

10°锥角台锥型液相色谱柱尺寸等比例放大和柱内谱带流型的可视化研究

观文娜, 谭峰, 关亚凤

(中国科学院大连化学物理研究所现代分析与微型仪器研究室, 大连 116023)

摘要 利用改进的可视化装置, 研究了10°锥角的台锥型液相色谱柱内的谱带流型与柱参数变化的关系. 将有机玻璃柱管加工成内圆台外方型的一体结构, 选择折射率一致的色谱固定相硅胶和流动相环己烷, 使整个色谱柱成为高度清晰的透明体, 能直接观察柱中彩色样品谱带的动态三维流型. 研究表明, 在实验条件范围内, 流动相流速对谱带流型无影响, 填料的形状和性质对塞子状流型有一定程度的影响. 比较了柱长为5 cm和等比例放大后柱长为10 cm锥型柱内的流型, 发现放大后的锥型柱内仍然保持塞子状流型, 总柱效等比例增加. 表明继续按比例放大成为工业规模色谱柱后仍能保持塞子状流型.

关键词 锥型色谱柱; 可视化; 柱尺寸放大; 谱带流型; 制备液相色谱

中图分类号 O658

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)01-0030-05

制备色谱作为一种快速高效的分离技术已在制药、食品辅助品和化妆品工业中得到普遍应用. 如何提高制备色谱的样品负载量、分离柱效和节省溶剂一直是备受关注的问题. 样品谱带在色谱柱中的流型与其柱效有密切的关系, 因此利用合理的可视化装置^[1~8]直接观察样品谱带在整个色谱柱内动态过程和流型变化, 对于研究色谱柱的柱头设计、柱形选择、装柱技术、填料和流速选择及进样方式等都具有重要的意义.

我们^[9~12]曾发展了一种无毒害溶剂的可视化装置, 采用有机玻璃($n = 1.49$)作为柱管材料, 用无毒的丙三醇($n = 1.47$)作为折射率补偿液, 环己烷($n = 1.43$)作为流动相, 碘的环己烷溶液作为有色样品, 用数码相机直接获取谱带流型的数字化信息. 利用这种可视化装置研究了常规圆柱形色谱柱和不同锥角的台锥型色谱柱内样品谱带的流型和动态过程^[13,14], 发现了锥角为10°且入口内径大于出口内径的台锥型色谱柱的样品谱带流型为塞子状, 且其柱效和分离能力最好, 比同长度、同体积的圆柱高30%左右, 而且样品容量也提高了40%以上.

本文发展了一种改进的可视化装置. 该装置仍以有机玻璃作为柱管材料, 但柱管为内圆台外方的形状. 改进的可视化装置不需要使用补偿液, 图像清晰程度大为提高, 能获得真实的谱带流型. 利用该装置研究了柱长为5 cm和等比例放大后柱长为10 cm的台锥型制备色谱柱中的谱带流型及其分离过程.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-100P 高流量 HPLC 泵(大连江申分离科学技术公司); LC-830 紫外-可见检测器(Soma Optics, LTD, Japan); DSC-S85 Cyber-shot 数码相机(Sony Corporation, Tokyo, Japan); 科分 Win-98 色谱工作

收稿日期: 2005-04-21.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20075030)资助.

联系人简介: 关亚凤(1957年出生), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事微型分析仪器和分析化学新方法的研究.

E-mail: kfguan@mail.dlptt.ln.cn.

站, Ver. 1. 08(大连科美精密仪器有限公司).

