



# 第七章 液相色谱

( Liquid chromatography )

# 第一节 色谱原理与分类

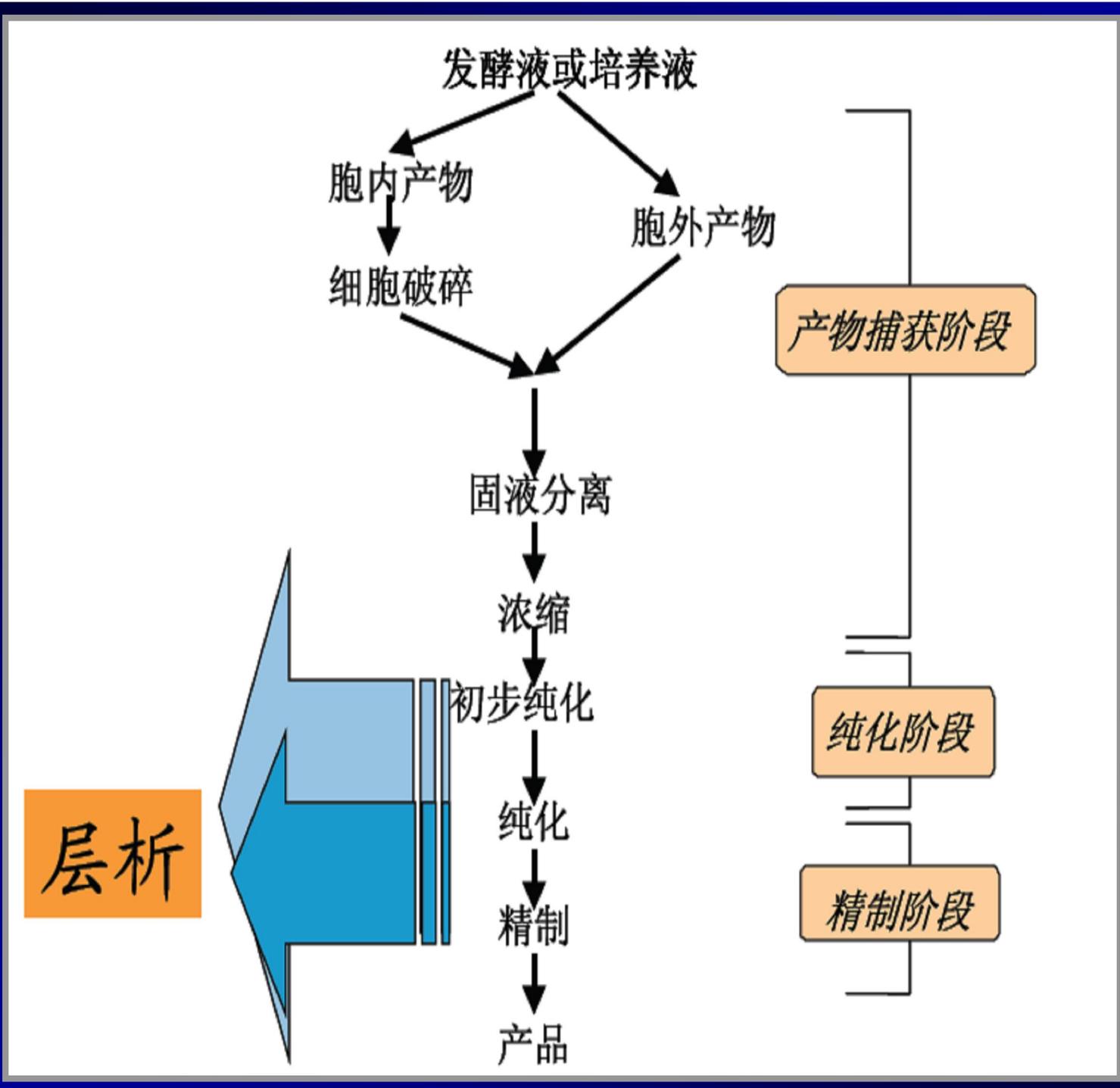
## 一. 分离依据

色谱是根据混合物中，溶质在互不混溶的两相之间分配行为的差别，引起移动速度的不同而进行分离。

## 二. 应用

分离精度高，设备简单，操作方便

- n 定量分析与检测；
- n 制备分离和纯化；
- n 最重要的纯化技术。



发酵液或培养液

胞内产物

胞外产物

细胞破碎

产物捕获阶段

固液分离

浓缩

初步纯化

纯化阶段

纯化

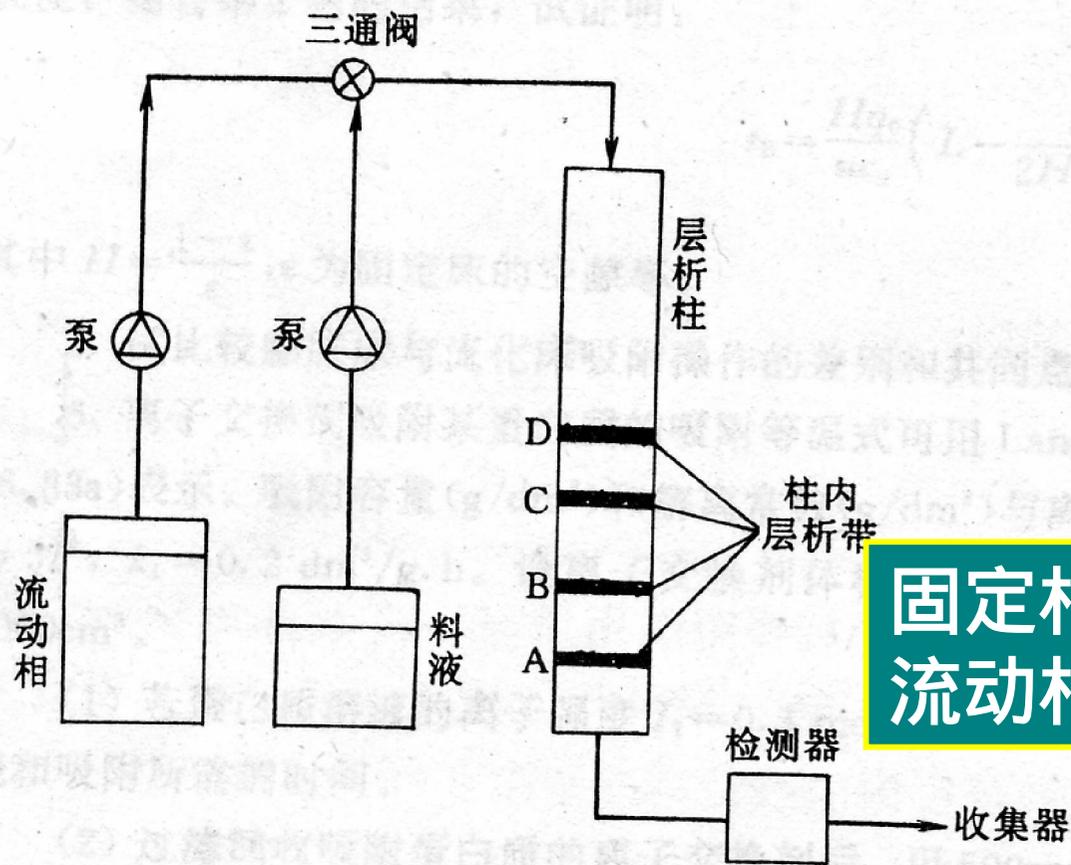
