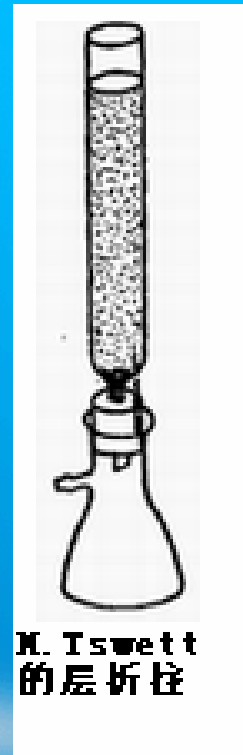
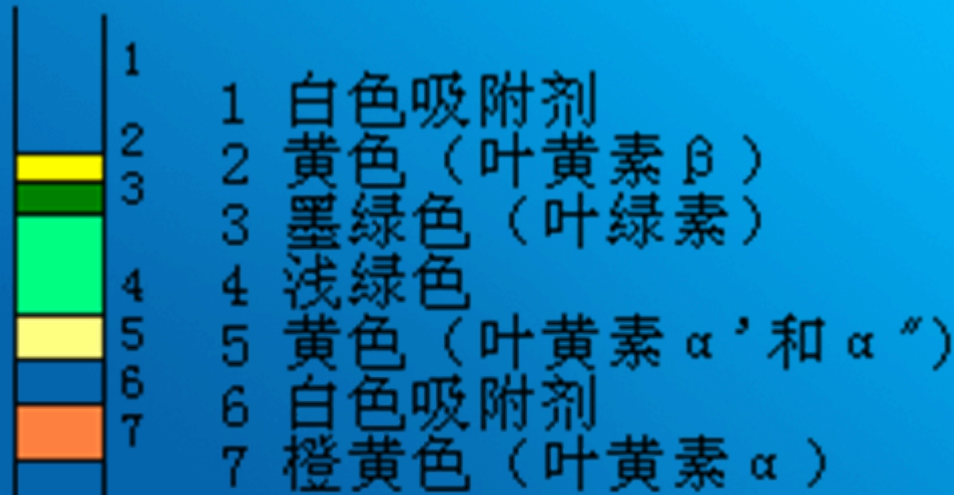


柱色谱



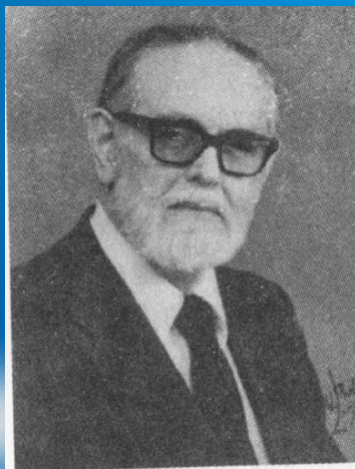
— 概 述

1906年时由俄国植物学家M. Tswett首先提出

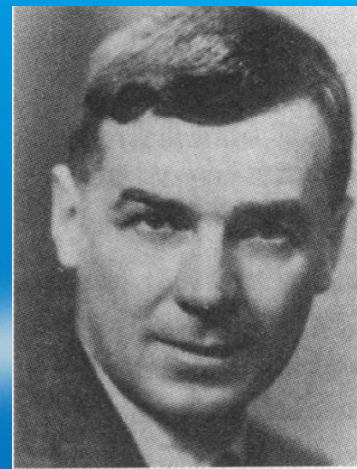


在荣获诺贝尔科学奖（主要是化学奖和生理学医学奖）的科学家中，至少有20多位得益于这种分析手段。

- ❖ 奥地利化学家库恩（R. Kuhn）获得了1938年的诺贝尔化学奖
- ❖ 英国化学家马丁（A. Martin）及辛格（R. Synge）获得1952年的诺贝尔化学奖



马丁



辛格

二 分 类

1. 按固定相所处的状态分类：

- ❖ 柱色谱 (Column Chromatography)
- ❖ 纸色谱 (Paper Chromatography)
- ❖ 薄层色谱 (Thin Layer Chromatography)



二 分 类

❖ 柱色谱 (Column Chromatography)

