

 现代化学专著系列·典藏版 13

计量置换理论及应用

耿信笃 著



科学出版社

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

西北大学“211”工程重点建设项目

现代化学专著系列·典藏版 13

计量置换理论及应用

耿信笃 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书系统地阐述了一种与组分在界面上迁移有关的全新理论——计量置换理论(SDT)及其在化学、化工、生物化学、分子生物学、基因工程和药学与在发展高新技术中的应用。全书共计十二章,涉及4方面的内容:(1)从提出新概念到计量置换模型的建立,再到从理论上推导出液相色谱和物理化学中组分保留机理和吸附机理;(2)SDT中多种参数的理论推导及应用;(3)在生物大分子中的应用,包括蛋白质分子的构象变化,蛋白质折叠、生物大分子的分离与纯化;(4)分离科学中长期存在的难点,包括:液-固界面热力学、收敛点的表征及RPLC中世界四大难题的解决。

本书可供化学、化工、生命科学、药学领域的高年级本科生、研究生、教师及工程师参考。

图书在版编目(CIP)数据

现代化学专著系列:典藏版/江明,李静海,沈家骢,等编著. —北京:科学出版社,2017.1

ISBN 978-7-03-051504-9

I. ①现… II. ①江… ②李… ③沈… III. ①化学 IV. ①O6

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第013428号

责任编辑:黄海/责任校对:鲁素

责任印制:张伟/封面设计:铭轩堂

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2017年1月第一版 开本:720×1000 1/16

2017年1月第一次印刷 印张:22 1/4

字数:425 000

定价:7980.00元(全45册)

(如有印装质量问题,我社负责调换)





前 言

当今科学技术的飞速发展促进了生产力的迅速提高，从而为人类社会的进步和繁荣做出了巨大的贡献。而科学新发现、新理论的问世，总会给高新技术产业的发展带来新的突破，为其指明方向和注入活力。人类社会文明的不断需求和生产力的持续发展，反过来又对科学和技术研究提出了一个又一个的难题以求解决。所以，人类文明、生产力和科学技术就是这样周而复始地相互促进和共同发展着。虽然如此，科技进步总是落后于社会生产力和人类文明的要求，这就使得科学家和工程师要不断地揭示自然界的奥秘，从表面上看来毫无联系和毫无规律的一些现象和数据中找出其内在的、能将这些现象联系起来的规律性的东西，也就是理论。

在过去的 30 年中，作为分离科学中新发展的分离手段之一的高效液相色谱，已从迅速的发展期走向成熟期，但在有关溶质保留机理方面出现了激烈地争论。在生命科学中，在追溯生命起源时也遇到了蛋白折叠机理问题。在用基因重组蛋白药物时又遇到了蛋白复性的分离和纯化及其工业化方面的难题。计量置换理论 (stoichiometric displacement theory, SDT) 的发展必然会与上述这些难题的提出和解决紧密地联系在一起。即便是在现今的刚刚处于发展初期的蛋白组学 (proteomics) 的研究中，也必然会遇到要用液相色谱法对复杂蛋白进行分离和纯化的问题。

SDT 是笔者、合作者及笔者的学生首次提出和系统发展的新创立的理论，国内外尚未有同类专著出版。本书所讲的 SDT 研究，是经历了从发现计量置换现象的存在，到提出计量置换概念，后发展成为一个理论模型，再到具有一套完整体系的一个理论。虽然有许多 SDT 论文发表，然而所发表的论文是按当时的认识和科学技术上提出问题的先后为顺序，而并非是按认识论上的先易后难的顺序向世人公布的。况且一些在国内外多种期刊上发表的论文也并非能被更多的读者容易见到，所以有必要从学科分类、认识论及逻辑性等方面将 SDT 重新整理一下，以使其更加条理化和系统化。在此过程中又能从理论上对 SDT 进行再提高，并将其在化学、化工、生物化学、药学、分子生物学及基因工程中的应用集中在一起进行介绍，这样或许能使工作在这些领域中的科学家及工程师能更容易、更深刻和更系统地理解 SDT，并从中有所收益。

