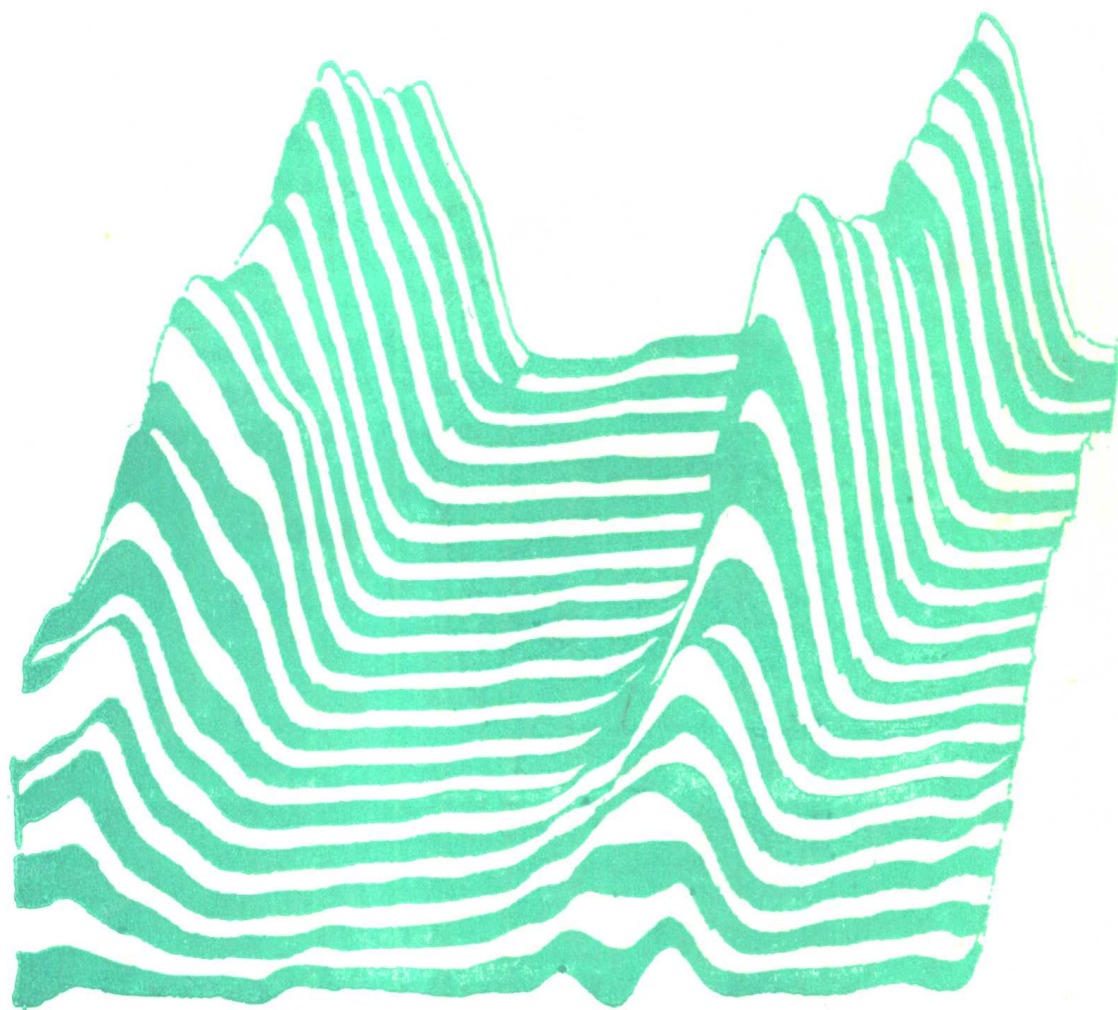


薄层扫描法

及其在药物分析中的应用

主编 孙毓庆



R914.1
SYQ
116858

人民卫生出版社

薄 层 扫 描 法 及其在药物分析中的应用

主 编

孙 毓 庆

编 者

孙毓庆 王延琮 林乐明

张莅峡 高光恩

人 民 卫 生 出 版 社

内 容 提 要

本书主要介绍薄层色谱及薄层扫描法的原理、有关仪器与设备,以及薄层扫描法的应用。

全书共六章,分为两部分内容。第一部分(一、三章)介绍薄层色谱参数、展开剂的选择方法以及铺板、点样、展开技术与仪器等有关薄层色谱法的内容。第二部分(二、四、五、六章)介绍薄层扫描法的基础理论、扫描条件选择、定性与定量方法,CS系列与CAMAG系列薄层扫描仪结构与主要功能以及薄层扫描法在中药、原料药、药物制剂及体内药物分析上的应用等有关薄层扫描法的内容。

本书可供药物分析、中药研究、卫生防疫、环境监测、食品检验、农药化肥、石油化工等方面的工作和科研人员,以及高等院校师生的参考。

薄层扫描法及其在药物分析中的应用

孙毓庆 主编

人民卫生出版社 出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

北京市房山区印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 14 $\frac{1}{2}$ 印张 332千字

1990年10月第1版 1990年10月第1版第1次印刷

印数: 00,001—3,000

ISBN 7-117-01361-3/R·1362 定价: 10.05元

[科技新书目220—221]

