

10°锥角台锥型制备液相色谱柱的放大研究

卢烈娟, 陈捷, 关亚风*

(中国科学院大连化学物理研究所仪器分析化学研究室,
中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要 将10°锥角台锥型液相色谱柱放大至150 mm长、入口直径54 mm、出口直径27 mm, 容积为200 mL, 填料为粒径40~75 μm、孔径11 nm的C₁₈球形硅胶。流动相在锥型柱内呈现塞子状流形。系统地评价了该柱的分离性能, 结果表明:在最佳流速为6 mL/min时,以萘峰计,锥型柱的折合理论塔板高度为2.11,柱效下降10%时的样品质量和体积载样量分别为2.1 mg和1.7 mL,与同长度同体积圆柱型柱相比,柱效提高了20%,质量载样量提高了16%以上,体积载样量提高了19%以上。当进样质量由2.4 mg增加到12 mg时,对羟基苯甲酸乙酯峰与对羟基苯甲酸丁酯峰的分离度(R_{s2})由2.14降到1.71,对羟基苯甲酸丁酯峰与萘峰的分离度(R_{s3})由2.91降到2.52;当进样体积由3 mL增加到19 mL, R_{s2} 由2.23降到1.28, R_{s3} 由2.95降到2.30,但此时的色谱峰峰形仍然高度对称,没有拖尾,有利于从基质中制备分离微量组分。实验结果表明锥型液相色谱柱将具有广泛的应用前景。

关键词 制备液相色谱;台锥型色谱柱;放大

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)03-0299-04 栏目类别:研究论文

Scale-up of conical column with 10° opening angle as preparative liquid chromatographic column

LU Liejuan, CHEN Jie, GUAN Yafeng*

(Department of Instrumentation & Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences; Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: A preparative scale liquid chromatographic column with the conical shape of 10° opening angle was constructed and evaluated. The column was designed with the inlet/outlet diameters of 54/27 mm, the column length of 150 mm and the column volume of 200 mL, and packed with the spherical C₁₈ bonded silica with the particle size of 40–75 μm and the aperture of 11 nm. The mobile phase in the conical column showed a plug like flow profile and plug like chromatographic band shape. For naphthalene, the reduced plate height was about 2.11; the maximum sample load was 2.1 mg or 1.7 mL (10% reduction of plate number), which is 20%, 16% and 19% higher than that of cylindrical one of the same length and volume. As the injection mass increased from 2.4 mg up to 12 mg, the resolution of ethyl paraben/butyl (R_{s2}) reduced from 2.14 down to 1.71, and the butyl paraben/naphthalene (R_{s3}) from 2.91 down to 2.52; the injection volume increased from 3 mL up to 19 mL, R_{s2} reduced from 2.23 down to 1.28, and R_{s3} from 2.95 down to 2.30, while the peaks were still in symmetric shape without tailing. This characteristic of the column shall benefit for the separation of trace components from matrix. This demonstrated the conical shaped preparative columns would have a broad practical applicability for obtaining pure compounds.

Key words: preparative liquid chromatography; conical chromatographic column; scale-up

近年来,随着制药和生物技术迅猛发展,特别是重组脱氧核糖核酸(DNA)和杂交瘤技术的广泛应

用,对于某些以生物大分子为主的重要生物制品和药剂,要求其具有95%以上、甚至99.9%的纯度,高

* 通讯联系人:关亚风,博士,研究员,博士生导师。Tel:(0411)84379590, E-mail:guan_yafeng@yahoo.com.cn.

基金项目:国家科技支撑计划课题(No. 2006BAK03A08).

收稿日期:2009-03-27

效制备液相色谱因操作简便、适用范围广、条件温和、选择性高而成为最有效的分离手段之一。在实际的制备工作中,人们为了追求尽可能高的产率,色谱分离都是在进样量过载条件下进行,而进样量超载将导致分离效率下降,产品的纯度也下降。因此,如何提高柱效、增加单位体积填料的样品载样量已成为制备色谱研究的主要问题。