SDT 在一些重要的观点上与已有的许多权威理论是有抵触的，这或许是该理论具有生命力的原因之一吧！所以应用此新理论在实践及发展高新技术产业中有时会出现与经典理论的预计和解释完全相反的结果。例如，依据传统的观点，

反相高效液相色谱、正相色谱、离子交换色谱、亲和色谱、疏水相互作用色谱、纸色谱和薄层色谱各自有着截然不同的保留机理；而依据 SDT，上述这 7 类色谱的保留机理却是相同的，均遵守 SDT。又如依据荣获 1952 年诺贝尔化学奖的液-液分配色谱理论，包括生物大分子和小分子溶质在内的组分，用色谱分离的柱效取决于所用色谱柱的柱长，色谱柱愈长，分离效果愈佳；而依据 SDT，生物大分子的色谱分离效果基本上与柱长无关，从而发展了“饼形”色谱柱并称为“色谱饼”。用该色谱饼还可对变性蛋白复性并同时进行纯化，以解决重组蛋白药物工业生产中的关键技术性难题。

用 SDT 也解决了在相界面上的许多难题，如建立了液-固吸附体系中组分的定量吸附机理，并依此将沿用了近一个世纪的、经验的 Freundlich（弗伦德利希）公式和 Langmuir（朗缪尔）公式从理论上推导出来，还得到了扩展的朗缪尔公式。依据 SDT，才能在国际上发展了用液相色谱（LC）法进行变性蛋白折叠的新方法，并称之为“液相色谱蛋白折叠法”。

在国内外的大学所设立的分科学课程中和已出版的一些著作中，已将 SDT 简要地介绍给了学生和广大的读者。SDT 也作为一章写进了《现代分离科学理论导引》一书。这本书在 2001 年由高等教育出版社出版，由教育部研究生工作办公室推荐为研究生教学用书。在该书出版后的三年多的时间里，有不少的研究生及其他读者曾以各种形式询问有关这一章中的不明白的问题，表明了他们对 SDT 的浓厚兴趣。然而，从另一方面讲，以“压缩饼干”的形式介绍 SDT 的确为读者深入理解 SDT 的内容增加了难度。早在 1991 年由国家教育委员会科技司编写并由南京大学出版社出版的《中国高等学校重大科技成果与研究进展选编》一书中，发表了从十一届三中全会以来全国高等学校的数以万计的科技成果中筛选出的 57 项重大成果介绍，SDT 及应用就是其中之一，所以很有必要详尽地将 SDT 展现给读者。相信本书的出版会对读者更加深入和广泛地研究 SDT 以及解决更多的、在界面上的理论和实际问题有所帮助。

SDT 的研究只是刚刚开始，SDT 本身及应用仍需做大量的工作，笔者只求这本书能起到“抛砖引玉”的作用，期望对 SDT 感兴趣的科技工作者、大学生和研究生勇于参与这一理论的研究工作。若发现 SDT 有错误和不妥之处，敬请批评指正！

在过去的 20 余年时间中，笔者在研究和应用 SDT 及其应用方面的研究经费是来自于国家有关部委及陕西省有关部门，包括国务院引进国外智力领导小组办公室项目、国家自然科学基金委员会的基础研究和高新技术新概念项目、国家计划委员会高技术产业化司的产业化项目、科技部的“863”生物技术项目和国家科技攻关项目、教育部的留学回国人员资助项目、陕西省省长基金、陕西省计划委员会高技术产业化项目、陕西省科技厅、陕西省教育厅的基础及应用研究项目。科技部国家科学技术学术著作出版基金委员会及西北大学“211”工程重点建设

项目资助本书出版。对于上述这些主管部门的支持，笔者在此一并致谢！

1989年，笔者合作人 Fred E. Regnier（弗莱德·依·瑞格涅尔）教授荣获美国化学会的分离科学奖，SDT 是其主要贡献之一。笔者也因在 SDT 方面的研究成果曾在 1988 年获国家教育委员会科技进步一等奖，1993 年和 1998 年又先后两次获陕西省科技进步一等奖和 1994 年美国匹兹堡第 10 届国际发明与博览会金奖，笔者对这些部门给予 SDT 的肯定、鼓励和荣誉表示感谢。

