

化学工业出版社

色谱技术丛书

SEPTIISHU CONGSHU



色谱柱技术

刘国詮 余兆楼 编著

色 谱 技 术 丛 书

傅若农 主编

汪正范 刘虎威 副主编

各分册主要执笔者:

《色谱分析概论》	傅若农			
《色谱定性定量》	汪正范			
《气相色谱检测方法》	吴烈钧			
《液相色谱检测方法》	张晓彤	云自厚		
《气相色谱方法及应用》	刘虎威			
《高效液相色谱方法及应用》	于世林			
《平面色谱方法及应用》	何丽一			
《离子色谱方法及应用》	牟世芬	刘克钠		
《毛细管电泳技术及应用》	陈 义			
《色谱分析样品处理》	王 立			
《色谱联用技术》	汪正范	杨树民	吴侔天	岳卫华
《色谱柱技术》	刘国铨	余兆楼		
《色谱仪器维护与故障排除》	吴方迪			

色 谱 技 术 丛 书

色 谱 柱 技 术

刘国詮 余兆楼 编著

化 学 工 业 出 版 社

• 北 京 •

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

色谱柱技术/刘国詮, 余兆楼编著. —北京: 化学工业出版社, 2001. 7

(色谱技术丛书)

ISBN 7-5025-3291-9

I. 色… II. ①刘…②余… III. ①色谱-柱
②色谱柱-技术 IV. TH833

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 037842 号

色谱技术丛书

色 谱 柱 技 术

刘国詮 余兆楼 编著

责任编辑: 任惠敏

责任校对: 洪雅姝

封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64918013

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

*

新华书店北京发行所经销

北京市彩桥印刷厂印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 11 $\frac{3}{4}$ 字数 311 千字

2001 年 7 月第 1 版 2001 年 7 月北京第 1 次印刷

印 数: 1—5000

ISBN 7-5025-3291-9/TQ·1382

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

色谱作为一种分离技术与方法，自本世纪初发表第一篇论文算起，已有 100 年的历史，虽然在前 30 多年间这种方法未受到应有的重视，但自 40 年代以后，逐渐得到发展，而且其势头越来越猛，从技术到理论，到各种分离模式，以及在各个科学领域内的应用，得到了突飞猛进的发展，现在已经成为分析化学学科中的一个重要分支。同时为许多重要学科的发展作出了极大的贡献。在人类进入 21 世纪之际，人们面临着在信息科学、生命科学、材料科学、环境科学等领域的快速发展的挑战，在这些领域人才的需求成为国家高度发展的至关重要的因素。而色谱技术是生命科学、材料科学、环境科学必不可少的手段和工具。根据最近的统计在全世界各类分析仪器中气相色谱仪和液相色谱仪的营销总额占 25%~30%。2000 年对各类分析仪器的需求量也以液相色谱仪最多。可以毫不夸张地说，如果没有色谱技术的应用，自然科学和生命科学能发展到今天的这个样子是很难想象的。

有关色谱的各种专著国内外已经出版了许多种，其中多是针对色谱专业人员而写的专著，而缺少一套系统的比较全面的介绍当代色谱技术的丛书，供广大的工厂企业中从事色谱分析的初中级技术人员和科研院所的科技人员，大专院校的研究生，甚至管理人员及有关领导学习参考的书籍。为此化工出版社提议，由北京理化分析测试学会组织编写了这套‘简明扼要，深入浅出，通俗易懂，新颖实用’的色谱技术丛书。这套书以傅若农教授为主编，汪正范教授和刘虎威副教授作副主编。为联系方便，主要请在京的专家来编写，并自 1998 年初开始运作。从方便读者学习角度出发，将色谱技术的主要内容分为 13 册。分别为：傅若农之《色谱分析概论》，刘国诠、余兆楼等之《色谱柱技术》，陈义之《毛细管电泳技术及应用》，于世林之《高效

液相色谱方法及应用》，刘虎威之《气相色谱方法及应用》，云自厚、张晓彤之《液相色谱检测方法》，吴烈钧之《气相色谱检测方法》，汪正范之《色谱定性与定量》，汪正范等之《色谱联用技术》，牟世芬、刘克纳之《离子色谱方法及应用》，何丽一之《平面色谱方法及应用》，王立之《色谱分析样品处理》，吴方迪之《色谱仪器维护与故障排除》。这些编著者多是我国目前在教学与科研第一线为色谱科学努力奋进的中青年专家，在书中都反映了色谱领域的基本知识、基本方法和他们自己的宝贵经验以及有关领域的最新成果。这套丛书将给初学色谱的年轻科技工作者提供较完整的学习参考书，也为大中专学生提供一套有用的教学参考书。还应该提出的是，由于得到了安捷伦科技有限（原中国惠普）公司的赞助，这套书的出版才能顺利进行。值此书即将付梓之际，特书此以为序。

周同惠

1999年9月9日

前 言

本书是《色谱技术丛书》中的一册，重点介绍色谱柱技术。

色谱主要是一种分离技术。色谱分离过程的本质是溶质在流动相和固定相之间分配的差异。不同溶质的这种差异，在多次反复进行分配之后被扩大，从而可以实现混合物的分离。固定相，可以是固体物质的表面，也可以是负载于固体表面的某些特定物质。它们在通常情况下均呈颗粒状（有时亦可以是膜或纤维），故可称之为填料。填料填充于柱管中，即为色谱柱。作为分离的场所和工具，色谱柱性能的优劣，从根本上决定了分离效果的好坏。因此，有人将色谱柱誉为色谱仪的心脏，应是当之无愧的。

在早期的色谱技术中，色谱柱比较简单，往往只是准备一根玻璃或金属管子，再填装进颗粒状的吸附剂或填料即可。但是，这种柱子的柱效很低，性能也差，难以满足对分离、分析愈来愈高的需求。随着对色谱理论与技术的深入研究，适用于气相色谱及高效液相色谱的现代色谱柱填料及色谱柱技术日臻完善，获得了飞速的发展。为使读者对色谱柱技术有一个全面而概括的了解，本书拟从色谱的基本理论入手，进而分类介绍气相色谱柱和液相色谱柱技术。其中，以较多的篇幅介绍了高效液相色谱的填料和色谱柱，对这一领域的新进展亦有所涉及。在本书编写过程期间，色谱柱技术又取得了不少新的发展。编著者们虽尽力地进行了跟踪和补遗，但因本身学识、时间和篇幅所限，很难将其全面地加以覆盖和介绍，难免挂一漏万。此外，关于色谱柱的选择与使用，本丛书另有专册论述，本书也没有更多地涉及。为给读者在实际工作中提供方便，还择要收集、介绍了一些主要的商品色谱柱，以供选用色谱柱时参考。

丛书主编对本书进行了悉心的指导。傅若农教授不辞劳苦地审

阅了全部书稿，提出了细致而精辟的修改意见，并就一些重要的观点和问题，与作者进行了讨论。例如，在国内外绝大多数著作上均写明，当两个色谱峰的分辨率为 1.0 时，若将两峰从峰谷处垂直分割开来，则各峰纯度为 98%。傅先生指出，这一结论似乎并不正确，他检阅了大量文献，发现已有作者指出这一问题，但在多数著作上却仍旧沿用惯有的说法。他亲自以概率积分法反复计算的结果亦表明， 4σ 时的分离程度确为 95%，而非一般所说的 98%。现书中已据此进行了修正。

本书是集体劳动的成果，参加本书编写的有刘国詮（第一章、第三章、第四章、第五章、第七章）、余兆楼、郭晴（第二章第一节、第二节）、徐桂云（第二章第三节）、赵睿（第三章，第五章第五节、第六节、第七章）、喻昕（第四章，第五章第一节、第二节、第七节）和苏天升（第六章）等。书中所述，也正是他们自己正在耕耘的领域。但也因为是分工写成，带来了写作风格和语气的不连贯性，敬希读者鉴谅。囿于编者学识和水平的限制，误漏不妥之处在所难免，尚乞同行专家及读者指正。

编写过程中，本实验室的博士研究生上官棣华、余晓、赵莹歆、刘阳，硕士研究生方灿良和柯林楠等同学，进行了大量的录入、绘图及编排等工作。正是他们的辛勤劳动和努力，才使本书得以顺利脱稿。

在本书即将面世之际，作者谨向傅若农等先生，向参加编写的各位作者以及对本书付出辛勤劳动的各位同学，致以诚挚的谢意。感谢化工出版社及 Agilent 公司，正是它们的有效策划、组织和支持，才使本书得以面世。

编者谨识

2001. 3 于中国科学院化学研究所

目 录

第一章 色谱柱理论概要	1
第一节 色谱柱的塔板理论	2
一、塔板理论要点	2
(一) 色谱峰及色谱参数	2
(二) 色谱过程的塔板理论	3
二、保留体积与保留时间	6
三、容量因子 k'	7
四、分离因子 α	8
五、色谱柱的死体积 V_0	9
六、色谱峰的对称性	11
七、柱效率	14
八、最大样品体积	16
九、色谱柱的峰容量	17
十、分离度	19
第二节 色谱柱的速率理论	22
一、影响谱带展宽的各种因素	23
二、柱外谱带展宽效应	23
三、柱内谱带展宽效应	24
(一) 多路径效应	25
(二) 纵向扩散	26
(三) 流动相中的传质阻力	27
(四) 固定相中的传质阻力	28
四、Van Deemter 方程	28
五、Van Deemter 方程的修正与发展	30
(一) Giddings 方程	31
(二) Huber 方程	31
(三) Norvath-Lin 方程	31

(四) Knox 方程	32
(五) 描述开管柱的 Golay 方程	33
一般参考文献	34
参考文献	34
第二章 气相色谱柱	36
第一节 气相色谱柱的类型	36
第二节 填充气相色谱柱	37
一、填充柱柱管的选择与处理	37
二、气固色谱填充柱	38
(一) 无机吸附剂	38
(二) 高分子多孔小球	41
(三) 化学键合固定相	47
三、气液色谱填充柱	48
(一) 载体	48
(二) 固定液	54
四、填充柱的制备方法	65
(一) 固定相的制备	65
(二) 固定相的填充	65
(三) 填充柱的老化与评价	66
第三节 毛细管气相色谱柱	67
一、毛细管柱的制备	67
(一) 毛细管柱的材料	67
(二) 毛细管柱的拉制	70
(三) 毛细管柱的内壁改性	71
(四) 毛细管柱的涂渍	81
二、毛细管柱的质量评价	86
(一) 毛细管柱的分离能力	86
(二) 毛细管柱活性的考查	87
(三) 毛细管柱热稳定性的考查	89
三、毛细管柱的安装	90
(一) 毛细管柱安装前的检查	90
(二) 毛细管柱的安装	91
(三) 毛细管柱的老化	92

四、毛细管柱的保护	92
五、商品毛细管柱	93
(一) 非极性毛细管柱	93
(二) 中极性毛细管柱	94
(三) 极性毛细管柱	97
(四) PLOT 毛细管柱	98
(五) 超低流失毛细管柱	98
参考文献	99
第三章 高效液相色谱柱的类型和结构	102
第一节 高效液相色谱柱的类型	102
第二节 高效液相色谱柱的结构	104
一、柱子的形状	104
二、高效液相色谱柱系统	106
(一) 柱子的连接与密封	106
(二) 筛板及分配板	109
(三) 材料与加工	110
(四) 柱子的结构	110
(五) 保护柱	112
第三节 液相色谱柱的填装、评价及维护	114
一、液相色谱柱的填装	114
二、色谱柱色谱性能的评价	119
三、色谱填料和色谱柱的生产厂家及供应商	122
一般参考文献	127
参考文献	127
第四章 用于色谱填料的无机基质材料	128
第一节 基质材料	128
一、色谱用硅胶基质材料	128
(一) 硅胶的化学结构	128
(二) 硅胶的表面	129
(三) 表面硅羟基的活性	132
(四) 硅胶表面硅羟基的测定	134
(五) 硅胶的化学稳定性	135
(六) 硅胶的物理性质	136

二、色谱用多孔硅胶的制备	139
(一) 多孔硅胶中孔的形成	139
(二) 硅溶胶的制备	140
(三) 溶胶-水凝胶过程中水凝胶的形成	142
(四) 干凝胶的形成(多孔硅胶的形成)	143
(五) 可控孔径球形多孔硅胶的制备	143
(六) 硅胶的扩孔	146
三、其他基质材料	146
(一) 氧化铝	147
(二) 氧化锆	150
(三) 可控孔径玻璃(CPG controlled porous glass)	155
(四) 羟基磷灰石(HAP hydroxyapatite)	158
第二节 硅胶的改性与修饰	159
一、硅胶的表面化学修饰	160
(一) 表面修饰涉及的官能团及化学键	160
(二) 以 Si—C 键直接进行表面修饰	161
(三) 以 Si—X—R 型结构对硅胶进行表面修饰	161
(四) 硅烷化试剂及键合反应	162
(五) 键合相硅胶填料的制备	169
(六) 键合相硅胶的稳定性	172
二、整体修饰	175
三、聚合物包覆法(polymer coated)	178
(一) 包覆型填料的制备	178
(二) 包覆型填料的特性与应用	180
四、无机基质填料的表征与评价	184
(一) 物理及表面性质的表征	184
(二) 填料化学性质的表征	185
参考文献	187
第五章 无机基质色谱填料及色谱柱	192
第一节 正相填料及色谱柱	192
一、分离机理	192
二、正相色谱填料	194
三、影响正相色谱分离过程的参数	195

(一) 比表面积和表面活性	195
(二) 样品在硅胶上的负载量及线性容量	196
(三) 硅胶的吸附选择性	196
(四) 极性化学键合硅胶填料的选择性	197
(五) 一些常见的正相填料及色谱柱	197
第二节 反相填料及色谱柱	199
一、反相色谱的分离原理	199
(一) 疏溶剂理论	200
(二) 计量置换保留模型 (stoichiometric displacement model of retention)	202
二、反相填料的类型和制备方法	203
(一) 以十八烷基三氯硅烷制备反相硅胶	204
(二) 醚键型反相填料的制备	206
三、性质及特点	206
(一) 基质对色谱行为的影响	206
(二) 键合相对色谱行为的影响	211
四、常见的反相填料及色谱柱	215
第三节 离子交换填料及色谱柱	216
一、薄壳型离子交换填料	216
二、全多孔硅胶型离子交换填料	217
第四节 体积排除色谱填料及色谱柱	218
一、分离机理	219
(一) 溶质的保留行为	219
(二) 保留机理	221
(三) 分离机理及其理论模型	222
(四) SEC 中的峰展宽	224
(五) SEC 中的分离度	225
(六) 峰容量	225
二、SEC 的填料	226
(一) 凝胶的结构参数	226
(二) 凝胶的色谱指标	227
(三) 合成高分子凝胶	228
(四) 无机基质凝胶	229

三、SEC 实验技术	231
(一) 凝胶柱的选择与使用	231
(二) 流动相	231
(三) 标准样品及标准曲线	232
第五节 亲和色谱填料及色谱柱	232
一、高效亲和色谱的特点	233
二、用于高效亲和色谱的基质	234
三、硅胶的活化	234
四、一些常见的高效亲和填料	237
第六节 疏水相互作用填料及色谱柱	239
第七节 手性色谱填料及色谱柱	240
一、配体交换手性固定相	241
二、高分子型手性固定相	242
三、键合及涂敷型手性固定相 (CSP)	243
(一) Pirkle 型手性固定相 (刷型手性固定相)	243
(二) 多糖类手性固定相	248
(三) 其他手性固定相	254
四、蛋白类手性固定相	254
参考文献	255
第六章 有机高分子类型液相色谱填料	260
第一节 有机高分子类型填料的结构特征	261
一、填料的物理结构	261
二、填料的化学结构	263
第二节 有机高分子类型填料的基质树脂	264
一、多糖型基质材料	264
(一) 葡聚糖系凝胶	264
(二) 琼脂糖系凝胶	265
二、聚合物型基质材料	266
(一) 交联聚苯乙烯树脂	266
(二) 交联聚甲基丙烯酸酯类树脂	267
(三) 其他类型树脂	268
第三节 有机高分子类型填料的性能评价	269
一、填料物化性质的表征	269

二、填料色谱性能的特征	269
(一) 保留值	270
(二) 选择性	270
(三) 柱效率	270
(四) 填充柱的总孔隙度和穿透性	271
(五) 分离度	271
第四节 有机高分子类型的反相色谱填料	271
第五节 有机高分子类型的离子交换色谱填料	276
一、多糖基质的离子交换层析介质	277
二、聚合物基质的高效离子交换色谱填料	278
(一) 多孔树脂的 IEC 填料	280
(二) 非多孔树脂的 IEC 填料	285
(三) 薄壳型树脂的 IEC 填料	289
三、高聚物型离子色谱填料	291
第六节 有机高分子类型的疏水性相互作用色谱填料	293
第七节 有机高分子类型的体积排除色谱填料	297
一、SEC 填料的一般特征与色谱指标	298
二、凝胶渗透色谱填料	299
三、凝胶过滤色谱填料	301
(一) 多糖型 GFC 填料	302
(二) 高聚物型 GFC 填料	305
第八节 有机高分子类型的亲和色谱填料	308
一、多糖基质的 AFC 填料	310
二、高聚物基质的 AFC 填料	311
参考文献	313
第七章 色谱柱技术的新进展	317
第一节 色谱柱技术进展概况	317
第二节 贯流色谱填料	321
第三节 石墨化碳填料	326
一、非极性化合物在石墨化碳上的保留行为	329
二、极性化合物在石墨化碳上的保留行为	329
第四节 整体柱	335
参考文献	338

附录	340
一、常见的商品硅胶	340
二、常见的商品氧化铝	343
三、常用的反相填料	344
四、常见的离子交换填料	351
符号表	355

第一章 色谱柱理论概要

色谱，是一种现代分离、分析方法，也是一种研究物理、化学过程很好的工具。任何两种不同的物质，只要它们存在物理、化学或生物学性质上的差异及在不同物相上分配系数的差异，便都可以在色谱过程中得到分离、分析或测定。这里，所谓不同的物相可以包括气相、液相、固相和超临界相。不同物相的配合，可以得到不同的色谱类型，如气相色谱系以气相为流动相，以固相或载有液相的固体为固定相进行物质的分离；液相色谱则是以液体为流动相，以广义的固相为固定相而进行的分离。通常，均将固定相装填于柱子中，即以色谱柱的形式进行工作。因此，色谱柱是进行色谱分离的主要场所。人们常将其比喻为色谱仪的心脏，这是很恰当的。

发生在色谱柱中的分离过程，受热力学因素和动力学因素的控制。为了得到满意的分离效果，首先必须考虑固定相的性质及其与溶质相互作用的强弱，这主要体现在色谱柱填料的设计、合成及选择上。为使分离的谱带展宽尽可能的小，就需要对柱子进行优化设计并将填料填充成性能优良的柱子。同时由于流动相的种类与使用条件既可影响动力学因素，又影响热力学因素，故必须正确地选择并优化色谱条件。在色谱柱确定后，主要是选择流动相、淋洗及各种参数。上述这些问题，都涉及到色谱的基本理论。

色谱技术的理论基础可以大致归纳为色谱热力学和色谱动力学两大部分。色谱热力学的问题，将在各具体色谱模式中加以探讨。这里，拟主要讨论色谱动力学的几个问题。在色谱理论发展的早期，主要是借用了化工原理上的塔板概念，形成了平衡分配的塔板理论。尔后，又针对塔板理论的不足，逐步建立并完善了速率理论。目前，这两种理论模型仍然为广大色谱工作者所接受和使用，且具有某种互补性。这里，拟省略去繁琐的数学推导，也尽量避免

难于理解的概念，以比较易于理解的方式，将塔板和速率理论的主要内容及其在色谱柱的设计、选择与使用方面的一些基本问题进行介绍和讨论^[G1~G4]。

第一节 色谱柱的塔板理论

一、塔板理论要点

(一) 色谱峰及色谱参数

假设有两个溶质 A 和 B，将它们注入色谱柱后，便会在流动相的携带下通过色谱柱并获得分离。在柱子出口处设置一个检测器，便能记录下流经出口的溶质浓度的变化。这种浓度-时间曲线便是该物质的色谱图（图 1-1）。

色谱峰及其参数

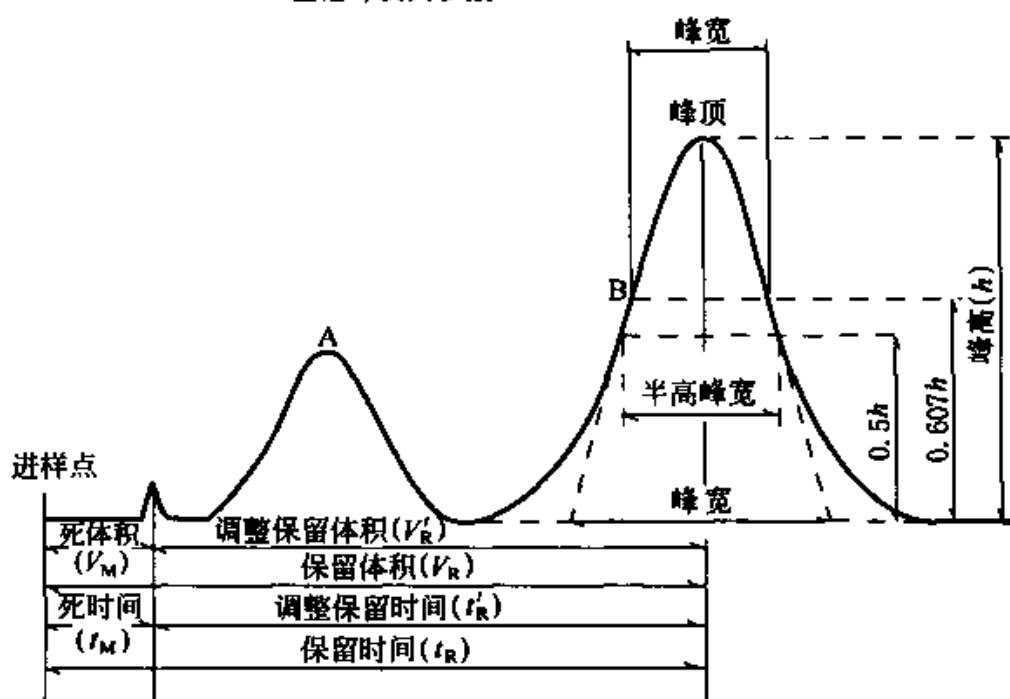


图 1-1 色谱峰及其参数

从图 1-1 上，可以见到溶质的色谱峰，如 A 峰、B 峰。同时，也有不保留物质或杂质形成的峰。没有峰时的信号轨迹形成基线。从色谱图上，可以直接得到或通过计算得到一系列的色谱参数，如

保留时间、峰高、峰宽等。

(二) 色谱过程的塔板理论

在色谱图中，最基本的一个参数是保留时间 t_R 与保留体积 V_R 。若流动相的淋洗速度为常数，则流速与保留时间之积为保留体积 V_R 。色谱过程是一个分离过程。不同溶质在色谱柱的不同位置上的浓度是不断变化的，各组分在柱内的浓度分布形状称为谱带。我们可以利用塔板理论去描述和表征这种浓度的变化过程。

色谱过程的塔板理论是 Martin 和 Synge 于 1941 年首先提出的^[1]。尽管最初的理论并不完备，但毕竟这是对色谱过程进行描述的初次尝试。在 Martin 之后，Said 等学者也对这一理论做了补充和完善，使塔板理论为色谱界所接受。稍后一些时间 Van Deemter 和 Giddings 等从色谱动力学的观点出发，提出和发展了色谱过程的速率理论，深入论述了影响与控制分离过程的各种因素，从而奠定了色谱柱和色谱分离的另一个重要的理论基础。

塔板理论描述溶质在色谱柱中的浓度变化，给出溶质的淋洗曲线方程。不妨按塔板理论的思路，分析一下溶质的淋洗过程。我们可以将一根色谱柱看作是一根精馏柱，它由许多单级蒸馏的小塔板或小短柱组成，每一个单级蒸馏的小塔板或小短柱长度很小，但允许溶质在其中有足够的时间达到两相间的平衡。就像在精馏塔内进行精馏一样，这种假想的塔板或小短柱越小或越短，就意味着在一个精馏塔或分离柱上允许反复进行的平衡的次数就越多，即具有更高的分离效率。一根柱子上能包容的塔板的数目，被称为一根柱子的“理论塔板数”（以 n 表示），而每一层“塔板”所占有的长度或高度，则被称为理论塔板高度（以 H 表示）。

对某一种溶质而言，假定在每一塔板上均存在两相间的平衡：

$$X_s = KX_m \quad (1-1)$$

式中， X_s 和 X_m 分别是溶质在固定相和流动相中的浓度，其单位为单位体积中的质量数。 K 则是两相中的分配系数。

则

$$K = \frac{X_s}{X_m}$$

从式中可知, K 是一个无量纲的系数。应该注意的是, 式 (1-1) 仅在线性吸附等温曲线的前提下才是正确的。在大多数情况液相色谱中, 这一假定是正确的。

将式 (1-1) 微分, 则

$$dX_s = K dX_m \quad (1-2)$$

假设有三块顺序连在一起的塔板: $(p-1)$, (p) 和 $(p+1)$, 而柱中的塔板数为 n , 且柱子十分均匀 (图 1-2), 则各塔板两相中溶质的浓度分别为

在 $(p-1)$ 板中为

$$X_{m(p-1)}, X_{s(p-1)}$$

在 (p) 板中为

$$X_{m(p)}, X_{s(p)}$$

在 $(p+1)$ 板中为

$$X_{m(p+1)}, X_{s(p+1)}$$

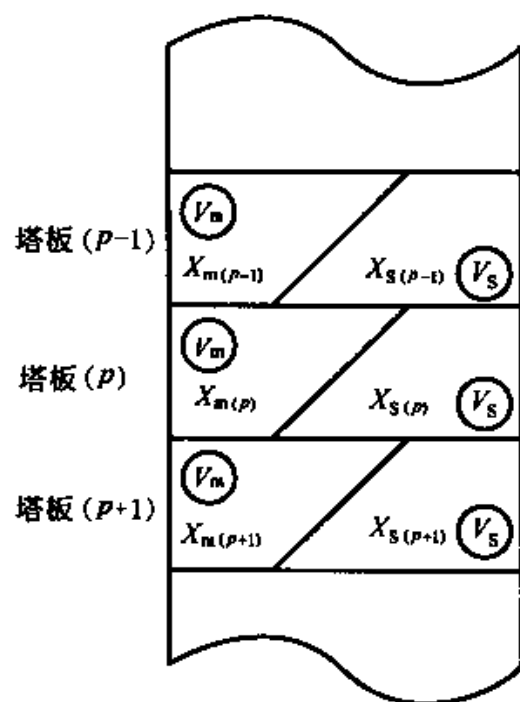


图 1-2 塔板上的平衡

现在, 让一个小体积的流动相 dV 从 $(p-1)$ 板移至 (p) 板中, 与此同时, 它又置换出同体积的流动相进入 $(p+1)$ 板。这一过程必然引起 (p) 板上溶质质量的变化, 这一变化又等于从 (p) 板进入 $(p+1)$ 板上质量的变化。由于质量为浓度乘以体积, 则

$$dm = [X_{m(p-1)} - X_{m(p)}] dV \quad (1-3)$$

而 dm 将进一步分配于流动相与固定相, 并引起 (p) 板上流动相和固定相上溶质浓度的改变:

$$dm = V_s dX_{s(p)} + V_m dX_{m(p)} \quad (1-4)$$

从公式 (1-2) 可以得到 $dX_{s(p)} = K dX_{m(p)}$

将其代入 (1-4) 式, 即

$$dm = V_s K dX_{m(p)} + V_m dX_{m(p)}$$

$$= (KV_S + V_m) dX_{m(p)}$$

从 (1-3) 式可知, $dm = [X_{m(p-1)} - X_{m(p)}] dV$

则 $(KV_S + V_m) dX_{m(p)} = [X_{m(p-1)} - X_{m(p)}] dV$

移项并整理

$$\frac{dX_{m(p)}}{dV} = \frac{[X_{m(p-1)} - X_{m(p)}]}{KV_S + V_m} \quad (1-5)$$

式中, $KV_S + V_m$ 实际上代表了一块塔板中的流动相与固定相的体积之和, 在这一体积的流动相中, 包含了该板上的全部溶质。这样, 我们便可以将其命名为“塔板体积” (plat volume), 并引入一个新的变量 ν

$$\nu = \frac{V}{(V_m + KV_S)} \quad (1-6)$$

将 (1-6) 式微分

$$d\nu = \frac{1}{(V_m + KV_S)} dV$$

即 $dV = (V_m + KV_S) d\nu$

将 dV 代入式 (1-5) 中, 则

$$\frac{dX_{m(p)}}{d\nu (V_m + KV_S)} = \frac{X_{m(p-1)} - X_{m(p)}}{KV_S + V_m}$$

加以整理可得到

$$\frac{dX_{m(p)}}{d\nu} = X_{m(p-1)} - X_{m(p)} \quad (1-7)$$

式 (1-7) 即是描述流动相通过塔板 (p) 时溶质浓度变化的最基本的微分方程, 将其加以积分, 就可以得到描述色谱柱上某一塔板上溶质淋洗曲线的公式。对于塔板 (p), 它的一个简单的代数解是

$$X_{m(p)} = \frac{X_0 e^{-\nu} \nu^p}{p!}$$

这里 $X_{m(p)}$ 是离开塔板 (p) 时流动相中溶质的浓度, X_0 则是柱子第一块塔板上, 即原始的溶质浓度。假如柱子共有 n 块塔板, 则柱子出口处的溶质浓度为

$$X_{m(n)} = \frac{X_0 e^{-\nu} \nu^n}{n!} \quad (1-8)$$

这便是塔板理论中最基本，也是最重要的一个公式。根据这一公式，便可从所测量到的色谱图了解有关柱子、固定相和流动相的性质和参数。式(1-8)是一个泊松函数(Poisson function)。但是，当 n 足够大时，它非常接近于高斯函数。通常的液相色谱柱，其理论塔板数均较高，所以液相色谱的所有色谱峰一般呈高斯分布，其峰形均应比较对称。

从上述公式可知，当加长柱子的长度，使塔板数增加时，流动相中溶质的浓度会减小，峰高降低，而其峰形也因更接近于高斯分布而更对称。

二、保留体积与保留时间

保留体积 V_R 与保留时间 t_R ，是色谱图即色谱淋洗曲线的两个基本参数，它们可以很方便地从色谱图上测得。它们代表自进样点至溶质峰的最高点之间，通过柱子的流动相的体积及相应的通过时间。那么，这两个参数与柱子的性能间又存在着怎样的关系呢？不妨利用塔板理论进行一下简单的讨论。

从塔板理论的基本方程式(1-8)可知

$$X_{m(n)} = \frac{X_0 e^{-\nu} \nu^n}{n!}$$

将其进行微分

$$\begin{aligned} \frac{dX_{m(n)}}{d\nu} &= X_0 \frac{-e^{-\nu} \nu^n + e^{-\nu} \nu^{(n-1)}}{n!} \\ &= X_0 \frac{-e^{-\nu} \nu^{(n-1)}}{n!} (n - \nu) \end{aligned}$$

令等式为0，则 $n - \nu = 0$ ， $\nu = n$

这意味着，在峰的最高点时，已有 n 倍“塔板体积”的流动相通过了色谱柱。这里的塔板体积即指 $(\nu_m + K\nu_s)$ ，故保留体积为

$$V_R = n (\nu_m + K\nu_s) = n\nu_m + nK\nu_s$$

式中， ν_m 为每一塔板中流动相的体积， ν_s 为每一塔板中固定相的体积。

令 $V_M = n\nu_m$, $V_s = n\nu_s$, 则

$$V_R = V_M + KV_S \quad (1-9)$$

对于一个在柱子中不保留的溶质来说, 其保留体积即为死体积 V_0 , 而 V_0 为柱中流动相体积与柱外体积之和, 即

$$V_0 = V_M + V_E \quad (1-10)$$

柱外体积 V_E 则为连接管路, 进样器以及检测器等的体积之和。柱外体积对一套色谱系统来说, 是一个十分重要的参数, 必须设法尽量减小柱外体积; 但是, 在一般的常规柱和制备柱等总柱体积较大的柱系统上, 柱外体积与柱体积相比已不算很大, 通常可以忽略不计, 此时, $V_0 \cong V_M$ 。当然, 对于微型色谱柱以及需要精确测量保留体积的场合, 则必须进行柱外体积校正。即式 (1-9) 应修正成

$$V_R = V_M + KV_S + V_E \quad (1-11)$$

将 (1-11) 式加以变换

$$V_R - V_M - V_E = KV_S,$$

令 $V_R - V_M - V_E = V'_R$

$$\text{则} \quad V'_R = KV_S \quad (1-12)$$

这里的 V'_R 即调整保留体积。从式 (1-12) 可知, 它只与溶质在两相中的分配系数以及固定相体积有关而与流速等其他柱参数无关。

上面讨论的是保留体积。若流动相是以恒定的流速进行淋洗, 则可以根据保留体积为流速与保留时间之积的关系求出相应的保留时间 t_R 和调整保留时间 t'_R 。在一般的分析中, 由于计时更加方便, 故保留时间更为常用。

三、容量因子 k'

在色谱发展的早期, 容量因子(capacity ratio)即被用以描述色谱柱中溶质的迁移速度, 它被定义为溶质的分配系数与柱子相比之商, 即

$$k' = \frac{K}{\phi} \quad (1-13)$$

ϕ 为相比, 它被定义为柱中两相, 即流动相体积与固定相体积之比:

$$\phi = \frac{V_M}{V_S}$$

将其代入 k' 的定义, 则

$$k' = \frac{KV_S}{V_M}$$

由公式 (1-12) 可知, $V'_R = KV_S$

$$\text{故} \quad k' = \frac{V'_R}{V_m} \quad (1-14)$$

由公式 (1-10) 可知, $V_M = V_0 - V_E$

故

$$k' = \frac{V'_R}{V_0 - V_E}$$

如果柱外体积 V_E 足够小, 则

$$k' = \frac{V'_R}{V_0} \quad (1-15)$$

这就是通常的容量因子的表达式。在实际测量中, 往往使用某溶质峰值至死体积之间的距离除以死点至原点的距离而得到。这一简化的计算的前提是, 柱外体积要足够小才成。当然如后面所要讨论的那样, 这只是一种理想状态, 因为每一个柱子要连接于色谱体系上, 都必须使用连接管, 也必须使用检测器, 因此, 总会有柱外体积存在, 只不过有大有小罢了。

四、分离因子 α

上节中已述及, 容量因子可以描述溶质在柱中的移动速度。但是, 要想精确地测量溶质的容量因子, 就必须精确地测量柱子的死体积及柱外体积。此外, 因固定相载体上的孔结构所引起的体积排除效应也必须加以考虑。为了避免柱外体积及体积排除效应的影响, 人们引进了另一个参数, 即分离因子 (separation ratio) α , 用以描述和表征两种不同的溶质在柱子中的分离过程。

设有两个溶质 A 和 B, 它们在柱子上的分离因子定义为它们的分配系数之比, 即

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B}$$

式中, $K_A > K_B$, 即溶质 A 在柱子上有更强的保留。从前面公式 (1-12) 可知,

$$\begin{aligned} V'_{R(A)} &= K_A V_s \\ V'_{R(B)} &= K_B V_s \end{aligned}$$

则

$$K_A = \frac{V'_{R(A)}}{V_s}; \quad K_B = \frac{V'_{R(B)}}{V_s}$$

因此,

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} = \frac{V'_{R(A)}}{V'_{R(B)}}$$

而当柱外体积很小时, 根据公式 (1-15),

$$k'_A = \frac{V'_{R(A)}}{V_0}; \quad k'_B = \frac{V'_{R(B)}}{V_0}$$

因此,

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} = \frac{V'_{R(A)}}{V'_{R(B)}} = \frac{k'_A}{k'_B} \quad (1-16)$$

从上式可以得知, α 可以从色谱图上直接测量两个溶质的保留时间或保留体积后计算得到。它与柱子的其他参数并没有直接的相关性, 它只取决于溶质在两相中的分配系数及温度。也就是说当温度相同时, 在以相同的填料填装的不同的柱子上某一对物质可以获得相同的分离因子 α 。

五、色谱柱的死体积 V_0

在实际的色谱分离过程中, 当将一个样品注射进色谱柱后, 几乎都可以观察到一个峰, 它将先于所有其他组分而第一个流出色谱柱。通常以为, 这是在柱中不保留的成分或杂质的峰, 它所需的流动相体积即代表死体积 (dead volume) V_0 。前面我们已经对它进行过初步讨论, 对于一根色谱柱来说, 这也是一个很重要的基本参数。它对于研究发生在柱子上的动力学和热力学过程, 以及研究流动相中的各组分保留行为等均十分重要。

一根运行中的柱子的内部体积是由三部分所组成的, 即流动相

体积、固定相体积和载体体积。它可以用公式表示为

$$V_c = V_m + V_s + V_{si} \quad (1-17)$$

式中, V_c 为总体积; V_m 为柱中流动相的总体积; V_s 为柱中固定相的总体积; V_{si} 为柱中载体的总体积 (这里以硅胶代表)。这个公式看似简单, 但有些问题需要详细讨论。首先, 柱子中的流动相并不全都是流动的, 例如孔中的流动相 (被称为停滞流动相) 以及填料粒子接触点附近的流动相就是不流动的。此外, 柱中的固定相也并非仅只是载于载体上的固定相, 它还包括了填料孔中的停滞流动相。现代的高效液相色谱, 多使用全多孔型微粒硅胶为填料或载体。填料的孔径大小是不均匀的。孔径很小的细孔, 很难被用于色谱过程。这种不均匀的孔会造成所填装柱子的体积排除效应。

从上面的分析可知, 一根柱子的死体积, 包括了填料颗粒间的间隙体积、填料的孔体积等, 情况相当复杂。通常, 人们用在柱上不保留的溶质为样品以测定死体积。Alhedai^[2] 曾以一系列不同离子体积的盐为样品, 测定了 Zorbax C₈ 柱子的粒子间隙体积 (表 1-1), 以其离子体积对保留体积作图, 则如图 1-3 所示。

表 1-1 一些无机盐在 Zorbax C₈ 柱的保留体积

物 质	保留体积/ml	物 质	保留体积/ml
NaNO ₃	1.85	Na ₂ [Fe (NO) (CN) ₅]	1.64
Na ₂ SO ₃	1.87	K ₂ Cr ₂ O ₇	1.62
Na ₂ S ₂ O ₃	1.83		

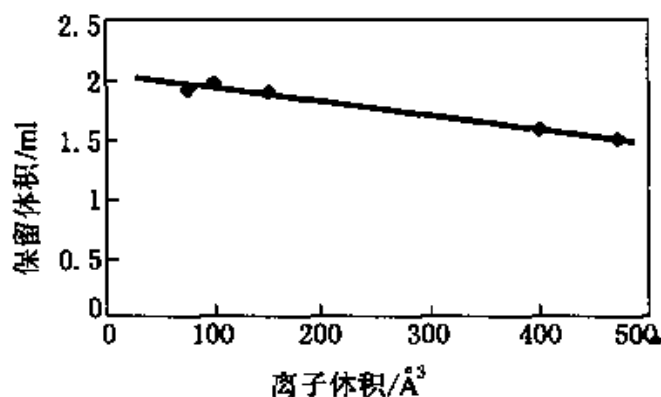


图 1-3 离子体积与保留体积关系图

从结果可知,随着盐离子体积的增加,其保留体积随之降低。填料的粒间体积亦具有体积排除的特性。此外,所使用的离子既有一价离子,也有两价离子,但电荷的多少对保留体积并没有太大的影响。从图 1-3 可知,将曲线外推至离子体积为零,则可以求出总间隙体积。

常用的测定死体积的物质有硝酸钠、硝普钠、硫代硫酸钠和硅溶胶等,以不同比例的甲醇-水为流动相,测定了它们在反相柱上的保留值。从测定结果可知,流动相的成分对死体积测定结果的影响不大。同时硅溶胶表现了最低的保留值。这里的硅溶胶是将烟雾状的二氧化硅粒子分散在水中而形成的。由于它们有凝聚成大颗粒的倾向,故使用前可使用超声波将它们充分分散,这样才能得到对称的色谱峰。有的作者推荐以硝普钠为样品去测定总排除体积或“动力学死体积”,这些参数可用以计算一些色谱参数。以较大的分子测定的死体积可以避免体积排除效应对测定的影响,容易获得较接近真实情况的数值。从上面的结果可以看出,对于以多孔硅胶为基质的色谱柱,由于存在有复杂的孔结构,且粒间孔隙也具有体积排除效应,故很难精确地测定其死体积。此外,不同分子尺寸溶质的相互比较也很困难,这是我们在实际工作中必须加以考虑的。

有人曾对典型的反相柱进行了测试,结果显示,在色谱柱中,流动相占柱内总体积约 68%,在流动相体积中,粒间隙体积约占 $2/3$,孔内体积约占 $1/3$;在间隙体积中真正能流动的流动相占总间隙体积的 $2/3$ 左右。因此在柱中的流动相中,总共只有约 50% 的流动相是流动的,剩下的 50%,即孔内的及粒子间隙中接近粒子接触点的流动相,则是相对静止的。由此可见,在色谱柱中的流动相,处于很复杂的状态下,柱子的死体积很难以一种简单的方式去统一地加以处理的。

六、色谱峰的对称性

在前面的讨论中,一般总是假设色谱峰服从高斯分布,因而,它们都应呈现对称的峰形。但是,在实际色谱分离过程中,却经常遇到不对称的峰,如拖尾峰或“伸舌头”峰。出现这些情况时,便会干扰所进行的分离、分析过程。因此,我们必须对出现不对称峰

的原因进行分析,以便寻找克服它的途径。

不对称峰的出现,意味着溶质谱带在柱床中移动速度的不均匀性。设谱带的移动速度 Z 为

$$Z = \frac{L}{t_R}$$

L 为柱子的长度, t_R 为溶质的保留时间。由塔板理论的基本公式可知,

$$t_R = \frac{V_R}{F}$$

F 为流速,即保留体积与流速之商;此外,

$$V_R = V_M + KV_S$$

所以

$$Z = \frac{L}{t_R} = \frac{LF}{V_R} = \frac{LF}{V_M + KV_S}$$

一般情况下, V_M 均小于 KV_S , 所以上式可以写成

$$Z = \frac{LF}{KV_S}$$

从上式可知,当柱长、流速等均为常数时,

$$Z \propto \frac{1}{K} \quad (1-18)$$

即谱带移动速度与分配系数成反比。这意味着谱带移动速度与溶质在固定相上的吸附等温曲线密切相关。

图 1-4 示意性地给出了三种不同的等温吸附曲线及其相对应的色谱峰。图中纵坐标代表溶质在固定相中的浓度 X_s ; 横坐标代表在流动相中的浓度 X_m 。吸附等温线 PqQ 代表线性吸附等温线, PrR 和 P_sS 分别代表凹型和凸型吸附

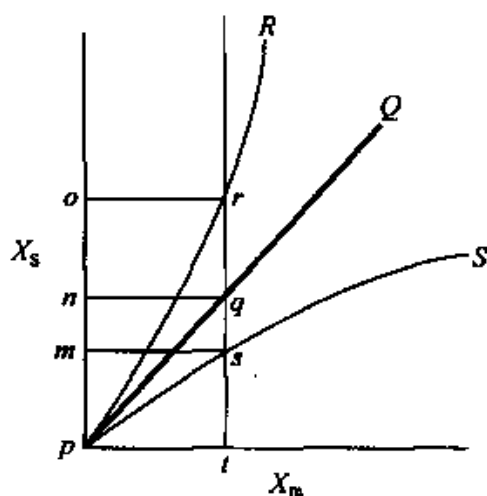


图 1-4 吸附等温线

等温线，凸形吸附等温线又称为 Langmuir 吸附等温线。

在线性吸附等温线的情况下，分配系数

$$K_1 = \frac{X_s}{X_m} = \frac{tq}{qn}$$

在线性情况下， K_1 是常数，故谱带移动速度 Z 也是常数，即谱带恒速移动并产生一个对称的正常峰。

凹型曲线，多出现在溶质分子相互作用力大于溶质分子与溶剂分子作用力的情况下。此时，随着进样量的增加，固定相表面上吸附的溶质分子对流动相中的溶质分子产生更强的作用力，因而，会有更多的溶质分子被吸附于固定相上，使得吸附等温线出现凹型。此时的分配系数

$$K_2 = \frac{rt}{or}$$

而 $or = nq$ 。所以显然， $K_2 > K_1$ 。在此情况下，溶质谱带通过柱子的速度在高浓度下慢，而低浓度下快，峰尖将向后移，出现“伸舌头”峰。这种情况下在样品超载时常会出现。

凸型曲线，多出现在吸附色谱的情况下。溶质分子被吸附于固定相上，导致产生屏蔽效应，减弱了溶质分子与固定相表面的作用力，使得外层溶质分子仅和固定相表面发生远程相互作用，甚至仅和溶质层产生相互作用，其吸附等温线为 P_5S 。此时，其分配系数 K_3 必然小于 K_1 ，因此，谱带移动速度将大于正常的线性吸附等温曲线的情况。在这种情况下含有较高浓度的谱带，将会较快的移动，从而造成拖尾状峰。在使用以硅胶为基质的高效液相色谱柱特别是在反相色谱柱时，经常会遇到因游离的硅羟基（或称为硅醇基）而导致的非特异性吸附。对一些极性较强的溶质，如碱性物质，色谱峰会严重拖尾，甚至会因强吸附而不能洗脱。此时除从洗脱条件上加以改善外，从设计与制造入手，制备出低吸附或无吸附性的填料才是根本的解决途径。

上面所述的几种情况，都和进样量有密切关系。在进行制备或半制备分离时，经常需要超载进样。超载进样有两种情况，即体积

$$(V_M + KV_S) = \frac{V_R}{n}$$

将其代入前式，则

$$\sigma^2 = n \frac{V_R^2}{n^2} = \frac{V_R^2}{n}$$

转换之便得到理论塔板数的最基本的表达式

$$n = \left(\frac{V_R}{\sigma} \right)^2 \quad (1-19)$$

从色谱图上，还可以测量并得到理论塔板数的其他一些不同的表达式，列举如表 1-2 所示。

表 1-2 以色谱图参数计算塔板数的方法^[3]

色谱峰参数	标准偏差	理论塔板数
V_R 和 σ_r		$n = \left(\frac{V_R}{\sigma_r} \right)^2$
V_R 和 w	$\sigma_r = \frac{w}{4}$	$n = 16 \left(\frac{V_R}{w} \right)^2$
V_R 和 $w_{h/2}$	$\sigma_r = w_{h/2} / \sqrt{8 \ln 2}$	$n = 5.54 \left(\frac{V_R}{w_{h/2}} \right)^2$
V_R 和峰面积 A 及峰高 h	$\sigma_r = \frac{A}{h \sqrt{2\pi}}$	$n = 2\pi \left(\frac{VRh}{A} \right)^2$

在实际工作中，为计算和测量的方便，大多数情况下取 1/2 峰高处的峰宽计算 n 值。于是上式可以写成

$$n = 5.54 \times \left(\frac{V_R}{w_{h/2}} \right)^2 \quad (1-20)$$

如以保留时间计，则

$$n = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{t_{1/2}} \right)^2 \quad (1-21)$$

这就是我们常见的测算柱子理论塔板数的最常用的公式。从上式可知，一根柱子的理论塔板数越高，则溶质从柱上流出曲线的方差或峰宽越小，即峰越尖锐，这表明这根柱子对溶质的分离能力高，即

柱效高。因此，理论塔板数的大小，可以用来表征柱子柱效的高低。要注意的是，这里计算的 n 值，只是被测柱的理论塔板值。为便于相互比较，可以引入理论塔板高度的概念。理论塔板高度 (height equivalent to one theoretical plate: HETP) 系指每一理论塔板所占的柱长，即

$$H = \frac{l}{n} \quad (1-22)$$

式中， l 为柱长，单位以 mm 计， n 为该柱的理论塔板数。理论塔板高度的单位为 mm。有了这一概念，我们便可方便地进行不同柱子间柱效的比较了。理论塔板高度越小，则一根柱子中所能达到的理论塔板数就越高。当然，也可以用每米理论塔板数来进行相互比较。理论塔板高度和每米理论塔板数之间的关系是 $N \cdot H = 1000\text{mm}$ ， N 表示每米理论塔板数， H 表示理论塔板高度。通常，商品预填充柱多给出每米理论塔板数，如以直径 $5\mu\text{m}$ 的键合相硅胶充填的色谱柱，多可达到每米 8 万理论塔板。

八、最大样品体积

从对色谱峰形的讨论中我们已经知道，超载进样会引起色谱峰的变形。这是指质量超载而言的。那么，体积超载时，分离会受什么影响呢？从理论上讲，样品是有一定体积的，这一含有样品溶液的体积的方差，当然会直接加和到流出曲线的方差中去。这意味着，使流出曲线的方差增加，因而使理论塔板数下降，即柱效降低。设注入柱子中样品的体积为 V_i ，它在柱头会形成一个矩形的谱带。从柱中淋洗出的峰的方差，将是样品的方差与峰的正常方差之和，它又可以表示为

$$\sigma^2 = \sigma_i^2 + \sigma_c^2$$

这里 σ^2 为洗脱峰的方差， σ_i^2 为样品的方差， σ_c^2 为柱子分散性即从柱子中淋洗出的峰的正常方差。现在，大家公认的可以允许的峰的展宽为标准偏差增加 5%^[4]（或峰方差增加 10%）。此时，样品体积所占方差为 $\left(\frac{V_i^2}{12}\right)$ ，则可以推导出

$$\begin{aligned}\sigma^2 &= \frac{V_i^2}{12} + [\sqrt{n} (V_m + KV_s)]^2 \\ &= \frac{V_i^2}{12} + n (V_m + KV_s)^2\end{aligned}$$

因设定的最大允许展宽为 5%，则

$$\sigma^2 = [1.05 \sqrt{n} (V_m + KV_s)]^2$$

即

$$\frac{V_i^2}{12} + n (V_m + KV_s)^2 = (1.05)^2 n (V_m + KV_s)^2$$

整理右式，得到

$$\begin{aligned}\frac{V_i^2}{12} &= (1.05)^2 n (V_m + KV_s)^2 - n (V_m + KV_s)^2 \\ &= n (V_m + KV_s)^2 (1.05^2 - 1) \\ &= 0.1025 n (V_m + KV_s)^2\end{aligned}$$

所以

$$\begin{aligned}V_i^2 &= 1.23 n (V_m + KV_s)^2 \\ V_i &= 1.1 \sqrt{n} (V_m + KV_s)\end{aligned}$$

如前已推导的，

$$V_R = n (V_m + KV_s)$$

则可导出

$$V_i = \frac{1.1 V_R}{\sqrt{n}} \quad (1-23)$$

这一公式给出了在允许最大峰展宽为标准偏差增量 5% 时的最大进样体积。由公式可知，柱效越高，允许的最大进样体积越小。此外，样品的保留体积越小则可允许的最大进样体积亦小；反之，对保留体积大的样品，则可允许较大的最大进样体积。

九、色谱柱的峰容量

在色谱的实际应用中，经常会遇到及其复杂的样品体系。例如生物化学样品、动植物组织、中药材以及复杂的环境样品等。这时就需要所使用的柱子能包容下更多的峰，以便能应付复杂体系中各

组分的分离之需。形象地说,我们希望在所选用的条件下,从出第一个峰起,一个接一个、没有间隔地排满彼此达到基线分离(或达到 4σ 分离)的峰,直到淋洗结束或出完最后一个峰。从实际操作上来讲,这当然仅是一种理想状态。但作为一种衡量的标准,还是可以将“峰容量”定义为在给定色谱条件下,在色谱图的死体积峰至最后一个峰之间所能包含的峰数,或定义为在分离的路径和空间中可容纳峰的最大值。

根据塔板理论,位于基线上的峰的宽度为

$$W = 4\sqrt{n} (V_m + KV_s)$$

这里,这一宽度的单位是以流动相体积来计算的,而此峰的保留体积为

$$V_R = n (V_m + KV_s)$$

设各峰的样品量及响应值相近,则峰的容量 S 可以下式给出

$$S = \frac{V_R}{W} = \frac{n (V_m + KV_s)}{4\sqrt{n} (V_m + KV_s)}$$

即

$$S = \frac{\sqrt{n}}{4} \quad (1-24)$$

这是一个非常清晰,但又很有局限性的结论。一方面,峰容量正比于柱效的平方根。因此,只要柱效足够高,便可获得更高的峰容量。这是很自然的。峰越窄而尖锐,它在色谱图上所占的时间轴上的距离也越小,也就是意味着在相同的时间轴长度上能排列下更多的峰。另一方面,在这种推导前已设定一个前提条件,即各峰具有相同的峰宽。但是实际情况却并非如此。峰展宽的效应,使得先出的峰窄而后边的峰宽。这一点也可以理解为,先被淋洗出柱子的溶质会不断地腾出新的柱子空间,从而允许在柱子中可容纳下大于 S 个峰。经过进一步的推导,此时最大峰 S 可表达为

$$S = 1 + \frac{\sqrt{n}}{4} \ln \frac{V_{\max}}{V_{\min}} \quad (1-25)$$

式中, $V_{\max}$ 和 $V_{\min}$ 为可被淋洗出来并可以检测的最大和最小保留体积(或保留时间),它们均与容量因子密切相关^[3]。

从式中可以得知，峰容量必须同时考虑柱子的塔板数与溶质的容量因子。因此，经过修正的峰容量与容量因子可有如下的关系（图 1-6）。峰容量 S 既与柱效 n 密切相关，同时也依最后一个峰的容量因子的值而变。换句话说，任何影响容量因子的因素，均又能影响到峰容量。实际进行色谱分离和分析时，这也是必须加以考虑的一个问题。例如，随着容量因子的增加，谱峰会展宽，峰形变矮。当低于所使用检测器的检测限时（通常为噪声的 2.5~3.0 倍），即使有溶质被淋洗出来，它也难以在色谱仪上观测到。检测器的灵敏度限制了更大谱峰的检测，亦即给 k' 附加了一个在该检测条件下的极值。因此，检测器的灵敏度或最小检测浓度也必然是最大峰容量的一个控制因素。

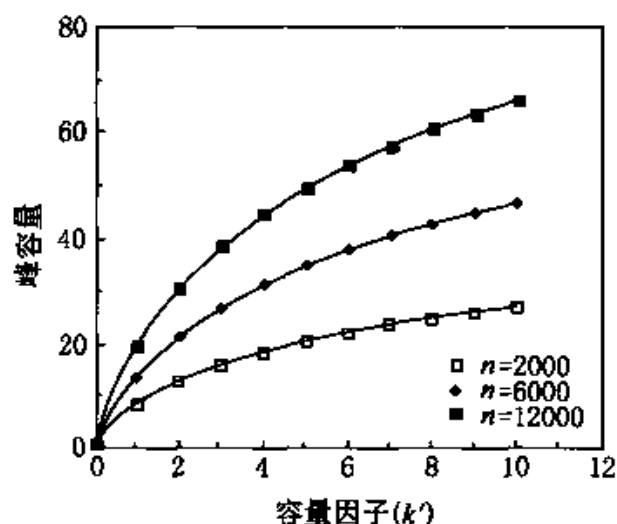


图 1-6 容量因子与峰容量关系

这里需要指出的是，实际的样品及其分离过程均极其复杂。通常，不可能恰好所有的峰均一个接一个地按顺序从柱上洗脱下来，也不会使所有的峰按 4 倍的标准偏差去均分色谱图上的基线而获得最大的峰容量。但无论如何，上述讨论还是指出了提高或比较柱子峰容量的途径和方法，在实际工作中还是有意义的。

十、分离度

色谱过程的根本目的是将混合物分离成单一的化合物。分离效

能的评价, 可以采用分离度 (resolution) 或分辨率的概念。分离度 R 定义为两峰间距离的 2 倍与其底宽之和的商, 即

$$R = \frac{2 (V_{RB} - V_{RA})}{w_A + w_B} \quad (1-26)$$

若以保留时间计算则

$$R = \frac{2 (t_{RB} - t_{RA})}{w_A + w_B} \quad (1-27)$$

这是一个无量纲的参数, 它表明两个溶质峰彼此离得越远分离就越好, 且两个峰越尖锐、越窄则分离亦越好。

从上述讨论可知, 两个溶质分离效果的好坏, 既取决于峰间的距离, 又受制于峰的展宽程度, 因此, 它必然与热力学过程和动力学过程都有关系。按定义,

$$R = \frac{2 (V_{RB} - V_{RA})}{w_A + w_B} = \frac{2 (V_{RB} - V_{RA})}{4\sigma_A + 4\sigma_B}$$

令

$$\sigma_A = \sigma_B$$

则

$$R = \frac{1 (V_{RB} - V_{RA})}{4 \sigma_A}$$

因为

$$\sigma_A = \sqrt{n} (V_m + K_A V_s)$$

所以

$$\begin{aligned} R &= \frac{1}{4} \frac{[n (V_m + K_B V_s) - n (V_m + K_A V_s)]}{\sqrt{n} (V_m + K_A V_s)} \\ &= \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{V_m + K_B V_s}{V_m + K_A V_s} - 1 \right] \\ &= \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{V_{rB}}{V_{rA}} - 1 \right] \end{aligned}$$

由容量因子定义可知

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m}$$

则

$$k' V_m = V_r - V_m$$

即 $V_r = k' V_m + V_m = V_m (k' + 1)$

代入上式, $R = \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{V_m (k'_B + 1)}{V_m (k'_A + 1)} - 1 \right]$
 $= \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{k'_B + 1 - k'_A - 1}{k'_A + 1} \right] = \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{k'_B - k'_A}{k'_A + 1} \right]$

变换上式, 或以 k'_A 分别除以分子及分母, 则

$$R = \frac{\sqrt{n}}{4} \left[\frac{\left(\frac{k'_B}{k'_A} - 1 \right)}{\left(1 + \frac{1}{k'_A} \right)} \right]$$

因为 $\frac{k'_B}{k'_A} = \alpha$

所以 $R = \frac{\sqrt{n}}{4} (\alpha - 1) \left(\frac{k'_A}{k'_A + 1} \right)$ (1-28)

这一公式给出了分离度 R 与柱效率 n 、分离因子 α 以及容量因子 k' 等色谱基本参数的关系。当然还有一些其他的表达形式和约化形式, 但其涵义是一致的。从以上公式可以看出, 色谱柱的分辨率与柱效 (塔板数) 的平方根成正比。这意味着当柱长加长 1 倍时, 柱效并没有成倍地增加, 而仅得到 $\sqrt{2}$ 即 1.41 倍的分辨率。此时, 柱子的背压则达到了原来压力的近两倍。因此靠增加柱长来增加分辨率虽然有效但也有限。但是, 当改变柱子的种类或改变淋洗条件以提高 α 值时, 则更易达到提高分辨率、改善分离的目的。

如果我们所讨论的两个峰面积相等, 且其为高斯型峰, 则它在不同 R 时的峰形可以形象的表示于图 1-7 中。在图中, 当 R 为 0.6 时, 已可以明显地观察到两物质的分离, 此时, 若从两峰交叉的谷点将它们分别接收, 则它们均可以达到约 88% 的纯度。当 $R = 1.0$ 时, 两峰间的距离恰好等于各峰底宽的 4σ , 可得到 95% 的纯度。当达到 $R = 1.25$, 即 6σ 分离时则可达到 99.4% 的高纯度。需要指出的是, 在国内外绝大多数著作上均写明, 当两个色谱峰的分辨率为 1.0 时, 若将两峰从峰谷处垂直分割开来, 则各峰纯度为 98%。傅若农指出, 这一结论似乎并不正确。他检阅了大量文献, 发现已有作者

指出这一问题，但在多数著作上却仍沿用习惯的说法。他以概率积分法反复计算的结果亦表明， 4σ 时的分离程度确为 95%。

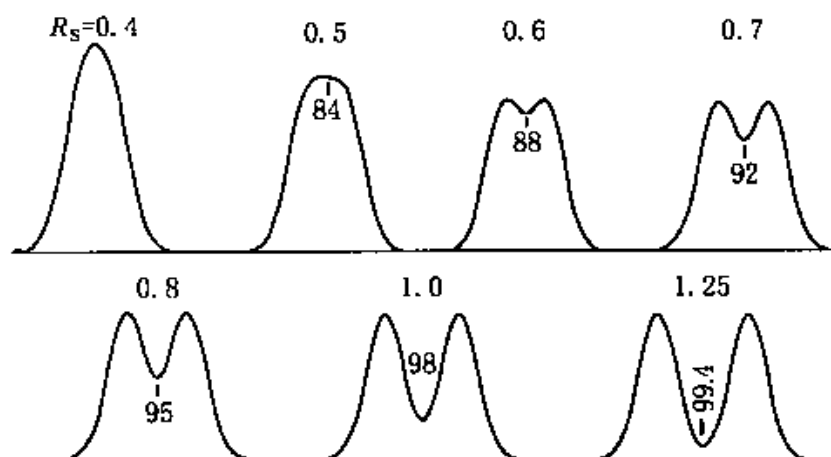


图 1-7 峰面积为 1:1 的标准分辨率曲线

第二节 色谱柱的速率理论

上一节中，我们简略地讨论了色谱柱的塔板理论。源于化工过程的塔板理论，可以形象而简便地解释和计算发生于色谱中溶质的分离过程。塔板理论所提出和建立起来的描述色谱分离过程的参数和概念，基本上已为大多数色谱工作者所接受。但是，严格地说，这一理论仍有根本性的弱点和不足。首先，在讨论塔板理论的概念时，引入了一个前提，即在每一个塔板中溶质在两相间的分配达到了平衡状态。实际上，这仅是一种理想状态，正如像 Giddings^[5]所指出的那样，只当谱峰处于最高点处，两相间才接近于平衡。因此，在实际运用塔板理论时便会带来偏离和误差。其次，塔板理论主要考虑的是溶质在色谱柱中的静态分配过程而没有涉及到动力学过程。它可以给出在给定色谱柱上针对给定溶质的理论塔板数，但却不能回答引起柱效变化的复杂的动力学因素以及谱带展宽发生的位置及特点。这方面的参数，如填料的形状与性质，柱系统的几何形状与参数，流动相的种类与流速等，均会影响到谱带的展宽与变化，且与色谱柱的实际操作和应用密切相关。Van Deemter 于 1956 年在前人工作的基础上归纳、总结并提出了描述色谱峰展宽的速率

理论^[6]，用于理解和控制峰展宽的各种参数和因素，以便进行柱子及其色谱条件的优化。在 Van Deemter 之后，有不少人对这一理论进行了补充与修正，使其更趋完善与合理，同时也证明了 Van Deemter 方程确实可以比较精确地描述和计算发生在色谱分离过程中的谱带展宽的原因及其相互关系。使其成为色谱技术中的一个最基本的理论支柱。这里，我们不拟对其进行详细的推导和讨论，仅对这一理论涉及的概念与公式，特别是与色谱柱技术关系密切的相关部分，做一简要的介绍。

一、影响谱带展宽的各种因素

一个溶质被注射进色谱仪以后，形成一个谱带，它像一个塞子状的液流，其形状应该是圆柱形的，如将其描述为色谱峰，其峰形应该呈矩形。随着色谱过程的进行，这一柱塞形的液流会因扩散或其他因素的影响而逐渐变形，至离开色谱柱而进入检测器时，它已成为了一个高斯型的峰了。在这峰上的任一点上，溶质的浓度服从正态分布。任何一个色谱过程，基本上都是谱带展宽的过程。影响谱带展宽的因素很多，大体上可分为色谱柱外和色谱柱内两大部分。

从前一节关于塔板理论的叙述中可知，谱带的展宽，可用方差来表征。根据统计学的定律，如果有几个独立的过程因素，它们都可能引起谱带的展宽，则其方差具有加和性，即

$$\sigma_k^2 = \sum_i \sigma_i^2$$

因此，发生在色谱柱上的总方差，是柱内与柱外方差之和

$$\sigma_k^2 = \sigma_E^2 + \sigma_I^2 \quad (1-29)$$

式中， σ_E^2 是柱外总方差， σ_I^2 是柱内总方差。

二、柱外谱带展宽效应

引起柱外效应的因素，大致有六种，即样品引起的方差 σ_S^2 、进样阀引起的方差 σ_V^2 、连接进样阀和柱子以及柱子和检测器的连接管引起的方差 σ_T^2 、柱头引起的方差 σ_F^2 、检测池形状和体积引起的方差 σ_D^2 和电子线路与传感器响应时间引起的方差 σ_R^2 。即柱外方差

$$\sigma_E^2 = \sigma_S^2 + \sigma_V^2 + \sigma_T^2 + \sigma_F^2 + \sigma_D^2 + \sigma_R^2 \quad (1-30)$$

以上六种柱外效应所引起的方差的大小是不同的。现代高效液相色谱仪和气相色谱仪的设计已日臻完善，对其各个部件都已尽可能地进行了优化。进样阀、接头、检测池等所引起的谱带展宽是有限的。例如，Scott 和 Simpson^[7]曾实际测定了一系列商品 HPLC 柱管接头的滤片，发现它们均不会带来太大的方差。此外，由于现代电子技术的发展，使得电子线路和传感器带来的方差亦显得微不足道。当然，也不能一概而论，如在实验室中自己组装高效液相色谱分离系统时，这些因素又必须均在考虑之列。总的来说，柱外效应中最主要的还是连接管引起的方差。因此，在实际工作中必须注意尽可能使用细而短的连接管，并让可能的柱外总体积降至最低。

从以上讨论可知，柱外效应是不可避免的，我们只能尽量降低而不能根本消除它们。那么，多大的柱外方差可以被允许呢？Klinkenberg^[4]建议，可允许的柱外方差为总方差的 10%，或标准偏差的 5%，即

$$\sigma_E^2 \leq 0.1 \sigma_C^2 \quad (1-31)$$

三、柱内谱带展宽效应

这里讨论的色谱柱，主要指的是填充型色谱柱。对开管柱（或空心柱），将单独进行讨论。一般认为，发生在填充柱内的谱带展宽效应主要有四种，即：多路径效应（multipath effect）、纵向扩散（longitudinal diffusion）、流动相中的传质阻力（the resistance to mass transfer in the mobile phase）以及固定相中的传质阻力（the resistance to mass transfer in the stationary phase）。不同作者在论述上述问题时，有可能采用不同的术语和分类方式，但基本内容是一致的。

在塔板理论的讨论中，我们一般采用理论塔板数这一参数。为了消除柱长的影响，也为了更直接的利用方差进行运算，在柱内谱带展宽的叙述中，我们更多地利用理论塔板高度这一概念进行论述，理论塔板高度实际上可以作为谱带宽度的一个表征指标。前面，我们已经定义了理论塔板高度为每一块理论塔板所占有的柱长，即

$$H = \frac{L}{N} \quad (1-32)$$

式中, H 为理论塔板高度, L 为柱长, N 为该柱的理论塔板数。

由于, $N = \left(\frac{V_R}{\sigma_R} \right)^2$, V_R 为给定溶质峰的保留体积, σ_R 为其标准偏差, 则

$$H = \frac{\sigma^2 L}{V_R^2}$$

由此式可知, 理论塔板高度与方差 σ^2 成正比。方差具有加和性, 所以理论塔板高度也具有加和性。此外, 我们也可以用诸项独立因素方差的加和, 来表征整个体系中各种因素对峰展宽的贡献。与柱外峰展宽效应相似, 柱内峰展宽可以表示为

$$H_{\text{内}} = H_M + H_L + H_{RM} + H_{RL} \quad (1-33)$$

这里 $H_{\text{内}}$ 是指柱内效应对色谱峰理论塔板高度所做的贡献或所占的份额。 H_M 是指多路径效应对理论塔板高度所贡献的份额; H_L 是指纵向扩散效应对理论塔板高度所贡献的份额; H_{RM} 是指流动相传质阻力对理论塔板高度所贡献的份额; H_{RL} 是指固定相传质阻力对理论塔板高度所贡献的份额。下边将逐一对它们进行简要的分析。

(一) 多路径效应

在填充色谱柱中, 粒状的填料之间的间隙, 即是流动相流通的通路。填料粒径、形状以及填充柱床紧密程度的不均一性, 都会使填充柱产生多路径效应。

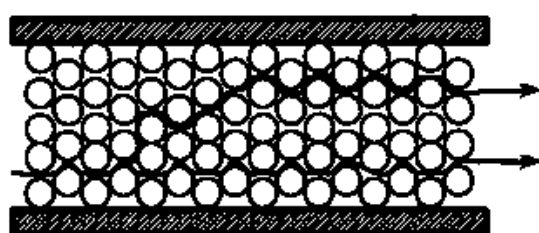


图 1-8 多路径效应示意图

这可以用相同的溶质分子在流过柱床内不同通路时通过的路径的长短来解释, 也可以理解为携带溶质的流动相与填料颗粒碰撞时产生涡流而带来的影响 (图 1-8)。基于这种考虑, 也有人把多路径效应称为涡流效应。多路径效应对理论塔板高度的贡献为

$$H_M = 2\lambda d_p \quad (1-34)$$

式中, λ 为表征粒子不均一性的常数项, 通常接近于 1。它与粒径分布有关, 粒径分布越窄, 即分布均匀, 则 λ 值越小, 反之则 λ 值越大。 d_p 为粒子直径。

为减少多路径效应对理论塔板高度的影响, 应尽可能减少 λ 和 d_p 。使用粒度均匀, 甚至粒径单分散的填料, 可以有效地降低 λ 值。此外, 使用细粒径的填料当然也是一条途径。但是, 粒径的降低也有一定的限度。首先小粒径的填料会使操作压力急剧提高, 而过高的压力会造成设备制造和操作上的困难。因此现代高效液相色谱柱一般使用 $5\mu\text{m}$ 或 $3\mu\text{m}$ 的填料。对一般的分离和分析来讲, 它们已足敷应用。

(二) 纵向扩散

将一定浓度的溶质注入色谱柱后, 溶质便会因浓度梯度而向周围的流动相内扩散。如果在进样口处的谱带是柱塞形, 扩散的结果是在流动相运动的方向, 即纵向产生扩散, 造成谱带的展宽, 形成高斯型的浓度分布 (图 1-9)。

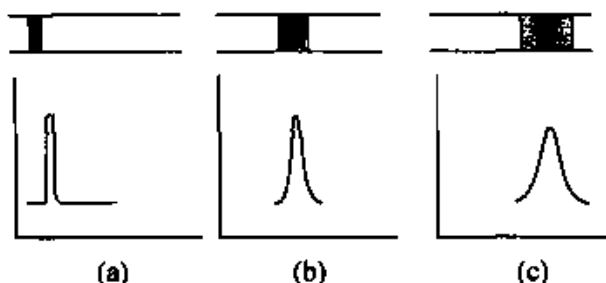


图 1-9 纵向扩散导致的峰 (谱带) 展宽示意图

(a) 柱头, 进样初; (b) 柱中间; (c) 柱尾

这种扩散是因分子的无规热运动所引起的, 所以又称为分子扩散, 服从爱因斯坦扩散方程, 其方差可用下式来计算:

$$\sigma^2 = 2D_m t$$

式中, D_m 为溶质在流动相或固定相中的扩散系

数, t 为溶质在流动相或固定相中停留的时间。由 $ut = l$, $t = \frac{l}{u}$, 所以, 纵向扩散 H_L 在总理论塔板高度中的贡献为

$$H_L = H_{L(m)} + H_{L(s)} \quad (1-35)$$

式中, $H_{L(m)}$ 表示流动相中的扩散项, 而 $H_{L(s)}$ 为固定相中的扩散项。这两相中的扩散过程类似但时间不同。对固定相中的扩散而言, 其停留时间为 $\frac{k'}{u}$, 此外考虑到填料的不均一性对扩散的影响,

Van Deemter 引入了一个系数 γ ，即填料因子（又称为曲折因子、曲折系数或阻碍因子）。对于填充柱，通常 $\gamma < 1$ ，对于开管毛细管柱，则 $\gamma = 1$ 。此时， H_L 可表示为

$$\begin{aligned} H_L &= \frac{2\gamma_1 D_m}{u} + \frac{2\gamma_2 k' D_s}{u} = \frac{2\gamma_1 D_m}{u} \left(1 + \frac{\gamma_2 D_s}{\gamma_1 D_m} k' \right) \\ &= \frac{2\gamma_1 D_m}{u} (1 + \xi k') \end{aligned} \quad (1-36)$$

式中 $\xi = \frac{\gamma_2 D_s}{\gamma_1 D_m}$

上式中， D_m 表示溶质在流动相中的扩散系数， D_s 为在固定相中的扩散系数。这是表示纵向扩散导致的谱带展宽的基本公式。从公式可知，它正比于扩散系数而反比于流动相的线速度。通常，溶质在气相中的扩散系数远大于在液相中的扩散系数， $D_m \approx (10^4 \sim 10^5) D_s$ 。所以纵向扩散对气相色谱来说是非常重要的因素，而在液相色谱，特别是高效液相色谱中，则并不十分重要。只要流速较高，便可将 H_L 在总理论塔板高度中的份额降至 1%，甚至更小。此外，选择细颗粒小且粒径分布均匀的填料，再经良好的充填，便可进一步降低 γ 值而使 H_L 进一步减小。此外，在填充柱中，由于填料粒子以及粒子上多孔性的影响，扩散是不自由的。在填充柱床上的扩散已几乎与 k' 无关。

(三) 流动相中的传质阻力

在色谱过程中，随着流动相的行进，所携带的溶质谱带亦一同前行。一方面，溶质在流动相和固定相之间不断地进行着传质过程；同时，受流动相流型的影响，其浓度分布，即谱带也会发生变化，产生谱带增宽效应。通常，这种展宽效应与流动相的流速、流型以及溶质在流动相中的扩散速度都有关系。在管状色谱柱中，靠近管壁的流动相因管壁的附加阻力而使流速减慢，位于管中心部位的流动相流速最大，形成抛物面型的速度梯度，因此流动相所携带的溶质，亦会因这种速度梯度而产生谱带的加宽。

色谱柱中的流动相，有的存在于固定相或填料的颗粒之间，当

使用多孔性固定相或填料时，还有一部分流动相进入到固定相或填料的孔中，形成所谓“停滞流动相”，这种停滞流动相不随流动相的流动而流动，它们处于相对静止的状态。流动相中的溶质，必须先进入停滞流动相，才能进而进入固定相中，实现在流动相与固定相之间的传质，同时也带来附加的谱带展宽。综合上述流动相的阻力造成的谱带展宽为

$$\sigma_{RM} = \frac{f_1 (ck') d_p^2}{D_m} u \quad (1-37)$$

式中， f_1 为常数， k' 为溶质的容量因子， d_p 为固定相或填料直径， D_m 为溶质在流动相中的扩散系数， u 为流动相的线速度。从上式可知，减小流动相的线速度和粒径，可以降低因流动相的传质阻力而造成的峰展宽。此外处于柱子截面上不同位置的溶质分子的速度是不一致的，而径向扩散有利于抵消这种不一致性。这就意味着扩散系数大时，谱带展宽降低，表现在公式中， σ_{RM} 与 D_m 呈反比关系。

(四) 固定相中的传质阻力

溶质分子在固定相中的传质阻力，在谱带展宽中占有重要的地位。溶质分子必须越过流动相与固定相的界面，才能进入或离开固定相。在固定相中停留的时间和路径的长短，会影响谱带展宽的程度，它可以表示为

$$\sigma_{Rs} = \frac{f_2 (k') d_f^2}{D_s} u \quad (1-38)$$

式中， d_f 为固定相或固定液膜的厚度， D_s 为溶质在固定相中的扩散系数。从上式可知，固定相的传质阻力所引起的谱带展宽，从形式上看与流动相传质阻力的情况相类似。流动相的线速度越大，固定液或固定相层越厚，展宽亦越大；但它可随溶质在固定中扩散系数的加大而降低。这提示我们细的固定相颗粒或薄的固定液层，有利于传质而获得更高的分离效率。

四、Van Deemter 方程

在总结归纳了上述各种引起峰展宽的效应的基础上，Van

Deemter^[8]于1956年提出了填充气相色谱柱内总理论塔板高度的方程, 即

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{f_2(k')}{D_s} \frac{d_f^2}{u} \quad (1-39)$$

式中各项参数的含义已如前述, 且 $f_2 = \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2}$ (1-40)

在推导这一公式时, 他认为在气相色谱中, 流动相的传质阻力可以忽略不计。但在实际的液相色谱过程中, 这是必须考虑的。Purnell^[9]于1960年推导出了较完整的流动相阻力项的表达式, 从而使得 Van Deemter 方程有了更完整的表达形式

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} (1 + \xi k') + \frac{f_1(k')}{D_m} \frac{d_p^2}{u} + \frac{f_2(k')}{D_s} \frac{d_f^2}{u} \quad (1-41)$$

式中, $f_1 = \frac{1 + 6k' + 11k'^2}{24(1+k')^2}$ (1-42)

或以简式表达为

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1-43)$$

式中, $A = 2\lambda d_p$,

$$B = 2\lambda D_m (1 + \xi k'),$$

$$C = \frac{(1 + 6k' + 11k'^2)}{24(1+k')^2} \frac{d_p^2}{D_m} + \frac{8k'd_f^2}{\pi^2(1+k')^2 D_s}$$

根据这一表达式, 可以比较精确地预测给定的色谱柱在优化的流动相速度下的柱效率, 以及各种因素对总理论塔板高度的影响。这对于色谱柱的优化设计是十分重要的。

Van Deemter 方程是一个双曲线函数, 即理论塔板高度 H 是流动相线速度 u 的函数。双曲线函数是有极值的, 也就是说, 应该有一个最佳的流速, 此时可获得最高的柱效。图 1-10 给出了一个典型的 $H-u$ 曲线。

从图上可以清楚地看出, 在线速度约 0.07 cm/s (相当于 2.67 ml/min) 处, 有一个最小理论塔板高度, 即该柱此时具有最高的柱效。

实际上, 上述图 1-10 所显示的是一组实验结果, 从上述结果可以计算出 Van Deemter 方程中的各个参数的数值。

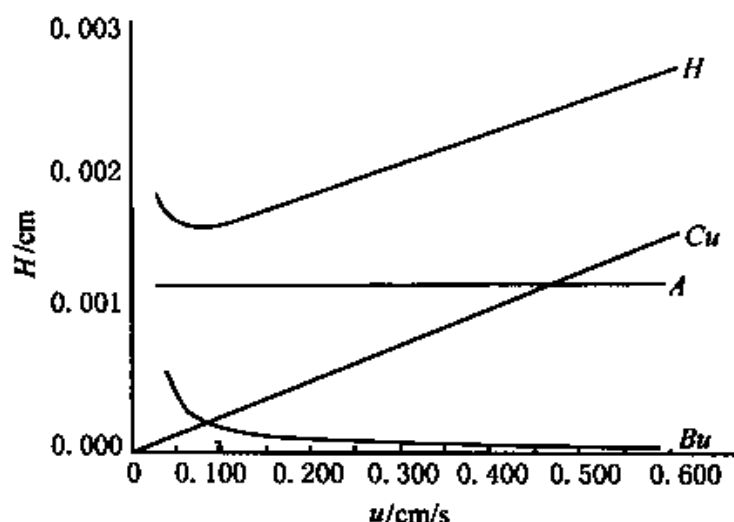


图 1-10 理论塔板高度-线速度曲线

色谱柱: Partisil 硅胶, $8.5\mu\text{m}$ 直径, $\phi 9 \times 250$ 不锈钢柱

流动相: 48g/L , 乙酸乙酯/正己烷

从 $H-u$ 曲线可以清楚地看出, 填充柱填料的粒径, 极大地影响着柱子的柱效, 粒径越小柱效越高。从 Van Deemter 方程经计算可以得知, 优化的流动相的线速度 (u_{opt}) 可近似的表示为

$$u_{\text{opt}} = \frac{1.62 D_m}{d_p} \quad (1-44)$$

而此时的最佳理论塔板高度则为 $H_{\min} = 2.48 d_p$ (1-45)

这一关系, 不依溶质、流动相以及固定相而改变, 具有一定程度上的通用性。依照这一关系式, 可以方便地估算出不同粒径填料填充的柱子在优化的条件下所能得到的最小理论塔板高度。

例如, 对于直径 $5\mu\text{m}$ 的填料, 大约可获得每米 8 万理论塔板的柱效; 如使用 $3\mu\text{m}$ 的填料, 则可达到每米 13 万理论塔板。这与性能优良的商品色谱柱的实测性能是一致的。

五、Van Deemter 方程的修正与发展

Van Deemter 方程比较满意地描述和解释了发生于色谱过程中的谱带展宽过程。但是, 在实际应用中发现有时实验值偏离公式。

于是,许多学者继续对其进行了广泛而深入的研究,并提出了一些修正的 Van Deemter 方程。其中,比较重要的有 Giddings 方程(1961 年),Huber 方程(1967 年)和 Golay 方程(1958 年)。

(一) Giddings 方程^[5]

考虑到流动相的线速度不仅影响多路径效应,同时也影响到流动相对传质的阻力。Gidings 提出需要将这两种影响加以综合考虑。当流动相通过填充柱床时,流动相在填料颗粒间曲折地流动。这种流动,会引起一种微湍流,这种微湍流有可能大大地加快粒子之间溶质的快速迁移,当流动相线速度提高时,粒子间的传质阻力会降低;而流动相速度较低时,这种阻力便会加大,一种极限情况是,当速度趋近 0 时,范第姆特方程中的 A 项,即多路径效应项变更趋于 0 了。Gidings 提出的修正方程是

$$H = \frac{A}{1 + \frac{E}{u}} + \frac{B}{u} + Cu \quad (1-46)$$

与原来的范氏方程不同的是,这里引入了一个展宽常数 E ,可以看出,当线速度 $u \gg E$ 时,则 $E/u \rightarrow 0$,此时即是原来的范氏方程。而当 $u \ll E$ 时,则 $E/u \rightarrow \infty$,则 $A \rightarrow 0$,即因流速的急速降低,多路径的影响已可忽略不计了。

(二) Huber 方程^[10]

Huber 方程更细致地讨论了固定相颗粒之间的流动相对传质的阻力,Huber 认为有一种“湍流混合”作用,导致随着流动相速度的增加,多路径效应项和径向扩散项会趋向于常数。不过,在实际的液相色谱过程中,速度并不会很大,且这两项总的来说并不高。若以公式表达,Huber 方程可表达为

$$H = \frac{A}{1 + \frac{E}{u^{1/2}}} + \frac{B}{u} + Cu + Du^{1/2} \quad (1-47)$$

(三) Horvath-Lin 方程^[11]

与 Huber 方程类似,Norvath-Lin 方程中也着眼于解释当流速

接近 0 时 A 项应为 0 的问题。在此方程中，假设了溶质在通过颗粒的间隙时会产生的一种湍流，它会产生附加的传质阻力，于是

$$H = \frac{A}{1 + \frac{E}{u^{1/3}}} + \frac{B}{u} + Cu + Du^{3/2} \quad (1-48)$$

(四) Knox 方程^[12]

许多研究者在探讨影响理论塔板高度的各种因素时，都主要注意到了填料粒径的问题。在 20 世纪 70 年代初期，Knox 和他的同事曾对此进行了细致的研究。在讨论这一问题时，他们使用了由 Giddings 建议的折合塔板高度 (Reduced Plate Height) 和折合速度 (Reduced Velocity) 的概念。

Giddings 所建议的折合塔板高度， $h = \frac{H}{d_p}$ 即相当于单位路径上的理论塔板高度。由于理论塔板高度 H 和粒径 d_p 具有相同的单位，所以， h 是一个无量纲参数；同样，折合速度， $\nu = \frac{u d_p}{D_m}$ 即折合速度为以粒间扩散速度为单位的流动相的速度。同样，它也是一个无量纲参数，式中， D_m 为溶质在流动相中的扩散速度。

Knox 利用上述折合塔板高度和折合速度，建立了类似于 Van Deemter 方程的公式

$$h = A\nu^{1/2} + \frac{B}{\nu} + C\nu \quad (1-49)$$

如果将 h 对 ν 作图，则可以得到类似于 $H-u$ 的曲线，它可有一个最小值，和最佳折合流速 (图 1-11) 在图上有两条相似，但却不同的 $H-u$ 曲线。一条表示填充得比较好的柱子，另一条代表填充得较差的柱子。对于填充较好的柱子，最佳 H 大约在 $2d_p$ ，即塔板高度等于约 2 倍的粒径；而优化的折合速度则约为 3~5，即 $\lg \nu$ 约等于 0.3。利用 Knox 公式可以简便而有效地去评价一根填充柱的质量，但却难以利用它去设计一根质量优良的柱子。因为，式中 A 、 B 、 C 等参数系半经验地得到的，并没有进行严格的理论解析与推导。

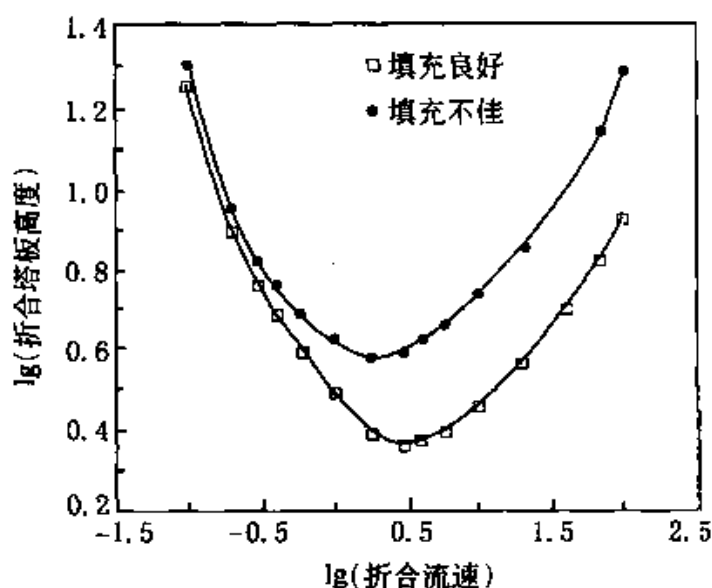


图 1-11 折合流速与折合塔板高度关系图

(五) 描述开管柱的 Golay 方程^[11]

前面介绍的几种 Van Deemter 方程，均主要是讨论填充柱的，但在气相色谱中，毛细管柱已经使用得非常广泛；在高效液相色谱中，由于痕量分析，液-质联用以及电色谱的发展，开管柱始终是一个令人感兴趣的话题。因此对开管毛细管柱的解析就显得十分必要。Golay 为描述开管气相色谱柱中的谱带展宽效应，提出了 Golay 方程，这一方程同样也适用于开管影响色谱柱。

在开管柱中没有填料，因此，就没有多路径效应，也没有与多路径效应相关的其他效应。因此，理论塔板高度只与径向扩散和传质阻力有关。此时，

$$H = \frac{2D_m}{u} + \frac{(1+6k' + 11k'^2)}{24(1+k')^2 D_m} \frac{r^2}{u} + \frac{k'^3 r^2}{6(1+k')^2 K^2 D_s} u \quad (1-50)$$

式中各参数及系数的意义已如前述，这里不再重复。若以不保留的物质的峰为例，因其 $k' = 0$ ，则

$$H = \frac{2D_m}{u} + \frac{r^2}{24D_m} u \quad (1-51)$$

从这一公式可以看出, 此时, 影响理论塔板高度的最大因素, 实际上是毛细管的半径 r , 随着 r 的增加, 理论塔板高度迅速加大, 分离效率急剧降低。按照类似于 Van Deemter 方程的简单的形式, 可以将上式写成

$$H = \frac{B}{u} + Cu \quad (1-52)$$

这一曲线也有一个最小值, 在此优化值下, 有一个最优化的流动相线速度 μ_{opt} , 将上述简式取微分, 即

$$\frac{dH}{Du} = -\frac{B}{u^2} + C$$

在曲线的极小值时, $\frac{dH}{Du} = 0$, 因此,

$$-\frac{B}{u^2} + C = 0, \quad u^2 = \frac{B}{C}, \quad u = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

将 μ 的优化值代入 Golay 简式中去, 则可得出

$$H_{\text{小}} = 2\sqrt{BC}$$

由前边叙述可知, B 和 C 的表达式为

$$B = \frac{2D_m}{u}; \quad C = \left[\frac{(1+6k' + 11k'^2)}{24(1+k')^2 D_m} r^2 + \frac{k'^3 r^2}{6(1+k')^2 K^2 D_s} \right]$$

可见, 无论是最小理论塔板高度, 还是优化的流动相的线速度, 均与毛细管的半径及流动相与溶质的热力学参数密切相关。

一般参考文献

- G1 Scott R P W. Liquid Chromatography Column Theory, John Wiley & Sons: New York, 1992
- G2 斯奈德 L R, 柯克兰 J J, 现代液相色谱法导论, 高潮等译, 北京: 化学工业出版社, 1988.
- G3 王俊德等. 高效液相色谱法. 北京: 中国石化出版社, 1992
- G4 朱彭龄等. 现代液相色谱. 兰州: 兰州大学出版社, 1989

参考文献

- 1 Martin A J P, Synge R L. J. Biochem. 1941, 35: 1358

- 2 Alhedai A , Martair D E , Scott R P W . Analyst. 1988 , 114: 869
- 3 高玉书. 高分子分离科学. 成都: 四川教育出版社, 1987. 70
- 4 Klinkenberg A . Gas Chromatography 1960. London: Butterworths Scientific Publications, 1960. 194
- 5 Giddings J C . J. Chromatogr. 1961 , 5: 46
- 6 Van Deemter J J , Zuiderweg F J , Klinkenberg A . Chem. Eng. Sci. 1956 , 5: 271
- 7 Scott R P W , Simpson C F . J. Chromatogr. Sci. 1982 , 20: 62
- 8 Van Deemter J J , Zuiderweg F J , Klinkenbeerg A . Chem. Eng. Sci. 1956 , 5: 271
- 9 Purnell J H , Quinn , C P . Gas Chromatography 1960
London: Butterworths Scientific Publications, 1960 . 184
- 10 Huber J F K , Hulsman J A R J . Anal. Chim. Acta. 1967 , 38: 305
- 11 Golay , M J E . Gas Chromatography 1958 .
London: Butterworths Scientific Publications, 1958 . 36
- 12 Kennedy G J , Knox J H . J. Chromatogr. Sci. 1972 , 10: 606

第二章 气相色谱柱

第一节 气相色谱柱的类型

气相色谱法 (gas chromatography, 简称 GC) 亦称气体色谱法, 气相层析法。其核心即为色谱柱。

气相色谱柱有多种类型, 可按色谱柱的材料、形状、柱内径的大小和长度、固定液的化学性能等进行分类。色谱柱使用的材料通常有玻璃、石英玻璃、不锈钢和聚四氟乙烯等, 根据所使用的材质分别称之为玻璃柱、石英玻璃柱、不锈钢柱和聚四氟乙烯管柱等。在毛细管色谱中目前普遍使用的是玻璃柱和石英玻璃柱, 后者应用范围最广。对于填充柱色谱, 大多数情况下使用不锈钢柱, 其形状有 U 型和螺旋型, 使用 U 型柱时柱效较高。按照色谱柱内径的大小和长度, 又可分为填充柱和毛细管柱。前者的内径在 2~4mm, 长度为 1~10m 左右; 后者内径在 0.2~0.5mm, 长度一般在 25~100m。在满足分离度的情况下, 为提高分离速度, 现在也有人使用高柱效、薄液膜的 10m 短柱。

根据固定液的化学性能, 色谱柱可分为非极性、极性与手性色谱分离柱等。固定液种类繁多, 极性各不相同。色谱柱对混合样品的分离能力, 往往取决于固定液的极性。常用的固定液有烃类、聚硅氧烷类、醇类、醚类、酯类以及腈和腈醚类等。新近发展的手性色谱柱使用的是手性固定液, 主要有手性氨基酸衍生物、手性金属络合物、冠醚、杯芳烃和环糊精衍生物等。其中以环糊精及其衍生物为色谱固定液的手性色谱柱, 用于分离各种对映体十分有效, 是近年来发展极为迅速且应用前景相当广阔的一种手性色谱柱。

在进行气相色谱分析时，色谱柱的选择是至关重要的。不仅要考虑被测组分的性质，实验条件（例如柱温、柱压的高低），还应注意和检测器的性能相匹配。有关内容我们将在以后章节中详细讨论。

第二节 填充气相色谱柱

填充气相色谱柱通常简称填充柱，在实际分析工作中的应用非常普遍。据资料统计，日常色谱分析工作大约有 80% 是采用填充柱完成的。填充柱在分离效能和分析速度方面比毛细管柱差，但填充柱的制备方法比较简单，定量分析的准确度较高，特别是在某些分析领域（例如气体分析、痕量水分析）具有独特用途。从发展上看，虽然毛细管柱有逐步取代填充柱的趋势（例如已有一些日常分析使用 PLOT 柱代替过去常用的气-固色谱填充柱），但至少在目前一段时期内，填充柱在日常分析中仍是一种十分有价值的分析分离手段。

填充柱主要有气固色谱柱和气液色谱填充柱两种类型。在色谱柱中关键的部分是固定相。在本节我们将首先介绍柱管的选择及其处理方法，然后再分别重点讨论气-固色谱柱和气液色谱填充柱有关固定相的内容。

一、填充柱柱管的选择与处理

用作填充色谱柱柱管的材料通常有不锈钢管、铜管、铝管、铜镀镍管、玻璃管以及聚四氟乙烯管等^[1~5]。铜管和铝管由于催化活性太强且易变形已不太常用。分析用的填充柱内径一般采用 2~4mm，制备用的柱内径可大些，一般使用 5~10mm。长度可选择 1~5m。柱子的形状可以是螺旋形的，也可以是 U 型的。使用后者较易获得较高的柱效。如果使用螺旋形的，应注意柱圈径的大小对柱效会有一定的影响^[3~6]，一般柱圈径应比柱内径大 15 倍。

柱材料的选择应依据待分析的样品性质和实验条件而定。如果

待分析的样品易分解或具有腐蚀性，应考虑使用玻璃管或聚四氟乙烯管。玻璃管柱的优点是化学惰性好，制备的柱子柱效高，便于观察柱子的填充情况，但玻璃管易碎是其缺点。聚四氟乙烯管的优点是耐腐蚀，缺点是不耐高温高压。在填充柱中目前最常使用的是不锈钢管。它的最大优点是不破碎，传热性能好，柱寿命长，能满足常见样品分析的要求。缺点是内壁较粗糙，有活性，比较难于清洗干净。

填充柱的柱管在使用前应该经过清洗处理和试漏检查。清洗的方法与柱管材料有关。对于不锈钢管，通常先用 10% 热氢氧化钠水溶液浸泡，抽洗除去管内壁的油污，然后用自来水洗至中性。如果用 1:20 的稀盐酸水溶液重复处理一次，则可显著降低柱内壁的吸附作用。玻璃柱的清洗可参照上面所述的方法，不同的是通常使用洗液浸泡。同样，为了减少玻璃内壁的活性，可以用 5% 二甲基二氯硅烷的甲苯溶液浸泡处理，然后用甲苯和甲醇分别冲洗干净。柱子的检漏方法比较简单：可将柱子泡在水里，堵死柱的一端，在另一端通气，若无气泡冒出即说明柱子无泄漏现象。

二、气固色谱填充柱

我们知道，色谱分离的基本原理是试样组分通过色谱柱时与填料之间发生相互作用，这种相互作用大小的差异使各组分互相分离而按先后次序从色谱柱流出。我们把色谱柱内不移动、起分离作用的填料称为固定相。气固色谱填充柱常采用固体物质作固定相。这些固体固定相包括具有吸附活性的无机吸附剂、高分子多孔微球和表面被化学键合的固体物质等。

（一）无机吸附剂

这一类吸附剂包括具有强极性的硅胶、中等极性的氧化铝、非极性的碳素及有特殊吸附作用的分子筛。它们大多数能在高温下使用，吸附容量大，热稳定性好，是分析永久性气体及气态烃类混合物理想的固定相。但使用时应该注意：①吸附剂的吸附性能与其制备、活化条件有密切关系。不同来源的同种产品或者同一来源的不同批产品，其吸附性能可能存在较大的差异；②一般具有催化活

性，不宜在高温和存在活性组分的情况下使用；③吸附等温线通常是非线性的，进样量较大时易出现色谱峰形不对称。

(1) 硅胶

硅胶是一种氢键型的强极性固体吸附剂，其化学组成为 $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 。品种有细孔硅胶、粗孔硅胶和多孔硅球等。气相色谱使用较多的是粗孔硅胶，其孔径为 $80 \sim 100\text{nm}$ ，比表面积近 $300\text{m}^2/\text{g}$ ，可用于分析 N_2O 、 SO_2 、 H_2S 、 SF_6 、 CF_2Cl_2 以及 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ 烷烃等物质。硅胶的分离能力主要取决于孔径大小和含水量。用前通常需要经过处理。方法：对市售的色谱专用硅胶，可在 200°C 下活化处理 2h 后使用；如果使用市售的非色谱专用硅胶，则先将硅胶用 6mol/L 盐酸浸泡 2h，然后用水冲洗至无 Cl^- 。晾干后置于马弗炉内，在 $200 \sim 500^\circ\text{C}$ 温度下灼烧活化 2h 后降温取出，贮存于干燥器中备用。

(2) 氧化铝

氧化铝有五种不同的晶型，气相色谱常用的主要是 γ 型，具有中等级性，主要用于分析 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ 烃类及其异构体，在低温下也能用于分离氢的同位素。氧化铝具有很好的热稳定性和机械强度，但其活性随含水量有较大的变化^[7]。故使用前通常需对其进行活化处理（在 $450 \sim 1350^\circ\text{C}$ 灼烧 2h）。为保持使用过程中含水量稳定，可将载气先通过含结晶水的硫酸钠（或硫酸铜）后再进入色谱柱。经过氢氧化钠处理改性的氧化铝，能在 $320 \sim 380^\circ\text{C}$ 柱温下分析 C_{36} 以下的碳氢化合物，峰形很好。

(3) 碳素

碳素是一类非极性的固体吸附剂，主要有活性炭、石墨化炭黑和碳分子筛等品种。活性炭是无定形碳，具有微孔结构，比表面积大（ $800 \sim 1000\text{m}^2/\text{g}$ ），可用于分析永久性气体和低沸点烃类。若涂少量固定液，可用来分析空气、一氧化碳、甲烷、二氧化碳、乙炔、乙烯等混合物。石墨化炭黑是炭黑在惰性气体保护下经高温（ $2500 \sim 3000^\circ\text{C}$ ）煅烧而成的石墨状细晶，特别适用于分离空间和结构异构体，也可用于分析硫化氢、二氧化硫、低级醇类、短链脂肪酸、酚、胺类。上述两种碳素固定相用前都需进行活化处理。方

法是用等体积的苯（或甲苯、二甲苯）冲洗 2~3 次，然后在 350℃ 通水蒸气洗涤至无浑浊，最后在 180℃ 活化 2h 即可使用。

碳分子筛又称为炭多孔小球，是聚偏二氯乙烯小球经高温热解处理后的残留物，比表面积 $800 \sim 1000 \text{ m}^2/\text{g}$ ，孔径约 $1.5 \sim 2 \text{ nm}$ ，主要用于稀有气体、空气、二氧化碳、氧化亚氮、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ 烷类分析。多孔炭黑国内外都有商品出售，如由中国科学院化学研究所研制、天津化学试剂二厂生产的 TDX-01 和 TDX-02，国外产品 Carbon Sieve B 等即属于此类。使用前通常在 180℃ 通氮气活化 3~4h，降温后存于干燥器内备用。

(4) 分子筛

分子筛是一类人工合成的硅铝酸盐，其基本化学组成为 $\text{MO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ ，其中 M 代表 Na^+ 、 K^+ 、 Li^+ 或 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 等金属阳离子。分子筛具有均匀分布的孔穴，其大小取决于 M 金属离子的半径和其在硅铝构架上的位置。一般认为，分子筛的性能主要取决于孔径的大小和表面特性。当试样分子经过分子筛时，比孔径小的分子可进入孔内，比孔径大的分子则被排除于孔外。气相色谱分析中应用的分子筛通常有 4A、5A 和 13X 等三种类型。前面的数字表示分子筛的平均孔径，例如 4A 指的是该分子筛的平均孔径为 0.4 nm (10^{-8} cm)。A、X 表示类型，其化学组成稍有差异。A 型中 Al_2O_3 与 SiO_2 的比例为 1:2，而 X 型的硅铝比则高一些。分子筛的表面积很大，内表面积通常有 $700 \sim 800 \text{ m}^2/\text{g}$ ，外表面积为 $1 \sim 3 \text{ m}^2/\text{g}$ 。在气相色谱中主要用于分离 H_2 、 O_2 、 N_2 、 CO 、 CH_4 以及低温下分析惰性气体等。

分子筛极易因吸水而失去活性。因此，用前应在 $550 \sim 600^\circ\text{C}$ 或在减压条件下于 350°C 活化 2h，降温后贮存于干燥器内。使用过程中要对载气进行干燥处理，样品中如果存在水分也应设法除去。此外，使用时还应注意，某些物质如氨、甲酸、二氧化碳等会被分子筛不可逆吸附。分子筛是否失效通常可从氮、氧的分离情况来判断。失活后的分子筛可以采用上述方法重新活化使用。常见的分子筛及其性能见表 2-1。

表 2-1 常用分子筛及其性能^[1~3,7]

分子筛	化学组成	比表面 (m^2/g)	孔径 /nm	最高使用温度 /°C	可吸附的物质	产地及国外相似品牌
4A	$\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	~8000	0.48	4000	He、Ne、Ar、Kr、Xe、 H ₂ 、O ₂ 、N ₂ 、CH ₄ 、CO、 CO ₂ 、H ₂ O、NH ₃ 、H ₂ S、 CS ₂ 、N ₂ O ₂ 、C ₂ H ₄ 、 C ₂ H ₂ 、CH ₃ OH、CH ₂ Cl、 CH ₃ Br、CH ₃ CN	大连红光厂 上海试剂厂 美国 Davison 4A 美国 Linde 4A 俄国 Zeolit NaA 法国 Siliporite K-1
5A	$0.7\text{CaO} \cdot 0.3\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	750~800	0.55	400	C ₃ H ₈ 、C ₄ 以上正构烷 烯 烃 C ₂ H ₅ Cl、C ₂ H ₅ OH、 C ₂ H ₅ NH ₂ 、CH ₂ Cl ₂ 及 4A 分子筛可吸附者	大连红光厂 上海试剂厂 美国 Davison 美国 Linde 5A 俄国 Zeolit CaA 法国 Siliporite K-20
13X	$\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2.5\text{SiO}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1030	1.0	400	异构烷烯烃、异构醇 类、苯类环烷类及 5A 分 子筛可吸附者	大连红光厂 上海试剂厂 美国 Davison 10A 美国 Linde 13X 俄国 Zeolit NaX

(二) 高分子多孔小球

高分子多孔小球 (GDX) 是以苯乙烯等为单体与交联剂二乙烯苯交联共聚的小球。这种聚合物在有些方面具有类似吸附剂的性能,而在另外一些方面又显示出固定液的性能^[8]。因此,它本身既可以作为吸附剂在气固色谱中直接使用,也可以作为载体涂上固定液后用于分离。在烷烃、芳烃、卤代烷、醇、酮、醛、醚、脂、酸、胺、腈以及各种气体的气相色谱分析中已得到广泛应用。其优点主要有:(1) 吸附活性低。无论对非极性物质还是极性物质,使用这种固定相通常都可以获得对称色谱峰;(2) 对含羟基的化合物具有相对低的亲和力。羟基作用力越强,亲和力越弱。在非极性固定相上出峰次序基本上按分子量大小分离,故特别适合有机物中微量水的快速测定;(3) 可选择范围大。不仅可以依据样品性质选

择合适的孔径大小和表面性质的产品直接使用,还可以涂上固定液,使亲油性化合物的保留时间缩短,极性组分的保留时间适当延长,从而增加色谱柱的选择性。此外,高分子小球在高温时不流失,机械强度好,圆球均匀,较易获得重现性好的填充柱。由中国科学院化学研究所研制、天津化学试剂二厂生产的 GDX-系列高分子小球产品即属于此类。

在交联共聚过程中,使用不同的单体或不同的共聚条件,可获得不同分离效能、不同极性的产品。从化学性质上可将它们分为极性和非极性两种。为方便读者选用,表 2-2 简要列出国内外一些重要的高分子多孔小球产品及其性能。详细情况也可参考有关手册^[7]。

高分子多孔微球有一个缺点是小球经常带有“静电”,易贴附于仪器和器皿上而难以清理,通常可用润湿过丙酮的纱布擦拭来消除。

表 2-2 一些重要高分子多孔小球产品及其性能^[3,7,9]

名 称	组 成	颜色	堆密度 /(g/ml)	比表面 /(m ² /g)	极性	最高使用 温度/℃	主要分析用途	生产厂
GDX-101	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.28	330	非极 性	270	烷烃、芳烃、卤 代 烷、醇、酮、 醛、醚、脂、酸、 胺、腈及各种气体	天 津 化 学 试 剂 二 厂
GDX-102	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.20	680	非极 性	270	高沸点物质	
GDX-103	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.18	670	非极 性	270	高沸点物质,还 可分离正丙醇-叔 丁醇	
GDX-104	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	半透 明	0.22	590	非极 性	270	气体分析	
GDX-105	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	透明	0.44	610	非极 性	270	微量水及气体分 析	

续表

名 称	组 成	颜色	堆密度 /(g/ml)	比表面 /(m ² /g)	极性	最高使用 温度/℃	主要分析用途	生产厂
GDX-201	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.21	510	非极 性	270	较高沸点化合物	天津化学 试剂二厂
GDX-202	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.18	480	非极 性	270	较高沸点化合 物, 还可分离正丙 醇/叔丁醇体系	
GDX-203	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.09	800	非极 性	270	较高沸点化合 物, 还可分离乙酸 /苯/乙酐体系	
GDX-301	二乙烯苯、 三氯乙烯共 聚物	白	0.24	460	弱极 性	250	乙炔/氯化氢	
GDX-401	二乙烯苯含 氮杂环单体共 聚物	乳白	0.21	370	中等	250	乙炔/氯化氢/ 水, 氨水, 甲醛水 溶液	
GDX-403	二乙烯苯 含氮杂环单 体共聚物	乳白	0.17	280	中等	250	水/低级胺/甲醛 等	
GDX-501	二乙烯苯 含氮杂环单 体共聚物	淡黄	0.33	80	较强	270	C ₄ 烯烃异构体	
GDX-502	二乙烯苯 含氮杂环单 体共聚物	白	-	170	较强	250	C ₁ - C ₂ 烯烃, CO, CO ₂	
GDX-601	含强极性 基团的聚二 乙烯苯	黄	0.3	90	强极 性	200	环己烷/苯等	中国 科学院 化学研 究所
401	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.32	300-400	非极 性	270	相当于 GDX-101	上海 试剂一 厂
402	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.27	400-500	非极 性	270	相当于 GDX-102	
403	二乙烯苯、 苯乙烯等共 聚物	白	0.21	300-500	非极 性	270	相当于 GDX-103	
404	二乙烯苯、 含氮极性单 体共聚物	—	—	<80	较强	270	相当于 GDX-105	

续表

名 称	组 成	颜色	堆密度 (g/ml)	比表面 (m ² /g)	极性	最高使用 温度/℃	主要分析用途	生产厂
405	二乙烯苯、 三氯乙烯共聚物	—	—	<150	较强	—	—	上海 试剂一厂
406	二乙烯苯、 苯乙烯共聚物	—	—	—	—	—	乙烯、乙炔、烷 烃、芳烃、卤代烃、 含氧有机化合物	
407	二乙烯苯、 乙基乙烯共聚物	—	—	—	—	—	乙烯、乙炔、烷 烃、芳烃、卤代 烃、含氧有机化 合物,还可用于正丙 醇与叔丁醇分离	
408	二乙烯苯、 苯乙烯、极性 单体共聚物	—	—	—	—	—	活泼化合物,如 氯化氢及氯中的水	
A101	二乙烯苯、 乙基乙烯苯 共聚物	白	0.2	—	非极 性	250	气体、芳烃同系 物、含氯化合物、 脂类	浙江 黄岩分析化学材料厂
A102	二乙烯苯、 乙基乙烯苯 共聚物	白	0.21	—	非极 性	250	气体、芳烃同系 物、含氯化合物、 脂类	
A101S	硅烷化的 A101	白	0.21	—	非极 性	250	气体、芳烃同系 物、含氯化合物、 脂类	
A102S	硅烷化的 A102	白	0.23	—	非极 性	250	气体、芳烃同系 物、含氯化合物、 脂类	
B101	二乙烯苯、 苯乙烯、乙 基苯乙烯共 聚物	白	0.12	—	非极 性	250	相当于 GDY-101	
B102	二乙烯苯、 苯乙烯、乙 基苯乙烯共 聚物	白	0.23	—	非极 性	250	相当于 GDX-102	
B101S	硅烷化的 B102	白	0.12	—	非极 性	250	相当于 GDX-101	

续表

名 称	组 成	颜色	堆密度 /(g/ml)	比表面 /(m ² /g)	极性	最高使用 温度/℃	主要分析用途	生产厂
B102S	硅烷化的 B102	白	0.12	—	非极 性	250	相当于 GDX- 102	浙江 黄岩 分析 化学 材料 厂
C101	二乙烯苯、 含氮极性单 体共聚物	—	0.24	—	较强	250	相当于 GDX- 501	
C102	二乙烯苯、 含氮极性单 体共聚物	—	0.25	—	较强	250		
D101	二乙烯苯、 苯乙烯、含 氮极性单体 共聚物	—	—	—	较强	250	腈类、醛类	
D102	二乙烯苯、 苯乙烯、含 氮极性单体 共聚物	—	—	—	较强	250	腈类、醛类	
Chromo- sorb 101	苯乙烯、 二乙烯苯共 聚物	白	0.30	30~40	弱	275	酸、二元醇、 烷、脂、酮、醛、 醚、氟化物	Mache- rey Nagel
Chromo- sorb 102	苯乙烯、 二乙烯苯共 聚物	白	0.29	300~400	中等	250	低沸点化合物、 永久气体、水、 醇	Mache- rey Nagel
Chromo- sorb 103	交联聚苯 乙烯	白	0.32	15~25	中等	275	C ₁ ~C ₆ 胺类、 醇、醛、酮	Mache- rey Nagel
Chromo- sorb 104	丙烯腈、二 乙烯苯共聚物	白	0.32	100~200	强	250	硫化氢水溶液、 氨、腈、硝基烷、 氮氧化物	Mache- rey Nagel
Chromo- sorb 105	聚芳族高 聚物	白	0.34	600~700	中等	250	甲醛、乙炔、 水、沸点低于 200℃的有机物	Mache- rey Nagel
Chromo- sorb 106	交联聚苯 乙烯	白	0.28	700~800	弱	250	C ₂ -C ₈ 脂肪酸和 醇	Mache- rey Nagel
Chromo- sorb 107	交联聚丙 烯酸酯	白	0.30	400~500	中等	250	甲醛水溶液	Mache- rey Nagel

续表

名 称	组 成	颜色	堆密度 /(g/ml)	比表面 /(m ² /g)	极性	最高使用 温度/℃	主要分析用途	生产厂
Chromo- sorb 108	交联聚丙烯酸酯	白	0.3	100~200	中等	250	水、醇、醛、酮、气体	Macherey-Nagel
Porapak P	苯乙烯、二乙烯苯共聚物	白	0.28	100~200	弱	250	乙烯、乙炔、烷烃、芳烃、含氧有机物、卤代烷等	Waters Associated Inc. (美国)
Porapak P _s	硅烷化的 Porapak P	白	—	—	弱	250	乙烯、乙炔、烷烃、芳烃、含氧有机物、卤代烷等	Waters Associated Inc. (美国)
Porapak Q	乙基苯乙烯、二乙烯苯共聚物	黄	0.25~0.35	500~600	非极性	250	乙烯、乙炔、烷烃、芳烃、含氧有机物、卤代烷等	Waters Associated Inc. (美国)
Porapak Q _s	硅烷化的 Porapak Q	白	—	—	非极性	250	乙烯、乙炔、烷烃、芳烃、含氧有机物、卤代烷等	Waters Associated Inc. (美国)
Porapak R	苯乙烯、二乙烯苯、极性单体共聚物	白	0.33	450~600	中等	250	氯与氯化氢等活性物质中的水	Waters Associated Inc. (美国)
Porapak S	苯乙烯、二乙烯苯、极性单体共聚物	白	0.35	350~450	中等	250	醇类、极性气体	Waters Associated Inc. (美国)
Porapak T	苯乙烯、二乙烯苯、极性单体共聚物	白	0.44	250~350	很强	200	醇类、极性气体	Waters Associated Inc. (美国)
Porapak N	苯乙烯、二乙烯苯、极性单体共聚物	白	0.39	437	中等	200	甲醛水溶液组分	Waters Associated Inc. (美国)

(三) 化学键合固定相

化学键合固定相又称化学键合多孔微球固定相。这是一种以表面孔径度可人为控制的球形多孔硅胶为基质，利用化学反应方法把固定液键合于载体表面上制成的键合固体相。这种键合固定相大致可以分为以下三种类型：

(1) 硅氧烷型 这是以有机氯硅烷或有机烷氧基硅烷与载体表面硅醇基反应，生成 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{C}$ 键合相。这种键合相的最大特点是热稳定性好。在气相色谱和液相色谱中广泛使用。

(2) 硅脂型 通常利用扩孔后的硅珠表面羟基与醇类的酯化反应生成 $\text{Si}-\text{O}-\text{C}$ 键合相。这种键合相在一定条件下有水解和醇解的可能性，热稳定性比硅氧烷型稍差。

(3) 硅碳型 将载体表面的硅醇基用 SiCl_4 等氯化后，再与有机锂或格氏 (Griynard) 试剂反应可制得 $\text{Si}-\text{C}$ 键合相。这样制备出来的键合相，其最大的特点是对极性溶剂不起分解作用，耐高温。在高达 300°C 下使用也不容易发生水解。缺点是制备手续比较麻烦。除了上述三种类型，还有一些其他类型的键合相，例如将表面氯化的硅胶与伯胺反应，可以制得 $-\text{Si}-\text{N}-\text{C}$ 键合相，其稳定性和选择性也很好。

与载体涂渍固定液制成的固定相比较，化学键合固定相主要有下述优点：(1) 具有良好的热稳定性。例如采用一般涂渍法时， β ， β -氧二丙腈，PEG 400 和正辛烷在 $80\sim 90^\circ\text{C}$ 就开始流失。若选用 Porasil-S 为骨架得到的键合相，则流失温度可提高到 200°C ；(2) 适合于做快速分析。键合相的 $H/U-U$ 图中，有一长的平滑最小 H/U 区域，即线速增加，板高不变；(3) 对极性组分和非极性组分都能获得对称峰。这种固定相具有较均匀的液相结合型分布，在载体表面上的液膜很薄，因此液相传质阻力小，柱效高；(4) 耐溶剂。特别是耐极性溶剂的抽提。化学键合固定相在气相色谱分析中常用于分析 $\text{C}_1\sim\text{C}_3$ 烷烃、烯烃、炔烃、 CO_2 、卤代烃及有机含氧化合物。国产商品主要有上海试剂一厂的 500 硅胶系列与天津试剂二厂的 HDG 系列产品，国外的品种主要有美国 Waters 公

司生产的 Durapak 系列。

三、气液色谱填充柱

气液色谱填充柱中所用的填料是液体固定相。它是由惰性的固体支持物和其表面上涂渍的高沸点有机物液膜所构成。通常把惰性的固体支持物称为“载体”，把涂渍的高沸点有机物称为“固定液”。

(一) 载体

载体又称担体，是一种化学惰性的物质，大部分为多孔性的固体颗粒。它的作用是使固定液和流动相间有尽可能大的接触面积。一般对载体有以下要求：即有较大的表面积；孔径分布均匀；化学惰性好，即不与固定液或样品组分起化学反应；热稳定性好；有一定的机械强度；表面没有吸附性或吸附性能力很弱。在实际工作中要找出完全满足上述要求的载体比较困难，只能根据具体分析对象选出性能比较优良的载体。

1. 载体的种类与性能

能用于气相色谱的载体品种很多，大致可分为无机载体和有机聚合物载体两大类。前者应用最为普遍的主要有硅藻土型和玻璃微球载体。后者主要包括含氟塑料载体以及其他各种聚合物载体。国内一些常见的重要载体及其性能见表 2-3。

表 2-3 一些重要的载体及其性能^[1~3,7~9]

名 称	组成及处理	颜色	催化吸附性能	产 地
上试 101	硅藻土载体	白	有	上 海 试 剂 一 厂
上试 101 酸洗	经盐酸处理的上试 101	白	小	
上试 101 硅烷化	经 HMDS 处理的上试 101	白	小	
上试 102	硅藻土载体	白	有	
上试 102 酸洗	经盐酸处理的上试 102	白	小	
上试 102 硅烷化	经 HMDS 处理的上试 102	白	小	
上试 201	硅藻土载体	红	有	
上试 201 酸洗	经盐酸处理的上试 201	红	小	
上试 201 硅烷化	经 HMDS 处理的上试 201	红	小	
上试 202	硅藻土保温砖载体	浅红	有	
上试 202 酸洗	经盐酸处理的上试 202	浅红	小	

续表

名 称	组成及处理	颜色	催化吸附性能	产 地
上试 301 釉化	经 B_2O_3 处理的上试 201	红	小	上海试剂一厂
上试 302 釉化	经 B_2O_3 处理的上试 202	浅红	小	
上试 303 釉化	经 B_2O_3 处理的上试 101	白	小	
上试 304 釉化	经 B_2O_3 处理的上试 102	白	小	
5701	硅藻土载体	红	有	中科院大化所
6201	硅藻土载体	红	有	大连催化剂厂
6201 硅烷化	经 HMDS 处理的 6201	红	小	
6201 釉化	经釉化处理的 6201	红	小	
405	-	白	小	
玻璃微球	特种高硅玻璃	无	小	上海试剂一厂
聚四氟乙烯	聚四氟乙烯烧结塑料	白	小	
Chromosorb A	硅藻土载体	白	有	John-Manville
Chromosorb C 48560	硅藻土载体	白	有	
Chromosorb G	硅藻土载体	白	有	
Chromosorb G AW	Chromosorb G 经过酸洗	粉红	有	
Chromosorb G AW -DMCS	Chromosorb G 经过酸洗、DMCS 处理	粉红	很小	
Chromosorb P NAW	非酸洗硅藻土载体	红	有	
Chromosorb P AW	酸洗硅藻土载体	红	有	
Chromosorb P AW -DMCS	硅藻土载体经过酸洗、DMCS 处理	红	小	
Chromosorb P AW -HMDS	硅藻土载体经过酸洗、HMDS 处理	红	小	
Chromosorb R	硅藻土载体	白	有	
Chromosorb T	聚四氟乙烯载体	白	小	
Chromosorb W	硅藻土载体	白	有	
Chromosorb W AW	Chromosorb W 经过酸洗	白	有	
Chromosorb W AW -DMCS	Chromosorb W 经过酸洗、DMCS 处理	白	小	
Chromosorb W AW -DMCS -HP	Chromosorb W 经过酸洗、DMCS 处理, 高效载体	白	很小	
Chromosorb W HMDS	Chromosorb W 经过 HMDS 处理	白	很小	
Chromosorb White	硅藻土载体	白	有	May & Baker Ltd.

