

玻 璃 加 压 层 析 柱 的 介 绍

湖南医药工业研究所

一九七七年七月

玻璃加压层析的介绍

在试制高压制备液体色谱的过程中，由于不锈钢层析柱加工迟迟未能完成，于是用普通厚壁玻璃柱代替不锈钢柱，以便能对整个色谱系统进行考查，提供对试制有用的经验。这项工作只是完成装各不锈钢柱色谱装置的手段，而且玻璃柱在耐受压力方面远不如不锈钢柱，因此在技术性能上以及操作方便上远不及装置不锈钢柱的色谱仪。但是通过一段时间的摸索与试验，克服了使用普通厚壁玻璃柱的一些困难，总结出使用玻璃柱的操作方法，使得这样一套装置能够进行小量的制备色谱分离，现将这方面的经验小结如下。

实 验 部 分

装置

色谱装置包括：

- 1 往复式计量泵：流量 $0-750\text{ml}/\text{min}$ ，可并联使用。
2. 色谱柱： $11 \leq \text{内径} \leq 30\text{mm}$ 厚壁玻璃加工制的，装填高度 50cm 。
- 3 紫外检测计：GZS—01 型，入 254nm ， $\phi 3$ 直管流动池。
- 4 记录仪： 10mV 全量程。

玻璃层析柱结构

取材：层析柱玻璃管取材有两种：

- 1 小内径柱：用管壁较厚的 50ml 或 100ml 滴定管。
2. 大内径柱：厚壁玻璃管，壁厚 $3 \sim 4\text{mm}$ 。

加工：玻璃管洗净干燥后按图1尺寸加工*。

柱头结构：柱头结构如图1所示。

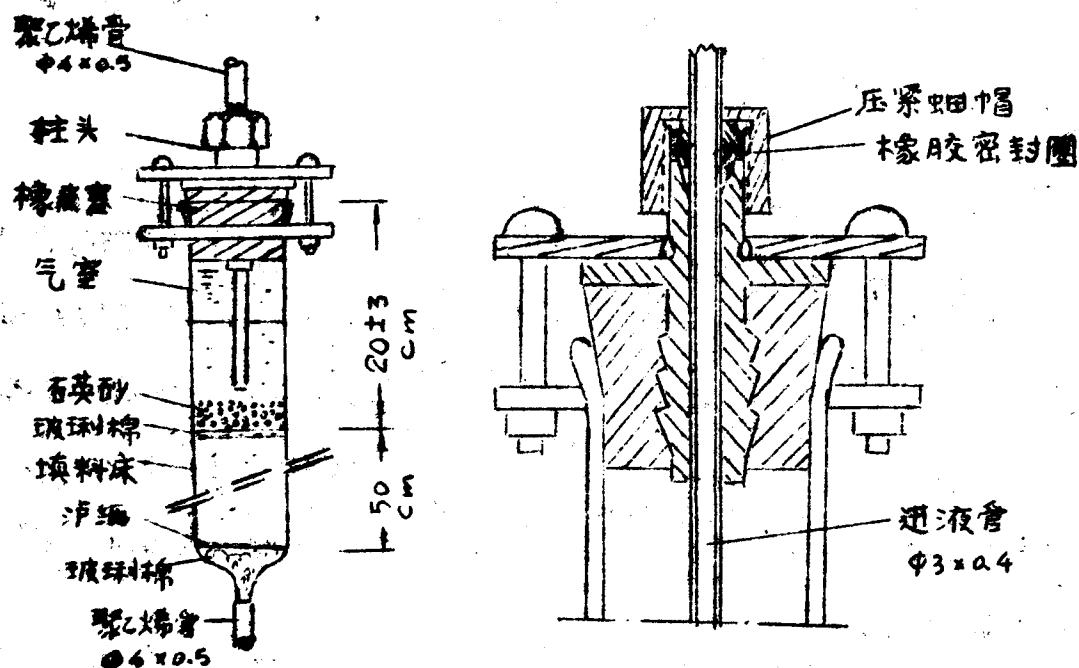


图1 玻璃层析柱及柱头结构图

柱径：在 $11 \leq \text{内径} \leq 30 \text{ mm}$ 范围内任意选定，曾试用了如下内径的柱子：11，14.4，17.5 和 30 mm。

输液管

一律采用外径为 4 mm，内径为 3 mm 聚乙烯管（透明），以外径为 3 mm 不锈钢管焊制简易的三通、... 等件连接。

安全措施

在气室部分以小直径（2 mm）无色透明聚乙烯管密实平贴地绕

* 由本所机修车间玻璃工组加工。

缠形成一个防爆保护层。

填料

“海洋”10—20 μ 不规则层析硅胶 使用前按常规酸洗、干燥、活化，加10—15 %水脱活。

操作

装柱：将处理好的硅胶以氯仿—甲醇（4:1）混合溶剂仔细调成浓浆，注意捣碎小结块，仔细倾入柱内，装好柱头，以同样溶剂在约10Kg/cm²压力下冲淋。床层压实后，取下的管柱，补加适量的料浆，装好后再冲淋直至床层不再明显压缩，如果床层尚不足需要高度（一般采用50cm），可再重复补加适当的料浆，冲淋压紧一次。压紧后加入一层玻璃棉，装入一定高度20目石英砂。

