亲和色谱的不少模型，系以酶动力学和凝胶

过滤为理论基础。1974年Dunn和Chaiken^[9]的研究认为,酶(E)与固定化配体(LM)的相互作用是由酶在非凝胶相和凝胶之间的分配系数或酶-配体复合物的解离常数来控制的,即:



式中, E为体系中的游离酶, E₁为包含在基质中的游离酶, LM为连接在基质上的配体, E-LM为酶-固定化配位体的复合物。

分配系数为

$$K_d = \frac{[E_1]}{[E]} \quad (13.17)$$

解离常数为

$$K_{LM} = \frac{[E_1][LM]}{[E-LM]} \quad (13.18)$$

对正常的凝胶过滤色谱

$$V_E = V_0 + K_d V_1 \quad (13.19)$$

亲和色谱中的固定化配体在酶和凝胶之间产生了一个额外的相互作用:

$$V'_E = V_0 + K'_d V_1 \quad (13.20)$$

$$K'_d = \frac{[E_1 - LM] + [E_1]}{[E]} \quad (13.21)$$

因此

$$K'_d = K_d \frac{[E_1 - LM]}{[E_1]} + K_d \quad (13.22)$$

将式(13.18),(13.19),(13.20)和式(13.22)合并,则得:

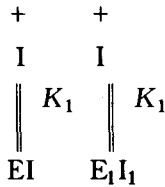
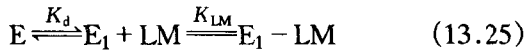
$$V'_E = V_E + (V_E - V_0) \frac{[LM]}{K_{LM}} \quad (13.23)$$

酶与固定化配体相互作用增加的洗脱体积显然与固定化配体(LM)的浓度成正比,与酶和固定化配体复合物的解离常数 K_{LM} 成反比,若基质为固定化配体, $[LM] = 0$,则 $V'_E = V_0$,这时,凝胶过滤起主要作用。

假设 $V_E \gg V_0$, 则可得到

$$\frac{V'_E}{V_E} - 1 = \frac{[LM]}{K_{LM}} \quad (13.24)$$

大多数吸附剂与酶的结合非常牢固, 很难测得 $\frac{V'_E}{V_E}$ 的数值, 若在洗脱剂中加入可溶性的配体或竞争性的抑制剂 (I), 使酶与固定化配体的亲和力降低, 其数值可以测得. 这一过程可表示如下:



$$K_1 = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (13.26)$$

$$K_1 = \frac{[E_1][I_1]}{[E_1 I_1]} \quad (13.27)$$

$[EI]$ 和 $[E_1 I_1]$ 分别为填料外部和内部的酶-抑制剂复合物, 如此, 可得到类似的方程:

$$V'_E = V_E + (V_E - V_0) \frac{[LM]}{K_{LM}} \cdot \frac{K_1}{K_1 + [I]} \quad (13.28)$$

$$\frac{V'_E}{V_E} - 1 = \frac{V_E - V_0}{V_E} \cdot \frac{[LM]}{K_{LM}} \cdot \frac{K_1}{K_1 + [I]} \quad (13.29)$$

在可溶性和竞争性配体存在下, 固定化配体对酶的阻滞作用降低, 其程度取决于可溶性配体和固定相键合配位体的相对浓度及解离常数.

用倒数形式重排该方程得

$$\frac{1}{V'_E - V_E} = \frac{1}{V_E - V_0} \cdot \frac{K_{LM}}{[LM]} + \frac{1}{V_E - V_0} \cdot \frac{K_{LM}}{[LM]} \cdot \frac{1}{K_1} [I] \quad (13.30)$$

很明显, $\frac{1}{V_E - V_E}$ 与 $[I]$ 作图呈线性关系. 设截距为 C , 斜率为 M , 则游离配体的解离常数 K_1 及固定化配体的解离常数可分别由 C/M 和 C 求得. 色谱法推导的 K_{LM} 值与其它方法测得数据十分一致, 但由于空间障碍的影响, 测得的固定化配体的 K_{LM} 值是不确切的. 最近有的作者对亲和色谱模型引进了一系列参数, 如扩散速率、作用速率、流速以及结合的酶分子的空间障碍等, 以便使亲和色谱模型与实际更进一步地吻合.

§ 13.1.5 金属络合亲和色谱

1975年 Porth 等^[11,12] 提出用于分离纯化生物大分子的金属络合亲和色谱. 在金属络合亲和色谱中生物大分子通过表面的组氨酸、胱氨酸和色氨酸与固定相表面过渡金属离子, 如 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的配位络合吸附在固定相表面上. 金属离子必须与固定相表面有适当的距离, 以便有足够的空间使生物大分子可以自由地与金属离子发生络合反应.

组氨酸的咪唑基和胱氨酸的巯基与过渡金属离子 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的络合作用与 pH 相关, 在中性 pH 值下络合作用最强, 而在碱性条件下氨基与这些金属离子也存在很强的络合作用, 但会大大降低络合作用的选择性. 组氨酸和胱氨酸还可以与其它金属离子, 如 Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 发生络合作用, 但络合作用的强度比与 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的络合作用要小得多. 由此可以看到金属络合亲和色谱与常规的分纯化色谱模式, 如离子交换不同, 在金属络合亲和色谱中蛋白质与固定相不直接发生相互作用, 而只发生与金属离子的络合作用. 络合物一旦生成就必须足够稳定, 以便在流动相各种盐和非电解质组成下, 蛋白质可以稳定地吸附在固定相表面. 因此金属络合亲和色谱分离纯化蛋白质主要基于蛋白质表面的咪唑基和巯基数目及密度的不同, 是一个高选择性的吸附分离过程.

§ 13.1.6 共价色谱

Eldjam 和 Jellum^[13]首先提出共价色谱分离纯化含有巯基的蛋白质。在共价色谱中，含有巯基的蛋白质通过与固定相表面的巯基或双巯基的化学反应键合到固定相表面，用流动相洗脱吸附较弱的其它成分后，采用含有胱氨酸和谷胱甘肽等还原试剂的流动相可以把共价键合在固定相表面的蛋白质洗脱下来。最常用的共价色谱固定相，其表面键合有吡啶双硫键。当这一类固定相与含自由巯基的蛋白质反应时，在 343nm 波长下可以测定释放出的吡啶-2-硫酮的含量，以确定发生共价反应的蛋白质的含量。洗脱后的固定相可以通过与 2, 2'-双硫吡啶反应再生。这一共价色谱分离纯化蛋白质和监测过程可由图 13.3 表示。共价色谱是蛋白质分离纯化技术中一个有用的补充手段。由于对含有巯基蛋白质的选择性，共价色谱已被应用于许多蛋白质分离纯化，通过调节流动相的 pH 值和选择适当的洗脱方法，可以进一步提高共价色谱的分离选择性^[14]。共价色谱吸附过程中的高度选择性有可能应用于蛋白质的相对粗纯化。但在现阶段，由于共价色谱的成本较高，再生过程费时，尚没有共价色谱应用于蛋白质大规模纯化的报道。

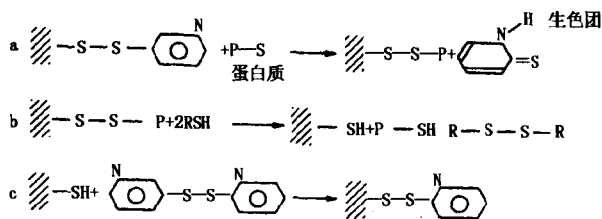


图 13.3 共价色谱生物大分子的吸附、洗脱和填料再生过程示意图

§ 13.2 生物大分子分离分析用固定相

近几年，HPLC已成为分离和纯化蛋白质的主要工具，尤其是在生物工程、生物化学和基因工程方面成了不可缺少的手段。早在70年代中期，HPLC已被广泛应用于小分子的分离分析上，并取得相当多的成果和经验结果。人们认为这些成果可以很容易地应用在生物大分子的分离上，但事实上并没有成功。其主要原因是当时柱填料不适合于蛋白质的分离。到1979年，Unger^[15]以孔径30nm~100nm的硅胶作为键合相基质合成了键合固定相，HPLC才真正地用在蛋白质的分离纯化上。与此同时，人们也研究了蛋白质性质和构象变化与填料和流动相之间以及分离过程之间的关系，提出在HPLC用于分离蛋白质时填料应该具有的一些特征：(1)高的选择性和特异性；(2)高的适应性以满足各种分析的作用；(3)不让蛋白质失活并且具有高的质量回收率；(4)柱床稳定、低的流动阻力；(5)在洗脱和贮存时应该具有高的化学稳定性；(6)适当的柱效；(7)快速的再生和再平衡；(8)不会造成污染；(9)不同批号与不同柱子之间柱效要一致；(10)可获得孔径相同大小不同的颗粒，以为纯化放大而提供方便。

蛋白质分子量从1万到100万不等，在它的外部有不同的电荷分布，亲水性和疏水性基团以及表现生物学活性的位点，这些基团同配体的作用形式决定了蛋白质的分离方式。因此配体的密度、性质对分离影响较大。

在蛋白质分离时，我们所希望的是蛋白质与配体作用时是个可逆的吸附，且不使蛋白质失活。位于表面的配体最好为亲水性的而且其作用基团与溶质的结构相似。不均匀的极性分布和强烈的疏水表面作用将会造成蛋白质构象严重的变化^[16]，同时也使吸附作用增强，洗脱慢。蛋白质与配体表面进行作用时，其作用点往往不是一个，这时需要一定时间去改变构象到合适的位置，

在吸附和解吸时其动力学过程比小分子就慢一些。生物大分子的作用基团与固定相表面基团作用时必须充分暴露作用基团才能满足要求。除了固定相表面的配体影响蛋白质保留外，其它因素对蛋白质与配体的影响也需要考虑。pH值、盐的变化将造成电荷和电荷分布的改变，蛋白质和配体的溶剂化作用同样也会影响吸附过程。总之，蛋白质在HPLC的保留对固定相组成和流动相组成的变化极其敏感。

由于蛋白质分子大，扩散系数小 ($10^{-10} \sim 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)^[17]，在孔中的出入（孔扩散）就比较困难。当分子直径等于或接近孔直径时，蛋白质在孔中的扩散受限制，它不能达到所有固定相表面。为了克服在孔中传质慢这个缺点，孔应该足够大，同时填料颗粒要小，以减小孔的深度。填料粒度的大小分布和密度应该均匀，柱床应该稳定，以防涡流扩散和峰变形。蛋白质的构象在固定相和流动相中都易变化，因此分离应该在尽可能短的时间内完成。

现在高效交联的聚合物也被制成微球颗粒用在HPLC上，它们的优点在于可以耐受pH值的变化（pH=0~14）而且稳定，表面可根据需要交联不同的化学基团形成不同类型的填料，而硅胶仅可在pH=2~8的范围内使用。

市场上有许多类型的填料可供选择，见图13.4。其中球形

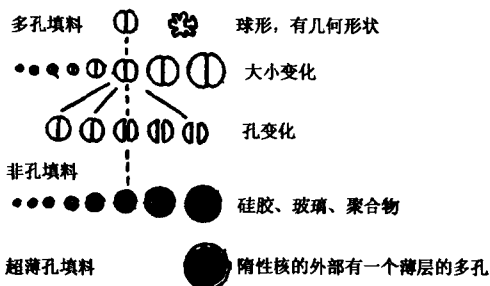


图13.4 市场上可获得的填料种类

颗粒比有几何形状的颗粒更易获得一个填得紧密、均匀、柱床稳定的柱子。球形的价格比有几何形状的高 10 倍。粒子大小从 $3\mu\text{m}$ 到几百微米(μm)不等。 $3\sim 5\mu\text{m}$ 主要用于快速分离, $5\sim 10\mu\text{m}$ 主要用于分析, $15\sim 60\mu\text{m}$ 主要用于制备色谱上, 再大一点的用于大工业生产上。

填料的孔径从 $6\sim 400\text{nm}$ 都有商品供应, 其中 $30\sim 50\text{nm}$ 的主要用于蛋白质的分离。

为了避免孔扩散的问题, $2\sim 7\mu\text{m}$ 的非孔微球填料可供选择。一些公司如(BioRed, Merck, Toyosoda)已经开始商业化生产, 这些材料可在几分钟内完成蛋白质的分离。

同样, 市售填料的表面配体也多种多样, 图13.5 是对配体在填料表面存在的形式的简单描述。

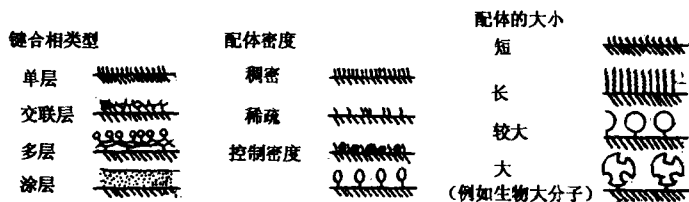


图13.5 键合相配体的类型

§ 13.2.1 有机高分子基质固定相^[19]

有关高分子类型液相色谱固定相的基本情况已在第五章中进行过介绍。高分子基质的反相液相色谱固定相, 目前较为广泛使用的是微球型交联聚苯乙烯树脂。这类树脂的表面具有烷基键合相那种非极性的特征, 因此无需化学改性就可以直接用作反相色谱固定相。近年来也出现一些其它类型(包括烷基衍生)的高分子基质固定相, 例如乙酸乙烯酯化物, 带有 C_{18} 烷基侧链的聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯的烷基酯化物和聚乙烯醇的酯化物, C_{18} 烷基键合的聚乙烯醇以及 C_{18} 烷基衍生的交联聚苯乙烯等。目前常见的高分子类型反相色谱固定相主要是多孔型树脂, 但也出现

了非多孔结构的固定相。高分子类型反相色谱固定相可以在广泛的 pH 值 (2~12, 甚至 1~13) 范围内使用, 从化学结构来看, 树脂表面均有较强疏水性作用, 其色谱性能基本上类似于硅胶基质的烷基键合固定相。表13.3 列出的是一些常用的高分子类型生物大分子分离分析用反相色谱固定相。

表13.3 部分常见生物大分子分离分析用高分子类型高效反相色谱填料

名称	基质材料	粒度 (μm)	孔径 (nm)	应用
TSK gel Phenyl-5PW RP	亲水高聚物	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel Octadecyl - 4PW	亲水高聚物	10	50	分离蛋白质、肽等
TSK gel Styren - 250	PS-DVB	5,10		分离药物、食品添加剂等
TSK Gel Octadecyl-NPR	聚丙烯酸酯类	2.5	非多孔	快速分离蛋白质等
Hamilton PRP - 1	PS-DVB	10	7.5	分离核苷、磺胺药等
Hamilton PRP - 3	PS-DVB	10	30	分离蛋白质、肽等
ARPP	PS-DVB	5,10	8	类似于 C_{18} 键合相填料
PLRP-S	PS-DVB	8,10	300、100	分离蛋白质、肽等
ACT - 1	PS-DVB- C_{18}	10		与 C_{18} 键合相填料性能相同
SodexRS pak DS - 613	PS-DVB			类似于 C_{18} 键合相填料
SodexRS pak DS - 613	聚丙烯酸酯类			类似于 C_{18} 键合相填料
Polypore Phenyl RP	PS-DVB	10	30	分离生物大分子化合物
Polypore RP	PS-DVB	10	8	类似于 C_{18} 键合相填料
Bio GEI PRP 70-5	含 Benzyl 高聚物	5	7	分离高分子和有有机物
Bio GEI PRP+	含 Benzyl 高聚物	70	100	分离高分子和有有机物

高分子类型疏水作用色谱固定相, 通常都在亲水高聚物基质微球表面引入疏水性基团或适当长度的醚链, 例如, 琼脂糖凝胶被引入戊基、辛基和聚乙二醇所衍生的产物, 亲水性高聚物凝胶

被引入苯基、低聚乙二醇的产物，尿醛树脂被疏水基团所修饰等。所有这些经化学改性处理后具有弱疏水性的树脂作为疏水作用色谱填料，对于蛋白质的分离都是有意义的。广泛应用的商品化填料主要有 TSK gel Phenyl-6PW, Ether-5PW 和 Macropore/R 等。Hjerten^[19]曾介绍过使用大孔琼脂糖凝胶经收缩，交联和非极性配基衍生而制得的一种非多孔树脂，以其作为疏水作用色谱填料进行蛋白质快速分离。

按所使用的离子交换固定相分类，离子交换色谱法可分为强阴、强阳、弱阴、弱阳离子交换 4 种方式。在离子交换色谱中高分子类型填料表现了更大的优越性。这一类固定相可在全程 pH 值范围内使用，对于广泛选择各种缓冲液淋洗体系十分有利；填料的使用寿命长，即使柱子受到污染，也比较容易通过再处理使其性能得以恢复。高分子离子交换固定相普遍有较高的色谱容量，甚至可以比硅胶键合相离子交换固定相高一个数量级；固定相的基质骨架结构，一般很少有非特异性吸附，对于保持样品生物活性是很有利的。常见的高分子类型离子交换色谱固定相多以交联共聚的苯乙烯-二乙烯苯为基质^[20,21]，同时也出现了许多其它交联高聚物基质的固定相，如以亲水性高聚物凝胶、聚甲基丙烯酸酯类和 N-乙烯吡啶共聚物为基质的。这些固定相一般都是高交联大孔结构的微球，具有良好的刚性和小而均匀的粒度。固定相按其所带基团，通常分为强碱性阴离子型（含季胺类）、弱碱性阴离子型（含伯、仲氨基）、强酸性阳离子型（含磺酸基）、弱酸性阳离子型（含羧酸基）。在以交联聚苯乙烯为基质的固定相中，Mono Beads 系列^[22]可认为代表了当前的先进水平。这种固定相的基质微球是利用第五章所述的分散聚合方法制得的。基质微球经化学改性处理变成亲水性高聚物，然后再键合上季胺基团或磺酸基团，制得粒度分散的具有大孔径结构的中等交换容量的阴阳离子交换剂（Mono Q 和 Mono S）。该系列固定相相对于活性生物大分子的分离纯化，在柱效、分离度、回收率、负载量以及穿透性方面所表现出的优异性能，使其得到广泛的应用^[21,22]。

表13.4 部分常见高分子类型高效离子交换色谱填料

名称	基质	官能基团	粒度(μm)	孔径(nm)	应用
Mono Q	PS-DVB	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	10	80	分离纯化蛋白质等
Mono S	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	10	80	分离纯化蛋白质等
TSK gel SP-5PW	亲水性高聚物	SP	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel DEAE-5PW	亲水性高聚物	DEAE	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel CM-5PW	亲水性高聚物	CM	10	100	分离蛋白质、肽、核酸等
TSK gel DEAE-NPR	亲水性高聚物	DEAE	2.5	非多孔	快速分离蛋白质、核酸等
TSK gel SP-NPR	亲水性高聚物	SP	2.5	非多孔	快速分离蛋白质、核酸等
TSK gel SCX	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	10		分离氨基酸、碱基、有机酸、糖类
TSK gel SAX	PS-DVB	$-\text{NR}_3^+$	10		分离氨基酸、碱基、有机酸、糖类
Macrosphene/R DEAE	HEMA 共聚物	DEAE	10	35	分离蛋白质等
Macrosphene/R QAE	HEMA 共聚物	QAE	10	35	分离蛋白质等
Macrosphene/R DM	HEMA 共聚物	DM	10	35	分离蛋白质等
Macrosphene/R SB	HEMA 共聚物	SB	10	35	分离蛋白质等
Bio-Gel MA7P	高聚物	PEI	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
Bio-Gel MA7C	高聚物	CM	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
Bio-Gel MA7S	高聚物	SP	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
Bio-Gel MA7Q	高聚物	$-\text{NR}_3^+$	7	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等

续表

名称	基质	官能基团	粒度(μm)	孔径(nm)	应用
PL-SAX	PS-DVB	$-\text{NR}_3^+$	8, 10	100, 400	分离蛋白质等
PL-SCX	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	8, 10	100, 400	分离蛋白质等
Hydrophase PEI	高聚物	PEI	10	50	分离蛋白质等
Hydrophase CM2	高聚物	CM	10	50	分离蛋白质等
Hitachi Gel 3011 - N	PS-DVB	$-\text{NR}_3^+$	10~15		分离核苷酸、有机酸、糖类
Hitachi Gel 3011 - S	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	10~15		分离核苷酸、氨基糖类等
Hitachi Gel 3011 - C	PS-DVB	$-\text{COOH}$	10~15		分离胺类等
BIO-10	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	5		分离酸性肽类等
BIO-20	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	5		分离碱性肽类
Benson BA-X	PS-DVB	$-\text{NR}_3^+$	7~10		分离氨基糖、糖类等
Benson BC-S	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	7~10		分离氨基糖、肽类等
Benson BCOOH	聚丙烯酸酯类	$-\text{COOH}$	7~10		分离蛋白质、药物等
Aminex HPX87 系列	PS-DVB	阳离子型	9		分离糖类、有机酸、醇类等
Aminex HPX42 系列	PS-DVB	阳离子型	9		分离寡糖等

以亲水性高聚物凝胶为基质的离子交换色谱填料，如 TSK-gel DEAE-5PW, SP-5PW, CM-5PW 等，是目前应用最为广泛的产品^[23,24]。它们都是在原有亲水性尺寸排阻色谱固定相 (TSK gel PW) 的基础上发展起来的。这种大孔径、小粒度、中等交换容量的树脂作为高效柱固定相，对于蛋白质、肽类、核酸等活性生化样品均表现出良好的分离作用。一种以高聚物为基质的阴离子交换复合树脂已在我国研制成功^[25]，这种粒度为 10 μm 左右的树脂作为高效柱填料，在柱效、选择性、分离度、穿透性、回收率以及流速适应范围等方面也均表现出良好的特征，对于蛋白质、多肽以及基因工程药物等均有良好的分离作用。表 13.4 是部分常见的高分子类型高效离子交换色谱固定相。

亲和色谱作为液相色谱的一个重要分支，对于生物大分子的分离纯化具有特殊的意义。原则上讲，如果在固相载体上连接一种具有生物特异性的配基，就可以建立一种亲和色谱方法，用于分离与配基相对应的物质。高分子类高效亲和色谱固定相大都是在多孔的硬质凝胶诸如交联聚苯乙烯 (如 PLRP-S)、交联聚甲基丙烯酸脂类 (如 Spheron)、亲水性高聚性 (如 TSK gel PW) 等树脂的基质上发展起来的^[26,27]。这类树脂普遍具有均匀的粒度、较大的孔径、良好的刚性、广泛的 pH 值适应性等特点，对于亲和色谱的使用甚为适宜，而且高分子材料一般说来对于生物大分子样品都有较好的相容性。至于填料的合成，相比之下在高分子基质微球上引入间隔臂和键合配基也比较容易实现^[4]。表 13.5 是部分常见高分子类型亲和色谱固定相。

表 13.5 部分常见高分子类型高效亲和色谱填料

名称	基质	配基	粒度, nm	主要应用
Affi-Prep 10	高聚物	羟基琥珀酰胺	50	分离伯氨基偶合物等
Bio-Gel Protein A	高聚物	蛋白 A	50	分离纯化抗体等
Affi-Prep Prot. A	高聚物	蛋白 A	40~60	分离纯化免疫球蛋白等

续表

名称	基质	配基	粒度(nm)	主要应用
PL-AFC Protein A	高聚物	蛋白 A	10~25	分离纯化免疫球蛋白等
Shodex AF-PAK	高聚物	Cibacron 蓝	15~20	分离纯化酶类等
Shodex AF-PAK	高聚物	半刀豆 球蛋白 A	15~20	分离糖类等
TSK gel Chelate-5PW	亲水性 高聚物	亚氨基二乙酸	10	分离纯化蛋白质、酶类等
TSK gel Heparin-5PW	亲水性 高聚物	肝素	10	纯化蛋白酶、核酸酶类等
TSK gel Blue-5PW	亲水性 高聚物	Cibacron 蓝	10	纯化核酸酶、细胞生长素 等
TSK gel Boronate-5PW	亲水性 高聚物	间氨基苯 基硼酸	10	分离糖蛋白、糖类、转移 RNA 等
TSK ABA-5PW	亲水性 高聚物	对氨基 苯甲脒	10	纯化蛋白酶、激酶等

70年代以来, 高效体积排阻色谱固定相得到了迅速发展, 随着合成技术的进步, 以有机高分子为基质的高效尺寸排阻色谱固定相相继出现. 例如含有亲水性基团的甲基丙烯酸类共聚物树脂^[28]、交联聚乙烯醇类树脂^[29]、被亲水性基团衍生的或者有亲水性单体参与共聚的交联聚苯乙烯类树脂^[30]、羟基化的聚醚树脂^[31]以及高交联的琼脂糖树脂等. 这些固定相都具有良好的亲水性, 它们的颗粒均匀、耐压性较强、孔径尺寸以及由孔径分布所决定的溶质分子量分离范围均较适宜, 所以被广泛用于生物大分子和合成水溶性高分子的分离. 大孔高交联的琼脂糖凝胶(Superose)是典型的多羟基高分子, 它保持了一定程度天然亲水性材料特性, 对生物物质有良好的适应性, 很有利于分离活性生物大分子. 在合成的亲水性高聚物凝胶中, TSK gel PW 产品颇有代表性, 它主要包含有 $-\text{CH}_2\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{O}-$ 链段, 可

