

CENGXILILUN YU YINGYONG

层析理论与应用

洪筱坤 王智华 曾 一 译

层析理论与应用

洪筱坤 王智华 曾 一 译

上海科学技术出版社

层析理论与应用

层析理论与应用

洪筱坤 王智华 曾 一 译

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行 上海新华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 16.5 插页 1 字数 397,000

1981 年 6 月第 1 版 1981 年 6 月第 1 次印刷

印数: 1—6,000

书号: 14119·1483 定价: (科四)1.60 元

译 者 序

在近代的分离分析技术中,当数层析技术发展最快,应用最广。世界各国每年发表的有关文献多达万篇以上,而且历久不衰,足见其生命力之旺盛。层析技术在我国也已广泛地用于医药卫生、石油化工、化学分析等方面,例如生命物质蛋白质、氨基酸的分离分析,药物的分析和鉴定,同位素或异构物的分离分析等。总之,用一般方法不易分离分析的对象,都可借助层析技术获得满意结果。它不仅可作定性定量之用,还可用于制备工作。

当前,有关层析技术专著和文章很多。本书取材主要来自 Elatkis A:《High Performance Thin-Layer Chromatography》;《Analytic Chemistry》vol. 46;《Chromatography Review》vol. 7;《Thin-Layer Chromatography》2nd Eng. Edn. 等书刊。内容力求做到既有基本理论和技术,又能反映最近的进展,可供层析工作者和高等院校讲授、学习有关课程的师生参考之用。

柱层析方面以《梯度洗脱的原理》一文为代表,它全面地阐述了柱层析的基本理论和基本技术。《干柱层析》把柱层析和薄层层析密切地联系起来了。《高速液相层析的理论基础》将液相层析的最新进展作了概括的叙述。

气相层析方面,它的基本理论和实验操作,国内已有好几种专门论述的著作,但对于如何利用气相色谱实验数据进行定性却涉及较少。近年来利用 Kovats 保留指数定性的工作发展很快,如果能获成功的话,它将可使我们摆脱对标准品的依赖,同时又可使我们在缺乏红外、核磁、质谱及色谱-质谱联用仪等大型仪器的情况下,也能作一些定性工作。保留指数的最大优点是把气相色谱的保留值数据标准化,以供广大的气相色谱工作者共同使用。本书选择的三篇文章只是介绍一下 Kovats 保留指数的基本知识。

在薄层层析方面,我们除摘译 Stahl《薄层层析实验手册》中的三章供广大实验者参考外,还选译了《程序蒸汽薄层层析的发展和应用》、《薄层层析的程序多次展开》、《高效薄层层析:展开,数据和结果》、《薄层层析的简单理论》、《利用纸层析和薄层层析的多种 R_f 值进行定性》等文章。这些文章不仅论述了薄层层析的理论,还提出了一些新的观点和新的实验技术,颇有启发。

限于译者水平,译文中可能存在不少错误,切望广大读者批评指正。

一九八一年春

目 录

一、梯度洗脱的原理·····	1
二、干柱层析·····	35
三、高速液相层析的理论基础·····	45
四、Kováts 保留指数系统 ·····	57
五、气相层析保留指数的综述·····	65
六、程序温度气相层析中保留指数的计算和应用·····	73
七、薄层层析技术·····	82
八、程序蒸汽薄层层析的发展和应用 ·····	113
九、薄层层析的程序多次展开 ·····	154
十、薄层层析的简单理论 ·····	163
十一、高效薄层层析：展开、数据和结果·····	178
十二、关于利用纸层析和薄层层析的多种 R_f 值进行定性工作 ·····	196
十三、薄层层析在植物中亲水性组分及其衍生物上的应用 ·····	205
十四、薄层层析的喷雾剂与应用 ·····	227

一、梯度洗脱的原理

Snyder LR

(一) 引言

在洗脱层析中,进入层析柱的溶剂组分通常是保持不变的,而在梯度洗脱层析中,为增加洗脱剂强度,就应当变化洗脱剂的组分。在分离时,如果将洗脱剂组分 V_B (为强洗脱剂组分 B 的体积分数) 对流出柱外的洗脱剂的总体积 V 作图,那么,所产生的梯度有两种情况:即有连续的(图 1a-d),也有不连续的(图 1e-h)。通常“梯度洗脱”是指用连续梯度来完成分离的,而“分级洗脱”则是指用不连续的梯度完成分离的。然而,许多作者^[1~4] 没有区分梯度和分级洗脱。Tswett 应用连续变化的溶剂来展开层析柱,被 Strain^[5] 和 Synge^[6] 认为是梯度洗脱层析的首创者。在 1940 年前,这种技术渐渐地引入到目前为大家所熟悉的分级洗脱。1949 年, Mitchell, Gordon 和 Haskins^[7] 首先用盐和 pH 梯度在“层析堆”上完成了梯度洗脱。只是最初应用的梯度洗脱是着重在“层析堆”技术(主要是柱中的纸层析),而对于梯度的独特优点和一般长处还是不清楚的。1949 年, Synge^[6] 根据 Tiselius 的原始概念,还认为梯度洗脱的可能性不大。但 1950 年, Strain^[8] 则认为在许多层析系统中有“吸附梯度”可能性,并设想它能改进分离。

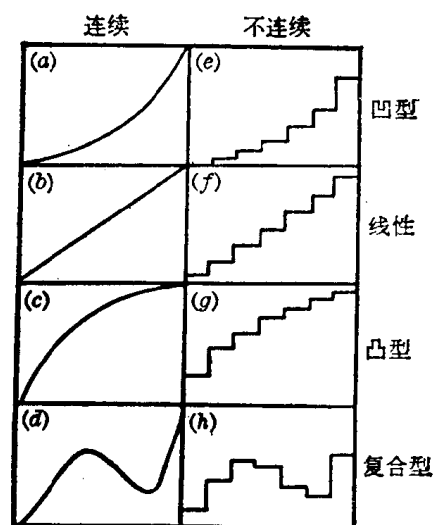


图 1 梯度的分类和形状

在 1950 年前,人们从实验室中发现了梯度洗脱,并有分离复杂混合物的独特能力。与此同时, Hagdahl, Williams 和 Tiselius^[9] 设想,梯度洗脱可在一定程度上解决活性炭层析上的某些问题,而 Donaldson, Tulane 和 Marshall^[10] 用更可行的方法来完成过去需要用分级洗脱来分离的技术。此后, Nervik^[11]、Busch、Hurriberk 和 Potter^[12] 亦分别设计了梯度洗脱的技术。从此,梯度洗脱很快地应用在大量分离实践上:无机阴离子^[13]和阳离子^[14],硅酮多聚体^[15],羧酸^[10,12],氨基酸和肽^[16],甾体^[17],类脂^[18],嘌呤碱^[19],糖衍生物和低聚糖^[20,21],维生素^[22],生物碱^[23],酶^[24],类珠蛋白^[25],血清蛋白^[26],激素^[27],核苷^[28],核酸^[29]及各种非生物的有机混合物^[30,31]。Lebreton^[32] 认为梯度洗脱在几年中发展如此之快,应归功于 Williams 的广泛研究及有关技术书籍的出版。