为了增加单位体积填料的样品载样量并提高分离柱效,人们曾考虑将不同内径的色谱柱串联^[1],但是结果表明此法并不能提高有效的分离能力。与传统的圆柱型色谱柱比较,入口内径大于出口内径的台锥型液相色谱柱能使载样量提高,在制备液相色谱中具有应用潜力^[2-5]。但对于锥角小于 5° 的台锥型液相色谱柱柱效提高不明显^[6,7]。我们实验室采用可视化装置对不同锥角(7° , 10° , 15°)的入口内径大于出口内径的台锥型液相色谱柱进行研究,发现 10° 锥角的台锥型柱可以实现塞子状谱带流形,其柱效和分离能力最佳,而且比圆柱型制备柱具有更大的样品容量和对样品较小的稀释效应^[8-10]。本文在上述实验基础上,将 10° 锥角台锥型制备柱等比例放大3倍,并且详细考察了柱效、分离性能、载样量等性能。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-100P 高流量高效液相色谱泵(大连江申分离科学技术公司);LC-830 紫外-可见波长检测器(日本 Soma 光学有限公司);二位三通电磁阀(SMC);N2000 色谱数据工作站(浙江大学智达信息工程有限公司)。

甲醇(工业甲醇重蒸);水(娃哈哈纯净水);流动相:甲醇-水(体积比为 80:20);硫脲(分析纯,丹东市集贤化学试剂厂),萘(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),对羟基苯甲酸乙酯(分析纯,天津市博迪化学有限公司),对羟基苯甲酸丁酯(分析纯,上海化学试剂一厂)。用流动相配制各种溶液。

1.2 锥型液相色谱柱的制备

10° 锥角台锥型制备液相色谱柱:柱长为 150 mm,入口内径为 54 mm,出口内径为 27 mm($V = 200.3 \text{ mL}$, $A_m/A_{out} = 4$),柱管为不锈钢材料,柱管内壁精密抛光。聚四氟乙烯垫片密封,筛板为多孔(孔径为 $2 \mu\text{m}$)烧结不锈钢材料,分配板采用如图 1 所示的商品化产品。柱内干法填充球形 C_{18} 化学键合硅胶(粒径为 $40 \sim 75 \mu\text{m}$, Fuji Silysia Chemical Ltd.)。

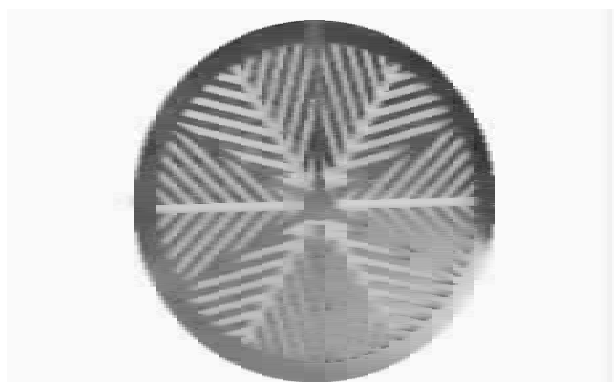


图 1 分配板照片

Fig. 1 Photograph of a distributor

2 结果与讨论

2.1 分配板的选用

本文中用锥型柱为本实验室小型 10° 锥角台锥型制备柱(柱长 50 mm,入口内径 18 mm,出口内径 9 mm, $V = 7.4 \text{ mL}$, $A_m/A_{out} = 4$)等比例放大 3 倍制成。对于大直径的制备型液相色谱柱,分配板直接决定了样品在柱头的分配情况,样品能否在整个柱截面均匀分布直接影响柱效的高低。采用原来的小型 10° 锥角台锥型所用分配板进行放大,我们发现柱效降低而且色谱峰存在严重拖尾问题,于是我们改用如图 1 所示的商品化分配板,在 6 mL/min 的流速下对硫脲、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丁酯和萘的混合样品进行分离,分离谱图、各峰之间的分离度及拖尾因子如图 2 所示。所有的色谱峰峰形基本对称,无明显拖尾,表明采用商品化分配板后的柱头结构合理。

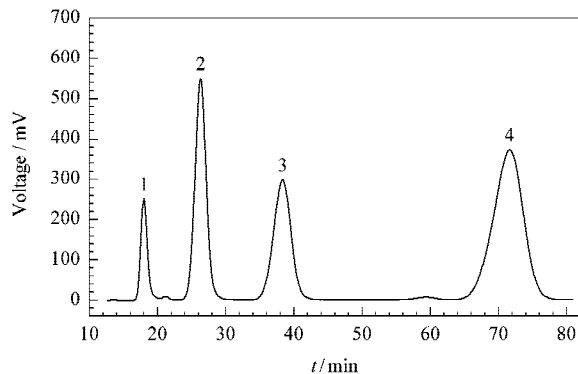


图 2 混合样品的分离色谱图

Fig. 2 Separation chromatogram of a mixture sample

Conditions: mobile phase, methanol-water (80:20, v/v); flow rate, 6 mL/min ; injection volume, $360 \mu\text{L}$; UV detection wavelength, 254 nm ; back pressure, 1 MPa .

