

機器化・高性能

薄層層析法

Instrumental HPTLC

Edited by

W. Hertsch, S. Hara, R.E. Kaiser, A. Zaitkin

莊萬發譯著

**H
P
T
L
C**

high

performance

thin

layer

chromatograph

復漢出版社印行

機器化・高性能

薄層層析法

Insturmental HPTLC

Edited by

W. Bertsch, S. Hara, R.E. Kaiser, A. Zlatkis.

莊萬發譯著

H
P
T
L
C

high

performance

thin

layer

chromatograph

復漢出版社印行

版權所有
翻印必究

B 平裝 二四〇元
精裝 二八〇元

薄層層析法

(HPTLC)

Edited by

原著者：W. Bertsch, S. Hara, R. E. Kaiser,
A. Zlatkis

譯著者：莊萬發

出版者：復漢出版社

地址：台南市德光街六五一號
郵政劃撥三一五九一號

發行人：沈岳林

印刷者：國發印刷廠

香港書業有限公司
YAU SHING BOOK CO., LTD.

二月一日出版

香港灣仔聖佛蘭士街秀華坊23號
TEL.: 5-293283, 5-299068

本社業經行政院新聞局核准登記局版台業字第〇四〇二號

序

層析法 (chromatography) 為極重要的分析手段，此技法為製造管理、製造工程的最適化、製品管理、環境分析等不可或缺的手段，也盛用於生化學或臨床實驗室。

混合物中構成成分定性定量分析的結果判定或進一步的行動乃立於所得分析情報的正確性和完全性。富高度情報性的氣相層析 (GC) 及液體層析有犯極端錯誤的危險性，GC因熱分解而反覆完全錯誤的結果，若不在適切的管理下測定，容易發生此種情形。今天可得再現性良好之結果的高性能液體層析 (HPLC) 也常犯極端而有系統的錯誤，原因在兩者都對混合物的複雜性，使用太原始的檢出器與評價方法。

數年前仍不相信薄層層析法 (TLC) 能突破分析不確實的問題，直到高性能薄層層析法 (HPTLC , High Performance Thin-Layer Chromatography) 問世後，HPTLC 成為最迅速、最正確，且有在半 ppb 範圍之檢出界限的最理想定量方法。機器化和小型化使 Izmailow 和 Shraiber 創始的 TLC 具有優秀的定量性。在定性方面，古典 TLC 也對情報量顯出無比的特色。TLC 板適於試料物質的定性記錄。

直線展開 TLC 有時不能發揮充分高密度的分離性能。高性能化的 HPTLC 在一次元展開有時也難得充分的分離度。適切的 HPLC 柱也許可得較明銳的分離，但可以說二次元直線 HPTLC 的分離性能優於目前的 HPLC 柱，而且可在 15 分以內完成分離。

所以有瞭解力的人會知道機器化 HPTLC 是定性、定量分析用層析法的尖端方法，目前的板材料及電氣評價方法若能進一步改良，HPTLC 可分析可溶於某種溶媒，隔絕光與空氣而揮發性不高的所有物質。HPTLC 定量法也可成為 GC 與 HPLC 定量法的媒介，各種層析法都不可能完全取代另一種技法，HPTLC 可望成為相補性的方法。

本書由 16 位著者合作完成，而且，W. Bertsch (USA)、G. Holzer (USA) 及 A. J. Starwack (西德) 在短期間內譯成必要的

Am 16/9/86

若干論文，及時發表於 1980 年的座談會，也同時以完全形態的書籍發行。

最後感謝出版社、著者、編輯諸位在出版之際，多方鼓舞及提供熟練的作業。

編集小組的代表

R. E. Kaiser

1980年4月20日

于 Bad Dürkheim (西德)

譯後感言

薄層層析應用於廣範圍的研究，不過較晚機器化。

1975 年發表高性能薄層層析法（HPTLC）以來，正式開發周邊裝置，其優秀的分離性能已可充分活用於微量定量分析。

本書原著是在高性能薄層層析分野領導開發新技法、新裝置的西德層析法研究所長 R.E.Kaiser 先生 1980 年 5 月在西德 Bad Dürkheim 召開第 1 屆“機器化高性能薄層層析法國際座談會”的論文集，內容包括在日常業務實際應用薄層層析的研究者之具體例及改善定量精度、再現性所必要的裝置。現在的電子技術——亦即應用微電腦的自動測定及資料處理技術。