至今,梯度洗脱已成熟地应用到许多新的实验中,这里不可能将这些例子一一加以列举。况且,由于梯度、分级和常规洗脱之间关系较大,而对于一些特殊分离的最佳梯度洗脱条件的选择,则要通过有关实验才能获取。因此,讨论梯度洗脱的原理应该着重于区分或比较它和其它层析技术之间的关系。Lebreton^[32] 和 Mikes^[33] 的有关梯度洗脱的两篇综述文章在这方面是不足的,而其后的许多书籍,则较成功地阐述了梯度洗脱。本文则侧重于讨论梯度洗脱的主要原理,以期有益于层析工作者。

(二) 理 论

【洗脱层析概况】

在讨论梯度洗脱前,需对常规洗脱层析的基本原理有所了解。在常规洗脱层析中,洗脱剂的组分在整个分离过程中是固定不变的。对于固定洗脱剂的层析已有几个可采用的数学模式^[84~86],从中选择一个适合于我们要求的最简单和熟悉的模式,即由 Keulemans^[95]描述的“连续转移当量板”模式。该模式设想层析柱能分成 P 个“当量板”,样品在柱上洗脱相当于洗脱物从一块板到下一块板的连续转移,每次转移后,在每块板上存在着分配平衡。对于 P 值大的柱来说,理论上预示着是对称性的展开,如图2所示的高斯形洗脱区带,它表示成分 i 从一个具有 P 个当量板的柱上洗脱。对于给定 P 值的柱来说,成分 i 的洗脱区带完全由分配系数 K_i 所决定,因为 i 在柱内固定相和移动相之间是达到分配平衡的。如果 K_i 规定为 $(i)_s/(i)_m$, $(i)_s$ 和 $(i)_m$ 分别为 i 在固定相(g/g)和移动相(g/ml)的平衡浓度, W 和 V^0 分别为柱内固定相(g)和移动相(ml)的总量,那么,区带 i (见图2)的保留体积 R_i (ml)为:

$$R_i = K_i W + V^0 \quad (1)$$

对较大的 P 值来说,该模式显示了区带宽度 W_i 、板值 P 和保留体积 R_i 之间的近似关系:

$$\frac{W_i}{R_i} = \frac{4}{\sqrt{P}} \quad (2)$$

其次考虑含有两种成分的样品洗脱,如图3(a),成分1和2的分离显然是由各自的区带宽度 W_1 和 W_2 以及两个区带间的最大间隔距离 $(R_2 - R_1)$ 所决定。两个区带的重叠程度可用间隔距离 $(R_2 - R_1)$ 与1和2的半宽度 $(W_1 + W_2)/2$ 的比值来定量测定。如果我们规定一个分离参数 S_r ,则

$$S_r = \frac{(R_2 - R_1)}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

当 S_r 等于1时,分离似乎是好的,当 S_r 增大时分离改进。从方程式(1)和(2)消去保留体积和区带宽度,则得:

$$S_r = \frac{\sqrt{P}[(K_2/K_1) - 1]}{4[(K_2/K_1) + 1 + 2(V^0/WK_1)]} \quad (2a)$$

由于 WK_1 (或 R_1)比 V^0 大得多,似乎仅由柱的板数 P 和分离因子 (K_2/K_1) 来

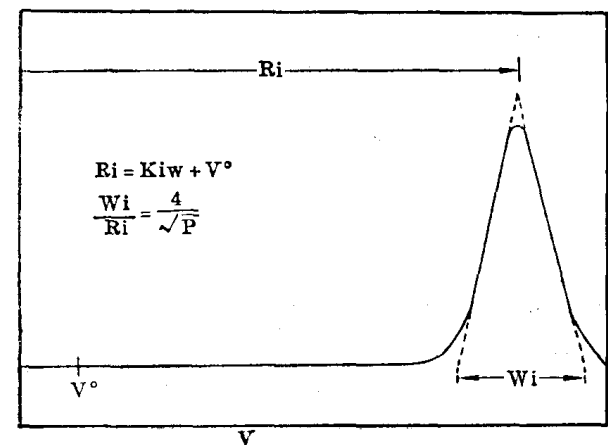


图2 用固定洗脱剂洗脱的理想洗脱区带

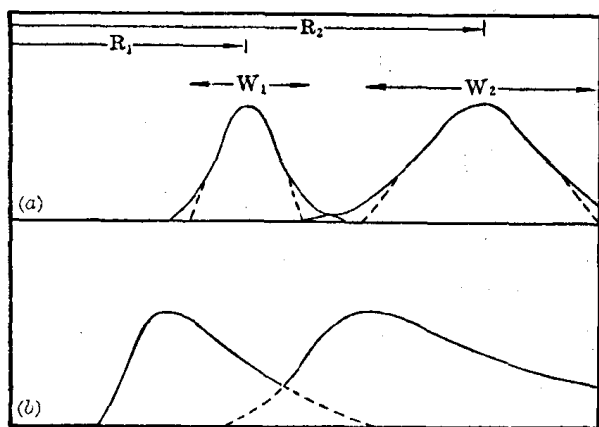


图3 (a) 洗脱层析中成分1和2的理想分离; 线性等温线。(b)同(a),但区带拖尾。

决定分离的好坏。然而,当 R_1 和 R_2 很小,最后达到同一点时,即使有大的 P 值和 (K_2/K_1) 值(它们通常保证好的分离),分离也是极差的。

在复杂的、多成分的混合物洗脱层析分离中,产生了一个重要的问题。对于一个给定的层析系统或一支柱,最初洗脱出的样品成分(其 R_f 值是小的)比其后洗出的分离要差,故很容易洗脱出的成分完全可能没有分离好。因为当 k' 的结构有规律地变化或增大时,其 K' 和 R_f 值倾向于指数增加,所以后洗出的成分有很大的 R_f 值。特别是当第一个洗出的成分其保留体积已经很大,这就可能导致需要很长的分析时间。根据方程式(2),除了过长的分析时间外,大的 R_f 值还意味着峰的宽度增加和峰的高度降低;从而使峰的检出灵敏度相应降低,以致造成少量强吸附成分漏检。我们将把这些固定洗脱剂层析操作中的普遍局限性作为“共同洗脱问题”来研究。图 4a-c 是假设六种成分的混合物的洗脱分离,以详细说明“共同洗脱问题”。图 4a,用弱洗脱剂 A 洗脱,弱吸附成分 1 和 2 很好地分离,并显出明显而易于检出的峰;成分 3 和 4 需要较长的洗脱时间,它们的峰高度极低。图 4(b)用强的洗脱剂 B 洗脱,成分 5 和 6 在合适的洗脱时间出现明显的峰,但成分 1~4 因洗脱太快以致分离不好。图 4(c)用混合溶剂 A-B,显示中间洗脱状况:峰 1 和 2 分离不好,峰 5 和 6 有过长的洗脱时间且峰的高度较低。