以认为是一种羟基化的聚醚。这类体积排阻色谱固定相相对于水溶性高分子具有良好的分离性能。表13.6是常见的高分子类型高效体积排阻色谱固定相。

表 13.6 部分常见高分子类型高效体积排阻色谱填料

名称	基质材料	粒度 (μm)	排除极限或分离范围
Superose 6	高交联琼脂糖	10, 13	$5000, 5 \times 10^6$ (蛋白质)
Superose 12	高交联琼脂糖	10, 13	$< 3.3 \times 10^6$ (蛋白质)
OHpak Q-801	聚乙烯醇	10	700(PEG), 1800(多糖)
OHpak Q-802	聚乙烯醇	10	1500(PEG), 5000(多糖)
OHpak B-803	GMA 共聚物	10	2×10^4 (PEG), 1×10^5 (多糖)
OHpak B-804	GMA 共聚物	10	2×10^5 (PEG), 5×10^5 (多糖)
OHpak B-805	GMA 共聚物	10	2×10^6 (PEG), 5×10^6 (多糖)
OHpak B-806	GMA 共聚物	10	1×10^7 (PEG), 2.5×10^7 (多糖)
Ionpak S-801	磺化 PS-DVB	10~15	1000(多糖)
Ionpak S-802	磺化 PS-DVB	10~15	10000(多糖)
Ionpak S-803	磺化 PS-DVB	10~15	5×10^4 (多糖)
Ionpak S-804	磺化 PS-DVB	10~15	5×10^5 (多糖)
Ionpak S-805	磺化 PS-DVB	10~15	5×10^6 (多糖)
Ionpak S-806	磺化 PS-DVB	10~15	5×10^7 (多糖)
Spheron P40	HEMA 共聚物		$2 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ (多糖)
Spheron P100	HEMA 共聚物		$7 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ (多糖)
Spheron P300	HEMA 共聚物		$2.6 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ (多糖)
Spheron P1000	HEMA 共聚物		$8 \times 10^5 \sim 7 \times 10^6$ (多糖)
Spheron P10000	HEMA 共聚物		$< 10^8$ (估计值)
TSK gel G2000PW	亲水性高聚物	10	100~5000(PEG)
TSK gel G3000PW	亲水性高聚物	13, 6	1000×10^4 (PEG)
TSK gel G4000PW	亲水性高聚物	13, 10	$2000 \sim 3 \times 10^5$ (PEG)

续表

名称	基质材料	粒度 (μm)	排除极限或分离范围
TSK gel G5000PW	亲水性高聚物	17,10	$4000 \sim 1 \times 10^6$ (PEG)
TSK gel G6000PW	亲水性高聚物	17,13	$4 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$ (PEG)
TSK gel Oligo PW	亲水性高聚物	6	100~5000(PEG)
TSK gel GMPW	亲水性高聚物	17,13	$100 \sim 8 \times 10^6$ (PEG)
TSK gel DNA-PW	亲水性高聚物	10	$4 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$ (PEG)

通常用作 HPLC 填料的高聚物树脂大都是具有多孔结构的微球, 其孔径为几个、几十个以至上百纳米。为了增强微球刚性和改善孔结构形态, 以提高生物大分子在固定相表面的传质性能, 近几年来对于树脂合成出现了两种明显趋势。第一, 向小颗粒非多孔性结构发展, 有关这方面的研究有许多报道。例如, 以 $2.2 \mu\text{m}$ 亲水性高聚物为基质所制得的非多孔型反相、离子交换和疏水色谱固定相, 其柱效、选择性、分离度以及对活性样品的回收率等指标都是令人满意的, 在蛋白质、核酸等生物大分子快速分离分析方面都取得了很大的成功^[32]。第二, 向贯通性超大孔结构发展, 近年来商品化的所谓灌注色谱 (Perfusion Chromatography) 填料就具有这种结构特征^[33]。这种取名为 POROS 的系列色谱固定相颗粒内部分布是两种结构的孔隙: 一种是贯穿整个颗粒的特大孔, 孔径在 $600 \sim 800\text{nm}$, 称为穿透孔或对流孔; 另一种是连接这些特大孔的较小一些的大孔, 称为连接孔或扩散孔, 孔径在 $50 \sim 150\text{nm}$, 孔深不超过 $1\mu\text{m}$ (图 13.6)。这类固定相具有二种规格, $10\mu\text{m}$ (H 型) 和 $20\mu\text{m}$ (M 型)。随表面连接的官能团不同, 又分反相、疏水和离子交换型及亲和色谱等多种固定相类型。固定相本身的孔隙率约 50%, 能耐 20MPa 压力。这种固定相的突出优点是孔内那种停滞流动相中的传质阻力大大减小。这是因为颗粒内部的传质过程主要靠 $600 \sim 800\text{nm}$ 穿透孔对流传递, 生物大分子溶质能随流动相的液流迅速达到孔内的活

性表面上。虽然对流孔之间存在着若干 50~150nm 的扩散孔，

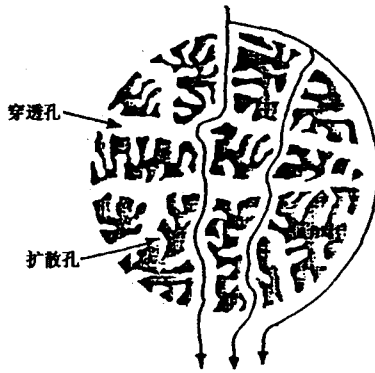


图 13.6 灌流色谱介质颗粒的孔结构

它们不能形成快速的对流传质，但这种孔的孔深一般不超过 $1\mu\text{m}$ ，扩散程很短，不会造成明显的传质阻力。因而整个传质过程非常快，提高了柱效。特别在高流速下，也不会因为传质来不及而使谱带加宽。我们从纤维素基质出发，通过与含乙烯基的化合物接枝聚合，再引入官能团合成了膜色谱介质^[34]。把合成的膜介质切成圆片填充到高效液相色谱柱中，进行了 IgG 等多种成分高效液相膜色谱分析^[35,36]，取得令人满意的结果，在亲和色谱下色谱柱的性能与灌流色谱的性能基本相近。

§ 13.2.2 无机基质生物大分子分离固定相^[37]

无机基质分离生物大分子固定相以多孔硅胶为基本材料，此外还可以采用可控孔径玻璃、氧化铝、氧化锆及羟基磷灰石等。将上述无机材料制成适宜应用的球形或无定形颗粒，经化学键合或涂层法改性后，制成不同分离模式的固定相或介质，以满足不同的分离分析目的。

对于生物高分子（例如生物工程产物）的反相色谱分离，特别是对多肽药物的分离纯化，需要尽可能高的分离效率，因此尽

可能地选择球形、全多孔，且孔径为 25nm 以上的硅胶键合固定相。单层键合固定相利于传质但稳定性稍差，而多层键合固定相传质虽稍差但稳定性好。对分子量较小者，可选用 C₁₈或 ODS 型配基，而分子量较大者以配基较短者为宜（如 C₈），但链短者稳定性比链长者稍逊。结合无机和有机基质优点的聚合物涂层型固定相有着更广泛耐用的 pH 值范围，这对生物大分子的分离是极其有利的因素，不过聚合物涂层型无论从制造还是从使用方面尚不如键合相成熟。表 13.7 是常见的无机基质分离分析生物大分子用的反相色谱固定相。

表 13.7 常见无机基质生物大分子分离分析用反相固定相

名 称	配 基	粒径 (μm)	孔径 (nm)	供应公司 或厂家
Amicon C ₈	辛基	5, 10, 15, 20	6, 10	Amicon
		20~45, 35~70	25	
Amicon C ₁₈	十八烷基	20~45, 35~70	6	Amicon
Ultraspher C ₃	丙基	5	—	Beckman
Ultraspher C ₈	辛基	5	—	Beckman
Ultraspher C ₁₈	十八烷基	5	—	Beckman
Hi-Pore RP-304	C ₁₈ 或 C ₄	5	30	Bio-Rad
Bio-sil ODS	C ₁₈	5, 10	8	Bio-Rad
Zorbax ODS	C ₁₈	5, 7	7~8	Du Pont
Zorbax Phenyl	苯基	3, 5, 7	7~8	Du Pont
Zorbax TMS	甲基	3, 5, 7	7~8	Du Pont
Zorbax C ₄	丁基	5	7~8	
Zorbax Bio Series	辛基	10	15	Du Pont
PEP. RP-1 Protein PLUS		—	30	
HP-12	可以是丙基, 丁基	5, 10, 15, 20	6	HP Chemicals

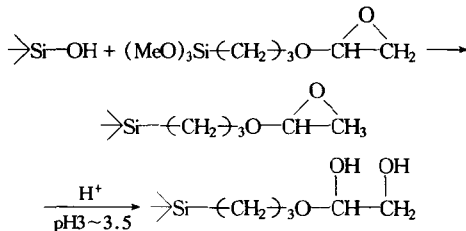
续表

名 称	配 基	粒径 (μm)	孔径 (nm)	供应公司 或厂家
HP-22	辛基,十八烷基	5,10,15,20	15	
HP-32	烷基,苯基等	5,10,15,20	25	
Nucleosil 800 C ₁₈	C ₁₈	5,7,10	30	Macherey Nagel
Nucleosil 500 C ₄	丁基	7	50	Macherey Nagel
Nucleosil 500 C ₈	辛基	7	50	Macherey Nagel
Nucleosil 500 C ₁₈	C ₁₈	7	50	Macherey Nagel
Nucleosil 1000 C ₄	丁基	7	100	Macherey Nagel
Nucleosil 4000 C ₄	丁基	7	400	Macherey Nagel
Nucleosil 4000 C ₁₈	C ₁₈	7	400	Macherey Nagel
Nucleosil C ₈	辛基	5,7,10	10	Macherey Nagel
Nucleosil C ₁₈	C ₁₈	3,5,7,10,30	10	Macherey Nagel
Lichrosper RP8	辛基二甲基	5,10	10	E. Merck
Lichrosper 100 RP18	C ₁₈ 二甲基	5,10	10	E. Merck
Lichrosper 500 RP8	辛基二甲基	10	50	E. Merck
Lichrosper 1000 RP8	辛基二甲基	10	100	E. Merck
Lichrosper 4000 RP8	辛基二甲基	10	400	E. Merck
μ -Bondapak C ₁₈	正十八烷基	10	12.5	Waters(Millipone)
μ -Bondapak Phenyl	苯基	10	1.25	Waters(Millipone)
Pep RPC HR5	C ₁₈ 二甲基	5	10	Pharmacia/LKB
Pro RPC HR5/2	C ₁₈ 二甲基	5	30	Pharmacia/LKB
Vydac 201 HSB	C ₁₈	5,10,15~20, 20~30	8	Separation Groups
Vydac 201 TPB	C ₈	5,10,15~20, 20~30	30	Separation Groups

续表

名 称	配 基	粒 径 (μm)	孔 径 (nm)	供应公司 或厂家
Vydac 214 TPB	丁基	5, 10, 15~20, 20~30	30	Separation Groups
Vydac 218 TPB	C ₁₈	5, 10, 15~20, 20~30	30	Separation Groups
TSK gel ODS-80T	C ₁₈	5	8	TOSOH(东曹)
TSK gel ODS-120T	C ₁₈	5	12	TOSOH(东曹)
TSK gel ODS-120A	C ₁₈ , 封尾	5	12	TOSOH(东曹)
300A ODS	C ₁₈	5	30	YMC
300 A Butyl	丁基	5	30	YMC

作为无机基质的尺寸排阻色谱固定相,其粒度及粒度分布,孔径或孔径分布以及孔容是基本参数. 粒径及粒度分布影响其柱效,例如,通常所使用的直径 $50\mu\text{m}$ 的软胶,理论塔片数能达到 $1500/\text{m}$ 左右的柱效,而直径 $10\mu\text{m}$ 的高效尺寸排阻色谱柱理论塔片数却可达到 $15000\sim 20000/\text{m}$. 理论塔片数越多,则可以分离的组分数目越多. 未经化学键合改性的可控孔径硅胶或玻璃可以直接用于中性糖的寡聚物和聚合物的分离,但用作生物大分子的亲水排阻色谱介质必须进行表面亲水处理. 尽管曾有人尝试过其它类型的亲水介质,但应用最广泛的还是二醇型化学键合硅胶:



这一类型的体积排阻色谱固定相被数家公司商业化并已获得广泛应用. 表13.8 列出了常见的无机基质亲水体积排阻色谱固定

表 13.8 常见的无机基质亲水体积排阻色谱介质

商品名称	键合相	粒径 (μm)	孔径 (nm)	孔容 (mL/g)	比表面积 (m^2/g)	排除极限			供应厂家 或公司
						蛋白	葡聚糖	聚苯乙烯	
Aquapore-OH	二醇相(甘油基)	10	10	1.7	350	1×10^5	9×10^4		Berownleelabs
			30	2.2	100	1×10^5	8×10^5		
			50			—	2×10^5		
			100			—	2×10^7		
			400			—	—		
Lichrospher Diol	二醇	10	10	1.2	250			8×10^4	E. Merck
			30	2.0	250		3×10^5		
			50	0.8	50		6×10^5		
			100	0.8	20		1.4×10^5		
			400	0.8	60		8×10^5		
Protein Columns 160	二醇	10	6	0.4	190	2×10^4			Waters Millipore
Protein Columns 1125			12.5	0.96	320	8×10^4			
Protein Columns 1250			25	0.98	130	5×10^5			

续表

商品名称	键合相	粒径 (μm)	孔径 (nm)	孔容 (mL/g)	比表面积 (m^2/g)	排除极限			供应厂家 或公司
						蛋白	葡聚糖	聚苯乙烯	
SyChroPack GPC	二醇	10	10	0.97	250	5×10^5	10^5	8×10^4	SynChrom Inc
		30	30	1.48	—	—	10^6	3×10^5	
		50	50	0.91	50	5×10^5	3×10^5	6×10^5	
		100	100	0.8	20	2×10^7	3×10^7	1.4×10^6	
TSK-G2000SW TSK-G3000SW TSK-G4000SW	表面羟基	10	13	0.8~1.0	—	—	—	3×10^6	TOSOH(东曹)
		10	24	1.5~2.0	—	1×10^5	—	—	
		13	45	2.4~2.8	—	5×10^5	—	7×10^5	

相。尽管它们的牌号各异，但其化学本质几乎均为二醇型化学键合硅胶。其中，TSK-Gel-SW 型固定相始终秘而不宣，但据许多实验室的研究，它极可能也是这一类的。

无机基质型高效离子交换色谱介质可分为薄壳型和全多孔硅胶型离子交换介质，薄壳型离子交换介质 (pellicular ion exchanger) 是最早应用于 HPLC 的无机基质离子交换介质，它是一个硬质无机内核的表面涂敷或粘上一层有机聚合物层，再经化学衍生而成为离子交换介质，例如，首先应用的强阴离子交换介质是在实心玻璃微球 ($30\sim 50\mu\text{m}$) 涂敷薄层聚苯乙烯-二乙烯苯，经氯甲基化后再季胺化。硅胶微球亦可应用于这一方法，利用不同的化学反应衍生或修饰后，成为各种不同类型的薄壳离子交换介质，它们的机械强度好，因其表面层很薄而利于传质，但是总交换容量相对较低。全多孔硅胶型离子交换介质通过在硅胶表面不同的修饰可再进一步衍生反应而得到。对基质的要求应考虑到所分离生物大分子的分子量范围，采用大孔硅胶，且应具有足够大的表面积。无机填料如以硅胶为基质，硅胶表面的硅醇基可以充当弱阳离子交换基团，在 $\text{pH} > 7$ 时更为显著。因此，以硅胶为基质的阳离子交换填料的质量取决于这种性质能否有效地消除和抑制。填料的合成大致可分为两类：一是通过烷基、芳基等在其末端键合离子交换基团，形成单分子层覆盖填料，另一类则是通过多步反应，形成顶端带有离子交换基团的多层或聚合层填料。填料粒度范围一般在 $3\sim 40\mu\text{m}$ ，孔径 $100\sim 400\text{nm}$ 。阴离子交换主要是二乙(甲)氨乙基 (DEAE, DMAE) 和季胺盐，阳离子交换基主要是羧甲基、磺酚基 (SP) 和磺酸基。一般孔径在 30nm 的填料既能保证良好的分离，又能达到较高的容量。在 $4.6\times 250\text{mm}$ 的离子交换柱上其容量可达 50mg 。

Regnier^[38] 在 100nm 和 400nm 大孔无机基质表面上合成了聚合层厚度为 10nm 的弱阴离子交换填料，整个聚合物层都挂上了离子交换基团，交换容量比以硅胶为基质的表面单层离子交换键合相高。在硅胶基质表面上较厚的聚合层是化学键合上的，对

大分子的有效孔所显示的交换容量仍然比 60nm 大。总之，无机基质提供了一个坚硬的基体，而薄膜离子交换又不致增加体系的压力。这类的填料孔径大，可以分析分子量超过 10^5 道尔顿的蛋白质。

Gupta 等人合成的聚合物离子交换填料，是在硅胶基质的表面上，使有机官能团和简单的有机硅烷单分子膜进行反应，这个硅烷化反应是用聚乙烯亚胺以共价键形式结合的，形成弱的阴离子交换填料，再进一步用环氧乙烷反应而形成叔胺离子交换填料。如果用酸酐，如琥珀酸酐、二甘醇酸酐反应，可得到弱的阳离子交换填料。用这个合成方法通常可制备阴离子和阳离子交换填料。

Alpert 等^[39]在合成过程中用聚乙烯亚胺(PEI)首先作为单分子层吸附在无机基质表面上，然后用环氧乙烷把聚氨层交联起来，

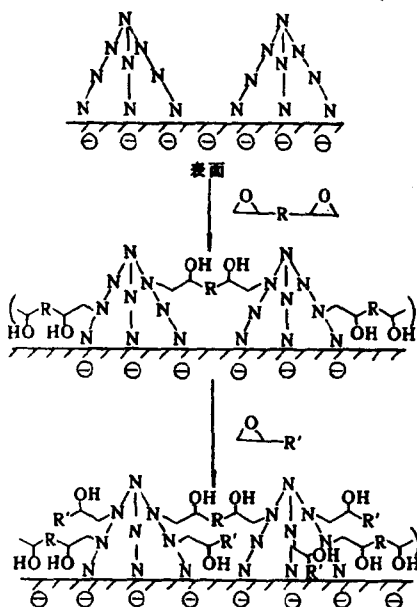


图 13.7 聚乙烯亚胺吸附和环氧乙烷的交联图

这一交联层通过许多活性点吸附在表面上,且保持得很紧密以至不能在任何色谱条件下脱落下来,高密度的氨基完全中和了所有表面的硅醇基,阻止了蛋白质在填料上的不可逆吸附,如图13.7所示. 由此而合成的阳离子和阴离子色谱填料,分离纯化生物大分子具有一定的特色.

表13.9和13.10是常见生物大分子分离分析用的薄壳型和无机基质型离子交换色谱固定相.

表 13.9 常见薄壳型离子交换介质

商品名称	类型	聚合物 涂层	交换基团	粒径 (μm)	交换容量 (μg 当 量/g)	厂家或公司
AE-Pellionex SAX	SAX	PS-AE	$-\text{NR}_3^+$	44~53	10	Alltech Assoc
AS-Pellionex SAX	SAX	PS-DVB	$-\text{NR}_3^+$	44~53	10	Alltech Assoc
Bonda Pak AX/Cor	SAX	BP	NMe_3^+	37~50	10~15	Waters
Vydac SAX	SAX	PS-DVB	$-\text{NMe}_3^+$	30~44	100	Separation Group(Vydac)
Zipax SAX	SAX	LA-ME	$-\text{NR}_3^+$	25~37	12	Du Pont
Bonda Pak CX/Cor	SCX	BP	$-\text{SO}_3^-$	35~50	30~40	Waters
HC-Pellionex SCX	SCX	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	37~53	60	Alltech Assoc
Vydac SC cation	SCX	PS-DBV	$-\text{SO}_3^-$	30~40	100	Separation Group(Vydac)
Zipax SCX	SCX	FC	$-\text{SO}_3^-$	25~37	5	Du Pont

注:BP为键合相;PS-DVB为苯乙烯-二乙烯苯共聚物;FC为氟塑料;PS-AE为苯乙烯脂肪族酯共聚物.

高效亲和色谱(HPAC, High Performance Affinity Chromatography)兼具亲和色谱和高效液相色谱的特点. 高机械强度使得HPAC可以以很高的速度淋洗并承受由此带来的较高工作压力. 高效亲和色谱一般可在几分钟至几十分钟内完成,相对于常规软

表 13.10 用于生物高分子分离的无机基质型离子交换介质

商品名称	用途	交换基团	粒径 μm	孔径 nm	交换容量 $\mu\text{mol/g}$	公司与厂家
Anion SW	离子色谱	$-\text{NR}_3^+$	5	17.5	400	Bio Rad
Zorbax Bio	通用	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	7	30	/	Du Pont
Series SAX, WAX	核苷酸	NH_2	7	30	/	Du Pont
Nucleosil SB	通用	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	5, 10	10	1000	Macherey-Nagel
Lichrospher SAX	通用	$-\text{CH}_2\text{-NR}_3^+$	5, 10	18	/	E. Merck
Poly Methyl A	多肽、蛋白、HIC	Polypeptides	5, 7, 15~20	30, 200	/	Poly LC
Poly Ethyl A	多肽、蛋白、HIC	Polypeptides	5, 7, 15~20	30, 100	/	Poly LC
Polypropyl A	多肽、蛋白、HIC	Polypeptides	5, 7, 15~20	30, 100	/	Poly LC
Poly butyl A	多肽、蛋白、HIC	Polypeptides	5, 7, 15~20	30, 100	/	Poly LC
SynChropak 300	蛋白质	NR_3^+	5	30	/	SynChrom
SynChropak AX 100	蛋白质	$-\text{NR}_2$	5, 6, 5, 55	10	/	SynChrom
SynChropak AX 1000	蛋白质	$-\text{NEt}_2$	5, 6, 5, 55	10	/	SynChrom
TSK-Gel DEAD-2SW	生化用	$-\text{NEt}_2$	5	12.5	>300	Toyo Soda

续表

商品名称	用途	交换基团	粒径 μm	孔径 nm	交换容量 $\mu\text{mol/g}$	公司与厂家
TSK-Gel DEAE-2SW	生化用	$-\text{NEt}_2$	10	15	>300	
Zorbax Bio	有机碱	$-\text{SO}_3^-$	7	30	/	Du Pont
Series SCX, WCX	多肽	$-\text{COOH}$	7	30	/	Du Pont
Nucleosil-SA	通用	SO_3^-	5, 10	10	1000	Macherey-Nagel
Poly CATA	蛋白	聚天门冬氨酸	5, 7, 15, ~20	30, 10	/	Poly LC
SynChropak S300	蛋白质	$-\text{SO}_3^-$	6.5	30	/	SynChrom
SynChropak CW300	蛋白质	$-\text{COOH}$	6.5	30	/	SynChrom
TSK-Gel CM-2SW	生化分离	$-\text{COOH}$	5	12.5	>300	Toyo Soda
TSK-Gel CM-3SW	生化分离	$-\text{COOH}$	10	25	>300	Toyo Soda

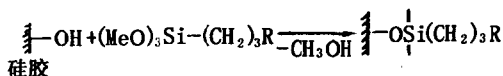
胶亲和色谱的几小时至几十小时,不仅可以提高效率,还可以改善回收产物纯度和浓度;淋洗速度快使得色谱峰非常尖锐,这大大提高了信噪比而使检测灵敏度得以大幅度提高.高度的亲和力使得 HPAC 在所有色谱方法中具有更高的选择性,正是由于这一特性,使得 HPAC 中的分离效率随填料粒径减少而增加的规律变得不那么重要了,所以有可能使用大粒径的硅胶而仍获得良好的分离.此外,配基结合的牢固性也可以延长填料的寿命并提高产物的质量,这对生物工程的分离、纯化工作是非常有利的.

当然,无机基质也有其弱点,主要是耐受 pH 值范围窄(pH=2~8),并且残余硅羟基可造成非特异吸附而降低收率,甚至导致产品失活.

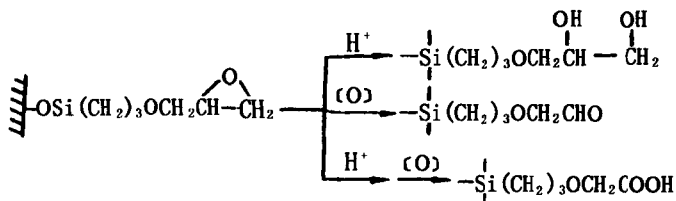
最重要的无机基质是多孔硅胶.当然,如果解决了生产价格问题,可控孔径玻璃以其孔径分布窄及孔径易于控制的特点,也是优良的基质.因它们的化学本质是一样的,故不再单独加以讨论.硅胶的孔径在 30~100nm 为宜;过小,会产生凝胶渗透或体积排除效应,而过大时又势必会因比表面积的降低而减少样品负载量.过大的孔容量会损坏机械强度,因此有中等孔隙度即已足敷应用.由于亲和色谱高选择性的特点,使得过细的颗粒度并不是很必要的,因此,在 HPAC 中可使用 5~50 μm 左右的粒度^[40].最近,直径小至 0.7~2.1 μm 的无孔或“非渗透性”小直径硅胶也应用到 HPAC 上^[41],进一步提高了分离速度.

为了使 HPAC 的固定相接上配基,必须进行硅胶质的活化.硅胶的活化应解决三个问题.一是提供与配基反应的基团;二是提供适当长短的间隔臂;三是解决残余游离硅羟基带来的非特异性吸附并对硅胶提供保护,以使其工作于更广的 pH 值范围.与其它硅胶的修饰类似,这里可用表面修饰和聚合物涂层两种方法.