在笔者过去的研究工作中，我国及国际上老一辈的化学家和工作在各个领域的科学家都曾给予笔者以大力的支持和帮助，他们对笔者寄予了很大的期望，然而笔者所完成的只是期望中很少的一部分，在此也谨向这些老一辈科学家的支持表示感谢！而对所做的不满意之处，笔者表示歉意并请予以谅解。

笔者诚挚地感谢中国科学院高鸿院士、周同惠院士、陆婉珍院士长期以来对 SDT 研究的大力支持和推荐出版本书。笔者感谢龚波林教授在第 6~8 章、王骊丽博士在第 9~10 章、王超展博士在第 3~5 章和第 12 章撰写过程中的大力协助，同时也感谢西北纺织工程学院的耿信鹏教授和西北大学的白泉副教授对书中有关章节的阅读和修改，西北大学的卫引茂副教授及申烨华副教授对本书的撰写提出的宝贵意见。

耿信笃

2004 年春季于西安

目 录

第一章 绪论	(1)
§ 1.1 问题的提出	(1)
§ 1.2 计量置换概念及发展史	(3)
§ 1.3 计量置换理论在分离科学中的关键作用	(9)
§ 1.4 本书内容简介	(11)
参考文献	(14)
第二章 基本概念和方法论	(16)
§ 2.1 基本概念	(16)
2.1.1 相和界面	(16)
2.1.2 溶质穿过界面的迁移	(17)
2.1.3 分离与计量置换	(18)
2.1.4 计量置换、计量置换模型和计量置换理论	(18)
2.1.5 化学分离和分离科学	(19)
2.1.6 分配过程与计量置换过程	(20)
2.1.7 在 SDT 中涉及液相色谱与液-固吸附体系中的术语	(21)
2.1.8 物理学中的两个基本原理	(21)
§ 2.2 研究 SDT 的方法论	(22)
2.2.1 平衡热力学	(22)
2.2.2 主体与客体互换法	(23)
参考文献	(23)
第三章 液-固界面上的溶质计量置换吸附理论	(25)
§ 3.1 概述	(25)
§ 3.2 液-固界面上的单组分溶质计量置换吸附理论	(26)
3.2.1 单组分溶质计量置换吸附理论表达式的推导	(26)
3.2.2 单组分溶质吸附的 SDT-A 的检验	(32)
§ 3.3 液-固界面上的双组分溶质计量置换吸附理论	(35)
3.3.1 双组分溶质 SDT-A 表达公式的理论推导	(36)
3.3.2 K_d 和 $K_{d,1}$	(38)
3.3.3 SDT-A 的两个表达式	(39)
3.3.4 双组分溶剂吸附体系中 SDT-A 的检验	(40)
§ 3.4 弗仑德利希吸附等温线及各参数的物理意义	(42)
§ 3.5 朗缪尔公式及改进的朗缪尔模型	(43)

3.5.1	扩展的朗缪尔公式的理论推导	(43)
3.5.2	扩展的朗缪尔公式的检验	(45)
§ 3.6	吸附剂吸附溶质的量与溶剂活度的定量关系	(47)
3.6.1	溶质吸附量与溶剂活度的定量关系的理论推导	(48)
3.6.2	二参数方程的线性关系的验证	(50)
3.6.3	二参数方程预测结果的比较	(50)
3.6.4	二参数方程 $\ln a_{pL} D_{(m-q)}$ 对 $\ln a_0$ 作图收敛趋势的研究	(51)
3.6.5	二参数方程在溶质活度很低和较高时获得参数值及相关系数的比较	(52)
3.6.6	多参数方程的回归	(53)
3.6.7	在相对高的溶质浓度下实验结果和预测值之间的比较	(54)
	参考文献	(55)
第四章	液相色谱中溶质的计量置换保留理论	(57)
§ 4.1	概述	(57)
§ 4.2	二组分流动相体系中的 SDT-R	(58)
§ 4.3	LC 中多元流动相体系的溶质计量置换统一保留理论	(59)
4.3.1	统一的 SDT-R 的理论推导	(60)
4.3.2	多元流动相体系中的 SDT-R 的检验	(64)
§ 4.4	用统一的 SDT-R 对 LC 中各种溶质保留模型数学表达式的 理论推导	(69)
4.4.1	多组分流动相体系	(69)
4.4.2	双组分流动相色谱体系	(72)
§ 4.5	反相液相色谱 (RPLC)	(76)
§ 4.6	疏水相互作用色谱 (HIC)	(82)
4.6.1	HIC 中的 SDT-R	(82)
4.6.2	SDT-R 中分子之间的相互作用	(83)
§ 4.7	离子交换色谱 (IEC)	(89)
4.7.1	静电作用模型	(89)
4.7.2	IEC 中的 SDT-R	(90)
§ 4.8	亲和色谱 (AFC)	(92)
4.8.1	溶质保留机理	(92)
4.8.2	SDT-R	(93)
§ 4.9	正相色谱 (NPC)	(95)
§ 4.10	薄层色谱 (TLC) 与纸色谱 (PC)	(98)
	参考文献	(99)
第五章	计量置换理论 (SDT) 中的参数	(102)
§ 5.1	概述	(102)
§ 5.2	计量置换保留理论 (SDT-R) 中的第一组线性参数	

