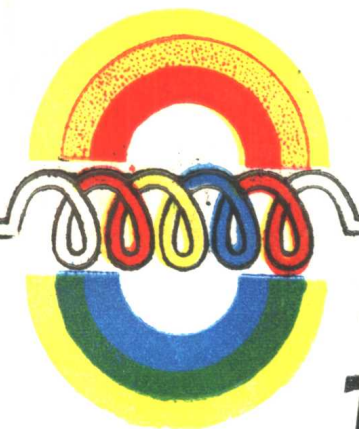




逆流色谱 技术

张天佑 编著

COUNTERCURRENT

CHROMATOGRAPHY

北京科学技术出版社

逆流色谱技术

张天佑 编著

北京科学技术出版社

内 容 提 要

本书系统地介绍了逆流色谱技术20多年来研究开发的概貌，内容涉及此项分离技术的基本原理、分析研究方法、仪器分类与特点、实验技术和在不同方面的主要应用实例。着重论述了在国际和我国近年发展的高效逆流色谱和逆流制备分离提取方法的实用成果。旨在为生物化学、生物工程、医药、化工、环境、农业、食品等科研生产领域的分离工作提供一种新颖有效、易于推广的技术手段。本书可供上述领域的科学研究人员、工程技术人员、教师、研究生、实验人员和生产操作人员引用和参考。

逆 流 色 谱 技 术

张天佑 编著

*

北京科学技术出版社出版

(北京西直门南顺城街12号)

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京顺义牛栏山印刷厂印刷

*

350×1168毫米 32开本 12.5印张 325千字

1991年3月第一版

1991年3月第一次印刷

印数1--2000册

ISBN7-5304-0806-2/T·163 定价：7.10元

前 言

逆流色谱 (Countercurrent Chromatography) 是一种不用固态支撑体或载体的液液分配色谱技术, 是一种能实现连续有效的分配分离功能的实用分离技术。

逆流色谱技术的创始人 Yoichiro Ito 对此项技术的发展付出了艰辛劳动和做出了重大贡献。20多年来, 国际上越来越多的科学家参加了此项研究开发事业, 使这一从实验研究起步的新技术日臻丰满、完善和实用。近几年, 它已经从实验室研究阶段转化为社会化适用阶段, 它的发展受到了国际范围的关注。

本书着重介绍的由螺旋管柱在特定离心力场作用下实现的逆流色谱技术, 除具有一般逆流分配分离法 (如逆流分溶法、液滴逆流色谱等) 的无载体影响、分离纯度高、分离量大等长处之外, 还有以下几方面的独特优点:

1. 它能构成连续、自动、高效和非高压的色谱系统。其分离效率比液滴逆流色谱法高十多倍至数十倍, 其分析分离的分辨率可与高效液相色谱相比。

2. 它能采用多种多样的溶剂系统。如用有机/水两相系统和聚合物双水相系统实现物质的对流分配; 用相混溶的系统 (如生理盐水与水) 和单一相的溶剂实现大分子、粒子的沉降性分离、细胞表面脆性的测定或细胞淘析。

3. 它能采用正向或反向的连续洗脱、步级洗脱、梯度洗脱等方式, 以保证高质量的色谱分离结果; 并适合于放射性同位素标记的实验方法。

4. 它除了能实现液液双向对流分配分离之外, 还能实现气液两相的双向对流泡沫式分离。能采用对气液界面的直接亲和法

或对泡沫生成剂、捕集剂的间接亲和法,实现非特征性分离(如基于物质表面电荷的分离)或高特征性分离(如酶基底和酶抑制剂结合等)。

5. 它能实现从微克、微升量级的分析分离到数克、上百毫升量级的制备提纯。它具有很强的超载能力,并为连续抽提和工业化的应用提供了条件。在半制备量以上的分离方面,性能投入比优于高效液相色谱等分离方法。