翻譯時的難題是原著乃開會期間倉促編集，各章形式不同，各著者的意見或圖例等重複，編成有一貫性的一本參考書頗費思量，只好徵求原著者及原出版社的諒解，變更各章順序，刪除重複部份。

但是原著及座談會的主旨在開發新機器，使研究者瞭解再現性良好、高精度的高性能薄層層析法。

省略原文局部內容時，都注意正確傳達原著者的意見，並設序章讓讀者正確瞭解 HPTLC 與 TLC 的基本差異。

目前尚無專門書籍介紹高性能薄層層析法的具體應用例或實驗操作，相信本書的問世會對研究者稍有幫助。

譯者

1984 年 11 月

目 錄

序 章 HPTLC	1
前 言	1
1 擔體的粒子大小與粒度分佈的改良	1
2 HPTLC 板的性能	2
3 擔體的種類與選擇	4
結 語	6
第 1 章 醫藥品製劑中類固醇荷爾蒙的定量	7
1.1 前 言	7
1.2 利用層析法的類固醇荷爾蒙定量分析	8
1.2.1 利用 TLC 的類固醇荷爾蒙分析	8
1.2.2 利用 GC 的分析	8
1.2.3 利用 HPLC 的分析	8
1.3 類固醇荷爾蒙的 HPTLC	8
1.3.1 文 獻	8
1.3.2 用 HPLC 分析醫藥品製劑中的類固醇荷爾蒙	9
1.3.3 結 果	16
1.4 考 察	25
第 2 章 抗生物質在工業製造上的定量	
一發酵過程的控制與最適化，血漿中抗生物質的定量	28
2.1 前 言	29
2.2 試料調製與裝填	30
2.3 層析法	32
2.4 衍生物化	33

2.4.1	利用薄層中試藥的衍生物化	33
2.4.2	試料溶液的衍生物化	33
2.4.3	試料裝填後的衍生物化	33
2.4.4	分離後在氣相中衍生物化	34
2.4.5	分離後浸入試藥中而衍生物化	34
2.4.6	分離後用試藥噴霧而衍生物化	34
2.5	測定與評價	37
2.5.1	概 論	37
2.5.2	檢量線的製作	37
2.5.3	自動化	40
2.5.4	生物自動放射照相檢出	42
2.6	應用例	42
2.6.1	發酵 bloat 中的短桿菌肽定量	42
2.6.2	發酵 bloat 中 griseoflavin 定量	45
2.6.3	鼠血漿中 griseoflavin 的定量	48
2.6.4	出自真菌的非皂化部份中之麥角固醇定量	50

第3章 殺蟲劑的品質管理與殘留分析 53

3.1	前 言	53
3.2	層析法與定量法	54
3.2.1	TLC 的適用途徑	54
3.2.2	定量方法	54
3.2.3	測光法的長處與短處	54
3.2.4	資料的取得	55
3.2.5	校 準	55
3.2.6	資料處理	55
3.2.7	利用桌上計算機的聯線定量計算	56
3.3	品質管理	58
3.3.1	與同等標準試料濃度直接比較的方法	58
3.3.2	相關測定的結果	59
3.3.3	殺蟲劑與不純物的同定	59

3.4 微量成分的分析	61
3.4.1 實驗方法	62
3.5 結語	64
第4章 水中所含微量硒的分析	65
4.1 前言	65
4.1.1 硒的存在量與排出	65
4.1.2 硒的毒物學、生物學作用	66
4.1.3 水中的硒濃度	67
4.2 水中所含硒的定量分析	67
4.2.1 試藥及機器	68
4.2.2 標準試料的調整	99
4.2.3 純粹硒化合物的定量	99
4.2.4 從水抽出的硒之定量	72
4.3 結論	74
第5章 柴油機排氣中多環芳香族化合物的分析	
一昇華及螢光光度法與薄層層析法的組合 (TLCF)	75
5.1 前言	76
5.2 技術的基本原理	76
5.3 裝置、試料與溶液	77
5.3.1 裝置	78
5.3.2 試藥與溶液	79
5.4 分析法與開發	81
5.4.1 空白試驗	81
5.4.2 標準試料	81
5.5 抽樣	81
5.6 分析操作	82
5.6.1 從凝結洗液與凝結物抽出 PAH	82
5.6.2 PAH 的昇華	82
5.6.3 矽膠上昇華的淨化	82