——溶质亲和势 $\lg I$ 和溶质置换溶剂的计量置换参数 Z	(102)
5.2.1 参数 $\lg I$ 和 Z	(102)
5.2.2 影响计量置换参数 Z 和亲和势参数 $\lg I$ 的因素	(103)
§ 5.3 SDT-R 中的第二组线性参数	(106)
5.3.1 第二组线性参数的理论推导	(106)
5.3.2 j 的物理意义	(107)
5.3.3 柱相比 φ 的热力学定义	(108)
5.3.4 非同系物 $\lg I$ 与 Z 间的线性关系	(109)
§ 5.4 计量置换吸附理论 (SDT-A) 中的溶质吸附势 β 、固定相释放溶剂分量 nr/Z 和溶质释放溶剂分量 q/Z	(113)
5.4.1 吸附势 β	(113)
5.4.2 nr/Z	(117)
5.4.3 q/Z	(117)
§ 5.5 当吸附层大于 1 时吸附剂释放置换剂的分量 nr 、溶质实际达到吸附层的厚度 r 和溶质释放置换剂的分量 q	(118)
§ 5.6 同系物单位结构单元和非重复单位结构单元对 Z 的贡献, s 和 i ——第三组线性方程的理论推导	(119)
参考文献	(123)
第六章 液-固界面组分迁移过程中的热力学函数及其分量	(125)
§ 6.1 概述	(125)
§ 6.2 柱相比的热力学定义	(126)
6.2.1 柱相比的传统定义	(126)
6.2.2 柱相比的两种新的测定方法	(127)
§ 6.3 SDT-A 中热力学函数及其分量	(129)
6.3.1 ΔG 及其分量	(129)
6.3.2 ΔH°_q 及其分量	(129)
6.3.3 ΔH 和 ΔS 的分量表示及分配系数的计算	(130)
6.3.4 测定 Gibbs 自由能及其分量	(132)
6.3.5 $\lg K_d$, β_s 和 q/Z 与 $1/T$ 的线性关系	(133)
6.3.6 焓变和熵变及其分量的测定	(134)
§ 6.4 SDT-R 中热力学函数及分量	(135)
6.4.1 $\lg I$ 和 Z 的热力学性质	(135)
6.4.2 ΔG 及其分量	(137)
6.4.3 ΔH 及其分量	(139)
6.4.4 ΔS 及其分量	(140)
§ 6.5 焓-熵补偿	(143)
6.5.1 在 RPLC 中溶质保留过程中焓-熵补偿理论公式的推导	(143)
6.5.2 公式的实验验证	(145)