流动相 1: 环己烷(分析纯, 沈阳市联邦试剂厂); 流动相 2: 甲醇(分析纯, 沈阳市联邦试剂厂)/水(体积比 80:20); 流动相 3: 甲醇/0.1 mol/L 乙酸胺水溶液(体积比 50:50). 碘(分析纯, 天津市励特吉尔环保技术研究所), 用环己烷配成 10 g/L 的溶液, 使用前经固相萃取柱过滤(填充与色谱柱相同的填料); 胭脂红和亮蓝(分析纯, 天津染料工业研究所), 用流动相配制成质量浓度 2 g/L, 0.15 g/L 尿嘧啶(Ultra pure, 北京经科宏达生物技术公司)和 1.2 g/L 萘(分析纯, 沈阳市联邦试剂厂).

1.2 可视化装置

可视化装置如图 1 所示. 内部为入口内径大于出口内径、锥角为 10°的圆锥体, 外部为长方体形状, 内壁和外部的 4 个平面精密抛光. 筛板(北京安泰科技股份有限公司)为多孔烧结不锈钢材料, 孔径均为 20 μm . 将纸质标尺(自制)粘贴在柱外垂直平面上, 用于测量谱带沿柱长移动的距离. 柱内用干法填充 43 ~ 63 μm 无定形或 40 ~ 60 μm 球形 C_{18} 化学键合硅胶(北京金欧亚科技发展有限公司).

1.3 液相色谱柱的制备

制备了两种尺寸的 10°锥型制备液相色谱柱: 柱 1[50 mm \times (18 \rightarrow 9) mm i. d.] 和柱 2[100 mm \times (36 \rightarrow 18) mm i. d.]. 可视化装置的柱管材料为有机玻璃, 由于有机玻璃易被溶剂腐蚀, 所以将加工尺寸相同的不锈钢色谱柱用于考察柱效.

在考察流型时, 为观测到清晰的样品谱带, 柱 1 的进样量为 80 μL , 柱 2 的进样量为 600 μL . 在分离样品时, 进样量分别为 40 和 160 μL .

2 结果与讨论

2.1 流型的研究

由于整个可视化装置为一体结构, 因此可以准确地确定内部锥型液相色谱柱入口和出口的位置. 将纸质标尺垂直粘贴在其中一个垂直平面上, 其 0 刻度位置与锥型液相色谱柱入口处的位置相同, 利用该标尺就可以准确地测量样品谱带沿柱长方向移动的距离.

2.1.1 谱带在柱内的动态过程 用肉眼可以清楚地看到谱带流型的立体图像. 但由于受数码相机记录系统的限制, 只能给出二维照片. 图 2 为可视化装置得到的谱带流型的动态照片. 可以看出, 样品在锥型柱内的洗脱过程中能保持平头塞子状流型. 在图 2(A) 中, 使用无定形硅胶填料, 样品在柱内有明显的拖尾, 使谱带展宽, 降低了分离柱效. 图 2(B) 使用球形硅胶填料, 样品没有拖尾. 对无定形填料的孔径分布的测量结果表明, 它含有大量 3 nm 左右的孔分布, 由于对小分子样品有强烈的滞留作用而引起拖尾, 而球形硅胶单体中这种孔分布则很少.

从直观的谱带流型照片可见, 图 2(B) 比图 2(A) 有更高的柱效. 图 2 对应的紫外检测谱图如图 3

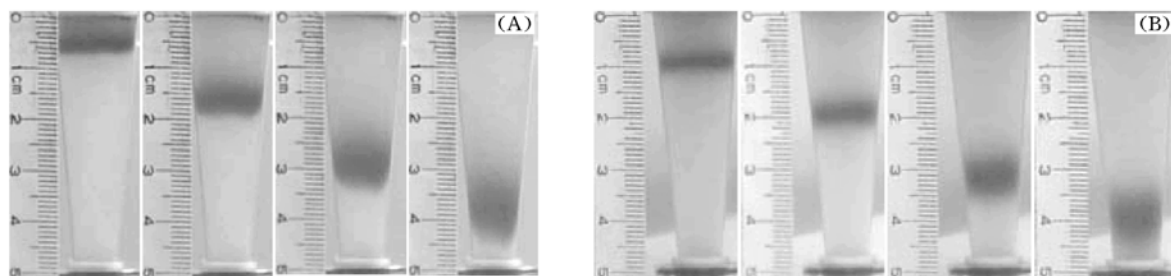


Fig. 1 Photograph of visualization device

1. Inlet; 2. packed liquid chromatographic column;
3. flow profile of sample band; 4. frit and distributor;
5. ruler; 6. column wall.

