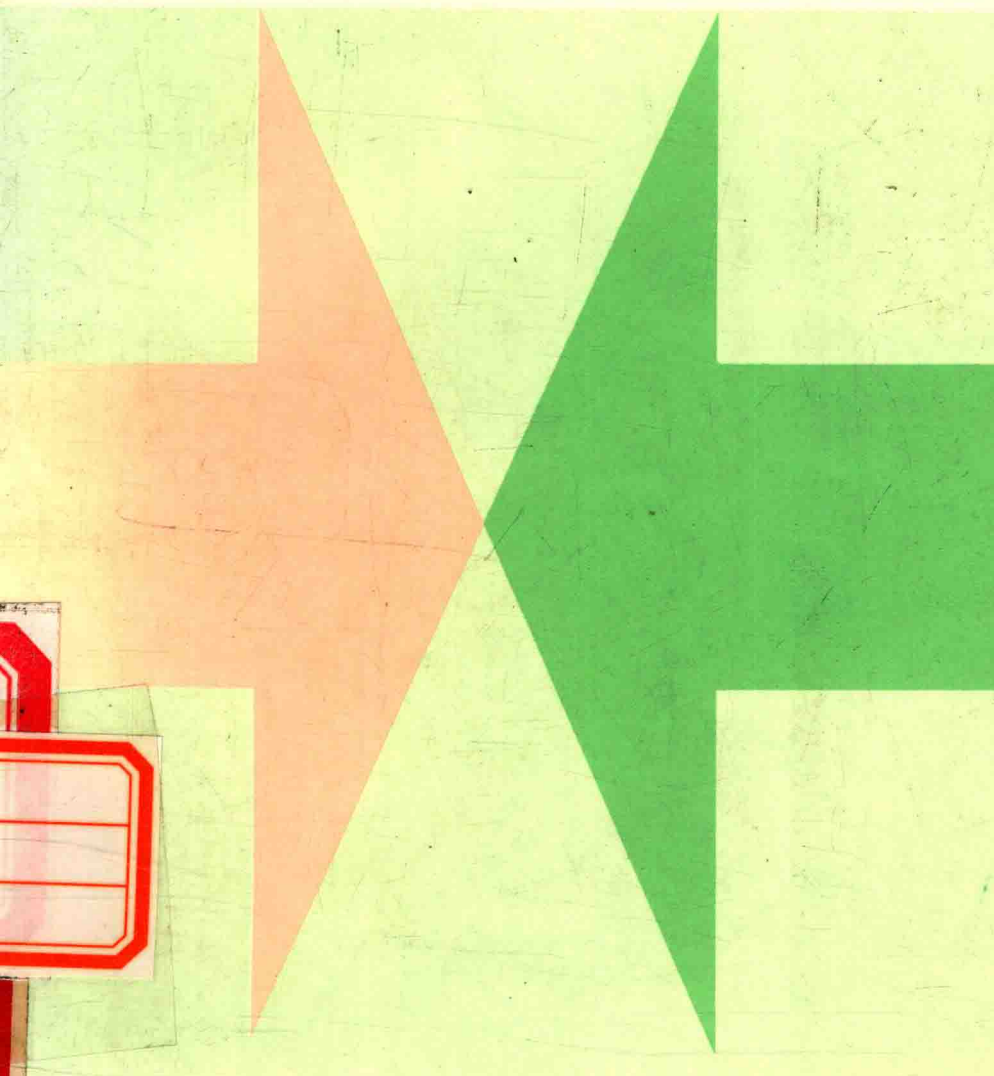


色層分析法概論

Introduction to Chromatography

吳廷源 等譯



銀禾文化事業公司印行

色層分析法概論

Introduction to Chromatography



銀禾文化事業公司印行

色層分析法概論

原作者：James M. Bobbitt

Arthur E. Schwarting

Roy J. Gritter

譯述者：吳廷源 李俊智

鄭寶樹 黃倉敏

校註者：何世延

主 編：陳國成

出版者：銀禾文化事業有限公司

發行人：陳俊安

地 址：台北縣永和市林森路 88-1 號 1樓

電 話：9230041・9230051

傳 真：9230051

郵 撥：0736622-3

定 價：新台幣 150 元

印製者：大原彩色印製企業有限公司

1990 年10月初版

新聞局登記證局版台業字第3292號

■版權所有・不准翻印■

ISBN957-568-021-9

作者簡介：

詹姆士·M·包比特

(*James M. Bobbitt*)

