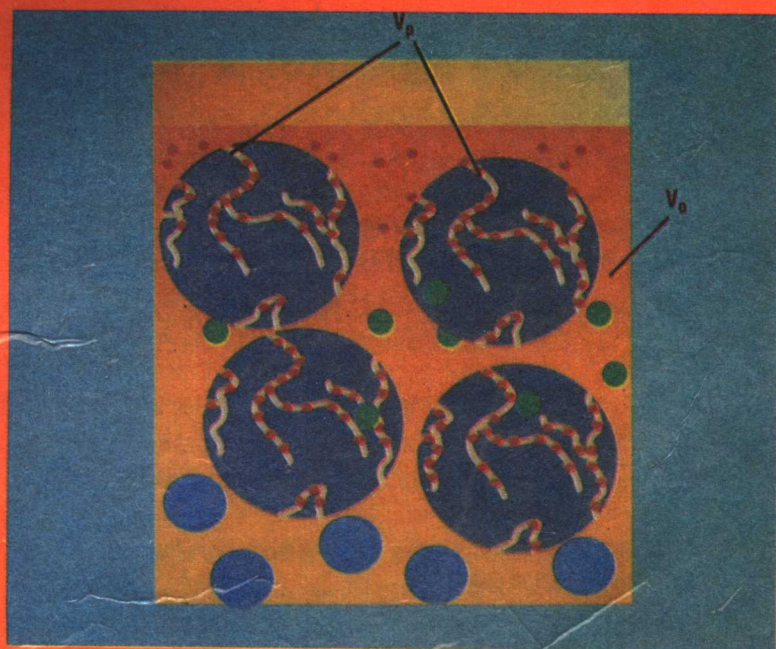


生物化学实验 原理和方法

李建武 肖能愿 余瑞元 袁明秀 合编
陈丽蓉 陈雅蕙 陈来同



北京大学出版社

生物化学实验原理和方法

李建武 萧能惠 余瑞元 袁明秀 合编
陈丽蓉 陈雅蕙 陈来同
(不分先后次序)

北京大学出版社

新登字(京)159号

图书在版编目(CIP)数据

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验原理和方法 / **李建武** 等编. —北京: 北京大学出版社, 1994.9

ISBN 7-301-02614-5

I. 生… II. 李… III. 生物化学-实验-知识 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (94) 第07041号

书 名: 生物化学实验原理和方法

著作责任者: **李建武** 等合编

责任编辑: 朱新邨

标准书号: ISBN 7-301-02614-5/Q·061

出 版 者: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

电 话: 出版部 2502015 发行部 2559712 编辑部 2502032

排 印 者: 北京大学印刷厂

发 行 者: 北京大学出版社

经 销 者: 新华书店

版 本 记 录: 787×1092毫米 16开本 29.75印张 740 字

1994年9月第一版 1994年9月第一次印刷

定 价: 29.20元

内 容 提 要

全书分生物化学实验原理、生物化学实验和附录三部分。实验原理部分着重论述各种层析法、电泳法、分光光度法和生物大分子制备等常用生化实验方法的基本原理。实验部分共选编了61个实验，包括糖类、脂类、蛋白质、核酸、酶、激素和维生素的分离、制备、分析和鉴定技术（如滴定、比色、纸层析、薄层层析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析、各种电泳和免疫技术）以及瓦氏检压法等。其中既保留了一些对加强学生基本实验方法和技能训练行之有效的传统实验，也引进了一些新近发展起来的生化实验技术。这些实验均经过历年来教学实践和科学研究工作反复验证，比较成熟。大多数实验可以在8—16学时内完成。有些实验既可以组合起来成为一个综合性实验，也可以各自独立作为一个实验，便于安排教学。每个实验后附有参考资料。附录部分包括各种常用数据表和常用仪器的使用方法等，可供读者查阅。

本书以综合性大学、师范、医药和农林院校有关专业的大学本科生为对象，也可供其他生化实验技术工作者参考。它可作为高等学校生化实验课教材，也可作为小型生化实验技术的工具书。

编 者 的 话

生命科学在20世纪有了惊人的发展，生物化学是其中最活跃的分支学科之一。今天，生物化学已是发展生命科学各分支学科和生物工程技术的重要基础；工业、农业、医药、卫生和环境科学的某些研究也以生物化学理论为依据，以其实验技术为手段。生物化学也成为高等学校许多相关学科学生的必修课程，因此，为这些学生提供一本新的、适用的生物化学实验教材是十分必要的。

北京大学原生物学系生物化学教研室分别于1958、1964和1978年先后三次系统总结各个历史阶段的教学经验，编写出版过三本《生物化学实验指导》。这几个版本的《生物化学实验指导》在北京大学生物学系及使用它们的高等学校的教学中发挥了良好的作用。鉴于近10余年间，生物化学发展迅速，新的实验方法和技术不断出现，为了引进新的内容，跟上学科的发展，编者本着继承与创新相结合的精神，吸取了以上几版教材的精华，并在我们近几年使用的实验教材基础上，经过总结经验，重新整理编写成这本新的实验教材。

