

# 高速逆流色谱的应用与发展

(内部交流)

欧阳藩 顾铭

中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室

国家生化工程技术研究中心

2007年6月1日

从重液滴通过另一液体滴落，溶质在两相中间实现分配的原理出发，进行设备与过程的研究转变，20世纪60年代发明了连续液/液的高速逆流色谱 (High-speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) 技术，目前已广泛应用于生物、医药、天然产物、环境分析、食品等领域的分离、分析和用于质控的指纹图谱的制定工作。从本次会议的论文亦可见，主要利用有机/水两相系统分离和纯化天然药物制备高纯度的药用成分标准品或参照物和探索建立中药材和中药方剂指纹图谱快速简便的质控新方法。从化学工程原理主要而言还是利用目标产物在两不相互溶的液相中的分配实现分离和纯化。

本文将从化学工程原理和技术角度讨论高速逆流色谱的应用与发展，供参考：

## 一、设备和装置的结构与规模的多样化、系列化、自动化

最早利用溶质在互不混溶的液/液两相分配原理设计了逆流分配装置，将许多试管式的部件安装在一个能转动的台架上，以半自动方式使试管部件及其中两相溶液同时振摇，静置分层，转移传递。

基于对流体与传递原理的分析研究发展逆流色谱设备，设备在不断地创新，主要有两大类。

一是基于流体静力学平衡的体系，有液滴逆流色谱 (DCCC)、回转腔式逆流色谱仪 (RLCCC)、旋转腔式逆流色谱 (GLCCC) 和固定螺旋管式逆流色谱仪 (HCCC) 等。

二是基于流体动力学平衡的体系，与上述差别是螺管绕自身轴线运动，分为非行星式、非同步式和同步式三大类，已开发出了多种形式的离心式逆流色谱设

备，如环绕螺旋管离心分离仪、同步螺旋管行星式离心分离仪、非同步流通型螺旋管行星式离心分离仪、正交轴同步螺旋管行星式离心分离仪、慢转螺旋管分离仪等。螺旋管同步式离心分离仪又有四种形式：绕自身轴和绕仪器中心轴线角速度相同；螺旋管中心倾斜，离心场复杂；螺旋管支持件轴线与仪器中心轴正交；支持件轴线自转和绕仪器中心轴公转角速度相同，转向相同，称为同步行星运动。

在改进设备结构、转速等创新后并在国内实现产业化批量生产的高速逆流色谱仪（HSCCC），分离用螺旋管采用公转和自转的行星运动方式，多个螺旋管单元平行环绕排列，可实现串联或并联操作。

这些都是同行所熟知的历史，简单回顾只是想说明从原理出发，集众多研究者的智慧可创造出多种多样适合不同目的的仪器与设备，随着应用面的拓展，为适应不同的要求，需要多样化、系列化和自动化。

从设备的规模而言，目前商品化的产品主要是克量级和毫克量级，需要从中间规模向两边扩展，分析级的要向微量分析扩展，工业分析型特别是微量分析型在指纹图谱法在推广应用之时，显得越来越迫切；在工业应用中单机生产能力的扩大要向公斤级放大。在仪器设备改进中有些细节可考虑：

有文献报导螺旋管直径加大保留率反而加大，因此提高管径可提高处理量，但管径加大，径向传递效率会降低，最初空管式的萃取塔，为提高传质效率加内部构件，螺旋管可试验葫芦串式的变径空心管等。

微量分析时可否参考反胶团萃取的概念，样品制成反胶团液与萃取相萃取分离降低样品量。

参考 Albertsson 针对高粘度双水相体系的特点所建立的薄层逆流分配装置开发出薄层高速逆流设备。

适合双水相萃取分离的高速逆流色谱设备。

总之在扩大高速逆流色谱应用方面在设备结构上可充分吸收过去已创制的不同类型的特点，加上应用领域的开拓，去设计与创新。

## 二、高速逆流色谱分离

### 2.1 两相分离

一直以来高速逆流色谱主要用于分离，且主要为水/有机两相的分离。这方面的文献报导很多，在此不赘述。

对用于 HSCCC 分离的溶剂体系，应该满足(1)不造成样品的分解与变性、(2)足够高的样品溶解度、(3)样品在系统中有合适的分配系数值、(4)固定相能够实现足够高的保留四方面的要求，前两点是对所有逆流色谱都适用的，而后两点对 HSCCC 特别重要。

