

## 液相色谱法的基本原理

张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

色谱法又叫层析法, 是用来分离混合物中各种组分的方法。色谱系统包括两相, 固定相(以下简称定相)和移动相(以下简称动相)。当以动相流过加有样品的定相时, 由于各组分在两相之间的浓度比例不同, 就会以不同速度移动而互相分离开来。定相可以是固体, 也可以是被固体或凝胶所支持的液体。定相可以装入柱中, 展成薄层或涂成薄膜, 称为色谱“床”。动相可以是气体, 也可以是液体, 前者称为气相色谱, 后者称为液相色谱。

气相色谱法在近20多年来发展极快, 应用很广, 在仪器的自动化程度、灵敏、精密、准确的程度上, 以及在理论研究的深度上都远远超过液相色谱法。液相色谱法如纸色谱和薄层色谱法所需设备简单, 操作容易, 特别是后者有相当高的分辨率和灵敏度, 而且速度快, 所以在生化工作中广泛应用。离子交换和凝胶渗透等都是常用的技术。最近几年来又发展了高压液相色谱技术, 新型的仪器在精巧的程度上可与气相色谱相比, 在用途的广泛性上则有过之, 因为很多不易挥发或不耐热的物质不适宜于用气相色谱, 则可用高压液相色谱法分离。此外, 它可以进行多种类型的色谱, 如吸附、分配、离子交换、凝胶渗透和亲和色谱等, 也可以配备多种检测系统, 如紫外光和可见光吸收计、荧光计、折光计等等, 看来这是目前大有发展前途的方法。

不同类型的液相色谱法虽有其特性, 但又具有共性, 基本原理是相同的。本文简要叙述其原理, 不作理论上的推导, 只着重说明其意义, 和如何用来指导实践, 以便能少化些工夫,

达到更好的分离效果。

本文所用名词和符号主要根据国际纯粹和应用化学联合会规定的关于色谱法名词的建议<sup>[1]</sup>和《英汉色谱技术词汇》<sup>[2]</sup>, 本文内容参考了一些主要有关著作<sup>[3-8]</sup>。

### 色谱法的分类

根据不同的标准, 可以将色谱法分成不同类型(见表1)。

表1 色谱法的分类

按动相-定相分	气液(GLC), 气固(GSC), 液液(LLC), 液固(LSC), 液凝胶。
按实验技术分	柱式(CC): 填充柱, 空管柱。 开床式: 滤纸(PC), 薄层(TLC)。
按分离机制分	吸附, 分配, 离子交换, 凝胶渗透(GPC), 其它(如亲合)。
按展开方式分	洗脱, 迎头, 置换。

### 一、按定相和动相的物态分类

气液和气固色谱之间的区别不是绝对的, 因为有时用液体改善固体吸附剂的活性, 而定相液体的支持物也会影响色谱过程, 要根据哪一种作用为主而定。气固色谱发展较早, 但应用面窄, 仅限于分离气体和低分子碳氢化合物。气液色谱应用极广, 它和液液色谱, 液固色谱是三个最主要的类型。定相为固体的属吸附色谱, 定相为液体的属分配色谱。液液色谱的动相和定相必须是互不相混合的液体。液凝胶色谱则包括离子交换和凝胶渗透色谱两种。

### 二、按实验技术分类

按实验技术, 或者说按“床”的几何形状来

分,有柱色谱,其中又包括填充柱和空管柱(open tubular columns,即毛细管内壁涂一层液体作定相),还有开床式色谱,包括滤纸和薄层色谱。

### 三、按分离的机制分类

#### (一) 吸附色谱

主要根据物质对活性固体表面的吸附亲合力的差异来分离。亲合力则主要取决于物质的极性大小。有机化合物分子中的功能团比非极性的碳链对分离效果有更大的影响,所以吸附色谱适于把混合物中的各物质按其所含极性基团的数目和类型分为几大类。

#### (二) 分配色谱

主要根据物质在定相中的溶解度的差异(指在气液色谱中);或是在定相和动相中的溶解度的差异(指在液液色谱中)。在液液分配色谱中,通常定相比动相的极性更强,例如纸色谱系统中,定相是结合于滤纸的水,动相常为含水有机溶剂。如果将它们的关系反过来,使定相为非极性的(以碳氢化合物处理的纸),或极性较弱的(如以甲酰胺处理的纸),则称为反相分配色谱。

#### (三) 离子交换色谱

定相是具有固定电荷的离子交换树脂,带有固定正电荷的称为阴离子交换树脂,带有固定负电荷的称为阳离子交换树脂。固定电荷吸引相反符号的对立离子以保持电中性。离子交换色谱主要根据动相和样品中的不同对立离子对定相固定电荷部位的亲合力大小不同而进行分离。

