

场流分级进展

高 玉 书

(中国科学院化学所, 北京)

摘要 场流分级是一种比较新的分离技术, 可用于大分子的分离, 具有一定潜力, 本文简述了场流分级的基本原理。除已得到应用的普通场流分级外还介绍了近来新发展的不同操作模式和一些新的综合场流分级。

关键词 场流分级、分析分离

场流分级(FFF)是一种用途广泛的分析分离技术。近来有人把它赞为第二次世界大战以来在分析分离方面最重要的发现^[1]。这种评价是否过誉还需FFF本身在各个领域中所显示的能力和优越性来证明。

有关场流分级的第一篇文章是美国犹他大学J. C. Giddings^[2]教授于1966年撰写的。在此后的十余年里绝大部分工作都是在Giddings领导的实验室内完成的。不仅奠定了坚实的理论基础而且研制了场流分级分种分支技术的专用设备。其中M. N. Myers教授和K. D. Caldwell教授做了重要的贡献。在70年代后期, 特别是80年代以来不仅在美国的其它实验室(如杜邦公司、Arizona大学等)同时也在许多国家如法、捷、澳、日、苏、希等开展了场流分级的研究。在我国于1985年在中国科学院化学研究所建立了场流分级研究组开始了这方面的工作。

场流分级一词是从英文Field-Flow Fractionation直译过来的, 颇能全面反映出这种技术的特点和目的。在扁平的柱槽中样品分子或微粒在合适的外场作用下沿场的方向采取一定的分布, 其方式和场的种类、强度以及样品本身的物理化学性质有关。沿柱槽方向流动的载流的线速度也有一个分布, 在流速不高的情况下这个分布呈抛物线型,

在柱槽的两壁处速度为零而在中心处速度最大。样品在柱槽中同时受到场和流的作用, 由于不同样品具有不同的空间分布, 因此它们的迁移速度不同, 原来混在一起的组分流经柱槽后按其某种特定的性质得到分级。在实验装置上场流分级和液相色谱一样, 即由输液泵、进样器、柱槽、浓度检测器、级分收集器等部分组成。但在柱槽中没有固定相只有流动相, 故场流分级实际上是一种单相色谱。由于导致分离的因素不是靠溶质在不同相之间的相互作用而是由一个合适的外场造成, 所以场的种类的选择、强度的控制都有更大的灵活性。这种特性使场流分级具有非常广泛的应用范围。在样品种类上它可以用于任何可溶的或悬浮的大分子和微粒; 在溶剂或分散剂上可使用有机溶剂或水; 微粒可以是带电的也可以是不带电的; 可以是无规线团, 也可以是球形的。可用场流分级分离的颗粒质量范围是分子量从 10^3 到 10^{18} (后者的尺寸相当于 $100\mu\text{m}$), 即FFF覆盖了大约 10^{15} 的质量范围。近年来场流分级日益受到人们的重视, 理论和实验设备的日臻完善, 新的分支技术的不断开发以及应用领域的扩展一再向人们显示这种技术的丰富内容和潜在能力。

在以前的文章中^[3,4]曾对场流分级的基

本原理作过介绍,然而由于新技术、新概念的不断出现,在那些文章中介绍的内容只能称作普通场流分级的。

一、普通场流分级

在两块平行平板组成的柱槽中溶质分子或颗粒在外场作用下产生场致输运。这种物质输运使溶质在远离场的一壁(称为蓄集壁)处的浓度增大。浓度的不均匀又会导致扩散现象来阻止场致输运过程。当这两种作用相反的效应达到稳态时溶质浓度在蓄集壁

