

## 五、色谱分析法的崛起

色谱法又叫色层法、层析法。初时是作为一种分离手段而研究的。其原理是混合物中不同组分在流动相和固定相间具有不同的分配系数，当两相作相对运动时，这些组分在两相间的分配反复多次，从而产生很大的分离效果，使它们得以充分分离。只是到了 20 世纪 50 年代，才开始把这种分离手段与检测系统连接起来，从而构成了一种独特的分析方法。然而这种方法发展极快，成为分析化学中最富活力的一个领域，也成为生物化学和有机化学中广泛应用的一种手段。特别是在有机天然产物的分离和分析中显示了独特作用。

### (一) 色层分离法的产生

化学家们很早就知道，许多物质能从气体和溶液中吸附到固体的表面上。1773 年，舍勒描述了气体在木炭上的吸附，1800 年以前，这个原理被应用到工业上——利用木炭来澄清糖溶液。有机化学家使用骨炭来漂白他们的制品，这至少已经有 150 年的历史了。在染料工业方面，工人们常常通过把一滴溶液点滴到纸上或布上，然后观察作为溶剂的染料组分所形成的圆形环，借助毛细作用向外移动的情况。以此来检验染色浴的质量。德国染料化学家 F·F·龙格 (Runge) 认识到，吸附作用不仅普遍可用于分离染料，而且可用于分离一般有色物质。他证实，无机阳离子可以借它们通过纸和其它多孔物质的不同迁移速度进行分离。他的方法和结果在 19 世纪 50 年代发表的两本书中作了叙述。他的后一本书附有实际的纸上色层谱作为说明。

龙格的工作对申拜恩和他的学生 F·高佩尔斯莱德 (Gopperströder) 发生了影响，1861 年左右他们开始从事毛细分离的研究。高佩尔斯莱德写过几本有关毛细作用的书籍，并对溶解物在多孔物上扩散的速度进行了广泛研究。他试验了几种吸附剂，发现用纸和织物效果更好些。他用硅藻土吸附柱和其它细粒吸附做实验，并观察到像意大利的马泰乌奇所观察到的某种分离作用一样。大约同一时期，英国土壤化学家 H·S·汤姆逊和 J·T·威伊观察到，当把矿物液顺泥土吸附柱从上向下倒入时，各种矿物质就会聚集在柱的不同高度上。1886 年，C·恩格勒 (Engler) 和 M·伯姆 (Boehm) 注意到，当烃类通过活性炭吸附柱时，其中的不饱和烃被挡住了，而饱和烃却随流出液移动，这一观察结果在德国被用来生产石油冻。尽管还有几位研究者报道了有关染料、矿物和其它材料的同样观察情况，但在 19 世纪期间，对该项技术的注意并不广泛和普遍。

1897 年，美国地质勘探局的一位石油化学家 D·T·德伊 (Day) 假定，世界不同地区的石油组成不同，因为岩石被石油渗过后会吸附各种物质成分。德伊使石油通过填有硅藻土和其它吸附剂的吸附柱时，观察到物质组成在通过吸附柱时会发生改变，石油的不同组分出现在柱的不同高度位置。他于 1900 年在巴黎举行的第一次国际石油会议上报道了这一结果。德伊观察到，柱吸附不仅在石油研究方面，而且在普通化学分析方面都是很重要的。这种方法不久就被美国、俄国和德国的石油化学家开始采用。恩格勒和 E·阿布雷希特 (Albrecht) 进行了广泛的研究，他们用在一个在不同高度安有许多出口的吸附柱，由出口排出样品，可研究物质的沸点、密度和粘性的变化。

1900年，俄国的K·克维特卡(Kvitka)发明了一种包括吸附法的分馏操作法，并因此获得巴库技术委员会的证书。

M·茨维特(Tswett, 1872—1919)在用色层法分离植物颜料方面作出过贡献。他出生在意大利，母亲是意大利人，父亲是俄国人。他曾在瑞士学习，并在华沙和俄国教育中心城市从事过研究和教学工作。作为一名植物学工作者，他对植物颜料很感兴趣，但他所受的物理化学训练却使得他把吸附作用用作了一种分离技术。他深刻地感到石油醚很不适用于由植物细胞组织中萃取颜料。尽管植物颜料易于溶解在这种溶剂里，他在1903年发表了一篇很少有人知道的论文，文中推断，植物细胞组织对颜料有很强的吸附作用，因而不易被石油醚萃取。他确信，这种萃取可以用醇或甚至用加有醇的石油醚来进行。

