

吸附柱色谱的使用方法

柱色谱(柱层析)常用的有吸附柱色谱、分配柱色谱、凝胶过滤柱色谱、离子交换柱色谱等。这里介绍吸附柱色谱的使用方法。

吸附柱色谱(adsorption chromatography)的原理是利用混合物中的各组分对固体吸附剂(固定相)的吸附能力不同而达到分离的层析方法。液—固吸附色谱是运用较多的一种方法,特别适用于很多中等分子量的样品(相对分子质量小于1000的低挥发性样品)的分离,尤其是脂溶性成分。吸附层析的分离效果,决定于吸附剂、溶剂和被分离化合物的性质这三个因素。

一、吸附剂的选择

吸附剂一般是一些多孔物质,具有较大的比表面积,在其表面有许多吸附中心。吸附剂的吸附作用主要是因为其表面的吸附中心,吸附中心的多少及其吸附能力的强弱直接影响吸附剂的性能。常用的吸附剂有硅胶、氧化铝、活性炭、硅酸镁、聚酰胺、硅藻土等。

1、硅胶

层析用硅胶通常用 $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 表示,是常用的吸附剂,约90%以上的分离工作都可采用硅胶。为多孔性物质,分子中具有硅氧烷的交链结构,同时在颗粒表面又有很多硅醇基。硅醇基是使硅胶具有吸附力的活性基团,它能与极性化合物或不饱和化合物形成氢键或发生其他形式的相互作用,硅胶吸附作用的强弱与硅醇基的含量多少有关。被分离组分由于极性和不饱和程度不同,和硅醇基互相作用的程度也不同,因而得以分离。硅醇基还能够通过氢键的形成而吸附水分,使其失去活性,因此硅胶的吸附力随吸着的水分增加而降低。当硅胶的“自由水”超过17%时,则吸附能力极低,不能用作吸附剂,但可作为分配层析中的支持剂。当硅胶加热至100~110℃时,硅胶表面因氢键所吸附的水分即能被除去,活性得以活化。但当温度升高至500℃时,由于硅胶结构内的水(结构水)不可逆地失去,使表面的硅醇基也能脱水缩合转变为硅氧烷键,从而导致其吸附能力显著下降,不再有吸附剂的性质,即使用水处理也不能恢复其吸附活性。所以硅胶的活化不宜在较高温度下进行。

硅胶的分离效率与其粒度、孔径及表面积等都有关系。硅胶的粒度越小,均匀性越好,分离效率越高;硅胶的表面积越大,则与样品的相互作用越强,吸附力越强。

硅胶是一种酸性吸附剂,适用于中性或酸性成分的分离分析。同时硅胶又是一种弱酸性阳离子交换剂,其表面上的硅醇基能释放弱酸性的氢离子,当遇到较强的碱性化合物,则可因离子交换反应而吸附碱性化合物。

2、氧化铝

色谱用的氧化铝是由氢氧化铝在 400~500℃灼烧而成，因制备方法和处理方法的差异，分为碱性、中性和酸性 3 种。碱性氧化铝(pH 9~10)适用于分离一些碱性和中性中草药成分，如对生物碱类的分离颇为理想。但是碱性氧化铝不适宜于醛、酮、内酯等类型化合物的分离，因为有时碱性氧化铝可与上述成分发生异构化、氧化、消除等次级反应。中性氧化铝(pH 7.5)的用途最广，适于分离生物碱、萜类、甾体、挥发油及在酸碱中不稳定的苷类。酸性氧化铝(pH 4~5)适于分离酸性物质，如酸性色素、氨基酸等。供柱层析用的氧化铝，其粒度要求在 100~160 目之间。粒度大于 100 目，分离效果差；小于 160 目，溶液流速太慢，易使谱带扩散。样品与氧化铝的用量比，一般在 1: (20~50)之间，层析柱的内径与柱长比例在 1: (10~20)之间。

与硅胶相似，市售的氧化铝也因黏合剂或荧光剂不同而分为氧化铝H、氧化铝G、氧化铝HF₂₅₄、氧化铝GF₂₅₄等不同类型。

在用溶剂冲洗柱时，流速不宜过快，洗脱液的流速一般以每 30~60min 内流出液体的体积(ml)与所用吸附剂的质量(g)相等为合适。

3、活性炭

活性炭是一种非极性吸附剂。一般需要先稀盐酸洗涤，其次用乙醇洗，再以水洗净，于 80℃干燥后即可供层析用。层析用的活性炭，一般分为以下 3 类。

(1) 粉末状活性炭 颗粒极细，呈粉末状，比表面积特别大，因此吸附力和吸附量也大，是活性炭中吸附力最强的一类。但由于颗粒太细，色谱过程中流速极慢，需加压或减压操作。常需加入适量硅藻土作为助滤剂一并装柱，以免流速太慢。