#### (四) 凝胶渗透色谱

又称排阻色谱、凝胶过滤、凝胶色谱、分子筛色谱等。主要根据多孔凝胶对不同大小的分子的排阻效应进行分离。排阻是指大分子不能进入小的凝胶孔中而被排阻在凝胶颗粒之外,而小分子可进入凝胶内部。在分离过程中,大分子随着动相一起移动得较快,小分子进入凝胶内部移动较慢,这样大小分子就可以分开。控制凝胶的孔径就可以用来分离各种不同分子

大小的物质。凝胶又有亲水性和疏水性两大类,亲水性凝胶如交联葡聚糖或聚丙烯酰胺凝胶及琼脂糖凝胶等,适于分离水溶性物质,如生物高分子等,而合成的聚苯乙烯凝胶则适于分离疏水性有机化合物。过去有人习惯称前者为凝胶过滤,称后者为凝胶渗透,今按参考资料<sup>[1]</sup>统一用凝胶渗透一词。无机物,如多孔玻璃或硅胶也可以控制一定的孔径用于此目的。

#### (五) 其它

亲和色谱是根据生物特异性吸附进行分离,如抗体-抗原复合物,酶-底物复合物等。另外也可利用形成其它复合物或螯合物的现象达到分离的目的。

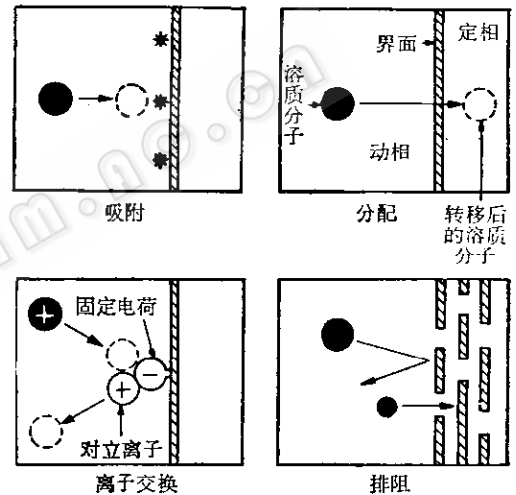


图 1 不同类型的色谱分离机制示意图

### 四、按洗脱方式分类

#### (一) 洗脱

将少量混合物样品加于定相“床”上,再以动相流过“床”,不同物质即分开成为不同区带或斑点,在开床式色谱中,情况即如此。在柱色谱中,则须继续洗脱至各成份依次由柱床中流出,经检测洗脱液中物质的浓度,在坐标图上可得一个个峰形,称为色谱图(图 2a)。因为被分离的物质最后分成一个个的区带,所以也称为区带色谱。

#### (二) 迎头分析

将被分离的混合物大量连续地通过柱,开

始各成份被留在柱上，待饱和后就出现在洗脱液中，开始出现的是亲合力最小的，可得到一部分纯物质。然后各成份依亲合力逐步增加的顺序出现(如图 2b)，最终各成份的浓度与样品中相同。这种方法不适于分析和分离的目的。用活性炭处理气体，或用离子交换剂处理水等属于这种类型。由混合物中提取含量少而对定相亲合力强的物质时，可用此方法将该物质浓缩于柱上，然后进行洗脱。

(三) 置换

将混合物样品加在柱上后，用含有对定相亲合力大的物质的动相进行洗脱，则原来样品中的各物质依亲合力由小到大的顺序被洗脱出来(图 2c)，这种峰形后沿较陡，不拖尾。用置换法可以得到各成份的纯的区带，所以可用于制备和工业生产的目的。但各区带衔接部分互相混杂，可以加进亲合力居间的物质使它们分开。