1. thiourea: 0.08 g/L , tailing factor 1.2; 2. ethyl paraben: 0.16 g/L , tailing factor 1.0; 3. butyl paraben: 0.16 g/L , tailing factor 0.9; 4. naphthalene: 1.2 g/L , tailing factor 0.9. R_{s1} (thiourea/ethyl paraben) = 1.5; R_{s2} (ethyl paraben/butyl paraben) = 1.4; R_{s3} (butyl paraben/naphthalene) = 2.7.

2.2 柱效

考察了不同流速下锥型柱柱效随流速的变化。由于硫脲在该柱上的保留极弱,故以其作为死时间标记物。锥型柱的折合理论塔板高度 h 和流动相的平均线速度 u 分别用公式(1)和(2)来计算。

$$h = L / (N \times d_p) \quad (1)$$

$$u = L / t_0 \quad (2)$$

其中 t_0 为硫脲的洗脱时间, min; L 为柱长, mm; N 为柱效(以萘计); d_p 为填料的平均粒径, μm 。

以萘为测试标样,所测定的折合理论塔板高度 h 随流动相平均线速度 u 的变化曲线如图3所示。在流速为 6 mL/min(线速度 8.8 mm/min)时,锥型柱的柱效最高,折合理论塔板高度为 2.11,比同长度同体积圆柱的柱效提高了 20%。这是由于在圆柱型色谱柱中,流动相的流形呈抛物面形,导致色谱谱带的加宽^[11]。而在锥型柱中,由于流动相的线速度不断增加,以及管壁的斜面作用,样品在管壁区与中心区的受力情况与圆柱型柱不同,其受力与锥型柱的锥角有关。在锥角为 10°时,样品谱带在管壁区与中心区垂直方向的线速度相等,谱带流形为塞子状,从而可获得较高的柱效。

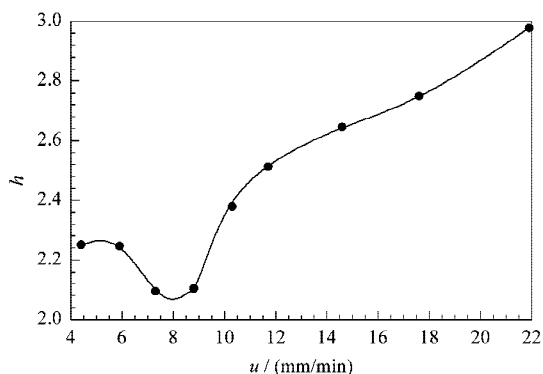


图3 折合理论塔板高度随流动相平均线速度的变化曲线
Fig. 3 Dependence of reduced height equivalent to a theoretical plate on average linear velocity

The sample is the mixture of thiourea (0.08 g/L) and naphthalene (1.2 g/L), other conditions are the same as in Fig. 2.

2.3 样品载样量

在制备色谱中,为了提高每次分离的产量必须尽可能提高样品载样量。通常载样量分为质量载样量和体积载样量。本实验以峰宽增加 5%(柱效下降 10%)时的载样量定义为色谱柱超载下限,此时的载样量分别为色谱柱的体积饱和载样量(V_m)和质量饱和载样量(M_m)。

在流速为 6 mL/min 下,固定进样量为 360 μL ,考察样品浓度不同时柱的理论塔板高度随进样质量变化的规律,结果如图4所示。实验结果表明, M_m 为 2.1 mg,与同长度同体积圆柱相比,提高了 16%。

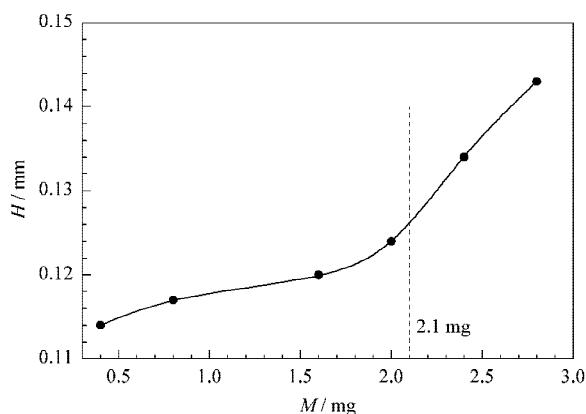


图4 理论塔板高度随载样质量变化的曲线

Fig. 4 Dependence of the height equivalent to a theoretical plate on sample mass

The conditions are the same as in Fig. 2.