一类是固定相装在玻璃或金属管内，叫“填充柱色谱”；

一类是固定相吸附在一根细管内壁上，管子中心是空的，叫“开管色谱柱”或习称“毛细管色谱”；

如果把固定相装在玻璃管内，再拉成毛细管，就叫“填充毛细管柱”。



二 分 类

2. 按分离机理分类:

- 吸附色谱 (Adsorption Chromatography)
- 分配色谱 (Partition Chromatography)
- 离子交换色谱 (Ion Exchange Chromatography)
- 凝胶色谱 (Gel Chromatography)

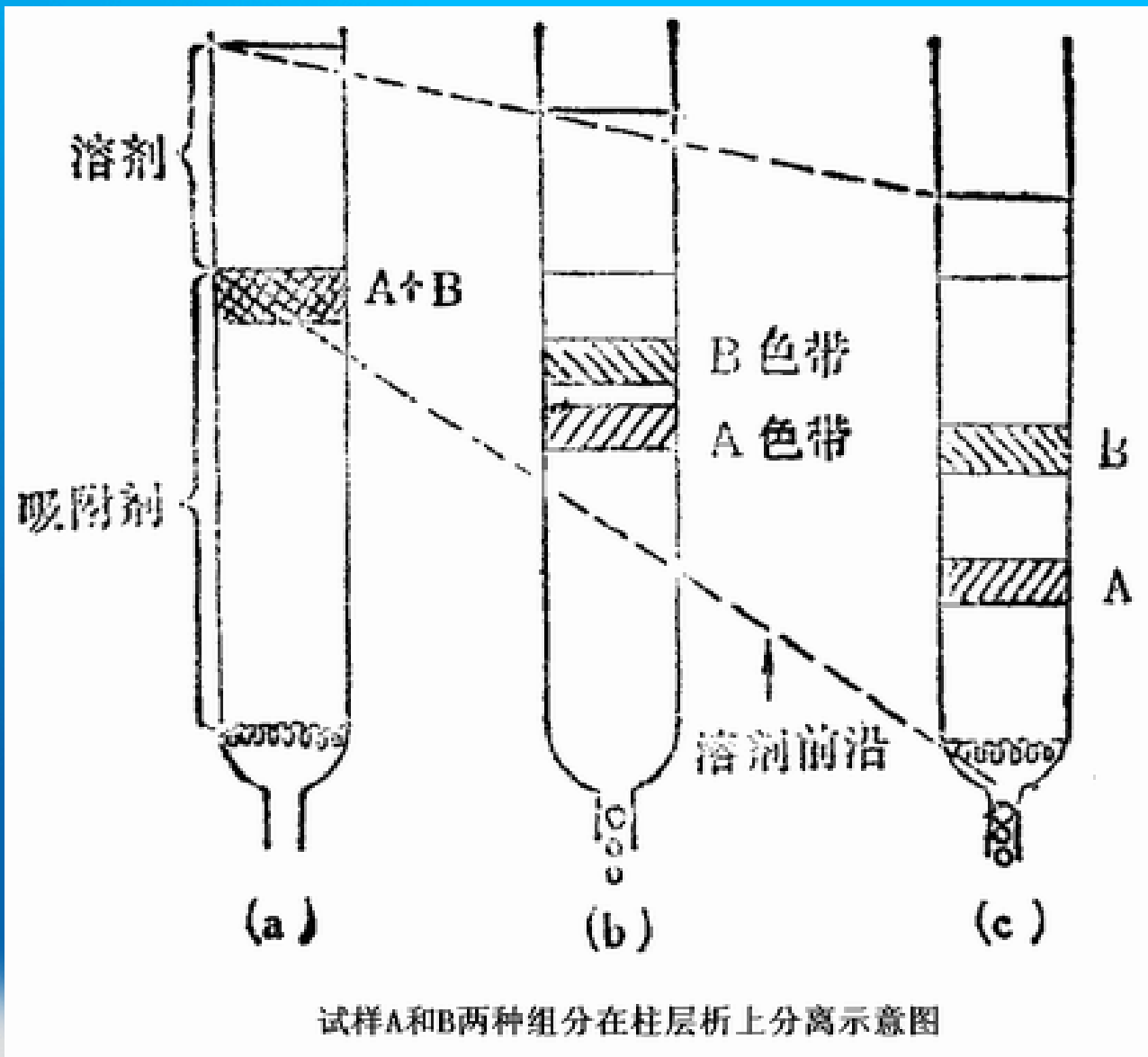


三 吸附色谱

吸附色谱基本原理：

吸附色谱体系是由吸附剂、溶剂和试样三者构成的，试样在吸附剂和洗脱剂作用下，反复地在柱中进行吸附—解吸，从而继续用洗脱剂连续展开，顺次从柱中流出而得到分离。





试样A和B两种组分在柱层析上分离示意图



在吸附层析中，为要提高分离效果，必须充分考虑**试样**、**洗脱剂**和**吸附剂**三者关系。它们三者的关系如下图。



吸附色谱三要素

1 . 吸附剂 (adsorbents)

对吸附剂的基本要求是:

- 具有适度的活性较大的比表面积;
- 与洗脱剂及被分离物质不起化学反应;
- 不溶于洗脱剂中;
- 要有一定的均匀粒度;



吸附色谱三要素—吸附剂

(1) 氧化铝 (alumina)

氧化铝的吸附活性来源于铝原子上未成键电子对。氧化铝的活性与含水量有关，含水量越低，活性越大，吸附力越强。无水氧化铝吸附活性特别强。根据氧化铝的含水量可将氧化铝的活性分为五级



吸附色谱三要素—氧化铝

活性	氧化铝含水量 (%)	硅胶含水量 (%)
I	0	0
II	3	5
III	8	15
IV	10	25
V	15	38



吸附色谱三要素—吸附剂

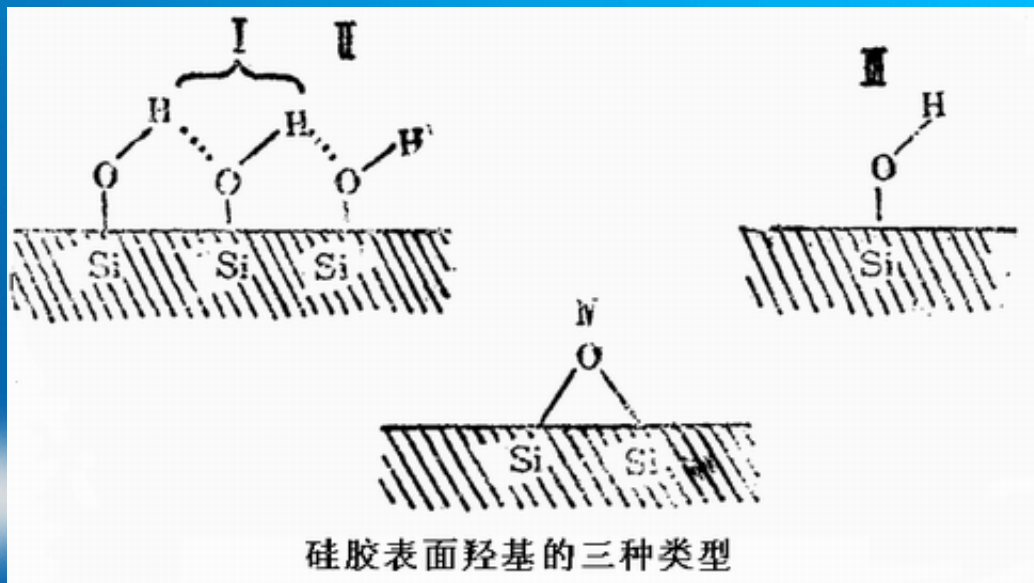
- ❖ 酸性氧化铝（ $\text{pH}5\sim4$ ），适用于分离酸性化合物和对酸稳定的中性化合物，如酚类物质和某些氨基酸类等。
- ❖ 中性氧化铝（ $\text{pH}=7.5$ ），适用与分离生物碱、挥发油、萜类、甾类、蒽醌以及在酸碱中不稳定甙类、酯、内酯等化合物。凡是能用酸性或碱性氧化铝层析分离的物质，中性氧化铝也都适用。
- ❖ 碱性氧化铝（ $\text{pH}9\sim10$ ），适用于碱性，如生物碱和中性化合物的分离。