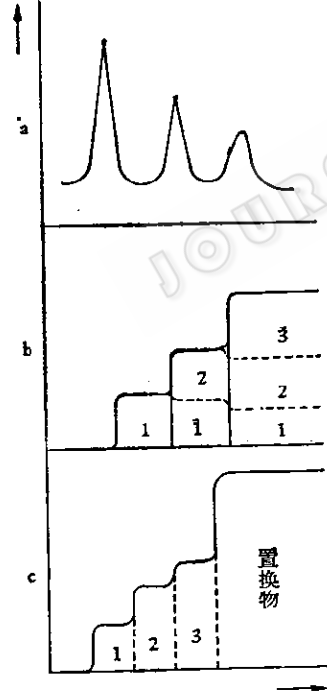


图 2 不同展开方式的色谱图  
a. 洗脱, b. 迎头, c. 置换

### 色谱法分离的过程

现以分配色谱为例,说明分离的过程<sup>[3]</sup>。图

4 中是两叠并列的小方盒, S 行代表定相, M 行代表动相, 两相不互相混合。假定溶质在各合之间左右互通, 分配达到平衡。而溶质在上下

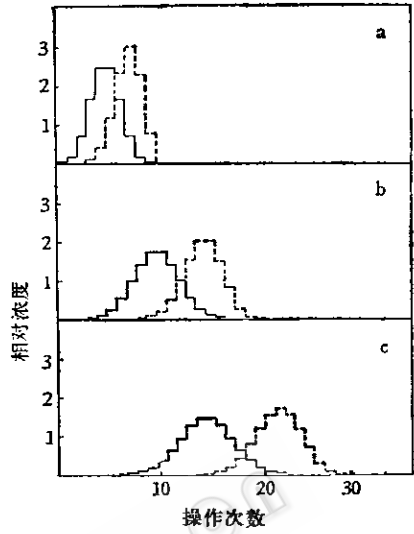


图 3 经过 10 次、20 次和 30 次操作后的浓度分布情况

在各层中的分数					
		S		M	
A	B	A	B	A	B
0.002	0.000	1	1	1	3
0.018	0.000	9	27	9	81
0.070	0.001	36	324	36	972
0.164	0.009	84	2268	84	6804
0.246	0.039	126	10206	126	30618
0.246	0.117	126	30618	126	91854
0.164	0.234	84	61236	84	183708
0.070	0.300	36	78732	36	236196
0.018	0.225	9	59049	9	177147
0.002	0.075	1	19683	1	59049

图 4 分配色谱的假想试验——经过10次操作, AB 两物质的浓度

各层之间不能通过。设 A 物质在定相和动相中的浓度比为 1:1, B 物质为 1:3。将 A, B 各 1 份加到第一层小合 S 中,平衡后, A 在 S 和 M 中各为 1/2, B 在 S 中为 1/4, 在 M 中为 3/4。再在 M 行上面加一层小合,并全体向下移动一层。再达成平衡后, A 在第一和第二层 M 和 S 中均为 1/4。B 在第一层 S 和 M 中分别为 1/16 和

3/16, 在第二层 S 和 M 中分别为 3/16 和 9/16。如此重复操作 10 次时, A、B 在各层中的量如图 3 中所示, 各数字均为分数的分子数, A 物质的共同分母数是 1024 ( $2^{10}$ ), B 物质的共同分母数是 1,048,576 ( $4^{10}$ )。再计算出每一层中(包括 S 和 M) A 物质相当总 A 量的分数, 和每一层中 B 物质相当总 B 量的分数 (见图 4 左边的数字), 以此分数对层数作图, 则得如图 3a 的形状。重复 20 次操作时, 如图 3b, 重复 30 次操作时如图 3c。AB 两物质已分离较好。重复极多次, 图形就与高斯分布曲线相符, 图 4 中的每层小合就相前一个“理论塔板”。

## 色谱柱及色谱图的重要参数

### 一、色谱柱参数(见图 5)

#### (一) 柱体积( $V_t$ )

装有填充物的柱总体积, 亦称“床”体积。

#### (二) 间隙体积( $V_i$ )

柱填充物颗粒之间的间隙体积, 即动相所占装柱部分的体积。

#### (三) 定相体积( $V_s$ )

定相所占体积, 即活性固体或凝胶, 或定相液体所占体积, 固体支持物不包括在内。

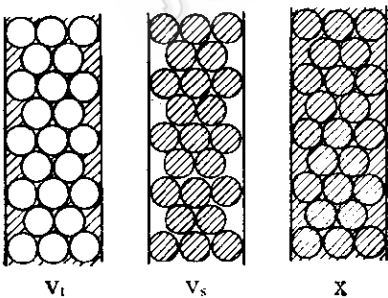


图 5 色谱柱的参数图解

### 二、色谱图参数

#### (一) 色谱峰

如图 6 所示, 有基线(CD), 峰宽(FG 或 W), 峰高(BE), 半高峰宽(HI,  $W_{0.5}$ ), 曲折点峰宽 [ $W_i$ , 即峰高 0.607 ( $e^{-1/2}$ ) 处的宽度], 峰面积(CHEID)。

#### (二) 滞留体积( $V_M$ )

从加样起至不被吸附的物质峰尖处洗脱出的动相总体积, 其中包括加样系统及检测器中的体积, 相当图 5 中的 OA, 在气相色谱中常用时间表示为  $t_0$ 。

#### (三) 死体积( $V_d$ )

相当进样点至有效检出点的体积减去柱总体积。

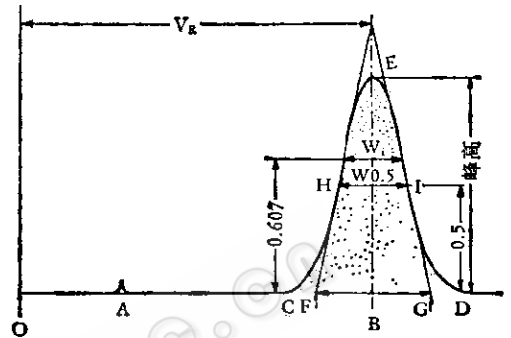


图 6 色谱峰的参数图解

#### (四) 总保留体积( $V_R$ )

从进样点至洗脱峰尖之间流出的动相总体积, 相当 OB。用时间表示则为  $t_R$ 。

#### (五) 峰洗脱体积( $\bar{V}$ )

从洗脱开始至峰尖处的动相体积, 仅适用于液相色谱, 它不包括加样时流出体积及冲洗时(如冲洗时样品不移动)流出的体积。

#### (六) 校正保留体积( $V'_R$ )

等于总保留体积减去滞留体积, 或峰洗脱体积减去间隙体积, 相当 AB, 用时间表示则为  $t'_{R0}$ 。

$$V'_R = V_R - V_M = \bar{V} - V_i$$

在试验条件恒定时, 物质的保留体积是个常数, 可以作为物质定性的标准。在开床式色谱中则用比移值( $R_f$ )作为物质定性标准。 $R_f$ 即区带所走距离与溶剂前沿所走距离之比值。

