

氨基酸之液滴向流分配及薄層層析法之比較研究

姜宏哲 (教授) 郭曼姪 (助教)

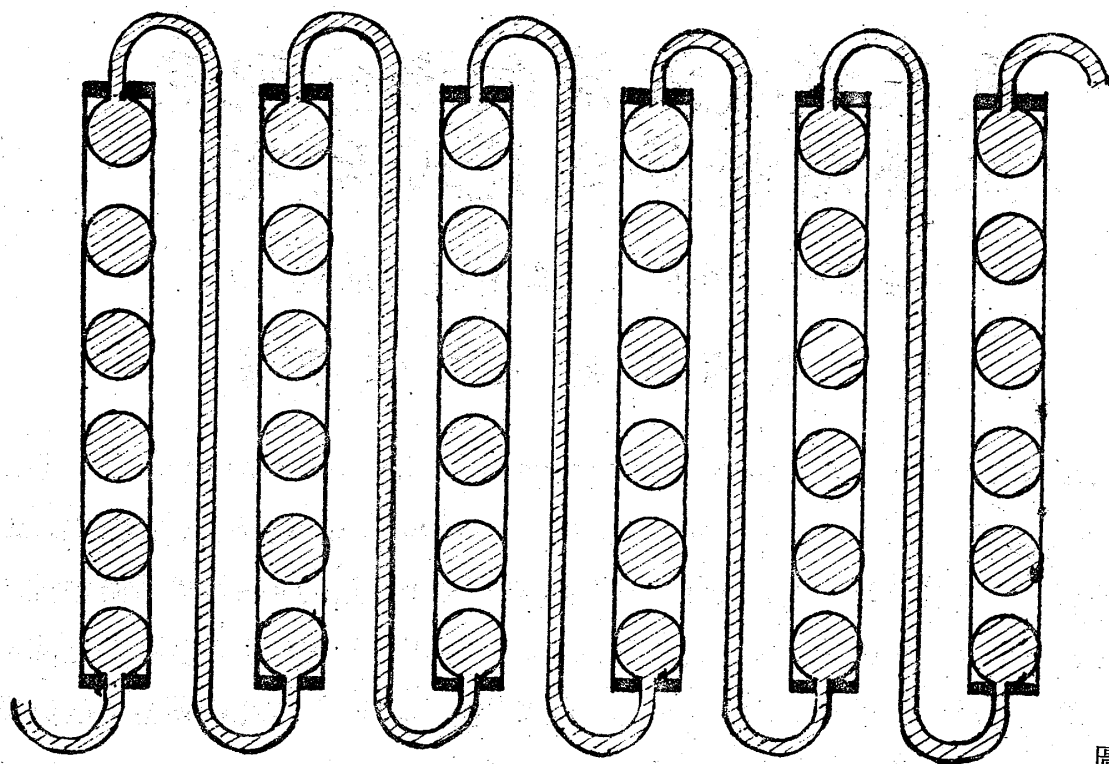
國立臺灣師範大學化學系

液滴向流分配, (Droplet Countercurrent Chromatography), 是由 Ito 和 Bowman⁽¹⁾將向流分配 (Countercurrent Chromatography) 層析法加以改良, 使其具有更高的容納量, 而且操作上非常簡便。這種完全是應用液體分離的技巧, 使溶質適當地分配於移動相 (穩定的液滴流) 和固定相 (管柱充滿之溶液) 之間。可應用於分離氨基酸⁽²⁾、胜⁽³⁾ (peptides)、脂質⁽⁵⁾ (lipids) 等比較極性大的物質之分離, 該分離的效果優於氣相色層分析法。

過去的液體——液體層析法 (Liquid-Liquid Chromatography) 和向流分配皆是可適用於許多化合物的純化和分離的有效工具, 但是這些技巧有其固定的限制。在液體——液體分配式色層分析, 部分溶質被吸附, 形成了燕尾情形 (tailing), 而且容納量非常得低; 至於向流分配層析法, 雖然沒有固體的支持物, 技巧上卻非常的累贅, 雖然具有高的容納量, 卻是很差的解離能力。