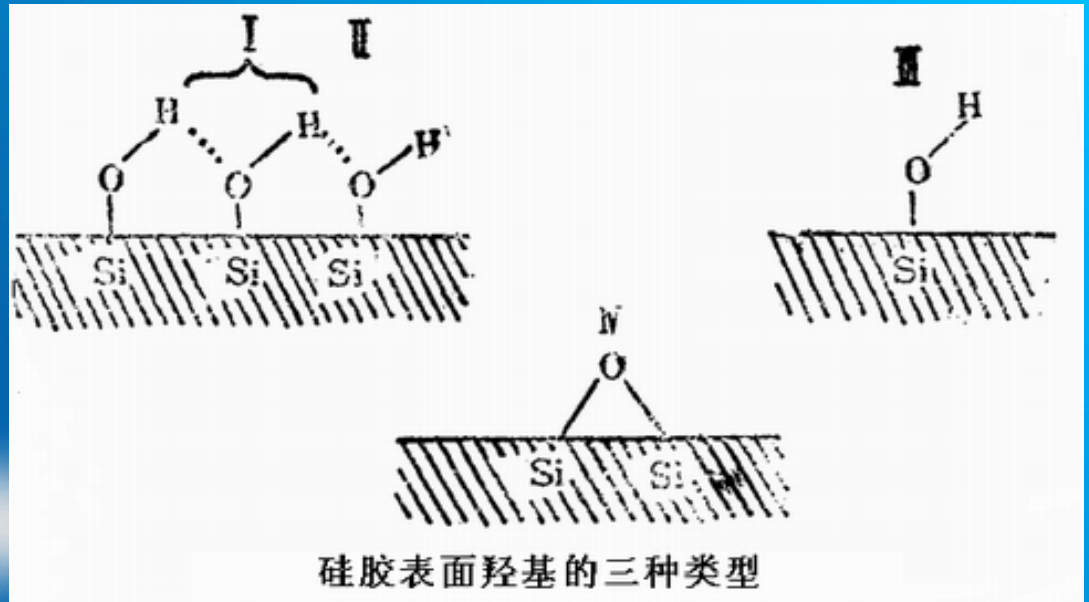
吸附色谱三要素—吸附剂

(2) 硅胶 (silica gel)

它的吸附性来源于硅胶氧原子上未成键的电子对和可以形成氢键的羟基。羟基有结合型 (I)、活性型 (II) 和游离型 (III) 三种



它们可以与试样和洗脱剂分子中的极性基团或不饱和键产生氢键缔合而起吸附作用，其吸附性强弱为：（I）<（III）<（II）。如果将硅胶在200℃以上长时间强热后，则硅原子上结合的羟基发生脱水而形成硅氧烷型（IV），这种不含羟基的硅氧烷型的硅胶吸附性极差。



吸附色谱三要素一吸附剂

硅胶，通常视为**酸性吸附剂**。一般用来分离一些酸性和中性有机物。如有机酸、萜类、氨基酸、甾类和一些甙类。

但是，对某些酸性弱的试样，在色层中有分解的危险。

此外，对于碱性物质可发生不可逆吸附。因此，对一些碱性物质在使用硅胶进行层析时，有必要进行预实验。

如在硅胶中拌入15%左右的硝酸银，这种加硝酸银的硅胶对有机物中不饱和键有特殊的吸附性，因此，常用它分离一些不饱和化合物。



吸附色谱三要素—吸附剂

(3) 活性炭 (active carbon)

活性炭是使用较多的一种非极性吸附剂。活性炭的吸附性主要是由范德华力所引起，它的特点是对非极性物质，尤其是对芳香族化合物吸附性特别强。它可以在如水溶液那样强的极性溶剂中，吸附弱极性的有机化合物。此外，活性炭还具有分子筛的性能。



吸附色谱三要素—吸附剂

活性炭主要用于分离水溶液成分，如氨基酸、糖类及某些甙类。由于它在水溶液中对有机物吸附性特别强，在有机溶剂中则较弱，故水的洗脱能力最弱，而有机溶剂洗脱能力则较强。例如，用乙醇和水的混合溶剂进行洗脱时，则随乙醇浓度的递增而洗脱能力增强。又由于活性炭对芳香族化合物的吸附性大于脂肪族化合物；对大分子化合物的吸附性大于小分子化合物。因此，利用这些吸附性的差别，可将水溶性芳香族化合物与脂肪族化合物分开，单糖与多糖分开，氨基酸与多肽分开。