5.6.4	氧化鋁上PAH的濃縮與分別	82
5.6.5	用TLC的一次元分離	83
5.6.6	用螢光光度法直接評價	83
5.6.7	溶液中的螢光及紫外光測定	87
5.6.8	半定量	88
5.7	方法的評價	88
5.7.1	PAH的回收率	88
5.7.2	正確度	88
5.7.3	檢出界限	88
5.8	方法的應用範圍	88
5.9	檢 討	92
5.9.1	真空昇華	92
5.9.2	TLC	94

第6章 微量分析的連續多重展開技法 96

6.1	前 言	96
6.2	定量分析必要的裝置性能	97
6.3	實 驗	98
6.3.1	用連續展開HPTLC的malto-oligo saccharide 定量分析	98
6.3.2	以增加溶媒極性的多重展開HPTLC同時定量血清 中的抗不整脈劑	99
6.3.3	以HPTLC定量糖蜜中的葡萄糖、果糖、蔗糖—— 在一溶媒系的連續多重展開——	103
6.3.4	利用連續多重展開及使用不同極性之兩溶媒系的 HPTLC同時分析多數霉菌毒素	105
6.4	結 論	111

第7章 化學結合型固定相的使用 114

7.1	前 言	114
7.2	材料與方法	116
7.3	結果與考察	116

7.3.1	薄層板	117
7.3.2	試料的裝填	117
7.3.3	各固定相擔體的比較	117
7.3.4	分離	120
7.4	結 論	121

第8章 用逆相薄層的醫藥品製劑之分析..... 123

8.1	前 言	123
8.2	機器化	124
8.3	薄層板	124
8.4	往逆相HPTLC板的裝填技法	124
8.5	分離的最適化	125
8.5.1	薄層的選擇	125
8.5.2	移動相中的水分含量	126
8.5.3	移動相中的流速與容量的最適化	128
8.5.4	利用多重展開的最適化	129
8.6	特殊的應用	130

第9章 血清中的氨基酸定量..... 137

9.1	層析條件	137
9.2	評價與結果	137
9.3	結 論	140

第10章 操作法及裝置的選擇基準..... 141

10.1	HPTLC 與HPLC 的選擇	141
10.2	試料裝填	142
10.2.1	必要的裝置與溶液	142
10.2.2	定容量吸量管	143
10.2.3	nanoapplicator	143
10.2.4	利用連續性溶媒揮發裝填試料	144
10.2.5	噴射技法	144

10·2·6	裝填試料所需的時間	145
10·2·7	接觸斑點	147
10·3	層析譜的展開	147
10·3·1	序 言	147
10·3·2	直線型層析譜展開	149
10·3·3	圓形層析譜展開 (U-室技法)	150
10·3·4	逆圓形層析譜展開	153
10·3·5	最適展開溶媒系的選擇	154
10·4	定量層析譜的評價	155
10·4·1	定 義	156
10·4·2	直線展開層析譜的掃描	157
10·4·3	圓形及逆圓形層析譜的掃描	158
10·4·4	所需時間	159
第11章	機器化的試料裝填法	162
11·1	前 言	162
11·2	試料裝填法	165
11·2·1	微細毛細管吸量管	166
11·2·2	微細注射器	167
11·2·3	接觸斑點法	167
11·2·4	成線狀裝填試料的方法	168
第12章	薄層層析譜利用電腦控制的全自動定量	170
12·1	前 言	170
12·2	電腦控制系統的設計	171
12·2·1	控制的過程	172
12·2·2	資料的取得	175
12·3	定 量	177
12·3·1	再現性與精度	178
12·3·2	光譜測定	180
12·3·3	分離不充分的物質之定量	180