Fig. 2 Photographs of dynamic flow profiles
(A) Irregular particles C-Gel C_{18} ; (B) spherical particles C-Gel C_{18} .

所示. 图 3(A) 的峰形有严重拖尾, 而图 3(B) 的峰形对称性很好, 这一结果用可视化装置直观拍摄到的谱带流型动态照片一致, 表明可视化装置可真实地反映样品谱带在柱内的动态过程.

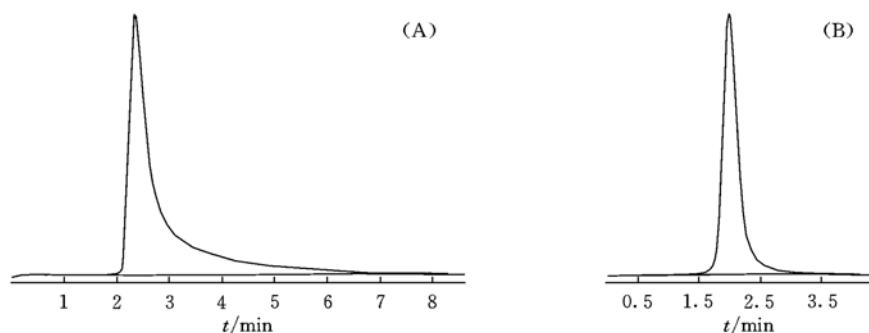


Fig. 3 Chromatograms of samples with UV detection

(A) Irregular particles C-Gel C₁₈; (B) spherical particles C-Gel C₁₈.

2.1.2 流速对谱带流型的影响 流动相的流速可能会影响谱带流型, 即影响锥型柱获得的平头塞子状流型. 实验采用数码相机和自制标尺考察了流速对流型的影响, 结果如图 4 所示. 结果表明, 对于柱长 5 cm, 锥角 10° 的锥型柱, 流速的变化对谱带流型几乎无影响, 即流速在 1 ~ 8 mL/min 范围内, 谱带能保持塞子状的最大长度(L_{\max})是恒定的. 比较图 4 曲线 *a* 和 *b* 可见, 球形硅胶填料能保持谱带为塞子状的最大长度比使用无定形填料的长度要长, 表明球形填料比无定形填料效果好.

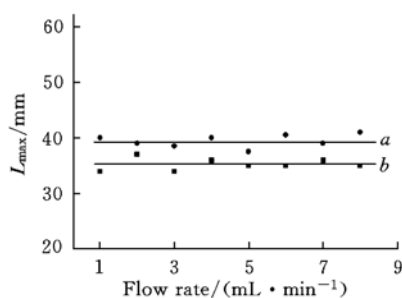


Fig. 4 Effect of mobile phase flow rate on flow profiles

a. Spherical particle C-Gel C₁₈; *b*. irregular particle C-Gel C₁₈.

