

# 制备色谱技术及装备研究进展

柳仁民<sup>1</sup> 王海兵<sup>1</sup> 周建民<sup>2</sup>

(1.聊城大学化学化工学院,山东 聊城 252059 2.聊城万合工业制造有限公司,山东 聊城 252022)

**摘要:**概述了制备色谱的研究进展,对制备型高效液相色谱、超临界流体色谱、高速逆流色谱等重要的制备色谱技术与装置进行了评述,总结了各自的技术特点,并探讨了制备色谱存在的问题和发展前景。

**关键词:**制备色谱 技术 装备 研究进展

随着现代制药行业的快速发展,药物活性成分的分离日益受到关注和重视,而药物活性成分的规模化分离制备技术成为制约现代制药行业发展的瓶颈。色谱分离技术是最主要的分离纯化技术之一,其已从分析规模发展到制备和生产规模,在药物活性成分的分离纯化中发挥了重要作用,并已发展成为大规模分离制备药物特别是中药活性成分的重要方法。本文对重要的制备色谱技术及装备的研究进展进行了综述。

## 1 制备型高效液相色谱

液相色谱是将分离填料填装在色谱柱内,以液体流动相进行洗脱,利用药物不同活性成分与填料相互作用力的差异进行分离。在液相制备色谱分离中,一般将柱压力低于0.5 MPa的称为低压制备色谱,压力0.5~2 MPa的称为中压制备色谱,压力>2 MPa的称为高压制备色谱<sup>[1]</sup>。

低压制备色谱通常有两种模式,一种是在柱上方加压,另一种是在柱下方减压。除了加减压外,其他的与经典柱色谱法基本一致。减压一般是用真空泵来完成,加压一般用空气泵、氮气钢瓶、蠕动泵等完成。在低压制备色谱中使用的是颗粒较大的填料,因此其分辨率是有限的。

中压制备色谱是利用恒流泵抽送流动相,带着样品流经色谱柱,实现对样品的分离。中压制备色谱系统由溶剂瓶、恒流泵、进样阀、色谱柱、检测器、记

录仪和馏分收集器等部分组成。其色谱柱一般是由耐压的强化玻璃制成,填料颗粒大小比低压制备色谱所用填料小,分离效率更高。

高压液相色谱又叫高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC),是利用更细的高效填料进行分离的,具有高柱效、高流速、分离时间短的特点。与经典液相色谱相比高效液相色谱有很大不同,表1列出了一些不同之处<sup>[2]</sup>。

表1 经典液相色谱和高效液相色谱的比较

	经典液相色谱	高效液相色谱
操作压力	常压或减压	高压 40~50 MPa
填料颗粒	大	小 2~50 μm
柱效	低	高 40 000~60 000块/m
分析速度	慢	快
色谱柱使用次数	色谱柱只用一次	色谱柱可重复使用多次

虽然制备型的HPLC也有缺点<sup>[3-4]</sup>,需要大量的溶剂,产品过于稀释以及无法避免地使用有毒的有机溶剂,但是由于制备型HPLC的优点比较突出,并且其分离模式多种多样,故其在生产各个领域的应用相当广泛<sup>[5]</sup>。

HPLC装置由输液泵、制备色谱柱、检测器、控制系统等组成,制备色谱柱是核心部件,色谱填料的填装是其操作的关键技术,下面主要对这两方面进行介绍。

### 1.1 高效液相制备色谱柱

制备型HPLC由于采用细的填料、高压操作,所以色谱柱多用不锈钢制作,目前所使用的柱结构形

式主要有空管柱、轴向压缩柱和径向压缩柱。

### 1.1.1 空管柱

空管柱结构与分析柱相同,常用空管柱内径为10~100 mm,采用匀浆填充技术填充色谱填料。随空管柱直径的增大,用匀浆法填充色谱柱的难度也越来越大,当内径>100 mm时,用匀浆法填充难以得到理想的效果。

### 1.1.2 轴向压缩柱

轴向压缩柱是采用活塞压缩床层,以使色谱柱内填料均匀、密实,得到更高的柱效。它源于1976年Godbille等人<sup>[6-7]</sup>的研究工作,其后在1990年后得到了迅速的发展。其原理是通过活塞的上下移动来装柱、维持柱压和卸柱,活塞周边配置了特殊设计的密封圈,能容许活塞上下自由移动,同时又能保持高的密封性。在柱内的两端均配有多孔不锈钢滤板和能使样品及洗脱液在柱截面上均匀分布的分散器。液流分散器保证了大量样品尽可能地瞬时分散在柱截面上,进而快速均匀进入柱床,克服了柱中心样品局部过浓的现象,保证了色谱柱的高效。