本书以综合性大学、师范、医药和农林院校有关专业的本科生为对象，也可供其他生物化学实验技术工作者参考。它是一本高等学校生物化学实验教材，也是一本小型生物化学实验技术工具书。全书内容分生物化学实验原理、生物化学实验和附录三部分。生物化学实验原理部分对一些重要的常用生物化学实验技术的有关理论进行了较系统、全面的论述。生物化学实验部分共选编了61个实验，包括生物化学分离、制备、分析和鉴定技术（如滴定、比色、纸层析、薄层层析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析、各种电泳和免疫技术）以及瓦氏检压法等。在选材方面，除保留一些对加强学生基本技能训练行之有效的传统实验外，也注意引进新近发展起来的生物化学实验技术，为大学生进入更高层次的生物化学乃至分子生物学实验打下基础。这些实验方法在科学研究和生产实践方面也有较大应用价值。本书约有三分之二篇幅的实验都是历年来北京大学原生物学系各专业的本科生和中国协和医科大学医预班学生做过的，其余新增的实验也是编者近年来在科学研究工作中经常应用的技术。书中的附录以及每个章节、每个实验后所附的参考文献，可供读者查阅。

本书经过集体讨论、分工负责进行编写。**李建武**教授生前主持了本书的编写、出版工作，并为此付出了很大的心血和精力。本书的出版是集体劳动的成果。

北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系王镜岩教授审阅了全稿，并提出了很好的修改意见。**沈同**、张庭芳、朱圣庚和胡美浩教授对本书的内容提供过宝贵意见。青年教师陈劲秋和姚瑾预做并编写了个别新增实验，实验技术人员邓爱平、孙相超和孙冬梅以及近年来参加实验教学工作的文津和刘健也为本书的出版付出了劳动。本书的责任编辑朱新邨在编辑加工中做了大量细致的工作，李丽霞和张虹为本书绘制了大部分图表，张志明为本书设计了封面，编者在此对他们一并表示衷心感谢。

诚挚地欢迎使用本书的教师、实验技术人员、学生及其他读者提出批评和指正。

编 者

1994年5月

生物化学实验室规则

1. 每个同学都应该自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，不大声谈笑。
2. 实验前必须认真预习，熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤，懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法，否则不能开始实验。
3. 实验过程中要听从教员的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并把实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本上，文字要简练、准确。完成实验后经教员检查同意，方可离开实验室。
4. 实验台面应随时保持整洁，仪器、药品摆放整齐。公用试剂用毕，应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕，仪器须洗净放好，将实验台面抹拭干净，才能离开实验室。
5. 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障须立即报告教员，不得擅自动手检修。
6. 实验室内严禁吸烟！煤气灯应随用随关，严格做到：人在火在，人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置。实验完毕，应立即关好煤气开关和水笼头，拉下电闸。离开实验室以前应认真、负责地进行检查，严防发生安全事故。
7. 废液体可倒入水槽内，同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须先用水稀释。废纸、火柴头及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。
8. 仪器损坏时，应如实向教员报告，并填写损坏仪器登记表，然后补领。
9. 实验室内一切物品，未经本室负责教员批准，严禁携出室外，借物必须办理登记手续。
10. 每次实验课由班长负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

目 录

第一部分 生物化学实验原理

第一章 液相层析法的一般原理和操作	(1)
第一节 引言.....	(1)
第二节 层析法的一般原理.....	(2)
第三节 洗脱峰不对称性及其原因.....	(7)
第四节 多组分的分离.....	(8)
第五节 柱层析系统基本操作方法.....	(10)
第二章 吸附层析法	(16)
第一节 原理.....	(16)
第二节 吸附剂的类型及选择.....	(16)
第三节 溶剂与洗脱剂.....	(17)
第三章 薄层层析法	(19)
第一节 引言.....	(19)
第二节 薄层层析原理.....	(19)
第三节 固定相支持介质的选择.....	(20)
第四节 薄层层析操作技术.....	(22)
第五节 薄层层析的定性分析.....	(26)
第六节 薄层层析的定量分析.....	(27)
第四章 纸层析法	(28)
第一节 纸层析基本原理.....	(28)
第二节 影响 R_f 值的主要因素.....	(28)
第三节 实验操作技术.....	(30)
第五章 离子交换层析法	(36)
第一节 基本原理.....	(36)
第二节 离子交换树脂的结构和常用的离子交换剂.....	(38)
第三节 离子交换剂的选择.....	(40)
第四节 树脂的处理、转型、再生与保存.....	(42)
第五节 离子交换层析法的应用.....	(43)
第六节 离子交换纤维素.....	(43)
第六章 凝胶层析法	(47)
第一节 引言.....	(47)
第二节 基本原理.....	(47)
第三节 凝胶的条件和类型.....	(49)

