

影响逆流色谱分离效率的动力学因素*

赵永宏 金绿松

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 逆流色谱是一种无固态支撑物的液液色谱, 它的色谱动力学过程有其特殊性, 分析逆流色谱的动力学过程, 推导适用于逆流色谱的速率方程式, 结合实验, 讨论影响色谱峰展宽的因素; 理论推导和实验的结果都显示, 管径、容量因子、质量传递系数和流动相液滴的直径和线速度是影响逆流色谱峰展宽的主要因素。

关键词 逆流色谱, 动力学, 离心

逆流色谱是由 Ito^[1] 建立的一种无固态支撑物的液液色谱, 可用于分离生物活性物质和稀土元素等, 根除了固态支撑物所导致的非特异性吸附、样品失活等缺点。张天佑等对逆流色谱仪器进行了一系列的改进^[2], 并同蔡定国、方起程等将逆流色谱用于天然产物特别是中草药的成分分离^[3], 显示了良好的发展前景。在色谱过程中, 动力学因素对色谱峰的宽度起决定作用, 严重影响柱效率和分离效果。在逆流色谱过程中, 没有固态支撑物存在, 其流动相与固定相的形状和状态与通常的液相色谱有很大的不同, 其色谱动力学过程更为复杂; Fedotov^[4]、Armstrong^[5] 和 Menet^[6] 等对影响逆流色谱分离效率的一些动力学因素分别进行了研究, 但对逆流色谱动力学的全面分析还未见报道。本文运用随机行走模型^[7] (random walk model) 以及质量平衡方法, 全面分析逆流色谱动力学过程, 推导各个因素对峰展宽的贡献, 结合实验的数据讨论所导出的结论, 对逆流色谱仪器的设计、溶剂系统的选择和实验参数的优化有指导意义。

1 理论分析

在逆流色谱系统中, 多数情形下流动相是以液滴的形式穿越固定相。本文研究的即是流动相液滴穿越固定相时的动力学过程, 先不考

虑柱的具体形状, 按直柱来分析, 如图 1 所示。

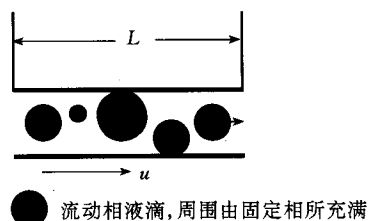


图 1 逆流色谱柱内流动相和固定相状态示意图

1.1 固定相中的涡流携质发散项 H_1

流动相液滴穿越固定相时, 会扰动固定相产生涡流, 不规则的涡流会导致携质发散。管壁对涡流起限制作用, 步长 s 与管的直径 d_c 成正比, 步数 n 应为溶质在固定相中停留的总时间 T_s 与每步所需时间 t_s 之比

$$s \propto d_c$$

$$t_s \propto d_c / u$$

$$T_s = kL / u \quad (1)$$

k 表示容量因子, L 为柱长, u 表示流动相的线速度;

$$n = T_s / t_s \quad (2)$$

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1996-04-28, 修回日期: 1996-07-15

$$\therefore n \propto kL/d_c$$

$$\therefore \sigma_1^2 = \lambda_s kLd_c \quad (3)$$

$$H_1 = \lambda_s kd_c \quad (4)$$

λ_s 为一修正因子, 应由具体的逆流色谱系统确定其值.

1.2 因流动相液滴的线速度不同导致的 H_2

不同大小的液滴的线速度也不相同, 速度快的液滴追上速度慢的液滴而融二为一, 大的液滴又会一裂为二, 这两种现象频繁发生, 步长 s 与液滴的平均直径 d_m 成正比, 步数应为溶质在流动相中的总停留时间 T_m 除以每步所需时间 t_m , 由此推导可得:

$$H_2 = \lambda_m d_m \quad (5)$$

λ_m 为一修正因子, 应由具体的逆流色谱系统确定其值.

1.3 固定相中的分子扩散项 H_3

溶质从高浓度区向低浓度区的扩散会使色谱峰展宽, 根据 Fick 第二定律中 Einstein 关系式:

$$H_3 = 2 \gamma_s kD_s / u \quad (6)$$

γ_s 为修正因子, D_s 代表溶质分子在固定相中的扩散系数.

1.4 流动相中的分子扩散项 H_4

与固定相中的分子扩散相基本相似, 类似的可得到:

$$H_4 = 2 \gamma_m D_m / u \quad (7)$$

γ_m 为修正因子, D_m 为溶质分子在流动相中的扩散系数.

1.5 固定相中的传质阻力项 H_5

固定相中的溶质分子必须扩散到两相界面时才能进行分配交换, 这会导致谱带扩散. 以 τ_s 表示一次扩散所需时间, 步数 n 应为 T_s/τ_s , 以 d_s 表示溶质在固定相中扩散的深度, 可得:

$$\sigma_5^2 = \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_s^2}{2D_s} Lu \quad (8)$$

扩散深度 d_s 正比于流动相液滴直径 d_m ,

$$H_5 = Q_s \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_m^2}{2D_s} u \quad (9)$$

Q_s 为比例系数, 由具体色谱系统决定.