精制

精制阶段

层析

产品

### 三. 层析原理

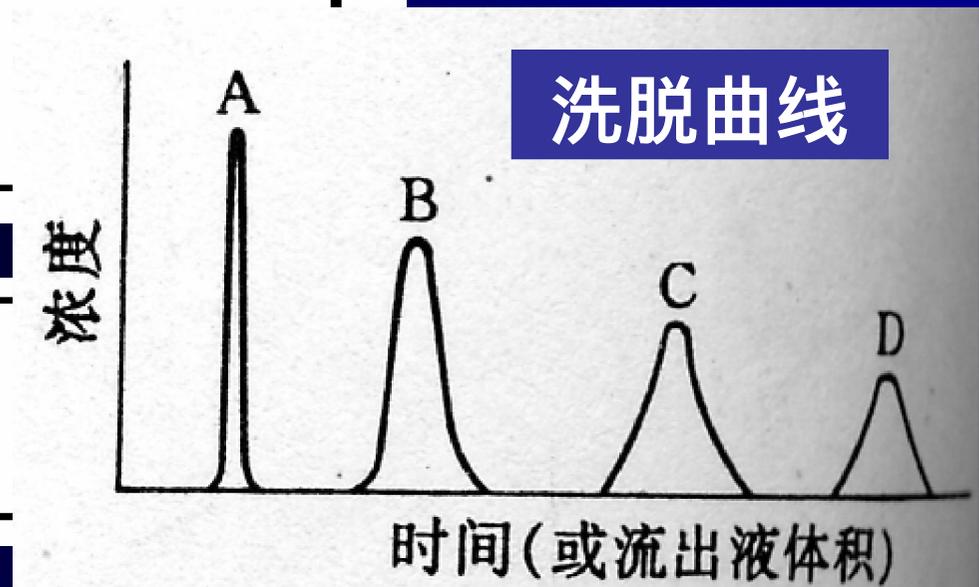
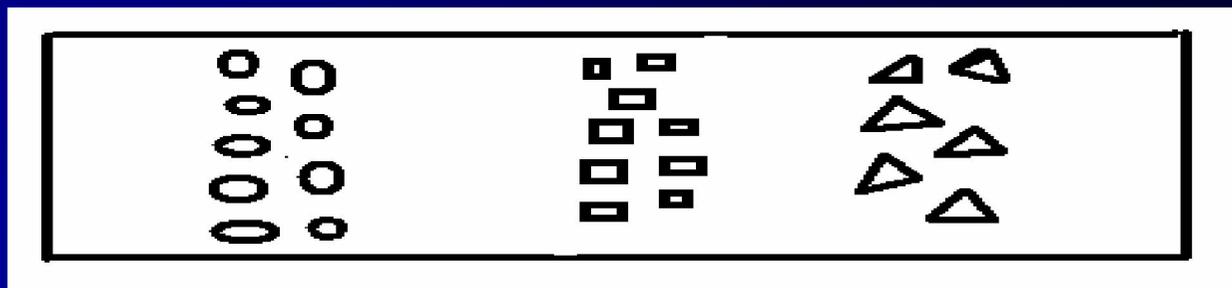
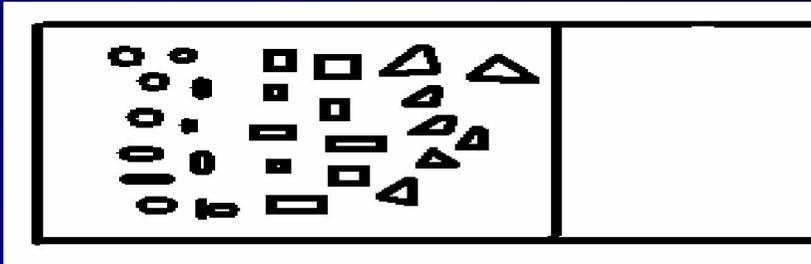
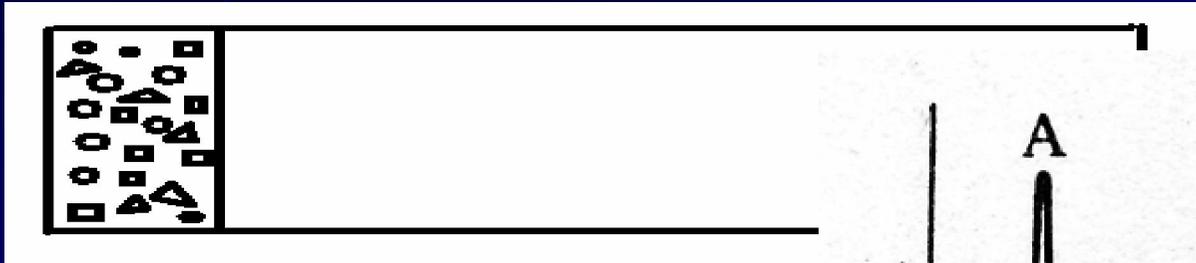
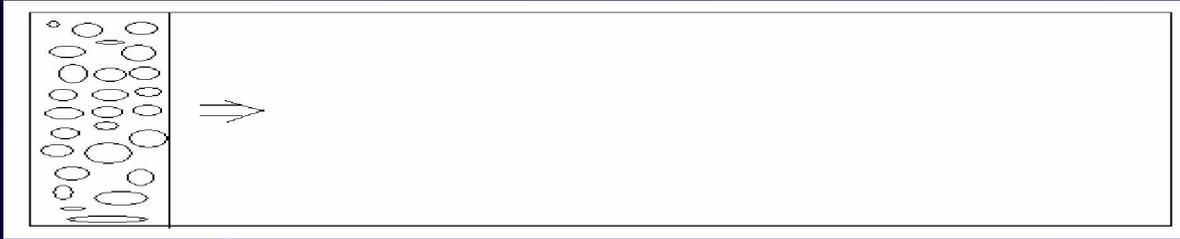


互不混溶的  
两相：



固定相 (stationary phase)  
流动相 (mobile phase)

