

第二章 目标成分分离纯化技术（二）

上次课内容回顾：

第一节 粗分级分离技术

一、根据溶解度不同：

1. **沉淀法**：盐析、有机溶剂沉淀、等电点沉淀
2. **萃取法**：有机溶剂萃取、双水相萃取、超临界流体萃取

二、根据分子量差异：**膜分离法**

1. **浓度差为动力**：透析
2. **静压力差为动力**：微滤；超滤；反渗透
3. **以电场为动力**：电渗析

第二节 细分级分离技术

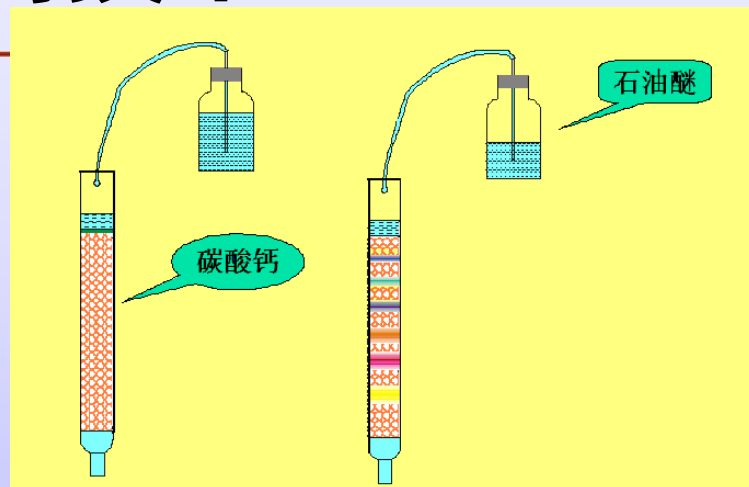
一、色谱法概论

✓ 色谱法首先是一种分离方法。

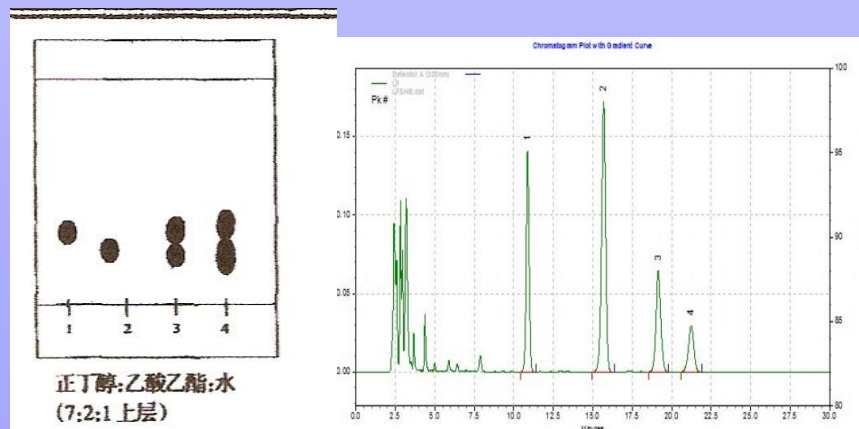
特点：有两相(固定相和流动相)

固定相 (stationary phase)：即固定的物质（可以是固体或液体）

流动相 (mobile phase)：即流动的溶液或气体。

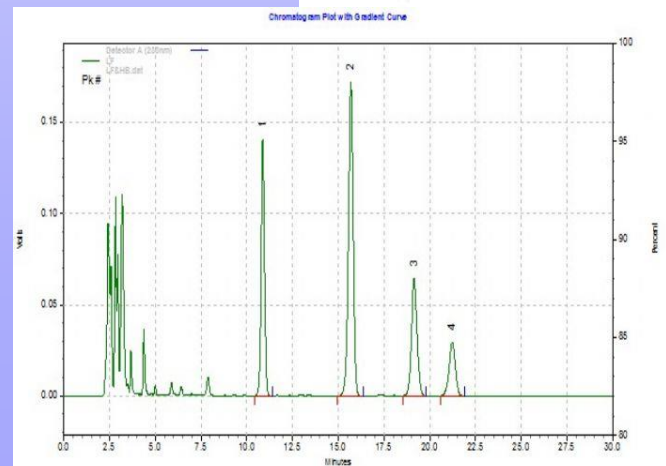
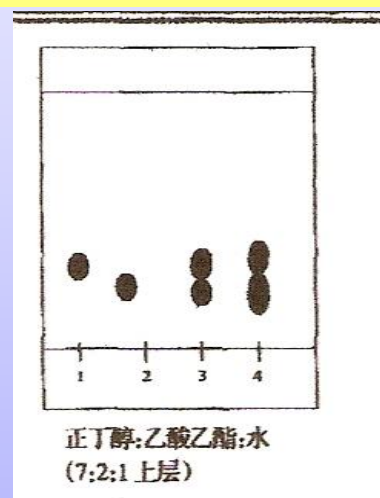
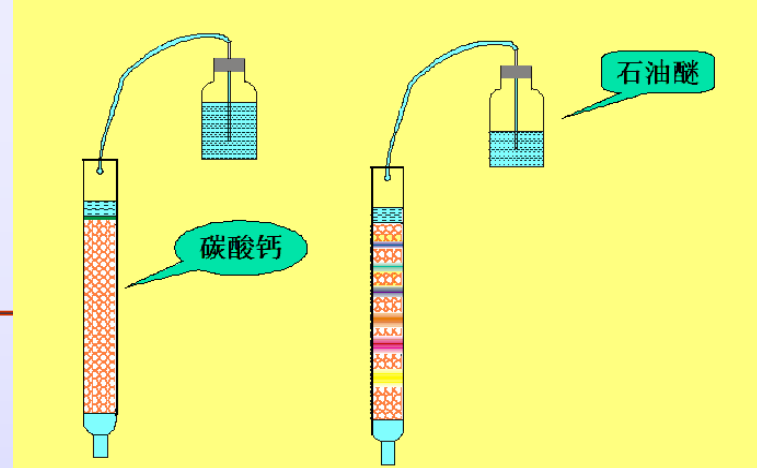


✓ 色谱是一种分离、分析法。



色谱法分离原理

- 当流动相中所携带的混合物流过固定相时，就会和固定相发生作用。
- 由于混合物中各组分在性质和结构上有差异，与固定相发生作用的大小也有差异。
- 因此在同一推动力作用下，不同组分在固定相中的滞留时间有长有短，从而按先后不同的次序从固定相中流出。



色谱法的分类

根据分离的原理

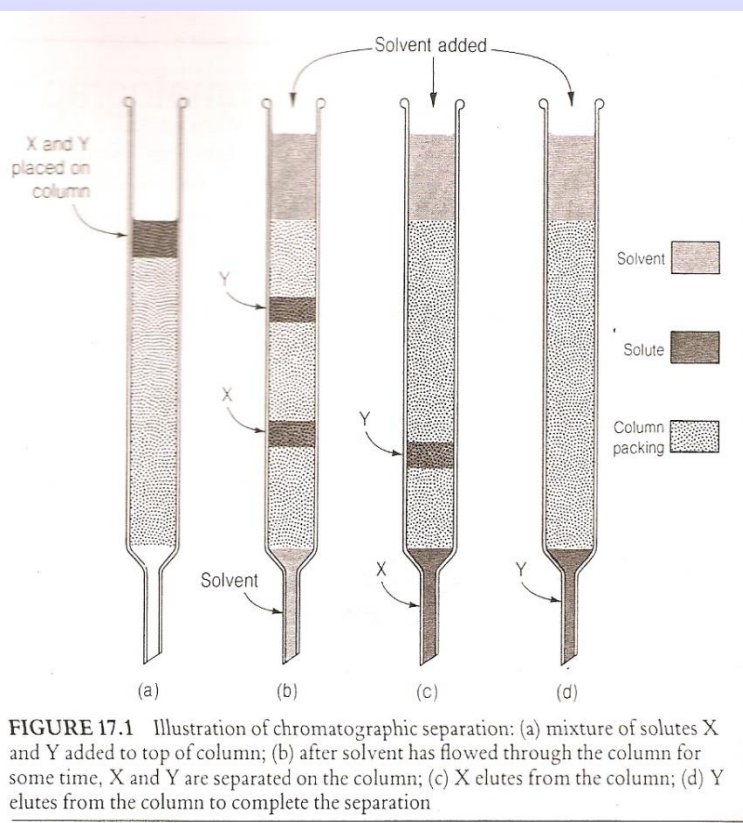
各组分在互不相溶的两“相”溶剂之间的
分配系数（一种溶质在互不相溶两种溶剂
 溶解度达到平衡时，在两溶剂中的浓度比
 例）之差异（**分配色谱**）