## 2.2 双水相体系分离

有机溶剂多数会使生物大分子和活性细胞发生不可逆的性质改变和结构破坏，因此，一般不采用有机溶剂体系进行分离和纯化，而选择双水相体系。双水相体系具有条件温和（含水量高达 70%~80%），产物回收率高，易放大，原料便宜而且可以循环使用等优势，特别适合用于生物大分子，如蛋白质、核酸和细胞粒子的提取和纯化过程中。但是双水相体系具有很低的界面张力、较高的粘度和较小的两相比重差异，给连续逆流分配带来了一些困难，如两相溶剂在较急剧振荡条件下易乳化、分相慢、而混合不够充分时，传递阻力又较大。因此，采用 HSCCC 的双水相体系分离纯化生物大分子，目前还处于研究阶段，主要包括改进 HSCCC 设备的结构、操作和双水相分离体系的建立和工艺条件的探索、研究，基本上采用的是实验室单机研制的正交轴高速逆流色谱设备或非同步高速逆流色谱设备，这些设备的结构复杂，需要通过多级齿轮传动或多个电机来实现，离心分离的主体部分又多数采用色谱柱和配重物相平衡的方式，不利于色谱柱分离规模的放大。同田公司批量生产系列 HSCCC 仪器设备，其中 TBE-300V 型高速逆流色谱设备为具有自有知识产权的多分离柱同步行星式高速逆流色谱仪，具有结构简单、无故障运行时间长、稳定性高、三分离柱串联结构自动平衡、色谱柱容积大等特点，选用合适的该类高速逆流色谱设备，在双水相体系中可有效地进行蛋白质的分离纯化，既保留了双水相体系性质温和、对生物大分子具有保护作用等优点，又解决了双水相体系单级萃取操作效率不高，连续多级萃取操作繁琐、设备复杂的问题，实现了双水相体系连续的色谱操作，并且易放大，具有良好而广阔的应用前景，为生物大分子的高效和高收率分离开辟了一条新的途径。

## 2.3 三相高速逆流色谱

利用高比表面的细小的固体分离载体与一液相形成流态化相与另一液相构成高速逆流色谱的两相体系进行分离，实现液/液粗分→液/固提纯→液/固洗脱→收集产品的一机优化过程，一方面可提高高速逆流色谱分离的选择性、分离容量和分离效率，又可发挥高速逆流色谱的连续、逆流、压降较低和可适合含固体杂质的分离，建立一种新的分离纯化的有效体系。可以解决目前液相色谱在分离粗制样品时存在的一些问题，如：柱吸附、柱堵塞造成的柱效下降，难以分离经微粉化技术处理的物料，难以分离高粘度样品，某些化合物需经过两步或多步才能实现有效分离等；同时可以解决高速逆流色谱在选择性和分离效率方面的局限性，将两种分离技术结合在一起，提供了新的分离选择性。这一体系的建立主要特点是在高速逆流色谱（HSCCC）体系中加入颗粒状的固相分离介质，在高速离心力场作用下，建立一固定相（由液/固或液相组成）—流动相（由液体相或液/固相组成）的三相高速逆流色谱。

### 2.3.1 三相高速逆流色谱的组合

三相高速逆流色谱是由液/液/固三相组成，在高速离心力场作用下与一般液/液/固（如三相浸出萃取）不同，从微观分析是液/液/固混合—分离，与一般三相体系相似，从宏观分析，由于高速离心力场作用，流动相和固定相是连续多级串联，是一种特殊传递过程。