图 7.1 柱层析设备和操作示意图



## 四、色谱分离常用术语

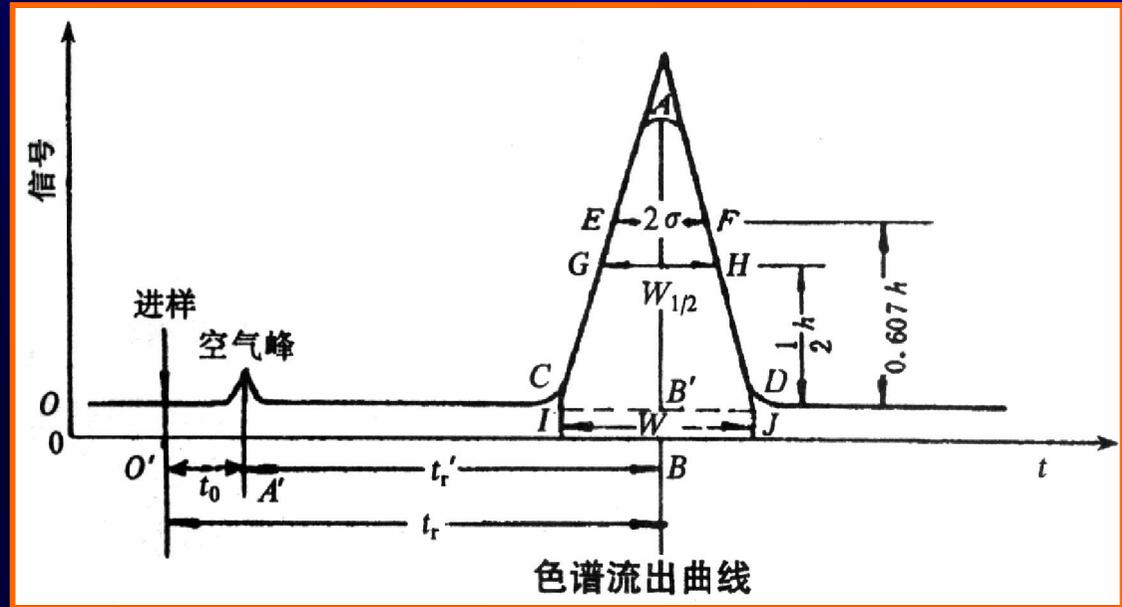
装柱：将经预处理并经过洗脱剂平衡过的吸附剂加入色谱柱的过程。

上样：或加样，指将待分离的样品加到色谱柱的操作。

洗脱：把加到柱上的待分离样品，在吸附剂吸附后，用洗脱液或洗涤剂冲洗柱子，实现被吸附样品分离的过程。

1) **基线**：在实验条件下，色谱柱后仅有纯流动相进入检测器时的流出曲线称为基线，稳定的基线为水平直线。

2) **峰高**：色谱峰顶点与基线的距离。



3) **保留值** (Retention value,  $R$ )

a **死时间** (Dead time,  $t_0$ )：不与固定相作用的物质从进样到出现峰极大值时的时间，它与色谱柱的空隙体积成正比。由于该物质不与固定相作用，因此，其流速与流动相的流速相近。据  $t_0$  可求出流动相平均流速