康乃狄格大學化學系教授

康乃狄格州 史拓斯市

若埃·J·葛瑞特

(*Roy J. Gritter*)

國際商業機械公司 (IBM) 分析化學研究部主任

加利福尼亞州 聖豪賽市

亞瑟·E·史瓦汀

(*Arthur E. Schwarting*)

康乃狄格大學醫藥學院藥理學系教授

康乃狄格州 史拓斯市

色層分析法概論

目 次

第一章 概 論 (<i>Introduction</i>)	1
1-1 名稱的定義 (<i>Definition of Terms</i>)	4
1-2 技術 (<i>Techniques</i>)	4
1-3 應用 (<i>Applications</i>)	10
1-4 理論上的概念 (<i>Theoretical Concepts</i>)	14
第二章 薄層式及管柱式色層分析法——方法的選擇 (<i>Thin-Layer and Column Chromatography-Choice of a System</i>)	25
2-1 概 論 (<i>Introduction</i>)	25
2-2 極 性 (<i>Polarity</i>)	26
2-3 吸附與分配 (<i>Adsorption vs. Partition</i>)	28
2-4 吸附過程 (<i>Adsorption Processes</i>)	31
2-5 分配過程 (<i>Partition Processes</i>)	41
2-6 氣態色層分析 (<i>Gas Chromatography</i>)	44
第三章 薄層色層分析法 (<i>Thin-Layer Chromatography</i>)	47
3-1 概 論 (<i>Introduction</i>)	47
3-2 顯微鏡載玻片色層分析法 (<i>Chromatography on Microscope Slides</i>)	49
3-3 大膜層薄層色層分析法 (<i>TLC on Larger Layers</i>)	57
3-4 製備的方法 (<i>Preparative Methods</i>)	83
3-5 定量用的薄層色層分析法 (<i>Quantitative TLC</i>)	91

第四章	管柱色層分析法 (<i>Column Chromatography</i>)	99
4-1	概 論 (<i>Introduction</i>)	99
4-2	吸附式管柱色層分析 (<i>Column Adsorption Chromatography</i>)	103
4-3	管柱分配式色層分析 (<i>Column Partition Chromatography</i>)	117
✓第五章	氣態-液態色層分析 (<i>Gas Liquid Chromatography</i>)	125
5-1	概 論 (<i>Introduction</i>)	125
5-2	系統的選擇 (<i>Choice of a System</i>)	130
5-3	系 統 (<i>The System</i>)	134
5-4	混合物之成分鑑定 (<i>The Identification of Components in a Mixture</i>)	154
5-5	混合物的定量分析 (<i>Quantitation Analysis of a Mixture</i>)	159
5-6	特別技術 (<i>Special Techniques</i>)	165
第六章	色層分析之參考文獻 (<i>The Literature of Chromatography</i>)	171
附 錄	(<i>Appendix</i>)	178
索 引	(<i>Index</i>)	184

第 1 章

概 論

(*Introduction*)

平衡
分配

色層分析 (chromatography) 是一種非常有效而且複雜的分離技術，雖然色層分析字面上含有顏色的意思，事實上除了第一個用這種技巧分離的化合物是植物的色素外，它和顏色並沒有直接的關係。

△ 色層分析分離法是利用分子的一般物理性質的巧妙操作，所用到的主要分子性質有：(a)分子溶解在液體的趨勢 (溶解度, solubility)；(b)分子吸附在某一特定固體的趨勢 (吸附力, adsorption)；(c)分子成為氣體或蒸發的趨勢 (揮發性, volatility)。在色層分析裡，被分離的混合物是置於動力或流動的實驗狀態中，在這種狀態下，它們能表現兩種上述的分子特性，這包括利用同樣的性質兩次，例如在兩種不同液體的溶解度，或是利用兩種完全不同的性質。