第四节	凝胶层析的实验技术	(53)
第五节	影响凝胶层析的主要因素	(55)
第七章	亲和层析法	(57)
第一节	基本原理	(57)
第二节	配基和载体的选择	(57)
第三节	亲和吸附剂的制备方法	(59)
第四节	亲和层析技术	(63)
第五节	亲和层析应用举例	(65)
第六节	金属螯合亲和层析	(66)
第八章	电泳	(69)
第一节	电泳基本原理	(69)
第二节	电泳的分类	(74)
第三节	醋酸纤维薄膜电泳原理	(75)
第四节	以琼脂(糖)为支持物的电泳	(75)
第五节	以聚丙烯酰胺凝胶为支持物的电泳	(82)
第六节	染色方法	(100)
第九章	分光光度法	(107)
第一节	原理	(107)
第二节	光吸收的测定	(109)
第十章	生物大分子的分离纯化与鉴定	(117)
第一节	引言	(117)
第二节	生物大分子制备的前处理	(118)
第三节	分离纯化	(120)
第四节	生物大分子的浓缩、干燥和保存	(121)
第五节	生物大分子含量的测定和纯度鉴定	(123)

第二部分 生物化学实验

实验 1	糖的呈色反应和还原糖的检验	(125)
实验 2	糖的定量测定	(131)
实验 3	粘多糖-肝素钠效价的测定	(133)
实验 4	油脂皂化与皂化值的测定	(136)
实验 5	脂肪碘值的测定	(139)
实验 6	血清胆固醇的测定(磷钼铁法)	(142)
实验 7	脂类组成对脂类单分子层通透性的影响	(145)
实验 8	去污剂及膜活性试剂对红血球细胞膜的作用	(147)
实验 9	蛋白质和氨基酸的呈色反应	(150)
实验 10	蛋白质的沉淀、变性反应	(156)
实验 11	蛋白质浓度测定(1)——总氮量的测定	(160)

实验12	蛋白质浓度测定 (2)——双缩脲法	(165)
实验13	蛋白质浓度测定 (3)——Folin-酚测定法	(168)
实验14	蛋白质浓度测定 (4)——紫外线(UV)吸收法	(171)
实验15	蛋白质浓度测定 (5)——染色法	(174)
实验16	氨基酸的分离与鉴定——滤纸层析法	(177)
实验17	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(182)
✓实验18	聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离血清蛋白	(189)
实验19	聚丙烯酰胺等电聚焦电泳	(197)
实验20	蛋白质分子量测定 (1)——葡聚糖凝胶薄层层析法	(204)
实验21	蛋白质分子量测定 (2)——凝胶过滤层析法	(207)
实验22	蛋白质分子量测定 (3)——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(216)
实验23	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(银染色法)	(224)
✓实验24	脂蛋白的分离——琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(227)
实验25	蛋白质多肽链N-末端氨基酸测定——DNS-Cl法	(232)
实验26	细胞色素C的制备和测定	(240)
实验27	酵母RNA提取与地衣酚显色测定法	(257)
实验28	猪脾(肝)脏DNA提取与二苯胺测定法	(260)
实验29	植物DNA的提取	(264)
实验30	RNA水解及其产物核苷酸聚酰胺薄膜层析	(266)
✓实验31	核酸浓度测定 (1)——定磷法	(270)
实验32	核酸浓度测定 (2)——紫外线(UV)吸收法	(275)
实验33	质粒DNA的微量制备(碱裂解法、煮沸法)	(278)
实验34	DNA的琼脂糖凝胶电泳	(284)
实验35	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	(290)
实验36	维生素A、B ₁ 和B ₂ 的定性鉴定	(395)
实验37	维生素B ₁ 的荧光测定法	(298)
实验38	维生素B ₂ (核黄素)的荧光测定法	(300)
实验39	维生素C的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	(302)
实验40	肾上腺素的提取与鉴定	(306)
实验41	酶的特性——底物专一性	(308)
实验42	脂肪酶活性测定	(311)
实验43	血清谷丙转氨酶(SGPT)测定(King氏法)	(313)
实验44	超氧化物歧化酶的分离纯化	(318)
实验45	超氧化物歧化酶活性染色鉴定法	(324)
实验46	影响酶促反应速度的因素 (1)——底物浓度、米氏常数(K_m)测定	(327)
实验47	影响酶促反应速度的因素 (2)——激活剂与抑制剂	(334)
实验48	影响酶促反应速度的因素 (3)——pH、最适pH	(336)
实验49	影响酶促反应速度的因素 (4)——温度、最适温度	(339)
实验50	酯酶的分离、纯化与活性测定	(342)