6.5.3 计量置换过程中的焓-熵补偿	(146)
§ 6.6 生物大分子的色谱热力学	(148)
6.6.1 RPLC 中生物大分子 $\lg \varphi$ 的测定	(148)
6.6.2 生物大分子的 ΔG 及其分量	(149)
6.6.3 生物大分子的 ΔH 及其分量	(154)
6.6.4 生物大分子的 ΔS 及其分量	(157)
6.6.5 生物大分子在 HIC 中的热力学参数	(158)
参考文献	(160)
第七章 界面过程中的收敛现象	(162)
§ 7.1 概述	(162)
§ 7.2 收敛的非热力学表征	(163)
7.2.1 理论依据	(163)
7.2.2 浓度平均收敛点	(164)
7.2.3 碳数平均收敛点 (ACPN)	(165)
§ 7.3 RPLC 中收敛的统一表达式	(166)
§ 7.4 收敛的热力学表征	(167)
7.4.1 等自由能点	(167)
7.4.2 LC 同系物保留过程中的等熔点	(170)
7.4.3 同系物的熵收敛	(173)
§ 7.5 SDT-A 中的收敛	(176)
7.5.1 吸附量与溶剂浓度多参数方程的推导	(176)
7.5.2 两参数方程吸附量与溶剂浓度作图的收敛趋势	(177)
参考文献	(177)
第八章 液相色谱中新的表征参数	(178)
§ 8.1 概述	(178)
§ 8.2 Z 和 S 以及 $\lg I$ 和 $\lg K_w^\circ$ 的平行与非平行关系	(178)
8.2.1 Z 和 S 及 $\lg I$ 和 $\lg K_w^\circ$ 之间的平行与非平行关系	(179)
8.2.2 分子结构性质与 Z 、 S	(181)
8.2.3 溶剂强度与 Z (S)、 N	(181)
§ 8.3 新表征参数 Z	(182)
8.3.1 溶质分子结构参数	(182)
8.3.2 溶剂性质	(184)
8.3.3 固定相特征	(185)
§ 8.4 溶质对固定相的亲势 $\lg I$	(185)
8.4.1 表征亲势的参数 $\lg I$	(185)
8.4.2 $\lg I$ 对非极性小分子溶质体系的表征	(186)
8.4.3 $\lg I$ 和分配系数 K_d 之间的关系	(188)
8.4.4 镧系元素中“四素组”效应的表征	(189)

§ 8.5	置换剂对固定相的亲势 j	(191)
8.5.1	理论依据	(191)
8.5.2	j 值与置换剂强度	(192)
§ 8.6	柱相比对数 $\lg \varphi$	(193)
§ 8.7	同系物中重复结构单元和端基、侧链对 Z 的贡献 s 和 i	(193)
8.7.1	测定 s 和 i 的准确度	(193)
8.7.2	s 和 i 应用举例——改进的马丁方程的推导	(194)
§ 8.8	1 mol 溶质被吸附时从吸附剂和溶质表面释放出的溶剂物质的量 nr 和 q	(197)
§ 8.9	被置换的溶剂的量和溶质到达吸附溶剂的层数 n 和 r	(199)
	参考文献	(199)
第九章	生物大分子的分离与短柱理论	(201)
§ 9.1	生物大分子在 HPLC 上的保留特征	(201)
9.1.1	描述生物大分子保留的 SDT-R	(201)
9.1.2	生物大分子分离中的固定相	(203)
9.1.3	生物大分子分离所用流动相	(204)
§ 9.2	流动相对生物大分子保留的决定性作用	(205)
§ 9.3	短柱理论	(205)
9.3.1	概述	(205)
9.3.2	短柱理论表达式的推导	(206)
9.3.3	有效柱长 L_{eff} 的测定	(210)
9.3.4	最短柱长 L_{min} 的测定	(211)
§ 9.4	短柱对生物大分子的分离效果	(213)
9.4.1	生物大分子的洗脱模式	(213)
9.4.2	不同柱长对生物大分子的分离效率	(214)
§ 9.5	色谱饼	(216)
9.5.1	半制备色谱柱和色谱饼的性能	(216)
9.5.2	色谱柱与色谱饼压力-体积流速曲线	(218)
9.5.3	色谱饼与色谱柱质量负载和体积负载	(219)
9.5.4	制备型色谱饼	(219)
§ 9.6	色谱饼分离条件的优化	(222)
9.6.1	流动相用量优化	(222)
9.6.2	色谱条件与分离度	(223)
9.6.3	生物活性回收率	(225)
9.6.4	色谱饼的复性并同时纯化	(225)
	参考文献	(227)
第十章	生物大分子构象变化的表征	(228)
§ 10.1	生物大分子构象变化的 Z 值表征	(228)

