

## 第一章 緒論

逆流層析是一種液相-液相分配層析技術，其分離的基本原理為溶質在動、靜相中產生分配現象，而達成分離效果。此技術最大特色在於其靜相不像一般液相層析之分離，需要靠固體支持物來將其滯留在分離管柱中，而是藉由離心力場與重力場保留在管柱中，如此可以避免分離樣品因吸附在固體支持物上所造成的流失問題，這也是逆流層析技術之優點。

一般而言，在逆流層析儀上使用來進行化合物純化與分離工作之溶劑系統大多屬於 Water-Organic 溶劑系統，例如使用 *tert*-butyl methyl ether/*n*-butanol/acetonitrile/water 進行花青素 (anthocyanins) 以及胜肽 (peptides) 的純化與分離<sup>1,2</sup>，chloroform/methanol/water 進行抗生素 (antibiotics) 分離<sup>3</sup>。但這類型溶劑系統則較難運用於疏水性化合物上，因此針對疏水性化合物發展一套簡單且分離性強的溶劑系統是一項重要的工作。

傳統逆流層析上分離疏水性物質有選擇使用雙有機相溶劑系統 (Organic two-phase) 來進行分離，例如溶劑系統 methanol/acetone/*n*-heptane 或者 acetonitrile/dichloromethane/*n*-heptane，進行 terpenoids、depsides 等低極性物種分離<sup>4,5</sup>，此為藉由分離物種在兩有機相中分佈差異達成分離效果，但雙有機相溶劑系統之溶劑選擇相當困難，為了使兩有機溶劑不互溶，則須選用極性差異較大的溶劑，但若兩溶劑極性差異大，分離物種在兩者間的分佈系數 (Partition Coefficient) 往往差距甚多，無法落在適合運用在逆流層析上所要求的  $K=0.2\sim 5$  之間。亦有研究選擇 Water-Organic 溶劑系統<sup>6,7,8</sup>，此為選擇一有機相以及一水相溶劑，並藉由在其中添加修飾溶劑來調整溶劑系統的極性來達成分離目的，但這樣的溶劑系統在配製上也有相當的困難度，往往在添加之溶劑調配比例上稍做更動即會造成上下層相互溶成為均一相的狀況發生。

本實驗以Progesterone、(+)-4-cholesten-3-one、 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione 三種類固醇化合物當做分離樣品，嘗試在疏水性溶劑系統：n-Hexane/Water溶劑系統中添加水溶性界面活性劑，藉由界面活性劑分子一端親水一端疏水的特殊性質，使類固醇化合物在溶劑系統之有機相與水相間產生不同的分佈來進行分離，探討不同種類界面活性劑之分離效果，且將界面活性劑添加濃度提升至臨界微胞濃度後發現分離效果更佳。此外，也利用高速逆流層析系統發展出數種適合類固醇類化合物分離的Water-Organic溶劑系統。希望藉此提供疏水性化合物分離系統的新資訊。



## 第二章 研究背景與理論

### 2.1 逆流層析法

#### 2.1.1 簡介

逆流層析<sup>9</sup> (Countercurrent Chromatography or CCC) 這項技術是屬於一種液相-液相分配層析技術，即所使用的動、靜相皆為液體，它和一般傳統層析方法最大差異在於逆流層析不需使用固體支持物或吸附劑來滯留靜相。CCC最大的特色在於藉由重力場或離心力場將液態靜相滯留在管柱中，並利用分析物在兩相中分配係數 (partition coefficient) 的不同而達到分離的目的。由於不需要固相填充物，所以樣品對於靜相不會有吸附現象產生，進而避免樣品分子遭受破壞或樣品流失的問題。



#### 2.1.2 起源與發展<sup>10</sup>

早期的逆流層析技術為一種不連續式分液漏斗的液相萃取，是由Lyman Craig在 1944 年發展出來的，我們稱此項技術為逆流分佈 (Countercurrent Distribution, CCD)<sup>11</sup>。CCD被廣泛應用在天然物的分離，但因其操作耗時且儀器複雜龐大容易損壞，因此在 1960 年代即被液相層析 (Liquid Chromatography, LC) 所取代。

到了 1970 年代，Yoichiro Ito 等人對於 CCD 的理論基礎開始深入研究而發展出離心系統，即所謂的離心式行星螺管結構 (Coil Plant Centrifugal, CPC)。之後 Ito 和 Conway<sup>12</sup> 等人進而發展出多種不同的儀器結構。在 1981 年發展出的高速逆流層析 (High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)，是結合了 CCD 和 LC 的優點所發展出的連續式逆流分離方法。

### 2.1.3 理論基礎<sup>12,13</sup>

逆流層析的理論基礎來自於液相層析 (LC) 及逆流分佈 (CCD) 因此針對這兩種技術做簡單介紹。

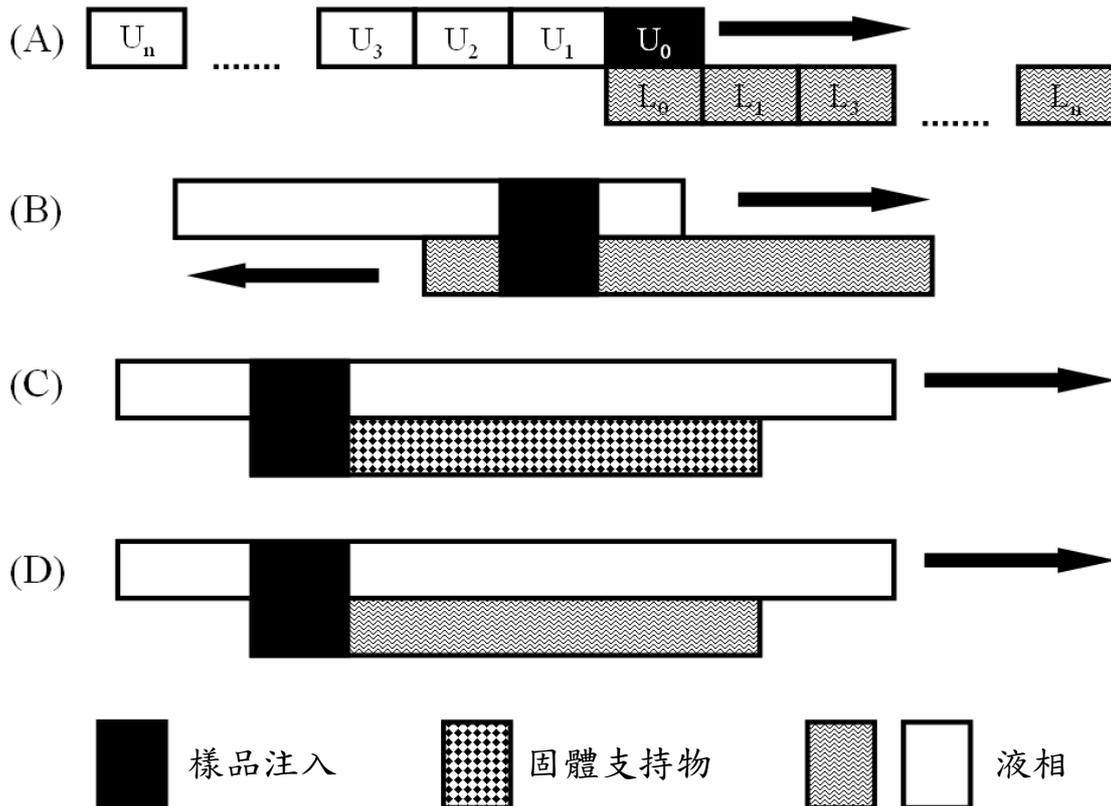


圖 1 液相-液相層析方法

(A) 傳統步驟式液相萃取

(B) 逆流萃取 (CCE)，兩相都是動相，分別往反方向移動，樣品從中間注入

(C) 液相-液相層析 (LLC)，靜相是以固體支持物滯留在管柱中

(D) 逆流層析 (CCC)，靜相滯留不需固體支持物 (Support-free)，而是以重力場、離心力場將靜相滯留在管柱中

CCD的過程可由圖 1 來說明。如圖 1-(A)，若有一連串的萃取槽，分析物開始是在 $L_0$ 中，而 $U_0、U_1、U_2...U_n$  與 $L_1、L_2...L_n$  分別為不含分析物的兩相 (L代表下層相，U代表上層相)。當 $U_0$ 與 $L_0$ 混合後，分析物會在兩相中進行分配，於是 $U_0$ 會萃走部分的分析物，接著和 $U_1$ 混合，再依序與 $U_2、U_3...U_n$  混合，新的下層相 $L_1、L_2、L_3...$  依序緊隨在 $L_0$ 後做相同的混合步驟，大部分的分析物最後會集中在某幾個分液漏斗中。若一開始含有兩個分配係數不同的混合物，那麼增加萃取槽的數目，就可以提高分離效率。而隨著萃取次數的增加，分析物的分佈也會變得較寬廣<sup>14</sup>，如圖 2。圖 1-(B)，為液相-液相分配層析法，亦為CCD概念的延伸，分析物在無限多個萃取槽間連續進行分配，不同的物質會由於分配係數不同而產生分離的情形，此為液相層析的原始觀點。圖 1-(C)，為我們所熟知的液相層析，藉由管柱中填充固體支持物，使液體靜相以物理性吸附或化學鍵結的方式留在固體支持物的表面。前者的缺點是因為物理性吸附性弱造成靜相易在沖提過程中溶解在動相中而減少，而後者之靜相雖不會被帶走，但是未被靜相完全覆蓋的固體支持物，則會吸附部分的分析物因而造成層析鋒拖尾的現象。圖 1-(D)，即為逆流層析法 (CCC)，其動、靜相皆為液體，在重力場、離心力場的作用下，靜相可不依靠固體支持物而滯留在管柱中。

#### 2.1.4 儀器系統基本結構<sup>12,13</sup>

為了能在分離工作上成為實用的層析儀器，陸續開發出具穿流性質、不同管柱結構和不同力場的儀器。因此，逆流層析儀依照其分離管柱本身的轉動方式可區分為兩種：流體靜態平衡系統和流體動態平衡系統。

##### (1) 流體靜態平衡系統 (Hydrostatic Equilibrium System, HSES)

在 HSES 系統中，管柱的每一個部分所受力大小固定。靜相因重力場或離心力場滯留在管柱中，樣品隨著動相穿越靜相，並藉著樣品在動靜相

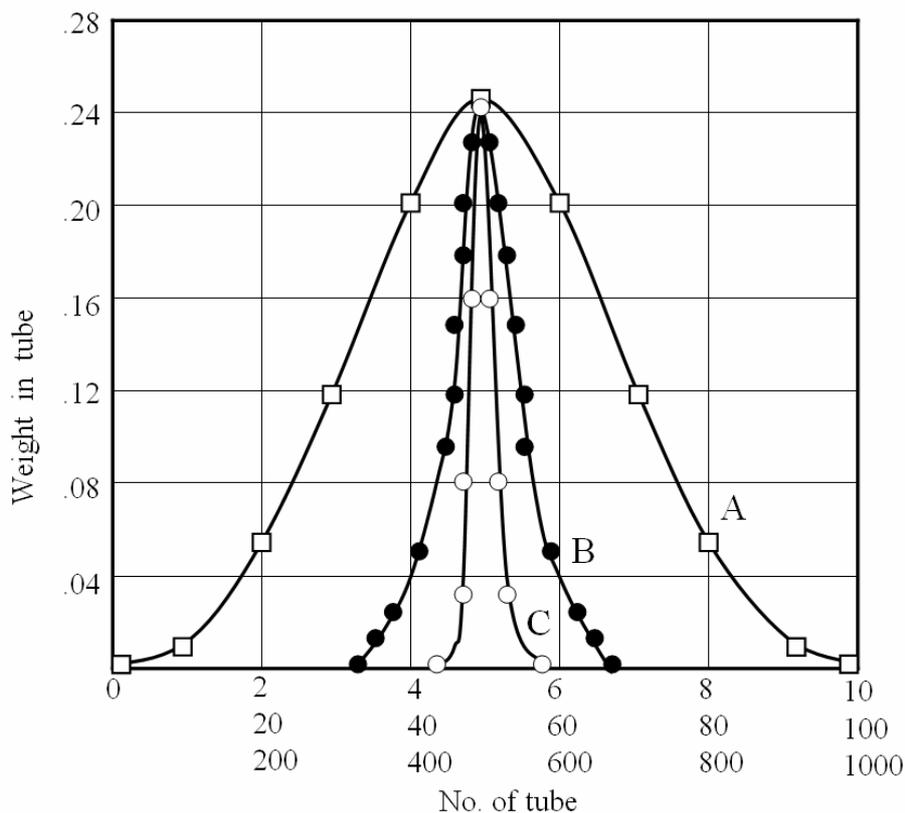


圖 2 表示萃取次數與分離效果的關係曲線。A、B、C 分別表示萃取次  
由小到大，解析度也越佳<sup>14</sup>

的分配係數不同而達到分離的目的。圖 3 為 HSES 的示意圖<sup>10</sup>。圖 3- (A)，所  
使用的靜相是事先平衡過的下層相，先使其充滿管柱後將動相（上層相）由  
一端緩緩注入，靜相會被動相推出直到兩相的界面到達螺管底部，此時由  
於重力場的作用，動相開始往上穿越靜相直到螺管頂端，如此一直重複直  
到分離管柱的末端，因此造成每一圈的螺管都會保留住一半的靜相。圖 3- (B)  
和圖 3- (A) 相反，使用平衡過的上層相當作靜相，而下層相為動相，使動靜  
相在螺管中產生不同的平衡狀態。

## (2) 流體動態平衡系統 (Hydrodynamic Equilibrium System, HDES)

在 HDES 系統中，管柱會藉由自轉與公轉現象所產生的離心力將靜相

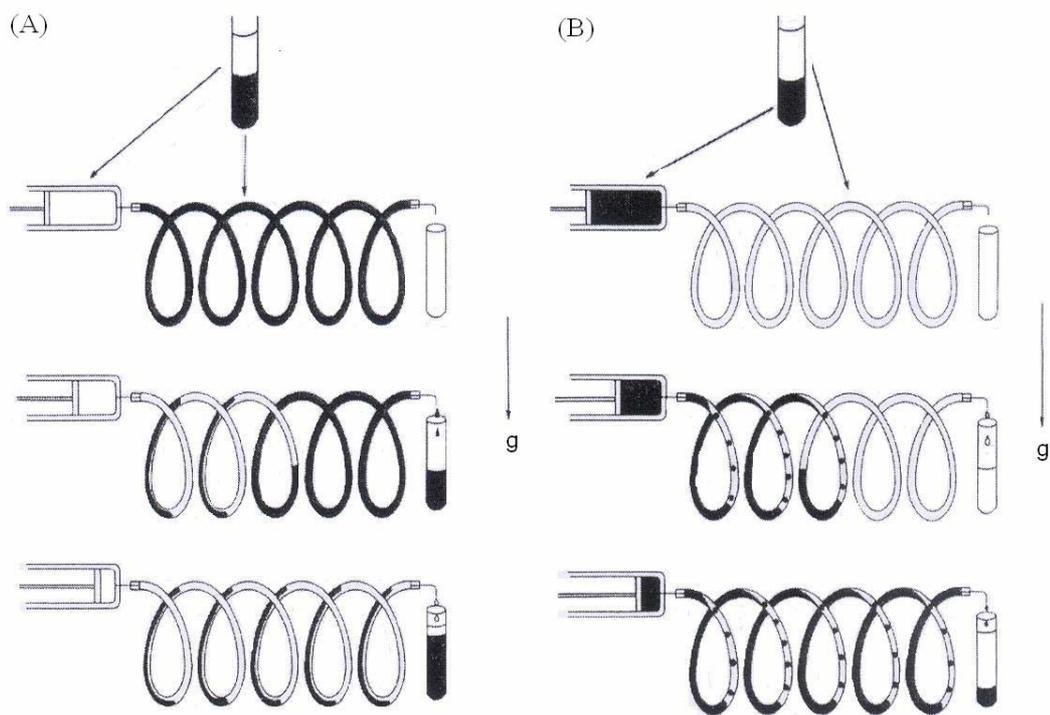


圖 3 流體靜力平衡 (HSES) 示意圖

(A) 靜相為下層相，動相為上層相

(B) 靜相為上層相，動相為下層相

滯留在管柱中，因此管柱中的每一部分所受力的大小與方向都不斷地改變。希臘數學家阿基米得發現，藉由轉動螺旋型的管子，可將河水疏導至水壩，此即所謂阿基米得扭力 (Archimedes screw force)。此原理亦被應用在 HDES 系統中。圖 4 說明在重力場作用下，阿基米得扭力對旋轉中螺管的影響。圖 4- (a)，先在螺管中注滿水再導入氣泡和玻璃珠，封住螺管兩端，接著將螺管緩慢旋轉，由於阿基米得扭力的作用將使氣泡與玻璃珠帶往螺管的左端，此表示不管比水輕或比水重的物質皆會向螺管的某一端移動，此端稱為螺管的頭端 (head)，而另一端則稱為尾端 (tail)。圖 4- (b) 中，利用平衡過的溶劑系統進行相同的實驗，圖 4- (b) 上圖是先將螺管注滿較輕的一

相，也就是溶劑系統的上層相，而較重的一相也就是下層相則由尾端打入。此時較重的一相就有如存在於水中的玻璃珠，會往螺管頭端移動。圖 4- (b) 下圖則是先將較重的一相注滿螺管，再由尾端打入較輕的一相，其行為就像是存在於水中的氣泡。圖 4- (c)，先將螺管內填入等體積的輕重兩相，其會在螺管的每一圈產生分離，輕者在上，重者在下，當螺管開始轉動，任一相多餘的量則會被推至螺管尾端。因此，當螺管到達動力學平衡，則兩相在螺管中的分佈將保持不變。因此，HDES 系統便是以阿基米得扭力原理，使靜相維持某程度的滯留，並與動相充分混合。