$$\bar{u} = \frac{\text{柱长}}{\text{死时间}} = \frac{L}{t_0}$$

**b. 保留时间 $t_r$** ：试样从进样到出现峰极大值时的时间。它包括组份随流动相通过柱子的时间 $t_0$ 和组份在固定相中滞留的时间。

**c. 调整保留时间**：某组份的保留时间扣除死时间后的保留时间，它是组份在固定相中的滞留时间。即

由于时间为色谱定性依据。但同一组份的保留时间与流速有关，因此有时需用保留体积来表示保留值。

**d. 死体积 $V_0$** ：色谱柱管内固定相颗粒间空隙、色谱仪管路和接头间空隙和检测器空隙的总和。

**h. 区域宽度**：用于衡量柱效及反映色谱操作条件下的动力学因素。通常有三种表示方法：

**标准偏差 $\sigma$** ：0.607倍峰宽处的一半。

**半峰宽 $W_{1/2}$** ：峰高一半处的峰宽。 $W_{1/2}=2.354 \sigma$

**峰底宽 $W$** ：色谱峰两侧拐点上切线与基线的交点间的距离。  
 $W=4\sigma$

色谱曲线的意义：

ü 色谱峰数=样品中单组份的最少个数；

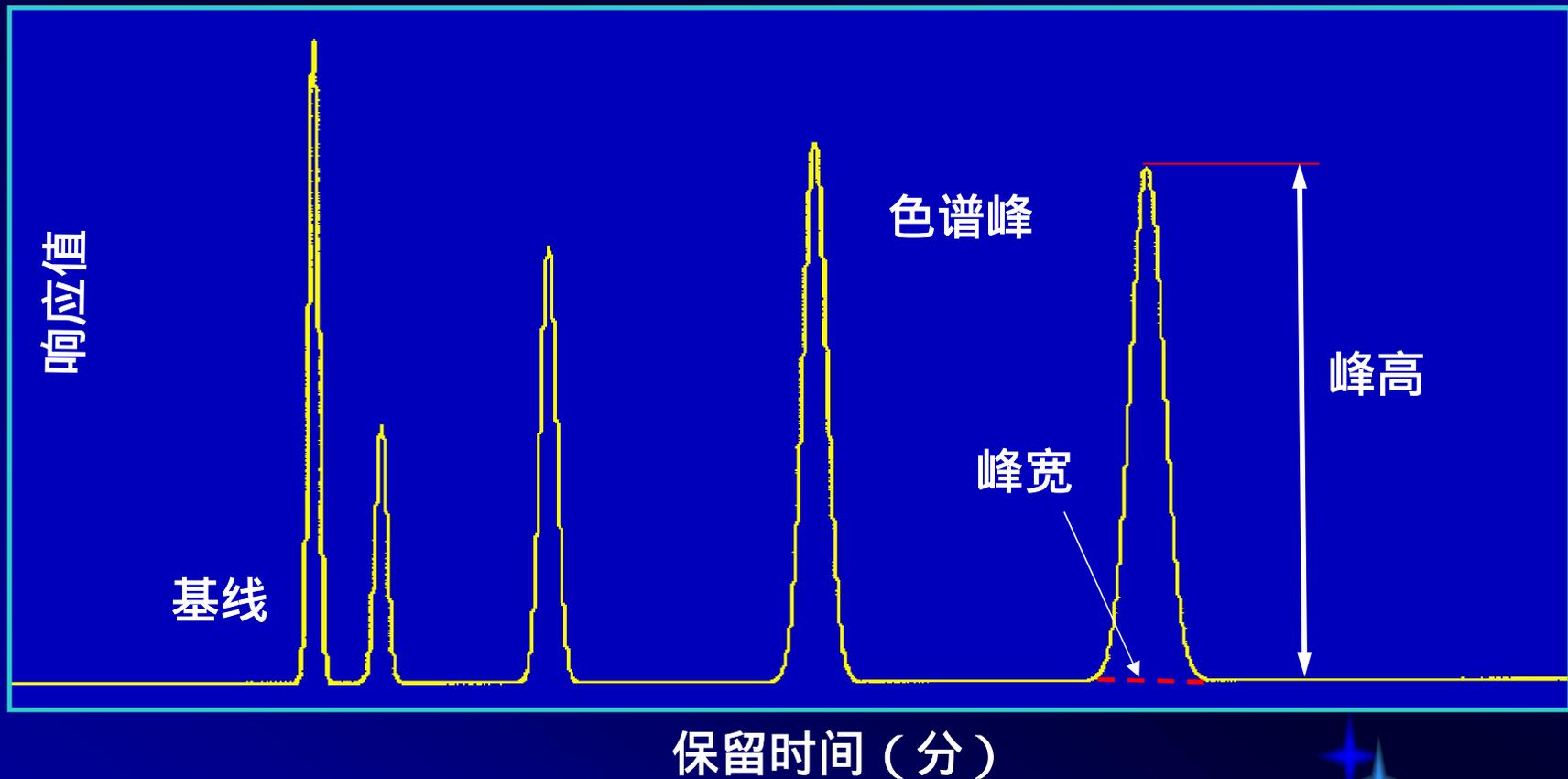
ü 色谱保留值——定性依据；

ü 色谱峰高或面积——定量依据；

ü 色谱保留值或区域宽度——色谱柱分离效能评价指标；

ü 色谱峰间距——固定相或流动相选择是否合适的依据。

色谱图即色谱柱流出物通过检测器时所产生的响应信号对时间的曲线图，其纵坐标为信号强度，横坐标为保留时间。



## 五、色谱分类

根据原理分类

吸附色谱

溶质通过固定相时，分子吸附在上面，后解吸，必须更换流动相

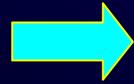
离子交换层析

靠各物质与固定相之间的离子交换能力的不同而分离；

疏水色谱

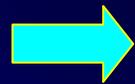
靠各物质与固定相之间的疏水作用的强弱不同而分离；

凝胶色谱：



靠各物质的大小或形状不同而分离。

亲和色谱



生物大分子与各种配基的生物识别能力的差异而分离；

# 根据流动相与固定相 分类

流动相的相  
状态

气相层析法  
液相层析法  
超临界流体层析法

固定相有固体、液体和以固体为载体的液体薄层

## 固定相的形状

根据固定相或层析装置形状的不同，液相层析又分为：

纸层析法 (Paper chromatography)  
薄层层析法 (Thin-layer chromatography)

多用于分析

柱层析法 (Column chromatography)

易于放大，适合于大量制备放大。

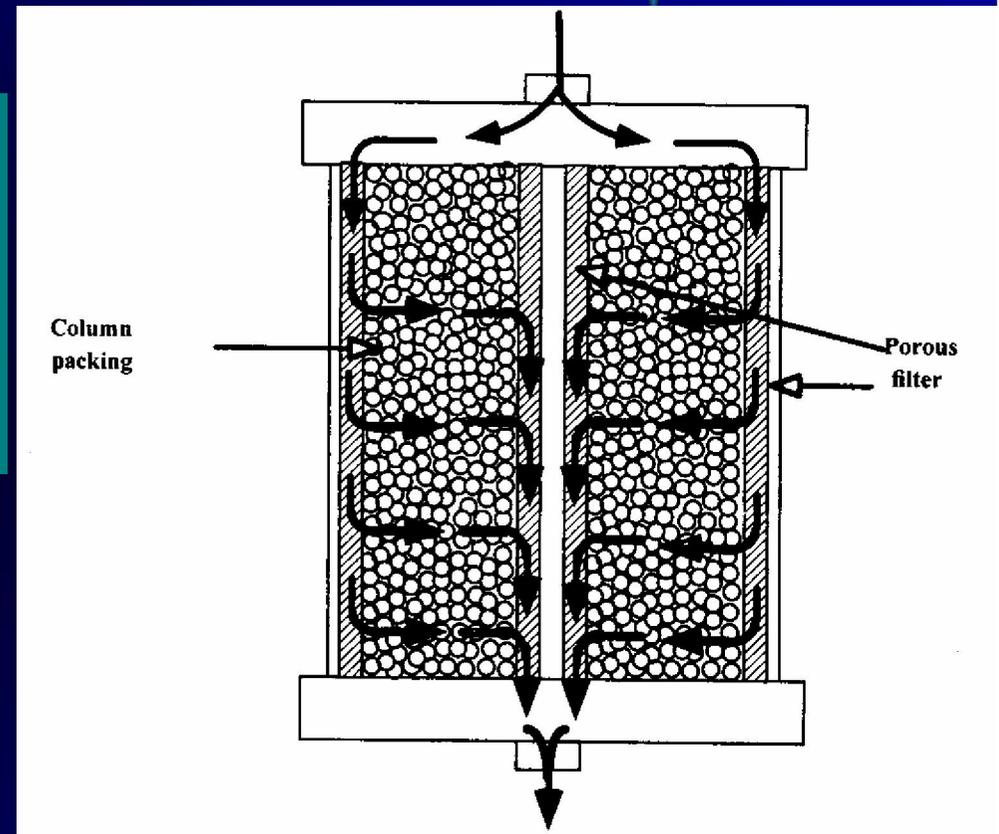
## 径向流层析

优点：

易放大；  
柱效率高；  
适宜大规模生产

缺点：

柱设备造价高；  
实际应用少



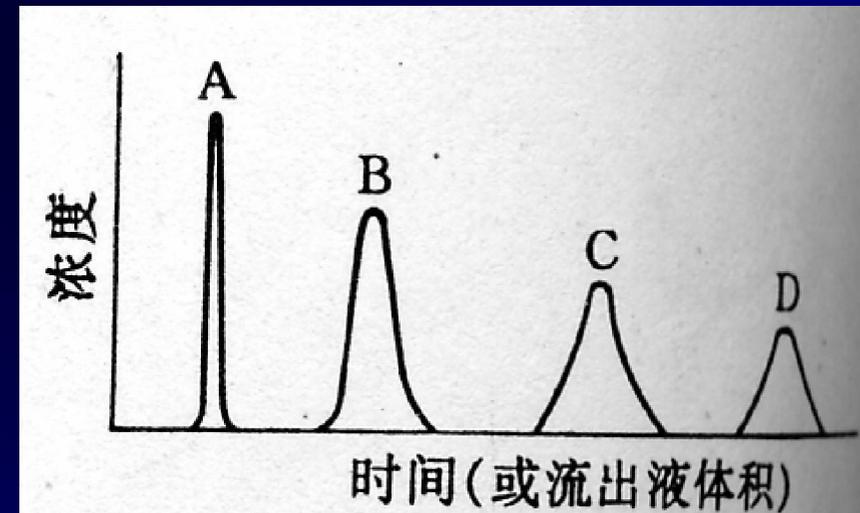
## 分离操作方式：

洗脱展开(elution development)