液滴向流分配層析法是藉著移動相的液滴, 通過管柱固定相而加以分配而達到分離的效果。移動相可能比固定相重, 或可能較輕。當較重之時移動相由管柱的頂端送入, 當較輕之時由底端送入。如圖(一)所示, 管柱 (由 pyrex 玻璃或鐵弗龍構成) 垂直的樹立, 而且充滿著固定相。移動相藉著一傳送管子, 由管柱的底端引入, 而造成如同管柱直徑般大小的穩定流動液滴。當一液滴到達管柱的頂端, 再由狹小的傳送管子送到另一管柱的底端, 如此不斷的經過幾百根管柱, 當移動相穿過管柱之時, 不同的溶質在移動相、固定相之間的分配係數不同, 液滴在固定相之間攪動, 增加各溶質在二相之間有效地分配。

一定組合的移動相及固定相, 所產生適當體積的液滴與管柱的口徑, 二不互溶液體間的干擾, 移動相的流動速度, 和傳送管子的直徑有關。一般言之, 如果口徑太大, 會形成大的液滴, 而不會使溶質形成有效的分配; 如果小的液滴被引入, 有些會合併而形成較大液滴而緩慢移動, 或形成一區域、一區域的移動相, 在管柱中上昇, 很明顯地阻止了溶質分配的有效度。如果移動相速度過快, 使得液滴彼此聯接, 將合併



圖(一)

形成圓柱亦無法達到理想。

綜合而言液滴向流分配具有如下之特點(a)不具有吸著力的固體，所以完全沒有由吸著而引起的試料損失。(b)因固定相的包容量很大，所以能處理大量的試料。(c)由於不使用有吸著力的固體，所以不必考慮粒子的形狀、大小，而且再現性相當高，並且管柱的長與理論板層數可以成比例，所以依理論而言，理論板層數儘可以增加，又沖滌出的曲線完全與正規的分佈曲線可符合。(d)輕相、重相都可以做移動相。重相當移動相，輕相則是固定相，液滴可採下降法。下降法所花的時間較短。(e)儀器裝置內沒有存在空氣，所以不會由大氣中的氧而引起氧化作用；內有溫度調節器，可以維持溫度的恒定；備有壓力保護裝置，可以使不超過一定壓力。

二 本研究的目的是應用D.C.C.之分離，每次所需約一星期以上的時間，所以展開溶媒的選擇不能用嘗試(trial and error)之方法，但對於如何選擇D.C.C.之展開溶媒未有參考文獻(未有人研究)，為解決這使用上之困難，考慮探討P.C., T.L.C.之展開溶媒是否能直接應用上去，或如何改良才接近D.C.C.的分離效果。

由於D.C.C.是利用移動相、固定相之間的分配，而P.C.是一種吸附、分配聯合的層析法，溶質在纖維素所含之水份與移動之有機溶劑中適當的分配。而T.L.C.亦先在展開溶媒之一層先飽和，然後再另一層展開，目的皆是使展開條件接近於D.C.C.。因之再進一步研究它們之間是否具有簡單的關係。若能由T.L.C.之展開溶媒應用到D.C.C.的分析，則可以減少嘗試錯誤的時間。在這實驗應用Ito 和 Bowman⁽²⁾ 等以D.C.

C.分離 DNP - amino acid 時所用之展開溶媒加以修改，而與 P.C.及 T.L.C.分離的結果加以比較檢討。

實 驗 部 分

一、實驗材料

(1)試藥

2,4,-Dinitrofluorobenzene (F. D. N. B.) [東京化成試藥特級]，L - aspartic acid, L - cystine, β - alanine, α - alanine, L - valine, L - leucine (味之素試藥特級)，碳酸氫鈉，甲醇、乙醇、乙醚、石油醚，鹽酸，氯仿皆為島久試藥一級。

(2)展開裝置

TOYO FILTER PAPER No. 50 (2 × 40 cm)

P.C.利用 34 cm 高，內徑 12.5 cm 之圓柱展開槽

薄層分析用 8.5 × 23 × 21 cm 之玻璃展開槽

(3)層析薄片之配製

(a) Silica gel

取 silicagel 20 g 與 40 ml 蒸餾水混合攪拌而成的稀泥 (slurry) 倒在支持板 (Aplicator, 三田村一理研工業會社出品) 製成二片層析薄片 (20 × 20 cm)，在空氣中乾燥之，置入 110°C 之烘箱內 30 分鐘。