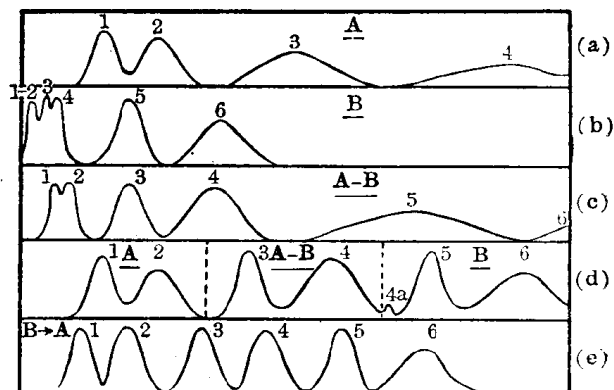


图 4 (a)假设六种成分的混合物在固定洗脱剂洗脱层析中用弱洗脱剂分离。(b)同上,用强洗脱剂分离。(c)同上,用中等强度的洗脱剂分离。(d)同种混合物的分级洗脱。(e)同种混合物的梯度洗脱。

洗脱层析的第二个共同问题是在有些层析系统中出现非线性或半可逆的吸附等温线(在今天,这个问题与四十年代相比已显得不重要了)。等温非线性或不可逆导致洗脱区带的严重拖尾[图 3(b)],结果使相邻的区带分离较差,最后洗脱出的成分有过长的洗脱时间,在某些情况下,样品的回收也是不完全的。

【梯度洗脱的初步设想】

在图 4(a-c)的洗脱层析分离中,可以看到用洗脱剂 A 时,峰 1 和 2 有最佳的洗脱;用洗脱剂 A-B,峰 3 和 4 有最佳的分离;用洗脱剂 B,则峰 5 和 6 有最佳的分离。这就很自然地建议采用分级洗脱,首先用 A 洗脱峰 1 和 2,然后用 A-B 洗脱峰 3 和 4,最后用 B 洗脱 5 和 6,这样能得到完善的分离图谱。如图 4(d)所示,分级洗脱提供了许多优点:所有成分都得到适当的分离;总样品有合理的洗脱时间;每种成分都有易于检出的明显的区带。早期工作者 Reichstein 和 Won Eum^[87] 利用分级洗脱的优点,他们用 12 种连续增强的洗脱剂组成分级洗脱的洗脱剂在氧化铝柱上分离甾体;又如 Marshall 等^[88] 连续用三种洗脱剂的混合液作有机酸混合物的分配分离。

图 4(e)说明样品的梯度洗脱分离,洗脱剂的组分假定是从纯 A 开始洗脱,连续地变化到纯 B 结束。自 1952 年引进梯度洗脱后,Donaldson, Tulane 和 Marshall^[10] 指出梯度洗脱优于分级洗脱:(1)在梯度洗脱时,洗脱剂强度的变化是自动的,从而避免了经常改变洗脱剂的缺点,并减少不时地试测何时更换洗脱剂的麻烦;(2)在分级洗脱中,当接近峰的末端变换洗脱剂时引起的假峰(如图 4d 中的 4a),但在梯度洗脱中则可避免。

图 4 所显示的分级或梯度洗脱的优点,是由于分离时所有样品的 K' 值不断地降低所

致。这样,从洗脱的观点来看,对 i 的最佳分离,应该是 K_i 仅有一个较小的范围,即 K_i 必须保持足够大,能使 i 和相邻的组分不会作为单一的、不能分离的区带而被推出柱外;如果要避免过长的洗脱时间和过宽的区带, K_i 值又必须适当小些。在一个良好的梯度设计中,最初洗脱出的样品,其 K_i 值在降低到不足以引起影响分离时就洗出柱外,而其后洗出的成分 K_i 值连续地减小,使从柱上洗脱的时间有一个最佳的范围。显然,梯度洗脱的唯一特征是在层析过程中规定各种溶质的 K_i 值随时间而降低。由于 K_i 是固定相组分、移动相组分、柱的压力、柱的温度的函数,原则上,这四个量中任一个量随时间的变化都能用来控制 K_i 值。在气相层析中, K_i 可以通过提高柱的温度(程序升温)来改变;在液相层析中,温度随时间的变化一般对 K_i 值的降低影响不大,因此,液相层析较少应用程序升温。压力的变化对 K_i 影响也很小,对于它在洗脱层析中作为解决“共同洗脱问题”的手段似乎是不清楚的*。固定相的组分若随时间而变,这在洗脱层析中一般是不理想的。Strain 设想梯度的作用可以沿着溶剂流动方向调节固定相组分,以使 K_i 值随 i 的迁移而增加。但此后十五年中没有报道过这种“吸附梯度”的实际应用,因为要达到固定相所需要的梯度是十分困难的。在这方面可以引证由 Baker 和 Williams^[40] 提出的柱层析的分部沉淀技术。如果将洗脱能力渐渐增加的溶剂通过一种多聚物样品,然后向下进入隋性装填的柱(例如玻璃珠装的柱),这种柱从顶到底有一个负的温度梯度。在这操作中,决定样品成分在柱上迁移的因素是与常规梯度洗脱层析完全不同的。最近,在电泳技术方面,梯度作用可在分离时通过增加柱或板的横截面的电量而达到。这些技术(例如程序升温,固定相梯度,溶剂沉淀,电泳)与梯度洗脱的关系不大,本文不拟讨论。然而,应该注意到程序升温与梯度洗脱基本上是相似技术,前者在气相层析中已有详细的理论和实验研究。

在常规洗脱层析中,第二个难题是区带拖尾,如图 3b 所示。这在 Hagdahl, Williams 和 Tiselius^[9] 的论文中已作了详细的讨论,并注意到许多样品从活性炭上洗脱分析(特别是用弱洗脱剂)出现区带拖尾现象特别严重。作者指出,在许多情况下,置换层析的技术似乎优于洗脱分析,因为分离样品时,已确定了其成分的浓度及吸附等温线之间的关系,成分 1 总是被成分 2 所置换,导致两种成分几乎完全分离。然而,由于样品的两个成分在置换分析分离中是直接毗邻的,如用置换层析技术要达到完全分离是决不可能的,除非采用载体置换的办法,即在置换分析前有意增加能分离 1 和 2 的第三种成分到样品中去。在多成分的混合物中,对 n 个成分则需要选择 $(n-1)$ 个载体。Hagdahl 等^[9] 认识到一个洗脱剂梯度实际上可以起到由 $(n-1)$ 个载体操作的作用,即在每一对样品成分的区带之间,提供了洗脱强度中等的混合洗脱剂,正如同所需要的载体一样。此外,这些作者注意到在活性炭层析中,如洗脱剂强度足够大时,其吸附等温线是线性的,以致当 i 刚从柱上洗脱时,成分 i 的梯度洗脱倾向于线性的吸附等温线。同时,样品的解吸速度(或者等温线可逆的程度)随洗脱剂强度增加而增加,这样,洗脱剂梯度将减少了由于样品成分解吸缓慢所致的区带拖尾。这样对区带拖尾及洗脱与置换关系的分析就简单化了,基于这些考虑,一些作者各自发现了梯度技术,成功地解决了区带拖尾问题。近十余年来,吸附剂的“饱和剂”或“减活剂”^[9,41] 以及改良吸附剂的发展,可使吸附等温线线性化,这对洗脱层析中的区带拖尾不是重要影响。而今天,梯度洗脱不仅解决了区带拖尾问题,更重要的是解决了“共同洗脱问题”。