高速逆流色谱实现多级连续分离在原理上是利用流体的流动相和流体的固定相在公转与自转双离心场作用下，实现液液混合和澄清，不断更新界面实现多级分配的分

离；  
高效液相色谱是利用固体的固定相和流体的流动相实现吸附—解吸、吸附—解吸、吸附—解吸、吸附—解吸……的多级分离。

三相高速逆流色谱分离目标产物有不同组合，即：

(1) 固体相在固定相中加入：待分离物从液体的流动相→液体的固定相→固体相→液体的固定相→洗脱液流动相（液体的流动相）→目标产物

(2) 固体相在流动相中加入：待分离物从液体的流动相→固体相→液体的固定相→洗脱液流动相（液体的流动相）→目标产物

在第 1 种组合中(即固体相在固定相中加入)以一个分离级单元如图 1 所示:

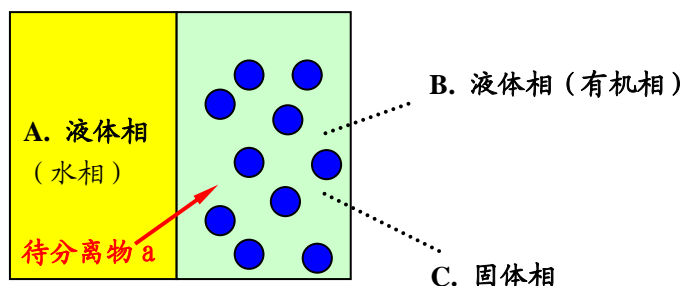


图 1 三相高速逆流色谱传递过程第 1 种组合  
——固体相在固定相中加入示意图

待分离物质 a, 利用萃取原理通过两液间的分配平衡富集于 B 相, 又利用液相色谱固定吸附原理选择性富集于 C 相, 而洗脱过程则利用一合适洗脱液流动相, 首先将 B 相中杂质洗脱, 然后将产品由 C→B 相→洗脱液流动相收集。

当固体颗粒加入到液液两相中时, 其行为是相当复杂的, 若固体相加入到用作萃取的一相中, 并作为固定相。固体表面的浸润则有利萃取相分布面扩大, 传递路程缩短, 液相夹带在高速逆流色谱分离中也是存在的, 但由于选择固—液配伍合适, 固相夹带通过努力是可以避免的。

这一组合可解决分离纯化产物需经液液萃取与液固分离的过程。

在第 2 种组合中(即固体相在流动相中加入)待分物质 a 利用固液吸附分离原理, 选择性吸附于固相上, 然后利用固体颗粒与有机相(或双水相)相容特性, 进入液态固定相, 在液态固定相中再一次固/液分配纯化一步, 产品 a 保留在液相中, 在洗脱流动相洗脱时, 再次液/液分配纯化一次。

三相高速逆流色谱体系的建立重点解决的关键技术是:

(1) 稳定的三相建立: 固相为亲水、亲油和亲两相三类, 选择合适的固体介质可达到预期的分相目的, 并在振动混合后仍能进行分相;

(2) 液液固配伍: 液液配伍可参照液/液萃取与高速逆流色谱经验选择, 固/液配伍可参照固相吸附沉降分离与高效液相色谱经验选择。三相的配伍则需在以上两方面的考虑外加上(1)的成相条件和对产物分离的选择性四因素综合考虑;

(3) 三相加入后, 必然会产生固相浸润, 传质界面种类叠加, 传质效率的保证是传递理论与实践的关键。

### 2.3.2 三相高速逆流色谱特殊传递过程的分析

三相高速逆流色谱的传递过程将包含液/固高压液相色谱和液/液高速逆流色谱两个体系的全部过程，且在高速离心力场作用下，受到流体力学和传递动力学的平衡与控制，是一个复杂体系，无相关文献报道。

固相浸润的影响主要由两方面决定，一是选用介质的亲和性，如果是亲油介质即使先被水占据多孔介质的外表面或内表面，在经过一段时间浸泡于油相中均会被油相所替代，这是一种平衡规律，反之亦相似，如果介质是双亲性质，则决定于油、水的亲和力对比。