吸附色谱三要素—吸附剂

(4) 硅藻土 (celite) :

硅藻土是由硅藻的硅质细胞壁组成的一种生物化学沉积岩。是一种吸附性非常弱的吸附剂，一般用在分离极性特别强的化合物和高度不饱和化合物等层析方面。也经常作助滤剂用，将它与别的吸附剂混合使用，能使溶液容易流过。此外，在柱层析中，可以将试样溶液与硅藻土拌合。风干后再加入柱中。



吸附色谱三要素—吸附剂

(5) 聚酰胺 (polyamide) :

聚酰胺的吸附性是由于分子中含有许多酰胺基，在水溶液中能与酚羟基发生氢键缔合而吸附，因此，聚酰胺是分离酚性物质和蒽醌及其甙类最有效的吸附剂。要从聚酰胺柱上洗脱被吸附的酚性物质，是用一种溶剂分子顶替被吸附的酚性化合物，溶剂这种解吸性质的强弱，一般是按下列顺序增强：水、乙醇、甲醇、丙酮、氯仿、稀氨水或稀氢氧化钠水液、甲酰胺。其吸附和解吸机理可表示如下：



吸附色谱三要素—洗脱剂

洗脱过程：

流动相与被分离分子竞争占据吸附剂表面活性中心的过程。



吸附色谱三要素—洗脱剂

2. 溶剂（洗脱剂）

在层析中，如采用氧化铝或硅胶为吸附剂，则所用的溶剂应先从极性低的（对吸附剂亲和力小的）开始，以后逐渐增加极性大的溶剂。常用的流动相按其极性增强顺序排列：

石油醚<环己烷<二硫化碳<四氯化碳<三氯乙烯
<苯<甲苯<二氯甲烷<氯仿<乙醚<乙酸乙酯<乙酸甲
酯<丙酮<正丙醇<乙醇<甲醇<吡啶<酸。



吸附色谱三要素—洗脱剂

在实际操作中，使用混合溶剂作为洗脱剂，一般要比单独使用一种溶剂为洗脱剂的时候多些，因为混合溶剂往往能起到单一溶剂所不能起到的微妙分离效果，但在使用时要绝对避免用两个极端洗脱力的混合剂，这是因为洗脱力强的溶剂发生溶剂化效应，从而降低混合溶剂的作用，达不到理想的分离效果。



吸附色谱三要素—洗脱剂

极性	溶剂组合
小 ↑ 大	己烷—苯 苯—乙醚 苯—乙酸己酯 氯仿—乙酸己酯 氯仿—甲醇 丙酮—水 甲醇—水



吸附色谱三要素—洗脱剂

层析时，如被分离的物质含有羧基或氨基等极性强的官能团，容易发生色带扩散和拖尾现象，为了防止这种现象达到有效分离：

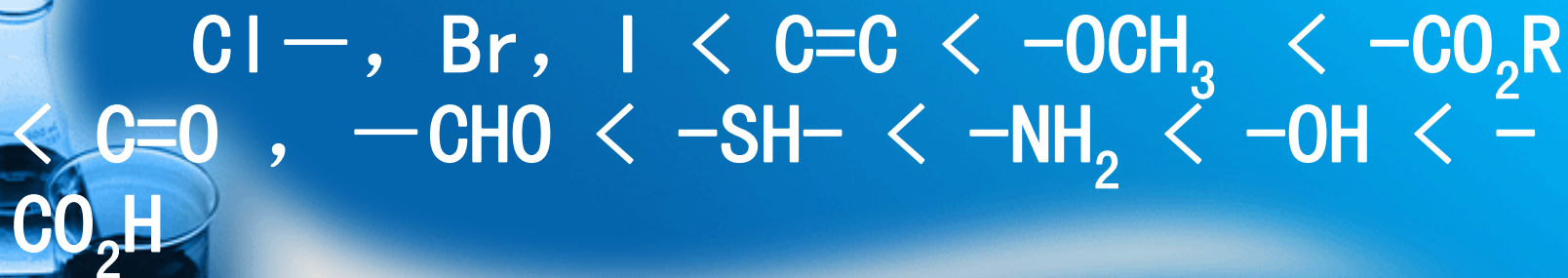
- ❖ 在分离含有羧基的试样时，可加少量的醋酸；
- ❖ 在分离含有氨基试样时，可加少量的氨水、吡啶、二已胺等溶剂，以控制它们的解离，消除拖尾，提高层析效能。