這些觀念可以用兩種性質互相作用的一些靜態例子來描述。假如我們將一個物質放在含有兩種液體的分液漏斗裡，而這兩種液體互相間之溶解度極微（例如水和乙醚），於是這個物質根據它在這兩種液體間之相對溶解而分配 (*partition*) 在這兩種液體

裡，這就是在兩種液體裡溶解度間的相互作用，或是第一種性質利用兩次。假如我們又把一種物質放在含有液體和極細的特定固體（如活性炭）的燒瓶裡，這物質將會有一部分在液體裡，有一部分在固體表面，此時溶解度和吸附性就被應用在一起。最後，假如有一種揮發性的物質被溶在一種非揮發性的液體薄膜，則這種物質一部分被吸附在薄膜上，一部分仍存在於薄膜相接的氣體中，這也表示揮發性和溶解度的相互作用。當然還有另外的可能性。在以上所述的系統裡，每一種成分都必須非常緊密的接觸，並且儘可能維持平衡狀態。這些系統都是一種物質分佈在兩相（*phases*）裡。

兩種不同的物質，在定量上幾乎是不可能表現出兩種完全相同的物理特性。這種差別之存在也許很小，但却是構成色層分析的基礎。

這些原理應用到混合物的實驗分離還須一些機械上的技巧。實驗上主要的觀念，就是把上述兩種靜態之一改為動態。動相（*moving phase*）雖流經靜相（*stationary phase*），而至少和它保持了某種程度的平衡。動相可能是液體或氣體，靜相可能為液膜（*liquid film*）或極細之固體。混合物進入系統後，各種成分的特性將決定它們是否移動，假如它們是可移動，則又決定在動相裡相對移動的快慢。假如它們完全不移動，那麼也就無法分離。通常相的選擇最好是使得混合物的成分都能動，而利用各成分移動速率之不同來分離，所以移動速率之不同是色層分析的基礎。

假如動相是液體而靜相是在適當支持物上的液膜，如此所構成的色層分析稱為分配式色層分析（*partition chromatography*）。假如動相是液體而靜相是具有吸附能力的固體（非支持液膜

的支持物)所構成的色層分析,稱為吸附式色層分析 (*adsorption chromatography*)。而另一種情況,動相是氣體,靜相是液膜,這種色層分析稱為氣態-液態分配式色層分析 (*gas-liquid partition chromatography*)。如果上述方法中靜相是吸附面時,稱為氣態-固態吸附式色層分析 (*gas-solid-adsorption chromatography*),這種例子較少。後兩種通稱為氣態色層分析 (*gas chromatography*)。

通常我們不太能確切的決定那一種色層分析較好或那一種能夠確實分離。在很多例子裡,至少有兩種現象會發生(通常是吸附和分配)。

另外有三種色層分析,本書不打算詳述,只是簡單的提一提。它們是離子交換色層分析 (*ion-exchange chromatography*)、電子交換色層分析 (*electronexchange chromatography*)、膠質過濾色層分析 (*gel-filtration chromatography*)。這三種方法的實驗技巧和所得的結果與分配式色層分析或吸附式色層分析相同,然而基本原理不同。

在離子交換色層分析裡,靜相是酸或鹼,通常是酸性官能基〔如羧酸 (*carboxylic acid*) 或磺酸 (*sulfonic acid*)〕或鹼性官能基〔胺 (*amine*) 或第四胺氫氧化物〕在一聚合物上,聚合物不溶於一般的溶劑,包括水,但官能基則具有活性,動相是離子物質如酸、鹼或鹽溶於水,它和靜相競爭所欲分離之物質而造成分離作用。

在電子交換色層分析中,靜相是氧化劑或還原劑,也是屬於聚合物,不溶於一般溶劑,而動相是經選擇的氧化劑或還原劑,它能和靜相產生競爭作用而造成分離。

膠質過濾色層分析是用一種多孔性且已知其孔大小的交錯連

接聚合物如多葡聚糖 (polydextran, Sephadex) , 溶質可以是離子或非離子化合物。此種吸附物能夠排除或保留某一特定大小的分子, 這種分離完全視分子大小而定。