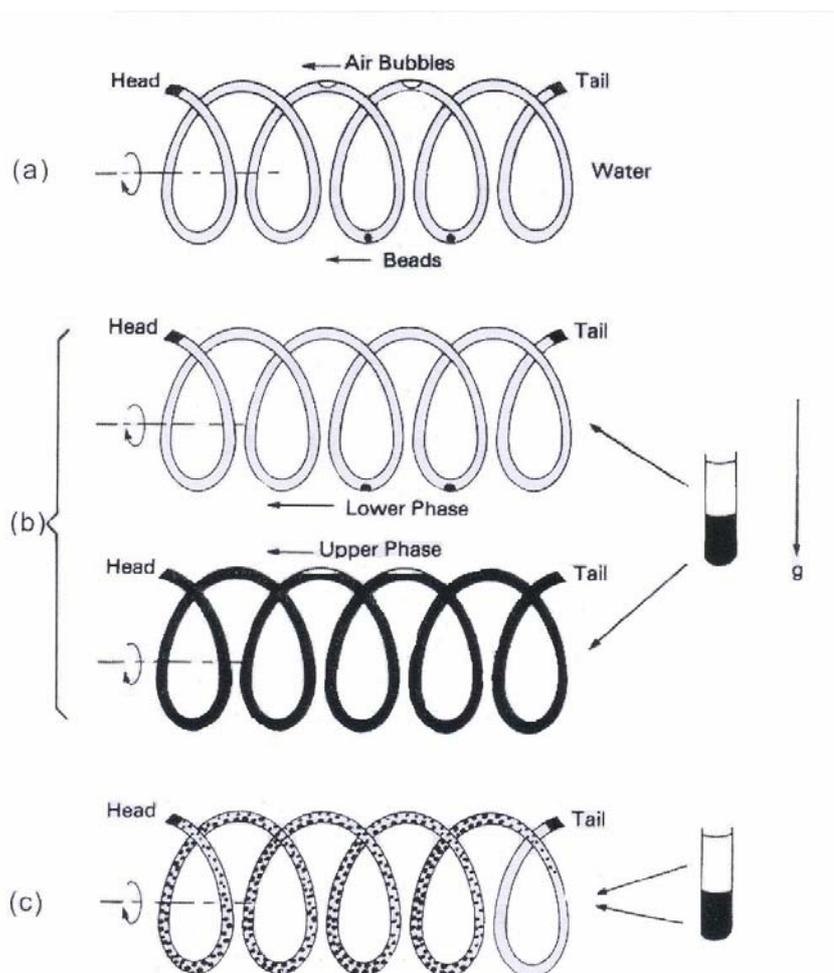


圖 4 旋轉螺管中物體移動的情形<sup>11</sup>

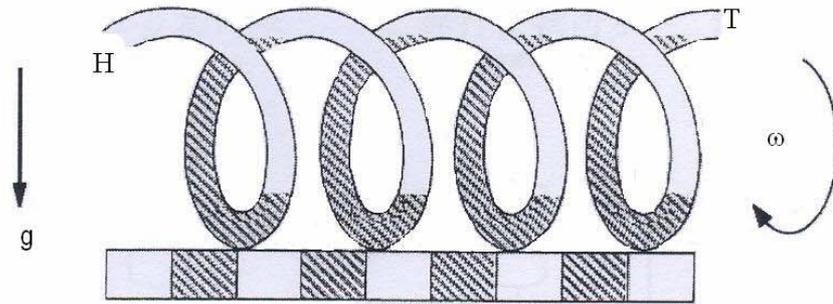
### 2.1.5 影響相分佈的因素

螺管在不同轉速下會影響不互溶溶劑的相分佈，Ito 認為是阿基米得扭力和離心力合力所造成的結果<sup>15,16</sup>。阿基米得扭力因螺管自轉而產生，其正切於螺管路徑，將液體恆帶向頭端。而離心力是因螺管轉動而產生由中心向外的力場。如圖 5- (a)，在低轉速時，忽略離心力，兩不互溶相會均勻分佈在管柱中，此為段狀分佈 (segmented distribution)，此種情形下，靜相滯留量會隨著流速增加而降低，因此欲維持較高的靜相滯留量，需進行低流速流析，因而造成層析效果不佳。中轉速，如圖 5- (b)，兩相會相互分離呈現兩段分佈 (unilateral distribution)，較重的一相會傾向往管柱的頭端，另一相則往管柱尾端，此現象解決了在低轉速時流速限制的問題。當轉速增高至高轉速時，如圖 5- (c)，兩段分佈的情形逐漸消失，動靜相密度的差異在離心力的作用下，使兩相在管柱中產生相對運動分成內外兩層，較重的一相分佈在外層，較輕的一相分佈在內層，成為均一分佈 (uniform distribution)。

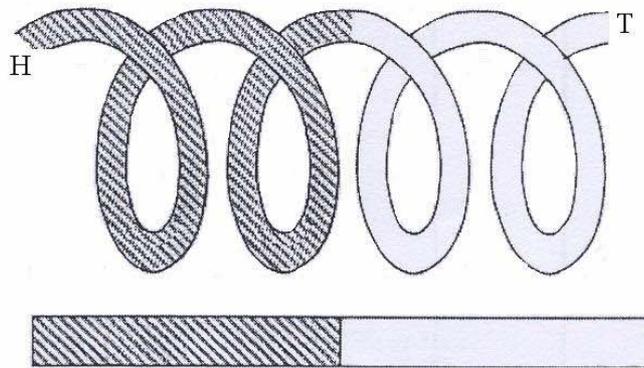
### 2.1.6 反扭轉機構的應用

目前逆流層析儀大多設計使用旋轉機構來提供離心力場，此時流體導入管和導出管與分離管柱的連接部位易因旋轉而造成扭曲糾結的現象。為了避免此現象而使用旋轉栓<sup>17</sup> (rotating seal) 的設備，它將兩導管分別接於旋轉栓兩側的旋轉體上，藉由旋轉體的轉動來解決導管扭轉的現象。但因旋轉栓易在高速旋轉下磨損，造成洩漏、腐蝕、污染、甚至使樣品變質影響分析結果。因此 Ito, Y. 等人引進一系列反扭轉機構<sup>10,18</sup>來防止導管糾結，此設計是在出入導管處裝置齒輪取代旋轉栓。反扭轉機構有以下幾個優點：(1) 在高壓下系統無洩漏之慮 (2) 可使用具腐蝕性的溶劑 (3) 降低樣品擴散的無效空間 (4) 減少樣品被污染的情形。利用反扭轉機構發展出三大類

(a) 低轉速-段狀分佈



(b) 中轉速-兩段分佈



(c) 高轉速-均一分佈

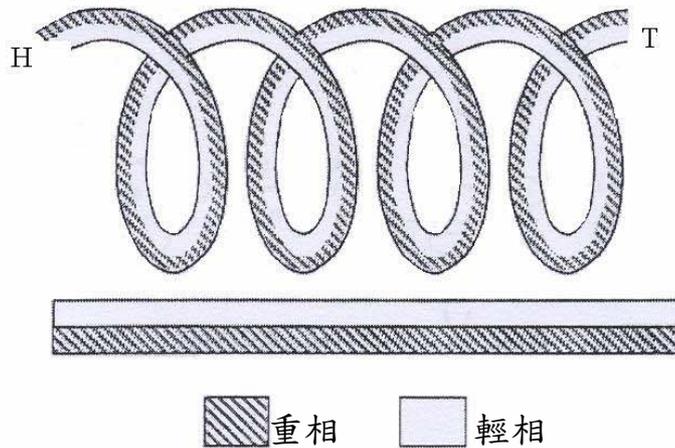


圖 5 螺管在不同轉速下兩不互溶溶劑的相分佈<sup>13</sup>

(a) 低轉速呈段狀分佈

(b) 中轉速呈兩段分佈

(c) 高轉速呈均一分佈

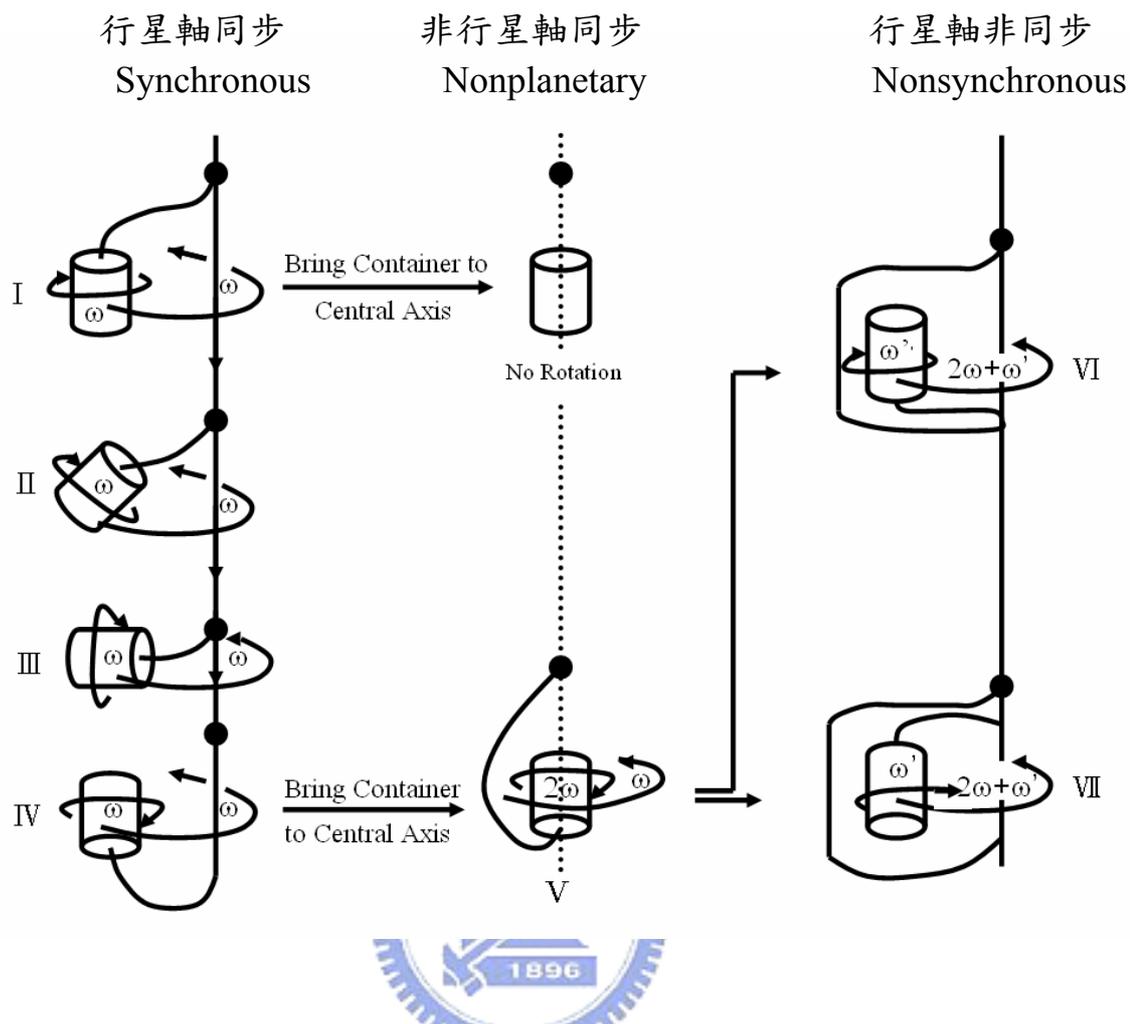


圖 6 反扭轉機構共有三種轉動系統，分別是同步行星式、非行星旋轉、非同步行星式共七個模型<sup>10,18</sup>

基本架構：同步行星式 (synchronous) 和非同步行星式 (nonsynchronous) 以及非行星繞旋式(nonplanetary)，依其複雜程度又可細分為七種結構，如圖 6。

本實驗所使用的高速逆流層析儀屬於同步行星模式，其基本旋轉方式為管柱支持物以角速度 $\omega$ 繞著主軸自轉 (rotation)，且本身也以相同的角速度公轉 (revolution)。此模式又依管柱支持物與主軸的傾斜度不同而可區分為 I、II、III、IV 型。其中 I 型為最簡單的型態，其自轉軸與主軸平行並保持一固定距離，即公轉半徑，而管柱支持物的公轉與自轉造成管柱支持物

本身相對地並無旋轉，由此可防止導出管與導入管的扭轉。同樣地，因應不同的需要，將管柱支持物傾斜某一角度如 II，甚至成水平狀如 III，而 IV 型的自轉與公轉方向則完全一致，其所產生的複雜力場應用在高速逆流層析儀上，可獲得相當好的靜相滯留。

IV 型又可依管柱的纏繞方式區分為離中心軸纏繞 (eccentric) 和同軸纏繞 (coaxial)，前者又分為 parallel 和 toroidal 兩種，後者則分為單層纏繞 (single-layer) 以及多層纏繞 (multi-layer)，如圖 7。其中發現多層纏繞的方式在高轉速下仍有兩段分佈的情形，因而發展出高速逆流層析儀 (High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)。相較於傳統逆流層析儀，HSCCC 因高轉速而使分離管柱內的動靜相激烈混合，而有較高的分配效率，可達較好的層析效果。



### 2.1.7 高速逆流層析 (HSCCC)

#### (1) 原理<sup>19</sup>

高速逆流層析是由第 IV 型模式發展出來的，其設計原理如圖 8- (A) 所示，中心軸呈水平方向，一螺管支持物支承一行星齒輪 (planetary gear)，其和固定在中心軸上的太陽齒輪 (sun gear、stationary gear) 相互咬合。其運動模式為螺管支持物不僅繞著中心軸旋轉，同時自身也以相同的角速度往相同方向旋轉。螺管支持物的同步行星運動可防止流體導出管與導入管的扭轉，如圖 8- (B)。

#### (2) 影響相分佈的因素

除了螺管在不同轉速下會影響兩不互溶溶劑的相分佈，此外，螺管半徑 ( $r$ ) 與公轉半徑 ( $R$ ) 的比值  $\beta$  值 ( $\beta = r/R$ )<sup>20</sup>，也是影響的因素。首先將較輕的一相 (靜相) 填滿管柱，令管柱旋轉，接著打入較重的一相 (動相)，待兩相達動力學平衡後，由頻閃觀測儀可看到管柱內的相分佈情形，如圖 9<sup>21</sup>。

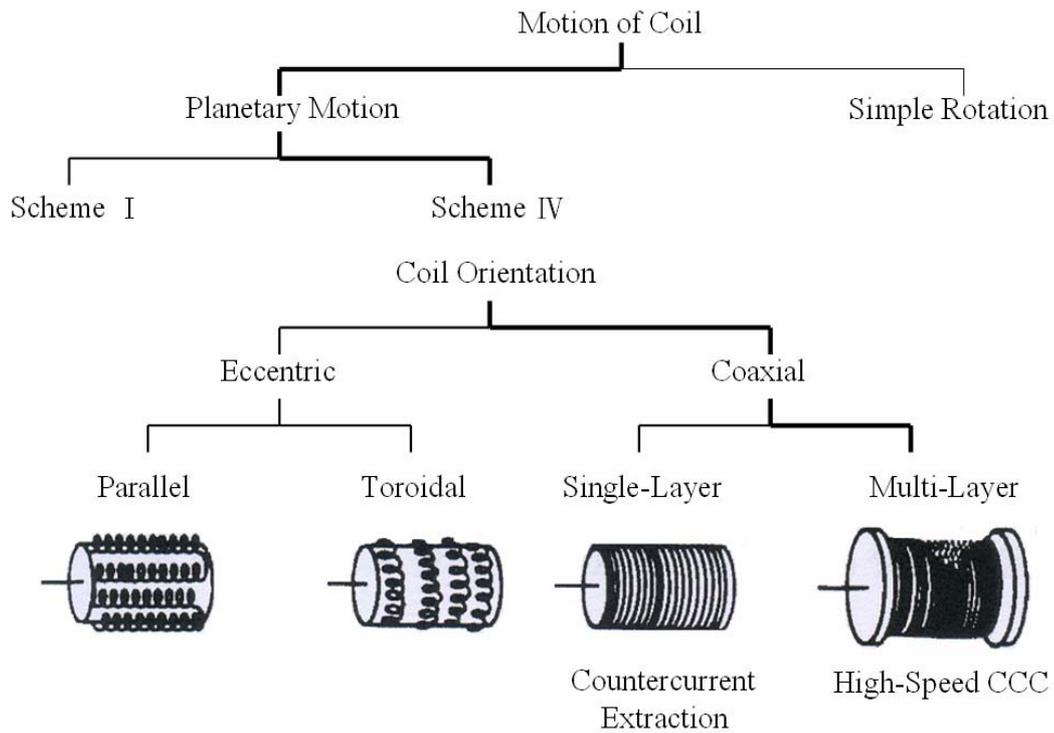


圖 7 CCC第IV型管柱纏繞方式之分類<sup>10</sup>

在 a 位置因靠近離心力中心區域，離心力較小，阿基米得扭力同時帶動兩相，使得動靜相劇烈混合，為混合區 (mixing zone)；而管柱外側因離心力較大，可完全蓋過阿基米得扭力，使得動靜相分開形成一明顯界面，動相在外圈，靜相在內圈，為澄清區 (settling zone)。隨著管柱公轉，在 b、c、d 位置皆有與 a 相同的情形，表示兩相在任何位置都可不斷進行混合與澄清。

### (3) 溶劑系統的選擇

大部分溶劑系統含水，配合其他有機溶劑，相互飽和而為不互溶的兩相，分別為動相與靜相。其成分組合視其分離條件而決定。對於溶劑的選擇，可分為三大類：疏水性 (lipophilic)、中間性 (intermediate) 和親水性 (hydrophilic)。當使用疏水性溶劑系統時，如正己烷/水，通常是較輕相分佈