对吸附剂吸附能力不同（**吸附色谱**）

分子的大小的差异（**排阻色谱**）

电荷性质的差异（**离子交换色谱**）

亲和作用的差异（**亲和色谱**）





根据载体及操作条件的不同:

- 纸色谱(Paper Chromatography)
- 薄层色谱 (Thin-Layer Chromatography, TLC)
- 柱色谱(Column Chromatography)

上次课讨论

- ✓ 液相色谱(Liquid chromatography):流动相液体
- ✓ 气相色谱(Gas chromatography):流动相气体

二. 纸色谱, 纸层析 (Paper Chromatography, PC)

1. 原理：分配色谱，分配系数的不同

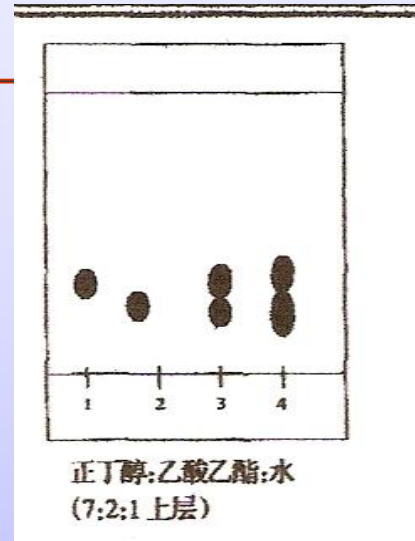
固定相 (Stationary phase)：滤纸上吸附的水

滤纸是水的支持物或载体

流动相 (Mobile phase)：有机溶剂和水

滤纸纤维中含有的羟基会从空气中吸收水分，并以氢键和滤纸纤维素结合。当流动相（展开剂）在滤纸上移行时，样品也就在流动相和水相中反复分配，最后由于各组分在两相中分配系数不同，迁移速度也就不同，从而使不同的组分在滤纸上得以分离。

适合糖和氨基酸的分离\分析



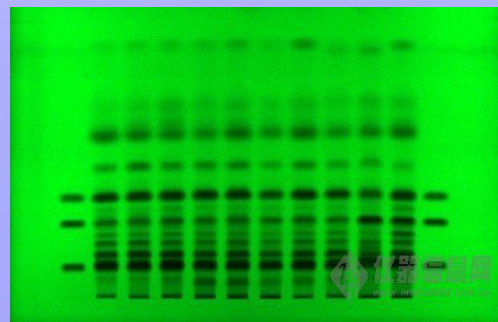
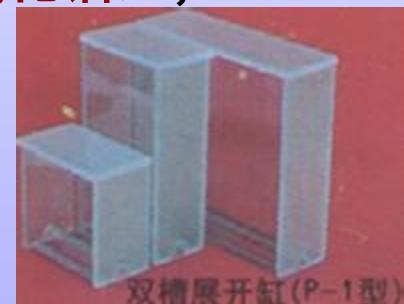
三、薄层色谱 (Thin-Layer Chromatography, TLC)

1. 原理 (Principle):

吸附色谱 (Adsorption chromatography): 吸附力差异

固定相: 吸附剂 (硅胶、氧化铝、聚酰胺)

流动相: 两种或以上溶剂混合 (2种有机溶剂混合/硅胶、氧化铝);
(甲醇: 水/聚酰胺)

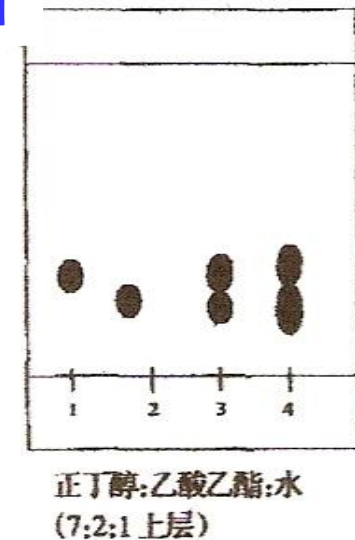


Paper Chromatography: 纸色谱

Thin-Layer Chromatography, TLC: 薄层色谱

Retardation value (R_f) 比移值

$$R_f = \frac{\text{Distance traveled by solute}}{\text{Distance travelled by mobile phase solvent front}}$$



各组分的位置一般用**比移值** R_f （点样线到样品展开完毕后斑点的位置之间的距离与点样线到展开溶剂前沿距离的比值）表示。
 R_f 值的大小与化合物的结构、性质、展开的溶剂系统、温度、展开方式等有关。

黄芩薄层层析图谱

S: a 黄芩素 b 汉黄芩素

1. 黄芩(北京) 2. 黄芩(大庆) 3. 滇黄芩
4. 川黄芩 5. 甘肃黄芩
6. 丽江黄芩 7. 大黄芩 8. 粘毛黄芩

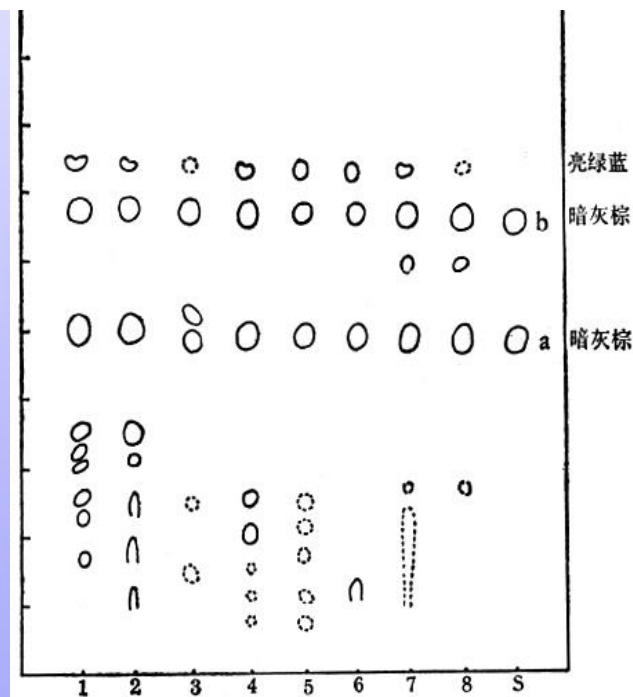
标准品



1 2 3 4

样品

图1 阿莫西林胶囊薄层鉴别图



薄层层析可以分析、
也可以分离纯化制备目标化合物

四. 柱色谱 (Column Chromatography)

✓ 液相色谱 (Liquid chromatography)

吸附色谱法 (Adsorption chromatography)

分配色谱法 (Partition chromatography)

分子排阻色谱法 (Molecular Exclusion Chromatography)

离子交换柱色谱法 (Ion Exchange Chromatography)

亲和色谱法 (Affinity Chromatography)

✓ 气相色谱 (Gas chromatography)