茨维特证实，萃取后的颜料在石油醚中会受到滤纸的强烈吸附，这就支持了他的吸附假说。当往里面加入少量醇后，石油醚才能从滤纸中萃取出相当数量的颜料。于是，滤纸与植物细胞组织一样也对颜料有吸附作用。接着茨维特试验了一百多种化学物质对叶绿素萃取物的吸附能力，他还研究了某些天然和合成染料以及卵磷脂的吸附作用。茨维特研究看来已受到戈佩尔斯莱德的影响，但并没受到他的同代人工作的影响。

1906年至1914年间，茨维特进行了有关叶绿素及伴生的叶黄素和叶红素的广泛研究。他在1906年发表的著名论文里谈到，当这种溶液通过一个碳酸钙吸附柱时，会将石油醚萃取液中的颜料分离出来。叶红素和叶黄素是作为有色带出现的，这些带可以用醇分离出来。茨维特极热心于柱色层法，但却没能引起人们多大注意。1916年，德雷(Dhéré)和韦吉齐(Vegizzi)把柱色层法用于叶绿素研究中。1920年左右，明尼苏达的L·S·帕尔默(Palmer)在他的类叶红素的广泛研究中利用了一些这方面的技术。

到了1931年，吸附色层法的真正价值由于柏林的威廉皇帝研究所的C·库恩(Kuhn)及其同事的工作成果而得到了公认。他们在有关叶红素和叶黄素的研究中利用了这种工具，使它在一段时期里受到人们的普遍注意。这个时期正是对维生素和其它生物活性物质发生浓厚兴趣的时期。他们证实，活性铝土是一种用途广泛的吸附剂。30年代期间，几位有机和生物化学家，如卡勒尔、文道斯、鲁济卡、温特斯坦、海尔布伦、崔斯曼斯特和维尔施泰特，在把色层法发展成为一种有用的分离工具方面作出了突出的贡献。它在处理有色化合物时很快就显示出有效性。它还被应用到混合物的分离、痕量物质的提浓和均匀性的检验方面。化学家们终于掌握了处理无色物质的各种技术。

## (二) 正面分析和置换展开

正面分析和置换展开是A·蒂萨留斯(Tiselius)及其同事，特别是S·克雷森(Claesson)，在40年代初介绍的色层法技术。正面分析就是连续测定流出柱的液体的折射率。然后以折射率对体积绘制曲线，记录组分通过柱的移动情况。一开始测出的是溶剂的折射率，因为柱上的固体足够多，可将全部溶质吸附住。后来折射率发生了改变，吸附的最不牢固的溶质就开始与吸附剂分开，穿流过去，接着各种溶质相继流过去。这种方法不仅已经用于分离，而且用到了脂肪酸及其酯和脂肪醇那样一些混合物的定量分析中，蒂萨

留斯及其同事原先是用此法来分离碳柱上的糖和蛋白质分裂产物的。

置换展开在原理上类似于正面分析，它利用一种溶液进行展开，这种溶液含有一种比柱上已吸附的物质更易被吸附的溶质，层带随着柱的展开同时向下移动。排出的溶液如正面分析一样进行分析。这个技术的优点是，连续层带随着前后带流过去后，所含的杂质比正面分析所含的要少。

### (三) 离子交换

离子交换物质很早就以绿砂那样一些天然硅酸盐形式为人们所知了，它们最早被用作再生水软化剂。自 1930 年以来，化学家们已经成功地制出了具有离子交换性质的合成树脂。这种树脂常被用在离子交换柱上，在进行某些分离时极其有效。

在第二次世界大战期间，离子交换树脂被很有效的用于从核反应堆中分离裂变产物。其中许多裂变产物处在周期表的稀土金属区，它们的分离极其费时费事。在使用了阳离子交换树脂后，才使得这些分离工作大有进展。1947 年，E·R·汤普金斯 (Tompkins)、F·H·斯佩丁 (Spedding)、G·E·博伊德 (Boyd)、L·S·迈尔斯 (Myers)、J·A·艾尔斯 (Ayres) 及其合作者发表了一系列论文，介绍这一工作的成果。他们使用能与稀土元素离子络合的柠檬酸盐，并细心地控制 pH 值，从而得到很好的分离效果。衣阿华州立学院核研究所的斯佩丁等人采用离子交换方法对稀土元素进行了大规模的分离实验。芝加哥附近的林德赛化学公司利用类似的方法进行了商品生产。对无机化学作出了杰出贡献。