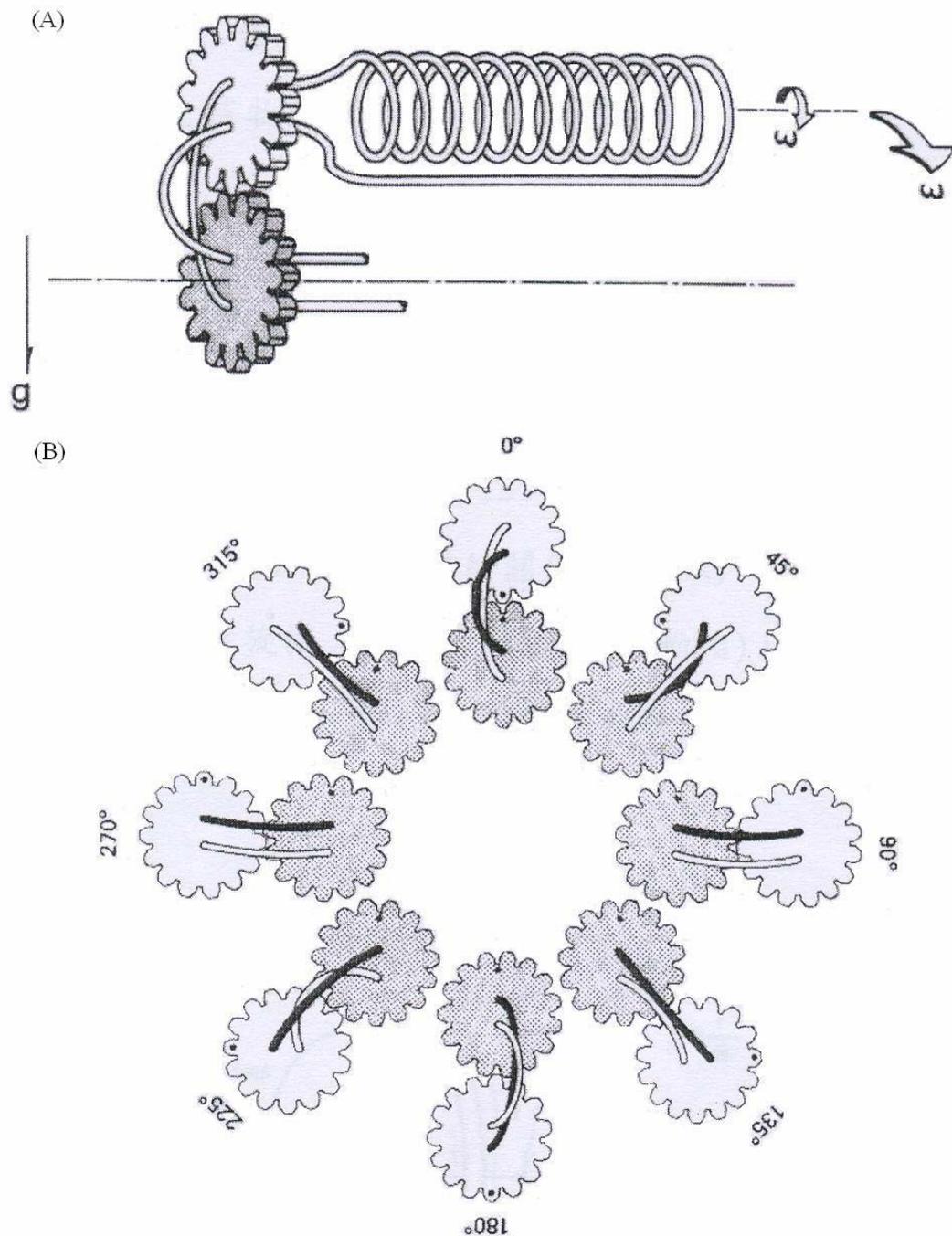


圖 8 高速逆流層析的旋轉機構<sup>19</sup>

(A) 螺管支持物不僅以角速度 $\omega$ 繞著中心軸旋轉，同時自身也以相同的角速度往相同方向旋轉

(B) 螺管支持物的同步行星運動可防止流體導入管與導出管扭轉

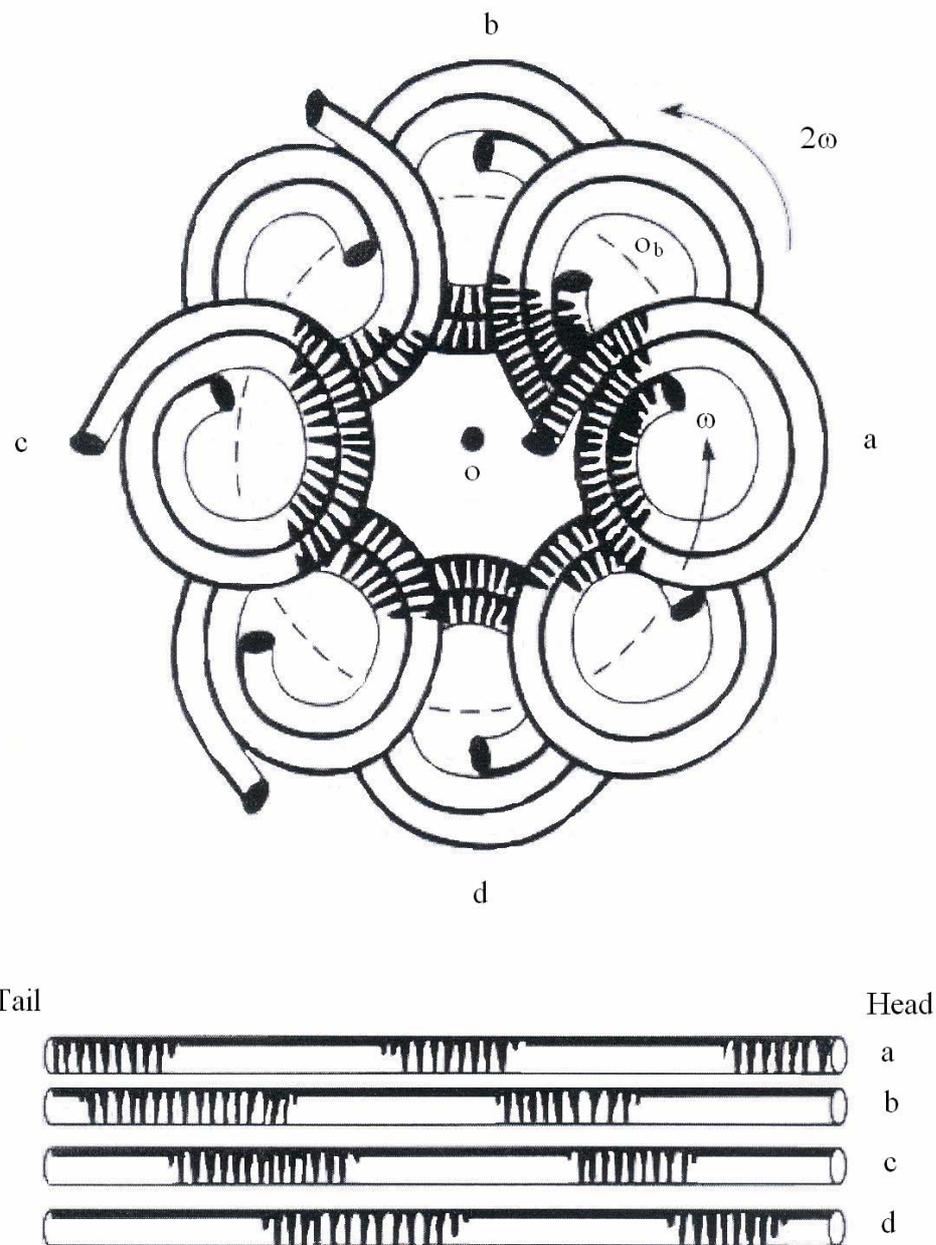


圖 9 IV型同步行星式逆流層析的混合在管柱內的分佈情形<sup>21</sup>

在頭端，較重相在尾端。反之，若為親水性溶劑系統，如 2-丁醇/水，其分佈正好相反。若溶劑系統性質在上述兩者之間，則由旋轉螺管之 $\beta$ 值決定， $\beta$ 值大者，分配情形與疏水性系統相同； $\beta$ 值小者，則與親水性系統相同。

在高速逆流層析中，溶劑系統的選擇有幾點必須注意<sup>12</sup>。(1) 樣品不會被分解和去活性 (2) 樣品有充分的溶解度 (3) 適當的分配係數 (4) 良好

的靜相滯留量。

#### (4) 影響靜相滯留量的因素

在高速逆流層析中，液體靜相在管柱中滯留的多寡影響了分離的效果。在較高的靜相滯留量下可提高分離的解析度以及對樣品的承載量。影響靜相滯留量及分離的因素可分為下列幾點<sup>13,22</sup>：

(a) 溶劑系統：在選擇溶劑系統時必須考慮溶劑極性、對溶質的選擇性以及溶質在不同溶劑中的溶解度。一般而言，分析物在兩相間最佳化的分配係數  $K$  需落在 0.2~5 之間，才可達到較佳的分離效果。但在二元溶劑系統中，要落在此範圍並不容易，因此，常藉由加入第三種甚至第四種可溶於兩者溶劑以調和原先溶劑在極性或是界面張力的差異。之後，再依分離需要決定動靜相。

(b) 轉速：在較大的轉速下，可提供較高的靜相滯留量，解析度也較佳。

(c) 動相流速：較慢的動相流速，會有較佳的靜相滯留量，提高解析度，但分離時間會變長。

(d)  $\beta$  值：對於疏水性的溶劑系統，較大的  $\beta$  值可提供的離心力較大，可有較高的靜相滯留量。

(e) 流析模式：疏水性的兩相溶劑系統有較大的表面張力，輕相會偏向頭端，重相在尾端。因此在疏水性的溶劑系統，若選擇重相當動相較適合 head-to-tail 的流析模式，可提高靜相滯留量。

#### 2.1.8 逆流層析的應用

一般傳統的分析方法，分析物通常需先經過前處理，以避免基質的干擾。逆流層析是一種分析型與製備型兼具的分離濃縮技術，分析型處理微量分析物，但應用性較少，製備型則不需事前純化步驟來除去雜質，可直接處理大量的粗製萃取物。使用逆流層析做分離通常具有下列幾項優點：

(1) 因不需固體支持物，可避免分析物在分離過程中被永久吸附的問題，分析物較不易受破壞 (2) 可提供較佳的回收率 (3) 除去固體支持物中污染物的問題。因此，近年來逆流層析日漸受到重視，主要應用在藥物研發、農業化學以及生化等方面。目前，逆流層析對於氨基酸衍生物、生化分子、天然物、添加色素、外消旋化合物，甚至是金屬離子的分離純化都有相當成果<sup>23-29</sup>。逆流層析從早期發展至現在，高轉速逆流層析 (HSCCC) 是目前最熱門的逆流層析儀器。因為高轉速而使管柱內的動靜相激烈混合，而有較高的分配效率，可提高分離並且縮短分離時間。

## 2.2 界面活性劑

### 2.2.1 界面活性劑介紹<sup>30,31</sup>



界面活性劑 (Surface active agents or Surfactants)，主要是由兩個極性相當不同的基團所組成，一端為低極性的長鏈烷基，稱為疏水基 (Hydrophobic group)，另一端為極性很大的親水基 (Hydrophilic group)，示意圖如圖 10，這樣結構的分子稱為雙性分子 (Amphiphilic Molecule)。當界面活性劑分子溶於水或油中時，容易吸附在溶液的表面或是兩液體之界面間，因而可降低界面張力。

界面活性劑的種類繁多，主要可依兩種方式區分。(1) 依界面活性劑親水基的帶電性，可分為陽離子型、陰離子型 (如實驗中所使用的月桂硫酸鈉、1-丁烷磺酸鈉、1-庚烷磺酸鈉，皆屬此類)、兩性型以及非離子型 (如實驗中所使用的 Triton X-100)。(2) 依界面活性劑的溶解性，可分為水溶性與油溶性兩類，本實驗中所使用到的界面活性劑皆屬水溶性之界面活性劑。

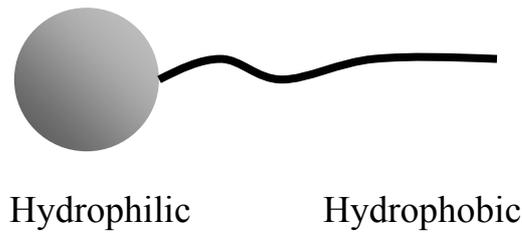


圖 10 界面活性劑分子示意圖<sup>30,31</sup>

### 2.2.2 界面活性劑之性質與應用<sup>30,31</sup>

當界面活性劑添加至水中，其分子之極性部分會傾向與水產生相互作用，而非極性部分與水之吸引力較弱，因此，界面活性劑分子會在水中發生親水基朝向水中，疏水基朝向界面上（可能是空氣或其他疏水性溶劑）的排列，示意圖如圖 11。其在水的表面形成一層單位面積濃度遠大於水中界面活性劑濃度的分子層，此時水的表面張力會隨著界面活性劑濃度增加而明顯降低。

此外，存在於水中的界面活性劑分子當濃度到達臨界微胞濃度後，可形成疏水基朝內，親水基朝外的聚集體 (aggregates)，稱之為微胞 (Micelle)，示意圖如圖 12，水中的界面活性劑出現在表面或是以微胞形式

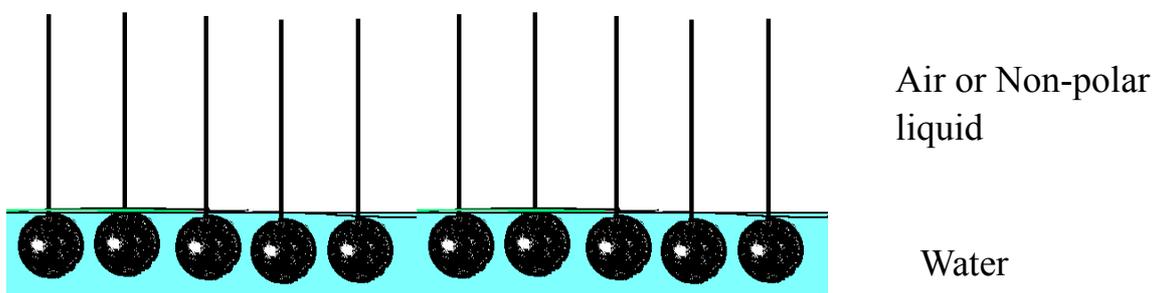


圖 11 溶於水中之界面活性劑示意圖

存在於水中的比例視界面活性劑的濃度而定。在低濃度時，界面活性劑偏向排列在液體表面上，當表面的界面活性劑分子隨著濃度提高而越來越擁擠，則會開始形成微胞。微胞的形狀大小主要受界面活性劑添加濃度影響，另外也與本身的結構與性質，溶液的組成以及溫度等因素有關。

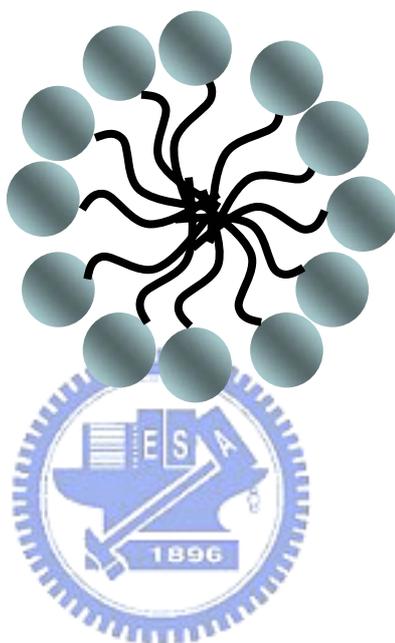


圖 12 微胞示意圖

在某一濃度下，液體表面所含之界面活性劑分子已達其最大承載量，之後所添加之界面活性劑分子將完全排列形成微胞，此濃度稱為臨界微胞濃度 (Critical Micelle Concentration)，簡稱為 CMC 值。圖 13 為液體之表面張力與添加之界面活性劑濃度指數所做的圖。圖 13 區域 1. 界面活性劑濃度增加，表面張力下降。圖 13 區域 2. 表面已完全承載界面活性劑分子，添加更多的界面活性劑對表面張力將不再影響。臨界微胞濃度的測定除了利用改變界面活性劑濃度求其導電度或表面張力變化的方法之外，尚有界面張力計測量法。圖 14 為用來偵測液體表面張力之表面張力計 (tensionmeter)，由測量白金環由液體表面拉離液面所需的拉力準確求得溶液之表面張力，為一簡單快速且商業化的表面張力測量儀器。

界面活性劑主要有潤濕、乳化、分散、起泡、可溶化、潔淨等性質，大量運用在紡織工業以及清潔劑工業中<sup>30,31</sup>，另外也廣範應用在分析化學領域當中，例如毛細管電泳中之膠束電動力學毛細管層析 (MEKC, Micellar electrokinetic capillary chromatography)，為主要在緩衝溶劑中添加一定濃度以上之界面活性劑，以形成膠束 (Micelle)，即可進行帶電成分以及中性成分的分離，其應用範圍包含維生素、大部分藥物與中藥成分<sup>33</sup>。此外尚有運用雲點萃取法配合高效液相層析儀偵測染料中微量芳香族胺類化合物等之研究與應用<sup>34</sup>。

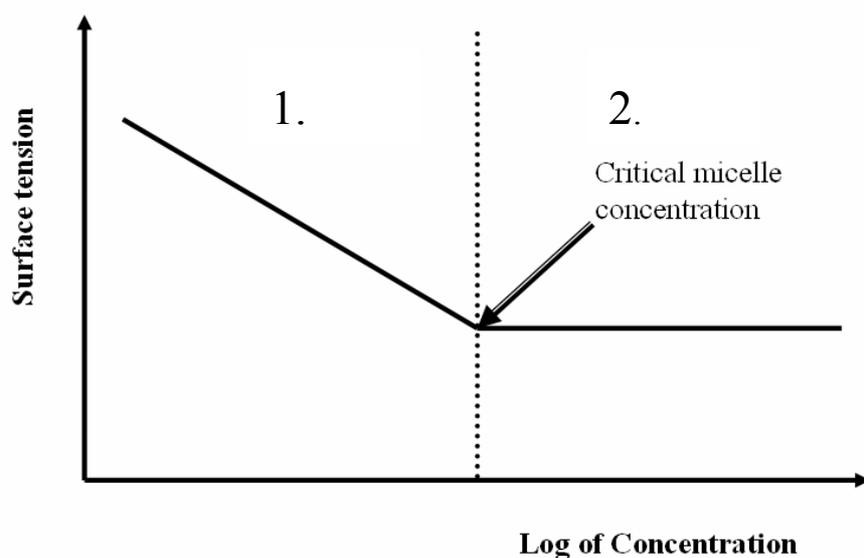


圖 13 溶液的表面張力與界面活性劑濃度間的關係圖



圖 14 表面張力計儀器圖

### 2.3 類固醇<sup>35</sup>

類固醇 (steroids) 化合物，是以四環為基本結構的脂溶性荷爾蒙，在生化領域中，可以算是最規則的一類化合物。類固醇的種類相當繁多，基本架構包含三個環己烷以及一個環戊烷，形成以十七個碳原子排列而成的 Cyclopentanoperhydrophenanthrene 的骨架，如圖 15。而在官能基上的差異，造成在物性、化性上的不同。膽固醇 (cholesterol)、維生素 D (vitamin D)、膽汁酸 (the bile acid)、抗生素 (antibiotic)、性荷爾蒙 (sex hormone)、皮質荷爾蒙 (corticoid hormone)、昆蟲蛻變荷爾蒙 (insect moulting hormones)，都是屬於類固醇化合物，對生物而言是相當重要的。

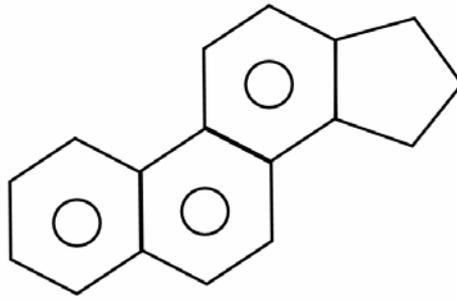


圖 15 Cyclopentanoperhydrophenanthrene 結構式

類固醇主要可以區分為兩類，分別為天然類固醇與合成類固醇。天然類固醇的主要來源，是從動物或植物上取得，對於製藥工業而言，是相當重要的物質。一些類固醇經過適當的萃取或是純化之後，就可以直接做為藥物的原料或是賦形物 (excipient)。

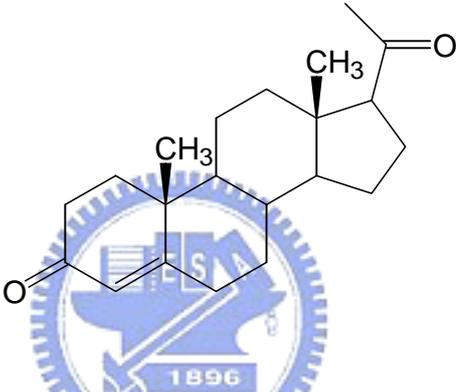
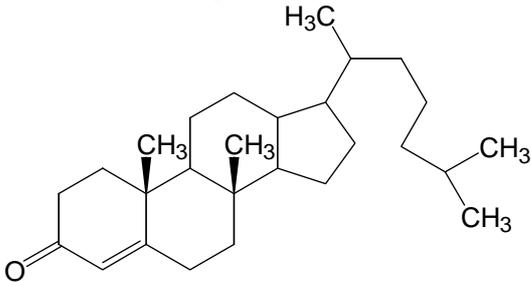
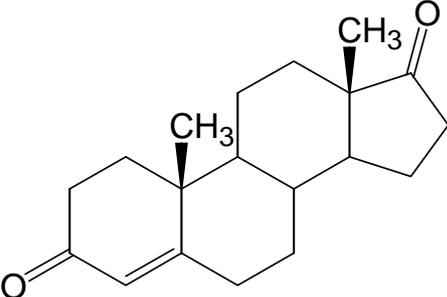
另一個類固醇來源，則是藉由合成的途徑來獲得。由此所獲得的類固醇純度與產量通常較天然類固醇高。但其所涉及的問題，在於產物中微量不純物質的分析與鑑定，這對於類固醇生產工業來說是相當重要的一環。經過分析之後，可將合成途徑做適當的修正，降低副產物與不純物的產生。合成路徑、操作參數、起始原料的品質與純度、溶劑和貯存，都關係到不純物的分佈，因此，對合成的類固醇而言，微量不純物的檢測則顯得非常重要，以確保合成物的品質。