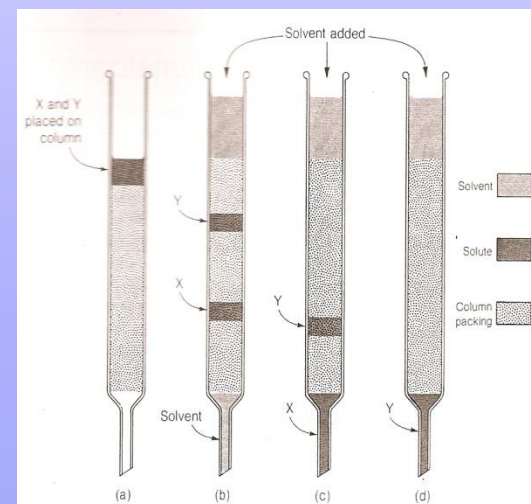
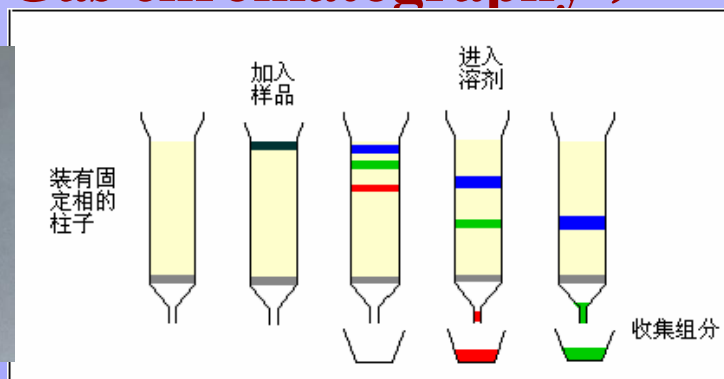
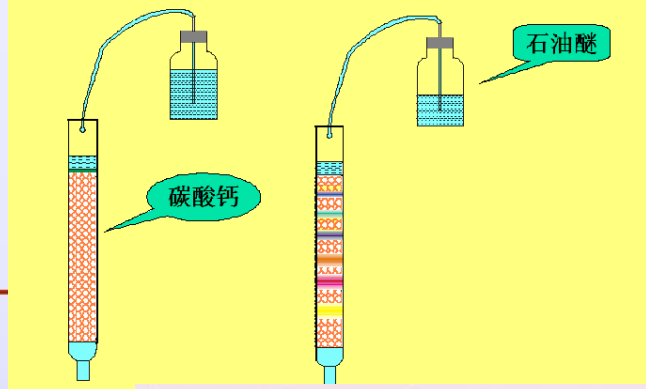


FIGURE 17.1 Illustration of chromatographic separation: (a) mixture of solutes X and Y added to top of column; (b) after solvent has flowed through the column for some time, X and Y are separated on the column; (c) X elutes from the column; (d) Y elutes from the column to complete the separation

柱色谱常用术语



洗脱(**elution**)--流动相携带混合样品经过固定相。

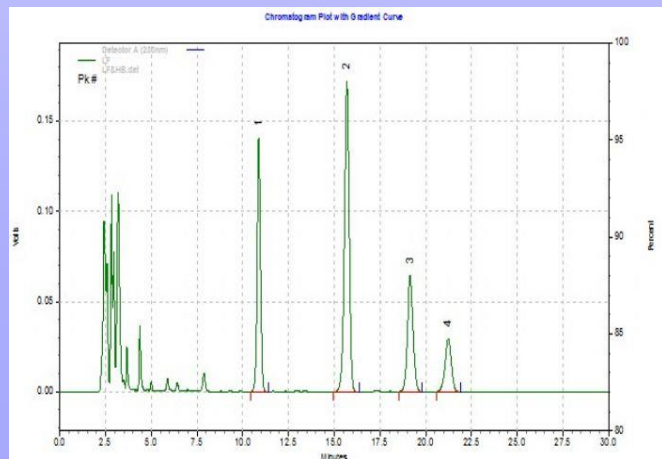
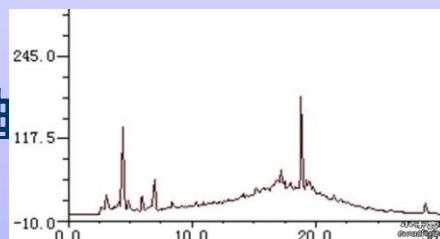
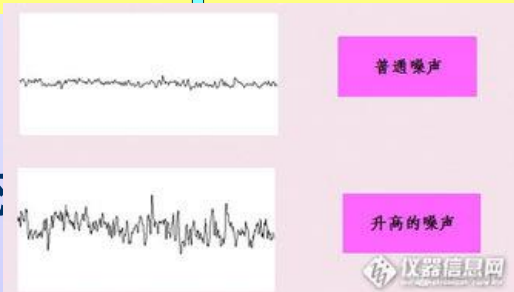
洗脱液(**eluent**)--流动相(**mobile phase**)

色谱图 (**chromatogram**) --色谱柱流出物通过检测器系统产生的响应**信号**对**时间**或流出体积的曲线图。

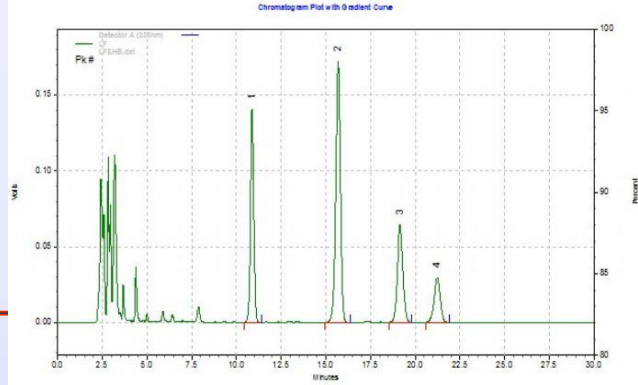
基线 (**base line**) --流动相冲洗柱达到平衡后，检测器测出一段时间的流出曲线。一般应平行于**时间轴**

噪音 (**noise**) --基线信号的波动。通常因电源接触不良或瞬时过载、检测器不稳定、流动相含有气泡或色谱柱被污染所致。

漂移 (**drift**) --基线随时间的缓缓变化。主要由于操作条件如电压、温度、流动相及流量的不稳定所引起，柱内的污染物或固定相不断被洗脱下来也会产生漂移。



关于色谱峰术语



色谱峰 (peak) --组分流经检测器时相应的连续信号产生的曲线。正常近似于对称性正态分布曲线。

峰高 (Peak height, h) --峰的最高点至峰底的距离。

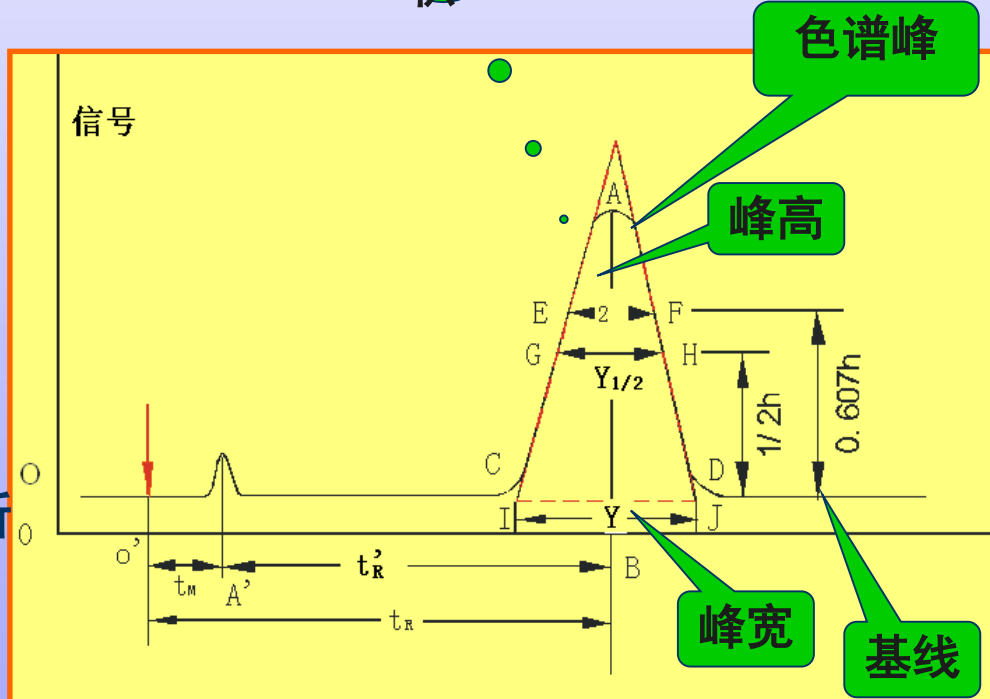
峰宽 (peak width, W) --峰两侧拐点处所作两条切线与基线的两个交点间的距离。

半峰宽 --峰高一半处的峰宽。

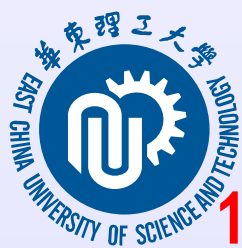
峰面积 (peak area, A) --峰与峰底所包围的面积

保留时间 (retention time, R_t) :被分离样品组分从进样开始到柱后出现该组分浓度极大值时的 时间。Min表示

峰面积



保留时间 (t_R)



1. 吸附柱色谱 (Adsorption chromatography)