如果采用固体颗粒加入油相，则固体内外表面均为油相所浸润，将颗粒简化为一孔球形颗粒，其示意图如图 2：

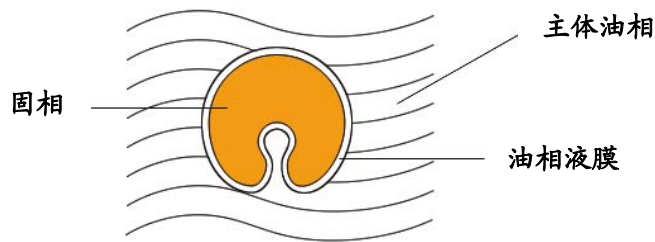


图 2 三相第 1 种组合即固体相在固定相的浸润示意图

则其微观传递过程示意图如图 3：

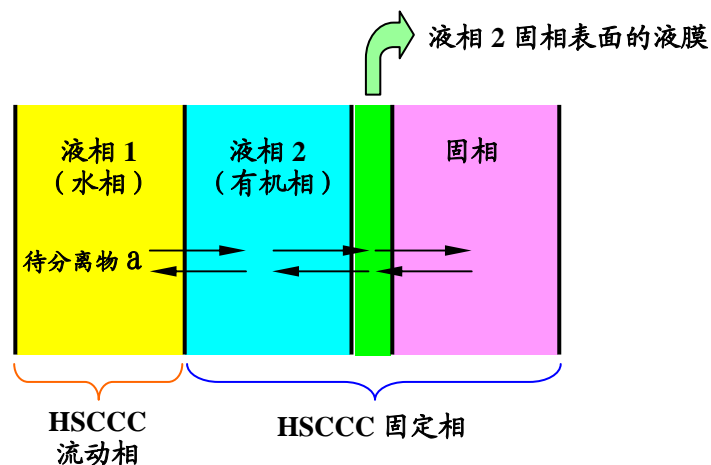


图 3 三相高速逆流色谱传递第 1 种组合

——即固体相在固定相中加入的浸润微观示意图

可见，液相 1 与液相 2 的传递过程完全符合 HSCCC 的传递过程，而在固定相中的固/液传质在微单元上完全符合固/液流动液相色谱的传递过程，因此从分离的静力学而言，是一串联过程，可提高分离效果，从动力学而言，传递过程速度决定于控制步骤，可能的控制步骤，强化液/液与液/固传递过程方面，需通过实验与分析来解决。液/液相的传质可完全符合 HSCCC 的传质强化，而 HSCCC 固定相中的固/液运动过程，在行星转动即自转与公转的方向周期变动的离心力作用下，是一种广义流态化状态，即振荡流态化状态，振荡流态化是可加速传递过程的，其分离效果已有扩张床吸附技术（以松动的流态化床状态的流动色谱）分离效果和报导。

其他组合方法相似，但问题变成先由固相从原料液相中选择性吸附目标产物和部分杂质，然后进入有机相由有机相通过液（有机） $\leftrightarrow$ 液（水相膜） $\leftrightarrow$ 固相的传递，进一步分离纯化，此时包覆着水相的固体颗粒，传递过程更相似于反胶团萃取反应。该过程比(1)的组合要复杂得多，要求固相的特性吸附更强，但其实验研究过程相似。

建立三相高速逆流色谱体系，在一个分离系统中实现高速离心力场作用下的萃取分配与吸附分离，在一个运行过程中，同步完成萃取与吸附两种原理的分离过程。为一些采用一步法无法分离或是分离度较差的化合物的纯化提供新的技术方法。

### 三、反应与反应/分离耦合

#### 3.1 酶或微生物生物转化的多相反应

生物转化的催化剂是酶，酶的活性在水环境中突出表现，因此酶促反应主要是在液相体系中，根据原料产物和酶的状态其多相反应可分以下几类：

##### (1) 均相反应

原料物和产物同在一液相中，催化剂游离酶，反应结束后将产物分离。

##### (2) 液/液两相

一般为水/有机两相，亦有双水相，酶一般分散于水相。

##### (3) 液/液/液三相

其中两液相情况如上，第三液相一般是以胶团（于水相中）反胶团（于有机

相中) 催化剂酶固定于第三液相中。

#### (4) 液/液/固三相

其中两液相情况如(2), 固相为固体载体的固定化酶催化剂颗粒, 一般置于水相中。所有这些多相反应均可在高速逆流反应器中实现。

### 3.2 高速逆流反应器

高速逆流色谱使用简单的螺旋空管, 进料方式简单灵活, 样品不需要严格的预处理, 可处理带固体悬浮物的物料, 这些优点作为反应器时同时保留, 因此高速逆流反应器有如下优势:

(1) 反应器是一组螺旋空管, 无内部构件, 相的混合和澄清是靠轴向流动和径向周期变化的强离心力产生双向多角度的强烈振荡来实现, 调节同步的卫星轮转速可定量增加传质动力学的传递速度;

(2) 两相有四个进出口, 可方便组成逆流、顺流操作, 固定液体相可选择轻相或重相, 因此操作上可多种组合, 灵活性大, 可实现一机多用途, 更换流动相又可将产物分离浓缩, 可实现一机多步操作;

(3) 选择合适的两相或三相, 可实现固定化酶促反应的反应—分离的耦合;

(4) 反应器内无构件, 无机械搅拌, 对酶和细胞无损伤, 有利于保持酶的活性和浓度。

### 3.3 高速逆流反应器反应过程的分析

#### 3.3.1. 两相反应过程

以一个反应级如图 3 所示, 分析如下:

催化反应是在界面进行, 原料物、产物和酶的分配有以上四种情况, 若原料物和产物均在有机相, 可将此相作为固定相, 在反应结束后, 再通一有机相或水相洗脱将原料与产物分离, 若产物和原料物均在水相则可利用有机相作萃取相, 将产物分离, 实现反应——分离耦合, 加速反应和提高反应转化率。



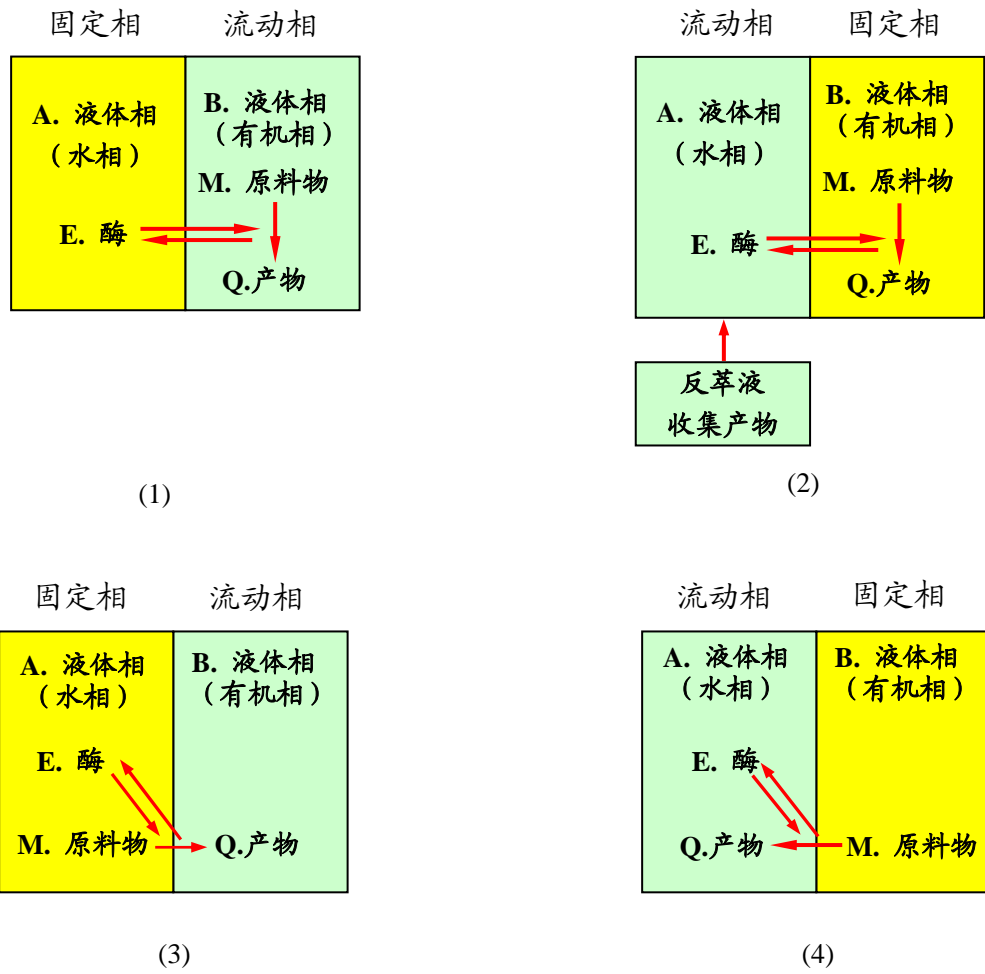


图3 高速逆流反应器两相反应过程分析

### 3.3.2、三相反应过程

应过程是在两相基础上，引入固定化酶，固定化酶可以是固体载体的固定化酶（或微生物）也可以是胶团、反胶团固定化酶或微生物，将含固定化酶的相作为高速逆流的固定相时，可以同时实现反应与分离的耦合或组合，更方便了操作。