吸附色谱三要素—试样

3 试样成分的性质

在给定的条件下，各个成分的分离情况，与被分离物质的结构和性质有关，对极性吸附剂而言，被分离物质的极性越大，两者吸附作用也越强。具有极性基团的化合物，其吸附能力按下列顺序增加：



四. 分配色谱

分配色谱基本原理：

分配层析法是利用混合物的各个组分，在互不相溶的溶剂中的分配系数不同，而进行分离和纯化物质的一种层析方法。



四. 分配色谱

分配层析是将两相溶剂中的一相，固定在某一种不起吸附作用的固体物质上，如硅藻土、纤维素、含水硅胶（无吸附性）等，称此为支持剂或担体。

被支持剂固定的溶剂，如水等称为固定相。

将含有固定相的支持体填充在层析柱中，然后加入与固定相不相混溶的另一溶剂，称为流动相，来冲洗层析柱，当流动相流经支持剂时，即与其中的固定相接触。



分配色谱三要素-支持剂和固定相

1. 支持剂和固定相：

做为分配层析保持液体固定相的支持剂应具备如下条件：

- 1) 中性多孔，表面积大并无吸附作用固体粉末，不溶于层析时所用的溶剂中；
- 2) 能保持一定量的固定相，并使流动相能自由通过，并不改变其组成；
- 3) 保持固定相的量应尽量多，最好能达到支持剂重量的50%以上。



分配色谱三要素-支持剂和固定相

- ❖ **纤维素**：含水量可达25%，层析用纤维素可分两种，即天然纤维素和微晶纤维素。纤维素上有许多羟基，易与水形成氢键而将水吸附，这种附着的水分形成分配柱层析中的固定相。
- ❖ **硅藻土**：系天然存在的非晶形硅胶，其中除 SiO_2 外还含 Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 CaO 、 Na_2O 和有机物及水分等，可吸收其重量的100%的水。需经净制才能供层析用。净制步骤包括淘洗、干燥、灼烧。
- ❖ **硅胶**：在分配柱层析中用作担体的硅胶应在较低温度下活化，使其表面残留一定量的水分作固定相，其含水量可达50%以上。



分配色谱三要素-洗脱剂

2 溶剂（洗脱剂）

一般是根据分配层析所使用的固定相和欲分离化合物的性质来选择溶剂。在分配层析中通常是用水为固定相，选用与水不混溶的溶剂作为流动相。

在实际操作中多用混合溶剂作为洗脱剂，使用时可调整溶剂系统的组成和各组分的比例，以获得理想的溶剂系统，并加入醋酸、氨水等弱酸、弱碱，以防止某些被分离组分的离解。



分配色谱三要素-被分离物质

3 被分离物质的性质：

- ❖ 一般来说，亲水性强或极性大的成分在亲水性分配层析中，保留时间长， R_f 值小，流出层析柱慢。
- ❖ 如果亲脂性较强的成分应用一般亲水性分配层析不易分离时，可考虑改用非水性分配层析法，这时用甲酰胺等代替水为固定相，效果可能得到改善。

- ❖ 如果亲脂性很强的成分，如高级脂肪酸、油脂等，则应考虑采用反相层析（Reverse phase liquid chromatography），即以石蜡油等代替水为固定相，用醇类作为流动相进行层析。

五. 吸附层析与分配层析的比较

- ❖ 从上述内容可见，分配层析与吸附层析在原理上是不同的，可以认为分配层析几乎没有吸附现象，但是两种层析在操作上是相似的。
- ❖ 在分离物质时究竟选用哪一种方法适宜，这要由被分离物质的性质来决定。一般来说，对于分离极性强的亲水性物质，适宜用以水作为固定相的分配层析法，对于极性不大的脂溶性物质，适宜用吸附层析法。
- ❖ 但是，改进层析技术和固定相即溶剂，两者也可以通用，如欲用分配层析分离脂溶性较强的物质，可改用液体石蜡油或凡士林的苯溶液代替水作为固定相，用亲水性较强的溶剂作为流动相，进行反相层析，也可以达到较好的分离效果。