### 第三章 實驗

#### 3.1. 試藥

##### 3.1.1 藥品

##### 1. 類固醇

Progesterone	 <p>The chemical structure of Progesterone is a steroid nucleus with a ketone group at C3, a double bond between C4 and C5, a methyl group at C10, and an acetyl group at C17.</p>	TCI. Tokyo, Japan, purity 98%
(+) - 4 - cholesten - 3 - one	 <p>The chemical structure of (+)-4-cholesten-3-one is a steroid nucleus with a ketone group at C3, a double bond between C4 and C5, methyl groups at C10 and C13, and a branched alkyl side chain at C17.</p>	TCI. Tokyo, Japan, purity 95%
$\Delta^4$ - androstene - 3,17 - dione	 <p>The chemical structure of <math>\Delta^4</math>-androstene-3,17-dione is a steroid nucleus with ketone groups at C3 and C17, a double bond between C4 and C5, and methyl groups at C10 and C13.</p>	TCI. Tokyo, Japan, purity 99%

三類固醇之 UV/Vis 吸收全光譜圖如圖 16。

圖 16-(A)

Progesterone

溶於正己烷溶液

濃度 33ppm

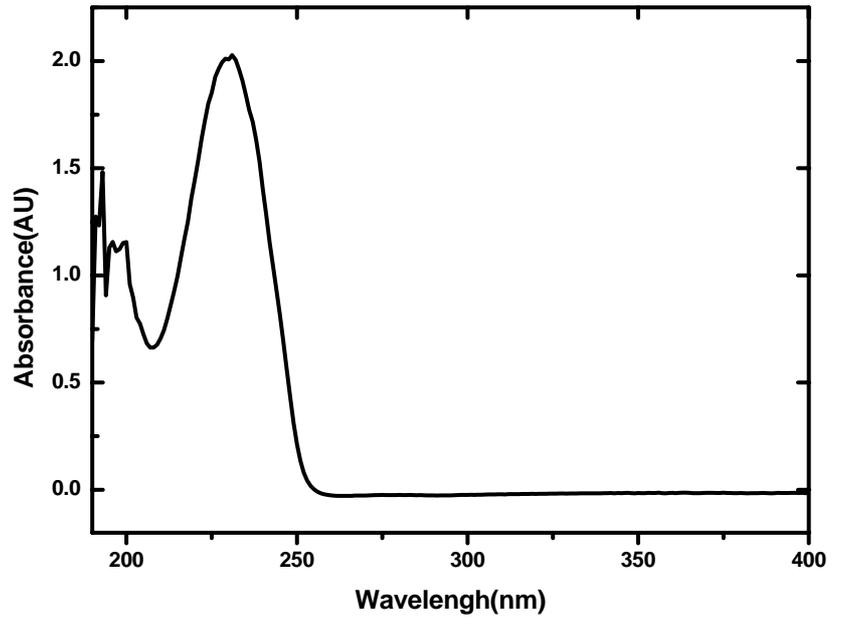


圖 16-(B)

(+) - 4 - cholesten - 3 - one

溶於正己烷溶液

濃度 33ppm

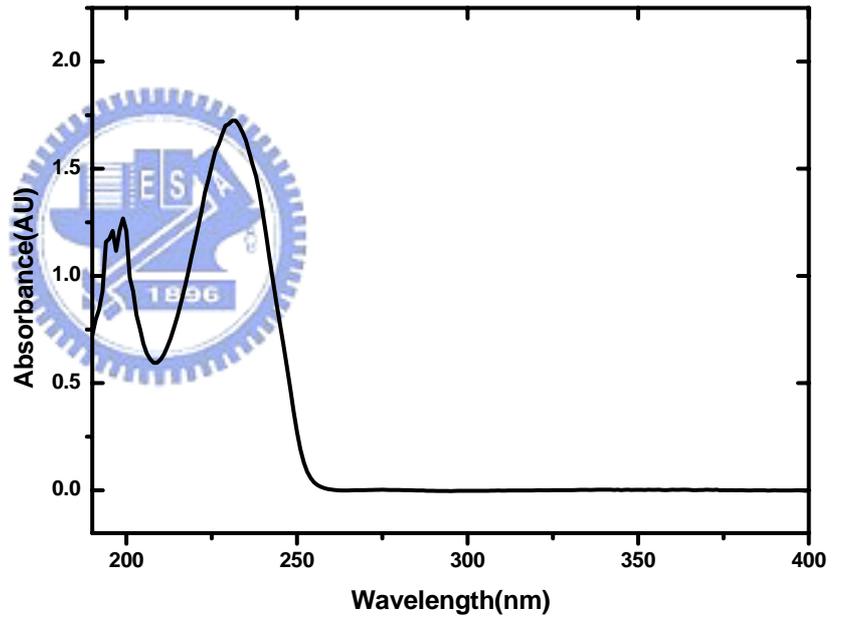
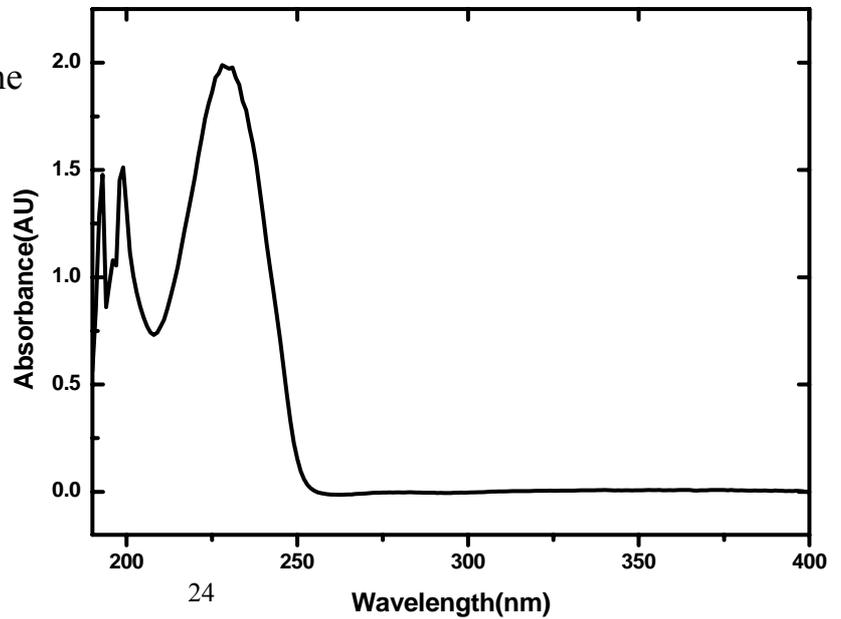


圖 16-(C)

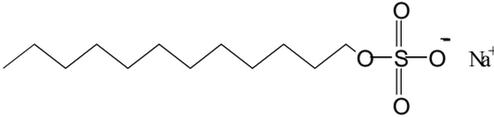
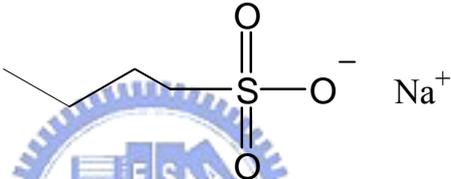
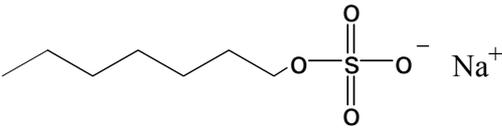
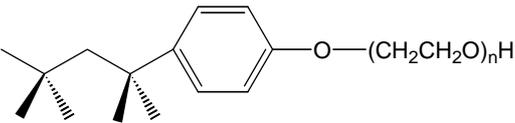
$\Delta^4$ - androstene - 3,17 - dione

溶於正己烷溶液

濃度 27ppm



## 2. 界面活性劑

<p>Sodium n-Dodecyl Sulfate (SDS)</p> <p>月桂硫酸鈉</p> <p><math>C_{12}H_{25}O_4SNa</math></p> <p>FW=288.4</p>		<p>Sigma Chemical</p> <p>USA</p> <p>purity 95%</p>
<p>Sodium 1-Butanesulfonate</p> <p>1- 丁烷磺酸鈉</p> <p><math>C_4H_9O_3SNa</math></p> <p>FW=160.16</p>		<p>TCI. Tokyo,</p> <p>Japan</p>
<p>Sodium 1-heptanesulfonate</p> <p>1- 庚烷磺酸鈉</p> <p><math>C_7H_{15}O_3SNa</math></p> <p>FW=202.25</p>		<p>TCI. Tokyo,</p> <p>Japan</p>
<p>Triton X-100</p> <p><math>C_{34}H_{62}O_{11}</math></p> <p>FW=646.85</p>		<p>Acros Organics</p> <p>New Jersey,</p> <p>USA</p>

### 3.1.2 溶劑

正己烷 n-Hexane	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	HPLC/SPECTRO Tedia Company
正丁醇 n-Butyl Alcohol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	HPLC/SPECTRO Tedia Company
正己醇 Hexyl Alcohol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{OH}$	HPLC/SPECTRO Tedia Company
乙醇 Ethanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Analysis grade NASA
丙酮 Acetone	$\text{CH}_3\text{COCH}_3$	景明化工 試藥級
去離子水 DIW	$\text{H}_2\text{O}$	Millipore Milli-Q plus

### 3.1.3 樣品配製

將欲分離的類固醇皆以溶劑系統之動相為溶劑，配製成 200~1400mg/L 不等的 stock solution，再以超音波震盪器震盪數秒鐘，幫助其溶解在溶劑中，並且去除氣泡。在每次實驗中，分別為不同種類類固醇之混合物。每次注射的樣品溶液體積為  $100\ \mu\text{L}$ ，另有幾組實驗樣品注射體積改為 1ml、5ml 此部份於圖文中將會詳細說明。

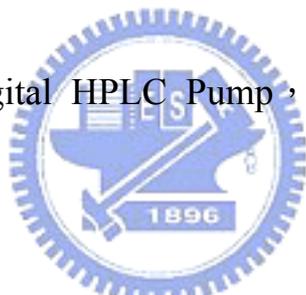
## 3.2 儀器設備

### 1. 高速逆流層析儀 (HSCCC)

為 Model CCC-1000，如圖 17，由 Pharma-Tech Reserch Company 製造 (Baltimore Maryland, USA)。本實驗前後分別使用了兩種不同的分離管柱。(A)纏繞單層 tefzel 材質分離管柱，外徑 1/10 inch，內徑 1/16 inch，總纏繞長度約 2920 公分，總體積 42 mL。(B)纏繞三層 tefzel 材質分離管柱，外徑 1/8 inch，內徑 1/16 inch，總纏繞長度約 3500 公分，總體積 112 mL。外接管柱為鐵氟龍材質，外徑 1/16 inch，內徑 1/32 inch。連接液體導出與導入管的低壓塑膠結合器 (nuts and ferrules) 皆購自 Chemical Research Supplies (Fairbanks Addison, IL 60101, USA)。

### 2. HPLC 幫浦

幫浦為 Series II Digital HPLC Pump，流速可由 0.01 mL/min ~ 9.99 mL/min。



### 3. 控溫裝置

控溫範圍可在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 內，由新竹盟利企業有限公司 (新竹市南大路 130 號)製作。

### 4. 六向閥

Type 50 Teflon Rotary Valve，可耐壓 300psi，耐溫  $50^{\circ}\text{C}$ 。

### 5. 紫外/可見光偵測器 (UV / Vis Detector)

所使用的偵測器為 BIO-RAD model 1801 型，並將訊號接上個人電腦，以”色層分析數據處理系統”(訊華公司，台北市) 截取實驗訊號。

### 6. 表面張力計

Shimadzu/日本 DN Type

### 7. 吸收光譜儀 (UV/Vis)

Agilent 8453 UV-Visible spectrophotomer (Waldronn, Germany)

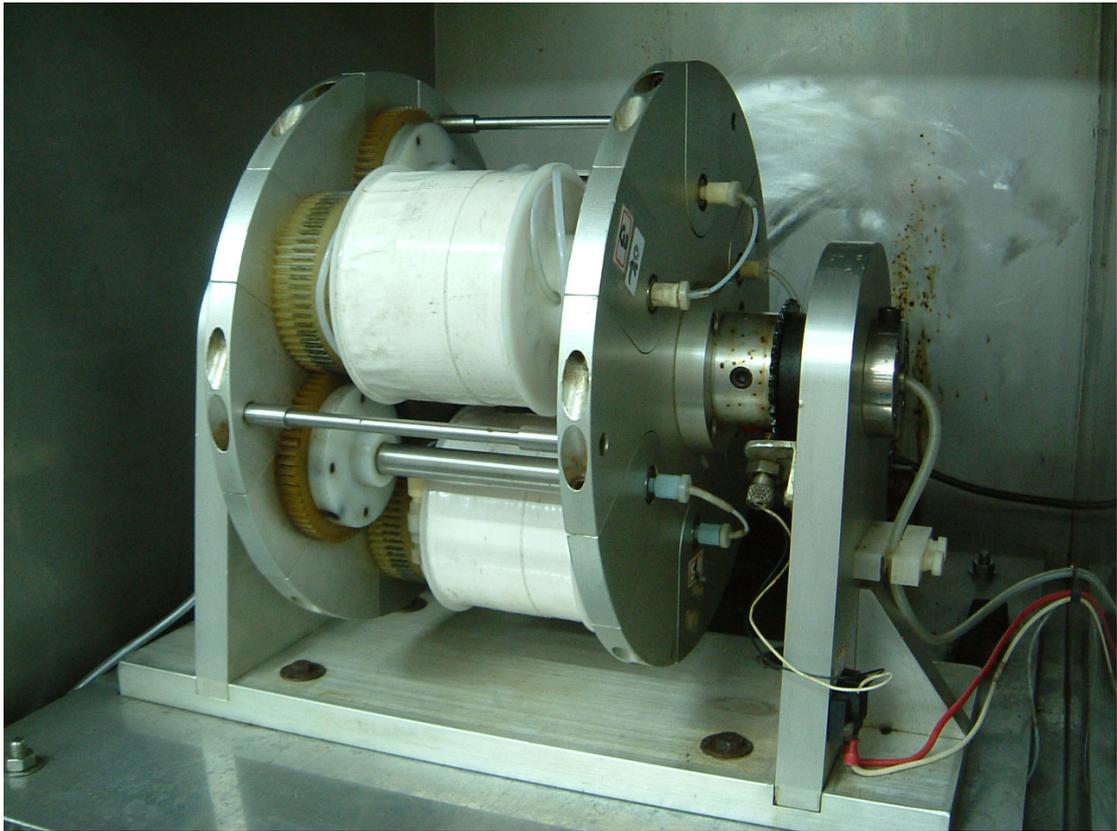


圖 17 高速逆流層析儀儀器主體圖

### 3.3 實驗步驟

實驗儀器裝置圖如圖 18 所示。

- (1) 將依照比例配方配製好的溶劑系統置於分液漏斗中靜置使之分層，並靜置隔夜使其達平衡，之後分別取出上層相與下層相。
- (2) 在實驗前所使用的溶劑與過濾器 (filter)，皆需經超音波震盪器震盪數分鐘以除去氣泡。
- (3) 啟動控溫裝置，將溫度設定在 20 °C，待系統內溫度到達設定值，以流速 3mL/min 將靜相 (下層相) 打入，使靜相完全充滿分離管柱。
- (4) 啟動 HSCCC，慢慢將轉速調至 700rpm，靜待轉速與儀器穩定。

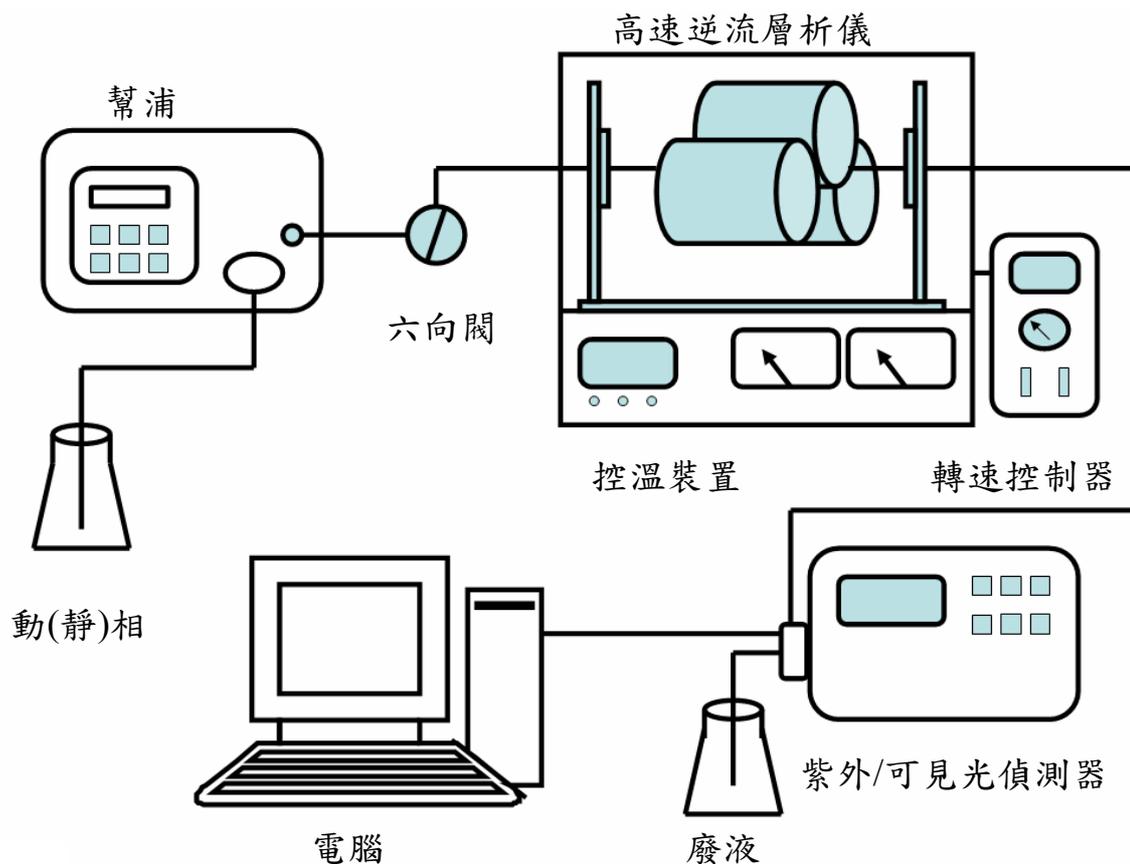


圖 18 實驗儀器裝置圖

- (5) 待轉速穩定後，以流速  $2\text{mL}/\text{min}$  注入動相（上層相），使動、靜相在管柱內達到平衡，並推出多餘的靜相。由被推出的靜相體積可求得此溶劑系統的靜相滯留量。
- (6) 將 HSCCC 管柱出口經六向閥接至紫外/可見光偵測器，選擇偵測波長  $230\text{nm}$  並開始偵測。
- (7) 待偵測器訊號穩定，即層析圖紫外光偵測基線平穩後，注入樣品溶液至 sample loop 中，注射體積為  $100\ \mu\text{L}$ ，此平衡需費時大約  $1\sim 5$  分鐘。另有幾組實驗樣品注射體積改為  $1\text{ml}$ 、 $5\text{ml}$  此部份於圖文中將會詳細說明。

- (8) 將 HSCCC 管柱入口經六向閥接至 sample loop，開始進行層析。
- (9) 待分離結束後，導入氮氣將管柱內的所有液體推出。
- (10) 再以大量的甲醇與去離子水清洗分離管柱以及偵測器，最後導入氮氣將管柱吹乾，避免因溶劑殘留影響實驗結果。