如果反应过程中产生第三相（产物相）则可采用（6）的操作方式通过流动相，流出后再澄清即可获得产物相，操作将更为方便。

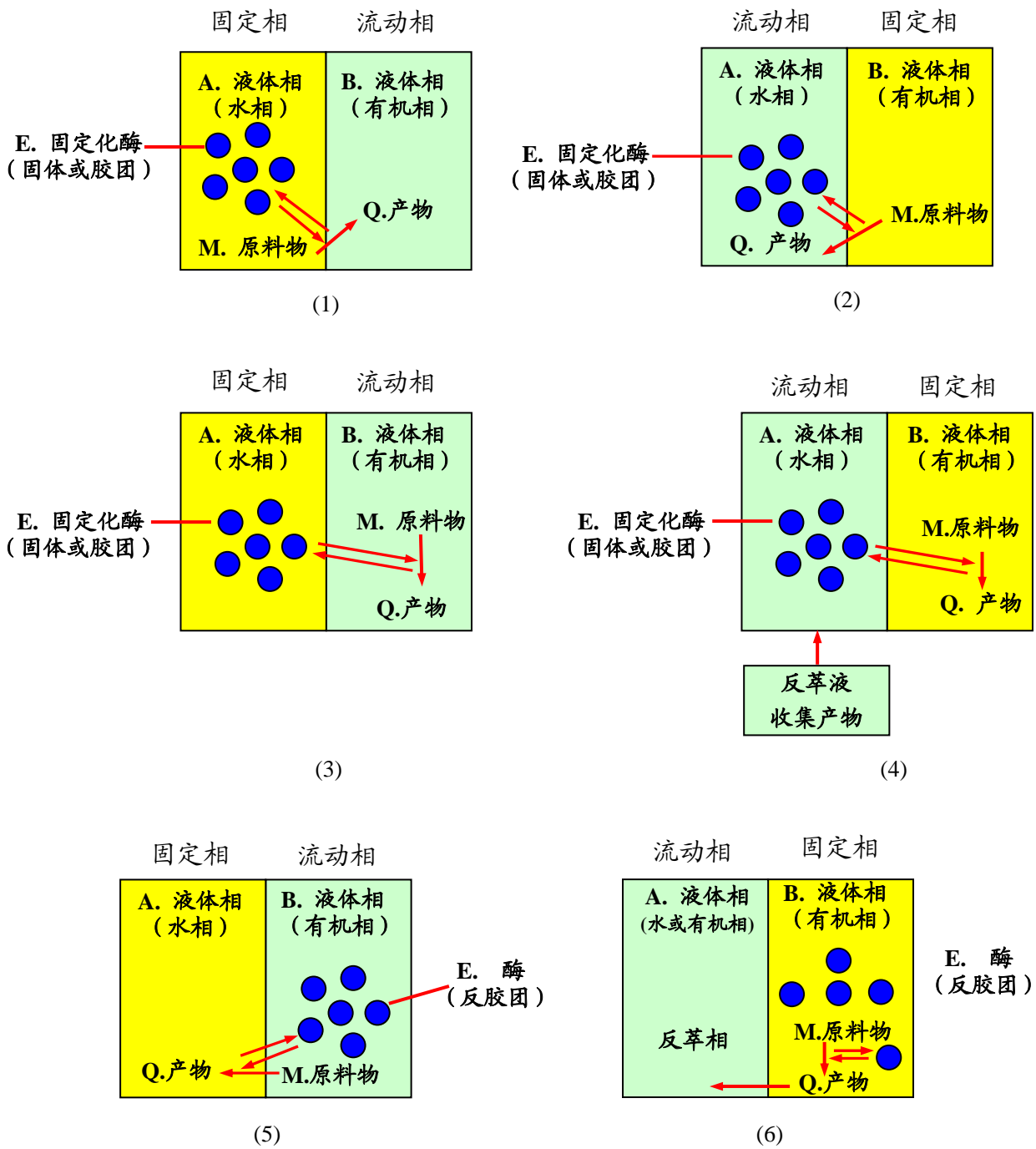


图 4 高速逆流反应器三相反应过程分析

### 3.3.4 四相反应过程

有些催化反应过程如氧化、加氢等，尚需加入气泡相，此时则形成气-液-液-固四相体系，气泡的注入可换用常用的气体分散法和预饱和法（类同泡载分离的方法）形成微泡，特点有利于实现四相反应过程。

### 3.3、反应—分离耦合

高速逆流色谱装置本以分离目标而设计创新的，一方面可与其他反应器联动而实现反应—分离的耦合，另一方面利用该设备的相改变如上所述将反应过程导入，实现反应—分离耦合更具优势。

## 四、应用的拓展

将高速逆流色谱（HSCCC）广泛应用于分离的基础上，利用其化工传递原理拓展为反应器，是最大应用领域的拓展，现举三方面的应用。

### 4.1 天然产物的分离

在植物药物与保健品方面利用 HSCCC 进行有效成分的分离已取得大量成果，在建立质控的指纹图谱方面亦有很大进展，今后这两方仍是主要方向。在基因工程产物和天然产物的蛋白质分离方面，应用双水相体系将是一个有潜力的发展方向，除需进行能分离目标产物又适应 HSCCC 操作的双水相体系的研发外，与之配合的高速逆流色谱设备的研发是非常重要的，借鉴曾开发出各种结构的逆流色谱的结构特点，采取组合与再创新开发出新的适宜双水相分离体系的设备有着广泛应用前景。