迎头分析(frontal analysis)

顶替展开(displacement development)

**洗脱展开：**料液中的溶质根据其在固定相和流动相（洗脱液）间分配行为的不同，在层析柱出口处被展开形成相互分离的层析峰





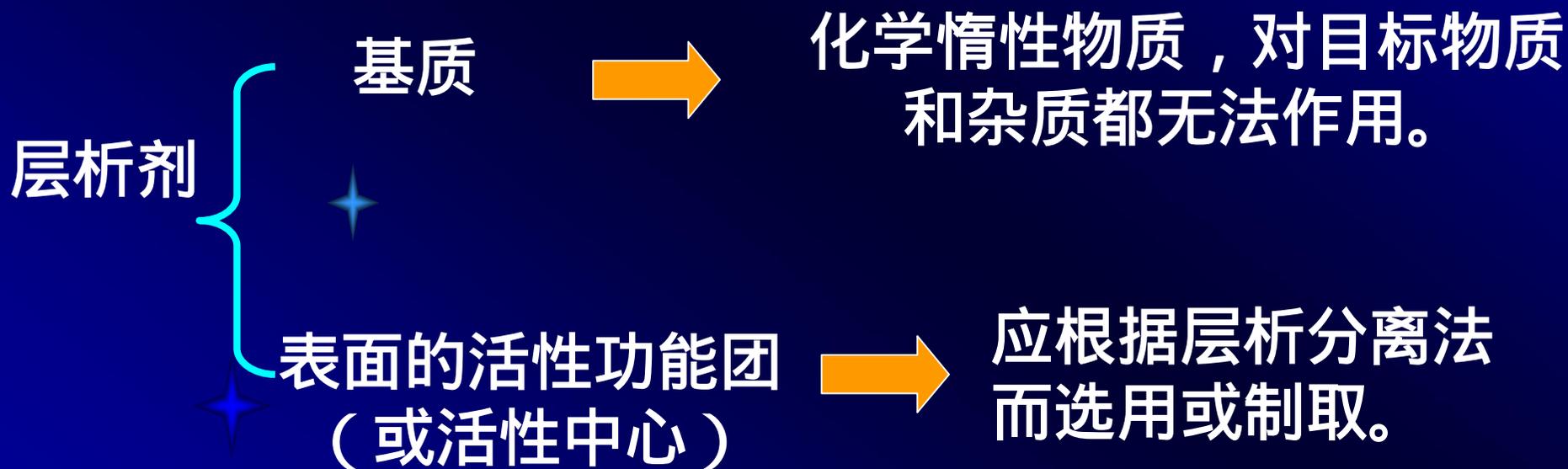
**迎头分析法**：与固定床相同，各个溶质按其在固定相和流动相间分配系数的大小次序穿透，最先穿透的组分能以纯粹的状态得到部分回收，之后均为双组分或双组分以上的混合物。

**置换展开**：采用的洗脱液中含有与固定相的亲合力比料液中各个组分都大的物质，称为顶替剂。顶替剂将料液中所含溶质按其于固定相亲和力的不同从柱中次序顶替出来。可浓缩，适于处理大量稀溶液。

## 第二节 常用的层析介质

### 一.层析剂

定义：用于层析分离技术的分离介质，总称层析剂。



## 层析剂特点：

应不溶于流动相（溶剂和展开剂），并具有良好的化学稳定性和机械强度。

具有较大的表面积，且粒度均匀。

对分离大分子生物活性物质时，要求层析剂有一定的孔度，且要求基质对生物活性物质（如酶等）无毒性。

能耐受生物降解作用，并具有好的热稳定性。

## 分类：

- ∅ 无机物质层析：氧化铝，硅胶，活性炭。
- ∅ 多糖类层析剂：琼脂糖，葡聚糖，纤维素。
- ∅ 合成类层析剂：聚丙烯酰胺凝胶。

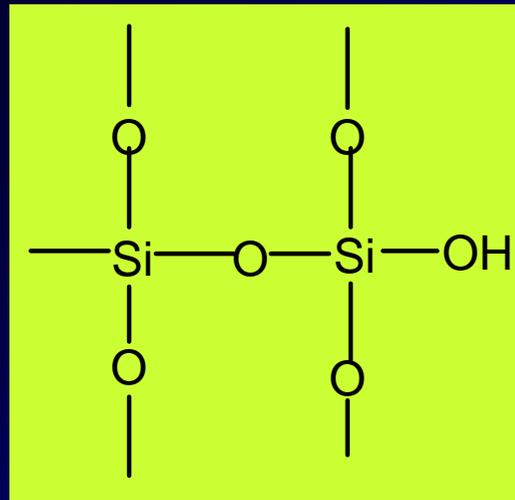
## 二.无机物质层析剂

### 1、氧化铝

- | 有碱性、中性和酸性之分，碱性氧化铝在碱性下稳定，酸性氧化铝在酸性下稳定。
- | 氧化铝活性与含水量有关，含水量多，活性低。在400℃、6hr下，可得活性I-II级的层析剂。
- | 可反复使用多次，多用于吸附层析剂。

## 2、硅胶

具有多孔性的硅氧烷交联结构：



- Ø 骨架表面有很多硅醇 - Si - OH 基团，能吸附很多水分，水分多以游离状态存在，加热即除去。
- Ø 在高温 500 下，硅醇结构被破坏，硅胶失去活性。

### 3、活性炭

粉末状活性炭：  
颗粒状活性炭

吸附能力很强，对  
流体阻力大；

是一种**憎水**的吸附层析剂，适于从水溶液中吸附**非极性**物质。

吸附特性：

极性弱>极性**强**；芳香族>脂肪族；  
分子量**大**>分子量小；不**饱和**>饱和。

## 特点：

- 1.样品上柱量大；
- 2.分离效果好；
- 3.来源较易，价格便宜；
- 4.适于大量制备柱的分离；
- 5.因生产原料不同，制备方法各异，吸附能力不易控制，应用不广。

## 三.多糖类层析剂

琼脂糖；葡聚糖

纤维素；复合型多糖

### 三、多糖类层析剂

#### 1、琼脂糖（agarose）



最常用的基质之一；

水溶性线性多糖，由琼脂或海藻中获得；

可直接成球，但热和化学稳定性差，用环氧氯丙烷交联后稳定性↑；

调节交联剂和琼脂糖的比例可以控制凝胶珠体的孔度大小，琼脂糖不应变干，否则发生不可逆变化；

agarose软，怕压；

带有大量“- OH”，亲水性好，可进行化学修饰，与某些“接枝手臂”或配基共价结合。

商品名为sepharose。

## 2、葡聚糖（dextran）

Ø是  $\alpha$ -1, 6相连的葡萄糖聚合物。

Ø由环氧氯丙烷交联葡聚糖得到的珠粒，商品名为**sephadex**.