1-1 名稱的定義 (Definition of Terms)

以上我們已經對一些重要的名稱加以定義, 但在一般討論色層分析裡, 還有一些名稱須加以明確的定義。

在吸附色層分析裡, 靜相之固體物稱為吸附劑 (*adsorbent*), 而分配色層分析裡, 液膜的依靠者稱為支持物 (*support*)。當動相對著吸附劑或支持物流動, 這種過程稱為展開 (*development*)。在色層分析中, 混合物經由展開而被分離, 我們稱它們被偵測出 (*detected*) 或顯示出 (*visualized*)。假如物質確實能從吸附劑中洗出來, 這種過程稱為沖提 (*elution*), 被分離之混合物稱為溶質 (*solute*) 或總稱為試樣 (*sample*)。

為了節省篇幅, 下面兩種縮寫常被使用。TLC 為薄層色層分析。GLC 為氣態 - 液態色層分析。還有一些特殊之名詞, 以後討論到時再加以定義。

1-2 技 術 (Techniques)

薄層色層分析 (Thin-Layer Chromatography)

在薄層色層分析裡, 吸附劑是附着在平面支持物的表面上 (約 0.1 ~ 2 毫米厚), 支持物通常是一片平的玻璃, 而吸附劑則以一種接合劑 (*binding agent*) 如澱粉液或巴黎石膏 (*plas-*

靜相：吸附劑
移動：洗滌劑 R_f 值。

ter of paris) 固著在玻璃表面上。將待分離的混合物溶於任一適當的溶劑中，然後在距離薄層一端近處（約 2 公分）點上一點（直徑約 3 ~ 5 毫米），這種操作可以一毛管或注射器行之（參見圖 1-1），溶劑可以蒸發或置於暖氣流中除去，然後將此薄層垂直地放於底端裝著溶劑（約 1 公分深）的展開槽（developing chamber），如此溶劑則與吸附物層在靠近試樣點（sample spot，圖 1-2）之一端接觸，然後將此槽關閉，讓溶劑藉毛細作用而上升（圖 1-3）。讓這種作用進行至溶劑爬過那點以上約 10 ~ 15 公分處為止。假如選擇適當，這種溶劑可將原來混合物那點分出一連串的小點，每一小點相當於一種化合物（圖 1-4）。假如這些點並非如圖所示是有顏色的化合物，則可使用一適當的着色劑噴灑而識別之。

色層分析通常是在所用的溶劑系統近乎飽和狀態的槽中進行，如此濾紙部份可以沿槽壁而置。如圖 1-2 和圖 1-4 所示。

除了已提到的術語以外，還有幾個是經常用於敘述 TLC（事實上大多數術語來自紙色層分析）。在色層分析之初，含混合物的那點稱為原點（origin）。將原點點在紙上之技術叫做點滴（spotting）。液前（solvent front）就是溶質經由色層分析體上行的最前端。當整個操作完成後，此液前和原點間的距離代表溶劑所走的最大高度。〔在一特定色層分析系統中，一特定化合物之行爲通常以 R_f 值表之。此值即為原點到化合物之距離（量至色點的中心）除以由原點到液前之距離（ R_f ）之值蓋介於 0 與 1 間如圖 1-5 所示。〕