* S. A. Clark(Nature, 202(1964)1106)第一个报道了气相层析中用程序升温的例子。

梯度洗脱的主要理论问题,是预测样品的各个成分的保留体积 R_i 和区带宽度 W_i ,这两者均为分离条件的函数。因此,对一个特定样品需有最佳的分离条件,并形成一般的规律以指导其他各种分离。Drake^[42] 首先提出了 R_i 决定于下列各种分离变量:

- (a) V_B 对 V 的关系所致的梯度形状;
- (b) 洗脱剂组分 B 在柱上迁移时有否吸附;
- (c) K_i 值决定于洗脱剂组分,在非线性等温线中 K_i 也决定于 i 的浓度。

图 5 说明了这些因素的作用。假设开始时洗脱剂梯度是线性的:强洗脱剂组分 B 的浓度按进入柱的洗脱剂体积而成正比例地增加。图 5 中的实线是假定 B 不被吸附时,在洗脱溶质区带 i 的过程中, B 在柱内移动相中的浓度;相应的虚线表示 B 可能被吸附时的浓度。虚线总是低于非吸附曲线。但是,通入足够量的洗脱剂,使 B 的吸附达到饱和时,该曲线就接近于非吸附曲线。当溶质区带沿柱向下移动时,其任何一点的瞬时速度是由区带的最大值处的 K_i 所决定。而 K_i 又由经过区带的洗脱剂组分所决定。对于非线性吸附的 i 而言, K_i 又将由该处的 i 浓度所决定,且 K_i 是整个洗脱分离过程的复杂的函数。下面将详细讨论各种梯度设计对梯度的影响;柱内洗脱剂的吸附对洗脱剂梯度的影响;计算洗脱剂组分变化时(同时变化溶质的浓度)的 K_i 值;最后计算各种梯度洗脱系统的 R_i 值。

Alm, Williams 和 Tiselius^[48] 首先注意到在梯度洗脱分离时,区带宽度决定于下列三个因素:

- (a) 洗脱区带在向柱下迁移时趋向于扩散。
- (b) 从柱的末端(指恰好从柱上洗脱前的部位),置换出一个给定宽度的区带,其所需的洗脱剂量是决定于洗脱剂的强度或 i 离开柱时的 K_i 值。

(c) 在一个特定的时间,通过区带的洗脱剂组分的变化;在任何一个给定的时间,其区带前沿的 K_i 值总是比其尾部为大。

换言之,在梯度洗脱过程中,区带宽度的增加可由于① 洗脱时 K_i 的降低在一定程度上被抵消;② 由于梯度经过区带而抵消;③ 由于梯度经过区带,与区带前沿相比,倾向于加速区带后缘的洗脱。其后的作者就梯度洗脱对区带增宽的影响作了更详细的描述,这将在下面部分讨论。

【梯度洗脱中保留体积的定量计算】

简述 在梯度洗脱中,推导 R_i 值的方程式是没有困难的。设想一个成分 i 在柱中迁移的过程如图 5 所示,不考虑区带的扩散,主要考虑区带最大值的移动。在任何一个时间 t ,或相当于洗出液体积 V ,在区带的最大值处存在着一定的洗脱剂组分,由它决定了 K_i 值和区带向柱下迁移时的瞬时速率。在区带的最大值范围内,为了强调 K_i 值与洗出液体积的函数关系,我们将指定梯度洗脱时的 K_i 值为 $K_i\{V\}$ 。在洗脱 i 的任一时间,经过区带最大值的洗脱剂体积 dV 将使区带的最大值沿着柱的长度有一个 dx 的迁移,其值等于

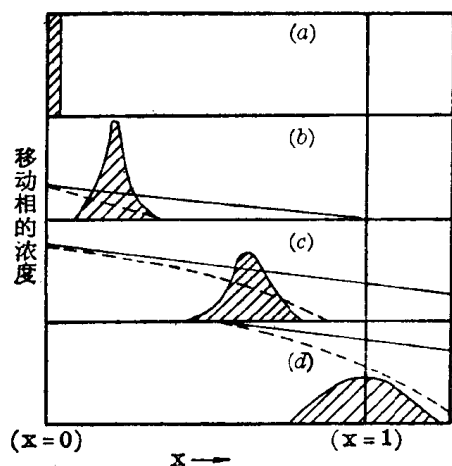


图 5 梯度洗脱时柱内的区带洗脱和洗脱剂梯度的假设性变化图

(a)洗脱开始。(b)洗脱后不久。(c)洗脱了一段时间。(d)恰好在柱的末端。阴影部分表示样品区带;实线——为洗脱剂组分 B 的浓度(没有吸附);虚线——为洗脱剂组分 B 的浓度(吸附)。

$dV/WK_i\{V\}$ 。这样,在固定洗脱剂层析中,经过区带最大值的洗脱剂体积 $K_i W$ 毫升将引起 $x=1$ 的迁移(也就是说,区带最大值完全通过柱),正如方程式(1)所示,总体积 R_i 包括了原来在柱内的 V^0 ml 洗脱剂(V^0 是不经过区带最大值的)。则

$$\frac{dV}{WK_i\{V\}} = dx$$

右项 dx 在 0 和 1 之间积分,分别对应于 i 在洗脱的开始和末端时的最大值位置 x ,而左项在洗脱剂体积 0 和 $(R_i - V^0)$ 之间积分;(在洗脱开始时,柱内的 V^0 假定为 V 的一部分,它不通过区带最大值)。得到下式:

$$\int_0^{(R_i - V^0)} \frac{dV}{WK_i\{V\}} = \int_0^1 dx = 1 \quad (3)$$

方程式(3)是了解梯度洗脱原理的基础。由 Drake^[42] 首先推导([42]中的方程式 18),其性质与上式相似。Freiling^[34] ([34]中方程式 4), Said^[44] ([44]中方程式 10) 及 Schwab^[45] ([45]中方程式 9) 等也作出了类似的推导。

