

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 87-2113-M-009-014

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

主持人：余 艇 國立交通大學應用化學系

tyu@cc.nctu.edu.tw

一、中英文摘要

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。

至於這項技術的應用，可分兩方面來探討。首先是層析方面，其特性是使用的超臨界流體，如二氧化碳在常溫、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；目前我們已經開始對天然物的分離做測試。此技術的另一項功能，是將其視為一液相萃取的裝置。一般使用超臨界流體做分析物（例如環境污染物）的萃取前處理，都是針對固體的樣品，不過近年來，使用超臨界流體做為液體樣品之萃取前處理，也逐漸受到重視，目前一般的液相萃取裝置效率不高，有待改進。根據我們初步的實驗顯示，由於逆向流層析旋轉的機構，使得流體之間的混合十分充分，而達到理想的萃取率；對於水中（例如地下水，河水）低濃

度污染物的濃縮很有效，因而降低其偵測極限，十分可行。

以上所提出的應用，亦可使用次臨界流體(subcritical fluid)，以二氧化碳為例，在次臨界態其密度要達到 0.8 g/ml 以上，並不需要外加高壓，然而在這樣的高密度之下，可以提高對分析物的溶解度，因此可適用的樣品更多。初步的研究發現在次臨界態，可以得到滿意的靜相滯留，有助於分離的容量以及解析度。

相信未來三年的研究，可以對這項我們提出並發展的技術，在理論方面可以進一步了解，以改進分離效果，並進而拓展其應用的範疇。

關鍵詞：超臨界流體，逆向流層析，超臨界流體層析，超臨界流體萃取，管柱層析

Abstract

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.

Two major parts are to be examined regarding the application. Firstly in the chromatographic separation, the supercritical fluids used (such as CO₂) turn into gas at room temperatures and pressures that helps split the analytes from the mobile phase. In other words, no further concentration process is required. Currently some preparative separations of natural products are under investigation. Secondly, the apparatus of CCC may be considered as an extraction equipment. Whenever supercritical fluids are employed in the sample pretreatment of analytes, the substrates are solids in most cases. However, supercritical fluid extraction for liquid samples earns attraction gradually in recent years. For the present, the extraction apparatus for liquid samples still requires improvement to enhance efficiency. Our preliminary outcome demonstrates that the extraction efficiency can be improved using the CCC rotor possibly due to the good mixing of the fluids. Potentially the technique may lower the detection limit of very low concentration pollutants in water (such as ground water or river) by efficient preconcentration of them.

Subcritical fluids can also be employed in the applications described above. Given CO₂ as an example, its density could reach as high as 0.8 g/ml without applying very high

pressure to the system. However, the solubility of analyte compounds would be increased considerably under this high density, therefore results in utilization of the fluid to more samples. Satisfactory stationary phase retention observed in the preliminary results indicates sufficient sample capacity and resolution for the separation.

The researches in this proposal, we believe, will enable us learn more about the relevant separation theory in order to improve the efficiency and further open the door to the application arena.

Keywords: Supercritical fluids, Countercurrent chromatography, Supercritical fluid chromatography, Supercritical fluid extraction, and Column chromatography.

二、緣由與目的

本三年期研究計劃，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。首先，我們依照文獻設計出一種稱之為異軸太陽運行式的慢轉速旋轉體，其目的是以較為簡單而可靠的儀器來測試這個構想的可行性，因應高壓的需要做了相當多的調整，終於成功的驗證了這個想法的可行性，而將其結果發表於 J. Chromatogr.

A.[1]。之後，我們更進一步的以實驗顯示出，將超臨界流體應用於逆向流層析，其操控分離參數的多樣 (versatile) 變化，並將結果發表於 J. Chromatogr. A.[2] 在儀器發展的階段，我們就開始思考這個原創性構想的後續研究。其目的是不僅只是把儀器設計出來，而要進一步改進其操作，提高其分離效率，並且發展其應用的領域；同時從傳統逆向流層析，我們已經領會到其分離機構和一般管柱式層析的不同之處。所以在未來三年之中，我們研究的目的，就是站在目前已有的基礎上，改進不同儀器的操作，探討其影響分離的參數，同時開發其在分離上的應用。色層分析從樣品的量來區別，可分為分析 (analytical) 及製備 (preparative) 型兩種。前者是為了了解樣品中各別化合物之成份與濃度，後者則是用來分離並收集各化合物，以備下游的分析或相關的研究。逆向流層析為製備型層析的一種，其特性前面已經敘述過，使用超臨界流體為動相，在分離的同時又達到濃縮的效果；其他可能的優點，也將在未來的研究中開發出來。至於樣品前處理萃取方面，超臨界流體應用在固態樣品，已有相當程度的發展，液態樣品方面，一般使用固相萃取術 (Solid Phase Extraction)，直接運用超臨界流體萃取尚不多見；我們將以逆向流層析的儀器作為萃取的工具，期望可因此降低分析物的偵測極限，同時減少有機溶劑的使用量。