根据在分离制备过程中提供给活塞的压力是否持续,可将轴向压缩柱分为静态和动态两种,静态轴向压缩柱的效果比动态的差,但是设备比动态便宜。动态轴向压缩柱在使用过程中,活塞始终产生一定的压力压缩填料,随时消除产生的死空间,色谱柱柱床均匀、性能稳定、密度高、柱效高。采用动态轴向压缩柱工艺装填的色谱柱现已基本上主宰了整个制备型色谱柱市场,国内已有动态轴向压缩柱制备色谱系统产品。

聊城万合工业制造有限公司自主研发了高效液相轴向加压(自振)制备层析柱系统,配套高压输液泵和检测器,通过计算机自动控制,成功开发了高效液相层析中药提取装备。图1为高效液相轴向加压(自振)制备色谱柱(HPLC-C200型)系统的示意图,图2为色谱柱柱体图,图3为汇流板结构示意图。

柱系统具有如下特点 (1)采用精密的机械抛光

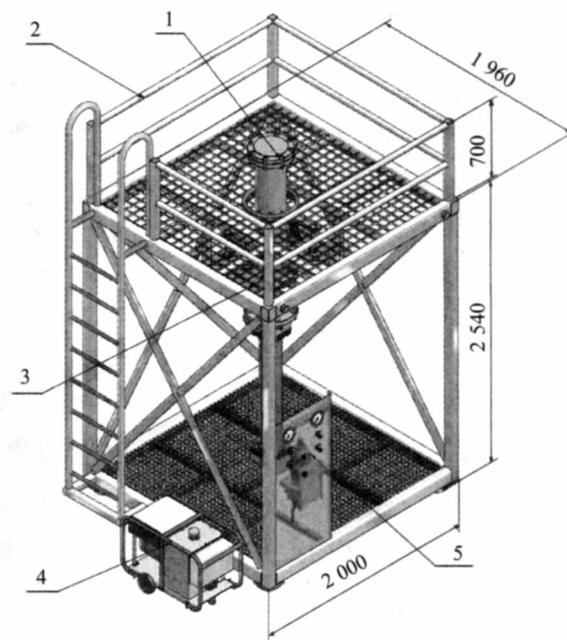


图1 轴向加压层析柱系统示意图

1—轴向加压层析柱 2—主框架结构 3—层析柱体振荡机构  
4—加压液压站 5—保压用皮囊式蓄能器

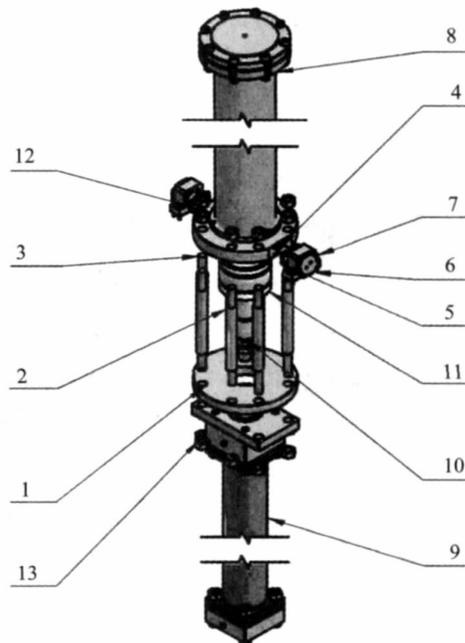


图2 轴向加压制备色谱柱柱体图

1—连接法兰 2—拉杆 3—长拉杆 4—支撑轴 5—连接挡板  
6—转动定位盘 7—定位销轴 8—层析柱体 9—加压油缸  
10—锁紧螺母 11—层析柱加压活塞体组件  
12—柱体铰接轴承座 13—外六角连接螺母