根据方程式(3)来计算梯度洗脱的保留体积,其 $K_i\{V\}$ 作为 V 的函数必须是已知的,但这是相当复杂的。下面列举一些决定 $K_i\{V\}$ - V 关系的因素:

- (i) 进入柱的洗脱剂组分必须是 V 的函数;
- (ii) K_i 必须是洗脱剂组分的函数;如果 i 的吸附等温线是非线性的,那么,对于各个洗脱剂组分的等温线又必须是已知的;在整个分离中,区带 i 的最大值浓度必须是可以计算的。
- (iii) 如果强洗脱剂组分 B 被相当程度吸附时,则在柱内任何一点及任何一个 V 值时吸附对洗脱剂组分的影响必须是可以计算的。

项(i)中,进入柱的洗脱剂组分作为 V 的函数,在实践上是不困难的。正如在第三部分 α 中将看到, V_B 作为 B 的函数方程式已为最普遍采用的梯度设计所推导,其它一些设计也提供了所希望的 V_B 对 V 的关系。然而,在许多实践中, V_B 函数的复杂性使得方程式(3)不能正确地积分。

项(ii), K_i 为洗脱剂组分的函数, K_i 依赖于溶质的结构。从梯度洗脱理论的观点来看,只是洗脱剂组分对 K_i 值的影响是最重要的,故我们不考虑 K_i 对于 i 的结构关系以及 K_i 对于其它分离变量的关系。下面将讨论各种层析系统梯度洗脱的 R_i 值计算及 K_i 值对于洗脱剂组分的依赖关系。

在非线性等温线中, K_i 随 i 的浓度而变化,似乎不可能计算 R_i 值。因这不仅需要计算各种洗脱剂组分的 K_i 值和 i 的浓度,还要考虑 i 区带在向柱下洗脱时的扩散所引起的 i 浓度变化。Drake^[42] 是唯一试图研究非线性等温线梯度洗脱的作者,但没有引起大家的注意。然而,如果所有的洗脱层析技术都是规格化的,那么线性等温线的研究将对非线性系统有更多的了解。非线性等温系统在第(二)部分中讨论,除特别注明外,所有的计算都是指线性系统的。

在大多数梯度洗脱吸附系统中,都存在着对强吸附剂成分 B 有一定程度的吸附,实际上要精确地计算 $K_i\{V\}$ 也是不可能的。且又常常会碰到洗脱剂的组分复杂的问题,故对吸附剂的吸附一般是忽略不计的。

离子交换 在离子交换分离中,带有净电荷 $\pm q$ 的离子 i ,由带有相同符号的单电荷洗

脱剂成分 B 所交换, i 在离子交换剂和溶液之间的分配系数 K_i 为:

$$K_i = \frac{E}{[B]^q} \quad (4)$$

式中 E 是离子交换反应的平衡常数^[45], $[B]$ 表示 B 在洗脱剂中的克分子浓度。一般, 洗脱剂 B 带有多电荷 r , 则 K_i 等于 $(E^{1/r})/[B]^{q/r}$ 。为计算用盐梯度作梯度洗脱的 R_i 值, 可以将方程式(4)及 $[B] = f\{V\}$ 直接代入方程式(3), 只要在整个分离过程中, B 的浓度变化时离子交换平衡常数 E 保持不变。对于简单的无机离子, 当 B 在 $0.5 \sim 1.0M$ 低浓度时, E 是不变的, 而在核苷酸的分离中, Cohn^[48] 观察到 K_i 和 B 的浓度近似于成反比, 这与方程式(4) $q=1$ 时是一致的。

Freiling^[47], Schwab 等^[45] 和 Maslova 等^[49] 报道了在几种盐梯度洗脱系统中, R_i 的实验值和从方程式(3)的计算值之间的标准误差平均为 $\pm 2\%$, 证明方程式(3)是适合于梯度洗脱的计算。Freiling 研究用 H^+ 梯度洗脱 Na^+ 和 Cs^+ , 采用了几种梯度形状, 并用方程式(3)图解积分, 发现当 HCl 浓度超过某一范围时, E 值始终是变化的。

Schwab^[45] 研究了用 NO_3^- 梯度洗脱 Cl^- 、 Br^- 和 $C_2O_4^{2-}$, 当 NO_3^- 浓度超过某一范围时, 则可应用方程式(4)。 R_i 值可以从方程式(3)来计算, 方程式(3)中 K_i 值又可从方程式(4)作为 V 的函数来表示, 并从已知的 V 和 $[B]$ 的关系来计算。对于一价、二价、三价离子 i 的洗脱, 洗脱溶液 B (一价) 可有两种梯度类型: 线性或者“指数”(见第二部分 8) 梯度, 用简单的仪器即可容易地测到。Maslova^[49] 研究了 Pm 和 Ce 离子的梯度洗脱。

Schwab^[45] 所报道的线性盐梯度是为大家感兴趣的, 并将应用来讨论梯度洗脱的某些共同方面, 它们可用下式表示:

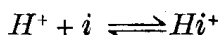
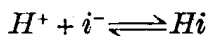
$$q=1 \quad r=1 \quad R_i - V^0 = \sqrt{\frac{2WE}{C}} \quad (5a)$$

$$q=2 \quad r=1 \quad R_i - V^0 = \sqrt[3]{\frac{3WE}{C^2}} \quad (5b)$$

$$q=3 \quad r=1 \quad R_i - V^0 = \sqrt[4]{\frac{4WE}{C^3}} \quad (5c)$$

式中, C 表示盐梯度 ($[B] = CV$) 的斜率。

假设 K_i 依赖于 $[B]$ 纯粹是质量作用效应, 那么, 方程式(4)及盐梯度可以应用, 因为在离子交换剂上, i 和 B 对带有相反电荷的位置发生了竞争作用。由于在移动相中 B 和 i 发生反应改变了 i 的净电荷, 因此, B 可以对 K_i 有附加作用, 或者甚至是主要作用。其中, 最有意义的反应是包括各种酸性和碱性溶质的解离和中和:



如果离子 B 在与 i^- 或 Hi^+ 的吸附竞争中, 以质量效应来说明 (因为 B 的浓度保持比较大的, 和/或 B 被强烈吸附), 那么酸性形式 Hi 和碱性形式 i 的 K_i 分别以方程式表示:

$$K_i = \frac{(E/[B])[i^-]}{[i^-] + [Hi]} \quad i \text{ 在阴离子交换剂上的吸附}$$

或者

$$K_i = \frac{(E/[B])[Hi^+]}{[i] + [Hi^+]} \quad Hi \text{ 在阳离子交换剂上的吸附}$$

式中 $[x]$ 是指 x 的克分子浓度。如果酸的解离常数 K_a 定义为 $[H^+][i^-]/[Hi]$ 或者 $[H^+][i]/[Hi^+]$, 那时:

$$K_i = \frac{EK_a}{[B](K_a + [H^+])} \quad \text{酸 } Hi \text{ 从阴离子交换剂上的洗脱} \quad (6a)$$

$$K_i = \frac{E[H^+]}{[B](K_a + [H^+])} \quad \text{碱 } i \text{ 从阳离子交换剂上的洗脱} \quad (6b)$$