(2) 颗粒状活性炭 颗粒较前者大，比表面积相对减小，吸附力和吸附量也较前者弱，但在色谱过程中流速易于控制，不需加压或减压操作，所以是层析最常选用的活性炭。

(3) 锦纶活性炭 以锦纶为黏合剂，将粉末状活性炭制成颗粒状活性炭。比表面积介于两者之间，吸附力比两者皆弱。可用于分离因前两种活性炭吸附力太强而不宜洗脱的化合物。用于分离酸性和碱性氨基酸效果良好。

活性炭主要用于分离水溶性成分，如氨基酸、糖类及某些苷。活性炭在水溶液中吸附力最强，在有机溶剂中吸附力较弱。故水的洗脱能力最弱，而有机溶剂则较强。例如以水-醇进行梯度洗脱时，则随乙醇浓度的递增而洗脱力增加。活性炭对极性基团多的化合物的吸附力大于对极性基团少的化合物的吸附力；对芳香族化合物的吸附力大于脂肪族化合物；对大分子化合物的吸附力大于小分子化合物。如对羟基脯氨酸的吸附力大于对脯氨酸的吸附力；对多糖的吸附力大于对单糖的吸附力。利用这些吸附性的差别，可将水溶性芳香族物质与脂肪族物质分开，单糖与多糖分开，氨基酸与多肽分开等。

二、洗脱溶剂的选择

层析过程中溶剂的选择，对组分分离效果影响极大。在柱层析时所用的溶剂习惯上称洗脱剂，由单一溶剂或混合溶剂组成。洗脱剂的选择，需根据被分离物质的性质与所选用的吸附剂性质这两者结合起来加以考虑。分离强极性成分，宜选用活性低的吸附剂，选用极性溶剂为洗脱剂；分离极性弱的组分，宜选用活性高的吸附剂，一般选用弱极性溶剂为洗脱剂；中等极性组分则选用中间条件进行分离。单一溶剂的极性顺序为：石油醚<环己烷<二硫化碳<四氯化碳<三氯乙烷<苯<甲苯<二氯甲烷<氯仿<乙醚<乙酸乙酯<丙酮<正丁醇<乙醇<甲醇<吡啶<酸<水。以单一溶剂为洗脱剂时，组成简单，分离重现性好，但往往分离效果不佳。所以，在实际工作中常常采用二元、三元或多元溶剂系统作洗脱剂。以上的洗脱顺序仅适用于极性吸附剂，如硅胶、氧化铝。对非极性吸附剂，如活性炭，则正好与上述顺序相反，在水或亲水性溶剂中所形成的吸附作用，比在脂溶性溶剂中强。

在多元流动相中不同的溶剂起不同的作用。一般比例大的溶剂往往起到溶解样品和分离的作用，占比例小的溶剂则起到改善 R_f 值的作用，有时在分离酸(碱性成分)时还需加入少量的酸(碱)以使被分离的某些极性物质的斑点集中，改善拖尾现象，提高分离程度。

洗脱时应该由小极性溶剂开始，逐渐增大洗脱的极性。这种极性的增大是一个十分缓慢的过程，称为“梯度洗脱”，使吸附在层析柱上的各组分逐个被洗脱。如果极性增大过快(梯度太大)，就不能获得满意的分离效果。

三、被分离物质的性质

被分离的物质与吸附剂、洗脱剂共同构成吸附层析中的3个要素，彼此紧密相连。在固定的吸附剂与洗脱剂的情况下，各组分的分离情况，直接与被分离物质的结构与性质有关。对极性吸附剂(活性炭和聚酰胺在这不讨论)而言，成分的极性越大，吸附性就越强，例如分子中极性基团的数目愈多，被吸附的可能就会更大些；在同系物中则碳原子数目愈少些，被吸附也会强些；分子中的双键越多，吸附力就越强，共轭双键增多，吸附力增强。总之，只要两个成分在结构上存在差别，就有可能分离，关键在于条件的选择。要根据被分离物质的性质，首先要考虑被分离物质的极性，来选择合适的吸附剂与洗脱溶剂。如被分离物质极性很小为不含氧的萜烯，或虽含氧但非极性基团，则需选用吸附性较强的吸附剂，并用弱极性溶剂如石油醚或苯进行洗脱。但多数中药成分的极性较大，则需要选择吸附性能较弱的吸附剂(一般III~IV级)。采用的洗脱剂极性应由小到大采用梯度递增洗脱，洗脱前应采用薄层层析来指导选择洗脱的溶剂系统。通常欲分离的混合物不同，采用的条件也不同，具体应用时还要通过大量的摸索实践才能找到最合适的分离条件。