和电抛光技术和圆柱化技术,使柱壁的表面粗糙度 $Ra \leq 0.025 \mu\text{m}$ ,达到了国外同类产品的制造水平,并

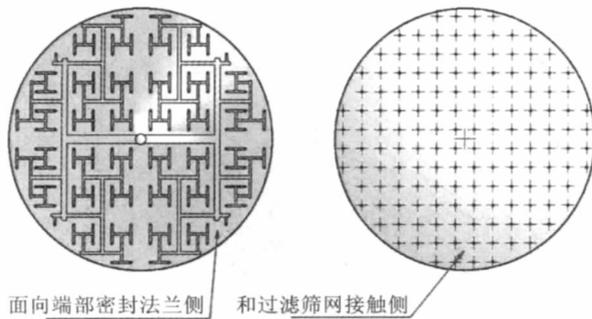


图3 汇流板结构示意图

保证了其柱管的圆柱度 $2\ \mu\text{m}$ ,从而最大限度地减少了装柱和使用过程中的管壁效应,并可保证重复装填多次后仍保持初次装填时的良好密封性能和柱效。(2)柱体部分和固定机架采用弹簧连接方式和铰轴连接方式的组合,在人工做干式固相填料时,可以通过手动振动和摆动柱体部分,将填料在加压前在柱体中呈均匀布置,以利于在液压轴向加压后,使填料在柱体中密度均匀。(3)通过柱端的汇流板流道分级布置,实现进出样品均匀分布,进一步提高柱效。

### 1.1.3 径向压缩柱<sup>[8]</sup>

径向柱色谱使用双管的色谱柱,填料装在管壁可压缩的高聚物柱管内制成柱芯,再将装有填料的柱芯放入不锈钢外套中,利用气体或液体施压于柱芯外壁和不锈钢外套之间,压紧柱芯内的填料,使色谱柱得到径向压缩。该技术由Little等于20世纪70年代中期发明,目的是消除颗粒间及颗粒与管壁间的空隙<sup>[9-10]</sup>。

径向色谱柱的结构如图4所示<sup>[11]</sup>,图中表明进入到径向色谱柱的样品和流动相并非如传统的轴向色谱柱从柱的一端流向另一端,而是沿径向流动,即样品和流动相是从色谱柱的周围流向柱圆心。

径向压缩柱的主要缺点是柱芯长度固定,不如轴向压缩柱可以任意调节。此外直径较大的色谱柱中径向经常出现粒度梯度,造成流动相径向流速分布不均匀。由于径向扩散太慢,不能抵消柱截面积流速差异所产生的浓度梯度,所以径向流速是峰展宽的一个重要来源<sup>[10]</sup>。径向压缩柱主要是由Waters公司生产,并已有预制柱出售。

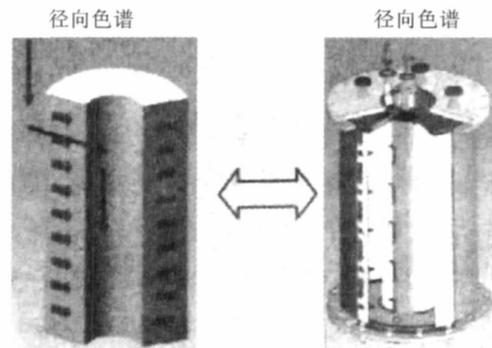


图4 径向压缩柱示意图

## 1.2 高效液相制备色谱填料

色谱柱的性能往往决定了整个仪器设备的性能,而色谱填料的类型和尺寸又决定了色谱柱的性能,因此对于柱填料的选择十分重要。

### 1.2.1 制备色谱中对填料的要求

一般来说,分析型色谱柱填料也可以用于制备型色谱柱中,但是制备色谱中使用的量大,而且需要反复装柱,因此对于制备色谱填料有一些特殊的要求<sup>[12]</sup>:(1)机械强度高;(2)负载量高,单位重量的填料负载量高可以处理更多的样品;(3)可大量供应,批间的重现性好;(4)粒径大小合适,分布范围窄;(5)化学稳定性好,选择性好,无毒,易于填充,价格合理等。

一般情况下,很难找到符合所有要求的填料,因此新型填料的开发以及对原有填料的改性一直以来都是色谱研究的热点,也是制备色谱攻关难题。

### 1.2.2 填料的种类

目前在制备色谱中,使用最多的就是硅胶及其衍生物的键合固定相填料。虽然硅胶及其衍生物使用的较多,但是它们也有其缺点,例如硅胶对极性物质(特别是对碱性溶质)产生非特异性吸附,导致峰严重拖尾。