## 液相色谱的基本理论

### 一、分布常数和质量分布比

由第二节所举例子, 知道 AB 两物质所以能够分开是因为它们在两相中的溶解度不同,

所以这是分配色谱中最关键的物性,通常用分布常数(distribution constant)  $K_D$  来表示,即平衡时定相中与动相中溶质浓度的比值:

$K_D = \text{定相中溶质浓度} / \text{动相中溶质浓度}$  分布常数也叫分配系数(partition coefficient),根据参考资料<sup>[1]</sup>,认为用分布常数较好。

如果不用浓度而用物质的绝对量的比值,则称质量分布比(mass distribution ratio,  $D_m$ ),相当于气相色谱中的“容量因子”(capacity factor)。

$D_m = \text{定相中溶质量} / \text{动相中溶质量} = (\text{定相中浓度} \times \text{定相体积}) / (\text{动相中浓度} \times \text{动相体积})$

$$D_m = K_D \cdot V_s / V_l \quad (1)$$

在吸附色谱的情况,固定相为固体,物质被吸附的量可用单位重量或单位表面积表示,如  $D_s, D_{s_0}$ 。

两种物质的分离取决于它们的  $D_m$  值的比值,称为“分离因子”,用  $\alpha$  表示:

$$\alpha = D_{m_2} / D_{m_1} \quad (2)$$

因为习惯上  $D_m$  值小的物质先被洗脱出来,故用  $m_1$  表示,所以  $D_{m_1} > D_{m_2}$ ,  $\alpha$  常大于 1。

## 二、总保留体积与分布常数的关系

物质在动相中才能随动相一起移动,在定相中则不能移动,所以留在定相中的量越多,也就是  $K_D$  和  $V_s$  越大时,总保留体积就越大,其关系如下:

$$V_R = V_l + K_D V_s \quad (3)$$

用一个简单的比喻表说明如下。三个人走过一条大街,甲照直走过去,乙到两家院子里转一圈再走到头,丙到十家院子里转一圈再走到头。显然甲走的最快,乙缓慢,丙最慢。再假定在各家院子里所走的距离相等(相当  $V_s$ ),甲走的距离等于一条街的长度( $V_l$ ),甲不进院子,  $K_D = 0$ ;乙走的路等于一条街长度( $V_s$ )加上两个院子( $K_D = 2$ )的长度( $V_s$ )。丙走的路等于一条街长度,加上 10 个院子( $K_D = 10$ )的长度( $V_s$ )。

前面讲到用  $V_R$  可作为物质定性的标准,这就要求在同一柱中,同样条件下进行试验,否则

不好比较。在柱和条件有变动时,应该用  $K_D$  作为标准。这是个比较恒定的物性,由(3)式导出  $K_D$  的计算公式如下:

$$K_D = (V_R - V_l) / V_s \quad (4)$$

## 三、理论塔板和理论塔板高度

理论塔板学说是 Martin 和 Synge<sup>[9]</sup> 于 1941 年提出的。他们把色谱柱比作蒸馏塔,蒸馏时,物质的气相与液相在每一理论塔板中达成平衡,在色谱法中,物质在定相和动相中的分布达成平衡。一个理论塔板也就相当图 3 中的一层小合。由图 4 看出理论塔板数越多,分离越完全,所以一个柱的分离效率通常用理论塔板数  $n$  来表示,  $n$  值按下式计算:

$$n = 16(V_R/W)^2 \text{ 或 } n = 16(\bar{V}/W)^2 \quad (5)$$

在液相色谱的情况,通常用峰洗脱体积( $\bar{V}$ )计算,  $W$  则为用体积表示的峰宽。在气相色谱中常用保留时间  $t_R$  计算 [ $n = 16(t_R/W)^2$ ],这时  $W$  也要用时间表示。因为半高峰宽( $W_{0.5}$ )容易测量准确,计算的  $n$  值也比较准确,所以  $n$  值也可以用  $W_{0.5}$  来计算:

$$n = 5.54(\bar{V}/W_{0.5})^2 \quad (6)$$

设柱的高度(或长度)为  $L$ ,则每一个理论塔板的高度( $h$ ,以前叫作 HETP)按下式计算:

$$h(\text{HETP}) = L/n \quad (7)$$

## 四、分辨率(resolution)

相临两个峰的分离程度称为分辨率  $R_s$ 。两个峰尖之间距离越大,分辨率越高,两峰越宽,则分辨率越低,所以  $R_s$  按下式计算(见图 7):