实验51	亲和层析法分离乳酸脱氢酶.....	(347)
实验52	乳酸脱氢酶活力测定.....	(352)
实验53	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶(活性染色鉴定法).....	(355)
实验54	尿激酶的纯化及活性测定.....	(359)
实验55	辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, NAD^+) 含量测定.....	(364)
实验56	辅酶 A 含量测定.....	(367)
实验57	胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响.....	(370)
实验58	肌糖元的酵解作用.....	(375)
实验59	用正交法测定几种因素对酵母发酵作用的影响.....	(378)
实验60	免疫扩散和免疫电泳.....	(382)
实验61	酶联免疫吸附测定法.....	(391)

第三部分 附 录

一、	实验室安全及防护知识.....	(398)
二、	试剂及试剂配制与保存.....	(401)
三、	一些常用单位.....	(411)
四、	单位与浓度的表示及溶液浓度的调整.....	(412)
五、	实验误差与提高实验准确度的方法.....	(416)
六、	实验记录与实验报告.....	(420)
七、	常用数据表.....	(424)
八、	层析、电泳材料.....	(435)
九、	其他附表.....	(445)
十、	常用仪器的使用方法.....	(448)

第一部分 生物化学实验原理

第一章 液相层析法的一般原理和操作

第一节 引言

1903年,俄国科学家 M.C. Двeт 首创了一种从绿叶中分离多种不同颜色色素成分的方法,命名为色谱法 (chromatography), 由于翻译和习惯的原因, 又常称为层析法。80多年来, 层析法不断发展, 形式多种多样。50年代开始, 相继出现了气相层析、液相层析、高效液相层析、薄层层析、通透层析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析、金属螯合层析等。几乎每一种层析法都已发展成为一门独立的生化高技术, 在生化领域内得到了广泛的应用。

层析技术因操作较简便, 设备不复杂, 样品用量可大可小, 既可用于实验室的科学研究, 又可用于工业化生产。它与光电仪器、电子计算机结合, 可组成各种各样的高效率、高灵敏度的自动化分离分析装置。这充分显示了层析技术的强大生命力, 它是近代生物化学发展的关键技术之一。

尽管不同类型的层析技术各具有其特点, 但它们都具有共性, 基本原理相同。本章仅简

表11 层析分类表

现用层析名称	层析主要依据的理化性质	操作方式			应属层析类别
		固定相	流动相	装置	
氧化铝(等)柱层析 活性炭柱层析	吸附力 吸附力	固 体 固 体	液 体 液 体	柱 柱	吸附层析
纸上层析 液相层析 高效液相层析	分配系数 分配系数 分配系数	固 体 液 体 液 体	液 体 液 体 液 体	纸 分液漏斗 高压分液装置	分配层析
各种薄层层析 硅胶(等)薄层层析 聚酰胺薄膜层析	分配系数、吸附力 分配系数、吸附力 氢键吸附、分配系数	固 体 固 体 固 体	液 体 液 体 液 体	玻 板 玻 板 薄 膜	吸附分配层析
离子交换层析	酸碱度、极性	固 体	液 体	柱或薄板	离子交换层析
凝胶层析	分子大小	固 体	液 体	柱	分子排阻层析
亲和层析	生物高分子亲和力	固相配基	液 体	柱	亲和层析
金属螯合层析 疏水层析 共价层析	亲和力 疏水性 共价结合	固相配基 固相配基 固相配基	液 体 液 体 液 体	柱 柱 柱	亲和层析 疏水层析 共价层析

述其一般原理，重点说明意义及如何指导实践，并使学生能在实践中举一反三，有所创新，以便更好地应用层析技术，发展层析技术。

层析法的分类见层析分类表1-1。

第二节 层析法的一般原理

生化工作者经常面临的问题是大量地分离、制备在工业上、医药上等需要的各种产品，同时要为生命科学、基因工程、蛋白质工程等理论研究提供各种蛋白质、核酸、酶、基因、质粒等生物活性物质，并对其进行生物活性测定、结构测定等。要进行这样的分离、分析，最方便、最可取的方法之一是使用层析技术。这种技术能用于分离大量（几十克）的或小量（微微克）的物质。为了得到好的分离效果，不但需要选择特殊层析方法，而且往往需要相继地使用几种层析方法。几种层析方法合理的搭配，对得到高纯度、高活性、高收率的生物活性物质是至关重要的，在以下几章中，将概括介绍目前使用的一些层析技术。

层析法尽管多种多样，但基本原理是一致的。所有的层析系统都由互不相溶的两相组成。一个是固定相 (stationary phase)；另一个是流动相 (mobile phase)。利用混合物中各组分的物理化学性质上的差异（如吸附力、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力、分配系数等），使各组分以不同程度分布在两相中，它们以不同的速度移动，最终彼此分开。固定相可以是固体、液体或一种固体和一种液体的混合物，而流动相可以是一种液体或一种气体，如逆流分溶，气液层析等。