续表

名 称	组成及处理	颜色	催化吸附性能	产 地
Gas Chrom A	酸洗的 Celaton 载体	白	有	Applied science Laboratories Inc
Gas Chrom CL	非酸洗的 Celite 载体	白	有	
Gas Chrom CLA	酸洗的 Gas Chrom CL	白	有	
Gas Chrom CLH	Gas Chrom CLA 经过 HMDS 处理	白	小	
Gas Chrom CLP	Celite 载体经过酸洗、碱 洗	白	有	
Gas Chrom CLZ	Celite 载体经过酸洗、 DMCS 处理	白	很小	
Gas Chrom P	Gas Chrom A 经过碱醇溶 液处理	白	有	
Gas Chrom Q	Gas Chrom P 经过 DMCS 处理	白	很小	
Gas Chrom R	非酸洗保温砖载体	红	有	
Gas Chrom RA	Gas Chrom R 经过酸洗	红	有	
Gas Chrom RP	Gas Chrom R 经过酸洗、 碱醇 溶液处理	红	有	
Gas Chrom RZ	Gas Chrom R 经过酸洗、 DMCS 处理	红	小	
Gas Chrom S	非酸洗的 Celaton 载体	白	有	
Gas Chrom Z	Gas Chrom A 经过酸洗、 DMCS 处理	白	很小	
Gas Pak F	表面涂全氟聚合物的硅藻 土载体	白	小	美国
Anaport Tee Six		白	小	Analabs Inc.
Chemalite TF	氟树脂载体	白	小	日本
C-22	硅藻土载体	红	有	美国

(1) 硅藻土型 硅藻土型载体使用的历史最长，应用也最普遍。这类载体绝大部分是以硅藻土为原料制成的。在天然硅藻土中加入木屑及少量黏合剂于 900℃ 左右煅烧，就得到红色硅藻土载体，如国产的 6201 载体及国外的 C-22 火砖和 Chromosorb P 即属于这一类。如果将天然硅藻土经盐酸处理后干燥，再加入少量碳酸

钠助熔剂在 1100℃ 左右煅烧, 就得到白色硅藻土载体。属于这一类载体的有国产的 101 白色载体、405 载体, 国外的 Celite 和 Chromosorb W 载体。

红色和白色硅藻土载体的化学组成基本相同, 内部结构相似, 都是以硅、铝氧化物为主体, 以水合无定形氧化硅和少量金属氧化物杂质为骨架。但是它们的表面结构差别很大, 红色载体和硅藻土原来的细孔结构一样, 表面孔隙密集, 孔径较小, 表面积大, 能负荷较多的固定液。由于结构紧密, 因而机械强度较好。与此相反, 白色硅藻土载体在烧结时由于助熔剂的作用, 硅藻土原来的细孔结构大部分被破坏, 变成了松散的烧结物。此种载体孔径较粗, 表面积小, 能负荷的固定液小, 机械强度不如红色载体。但是和红色载体相比, 它的表面吸附作用和催化作用比较小, 能用于高温分析, 特别是应用于分析极性组分时易获得对称峰。

(2) 玻璃微球 玻璃微球是一种有规则的颗粒小球。它具有很小的表面积, 通常把它看做是非孔性、表面惰性的载体。为了得到较为理想的表面特性, 增大表面积, 使用时往往在玻璃微球上涂敷一层固体粉末, 如硅藻土、氧化铁、氧化锆等^[11,12]。也有人用含铝量较高的碱石灰玻璃制成蜂窝状结构的低密度微球; 或用硅酸钠玻璃制成表面具有纹理的微球; 或用酸、碱腐蚀法制成表面惰性、多孔性的微球等。这类载体的优点是能在较低的柱温下分析高沸点物质, 使某些热稳定性差但选择性好的固定液获得应用。缺点是柱负荷量小, 只能用于涂渍低配比固定液。另外, 柱寿命较短。国产玻璃微球性能很好, 已有各种筛目的多孔玻璃微球载体可供选择。

(3) 氟载体 这类载体的特点是吸附性小、耐腐蚀性强, 适合用于强极性物质和腐蚀性气体分析。其缺点是表面积较小, 机械强度低, 对极性固定液的浸润性差, 涂渍固定液的量一般不超过 5%。这类载体主要有两种, 常用的是聚四氟乙烯载体, 通常可以在 200℃ 柱温下使用。随着聚合和加工条件的变化, 不同型号的聚四氟乙烯载体其表面结构略有差异。国外的产品有 Teflon, Chromosorb T, Halopart F 等, 国内上海试剂总厂也有产品。除聚四氟

乙烯载体外，还有聚三氟氯乙烯等氟氯载体，如国外的产品 Ekatlurin, Daiflon, Kel-F300 和 Halopart K 等。与聚四氟乙烯载体相比，氟氯载体的颗粒比较坚硬，易于填充操作，但表面惰性和热稳定性较差，使用温度不能高于 160℃。

2. 载体的表面活性和去活方法

一种理想的载体，其表面应该无吸附性和催化性，在操作条件下不与固定液和样品组分反应。但是实际上载体表面完全没有吸附性能和催化性能是不可能的。实验表明，经过灼烧后制成的硅藻土类载体，其表面既有催化活性，也有吸附活性。当载体表面存在氢键活性作用点时，分析能与硅醇、硅醚形成氢键的物质例如水、醇、胺等一类化合物时就会观察到相应组分色谱峰的拖尾；同样，用具有酸性（或碱性）作用点的载体分离碱性（或酸性）化合物时也会引起相应色谱峰的拖尾，甚至发生一些醇类、萜类、缩醛类等化合物的催化反应。引起载体表面活性的原因主要有三：

① 表面硅醇基团：载体表面存在的硅醇基团（ —Si—OH ）能与醇、胺、酸类等极性化合物形成氢键，发生吸附，引起色谱峰的拖尾；

② 无机杂质：载体中通常存在少量金属氧化物，在表面形成酸性或碱性活性基团。酸性活性基团能吸附碱性化合物甚至发生催化反应。碱性活性基团可以引起酸类及酚类物质的吸附，造成色谱峰严重拖尾。

③ 微孔结构：硅藻土载体本身有许多孔隙，孔隙的分布与孔径的大小对载体性质有很大影响。孔径小于 $1\mu\text{m}$ 的微孔会妨碍气体扩散，还会产生毛细管凝聚现象。例如红色载体存在许多这种微孔，它是产生吸附的主要原因。

为了取得好的分离效果，特别是在分析极性、酸碱性以及氢键型样品时获得对称的色谱峰，人们常采用下述方法对载体进行预处理：

① 酸洗：通常用 6mol/L 盐酸浸泡载体，加热处理 20 ~ 30min，然后用水冲洗至中性，用甲醇淋洗、烘干、过筛。也可以

用王水或硝酸进行酸洗处理。载体经酸洗后可除去无机杂质，减小吸附性能，适用于分析酸性物质和脂类。使用中应当注意，经酸洗的载体催化活性较大。例如在高温下会使 SE-30 的硅氧链断裂，PEG-400 裂解。不宜分析碱性化合物和醇类。

② 碱洗：将酸洗载体用 10% NaOH-甲醇溶液浸泡或者回流，再用水冲洗至中性，最后用甲醇淋洗、烘干备用。碱洗载体的表面酸性作用点较低，适合于胺类等碱性化合物的分析。但碱洗载体的表面仍残留有微量游离碱，可能会引起非碱性物质（如脂类）的分解。

③ 硅烷化：硅烷化是消除载体表面活性最有效的办法之一。它可以消除载体表面的硅醇基团，减弱生成氢键作用力，使表面惰化。一般的方法是将载体用 5%~8% 硅烷化试剂的甲苯溶液浸泡或回流，然后用无水甲醇洗至中性，烘干备用。常用的硅烷化试剂有二甲基二氯硅烷（DMCS）、三甲基氯硅烷（TMCS）和六甲基二硅氮烷（HMDS）。以 DMCS 的硅烷化效果最好，HMDS 其次，TMCS 较差。如果用酸洗的载体进行硅烷化，其效果比未酸洗的更好。硅烷化载体适用于分析水、醇、胺类等易形成氢键而产生拖尾的物质。载体经硅烷化处理后，表面由亲水性变成了疏水性，比表面也相应缩小 2~3 倍。因此，一般只能涂渍非极性或弱极性固定液，操作温度也应控制在 270℃ 以下。

④ 釉化：目的是堵塞载体表面的微孔，改善表面性质。通常将欲处理的载体置于 2.3% 的 Na_2CO_3 - K_2CO_3 （1:1）水溶液中浸泡两昼夜，烘干后在 870℃ 灼烧 3.5h，再升温到 980℃ 灼烧约 40min。经过这样处理后，载体表面产生了一层玻璃状的釉质，从而屏蔽或惰化了载体表面的活性中心，增加了机械强度。釉化载体适于分析醇、酸类极性较强的物质，但分析甲醇、甲酸时有不可逆的化学吸附，分析非极性物质时柱效较低。

以上几种经过表面处理的色谱载体国内都有产品出售。

3. 载体的选择原则与评价

载体性能的优劣对样品的分离起着重要的作用，实际工作中主

要依据分析对象、固定液的性质和涂渍量来选择载体：

① 固定液：当固定液的涂渍量大于5%时，可以选用白色或红色硅藻土载体；若涂渍量小于5%，则应选用处理过的硅烷化载体；

② 分析对象：当样品为酸性时，最好选用酸洗载体，样品为碱性时用碱性载体。对于高沸点组分，一般选用玻璃微球载体，分析强腐蚀性组分时应选用氟载体。

常用的载体粒度一般在80~100目范围，为提高柱效也可使用100~120目。

对载体进行评价是为了比较不同处理方法或处理前后的效果，确定最佳处理条件。方法之一是将不涂固定液的裸载体填装到色谱柱中，选用丙酮、苯等有代表性的组分进行考察，测定相应的保留值、峰形和柱效。载体的吸附性越强，相应组分的保留时间则越长，峰形拖尾越严重，柱效越低。

（二）固定液

固定液是气液色谱柱的关键组成部分。它的种类繁多，应用极其广泛。与气固色谱柱中的吸附剂相比，固定液的优点主要是在通常的操作条件下，组分在两相间的分配等温线多是线性的，因此比较容易获得对称峰。

1. 对固定液的要求

适合用作气相色谱固定液的物质应能满足以下一些基本要求：

① 在操作温度下呈液态，黏度越低越好。组分在黏度高的固定液中传质速度慢，柱效下降。这决定了固定液的最低使用温度。

② 蒸气压低，热稳定性好。这样可以减少固定液的流失，延长色谱柱的使用寿命。这两者决定了固定液的最高使用温度。

③ 化学惰性高，润湿性好。化学惰性高是指固定液不与组分、载体、载气发生不可逆化学反应。润湿性好则可以使固定液均匀涂布在载体表面或毛细管柱内壁，形成结构稳定的薄层。

④ 有良好的选择性。选择性好的固定液对沸点相同或相近而类型不同的物质具有分离能力，即保留一种类型化合物的能力大于

另一种类型。

固定液的选择性取决于被分析组分与固定液两者分子之间的相互作用力^[14]。这种作用力有以下几种^[13]：

① 静电力：这是极性分子永久偶极间的作用力，由此力形成的平均势能 (E_k) 为

$$E_k = -\frac{2\mu_1^2\mu_2^2}{3kTR^6} \quad (2-1)$$

式中， k 为玻兹曼常量， T 是开尔文温度，负号表示吸引力。从式 (2-1) 可见，静电作用能与两极性物质分子间的距离 R 的 6 次方及绝对温度 T 成反比，与两物质的偶极距 μ_1 ， μ_2 的平方成正比。

② 诱导力：这是非极性分子受极性分子永久偶极电场作用而产生诱导偶极时二者之间的作用力。由此力产生的平均作用能 (E_D) 为

$$E_D = \frac{\alpha_1\mu_2^2 + \alpha_2\mu_1^2}{R^6} \quad (2-2)$$

式中， μ_1 ， μ_2 分别是固定液与组分的偶极矩。由式 (2-2) 可见，若两个分子的偶极距越大，诱导作用能则越大。如果两个分子越接近或分子体积越小，则诱导作用越强。

③ 色散力：这是非极性分子（弱极性分子）间由于分子内电子振动所产生的瞬时偶极而引起的相互作用力。这种力的相互作用能 (E_L) 可表达为

$$E_L = -\frac{3}{2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{R^6} \quad (2-3)$$

式中， I_1 ， I_2 是固定液和组分分子的电离能， α_1 与 α_2 分别为其分子的极化率， R 为分子间距。色散力不受温度影响，具有加和性。对于非极性（弱极性）的物质而言，分子间的作用力主要是色散力。

④ 氢键作用力：这是与电负性原子（如 N、O、F 等）形成共价键的氢原子又和另一个电负性原子所生成的一种有方向性的相互作用力，常称为范德华力。这种作用力介于化学键力和色散力之

间，通常在 $5 \sim 10 \text{ kcal/mol}$ ^①。

有机化合物形成氢键的能力按下列顺序递降：(1) 能形成三维空间结构的强氢键的化合物。如水、多元醇、氨基醇、羟基酸、多元酸、酰胺、多元酚等。(2) 含 α -活泼氢原子和带自由电子对的原子 (O、N、F) 的化合物。如醇、脂肪酸、酚、伯胺、仲胺、肟、硝基化合物、有 α -氢的腈以及氨、肼、氟化氢等。(3) 含电负性原子 (O、N、F) 但不带活泼氢原子的化合物。如醚、酮、醛、酯、叔胺、以及有 α -氢原子的腈和硝基化合物。(4) 含有活泼氢原子但不带电负性原子的化合物。如二氯甲烷、三氯甲烷、芳烃、烯烃等。(5) 不能形成氢键的化合物。如饱和烃、二硫化碳、硫醇、四氯化碳等。

“极性”一词常用来描述或评价固定液的性质。气相色谱中的所谓极性，是指含有不同功能团的固定液与分析物质的功能团和亚甲基之间相互作用的程度。如果一种固定液保留某种化合物的能力大于另一类，则认为这种固定液对于前一类化合物有较高的选择性。人们最初用来描述和区别固定液分离特性的方法是罗胥耐德 (Rohrschneider) 于 1959 年提出的相对极性方法。他首先规定固定液 β ， β -氧二丙腈的相对极性为 100，角鲨烷为零，选用正丁烯与正丁烷或环己烷与苯作为物质对，然后分别测定物质对在氧二丙腈、角鲨烷以及被测固定液柱上的相对调整保留值并取对数，被测固定液的相对极性 (P_x) 按下式计算

$$P_x = 100 - \frac{100 (q_1 - q_x)}{q_1 - q_2} \quad (2-4)$$

式中， q_1 ， q_2 ， q_x 分别是物质对在氧二丙腈、角鲨烷、被测固定液柱上的相对调整保留值的对数。 P_x 值越大，说明极性越大。这种方法主要反映的是组分和固定液分子间的诱导力。考虑到固定液与组分分子之间相互作用的复杂性 (偶极矩、色散力、氢键作用力等)，1966 年他又提出采用某标准物质 (M) 在某一固定液 (P)

① $1 \text{ cal} = 4.1868 \text{ J}$ ，下同。

和非极性固定液 (S) 的保留指数之差 (ΔI) 来衡量该固定液 (P) 相对极性的大小, 即

$$\Delta I_p^M = I_p - I_s \quad (2-5)$$

式中, I_p 及 I_s 分别为标准物质 M 在被测固定液 (P) 和非极性固定液 (S) 上的 Kovats 保留指数。S 通常选用角鲨烷, 并规定在 100℃ 下进行实验。为了全面反映被测固定液的分离特征, 选用的标准物是 5 种不同性质的物质, 其中用苯作为电子给予体, 乙醇作为质子给予体, 甲乙酮代表定向偶极力, 硝基甲烷代表电子接受体, 吡啶代表质子接受体。根据分子间作用力的相加性, 被测固定液的极性则用下式表示:

$$\Delta I_p^M = I_p - I_s = aX + bY + cZ + dU + eS \quad (2-6)$$

式中, a 、 b 、 c 、 d 、 e 是标准物的各种极性因子, 叫做组分常数。X、Y、Z、U、S 是固定液各种作用力的极性因子, 叫做固定液常数。组分常数随标准物的不同而异, 对不同的固定液则为常数。由于 5 种标准物质分别代表不同的作用力, 故人为规定它们的“组分常数”如表 2-4 所示。

表 2-4 5 种标准物的组分常数^[3]

标准物质	组 分 常 数				
	a	b	c	d	e
苯	100	0	0	0	0
乙醇	0	100	0	0	0
甲乙酮	0	0	100	0	0
硝基甲烷	0	0	0	100	0
吡啶	0	0	0	0	100

如果将表 2-4 中标准物的组分常数代入式 (2-6), 则可得到相应的固定相常数为

$$X = \Delta I_{\text{苯}}/100; Y = \frac{\Delta I_{\text{乙醇}}}{100}; Z = \frac{\Delta I_{\text{甲乙酮}}}{100}$$

$$U = \frac{\Delta I_{\text{硝基甲烷}}}{100}; S = \frac{\Delta I_{\text{吡啶}}}{100} \quad (2-7)$$

求得的 X 、 Y 、 Z 、 U 、 S 值，即表示固定相极性的罗氏常数。数值越大极性越强。

对于罗氏所建议的方法，有些人仍认为不够完善。1970 年麦克雷诺 (McReynolds) 对这一方法提出改进方案。他采用丁醇、2-戊酮和硝基丙烷分别取代罗氏所用的乙醇、甲乙酮和硝基甲烷，实验温度改为 120°C 。为了与罗氏常数相区别，相应的麦氏常数用 X' 、 Y' 、 Z' 、 U' 、 S' 表示。许多色谱手册都列有这两种常数，但罗氏常数现在人们已经不太常用，使用比较广泛的是麦氏常数。

固定相的评价是一个比较复杂的问题。不论是罗氏常数还是麦氏常数，许多人认为都还有不少缺点^[13~15]。为了寻求比较完美的表征方法，近年来 Abraham 等人^[16~19]提出了一种“溶剂化参数模型” (solvation parameter model)。这一模型将溶质分子从气相溶解到固定相的过程分为三个阶段：①在固定相中形成一定大小的空穴。这一过程要打破溶剂-溶剂分子间的“键”，是一个吸收能量的过程。溶质分子越大，需要打破的溶剂-溶剂分子间的“键”越多，吸收的能量也越多。如果仅考虑这一阶段，溶质分子越大，其保留值越小；②孔穴周围的溶剂分子重新排列。这一过程虽然与熵及焓有关，但对 Gibbs 自由能的贡献不大；③溶质进入孔穴。这一过程产生溶质和溶剂之间的各种作用力。所有作用力都会导致释放能量，有利于溶质的溶解。根据这一模型，Abraham 提出某溶质在某固定相上的保留值用下式表示：

$$\log K_L = c + rR_2 + s\Pi_2^H + a\alpha_2^H + b\beta_2^H + l\lg L^{16} \quad (2-8)$$

式中， K_L 为比保留体积； R_2 、 Π_2^H 、 α_2^H 、 β_2^H 、 $\lg L^{16}$ 是描述溶质性能的参数； R_2 为溶质修正的摩尔折光指数； Π_2^H 为溶质的偶极； α_2^H 为溶质的氢键酸性（给质子性）； β_2^H 为氢键碱性（受质子性）； $\lg L^{16}$ 为溶质在正十六烷烃上 25°C 时的保留值。这些溶质性能的参数可以从平衡常数或从气相色谱测定的数据计算而得到。而式中的 c 、 r 、 s 、 a 、 b 、 l 是表征固定相保留能力的常数，每种固定相有其特定值。其中 c 为常数； r 是表示溶剂与 n -电子对及 π -电子对

作用能力的常数； s 表示溶剂参与静电和诱导作用能力的常数； a 是度量溶剂参与氢键碱性作用能力的常数； b 为度量溶剂参与氢键酸性作用能力的常数； l 则是溶剂孔穴形成和溶剂-溶质间色散力大小的常数。从色谱角度它表示分离同系物能力的大小。

溶剂化参数模型有其科学性，但是要确定一个新的固定相的溶剂化参数，其实验和计算过程不如测定麦氏常数的方法那样简单易行，得到的表征固定相保留能力的常数 c 、 r 、 s 、 a 、 b 、 l ，其代表性是否优于麦氏常数，仍有待人们继续作进一步深入探索。

2. 选择固定液的原则和方法

到目前为止，固定液的选择尚无严格规律可循，多数情况下往往是根据文献的记载再经过实验比较才能最后确定。这里仅讨论固定液选择的一般原则和方法。

对于日常分析的样品，通常可知道大多数组分的性质，初步确定难分离物质对。此时固定液的选择应遵循“相似相溶”的基本原则。即对于非极性的样品，应首先考虑用非极性固定液分离。这时固定液与被分离组分间主要靠色散力起作用，固定液的次甲基越多，则色散力越强，各组分基本上按沸点顺序彼此分离，沸点低的组分先流出。如果被分离的组分是极性和非极性的混合物，则同沸点的极性物质先流出。对于极性物质的分离，应首先考虑选用极性固定液。这类固定液分子中含有极性基团，组分与固定液分子间的作用力主要为静电力，诱导力和色散力处于次要地位。各组分流出色谱柱的次序按极性排列，极性小的先流出，极性大的后流出。如果样品是极性和非极性的混合物，则非极性组分先流出，而且固定液极性越强，非极性组分流速越快，极性组分的保留时间就越长。对于分离能形成氢键的样品，如水、醇、胺类物质，一般可选择氢键型固定液。此时组分与固定液分子间的作用力主要为氢键作用力，样品组分主要按形成氢键能力的大小顺序分离。

利用固定液与被分离组分分子间生成弱的化学键这种特殊的作用力，有时也能实现一些组分的分离。例如在极性和氢键型固定液

中加入硝酸银，由于固定液中的银离子能和样品分子中的不饱和键生成松散的化学加成物，增大了烯烃在色谱柱内的保留，使其在同碳数的烷烃之后流出。又如使用硬脂酸锌等重金属脂肪酸脂作固定液时，由于脂肪胺与这种固定液的络合能力存在差异，故可选择地分离胺类。此外，某些固定液对芳烃具有特殊选择性，在实际工作中常有一定价值。常用的这类固定液有：聚乙二醇、磷酸三甲酚酯、四氯代邻苯二甲酸脂、3, 5-二硝基苯甲酸乙二醇脂等。这些固定液往往与被分离的芳烃形成所谓的 π -络合物，固而对芳烃产生选择性保留，而脂肪烃则较快地流出色谱柱。

3. 常用固定液

可以用作气相色谱固定液的物质很多，已被采用的有近千种。按我国国家标准 GB 2991—82 的规定，根据化学结构的不同，这些固定液可被分为烃类、聚硅氧烷类、聚二醇及聚烷基氧化物、酯类、其他含氧化合物、含氮化合物、含硫及硫杂环化合物、含卤素化合物及其聚合物、无机盐、其他固定液，共 10 类。在这些已被使用的近千种固定液中，实际上有许多固定液其色谱分离性能相同或者近似，我们可以限定少数几种或几十种固定液代替种类繁多的固定液，使人们在有限的几种固定液范围内进行选择，使分析工作简化。

1970 年，Preston 等^[20]依据文献资料的统计，提出了 21 种最为常用的固定液。后来 Leary 等^[21]采用“最相邻技术”考察了各种固定液的相似程度，认为 12 种可以作为常用固定液。Leary 确定常用固定液的标准是，色谱性能具有代表性；便于重复制备与精制；热稳定性好，使用温度范围宽；具有各种类型的作用力，极性范围广。现在文献中出现次数最多，使用概率最大，即可以认为最常使用的固定液为：OV-101（甲基聚硅氧烷）；OV-17（50% 苯基的甲基聚硅氧烷）；OV-210（50% 三氟丙基的甲基聚硅氧烷）；Carbowax 20M（聚乙二醇，平均分子量 2 万）；DEGS（二乙二醇脂丁二酸）。这组常用固定液性能稳定（表 2-5），极性间距均匀，应用面广，可从解决大量的一般性分析问题。

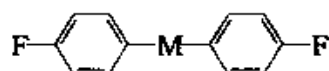
表 2-5 五种常用固定液的性能

固定液	型 号	麦氏平均极性	常用溶剂	使用温度	类似型号
甲基聚硅氧烷	OV-101	43	氯仿	0/350	SE-30
苯基 (50%) 甲基聚硅氧烷	OV-17	177	己烷	0/350	
三氟丙基 (50%) 甲基聚硅氧烷	OV-210	300	氯仿	0/275	QF-1
聚乙二醇-200M	Carbowax 20M	462	氯仿	60/250	
二乙二醇丁二酸脂	DEGS	586	丙酮	20/200	

4. 新型高选择性固定液

新型高选择性固定液是一类特殊固定液，主要用于一些特殊样品的分析，例如不对称选择合成中对映体纯度及过剩量的测定，手性药物中对映体纯度以及天然产物绝对构象的测定等。这类特殊固定液不仅在毛细管气相色谱中应用广泛，在填充柱气相色谱中也有较好的应用效果。

新型高选择性固定液主要有过渡金属混合物、液晶、手性化合物及有机盐类等。过渡金属混合物通常用于分离顺反异构体，被称为“超选择性”的填料。将其涂敷在载体或吸附剂的表面可用于各种顺反异构体的分离。液晶是“液态晶体”的简称。是某些有机物在一定的温度范围内所呈现的一种中间状态，即所谓的“中介相”。在这种中介相状态下，分子排列有特殊的取向，分子的运动也有特殊的规律，从而液晶既具有液体的流动性和表面张力，又有像晶体一样的各向异性。液晶有三种类型，即近晶型、向列型和胆甾型。它们的化学结构通常为



F: $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{O}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OCO}$, $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OCOO}$;

M: $-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{CH}=\text{N}-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{N}=\text{N}-$
 $\downarrow$
 O

利用液晶作气相色谱固定液的优点是它们的高选择性，特别适

合分离几何异构体和位置异构体的混合物。例如有人使用苯甲酸甲酯衍生物液晶固定相分离苯、甲苯、乙苯以及间位、邻位和对位的二甲苯混合物获得很好的结果。液晶固定液在填充柱中使用已经很成功，在毛细管柱上使用也显示出既有高柱效又有高选择性。但是这种固定液成膜性能较差，涂渍比较困难，易出现高温下固定相流失是其缺点。在国内，傅若农的实验室在这一领域已经作了许多开拓性的研究，合成了一批具有低相变温度的高分子液晶固定液^[39]。

手性色谱固定液现在已发展成为一种分离对映体的特殊固定液。目前主要有三类：氢键型手性色谱固定液、形成包合物的手性色谱固定液和金属配体交换的手性色谱固定液。

(1) 氢键型手性固定液

这类手性色谱固定液主要用于分离氨基酸、羧酸、醇、胺、内酯、内酰胺等化合物的对映体。它们以手性氨基酸衍生物为选择体，利用对映体之间的氢键作用来达到分离的目的。将这类固定液再与聚硅氧烷固定液或毛细管壁交联，则形成手性聚硅氧烷固定液和交联手性固定液，其选择性和热稳定性都有较大的提高。缬氨酰叔丁胺因其对对映体的选择性强、外消旋趋势小而被选为常用的手性中心。许多研究表明，与手性碳原子相连的二级烷基、苯基取代基，与酰胺基相连的三级烷基取代基这类结构的手性中心对许多化合物都有高选择性。另外，手性中心的含量也是影响固定液的对映体选择性、耐温性的重要因素，如果手性中心含量太高就会使固定液的软化点升高，而含量太低则会降低固定液的对映体选择能力，较理想的手性中心含量为 13%~25%。新近合成并交联的一种高温手性聚合物固定液，在聚合物中引入一个更稳定的手性中心，在 280℃ 加热 10h 不流失，不发生外消旋，是手性聚合物固定液在热稳定性上的重要进展。

(2) 形成包合物的手性固定液

在形成包合物的手性固定液中，冠醚、环糊精及其衍生物和杯芳烃是近几年发展起来的一些高选择性手性固定液。由于它们都具有独特的环腔结构，所以是色谱中超分子化学理论的主要研究对

象。环糊精类衍生物固定液主要拆分各种手性对映体，而冠醚类固定液主要分离各种位置异构体。

环糊精固定液主要是 α -、 β -、 γ -环糊精的烷基化或酰基化衍生物，具有许多手性中心和特殊的笼状结构，能与被分析的化合物形成包合物，可分离非极性和弱极性的烃类、卤代烃类和环氧类化合物。其中以 β -环糊精作色谱固定液的应用最为广泛。 β -环糊精的内腔由亲脂性的 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 和 $-\text{C}-\text{H}$ 组成，自由羟基都伸向腔体外侧，中间空穴为 $0.5 \sim 0.8\text{nm}$ ，这种环状大分子空腔结构能包含许多化合物，能与对映体分子形成非对映包结物，导致对映体分子有选择地保留，其空穴大小对于手性化合物的对映体选择包结起着重要的作用。

环糊精衍生物分离对映体具有以下特点：①可分离一些在手性酰胺固定液上不能分离的含氮化合物；②对醇、二醇、多醇和糖类手性化合物对映体选择性极高，这些化合物不需要衍生化就能得到基线分离；③可直接分离外消旋混合物；④能分离一些易挥发、强极性的外消旋物。总之，由于环糊精分子上 2, 3, 6 位羟基活性的差异，它们可以选择性地分离多种类型的手性化合物。不难预见，这种高选择性的手性固定液在合成肽、香料、激素和手性药物的立体化学等方面将有广阔的应用前景。

冠醚也是一类有一定大小环腔的大环聚醚化合物，具有王冠状结构。环外沿是亲脂性的一撑基 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)，环内沿是富电子的杂原子 O、N、S 等，极性集中在环内的氧原子上，所以它可以高选择性地配合阳离子及极性化合物。冠醚作为色谱固定液还处于初级阶段，其分离机理目前尚不明了。这类色谱固定液又可分为小分子冠醚固定液、聚硅氧烷高分子冠醚固定液、小分子开链冠醚固定液和套索冠醚固定液。将小分子冠醚固定液涂渍在白色硅藻土、耐火砖或白色 101 载体上，对酚和苯的衍生物、氨基化合物及硝基苯酚和硝基苯胺的各种异构体等都能取得很好的分离结果。将小分子冠醚高分子化，采用交联或共聚、加成等方法，使得高分子冠醚固定液色谱柱不仅柱效提高，而且最高使用温度可达 300°C ，

对多种化合物的不同异构体都具有良好的选择性。国内傅若农等制备了两种饱和漆酚冠醚固定液,对醇、酚和一些芳香化合物取得了很好的分离效果。开链冠醚是一种具有类似冠醚 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}-$ 结构单元的非环多醚化合物,能分离一些非极性固定液不能分离的沸点相近的极性化合物,但热稳定性差,使用温度范围小($80\sim 200^\circ\text{C}$),柱寿命短,载气中如有水、氧等极易引起固定液降解,采用交联、键合 PFG 固定液或接枝到聚硅氧烷链等可弥补其不足。这类固定液可分析极性范围较宽的样品,如胺类异构体。武汉大学吴采樱合成的两种开链冠醚聚硅氧烷固定液,最高使用温度达 310°C ,对醇、酚、多种芳烃异构体具有良好的分离性能。套索冠醚固定液是在氮杂 18 冠 6 上引入“臂”基团,构成了独特的三维立体结构,使其具有更有利于溶剂分子的多点识别和包合作用,具有柱效高、易涂渍、表面惰性好、无活性吸附等特点,是一种适用于分离醇、卤代烃、芳香烃等各类异构体的一种中等极性、高选择性、色谱性能良好的特殊色谱固定液。

同时具有冠醚和环糊精包结能力的杯芳烃是另一类环状低聚物。通过控制杯芳烃中苯酚单元的数目、改变相邻苯酚单元的桥联基或对杯芳烃的上、下缘进行改性等,可以制得数量众多且性能不同的功能化杯芳烃。胡旭波等合成的杯芳冠醚聚有机硅氧烷将杯芳冠醚的环腔结构与聚硅氧烷的柔顺性、易成膜性结合在一起,获得了有效塔板 $N = 4500\text{m}^{-1}$ 的柱效,对醇类、卤代烃、芳烃、烷烃、各种多取代苯的位置异构体都具有良好的分离能力,使用温度范围宽,其热稳定性远远高于一般冠醚聚硅氧烷固定液。杯芳烃作为一种新型的特殊固定液还处于初始研究阶段,但这类环状低聚物是一类极具发展前景的新型色谱固定液。很有可能比冠醚和环糊精类固定液更优秀。

(3) 金属配体交换手性色谱固定液

这类手性色谱固定液主要是一些金属离子与手性试剂所形成的络合物。常用的金属离子有 Eu、Rh、Ni、Mn、Cu 等,手性配体为樟脑酸衍生物,水杨醛与手性胺形成的西佛碱等。这类手性固定

相可用于分离烯烃、环酮、醇、胺、氨基酸、羧基酸等化合物的对映体。

四、填充柱的制备方法

要制备一根高效能的填充柱，不仅要选择好合适的固定液和载体，还要掌握好固定液的涂渍方法和色谱柱的填充技术。

(一) 固定相的制备

气固色谱用的固体固定相的制备方法比较简单。通常先进行过筛，根据需要取 60~80 目或 80~100 目的筛分范围，然后按要求进行活化处理。活化后的固定相应干燥器内贮存备用。对于液体固定相的制备，可以根据实际情况选用下述方法：

1. 蒸发法

称取需要量的固定液溶解在选定的有机溶剂中制成涂渍溶液。为了使固定液完全溶解，可以将溶液置于热水浴上加热，但应控制温度低于所用溶剂沸点以下 20℃。待固定液完全溶解后，缓缓倒入经预处理和过筛备用的载体。在适当温度下轻轻摇动容器，让其中溶剂慢慢地自然挥发完全后即涂渍完毕。如果希望加快工作进度，也可以使用旋转蒸发器在适当的温度下除去有机溶剂。在涂渍过程中应注意不能猛烈搅料，以免损伤载体。有机溶剂的用量一般为载体体积的 2 倍。

2. 回流法

本法适合溶解性能较差的高温固定液的涂渍。方法是将已知量的固定液和溶剂置于圆底烧瓶内，上接冷凝器，然后加热回流 0.5h，待固定液完全溶解后缓缓加入载体，继续加热回流 1.5~2h。最后将载体和溶剂倒入烧杯，置通风橱内让溶剂自然挥发至干。

在制备液体固定相过程中，载体的粒度通常选用 80~100 目级分。有机溶剂的选用通常遵循三个原则：(1) 不与固定液起化学反应；(2) 能和固定液形成无限互溶体系，当加入载体后不会出现分层现象；(3) 沸点适当，有一定的挥发度。

(二) 固定相的填充

固定相填充质量的好坏直接影响填充柱的柱效。一根填充质量

较高的色谱柱，通常其理论塔板数应该达到 $2000 \sim 3000/\text{m}^{[22]}$ 。为了获得最佳的填充密度，可根据情况选择下面不同的方法：

(1) 加压法 将填充柱的一端塞好硅烷化的玻璃棉，另一端与填料池连接。先将固定相倒入填料池，填料池的另一端出口与氮气或空气钢瓶的减压阀连结。对于常见内径为 4.5mm 的填充柱，可调节气流为 $30\text{ml}/\text{min}$ （气流应随内径大小作相应调整），将填充池内的固定相压入填充柱中，同时用木棒轻敲填充柱体使固定相填充均匀。固定相填充完毕后，在原来连接填充池的一端塞上硅烷化的玻璃棉，注意这一端应该与色谱仪的进样室相连接，另一端作为出口端与检测器相连接，不能接反。

(2) 减压法 填充长柱子时多采用此法。这个方法采用真空泵抽气，将填充柱的一端塞好硅烷化的玻璃棉后与真空泵的缓冲安全瓶相连接。为了防止抽气时潮湿空气进入而使固定相性能受影响，可以在填料池加入固定相后，在入气口接氯化钙和硅胶干燥塔，其他操作过程与加压填充法相同。

(3) 手工填充法 这种方法一般只用于某些涂有沸点较低固定液的固定相的填充。通常采用边装边敲打的办法。每次加进柱内的填料约 5cm 。填充时应注意两点：一是固定相要填充均匀和紧密适度，柱内不留有死空间或者间隙；二是要避免填充过程中敲打振动过猛，造成固定相机械粉碎。

(三) 填充柱的老化与评价

新制备的填充柱在使用前必须经过老化处理，以便把柱内的残存溶剂、低分子量固定液以及低沸点杂质除去，使固定液在载体表面涂渍得更均匀牢固。老化的方法比较简单：在室温下将色谱柱的入口端与进样器相连接。为了避免污染，出口端与检测器断开。然后接通载气，调节载气流速 $10 \sim 20\text{ml}/\text{min}$ ，再以程序升温的方式缓慢将柱温升至比使用温度高 20°C ，并在此温度下老化 $4 \sim 8\text{h}$ 。注意，老化温度不能高于固定液允许的最高使用温度。如果使用氢气作载气，还应注意将出口端流出的氢气引出室外。老化处理后，将柱温降至室温，把色谱柱出口端与检测器相连接，在分析条件下观

察基线。若能获得平稳的基线，说明色谱柱已经老化合格，一般即可进行正式分析试验。

填充柱的评价方法基本与毛细管柱的评价方法相同，操作过程可参考毛细管柱的有关内容。

第三节 毛细管气相色谱柱

一、毛细管柱的制备

(一) 毛细管柱的材料

毛细管柱的材料对制备一支高质量的毛细管气相色谱柱是十分重要的。毛细管柱的材料应具有化学惰性，热稳定性好，内表面光滑易润湿以及操作方便等性能。自从毛细管气相色谱柱发明以来，对许多材料，如塑料、铜、镍、不锈钢等进行过研究^[23~26]。但目前普遍使用的则是玻璃和石英玻璃材料，应用最多的是后者。本节着重讨论玻璃和石英玻璃的结构、表面成分以及它们对色谱性能的影响。

1. 玻璃和石英玻璃的组成和结构

玻璃和石英玻璃的化学成分都是以二氧化硅为主。玻璃中的二氧化硅通常是一个硅原子和四个氧原子结合成四面体。每个二氧化硅四面体通过硅氧键形成一个三维网络，这样由硅和氧原子形成一个不规则的六元环，如图 2-1 所示。石英玻璃由于 Si—O—Si 之间的角度易于变动而具有柔性，这种环状结构相对稳定。根据硅氧键角大小不同而形成不同的同分异构体。石英玻璃的硅氧夹角为 150° ，是一种最简单的玻璃。通常人们称它为石英。其结构见图 2-1 (a)。它具有高度交联的三维结构，因此它的熔点高（近 2000°C ），热膨胀系数低。它的成分主要是二氧化硅，含有极少的金属氧化物，抗化学腐蚀性好和抗张强度高，可允许拉制成优质弹性薄壁毛细管柱。由它制作的毛细管柱人们通常称之为弹性石英毛细管柱 (flexible fused silica capillary column)。

在玻璃生产过程中，常加入各种金属氧化物以改变物理和化学

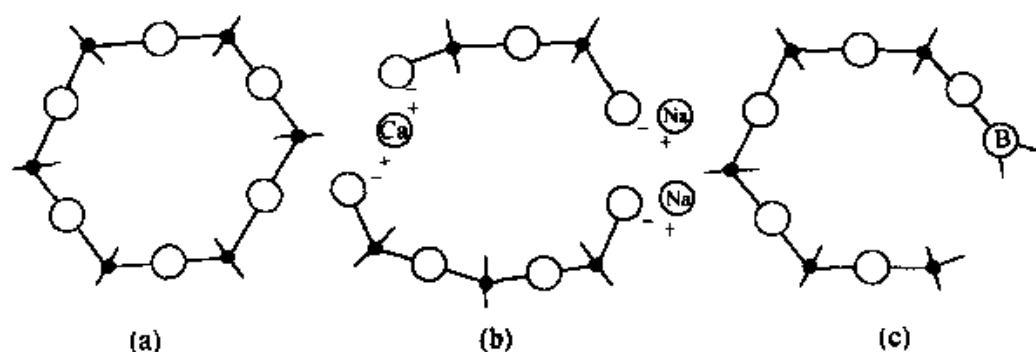


图 2-1 各种玻璃的结构

性能。加入 Na_2O 可切断 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键而使玻璃软化并降低黏度，增加热膨胀系数和在水中的溶解度，降低它的抗化学腐蚀性。加入 CaO 和 MgO 则为了减小溶解度，增加其抗化学刻蚀性。常用于毛细管柱材料的两种玻璃是钠钙玻璃（软玻璃）和硼硅玻璃（硬玻璃，如 Pyrex），其组成如表 2-6 所示。 Na_2O 、 CaO 和 B_2O_3 等氧化物的加入使 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键截断，如图 2-1 (b)、(c) 所示。因此这些玻璃的熔点比石英要低得多。软玻璃的熔点约 700°C ，硬玻璃比软玻璃高 $100\sim 125^\circ\text{C}$ 。强度也比软玻璃好，不易脆碎，软玻璃由于含有较高的 Na_2O 而呈碱性；硬玻璃由于它含有 B_2O_3 而呈酸性。

表 2-6 钠钙玻璃和硼硅玻璃的组成^[27]

组 分	钠钙玻璃	硼硅玻璃	组 分	钠钙玻璃	硼硅玻璃
SiO_2	67.7	81.1	Na_2O	15.6	4.0
CaO	5.7	0.5	Al_2O_3	2.8	2.0
B_2O_3	—	13.0	MgO	3.9	—
FeO	0.8	—	K_2O	0.6	—

天然石英和人造石英都是作毛细管柱的好材料。天然石英在高温及真空下可熔化制成熔融石英。其纯度随石英原料的来源不同而异。如果在加工过程中注意减少污染，一般情况下金属杂质含量可低于 $1\times 10^{-4}\text{g/g}$ 。经进一步提纯的熔融石英，其金属杂质含量可达 $1\sim 5\times 10^{-5}\text{g/g}$ 。人造石英则是在高温下用四氯化碳在火焰中与水反应水解而成，基本上是纯二氧化硅，其金属杂质含量小于 $1\times$

10^{-6}g/g 。

2. 玻璃表面成分对色谱性能的影响

玻璃表面的化学性质影响色谱柱的性能。各种金属氧化物在玻璃的表面形成路易斯酸作用点，可对醇、酮、氨以及含 π 键的分子（如芳香化合物和烯烃）等一类局部电子密度高的化合物产生吸附。石英材料因金属杂质含量极小，表面不存在或很少存在酸化点，故与玻璃相比具有天然惰性。玻璃和石英表面的羟基是构成氢键型吸附的主要因素。表面羟基团之间氧原子的距离大于 0.31nm 时，就不能在两个羟基之间形成氢键。这类羟基的活性最大，对一些电子云密度高的化合物如胺、酮、醇以及 π 键化合物产生吸附。也是进行表面硅烷化处理的主要作用点。氢和氧相距 $0.24 \sim 0.28 \text{nm}$ 时容易形成氢键，大约 50% 表面的羟基彼此相互作用形成氢键。这种已形成氢键的羟基活性很小，几乎不再起自由羟基的作用。吸附在表面羟基的水也能对电子云密度高的化合物产生吸附，其活性与自由表面羟基相似。当加热时可以把物理吸附水除去，留下自由羟基进一步加热使二氧化硅表面与相邻羟基脱水形成氧桥。加热到 165°C 能把物理吸附水赶走，约在 400°C 左右会使羟基脱水而成氧桥。这时如把二氧化硅冷却并暴露于水蒸汽中，它还可以再恢复形成硅醇基。加热 400°C 以上时再冷却吸湿羟基恢复的数量要减少，如加热到 800°C 时二氧化硅表面羟基消失就不再恢复。温度对二氧化硅表面的失水情况可表示如下：

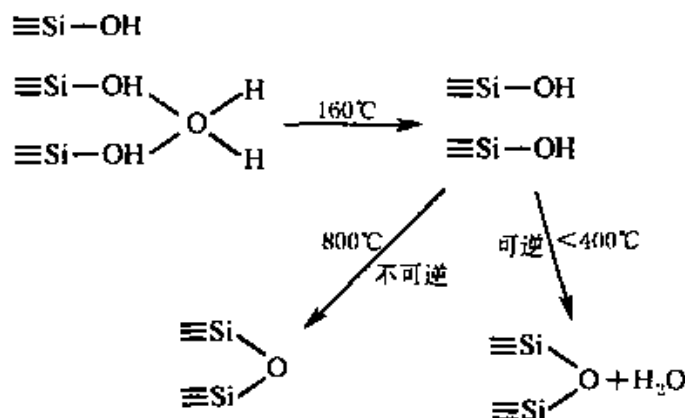


表 2-7 给出了在不同温度下二氧化硅表面羟基的浓度。另外表面的硅氧桥是氢键结合中的质子受体, 对醇类分子产生吸附并有较强的范德华力。由于在玻璃和石英表面不同程度存在金属氧化物、游离羟基、硅氧桥, 它们以不同形式会与分离物质产生一定吸附作用。

表 2-7 真空处理二氧化硅后表面羟基的浓度^[28]

真空处理温度/℃	每 1nm ² 上的羟基数	真空处理温度/℃	每 1nm ² 上的羟基数
200	4.8	600	1.6
300	3.6	700	1.2
400	2.7	800	0.9
500	2.1	900	0.7

(二) 毛细管柱的拉制

1. 玻璃毛细管柱的拉制

目前玻璃毛细管柱已很少使用, 但在需要大内径 (0.75mm) 的毛细管柱时还必须用玻璃材料。本节将玻璃毛细管柱的拉制作方法作一简要介绍。现代的玻璃毛细管拉制机由计算机控制, 基本原理与最早 Desty^[29] 的发明相似, 如日本岛津公司的 DM-2 型, 见图 2-2。外径为 4~10mm, 内径为 2~6mm 的原料玻璃管都可以用, 由送料轮送入温度为 650~850℃ 加热炉中软化, 然后拉伸轮以较快的速度驱动已软化的玻璃管, 使之变细成为需要的毛细管。再通过在弯曲电热管中加热至 550~650℃ 而烧成盘管, 最后存放在支架托盘上。控制送料轮和拉伸轮的转速比可以拉制不同内径的毛细

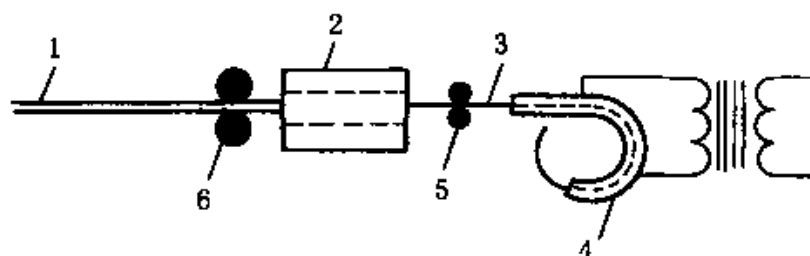


图 2-2 玻璃毛细管拉制机的示意图
1—原料玻璃管；2—电炉；3—毛细管；
4—弯曲电热管；5—牵引轮；6—送料轮

管。但值得注意的是所用原料管内外径粗细不均，加热炉及弯管炉温度波动以及送料轮与拉伸轮的转速之比过大都是引起拉制毛细管内径不均匀的因素。现在的商品玻璃毛细管拉制机拉出的毛细管内径不均匀性在 $\pm 3\% \sim \pm 5\%$ 之间。

2. 弹性石英毛细管柱的拉制

石英比玻璃熔点高，不能用一般玻璃拉制机拉制。石英毛细管的拉制机见图 2-3 所示。需将石英原料管在石墨炉中加热到 $1900 \sim 2000^\circ\text{C}$ 时才能拉制出薄壁毛细管柱。如果石英的表面被污染或受潮，其强度会下降而易破损。所以拉出的石英毛细管必须立即通过一个盛有耐高温聚合物溶液的容器。这种聚合物通常为聚酰亚胺。然后通过加热炉烘干，使柱子的外表敷上一层保护膜，最后是将拉好的毛细管缠绕到一个转鼓上。目前拉制的石英毛细管内径为 $0.1 \sim 0.5\text{mm}$ ，壁厚 $< 0.05\text{mm}$ 。作为柱子外涂层材料的聚酰亚胺最高使用温度为 350°C 。近年来市场上出现了铝涂层的弹性石英毛细管柱，可耐热 $400 \sim 480^\circ\text{C}$ 的高温。这类柱子可以用于一些高级烷烃（大于 100 个碳原子）以及甘油三酯类的分离。

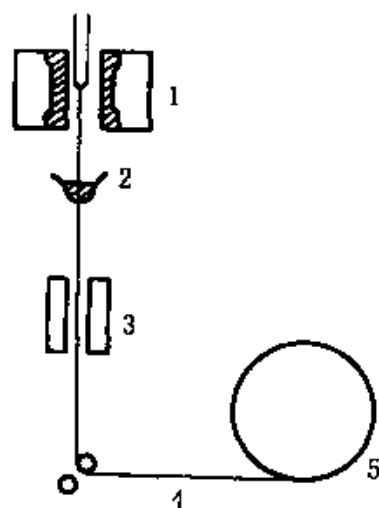


图 2-3 弹性石英毛细管柱拉制机示意图

- 1—电炉；2—聚酰亚胺炉；
3—烘干炉；4—拉好的毛细管；
5—转鼓

（三）毛细管柱的内壁改性

如上所述，玻璃和石英材料表面存在的硅醇基吸附电子密度高的化合物，硅氧桥的离子特征作为质子接受体形成氢键而吸附易给质子的化合物，玻璃表面存在的金属离子造成更严重的吸附和催化作用，将会使高温下的固定液分解而流失。因此在涂渍固定液之前必须对内表面进行处理，以改变化学和物理性能提高表面对固定液的湿润性。湿润性是指液体浸润固体表面的能力，这种能力是

通过接触角来衡量的。接触角是指液滴界面的切线与固体表面的夹角。当接触角为零时液态完全湿润固体表面，易于涂渍成均匀的薄膜。反之当接触角增大时液体覆盖固体表面能力降低，液体能否浸润固体表面取决于液体的内聚力和固体表面的能量。液体的内聚力由其表面张力来表征，固体的表面能则通过表面自由能表示。当液态的表面张力大于某一固体表面的临界表面张力（CST）时，此液体在固体表面上就有个大于零的接触角数值。CST 的参数是这样得到的，即把一组同系化合物在给定的固体表面上测定其接触角（ θ ），把 $\cos\theta$ 对同系物的表面张力作图，一般成一条直线，在 $\cos\theta = 1$ 时的表面张力即为该固体表面的临界表面张力。如果液体的表面张力小于某一固体表面的 CST，其接触角为零，该固体表面就可以被此液体所湿润。由此可见 CST 作为湿润性的标志，可用作衡量固定液是否易于涂渍成均匀薄膜的定量考查。光滑干净玻璃的 $CST < 3.0 \times 10^{-4} \text{ N/cm}$ ，而大多数固定液的表面张力 $= 3.0 \sim 5.0 \times 10^{-4} \text{ N/cm}$ ^[30,31]，这说明大多数固定液对玻璃表面不湿润。要制作有效的毛细管柱，首先必须对玻璃和石英管内壁表面进行粗糙化或化学、物理改性，使它们的表面能增大，CST 值提高。表 2-8 和表 2-9 分别给出了一些固定液的表面张力和玻璃及石英经不同方法处理后的 CST 值。

表 2-8 室温下部分固定液的表面张力^[23,32]

固 定 液	N/cm	固 定 液	N/cm
甲基硅油	1.92×10^{-4}	Ucon 50 LB 500X	3.14×10^{-4}
OV-101	2.04×10^{-4}	癸二酸二辛脂	3.22×10^{-4}
OV-210	2.36×10^{-4}	Apiezon L	3.3×10^{-4}
OF-1	2.46×10^{-4}	Trion	3.4×10^{-4}
十八烯-1	2.76×10^{-4}	Ucon 50 HB 2000	3.57×10^{-4}
Ucon DLB-100-B	2.83×10^{-4}	2, 4-二甲-1, 1 二	3.81×10^{-4}
邻苯二甲酸二癸脂	2.85×10^{-4}	氧四氢化噻吩	
邻苯二甲酸二壬脂	2.88×10^{-4}	聚丙烯癸二酸脂	4.02×10^{-4}
鲨鱼烷	2.995×10^{-4}	磷酸三甲基苯脂	4.09×10^{-4}
柠檬酸三丁脂	3.04×10^{-4}	聚乙二醇 400	4.42×10^{-4}
		Os-124	4.61×10^{-4}

续表

固 定 液	N/cm	固 定 液	N/cm
双(乙基己基)癸二酸脂	3.11×10^{-4}	β, β -氧二丙腈	4.86×10^{-4}
癸丙二醇	3.13×10^{-4}	1, 2, 3-三(2-二氟乙氧基)丙烷	4.92×10^{-4}
双(2-乙基己基)邻苯二酸脂	3.13×10^{-4}	双甘油	5.03×10^{-4}
OV-17	3.14×10^{-4}	丁二酸二乙二醇脂	5.09×10^{-4}

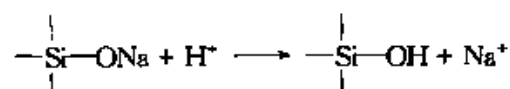
表 2-9 柱材料表面的临界表面张力^[23~32]

材 料	处 理	临界表面张力 N/cm
天然石英	用水蒸气平衡	$>5.0 \times 10^{-4}$
人造石英	未处理	$>6 \times 10^{-4}$
硬质玻璃	丙酮清洗	2.8×10^{-4}
硬质玻璃	硫酸铬清洗液净化	4.4×10^{-4}
硬质玻璃	氢氧化钠蚀刻	$3.2 \sim 3.4 \times 10^{-4}$
硬质玻璃	表面炭化	4.1×10^{-4}

1. 毛细管柱内表面的粗糙化

内壁表面粗糙化可采用表面腐蚀和在内壁沉积惰性微粒物质两种技术。但腐蚀只用于玻璃毛细管柱，不适用于石英柱，因腐蚀后的石英柱壁太薄，易于脆断。

玻璃毛细管柱内壁的腐蚀有氯化氢刻蚀和氟化氢刻蚀两种技术。氯化氢刻蚀法是将干燥的氯化氢气体通入柱子，用小火把两端封住，在 $300 \sim 400^\circ\text{C}$ 下加热 $3 \sim 12\text{h}$ ^[33~35]，于是在玻璃毛细管柱内壁形成有规则排列的氯化钠晶体粗糙层。Franken 等人^[34]详细地讨论了氯化钠晶体的生成规律，其过程是：钠钙玻璃有一层较丰富的碱金属，在与氯化氢作用时形成反应中心，高温下玻璃表面的钠离子易于流动，通过晶格游动到表面上，在表面上钠离子与氢离子进行交换，即



然后 Na^+ 通过表面与 Cl^- 结合形成氯化钠晶体。硅硼玻璃因碱金属离子浓度低，用氯化氢处理效果不显著。这种粗糙化方法的缺点是随金属离子浓度的增加可导致弱路易氏酸性吸附和一些固定液催化降解。所以本方法的应用受到一定的限制。

氟化氢刻蚀也叫晶须生成法，用氟化氢在高温下使玻璃表面形成二氧化硅晶须^[36]，其表面积是光滑玻璃的上千倍。因有剧毒，一般不直接使用氟化氢气体。通常是用 2-氯-1, 1, 2-三氟乙基甲基醚 (CTFME) 或二氟化铵充满毛细管柱。把两端封住，然后加热一段时间，CTFME 或二氟化铵放出 HF，这样使玻璃表面产生高密度须状物。晶须的粗细及长度取决于试剂的浓度、温度和反应时间。低于 250°C 不会形成晶须。刻蚀温度在 400°C ，试剂浓度在 2.5% ~ 10.0% 之间，24h 之后生成完全。

内壁粗糙化的另一种技术是从溶液中沉积一层薄而均匀的微颗粒物质，如石墨化炭黑、氯化钠微晶、碳酸钡以及二氧化硅等惰性微颗粒物质。

Nota^[37]和 Vidal^[38]等人分别以静态和动态法研究了在毛细管柱内壁沉积石墨化炭黑的方法，即把石墨化炭黑制成胶体溶液，然后涂渍在毛细管中，石墨化炭黑就牢固地粘附在毛细管内壁上，各种溶剂都冲洗不掉。这种粗糙化的方法可适应各种类型的固定液，但是不能涂渍厚液膜的固定液。

Frank 等人^[34]研究了用氯化钠胶体溶液使氯化钠沉积覆盖在柱内表面的方法。先把氯化钠制成饱和甲醇溶液，然后加入 1, 1, 1-三氯乙烷或三氯甲烷，使之成为胶体溶液，把此溶液通过毛细管柱，待溶剂蒸发后再涂第二次，这样反复四次以上，最后将柱子加热 350°C 并保温 1h。

碳酸钡沉积是在毛细管柱内壁涂以氢氧化钡溶液，然后通入二氧化碳气体除去溶剂，随即在毛细管柱内壁生成碳酸钡层。这一方法虽说可以达到粗糙化的目的，但是由于碳酸钡形成较强的活化点，以致于去活困难，对某些固定液热稳定性差。

二氧化硅沉积法是将 SiO_2 粉末 ($< 1\mu\text{m}$) 在 300°C 加热 3h，

然后以 CHCl_3 和二氧六环为溶剂配成 $6 \sim 8 \text{ mg SiO}_2/\text{ml}$ 混合液。经超声 $1 \sim 1.5 \text{ h}$ 使 SiO_2 分散成均匀的悬浮液。将此悬浮液吸入事先用 CHCl_3 湿润的毛细管柱子至柱长的 $1/10$ ，用氮气流使液栓通过柱子，再用低流速氮气赶走溶剂即可完成 SiO_2 涂层。这样处理后的柱子沉积一层 SiO_2 ，达到覆盖表面活性基团和粗糙化的双重目的。这种柱子适合涂渍极性较大的固定液。

2. 毛细管柱内表面的羟基化

在对毛细管柱内壁去活处理之前，无论是玻璃柱还是石英柱都要经过酸处理。目的是使柱内壁增加硅醇基，在下一步的去活化中降低或消除玻璃种类影响，从而制备出重现性好的毛细管柱。

玻璃毛细管柱的沥取：所谓沥取（leaching）就是用酸或碱把玻璃柱内表面的金属离子除去，使玻璃表面形成丰富的硅醇基。用碱沥取时玻璃表面被腐蚀形成多孔层，用酸沥取能得到较为平滑的表面，所以通常用酸沥取。在试验过的几种酸溶液，如硫酸、硝酸、磷酸、草酸和盐酸中，盐酸效果最好^[39]，不会在二氧化硅表层中留下残酸。合适的盐酸浓度为 18%。酸沥取玻璃表面是用氢离子取代金属离子，也就是说玻璃表层和表层上面稍微深层的金属离子会迁移出来。这是由于在沥取过程中玻璃表面部分被水化。硅酸盐网络结构成开放型，形成了许多亲水的硅醇基。由于水进入网络产生溶胀作用，表层的金属离子扩散到溶液中，而深层的金属离子向表层扩散，这一过程如图 2-4 所示。

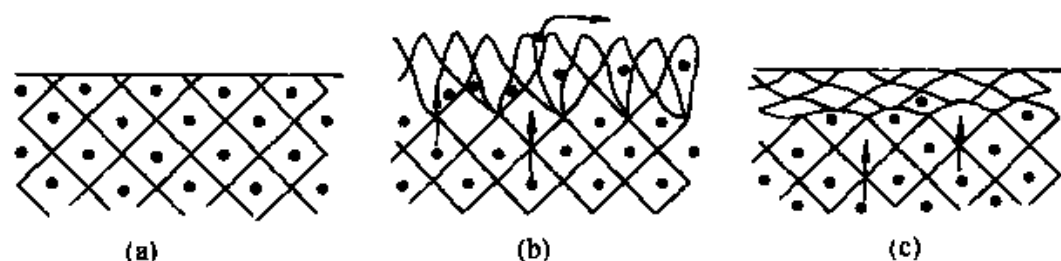


图 2-4 进行沥取玻璃表面的示意图

(a) 尚未处理的表面；(b) 沥取过程中；(c) 沥取后形成的硅酸表面

沥取方法是用负压法将酸溶液吸入毛细管柱中，然后把毛细管

缓慢加热,使管中的盐酸溶液溢流出一部分。待冷到室温后管内有一段是空的,在真空条件下把毛细管封死,继续加热过夜。在 150°C 下达到中等程度沥取,若需深度沥取可加热到 175°C 。沥取后的柱子应立刻进行洗涤,洗涤一般用 $0.2\% \sim 1.0\%$ 的盐酸或水,目的是除去浓盐酸溶液和沥取出来的金属离子。洗涤后的柱子通以干燥的氮气,置于约 250°C 下保温 $2 \sim 4\text{h}$,使柱内的水气、酸气彻底除去。Grob^[40]等对于动态沥取方法的研究表明,采用动态法沥取效果不好,易造成毛细管内壁结构的破坏,所以不宜使用。

弹性石英毛细管柱的水热处理:石英柱的水热处理是在高温下使表面充分羟基化。石英柱因在高温下拉制,表面羟基含量甚少,约 $0.2/\text{nm}^2$ 。这样少的羟基不易去活处理,水热处理后获得的丰富羟基对涂渍极性固定液十分重要。与玻璃柱的沥取一样,通常采用酸进行处理。Grob^[40]水热处理方法是:将 2% 的盐酸溶液充入至 25% 柱长之后,以 5cm/s 的速度使盐酸溶液向前移动至另一端流出溶液,用丁烷/氧火焰把柱两端封住,再把毛细管柱放入恒温箱中在 200°C 下保温 6h 。然后再一次充以 25% 的盐酸溶液至 25% 柱长,以 1cm/s 的速度把盐酸溶液赶出毛细管柱,最后将毛细管柱抽真空并在 230°C 下保温 1h 。

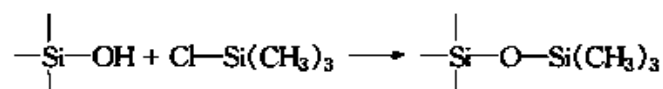
3. 毛细管柱内表面的惰性化

柱内壁粗糙化可使固定液液膜稳定,但也使内壁的活性增加,对一些固定液产生严重吸附。要制备一支柱效高、活性低、热稳定性好和保留值重复的毛细管柱,在填充之前,无论对于玻璃柱还是石英柱都要进行惰性化处理。目前应用的惰性化处理方法,使用有机聚合物或硅烷化试剂处理柱内壁。应用最多的是后者。

最早是 Aue^[41]使用 PEG20M 改性硅藻土色谱载体,后来 Cronin^[42]把 Aue 的方法用于改性毛细管柱内壁取得了很好的效果。一般认为去活机理是 PEG20M 在高温下产生环氧烷结构单元,然后开环与柱内表面的硅羟基发生键合反应,形成一层桥式结构的聚合物薄膜以掩蔽硅醇基的活性。PEG20M 惰性化处理有静态法和动态法。静态法是将 6% 的 PEG20M 的二氯甲烷溶液充入毛细管

柱，赶净溶剂后，将柱两端封住，放入恒温箱中在 280℃ 保温 2~4h。最后洗去剩余的 PEG20M。动态法是在载气的携带下将 PEG20M 蒸气与置于 250℃ 的毛细管柱内壁反应 12h。用 PEG20M 处理的柱子在高于 250℃ 使用时会降解流失。Franken^[28]等人对于用 PEG20M 处理的柱子与固定液的湿润性进行了研究，认为 PEG20M 在柱子内壁形成薄的一层可与非极性固定液相容，如果是厚的一层可与极性固定液相容。

硅烷化是惰化毛细管柱内表面羟基活性的最有效方法。其原理是硅烷化试剂的活泼基团与柱内表面羟基反应，从而消除表面羟基的活性。反应式如下：

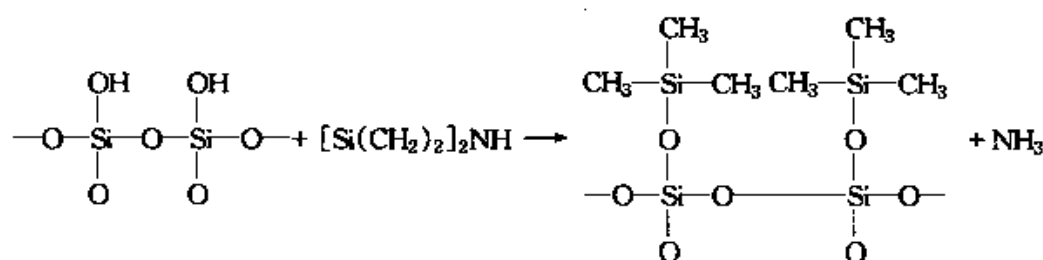


最早的硅烷化去活方法是在常温下进行。这样去活处理的毛细管柱要在低于 250℃ 下使用。20 世纪 70 年代末 Welsch^[44]等人首次提出高温硅烷化方法。在此之后，Grob^[40]和 Lee^[45]等人对方法进行了改进，证明在高温下进行硅烷化得到的去活层可在 300~400℃ 稳定。现在普遍采用高温硅烷化去活玻璃和石英柱内壁的方法，简称 HTS (high-temperature silylation)。HTS 可采用静态或动态的方法进行。静态法是将硅烷化试剂用氮气以 4~5cm/s 的速度通过柱子，试剂排出后将两边封住，缓慢升温 (2~3℃/min) 至 300~400℃，保持 4~20h。再用甲苯和甲醇依次冲洗，氮气吹干。动态法是把柱子放在 400℃ 炉中，将两端伸出炉外，一端置于含有试剂的鼓泡器中，产生的蒸气通过干燥的氮气将其循环流过柱子，持续 48h 后将炉子冷却至 200℃，移去鼓泡器，用干燥氮气吹柱子，以除去未反应的试剂。动态法并不常用。HTS 法处理的柱表面形成了三甲基硅烷基层，临界表面张力为 $2.1 \times 10^{-4} \text{N/cm}$ 。涂制 OV-101、OV-1、SE-30 等非极性固定液可得稳定均匀液膜。硅烷化表面的覆盖度与羟基量有关，用酸淋洗沥取后增大硅醇基密度的柱表面可增加覆盖度和柱子的热稳定性。经六甲基二硅氮烷高温硅烷化的柱子表面能很低，也可涂制弱极性的固定液。若用二苯基

四甲基二硅氨烷和四苯基二甲基二硅氨烷进行硅烷化处理, 可得到更稳定的去活表面, 适用于中等极性固定液的涂制^[46,47]。

HTS 中的另一种常用方法是用聚硅氧烷高温降解^[48] 又称 PSD 法。聚硅氧烷在 300~400℃ 受热分解的部分产物与表面硅醇基键合形成一层高分子硅氧烷聚合层, 达到去活的目的。Blum 和 Grob^[49] 用 XF-1105 固定液 (含 50% 氰乙基和 50% 的甲基) 和二苯基四甲基二硅氨烷混合液在 370℃ 反应 8h 后, 用于涂制中等极性固定液的柱子。其他一些聚硅氧烷固定液如 OV-1701、OV-101、SE-54、SE-52、OV-17、Dexsil 400 等均可进行热解去活处理。

HTS 中的全硅烷化 (persilylation) 也是有效的去活方法^[50]。全硅烷化的去活机理没有一致的观点, 如在高温下硅烷化试剂如何与石英玻璃硅醇基作用, 在表面形成什么样的基团等问题, 有不少争论。Grob^[50] 等人用核磁共振谱研究了一些全硅烷化试剂与石英玻璃表面硅醇基反应的产物, 得到的结果如下:



他认为形成这种产物可使活性点得到屏蔽, 既有去活作用又能改进固定液的湿润性。因此这是一种令人十分满意的技术。常用的全硅烷化试剂有氯硅烷、硅氨烷、硅氧烷和聚硅氧烷。

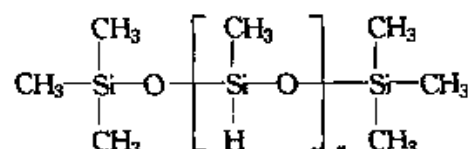
氯硅烷类: 三苯基氯硅烷 (TPCS); 二苯基氯硅烷 (DPD-CS); 六甲基二硅烷。

硅氨烷类: 六甲基二硅氨烷 (HMDS) 是空间障碍最小的硅烷化试剂, 它在玻璃表面形成非极性的甲基硅氧烷基团, 适合涂渍聚二甲基硅氧烷类固定液。二苯基四甲基硅氨烷 (DPTMDS) 在玻璃表面引入苯基, 所以适用于涂渍含苯基量不高的苯基甲基聚硅氧烷 (如 OV-61) 类固定液。四苯基二甲基硅氨烷 (TPDMDS) 适合于涂渍苯基含量小于 50% 的苯基甲基聚硅氧烷类固定液的去活,

例如从 OV-61 至 OV-17。

硅氧烷类：八甲基环四硅氧烷 (D_4) 是使用最多的一种硅烷化试剂。将 D_4 (20%) 制备在正戊烷中，以动态法涂渍，移动速度为 2cm/s，封口并用铝箔把色谱柱包住，在 400℃ 下保持 4h 后用正戊烷冲洗。用 D_4 处理过的柱子适用于涂渍非极性固定液。三苯基三甲基环三硅氧烷 (TMPCTS) 和八苯基三甲基环四硅氧烷 (OPCTS) 是用来作涂渍中等极性固定液的去活试剂。用二氯甲烷作溶剂，将 TMPCTS 与 DPTMDS 等体积混合液处理的玻璃毛细管柱，涂渍 OV-1701-OH 可得到很好的去活效果。将 OPCTS 制成二氯甲烷的饱和溶液，以 2~4cm/s 的流速动态法涂渍在弹性石英毛细管柱中，把柱两端接到真空系统上，抽空 0.5h 后封死，在 400℃ 下加热 16h，用 3 倍柱体积的二氯甲烷洗涤色谱柱。然后采用静态法涂渍 OV-17 或 Dixil 400，效果十分令人满意。二氰丙基六甲基环四硅氧烷 (BCHMCTS) 是含氢基（如 OV-225, Silar 10C 等）固定液的去活试剂^[51]。去活方法是把经沥取的玻璃柱或弹性石英柱以动态法涂渍 0.2g/ml 的 BCHMCTS 二氯甲烷溶液，用氮气赶走溶剂后，在抽真空下将柱两端封死，以 5℃/min 升温至 395℃ 并保持 1.5h。最后把温度慢慢冷却至室温，把柱子的一头放入二氯甲烷中后打开，这样有一部分二氯甲烷进入柱中并用此溶剂在氮气流下洗涤柱子。

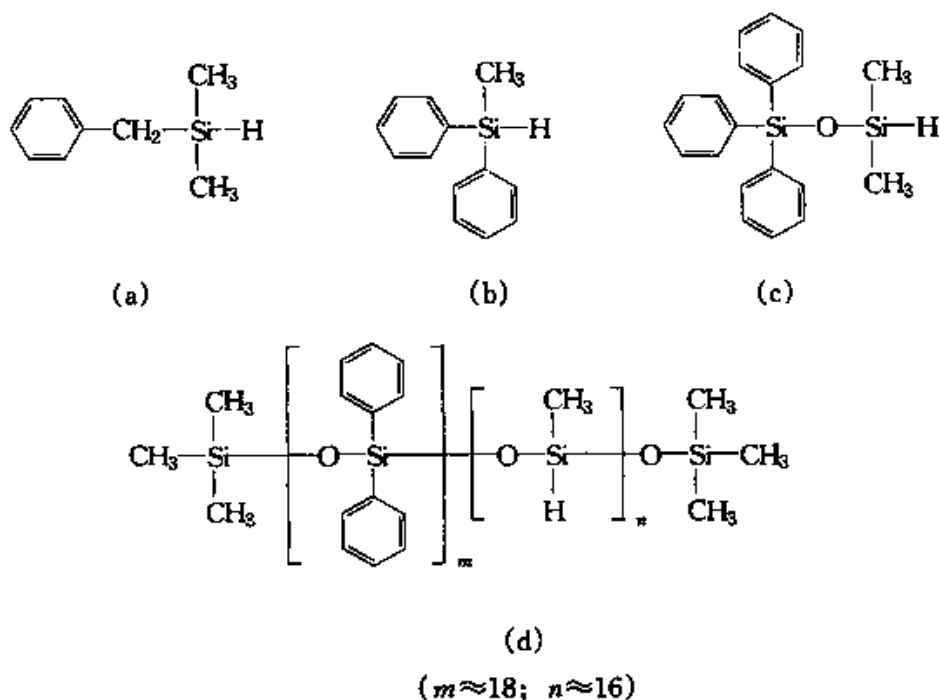
含氢聚甲基硅氧烷类更适用于石英毛细管柱的去活^[52]。它可在 250~350℃ 较低的温度下进行去活反应，克服了在高温下硅烷化石英柱外涂层聚酰亚胺被氧化的问题。这种去活试剂有含甲基、苯基和氰丙基的三种：聚甲基氢基硅氧烷（俗称含氢硅油），其结构如下：



硅烷化方法是将弹性石英柱以动态或静态法涂渍纯液体的含氢硅油，用氮气吹 5~10min 后封住柱口，放在恒温箱中加热到

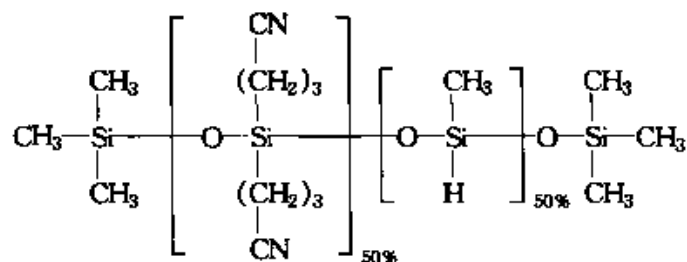
250~350℃, 用约 10 倍柱体积的二氯甲烷洗涤柱子, 最后在 280℃ 老化 30min。用这种试剂处理的柱子只适用于涂渍非极性固定液。

含苯基聚甲基硅氧烷的去活试剂有苄基二甲基硅烷 (a)、二苯甲基硅烷 (b) 1, 1, 1-三苯基甲基硅烷 (c) 和高分子量的含苯基的聚甲基氢基硅氧烷 (d)。它们的结构如下:



使用这四种去活试剂处理弹性石英柱不仅可以去活而且可以使柱表面具有适合于涂渍极性固定液的湿润性。使用这几种试剂的去活方法^[53]是: 将 5%~10% 的聚苯基甲基氢基硅氧烷甲苯溶液以动态法涂渍到毛细管柱中, 用氩气吹柱子 10h 以除去溶剂, 将柱子两端封死, 注意不要让空气进入柱中。最后在 300℃ 下去活 10h。

二氰丙基甲基氢基硅氧烷的结构如下:



使用这种试剂处理石英柱的基本步骤同上。不同的是去活在 250℃ 下保持 10h, 即可得到满意的效果。

(四) 毛细管柱的涂渍

1. 动态涂渍法

动态法系以惰性气体压力推动固定液溶液通过毛细管柱, 在柱内壁上留下一层液膜。固定液的浓度一般为 10% ~ 20%, 根据固定液黏度和极性不同, 选择二氯甲烷或丙酮作溶剂。操作时需在毛细管柱尾连接一根与柱子内径相同、长度约 10m 的废毛细管, 以免溶液走到柱尾时速度发生变化。柱子的另一端插入固定液溶液中, 用高压氮气把固定液溶液压入柱内。当液体到达柱体积的 $\frac{1}{5} \sim \frac{1}{10}$ 时, 将插入固定液中的毛细管柱拉起离开液面。用 N_2 推动溶液的液柱向前移动, 速度为 2~6cm/s, 不得超过 10cm/s。涂完后柱子继续通 N_2 3~4h, 以完全除去溶剂。

动态法涂渍固定液速度快, 但常常得不到均匀的液膜, 重复性较差, 柱效也比较低。为了提高动态法的效果, 人们不断提出改进的方法。Levy^[54]等人提出一种限制流速的办法, 将装置置于要涂渍柱的后边, 在涂渍过程中使溶液流动速度稳定。也可采用汞塞法提高动态法的效果: 往色谱柱管中吸入柱长 10% 的固定液溶液, 停止抽空, 使毛细管入口离开液面, 让液柱后的弯月面移动几厘米。然后把柱入口处擦干净, 取一小滴干净的汞放入管中, 使汞塞长度为 8~10cm, 举起毛细管入口端以重力使汞塞进入柱中。把毛细管柱平放在没有对流风的桌面上, 并用一块玻璃片盖在毛细管平面上, 在毛细管末端装一段缓冲柱。施加一定压力使汞塞向前移动, 速度约为 0.5~0.7cm/s, 待液体离开毛细管柱之后, 取下缓冲柱。加大气体流量吹扫色谱柱 20min, 然后进行色谱柱的老化。

液膜厚度难于准确预测, 通常只能近似按以下公式计算,

$$d_f = r_c / 200 (\nu\eta/\gamma)^{0.5}$$

式中, d_f 为液膜厚度; r_c 为毛细管柱内径; ν 为涂渍溶液移动速度; η 为涂渍溶液的黏度; γ 为涂渍溶液的表面张力。

2. 静态涂渍法

静态涂渍法的优点是重现性好，柱效高。其方法要点是把固定液的稀溶液（2~20mg/ml）用真空系统吸入毛细管柱中，一端封口，从另一端抽真空，在低于溶剂沸点 10~15℃ 的恒温条件下使溶剂慢慢蒸发出去。这样在管壁留下一层薄薄的液膜，液膜厚度通常用 $d_f = r_c/200$ 公式计算。计算时应注意，涂渍液浓度为体积百分数，而实际配制时往往采用 g/ml 为单位，因此必须知道其相对密度。表 2-10 列出了一些固定液的相对密度。在静态涂渍法中，毛细管口的密封是一个关键性问题，溶剂与封口的交界面不能留下气泡，否则它将会把柱内的部分或全部涂渍液带出柱外。为此人们已经研究过许多封口方法和材料^[52~58]，如用有机胶、水玻璃、各种蜡脂和聚四氟乙烯等。这里推荐硬脂酸甘油酯和水玻璃作封口材料。

表 2-10 部分固定液的密度^[59]

固定液	密度/(g/cm ³)	固定液	密度/(g/cm ³)	固定液	密度/(g/cm ³)
AN-600	1.08	OV-101	0.96	DC-200	0.97
OV-105	0.99	DC-510	1.00	OV-210	1.32
DC-550	1.07	OV-225	1.09	DC-710	1.10
OV-275	1.16	DEGS	1.26	PEG 400	1.13
OS-124	1.21	QF-1	1.32	OV-1	0.98
SE-30	0.96	OV-3	1.00	SE-54	0.98
OV-7	1.02	SF-96	0.97	OV-11	1.06
Silar 5CP	1.13	OV-17	1.09	Silar 10c	1.12
OV-22	1.13	SP-2401	1.30	OV-25	1.15
Squalane	0.83	OV-61	1.09	XE-60	1.08

为了缩短制作柱子的时间，选用溶剂时除考虑对固定液的溶解性能外，还应尽量选用挥发性强的。例如，一支 20m 长、内径为 0.3mm 的毛细管柱在室温下蒸发，若用二氯甲烷作溶剂需要 15h，而选用戊烷只需要 8h。

Kong 和 Lec^[60]提出了高温（85℃）下的静态涂渍法，加快了溶剂的挥发速度。国内徐秉玖等人^[61]改进了这一方法，建立了所

谓自由逸出静态涂渍法。该方法是在高于溶剂沸点 75℃ 或 80℃ 的恒温条件下进行。不需抽真空使溶剂自由挥发，蒸发溶剂时在毛细管柱上接上一段缓冲柱增加阻力。这种方法简便，涂渍速度快，柱效高，可用于各种柱径和固定液的涂渍。

3. 毛细管柱的交联

涂渍在毛细管柱内的固定液，通过分子间的共价连接（原位交联）或与毛细管柱壁连接（键合），使液膜稳定性得到提高。制备这种毛细管柱的技术称之为毛细管柱的交联。交联柱有下列优点：

① 增大黏度，减小柱流失，提高柱子的使用温度，交联使原来线性的固定液分子变成网状结构。制备好之后，用溶剂把未交联的低分子物质洗去，从而提高了固定液的热稳定性。

② 抗溶剂冲洗，有利于柱内污染物的清除。

③ 防止固定液在柱中脱落，允许注入大体积稀溶液，不致于造成柱子超载。

④ 防止固定液的热重排。固定液交联形成的固定液网状结构阻止热重排。

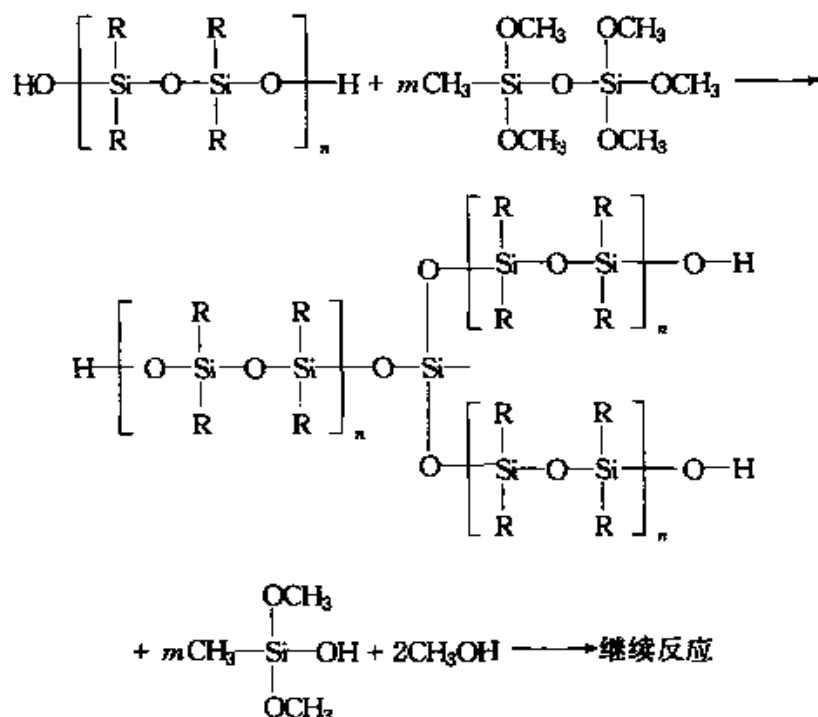
制备交联柱有两种方法，其一是通过固定液的缩合或固定液在柱壁上的硅醇基反应形成 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键而实现交联固化。另一方法是聚硅氧烷上的甲基（或乙烯基）经引发剂引发产生 $\text{Si}-\text{C}-\text{C}-\text{Si}$ （即碳与碳间形成键）的反应。下面介绍几种交联的方法：

（1）加热缩合法

① 固定液直接与玻璃柱内壁上的 $\text{Si}-\text{OH}$ 缩合固化。其原理是涂渍在柱内的端羟基固定液在加热过程中与玻璃表面的硅醇基产生缩合键合而实现交联化。其方法是把涂渍完的柱装入气相色谱仪中，在大约 0.3bar 的压力下通入氢气冲洗，以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率升至 300°C 保持过夜，即可完成缩合固化。这种方法可应用于各类端羟基固定液，能得到热稳定性和惰性都很好的柱子。例如经过这种方法交联的 OV-1701-OH 和 OV-31-OH 色谱柱，可长期在 330°C 使用。而非极性的 PS-086 和 PS-347 色谱柱，使用温度可高达 380°C 。对于氰基固定液的缩合，应注意采用低的程升速度和高的

载气流速，目的是防止在缩合过程中可产生胺基而增加柱子活性。缩合键合的固化程度与可供缩合的柱壁硅醇基密度、固定液分子量和膜厚等因素有关。

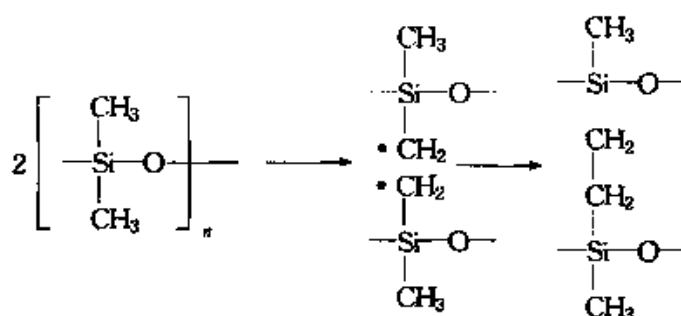
② 在交换剂作用下产生缩合固化常用的交换剂有：甲基三甲基硅氧烷、二甲基二甲氧基硅氧烷和氰丙基三乙氧基硅氧烷。方法通常是将含有一定数量交联剂的端羟基固定液涂渍在柱子上后，用 N_2 吹 5min。然后把两端封住，在恒温箱 60°C 保持 1h，打开柱两端并将柱子装在色谱仪上，约在 0.4bar 压力下通 H_2 ，以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率升至 280°C 保持 6h，即可完成固化。这种交联固化可形成大分子网状结构，其反应式如下



柱内壁网状大分子的形成，可提高柱子的热稳定性，例如非极性固定液通过甲基三乙基硅氧烷的缩合固化，可使柱子使用温度提高到 $380 \sim 390^\circ\text{C}$ 。

(2) 原位自由基引发法 原位自由基引发法是广为应用的一类交联方法。这类方法的交联机理主要是通过不同自由基母体，如过氧化物、偶氮化合物、臭氧或 γ 辐射诱导等产生的自由基与聚

合物链形成 $\text{Si}-\text{C}-\text{C}-\text{Si}$ 链段交联结构。其形成方式为



把引发剂按一定比例与固定液混合配成涂渍液，按静态法或动态法涂渍柱子，将两端封住后放在色谱仪柱室内，以 $41^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率升到适当温度（决定于不同引发剂）。保持一定时间进行交联固化。对液体引发剂的交联方法是：先按常规方法涂渍毛细管柱，涂好后用氮气通入引发剂液体，把引发剂蒸气带入毛细管柱约 2h。然后与上述的相同的条件交联。对蒸气压较低的液体引发剂可直接加到固定液中。常用的引发剂有如下几类：

过氧化物引发剂：这类引发剂有过氧化苯甲酰（BP）、过氧化二异丙苯（DCP）、过氧化叔丁基（TBP）、过氧化 2, 4-二氯苯甲酰（DCBP）。BP 和 DCBP 很活泼，可在较低的温度下进行交联。但缺点是会产生极性强的分解产物，改变固定液的极性，而且在甲基聚硅氧烷固定液中溶解度小，容易引起交联后的液膜不均匀，DCP 和 TBP 分解温度高，反应活性小一些。但它们的分解产物为中性，对固定液和柱极性影响不大。DCBP 分解温度比 TBP 低一些，是值得推荐的引发剂。

偶氮化合物引发剂：近年来研究表明多种极性和非极性固定液都可由偶氮引发交联，对固定液不会发生氧化，副产物对柱极性没有影响。这类引发剂主要有偶氮叔丁烷（ATB）、偶氮叔辛烷（ATO）、偶氮异丁腈（ATBN）和偶氮叔十二烷（ATD）。其效果最好的是 ATB 和 ATO。

臭氧引发剂：这类引发剂适用于中等极性和非极性固定液。对于 OV-1、SE-33、SE-54、OV-215 等固定液只需室温即可固化交联。而对 SE-30、OV-1701、SE-52 和甲基氰丙基聚硅氧烷等固定

液需在 50~150℃ 交联^[62]。臭氧也适合于含有甲基或乙烯基固定液的引发交联。但是由于 O₃ 要渗透到固定液中才能引发交联, 因此适用于薄膜毛细管柱的交联。为减少柱子浪费, 柱子可先经过评价, 选质量好的再通臭氧交联。这种方法重复性好, 设备简单, 无残留副产物。此外, Schomburg^[63] 和 Bertsch^[64] 等人曾提出用⁶⁰Co 高能照射法交联固定液。但由于这种方法费用昂贵, 而且对极性固定液的交联效果不理想, 对弹性石英毛细管柱的外涂层聚氯亚胺有破坏作用, 所以该方法应用不多。

二、毛细管柱的质量评价

无论是自制的还是商品的毛细管柱, 在使用前都要对其性能进行评价。能反映柱子综合性能的有三项主要指标, 即柱效、表面惰性和热稳定性。但这三项指标数值随测试样品和操作条件而异。规定标准化的色谱参数和测试样品, 才能准确地测量和客观地评价柱子性能。Grob^[40,65] 等人规定了标准化测试条件并且提出用各种极性、各种官能团的混合物进行测试, 以便考核柱子的不同性能, 如极性和酸碱性等。这些化合物包括醇类、醛类、酮类、酚类、游离醇、酯类、胺类、烷烃和芳香族化合物。目前一些色谱工作者和柱生产厂家采用 Grob 的检测实验方法。

(一) 毛细管柱的分离能力

柱效能常用每米柱长理论塔板数来衡量, 柱的性能、理论塔板数的大小, 很大程度上取决于操作条件, 如载气性质、流速、柱温以及进样量等, 通常可以用下式表达

$$n/m = 16 (t_R/w_b)^2/L$$

或
$$n/m = 5.54 (t_R/w_h)^2/L$$

式中 t_R —— 色谱峰保留时间;

w_b —— 色谱峰峰底宽;

w_h —— 色谱峰峰高一半处的宽度;

L —— 柱长。

1. 分离数

分解数是在碳原子数为 n 和 $n+1$ 的两个相邻标准同系物的峰之间, 使分离度达到时可插入组分峰的数目, 它是一个易于测量的参数, 既适用于恒温操作, 也适用于程序升温, 程序升流速操作。测试的样品要根据固定液的性质来选择。分离数的公式为

$$TZ = \frac{t_{(n+1)} - t_{R(n)}}{W_{h(n+1)} + W_{h(n)}} - 1$$

TZ 与容量有关, 常采用 $K=3$ 时的 TZ 来比较柱效。

2. 涂渍效率

涂渍效率是在最佳条件下, 理论与实测塔板高度之比, 用百分数表示为

$$CE \% = H_{\text{理论}} / H_{\text{实测}} \times 100$$

它表明一根毛细管柱达到“理想性”的程度。一般性能好的柱子涂渍效率在 80%~100% 之间。

(二) 毛细管柱活性的考查

毛细管柱的活性主要是由于玻璃和石英内壁的硅烷醇基与极性组分中的氢或硅氧烷桥之间氢键的键合作用。另外由于在玻璃内存在金属氧化物所表现出的酸碱活性所引起吸附。这些峰将造成峰扩宽和拖尾, 响应值减小, 对试样产生催化作用。采用 Grob 的测试方法, 一次实验可以得到柱子的综合性能信息, 即分离效率、吸附活性、酸碱度以及固定液液膜厚度等数据, 包括某些定量的概念, 适用于不同类型和不同固定液柱子的性能评价, 由于该方法条件标准化, 所得结果可以直接比较。Grob 试剂组成和浓度, 以及实验的标准条件分别见表 2-11 和表 2-12。

表 2-11 Grob 实验混合物的组成

实 验 物 质	缩 写 符 号	20ml 正己烷溶剂 中溶解的量/mg
甲基癸酸脂	E ₁₀	242
甲基十一酸脂	E ₁₁	236
甲基十二酸脂	E ₁₂	230

续表

实 验 物 质	缩 写 符 号	20ml 正己烷溶剂 中溶解的量/mg
癸烷	C ₁₀	172
十一烷	C ₁₁	174
(十二烷) ^①	C ₁₂	
辛醇-1	Ol	222
壬醛	al	250
2, 3-丁二醇 ^②	D	380
2, 6-二甲苯胺	A	205
2, 6-二甲苯酚	P	194
二环己基胺	am	204
2-乙基己酸	S	242

①可代替 C₁₁以减少在极性固定液中可能出现的峰重叠。

②溶于氯仿。

表 2-12 Grob 实验方法的标准化测试条件

柱长/m	H ₂ 作载气时甲烷 流出时间/s	升温速率 / (°C/min)	N ₂ 作载气时甲烷 流出时间/s	升温速率 / (°C/min)
10	20	5.0	35	2.5
15	30	3.3	53	1.65
20	40	2.5	70	1.25
30	60	1.67	105	0.84
40	80	1.25	140	0.63
50	100	1.0	175	0.5

实验步骤为：柱室始温小于 40℃，用甲烷来调节载气流速和合适的分流比。使甲烷流出时间的误差调整到表 3-7 所示时间的 ±5% 之内。按表所示调节升温速率，注入样品量要使每一组分在 2.0mg 左右。注入样品后迅速将柱室升至 40℃（薄液膜柱 30℃），然后开始程序升温至达到终温。记录各组分的峰高，保留时间以及流出温度。可用流出峰的峰形和不对称因子（A_s）来考查柱子的可逆吸附。

$$A_s = \frac{a+b}{(a+b) - (a-b)}$$

式中， a 和 b 是从峰顶处画垂直线把基线分为两半，前一半为 a ，后一半为 b 。 A_s 反映出与高斯峰的偏离程度，表示在流出过程中溶质和色谱柱之间发生的作用。也可用拖尾因子来描述可逆吸附的程度，即

$$TF\% = (a'/b') \times 100$$

式中， a' 和 b' 与上式中的 a 、 b 类似，只是在 10% 峰高处测量峰宽，前边为 a' ，后边为 b' （见图 2-5）， TF 越大表示脱尾越严重。

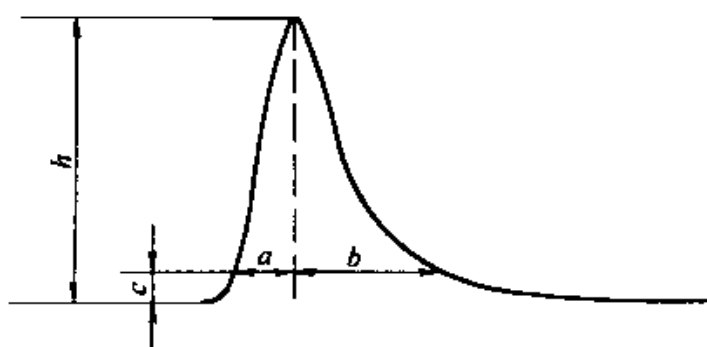


图 2-5 拖尾因子测定图

$c = 0.1h$, h 是峰高

柱子催化作用的测定比较困难。因为催化和吸附都会引起响应值减少。要区别催化作用还是吸附作用，可在不同温度下对各种官能团化合物进行色谱测定。吸附作用随温度升高而减弱，而催化作用随温度提高而加剧。

（三）毛细管柱热稳定性的考查

毛细管柱常常是在高温下或是程序升温到很高温度下使用。所以固定液涂渍的毛细管柱要具有良好的热稳定性。影响热稳定性的因素有两个方面。一是固定液本身的物理化学稳定性；另一方面是柱表面对固定液的催化作用会导致固定液的流失。玻璃表面的金属氧化物、碱可以使聚硅氧烷解聚。硼玻璃含碱量低，石英毛细管柱表面是纯净的二氧化硅，所以以其制成的毛细管涂渍柱的热稳定性一般都很好。

毛细管柱的热稳定性测试可采用流失速率试验。在程序升温条件下测量基线漂移，即把基线漂移随柱温变化画成曲线，如图 2-6 所示。各种柱子要在相同的实验条件下测试才能比较结果。为了防止检测器的污染，程序升温的最终温度要比最高使用温度低 20~30℃。

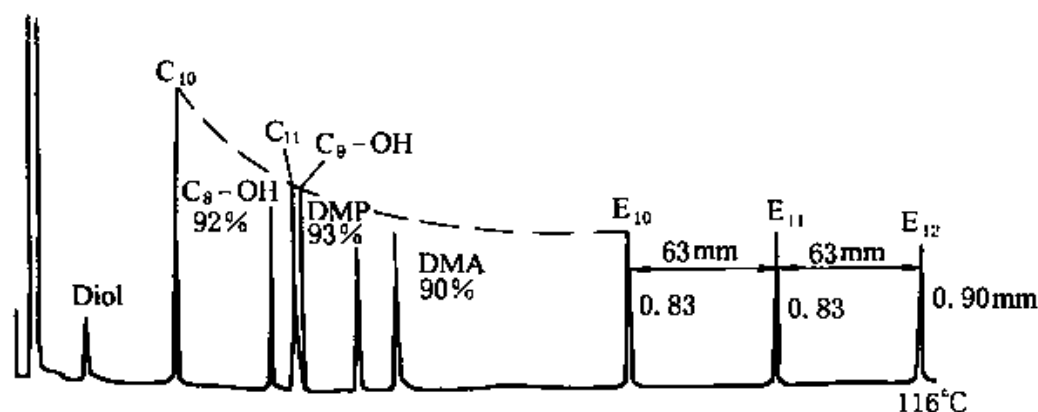


图 2-6 用 Grob 试剂测试混合物的色谱图

色谱柱：SE-52

色谱峰：Diol—2, 3-丁二醇；C₁₀—正十烷，C₈-OH—辛醇；C₁₁—正十一烷；

C₉-OH—壬醇；DMP—2, 6-二甲基苯酚；DMA—2, 6-二甲基苯胺；

E₁₀—癸酸甲酯；E₁₁—十一酸甲酯；E₁₂—十二酸甲酯

考察柱子的热稳定性也可采用在高温下使用后测定一些参数^[66]，如测量容量比 (*K*) 和理论塔板数；检查固定液的分解程度和液膜均匀性是否破坏；用标准化合物测保留指数，考查固定液和去活层是否变化等。

三、毛细管柱的安装

(一) 毛细管柱安装前的检查

① 检查气瓶压力以确保有足够的载气、尾吹气和燃气。载气的纯度不低于 99.995%。

② 清洁进样口，必要时更换进样口密封垫圈，进样口衬管和隔垫。

③ 检查检测器密封垫圈，必要时更换。如有必要，清洗或更换检测器喷嘴。

④ 仔细检查柱子是否有破损或断裂。

(二) 毛细管柱的安装

① 从柱架上将色谱柱两端各拉出大约 0.5m，以用于进样口和检测器安装，避免色谱柱锐折。

② 在柱两端安装柱接头和石墨密封垫圈，向下套柱接头和密封垫圈，离端口大约 5cm。

③ 标记和切割柱子。在柱距两端大约 4~5cm 处用标记笔标记，拇指和食指尽量靠近切割点抓牢，轻轻地拉并弯曲柱子，柱会很容易折断。如果柱子不容易折断，不要用力强行折，换个在离柱端更远的地方再刻一下，使其折断口处光滑。为确保柱两头切口截面没有聚酰亚胺和玻璃碎片，可用放大镜检查切口。

④ 在进样口安装色谱柱时，先查看仪器说明书找到正确的插入距离，并且用涂改液把这个距离标出来。将色谱柱插入检测器，用手指拧紧柱螺帽直到它固定住色谱柱，然后再拧螺帽 $1/4 \sim 1/2$ 圈，这样当加压时色谱柱不会从接头脱出来。

⑤ 打开载气，确定合适的流速。设定柱头压力，分流比和隔垫吹扫至合适的水平。如果使用分流和不分流进样口，检查清洗分流阀至 ON（开）状态，确认载气流过色谱柱，将色谱柱一端浸入丙酮瓶中检查是否有气泡。

⑥ 将色谱柱安装到检测器上时，查看仪器说明书所提供的正确插入距离。

⑦ 检查有无泄漏。在未仔细检查色谱柱有无泄漏之前对柱子不能加热。

⑧ 清洗系统中的氧气至少数 10min，如果色谱柱被打开暴露到空气中很长时间（几天），那么需要更长时间（1~2h）来清洗系统以排除所有的氧气。

⑨ 设定正确的进样器和检测器温度。

⑩ 设定正确的尾吹气和检测器气流。点火、打开检测器至 ON 状态下。

⑪ 注射非保留物质 [甲烷 (FID)、乙腈 (NPD)、二氯甲烷

(ECD)、空气 (TCD)、氩气 (质谱)] 以检验进样器是否正确安装。如果出现对称峰则安装正确, 如果有峰拖尾, 重复进样口安装程序。

(三) 毛细管柱的老化

(1) 在比最高分析温度高 20°C 或最高柱温 (温度更低者) 的条件下老化柱子 2h, 如果在高温 10min 后背景不下降, 立即将柱子降温并检查柱子是否有泄漏。

(2) 如果用 Vespel 密封垫圈的话, 老化完后重新检查密封程度。

(3) 注射非保留物质以确定合适的平均线速度。

四、毛细管柱的保护

在使用毛细管柱过程中, 主要是防止固定液流失, 因为固定液流失会使柱效能降低。事实上色谱柱固定液流失是自然的、是热力学平衡过程。色谱柱固定液聚硅氧烷通过聚合物本身的取代基形成环状分子。聚合物碎片之间由于取代基作用也可形成一些短键聚合物碎片。当这些碎片从色谱柱流出, 它们会被检测到, 从而导致信号的增强。在毛细管柱使用的全过程中这种反应一直发生。因此, 所有的色谱柱都有不同程度的流失。氧是导致严重柱流失的主要因素, 在色谱分析时尽量减少色谱仪气路系统氧的含量、使用好材料的部件以及选择正确的操作条件, 可降低柱固定液的流失, 延长柱子使用寿命。下面介绍几点注意事项:

① 使用高纯度的载气。氧气含量不宜高于 $1 \times 10^{-6} \text{g/g}$ 。

② 利用净化器可以除去较低级别气体中的氧和碳氢化合物杂质。通常杂质含量可减少到 $100 \times 10^{-6} \text{g/g}$ 或更少。

③ 聚合物材料通常不稳定。因此, 调节器主体, 阀盘座, 密封圈和隔膜应首选金属材料。

④ 管线只能使用没有油或其他污染物的铜管或不锈钢管, 推荐使用制冷级铜管。

⑤ O 形圈或其他聚合物垫圈的阀最好用有焊接金属、波纹形密封垫。

⑥ 整个系统必须无泄露，并且确保样品中不存在非挥发性物质。因为氧和污染物对固定液的分解有催化作用，会导致柱流失增强。

⑦ 在柱子安装后加热柱箱之前，柱子必须用干净的载气清洗15min。如果色谱仪是新的，或进样器和仪器管线进行维护或修理过，仪器应当再清洗15~30min；

⑧ 各种固定液的热稳定性不一样，柱流失对背景信号的影响随固定液种类和所受温度变化而变化。当柱箱温度接近于柱温的上限时柱流失也会增加。所以应当尽量在较低的温度下工作以延长柱子的使用寿命。

⑨ 一旦柱子损坏，由于固定液降解的程度不同，重新老化后有可能改善柱性能。

五、商品毛细管柱

随着色谱固定相的发展，商品毛细管柱的品种迅速增加。不同长度、内径、膜厚的各种固定相商品柱品种繁多。在商品柱制造技术方面，国外厂家起步较早。它们生产的商品柱往往性能较为稳定，但价格比较昂贵。在国内，目前生产商品毛细管柱的单位也不少，中国科学院大连化物所、北京石油化工研究院、中国科学院兰州化物所、济南精益仪器研究所等单位都有商品柱可供选购。为方便选用，本节列出部分常用商品柱供色谱工作者参考。

（一）非极性毛细管柱

1. 100% 聚二甲基硅氧烷毛细管柱

相似固定相：AT-1, BP-1, CP-SIL-5, DB-1, DC-200, HP-1, MTX-1, 007-1, MDN-1, OV-17, OV-101, Rtx-1, RSL-150, SE-30, SP-2100, SF-96。

使用温度范围：等温 - 60 ~ 325℃；程序升温 - 60 ~ 350℃。

规格：长度 5, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 105m；
内径 0.1, 0.2, 0.25, 0.32, 0.53mm；膜厚 0.1, 0.11, 0.15, 0.17, 0.2, 0.25, 0.33, 0.4, 0.5, 0.88, 1.0, 1.5, 2.65, 3.0, 4.0,

5.0 μm 。

主要分析用途：胺类、烃类、酚类、杀虫剂、聚氯联苯、硫化物、香精和香料。

生产厂家：Agilent, Alltech, J&W, Restek, Supelco.

