

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 88-2113-M-009-003

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：余 艇 國立交通大學應用化學系

一、 中文摘要

關鍵詞：逆向流層析，高速逆向流層析，超臨界流體，超臨界流體層析，超臨界流體萃取，管柱層析，當歸

過去幾年中，本實驗室將超臨界流體的技術引入逆向流層析(Countercurrent Chromatography)，擴展了這種傳統液相/液相層析的領域；在過去的研究中，我們已經在儀器發展方面克服了許多困難，使得這項新技術逐漸成熟，這項努力還在繼續進行之中，然而在儀器發展的同時，我們也開始探討此層析法的理論，以及其應用的範疇。

逆向流層析的特質，是不需要固體的填充劑來將靜相固定於分離管柱中，因而減低了因為不可逆吸附而造成樣品的損失，同時管柱中靜相之比例很高，使其成為一種製備型的層析法。此種層析分離現象的發生，是由分析物在兩流體相中的分配所造成，由於管柱中無固體填充物，其理論板高與動相流速之相關函數，和一般管柱層析不同；此外其他影響分離之參數，亦和填充式管柱之層析不盡相同，值得進一步探討。

至於這項技術的應用，可分兩方面來探討。首先是層析方面，其特性是使用的超或次臨界流體為動相，這些流體在常溫、常壓下都是氣體，所以分離結束之後，不需要再將分析物和動相分離或再濃縮。此技術的另一項功能，是將其視為一液相萃取的裝置，比一般的萃取槽效率更高。

我們的成果包括使用新世代冷媒 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) 為動相，在高速逆向流層析裝置中分離當歸標準品；以及改進先前發展出的數學模式來探討以水為靜相的超臨界層析和超臨界萃取之關聯性。

二、 英文摘要

Keywords: Countercurrent Chromatography, High-Speed Countercurrent chromatography, Supercritical fluid, Supercritical Fluid Chromatography, Supercritical Fluid Extraction, Column Chromatography, *Angelicae Radix*

In the last few years, we developed a novel technique by applying supercritical fluids in countercurrent chromatography (CCC) that enlarged the research area of this liquid/liquid chromatography. After successful endeavor in overcoming the difficulties in the instrumentation development, this technique has become mature gradually. In the midst of the instrumentation progressing, we also pay our attention to the theory and application of this chromatography.

No solid support needed for the stationary phase is one of the characteristics of CCC that may help reduce the sample loss due to the irreversible adsorption. Besides, the high ratio of the stationary phase in the column makes the technique a

preparative chromatography. The separation occurs purely due to the partition of the analyte molecules in the two phases. The factors that determine the function of the correlation of the plate and flow rate differ considerably from the common column chromatography with solid phase packing. In addition, parameters that affect separation efficiency are also found different from those of the packed columns and worth further investigation.

Two major parts are to be examined regarding the application. Firstly in the chromatographic separation, the supercritical or subcritical fluids used (such as CO₂) turn into gas at room temperature and pressure that helps split the analytes from the mobile phase. In other words, no further concentration process is required. Secondly, the apparatus of CCC may be considered as an extraction equipment. The extraction efficiency may be greatly improved using the CCC rotor due to the good mixing of the fluids.

We successfully used new generation refrigerant 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) as the mobile phase to separate standard components of *Angelicae Radix*. We also upgraded a recently developed mathematical model that correlates supercritical fluid chromatography and supercritical fluid extraction in aqueous matrixes.

三、計畫緣由

本研究計畫是繼續我們近年所發展出來的超臨界流體/逆向流層析技術進一步探討其分離理論改進分離技術並發展其應用。逆向流層析 (CCC) 是一種製備型的層析，其特點是，靜相純粹是液體，不像一般的液相或氣相層析的靜相是附著於固體支持物上；因為參與分離之靜相，是整個可以滯留於分離管柱中的液體體積，導

致這種技術的分離容量 (separation capacity) 很大；此外，分離的機制完全肇因於溶質在兩溶劑 (動相及靜相) 中的分配現象，和吸附無關，不易發生樣品損失或分解的現象，適合天然物及生物分子的分離。

我們前幾年致力於儀器的發展和改進，成功的將超臨界流體應用於逆向流層析。初期，我們以慢速儀器來嘗試其可行性，如今，就要將此構想實施於新型快速的高速逆向流層析 (High Speed Countercurrent Chromatography, or HSCCC)，以上就是此計劃的緣由。