(b) Alumina

取 Alumina 30 g 與 60 ml 蒸餾水混合攪拌而成的稀泥，如同 (a) silicagel 之方法製成二片薄片 (20 × 20 cm)。

(c) Kieselguhr

取 kieselguhr 30 g 與 60 ml 蒸餾水混合攪拌而成的稀泥，如同 (a) silicagel 之方法製成二片薄片 (20 × 20 cm)。

(4)展開溶媒

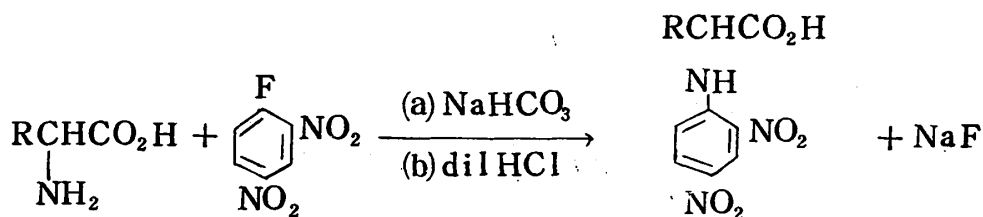
氯仿：冰醋酸：0.1 N 鹽酸 = 2 : 2 : 1 (體積比)

2 : 1 : 1

2 : 0.5 : 1

二、實驗方法

(1)合成六種 2,4,-Dinitrophenyl ammo acid (DNP - Amino acid) (6)



取 0.2 g 之氨基酸與 0.4 g 2,4-Dinitrofluoro benzene (F. D. N. B.)，與等重之碳酸氫鈉，以 67% 之乙醇 15ml 做溶劑，在室溫之下攪拌二小時，然後將乙醇揮發掉，再用蒸餾水 20 ml 稀釋，以 10 ml 乙醚萃取過量的 F. D. N. B.，萃取三次，在水層裏加入鹽酸產生所需要的 DNP-氨基酸，以石油醚再結晶而得。

DNP-Amino Acid	m. p. (uncor.) °C	文獻值 °C (7)
(1) N-DNP-L-aspartic acid	176-177	177
(2) N,N'-di-DNP-L-cystine	146-147	145-146
(3) N-DNP-β-alanine	132-133	132
(4) N-DNP-α-alanine	107-108	109
(5) N-DNP-L-valine	94-96	94-95
(6) N-DNP-L-leucine	186-188	186-187

(2) P. C.

準備 A.B. 二個圓柱形展開槽 (高 34 cm、內徑 12.5 cm)，配製展開溶媒利用分液漏斗分離其上層、下層溶液，上層是氯仿層 (固定相)，下層是水層 (移動相)，氯仿層之溶液注入 A 展開槽，使其深度大約 1 公分；水層之溶液注入 B 展開槽，使其深度大約 1 公分，分別靜置一小時的時間，使展開槽內空間得以為溶媒蒸氣所平衡，利用微量的毛細管將約 5% 之 DNP-amino acid 之丙酮溶液，點滴於長條之濾紙距底邊約 4 cm。待風乾後裝入 A 展開槽，將其豎立於 A 展開槽使其在上層溶液中達到飽和 (但不展開)，然後取出在 B 展開槽中展開，利用上昇法，上昇至 20 cm 左右，取出風乾後測其 R_f 值。

(3) T. L. C.

準備 A.B. 二個展開槽 (8.5 × 23 × 22 cm)，以同樣展開溶媒將上層、下層分別注入 A、B 二個展開槽，使其深度約 1 cm 左右，放置一小時時間，使展開槽內空間得以為溶媒蒸氣所平衡，利用毛細管將合成之 DNP-amino acid 約 5% 之丙酮溶液滴於距底邊 2 cm 處，待風乾之後置入 A 展開槽 (A 展開槽底端，以試管橫放，而墊高一個高度)，層析薄片不致於浸於溶液之中，而是在上層溶液達

到飽和，然後取出在B展開槽中展開，上昇至18cm左右，風乾後測其Rf值。

實驗結果

(1) P. C.

(a)以適當於D. C. C. 之展開溶媒

氯仿：冰醋酸：0.1 N鹽酸 = 2 : 2 : 1

及氯仿：冰醋酸：0.1 N鹽酸 = 2 : 0.5 : 1

無論是取上層或是下層飽和，再以下層（氯仿層）展開，皆發生燕尾情形（tailing），無法決定其Rf值。

(b)用展開溶媒 氯仿：冰醋酸：0.1 N鹽酸 = 2 : 1 : 1

以下層飽和之，再以下層展開——甲

以上層飽和之，再以下層展開——乙

其結果如下：

	DNP- aspartic acid	cystine	β -alanine	α -alanine	valine	leucine
(甲) Rf	0.23	0.46	0.91	0.90	0.94	0.97
(乙) Rf	0.06	0.60	0.93	0.94	0.99	0.97
DCC 分離次序	1	2	3	4	5	6

此結果與D. C. C. 分離之次序⁽²⁾有所偏差不能應用。

(2) T. L. C.