管柱色層分析（Column Chromatography）

在管柱色層分析中，靜相置於圓柱管中，此管通常由玻璃製

6 色層分析法概論

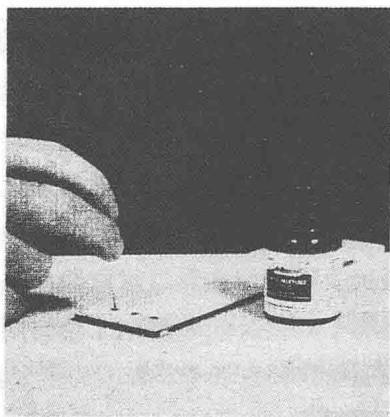


圖 1-1

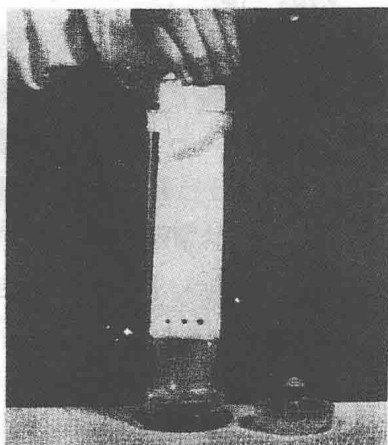


圖 1-2

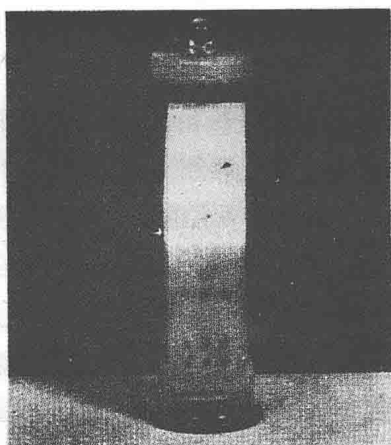


圖 1-3

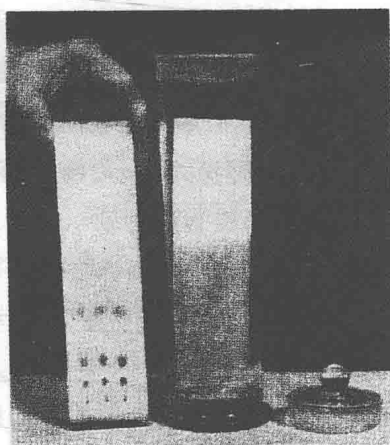


圖 1-4

圖 1-1 至 1-4 將混合三種染料〔奶油黃 (butter yellow)、蘇丹紅 (sudan red III) 和靛酚 (indophenol) 係用 Mallinckrodt Chem. Co.〕的苯溶液，配成三種不同的濃度分別點在一種矽膠凝體 G (silica gel G) 層上 (圖 1-1)，置於一個以苯液為流動展開劑 (圖 1-2) 的飽和密閉槽中進行分離 (圖 1-3)，分離後移開並吹乾 (圖 1-4)。

成，在底端由活塞或栓塞關閉之。此相通常是分得很細的一種固體吸附劑或是一種液體薄層固着於某些惰性物質上。此管內可裝

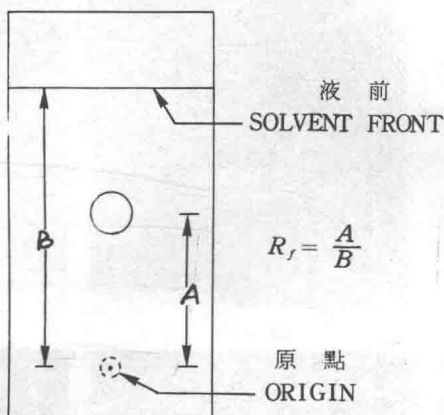


圖 1-5 一個理想的薄層分析圖，顯示 R_f 值如何被度量及計算。

入乾的吸附劑或稀泥 (slurry) (圖 1-6)。如果裝的是乾的吸附劑，就必須同時加入動相液體，使其與液體接觸。

當液面降至吸附劑的頂端時，將欲被分離之試樣溶於最小量的溶劑中（通常與在管內的液體相同），置於管柱上端，讓其往下流（圖 1-7），這時需要注入一種溶劑或數種溶劑的混合物，來分別展開試藥中的各化合物而分離之。從管柱流出的液體稱為流出液 (effluent)。與薄層色層分析 (TLC) 不同的是在管柱色層分析中，混合溶劑經常視需要而改變，一般是逐漸增加溶劑的極性。假如溶劑和吸附劑選用適當，則被分離的物質以不同的速率流經管柱〔如帶 (bands)〕（圖 1-8）；而在不同的時間隨流出液而流出（圖 1-9）。