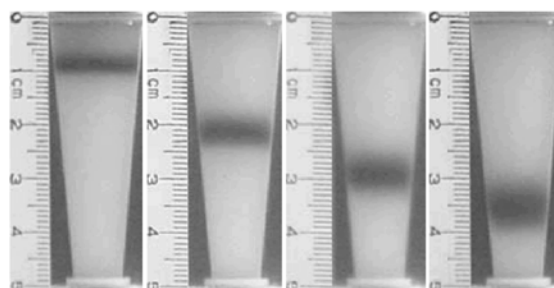


Fig. 5 Photographs of dynamic flow profiles

2.1.3 填料粒径对流型的影响 为考察填料的粒径对 10° 锥型柱中塞子状流型的影响, 观察了样品在 20 μm 球形硅胶填料上的分离过程. 图 5 为谱带流型的动态照片 (流速 2 mL/min), 可见在整个色谱过程中均能保持平头塞子状, 说明填料的粒径对锥型柱中的平头塞子状流型基本无影响. 但是, 在进样量和流速相同的情况下, 小粒径填料的色谱柱中的谱带宽度较小. 图 6 为填料粒径不同时所对应的紫外检测谱图, 图 6(A) 的半峰宽为 0.26 min, 而图 6(B) 的半峰宽为 0.19 min. 这与直观拍摄到的谱带流型动态照片一致, 说明利用可视化装置可以提供一种直观有效的评价制备液相色谱柱效的方法.

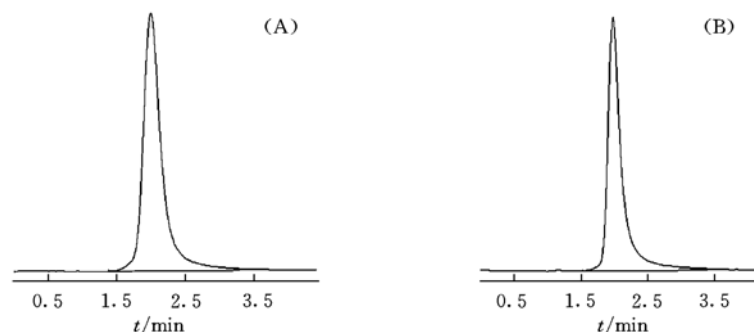


Fig. 6 Chromatograms of samples with UV detection

(A) Spherical particle C-Gel C₁₈, 40—60 μm; (B) spherical particle C-Gel C₁₈, 20 μm. Flow rate: 3 mL/min.

2.1.4 柱尺寸对流型的影响 为考察柱尺寸对流型的影响, 将上述获得很好塞子状流型的锥型柱 (锥

角保持不变)等比例放大, 得到柱长为 10 cm 的锥形柱. 由图 7 可见, 在已放大的锥型柱内, 样品在整个分离过程中仍保持平头塞子状, 而且流速的改变同样不会影响谱带的流型. 从谱带流型照片可以看出, 在柱的入口处样品分配均匀, 说明柱头及分配盘的设计合理.

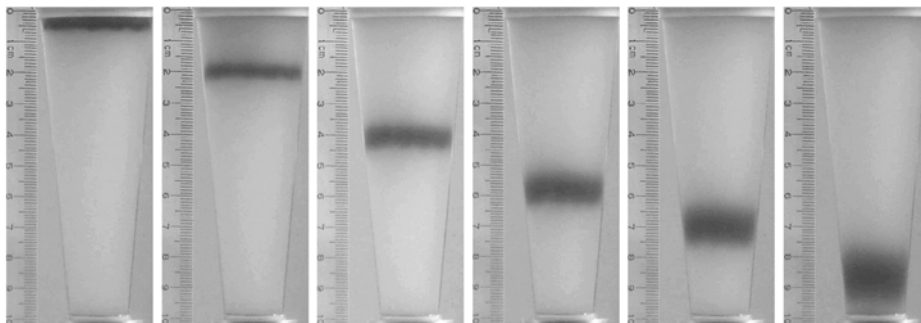


Fig. 7 Photographs of dynamic flow profiles of column 2

2.2 柱尺寸对柱效和分离度的影响

图 8 为采用不同尺寸的锥型柱分离尿嘧啶和萘(流动相 2)时, 萘的有效塔板高度随流动相平均速度的变化曲线. 柱 1 的理论塔板数为 524/5 cm, 折合塔板高度($h = H/D_p$)为 1.91; 柱 2 的理论塔板数为 1171/10 cm, 折合塔板高度为 1.71, 与柱 1 相比理论塔板数提高了 1.2 倍, 折合塔板高度降低了 10%. 由于柱 2 的入口截面积为柱 1 的 4 倍, 因此实验中其进样量(160 μL)也是柱 1(40 μL)的 4 倍. 结果表明, 将 10°锥型液相色谱柱等比例放大后, 总柱效等比例增加, 而且由于柱外效应的影响减小, 柱效还有所提高.