一、分配系数

分配系数是代表物质种属的特征常数，是层析法分离纯化生物大分子的主要依据。故用分配系数 (partition or distribution coefficient) 这个术语描述一种化合物在互不相溶的两个相中的分配状况。在一定的温度下达到平衡后，溶质在两相中浓度的比值是一个常数，用 K_D 表示：

$$K_D = \frac{\text{溶质在固定相中的浓度}}{\text{溶质在流动相中的浓度}} \quad (1)$$

若 K_D 值等于0.2，意味着流动相中所含溶质浓度为固定相的5倍。

实践证明，某一物质在层析系统的行为并不直接取决于它的分配系数 K_D ，而是取决于有效分配系数 (effective distribution coefficient)，用 K_{eff} 表示。

对液相-液相层析系统来说：

$$K_{eff} = K_D \frac{\text{固定相体积}}{\text{流动相体积}} = K_D \times R_V \quad (2)$$

“有效分配系数”的意义是物质在一个相中的总量除以它在另一个相里的总量。用 R_V 表示两相的体积比。由此可见， K_{eff} 是 R_V 的函数，溶质的有效分配系数可通过调整两相的体积比而加以改变。

利用分配层析法分离、纯化混合物各组分时，其前提条件是各组分的分配系数必须有差异，哪怕是很小的差异。一般差异越大，越易分开。

现以固体为固定相和液体为流动相的理想柱层析为例，对分配层析法(partition chroma-

tography) 原理说明如下:

柱长 7cm, 溶剂 1ml/cm, 将含有 128 μ g 溶质的 1ml 溶剂加到柱顶, 如图 1-1 第一步所示, 从柱底洗脱出 1ml 溶剂, 7ml 溶剂将留在柱中。若有效分配系数 K_{eff} 等于 1, 则溶质将等量

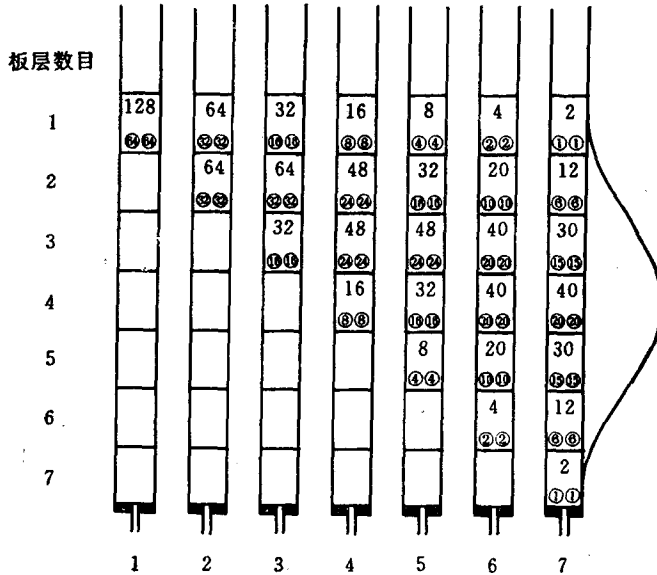


图 1-1 理想柱层析溶质的假想分布

该柱包含有 7 个板层, 每个板层 1ml 容积, 1—7 柱表明每加 1ml 展层剂后的色谱情况, 柱 7 右边曲线显示展层时溶质分布。

分布于固定相和流动相中, 从而在柱顶 1cm 的两相中存在 64 μ g 溶质。若再加 1ml 无机溶剂, 将流出另 1ml 溶剂。从第二步将会看到: 已存在顶层流动相中 64 μ g 溶质移入第二个 1cm 层。在顶部两个 1cm 层的每一个将存在 64 μ g 溶质。在每层的吸附剂和溶剂间同等分布。在第三步中, 再加 1ml 溶剂, 它将载运包含在顶层溶剂中的 32 μ g 溶质进入第二层, 而溶剂将从第二层流动相中载运 32 μ g 溶质进入第三层, 留在顶层中的 32 μ g 溶质将等量分布于两相中。因为 32 μ g 溶质将进入第三层。在第二层存在着从顶层流动相载运来的 32 μ g 溶质和残留在固定相中的 32 μ g 溶质, 从而, 仍可发现第二层 64 μ g 溶质等量分布于两相中。每加入 1ml 溶剂后, 溶质分布能从图 1-1 另外步骤中看到, 在第七步中, 溶质分布于整个柱中, 最高浓度处于柱的中心, 从第七步右边所画曲线, 将看到溶质浓度呈正态分布。

若上例有效分配系数大于 1, 则每一次平衡后, 大部溶质将与溶剂通过柱, 因而溶质在柱内移动较快, 柱中心部位之下出现的溶质浓度最高。反之, 若有效分配系数小于 1, 则每次平衡后, 吸附剂将比溶剂保留更大比例的溶质。在这种情况下, 浓度峰将在柱中心之上出现。然而, 在每种情况下, 整个柱中将存在一定溶质百分率。