1947 年，蒂萨留斯、德雷克 (Drake) 和哈格达尔 (Hagdahl) 在离子交换树脂上将氨基酸分离成碱性、中性和酸性几种不同类型。甚至更早时，布洛克 (Block) 就成功地在磺酚阳离子交换树脂 (一种进行阳离子交换的磺化酚醛树脂) 上进行了类似的分离操作。

40 年代末，由于原子能工业需要分离裂变产物给离子交换树脂工业以极大推动，各种型号的树脂研制出来。1947 年，美国克林顿 (Clinton) 研究室的凯特尔 (B.H.Ketelle) 等在强酸型 Dowex—50 (美国 Dow 化学公司商品型号) 树脂上分离了稀土。众所周知锆钍分离曾是化学上的难题。1948 年美国加州大学的西博格 (G.T.Seaborg) 和斯特里特 (K.Street Jr) 在 Dowex-50 型树脂上分离锆—钍，回收了 66% 的钍，其中锆含量小于 0.1%；1949 年，美国橡树岭实验室的克劳斯 (K.A.Kraus) 和赫夫曼 (E.H.Huffman) 也分别用其他类型的树脂和介质条件分离锆—钍成功。这是离子交换技术对无机化学的又一重大贡献。

1950 年，美国科学家维尔纳 (L.B.Werner) 等利用 pH 为 3.5 的柠檬酸缓冲液在 Dowex-50 树脂上分离了 Am 和 Cm；同年，斯特里特也用这种树脂以 3.3 摩/升盐酸为洗提剂使 Am 和 Cm 与稀土的混合物分离；同年，美国加州大学的汤普森 (S.G.Thompson) 等则将 Bk 与 Cm、Am、Pu 分开。Nb、Ta 和 Pa 的分离也是长期以来困扰人们的难题，1948 年 K·A·克劳斯和 G·E·摩尔 (Moore) 在 Dower-1 型树脂上分离了 Nb 与 Ta，Zr 与 Nb 的氟络合物。1953 年他们又用这种方法使 Zr、Pa 和 Nb、Ta 得以分离。

由于离子交换树脂在一系列疑难的分离课题中显示出了非凡的功能，从而促使科学家们对离子交换机制和交换平衡的理论开展研究。1940 年美国加

州理工学院的化学家 J·N·威尔逊 (Wilson) 和德·沃尔特 (D.De Vault) 分别推导出层析吸附的数学式。1941 年, 英国里兹的化学家马丁 (A.J.P.Martin) 和辛格 (R.L.M.Synge) 提出了与分馏类似的柱体理论, 并进行“理想塔板”数的计算。1947 年, 美国克林顿实验室的 S·W·迈厄尔 (Meyer) 等计算了在溶解的与被吸收的溶质之间达到平衡过程所需的柱长。1955 年, 英国哈韦尔 (Harwell) 原子能研究所的格留考夫 (E.Gluckauf) 对他们的计算加以修正, 列表指出分离产物的纯度是分离因数的函数。

#### (四) 分配色层法

分配色层法是 A·J·P·马丁 (生于 1910 年) 和 R·L·米林顿·辛格在 1941 年采用的。1938 年, 辛格在研究乙酰氨基酸时观察到, 这些氨基酸在氯仿和水之间的分配系数明显不同。马丁曾在那以前研制出一种用于维生素纯化的逆流萃取器。他们进行合作尝试在两种逆向流动的溶剂间分配氨基酸以便分离它们, 但这没有成功。后来他们发现, 如果使水吸附在硅胶上保持水相不动, 只许氯仿相流动的话, 分配过程就可顺利进行。他们还发现, 如果使用甲基橙那样的不溶于氯仿的指示剂, 就有可能检测到乙酰氨基酸在柱上的层带。

这项技术不久就被伊舍伍德用来分离富马酸、琥珀酸、草酸、苹果酸、柠檬酸和酒石酸。在分离过程中使用了氯仿—丁醇作为流动相, 稀硫酸作为固定相。列维和他的同事们则利用这一技术来分离青霉素。美国食物药品局的拉姆赛和帕特逊将分配色层法用于分离六氯环己烷和  $C_5—C_{10}$  脂肪酸。他们开辟了非水体系分配色层法, 一方面在硅胶和正己烷上使用硝基甲烷进行分离, 另一方面在硅胶和三甲基戊烷上使用甲醇进行分离。