编写说明

薄层扫描法作为薄层色谱组分的原位分析方法,近年来得到了飞速发展,并已广泛用于药物分析、中药研究、临床化验、卫生防疫、食品检验、环境监测、化工染料及农药化肥等诸多领域中,特别是对于中药分析,已作为法定分析方法,收载于《中国药典》1985年版一部中。

薄层扫描法是在经典薄层色谱法基础上发展起来的分析方法。经典薄层色谱法虽然应用广泛,但主要还是作为分离手段,用于定性鉴别及杂质限量检查,充其量是一种半定量方法。自从七十年代出现了商品薄层扫描仪,才使薄层色谱斑点原位定量变为可能,从而使薄层色谱法产生了飞跃,形成了与气相色谱法及高效液相色谱法相类同的分离-分析方法。八十年代,由于新型色谱固定相的使用,薄层板质量的提高、自动化点样装置的出现、仪器化展开装置的运用及薄层扫描仪性能的改进,使薄层扫描法的检测灵敏度、定量分析的精密度与准确度均已达到与高效液相色谱法相媲美的程度。薄层扫描法作为复杂样品的痕量分析方法,已越来越多地为人们所接受。为此,许多分析工作者希望能较全面地了解这种方法。但遗憾的是,目前国内尚无这方面的书籍,国外介绍这方面内容的书籍也极少,且与国内情况有较大的距离。为此,我们查阅了国内外大量资料,并总结了我们多年的实验工作及多次举办全国薄层扫描法培训班的经验,撰写而成此书。仪器化薄层色谱法由分离与分析两部分技术与仪器所组成,薄层扫描法是该法的“司分析”部分,“司分离”部分是其基础。考虑读者开展薄层扫描工作的实际需要,本书对“司分离”部分所涉及的仪器(铺板机、点样器及展开装置)、薄层色谱参数及展开溶剂的选择等基础内容,也作了介绍,但仍以薄层扫描法及其应用为主题。

本书由孙毓庆任主编,五位同志共同编写而成。执笔情况如下:绪论、第一、第二及第六章由孙毓庆执笔,第三章(部分)及第四章由王延琮执笔,第三章(部分)及第五章由林乐明执笔,高光恩与张莅峡分别参加了第四章及第六章部分编写工作。

在本书编写过程得到了中国医学科学院药物研究所周同惠教授的热情帮助,他在百忙中阅读了书稿,并为本书写了序言。在本书出版过程,人民卫生出版社药学编辑室主任孙祖基编审及张月如副编审给予了大力支持,使本书能顺利出版。此外,班允东、孟品佳与谢立英同志参加了一些实验工作。对此一并表示感谢。

由于我们的水平所限,错误与不当之处在所难免,恳请读者给予批评指正。

孙毓庆

1989年1月于沈阳

序 言

色谱法发展至今已有八十多年的历史。这些年来，相继出现了多种色谱分离分析方法。各有各的特色。薄层色谱法的历史较久，但只是到了五十年代后期，此法才真正得到推广应用，现在它已是色谱法中的一个重要分支，与气相色谱法和高效液相色谱法鼎足而三，被广泛应用于医学、药物、生化、环境、卫生、化学、化工等许多领域。三种方法相辅相成，各有特点。薄层色谱法的优点是不需很多特殊设备，操作简便，一次可同时分离多个样品，样品前处理可较简单，检出方法多种多样，等等。而更值得提出的是由于操作的标准化、仪器化，已使薄层色谱由一种半定量技术发展成为有相当好的准确度和精密度的定量方法，从而与气相色谱法和高效液相色谱法可以分庭抗礼，并驾齐驱。在这方面，薄层扫描法及薄层扫描仪起了决定性的作用，而且进展相当迅速。自七十年代开始至今，有的仪器系列已经历了几代的更新而日臻完善。沈阳药学院分析化学教研室的同志，在孙毓庆教授的领导下，多年来在薄层扫描法及其在药物分析中的应用等方面，做了大量工作，并首次将此法用于中成药的分析鉴定，有许多心得与经验。现在将其整理出版，系统地介绍与薄层扫描法有关的原理、仪器、操作、及在药物分析中的应用，包括中成药鉴定、中药材鉴定、天然药物、合成药及体液分析等，将他们的成果与经验介绍于众，无疑将对薄层扫描方法以及在上述这些药物分析方面的推广应用起到很大的推动作用，对我国广大的薄层色谱工作者也将有很好的参考价值。有幸先睹全稿，不胜欣喜，特作此序。