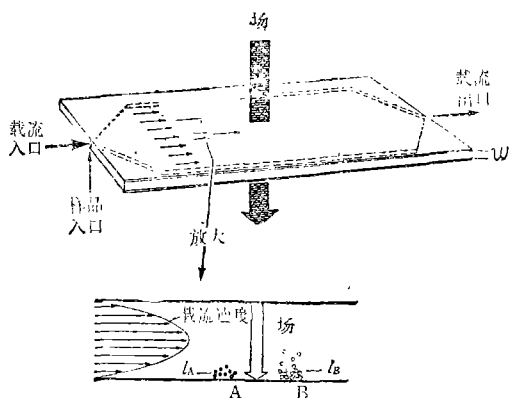


图1 场流分级示意图,
溶质在柱槽中的分布

附近呈指数分布,如图1所示。在距蓄集壁为 x 处的浓度 C 可以写成

$$C = C_0 \exp(-l/w) \quad (1)$$

式中, w 是柱槽厚度(两板之间的距离); C_0 是蓄集壁处的浓度; l 是溶质层的一个特征厚度,FFF理论给出

$$l = D/U \quad (2)$$

这里 D 是分子或颗粒的扩散系数; U 是场致迁移速度。保留参数 λ 在场流分级中有非常重要的意义,定义为

$$\lambda = l/w = D/Uw \quad (3)$$

如果对 D 应用Stokes-Einstein方程

$$D = kT/f \quad (4)$$

并从迁移速度和作用力 F 之间的关系

$$U = F/f \quad (5)$$

式中, f 是摩擦系数; k 是Boltzmann常数; T 是温度。可得

$$\lambda = kT/Fw \quad (6)$$

此式表明 λ 是热能和使粒子通过柱槽 w 的机械能 Fw 之比。

由上述式子所描述的粒子云在载流带动下沿柱的方向移动。载流的流速分布呈抛物线型

$$v = 6\langle V \rangle \left[\frac{x}{w} - \left(\frac{x}{w} \right)^2 \right] \quad (7)$$

这里 $\langle V \rangle$ 是载流的平均速度。样品分子的迁移速度和它所在的流线的速度相同。经过对溶质云的位置进行平均并考虑到浓度分布的权重,可以得到溶质的平均速度

$$v = R\langle V \rangle \quad (8)$$

理论计算出保留比 R 和保留参数 λ 的关系是

$$R = 6\lambda \left[\coth \frac{1}{2\lambda} - 2\lambda \right] \quad (9)$$

(9)式表明 R 是样品的平均速度和载流平均速度之比,也即是无保留的溶质(溶剂)与溶质的保留时间或保留体积之比

$$R = \frac{t^0}{t_r} = \frac{V^0}{V_r} \quad (10)$$

这里 t^0 和 V^0 是溶剂的保留时间和保留体积; t_r 和 V_r 是溶质的保留时间和保留体积。这些值都是可以从实验中测定的。不同溶质分子或微粒在场的作用下采取不同的分布并以不同的速度被载流冲出柱槽,即造成分离。原则上凡是能够对溶质发生作用并使其产生场致输运的场都可以用于场流分级,目前已经使用的有沉降场、热场、电场、交叉流场、磁场等。表1中列出相应于各种场的保留参数的表示式以及控制保留程度的物理因素。

当然,不同种类的场使用范围不同,普适性也不同,如电场和磁场的应用领域较窄而沉降场和交叉流场较宽。每种分支技术都有其特点,本文中不能详细论述了,这里只介绍一些它们的共同性质。

表 1 各种场流分级保留参数的表示式

场的种类	λ 表示式	控制保留程度的因素
所有场	$\lambda = \frac{D}{Uw} = \frac{R'T}{Fw}$	
沉降场	$\lambda_s = \frac{D}{SGw} = \frac{R'T}{GM(1 - \frac{\rho}{\rho_s})w}$	M, ρ_s, ρ, D
交叉流场	$\lambda_F = \frac{DV^0}{\dot{V}_c w^2} = \frac{R'TV^0}{3\pi\eta N \dot{V}_c w^2 d}$	D, d
热 场	$\lambda_T = \frac{D}{D_T w (dT/dx)}$	D, D_T
电 场	$\lambda_E = \frac{D}{\mu E w}$	μ, D
磁 场	$\lambda_M = \frac{R'T}{MW(\xi_s - \xi)H \frac{dH}{dx}}$	ξ_s, ξ, M