六. 柱层析操作

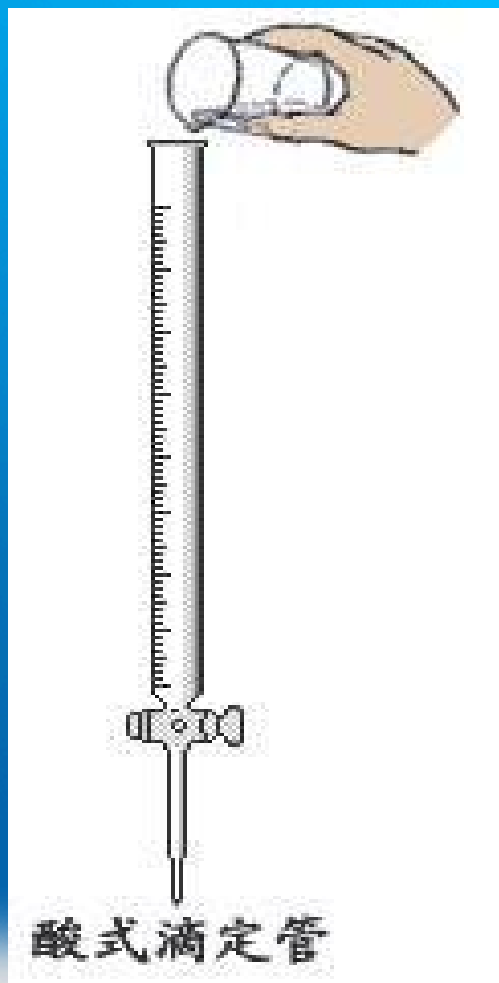
(1) 装柱

干法装柱

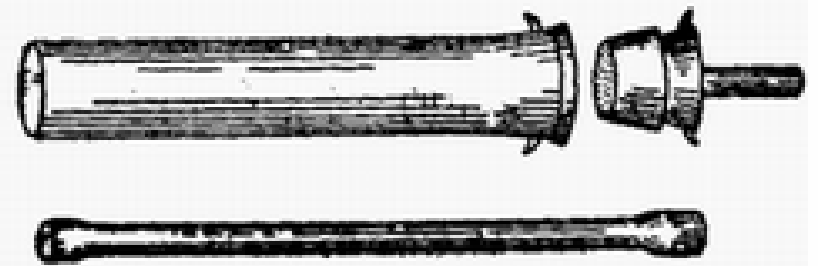
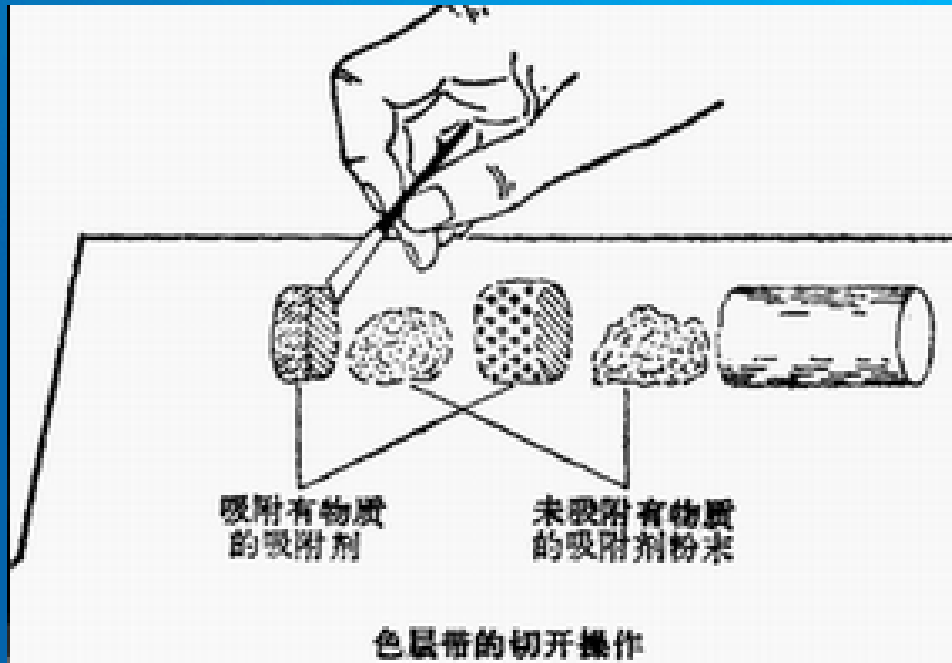
湿法装柱