周同惠

1989年12月30日

目 录

绪论	1
第一章 薄层色谱法及实验条件的选择	7
第一节 薄层色谱的分类及其分离原理	7
一、吸附薄层色谱法	8
二、分配薄层色谱法	8
三、胶束薄层色谱法	10
第二节 薄层色谱参数	13
一、定性参数	13
(一) 比移值(R_f)	14
(二) 相对比移值(R_x 或 R_s)	15
(三) R_M	15
(四) 圆形展开的比移值	15
二、相平衡参数	16
(一) 分配系数与比移值的关系	16
(二) 容量因子(k)	17
三、分离参数	19
(一) 分离度(R 或 R_s)	19
(二) 分离值(SV)	21
(三) 分离数(SN)	23
四、薄层板的板效参数	24
(一) 有效塔板数与有效板高	25
(二) 真实塔板数与真实板高	25
第三节 展开溶剂的选择方法	27
一、展开溶剂对分离度的影响	27
二、溶剂强度法	28
三、溶剂参数法	34
(一) Snyder溶剂参数	34
(二) 溶剂选择性分组三角形	36
(三) Glajch三角形最优化法	37
四、均匀设计法	39
(一) 溶剂系统组分的选择	40
(二) 溶剂系统配比的选择	40
(三) 实验方法	43
(四) 实验验证	43
第二章 薄层扫描法的基础理论及实验方法	45
第一节 薄层吸收扫描法的基本原理	45
一、Kubelka-Munk 理论	45
二、Kubelka-Munk 曲线	49

第二节 薄层吸收扫描法的扫描条件选择	51
一、扫描方式选择	52
二、波长选择	54
(一) 单波长薄层扫描法	54
(二) 双波长薄层扫描法	54
第三节 薄层荧光扫描法	60
一、薄层荧光扫描法的基本原理	60
二、薄层荧光扫描法的扫描条件选择	61
(一) 激发波长选择	61
(二) 发射波长的选择	62
第四节 色谱组分的鉴定方法	67
一、色谱鉴定法	67
二、薄层色谱-光谱联用法	68
(一) 薄层色谱-紫外、可见吸收光谱联用	68
(二) 薄层色谱-红外吸收光谱联用	71
(三) 薄层色谱-质谱联用	74
(四) 其它联用	76
第五节 定量分析方法	76
一、新建薄层扫描定量方法需考察的内容	76
(一) 工作曲线	76
(二) 精密度考察	77
(三) 准确度考察	77
(四) 统计检验	77
二、外标法	81
(一) 外标一点法	81
(二) 外标两点法	83
三、内标法	85
(一) 内标一点法	85
(二) 内标两点法	87
四、追加法(叠加法)	88
五、回归曲线定量法	90
第三章 涂布、点样和展开装置	91
第一节 涂布器	91
一、手动涂布器	91
二、自动涂布器	92
第二节 点样器	93
一、手动点样器	93
二、自动点样仪	96
第三节 色谱展开装置	100
一、矩形展开槽和双底展开槽	101
二、可调夹层展开室	101
三、高效薄层色谱直线式展开室	102

四、U-室系统	103
(一) U-室	103
(二) 反向 U-室	103
五、加压薄层色谱展开系统	104
(一) 仪器设备	104
(二) 展开模式与技术	105
(三) 基本特点	105
六、自动多步展开仪	105
(一) 简介	105
(二) 自动多步展开中的溶剂程序	107
(三) 自动多步展开色谱图的扫描测量	108
(四) 自动多步展开仪的主要优点和局限性	109
第四章 CS系列薄层色谱扫描仪	111
第一节 岛津CS-910型双波长薄层色谱扫描仪	111
一、仪器结构	111
二、光学系统	113
三、电学系统	114
四、主要功能	114
第二节 岛津CS-920型高速薄层色谱扫描仪	115
一、仪器结构	116
二、光学系统	116
三、电学系统	117
四、主要功能	117
第三节 岛津CS-930型双波长薄层色谱扫描仪	121
一、仪器结构	121
二、光学系统	122
三、电学系统	123
四、主要功能	124
五、性能指标	132
六、测试条件选择示例	133
第四节 岛津CS-9000型双波长飞点扫描仪	135
一、仪器结构	135
二、光学系统	136
三、电学系统	137
四、主要功能	138
第五节 170型双波长层析扫描仪	144
一、仪器原理	144
二、主要功能	145
第五章 CAMAG系列薄层色谱扫描仪	146
第一节 CAMAG薄层色谱/高效薄层色谱扫描仪	146
一、仪器结构	146
二、光学系统	147

三、电学系统	148
四、主要功能	149
(一) 扫描直线形薄层色谱图	150
(二) 扫描圆形薄层色谱图	151
(三) 采用不同的测量方式	151
(四) 联接不同的外围数据系统	151
(五) 记录光谱图	152
第二节 CAMAG 薄层色谱扫描仪Ⅱ型	152
一、仪器结构	152
(一) 主机简介	152
(二) 操作系统	153
(三) 外围系统	154
二、光学系统	155
三、电学系统	156
四、主要功能	157
(一) 与模拟记录仪联用	157
(二) 与SP系列计算机积分仪联用	157
(三) 与HP9816桌上计算机联用	159
(四) 与IBM桌上计算机联用	165
第六章 薄层扫描法在药物分析上的应用	167
第一节 薄层扫描法在中药及其制剂分析上的应用	167
一、在中药鉴定及其成分研究上的应用	167
(一) 中药材的品种鉴别	167
(二) 中药的成分研究与含量测定	169
二、在中成药鉴定上的应用	178
(一) 成药的提取方法	179
(二) 薄层色谱	180
(三) 阴、阳对照法	181
(四) 应用实例	184
第二节 薄层扫描法在化学合成与生物合成药物及其制剂上的应用	193
一、原料药分析	193
(一) 原料药安定中微量杂质的含量测定	193
(二) 麦迪霉素主要成分的含量测定	193
二、制剂分析	195
(一) 复方乙酰水杨酸片剂的含量测定	195
(二) 复方醋酸炔诺酮片的含量测定	196
(三) 复方磺胺甲基异噁唑片的含量测定	198
(四) 维生素C片剂的含量测定	199
(五) 酚磺乙胺注射液的含量测定	201
三、制剂的稳定性研究	202
(一) 氨酚待因片中磷酸可待因降解动力学研究	202
(二) 盐酸烯丙基吗啡针剂的稳定性研究	203