12.4	將來的展望	182
第13章	HPTLC活用個人電腦與高精度定量	184
13.1	定量HPTLC法必要的電腦大小	184
13.2	個人電腦優於特別的實驗室用資料處理系統	185
13.3	HPTLC的非直線性	186
13.4	動作範圍的問題及利用指數性稀釋容器的校正法	190
13.5	利用Apple II電腦用簡單BASIC程式的 log/log 直線回歸	193
第14章	TLC/HPTLC板上的直接定量與光密 度計(I)	196
14.1	前 言	196
14.2	理 論	197
14.2.1	光的傳播式	197
14.2.2	傳播式的近似解	198
14.2.3	不連續理論	200
14.3	實 驗	200
14.3.1	單光束方式	201
14.3.2	雙光束方式	204
14.3.3	試料裝填	205
14.4	計 算	205
14.5	機 器	206
14.5.1	Zeiss km3	207
14.5.2	Schoeffel SD 3000	208
14.5.3	島津CS910	209
14.6	實驗結果	211
第15章	TLC/HPTLC板上的直接定量與光密 度計(II)	211
15.1	前 言	215

15.2	素來的TLC板與HPTLC板	215
15.2.1	總 論	215
15.2.2	TLC板與HPTLC板的檢出界限	216
15.3	薄層層析譜的直接定量	218
15.3.1	總 論	218
15.3.2	TLC掃描器的光學系	218
15.3.3	TLC評價用測光法	219
15.3.4	波長的選擇與最適化	222
15.3.5	薄層層析譜的自動定量	224
15.4	高性能薄層層析譜直接定量的再現性	225
15.4.1	總 論	225
15.4.2	光學測定的再現性	226
15.4.3	試料裝填及層析條件的再現性	226
15.4.4	線狀裝填的再現性	228
第16章	TLC/HPTLC 板上的直接定量與光密度計(Ⅲ)	230
16.1	依據Kubelka-Munk式的信號變換	230
16.2	TLC掃描器利用微電腦	232
16.3	結果與考察	235

序章 HPTLC

前言

TLC (薄層層析法) 為最基本的分析手段，廣用於化學、生化學、藥學或臨床化學的分野。因屬並列分析法，可在較短時間處理多件試料，分離的各成分可直接或利用選擇性特異性發色反應等同定等，但是，常見分離不充分或展開費時，而且，定量精度和檢出感度不如其他層析 (chromatography) 技法，只能用為定性分析手段。

儘管長年以來已在多方面應用，也只不過從研究者自行調查製薄層進展到利用市售的預塗板 (precoated plate) 而已。

但是，1975 年以來總算可利用新式的 HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography, 高性能薄層層析法)。

這不只是出現利用改良擔體的高分離能 TLC 板，也包括機器化的高精度試料裝填裝置、展開裝置、把分離的斑點 (spot) 直接以分光光學法定量的裝置 (densitometer (光密度計) 或 scanner) 等一系列系統。

為使讀者深入瞭解第 1 ~ 16 章詳述的機器化 HPTLC 之實際應用，本章先簡單比較新式薄層——HPTLC 板與以往 TLC 板的差異。

1 擔體的粒子大小與粒度分佈的改良

E. Stahl 報告實施 TLC 用擔體 (載體) 物性——亦即粒子大小和微孔大小的標準化，可得再現性良好的層析結果。TLC 所用把物性標準化的擔體是粒子大小有 $10 \sim 40 \mu\text{m}$ 粒度分佈者 (圖 1)。在市售的預塗板 (E. Merck 公司例) 是用粒度分佈狹窄的擔體 ($6 \sim 23 \mu\text{m}$)，分離性能遠優於自行調製板。粒度分佈的差異不只表現於粒子大小分析的結果，TLC 的分離結果也有顯著差異。如圖 2 所示，分離天然胡蘿蔔素 (carotene) 濃縮物時，在用粒度分佈狹窄之擔體的 TLC 板上，