6. 它既能用于未经严格预处理的大量粗制样品的中间级分离,又能用于直接与质谱仪或傅立叶红外光谱仪联用的高纯度分离,具有较强的适用选择性。

7. 它能在一个流程中分离复杂样品中极性差异极大的各个组分,特别是能有效地分离强极性的组分,可成为其它色谱法的补充。

8. 它同高效液相色谱等现代分离方法相比,具有仪器设备简单、价廉、操作方便、样品无损耗或沾染、溶剂用量少、处理样品量大等优点,有利于普及推广。

因此,随着此项技术的发展,其应用领域也在迅速地扩展。它已经成功地用于: DNP氨基酸、各种肽和人工合成肽、嘌呤、吡啶、胰岛素、植物激素、各类抗生素异构体、抗肿瘤药物代谢物、鞣酸、染料、多核苷酸、儿茶酚胺代谢物、海藻蛋白、肾上清液中CSF、RNA中质体DNA、哺乳动物血球细胞和器脏细胞、异株细菌细胞、病毒、衣原体等方面的分离,本书作者和我国科学家还获得了分离提取天然药物中黄酮、生物碱、蒽醌类衍生物、皂甙等有效成分的应用研究结果。

本书是我国介绍此项分离技术的第一本专著。作者系统地综述了它的发展概貌,在一定的原理论述和分析的基础上,着重谈及仪器特点、实验方法和应用实例等实用内容,使读者易于了解和利用此项技术。书中编入了作者同国内专家们自1978年以来在仪器和应用研究方面的成果,以及作者近年在美国同Y. Ito 博士合

作在高效逆流色谱技术研究和应用方面至1989年的最新成果（本书第十一、十二章），以便于读者引用我国已有的仪器、方法和经验，其中一些内容，受到国际的广泛关注，尚无一本专著归纳发表。

作者引用了百余篇文献资料，反映了国内外众多科技专家的成就。北京市科学技术研究院及北京市新技术应用研究所对此项研究和本书编著给予了支持和扶植。田湛然同志在情报资料的搜集、整理和分析方面做了大量的工作，并撰写了第一章的部分内容。孟建晖同志为本书的图表制作做了大量而细致的工作，高金生、黎娜等同志也参加了插图的绘制。在此，谨向国内外的支持者和合作者表示由衷的感谢。

逆流色谱技术是一门正在发展的新技术，它的实现和应用涉及较广泛的知识领域。限于作者的学识和水平，编著中难免发生差错和问题。在把这本书奉献给社会主义祖国和广大读者时，希望各方面的专家学者和从事此项技术工作的同志给予批评和指正。作者期望，通过此项技术的推广应用，使我国的有关研究和应用水平不断提高，共同做出有我国特色的成果，为分离科学的发展和进步作出贡献。

北京市科学技术研究院生化分离检测技术实验室
北京市新技术应用研究所

张天佑

1989.12

目 录

第一章 逆流色谱技术CCC的基础知识	(1)
§ 1 发展史	(1)
§ 2 逆流分溶法CCD简介	(4)
§ 2.1 CCD原理	(5)
§ 2.2 溶剂系统的选择方法	(7)
第二章 螺旋管行星式离心分离仪CPC	(13)
§ 1 引言	(13)
§ 2 粒子在转动螺旋管里的运动分析	(13)
§ 3 仪器装置	(16)
§ 3.1 采用单一媒质	(17)
§ 3.2 采用两种混溶的媒质	(17)
§ 3.3 采用两种互不混溶的媒质	(17)
§ 4 实现逆流过程的机制	(18)
§ 5 几种测试样品的分离举例	(21)
§ 5.1 碱性染料的分离	(21)
§ 5.2 海藻蛋白的分离	(22)
§ 5.3 红血球的分离	(22)
§ 6 各个物理参量对分离效果的影响	(24)
§ 6.1 螺旋单元数的影响	(24)
§ 6.2 螺旋管内径的影响	(25)
§ 6.3 媒质接触时间的影响	(25)
§ 6.4 离心力的影响	(25)
§ 6.5 螺旋直径的影响	(26)
§ 6.6 螺旋管柱材质的影响	(26)
§ 6.7 进样量的影响	(26)