1.6 流动相中的传质阻力项 H_6

类似于固定相中的传质阻力项, 可以得到:

$$H_6 = Q_m \frac{k^2}{(1+k)^2} \frac{d_m^2}{2D_m} u \quad (10)$$

Q_m 为一比例系数.

1.7 两相界面的传质阻力项 H_7

溶质分子在两相之间的质量传递速度的快慢, 会显著地影响色谱峰的展宽. 对这一项的处理运用质量平衡的方法, 不考虑扩散作用, 只考虑两相之间的传质, 溶质通过界面单位面积的流量由 $k_f(C_m - C_s/k_D)$ 表示 (k_f 为质量传递系数), 假定溶质是以浓度 $C_{m,0}$ 和持续时间 δ_t 的脉冲形式被引入的. 先列出质量平衡方程, 进行拉普拉斯变换求解可得:

$$H_7 = \frac{k^2}{(1+k)^2} \frac{2(1-R)}{k_f A} u \quad (13)$$

R 表示固定相保留比, A 代表单位柱容积的两相界面面积. 当流动相液滴的直径为 d_m 时, $A = 6(1-R)/d_m$.

1.8 理论塔板当量高度 H

将上述七项相加, 并考虑柱外峰展宽项 H_e , 可得:

$$\begin{aligned} H = & H_e + \lambda_s kd_c + \lambda_m d_m + \\ & 2 \gamma_s kD_s / u + 2 \gamma_m D_m / u + \\ & Q_s \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_m^2}{2D_s} u + Q_m \frac{k^2}{(1+k)^2} \frac{d_m^2}{2D_m} u + \\ & \frac{k^2}{3(1+k)^2} \frac{d_m}{k_f} u \end{aligned} \quad (14)$$

由于 D_s 和 D_m 的数量级为 $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, 所以在通常的流速下 H_3 和 H_4 很小, 可以忽略, 由于固定相涡流和流动相液滴的融合分裂有使溶质在两相内部的浓度分布趋向均匀的作用, 所以应考虑 H_1 和 H_5 、 H_2 和 H_6 的偶和项, 上式成为:

$$\begin{aligned} H = & H_e + \frac{1}{1/H_1 + 1/H_5} + \\ & \frac{1}{1/H_2 + 1/H_6} + H_7 \end{aligned} \quad (15)$$

2 材料和方法

2.1 实验装置

CCPC 仪器装置^[8], 由 YSB-2 型平流泵 (中国科学院上海分院科学仪器厂) 送液, 经进样器后进入离心逆流色谱柱 (聚四氟乙烯管绕制), 用 8832-UV MONITOR (北京新技术应用研究所) 进行 280 nm 紫外连续监测, 由 YOKOGAWA 3057 PORTABLE RECORDER (四川仪表总厂) 记录, 试验溶质由进样器注入.

2.2 试剂

溶剂系统为正丁醇:冰乙酸:水 (4:1:5), 以 DNP-鸟氨酸为试验溶质; 所用药品均为分析纯.

2.3 实验参数

转速 400 r/min.

3 结果和讨论

3.1 螺旋形离心逆流色谱系统的 $H-u$ 关系

采用螺旋形绕法^[8], 以不同内径 (d) 的聚四氟乙烯管绕成离心逆流色谱柱, 以下相为固定相, 上相为流动相, 在不同的流速下作实验, 得到试验溶质的色谱图, 由公式 $N = 5.54(T_R/\omega)^2$ 求出理论塔板数 N , T_R 和 ω 分别代表色谱图中的保留时间和半峰宽, 再由 $H = L/N$ 求出 H . 结果见图 2.

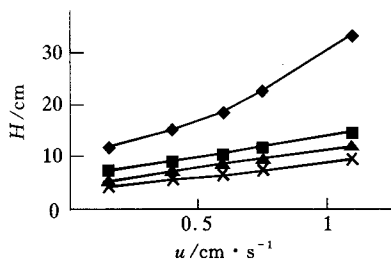


图 2 螺旋形绕法的 $H-u$ 关系图

◆—◆: $d = 2.0$ mm; ■—■: $d = 1.5$ mm;
▲—▲: $d = 1.1$ mm; ×—×: $d = 0.8$ mm.

3.2 折线形离心逆流色谱系统的 $H-u$ 关系

改变绕法, 采用折线绕法 (如图 3), 用不同内径的管在不同的流速下作实验. 结果见

图 4.