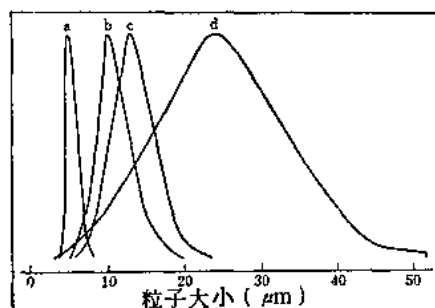


圖 1 (HP)TLC用矽膠的粒度分布〔a: HPTLC板, b: macro-TLC板, c: 15 μm 粉末TLC-矽膠 60 (自家調製用), d: 素來的macro-TLC用粉末 (自家調製用)〕

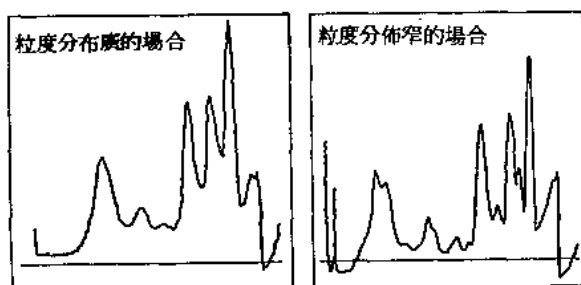


圖 2 擔體粒度分布差異所致分離性能的差異〔試料：天然胡蘿蔔素濃縮物，反射模態測定（波長 450 nm）〕

比用粒度分佈廣者可分離較多成分。

近年由於HPLC（高速液體層析法的發展，確立製造微細（5，7或10 μm 等）而且粒度範圍小的擔體。把同程度的擔體導入TLC而完成HPTLC板。

2 HPTLC板的性能

HPTLC板的基本技術是盡量減小試料裝填量（約以往的1/10以下）。

為具體評價薄層的品質，可畫 $H-z_f$ 曲線表示分離段高度（ H ）與展開距離（ z_f ）的關係。

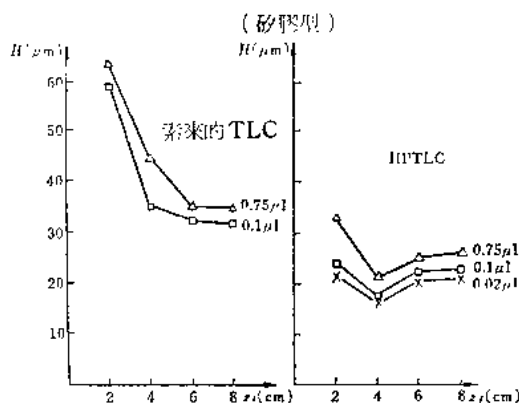


圖 3 素來的TLC與HPTLC之分離能比較 (H :分離段高度 (μm), 對 ceresviolt BRN的斑點算出, z_f :展開距離 (cm), 展開溶媒: 甲苯, 板的活性度: 20 %相對濕度, 展開槽: 不飽和N展開槽)

圖 3 對脂溶性物質畫示各展開距離的分離段高度 $H = \frac{b^2}{16z_x}$, b 為峯寬, z_x 為斑點移動距離。

HPTLC 以 3 ~ 6 cm 的展開距離獲得理想的分離段高度, 而且, 即使展開距離更大, 分離段高度也不激升, 亦即全體有理想的分離性能。TLC 板是從展開距離約 5 cm 起開始有良好的分離, 一般須展開 10cm 或更大。

HPTLC 板因緻密充填粒子大小較小的擔體, 溶媒的滲入速度減慢。

TLC 板上的溶媒移動速度用下示的滲入常數 κ 表示。

$$\kappa = \frac{z_f^2}{t} \text{ [mm}^2 \text{ / sec]}$$

z_f : 從開始位置到溶媒前端的距離, t : 溶媒移到前端 z_f 的時間。

在早期的 HPTLC 板 (粒子大小 5 ~ 10 μm), κ 值比 TLC 小約 30 %, 現已改良成 (粒子大小 5 ~ 7 μm) 約 18 %。

如此, HPTLC 板的溶媒滲入速度減小, 理想的分離是在 z_f 小之