Ø由于多糖骨架上有大量羟基使得它的亲水性比**sepharose**还强。

## 特点

- (1) sephadex凝胶在反复干燥和溶胀之后，结构和层析性质没有很大变化；
- (2) 化学和热稳定性好，可以高压消毒，且性质不变。

## 缺点

- (1) 氧化剂会引起基质部分降解；
- (2) 低交联度的sephadex凝胶，较脆；高交联度的sephadex，孔度低，使得很多生物大分子不能通透。
- (3) 可作为分子筛，用于凝胶过滤。

### 3. 纤维素 ( cellulose )

#### 特点

- | 纤维素是  $\beta$ -1,4相连接的D-葡萄糖的线性聚合物
- | 被广泛用于蛋白质物质纯化。

#### 缺点

- | 物质结构不均一；由微晶型结构和无定型结构两部分组成。
- | 缺乏孔度。

#### 改进----大孔型珠状纤维素：

- n 内部呈不均匀球状结构，具有高孔度和亲水性。
- n 机械强度高，可进行化学修饰。

## 4、复合型多糖

### Superdex

- ü 是将dextran共价交联到高度交联的agarose珠体上制备刚性凝胶；
- ü 24~44  $\mu\text{m}$ ，分离精度高；
- ü 适用于高效液相层析。P>200atm。

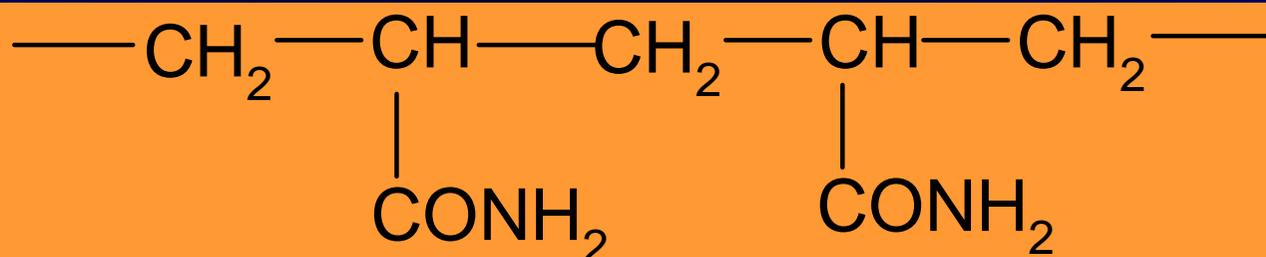
### Superose :

- Ø 经二次交联制备的刚性琼脂糖凝胶，
- Ø 常用于高效离子交换层析和高效亲和层析的载体。
- Ø 缺点：不稳定。

## 四. 合成类层析剂

### 1、聚丙烯酰胺凝胶

由丙烯酰胺与交联剂N,N'-甲叉双丙烯酰胺共聚得到，具有烷烃的骨架和许多羧酰胺侧链：

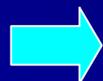


优点：



亲水性好，在pH = 1 ~ 10范围内稳定，不为生物降解。

缺点：



机械强度差。

## 2、Trisacryls凝胶 - 新型的聚丙烯酰胺类凝胶

优点：



亲水性好，化学稳定性与机械强度好， $\text{pH} = 1 \sim 13$ ，范围宽。

缺点：



在高 $\text{pH}$ 下，缓慢水解。

## 第三节 色谱过程的基本原理

从层析过程热力学和动力学出发，理论模型  
主要有三种：

平衡模型✓  
理论板模型✓  
轴向扩散模型

## 理论板模型

### 理论板模型

认为溶质的分配平衡不能瞬间完成，而需要一定的柱高，即在此柱高内溶质在两相间达到一次平衡。

**理论板(theoretical plate)**：将溶质达到一次分配平衡的层析柱段称为一个理论板。

**理论板当量高度(height equivalent to a theoretical plate)**：一个理论板的层析柱的高度。

设高度为 $L$ 的层析柱的理论板数为 $N$ ，  
则： $HETP=L/N$

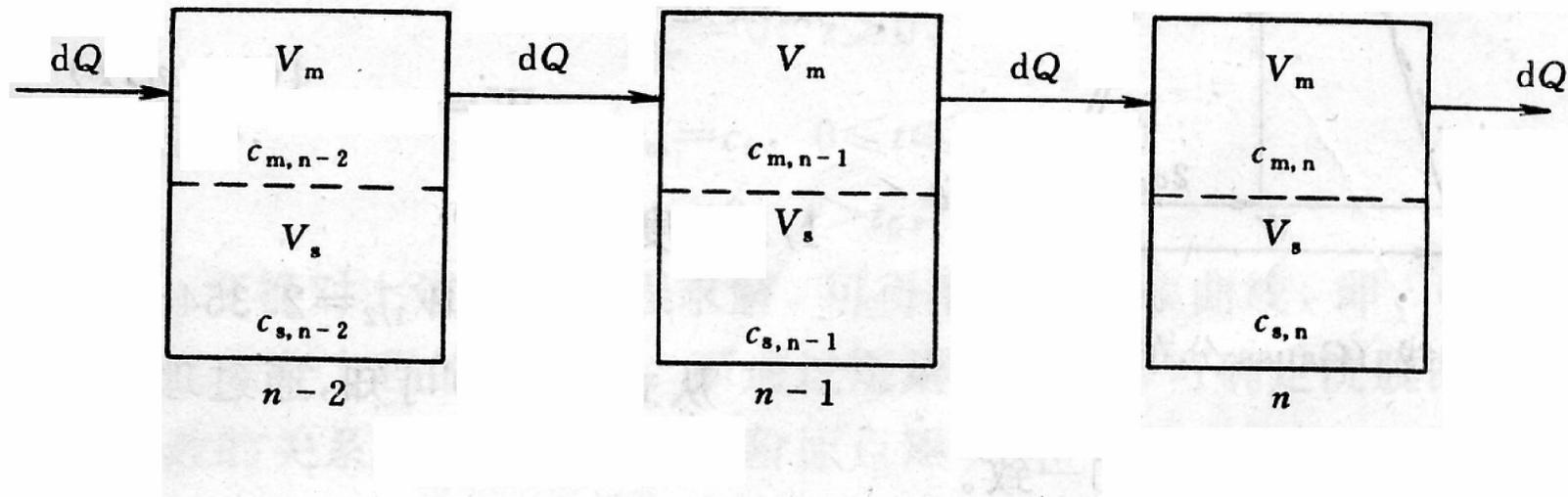


图 7.6 理论板模型示意图

已知：1. 每个理论板上溶质分配均达到平衡

## 对于线性分配平衡

第n块理论板

$$C_{s,n} = mC_{m,n}$$

固定相溶质浓度

$$V_s = \frac{V_1 - V_0}{N}$$

流动相溶质浓度

$$V_m = \frac{V_0}{N}$$

$V_s$  ,  $V_m$  : 每块理论板内固定相和流动相的体积

$V_1$  : 层析柱体积

$V_0$  : 层析柱内的空隙体积 , 即流动相体积

已知：

$$H = \frac{V_1 - V_0}{V_0} = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}$$

$$\varepsilon = \frac{V_0}{V_1}$$

(床层空隙率)