## 第四章 結果與討論

### 4.1 溶劑系統的選擇

溶劑系統的選擇是進行類固醇分離的首要步驟，參考許多利用逆流層析系統分離類固醇的文獻，發現有例子是使用正己烷 (n-Hexane) 當作有機相的基本溶劑，水當作水相的基本溶劑<sup>6,36,37</sup>，可順利將數種同類型類固醇分離，因此本實驗基本上選用n-Hexane/Water的溶劑系統，探討在此溶劑系統中添加不同種類之界面活性劑，不同界面活性劑添加濃度，或是添加其他溶劑對類固醇化合物分離效果的影響。在選擇添加物質或是添加濃度的前提，必須確保溶劑系統在添加後保持上下層相完整分層，且不會有混濁或是乳化現象產生。就實驗經驗上得知，產生混濁或乳化現象的溶劑系統會因為黏滯度大幅增加而易造成管柱內壓力增大，提高了分離系統滲漏的機率。再者，就是確定溶劑系統擁有相當的靜相滯留量，靜相滯留量的多寡會影響分離結果，因此靜相滯留量最好能維持在 50%以上。

完成靜相滯留量的測試後，接下來進行系統穩定性的測試。這項測試的目的在於檢測溶劑系統在分離過程中，靜相是否會隨著動相被帶出，造成靜相流失的狀況，這情形會使系統不穩定，同時也嚴重干擾偵測結果。因此在打入分離樣品前，先等待約五分鐘觀察紫外光偵測基線是否平穩，再進行分離工作。

### 4.2 分離條件的選擇

由於類固醇類化合物不溶於水的性質，因此，在高速逆流層析分離機制中，選用溶劑系統之下層相（水相）當作靜相，而上層相（有機相）當作動相，由動相帶著分離物種前進而進入分離管柱，藉著不同分離物種在兩相中分佈的差異達到分離的效果。本實驗使用的是 tail - to - head 的流析模

式以提高靜相滯留量。

HSCCC 的轉速不同會改變液體在管柱內受到的離心力與重力，導致靜相滯留量的不同。本實驗使用溶劑系統: n-Hexane /Water (界面活性劑 SDS 0.66mM) = 1:1 測試了兩種不同轉速，分別為 700rpm 以及 800rpm，發現靜相滯留量各為 60%與 83%，可見轉速對靜相滯留量的影響。然而，當轉速設定在 800rpm 時，因為在高轉速下動、靜相混合較激烈的緣故，使得紫外光偵測基線在開始流析 40 分鐘後呈現不穩定狀態，且當界面活性劑濃度再提高，紫外光偵測基線呈平穩的時間逐漸縮短。由於逆流層析的分離工作往往需要長時間進行，因此為了確保分離工作順利，之後的實驗皆是將轉速設定在 700rpm。

在溫度控制部分，在測試階段分別使用了室溫 (約 25°C)、20°C 以及 15°C 來進行溶劑系統穩定度的檢測，經實驗後發現，較高的溫度會較容易造成溶劑系統呈現不穩定現象。此外，又基於恆溫控制系統老舊，15°C 恆溫的條件不易達成，在溫度較高的環境下往往需要另外放置冰塊來保持低溫，因此，本實驗條件選用恆溫 20°C 來進行類固醇類的分離。

### 4.3 HSCCC 儀器分離之初步測試

開始使用本實驗室高速逆流層析儀時，儀器的分離管柱規格為單層纏繞 tefzel 材質分離管柱，外徑 1/10 inch，內徑 1/16 inch，總體積 42 mL。利用這樣的管柱進行類固醇分離，所使用的溶劑系統為 n-Hexane /Water (界面活性劑 SDS 0.83mM) = 1:1，分離樣品為 (+) - 4 - cholesten - 3 - one 和  $\Delta^4$ -androstene - 3,17 - dione 兩種類固醇的混合物，其分離結果之層析圖如圖 19。由此實驗層析圖中，很明顯的看出分離效果並不佳，雖然此溶劑系統對於這兩種類固醇有分離效果，但是兩層析訊號峰部分重疊在一起，解析度 (Resolution) 並不理想。為了提升解析度，在不改變溶劑系統的情況下，

一個直接的方式就是增加層析管柱的理論版數 (Number of plates)，可以藉著增加層析管柱長度來達成。因此，將原本單層纏繞的分離管柱變更為三層纏繞，規格為tefzel材質分離管柱，外徑 1/8 inch，內徑 1/16 inch，總體積增加為 112 mL，約略為原來的 2.6 倍。

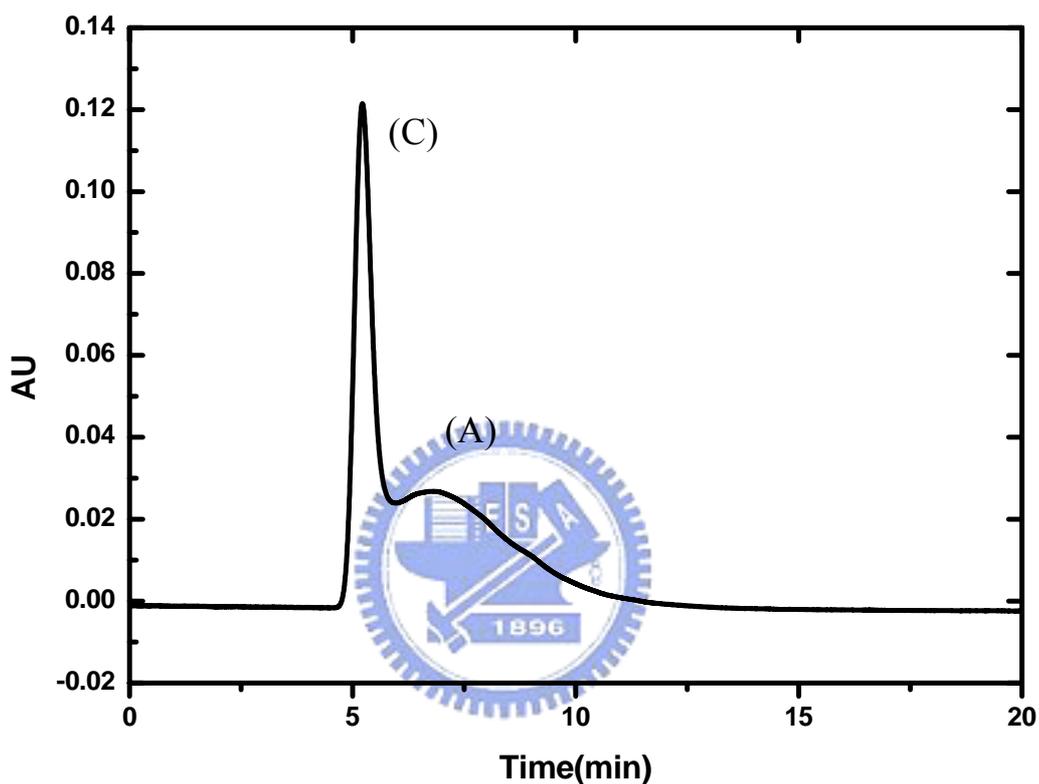


圖 19 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：42mL

溶劑系統：n-Hexane/Water (SDS 0.83mM) = 1:1

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：76% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (50 mg/L)

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17 - dione (200 mg/L)

進行層析管柱長度增長後，馬上進行測試。使用與改造前相同的溶劑

系統: n-Hexane /Water (SDS 0.83mM) = 1:1，同樣進行(+)-4-cholesten-3-one和 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione兩種類固醇混合物的分離，其分離結果之層析圖如圖 20。由圖 20 中可觀察出此兩種類固醇的層析訊號順利完整分開，證實增加層析管柱長度的確可以有效提升分離的解析度。因此，之後的實驗皆使用加長後的層析管柱進行分離工作。

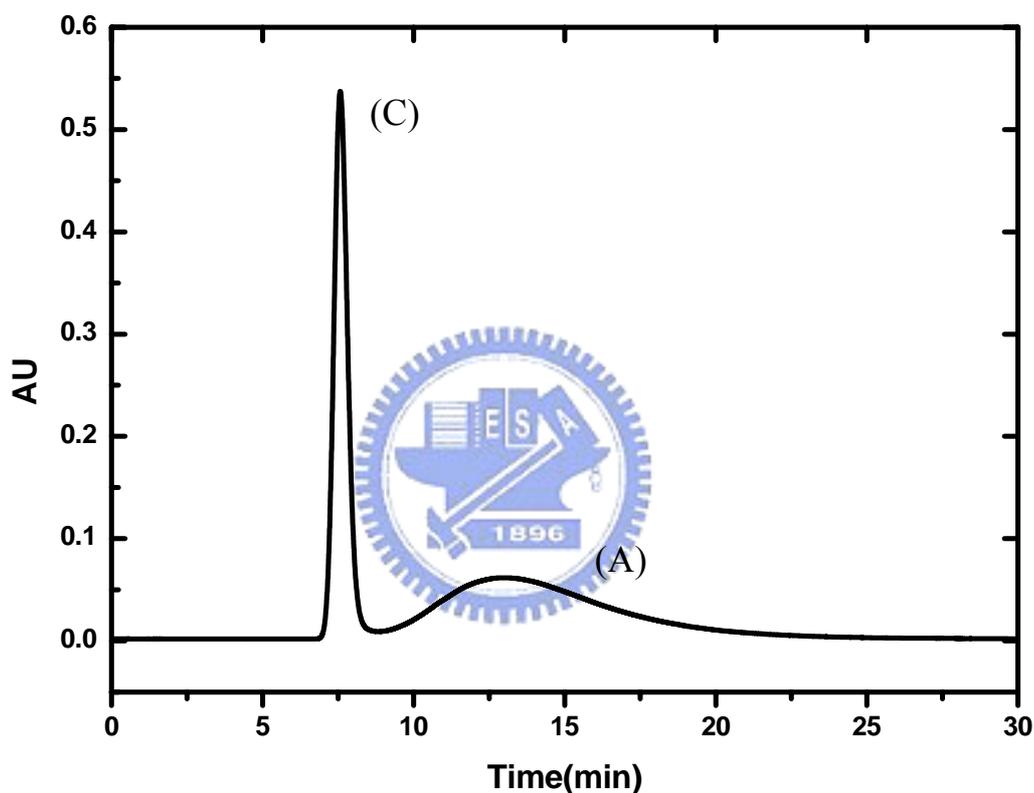


圖 20 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積: 112mL

溶劑系統: n-Hexane/Water (SDS 0.83mM) =1:1

轉速: 700rpm 流速: 2mL/min 注射時間: 0 分鐘注入

靜相滯留量: 86% 樣品注入量: 100 $\mu$ L

(C): (+)-4-cholesten-3-one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione (400 mg/L)

## 4.4 實驗分離結果

接下來針對溶劑系統中添加之界面活性劑種類、濃度變異以及使用多種溶劑系統組成來討論分離結果。

### 4.4.1 添加界面活性劑月桂硫酸鈉的分離效果

首先選用一般常用之水溶性界面活性劑-月桂硫酸鈉 (SDS)，其臨界微胞濃度約為 7-10mM<sup>38</sup>。實驗最初選用 n-Hexane/Water = 1:1 的比例，添加此界面活性劑至臨界微胞濃度 8mM，卻發現溶劑系統之上層相呈現混濁黏稠之乳化現象，完全不適用於高速逆流層析儀當中，因此不得不降低界面活性劑的使用濃度。之後分別嘗試了數十種低於 8mM 的濃度後發現，上層相混濁現象隨著界面活性劑濃度降低而越趨澄清，且逆流層析圖之紫外光偵測基線也隨之趨於平穩，這樣的溶劑系統才適合進行分離工作。最後測試出可保持溶劑系統穩定以及紫外光偵測基線平穩的最高界面活性劑添加濃度為 0.83mM，隨即進行 Progesterone、(+)-4-cholesten-3-one、 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione 三種類固醇混合物的分離。實驗之溶劑系統為：n-Hexane/Water (SDS 0.83mM) = 1:1，實驗之層析圖如圖 21。由實驗結果發現此溶劑系統僅能將  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione 從其他類固醇中分離開來，而類固醇 Progesterone 與 (+)-4-cholesten-3-one 在此溶劑系統中並無滯留現象，因此無法有效分離。

由此溶劑系統之分離結果得知，在溶劑系統內添加的界面活性劑 SDS 遠低於臨界微胞濃度時，由於存在於水相中的界面活性劑分子降低水相的極性，使原本只溶解於有機相的類固醇有某程度溶於水相中，造成分離物種在動、靜相間有適當之分佈差異，因此有分離類固醇混合物的能力，但界面活性劑添加濃度太低導致分離效果有限。

由於在 n-Hexane/Water 的溶劑系統中添加界面活性劑 SDS 至臨界微胞

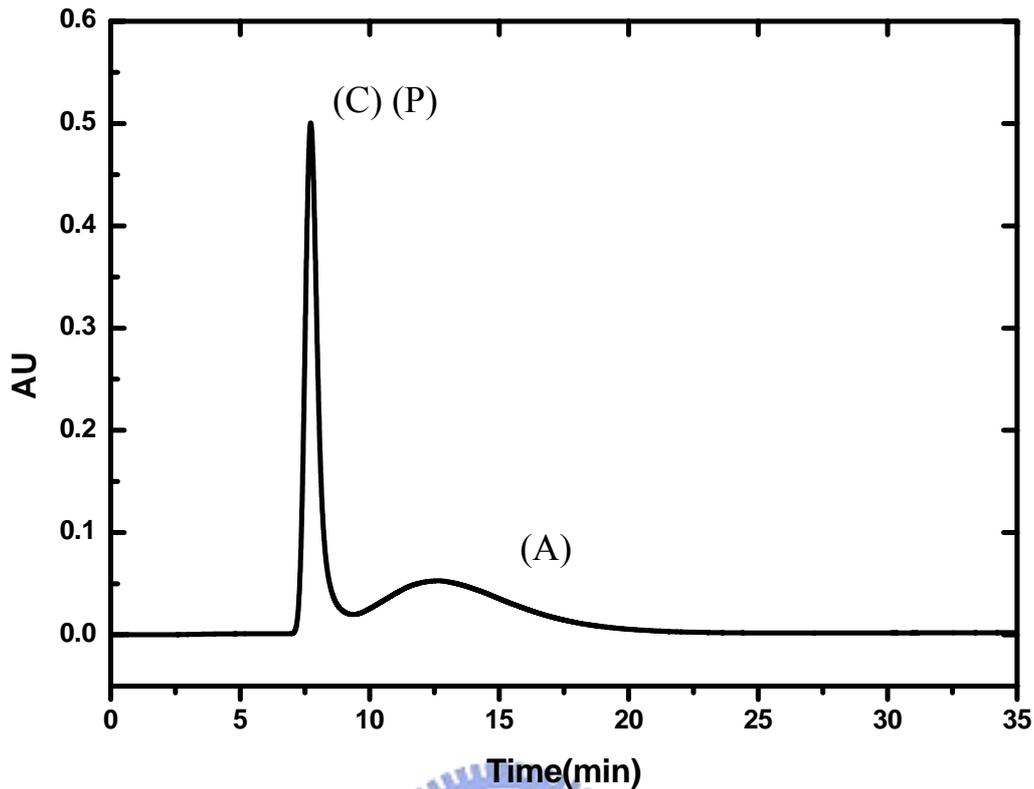


圖 21 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/ Water (SDS0.83mM) =1:1

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：85% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17 - dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

濃度會出現乳化現象，因此在此溶劑系統內添加大量乙醇當作共溶劑 (co-solvent)，希望藉由乙醇破壞乳化的能力來解決乳化問題。之後實驗選擇之溶劑系統為：n-Hexane/Water (SDS 8mM)/Ethanol = 2:1:1，經實驗後發現，添加大量乙醇的溶劑系統確實不再出現混濁濃稠之乳化現象。接著使其進入逆流層析儀中進行三種類固醇混合物的分離，層析圖如圖 22，實驗後由

層析圖發現此溶劑系統確實有分離三種類固醇混合物之能力，但由於此溶劑系統尚未找到最佳化的溶劑配置比例以及分離參數，因此溶劑系統並不穩定，分離過程中有靜相流失之狀況，經過三小時的流析後，靜相完全被動相帶出分離管柱外，由此實驗結果得知此溶劑系統目前尚無法適用於分

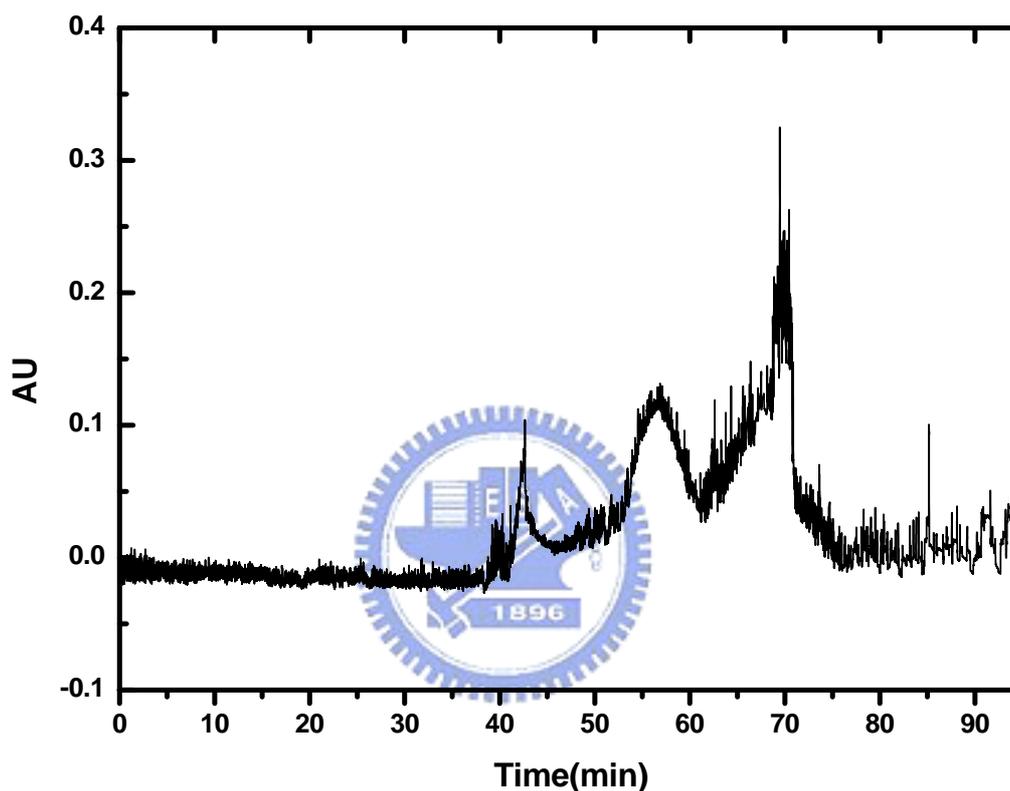


圖 22 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Water (SDS 8mM)/Ethanol =2:1:1

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：85% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17 - dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