由于亲和色谱中不需要很高的配基浓度,故在表面修饰时主要利用烷氧基硅烷化在水相中与硅胶反应,以形成可供进一步衍生反应的基团:

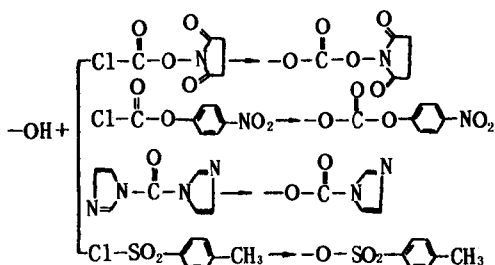


当 R 为环氧基时还可进一步转化为其它基团，如



当 R 为 $-\text{SH}$ ， $-\text{NH}_2$ 等基团时，也可以以类似的反应形成不同活化形式的基团。

这里生成的 $-\text{OH}$ ， $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ ， $-\text{CHO}$ ， $-\text{COOH}$ ， $-\text{NH}_2$ ， $-\text{SH}$ 等均可进一步反应。例如，羟基又可进行一系列类似软胶中应用的活化方法：



环氧基与蛋白质上的氨基虽可以直接反应，但反应速度很慢。如让它与一系列其它试剂反应，则可以有很大的灵活性，图 13.8 中示意地给出了环氧硅胶的各种键合反应途径。例如，以大豆胰蛋白酶抑制剂为配基分离胰蛋白酶，确认以醛基硅胶效果最好。由于采用 $5\mu\text{m}$ 硅胶为基质，所得色谱峰非常尖锐，因而检测灵敏度亦随之提高。在 280nm 检测时，胰蛋白酶最低检测量达 1ng ，并且酶的活性回收率也提高了。

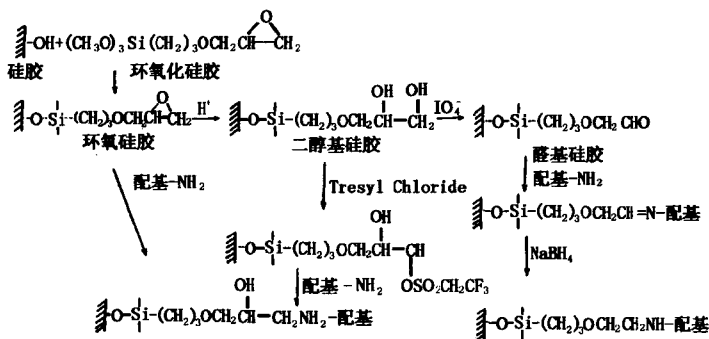


图13.8 配基与环氧硅胶偶联的途径

早期使用的环氧硅胶,键合效率很低.现已发展出一种商品化的新型聚合物包覆型环氧硅胶,它的基质为直径 $37\sim 55\mu\text{m}$ 、孔径 50nm 的硅胶,聚合物涂层是亲水型的,可以避免蛋白质的非特异性吸附,而表面稳定的环氧基则可以与各种配基键合^[42].这也表明了一种趋势,即已活化好的预装柱将会更快地走向市场.

亲水性聚合物涂层应更适合于 HPAC 的要求,以 DEAE-衍生的葡聚糖或琼脂糖涂层的硅胶有良好的应用前景.

在硅胶活化过程中,间隔臂的长短并未引起太大的问题,因为这些硅烷化试剂本身已带有足够长的间隔臂,无须专门考虑.表 13.11 列出的是一些常见的市售高效亲和色谱介质.

利用蛋白质与固定相之间的弱疏水相互作用的疏水作用色谱,特别适用于蛋白质类生物工程产品的分离.1980年前后,不少学者就疏水作用的机理、分离规律等进行了大量研究,但 these 工作多是用软或半硬基质进行的,其基本形式是将短烷基链键合于亲水性微球上,作为配基的烷基链的密度通常不大,且操作压力和流速均不能提高.为改进 HIC 的分离效率和分离速度,出现了以硬质高聚物微球、硅胶及可控孔径玻璃为基质的高效疏水作用色谱 (HIC) 固定相^[43~45].

与其它类型基质相比,对用于这种介质的硅胶基质并没有特

殊的要求，只要孔径在 25~100nm 之间且有较大的比表面积就可以应用，与对可控孔径玻璃的要求相似，只要经过表面修饰或涂层，使其具有合适的亲水表面和较弱的疏水基，就可以制备出高效疏水作用色谱。

表13.11 市售高效亲和介质载体

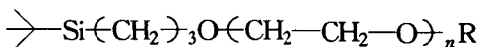
类型	商品名	基质	材料 (μm)	主要用途	供应公 司或厂家
活化凝胶					
醛基		硅胶	10, 30	偶联氨基	Serva, Sterogen, Chromatochem
羧甲酸脂	HyPAC Carbonite N	硅胶	5~10	偶联氨基	Barspec
环氧	Ultrafinity-EP	硅胶	10	偶联氨基	Beckman
	Durasphere A	硅胶	7	偶联氨基	Alltech
Tresyl	SelectiSpher Tresyl	硅胶	10	偶联巯基	Pierce
	Shim-Pack AFC-RT	硅胶	10	偶联巯基	Shimadzu
	YMC-Pack	硅胶	10	偶联巯基	YMC
	AFS-Tresyl				
清蛋白	Resolvosil	硅胶	10	对映体分离	Nachery-Nagel
硼酸盐	Selecti Spher				
	Boronate	硅胶	10		Perstorp Biolytica AB
	Shim-Pack AFC-BN	硅胶	10		Shiadzu
	YMC-Pack	硅胶	10		YMC
	AFS-Boronate				
蓝染料	SelectiSpaer	硅胶	10		Perstorp Biolytica AB
	Cibacron Blue				
	Durasphere	硅胶	7		Alltech
	Shim-Pack AFC-CB	硅胶	10		Shimadzu

续表

类型	商品名	基质	材料 (μm)	主要用途	供应公 司或厂家
伴刀豆球 蛋白 A	SelectiSpher Con A	硅胶	10		Perstorp Biolyti- ca AB
	Durasphere Con A	硅胶	7		Alltech
	Shim-Pack AFC-CA	硅胶	10		Shimadzu
亚氨基二 乙酸	Immunodiacetic and	硅胶	10		Serva
	Si 100				
血清类粘 蛋白	Shodex AF-PAK	硅胶	15~20		Showa Denko
	LKB-Enantiopac	硅胶	10		Pharmacia-LKB
蛋白质 A	SelectiSpher Protein A				
	Durasphere	硅胶	10		Perstor Biolytica AB, Pierec
	Protein A	硅胶	7		Alltech
	Shim-Pack AFC- PRA	硅胶	10		Shimadzu
	HiPac Protein A	硅胶	30		Chromatochem
蛋白质 G	SelectiSpher Protein G	硅胶	10		Perstor Biolytica AB
	Shim-Pack AFC- PRG	硅胶	10		Shimadzu
	Gammabind HPLC	硅胶	30		Genex
	YMC-Pack	硅胶	10		YMC
	AFS-ProteinG				

尽管曾研究过不同类型的高效疏水作用固定相，但有实用价值的主要是两类。一类是在基质表面键合上短链烷基或苯基的固

定相^[46]，例如 Phenyl-TSK-Gel 3000 SW 柱即是一种性能优良的商品化 HIC 柱；另一类是醚型键合相^[47,48]，在硅胶上键合上环氧丙氧基三乙氧基硅烷，再在路易斯酸催化下接上短链烷氧基而成：



如果将聚乙二醇与环氧化硅胶反应，则可制备出聚乙二醇型 HIC 介质，我国有几家单位曾对此进行过深入研究并取得了很好的结果。

§ 13.3 生物大分子分离分析的影响因素

在生物大分子的高效液相色谱的分离分析中，体积排阻、离子交换、疏水作用、反相液相和亲和色谱是最常用的分离模式，由于每一种分离模式的分离机理有所差别，因此根据被分离生化样品的性质选择适当的分离模式和操作条件是一个重要的方面。Zhang 等^[49]曾基于大量的文献结果，建立了用于生物大分子分离分析条件选择的色谱专家系统知识库。本节将主要讨论各种高效液相色谱分离模式下操作参数对生物大分子分离分析的影响。

§ 13.3.1 尺寸排阻色谱的影响因素

1. 填料

分离度和蛋白质分离范围以及最小分离分子量之比是选择柱填料要考虑的首要问题。通常有两种类型柱填料被采用，即化学键合的硅胶和亲水树脂凝胶。一般以硅胶为基质的填料对于蛋白质的分离是合适的，因为它比起亲水树脂凝胶有较高的柱效率和分离度。目前 TSK 系列凝胶柱被认为是最好的蛋白质分离柱，但不同类型柱的性质却有许多不同之处。分离度高和吸附性小是 TSK 柱系列的特点。表 13.12 列出了 TSK 柱分离蛋白质的分子量范围，如分子量从 30 000 到 500 000 的蛋白质在 G3000 SW 上比在 G2000 SW 和 G4000 SW 上分离得理想，而分子量低于

30 000 的蛋白质在 G2000 SW 上分离较好, 分子量高于 500 000 的蛋白质最好在 G4000 SW 上分离.

2. 柱长

体积排阻色谱的分离度与柱长的平方根成正比, 因此应根据分离的要求确定柱长, 一般柱长 60~120cm 对于蛋白质的分离比较理想, 而长度 30cm 的柱子多用于快速分离. 图13.9 指出最小分离分子量之比与柱长的相关图.

表 13.12 球蛋白在一般洗脱液中在 TSK SW 柱上的分离

柱填料	分子量分离范围	最理想的范围
G2000 SW	500~100 000	低于 30 000
G3000 SW	10 000~500 000	30 000~500 000
G4000 SW	20 000~7 000 000	高于 500 000

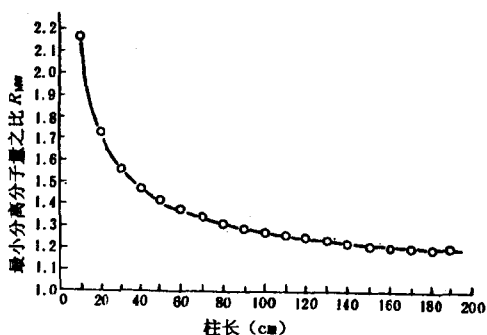


图13.9 最小分离分子量之比与柱长的相关性

3. 洗脱液

以硅胶为基质的填料, pH 范围在2.0~8.0, 如果超出这个范围, 将会使键合相的有机层溶解速率增加, 加快柱子的恶化, 缩短柱子的寿命. 键合硅胶如 TSK 系列凝胶柱在分离蛋白质时保留时间主要取决于填料表面上的硅醇基与离子的反应, 当洗脱液离子强度低时, 这种现象十分明显. 洗脱液的离子强度增加到

0.3~0.5mol/L时,离子反应能够被抑制.不断增加离子强度会引起蛋白质和键相填料的有机膜之间的疏水反应,其结果使洗脱延滞.常用磷酸盐和硫酸盐进行离子强度的调节,用氯化钠作离子剂疏水作用最小,但pH不能太低,因为氢离子会腐蚀不锈钢柱,离子反应可由抑制硅氧烷的解离而消除,这种抑制的完成可用pH<4来控制.但一些蛋白质在低pH情况下,回收率损失不少,因此pH值接近中性较为理想.

实际上,蛋白质和柱填料之间的疏水作用并不是如此严重,疏水作用只影响蛋白质的洗脱.例如,溶菌酶和 α -糜蛋白酶保留值由于疏水作用而延滞,加入有机溶剂可以消除疏水作用.在疏水作用现象难于确定的情况下,以不破坏蛋白质选择性为前提,可以加入5%~10%的乙醇或异丙醇,这样可以降低疏水作用.

4. 流速

蛋白质分离时,流速对分离度的影响是一个很重要的因素.一般在低流速下蛋白质的分离是比较理想的,如流速在0.1ml/min以下,蛋白质的分离度很好;流速在0.5~1.0ml/min时,对7.5mm直径的柱子,提供了比较好的分离效率和时间.图13.10指出了最小分离分子量之比与流速之间的关系.

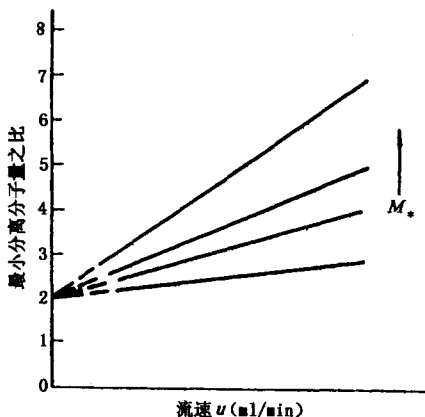


图13.10 最小分离分子量之比与流速的关系

5. 样品容量

进样体积和样品的浓度将明显地影响蛋白质的分离度, 要想得到最好的分离度, 注入样品的浓度范围一般在0.01%~0.5%, 如果样品浓度高于1%或者进样体积大于柱体积, 其结果将会降低分离度, 对分离和纯化不利. 样品量如低于10 μ g, 往往导致峰的不对称性和低的回收率. 实际上最好是高浓度、小体积, 在一般范围内可以得到好的分离效果. 蛋白质的样品体积为柱体积的1%~3%比较合适, 无论是分离效果和样品在柱上的负载都比较满意.

6. 蛋白质在变性洗脱条件下的分离

变性溶剂如6mol/L 盐酸胍($\text{CH}_5\text{N}_3\text{HCl}$), 8mol/L 脲(NH_2CONH_2), 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)等有助于精确地确定蛋白质的分子量. 洗涤剂如SDS, 主要是用在球蛋白的分离上.

溶液里的蛋白质由于变性, 分子量会有较大的增加. 在变性溶剂中, 柱的分离范围因此而移动到低分子量范围内, 采用变性溶剂6mol/L 盐酸胍和0.1%的十二烷基硫酸钠, 在TSK SW凝胶柱上蛋白质的分离范围如表13.13所示. 与通常的洗脱分离蛋白质范围比较(表13.12), 显然, 这三种类型TSK SW凝胶柱的分子量分离范围和分离条件比较理想.

表 13.13 蛋白质在变性洗脱条件下在 TSK - SW 系列柱上分离¹⁾

柱填料	分子量分离范围		最佳分子量分离范围	
	在 6mol/L 盐酸胍中	在 0.1% SDS 中	在 6mol/L 盐酸胍中	在 0.1% SDS 中
G2000 SW	1000~25 000	15 000~25 000	低于 10 000	
G3000 SW	2000~700 000	10 000~100 000	10 000~70 000	低于 60 000
G4000 SW	3000~400 000	15 000~300 000	高于 70 000	高于 60 000

1) 6mol/L 盐酸胍中含有 0.1mol/L 磷酸氢二钠(pH6.0); 0.1% SDS 含有 0.1mol/L 磷酸氢二钠(pH7.0)

较高的洗脱剂粘度和流速将影响到蛋白质的分离。因此，蛋白质在 6mol/L 盐酸胍和 8mol/L 脲的高粘度的洗脱液中分离时必须在低流速下完成。对于 7.5mm 内径的分离柱，体积流量控制在 0.25~0.5ml/min 范围内是恰当的。

蛋白质-SDS 组成的复杂络合物，在 SDS 水溶液中解离，离子强度对这个络合物的稳定性影响很大，随着离子强度的增加，蛋白质-SDS 络合物洗脱出的时间推迟，分离效果就比较好。如果不断增加离子强度，将会引起蛋白质-SDS 在柱上的吸附，结果使峰增宽。如用分子量对洗脱体积作图，数据就比较分散。一般采用在 0.1% 的 SDS 水溶液中加入 0.1mol/L 的 Na_2HPO_4 ，pH7 是合适的。当然，SDS 的浓度也影响到蛋白质-SDS 络合物的洗脱，如在 TSK 3 000 SW 柱上，用 0.2% SDS 水溶液分离蛋白质，可使分离的分子量范围延续至 1 000，如用 0.1% 的 SDS 水溶液仅达到 10 000；因此，低分子量的多肽可以用 0.2% 的 SDS 水溶液含 0.2mol/L Na_2HPO_4 (pH7) 作为洗脱液。

§ 13.3.2 离子交换色谱的影响因素

1. 填料孔径的影响

填料孔径和样品分子的大小直接影响到色谱柱的分离度和柱容量。

离子交换色谱 (HPIEC) 的保留值受到两个因素控制。大孔径填料使溶质产生不同的内在的渗透和离子交换表面的静电效应。在体积排阻色谱中溶质的大小接近于填料的孔径，在孔径内溶质分子大小受到严格限制。这种作用直接阻碍了溶质在填料和流动相中的传递，其结果使分离度降低。HPIEC 中也有溶质大小接近孔径的，这个内在的排阻选择性同样会引起峰的扩张。在高效离子交换色谱中采用的是大孔径的填料，易于控制溶质在流动相中的传递过程，孔径和溶质大小的最佳关系虽然难以确定，但实验证明，30~50nm 孔径有好的分离度，可以分离分子量大于 10^5 道尔顿的蛋白质。

因为离子交换色谱是表面作用的直接结果，自然它的柱容量与表面积成正比。确切地说，不是全部的表面积，而是对大分子有效的表面积。一般要求填料应当对所分离的蛋白质大分子是有效的，并且溶质必须渗透到填料表面上，其有效的表面积 A_a 可用下式表示

$$A_a = A_0 + K_a A_i \quad (13.31)$$

式中， A_0 是离子交换色谱柱床颗粒外表层面积， A_i 是柱床颗粒内孔表面积， K_a 理解为表面系数，它表示在色谱吸附过程中对离子有效的那部分面积的分数的范围是 0~1。很明显，分子的种类不同其 K_a 值是不同的，分子的大小如近于孔的大小，则 K_a 为零。如对血红蛋白 (hemoglobin) 和牛血清蛋白 (BSA)，在 25~30nm 孔径的填料上 $K_a A_i$ 比较大，因此，柱容量最高，BSA 一般达 100mg/g。而小分子的蛋白质如碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)，在 10nm 孔径的填料上也可能获得较大的柱容量。相反，对很大的蛋白质分子，则需 50~100nm 孔径方可得到最大的柱容量。

对 5~10 万分子量的蛋白质，孔径为 25~30nm 的离子交换填料应用最广。在 (300mm×4.2 mm i. d.) 离子交换柱上，平均蛋白质的容量为 10mg/g。柱容量对分离度的影响很小，总的超载达 50mg 时蛋白质在离子交换柱上仍然可以分离制备。

2. 柱长的影响

柱长对蛋白质分离度的影响是很小的，差不多 25cm 和 5cm 的柱对蛋白质的分离度是一样的。短柱分析蛋白质的优点为：(1) 洗出蛋白质的体积小，其浓度相应比较高；(2) 由于浓度高，因此灵敏度提高约 6 倍；(3) 柱的负载问题少；(4) 操作压力小；(5) 柱寿命长；(6) 较便宜。5cm 的短柱柱容量可以达到几毫克。实际上 5cm 柱长的分离度是 30cm 柱长的 75.8%，其下降的原因主要是柱体积减少所致。图 13.11 表示了离子交换色谱和反相液相色谱柱长对保留时间的影响。

3. 流速的影响

关于流速对峰扩张和分离度的影响，Giddings 已有详细的论述。他指出分子扩散系数减少，使扩散到填料孔内和孔外的分子随之减少。分子量增大，扩散系数降低，传质的问题也随之突出，因此增加柱中的流速只会恶化传质。例如对于 7 万分子量的蛋白质分子，若保持与小分子相同的柱效，线性流速应为 0.1 mm/s 或更低。对于一根 250mm × 4.0 mm i. d. 的常规分析柱，流速在 0.25 ml/min 时能得到较好的分离度。分子量为 20 万的蛋白质，从这根柱子上洗出的时间小于 100min。在大多数情况下，流速为 0.5~1.0 ml/min 时，分析时间约为 30min，虽然仍可完成分离和分析，但分离度相对较低。

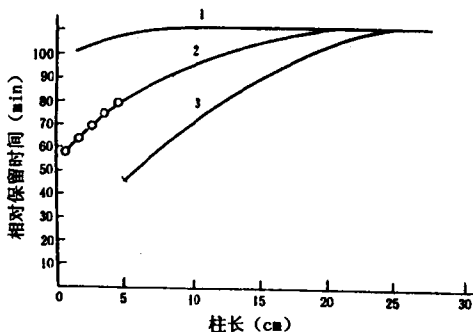


图13.11 柱长与相对保留时间的关系

1. 生物大分子在反相色谱柱上;
2. 生物大分子在离子交换柱上;
3. 小分子在离子交换柱上。

4. pH 的影响

蛋白质在离子交换色谱中分离的基础是用 pH 来控制蛋白质的电荷。如果流动相的 pH 高于蛋白质的等电点 (pI)，它将带有净的负电荷；如果流动相的 pH 低于蛋白质的 pI 时，则显示净的正电荷，因此，蛋白质的 pI 决定了是选择阳离子交换柱还是阴离子交换柱，pI 高的蛋白质最好在阳离子交换柱上分离，pI 低的蛋白

质可选择阴离子交换柱。

经典的离子交换和高效离子交换色谱,一般是非常相似的,不同处在于离子强度的变化,其分离度和分离时间也受到影响.蛋白质在离子交换柱上的脱附需要高的离子强度,并且它与填料的配基密度有密切的关系.采用不同方法合成的填料,其脱附动力学也不同.所以比较只能在相对洗出的位置上进行.在高效离子交换色谱中,酶活性的回收率比经典的离子交换色谱大大提高.如果在流动相中加入稳定剂,可以在离子交换柱上得到稳定的蛋白质.

无论在强的还是弱的阴离子交换柱上,蛋白质均显示出不同的 pH 值影响结果,由此决定了它的保留选择性、分离度和回收率等因素.图13.12明显地表示出不同蛋白质在不同的 pH 条件下的保留选择性.大豆胰蛋白酶(STI)随着 pH 的降低而保留时间大幅

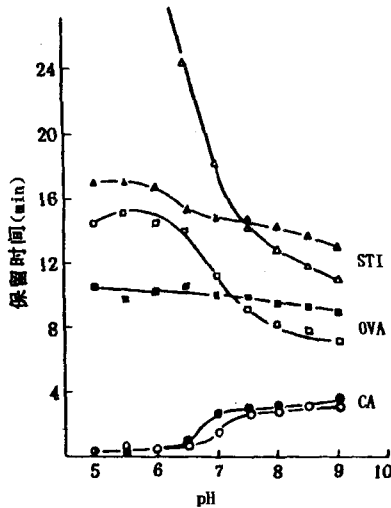


图13.12 在强的和弱的阴离子交换柱上蛋白质在不同 pH 条件下的保留特性
WAX Δ, □, ○; SAX ▲, ■, ●.
碳酸酐酶(CA), 卵清蛋白(OVA), 大豆蛋白(STI).

度地增加,这是由于 pH 的降低,增加了填料的离子化.而 pH 值在很大程度上是依靠相对吸附强度.因此,强保留的蛋白质受 pH 的影响是比较敏感的.相反,碳酸酐酶(CA)的保留时间是不增加的,因为 CA 的 pI 值是 7.3,在填料未离子化前就失去了负电荷的特性.蛋白质的保留值各异是分离选择性的基础,对应一个 pH 值就会得到蛋白质所对应的一个保留时间,尽管这种选择性预测困难,但在强阴离子交换和强阳离子交换柱上,一般对酸性蛋白质和碱性蛋白质来说, pH 中性或接近中性是较为理想的选择.

在离子交换色谱中分离度主要取决于两个不同蛋白质的保留时间,而保留时间的变化与 pH 值的改变相关.对于特定的蛋白质来说,要得到高的分离度仍然是选择比较合适的 pH 值.在强的和弱的阴离子交换柱上, pH 值的变化对不同蛋白质分离度的影响是十分明显的,当然,高的分离度对离子交换脱附动力学的研究也十分有利.蛋白质在高效离子交换色谱柱上回收率的研究紧密地与蛋白质的脱附动力学相关.一般来说保留强的蛋白质,脱附动力学比较慢,蛋白质的回收率低.

5. 离子强度的影响

在流动相中,盐的类型和 pH 一样重要,这两个因素共同控制着蛋白质在离子交换色谱柱上的保留行为、分离度和回收率.蛋白质的带电特征和离子化决定了蛋白质在离子交换色谱柱上参数的变化.单一的阳离子和单一的阴离子顶替作用并没有一定的规律,基本上靠实验来确定.无论是阳离子还是阴离子对于某一蛋白质顶替效果和次序都截然不同.表 13.14 中,镁盐的顶替作用比较强;在表 13.15 中,溴盐和柠檬酸盐的顶替作用比较强.盐的类型对蛋白质保留行为的影响,可分为三种类型,强的顶替作用、弱的顶替作用和中间顶替作用.强顶替作用的盐降低了蛋白质的保留时间,弱顶替作用的盐影响了蛋白质的回收率,一般选择中间顶替作用的盐较为合适.