1.1 原理：依据吸附剂对混合物中各成分吸附性能的不同，使各成分得到分离。

1.2 常用吸附剂：

硅胶、氧化铝、**活性炭**与聚酰胺。

流动相：有机溶剂配比 \ 有机溶剂、水 配比

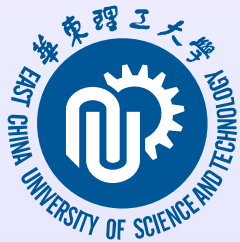
1.3 柱色谱常用的吸附种类：

① 物理吸附：无选择性；吸附与解吸是可逆的；速度快；

实际应用最多。**硅胶、氧化铝、活性炭**

② 半化学吸附：介于物理吸附与化学吸附之间，其吸附力较弱；半化学吸附有一定应用价值。如：**聚酰胺**与黄酮类、醌类等酚性化合物之间的**氢键**吸附属于半化学吸附。

吸附柱色谱分离纯化小分子化合物时常用



1.4 物理吸附的基本规律

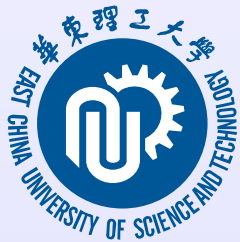
① 常用的物理吸附剂：

✓ 硅胶、氧化铝（**极性吸附剂**）

✓ 活性炭（**非极性吸附剂**）

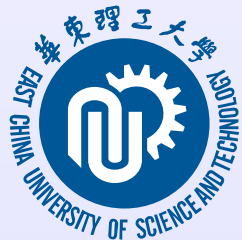
② **极性吸附剂**对极性物质具有较强的亲和能力（**极性强的溶质将被优先吸附**）。

洗脱溶剂极性越弱，则极性吸附剂对溶质表现出的吸附能力就越强；洗脱溶剂的极性增强，则极性吸附剂对溶质的吸附能力随之减弱。溶质即被溶剂置换下。



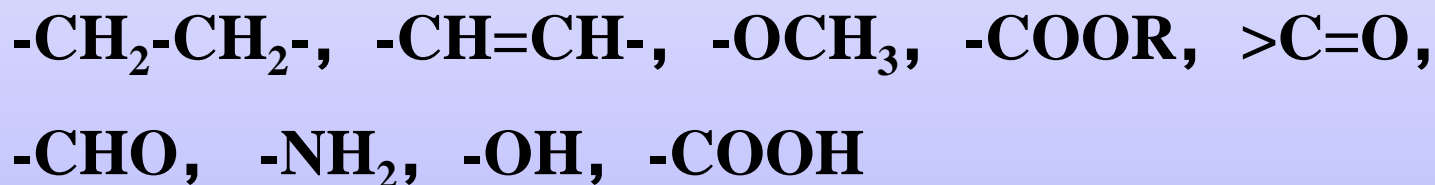
④ **非极性吸附剂**活性炭的吸附能力与极性吸附剂硅胶、氧化铝恰好相反。

- a. 活性炭对非极性溶质在水中表现出较强的吸附能力。
- b. 当洗脱溶剂的极性降低时，则活性炭对非极性溶质的吸附能力随之减弱；
- c. 从活性炭柱上洗脱被吸附物质时，溶剂的洗脱能力将随溶剂极性的降低而增强。



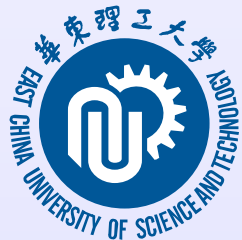
⑤ 极性及其强弱判断

a: 化合物的极性：按下列官能团的顺序增强



极性增强方向

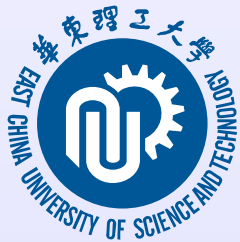
✓ 化合物的极性：由分子中所含官能团的种类、数量及排列方式等综合因素决定。



b: 溶剂的极性:与介电常数大小一致

环己烷	1.88
苯	2.29
无水乙醚	4.47
氯仿	5.20
乙酸乙酯	6.11
乙醇	26.0
甲醇	31.2
水	81.0

极性递增



1.5 吸附柱色谱法在物质分离中的应用

(1) 吸附柱的选择：酸性物质分离宜用硅胶柱，碱性物质分离选用氧化铝柱。

(2) 吸附剂的使用情况

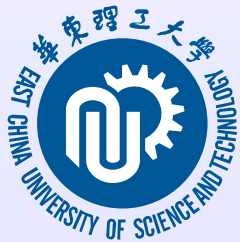
用量： 为样品量的30-60倍

规格： 100目左右

规格： 15:1~20:1（高度:直径）

(3) 装柱：硅胶、氧化铝（**极性吸附剂**）尽可能选用**极性小的溶剂**溶解样品及其装柱。

非极性吸附剂活性炭？



(4) 洗脱剂的选择

- ✓ 单一成分分离时，一般选用TLC展开时使组分 R_f 值达到0.2-0.3的溶剂系统；多成分分离时，多用梯度洗脱。
- ✓ 实际多用两种或以上溶剂混合系统进行洗脱。
如硅胶：常用石油醚：乙酸乙酯系统或氯仿：甲醇系统洗脱；
活性炭，聚酰胺：常用甲醇：水系统洗脱。
- ✓ 分离酸性物质时，常在洗脱溶剂中加入少量醋酸；分离碱性物质时，则在洗脱溶剂中加入少量氨水或二乙胺。

按照极性增强顺序，常用混合洗脱溶剂：

石油醚/乙酸乙酯 → 氯仿/甲醇 → (甲醇/水)

例：硅胶吸附柱色谱

原理：

硅胶层析法的分离原理是根据物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离，一般情况下极性较大的物质易被硅胶吸附，极性较弱的物质不易被硅胶吸附，整个层析过程即是吸附、解吸、再吸附、再解吸过程。

固定相：硅胶

流动相：

极性小的用石油醚：乙酸乙酯系统；极性较大的用氯仿：甲醇系统；极性大的用甲醇：水：正丁醇：醋酸系统；拖尾可以加入少量冰醋酸。





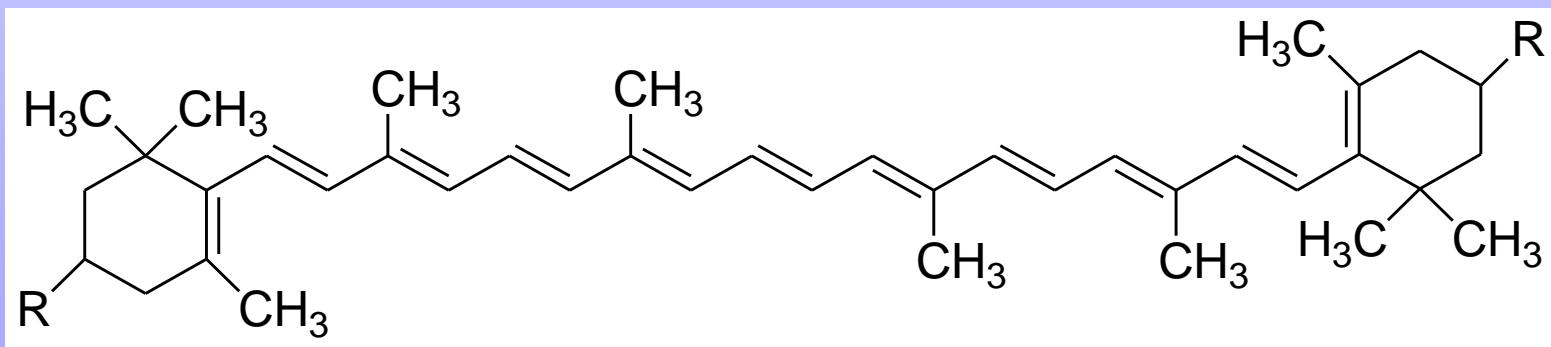
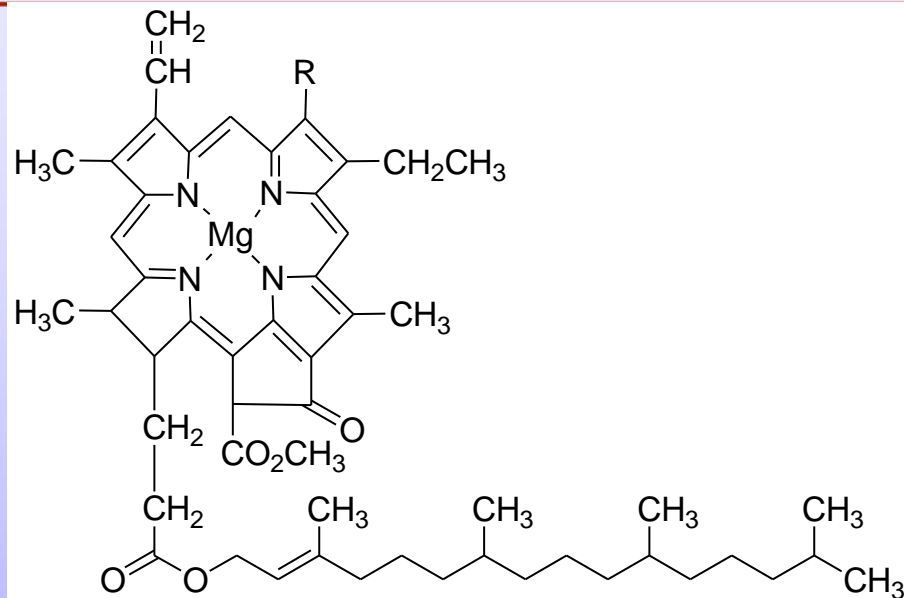
具体操作