尽管上述理想色谱足以说明层析法的基本原理, 在实际应用中, 不可能使用这样的层析。例如, 实际进行的层析溶剂是连续加入的。在一根正常工作的柱中发生着数千次的平衡, 平衡次数可以称为理论塔板数。柱的效率越高, 所包含的理论塔板数越多, 分离越完全。所以一个柱的效率通常用理论塔板数 n 表示, n 值按下式计算:

$$n = 16(V_R/W)^2 \quad \text{或} \quad n = 16(\bar{V}/W)^2 \quad (3)$$

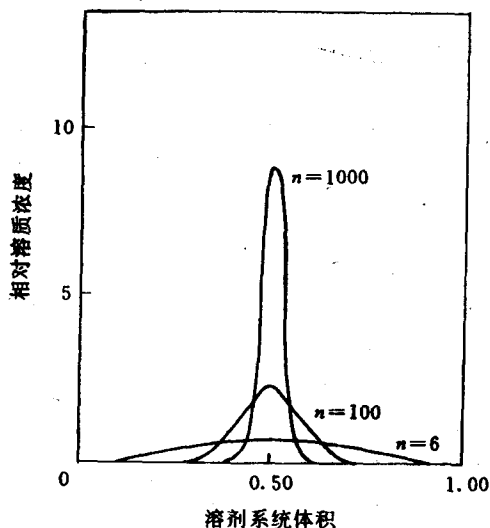


图1-2 作为平衡次数函数的溶质在柱层析中的分布

图中字母 n 表示平衡次数或理论塔板数。

在液相层析中, V_R 代表从加样点算起至峰尖之间的洗脱体积, W 代表用体积表示的峰宽。 \bar{V} 代表从洗脱开始算起至峰尖之间的洗脱体积。

图1-2表示理论塔板数 (n), 对一个有效分配系数为1的溶质区带形状的影响。

分配层析法包括柱层析、纸层析和薄层层析等, 它已广泛用于氨基酸、蛋白质、肽、核酸、激素和抗生素等的分离纯化。

二、分辨率 (resolution)

分辨率有几种表示方法, 为了全面掌握层析理论, 在这里介绍三种表示方法及影响因素。瑞典 Pharmacia 公司设计了如下公式, 相临两峰的分开程度称为分辨率

R_S :

$$R_S = \frac{V_{R2} - V_{R1}}{W_1 + W_2} = \frac{2Y}{W_1 + W_2} \quad (4)$$

V_{R1} : 组分 I 从进样点至对应的洗脱峰尖之间流出的流动相总体积 (见图1-3)。

V_{R2} : 组分 II 从进样点至对应的洗脱峰尖之间流出的流动相总体积。

W_1 : 组分 I 对应的洗脱峰宽度。

W_2 : 组分 II 对应的洗脱峰宽度。

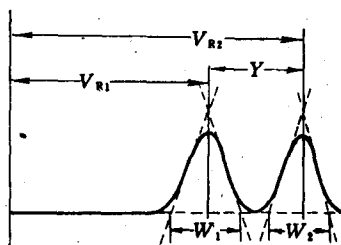


图1-3 由层析图计算分辨率的方法

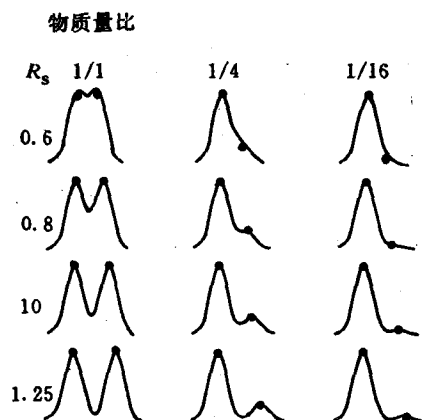


图1-4 两种物质浓度比在不同情况下的分辨率

由公式可见, R_S 值越大, 表示两个峰分得越开, 当 $R_S = 1$ 时, 表示较好的分离。当 $R_S = 1.5$ 时, 两峰完全分开。

图1-4表示两种物质浓度比不同的分辨率, 由图可见, 在两种物质浓度相差较大时,

尤其要求较高的分辨率。

按照上述方法，我们可以方便地计算出分辨率，并容易地比较各次分离的好坏，但这个公式没有与实验技术有关的参数（如理论塔板数，柱高等）联系起来。为了提高分辨率，改进实验设计，采用了另外两种表示方法。

分辨率的另一种表示方法：

$$R_s = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{a-1}{a} \cdot \frac{D_{m2}}{D_{m2}+1} \quad (5)$$