表 13.14 阳离子对蛋白质的保留行为和分离度的影响

阳离子	相对顶替强度					分离度 R_s	
	OVA	STI	CHY	CYT	LYS	OVA/STI	CYT/LYS
Li ⁺	0.68	0.57	0.60	0.56	0.54	5.2	3.1
Na ⁺	0.82	0.72	0.93	0.97	0.98	5.4	3.6
K ⁺	0.80	0.69	0.93	0.98	0.98	5.0	4.0
NH ₄ ⁺	0.83	0.74	0.86	0.94	0.93	5.5	3.7
Mg ²⁺	1.00	0.94	1.00	1.00	1.00	3.1	2.8
Ca ²⁺	1.00	1.00	—	—	—	2.8	—

表 13.15 阴离子对蛋白质的保留行为和分离度的影响

阴离子	相对顶替强度					分离度 R_s	
	OVA	STI	CHY	CYT	LYS	OVA/STI	CYT/LYS
Br ⁻	0.70	1.00	0.93	0.77	1.00	4.1	2.2
PO ₄ ³⁻	0.59	0.74	1.00	1.00	0.90	—	3.8
C ₄ H ₅ O ₇ ⁻	1.00	0.80	0.64	0.44	0.51	5.3	3.6
Cl ⁻	0.60	0.88	0.87	0.66	0.80	5.4	3.6
ClO ₄ ⁻	0.81	0.88	—	—	—	4.3	—
F ⁻	0.45	—	0.74	0.56	0.58	—	6.7
HCO ₂ ⁻	0.61	0.79	—	—	—	4.1	—
SO ₄ ²⁻	0.73	0.70	0.70	0.60	0.61	6.1	3.0
HCOO ⁻	0.54	0.74	—	—	—	3.5	—
CH ₃ COO ⁻	0.54	0.59	0.75	0.73	0.70	5.7	4.1

§ 13.3.3 反相液相色谱的影响因素

1. 色谱柱的柱效率与蛋白质的分离度

蛋白质在反相柱上的保留相对较大，因此，在分离过程中采用梯度洗脱比较理想。为了比较反相柱的柱效率和蛋白质在梯度

洗脱下实际的分离度之间的关系，这里用 5 根常用反相柱，测定它们的塔板数、塔板高度和分离度，结果如表 13.16 所示。可见，在梯度条件下洗脱蛋白质，即使塔板数大，分离度也不一定理想，所以要综合地考虑评价反相液相色谱柱的性能。

表 13.16 蛋白质的分离度与柱效率

反相柱类型	柱尺寸 (cm)	粒度 (μm)	塔板数 N	塔板高度 $H(\mu\text{m})$	分离度 $R_s =$ BSA/OVA
Partisil ODS-3	25×0.46	10	4050	0.617	2.03
LiChrosorb-RP8	25×0.46	10	3918	0.638	—
Partisil C ₄	25×0.46	10	2397	1.043	1.52
Bio-Rad-ODS-5	25×0.46	5	2330	1.073	1.74
Vydac-test-C ₄	25×0.46	5	830	3.012	2.90

2. 流动相的选择

作为反相色谱中流动相的有机溶剂主要是乙腈、异丙醇、正丙醇和四氢呋喃等。乙腈由于粘度低，且和水组成的二元流动相对多肽和蛋白质的溶解度高，因此被广泛应用。在醇类溶剂中，由于甲醇对一些蛋白质的溶解度低，因而使应用受到了限制。乙醇、正丙醇、特别是异丙醇，和水组成的洗脱体系一般可以得到高的蛋白质回收率而被广泛采用。洗脱强度随有机溶剂强度的增加而增加，其次序为：乙腈 < 乙醇 < 丙醇 < 异丙醇 < 四氢呋喃。在选择有机溶剂的同时，要充分考虑到反相柱的类型和生物大分子的特性。

流动相中离子对试剂分无机酸和有机酸两种，无机酸通常有磷酸、盐酸和高氯酸，其作用主要是抑制硅羟基离子化，增加蛋白质的亲水性，伴随着蛋白质极性的增加，降低了在色谱柱上的保留时间。有机酸主要以三氟乙酸 (TFA) 和七氟丁酸 (HFBA) 应用比较多，虽然其作用也是阻止硅羟基的离子化，但也增加了蛋白质的疏水性。三氟乙酸是弱的疏水离子对试剂；七氟

丁酸是较强的疏水离子对试剂，由于疏水性增加，在色谱柱上的保留值也增加，从而提高了分离度。

3. 柱温的影响

蛋白质在反相液相色谱上的分离，柱温也是一个很重要的参数，一般随柱温的升高保留体积减少。例如，对蛋白质 BSA 和 OVA 的分离，温度由 0℃ 逐步增加到 65℃，分离度有明显下降。温度升高时，主要影响到蛋白质峰形的尖锐度，这是因为随着柱温的升高，蛋白质本身产生了不可逆的变性，使其构型发生改变。柱温对蛋白质分离的选择性没有多大变化。一般来说，提高柱温对蛋白质的分离制备是不可取的。

4. 流速的影响

在反相液相色谱中，流速是与蛋白质谱峰的展宽、分离度和制备量有密切关系的一个参数。一般流速增大，蛋白质色谱峰的展宽减小；流速减小蛋白质的色谱峰的展宽增大，特别是对于扩散系数小的蛋白质，随流速的减小，拖尾严重，直接影响到蛋白质的回收率。在一定范围内，蛋白质的分离度随流速的提高而增加，因为在某一确定的时间内线性梯度不断运行时，流速的改变对梯度斜率的影响非常敏感，使得分离度有所提高。

§ 13.3.4 疏水作用色谱 (HIC) 的影响因素

HIC 的流动相是采用离子强度的盐水溶液，在低离子强度的流动相中某些填料类似于高效液相排阻色谱，只有在高离子强度时是按 HIC 模型洗脱。填料选好后，影响洗脱能力的主要因素有：盐离子的种类、离子强度、pH 值和柱温等。

1. 盐的影响

盐的种类对洗脱能力的影响可以从两个方面来讨论。一是用盐摩尔表面张力增量来定量地说明盐对保留值的影响，盐的摩尔表面张力增量，蛋白质的保留值也大。二是各种盐和离子对破坏水的有序排列的能力，这种能力的大小即洗脱顺序与 Hofmeister 的系列是一致的。其洗脱能力为： $\text{KSCN} > \text{CaCl}_2 > \text{NH}_4\text{Cl} >$

$\text{NaCl} > \text{Na}_2\text{SO}_4$.

大多数高浓度的盐溶液对许多蛋白质是无害的。用圆二色谱研究表明，无论是 3mol/L NaCl 或 $1\text{mol/L Na}_2\text{SO}_4$ 都不会改变牛血清蛋白和卵清蛋白的构象。某些离子如 SO_4^{2-} 可提高蛋白质构象的稳定性，也能使蛋白质的溶解度下降，对蛋白质有盐析效应，使蛋白质与固定相的疏水作用增强，这些盐和离子的洗脱能力就较弱。有些离子如 Ca^{2+} ， SCN^- 会使蛋白质构象稳定性降低，使蛋白质发生不同程度的变性，增加蛋白质的溶解度，有盐溶效应。这样的盐或离子的洗脱能力就比较强。按照盐析效应和洗脱能力，可以将离子和盐按如下顺序排列：

负离子： PO_4^{3-} ， SO_4^{2-} ， CH_3COO^- ， Cl^- ， Br^- ， NO_3^- ， ClO_4^- ， I^- ，

SCN^-

正离子： $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ ， NH_4^+ ， K^+ ， Na^+ ， Li^+ ， Mg^{2+} ， Ca^{2+} ， Ba^{2+}

盐： Na_2SO_4 ， KH_2PO_4 ， Na_2HPO_4 ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， NH_4OAc ，

KOAc ， NaOAc ， NaCl

←—————盐析作用增强

—————→洗脱能力增强

选择合适的盐对保证蛋白质的分离以及分离后蛋白质的活性都很重要。在 HIC 中， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， NH_4OAc ，磷酸盐和氯化钠是常用的几种盐。

盐类型的不同引起保留值的改变。起始的盐浓度增加或者用强盐析能力的中性盐能够增加保留值，如果降低起始盐浓度或者用低盐析能力的中性盐，那么保留值就会降低。盐的种类对蛋白质的分离度也有较大的影响，对于亲水性的蛋白质必须采用高盐析能力的溶液，而疏水蛋白质以低盐析能力为佳。

2. 离子强度的影响

改变离子强度，会使洗脱方式改变，一般宜采用梯度洗脱方式，这样可以提高分离的选择性。低离子强度使蛋白质的疏水作用下降，是最方便、最常用的洗脱方法。

3. pH值的影响

大多数蛋白质在 $\text{pH}=4\sim 8$ 范围内是稳定的, 强酸和强碱介质会引起蛋白质变性, 因此流动相的 pH 值必须选择在蛋白质不失活的范围内. 若 pH 值不在蛋白质的等电点, 无论 pH 值偏向大或小的一边, 都会使蛋白质带上电荷, 此时如填料的配基不带电荷, 蛋白质易于洗脱.

4. 柱温的影响

蛋白质在高温下会失活, 所以一般都是在常温或更低的温度下操作. 在高效疏水作用色谱中蛋白质的保留对温度较敏感. 柱温升高, 疏水作用增强, 保留值增加.

在流动相中添加少量乙二醇、尿素、蔗糖等物质, 可降低流动相的极性, 使蛋白质的保留作用减弱. 表面活性剂也常被用作流动相的添加物, 可以改变蛋白质的保留特性. 在添加这些物质时要特别注意对样品活性的影响. 在疏水色谱中, 如在流动相中加入醇, 会明显地改变蛋白质分离的选择性.

§ 13.3.5 亲和色谱的影响因素^[50]

亲和色谱的洗脱, 无论是特异性的还是非特异性的, 主要是选择互补大分子的最佳条件.

1. 平衡和平衡缓冲液

洗脱前, 将大分子与填料平衡一段时间是重要的, 因为这不仅增加了相互作用, 常常可以提高凝胶床的分离度, 选择平衡缓冲液所具有的 pH 、离子强度、温度和化学组成, 都应使配体与蛋白质之间能发生比较强的相互作用.

2. 蛋白质的浓度和温度效应

对亲和力一般或较高的蛋白质, 其互补酶的浓度对亲和容量的影响不明显. 柱顶端结合的大分子与最初加入的大分子的浓度无关. 这里必须注意的是互补生物大分子与配体之间的相互作用与样品中的惰性蛋白质的浓度无关.

温度效应在亲和色谱中是非常重要的, 因为亲和填料吸附作

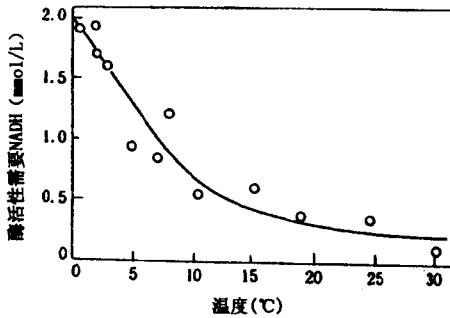


图13.13 乳酸脱氢酶与 N^6 -(6-氨基己基)-AMP-琼脂糖结合的温度效应^[50]

在 0°C 与 30°C 之间的几个温度内, 将含 1.5mg 牛血清蛋白(10 μ l)的酶样品加到含 0.5g 固定化的 AMP 的色谱柱上(50mm \times 5mm i. d.), 纵坐标为以 NADH 线性浓度梯度洗脱时, 酶活性达到高峰值所需要的 NADH 浓度(0~5mmol/L, 总体积为 20ml).

用的强度随温度的升高而减小. 图 13.13 给出乳酸脱氢酶与配体 AMP 相结合的温度效应. 由图可见, 洗脱酶的活性随温度的升高而减少, 在 0~10°C 范围内非常明显, 这是最佳的实验温度, 在这个温度范围内结合率降低具有特殊的意义. 因此, 利用不同的温度吸附和洗脱, 有利于生物大分子的纯化.

配位体与纯化的生物大分子之间达到平衡是非常缓慢的, 因此, 样品应以尽可能慢的速度加在柱上. 如果流速很快, 样品中蛋白质浓度又相应较高时, 往往少量的互补大分子会和杂蛋白一起流出. 如果样品浓度低, 即使流速较快, 互补生物大分子仍然保留在柱上. 生物大分子与配体相互作用对时间的依赖性反映在保留时间效应上, 如图 13.14 所示.

很明显, 16h 后结合率达 100%, 可观察到无论是柱的效率或酶与配位体之间的相互作用强度都随时间的增加而增加. 样品的体积根据它在亲和色谱上的亲和力的不同, 要求也不一样. 生

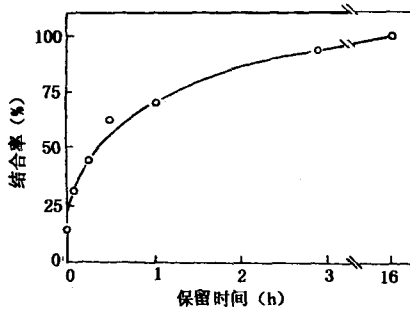


图 13.14 分批法条件下,保留时间对 N^6 -(6-氨基己基)-AMP-Sepharose 结合乳酸脱氢酶能力的影响^[50]

将吸附剂(0.5g 湿重,含 $1.5\mu\text{mol/mL}$)悬浮于 100ml 含 10IU 猪心肌乳酸脱氢酶的 10mmol/L KH_2PO_4 -KOH 缓冲液(pH 7.5)中,于不同时间内分析悬浮液的酶活性以推断结合的百分率。

物大分子与配体亲和力强时,对样品体积的要求不严格。生物大分子与配体亲和力弱,容易使蛋白质和惰性蛋白质一起流出,这时样品体积小一些比较合适。

3. 特异性洗脱

采用通用的配体填料,容易对性质相似的生物大分子表现出相似的亲和性,这给分离带来了困难。但用特异性置换剂时,所产生的浓度梯度,可以提高选择性,使性质相似、特异性程度不尽一致的生物大分子得到有效地分离。

凡是能与配体竞争的生物活性分子的游离配体,都十分强烈地影响着结合活性分子的洗脱过程。游离配体浓度若与固定化配体浓度相同,则可直接从填料上洗脱下结合的活性分子。

洗脱液浓度要根据活性分子与配体的亲和力的大小而定。亲和力大,则浓度要高;亲和力小,相对洗脱配体浓度则较低。通常选择对纯化的活性分子有高的亲和力、但其结构与填料上的配体不同的配体来洗脱,这样就保证了吸附和洗脱双重特异性,使

非特异性的洗脱减少到最小程度。

4. 非特异性洗脱

非特异性洗脱主要受缓冲液中的 pH、离子强度、温度和介电常数的控制。洗脱液最好是既能改变蛋白质的构象以降低蛋白质配体的亲和力，同时也不损害蛋白质和吸附剂的稳定性。在大多数实验中，只需改变单一的物理变量，就可能提高洗脱能力。如仅改变 pH，就足以使吸附蛋白质洗脱，被纯化的物质和基质稳定的 pH 一般较洗脱液的 pH 低。将 pH 从 7.8 降至 3.2，可将胰蛋白酶从大豆胰蛋白酶抑制剂-Sephrose 上洗脱。甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.5) 可解离抗原-抗体复合物。从亲和力很高的填料上解离蛋白质需要比较强的酸或比较强的碱，若加入蛋白质的变性剂-盐酸胍，则有利于蛋白质的解离。

改变洗脱液的离子强度使复合物解吸是一种十分方便的洗脱方法。生物特异性吸附蛋白的洗脱一般是通过在起始缓冲液中加入 0.5 mol/L 或者 1.0 mol/L NaCl 来实现的。从琼脂糖固定化抗 IgE 抗体上洗脱 IgE，需用高浓度的硫氰酸钠。使用温度梯度洗脱蛋白质是一种特别有用的方法。因为冷却能使洗脱液恢复到原有的缓冲液组成，从而能进一步直接研究解吸蛋白质。

§ 13.4 高效液相色谱在生物大分子分离分析中的应用

体积排阻色谱主要基于被

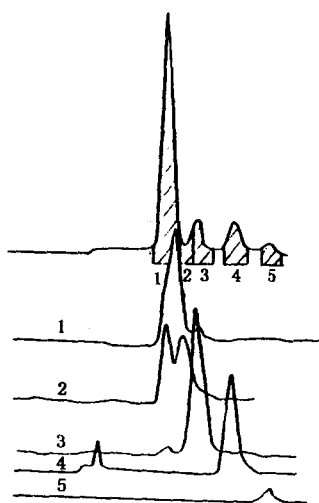


图 13.15 高密度脂蛋白的纯化图
制备柱: 22mm × 300mm i. d. TSK 3000SW; 样品: 10mg 溶于洗脱液中;
流动相: 0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.0) 含 4 mol/L 脲; 流速: 1.0ml/min;
紫外检测: 250nm.

分离样品的体积大小进行分离测定。体积排阻色谱的优点是样品回收率高，收集也较为方便；缺点是分离能力较低。图13.15是体积排阻色谱分离制备人血清中高密度脱脂蛋白质的色谱图。

体积排阻色谱纯化膜糖蛋白的抗原也取得很好的结果。在4℃下从血浆中取得异常的癌细胞变体 P₃₅，然后加入 2 mmolMgCl₂，使其破坏细胞成为稳定核蛋白。将此核蛋白溶解在 10mmol Na₃PO₄ (pH 7.4) + 15 mmol NaCl + 6.25% 脱氧胆酸钠的缓冲液中，并以植物外源凝集素的亲和色谱进行初步分离纯化的，洗脱后得到含膜糖蛋白，进一步用 Sephadex G200 透析浓缩，使膜糖蛋白的含量达到 1mg/L 粗品，将粗品通过 0.45 μm 的滤膜。将得到的含膜糖蛋白的粗品 200μg，分别溶解在 20μl 和 200μl 的洗脱液中，然后在体积排阻色谱上分离和纯化，其结果如图13.16 所示。

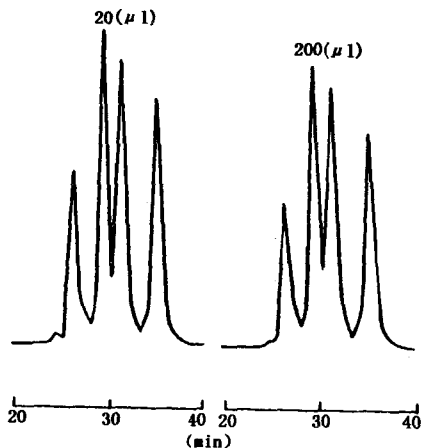


图 13.16 膜糖蛋白抗原立体排阻色谱纯化图
 色谱柱: Waters-I-250 和 I-125 相连的色谱柱;
 流动相: 10mmol/L 的 Na₃PO₄ (pH 7.4), 150mmol/L
 NaCl 和 0.25% 脱氧胆酸钠缓冲液;
 流速: 0.5ml/min; 紫外检测: 214nm.

蛋白质在离子交换色谱上分离纯化的研究,已有不少报道,但大规模的纯化仍在研究中.大豆中脂肪氧化酶(L_1)是一种同功酶,容易萃取,萃取的粗品在 $10\mu\text{m}$ 和 $30\mu\text{m}$ 颗粒度的离子交换色谱柱上分离纯化,其结果如图13.17所示.

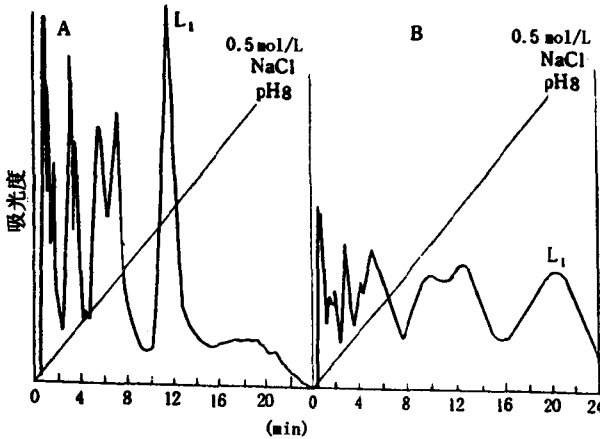


图 13.17 从大豆花提取的蛋白中脂肪氧化酶的分
 色谱柱: $50\text{mm} \times 4.1\text{mm}$ i. d. 填充 PEI-S-200 填料: A. $10\mu\text{m}$ 和 B. $30\mu\text{m}$;
 洗脱: 经 20 min 流动相由 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8) 到 0.5mol/L
 NaCl 缓冲液 (pH8); 流速: 1.0ml/min ; 紫外检测: 254nm .

TGF- α - β 半乳糖苷酶是转化生长因子,这类因子对细胞分化和分裂有非常重要的意义.在早期肿瘤细胞组织中含量比较高,其抗体可用于肿瘤的早期诊断.最近的研究表明,它可以促进伤口愈合,调节血管的形成,表皮的再生和肉芽的形成,其离子交换色谱分离如图13.18所示.

肿瘤坏死因子,是治疗肿瘤非常有效的生物制剂之一.在进行临床治疗前,必须进行纯化,以使除去基因重组 TNF 或体内外诱导的 TNF 中含有的生物活性成分或毒性产物.如胞壁酰二肽,磷壁酸等以及一些杂蛋白等,影响了 TNF 的正常作用的发挥和实际应用,用离子交换色谱在临床治疗前纯化得到了明显的效果,如图

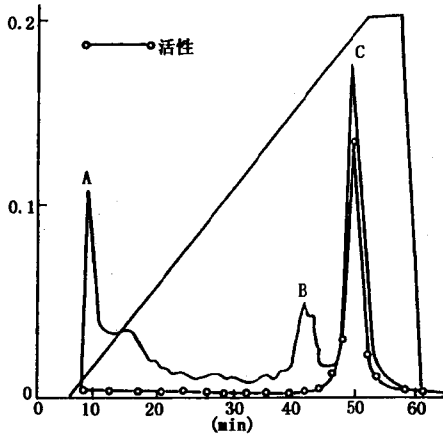


图 13.18 TGF- α - β 半乳糖苷酶离子交换
色谱分离图

色谱条件: 色谱柱 50mm \times 5mm i. d. 填充

Mono Q HR 5/5;

流动相: A. 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0);

B. 20 mmol/L Tris-HCl 和 0.7mol/L NaCl 缓冲液
(pH 8.0);

梯度: 经 50min 由 100%A 到 100%B;

流速: 1.0ml/min; 紫外检测: 280nm.

13.19 所示.

基因重组人体白细胞干扰素, 具有不同的构型, 同一种构型 γ IFN- α A 仍具有两种聚合体, 即二聚体, 三聚体和还有杂合体 γ IFN- α A/D. 用反相液相色谱进行分段梯度洗脱对基因重组人体白细胞的干扰素分离和纯化, 结果较佳.

混合的基因重组人体白细胞干扰素在反相液相色谱上分离纯化色谱如图 13.20 所示. 不同聚合体的干扰素反相色谱分离纯化如图 13.21 所示.

基因重组人体白细胞 IL-2 是人体内起免疫调节作用的一种蛋白质, 它具有强的疏水性, 分子量 15 500. 它以不溶解的聚合

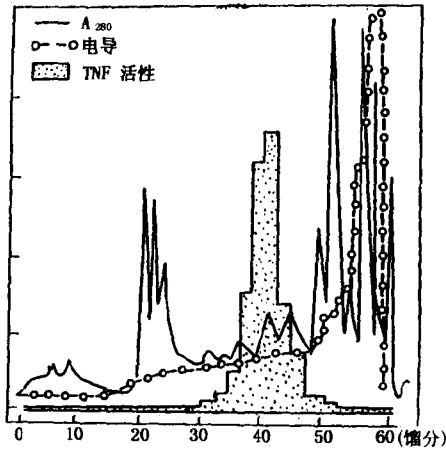


图13.19 离子交换色谱分离肿瘤坏死因子(TNF)
 色谱条件: 色谱柱 50mm × 50mm i. d. 填充 Mono Q; 流动相及洗脱形式: A. 20 mmol/L Tris-HCl 含 0.01% Tween 20 缓冲液 (pH 8.0) 洗脱杂蛋白; B. 上 40~70mmol/L 的 NaCl 缓冲液梯度洗脱, 在 50~65mol/L NaCl 缓冲液洗脱得到 TNF;
 流速: 1.0ml/min; 紫外检测: 280nm.

体在大肠杆菌上表达。图13.22 是纯度为 85% 的 IL-2 在半制备反相液相色谱上进行制备的分离图。

以灌注色谱 Poros 为基质的反相色谱填料类似于硅胶为基质的反相色谱填料, 明显的特点可以在碱性条件下分离。图13.23 是灌注反相液相色谱分离血管扩张素异构体的色谱图。

疏水作用色谱分离蛋白质主要基于被分离样品疏水性的差别。与反相液相色谱不同, 蛋白质在疏水色谱中的分离基本上不被破坏三级结构, 这就使得疏水作用色谱有更大的开发潜力。TSK 系列的疏水作用填料与一般以硅胶为基质的填料不同之处在于, 首先在硅胶表面上覆盖一层高分子化合物, 然后再将丁基或苯基通过缩水甘油键合在分子层上形成固定相。这是一类性能比较

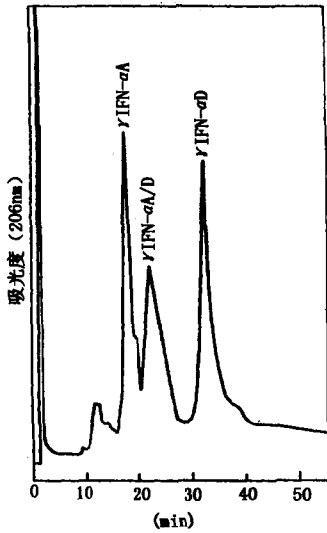


图13.20 混合干扰素的反相色谱分离
色谱条件: 色谱柱 250mm×4.2mm i.

d. 填充 SynChopak RP-PC₁₈;
流动相: A. 0.1% HClO₄ pH 2.5; B. 100% 乙腈; 梯度在 45min 内由 4.0% A~60% B;
流速: 2ml/min; 紫外检测: 206nm; 进样量: 15μg γIFN-α 和 8μg γIFN-α/D;
色谱峰: 1. γIFN-αA; 2. γIFN-αA/D(杂交); 3. γIFN-αD.