为了克服上述缺点,人们对高纯硅胶及其键合固定相进行了潜心的开发,得到了金属杂质含量极低的高纯硅胶及其键合固定相。例如Eka Chemicals AB的Kromasil  $\delta$ 系列、GL Sciences的Inertsil  $\delta$ 系列及DAISO的DAISOGEL系列等。

近年来又发展了整体柱色谱<sup>[8]</sup>,它是原料经过聚

合或固化在色谱柱内,形成一整块连续的多孔填料。整体柱色谱具有传质快、谱带展宽小、孔隙度及渗透性好的特点,在高流速下压力远低于颗粒填充柱,是一种很值得深入研究的色谱填料。

### 1.2.3 制备柱的装填技术<sup>[12]</sup>

制备柱是否装填均匀、结实,关系到色谱过程的分离效率,是柱技术中最关键的部分,也是决定柱效高低的主要因素之一。目前,制备柱的装柱方法主要有干装法、匀浆法和压缩法3种。

#### 1.2.3.1 干装法

干装法是色谱柱在做上下抖动的同时,将柱填料加入柱子中。干装法填装的柱子柱床相对稳定均匀,填充装置简单,成本低。此法适合于装填颗粒度 $> 20 \sim 30 \mu\text{m}$ 的填料,而颗粒 $< 20 \mu\text{m}$ 的填料不宜用此法装填,不易于填装均匀。

#### 1.2.3.2 匀浆法

匀浆法又称湿法,是用等密度溶剂作为匀浆剂,经超声波处理,使填料在匀浆剂中高度分散制成匀浆,在高压下,用顶替液将匀浆压入柱内,制成具有均匀、紧密填充床的制备色谱柱。该法的关键在于获得稳定的匀浆,常用二恶烷与四氯化碳(或四溴乙烷与四氯乙烯)混合,通过选取不同比例,配置与填料等密度的溶剂作为匀浆剂。匀浆法现已成功用于柱径不超过100 mm的制备柱的装填,而大柱径制备柱的装填不适合用此法,因为柱径大,难以得到稳定的柱床。

#### 1.2.3.3 压缩法

压缩法主要有轴向压缩法、径向压缩法和环形膨胀压缩法,前两种使用前述的相应设备即可实现。环形膨胀柱是通过柱中心的一个楔形杆推动活塞上下移动,产生挤压柱床的径向和轴向复合力,使柱填充紧密,目前还处于试验阶段。

## 2 制备型超临界流体色谱

超临界流体色谱(Supercritical fluid chromatogra-

phy, SFC)是一种以超临界流体作为流动相的色谱分离技术。超临界流体是指在高于临界压力和临界温度时的一种物质的状态,它兼有气体的低黏度、液体的高密度以及介于气、液之间较高的扩散系数等特征<sup>[13]</sup>。因而,超临界流体色谱既具有气相色谱的主要优点(溶质在流动相中的高扩散系数),又具有液相色谱的主要优点(流动相对溶质的良好溶解能力)。从理论上说,无论化合物是极性的、热不稳定性的、化学活泼性的或是低挥发性的,都能利用超临界流体色谱将它们快速地分离开。

图5为超临界流体色谱装置示意图<sup>[14]</sup>,从中可以看出,超临界流体色谱装置与高效液相色谱装置类似,也主要由泵系统、进样系统、色谱柱、检测器、控制系统等组成。

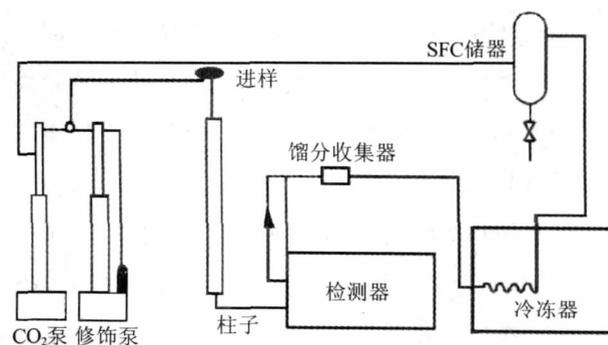


图5 超临界流体色谱流程图

在超临界流体色谱装置中常用的高压泵有螺杆注射泵和双柱塞往复泵,由于超临界流体色谱所用的流动相为超临界 $\text{CO}_2$ ,一般需使泵的缸体或泵头要冷却到 $0^\circ\text{C}$ 左右,以保证流量的稳定。