三、結果與討論

本計劃的結果可分層析以及萃取兩部份來說明。在層析方面我們使用了超臨界二氧化碳來分離一些類固醇化合物，顯示出使用其特性，也就是分離效率可以經由溫度以及壓力的調整來達成，而不僅是如傳統的方法改變溶劑系統。除此之外，我們還計算出一些和分離相關的參數，例如溶質在二氧化碳和水相之間的分配常數以及轉移能量；以分配常數而言，一般都需要冗長的實驗方法才可獲得，以本計劃的

層析法而言，在速度和準確性上都有其優越性，我們將這些實驗結果發表，已被接受，將於近期刊出[3]。

在萃取方面，有如前述，逆向流層析也可以當作萃取的裝置來使用。我們有興趣的是研究萃取和層析之間的相關性，如果此二者都在以液體為基質和靜相中進行時，萃取和層析的過程，可以說只和溶質在萃取液和基質中或是溶質在動靜相中的分配係數有關，以這個關係來研討其相關性十分可行，我們推導出一個數學的模式，用層析的數據，包括溶質的滯留時間和其層析峰的標準差，就可以預測在同樣條件下的萃取回收率曲線，因為萃取最佳化條件的取得，比層析實驗的進行要複雜很多，所以這個數學模式可以作為選擇萃取條件的參考。我們以數學模式的預測值，以 capacity factor 較大的溶質比較正確，當這個值比較小的時候，誤差變大，但是作為一個參考，依然有很好的價值。這一部份的結果，已經發表[4]。此外對於這個數學模式的修正也已經在進行中，預期不久就會有新的成果。

四、計劃成果自評

如前所述，將超臨界流體的技術應用於逆向流層析，是由本實驗室首先發展出來，在實際應用上尚無法評估，在學術上，至少我們提供了超臨界流體方面研究的一個新的領域，從逆向流層析技術而言，我們也提供了一個新的可能性，也就是使用超臨界流體為層析的動相。進一步而言，本計劃又研究了層析與萃取的相關性，除了在學術方面有價值之外，也可能可作為工業上預估液相萃取回收率。

基本上，我們研究的方向和實質成果，與原先所提出的內容相近，但是也有部分超出原計劃；原計劃的目標大致上都已達成或超過。所得到的成果，目前已發表的，見參考資料三及四，從前相關之研究已發表的論文，見參考資料一及二。

五、參考資料

- 1) **Tiing Yu***, Shu-En Li, Yi-Hsing Chen, H. Paul Wang "Counter-current Chromatography Using Supercritical Fluid Carbon Dioxide as Mobile Phase" J. Chromatogr. A, 724, 91-96, (1996)
- 2) **Tiing Yu***, Yi-Hsing Chen "Separation Factor Studies on Countercurrent Chromatography Using Supercritical Fluid Carbon Dioxide" J. Chromatogr. A, 790, 31-39, (1997)
- 3) **Tiing Yu***, Sheng-Kang Luo, Shin Jyh Chen "Correlation of Supercritical Fluid Extraction with Supercritical Fluid Chromatography in Aqueous Matrices" Anal. Chem., 70, 2115-2122, (1998)
- 4) Chiuan Shiuian Yeh, **Tiing Yu***, Alain Berthod "Separation of Steroid Compounds by Countercurrent Chromatography Using Supercritical Carbon Dioxide as Mobile Phase", J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., (in press), (1998)
- 5) Ma Y., Shinomiya K., Fales H.M., J. Chromatogr. A, 685, 259, (1994)
- 6) Ma Y., Ito Y., J. Chromatogr. A, 702, 197 (1995)
- 7) Berger T. A., Chromatographia, 41, 133 (1995)
- 8) Jagota N. K., Nair J. B., Frazer R., Klee M., Wang M. Z., J. Chromatogr. A, 721, 315, (1996)
- 9) Leyendecker D., Schmitz F. P., Liesper E., J. Chromatogr., 392, 101, (1987)
- 10) Ito Y., Weinstein M.A., Aoki I., Harada R., Kimura E., Nonugaki K., Nature, 212, 985, (1966)
- 11) Walter D. Conway, Countercurrent chromatography, apparatus, theory, and applications. (1989)
- 12) Ito Y., J. Liq. Chromatog., 15, 2639 (1992)
- 13) Roop R.K., Akgerman A., Keller R.A.; Science, 162, 67, (1968)
- 14) Hedrick J.L., Taylor L.T.; Anal. Chem. 64, 981, (1992)
- 15) Ito Y., Bhatnagar R., Preparative CCC with a rotating coil assembly. J. chromatog., 207, 171 (1981)