$$R_s = (V_{R_2} - V_{R_1}) / (W_1 + W_2) / 2 = 2Y / W_1 + W_2 \quad (8)$$

通常两个相临峰的峰宽近似,即  $W_1 + W_2 = 2W_1$ ,又  $W = 4\sigma$ , ( $\sigma = W_i/2$ ,  $\sigma$  为标准偏差,等于曲折点峰宽  $W_i$  的一半),代入上式即得:

$$R_s = Y/4\sigma \quad (9)$$

$R_s$  值越大表示两个峰分的越开,当  $R_s = 1$  时,表示较好的分离,称为  $4\sigma$  分离,两个峰在  $2\sigma$  之外的部分重叠,互相沾染 2%。 $R_s = 1.5$  时,两峰完全分开,称为基线分离或  $6\sigma$  分离。

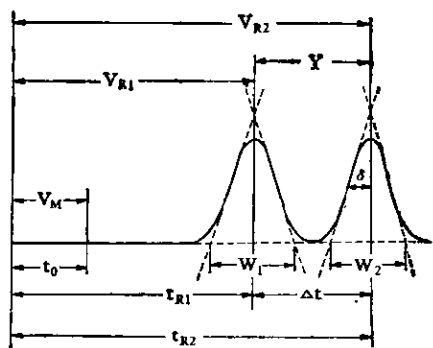


图 7 由色谱图计算分辨率的方法

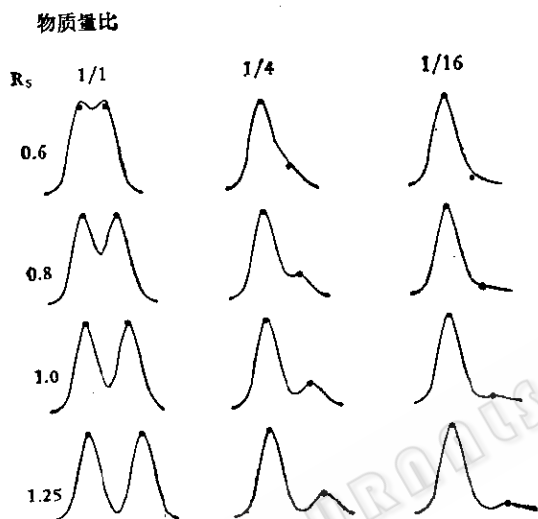


图 8 两种物质浓度比不同的情况下的分辨率

图 8 为两种物质浓度比不同的情况下的分辨率。可以看出在两种物质浓度相差较大时,尤其要求有较高的分辨率。

按照上述方法,我们可以很方便地计算出分辨率,并可以容易地比较各次分离的好坏,但这一公式不能指导我们如何改进实验设计,以达到更有效的分离,这就要求我们用一些与实验技术有关的参数来表示分辨率。

## 五、分辨率的另一表示方法

由公式(8)可推导出下式<sup>[7]</sup>:

$$R_s = \sqrt{n/4} \cdot \alpha - 1/\alpha \cdot D_m/D_{m+1} \quad (10)$$

式中等号右边第一项中的  $n$  即理论塔板数,它与柱效率有关。第二项中的  $\alpha$  为“分离因子”,也称为选择性因子。第三项中的  $D_m$  为“容

量因子”。这三项都与色谱法操作条件直接有关,靠改变这些条件可以提高分辨率。三项不一定同时改变,可以单独改变,但在什么情况下应该改变哪一个因子,又应如何改变呢?下面作一简单说明。

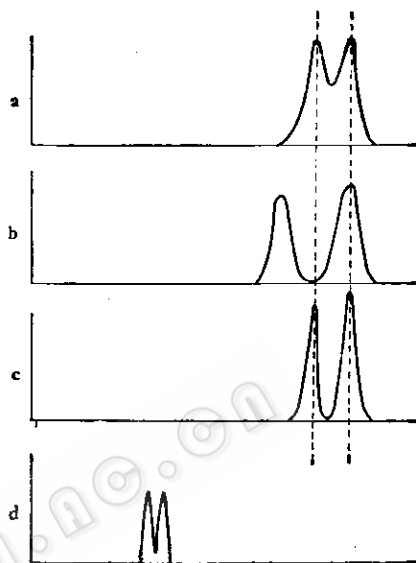


图 9 色谱分离的最优化

a. 分离不良, b. 加大  $\alpha$  提高选择性; c. 加大  $n$ , 提高柱效率; d. 减小  $D_m$ , 省时间

图 9 表示不同因子对色谱图的影响,在 a 的情况分离不良,两峰相距太近,应加大  $\alpha$  值; b 为加大  $\alpha$  后提高了选择性的结果,两峰分开; c 为在 a 的基础上加大  $n$ , 提高柱效率,使峰变窄,但峰尖位置不变(与 a 同); d 为减小  $D_m$  值,使峰提前出现,节省时间。