制备型超临界流体色谱使用填充柱进行分离,所用填料大部分是高效液相色谱柱常用的填料。为适应大量样品的注入,可用单独的进样泵,也可用带有较大体积样品环管的六通进样阀进样。检测器也大多与高效液相色谱的检测器相同,如固定或可变波长的紫外检测器、多波长或二极管阵列检测器等。

与高效液相色谱不同,超临界流体色谱除可通过改变流动相改进分离外,还可通过改变流动相温度或压力来改变流动相密度,从而改进色谱分离特性<sup>[15]</sup>。

因此,一种单一的流动相就可以实现多种用途的分离。另外,所收集的馏分中的流动相可简单地降压气化除去,流动相的回收也十分简便,经过净化后可使其重返超临界流体状态,易于回收,成本低廉,这对工业制备极具吸引力。然而,超临界流体色谱也有缺点,设备相当昂贵,操作也不像液相色谱那样简单。另外,通常加入改性剂以改善CO<sub>2</sub>的溶解性能,这也部分抵消了上面所提到的超临界流体色谱的优势。所以对超临界流体色谱仍有待于进行深入的研究。

### 3 高速逆流色谱

高速逆流色谱(High speed counter-current chromatography, HSCCC)是一种基于样品在两个互不混溶的溶剂之间分配作用的分离技术,是当今国际分离科学技术的一个新颖的分支。由于HSCCC不使用固态支撑体,与其他的色谱技术相比,HSCCC能够完全排除支撑体导致的样品的不可逆吸附和对样品的沾染、失活、变性等影响,能实现对复杂混合物中各组分的高纯度制备量分离。

逆流色谱技术由Yoichiro Ito于20世纪70~80年代间创建,Ito教授为了在行星式运动模式和螺旋管柱在支持体上的几何位置之间寻求一种理想的结合状态,展开了一系列的研究,经过近10年的潜心研究,终于研制出一种高效的逆流色谱系统,并发展成为现在所称的高速逆流色谱。

我国从20世纪80年代初开始从事逆流色谱技术和仪器的研制工作,是继美国、日本之后最早开展逆流色谱研究与应用的国家,张天佑教授为我国乃至世界HSCCC的发展作出了重要贡献。近年来,随着逆流色谱技术的发展,国内也有越来越多的专家学者开展逆流色谱技术研究,特别是在天然中草药有效成分的分离纯化方面取得了重要成就,并有多部专著出版<sup>[16-18]</sup>。

#### 3.1 HSCCC仪器装置

HSCCC装置如图6所示,主要由输液泵、进样阀、螺旋管式离心分离管、检测器等组成。由于其操作压力并不高,用普通的中低压泵即可。进样可用带有样品环管的六通进样阀进样。样品的分离是在多层螺旋管式离心分离管内完成。检测器与液相色谱的检测器相同,如紫外检测器、蒸发光散射检测器、质谱检测器等。

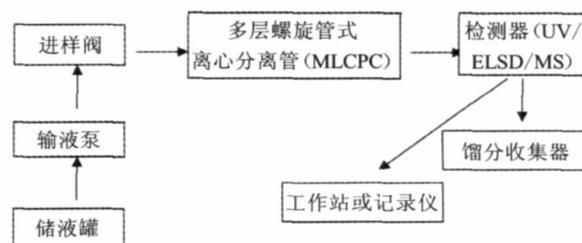


图6 HSCCC分离系统构成

#### 3.2 HSCCC分离原理

HSCCC是建立在一种特殊的流体动力学平衡的基础上,利用螺旋管的高速行星式运动产生的不对称离心力,使互不相溶的两相不断混合,同时保留其中的一相(固定相),利用恒流泵连续输入另一相(流动相),此时在螺旋柱中任何一部分,两相溶剂都反复进行着混合和静置的分配过程。流动相不断地穿过固定相,随流动相进入螺旋管柱的溶质在两相之间反复分配,按分配系数的大小次序被依次洗脱。螺旋管装置如图7所示,它的公转轴水平设置,螺旋管柱距公转轴R处安装,二轴线平行。通过齿轮传动,使螺旋管柱实现在绕仪器中心轴线公转的同时,绕自转轴作相同方向相同角速度的自转。