(三) 发酵液中抗生素的含量测定	204
第三节 体内药物分析	207
一、色谱预柱样品预处理法	208
二、血清或血浆中若干抗癫痫药物和巴比妥类药物的高效薄层色谱测定法	210
三、血浆中吲哚美辛的含量测定	211
四、尿中雌三醇的含量测定	212
五、羊水中卵磷脂和鞘磷脂的含量测定	213
六、动物肝脏中联硝氯酚的含量测定	214
附表	216
表 1 相关系数 $r_{a,v}$ 的临界值	216
表 2 F 分布临界值 λ (部分)	217
表 3 t 分布临界值 λ	219
表 4 统计检验表	220
表 5 Grubbs 检验临界值 $G_{a,n}$	220
表 6 一些溶剂的溶剂参数	221

绪 论

薄层色谱扫描法(Thin-layer chromatography-Scanning method, 缩写TLCS), 或称薄层色谱光密度法(TLC-Densitometry, TLC-DM)、薄层色谱扫描光密度法(TLC-Scanning densitometry), 简称薄层扫描法, 相应仪器称为薄层扫描仪(Thin layer chromatogram scanner)。薄层扫描法是以薄层色谱法为基础, 发展起来的薄层色谱组分原位分析方法及薄层色谱的记录方法。经典薄层色谱法虽然应用广泛, 但主要是作为分离、鉴别手段, 定量分析任务需靠其它分析方法来完成。薄层色谱法发展至薄层扫描阶段, 才形成完整的分离-分析方法。现代薄层色谱法的铺板、点样与展开操作已实现了仪器化, 这些技术与薄层扫描法组成了仪器化薄层色谱法。薄层扫描法是仪器化薄层色谱法的重要组成部分, 是“司分析”部分, 其它技术则属于“司分离”部分。

近年来, 随着薄层板质量提高与商品化及仪器化薄层色谱法各环节仪器性能的改善, 使薄层扫描法的检测灵敏度、分析结果的精密度与准确度均达到与高效液相色谱法相当的水平。但薄层色谱的实验成本低、流动相的更换与选择方便及薄层扫描仪的使用效率高等方面, 均优于高效液相色谱法。

一、薄层扫描法的分类与定义

通常, 薄层扫描法指薄层色谱斑点的色谱扫描, 广义薄层扫描法则包括薄层色谱斑点的色谱扫描与光谱扫描两大类扫描方法。

(一) 色谱扫描

主要分为薄层吸收光度扫描法(简称薄层吸收扫描法)及薄层荧光光度扫描法(简称薄层荧光扫描法)两种方式。

用一定波长的光束照射展开后的薄层板, 测定薄层色谱斑点的吸光度 A (或荧光强度 F)随展开距离 l 的变化, 所记录的 $A-l$ (或 $F-l$)曲线称为薄层色谱扫描图, 简称薄层扫描图, 利用薄层扫描图进行定量及定性分析的方法称为薄层扫描法。

上面所述虽是色谱扫描法的定义, 但反映了薄层扫描法的主要内容, 故通常用此狭义定义来描述薄层扫描法。

1. 薄层吸收扫描法 可分为透过法与反射法; 单波长法与双波长法。扫描方式可分为直线式与锯齿式等。

在双波长薄层吸收扫描法中, 是用两种波长(λ_1 与 λ_2)的光交替照射展开后的薄层板, 测定斑点对这两种波长光的吸光度之差 ΔA , $\Delta A = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$ 。此时, 所测得的薄层扫描图为 $\Delta A-l$ 曲线。双波长扫描法具有可以排除分离度不佳时两斑点间的相互干扰等优点。

2. 薄层荧光扫描法 用一定波长的单色光为激发光, 照射展开后的薄层板, 测定薄层色谱斑点在固定发射波长下的荧光强度随展开距离 l 的变化, 所测得的 $F-l$ 曲线为薄层荧光扫描图。

另外, 还可由所用薄层固定相的不同, 分为高效薄层扫描法与常规薄层扫描法; 薄

层荧光猝灭扫描法及凝胶薄层扫描法等。

(二) 光谱扫描

测定薄层色谱斑点光谱的扫描方式称为光谱扫描。它与色谱扫描的区别是：斑点固定不动，改变波长测定 $A-\lambda$ 或 $F-\lambda$ 曲线；而色谱扫描则是波长固定，斑点移动，测定 $A-l$ 或 $F-l$ 曲线。

薄层光谱扫描分为紫外、可见吸收光谱及荧光光谱扫描等，目前生产的薄层扫描仪都具有扫描可见与紫外吸收光谱的功能。少数仪器能测定薄层斑点的荧光激发光谱，个别仪器能测定荧光发射光谱，多数情况需应用具有薄层扫描附件的荧光分光光度计来实现。薄层色谱斑点的红外吸收光谱及质谱等的测定，需要由薄层色谱-光谱联用法来解决。