2. 5%-二苯基-95%-二甲基硅氧烷毛细管柱

相似固定相：AT-5, BP-5, BP-5, DB-5ht, CP-SIL BCB, DB-5, GC-5, HP-5, MTX-5, 007-2, MDN-5, OV-5, PTE-5, Rtx-5, RSL-150, SPB-5, SE-52, SE-54。

使用温度范围：等温 -60~325℃；程序升温 -60~350℃。

规格：长度 5, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 105m；内径 0.1, 0.2, 0.25, 0.32, 0.53mm；膜厚 0.1, 0.11, 0.15, 0.17, 0.2, 0.25, 0.33, 0.4, 0.5, 0.88, 1.0, 1.5, 2.65, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0 μm 。

主要分析用途：生物碱、脂肪酸甲酯、卤代化合物、芳香化合物、药品。

生产厂家：Agilent, Alltech, J&W, Restek.

(二) 中等极性毛细管柱

1. 6%氰丙基苯基-94%二甲基硅氧烷共聚物毛细管柱

相似固定相：AT-1301, DB-624, DB-1301, HP-1301, Rtx-1301, Rtx-624, 007-502。

使用温度范围：等温 -20~280℃；程序升温 -20~300℃。

规格：长度 15, 30, 60, 75, 105m；内径 0.25, 0.32, 0.53mm；膜厚 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 μm 。

主要分析用途：杀虫剂、醇类、氧化剂、亚老哥尔类 (Aroclors)。

生产厂家：Agilent, Alltech, J&W, Restek.

2. 6%氰丙基苯基-94%二甲基硅氧烷共聚物毛细管柱

相似固定相：AT-624, CP-624, CP-Select624CB, DB-VRX, Rtx-624, Rtx-502, VOCOL, 007-624。

使用温度范围：等温 - 20 ~ 260℃；程序升温 - 20 ~ 270℃。

规格：长度 25, 30, 60, 75, 105 m；内径 0.18, 0.2, 0.25, 0.32, 0.53 mm；膜厚 1.0, 1.12, 1.4, 1.8, 3.0 μm 。

主要分析用途：挥发性卤代化合物。

生产厂家：Agilent, Alltech, J&W, Restek, Supelco.

3. 35%二苯基-65%二甲基硅氧烷共聚物毛细管柱

相似固定相：AT-35, DB-35, HP-35, Rtx-35, SPB-3, SPB-608, Sup-Herb.

使用温度范围：等温 - 40 ~ 300℃；程序升温 - 40 ~ 320℃。
规格：长度 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 105m；内径 0.18, 0.25, 0.32, 0.53mm；膜厚 0.1, 0.2, 0.25, 0.33, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 μm 。

主要分析用途：胺类、杀虫剂、药品、亚老哥尔 (Aroclors)。

生产厂家：Agilent, Alltech, Restek, Supelco。

4. 4%氰丙基苯基-86%二甲基硅氧烷共聚物毛细管柱

相似固定相：AT-1701, DB-1701, HP-1701, OV-1701, Rtx-1701, SPB-1701, 007-1701。

使用温度范围：等温 - 20 ~ 280℃；程序升温 - 20 ~ 300℃。

规格：长度 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 105 m；内径0.18, 0.2, 0.25, 0.32, 0.53 mm；膜厚 0.1, 0.2, 0.25, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 μm 。

主要分析用途：杀虫剂、药品、除草剂、TMS糖、亚老哥尔类 (Aroclors)。

生产厂家：Agilent, Alltech, Restek, Supelco.

5. 50%二苯基-50%二苯基-50%二甲基硅氧烷共聚物毛细管柱

相似固定相：AT-50, BPX-50, CP-Sil 19, CP-Sil 24CBRS�-300, DB-17, DB-17ht, HP-50, OV-17, Rtx-50, SP-2250, SPB-50, 007-17。

使用温度范围：等温 40~260℃；程序升温 40~280℃。

规格：长度 10, 15, 20, 30, 25, 40, 50, 60 m；内径 0.18, 0.2, 0.25, 0.32, 0.53 mm；膜厚 0.1, 0.16, 0.20, 0.25, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5 μm 。

主要分析用途：药品、乙二醇、杀虫剂、甾族化合物。

生产厂家：Agilent, Restek, Alltech, J&W, Supelco.

6. 50%三氟丙基-50%甲基硅氧烷共聚物毛细管柱

相似固定相：AT-210, HP-210, DB-210, Rtx-200.

使用温度范围：等温 - 45 ~ 240℃；程序升温 - 45 ~ 260℃。

规格：长度 10, 15, 20, 30, 40, 60, 105m；内径 0.18, 0.25, 0.32, 0.4, 0.53 mm；膜厚 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 μm 。

主要分析用途：醛类、酮类、有机或有机磷、杀虫剂、除草剂。

生产厂家：Alltech, Agilent, Restek, J&W.

7. 50%氰丙基苯基-50%二甲基硅氧烷共聚物毛细管柱

相似固定相：AT-225, BP-225, CP-Sil43CB, DB-225, HP-225, OV-225, Rtx-225, RSL-500, SP-2330, 007-225.

使用温度范围：等温 40~220℃；程序升温 40~240℃。

规格：长度 12, 15, 25, 30, 60 m；内径 0.2, 0.25, 0.32, 0.53, 0.75 mm；膜厚 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 1.0 μm 。

主要分析用途：醛醇、乙酸酯类、中性甾醇、聚不饱和脂肪酸。

生产厂家：Agilent, Alltech, J&W, Restek, Supelco.

8. 50%氰丙基-50%甲基硅氧烷共聚物

相似固定相：DB-23, HP-23, Rtx-2330, SP-2330/2340/2380/2560, 007-23。

使用温度范围：等温 40~250℃；程序升温 40~260℃。

规格：长度 15, 25, 30, 50, 60 m；内径 0.2, 0.25, 0.32, 0.53 mm；膜厚 0.2, 0.25, 0.5 μm 。

主要分析用途：顺/反脂肪酸异构体。

生产厂家：Agilent, J&W, Restek.

(三) 极性毛细管柱

1. INNPhaseTM bondable PEG 毛细管柱

相似固定相：AT-WAX, BP-20, 007-CW, CP wax52CB, Carbowax PEG 20M, DB-WAXetr, HP-INNOWax, Stabilwax, Supelcowax-10。

使用温度范围：等温 40~260℃；程序升温 40~270℃。

规格：长度 10, 15, 25, 30, 50, 60 m；内径 0.2, 0.25, 0.32, 0.53 mm；膜厚 0.1, 0.2, 0.25, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μm 。

主要分析用途：醇类、芳香族类、香精油、溶剂。

生产厂家：Alltech, Agilent, J&W, Restek, Supelco.

2. 键合聚乙二醇毛细管柱

相似固定相：Carbowax, HP-Wax, Rtx-Wax。

使用温度范围：等温 20~250℃；程序升温 20~264℃。

规格：长度 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 m；内径 0.1, 0.2, 0.25, 0.32, 0.53 mm；膜厚 0.1, 0.2, 0.25, 0.4, 0.5, 1.0 μm 。

主要分析用途：醇类、芳香族类、香精油、溶剂、乙二醇类。

生产厂家：Agilent, Restek, Supelco.

3. 交联聚乙二醇毛细管柱

相似固定相：AT-1000, CP Wax 58CB, DB-FFAP, HP-FFAP, Nukol, OV-351, Stabilwax-DA, SP-1000, 007-FFAP。

使用温度范围：等温 60~240℃；程序升温 60~250℃。

规格：长度 15, 25, 30, 50, 60 m；内径 0.2, 0.25, 0.32, 0.53 mm；膜厚 0.1, 0.25, 0.3, 0.5, 1.0 μm 。

主要分析用途：酸类、醇类、醛类、酮类、腈类、丙烯酸酯类。

生产厂家：Agilent, Alltech, J&W, Restek.

(四) PLOT 毛细管柱

1. Al_2O_3 毛细管柱

相似固定相: $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{KCl}$, $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Na}_2\text{SO}_4$, Alumina Plot, CP- $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{KCl}$ PLOT HP-PLOT Al_2O_3 , AT-Alumina, GS-Alumina, Rt-Alumina Plot。

使用温度范围: 200℃。

规格: 长度 15, 30, 50m; 内径 0.25, 0.32, 0.53mm; 膜厚 5.0, 8.0, 16 μm 。

主要分析用途: $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 烃、环丙烷、丙烯乙炔、丙二烯、1, 3-丁二烯。

生产厂家: Alltech, Agilent, J&W, Restek。

2. Molesieve 毛细管柱

相似固定相: AT-Mole Sieve, CP-Molesieve 5A, HP-PLOT Molesieve, Molesieve 5A-PLOT, RT-Msieve 13K, WGS-Molesieve。

使用温度范围: 300℃

规格: 长度 15, 30 m; 内径: 0.32 mm; 膜厚: 12, 25, 50 μm 。

生产厂家: Agilent, Alltech, J&W, Restek。

主要分析用途: 气体分析。

(五) 超低流失毛细管柱

1. 100% 聚二甲基硅氧烷毛细管柱

相似固定相: DB-1, HP-1, Rtx-1。

使用温度范围: 等温 60~325℃; 程序升温 60~350℃。

规格: 长度 15, 20, 25, 30, 60 m; 内径 0.1, 0.2, 0.25, 0.32 mm; 膜厚 0.1, 0.25, 0.33, 0.4, 0.5, 1.0 μm 。

主要分析用途: 胺类、烃类、酚类、杀虫剂、聚氯联苯、硫化物、香精和香料。

生产厂家: Agilent, Restek。

2. 5% 二苯基-95% 二甲基硅氧烷毛细管柱

相似固定相: DB-5S, HP-5MS, PTE-5, Rtx-5MS.

使用温度范围: 等温 60~325 °C; 程序升温 60~350 °C。

规格: 长度 12, 15, 25, 30, 50, 60 m; 内径 0.2, 0.25, 0.32 mm; 膜厚 0.1, 0.25, 0.33, 1.0 μm 。

主要分析用途: GC/MS 痕量分析、生物碱、脂肪酸甲酯、卤代化合物、芳香化合物。

生产厂家: Agilent, J&W, Restek.

3. 5%二苯基-95%二甲基亚芳基硅氧烷毛细管柱

相似固定相: HP-5TA, CP-Sil 8CB-MS, DB-5MS, MDN-5S, PTE-5, Rtx-5MS, XTI-5。

使用温度范围: 等温 60~325 °C; 程序升温 60~350 °C。

规格: 长度: 12, 15, 25, 30, 50, 60 m; 内径: 0.2, 0.25, 0.32 mm; 膜厚: 0.1, 0.25, 0.33, 1.0, 1.5 μm 。

主要分析用途: GC/MS 痕量分析、生物碱、脂肪酸甲酯、卤代化合物、芳香化合物。

生产厂家: Agilent, Restek.

4. 35%二苯基-65%二甲基亚芳基硅氧烷毛细管柱

相似固定相: BPX-35, DB-35MS, HP-35MS, MDN-35, Rtx-35。

使用温度范围: 等温 40~340 °C; 程序升温 40~360 °C。

规格: 长度 15, 30 m; 内径 0.25, 0.32, 0.53 mm; 膜厚 0.15, 0.25, 0.5, 1.0 μm 。

主要分析用途: 胺类、杀虫剂、药品亚老哥尔 (Aroclors)。

生产厂家: J&W, Alltech, Agilent, Restek.

参 考 文 献

- 1 孙传经. 气相色谱分析原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 1993
- 2 中国科学院大连化学物理研究所. 气相色谱法. 北京: 科学出版社, 1973
- 3 李浩春, 卢佩章. 气相色谱法. 北京: 科学出版社, 1998
- 4 Gidings J G. J Chromatogr. 1960, 3: 520
- 5 Matsen J M, Harding J W. J Chromatogr. 1963, 12: 145
- 6 Gidings J G. Anal Chem. 1965, 37: 1580

- 7 中国科学院化学研究所色谱组. 气相色谱手册. 北京: 科学出版社, 1977
- 8 Hollis O L. J Chromatogr Sci. 1973, 11: 335
- 9 Grushka E. Bonded Stationary Phase in Chromatography Michigan. Ann Arbor: Ann Arbor Science Pub, 1974
- 10 Halasz I. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 1969, 8: 453
- 11 Dewar R A, Majer V E. J Chromatogr. 1963, 11: 295
- 12 Halasz I, Horvath C. Anal Chem. 1964, 36: 1178
- 13 Poole C F, et al. Chem Rev. 1989, 89: 377
- 14 Yancey J A. J Chromatogr. Sci. 1994, 32: 349
- 15 Yancey J A. J Chromatogr Sci. 1994, 32: 403
- 16 Abrahm M H, et al. J Chromatogr. 1990, 518: 329
- 17 Abrahm M H, et al. J Chromatogr. 1991, 587: 229
- 18 Poole S K, et al. J Chromatogr. A 1995, 697: 415
- 19 Poole S K, et al. J Chromatogr. A 1995, 697: 429
- 20 Preston S T. J Chromatogr. Sci. 1970, 8: 18A
- 21 Leary J J, Justice J B, Ltsuge S, Lowry S R, Isenhour T L. J Chromatogr. Sci. 1973, 11: 201.
- 22 Klaus K U. Pakings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques. New york: Marcel Dekker, Inc, 1990
- 23 Lee M L, Wright B W. J. Chromatogr. 1980, 184: 235
- 24 Lee M L, Yang F J, Bartle K D. Open tubular column gas chromatography. New York: John & Wiley of Sons, 1984. 50
- 25 Onuska F I, Karasek F W. Open tubular column gas chromatography in environmental sciences. New York: Plenum Press, 1984. 27
- 26 Poole C F, Schutte S A. Comtemporary practice of chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1984. 79
- 27 吴采樱, 曾昭睿. 现代毛细管柱气相色谱法. 武汉: 武汉大学出版社, 1990.
- 28 Zhuravlev L T, et al. J Phys Chem. 1965, 39: 236
- 29 Desty D H, et al. Anal Chem. 1960, 32: 302
- 30 Grob K J. HRC. of CC. 1979, 2: 599
- 31 Bartle K D, et al. Chromatographia. 1961, 14: 387
- 32 Mccasova M, Terarik K. J Chromatogr. 1973, 79: 15
- 33 Alexander G, Rutten GAFM. J Chromatogr. 1974, 99: 81
- 34 Franken J J, et al. J Chromatogr. 1976, 126: 117
- 35 Bading H T, et al. Chromatographia. 1977, 10: 404
- 36 Schicke J D, et al. J Chromatogr. 1975, 112: 97

- 37 Nota G, et al. *J Chromatogr.* 1974, 95: 229
- 38 Vidal - Madjar C, et al. *Anal Chem.* 1977, 49: 768
- 39 傅若农, 刘虎威. 高分辨气相色谱及高分辨裂解气相色谱.
北京: 北京理工大学出版社, 1992. 113
- 40 Grob K. *Making and manipulating capillary columns for gas chromatography.* Berlin: Huethig Verlag, 1976.
- 41 Ane W A, et al. *J Chromatogr.* 1973, 77: 799
- 42 Gronin D A. *J Chromatogr.* 1974, 97: 263
- 43 Franken J J, et al. *J Chromatogr.* 1977, 144: 253
- 44 Welsch T H, et al. *Chromatographia.* 1977, 10: 22
- 45 Lee M L. *J Chromatogr Sci.* 1984, 22: 136
- 46 Grob K, et al. *J Chromatogr.* 1982, 244: 197
- 47 Grob K, Grob G. *J HRC of CC.* 1980, 3: 197
- 48 Schomburg G, et al. *Chromatographia.* 1979, 12: 651
- 49 Blum W, Grob K. *J Chromatogr.* 1985, 346: 341
- 50 Grob K, et al. *J HRC of CC.* 1979, 2: 31
- 51 Markides K, et al. *J Chromatogr.* 1985, 254: 53
- 52 Wooley C L, et al. *J HRC of CC.* 1984, 7: 329
- 53 Markides K, et al. *J HRC of CC.* 1985, 8: 378
- 54 Levy R L, et al. *Anal Chem.* 1968, 40: 459
- 55 Grob K, Grob G. *J HRC of CC.* 1982, 5: 119
- 56 Kim T R, et al. *J HRC of CC.* 1982, 5: 571
- 57 高毅飞, 张桂琴, 杨吉坡. 色谱. 1986, 4: 310
- 58 顾佩英, 王昌时. 色谱. 1986, 4: 108
- 59 Rijka J A, Rutten GAFA. *Technique for static coating of glass capillary columns, in recent dvance in capillary gas chromatography.* Ed. . Berisch; Huthig, 1982. 117
- 60 Kong R C, Lee M L. *J HRC of CC.* 1983, 6: 319
- 61 Xu B, Vermeulen N P E. *Chromatographia.* 1984, 18: 520
- 62 Buijten J, Blomberg L. *J Chromatogr.* 1984, 283: 341
- 63 Schomburg G, et al. *Chromatographia.* 1982, 15: 599
- 64 Bortsch W, Pretorius V, et al. *J HRC of CC.* 1982, 5: 432
- 65 Grob K, et al. *J. Chromatogr.* 1981, 219: 13
- 66 Schomburg G, et al. *J Chromatogr.* 1974, 99: 63

第三章 高效液相色谱柱的类型和结构

第一节 高效液相色谱柱的类型

与所有其他色谱方法一样，色谱柱是进行液相色谱分离的核心部位。

发生在色谱柱中的分离过程，均受热力学因素和动力学因素的控制。为得到满意的分离，首先必须考虑固定相的性质及其与溶质相互作用的强弱，这主要体现在色谱柱填料的设计、合成及选择上。为使分离的谱带展宽尽可能地小，就需要对柱子进行优化设计并将填料填充成性能优良的柱子。

高效液相色谱柱可以按其分离模式，也可以按其分离的规模来进行分类。此外，随着色谱技术的发展，不断有新的柱型出现，例如，最近几年出现的整体（monolith）柱就是一个很好的例子。这种柱子不是以微粒型填料填装的，而是在柱子中通过可控制的聚合反应或其他相分离过程直接形成连续、整体型柱床。此外在柱外制备连续柱床后整块装入柱中的方法也应属于此类柱子。

若按色谱分离模式来分，大致可分为正相、反相、离子交换、疏水作用、体积排除、亲和以及手性等类型。表 3-1 给出了这种分类的诸模式及其所依据的分类原理和适用范围。

表 3-1 按色谱模式分类的各类色谱柱

柱类型	分 离 原 理	适 用 对 象
反相	依据因溶质疏水性的不同而产生的溶质在流动相与固定相之间分配系数的差异而分离	大多数有机化合物；生物大、小分子，如多肽、蛋白质、核酸、糖缀合物。样品一般应溶于水相体系中
正相	依据溶质极性的不同而产生的在吸附剂上吸附性强弱的差异而分离	中、弱至非极性化合物。样品一般应溶于有机溶剂中

续表

柱类型	分离原理	适用对象
离子交换	依据溶质所带电荷的不同及溶质与离子交换剂库仑作用力的差异而分离	离子型化合物或可解离化合物；样品一般应溶于不同 pH 值及离子强度的水溶液中
体积排除	依据分子尺寸及形状的不同所引起的溶质在多孔填料体系中滞留时间的差异而分离	可溶于有机溶剂或可溶于水溶液中的任何非交联型化合物
疏水作用	依据溶质的弱疏水性及疏水性对盐浓度的依赖性而使溶质得以分离	具弱疏水性且其疏水性随盐浓度而改变的水溶性生物大分子
亲和	依据溶质与填料上的配基之间的弱相互作用力即非成键作用力所导致的分子识别现象而分离	多肽、蛋白质、核酸、糖缀合物等生物分子及可与生物分子产生亲和相互作用的小分子
手性	手性化合物与配基间的手性识别	手性拆分

当然表中所列举的各种色谱模式，还可以再细分为不同的类别。如反相色谱柱有不同的反相配基（ C_{18} 、 C_8 、 C_4 、 C_1 以及苯基等）的差异；正相又可细分为硅胶柱及各种键合正相柱；离子交换柱有强阴、强阳、弱阴、弱阳之分；体积排除色谱柱中，用于有机相的称为凝胶渗透色谱柱，而用于水相体系的称为凝胶过滤色谱柱，总称为体积排除，又称为尺寸排阻或凝胶色谱柱；疏水作用色谱柱虽然种类不多，但也有不同配基之分，如丁基、苯基和聚乙二醇基等；亲和色谱柱也是一大类，可依据配基的类别或亲和作用专一性的程度而进一步细分。由于制药工业的需求日增，手性柱近年有了很大的发展，其配基种类也急剧增加。总之，色谱柱的种类也正不断扩大，以适应于日益开拓的应用领域。

按照分离的规模及柱子的几何参数，高效液相色谱柱可以分为制备柱、分析柱和微型柱三种类型（表 3-2）。

表 3-2 按分离规模分类的高效液相色谱柱

类别	尺寸（柱径/mm）	备注
制备柱	>10	生产型制备柱直径可达几十厘米
半制备柱	5~10	

续表

类 别		尺寸 (柱径/mm)	备 注
分析柱		2~5	典型柱为 $\phi 4.6$ 或 $\phi 4$
微型柱 (micro column)	细径柱 (narrow bore column)	0.8~2.0	一般柱管可为金属亦可为塑料制, 如 PEEK 制
	毛细管柱 (capillary column)	0.05~0.5	毛细管柱可为填充柱亦可为开管柱
	纳米柱 (nano-column)	<0.1	填充柱或开管柱

用于制备分离的高效制备柱, 一般最小直径为 10mm, 已能用于毫克级的制备, 工业级制备所需的柱子, 内径一般在 20mm 以上, 长度一般为几百毫米, 也有可达 1m 甚至更长的柱子, 以用于制备克级至千克级高纯度的产品。毫无疑问, 目前应用最广的, 还是分析型柱子。直径为 4.6 或 4.0mm 的标准柱子占据了市场的最大的份额。这种“标准柱”的柱长多为 250mm。此外, 在一些对柱效要求并不苛刻的情况下, 150mm 长的柱子也逐渐为使用者所接受。近年来, 随着细粒径填料, 如 $3\mu\text{m}$ 硅胶基质填料的发展, 预填充 $3\mu\text{m}$ 填料的短柱子也很流行, 其长度一般为 150mm 以下, 如 150、100、50 甚至 30mm。近年来, 为适应于微量和痕量分离、分析之需, 微型柱发展很快。微型柱也还可以再细分为细径柱、毛细管柱和纳米柱等。在微型柱中, 当属用于 LC-MS 联用上的细孔柱和用于毛细管电色谱 (CEC: capillary electrochromatography) 的毛细管柱最为重要。对于前者, 并没有太特殊的要求, 但因系用于多肽及蛋白等生物分子分离, 故在填料及柱子的设计中应尽量避免非特异性吸附; 而对后者而言, 应注意减小死体积和柱外体积。包括制备方法在内, 毛细管柱的设计和制造仍在继续发展之中。

第二节 高效液相色谱柱的结构

一、柱子的形状

现代高效液相色谱的色谱柱几乎均是管状的, 且多采用直形

(图 3-1)。这是因为在液相色谱,特别是在高效液相色谱中,由于使用了高效填料,并不需要很长的柱长。直型柱既利于加工,又利于填充,是最适宜的柱型。当然,在一些特殊的场合,如以膜为分离介质时,也使用盘型柱、径向柱;在使用开管毛细管柱时,因柱长较长,也可将柱子盘曲起来。但大多数情况下,液相色谱中均使用管形直型柱,而且是填充柱。近年来,随着复杂样品体系,如生物样品、环境样品分析的需要,特别是伴随着人类基因组测定、蛋白质组以及芯片技术、联用技术的发展,微型液相色谱柱和开管毛细管液相色谱柱重又引起了研究者的兴趣。在上述情况下,需要处理极微小的样品体积,但需要很高的分辨率,毛细管柱恰能满足这些要求,而其样品负载量小的缺点已不是限制性因素。

在高效液相色谱发展的早期,色谱工作者发现,细径柱子易引起柱效的降低。因此,对“无限直径效应”和管壁效应曾进行过深入的讨论^[1,2]。所谓无限直径效应,系指当在一根色谱柱柱头中心以点进样的方式进样后,伴随着样品中溶质谱带向柱尾的移动,必然会存在径向扩散。因此,当溶质谱带到达

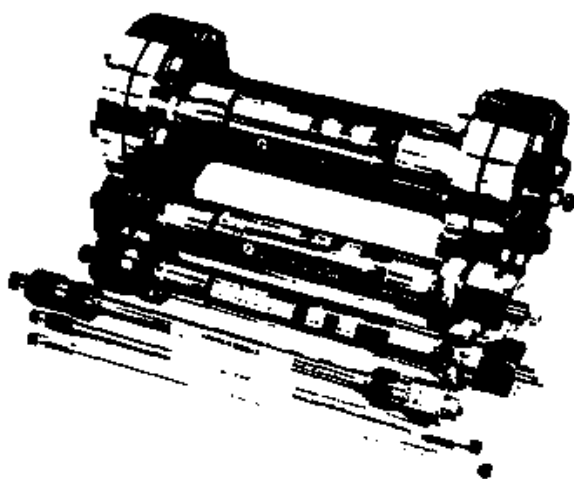


图 3-1 现代直管形高效液相色谱柱

柱尾时就不会仍然保持原有的“点状”,而必然扩展成“盘状”,如果柱径足够大,使得盘状的溶质谱带到出口时还没有与柱壁接触,则可称此柱为“无限直径柱”。Knox 认为,当点进样时,“无限直径” dc 可以用下式表示

$$dc \geq 60d_p + 4\sqrt{Ld_p\left(\frac{1.8}{\nu} + 0.06\right)}$$

式中, d_p 为填料的粒径, L 为柱长, ν 为流动相折合流速, 即

$$\nu = u \frac{d_p}{D_m}$$

u 为流动相线速度, D_m 为流动相中溶质的扩散系数。从 dc 的公式可知, dc 与填料粒径密切相关。粒径越大则达到无限直径所需要的柱径亦越大。对于 25cm 长, 以 $5\mu\text{m}$ 填料装的柱子。 dc 大约为 3.9mm。但是, 进一步的研究发现, “无限直径柱”对高效柱并不特别重要。我国色谱学者的研究结果也表明, 对于一根填充良好的高效液相色谱柱来说, 影响柱效的最大因素来源于柱外效应, 特别是连接进样阀与柱子及柱子与检测器之间的管路所带来的柱外体积, 这种柱外体积所产生的流型扩散引起的理论塔板高度与连接管长度成正比, 也与管内径的四次方成正比; 因此, 只要尽量缩短连接管路的死体积, 即用尽量短而细的连接管, 并且注意不要在连接管路上形成死区, 则就不必担心柱壁效应对柱效的影响。这一观点已得到实验的证明, 并为国际色谱界所接受。

但是另一方面, 对于柱效较低的柱子、直径较细或较短的柱子来说, 柱壁效应是存在的。一般情况下, 现代高效液相色谱填料多用六通阀进样。而且, 柱的入口处均加有阻止填料离子外漏的多孔筛板或滤片, 它们在样品注入柱子之初就有了一定的扩展, 使真正的点进样很难实现。这种由流型和径向扩散引起的柱效降低和峰形的畸变, 只有靠柱子的精细设计、制造与填装来加以改善。

二、高效液相色谱柱系统

(一) 柱子的连接与密封

现代的高效液相色谱柱填料, 多采用细粒径以获得高分辨率。但是, 细粒径填料的流体阻力往往很大, 必须采用高压泵以将流动相强制输运通过柱子。所以, 柱子必须能承受高压而不泄漏、不破坏才行。

现代高效液相色谱仪, 一般均可在 35~70MPa 的压力下工作; 此外, 为获得高性能的柱子, 往往需要以很高的压力, 例如 30~100MPa, 将填料的匀浆压入柱中。所以, 柱子必须有良好的密封性能。除可以利用带密封垫或密封圈的螺纹连接外 (例如, 在柱径

较大的高效制备柱上), 通常使用带锥套的线密封连接方式 (如图 3-2 所示)。当旋紧连接螺钉或柱头螺帽, 使锥套在压力下向上方移动时, 其边缘会接触位于阳螺栓上的锥面, 而锥面的角度稍大于锥套的角度。由于锥套前端边缘很薄, 它在挤压下受到锥面向内的压力会变形并抱紧内管, 同时与锥面接触处会形成一圈环状的密封面, 即形成了线密封。这种由金属在高的压力下变形而形成的密封十分紧密而可靠, 在耐受很高压力的同时, 又可造成很牢靠的机械连接, 使其牢牢抱紧所箍套的柱管或连接管而不致滑

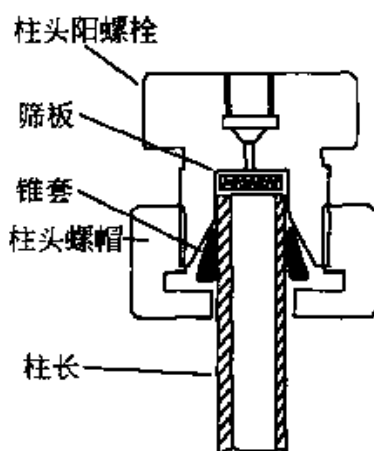


图 3-2 锥套密封示意图

脱。为保证可靠的连接, 首先必须保证锥套的角度要小于锥面的角度。否则, 锥套前缘将不会与锥面接触而变形, 形成线密封。其次, 锥套的前缘必须薄而有刃, 否则它将难以变形。还有一点必须注意的是, 与之配套的柱管的外圆应保持良好的圆柱形, 与锥套的内径可以滑配, 且表面应有很好的光洁度, 不应有轴向划痕或沟槽。只有上述几点均注意到了, 才能获得良好的密封。这种线密封方式既可用于色谱柱与柱头的密封, 又可用于连接管路的连接。锥套所用的材料, 主要是不锈钢。近年来, PEEK (即聚醚醚酮) 和聚四氟乙烯管常被用于高、低压流路的连接, 特别是 PEEK 管, 可耐受近 30MPa (4000psi) 的压力, 且化学稳定性亦好, 因此, PEEK 制的锥套也常用于管路的密封连接。

在现代的高效液相色谱仪上, 多采用外径 $1/16\text{in}^{\bullet}$ (即 1.6mm) 的不锈钢管为连接管, 其内径自 0.1~0.5mm 不等。近年来, PEEK 管和聚四氟乙烯管亦获得广泛应用。正如在前面所讨论的那样, 对于一根填充良好的高效液相色谱柱来说, 影响柱效的最大因素来源于柱外效应, 特别是连接进样阀与柱子及柱子与检测器

● $1\text{in} = 2.54\text{cm}$

之间的管路所带来的柱外体积。因此，应当尽量缩短连接管路的死体积，采用尽量短而细的连接管，才能有效地降低柱外效应。

此外，通过理论分析可知，在圆柱形管中的谱带展宽，起源于管壁所引起的抛物线形的流型。破坏这种流型，使流体产生径向混合，就有可能降低连接管带来的柱外展宽效应。

Halasz^[3]提出了使用几何变形管（紧密压缩的缠绕盘管）的方法，Katz 和 Scott^[4]则研究了利用蛇形管产生次级流的方案（图 3-3）。在蛇形管中的每个拐弯处，液流均会发生方向反转，迫使流体混合。研究结果表明，蛇形管（也可以使用折成锯齿状的管子）的方案大大优于螺旋管。而且蛇形管中发生的谱带展宽，实际上与流动相线速度无关（图 3-4）。因此，这种方式可以应用于很宽的速度范围。

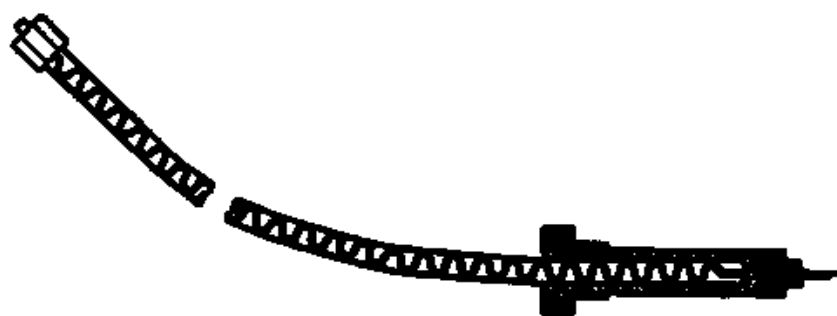


图 3-3 低扩展蛇形连接管

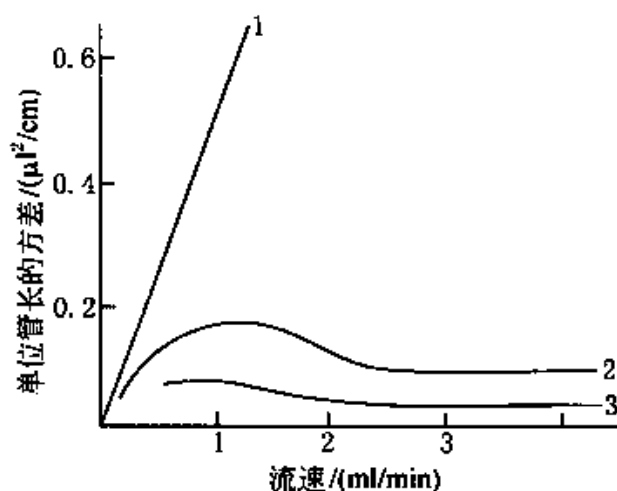


图 3-4 各种连接管的峰展宽与流动相线速度的关系

1—直管，内径 0.18mm；2—螺旋盘管，内径 0.13mm；

3—蛇形管，内径 0.13mm

在色谱柱及其连接管线的密封与连接的问题上，有一些不规范的操作。例如，有人为了防止漏液而往螺纹上包缠聚四氟乙烯薄膜（生料带），这样既不能彻底解决泄漏问题，同时还会将聚四氟乙烯的碎屑留在孔道内造成流路的堵塞。正确的做法是仔细寻找原因，然后对症加以排除。如果是锥套或柱头上相应的锥管变形而导致的泄漏。则应将连接导管去掉一段并换上新的锥套或更换柱头；如果是部件上螺纹损坏则应以一与之相符的板牙或丝锥将该部件重新攻丝，使螺纹能滑配自如地拧紧。另外，拧紧这些连接螺丝时，切忌使用过长、过大的扳手，或使用过大的力气，以防使螺牙变形而造成部件的损坏。

（二）筛板及分配板

色谱柱的另一种不可缺少的部件是筛板或称滤网，即阻挡填料从柱中流失的多孔网。它一般系用具有特定粒度的不锈钢粉末或镍粉在模型中烧结而成，颗粒的间隙即为筛板的孔，控制颗粒的大小即可得到不同的筛孔。筛孔应小于填料的直径，例如，对于粒径 $5\mu\text{m}$ 的填料，使用孔径 $1\mu\text{m}$ 或 $2\mu\text{m}$ 的筛板已敷应用。对于制备柱，因其填料粒径较粗，可使用多孔塑料制成的筛板或滤网，如聚四氟乙烯、尼龙或聚乙烯制的筛网均可。有的厂家，以两片孔径较大的不锈钢网，中间夹上滤纸或聚四氟乙烯滤膜，亦可充当很好的滤网。目前，一些色谱零件公司可以提供不同规格的不锈钢烧结筛板，其标称孔径有 $0.2\mu\text{m}$ 、 $0.45\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 等。我国北京钢铁研究院生产并销售筛板已有多年历史，质量亦足敷应用。在选用筛板时，宜选用厚度较薄者，以免引入过大的柱外体积而导致附加的峰展宽效应。此外，筛板的孔径宜与填料颗粒大小相匹配。有时，质量欠佳的色谱柱筛板孔径不均匀，会造成填料穿过筛板上的大孔而流失，造成柱床破坏，柱效下降。

制备柱的柱径较大，一般为 10mm 以上。为使样品能均匀地加至柱头，常需要在筛板前再加上一块分配板。这样，当样品溶液自连接管流至柱头时，可以通过精心设计、加工出来的沟槽和孔洞，使样品溶液均匀地分配至柱头全截面的柱床上。这些沟槽一般由若

干条自圆心至外径的辐射沟和几个同心圆形沟槽，以及在沟槽底部向下连通的小孔组成。当然，分配板会引入额外的柱外体积，但是，由于制备柱柱体积较大，分配板所带来的谱带加宽并不大，一般不必加以考虑。

（三）材料与加工

为耐受高操作压力并可方便地进行流路的连接，一般的高效填充柱，多以不锈钢为材料制成。在选材上，几乎均以 316[#] 不锈钢制造。这种不锈钢既有很高的机械强度、很好的韧性，同时，也具有很好的耐腐蚀性。如所用不锈钢质量较差，则在含有缓冲液的流动相环境中，特别是含 Cl^- 时会腐蚀生锈而造成柱子性能下降和对样品的污染。但是，在大多数色谱操作模式，如离子交换、疏水作用、亲和、亲水凝胶以及反相色谱的情况下，均需在含盐流动相中工作，因此，防锈蚀是一个必须考虑的问题。此外，在用于生化样品的分离时，还会发现不锈钢能强烈地吸附蛋白质，从而造成回收率的降低并影响分析的准确性。因此，有的厂家推出了以其他材料制造的柱子及其附件，借以减少这种非特异性吸附。例如，内壁衬玻璃不锈钢柱、钛柱及聚醚醚酮（PEEK）柱等。在进行制备性分离时，需使用中压液相色谱，其填料多以质地较软的高分子制成，因其颗粒一般较大，故不需要太高的压力。这种柱子可用玻璃或合成高分子材料（如有机玻璃、聚碳酸酯等）制成。

需要指出的是，色谱柱尤其是高效液相色谱柱的内壁应进行仔细的加工使其内表面光滑，以减少内壁附近的沟流现象与贴壁填料层的不均一性，降低柱壁引起的谱带展宽。利用特殊的涂层和径向压缩技术，也可以降低这种柱壁效应。一般情况下，柱管内壁光洁度应在 $\nabla 8$ 以上或以特殊的技术抛光成镜面。

（四）柱子的结构

通过以上的叙述可知，一套完整的色谱柱，即高效液相色谱柱系统，除填有填料的柱管外，还应有柱头及配套的连接管。柱头内应有锥套和筛板，连接管应包括连接螺钉、锥套和连接管。图 3-5 是一种典型的分析型高效液相色谱柱的结构示意图，也是目前较为

流行的一种柱型。

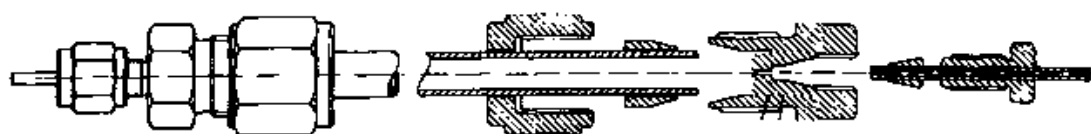


图 3-5 一种典型的高效液相色谱柱的结构

这种结构的柱子依连接管连接方式和柱头结构的不同，还可以细分成不同的形式。如连接管的连接螺钉可用阳螺钉形也可用阴螺母形，但现在通用的还是阳螺钉形，一般为英制 3/16in 的螺钉。但是，也有的厂家使用公制 M6 的连接螺钉。由于 3/16in 的螺钉的标称直径为 4.76mm，所以很容易与公制 M5 螺钉相混淆，如误用 M5 螺钉与 3/16in 接头柱子配合，很容易造成柱头的损坏，宜加注意。除连接管外，柱头的结构也可以采用不同的形式。如柱头的螺帽、螺栓既可以上阴下阳，亦可采用上阳下阴形式。此外，也有的厂家在柱子的两端攻上螺纹，再将带有阴螺纹的螺帽直接与其相连而完成接头的组装。

有的厂家，如 Agilent 等公司为降低柱子的造价，设计、制造了可更换柱芯的卡套式柱子（cartridge column）（图 3-6）。它由卡套和预装的可更换柱芯组成，柱芯两端面均有嵌入的筛板。更换柱芯时，只要拧开套管头上的螺栓，取出旧芯，换上新芯即可。须注意的是，这种柱芯的密封靠的是外径与柱芯外径相同的很薄的聚酰亚胺环片，当拧紧螺栓时，两端同时压紧而密封。聚酰亚胺环片很轻薄，拆卸时要防止丢失。由于柱套可反复使用，而消耗性的柱芯价格比标准的色谱柱便宜许多，故这种形式的柱子的使用成本要低得多。

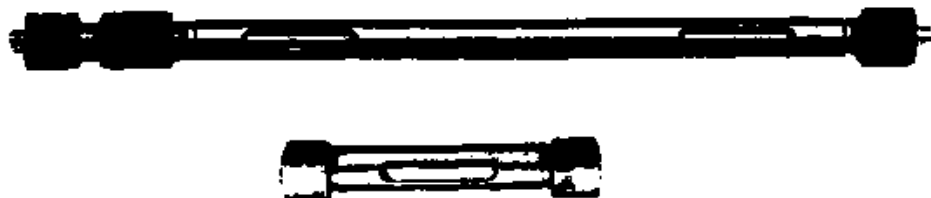


图 3-6 可更换柱芯的卡套式色谱柱

与卡套式柱子相类似，Waters 公司设计、开发了径向加压式

的可换柱芯柱。这种径向加压柱的柱芯，系由不同类型的填料装填于可变形的塑料，如聚乙烯制成的柱管中。使用时，将其置于特制的部件内，通过流体对柱芯从外壁均匀施以压力。这样，一方面可以消除一般不锈钢等硬质柱管壁附近填料的不均匀性和可能的沟流现象，可以有效地消除管壁效应；另一方面，径向的压力使柱床更紧密，从而可以很方便地获得更高的柱效。这种柱子与常规柱子相比成本较低，且很容易按比例放大，因而尤其适合于大规模制备分离之需。

（五）保护柱

柱子在使用过程中，均会受到来自样品和色谱体系中的污染而导致性能变坏、寿命缩短。这些污染包括不可溶性固体颗粒以及在柱子上造成不可逆吸附的物质。样品中的不可溶固体，如尘埃、脱落的过滤材料、输液泵柱塞密封环上磨下的碎末、操作者的头屑和衣物上的纤维、未完全溶解的样品、已溶解样品自进样器进入流动相后因溶解度的差异而产生的絮凝或沉淀等。它们均可能堆积在柱头筛板前而造成操作压力上升。样品乃至配制流动相的试剂和溶剂中，往往含有在柱子上产生不可逆吸附的物质，特别是分析生化样品、动植物中的成分以及药物等时，它们会造成柱效的降低，这是必须面对的一个问题。此外，有一些样品溶液的 pH 值较高或较低，它们均能引起填料的不可逆性破坏。防止这些污染与破坏的一个有效的方法是使用可拆卸性的在线滤网和保护柱（guard column，有时亦称为预柱）。在现代的液相色谱仪上，流动相的进口处、泵的进液止逆阀前，当然还有柱子的柱头均有筛板（或称滤网）。但是，流动相进口处的过滤器网孔往往较粗（如 $10\mu\text{m}$ ），太细会造成泵吸入流体时附加的阻力；而泵上、柱前的滤网又难以拆卸下来更换或清洗，因此，加一个可拆卸、更换滤网的在线过滤器就很方便。这种在线过滤器接在进样器与柱子之间，对通过进样器引入的固体颗粒和样品的沉淀等能有效地阻留。在设计和使用在线过滤器时最重要的原则是：尽量减少死体积以降低柱外谱带展宽（图 3-7）。

与不溶性固体颗粒物相似，更困难的是防止非特异性的、不可

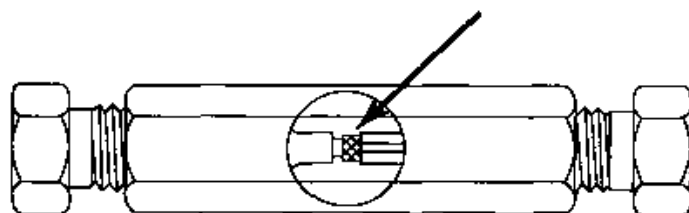


图 3-7 可拆卸式在线过滤器

逆性的吸附以及 pH 过高或过低对柱子造成的损坏。在进样器和柱子之间，或直接连接于柱头的保护柱，可以先于柱子承受这种损害，牺牲局部而保护了整体。早期的保护柱即是一支以相同填料、相同柱径填装的短柱（一般仅几厘米长）。进一步的研究表明，保护柱中不一定要装完全一样的填料，可以使用较粗颗粒的填料，例如制备型填料，但柱体积不宜过大。这样，由保护柱引起的柱外谱带展宽效应就不是很重要的了。根据前面对色谱基本理论的讨论可知，柱外谱带展宽效应在柱效损失 5%~10% 的范围内还是可以被接受的。因此，一般可以让保护柱体积占被保护柱子体积的十分之一至二十分之一即可。由于保护柱的寿命相对要短得多，所以现在多将保护柱制成可更换柱芯的套管式或卡套式（图 3-8）。如有的

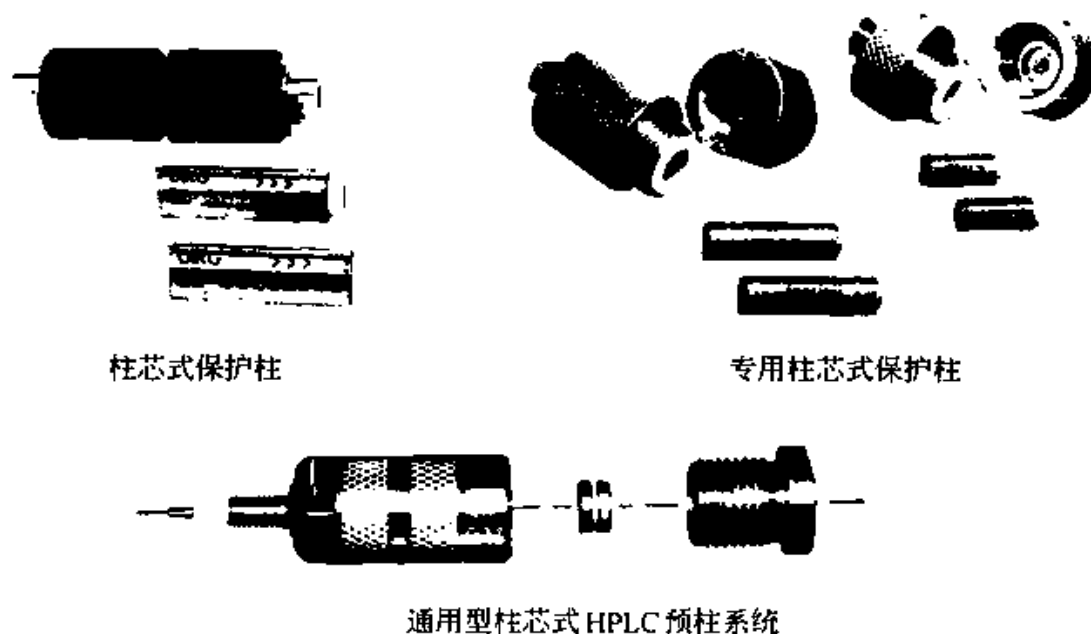


图 3-8 不同类型的保护柱

卡套式保护柱，芯心仅是一片1~2mm厚的粘结在一起的填料，使用与更换均很方便。近年，有几家公司设计、销售带有卡套式预柱的柱子，预柱芯的更换十分方便。更重要的是，预柱芯可以紧贴柱头，从而消除预柱与柱子间的死体积，不会引起柱效的降低。

近年来，用做保护柱的超短柱在快速分离上的优点重又引起了人们的兴趣。随着组合化学的发展，迫切需要进行快速且高通量的筛选。以3 μm 或5 μm 填料充填的保护柱或超短柱，尽管仅有几十厘米长，但已具有几千至近万理论塔板数。同时，当以通常的线速度淋洗时，分析一组样品仅需1~2min。因此，很适于进行高速筛选之用。这种柱子的设计、制造与使用，与通常的柱子或保护柱相比，并没有原则的差异或不同。但对于相对仍然较贵的“快速柱”来说，给它再加一个“保护柱”，仍然具有实际应用价值。

第三节 液相色谱柱的填装、评价及维护

一、液相色谱柱的填装

液相色谱柱、特别是高效液相色谱柱的填装，需要有一定的技巧和熟练的技能。因此，有人甚至将“装柱”看作是“艺术加技术”。但是，只要掌握了一些基本的规律和方法，任何实验室都可以填装出具有较高柱性能的色谱柱。当然，目前大多数实验室多是购买商品预填装柱来满足分离、分析之需。但是在一些有特殊需要的情况下，或为节省经费，在实验室中自行填装高效液相色谱柱还是可取的。

在有关色谱基本理论的讨论中可以得知，发生在色谱柱中总的谱带展宽效应与流动相的线速度、粒径以及溶质在流动相中的扩散系数、溶质在固定相中的扩散系数等密切相关。对于给定粒径的填料来说，能否填充成均匀而紧密的柱床，是得到高性能柱子的关键，而采用粒径细且分布均匀的优质填料，则是得到高性能柱子的最基本保证。

对于粒径较大的填料（多用于制备色谱），如粒径 $\geq 20\mu\text{m}$ 的填料，可以用干法装填，其基本方法与填装气相色谱柱类似。但需

注意的一点是，在干法填装制备液相色谱柱时，不要过分剧烈地振动和敲打。振动和敲打会使填料因自身粒径的不均匀性而产生柱子整体上的不均一性，即较大的填料粒子靠近柱壁，而较细粒径者则倾向集中于柱中心。这种柱内颗粒分布的不均匀性，会导致柱效的降低。比较好的方法是采用小量多次的方法向柱内加入填料，例如每次加入相当于3~5mm柱床的填料，装一点即在实验台或桌面上垂直地轻轻磕几十下，续加一些填料后，重复上述操作，直至填装完成。

对于高效柱、特别是现在流行的以3~10 μm 细柱径填料填装的高效分析柱，则必须使用湿法，即匀浆法装柱。因为，随着粒径的缩小，因静电作用和表面能的加大，粒子间倾向于聚集和“粘结”，若以干法填装，它们会粘附在连接管及柱壁上，也会因强烈的静电作用彼此排斥，因而难以填装出均匀而紧密的柱床。这样，必须改以湿法装填，即将填料悬浮于适宜的液体中消除上述不良作用。但是，在固-液系统中仍然存在因重力而引起的沉降现象。粒子沉降的速度 V 为

$$V \text{ (cm/s)} = \frac{2gd^2(\rho - \rho_0)}{3600\eta}$$

式中， g 为重力加速度 (cm/s^2)， d 为粒子直径 (cm)， ρ 为粒子密度 (g/cm^3)， ρ_0 为液体密度 (g/cm^3)， η 为液体的黏度 ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)。从上述公式可知，粒子在液体中的沉降速度，与粒径直径的平方以及液-固密度之差成正比，而与液体黏度成反比。据此，湿法填装可以依阻止沉降的思路分成三种：一条思路是设法寻找与硅胶密度相近的溶液，以使 $(\rho - \rho_0)$ 减小而降低沉降速度。第二种方法是增加液体的黏度以阻止粒子的下沉。第三种方法是综合利用前两种方法，尽力减小沉降并尽快地在发生较显著的沉降之前完成装柱操作。

在 HPLC 发展的早期，常采用第一种方法，即“等密度法”来填装高效柱。多孔硅胶的骨架密度较高。例如，LiChrospher 100 的表观密度约为 2.3g/cm^3 ，LiChrospher 500 为 2.46g/cm^3 ，

LiChrospher 1000 为 $2.49\text{g}/\text{cm}^3$ 。不同牌号的硅胶因制法不同（例如，含有超细孔和封闭孔者表观密度小）而有差异，但多在 $2.2\text{g}/\text{cm}^3$ 以上。因此，需以高密度溶剂配制密度与硅胶骨架密度相近的混合液。常使用的高密度溶剂为碘代和溴代烷类（表 3-3），再与适当比例的其他溶剂相配，配制出具有密度适宜的液体，使填料能呈“失重”状态悬浮于匀浆液中，以从容地用高压泵将其压入空色谱柱中，制出填装均匀的高效色谱柱。在配制上述等密度悬浮液时，除密度外，还要考虑填料的表面状况与化学性质。如填装反相柱，应选用极性较弱的溶剂，而填充正相柱，如以硅胶为填料时，则应选择极性较强的溶剂，以防止颗粒板结并保证有良好的润湿性，以使填料颗粒均匀地分散在匀浆液中。但是，碘代或溴代烷价格昂贵且多数有较大的毒性，因此，这种方法目前已经很少使用。不过，当填料粒径较大，且又难以干法填装时，等密度法将能发挥出特殊的作用。

表 3-3 常用于湿法填充的溶剂

名 称	密度/ ($\rho/(\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})$)	黏度 η / ($\text{mPa}\cdot\text{s}$ 20°C)	名 称	密度/ ($\rho/(\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})$)	黏度 η / ($\text{mPa}\cdot\text{s}$ 20°C)
二碘甲烷	3.3	29	四溴乙烷	3.0	-
二溴甲烷	2.5	10	碘甲烷	2.3	5
四氯化碳	1.6	10	氯仿	1.5	6
乙二醇	1.11	17	正丁醇	0.8	30
正丙醇	0.8	23	乙醇	0.8	12

第二种方法是高黏度法，即使用黏度较高的匀浆液体系以阻止颗粒的沉降。可以采用乙二醇、聚乙二醇、甘油以及石蜡油等高黏度液体调配匀浆液。但是，高黏度导致流体阻力加大，必将延长装柱时间且需使用更高的装柱压力，在实用上很不方便。因此，高黏度法已很少被采用。

最常用的方法是高压匀浆法。将填料悬浮在适宜的匀浆液中制成匀浆，在其尚未沉降之前，很快地以高压泵将其以很高的流速压进柱中，便可制备出填充均匀的柱子。高压匀浆法的设备，如图 3-9 所示。

装柱机的核心是气动放大泵，通常多设计放大率为 100，即低、高压柱塞直径比为 10:1，面积比为 100:1 的气动放大系统。若低压端输入 1MPa 压强的压缩空气（通常可用压缩空气钢瓶供给），则相同的压力会传递至高压端柱塞上，而高压柱塞面积仅为低压端的 1/100，因而其输出压强亦提高至 100MPa。由于气动放大泵很容易获得高压、高流速的输液，故很适于柱子的填充之需。

在装柱之前，先确定所用的柱型，以确定选用多大的匀浆罐体积。例如，常用的“标准”HPLC 柱为 $\phi 4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$ ，其内腔体积约为 4.2mL，约需 3.5g 填料。一般情况下，为保证填充的成功，需适当过量 15%~20% 为宜。如使用 4g 填料充填它，选择固-液比约为 1:10，则匀浆罐体积以 40mL 为宜。若罐过大，则可在匀浆罐内装入一个以惰性材料（如聚四氟乙烯或不锈钢）制的衬套将其调整至所需体积。

将选用的柱子仔细以乙醇或丙酮清洗干净，并以干净的热风吹干。如柱管内壁污染较重，也可以用表面活性剂及去离子水依次清洗，并以长竹签或塑料棒扎上棉纱或纱布往复抽擦，以除去污垢。但应注意不要伤及内壁表面的光洁度，尤其不能造成轴向的划痕。将清洁的柱管的一端装配上带滤板的柱头，另一端则连接至匀浆罐上。

配制匀浆液是高压匀浆法的重要一环，不同的填料应采用不同的匀浆液。不同的文献和实验室所报道的匀浆液的种类和比例有所不同。例如，填充硅胶正相柱，可以使用 1:1 的氯仿/甲醇；对于 C_{18} 反相填料，可以使用适宜比例的正己烷/氯仿混合溶剂。若有四

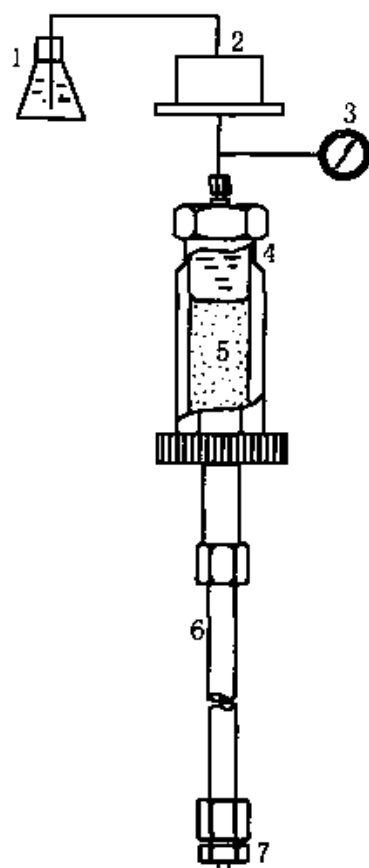


图 3-9 下行法装柱示意图
1—溶剂贮罐；2—气动放大泵；3—压力表；4—匀浆罐；5—匀浆液；6—色谱柱；7—柱头

溴乙烷等高密度溶剂，也可以以 20% 的高密度溶剂与 40% 的二氧化六环和 40% 的四氯化碳配成匀浆液。一些实验室中，常以 2:1 的四氯化碳/二氧化六环配成匀浆液，也可以填充出性能很好的柱子。称取所需重量的填料，将其置小烧杯中，按其重量的 10 倍量（一般也可以按体积计，即 10mL 的匀浆液中加入 1g 重的填料）加入匀浆液。摇动或搅拌均匀后，将其移至超声波浴中，以中强的超声波令填料粒子均匀而稳定地悬浮起来。最后，再以强超声短时间强化一下。超声处理的时间不宜过长，一般应不超过 2~3min，过长则可能造成颗粒的破碎。

将准备好的匀浆液立即倒入匀浆罐中，装满后，将匀浆罐盖好、旋紧，再以针筒抽取一定量的匀浆液，从盖子上的连接孔中插入匀浆罐内部并加注匀浆液至从连接孔中溢出为止。这一操作的目的是排除匀浆罐中的空气泡，空气泡的存在会妨碍向系统中迅速地施加压力。抽出注射针并将罐与气动放大泵的出液管路相连。确认连接正确且牢固后，即可开启放大泵的截门，令贮存于气动放大泵内的顶替液（正相时可以使用氯仿，反相时可使用甲醇）高速压入罐内。以常见的 5 μ m 多孔硅胶填料为例，填装压力为 50MPa 左右（细孔硅胶可至 70MPa）。这里使用的是瞬间升压的方式，也有文献报道使用程序加压。加压时，匀浆液中的填料滞留于柱尾的滤板上而匀浆液则被排除于柱外。开始时，排出的匀浆液因含部分气体，释压后会逸出而使液体浑浊。待全部匀浆液被排出后，因顶替液黏度较少而流速亦稍加大，且排出液有明显的外观上的变化。此时，可以稍稍降低填充压力，例如，降至约 35MPa，并维持 30~40min，然后，在约 30min 内逐步将压力降至常压。降至常压后，宜静置一段时间，例如 30min，以让柱床内的压力平衡。否则，过早拆卸下已填充的柱子时，会因柱子内部的残余压力而将柱头上的填料挤出柱外。拆下已填装好的柱子并装配上带有筛板（滤网）的柱头（注意：一定要将沾在柱头锥套上的填料除净，否则会影响到柱子的密封性），做好标记，即已完成柱子的填装。

在上述填装程序中应该注意的问题是：①高压操作的安全问

题。常发生的问题是柱子与匀浆罐连接不牢,造成加压时柱头被高压冲下或柱子从匀浆罐上滑脱。此时,轻则填装失败,材料损失,重则造成人身伤害事故,一定要加以防范。除每次填装前均须仔细确认是否连接正确且牢靠外,最好还可加上由法兰盘和长螺杆组成的预防脱落装置,以防万一。②通常,先填装的柱床较后填装的柱床紧密。因此,当使用时宜以相反的方向为宜,即让近匀浆罐一端作为使用时流动相的出口,而填装时的出口端则作为流动相的入口。③新柱子使用前应以甲醇冲洗 20~30 min 后,再改用流动相平衡。④新柱子宜选适宜的标准样品进行评价并记录,以备存查和比较。

实验和理论研究均指出,以上述下流式匀浆法难以填装成长柱子,其原因是,随着已填充柱床的增高,对流体的阻力亦逐渐增加,使在一定压力下通过柱床的流速降低,亦即柱床的增长速度变慢,在这一过程中,填料颗粒的沉降亦在进行,导致所填充柱床的紧密性和均匀性降低。为保证达到一定柱效,一次填充的单柱长度不宜过大。有文献指出,使用 6mm 内径的柱子,5 μ m 粒径填料,适宜的单柱柱长为 10~15cm。但是近年来, $\phi 4.6 \times 250$ mm 的预装柱已被认为是标准柱型,在这样的柱子上,多能获得 ≥ 80000 片/m 理论塔板的柱效。

为制取更长的柱子,可以使用上流法(图 3-10)。曾有报道,使用 3 μ m 填料,以上流法可以制备长达 1m 的柱子,且其柱效与短柱子相类似。上流法中使用的匀浆液浓度比下流法要小一些,速度也慢一些,因此所填充的柱床相对较均匀。近年来,由于微柱色谱和毛细管电色谱的发展,需要填微色谱柱乃至毛细管色谱柱,而上流法则可以用作为微柱的填充方法之一。

二、色谱柱色谱性能的评价

在填料的诸多特性中,使用者最关心的是以这些填料装成色谱柱后的分离效率、对指定溶质的选择性,在不同 pH 介质中的稳定性,不同批次但同型号填料间性能的重现性以及较适宜的操作压力。当用于生物样品的分离与分析时,还需要考虑柱子的样品负载

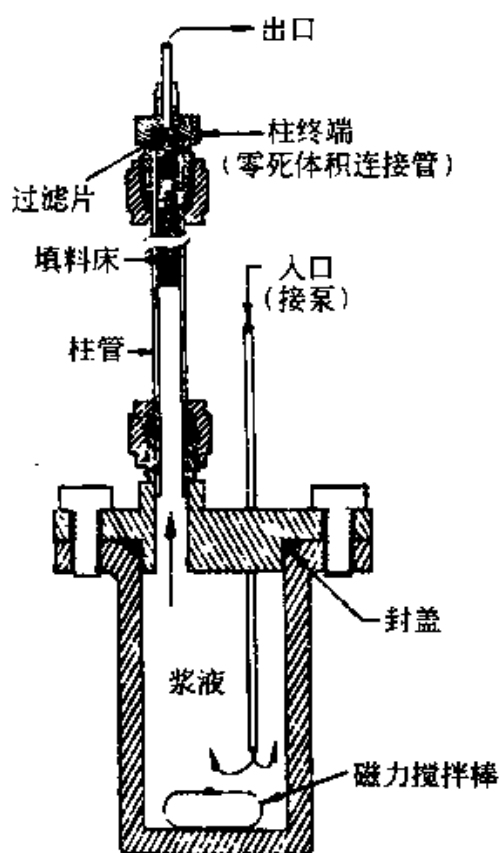


图 3-10 上行法装柱示意图

量和回收率等指标。

通常，以指定的一组标准溶质为样品，测定它们在柱子上的理论塔板数，以作为柱效的衡量指标。这种标准溶质的选择，因不同的色谱模式而异，也因不同的使用目的而有所不同。一般情况下，要求它们具有不同的容量因子（例如，第一个化合物 $k' = 0$ ，其余的在 2~10 范围内，能反映出对柱子性质的基本要求，而且能在一般的 HPLC 装置上得到清晰的信号。例如，对于反相填料，可以选择一组具有不同极性的芳香族化合物。这一组标准溶质可由苯、萘、菲或苯、甲苯、二甲苯等为基本组分，再添加以苯酚和苯胺等酸、碱性溶质而成。不

同的厂家推荐的标准溶质往往相差很大，如有的由尿嘧啶、对位乙基苯和对位丙基苯组成（Waters）。其中的尿嘧啶兼顾了碱性物质；有的厂家推荐用马来酸、苯胺、二甲基苯胺、苯二甲醛和苯甲醛组成，其目的是观察它们同时分离性质差异很大的化合物的能力。对碱性物质的分离能力是填料残余硅羟基和杂质金属离子含量多少的反映。因此，在试样中加入吡啶便可以很敏感地观察填料这一方面的性能。各实验室可根据自己的要求配制自己的标准溶质。也可以采用与一些著名厂家相同的标准溶质系列，以便于与之进行比较。从标准溶质系列的色谱图，便可以测定出各溶质的理论塔板数 N 。在测定时， N 的计算可按式

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

式中, t_R 为保留时间, $W_{h/2}$ 为半宽峰高, 它们既可以用时间, 也可以用记录纸上的长度来计算。当然, 理论塔板数的表达式有几种, 也都可以使用。不过, 以上式为最方便。之所以选用一组而不仅仅是一种试验溶质, 是因为它们可以提供更多的有关填料和填装情况的信息。 $k' \approx 0$ 的组分的 N 值, 可用以表征柱子填装的好坏以及 HPLC 系统的情况。如它的 N 值明显小于被保留组分的 N 值, 则说明此系统有较严重的柱外展宽效应。若 N 值随 k' 的减小而降低, 则说明填料本身的品质不佳。

从色谱图上还可以测量并计算出每一个峰的不对称因子。色谱峰的不对称因子 A_s 可以用峰高 10% 处的峰宽被峰高切割成的前、后两线段之比来计算, 即如图 3-11 上 CB/AC 之比。商品色谱柱子的 A_s 值, 应在 0.9~1.2 之间。超过此值, 说明柱子填充不佳或填料因制造不良而对溶质有较强的非特异性吸附。

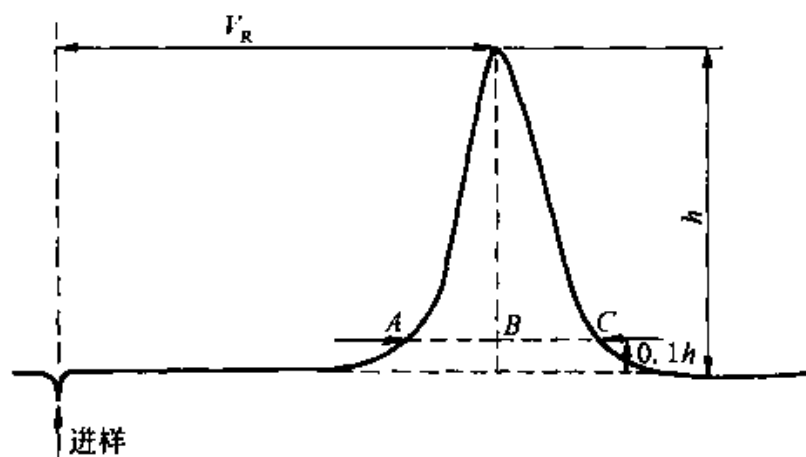


图 3-11 不对称因子 A_s 测定示意图

如果在标准样中加入了一对特定的化合物, 则从色谱图上还可以计算出这两个化合物的分离因子 α , 它表达为两个溶质的调整保留时间 t'_R 之比

$$\alpha = \frac{t'_{R(A)}}{t'_{R(B)}} \quad t'_{R(A)} > t'_{R(B)}$$

需要注意的是，新购来的柱子在实验室中所测得的柱效，往往低于生产厂家给出的柱效。排除在保存和运输中所引起的柱性能的变化等因素外，柱外效应的影响可能是主要的原因。只要将柱外效应减至最小（主要是自进样阀至柱头，以及自柱头至检测器的连接管），一般就可以得到满意的色谱图。

对使用者来说，希望柱子既有高分离效率，又只需使用较低的操作压力。对一根柱子来说，所需的操作压力是由其渗透性所决定的。渗透性 K 定义为

$$K = K^{\circ} \epsilon_T$$

式中， K° 为比渗透率， ϵ_T 为柱子的总孔隙率。比渗透率

$$K^{\circ} = \frac{u\eta L}{\Delta P}$$

式中， u 为流动相线速度 (cm/s)， η 为流动相黏度 (Pa·s)， L 为柱长 (cm)， ΔP 为柱压降 (Pa)。柱子的总孔隙率 ϵ_T 可表达为

$$\epsilon_T = \frac{F t_M}{V_c}$$

式中， F 为流动相流速 (ml/s)， t_M 为死时间 (s)。所以， $F t_M$ 即为柱内死体积（柱内孔隙总体积）， V_c 为空柱体积。所以，可以表示为

$$K = \frac{FL\eta}{\pi r^2 \Delta P}$$

即渗透性与流动相流速、柱长及流动相黏度成正比，而与柱子的截面积和压降成反比。因此，记录下一根新柱子在一定淋洗条件下所需要的柱压，便能反映出柱子渗透性的变化。

三、色谱填料和色谱柱的生产厂家及供应商

经过 30 余年的发展，色谱填料和色谱柱技术已十分成熟。经过长期的发展和激烈的竞争，一些知名的色谱填料和色谱柱的生产厂家及供应商，逐渐形成了各自的特色，其产品也成为市场主流。表 3-4 列出了一些主要的厂家。

表 3-4 液相色谱填料及色谱柱的主要生产厂家及供应商

厂家(公司)	所在地区及网址(部分)	厂家(公司)	所在地区及网址(部分)
Agilent Technologies	USA www.agilent.com	Agilent Technologies (中国安捷伦科技公司)	中国 www.agilent.com.cn
Alkzo Nobel	Sweden, www.kromasil.com	Alltech	中国代理: alltechb@online.sh.cn
Amicon	USA	Analytichem	USA
Asahi	日本	Baker	USA
Bio-Rad	USA	Brownlee	USA
Chrompack	Netherlands	ES Industries	USA
Hamilton	USA www.hamiltoncompany.com	Hitachi (日立)	日本
Hypersil	UK, www.hypersil.com	Interaction	USA
ISCO	USA	Jasco (日本分光)	日本
Macherey - Nagel	FRG; www.macherey-nagel.com	Merck KGaA	FRG www.merck.de
Waters	USA www.waters.com	Mitsubishi (三菱化成)	日本
Pharmacia	Sweden	Phenomenex	USA
Scientific Systems	USA	Separations Group (Vydac)	USA
Serva	FRG	SGE	澳大利亚 www.sge.com;
Shimadzu (岛津)	日本	Showa Denko (昭和电工)	日本
Supelco	USA	SynChrom	USA
TOSOH	日本	Varian	USA
Whatman	UK, www.whatman.co.uk	大连依利特科学仪器有限公司	中国大连 elite@pub.dl.lnpta.net.cn

上表中公司的产品, 多已为广大用户所熟知。其中一些公司的

产品, 已进入国内市场。下面拟将这几个公司简要加以介绍。

安捷伦公司 (Agilent) 的前身, 即是惠普公司的测量仪器方面的各事业部。在 20 世纪末的 1999 年组成一个新公司。它所生产和销售的仪器及配套的色谱柱, 以优质而著称。在高效液相色谱填料方面, 更由于 Zorbax[®] 的加盟而实力大增。Zorbax 系由著名的色谱科学家 Kicland 所研制, 并由杜邦公司所生产和销售的系列色谱填料的注册商标。现在, Zorbax 的全部生产线已并入 Agilent 公司, 所以, Zorbax[®] 亦全部转入 Agilent 公司。Zorbax 系列高效液相色谱填料, 是以堆砌硅珠法生产的, 粒径 $3\mu\text{m}$, $5\mu\text{m}$ 或 $7\mu\text{m}$, 孔径 $70\text{\AA}$, 比表面积约 $300\mu\text{m}^2/\text{g}$ 。在这种基球的基础上, 经化学修饰后生产出包括键合正相、反相等系列产品。为适应生命科学和生物工程之需, Zorbax 以超纯硅胶 Zorbax Rx 为基球, 开发出了 Zorbax SB 系列, 即稳定键合相 (包括 C_3 、 C_8 、 C_{18} 、苯基以及氰丙基等) 特别是基于位阻效应的二异丁基十八烷基键合相, 更具有优良的耐低 pH 化学稳定性。这样, 就使得这些填料或色谱柱具有长寿命、低非特异性吸附以及耐较低 pH 的特点。对于碱性物质以及多肽, 蛋白质等生物分子不但可以得到对称的峰, 且回收率亦可以提高。此外 Zorbax 还发展了用于体积排除模式的填料 (PSM 系列, 有机相; 以及 GF 系列, 水相)、离子交换填料 (Zorbax SAX、WAX、WCX、和 SCX 系列) 以及手性填料 (Ultron ES-OVM 和 ES-Pepsin 柱)。

Waters 公司不但是高效液相色谱仪器的生产厂家, 也是一个各种高效液相色谱填料和色谱柱的供应商。除本公司研制和生产的系列填料和色谱柱外, Waters 还经营其他一些公司的产品, 如 YMC 的诸多品牌。Waters 公司自己的品牌有 Bondapak[®], $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$, Delta - pakTM, Nova - pak[®], Symetry[®], Waters Spherisorb 以及 XterraTM等, 其中的 Xterra 系以有机-无机球制备的填料系列。其基球以精细调控的整体技术获得“杂交”的基球, 再经化学衍生后, 便可制备出高效、宽 pH 范围 (pH1~12) 以及低吸附性的填料, 这对药物分析和筛选是很有用的。而 $\mu\text{Bondapak}$

C₁₈则是一种性能重现性非常好的高效液相色谱填料。能经历 20 多年但性能基本上保持一致的 HPLC 并不多， μ Bondapak C₁₈是其中一个代表性的品种。此外其专有的径向压缩柱也是很有特色的产品。

Bio-Rad 公司（伯乐）在生化分离仪器和用品上有其特长。Bio-Rad 公司在色谱填料及色谱柱方面也尽力凸现自己的特点，其 HPLC 填料主要有两个系列，即 Bio-Sil 和 Hi-Pore，后者孔径 30nm，主要针对生物大分子的分离。

Supelco 公司自 1979 年开始推出其 5 μ m 硅胶填料柱，除自行生产填料和柱子外，还销售一些其他公司的产品，包括 Pharmacia 的 FPLC 柱，TOSOH 的 TSK 柱等。这主要是因为 Supelco 公司的产品，以针对小分子的居多。因此，和其他公司的柱子恰可互补。Supelco 的柱子，除常规柱外，还生产与销售细径柱和微管柱。为了适合美国药典对 HPLC 的需求，也专门生产几种规格的适合药典方法的柱子。

Kromasil 是瑞典 Akzo Nobel 公司的硅胶填料的牌号，近年来开始在国内市场上逐渐为人所知，这种硅胶的纯度较高，化学稳定性好，比表面积亦较大，例如，6nm 孔径的硅胶的比表面积约 550m²/g，10nm 孔径者达 320m²/g。因此它不会是堆砌硅珠法所生产的，后者比表面积往往较低，因而样品负载量较小。Kromasil 硅胶的质量较稳定，但柱压较高往往使使用者感到不便。

Phenomenex 公司有自己的 HPLC 填料产品，但同时也代销其他许多公司的柱子，基本上各种色谱模式、各种规格的柱子均有供应。国内市场上对其 LunaTM较为熟悉，这种填料对酸性、碱性和两性化合物表现了很好的分离能力与峰形，而且与同型柱相比，柱压较低是其特点。

SGE 公司为澳大利亚的色谱仪器及零配件生产和供应商，近年来，在国际上和在中国市场上均很活跃。在色谱柱方面，除 GC 柱有其特色外，在 HPLC 柱方面，除自行生产外，还代销一些厂家的知名产品，如 NucleosilTM系列，以及近来销售的 Wakosil II 高

纯硅胶柱（日本和光公司），均是很有特色的填料和色谱柱。此外，SGE 公司开发的内衬玻璃的不锈钢柱管（GLT），可以有效地消除非特异性吸附，有其特色。

Alltech 公司生产并销售以硅胶为基质的各种 HPLC 填料及色谱柱，以适应于不同的需求，且大部为适于美国药典方法之用。Adsorbosphere® 是一个比较完整的系列；Macrosphere™ 300 则是 30nm 的大孔硅胶填料，适合于分离生物大分子。Platium™ 系列中更有了 1.5μm 的细粒径填料。该公司的 Alltima™ 也是一种重复性很好的低吸附填料。

Merck 公司和 Macherey-Nagel 公司均是生产和销售色谱填料和色谱柱的知名厂家。它们生产的 LiChrosorb、LiChrospher（Merck）和 Nucleosil（MN）均是世界知名产品。最近，Merck 推出的整体硅胶柱（Monolithic column）也是很有特色的产品。

TOSOH 公司的前身是日本的东洋曹打（TSK）。TSK 生产的 TSK-Gel SW 和 PW 高效凝胶过滤柱系列，以其稳定的性能和高市场占有率，成为了凝胶过滤色谱柱中的代表产品。

在国内的色谱仪器及零配件的企业中，以大连依利特公司科学仪器有限公司最为知名。依利特公司的前身系中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心所开办的色谱技术开发企业。在色谱仪器、器件及色谱柱的研制、开发与生产方面有长年的积累，是国内最大的高效液相色谱柱供应商，能提供各种色谱模式的、不同规格的色谱柱，其质量得到了广大用户的信赖。此外，青岛海洋化工厂生产高效液相色谱用硅胶已有多年的，其球形多孔硅胶有 5μm、7μm、10μm 等多种规格，可以用作高效液相色谱填料的基球。天津化学试剂二厂生产 YWG 和 YQG 型高效液相色谱填料，前者为无定型后者为球形填料。主要品种为 C₁₈ 反相及键合相正相填料，可以满足一般 HPLC 分离、分析之用。最近，营销色谱零配件和消耗品的迪马公司，研制了 Diamonsil™（钻石）HPLC 柱。Diamonsil 以高纯硅胶为基质，因而非特异性吸附较低，可同时分离酸、碱和中性化合物。

一 般 参 考 文 献

- G1 斯奈德 L R, 柯克兰 J J. 现代液相色谱法导论. 高潮等译. 北京: 化学工业出版社, 1988
- G2 王俊德等. 高效液相色谱法. 北京: 中国石化出版社, 1992
- G3 朱彭龄等. 现代液相色谱. 兰州: 兰州大学出版社, 1989

参 考 文 献

- 1 Horne J H K D S, Knox J H et al. Sep Sci. 1966, 1: 531
- 2 Knox J H, Laird G R and Raven P A. J Chromatogr. 1976, 122: 129
- 3 Halasz I, Gerlach H O, Gutlich K F and Walking P. U S Patent. 3, 820, 660, 1974
- 4 Katz E D and Scott R P W. J Chromatogr. 1983, 268: 169

第四章 用于色谱填料的无机基质材料

第一节 基 质 材 料

高效液相色谱填料，若依其基质材料来分，可分为两大类，即有机基质填料和无机基质填料，此外，有机-无机复合物亦有应用。目前，无机基质填料是研究和应用的主流，但有机基质填料因其独有的特性，日益引起重视，正获得飞速的发展。无机基质材料可以包括硅胶、氧化铝、氧化锆、羟基磷灰石、氮化物以及碳等，此外在生化分离上还经常使用可控孔径玻璃，它实质上也是一种二氧化硅材料。不言而喻，无机基质材料中最重要、最基本的是硅胶。正是微粒型硅胶的出现，促进了高效液相色谱法的产生。因此，我们不能不对硅胶有一个比较全面的了解。

一、色谱用硅胶基质材料^[1]

硅胶（silica gel）的化学成分是二氧化硅。硅属元素周期表第Ⅳ族元素，原子量为 28.085，外层电子结构为 $3s^2 3p^2$ ，它可以与氧、碳、氮、氢及卤素等形成稳定的共价键。硅在自然界中的含量极其丰富，但多数以石英和硅酸盐的形式存在。硅和氧形成的二氧化硅极其稳定，砂子、花岗岩的主成分都是二氧化硅。但是，用作色谱填料基质的硅胶均是人工合成的，高性能硅胶的合成方法是厂家的不传之秘或是受专利保护的独有技术。例如，仅在球形硅胶的制备方法方面，即有数十个专利。由于合成方法的改进和对硅胶基本性质研究的深入，使得合成的硅胶具有机械强度高、比表面积大及表面易于修饰与控制的特点，其优异的物理、化学和机械特性，使其成为色谱填料的一种不可替代的基质。

（一）硅胶的化学结构

天然二氧化硅以晶体和非晶体结构两种形式存在。晶体的二氧

化硅，均具有精细的结构。如水晶石，即是六方晶系的二氧化硅。处于超冷液体状态的二氧化硅，如石英玻璃以及用于毛细管电泳、毛细管电色谱及毛细管色谱的弹性石英毛细管被认为是介于晶型和无定形之间的中间体。蛋白石（opal，一种宝石，又称澳宝）是非晶形二氧化硅及其水合物。合成的色谱用硅胶则完全是无定型的二氧化硅。由于无定型硅胶的结构信息主要是基于晶形硅胶的数据得到的，故其结构信息或多或少是不确定的，因合成和后处理方法的不同，其结构的差异也是不可避免的。

各种类型的硅胶都含有 Si—O 键，Si—O 键是所有 Si—X 键中最稳定的键，其键长为 0.162nm，远低于氧分子共价半径之和 (0.192nm)。短键长可以在很大程度上解释 Si—O 键部分离子化的特征以及硅氧烷相对高的稳定性。每个硅原子周围各有 4 个氧原子，形成 $[\text{SiO}_4]^{4-}$ 的正四面体结构单元，此外，在有些天然石英晶体上，如在单斜石英（coesite）上也观察到六配位的八面体结构单元。 $[\text{SiO}_4]^{4-}$ 和 $[\text{SiO}_6]^{8-}$ 是形成二氧化硅三维框架结构的基本单元。

Unger 对部分晶形二氧化硅的 Si—O 键，Si—O—Si 键键角等的红外光谱的研究结果表明，在低波数区的 $700 \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ 之间的 3 个强吸收 800 、 1100 、 1250 cm^{-1} 来自 Si—O 键，并且这些特征频率在不同的二氧化硅的类型中没有大的区别，但是，在高波数区 ($2800 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$) 却有差异^[2]。此外，无论是晶形二氧化硅还是非晶形硅胶，通常不可避免地含有杂质，特别是碱金属及碱土金属离子。杂质金属种类及其含量都可能对硅胶的结构和化学特性产生显著影响。

（二）硅胶的表面

硅胶用作色谱基质材料的重要理由之一，是因其具有特殊的表面化学特性。无论是晶形还是非晶形硅胶，其表面的化学性质都被仔细地研究过。

暴露于硅胶表面的硅原子倾向于与氧原子的四面体配位，通常以结合单价羟基，即形成表面硅羟基来完成这种配位。色谱过程的

实质就是溶质、流动相及固定相相互作用的过程。作为固定相的基质材料，硅胶上硅羟基的密度、分布及其化学特征对各种类型的色谱行为都会产生不同程度的影响，而硅胶基体中的金属杂质也扮演着举足轻重的角色。

硅胶表面主要存在着硅羟基（silanol，或称硅醇基）和暴露于表面的 Si—O—Si 键。硅羟基被认为是强吸附位点^[2]，而 Si—O—Si 则通常被认为是疏水性的^[1]，Si—O—Si 上的 δ 键通过 $d\pi - p\pi$ 相互作用而强化。氧原子上的两个孤对电子都介入了 π 相互作用从而导致 Si—O—Si 部分不能产生给电子-受电子相互作用，比如，不能与给质子吸附物形成氢键。至于硅氧烷化的 Si—O—Si 键，则具有更低的电子给予特性^[3]，研究证明在正相色谱中的 Si—O—Si 基团对极性溶质保留的贡献极小，甚至没有。但是，由于 Si—O—Si 的疏水特性使得非极性分子在此位点的保留成为可能。当主要以水相作为流动相时，裸露硅胶上的疏水性 Si—O—Si 位点可能是其反相保留机理的根源^[4]。但是总的来说，在硅胶中硅氧烷基团不是很重要的，最重要的当然是硅羟基。

理论上一个表面硅原子可以带 1~3 个羟基，如图 4-1 所示。

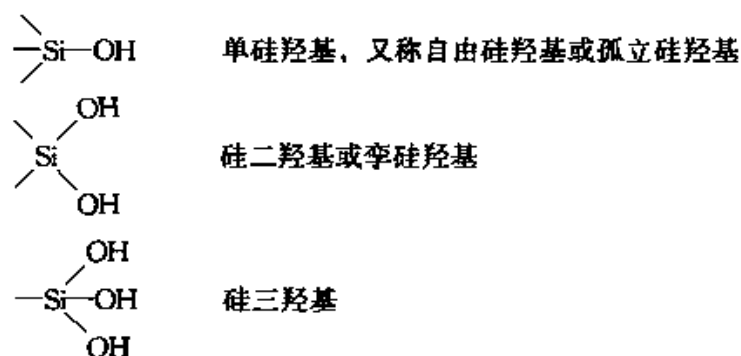


图 4-1 理论上应有的不同类型的硅羟基

实际上，在硅胶表面上硅三羟基的存在几乎是不可能的，对于晶型二氧化硅而言，其表面硅羟基可能仅存在一种形式及自由硅羟基或孤立硅羟基，而在一般的无定形硅胶表面上，其分布是不均匀的，除自由或孤立硅羟基外，还有孪位硅羟基和邻位硅羟基。此外，暴露于空气中的无定形硅胶的表面不可避免地会吸附水而形成

氢键结合水或物理吸附水（见图 4-2），曾有文献指出，在这几种不同的硅羟基中，邻位硅羟基的反应性可能增强，但在实际上，此结论与实际有出入^[5]。

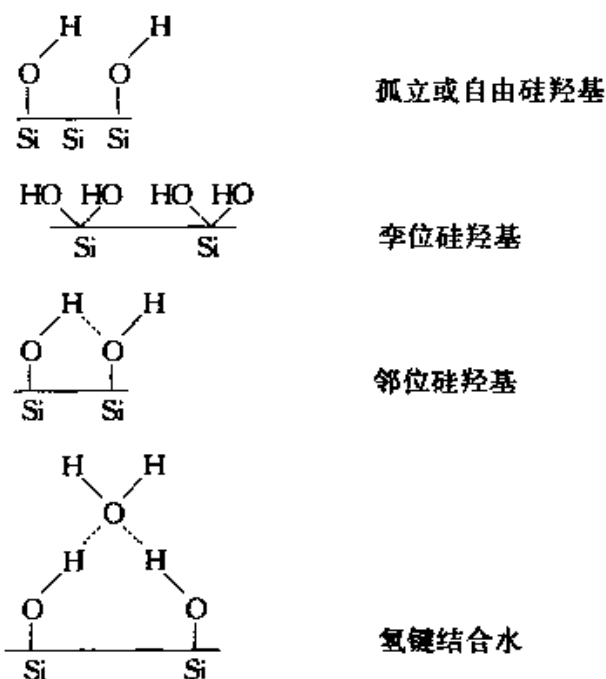
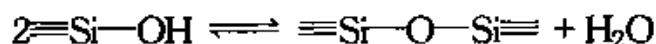


图 4-2 无定形硅胶表面存在的硅羟基形式

需要特别指出的是，在实际工作中，物理吸附水的去除是硅胶衍生反应中不可或缺的一步，特别是在有机相中进行反应时更是如此。物理吸附水与硅烷化试剂的反应及硅羟基与硅烷化试剂的衍生反应是竞争反应，会引起键合率的降低与非特异性吸附的增强，使得所制备的填料的性能低劣。一般情况下，可用加热或真空下的热处理驱去物理吸附水。除去物理吸附水的温度可能有所差异，在 150~300℃ 之间^[6]。当于真空下温度超过 200℃ 时，可能会伴随有硅羟基的缩合，形成 Si—O—Si 键，其反应如下：



这一过程随温度升高而加剧，至 1200℃ 时硅羟基浓度将会减至很低，构成硅胶整体成分的内部羟基亦可能脱水形成硅氧烷键而释放出水。Fripiat 和 Vyterhoeve^[7] 首次使用红外光谱（1000 ~ 4000cm⁻¹）并结合热失重的方法测定了物理吸附水与硅羟基的量，

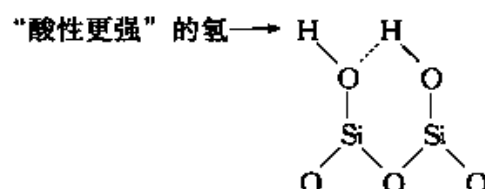
并给出公式

$$N = X + 2Y$$

式中, N 是总的水量, 单位为每克吸附剂上硅羟基的摩尔数, Y 是每克吸附剂物理吸附水的摩尔数。按照他们的结论, 硅羟基的含量在 $20 \sim 240^\circ\text{C}$ 范围内几乎不受影响。一般说来, 随制造和保存方法的不同, 多孔硅胶的总含水量约为总重的 $2\% \sim 10\%$, 表面硅羟基的浓度最大可达 $8 \sim 9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。

(三) 表面硅羟基的活性

人们很早就注意到, 不同种的 $\text{Si}-\text{OH}$ 具有不同的吸附或反应活性。如在键合硅胶填料上, 孤立和键合 $\text{Si}-\text{OH}$ 对碱性溶质具有不同吸附行为。游离和残余的硅羟基是造成色谱峰尤其是碱性溶质峰形拖尾的一个主要原因。因此, 有必要对硅胶表面不同活性位点的相对比例进行估计。早在 1966 年, Snyder 等^[8]曾提出了这样的观点, 即由氢键结合的两个 $\text{Si}-\text{OH}$ 形成硅羟基对 (pairs), 因硅羟基对中有一个质子不参与形成氢键, 此质子的酸性会增强, 且比孤立硅羟基酸性还强 (见下图)。



但进一步的研究却表明, 孤立硅羟基是更活泼的。因为在实际情况下, 这种邻位的 $\text{Si}-\text{OH}$ 更倾向于彼此形成线形或二维结构。因为所有的氢都介入氢键的形成, 故结构中不会含有更多的活性氢, 其示意图如下 (图 4-3)。

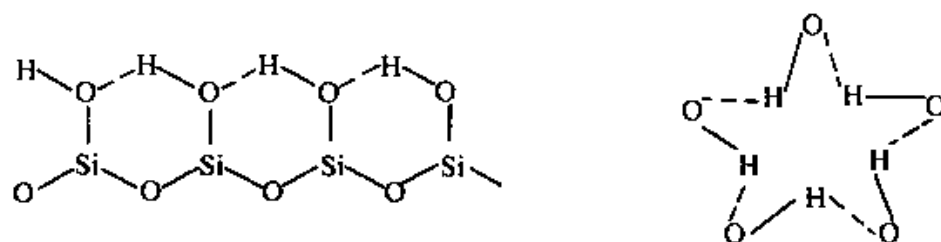


图 4-3 氢键结合氢全部介入氢键形成

这种结构可能反而对其他的氢给予体敏感。因此，相比之下，自由硅羟基应该具有更高的活性。但是，从另外的角度讲，这恰恰也是 HPLC 中以硅胶为基质的键合相中所不希望有的吸附位点。

Van Der Voort 等^[9]曾根据红外光谱测得的数据，估算了自由和键合的 Si—OH 仅占 Si—OH 总数的 6%。但 Gillis 等^[10]通过程序升温法测定吡啶的解吸结果指出，自由 Si—OH 对键合 Si—OH 的相对比例接近 1:1。²⁹Si CP-MAS NMR 和 FT-IR 联用测得各种类型 Si—OH 的定量分布^[8]也显示，孤立 Si—OH 含量要高于 6%。还有人报道，大约 19% Si—OH 是孤立的^[5]。

由此我们可以看出，以上结果间的差别是很大的，这可能源于两种位点活性的相似性以及测定两种位点方法的不精确性。此外，不同种类的硅胶以及不同的处理方法也会得出不同的 Si—OH 类型比例。不过，利用重羟基化过程可极大地增加键合 Si—OH 的数量，同时也能减少因孤立 Si—OH 所引起的吸附。

前面，我们讨论了两种不同类型的硅羟基及其比例。这两种硅羟基在能量和活性上是有差异的。键合 Si—OH 为低能量吸附位点（其解吸热为 50 ~ 65 kcal^① /mol），而孤立 Si—OH（ $E_d \cong 90$ kcal/mol）则是较强的吸附位点。

Wang 和 Harris^[11]通过荧光衰变的不同，进一步证实了硅胶表面少量强烈相互作用 Si—OH 的存在。他们还指出活泼表面在硅胶表面上的分布是不均匀的，呈一簇簇状分布。

正是由于上述不同类型硅羟基活性的差异及其分布上的不均匀性，给硅胶的化学修饰带来了一系列的问题，使其难以控制和重现，但另一方面，也提供了更多的控制途径。例如，现代化学键合硅胶填料多采用氯硅烷为硅烷化试剂，但氯硅烷与硅羟基的反应并不像一般认为的那样简单。如果使用彻底干燥的硅胶，则直至 200℃，氯硅烷都难以很快地与硅烷反应。但是，当加进少量催化剂时，反应会很快地进行。在后面介绍各种填料的制备方法时，我

① 1cal = 4.1868J，下同。

们还会进一步加以叙述。

(四) 硅胶表面硅羟基的测定

在测定硅羟基的所有方法中，都需要硅胶表面没有物理吸附水。通常，体系中的水可以通过加热除去。但是，以氢键结合到表面的单层水分子，很难彻底去除。由于水可以与测定硅羟基的所有化学试剂反应，因而会导致错误的测定结果。解决这个问题最有效方法是，在真空下加热硅胶至 200℃ 约 2~4h，即可获得干燥的硅胶。

测定硅羟基的方法有化学方法和物理方法。其中化学方法有：

① 以重水 (D_2O)^[12]、氚水 (HTO)^[2] 或重氢代氨 (ND_3)^[13] 进行同位素交换的方法；

② 在盐酸存在下以 NaOH 进行滴定^[13]；

③ 与 Grignard 试剂反应^[2]；

④ 与甲基锂（或其他烷基锂）反应^[14]；

⑤ 与二甲基锌反应^[15]；

⑥ 与二硼烷以及有机硼试剂反应^[16]；

⑦ 在 1200℃ 下的热失重反应也可用于表面硅羟基的测定^[17]，但在此方法中，高温可能会导致内部硅羟基的除去，从而带来误差；

⑧ 利用硅羟基上氢原子与 CF_3COOD 上的重氢交换的方法测定 CF_3COOH 的 NMR 信号，并据此推知硅羟基的浓度^[18]。Holik 和 Matejkova^[19] 结果表明，对某些硅羟基来说此法的结果比真实浓度稍显偏高。

在前述方法中，由于金属有机试剂总是以有机分子络合物的形式而存在的，而络合物的体积一般较大，故其与微孔中硅羟基之间的反应较为困难，从而导致测得的表面硅羟基浓度相对偏低。但如果硅胶上的微孔不小于 5nm，则测定结果还是令人满意的^[2]。也曾有人报道了一种以 GC 方法估计硅胶及表面修饰硅胶上硅羟基上的数量的方法，但此法忽视了人们早已报道的硅羟基的不均一分布问题^[20]，故也有其局限性。相比之下，与 D_2O ^[12]、HTO^[2]、 ND_3 ^[21] 进行同位素交换的方法应该是最可靠的。这一方法给出的

表面硅羟基浓度为 $8.0 \pm 1.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，这个数值已普遍为人们所接受^[12]，而且也常被作为一个物理化学常数使用^[22]。

诚如以上所讨论的那样，硅胶表面硅羟基的浓度应为 $(8.0 \pm 1.0) \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 左右。然而也有报道指出，某些色谱级硅胶上的表面硅羟基浓度还是较低的，仅约 $(5.5 \pm 1.0) \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。Morrow 和 McFarlan^[5] 也曾报道，没有重新羟基化的硅胶表面的硅羟基浓度较低，约在 $4.1 \sim 5.8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，这可能是由于制备硅胶时进行热处理，且其后未再进行羟基化所致。无疑，这会影响到硅胶的衍生及其色谱特征。以二甲锌^[23] 和有机硼试剂法测得的数值与上述值类似，例如，Nucleosil-5-100 的硅羟基浓度约为 $6.73 \sim 6.97 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。以堆砌硅珠法所制备的 Zorbax 型硅胶其硅羟基的浓度也较低，约 $6.2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ （同位素交换法）。而以同样方法测得 Lichrosorb Si-60 上为 $8.23 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。Foti^[12] 以 D_2O 同位素交换方法测得 LiChrosorb Si-100 上硅羟基浓度为 $(8.4 \pm 0.1) \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。由于具有低硅羟基浓度的硅胶含有相对较高的孤立自由硅羟基，所以完全羟基化的硅胶表面更适于色谱之用。

如前所述，在测定硅羟基的浓度时，所用试剂的分子体积的大小也会给测定结果带来影响。试剂分子体积越大，其接近硅羟基并与之反应的概率便越小，如以六甲基二硅氨烷（HMDS）所测定的结果仅约为 $4.05 \sim 4.65 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，小于以二甲基氯硅烷所测定的值。此外，测定 $\text{Si}-\text{OH}$ 的物理方法也很多，如红外光谱（IR，包括 FT-IR），以及最近发展起来的魔角探头固体核磁共振法（ ^{29}Si CP-MAS, NMR）。物理方法的优点之一是可以区别不同种类的硅羟基。如 IR 可以区别自由和缔位硅羟基位点，而 ^{29}Si CP-MAS, NMR 可以区分单和缔位硅羟基却不能区别自由和键合硅羟基位点。通过 IR 对孤立和键合的 $\text{Si}-\text{OH}$ 定量，以温度程序化的解吸过程来测键合和自由 $\text{Si}-\text{OH}$ 的量的方法亦有报道^[10]。

（五）硅胶的化学稳定性

硅胶的化学性质相对稳定，一般可以耐受酸性介质的侵蚀。常温下无定型硅胶在纯水中的平衡溶解度约为 $100\text{mg}/\text{L}$ 。相比之下，

石英的溶解量则远小于此,这可能是由于表面性质差异及未达到溶解平衡所致,无定型硅胶在水中的溶解度随温度的增加而线性增加,石英则仅当温度超过 150°C 时,溶解度才随温度的增加而增加。此外,硅胶的溶解度还与 pH 值密切相关, pH 升高,溶解加速。还有,介质中的电解质以及硅胶固体中的杂质都会影响水解的速率。不过,排除水解速率的不同,溶解的硅胶量在 pH1~9 的范围内^[24]几乎是常量。在 pH>9 时,溶解度显著增加,至 pH10.7 以上时,硅胶即开始溶解。以后在讨论正、反相硅胶基质材料时,还会强调,除非经过特殊处理,否则在使用硅胶基质作为色谱填料时,其使用的环境 pH 值最好限制在 1~8 之间,对于键合相硅胶,由于 Si—C 键的不稳定性,此范围应降至 pH2~8。所有的键合硅胶,除特别申明者外,一般其使用 pH 范围均在 2~8 以内。

多孔硅胶的孔结构对水处理极为敏感,故水热处理可以用于小孔硅胶的扩孔。此外,缩合-溶解或附聚-溶解过程将在水中继续,此过程中 Si—OH 体现出弱酸性,产生弱的离子交换作用。

还有一点需要指出的是,对于无机基质来说,它们有一个共同特点,即粒径越小,在水中的溶解度便会越大。这也许是在很长一段时间里, $3\mu\text{m}$ 以下的粒子没有得到很好发展的一个原因。

(六) 硅胶的物理性质

在色谱过程中,溶质分子与固定相间的传质速率通常被它们在色谱柱多孔粒子中的扩散所左右,因此,颗粒的物理性质,如颗粒的形状与大小,孔的结构,孔径及其分布,总孔容、比表面积及其使用在高压下的机械强度等,是至关重要的参数。

色谱用硅胶微粒可以是球形的,也可以是无定形的颗粒。一般认为,球形硅胶由于可渗透性强,应该比无定形硅胶更有利于传质,且可减少操作压力,因而能装填出更有效的填充柱。特别是对 $2\sim5\mu\text{m}$ 粒径的粒子而言,球形填料的优点更为明显。但是,当使用大颗粒硅胶时进行制备分离时,无定形硅胶会具有更好的性能-价格比。

较之于粒子的外形,粒径分布显得更为重要,特别是粒径分布

范围的小粒径端极为关键。因为过小的粒子会堵塞筛板，导致柱压上升（采用恒流速操作模式时），或流量减少（采用恒压模式时）。在高效液相色谱中，最常使用的粒径是 $5\sim 10\mu\text{m}$ ，近年来 $3\mu\text{m}$ 亦日渐受到欢迎。此外，小粒径无孔硅胶在近年来亦引起重视，而且在许多领域内得到应用。一般情况下，在小粒径填充柱上可以得到更高的分离效率，但随之而引起的高压迫使人们采用更短的柱子，这样带来的结果之一是分离速度能得以提高。这种材料的另一优点是理论塔板高度-流速曲线（ $H-u$ 曲线）的斜率减小，因此，在提高流速时，柱效损失不大。

考虑到柱效问题，填料粒子的孔结构亦是非常重要的参数。因为，孔的结构不仅影响到孔径的计算，而且影响到孔径分布、孔容及比表面等一系列参数，正是这些参数决定着其作为正、反相乃至其他一系列 LC 填料的性能。且对化学键合反应以及分离过程与机理等均有不可忽视的影响。

测定孔径及孔径分布的方法，主要是气体或蒸气的吸附法，此外，对较大的孔亦可采用压汞法。目前，这两种方法均已有很完备的仪器可供使用^[25]。通过孔结构分析数据，可以指导具有特定目标孔结构的填料的合成与制备（图 4-4）。

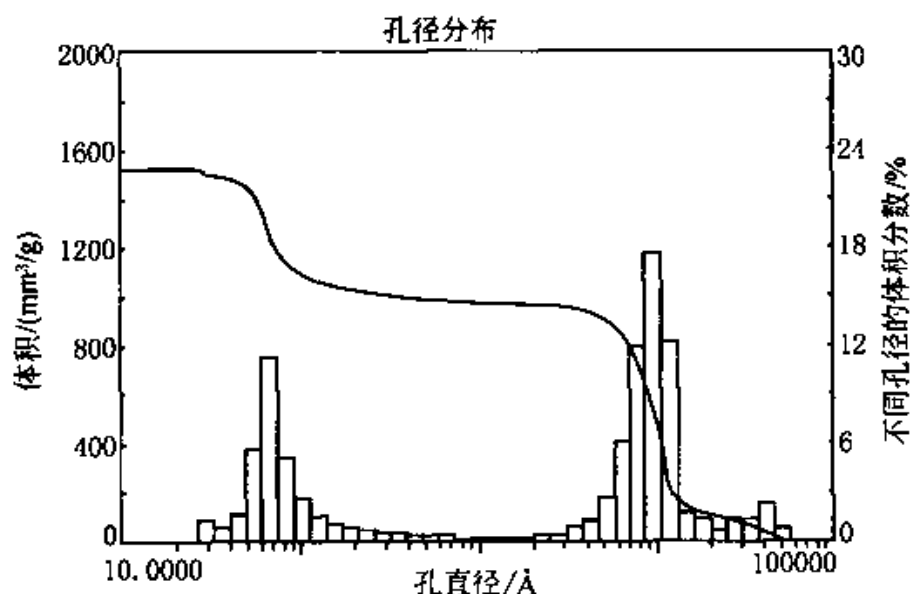


图 4-4 硅胶的孔径及孔径分布

有关孔结构的几个重要参数有：平均孔径 (D)，比表面积 ($S, \text{m}^2/\text{g}$)，比孔容 (mL/g) 及孔径分布等。孔径，一般指平均孔径。多孔硅胶可分为微孔、中孔和大孔硅胶。据 Dubinin^[26] 的推荐，将小于 2nm 的称为微孔硅胶，对于 $2 < D < 50\text{nm}$ 的称为中孔硅胶，超过 50nm 的称为大孔硅胶。但是，目前比较普遍接受的观点是，30nm 孔径的硅胶已算是大孔硅胶。对于一般有机化合物的分离，使用孔径 6~12nm 硅胶已足敷应用。用于生物大分子分离时，30nm 的大孔硅胶最为常用。此外，利用无孔硅胶^[27] 也是一种有效的解决途径。大孔硅胶可利用小孔或中孔硅胶扩孔得到。