在一个纯粹的 pH 梯度洗脱中, $[B]$ 实际上是不变的, 一般如方程 (6a) 和 (6b) 所示, 仅由于 i 的离子形式的分数减少的结果; 或者在多元酸和多元碱情况下, 是 i 净电荷减少的结果使 K_i 值随 V 的增加而降低 (如果 K_i 值大大降低是因为 i 上电荷的减少, 那么方程式 (6a) 和 (6b) 还可以应用到超过某些 pH 范围的多元分子的 K_i 值计算, 这在实际情况中是常有的)。对于用梯度洗脱分离的样品, 其大部分成分的 K_i 值在开始洗脱时是大的, 在 pH 梯度洗脱时, 荷电形式的 i 将大大地减少。这意味着在洗脱酸 Hi 时, $[H^+]$ 将大大地大于 K_a , 洗脱碱 i 时, 则 $[H^+]$ 将大大地小于 K_a ; 由此可得出近似关系:

$$K_i \cong \frac{EK_a}{[B][H^+]} \quad \text{酸 } Hi \text{ 在阴离子交换剂上的洗脱} \quad (6c)$$

和

$$K_i \cong \frac{E[H^+]}{K_a[B]} \quad \text{碱 } i \text{ 在阳离子交换剂上的洗脱} \quad (6d)$$

对于一价的阴离子和阳离子 ($q=1$), 以及单元酸和单元碱, 如果将 $10^{-14}/[OH^-]$ 代入到方程式 (6a) 的 $[H^+]$ 上, 那么, 方程式 (4), (6c) 和 (6d) 似乎是相同的形式; 在各种情况下, K_i 值与梯度物质 B 、 H^+ 或 OH^- 的浓度成反比。因此, 这些离子、酸或碱在盐或 pH 梯度洗脱中, R_i 的计算及控制它们分离的原理基本上也是相同的。

在离子交换分离中, 正如方程式 (6c) 和 (6d) 那样, 如果假设 E 是常数, 那么氨基酸的相对分离次序是近似于 K_a 值的次序^[50]。在核糖核苷酸的离子交换分离中已证实了 R_i 和 K_a 之间有相类似的关系, 当然也有例外情况。Hurlbert 等^[28] 指出, pH 梯度在改变相对分离次序方面比盐梯度的作用更大。

Ponts 和 Blumson^[55] 曾指出, 在核苷酸的盐或 pH 梯度洗脱中, 它们的钙盐和钠盐在移动相中的解离度和溶解度在决定相对分离次序上起了关键的作用。然而, 对于它的重要性认识尚还不足, 只是在分离中估计了它的作用。

在盐或 pH 梯度的离子交换分离中, 其梯度是指有效洗脱剂 B 的浓度增加 (B 在酸或碱的 pH 梯度时可分别是氢或氢氧根离子)。然而, 阴离子在阳离子交换树脂上的分离或阳离子在阴离子交换树脂上的分离都包含着复杂的离子平衡:



和



其中, 还包含着 i 复合物的吸附。X 离子浓度的增加会促进复合物的吸附, 因此, 必须有一个 X 浓度降低的梯度。Marcus 和 Nelson^[56] 采用了硝酸盐离子浓度降低的梯度, 在阴离子交换树脂上分离稀土金属离子。

吸附 在吸附层析和恒定 pH 离子交换层析中, K_i 值依赖于洗脱剂的组分, 两者在这一点上是十分相似的。前者是在吸附剂的活性表面上, 后者是在离子交换剂上的带电基团上, 均存在着溶质分子与强洗脱剂分子 B 之间的竞争作用。如果 m 个洗脱剂分子解吸一个溶质分子, 那么, 在层析柱上存在一个分配平衡:



从上式可以导出方程式(4)。在离子交换层析中, m 等于溶质和洗脱剂的离子电荷的比值 q/r 。或等于在吸附剂表面的溶质分子同洗脱剂分子所占的面积之比^[41] (有时由于某些操作因素会影响吸附, m 值比计算值大)。当考虑到 K_i 决定于洗脱剂组分时, 这在离子交换层析与吸附层析之间有如下的区别: 在离子交换中, 当洗脱剂中不含有 B 离子时, i 不能从吸附剂上取代, 正如方程式(4)所示, $[B]$ 等于零时, K_i 为无限大; 在吸附层析中, 当 B 比其它洗脱剂成分更强烈地被吸附时, 后者仍将有效地从吸附剂表面取代 i 。也就是说, 虽然在吸附层析中, 当 $[B]$ 小时, K_i 常常是大的, 在 $[B]$ 等于零时, K_i 很少倾向于极大(或无限大)。因此, 方程式(4)及有关表示式 $K_i = (E^{1/r}/[B]^{q/r})$ 只能基本上适用。

对于线性等温系统的吸附层析, 其 K_i 值和洗脱剂组分间的关系已由 Snyder^[39,41,57] 作了描述。对于一个溶质 i , 它在吸附剂上的面积是 A_i , 当它从一个洗脱剂强度为 ε^0 的洗脱剂中吸附到表面能为 α 的吸附剂上, 则其 K_i 为:

$$K_i = K_p 10^{-\alpha \varepsilon^0 A_i} \quad (7)$$

K_p 是标准洗脱剂(戊烷)的 K_i 值。方程式(7)对于各种溶质在氧化铝、硅胶及硅酸镁上的吸附都是精确可信的。上述三种吸附剂的各种层析系统的吸附剂的表面能 α ^[41] 和洗脱剂强度 ε^0 值^[39] 都有表可查, 并讨论了各种溶质的 A_i 值计算方法^[41]。其它的吸附剂(氧化镁^[59]、碳^[59])的相对洗脱剂强度的数值可以从“洗脱能力递变系列”中推导。

例如在二元洗脱剂梯度洗脱的情况中, ε^0 值(及 K_i 值)能够从洗脱剂 A (弱吸附) 和 B (强吸附) 的 ε^0 值来计算, 其 A 和 B 的 ε^0 值分别以 ε_A^0 和 ε_B^0 表示:

$$\varepsilon_{AB}^0 = \varepsilon_A^0 + \frac{\log_{10}[X_B 10^{\alpha n_b (\varepsilon_B^0 - \varepsilon_A^0)} + 1 - X_B]}{\alpha n_b} \quad (8)$$

ε_{AB}^0 是二元组分的洗脱剂强度, n_b 是洗脱剂 B 的相对面积(大多数情况下是 A_i 值), X_B 是 B 在洗脱剂中的克分子分数。方程式(8)最初是从最简单的吸附模式所推导, 实验已证明在氧化铝和硅胶上是可信的; 但在硅酸镁上不令人满意。对于三元组分洗脱剂也推导出类似的方程式, 在氧化铝上显示出精确性。方程式(7)和(8)的意义相同于(4), 或者当 X_B 足够大时, 经常是用 $K_i = (E^{1/r})/[B]^{q/r}$ 来表示(从吸附剂表面置换 i 时, 仅 B 是重要的)。