§ 10.2	RPLC 中蛋白质分子构象的 Z 值表征	(230)
10.2.1	蛋白质构象的始末状态	(230)
10.2.2	变性蛋白质的 Z 值与蛋白质的相对分子质量	(231)
10.2.3	甲酸浓度与生物大分子的构象	(232)
10.2.4	Z 值与不同种类离子对试剂	(233)
10.2.5	Z 值与置换剂分子的大小	(235)
10.2.6	RPLC 中白细胞介素-2 (IL-2) 突变蛋白分子的构象变化与 Z 值表征	(235)
10.2.7	不同变性状态条件下溶菌酶的 Z 表征	(238)
10.2.8	在 RPLC 中人工交联修饰蛋白质保留行为及其与 Z 值表征	(243)
10.2.9	重组人干扰素- γ (rhIFN- γ) 在有孔与无孔反相硅胶固定相上保留行为的比较	(244)
§ 10.3	HIC 中蛋白质分子构象的 Z 值表征	(244)
10.3.1	HIC 中在变性剂存在条件下 Z 值的准确测定方法	(244)
10.3.2	脲浓度与蛋白质分子构象变化的 Z 值表征	(248)
10.3.3	胍浓度与蛋白质分子构象变化的 Z 值表征	(249)
10.3.4	Z 值的测定精度	(251)
§ 10.4	IEC 中蛋白质分子构象 Z 值的表征	(252)
10.4.1	IEC 中变性蛋白质与 Z 值的测定	(253)
10.4.2	不同变性状态下 Lys 的弱阳离子交换色谱保留	(253)
10.4.3	不同脲浓度下溶菌酶与 Z 值	(254)
10.4.4	Z 值对还原变性溶菌酶活性回收率随脲浓度变化趋势	(255)
10.4.5	Z 值对 Lys 分子构象变化的定量表征	(256)
§ 10.5	$\lg I$ 的表征	(257)
10.5.1	在 RPLC 中不同折叠状态下蛋白质的 $\lg I$ 值	(258)
10.5.2	IEC 上的 $\lg I$ 值	(259)
10.5.3	HIC 上不同浓度变性剂条件下测定 $\lg I$ 的精度	(260)
10.5.4	变性蛋白质的折叠自由能及折叠自由途径 (pathway)	(261)
10.5.5	蛋白质在不同 HIC 固定相的 $\lg I$	(262)
	参考文献	(262)
第十一章 蛋白质复性及其在生物工程中的应用		(265)
§ 11.1	蛋白质复性的策略	(265)
11.1.1	传统的复性方法	(265)
11.1.2	人工促进蛋白质折叠	(266)
11.1.3	蛋白质折叠机理争论的焦点	(268)
11.1.4	变性蛋白质折叠过程中的自由能	(268)
§ 11.2	液相色谱法对蛋白质进行折叠及其应用	(270)
11.2.1	各种 LC 对蛋白质复性的热力学基础——化学平衡	(270)
11.2.2	各种 LC 法的变性蛋白质复性法	(273)

§ 11.3	变性蛋白质在 HPHIC 复性与同时纯化	(278)
11.3.1	HIC 蛋白质复性的分子学机理	(278)
11.3.2	HPHIC 法折叠蛋白质与人工分子伴侣	(283)
§ 11.4	影响 HPHIC 对蛋白质复性的因素	(284)
§ 11.5	蛋白质复性并同时纯化装置	(284)
11.5.1	蛋白质复性并同时纯化装置对变性的标准蛋白质复性效果	(284)
11.5.2	蛋白质复性并同时纯化装置对 rhG-CSF 复性	(286)
11.5.3	蛋白质复性并同时纯化装置对 IL-2-Ang 复性	(287)
11.5.4	蛋白质复性并同时纯化装置对 rhIFN- γ 复性与纯化	(288)
§ 11.6	LC 法应用展望	(290)
参考文献	(291)