在流速为 6 mL/min 下,固定进样样品浓度为 1.2 g/L,考察进样体积不同时锥型柱的理论塔板高度随进样体积变化的规律,结果如图5所示。结果表明,在柱效下降 10%时, V_m 为 1.7 mL,比同长度同体积圆柱提高了 19%。

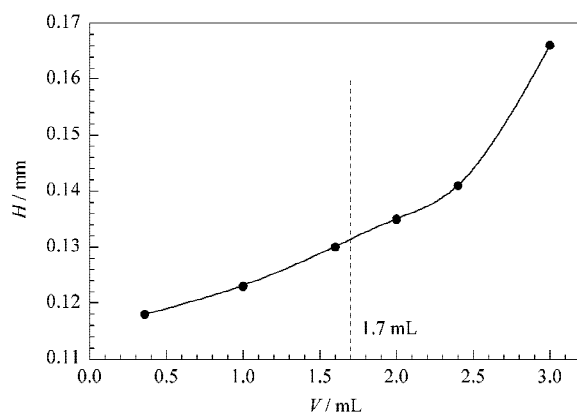


图5 理论塔板高度随进样体积的变化曲线

Fig. 5 Dependence of the height equivalent to a theoretical plate on the injection volume

The sample is 1.2 g/L naphthalene, and other conditions are the same as in Fig. 2 except injection volume.

2.4 样品超载量

设定检测波长为 290 nm,固定混合样品的进样量为 1 mL,逐渐增大所进样品的浓度,考察锥型柱的质量超载行为,结果如图6所示。在进样质量超载条件下,锥型柱的柱效及对羟基苯甲酸乙酯与对羟基苯甲酸丁酯的分离度(R_{s2})和对羟基苯甲酸丁酯与萘的分离度(R_{s3})随进样质量的变化如表1所示。当进样质量由 2.4 mg 增加到 12 mg 时,锥型柱的柱效由 814 块理论塔板/m 降到 654 块理论塔板/m, R_{s2} 由 2.14 降到 1.71, R_{s3} 由 2.91 降到 2.52,但色谱峰仍具有非常好的峰形,峰形高度对称,没有拖尾,这有利于从基质中制备分离微量组分。

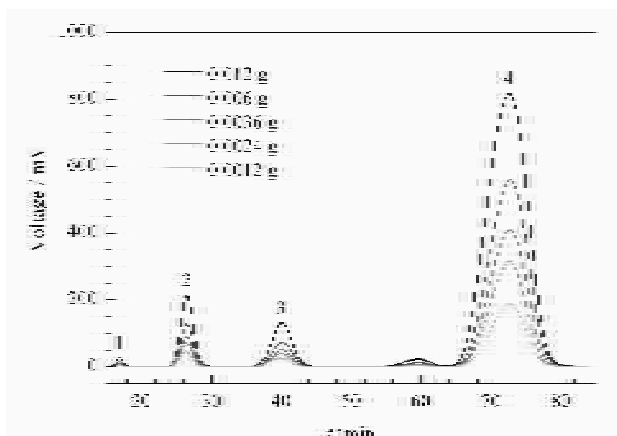


图 6 混合样品进样质量超载下的色谱图
Fig. 6 Chromatograms of mixture sample at mass overload

Conditions : mobile phase , methanol-water (80 : 20 , v/v) ; flow rate , 6 mL/min ; UV detection wavelength , 290 nm ; injection volume : 1 mL ; back pressure , 1 MPa.

1. thiourea ; 2. ethyl paraben ; 3. butyl paraben ; 4. naphthalene.