1943 年, A·H·戈登、马丁和辛格在硅胶上进行某些氨基酸的分离时遇到了困难。他们转而研究其它像淀粉和纤维素那样一些吸水物质。他们使用外围被水蒸气饱和了的滤纸, 分离了各种氨基酸混合物, 并通过用茚满三酮喷射和加热检测了这些氨基酸的位置。

纸条层析法从此迅速发展起来。1944 年, R·康斯登与戈登和马丁一起提出了一种二维技术, 用来实现难结合物的分离。依此法先在一张方形滤纸的一个角上点滴试验物质, 如蛋白质水解产物, 然后用适当的溶剂展开。这样各种组分就沿着滤纸的边缘扩散, 待干后, 将滤纸转九十度弯。改用第二种溶剂展开。结果, 第一种溶剂不能分离的组分经第二种溶剂就被分开了。康斯登及其同事先用苯酚和水, 接着再用可力丁和水, 对二十多种氨基酸进行展开。从而确定了他们的位置。

帕特里奇采用纸条层析法鉴定还原糖, 并用硝酸银的氨溶液来显露色带。古达尔和列维利用纸上层析法分离青霉素, 通过把滤纸放在接种有枯草杆菌 (*B.Subtilis*) 的琼脂培养基上, 确定了每种活性化合物的位置。这种方法借助观察青霉素点邻近的抑制生长程度而改进成一种定量试验。纸上层析法也有了其它各种用途, 包括无机阴、阳离子混合物的分析, 但它主要用于定性分析工作中。

马丁和辛格因在 1941 年发明了分配色层法特别是纸上色层分析法而共享了 1952 年诺贝尔化学奖。这种方法在生物化学和分子生物学革命中将成为一种基本的分析工具。用这种方法辛格弄清了简单的蛋白质短杆菌肽

(Gramicidins) 的结构, 找出了几种氨基酸在这种分子中的次序。很快就证明, 这项工作对于 F·桑格阐明在胰岛素分子中氨基酸的排列次序有巨大作用。但是马丁本人对他们贡献的评价却不那么高, 他指出: “整个思想都很简单, 如果人们的思想都能指引到这一思路上的话, 大概早在一个世纪以前这个方法就盛行了。”

## (五) 气相色谱

气相色谱或蒸气相色谱自从 1952 年英国的 A·T·詹姆斯 (James) 和 A·J·P·马丁提出以来已经获得了非常迅速的发展。它实际是分配层法的变种, 不过其中有一相改为气相罢了。德国的 G·黑塞 (Hesse) 早在 1941 年就采用过气态组分的色层吸附法, 然而把蒸气相色谱发展成为一种有效的分析工具的则当推詹姆斯和马丁。他俩用硅酮油和硬脂酸作为液相, 硅藻土作为液相的载体, 分离和分析了挥发性脂肪酸, 使乙酸、丙酸、异丁酸、正丁酸、—甲基戊酸、X—甲基戊酸和正戊酸依次与作为载体的氮气分离。而流动气带走的各种酸的量可由自动记录滴定管来测定。

詹姆斯和马丁把这一方法推广到氨、甲胺、挥发性脂肪胺和吡啶的同系物的测定中。这种技术很快就被其他实验工作者采用。它在分析挥发性高的烃混合物时极为有用, 并已成为石油工业中一种重要的分析工具。随着高温色谱柱的发展, 这种技术被推广到挥发性低的混合物, 如脂肪酸酯类的分析中。

气相色谱应用范围的扩大是随着新的检测装置的采用而来的。匈牙利的 J·詹纳克 (Janak) 采用了测氮管。热导管获得了最广泛的应用。匈牙利的 S·克雷森 (Claesson) 使用了气体密度天平, 并由詹姆斯和马丁对它作了进一步的改进。A·E·马丁和 J·斯马特采用红外气体检测器。其他技术包括氢焰离子化、表面电势、放射性、流动阻抗和比热的检测, 其中流出气体的变化都自动记录的。

气相色谱的发展是高效分离的突破口。所谓高效是指既有高度分离能力, 又能在较短的时间内完成分析, 是分离能力和分析时间的统一。气相色谱理论和实践的发展, 充分认识了物质在色谱过程中的迁移规律 (扩散过程), 根据对保留值和对柱效率的热力学和动力学过程的描述, 提出了柱效率、分离度、峰容量和选择性等的表达关系式, 从而提出了最佳色谱条件和最佳分析时间影响参数的选择依据。