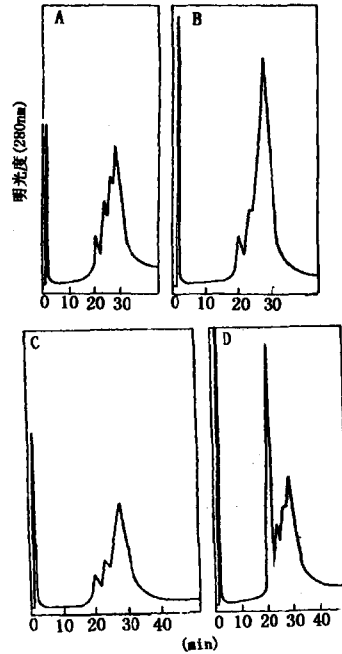


图 13.21 反相液相色谱分离 γIFN-αA
不同聚集体

色谱柱: 250mm×4.1mm i. d. 填充 Syn-Chopak RP-P C₁₈;
流动相: A. 0.1% HClO₄ 缓冲液 (pH 2.5); B. 100% 乙腈; 梯度在 30min 由 35% A 到 50% B; 紫外检测: 206nm; 流速: 2ml/min; A. 低聚 γIFN-αA; B. 二聚 γIFN-αA; C. 三聚 γIFN-αA; D. 混合样.

好的填料, 无论是分离度还是蛋白质生物活性的回收率都比较高.

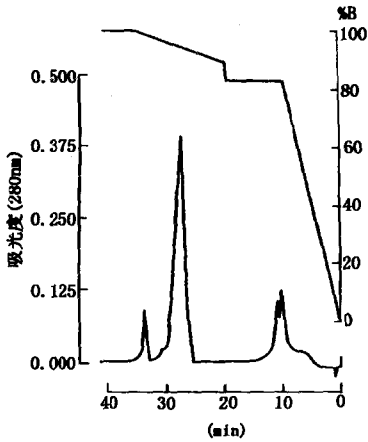


图 13.22 半制备的反相液相色谱纯化从离子交换色谱得到 IL-2 白细胞
 色谱柱: 250mm × 10mm i. d. 填充 Syn-
 Chropak RP-PC₁₈; 流动相: A. 0.1%
 TFA; B. 65% 乙腈; IL-2 在梯度洗脱
 时 28min 即可得到纯品; 紫外检测:
 280nm; 流速: 1.5ml/min.

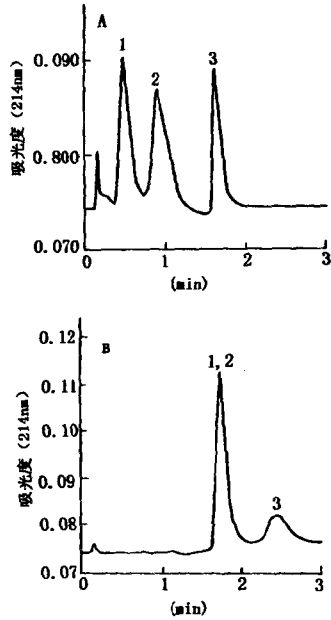


图 13.23 血管扩张素(angiotensis)异
 构体在 POROS R/H 的分离
 色谱柱: 50mm × 4.6mm i. d. 填充
 POROS R/H;
 流动相: 图 A 溶剂(a) 0.1% TFA; 溶剂
 (b) 100% 乙腈; 经 5min 由 100% (a) 到
 12% (b); 图 B 溶剂 (a) 10mmol/L
 Na₃PO₄; 溶剂 (b) 100% 乙腈; 经 5min
 由 100% (a) 到 12% (b);
 流速: 5ml/min; 紫外检测: 214nm.
 每一组含 2mg/L, 进样量 10 μ l.
 色谱峰: 1. 血管扩张素 II; 2. 血管扩张
 素 III; 3. 血管扩张素 I.

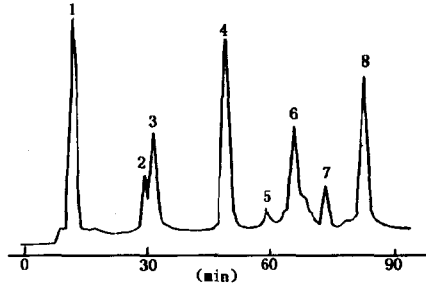


图 13.24 蛋白质在 Phenyl-G3000 SW 柱上的分离
色谱柱:150mm×6mm i. d.;

流动相:A.1.5mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在 0.1mol/L 磷酸缓冲液中;B. 0.1mol/L 磷酸;

梯度洗脱:经过 60min 由 100% A 到 100% B;

流速:0.5mL/min;紫外检测:280nm.

色谱峰:1. 细胞色素 C;2. 核糖核酸酶;3. 肌红蛋白;4. 溶菌酶;5. 卵清蛋白;6. 牛血清清蛋白;7. α -糜蛋白酶原;
8. α -糜蛋白酶.

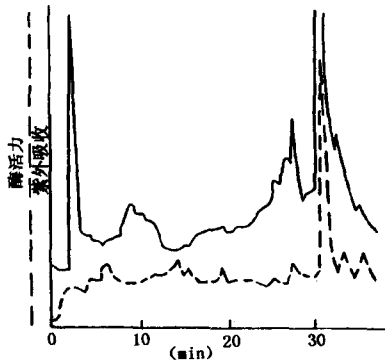


图 13.25 胰蛋白酶在 SynChropak Propyl 柱上的纯化
色谱柱:250mm×4.1 mm i. d.;

流动相:A. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.1 mol/L 在 0.02 mol/L 磷酸缓冲液中;B. 0.2mol/L 磷酸缓冲液;

梯度:经 30min $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 由 2.1 mol/L 到 0.1mol/L;

流速:1.0 ml/min;紫外检测:280nm.

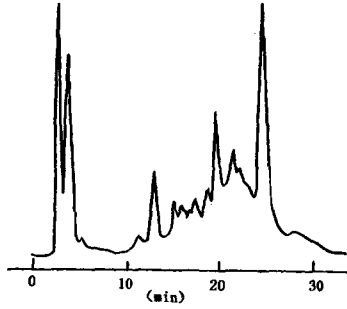


图 13.26 在疏水柱 TSK Phenyl-5PW 上人的血小板
溶菌产物的分离

疏水柱: 75mm × 7.5mm i. d. 填充 TSK phenyl 5PW;
 流动相: A. 1.7 mol/L (NH₄)₂SO₄ 在 0.1 mol/L
 Na₂HPO₄ 中 (pH 7.0); B. 0.1 mol/L Na₂HPO₄ (pH 7.0);
 梯度: 30min 从 0% 到 100% B;
 紫外吸收: 280nm; 流速: 1.0ml/min.

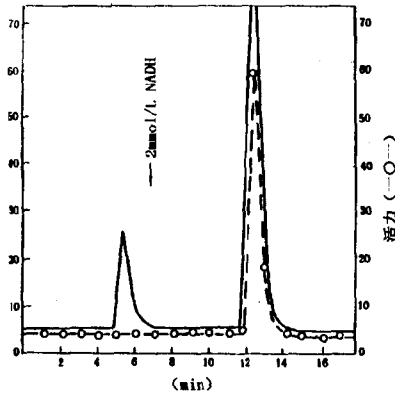


图 13.27 兔肌乳酸脱氢酶的纯化
 亲和柱: 100mm × 4.6mm i. d. 填充 Procion Blue Mx-r Silica;
 样品: 粗兔肌乳酸脱氢酶提取液 1ml;
 洗脱: 用 2.0mmol/L 辅酶 II (NADH) 脉冲洗脱在 5min 可得
 到纯的酶, 产率 80%; 紫外检测: 210nm.

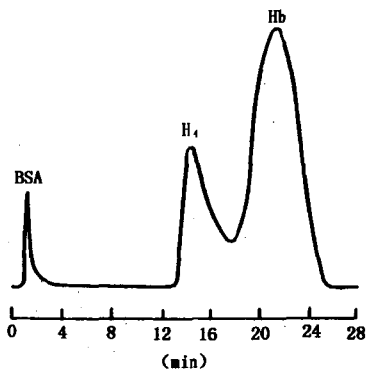


图 13.28 乳酸脱氢酶的同功酶分离

亲和柱: 100mm × 4.4mm i. d. 填充 Cibacron
Blue F3G-A Silica;

样品: LDH-H (1.3 μ g) + LDH-M (4.8 μ g) + BSA
(60 μ g) 在 0.1 mol/L 磷酸钾中 (pH 7.0);

洗脱: 亲和柱用 0.1mol/L 磷酸钾溶液 (pH 7.0)
在流速 1.0ml/min 下平衡; 用 NADH 0~4nmol/
L (在 0.1mol/L 磷酸钾中, 流动相 pH7.5) 20ml
混合梯度洗脱;

柱温: 20 $^{\circ}$ C; 紫外检测: 290nm; 活性测定:
340nm.

图13.24 是 TSK Phenyl-G3000 SW 填料分离标准蛋白质的色谱图。

图13.25 是胰蛋白酶在疏水作用色谱柱上的分离纯化谱图。

图13.26 是血小板溶菌产物在疏水柱 TSK Phenyl - 5PW 上的分离谱图。

以硅胶为基质染料作为配体的亲和色谱对于蛋白质和酶的分离纯化是比较理想的填料。由于染料价格便宜, 易于固定化, 用于规模性蛋白质制备的亲和色谱填料比较理想, Procion 染料用来大规模纯化 3-羟基丁酯脱氢酶。图13.27 和图13.28 是 Procion 和 Cibacron 键合硅胶固定相亲和色谱分离纯化兔肌酸脱氢酶和

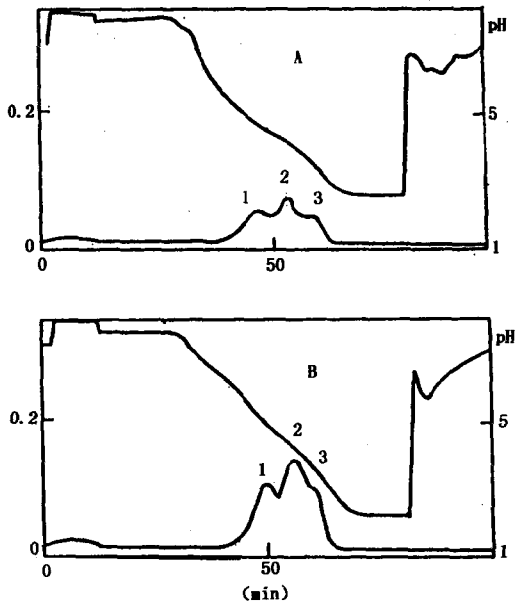


图 13.29 抗多糖免疫球蛋白 IgG 亚类的亲和色谱制备
A. 抗嗜血免疫球蛋白亲和纯化; B. 抗肺炎球菌多糖的亲和纯化。

色谱柱: Protein A Superose HR 10/2;

流动相: A. Na_2HPO_4 + NaAc + 甘氨酸 + NaCl (pH 8.1);

B. NaAc + 甘氨酸 + NaCl (pH 2.8);

pH 梯度: pH 8.1 经过 50min 降为 pH 2.8;

流速: 1.0 mL/min; 紫外检测: 280nm;

色谱峰: 1, IgG₂; 2, IgG₁; 3, IgG₂。

乳酸脱氢酶的同功酶的谱图。

多糖是免疫球蛋白 IgG 亚类的组成部分, 对研究生命科学中各种 IgG 的功能有很重要的意义。由于免疫球蛋白亚类有着不同的等电点, 这是选择性分离纯化的基础。人体中免疫球蛋白的亚类的分离选用以单克隆抗体为配体的生物亲和色谱, 应用

Protein A Superose 柱, 在高流速下, 采用 pH 的梯度, 很满意地分离纯化了抗嗜血免疫球蛋白的亚类及其抗肺炎球菌多糖抗体, 其分离纯化的亲和色谱如图 13.29 所示。

我们^[36]利用膜亲和色谱柱可以快速分离分析血浆中的 IgG. 其结果如图 13.30 所示。

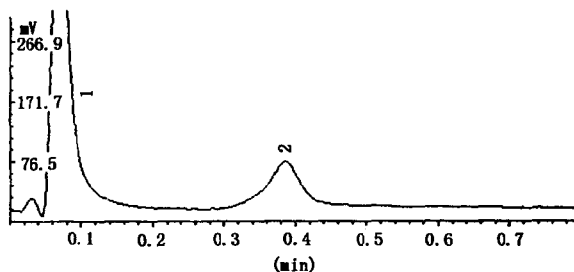


图 13.30 人血浆中 IgG 的膜亲和色谱快速分离分析
 亲和柱: 20mm × 4mm i. d. Protein A 固载化纤维素复合膜柱;
 样品: 人血浆由生理盐水稀释 10 倍; 洗脱: 上样液 A. 50 mmol/L
 磷酸缓冲液含 0.15mol/L NaCl (pH 7.0); 洗脱液 B. 0.2mol/L 甘
 氨酸盐缓冲液 (pH 2.3);
 紫外检测; 280nm; 流速: 3.0ml/min.

参 考 文 献

- [1] E. L. V. Harris, S. Angal, *Protein Purification Methods-A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1987.
- [2] 郭立安, 高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术, 陕西科学技术出版社, 西安, 1993.
- [3] M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.*, **418**, 3(1987).
- [4] 师治贤, 王俊德, 生物大分子的液相色谱分离和制备(第二版), 科学出版社, 北京, 1996.
- [5] W. Kopaciewicz, *J. Chromatogr.*, **358**, 107(1986).
- [6] S. Hjerten, *Protein Biol. Fluids*, **23**, 667(1976).
- [7] O. Sinanoglu, *Fed. Proc.*, **24**, 12(1965).
- [8] Cs. Horvath, et al, *J. Chromatogr.*, **129**, 129(1976).
- [9] B. M. Dunn, I. M. Chaiken, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2382(1974).

- [10] I. M. Chaiken, M. Wilchek and I. Parikh (eds), *Affinity Chromatography and Biological Recognition*, Academic Press, New York, 1983.
- [11] J. Porth, J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage, *Nature*, **258**, 598(1975).
- [12] P. Hubert and J. Porth, *J. Chromatogr.*, **198**, 247(1980).
- [13] L. Edljam and E. Jellum, *Acta. Chem. Scan.*, **17**, 2610(1963).
- [14] Separation News, Pharmacia Fine Chemicals, Vol. 13, 6, 1987.
- [15] K. K. Unger, *Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*, Marcel Dekker, New York, 1990.
- [16] E. Rassi, et al, *Chromatographia*, **19**, 9(1984).
- [17] F. Regnier, et al, *Chromatographia*, **24**, 146(1987).
- [18] 苏天升, 生物工程下游技术(刘国詮主编), p. 193, 化学工业出版社, 北京, 1993.
- [19] S. Hjerten and J. Liao, *J. Chromatogr.*, **457**, 165(1988).
- [20] D. P. Lee, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 327(1984).
- [21] L. L. Lloyd, *J. Chromatogr.*, **544**, 201(1991).
- [22] J. Richey, *Methods Enzymol.*, **102**, 223(1984).
- [23] B. Pavlu, U. Johansson, C. Nyhlen and A. Wichman, *J. Chromatogr.*, **359**, 449(1986).
- [24] Y. Bouriotis, A. Zefeiropoulos and Y. D. Clonis, *Anal. Biochem.*, **167**, 127(1987).
- [25] 苏天升, 李世贵, 胡喜章, *Anal. Sci.*, **7**(Supplement), 191(1991).
- [26] Y. Koto, K. Nakamura and Y. Kato, *J. Chromatogr.*, **354**, 511(1986).
- [27] K. Nakamura, T. Hashimoto, Y. Kato, K. Shimura and K. Kasai, *J. Chromatogr.*, **510**, 101(1990).
- [28] T. B. Tennikova, D. Horak and F. Svec, et al, *J. Chromatogr.*, **435**, 357(1988).
- [29] K. Makino, H. Wada and H. Ozaki, et al., *Chromatographia*, **20**, 713(1988).
- [30] Y. B. Yang and M. Verzele, *J. Chromatogr.*, **391**, 303(1987).
- [31] B. L. Johansson and L. Aahsberg, *J. Chromatogr.*, **351**, 136(1980).
- [32] 中国科学院化学所内部报告.
- [33] N. Afeyan, S. Fushon and F. Regnier, *J. Chromatogr.*, **554**, 267(1991).
- [34] 邹汉法, 周冬梅, 杨利等, CN 97 101 243.1, 1997.
- [35] 周冬梅, 邹汉法, 杨利等, 色谱, 待发表.
- [36] H. Zou, D. Zhou, L. Yang, et al., *Anal. Chem. accepted for Publication.*
- [37] 刘国詮, 生物工程下游技术, p. 215, 化学工业出版社, 北京, 1993.
- [38] J. Mazaroff and F. E. Regnier, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1439(1986).
- [39] A. J. Alpert and F. E. Rgnier, *J. Chromatogr.*, **1985**, 375(1979).
- [40] D. J. Phillips, et al., *J. Chromatogr.*, **536**, 95(1991).
- [41] K. Mosbach, et al., *Anal. Biotech.*, **197**, 171(1989).

- [42] 吴晓军、刘国詮,生物物理与生物化学学报,7,179(1989).
- [43] Y. Kato, et al., *J Chromatogr.*, **360**,260(1986).
- [44] J. L. Fauusnaugh, et al, *Anal. Biochem.*, **137**,464(1984).
- [45] Z. E. Rassi and Cs. Horvath, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**,3245(1986).
- [46] N. T. Miller, et al, *J. Chromatogr.*, **316**,519(1985).
- [47] J. P. Chang, et al, *J. Chromatogr.*, **319**,396(1985).
- [48] 安建国、张仁斌,色谱,6,6(1986).
- [49] Zhang Yukui, Zou Hanfa and Lu Peichang, et al, *Chinese Journal of Chemistry*, **9**, 441(1991).
- [50] C. R. Lowe, An Introduction to Affinity Chromatography, Elsevier-North Holland, Biomed. Press, 1979(中译本: C. R. 洛著, 刘毓秀译, 亲和色谱导论, 科学出版社, 1983).

第十四章 毛细管电色谱

§ 14.1 毛细管电色谱的基本原理

毛细管电色谱是电泳迁移原理和色谱分离原理相结合的新兴技术。毛细管电色谱可分成两大类，即填充毛细管电色谱 (packed capillary electrochromatography, PCEC) 和开管毛细管电色谱 (open-tubular capillary electrochromatography, OTCEC)。在填充毛细管电色谱中，分离柱中填充了常用于高效液相色谱分离分析的填料；而开管毛细管电色谱则主要在毛细管壁涂布键合固定相。

毛细管电色谱是通过电渗流驱动流动相和被分离的化合物。早在 1974 年，Pretorius 等把电渗机制应用于薄层色谱和高效液相色谱^[1]。1981 年，Jorgenson 和 Lukacs 在研究毛细管区带电泳的同时，于 $170\mu\text{m}$ 内径毛细管中填充 Partisil-10-ODS-2，尝试使用电渗流推动流动相，对中性化合物 9-甲基蒽和芘等进行了分离，获得了 3.1 万理论塔板数/m 的柱效；发现在此种模式下，填充不规则度对区带展宽并不重要^[2]。因而指出，使用不同粒径的混合填料也许不影响柱效。这是真正意义上的关于毛细管电色谱研究的最先报道。这项研究证明了利用电渗流进行液相色谱实验是可行的。1980 年和 1985 年，Otsuka 等^[3] 和 O'Farrell 等^[4] 分别在 2mm 和 7mm 内径液相色谱柱上加低电压（例如 12V/cm）分离了铁蛋白片段，但分析时间长于 10h。1984 年 Antrim 进行了类似实验^[5]。1982 年，Tsuda 在 $30\sim 200\mu\text{m}$ 内径的毛细管柱中首次实现了电驱动开管液相色谱 (ED-OTLC)^[6]，即开管毛细管色谱。1987 年，Tsuda 等又在 2mm 内径 ODS 液相色谱柱上施加 15kV 高电压，分离了尿嘧啶和碘化顺式 *N*-甲基

-4-β-苯乙烯胺^[7]. 1987年, Knox和Grant用拉伸方式在50μm内径毛细管中填充了5μm Hypersil ODS, 对茈萜等芳香化合物进行分离, 获得了6.9万理论塔板数/m的柱效. 并且论证了在电渗流驱动体系下使用更细粒度填料来进行柱填充是可行的^[8-10]. 从此以后, 毛细管电色谱的研究在世界各国数个实验室相继展开.

在毛细管电色谱中, 电渗流是中性化合物迁移的主要驱动力, 而电渗流的产生又与双电层的产生相关; 毛细管管壁或填料表面自由硅羟基的解离使它们的表面形成产生电渗流的双电层. 在压力驱动系统中计算流动相的线速度的方程式为^[8]

$$u = \left(\frac{d^2}{\Phi\eta} \right) \cdot \left(\frac{\Delta P}{L} \right) \quad (14.1)$$

式中, d 是填料粒度或毛细管内径, Φ 是填充柱的压力阻抗因子, η 是粘度; ΔP 是柱压降, L 是柱长. 而在电驱动分离系统中, 流动相的线速度可由下式表示:

$$u = (\epsilon_0 \epsilon_r \xi) \left(\frac{V}{L\eta} \right) = \epsilon_0 \epsilon_r \xi E / \eta \quad (14.2)$$

式中, ϵ_0 是真空介电常数, ϵ_r 是相对介电常数或介电常数, ξ 是 Zeta 电势, V 是施加于分离柱的电压, E 是电场强度, η 为溶剂的粘度. 在压力驱动系统中, 线速度 u 与 d^2 成正比, 而在电驱动系统中, 线速度 u 却与 d 无关. 这一结果表明在一定的范围内, 电驱动系统中流动相的线速度不随填料粒度或毛细管内径的降低而变化, 因此在毛细管电色谱中有可能使用粒度非常小的填料来提高分离效率. 但必须注意的是, 当 $d < 20\delta$ 时, 双电层将出现重叠, 此时式 (14.2) 不再成立. Zeta 电势与电荷密度 σ 的关系可由下式表达:

$$\xi \approx \frac{\delta\sigma}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (14.3)$$

式 (14.3) 中 δ 是双电层的厚度, 可由下式表示^[8]:

$$\delta = \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0 RT}{2CF^2} \right)^{1/2} \quad (14.4)$$

式中, R 是气体普适常数, T 是绝对温度, C 为电介质摩尔浓度, F 是法拉第常量. 将式 (14.2)~(14.4) 组合起来, 经处理后可得:

$$u = \frac{1}{k} \cdot \frac{\sigma E}{\eta} \quad (14.5)$$

式中 $\frac{1}{k}$ 是双电层的厚度. 从式 (14.5) 可以知道电渗流只与表面电荷密度、电场、双电层厚度和分离介质的粘度相关 (而粘度又与温度相关).

由不同的方法所制备的硅胶固定相具有不同的物化性质, 例如与固定相比表面积相关的电荷密度不同或固定相表面硅羟基的酸性不一样. 假如在含水介质中的 Zeta 电势为 100mV, 则可以估算出在施加电场为 100V/cm 时电渗流的线速度为 0.8 mm/s; 而电场增致 400V/cm, 则电渗流的线速度可达到 3.2 mm/s. 由于在常用 HPLC 填充柱中流动相的线速度大多控制在 0.5~3.0mm/s 范围之内, 因此采用电驱动的毛细管电色谱也可能使样品获得有效的分离.