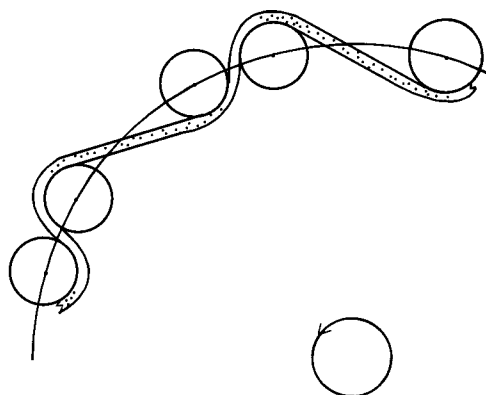


图 3 折线绕法示意图

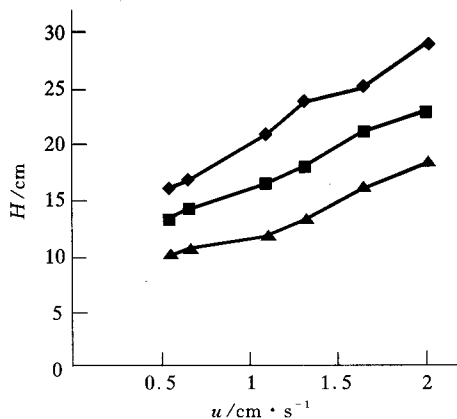


图 4 折线绕法的 $H-u$ 关系图

◆—◆: $d = 2.0$ mm; ■—■: $d = 1.5$ mm;
▲—▲: $d = 1.1$ mm.

3.3 讨论

在实验中使用频闪仪观察流动相 (用油红染成红色), 流动相是以液滴状穿越固定相的, 管径越大, 形成的液滴的直径越大.

从实验结果看, 随流动相线速度的增加, H 增加, 这与 (15) 式是一致的; 当管径减小时, 流动相液滴的直径 d_m 随之减小, 从而使 H_1 、 H_2 、 H_5 、 H_6 和 H_7 减小, 总的结果是 H 减小, 这与实验中表现的趋势相吻合; 从 Fedotov 等^[4]的工作中可以看出, 高的质量传递系数 k_f 对应高的柱效率 (即 H 小), 这也支持了 (15) 式; 同时, (15) 式也很好地理

释了在一张有多个色谱峰的色谱图上, 由 k 值大的色谱峰求得的 H 值明显地大于由 k 值小的色谱峰求得的 H 值这一现象.

3.4 结论

在逆流色谱柱中, 速率方程主要包括 H_1 和 H_5 的偶和项、 H_2 和 H_6 的偶和项以及与流动相线速度成正比的两相界面传质阻力项 H_7 , 影响峰展宽的因素主要有管径、容量因子、质量传递系数、流动相液滴直径和线速度等, 较小的管径、较小的容量因子、较大的质量传递系数、较小的流动相液滴直径和线速度有利于提高柱效率.

参 考 文 献

- 1 Ito Y, Weinstein M A, Aoki I *et al.* The coil planet centrifuge. *Nature*, 1966; **212**: 985~ 987
- 2 张天佑. 逆流色谱技术. 北京: 北京科学技术出版社, 1991: 1~ 366
- 3 Ito Y, Conway W D. High-speed countercurrent chromatography. New York: John Wiley & Sons Inc, 1996. 225~ 263
- 4 Fedotov P S, Maryutina T A, Pukhov-skaya V M *et al.* Influence of kinetic properties of extraction systems on the separation and preconcentration of some elements by countercurrent chromatography. *J Liq Chromatogr*, 1994; **17** (16): 3491~ 3506
- 5 Armstrong D W, Bertrand G L, Berthod A. Study of the origin and mechanism of band broadening and pressure drop in centrifugal countercurrent chromatography. *Anal Chem*, 1988; **60**: 2513~ 2519
- 6 Menet J M, Rolet M C, Thiebaut D *et al.* Fundamental chromatographic parameters in countercurrent chromatography: Influence of the volume of stationary phase and the

flow-rate. *J Liq Chromatogr*, 1992; **15** (15& 16): 2883~ 2908

- 7 Heftmann E. Chromatography: a laboratory handbook of chromatographic and electrophoretic methods. 3rd. New York: Van nostrand reinhold company, 1975. 34~ 42
- 8 Kim L S, Tian Z Q, Li X N *et al.* Centrifugal countercurrent partition chromatography with helical coil rotor. *J Chromatogr*, 1989; **483**: 359~ 368

Analysis of Dynamics in Countercurrent Chromatography. ZHAO Yonghong, KIM Lock Song (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing* 100101, China).

Abstract Dynamics in countercurrent chromatography, a kind of liquid-liquid chromatography without solid matrix, is very different to that in other liquid-liquid chromatography. Dynamics in countercurrent chromatography was analyzed and the rate equation that fits countercurrent chromatography was derived out. Some experiments were done to measure H (plate height) of two kinds of CCPC (centrifuge countercurrent partition chromatography) columns. The results of both theoretical deriving and experiments reveal that the diameter of column, capacity factor, mass transfer coefficient, the average diameter and velocity of mobile phase droplets are main factors that determines H . Mathematics analysis is given.

Key words countercurrent chromatography, dynamics, centrifuge

重组镰孢菌细胞色素 P-450nor 的性质研究

刘德立

(华中师范大学生物系, 武汉 430070)

祥云弘文

(筑波大学应用生物化学系, 茨城 305, 日本)

摘要 纯化的重组镰孢菌细胞色素 P-450nor (recombinant fusarium oxysporum cytochrome P-450nor,