R' 是气体常数； F 是对每摩尔溶质的场力； S 是沉降系数， G 是重力加速度； ρ 是溶剂密度， ρ_s 是样品密度， V^0 是交叉流的体积流速； d 是微粒直径； D 是扩散系数； D_T 是热扩散系数； E 是电场强度； μ 是电泳迁移率； H 是磁场强度； ξ 和 ξ_s 分别是溶剂和样品的导磁率。

前面已经叙述了保留程度和场以及被分离物质的某些物理化学性质之间的关系，和任何淋洗技术一样，溶质层在流经柱槽的过程中有加宽（扩展）效应。在理想情况下体系的加宽效应使淋出谱图呈高斯型。其标准偏差 σ 可以用于表示高斯峰的宽度，但对于场流分级用塔板高度 H 更为方便

$$H = \sigma^2 / L \quad (11)$$

这里 L 是柱槽长度。如不考虑其它非理想因素（如管路、检测池以及柱槽的边界效应等） H 可以表示成

$$H = \chi \frac{w^2 \langle V \rangle}{D} + H_p \quad (12)$$

式中 χ 是保留参数 λ 的一个复杂的函数，对于强保留的极限情况（ $\lambda \ll 1$ ）

$$\chi = 24\lambda^3 \quad (13)$$

这表明当保留增强时（ λ 减小）加宽效应急剧下降。（12）式中的 H_p 表示样品本身的多分

散性对 H 的贡献。所以可以通过对 H 的测定求得 H_p ，从而得到有关多分散性的信息。这也是FFF的主要用途之一。

一种分离技术的分离能力可以用选择性 S 来表示。如以被分离物质的质量为基础， S 可以写成

$$S = \frac{|\ln V_r|}{|\ln M|} \quad (14)$$

式中 M 是分子量。当保留很强时 S 达到最大值 $S_{\max}$ 。常用的几种场的 $S_{\max}$ 可以从理论上算出，如图2所示。为了对比，图中还画出了