第十二章 反相液相色谱中世界四大难题的解决

§ 12.1	难题的提出及历史背景	(294)
12.1.1	问题的提出	(294)
12.1.2	历史根源	(295)
12.1.3	难点之所在	(295)
§ 12.2	基本思路	(295)
§ 12.3	液相色谱中一种全新实验方法的建立	(296)
§ 12.4	实验装置及定量测定甲醇方法的可靠性	
	——定性回答溶质置换溶剂	(297)
12.4.1	实验装置	(297)
12.4.2	不同波长下甲醇的洗脱曲线	(298)
12.4.3	定量方法	(300)
§ 12.5	在 RPLC 中溶质保留的动力学因素——样品分子可否进入到键合相层深处	(304)
12.5.1	甲醇和 TFA 之间的计量置换性	(305)
12.5.2	置换出的组分浓度的不连续及两个切线之间交点附近的曲线形状	(308)
§ 12.6	胰岛素对甲醇的计量置换——溶质置换溶剂的定量回答	(310)
12.6.1	胰岛素的一组洗脱曲线	(311)
12.6.2	SDT 的直接证明	(312)
12.6.3	结论	(319)
§ 12.7	吸附和分配机理的统一——在分配和吸附机理中两者各自贡献的大小	(320)
12.7.1	吸附和分配机理各自的论点	(321)
12.7.2	统一吸附和分配机理的方法	(322)
12.7.3	在键合相层中可容纳甲醇分子层数的估算	(324)
12.7.4	结论	(326)

§ 12.8 运用于 SDT 解决 RPLC 中的多种难题及胰岛素吸附等温线研究 举例	(327)
12.8.1 影响胰岛素吸附的因素	(329)
12.8.2 在溶液中胰岛素随时间的稳定性	(329)
12.8.3 离子对试剂的种类和浓度的选择	(330)
12.8.4 胰岛素在各种流动相中的吸附等温线	(332)
参考文献	(334)
后记	(336)

第一章 绪 论

§ 1.1 问题的提出

1952年英国生物化学家马丁 (Martin) 和辛格 (Synge) 因提出了液-液分配色谱中的塔板理论而荣获了诺贝尔化学奖^[1]。该理论的实质是将溶质在不相溶解的两相有机溶剂中的分配机理引入到色谱中来。不同于分配机理认为的溶质在两相中的一次性分配, 塔板理论认为溶质是在流动相和吸附在支持体表面上的、与流动相组成不同的液相之间的多次分配, 或者是类似于串级萃取, 使得在后者条件下的分离效果远较前者为佳, 结果用液相色谱法 (LC) 分离了许多复杂的、用其他方法难以分离的组分。依据塔板理论, 色谱柱愈长, 即理论塔板数愈多, 则分离效果愈佳。依此发展了气相色谱分析方法及以后的高效液相色谱法。这两种色谱法的出现, 不仅解决了诸如复杂的石油和天然气中复杂成分的分离和分析以及在生产制备中的许多难题, 而且对科学的发展也起到了至关重要的作用。截止到1975年的统计, 除有2项诺贝尔奖是专门发给对发展色谱学的贡献外, 在另外的12次诺贝尔奖中, 色谱均做出了重要的贡献, 换句话说, 没有色谱, 就很难、或者根本就没有这12次诺贝尔奖^[2]。迄今为止, 马丁和辛格的塔板理论仍然被广泛地采用着。

在马丁和辛格获诺贝尔奖6年后, 即1958年, 笔者跨进了大学校门学习化学, 马丁和辛格的塔板分配理论自然是学习化学和分离方法中的极为重要的内容。笔者当时一方面努力学习这一理论, 另一方面就对该理论有迷惑不解之处。例如依据这一理论, LC中的分离仅与该溶质在流动相和被吸附在担体表面上的液体间的分配系数有关, 除非担体性质会影响该吸附层的化学组成, 否则, 即便担体性质变了, 也应与担体 (或固定相) 本身性质无关。既然如此, 那为什么科学家又要发展诸多种类不同的固定相和研究包括物理性质在内的固定性质对组分分离的影响呢? 科学家承认固定相性质对溶质保留有贡献, 为什么还坚持溶质的保留是分配机理呢? 将这一理论应用到反相高效液相色谱 (RPLC) 中溶质的保留机理时, 这个让人迷惑不解的问题就显得尤为突出。