根据气相色谱的理论, 早在 50 年代末 (1957), Golay 就指出以开口空心柱 (毛细管柱) 为基础结构的高效气相色谱系统, 并获得了实践证明。但经过了 10 余年的不断探索, 才有了较快的发展和广泛的应用, 成为气相色谱的一个重要成员。

毛细管柱气相色谱的总柱效 (以柱长为 30m 计算) 可达到十几万理论塔片, 与填充柱气相色谱的差别主要是渗透性的差别。

高效液相色谱是在 70 年代初, 在气相色谱的理论发展基础上发展起来的一种高效分离方法。其高效的来源是采用了粒径小而均匀的填料, 其柱效率至少要比经典法高出 3 个数量级。物质在液体中的扩散系数比在气体中小 4 个数量级, 因此在液相色谱中这个影响柱效的参数可忽略不计, 这也是对高效的一个贡献。在气相色谱中, 流动相和固定相之间的相互作用可以忽略,

但在液相色谱中却是很重要的因素，是获得高选择性分离的重要依据。从这个意义上讲，液相色谱的应用范围远广于气相色谱。

高效气相色谱和高效液相色谱的发展奠定了现代高效分离技术的基础。

## (六) 高效色谱分析进展

高效色谱分析。一般认为，气相色谱已处于“成熟”阶段。但是对毛细管柱的制备，特别是新型高选择性耐高温固定相仍是值得注意的发展动向，例如固定化固定相 (immobilized stationary phase) 的研究可使气相色谱发挥更大的威力，目前已报道可分析 100 个碳原子的烷烃和三甘油酯类化合物。

特别要指出，当前在实际分离分析中，气相色谱是应用面最广和最普及的一种分离技术。除了大分子量 (> 2000) 化合物以外，其它如环境中的有害有机污染物，生理过程中医药及其代谢物，超纯物的杂质等，气相色谱的应用研究仍有值得重视的动向。由于气相色谱易于与其它样品预处理技术结合，使它在痕量物质的分离分析中仍具有举足轻重的作用。

在我国，近年来，气相色谱仪的增长量是 3000 台/年，其中约 1/3 属进口；这个数目远远超过其它分离分析工具。

高效液相色谱的蓬勃发展高峰期似乎已成过去，现正处于深入巩固、扩大战果的阶段。充分利用流动相的选择性相互作用已经发展出了反相色谱、反相离子对色谱、胶束色谱等。离子型物质和大分子物质的分离是液相色谱应用研究的热点。手性固定相的合成 (包括气相色谱手性固定相) 和流动相中手性试剂的添加使光学异构体在色谱柱上的拆分成为可能，这方面的发展正在方兴未艾之中。可以预计，选择性色谱柱和选择性流动相的应用和发展仍是今后若干年里高效液相色谱的一个主攻方面。

细径柱 (microbore column) 是高效液相色谱的一个新发展，目前 1mm—2mm 内径者已有商品，前几年还发展了 3 $\mu$ m 颗粒的高效填充，近来还报道了 1.5 $\mu$ m 填充的高效柱，但由于流动相的低扩散系数，限制了柱径和分析时间。近年来，毛细管柱液相色谱的研究正在逐步深入中，不久将来，将有所突破。此外，在细径柱上，只允许很小的样品进样量，使得要求有更高的检测灵敏度以及更小的死体积。要使 HPLC 能用更细的柱子，以更短的分析时间完成高效的分离分析尚需有一系列突破性的发展。细柱径的合理开发使 LC/MS 联机分析较易实现。

尽管高效色谱技术，可以对付不少复杂系统的需要，但仍有很多场合，单靠一根色谱柱和一只检测器难以解决问题。多维色谱 (poly-dimensional chromatography) 为解决这个难题提供了一个新的途径。多维色谱实际上是色谱本身的联机，结合不同色谱操作形式、不同检测系统，并附加反应、捕集、反冲、循环等辅助系统大大提高了色谱分析的选择性和峰容量，GC—GC，LC—LC 的联机已有一定的研究，LC—GC 技术则正在发展阶段。LC—GC 的开发并由此而组成的色谱系统分析网络将对复杂系统有机痕量物质的分离和分析迈出新的一步。

多维色谱与 MS、FTIR 或其它结构分析手段联机将可形成更完整的有机物系统分析体系。

在实际分析工作中，样品的前处理包括富集是非常重要的一个环节，在

痕量分析中尤为如此。加强这方面的研究已为今日分析化学家们所共识。