連續從色層分析管柱中流出的流出液可以分為數部份而加以



圖 1-6

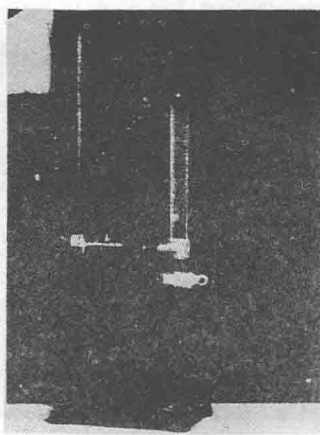


圖 1-7

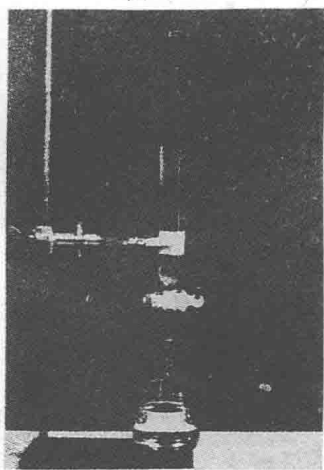


圖 1-8

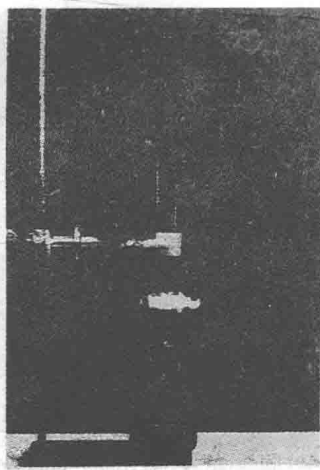


圖 1-9

圖 1-6 至 1-9 一種矽膠凝體被倒入玻璃管中 (圖 1-6)，讓溶劑慢慢流出直到溶劑的液面剛好蓋過吸附劑為止。一張小圓濾紙置於管柱頂端 (圖 1-7)，用滴管加入染料混合物 (參看圖 1-1)。再加入苯，當作流動展開劑，使其流經管柱，讓各色層被分離開 (圖 1-8)。最後直到其中一種成分從管柱底部流出 (圖 1-9)，此一操作費時約一小時。

分析（常用TLC），把同成分者合併，並把溶劑蒸發掉，即可獲得分離出來的成份。這種經由沖洗的分析法稱為沖提分析法（*elution analysis*）。假如在展開過程中所用的溶劑有所改變，則此種步驟稱為梯度沖提分析（*gradient elution analysis*）。

另外一種方法是在被分離的混合物被沖出管柱之前，停止添加溶劑，讓已在內的慢慢流出，同時把管柱中濕潤的固體吸附劑分段擠壓出來，各以所含的成份歸類後，用一種極性溶劑（*polar solvent*）沖洗之以分離出各成份。

氣態-液態色層分析（Gas Liquid Chromatography）

在此法（即GLC）中，液體靜相以一薄層附着在一分割很細的惰性物上，順次填塞於一適當長度（4~15呎）小直徑的管中（ $\frac{1}{16}$ ~ $\frac{1}{4}$ 吋）。動相，如氮之惰性氣體使其流經管柱，這種管柱是置放在加熱槽中，以便加熱促進高沸點物質的分離。試樣混合物通常由一種小型注射器（*microsyringe*）經由儀器上的橡皮圓圈（*rubber septum*）而注入（*injected*）管柱中，混合物各成分在管中以不同速度被惰性氣體展開，當它們流出時，在檢示器（*detector*）上測出，並傳送一信號至記錄器（*recorder*）。

圖1-10圖解GLC裝置，它包括幾個基本部分，一個高壓載送氣體供應器，連帶一個壓力調節器，一個試樣導入系統，一個有外圍支持物的分離管，一個檢示器及一個記錄器。圖1-11描述一個二成份液體混合物注入管中所發生的情形。

在特定的分離管中，一定溫度及一定的氣體流動速率下，某種特定的化合物其被帶動展開的情形是一定的。因此經過一定長的時間，亦即滯留時間（*retention time*）後，某種化合物會在檢示器上出現。滯留時間可用來做定性分析，而靠記錄器可做定