### 4.2 手性化合物的制备

20 世纪 60 年代，欧洲发生一场医药惨剧，当时在欧洲用反应停(thalidomide)作为镇痛剂和止咳剂，很多孕妇服用了此药后，生出了无头或缺胳膊短腿、手生在肩上的怪婴，非常恐怖。后来科学家发现反应停是一种消旋体药物，R-对映体有镇静作用，但其 S-对映体则对胚胎有很强的致畸作用。手性药物的研究、开发引起了世人关注，成为了前沿和热点。

手性是自然属性，生物体内大分子（如蛋白质、多糖、核苷和酶等）几乎全是手性的。使用广泛的化学药物多为有机小分子，很大一部分也是手性的，它们是通过与体内酶、核酸等大分子中的靶点结合产生作用，抑制或激活大分子而出现活性，达到治疗目的，人对药物有很高的选择性，消旋药物中一个对映体能与

手性大分子很好契合，发挥预期的治疗作用，而另一个对映体则往往不能很好契合而成为无效的对映体，或与其他大分子契合产生不同的药理作用或产生毒副作用。

由于手性药物具有技术含量高、疗效好、副作用小等优点且蕴含着巨大的经济效益，因此，自 20 世纪 90 年代以来成为药物研究、开发与生产的热点，销售额每年以 6.6% 的速度增长，到 2000 年已超过 2000 亿美元，而消旋体药物则以每年 29.5% 的速度递减。