此外，孔类型及分布亦是影响色谱行为的重要参数。无定型硅胶上孔的分布是不均匀的。因此，合成粒径和孔径相对均匀的硅胶一直是色谱工作者关注的一个问题。一般而论，孔径越小，比表面积越大，反之亦然。高的比表面积如 $S > 500\text{m}^2/\text{g}$ ，表明有细孔存在，低的比表面积，如 $S < 10\text{m}^2/\text{g}$ ，则表明这种硅胶具有大孔结构。多孔材料的比孔容 V_p 是指总孔体积与总体积之比。因为它的测定相对要简单得多，其物理意义也更清晰。

上述参数对作为色谱固定相基质的硅胶来说，是十分重要的，此外，为建立稳定可靠的色谱固定相合成工艺，以及研究发生在色谱柱中的分离过程等等，也必须清楚地了解这些参数。有关这些参数的测定方法，可以参阅有关的文献或专著^[28]。

硅胶的热稳定性很好，可以经受一般的热处理而不会破坏。通常，多孔硅胶热处理至 400~500℃ 基本上不会影响其孔结构参数。高于 600℃，依所含不同杂质的影响而有可能变成无孔硅胶。在 200~400℃ 范围内，主要是表面邻位硅羟基的缩合，形成 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键，大于 500℃，粒子内的自由 $\text{Si}-\text{OH}$ 缩合，导致硅胶内粒子重排产生更稳定的结构。大约 800℃ 时，产生 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 网络。有时，不同批次生产的硅胶的热处理反应及得到的硅胶的性质并不完全相同，这可能是由于不同的合成过程以及硅胶本身的无定型特性所造成的结果。

二、色谱用多孔硅胶的制备

在液相色谱发展的初期，主要采用薄壳形硅胶微珠为色谱填料的基质^[29,30]。但是随着全多孔型硅胶的出现，全多孔硅胶很快成为色谱填料基质的主流。全多孔硅胶的制备技术已经十分成熟。通常，可以采用溶胶-凝胶法或堆砌硅珠法制备。在溶胶-凝胶法中，既可以先制成块状的多孔硅胶，再粉碎并分级至所需的粒度以适于不同的使用要求，也可以将酸化的水溶性硅酸盐溶液喷雾成细小的液珠并在热气流或矿物油介质中使其凝聚成球^[31]。无定型多孔硅胶对流体的阻力相对大于球形硅胶，致使柱子的通透性降低，所以，在分析型高效液相色谱上多使用球形的多孔硅胶。但是，以喷雾法制备的球形多孔硅胶的粒径分布很不均匀，必须通过分级才能得到较满意的粒径分布较窄的基质材料。而微米级颗粒的分级却是一件既费时又费力的操作，所以，迫使人们去寻找其他的方法以制备粒径分布均匀的球形多孔硅胶。Kirkland^[32]于1974年发明了堆砌硅珠法，先在硅溶胶中制备出脲醛树脂或三聚氰氨甲醛树脂与胶体二氧化硅微珠混合形成的小球，再经煅烧将树脂除去，留下由二氧化硅微珠堆砌而成的粒径均匀的全多孔硅胶。除上述薄壳形和全多孔硅胶外，尚有无孔硅胶^[33]也是一种重要的基质材料。由于无孔，便消除了孔内较慢的扩散传质所引起谱带展宽效应。

(一) 多孔硅胶中孔的形成

在多孔硅胶中，取决于制备方法的不同，孔结构主要有两种类型，即微粒体系（corpuscular systems）和海绵体系（spongy systems）。由于制造上比较方便，常见的硅胶以采用微粒体系为多，堆砌硅珠法的硅胶即属于此。在此体系中，孔即是固体微粒子堆砌起来后形成的微粒间隙。因此，孔结构是由微粒形状以及其排布状况来决定的，孔的尺寸决定于微粒的大小以及它们堆积的精密程度（见图4-5）。

多孔硅胶的一个极大优点是可以通过不同的方法与工艺，在很宽的范围内控制孔径的大小和分布。例如，其孔径可以由1nm到

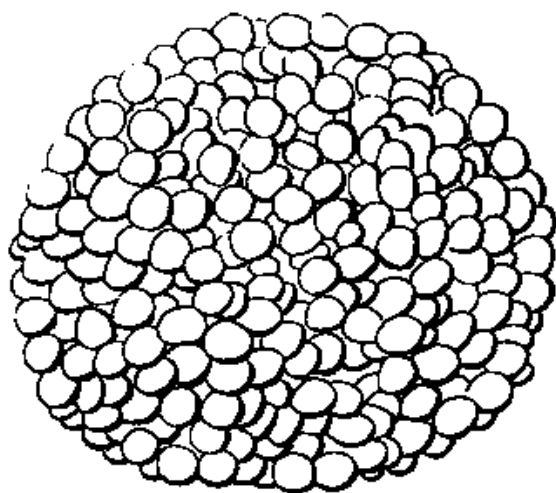


图 4-5 堆砌硅珠法制备的硅胶结构示意图

1 μm ，甚至达 2 μm ^[34] 多孔硅胶的这种特性使其应用范围得以进一步扩大。

孔体系可以在颗粒的形成过程中形成，也可以根据需要通过后处理得到。故孔结构参数既可由化学反应类型来控制，又可由实验条件来控制，或两种方法兼而用之。多孔硅胶的制备方法虽然较多，但通常总要先制备稳定的硅溶胶以作为出发原料。胶体粒子的大小及均匀程度对后来的

孔体系有着重要的影响。故制备出稳定且胶体颗粒均一的硅溶胶至关重要。目前，市场上有不少以不同方法制备、不同试剂加以稳定的硅溶胶商品，但其规格、性能往往相差甚远，选用时须非常小心才行。

(二) 硅溶胶的制备

制备硅溶胶可以采用不同的工艺路线，水溶性硅酸盐、 SiCl_4 、 $(\text{RO})_4\text{Si}$ 或元素 Si 等均可作为硅的来源，以制备硅溶胶。但在实际生产中，则几乎都是采用水溶性硅酸盐（如水玻璃）。但近年来，随着超纯硅胶的需求日增，以 $(\text{RO})_4\text{Si}$ 为原料的路线也日益引起重视。

合成硅胶的全过程可用图 4-6 表示。

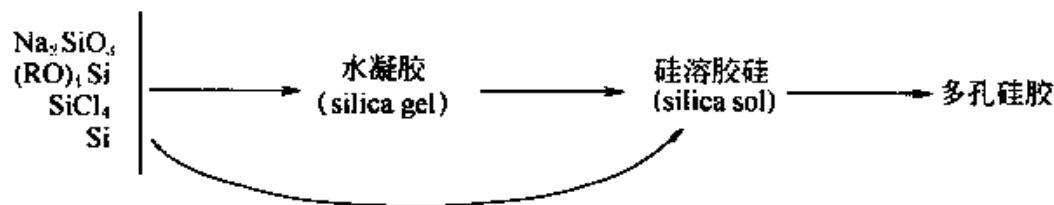


图 4-6 硅溶胶的形成

以这种“溶胶-凝胶”工艺所制备的硅胶的粒子基本上是球形

的。在多数情况下，通过水解缩聚反应所制备的是微孔和中孔硅胶，大孔硅胶可通过硅水凝胶或干凝胶的热处理、水热处理及浸盐等方法得到。

在生产上，通常将 Na_2SiO_3 溶液加入到酸性溶液中或以酸将 Na_2SiO_3 溶液的 pH 值调节至酸性范围来制备硅溶胶。此外，使用透析、离子交换、胶溶法、硅化合物水解法、元素硅溶解法、热解硅的分散法等都可以制得稳定的硅溶胶。下面介绍两种较为典型的方法：

1. 可溶性硅酸盐酸化法

可溶性硅酸盐的酸化，可以产生单硅酸。单硅酸与其进一步缩聚后形成的多聚硅酸处于溶解平衡状态，可以通过控制 pH、 SiO_2 浓度、盐浓度（或电解质浓度）以及温度等达到上述平衡^[35]，以制备不同类型的硅溶胶。

pH 值对多聚硅酸盐缩聚反应有很大的影响，在 $\text{pH} = 2 \sim 4$ 之间时，反应速率很低，随着 pH 值的增加，由于 OH^- 的催化作用，反应速率会逐渐增加。因此，酸性条件下形成的多聚硅酸因尚未达到平衡而不稳定。而碱性环境下，例如在 $\text{pH} = 9$ 时，则有利于多聚硅酸凝集并生成稳定的硅溶胶。碱性物质，如碱，氨水等均可作为常用的稳定剂。提高温度，缩聚反应速度可被加速。

胶体硅胶的等电点大约在 $\text{pH} = 3$ ^[36]，因此在 $\text{pH} = 2$ 时，其表面上带有正电荷，而在高 pH 值时，表面则会带负电荷，这样颗粒可以被 Na^+ 或其他阳离子包围，形成扩散型的双电层。这一双电层的稳定性与胶体溶液的稳定性密切相关。例如，硅溶胶的稳定性不但受 pH 值的影响，也会受到电解质浓度的影响。增加电解质的浓度，可急剧减少扩散层的厚度，导致溶胶凝胶化。Bolt^[37]指出，在 $\text{pH} = 6 \sim 10$ 范围内，增加电解质的浓度也能增加对 OH^- 的吸附。

2. 阳离子交换法

将硅酸盐调配成适当浓度的溶液，例如 5%，令其通过强酸性阳离子交换柱，即可得到硅溶胶。这种方法的要点是离子交换柱

pH 值的选择和流速控制, 为此, 可在离子交换柱的出口处安装上 pH 电极, 或以 pH 试纸不断监测流出液的 pH 值, 一旦流出液呈现弱碱性则表明交换柱已经饱和, 交换柱应即再生。这一方法简便, 易于控制, 且所制备的硅溶胶纯度也高, 但缺点是需要消耗大量的离子交换树脂。同时, 再生交换柱的手续亦比较烦琐。为得到稳定的硅溶胶, 需要将所收集的流出液以碱溶液调节至 $\text{pH}=9$ 才行。

(三) 溶胶-水凝胶过程中水凝胶的形成

凝胶化 (gelation), 也就是胶体二氧化硅粒子通过缩聚反应相互连接成一个三维整体的过程。凝胶化过程中, 通过表面硅羟基缩合成大量 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键使其形成三维空间网络, 凝胶化速率同样也由 pH 值、 SiO_2 浓度, 电解质浓度以及温度决定。

pH 值对凝胶化的影响是双重性的^[2]。首先, 在溶液 pH 值高于 6 的情况下, 随 pH 值增加, 由于表面产生更多的负电荷, 从而导致粒子碰撞频率降低。但同时相邻粒子表面上硅羟基的缩合程度与溶液中 OH^- 浓度成正比, 因此 $\text{pH}=3$ 以上有助于凝胶化。这两个效应的共同作用, 使得在 $\text{pH}=5$ 时可得到最大的凝胶化速率。据文献报道^[38], 在 $\text{pH}=5$ 时, 硅溶胶粒子增长很快, 且迅速凝胶化。当进一步将溶胶调至碱性以后, 硅溶胶的胶体粒子即会因表面电荷的排斥作用而变得较为稳定。

SiO_2 的浓度对凝胶化的影响很大, 具有相同 SiO_2 浓度与数均粒径比值 (若将粒径从大向小排列, 居于中间的数值, 即为数均粒径) 的溶胶具有相同的凝胶速率。凝胶化反应在电解质的存在下会明显加速, 这主要是因为粒子上的电荷减少了, 粒子间的吸引力克服了静电斥力所造成的。此外, 温度增加, 粒子间碰撞概率变大, 故可使凝胶化速率增加。

水凝胶放置过程中, 可产生溶解和再沉淀过程, 同时也会产生粒子的聚集。这将导致生成更大的粒子, 且使得胶体粒子的分布也更不均一, 此时, 比表面会下降而比孔容却会增加。水凝胶经过酸洗再干燥, 经后处理可得目标产品。由酸性溶胶制备而得到的水凝胶, 用酸洗并仔细地干燥, 可得到很小的硅胶颗粒的聚集体, 其干

凝胶（多孔硅胶）亦具有较高的比表面积^[36]。

（四）干凝胶的形成（多孔硅胶的形成）

水凝胶经过酸洗后，置于高温烧结炉（如马弗炉）中干燥除水。脱水过程伴随着粒子间 Si—O—Si 键的形成，并因此增加了颗粒的密度，也可以观察到硅胶结构的轻微收缩。如果在干燥前用有机溶剂将水置换掉，则这种收缩将大为减少。

值得提出的是，由于硅羟基具有不可逆反应生成 Si—O—Si 键的倾向，只要一有机会，缩合就会发生。以溶胶-凝胶法制备多孔硅胶的影响因素很多，因此，可以通过许多方法加以控制，如 pH 值、酸洗过程、操作时间、温度、硫酸或氨水的浓度以及对水凝胶的有机溶液替换等。通过对以上因素的仔细设计与优化，可以得到制备目标产品的最佳条件^[2]。

（五）可控孔径球形多孔硅胶的制备

目前，多孔硅胶制备技术已相当成熟，通常可分为两相法^[39]、喷雾干燥法^[40]、堆积硅珠法^[41]以及生物微囊法^[42]。两相法是指将合成硅胶的原料如硅溶胶、硅酸盐及有机硅烷类化合物制成油包水或水包油型乳液，再通过缩合反应使硅胶成形固化。喷雾干燥法是将合成硅胶的原料如硅酸盐的酸性乳液或硅溶胶，通过喷雾成形，然后在热气流或分散剂（如石蜡油）中固化以得到最终的硅胶产品。目前，市场常见的高比表面积硅胶（平均孔径 6~8nm 的硅胶，比表面积 400~500m²/g）多属此种类型，国产的 YQG 型硅胶、瑞典的 Kromadil、德国的 nucleosil 等均系此类。

1. 堆砌硅珠法

以堆砌硅珠法生产的硅胶的典型代表是 Agilent 公司生产并销售 Zorbax 硅胶。其原理是：在含有一定粒径（如几至十几纳米）硅微球的硅溶胶中，加入尿素与甲醛，令在其中发生反应，生成尿素树脂，并与硅微球一起凝聚，成为树脂与硅微球的复合球。收集这种复合球，加热煅烧令有机树脂分解并逸去，而硅球则存留下来，即得到多孔硅胶。其反应和生产流程如图 4-7 所示。

表面硅羟基。而表面硅羟基的缺乏,将使硅胶表面难以直接进行化学修饰。此外,过高的温度还会因硅胶中孔的塌陷和阻塞而造成孔结构的破坏。这种情况经常发生在含金属离子杂质,特别是钠离子较多的情况下。这种情况可以形象地理解为由于 Na^+ 的存在而产生了局部玻璃化所致,钠玻璃的熔化导致了孔结构的变化。以上述方法,可以制备出粒径 $3\sim 8\mu\text{m}$ 的多孔硅胶微球。且其粒径很均匀而不必再加筛分。其孔径取决于所使用的硅胶溶胶中硅微珠的大小。一般情况下,市售的硅溶胶的硅微珠约在 20nm 左右,因此,以这种工艺制成的硅胶的孔径多在 $8\sim 10\text{nm}$ 范围内,即孔径约为胶体硅微珠直径的二分之一左右。上述方法所制备的硅胶,还可以在同样的反应体系中继续“长大”,进一步得到直径 $8\sim 15\mu\text{m}$ 的硅胶微球,但其粒径分布也会变得比较大了。

2. 生物微囊法

生物微囊法是作者的实验室中提出的合成硅胶微球的新方法。利用生物细胞的细胞壁或细胞膜为容器,将其内部充以硅酸盐或有机硅化合物,在适当的条件下,可令其转化为正硅酸,再经处理便可得到硅胶。由于成熟细胞的均一性较好,使得所制备的硅胶的粒径也很均匀,而不必进一步筛分。

自然界中有一些细菌细胞和植物细胞,具有规则的形状和大小。例如,酵母细胞通常为球形或椭球形,直径约为 $3\sim 8\mu\text{m}$ 。这一范围恰与色谱用硅胶的大小相符。加之酵母细胞具有强度很高的由多糖形成的细胞壁,完全可以经受较剧烈的物理化学处理而不破坏。因而是一种理想的微囊材料。选用市售或专门培养的酵母细胞,通过适当的处理将细胞的内容物除去,仅留下其细胞壁。在这种微囊内装入正硅酸乙酯,并将其悬浮于酸性水溶液中,因水解缩聚而形成水凝胶。为防止这些微囊相互之间聚集,水溶液中可加入表面活性剂。应注意的是,表面活性剂中不宜含有金属离子杂质,以免影响最终硅胶产品的纯度。收集包在微囊中的已凝胶化的硅胶,于一定温度下煅烧,可将硅胶微球外面的微囊和含有的其他有机物除去,并赋予硅胶的良好的机械性能。不言而喻,这种硅胶的外形与微囊

的形状极为相似,可呈圆形或椭球形(图4-8)。以在正硅酸乙酯中添加适当的有机致孔剂的方法可以调整硅胶的孔结构。



图4-8 生物微囊法
制备的硅胶微球

生物微囊法简便、易控,可根据需要制出不同性能的多孔硅胶,且硅胶纯度亦可控制。因而可作为制备特殊硅胶的一种方便的通用方法。

(六) 硅胶的扩孔

以上合成多孔硅胶的方法只能得到小孔或中孔硅胶,对于大孔硅胶的合成,通常是将小孔或中孔硅胶扩孔成为大孔硅胶。常用方法有浸无机盐^[43]水热法^[44];在以正硅酸酯缩聚法制备多孔硅球时,可以通过加入惰性致孔剂控制其孔径与孔容,这种多孔

硅胶在凝胶色谱中表现出极好的性能。这里仅对浸无机盐扩孔法作简单的介绍。

一些高价金属离子在硅胶结构中的存在,如 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 等或多或少地阻止硅胶的溶解^[44],但 Li^+ 、 Na^+ 和 K^+ 则不同于以上离子,它们的存在可以侵蚀硅胶的孔壁,在一定条件下,可利用这些离子的特性对硅胶继续扩孔。首先将小孔或中孔硅胶浸入 Li 、 Na 或 K 的盐溶液中,利用旋转蒸发除去水分,烘干硅胶,得到 Na 、 K 或 Li 盐均匀分布于其中的多孔硅胶,再于程序控制升温炉中进行煅烧处理,处理温度一般不超过 700°C 。以水将盐洗净,在空气中干燥,即得到大孔硅胶。调整无机盐的种类、成分和比例,选择适当的热处理温度、时间和程序,便可以制出所需孔径的大孔硅胶,所制得的硅胶的孔径一般在 $300\sim 1000\text{\AA}$,可进一步化学修饰后,用于生物大分子的分离。

三、其他基质材料

尽管硅胶及键合相硅胶在液相色谱中已获得了广泛的应用,而且在实际上居于不可替代的地位。但是,硅胶也有其致命的弱点,

即化学稳定性差, 仅能使用于 $\text{pH}=2\sim 8$ 的范围内。此外, 由于残余硅羟基和金属离子等杂质的存在, 易对碱性溶质造成不可逆吸附, 并易使生物大分子, 特别是多肽、蛋白质等样品产生变性和非特异性吸附, 造成峰形变劣和回收率降低, 大大限制了它们在生物体系分离、分析中的应用。为此, 人们一直在努力寻找性能更好的基质材料。除有机高分子型填料外, 氧化铝、氧化锆、二氧化钛、羟基磷灰石、石墨化碳和可控孔径玻璃等均曾被加以研究, 并开发出一些具有特色的新型高效液相色谱填料。

(一) 氧化铝

铝原子序数 13, 属周期表Ⅲ主族元素, 原子量 26.9815, 具有 $3s^2 3p^1$ 外围电子结构。氧化铝虽然是稳定的氧化物, 但具有两性特性, 既可呈酸性, 又可呈碱性。铝在自然中含量甚丰, 仅次于氧和硅, 居第三位。天然的晶体氧化铝, 即刚玉, 属三方晶系, 比重 $3.95\sim 4.10$, 硬度达 9。含微量 Cr 的刚玉为红宝石, 含 Ti 的为蓝宝石。工业上大量制备的刚玉可作为高温耐火材料或研磨材料, 而人工制造的晶体则用于激光器和仪器、仪表的轴承材料。如在高压液相色谱仪中, 往复式输液泵的柱塞和止逆阀座即是以人造红宝石或蓝宝石制造的。至于用作液相色谱填料的氧化铝, 则全部是人工合成的。它们实际上是氧化铝的水合物, 其分子式为 $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, 这里的 $n=0\sim 3$ ^[45]。

通常, 利用水合氧化铝的再沉淀工艺以制备具有不同化学组成和相组成的氧化铝。将水合氧化铝溶于酸, 再以碱中和, 使氢氧化铝沉淀出来并与杂质得到部分分离。以不同的煅烧工艺, 可以得到具有不同水含量、不同相及不同孔结构的氧化铝。依据热处理温度的不同, 可将氧化铝分为: ①低温氧化铝, 热处理温度小于 600°C 。它还可以细分为 γ -氧化铝、 ρ -氧化铝和 χ -氧化铝。由于煅烧温度较低, 所以它们含有部分残余水, $0 < n < 0.6$ 。②高温氧化铝, 煅烧温度 $900\sim 1000^\circ\text{C}$, 几乎不含残余水分。从晶相分, 可有 θ -氧化铝、 χ -氧化铝、 δ -氧化铝; ③刚玉, 当以高于 1000°C 煅烧时, 会失去全部水分而形成 α -氧化铝, 即刚玉。

使用类似于堆砌硅珠的工艺,也可以生产出氧化铝的微球。将三聚氰胺(或脲素)和甲醛在含有 Al_2O_3 胶体粒子的溶液中进行聚合反应,通过相分离过程而得到含 Al_2O_3 微粒的三聚氰胺-甲醛(或脲素-甲醛)小球。通过煅烧除去有机相,即可得到能用于高效液相色谱的球形 Al_2O_3 ^[46]。

用作吸附材料和色谱填料基质的氧化铝主要是 γ -氧化铝。类似于硅胶的情况, γ -氧化铝的表面上也含有活性羟基位点。通过对氧化铝表面的红外光谱研究发现,氧化铝表面可能存在有五种不同类型的羟基^[47]。经测定, γ -氧化铝表面的总羟基浓度约为 $3\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ^[48]其比表面积约为 $50\sim 200\mu\text{m}^2/\text{g}$, 比孔体积约为 $0.6\text{ml}/\text{g}$ 。依照制造方法和工艺的不同,其孔径一般在 10nm 以下,但通过特殊的制造方法可以获得更大的孔,如近 100nm 的孔。与硅胶稍有区别的是,氧化铝通常还含有小于 2nm 的微孔。由于 γ -氧化铝中通常含有碱金属或碱土金属杂质,所以, γ -氧化铝通常呈碱性。将 γ -氧化铝悬浮于水中,其 pH 值可达 9,故常被称为碱性氧化铝。利用酸中和,可得到中性氧化铝乃至酸性氧化铝。

正是由于 Al_2O_3 具有的独特的分子结构和表面性质,以及优异的机械强度,使得它在正相色谱和离子交换色谱模式中得到比较广泛的应用。它所具有的化学稳定性和对一些化合物的独特的选择性,有时恰好与硅胶具有互补性^[49]。但是,与硅胶相比,氧化铝的表面化学修饰要困难得多。因此使得氧化铝多使用于一些小分子有机化合物的分离,在生化分离上则使用较少。不过,随着对氧化铝研究工作的深入开展,这种障碍正逐渐被突破。

氧化铝的化学修饰可采用两种途径。一条途径是利用铝羟基的反应,另一条途径是利用涂敷技术。Pesek^[50]利用氧化铝与二氯亚砷反应,使氧化铝表面带上取代—OH 的氯,令其再与丁基锂反应,则生成丁基化的氧化铝。在此工作中使用的氧化铝是直径 $10\mu\text{m}$ 的多孔氧化铝微球,比表面积约为 $100\text{m}^2/\text{g}$ 。所制备的丁基化氧化铝,在 $\text{pH}=1$ 至 12 的宽 pH 值范围内均很稳定。当将上述填料以反相模式分离蛋白质特别是碱性蛋白质时,可得到对称的

峰, 这表明这种填料对这些生物大分子的非特异性吸附很小。经测定, 在分离蛋白质时, 这种丁基化氧化铝柱子的柱效达每米 1.3~1.6 万理论塔板。除 C_4 外, 以 C_8 和 C_{18} 为配基的烷基化氧化铝亦已合成^[51]且被用于反相模式的分离。从已有的结果看, 氧化铝基反相填料的化学稳定性, 特别是在碱性介质中的稳定性比硅胶填料为好。另一种修饰方法是表面涂敷, 其方法与硅胶表面涂敷的方法类似。一般是在氧化铝的表面上以物理或物理-化学方法涂敷一层高聚物, 如聚苯乙烯-二乙烯基, 聚丁二烯或聚十八烷基硅烷等, 以得到强疏水性的表面^[52]。以这样的方法制备的填料具有极好的 pH 值稳定性, 通常也会有较强的保留。但是, 在一些溶剂中它们会产生溶胀, 从而会导致较高的柱压; Pesek 等^[53]利用硅烷化工艺, 先在 Al_2O_3 表面形成一层氢基硅化物, 继而以过渡金属催化剂催化硅氢加成反应, 形成烷基键合的 Al_2O_3 , 这种填料具有优良的反相特征, 并且在高浓度磷酸盐缓冲液中无明显破坏。通过评价不同链长、孔径和粒子形状的烷基氧化铝在分离多肽混合物, 以及蛋白质的胰蛋白酶酶解产物的色谱行为可以得知: ①小孔 ($d = 11nm$) 氧化铝近于或优于相应的大孔 ($d = 21nm$) 氧化铝; ② $C_{18}-Al_2O_3$ 优于 $C_8-Al_2O_3$; ③含有熔融微小板状颗粒的 Al_2O_3 固定相优于含球形颗粒的相应的固定相。Heky 利用将有机磷酸或羧酸吸附至色谱级 Al_2O_3 的方法^[54]制备了 C_8^- , $C_{18}^- Al_2O_3$, 继而又以类似的工艺制备了全氟 $C_8-Al_2O_3$ (PFDA) 和全氟 $C_4-Al_2O_3$ (PFBA), 这两种修饰 Al_2O_3 与 OCA 和 ODA 的选择性以及稳定性上稍有不同。作者指出, 全氟烷基- Al_2O_3 在对肽分离方面, 以及使用低成本无毒流动相对低分子量混合物的快速分离方面, 具有潜在的广泛应用前景。必须指出的是, 使用 PFOA 时, 流动相中不能使用 TFA 作为质子化及离子对试剂, 在分离蛋白质和多肽时的一个较好的替代品是全氟辛酸。由于 PFBA 键合量要高于 PFOA 的键合量, 因而 PFBA 与酚之间氢键作用力明显低于 PFOA。

综上所述可知, Al_2O_3 除在正相和离子交换色谱应用外, 在反相高效液相色谱分离分析中也具有很好的应用前景, 氧化铝独特的特

性使得氧化铝类的填料有可能成为硅胶类固定相的一个重要补充。

(二) 氧化锆

氧化锆是另一种新型而又极有希望的无机基质材料, 过去几年里人们对它表现了极大兴趣^[55~59]。氧化锆作为常规离子交换材料, 已经用于核工业中溶液再处理、裂变产品的回收、高温离子交换分离等过程。氧化锆独自作为 HPLC 填料的研究始于 1979 年。在低比表面积的氧化锆上吸附季铵盐以形成反相结构, 并对其在 HPLC 中应用的可能性进行初步探讨。然而在随后几年里很少有关于这方面的研究报道, 这可能与在锆凝胶上很难得到与硅胶上类似的表面键合相有关。近年来, 这方面的研究发展很快。并在正相、反相、离子交换填料等方面获得了初步成效。

1. 氧化锆多孔微球的制法

适当粒径与孔径的多孔氧化锆微球的制备是氧化锆作为色谱填料的首要条件。目前, 美国明尼苏达的 3M 公司与德国的 Unger、澳大利亚的 Hearn 等都已通过适当方法合成出适合于 HPLC 用的氧化锆多孔微球^[55,58]。根据文献报道, 氧化锆微球的制备可采用两相法^[58]:

酸稳定的氧化锆溶胶 $\xrightarrow[\text{凝胶化}]{\text{在油水乳液中搅拌成球}}$ 多孔形氧化锆微球

氧化锆凝胶可由四氧化锆的水解得到, 氧化锆微球的粒径可由搅拌速度控制, 过程与合成二氧化硅微球类似。不同的是, 在合成氧化锆微球时应适当控制温度等处理条件, 如上所述, 处理条件对氧化锆的表面特性有较大影响。

2. 氧化锆的物理化学性能

人们对氧化锆的兴趣, 来源于它优异的物理化学性质。氧化锆的晶体结构决定了其高机械强度与耐高温特性, 晶体氧化锆的熔点高达 2700℃, 远高于氧化硅的熔点, 氧化锆表面的羟基在高达 300℃ 的水热处理下也依然稳定。无定形的锆球也有较好的机械强度, 在 50MPa 的高压下, 锆球没有破裂现象^[60]。

氧化锆具有极好的耐酸碱稳定性, pH 值使用范围达 1~14。众所周知, 硅胶在碱性条件下极易溶解; 氧化铝在 pH 值大于 12

及小于 3 时, 表现出一定程度的可溶性^[55]。因此, 在色谱用无机基质中, 氧化锆具有极好的耐酸碱性能 (图 4-9)。这种特性是由其表面结构所决定的。产品来源不同, 其酸碱性能会因结构差异而不同, 这与生产过程中温度等处理条件有关^[60]。氧化锆的两性结构行为表现在等电点上, 其等电点在 3~10 之间。

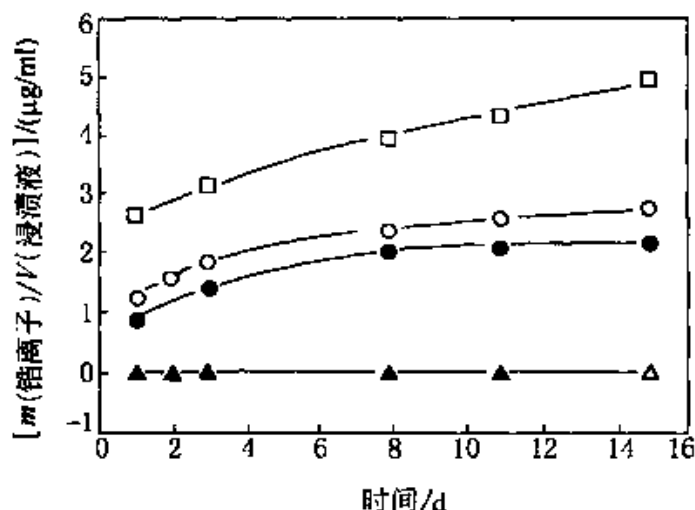


图 4-9 氧化锆与氧化铝的耐酸碱性能
 ▲—ZrO₂, pH=1~14; □—Al₂O₃, pH=14;
 ○—Al₂O₃, pH=12; ●—Al₂O₃, pH=3

在氧化铝的表面上, Zr (IV) 表现为 Lewis 酸点, 具有较强的电正性, 可接受供电性 Lewis 碱的孤对电子而形成配位络合物, 因此, 当氧化锆多孔微球用作色谱填料时, 氧化锆的表面与流动相间存在着如下几种 Lewis 酸碱作用:

- ① 流动相中阳离子与氧化锆表面脱质子化羟基间的阳离子交换作用;
- ② 氧化锆表面的正电性 Lewis 酸点与未配位阴离子溶质间的阴离子交换作用;
- ③ Lewis 碱溶质与 Lewis 酸点间发生的配基交换作用;
- ④ 淋洗剂中被吸附的 Lewis 碱与被测试溶质间的竞争交换作用。

当氧化锆用作色谱填料时, Lewis 酸碱作用对色谱行为有很大影响, 在不同类型的色谱中所起的功能是不同的。在反相色谱中, Lewis 酸碱作用的附加效果使色谱峰增宽、拖尾, 阻碍分离, 必须

设法避免；在正相色谱中，可利用 Lewis 酸碱作用的差异对一些富电子基团，如多环芳烃等进行分离；在离子交换色谱中，可以利用被分析物与填料间 Lewis 酸碱作用强弱及离子交换作用的差异，对被分析物进行分离。

能与氧化锆表面上 Lewis 酸进行酸碱作用的 Lewis 碱很多，包括磷酸根，硫酸根，硼酸根，氢氧根，氟离子及其他富电子化合物。由于它们的结构不同，它们的碱性以及与氧化锆的酸碱作用大小也存在差异。其中磷酸根与氧化锆的作用最强^[61]。另外，氟离子与氧化锆表面也有较强的结合能力^[62]。氧化锆表面上每个 Lewis 酸点上可以结合多个氟离子。与磷酸根不同，氟离子的吸附是可逆的。

3. 在液相色谱中的应用

1979 年，Wall 等将溴化十六烷基三甲胺吸附在氯化锆表面上，以形成反相结构，并研究了其色谱行为，但发现这种结构极不稳定^[63]。1981 年，Dines 又以直接沉积法，用有机磷酸锆直接得到了分子式为 $Zr(O_3POR)_2$ 的反相填料（式中 R 为丁基、十六烷基、十八烷基等）^[64,65]，但这种填料机械稳定性差。由于本身的缺陷，以上两种填料难以广泛应用。

1989 年，Carr 等研制出了可以用于反相色谱的聚丁二烯包覆多孔氧化锆微球^[66]。研究表明，氧化锆表面上包覆聚丁二烯后，其耐碱性优于其他任何有机-无机复合物填料。但是，像在其他无机氧化物上进行包覆一样，该方法仍存在缺陷，如凝胶球的比表面积下降，表面覆盖不完全等。当使用这种反相填料作色谱固定相时，若流动相为 pH=3 的磷酸缓冲液，小分子溶质在这种固定相上的保留特征与在烷基化硅胶相似；若流动相中没有磷酸根离子，则流动相中 Lewis 碱型溶质会与氧化锆凝胶表面上未被覆盖的 Lewis 酸点发生酸碱作用而导致峰变形。

Unger 等将十八烷基键合氧化锆多孔微球应用于反相色谱^[58]。在这项工作中，由于成功地对氧化锆表面极性进行了控制，从而得到了稳定性较好的键合相。该填料在 pH=12 的环境中使用 500h 仍能基本保持原性能，从而修正了“硅烷化氧化锆凝胶在水溶液

流动相中不稳定”的观点^[66]。氧化锆的键合技术与硅胶类似，键合条件如 Engerhardt 等所述^[67]，所得产品中十八烷基的含量为 $1.2 \sim 1.4 \text{ mol/m}^2$ 。

Carr 利用化学气相沉积法 (CVD) 制备了表面覆盖碳的氧化锆微球，并对其用作为反相填料的色谱行为进行了研究^[68]。研究表明，这种 C/ZrO₂ 材料在 pH = 0~12 间是稳定的，其选择性与常规的反相色谱有差异，对位置异构体有较好的分离能力且分辨率可与常规反相填料相媲美。

以上研究事实表明，通过目前所用的常规方法，在氧化锆表面可以制备出反相结构。但要将这种产品应用于色谱填料则仍须进一步探索，因为它们的表面覆盖不完全，那些未被覆盖的表面仍有机会与流动相中 Lewis 碱发生作用而影响分离过程。

除反相外，氧化锆在正相色谱中也有许多应用。Unger 等曾对多孔锆球用作正相色谱填料的色谱行为进行初步研究^[58]，他们发现它的一些特征与硅胶基质正相色谱不同：①流动相中水含量对被分析物的容量因子影响极大，利用这一特性可大大缩短色谱柱的清洗等过程的平衡时间，因此在这样的色谱柱上做分离工作比在硅胶柱上进行更省时间；②表面极性高的非键合氧化锆对多环芳烃等强疏水性溶质有较大保留作用，因此它可被用于分离一些异构体，而硅胶和氧化铝却没有同样的性能；③氧化锆对碱性被分析物显示高度的峰对称性；相反，硅胶的酸性结构表面对碱性物质具有较强的保留作用导致峰增宽、拖尾现象产生。氧化铝凝胶的这些特征使得它在作为正相色谱填料时具有一定的优越性。

氧化锆在离子交换与配基交换色谱中的应用始于 Carr 和 Blackwell 等人的工作^[61,66]。如前面所介绍的那样，氧化锆表面既存在酸性位点又存在碱性位点，在它的表面上可以发生四种 Lewis 酸-碱作用，因此就存在有广泛的离子交换作用。可以将其加以适当的控制而用于色谱分离之需。以氧化锆凝胶作为 HPIEC 填料的主要优点是它可以直接使用而不须表面修饰。在这一点上它与羟基磷灰石类似，但比羟基磷灰石稳定性要好。羟基磷灰石表面的羟基上可以发生阳

离子交换，钙（或镁）离子上可发生阴离子交换。而氧化锆型色谱填料也具有这种优点，在它的表面上两种离子交换作用并存；同时，由于 $Zr(IV)$ 离子的电正性较强，对富电子基团具有配位络合作用，于是在其表面上又存在配基交换作用。当氧化锆直接用作色谱填料时，它的分离机理为阳离子、阴离子及配基交换同时存在的混合分离模式，适当调节流动相组成，如 Lewis 碱等的浓度，就可以用来分离蛋白质等生物大分子。若氧化锆经过适当改性，分离模式也会改变。1991 年，Schafer 研究了磷酸盐改性的氧化锆作为离子交换色谱填料的色谱行为^[69]。由于磷酸根与氧化锆表面 Lewis 酸点间的酸碱作用相当强，磷酸根被紧密地结合于氧化锆表面，很难被其他离子或化合物置换下来，因而其分离机理与羟基磷灰石的混合机制分离模式不同，只剩下阳离子交换作用。这样改性的氧化锆也就变成了典型的阳离子交换剂，如图 4-10 所示，只能保留阳离子型样品 (IgG)。同时由于磷酸根有效阻止了阴离子的吸附，从而也保证了蛋白质与酶等的回收率与活性。但也存在缺点，在高 pH 值的碱性环境中因磷酸根脱附而导致填料不稳定。然而，它的再生性能好，弥补了它在碱性环境中稳定性差的缺点。因此可以说，磷酸盐改性的氧化锆作为色谱填料分离蛋白质等是可行的 (图 4-10)。

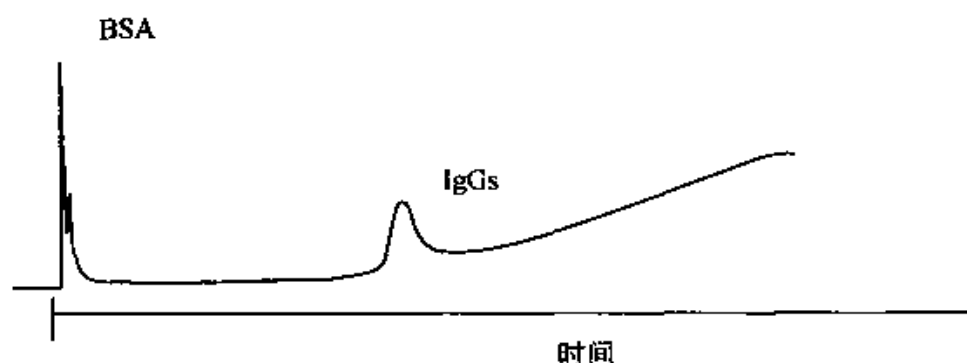


图 4-10 IgG 的分离

分离柱: 5cm×0.46cm i.d. (6~11 μ m, 300Å, 磷酸盐改性氧化锆)
流动相: 30min 线性梯度, 50~500mmol (pH=6), 0.5ml/min

Carr 等以乙二胺- N, N' -四甲基磷酸 (EDTPA) 作为 ZrO_2 表面修饰剂以分离蛋白质。由于 EDTPA 本身也具有很好的阳离子

交换特性，故蛋白质可以以很高的回收率被分离。

Blackwell 选择氟化物对氧化锆进行改性以用于生物工程产品的分离，发现其机理类似于羟基磷灰石^[70]；还建立了 Lewis 碱的碱性强弱顺序。在没有螯合作用与空间位阻作用等的影响时，该序列的准确性较好^[61]；用磷酸盐与铜离子对氧化锆进行改性，也得到了比较适合于蛋白分离的色谱填料^[71]。

在亲和色谱中的应用氧化锆也有文献报道。1992 年，Hearn 等将亚氨基二乙酸（IDA）及 Cibacron 蓝分别键合到氧化锆上，同时用铜离子加以改性，得到了适合于蛋白质分离的金属亲和色谱填料^[72]。

综上所述，氧化锆作为 HPLC 填料的研究已引起了色谱学界浓厚的兴趣。其主要的原因是氧化锆耐酸碱性好，pH 使用范围可达 1~14。同时还具有其他优点，如：①高机械强度；②耐高温；③粒径、孔径可控，适合于生物工程产品的分离；④在正相色谱中，由于对氨基等碱性基团无吸附而具有较好的峰对称性；⑤在用作离子交换色谱填料时不须键合。这些优点使它极有可能成为将来最为通用的色谱材料之一。

（三）可控孔径玻璃（CPG controlled porous glass）

某些玻璃，如含硼的 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ 系玻璃，在热处理过程中会发生分离现象，生成可溶于酸的 $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相及不溶于酸的高硅相。其中的酸可溶部分，能以酸处理令其浸析出来，而剩余的高硅相则存留下来。在这一过程中， $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$ 相所占的体积成为孔隙，剩余的高硅相实质上是二氧化硅。于是，便达到了可控孔径玻璃^[73,74]。

与硅胶相似，可控孔径玻璃表面具有可以进行修饰与衍生的游离硅羟基。所以，它可以通过各种化学修饰方法而得到具有不同官能团的表面，可以用作几乎所有色谱模式的色谱填料的基质。此外，它的机械强度高，可耐受非常剧烈的、反复的处理和操作。与硅胶一样，它可以承受数百巴（bar）的操作压力而不被破坏。此外，它的孔系由相分离过程而形成的，因而，其孔径分布非常窄而

均匀。这样的特性,使得它可以应用于酶的固定化、色谱填料、催化剂载体和化工分离等众多的领域。但是,正如在讨论硅胶基质时所指出的那样,游离的硅羟基会造成对强极性物质的非特异性吸附乃至蛋白质的变性、失活,且硅胶类基质适用 pH 范围较窄的缺点,它同样存在。加之,从制造成本上看,可控孔径玻璃的制造成本较高,这也是限制它更广泛使用的一个因素。因此,在色谱分离中,可控孔径玻璃的主要应用是用于生化分离领域,故可控孔径玻璃有时也被称为生物玻璃或多孔玻璃。

制造可控孔径玻璃可采用与一般玻璃制造时的工艺。例如,在硅碳棒炉中,以铂坩埚将配好的料熔炼为玻璃。选择适宜的原料组成和比例,控制不同的熔炼温度与时间,尤其要精细选择并控制适宜的相分离温度与时间,令所熔制的比例分相。分相后的比例在 90~95℃ 下,以适宜的盐酸浸渍,可除去钠硼相而得到具有一定孔径的可控孔径玻璃。在生化分离中,考虑到生物大分子分子量一般均在一万至几十万之间,故要求可控孔径玻璃的孔径应一般在 25~100 nm 之间。为得到这种大孔径的可控孔径玻璃,可选用钠硼玻璃为母体,相分离处理温度为 570~650℃,处理时间 4~48h。浸渍所用的盐酸可用稀盐酸,但当 SiO_2 比例大于 60% 时,亦可采用 1~2mol/L 的盐酸为浸渍液。表 4-1 给出了用以上工艺制备的可控孔径玻璃的性能。

表 4-1 可控孔径玻璃的性能

序号	$\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$			610℃/24h		650℃/24h	
	Na_2O	B_2O_3	SiO_2	Pore Radius		Pore Radius	
1	5.83	29.17	65.00	30nm	12m ² /g	50nm	24m ² /g
2	11.54	38.46	50.00	15nm	76m ² /g	30nm	39m ² /g
3	8.30	41.70	50.00	75nm	19m ² /g	30nm	9m ² /g
4	6.52	43.48	50.00	100nm	11m ² /g	30nm	20.7m ² /g
5	6.98	46.51	46.61	107.5nm	22m ² /g	30nm	23m ² /g

从上表可以得知,各种配方及工艺,均可得到直径大于 30 nm 的可控孔径玻璃,但其表面积则有一定差别。如同是 30 nm 孔径的玻璃,其比表面积却是 12m²/g 和 39m²/g。对于生化分离来说,

这代表着不同的样品负载量。

为降低可控孔径玻璃的生成成本，黄照怀等发明了以 Na_2O — CaO — Al_2O_3 — B_2O_3 — SiO_2 系玻璃为原料，制备可控孔径玻璃的新方法。在这一工艺中，大幅度降低了氧化硼的使用量，从而生产成本大幅降低^[75]。他们更进一步开发出硅藻土为原料，廉价地生产可控孔径玻璃的新方法^[76]。

早期制造的可控孔径玻璃为无定形固体物质，使用时必须经粉碎、过筛，以得到不同粒度的材料。为满足色谱分离的要求，也可以采用特殊的工艺制备球形可控孔径玻璃。例如，粒径 $10\mu\text{m}$ 左右及 $25\mu\text{m}$ 左右的可控孔径玻璃，其孔径可以是几纳米至几千纳米，分别供分析型和制备型色谱填料制备之需。

由于性质的相似性，可控孔径玻璃在色谱中的应用范围大致与硅胶相同。但是，由于它的孔径分布窄，且可以随需要而方便地控制其孔径，因而，在生化分离中也有其特点。例如，以可控孔径玻璃为基质的反相填料，可用于蛋白质的分离（图 4-11）。

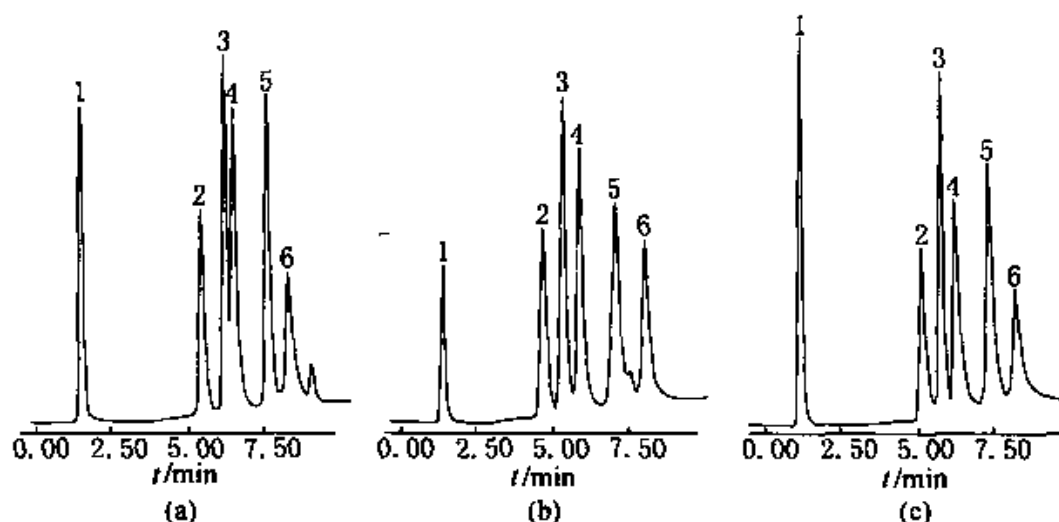


图 4-11 以不同孔径 ODS 化可控孔径玻璃填料分离蛋白质^[77]

(a) 28nm; (b) 50nm; (c) 110nm

使用 $7\mu\text{m}$ 填料，以 5cm 短柱，在 10min 内将 6 种标准蛋白质完全分离。将 CPG 用于疏水作用色谱的基质材料，链合上聚乙二醇配基，可以仅以改变盐浓度的方式分离蛋白。以胰蛋白酶为样

品, 经 CPG-PEG400 分离后, 其活性回收率接近 100%^[78]。

(四) 羟基磷灰石 (HAP hydroxyapatite)

羟基磷灰石也是一种可用于液相色谱填料的基质材料, 主成分为羟基磷酸钙, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 。天然的羟基磷灰石属六方晶体, 由于有很好的生物相容性, 故可以用做生物医学材料, 特别是牙科材料。近年来, 用作为人工骨骼的研究也取得了很大进展^[79]。用作为蛋白质的分离材料始自 1956 年^[80]。1983 年, Bio-Rad 公司生产并开始销售由无定形羟基磷灰石填充的高效液相色谱柱。实际上, 这种羟基磷灰石系由细小的片状结晶所组成的, 因而柱效、柱子的通透性以及柱床的稳定性均不是很好。1986 年, $5\mu\text{m}$ 的球形羟基磷灰石填料问世, 随后, 羟基磷灰石填料的应用也有了长足的进展。

片状微晶羟基磷灰石可由钙盐或氢氧化钙与磷酸盐的反应制成。控制配料的成分、比例及结晶的条件, 便可得到所需性质的产品。制备球状的羟基磷灰石可采用不同的方法。如两步法、喷雾热解法等。余贤真等提出的复合球形羟基磷灰石^[81]和均相法制备球形羟基磷灰石的方法^[82], 具有粒径可控、性能稳定的特点, 可用的填充出柱压低、流速快且柱效也高的高效液相色谱柱。所谓复合球法, 系指高分子基质与羟基磷灰石微晶复合成球。高分子基质提供机械强度和稳定性形状, 而羟基磷灰石微晶则提供特殊的分离功能。均相法球形羟基磷灰石的制备过程中, 需要严格控制晶核的数目和结晶条件。所得到的微球直径约为 $2\sim 60\mu\text{m}$ 。根据需要, 可不同粒径范围的微球, 如 $2\sim 5\mu\text{m}$ 球可用作高分辨柱的填料, $10\sim 20\mu\text{m}$ 及 $30\sim 60\mu\text{m}$ 的球可用与高效制备柱。目前, 已有商业供应的高性能球形羟基磷灰石, 它们是由微晶聚集而成的。由其形状可知, 以此种微球填装的柱子, 应有很好的通透性和很高的柱效 (图 4-12)。

正是由于羟基磷灰石在化学组成和晶体结构特性, 使得它具有独特的分离机理。羟基磷灰石晶体上有两种不同的晶面, 形成了两种具有不同吸附特性的吸附位点, 即位于 Ca^{2+} 离子上的吸附阴离子的位点和位于 $(\text{PO}_4)^{3-}$ 离子上的吸附阳离子的位点。而 OH^- 不

参与吸附过程。这种吸附作用的机理,使得它具有很高的吸附容量。例如一根 $\phi 10 \times 100$ (单位) 的羟基磷灰石柱,可以吸附并分离 20.4mg 的溶菌酶^[83]。

羟基磷灰石一般不经表面化学修饰而直接用作液相色谱填料。它具有较高的机械强度。球形羟基磷灰石可在 15 MPa 压力下工作。若经高温进行陶瓷化处理,可耐受更高的操作压力。羟基磷灰石的化学稳定性较好,特别是可耐受碱性环境。但是,它耐酸性不佳。若将其羟基以 F^- 取代,则可将耐低 pH 值下限延至 pH=4.0。用于生化分离时,必须考虑柱子上的非特异性吸附问题。这恰恰是羟基磷灰石最大的优势之所在。在大多数情况下,羟基磷灰石柱对蛋白质的非特异性吸附极低,分离诸如酶、抗体等物质时,可获得很高的活性回收率。目前,羟基磷灰石填料主要用于生物分子的分离与分析,特别是多肽、蛋白质及糖类的分离与纯化。在蛋白质分离纯化方面的应用中,酶、抗体的分离中应用最多。用羟基磷灰石分离单克隆抗体具有简单、快速、高效和成本较低的特点。例如,仅用梯度淋洗的羟基磷灰石柱,便可从小鼠腹水或细胞培养上清液中分离 IgG^[84]。从小鼠腹水中,更可以高分辨地分离出 IgG、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃ 和 IgG 等不同型和亚类的单克隆抗体^[85]。人们期待羟基磷灰石能有更广的应用。

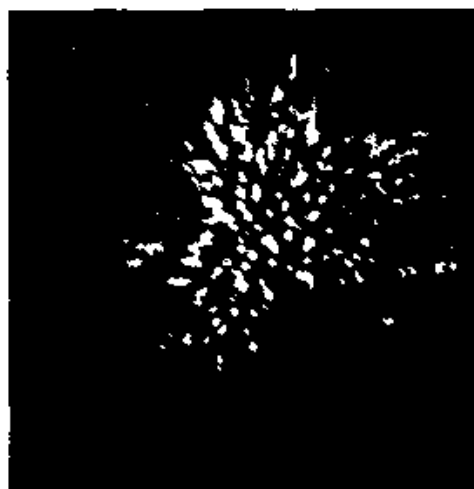


图 4-12 球形羟基磷灰石柱的扫描电镜图

第二节 硅胶的改性与修饰

除在正相色谱中硅胶可以直接使用外,在液相色谱中用做填料的硅胶均需进行改性与修饰,制备出各种键合相填料,以适应于各种色谱模式的分离之需。这种改性与修饰一般可通过 3 种途径进行,即表面化学修饰、整体改性和涂敷。

一、硅胶的表面化学修饰

通过适当的化学反应，可以将特定的官能团或配基以共价键结合于硅胶表面，从而使硅胶的表面状态与性质可以按照色谱分离的要求加以调整和控制，这就是硅胶的表面化学修饰。通过化学修饰，可以将所需要的基团或配基牢固地联接在硅胶表面上，而硅胶基质固有的特性并没有变化。如高机械强度、耐较高的温度、在一定的 pH 值范围内稳定等特性均仍存在，其孔结构通常也不会发生太大的变化。

(一) 表面修饰涉及的官能团及化学键

可键合到硅胶表面的官能团多种多样。例如，对反相填料而言，可将烷基或芳香族烃基接到硅胶上；制备正相填料可以使用氰基、二醇基或氨基；将硅胶表面接上各种活泼的反应性基团后，又可再经进一步的衍生反应，连接上具有疏水性、离子交换性、金属螯合性以及具有分子识别性的各种亲和配基，便能制备出疏水作用、离子交换、螯合和亲和色谱填料。尽管接上的官能团可以多种多样，但对于硅胶来说，主要是利用了其硅羟基的反应。

前面已介绍过，硅可以与很多元素形成稳定的共价键，如 Si—O 键、Si—C 键、Si—N 键等。表 4-2 给出了上述 3 种键的有关参数。

表 4-2 几种键的键长及键能

键	键长/nm	参考化合物	键能/(kJ/mol)	参考化合物
Si—O	0.160	SiO ₂	479	SiO ₂
	0.164	Si (OCH ₃) ₄		
Si—C	0.189	Si (CH ₃) ₄	306	(CH ₃) ₃ SiCl
	0.185			
Si—N	0.174	(SiH ₃) ₃ N	318	(CH ₃) ₃ Si ₂ NH

从表 4-2 可知，Si—O、Si—C 等均是很稳定的键，Si—O 键对酸较稳定，但对碱则不大稳定，当 pH>9 时，Si—O 键则易发生解离和断裂。Si—C 键则对酸不稳定，当 pH<2 时，Si—C 键易破坏

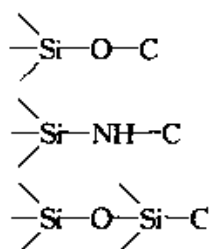
而导致所连接的官能团脱落。由于 Si—C 键对温度较稳定，使它可以经受较高的处理温度。作者的实验室曾测定了一些市售和自制反相填料的热失重曲线，发现它们在 300~320℃ 左右才发生明显的失重。至于 Si—N 键，尽管它也比较稳定，但其高反应活性使它不适应于含水试剂。因此，通常仅将硅氮烷用做硅烷化试剂，而不在最终产品中使用 Si—N 键。

(二) 以 Si—C 键直接进行表面修饰

Si—OH 是很活泼的基团。通过卤素的取代反应，如以 SOCl_2 将硅胶表面修饰为 Si—Cl 基。再以格氏试剂、烷基锂或有机胺的衍生物等与其反应，便可以将烷基^[86]（正丁基、正辛基、十八烷基以及苯基）和衍生的胺基引至硅胶表面^[87]。从理论上讲，以 Si—C 键形成的键合相，应属于“刷子”形且具有单分子键合层的填料，其稳定性和传质特性均很好。但是，使用格氏试剂很不方便，且硅胶和所用试剂均须保持干燥，否则会生成许多不期望的副产物而影响最终产品的质量。因此，在实际制备填料时，多不采用这种工艺。至于衍生胺基键合相，即含 Si—N—C 键的填料，也因其较窄的 pH 使用范围（pH = 4~8）而未被普遍接受。

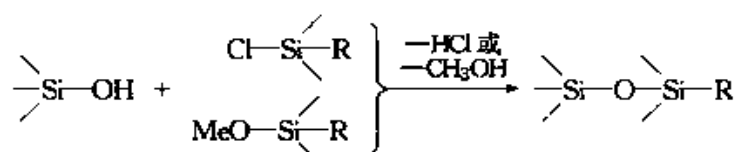
(三) 以 Si—X—R 型结构对硅胶进行表面修饰

这里的 X 代表一个中间原子，例如 O、N 等，通常的结构形式是



这里的第一种结构即所谓硅酸酯型填料，它是在色谱发展的早期所使用的填料之一。其特点是柱效较高但稳定性较差，因而只能使用于正相色谱模式中，现在已不大应用了。至于第二种结构，在前边

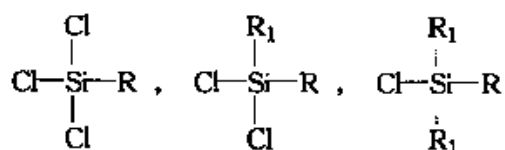
已讨论过，其稳定性介乎硅酸酯和最常见的 —Si—O—Si—C 结构填料之间，实际应用价值亦不大。所以，目前所使填料的绝大部分属于第三种结构。 —Si—O—Si—C 型结构可以通过硅胶与带有活泼反应基团的硅烷的反应而生成。这种活泼的反应基团可以是氯或烷氧基，即



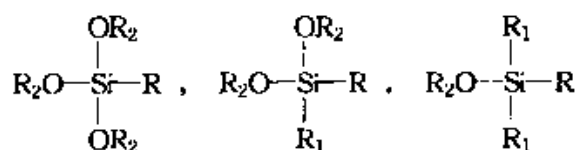
显然，在上述结构形式中，联接配基的实际上还是 Si—C 键。这种结构以其性质优良和制备方便的优点，得到了最广泛的应用，是键合相硅胶的最主要的结构形式。在上述 Si—O—Si—R 结构中，R 基的空间位置受硅氧烷键的四面体排布形式的影响。当硅胶表面密布这种带很强疏水性的 R 基时，R 基被认为呈刷子状。但是，若键合密度不是很高，或 R 基的另一端与硅胶表面有另外的键合点时，它也会“倒伏”在硅胶表面。此外，R 基的大小，也会对硅氧烷键的四面体结构产生影响，从而使最终产物的性质发生一定的变化。例如，当 R 是直链型烷基时，随 R 基中 C 原子数的增加，硅胶表面结构的稳定性将逐渐增加，至 $\text{R} = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 中的 $n = 16$ 时，趋于极大值，然后随 n 的增加而减小。但是，在直链烷基以外的配基中，尚未能清晰地观察到这种规律性。

(四) 硅烷化试剂及键合反应

用于硅胶表面化学修饰的硅烷化试剂，基本上可分为烷基氯硅烷和烷氧基硅烷两大类。此外，烷基硅氮烷（或称硅氮烷）也有所使用。它们的分子式为
氯硅烷：



烷氧基硅烷：



上面分子式中的 R 基，可以是直链或支链烷基、芳香基，如 CH_3- 、 C_4H_9- 、 $\text{C}_8\text{H}_{17}-$ 、 $\text{C}_{18}\text{H}_{37}-$ 、苯基等，也可是它们被不同的基团取代后的衍生基团。 R_1 通常为甲基，但有时亦可以是其他基团。在烷氧基硅烷中，通常使用甲氧基或乙氧基，即 $\text{R}_2 = \text{CH}_3\text{O}-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$ 。

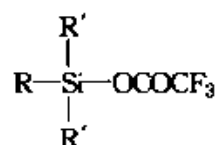
氯硅烷虽然是常用的硅烷化试剂。但是，它有一些很明显的缺点。例如，氯硅烷会和空气中微量的水反应，放出具有腐蚀性和刺激性的 HCl 气，易对环境和人造成污染与危害。制造过程中放出的 HCl 还会强烈地吸附于所制备的填料中，从而造成 $\text{Si}-\text{C}$ 键的断裂。这可能是制造不良的填料的性能逐渐变劣的一个重要原因。加之氯硅烷价格不菲，所以它并不是一种理想的硅烷化试剂。

相比之下，烷氧基硅烷对环境和人体的危害性要小得多。因此，烷氧基硅烷广泛地使用在离子交换、疏水作用、凝胶过滤以及亲和作用等色谱填料的制备中。然而，用于反相色谱的却很少报道。作者的实验室中，利用正构烷基链烃取代的烷氧基硅烷，研制成功了反相高效液相色谱填料^[88~93]。经色谱性能表征可知，以此方法制备的反相填料与通常的反相填料类似。但是，由于使用了环境友好的试剂与工艺，所以对环境造成的污染很小。此外，这类国产试剂，成本很低，因而是一种有前途的制造高效液相色谱填料的方法。

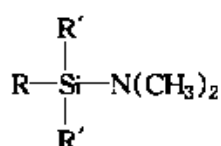
除氯硅烷和烷氧基硅烷外，还可以使用烷基硅氨烷。例如，六甲基二硅氨烷便是经常使用的一种活泼的“封头”试剂。利用硅氨烷的高活性，可以得到高键合度的反相填料^[94]。

为制备高性能的键合硅胶填料，一些实验室和公司相继研制了

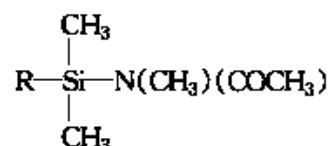
一些新的高活性的硅烷化试剂^[95,96]。例如，
烷基三氟乙酰氧硅烷



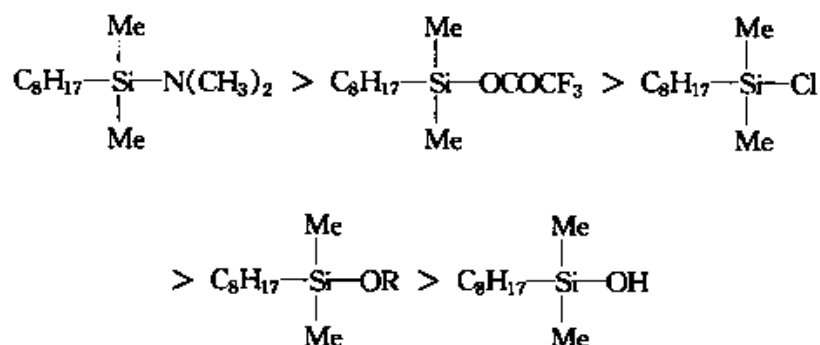
N-（有机硅烷基）-*N*, *N*-二甲基胺



N-二甲基烷基硅烷基-*N*, *N*-乙酰基甲基胺



一般情况下，上述化合物中的 R 基为正丁基（ $n-\text{C}_4\text{H}_9-$ ）和正辛基（ $n-\text{C}_8\text{H}_{17}-$ ）。它们均比通常的氯硅烷和烷氧基硅烷要活泼。以正辛基二甲基硅基为例，不同类型硅烷化试剂的活性顺序为^[97]



在氯硅烷中，当 R 相同时，三氯硅烷的活性大于二氯和一氯代硅烷，即： $\text{RSiCl}_3 > \text{RR}_1\text{SiCl}_2 > \text{RR}_1\text{R}_2\text{SiCl}$ 。但是，试剂的价格的顺序则与活性顺序相反。因此，可以针对不同的需要选择不同的硅烷化试剂。如需要制备单分子层键合相，应选用单氯硅烷；需合成高碳含量或高容量因子（ k' ）填料时，则选用三氯硅烷。表 4-3 给出了常见的硅烷化试剂以及其主要物理性质。

表 4-3 常用的硅烷化试剂

氯 硅 烷 型					
名 称	牌号 ^①	分子式	沸点 ^② /℃ (P/kPa)	公司或 厂家	备注
三甲基氯硅烷 trimethylchlorosilane		$(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$	57(101.3)		残余 Si—CH ₃ 基 封头; C ₁ 反相
正丁基二甲基氯硅烷 <i>n</i> -butyldimethylchlorosilane		$n-\text{C}_4\text{H}_9(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	140 (101.3)		C ₄ 反相, 单 层键合相
正辛基二甲基氯硅烷 <i>n</i> -octyldimethylchlorosilane		$n-\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	105 (2)		C ₈ 反相, 单 层
正十八烷基二甲基氯硅烷 <i>n</i> -octadecyldimethylchlorosilane		$n-\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	140~145 (0.013)		C ₁₈ 、ODS 反 相, 单层
苯基二甲基氯硅烷 Phenyldimethylchlorosilane		$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	87 (2.4)		苯基反相, 单层
氰乙基二甲基氯硅烷 cyanoethyldimethylchlorosilane		$\text{NCC}_2\text{H}_4(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	83 (2.4)		氰基反相, 单层
二甲基二氯硅烷 dimethyldichlorosilane		$(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$	70(101.3)		C ₁ 反相, 单 及多层
二丁基二氯硅烷 dibutyldichlorosilane		$(\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{SiCl}_2$	212 (101.3)		C ₄ 反相, 单 及多层
正辛基甲基二氯硅烷 <i>n</i> -octylmethyldichlorosilane		$\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{CH}_3)\text{SiCl}_2$	94 (4.8)		C ₈ 反相, 单 及多层
十八烷基甲基二氯硅烷 <i>n</i> -octadecylmethyldichlorosilane		$\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{CH}_2)_3\text{SiCl}_2$	185(0.33)		C ₁₈ 反相, 单 及多层
苯基甲基二氯硅烷 phenylmethyldichlorosilane		$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_3)\text{SiCl}_2$	205 (101.3)		苯基反相, 单及多层
甲基三氯硅烷 methyltrichlorosilane		CH_3SiCl_3	66(101.3)		C ₁ 反相, 多 层

续表

氯 硅 烷 型					
名 称	牌 号 ^①	分子式	沸点 ^② /℃ (P/kPa)	公司或 厂家	备注
正丁基三氯硅烷 <i>n</i> -butyltrichlorosilane		$C_4H_9SiCl_3$	142~143 (101).3		C ₄ 反相, 多层
正辛基三氯硅烷 <i>n</i> -octyltrichlorosilane		$C_8H_{17}SiCl_3$	224~226 (97.3)		C ₈ 反相, 多层
十八烷基三氯硅烷 octadecyltrichlorosilane		$C_{18}H_{37}SiCl_3$	160~162 (0.4)		C ₁₈ 反相, 多层
苯基三氯硅烷 phenyltrichlorosilane		$C_6H_5SiCl_3$	201 (101.3)		苯基反相
乙烯基三氯硅烷 vinyltrichlorosilane	A150	$CH_2=CH-SiCl_3$			聚合物包覆
环氧丙基丙氧基三甲氧基硅烷 glycidoxypropytrimethoxysilane	KH560 A187	$(CH_3O)_3Si(CH_2)_3O-CH_2-$	290 (101.3)	盖州 UC	正相、反相、疏水、离子交换、亲和、凝胶等
环氧丙基丙氧基三乙氧基硅烷 glycidoxypropytriethoxysilane		$(C_2H_5O)_3Si(CH_2)_3O-CH_2-$			正相、反相、疏水、离子交换、亲和、凝胶等
氨丙基三乙氧基硅烷 aminopropyltriethoxysilane	A-1100, KH-570	$(C_2H_5O)_3Si(CH_2)_3O-(CH_2)_3NH_2$	122 (5.06)	盖州 UC	离子交换、亲和、正相
γ-甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷	KH-570	$CH_2=C(CH_3)-COO(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$	255(101)	上海 耀华; 天津化 工一厂 UC	包覆型填料, 复合型填料
γ-巯基丙基三乙氧基硅烷 mercaptopropyltriethoxysilane	KH-590 A189	$HS(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$		盖州 UC	复合、亲和

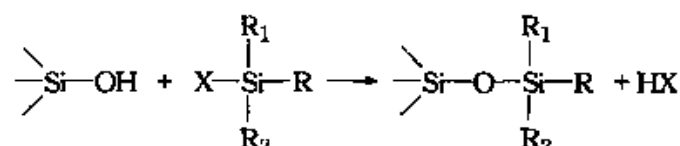
续表

氯 硅 烷 型					
名 称	牌号 ^①	分子式	沸点 ^② /℃ (P/kPa)	公司或 厂家	备注
六甲基二硅氮烷		$(\text{CH}_3)_3\text{Si}-$ $\text{NH-Si}(\text{CH}_3)_3$			封头试剂
氰基丙基三甲氧基硅烷 Cyanopropyltrimethoxysilane	GH-520	$\text{NC}-(\text{CH}_2)_3$ $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$			键合正相、 离子交换、反 相
乙烯基三乙氧基硅烷	A151	$\text{CH}_2=\text{CHSi}$ $(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$		天津试 剂一厂 UC	复合、包 覆型

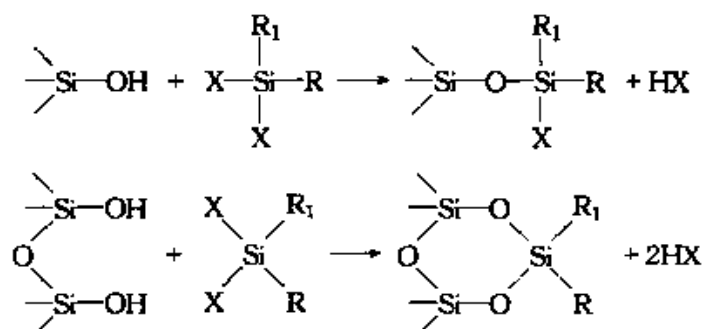
① A字头为美国联合碳化物公司的牌号；KH为中国科学院化学研究所的牌号。

② 沸点单位为℃/kPa，kPa与mmHg换算关系为1kPa=760/101.3mmHg。

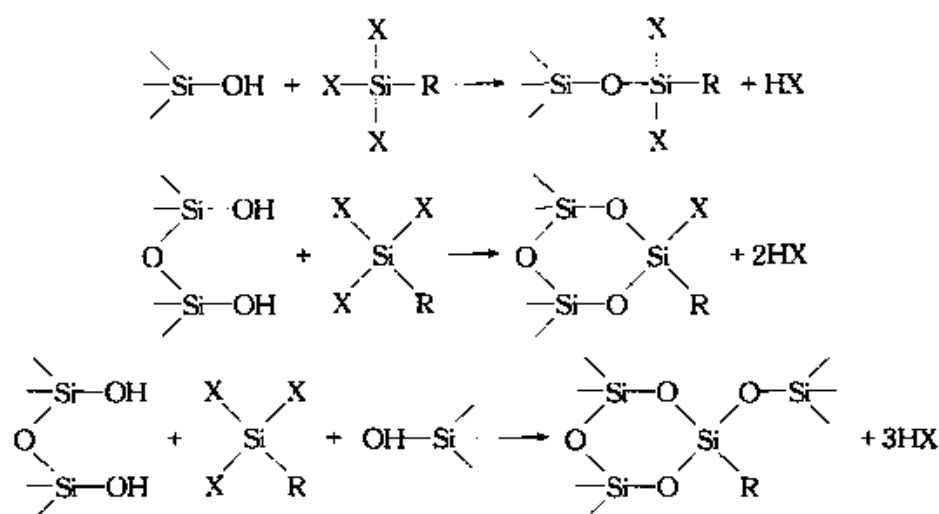
在表面化学修饰反应中，不管使用什么样的硅烷化试剂，它们均是通过硅烷表面的硅羟基与试剂发生化学反应的。前述的各种硅烷化试剂，可按反应官能团的数目，分成单官能团、二官能团及三官能团等几类。对于单官能团试剂，可按如下反应式修饰硅胶



由上式可知，只能生成单分子键合层。由于键合层是单层的，所以反应的控制比较容易，所制备的填料的传质特性亦较好。通常，式中的R为所设计的配基，而R₁、R₂则为甲基。如果使用二官能团试剂，情况则复杂得多



对于三官能团试剂则可能有如下反应



在实际上，前两个反应是合理且可能的。第三个反应，因有较大的位阻效应，发生的概率很小。但是，当体系中有水分存在时，情况则变得十分复杂。水和 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \text{Cl}$ 反应，生成 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \text{OH}$ ，它既可以参与和 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \text{Cl}$ 的进一步反应，也可以与另外的 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si} \\ \diagdown \end{array} \text{OH}$ 基反应而形成 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键。因此，使用二官能团或三官能团试剂时，往往会产生多层，或称为聚合型键合相。在这种键合相中，会存在交联结构。因此，这种修饰反应的控制也远较单官能团的试剂困难。但是，利用这种性质，可以形成较致密的键合层，可以更有效地掩蔽硅胶表面的硅羟基，从而，有可能导致溶质更强的保留和对强极性溶质的更小的非特异性吸附。图 4-13 列出各种可能的表面化学修饰的填料表面的模式图。

从图上可以看出，在有水存在时，特别是硅胶表面有物理吸附水时，所形成的聚合物键合层会因自组装（self-assembled monolayers, SAMs）而形成比较致密的修饰层。反映在元素分析数值上， $\text{C}\%$ 很高，而在色谱性能上， k' 也会较高，对不同的溶质会表现出不同的选择性。

如前所述，完全羟基化的硅胶表面的硅羟基浓度为 $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。根据在晶体表面上吸附性质的研究，紧密排列的烷基所占的面积约为 0.2nm^2 。而这一数值恰恰与硅胶表面硅羟基的浓度相等。这就意

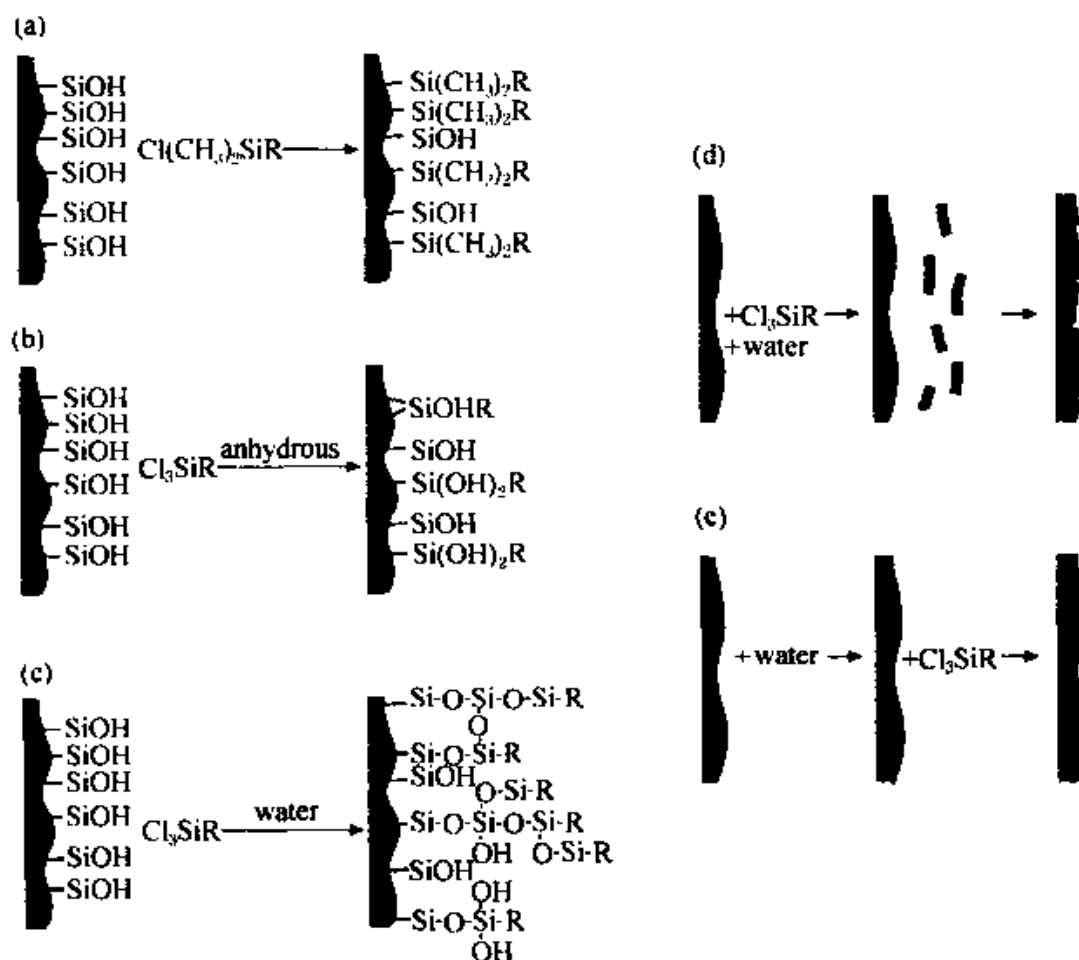


图 4-13 硅胶表面修饰的模式图

味着，若所有的烷基配基都按最紧密竖直排列方式覆盖在硅胶表面，则恰恰是 $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。但是由于空间位阻，在键合相硅胶中很难达到这一数值。一般仅达 $2\sim 3.5\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。至于聚合相硅胶，则有可能更高一些。但是，若按硅胶表面硅羟基的键合率来计算，则未必会高于单层键合的硅胶填料。

(五) 键合相硅胶填料的制备

前面已介绍了各种硅胶化试剂以对硅胶进行表面修饰的各种途径和方法。选用带有不同功能基的硅烷化试剂，可以得到用于不同色谱模式的填料。例如，以烷基（包括链烃和芳烃）可得到反相填料；以氨基、羧基、磺酸基等可得到离子交换填料；以 PEG 可得

到疏水作用填料等等。这些填料的制备,可以在水相中进行(如以烷基硅烷为硅烷化试剂),也可在非水相中进行。但是,从填料性能上讲,还是以非水相为好。气相衍生反应亦有人加以研究。其中,以流态化床法制备反相填料的方法,具有很突出的优点。在讨论反相色谱填料的制备时,将进行较为详细的介绍。

在非水相有机溶剂中制备键合相硅胶填料,通常包括以下步骤^[98]:

1. 硅胶预处理

硅胶的预处理有三种作用:洗去制备、运输和保存过程中引进的污染物,除去有害的金属离子,如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 等以及使硅胶表面产生较多的游离硅羟基,以备下一步进行表面修饰时有更多的反应位点。通常,可以用 0.1mol/L 的盐酸,于 90°C 下浸泡 24h,或以 10% 的盐酸在回流状态处理 8h。处理好的硅胶以水洗至无 Cl^- ,然后在烘箱内干燥备用。如果所用的硅胶纯度较高,也可以仅用稀氢氟酸处理即可。在作者的实验室中,以 $0.4\% \sim 1.2\%$ HF 将硅胶浸泡一昼夜后,洗净、烘干,然后直接进行表面化学修饰,也可以得到很好的填料,但预处理过程则简单得多。

调整表面硅羟基浓度:经过上述酸处理后,硅胶表面的硅羟基浓度已达到理论值的 $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 左右。但是,极性表面,使得它们均含有相当数量的物理吸附水。为除去物理吸附水,在进行键合前,多采用真空下加热的方法。一般在 150°C 至 250°C 下,抽真空至 0.1mmHg ,即 13.3Pa ,并维持数小时。这样,既除去了物理吸附水,又可令硅羟基发生部分自缩合,代之以较为惰性的 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 键。不管原来所使用的硅胶的表面硅羟基浓度是多少,经过这样的处理,均可以达到接近一致的表面硅羟基浓度。

2. 溶剂与试剂的预处理

硅烷化试剂,特别是氯硅烷,对水很敏感。在保存过程中,总会遇到微量的水分。因而,保存期过长或保存不佳的硅烷化试剂,会产生絮状沉淀或飘浮固形物。它们多是硅烷化试剂与水反应或自聚的产物。有时,与水反应后会放出的 HCl 具有很强的腐蚀性而

将容器盖破坏，盖子的碎渣也会进入试剂中。所以，如有必要，在使用前应将硅烷化试剂以蒸馏方式进行纯化或至少以玻璃棉将其中的悬浮物滤去方可用于衍生反应。所使用的有机溶剂，必须进行干燥。若是以甲苯为溶剂，最好以金属钠干燥。

3. 衍生反应

衍生反应最好在玻璃反应器内进行。氯硅烷有很强的腐蚀性，不宜在不锈钢反应器内使用。为防水气进入反应体系，应以干燥管和外界相通。反应温度一般为 109°C ，即在甲苯回流的状态下进行。若采用更高的反应温度，则应改换其他反应溶剂。如采用二甲苯，则可将反应温度提高至 138°C 。必须注意的是，若采用高温，就必须注意防止氧化。可采用干燥的氩、氯或氮气以保护反应体系。为使反应试剂能渗透进硅胶的微孔内部，应注意加料的方式与顺序。应进行真空加料且预先将硅烷充分脱氧。反应的温度与时间的选择，应以得到足够的键合率为准，在使用甲苯为溶剂时，反应时间至少应为 18h 以上。这样所得到的填料，必须经仔细洗涤，以除去多余的试剂及副反应产物。所得到的产物，也可以作为填料使用。但是，因为其键合率通常仅有 $3\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 左右，远未达到理论覆盖的 $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。残余的硅羟基会造成对溶质的非特异性吸附。为此，需对这种填料进行“封头”处理，即以高反应活性的小分子量硅烷化试剂，将残余的硅羟基通过衍生反应加以覆盖。常用的封头试剂为三甲基氯硅烷或六甲基二硅氮烷，封头反应所用装置与步骤同前述键合反应。

在衍生反应中，可视需要加入一定数量的催化剂。有时，加入微量的水可使反应更加完全。使用氯硅烷时，由于会释放出 HCl，所以加入胺类物质以吸收体系中的 HCl，同时，也起到了催化剂的作用。

理想的填料制备工艺，应具备低消耗、高效率、产品质优且重复性好，而且，操作条件的宽容度也应较宽才行。如果操作条件非常严格而苛刻，则其质量的稳定性和重复性是难以保证的。上述填料合成工艺已经比较成熟，基本上符合这一条件。但是由于硅胶基

质、衍生试剂及衍生反应的复杂性，使得不同的实验室和厂家所制备的相同种类的填料的性能千差万别。因此，合成反应和工艺的研究至今仍在进行。例如，利用气相衍生反应^[99]可以快速制备高性能的反相填料（通常少于 3h），但其缺点是需使用大容积的反应容器且要求硅烷化试剂在所使用的温度下有适当的蒸气压。换句话说，要求硅烷化试剂的沸点不能太高。这就使得长链烷基反相填料难以使用这一工艺。比较成功的另一种方法是流态化或沸腾状床法^[100,101]。所谓流态化法，系将硅胶置于底部可通入气流的竖直反应器中，通入干燥的惰性气体，令硅胶保持在流态化状态。在惰性气体中加入气化的硅烷化试剂且将硅胶加热至一定的温度，则硅胶会与硅烷化试剂在气相下发生衍生化反应。这一方法效率高，无溶剂消耗且不同批次间重复性好。因此，这是一个有前途的制备工艺。当然，与气相衍生相类似，所使用的硅烷化试剂沸点不能太高则是其缺点。

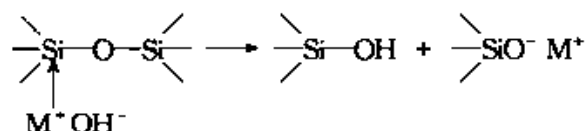
（六）键合相硅胶的稳定性

作为 HPLC 的色谱柱填料，键合相硅胶工作的环境是流动相。它必须能耐受各种有机，无机溶剂的持续作用。对于正相色谱填料来说，在有机溶剂中应不流出、不溶胀，不与溶剂发生化学反应；对于反相色谱填料，除应耐受有机溶剂外，还应能在较宽的 pH 范围内稳定地工作。有时，溶剂中还会有不同浓度的无机盐，它们也会对填料造成损害。虽然，对液相色谱填料的耐高温特性的要求比在气相色谱中要低，但是毕竟也应有相当的耐高温性能。例如，有时分离过程需要在几十度的温度下进行。

化学键合相硅胶是通过硅-氧-硅-碳键形成的。因此，在普通的有机溶剂中不会因溶解而流失。但是，有些质量较差的商品填料，特别是反相填料，在经长时间淋洗就会产生轻微的流失。在柱子经过使用后需要以较强的溶剂及较高浓度再生时，往往可以观察到这种现象。厂家对此一般不做任何解释，但究其原因，最大的可能是键合时没能除净物理吸附水，造成填料颗粒表面存在有硅烷化试剂与水作用的副产物。这些副产物很易溶解在有机溶剂中，造成表观

的键合相流失的现象。所以，对真正的化学键合相而言，最重要的还是在不同的 pH 溶液中的稳定性问题。

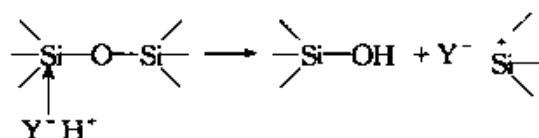
无论是球形还是无定形的化学键合相硅胶，其中的 Si—O—Si 键很容易被 KOH 和 NaOH 这一类强碱性亲核试剂所切断，其作用方程如下：



式中，M 代表 Na⁺、K⁺、Li⁺ 等金属离子。

如在前面讨论硅胶时所指出的那样，对硅胶基质而言，在 pH > 9.0 的水溶液中，这种断链变得显著起来。另一方面

$\diagup \text{Si} \diagdown \text{--- O ---} \diagup \text{Si} \diagdown$ 三键也易于受到 Brnsted 和 Lewis 酸等亲电试剂的进攻而断裂：



亲电进攻的程度决定于氧原子上自由电子对的可接近程度，这主要是由连接到硅原子上的给电子和吸电子取代物所带来的特点。增加吸电子取代基强度，Si—O—Si 键的极性减弱，对亲电进攻相对稳定，而给电子取代基由于增加了 $\diagup \text{Si} \diagdown \text{--- O ---} \diagup \text{Si} \diagdown$ 键中 O 原子上的电子云密度，导致更易受亲电试剂的进攻。

=Si---C= 是很稳定的化学键。通过对四烷基和四芳基硅烷的热解研究得知，大约 1100K，即超过 800℃ 时 Si—C 键才会完全热解，因此人们可以预料，通过 =Si---O---Si---R 键合到硅胶表面的烷基和芳基配基的热稳定性可达到 600~700K。但在实际上，如果在空气中加热，伴随着氧化过程的发生，键合相的实际耐热性会迅速下降。通常键合相硅胶应在 150℃ 以下使用为宜。

由于 Si—C 键的弱离子特性（主要是由极化引起的 Si⁺—C⁻），它既可被亲核试剂进攻也可为亲电试剂进攻而产生键断裂。但是当

烷基基团的 α -, β -, 或 γ 位有极性的取代原子存在时, 则会使亲核进攻导致的断裂增加, 而亲电进攻导致断裂的可能性减少。取代异原子按 α , β , γ 位的顺序对断裂影响减小。但也有例外, 如卤素化合物、 α -N 和 β -O 化合物等这种规律就不大明显。比较而言, Si—芳基键更易于受到亲电进攻, 如芳烃的亲电取代。总而言之, 给电子取代基显著加速裂解而吸电子取代基则相反。Si—芳基键的亲核断裂比硅烷基键的断裂要更容易一些, 而芳基上吸电子取代基似乎使断裂变得容易。

在实际应用中, 键合相的稳定性被广泛地研究过。一般而言, 硅胶基质化学键合相在 $\text{pH}=2\sim 8$ 的范围内是稳定的。化学键合相的低 pH 值稳定性极适于大多数多肽和蛋白质的分离分析, 因为在大多数多肽和蛋白质的分离时, 为了克服离子交换机理的产生而使用低 pH 值 (可低至 $\text{pH}=2$)。Kirkland 研究组广泛研究了低 pH 值稳定性。他们指出用于合成的硅胶决定了最终键合相的稳定性, 按文献所述, 硅胶的完全羟基化对化学键合相的稳定性来说是必须的。使用这种硅胶制备的键合相可以具有: ①大量的缔合硅羟基; ②更高的表面 pH 值; ③对碱性化合物低的吸附性; ④键合相配基的较好的水解稳定性; ⑤增强了机械稳定性。有些实验证实, 高覆盖率固定相在酸性条件具有较高的稳定性, 同时, 长链键合相比短链的烷基相稳定。

对高 pH 值的稳定性也是色谱工作者十分关心的问题。特别是在生化体系的分离时, 经常需要使用较高的 pH 值。甚至, 有的生物大分子在制备过程中, 需要以稀 NaOH 溶液除去杂蛋白并对系统进行消毒。但是, 难以耐受高 pH 值恰恰是硅胶基质填料的最大问题之一。因此, 很多实验室和公司对此进行了深入的研究。过去有一种流行的观点, 认为硅胶在 $\text{pH}>7.5$ 时会产生溶解。但近来的研究表明, 这一看法并不确切。实际上, 在有机溶剂的流动相里, 硅胶的溶解是极弱的, 甚至可以忽略, 早期曾有一些报道指出, 日常使用的硅基键合相在反相色谱中至少可以耐受 $\text{pH}=9\sim 10$ 。例如, 在 pH 高达 9 的情况下, N -乙酰基普洛卡因酰胺的保留未受到影

响。对此, Kirkland 认为, 碱进攻的是硅胶基体而不是进攻键合的键。在强碱性流动相中硅胶基体的逐渐溶解引起碳覆盖率 (%C) 的相对的增加, 对一些商品化的 ODS 柱在高 pH 值下稳定性的系统研究表明:

① 紧密键合的二甲基十八烷基比整体修饰的配基能更好地阻止硅胶遭遇破坏。

② 高 pH 值流动相更易于溶解基体本身, 而键合相的水解则是很弱的。

③ 键合相的特性 (单体或多聚体) 并不能显著地影响柱子的稳定性。

④ 多孔硅胶的特性决定了基质的溶解速率, 纯硅胶更易于溶解, 而含有金属杂质的硅胶则溶解缓慢。

⑤ 与甲醇相比, 以乙腈作为流动相可以延长柱子的寿命。

⑥ 缓冲液的选择也很重要。碳酸盐和磷酸盐缓冲液比有机缓冲液对柱子的破坏性更强; 较高浓度的缓冲液比较低浓度的缓冲液破坏性强。

⑦ 高温会促使硅胶溶解。

⑧ 缓冲液中阳离子对硅胶溶解亦有影响, 其影响顺序为



在研究硅胶键合相的稳定性时, 还发现了一种有趣的现象, 即含金属杂质的硅胶更能耐受强碱溶液的侵蚀。例如, 掺有 Al^{3+} 的硅胶在 $\text{pH}=10$ 下使用可以耐受 10000 倍柱床体积流动相的冲洗。同样的效应, 也曾在 ZrO_2 修饰的硅胶中被观察到。含 Mg 的硅胶基质分离有机碱时可以产生对称的峰形。

二、整体修饰

利用双官能团或三官能团的有机硅烷的自缩聚反应及溶胶-凝胶反应, 使所制备的干凝胶中含有所期望的功能性有机基团, 是得到具有指定色谱模式填料的有效途径。所引入的有机基团的种类和数量, 可以通过选择原料硅烷的种类与配比来决定。此外, 在以这样的方式所制备的填料中, 也从根本上避免残余硅羟基的影响。

在整体修饰中所使用的原料，多是 R_nSiX_{4-n} 以及 SiX_4 ，其中，R 可是烷基，芳基或它们的衍生基团， $1 \leq n \leq 3$ 。式中 X 的代表卤素或烷氧基。按 X 或 n 的不同，有机硅烷可以有单官能团，双官能团及三官能团化合物。显然，每一个 Si—X 键，在最后会合成一个键 Si—O—Si。有机硅烷的官能度决定所形成的干凝胶的交联结构并影响最终产品的性质（表 4-4）。

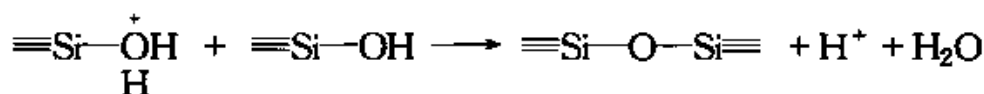
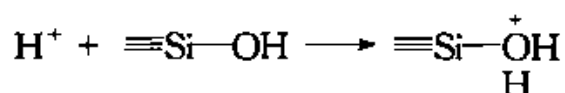
表 4-4 整体修饰中使用的有机硅烷

有机硅烷	官能团	产物的结构	产物的组成
R_3SiX	单官能团 (M)	R_3Si-O-	$R_3SiO_{1/2}$
R_2SiX_2	双官能团 (D)	$\begin{array}{c} O- \\ \\ R_2Si \\ \\ O- \end{array}$	$R_2SiO_{2/2}$
$RSiX_3$	三官能团 (T)	$\begin{array}{c} O- \\ \\ RSi-O- \\ \\ O- \end{array}$	$RSiO_{3/2}$
SiX_4	四官能团 (Q)	$\begin{array}{c} O- \\ \\ -O-Si-O- \\ \\ O- \end{array}$	$SiO_{4/2}$

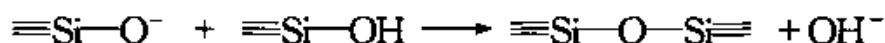
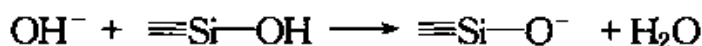
单官能团有机硅烷如仅形成 R_3SiX 二硅氧烷，不能单独使用。它们主要作为封头剂或链终止剂加入到 R_2SiX_2 ， $RSiX_3$ 和 SiX_4 中以调整最终产物的结构。双官能化合物如 R_2SiX_2 可单独形成线性或环状有机硅氧烷。 $RSiX_3$ 型化合物的水解可以形成三维交联产品。但在实际应用中，聚合硅氧烷通常是通过含单、双、三及四官能单位的甲基和苯甲基氯硅烷混合物的协同水解和协同缩合来制备的。

向有机硅烷中加入酸或碱溶液以引发缩聚反应。酸或碱催化 Si—X 键断裂，形成的 Si—OH 自发缩合成 Si—O—Si 类型。为获得刚性的固体产物，还需对缩合产物进行进一步处理。R—Si—X 键的水解速率随取代基的极性增强而增强，而增加单个分子 Si—X 键极性同样会增加 Si—X 键的水解速率，另一方面有机官能团 R 越大，Si—X 键断裂速率越慢，这是由于水分子进攻 Si—X 的位阻

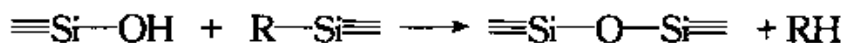
增加所引起的,如苯基氯硅烷的水解比相应甲基氯硅烷的水解要慢。此外,使用的溶剂类型也对水解有相当大的影响。甲苯、二甲苯以及乙醚等与水相不相溶或仅部分互溶的化合物都是有机硅烷及聚有机硅氧烷的极好的溶剂。有机溶剂可以使有机硅烷大量稀释。可使形成的产品在进一步反应前较容易地溶于有机相。选择适当的溶剂以及相应的有机硅烷的稀释是控制硅羟基之间以及分子内部缩合的有效方法。与惰性溶剂甲苯相比,极性溶剂,如醇则通过醇解形成 $\equiv\text{Si}-\text{OR}$ 基团之后,才会进一步进行缩合反应。在使用氯硅烷为原料时,以碱代替酸作为催化剂将会中和由水解释放出的酸,并且会对中间形成的有机硅羟基有稳定的作用。有机硅羟基的缩合既可以以酸催化也可以以碱催化。酸催化机理可如下所示



其中第一步反应是快速反应,因此,第二步的缩合是决定醇缩合速率的反应。碱催化反应机理可如下所示



第二步也是决定反应速率的步骤。在高度交联的聚有机硅氧烷中,残余 OH 的缩合由于位阻效应而进行得很慢。但可以通过添加有机硅烷处理而加速和完成



通过有机三烷氧基硅烷及四烷氧基硅烷的协同水解、及共缩合聚合可极大地增加产品的多样性和成品的组成。这样,可以通过改变 $\text{RSi}(\text{OR})_3$ 和 $\text{Si}(\text{OR})_4$ 的相对比例控制最终成品里 $\text{R}:\text{SiO}_2$ 的比例。 $\text{Si}(\text{OR})_4$ 对 $\text{RSi}(\text{OR})_3$ 的比例增加可以得到机械稳定性更好的产品。值得一提的是两种起始化合物不同的水解及缩合速率可能导致不均匀交联结构,这应尽量加以避免。

带有取代基 R 基团的有机硅烷，水解缩合后的产品具有疏水特性，可作为反相填料。使用带有取代基的有机硅烷如 YR-SiX₃ (为 NH₂ 或 SO₃H) 则通过硅烷本身或与 SiX₄ 型的硅烷一起的水解缩合而合成亲水性硅胶或离子交换性的填料。

三、聚合物包覆法 (polymer coated)

无机基质材料，特别是硅胶，已广泛用于色谱填料的制备。但是，化学稳定性较差，难以耐受更宽的 pH 范围，是硅胶固有的一个主要缺点。此外，残余的硅羟基又可能造成对极性溶质的非特异性吸附，长久以来，不少实验室和厂家一直在寻找克服这一问题的途径。人们注意到，高聚物型填料在很多方面与硅胶的性质具有互补性。它们可以耐受较宽的 pH 范围，没有强吸附性位点。但是，其缺点是机械强度较低且在有机溶剂中会发生溶胀而导致难以进行的梯度洗脱。此外，高聚物型填料的柱效也难与硅胶相匹配。因此，人们很自然地希望将这两种类型填料的优点结合起来，制备出兼具两种类型填料特点的有机-无机复合型填料。这种填料，一般被称这为包覆型 (polymer coated) 填料或涂敷型填料。

(一) 包覆型填料的制备

硅胶、氧化铝、氧化锆、氧化钛以及玻璃珠等，都曾被用作作为包覆型填料的基质材料^[102,103]。其中，最重要的当然是硅胶和氧化锆。与硅胶相比，氧化锆除和硅胶一样，具有优异的机械强度，适宜的孔结构和可用于键合或某合其他修饰物所需的活泼位点外，它还具有极好的 pH 稳定性和耐高温特性。氧化锆多孔小球可以耐受 pH=0~14 的介质环境，在高达 900℃ 温度下处理很长时间也不会变形且孔结构不遭破坏。所以，它似乎更适于制备复合型填料。

曾经有很多种高聚物被用于包覆型填料的制备。例如，聚苯乙烯^[104]、聚乙基苯乙烯-二乙烯基苯^[105,106]、聚丁二烯^[107,108]、聚环氧乙烷^[109]、聚硅氧烷^[110]、琼脂糖^[111]、聚氯甲基苯乙烯-二乙氧基甲基乙烯基硅烷^[112]以及气相沉积碳^[113]等。

早期，包覆型填料的制备物理包覆法。一般多将高聚物以适当的挥发性有机溶剂溶解，使成为具有较好流动性的溶液。将待包覆

的无机基质，如硅胶等放置到溶液中，并使两者混合均匀。在混合之前，最好将基球预先抽真空以除去微孔中的空气，使聚合物溶液能接触基球中所有的表面。以旋转蒸发等方法将溶剂驱去，这样，在基球表面就会留下一层聚合物的薄膜。但是，这样制备的涂层不牢固，很容易遭受有机溶剂和机械性的损坏。高聚物的溶液的黏度一般较高，流动性较差。可以采用稀溶液、多次涂敷的方法提高包覆的效果，但综合起来看不是一个好方法。还可以将低聚物的溶液或单体先吸附于基体表面，再以预加的引发剂令其聚合、共聚或交联以产生所需要的坚韧的聚合物层。聚丁二烯、聚丙烯酸酯类均曾以上述方式被包覆在硅胶、氧化铝和氧化锆上。但是，通过深入的研究发现，以聚合物包覆的多孔性材料，往往不能按人们想象的那样在微孔的内表面上均匀地涂敷上一层高聚物，而是将孔填塞住^[114]。这样，微孔基质所特有的比表面积大的优点便失去了。有时，比表面积反倒会增加许多。这是因为，高聚物聚合时因相分离产生了微珠状高聚物，它们填塞在微孔内或包覆在基质表面，使得表观上比表面积增大了。对于小分子溶质的分离的影响不大，但对大分子的分离则是非常不利的。

与物理包覆法相比，更常用的是化学键合或合型包覆法。利用无机基质的表面修饰技术，可以使硅胶、氧化铝或氧化锆等基质的表面带上适当数量的反应性基团，如双键、环氧基、氨基或羧基等，再将高聚物的溶液、低聚物或单体等涂敷到基质表面，然后以引发剂、高温、放射线或其他适宜的溶剂等令其与上述反应性基团产生化学键合或共聚合，将包覆层紧密地某合在基质上。毫无疑问，这样所得到的包覆层更加稳定和牢固，更适合用作色谱填料。

在研究高聚物包覆型氧化锆填料时发现，尽管交联聚丁二烯包覆的二氧化锆可以在 100℃ 下耐受 pH = 14 介质的侵蚀。但是，由于聚丁二烯包覆的不完全，仍然有部分 ZrO_2 表面暴露出来，一些路易士碱型的物质可以与其产生强相互作用，使得色谱峰变宽、变坏。例如，它们会因对蛋白质的吸附而造成拖尾和峰展宽。为解决这一问题，就必须对无机基质进行更彻底、更完全的包覆。一种可

行的方法是通过化学气相沉积的方法以热解碳对无机基质进行包覆^[113,115]。由于 ZrO_2 的耐高温特性, 热解可在 $400\sim 800^\circ\text{C}$ 高温下进行。令含有适当的有机物的蒸气通过被加热的无机基质, 则热裂解后的碳便均匀地沉积于无机基质的表面。曾使用过的有机物有甲苯、正丁烷、环戊烷、己烷、异辛烷以及辛二烯等。这种热解碳包覆的二氧化锆能耐受 $\text{pH}=0\sim 12$ 的介质环境。而且, 它们的色谱, 特别是选择性与通常的反相色谱有很大的不同, 它更适合于分离位置异构体。

(二) 包覆型填料的特性与应用

作为复合材料的包覆型填料, 兼具无机基质和包覆层的特点。首先, 作为基质的无机材料可以提供规整而均匀的球形, 可控制的孔径与孔径分布、足够大的比表面积以及优异的机械强度。当然, 基质表面的活性基团则提供了进行键合或某和的位点。包覆层的最大功能在于完全遮盖无机基质的表面, 以克服无机基质上不利于分离的缺点并对其提供有效的保护。此外, 包覆层上还可以带来新的功能, 如可灵活地调整色谱模式或对特定的溶质提供更好的选择性等。

左育民等^[106]以 $5\mu\text{m}$ 多孔硅球为基质, 先键合上一层乙烯基三乙氧基硅烷, 使其表面带上可用于键合的双键, 然后将其悬浮于含有二乙烯基苯(单体)、偶氮二异丁腈(引发剂)和乙醇(致孔剂)的乙腈溶液中令其与硅胶表面的双键产生聚合并交联。由于致孔剂的作用, 这样制备的二乙烯苯型包覆硅球的包覆层具有多孔性。以漫反射红外光谱, 可以验证在表面上生成了乙基苯和二乙烯基苯的共聚物。改变硅胶-单体的比例, 可以获得一系列包覆型填料。其主要的表征参数如表 4-5 所示。

表 4-5 不同包覆比例填料的参数

填料代号	碳含量	包覆层厚度	溶胀值
SiO_2	0	0	0
BJ-11	7.05	0.25	0.00
BJ-12	10.08	0.37	0.00

续表

填料代号	碳含量	包覆层厚度	溶胀值
BJ-13	15.66	0.61	0.02
BJ-14	22.74	0.98	0.31
BJ-15	28.95	1.37	0.52

上表中的包覆层厚度可由下式计算得到

$$\text{包覆层厚度 } S \text{ (nm)} = \frac{1000 (x/y)}{(1 - x/y) \cdot O_{sp} \cdot d}$$

式中, X 表示填料中的碳含量, 即 $C\%$; y 表示纯聚合物中的碳含量; O_{sp} 是填料的比表面积, 单位是 m^2/g ; d 是聚合物膜的密度, 在上表中假定 $d = 1.0 g/cm^3$ 。以 BJ-13 为例, 其含碳量仅为 15.7%, 包覆层厚度 0.6 nm, 此时, 其溶胀度仅约 0.02, 与之相比, 商品 ODS 型反相填料的溶胀度为 0.05。此时, 即使使用纯有机溶剂, 也不会产生色谱柱柱床体积和柱压的明显的改变。经以滴定法进行测定, 硅胶表面的硅羟基, 已被屏蔽掉近 97%。所制备的填料, 可以用于一般溶质的反相高效液相色谱分离, 例如, 以 8 种含氨基的化合物为样品, 在此种填料所填装的柱上, 均获得了良好的分离并可得到比较对称的色谱峰。以类似的工艺制备的交联共聚丙烯酸甲酯-丙烯酸辛酯-二乙烯基苯包覆型硅胶填料^[116], 也显示了类似的色谱特性。

作为无机介质, 二氧化锆小球具有十分突出的优点。它最大的特点是极好的稳定性。但是, 目前尚缺少适宜的用于 ZrO_2 表面修饰的试剂。虽然, 修饰硅胶用的硅烷化试剂也曾用于 ZrO_2 的表面修饰^[117], 将其用于亲和色谱填料的载体虽然有较好的耐碱性 ($pH = 10.5$), 但耐酸性不佳。这是因为, $Zr-O-Si$ 键远没有 $Si-O-Si$ 键那样稳定。而以包覆的方法, 将丁二烯均匀地涂敷并交联于 ZrO_2 粒子上, 完全可以制备出与常用的 ODS 型硅胶相类似的高效反相色谱填料 ($PBD-ZrO_2$)^[118]。将聚氯甲基苯乙烯通过共聚键合于 ZrO_2 表面上, 可得到另一种新型的芳香族聚合物包覆型氧化锆填料 ($CMS/VMS-ZrO_2$)。在这种填料制备过程中, 克服了 $Si-O-Zr$ 键的相对不

稳定性，通过高温下氯甲基和苯环的自缩合反应，使覆盖在锆球表面上的共聚物交联而形成了致密的保护层，从而为基球提供了有效地保护。以含 0.1% 硝酸和 50% 乙腈的水溶液淋洗柱子 1000 倍柱体积，以及以含 0.1% 氢氧化钠和 40% 乙腈的水溶液淋洗 8000 倍柱体积后，柱性能没发生任何改变。还有一点需要指出的是，这种填料的孔结构，在包覆前后并没有发生太大的变化。图 4-14 给出了包覆前后孔体积分布和比表面积分布的变化。

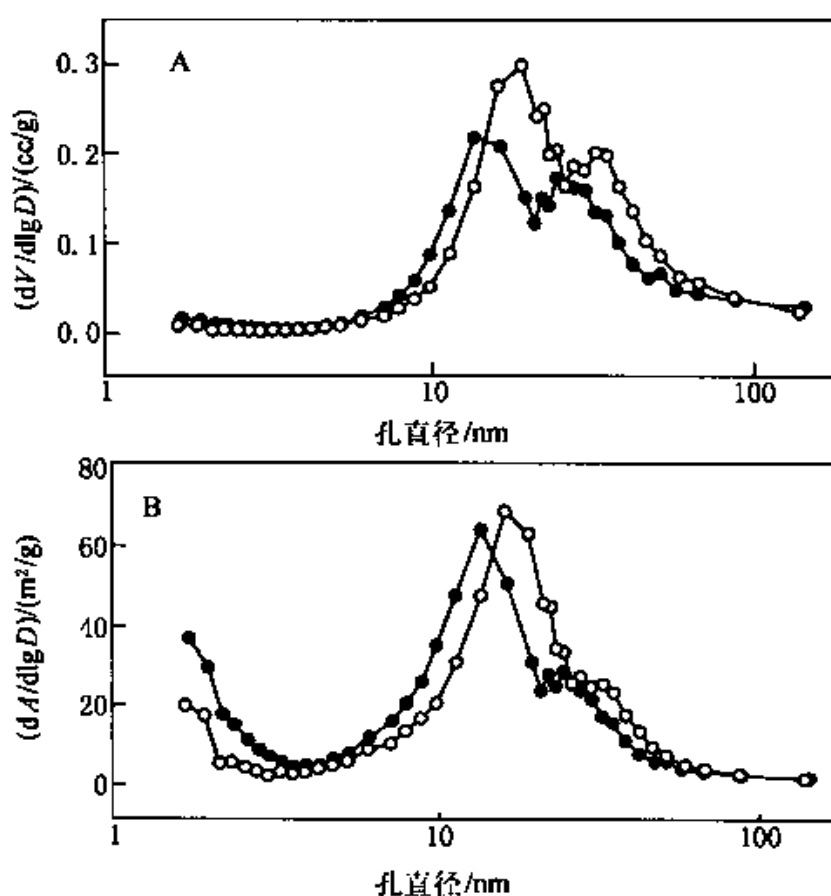


图 4-14 CMS/VMS-ZrO₂ 包覆前后孔特性的变化

A—孔体积分布；B—表面积分布

○—包覆前氧化锆微球；●—包覆后氧化锆微球

从图上可知，包覆后，孔径和比表面积稍微变小了些，这完全符合孔内壁均匀涂敷产物的特点。在包覆型填料发展的早期，孔的堵塞问题，曾是困扰这一方法发展的一个难题。看来，在 CMS/VMS-