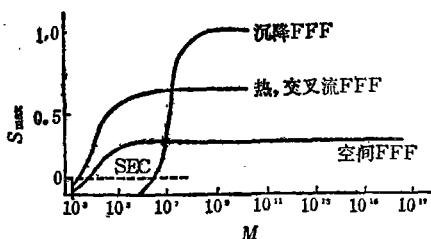


图 2 各种场流分级最大选择性 $S_{\max}$ 和分子量的关系

对于热场和交叉流场 $S_{\max}$ 在0.33到0.65之间

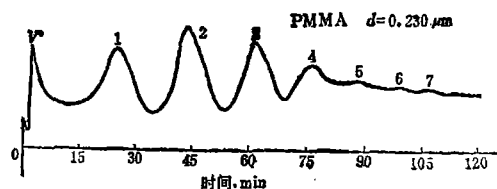


图 3 PMMA胶乳的沉降场流分级谱图

第一个峰是原始样品（0.23 μ m），以后各峰分别是二聚体、三聚体等

体积排除色谱（SEC）的 $S_{\max}^{[5]}$ ，约为0.2，可见各种场流分级在选择性上都优于体积排除色谱。

作为普通场流分级的应用实例，图3及图4分别是沉降场流分级^[6]和热场流分级^[7]。

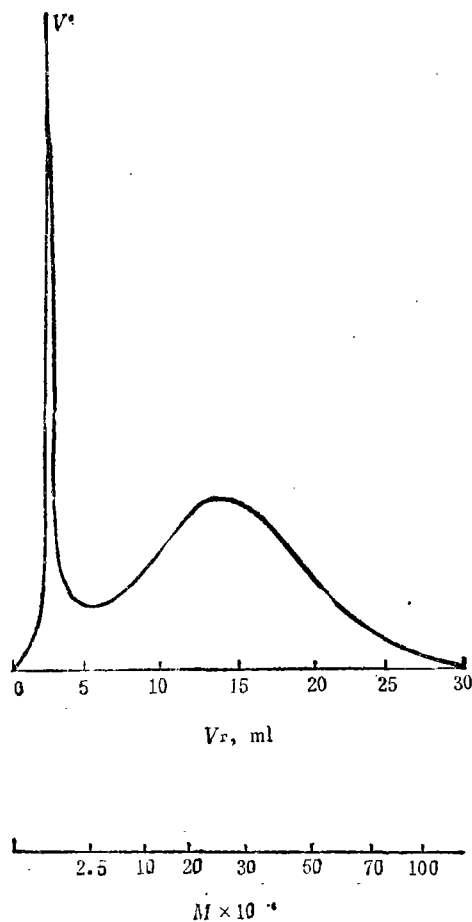


图4 超高分子量PS (20×10^5)
的热场流分级谱图

的谱图。

本节所讲的普通场流分级是从两个意义上讲的。第一在溶质层的稳态模式上是由扩散效应(布朗运动)来平衡溶质分子或微粒的场致输运的;第二是所使用的只是单一的场(对于尺寸小于 $1\mu\text{m}$ 的微粒重力场可以忽略不计)。现在对场流分级的研究有了新的进展,不仅研究其它可能存在的模式而且正在探讨几种不同场共同作用的综合场流分级,为场流分级的应用开辟了新的领域。

二、空间场模式(Steric mode) 和聚焦模式(Focusing mode) 〔或称超层模式(Hyperlayer mode)〕场流分级

随着微粒体积的增大($d \leq \mu\text{m}$),场(包括重力场)致输运现象不能被布朗运动所平衡,所有微粒都被压向蓄集壁表面。由于较大粒子的质心接近壁的距离比较小粒子的大,因此大粒子所处的流线的速度也大,其结果是大粒子先被淋出柱槽,而小粒子则在后面从而得到分离(见图5)。这个淋出顺序和普

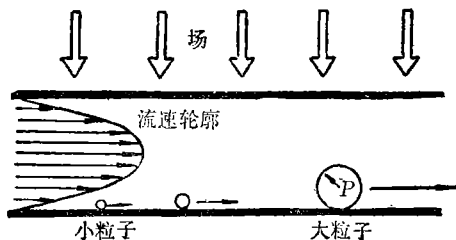


图5 空间场流分级示意图

通FFF的相反,而和SEC的相同。利用这种空间效应的称为空间场流分级(Steric FFF)。这种方法在较早的文献中也被简单地看作是场流分级的一个分支。然而后来认识到这种淋出顺序的不同不仅反映了场的种类的不同,更重要的是在稳态情况下粒子在柱槽内分布的方式的差别。原则上讲各种分布方式是由操作模式决定的,即通过操作模式的选择可以使粒子的分布改变方式。应当指出,虽然在淋出顺序上空间场流分级和SEC相同,而且也是基于粒子和壁之间的空间排斥效应,但和SEC以及流体力学色谱(Hydrodynamic chromatography)有本质上的不同。从分离机理上看,这里利用了外场(包括重力场),因此实验得到的仍是 $V_r > V_0$,即样品的保留大于溶剂的保留,反映了FFF的

特色。对于空间场流分级, 保留比可以写成

$$R = \frac{3\gamma d}{w} \quad (15)$$

这里 d 是微粒直径; γ 是一个接近于 1 的校正因子, 它反映了粒子在运动时所产生的升力使粒子脱离于壁的扰动作用^[8], 对于理想状态, $\gamma = 1$ 。空间场流分级在分离细胞、工业粉尘、煤粉^[9]、血液等方面都得到了利用。图 6 是羊、兔、马血的空间场流分级谱图^[10]。