四、結果與討論

我們的成果可以分成兩部份來討論。首先，我們繼續上一篇論文 (見參考文獻一) 所提出的數學模式做進一步的修飾；其主要目的是研究水相基質中以超臨界流體層析之實驗數據模擬超臨界流體萃取之回收率曲線。只要從實驗得到分析物層析峰的寬度及滯留時間就可以預測回收率曲線，最初我們的數學模式是以 countercurrent distribution (CCD) 的方式來預測，所得之結果和實際實驗值的誤差比較大。之後我們嘗試使用層析趨近法，來改良此模式，結果有大幅改進 (~30%)，這些研究的成果發表於參考文獻二。這個系列的研究，主要目的是幫助超臨界流體在水溶性基質中萃取的預測，而此種方式的萃取之應用可能在於從水中萃取非常稀釋卻具有高價值的化合物，例如從發酵槽中純化酵素；除此之外理論上也是值得探討的一個題目。

研究成果的第二部份是發展使用冷媒 R134a 為動相的逆向流層析。原

本我們希望將超臨界二氧化碳應用於高速逆向流層析系統，但是在高壓的情形下(例如~100 bar)該儀器之反扭轉機構無法承受高速轉動而導致管子斷裂，因而思考使用新世代冷媒 R134a，此種冷媒不會破壞臭氧層；然而還是具備了超臨界二氧化碳的優點，即是在分離結束時，在常溫常壓下氣化與欲分離之樣品分開，而不需要進一步的濃縮過程。我們直接使用儀器本身所提供的鐵弗龍管，在壓力小於 20 bar 之下，鐵弗龍管可以達成儀器反扭轉的功能，同時也可以承受壓力。我們將此應用於中藥當歸的若干標準品，實驗結果顯示和一般傳統方法之分離效果相當，同時具備了前面所敘述，使用超臨界流體二氧化碳為動相的優點，亦即在分離結束後，收集樣品時，R134a 自動氣化而分離。研究結果同時顯示，雖然 R134a 的極性比二氧化碳要高，但是對於極性較高的物質之溶解度依然不高，基本上還是只適合低極性物質之沖提，然而加入一些極性的溶劑，或許可以增加溶劑強度，有待後續的研究。總之，我們的研究首度顯示可以在傳統的高速逆向流層析儀中使用所謂的高壓氣體或次臨界流體為動相，我們的研究也可以說擴展了逆向流層析應用的範疇。

五、計畫成果自評

本研究計畫是延續本實驗室將超臨界流體應用於逆向流層析之應用。我們成功的將先前對超臨界流體層析及萃取關聯性之數學模式做改良，而更能比較準確的預測萃取的結果，正是我們原先計畫中預期探討以逆向流層析儀作為超臨界萃取工具的部份。

另外則是將超臨界流體應用於高速逆向流層析，雖然有礙於技術上無法克服的因素而不能使用二氧化碳，我們卻成功的應用冷媒 R134a，其優點是在溫和的壓力之下就有相當合理的溶解強度，而能做沖提分離天然物，也完成了預期的計畫。研究的成果分別發表於國際認可的期刊（見參考文獻一、二），相關研究學生之論文分別列於參考文獻三、四。

六、參考文獻

- 1) Tiing Yu,* Chia Shan Liang, and Sheng-Kang Luo "Correlation of Countercurrent Extraction with Countercurrent Chromatography in Aqueous Matrixes. An Improved Model" Anal. Chem., **71**, 507-513, (1999)
- 2) Ya Ling Tsai and Tiing Yu* "Feasibility Study of Using Refrigerant 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as Mobile Phase in High-Speed Counter-current Chromatography" J. Chromatogr. A, **835**, 237-242, (1999)
- 3) 梁嘉杉，國立交通大學碩士論文"逆向流層析與水相基質萃取關聯性之研究"(1998)
- 4) 蔡雅玲，國立交通大學碩士論文"以環保冷媒 R134a 為動相應用在高速逆向流層析可行性之探討"(1998)
- 5) Ma Y., Ito Y., J. Chromatogr. A, **702**, 197 (1995)
- 6) Berger T. A., Chromatographia, **41**, 133 (1995)
- 7) Jagota N. K., Nair J. B., Frazer R., Klee M., Wang M. Z., J. Chromatogr. A, **721**, 315, (1996)
- 8) Leyendecker D., Schmitz F. P., Liesper E., J. Chromatogr., **392**, 101, (1987)

- 9) Ito Y., Weinstein M.A., Aoki I., Harada R., Kimura E., Nonugaki K., The coil planet centrifuge. Nature, 212, 985-987, (1966)
- 10) Walter D. Conway "Countercurrent chromatography, apparatus, theory, and applications." (1989)
- 11) Ito Y. J. Liq. Chromatog., 15, 2639 - 2675 (1992)
- 12) Roop R.K., Akgerman A., Keller R.A.; Science, 162, 67, (1968)
- 13) Hedrick J.L., Taylor L.T.; Anal. Chem. 64, 981, (1992)
- 14) Ito Y., Bhatnagar R., J. chromatog., 207, 171-180 (1981)
- 15) Ito Y. "Countercurrent Chromatography theory and practice." (1988)