注样及淋洗：对已淋洗平衡的柱子，松开压紧螺帽，取出进液管，以带有长针头的注射器，将气室内存留的溶剂及石英砂层中的溶剂吸尽，再以同一注射器注入样品溶液，装好柱头，开动输液泵，压入少许空气，迫使样品溶液进入床层，待溶液接近完全压入床层时，松开压紧螺帽（尽可能地使样品溶液进入床层而不让空气进入床层），加入少许淋洗溶剂，使石英砂刚好淹没，将柱安装还原，同样压入空气，迫使溶剂进入床层。如事反复再操作一次，松开压紧螺帽，泵入淋洗溶剂，以除去管路中的空气。待溶剂开始进入进液管时，停泵，拧紧螺帽，开泵注入溶剂淋洗。

利用泵冲程控制机构控制流量，待气室内气、液体积比例基本上达到平衡，按这个比例推算操作压力，并测定流量，按色谱峰的显示分得接取

淋洗液。

结 果 和 讨 论

与经典液体色谱比较

使用玻璃柱，工作压力受到极大的限制。如果采用特制的模压厚壁管，可能承受 30Kg/cm^2 的压力，这对制备规模液体色谱来说，是一个可以工作的压力。而本试验中采用普通厚壁玻璃管，一般只在 10Kg/cm^2 左右的压力下操作，这个压力比高效液体色谱的操作压力远远为低但是与经典柱相较，可使分离时间缩短1~2个数量级，能仅几天的过程在几小时内完成，而且在较低速度下能充分发挥柱的分离效能，这也是对速度不理想的一个补偿。此外，由于加压淋洗，使得在经典层析柱中不能采用的微粒高效填料能够被利用，因此，与一般高压液体色谱相比，它的性能差的很远，但与经典色谱比较，它还是具有高效液体色谱特点的。

分离速度的限制

在给定的条件下，色谱分离的速度取决于操作压力的大小。使用玻璃柱，操作压力受到如下两个因素的限制。第一，玻璃柱的耐压；第二，维持淋洗液在填料床底部不释放出气体的气室内压力的限度。可能后者是最主要的限制因素。

避免在气室内迅速大量溶解气体便于提高操作压力，考虑柱头结构时，将进液管伸入到气室的底部，紧靠石英砂层，这诚然是减缓溶解气室中空

气组分的一个较为有效的措施。由于气体在液体中的扩散慢，而淋洗溶剂是在“短路”的情况下进入床层，这就大大减缓了空气渗入淋洗溶剂中的速度，降低了淋洗液中溶解的气体量，从而可能提高工作压力，加快分离速度。在这情况下，试验中曾采用了略大于 1.0 Kg/cm^2 的压力，工作情况正常，在床层下部不析出气体破坏床层。

在操作中观察到淋洗溶剂溶解气体并将其带出色谱系统的速度随操作时间的延长逐渐减小，同时淋洗液在柱后释放出气体的几率也逐渐有所减小。这恐怕是氧在有机溶剂中的溶解度较氮为大而首先较大幅度地被溶解带出所致。如果这是属实，气室充入氮气可能是有利的。这一点需要实验证实，利用氮置换气室内的空气，即使不能减缓带出气体的速度，对保护被分离的物质避免氧化破坏也是有好处的。

事实上在柱床后部常常有气体释放出来，特别是在操作开始的一段时间内，影响紫外检测。如果紫外检测计采用直立橄榄形的石英管流动池，基本上可以避免小气泡对记录的干扰。

气室的作用

柱上部气室对色谱系统带来了一定的麻烦，但也起到一定的作用。首先，缓冲压力，起到安全保护作用，其次，起到脉冲的阻尼作用，虽然紫外检测对脉冲并不敏感，但是脉冲能适当地被消除，总是一个有可能被利用的条件。

* 工作压力过大，淋洗溶剂在气室内溶解较多的空气，而在填料床下端释放出气体，破坏床层。

柱效的情况

没有专门进行柱效的测定，根据对龙胆甙类成份的分离，测得的塔板数如下：

	大 峰 ^①	小 峰 ^①	填 料
分 析 柱 2.3 × 500	400	430	W0—01 (薄壳硅球)
玻 璃 柱 14.4 × 500	400	— ^②	10—20 μ 硅胶
玻 璃 柱 12.6 × 450	520	940	— — —

① 按底宽公式计算； ② 峰高过低，测定准确性差，数值过大而未列入。

与分析柱相较，塔板数略高，但两者测定的基础不一致，实际上不可比。玻璃柱操作流速低，使塔板数偏高，但制备操作注样量大，促使峰展宽，使塔板数偏低，可是玻璃柱柱径大，使用的又是微粒填料，有利于提高柱效。看来，玻璃柱的柱效并没有达到应有的水平，这可能是装柱不够理想，柱床中的小缺陷甚多或装填不够密实所致。