§ 14.1.1 毛细管电色谱中自加热效应

Konx 和 Grant 研究了压力驱动和电驱动色谱中自加热效应, 得到毛细管中单位体积电介质产生的热量 (Q) 可由下式表达^[8]:

$$Q = E^2 \lambda c \epsilon_e \quad (14.6)$$

式中, E 是电场强度, λ 是摩尔电导率, C 是摩尔电介质浓度, ϵ_e 是填充床的孔隙度. 同时, 毛细管中心与管壁间的温度差 ΔT 可由下式表达:

$$\Delta T = \frac{E^2 \lambda C \epsilon_e d_c^2}{16K} = \frac{Q d_c^2}{16K} \quad (14.7)$$

根据 Knox 和 Grant 的计算, 电驱动系统中单位体积产生的热量比压力驱动系统中大 1500 倍左右. 这一结果表明在电驱动系统

中，应尽可能选用低浓度、低电导率的电介质和减少毛细管的内径，以尽可能减少自加热效应。虽然理论上的估算表明填充毛细管电色谱中的毛细管内径应小于 $100\mu\text{m}$ ，但事实上采用 $320\mu\text{m}$ 内径的毛细管也可获得良好的分离效果。这是因为在大多数填充毛细管电色谱中所选用的流动相的电流非常小。图 14.1 是电渗流线速度和苯的 k' 值与施加电压的关系曲线。从图 14.1 中可以看到，电渗流线速度随施加电压线性增加，而苯的 k' 值则与施加电压无关。这一结果表明在此操作条件下毛细管电色谱的自加热效应可以忽略不计^[11]。

当自加热效应产生时，可使毛细管电色谱中的流动相产生气泡，导致电流中断。当所使用的流动相中有机溶剂浓度较高且溶剂的有效沸点较低时，这一问题的产生尤为严重。为了抑制此类流动相产生气泡的问题，采用加压电色谱模式是较好的选择。

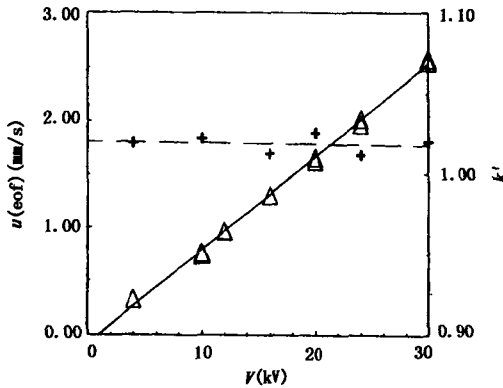


图 14.1 毛细管电色谱中电渗流线速度 u_{eof} 和苯的 k' 值与施加电压 (V) 的关系曲线

实验条件：毛细管填充长度/总长度 (15.0/47.0cm) 填充为 Spherisorb-ODS₂ ($3\mu\text{m}$)；

流动相：乙腈/缓冲液 (70/30) 包含有 4mmol/L Tris (pH9.2)；操作电流小于 $1.0\mu\text{A}$ ；柱温， $15.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 。

§ 14.1.2 毛细管电色谱的谱带展宽

在填充毛细管电色谱中，由于色谱柱内填充了固定相颗粒，因此其谱带展宽的基本原理与常规的高效液相色谱相同，填充毛细管电色谱的塔片高度可由 Van Deemter 方程表示：

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (14.8)$$

式中， A 表示由于填充床中流量非均匀性对塔片高度的贡献， B 项表示分子扩散对塔片高度的贡献， C 项则由溶质的流动相与

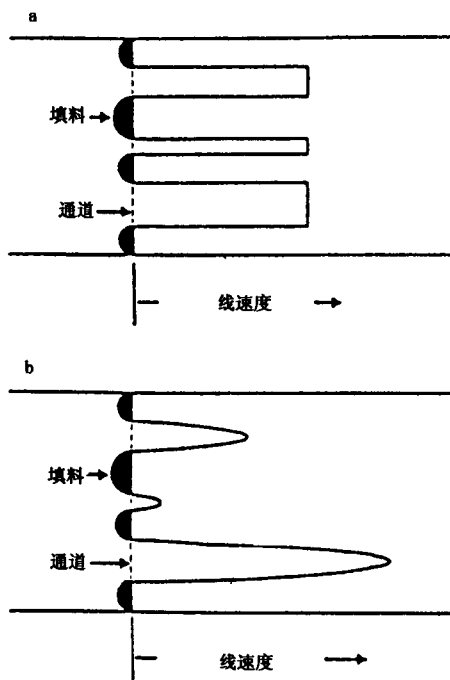


图 14.2 在填充床中流动相的流型
a. 电驱动系统；b. 压力驱动系统。
图中涂黑的半圆表示填充床中的颗粒。

固定相传质的非平衡效应所产生。在电驱动和压力驱动的填充床分离系统中，流动相轴向流速的变化如图14.2所示。从图14.2中可以看到，在压力驱动系统中，流动相在每一填充间隙通道中的流型都是抛物线型的，而且随着通道的加宽，其平均线速度也增加。在电驱动系统中，电渗流的流型是塞子型的，并且与通道的直径无关^[8]。因此，可以推断在填充毛细管电色谱中的A项对塔片高度的贡献比HPLC中的贡献小得多。如果进一步减少填料的粒度，则A和C项对塔片高度的贡献与分子扩散项相比较可以忽略不计，式(14.8)可简化成毛细管区带电泳中的塔片高度公式^[2]：

$$H = \frac{2D_m}{u} \quad (14.9)$$

我们在同一毛细管微柱下，实验测定了HPLC模式和CEC模式下塔片高度与流动相线速度的关系^[11]，其结果如图14.3所示。从图14.3的结果可以看到CEC模式下的A值比HPLC模式下的A值小近10倍，而C则小约2.5倍，这不仅表明CEC的分离效率大大高于HPLC的分离效率，而且CEC比较适用于快速分离。

开管毛细管电色谱(OTCEC)是指在毛细管管壁进行固定相的涂布、键合的电分离技术；OTCEC柱中没有塞子，因而没有塞子效应的产生，近年来，开管电色谱已成为毛细管电色谱研究的重要内容之一。OTCEC的柱塔片高度与开管液相色谱(open-tubular liquid chromatography, OTLC)的相似，都可用Golay方程表示^[12]：

$$H = \frac{2D_m}{u} + \frac{C_m d_c^2 u}{D_m} + \frac{C_s d_f^2 u}{D_s} \quad (14.10)$$

式中， u 是流动相线速度； D_m ， D_s 分别为溶质在流动相和固定相中的扩散系数； C_m ， C_s 分别为固定相和流动相的传质阻力系数， d_c 为柱子的内径， d_f 为固定相的厚度。等式右侧第一项为轴向扩散项，第二项为流动相传质阻力项，第三项为固定相传质阻

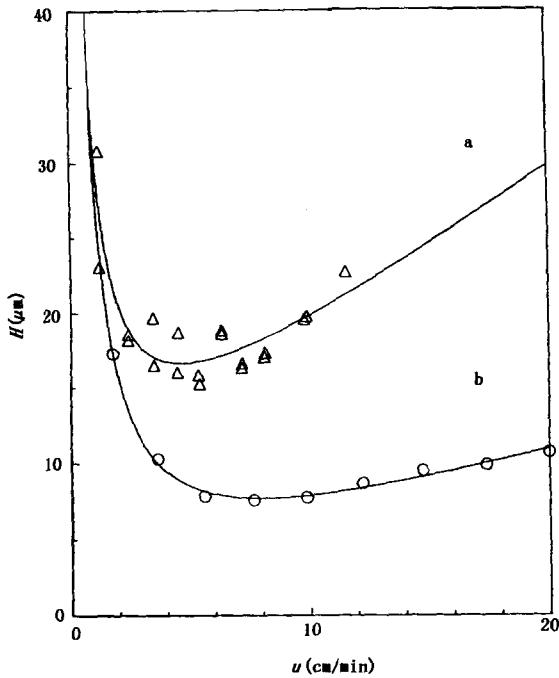


图 14.3 高效液相色谱和毛细管电色谱中塔片高度与流动相线速度的关系

色谱柱: 填充/总柱长 = 20/27cm, 填充 Spherisorb-ODS₂ (3 μ m), 柱内径 75 μ m.

a. 微柱 HPLC, $H = 6.43 + 23.62/u + 1.10u$;

b. CEC, $H = 0.653 + 28.04/u + 0.441u$.

力项. 在通常情况下, 固定相传质阻力项可以忽略不计^[13], 因此对塔板高度 H 的贡献主要来自第一项和第二项. 流型对 C_m 的影响很大, 电渗流的流型呈塞子状, 其 C_m 可以用下式^[14,15]表示:

$$C_m^{\text{EDF}} = \frac{k'^2}{16(1+k')^2} \quad (14.11)$$

而压力驱动的流体流型呈抛物线型, 其 C_m 可以用下式^[14,15]表

示：

$$C_m^{\text{PDF}} = \frac{1 + 6k' + 11k'^2}{96(1 + k')^2} \quad (14.12)$$

图14.4是根据式(14.11)和式(14.12)所作的 C_m^{EDF} 和 C_m^{PDF} 与 k' 的关系曲线。很明显，这两个函数都随 k' 的增大而增大，但 C_m^{EDF} 始终比 C_m^{PDF} 小。在 $k' < 2$ 时， C_m^{EDF} 比 C_m^{PDF} 小得多，当 $k' > 2$ 时， C_m^{EDF} 只比 C_m^{PDF} 小2倍。因此，在保留值较小时， C_m

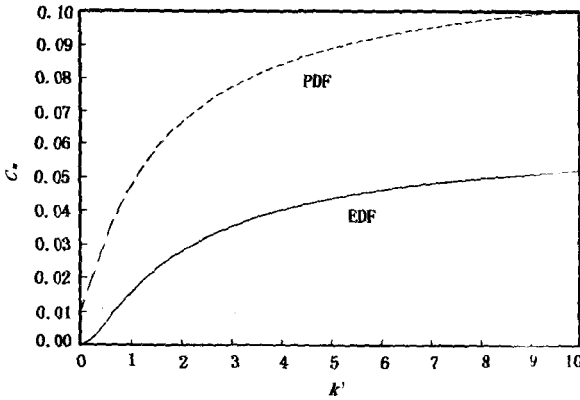


图 14.4 在压力驱动 (PDF) 和电驱动 (EDF) 下流动相传质阻力系数 (C_m) 与保留因子 (k') 的关系

对 H 的贡献在 OTCEC 模式下比 OTLC 模式下小得多。由此可见，OTCEC 的高柱效主要是由于电渗流型呈塞子状， C_m 较小，有较小的流动相传质阻力所致。从有关 OTCEC 的文献报道来看，20~30 万理论塔板数/m 的柱效很常见，最高柱效可达 50 万/m，其高效性可以与毛细管区带电泳 (CZE) 相媲美，而且克服了 CZE 不能分离中性化合物的缺点。从式 (14.10) 可以看出，毛细管的内径对柱效影响很大，图 14.5 是根据式 (14.10) 所作的 H 与 d_c 的关系曲线，从图中可以看出 H 随 d_c 呈指数增长，但 OTLC 比 OTCEC 增长得更快。另外，还可以看出 10 μm 的 OTCEC 柱获得的柱效与 5 μm 的 OTLC 相当，这也就

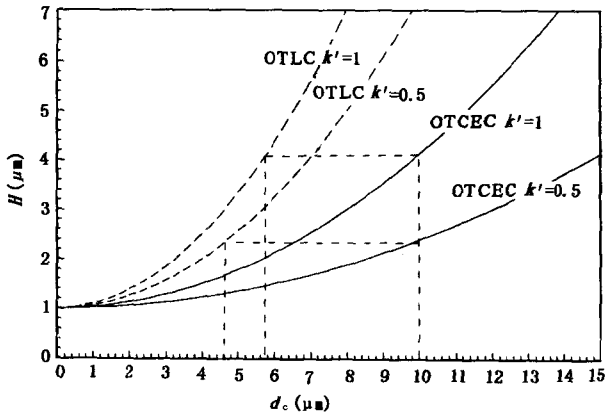


图 14.5 在 OTCEC 和 OTLC 中理论塔板高度 (H) 与毛细管内径 (d_c) 关系 参数: $D_m=10^{-9}\text{m}^2/\text{s}$; $u=2\text{mm}/\text{s}$.

是说, OTCEC 可以使用比 OTLC 更大内径的毛细管柱, 使得 OTCEC 在柱的制备及在柱检测方面显示出更大的优越性. 图

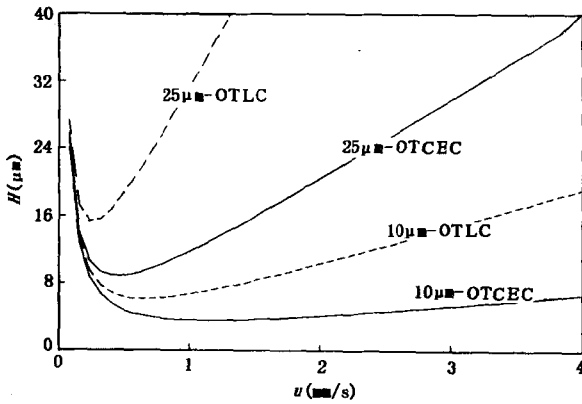


图 14.6 在 OTCEC 和 OTLC 中理论塔板高度 (H) 与流动相的线速度 (u) 关系

参数: $D_m=10^{-9}\text{m}^2/\text{s}$; $k'=1$.

14.6是根据式(14.10)所作的 H 与 u 的关系曲线。当柱内径相同时, OTLC 的 H 大约是 OTCEC 的两倍, 增大流速对 OTCEC 的影响比对 OTLC 的更小, 因此 OTCEC 在快速分离中有很大的应用前景。特别值得指出的是, 在 OTCEC 中, 使用 $10\mu\text{m}$ 内径的柱子, 在 u 大于最佳流速时, H 几乎为常数, 这对于快速分离有实际意义。

§ 14.1.3 电色谱的保留机理

CEC 保留机理包括两个方面: 其一, 如同 HPLC, 基于溶质在固定相和流动相间相互作用的不同; 其二, 如同 CZE, 基于溶质电泳淌度的不同。由于电泳机理的参与, 在 HPLC 中使用的保留因子 k' 已不能正确描述 CEC 的迁移行为。CEC 的保留因子可用下式^[16,17]表示:

$$k^* = k' + k' \left(\frac{\mu_{\text{ep}}}{\mu_{\text{eof}}} \right) + \left(\frac{\mu_{\text{ep}}}{\mu_{\text{eof}}} \right) \quad (14.13)$$

该式中 k^* 是 CEC 的保留因子, k' 是在 CEC 中单纯由色谱因素引起的保留因子, μ_{ep} 为溶质的电泳淌度, μ_{eof} 为流动相的电渗淌度。值得注意的是, 在 CEC 中采用电场驱动, 它对溶质的色谱保留有显著的影响, 因此在式(14.13)中的色谱保留因子 k^* 并不等同于 HPLC 中的 k' 。从式(14.13)可以看出, CEC 的保留因子并非 CZE 和 HPLC 的保留因子的简单加和, 二者之间是有相互影响的。对于中性化合物, μ_{ep} 为零, k^* 等于 k' , 反映纯粹的色谱过程; 对于不保留的带电化合物, k' 为零, 反映纯粹的电泳过程; 对于有保留的带电化合物, 色谱和电泳机理同时起作用。因此, CEC 既能分离电中性物质, 又能分离带电物质, 因而对复杂的混合样品显示出了强大的分离潜力。

我们考察了中性芳香烃类化合物在毛细管电色谱中的保留行为, 发现以下结果^[11]:

(1) 在相同微柱和 CEC 电流很小时, 溶质在微柱 HPLC 上的保留值与 CEC 上的保留值基本相同。图 14.7 是这二种模式下

k' 值线性回归结果.

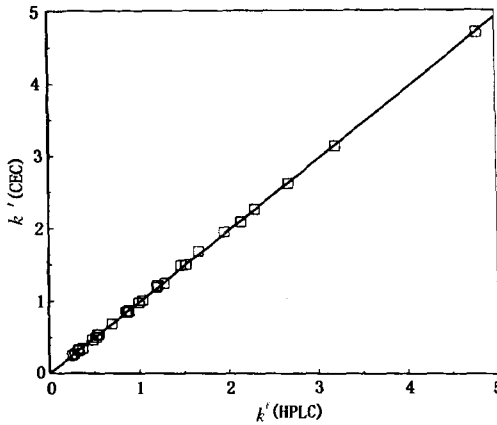


图 14.7 中性溶质在 CEC 下的

k' 值与微柱 HPLC 下的 k' 值的线性回归

$$k'_{\text{CEC}} = 0.009 + 0.984k'_{\text{(HPLC)}}, r = 0.9998, n = 27.$$

(2) 流动相中有机溶剂浓度对保留值的影响与反相液相色谱相似, 也可用以下的关系式表示^[18]:

$$\log k' = \log k_w - S\varphi \quad (14.14)$$

式中, $\log k_w$ 和 S 为在给定的柱系统下的回归系数, φ 是有机溶剂浓度. 图 14.8 是一些中性化合物在不同有机溶剂下按式 (14.14) 线性回归结果. 从图中可以看出, 随着有机溶剂浓度的增加, 溶质的保留值随之减少, 这也是 CEC 梯度洗脱的基础.

(3) 在给定的操作条件下, 我们研究了中性化合物分子结构与保留值的定量关系, 结果表明溶质的保留值符合线性溶剂化自由能关系, 即^[19]

$$\log k' = \log k_0 + m(V_w/100) + s\pi^* + b\beta + a\alpha \quad (14.15)$$

式中, V_w , π^* , β 和 α 分别表示溶质的范德华体积、偶极矩、接受质子能力的碱性和给予质子能力的酸性. $\log k_0$, m , s , b 和 a 则是回归系数.

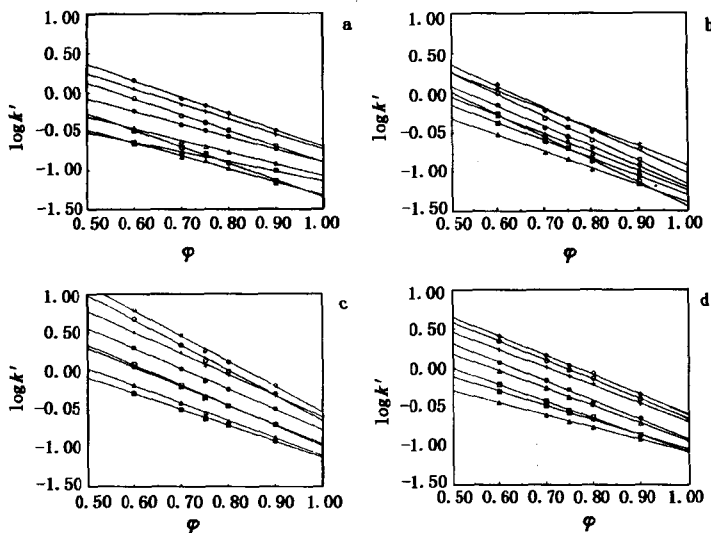


图 14.8 CEC 流动相中有机溶剂浓度对保留值的影响

a. 甲醇; b. 乙腈; c. 异丙醇; d. 四氢呋喃.

溶质: + 为苯; △为苯甲腈; ○为苯丁酮; □为对甲苯酚;

▲为苯甲醇; ●为硝基苯; ■为苯胺; ◇为氯苯.

上述结果充分表明, 中性化合物在 ODS 为固定相的 CEC 中的保留机理与反相色谱中的保留机理非常相似.

§ 14.2 毛细管电色谱仪器和柱制备

通过对缓冲溶液的脱气, 常规的毛细管电泳仪可以进行毛细管电色谱实验, 但一般操作电压限制在 20kV 以下. 如选用挥发性较低的有机溶剂和电导率较低的电介质作为流动相, 则操作电压可以提高到 30kV. 以前人们认为 CEC 实验中气泡的产生来自焦耳热, 但现在人们普遍认为气泡是由通过 CEC 柱的塞子时所产生的. 新近推出的商品化毛细管电泳仪 (如 MDQ) 已具备 CEC 实验所必须的功能.

§ 14.2.1 毛细管电色谱填充柱的制备

填充电色谱柱内径一般在 $30\mu\text{m}$ 到 $320\mu\text{m}$, 柱长一般在 $10\sim 100\text{cm}$, 根据检测窗口设计方法的不同, 又可分为偶联柱与非偶联柱两类. 前者制备简便且分离柱易再生, 但只能在较低场强下使用; 后者填充床与检测池间死体积小, 易得到高柱效, 但制备较复杂. 1992 年 H. Yamamoto 等在 $50\mu\text{m}$ 内径柱内填充 $3\mu\text{m}$ ODS, 对测试样品 ($k' = 0\sim 4.8$) 进行分离, 所获得折合塔板高度为 $1.7\sim 2.2$ ^[20]. 国家色谱研究分析中心在多年对细内径液相色谱柱研究的基础上, 于 $75\mu\text{m}$ 和 $100\mu\text{m}$ 毛细管柱内填充 $3\mu\text{m}$ ODS 填料, 获得了折合塔板高度 1.3 , 柱效 25.9 万理论塔板数/ m 的好结果, 电渗流淌度达 $0.058 \text{ m/s}\cdot\text{V}$, 从封口到装柱完成, 总耗时在 10min 以内^[21,22]. 除此以外, 还可以填充离子交换固定相^[23], Smith 和 Evans 用离子交换固定相在 $\text{pH} < 3$ 的流动相下分离酸性药物, 取得了 80 万理论塔板数/ m 的柱效. 这大概是目前关于 CEC 柱效的最佳报道, 与其它分离模式相比也毫不逊色. 另外, 填充手性固定相可以分离对映体^[24,25], 还有人填充凝胶、利用体积筛分机制分离二肽^[26].

电色谱柱填充方式主要有匀浆填充制备法、拉伸填充制备法和电动填充法三种.

1. 匀浆填充制备法

匀浆法制备方便, 设备只需有一台液相色谱泵即可, 填充的电色谱柱较均匀, 容易实现快速填充, 一般在 10min 内即可制得 $50\sim 100\text{cm}$ 填充柱, 因此大部分文献均采用匀浆法制柱. 通过加压法可有效地防止气泡的产生^[27,28]. 通过超声灌柱, 易制备密度均匀的柱床. Boughtflower 等用类似方法装柱, 并研究了加压超声装置在柱制备中的作用, 制得了密度均匀的电色谱柱, 获得了 8 万理论塔板数/ m 的柱效, 5 次进样保留时间相对标准偏差达 0.5% ^[29]. 大口径的毛细管柱可以提高检测灵敏度和柱容量, 这对于许多紫外响应因子小的药物成分的分离尤为重要, 对于发

展制备级 CEC 也相当必要, 但制备时用一般方法不易得到牢固的封口. 1994 年 Yan 等成功地在 $320\mu\text{m}$ 毛细管柱中填充了 $3\mu\text{m}$ 和 $5\mu\text{m}$ 的 ODS 填料^[30].

2. 拉伸填充制备法

拉伸法在固定相填充方面相对来说比较容易, 而且不需要烧结封口 (frit), 柱效较高. 但需要特别的控制仪器, 这在一般液相色谱或电泳实验室中难以获得, 而且拉伸电色谱柱的高温条件会破坏键合相填料, 因此只能选择填充硅胶, 待拉伸完毕后, 再实现柱内键合衍生化. 该方法制柱耗时较长, 手续麻烦. 另外因为高温易破坏硅胶, 所以毛细管材料不能取自高熔点的石英, 只可使用低熔点的玻璃, 至今只有一篇文献采用拉伸法制柱^[31].

3. 电动填充法

这是一种新方法, 采用电动法填装固定相, 而不是用高压液相色谱泵填装. 用电动填充法易得到非常均匀的填充柱床, 柱效较高^[32].

另外有报道用溶胶-凝胶法来制备填充柱.

填充毛细管电色谱柱的另一重要技术问题是塞子的制备. 进出口端的塞子主要是为了防止在电渗流或压力下填充床的移动. 塞子在填充柱中引入了非均匀性因子, 因而会引起气泡的产生. 塞子效应也是谱带展宽的重要因素之一, 甚至这一塞子效应可以完全消除 CEC 的优越性. Tsuda 等认为^[33]一个好的塞子应具备以下功能: (1) 具有足够强的机械强度能经受装柱过程的高压; (2) 在一定的 pH 值范围内对流动相中的成分无活性反应; (3) 塞子的孔隙应足够大, 易于溶质和流动相通过; 但孔隙也不能过大, 以免固定相漏出. 填充毛细管电色谱柱塞最常用的制备方法是把填料与水玻璃注入柱内后高温焙烧.

§ 14.2.2 开管毛细管电色谱柱的制备

内壁光滑的毛细管柱的相比, 比填充柱小 350 倍, 因此开管柱制备的关键是增大表面积, 以制备相比大、柱容量大的色谱

柱。从1969年开始,对OTLC就有不少研究^[34],1982年Tsuda等^[35]进行了第一次OTCEC实验,但是由于制备的困难进展一直不大。开管柱的制备方法主要有三种:涂布聚合物固定相、表面粗糙化后键合固定相和溶胶-凝胶(sol-gel)技术^[36]。

1. 涂布聚合物固定相

聚合物固定相,由于稳定性好、相比大和柱容量大,因此在OTLC中应用较广,是目前制备OTLC的主要方法。这种方法在OTCEC中也有应用。1990年Pfeffer等^[37]在 $10\mu\text{m}$ 的毛细管中采用聚合物固定相,分离了五种PAHs,获得了25~29万理论塔片数/m的柱效。Pfeffer和Garner^[38]在毛细管管壁键合PS-264和OV-17,在流动相中加入离子对试剂,分离了具有相似电泳淌度的物质。Mayer等^[39,40]和Armstrong等^[41]在毛细管管壁涂布聚硅氧烷,并在聚硅氧烷上键合手性环糊精分离了手性物质。交联的聚合物固定相覆盖了柱壁表面的硅羟基,不能产生足够的电渗流。为了加大电渗流,需要加入表面活性剂,如CTAB等。因而限制了聚合物固定相在OTCEC中的应用。最近Tan等^[42]在毛细管管壁键合线性聚合物,使硅羟基能够部分露出,以产生电渗流,在5min内基线分离了4种对羟基苯甲酸酯。此外,溶质在聚合物固定相中,传质系数小获得的柱效低,也限制了这种方法的使用。

2. 表面粗糙化键合固定相

(1) 蚀刻毛细管柱

由于石英毛细管化学惰性强,不易蚀刻,早期的开管柱都采用易于蚀刻的钠玻璃或硼玻璃制备^[43~45]。其制柱过程是先对其表面进行蚀刻,以增大表面积,然后将固定相键合上去。1982年,Tsuda等^[36]使用这种方法进行了第一次OTCEC实验。这种方法得到的相比太小,钠玻璃或硼玻璃比较脆,毛细管容易断裂,这种方法也没有得到推广。最近,Pesek报道在 $300\sim 400^\circ\text{C}$ 下用 NH_4HF_2 溶液蚀刻石英毛细管,表面积可以增大1000倍^[46~48]。

(2) 沉淀多孔硅胶

Toock 等^[49,50]发展了一种在 10~25 μm 毛细管管壁沉淀一层多孔硅胶的方法。首先在毛细管中注入聚乙氧基硅烷, 然后通入氨气或氨水使其沉淀出二氧化硅, 析出的二氧化硅吸附在管壁上形成一层多孔硅胶。1990 年 Bruin 等^[14]将这种方法用于制备 OTCEC 柱。在硅胶上键合 ODS 后, 用于分离 PAHs, 获得了 1.2~1.3 μm 的塔板高度。这种方法能够获得较大的相比和较高的柱效, 但是制备特别困难, 主要表现在经常堵塞柱子, 重现性不好, 不宜制备内径小于 10 μm 的柱子。

(3) 键合多孔硅胶

Crego 等^[51]发展了一种在毛细管管壁键合一层多孔硅胶的方法。四乙氧基硅烷、乙醇、盐酸或氨水以一定比例混合, 四乙氧基硅烷水解产生原硅酸, 原硅酸缩聚产生硅胶。水解和缩聚同时进行, 但水解速度大于缩聚速度。在水解结束时, 将凝胶注入活化的毛细管中, 缩聚反应继续进行, 毛细管壁壁上的硅羟基也参与反应, 从而将硅胶层固定在管壁上。Crego 用这种方法制备 5 μm 的 ODS 柱, 用于 OTLC 实验分离 PAHs, 取得了 50 万理论塔片数/m 的柱效^[52]。这种方法制得的柱子, 相比较大, 柱效较高, 稳定性好, 成功率 80% 以上, 但是制柱的步骤多, 周期长。

3. 溶胶-凝胶 (sol-gel) 技术

sol-gel 技术通常用于在低温下制备石英玻璃, 在制备复合玻璃材料和生物化学传感器等方面应用较广^[53,54]。1995 年, Guo 和 Colon^[55,56]用 sol-gel 技术制备 OTCEC 柱分离 PAHs, 柱效在 28~50 万理论塔片数/m 之间。把四乙氧基硅烷和带有固定相基团的三乙氧基硅烷 (如正辛基三乙氧基硅烷) 以及水、盐酸、醇按一定比例混合, 水解缩聚后, 形成带有固定相的多孔硅胶。在这一过程中, 液体状的溶胶通过胶凝作用转化为凝胶, 从而形成了网状的多孔物质; 凝胶通过老化和干燥形成 SiO_2 干胶。其基本原理及制柱过程与键合多孔硅胶相似, 但不需额外键合固定相, 从而简化了制备过程。由于固定相与硅胶是以 C-Si 键相

连, 其化学稳定性较好, 在 pH 0.3~11.4 之间都可以使用^[55]. 1997 年, Colon 等用 sol-gel 技术制得了以氟化物为固定相的毛细管色谱柱, 基线分离了 6 种苯的氟化物^[57]. 用这种方法制得了柱子相比较, 柱效较高, 制柱的成功率也高, 但是必须加入带有固定相基团的三乙氧基硅烷, 因而其固定相的选择余地不大.