目前国际上销售的 1850 种药物中，天然及半合成药物有 523 种，其中手性药物有 517 种，非手性药物 6 种；但化学合成药物 1327 种中，非手性药物有 799 种，具有手性的药物 528 种，其中以单一手性药物出售的仅 61 种，以消旋体出售的 467 种，可见从中开发出手性药物具有巨大的潜力和市场。

手性药物主要为化学合成和拆分的有机化合物，不对称手性合成是目前发展较快的领域，酶是由生物体产生的活性催化剂，生物酶具有立体、位点、区域和对底物的高度专一性及高程度的反应，使酶能有效地催化一般化学反应无法实现的手性化合物的转化，制备单一手性化合物。

利用酶促反应或微生物转化替代化学催化具有反应条件温和（一般 20-30℃）、位点选择性强、副反应少、收率高、光学纯度高（100% 单一对映体）、无环境污染等优点。早期主要利用水解酶类，如脂肪酶、酯酶、蛋白酶、酰胺酶、腈水合酶、酰化酶等，对外消旋底物进行不对称水解拆分制备手性化合物。近年发展是用微生物或酶直接转化或利用氧化还原酶、合成酶、裂解酶、水解酶、羟化酶、环氧化酶直接从前体化合物不对称合成种种复杂的手性化合物。经典的生物催化剂都是蛋白质酶，近年来生物催化剂被逐步发现，包括抗体（称之为抗体酶）、RNA（ribozyme，核酶）、脱氧核酶（deoxyribozyme 或 DNAzyme）、蛋白质自催化——自剪接（protein self-splicing）等。酶的获得主要通过从生物体制备、分离获得，部分通过化学合成。制备酶的生物体可通过基因工程技术、细胞融合技术和传统的筛选、诱变等获得。酶促反应可通过均相反应、固定化细胞（酶）反应和双液相、反胶团等过程实现；反应器有机械搅拌、流态化、双液相、膜反应器（中空纤维、板式膜）、气升式、液升式等多种类型反应器，如固定化增殖细胞反应器：外循环流态化生物反应器、喷射循环移动床生物反应器、悬浮

床生物反应器、并流固定床生物反应器、震荡流态化反应器等；固定化酶反应器：膜反应器、微载体反应器、纤维固定床反应器、磁场流态化反应器等；在固定化反应器反应中，固定化载体的研究开发亦是多种多样包括材料、形状、粒径的不同和多孔颗粒、中空颗粒、微囊、膜等类别。酶和微生物的固定形式又分吸附、嵌入、包埋、分隔等不同固定形式。高速逆流反应器以其连续、高效和适合反应-分离耦合等优势将有着广阔的发展空间。

### 4.3 生物能源

生物柴油是生物质能的一种形式，其主要成分为通过动植物油脂转化而来的高级脂肪酸的低碳烷基酯混合物，以其物化性能与石化柴油相近，并可以直接代替石化柴油或与普通石化柴油以任意比例互溶代替石化柴油使用而得名。由于得自于动植物油脂的生物柴油与得自于石油的石化柴油相比，生物柴油具有环境友好、在使用过程中降低有害废弃物排放等多方面环保优点，加之占世界能源消耗量 40% 的石油因资源量极为有限，造成原油和燃料油市场价格巨幅波动，生物柴油作为一种优质生物质可再生能源，自二十世纪九十年代以来在世界范围内形成了研究开发热潮，并已经形成快速发展的产业。

随着生物技术的发展，近年来采用生物酶催化剂合成生物柴油的技术得到研究和发展，而生物酶技术还无法达到工业化实用水平，需要研究新的酶和不使用化学催化剂或使用可完全回收催化剂的生物柴油绿色化生产技术。发展生物柴油不可能像石油工业那样大规模集中生产，原因是资源多样与分布面积广阔，原料收集加工等成本相对高，因此国外有报导采用国家统一标准（我国也正在做），分散生产，甚至可以农庄或个人为生产单元，高速逆流反应若能放大到一定规模，如管径达到 20mm，将是一个很好的推广单元。

以上三方面应用举例，有的还是设想，更多的应用开拓有待设备研制和应用研究者的共同努力。