在对管柱里两相溶剂状态进行频闪观察时发现,在用选定溶剂体系的下相作流动相的条件下,管柱里会出现如图8所示的分布区带。在达到稳定的流体动力学平衡态后,柱中呈现两个截然不同的区域:在靠近离心轴心大约有1/4的区域,呈现两相的激烈混合(混合区),其余区域两溶剂相分成两层(静置区),较重的溶剂相在外部,较轻的溶剂相在内部,两相形成一个线状分界面。

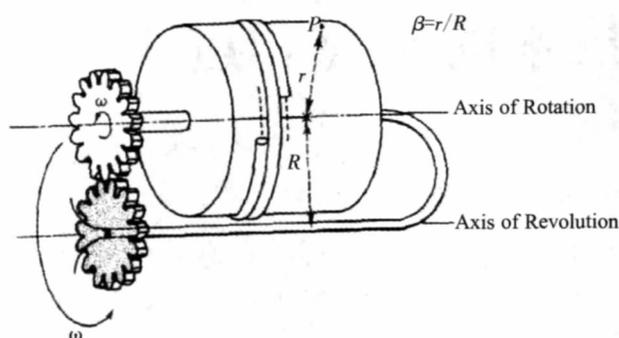


图7 HSCCC螺旋管装置示意图

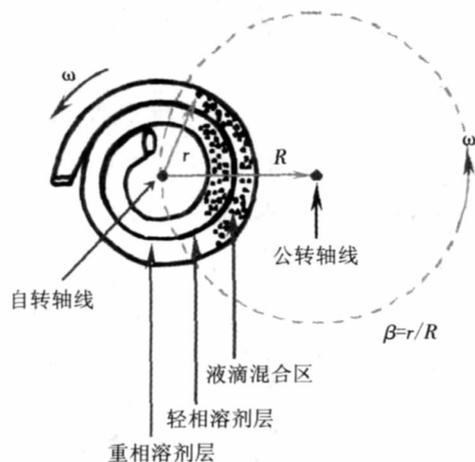


图8 HSCCC螺旋管内溶剂体系的区域分布图

图9为旋转一周混合区域的变化示意图,每一混合区域以与柱旋转速度相同的速度向柱端移动。图9(a)所示为螺旋管在连续转动的不同位置(I、II、III、IV)时,观察到的其中两相分布情况。图9(b)则表示将对应于不同位置(I、II、III、IV)的螺旋管拉直,以更明显地表示混合区域在螺旋管内的移动,即每个混合区带都向螺旋管的首端进行,其行进速率和管柱的公转速率相同。这表明,当流动相恒速通过固定相时,两相溶剂都在反复进行混合和静置的分配过程,这

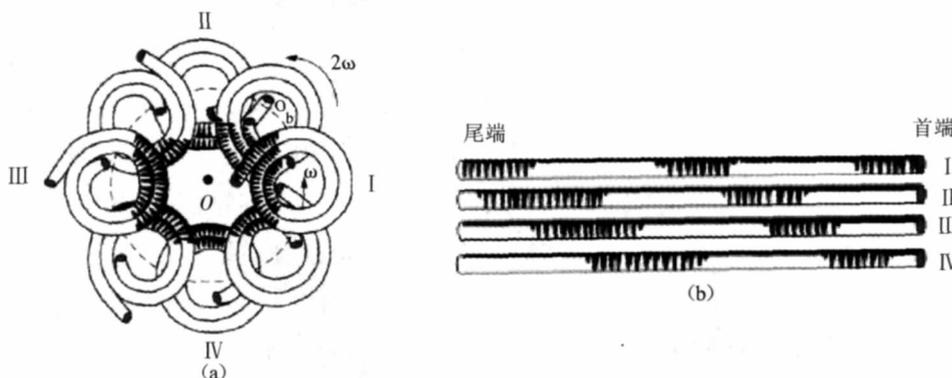


图9 旋转一周混合区域的变化示意图

一过程频率极高,当柱以800 r/min旋转时,频率超过13次/s,所以HSCCC有相当高的分配效率。

经过近30年的发展,随着其理论与技术的日益发展与完善,HSCCC已在生物、医药、食品、材料、农业、环保等领域获得了广泛的应用,尤其是在中药有效成分的分离纯化领域已成为最有优势的分离方法之一。