(a) Silica gel 薄片

i) 以展開溶媒——氯仿：冰醋酸：0.1 N鹽酸 = 2 : 2 : 1 之下層展開，由於極性太大，其Rf值皆接近1，不易分離。

ii) 以展開溶媒——氯仿：冰醋酸：0.1 N鹽酸 = 2 : 0.5 : 1 之下層展開，由於極性較小，其Rf值皆相近，不易區別其先後次序。

iii) 以展開溶媒——氯仿：冰醋酸：0.1 N鹽酸 = 2 : 1 : 1 的效果最好，以上層溶液飽和之再以下層展開。

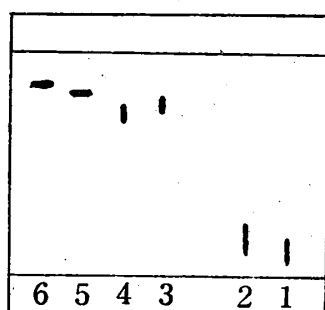
結果如下：

DNP-	aspartic acid	cystine	β -alanine	α -alanine	valine	leucine
Rf	0.16	0.18	0.72	0.75	0.83	0.85
DCC 分離次序	1	2	3	4	5	6

此結果與 D. C. C. 分離結果一致之次序。

(b) Alumina 薄片

以展開溶媒——氯仿：冰醋酸：0.1 N 鹽酸 = 2 : 1 : 1 之上層飽和，下層展開。



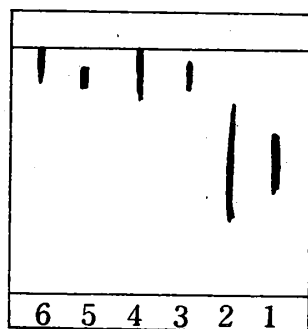
1. N-DNP-L-aspartic acid
2. N,N'-di-DNP-L-cystine
3. N-DNP- β -alanine
4. N-DNP- α -alanine
5. N-DNP-L-valine
6. N-DNP-L-leucine

DNP-	aspartic acid	cystine	β -alanine	α -alanine	valine	leucine
Rf	0.10	0.14	0.90	0.81	0.93	0.94
DCC 分離次序	1	2	3	4	5	6