- 1. 称量：**100–200目硅胶，称30–60倍于样品量；如果极难分，也可以用100倍量的硅胶H。
- 2. 搅成匀浆：**加入一倍的溶剂用玻璃棒充分搅拌。如果洗脱剂是**石油醚/乙酸乙酯**体系，就用**石油醚**拌；如果洗脱剂是**氯仿/甲醇**体系，就用**氯仿**拌。
- 3. 装柱：**将柱底用棉花塞紧，加入约1/3体积石油醚（氯仿），打开柱下活塞，将匀浆一次倾入，沉降。 **15:1~20:1（高度:直径）**
- 4. 压实：**沉降完成后，加入更多的石油醚（氯仿），平衡柱子。
- 5. 上样：**干法和湿法皆可。上样后，可将一团脱脂棉塞至接近硅胶表面。然后就可以放心地加入大量洗脱剂，而不会冲坏硅胶表面。
- 6. 洗脱和收集：**多用梯度洗脱。人工收集或自动收集器。石油醚：乙酸乙酯系统/氯仿：甲醇系统；1–2g上样量，50g硅胶，20–50ml收一馏分。
- 7. 检测：**TLC\分光光度法/或HPLC检测。 TLC(显色或紫外灯检测)。

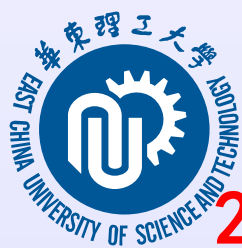
推测植物色素在硅胶柱上出峰顺序

叶绿素a ($R = \text{CH}_3$)

β -胡萝卜素 ($R = \text{H}$)



流动相是石油醚：乙酸乙酯 (2:1)



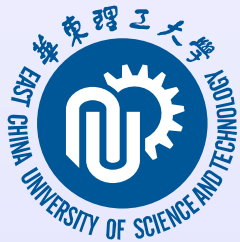
2. 分配柱色谱法 (Partition chromatography)

原理：根据被分离物质在两相不相混容的溶剂间溶解度不同，而具有不同分配系数，从而达到分离。液-液分配。

{ 正相色谱
反相色谱

早期将固定相涂布式涂抹在担体上，易流失，不太用了。

现在多采用将固定相化学键合于担体表面（化学键合相色谱）



正相色谱 (Normal Phase LC, NP-LC) :

是用极性固定相和非极性或弱极性流动相构成的色谱系统。

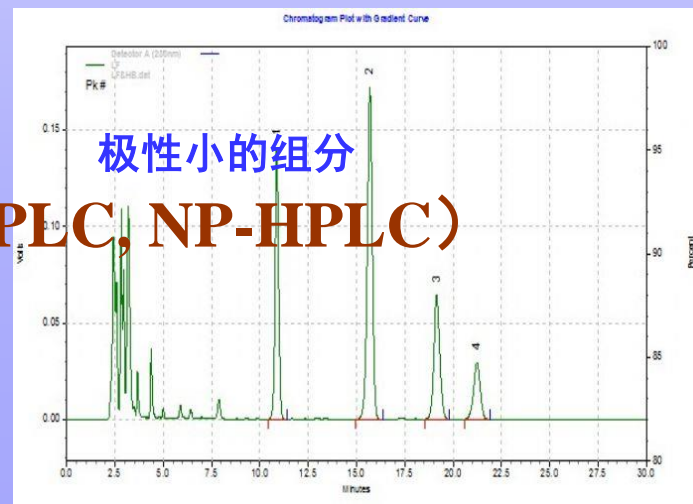
常用的固定相：硅胶与**氰基**、**氨基**键合。

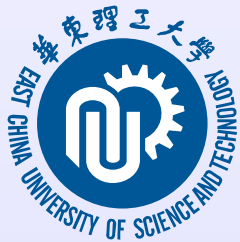
流动相：己烷等有机溶剂或配比，极性小的先出。

固定相极性 > 流动相极性

适用范围：用于分离中等极性或极性较强的分子。如，生物碱、苷类、糖类、有机酸等。

正相高效液相色谱 (Normal Phase HPLC, NP-HPLC)





反相色谱（Reverse Phase LC, RP-LC）：

反相色谱（Reverse Phase LC, RP-LC）：

反相高效液相色谱（RP-HPLC）

是用非极性或弱极性固定相和极性流动相构成的色谱系统。

常用的固定相：硅胶与十八烷（C18, Octadecylsilyl, ODS），

C8（Octyl Silyl, 简称OTS）键合。

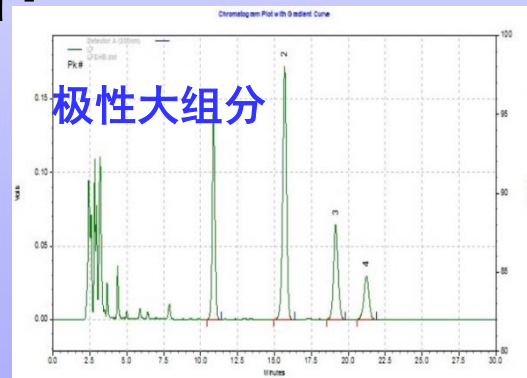
流动相：甲醇-水，乙腈-水。

固定相极性 < 流动相极性

化合物出峰顺序：极性大组分先出。

溶质按其疏水性大小进行分离，极性越大疏水性越小的溶质，越不易溶解于固定相，所以先被洗脱下来。极性越小，后出峰。

适用范围：用于非极性和弱极性组分的分离。



3. 分子排阻色谱法, 凝胶色谱, 分子筛色谱 (Molecular Exclusion Chromatography)

原理: 分子筛, 分子大小。

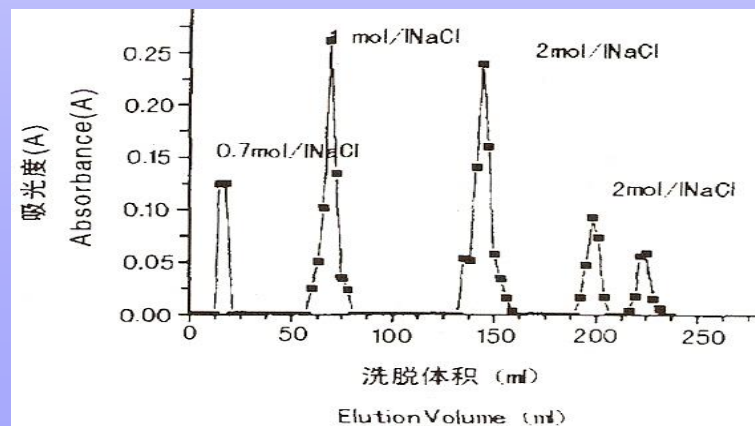
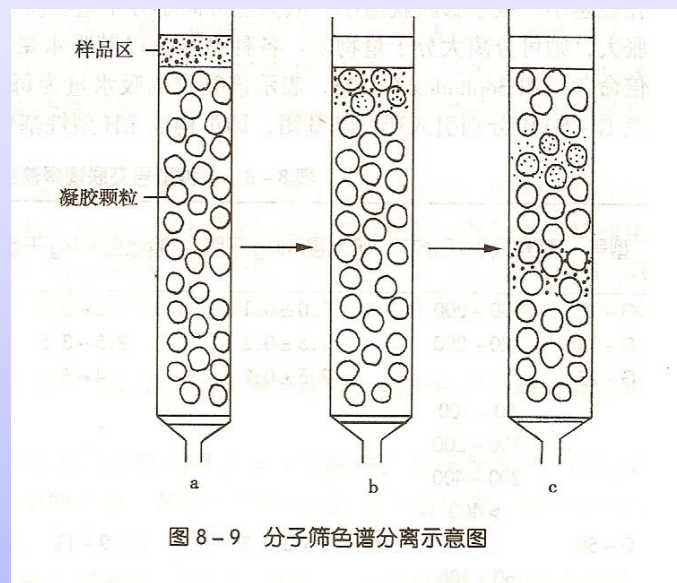
固定相: 葡聚糖凝胶