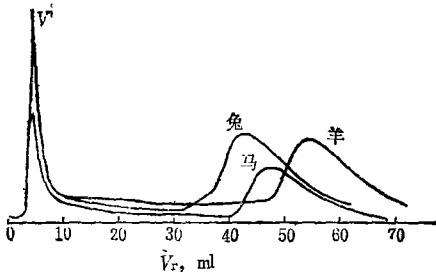


图 6 不同动物血液的空间场流分级谱图

聚焦模式的场流分级又是一种新的模式。在普通场流分级中溶质在柱槽内的浓度分布呈指数形式。在蓄集壁处的浓度最大。这对样品的峰加宽效应有很大影响。如果模仿电泳中的等电聚焦和超速离心法中的等密度沉降方式, 使同种样品在柱槽的横截面上聚焦成与蓄集壁为不同距离的薄层则对提高分离效率会很有好处。为了达到这个目的, 除去外场的作用外还需要另一种与之抗衡的力或场。载流的密度梯度场和 pH 值梯度场很自然地首先作为研究对象。它们分别构成沉降浮力聚焦场流分级^[11]和等电聚焦场流分级^[12]。图 7 是沉降浮力聚焦场流分级的示意图。具有密度为 ρ_i 和 ρ_j 的两种样品 i 和 j 在沉降场和密度梯度场的作用下各取其平衡位置 $x_{eg,i}$ 和 $x_{eg,j}$ 。在这里载流的密度和样品的相同, 每种样品都以此为中心形成一个薄层, 其浓度向两侧逐渐减小呈钟形 (如图 3 所示)。对于这种模式的保留比可以写成

$$R = 6 \left[\left(\frac{x_{eg}}{w} \right) - \left(\frac{x_{eg}}{w} \right)^2 \right] = 6(\Gamma - \Gamma^2) \quad (16)$$

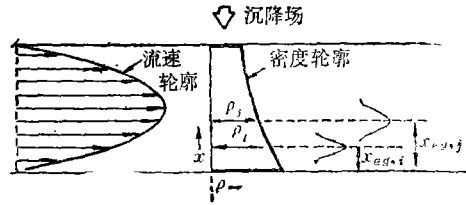


图 7 沉降浮力聚焦场流分级示意图

表示峰加宽效应的塔板高度, H 可以写成

$$H = A \frac{\eta k T \langle V \rangle}{(w G d \rho / d x)^2 d^5} \frac{(1 - 2\Gamma)^2}{\Gamma(1 - \Gamma)} \quad (17)$$

式中 A 是常数, 其它符号的定义同前。这里特别需要指出的是 H 和粒子直径的 5 次方成反比, 即粒子越大、运动越迟钝, 所形成的 H 越小。

前面提到, 对于空间场流分级粒子在移动时所产生的升力是一个扰动因素, 它使保留行为与 (15) 式不符。然且在这里升力却可以被用于和外场力相抗衡以达到聚焦的目的。对于在平行平板当中运动的粒子所产生的升力尚无严格的定量描述, 但可以认为是和粒子的截面积成正比。聚焦模式场流分级是一个很有意义的领域, 但目前成果还不太多。