ZrO_2 中这一问题已得到基本的解决。此外, 这种填料具有优异的耐高温性, 可用于高达 160°C 的高温淋洗, 也带来了一些附加的优点, 如柱压降低, 分析时间缩短以及改善对一些溶质的选择性等。图 4-15 给出了使用这种填料和常规 $\text{C}_{18}\text{-SiO}_2$ 填料分离一些芳香族溶质时的比较。在相同的分离条件下, CMS/VMS-ZrO_2 可缩短分离时间, 且对对异丙基苯甲烷具有完全不同的保留能力。

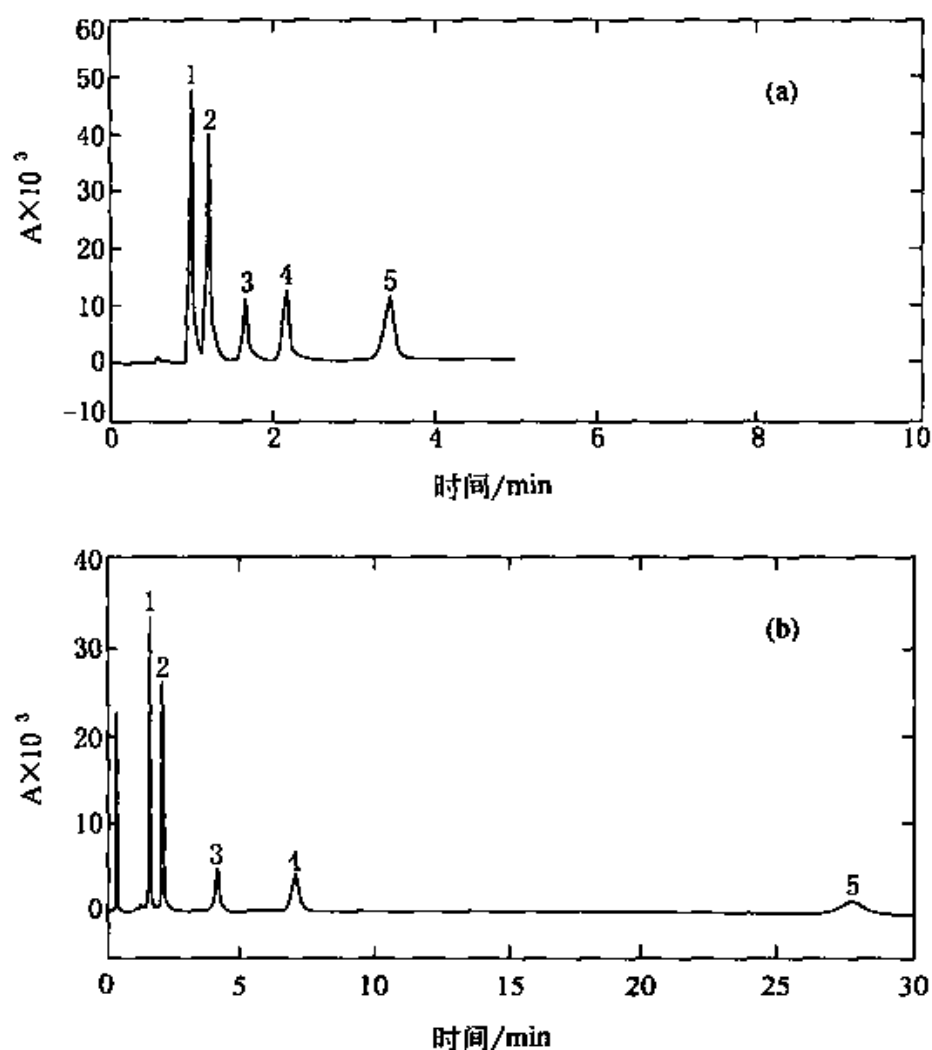


图 4-15 芳香族化合物的分离

(a) CMS/VMS-ZrO_2 色谱柱; (b) $\text{C}_{18}\text{-SiO}_2$ 色谱柱

色谱条件: $4.6 \times 50\text{mm i. d.}$ 色谱柱: 40/60 乙腈/水; 30°C

样品: 1—苯乙酮; 2—肉桂醛; 3—肉桂酸甲酯; 4—肉桂酸乙酯;

5—对异丙基苯甲烷

四、无机基质填料的表征与评价

不论是用什么方法所制备的填料，均需进行化学结构及物理、化学性质的表征和色谱性能的评价。其目的在于确认其结构并建立起结构与性能的关系，进而能控制其结构与性能，以制备符合设计要求的高性能的填料。

基质材料，如硅胶、氧化铝、氧化锆等的表征，已在前边进行了较多的介绍。基质材料的表面性质及其基本的数据，也是填料性能表征的基础。例如，对于聚合物包覆型填料，必须预知其基球的比表面积，才能据以计算出包覆层的厚度。填料制备后，仍然需要测定其粒径及粒径分布、孔径及孔径分布、比表面积以及比孔容，有时还需要研究其表面形貌。在化学性质填料装柱后柱效（理论塔板数或理论塔板高度），对指定溶质的峰的不对称性以及柱子的渗透性。

（一）物理及表面性质的表征

填料的粒径及粒径分布，可用光学显微镜测定。随着填料粒径的减少，如有的填料的粒径可小至 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 。此时，以光学显微镜测定已有困难，则可使用扫描电镜。扫描电镜不但可以测出粒径，更可以在高倍率影像中直接观察到粒子的表观形貌及孔的形状及大小。粒径的分布，可在显微镜或电镜照片上直接测量后加以统计得出。如果显微镜或扫描电镜与具有图像分析功能的计算机相联，则可很方便地得到粒径分布的数据。此外，利用离心沉降或粒度分析仪或压汞仪，也可以直接测出粒径及其分布的数据。

孔及表面性质的测定已如前节所述，使用吸附法、气相色谱法和压汞仪等均可用于测定比表面积、孔径和孔径分布。对于中孔和大孔填料，扫描电镜图像也可有助于了解其孔结构。有时，利用“逆尺寸排阻色谱法”（inverse size exclusion chromatogr, ISEC）也可以测定孔径分布^[119,120]。例如，以四氢呋喃为溶剂利用苯为小分子标准，以 2×10^7 聚苯乙烯为完全排阻分子，再以不同分子量的标准聚苯乙烯为样品，测定它们在以所研究的填料填装的柱子上的尺寸排阻淋洗曲线，即可测定出该填料的孔径分布。

(二) 填料化学性质的表征

填料，特别是反相填料的含碳量，常被用来表征表面化学修饰的程度。现代的元素分析仪可用于化学键合硅胶中 C、H 和 O 等含量的测定，其测定极限约为 0.2%~0.3%。

用于含碳量百分之几至二十几的高效液相色谱固定相的分析已足敷应用。如果基球表面的修饰层是单分子层，将 %C 数据换算成为每克填料上的配基的量 (mol)，再除以其比表面积，即很容易据此计算出其配基浓度。但是，若修饰层是多分子层或聚合物薄膜，就不能这样计算了。此时，可根据修饰层的密度，计算出包覆层或修饰层的厚度，则也可以用于不同填料的比较了。

残余硅羟基的密度，可用物理的或化学的方法测定。实践证明，以 NaOH 溶液滴定和以 LiAlH_4 与填料反应释出氢的方法比较简便，其准确性和精密度亦足敷使用。

由于硅胶的化学修饰仅发生在硅胶的表面，而表面又包括内孔表面和球外表面。对于 $5\mu\text{m}$ 直径，孔径的 10nm 的硅胶，其表面积约 300m^2 ，而球外表面积仅约 1m^2 。可见，球外表面积仅占微不足道的份额。通常，研究表面的方法和仪器，由于很难达到内孔，因而也不能方便地用于填料表面配基结构的研究。红外分光光谱技术曾用于研究硅胶及键合相硅胶^[121]。但收效甚微，直到 20 世纪 80 年代，利用傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 大大提高了信噪比，才使得 FTIR 技术真正能用于键合相填料的研究。

例如，有人曾以漫反射技术研究了反相硅胶填料在含三氟乙酸介质中的降解行为。发现，浸泡一天后，填料即发生了部分降解。而且，随着时间的延长，填料将进一步失去其键合的配基^[122]。紫外光电子能谱法也可用于填料表面结构的研究，所得到的是表面不同价态元素的含量的信息。

自 20 世纪 70 年代开始，魔角旋转 (magic-angle spinning, MAS)，交叉极化 (cross-polarization, CP) 固体核磁技术发展起来以后才使得呈不均匀性固体的色谱填料的表征工作顺利发展起

来^[123]。固体核磁用于反相色谱填料的表征,始于1980年。Maciel和Sindory首次以²⁹Si CP/MAS NMR 技术研究了硅胶的表面。固体核磁明显的优点立即为人们所公认,使得魔角探头固体核磁成为研究硅胶基质色谱填料的最有力的手段。利用²⁹Si 谱,可以清楚地显示硅胶表面上的硅羟基以及不同种类的键合配基(见图4-16)。在图上,硅原子周围化学环境不同时,便会产生不同的化学位移。

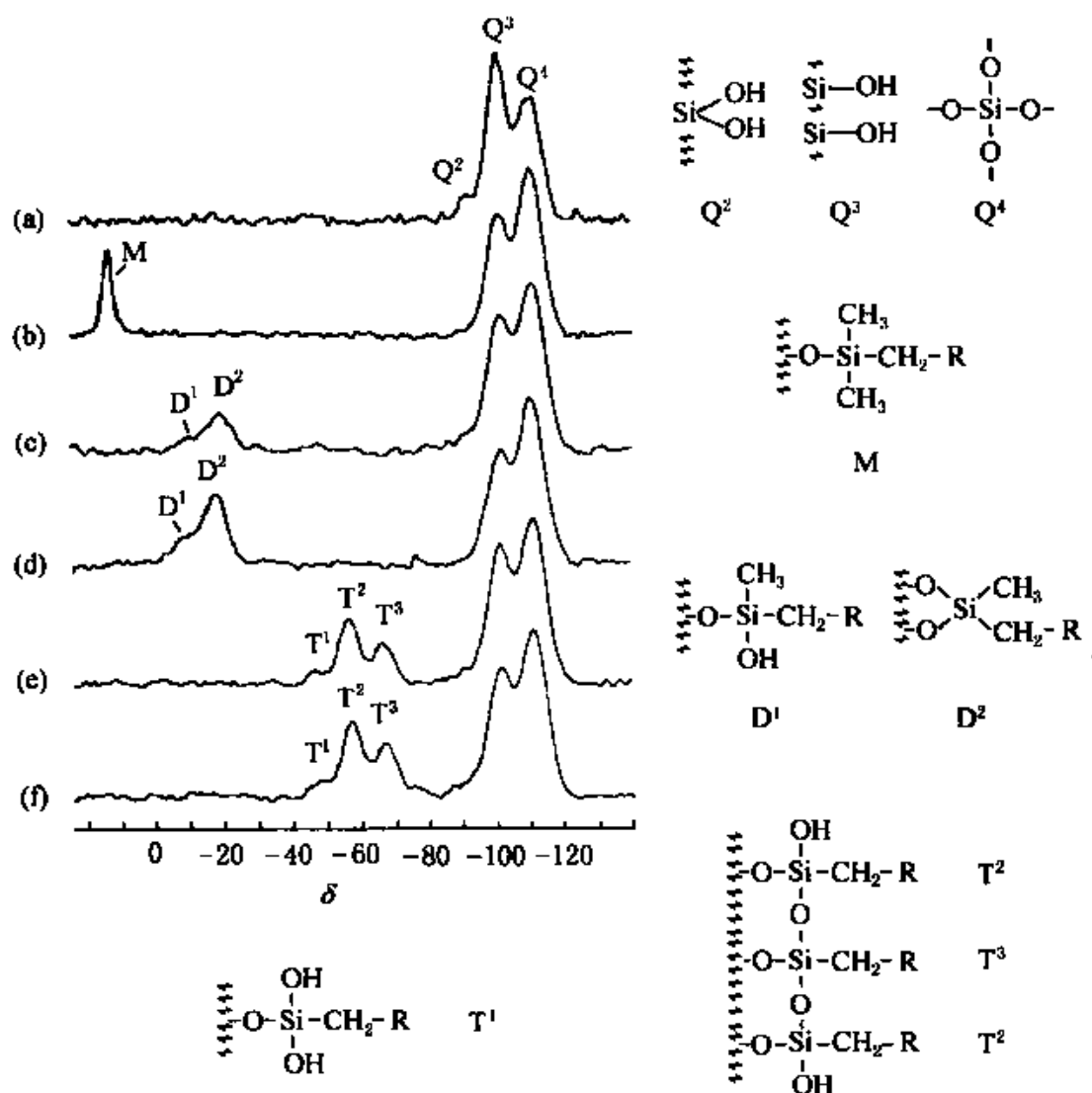
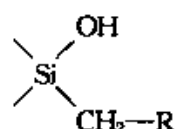


图 4-16 利用单官能硅烷制备的填料和基质硅胶的²⁹Si 固体核磁谱

对于表面硅羟基而言,孤立的硅羟基最常见 (Q₃); 在表面进行化

学修饰时,若使用多官能团试剂,会存在相当部分的新生硅羟基



,它会对所得到的填料的性质产生不利的影响。

除 ^{29}Si 谱外, ^{13}C 谱, ^1H 谱也经常用于填料的表征。由于在 ^{13}C 谱和 ^1H 谱中,作为填料基质的二氧化硅不产生信号,因此得到的仅仅是表面化学修饰层的信息。在现代NMR中,可以通过傅立叶转换,以多次测定提高信噪比的方法,测定表面上极微小的化学成分的变化并给出确定的结构信息。无疑,这对于色谱填料的物理、化学性能表征是十分有用的。

参 考 文 献

- 1 Unger K K. Porous Silica. Amsterdam: Elsevier, 1979, Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques, New York: Marcel Dekker, 1990
- 2 Hair M L, Hertl W. J Phys Chem. 1969, 73: 4269
- 3 Trudinger U, Muller G, Unger K K. J Chromatogr. 1990, 535: 111
- 4 Cox G B. J Chromatogr. 1993, 656: 353
- 5 Nawrocki J. J Chromatogr. A. 1997, 779: 29
- 6 Davydov V Ya, Zhuravlev L T and Kiselev A V. Russ J Phys Chem. 1964, 38: 1108
- 7 Iler R K. The Colloid Chemistry of Silica and Silicates. New York: Cornell University Press, 1955
- 8 Van Der Voort P, Vansant E F. J Liq Chromatogr Rel Technol. 1996, 19: 2723
- 9 Van Der Voort P, Gillis - D' Hamers I, Vansant E F. J Chem Soc Faraday Trans. 1990, 86: 3751
- 10 Gillis - D' Hamers I, Cornelissens I, Vrancken K C, et al. J Chem Soc Faraday Trans. 1992, 88: 723
- 11 Wang H, Harris J M. J Phys Chem. 1995, 99: 16999
- 12 Foti G, Martinez C, Kovats E sz. J Chromatogr. 1989, 461: 243
- 13 Khurama, A L, Ho C T. J Liq Chromatogr. 1988, 11: 3205
- 14 Schomburg G, Deege A, Kohler J, et al. J Chromatogr. 1983, 325: 325
- 15 Nondak L, Reissova A. J High Resolut Chromatogr Commun. 1984, 7: 153
- 16 Vansant E F, Van Der Voort P, Vrancken K C. Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface. Amsterdam: Elsevier. 1995
- 17 Kohler J, Kirkland J J. J Chromatogr. 1987, 385: 125

- 18 Snyder L R, Ward J W. *J Phys Chem.* 1966, 70: 3941
- 19 Holik M, Matejkova B. *J Chromatogr.* 1981, 213: 33
- 20 Navrocki J, Buszewski B. *J Chromatogr.* 1989, 449: 1
- 21 Morrow B A, McFarlan A. *J Langmuir.* 1991, 7: 1695
- 22 Zhuravlev L T. *Pure Appl Chem.* 1989, 61: 1969
- 23 Buszewski B, Jurasek A, Garaj J, et al. *J Liq Chromatogr.* 1987, 10: 2325
- 24 Iler R K. *Surface and Colloid Science.* In: E. Matijevic ed. London: Wiley - Interscience, 1973. V. 6
- 25 Modry S. and Svata M. *Proceedings of the Rilem/IUPAC International Symposium on Pore Structure and Properties of Materials.* Prague: Academia, 1974. V. I - VI
- 26 Uner K and Scharf B. *J Colloid Interface Sci.* 1976, 55: 377
- 27 Wen - chien Lee. *J Chromatogr B.* 1997, 699: 29
- 28 施良和. 凝胶色谱法. 北京: 科学出版社, 1985
- 29 Golay M J. *Gas Chromatography.* In: R. P. W. Scott ed. London: Butterworths, 1960. 139
- 30 Halasz I and Horvath. *Anal Chem.* 1964, 36: 1178
- 31 Bergna H E and Simko F A. Jr US 3301635. 1965
- 32 Kirkland J J. US 3782075. 1974
- 33 Michael H, Vnger K. *LC - GC int.* 1996, 9: 650
- 34 Fields S M. *Anal Chem.* 1996, 68: 2709
- 35 Alexander G B. *J Am Chem Soc.* 1954, 76: 2094
- 36 Okkerse C. *Physical and chemical aspects of adsorbents and catalysis.* In: Insen B G. London: Academic Press, 1970, 213
- 37 Bolt G. *J Phys Chem.* 1957, 61: 1166
- 38 Iler R K. *Chemistry of silica,* New York: Willey interscience, 1979
- 39 Unger K and Shick - Kalb J. Ger 2155281. 1971
- 40 Bergna H E and Kirkland J J. US 4131542. 1978
- 41 Kirkland J J. US 3782075. 1974
- 42 李新会. 新型色谱填料的研制: 学位论文. 北京: 中国科学院化学研究所, 1994
- 43 柴志宽. *化学通报.* 1978, 5: 20
- 44 Boehm H P and Schneider M. *Adv Catal.* 1966, 16: 226
- 45 Lippens B C. *Physical and Chemical Aspects of Adsorbents and Catalysts.* In: Linsen B G. ed. London: Academic Press, 1979, 171
- 46 Iler R K, Queston H J Mc. US 3855172. 1974
- 47 Pwei J B. *J Physi Chem.* 1965, 69: 220
- 48 Kreis W K and Unger K K. *Adsorption at the gas - solid and liquid solid interface.* *Amel-*

- terdam: Elsevier, 1982. 373
- 49 Snyder L R, Kirkland J J. Intraduction to modern Liquid Chromatography. 2nd ed. New York: John Wiley & Sans, 1979. Chapters 1 & 9
 - 50 Pesek J J and Lin H D. Chromatographya. 1989, 28: 565
 - 51 Pesek J J, Sandoral J E and Su M. J Chromatogr. 1993, 630: 95; Haky J E, Venu-lapalli S and Wieserman L F. J Chromatogr. 1990, 505: 307; Haky J E, Ramdial N D, Dunn B M and Wieserman L F. Chromatographia. 1991, 32: 47
 - 52 Vogelsang U B, Deege A, Figge H, et al. Chromagraphia, 1984, 19: 170
 - 53 Pesek J J, Sandoval J E and OSu M. J Chromatogr. 1993, 630: 95
 - 54 Wieserman L F, Wefers K, Cross K, Martin E S. US 4983566. 1991
 - 55 Rigney P, Funkenbush E F and Carr P W. J Chromatogr. 1990, 443: 734
 - 56 Funkenbush E F. Eur 443734. 1990
 - 57 Funkenbush E F, Carr P W, et al. Eur 448302. 1991
 - 58 Unger K K, Trudinger U. Chem Anal. 1989, 98: 145
 - 59 Kawahara M, Nakamura H and Nakajima T. Anal Sci. 1989, 5: 485
 - 60 Trudinger U, Muller G and Unger K K. J Chromatogr. 1990, 535: 111
 - 61 Blackwell J A, Carr P W. Anal Chem. 1992, 64: 853
 - 62 Kawahara M, Nakamura H and Nakajima T. J Chromatogr. 1990, 515: 149
 - 63 Ghaema R and Wall R A. J Chromatogr. 1979, 174: 51
 - 64 Dines M B and Digiacomo P M. Inorg Chem. 1981, 20: 92
 - 65 Dines M B and Griffith P C. J Phys Chem. 1982, 86: 571
 - 66 Rigney M P, Weber T P and Carr P W. J Chromatogr. 1989, 484: 273
 - 67 Engelhardt H and Orth P. J Liq Chromatogr. 1987, 10: 1999
 - 68 Weber T P, Jackson P T and Carr P W. Anal Chem. 1955, 67: 3042
 - 69 Schafer W A A and Carr P W. J Chromatogr. 1991, 587: 137
 - 70 Blackwell J A and Carr P W. J Chromatogr. 1991, 549: 43: 51
 - 71 Blackwell J A and Carr P W. J Liq Chromatogr. 1991, 14: 2875
 - 72 Wirth H J and Hearn M T W. Twelfth International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides. Sydney. 1992. 109
 - 73 Royer G P. Chem Technol. 1974, 411: 694
 - 74 Huang X H. J Non-Crystalline Solids. 1989, 112: 58
 - 75 黄照怀. 硅酸盐学报. 1984, 12: 12
 - 76 黄照怀等. CN 88105499. 2. 1988
 - 77 松本米藏等. 第 34 回液体クロマトグラフ研究会. 1991, 35
 - 78 丁向东等. 分析化学. 1993, 21: 410
 - 79 余贤真, 周纯意. 羟基磷灰石分离介质. 见: 刘国淦主编. 生物工程下游技术. 北

- 京: 化学工业出版社. 1993. 240
- 80 Tiselins A. Arch Biochem Biophys. 1956, 65: 132
 - 81 贾忠江, 余贤真. 863 计划生物技术领域年会. 1990. 149
 - 82 余贤真. 863 计划生物技术领域年会. 1989. 122
 - 83 Majors R E. LC/GC asia pacific. 2000, 3, 4: 10
 - 84 Bukovsky J, et al. Hybridoma. 1987, 6: 219
 - 85 Iino S. Bio Ind. 1988, 5: 903
 - 86 Locke D C, et al. Anal Chem. 1972, 44: 90
 - 87 Brust O E, et al. J Chromatogr. 1973, 83: 15
 - 88 Yu X, Zhao R and Liu G Q. Chromatographia. 2000, 52: 517
 - 89 Yu X, Zhao R and Liu G Q. J Liq Chrom & Rel Technol. 2000, 23: 1821
 - 90 喻昕, 赵睿, 刘国詮. 高等学校化学学报. 2000, 21: 383
 - 91 喻昕, 赵睿, 刘国詮. 高等学校化学学报. 2000, 21: 1043
 - 92 刘国詮, 喻昕, 赵睿 (中国科学院化学研究所). 99111256. 3. 1999
 - 93 刘国詮, 喻昕, 赵睿 (中国科学院化学研究所). 99111257. 1. 1999
 - 94 Renen Zhang, et al. Anal Chem. 1991, 63: 1861
 - 95 Szabo K. Hely Chim Acta. 1984, 57: 2128
 - 96 王天用等. 中国科学院化学研究所内部报告. 1992
 - 97 Lork, K D, et al. J Chromatogr. 1986, 351: 393
 - 98 刘国詮. 无机基质分离介质. 见: 刘国詮主编. 生物工程下游技术. 北京: 化学工业出版社. 1993. 224
 - 99 Wikstrom P, Predric C F, Larsson P O. J Chromatogr. 1988, 455: 105
 - 100 Khong T M and Simpson C F. UK 8618322. 1986
 - 101 Akapo S O and Simpson C F. J Chromatographic Sci. 1990, 28: 186
 - 102 王俊德, 商振华. 化学进展. 1993, 6: 65
 - 103 Pesek J J, Tang V H. Chromatographia. 1994, 39: 649
 - 104 Abuelafiya R, Pesek J J. J Liq Chromatogr. 1989, 12: 1571
 - 105 左育民, 朱伯儒等. 高等学校化学学报. 1993, 14: 358
 - 106 Zuo Y M, Zhu B. R, et al. Chromatographia. 1994, 38: 756
 - 107 Figge H, Deege A, et al. J Chromatogr. 1986, 351: 393
 - 108 Rigney M P, Weber T P, Carr P W. J Chromatogr. 1989, 484: 273
 - 109 Hatch R G. J Chromatogr Sci. 1990, 28: 210
 - 110 Shiota O, Ohtsu Y, Nakata O. J Chromatogr Sci. 1990, 28: 553
 - 111 Zhou F L, Muller D. J Chromatogr. 1990, 510: 71
 - 112 Zhao J H and Carr P W. Anal Chem. 1999, 71: 5217
 - 113 Weber T P, Jackson P T and Carr P W. Anal Chem. 1995, 67: 3042

- 114 Hanson M, Eray B, Unger K, et al. *Chromatographia*. 1993, 35: 403
- 115 Weber T P, Carr P W and Funkenbusch E F. *J Chromatogr*. 1990, 519: 31
- 116 左育民等. *高等学校化学学报*. 1997, 18: 1479
- 117 Wirth H J, Hearn M T W. 12th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides. Sydney. 1992, No. 113
- 118 Li J, Hu Y and Carr P W. *Anal Chem*. 1997, 69: 3884
- 119 Knox J H, Scott H P. *J Chromatogr*. 1984, 316: 311
- 120 Knox J H, Ritchie H J. *J Chromatogr*. 1987, 387: 65
- 121 Little L H. *Infrared Spectra of Adsorbed Species*. London: Academic Press. 1966
- 122 Hardwick R A. *J Chromatogr*. 1988, 458: 225
- 123 Fyfe C A. *Solid - State NMR for Chemists*. CFC Press: Guelph/Ontario. 1983

第五章 无机基质色谱填料及色谱柱

第一节 正相填料及色谱柱

依据相间的相对极性，可以将液相色谱分为正相和反相色谱。当固定相极性大于流动相极性时，称之为“正相”色谱；反之，当固定相极性小于流动相极性时，则称之为“反相”色谱。

正相色谱，包括吸附色谱和极性化学键合相色谱，由于它们在分离规律和应用范围方面有很多相似之处，故放在一起加以讨论。

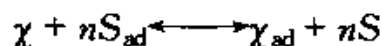
正相色谱主要适用于非极性至中等极性的中小分子化合物的分离，在石油化工、精细化工、医药、农药、环境分析等方面均有广泛的应用。色谱创始人 Tswett 所使用的方法即是吸附色谱。

一、分离机理

就液-固吸附色谱而论，其柱填料是吸附剂。溶剂分子和溶质分子均能被吸附于吸附剂的活性位点上。在这些位点上，溶剂分子与溶质分子、溶质分子相互之间又存在竞争吸附，从而造成了在柱内保留时间的差异，形成了分离。

为描述其保留机理并预测保留行为，色谱工作者曾提出了几种物理化学模型^[1]。例如 Snyder 模型认为，在被溶剂平衡的色谱柱中，溶剂分子覆盖于吸附剂表面形成单分子层，溶质分子竞争置换（或顶替）溶剂分子而形成吸附。这一模型可用于解释氧化铝体系以及弱溶剂-硅胶体系中的吸附行为。Soczewinski 发展了这一模型，使其适用于强溶剂-硅胶体系。而 Scott-Kucera 模型则假定吸附剂表面先被流动相中极性较强的组分所完全覆盖，固定相表面处于稳定状态，溶质通过柱子时，在此吸附层上被吸附，是为“多层吸附模型”，它可用于选择梯度洗脱中的溶剂体系。下面，我们以 Snyder 模型（1968）为例，进行简要的讨论。

假定在吸附过程中，溶剂分子 S 先被吸附，成为一个单分子层。当溶质分子 χ 随溶剂进入系统后，便在吸附点（活性位点）上发生了竞争吸附：



式中， n 表示一个溶质分子顶替下来 n 个溶剂分子。回顾一下，在色谱过程中

$$K' = \Phi K$$

式中， Φ 为相比， K 为分配系数，即达平衡时溶质在两相中分配的比例； Φ 在不同的色谱类型中定义不同，在吸附色谱中

$$K' = \frac{C_s' w}{C_m V_m}$$

式中， w 是柱中吸附剂的量。 C_s' 是每克吸附剂上吸附的被吸附物质的浓度，单位为 ml/g； C_m 是平衡时溶质在流动相中的浓度； V_m 是流动相的体积。

若令吸附系数

$$K_{ads} = \frac{C_s'}{C_m},$$

则可以建立起公式

$$\lg K_{ads} = \lg V_a + \beta (S^0 - A_s \epsilon^0)$$

式中， V_a 为每克吸附剂上单分子层溶剂的体积； β 为吸附剂的表面活性； S^0 为与表面相互作用的溶质的自由能； A_s 为溶质分子的表面积，通常情况下， $A_s = 0.0085 \text{ nm}^2$ ，它相当于吸附苯分子的 1/6 或“孤立”的芳香 C 原子； ϵ^0 为覆盖在 0.0085 nm^2 表面上的溶剂的相对吸附自由能。

V_a 和 β 均系由吸附剂的特性所决定的参数，它们控制溶质的保留行为，并且对所有溶质与溶剂均为常数，通常

$$V_a \cong 0.00035 S_{\text{BET}}$$

式中， S_{BET} 是以 BET 法测定的吸附剂比表面积。换言之，所吸附的单分子层约为 0.35 nm ，即 0.35 nm 厚。 β 是无量纲的系数，它

取决于表面硅羟基的类型与活性,同时也受比表面积和孔结构的影响。在完全羟基化的 SiO_2 表面, $\beta = 1$, 达最大值, 它随吸附水分子而急剧降低。这一过程优先发生于新活化的表面硅羟基上。利用一系列的标准溶质和给定的吸附剂(其水分含量恒定), 可以从 $K' - (S^0 - A_s \epsilon^0)$ 曲线的斜率求出 β 的数值。在吸附色谱中, 充分活化的吸附剂的 β 值一般在 0.5~0.9 之间。

二、正相色谱填料

优良的正相色谱填料, 应当具有以下基本特性:

- (1) 表面具有极性活性基团即吸附位点;
- (2) 具有适宜形状, 最好呈微米级微球形, 且粒径分布均匀;
- (3) 具多孔性并有高比表面积, 以承载较大的样品负荷;
- (4) 在操作条件下化学性质稳定;
- (5) 具有高机械强度;
- (6) 价格合理且可稳定供应。

在吸附色谱中最常用的填料是硅胶。此外, 氧化铝和极性键合相硅胶亦是重要的正相填料。前一章已对作为填料基质的硅胶及氧化铝的制法和性质进行了较详细的介绍, 此处不拟赘述。

Al_2O_3 对于不饱和化合物, 特别是芳香族化合物, 多核芳烃, 保留能力较强, 芳烃异构体可以得到良好分离; 此外, 当样品为碱性化合物时, 若使用硅胶则会造成严重吸附, 溶质峰拖尾或难以洗脱, 此时宜选用 Al_2O_3 进行分离。

极性键合相系以硅胶为基质, 键合以极性基团, 如 $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$ 及 $-\text{NO}_2$ 等而制备的填料, 分别称为氨基、氰基、二醇基及硝基键合相填料。其合成方法, 同样有表面修饰及整体修饰之分。在表面修饰路线中, 与反相填料不同的是, 极性键合相的合成多采用硅胶与烷氧基硅烷的反应。依据表面修饰试剂和反应条件的不同, 表面修饰层的浓度约在 $2 \sim 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 。多数情况下, 化学键合填料可以采用一步法, 也可采用两步法制备。在两步法中, 第一步为硅胶与烷氧基硅烷化试剂的反应, 在硅胶表面引入适当的基团, 第二步则通过相应的取代反应引入极性功能

团。由于反应系液-固反应，而且往往存在有较大的位阻效应，所以取代的程度小于均相反应，配基浓度一般较低。

极性键合相的配基比反相的配基复杂，因此，在不同的流动相中会显示不同的特性。在非极性溶剂中，极性基团（如 NH_2 和 NH 等）主导与溶质的相互作用；而在极性溶剂中，配基的非极性链段的作用增强。当在水溶液体系中工作时，配基中的氨基在 $\text{pH} < 7$ 时会质子化，而残余硅羟基的去质子化起始于 $\text{pH} > 7$ 。因此，不论与硅胶为基质的离子交换剂相比，还是与硅胶基质反相填料相比，上述极性化学键合相填料均属于中等极性填料。此外，由于有机配基对于硅胶表面的修饰，使得具有极高活性的硅羟基大部分消失了，这是极性化学键合相填料的稳定性和重现性较高的一个重要原因。

由于极性基团的可变性大，故可以通过改变极性基团的方法控制分离的选择性，具有更大的灵活性。极性键合相的极性通常弱于硅胶，所以更适于对中等极性物质的分离，其色谱条件选择的方便性和重复性均优于硅胶。在极性键合相色谱填料中，研究较多的是氨基键合相填料。它的吸附过程与 SiO_2 相似但又有所不同。由于氨基的极性比硅羟基弱，且氨基位于烷基链末端，有一定的自由度（这与 SiO_2 及 Al_2O_3 不同），加之氨基浓度亦较硅羟基浓度小，仅为 $2\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 左右，故同一溶质于相同条件下在氨基柱上的保留要小一些，在分离酸性化合物，如酚、羧酸、核苷酸时较为有用。此外，氨基键合相填料对某些物质的特定基团会表现出优异的选择性，例如，可以用乙腈-水为洗脱剂在氨基键合相柱子上分离单糖。氰基柱对几何异构体或含双键数目不同的化合物（环状化合物）具有较好的分离能力。而硝基柱（ $-\text{NO}_2$ ）对芳香族化合物有较好的选择性，在 C_{60} 、 C_{70} 等富勒烯的分离上可望其发挥作用。

三、影响正相色谱分离过程的参数

（一）比表面积和表面活性

在正相色谱中，控制保留和选择性的决定性参数是比表面积和

表面活性,通过对这两个参数的调节,可以调节一些分子的吸附-脱吸行为,从而达到分离的目的。对于硅胶,可以通过两种方式降低其比表面积和表面活性。一种途径是热处理,当温度高于 200℃ 时,其表面硅羟基会通过脱水而使表面活性降低;而在温度高于 600℃ 时,通过烧结可导致比表面积的减小。另一种途径则是调整吸附剂的含水量,以改变其表面活性和有效比表面积。通常,比表面积为 200~400m²/g、平均孔径为 6~10nm 的多孔硅胶是最常用的正相色谱填料。

表面活性是正相色谱中作为填料的硅胶的另一个重要参数,它主要依赖于表面硅羟基的类型、分布及其反应性。完全羟基化的表面具有最大的反应性,表面吸附的水或其他极性化合物,即使是极少量也会明显地降低表面活性。此外,比表面积相对较低的大孔硅胶,其表面硅羟基的分布一般较为均一。这是因为,在它们的制造过程中,通过热处理或烧结已使其无定形表面部分地具有微晶形的特征。微孔硅胶的表面不确定性较高,故其表面活性比大孔硅胶要高。

(二) 样品在硅胶上的负载量及线性容量

在所谓线性洗脱吸附色谱中,分离是在低样品浓度下进行的。此时,吸附等温线是线性的。高样品浓度将会导致吸附等温线偏离线性,成为凸形或凹形吸附等温线。填料的线性吸附容量 ($\theta_{0.1}$),可以定义为在每克吸附剂上引起等温线线性部分分配系数 (k_w) 值产生相对 10% 变化时的样品量。通常,硅胶的线性容量约为 10⁻³~10⁻⁴g/g^[2]。对于给定的溶质和溶剂,线性容量主要决定于硅胶的比表面积及其表面活性。

(三) 硅胶的吸附选择性

硅胶的吸附选择性可以表现为多种形式,如分子量或分子尺寸选择性、功能团选择性、形状选择性、异构体选择性以及生化选择性等,LSC 提供了对功能团和异构体选择性分离的极好潜力。影响吸附剂选择性的参数有:比表面积、平均孔径和表面活性。

(四) 极性化学键合硅胶填料的选择性

在非极性或中等极性流动相体系中，溶质在化学键合硅胶填料上的选择性保留，起因于溶质分子和极性配基间的偶极取向、氢键或电荷转移等相互作用的差异。表 5-1 中给出了一组溶质在硅胶和具有不同配基的极性化学键合硅胶填料柱上的容量因子和选择性的差异，所有的填料具有接近的比表面积，其中的极性化学键合相系采用整体修饰方法制备的。其结构分别为

柱 1 $\text{Si}-\text{OH}$

柱 2 $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$

柱 3 $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ OH/NH_2 摩尔比为 6

柱 4 $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ OH/NH_2 摩尔比为 1

表 5-1 极性溶质于等度洗脱条件下在不同整体修饰
硅胶填料柱上的容量因子及分离因子

样 品	柱 1		柱 2		柱 3		柱 4	
	K'	α_{ij}	K'	α_{ij}	K'	α_{ij}	K'	α_{ij}
α -氯苯酚	0.21		0.25		0.46		0.72	
苯酚	0.80	3.75	0.85	3.4	1.06	2.3	1.14	1.6
4-氯苯酚	0.69	0.86	0.80	0.94	1.23	1.16	1.75	1.54
苯胺	1.49	1.23	1.00	1.48	2.26	1.83	4.08	5.18
α -甲基吡啶	大	/	1.3	1.3	4.6	2.0	10.8	2.25
4-硝基苯酚	0.85	/	1.18	/	2.26	/	9.08	/

从表 5-1 中可知，各溶质的容量因子 K' 均按自柱 2 至柱 4 的顺序增加，这与填料中二醇基上的羟基被氨基逐渐取代的程度是一致的。在另外的实验中已证明，上述溶质在以羟胺修饰的填料中的保留更大，甚至超过了同样条件下在未经修饰硅胶上的保留。正是这种保留影响了溶质对选择性系数的变化。

(五) 一些常见的正相填料及色谱柱

全多孔型的微球形或无定形硅胶，均可作为正相填料使用。但若用于高效分离，还是以球形硅胶为好，以其填装的正相柱的渗透性较好，操作压力较低，且柱子的稳定性也比较好。附录一中列出了一些常见的正相硅胶填料及其主要参数，而具体的不同规格的预

填充柱，则可参照各公司的目录。附录二中列出了一些常见氧化铝填料及其主要参数，表 5-2 给出了常见的极性化学键合相。

表 5-2 常见极性化学键合相

商 品 名	供 应 商	颗粒形状	粒径/ μm	键合的基团
$\mu\text{Bondapak}$ 糖柱	Waters	无定型	8~12	
$\mu\text{Bondapak CN}$	Waters	无定型	8~12	氰基
Cyano Sil-X-I	Perkin-Elmer	无定型	13 $\pm$ 5	氰基
Durapak Carbowax (Porasil C)	Waters	无定型	37~75	键合聚乙二醇 400
Durapak OPN (Porasil)	Waters	无定型	37~75	通过 Si—O—C 键键 合的氧二丙腈基
FE Sil-X-I	Perkin-Elmer	无定型	13 $\pm$ 5	氟代醚基
Kromasil NH ₂	Alkzo Nobel	球形	5, 10	氨基
LiChrosorb DIOL	E. Merck	无定型	5, 10	二醇基
Micropak CN	Varian	无定型	10	烷基氰基
Nucleosil CN	Macherey Nagel & Co	球形	5, 10	氰基
Nucleosil NO ₂	Macherey Nagel & Co	球形	5, 10	硝基
Partisil PAC	Phase Sep. Ltd.	无定型	10	烷基氰基
Platinum CN	Alltech	球形	1.5, 3, 5, 10	烷基氰基
Platinum NH ₂	Alltech	球形	1.5, 3, 5, 10	氨基
Sil 60-CN	Macherey Nagel	无定型	5, 10	氰基
Sil 60-NO ₂	Macherey Nagel	无定型	5, 10	硝基
Supelcosil LC-CN	Supelco	球形	3, 5	氰基
Supelcosil LC-NH ₂	Supelco	球形	3, 5	氨基
Supelcosil LC-Diol	Supelco	球形	3, 5	二醇基
Vydac TP polar	Macherey Nagel Agilent	无定型	10	
Zorbax CN	Agilent	球形	3, 5	烷基氰基
Zorbax NH ₂	Agilent	球形	3, 5	氨基

第二节 反相填料及色谱柱

早在 20 世纪 40 年代初,即有人提出了使用非极性固定相和极性流动相的色谱体系,“反相色谱”(recersed phase chromatography)的名称,则是 1950 年由 Horvath 所命名的。但它真正被广泛地应用,却是在微粒型多孔硅胶键合相出现之后的事。1970 年, Kirkland 等将聚合型正十八烷基硅基键合到薄壳型基球的表面,制备了高效反相填料^[3]; Majars 等也使用三氯硅烷与微粒硅胶的反应制备了一系列的高效反相填料^[4]。在反相色谱中所使用的柱填料主要是键合相硅胶,而键合相硅胶最主要的应用也是在反相色谱。所以,一般的文献中多将“反相色谱”放在“键合相色谱”项下加以介绍。据统计资料显示,反相色谱的应用,占到了全部色谱分离工作的 70% 左右。因此,说反相色谱是最重要的色谱分离模式是毫不为过的。

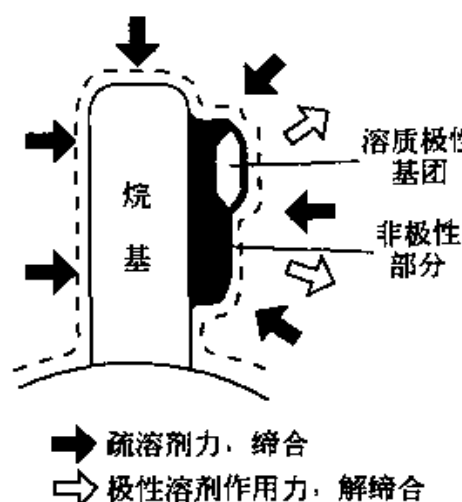
一、反相色谱的分离原理

在反相色谱发展的早期,关于反相色谱保留机理曾有几种不同的看法。一般认为,反相色谱属于分配色谱。在混合溶剂中,有机溶剂吸附于填料的烷基配基层的表面,而溶质分子则在流动性及吸附了有机溶剂分子的烷基配基层中进行分配。在柱中经多次分配后便能具有不同分配系数的混合物得到分离。此外,还有一种看法认为反相色谱属于吸附色谱。即认为流动相中的溶质分子受水分子的排斥而与烷基直接作用,在烷基与流动相间存在着平衡过程。

为寻找正确的理论解释并用以指导反相色谱的发展,学者们提出了一些不同的观点和假说,如疏溶剂理论、拓扑指数理论、双保留理论、顶替吸附—液相相互作用模型以及计量置换保留模型等。这些理论与假说各有自己的观点,也得到了相当实验数据的支持。但是,又难以全面、完整地对反相色谱中复杂的现象给出圆满的解释。所以,反相色谱的保留机理与分离过程,仍有许多问题值得进一步研究。这里,选择两种理论假说加以简要的介绍。

(一) 疏溶剂理论^[5~7]

反相色谱中，溶质分子由非极性部分与极性官能团所组成。其

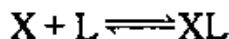


非极性部分与极性溶剂相相接触时，便会产生排斥力，使得自由能 ΔG 增加而熵减少。这种排斥力会引起溶质非极性部分的取向，造成流动相的混合溶剂中出现容纳分子的“空腔”。由于它是与水、溶剂、混合流动相的不相容性或疏水排斥作用所造成的，故称为疏水或疏溶剂（solvophobic interaction）效应。这种过程，可以由示意图得到说明（图 5-1）。

图 5-1 疏溶剂理论示意图

从图 5-1 可以看出，溶质分子（X）与烷基（L）之间，会因疏水或

疏溶剂力而形成缔合作用，它是可逆的



当流动相的极性减小时，平衡便会向左移动。即解缔合的倾向增加，溶质分子被洗脱。而当极性增加时，平衡便会向右移动，使缔合作用增强。根据容量因子的定义

$$k' = \Phi K$$

式中， k' 为容量因子； K 为分配系数， Φ 为相比，即溶质在流动相与固定相间分配的比例。根据热力学定律，分配系数，即过程的平衡常数，它与自由能的变化间存在有如下的关系

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}$$

式中， ΔG 为系统自由能的改变， R 为气体常数， T 为绝对温度，因为 $k' = \Phi K$ ，所以

$$\begin{aligned} \ln k' &= \ln \Phi + \ln K = \ln \Phi + \ln \left[e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \right] \\ &= \ln \Phi - \frac{\Delta G}{RT} \end{aligned}$$

式中, 相比 Φ , R 和 T 等均为常数, 所以影响 $\ln k'$ 的主要因素就是 ΔG_0 , 即系统自由能的变化。它主要来源于两部分, 一部分是“空腔”形成所需的自由能 ΔG_c , 即用以在流动相溶剂中形成大小和形状能与溶质分子相吻合的一个空间时所需要的能量; 第二部分是溶质分子进入“空腔”内, 并与周围的溶剂分子之间发生相互作用的能量 ΔG_{int} 。此外, 还需要将这一过程中自由体积的变化加以考虑。这样, 可以得到

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

式中, 最后一项 $RT \ln \left(\frac{RT}{P_0 V} \right)$ 即为自由体积的变化。 P_0 为标准大气压, V 为溶剂的摩尔体积。式中, ΔG_c 可以表达为

$$\Delta G_c = -N\gamma\Delta A - N\gamma\Delta A_s (k_e - 1)$$

式中, N 为阿伏加德罗常量, γ 为溶剂的表面能力, ΔA 代表 X 和 L 缔合时表面积的变化, A_s 为溶质分子的表面积, k_e 为表面能力的校正因子。而 ΔG_{int} , 则可以表达为

$$\Delta G_{int} = \Delta G_v + \Delta G_e$$

式中, ΔG_v 代表范德华力对缔合作用的贡献, $\Delta G_v = -\omega - \alpha\Delta A$; 而 ω 和 α 是与溶剂有关的参数; ΔG_e 为静电力对缔合作用的贡献, $\Delta G_e = \Delta Z/\epsilon$, Z 表示静电荷对缔合的贡献, ϵ 表示溶剂的介电常数。这样, 将上述各式加以整理便可得到

$$\ln k' = \ln \Phi + \frac{1}{RT} \left[\Delta A (N\gamma + \alpha) + NA_s \gamma (k_e - 1) + \omega - \frac{\Delta Z}{\epsilon} \right] + \ln \frac{RT}{P_0 V}$$

从上式可以得知:

- (1) 溶质分子中非极性部分的面积或烷基配基的表面积越大, 则缔合作用越强, 导致 k' 增大;
- (2) 流动相的表面能力越大, 则 k' 亦增大;
- (3) 流动相的介电常数增大时, k' 增大。

这样, 我们便可以利用疏溶剂理论, 解释反相色谱中保留值和选择性变化的规律, 并用以预测在某一分离体系或某种分离条件下的保留行为。

(二) 计量置换保留模型 (stoichiometric displacement model of retention)^[8~10]

两相界面上的分子与相内分子的不同之处, 在于表面上有剩余的能量, 即表面自由能。因此, 当溶剂或溶质与表面发生相相互作用时, 便会产生能量的变化。在液相色谱中, 主要发生的是液-固相互作用。例如, 在液相吸附过程可以包括五种不同的分子间相互作用, 即溶质-溶剂、溶质-吸附剂、溶剂-吸附剂、溶剂与溶质的络合物-溶剂, 以及溶剂化的溶质-吸附剂络合物解吸相互作用。整个吸附体系的平衡, 便是由这五个热力学平衡所共同确定的。

假定在一定的实验条件下能吸附一个溶剂分子的活性点为“平均活性位点”(以 $\bar{L}$ 表示), 它与溶剂分子 D 有一个平衡



这里的 $\bar{L}D$ 表示“平均活性位点”与溶剂形成的络合物。一般情况下, 如没有溶质存在, 吸附剂表面会被一层溶剂分子所占满。而当一个溶质的分子被吸附在吸附剂表面时, 所释放出的溶剂分子的总数, 或一个分子解吸时, 重又吸附到吸附剂表面上的溶剂分子的总量是相等的。这一分子的“总量”, 可用 Z 定义

$$Z = n + q$$

式中, n 为溶质与吸附剂接触的表面上吸附剂吸附或解吸的溶剂分子的数目; q 是一个溶剂化的溶质分子被吸附剂吸附时减少的溶剂的分子数。 Z 值对研究色谱过程热力学很有价值。由于在固-液体系统中溶质的吸附机理是计量置换的。而且, 这种计量置换与溶质分子同固定相间的相互作用力的种类无关。因此, 溶剂的计量置换保留模型, 可以适用于除尺寸排阻色谱以外所有的色谱模式。

在反相色谱中, 假定流动相是一个由强溶剂和弱溶剂所组成的二元体系混合溶剂。为处理方便, 不妨认为只有强溶剂起支配作用而弱溶剂只起稀释作用, 则溶质的分配系数与溶剂的浓度有关

$$\lg K_d = \lg K_s + n \lg a_D - Z \lg a_D$$

式中, $\lg K_d$ 是溶质在两相中的活度分配系数; $\lg K_s$ 是溶质的平衡常数; n 的意义已如前述, 为溶质与吸附剂接触的表面上, 被吸附

剂吸附或解吸下来的溶剂分子的数目； a 邻位活度； D 代表溶剂； $\bar{LD}$ 为平均活性点和溶剂的络合物。在讨论有关化学平衡的问题时，严格地讲，均应以活度或活度系数乘以浓度之积，才能求出热力学平衡常数。在热力学的标准态时 $a = 1$ ，在反相色谱中

$$K' = \Phi K_d$$

$$\therefore \lg K' = \lg \Phi + \lg K_d$$

将 K_d 的表达式代入上式，则

$$\lg K' = \lg \Phi + \lg K_a + n \lg f(a_D) - Z \lg a_D$$

因为式中的 K_a 、 Φ 及 Z 均为常数项，故可以 $\lg I$ 表示 $(\lg \Phi + \lg K_a + n \lg a_{LD})$ 。则

$$\lg K' = \lg I - Z \lg a_D$$

通过这一模型，可以推导出计算相比和热力学参数的公式，也可以较好地解释在“疏溶剂效应模型”中与实验现象的某些不一致的现象。例如，随温度的升高，溶质的保留值不是增加而是减少了。此外，通过 Z 值的研究，还可以研究反相色谱过程中蛋白质构象的变化等等。尽管计量置换模型尚不十分完备和成熟，但已引起了色谱界愈来愈多的关注和兴趣。

二、反相填料的类型和制备方法

反相填料品种繁多，性质各异。据不完全统计，目前，已有

表 5-3 反相填料的分类

按基质材料划分	无机基质 有机基质 复合型	按形状划分	无定型 膜型 化学键合相
按粒度划分	分析型： $\leq 10\mu\text{m}$ 制备型： $> 10\mu\text{m}$ 全多孔	按表面化学结构划分	整体键合相 包覆型 正烷基： $C_1, C_4, C_8, C_{18}, C_{22}$ 等
按孔结构划分	表面多孔 无孔 小孔	按配基种类划分	芳香基：苯基，石墨化碳等 其他：环烃，聚合物等
按孔径划分	大孔 超大孔（贯流型）： $600 \sim 1000\text{nm}$ 球形		

约 600 种不同的键合相填料。我们可以从不同的角度将它们加以分类 (表 5-3)。以无机材料为基质制备的反相填料, 目前仍是市场的主流, 但是, 高分子类型的反相填料, 也有其特殊的用途。在硅胶基质的反相填料中, 以键合有 C_{18} 及 C_8 的球形、全多孔填料最为常见, 用途也最广。我们可以根据不同的使用目的加以选择。

在讨论硅胶的化学修饰时, 我们已概略地介绍了化学键合相硅胶的制备方法。这些方法, 对不同类型的硅胶和硅烷化试剂都是适用的。为给读者以更具体的了解, 下面介绍几个具体的合成事例。

(一) 以十八烷基三氯硅烷制备反相硅胶

取 20g $5\mu\text{m}$ 硅胶 (孔径 10nm, 比表面积约 $200\text{m}^2/\text{g}$), 以 10% 的盐酸 200ml, 在置有回流冷凝管及桨式搅拌器的三口烧瓶中进行酸洗处理。以油浴加热使盐酸回流, 搅拌速度的调整以能将硅胶悬浮起来不沉淀为宜。处理时间 6~8h。处理完毕后, 以 4# 砂芯漏斗抽吸过滤, 以蒸馏水洗至洗出液呈微酸至中性 ($\text{pH}=5.5\sim7.0$), 然后置烘箱中于 $100\sim110^\circ\text{C}$ 烘干。

将上述处理好的硅胶放入三口烧瓶中, 置油浴中加热至 100°C 左右, 保持 2 h。在三口瓶上装上真空导管和滴液漏斗, 真空导管处宜填塞一些玻璃棉以防硅胶逸出, 接上真空系统抽真空至约 666.61Pa (5mmHg), 并加热至 $150\sim180^\circ\text{C}$, 保持 4~10 h。待冷至近室温时, 关闭真空管路, 从滴液漏斗加入硅烷化试剂的甲苯溶液。溶剂甲苯应以金属钠处理, 以保持绝对无水。通常, 甲苯的用量约为硅胶的 10 倍。在此实验中应为 200ml 左右。硅烷化试剂的用量, 应按所用硅胶总表面积加以计算。例如, 对 $200\text{m}^2/\text{g}$ 的硅胶而言, 20g 硅胶共计 4000m^2 , 其上共有 $4000\times8=32\,000\mu\text{mol}$ 硅羟基, 即 32mmol 个硅羟基。可取试剂 1.2~1.5 倍过量。如按 1.2 倍过量, 可加入 15g 十八烷基三氯硅烷。此外, 可以视需要加入适量的催化剂, 以摇动、振荡或超声处理的方式, 使硅胶均被反应混合液所润湿。然后, 在瓶中充入干燥的惰性气体使至常压。在三口瓶上装上桨式搅拌器、回流冷凝管及通气管。通气管也可以用干燥管代替。在搅拌下通入干燥氮气, 并将三口烧瓶以油浴加热甲苯使回流, 并在回流下反应

24~48 h。结束反应，过滤，并依次以干燥的甲苯、未经干燥的甲苯、丙酮和甲醇洗涤。洗涤后再将键合硅胶置于脂肪抽提器中，以丙酮抽提 24 h。将经丙酮洗净的硅胶自然晾干，并置三口烧瓶中进行“封头”处理。所需装置与键合相同，唯将硅烷化试剂换成三甲基氯硅烷。由于其分子量仅有 108.7 故其加入量仅需约 5g 即可。封头反应时间约 4~6 h。封头后如前述顺序洗净，晾干即为产品。

这一制备程序，实际上是一个通用程序，几乎适用于所有的硅烷化试剂的键合反应。所不同的是应根据不同的硅烷化试剂，调整试剂的加入量。此外，可以灵活地根据需要加入不同的催化剂或 HCl 吸收剂，如吡啶、咪唑、三乙胺等。它们既作为催化剂，又作为吸收剂，以便将反应中的逸出的 HCl 吸收掉，促使反应向右方移动。图 5-2 给出了使用催化剂和不使用催化剂时，合成反相填料的反应动力学曲线。

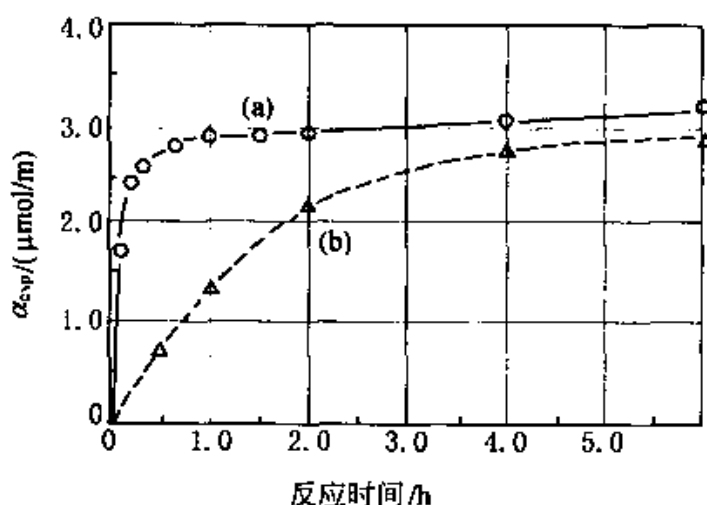


图 5-2 催化硅烷化

(a) 与非催化硅烷化；(b) 反应动力学曲线

图中 (a) 为使用 2, 6-二甲基吡啶为催化剂于 110℃ 进行键合反应的动力学曲线，(b) 为不加催化剂但温度为 160℃。可以清楚地看出，不使用催化剂时，尽管温度升至 160℃，但达到相同覆盖率所需要的时间相差极大。常用有机碱的催化活性顺序是：

咪唑 > 2, 6-二甲基吡啶 > 2, 4-二甲基吡啶 > 三乙胺 > 吡啶 > 1, 2, 4-三唑

除有机碱外也可以使用酸性催化剂, 如对甲苯磺酸, 它可以大大加强烷基硅烷化试剂的反应活性。在优化的反应条件下, 可以得到 $4.2\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 的高配基覆盖密度^[11]。

(二) 醚键型反相填料的制备^[12]

在装有回流冷凝管和桨式搅拌器的三口瓶中, 加入 6.5g 正十八醇和 50ml 干燥的甲苯, 搅拌至溶。再加入 0.5ml 新蒸馏的三氟化硼乙醚 $[\text{BF}_3 (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}]$, 并在搅拌下逐滴加入 5ml 环氧丙基氧丙基三甲氧基硅烷 (KH-560), 于回流下反应 8 h。取 5g 以酸洗并干燥过的多孔硅胶 ($5\mu\text{m}$, 比表面积 $200\text{m}^2/\text{g}$), 置 250ml 三口烧瓶中。三口瓶上装滴液漏斗和真空接口。将装有硅胶的烧瓶于 5mmHg 真空下加热至 150°C 并保持 4 h。冷至室温后, 通过滴液漏斗加入前述已制备的十八烷基醚型三甲氧基硅烷的甲苯溶液。在三口瓶上接上回流冷凝管、桨式搅拌器和气路接管。开动搅拌器, 使硅胶均匀悬浮起来。通入氮气, 并加热令其回流 8 h。停止反应, 将键合硅胶以 4# 砂芯漏斗过滤, 以丙酮充分洗涤后转移至另一烧瓶中, 其内放有 100ml 70% 的乙醇, 并以酸调整体系的 pH 值至 3, 在搅拌下回流 8 h。这一处理过程的目的是令表面键合层中的甲氧基充分水解以生成新生的硅羟基。反应后的键合硅胶以丙酮充分洗涤后, 置真空下 $133.3\sim 666.6\text{Pa}$ ($1\sim 5\text{mmHg}$) 加热至 150°C 4~6 h。然后, 以常规封头工艺令其与三甲基氯硅烷反应, 以便掩蔽残余的硅羟基。封头后, 以常规方法洗净, 晾干备用。上述键合相醚型反相填料的配基密度约为 $1.8\mu\text{mol}/\text{m}^2$, 具有典型的反相特性。

三、性质及特点

反相填料的特性是由基质与配基两方面所共同决定的。基质的颗粒形状、大小、孔径及孔径分布、比表面积、残余的硅羟基浓度以及杂质离子的含量等, 均会对反相填料的色谱行为产生影响。而配基的种类, 连接方式、配基的密度等, 则决定了溶质的保留行为。

(一) 基质对色谱行为的影响

1. 粒径

一般认为,基质的颗粒形状和大小,主要影响流体动力学行为,影响分离效率。在讨论色谱的速率理论时曾指出,填料的粒径决定了填充液相色谱柱的柱效。从 Van Deemter 方程可知,在优化的流动相线速度下,最佳理论塔板高度为

$$H_{\min} = 2.48d_p$$

根据这一公式,可以计算出不同粒度填料填装的柱子可获得的最大理论塔板数。例如,3 μm 粒子可获得 13.4 万理论塔板/米,5 μm 粒子可获得 8.0 万理论塔板/米,10 μm 粒子则只能获得 4.0 万理论塔板/米了。这些数值,和实测结果极为接近。一些质量上乘的商品基本上都可以达到理论值。但是,不能不指出的是,小粒径填料固然可以得到高效柱,但也带来了一些实际使用中的问题,主要可以归纳为:柱压高、易堵塞、寿命较短。由于粒径减小,为保证一定的流动相线速度就得提高输液压力。虽然,大多数高效液相色谱仪的压力上限可允许达到 42MPa,但长时间工作在高压状态下肯定会缩短输液泵及进样阀的使用寿命。为此,小粒径,例如 3 μm 填料柱子的柱长一般均较短,例如 50mm, 75mm 及 100mm 等,鲜有越过 150mm 者。若以 150mm 计其单根柱子可获得的最大柱效为 19500 理论塔板,这与 5 μm 填料填装的 250mm 长的柱子是相近的。当然,3 μm 柱子的分析时间较之 5 μm 柱子要短一些。最近,粒径 1.5 μm 的填料以其可以快速分离的特点,引起了人们的兴趣^[13]。但从上述讨论可以看出,除非有特殊的目的,否则,2 μm 以下的超细粒径填料不会成为反相填料的主流。

2. 填料形状

在色谱发展的早期,无定形填料使用较多。尽管,一般认为无定形填料的柱效与同粒度的球形填料相比,其柱效相差不多,但是,以它们填装的柱子的柱压却相对较高。因此,现在的 10 μm 以下的分析型柱多使用球形填料,而制备型柱子则多选用无定形填料,因为无定形填料较为便宜且大粒度填料的粒间孔较大,所填装的柱子并不需太高的压力便能很好地运行。

3. 孔径及孔径分布

填料粒子的孔径及孔径分布，主要从三个方面影响反相色谱的色谱行为。首先，是孔径影响了粒子比表面积的大小，从而对配基的数量，即碳含量造成影响，它涉及到样品的负载量。其次，孔径的大小，从空间上必然对溶质的分子量大小有所限制。此外，孔的不均一性，及孔径分布，也会带来尺寸排阻效应。

小分子化合物（分子量小于 6000），可以在平均孔径 6~15nm 的填料上获得很好的分离。而对于分子量大于 10 000 的化合物，则应利用孔径 30nm 以上的填料。这一点，在分离生物大分子时尤应引起注意。一般情况下，当填料的平均孔径小于溶质分子直径的 3 倍时，孔径便会影响到溶质在填料上的保留行为。图 5-3 给出了不同孔径分析填料分离相同的一组蛋白质时的色谱图。可以看出，当使用小孔径填料时，不仅分离变劣，其回收率亦大大降低。

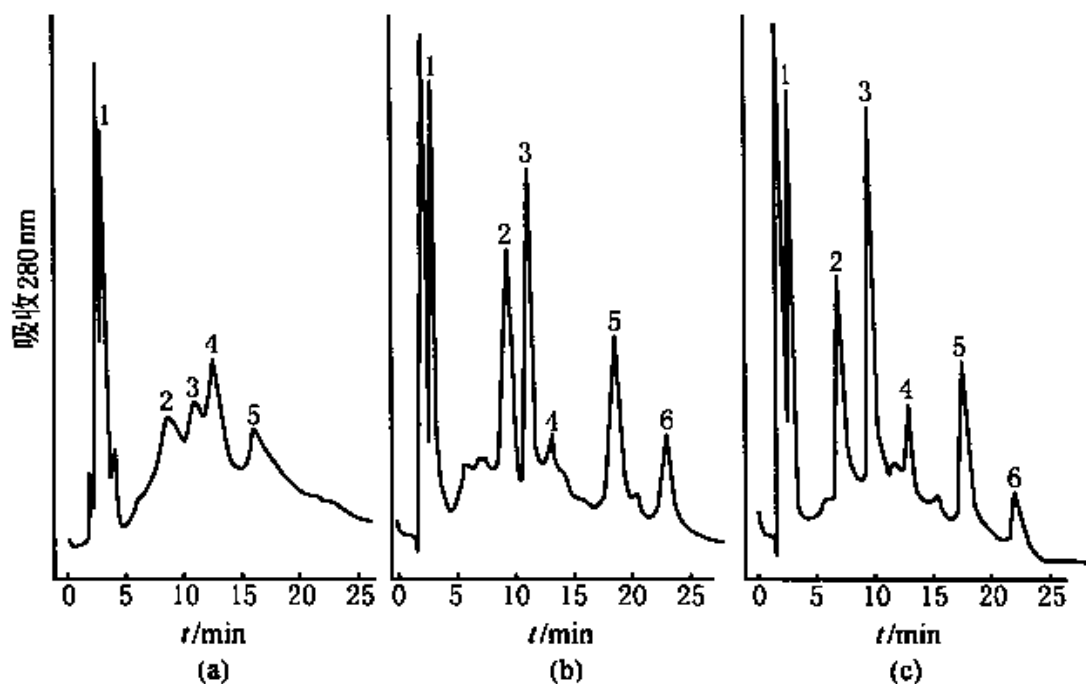


图 5-3 不同孔径 C_{18} 填料分离蛋白质

(a) $C_{18}-60$; (b) $C_{18}-210$; (c) $C_{18}-600$

色谱峰：1—胰凝乳蛋白酶，2—胰岛素，3—细胞色素 C，4—牛血清白蛋白，5—血红蛋白- β 链，6—卵清蛋白；

色谱条件：色谱柱：4mm $\times$ 150mm，流动相：20%~60% 异丙醇/0.1mol/L NaH_2PO_4 ，pH=2.2，流速：0.5ml/min，线性梯度 30min

这里需要指出的是，硅胶表面的化学修饰是有一定厚度的。表面化学修饰及包敷，均会引起孔的收缩，孔径的减少值约等于修饰

层或包敷层厚度的 2 倍。这种孔径的改变可用 N_2 吸附的方法进行测定,也可以用配基的平均链长加以估计。经计算,一些正烷基链的长度为

三甲基硅烷基	0.3nm
正丁基二甲基硅烷基	0.7nm
正辛基二甲基硅烷基	1.2nm
正十二烷基二甲基硅烷基	1.7nm
正十八烷基二甲基硅烷基	2.3nm

由此可以想像,即使单分子层的修饰层,若使用 C_{18} 键合相,修饰引起的孔的缩小达 4.6nm。对于 6nm 孔的小孔硅胶来说,键合后仅剩下了 1.4nm^[14]

4. 比表面积

填料的多孔性,极大地增加其比表面积。对于无孔的小球,其外表面积可按下式推算

$$S_e = \frac{6}{d_p \cdot \rho_s}$$

式中, S_e 为无孔微球外比表面积, d_p 为微球直径, ρ_s 为球密度。设 d_p 为 $5\mu m$, ρ 为 $2g/cm^3$, 则 $S_e = 0.3m^2/g$, 可见,若仅是无孔球,则其比表面积是很小的。但是一旦具多孔性,则多孔微球的比表面积为球外比表面积与孔内表面积之和。硅胶的孔径与比表面积可有如下关系:

$$d_p = \frac{4V_p (cm^3/g)}{S_p (m^2/g)} \times 10^3$$

式中, d_p 为平均孔直径; V_p 为微球的表观密度; S_p 为比表面积。因制造方法的差异及孔径的不同,比表面积在很大的范围内变化。如对于小孔硅胶 ($d_p = 6 \sim 8nm$), 比表面积约为 $200 \sim 500m^2/g$ 。比表面积不同,其键合配基的量亦有所不同。所以,即使是以相同的反应条件制备的同样配基的反相填料,也会有不同的保留行为。特定溶质的保留值随比表面积的增大而减少。

5. 基质硅胶的纯度

硅胶基质上残存的硅羟基和杂质金属离子, 共同造成了以硅胶为基质的反相填料的“次级保留行”。因此, 为得到高质量的反相填料, 就必须设法消除这种次级效应。

早期的硅胶, 多是以溶胶-凝胶过程以水玻璃为基本原料制成的。在生产过程中, 不可避免的会带进大量的金属离子杂质。图 5-4 给出了几种以硅胶为基质的商品 C_{18} 反相填料中杂质金属离子的比较。由于杂质金属离子的含量不同, 其色谱行为有明显的差距, 例如, 以 2, 2'-联吡啶为样品考察 Kromasil C_8 (图 5-5) 填料和某一种 C_8 填料时发现, 2, 2'-联吡啶完全不可逆的吸附在后者填装的柱子上。而这两种填料的差别主要在于后者含有较多的杂质金属离子, 因而使具有螯合作用的样品被吸附在柱子上。

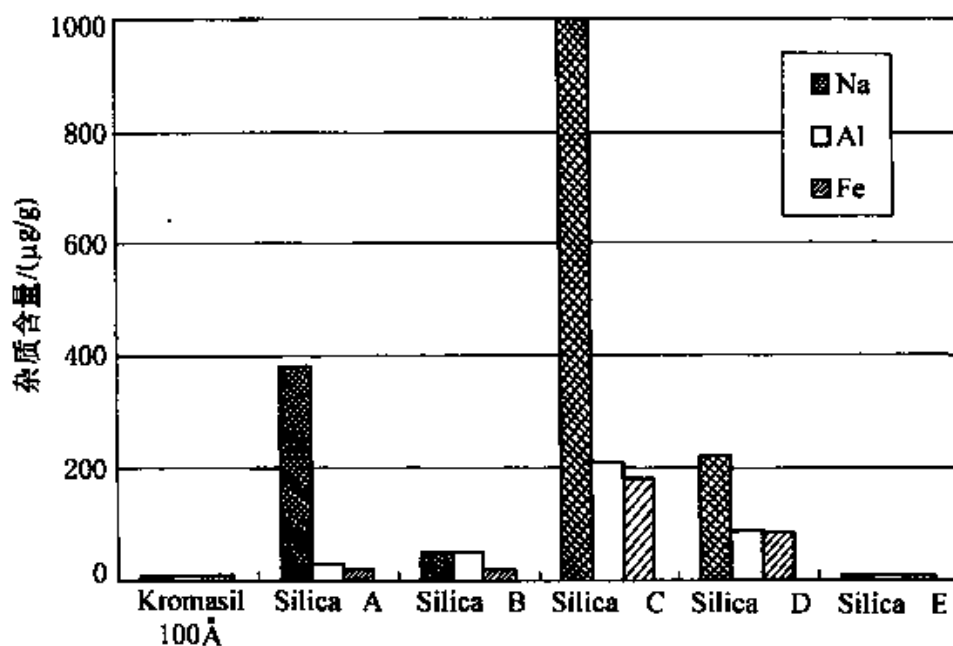


图 5-4 几种商品 C_{18} 反相填料中杂质金属离子的比较

其他金属杂质, Kromasil-5 μ -SIL (μ g/g):

Ca <3 K <2 Ti <2 Cr 0.3 Mg 4 Zn <2
Cu <0.3 Mn 0.05 Zr <3 Li <1 Ni <0.5

在生物医药体系的分离、分析中, 经常或遇到强极性的溶质。它们在制造不良的反相色谱柱中, 经常会因强烈的非特异性吸附而难以获得良好分离。究其原因, 除前边所讨论的孔径大小的因素

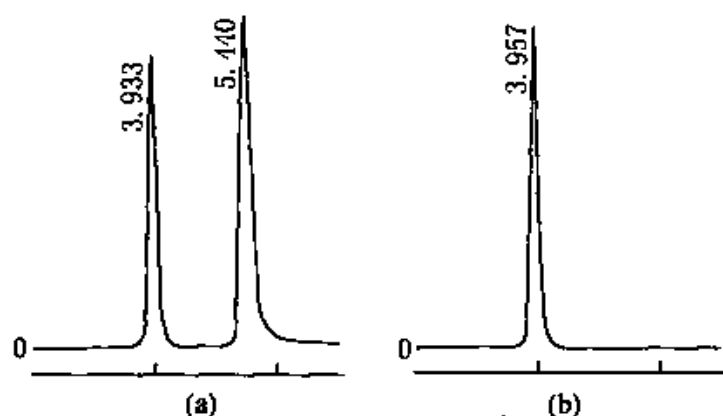


图 5-5 螯合物 2, 2'-联吡啶 ($R_t=5.54$) 和 4, 4'-联吡啶 ($R_t=3.93$)

在 Kromasil C₈ 和其他商品填料上的色谱图,
试验在无金属系统和色谱柱 (Peek) 上进行

(a) Kromasil C₈; (b) Silica A, C₈

外, 最大的可能是硅胶表面的覆盖率低和基质含杂金属离子太多所致。因此, 在现代硅胶基质的反相色谱填料中, 杂金属离子的含量已成为衡量该填料性质的一个重要指标。上述图 5-4 所举出的 Kromasil, 已属比较纯净的硅胶。此外, 尚有一些厂家推出了“超纯”硅胶, 可根据分离工作的目的加以选用。

(二) 键合相对色谱行为的影响

键合在硅胶表面的疏水性键合相, 决定了溶质在反相填料上的保留行为和选择性。键合相的表面覆盖率、化学结构等, 均会影响溶质的色谱行为。

1. 容量因子和表面覆盖率的关系

在相同的洗脱条件下, 给定溶质在分析柱子上的容量因子随键合相的表面覆盖率的提高而加大。以 $\lg k'$ 对覆盖率作图, 不管烷基的链长是 C₁、C₄、C₈ 还是 C₁₈, 在覆盖率为 $3\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 以下时, 基本上呈线性关系 (图 5-6)。因此如果想得到较高的容量因子, 应选择覆盖率较高的键合相填料。上述结果是在单分子键合层填料上得到的, 在聚合型键合相上也有类似的结果。由于多分子层的键合相很难确切地计算其覆盖率, 但是, 一般情况下, 只要键合相的碳含量 (C%) 较高, 总会得到较高的 k' 。

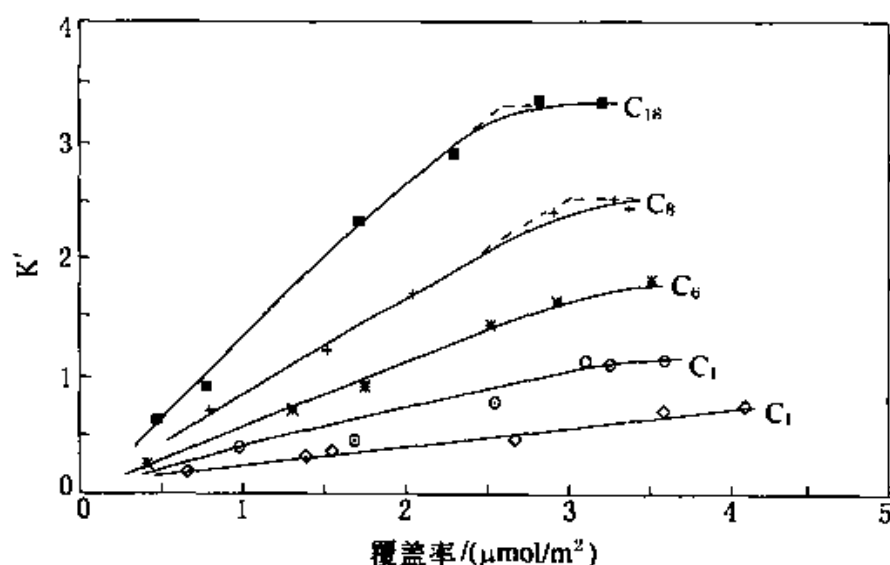


图 5-6 不同键合覆盖率对苯甲酸丁酯容量因子的影响

在讨论硅胶的化学修饰时已经注意到，由于键合相配基的分子体积大小相差很大。因此，由于位阻效应，随分子体积的加大，其在硅胶表面上的键合率也会相应的降低^[15]（图 5-7）。

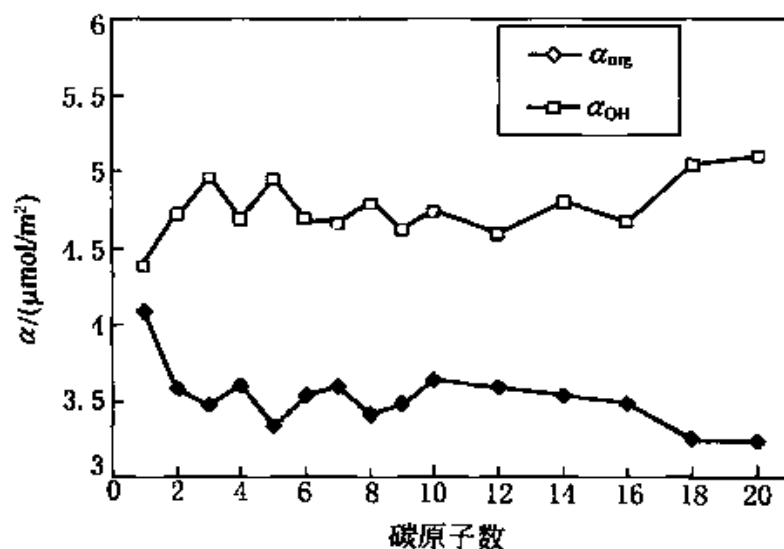


图 5-7 烷基链长与配基密度关系图
(根据 Unger, p370 Table1 以计算机绘出)

对于常见的反相填料，特别是 C_{18} 反相填料，其配基的密度一般在 $3.0 \sim 3.2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，最佳值约在 $3.1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 左右^[16]。

2. 链长对容量因子的影响

在 20 世纪 70 年代, 已有不少人研究了配基链长和容量因子的关系, 并得到了大致相似的结果。即容量因子和正烷基链中的碳原子数有相当好的线性关系。在以相同的淋洗条件时, 溶质的保留能力随链长而增加。当然, 当配基的键合密度相同时, 链长的增加意味着填料含碳量的增加, 但实际上, 按疏溶剂理论, 长链配基意味着配基所具有的表面积更大, 因而有更强的缔合作用。因此, 碳含量只是链长增加的特征而非保留增加的起因。在图 5-6 上可很清楚地看到, 当横坐标固定时, 即配基密度固定时, 长链配基对应着较高的 k' 值。

与链长有关的一个问题是配基的化学结构。由于可用使用单氯、二氯及三氯硅烷来合成反相填料。所以, 同是 C_8 或 C_{18} , 它们的配基结构是不同的。研究表明, 相同的淋洗条件下, 单氯型 > 二氯型 > 三氯型。这其实也还是疏水性的微小的差异所导致的结果。

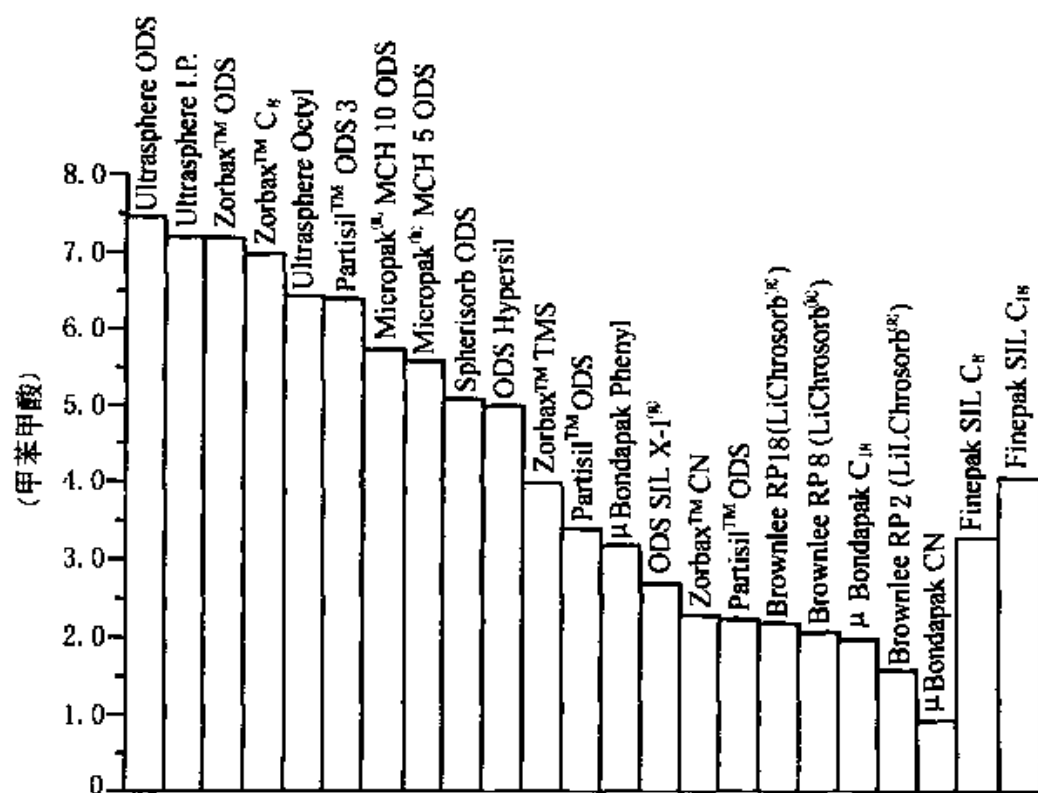


图 5-8 甲苯酸在一些反相填料柱上的 k' 值

3. 反相填料的选择性

反相填料的选择性取决于填料表面的物理、化学特性。影响选择性的主要因素有：配基的种类与数量；硅胶基质的纯度，即杂质的种类与含量以及表面残余硅羟基的浓度。不同的填料，往往表现出不同的选择性，这为不同的分离对象提供了很大的选择空间。但同时又给不同厂家、不同牌号的填料或柱子间的互换带来了困难，也使得即使是同一厂家、同一牌号的填料及柱子的重现性难以保证。

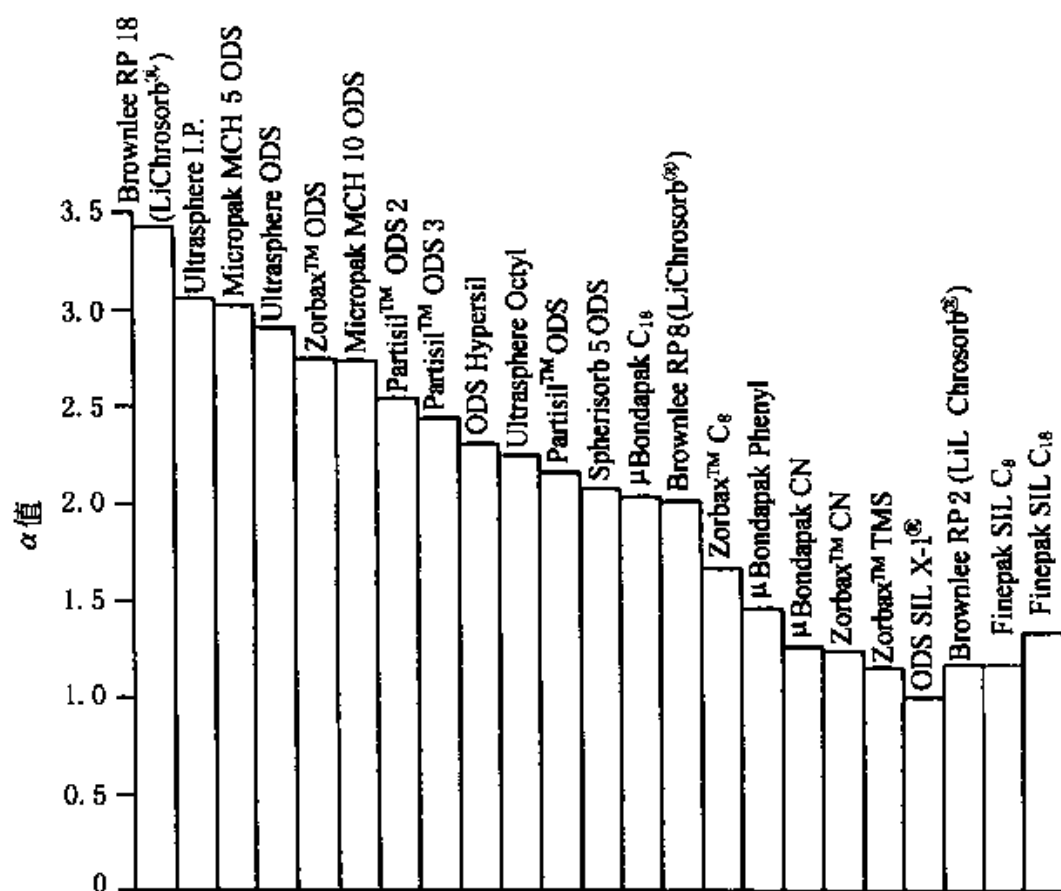


图 5-9 三联苯与联苯在一些反相填料柱上的 α 值

有人曾将配基为混合的 n -十八烷基和三甲基的填料与单一的烷基配基填料进行过对比，发现在相同的碳含量时，混合配基型填料表现出了较高的容量因子和较高的选择性。在以二苯屈 (TBN) 和苯并芘 (BaP) 为溶质，将具有相同碳含量的单分子层键合反相及聚合型键合反相进行比较后发现，当碳链较短时， $\alpha_{\text{TBN/BaP}}$ 差别

较大，而随碳链长度延长，两者的差别即逐渐缩小至相等^[17]。

一些商品反相填料，由于原料和制法的不同，在相同色谱条件下，对相同溶质的容量因子和选择性往往相差很大。例如，图 5-8 和图 5-9 分别给出了甲苯甲酸在一些反相填料柱上的 k' 值和三联苯与联苯的 α 值，其性能的差别可见一斑。

图 5-10 标出了一些商品反相柱的选择性与容量因子值，图上的选择性实际上表征了硅羟基的活性，而容量因子则可表征填料的疏水性。从图上可知，靠下方的填料，其基质多为高纯硅胶，且封端良好。这些填料，比较适于强极性和碱性物质的分离；而位于上方的填料，有可能具有较高的选择性，但往往吸附性较大且色谱峰常常拖尾，在分离碱性物质时，难以期望得到较高的回收率。

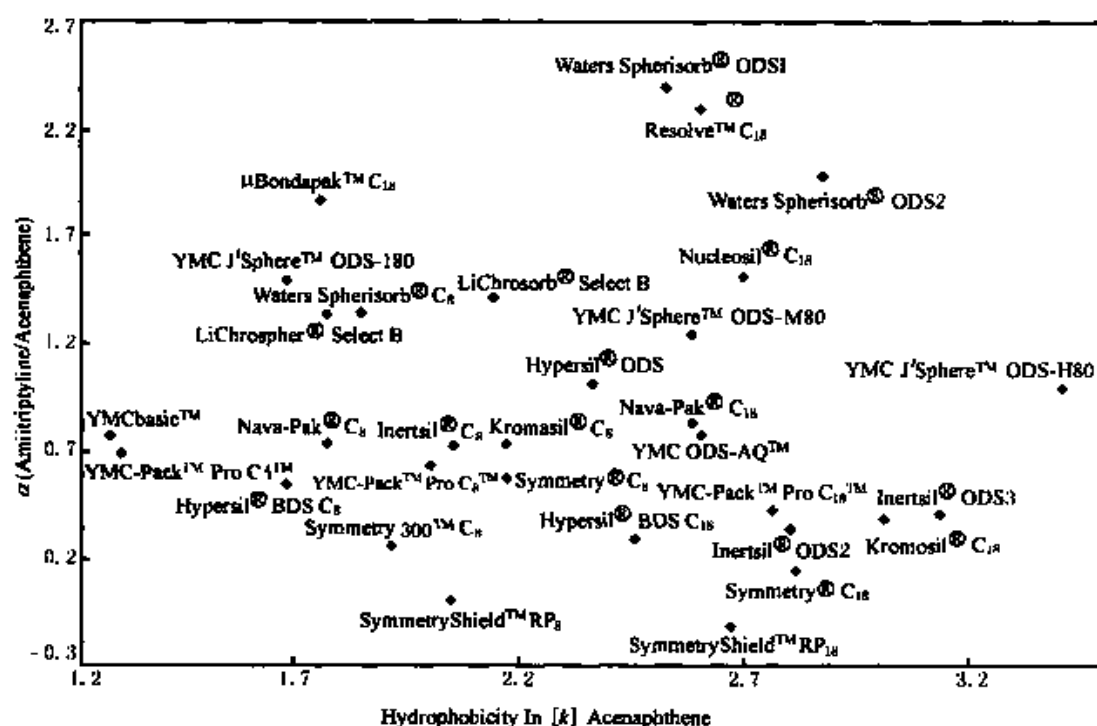


图 5-10 一些商品反相柱的选择性与容量因子

四、常见的反相填料及色谱柱

在第三章中，已介绍了生产和销售各种高效液相色谱填料和色谱柱的一些主要的厂家和公司。其实，在所有公司的产品中，反相

填料和色谱柱均是其核心产品。使用者若需要哪一类型的柱子,只要与各公司联系,便会得到详尽的资料或目录。通过 Internet 网,也可以很方便地得到这方面的信息。在附录三中择常见和有特色者,列表加以介绍。

第三节 离子交换填料及色谱柱

离子交换是高效液相色谱中必不可少的分离模式。作为离子交换色谱填料,可以按其基质的成分和结构大致分成有机和无机基质两大类。两类基质的优缺点已如前述,但无机基质的硅胶耐受 pH 值范围窄 ($\text{pH}=2\sim 8$) 的问题在离子交换色谱中将更加突出。从长远看,以高分子为基质的填料以及硅胶-高分子复合型的填料,应有更好的发展前景。

与其他色谱分离模式相比,离子交换色谱的分离机理相对较为简单,这里不拟详加讨论。离子交换色谱的一种特别类型,即离子色谱,本系列丛书中另有专著讨论,故本书亦没有涉及。

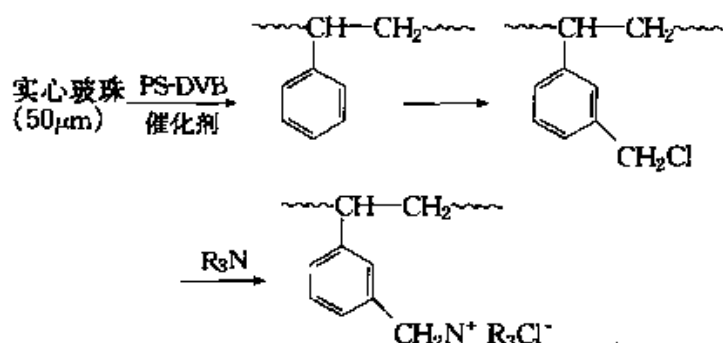
按照表面基团的不同,可以将离子交换填料分成阴、阳两类,其中又有强、中、弱之分。常见的主要是:

强阴型 (SAX), 如 $[-\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+$	(QAE)
中阴型 (MAX), 如 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	(DEAE)
强阳型 (SCX), 如 $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$	(SA)
弱阳型 (WCX), 如 $-\text{OCH}_2\text{COOH}$	(CM)

一、薄壳型离子交换填料

薄壳型离子交换填料 (pellicular ion exchangers) 是最早应用于 HPLC 的无机基质交换填料。它是在一个硬质无机内核的表面涂敷或粘上一层有机聚合物层,再经过化学衍生而成为离子交换填料。

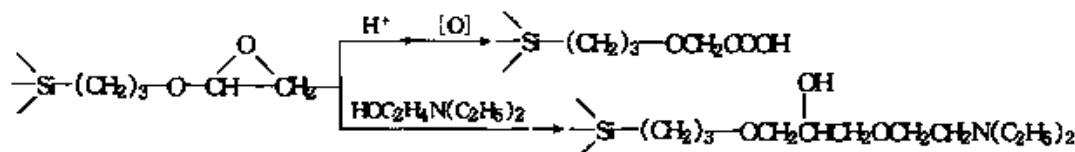
例如,首先应用的强阴离子交换填料^[18]是在实心玻璃微球 ($30\sim 50\mu\text{m}$) 涂敷薄层聚苯乙烯-二乙烯苯,经氯甲基化后再季铵化。硅微球亦可应用于这一方法,利用不同的化学反应衍生或修饰后,成为各种不同类型的薄壳离子交换填料。它们机械强度好,因其表面层很薄而利于传质,但是总交换容量相对较低。



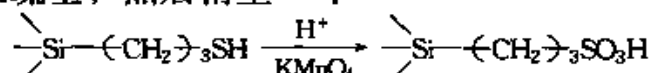
二、全多孔硅胶型离子交换填料

硅胶可以通过不同的表面修饰或再进一步进行衍生反应,生成不同类型多离子交换填料。对基质多要求应考虑到所分离生物大分子多分子量范围,采用大孔硅胶,且应具有足够大的表面积。

表面修饰可以使用前边介绍过的任何修饰方法,最常见的还是通过烷氧基硅烷的方式。例如先在硅胶表面引入环氧基,然后再转化为所需的功能基,生成 CM 型及 DEAE 型离子交换填料:



也可以先引入巯基,然后衍生^[19]:



这样,便生成了磺酸型强阳离子交换填料。

在离子交换填料的制备中,聚合物涂层法也有重要的应用^[20]。先在硅胶上引入乙烯基,再令其与苯乙烯共聚,随后通过衍生反应在本环上引入各种基团,例如 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}^+\text{R}_3\text{X}^-$,也可以引入其他弱阴、弱阳基团。Gupta 等人(1983)介绍了另一种制备聚合物涂层的方法:通过硅胶的表面修饰使其带上适当的反应基团,将其上涂以聚乙烯亚胺(polyethylenimine PEI)并使其与硅胶上的反应基团作用,便生成了键合相。Pharmacia 公司的 Plyanion SI 即属此类,它用作 HPLC 系统的填料,填装成预装柱销售。此外,聚琥珀酸亚胺可以在 γ -氨基丙酸催化下与带有氨基的硅烷反应,

通过这一反应，可以制备出复合型硅胶-聚酰亚胺型阳离子交换填料，它非常适于蛋白质类的分离。通过进一步修饰，还可以制备出一系列其他用途的产品，用于酶的固定化或亲和载体。

还有人报道，在无机基体表面通过吸附一层有机层的方法制备离子交换填料，例如，将 DEAE-葡聚糖吸附于或交联于硅胶表面，亦可用于生化分离。一些常见的、用于生物高分子分离的离子交换填料举例列于附录四中。

第四节 体积排除色谱填料及色谱柱

体积排除色谱，是色谱个分离模式中最简单、最单纯的一种类型。在排除色谱中，溶质即待测样品组分，与固定相或填料、流动相之间没有额外的相互作用。只依据分子的体积（流体力学体积）的大小而分离。

在文献上，体积排除色谱的名称曾很混乱，这是由于其发展历史及所用分离材料的不同等因素所造成的。

1953 年，Porath 和 Flodin 首先用交联葡聚糖凝胶在水溶液中分离水溶性高分子。这种交联葡聚糖凝胶的商品名称，即是后来广为人们所知的 Sephadex。由于其突出的优点，立即得到了生化界的承认和广泛的应用。这种分离技术被称为凝胶过滤（gel filtration chromatogr.）。

在水溶液体系中的成功，促使人们去研究非水有机溶剂体系中的凝胶色谱。1964 年，Moore 以苯乙烯-二乙烯苯共聚物为基质的不同孔径的有机高分子凝胶，解决了分子量几千至几百万的合成高分子的体积排除色谱分离问题。在分离高分子分级与分子量测定领域内，被称之为凝胶渗透色谱（gel permeation chromatogr.）。1965 年 Waters 公司的专用凝胶色谱仪问世（GPC 200）。以后的几年中，从理论到仪器乃至应用等各个方面，凝胶色谱得到了快速发展并臻完善，成为高效液相色谱家族中重要的一员。

关于名称，20 世纪 70 年代时曾统一为凝胶色谱（gel chromatography）。但是，体积排阻色谱这一名称似乎能更确切地反映

其分离过程的本质。因此，目前以称其为体积排阻色谱为宜。不过，SEC 主要的应用领域是生化分离和高分子科学，前者仍习惯地将其称之为凝胶过滤色谱，而后者，更习惯地沿用凝胶渗透色谱的名称。

与其他几种色谱分离模式相比，体积排阻色谱具有几个突出的优点：

- ① 出峰迅速，任何组分的保留体积均在 V_i 和 V_0 之间；
- ② 溶质与固定相（填料）和流动相无相互作用，毋需梯度淋洗；
- ③ 分离时不会滞留杂质或残留物在柱上，故柱寿命长；
- ④ 对于大分子，可以测定分子量及分子量分布；
- ⑤ 对于生物大分子，有很高的活性回收率；
- ⑥ 柱负载较大，利于制备分离。

但是，作为一种分离方法，它也有本身难以克服的缺点。即，与其他色谱模式相比，体积排除色谱的分辨率及峰容量均相对较低。

一、分离机理

（一）溶质的保留行为

体积排除色谱的分离，是在装填有多孔性材料的色谱柱中进行的。多孔材料的孔有大有小。孔径，有其“孔径分布”。当流动相携带分子量不同的溶质进入色谱柱后，溶质会因浓度差而渗入或扩散进入填料的孔中。也就是说，溶质在两相中的运动的动力是浓度梯度。但是，分子体积的大小，造成了在孔中扩散路径的差异，这可以从图 5-11

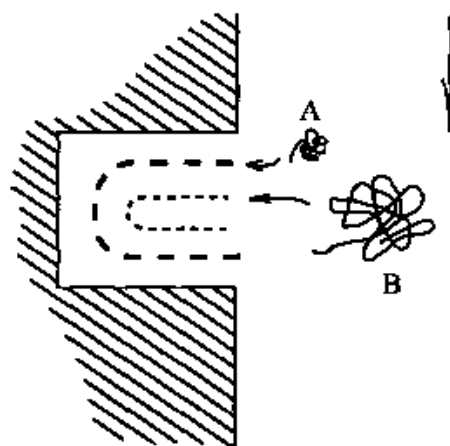


图 5-11 单孔中的体积排除

看出。形象地说，填料颗粒上的孔有大有小，但对于溶剂分子来说，它们是足够大的，可以允许它们自由地扩散、进出。不过，对于体积大的分子来说，它们只能进入尺寸大于该分子的孔，对于比颗粒上的孔还要大的分子，它只能从孔旁流过。换句话说，分子量或分子尺寸较小的溶质，能占有更多的

孔体积。这样，分子体积不同的混合物一齐进入柱端时，经过淋洗、扩散，总是体积大的分子先流出柱子，分子量小的（即体积小）分子滞后流出。

在一个紧密填充柱中，柱子的总体积为 V_A

$$V_A = V_i + V_0 + V_{GM}$$



式中， V_A 为柱子总体积； V_i 为孔体积； V_0 是粒间孔体积，而 V_{GM} 为骨架体积（图 5-12）。

方框内表示柱子的一部分，颗粒间总体积为 V_0 ，黑色部分为骨架体积 V_{GM} ，球内白色区域为孔体积，则

$$V_t = V_i + V_0$$

图 5-12 凝胶柱床
体积组成示意图

式中， V_t 是孔体积与粒间孔体积之和，它们构成了柱内的空间。若按流动相与固定相的概念去分析，可以将孔内充满的溶剂看作是“固定相”，而颗粒间的孔中充满的溶剂则是流动相。

对于某一大小的分子，其淋出体积为

$$V_e = V_0 + V_{i,acc}$$

式中， $V_{i,acc}$ 系指该尺寸的溶质可以渗透进入的那部分总体积，它是总孔体积的一部分，且是溶质分子量的函数，它和 V_i 之比即等于分配系数 K

$$K = \frac{V_{i,acc}}{V_i}$$

当然，从另外的角度来看， K 应是达到平衡时，组分在流动相和固定相中的浓度

$$K = \frac{[X_s]}{[X_m]}$$

式中， $[X_s]$ 和 $[X_m]$ 分别代表溶质在两相中的浓度。对于尺寸大于最大孔的分子，全部被排除在孔外，故 $[X_s] = 0$ ，此时 $K = 0$ ；而对于尺寸极小的分子，可以自由进出全部的孔，即当平衡时， $[X_s] = [X_m]$ ，则 $K = 1$ 。对于中间尺寸的分子，必然 $[X_s] <$

$[X_m]$ ，即在体积排除色谱中，

$$0 \leq K \leq 1$$

如果在体积排除色谱中出现了 $K > 1$ 的情况，肯定出现了违背 SEC 基本假设的其他作用力，致使溶质产生了额外的保留。

(二) 保留机理

溶质分子在穿过 SEC 柱时，会不断地在流动相和固定相之间来回运动改变在两相内的分布以达到热力学平衡。即使对于扩散速度非常慢的大分子，在正常实验条件下，溶质的分布也是接近于热力学平衡的。当达到热力学平衡时，溶质每一组分在两相中的化学势均相等。对于平衡状态下的稀溶液，溶质的分布与定温定压下两相的标准自由能增量有关

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

而

$$\Delta G^0 = \Delta H - T\Delta S^0$$

式中， R 为气体常数， T 为绝对温度， ΔH 为两相间的标准焓增量， ΔS^0 为两相间的标准熵增量；将两式合并

$$-RT \ln K = \Delta H - T\Delta S^0$$

在通常的液相色谱的中，溶质与固定相之间存在着某种相互作用，有比较明显的 ΔH^0 的改变，但熵变很小，故 ΔS^0 可以忽略不计，故前述公式可写成

$$-RT \ln K = \Delta H$$

将上式整理后可得出

$$K_{LC} \approx e^{-\left(\frac{\Delta H^0}{RT}\right)}$$

通常 ΔH^0 是负值，故 K_{LC} 一般 > 1 ，即溶质的保留体积大于溶质的保留体积，这种保留称为正保留。但是，在体积排除色谱中，溶质在两相间的分布主要靠熵变，不考虑焓变 ΔH^0 ，故此时

$$K_{SEC} \approx e^{\left(\frac{\Delta S^0}{R}\right)}$$

由于 SEC 中溶质在两相的分布主要靠熵变的变化， ΔS^0 为负，导致在 SEC 中， $K_{SEC} < 1$ ，即溶质在溶剂前自柱中被淋洗出来，从表

达式可知, K_{SEC} 与温度无关, 这已为实验所证实。当然, 由于 T 影响聚合物的体积, 且使峰加宽, 故在进行实验时仍以恒温为好。

(三) 分离机理及其理论模型

有三种 SEC 分离的物理模型: 平衡排除理论; 限制扩散理论; 流动分离理论。

物理模型的意义在于, 可以用溶质和填料孔的尺寸和形状为基质, 定量地解释 K_{SEC} 和 $V_e - M$ 标定关系。

迄今为止的研究工作证明, 这些机理并不是互相排斥的, 但有一种是主要的, 即排除理论在分离机理中占主要作用; 当流速加大时, 扩散在分离中的作用逐渐加大; 流动分离理论则只在流速很高时才起作用。

在平衡排除理论中, K_{SEC} 和溶质分子的理论模型有关, 具有不同构象的溶质, 其 K_{SEC} 具有不同的物理意义, 需要进行不同的理论处理。孔的结构, 形状也是一个重要的因素, 但它只改变 K_{SEC} 值而不影响体积排除的本质。图 5-13^[21] 表示在一个圆柱形孔中三种溶质分子的排除效应: 实心球, 可代表许多生物高分子, 如球蛋白, 病毒颗粒等; 无规线团适合许多生物高分子, 细杆也主要适合生物高分子。

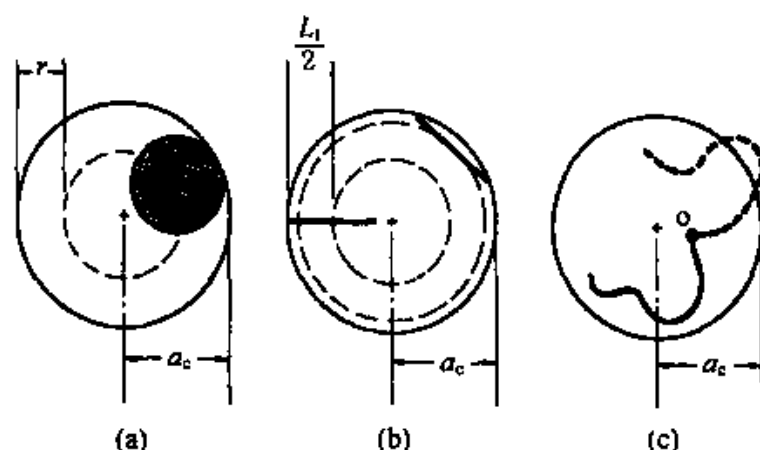


图 5-13 在半径为 a_c 圆柱形孔中的排除效应

- (a) 半径为 r 的实心球; (b) 长度为 L 的细杆, 在横切面上两种取向;
(c) 无规线团, 一端固定在 O 点上实线是允许的构象, 虚线表示禁止的构象

在实心球模型中，球心的活动范围只限于 $(a_c - r)$ 为半径的管中，而不能进入虚线以外的地方，在达到平衡时，实际尚有一部分孔内容积是该溶质不能进入的，这意味着孔内平衡浓度小于孔外。孔内、外溶质浓度之比，等于孔内虚线以内部分的面积所占的分数。如果以 K_e 表示平衡的分布系数，则

$$K_e = \left(\frac{a_c - r}{a_c} \right)^2 = \left(1 - \frac{r}{a_c} \right)^2$$

若是平板缝隙孔，

$$K_e = 1 - \frac{2r}{a}$$

对于球形孔，

$$K_e = \left(1 - \frac{2r}{3a} \right)^3$$

这里，将 $\bar{a}$ 定义为孔的有效半径

$$\bar{a} = 2 \times \frac{\text{孔体积}}{\text{孔表面积}}$$

$\bar{a}$ 还可以作为描述色谱孔尺寸的一个基本参数。

图 5-14 表示以上述公式计算的各种形状的孔中 K_e 和实心球形

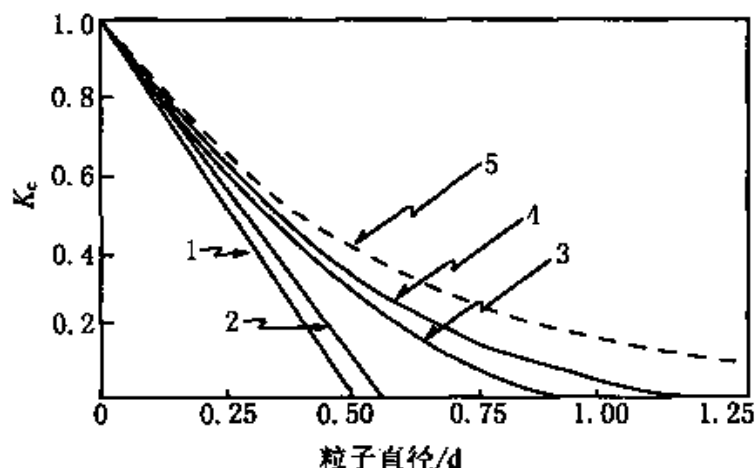


图 5-14 球形粒子的分布系数

1—平行平板；2—矩形孔；3—柱形孔；4—球形孔；5—无规平板

溶质的关系。从图上可知，虽然各曲线差别很大，但随着溶质尺寸减小，它们均沿同一曲线趋于 1。图中虚线是按 Gidings 提出的无

规平板构成的填料模型对实心球计算的结果。

无规线团模型，适用于多数柔性链合成高分子，图上表示了分子两种构象。即使 0 端被固定，仍然可以采取多种构象，但由于孔壁的存在，其中的一些构象是不可能实现的，图中虚线即属这种情况。这种对构象自由度的限制，导致孔内熵和溶质浓度的降低。