流动相: 水/甲醇/甲醇: 水

色谱柱内填充具有一定大小孔穴的凝胶。当样品进入色谱柱后, 不同大小的样品分子随流动相沿凝胶颗粒外部间隙和凝胶孔穴旁流过, 体积大的分子因不能渗透到凝胶孔穴里而得到排阻, 因此较早地被流动相冲洗出来。中等体积的分子产生部分渗透作用, 小分子可渗透到凝胶孔穴里去而受阻滞, 这样, 组分基本上按分子大小受到不同阻滞而先后流出色谱柱, 从而实现分离目的。

凝胶色谱采用水溶液作流动相, 称为过滤凝胶色谱 (HFC) **(分离大分子)** Sephadex G

有机溶剂为流动相时, 称为凝胶渗透色谱 (GPC) **(分离小分子)** Sephadex LH-20



常用凝胶的种类与性质

① 葡聚糖凝胶 Sephadex G

◆ 由平均分子量一定的葡聚糖及交联剂（如环氧丙烷）交联而成的多孔网状结构。

◆ 葡聚糖凝胶颗粒网孔大小取决于所用交联剂的数量及反应条件。交联度越大，网孔结构越紧密；交联度越小，网孔结构就越疏松，网孔越大。网孔的大小决定了被分离物质的分子量范围。

◆ 商品用葡聚糖凝胶是根据交联度大小分类，并以吸水量多少表示。

例如：SephadexG-25, G-50, G-75, G-100

后附数字=吸水量 $\times 10$ （每克干胶吸水？克/ml）

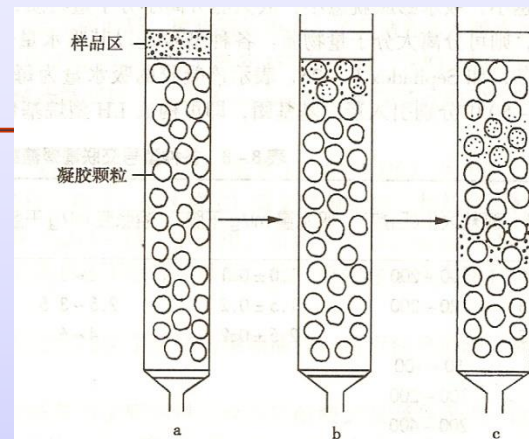


图 8-9 分子筛色谱分离示意图

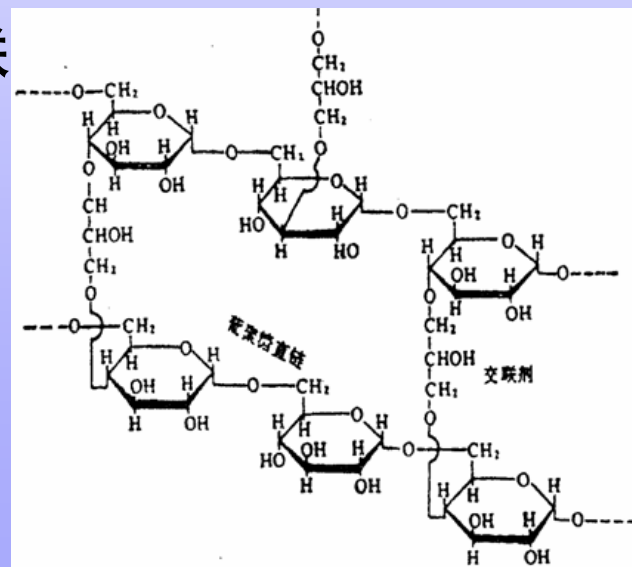
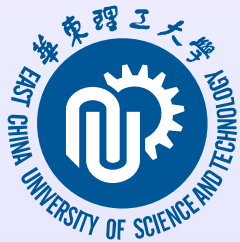


图 17-2 葡聚糖凝胶的基本结构

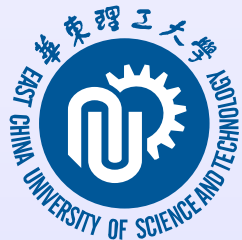


◆ SephadexG-25, G-50, G-75, G-100, 交联度递减, 吸水量递增。

流动相: 水/或缓冲液 (减轻吸附)

分级分离范围:

SephadexG-25,	1000-5000
SephadexG-50,	1500-30, 000
SephadexG-75,	3000-70, 000
SephadexG-100	4000-150, 000



◆ **排阻极限：**是指不能进入凝胶颗粒孔穴内部的最小分子的分子量。所有大于排阻极限的分子都不能进入凝胶颗粒内部，直接从凝胶颗粒外流出，所以它们同时被最先洗脱出来。**排阻极限代表一种凝胶能有效分离的最大分子量，大于这种凝胶的排阻极限的分子用这种凝胶不能得到分离。**例如Sephadex G-50的排阻极限为30, 000，它表示分子量大于30, 000的分子都将直接从凝胶颗粒之外被洗脱出来。

SephadexG-25,	1000-5000（排阻极限为5000）
SephadexG-50,	1500-30, 000（排阻极限为30, 000）

Sephadex G的应用

分离制备亲水性分子： SephadexG 多用于分离蛋白（酶）、多肽、核酸、多糖、氨基酸等亲水性分子（水/缓冲液洗脱）。常选用SephadexG75-200用以分离各类蛋白质。

蛋白质脱盐： 利用盐类小分子可以凝胶进入筛孔中，而大分子蛋白质被排阻在外的原理，得以分离除去。常选用SephadexG10, 15, 25。

分子量的测定： 分子量对数与洗脱体积、分配系数或保留时间成线性关系

常多以V/或Kav对分子量的对数作图得一曲线

$$V = -b \lg M + c$$

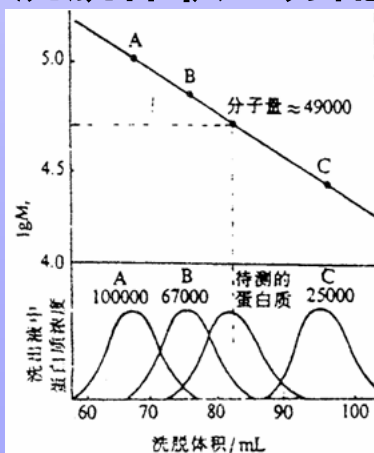
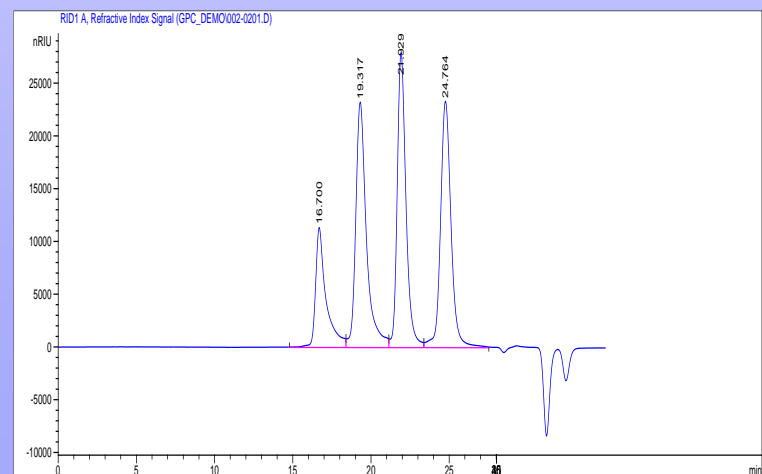