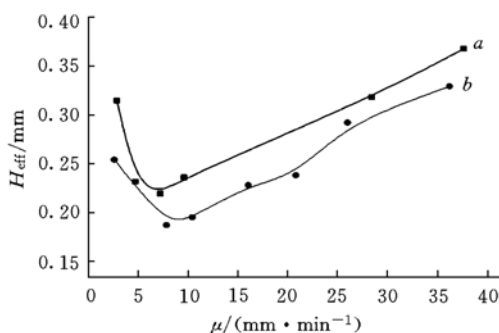


Fig. 8 Effects of flow rate on plate height
a. Column 1; b. column 2.

为比较柱尺寸变化对分离度的影响, 使用相同的色谱填料和流动相(流动相 3), 分别在柱 1 和柱 2 上对胭脂红和亮蓝进行了分离. 图 9 为获得的紫外检测谱图, 可见, 两个样品在柱 1 上的分离度 R_{s1} 为 1.52, 在柱 2 上的分离度 R_{s2} 为 2.21, $R_{s2}/R_{s1} = 1.45$, 比 $\sqrt{2}$ (1.414)略高. 表明 10°锥型柱的尺寸按比例放大后柱效略有提高.

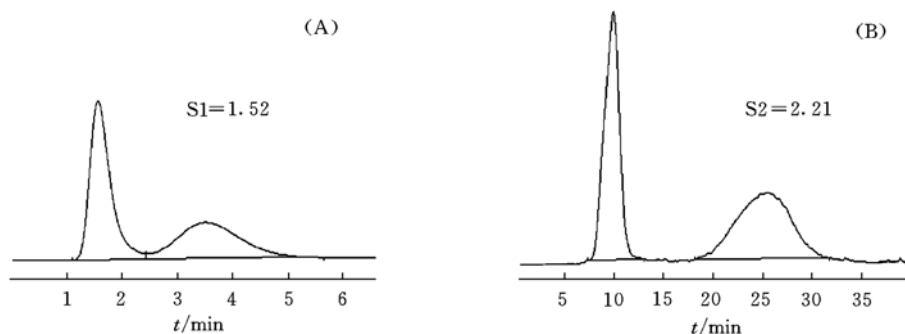


Fig. 9 Chromatograms of carmine and brilliant blue in column 1 (A) and column 2 (B)

Mobile phase: methanol/0.1 mol/L ammonium acetate (volume ratio is 50:50); flow-rate: 4 mL/min;
sample: 2 g/L carmine and brilliant blue solution; detection wavelength: 555 nm.

参 考 文 献

- [1] Kirkland J.; Ed.; Fina N. J.. Proceedings of the First Philip Morris Scientific Symposium[C], New York: Philip Morris, 1973
- [2] Broyles B. S., Shalliker R. A., Cherrak D. E. *et al.*. J. Chromatogr. A[J], 1998, **822**: 173—187
- [3] Shalliker R. A., Broyles B. S., Guiochon G.. J. Chromatogr. A[J], 1998, **826**: 1—13
- [4] Broyles B. S., Shalliker R. A., Guiochon G.. J. Chromatogr. A[J], 1999, **855**: 367—382