三、综合场场流分级

普通场流分级只用一种外场, 在聚焦模式的场流分级中不管是利用介质的某物理量的梯度或是升力, 都是有第二种场存在。但这里介绍的是明确地引入另一种场的情况。

为了克服升力对空间场流分级柱槽内粒子分布的扰动, 可以在重力场之外再加一个场迫使粒子靠近蓄集壁, 沉降场和交叉流场

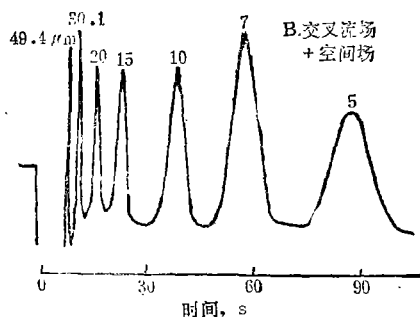


图 8 交叉流场/空间场综合场流分级谱图

是两种首先考虑的手段,图8是交叉流场/空间场的综合场流分级谱图^[13],7种不同尺寸的PS胶乳在两分钟内得到很好的分离。用沉降场和空间场结合也得到了很好的结果^[14]。虽然沉降力和交叉流力都可以克服粒子运动时产生的升力,但这两种不同场的作用和粒子尺寸之间的关系不同。沉降力和粒子的直径的3次方成正比而交叉流力和直径呈线性关系,因此对于不同的粒度范围应选用不同的场。

利用综合场的另一个例子是热重力热流分级^[15]。这种技术是热重力和热场流分级的结合。在一个单纯的热重力体系中,一般柱槽是垂直放置的,温度梯度的方向是水平的,由于热扩散效应而导致在水平方向上有一个密度梯度,而后者又在热板和冷板处形成一个向上和向下的物质流。这样也能造成分离,但只是在柱的上下端得到两个级分,不能连续分级。这种方法早在30年代就已被利用分离二组分的同位素混合物了。如果再加上场流分级中的载流,则不仅可以得到连

续的级分而且具有特殊的性能。在普通的热场流分级中,分子量较低的样品的分离度较低,但在这里却仍能保持较高的分离度。

以上介绍的是场流分级的一些基本原理和近况,此外这门技术在许多方面都有很大的灵活性,如可以按照一定程序改变场强以达到最佳分离效果;可以在柱上浓缩,再进样等都是具有实用意义的。

参 考 文 献

- [1] Janca, J., "Field-Flow Fractionation: Analysis of Macromolecules and Particles", Chromatographic Science Series Vol. 39, Marcel Dekker, New York, 1988.
- [2] Giddings, J. C., *Sep. Sci.*, 1966, 1, 123.
- [3] 高玉书, 化学通报, 1984, 11, 22.
- [4] 高玉书, 大自然探索, 1985, 4, 135.
- [5] Giddings, J. C., *Pure and Appl. Chem.*, 1979, 5, 1459.
- [6] Gao Y. S., Caldwell, K. D., Myers, M. N., Giddings, J. C., *Macromolecules*, 1985, 18, 1272.
- [7] 李惠鸣、高玉书, 高分子学报, 待发表.
- [8] Caldwell, K. D., Nguyen, T. T., Myers, M. N., Giddings, J. C., *Sep. Sci. Technol.*, 1979, 14, 935.
- [9] Graff, K. A., Caldwell, K. D., Myers, M. N., Giddings, J. C., *Fuel*, 1984, 63, 621.
- [10] Caldwell, K. D., Cheng, Z. Q., Hradecky, P., Giddings J. C., *Cell Biophys.*, 1984, 6, 233.
- [11] Janca, J., *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, 1982, 3, 887; 1983, 4, 267.
- [12] Chmelik, J., Janca, J., *Nat. Chem. Soc. Banská Stiavnica*, 1984, 1, 38.
- [13] Chen, X. R., Wahlund, K. G., Giddings, J. C., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 367.
- [14] Koch, T., Giddings, J. C., *Anal. Chem.*, 1986, 58, 997.
- [15] Giddings, J. C., Martin, M., Myers, M. N., *Sep. Sci. Technol.*, 1979, 14, 611.

Progress in Field-Flow Fractionation

Gao Yushu

(Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing)

Summary Field-Flow Fractionation is a relatively new technique with considerable potential in the field of macromolecular separation. The general principles and development of FFF are briefly presented. Besides ordinary FFF, which has been used as a useful separation method, some new operational modes and new combined subtechniques are introduced.

Key words Field-Flow Fractionation, Analytical separation