離工作，不過進一步改進後的效果則是可期待的。

#### 4.4.2 添加界面活性劑 Triton X-100 的分離效果

實驗選擇之第二種界面活性劑為 Triton X-100，此為一種非離子型界面

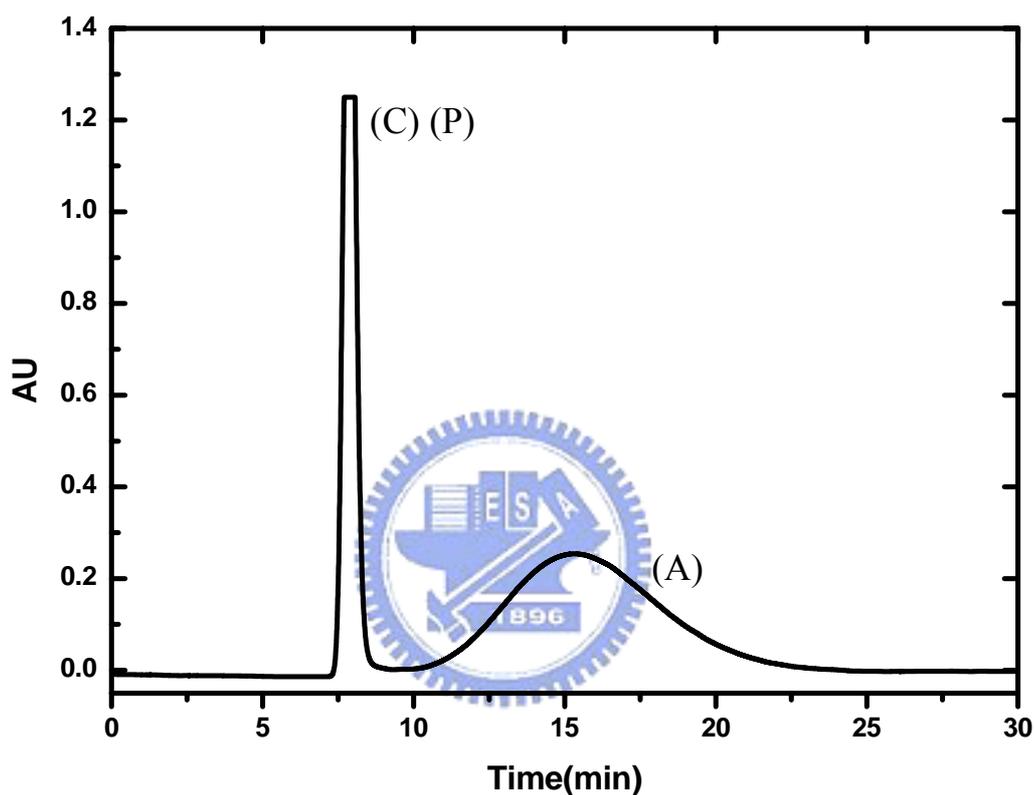


圖 23 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Water (Triton X-100 0.054mM) = 1:1

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：84% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17- dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

活性劑，臨界微胞濃度約為 0.2mM。開始使用之溶劑系統為: n-Hexane/Water (Triton X-100 0.2mM) = 1:1，亦出現渾濁黏稠乳化之現象，因此降低界面活性劑添加濃度。最後測試出可保持溶劑系統穩定以及紫外光偵測基線平穩的最高界面活性劑添加濃度為 0.054mM，隨即進行Progesterone、(+)-4-cholesten-3-one、 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione三種類固醇混合物的分離。分離之層析圖如圖 23，由實驗結果發現此溶劑系統僅能將 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione從其他類固醇中分離開來，而類固醇Progesterone與(+)-4-cholesten-3-one在此溶劑系統中無滯留現象，因此無法有效分離。此分離結果與溶劑系統: n-Hexane/Water (SDS0.83mM) = 1:1 的效果類似。

#### 4.4.3 添加界面活性劑 1-丁烷磺酸鈉的分離效果

由之前界面活性劑 SDS 以及 Triton X-100 添加至 n-Hexane/Water 的溶劑系統中發現添加高濃度會有渾濁濃稠的乳化現象，推斷是因為此種界面活性劑之長碳鏈端親油能力強，造成有部分的水溶進正己烷相中，因此出現上層相（有機相）乳化的情形。因此，更改為選擇短碳鏈之界面活性劑 (short-chain surfactant): 1-丁烷磺酸鈉來進行實驗。

由於開始實驗時尚未知道界面活性劑 1-丁烷磺酸鈉的臨界微胞濃度，經測試後選用溶劑系統: n-Hexane/Water (1-丁烷磺酸鈉 25mM) = 2:1，可保持上、下層相澄清穩定，且在逆流層析儀快速旋轉下保持紫外光偵測基線平穩，因此可進行分離工作。三種類固醇混合物的分離結果之層析圖如圖 24。實驗後發現，此溶劑系統僅能將 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione從其他類固醇中分離開來，而類固醇Progesterone與(+)-4-cholesten-3-one在此溶劑系統中無滯留，因此無法有效分離。

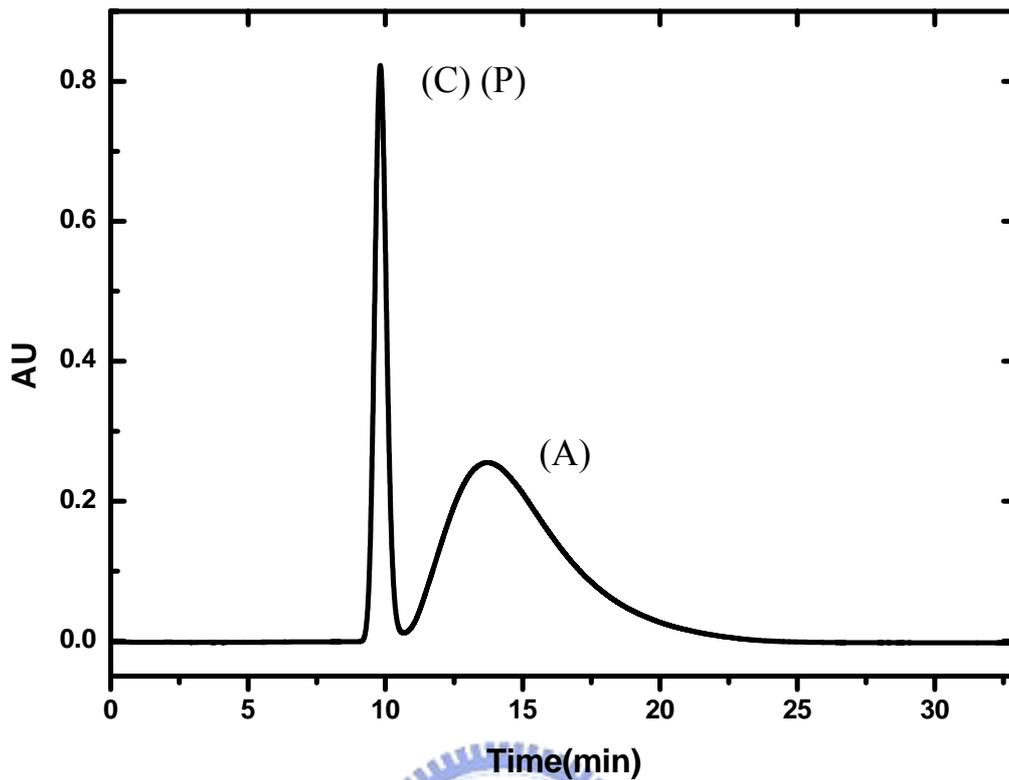


圖 24 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Water (1-丁烷磺酸鈉 25mM) = 2:1

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 鐘分注入

靜相滯留量：83% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17- dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

#### 4.4.4 添加界面活性劑 1-庚烷磺酸鈉的分離效果

由界面活性劑 1-丁烷磺酸鈉的實驗得知，添加短碳鏈界面活性劑於 n-Hexane/Water 的溶劑系統中，可避免因長碳鏈端之疏水性強而造成之乳化狀況發生。因此之後再選用疏水端碳鏈長度介於 SDS 以及 1-丁烷磺酸鈉之間的 1-庚烷磺酸鈉來測試不同界面活性劑對分離效果造成的影響。苦於文

獻中遍查不到 1-庚烷磺酸鈉之臨界微胞濃度，因此剛開始進行實驗時，則先選用溶劑系統: n-Hexane/Water (1-庚烷磺酸鈉 20mM) = 2:1 之配製比例，

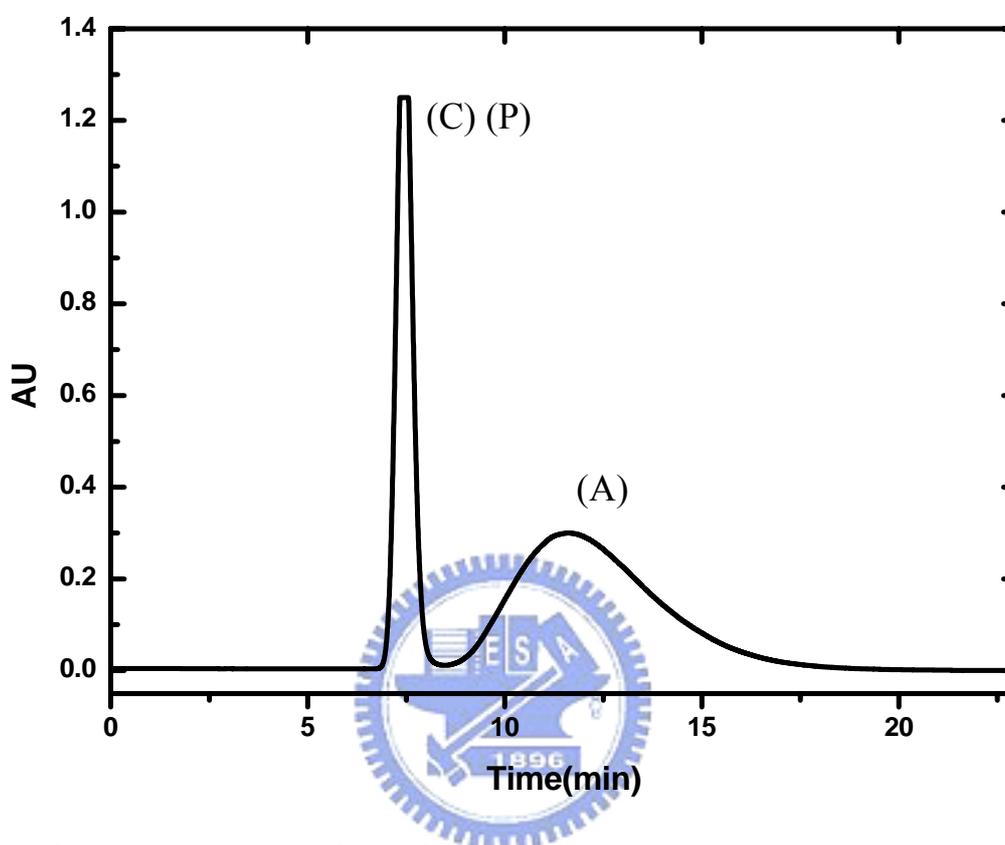


圖 25 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Water (1-庚烷磺酸鈉 20mM) =2:1

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：87.5% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17 - dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

來進行三種類固醇混合物的分離，實驗之層析圖如圖 25。實驗後發現此溶劑系統僅能將 $\Delta^4$ - androstene - 3,17 - dione從其他類固醇中分離開來，而類固醇 Progesterone 與(+)- 4 - cholesten - 3 - one 皆無滯留現象，無法有效分離。之後再提高界面活性劑添加濃度，分別做了 50mM、200mM 兩組實驗，層析圖分別如圖 26、圖 27-(A)。由實驗結果發現，雖然已將界面活性劑濃

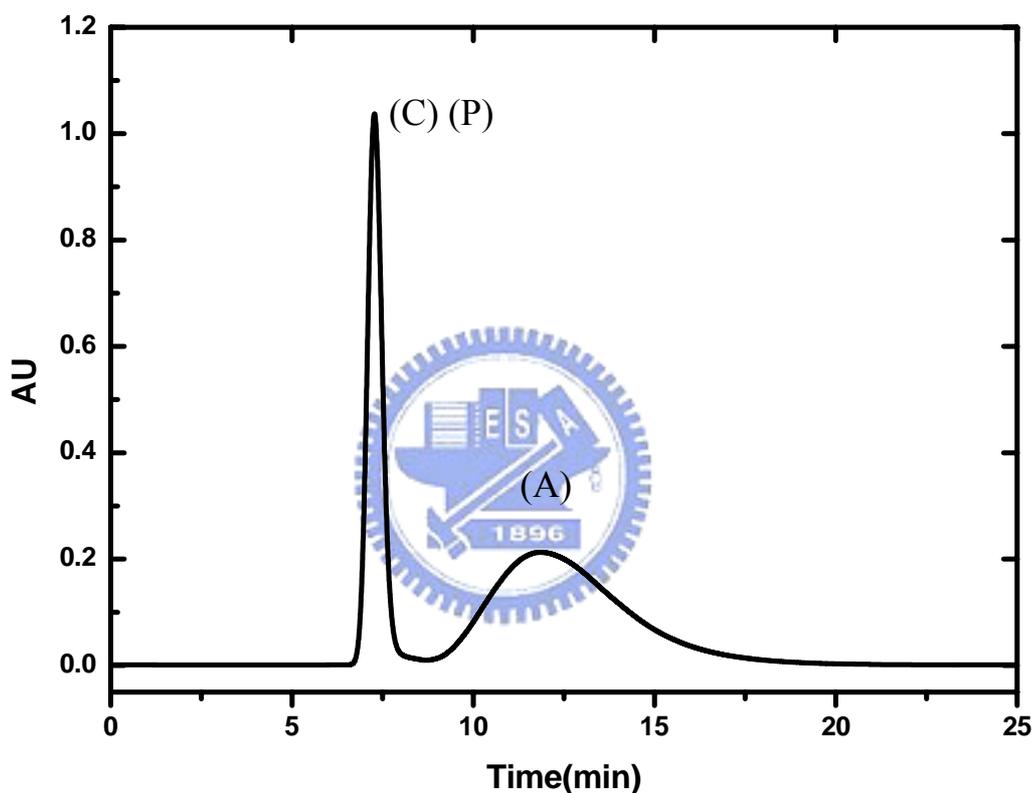


圖 26 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Water (1-庚烷磺酸鈉 50mM) = 2:1

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：88% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+)- 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$ - androstene - 3,17 - dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

度增加至 200mM，但對分離結果未有明顯之影響，對此三種類固醇之分離效果幾乎和濃度為 20mM 時一樣。因此得知當界面活性劑添加濃度未超過 CMC 值時，若稍加提升界面活性劑添加濃度對分離效果之助益並不很顯著。

或許是因為 1-庚烷磺酸鈉長碳鏈端親油性較弱的因素，所以將界面活性劑濃度持續提高，溶劑系統並未出現乳化現象，因此大膽將界面活性劑添加濃度提升至 400mM，進行三種類固醇混合物的分離，實驗之層析圖如圖 27-(D)。經實驗後發現，添加如此高濃度界面活性劑的溶劑系統，可順利的將三種類固醇做完整的分離，其中層析峰(C)為無滯留現象。

由結果中發現，當界面活性劑濃度提升到 400mM，對類固醇混合物的分離效果竟然大幅提升，推斷是由於溶劑系統內已有微胞的形成，才有如此的分離能力。為了證實溶液中微胞存在，則使用表面張力計測量不同界面活性劑濃度下的表面張力，利用到達臨界微胞濃度後表面張力不再下降之特性求得臨界微胞濃度約為 300mM，如表一，圖 28。

之後又進行兩組界面活性劑添加濃度之實驗，分別為添加界面活性劑 1-庚烷磺酸鈉 300mM 以及 350mM，其層析圖為圖 27-(B)與圖 27-(C)。由圖 27 四組層析圖比較界面活性劑添加濃度相對於類固醇分離效果發現，當界面活性劑濃度達 CMC 值左右，隨著界面活性劑添加濃度的增加，對於類固醇化合物的分離效果也隨之大幅增進。由此推測存在於水相中之界面活性劑分子疏水端對類固醇化合物之吸引力，會隨著濃度升高至 CMC 值附近而更加明顯。

由先前一連串實驗結果得知溶劑系統 n-Hexane/Water (1-庚烷磺酸鈉 400mM) =2:1 對於此三種類固醇化合物之分離效果最佳，因此將樣品注射量提升至 1ml、5ml 以及提高注射樣品濃度，層析圖如圖 29-(A)~29-(C)，由實驗結果得知此溶劑系統之樣品承載量最高可達 (+) - 4 - cholesten - 3 - one 3.3mg，Progesterone 5.0mg， $\Delta^4$ - androstene - 3,17 - dione 6.7mg。

圖 27-(A)  
n-Hexane/Water  
(1-庚烷磺酸鈉 200mM)

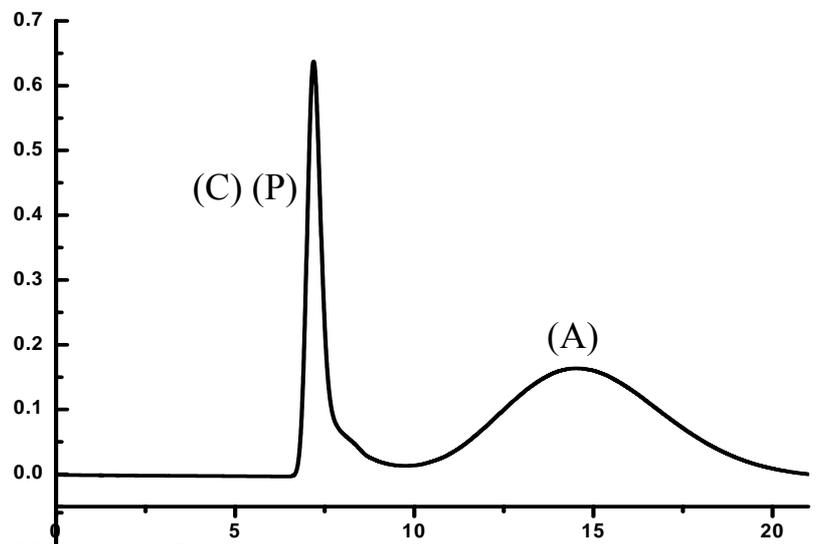


圖 27-(B)  
n-Hexane/Water  
(1-庚烷磺酸鈉 300mM)

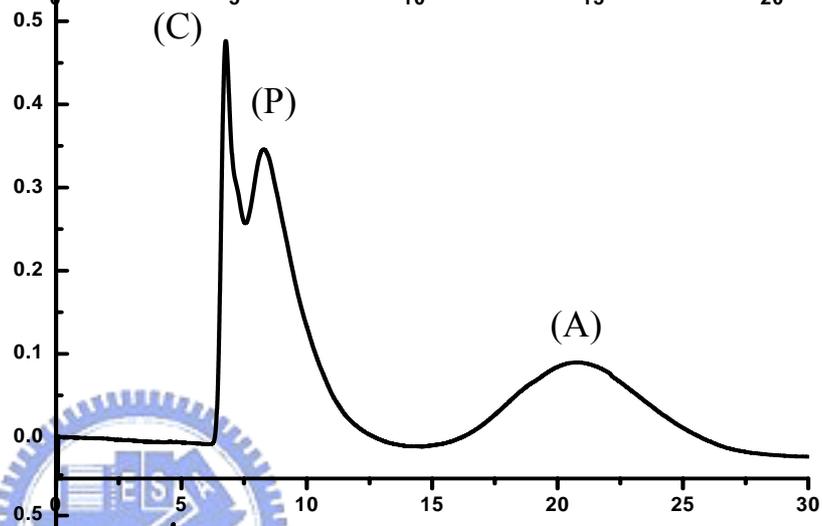


圖 27-(C)  
n-Hexane/Water  
(1-庚烷磺酸鈉 350mM)