用方程式(8)代入(7), 方程式(7)再代入(3), 则得到相当复杂的积分, 当 X_B 对 V 的关系是一个复杂的函数时, 那么, 对于 R_i 已知的溶液来说, 该式是不实际的(实际上也常是这种情况, 看第三部分有关的梯度设计)。对于某一类洗脱剂梯度而言, ε^0 是 V 的线性函数:

$$\alpha \varepsilon^0 = a + bV \quad (8a)$$

式中 a 和 b 是常数, 则方程式(3)的积分简化了, 得到下式:

$$R_i - V^0 = \frac{\log(2.3 A_i b W R_p 10^{-a A_i} + 1)}{b A_i} \quad (9)$$

线性强度梯度的应用(方程式 8a)不仅使梯度洗脱中的 R_i 计算简化,而且有最佳应用的价值。方程式(9)已在氧化铝和硅胶上为几种洗脱剂系统洗脱各种溶质所证明^[62]。

对于某些较不重要的梯度类型言,方程式(3)很容易积分。在线性浓度梯度情况下, X_B 等于 CV ;在特殊情况,可以认为溶质 i 和洗脱剂成分 B 是相等大小的($A_i = n_b$),则

$$R_i - V^0 = \frac{\sqrt{1 + C'WK_A} - 1}{C'} \quad (9a)$$

式中, C' 等于 $C[10^{an_b(80-82)} - 1]$ 。方程式(9a)与(5a)是相似的形式,对于大的 R_i 值来说, R_i 是直接随 K_A 和 W 的平方根而变化,而与 C' 的平方根成反比(K_A 和 E 是 i 的相应吸附量度, C' 和 C 是梯度斜率的量度)。

Jermyn 指出,在给定的梯度洗脱吸附层析系统中,洗脱溶质 i 的强洗脱剂成分 B 的总量 $S(\text{ml/g}_{\text{吸附剂}})$ 不变时,则其 R_i 值随梯度形状或斜率而变化,其关系相似于 Marshall 等^[64] 提出的分配梯度洗脱。Lakshmanan 和 Lieberman^[65] 认为这个建议在数学上是不健全的,且发现甾体在氧化铝上的梯度洗脱分离实验亦是不可信的。然而, Jermyn^[63] 在活性炭上糖的梯度洗脱实验中,证明了 S 与分离的关系,指出 S 的恒定是系统中吸附竞争作用的直接结果。他的建议可能对于一个相当特殊的情况是可信的:即一个洗脱剂分子 B 从吸附剂上直接取代一个溶质分子 i ,而其它洗脱剂成分对于 i 的取代是无效的。因此,当 $q=1$ 时的方程式(4)是具有精确性的。这可以用一个线性浓度梯度的例子和方程式(5a)加以说明,方程式(5a)对任何梯度都是适用的。首先, S 等于 C 乘上 $(R_i - V^0)^2/2W$,即 SW 等于 $R_i - V^0/2$ 和洗脱剂中(在 $V = R_i - V^0$ 时) B 的最大浓度的乘积。其次, $(R_i - V^0)$ 由方程式(5a)给出,当代入上式时,则 $S = E$ 。这就是说,对于一个给定的溶质,当 C (梯度斜率)和 W (吸附剂重量)变化时, S 是恒定不变的。如果溶质 i 和洗脱剂 B 的大小(A_i 和 n_b)或离子电荷(q 和 r)显著地不同时,或者弱洗脱剂组分是显著地吸附在固定相上时, C 是变化的,则 S 也将不能恒定。据作者的经验,金属氧化物在吸附层析中,并不经常观察到 S 的恒定(虽然它们在离子交换层析中常常是正确的)。Lakshmanan 和 Lieberman^[65] 在氧化铝上洗脱甾族化合物,也不能观察到恒定的 S 值。Jermyn 在观察了另一些层析分离后,修正了这个关系,认为这仅表示一种有限的情况,还须有一些必要的条件。

Barker 等^[66] 注意到低聚糖在活性炭上线性浓度梯度分离中(乙醇—水梯度),其 R_i 值是糖的单位数目的线性函数(也就是说,从单糖到双糖、从双糖到三糖, R_i 是以一个常量而增加)。这似乎是意外的关系,因为在这种层析系统中计算 R_i 值时的积分是太复杂了。线性强度梯度用于氧化铝和硅胶吸附剂上,对于同系物例如低聚糖中 R_i 值较大的区带有些推进作用,使相邻两区带的 ΔR_i 值随着洗脱过程而减小)。由于线性强度梯度是一个凹形的浓度梯度,线性浓度梯度比线性强度梯度更倾向于在洗脱末端增加区带的分离。因此,在 Barker 等^[66] 观察到区带的线性间隔还是合理的,虽然不象线性浓度梯度分离时那么精确。

Cassidy^[67] 在计算梯度洗脱时,观察到二元洗脱剂在 B 的中间浓度时,常常有最大的洗脱能力,而不是方程式(8)所表明那样在纯 B 时有最大的洗脱能力。因此, Cassidy 的结论是在 V_B (和 X_B) 超过这个中间值即在最大洗脱能力之前就应该停止梯度,这点是很重要的,不然洗脱能力在洗脱末端将减小(无疑,这不是所希望的)。据作者的经验,这种现象是罕见的,几乎并不出现 Cassidy 所提到的情况。Snyder^[39,60,61] 研究了 18 种以上的二元洗脱剂,仅仅观察到一例,该例是四氯化碳—戊烷在小孔径硅胶上洗脱,它在洗脱剂组分 B

的中间浓度时有最大的洗脱能力,是归因于直径大的洗脱剂和直径小的吸附剂相结合。而其他类似的结合因素很少看到。我们认为在设计梯度洗脱吸附层析分离时,不必考虑Cassidy 提出的观点。

其它吸附剂和层析技术 分配层析分离较少应用梯度洗脱原理,因此,在常规分配层析中兴趣不大(除下面讨论的纸层析外)。脂肪酸^[10,68,69]和甾体^[70,71]的分离虽有报道考虑梯度洗脱分配层析,但很少注意其原理。Marshall 等^[64]曾提出分配梯度洗脱,预言在洗脱剂和固定相保持不变时,对于一个给定的成分其 S 值是常数。这规则也仅仅与有关的层析系统相近似,而与吸附及离子交换层析的梯度洗脱是不一样的,在分配系统中似乎没有基本规律,连有限经验的可靠性也没有。Mader^[68]建议,在分配梯度洗脱分离中,成分 i 的 R_i 为:

$$\log_{10}([B]_R - V) = mR_i + b \quad (9b)$$

式中 $[B]$ 表示所谓“指数”梯度设计中贮藏器内 B 的浓度(见第(三)部分1), m 和 b 对于一个给定的溶质 i 来说是常数。它的用途相当有限,且可信性更低。其实,要预言 R_i 值还得从方程(3)着手,但 K_i 与洗脱剂组分之间的关系还有待于发展。