由公式(10)可知,当  $D_m \rightarrow 0$  和  $\alpha \rightarrow 1$  时,  $R_s \rightarrow 0$ , 分辨率变得极低,但  $D_m$  值太大时则分离时间太长,  $D_m$  值以 2—5 较好。不同类型的色谱情况不同,凝胶渗透色谱  $K_D$  值最大为 1,  $D_m$  值不可能太大;而在离子交换色谱中,  $D_m$  值可以很大,当  $\alpha$  接近于 1 时,不管怎样加大  $n$  值和使  $D_m$  最优化,都不能达到分离的目的。必须改变条件,加大  $\alpha$  值。在不同类型的色谱法中,用不同的办法改变  $\alpha$  值。如在分配色谱中,改变动相和定相的组成以改变其极性大小;在离子交换色谱中,可以选择不同的离子交换剂,改变动相的 pH 和离子强度;在凝胶渗透色谱

法中,则选用不同孔径的凝胶。这方面只能在各专门的技术中论述,此处不多谈。下面着重说明改进柱效率的办法。

## 六、柱效率

由公式(5)可知,峰越宽,理论塔板数越少,柱效率越低。所以导致区带展宽的一些因素可降低柱效率,这些因素如下。

### (一) 涡流扩散

动相流动时碰到固体颗粒就会产生涡流,在颗粒间隙之间的流动不规则,有的流路快,有的慢,区带即展宽。颗粒越小,粒度越均匀,装柱越均匀,都能减少涡流扩散而提高柱效率。

### (二) 分子扩散

分子扩散就是物质分子由浓度高的区域向浓度低处运动。这也会引起区带展宽。动相的流速太慢时,物质停留时间太长,扩散严重。

### (三) 传质影响

物质要在动相和定相中迅速达成平衡,这样不同的物质才能很好地分开。所以在两相中和两相界面之间的传质快慢很有关系。如传质慢,来不及达成平衡,动相就移过去了,区带就会变宽。这种现象称为物质的非平衡移动(见图10)。定相颗粒越小,液膜越薄,动相流速越快,都对传质有利。

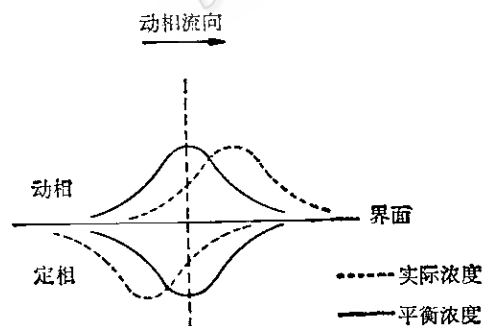


图10 非平衡移动

对以上三种影响因素加以分析,可以看出动相的流速和定相颗粒的大小是两个主要因素。现分述如下。

### (四) 动相流速

当流速太低时,分子扩散严重,特别是在气

相色谱中,因气体分子扩散快,流速影响特别大。如将理论塔板高度( $h$ )对流速作图(图11a),可以看出, $h$ 随流速增加而急速下降,达到一最低值,当流速再加大时,则传质影响起了主要作用, $h$ 又加大。在液相色谱中,因分子扩散比在气相中约低 $10^4-10^5$ 倍,所以流速低时 $h$ 不会增加很大,流速太高时 $h$ 也不象在气相色谱中那样升得快(图11b)。在高压液相色谱中,流速快一些影响不大。不过要特别指出的是凝胶渗透色谱,因为物质要渗透到凝胶内部,所以传质因素影响大,流速快了就会大大降低柱效率。

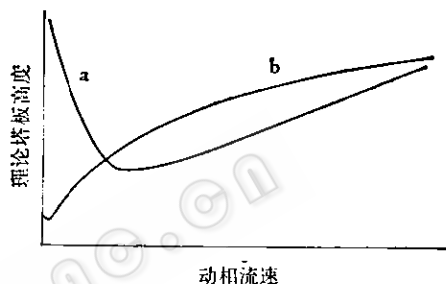


图11 理论塔板高度与动相流速的关系  
a. 气相色谱, b. 液相色谱。

### (五) 定相颗粒大小

粒子越小柱效率越高,但这对动相流动的阻力就增大,需要用高压使它流动。高压液相色谱(HPLC)就是根据这一理论而发展起来的。常规液相色谱用的定相颗粒直径在100微米左右,高压液相色谱则在10微米以下。近年来在颗粒结构方面也有很大改进。例如“控制表面多孔型”颗粒,中间是实心的,表面有一层极薄(1微米)的多孔层颗粒直径小,表面积大,传质快,大大提高了柱效率。

此外柱的死体积一定要小,否则已分离的区带在出柱又发生混合,就会降低柱效率。

## 洗脱峰不对称及其原因

### 一、吸附等温线的类型

吸附等温线表示在恒定温度下,被吸附物质的量随溶质浓度而变化的情况,以溶液中溶质质量为横坐标,以被吸附溶质质量为纵坐标作图,得到吸附等温线。通常有直线型,凸线型和凹