但是，以此种模型计算的理论曲线与实测相差很远，经进一步研究得知，这是孔的不均匀性造成的。以压汞法测出的孔径偏低，经用 BET 法测定体积 V_p 、表面积 A_p 后，以公式

$$\bar{a} = 2V_p/A_p,$$

此时，理论值和实验值比较符合。

以上的理论考虑虽然比较粗糙，但它们和实测结果比较符合，说明理论模型是比较合理的。同时也可以证明，平衡排除在 SEC 分离机理中起了主要的作用。

(四) SEC 中的峰展宽

在塔板理论中，有一个重要的结论，即理论塔板高度具有加和性：

$$H = H_L + H_S + H_M + H_{SM}$$

式中， H_L 为纵向扩散效应； H_S 为固定相对溶质输运阻力的贡献； H_M 为流动相对塔板高度的贡献； H_{SM} 为停滞的流动相对塔板高度的贡献。

SEC 中，要求填料表面对溶质无吸附作用，故 H_S 很小，可忽略不计；高分子溶质的扩散系数一般很小，一般在 $10^{-6} \sim 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ 之间，故在一般流速下， H_L 亦可不予考虑。例如，曾有人以 GPC 测定聚苯乙烯，进样后停止输液而将样品在柱中保持了七天，其谱图与正常实验谱图仍然吻合，说明 H_L 很小。

这样，SEC 中的理论塔板高度

$$H = H_M + H_{SM}$$

即，主要是流动相及停滞流动相的贡献。一般情况下，随着溶质分子量的增大和流速的增大，溶质在流线间纵向扩散的机会减少，涡

流扩散的成分增大, H 趋向一常量。此外, 实验结果亦证实, 在相同实验条件下, 多孔填料比无孔填料的峰展宽要大得多, 故应选小而均匀的填料。

(五) SEC 中的分离度

前已述及, 分离度

$$R = \frac{2(t_{r_1} - t_{r_2})}{(w_{b_1} + w_{b_2})}$$

这里 t_r 亦可用 v_R 表示, w_b 是峰宽, $w_b = 4\sigma$ 。在 SEC 中, 由于 H 与保留体积 V_R (或 V_e) 有关, 上述 R 的概念不完全适用, 对于同一根柱子或 SEC 体系, 可以证明

$$R = \frac{\Delta \lg M}{4\sigma D_2}$$

式中, D_2 为溶质的扩散系数, 这一表达式有很大局限性, 为使 R_s 更具普遍性, 引入了比分离度的概念。比分离度 R_p 为

$$R_p = \frac{R_s}{\Delta \lg M} = \frac{0.58}{\sigma D_2}$$

SEC 峰间距与溶质分子量的关系如图 5-15 所示。

(六) 峰容量

峰容量指的是在分离的路程或空间内所能容纳的峰数目的极大值, 且每两个相邻峰分辨率接近于 1。对 SEC 来说, Giddings 提出了一个估算理论塔板数 N 与可分离组份数 n 的公式

$$n = 1 + 0.2 \sqrt{N}$$

式中, N 为理论塔板数。由式可知, 对于一根 15 000 片/m 的凝胶柱, 若其长度为 60cm, 则 $n \sim 20$ 。当然, 如我们在第一章中所讨论的那样, 实际的峰容量比这一数据要大, 但上述公式仍然给我们

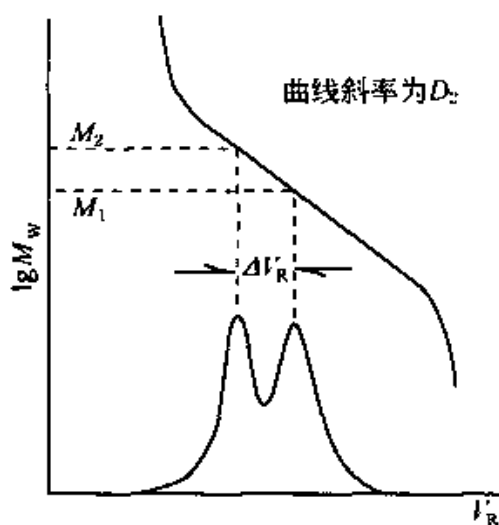


图 5-15 SEC 峰间距与溶质分子量的关系

提供了一个可供参考的依据。

二、SEC 的填料

SEC 的填料，通常称之为凝胶。早期的 SEC 中 GFC 和 GPC 是独立发展的，但其本质都是相同的，即它们对于溶质来讲，均是多孔性物质。一种理想的高效 SEC 填料应具备以下性能：

- ① 机械强度高，能耐受几兆帕的操作压力；
- ② 球形颗粒，粒子直径控制在 $3\sim 10\mu\text{m}$ ，且粒径分布窄；
- ③ 无体积排阻效应以外的其他次级效应；
- ④ 孔径应为 $5\sim 100\text{nm}$ 或更高，孔径分布符合需要；
- ⑤ 具有高孔容；
- ⑥ 容易处理和充填；
- ⑦ 价格合理。

对 GFC 来说，还有附加的要求：

- (1) 应具有亲水性表面；
- (2) 至少在 $\text{pH}=3\sim 10$ 之间化学性质要稳定；
- (3) 不会引起生物活性物质的失活及降解。

这种理想的填料目前虽然尚未找到，但我们可以研制出基本满足或接近上述要求的材料。

作为体积排阻色谱的填料，其粒度及粒度分布、孔径或孔径分布以及孔容是基本参数。粒径及粒径分布影响其柱效。例如，通常所使用的直径 $50\mu\text{m}$ 的软胶，能达到理论塔板数 1500 片/m 左右的柱效，而直径 $10\mu\text{m}$ 的高效凝胶色谱柱却可以达到理论塔板数 15000~20000 片/m。理论塔板数愈多，则可以分离的组分的数目愈多。

(一) 凝胶的结构参数

粒度 球形凝胶以直径来衡量，无定形颗粒指其最大长度；有机胶在溶剂中会溶胀，故其粒度指其干燥状态下的尺寸。粒度可以用筛目来表示，精确数值可用显微镜下的测量得到；还可以用粒度测量仪器测量，如沉降法、离心法、激光光散色法测定等。压汞仪在测定孔径及孔径分布的同时，亦可以表征粒度分布。

比表面积 (S) 比表面积 S 系指每克多孔物质的内、外表面面积之和。有机胶干燥状态下无可测的孔度, 比表面积积极小, 但溶胀后出现网络孔。比表面的测定采用 BET 法或压汞法等。

堆积密度 ρ_p 紧密堆砌的凝胶每毫升的重量, 单位 g/ml。

骨架密度 ρ_g 骨架密度的单位为 g/ml。

孔体积 V_p 适用于无机凝胶, 每克多孔物质所有孔的总体积, 单位是 ml/g。

溶剂吸收量 S_r 、得水值 ω_r 适用于有机胶, 即 1g 干胶充分溶胀所需要的溶剂或水的量 (体积)。

孔度 ψ 孔的体积在多孔性物质总体积中所占的比例

$$\psi = \frac{V_p}{\left(V_p + \frac{1}{\rho_g}\right)}$$

在 SEC 中, 孔度大则分离容量大。无机胶在不同的溶剂中, ψ 不变, 而有机胶因溶胀程度不同, 可以有不同的孔度。孔度大者标定曲线斜率小。

平均孔径 $\bar{D}$ 和孔径分布 对无机胶, 若是圆柱形孔, 则

$$\bar{D} = \frac{4V_p}{S}$$

若是堆砌硅珠, 则

$$\bar{D} = (1.32 - \psi) \frac{4V_p}{S}$$

此式中 1.32 适用于 $0.3 < \psi < 0.8$ 的情况, 其孔径分布可用吸附法或压汞法测得。

(二) 凝胶的色谱指标

渗透 (排除) 极限 凝胶用来分离高分子的最大极限, 一般以具有不同的分子量、且分子量分布极窄的聚苯乙烯来标定凝胶渗透色谱 (GPC), 以具有不同的分子量的葡聚糖 (dextran)、聚乙二醇 (PEG), 或最好是以蛋白质标样的分子量来标定凝胶过滤色谱 (GFC)。在 GFC 的情况下应注意的一点是, 因为在溶液中蛋白质

常呈球形，而 PEG 和葡聚糖则是线型分子。以不同的样品所测定的数据是有差别的。

分离范围 一般系指标定曲线的线性范围。

固流相比

$$\frac{\bar{V}_i}{V_0}$$

根据凝胶色谱的一般理论，柱子总体积 V_T 为

$$V_T = V_0 + V_i + V_g$$

式中， V_0 为颗粒间的空间； V_g 为材料的骨架体积； V_i 是凝胶的内孔体积，作为固定相对待，故 $\frac{\bar{V}_i}{V_0}$ 反映了色谱峰容量。一般只与孔度有关。孔度愈大， V_i/V_0 值就愈高。因此，用作凝胶分离填料的硅胶，必须具有较高的孔度。对于无机胶和高度交联的有机胶，

$$\frac{\bar{V}_i}{V_0} = 1.75\phi$$

对于多孔硅胶而言， ϕ 一般在 0.6~0.7，故其 $\frac{\bar{V}_i}{V_0}$ 值应在 1.05~1.23 之间。

(三) 合成高分子凝胶

使用最广泛的合成高分子凝胶是以二乙烯基苯交联的聚苯乙烯，以悬浮聚合或分散聚合的方式制成均匀球形，以致孔剂制出所需孔径和孔容。这种凝胶目前主要用于 GPC，以分离合成高分子，助剂及精细化工产品。将 PD-DVB 改性使表面亲水后，也可用于 GFC。但是用于 GFC 的合成高分子胶，却主要是由其他具有亲水性基团的合成高分子制成的。

著名的合成高分子胶商品有：u-Styragel (Waters)，PL-gel (Polymer lab.)，TSK-typeH (东曹)，NGX (天津试剂二厂) 详见第六章的讨论，此处不拟赘述。

是这一类的。凝胶渗透色谱柱主要用于合成高聚物和精细化工产品的分析,可参阅厂家的有关资料。

表 5-4 常见的无机基质亲水凝胶填料

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	1.71	350	1×10^5	9×10^4		Beownlee labs
			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	Waters
			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	6			8×10^5	
Protein Columns	二醇	10	6	0.4	190	2×10^4			Waters
160									Milli- pore
1125			12.5	0.96	320	8×10^4			
1250				25	0.98	130	5×10^5		
SyChroPack GPC	二醇	10	10	0.97	250	5×10^5	10^5	8×10^4	SynChrm Inc
			30	1.48	-		10^6	3×10^5	
			50	0.91	50	5×10^5	3×10^5	6×10^5	
			100	0.8	20	2×10^7	3×10^7	1.4×10^6	
			400	-	8	-		3×10^6	
TSK- G2000SW	表面羟基	10	13	0.8~ 1.0	-	1×10^5			

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	
-G3000SW		10	24	1.5~ 2.0	-	5×10 ⁵			TOSOH (东曹)
-G4000SW		10	45	2.4~ 2.8	-	7×10 ⁵			

三、SEC 实验技术

关于 SEC 的实验技术问题，另有其他专门的论述。但为讨论 SEC 填料的方便，这里仅概要性地加以罗列。

(一) 凝胶柱的选择与使用

按使用目的考虑：GPC 还是 GFC？

分析分离还是制备分离？

分子量测定还是精制纯化？

定性还是定量？

按分子量范围考虑：应落在分子量-淋出曲线的线性部分；若范围太窄则可以考虑将不同规格的柱子串联使用。

使用中最大的问题是严禁超压（超流量），否则，将会引起柱子孔结构的破坏，使柱子完全报废。使用后应妥善保存，防干，防盐析，防霉菌生长。由于使用了缓冲液以及无机盐溶液，故必须以纯水冲洗干净。较长时间不用时，可以用甲醇或含叠氮化钠的水溶液置换后，密封保存。

(二) 流动相

GPC 中，主要考虑高分子样品的溶解度，检测器的要求，处理的方便及安全性、经济性等因素。特别是常用的四氢呋喃，在纯化时还要考虑过氧化物的生成的危险。

GFC 中主要是添加中性盐及缓冲液等问题。

所有的溶剂使用前均要以微孔滤膜或 5# 砂芯漏斗过滤。

(三) 标准样品及标准曲线

SEC 不是一个绝对的测定方法 (装有分子量检测器的除外)。因此, 通常需要用标准样品标定出淋洗体积与分子量之间的关系。对于 GFC, 可采用窄分布的标样, 如分子量窄分布的聚苯乙烯 (PS), 其分子量一般可从 $600 \sim 3 \times 10^6$ 。

对于 GFC, 可采用蛋白质标样, 其分子量是精确的, 故可绘出精确的标准曲线; 但昂贵的价格限制了它的广泛的应用; 亦可用葡聚糖或 PEG 来代替, 但它们是线性分子且不是单分散的, 故有局限性, 其数据仅供参考。

为解决普适标定问题, 采用了特性黏度与流体力学体积 $[\eta] M$, (η 是特性黏数, M 是平均分子量), 从而通过换算求出试样的 $\lg M - V_e$ 标准曲线; 当淋出体积相同时

$$[\eta]_1 M_1 = [\eta]_2 M_2$$

根据特性黏数-分子量方程 $[\eta] = K_1 M^{\alpha}$

可得出

$$\lg M_2 = \frac{1 + \alpha_1}{1 + \alpha_2} \lg M_1 + \frac{1}{1 + \alpha_1} \lg \frac{K_1}{K_2}$$

只要待测样品的 K_2, α_2 已知, 便可推知其分子量 M_2

第五节 亲和色谱填料及色谱柱

亲和色谱以其极高的选择性不可代替地应用于复杂生物体系的分离、分析中。常规的亲和色谱, 使用的多是天然或合成高分子载体。而天然高分子 (葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶等) 多数机械强度差, 难以提高淋洗速度。其与配基的键合多数通过表面羟基进行, 结合并不十分牢固, 加之还有滋生微生物的危险, 故其更广泛的应用受到了限制。

与其相比, 无机基质 (如可控孔径硅胶、可控孔径玻璃等) 因为机械强度高且可通过各种化学键合而增加配基牢度, 同时, 也不利于微生物的生长, 因而近年来以 CPS 或 GPG 为基质的高效亲和色谱, 逐渐引起了人们的重视并展现了很好的应用前景 (表 5-5)^[22]。

表 5-5 高效亲和色谱应用举例

配 基	与其相互作用的生物分子
抗体	抗原
抗胰岛素 (单克隆抗体)	胰岛素
抗白细胞 A 干扰素 (单克隆抗体)	γ-干扰素
苯并二氮卓	抗苯并二氮卓
核苷酸	
AMP	醇脱氢酶
NAD	乳酸脱氢酶
蛋白质	
大豆胰蛋白酶抑制剂	胰蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶
蛋白质 A	免疫球蛋白, 免疫络合物
伴刀豆球蛋白 A	糖类, 糖蛋白类
牛血清白蛋白	对映体
其他	
羧酸	核酸成分, 核苷糖类
蓝染料 F3G-A	脱氢酶、激酶、核糖核酸酶
头孢菌素	γ-内酰胺酶
氨基糖	伴刀豆球蛋白 A
亚氨基二乙酸 (IDA)	金属结合蛋白, 氨基酸
氨基苯甲脒 (ABA)	血纤维蛋白溶酶
	血纤维蛋白溶酶原
糖类	外源凝集素
吩噻嗪	钙调蛋白

一、高效亲和色谱的特点

高效亲和色谱 (high Performance affinity chromatography, HPAC) 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的工作压力。高效亲和色谱一般可在几分钟至几十分钟内完成, 相对于常规软胶亲和色谱的几小时乃至几十小时, 不仅可以提高效率, 还可以改善回收产物的纯度和浓度; 淋洗速度快使得色谱峰非常尖锐, 可以大大提高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 在所有色谱模式中具有最高的选择性。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品的质量,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 ($\text{pH}=2\sim 8$),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。

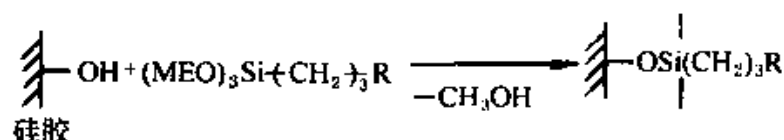
二、用于高效亲和色谱的基质

最重要的基质是多孔硅胶。当然,如果解决了生产价格问题,CPG 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。硅胶的孔径以 $30\sim 100\text{nm}$ 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降低而使样品的负载量降低。过大的孔隙会降低填料的机械强度,故而,有中等孔度即已足敷应用。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 $5\sim 50\mu\text{m}^{[23]}$ 左右的粒度。最近,直径小至 $0.7\sim 2.1\mu\text{m}$ 的无孔或“非渗透性”的小粒径硅胶也应用到了 HPAC 上^[24],进一步提高了分离速度。更有人将超细石英纤维 ($0.5\mu\text{m}$ 直径, $50\mu\text{m}$ 长) 用作为亲和填料的基质,通过涂于纤维表面的活化葡聚糖与 DNA 的衍生物键合,用以分离牛心乳酸脱氢酶。这种纤维状的填料由于通透性好,可以使用很高的淋洗速度,且因纤维直径仅 $0.5\mu\text{m}$,比表面相对较大,每克纤维可以吸附 15mg 酶。装有 100g 纤维的柱子 1h 可以纯化 1g 产物,在制备分离方面有很大应用价值。膜亲和色谱的兴起,也给高效亲和色谱基质的选择提供了新的可能。

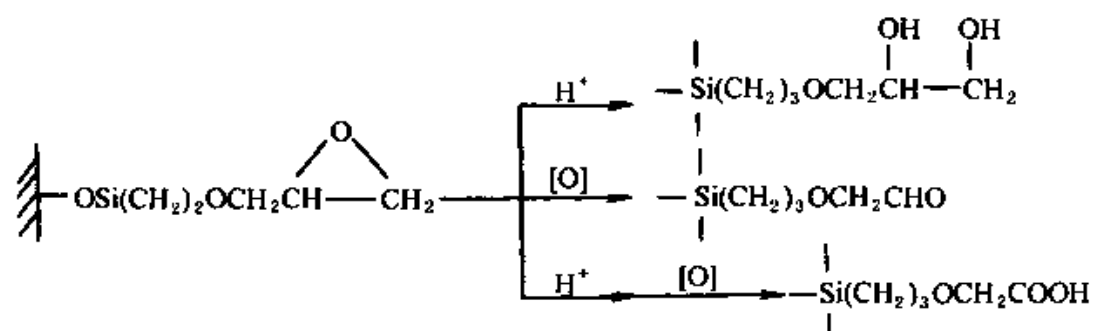
三、硅胶的活化

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。与其他的硅胶修饰类似,这里可用表面修饰和聚合物涂层两种方法。

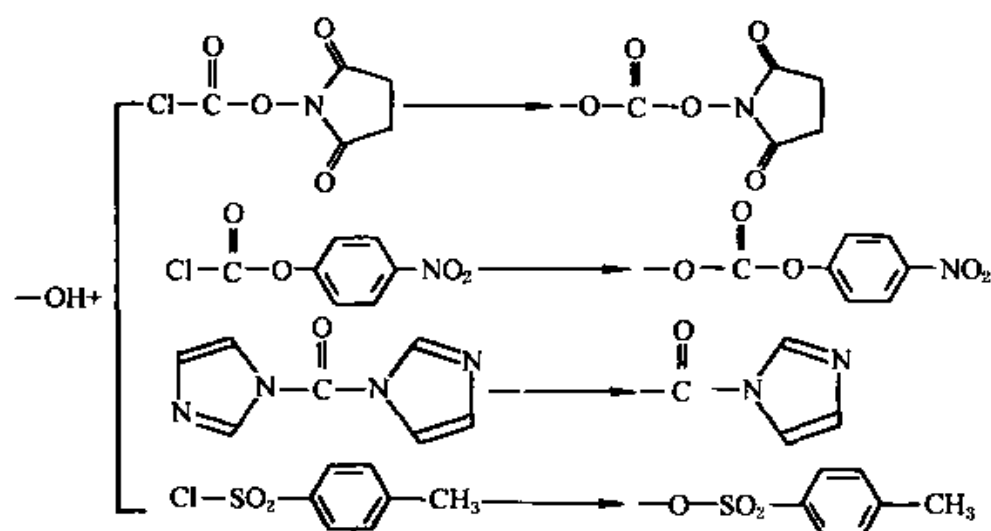
由于亲和色谱中不需要很高的配基浓度，故在表面修饰时，主要利用烷氧基硅烷化在水相中与硅胶的反应，以形成可供进一步衍生反应的基团



当 R 为环氧基时还可以进一步转化为其他基团，如



当 R 为—SH、—NH₂ 等基团时，也可以以类似的反应形成不同活化形式的基团，或直接进行键合。这里生成的一OH、—CH(OH)CH₂OH、—CHO、—COOH、—NH₂、—SH 等均可进一步反应。例如，羟基又可进行一系列类似硅胶中应用的活化方法^[25]



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。如让它与一系列其他试剂反应，则可以有很大的灵活性，图 5-16 中示意

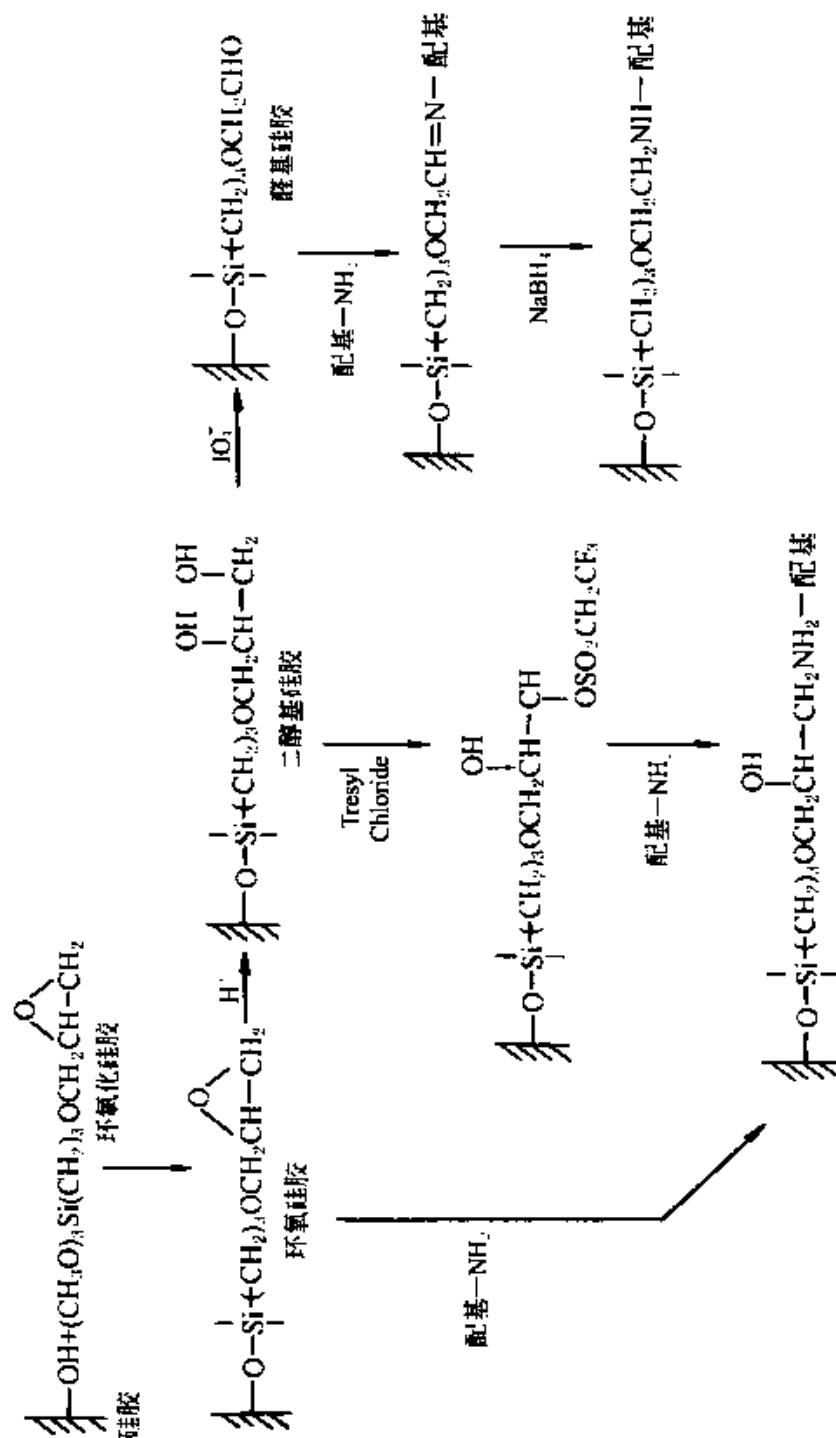


图5-16 配基与环氧硅胶偶联的途径

地给出了环氧硅胶的各种键合反应途径^[26]。作者曾对比了这3种方法,以大豆胰蛋白酶抑制剂为配基,将其键合于大孔硅胶上,以用于分离胰蛋白酶。发现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 $1\mu\text{g}$,并且酶的活性回收率也提高了^[27]。

早期使用的环氧化硅胶,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化硅胶,它的基质为直径 $37\sim 55\mu\text{m}$ 、孔径 50nm 的硅胶,聚合物涂层系亲水型的,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。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。

亲水性聚合物涂层看来更适合 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。

在硅胶活化的过程中,间隔臂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分子链,无须专门去考虑。

四、一些常见的高效亲和填料

表 5-6 列出了一些商品化的 HPAC 填料,除少数为高聚物外,大多为硅胶基质^[22]。

表 5-6 市售高效亲和填料载体

类 型	商 品 名	基 质	粒径/ μm	主要用途	供应公司或厂家
醛基		硅胶	10, 30	偶联氨基	SE, ST, C
氯甲酸酯	HyPAC Carbonite N	硅胶	5~10	偶联氨基	BA
环氧	Ultrafinity-EP	硅胶	10	偶联氨基	B
	Eupergit	丙烯酸酯	30	偶联氨基	R
	Durasphere A	硅胶	7	偶联氨基	A
羟基丁二酸	Affiprep 10	聚合物	40~60	偶联氨基	BR
	Selecti Spher				
Tresyl	Tresyl	硅胶	10	偶联氨基	PR, P
	Shim-Pack APC-TR	硅胶	10	偶联氨基	S
	TSK Gel Tresyl-5PW	PS-DVB	10	偶联氨基	TS
	YMC-Pack	硅胶	10	偶联巯基	Y
	AFS-Tresyl				
清蛋白	Resolvosil	硅胶	10	对映体分离	MN

续表

类 型	商 品 名	基 质	粒径/ μm	主要用途	供应公司或厂家
硼酸盐	Selecti Spher Boronate	硅胶	10		PB
	TSK Gel Boronate - 5PW	PS-DVB	10		TS
	Shim-Pack AFC-BN	硅胶	10		S
	YMC-Pack	硅胶	10		Y
	AFS-Boronate				
蓝染料	Selecti Spear	硅胶	10	需辅酶的酶	PB
	Cibacron Bule			干扰素	
	Shodex AF-PAK	聚合物	15~20	凝集素等	SD
	TSK Gel Bule-5PW	PS-DVB	10		TS
	Durasphere	硅胶	7		A
伴刀豆球蛋白 A	Shim-Pack AFC-CB	硅胶	10		S
	Selecti Spher Con A	硅胶	10	抗体球蛋白	PB
	Shodex AF-PAK	聚合物	15~20		SD
	Durasphere Con A	硅胶	7		A
	Shim-Pack AFC-CA	硅胶	10		S
亚氨基二乙酸	Immunodiacetic acid	硅胶	10	固定金属	SE
	Si 100	硅胶			
	Shodex AF-PAK	硅胶	15~20		SD
血清类黏蛋白	LKB-Enantiopac	硅胶	10	胰蛋白酶	PHL
	Selecti Spher Protein A			IgG,	
	Durasphere	硅胶	10	IgG 亚类	PB, P
	Protein A	硅胶	7		A
	Shim-Pack AFC-PRA	硅胶	10		S
蛋白质 G	Shodex AF-PAK	聚合物	15~20		SD
	Protein A Soperose	琼脂糖	10		PHL
	HiPac Protein A	硅胶	30		C
	PL-AFC Protein A	聚合物	15~20		PL
	AffiPrep Prot A	聚合物	40~60		BR
	SelectiSpher Protein G	硅胶	10	IgG	PB
	Shim-Pack AFC-PRG	硅胶	10	IgG 亚类	S
	Gammabind HPLC	硅胶	30		G
	YMC-Pack	硅胶	10		Y
	AFS-Protein G				

供应公司或厂家: A. Alltech; B. Beckman; BA. Barspec; BR. Bio-Rad; C. Chromatochemn; G. Genex; MN. Nachery-Nagel; P. Pierce; PB. Perstorp Biolytica AB; PHL. Pharmacia; PL. Polymer Lab; R. Rhom-Pharma; S. Shimadzu; SE. Serva; SD. Showadenko; ST. Sterogen; TS. Toso Haas; Y. YMC.

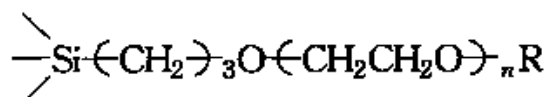
第六节 疏水相互作用填料及色谱柱

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。

疏水作用色谱 (hydrophobic interaction chromatography, HIC) 始于 1972 年^[28] Shaltiel 及其工作者,他们利用带有碳氢化合物配基的琼脂糖凝胶以“疏水亲和色谱”分离蛋白质。在其他实验室内也进行了类似研究和探索,1976 年 Hofstee 将这种类型的色谱命名为疏水作用色谱。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,但这些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基球上,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。为改善 HIC 的分离效率和分离速度,出现了以硬质高聚物微球、硅胶以及 CPG 为基质的高效 HIC 固定相^[29~33]。

与其他类型相比,对用于这种填料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 CPG 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。

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烃或苯基而成^[34],例如, TOSOH 公司的 Phenyl-TSK-Gel 3000SW、Butyl-TSK 3000 SW 柱均是很典型的商品 HPHIC 柱。另一类是醚型键合相^[32,34]。在硅胶上先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 填料。作者的实验室曾以可控孔径玻璃为基质,键合以聚乙二醇,

制备出 HIC 填料。这种填料,系无定型颗粒,粒径分 25~37 及 5~10 μm 两种。孔径有 30、60 以及 100nm 等几种。使用了分子量为 400、600、800、1000 及 2000 的 PEG 为配基,研究了不同色谱条件下蛋白质的分离行为。结果表明随 PEG 链长的增加,蛋白质的保留加大,比较适宜的是 PEG600-1000。对一般生化分离而言,孔径 30~60nm 较为合适。以结晶胰蛋白酶为样品,经 HIC 分离后的活性回收率为近 100%,表明这种 HIC 填料很适合于蛋白质的分离^[35]。耿信笃等以硅胶为基质,以改性聚乙二醇为配基,制备了用于蛋白质分离的 HIC 填料。在分离基因重组 γ -干扰素时发现,干扰素的活性回收率有异乎寻常的升高。经研究后认为,这是由于 HIC 分离过程有利于变性蛋白的复性所致。这更加说明, HIC 是生物大分子分离和纯化的一个重要的手段。

第七节 手性色谱填料及色谱柱

色谱中一特殊而引人注目的应用领域是光学对映异构体的分离。对映异构体是化学性质相同而从分子结构上却是不可重叠且呈镜像对称的两个分子。就如人的左右手一样。它们是非对映异构体和顺反异构体之外的又一类特殊的立体异构体。描述光学对映异构体最简单而又生动的模型是人的左右手,因此,这一类对映异构体的色谱分离技术就被称为手性色谱。

在手性色谱中,有三种分离对映异构体的方法:

(1) 将对映异构体柱外衍生成为非对映异构体衍生物。因为非对映异构体具有明显不同的物理特性,因而可以较容易地通过一般的色谱过程加以分离。如此可先以衍生试剂制备成非对映异构体,接着以正相(NP)或反相(RP)等常规方法分离。Tamegai 等^[36]发展了几种适用于羟基、氨基化合物及羧酸的手性衍生试剂。文献^[37]给出了一些应用,其中列出了主要的手性衍生试剂。

(2) 使用手性流动相添加剂。对映体与流动相中的手性添加剂作用,可以产生非对映体离子对或络合物,便可在色谱上进行分离。这种方法不需预衍生化,故操作相对简单。这种方法的机理,

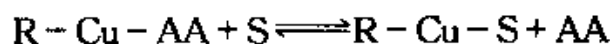
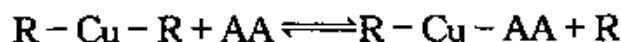
有可能是添加剂先吸附至固定相上,形成一种动态的手性固定相,手性溶质再与其作用达到分离^[38]。

(3) 使用手性固定相(chiral stationary phase, CSP)直接对对映体进行拆分。这种拆分方法的基础,来源于未消旋的手性固定相和手性溶质之间的对映体分子作用力的差别。

以上三种方法都很成功,但采用手性固定相的方式更为经济、有效,且可以使用制备色谱进行大规模制备分离,已成为许多研究领域不可缺少的工具^[39]。Bojarski 介绍了近年来对映异构体色谱分离的最重要的进展,包括直接和间接模式,新的衍生试剂、手性固定相以及药物和其他生理活性物质对映分离的应用等^[40]。Chandwani 则讨论了手性分离的不同模式及机理^[41]。

一、配体交换手性固定相

所谓配体交换色谱(ligand exchange chromatography, LEC)是指在形成离子络合物的空间内形成络合键的同时,固定相与被拆分的分子之间发生了一种内部相互作用,这种相互作用是通过金属络合物的络合空间来完成的,是连于中心金属离子上的配位体的交换过程,可用下式表述^[42]



其中 R、AA、S、分别表示高分子相、氨基酸以及流动相中的配体。配位体和金属离子所形成的络合物必须易于断裂和再生,这样才有利于配体交换的进行。

键合的配体交换填料经常被用于分离氨基酸对映体。Dacankov^[43]曾报道将氨基酸和 N', N'-二苄基-1, 2-丙二氨键合至聚苯乙烯和聚丙烯酰胺树脂,以 Cu(II) 和 Ni(II) 作为络合金属,这些材料尽管表现出良好的对映选择性,但拆分效率不高。因此,他转而研究将手性螯合试剂键合于硅胶微球以制备配体交换色谱填料^[44,45]。通常,氨基酸被用作键合的手性配基,其中 L-脯氨酸和 L-羟脯氨酸是最常用的^[46~51]。

不同的中心离子所产生的拆分结果的差别往往会很大,常见中

心离子拆分能力的顺序是： $\text{Cu(II)} \gg \text{Ni(II)} > \text{Zn(II)} > \text{Cd(II)}$ ，故 Cu(II) 常作为络合金属^[51~53]。但是，当螯合物固定至硅胶表面时，活性位点的可接近性可能会影响交换过程。而且，当键合配体彼此太靠近时，螯合作用可能会发生于相邻配体之间而不是与溶质。这种螯合作用的不均一性可能导致宽而不对称的色谱峰。不同的研究者均曾指出，过多的作用位点不利于手性分离，通过消除多余的作用位点可使 CSPs 有更好的选择性，更小的保留和更好的峰形^[54~56]。此外通过改变手性配体的间隔臂亦可以得拆分能力不同的 CSP^[57]。

除硅胶外，高分子小球也常被用于手性填料。何炳林（离子交换与吸附，1992，8 [1]：63~69）曾把高分子为基体的配体交换手性固定相分为聚苯乙烯系、聚丙烯酰胺系、聚丙烯酸酯系、聚乙烯胺以及聚乙烯吡啶系手性固定相，并对它们的拆分机理进行了描述。Davankov 也曾对配体交换手性固定相中保留、对映选择性和效率的相互关系的理论预测进行了综述，感兴趣的读者可以一阅^[58]。

冠醚类手性固定相是另一类重要的配体交换手性固定相。冠醚能够和一定的金属离子形成包容性络合物，手性试剂与其中的金属离子相互作用，从而使对映体，例如多种氨基酸、胺类化合物、芳香族异构体及同系物等得到成功的拆分^[59~62]。通常所用的冠醚是 18-冠-6 的衍生物，将其键合于高分子基质或硅胶上，对映体由于与衍生基团以及冠醚孔穴内金属离子作用力的不同而得到拆分。但是，与其他手性填料相比，昂贵的价格限制了冠醚的更广泛应用，故近年来这方面的报道较少。

二、高分子型手性固定相

早期用于拆分对映体的基体材料一般是羊毛，葡聚糖等天然的光学活性物。随着立体化学的发展和离子交换树脂的广泛应用，一系列具有手性中心的合成聚合物也被用于拆分药物、酸类、酰胺类化合物^[63~65]。

所使用的高分子基球有：单分散（缩水甘油甲基丙烯酸-Co-亚乙基而异丁烯酸酯^[66]）、一锅法制备的单分散聚甲基丙烯酰胺球^[67]、聚硅

氧烷^[68]、光学活性聚氨基甲酸酯^[69]以及聚苯乙烯^[70]等。均可以得到较好的对映选择性，并易于实现大规模制备分离。

分子印迹在手性识别方面具有巨大的潜力。早在 1949 年就有人提出，有可能利用在网状高分子化合物中形成一个手性腔而产生手性识别能力^[71]。到 20 世纪 70 年代，Wulff 等人^[72]将旋光化合物（或称作模板化合物）加入到大分子单体中，经交联聚合形成高聚物，再用溶剂除去聚合物中的未参与聚合的模板化合物，形成手性印迹，以产生手性识别能力。此后，在发展新型分子印迹手性识别材料方面取得了不少进展^[73,74]。除用于手性化合物的拆分外，用于氨基酸、多肽和蛋白质分离的 MIP 亦有报道^[75,76]。

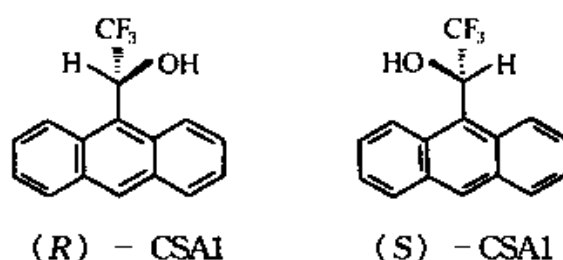
许多立体规则的高分子在固态时具有螺旋构象，有些甚至在溶液中也维持这种构象。螺旋结构是手性的，因此，具有螺旋形构象的螺旋高分子也具有手性识别能力^[77]。已有几种高分子，包括聚甲基丙烯酸酯和多糖衍生物等在实践中被用于光学活性体的手性分离^[77~80]。许多对映体，其中包括光学活性的聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚异氰酸酯等。带有单手螺旋构象占主体的光活性聚异氰酸酯识别溶液中对映体能力最佳。此外，带有手性腔高分子也可用于基于分子识别的色谱分离^[81,82]。

三、键合及涂敷型手性固定相（CSP）

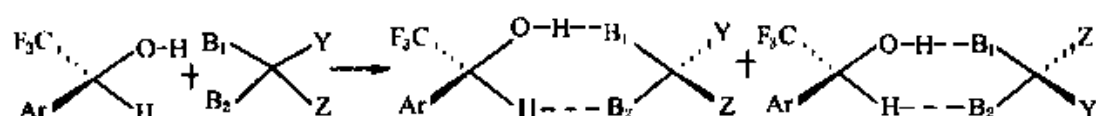
键合及涂敷型手性固定相在手性色谱中占有重要地位。在这类填料中，可以将具有手性识别作用的配基，通过稳定的共价键连接或以物理方法涂敷于适当的固相载体上，以制备出手性固定相。这类填料的载体，可以是任何适宜种类、适宜形状的固体材料，如有机高分子小球、粉末、膜以及硅胶材料等。按其配基的种类，可以将它们分为不同的类别。下面，分类加以介绍。

（一）Pirkle 型手性固定相（刷型手性固定相）

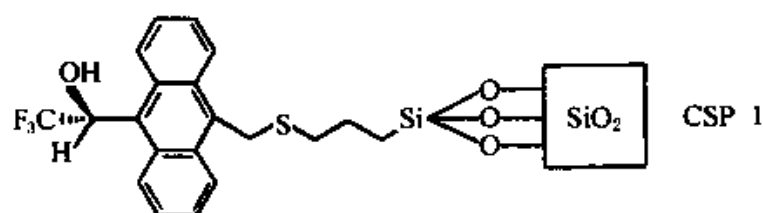
1966 年，Pirkle 等发现，当加入手性溶解试剂（CSA）时，由对映体产生的 NMR 信号发生改变^[83]。这一发现，导致了新型手性固定相的发展。当时他们所用的 CSA 代表化合物为



它们与手性溶质的作用方式为

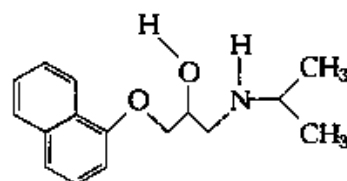


这种作用方式提示人们, 可以将单一的对映体固定于硅胶上, 以提供分离对映体的 CSP^[84,85]。

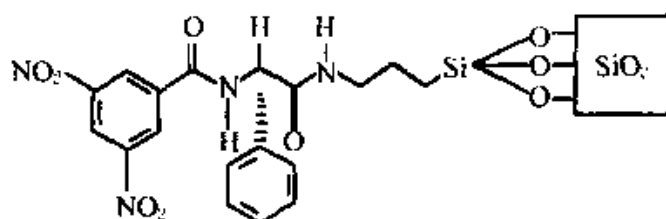


自 Pirkle 实验室开创性地进行手性固定相的研究以来, Pirkle 型固定相成为刷型固定相类的统称, 在色谱工作者共同努力下, 这类固定相得到了不断的发展与创新。

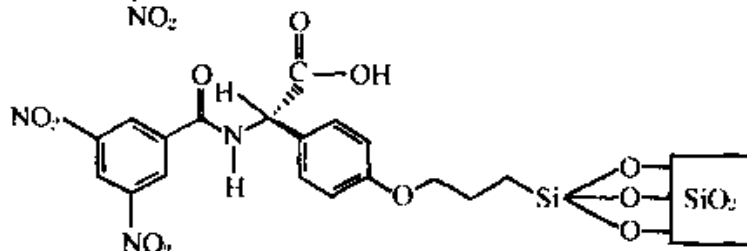
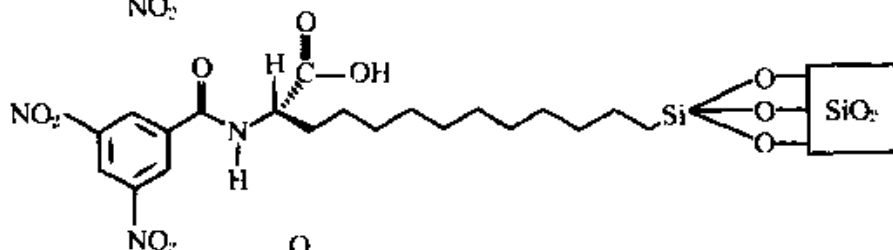
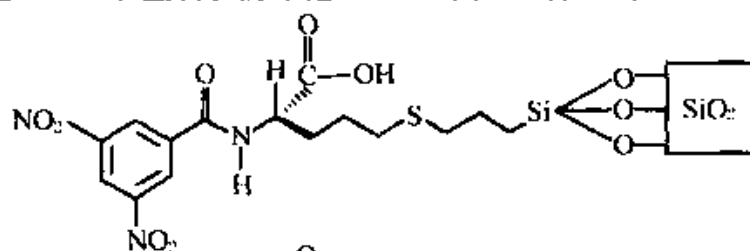
CSPs 的早期, 发展出二硝基苯甲酰胺基酸 CSPs、乙内酰脲衍生 CSPs、N-芳基氨基酸衍生 CSPs、二苯并 [c] 呋喃酮衍生 CSPs 以及 DNB-氨基酸 CSPs 等手性填料, 并对其结构, 拆分机理等进行了研究。在实际应用方面, 也设计了一系列的手性配基以分离具有重要经济和科学意义的外消旋体^[86]。例如蔡心安 (propranolol) 对映体是一类重要的 β -阻断类药物 (下图)



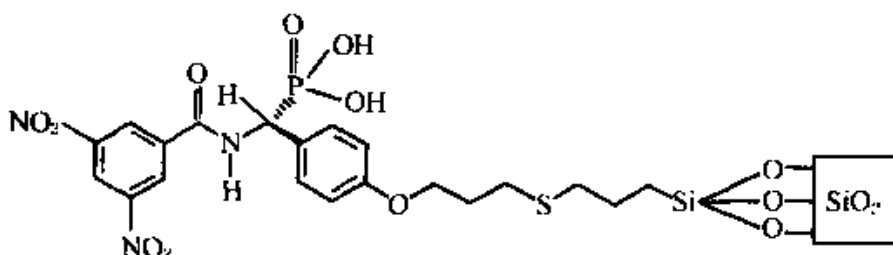
并可以在 DNB-苯基甘氨酸衍生 CSP (见下图) 上获得拆分。



除上述 DNB-苯基甘氨酸衍生 CSP 外, 还有几种 DNB-氨基酸衍生 CSP



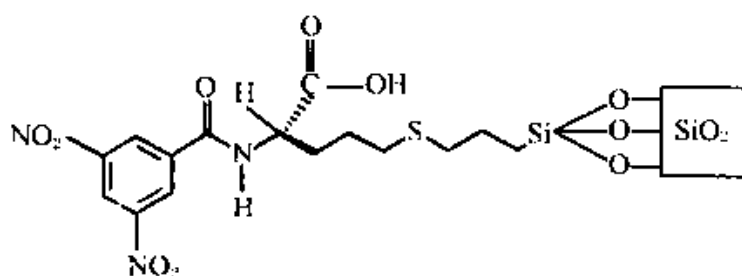
它们的配基分子中的羟基是自由的和离子化的, 这样, 便可以通过 π - π 、氢键以及静电相互作用, 对未衍生化的萘心安进行手性分离, 且其洗脱顺序及相互作用模式可以预测。在上述手性固定相上, 其他几种的 β -阻断剂也可以得到拆分。然而, 由于静电相互作用相对较强, 因而上述化合物的保留相对较长, 峰形也较差。为了改善这种情况, 发展了氨基酸衍生 CSP:



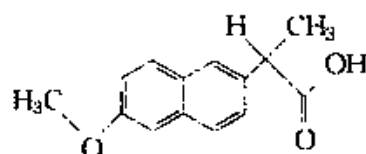
在氨基酸衍生 CSP 中, 由于磷酸根阴离子上的电荷更分散, 使静电相互作用相对较弱, 应该有利于萘心安的拆分。但遗憾的是恰恰相反, 它对萘心安对映体具有强的保留, 但如磷酸根 OH 上的一H 被 $-\text{CH}_3$ 所取代, 则保留会大大降低, 且分离亦得到改善^[87]。

在 CSP 的设计中, 芳香基团经常可作为氢键或 $\pi-\pi$ 相互作用位点。因此, 上述 CSP 上的芳环被具有位阻效应的基团取代后, 便能极好地拆分萘心安和大量 β -阻断剂的对映体。这种 CSPs 已经被商品化, 商品名为 α -Burkel CSP (Regis)。

另一种特异性 CSP 例子, 是为拆分非甾体抗炎药物 (NSAID) 和萘普生 (naproxen, 又名甲氧萘丙酸) 而设计的手性填料。NSAIDs 和萘普生的酰胺衍生物, 可以使用 β -GEMI CSP 进行拆分 (下图)^[88]

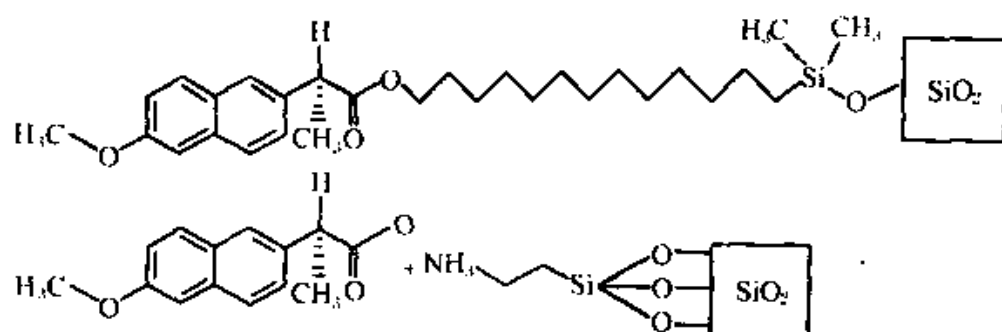


随后研究证实, 在一给定的流动相条件下, 奈普生的对映体可以不必衍生而直接在这种 CSP 上拆分。奈普生具有以下结构

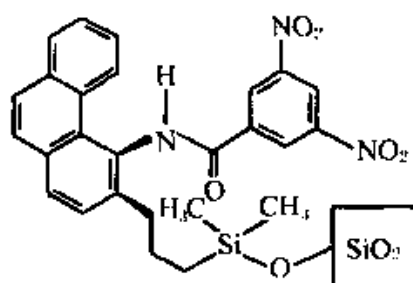


奈普生

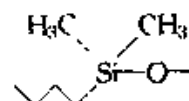
根据对映互补的原则, 通过将单个奈普生分子的对映体固定化, 制备出两种 CSPs: 一种通过酯键将奈普生联至间隔臂分子上; 另一种是通过离子键将奈普生与氨基间隔臂相连, 如下图这两种 CSPs 均可以拆分几种 π -酸性光活性溶质, 但下一种 CSP 对奈普生对映体分离的对映选择性达 $\alpha = 2.25$, 优于任何先前发展的奈普生的 CSPs^[89], 此外, 结构相关的 NSAIDs, 如布洛芬 (ibuprofen)、



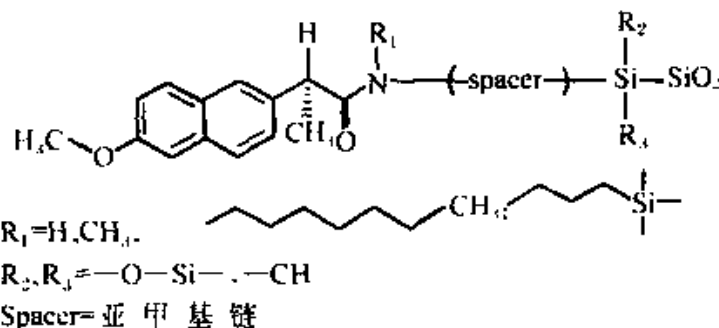
优洛酚 (ketoprofen)、氟联苯丙酸 (flurbiprofen) 也可以在其上拆分。而另一种短间隔臂的 CSP 则可以很好地拆分 NSAIDs 对映体, (商品名 Whelk-O, CSP.)



在 CSPs 中消除非特异性吸附位点是十分重要的, 在下图中, 当 R₁ 不是 H 时, 在分离 π -酸性消旋体时, 其对映选择性增高, 当 R₁ =



时, 对映选择性达到最高。所有这一系列以酰胺键联接的 CSPs, 其色谱行为要优于以酯键或离子键联接的 Naproxen CSPs, 这种增强了的对映选择性可能来源于酰胺键上的羰基 (氢键作用)。



Hyun 等合成了具有 π -酸性和 π -碱性两种位点的 CSP。其中一

种是由 (R) 或 (S) - α -萘乙胺和 (S) - 奈普生 (Naproxden) 制备的, 因此, 它有两个手性中心。利用这种 CSPs, 可以成功地拆分类似于 α -芳基丙酸抗炎药的 3, 5-二硝基-N-酰苯胺衍生物^[90]。

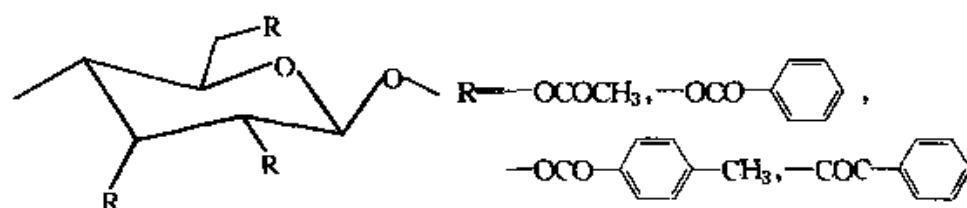
(二) 多糖类手性固定相

多糖, 如纤维素和直链淀粉是最容易得到的光学活性高分子, 而且, 它可以很容易地被修饰, 生成如多糖三酯和三氨基甲酸酯衍生物^[91]以制备 CSPs。环糊精, 则是另一大类具有手性识别能力的手性配基^[92,93]。

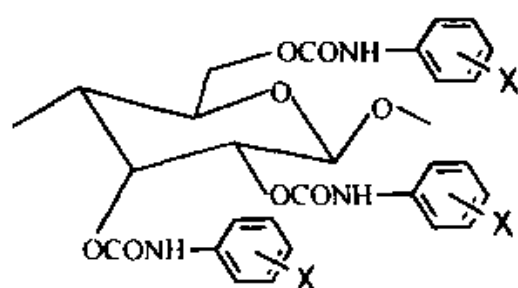
下面对多糖类 CSPs 分别加以介绍。

1. 纤维素类

纤维素和直链淀粉是最容易得到的大天然光学活性高分子。这些多糖本身都具有手性识别能力^[94~96]。但是, 它们没有直接实用价值, 通过化学衍生, 却能制备出具有实用价值的 CSPs, 1973 年出现的微晶纤维素三乙酸酯 (MCT) 即是一例^[97]:



它的手性识别能力来源于天然纤维素的晶体结构。当 MCT 溶于溶



X =

- | | |
|--|---|
| 1. 4-CH ₂ O | 12. 3-CH ₃ |
| 2. 4-C(CH ₃) ₃ | 13. 2-CH ₃ |
| 3. 4-CH ₃ | 14. 3, 4-(CH ₃) ₂ |
| 4. 4-C ₂ H ₅ | 15. 3, 5-(CH ₃) ₂ |
| 5. 4-CH(CH ₃) ₂ | 16. 2, 6-(CH ₃) ₂ |
| 6. H | 17. 3, 4, 5-(CH ₃) ₃ |
| 7. 4-Br | 18. 3, 5-Cl ₂ |
| 8. 4-Cl | 19. 3, 5-F ₂ |
| 9. 4-F | 20. 3, 5-(CF ₃) ₂ |
| 10. 4-CF ₃ | 21. 4-N=N-C ₆ H ₅ |
| 11. 4-NO ₂ | |

剂并吸附于硅胶上时,其手性识别能力则与原来的 MCT 有了差异。有几种消旋物的洗脱顺序产生了颠倒现象^[98]。这种手性识别上的变化与纤维素三乙酸的不同构象有关。这些结果清楚地表明大分子, CSP 的光学分辨能力在很大程度上依赖于它们的高级结构。具有芳环的化合物特别易于在其上拆分^[99], 据推测, 消旋化合物可能是嵌入了 MCT 链上的手性腔而达到手性识别的。

在各类纤维素酯中, 吸附于大孔硅胶上的纤维素三苯甲酸酯及其衍生物显示出了高手性识别能力^[100]。苯甲酸酯衍生物的光学分辨能力, 依赖于苯基上的取代物, 衍生物的最重要的吸附位点可能是羰基, 且其极性随苯环上取代物的不同而改变。衍生物可能与具有羰基团的消旋化合物产生偶极-偶极相互作用, 而与具有羟基的化合物则通过氢键产生相互作用^[101]。如果苯甲酸酯具有给电子取代基, 如 $-\text{CH}_3$, 则比具有吸电子基, 如 $-\text{Cl}$ 的苯甲酸酯具有更高的手性识别能力。此外, 羰基氧上电子密度的增加, 可能也起重要的作用。因此纤维素的 3- 或 4- 甲基苯甲酸酯能拆分各类消旋物^[78]。此外, 这些衍生物的手性识别能力也会受到制备过程的影响, 其原因也是由于 CSPs 的高级结构受到影响所致。在纤维素衍生物中, 其氨基甲酸酯衍生物在手性 HPLC 分离中亦有重要的应用。纤维素三(苯基甲酸酯)(CTPC)及其衍生物, 可以方便地由纤维素与相应的苯异氰酸酯衍生物制备出来, 将其涂敷至硅胶上, 即得到用于 HPLC 的 CSPs^[102]。苯基氨基甲酸酯的光学分辨能力, 同样也依赖于苯环上的取代基, 具有给电子基, 尤其是特丁基的衍生物^[103]或吸电子基如卤素的衍生物, 比非取代的苯基氨基甲酸酯衍生物显示出更高的手性识别能力。CTPC 上最重要的吸附位点可能是邻近手性糖单元的氨基甲酸酯残基, 而且这种残基的极性肯定受到苯环上取代基的影响。如果将给电子取代基引入苯环, 羰基上的电子密度将会增加, 而如果引入吸电子基, 则 $-\text{NH}$ 基团的酸性将会变得更高。具有极性基团的消旋物与氨基甲酸酯残基之间的识别, 可能主要是通过氢键相互作用而达到的。

在纤维素苯基氨基甲酸酯系统中, 规整的高级结构有利于获得

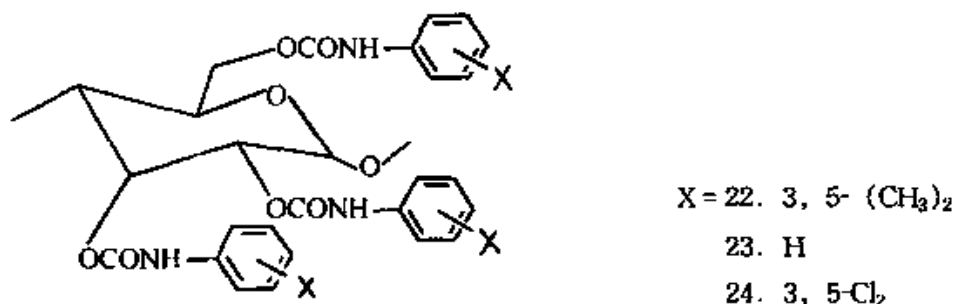
高的手性识别能力,而不规整的高分子则总是难以达到有效的分离。

在上述纤维素苯基氨基甲酸酯中,纤维素三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)(15, chiralcel OD)显示出很高的光学分辨能力,提供了有实用价值的 CSP。这种 CSP 在含有己烷和 2-丙醇的洗脱体系中是较稳定的,将其用于 510 种消旋物的拆分,大约有 62% 可以得到完全分离。除己烷-2-丙醇流动相外,水-乙氰(含高氯酸)混合体系在拆分几种药物(如 β -阻断类药物)时亦可用作流动相^[104]。

对纤维素三(苯基氨基甲酸酯)的 X 射线分析结果表明,带有极性氨基甲酸酯的手性螺旋沟槽存在于其主链上。如果某一消旋物可进入这种沟槽,则消旋物就可被有效地拆分成对映体。为达到有效的分离,螺旋结构必须具有高度的规整性。给电子基团(如甲基),可以对上述螺旋构象起稳定作用。

2. 直链淀粉类手性固定相

将直链淀粉键合至硅胶上,并将直链淀粉上的羟基转化成氨基甲酸酯基,可以有效地分离某些消旋物。直链淀粉苯基氨基甲酸酯及其衍生物(见下图)也可以用作 CSPs^[105]。



其中三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)衍生物 22 (chiralpak AD), 对大多数消旋物均具有极高的手性识别能力。直链淀粉衍生物的光学分辨能力与相应纤维素的衍生物是不同的,两者互为补充,但对手性识别最重要的吸附位点也是氨基甲酸酯残基。

纤维素和直链淀粉衍生物在手性识别中的不同是由于糖残基的不同结构和高级结构的不同。直链淀粉同样对广泛范围内的消旋物

可以完全拆分。

由于纤维素的烷基氨基甲酸酯, 如 CH_3 -和 $\text{iso-C}_3\text{H}_7$ 基取代的氨基甲酸酯的手性分辨力较低, 故应用较少, 但纤维素和直链淀粉的芳烷基氨基甲酸酯却表现出高的手性识别能力。

在纤维素衍生物 (图 5-17) 中, 26 和 27 比其他衍生物的手性识别能力更高, 直链淀粉亦具有类似的结果。这表明, 仅 1-苯乙基和 1-苯丙基有利于保持多糖衍生物的高级结构, 因而有利于达到有效的手性识别。此外, 取代基 R -的手性 1-苯乙基的手性对手性识别也会产生影响。(R)-26 比其他衍生-26 具有更高的手性识别能力; 对直链淀粉衍生物来说, (S)-31 优于其他 31 的衍生

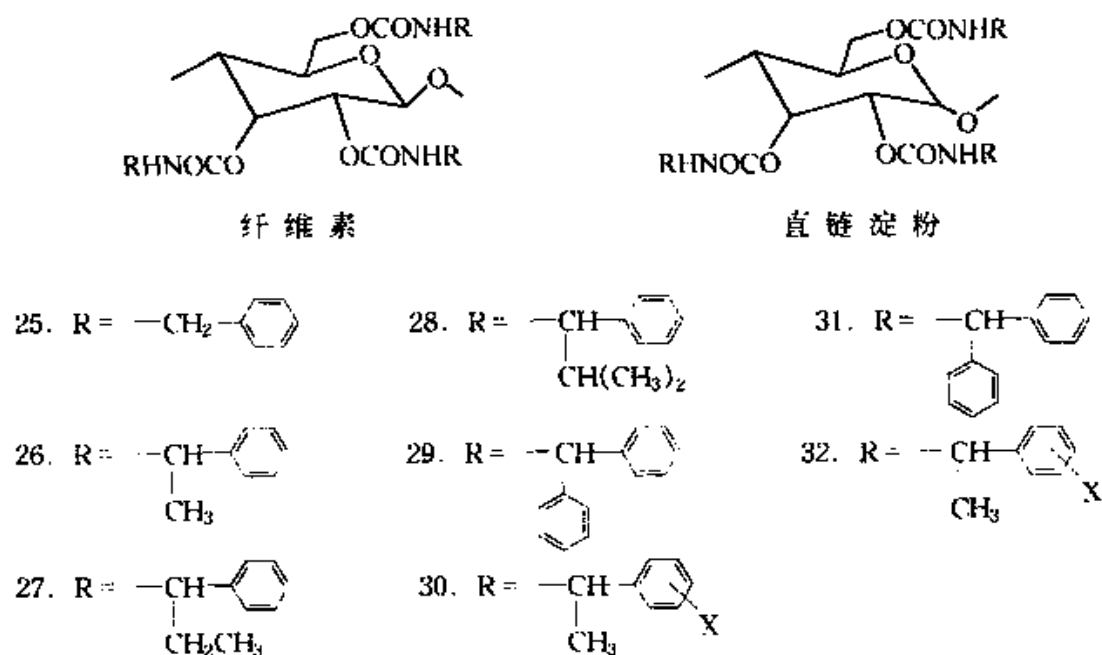


图 5-17 纤维素 (25~30) 和直链淀粉 (31、32) 的芳烷基甲醇酯物。从这里也可以看出高级结构不同对手性分离的影响。在这些芳烷基氨基甲酸酯中, 直链淀粉衍生物 (S)-31 (chiralpak AS) 通常能显示出对许多不同的化合物具有极高的光学分辨能力, 许多不能在多糖类苯氨基甲酸酯衍生物上拆分化合物, 可以在这种固定相上得到拆分。

目前, 使用多糖类氨基甲酸酯以及苯甲酸酯衍生物的 CSPs,

已有一些商品手性柱可供选择（表 5-7）。

表 5-7 商品手性柱

多糖类衍生物	商品名	经销商
微晶纤维素三醋酸酯	Chiralcel CA-1 Cellulose triacetate Cellulose Cel-Ac-40xF	Daicel Merck Macherey -Nagel
纤维素三醋酸酯（涂敷至硅胶）	Chiralcel OA	Daicel
纤维素三苯甲酸酯（涂敷至硅胶）	Chiralcel OB	Daicel
纤维素三苯氨基甲酸酯（涂敷至硅胶）	Chiralcel OC	Daicel
纤维素三（3, 5-二甲苯基）氨基甲酸酯（涂敷至硅胶）	Chiralcel OD	Daicel
	Chiralcel OD-R	Daicel
纤维素三（4-氯苯基）氨基甲酸酯（涂敷至硅胶）	Chiralcel OF	Daicel
纤维素三（4-甲苯基）氨基甲酸酯（涂敷至硅胶）	Chiralcel OG	Daicel
纤维素三（4-甲苯基）甲酸酯（涂敷至硅胶）	Chiralcel OJ	Daicel
纤维素 tricinnamate（涂敷至硅胶）	Chiralcel OK	Daicel
直链淀粉三（3, 5-二甲苯基）氨基甲酸酯（涂敷至硅胶）	Chirapak AD	Daicel
直链淀粉三〔（S）-1-苯乙基氨基甲酸酯〕（涂敷至硅胶）	Chirapak AS	Daicel

3. 环糊精类手性固定相

糊精是淀粉的部分水解产物，它会在 CD-糖基-转移酶的作用下生成环糊精。环糊精（CDs）则是含有以 α -1, 4-联接的 β -吡喃葡萄糖单元的环状非还原寡糖。目前，常见的环糊精有三种，最小的是 α -CD（六个葡萄糖单元），其次是 β -CD（七个葡萄糖单元）和 γ -CD（八个葡萄糖单元），它已被广泛用于 HPLC 的手性固定相的制备或作为 HPLC 及毛细管电泳（CE）中的手性添加剂。

在 CDs 中，糖采取⁴C₁ 椅式构象，自我定向，因此分子形成一复曲面或空心去锥顶的结构。许多水溶性及非水溶性化合物均可以恰好填入其中而形成包结络合物。表 5-8 给出 CDs 的衍生 CDs 的物理和化学特征^[93]。

表 5-8 未衍生以及衍生 CDs 的物理和化学特征

物 化 性 质	α -CD	β -CD	γ -CD	甲基化 β -CD ^①		2-羟丙基化 β -CD	
				RAMEB	DM	HPBCD-2-7	HPBCD-4-6
分子质量	972	1135	1297	1317	1331	1292	1384
糖单元数	6	7	8	7	7	7	7
腔体积/nm ³	1.74	2.62	4.27	-	-	-	-
外径/nm	1.37	1.53	1.69	-	-	-	-
腔直径/nm	0.57	0.78	0.95	-	-	-	-
深度/nm	0.79	0.79	0.79			1.0-1.1	
水中溶解性 0.08g/ml(25℃)	14.5	1.85	23.2	>100	>50	>33	>33
每 CD 单元取代数	-	-		~13	14	~27	24.6

① RAMEB randomly methylated β -CD; DM — heptakis (2, 6) - di - methyl β -CD。

在 β -CD 中, 有 21 个羟基可以进行化学修饰。修饰基团可以是: 烷基、羟烷基、氨基、巯基、糖基、麦芽糖基、甲基、羟乙基、羟丙基、乙酰基等。通过修饰, 可以达到种种不同的目的:

- ① 改善 CD 衍生物的溶解性;
- ② 改善 CD 与客体分子间的适配程度, 增加客体分子的稳定性, 从而减少反应性及流动性;
- ③ 将特殊基团联至键合位点上;
- ④ 将 CD 固定化在高分子、硅胶等基质上, 用作色谱填料。

在数千种 CD 的衍生物中, 主要的产品是高水溶性的甲基化 CD 和 2-羟丙基化 β -CDs。但一些小品种的产品也都可以由制造商提供。孔穴外的羟基的衍生, 不会影响 CD 分子的基本构象, 因而也不会明显干扰客体分子的嵌入。

β -CD 分子是最佳尺寸的络合模板。客体溶质分子与其疏水孔穴之间通过范德华力产生相互作用。大多数情况下, 孔穴内的键合不会产生明显的手性选择性, 因此其他位点对获得手性识别能力来说就显得必需了。孔穴是相对疏水的而其外表面是亲水性的。 α 、 β 、 γ -CDs 的空间尺寸不同, 其手性选择性亦有所不同。

CDs 在 HPLC 中已得到了广泛应用^[93]。CD 键合 CSP 可于正相、反相等色谱模式。Hargitai 等^[106]对用于 NP-HPLC 的 13 种 3, 5-二甲苯基氨基甲酰化的 β -CD CSP 的研究表明, β -CD 上取代的程度越大, 其手性选择性就越大。

4. 其他多糖类手性固定相

木聚糖 (xylan)、curdlan、聚氨基葡糖 (chitosan)、葡聚糖 (dextran)、葡粉 (inulin) 等的衍生物也曾被用于 CSPs。在上述衍生物中, 木聚糖 (xylan) 的衍生物显示出了很高的手性识别能力^[107]。此外, 低聚麦芽糖的 1-(1-萘基)-乙基氨基酸衍生物键合硅胶, 不仅可以用于一些 3, 5-二硝基苯氨基甲酰化的醇的拆分, 也可以用于分离 3, 5-二硝基苯甲酰衍生的胺和氨基酸^[108]。一种新的磺化 β -环糊精 CSP, 可以成功地拆分 33 种对映异构体, 包括抗组织胺, 抗抑郁剂和苯基乙内酰脲等。

(三) 其他手性固定相

将大环糖肽抗生素共价键合至硅胶上, 对未衍生氨基酸、多肽、2-羟基羧酸以及包括环酰胺和胺在内的许多中性分析物都具有良好而稳定的光学选择能力^[109]。将叔丁基氨基甲酰化喹啉固定于无孔硅胶上, 可以拆分 *N*-保护的 α -氨基酸^[110]。还有一种有趣的手性配基是大环抗生素, 将其共价键合至硅胶, 可以分离 70 种以上不同结构的手性化合物, 这些 CSP 还表现出了多模式操作的特征^[111]。

由于手性分子本身的手性构象与结构的复杂性, 不可能有一种万能的 CSP 可以同时对所有的手性化合物进行拆分。从文献报道的情况来看, 每一年都会有一些新的 CSP 被制备出来, 或是为了改进原先的 CSP 或是为了某一特定的分离, CSP 必将继续向前发展。

四、蛋白类手性固定相

由于蛋白质分子的独特性, 我们把蛋白类手性固定相单独归为一类。在这个领域中最初的尝试, 是将 BSA 键合至琼脂糖凝胶上, 但效率不高。以大孔硅胶作为基质材料键合以 BSA, 可以大幅提

高效率^[112]，现在已有商品出售。合成多肽亦可以用作手性配基，但这方面的报道相对较少。

蛋白质柱具有广泛的用途。一般情况下，可使用于水溶液体系中。由于蛋白质含有可离子化的基团，在一定的 pH 值下，蛋白质极有可能与溶质通过静电相互作用产生部分键合或络合。许多蛋白质含有疏水区，疏水相互作用对溶质的保留也有很大的贡献。疏水及静电相互作用，使得流动相的选择成为一个相当复杂的问题，但同时也给映异构体的拆分提供了更多的可能性。

用于拆分对映异构体的蛋白质配基有牛血清白蛋白 (BSA)^[113]、人血清白蛋白 (HAS)^[114]、糖蛋白如 α_1 -酸性糖蛋白^[115]、卵粘蛋白^[116]、抗生物素蛋白^[117]、纤维素酶^[118]、胰蛋白酶^[119]、 α -胰凝乳蛋白酶^[120]和溶菌酶等^[121]。此外，伴清蛋白、黄素蛋白、纤维素酶、纤维二糖水解酶以及胃蛋白酶等，均曾被用于 CSPs 的配基并考察了其拆分能力。

蛋白质柱可以对广泛范围内的消旋物进行拆分，但迄今为止，其拆分机理仍处于探索阶段。但是，作为一种重要而有效的手性固定相，必将在对应体的拆分中发挥巨大的作用。

参 考 文 献

- 1 Unger K K. Porous silica. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1979. 187
- 2 Snyder LR. Principles of adsorption Chromatography. New York: Marcel Dekker, 1968. 160
- 3 Kirkland J J and Destefano J J. J Chromatogr Sci. 1970, 8: 309
- 4 Majors. Anal Chem. 1971, 44: 1922
- 5 Sinanoglu O. Molecular Associations in biology. Dyllman B ed. New York: Academic Press, 1968. 429
- 6 Norvath C and Molnar I. J Chromatogr. 1976, 15: 129
- 7 王俊法, 商振华, 郁蕴璐. 高效液相色谱法. 北京: 中国石化出版社, 1992. 125
- 8 Xindu Geng and Regnier F E. J Chromatogr. 1984, 296: 15
- 9 Xindu Geng and Regnier F E. J Chromatogr. 1985, 332: 147
- 10 耿信笃. 现代分离科学理论导引. 西安: 西北大学出版社, 1990.

- 11 Engelhardt H, Orth P. *J Liq Chromatogr.* 1987, 10: 1999
- 12 喻昕, 赵睿, 刘国诠. *高等学校化学学报*. 2000, 21 (7): 1043
- 13 Chappell I, Weigand R J, Zuzelski T J, Jersild C. *LC/GC ASIA PACIFIC*. 2001, 4 (1): 32
- 14 Unger K K. *Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*. New York: Marcel Dekker, 1990. 418.
- 15 Holik H, Marek B J. *Chromatogr.* 1981, 213: 33
- 16 Sentell K B, et al. *Anal Chem.* 1999, 61: 930
- 17 Sander L C, Wise S A. *Anal Chem.* 1987, 59: 2304
- 18 Horvath C, et al. *Anal Chem.* 1967, 39: 1422
- 19 Wheals B B. *J Chromatogr.* 1979, 177: 263
- 20 Cande M, Rosset R. *J Chromatogr Sci.* 1977, 15: 405
- 21 Casassa E E. *J Phys Chem.* 1971, 75: 3929
- 22 Ohison S, et al. *TIBTECH.* 1989, 7: 179
- 23 Phillips D J, et al. *J Chromatogr.* 1991, 536: 95
- 24 Anspach F B, et al. *Anal Biotech.* 1989, 179: 171
- 25 Karin E C, Meir W. *J Chromatogr.* 1987, 397: 187
- 26 Mosbach K, et al. *Anal Chem Series.* 1981, 9: 203
- 27 吴晓军, 刘国诠. *生物物理与生物化学学报*. 1992, 24: 279
- 28 Er-El, Zaidenzaig Z Y, Shalitiel S. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972, 49: 283
- 29 Hofstee B H B. *J Macromol Sci Chem.* 1976, A10: 111
- 30 Kato Y, et al. *J Chromatogr.* 1983, 266: 49; 1984, 292: 418; 1986, 360: 260
- 31 Fausnaugh J L, et al. *Anal Biochem.* 1984, 137: 464
- 32 Chang J P, et al. *J Chromatogr.* 1985, 319: 396
- 33 Rassi Z E, Norvath C. *J Liq Chromatogr.* 1986, 9: 3245
- 34 Miller N T, et al. *J Chromatogr.* 1985, 316: 519
- 35 丁向东等. *分析化学*. 1993, 21 (4): 410
- 36 Tamagai T, Ohmae M, Kawabe K, Tomoeda M. *J Liq Chrom.* 1979, 2: 1229
- 37 Gilbert M T. *High Performance Liquid Chromatography*. IOP Publishing Limited, 1987 296
- 38 Grushka E, Leshem R, Gilon C. *J Chrom.* 1983, 255: 41
- 39 Allenmark S. *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*. 2nd ed. New York: Ellis Horwood, 1991
- 40 Bojarski J. *Chem Anal.* 1997, 42 (2): 139
- 41 Chandwani D, Dhaneshwar S R. *Indian Drugs.* 1996, 33: 187
- 42 袁直, 何炳林. *离子交换与吸附*. 1992, (1): 63

- 43 Davankov V A. *Adv Chrom.* 1980, 18: 139
- 44 Davankov V A, Kurganov A A. *Chromatographia.* 1983, 17: 686
- 45 Davankov V A, Kurganov A A, Bochkov A S. *Adv Chrom.* 1983 22: 71
- 46 Foucault A, Caude M, Oliver L. *J chrom.* 1979, 185: 345
- 47 Gubitz G, Jellenz W, Santi W. *J Chrom.* 1981, 203: 377
- 48 Boue J, Audebert R, Quivoron C. *J Chrom.* 1981, 204: 185
- 49 Rounmeliotis P, Unger K K, Kurganov A A, Davankov V A. *Angew Chem.* 1982, 94: 928
- 50 Rounmeliotis P, Unger K K, Kurganov A A, Davankov V A. *J Chrom.* 1983, 255: 51
- 51 Kurganov A A, Tevlin A B, Davankov V A, *J Chrom.* 1983, 261: 223
- 52 Boue J, Audebert R, Quivoron C. *J Chrom.* 1981, 204: 185
- 53 Charnot D, Audebert R, Quivoron C. *J Liq Chrom.* 1985, 8: 1769
- 54 Feibush B M, Cohen M J, Karger B L. *J Chrom.* 1983, 282: 3
- 55 Welch C. *J Chrom A.* 1994, 666: 3
- 56 Suden K, Hunter C, Lloyd-Jones J G. *J Chrom.* 1981, 204: 195
- 57 Yan H S, Cheng X H, Ni A C, He B L. *J Liq Chrom.* 1993, 16: 1045
- 58 Davankov V A. *J Chrom A.* 1994, 666: 55
- 59 Cram D. C A. 1978, 88: 50938
- 60 Sogak G D Y, Cram D J. *J Am Chem Soc.* 1979, 101: 3035
- 61 Peacock S S, Walba D M, Geata F C A, et al. *J Am Chem Soc.* 1980, 102: 2043
- 62 达式禄, 刘武平. *化学试剂.* 1993, 15 (2): 68
- 63 Blaschke G. *Chem Ber.* 1976, 109: 1967
- 64 Blaschke G. *Chem Ber.* 1975, 108: 1183
- 65 Blaschke G. *Chem Ber.* 1975, 111: 2732
- 66 Liu Y, Sver F, Frechet J M J, Juneau K N. *Anal Chem.* 1997, 69: 61
- 67 Hosoyak, Yoshizako K, Tanaka N, Kinata K, et al. *J Chrom A.* 1994, 666: 449
- 68 Terflath G J, Pirkle W H, Lynam K G, Niccolas E C. *J Chrom A.* 1995, 705: 185
- 69 Kobashi T, Kakimoto M, Imai Y. *Polym J.* 1994, 26 (6), 763
- 70 Yanshima E, Huang S, Okamoto Y. *J Chem Soc Chem Commun.* 1994, 1181
- 71 Pauling I. *Chem Eng New.* 1949, 27: 293
- 72 Wulff G, Vesper W. *Makromol Chem.* 1977, 178: 2817
- 73 Welch C J, *J Chrom A.* 1995, 689: 189
- 74 Remcho V T, Tan Z J. *Anal Chem.* 1999, 71: 248A
- 75 Kempe M, Masbach K. *J Chrom A.* 1995, 691: 317
- 76 Kempe M, Masbach K, *Tetrahedron Lett.* 1995, 36: 3563
- 77 Okamoto Y, Nakano T. *Chem Rev.* 1994, 94: 349

- 78 Okamoto Y, Kaida Y. *J Chrom.* 1994, 666: 403
- 79 Yashima E, Okamoto Y. *Bull Chem Soc Jpn.* 1995, 68: 3289
- 80 Okamoto Y, Hatada K. *J Liq Chrom.* 1986, 9: 36
- 81 Okamoto Y, Yashima E. In *Chromatographic Polymeric Separations Based on Molecular Recognition*. Jinno K. Ed. New York: Wiley - VCH, 1997. 239
- 82 Okamoto Y, Yashima E. *Macromolecular Resin of Polymeric Materials. Plast Eng.* 1994, 40: 731
- 83 Pirkle W H, Hoover D J. In *Wilens S, Eliel E. Topics in Stereochemistry. Vol 13*, New York: Wiley, 1982. 263
- 84 Pirkle W H, House D W. *J Org Chem.* 1979, 44: 1759
- 85 Pirkle W H, House D W, Finn J M. *J Chrom.* 1980, 192: 143
- 86 Pirkle W H, Welch C J, Burke J A, Lamm B. *Anal Proc.* 1992, 29: 225
- 87 Pirkle W H, Pochapsky T C, Mahler G C, et al. *J Org Chem.* 1986, 51: 4991
- 88 Pirkle W H, Murray P G. *J Liq Chrom.* 1990, 13: 2123
- 89 Pirkle W H, Welch C J, Lamm B. *J Org Chem.* 1992, 57: 3854
- 90 Hyun M H, Jin J S, Na M S, Jyung K K. *Bull Korean Chem Soc.* 1995, 16: 344
- 91 Oguni K, Oda H, Ichida A. *J Chrom A.* 1995, 694: 91
- 92 Maccarrone G, Rizzarelli E, Vecchio G. *NATO ASI Ser C.* 1994, 448: 51
- 93 Bressolle F, Audran M, Pham T-N, Vallon J-J. *J Chem B.* 1996, 687: 303
- 94 Yuasa S, Shimada A, Karneyama K, Yasui M, Adzuma K. *J Chrom Sci.* 1980, 18: 331
- 95 Fuku-hara, Isoyama M, Shimada A, Itoh M, Yuasa S. *J Chrom.* 1987, 387: 562
- 96 Gubitz G, Jellenz W, Schomleber D. *J High Resolut Chromatogr Commun.* 1980, 3: 31
- 97 Hesse G, Hagel R. *Chromatographia.* 1973, 6: 227
- 98 Ichida A, Shibata T, Okamoto I, Yuki Y, Namikashi H, Ito Y. *Chromatographia.* 1984, 19: 280
- 99 Mannschreck A, Koller H, Wernicke R. *Kontakte.* 1985, 1: 40
- 100 Ichida A, Shibata T, Okamoto I, et al. *Chromatographia.* 1984, 19: 280
- 101 Wainer I W, Alimik M C. *J Chrom.* 1986, 358: 85
- 102 Okamoto Y, Kawashima M, Hatada K. *J Am Chem Soc.* 1984, 106: 535
- 103 Okamoto Y, Hatada K, Aburatani R, Hatada K. *Chem Lett.* 1989: 715
- 104 Ikeda K, Hamadaki T, Kohno H, Ogawa T, et al. *Chem Lett.* 1988: 1089
- 105 Okamoto Y, Aburatani R, Fukumoto T, Hatada K. *Chem Lett.* 1987: 1857
- 106 Hargitai T, Kaida Y, Okamoto Y. *J Chrom.* 1993, 628: 11 - 22
- 107 Okamoto Y, Aburatani R, Hatada K, Honda M, et al. *J Chrom.* 1996, 513: 375
- 108 Stalcup A M, Williams K L. *J Chrom A.* 1995, 695: 185
- 109 Armstrong D W, Liu Y, Ekborgott K H. *Chirality.* 1995, 7: 474

- 110 Piette V, Lammerhofer M, Bisschiff K, Lindner W. *Chirality*. 1997, 9: 157
- 111 Armstrong D W, Tang Y, Chen S, Zhou Y, et al. *Anal Chem*. 1994, 66: 1473
- 112 Allenmark S, Bongren B, Boren H. *J Chrom*. 1983, 264: 63 - 68
- 113 Allenmark S. *J Liq Chromatogr*. 1986, 9: 425
- 114 Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, et al. *Chromatographia*. 1990, 29: 170
- 115 Hermansson J. *J Chrom*. 1983, 269: 71
- 116 Miwa T, Ichikawa M, Tsuno M, et al. *Chem Pharm Bull*. 1987, 35: 682
- 117 Miwa T, Miyakawa T, Miyake T. *J Chrom*. 1988, 457: 227
- 118 Erlandsson P, Marle I, Hansson L, et al. *J Am Chem Soc*. 1990, 112: 4573
- 119 Thelohan S, Jadaud P, Wainer I W. *Chromatographia*. 1989, 28: 551
- 120 Wainer I W, Jadaud P, Schombaum G R, et al. *Chromatographia*. 1988, 25: 903
- 121 Haginaka J, Murashima T, Seyama C. *J Chrom A*. 1994, 666: 203

第六章 有机高分子类型液相色谱填料

液相色谱方法，无论是经典的柱色谱（或称柱层析）还是现代的高效液相色谱方法，都是基于样品分子在固定相（即填料或称介质）和流动相（即淋洗液或称洗脱液）之间的特殊相互作用而实现分离的。液相色谱分离技术的实施，除了必要的输液系统，检测系统等设备之外，最关键的还需要有分离柱，分离柱是色谱的技术核心，分离柱填料的研究、选择与应用，是各种液相色谱（包括不同分离模式的分析分离和制备分离）方法赖以建立和发展的基础。

目前常用的液相色谱分离填料，按其所使用的基质材料，一般可分为无机基质和有机基质两大类型。前者诸如硅胶、氧化锆、氧化铝、多孔玻璃、羟基磷灰石、石墨化炭黑等；后者诸如各种多糖型凝胶、各种高聚物树脂等。两大类型基质的填料各有其特点，它们均在液相色谱分离技术中得到广泛应用。本章将较为系统地介绍有机高分子类型的液相色谱填料。

同无机基质的填料相比较，有机高分子类型填料普遍具有以下特征：

① 它们的基质微球可以广泛地选择各种天然的多糖为原料来制备，也可以广泛地使用各种合成的单体和交联剂来制备。这些高分子材料一般都容易进行化学改性处理，所得到的填料普遍具有良好的色谱选择性。

② 它们对于被分离样品有较强的负载能力，有较高的色谱容量。这对于不同规模的制备色谱来说是尤为适宜的。

③ 它们具有良好的耐酸、耐碱和耐溶剂处理的化学稳定性，可以在广泛的 pH 值范围内使用，并且有较长柱寿命和较好的再生能力。

④ 它们不易产生不可逆的非特性吸附作用，特别对于生物大

分子的分离有较好的相容性，能有效地保持样品的生物活性。

诸多优点，决定了有机高分子类型填料广阔的应用发展前景，尤其是对于分离纯化生化物质所表现出的良好性能，已越来越受到研究者和应用者的重视。在最近的 10 多年里，随着合成技术的进步，许多性能优异的新一代高效填料竞相出现，促使整个液相技术获得了长足发展。有关这方面的进展情况，在一些周期性的综述文章中均有所评论，并较系统地给出了相应的参考目录^[1~17]。

当然，需要指出的是，有机高分子类型填料的颗粒刚性还普遍不如无机基质填料那样好，孔结构也往往比较复杂，在淋洗体系的变化过程中可能或多或少地产生膨胀或收缩现象，所有这些影响色谱性能的因素，仍有待于进一步研究解决。

第一节 有机高分子类型填料的结构特征

一、填料的物理结构

在色谱分离过程中，填料的物理结构（如粒度与粒度分布、孔径与孔径分布、颗粒强度和表观形态等）、是影响色谱动力学行为（如柱效率、穿透性等）的主要因素。所以物理结构对于填料的设计与合成来说，是必不可少的研究内容，对于填料的选择与应用来说，是必不可少的参考依据。

色谱技术对于填料在物理性质方面的基本要求是：①具备合适的颗粒大小和较窄的粒度分布范围，当然最好能实现颗粒单分散；②具备一定的颗粒强度，特别对于高效填料来说，应能满足在高速高压操作条件下使用的颗粒刚性；③若为多孔结构的填料，则应达到一定的孔径大小和孔径分布要求，并且应尽可能避免形态复杂的微孔结构；④在使用的条件下，填料的溶胀或收缩现象不能超出所允许的限制范围。

目前常见的液相色谱填料，按其物理形态，一般分为多孔型、非多孔型和薄壳型三种结构类型。多孔型填料，依其孔径大小，包括小孔（ $<10\text{nm}$ ）、中孔（ $10\sim30\text{nm}$ ）、大孔（ $>30\text{nm}$ ）和超大孔（ $>100\text{nm}$ ）结构的产品。非多孔型填料，其整体颗粒是无孔的。

薄壳型填料，其颗粒表面层是多孔结构的，而颗粒内部则是无孔的。从应用情况来看，高负载量的多孔型填料占据主导地位，特别是带有大孔和超大孔结构的产品，几乎在所有液相色谱分支技术中都得到广泛应用。当然对于体积排除色谱来说，因其是基于分子尺寸大进行分离的，要求填料具有一定的孔径分布范围（即包括大孔、中孔乃至小孔的分布），但对于其他分离模式的色谱技术来说，大孔和超大孔结构的填料更有利于增强传质速率，提高分离柱效，这对于生物大分子的分离是尤为重要的。

有机高分子类型高效液相色谱填料的颗粒大小，视其基质材料、物理形态和使用范围的不同而不同。以合成树脂为基质的产品，其多孔型大都为 $10\mu\text{m}$ 左右，非多孔型一般都 $<7\mu\text{m}$ ，二者的颗粒分布范围都比较窄。甚至是单分散的；以多糖凝胶为基质的产品，大都 $>20\mu\text{m}$ ，粒度分布范围比较宽；多数高效填料都兼备分析分离和制备分离的特点，但对于大规模的分离纯化来说，使用较大颗粒填料更便于操作。

自 20 世纪 80 年代中期以来的 10 多年里，对于有机高分子类型高柱效、高分辨率、高穿透性填料的研究，从物理结构品角度来看，最突出的进展表现在以下三个方面：①颗粒单分散的填料。长期以来，颗粒单分散的高聚物微球，一直是色谱技术所追求的目标，也是其他特殊用途功能高分子材料的研究热点。随着合成技术的进步，以可控颗粒单分散树脂（包括多孔与非多孔型树脂）为基质的新一代填料，已竞相进入液相色谱领域并得到广泛应用，从而促使高效分离技术获得了长足发展。②具有贯穿性超大孔结构的填料。新发展的贯流色谱填料就具有这种结构特征。它的基质是高交联的聚苯乙烯微球，其颗粒内部带有 $600\sim 800\text{nm}$ 可实现对流传质的贯穿孔，在贯穿孔内又连接着 $80\sim 150\text{nm}$ 的扩散孔。这类填料对生物大分子的色谱传质非常有利，高柱效可在 $200\sim 6000\text{cm/h}$ 线速度范围内基本保持不变，而且柱压也很低，所以非常适于高效分离。③小颗粒的非多孔填料。颗粒细小、刚性良好的非多孔型填料，因其没有内孔扩散并基本上避免了微孔吸附等问题，所以柱效

率、分辨率、回收率很高并能很好保持样品的生物活性，是这类产品最显著的特征，用于快速高效分析检测以及微量样品的制备分离，都是十分有利的。

二、填料的化学结构

在色谱分离过程中，填料的化学结构，特别是颗粒表面和内孔表面的化学结构（如连接在基质上的官能基团或链段），是影响色谱热力学行为（如样品的保留值、选择性等）的主要因素。液相色谱技术对其所使用的填料，既要求能在相应色谱模式的淋洗条件下，具有特定选择性分离作用的化学结构，又要求具有良好化学稳定性（包括一定程度的耐酸、耐碱和耐溶剂处理的稳定性）和热稳定性等，同时还要求能够避免不可逆的非特性吸附作用。

不同分离模式的液相色谱填料，按其化学结构（指基质材料表面所连接的官能基团），主要有如下几种类型。

离子交换色谱填料，其颗粒表面主要携带季铵基、二乙氨基、磺酸基、羧基等强弱阴阳离子交换基团。

反相色谱填料，其颗粒表面主要含有 C_{18} 、 C_8 烷基以及苯基等强疏水性基团或链段。

正相色谱填料，其颗粒表面主要含有羟基、氨基、氰基、羧基、醚键等极性基团或链段。

疏水性相互作用色谱填料，其颗粒表面主要含有 C_1 、 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，其颗粒表面结构按所使用的色谱体系不同，可分为亲水性和亲油性两大类，其中用作水相体系的凝胶过滤填料，主要含羟基等亲水性基团。

亲和色谱填料，其颗粒表面携带有诸如蛋白质、抗体、激素、抗菌素、酶等具有生物特异性的配基。

不同填料的化学结构是通过对其基质材料的化学改性而实现的。虽然某些合成的基质材料也可直接应用于色谱，但在大多数情况下还需要根据不同色谱技术的需要，对基质材料通过适当的化学修饰，才能达到所期望的色谱选择性。一般来说，液相色谱技术对于

填料的化学结构要求，不仅仅只限于所携带的色谱选择性基团，而且还要求填料颗粒整体对欲分离样品有良好的相容性，对所使用的淋洗体系有良好的匹配能力。所以对于某些以合成树脂（如交联聚苯乙烯）为基质的填料来说，在其制备过程中还应包括对基质材料表面的改性处理，例如首先对基质树脂表面进行亲水化处理，然后再引入官能基团，这样才能满足填料在水相体系中的使用要求。

第二节 有机高分子类型填料的基质树脂

基质材料（或称载体）是色谱填料的支撑骨架，它直接决定了填料的颗粒大小与分布、颗粒强度、孔径大小与分布、孔结构形态、颗粒内部的化学结构与其稳定性等，也直接影响到对颗粒表面（包括内孔表面）化学修饰方法的实施。常见的有机高分子类型填料的基质树脂，大体上可分为多糖型和聚合物型两大类，前者是以天然多糖化合物为原料，用物理方法加工成微珠并经交联而得到的凝胶；后者是以合成单体与交联剂为原料，用化学聚合方法制得的交联高聚物微球。

一、多糖型基质材料

这类凝胶是典型的亲水性树脂，对于水溶性生化物质有很好的相容性，所以无需改性也可以直接用于凝胶过滤色谱。经典柱层析所用的多糖型凝胶大都是颗粒分布范围宽，颗粒强度低的软胶，只能在常压和低流速下使用。后来随着制备技术的改进，相继出现了颗粒强度较高、颗粒度较小、粒度分布范围较窄，适合于快速高效液相色谱使用的半硬质凝胶。各种多糖型凝胶及其改性产物极为广泛地应用于生化物质的分离纯化，目前在国际市场上以瑞典 Pharmacia 公司的产品占据绝对优势。

（一）葡聚糖系凝胶

由葡聚糖和环氧氯丙烷偶联而成的凝胶，如 Sephadax G 系列产品，是早期出现的典型的软质凝胶。在不同分离范围的 G 型凝胶基础上，引入羟丙基而衍生成相应的 Sephadax LH 系列产品，也属于软质凝胶。这些软质凝胶因其颗粒强度低，粒度分布范围宽，

只适于在普通层析技术中使用。

葡聚糖，如一种称之为 Sephasorb HP Ultrafine 的凝胶，它的结构与分离范围虽然同 Sephadex LH-20 相类似，但其颗粒刚性好，粒度小而分布范围窄（ $10\sim 23\mu\text{m}$ ），所以可用于中低压色谱和高效色谱。又因属于中等极性的树脂，也可直接用作填料分离某些有机小分子。

由烯丙基葡聚糖和 N, N' -亚甲基双丙烯酰胺交联共聚而成的凝胶，主要商品有 Sephacryl 系列。在不同分离范围的 Sephacryl 凝胶中 S-100HR、S-200HR、S-300HR 等型号，其粒度分布范围 $25\sim 75\mu\text{m}$ ，颗粒刚性好，柱反压低，基本属于高效凝胶，可在较高流速下使用。

（二）琼脂糖系凝胶

在琼脂糖系的凝胶中，传统的软胶主要有 Sepharose 系列、Bio-GelA 系列、Ultrogel A 系列等产品。这些偶联琼脂糖凝胶大都机械强度低，颗粒分布范围宽。其商品一般都按照与分离范围相对应的琼脂糖含量来分类，如广泛使用的 Sepharose 系列主要有 2B、4B、6B 等产品。

由 Sepharose 与 2, 3-二溴丙醇反应而成的琼脂糖凝胶，其商品命名为 Sepharose CL。该系列凝胶由于有效地增强了珠体的交联结构，使其颗粒的物理与化学稳定性有了显著提高。又因其对原母体的孔结构并无明显影响，所以相对应的产品仍有 CL-2B、CL-4B、CL-6B 等型号。

在 Sepharose 的基础上，所制备的高度偶联的琼脂糖凝胶，其商品名为 Sepharose Fast Flow。这类凝胶具有较高的机械强度和化学稳定性，从其名称就可以看出，适合于在快流速下使用。产品按其技术指标有 Sepharose 6FF 和 Sepharose 4FF 两种型号，平均粒度为 $90\mu\text{m}$ 。

在 Sepharose 的基础，发展出的高效琼脂糖凝胶，商品称之为 Sepharose High Performance，其平均粒度为 $34\mu\text{m}$ 。

由球状琼脂糖经两次交联而制得的凝胶，其商品称作 Superose。

高交联结构显著提高了颗粒刚性和物理化学稳定性, 粒度小而分布范围窄, 所以属于高效凝胶, 可在高流速下使用, 并具有分离范围宽和分辨率高等特点。按其产品的技术指标, 有 Superose 6 和 Superose 12 两种型号, 粒度为 8~12, 11~15, 20~40 μm 。

将葡聚糖共价结合到交联琼脂珠体上而制得的新型凝胶, 其商品称作 Superdax。该系列凝胶的分辨率好, 选择性高, 颗粒分布范围窄, 柱反压低, 适于在快流速下使用。按凝胶的技术指标, 有分析分离级和制备分离级产品, 其粒度为 13~15、22~44 μm 。

二、聚合物型基质材料

高聚物微球作为色谱填料的基质树脂, 因其可以广泛选择各种单体与交联剂为原料, 并可采用不同聚合方法来制备, 所以聚合产物的结构类型是很多的。同多糖型凝胶相比较, 交联共聚物微球的颗粒骨架结构具有更高的机械强度和化学稳定性, 所以更适合于能以经受高流速高压操作的高效液相色谱使用。常见的合成树脂按其结构形态与性能, 有多孔与非多孔之分, 有疏水性与亲水性之分; 部分树脂也可以不经改性而直接用于色谱分离。

(一) 交联聚苯乙烯树脂

苯乙烯与二乙烯基苯的交联共聚物 (PS-DVB) 微球, 是各种液相色谱技术中应用最为广泛的一类基质树脂。常见的由美国、日本、英国等多家公司所推出的商品, 诸如 Rohm-Haas 的 Amberlite XAD 系列、Hamilton Co. 的 PRP-1 (10 μm)、Hitachi 的 Hitachi gel 3010 与 3011 (10 μm 、25 μm)、Japan Spectroscopies 的 Jasco HP-01 (10 μm)、Mitsubara Chemicals 的 Diaion CHP-3C (10 μm)、Polymer Labs 的 PLRP-S 系列 (8 μm) 等。这些 PS-DVB 微球因其具有良好的颗粒刚性、小而均匀的粒度和适宜的孔径大小与分布, 所以均适于用作高效液相色谱填料的基质材料^[18~21]。

如前所述, 颗粒均匀性呈现单分散的填料和具有贯穿性超大孔结构的填料, 代表了当前高效填料的最新发展水平。这些具备特定物理结构的新一代产品, 其基质树脂大都是高交联的 PS-DVB 微球。

颗粒单分散树脂的制备,在文献中已介绍过许多方法,如种子溶胀聚合法、有机介质中的分散聚合法、微重力环境中连续溶胀聚合法、单体气溶胶的阳离子聚合法、喷射-冷冻成形和辐射聚合法等。相比之下,由 Ugelstad 等人^[22~26]建立的种子溶胀聚合方法,对于制备液相色谱用的颗粒单分散 PS-DVB 树脂更为有效。用这类方法所合成的产品(包括大孔结构产品)作为填料已得到广泛应用;由 Pharmacia 公司先后发展出的颗粒分散高效填料,如 Mono Beads 系列(粒度 $10\mu\text{m}$,包括强阴与强阳离子交换填料)和 SOURCE 系列(粒度 15、 $30\mu\text{m}$,包括阴阳离子交换、疏水层析和反相层析填料),都是以颗粒完全均一的多孔型 PS-DVB 树脂为基质的产品。

所谓贯流色谱填料,是由 Regnier 等人^[27~29]发展出的。前面已经提到,此类填料是以具有贯穿性超大孔结构的 PS-DVB 树脂为基质的。由这种树脂所派生的 POROS 系列产品(粒度 10、 $20\mu\text{m}$),包括反相、离子交换、疏水性相互作用、金属螯合和生物亲和等快速高效填料。

颗粒小而均匀的非多孔型 PS-DVB 微球,也是非常有用的基质树脂,以其所制备的各种分离模式的填料,用于快速高效高分辨的分析检测和小量微量的分离制备,是很有意义的。

我国也相继发展出了各种类型颗粒单分散的多孔(包括大孔与超大孔)与非多孔的树脂。例如,用分散聚合与溶胀聚合相结合的方法,并采用高分子溶液致孔技术,制备出的颗粒单分散并具有大孔超大孔结构的 PS-DVB 微球,或者不经致孔而得到的颗粒单分散非多孔 PS-DVB 微球,以其作为高效填料的基质树脂,同样具有优异的性能^[30,31]。

(二) 交联聚甲基丙烯酸酯类树脂

以甲基丙烯酸的甲酯、丁酯、羟基乙酯、环氧丙酯等化合物为单体,可以制备出多种类型的高联高聚物微球,交联剂既可以使用与单体结构相近的二甲基丙烯酸乙二醇酯,也可以使用二乙烯苯或其他双烯类化合物。这些树脂,无论是疏水性的还是亲水性的,基

本上都可用作色谱填料的基质材料,部分树脂也可直接用于色谱色谱分离。

由捷克 Lachema 公司制备的 Spheron 系列凝胶,是基于甲基丙烯酸羟乙酯和二甲基丙烯酸乙二醇酯的交联共聚物微球^[32~35]。此类凝胶具有良好的亲水性和颗粒刚性,并按其孔径大小而成系列。以其作为高效的凝胶过滤色谱填料,以其作为基质材料而被衍生成的高效离子交换和高效亲和色谱填料,均得到广泛应用。与 Spheron 结构相类似的其他亲水性凝胶,如 Shodex OH Pak^[36]、Hitachi Gel 3020 等产品,也同样得到广泛应用。

颗粒单分散的多孔(或非多孔)型交联聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球,作为性能优异的活性基质材料,已有报道^[37~38]。这类树脂具有良好的化学反应性,在很温和的条件下,就能方便地衍生成适合于不同色谱使用的分离填料。例如,将其环氧基水解开环,就变成亲水性树脂;将其与不同的类型的离子化试剂反应,就可制得相应的强弱阴阳离子交换剂以及螯合树脂;将其与生物亲和配基反应,就可制得相应的亲和树脂等。

(三) 其他类型树脂

由日本 Toyosoda 公司生产的亲水性凝胶,TSK gel PW 系列,是一种含有 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{O}-$ 链段的交联高聚物,即羟基化的聚醚树脂^[36,39,40]。该系列凝胶的颗粒刚性好,粒度分布范围窄,按其孔径大小有多种型号产品。它们无论作为填料还是基质材料,均有优异的性能,直接用于凝胶过滤色谱,可在水相体系中分离多种类型水溶性高分子。特别是大孔结构的凝胶经化学改性所制得的各种高效填料,在离子交换、反相、疏水性相互作用以及生物亲和等色谱技术中,均得到极其广泛的应用。以小颗粒非多孔结构的凝胶 TSK gel NPR 为基质,所制得的各种填料用于快速高效高分辨的分析分离生物大分子,同样具有优异的性能。

此外,多孔结构的交联聚乙烯醇树脂,如 Asahipad GS 系列(包括 GS-310、320、510、520 型号)、Toyopearl 系列(按分子量分离范围分为 6 个型号),多孔型的交联聚丙烯酰胺类树脂,如

Trisacryl 系列 (包括 GF 05、GF 2000) 等, 都是性能良好的亲水性凝胶^[41~45]。交联聚乙烯吡啶树脂, 因其所含吡啶环而呈现弱碱性, 可能直接用作弱阴离子交换填料; 将树脂季胺化, 可得到强阴离子交换填料。

第三节 有机高分子类型填料的性能评价

在第一和第三章中, 对于柱色谱的理论与技术已作了较全面的描述, 本节主要针对有机高分子类型填料的性能评价与表征, 将一些有关的物化参数和色谱参数指标作一简单介绍。

一、填料物化性质的表征

填料颗粒的 d_p (μm) 及其分布, 可使用显微镜观测或使用粒度分布仪测定。

填料的比表面积 S (m^2/g), 一般用 BET 方法测定。

填料的骨架密度 ρ_g (g/ml)、溶剂吸收量 S_r (ml/g)、溶胀因子 f 等参数, 可用文献^[46]所述方法测定。

填料的比孔体积 V_p (ml/g), 可以根据 S_r 、 f 及 ρ_g 值, 按下式求得

$$S_r = fV_p + (f-1) / \rho_g \quad (6-1)$$

填料的孔度 ψ 为

$$\psi = \frac{V_p}{V_p + 1/\rho_g} \quad (6-2)$$

填料的孔径大小及其分布的测定, 通常使用毛细管凝聚法 ($< 30\text{nm}$ 的孔)、压汞法 ($> 30\text{nm}$ 的孔) 以及电镜法等。对于孔的结构形态, 可以使用扫描电镜直接进行观察, 也可以通过色谱行为或其他性质进行间接表征。

填料的化学结构 (如组成、骨架结构、官能基团等) 与化学性质 (如对溶剂的化学稳定性、pH 值适应性、离子交换剂的交换容量等), 可以用常规的化学分析方法及相应的仪器分析手段加以表征。

二、填料色谱性能的表征

虽然不同分离机理的色谱填料各有其特定的性能指标, 但是如

下所述的一系列最基本的色谱参数, 对于任何填料的评价都是有意义的。

(一) 保留值

保留时间 (t_R) 指样品在填充柱中的滞留时间, 若以体积来表示则称保留体积:

$$V_R = t_R \cdot F_c \quad (6-3)$$

式中, F_c 为流动相流速。如果扣除不保留物质的流出时间即死时间 (t_0), 则可得到调整保留值:

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (\text{或 } V'_R = V_R - t_0 F_c) \quad (6-4)$$

容量因子 (k') 是色谱中广泛采用的保留值参数,

$$k' = \frac{t_R}{t_0} - 1 = \frac{t'_R}{t_0} \quad (6-5)$$

在液相色谱技术中 k' 只与固定相、流动相性质及柱温有关。

(二) 选择性

选择性 (α') 表示相邻二物质保留时间的比值,

$$\alpha' = \frac{t_{R(2)}}{t_{R(1)}} = \frac{1 + k'_{(2)}}{1 + k'_{(1)}} \quad (6-6)$$

α' 值是与固定相种类、流动相组成以及温度有关的参数。

(三) 柱效率

目前色谱法广泛使用理论塔板数 (N) 来表示柱效率,

$$N = 5.54 \left[\frac{t_R}{2\omega_{h/2}} \right]^2 \quad (6-7)$$

式中, $2\omega_{h/2}$ 表示色谱峰的半高宽度。或者利用理论塔板高度 (H) 来表示柱率,

$$H = \frac{L}{N} \quad (6-8)$$

式中, L 为色谱柱长度。从理论上解释色谱谱带加宽效应是较为复杂的, 在 HPLC 中通常使用如下方程综合性地描述各种因素对 H 的影响,

$$H = Au^{0.33} + \frac{B}{u} + Cu \quad (6-9)$$

式中, u 为流动相线速度, A 、 B 、 C 分别表示涡流扩散、纵向扩散和固定相传质效应对 H 的贡献。在一些评价色谱柱的文献中, 对于 H 、 u 、 L 等值经常用 Knox^[47] 所推荐的无量纲的折合参数形式来表述。

(四) 填充柱的总孔隙度和穿透性

填充柱的总孔隙度 (ϵ_T), 可由下式计算

$$\epsilon_T = \frac{F_c t_0}{V_c} \quad (6-10)$$

式中, V_c 为空柱体积。柱子的穿透性 (K_1) 定义为

$$K_1 = K_0 \epsilon_T = \frac{u \eta L \epsilon_T}{\Delta P} \quad (6-11)$$

式中, K_0 为穿透性常数; η 为流动相黏度; ΔP 为柱压降。

(五) 分离度

分离度 (R) 被定义为相邻两色谱峰的保留值之差与各自峰底宽度 ($t_{w(1)}$ 和 $t_{w(2)}$) 一半之和的比值,

$$R = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2} (t_{w(2)} + t_{w(1)})} \approx \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{t_{w(1)}} \quad (6-12)$$

按此定义可以推导出,

$$R = \frac{1}{4} (a - 1) \sqrt{N} \left[\frac{k'_{(1)}}{1 - k'_{(2)}} \right] \quad (6-13)$$

式中, $a = t'_{R(2)} / t'_{R(1)} = k'_{(2)} / k'_{(1)}$, 表示相对保留值。由式 (6-13) 可以看出, R 值是分离效能的综合指标。

第四节 有机高分子类型的反相色谱填料

反相色谱 (reversed phase chromatography, RPC) 可以说是液相色谱技术最大的一个分支, 它的分离对象几乎覆盖了所有类型的化合物。目前 RPC 分离柱仍然是以硅胶基质的键合相填料为主体。

特别是键合 C_{18} 、 C_8 烷基以及苯基填料的出现, 使该技术得到长足发展, 被极其广泛地用于各个领域。这类填料的最大特点是颗粒刚性好, 有利于传质, 可以得到很高的柱效, 并有良好的选择性。但是硅胶基质填料的 pH 值适应性一般都限制在 2~8 之间。此外, 当基质表面的硅羟基不能被完全覆盖时, 则可能使欲分离的蛋白质等生化样品失去活性。

高分子基质的 PRC 填料, 目前较为广泛使用的是微球形交联聚苯乙烯树脂。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。此外还有一些其他类型(包括烷基衍生)的高分子基质 RPC 填料, 例如乙酸乙酯共聚物、带有 C_{18} 烷基侧链的聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸烷基酯化物、聚乙烯醇的酯化物、 C_{18} 烷基键合的聚乙烯醇、 C_{18} 烷基衍生的交联聚苯乙烯以及苯基或烷基衍生的羟基化聚醚树脂等。表 6-1 给出了一部分商品化的高分子类型 RPC 填料(一些主要产品的生产厂家见本章第二节介绍)。

表 6-1 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	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 Styrene-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	30, 100	分离蛋白质、肽等
ACT-1	PS-DVB- C_{18}	10		与 C_{18} 键合相填料性能同
Shodex RS pak DS-613	PS-DVB			类似于 C_{18} 键合相填料
Shodex RS 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

续表

名 称	基质材料	粒度/ μm	孔径/ nm	应 用
Polypore RP	PS-DVB	10	8	类似于 C_{18} 键合相填料
Bio Gel PRP 70-5	含 Benzyl 高聚物	5	7	分离高分子和有机物
Bio Gel PRP +	含 Phenyl 高聚物	70	100	分离高分子和有机物
SOURCE 15RPC	PS-DVB	15		在碱性下分离纯化血管紧张肽, 脂肪动员激素及酸性下不稳定的生长因子等
SOURCE 30RPC	PS-DVB	30		
POROS R	PS-DVB	10, 20		快速分离生物大分子,
POROS - C_{18}	PS-DVB	10, 20		在碱性条件下分离血管紧张肽等

这类填料都可以在广泛的 pH 值 (2~12, 甚至 1~14) 范围内使用。从化学结构来看, 树脂表面均有较强疏水作用, 在乙腈-水或甲醇-水溶液的典型反相色谱淋洗条件下, 其色谱性能基本上类似于硅胶基质的烷基键合相填料。

对于多孔结构填料的使用, 应根据被分离样品的分子量大小来选择合适孔径的填料。以多孔型的 TSK gel Phenyl-5PWRP 和 Qc-tadecyl-4PW 两种反相填料为例, 前者适合于分离分子量大于 10000 的大分子化合物, 而后者则对分子量小于 10 000 的较小分子化合物是适宜的^[48]。同样情况, 如果选择 PLRP-S 填料来分离肽类和蛋白质的话, 那么孔径为 10nm 的填料, 大概对于 15~20 个氨基酸长度的肽类是合适的, 孔径为 30nm 的填料, 对于中等分子量的球形蛋白质是适合的; 孔径为 100nm 的填料, 对于较大的球状蛋白质或那些纤维状结构的化合物是适宜的; 而孔径为 400nm 的超大孔填料, 则可分离很大分子量的物质^[49]。图 6-1 出了一种孔径 30nm 的 PLRP-S 填料对蛋白质混合物的分离结果。

在高效的反相色谱填料中, 以 SOURCE 15RPC、30RPC 和 POROS R、 C_{18} 两类树脂的性能最为优异。它们均有很高的负载量, 均可在很高流速下使用, 而且操作压力都很低, 对于快速高效高分辨的分离复杂生物大分子尤为适宜。图 6-2 和图 6-3 表示 POROS

续表

名 称	基质材料	粒度/ μm	孔径/ nm	应 用
Polypore RP	PS-DVB	10	8	类似于 C_{18} 键合相填料
Bio Gel PRP 70-5	含 Benzyl 高聚物	5	7	分离高分子和有机物
Bio Gel PRP +	含 Phenyl 高聚物	70	100	分离高分子和有机物
SOURCE 15RPC	PS-DVB	15		在碱性下分离纯化血管紧张肽, 脂肪动员激素及酸性下不稳定的生长因子等
SOURCE 30RPC	PS-DVB	30		
POROS R	PS-DVB	10, 20		快速分离生物大分子,
POROS - C_{18}	PS-DVB	10, 20		在碱性条件下分离血管紧张肽等

这类填料都可以在广泛的 pH 值 (2~12, 甚至 1~14) 范围内使用。从化学结构来看, 树脂表面均有较强疏水作用, 在乙腈-水或甲醇-水溶液的典型反相色谱淋洗条件下, 其色谱性能基本上类似于硅胶基质的烷基键合相填料。

对于多孔结构填料的使用, 应根据被分离样品的分子量大小来选择合适孔径的填料。以多孔型的 TSK gel Phenyl-5PWRP 和 Qc-tadecyl-4PW 两种反相填料为例, 前者适合于分离分子量大于 10000 的大分子化合物, 而后者则对分子量小于 10 000 的较小分子化合物是适宜的^[48]。同样情况, 如果选择 PLRP-S 填料来分离肽类和蛋白质的话, 那么孔径为 10nm 的填料, 大概对于 15~20 个氨基酸长度的肽类是合适的, 孔径为 30nm 的填料, 对于中等分子量的球形蛋白质是适合的; 孔径为 100nm 的填料, 对于较大的球状蛋白质或那些纤维状结构的化合物是适宜的; 而孔径为 400nm 的超大孔填料, 则可分离很大分子量的物质^[49]。图 6-1 出了一种孔径 30nm 的 PLRP-S 填料对蛋白质混合物的分离结果。

在高效的反相色谱填料中, 以 SOURCE 15RPC、30RPC 和 POROS R、 C_{18} 两类树脂的性能最为优异。它们均有很高的负载量, 均可在很高流速下使用, 而且操作压力都很低, 对于快速高效高分辨的分离复杂生物大分子尤为适宜。图 6-2 和图 6-3 表示 POROS

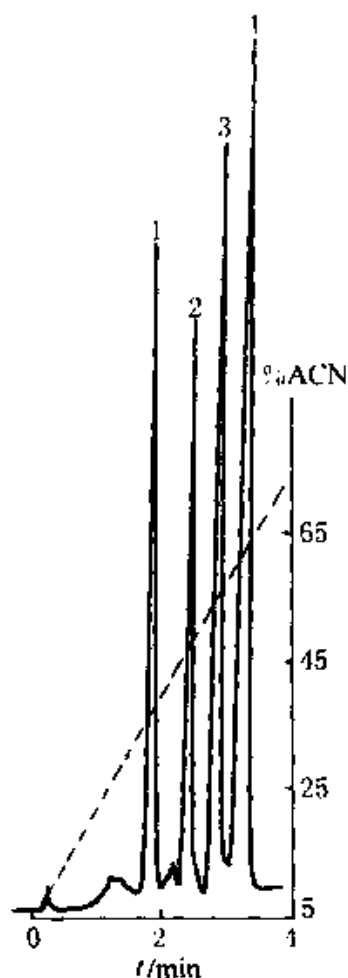


图 6-2 蛋白质混合物样品的 RPC 分离
分离柱: POROS R/M
(100mm × 4.6mm i.d.)
淋洗液 A: 水含 5% 乙腈
+ 0.1% TFA
淋洗液 B: 乙腈;
梯度: 线性 A → 70% B
(4min)
流速: 5ml/min
检测: UV280nm
样品: 1—核糖核酸酶;
2—溶菌酶; 3— β -乳球
蛋白; 4—鸡白蛋白

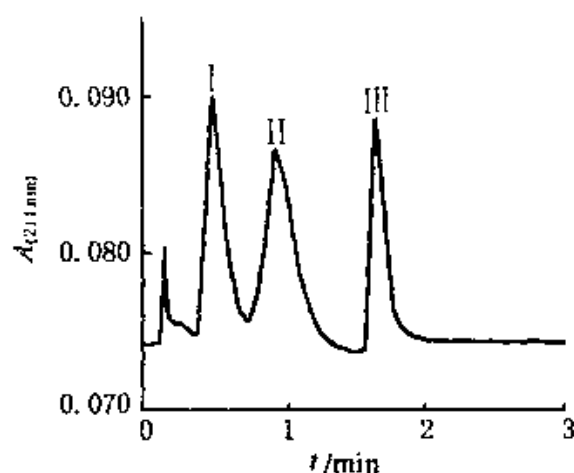


图 6-3 血管紧张肽 (I、II、III)
的 RPC 分离
分离柱: POROS R/H (100mm × 4.6mm
i.d.)
淋洗液: 10mM 碱性磷酸盐-乙腈
梯度: 12~14% 乙腈 (5min)
流速: 5ml/min
检测: UV220nm

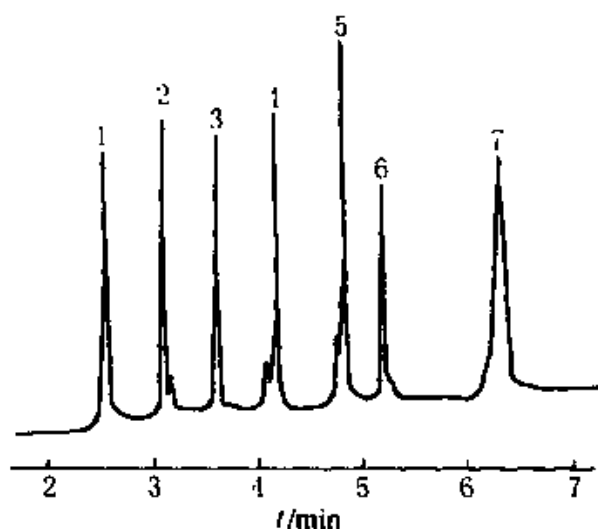


图 6-4 蛋白质混合样品在非多孔
填料上的 RPC 分离
分离柱: TSK gel Octadecyl - NPR (35mm ×
4.6mm)
淋洗液 A: 水含 0.05% TFA; 淋洗液 B: 乙腈
含 0.05% TFA
梯度: 线性 15% ~ 80% B (10min); 流速:
1.5ml/min
检测: UV220nm
样品: 1—核糖核酸酶; 2—胰岛素; 3—细胞
色素 C; 4—溶菌酶; 5—乳白蛋白;
6—肌红蛋白; 7—卵清蛋白

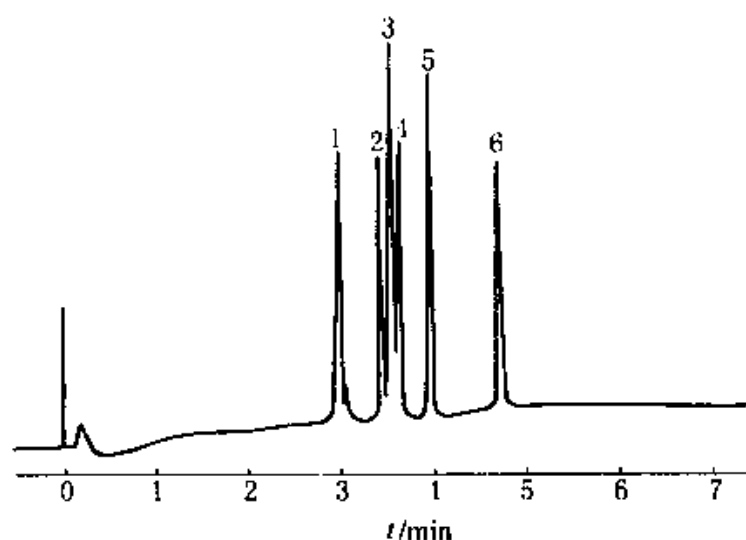


图 6-5 肽类混合物在非多孔填料上的 RPC 分离

分离柱: TSK gel Octadecyl-NPR (100mm×4.6mm i. d.)