其它固定相如聚四氟乙烯的应用几乎不值得讨论,因为它们对它们在常规层析中的性质了解得还不多。

在纸层析和薄层层析中,应用梯度洗脱的报道还不多,这说明在这些层析技术上控制梯度较为困难。但梯度洗脱的所有优点还是能达到的,即对于一个给定的样品,同时用几张纸条或几块板选用不同强度的洗脱剂而达到分离的目的,且也相当容易完成,往往做几个分离的工作量还少于完成梯度分离的工作量。在纸、薄层或如Tswett的柱层析上的梯度分离中,其溶质迁移的基本方程式是:

$$\int_0^{V_0(1-R_i)} \frac{dV}{WK_i} = \int_0^{R_i} dx \quad (10)$$

它可和方程式(3)比较。在此, R_i 是 i 在纸或板上(或向柱下)迁移的距离与溶剂前沿的比值。用方程式(7)(8)的 K_i 值代入到方程式(10),可以表示梯度洗脱薄层或柱层析(吸附)的 R_i 值。但是这样的计算是太复杂了,以致很难求出 R_i 值,如同求某些离子交换或吸附层析中的 R_i 值一样。由此看来,方程式(10)似乎对进一步发展 R_i 的理论模式的实用意义不大。

【梯度洗脱中区带宽度的定量计算】

为要了解梯度洗脱中决定区带宽度的因素,就必须考虑在固定洗脱剂分离中的区带宽度,特别是它在柱上的扩散。图6a表示一个到达柱末端的溶质区带,区带上三个黑点的位置相应于区带最大值 b 及决定区带宽度的 a 和 c (如图2)。在柱上,点 a 和 c 之间的距离等于柱的长度的份数 x ,因此,点 a 和 c 之间的吸附剂重量等于 xw 。从图6a的位置上洗脱区带点 a 、 b 和 c 所需的体积分别为零、 $\frac{1}{2}xR_i$ 及 xR_i ,最后区带的宽度(图6b)将等于 xR_i 。将这一 W_i 值代入到方程式(2),则得 $x = 4/\sqrt{P}$,也就是说,洗脱区带时,其宽度(W_i)是与溶质的保留体积 R_i 成正比的,只要 P 值不变,所有的溶质在柱上的宽度(x)也不变。当然,这对于用洗脱能力不同的洗脱剂来洗脱一种溶质也是正确的。推而广之,在梯度洗脱时亦是正确的;对于板数 P 恒定的柱来说,溶质在柱上的宽度(x)将是不变的。

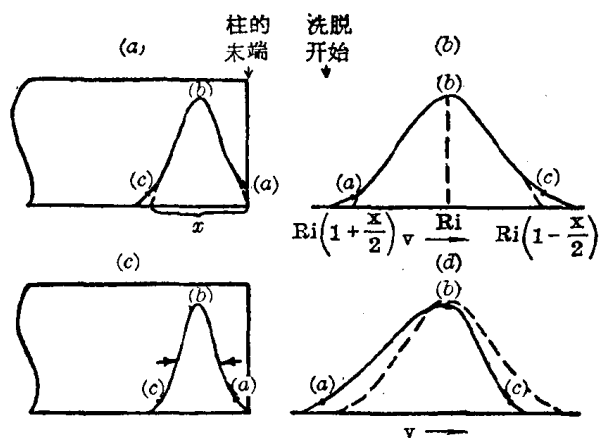


图6 梯度洗脱中决定区带形状的因素

(a)在柱上的区带,恰好在洗出前;(b)在洗出后(用固定洗脱剂);(c)梯度经过区带,使区带变狭;(d)在从柱上洗出时,由于梯度经过区带而使区带不对称。

因此,在梯度洗脱时,区带的宽度(W_i)可由溶质 i 在离开柱时的有效 R_i 值或瞬时 R_i 值来决定。末端的保留体积 R_i 由方程式(1)给出,它的 K_i 值就是 $V = R_i$ 值时的 K_i 值。我们能近似地假设,在洗脱点 a 和 c 时, K_i 和 R_i 是不变的。随后再考虑在柱的末端洗脱点 a 和 c 之间, K_i 值的微小变化对区带形状的影响。图 6a 显示的,从柱上取代点 a 、 b 和 c 所需的洗脱剂体积分别为零、 $2R_i/\sqrt{P}$ 及 $4R_i/\sqrt{P}$, 其区带宽度(W_i)为:

$$W_i = \frac{4R_i}{\sqrt{P}} \quad (11)$$

如常规的固定洗脱剂洗脱一样,所产生的峰形状是对称的、高斯形的。Alm 等^[43] 首先定性地预言了方程式(11),而 Freiling^[47] 则给予更精确的处理,基本上符合方程式(11)。

在某些梯度洗脱中,为了进一步解决 W_i 的决定因素,应用方程式(11)是有益的。考虑梯度洗脱的离子交换层析时,应用了 $q=1$ 的方程式(4)(也就是说, B 和 i 的净电荷相等),在洗脱的后阶段,也能用来描述 $i_{(AS)}$ 和 $B_{(nb)}$ 面积相等的梯度洗脱吸附分离。假设一个线性浓度梯度, $[B]$ 等于 OV , 因此 R_i 由方程式(5a)求得,则 R_i 为:

$$R_i = V^0 + [K_i]_V = R_i W$$

由于

$$[K_i]_V = R_i = \frac{E}{C(R_i - V^0)}$$

所以

$$R_i = V^0 + \frac{EW}{C \sqrt{\frac{2WE}{C}}}$$

在 R_i 相当大时,上式可简化为:

$$R_i \approx \sqrt{\frac{WE}{2C}} \approx \frac{R_i}{2} \quad (12)$$

该式能预言 R_i 随 i 的保留体积增加而增加。因此,在一个线性浓度梯度的分离过程中,区带宽度会连续增宽,这是不希望的。

“线性洗脱剂强度”梯度的概念能推广到离子交换层析中去,则方程式(4)能写成:

$$K_i = E10^{-q \log_{10}[B]}$$

上式与吸附分离的方程式(7)相似, q (当 $r=1$ 时)或者 q/r 的作用相似于 AS , $\log_{10}[B]$ 的作用相似于 $\alpha \Sigma^0$ 。如果在离子交换分离中,则

$$\log_{10}[B] = a + bV \quad (13)$$

当 $r=1$ 时, R_i 为:

$$R_i = V^0 + \frac{\log_{10}(2.3qbWE10^{-aq} + 1)}{bq} \quad (13a)$$