第n段物料衡算：

流入的溶质量 = 流出的溶质量 + 积累量

$$C_{m,n-1} \cdot dQ = C_{m,n} \cdot dQ + \frac{V_0}{N} \cdot dC_{m,n} + \frac{V_1 - V_0}{N} dC_{s,n}$$

液相残留

固相吸附

因为

$$C_{s,n} = mC_{m,n}$$



$$dC_{s,n} = m \cdot dC_{m,n}$$

$$dQ = A \cdot u \cdot dt$$

(A : 柱截面积 , u : 流速)

$$(C_{m,n-1} - C_{m,n}) = \frac{1}{A \cdot u} \left( \frac{V_0}{N} + \frac{m(V_1 - V_0)}{N} \right) \frac{dC_{m,n}}{dt}$$



$$= \frac{V_0}{A \cdot u \cdot N} \left( 1 + m \left( \frac{V_1 - V_0}{V_0} \right) \right) \frac{dC_{m,n}}{dt} = \frac{\tau(1 + mH)}{N} \cdot \frac{dC_{m,n}}{dt}$$

$$\frac{V_0}{A \cdot u} = \frac{L}{u} = \tau$$

因为料液脉冲输入，则边界条件为：

进料时间为 $t_0$ ，料液中溶质浓度为 $C_0$ ， $t > t_0$ 后输入不含溶质的流动相

$$C_{m,0} = C_0, \quad 0 < t \leq t_0$$

$$C_{m,n} = C_{m,n-1} = 0, \quad t = 0$$

$$C_{m,0} = 0, \quad t > t_0$$

若N值很大，溶质的洗脱曲线可用Gauss分布近似，即：

$$C_{m,n} = \frac{C_0 \cdot t_0}{\sqrt{\frac{2\pi\tau^2(1+mH)^2}{N}}} \exp\left\{-\frac{[t - \tau(1+mH)]^2}{\frac{2\tau^2(1+mH)^2}{N}}\right\}$$

或：

$$C_{m,n} = \frac{C_0 \cdot \theta_0}{\sqrt{\frac{2\pi(1+mH)^2}{N}}} \exp\left\{-\frac{[\theta - (1+mH)]^2}{\frac{2(1+mH)^2}{N}}\right\}$$

$$\theta = \frac{t}{\tau}$$

$$\theta_0 = \frac{t_0}{\tau}$$

## 洗脱曲线的各个无因次特性值。

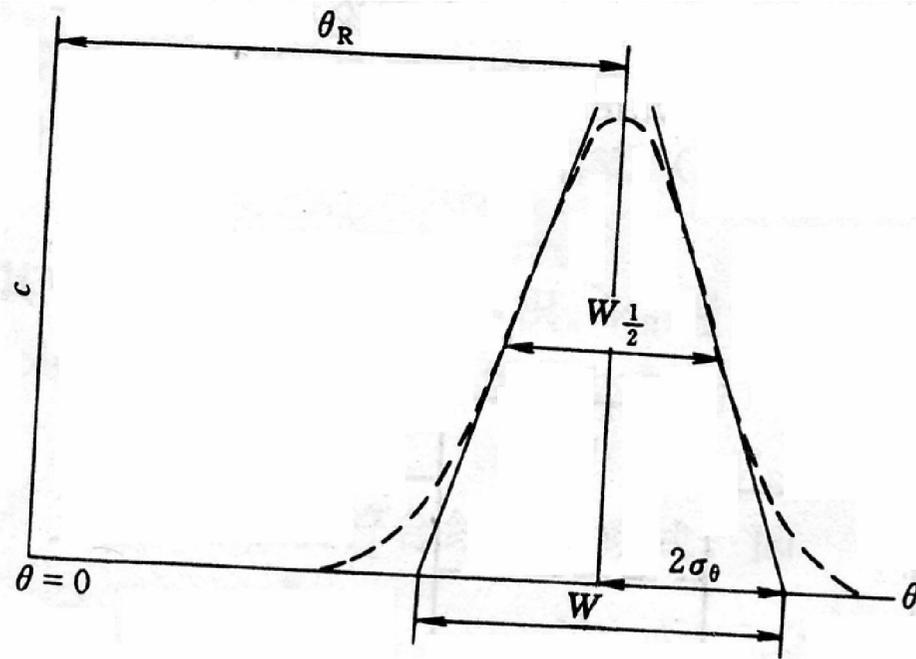


图 7.7 洗脱曲线 (Gauss 分布)

平均洗脱时间：

$$\theta_R = \frac{t_R}{\tau} = 1 + mH$$

散度：

$$\sigma_\theta^2 = \frac{(1 + mH)^2}{N}$$

底线处切线峰宽：

$$W = 4\sigma_\theta = \frac{4(1 + mH)}{\sqrt{N}}$$

1/2高度处峰宽：

$$W_{1/2} = 2.354\sigma_\theta$$

理论板数：

$$N = \left( \frac{\theta_R}{\sigma_\theta} \right)^2$$

或：

$$N = 16 \left( \frac{\theta_R}{W} \right)^2$$

说明：

1. 理论板数**N**越大，洗脱峰窄，溶质分离程度好。
2. 对于实测洗脱峰，可精确测量，**N**可采用下式计算

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

### 第三节 分离度

一、分离度(Resolution)又称分辨率：

两种洗脱曲线相邻的溶质相互分离的程度。

$$R_s = \frac{2(\theta_{R2} - \theta_{R1})}{W_1 + W_2}$$

分离度是两个相邻洗脱峰之间的距离与两个峰宽的代数平均值之比。

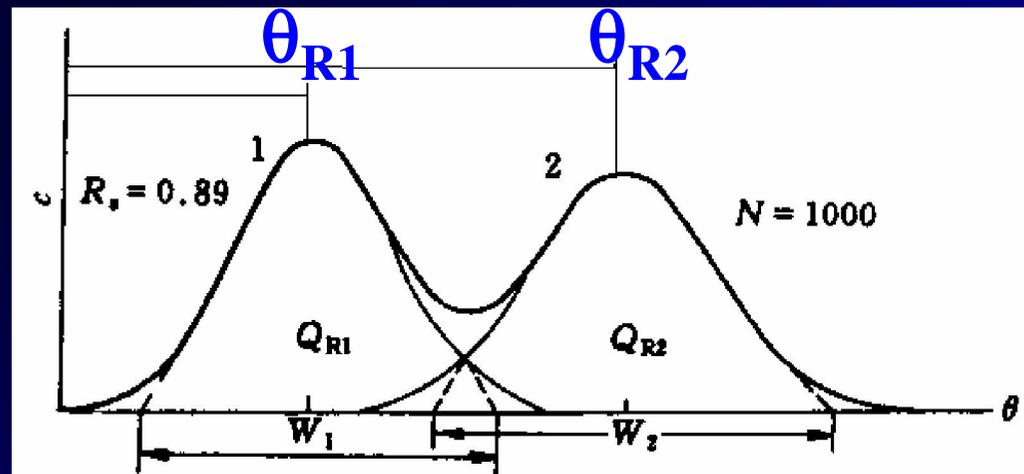


图 7.9 两个相邻的洗脱峰及其分离度  
( $\epsilon=0.35$ ,  $H=1.86$ )