淋洗液 A: 水含 0.2% TFA

淋洗液 B: 乙腈含 0.2% TFA

梯度: 线性 A→80% B (10min)

流速: 1.5ml/min

检测: UV215nm

样品: 1— α -endorphin; 2—bombesin; 3— γ -endorphin;

4—angiotensin; 5—somatostatin; 6—calcitonin

第五节 有机高分子类型的离子交换色谱填料

离子交换色谱 (ion exchange chromatography, IEC) 是在诸多液相色谱分支技术中最先得到发展和应用的。该方法对于分离各类生物物质, 诸如蛋白质、肽类、氨基酸、核酸、核苷、碱基、碳水化合物等, 尤为适宜, 因而在生物化学、医学、农学等一系统与生命科学相关的领域中, 它已成为非常有效的应用极广泛的分析检测和分离纯化手段。

IEC 的分离机理是建立在样品分子与固定相表面基团之间电荷相互作用的基础上的。这种相互作用可能表现为离子与离子、偶极与离子或者其他动态平衡作用力的形式。按所使用的离子交换剂, IEC 方法可分强阴、强阳、弱阴、弱阳离子交换 4 种方式。

在 IEC 方法中, 相比之下高分子类型填料表现了更大的优越

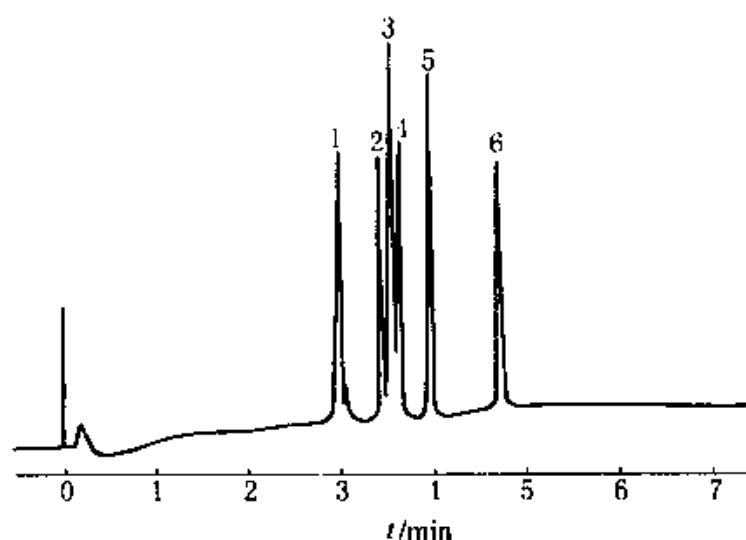


图 6-5 肽类混合物在非多孔填料上的 RPC 分离

分离柱: TSK gel Octadecyl-NPR (100mm×4.6mm i. d.)

淋洗液 A: 水含 0.2% TFA

淋洗液 B: 乙腈含 0.2% TFA

梯度: 线性 A→80% B (10min)

流速: 1.5ml/min

检测: UV215nm

样品: 1— α -endorphin; 2—bombesin; 3— γ -endorphin;

4—angiotensin; 5—somatostatin; 6—calcitonin

第五节 有机高分子类型的离子交换色谱填料

离子交换色谱 (ion exchange chromatography, IEC) 是在诸多液相色谱分支技术中最先得到发展和应用的。该方法对于分离各类生物物质, 诸如蛋白质、肽类、氨基酸、核酸、核苷、碱基、碳水化合物等, 尤为适宜, 因而在生物化学、医学、农学等一系统与生命科学相关的领域中, 它已成为非常有效的应用极广泛的分析检测和分离纯化手段。

IEC 的分离机理是建立在样品分子与固定相表面基团之间电荷相互作用的基础上的。这种相互作用可能表现为离子与离子、偶极与离子或者其他动态平衡作用力的形式。按所使用的离子交换剂, IEC 方法可分强阴、强阳、弱阴、弱阳离子交换 4 种方式。

在 IEC 方法中, 相比之下高分子类型填料表现了更大的优越

续表

产 品	每毫升载量 /D	颗粒大小/ μm	耐压 /MPa	最高流速 /(cm/h)	特性与应用
Q Sepharose F. F.	120mg HSA	90	0.3	750	高流速, 高负载量, 适于快速分离纯化大量的生化物质粗产品
SP Sepharose F. F.	70mg 核糖核酸酶	90	0.3	750	高流速, 高负载量, 适于快速分离纯化大量的生化物质粗产品
DEAE Sepharose F. F.	110mg HAS	90	0.3	750	高流速, 高负载量, 适于快速分离纯化大量的生化物质粗产品
CM Sepharose F. F.	50mg 核糖核酸酶	90	0.3	750	高流速, 高负载量, 适于快速分离纯化大量的生化物质粗产品
Q Sepharose XL	>130mg BSA	90	0.3	700	超高负载量, 适于粗分离生化物质
SP Sepharose XL	>160mg Lysozyme	90	0.3	700	超高负载量, 适于粗分离生化物质
Q Sepharose Big Beads		200	0.3	1800	大颗粒、高稳定性, 适于快速粗分离生化物质
SP Sepharose Big Beads		200	0.3	1800	大颗粒、高稳定性, 适于快速粗分离生化物质

二、聚合物基质的高效离子交换色谱填料

常见的聚合物类型高效 IEC 填料多以交联共聚的苯乙烯-二乙烯苯为基质, 同时也出现了许多其他交联高聚物基质的 IEC 填料, 例如, 以亲水性高聚物凝胶为基质的, 以聚甲基丙烯酸酯类为基质的, 以 4-乙烯吡啶共聚物为基质的等。这些填料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 (一般 $10\mu\text{m}$)。填料按其所带基团, 通常分为强碱性阴离子型 (含季胺基)、弱碱性阴离子型 (含伯、仲胺基)、强酸性阳离子型 (含磺酸

基)、弱酸性阳离子型(含羧酸基)。表 6-3 列出了一部分常见高聚物基质 IEC 填料(包括非多孔填料)的结构与性能特征。这些填料除 Aminex HPX 系列之外,均可在 $\text{pH} = 2 \sim 12$ 的范围内使用,甚至更宽一些。

表 6-3 部分常见的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	$-\text{NMe}_3^+$	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
MacroSphere/R DEAE	HEMA 高聚物	DEAE	10	35	分离蛋白质等
MacroSphere/R QAE	HEMA 高聚物	QAE	10	35	分离蛋白质等
MacroSphere/R CM	HEMA 高聚物	CM	10	35	分离蛋白质等
MacroSphere/R SB	HEMA 高聚物	SB	7	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	$-\text{NR}_3^+$	8, 10	非多孔	快速分离蛋白质、肽、核酸等
PL-SAX	PS-DVB	$-\text{NR}_3^+$	8, 10	100, 400	分离蛋白质等
PL-SCX	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	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	10~15	50	分离蛋白质等

续表

名 称	基 质	官能基团	粒度/ μm	孔径/ nm	应 用
Hitachi Gel 3011-N	PS-DVB	$-\text{NR}_3^+$	15		分离核苷酸、有机酸、糖类等
Hitachi Gel 3011-S	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	10		分离核酸碱基、氨基酸等
Hitachi Gel 3015-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	$-\text{NE}_3^+$	7~10		分离氨基酸、糖类等
Benson BC-X	PS-DVB	$-\text{SO}_3^-$	7~10		分离氨基酸、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
SOURCE 15 Q	PS-DVB	阴离子型	15		高分辨率精细分离纯化生物物质
SOURCE 15 S	PS-DVB	阳离子型	15		高分辨率精细分离纯化生物物质
SOURCE 30 Q	PS-DVB	阴离子型	30		极快速中度至精细分离纯化生物物质
SOURCE 30 S	PS-DVB	阳离子型	30		极快速中度至精细分离纯化生物物质
POROS Q	PS-DVB	季铵型	10, 20	超大孔	极快速分离纯化生物物质
POROS DEAE	PS-DVB	DEAE	10, 20	超大孔	极快速分离纯化生物物质
POROS S	PS-DVB	磺碳型	10, 20	超大孔	极快速分离纯化生物物质
POROS CM	PS-DVB	CM	10, 20	超大孔	极快速分离纯化生物物质

(一) 多孔树脂的 IEC 填料

在以多孔交联聚苯乙烯微球为基质的 IEC 填料中, Mono Beads 系列、SOURCE 系列和 POROS 系列产品,可以说是代表了近些年来已商品化的高效离子交换填料的新发展水平。这些填料用于快速分离纯化生物大分子,在其柱效、穿透性、分离度、负载量、回收率等方面,均表现出了极其优异的性能。

Mono Beads 系列,包括 Mono Q、Mono S、Mono P 3 种型号。它们都是以 $10\mu\text{m}$ 颗粒单分散的大孔 PS-DVB 微球为基质,经亲水化处理后再连接相应官能基团而制得的具有中度交换容量的离子交

换树脂。Q 型与 S 型每毫升的蛋白负载量分别为 65mg HAS 和 75mg IgG。树脂属于高分辨率高效填料，并具有良好的耐压性，适于快速的分析检测和纯化制备各类生化物质。

SOURCE 系列的 IEC 填料，包括 15Q、15S、30Q、30S 以及 RESOURCE Q 与 S 等型号。树脂的颗粒大小（分 15 μm 、30 μm ）是完全均一即单分散的，并具有良好的颗粒刚性和可以经受酸碱溶液在位清洗的化学稳定性。每毫升树脂的样品负载量是，Q 型为 45~50mg 白蛋白，S 型为 80mg 溶菌酶。该类树脂属于高分辨率的 IEC 填料，其最大特点是高速低反压，在 1800cm/h 最高流速下反压仅 1MPa，适合于在任何高、中、低压色谱系统中使用，柱效可达每米 30 000 理论塔板数，所以非常适于精细分离纯化各种生化物质。图 6-6 表示填充了 SOURCE 30S（粒度 30 μm ）的分析型和制备型分离柱上，一些标准蛋白质的分离结果。

在称之为贯流色谱填料 POROS 系列中，其离子交换型包括 Q（quarternized PEI）、DEAE、S（sulfoethyl）、CM 4 种产品型号，并按其颗粒大小又分为 H 系列（10 μm ）和 M 系列（20 μm ）。这类兼备分离制备与分析检测用的强弱阴阳离子交换填料，其高分辨、高容量、高流速、低反压等特点，并不亚于前面所述的 SOURCE 系列树脂。它们通常可在 1000~5000cm/h 甚至更高的线流速下工作，在此范围内柱效基本上保持不变，而且柱压是很低的。所以该类填料用于高效快速的分离与分析各类生化物质非常有利。图 6-7 和图 6-8 分别表示 POROS S/M 和 POROS Q/M 填充粒在高流速下对某些生化物质的分离结果^[27]。

以大孔亲水性高聚物羟基化聚醚凝胶为基质的 IEC 填料，如 TSK gel DEAE-5PW、SP-5PW、CM-5PW 等，是目前应用非常广泛的产品^[51~53]。它们都是在原有亲水性凝胶过滤色谱填料（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填料，对于蛋白质、肽类、核酸等活性生化样品均表现了良好的分离作用。许多蛋白质可用这些填料来分离，选择适当的淋洗条件，它们的分辨率几乎可与凝胶电泳相比宜，甚至

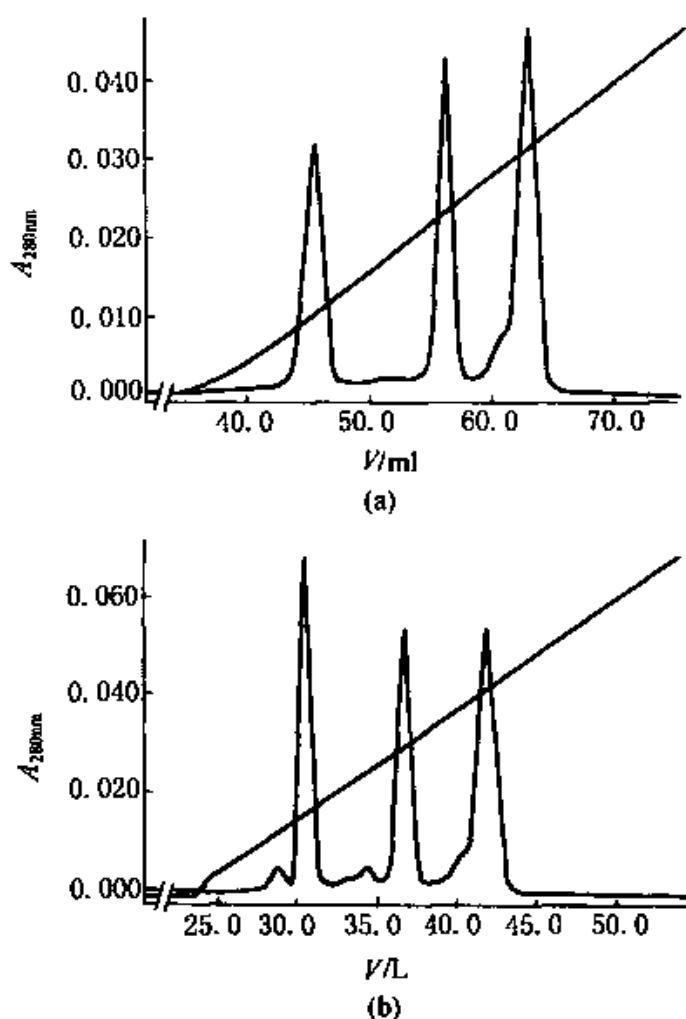


图 6-6 蛋白质混合样品的 IEC 分离
 分离柱: SOURCE 30S (a) 50mm×7.5mm (i.d.);
 (b) 50mm×200mm (i.d.)
 淋洗液 A: 20mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=6.8)
 淋洗液 B: A+0.5mol/L NaCl; (pH=6.8)
 梯度: 线性 A→B (20 柱体积)
 流速: (a) 2.2ml/min; (b) 1.57L/min
 检测: UV280nm
 样品: 胰凝乳蛋白酶、细胞色素 C 和溶菌酶混合物

一些分子量很大的蛋白质如 β -淀粉酶 (197 000)、过氧化氢酶 (240 000) 和血纤维蛋白原 (330 000) 也能高分辨的分离。碱性蛋白如 α -胰凝乳蛋白酶, 胰蛋白酶原可用 DEAE-5PW 树脂来分离, 酸性蛋白如脂肪氧合酶、 β -淀粉酶可用 SP-5PW 树脂来分离。在这类树脂上, 一些膜蛋白质也可被成功地分离。由于这类树脂通

过 $0.1 \sim 0.5 \text{ mol/L}$ NaOH 溶液的洗涤很容易被再生, 所以选择较大的颗粒 ($20 \sim 30 \mu\text{m}$) 作填料, 用于大规模分离制备是适宜的。几种树脂应用于核酸类和肽类的分离, 同样具有良好的效果 (见图 6-9 和图 6-10)。

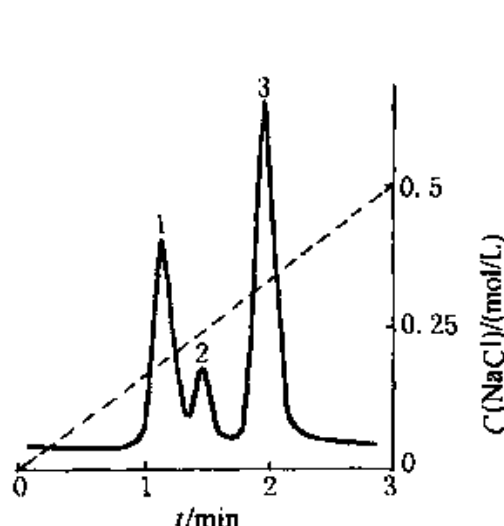


图 6-7 蛋白质混合物
样品的 IEC 分离

分离柱: POROS S/M ($100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$)
淋洗液 A: 20 mmol/L 2-[N-吗啉代]
乙磺酸缓冲液 ($\text{pH}=6.0$)
淋洗液 B: A + 0.5 mol/L NaCl;
($\text{pH}=6.0$)
梯度: A $\rightarrow$ B (3min)
流速: 5 ml/min
检测: UV280nm;
样品: 1—胰凝乳蛋白酶; 2—细胞色
素 C; 3—溶菌酶

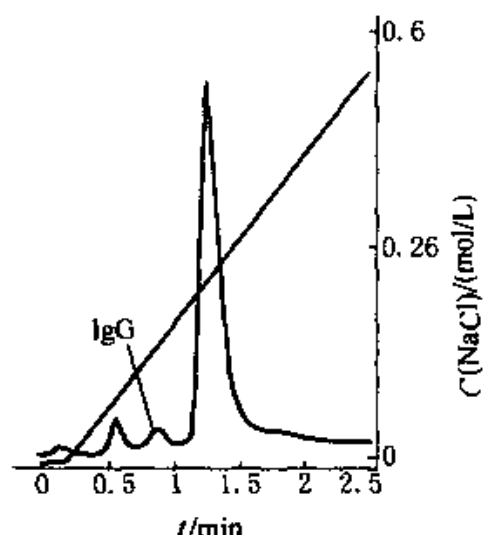


图 6-8 杂交细胞上清液中
IgG 的 IEC 分离

分离柱: POROS Q/M ($100 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$)
淋洗液 A: 20 mmol/L Tris - HCl
($\text{pH}=8.0$)
淋洗液 B: A + 0.5 mol/L NaCl
($\text{pH}=8.0$)
梯度: 线性 A $\rightarrow$ B (2.5min)
流速: 10 ml/min
检测: UV280nm

以亲水性大孔交联聚甲基丙烯酸羟基乙酯微球为基质的各种离子交换树脂, 在高效 IEC 填料中也占有重要地位。例如, 由 Spheron 凝胶所衍生的携带有 DEAE、TEAE、SP、CM 基团的树脂, 其相关参数与性能指 (包括粒度大小、孔径分布、颗粒强度、亲水性能、交换容量、负载量、回收率、pH 值与流速的适应范围等) 均适合分离各种生物样品而得到广泛应用^[54,55]。相类似结构的 Macrosphere/R DEAE、QAE、CM 和 SB 树脂, 也同样是适于蛋

白质等生物大分子分离的高效 IEC 填料。

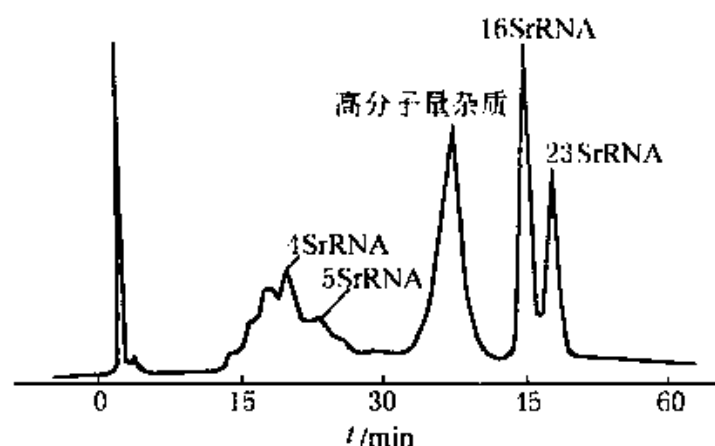


图 6-9 *E. coli* RNA 的 IEC 分离

分离柱: TSK gel DEAE-5PW (75mm×7.5mm)

淋洗液 A: 0.1mol/L Tris-HCl+0.3mol/L NaCl (pH=7.6)

淋洗液 B: 0.1mol/L Tris-HCl+1mol/L NaCl (pH=7.6)

梯度: 线性 A→B (300min)

流速: 1.0ml/min

检测: UV260nm

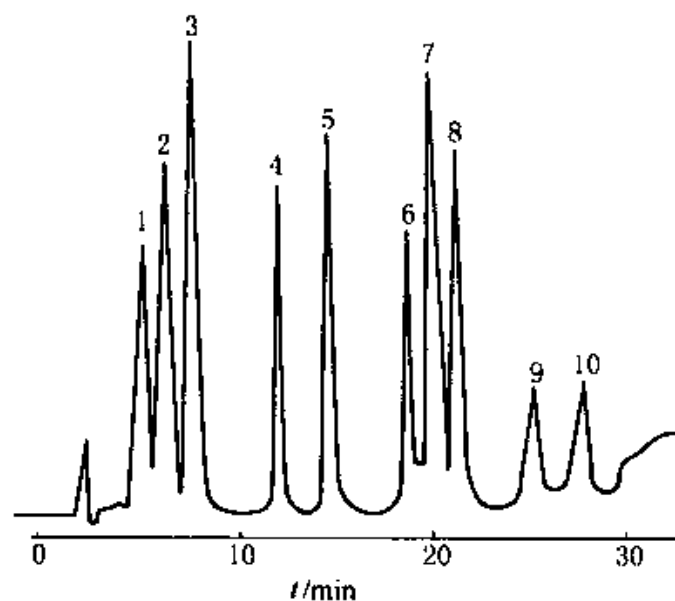


图 6-10 激素类型多肽的 IEC 分离

分离柱: TSK gel SP-5PW (75mm×7.5mm i.d.)

淋洗液 A: 0.02mol/L, 磷酸盐/乙醇 (70/30) (pH=3.0)

淋洗液 B: 0.5mol/L, 磷酸盐/乙醇 (70/30) (pH=3.0)

梯度: 线性 A→B (30min); 流速: 1.0ml/min

检测: UV220nm

样品: 1—催产素; 2—脑啡肽; 3—TRH; 4— α -内啡肽; 5—LHRH; 6—神经降压素; 7— α -MSH; 8—血管紧张肽 II; 9—P 物质; 10— β -内啡肽

(二) 非多孔树脂的 IEC 填料

近 10 多年来, 非多孔结构类型填料的开发与应用在离子交换色谱中表现得甚为突出。高分子类型非多孔 IEC 填料所用的基质树脂主要包括有亲水性高聚物即羟基化聚醚、交联聚苯乙烯、交联聚甲基丙烯酸酯以及交联琼脂糖等。填料表面的化学结构与多孔型产品相类似, 目前已有许多包括分析柱和制备柱在内的商品。用作高效分离柱的非多孔型填料, 一般粒度只有几个微米, 颗粒小而均匀, 刚性良好, 色谱穿透性强, 流速适应范围宽。由于非多孔结构可以有效地避免溶质在固定相内部的吸附与扩散, 所以对于改善色谱柱效、提高样品回收率以及保持大分子溶质的生物活性都是很有利的。这类填料普遍有很高的柱效、分离度和样品回收率, 尤其适合于快速地分离活性生物大分子。

在非多孔树脂的 IEC 填料中, TSK gel DEAE-NPR 和 SP-NPR 树脂似乎更为典型。它们的粒度 ($2.5\mu\text{m}$) 已达到同类型填料的最小程度, 用于快速分离生化物质的分辨率是其他类型填料难以比拟的^[56]。

快速高分辨的分离蛋白质, 是非多孔树脂 IEC 填料最显著的特征之一。图 6-11 表示在一根很小尺寸的 DEAE-NPR 填充柱上, 几种酸性蛋白质及其杂质的分离结果, 从蛋白质的淋洗行为来看, 仍可通过减小梯度时间而更快地完成分离。该填料对蛋白质的分辨率非常高, 可与凝胶电泳相比较, 甚至比后者更高一些。

非多孔树脂的 IEC 填料对于分子量较大的肽类混合物的快速分离同样适宜。例如在一根很小尺寸的 SP-NPR 填充柱上, 9 种高分子量的肽类混合物, 大约可在 7min 内完成分离, 而且分辨率相当高 (图 6-12)。然而这类树脂对于分子量小于 1000 的小肽类混合物的分离似乎不太理想, 这可能是树脂仍存在很小的孔而导致了小分子肽类化合物的峰形加宽和拖尾。

非多孔树脂 IEC 填料对于寡核苷酸的分离。Kato 等人^[57]曾描述过用 DEAE-NPR 填充柱对寡聚腺嘌呤核苷酸的分离。带有链长为 1、2、3、4、5、8、10、12、16 和 20 个核苷酸单元的寡聚腺嘌呤

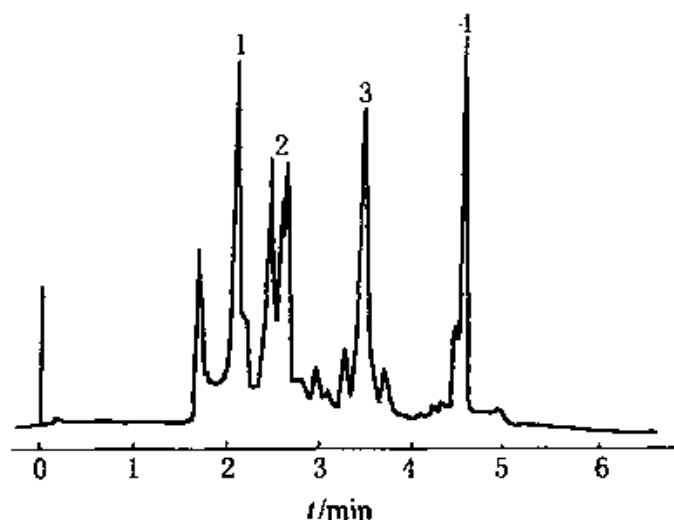


图 6-11 酸性蛋白质混合物
在非多孔填料上的 IEC 分离

分离柱: TSK gel DEAE-NPR (35mm×4.6mm i.d.)

淋洗液 A: 20mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)

淋洗液 B: A+0.5mol/L NaCl; (pH=8.0)

梯度: 线性 A→B (10min)

流速: 1.5ml/min

样品: 1—伴清蛋白; 2—铁传递蛋白; 3—鸡白蛋白;
4—胰蛋白酶抑制剂

呤核苷酸, 在 8min 内可被很好的分离 (图 6-13)。同样的填充柱对于含有 17mer 到 100mer 聚腺嘌呤核苷酸水解产物的分离, 在不到 20min 的时间内即可完成 (图 6-14)。所呈现的色谱峰达 70mer, 其中基线分离峰达 32mer, 而用别的填充柱完成这一结果约需 20h, 可见前者的分辨率之高。该填料既可按链长度也可按基本组分来分离寡核苷酸, 所以非常适于合成寡聚核苷酸的纯化与杂质分析, 这对于 DNA 和 RNA 的合成是很重要的。

DEAE-NPR 填充核对于 DNA 碎片的分离性能, 可从两个应用实例得到证实, 即用于 pBR322DNA-Hae III digest 分离, 其样品为含有 7~587 个碱基对的 22 个碎片 (图 6-15); 用于 λ DNA-Hind III digest 分离, 其样品为含有 125~23 130 个碱基对的 8 个碎片 (图 6-16)。前一结果表明, 该柱对于链长差别为 5%~10% 的小

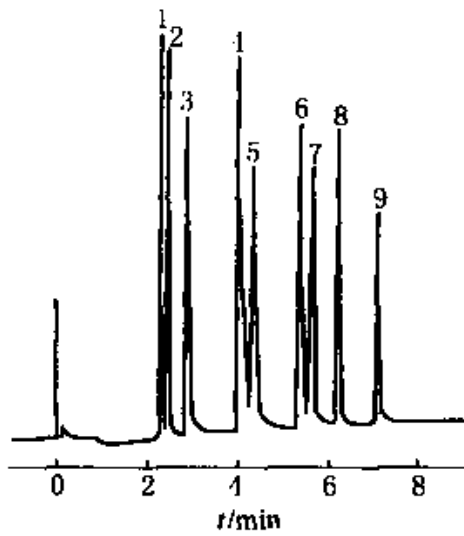


图 6-12 肽类混合物样品
在非多孔填料上的 IEC 分离
分离柱: TSK gel SP-NPR (35mm
× 4.6mm i.d.)

淋洗液 A: 20mmol/L 乙酸缓冲液
(pH=3.5) 乙腈 (体积比=60:40)

淋洗液 B: A + 0.25mol/L 硫酸盐;

梯度: 线性 A → B (30min)

流速: 1.5ml/min

检测: UV215nm

样品: 1— γ -endorphin; 2—bombesin;

3—luteinizing hormone-releasing
hormone; 4—somatostatine; 5—

α -melanophore-stimulating hor-
mone; 6—substance P; 7—

glucagon; 8—insulin; 9— β -en-
dorphin

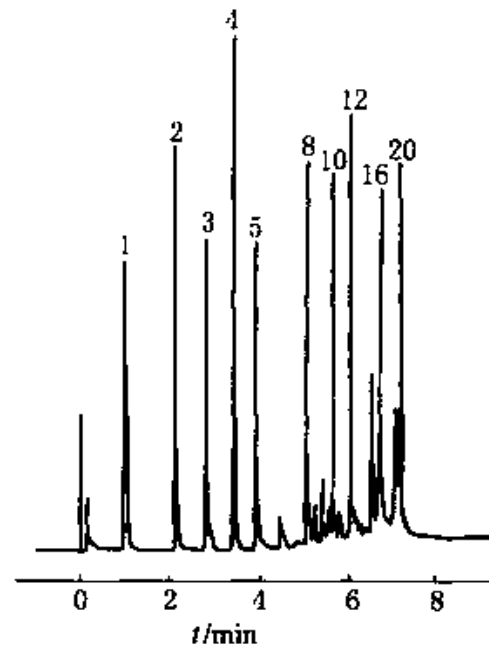


图 6-13 寡核苷酸在非多孔
填料上的 IEC 分离

分离柱: TSK gel DEAE-NPR (35mm
× 4.6mm i.d.)

淋洗液 A: 20mmol/L Tris- HC_2O_4 缓
冲液 (pH=9.0)

淋洗液 B: A + 0.4mol/L 高氯酸盐
(pH=9.0)

梯度: 线性 A → B (20min)

流速: 1.5ml/min

检测: UV260nm

样品: 带有 1、2、3、4、5、8、10、
12、16 和 20 个核苷酸单元的
寡腺嘌呤核苷酸混合物

DNA 碎片 (小于 600 个碱基对) 样品, 几乎可以实现完全分离; 后一结果表明, 该柱对于 1000 以上碱基对的大 DNA 碎片的分离也是很有效的, 对于链长差别 50% 以上的大碎片在很短时间内几乎能够实现基线分离^[58]。

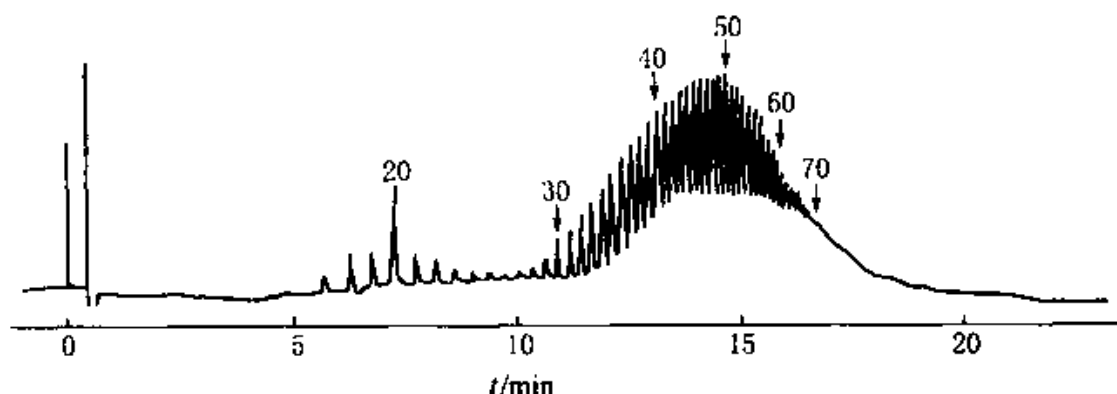


图 6-14 聚腺嘌呤核苷酸水解产物非多填料上的 IEC 分离

分离柱: TSK gel DEAE-NPR (35mm×4.6mm i.d.)

淋洗液 A: 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH=9.0) + 0.25mol/L NaCl

淋洗液 B: 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH=9.0) + 1mol/L NaCl

梯度: 线性 A → B (60min)

流速: 1.0ml/min

检测: UV260nm

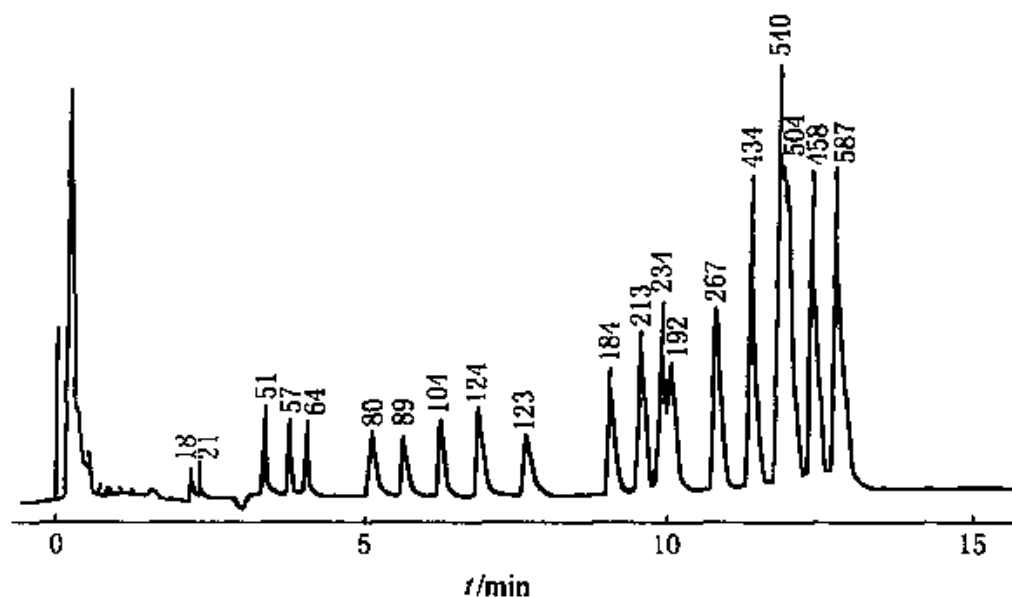


图 6-15 非多孔型 IEC 填料对核酸碎片的分离

分离柱: TSK gel DEAE-NPR (35mm×4.6mm)

淋洗液 A: 20mmol/L Tris-HCl (pH=9.0)

淋洗液 B: A + 1mol/L NaCl (pH=9.0)

梯度: 线性 25% → 45% B (0.1min) → 50% B (2.9min) → 100% B (57min)

流速: 1.5ml/min: 检测: UV260nm

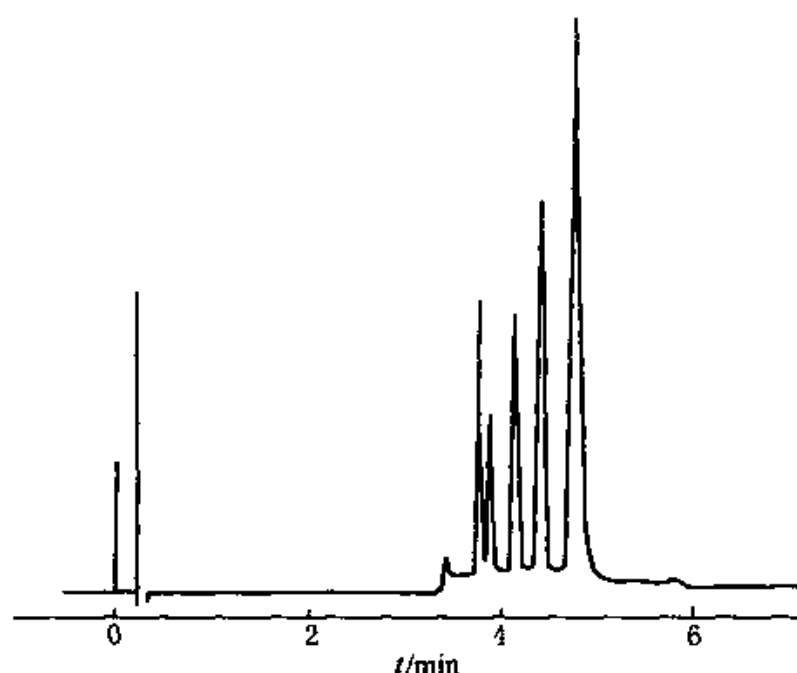


图 6-16 λ DNA-Hind III digest 在非多孔填料上的 IEC 分离

分离柱: TSK gel DEAE-NPR (35mm $\times$ 4.6mm i.d.)

淋洗液 A: 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH=9.0)

淋洗液 B: A + 1mol/L NaCl

梯度: 线性 A $\rightarrow$ B (10min)

流速: 1.0ml/min

检测: UV260nm

非多孔树脂的 IEC 填料, 虽然对样品的负载量比较低, 但正如以上所述, 它们的优越性却十分明显, 尤其在快速分析和小量乃至微量样品的分离与制备方面有着广阔的应用发展前景。

(三) 薄壳型树脂的 IEC 填料

薄壳结构的填料, 在高效液相色谱技术发展初期曾颇为盛行, 但是后来逐渐为多孔和非多孔的填料所代替。从物理结构形态来看, 薄壳型填料是有其合理之处, 它在一定程度上可以说是兼备了多孔与非多孔填料的某些优点, 所以对于专门从事填料设计与合成的研究者来说, 也是一种值得选择的模型。

一种类似于薄壳结构的复合树脂型 IEC 填料曾被报道过^[59]。

这类树脂是以 $10\mu\text{m}$ 交联聚苯乙烯微球为基质，在被磺酸化了的基质微球表面复合一层颗粒更小的季胺化高聚物微球，形成一种复合结构的阴离子交换树脂，其交换容量为 0.25mg/ml 。该树脂作为高效 IEC 填料，在柱效、选择性、分离度、穿透性、回收率以及流速与 pH 值适应范围等方面，均表现出了优异的特性，对于蛋白质、多肽以及某些基因工程药物等均有良好的分离作用。图 6-17 表示一引起蛋白质混合物在复合树脂填充柱上的分离结果。

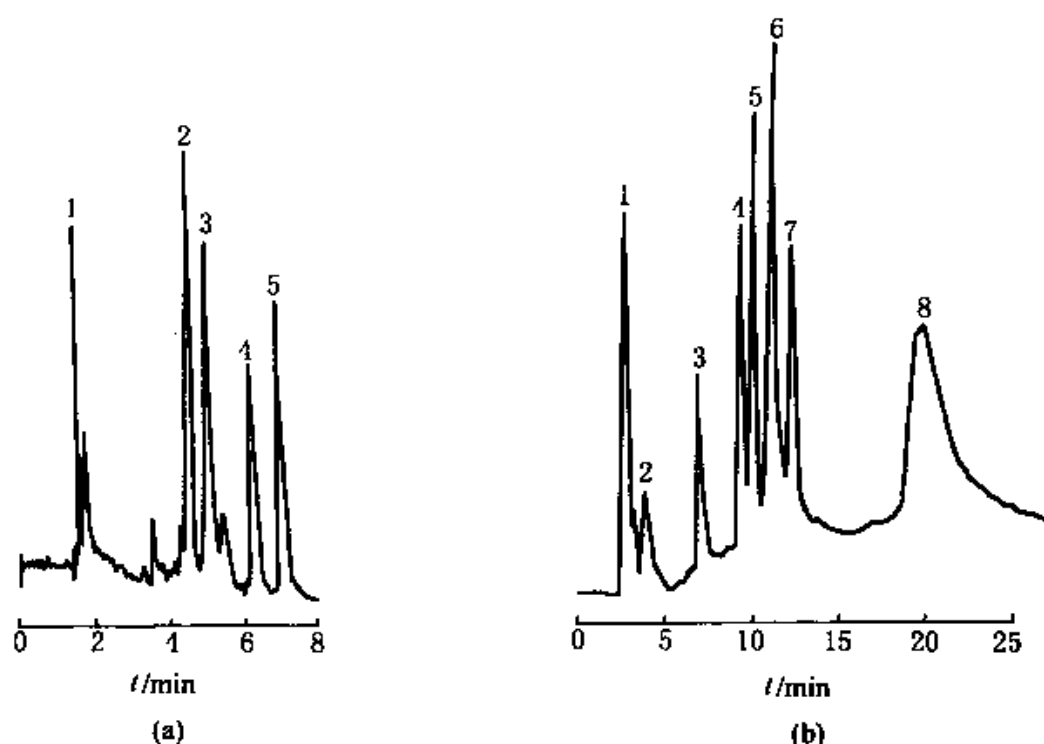


图 6-17 阴离子交换复合树脂对蛋白质的分离

分离柱：阴离子交换复合树脂填料 ($100\text{mm} \times 8\text{mm}$)

淋洗液 A: 25mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}=8.0$)

淋洗液 B: A + 1mol/L NaCl ($\text{pH}=8.0$)

梯度：线性 A $\rightarrow$ B (10min)

流速：(a) 1.5ml/min , (b) 1.0ml/min

检测：UV280nm

样品：(a) 1—碳酸酐酶；2—卵清蛋白；3—牛血清蛋白；4、5—细胞色素 C；

(b) 1—肌红蛋白；2—胰岛素；3—纤维蛋白原；4—牛血清蛋白；5—肌酸激酶-BB；6, 7—细胞色素 C；8—溶菌酶

三、高聚物型离子色谱填料

离子色谱 (ion chromatography, IC) 方法出现于 20 世纪 70 年代中期, 并已形成一个独立的色谱分支。该方法的建立与发展主要依赖于高灵敏电导检测器的应用、高柱效低交换容量分离柱填料的产生以及消除淋洗背景离子干扰技术的进步。由于 IC 方法能够快速灵敏地测定各种痕量的阴阳离子型物质, 解决了离子交换色谱以及其他方法所不能解决的分析检测问题, 因而在环境部门、生产部门 (如能源、资源、材料、水质、食品、医药、农业等) 以及包括生命科学在内的许多基础研究领域中得到极其广泛的应用。

常见的离子色谱一般有单柱系统和双柱系统之分。前者是将分离柱直接与检测器连接, 后者则是在分离柱与检测器之间连接一个用以消除本底电导的抑制系统。早期的抑制系统常使用一根具有相反离子交换作用的高交换容量的填充柱, 后来逐渐发展成可以自动再生的纤维抑制柱和薄膜抑制柱。

在双柱 IC 方法中, 所使用的填料如 Dionex 的 AS 系列 (阴离子分析柱) 和 CS 系列 (阳离子分析柱)。它们都是以交联聚苯乙烯为基质的具有薄壳结构的离子交换剂。以阴离子分离柱填料为例, 它是借助于阴阳离子之间的库仑引力, 将季胺化的交联聚苯乙烯胶乳附聚在表面被磺化了的交联聚苯乙烯基质微球上, 形成一种薄壳结构的阴离子交换附聚树脂。这种填料具有优异的色谱性能, 如图 6-18 所示, 在适当的淋洗条件下, 可使 36 种无机和有机的阴离子得到成功的分离^[60]。

单柱 IC 方法所使用的柱填料一般都是低交换容量的多孔性离子交换剂、早期的单柱离子色谱填料就是用多孔树脂 XAD 经浅度离子化而制得的, 目前较为广泛应用的填料如 TSKgel IC-Anion-PW 和 TSK gel-IC-Cation-PW, 其交换容量分别为 $(30 \pm 3) \mu\text{mol/ml}$ 和 $(12 \pm 3) \mu\text{mol/ml}$ 。

IC 方法作为一种痕量分析技术, 成功地解决了长期以来在分析化学上视为重大难题的痕量阴离子的分析检测问题。随着柱填料的发展和检测技术的进步 (包括其他高灵敏度检测器的应用), IC

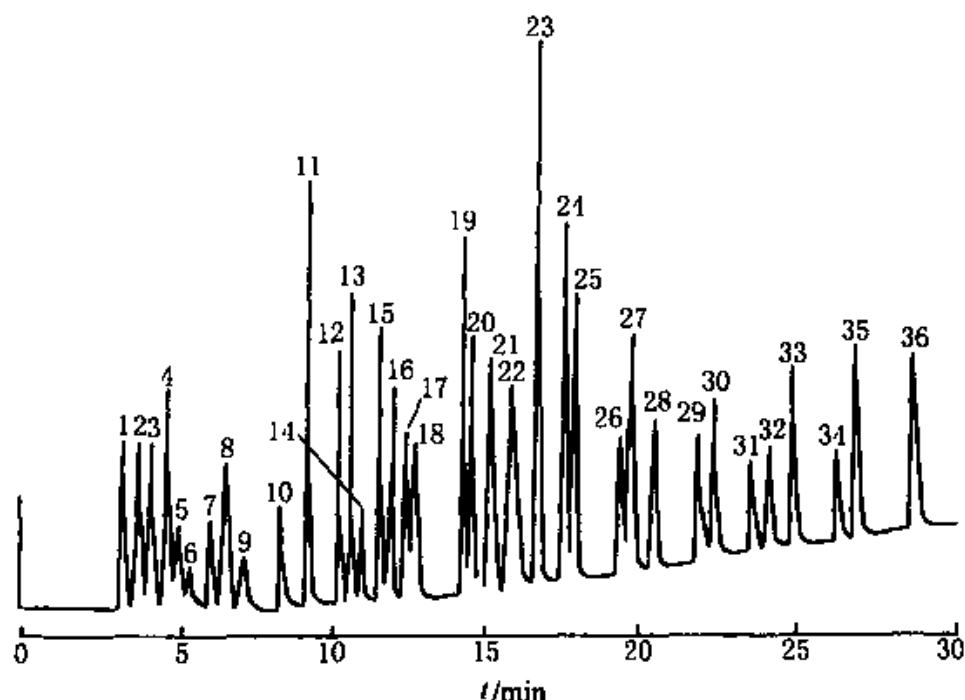


图 6-18 无机与有机阴离子在离子色谱上的分离

分离柱: Dionex HPIC-AS5A

淋洗液 A: 0.75mmol/L NaOH

淋洗液 B: 100mmol/L NaOH

梯度: 线性 100% A (5min) $\rightarrow$ 30% B (10min) $\rightarrow$ 86% B (20min)

流速: 1.0ml/min

检测器: 电导

样品: 1—F⁻; 2— α -羟基丁酸根; 3—乙酸根; 4—甘醇酸根; 5—丁酸根; 6—葡萄糖酸根; 7— α -羟基戊酸根; 8—甲酸根; 9—戊酸根; 10—丙酮酸根; 11—氨乙酸根; 12—BrO₃⁻; 13—Cl⁻; 14—半乳糖醛酸根; 15—NO₂⁻; 16—葡萄糖醛酸根; 17—二氯乙酸根; 18—三氟乙酸根; 19—亚磷酸根; 20—亚硒酸根; 21—Br⁻; 22—NO₃⁻; 23—SO₄²⁻; 24—草酸根; 25—硒酸根; 26— α -氧代戊二酸根; 27—反丁烯二酸根; 28—邻苯二甲酸根; 29—草乙酸根; 30—PO₄³⁻; 31—AsO₄³⁻; 32—CrO₄²⁻; 33—柠檬酸根; 34—异柠檬酸根; 35—顺乌头酸根; 36—反乌头酸根

方法已不仅仅限于测定一些常见的阴阳离子型物质, 从分析对象来看, 已步入生化领域, 例如用于分析氨基酸、有机酸、有机胺、核苷、核苷酸、碱基、单糖、寡糖等, 均有特色; 从分析方法来看, 又派生出了离子排除色谱和流动相离子色谱等新的分支。

第六节 有机高分子类型的疏水性相互作用色谱填料

疏水性相互作用色谱 (hydrophobic interaction chromatography, HIC) 是为了适应活性生物大分子特别是蛋白质的分离而发展起来的一种液相色谱方法。HIC 柱填料的表面具有弱疏水性特征。如果说前面所述的 RPC 方法是基于强疏水性作用的话, 那么 HIC 方法则是依赖于溶质与填料表面之间弱的疏水性相互作用。在高离子强度的盐水溶液淋洗条件下, 蛋白质分子中的疏水性部分与填料表面产生疏水性相互作用而被吸附, 当淋洗液的离子强度逐渐降低时, 蛋白样品则按其疏水性特征被依次洗脱, 疏水性越强, 洗脱的时间越长, 用此原理来实现分离。同反相色谱相比较。HIC 方法的最大特点是既可以避免使用含有大量有机溶剂的淋洗体系, 也能有效地保持被分离物质的生物活性, 因此在活性生化物质的分离纯化方面被广泛采用。

常见的商品化键合相 HIC 填料, 一般都是在硅胶微球表面键合一层亲水性的有机层, 然后再连接上各种具有一定疏水性的基团, 如羟丙基、甲基、丙基、丁基、苯基、戊基、苯甲基等。蛋白质在这类填料上的保留时间基本上按所键合基团疏水性递增而加长。

有机高分子类型 HIC 填料, 通常都是以亲水性凝胶或者经过亲水化处理的高聚物微球为基质, 表面通过化学修饰而引入疏水性基团或链段的树脂。所使用的基质材料, 既可选择多糖型凝胶如各种交联琼脂糖凝胶, 也可选择合成的高聚物微球, 如羟基化聚醚树脂、交联聚甲基丙烯酸酯类树脂、交联聚苯乙烯树脂等。为了适应于生物大分子分离, 拟选择的基质材料, 要么就是大孔超大孔结构的, 要么就是非多孔结构的。由于 HIC 方法是在水相体系中对于蛋白质等生物大分子进行分离的, 为了使填料与淋洗液相匹配, 填料的基质微球应具备一定的亲水性, 因此对于某些合成的高聚物微球如交联聚苯乙烯树脂, 应在连接官能基团之前进行一些必要的亲水化处理。在具有一定亲水性能的基质微球表面, 所引入的官能基团主要是丁基、辛基、苯基等以及聚乙二醇 (即聚醚类) 链段。表 6-4 给出了部分常见的多糖基质与高聚物基质的 HIC 填料。

表 6-4 部分常见的有机高分子类型疏水性相互作用色谱填料

名 称	基质	官能基团	粒度/ μm	孔径/ μm	应 用
TSK gel Phenyl-5PW	亲水性高聚物	Phenyl	10	100	分离纯化蛋白质等
TSK gel Ether-5PW	亲水性高聚物	Ether	10	100	分离纯化蛋白质等
TSK gel Butyl-NPR	亲水性高聚物	Butyl	2.5	非多孔	分析分离蛋白质、肽等
SOURCE ETH	PS-DVB	Ether	15		快速高分辨分离蛋白质、肽类等
SOURCE PHE	PS-DVB	Phenyl	15		快速高分辨分离蛋白质、肽类等
SOURCE ISO	PS-DVB	Isopropyl	15		快速高分辨分离蛋白质、肽类等
HRLC MP7 HIC	高聚物	Methyl	7	90	分离蛋白质等
Macrosphere/R HIC	HEMA 高聚物	酯链	10	35	分离蛋白质等
POROS Phenyl	PS-DVB	Phenyl	10, 20	贯流孔	快速分离纯化蛋白质等
POROS Butyl	PS-DVB	Butyl	10, 20	贯流孔	
POROS Ether	PS-DVB	Ether	10, 20	贯流孔	
POROS Diol	PS-DVB	Diol	10, 20	贯流孔	
Alkyl Superose	多糖	Alkyl	12	大孔	适于纯化疏水性强及不稳定的蛋白质
Phenyl Superose	多糖	Phenyl	12	大孔	分离纯化蛋白质、酶等
Phenyl Sepharose HR	多糖	Phenyl	34	大孔	蛋白纯化及分离制备
Phenyl Sepharose FF	多糖	Phenyl	90	大孔	快速蛋白与生物分子制备
Butyl Sepharose FF	多糖	Butyl	90	大孔	
Octyl Sepharose FF	多糖	Octyl	90	大孔	

一般来说,生物大分子大都含有或强或弱的疏水区域,在不同环境中,生物样品与各种疏水介质所产生的疏水性相互作用大小亦各不相同,正是由于这种原因,才使 HIC 分离方法得以建立和实施。常见 HIC 填料所携带官能基团的疏水性强弱程度,依次为苯基>辛基>丁基>异丙基>醚链。疏水性基团的结构和密度,是影响生物样品的色谱保留值和负载量的主要因素。从淋洗方式来看, HIC 和 IEC 正好相反,虽然两种色谱技术都是在缓冲液体系中进行,但前者对样品的分离是高盐浓度吸附,低盐浓度洗脱。在 HIC 技术中,常用的盐如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4AC 、 NaCl 和磷酸盐

等, 其中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 因其溶解度大、对蛋白质的活性影响小、盐析能力强而被最为广泛的使用。

常见的 HIC 填料, 绝大多数是多孔结构的, 它们的负载量都比较高, 每毫升树脂可负载数十毫克的蛋白样品。表 6-4 中几种广泛应用的基于多糖基质的 HIC 填料, 基本上都属于快速高效的并可作为预装柱的分离纯化介质。两种以特定物理结构 PS-DVB 树脂为基质的产品, 即 POROS 系列的 HIC 填料^[29]和 SOURCE 系列的 HIC 填料, 更适于在很高流速下, 快速高效的精细分离纯化蛋白质等生物样品。以大孔交联聚甲基丙烯酸羟乙酯微球为基质的 Maerosphere/RHIC 填料, 对于蛋白质混合样品的分离如图 6-19 所示。基于大孔羟基醚基质的 TSK gel Phenyl-5PW 和 Ether-5PW, 是性能甚为优异, 应用相当广泛的两种 HIC 填料^[61,62]。从图 6-20 可以看出, 以粒度为 $10\mu\text{m}$ 和 $13\mu\text{m}$ 的 Phenyl-5PW 为填料, 分别被填充在尺寸不同的分析型和制备型的柱管中, 用于蛋白质混合样品的分离, 其结果都是很好的^[63]。

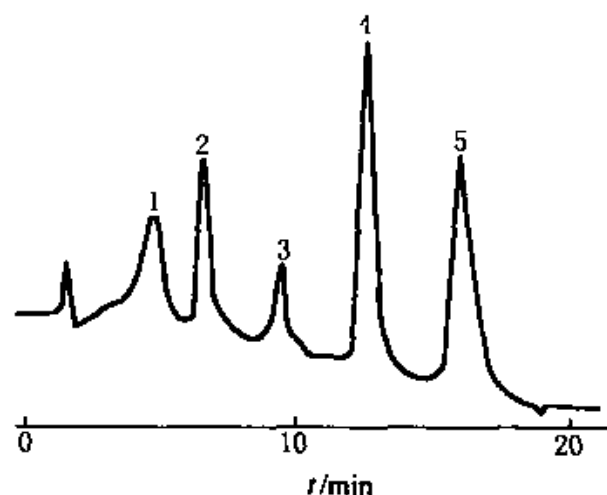


图 6-19 蛋白质混合物样品的分析型和制备型 HIC 分离

分离柱: Maerosphere/R HIC (250mm×4.6mm)

淋洗液 A: 20mmol/L NaH_2PO_4 + 2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH=7.0);

淋洗液 B: 20mmol/L NaH_2PO_4 (pH=7.0)

梯度: 线性 A→B (20min); 流速: 1.0ml/min; 检测: UV280nm

样品: 1—细胞色素 C; 2—肌红蛋白; 3—核糖核酸酶 A; 4—溶菌酶; 5—铁蛋白

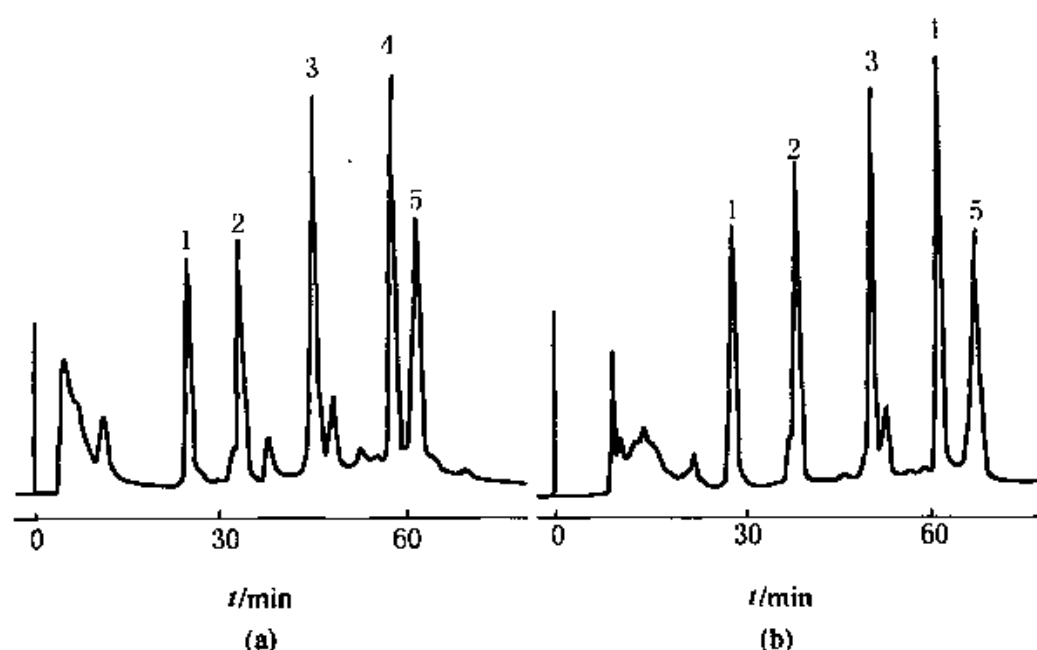


图 6-20 蛋白质混合物样品的分析型和制备型 HIC 分离

分离柱: TSK gel Phenyl 5PW (a) 分析型 75mm × 7.5mm i.d.; (b) 制备型 150mm × 21.5mm i.d.

淋洗液 A: 0.1mol/L 磷酸铵缓冲液 (pH=7.0);

淋洗液 B: A + 1.8mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

梯度: 线性 A → B (60min)

流速: (a) 0.5ml/min; (b) 4ml/min

检测器: UV (280nm)

样品: 1—肌红蛋白; 2—核糖核酸酶; 3—溶菌酶; 4—胰凝乳蛋白酶原 A; 5— α -胰凝乳蛋白酶

带有疏水性基团的非多孔树脂作为 HIC 填料也是甚有特色的。例如, 使用非多孔的 TSK gel Butyl-NPR 填料分离商品胰蛋白酶, 可以使 α 和 β 型两种胰蛋白酶组分分离开 (见图 6-21)^[64]。这两种胰蛋白酶的结构是相类似的, 然而仅仅利用它们色谱行为的微弱差异, 就可得以分离和识别。又如, 有人曾介绍过将大孔琼脂糖凝胶经过收缩、交联和非极性配基衍生, 制成一种非多孔的弱疏性树脂, 以其作为 HIC 填料, 用于分离蛋白质, 可在 1min 左右使 5 种蛋白质混合样品得以分离 (见图 6-22)^[65]。

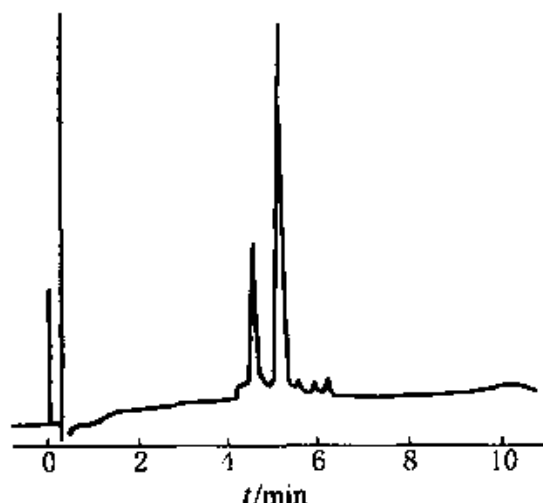


图 6-21 α -和 β -胰蛋白酶
在非多孔填料上的 HIC 分离

分离柱: TSK gel Butyl-NPR (35mm $\times$ 4.6mm i.d.)

淋洗液 A: 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH=7.5)

淋洗液 B: A + 2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

梯度: 线性 A $\rightarrow$ B (10min)

流速: 1.0ml/min

检测: UV280nm

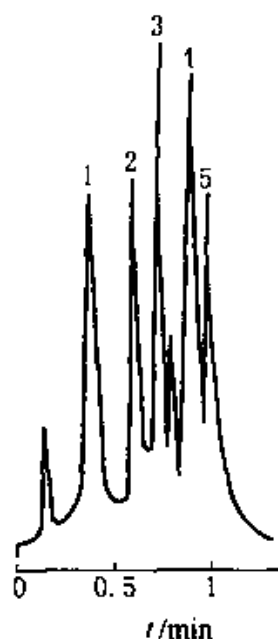


图 6-22 非多孔型 HIC
填料对蛋白质的分离

分离柱: 非多孔琼脂糖基质 HIC 填料 (55mm $\times$ 4.6mm)

淋洗液 A: 0.01mol/L NaH_2PO_4 + 0.25mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH=6.8)

淋洗液 B: 0.01mol/L NaH_2PO_4 (pH=6.8)

梯度: 线性 A $\rightarrow$ B 体积 3.2ml

流速: 4ml/min

检测: UV280nm

样品: 1—核糖核酸酶; 2—卵清蛋白;
3—胰凝乳蛋白酶原; 4—过氧化氢酶;
5—铁蛋白

第七节 有机高分子类型的体积排除色谱填料

体积排除色谱 (size exclusion chromatography, SEC) 方法, 通常是一种对于分子量大于 2000 的物质按其分子尺寸大小进行分离的技术。作为液相色谱技术的一个重要分支, SEC 方法最广泛的用途是测定合成聚合物的分子量分布; 对于某些大分子样品如蛋白

质、核酸等，也是一种很有效的分离纯化手段。SEC 方法能简便快速地分离那些样品组分中分子量相差较大的简单混合物。它非常适合于未知样品的初步探索分离，无需进行复杂实验就能获得样品组成分布方面较为全面的概况。

SEC 方法按其淋洗体系通常分为两大类，即水相 SEC（也称凝胶过滤色谱）和有机相 SEC（也称凝胶渗透色谱）。两种方法的分离原理虽然是相同的，但柱填料及其分离对象和使用技术完全不同。

一、SEC 填料的一般特征与色谱指标

在 SEC 方法中，柱填料的性质必须与溶质和淋洗体系相匹配。欲分离的高分子样品可能是油溶性的，也可能是水溶性的，前者只能在有机相体系中分离，后者只能在水相体系中分离，填料必须能被淋洗剂所浸润。SEC 方法要求填料与试样尽可能不发生任何基团之间的相互作用，即在色谱过程中应尽可能避免非空间排除效应（如吸附、离子交换、分配等相互作用）的影响，而是完全按照分子尺寸大小进行分离。填料的多孔结构是 SEC 方法赖以建立的基础。有关填料的孔结构参数（如孔度、孔径、孔径分布以及孔结构形态等）对于 SEC 技术来说尤为重要。

一种高效的 SEC 填料，它的化学结构应当能够很好地适应欲分离对象和淋洗体系，并能有效地避免非空间排除现象的发生；它的物理结构除了具备均匀而合适的颗粒度外，还需要有光洁的表面（包括孔壁表面）、规整而通畅的孔结构形态、较大的孔度以及适当的孔径大小与分布。

SEC 填料的色谱表征，除了前面所述的柱效、选择性、分离度、穿透性等参数以外，还需满足如下三项色谱指标要求。

1. 排除极限

表示填料可以用来分离高分子物质的最大限度、超过这个限度溶质就会在填料的粒隙间穿过而没有分离效果。排除极限主要取决于填料最大的有效孔径。

2. 分离范围

表示填料可以分离高分子物质的分子量范围。它一般指分离柱的分子量-淋洗体积校正曲线的线性部分。分子量高于和低于这个范围的溶质分别被排除和渗透，均没有分离效果。分离范围主要取决于填料有效孔的分布范围。对于高分子类型 SEC 填料，分离范围通常以相差 2 个数量级的分子量为宜。

3. 固流相比

指填料的有效孔内体积与填料的颗粒间隙体积之比值。它反映了色谱柱的分离容量，其值越大越好。在紧密填充的条件下，固流相比主要与填料的孔度有关。

以上所述，既是填料在制备过程中的主要研究内容，也是填料在应用过程中的重要参考依据。

二、凝胶渗透色谱填料

凝胶渗透色谱 (gel permeation chromatography, GPC) 方法，通常都是在有机溶剂（如 THF）淋洗体系中进行，与之相匹配的填料是疏水性的，其分离对象一般是油溶性的高分子物质。

高分子类型 GPC 填料目前基本上还是以交联共聚的苯乙烯-二乙烯苯多孔微球为主。这类填料的孔径大小与孔的形态因其致孔方法不同而异。单纯由交联网络所决定的孔一般都是均匀的微孔，这种结构均匀的产品呈透明状；结构半均匀的填料是使用良溶剂致孔而聚合的，产品呈半透明状，排除极限可达 5×10^5 聚苯乙烯分子量；结构非均匀的填料通常是用非良溶剂致孔的，由于聚合反应一开始就产生相分离，形成了由交联聚合物小颗粒堆积而成的大孔，产品呈乳白色，排除极限可高达 10^7 聚苯乙烯分子量。

研究表明，在 GPC 中溶质的传质阻力与高分子填料颗粒内部无规分布的位垒和复杂的孔结构密切相关。由于填料颗粒内部高聚物超微结构粒子堆堆积的不均匀性而使多孔骨架弯曲所产生的障碍作用，将是影响色谱行为的主要因素。所以致孔技术是合成凝胶色谱填料至关重要的研究内容。

交联聚苯乙烯多孔微球作为高效的 GPC 填料已有许多商业化产品，如 μ -Spherogel 系列，Shodex GPC-A、-H、-KF 系列，

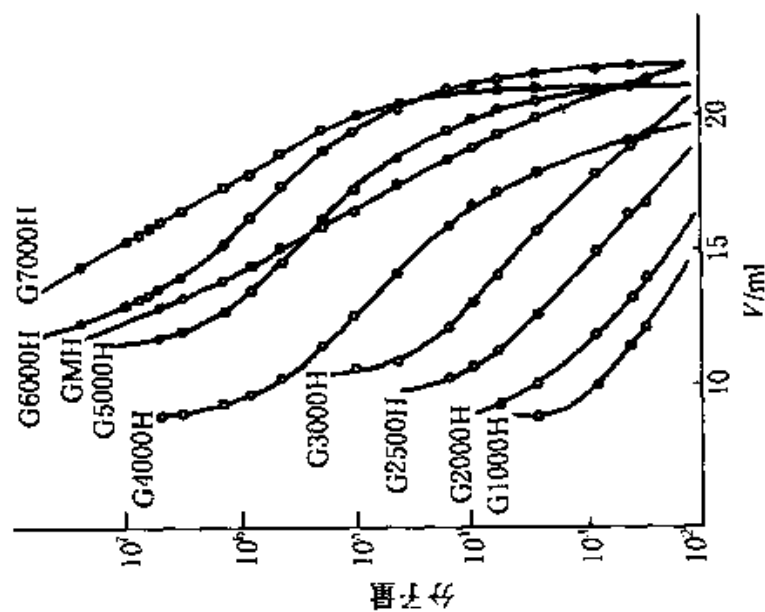


图6-23 GPC分离柱的分子量-淋洗体积校正曲线

分离柱: TSK gel HXL (300mm × 7.8mm)

淋洗液: TEF

流速: 1.0ml/min

检测: RI

样品: 聚苯乙烯

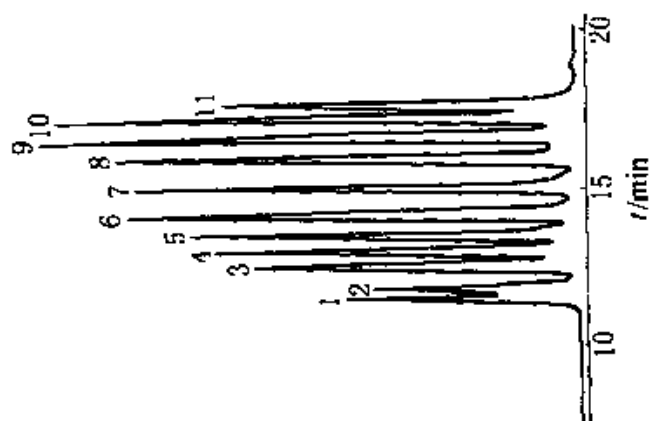


图6-24 邻苯二甲酸酯的GPC分离

分离柱: TSK gel G1000 HXL (300mm × 7.8mm i.d.);

淋洗液: THF

流速: 1.0ml/min

检测: UV280nm

样品: 1-邻苯二甲酸二辛酯; 2-邻苯二甲酸二庚酯; 3-邻苯二甲酸二乙酯; 4-邻苯二甲酸二丁酯; 5-邻苯二甲酸二丙酯; 6-邻苯二甲酸二乙酯; 7-邻苯二甲酸二甲酯; 8-丙基苯; 9-乙基苯; 10-甲苯; 11-溶剂峰

PLRP-S 系列、TSK gel-H、-HXL 系列, Styragel 系列、HSG 系列等等。这些填料大都是 $10\mu\text{m}$ 左右粒度均匀的微球; 颗粒机械强度良好, 可以在较高流速和压力下使用; 它们一般都有每米塔板数上万甚至数万的柱效。

图 6-23 给出了 TSK gel HXL 系列填料对于聚苯乙烯标样的分子量-淋洗积校正曲线。从曲线可以得到不同孔径尺寸 GPC 填料的排除极限、分离范围和固流相比。交联聚苯乙烯的 GPC 填料大都可以用来分离合成的高聚物、齐聚物, 也可用于较小分子量的物质, 例如较小孔径的 TSK gel G1000HXL 凝胶可使分子量 92~391 的邻苯二甲酸酯类等混合样品在较短的时间内得到良好的分离 (见图 6-24)。

三、凝胶过滤色谱填料

凝胶过滤色谱 (gel filtration chromatography, GFC) 方法是在水相淋洗体系中, 对于水溶性大分子化合物按其分子尺寸大小进行分离的一种液相色谱技术。

水溶性物质尤其是高分子量水溶性化合物的分离, 在生命科学和材料科学的发展中具有极其重要的意义。虽然前面所介绍的几种液相色谱技术对于此类问题的解决都是有特色的, 但是在溶质分子量相差较大的情况下, GFC 方法仍是目前最简便的一种分离手段。用于初级分离、缓冲液交换、有机溶剂纯化, 用于高分辨和高效快速分离以及分子量的测定等, 该方法都是有效的。

传统的 GFC 分离介质都是软质凝胶, 主要包括葡聚糖型凝胶如 Sephadex 系列; 琼脂糖型凝胶如 Sepharose 系列、Bio-Gel A 系列; 聚丙烯酰胺型凝胶如 Bio-Gel P 系列等。这些软质凝胶的粒度分布范围宽, 颗粒强度低, 不能经受压力操作, 分离速度慢, 一般只适于普通柱层析。但是它们的亲水性和生物相容性甚为良好, 适合于大规模地分离纯化生物大分子和水溶性高聚物, 所以作为普通常规层析介质, 仍得到广泛应用。

(一) 多糖型 GFC 填料

如前所述, 在传统多糖型凝胶的基础上, 已相继发展出多系列高交联结构的多糖型凝胶。表 6-5 给出了一部分目前常见的可用作 GFC 填料的多糖型凝胶。

表 6-5 部分常见的多糖型凝胶过滤色谱填料

产 品	分离范围 (球蛋白)	颗粒大 小/ μm	耐压 /MPa	最高流速 /(cm/h)	特性/应用
Superdex 30 prep grade	< 10 000	22~44	0.3	90	重组蛋白肽类、多糖、小蛋白等
Superdex 75 prep grade	3000~70 000	22~44	0.3	90	重组蛋白、细胞色素
Superdex 200 prep grade	10 000~ 600 000	22~44	0.3	90	单抗、大蛋白
Superose 6 prep grade	5000~ 5×10^6	20~ 40	0.4	40	肽类蛋白、多糖、寡核苷酸、病毒
Superose 12 prep grade	1000~300 000	20~40	0.7	40	肽类蛋白、多糖
Sephacryl S-100 HR	1000~100 000	25~75	0.2	60	肽类、激素、小蛋白
Sephacryl S-200 HR	5000~250 000	25~75	0.2	60	蛋白, 如小血清蛋白、白蛋白、血液抗体、单抗 (IgG/MAB)
Sephacryl S-300 HR	10 000 1.5×10^6	25~75	0.2	60	蛋白, 如膜蛋白和血清蛋白、血液抗体、单抗 (IgG/MAB)
Sephacryl S-400 HR	20 000~ 8×10^6	25~75	0.2	50	多糖、具延伸结构的大分子如蛋白多糖、脂质体 <25 000 bp DNA 限制片段
Sephacryl S-500 HR	葡聚糖 40 000 ~ 2×10^7	25~75	未经 测试	40	<25 000 bp DNA 限制片段, 如 DNA 限制片段
Sephacryl S-1000 HR	葡聚糖 5×10^5 ~ 1×10^8	40~105	0.1	300	巨大多糖分子、蛋白多糖; 小颗粒分子如膜结合囊 (<300~400nm 直径) 或病毒
Sepharose 6 Fast Flow	10 000~ 4×10^6	45~165	0.1	250	巨大分子如 DNA 质粒、病毒
Sepharose 4 Fast Flow	60 000~ 20×10^6	45~165	0.005	15	巨大分子如重组乙型肝炎表面抗原、病毒

续表

产 品	分离范围 (球蛋白)	颗粒大小/ μm	耐压 /MPa	最高流速 /(cm/h)	特性/应用
Sepharose CL-2B	70 000~ 40×10^6	60~200	0.005	26	蛋白、大分子复合物、病毒核酸、蛋白多糖、分子量的测量、特别是不能溶解/凝集于水溶液中的分子
Sepharose CL-4B	60 000~ 20×10^6	45~165	0.012	26	大蛋白、肽类、多糖、特别是不能溶解/凝集于水溶液中的分子及分子的测定
Sepharose CL-6B	10 000~ 4×10^6	45~65	0.02	30	蛋白、肽类、多糖、特别是不能溶解/凝集于水溶液中的分子及分子的测定

这些凝胶的物化参数和性能指标，较之传统产品均有很明显的改进与提高。大部分凝胶的颗粒分布范围比较窄，它们普遍具有良好的机械强度和化学稳定性，既可以在适当压力和较高流速下进行操作，也能够经受酸碱溶液清洗和在广泛 pH 值范围内使用。不同系列的产品各有其突出的特点，例如 Superdex 的分辨率高，Superose 的分离范围很宽，Sepharose FF 适于高流速分离，Sephacryl 经济实用而品种多样，Sepharose CL 更适合于含有机溶剂样品的分离。

此外，值得一提的是，在 Superdex 和 Superose 基础上发展出的一些颗粒细小而分布范围更窄的凝胶，作为高效 GFC 预装柱填料，既可在 FPLC、HPLC 系统中进行半制备分离，也可进行高效能的分析分离（见表 6-6）。

表 6-6 几种高效 GFC 预装柱的多糖型凝胶

名 称	平均颗粒 / μm	球蛋白分离 范围/D	特 性
Superdex Peptide PE	13~15	100~7 000	肽及其他小分子的半制备和高性能分析分离
Superdex Peptide HR	13~15	100~7 000	肽及其他小分子的半制备和高性能分析分离
Superdex 75 HR	11~15	3 000~70 000	蛋白、肽、核酸苷酸及其他小分子的半制备和高性能分析分离

续表

名 称	平均颗粒 /m	球蛋白分离 范围/D	特 性
Superdex 200 HR	13~15	10 000~600 000	蛋白、DNA 片段及其他小分子的半制备和高性能分析分离
Superose 12 HR	8~12	1 000~300 000	蛋白、肽、寡核苷酸及多糖的半制备和高性能分析分离
Superose 6 HR	11~15	5 000~5 000 000	蛋白、肽、寡核苷酸、核酸及多糖的半制备和高性能分析分离

Superdex Peptide 凝胶，是专为分子量 10 000 以下的肽类或小蛋白的分析及小量制备而设计的。该类凝胶作为高效的 GFC 填料，对于分子量 100~7000 的样品具有相当高的分辨率，甚至相差一两个氨基酸的肽分子亦可得以分离（见图 6-25）。此外还可以自由选择 pH=1~14 的任何淋洗液，包括 70% 甲酸，乙腈/TFA、6mol/L

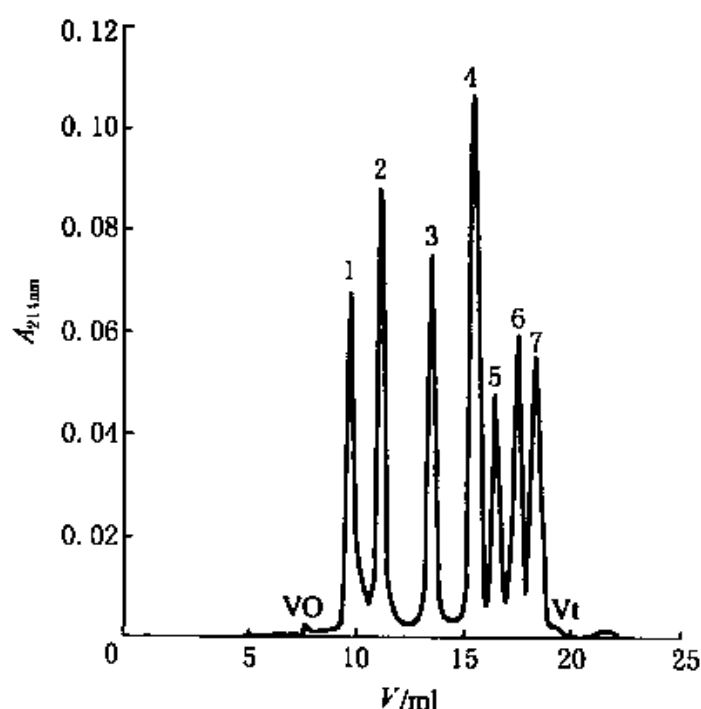


图 6-25 7 种肽类混合物的 GFC 分离

分离柱：Superdex Peptide HR (300mm × 10mm i.d.)

样品：1—Cytochrome C；2—Aprotinin；3—Gastrin I；

4—Substance P；5—(Gly)₆；6—(Gly)₃；7—Gly

盐酸胍、8mol/L 尿素、有机溶液、中性及碱性缓冲液等，来进行分离。Superose 6HR 与 12HR 凝胶具有很宽的分离范围，适合于蛋白、肽类、寡核苷酸、核酸、多糖等多种生物分子的分离与分析。图 6-26 表示核凝胶对骨髓瘤血清 IgA 的分离。

(二) 高聚物型 GFC 填料

以合成的多孔高聚物微球为基质的 GFC 填料，普遍来讲都要比多糖型凝胶的机械强度更好一些，可以经受高压和高流速操作，粒度分布范围也更窄些，甚至可达到颗粒单分散水平，所以它们大都属于高效填料，适合于在 HPLC 系统中使用。虽然多数合成树脂的化学结构决定了它们的亲水性和生物相容性还远不及多糖型凝胶，但是通过适当的改性处理，仍可达到预期目的。目前常见的以合成高聚物为基质的 GFC 填料，按其类型主要包括：带有亲水性基因的多孔交联聚甲基丙烯酸酯类树脂、交联聚乙烯醇树脂、被亲水化处理的交联聚苯乙烯树脂、羟基化聚醚类亲水性树脂等。表 6-7 列出了部分商品化的高聚物型 GFC 填料。

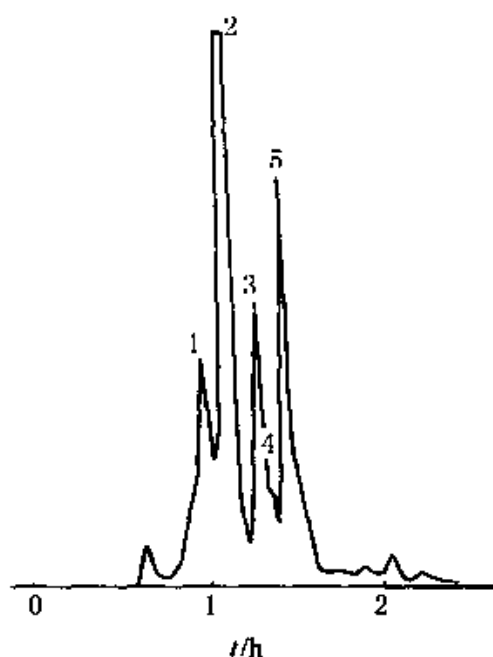


图 6-26 骨髓瘤血清
IgA 的 GFC 分离

分离柱: Superose 6 (300mm×10mm)
淋洗液: 0.05mol/L 磷酸盐 + 0.15mol/L NaCl (pH=2.0)

流速: 0.2ml/min

检测: UV280nm

样品: 1—IgA 高聚体; 2—IgA 二聚体;
3—IgA 单体; 4—IgG; 5—白蛋白

表 6-7 部分常见的高聚物基质凝胶过滤色谱填料

名 称	基质材料	粒度 / μ m	排除极限或分离范围
Ohpak Q-801	聚乙烯醇		700 (PEG), 1800 (多糖)
Ohpak Q-802	聚乙烯醇		1500 (PEG), 5000 (多糖)
Ohpak Q-803	GMA 共聚物		2×10^4 (PEG), 1×10^5 (多糖)

续表

名 称	基质材料	粒度/m	排除极限或分离范围
Ohpak Q-804	GMA 共聚物		2×10^5 (PEG), 5×10^5 (多糖)
Ohpak Q-805	GMA 共聚物		2×10^6 (PEG), 5×10^6 (多糖)
Ohpak Q-806	GMA 共聚物		1×10^7 (PEG), 2.5×10^7 (多糖)
Ionpak S-801	磺化 PS-DVB		1000 (多糖)
Ionpak S-802	磺化 PS-DVB		10000 (多糖)
Ionpak S-803	磺化 PS-DVB		5×10^4 (多糖)
Ionpak S-804	磺化 PS-DVB		5×10^5 (多糖)
Ionpak S-805	磺化 PS-DVB		5×10^6 (多糖)
Ionpak S-806	磺化 PS-DVB		5×10^7 (多糖)
Spheron P 40	HEMA 共聚物	分不同等级	$2 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ (多糖)
Spheron P 100	HEMA 共聚物	分不同等级	$7 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ (多糖)
Spheron P 300	HEMA 共聚物	分不同等级	$2.6 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ (多糖)
Spheron P 1000	HEMA 共聚物	分不同等级	$8 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ (多糖)
Spheron P 10000	HEMA 共聚物	分不同等级	$< 10^8$ (估计值)
TSK gel G2000 PW	亲水性高聚物		100~5000 (PEG)
TSK gel G3000 PW	亲水性高聚物	6, 13	1000×10^4 (PEG)
TSK gel G4000 PW	亲水性高聚物	10, 13	$2000 \sim 3 \times 10^5$ (PEG)
TSK gel G5000 PW	亲水性高聚物	17, 10	$4000 \sim 1 \times 10^6$ (PEG)
TSK gel G6000 PW	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)
PL-GFC-300Å	PS-DVB	8, 10	100~200kDa (多糖)
PL-GFC-1000Å	PS-DVB	8, 10	20~2000kDa (多糖)
PL-GFC-4000Å	PS-DVB	8, 10	100~20000kDa (多糖)
Toyopearl 系列	聚乙烯醇	分不同等级	$7 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ (多糖)
Asahipak GS Gel 系列	聚乙烯醇	9	$4 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ (多糖)

这些产品普遍具有小而均匀的粒度, 颇高的机械强度, 适宜的孔径大小与分布, 良好的亲水性和化学稳定性, 所以适于生物大分子和水溶性高分子的分离。OH pak 和 Ion pak 两个系列产品, 是日本 Shodex 公司为分离水溶性高分子而发展出的具有多种分离范围的亲水性高效 SEC 填料^[36,44]。Ion pak 属于以 PS-DVB 微球为基质的强酸性阳离子交换剂, 可用于不含离子化基团的诸如多糖和寡糖

之类化合物的分离，阳离子化合物能被吸附，而阴离子化合物则被排除。PL-GFC 系列产品是由孔径与之相对应的 PLRP-S 系列树脂发展而成的适于生物大分子分离的亲水性高效 SEC 填料^[49]。亲水性的 Spheron 树脂以及它们的单糖衍生物，均可作为 GFC 填料用于水溶性高分子的分离，后者用于蛋白质的分离以及用作亲和色谱载体，似乎更为有利，因为单糖衍生树脂有更好的亲水性能^[66,67]。基于聚乙烯醇基质的 Asahipak GS 系列，作为高效 GFC 填料，可用于诸如支链淀粉、蛋白质、肽类等化合物的分离^[41]。图 6-27 表明在一根颗粒为 9 μ m 的 Asahipak GS gel 填充柱上，蛋白质标样的分子量-淋洗体积校正曲线。Asahipak GS-320 树脂作为 HPLC 填料，用于氨基酸和肽类化合物的分析，也被研究和报道过^[68]。

在合成的亲水性高聚物凝胶中，羟基化聚醚树脂 TSK gel PW 系列作为 GFC 填料，其产品型号是最多的。这类填料无论是分离性能还是应用的广泛性，都表现得最为突出。PW 系列特别适合于多糖类化合物的分离，例如，GMPW（它是 G2500PW、G3000PW 和 G6000PW 混合物）填充柱、G6000PW + G3000PW 填充柱、G5000PW + G3000PW 填充柱都有很宽的分离范围和几乎呈线性的分子量校正曲线，所有非离子型、阴离子型和阳离子型的多糖类化合物以及多糖的衍生物，都能成功地得以分离^[69,70]。带有小孔结构的树脂如 G2000PW 和 Lligo PW 可用于高分辨地分离寡糖类化合物^[71]。大孔结构的 PW 树脂，如

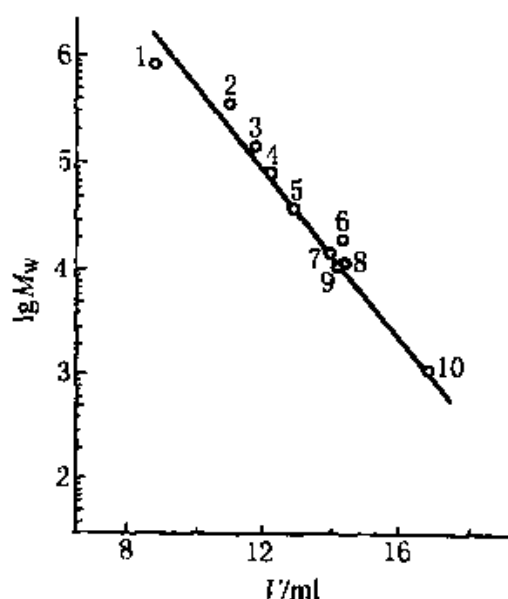


图 6-27 蛋白质标样的 GFC 校正曲线

分离柱：Asahipak GS gel (50mm × 7.5mm i.d.)
淋洗液：0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 + 0.3mol/L NaCl (pH=7.0)
流速：1ml/min
样品：1—IgM；2—IgA；3—IgG；4—铁传递蛋白；5—鸡白蛋白；6—胰凝乳蛋白酶原；7—肌红蛋白；8—核糖核酸酶；9—细胞色素 C；10—催产素

G5000PW 和 G6000PW 作为 GFC 填料, 虽然对普通蛋白质的分辨率低, 但可用于大分子蛋白质的分离^[69,72,73]。肽类化合物在 PW 填充柱上的分离, 为了减小疏水性吸附作用, 宜使用特殊的淋洗剂^[71,74]。PW 树脂也可用于核酸, 如 DNA 碎片、RNA 和寡核苷酸的分离^[75,76]。DNA-PW 是一种特殊的、适于 1000~7000 碱基对的大 DNA 碎片的分离。图 6-28 给出了一个使用 DNA-PW 填充柱的分离实例。

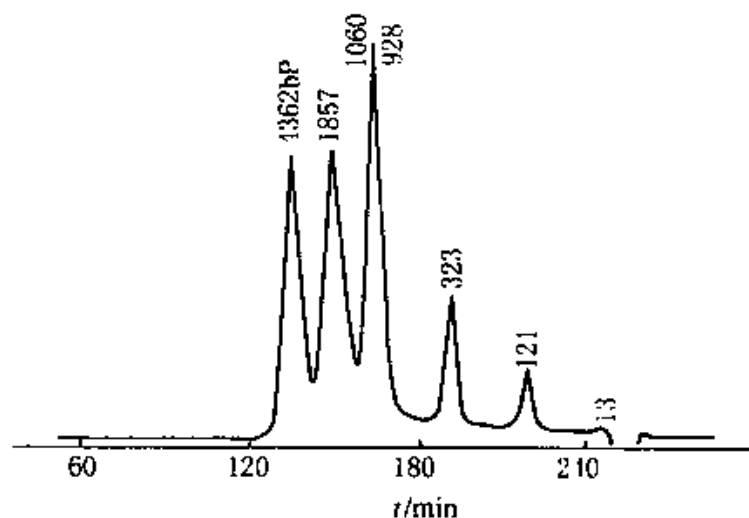


图 6-28 质粒 pBR322 的限制性内切酶 EcoRI 及 BstNI 酶解产物的 GFC 分离

分离柱: TSK gel G-DNA-PW (300mm×7.8mm×4)

淋洗液: 0.1mol/L Tris-HCl (pH = 7.5) + 0.3mol/L NaCl + 1mmol/L EDTA

流速: 0.15ml/min

检测: UV260nm

第八节 有机高分子类型的亲和色谱填料

亲和色谱 (affinity chromatography, AFC) 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是有特殊意义的。如果说前面所介绍的几种色谱方法都是通用性分离技术的话, 那么 AFC 方法则基本上是属于专一性的, 前者是根据溶质分子之间在物理化学性质方面的差异所建立的分离方法, 后者则利用了生物分子之间

特异性相互作用而实现分离的。这种特异性相互作用是活性生物大分子固有的特征，例如酶能与底物、抑制物、辅酶等结合，抗体能与互补的抗原相结合，凝集素能与细胞的表面抗原以及某些糖类相结合，激素能与蛋白及细胞受体形成复合物，基因可与核酸和阻遏蛋白相互作用等等。所以，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。

亲和色谱的显著特点是，具有其他分离技术所不能比拟的高选择性，而且能有效地保持生物大分子高级结构的稳定性，活性样品的回收率也比较高，所以这种技术用于纯化酶、抗体、核酸、辅助因子和各种能识别、贮存和运载具有生化和药理作用物质的蛋白质，用于生物样品解离常数和平衡常数以及动力学序列和结合机制的研究等，都是很有意义的。

有机高分子类型的 AFC 填料，按其基质材料，可分为多糖型和高聚物型两大类；按其配体性能即填料所携带配体对被分离物质的选择性特征，可分为专用性和通用性两大类。专用性填料，例如基于抗原与抗体、激素与受体蛋白等特异性相互作用的填料，其配体对于目标化合物有很高的特异选择性和亲和能力。通用性填料因其配体可与数种生物分子产生亲和作用，显然达不到专一的选择性，但这类配体的种类很多，价格低廉而容易获得，应用范围非常广泛，所以在亲和色谱中仍处于主导地位。常见的通用性亲和配体，主要包括金属螯合配体（如螯合了 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子的配体），小分子类配体（如氨基酸、肽类、明胶、肝素等），颜料类亲和配体（如 Cibacron 蓝、Procion 红等），外源凝集素类亲和配体（如刀豆球蛋白 A、扁豆外源凝集素、麦芽外源凝集素等）、核酸与核苷酸类亲和配体（如 AMP、PolyA、PolyU 等）。

从亲和配体的连接方式来看，既可以将配体与基质直接偶联，也可以在基质与配体之间插入一如适当长度的链状间隔臂。大量研究表明带有间隔臂的 AFC 填料往往具有更为优异的色谱性能，由于适当的间隔臂链段可以有效地克服基质表面的几何位阻效应，使

得配体更容易与被分离物质相结合。对于以小分子为配体来分离大分子的亲和填料来说,间隔臂的作用就更为重要了。AFC 填料的间隔臂按其结构类型,主要包括脂肪链的烃类、链状的聚胺类、肽类、链状聚醚类等。间隔臂有亲水性的,也有疏水性的,间隔臂链段长度则视其结构与性能不同而异,例如疏水性的脂肪烃类链段,一般为 2~10 个亚甲基的长度,过长会因其自身返折而失去作用,也会因其产生强疏水性吸附而对蛋白质的分离不利。

一、多糖基质的 AFC 填料

常见的多糖型凝胶,如 Sepharose 4B 与 6B、Sepharose 4FF 与 6FF、Sepharose CL-4B 与 CL-6B 等,均可用作 AFC 填料的基质。这些凝胶经活化处理后,可用如上所述的各类亲和配体进行偶联,制备出具有相应分离作用的专用性或通用性的亲和层析介质。目前这类介质已得广泛应用。使用小颗粒的高效多糖型凝胶,例如平均粒度 34 μ m 的 Sepharose HP 凝胶,所制得各种亲和预装柱填料也实现了商品化(见表 6-8)。

表 6-8 多糖基质 Sepharose HP 的亲亲和预装柱填料

类别名称	平均粒度/ μ m	配体	应用特性
抗体亲和填料	90	r-protein A	分离纯化单抗,负载量高,专一性强
抗体亲和填料	34	Protein A	分离纯化免疫球蛋白,专一性强
抗体亲和填料	34	Protein A	纯化 IgG; 与 Protein A 相比, Protein G 对牛、鼠、马的多 IgG 结合更强,不同的是 Protein G 也可结合人工 IgG3
金属螯合填料	34	Chelating Cu ²⁺	纯化暴露氨基酸的蛋白/肽: His (Cys, Trp). 如巨球蛋白、干扰素
抗生素配体亲和填料	34	Heparin	纯化抗凝血激酶和别的凝集因子,脂蛋白、脂酶、蛋白合成因子、激素、类固醇受体、DNA 结合蛋白、干扰素
肝素配体亲和填料	34	Streptavidin	利用生物素和抗生素的结合作用做亲和层析;如使用生物素标记的抗体纯化相应抗原

续表

类别名称	平均粒度/ μm	配 体	应用特性
颜料配体亲和填料	34	Blue	纯化抗凝血激酶、核酸酶、 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 依整酶、ATP 依赖酶、酯蛋白、干扰素、白蛋白等
外源凝集素亲和填料	34	Con A	纯化糖蛋白、糖肽、糖脂
外源凝集素亲和填料	34	Lentil Lectin	纯化糖蛋白、糖肽、糖脂
外源凝集素亲和填料	34	Wheat Germ Lectin	纯化糖蛋白、糖肽、糖脂

二、高聚物基质的 AFC 填料

各种合成的高聚物微球，只要它们的结构参数和物化性能适宜，基本上都可作为基质树脂，用于制备高效的 AFC 填料。常见的基质微球主要有交联聚苯乙烯、交联聚甲基丙烯酸酯类、亲水性的羟基化聚醚、交联聚乙烯醇等树脂。这些类型的树脂，特别是前面所介绍的各种产品，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。如前所述，虽然多数合成的高聚物微球在亲水性和生物相容性方面，还不及多糖型凝胶那样好，但通过适当的化学修饰，仍能有效地克服其非特性吸附作用。此外从合成的角度来看，相比之下在高聚物基质微球上引入间隔臂和偶联配体，也是比较容易实现的。

目前高聚物基质的 AFC 填料已得到广泛应用，而且基本上都是高效的，表 6-9 给出了一部分常见的商业化产品。

表 6-9 部分常见的高聚物基质的高效亲和色谱填料

配 基	名 称	基 质	粒度/ μm	主要应用
羟基琥珀酰胺	Affi-Prep 10	高聚物	50	分离伯氨基偶合物等
蛋白 A	Bio-Gel Protein A	高聚物	50	分离纯化抗体等
蛋白 A	Affi-Prep Prot A	高聚物	40~60	分离纯化免疫球蛋白等
蛋白 A	PL-AFC Protein A	高聚物	10~25	
Cibacron 蓝	Shodex AFPAK	高聚物	15~20	分离纯化酶类等
半刀豆球蛋白 A	Shodex AFPAK	高聚物	15~20	分离糖类等
亚氨基二乙酸	TSK gel Chelate 5PW	亲水性高聚物	10	分离纯化蛋白质、酶类等

续表

配基	名称	基质	粒度/ μm	主要应用
肝素	TSK gel Heparin-5PW	亲水性高聚物	10	纯化蛋白酶、核酸酶类等
Cibacron 蓝	TSK gel Blue-5PW	亲水性高聚物	10	纯化核酸酶、细胞生长素等
<i>m</i> -氨基苯基硼酸	TSK gel Boronate-5PW	亲水性高聚物	10	分离糖蛋白、糖类、转移 RNA 等
<i>p</i> -氨基苯甲脒	TSK ABA-5PW	亲水性高聚物	10	纯化蛋白酶、激酶等
蛋白 A	Protein A POROS	DS-DVB	10, 20	分离纯化 IgG
IDA	Imidodiacetate POROS	DS-DVB	10, 20	分离纯化蛋白质等

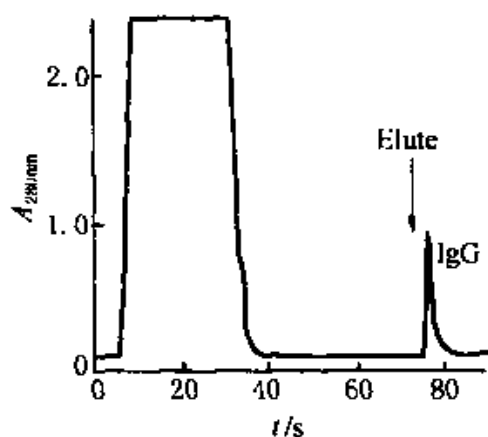


图 6-29 杂交细胞培养
上清液中 IgG 的 AFC 分离
分离柱: Protein A POROS, 30mm ×
2.1mm (i.d.)
淋洗液: 10mmol/L 磷酸盐 +
0.15mol/L NaCl (pH=7.4)
洗脱使用 0.3mol/L 乙酸 (2%) +
0.3mol/L MgCl₂
流速: 2ml/min
检测: UV280nm