线型三种(图 12a),具有直线型吸附等温线的物质,其洗脱峰型对称,凸线型的则有拖尾现象,凹线型的则前沿伸长(图 12b)。在薄层色谱中则分别表现为圆形、拖尾和前伸的斑点(图 12c)。形成的原因如下:凸线型的吸附等温线表示物质浓度低时被吸附得牢,浓度高时吸附相对减弱。因色谱峰中心浓度高,前后沿浓度低,前沿由于吸附得牢,迟迟不被洗脱出来,而峰中心则提前洗脱出来,所以洗脱峰前沿陡直。后沿也被吸附得牢,也迟迟不被洗脱出来,所以拖尾。凹形的吸附等温线则恰好相反。在吸附色谱中凸线型的情况较多。在分配色谱中,通常直线型较多,样品量大时则为凹线型。各类色谱在样品量小时均趋于有直线型的吸附等温线。

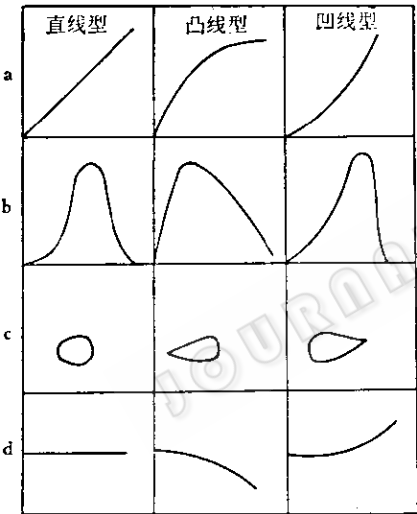


图 12 吸附等温线的类型及其影响  
a. 吸附等温线, b. 相应的洗脱峰形, c. 薄层色谱斑点形状, d. 样品量与保留时间的关系。

## 二、样品量对色谱峰的影响

当样品量大时,对色谱峰有影响,不但峰形不对称,而且  $V_R$  值发生改变。以  $V_R$  为纵坐标,样品量为横坐标作图,可得如图 12d 的关系。具有直线型的吸附等温线者,不影响  $V_R$  值;具有凸线型者,则样品加大时,  $V_R$  降低。因为样品浓度高时,吸附较弱,尤其峰中心部分浓度最高,所以提前被洗脱出来,  $V_R$  值即减小。图 13 为加样量大小对色谱峰形和薄层色谱斑点的影响。

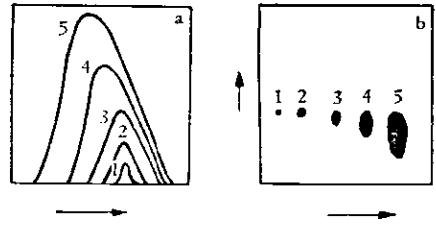


图 13 加样量大小的影响  
a. 色谱峰形, b. 薄层色谱斑点。  
1—5 加样量由小到大

响。所以为了分析准确,样品量要尽可能小些。

## 多组份的分离

### 一、洗脱的一般问题<sup>[7]</sup>

在分离多组份的混合物时,如果采用一个恒定的洗脱条件,往往不能将所有的组份适当地分开,如图 14 和图 15 中的 6 种物质,1、2 移动最快,3、4 较慢,5、6 最慢。当实验条件使 1、2 的  $D_m$  值接近最适( $\approx 2$ ),则图 14a 中 1、2 在适当时间出现为窄峰,3、4 较迟出现,峰较宽,5、6 最迟出现,峰极宽。在开床式色谱的情况下,则 5、6 不能分开(图 15a),如选择的条件使 5、6 之  $D_m$  值接近最适(图 14a),则 1、2、3、4 都不能分开。采取适于 3、4 的分离条件,则得如图 14b 的图形。因此,可以总结以下 3 点:①具有相当小的  $D_m$  值的物质分离不良;②  $D_m$  值太大的物质所需洗脱时间过长,在开床式色谱中则分离不良;③具有太大的  $D_m$  值的物质,洗脱峰太宽,如含量低时,过于稀释则不易检测。

这类多组份物质洗脱的一般问题,靠提高  $n$ ,或调整  $\alpha$ ,或使  $D_m$  最适化都不易解决。当不同物质的  $D_m$  值相差很大,甚至相差几个数量级时,很难在一次洗脱中得出满意的结果,所以要系统的改变洗脱条件。改变可以是阶段式的,也可以是梯度式的,如分别采用如图 14 中 a、b、c 的条件进行阶段洗脱,则得如图 16 的结果。由图 17 可以看出,用梯度洗脱分离核苷酸,显然比非梯度洗脱的分离效果好得多。