测定薄层色谱斑点的光谱，有助于色谱组分的定性分析以及定量分析的最佳波长选择。因此，一般都是先进行光谱扫描选择波长，尔后再进行色谱扫描。

二、薄层扫描法发展简史

薄层扫描法是以薄层色谱法为基础发展起来的分析方法，因此，首先介绍薄层色谱法发展简史^{①②}。早在1938年 Izmailov 与 Shraiber ^③率先用涂在玻璃板上的氧化铝分离药物。因为是将展开剂滴加在玻璃板上，而称为点滴色谱法(drop chromatography)。1950~1954年 Kirchner 及其同事发展了薄层色谱法。他们是将吸附剂铺在玻璃板上，按照纸色谱法的上行展开法，展开。Kirchner 用“色条谱”(chromatostrips)来描述他的发现。五十年代末 Stahl 首次提出“薄层色谱法”的专用名词，并对薄层色谱法所用的器材、操作方法和术语，进行了规范化，还介绍了分离一些重要物质类别的溶剂系统。Kirchner 与 Stahl 的工作奠定了现代薄层色谱法的基础。

薄层色谱法发展至今日，已成为迅速、简便、灵敏度高的痕量分析方法，已广泛应用于各种混合物的分离，在药物分析中是最常用的法定分析方法之一。以《中国药典》，1985年版为例，该版药典一部及二部收载用薄层色谱法鉴别或检查的条目共171项。其中，中药材及其制品49味；中药成方制剂23项，化学药品及抗生素等原料药75项，制剂7项。由此可见薄层色谱法在药物分析中应用之广泛。但这些项目，绝大多数还停留在定性鉴别或半定量(如杂质检查等)的水平上。

过去薄层色谱的定量方法，多采用将薄层色谱斑点洗脱，然后再用化学分析或仪器分析方法进行定量分析。手工洗脱法不但费时，而且损失较多，定量误差较大，薄层扫描法扭转了这种局面。

1931年 Kubelka 与 Munk ^④提出了 Kubelka-Munk 理论，Goldman^{⑤⑥}用此理论说明了由于薄层固定相对照射光存在着散射作用，而使薄层色谱斑点中物质的量与其吸光度的关系不服从 Beer 定律。此理论给出了薄层色谱斑点的透过率或反射率与其物质

① Fried, B. et al., Thin-Layer Chromatography Techniques and Applications, New York, Marcel Dekker Inc., 1982, 3~6

② Zweig, G., Anal. Chem., 1980, 52, 276R~280R

③ Kubelka, P. and Munk, F., Z. Tech. Physik, 1931, 12, 593

④ Goldman, J., J. Chromatogr. 1973, 78, 7~19

⑤ Goldman, J. et al., J. Chromatogr., 1968, 32, 24~42

含量及薄层板的散射参数间的关系。该理论是薄层扫描定量分析的理论基础。虽然此理论早在1931年提出,但直至1964年才见到用薄层扫描法直接定量的报道^①,这主要是仪器的原因。因为,有了薄层扫描仪,才能实现薄层扫描法。1964年 Hara 等人^②设计了具有自动积分装置的二维扫描光密度计。用此仪器,测定了某些甾体同系物、共轭胆酸及氨基酸的薄层色谱斑点的光密度积分值,直接进行定量分析。此法迅速、灵敏度高,光密度测定精密度(变异系数)约为5%。

1972年日本岛津公司首先推出了CS-900型薄层扫描仪商品。1976年在原有基础上改进,生产出CS-910型双波长薄层扫描仪。七十年代末期薄层扫描仪的生产有了迅速发展,主要商品有:瑞士CAMAG薄层色谱/高效薄层色谱扫描仪;岛津CS-920型薄层扫描仪、西德Zeiss KM-3型色谱分光光度计^③及苏联ERI-10型光密度计^④等。这些仪器各有特点。CAMAG仪器能与计算机联用;920型仪器为微机控制;KM-3型仪器具有双单色器,可以测定薄层色谱斑点的荧光激发光谱及发射光谱。八十年代薄层扫描仪有了进一步的发展,相继出现了CS-930型双波长薄层扫描仪、CAMAG薄层色谱扫描仪I型及CS-9000型仪器,它们的功能与自动化程度都有了很大的提高,后两种仪器是八十年代具有代表性的产品。八十年代我国也生产了170型双波长薄层扫描仪,填补了过去国内无薄层扫描仪生产的空白。

由于药物分析,特别是中成药及中药鉴定的需要,薄层扫描法已在我国逐渐普及。为此,《中国药典》1985年版,一部附录收载了薄层扫描法,并收载了两种中成药(六味地黄丸及九分散^⑤)的薄层扫描定量方法。在我国开创了用薄层扫描法作为法定定量方法的先例。除此以外,目前许多中药厂用薄层扫描法作为中成药质量厂控方法。各种国内文献上发表的有关薄层扫描法应用与研究的文章,涉及范围之广、发展之快、数量之多(每年近百篇),已达到令人瞩目的程度(详见本书第六章)。