- [5] Broyles B. S. , Shalliker R. A. , Guiochon G. . J. Chromatogr. A[J] , 2001 , **917** : 1—22
- [6] Shalliker R. A. , Broyles B. S. , Guiochon G. . J. Chromatogr. A[J] , 1999 , **865** : 83—95
- [7] Broyles B. S. , Shalliker R. A. , Guiochon G. . J. Chromatogr. A[J] , 2000 , **867** : 71—92
- [8] Shalliker R. A. , Broyles B. S. , Guiochon G. . Anal. Chem. [J] , 2000 , **72** : 323—332
- [9] MA Ji-Ping(马继平) , GUAN Ya-Feng(关亚凤). Progress in Chemistry(化学进展)[J] , 2003 , **15**(1) : 25—30
- [10] Ma J. P. , Guan Y. F. , Chen L. X. . J. Separation Science[J] , 2003 , **26**(3/4) : 307—312
- [11] MA Ji-Ping(马继平) , CHEN Ling-Xin(陈令新) , ZHU Dao-Qian(朱道乾) *et al.* . Chinese J. Chromatography(色谱)[J] , 2003 , **21**(2) : 106—109
- [12] MA Ji-Ping(马继平) , CHEN Ling-Xin(陈令新) , TAN Feng(谭峰) *et al.* . Chinese J. Chromatography(色谱)[J] , 2003 , **21**(4) : 430—433
- [13] MA Ji-Ping(马继平) , CHEN Ling-Xin(陈令新) , TAN Feng(谭峰) *et al.* . Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J] , 2003 , **31**(11) : 1317—1321
- [14] Ma J. P. , Chen L. X. , Guan Y. F. . J. Chromatogr. A[J] , 2004 , **1033** : 275—281

Studies on Column Size Scale-up and Flow Profile in Conical Shape Liquid Chromatographic Column of 10° by Visualization Method

GUAN Wen-Na, TAN Feng, GUAN Ya-Feng*

(Department of Analytical Chemistry & Micro-Instrumentation, Dalian Institute of Chemical Physics,
The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116012, China)

Abstract An improved visualization device made of polymethyl methacrylate (PMMA), packed with C_{18} , was utilized to study the 3D flow profile of conical columns with an angle of 10° . The outside wall of the conical columns was a rectangular shape in order to improve the transparency property of the column wall and reduce the deformation of image for better observation of the flow profiles of colored solutes inside the column. The influence of mobile phase flow rate, particle size and shape on the flow profile of a colored band was studied both for a 5 cm long column and a scaled-up column of 4 fold in volume. The experimental results show that the flow rate of mobile phase has a little influence on the flat flow profiles of the iodine band while the properties of stationary phase have a certain influence on them. The flow profiles of the scaled-up column are flat during the whole chromatographic process, and the efficiency and resolution of the column are also increased in accordance with theoretical prediction. The results indicate that the 10° conical columns can be proportionally scaled up while still keeping the flat flow profile and superior column efficiency than conventional column.

Keywords Conical chromatographic column; Visualization; Column scale-up; Flow profile; Preparative liquid chromatography

(Ed. : K, G)

(上接第 22 页)

《Chemical Research in Chinese Universities》于 2004 年由原季刊扩为双月刊, 16 开本(A4), 每期 128 页, 采用微机排版, 激光照排, 80 g 胶版纸, 胶版印刷, 装帧质量高。国内定价 9 元/期(54 元/年), 国内外公开发售, 国际刊号 ISSN 1005-9040, 国内刊号 CN 22-1183/06, 邮发代号 12-170。国内读者可在当地邮局订阅, 国外读者可通过中国国际图书贸易总公司(国外发行代号: 1533BM) 订阅。补订者可与本刊编辑部联系。2006 年起期刊的网络版由 Elsevier 出版公司出版发行(<http://www.sciencedirect.com>)。

通讯地址: 长春市吉林大学前卫校区北区《高等学校化学学报》编辑部(邮政编码: 130021)

电话: 0431-8499867, 8499870; 传真: 0431-8925344; E-mail: cjcu-f@jlu.edu.cn; <http://www.cjcu.jlu.edu.cn>