我们则利用一些带正电荷的配基在毛细管壁上的物理吸附, 发展出所谓的物理吸附固定相开管毛细管电色谱方法, 并成功地用于 5 种对映体的手性拆分^[58].

§ 14.2.3 毛细管电色谱的梯度洗脱技术

梯度洗脱在高效液相色谱中是很常用的技术, 它对于复杂样品的分析尤为必要. 毛细管电色谱的高分辨率、选择性决定了该技术将更多地应用于复杂样品的分析, 因此发展毛细管电色谱的梯度洗脱技术是非常必要的. Bayer 等^[59,60]发展了加压梯度洗脱方法, 他们把微柱梯度洗脱 HPLC 装置与毛细管电泳装置连接起来, 六通转换阀用于进样; 由微型泵输入的流动相经不锈钢 T 型管分流后进入 CEC 柱. 分流器必须接电以防止漏电和损伤仪器. Bayer 等人的实验结果表明, 加压梯度 CEC 洗脱不仅提高了分离的重复性和稳定性, 而且可以防止分离过程中气泡的产生, 其对寡核苷酸 (dC₃-dC₁₁) 的分离效果大大优于微柱 HPLC 的分离结果.

Zare 等人^[61]则发展出由高压电源控制电渗流的 CEC 梯度洗脱装置. 他们采用该梯度洗脱装置进行从 55% 乙腈到 80% 乙腈的梯度冲洗分离分析了 16 种多环芳烃.

我们则在自制的电泳仪上建立了流动相滴加 CEC 梯度洗脱方法^[62]. 该方法先在有机溶剂浓度较低的流动相体系下分离样品中保留行为相差较小的组分; 当开始分离保留值相差较大的组分时, 立即向进样端的流动相贮瓶中滴加高有机溶剂浓度的缓冲液, 同时用磁搅拌子将流动相迅速混合均匀, 从而在流动相中形成了有机溶剂的浓度梯度. 图 14.9 是衍生化醛酮化合物在梯度

方式下的谱图，分离时间由等度方式下的 54min 缩短到梯度方式下的 22min。但由于实验在自组装仪器和手动进样的条件下进行，该方法的重现性受到一定限制，各组分保留时间的 RSD% 在 7.56% 以内。

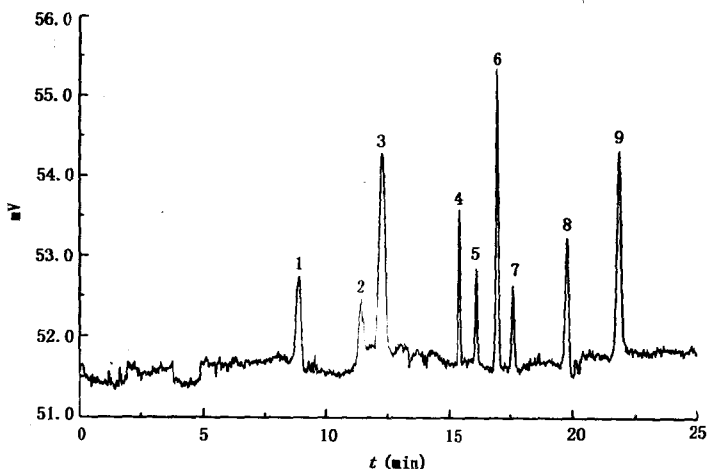


图 14.9 9 种醛酮 DNP 衍生物梯度方式下的 CEC 谱图

实验条件:柱温:室温;UV 检测波长:360nm;进样:10kV×3s;填充柱长/总柱长 = 15.8/43.5cm 填充 $3\mu\text{m}$ 的 Spherisorb-ODS₂.

流动相:4 mmol/L Tris(pH=9.50);

梯度洗脱:0~12.83 min,乙腈/水(V/V)=60/40;12.83min 以后,乙腈/水(V/V)=80/20.

色谱峰:1. 乙醛;2. 丙酮;3. 丙醛;4. 苯甲醛;5. 丁醛;6. 邻甲基苯甲醛;7. 戊醛;
8. 2,5-二甲苯苯甲醛;9. 庚醛.

我们还在商品化的 Beckman P/ACE 5510 型电泳仪上, 利用仪器具有流动相贮瓶自动切换的功能实现了 CEC 的梯度洗脱^[63]. 具体方法是: 首先在流动相切换前将电压降为零; 然后将含不同流动相的贮瓶进行切换, 最后将电压恢复到原值. 利用这种方法我们对 13 种芳香族化合物的混合样品进行了分离. 尽管在乙腈/水 (V/V) 分别为 90/10 和 80/20 的流动相体系中样

品的分离速度很快（分别在4.55和7.07min以内），但均未能实现所有组分的基线分离；但在甲醇/水（V/V）为80/20的流动相体系中可以实现所有组分的基线分离，但保留时间过长（近40min）。因此我们发展了多二元多台阶梯度洗脱的分离方式，使所有组分在13.8min内完全分离（见图14.10）。各组分在6次连续进样中保留时间的RSD%值在0.374%以内，说明该方法具有快速、可靠的性能，完全可以用来分离复杂样品。

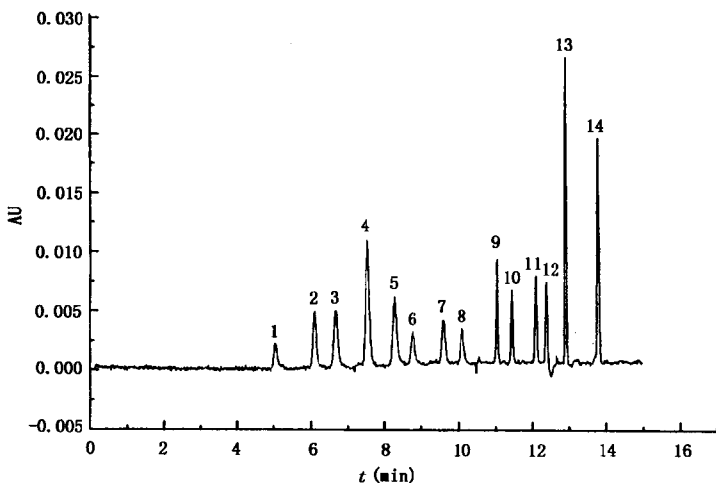


图 14.10 13 种芳香族化合物流动相切换法梯度洗脱的 CEC 谱图

实验条件：柱温：室温；UV 检测波长：360nm；进样：10kV×3s；填充柱长/总柱长 = 15.8/43.5cm 填充 3 μ m 的 Spherisorb-ODS₂。

流动相：4mmol/L Tris(pH=9.50)；

梯度洗脱：0~7.0min, 甲醇/水(V/V)=80/20；7.0~10.3min, 乙腈/水(V/V)=80/20；10.3min 以后, 乙腈/水(V/V)=90/10。

色谱峰：1. 硫脲；2. 苯胺；3. 苯乙醇；4. 苯乙醛；5. 硝基苯；6. 苯丙酮；7. 苯；8. 苯甲酸乙酯；9. 氯苯；10. 溴苯；11. 乙苯；12. 对二甲苯；13. 正丙苯；14. 1,2,4,5-四甲基苯。

§ 14.2.4 毛细管电色谱与质谱联用技术

多年来，人们普遍认为采用微柱 HPLC 与电喷雾（ESI）质

谱联用具有许多优越性。作为浓度型检测器，当色谱柱内径从 4.6mm 减少至 0.1 mm 时将大大提高检测器的信号响应值。但在实际工作中由于各种各样技术上的限制，人们很难实现这一目标。近年来，由于各个学科科学家的共同努力，这些技术上的限制正在逐步被解决，电驱动分离方法可能解决许多 HPLC 方法所面临的技术限制，已有许多研究论文报道毛细管电泳与质谱的联用技术^[64]。但这一技术至今还未被接纳为常规的分析方法；其原因是在保持毛细管电泳高分离效率时小的样品进样体积的限制，导致低的浓度检测限；同时胶束电动毛细管色谱与质谱是很难兼容的。

Verheij 等人^[65]和 Hugener 等人^[66]报道了准电色谱与质谱的联用技术，所谓准电色谱主要是指柱内的流动相接近于压力驱动的流型。Gordon 等^[67]则报道了真正的毛细管电色谱质谱 (ESI) 联用技术，但由于商品化 CE 仪器在与质谱仪联接时所需的一段空的毛细管连接管有效地降低了 CEC 的分离效率。Lane 等人^[68]采用全填充的毛细管柱与质谱联接，使得色谱的分离效率大大提高。在 95cm 长的毛细管柱上电色谱电喷雾质谱联用分离甾类化合物和内消旋抗生素，获得很好的分离效率和质谱数据；但由于毛细管柱太长，所需的分析时间达 70min；同时，为了使缓冲液保持在高的 pH 值（有利于 C₁₈固定相产生足够的电渗流），他们在缓冲液中加入了非挥发性的缓冲盐。Lane 认为尽管他们所选用的电色谱质谱分离条件不是最佳条件，但从中可以发现毛细管电泳在与质谱联用时还存在的一些缺陷；另一问题是缺少能在低 pH 值下具有高电渗流的电色谱固定相，而在一般的 HPLC 与质谱联用技术中，应用最多的是低 pH 值下具有挥发性的缓冲溶液。为了避免毛细管柱过长这一问题，Lane 等^[69]建立了一套适用于短电色谱柱与质谱联用的接口，他们采用 43cm 的电色谱柱在 11min 内分离了原先需要 70min 分离分析的混合样品。

§ 14.3 毛细管电色谱的应用

采用毛细管电色谱分离分析实际样品已有很多文献报道。图 14.11 是填充 $3\mu\text{m}$ Spherisorb ODS₁ 固定相的毛细管电色谱分析甾类化合物 fluticasone propionate 的色谱图^[23]。这一结果与梯度 HPLC 的分离分析谱图相比较，其分离效率大为提高，分析时间明显减少。

多环芳烃通常都由 HPLC 进行分离分析，Yan 等人^[70]采用

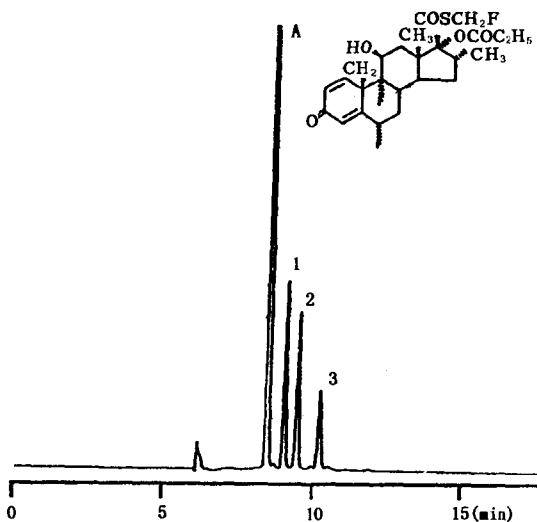


图 14.11 填充毛细管柱电色谱分析 fluticasone propionate 及其相关化合物

色谱柱：填充柱长/总长 = 40/55cm 填充 Spherisorb-ODS₁ ($3\mu\text{m}$)；

流动相：乙腈/0.1 mol/L Tris 缓冲液 (90/10)；

检测波长：238nm；施加电压：30kV；柱温：30℃；

电动进样：10kV × 30s。

色谱峰：A. fluticasone propionate；1. 结构相近的杂质；2. 脱氟类似物；3. 疏水性杂质。

ODS 填充柱电色谱分离分析这一类化合物，柱效达到 18 万理论塔片数/m，其电色谱分离结果如图 14.12 所示。

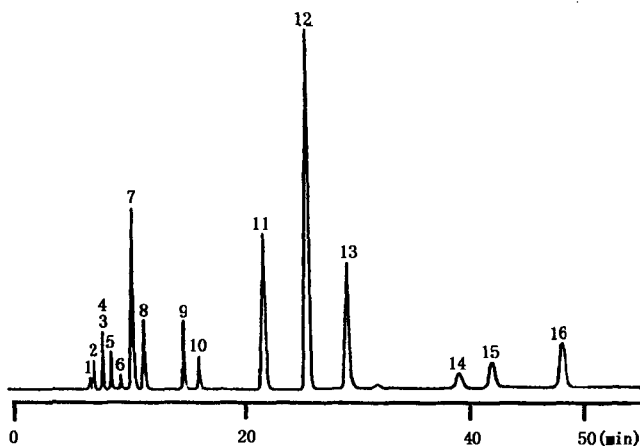


图 14.12 填充柱毛细管电色谱分离分析多环芳烃类化合物

色谱柱：柱填充长度 33cm 内填充 Porous ODS ($3\mu\text{m}$)；

流动相：乙腈/4 mmol/L 四硼酸钠缓冲液 (80/20)；

施加电压：5.15kV；电动进样：5kV \times 5s.

色谱峰：1. 萘；2. 苊烯；3. 苊；4. 芴；5. 菲；6. 蒽；7. 荧蒽；
8. 苝；9. 苯并 [a] 蒽；10. 蒎；11. 苯并 [b] 荧蒽；12. 苯并 [k] 荧蒽；
13. 苯并 [a] 苝；14. 二苯并 [a, h] 蒽；15. 苯并 [ghi] 苝；
16. 茚并 [1, 2, 3-cd] 苝。

寡糖是一类重要的化合物，图 14.13 是毛细管电色谱高选择性分离阶梯葡聚糖氨基吡啶酮衍生物的色谱图^[71]，所选用的填料是 $3\mu\text{m}$ Spherisorb-SCX。由于阶梯葡聚糖在该系统中分离选择性非常好，因此可以选择 8cm 短柱获得较快速的分离分析。Lubman 等人^[72]采用加压电色谱反射式飞行时间质谱检测器分析了蛋白质的降解产物。由于在 HPLC 中肽的容量因子很相近，通常采用梯度洗脱分离分析。但在电色谱中，对离子性的肽类化合物分离不仅包含有 HPLC 分离机理，而且还具有电泳迁移的

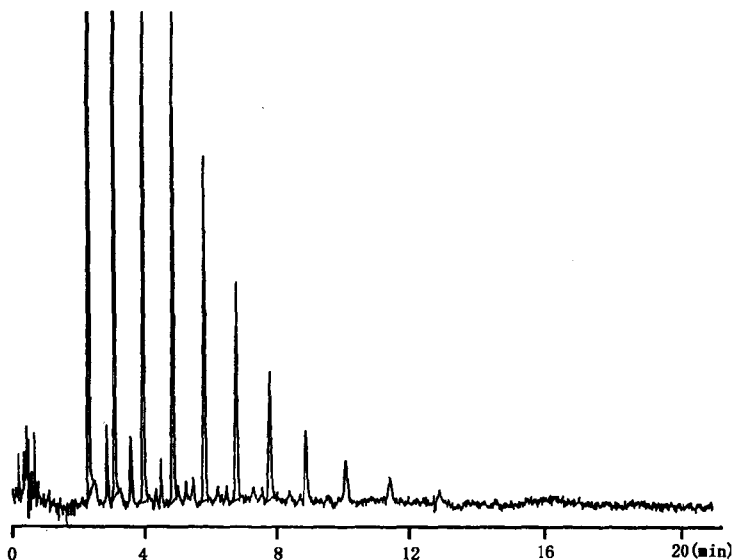


图 14.13 毛细管电色谱分析阶梯葡聚糖氨基吡啶衍生物
 色谱柱：填充柱长/总柱长为8.5/33cm 填充 Spherisorb-SCX ($3\mu\text{m}$)；
 流动相：乙腈/pH为2.3的0.05 mol/L NaH_2PO_4 缓冲液 (70/30)；
 检测波长：254nm；
 施加电压：-30kV；柱温：30℃；电动进样：-5kV/5s.

分离机理，因此采用等度电色谱有可能很容易分离肽类化合物。图14.14是牛细胞色素C的降解产物在HPLC和加压电色谱上分离结果的比较，从图14.14的结果可以看到电色谱具有更好的分离选择性。

Ding 和 Vouros^[73]则把毛细管电色谱和质谱联用技术应用于DNA加合物的分析。他们以反二羟基环氧烯苯并[g]蒽与DNA或核苷酸反应，生成多种内消旋DNA加合物，其反应过程如图14.15所示。这些反应产物的毛细管电色谱分离结果如图14.16所示。这一结果充分显示了电色谱的高柱效和高选择性，Ding 和 Vouros 认为电色谱是与纳升电喷雾质谱联用的联想分析模式。

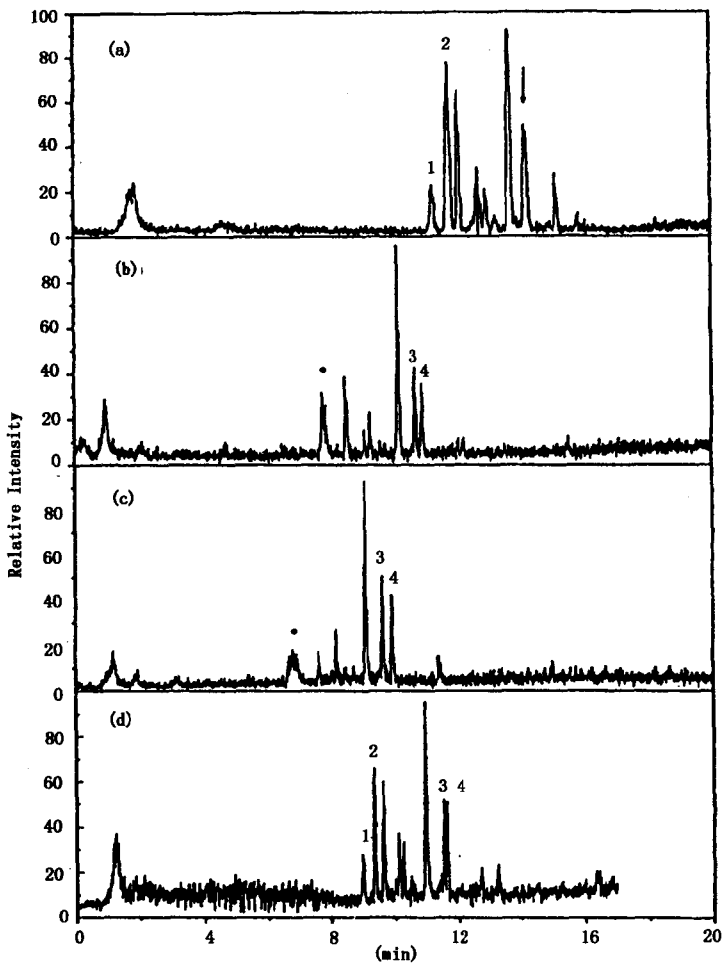


图 14.14 牛细胞色素 C 降解产物在微柱 HPLC 和加压电色谱模式下分离结果的比较, 色谱柱长度为 6cm.

- (a) 20min 内 0 到 50% 乙腈的 HPLC 线性梯度洗脱, 柱压降 90bar;
- (b) 加压电色谱, 施加电压 1000V, 柱压降 50bar;
- (c) 加压电色谱, 施加电压 1400V, 柱压降 50bar;
- (d) 加压电色谱, 施加电压 600V, 柱压降 70bar.

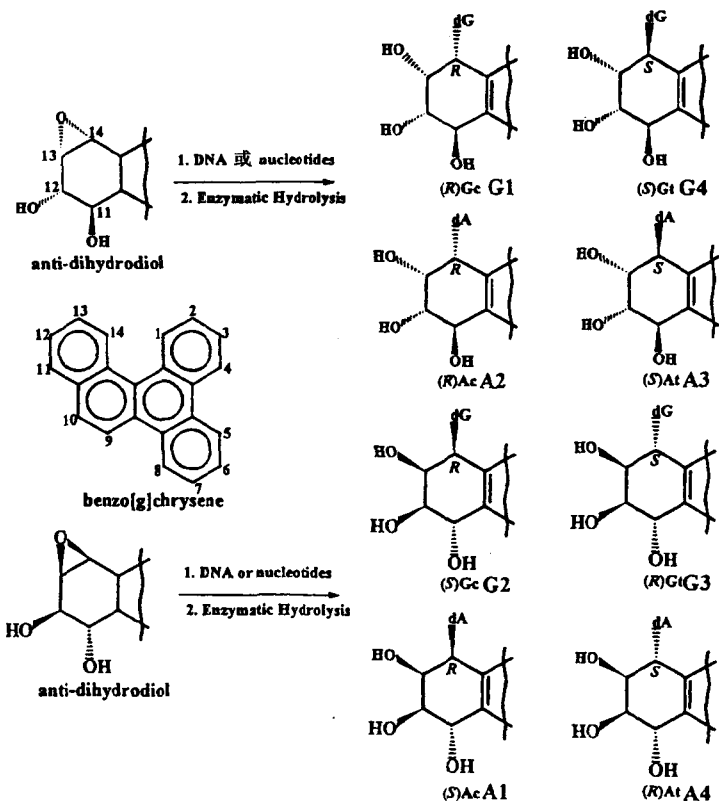


图 14.15 反二羟基环氧烯苯并 [g] 蒽与脱氧鸟苷和脱氧腺苷反应生成 DNA 加合物内消旋体的化学结构

手性化合物的分离分析一直得到广泛的重视，气相色谱、液相色谱和毛细管电泳在手性化合物的拆分方面都起着非常重要的作用。毛细管电色谱也已逐步应用于手性化合物的拆分。图 14.17 是电色谱分离头孢菌素类抗生素非对映异构体的色谱图^[74]，从图 14.17 可以看到所有的非对映异构体都获得了基线分离，而采用 HPLC 技术却很难获得这样的结果，因为填充 $3\mu\text{m}$ 填料 40cm 的色谱柱在 HPLC 模式下因压力限制很难进行操

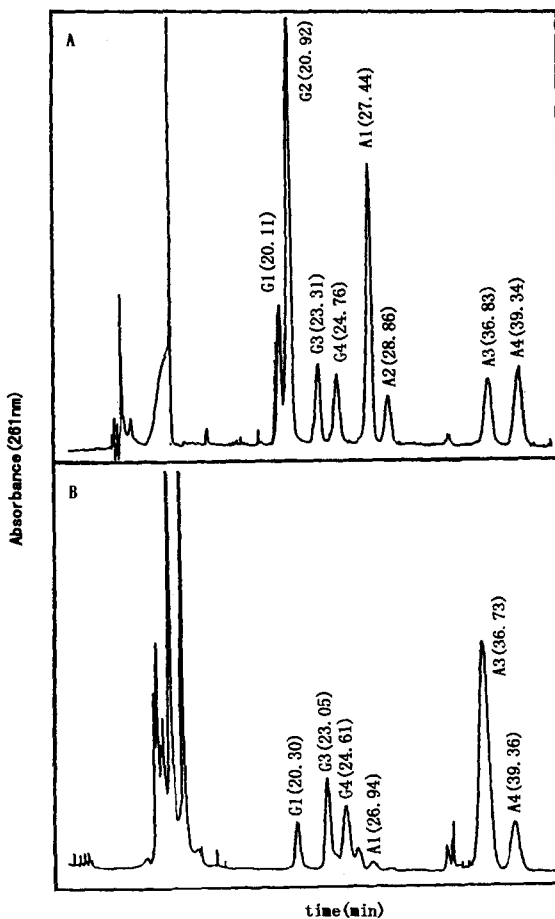


图 14.16 毛细管电色谱紫外检测分析图 14.15

所示的 DNA 加合物

A. 8 个标样分离图；B. 反二羟基环样烯苯并 [g] 蒽与牛胸腺 DNA 体外反应生成的加合物分析。

作。图 14.18 给出的是 HP- β -CD 手性固定相填充毛细管电色谱拆分氯塞酮对映体的谱图^[75]，从图 14.18 可以看到氯塞酮对

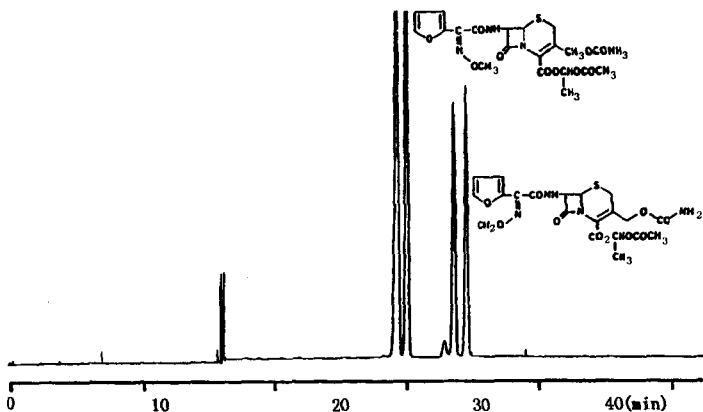


图 14.17 毛细管电色谱分离头孢菌素类抗生素非对映异构体
 色谱柱:填充柱长/总柱长=40/55cm 填充 Spherisorb ODS₁;
 流动相:乙腈/10 mmol/L Na₂HPO₄ 缓冲液(50/50);
 施加电压:30kV;柱温:30℃;电动进样:20kV×0.2min.