§ 6.8 其它参量的影响	(26)
§ 7 小结	(27)
第三章 逆流色谱技术原理	(29)
§ 1 引言	(29)
§ 2 流体静力平衡体系HSES	(29)
§ 2.1 基本模型	(29)
§ 2.2 以HSES为基础的逆流色谱仪机型	(32)
§ 3 流体动力平衡体系HDES	(34)
§ 3.1 基本模型	(34)
§ 3.2 单向性流体动力平衡体系HDES	(39)
§ 3.3 以HDES为基础的逆流色谱仪	(40)
§ 4 小结	(41)
第四章 不用螺旋密封接头的流通式离心分离仪	(43)
§ 1 引言	(43)
§ 2 三类不用旋转密封接头的离心分离仪	(43)
§ 2.1 同步式仪器 (I ~ IV型)	(45)
§ 2.2 非行星式仪器 (V型)	(47)
§ 2.3 非同步式仪器 (VI和VII型)	(48)
§ 3 同步行星式运动的加速度的数学分析	(49)
§ 3.1 I型行星式运动的加速度分析	(49)
§ 3.2 IV型行星式运动的加速度分析	(52)
§ 3.3 III型行星式运动的加速度分析	(56)
§ 4 小结	(60)
第五章 非螺旋管式的逆流色谱仪	(61)
§ 1 引言	(61)
§ 2 液滴逆流色谱法DCCC	(61)
§ 2.1 DCCC原理	(62)
§ 2.2 DCCC仪器	(63)
§ 2.3 管柱的制造方法	(65)

§ 2.4 溶剂系统的选择	(65)
§ 2.5 DCCC 的应用	(66)
§ 3 旋转腔室逆流色谱RLCCC	(68)
§ 3.1 RLCCC原理	(69)
§ 3.2 RLCCC仪器	(70)
§ 3.3 影响RLCCC分离效果的因素	(72)
§ 4 回旋腔室逆流色谱GLCCC	(73)
§ 4.1 GLCCC原理	(73)
§ 4.2 GLCCC仪器	(75)
§ 4.3 影响GLCCC分离效果的因素	(76)
§ 5 整体集成流通回路 MIFC	(78)
§ 6 小结	(80)
第六章 非行星式螺旋管离心分离仪	(82)
§ 1 引言	(82)
§ 2 带旋转密封接头的环绕螺旋管离心分离仪	(82)
§ 2.1 环绕螺旋管离心分离仪原理	(82)
§ 2.2 仪器的功能	(84)
§ 3 不用旋转密封接头的环绕螺旋管离心分离仪	(88)
§ 3.1 仪器设计原理	(88)
§ 3.2 仪器的功能	(91)
§ 4 环绕螺旋管柱的改进	(94)
§ 4.1 微量分析型管柱	(94)
§ 4.2 平板环绕螺旋管柱	(95)
§ 5 小结	(96)
第七章 同步螺旋管行星式离心分离仪——I、II、III型CPC	(97)
§ 1 引言	(97)
§ 2 I型流通式CPC	(97)

§ 2.1	仪器的原理和设计.....	(97)
§ 2.2	固定相保留值的研究.....	(97)
§ 2.3	仪器的应用举例.....	(104)
§ 3	连续洗脱离心分离仪.....	(112)
§ 3.1	仪器原理.....	(112)
§ 3.2	仪器设计.....	(113)
§ 3.3	早期仪器的应用举例.....	(115)
§ 4	Ⅱ型倾斜转子式CPC.....	(120)
§ 4.1	可调倾斜角度的转子结构设计.....	(121)
§ 4.2	选用不同溶剂系统时仪器的分离功能	(122)
第八章 新型同步螺旋管行星式离心分离仪——Ⅳ、		
	Ⅳ + I 型CPC	(131)
§ 1	引言.....	(131)
§ 2	水平流通型CPC (Ⅳ型)	(131)
§ 2.1	仪器的原理和设计.....	(131)
§ 2.2	仪器的功能.....	(134)
§ 3	组合式水平流通型CPC(Ⅳ + I 型).....	(140)
§ 3.1	仪器的设计原理.....	(141)
§ 3.2	仪器的结构设计.....	(142)
§ 3.3	固定相保留值的研究.....	(144)
§ 3.4	分配效率的研究.....	(148)
§ 3.5	组合式流通型CPC的应用举例.....	(160)
§ 4	国产改进型水平流通CPC.....	(164)
§ 4.1	仪器的设计特点.....	(164)
§ 4.2	实验方法的讨论.....	(166)
§ 4.3	应用举例.....	(169)
第九章 非同步流通型螺旋管行星式离心分离仪		
§ 1	引言.....	(183)