#### 4 展望

目前,制备色谱在实际制备生产中得到了广泛的应用,但也还存在一些问题,比如填料的用量大,且价格贵,使得生产成本高,制约了其发展;由分析型色谱到制备色谱过渡的理论方面的工作还有待进一步深入研究和完善;色谱法的定性能力差,如何把分离和分析联合成为一个整体,应用于工业制备中,实行一体化的监控,也有待于深入研究。与国外相比,我国的制备色谱发展还有很大差距,着眼于上述存在问题的深入研究,制备色谱具有广阔的发展前景。

#### [参考文献]

- [1] 袁黎明. 制备色谱技术与应用[M]. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [2] 傅若农. 色谱分析概论[M]. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [3] Cretier G, Neffati J, Rocca J L. Preparative LC and Preparative SFC: two complementary techniques in the fractionation of an impurity from a major component[J]. J. Chromatogr. Sci., 1994, 32, 449~454
- [4] 王学军, 赵锁奇, 王仁安. 制备色谱技术进展[J]. (下转第41页)

回流,操作压力-0.05 MPa,凝液出口温度40℃,质量流量800 kg/h;冷媒采用15℃的深井水。采用SECESPOL的一台JADX6.50,换热面积5.3 m<sup>2</sup>,即能满足工况。自2008年4月份至今,该设备运行效果良好。

## 6 结语

目前全世界已经有124个国家和地区建立了各种中医药机构,中医药在东南亚、日本、韩国等地区、国家已被广泛应用,欧美的一些国家也正在逐渐放松对中医药的限制。我国的中药资源非常丰富,但是我国中医药的发展却并不如人意。

尽快改变目前传统设备科技含量低的状况,在继承发扬中医药的基础上,充分利用先进的科学技术,不断创新,研发具有中国特色的现代高科技产

品,形成产业优势和市场优势将是我国中药发展的必由之路。

SECESPOL换热器为欧洲进口产品,其独特的结构特点以及优良的性能可以很好地满足目前中药提取浓缩工艺中对冷凝器的要求。

## [参考文献]

- [1] 沈永贤.中药热回流提取浓缩机组:中国 2827365[P]. 2006-10-18
- [2] 刘明言.中药提取液浓缩新工艺和新技术进展[J].中国中药杂志,2006(3)
- [3] 韩凤梅.真空冷凝器的设计[J].化工设计,1993(6)

收稿日期:2010-12-13

作者简介:王梅华(1984—),女,山东德州人,硕士,工艺工程师,现从事化工、制药、换热器方面工作和研究。

(上接第15页)

- 青岛大学学报:工程技术版,2001,16(4):92~97
- [5] 师治贤,王俊德.生物大分子的液相色谱分离和制备[M].第2版.北京:科学出版社,1996
  - [6] Godbille E,Tondu L.USP 3966609.1976
  - [7] Godbille E,Devau P.Use of an 18 mm I.D. column for analytical and semi-preparative scale high pressure liquid chromatography [J]. J. Chromatogr.,1976,122:317~329
  - [8] 张拥军,蒋家新,杜琪珍.径向色谱及其在生物大分子快速分离中的应用.食品科技,2008,10,101~104
  - [9] 黄骏雄.生物工程下游技术.刘国诠主编.北京:化学工业出版社,1993
  - [10] Dingenen J.Columns and packing methods[J].Analysis,1998,26:M18~M32
  - [11] Cabanne C,Raedts M,Zavadzky E,Santarelli X.Evaluation of radial chromatography versus axial chromatography,practical approach [J].J. Chromatogr.B,2007,845(2):191~199
  - [12] 李瑞萍,黄骏雄.高效制备液相色谱柱技术的研究进

展[J].化学进展,2004,16(2):273~283

- [13] 傅若农,顾峻岭编著.近代色谱分析[M].北京:国防工业出版社,1998,199~200
- [14] 赵晶明,张丹东,张西咸,等.克级超临界流体制备色谱仪的自动控制和数据处理[J].分析仪器,2001(4),23~25
- [15] Taylor L T,Trends in supercritical fluid chromatography [J].J.Chromatogr. Sci.,1997,35:374~381
- [16] 张天佑.逆流色谱技术[M].北京:北京科学技术出版社,1991
- [17] 曹学丽.高速逆流色谱分离技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2005
- [18] 柳仁民.高速逆流色谱及其在天然产物分离中的应用[M].青岛:中国海洋大学出版社,2008

收稿日期:2010-12-13

作者简介:柳仁民(1963—),男,山东栖霞人,院长、教授,研究方向:中药化学成分分离方法与技术。