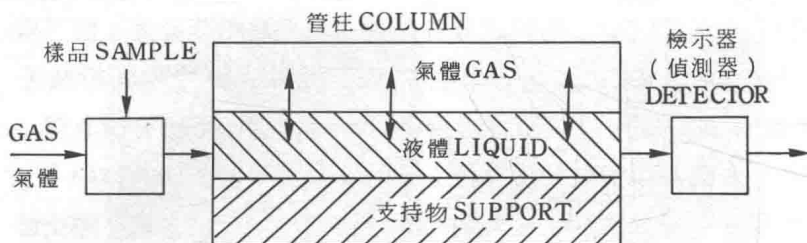


圖 1-10 GLC系統裝置圖 試樣試劑被注入氣體流中流經管柱，在各部分與氣相與固體支持物上的液相間保持均衡，試樣由是被分開，並由管柱進入檢示器。(該圖取材於 S. Dal Nogare and R. S. Juvet, Jr. 所著“Gas-Liquid Chromatography”, Interscience, New York, 1966, 24 頁)

量分析。當每一種成份流出管柱被收集後，可用別種儀器鑑定之。

1-3 應 用 (Applications)

定性應用 (Qualitative Applications)

① 色層分析在定性方面最重要的是能顯示試樣中是否有一特殊化合物的存在。一般的方法是在同一色層分析圖上比較混合物和純化合物之異同 (TLC)，或是比較它們的滯留時間 (GLC)。

② 其次，它能表示出一混合物中的組成。在不同的條件下，將混合物色層分析之，由色點的數目 (TLC) 或尖峯的數目 (GLC) 即可知其所含最低的成分數。如果某些色點或尖峯所代表的不祇是一種物質，則混合物本身可能比它顯示出的要複雜得多。反之，化合物的純度亦可檢查出，這是將化合物在幾種不同的條件及濃度下行色層分析，則在各條件下一點 (TLC) 或一個尖峯 (GLC) 的出現是為純度的良好標準，因此通常如此檢驗純度。

最後，定性色層分析可用以建立一組織或一未經純化的化學

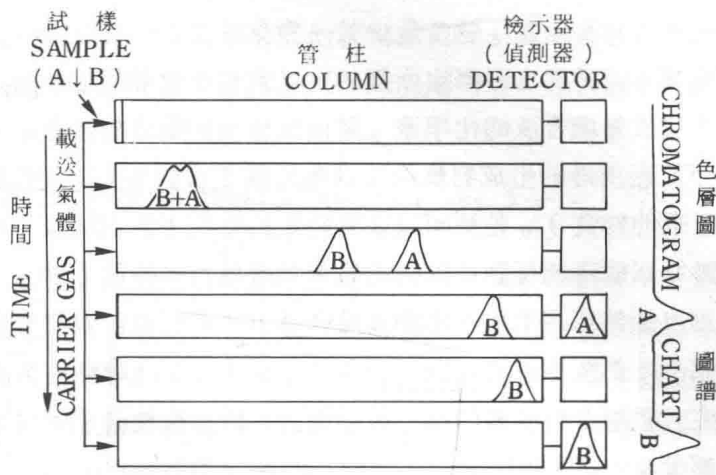


圖 1-11 氣態色層分析詳細圖。溶質 A 和 B 當經過管柱時被分離，並且在流出時記錄在一張譜上。（取材與圖 1-10 相同，該書 15 頁）

藥品的成分圖或“指紋圖”（fingerprint），然後把要檢查樣品的圖和這些圖相比較即可知道組織的反常情形或藥品的混合情形。

定性分析所選擇的方法是薄層色層分析法和氣態色層分析法。管柱式色層分析則既不經濟，也較費時。在上述兩種方法中，前者較簡單，並且不需要複雜的儀器，但是它不適用於揮發性化合物，分析能力也不及氣態色層分析。通常 GLC 用來檢驗液體及揮發性物質（沸點高至 400℃），而 TLC 則用在前者所不適用的物質或是固體及揮發性極低的化合物。但是揮發性物質能夠先變成不具揮發性的衍生物，再以 TLC 法分離。反之亦然，無揮發性的物質常常先變成揮發性的衍生物，再以 GLC 法分離。GLC 法最大的優點是同時能得到定量的結果，這將在以後討論。色層分析做為定性研究用的主要優點是僅需極少量的試樣即可。它的極限