三、薄层扫描法的进展

薄层扫描法的进展是伴随着仪器化薄层色谱法的发展而发展的,特别是薄层扫描仪性能的提高。已经叙述,薄层扫描法作为复杂样品痕量分析方法的定量精密度与准确度,都有了显著的提高,但在定性分析方面,仍是薄弱环节。为此,下述介绍薄层色谱-光谱联用法作为定性分析手段及薄层扫描仪的一些进展。

(一) 薄层色谱-光谱联用法

以薄层色谱法为分离手段,以薄层色谱组分的光谱为定性鉴定的依据;两者结合所形成的分离-分析方法,称为薄层色谱-光谱联用法。这种联用法是仪器化薄层色谱法定性分析的重要进展。

色谱法有很高的分离能力,但定性分析困难,一直是所有色谱法需要解决的共同课题。光谱法的专属性强是定性鉴定的最有力方法,已是众所周知,但较适合于纯组分的定性分析。因而,把色谱法与光谱法联用,前者分离,后者分析,两者取长补短,形成当前

^① Hara, Shoji et al., Chem. Pharm. Bull., 1964, 12(5), 626~630

^② Hezel, U., Am. Lab., 1978, 10, 91~96; 100~104; 106~108

^③ Kaimal, T. et al., Anal. Chem., 1978, 50, 268~270

^④ 《中国药典》,一部,北京,人民卫生出版社,1985,363页及393页

最重要的分离-分析方法——色谱-光谱联用法。薄层色谱-光谱联用法是这类方法的一个分支。

薄层色谱-光谱联用法可分为非在线与准在线(原位)联用两类方法。非在线联用是将薄层板上的色谱斑点洗脱,而后用光谱法测定色谱组分的光谱,定性。这类方法不属于薄层扫描法的范围。准在线联用是指薄层色谱斑点不经洗脱,原位测定光谱,定性。由于这种联用与气相色谱-质谱(GC-MS)及气相色谱-红外吸收光谱(GC-FTIR)等构成一个完整的联用仪(在线联用),有程度上的差别,故称为“准在线”联用。

现代薄层扫描仪都能进行光谱扫描,即具备薄层色谱-可见及紫外吸收光谱(TLC-VIS, TLC-UV)联用功能,已成为常规。近年来,联用法的进展非常迅速,发表的文章也很多,仅摘要介绍一些有代表性的联用法,如薄层色谱-激光荧光光谱联用^{①、②}、薄层色谱-漫反射红外吸收光谱联用^{③、④}、薄层色谱-拉曼光谱联用^⑤、薄层色谱-红外光声光谱联用^⑥、薄层色谱-快速原子轰击质谱联用^⑦,以及薄层色谱-二次离子质谱联用法^⑧等。这些联用法都是准在线联用,都是薄层色谱-光谱联用法的新进展。检测灵敏度高、测定速度快及光谱专属性强是这些联用法的共同特点。例如,薄层色谱-拉曼光谱、薄层色谱-质谱及薄层色谱-激光荧光光谱等联用方法的最小检测量,均为ng级或以下。即在薄层板上的色谱组分含量为ng级时,则可获得一张清晰的光谱。其它联用法的灵敏度虽稍低,也在μg与ng之间,都属于微量或超微量光谱分析方法。

三维光谱-薄层色谱是联用技术的又一进展。所谓三维谱,是将色谱图与光谱图绘成一张三维坐标的立体图或等高线图。由三维光谱-薄层色谱图上,可同时获得定性及定量信息,并可了解薄层色谱斑点是否是单一组分及色谱扫描的最佳波长选择等信息。CAMAG薄层扫描仪Ⅰ型,具有九个波长的多波长扫描功能,可获得简易三维紫外吸收光谱-薄层色谱图^⑨。作者等^⑩将CS-930型薄层扫描仪与IBM计算机联用,可测定连续波长的三维紫外吸收光谱-薄层色谱图及等吸收线图。三维荧光光谱-薄层色谱图,1981年就有文献报道^⑪。有关联用法的内容见第二章。

(二) 薄层扫描仪的进展

现代薄层扫描仪都具有光谱扫描及色谱扫描两种功能。前者已经介绍,色谱扫描是将薄层扫描仪充当光密度计,用于定量分析,这是仪器的主要功能。现简要介绍仪器的计算机化、光源及检测方法三方面的进展。

1. 计算机化 八十年代生产的薄层扫描仪都由微机控制,或与微型通用计算机联用(如CAMAG系列薄层扫描仪等)。由于薄层扫描仪的计算机化,使仪器操作参数的设定、测定条件的优化、定量分析数据的处理与存贮、实验结果的打印等实验步骤大