图 17-9

洗脱体积与分子量(M_r)的关系



② 羟丙基葡聚糖凝胶Sephadex LH-20

◆ Sephadex LH-20 为Sephadex G-25 经羟丙基化处理后得到的产物（具醚键形式）。



◆ Sephadex LH-20分子中-OH数量无改变，但碳原子所占比例却相对增加了；

◆ 不仅可以在水中应用，也可在极性有机溶剂或它们与水组成的混合溶剂中膨润使用。

Sephadex LH-20可以反复再生使用。

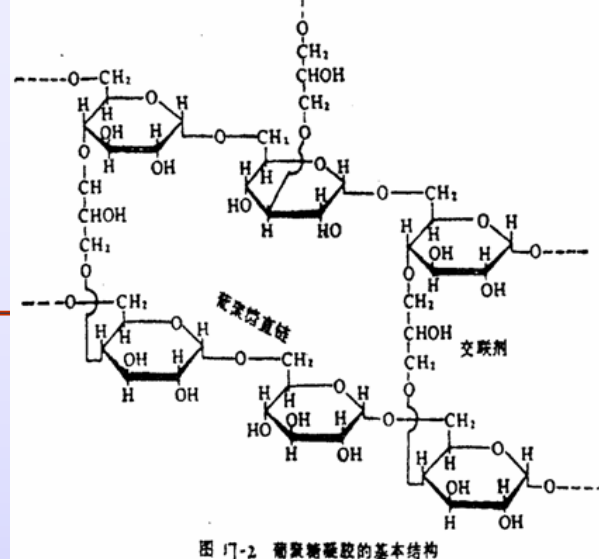
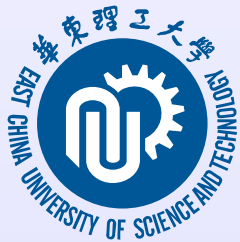


图 17-2 葡聚糖凝胶的基本结构



Sephadex G和 Sephadex LH-20区别：

- √Sephadex LH-20多用于分离亲脂性分子(有机溶剂洗脱/甲醇或氯仿/甲醇：水)。
- √SephadexG 多用于分离蛋白（酶）、多肽、核酸、多糖、氨基酸等亲水性分子（水/缓冲液洗脱）。

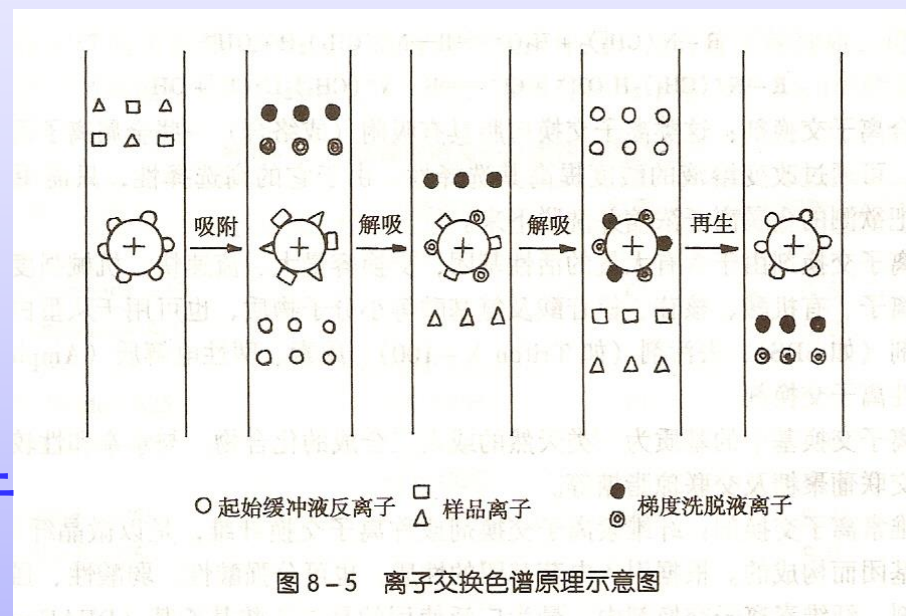
4. 离子交换色谱 (Ion Exchange Chromatography)

固定相: 离子交换剂

流动相: 水或含水溶剂

原理:

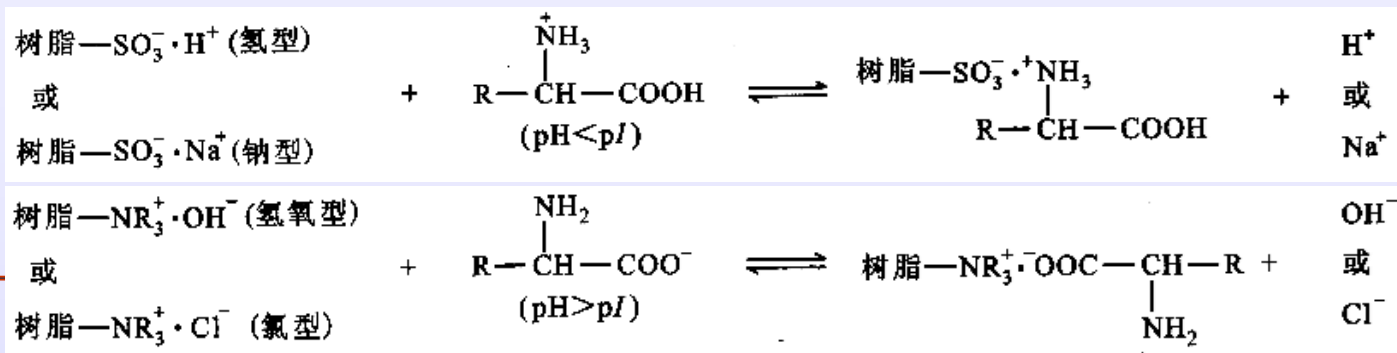
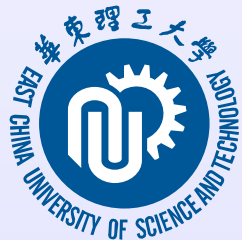
利用被分离组分与固定相之间发生离子交换的能力差异来实现分离。主要用于分离可离子化的成分。



离子交换剂包括两部分:

母核部分: 不溶性高分子化合物, 如树脂、纤维素、葡聚糖等

可解离基团: 可交换基团, 在水溶液中能离解出某些阳离子 (如 H^+ 或 Na^+) 或阴离子 (如 OH^- 或 Cl^-), 可与水溶液中的其它阳离子或阴离子起交换作用。据此可分为阳离子交换剂或阴离子交换剂。

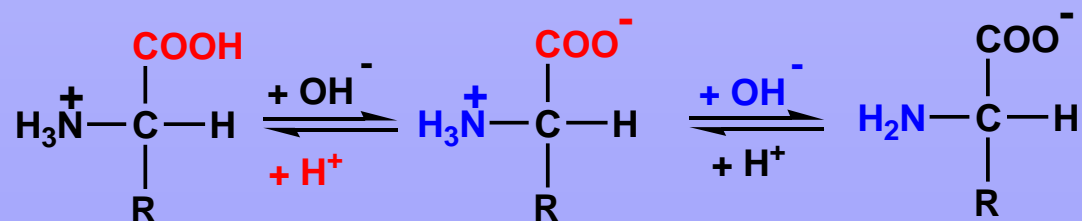


阳离子（酸性）交换基团：磺酸基(-SO₃-H⁺)、羧基 (-COO-H⁺)

阴离子（碱性）交换基团：伯胺 (-NH₂)、仲胺 (-NHCH₃)、季胺 [N⁺(CH₃)₃OH⁻]