(2) 加样

(3) 洗脱与分离



六. 柱层析操作



七. 应用

1. 层析技术在中药化学中的应用:

如中药丹参的化学成分在30年代仅从中分离到3种脂溶性色素，分别称为丹参酮 I、II、III。但以后进一步的研究，发现除丹参酮 I 为纯品外，II、III、均为混合结晶。此后通过各种层析方法，迄今已发现15种单体（其中有4种为我国首次发现）。



七. 应用

如对于C-27甾体皂甙元类成分，能因其分子中羟基数目的多少而获得分离：将混合皂甙元溶于含有5%氯仿的苯中，加于氧化铝的吸附柱上，采用溶剂进行梯度洗脱。如改用吸附性较弱的硅酸镁以替代氧化铝，由于硅酸镁的吸附性较弱，洗脱剂的极性需相应降低，亦即采用苯或含5%氯仿的苯，即可将一元羟基皂甙元从吸附剂上洗脱下来。

七. 应用

2. 在食品生产中的应用：

卵磷脂可以促进脂肪代谢，防止出现脂肪肝，具有抗衰老功能，可促进神经传导，提高大脑记忆力，即卵磷脂的药用价值越来越突出。西安力邦医药科技有限公司和西北工业大学合作，对25%的蛋黄卵磷脂应用柱层析法进行分离纯化，以硅胶为固定相，氯仿、甲醇作为梯度洗脱剂，应用薄层层析法进行定性鉴定，薄层扫描仪定量分析。结果显示柱层析法纯化的卵磷脂经薄层层析分析呈单一斑点，经过薄层扫描仪测定纯度达97.5%，5g粗卵磷脂得到卵磷脂1.07g。



七. 应用

- ❖ 层析柱制备：称取60~100目或200~300目硅胶70g，放置在烘箱中活化1h，活化温度为110~120℃，在活化后的硅胶中加入适量氯仿搅拌成浆糊状，采用湿法将浆糊状液装入2.5cm×50cm的层析柱中，氮气加压，赶走柱内残留气泡。
- ❖ 梯度洗脱：将25%的卵磷脂5g用少量氯仿溶解，卵磷脂完全溶解后加入层析柱内，用不同浓度的氯仿—甲醇混合液连续冲洗（氯仿：甲醇分别为40: 1, 35: 1, 30: 1, 25: 1, 20: 1, 15: 1, 10: 1, 5: 1, 1: 1, 2: 3, 1: 2）流速控制在80滴/min，收集各浓度洗脱液，每管收集10ml，通过薄层层析进行定性检测。



参考书及参考文献

1. 邵令娴主编，分离及复杂物质分析，高等教育出版社，1984年
2. 周嘉华、倪莉主编，诺贝尔百年鉴—化学中的火眼金睛，上海科技出版社，2000年
3. 西北师院、陕西师大、河北师大等学校编，有机分析教程，陕西师范大学出版社，1987
4. 陈耀祖 编著，有机分析，高等教育出版社，1981
5. 史坚 编，现代柱色谱分析，上海科学技术文献出版社，1988
6. 奥.米克斯 主编，色谱及有关方法的实验室手册，机械工业出版社，1986
7. 赵彬侠、许晓慧等，用柱层析法分离纯化蛋黄卵磷脂，西北大学学报（自然科学版），2003年4月，第33卷第2期：171~173
8. 杨献文、刘墨祥等，大孔吸附树脂柱色谱法分离桔梗总皂苷，吉林农业大学学报，2001年，23(2):50~52
9. 袁黎明、李方楼等，并联多柱色谱研究，化学试剂，2003，25(3)：134~136