§ 2 非同步流通型CPC的设计原理.....	(184)
§ 2.1 双路旋转密封接头非同步流通型CPC	(184)
§ 2.2 不用旋转密封接头的非同步流通型CPC (Ⅳ型)	(185)
§ 2.3 改进型非同步流通型CPC.....	(187)
§ 3 用双水聚合物相系统实现逆流色谱.....	(190)
§ 3.1 原理.....	(190)
§ 3.2 应用举例.....	(190)
§ 4 用生理盐水实现细胞淘析.....	(197)
§ 4.1 原理.....	(197)
§ 4.2 应用举例.....	(198)
§ 5 我国自制的FNC非同步CPC	(200)
§ 5.1 仪器设计.....	(201)
§ 5.2 初步应用举例.....	(202)
第十章 慢转螺旋管组合	(205)
§ 1 引言.....	(205)
§ 2 仪器设计.....	(205)
§ 2.1 用旋转密封接头的原型仪器.....	(205)
§ 2.2 不同旋转密封接头的新型慢转螺旋管 组合.....	(206)
§ 3 装设小孔径螺旋管柱的原型组合的功能.....	(208)
§ 3.1 固定相保留值的研究.....	(209)
§ 3.2 分配效率的研究.....	(212)
§ 3.3 制备量逆流色谱长管柱.....	(217)
§ 4 偏心装设大孔径螺旋管柱的功能.....	(219)
§ 4.1 螺旋芯管直径和螺旋管柱位置的影响.....	(220)
§ 4.2 仪器倾斜方向和管柱偏斜方向的影响	(224)
§ 5 同轴装设的大孔径螺旋管柱的功能.....	(227)
§ 5.1 相分布图的研究.....	(227)

§ 5.2	分配效率的研究.....	(229)
§ 5.3	多层螺旋管制备型逆流色谱仪.....	(231)
第十一章 高效逆流色谱仪器和应用		(232)
§ 1	引言.....	(232)
§ 2	单向性流体动力平衡逆流色谱原理.....	(233)
§ 3	仪器的设计.....	(235)
§ 3.1	连续抽提用的CPC.....	(236)
§ 3.2	高速逆流色谱用的CPC.....	(237)
§ 3.3	组合式水平流通型CPC.....	(237)
§ 3.4	供频闪仪观察用的CPC.....	(240)
§ 4	溶剂系统中两相在转动管柱里的流体动力学 分布.....	(241)
§ 4.1	流体动力学特征的频闪仪观察结果.....	(241)
§ 4.2	相分布图的研究.....	(245)
§ 4.3	影响相分布的各个物理参量.....	(259)
§ 5	连续抽提法.....	(266)
§ 5.1	DNP氨基酸的抽提	(266)
§ 5.2	尿中药物代谢物的抽提.....	(271)
§ 6	高速逆流色谱.....	(274)
§ 6.1	两相溶剂系统的选择.....	(275)
§ 6.2	样品溶液的制备.....	(276)
§ 6.3	分离实验的步骤.....	(283)
§ 6.4	高速逆流色谱仪的应用举例.....	(285)
§ 7	高速逆流色谱仪HSCCC分离天然药物有效成分 的应用研究.....	(290)
§ 7.1	黄酮类成分的分离提取.....	(290)
§ 7.2	生物碱成分的分离提取.....	(293)
§ 7.3	羟基蒽醌衍生物的分离提取.....	(298)
§ 7.4	分析分离沙棘粗提物中成分的快速性研究	