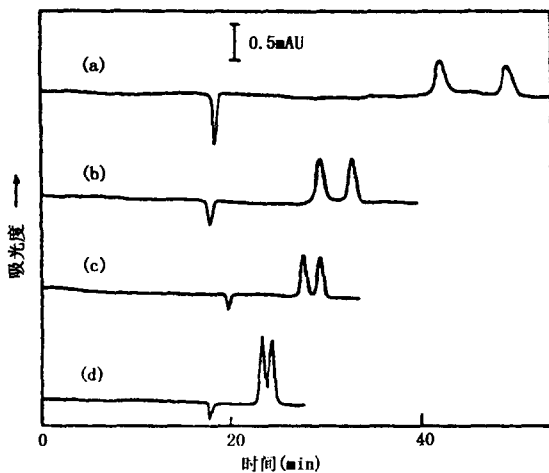


图 14.18 手性固定相填充柱毛细管电色谱拆分氯塞酮对映体
 色谱柱:58cm(填充柱长 27cm)×50μm i. d. 填充
 5μm HP-β-CD 键合硅胶固定相;
 流动相:乙腈/5mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.5).
 (a)15/85;(b)20/80;(c)25/75 和(d)30/70;施加电压:15kV.

映体获得了基线分离。Mayer 和 Schurig^[39]首先采用开管毛细管电色谱拆分对映体，他们把全甲基化的 β -CD 键合到石英玻璃毛细管柱，制柱过程与气相色谱手性分离柱 Chirasil-Dex 的制备过程完全相同。图 14.19 是开管毛细管电色谱拆分手性对映体的

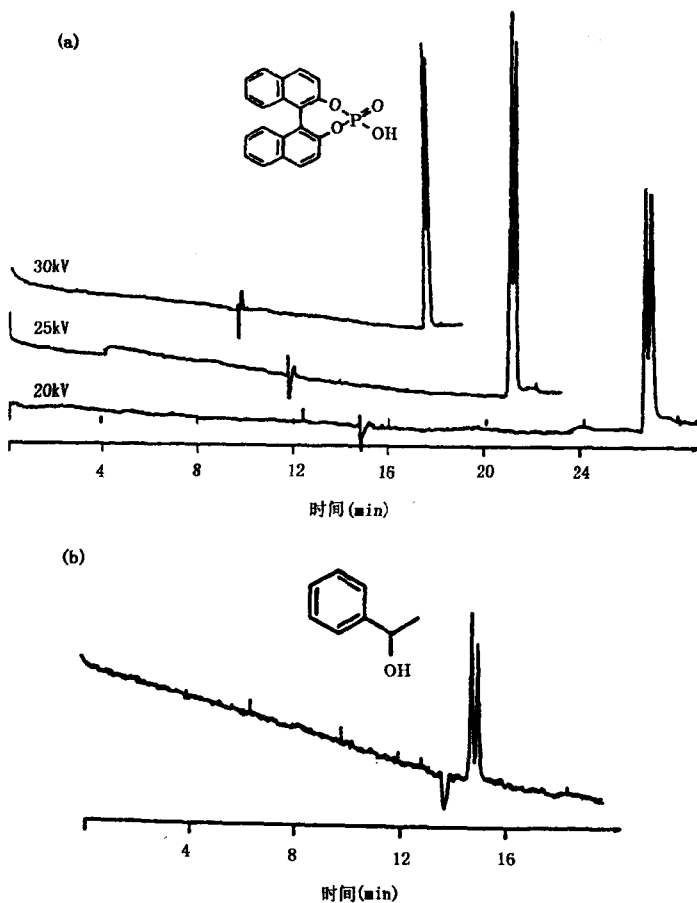


图 14.19 Chirasil-Dex 开管柱毛细管电色谱拆分图

(a)(R,S)-1,1'-联苯-2,2'-二基磷酸酯;(b)(R,S')-1-苯基乙醇.

色谱柱:80cm \times 50 μ m i. d. Chirasil-Dex 开管柱;流动相:磷酸和磷酸混合缓冲液.

典型图谱. 我们则利用蛋白质分子的手性选择性效应, 发展出固定相吸附开管毛细管电色谱拆分手性对映体的新方法. 图14.20是溶菌酶吸附固定相开管毛细管电色谱拆分一些手性化合物的典型

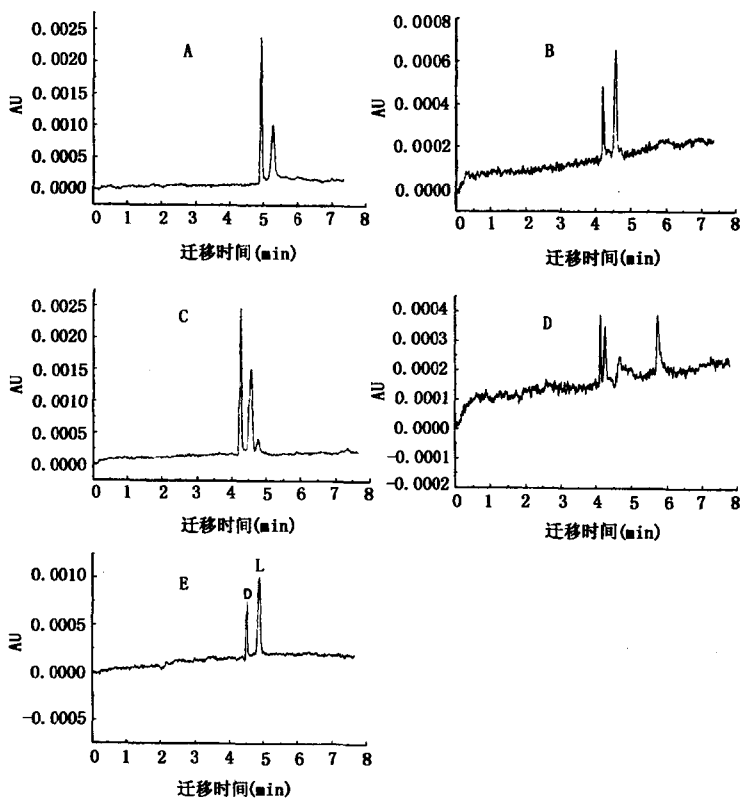


图 14.20 溶菌酶吸附固定相 OTCEC 手性化合物分离色谱图

色谱条件: 吸附固定相的制备: 以0.5 mg/mL溶菌酶的10mmol/L磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.20)冲洗毛细管10~20min,然后用流动相冲洗6min;
 流动相: 异丙醇/10mmol/L磷酸盐缓冲溶液 (pH7.20)(10/90);毛细管柱:47cm
 (至检测器40)×50 μ m i. d.;电压:25kV;温度:25 $^{\circ}$ C.
 A. DL-美芬妥因;B. PTH-DL-天冬氨酸;C. DasyI-DL-亮氨酸;D. PTH-DL-苏氨酸;E. DL-色氨酸.

型谱图^[58]。

尽管电色谱已经逐步走向实际应用，但要成为常规分析手段还有相当多的困难。最大的障碍是电色谱分析碱性化合物难度很大，而许多药物恰恰是碱性化合物；另一问题是电色谱的电渗流在低的流动相 pH 值时太小，导致样品分析时间过长。此外，有关电色谱的保留机理尚需进一步澄清，以便进一步指导电色谱酸性、中性和碱性样品分析的新的固定相的设计。虽然电色谱存在这样或那样的问题，但由于该技术在分离原理上存在的优越性，我们深信电色谱一定会成为与气相色谱、液相色谱和毛细管电泳互补的重要分离分析手段。

参 考 文 献

- [1] V. Pretorius, B. J. Hopkins and J. D. Schieke, *J. Chromatogr.*, **99**, 23(1974).
- [2] J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, **218**, 209(1981).
- [3] S. Otsuka and L. Listowsky, *Anal. Biochem.*, **102**, 419(1980).
- [4] P. H. O' Farrell, *Science*, **227**, 1586(1985).
- [5] R. F. Antrim, R. A. Scherrer and A. M. Yacynych, *Anal. Chim. Acta.*, **164**, 283(1984).
- [6] T. Tsuda, K. Nomura and G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, **248**, 41(1982).
- [7] T. Tsuda, *Anal. Chem.*, **59**, 521(1987).
- [8] J. H. Knox and I. H. Grant, *Chromatographia*, **24**, 135(1987).
- [9] J. H. Kox, *Chromatographia*, **26**, 329(1988).
- [10] J. H. Knox and I. H. Grant, *Chromatographia*, **32**, 317(1991).
- [11] Yukui Zhang, Wei Shi, Lihua Zhang and Hanfa Zou, *J. Chromatogr.*, **802**, 59(1998).
- [12] M. J. E. Golay, in *Gas Chromatography* (V. J. Coates et al, eds), Academic Press, NY, p. 1, 1958.
- [13] D. Ishii, K. Hibio, K. Asai and T. Takeuchi, *J. Chromatogr.*, **151**, 147(1978).
- [14] G. J. M. Bruin, P. P. H. Tock, J. C. Kraak and J. Poppe, *J. Chromatogr.*, **517**, 557(1990).
- [15] M. Martin and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **56**, 614(1984).
- [16] A. S. Rathore and Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **743**, 231(1997).
- [17] L. A. Colon, Y. Guo and A. Fermier, *Anal. Chem.*, **69**, 461A(1997).

- [18] 张丽华、邹汉法、施维、张玉奎, 色谱, **16**, 106(1998).
- [19] 张丽华、邹汉法、施维、张玉奎, 色谱, **16**, 203(1998).
- [20] H. Yamamoto, J. Baumann and F. Erni, *J. Chromatogr.*, **593**, 313(1992).
- [21] 施维、邹汉法、张玉奎, 色谱, **14**, 351(1996).
- [22] 施维、邹汉法、张玉奎, 色谱, **15**, 201(1997).
- [23] N. W. Smith and M. B. Evans, *Chromatographia*, **41**, 197(1995).
- [24] S. Li and D. K. Lloyd, *Anal. Chem.*, **65**, 3684(1993).
- [25] F. Lelievre, C. Yan, R. Zare and P. Gareil, *J. Chromatogr.*, **723**, 145(1996).
- [26] C. Fujimoto, J. Kino and H. Sawada, *J. Chromatogr.*, **716**, 107(1995).
- [27] H. Rebscher and U. Pyell, *Chromatographia*, **38**, 737(1994).
- [28] T. Tsuda, *LC. GC*, **5**, 32(1992).
- [29] R. J. Boughtflower, T. Underwood and C. J. Paterson, *Chromatographia*, **40**, 329(1995).
- [30] C. Yan, D. Schaufelberger and F. Erni, *J. Chromatogr.*, **670**, 15(1994).
- [31] T. Tsuda, I. Tanaka and G. Nakagawa, *Anal. Chem.*, **56**, 1249(1984).
- [32] C. Yan, Electrokinetic Packing of Capillary Columns, U. S. Patent, No. 5453163, 1993.
- [33] T. Tsuda, *Anal. Chem.*, **59**, 521(1987).
- [34] J. H. Knox and M. T. Gilbert, *J. Chromatogr.*, **186**, 405(1978).
- [35] T. Tsuda, K. Nomua and G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, **248**, 241(1982).
- [36] 叶明亮、邹汉法、倪坚毅、刘震、张玉奎, 分析测试学报, 待发表.
- [37] W. D. Pfeffer and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **62**, 2178(1990).
- [38] W. D. Pfeffer and E. S. Yeung, *J. Chromatogr.*, **557**, 125(1991).
- [39] S. Mayer and V. Schurig, *J. HRC and CC.*, **15**, 129(1992).
- [40] S. Mayer and V. Schurig, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 915(1992).
- [41] D. W. Armstrong, Y. Tang, T. Ward and M. Nichols, *Anal. Chem.*, **65**, 1114(1993).
- [42] Z. J. Tan and V. T. Remcho, *Anal. Chem.*, **69**, 581(1997).
- [43] K. Hibi and T. Tsuda, *J. Chromatogr.*, **175**, 105(1979).
- [44] D. Ishii, T. Tsuda and T. Takeuchi, *J. Chromatogr.*, **185**, 73(1979).
- [45] J. W. Jorgenson and E. J. Guthrie, *J. Chromatogr.*, **255**, 335(1983).
- [46] J. Pesek and M. T. Matyska, *J. Chromatogr.*, **736**, 255(1996).
- [47] J. Pesek and M. T. Matyska, *J. Chromatogr.*, **736**, 313(1996).
- [48] J. Pesek, M. T. Matyska and Mauskar, *J. Chromatogr.*, **763**, 307(1997).
- [49] P. P. H. Tock, G. Stegeman and K. K. Unger, et al., *Chromatographia*, **24**, 617(1987).

- [50] P. P. H. Tock, C. Boshoven, H. Poppe and J. C. Kraak, *J. Chromatogr.*, **477**, 95 (1989).
- [51] A. L. Crego, J. C. Diez-Masa and M. V. Dabrio, *Anal. Chem.*, **65**, 1613(1993).
- [52] A. L. Crego, M. V. Dabrio and J. C. Diez-Masa, *J. Chromatogr.*, **659**, 255(1994).
- [53] L. L. Hench and J. K. West, *Chem. Rev.*, **90**, 33(1990).
- [54] C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine and J. I. Zink, *Anal. Chem.*, **66**, 1120A(1994).
- [55] Y. Guo and L. A. Colon, *Anal. Chem.*, **67**, 2511(1995).
- [56] Y. Guo and L. A. Colon, *J. Microcol. Sep.*, **7**, 485(1995).
- [57] P. Narang and L. A. Colon, *J. Chromatogr.*, **773**, 65(1997).
- [58] Zhen Liu, Hanfa Zou and Yukui Zhang, *Anal. Chim. Acta.*, accepted for publication.
- [59] B. Behnke and E. Bayer, *J. Chromatogr.*, **680**, 93(1994).
- [60] B. Behnke, E. Grom and E. Bayer, *J. Chromatogr.*, **716**, 207(1995).
- [61] R. Dadoo, C. Yan and R. N. Zare, et al, *LC-GC.*, **164**(1997).
- [62] 施维、邹汉法、张丽华、张玉奎, *科学通报*, **42**, 498(1998).
- [63] 张丽华、邹汉法、施维、张玉奎, *分析化学*, **26**, 724(1998).
- [64] J. Cai and J. Henion, *J. Chromatogr. A.*, **703**, 667(1995).
- [65] E. R. Verheij, U. R. Tjaden, W. M. A. Niessen and J. van der Greef, *J. Chromatogr.*, **554**, 339(1994).
- [66] M. Hugener, A. P. Tinke and J. van der Greef, et al, *J. Chromatogr.*, **647**, 375 (1993).
- [67] D. B. Gordon, G. A. Lord, L. W. Tetler and C. M. Carr, *J. Chromatogr.*, **700**, 27 (1993).
- [68] S. J. Lane, R. Boughtflower, C. Paterson and T. Underwood, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1283(1995).
- [69] S. J. Lane, R. Boughtflower, C. Paterson and M. Morris, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 773(1996).
- [70] R. Dadoo, C. Yan and R. N. Zare, et al., *LC-GC.*, **13**, 164(1997).
- [71] N. Smith, *Capillary Electrochromatography*, Beckman Inc., p. 27, 1998.
- [72] J. T. Wu, P. Huang, M. X. Li and D. Lubman, *Anal. Chem.*, **69**, 2908(1997).
- [73] J. Ding and P. Vouros, *Anal. Chem.*, **69**, 379(1997).
- [74] N. W. Smith and M. B. Evans, *Chromatographia*, **38**, 649(1994).
- [75] F. Leliever, C. Yan, R. N. Zare and P. Gareil, *J. Chromatogr. A.*, **723**, 145(1997).

主题索引

一 画

一元碱 71
一元酸 71,73
一级矩 28

二 画

二元冲洗剂 129
二性化合物 72
二性配对色谱 443
二极管阵列检测器 364
二级中心矩 28,29

三 画

大孔硅胶 501
干扰素 530
已知样品 226
三级中心矩 28,29

四 画

反相色谱 7,49,381
气相色谱 11
Van Deemter 方程 21,545
分子间距离 86
分子体积 87
分子结构参数 87
分子形状 89
分子生物色谱 109
分子总能量 106
分配系数 51,70
分离选择性 57
分离条件最优化 208
分离模式选择 179,184

双电层理论 54,56
生物活性 122
无机盐 59,61
无机基质固定相 495
化学键合 141
水相 264
内标法 369
火炸药 375
天然产物 385
手性对映体 415,565
手征性碳原子 415
手性流动相 417
手性固定相 417,446
手性添加剂 436
手性离子型络合剂 439
毛细管电色谱 541
毛细管管壁 541
毛细管区带电泳 546
毛细管电色谱应用 561
开管毛细管电色谱 546
匀浆填充 553

五 画

半峰宽 15,31
平衡常数 50,70
平衡偏离因子 22
正交设计 217
正辛醇/水分配系数 112
正相色谱 38,373
电子对给体 83

电子对受体 83
电导池 341
电导检测器 341
电导抑制柱 348
电离能 86
电驱动 541
电泳淌度 550
电色谱填充柱 553
电动填充法 554
电渗流 542
电喷雾质谱 560
未知样品 226
示差折光检测器 336
外标法 368
生物碱 409
生物大分子 470
生理活性 470
DNA 加合物 563

六画

色谱法定义 1
色谱法分类 5
色谱动力学 13
色谱专家系统 170,176
色谱响应函数 214
色谱峰托尾因子 27,36
色谱峰跟踪 259
色谱柱上浓缩 295
色谱柱 317
色谱柱评价 319
色谱柱切换 322
色谱柱恒温装置 323
色散作用力 81
自由焓 62
吉布斯自由能 64
同系物 106

优化指标 210
优化参数 238
优化区域 241
因子设计 218
并行优化方法 227
吸附等温线 36
多阶梯梯度 255
有机相 264
有机溶剂 56
有机离子 116
有机高分子基质 161,164,486
安培检测器 342
光学活性试剂 419
共价色谱 483
压力驱动 542
自加热效应 543

七画

体积排阻色谱 6,472
补偿温度 64,91
极化率 85
极性键合相 152
连通指数 90
条件优化 178
串行色谱响应函数 216,233
串行优化方法 227
均匀设计 223
均匀重复设计 238,244
均壳设计 221
低压梯度 309
进样系统 312
进样阀 312
灵敏度 327
间接检测法 350
系统峰 354
抛物线流型 546

免疫萃取 298
免疫亲和色谱 471
免疫球蛋白 536

八画

物理吸附固定相 557
质量平衡理论 27
固定相 38,65,194
固定相表面活性点 66
固相萃取 266
顶替吸附 38,56
顶替吸附-相互作用模型 44
表面张力 48,61
表面改性 144
表面活性剂 375
范德华作用力 82
拓扑参数 90
环糊精 436,444
环境化学参数 122
环境污染物 376
知识库 171
知识表达 171
试验设计 217
单纯形优化方法 227
乳状液 265
贮液系统 301
注射器进样 312
线性范围 331
定性分析 361
定量分析 367
非平衡理论 22
非对映异构化衍生拆分 417
非对映异构体 417,435
非多孔基质 494
非特异性洗脱 526
空穴型手性固定相 456

金属络合亲和色谱 482
转换生长因之 529
肿瘤坏死因子 529
拉伸填充制备法 554

九画

亲和色谱 9,471,479
柱外效应 27
柱末端效应 32
柱效 30
柱后衍生 294
柱系统推荐 200
柱前衍生 293
柱温 61,64
统计热力学 44,53
氢键 80,82,100
诱导作用力 81
选择性 130,180
残余硅羟基 149
复合形优化方法 234
重叠分辨分离度法 245,249
活体取样 279
活度系数 42
荧光检测器 282,288,338
荧光衍生试剂 289
衍生反应 283
恒压泵 303
恒流泵 303
保护柱 322
背景信号 359
食品分析 389
药物分析 388
药物代谢动力学 453
施加电压 543
Pirkle 型固定相 456

十 画

离子色谱 6,50
离子交换色谱 6,50,475
离子交换树脂 50
离子对色谱 8,116
离子对试剂 56,66,75
离子-偶极相互作用 80
离子强度 518,523
峰基宽 15
流 20
流动相线速度 30
流动相 38,126,194
流动相速度 69,70
竞争吸附 38
胶束液相色谱 110
氧化铝 166
氧化锆 167
样品预处理 262
盐析效应 265
浸透限制固定相 297
高效液相色谱仪 301
高压输液泵 303
高压梯度 309
高斯峰 35
消旋异构体 437
配基交换手性固定相 460
特异性洗脱 526
涂布聚合固定相 14-9

十一 画

粒度分布 162
随机模型理论 17
检测池有效体积 28,30
虚拟保留值 35
液固吸附色谱 38,40,48,137
液固萃取 262

液固萃取固定相 267
液固萃取流动相 268
液相色谱热力学 38
液相色谱保留值 182
液相色谱检测器 332
液液萃取 262
偶极矩 80,83,93
添加剂 129,197
硅羟基 137
硅胶 139
硅烷化试剂 146,148
推理机 173
混合设计 219
移动重叠分辨分离度法 253
淤浆装柱 318
基线漂移 327
探针试剂 352,356
维生素 377
敏感度 330
蛋白质 478
蛋白质手性固定相 449
梯度洗脱 132,226,557

十二 画

疏水色谱 9,477
疏水作用力 83
疏水性参数 120
疏溶剂理论 40
塔片理论 13
塔片数 14
塔片高度 15,21,29
超热力学 79,113
超滤膜技术 281
量化计算 106
等度洗脱 130
等电点 517

最小检测量 330
最难分离物质对 216
窗口图形法 246
紫外光检测器 282,332
紫外光衍生效剂 283

十三画

微渗析 278
微渗析探针 278
溶质电荷数 60
溶质流通量 25
溶质-溶剂相互作用 41
溶质结构保留值定量关系 79
溶剂强度 40
溶剂化结构参数 94
溶剂混合器 311
溶解度理论 42
溶解度参数 43,92
溶胶-凝胶技术 556
填充载体 30

馏分收集器 324
塞子效应 554
键合相配体 486

十四画

静电作用力 50,75,80
碳含量 151
酸解离 70
酶动力学 479
膜技术 277
膜色谱 495

十五画

摩尔吸光系数 333,355

十六画

薄层色谱 10
噪声 327

二十画

灌流液 278
灌流色谱 494

内 容 简 介

本书比较系统、全面地介绍液相色谱分离分析技术和方法的原理、现状及发展动态。全书共分十四章。

内容包括绪论,液相色谱理论基础,液相色谱固定相和流动相,计算机在液相色谱分析中的应用,样品预处理,液相色谱仪器,液相色谱检测技术和色谱峰定性、定量,液相色谱应用,液相色谱手性化合物拆分和液相色谱的生物大分子分离、纯化和毛细管电色谱等。

本书内容新颖、丰富,注重理论与实际,原理与应用,现状与发展趋势的结合,可读性强,实用性好,可供化学、化工、生化、医学、药学和生物工程方面的研究人员和技术人员参考,也可作为高等院校本科生、研究生和教师的教课书和参考书。

图书在版编目(CIP)数据

高效液相色谱法/邹汉法等编著. -北京:科学出版社,1998.11

(分析化学丛书;第三卷;第三册)

ISBN 7-03-006716-9

I. 高… II. 邹… III. 液相色谱-基本知识 IV. O657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 11271 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

科地亚印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998 年 11 月第 一 版 开本: 850×1168 1/32

1998 年 11 月第一次印刷 印张: 18 3/4

印数: 1—2 100 字数: 485 000

定 价: 42. 00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)