① Hofstraat, J. W. et al., Anal. Chem. Acta, 1985, 170(1), 61~67

② Hofstraat, J. W. et al., ibid, 1984, 159, 359~363

③ Fuller, M. P. et al., Anal. Chem., 1978, 50, 1906~1910

④ RFX-75 型FT-IR 仪器附件TLC/IR 系统说明书, Analect Instruments, Utica, 1987

⑤ Armstrong, D. W. et al., J. Chromatogr. 1986, 366(1), 227~230

⑥ White, R. L., Anal. Chem., 1985, 57(9), 1819~1822

⑦ Chang, T. T. et al., Anal. Chem., 1984, 56, 111~113

⑧ Busch, K. L., Trends Anal. Chem., 1987, 6, 95~100

⑨ CAMAG TLC Scanner Ⅰ 1.88 Model, 1983, 13

⑩ 孙毓庆(Sun, Yuqing), Proceedings of 2nd BCEIA, 1987, 1015~1016

⑪ Glaneli, M. L. et al., Anal. Chem., 1981, 53, 1357~1361

为简化。而且能降低人为的主观误差,提高测量精度与分析速度,这些都是薄层扫描仪计算机化的优点。这方面的内容已在本书第四、第五章介绍,这里不再重复。

2. 光源 薄层扫描仪常用光源为钨灯(用于可见光谱区段)、氘灯(用于紫外光谱区段)、汞灯及氙灯(荧光激发光源)。近期文献有一些关于用激光为薄层扫描仪光源的报道,仅举几例:用仄带激光为激发光源的荧光薄层光密度计①、用脉冲紫外激光为光源的薄层光热折射光密度计②、及用快速激光束扫描的薄层光声光密度计③等。由于激光为仄带光源,单色性好,光强大,因而使仪器的检测灵敏度与分辨率都有明显的提高,最小检测量低于纳克(ng)级。

此外,还有用X射线为光源的薄层X射线荧光光密度计④,可用于测定无机元素的含量。

3. 检测方式 一般薄层扫描仪用光电倍增管为检测器,测定薄层斑点的透过光、反射光或荧光光强。近期有不少关于具有新型检测器或信号传导装置的薄层扫描仪的报道,如:光声光密度计③④、脉冲光热折射光密度计②、光电二极管阵列检测扫描仪⑤、光学纤维光学扫描仪(fiber-optic scanner)⑦以及利用共振拉曼光⑧等薄层扫描装置。这些仪器各有特点,如光声光密度计是利用高灵敏度的微音器,检测光声信号。这种检测器的灵敏度高,重复性合乎要求。如测定孔雀石绿,含量为 $0.03\sim 0.25\mu\text{g}$ 时,相对标准差 $\text{RSD}=1.7\sim 4.5\%$ 。光电二极管阵列装置是由一系列光电二极管排列而成,一般一个光电二极管对应一个纳米的单色光。虽然该检测器也是检测可见光与紫外光,但它不需扫描,可同时记录薄层斑点的光谱与色谱。由于一次照射信号较弱,需要用计算机累加。光纤光学扫描仪,由光纤传导光学信号,可以降低杂散光,具有高灵敏度、高重复性及宽线性范围。例如测定3-甲氧肾上腺素其线性范围为 $500\text{ng}\sim 10\mu\text{g}$ 。光热折射光密度计具有很高的检测灵敏度,如测定2,4-二硝基苯胺的最小检测量为 $750\text{pg}(0.75\text{ng})$ 。其它还有棒状薄层的氢焰离子化检测装置等,但较早就有人应用,不是新型检测装置。

四、薄层扫描法定量分析误差

过去不少分析工作者抱怨薄层色谱法的定量误差较大。甚至认为,薄层色谱法不能作为一种精确的定量方法,理由是定量结果的重复性差。当前,随着薄层色谱固定相质量的提高,薄层板的规格化与商品化,机械点样装置与自动点样装置(如CAMAG Automatic Sample I)的出现,展开装置的改进,自动多步展开装置⑨及过压薄层展开装置⑩的运用,以及薄层扫描仪的检测灵敏度及测量精度有很大提高,使这种状况已根本扭转。

薄层扫描法定量分析结果误差主要来源于点样误差(σ_v)、薄层色谱展开误差(σ_e)、

① 同绪论三(一)之①与②

② Fotiou, F. K. et al., Appl. Spectrosc., 1986, 40(5), 700~704

③ Imaeda, K. et al., Anal. Sci., 1987, 3(1), 11~15

④ 同绪论三(一)之③

⑤ Berezkin, V. G. et al., Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1985, 281(2), 337~339; CA 103, 16109y

⑥ Ebel, S. et al., Proc. Int. Symp. Instrum. HPTLC, 3rd, 1985, 381~386; CA 106, 226800e

⑦ Ikuji, M. et al., Josai Shika Daigaku Kiyo, 1982, 11(1), 90~95 (Japan); CA 98, 85566k

⑧ 同绪论三(一)之⑤

⑨ 见本书第二章

⑩ 见本书第三章五

⑪ 陈执中, 药物分析杂志, 1988, 8(6), 370~374

薄层扫描中斑点定位误差 (σ_p)及测量误差 (σ_m)四部分①②。根据误差传递理论, 不可定系统误差的总误差 (σ_{total})应为:

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_v^2 + \sigma_c^2 + \sigma_p^2 + \sigma_m^2 \quad (1)$$