其次序亦不同於 D. C. C. 分離的次序。

(c) kieselguhr 薄片

以展開溶媒——氯仿：冰醋酸：0.1 N 鹽酸 = 2 : 1 : 1 之上層飽和，下層展開；效果非常不好，此吸附劑不適用。



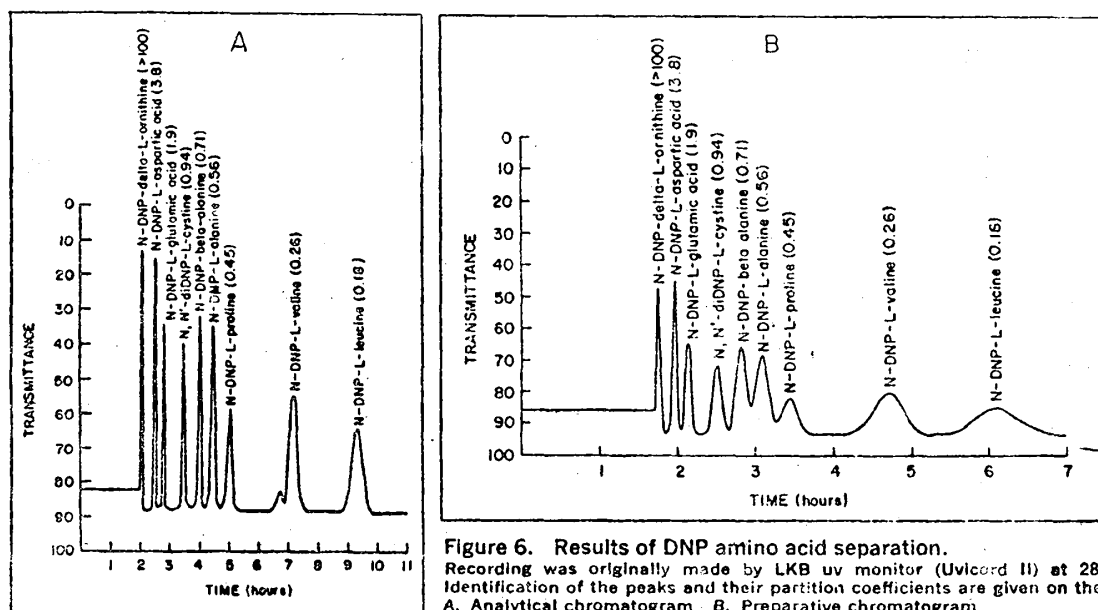
其 1, 2, 3, 4, 5, 6 代表如同 (b) Alumina 薄片

討 論

(1)由 Ito 和 Bowman⁽¹⁾ 利用 D. C. C. 以展開溶媒

氯仿：冰醋酸：0.1 N 鹽酸 = 2 : 2 : 1

分離 DNP - Amino Acid 的結果如下所示，上層是固定相，下層是移動相。



- (2)利用 Silica gel T. L. C. 將展開溶媒中極性的成份冰醋酸的比例降低，以展開溶媒——氯仿：冰醋酸：0.1 N 鹽酸 = 2 : 1 : 1 分離，所得結果與 Ito 等用 D.C.C. 所得結果接近，即可利用 T. L. C. 上分離的效果，將極性的比例增加，應用於 D. C.C. 的分離。而且在利用 T. L. C. 嘗試尋找展開溶媒之時，飽和與展開之溶液層必須是不同，這點與一般 T. L. C. 法不同，即如是下層展開，薄片先在上層飽和。如果在下層飽和，下層展開，點的長度會較長，甚至形成燕尾 (tailing) 之情形。
- (3)D.C.C. 每次分離的時間要一星期以上，而且其條件展開溶媒必須能分成二層，所以展開溶媒選擇非常困難，不能任意更改比例，而且上、下層有時很難達平衡，置放時間要長，再以分液漏斗慢慢分離之。
- (4)展開以吸著劑 Kieselguhr 所需的時間最短，但是效果最不好，有燕尾的現象；而且無法分出其前後次序，吸著劑 Alumina 與 Silica gel 所需的時間差不多，但是氨基酸是酸性化合物，比較適合用 Silica gel 來做嘗試。
- (5)此實驗僅是研究 DNP - Amino Acid 分離效果在液滴向流分配及薄層層析法展開溶媒之比較研究，可能在其他的化合物可以利用此關係，有待更進一步實驗而驗證之。

參 考 文 獻

- 氨基酸之液滴向流分配及薄層層析法之比較研究
- (1) Y. Ito and R. L. Bowman, *Anal. Chem.*, **43**(13), 69A(1971).
 - (2) Y. Ito and R. L. Bowann, *Science*, **167**, 281(1970).
 - (3) K. Okamoto, H. Yonezawa and N. Izumiya, *J. Chromatogr.*, **92**, 147 (1974).
 - (4) T. Tanimura, J. J. Pisano, Y. Ito and R. L. Bowman, *Science*, **169**, 54(1970).
 - (5) T. Tanimura and Y. Ito, U. S. Patent 3784467, (C. A. **81**, 22856h (1974)).
 - (6) R. R. Krishnarau and A. S. Herbert, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1328 (1954).
 - (7) A. L. Levy and D. Chung, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2899 (1955).

The Comparison of Solvent System Between D.C.C. and T.L.C. for
the Separation of DNP-Amino Acid

Hung-Cheh Chiang and Mann-Yan Kuo

Department of Chemistry, National Taiwan Normal University

For quick selection for suitable solvent system for droplet counter-current chromatography (DCC), Ito's⁽²⁾ solvent system (CHCl_3 : CH_3COOH : 0.1 NHCl = 2 : 2 : 1 by volume) for separation of DNP-amino acid is applied on paper-chromatography (PC), silica gel, alumina and kieselguhr thin layer-chromatography (TLC) for separation of six kind of DNP-amino acid (L-aspartic acid, L-cystine(di), L- α -alanine, β -alanine, L-valine, L-leucine). The poor separation (all $R_f \approx 1.0$) was obtained on PC and TLC.

The modified solvent system (CHCl_3 : CH_3COOH : 0.1 NHCl = 2 : 1 : 1) on silica gel TLC gave the similar separation effect as DCC, since the better solvent system could be obtained by increase polar component in the suitable solvent system for silica gel TLC.