式中等号右边第一项中的 n 即理论塔板数，它与柱效率有关。第二项中的 a 为“分离因子” ($a = \frac{D_{m2}}{D_{m1}}$)，也称为选择性因子。第三项中的 D_m 为质量分布比 (mass distribution ratio)，相当于气相色谱中的“容量因子” (capacity factor)。

$$D_m = \frac{\text{固定相中溶质量}}{\text{流动相中溶质量}} = \frac{\text{固定相中浓度} \times \text{固定相体积}}{\text{流动相中浓度} \times \text{流动相体积}}$$

$$D_m = K_D \cdot V_S / V_I$$

式中： V_S ：固定相体积 (volume of the stationary phase)，即活性固体或凝胶或固定相液体所占体积（不包括固体支持物），亦称内水体积 (the inner volume)。 V_I ：间隙体积 (interstitial volume)，即柱填充物颗粒之间的间隙体积或流动相所占装柱部分的体积，亦称外水体积 (the void volume)。

n , a 和 D_m 直接与分辨率有关，靠改变这些条件可以提高分辨率。三项不一定同时改变，可以单独改变，但在何种情况应改变哪一个因子，又应如何改变？下面简单加以说明：

图1-5表示不同因子对层析图的影响，a 的情况分离不良，两峰相距太近，应加大 a 值，b 为加大 a 值后提高了分辨率的结果，两峰分开；c 为在 a 的基础上加大 n ，提高柱效率，使峰变窄，但峰尖位置不变（与 a 同）；d 为减少 D_m 值，使峰提前出现，节省时间。

由公式(5)可知，当 $D_{m2} \rightarrow 0$ 和 $a \rightarrow 1$ 时， $R_s \rightarrow 0$ ，分辨率变得极低；但 D_m 值太大时则分离时间太长，因此 D_m 值以2—5较好。不同类型的色谱情况不同，凝胶过滤层析 K_D 值最大为1，则 D_m 值不可能太大；而在离子交换层析中， D_m 值可以很大。当 a 接近于1时，不管怎样加大 n 值和使 D_m 值最优化，都不能达到分离的目的，必须改变条件，加大 a 值。在不同类型的层析法中，用不同的办法改变 a 值。如在分配层析中，改变流动相和固定相的组成以改变其极性大小；在离子交换层析中，可以选择不同的离子交换剂，改变流动相的 pH 值和离子强度；在凝胶过滤层析中，则选用不同孔径的凝胶。这方面的详细内容请参阅参考资料[2]，此处不多介绍。

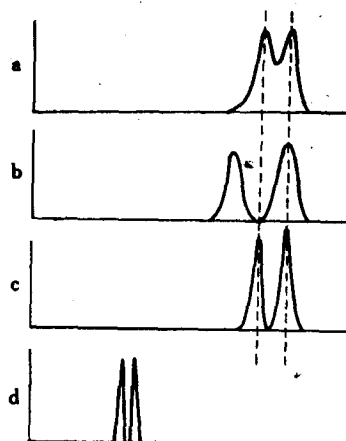


图1-5 层析分离的最优化

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

分辨率的第三种表示方法:

相对分辨率表示在有效分配系数有微小差别的不同条件下, 分开各种溶质的层析能力, 用 R_f 表示, 其数学计算公式如下:

$$R_f = \frac{\sqrt{K_{eff} n}}{K_{eff} + 1} \quad (6)$$

式中: K_{eff} 为有效分配系数, n 为理论塔板数。

由上述公式可知, 相对分辨率正比于层析柱所包含的理论塔板数 (n) 的平方根。因此加长层析柱, 将增加其相对分辨率。必须说明的是, 这一公式只有在排阻层析的情况下才能适用。

在理解了分辨率的物理意义之后, 下面将重点说明改进柱效率的方法, 这是柱层析的核心部分。层析条件设计合理, 将得到高效、高收率的分离效果, 否则将得不到有效分离。

三、柱效率

由公式 (3) 可知, 峰越宽则理论塔板数越少, 也就是塔板高度 h 值越大, 柱效率越低。所有导致区带展宽的因素都使柱效率降低, 主要的因素为涡流扩散、分子扩散和传质。它们与理论塔板高度的关系如下:

$$h = h_p + h_d + h_s + h_m \quad (7)$$

式中的 h_p 为涡流扩散项, h_d 为分子扩散项, h_s 和 h_m 分别为固定相和流动相传质项。

1. 涡流扩散 (eddy diffusion)

流动相流动时碰到较大的固体颗粒, 就像流水碰到石头一样产生涡流。如果柱装得不均匀, 有的部分松散或有细沟, 则流动相流动的速度就快; 有的部位结块或紧密则流速就慢, 由于各条流路有快有慢, 就使区带展宽。涡流扩散对理论塔板高度所提供的数值为 h_p :

$$h_p = 2\lambda d_p \quad (8)$$

其中, d_p 为固定相粒子直径, λ 代表装柱的不均匀度。可知粒子越小, 粒度越均, 装柱越均匀, 则 h_p 值就越小, 柱效率即提高。

2. 分子扩散 (molecular diffusion)