由于可供选择的基质树脂种类很多, 加之每种树脂都可与不同性能的亲和配基相偶联, 所以从结构来看, 高聚物型 AFC 填料的种类是相当多的。特别是以如前所述的几种高柱效、高穿透性树脂为基质的产品, 诸如基于 PLRP-S (交联聚苯乙烯) 树脂衍生的 PL-AFC 填料^[49]、基于 POROS (交联聚苯乙烯) 树脂衍生和 AFC 填料^[29]、基于 Asahipak (交联聚乙烯醇) 树脂衍生的 AFC 填料^[77,78]、基于 TSK gel PW (羟基化聚醚) 树脂衍生的 AFC 填料^[79~83]、基于 Spheron (交联聚甲基丙烯酸羟乙酯) 树脂衍生的 AFC 填料^[84~88]等, 对于生物分子的分离纯化, 均有优异的色谱性能,

并已得到广泛应用。图 6-29 给出了 Protein A POROS 填料的一个应用实例, 可以看这种具有贯流色谱特征的亲和填料, 非常适于高效快速分离, 在一根 30mm × 2.1mm (i.d.) 的填充柱上, 用于杂

交细胞上清液中 IgG 的纯化, 仅需 80s 就可以获得满意的结果^[29]。

在亲和色谱技术中, 除了常见的已经偶联了各种配体而直接可用于 AFC 分离填料之外, 还会经常看到一些带有不同反应基团的可用作亲和载体的产品。这类树脂, 例如 TSK gel Tresyl-5PW、Aldehyde-POROS、Epoxy-POROS、Tresyl-POROS、Spheron-Epoxy 等, 都有很高的反应活性, 在温和的条件下很容易与各种配体进行偶联, 使用者可根据自己的需要选择配体, 就能方便地制备出相应的 AFC 填料。

参 考 文 献

- 1 Walton H F. Anal. Chem. 1980, 52: 15R
- 2 Majors R E, Barth H G, Lochmuller C H. Anal. Chem. 1982, 54: 223R
- 3 Hagnauer G L. Anal. Chem. 1982, 54: 265R
- 4 Majors R E, Barth H G, Lochmuller C H. Anal. Chem. 1984, 56: 300R
- 5 Barth H G, Barber W E, Lochmuller C H, Majors R E, Regnier F E. Anal. Chem. 1986, 58: 211R
- 6 Barth H G, Barber W E, Lochmuller C H, Majors R E, Regnier F E. Anal. Chem. 1988, 60: 387R
- 7 Dorsey J G, Foley J P, Cooper W T, Barford R A, Barth H G. Anal. Chem. 1990, 62: 324
- 8 Barth H G, Boyes B E. Anal. Chem. 1990, 62: 381
- 9 Dorsey J G, Foley J P, Cooper W T, Barford R A, Barth H G. Anal. Chem. 1992, 64: 353R
- 10 Barth H G, Boyes B F. Anal. Chem. 1992, 64: 428R
- 11 Dorsey J G, Cooper W T, Wheeler J F, Barth H G, Foley J P. Anal. Chem. 1994, 66: 500R
- 12 Barth H G, Boyes B E, Jackson G. Anal. Chem. 1994, 66: 595R
- 13 Dorsey J G, Cooper W T, Siles B A, Foley J P, Barth H G. Anal. Chem. 1996, 68: 515R
- 14 Barth H G, Boyes B E, Jackson C. Anal. Chem. 1996, 68: 445R
- 15 Barth H G, Boyes B E, Jackson C. Anal. Chem. 1998, 70: 251R
- 16 Dorsey J G, Cooper W T, Siles B A, Foley J P, Barth H G. Anal. Chem. 1998, 70: 591R
- 17 Lacourse W R. Anal. Chem. 2000, 72: 73R

- 18 Pietrzyk D J, Cahill W J, Stodola J D. J. Lig. Chromatogr, 1982, 5: 443
- 19 Iskandarami Z, Pietrzyk D J. Anal. Chem. 1981, 53: 489
- 20 Kimura Y, Kitamura H, Araki T, Noguchi K, Baba M. J Chromatogr, 1981, 206: 563
- 21 Tweeten K A, Tweeten T N. J Chromatogr, 1986, 359: 111
- 22 Ugelstad J. European 0003905. 1979
- 23 Ugelstad J, Mork P C, Kaggernd K H, Ellingsen T, Berge A. Adv. Colloid inter-face sci. 1980, 13: 101
- 24 Ugelstad J, Mfutakamba H R. J Polym Sci, 1985, 72: 225
- 25 Kulin L I, Flodin P, Ellingsen T, Ugelstad J. J Chromatogr, 1990, 514: 1
- 26 Ellingsen T, Aune O, Ugelstad J, Hsgen S. J Chromatogr, 1990, 535: 147
- 27 Afeyan N B, Gordon N F, Magsaroff I, Varady L, Fulton S P, Yang Y B, Regnier F E. J Chromatogr, 1990, 519: 1
- 28 Afeyan N, Fulton S, Gordon N, Mazsaroff I, Varady L, Regnier F E. Biotechnolo-gy, 1990, 8: 203
- 29 Afeyan N B, Fulton S P, Regnier F E. J Chromatogr, 1991, 544: 267
- 30 苏天升, 杨树明. 中国发明专利 ZL 95103038. 8
- 31 杨树明, 常晓青, 田秀兰等. 化学通报. 1997, 8: 40
- 32 Coupek J, Krivakova M, Pokorny S. J Polym Sci Polym Symp, 1973, 42: 185
- 33 Mikes O, Strop P, Zbrozek J, Coupek J. J Chromatogr, 1973, 119: 339
- 34 Mikes O, Strop P, Coupek J. J Chromatogr, 1978, 153: 23
- 35 Strop P, Cechova D, Tomasek V. J Chromatogr, 1983, 259: 225
- 36 Alfredson T V, Wehr C T, Thallman L, Klink F. J Lig Chromatogr, 1982, 5: 489
- 37 Smigol V, Svec F. J Appl Polym Sci, 1992, 46: 1439
- 38 金超, 杨彦果, 赵中璋等. 科学通报. 1999, 44 (18): 1951
- 39 Hashimoto T, Sasaki H, Aiura M, Kato Y. J Polym Sci Polym Phys Ed. 1978, 16: 1789
- 40 Kato Y, Komiya K, Sasaki H, Hashimoto T. J Chromatogr, 1980, 193: 311
- 41 Wada H, Makino K, Takeuchi T, Hirouki H, Noguchi K. J Chromatogr, 1985, 320: 369
- 42 Germershausen J, Karkas J D. Biochem Biophys Res Commun, 1981, 99: 1020
- 43 Gurkin M, Patel V. Am Lab (Fairfield, Conn.). 1982, 14: 64
- 44 Dubin P L. Sep Purif Methods 1981, 10: 287
- 45 Brown E, Boschetti E. Inf Chim, 1982, 222: 131
- 46 施良和. 凝胶色谱法. 北京: 科学出版社, 1985
- 47 Bristow P A, Knox J. Chromatographia. 1977, 10: 279

- 48 Kato Y, Kitamura T, Hashimoto T. *J Chromatogr*, 1985, 333: 93
- 49 Lloyd L L. *J Chromatogr*. 1991, 544: 201
- 50 Kato Y, Nakatani S, Kitamura T, Yamasaki Y, Hashimoto T. *J Chromatogr*, 1990, 502: 416
- 51 Hashimoto T. *J Chromatogr*, 1991, 544: 249
- 52 Kato Y, Nakamura K, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1983, 266: 385
- 53 Kato Y, Nakamura K, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1984, 294: 207
- 54 Mikes O, Strop P, Hostomska Z, Smrz M, Slovakova S, Coupek J. *J Chromatogr*. 1984, 301: 93
- 55 Mikes O, Hostomska Z, Strop P, et al. *J Chromatogr*. 1988, 440: 287
- 56 Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1991, 544: 257
- 57 Kato Y, Kitamura T, Mitsui A, et al. *J Chromatogr*. 1988, 447: 212
- 58 Kato Y, Yamasaki Y, Onaka A, et al. *J Chromatogr*. 1989, 478: 264
- 59 Su T S, Li S G, Hu X Z. *Anal Sci*. 1991, 7 Supplement: 191
- 60 Rocklin R D, Pohi C A, Schibler J A. *J Chromatogr*. 1987, 411: 107
- 61 Kato Y, Kitamura T, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1984, 292: 418
- 62 Kato Y, Kitamura T, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1986, 360: 260
- 63 Kato Y, Kitamura T, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1985, 333: 202
- 64 Kato Y, Kitamura T, Nakatani S, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1989, 483: 401
- 65 Hjerten S, Liao J. *J Chromatogr*. 1988, 457: 165
- 66 Macek K, Deyl Z, Coupek J, Sanitrak J. *J Chromatogr. Biomed. Appl*. 1981, 222: 284
- 67 Deyl Z, Macek K, Adam M, Horakova M. *J Chromatogr Biomed Appl*. 1982, 230: 409
- 68 Yasukawa K, Kasai M, Yangihara Y, Noguchi K. *J Chromatogr*. 1985, 332: 287
- 69 Kato Y, Matsuda T, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1985, 332: 39
- 70 Kato Y, Hashimoto T. *J Chromatogr*. 1982, 235: 539
- 71 Sasaki H, Matsuda T, Ishikawa Q, et al. *Sci Rep Toyosoda*. 1985, 29: 37
- 72 Okazaki M, Ohno Y, Hara I. *J Chromatogr*. 1980, 221: 257
- 73 Himmel M E, Squire P G. *J Chromatogr*. 1981, 210: 443
- 74 Swergold G D, Rubin C. *Anal. Biochem*. 1983, 131: 295
- 75 Kato Y, Sasaki M, Hashimoto T, et al. *J Chromatogr*. 1983, 266: 341
- 76 Kato Y, Yamasaki Y, Hashimoto T, Murotsu T, Fukushima S, Matsubara K. *J Chromatogr*. 1985, 320: 440
- 77 Ito N, Noguchi K, Shimura K, Kasai K I. *J Chromatogr*. 1985, 333: 107
- 78 Ito N, Noguchi K, Kazama M, Shimura K, Kasai K I. *J Chromatogr*. 1985, 348:

- 79 Kato Y, Nakamura K, Hashimoto T. *J Chromatogr.* 1986, 354: 511
- 80 Nakamura K, Toyoda K, Kato Y. *J Chromatogr.* 1988, 445: 234
- 81 Nakamura K, Hashimura T, Kato Y, Shimura K, Kasai K. *J Chromatogr.* 1990, 510: 101
- 82 Nakagawa Y, Tip T T, Belew M, Porath J. *Anal Biochem.* 1988, 168: 75
- 83 Yip T T, Nakagawa Y, Porath J. *Anal Biochem.* 1989, 183: 159
- 84 Turkova J, Valentova O, Coupek J. *Biochem Biophys Acta.* 1976, 420: 309
- 85 Turkova J, Blaha K, Adamova K. *J Chromatogr.* 1982, 236: 375
- 86 Turkova J, Blaha K, Horacek J. *J Chromatogr.* 1981, 215: 165
- 87 Rexova L, Filka K, Kocourek J. *J Chromatogr. Biomed Appl.* 1986, 376: 413
- 88 Taylor R F. *Anal Chem Acta.* 1985, 72: 241

第七章 色谱柱技术的新进展

第一节 色谱柱技术进展概况

近年来，为适应科学的进步和工业技术的发展，色谱柱技术也取得了显著的进步。一方面，现有的色谱技术已可以满足当前各个领域中对色谱柱的需求；另一方面，色谱柱技术的改进与提高仍在不断进行之中。除生化分离的特殊要求外，发展新药和基因组研究等，也对色谱柱提出了高效、高选择性以及快速检测等要求。特别是组合化学和蛋白质组学研究的蓬勃开展，多通道快速分离分析的要求增强。因而，微型液相色谱柱、芯片式色谱柱乃至微芯片全色谱分析系统成了色谱技术中的另一个热点。此外，将色谱的多模式分离与毛细管电泳结合起来的毛细管电色谱，也需要特殊的微色谱柱系统。我们似乎可以说，未来液相色谱的发展的特点将是两极分化式的发展。面对生物高技术产业和制药工业的制备色谱系统，需要发展简单、高效、高速、低成本的色谱柱填料及制备型色谱柱；而面向基因组、蛋白质组及环境分析的高效、高选择性以及高通量、快速分析系统，将会向微型化方向发展。

在色谱柱的硬件方面，一个有趣的进展是变形色谱柱。例如 Pecavar^[1]研究了锥型色谱柱管。使用这种柱子，以恒定流速进行淋洗时，其流动相线速度会随柱截面的缩小而逐渐递增，因而动态效率较高。当流量相同时，其分析时间比常规柱要短；而与细径柱相比，又可以有更大的样品负载量。但尽管如此，这种柱子能否更广泛地应用，最终还取决于是否能解决稳定的制备和以合理的价格为用户所接受。在微型 HPLC 柱方面，以 $1.0\mu\text{m}$ 无孔硅球反相填料填装的 $33\mu\text{m}$ 内径、长 $25\sim 50\text{cm}$ 弹性石英毛细管柱，可用于输液压力达 50MPa 的超高压色谱中，柱效可达 20 万理论塔板，而分

析时仅需几分钟^[2]。微芯片液相色谱也是一个引人注目的课题。Golubovic 报道了一种制造在硅片上的全微色谱系统^[3]。以微加工工艺,在硅片上蚀刻出一组平衡的沟槽,制成柱阵列以降低操作压力,并在硅片上制作了池体积小于 1 μ L 的电化学检测池。Eijkel 等人以玻璃和硅片组成了夹心式微芯片。为进行柱前衍生以提高检测灵敏度,他们在芯片上制作了可以加热的微型化学反应器,反应器池体积仅 50 μ L,加热功率 2W,升温速度可达 2 $^{\circ}$ C/s。以氨基酸为样品,以 NBD-F 为衍生试剂,对其进行荧光衍生。在 2min 内,反应池内温度即可达 60 $^{\circ}$ C,反应结束后,即可在芯片上进行色谱分离和荧光检测,十分方便。在电色谱柱的研制方面,前几年所遇到的制造“筛板”的问题已基本解决,制备技术有了长足的进步并逐渐普及。

在提高柱效方面,已经进行了大量工作。其主要的思路是采用更小的粒径,并发展高度均匀甚至粒径单分散的球形填料。目前,市场上已能够买到 3 μ m 乃至 1.5 μ m 粒径的硅胶基质色谱填料及色谱柱。以反相色谱为例,3 μ m 填料可达到每米 13 万理论塔板,而 1.5 μ m 的反相填料,更可达到每米 25 万理论塔板^[4]。但是,正如在第五章所讨论的那样,粒径的减少会导致柱子渗透性的降低,使得柱子的操作压力急剧上升。当然,缩短柱长,可以在一定程度上缓解这一问题。不过,在单根柱上所能取得的柱效与常规柱相差无几(图 7-1)。

如图 7-1 所示,在一根以 1.5 μ m 填料填装的 33mm $\times$ 7mm 柱上和在以 5 μ m 反相 C₁₈ 填料填装的 150mm $\times$ 4.6mm 柱子上所获得的分离情况大致相等。但是,在 1.5 μ m 填料柱上所花费的时间仅为常规柱的约 1/4。这在需要进行快速分离或高速筛选的场合是很有用的。在粒径高度均匀基球的制备方面,主要的工作是在高分子类型填料中进行的。第六章已做了详细的介绍。作者的实验室中,曾仔细研究了以堆砌硅珠法制备多孔硅球的动态过程和各种控制因素,发现粒径分散的主要原因是尿素-甲醛树脂球同步生长到一定时期时,会出现新的活性位点而产生的新生球所致。据此提出一种

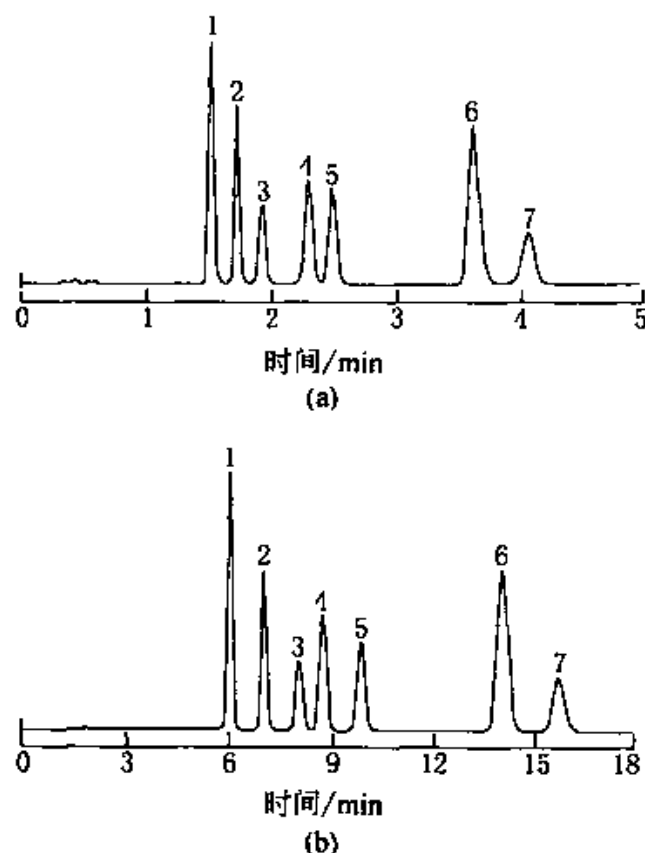


图 7-1 细粒径填料与常规填料的比较^[4]

(a) C_{18} , $1.5\mu m$ 粒径, $33mm \times 7mm$ (i. d.) 柱;

(b) C_{18} , $5\mu m$ 粒径, $150mm \times 4.6mm$ (i. d.) 柱

制备柱粒径均匀的多孔硅球的新方法——中间中止法。所制备的多孔硅胶呈高度均匀性, 95% 的硅胶位于 $(5 \pm 0.5) \mu m$ 区间内^[5]。

长期以来, 硅胶基质色谱填料对极性溶质、特别是对碱性溶质的强非特异性吸附, 以及导致生物大分子变性和失活的问题, 一直困扰着广大的学者和公司。此外, 与此有关的还有使用 pH 范围较窄 ($pH=2 \sim 8$), 化学稳定性相对较差等问题, 也都亟待解决。引起强吸附的主要原因, 来源于硅胶中所含的杂质金属离子, 以及在化学修饰或键合时, 因位阻等原因在硅胶表面上残存的、或新生的 (通过 $Si-Cl$ 键或 $Si-OR$ 键的水解) 硅羟基。针对上述吸附现象, 可以有针对性地采取对策, 主要的方法有:

(1) 开发、研制高纯度或超纯硅胶。如 Zorbax Rx SIL 系以高纯

硅溶胶为原料,以堆砌硅珠法制成的。其 SiO_2 纯度达 99.995%, 金属 Na^+ 含量约为 $10\mu\text{g/g}$, 其他金属离子含量亦很低, 仅 $1\sim 4\mu\text{g/g}$ 。因此, 这种硅胶的酸性很弱, 而且碱性溶质在其上的吸附很小。

(2) 设计和发展新的配基和新的键合试剂。例如, Kirkland^[6]以二异丁基十八烷基为反相配基所制备的反相填料 Zorbax SB- C_{18} , 具有非常好的低 pH 稳定性和重现性, 很适合于碱性物质的分离。以 1% TFA 的 50% 甲醇于 90°C 冲洗柱子 25 000 倍柱体积以上, 仍未见溶质的相对保留值下降。而对照柱子此时却多已遭到破坏。张任恩等^[7]以二丁基四甲基硅烷为高活性硅烷化试剂, 合成了高键合率的 C_4 反相填料 (如对小孔硅胶键合率达 $4.22\mu\text{mol/m}^2$)。因而, 所得到的填料对于一些碱性氨基酸、小肽等的分离均优于通常以氯硅烷合成的相应的 C_4 反相填料, 且低 pH 稳定性也很好。

(3) 增强表面的疏水性: 使用长链配基或含氟配基, 可以增强填料表面的疏水性, 并增加抵抗 OH^- 及 H^+ 离子攻击的能力。因此, 不同链长的反相填料的稳定性随其碳链长度而增加, $\text{C}_{30} > \text{C}_{22} > \text{C}_{18} > \text{C}_{12} > \text{C}_8 > \text{C}_4 > \text{C}_1$; 短碳链的填料, 适于分离多肽、蛋白质等样品, 而长链的, 如 C_{30} , 则适用于分离异构体、类红萝卜素、叶绿素和黄酮等, C_{30} 对这些化合物表现了极好的选择性。而使用含氟配基, 则可增加对卤代物、含羰基化合物 (醛、酮、酯等) 和亲脂性化合物等等选择性保留。

(4) 研制高聚物型填料, 从根本上解决硅羟基的吸附并提高化学稳定性。详细介绍参阅第六章。

(5) 聚合物包覆型填料: 兼具硅胶等无机基质的高强度和高聚物型填料的高化学稳定性, 是复合型填料。

(6) 开发其他适宜的基质填料, 如氧化锆、石墨化碳、氧化钛等。

通过上述多方面的努力, 已经基本上解决了硅胶基质填料所惯有的高吸附、低化学稳定性的弊病。在保持高效、高机械强度的同时, 具有了低吸附、宽 pH 范围可以使用的硅胶基质高效液相色谱填料。但是, 与常规的 HPLC 填料相比, 其价格当然高出许多。

因此,在选用时,还是以根据需要选用适宜的柱子为宜。

提高硅胶基质填料的化学稳定性,一直是色谱填料研究中的一个重要问题。除如前所述的超纯硅胶、新键合试剂、有机-无机复合材料和开发高分子型填料外,发展新型基质材料也是一条重要的途径。例如氧化锆、石墨化碳等。氧化锆经包覆处理后,可以表现出优异的稳定性和色谱性能。石墨化碳将在本章下节予以介绍。此外,为使读者对前述色谱柱技术进展,以及本书前面章节介绍较少的贯流色谱等有更深入的了解,下面将对它们择要加以介绍,供感兴趣的读者参阅。

第二节 贯流色谱填料

贯流色谱(perfusion chromatography)是20世纪80年代末至90年代初发展起来的一种色谱分离新方法^[8]。Ageyan及其同事制备了一种特殊的填料,在这种填料上,既有通常的微孔或大孔,例如50~150nm的微孔,又有贯穿整个颗粒的,孔径约600~800nm超大孔存在。这种贯通的大孔,可以允许流动相直接进入填料颗粒的内部并贯穿而过(图7-2)^[9]。这样,就相当于极大地降低了填料颗粒的直径,即以贯穿孔将填料分割成了很多更细小的颗粒,在这种小颗粒上的微孔已经短到不对传质过程构成明显的阻力。因此,在这种贯流色谱填料上,传质阻力已经非常小。同时,贯穿孔内流动相的线速度正比于柱子中流动相的速度,即传质过程已由扩散传质变为对流传质。在流体力学上描述对流传质与扩散传质之比的皮特里克数 $Pe \gg 1$ 。此时,描述谱带展宽过程的范第姆特方程,已与流动相线速度无关,理论塔板高度 H 已不随线速度 U 而改变而趋于一个定值。这就意味着,在一定范围内,即使提高流动相速度,也不会

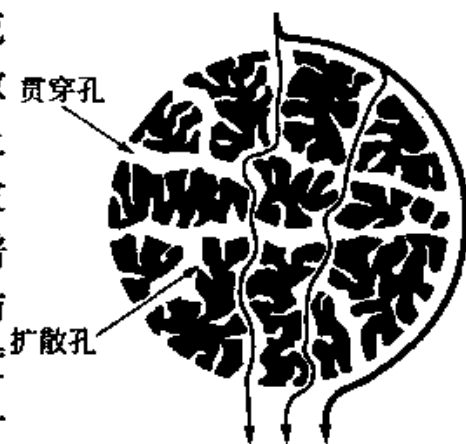


图 7-2 贯流色谱填料示意图

降低柱子的分离效率。由于填料上同时还存在有通常的多孔结构，其比表面积并未随贯穿孔的出现而大幅度降低。因此，在这种填料上的样品负载量也不随流速的增加而减少。再者，填料上 600~800nm 的贯穿孔，极大地增加了柱子的通透性，使得这种柱子即使工作于很高的流速下，其操作压力也不需要很高。所以，这种贯流色谱柱可以同时具有高流速、高效率、高样品负载量和低操作压力的特点。

这种新型的色谱填料一经出现，便以其巨大的优势，尤其是在生物大分子分离上的独特的优势引起了色谱界的关注。PerSeptive Biosystem 公司（现在是 PE 公司的一个部门）迅速将其工业化并以 Poros[®] 的名称推向市场，Poros[®] 主要以高交联度的高聚物小球制成，经表面化学修饰或衍生后，形成不同的功能基团。可适用于包括阳离子交换、阴离子交换、疏水相互作用、金属螯合、亲和以及反相等不同的色谱模式和不同的使用目的，按粒径分成不同的规格。目前，主要有标准直径 10 μ m、20 μ m 和 50 μ m 3 种（表 7-1）。

表 7-1 贯流色谱填料的类型

作 用	Poros [®]	贯流色谱填料的类型
阴离子交换	Poros HQ Poros QE Poros PI Poros D	聚苯乙烯-季铵盐 聚苯乙烯-季铵盐 聚酰胺 二乙基氨基乙基
阳离子交换	Poros HS Poros S Poros SP Poros CM	磺丙基 磺乙基 磺丙基 羧甲基
疏水作用	Poros HP2 Poros PE Poros ET	高密度苯基 苯基醚 乙基醚
金属螯合	Poros MC	亚胺-二乙酸盐
亲和	Poros A Poros G Poros HE	重组蛋白 A 重组蛋白 G 肝素

续表

作 用	Poros [®]	贯流色谱填料的类型
预活化基球	Poros AL	酰基
	Poros EP	环氧基
	Poros OH	羟基
	Poros NH	氨基
	Poros HY	酰肼
反相	Poros R ₁	PS-PVB
	Poros R ₂	PS-PVB
	Poros Oligo-R ₃	PS-PVB
	PepMap C ₁₈	硅胶基质

在最初的产品中,几乎均是以有机基球制备的,但现在已推出的硅胶为基质的 Poros 反相填料。即使是以高分子基球为原料的,因交联度非常高,所以它们均具有很高的机械强度,耐压可达 18MPa。曾有人以透射电镜观察了以 40MPa 处理过的 Poros 填料,发现它们完好无损。实验结果表明, Poros 柱可在 5000 ~ 6000cm/h 线速度下工作,即约为常规 HPLC 柱子线速度的 10 余倍,(例如,常规 Φ 4.6 柱子,若以 1ml/min 流速淋洗,其线速度约为 360cm/h)。与软胶柱如交联琼脂糖凝聚柱相比,约相当于 100 余倍。

图 7-3 给出了使用贯流色谱进行分析的一个实例。在一根直径 6mm, 长 50mm 的 Poros RH 型反相柱上,以 4ml/min 的流速分离含有五种蛋白质的混合物(包括核糖核酸酶 A、溶菌酶、 β -乳球蛋白 A 和 B 有机牛

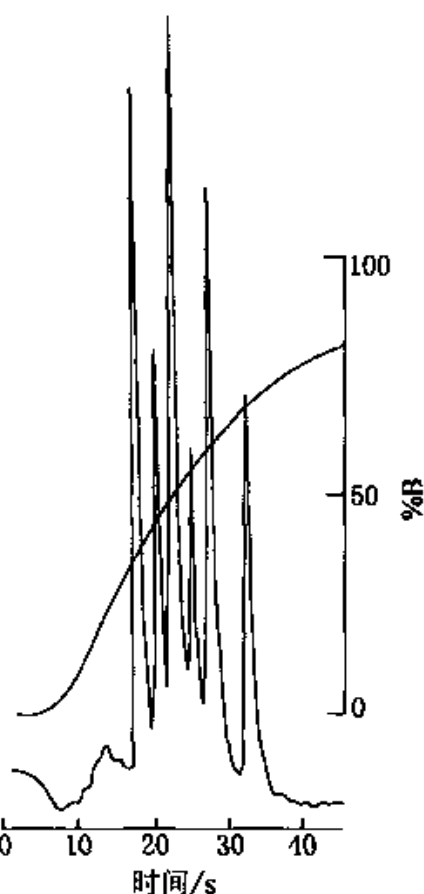


图 7-3 蛋白质的快速分离
柱子: POROS R/H, Φ 6×5mm
流动相 A: 0.1% TFA
流动相 B: 乙腈, 梯度淋洗, 4% ~ 75% B
流速: 4ml/min, 850cm/h

血清白蛋白)。此时流动相的线速度约 850cm/h ，在不到一分钟的时间内 (40s) 即可获得满意的分离。

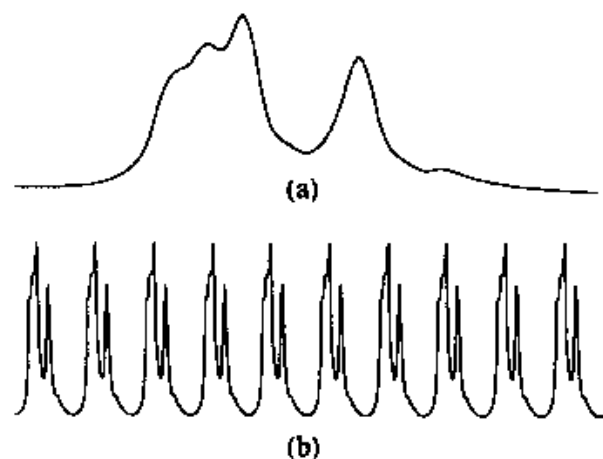


图 7-4 常规与贯流色谱模式的比较
(a) 常规色谱模式; (b) 贯流色谱模式

在快速分离时，其分离效率几乎没有改变（即理论塔板高度基本上没有变化），因此，这就意味着生产效率可以有数量级的提高。图 7-4 给出了常规色谱条件与贯流色谱条件下分离同一样品时的比较。从图上可以看出，流速提高了 10 倍，分离情况并未改变，但是，生产效率却可以有数量级的提高。

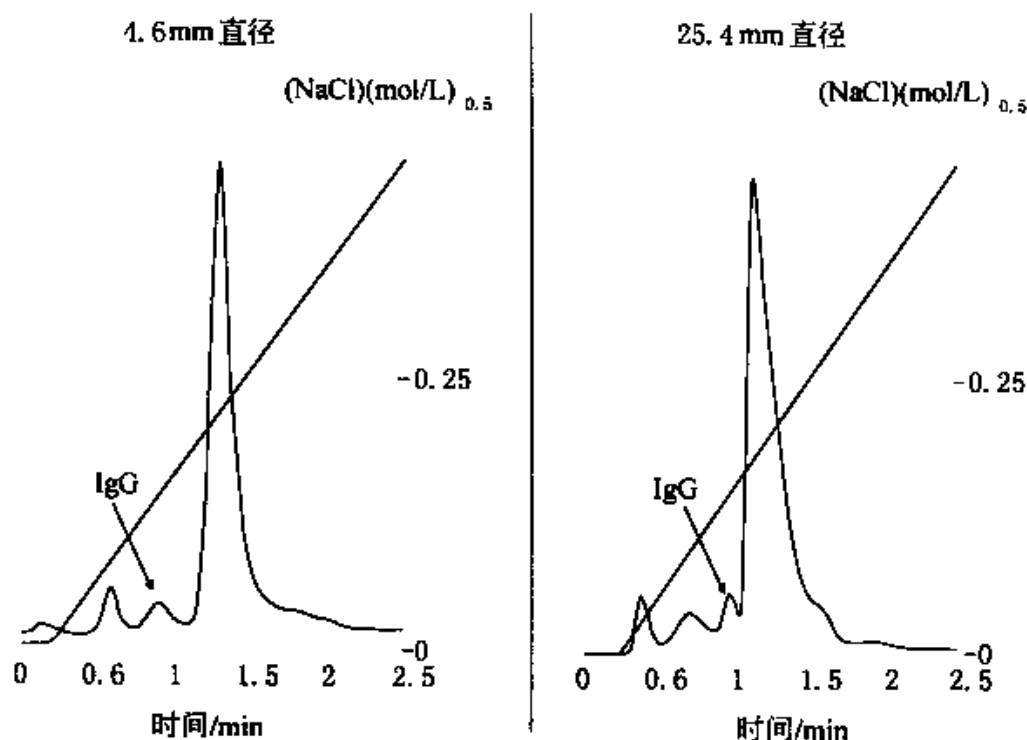


图 7-5 从杂交瘤细胞培养液中分离纯化 IgG

流速: 4.6mm 柱为 10ml/min (360cm/h);

25.4mm 柱为 340ml/min (4000cm/h)

由于贯流色谱所具有的特性,使得它在进行制备分离时具有很大的优势。在发展分离方法时,只需大约十分之一的的时间即可。特别是当使用配有计算机控制的快速液相色谱纯化系统时,可直接以一台仪器完成分离方法的选择、优化并进一步实现蛋白质产品的制备纯化。图 7-5 为从杂交瘤细胞培养液中分离 IgG 的色谱图。柱填料为 POROS Q 型,柱长 100mm,柱径分别为 4.6mm 和 25.4mm。在两支柱子上分别进样杂交瘤细胞培养上清液 50 μ l 和 30ml (4mg 蛋白/ml)。两根柱子流动相的线速度各为 3600cm/h 和 4000cm/h,这已是常规高效液相色谱柱的 10 倍以上了。但是,它们的分离效率却很相近。还应特别指出的是,在 25.4mm 柱子上的分离时间,仅约 25min,而处理的蛋白量确达 120mg 之多。这就意味着,这根柱子一天可处理近 30g 的蛋白质。对于生物工程产品来说,这已是生产级的制备规模了。

若将贯流色谱填料与常规的大孔硅胶填料和交联琼脂糖凝胶相比较,贯流色谱填料在每天、单位柱体积产量方面的优势就十分明显了(图 7-6),这种优势在高线速度下更加突出,这是传统的柱填料所无法比拟的。

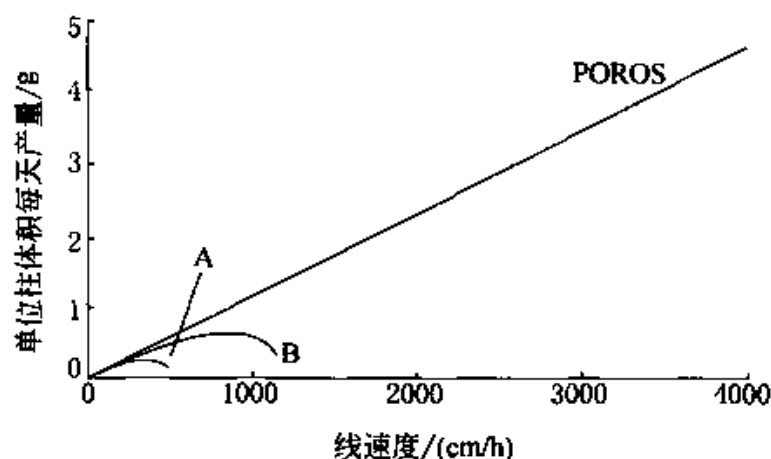


图 7-6 不同柱填料单位柱体积的产量与线速度的关系

有机基质的使用,使得此种填料具有优异的化学稳定性,它可以耐受达 pH=1~14 的介质环境,这是以硅胶为基质的填料所难以匹敌的。高交联度还赋予它低溶胀性和良好的耐湿性。正是上述

优异的特性,使得贯流色谱填料非常适合于生物大分子,如生物工程产品的快速分离纯化。近来,随着组合化学的发展,对快速高通量分析有了更迫切的要求,而贯流色谱恰好能用于这一方面的目的。此外,在临床分析方面也会有广泛的应用。

第三节 石墨化碳填料

硅胶的化学稳定性较差,仅能在 $\text{pH}=2\sim 8$ 的环境下工作。但是,在很多场合下,需要使用极端的 pH 条件。例如,在进行生化分离、分析时,不但有时用酸性的缓冲溶液,而且经常需要使用碱性溶液进行消毒并清除吸附在柱子上的杂蛋白。为此,人们曾大力发展高分子微球、氧化铝、氧化锆等化学稳定性更好的基质材料。但是,很难有一种材料能全面地满足液相色谱基质的要求。例如,高分子微球在有机溶剂中会发生一些溶胀,因此难以应用于以含有有机溶剂的流动相进行梯度淋洗的场合;氧化铝和氧化锆与硅胶相比,虽然化学稳定性较好,但其表面修饰与键合比较困难。因此,化学稳定性好的碳材料便很自然地考虑作为色谱填料的基质。

碳是人们非常熟悉的物质。焦炭、活性炭、石墨以及金刚石都是由碳元素形成的。近年来碳-60、碳纳米管等高技术材料相继出现,但其本质也是碳。碳材料有极好的化学稳定性,可耐受宽达 $\text{pH}=1\sim 14$ 的环境;耐高温,石墨化碳能耐 3000°C 以上的高温而不受破坏;经适当加工的碳材料可具有很好的机械强度,如碳纤维的抗张强度达到 400MPa ($4000\text{kg}/\text{cm}^2$) 或更高,其弹性模量达 4 万 MPa 以上;碳材料,特别是石墨材料和碳纳米管等,具有优良的导电性、导热性及电磁屏蔽特性。更为难能可贵的是,多孔性碳材料以其结构的特点而具有很好的吸附性及选择性。正是碳材料的这些特性,使人们期待它在色谱领域中能有特殊的用途。

1973 年,Telepchak^[10]以金刚石为填料,分离了苯和葱。尽管金刚石价格太贵,且无定形金刚石的比表面积太小使得这种填料没有实用价值但这毕竟是碳材料作为液相色谱填料的第一次有意义的尝试与探索。后来石墨化碳^[11]、热解碳^[12]、还原碳^[13]以及玻璃

碳^[14]等均先后被用来进行液相色谱分离。然而,它们或者因为机械强度差,或者因为色谱性能不太好而难以得到推广应用。直到二维石墨化碳球研制出以后^[15],才有了真正意义上的碳石墨型高效液相色谱填料。

Knox 和 Gillbert 提出了制备玻璃碳小球的硅胶模板法^[14],利用多孔硅胶小球为模板,令其吸饱酚醛树脂,然后在无氧的条件下加热使生成玻璃碳。以热碱液将二氧化硅溶去,便剩下了多孔的玻璃碳小球骨架,原来硅胶所占的体积便成了孔隙。将玻璃碳小球以高于 2000℃ 的温度处理,使其部分结晶而石墨化,同时,也消除了细小微孔所引起的不良色谱效应,便制出了二维石墨化碳球^[15]。这种石墨化碳球于 1988 年由 Hypersil 公司投入生产。定名为 Hypercarb。Hypercarb 微球直径 7μm,孔径 25nm,比表面积约 110m²/g,可耐受达 70MPa 的压强,机械强度极好。1994 年,5μm 的石墨化碳填料问世,它可达到更高柱效。此外,日本的 Tanaka (田中)等,以石油沥青直接制出碳球,再石墨化而制出石墨化碳小球,商品名为 Carbonex^[16]。

作者的实验室也曾开展过类似的研究^[17]。考虑到 Knox 等的工艺比较复杂,且如多孔硅胶制法一节所介绍的那样,在以堆砌硅球法制备硅胶时,利用的是脲醛树脂形成时的相分离反应。为制出硅球,必须将作为复合球基质的脲醛或三聚甲醛树脂烧去,只留下由堆砌硅珠构成的多孔硅胶。在上述工艺过程中,只要设法让脲醛树脂在升温过程中不裂解而成为玻璃碳,则以碱溶去二氧化硅即可得到多孔碳球。在制备过程中,通过对脲醛树脂热解过程的分析,选择了最有利于成碳的处理程序,在高纯惰性气体的保护下,制备出了直径 5μm 的玻璃碳-硅胶复合球,然后以 80℃ 热碱溶液处理,使二氧化硅完全除去,洗净,烘干,即得到多孔玻璃碳球。将这种碳球置石墨容器中,在工业电碳炉中于 3000℃ 左右处理,即得到多孔石墨小球。

经测定,这种石墨球的含碳量为 99%,平均孔径 30nm,孔径分布较宽,约为 3~80nm,比孔容 1.8cm³/g,远大于硅胶的比孔

容。因此，这种多孔石墨小球应能适于生化分离之需。

由部分石墨化的碳构成的石墨化碳球的结构，介于石墨和玻璃碳之间，其表面由片层状的六方晶体的碳所组成。其排列情况很类似于多核芳烃中的稠并环结构它不同于通常的石墨，具有二维结构，而石墨是三维结构的（图 7-7）。

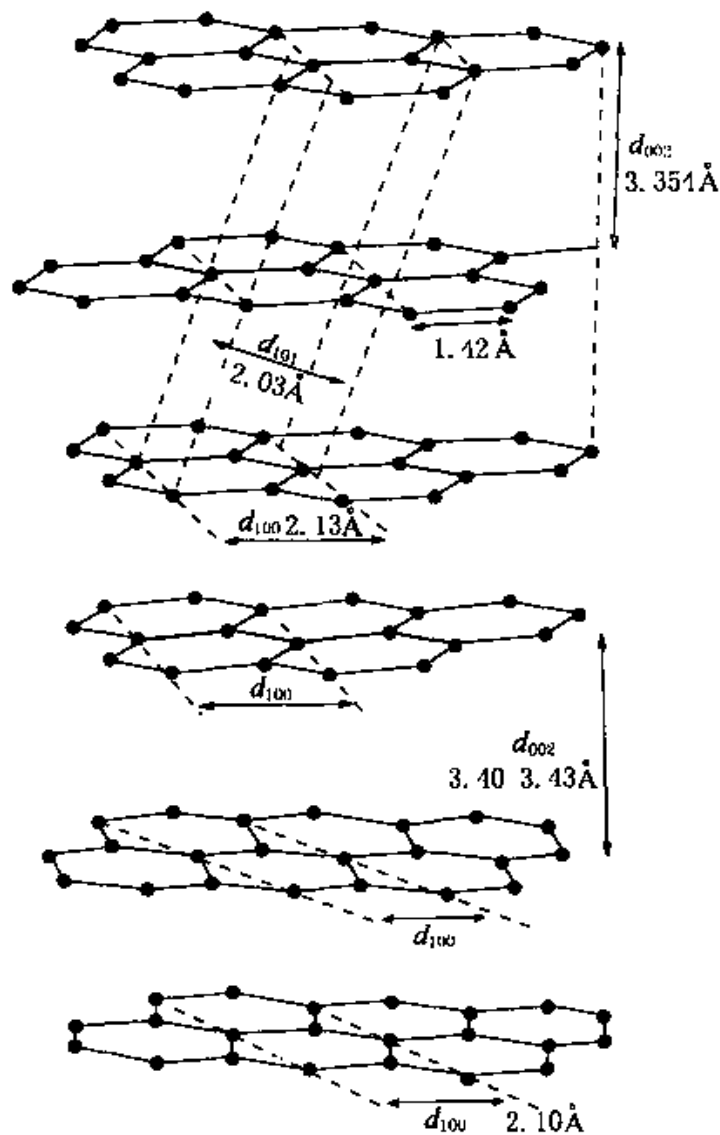


图 7-7 石墨化碳与石墨的晶体结构示意图

在石墨化碳中，002 晶面之间的宽度比石墨要宽。正是这种片层状的结构，赋予石墨化碳球以有别于通常的硅胶基质以反相填料的保留特性。

对石墨化碳填料色谱性能研究的结果表明,它基本上属于反相色谱的范畴。同时,与传统的硅胶基质填料相比,又有其独特的性质。例如,由于色散力作用的影响,石墨化碳对非极性化合物的保留能力较强;对结构较为类似的化合物的选择性较大。

一、非极性化合物在石墨化碳上的保留行为

与常规反相材料相似,脂肪族的芳香族化合物在多孔石墨化碳上的容量因子的对数与溶质的碳数成正比,即

$$\lg_{10} k' = \beta + \alpha n$$

这里, k' 是容量因子, β 是苯的理论 $\lg k'$, α 是斜率, n 为碳的数目。对于不同的同系物 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{n-1}\text{X}$, X 可以是 CH_3 、 COCH_3 、 Cl 、 NO_2 , 它们的斜率都是相似的。但是,若与硅胶为基质的反相填料相比,则可以看出明显的差距。在石墨化碳柱子上,上述式中 α 值比在硅胶基反相填料柱子上大,经测定,对石墨化碳来说, α 为 0.26,而硅胶柱上则为 0.08^[18]。

有人利用芳香族同系化合物进行了同样的研究^[19],其结果列于表 7-2。在石墨化碳上,邻位取代的多甲基苯的 α 值为 0.42,而在硅胶基填料柱上为 0.17 (Hypersil ODS)。说明使用石墨化碳可以得到更好的分离。

表 7-2 不同填料上斜率 α 的比较

基 质	$\alpha (\text{CH}_3)$	$\alpha (\text{CH}_2)$	流 动 相
CPG	0.46	0.22	甲醇
$\text{C}_{18}\text{-SiO}_2$	0.17	0.17	甲醇-水 (体积比 = 80 : 20)
SiO_2	0.046	0.1	戊烷
Al_2O_3	0.195	0.00	戊烷

二、极性化合物在石墨化碳上的保留行为

在通常的反相色谱体系上,随着溶质疏水性的增加,溶质与固定相间的色散作用加大,从而导致溶质的容量因子增加,保留增强。反之,随着溶质极性的增强,溶质与固定相之间的色散作用减少,与流动相水溶液之间的分子相互作用增强,导致容量因子降

低，而保留减弱。这一规律，在反相色谱中是普遍成立的。但是，在以石墨化碳为基质的反相色谱中却出现了反常情况。在石墨化碳反相色谱中，随着溶质极性加大，保留反而增强。这种现象可以称之为“石墨表面的极性增强效应”（polar retention effect on graphite）。正是因为有了这种效应，才使得石墨化碳填料具有了非常有用的特性。

在以硅胶为基质或以高分子小球为填料的反相柱子上，强极性组分总是随着不保留峰一起穿过柱子而没有保留，因而也难以得到良好的分离。但是，强极性化合物又恰恰是一些常见而又极为重要的物质，如许多生理活性物质、糖、多羟基、多羧基和多胺基取代的化合物以及表面活性剂等。因此，石墨化碳填料在这些物质的分离上有着独特的优势。

Hennion 等以苯酚、二羟基苯和三羟基苯为样品，研究了它们在石墨化碳、硅胶反相填料以及高聚物反相填料柱上的色谱行为。其结果如表 7-3 所示。

表 7-3 羟基苯在反相填料上的容量因子 $\lg k'_w$ [20]

化 合 物	SiO ₂ -C ₁₈	高聚物 (PRP-1)	PGC
苯酚	1.55	2.4	1.8
1, 3-二羟基苯	不保留	1.35	2.35
1, 3, 5-三羟基苯	不保留	0.5	2.7

在实验室中所得到的数据，系以不同浓度的甲醇-水为流动相所测定的。为进行相互间的比较，将各组数据作图，外推，便可得到纯水时的 k' 值，即 k'_w ，表中所给出的 $\lg k'_w$ ，即是外推甲醇为零时的 k' 值，其公式可表示如下：

$$\lg k = \lg k_w + AC_{\text{org}}$$

式中， k 为容量因子， k_w 即为外推值， A 为斜率， C_{org} 为溶剂的百分浓度，即有机相在流动相中的百分率。从表中列出的结果可知，对于苯酚，三种填料的性能是相近的，但随着溶质极性的加

大, 石墨化碳柱的保留作用明显增强。

那么, 为什么在石墨化碳上有如此反常的保留行为呢? 利用现有的色谱模型保留机理, 难以给出令人信服的解释。目前, 主要有两种理论假设, 一是 Horvath 的色散作用说, 其主要观点是, 认为溶质分子与溶剂及与固定相表面的相互作用是色散力。但是, 在石墨化碳上观察到的极性保留效应说明, 在此情况下, 有着完全不同于色散力的力在控制着保留行为。另一种理论假设是 Snyder 的吸附色谱理论^[21], 在此理论中, 氢键相互作用是主要的相互作用模式。但是, 石墨化碳表面上显然缺乏必要的氢键作用条件, 因而 Snyder 的理论亦难以应用。最近, Knox 等定量测定了石墨表面的极性保留效应, 比较了极性溶质及其相对应的“等效烃类化合物”保留行为的差异。所谓“等效烃类化合物”系指 CH_2 取代极性溶质中的 O, 以 CH 取代极性溶质中的 N 原子后所形成的化合物。为此, 他们引入了一个定量化的“极性保留效应”的表达式

$$\begin{aligned} & 2.303RT \lg(k_x/D_x) - 2.303RT \lg(k_{\text{HC}}/D_{\text{HC}}) \\ &= 2.303RT \lg\left(\frac{k_x/D_x}{k_{\text{HC}}/D_{\text{HC}}}\right) \\ &= 2.303RT \lg\left(\frac{k_x \cdot D_{\text{HC}}}{k_{\text{HC}} \cdot D_x}\right) \end{aligned}$$

式中, R 为气体常数, T 为绝对温度, k 为容量因子, D 为分配系数, 下角标 x 代表极性溶质, HC 为等效烃。经测定, 石墨化碳上的极性保留值高达 42 kJ/mol , 这一数值远离开一般的反相色谱中的分子间相互作用力。他们通过研究后提出, 石墨表面可以被看成质子的给体或电子的受体。正是极性化合物在石墨表面上诱导出的偶极效应, 使得石墨化碳表面对极性化合物产生了异常的保留, 这种偶极效应的能量 E 可以表示为

$$E = \frac{S\alpha}{(4\pi\epsilon_0\epsilon_r) r^4}$$

这里, E 是离子诱导偶极子的能量, S 是溶质对电荷量的贡献, α 是给定介质的极化常数 (注意, 这里的 α 不是代表选择性的 α),

对石墨, 这一值均为 $1.5 \times 10^{-10} \text{ cm}^3$ 。 $4\pi\epsilon_0\epsilon_r$ 是能量的静电单位, r 是溶质电荷与石墨表面之间的距离, ϵ_0 是真空中介电常数, 从上式可知, 偶极效应的能量与溶质对电荷量的贡献呈正比, 这也部分地解释了为什么溶质的极性越大, 它在石墨化碳表面上的保留也越强这一反常保留行为。尽管, 上述解释还是比较初步的, 但已有的实验事实, 使得石墨化碳的特殊保留行为已经得到确认, 并在一些通常色谱填料难以达到的极端条件下获得了应用。这里所指的极端条件, 包括强酸或强碱的流动相、高温等, 此外, 还可以引伸至强极性溶质, 特殊的化合物结构等, 下边拟举例加以介绍。

1. 亲水、疏水性物质的同时检测

非离子表面活性剂是一类极其重要的精细化工产品, 它广泛使用在工业、医药及日常生活中。但是, 非离子表面活性剂的分离、分析却是比较麻烦的。这是因为, 它的成分实在太复杂了。除了一些必须添加的辅料外, 它的主成分是脂肪醇或烷基酚的聚氧乙基醚以及作为副产物的聚乙二醇。由于它们系利用环氧乙烷(或环氧丙烷)的开环聚合反应而合成的, 所以不论主产物还是副产物, 均不是单一的化合物, 而是一个同系物混合物。再加上所使用的原料烷基酚也是一组具有不同烷基链长的同系物混合物, 所以非离子表面活性剂是一种非常复杂的混合物特性, 当以反相色谱分析时, 强极性的聚乙二醇会随不保留峰一起流出, 且不能获得分离; 而以正相色谱分离时, 这些聚乙二醇又会被吸附到柱子上难以淋洗下来。再加上聚乙二醇在紫外检测器上不能产生足够强的信号, 所以非离子表面活性剂的全分析需要复杂的样品处理程序和繁琐的操作步骤。但是, 由于石墨化碳填料可以分离强极性物质, 因而可使用单根石墨化碳柱子实现非离子表面活性剂的全分析(图 7-8)。

在这个例子中^[22]正是利用了石墨化碳对强极性化合物的特殊保留能力。使 PEG 400 在反相条件下获得了很好的分离, 从色谱图上可以看出, 对于 PEG400 来说, 其同系物 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 中的每一个化合物几乎都被分离出来了。而烷基酚的聚氧乙基醚部

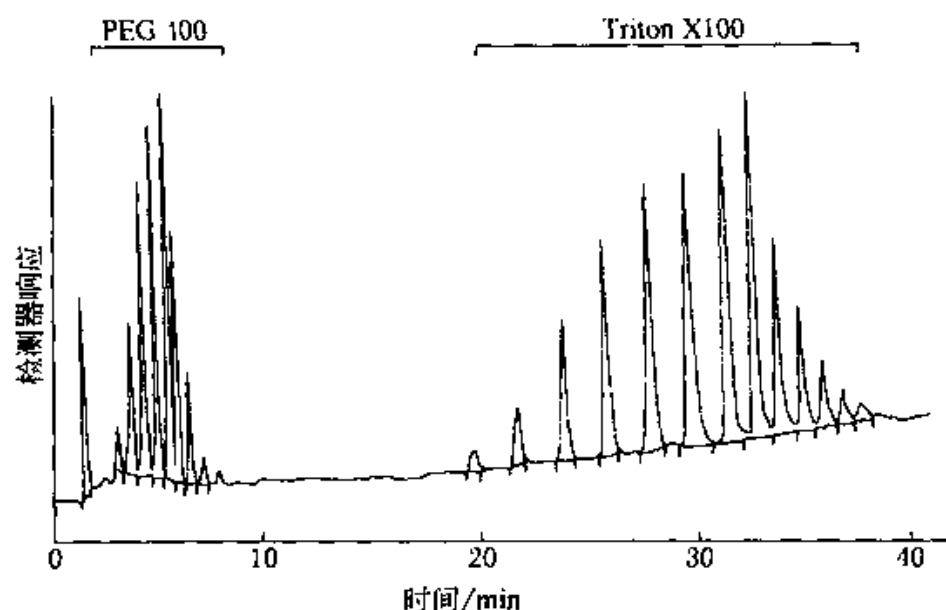


图 7-8 非离子表面活性剂 Triton X1000 的分离

色谱柱: Hypercarb, 7 μ m, ϕ 4.6 $\times$ 100 mm

流动相: A. H₂O; B. 乙腈; C. 二氯甲烷

0~15min 20% A~100% B;

16~40 min 0% C~80% C

检测器: 蒸发光散射检测器

分,也在同一次分离过程中获得了良好的分离。

2. 二糖类的分离

二糖是重要的天然产物,也是重要的生理活性物质。在二糖的分离中,会遇到因异头物(α , β 的异构体)产生而导致的双峰现象,此外,强极性的糖在一般的反相柱上很难被分离。为防止异头物问题,需要使用高 pH 值。但是,以硅胶为基质的填料的致命弱点恰恰就是难以耐受过高、过低的 pH 值。而使用石墨化碳恰恰可以满足这种要求。图 7-9 给出了在 Hypercarb 柱上分离 9 种葡二糖的情况^[23]。当流动相基本组成是 1mmol/L NaOH 时,9 种葡二糖在 30min 内可获得完全分离。

3. 糖肽的分离

在生命体中,糖肽是一种非常重要,但又难以分离的物质。糖肽由一段较小的肽段(甚至仅含一个氨基酸)和寡糖链组成。它们

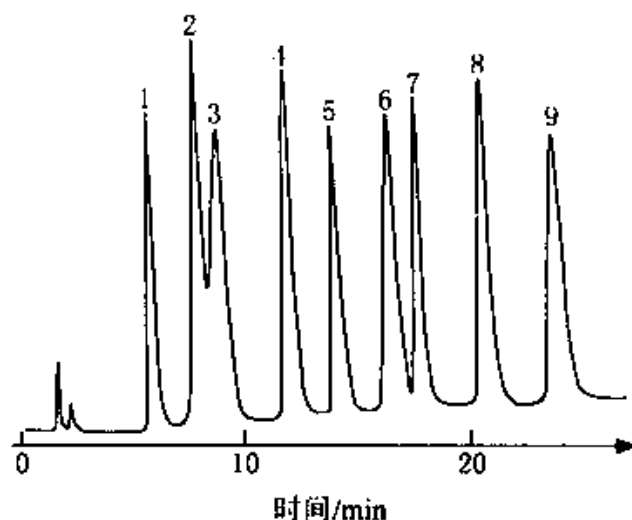


图 7-9 9 种葡二糖的分离

1—海藻糖；2—黑曲霉糖；3—异麦芽糖；4—麦芽糖；5—曲二糖；6—昆布二糖；7—龙胆二糖；8—纤维二糖；9—2-葡萄糖- β -葡萄糖苷

色谱柱：Hypercarb, 7 μ m, ϕ 4.6mm $\times$ 100mm

流动相：A. 1mmol/L NaOH/5% CH₃CN；B. 1mmol/L NaOH/1.5% CH₃CN

梯度：0~15 min 30%~100% A, 16min 后 100% A

流速：1 ml/min

的 ϕ 4.6mm $\times$ 100mm 石墨化碳柱子上，核糖核酸酶 B 的 4 个糖肽 R-I、R-II、R-III 和 R-IV 得到了很好的分离^[24]。

从色谱图上可以得知，1[#]峰和 2[#]峰，即 R-I 和 R-II 的区别仅在于 R-I 多了一个甘露醇，R-I 的保留较 R-II 稍弱；同样，R-III 和 R-IV 也有同样的规律。1[#]峰和 3[#]峰，即 R-I 和 R-III 相比，R-III 多了一个 Leu，因此它比 R-I 疏水性稍强，故 R-III 的保留大于 R-I。同样，R-II 和 R-IV 也有同样规律。所以我们可以推知，在糖肽的情况下，寡糖链和肽段共同决定了糖肽在石墨化碳柱上的保留行为。

从上面几个例子，已经可以发现，石墨化碳柱子确实具有很奇特的特性。因而它可以作为硅胶基质填料和高分子型填料的一个很好的补充，在生化分离和一些特殊分离课题上发挥作用。

既可能是以游离的糖肽存在于生物体中，也可能是糖蛋白的组成部分。这种结构特性，决定了它们通常具有极强的亲水性。当我们以反相色谱模式分离糖肽时，尽管将有机相的浓度降至极低，甚至使用水为流动相，但糖肽仍然随不保留峰一切流出而不显示任何保留。因此，糖肽的分离一直是一个难以很好解决的课题。但是，利用石墨化碳的极性保留效应，往往可以顺利解决这一难题。图 7-10 给出了这样一个例子，在标准的

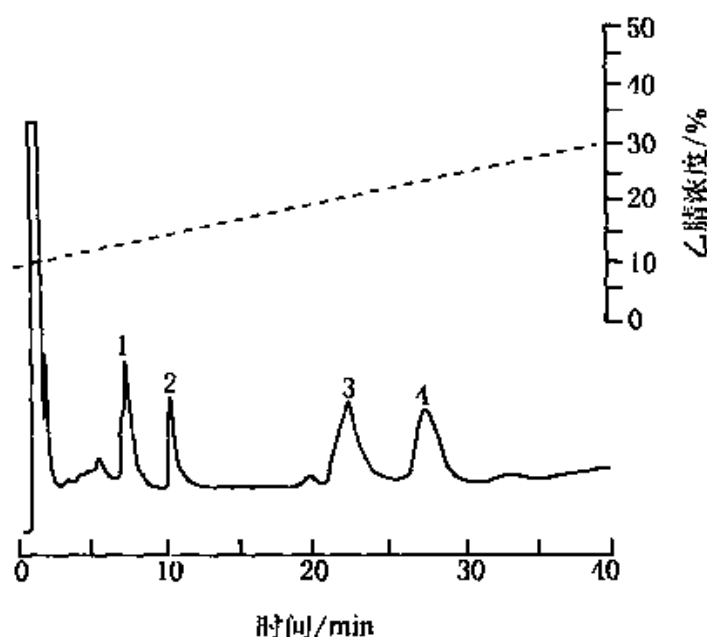


图 7-10 4 种糖肽的分离

色谱柱: Hypercarb, $7\mu\text{m}$, $\phi 4.6\text{mm} \times 100\text{mm}$

流动相 A: H_2O

流动相 B: CH_3CN , 0~40min 10%~30% B

样品: 1—R-I $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$; 2—R-II $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$,

3—R-III $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2\text{AsnLeu}$; 4—R-IV $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{AsnLeu}$

第四节 整体柱

整体柱 (monolithic column), 又称为连续固定相 (continuous-bed stationary phase), 是用原位聚合和类似浇筑的方法, 在色谱柱空柱管内或不用柱管所形成的整体、连续的柱体, 而不需用细粒径的填料去填装。这种简单而直接的制备柱子的方法, 已被证明是成功的, 有很好的应用前景。

早在 1967 年 Kubin 以高度溶胀的聚 2-羟乙基甲基丙烯酸凝胶为整体柱, 以低压柱色谱的方式分离了蛋白质^[25]。以高度交联的聚丙烯酰胺制备了真正的高效整体柱^[26]。此后, 有机基质的整体柱逐渐引起了色谱界的注意, 并在常规柱和毛细管电色谱柱方面获得成功的应用^[27,28], 使用的高聚物主要是聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯以及衍生的聚苯乙烯。在无机基质整体柱方面, Minakuchi

等人于 1996 年首先制备出了连续的硅胶整体柱^[29,30]，并迅即与 Merck 公司联合商品名为 SilicaROD[®] 的整体柱。最近，又推出了此种整体柱的一个新的柱型 Chromolith[®]（如图 7-11 所示），这是一种反相整体柱。此外，Bio-Rad 公司也推出来商品名为 UNO 的高分子基质整体柱。



图 7-11 Chromolith[®] 整体柱

Chromolith[®] 是连续柱床的 SiO_2 ，它是以烷氧基硅烷及水溶性高聚物为原料，以改进的溶胶-凝胶工艺制成的^[31]。在这种整体柱

大孔及中孔结构

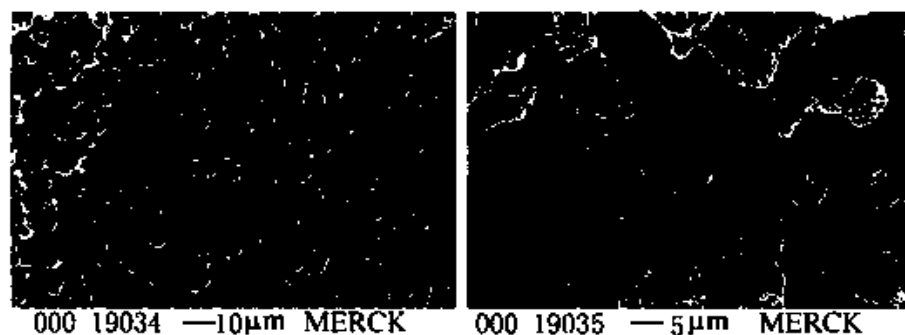


图 7-12 Chromolith[®] 整体柱孔结构

上，同时具有大孔和中孔结构（图 7-12），且其孔容比填充柱高。孔隙率 $>80\%$ 。这种结构，已很接近于贯流色谱的填料。因此，即使使用于较高的流速，也不会有太大的流体阻力，操作压力较低（例如直径 4.6mm，长度 50mm 的柱子，当流速为 1ml/min 时，仅

13MPa 左右)。这种柱子的这种特性,使其很适合高通量分析和快速分离。这对于组合化学筛选和 LC-MS 应用是非常有利的。

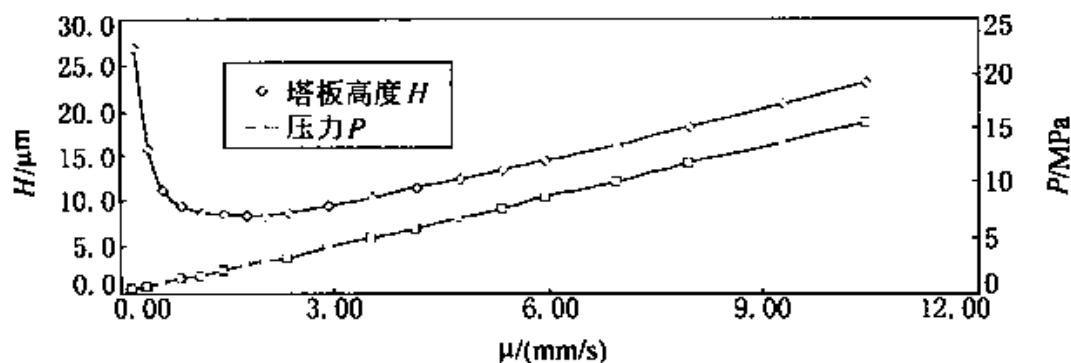


图 7-13 Chromolith[®] 整体柱流动相线速度-塔板高度、压力的关系

色谱柱: Performance RP-18e, 100mm×4.6mm (i. d.)

样品: 萘 流动相: 乙腈/水 (60/40)

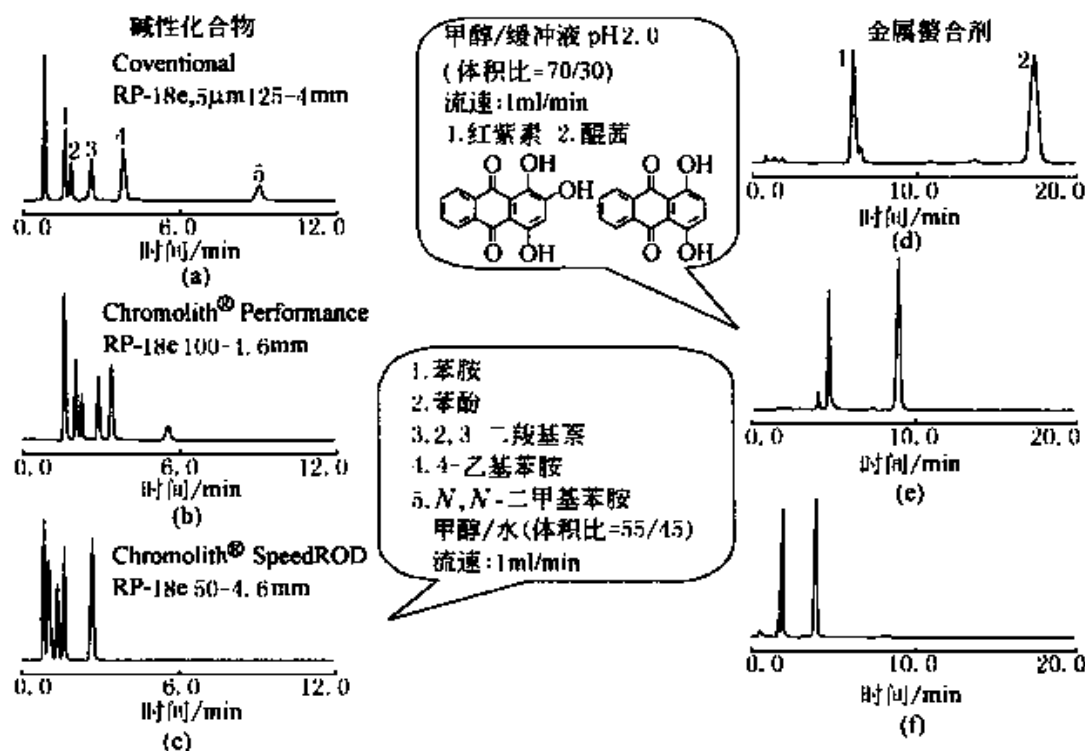


图 7-14 碱性化合物和金属螯合剂在 Chromolith[®] 整体柱上的分离

(a) ~ (c) 碱性化合物; (d) ~ (f) 金属螯合剂

图 7-13 给出了这种柱子的流动相线速度-理论塔板高度、压力的关系。从图上可知,在优化的线速度下,即线速度 1.5mm/s 时,

理论塔板高度约为 $10\mu\text{m}$ ，即具有每米 10 万理论塔板。

由于此种柱子系以烷氧基硅烷制备的，因此，其 SiO_2 的纯度很高，故对碱性化合物和金属螯合剂非特异性吸附很小（图 7-14）。由于很高的柱效和可工作于高流速下（图 7-15），例如， $\phi 4.6\text{mm} \times 50\text{mm}$ 的柱子可以工作于 $1 \sim 9\text{ml/min}$ ，且此时的工作压力仅为 10MPa 左右，这是一般的 HPLC 仪器最适宜的工作条件。

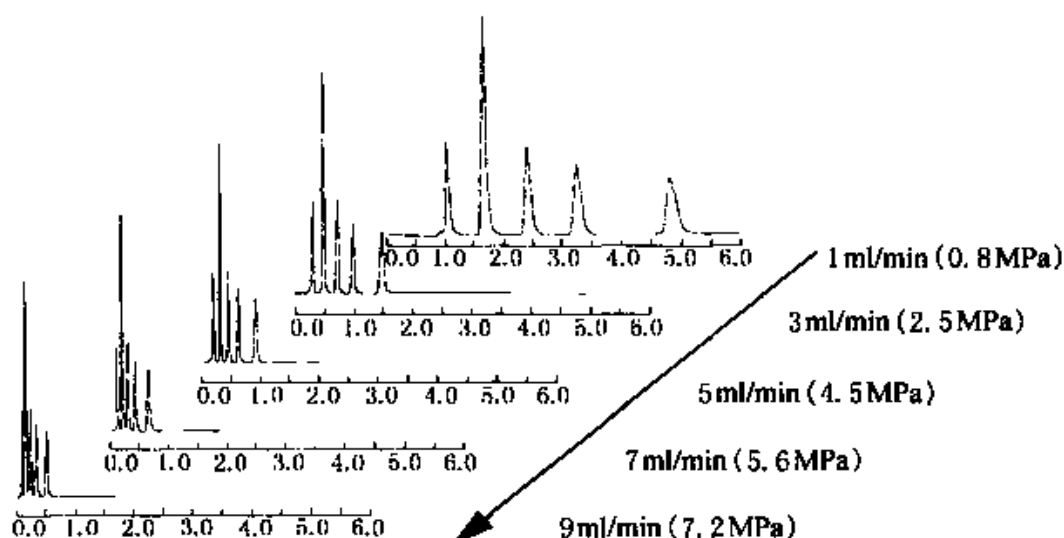


图 7-15 不同流速条件下 β -阻断药物的分离

色谱柱: Chromolith[®] SpeedROD RP-18e, $50 \times 4.6\text{mm}$

流动相: 乙腈/0.1 TFA/水 (梯度)

流速: $1 \sim 9\text{ml/min}$

检测器: 222nm

样品: 1—氨酰心安; 2—吲哚心安; 3—甲氧乙心安

4—二乙脲心安; 5—Bisoprolol

综上所述，这种整体反相硅胶柱具有高速、低压、高效、适于梯度淋洗的特点，在快速分离上有其优势。

参 考 文 献

- 1 Pecavar V, Vovk I, et al. Anal Sci. 1999, 15: 233-240
- 2 MacNair J E, Patel K D and Jorgenson J W. Anal Chem. 1999, 71: 700
- 3 Golubovic N C, Kang Q, Henderson H T and Pinto N. Proc. SPIE - Int. Soc Opt Eng. 1998, 3515: 86
- 4 Chappell I, Weigand R J, Zuzelski T J and Jersild C. LC/GC (asia pacific). 2001, 4:

- 5 刘国詮、李新会. 粒径均匀的氧化物多孔微球及其制备方法. 中国发明专利. ZL 94105909. X
- 6 Kirkland J J, Henderson J W. *J Chromatogr Sci.* 1994, 32: 473
- 7 Zhang R E, Xie Z M, Zhao R, et al. *Anal Chem.* 1991, 63: 1861
- 8 Regnier F E, et al. *Nature.* 1991, 350: 634
- 9 Ageyan N, et al. *J Chromatogr.* 1990, 519: 1
- 10 Telepchak M J. *Chromatographia.* 1973, 8: 234
- 11 Ciccio P, et al. *J Chromatogr.* 1981, 206: 35
- 12 Colin H, Eon C and Guichon G. *J Chromatogr.* 1976, 119: 41
- 13 Plzakm Z, Dousek F P and Jansta J. *J Chromatogr.* 1978, 147: 137
- 14 Knox J H, Gillkerk M T. UK 7939449. 1979
- 15 Knox H H, Kaur B and Millward G R. *J Chromatogr.* 1986, 352: 3
- 16 Tanaka N, et al. *J Chromatogr.* 1981, 549: 29
- 17 李新会. 新型色谱填料的研制: 学位论文. 北京: 中国科学院化学研究所, 1994
- 18 Möckel H J, Braedikow A, Melzer H, et al. *J Liq Chromatogr.* 1989, 461: 139
- 19 Kriz J, Aolamcová E, Knox J H, et al. *J Chromatogr.* 1995, 663: 151
- 20 Hennion M C and Coguart V F. *J Chromatogr.* 1993, 642: 211
- 21 Knox J H and Ross P. Quantification and correlation of the energies associated with retention of polar analytes on porous graphitic carbon. Poster presented at HPLC' 99. Granada, Spain, 30 May - 4 June, 1999
- 22 Chaimbault P., Elfakir C., and Lafosse, M. *J Chromatogr A.* 797, 1998, 83: 91
- 23 Kitahata S., Hara K., Fujita K., Nakano N., Kuwahara K., and Koizumi K., *Biotechnol Biochem.* 1992, 56: 1386.
- 24 Monser L., and Greenway GM. *Anal Chem Acta.* 322, 1996, 63: 68
- 25 Kubin, M. et al. *Chem Commun.* 1967, 32: 3881
- 26 Hjerten et al. *Jpn J Electrophoresis.* 1995, 39: 105
- 27 Wang Q C, Svec F, Frechet J M J. *Anal Chem.* 1993, 65: 2243
- 28 Svec F, et al. *J Chromatogr.* 2000, 887: 1
- 29 Minakuchi H, et al. *Anal Chem.* 1996, 68: 3498
- 30 Minakuchi H, et al. *J Chromatogr A.* 1997, 762: 135
- 31 Lubda D, et al. Poster presented at HPLC - 2000, in Seattle, USA, June 24 - 30, 2000, P - 5033

附 录

一、常见的商品硅胶

供应商	商品名	粒径/ μm	比表面积/ (m^2/g)	孔径/ nm
Alltech	Adsorbosphere Silica	3, 5, 10	220	10
	Econosphere Silica	3, 5	220	10
	Versapak Silica	10	300	15
Amicon	Matrex Silica Media	5, 10, 15, 20, 30,	540	6
/Grace		50, 105	320	10
			320	25
	XWP 500A	30-100	60	50
	XWP 1000A	30-100	40	100
	XWP 1500A	30-100	28	150
Baker	Silica Gel	3, 5	170	12
	Silica Gel	10	300	15
	Silica Gel	40	480	6
	Flash Silica Gel	100-425	—	6
		63-200	—	6
Beckmann	Ultrasil - Si	10	—	—
	Ultrasphere - Si	5	180	8
Bio-Rad	Bio-Sil HA	< 100	—	—
	Bio-Sil A	20-44, 80-150	—	—
Chrompack	ChromSpher Si	5	160	12
	CP-Spher Si	8	—	8
Du Pont	Zorbax SIL	3, 5-6	350	7-8
		3-6, 7-12, 10-18, 18-32, 32-63, 63-100, 63-200, 100-200, 200-600	550	6
Kali Chemie	KC-Mikroperl M	30-60	210	10
			130	18
			76	27
			65	34
			55	43
			47	54
			38	68
	KC-Mikroperl L	100-200		
Macherey	Nucleosil 50	5, 7, 10	450	5
Nagel	Nucleosil 100	5, 7, 10, 15-25,	350	10
		25-40, 40-63		
	Nucleosil 120	3, 5, 7, 10	200	12

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	比表面积/ (m^2/g)	孔径/ nm
Merck	Nucleosil 300	5, 7, 10, 15 ~ 25, 25 ~ 40, 40 ~ 63	100	30
	Nucleosil 500	5, 7, 10, 15 ~ 25, 25 ~ 40, 40 ~ 63	35	50
	Nucleosil 1000	5, 7, 10, 15 ~ 25, 25 ~ 40, 40 ~ 63	25	100
	Nucleosil 4000	5, 7, 10, 15 ~ 25, 25 ~ 40	10	400
	Polygosil 60	5, 7, 10, 15 ~ 25, 25 ~ 40, 40 ~ 63 63 ~ 100	450	6
	Polygosil 100	5, 7, 10, 25 ~ 40, 40 ~ 63	300	10
	Polygosil 300	7, 15 ~ 25, 25 ~ 40, 40 ~ 63	35	30
	Polygosil 500	7, 15 ~ 25, 25 ~ 40, 40 ~ 63	35	50
	LiChrosorb Si 60	5, 7, 10	500	6
	LiChrosorb Si 100	5, 7, 10	300	10
	LiChrospher Si 100	5, 10, 20	250	10
	LiChrospher Si 300	10	250	25
	LiChrospher Si 500	10	60	50
	LiChrospher Si 1000	10	30	100
	LiChrospher Si 4000	10	10	400
	Fractosil 200	40 ~ 63, 63 ~ 125	150	18
	Fractosil 500	40 ~ 63, 63 ~ 125	50	50
	Fractosil 1000	40 ~ 63, 63 ~ 125	20	100
	Fractosil 2500	63 ~ 125	8	250
	Fractosil 5000	63 ~ 125	3	500
	Fractosil 10, 000	63 ~ 125	1.5	1000
	Fractosil 25, 000	63 ~ 125	0.6	2500
	Superspher Si 60	4	550	6
	Superspher Si 100	4	350	10
	Kieselgel 40	63 ~ 200, 200 ~ 500	>500	4
	Kieselgel 60	< 63, 63 ~ 200, 200 ~ 500	500	6
	Kieselgel 100	63 ~ 200, 200 ~ 500	250	10
	Kieselgel 60	15 ~ 40, 40 ~ 63, 63 ~ 100	500	6
	Keiselgel 60 reinst	63 ~ 200	500	6

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	比表面积/ (m^2/g)	孔径/ nm
Millipore/ Waters	LiChroprep Si 40	15~25, 40~63	—	—
	LiChroprep Si 60	15~25, 40~63	—	—
	LiChroprep Si 100	15~25, 40~63	—	—
	μ -Porasil	10	300	6
	Resolve Silica	5, 10	—	9
	Porasil A	35~75, 75~125	300~500	—
	Porasil B	35~75, 75~125	140~230	—
Orpegen	Prep-PAK 500 Silica	55~105	—	—
	HD-Sil-60	10, 20, 30, 60	—	6
	HD-Sil-100	10, 20, 30, 60	—	10
	HD-Sil-SS-80	5	—	8
	HD-Sil-SS-100	5	—	10
	HD-Gel-WP	10, 30, 60	—	25
	HD-Gel-300	7	—	30
Phase Separations	Spherisorb SW	3, 5, 10	220	8
	Spherisorb SX	5, 10	190	30
	Spherisorb VLS	20	190	30
Reichert	Thomasorb Si 60	5, 7.5, 10	500	6
	Thomaspher Si 50	5, 7.5, 10	500	5
	Thomaspher Si 500	5, 7.5, 10	300	10
Separations Group	Vydac TP Silica	5, 10, 20~30	80	30
	Vydac HS Silica	5, 10, 20~30	500	8
Serva	Daltosil 75	40~100, 100~200	—	7.5
	Daltosil 100	40~100, 100~200	—	10
	Daltosil 150	40~100, 100~150, 150~200, 100~200	—	15
	Daltosil 300	40~100, 100~150, 150~200, 100~200	—	30
	Daltosil 500	40~100, 100~200	—	50
	Daltosil 1200	40~100, 100~200	—	120
	Daltosil 3000	40~100, 100~200	—	300
	Si 60	3, 5, 10, 15, 20~ 40, 50~100, 125~ 150	—	6
	Si 100	3, 5, 10	—	10
	Si 300	3, 5, 10, 20~40	—	30
	Hypersil	3, 5, 10	170	12
	Hypersil WP-300	5, 10	60	30
	Silicapak E-411	5	—	—
	LC-Si	3, 5	170	10
	LC-3-Si	5	—	30
Showa Supelco	LC-5-Si	5	—	50
	PLC-Si	15	170	10

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	比表面积/ (m^2/g)	孔径/ nm
TOSOH	TSK-Gel LS 310 SIL	5, 10, 15	—	—
Whatman	Partisil	5, 10	350	9
	LPS-1	13~24	250	—
	LPS-2	37~53	450	—
YMC	100 A Silica	3, 5, 15, 25~44	—	—

二、常见的商品氧化铝

供应商	商品名	粒径/ μm	比表面积/ (m^2/g)	孔径/ nm	悬浮液 pH 值
Baker	Aluminum oxide, acid-washed	50~200	—	6	4.5
	neutral	50~200	—	6	7
	acid, activity 1	50~200	—	6	4.5
	basic, activity 1	50~200	—	6	10.0
	neutral, activity 1	50~200	—	6	7.5
Bio-Rad	Neutral alumina AG7	—	—	—	6.9~7.1
	Basic alumina AG10	—	—	—	10.0~10.5
	Acid alumina	—	—	—	3.5~4.5
ICN	ICN alumina N	18~32,	200	6	7.5
		32~63			
	ICN alumina A	18~32	200	6	4.5
	ICN alumina B	18~32	200	6	10
Macherey	Alox 60~5, 10	5, 10	155	6	碱性氧化铝
Nagel					9.5
Merck	Aluminum oxide 60, active basic	63~200	—	6	9.0 $\pm$ 0.5
	Aluminum oxide 90, active basic	63~200	—	9	9.0 $\pm$ 0.5
	Aluminum oxide 90, active neutral	63~200	—	9	9.0 $\pm$ 0.5
	Aluminum oxide 90, active acid	63~200	—	9	4.0 $\pm$ 0.5
	Aluminum oxide 150, basic	63~200	—	15	9.0 $\pm$ 0.5
	LiChroprep Alox T	25~40	—	—	碱性氧化铝
	LiChrosorb Alox T	5, 10	—	15	碱性氧化铝
	Spherisorb AY	5, 10	90	13	—
Phase Separations					

三、常用的反相填料

供应商	商品名	粒径/ μm	孔径/nm	备 注
Agilent	Zorbax C18	5, 7	7	
	Zorbax C8	3, 5, 7	7	
	Zorbax Phenyl	3, 5, 7	7	苯基
	Zorbax TMS	3, 5, 7	7	甲基
	Zorbax SB-C18	3.5, 5, 7	8	十八烷基硅烷
	Zorbax SB-C8	3.5, 5, 7	8	辛基硅烷
	Zorbax SB-Phe	3.5, 5, 7	8	苯基
	Zorbax Rx-C18	5, 7	8	
	Zorbax Rx-C8	5, 7	8	
Alltech	Adsorbosphere C8	3, 5, 10	8	辛基硅烷
	Adsorbosphere C18	3, 5, 10	8	十八烷基硅烷-封端
	Adsorbospher Pheyl	3, 5, 10	8	苯基硅烷-封端
	Adsorbospher TMS	3, 5, 10	8	
	Econosphere C8	5	10	
	Econosphere C18	5	10	
	Ro Sil C3	3, 5, 8	8	
	Ro Sil C8	3, 5, 8	8	
	Ro Sil C18	3, 5, 8	8	
	R Sil C3	5, 10	6	
	R Sil C8	5, 10	6	
	R Sil C18HL	5, 10	6	含碳量 16%
	R Sil C18LL	5, 10	6	含碳量 16%
	R Sil Phenyl	5, 10		
	Versapak C18	10	6	封端
Analytichem	Sepralyte C1 Methyl	5, 10, 40	—	封端
	Sepralyte C2 Ethyl	5, 10, 40	—	封端
	Sepralyte C4 Butyl	5, 10, 40	—	封端
	Sepralyte C6 Hexyl	5, 10, 40	—	封端
	Sepralyte C8 Octyl	3, 5, 10, 40	—	封端
	Sepralyte C18 Octadecyl	5, 10, 40	—	封端
	Sepralyte CH Cyclohexyl	5, 10, 40	—	封端
	Sepralyte PH Phenyl	5, 10, 40	—	
	Sepralyte 2PH Diphenyl	5, 10, 40	—	
Amicon	Amicon C8	5, 10, 15, 20 20~45, 35~70, 90~130	6, 10, 25	辛基硅烷
	Amicon C18	5, 10, 15, 6, 20 20~45, 35~70, 90~130		十八烷基硅烷

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	孔径/ nm	备注
Baker	Bakerbond Methyl	10, 40	6	含碳量 4.6%
	Bakerbond Ethyl	10, 40	6	含碳量 6.0%
	Bakerbond Butyl	5	33	含碳量 3.0%
	Bakerbond Butyl	10, 40	6	含碳量 7.9%
	Bakerbond Hexyl	10, 40	6	含碳量 10%
	Bakerbond Octyl	5	5	含碳量 10.7%
	Bakerbond Octyl	5	33	含碳量 3.4%
	Bakerbond Octyl	10, 40	6	含碳量 12.0%
	Bakerbond Octadecyl	5	56	含碳量 17.2%
	Bakerbond Octadecyl	5	33	含碳量 7.3%
	Bakerbond Octadecyl	10, 40	6	含碳量 18%
	Bakerbond Phenylethyl	5	5	含碳量 11.4%
	Bakerbond Phenylethyl	10, 40	6	含碳量 10.7%
	Bakerbond Diphenyl	5	33	含碳量 3.8%
	Bakerbond Diphenyl	10	6	含碳量 11.5%
	WP-Butyl	5, 15, 40	27.5, 30	
	WP-Octyl	5, 15, 40	27.5, 30	
	WP-Octadecyl	5, 15, 40	27.5, 30	
	WP-Cyanopropyl	5, 15, 40	27.5, 30	
	WP-Diphenyl	5, 15, 40	27.5, 30	
Beckman	Ultrasphere C3	5	—	
	Ultrasphere C8	5	—	
	Ultrasphere C18	5	—	
Bio-Rad	Hi-Pore RP-304	5	33	丁基, 含碳量 3%
	Hi-Pore RP-318	5	33	十八烷基, 含碳量 8%
	Bio-Sil ODS	5, 10	8	
Brownlee	Aquapore Butyl BU300	10	30	丁烷基硅烷
	Aquapore Octyl RP300	10	30	辛烷基硅烷
	Aquapore RPC 18,	10	30	十八烷基硅烷
	RP-300			
	Aquapore Phenyl PH300	10	30	苯基硅烷
	Spheri RP8	5, 10	10	
	Spheri RP18	5, 10	10	
Chromapack	Chrom Spher C8	5	12	
	Chrom Spher C18	5	12	
	CP-Microspher C18	3	—	
	CP-Spher C8	10	—	
	CP-Spher C18	10	—	
	Prep ODS	10, 32~74	20, 6	
ES Industries	Chromegabond C1	3, 5, 10	6, 10	甲基
	Chromegabond C2	3, 5, 10	6, 10	乙基
	Chromegabond C2	3, 5, 10	6, 10	二甲基
	Chromegabond TMS	3, 5, 10	6, 10, 30	三甲基

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	孔径/ nm	备注
ICN	Chromegabond C3	3, 5, 10	6, 10	正丙基
	Chromegabond C4	3, 5, 10	6, 10	正丁基
	Chromegabond C6	3, 5, 10	6, 10	正己基
	Chromegabond C-C6	3, 5, 10	6, 10	环己基
	Chromegabond C8	5, 10	10	正辛基 (多层)
	Chromegabond M-C8	3, 5, 10	6, 10, 30	正辛基 (单层)
	Chromegabond C10	5, 10	6	正癸基
	Chromegabond C12	5, 10	6	正十二烷基
	Chromegabond C18	6, 10	10	正十八烷基 (多层)
	Chromegabond M-C18	3, 5, 10	6, 10, 30	正十八烷基 (单层)
	Chromegabond C22	5, 10	10	二十二烷基
	Chromegabond AP	3, 5, 10	6, 10, 30	烷基苯基
	Chromegabond DP	10	6, 10, 30	二苯基
	ICN Silica RP8	7 ~ 12, 18 ~ 32, 32~63	6, 10	封端, 含碳量14.5% 16.5%
	ICN Silica RP18	7 ~ 12, 18 ~ 32, 32~63	6, 10	封端, 含碳量14.5% 16.5%
Isco	Isco MP C4	5	30	
	Isco MP C18	5	30	
	Isco C1	5	8	
	Isco C8	5	8	
	Isco C18	5	8	
Manville	Chromosorb LC-7	5, 10	—	十八烷基硅烷, 含 碳量 15%
	Chromosorb LC-10	5, 10	—	辛基硅烷
Macherey Nagel	Nucleosil 300 C18	5, 7, 10	30	
	Nucleosil 300C ₆ H ₅	7	30	
	Nucleosil 500 C4	7	50	
	Nucleosil 500 C18	7	50	
	Nucleosil 300 C ₆ H ₅	7	50	
	Nucleosil 4000 C4	7	400	
	Nucleosil 4000 C18	7	400	
	Nucleosil 4000 C ₆ H ₅	7	400	
	Nucleosil C8	5, 7, 10	10	
	Nucleosil C18	3, 5, 7, 10, 30	10	
	Nucleosil C ₆ H ₅	7	10	
	Nucleosil 120 C8	3, 5, 7, 10	12	
	Nucleosil 120 C18	3, 5, 7, 10	12	
	Nucleosil 102 C ₆ H ₅	7	12	
	Nucleosil 300 C4	5, 7, 10	30	
	Nucleosil 300 C8	5, 7, 10	30	

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	孔径/nm	备注
Merck	Polygosil 60 C8	5, 7.5, 10, 5 ~20	6	
	Polygosil 60 C18	5, 7.5, 10, 5 ~20	6	
	Polygosil 100 C18	5, 7, 10	10	
	LiChroprep RP8	5 ~ 20, 15 ~ 25, 25~40	6	辛基二甲基硅烷
	LiChroprep RP8	5 ~ 20, 15 ~ 25, 25 ~ 40, 40~63	6	十八烷基二甲基硅烷
	LiChrosorb RP2	5, 10	6	用二甲基二氯硅烷改性
	LiChrosorb RP8	5, 7, 10	6	辛基二甲基硅烷
	LiChrosorb RP18	5, 7, 10	6	十八烷基二甲基硅烷
	LiChrospher RP8	5, 10	10	辛基二甲基硅烷
	LiChrospher 100 RP18	5, 10	10	十八烷基二甲基硅烷
	LiChrospher 500 RP8	10	50	辛基二甲基硅烷
	LiChrospher 1000 RP8	10	100	辛基二甲基硅烷
	LiChrospher 4000 RP8	10	400	辛基二甲基硅烷
	Perisorb RP2	30~40	—	薄壳型
	Perisorb RP8	30~40	—	
Waters	Perisorb RP18	30~40	—	
	μ -Bondapak C18	10	12.5	封端
	μ -Bondapak Phenyl	10	12.5	封端
	Nova-Pak C18	4	6	封端
	Nova-Pak Phenyl	4	6	封端
	Prep-PAK Vydac C4	30	—	正丁基
	Prep-PAK Vydac C18	30	—	正十八烷基
	Resolve C8	5, 10	9	
	Resolve C18	10	9	
Orpegen	HD-Sil-18-55-80	5	8	十八烷基
	HD-Sil-18-55-100	5	10	十八烷基
	HD-Sil-18-10-60	10	6	十八烷基
	HD-Sil-18-10-100	10	10	十八烷基
Pharmacia	Sephasil Protein C4	5, 12	30	
	Sephasil Peptide C8	5, 12	10	
	Sephasil Peptide C18	5, 12	10	
	Sephasil C8	5, 12	12	
	μ RPC C2/C18	3	12	
	ProRPC	5, 15	30	
Phase	PepRPC	5, 15	30	
	Spherisorb SC1			

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	孔径/nm	备注
Separations	Spherisorb SC6	3, 5, 10	8	
	Spherisorb SC8	3, 5, 10	8	
	Spherisorb S ODS1	3, 5, 10	8	
	Spherisorb S ODS2	3, 5, 10	8	
	Spherisorb S Phenyl	3, 5, 10	8	
	S5XC1	5	30	C1
	S5XC3	5	30	C3
	S5XC6	5	30	C6
	S5XC18	5	30	C18
	S10XC1	10	30	C1
	S10XC3	10	30	C3
	S10XC6	10	30	C6
	S10XC18		30	C18
Reichert	Thomasorb Si60 C8	10	6	
	Thomasorb Si60 C18	10	6	
Scientific Systems	Soft Seal Alkyl 8	3, 5	10	含碳 12.5%
	Soft Seal Alkyl 18	3, 5,	10	含碳 12.5%
Separation Groups	Vydac 201 HSB	5, 10,	8	C18, 封端
		15 ~ 20, 20 ~		
		30		
	Vydac 201 TPB	5, 10, 15 ~	30	C18
		20, 20 ~ 30		
	Vydac 214 TPB	5, 10, 15 ~	30	C4, 封端
		20, 20 ~ 30		
	Vydac 218 TPB	5, 10, 15 ~	30	C18, 封端
		20, 20 ~ 30		
	Vydac 219 TPB	5, 10, 15 ~	30	二苯基硅烷, 封端
		20, 20 ~ 30		
	Vydac 201 SC	30 ~ 40		十八烷基硅烷, 薄壳型
Serva	Serva Butyl = Si 300	5, 10	30	整体修饰
	Polyol			
	Serva Octyl = Si 500	10, 30	50	
	Polyol			
	Serva Octyl = Si 100	3, 5, 10, 30	30	
	Polyol			
	Serva Octyl = Si 300	3, 5, 10	30	
	Polyol			

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	孔径/nm	备注
Hypersil (Shandon)	Serva Octyl = Si 500 Polyol	10	50	
	Serva Octadecyl = Si 60 Polyol	3, 5, 10	6	
	Serva Octadecyl = Si 100 Polyol	3, 5, 10, 30	10	
	Serva Octadecyl Si 300 Polyol	3, 5, 10	30	
	Serva Octadecyl = Si 500 Polyol	10	50	
	Serva Phenyl = Si 100 Polyol	3, 5, 10	10	
	Serva Diphenyl = Si 100 Polyol	3, 5, 10, 30	10	
	Serva Diphenyl = Si 300 Polyol	3, 5, 10	30	
	Hypersil-MOS	3, 5, 10	12	单层辛基硅烷, 含碳量 7.0%
	Hypersil-ODS	3, 5, 10	12	单层十八烷基硅烷, 含碳量 10%
	Hypersil-SAS	3, 5, 10	12	单层三甲基硅烷, 含碳量 2.6%
	Hypersil-Phenyl	3, 5, 10	12	单层苯基硅烷, 含碳量 5.0%
	WP-300	5, 10	30	含碳量 2.0%
	WP-300 Octyl	5, 10	30	含碳量 2.7%
Supelco	Supelcosil LC-1	5	10	
	Supelcosil LC-8	3, 5	10	
	Supelcosil LC-8 DB	3, 5	10	可用于碱性化合物分离
	Supelcosil LC-18	3, 5	10	
	Supelcosil LC-18 DB	3, 5		可用于碱性化合物分离

续表

供应商	商品名	粒径/ μm	孔径/nm	备注
Synchrom	Supelcosil LC-DP	5	10	二苯基甲基硅烷
	Supelcosil LC-PAH	5	10	十八烷基二甲基硅烷, 多层
	Supelcosil LC-304	5	30	丁基二甲基硅烷
	Supelcosil LC-308	5	30	辛基二甲基硅烷
	Supelcosil LC-318	5	30	十八烷基二甲基硅烷
	Supelcosil LC-8	15, 40	50~200	辛基二甲基硅烷
	Supelcosil LC-18	15, 40	50~200	十八烷基二甲基硅烷
	SynChropak RP-PC1	6.5	10, 30, 100	
	SynChropak RP-PC4	6.5	10, 30, 100	
	SynChropak RP-PC8	6.5	10, 30, 100	
TOSOH	SynChropak RP-PC18	6.5	10, 30, 100	
	TSKgel ODS-80T	5	8	十八烷基, 封端
	TSKgel ODS-120T	5	12	十八烷基, 封端
	TSKgel ODS-120A	5	12	十八烷基
Varian	TSKgel TMS 250	5	25	三甲基硅烷
	Micro Pak CH	10	—	十八烷基硅烷, 多层
	Micro Pak MCH	5, 10	—	十八烷基硅烷, 单层
	Micro Pak MCH-N-Cap	5	—	十八烷基硅烷, 单层, 封端
Whatman	Micro Pak C18	4	—	十八烷基硅烷
	Micro Pak SP C18	3, 5	—	十八烷基硅烷
	LRP-1	13~24	—	正十八烷基
	LRP-2	37~53	—	正十八烷基
	Partisil 10 ODS	5, 10	8, 5	十八烷基硅烷, 多层, 碳含量 5%
	Partisil 10 ODS 3	5, 10	8, 5	十八烷基硅烷, 封端, 碳含量 10%
	Partisil 10 OCS/C8	5, 10	8, 5	OCS 基团键合 C8, 封端, 碳含量 9%
	Protesil 300 Octyl	10	30	封端, 碳含量 7.5%
YMC	Protesil 300 Diphenyl	10	30	封端, 碳含量 8%
	300A ODS	5	30	C18
	300A Butyl	5, 15	30	C4

四、常见的离子交换填料

商品名	离子化基团	基球孔径/Å	粒径/ μm	容量/(mol/g)	厂家
阴离子交换					
Bakerbond 7100	$-(\text{CH}_2)_x\text{N}(\text{R}_3)^+$	120	5	400	J. T. Baker
Bakerbond 7099	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	120	5	700	J. T. Baker
Bakerbond PEL	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_x$	300	5, 15, 40	-0.15g 蛋白质	J. T. Baker
Anion SW	NR_3^+	175	5	400	BioRad
Amino 5S	$-\text{NH}_2$	80	5		BioRad
Aquapore AX-300	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_x$	300	7, 5, 20	300	Brownlee Labs
Aquapore Amino	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	300	5, 7		Brownlee Labs
Zipax	$-\text{NR}_3^+$	薄壳型	30		Du Pont
Zorbax SAX	$-\text{NR}_3^+$	80	5		Du Pont
Zorbax Bio Series SAX	$\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	300	7		Du Pont
Zorbax NH ₂	$-\text{NH}_2$	80	5		Du Pont
Zorbax Bio Series WAX	$-\text{NH}_2$	300	7		Du Pont
SAX	$-(\text{CH}_2)_x\text{NR}_3^+$	60, 100, 300	5, 10	800~2000	ES Industries
RP SAX	$-(\text{CH}_2)_x\text{NR}_3^+$ 封端丁基	60, 100, 300	5, 10	800~2000	ES Industries
M WAX	$-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$	60, 100, 300	5, 10		ES Industries
D-WAX	$-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}$	60, 100, 300	5, 10,		ES Industries
T-WAX	$-(\text{CH}_2)_x\text{NR}_2$	60, 100, 300	5, 10,		ES Industries
Nucleosil SR	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	100	5, 10	1000	Macherey-Nagel, Co.
Nucleosil NH ₂	$-\text{N}(\text{CH}_3)_x\text{NH}_2$	100, 120	5, 10		Macherey-Nagel, Co.
Nucleosil N $(\text{CH}_3)_2$	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	100	5, 10		Macherey-Nagel, Co.
LiChrosorb NH ₂	$-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$	250	5, 10		E. Merck, EM Science

续表

商品名	离子化基团	基球孔径/Å	粒径/ μm	容量/(mol/g)	厂家
LiChrospher NH ₂	- (CH ₂) _x NH ₂	180	3, 5, 10		E. Merck. EM Science
LiChrospher SAX	- (CH ₂) _x NR ₃ ⁺	180	5, 10		E. Merck. EM Science
Spherisorb SAX	- (CH ₂) ₃ N (CH ₃) ₃	220	5, 10	400	Phase Separations. Inc.
Spherisorb NH ₂	- (CH ₂) ₃ NH ₂	220	3, 5, 10	600	Phase Separations. Inc.
PolyMethyl A	多肽	300, 2000	5, 7, 15~20		PolyLC
PolyEthyl A	多肽	300, 1000	5, 7, 15~20		PolyLC
PolyPropyl A	多肽	300, 1000	5, 7, 15~20		PolyLC
PolyButyl A	多肽	300, 1000	5, 7, 15~20		PolyLC
APS-Hypersil	- NH ₂	120	3.5, 10		Shandon
Sotaphase SAX	- NR ₃ ⁺		5		Sota Chromatography
Sotaphase QA	- NR ₃ ⁺	100~4000	7		Sota Chromatography
Sotaphase Amine	- NH ₂		3.5		Sota Chromatography
Sotaphase DE	- (CH ₂) ₂ N (Et) ₂	100~4000	7		Sota Chromatography
SynChropak 0300	- NR ₃ ⁺	30	6.5		SynChrom
SynChropak AX100 to AX1000	- NR ₂	100, 200, 300, 500, 1000	5, 6.5, 55		SynChrom
TSK IEX-260A SIL	- N (CH ₃) ₂ (CH ₂ C ₆ H ₅) ⁺		12	>500	Toya Soda
TSK IEX - 540DEAE SIL	- N (Et) ₂		5, 10	>200	Toya Soda
TSK gel DEAE-2SW	- NEt ₃	125	5	>300	Toya Soda

续表

商品名	离子化基团	基球孔径/Å	粒径/ μm	容量/(mol/g)	厂家
TSK gel DEAE-2SW	-NEt ₃	150	10	>300	Toya Soda
MicroPak SAX	-NR ₃ ⁺		10		Varian
MicroPak AX	-NH ₂		5, 10		Varian
Vydac 300IC405	-(CH ₂) _x NR ₃ ⁺		5		Vydac
Vydac 301TP104	-(CH ₂) _x NR ₃ ⁺		10		Vydac
Vydac 302IC4.6	-(CH ₂) _x NH ₃ ⁺		10		Vydac
Vydac 301 SC	玻璃-二氧化硅 (CH ₂) NR ₃ ⁺	薄壳型	30		Vydac
Vydac 601 PSC	玻璃-二氧化硅 (CH ₂) -NH ₂	薄壳型	30		Vydac
Bondapak Amine	-NH ₂		10	300~400	Waters
Anion	-NR ₃ ⁺		10	200	Wescan
Partisil SAX	-NR ₃ ⁺	85	5, 10		Whatman
Partisphere SAX	-NR ₃ ⁺	120	5	200	Whatman
Partisil PAC	-NRH/-CN	85	5, 10		Whatman
Partisphere PAC	-NRH/-CN	120	5		Whatman
Partisphere WAX	-(CH ₂) ₂ N (Et) ₂	120	5	200	Whatman
阳离子交换					
Bakerbond 7101	-(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻	120	5	300	J. T. Baker
Bakerbond 7108	-(CH ₂) ₃ CO ₂ H	120	5	200	J. T. Baker
Bakerbond CRX	-CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	300	5, 15, 40		J. T. Baker
Aquapore CX-300	羧基-氨基	300	7, 10, 20		Brownlee Labs
Zipax 300 SCX	-SO ₃ ⁻	薄壳型	30		Du Pont
Zorbax SCX	-SO ₃ ⁻	300	5		Du Pont
Zorbax Bio Series SCX	-SO ₃ ⁻	300	7		Du Pont
Zorbax Bio Series WCX	-CO ₂ H	300	7		Du Pont

续表

商 品 名	离子化基团	基 球 孔 径/ $\text{\AA}$	粒 径/ μm	容 量 / (mol/g)	厂 家
P-SCX	- ArSO_3^-	60, 100, 300	5, 10	800~2000	ES Industries
A-SCX	- $(\text{CH}_2)_x\text{SO}_3^-$	60, 100, 300	5, 10	800~2000	ES Industries
RP-SCX	- ArSO_3^- , 封端丁基	60, 100, 300	5, 10	800~2000	ES Industries
P-WCX	- ArCO_2H	60, 100, 300	5, 10		ES Industries
A-WCX	- $(\text{CH}_2)_x\text{CO}_2\text{H}$	60, 100, 300	5, 10		ES Industries
Nucleosil-SA	- SO_3^-	100	5, 10	1000	Machery-Nagel, Co.
LiChrosorb	- SO_3^-		10		E. Merck; EM Science
Perisorb KAT	- SO_3^-				E. Merck; EM Science
PolyCATA	聚天冬氨酸	300, 100	5, 7, 15~20		PolyLC
Soraphase QA	- $(\text{CH}_2)_x\text{CO}_2\text{H}$	100~4000	7		Sota Chromatography
SynChropak S300	- SO_3^-	300	6.5		SynChrom
SynChropak CM300	- CO_2H	300	6.5		SynChrom
TSK CM-2-SW	- CO_2^-	125	5	>300	Toya Soda
TSK CM-3-SW	- CO_2^-	250	10	>300	Toya Soda
Vydac 400 IC405	- SO_3^-	300	5		Vydac
Vydac 401 TP104	- SO_3^-	300	10		Vydac
Vydac 401 SC	玻璃-二氧化硅- $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_3^-$	薄壳型	30		Vydac
Purisu SCX	- ArSO_3^-	54	5, 10		Whatman
Partisphere SCX	- ArSO_3^-	120	5	200	Whatman
Partisphere WCX	- CO_2H	120	5	100	Whatman

符 号 表

A_s	不对称因子
ATB	偶氮叔丁烷
ATBN	偶氮二异丁腈
AID	偶氮叔十二烷
ATO	偶氮叔辛烷
BaP	苯并芘
CD	环糊精
CM	$-\text{OCH}_2\text{COOH}$, 弱阳型离子交换基团的一种
CP	交叉极化 (固体核磁技术)
CSP	手性固定相
CTFME	2-氯-1, 1, 2-三氟乙基甲基醚
CTP	纤维素三 (苯基甲酸酯)
D	平均孔径
D_c	“无限直径”
DEAE	$-\text{O}^-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, 中阴型离子交换基团的一种
Dextran	葡聚糖
d_f	固定相或固定液膜的厚度
D_m	溶质在流动相或固定相中的扩散系数
d_p	粒子直径
DPDCS	二苯基氯硅烷
DPTMDS	二苯基四甲基硅氮烷
D_s	溶质在固定相中的扩散系数
E_D	诱导偶极作用
E_K	极性分子永久偶极间的作用力
E_L	色散力相互作用
FTIR	傅立叶变换红外光谱
GFC	凝胶过滤色谱, gel filtration chromatography

GPC	凝胶渗透色谱, gel permeation chromatography
h	折合塔板高度
HAP	羟基磷灰石
HETP	理论塔板高度
HIC	疏水作用色谱, hydrophobic interaction chromatography
$H_{L(m)}$	示流动相中的扩散项
$H_{L(s)}$	固定相中的扩散项
H_L	纵向扩散效应对理论塔板高度所贡献的份额
H_M	多路径效应对理论塔板高度的贡献
	多路径效应对理论塔板高度所贡献的份额
HMDS	六甲基二硅氮烷
H_{RL}	固定相传质阻力对理论塔板高度所贡献的份额
H_{RM}	流动相传质阻力对理论塔板高度所贡献的份额
IDA	亚氨基二乙酸
I	保留指数
K	玻兹曼常数, 分配系数; 容量因子
K_1	柱子的穿透性
K^o	比渗透率
LEC	配体交换色谱, ligand exchange chromatography
M	平均分子量
MAS	魔角旋转 (固体核磁技术), magic-angle spinning
MCT	微晶纤维素三乙酸酯
n	一根柱子的“理论塔板数”
N	阿佛加德罗常数; 每米柱长的理论塔板数
PEG	聚乙二醇
PS	聚苯乙烯
PS-DVB	苯乙烯与二乙烯基苯的交联共聚物
P_X	固定液的相对极性
QAE	$[-N(CH_3)_3]^+$, 强阴型离子交换基团的一种
$r_{i,s}$	相对保留值
R_s	分离度
S	峰容量; 比表面积

SA	$-\text{SO}_3\text{H}^+$, 强阳型离子交换基团的一种
TBN	二苯肼
t_M	死时间
TPCS	三苯基氯硅烷
t_R	保留时间
u	流动相的线速度
V_0	柱子的死体积
V_C	柱子总体积
V_M	死体积
V_m	柱中流动相的总体积
V_p	孔体积
V_R	保留体积
V'_R	调整保留体积
V_S	柱中固定相的总体积
V_s	柱中载体的总体积 (这里以硅胶代表)
W	峰宽
$W_{1/2}$	半高峰宽
Z	化学计量学指数
ΔG_o	系统自由能的变化
ΔH	两相间标准焓增量
ΔS^0	两相间标准熵增量
α	分离因子 (又称为分离度或选择性因子)
ν	折合速度
σ	标准偏差
σ_E^2	柱外总方差
σ_I^2	柱内总方差
ϵ_T	填充柱的总孔隙度
T	填料因子 (又称为曲折因子、曲折系数或阻碍因子)
η	特性黏度
λ	表征粒子不均一性的常数项
μ_{opt}	优化的流动相的线速度

ρ_g	骨架密度
ρ_p	堆密度
Φ	相比
Ψ	孔度
ω_r	干凝胶的得水值

ρ_g	骨架密度
ρ_p	堆密度
Φ	相比
Ψ	孔度
ω_r	干凝胶的得水值

ρ_g	骨架密度
ρ_p	堆密度
Φ	相比
Ψ	孔度
ω_r	干凝胶的得水值