四、柱色谱操作

1、装柱

装柱的方法通常有两种。

(1) 干法装柱 将适量吸附剂（一般能装样品的 30-50 倍量的吸附剂即可，难以分离者，吸附剂用量可适当提高至样品量的 100-200 倍）经漏斗慢慢地加入到柱中，必要时用吸耳球等软物轻轻敲打层析柱，使填料压实，或小心地用平物将其压紧，压紧时用力要均匀，使吸附剂的松紧一致。填充完后，打开下端的活塞，用初始的洗脱剂缓缓加入洗脱，除尽层析柱中的气泡，平衡柱子。如果有气泡存在，会在柱中形成小沟和裂缝，降低分离效率。

(2) 湿法装柱 把适量吸附剂和洗脱用的初始的洗脱液调成糊浆状，沿层析柱内壁，徐徐灌入柱中，同时打开下端活塞，让洗脱液缓缓滴出，带动吸附剂缓慢沉于柱下端。待加完吸附剂后，继续使洗脱剂流出，直到吸附剂的沉降不再变动。此时在吸附剂上加少许棉花或小片纸片，将多余洗脱剂放出至上面保持 1cm 高液面为止。注意在灌浆过程中和灌浆完毕都不能让洗脱剂流完、干柱，应让柱面上一直保持有一定的液面，让吸附剂自由沉降而填实。湿法装柱填充比较均匀，且不易产生气泡。

2、加样

被分离样品在加样时可采用干法，亦可选用初始的洗脱液将样品溶解后加入。

(1) 溶液加样法 将适量以适量溶解溶解，溶解样品的溶解应尽可能选择极性较小的，以利于样品在吸附剂上形成狭窄的原始谱带，指样品溶液（该溶液要求体积小、浓度高，溶液浓度如太浓加样后吸附剂易结块，太稀样品区带太宽，影响分离效果）。将样品溶液加于柱顶端，用手轻拍柱顶，使样品带平整，再放一层石子或玻璃柱，以免加样时扰动柱顶表明。

(2) 干法拌样法 如果样品不能溶于初始的洗脱液，则可选用合适的易挥发的有机溶剂溶解样品后均匀地拌入适量吸附剂中[样品和吸附剂的比例一般为 1: (1~2)左右]，挥干溶剂后，将吸附有样品的吸附剂轻轻均匀地添加在层析柱中吸附剂的上面，使样品带平整，再放一层石子或玻璃柱，以免加样时扰动柱顶表明。

3、洗脱

加样完毕后，就开始用合适的洗脱剂不断冲洗，分段定量收集洗脱液，不断进行薄层色谱(TLC)检测或其他分析，合并组分相同的流分。如果采用单一洗脱剂不能得到满意的分离效果，则可以选择“梯度洗脱”，逐渐增大洗脱剂的极性，以逐渐提高其洗脱能力，让各组分得到更好的分离。注意在梯度洗脱过程中，极性要缓慢地渐进地提高，才有利于混合物的完全分离。

柱色谱洗脱过程中，应特别注意以下几点：

(1) 采用的洗脱剂极性应由小到大按某一替代逐步递增,使吸附在色谱柱上的各个成分逐个被洗脱。但极性跳跃不能太大否则因热交换不及时而导致柱子上出现气泡,产生裂纹,从而降低分离效率;

(2) 吸附柱色谱的溶剂系统可通过TLC进行筛选,一般TLC展开使组分 R_f 值达到0.2~0.3的溶剂系统可选为柱色谱该相应组分的最佳溶剂系统。

(3) 通常在分离酸性(或碱性)物质时,洗脱溶剂中分别加入适量乙酸(或氨、吡啶、二乙胺),常可收到防止拖尾、促进分离的效果。

修改于二零一零年三月