分子扩散就是物质分子由浓度高的区域向浓度低的区域运动, 也称纵向分子扩散。分子扩散对理论塔板高度所提供的数值为 h_d :

$$h_d = 2rD_f/F_c \quad (9)$$

式中, r 为填充柱的扩散阻止参数, F_c 为直线流速, D_f 为溶质在流动相中的扩散系数。采用小而均匀的粒子装柱使 r 值减小。流速如果太慢, 物质停留时间长, 则扩散严重。由于溶质分子在溶剂中的扩散系数仅相当气体的 10^{-5} 倍, 所以液相色谱中的分子扩散影响远较气相色谱小。

3. 传质 (mass transfer)

物质要在流动相和固定相中迅速达到平衡, 才能形成较窄的区带。在液相色谱中, 溶质分子要在两个液相之间进行分配, 或在固体上被吸附和解吸, 这都需要一定的时间。当流速快时, 传质速度慢, 来不及达成平衡, 流动相就向前移动了, 这种现象称为物质的非平衡移动

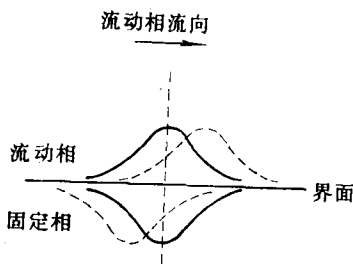


图1-6 非平衡移动
实际浓度, ——平衡浓度。

(见图1-6), 使区带展宽。传质对理论塔板高度所提供的数值有固定相传质 h_s 和流动相传质 h_m 两项:

$$h_s = q\rho d_s^2 F_C / D_{fs} \quad (10)$$

$$h_m = wd^2 p F_C / D_f \quad (11)$$

式中, q 为与固定相形状有关的参数即“构成参数”, ρ 为溶质和流动相的相对移动速度, d_s 为固定相厚度, D_{fs} 为溶质在固定相中的扩散系数, F_C 为流动相流速, w 为柱参数, 它与装柱结构、柱直径和形状有关, d_p 为粒子直径, D_f 为溶质在流动相中的扩散系数。由以上两式可以看出粒子小, 固定相厚度小, 有利于增加柱效率, 而流速大是不利的。

将式(8)–(11)代入式(7)并加以简化得下式:

$$h = A + \frac{B}{F_C} + CF_C \quad (12)$$

与 Van. Deemter 的气相层析公式相同, A 为涡流扩散项系数; B 为分子扩散项系数; C 为传质项系数, 综合以上所述可知, 流动相流速和固定相粒子大小是两个主要影响因素。

4. 流动相流速

当流速太低时, 分子扩散严重, 特别是在气相层析中, 因气体分子扩散快, 流速影响特别大。如将理论塔板高度(h)对流速作图(图1-7 a), 可以看出, h 随流速增加而急速下降, 达到一最低值。当流速再加大时, 则传质影响起了主要作用, h 又加大。在液相色谱中, 因分子扩散比在气相中约低 10^4 – 10^5 倍, 所以流速低时, h 不会增加很大; 流速太高时, h 也不会像在气相层析中那样升得快(图1-7 b)。在高压液相层析中, 流速快一些, 影响不大。不过要特别指出的是凝胶过滤层析, 因为物质要渗透到凝胶内部, 所以传质因素影响大, 流速快了就会大大降低柱效率。

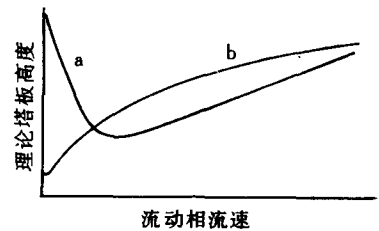


图1-7 理论塔板高度与流动相流速的关系

a. 气相色谱 b. 液相层析

5. 固定相颗粒大小

粒子越小, 柱效率越高, 但这对流动相流动的阻力就增大, 需要用高压使它流动。高压液相层析(HPLC)就是根据这一理论而发展起来的。常规液相层析用的固定相颗粒直径在 $100\mu\text{m}$ 左右, 高压液相层析则在 $10\mu\text{m}$ 以下。近年来, 在颗粒结构方面也有很大改进。例如“控制表面多孔型”颗粒, 中间是实心的, 表面有一层极薄($1\mu\text{m}$)的多孔层, 颗粒直径小, 表面积大, 传质快, 大大提高了柱效率。此外, 柱的死体积一定要小, 否则已分离的区带在出柱后又发生混合, 就会降低柱效率。

第三节 洗脱峰不对称性及其原因

一、吸附等温线的类型

吸附等温线表示在恒定的温度下, 被吸附溶质的量随溶质浓度而变化的情况。以溶液中溶质量为横坐标, 以被吸附溶质量为纵坐标作图, 得到吸附等温线。通常有直线型, 凸线型和凹线型3种(图1-8 a)。具有直线型吸附等温线的物质, 其洗脱峰对称, 凸线型的则有拖