无论从发表论文的数量和应用的广泛程度上讲, 在高效液相色谱 (HPLC) 中 RPLC 都是最多的。所以上述这种迷惑不解的难题也就出现在许多色谱学家的脑海中, 并且直至今天色谱学家都在一直思考着如何解决这一难题。出现争论的历史渊源是, 除马丁和辛格的液-液分配色谱外, 还有另一次诺贝尔奖专门授予瑞典科学家迪塞留斯 (Tiselius) 对吸附色谱 (实为电泳与吸附色谱) 的贡献^[2]。

这就成了许多色谱学家围绕着在 RPLC 中溶质保留是属马丁和辛格所提出的分配机理、还是迪塞留斯提出的吸附机理、或者是二者的混合机理的长期争论不清的难题。1993 年“Journal of Chromatography”出了一个专门讨论在 RPLC 中溶质保留机理的专辑，在前言中三位主编提出了在 RPLC 中的四大难题，以求世界各国科学家去努力解决并称其为 RPLC 中世界四大难题^[3]。这四大难题之一就是溶质的保留机理是分配、吸附还是二者的混合机理。如果是最后一种情况，那么分配和吸附机理各自的贡献又是多少？虽然这只是该四大难题之一，但却是该四大难题的核心。换句话讲，只要这一难题得到解决，其他三个难题也就能较容易地得到答案。

在上世纪 80 年代初期，笔者曾在美国明尼苏达大学化学系和普渡大学生化系用 RPLC 进行生物大分子的分离和纯化的理论研究。首先要解决的便是生物大分子在 RPLC 中的保留机理。这个在笔者脑海中埋藏了 20 多年的未曾解决的“固定相对色谱保留的贡献如何与马丁-辛格塔板分配理论协调一致”的难题又一次摆在了笔者的面前。从理论上讲，如果把分子质量大于 2 000 Da（非法定单位，1Da=1u=1.660 54×10⁻²⁷ kg，下同）作为人为的大、小分子的分界限的话，那么蛋白质的分子质量一般都大于 10 000 Da，应为大分子。在 RPLC 中所用固定相表面一般键合的是十八烷基，而在该固定相表面上所吸附的流动相只有 1 到几个分子层的厚度，很难设想，一个分子质量高达万级 Da 的蛋白质，或分子质量仅为几千 Da 的多肽能在分子质量小于 100 Da 的几个分子层的有机溶剂相中进行诸如液-液萃取一样的相分配。这种理论分析的结果是显而易见的，也就是说，至少是对于生物大分子而言，在 RPLC 中的保留机理不会是分配机理。做出这样的回答不仅要有实验结果的证实，而且也要求有强有力的理论支持。

笔者在实验中发现：①在 RPLC 中生物大分子的分离效果优劣几乎与所用色谱柱的长度无关，这也就是在上世纪 80 年代中期用柱长 2~5cm 的色谱柱分离生物大分子的理由。这与马丁-辛格塔板理论中色谱柱愈长，分离效果愈佳的理论相矛盾；②在 RPLC 中所用有机溶剂的洗脱范围非常狭窄，表现为或吸附在固定相表面“不动”，或“瞬时”解吸到流动相中，并随同流动相一起流出色谱柱，几乎呈现不出如像马丁-辛格塔板理论中所描述的吸附和解吸附的多次的“分配”过程。这一过程后来有科学称其为“开”和“关”^[4]以及“有”和“无”^[5]的保留机理；③生物大分子的保留和分离效果只与其同固定相表面的实际接触表面面积有关，而与固定相的总面积大小无关。这就产生了当今在分离生物大分子时只能用大孔基质，如大孔硅胶，表现出生物大分子分离不仅与键合相的化学组成有关，而且与其载体的物理特征有关，这也是用马丁-辛格的分配色谱理论无法做出解释的实验事实。

要解释上述实验中的这些现象就必须建立一个能将生物大分子保留与 RPLC 中流动相和固定相的贡献均包括在内的、新的生物大分子的保留机理。通常色谱