.....	(299)
§ 7.5 讨论.....	(302)
§ 8 泡沫式逆流色谱.....	(303)
§ 8.1 实现泡沫式逆流色谱的仪器.....	(303)
§ 8.2 应用研究结果.....	(304)
第十二章 正交轴同步流通式螺旋管行星式离心分离仪	
.....	(312)
§ 1 引言.....	(312)
§ 2 仪器的设计.....	(312)
§ 3 正交轴仪器的同步行星式运动加速度分析	(314)
§ 3.1 作用于支持件中心平面上的加速度.....	(314)
§ 3.2 作用于支持件上任一点的加速度.....	(318)
§ 4 正交轴型仪器同轴螺旋管内相分布特性和分配效率的实验研究.....	(322)
§ 4.1 仪器的螺旋管柱.....	(322)
§ 4.2 试剂的选择和溶剂系统的制备.....	(323)
§ 4.3 单层螺旋管内固定相保留值的测定.....	(324)
§ 4.4 频闪仪观察试验.....	(324)
§ 4.5 用多层螺旋管进行制备分离的实验步骤.....	(325)
§ 5 实验研究的结果和讨论.....	(327)
§ 5.1 单层螺旋管内的相分布图.....	(327)
§ 5.2 频闪仪观察平板形螺旋管内两相运动的结果.....	(329)
§ 5.3 多层螺旋管柱的制备分离结果.....	(331)
§ 6 用于大制备量分离的正交轴型CPC.....	(336)
§ 6.1 大制备量正交轴型CPC的仪器和管柱的特点.....	(336)
§ 6.2 固定相保留值的测定.....	(327)

§ 6.3	相分布图.....	(328)
§ 6.4	单层短螺旋管柱的分配效率.....	(344)
§ 6.5	多层长螺旋管柱的制备分离能力.....	(346)
§ 7	慢转正交轴行星式运动的大孔径螺旋管柱	(349)
§ 7.1	仪器的设计.....	(350)
§ 7.2	短螺旋管柱的固定相保留值和分配效率	(350)
§ 7.3	成对多层螺旋管柱的制备分离能力.....	(353)
§ 8	大制备量正交轴型CPC的应用举例.....	(356)
§ 8.1	沙棘粗提物的分离.....	(357)
§ 8.2	甾类中间反应物的分离.....	(357)
§ 8.3	吲哚类植物激素的分离.....	(358)
§ 8.4	一组DNP 氨基酸的分离.....	(359)
§ 8.5	讨论.....	(360)
总结		(362)
参考文献		(367)
附录		(374)

第一章 逆流色谱技术CCC的基础知识

§ 1 发 展 史

在色谱技术的发展历史中,以物质或分子在两个互不混溶的溶剂相中的不同溶解度作为特征依据来实现分离,已经出现了多种高选择性的分离技术和方法,例如:纸色谱法(Paper Chromatography)、逆流分溶法(Counter Current Distribution)和液相色谱法(Liquid Chromatography)等。这些技术和方法的良好选择性是由物质的分配系数这个参量所决定的。因为分配系数,即物质在两个溶剂相中的溶解度的比值,是分子间力的相互作用的最基本反映,它能够随不同的温度和溶剂相不同的配合方式等条件在很宽的范围内调变。所以通过各种条件的合理选择,就能充分利用非常好的相互作用特征,从极复杂的混合物中分离分辨出特定的组分。

分离科学的领域中,常用的纸色谱、高分辨度柱色谱和高效液相色谱等,都是在液液分配原理的基础上发展的,不过,所有这些色谱技术和方法的实现,都需要用某种固态的载体或支撑体,以承载或支撑住两溶剂相中的一相作为固定相。这种固态载体的存在,往往对物质的分离提纯造成一些问题,如因吸附作用引起的样品损失、样品组分的化学变性等。本书介绍的逆流色谱技术,则是无需任何固态载体的液液分配分离技术。

追溯最早出现的液液分配装置,乃是现今实验室里常用的分液漏斗。把两个互不混溶的溶剂相置入分液漏斗中,投入要萃取分离的样品,经振摇和静置,样品溶质就按分配系数的特征在两溶剂相间实现分配。如果两种溶质分子在两相溶剂系统中的分配系数差异明显,那么,在分液漏斗里的一次萃取过程中就能分离