式中前二项误差来源于薄层色谱, 后二项来源于薄层扫描仪。由计算机控制并具有斑点自动定位的薄层扫描仪, 实际 $\sigma_p=0$, 此时:

$$\sigma_{calc}^2 = \sigma_v^2 + \sigma_c^2 + \sigma_m^2 \quad (2)$$

具有数据处理装置的薄层扫描仪, 峰面积测量误差为0.2~0.6%, 误差大小与仪器及曲线校正是否正确有关, 用薄层扫描仪测量同一薄层斑点 (10次), 合格仪器的相对标准差 (RSD)应小于1%。因此, 薄层扫描定量误差主要取决于点样误差与薄层展开误差。用仪器化的点样装置, 点样误差可以达到小于0.5% (0.5 μ l)。对于有经验的薄层工作者, 用定量毛细管手工点样, 点样量1 μ l或以上, 也不难达到1%的精度。但若用微量注射器点样, 则误差将大大增加。薄层展开是薄层色谱法的薄弱环节, 因展开后斑点不规则、斑点扩散等原因引起的误差 σ 。往往超过1%。不过用由计算机控制, 具有斑点自动优化定位的薄层扫描仪, 或用锯齿式扫描或用高效薄层板或用过压薄层装置展开, 都可以降低误差。

综上所述: 1. 用仪器化点样器 若 $\sigma_v=1\%$; 设色谱展开误差 $\sigma_c=2\%$; 用具有自动斑点优化定位仪器 $\sigma_p=0$; 设仪器测量误差 $\sigma_m=0.6\%$, 则总误差 $\sigma_{min}=2.4\%$ 。

2. 若用毛细管手工点样, 设 $\sigma_v=2\%$; 设 $\sigma_c=2\%$; 用一般仪器扫描, 设 $\sigma_p=1\%$ 、 $\sigma_m=1\%$, 则总误差 $\sigma_{min}=3.2\%$ (相对总体标准差)。

根据作者等多年的薄层扫描定量经验, 用自制普通薄层板 (CAMAG 铺板机涂布)、用定量毛细管点样 (1 μ l或以上)、用双底槽上行展开, 用CS-930型仪器扫描, 一般样品定量精密度及准确度 (以加样回收率计算) 分别达到 $RSD \leq 3\%$ 及回收率95~105%, 比较容易。

因此, 我们建议: 用薄层扫描法作一般样品的定量分析时, 定量分析结果的精密度合格限度应是 $RSD \leq 4\%$; 准确度以加样回收率计算应在95~105%范围内, 即准确度误差为 $\pm 5\%$ 。难分离样品、含量很低的样品及生物样品 (包括体液分析样品等), 定量分析结果的精密度及准确度的允差, 应根据实际情况适当放宽。由上述误差分析可知, 薄层扫描法的定量分析精密度和准确度都已达到与高效液相色谱法相当的程度。

(孙毓庆)

① Bertsch, W.; Hara, S.; Kaiser, R. E.; Zlatkis, A., Instrumental HPTLC, Druckerei Krebs-Gehlen, Hemsbach, 1980, 68~69

② 林乐明, 中国化学会第二届薄层色谱学术会议论文集, 沈阳, 1988, A-4-1~16

* σ 为总体标准差, $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}$, 相对标准差 $RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$, $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$, s 为样本标准差。

第一章 薄层色谱法及实验条件的选择

本书主要介绍薄层扫描法的原理及实验方法,而薄层色谱法是薄层扫描法的基础,必须有一块已经展开而且合乎要求的薄层板,才能进行薄层扫描,因此首先介绍薄层色谱法。

薄层色谱法是一种分离方法,包括薄层色谱分离原理、薄层固定相及薄层板的制备、点样方法、展开方法与装置、展开溶剂的选择等内容。薄层板及流动相的选择是薄层色谱法的主要内容。

第一节 薄层色谱的分类及其分离原理

薄层色谱属于液相色谱的范畴,与其它液相色谱一样,按分离原理也可分为吸附色谱、分配色谱、空间排斥色谱、离子交换色谱及胶束色谱等类别。在薄层色谱法中应用最广的是吸附色谱。硅胶与氧化铝是常用的吸附剂。硅胶含水17% (w/w) 以上,则构成正相分配色谱。近年来反相薄层板、手性固定相板等新型薄层板、离子对色谱法以及胶束薄层法的出现,使薄层色谱法的应用范围进一步拓宽。

薄层色谱法按所使用薄层板的分离效能可分为经典薄层色谱法(TLC)及高效薄层色谱法(High performance TLC; HPTLC)两类,其区别列于表1-1。以下介绍几类主要的薄层色谱法。

表 1-1 普通薄层板(TLC板)与高效薄层板(HPTLC板)的比较
(以硅胶板为例^①)

项 目	TLC板	HPTLC板
薄层板尺寸(通常)	20×20cm	10×10cm
固定相颗粒直径	10~40μm	5~10μm
主要颗粒直径	20μm	7μm*
薄层厚度	0.25~0.3mm	0.2mm
点样量/斑点	1~5μl	0.1~0.2μl
原点直径	3~6mm	1~1.5mm
展开后斑点直径	6~15mm	2~5mm
有效塔板数	<600	<5000
有效板高	~30μm	~12μm
分离数(SN)	7~10	10~20
点样数	10	18或36
展开距离	10~15cm	3~6cm
展开时间	30~200min	3~20min
最小检测量: 吸收	1~5ng	0.1~0.5ng
荧光	50~100pg	5~10pg

① Colin F. Poole et al., Contemporary Practice of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1984.

* E. Merck, Whatman及青岛海洋化工厂生产的HPTLC板。