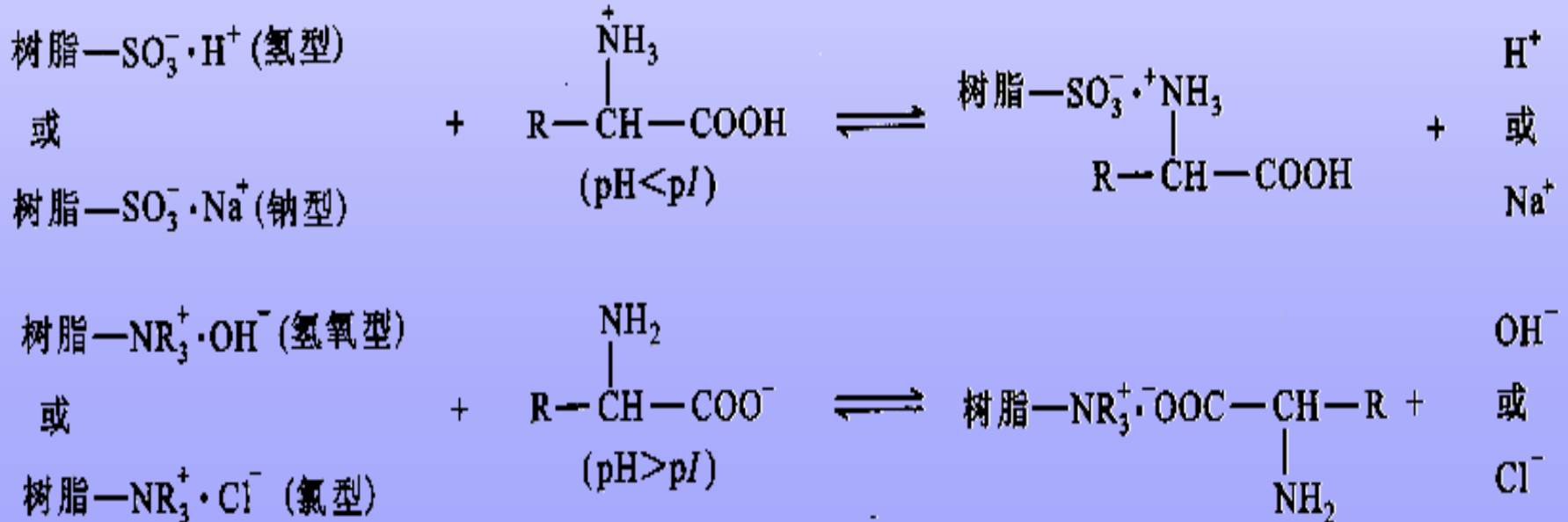
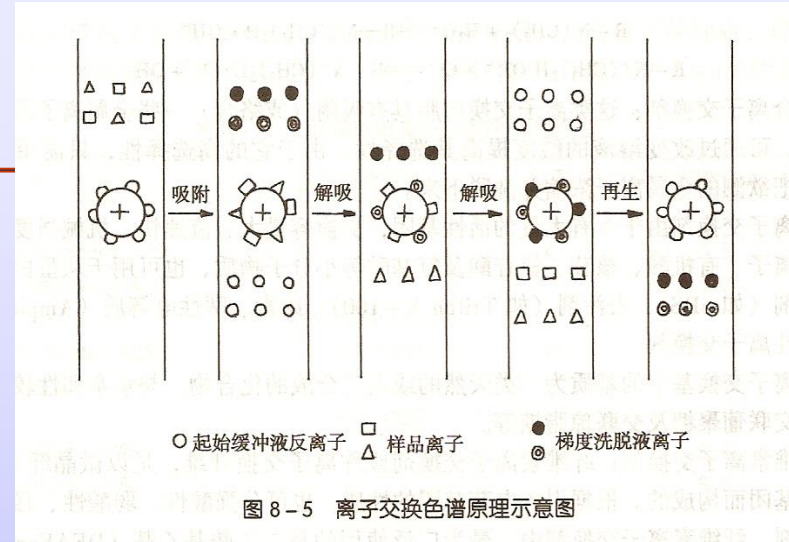
离子交换剂的选择： 主要根据被分离物质在溶液中解离后离子所带电荷性质。

- ✓ 正离子选用阳离子（酸性）交换剂分离
- ✓ 负离子选用阴离子（碱性）交换剂分离
- ✓ 氨基酸、蛋白质、核苷酸等两性电解质，可根据PI值来选择。



当上样后流动相流过交换柱时，中性分子和具有与离子交换基团相反电荷的离子将不被交换从柱子下端随流动相一起流出，而具有与离子交换基团相同电荷的离子则被交换吸附到柱子上，变化流动相洗脱下来，即可达到分离的目的。

带电荷少的，亲和力小，先出柱；
带电荷多的，亲和力大，后出柱；



5. 亲和色谱法 (Affinity Chromatography) :

原理: 利用被分离组分与它的特异性配体间具有特异的亲和力，而达到分离目的。

- ✓ 抗原与抗体
- ✓ 酶与底物或竞争性抑制剂
- ✓ DNA与互补DNA或RNA
- ✓ 激素（或药物）与受体
- ✓ 糖蛋白与相应植物凝集素

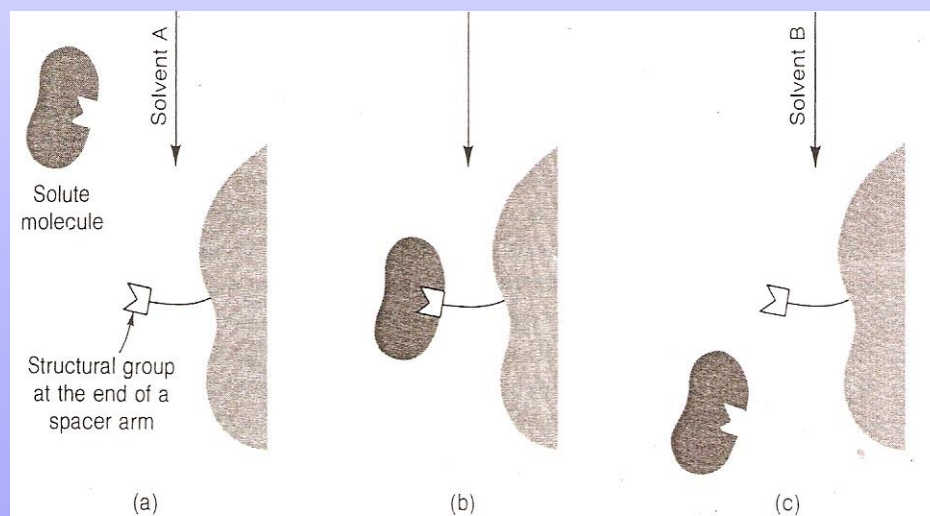


FIGURE 18.10 Affinity chromatography showing (a) solute introduced onto column in solvent A, (b) solute attached to specific binding group on column, and (c) solute eluted from column with solvent B. The binding group on the column is located at the end of a chain of carbon atoms called a spacer arm to avoid steric hindrance by the resin surface that could prevent the solute molecule from reaching the binding group.

基本过程

- **配基固相化**：将与纯化目标成分有特异结合作用的配基，共价结合到不溶性载体上，作为固定相，装柱。
- **亲和吸附**：流动相带将纯化的混合物通过亲和柱，纯化对象被吸附。
- **解吸附**：更换流动相，将吸附在柱上的目标物质洗脱下来。

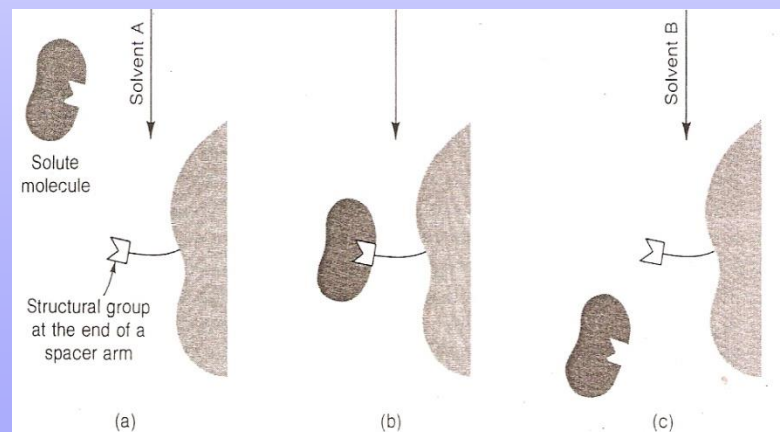


FIGURE 18.10 Affinity chromatography showing (a) solute introduced onto column in solvent A, (b) solute attached to specific binding group on column, and (c) solute eluted from column with solvent B. The binding group on the column is located at the end of a chain of carbon atoms called a spacer arm to avoid steric hindrance by the resin surface that could prevent the solute molecule from reaching the binding group.

思考

柱色谱制备目标成分时, 如何判断是否已经出柱?