开来。但是，实际遇到的问题往往是要分离性质极其相近的复杂混合物，这就需要进行多次萃取才能实现满意的分离。1941年，Martin和Syngé提出了一种级联链型萃取装置⁽¹⁾，通过对于逆流（对流）萃取的研究，开辟了分配色谱技术的发展途径⁽²⁾。1944年，Craig发明了非连续式的逆流分溶装置，简称CCD⁽³⁾，它适用于大量或小量的样品的液液分配分离。这些早期的分离装置能实现上千次的分配和萃取，很快为有机化学，生物化学等应用领域所接受。虽然，这些装置已很少在现今的实验室里用作分离分析的手段，但是，Craig的设计仍被认为是在分离大极性组分，包括天然产物、多肽和其它大分子时具有特色，它更适合于大制备量的分离提取工作。CCD的主要缺点是：仪器设备庞大复杂，溶剂系统容易乳化，溶剂消耗量大和分离操作时间太长等。

表 1-1 列出了1960年以前出现过的各种液液分配分离装置和仪器。其中，除了前面提到的方法之外，虽然有的也具有较好的分离能力，但是并未获得推广应用。仪器容易破损、操作不方便、分离样品的局限等是限制其发展的主要原因。

表 1-1 早期的液液分配分离装置

装 置 名 称	发 明 人	发明年代
分液漏斗	—	—
级联链型萃取装置 ⁽¹⁾	Martin 和 Syngé	1941
分配色谱仪器 ⁽²⁾	Martin 和 Syngé	1941
非连续式CCD ⁽³⁾	Craig	1944
大型玻璃制CCD ⁽⁴⁾	Craig 等	1951
小型非连续式CCD ⁽⁵⁾	Bell 等	1956
紧凑型CCD ⁽⁶⁾	Raymond	1958
具有混合和分层带的分离柱 ⁽⁷⁾	Scheibel	1948
级联链型渗流装置 ⁽⁸⁾	Kies 和 Cavis	1951
旋转盘形装置 ⁽⁹⁾	Signer	1952
自旋转子分离柱 ⁽¹⁰⁾	Spence 和 Streeton	1952
分隔式渗流分离柱 ⁽¹¹⁾	Keppes	1954
高效连续混合分层装置 ⁽¹²⁾	Kietala	1960

Yoichiro Ito (伊东洋一郎) 等首先在日本, 随后在美国国家医学研究院 (National Institute of Health, U.S.A.) 发现了一种有趣的现象, 即互不混溶的两相溶剂在绕成螺旋形的小口径管子里分段割据, 并能实现两溶剂相之间的逆向对流。在内径约 2 毫米的螺旋管绕组层里, 两相的分段状态能在重力场的作用下形成; 而当螺旋管柱在一离心力场内转动时, 特别是在如 0.2 毫米口径的细螺旋管柱里, 会形成更强的两相分割趋势和对流趋势, 这种分割和对流的过程是连续进行的。如果把要分离的样品从螺旋管柱的引入口注入, 连续的分配传递过程就会在管柱里进行, 从而实现连续的液液分配分离。在这样的体系中, 不存在固态的载体, 因而不仅避免了载体对样品组分的吸附和污染, 而且保证了纯粹的液液分配特征, 其分配效果完全取决于样品各组分的分配系数值和管柱特定的效能。

Ito 等早期设计和实现的各种逆流色谱仪列于表 1-2 中。在 1975 年之后发展出来的新的成果, 将在本书各主要章节中予以介绍。液滴逆流色谱^[16]的管柱是采用一系列的竖直管柱, 一个溶剂相的小滴穿过管柱里的另一个溶剂相, 以实现两相之间的对流。腔室式的逆流色谱仪^[17], 则是在很多小的分立腔室里分级实现两相的分配。这些不同原理、不同设计的逆流色谱仪, 将在本书第五章给予概要的介绍。

表 1-2 早期的逆流色谱仪器

仪 器 名 称	发 明 人	发明年代
螺旋管行星式离心分离仪 ^[13, 14] (CPC)	Ito 等	1966
螺旋形逆流色谱仪 ^[15]	Ito 和 Bowman	1970
液滴逆流色谱仪 ^[16]	Tanimura 等	1970
旋转移位逆流色谱仪和回旋移位逆流色谱仪 ^[17]	Ito 和 Bowman	1970
流通型 CPC ^[18~20]	Ito 和 Bowman	1971
连续洗脱型离心分离仪 ^[21~26]	Ito 和 Bowman	1972
倾斜角转子逆流色谱仪 ^[27]	Ito 和 Bowman	1975