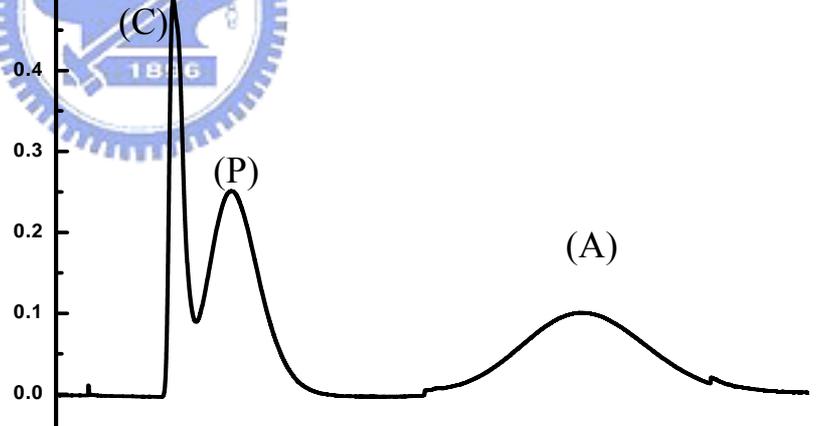
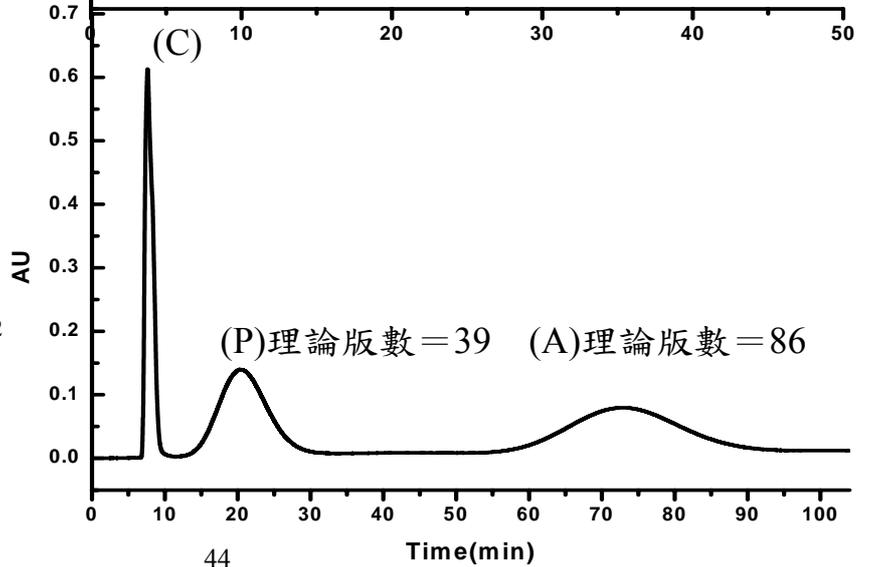


圖 27-(D)  
n-Hexane/Water  
(1-庚烷磺酸鈉 400mM)

理論版數 =  $5.54(t_R/W_{1/2})^2$  (P)理論版數 = 39 (A)理論版數 = 86



1-庚烷磺酸鈉 Concentration (mM)	Log of Concentration	Surface Tension ( $10^{-3}$ 牛頓/公尺)
50mM	1.699	74.0
100mM	2	62.9
200mM	2.301	52.0
300mM	2.477	49.8
400mM	2.602	50.2
500mM	2.699	49.5
600mM	2.778	49.6

表一 測量界面活性劑 1-庚烷磺酸鈉在不同濃度下溶液之表面張力

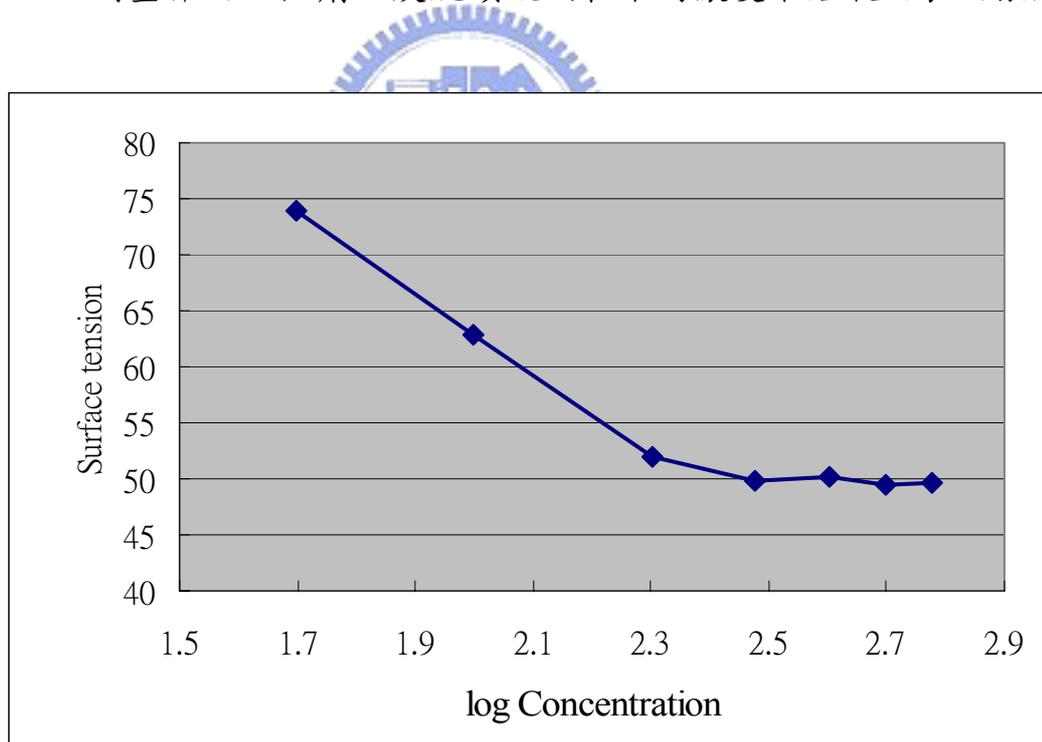


圖 28 界面活性劑 1-庚烷磺酸鈉 表面張力 V.S log 濃度做圖

找出臨界微胞濃度約在 300mM

圖 29-(A)

n-Hexane/Water

(1-庚烷磺酸鈉 400mM)

樣品注射量 1ml

(C) 200 mg/L

(P) 300 mg/L

(A) 400 mg/L

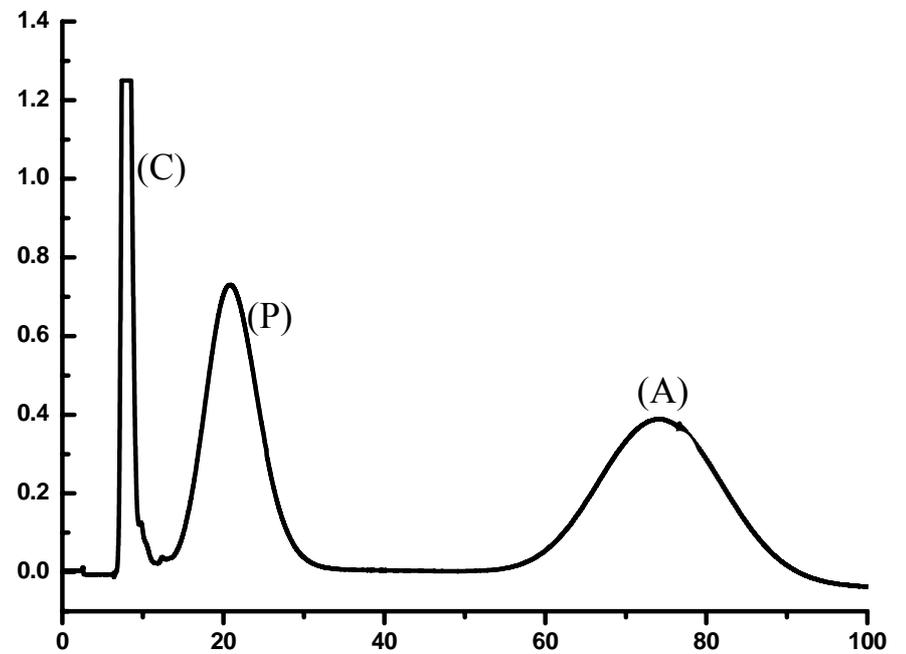


圖 29-(B)

n-Hexane/Water

(1-庚烷磺酸鈉 400mM)

樣品注射量 5ml

(C) 200 mg/L

(P) 300 mg/L

(A) 400 mg/L

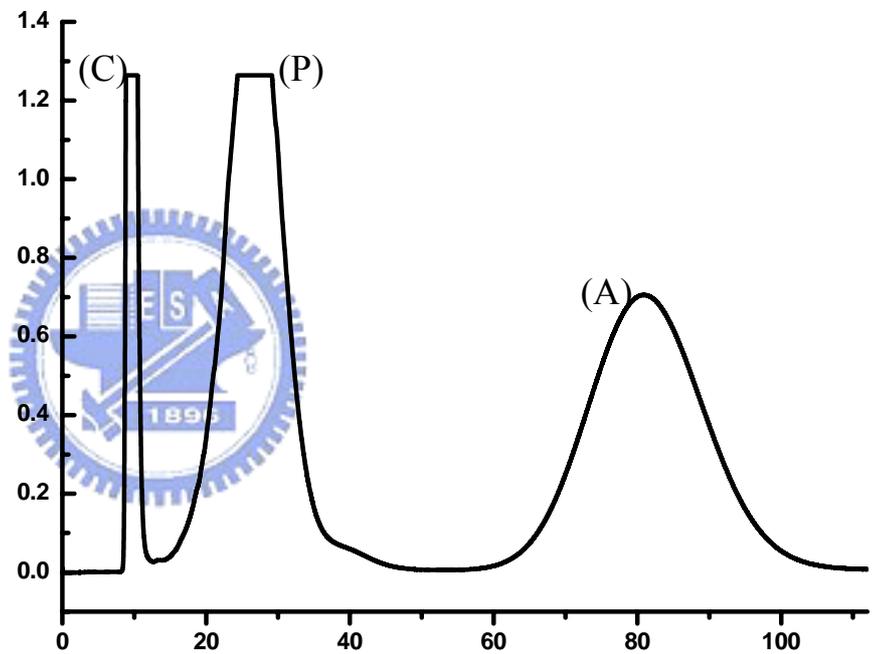


圖 29-(C)

n-Hexane/Water

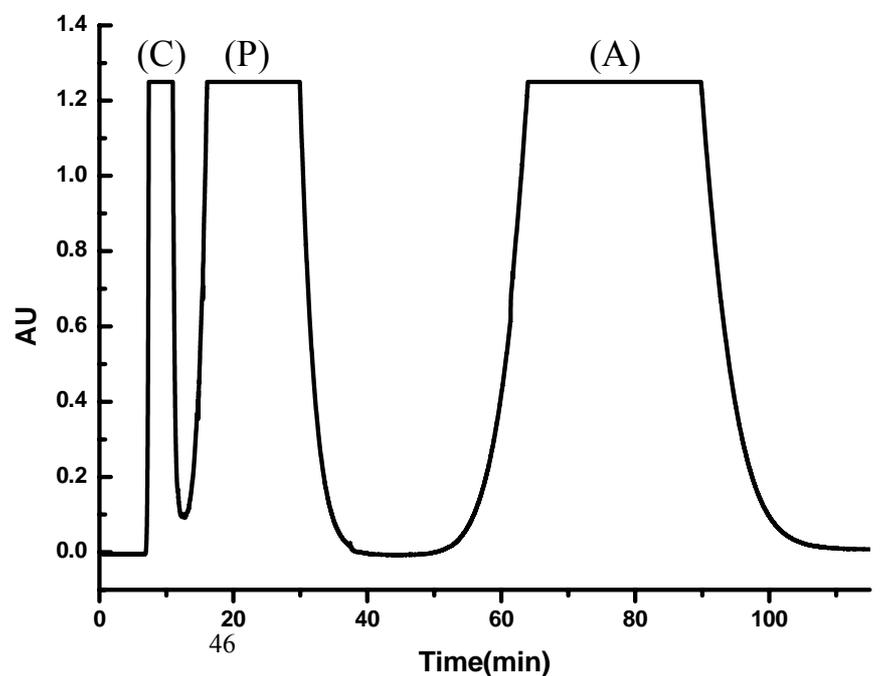
(1-庚烷磺酸鈉 400mM)

樣品注射量 5ml

(C) 667 mg/L

(P) 1000 mg/L

(A) 1334 mg/L



#### 4.4.5 Water-Organic 溶劑系統的分離效果

一般應用在逆流層析上分離疏水性化合物，大多使用 Water-Organic 溶劑系統，大部分組成為水與其他有機溶劑相互飽和成不互溶兩相，另外依分離物種特性需要添加其他修飾溶劑來改變系統之極性性質。本實驗也測

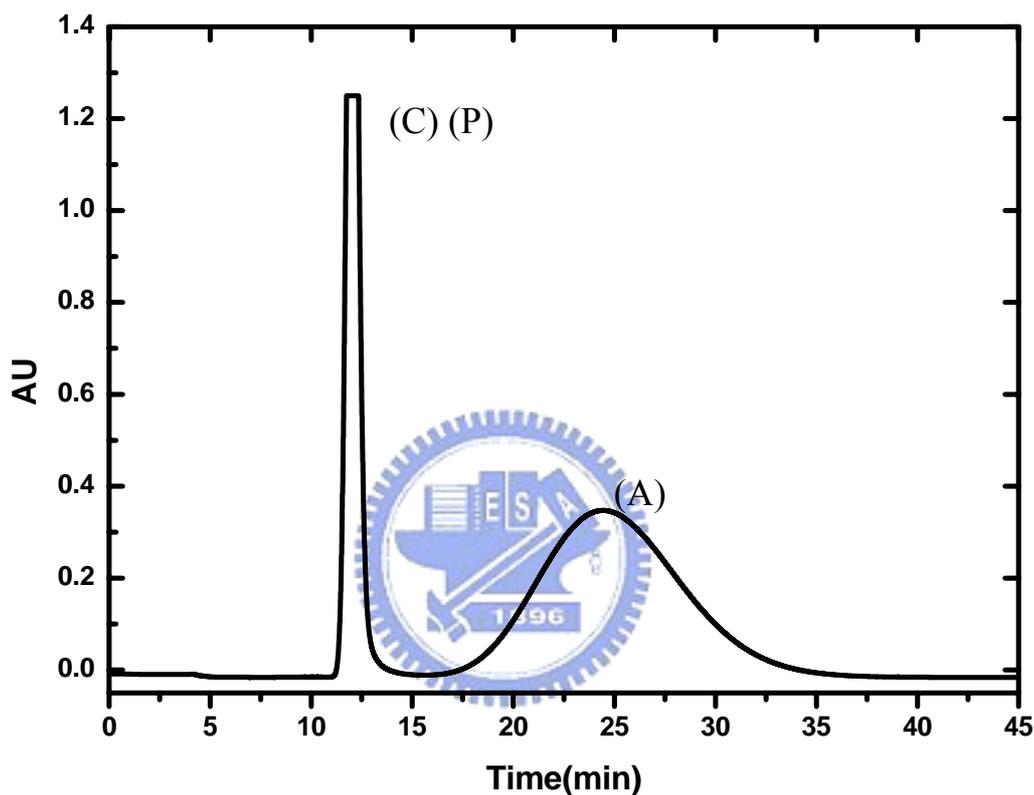


圖 30 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Ethanol/Water (10:1:4)

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：77.7% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17- dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

試了數種 Water-Organic 溶劑系統進行三種類固醇混合物的分離試驗。

(1) 溶劑系統 n-Hexane/Ethanol/Water (10:1:4)，只可將類固醇 $\Delta^4$ - androstene -3,17 - dione從其他類固醇中分離開來，層析圖如圖 30。

(2) 溶劑系統 n-Hexane/Acetone/Water (10:3:7)，除可將 $\Delta^4$ - androstene - 3,17

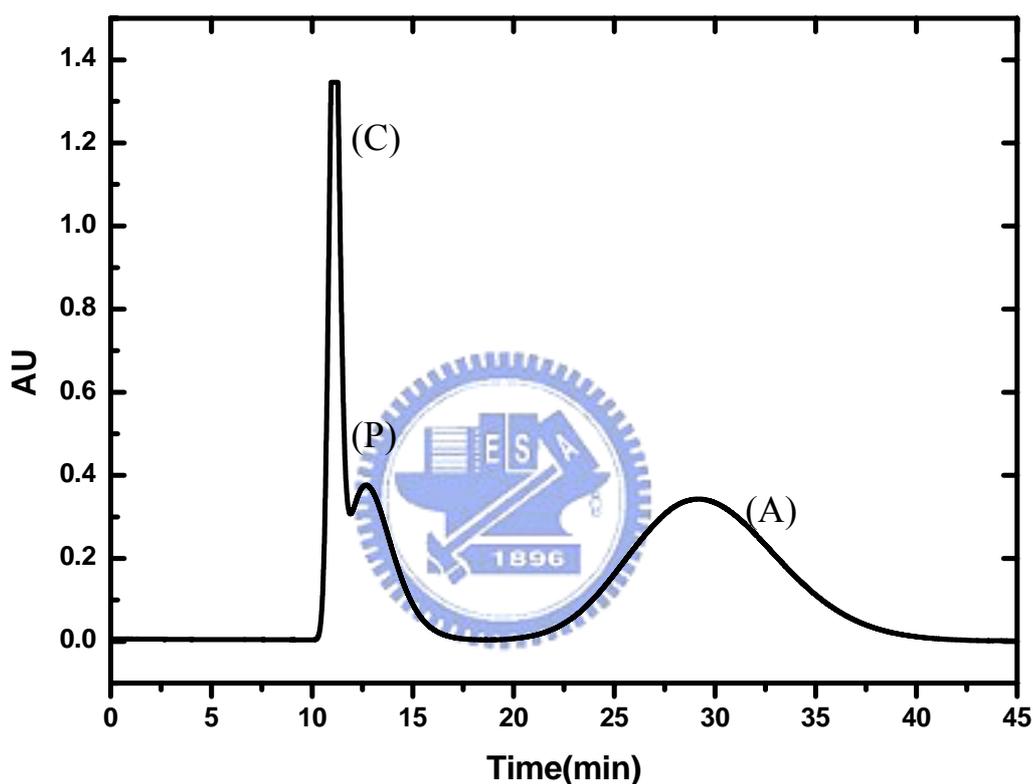


圖 31 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統： n-Hexane/Acetone/Water (10:3:7)

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：77.7% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$ - androstene - 3,17- dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

- dione 從其他類固醇中區分開來之外，類固醇 Progesterone 以及(+)-4-cholesten-3-one 亦可稍微分離開，但分離效果不佳，兩層析峰部份重疊，層析圖如圖 31。

(3) 溶劑系統n-Hexane/Ethanol/Hexyl Alcohol/Water (10:2:2:5)，可稍微將 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione從其他類固醇中區分開來，但分離效果不佳，層析