玻璃柱的独特优点

试验的玻璃柱液体色谱装置的性能局限性很大，而且操作中，特别是进样操作，远不如没有气室的不锈钢柱方便，但是玻璃的透明形成了玻璃柱的独特优点。由于能够直观柱床的情况，对有色色谱带在柱内的发展情况以及柱床的污染和缺陷（包括气囊的形成）都可一目了然，便于掌握操作。在分离龙胆有效成份时，根据图谱捕集主要的成份对进样量的百分比甚小，从玻璃柱可以看到有大量色素吸附在柱上，这些

色素以强极性溶剂都不能洗脱。

分离实例

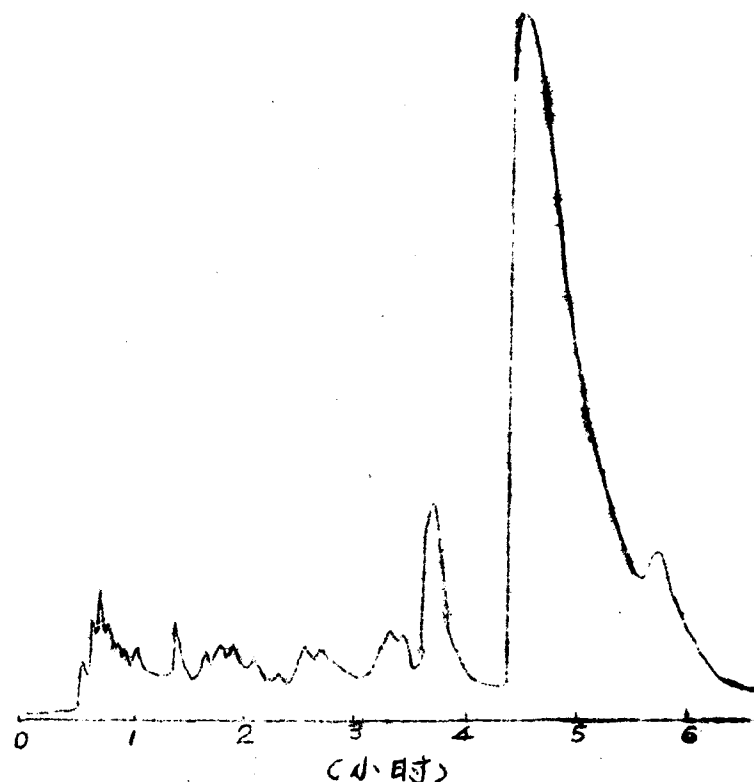
曾利用玻璃柱分别进行了龙胆草及青叶胆苦味质部分的主要成份(被认为是甙类物质)的分离。分离条件如下:

柱: 10—20 μ 青岛海洋化工厂硅胶(不规则), ϕ 14.4— ϕ 30 mm
 $\times$ 500 mm 玻璃柱。

移动相: 氯仿—甲醇(94:6)

检测器: 紫外(GZS—01型) 254 nm

下图是以 14.4 mm 内径玻璃柱分离龙胆草苦味质部分的色谱图。

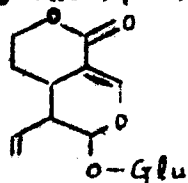


由图中可以看出:除了两个较大的峰外,还分出了几近 20 个的小峰。
实验的重复性好。与用 FLO—350 型色谱仪(2.3 mm 内径)分析的谱图

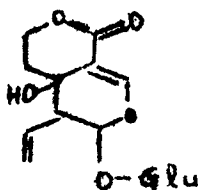
比较，分出的峰甚至更多一些。这说明玻璃柱分离性能是较为满意的。利用这种玻璃柱进行制备性分离，时间比常规的柱层析节省1~2个数量级，制备效率的提高引人注目。

运用玻璃柱进行龙胆及青叶胆苦味质主要成分的制备，分离结果获取了样品数十毫克，用PLC-350色谱仪以WC-01柱进行分析，均只呈一个峰。用红外、紫外等对其进行鉴定，证实是化合物 Swero-

sida。



Amarin



但同时发现样品中还含有微量的 Swert-

，这可能是收集馏分时分取不严，致使

色谱图中大峰后的小峰有部分混入而造成的。由于混入量甚少，且性质很近，分离不易，故在用PLC-350色谱仪分析时，仅呈一个峰。

小 结

利用柱床上端带有气室的较大内径玻璃层析柱，可以进行有效的制备分离。玻璃柱经济易得，并具有可直观床层情况的优点。带气室的玻璃层析柱可能使用的压力在很大程度上受到溶解空气速度的限制。观察到的这个压力限制略高于 $10\text{Kg}/\text{cm}^2$ 。在这个压力下操作，可能采用高致密粒填料，并且能够在几小时内完成一次制备分离，较经典液相色谱的速度高1~2个数量级。这样不方便是这个带气室层

析桂操作上的最大缺点，有待进一步改进。