表 1 锥型柱柱效及分离度随质量超载的变化

Table 1 Dependence of the column efficiencies and resolutions on mass overload

Mass overload/ mg	N/m^{-1}	R_{s2} (ethyl paraben/ butyl paraben)	R_{s3} (butyl paraben/ naphthalene)
2.4	814	2.14	2.91
3.6	781	2.00	2.74
6.0	717	1.81	2.61
12.0	654	1.71	2.52

设定检测波长为 290 nm , 固定混合样品的浓度 , 逐渐增大进样体积 , 考察锥型柱的体积超载行为 , 结果见图 7。在进样体积超载条件下 , 锥型柱的

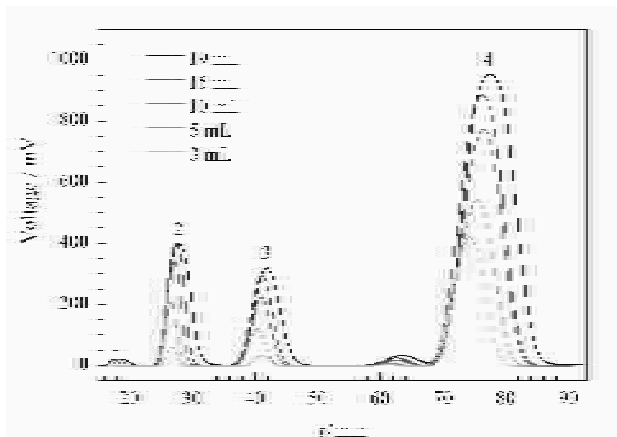


图 7 混合样品进样体积超载下的色谱图
Fig. 7 Chromatograms of a mixture sample at volume overload

Sample mass concentrations : thiourea (0.08 g/L) , ethyl paraben (0.16 g/L) , butyl paraben (0.16 g/L) and naphthalene (1.2 g/L). Other conditions are the same as in Fig. 6 except injection volume.

1. thiourea ; 2. ethyl paraben ; 3. butyl paraben ; 4. naphthalene.

柱效及 R_{s2} 和 R_{s3} 随进样体积的变化如表 2 所示。当进样体积由 3 mL 增加到 19 mL 时 , 锥型柱的柱效由 801 块理论塔板/m 降到 418 块理论塔板/m , R_{s2} 由 2.23 降到 1.28 , R_{s3} 由 2.95 降到 2.30 , 但色谱峰仍具有非常好的峰形 , 峰形高度对称 , 没有拖尾 , 这有利于从基质中制备分离微量组分。

表 2 锥型柱柱效及分离度随体积超载的变化
Table 2 Dependence of the column efficiency and resolutions on volume overload

Volume overload/ mL	N/m^{-1}	R_{s2} (ethyl paraben/ butyl paraben)	R_{s3} (butyl paraben/ naphthalene)
3	801	2.23	2.95
5	736	1.91	2.88
10	644	1.65	2.63
15	530	1.48	2.46
19	418	1.28	2.30

3 结论

本文对 10° 锥角台锥型制备柱进行了放大研究 , 采用商品化分配板 , 在流速为 6 mL/min 时 , 锥型柱的折合理论塔板高度最小 (2.11) , 柱效下降 10% 时的样品质量和体积载样量分别为 2.1 mg 和 1.7 mL , 与同长度同体积圆柱型柱相比 , 柱效提高了 20% , 质量载样量提高 16% , 体积载样量提高了 19%。当进样质量由 2.4 mg 增加到 12 mg , 或者进样体积由 3 mL 增加到 19 mL , 锥型柱仍可获得峰形对称的色谱峰。这表明进一步放大后的锥型柱仍具有高柱效和高分离度 , 其在生物制药和天然产物的制备纯化等领域将有着广泛的应用前景。

参考文献 :

[1] Kwok J , Snyder L R , Sternberg J C. Anal Chem , 1968 , 40 (1) : 118
[2] Said A S. J High Resol Chromatogr , 1979 , 2 : 63
[3] Stahr H M , Ikeda R M , Oakley E T , et al. Anal Chem , 1966 , 38 : 1974
[4] Pecavar A , Vovk I , Marsel J , et al. Anal Sci , 1999 , 15(3) : 233
[5] Kerry D. World Patent WO 00/74 808. 2000
[6] Pecavar A , Smidovnik A , Prosek M. Anal Sci , 1997 , 13 : 229
[7] Vovk I , Pecavar A , Prosek M , et al. J Planer Chromatogr , 1999 , 12(1) : 66
[8] Ma J P , Guan Y F , Chen L X. J Sep Sci , 2003 , 26 : 307
[9] Ma J P , Chen L X , Guan Y F. J Chromatogr A , 2004 , 1033 : 275
[10] Guan W N , Xu F , Tan F , et al. J Chromatogr A , 2006 , 1108 : 218
[11] Catchpoole H J , Shalliker R A , Dennis G R , et al. J Chromatogr A , 2006 , 1117 : 137