### 二、有限峰容量问题<sup>[7]</sup>

当混合物中组份很多时,各峰不易分开。



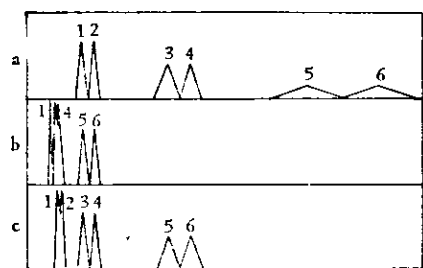


图 14 柱色谱多组份的分离情况

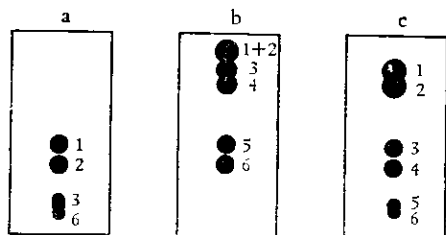


图 15 开床式色谱多组份的分离情况

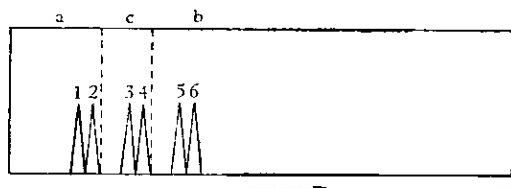


图 16 阶段式洗脱结果

尽管改变多种条件,总有一些峰分不开(图18)。这是因为在一个有限的空间之内峰太多了,也就是“峰容量”有限。加大峰容量的办法是:①增加  $n$ ,②增加  $D_{m2}/D_{m1}$ ,即第一个和最末一个物质的  $D_m$  比值 ( $\alpha$ )。但这也不是很容易办到的。特别是在凝胶渗透色谱中,  $K_D$  值最大为 1,所有物质在间隙体积和柱总体积之间洗脱出来,峰容量特别小。

用联柱法便于解决以上问题。先用一个短柱,把混合物粗分为几个部分,如图 14 中将 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6 分为三个组,再分别进入三个柱,相当于 a、c 和 b 的条件,这样也同时解决了有限峰容量问题。

在凝胶渗透色谱法中,可采用循环式洗脱,开床式色谱中可用多次展开或双向展开法,也可以分别采用不同条件各作一次展开。

### 参 考 资 料

[1] IUPAC, Anal. Chem. Division, Commission on Analytical Nomenclature: *Pure and Applied*

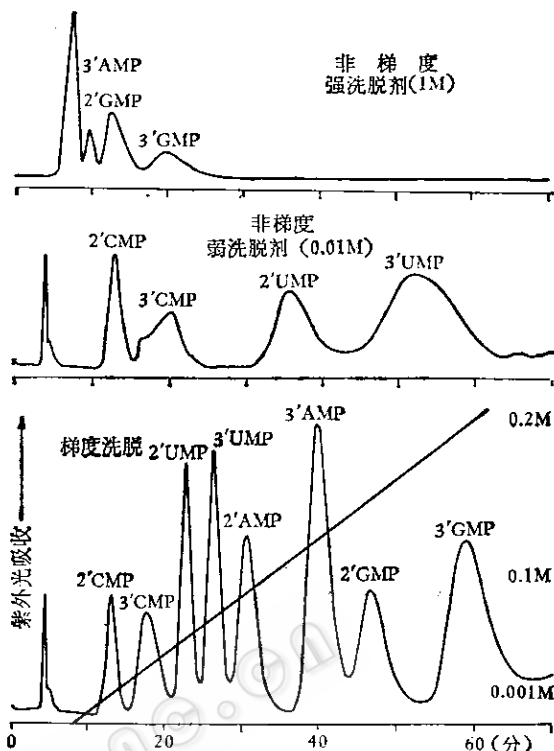


图 17 梯度和非梯度洗脱分离核苷酸的比较

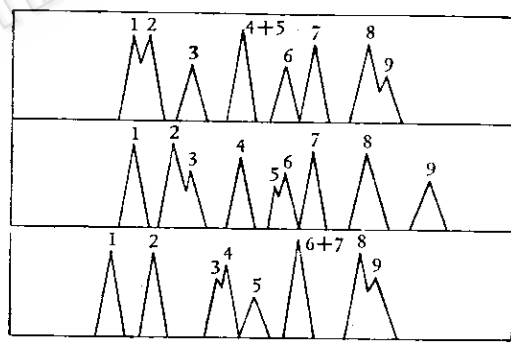


图 18 有限峰容量问题

*Chemistry*, 37(4):445, 1974.

- [2] 英汉色谱技术词汇, 科学出版社, 1977.
- [3] Brimley, R. C. and F. C. Barrett: *Practical Chromatography*, Chapman & Hall LTD., London, 1954.
- [4] Perry, S. G. et al.: *Practical Liquid Chromatography*, Plenum Press, New York-London, 1972.
- [5] Kirkland, J. J.: *Modern Practice of Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience, 1971.
- [6] Brown, P. R.: *High Pressure Liquid Chromatography*, Academic Press, 1973.
- [7] Karger, B. L. et al.: *An Introduction to Separation Science*, John Wiley & Sons, 1973.
- [8] Hadden, N. et al.: *Basic Liquid Chromatography*, Vavian Aerograph 1971.
- [9] 惠永正: 分析化学, 2 (2): 157, 1974.