为提高溶质之间的分离度 $R_s$ ：  
采用增大峰间距离或降低峰宽。

假设：

1. 洗脱曲线为Gauss分布，
2. 分配平衡为线性，
3. 利用两种溶质测得的理论板数相等。

$$R_s = \frac{H(m_2 - m_1)N^{1/2}}{2(2 + m_1H + m_2H)}$$

对于两个相邻的洗脱组分：

假定， $W_1=W_2$ ， $m_1=m_2$

$$R_s = \frac{H(m_2 - m_1)N^{1/2}}{4(1 + m_2H)} = \frac{H(m_2 - m_1)L^{1/2}}{4(1 + m_2H)HETP^{1/2}}$$

$N \uparrow, R_s \uparrow$

$HETP \downarrow, R_s \uparrow$

$R_s > 1$ 时溶质分离较好。  
为实现溶质的良好分离，  
值应为1 ~ 1.3之间。

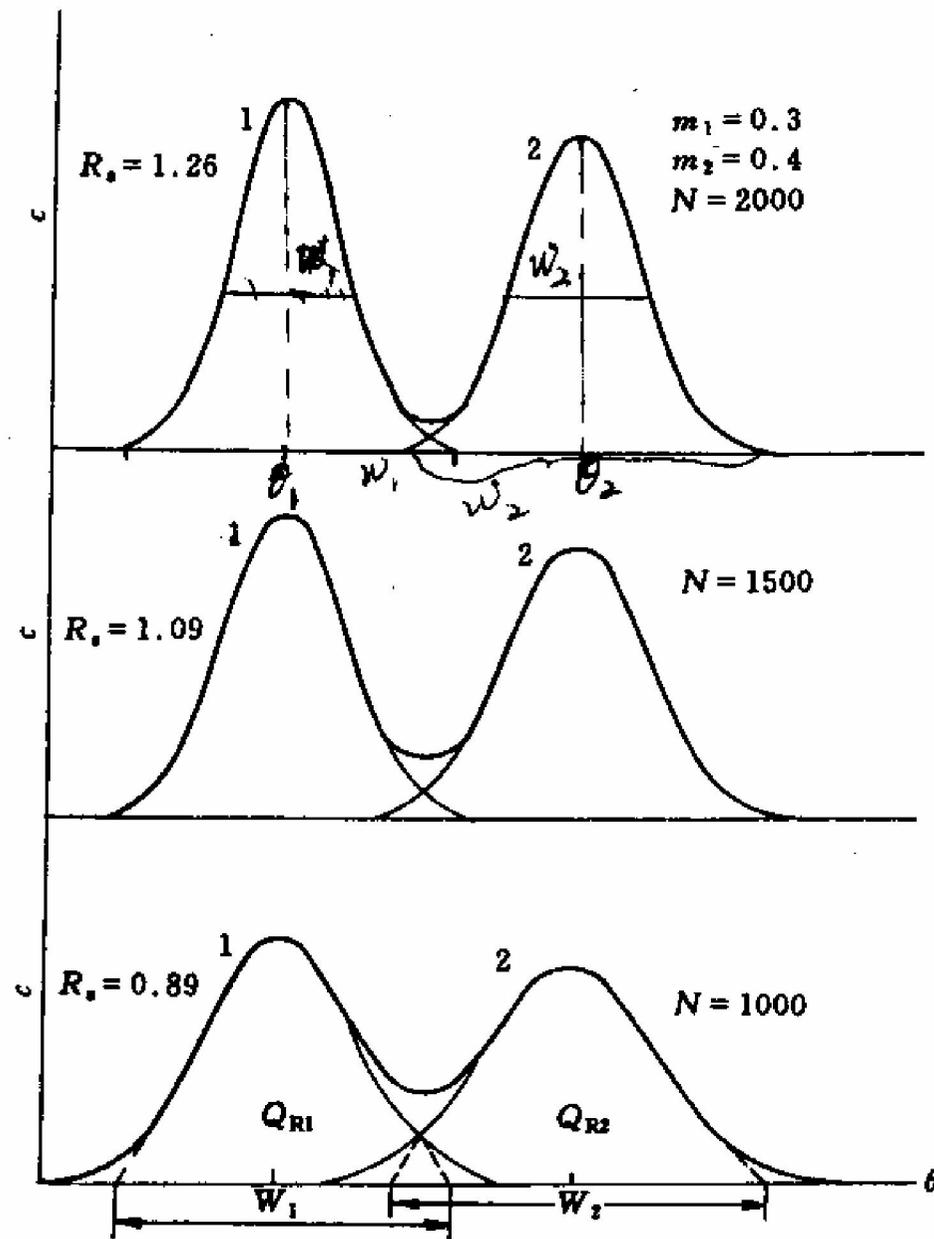


图 7.9 两个相邻的洗脱峰及其分离度  
( $\epsilon = 0.35$ ,  $H = 1.86$ )

## 二、描述层析柱性能的两个参数

容量因子(capacity factor) :  $k'$

固定相与流动相间溶质分配量之比

$$k' = m \cdot H = \frac{m_{\text{固}}}{m_{\text{液}}} = \frac{C_s \cdot V_{\text{固}}}{C_m \cdot V_{\text{液}}} = m \cdot H$$

$$m = \frac{C_s}{C_m}$$

$$H = \frac{V_{\text{固}}}{V_{\text{液}}}$$

## 选择性 (selectivity) : $\alpha$

洗脱峰相邻的两种溶质的容量因子之比。

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$



(蒸馏的相对挥发度，  
萃取中的萃取因子)

则

$$R_s = \frac{k'_2 - k'_1}{4(1 + k'_2)} N^{1/2}$$

或：

$$R_s = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{k'_2}{(1 + k'_2)} N^{1/2}$$

说明：

1.  $N \uparrow, R \uparrow$

2.  $\alpha \downarrow R \downarrow$ 。

所以 $\alpha$ 较小时，必须 $N \uparrow$ ，才能得到较大的 $R$ 。

- 凝胶过滤层析中待分离的物质可以分为哪几类，分离方式可以分为哪几类？
- 色谱分离中的各参数如何影响分离效率？
- 如何确定凝胶过滤层析的实验操作参数？