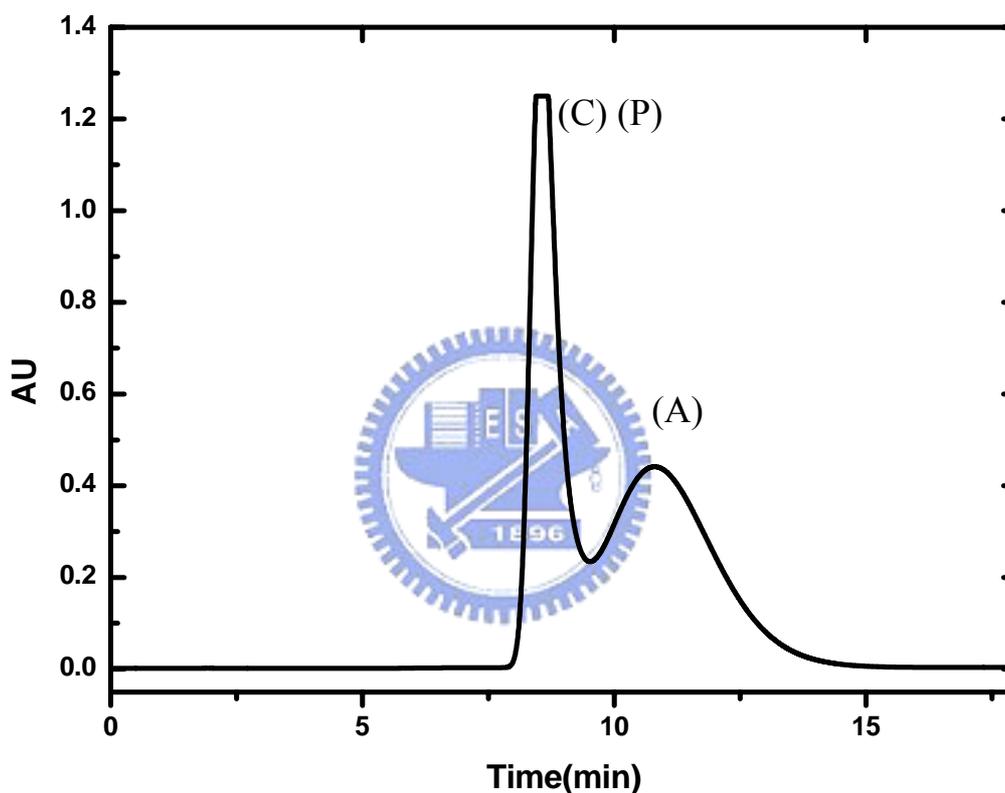


圖 32 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Ethanol/Hexyl Alcohol/Water (10:2:2:5)

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：82% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+)-4-cholesten-3-one (200 mg/L)

(A):  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione (400 mg/L)

(P): Progesterone (300 mg/L)

圖如圖 32。

(4) 溶劑系統 n-Hexane/Ethanol/n-Butyl Alcohol/Water (11:3:2:6) ，可順利將三種類固醇混合物分離開來，層析圖如圖 33。

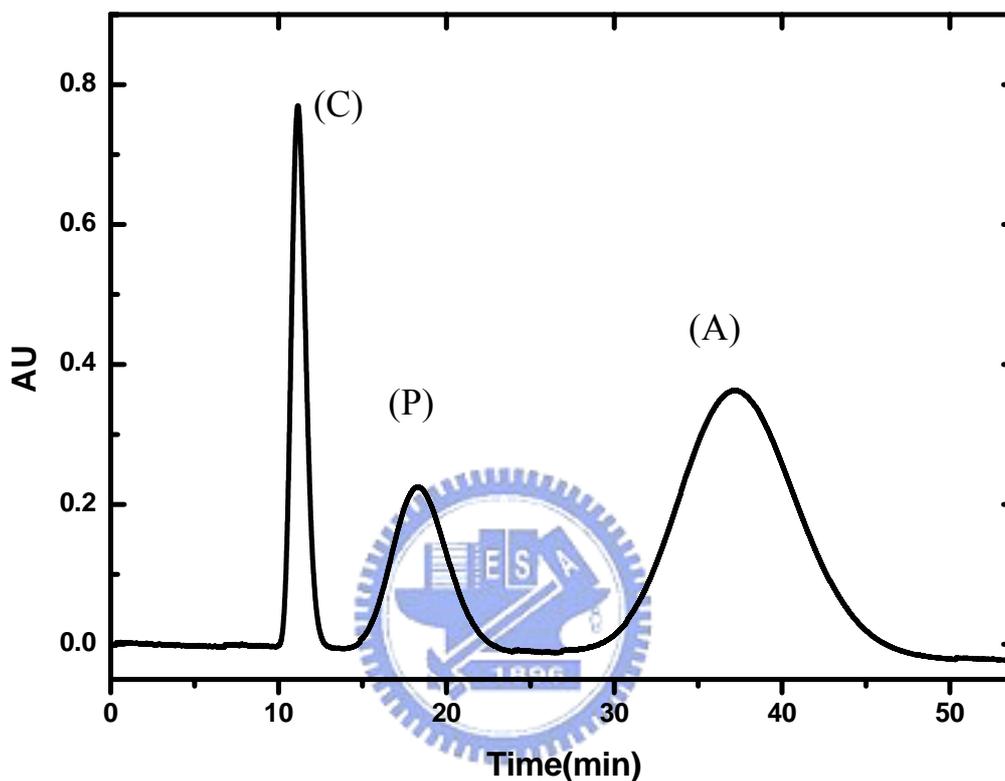


圖 33 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Ethanol/n-Butyl Alcohol/Water (11:3:2:6)

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：79.5% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L) 無滯留

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17- dione (500 mg/L) 理論版數 = 111

(P): Progesterone (300 mg/L) 理論版數 = 116

(5) 溶劑系統 n-Hexane/Ethanol/n-Butyl Alcohol/Water (15:3:1:6) ，可順利將三種類固醇混合物分離開來，層析圖如圖 34。

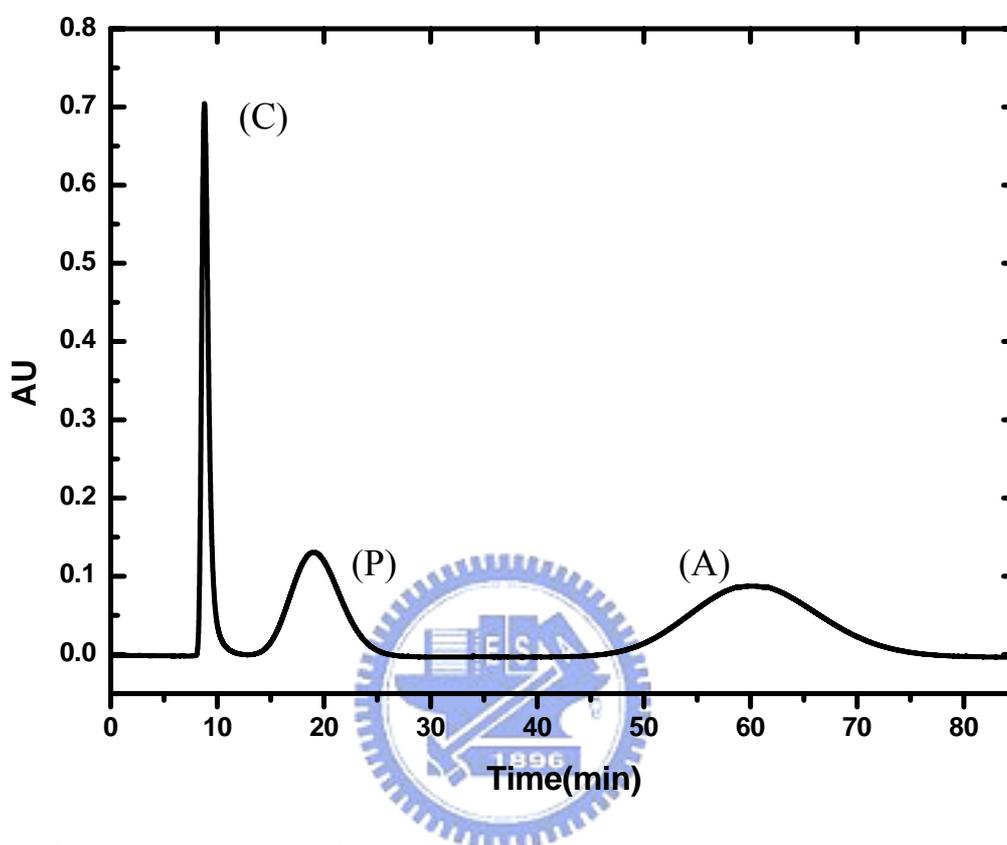


圖 34 類固醇分離層析圖

分離管柱內體積：112mL

溶劑系統：n-Hexane/Ethanol/n-Butyl Alcohol/Water (15:3:1:6)

轉速：700rpm 流速：2mL/min 注射時間：0 分鐘注入

靜相滯留量：81% 樣品注入量：100 $\mu$ L

(C): (+) - 4 - cholesten - 3 - one (200 mg/L) 無滯留

(A):  $\Delta^4$  - androstene - 3,17- dione (400 mg/L) 理論版數 = 101

(P): Progesterone (300 mg/L) 理論版數 = 67

由幾組成功分離progesterone、(+)-4-cholesten-3-one，以及 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione 三種類固醇混合物之Water/Organic溶劑系統 (如溶劑系統: n-Hexane/Ethanol/n-Butyl Alcohol/Water，參考圖 33、34) 的層析結果中觀察到類固醇 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione之滯留時間最長，progesterone次之，而(+)-4-cholesten-3-one則完全不滯留，由此可判斷此三種類固醇之極性分別為 $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione最大，progesterone次之，而(+)-4-cholesten-3-one則極性最小。而此三種類固醇之分離之順序在溶劑系統: n-Hexane/Water (1-庚烷磺酸鈉 400mM)中與在Water/Organic溶劑系統結果相同 (參考圖 27-(D))，因而推測水相中形成微胞之界面活性劑分子大幅降低水的極性，使原本難溶於水之疏水性物質有機會進入水相當中，且分離物種自身之極性較高者越容易進入水相中而產生滯留現象，藉此達成分離。此外，由圖 27 可得到，當界面活性劑 1-庚烷磺酸鈉添加濃度提昇到臨界微胞濃度後，對於三種類固醇的分離效果有相當大的影響，因此得到，當溶劑系統中有微胞形成，則對於分離效果有相當大的幫助。

## 第五章 結論

由文獻中發現，在過去的研究當中對於疏水性物質的分離大多選用雙有機相溶劑系統，但選擇到適當極性之溶劑不易，另外選用 Water-Organic 溶劑系統，並藉由在其中添加修飾溶劑來調整溶劑系統上、下層相之極性來達成分離目的，但這樣的溶劑系統在配製上有相當的困難度，往往在添加之溶劑調配比例上稍做更動即會造成上下層相互溶成為均一相的狀況發生，因此溶劑系統改變不易且可變更範圍有限。

本實驗經過一連串的實驗與測試之後，成功的結合逆流層析儀以及添加水溶性界面活性劑之新溶劑系統來進行疏水性物質-類固醇類化合物的分離。根據實驗結果發現，在溶劑系統中添加界面活性劑可降低水相極性，因此就算尚未達到臨界微胞濃度，仍可以小幅改變類固醇化合物在有機相與水相中的分佈，進而達成分離目的，但若界面活性劑添加濃度低，分離效果則有限。因此當增加溶劑系統內之界面活性劑添加濃度至臨界微胞濃度，則發現分離效果大幅提升。另外，本實驗所使用之三種類固醇化合物亦可以使用 Water-Organic 溶劑系統來進行分離，也有相當不錯的分離效果。

未來除了找出溶劑系統:n-Hexane/Water (SDS 8mM)/Ethanol=2:1:1 最佳化的溶劑配置比例以及分離參數，來完成三種類固醇混合物的分離之外，尚可用來分離其他疏水性化合物。此外，由於本研究發現在溶劑系統中添加不同種類之界面活性劑對於分離有不同的能力，因此之後可嘗試使用更多種類的界面活性劑，如陽離子型界面活性劑，或是選擇他種有機相以及水相溶劑進行分離，甚至可藉由添加其他修飾溶劑來提高溶劑系統之分離能力。

## 參考文獻

1. A. Degenhardt, H. Knapp and P. Winterhalter, “Separation and Purification of Anthocyanins by High-Speed Countercurrent Chromatography and Screening for Antioxidant Activity.”, *J.Agric. Food Chem.*, 48, (2000) 338-343.
2. M. Knight, M. O. Fagarasan, “Separation and Purification of peptides by High-Speed Countercurrent Chromatography.” *J. Chromatogr. A*, 702, (1995) 207-214.
3. H. Oka, K. Harada, “ Separation of antibiotics by Countercurrent Chromatography” *J. Chromatogr. A*, 812, (1998) 35-52.
4. B. Domon, M. Hostettmann, “Droplet counter-current Chromatography with non-aqueous solvent systems.” *J. Chromatogr.*, 246, (1982) 133-135.
5. H. Becker, J. Reichling, “Water-free solvent system for droplet counter-current Chromatography and its suitability for the separation of non-polar substances.” *J. Chromatogr.*, 237, (1982) 307-310.
6. Q. Du, P. Wu, Y. Ito, “Low-Speed Rotary countercurrent Chromatography using a Convolute Multilayer Helical Tube for Industrial Separation.” *Anal. Chem.*, 72, (2000) 3363-3365.
7. G. Tian, T. Zhang, Y. Ito “Separation of tanshinones from *salvia miltiorrhiza* Bunge by multidimensional counter-current Chromatography.” *J. Chromatogr. A*, 945, (2001) 281-285.
8. G. Tian, Y. Zhang, Y. Ito , “Separation of tanshinones from *salvia miltiorrhiza* Bunge by multidimensional counter-current Chromatography using stepwise elution.” *J. Chromatogr. A*, 904, (2000)

- 107-111.
9. A. P. Foucault, "Countercurrent Chromatography.", *Anal.Chem.* 63, (1991) 569A-579A.
  10. Y. Ito, "Development of Countercurrent Chromatography.", *Anal. Chem.* 56, (1984) 534A-551A.
  11. Y. Ito, N. B. Mandava, "Countercurrent Chromatography: Theory and Practice.", Marcel Dekker, Inc., New York, 1988.
  12. W. D. Conway, "Countercurrent Chromatography: Apparatus Theory and Applications.", VCH Publishers, Inc., 1990.
  13. Y. Ito, W. D. Conway, "High-Speed Countercurrent Chromatography", John Wiley & Sons, Inc. 1996.
  14. Criag, L. C. and Craig, D. "Laboratory Extraction and Countercurrent Distribution in Technique of Organic Chemistry.", *Vol.3, Part I*, pp.149-332, A. Weissberger(ed.), Interscience, New York, 1956.
  15. Ito, Y. "Speculation on the mechanism of unilateral hydrodynamic distribution of two immiscible solvent phases in the rotating coil.", *J. Liq. Chromatogr.*, 15, (1992) 2639-2675.
  16. Y. Ito, R. Bhatnagar, "Improved scheme for preparative countercurrent chromatography with a rotating coil assemble.", *J. Liq. Chromatogr.*, 7, (1984) 257-273.
  17. Y. Ito, R. L. Bowman, *J. Chromatogr. Sci.*, 8, (1970) 315-323.
  18. Y. Ito, G. T. Bramblett, R. Bhatnagar, M. Huberman, L. Leive, L. M. Cullinane, And W. Groves, "Improves nonsynchronous flow-through coil planet centrifuge without rotating seals: Principle and application.", *Sep. Sci. Tech.*, 18, No. 1, (1983) 33-48.

19. Y. Ito, and R. L. Bowman, "Horizontal flow-through coil planet centrifuge without rotating seals.", *Anal. Biochem.*, 82, (1977) 63-68.
20. Y. Ito, J. Sandlin, and W. G. Bowers, "High-speed preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge.", *J. Chromatogr.*, 244, (1982) 247-258.
21. W. D. Conway, and Y. Ito, "*Pittsburgh Conference and Exposition on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy*", Abstract No. 475, (1984)
22. W. D. Conway, Y. Ito, "Resolution in Countercurrent Chromatography", *J. Liq. Chromatogr.*, 8 (12), (1985) 2198-2207.
23. Y. Ito, Y. Ma, "pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography: a Displacement Mode Applied to Separation of Dinitrophenyl Amino Acids.", *J. Chromatogr. A*, 672, (1994) 101-109.
24. H. Oka, Y. Ito, S. Yamada, T. Kagami, J. Hayakawa, "Separation of lacye components by high-speed countercurrent chromatography.", *J. Chromatogr. A*, 813, (1998) 71-77.
25. K. Shinomiya, N. Inokuchi, J. N. Gnabre, M. Muto, Y. Kabasawa, H. M. Fales, Y. Ito, "Countercurrent Chromatographic Analysis of Ovalbumin Obtained from Various Sources Using the Cross-Axis Coil Planet Centrifuge.", *J. Chromatogr. A*, 724, (1996) 179-184.
26. Y. Ma, Y. Ito, A. Foucault, "Resolution of Gram Quantities of Racemates by High-Speed Countercurrent Chromatography.", *J. Chromatogr. A*, 704, (1995) 75-81.
27. Q. Du, M. Li, T. Y. Zhang, Y. Ito, "Purification of (-)-Epigallocatechin from Enzymatic Hydrolysate of its Gallate Using High-Speed

- Countercurrent Chromatography.”, *J. Chromatogr. A*, 687, (1994) 174-177.
28. Y. Shibusawa, S. Iino, H. Shindo, Y. Ito, “Separation of Chicken Egg with Proteins by High-Speed Countercurrent Chromatography.”, *J. Liq. Chrom & Rel. Technol.*, 24 (13), (2001) 2007-2016.
29. R. G. Whiteside, D. E. Games, C. Strawson, A. S. Grahan, L. Brown, “Application of High-Speed CCC for the Purification of Lisinopril Diketopiperazine Diastereomers.”, *J. Liq. Chrom & Rel. Technol.*, 24 (11 & 12), (2001) 1801-1810.
30. 趙承琛博士， “界面活性劑化學” ，復文書局，台灣台南，1990年。
31. Y. Moroi, “Micelles Theoretical and Applied Aspects.”, New York and London, 1992.
32. 趙承琛博士， “界面活性劑探原” ，科學月刊雜誌，0048，1973年。
33. J. G. Bumgarner, M. G. Khaledi, “Mixed micelles of short chain alkyl surfactants and bile salts in electrokinetic chromatography: Enhanced separation of corticosteroids.”, *J. Chromatogr. A*, 738, (1996) 275-283.
34. 吳煜朝， “以雲點萃取法或固相微萃取法配合高效液相層析儀偵測微量芳香族胺類及羧基芳香族化合物” ，國立清華大學，博士論文，民國八十七年六月。
35. S. Gorog, “Steroid Analysis in The Pharmaceutical Industry.”, New York、Chichester、Brisbane、Toronto, 1989.
36. Q. Du, P. Y. Zhang, Y. Ito, “Purification of 25- Hydroxy-Cholecalciferol from Irradiation of Cholesta-5,7- Diol by High-Speed Countercurrent

- Chromatography.”, *J. Liq. Chromatogr. A*, 18, (1995) 181-188.
37. Q. Du, X. Xiong, Y. Ito, “Separation of Bioactive Quadri-Terpenic Acids from the Fruit of *Ligustrum Lucidum* Ait by High-Speed Countercurrent Chromatography.”, *J. Liq. Chromatogr. A*, 18, (1995) 1997-2004.
38. Y. Rharbi, and M. Winnik, “Salt Effects on Solute Exchange in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles.”, *J. Am. Chem. Soc.* 124, (2002) 2082-2083.

