

高效薄层色谱

A. 茨拉脱坎斯 R. E. 卡爱塞 著



上海科学技术出版社

高效薄层色谱

A. 茨拉脱坎斯 著
R. E. 卡爱塞

林珍安 蒋晓声 邬显德 译

上海科学技术出版社

内 容 提 要

本书共有九章,由美国Hunston大学的 A.Zlatkis与西德色谱研究所 R. E. Kaiser 合编。内容由基本原理(第一、二、三章),实验技术(第四、五、六、七章)及定量分析和自动化数据处理等三方面对高效薄层色谱法作了较全面的介绍。着重介绍各种实验条件的选择比较,并列各种实验数据进行比较,书末还附有计算机程序以供参考。

本书可供化学、化工、石油、生化、环保、药物以及临床医学等广泛领域中从事分析研究及生产上分析的科技人员参考。

高 效 薄 层 色 谱

A 茨拉脱坎斯 著
R. E. 卡爱塞

林珍安 蒋晓声 邬显德 译

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 上海新华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 6.375 字数 140,000

1984年5月第1版 1984年5月第1次印刷

印数: 1—7,000

统一书号: 13119·1132 定价: (科五)0.86元

译 序

高效薄层色谱除了具有高效、快速、试样不受沸点、热稳定性限制的优点外,还具有选择操作条件灵活的独特优点。它能与高效液相色谱相互补充成为各类化合物分离、分析的有效工具,不能作为高效液相色谱条件选择的预初试验。近年来高效薄层色谱仪器商品化,更促进了它在定量方面的发展,可以预料它将在综合分析中占有一定的地位,越来越多地用于科研和常规分析中。本书不仅对初学者可以作为入门的向导,而且对已从事高效薄层色谱工作的同志也具有一定的参考和实用价值。国内近年来越来越多的人从事高效薄层色谱工作,但还没有这方面的专著译文。为了更有利于科技交流,我们翻译出版这本著作。但由于水平有限,错误是难免的,希读者指正。

本书承蒙林莫棣校阅,特此致谢。

译 者

1983年11月

目 录

译序

序言和导论	1
专用词说明	8
第一章 薄层色谱(TLC)的理论浅说(R. E. Kaiser)	9
一、 R_f 值和 k 值	9
二、真实 R_f 值	12
三、在高效薄层色谱 HPTLC 中流动函数	13
四、在环形 HPTLC 中 R_f 值作为迁移距离的函数	20
五、环形 HPTLC R_f 值和线形真实 R_f 值之间关系	21
六、在 HPTLC 中分离容量和分离效率	23
七、在 TLC 中塔板高和分离数	26
八、分离度、选择性、分离容量	29
第二章 在线形和环形 TLC 中的分离数(J. Blome)	34
一、起始峰的宽度 b_0	34
二、线形 TLC 中分离数的计算	35
三、空间扩散模型	37
四、环形 TLC 中分离数的测定	39
五、关键性问题	44
第三章 环形展开技术的优点、缺点和局限性 (J. Blome)	46
一、回顾	46

二、	环形展开技术的必要条件	47
三、	环形色谱操作技术	48
四、	线形 TLC 和环形 TLC 方法的比较	56
第四章	U-室 (R. E. Kaiser)	67
第五章	HPTLC 中点样技术 (R. E. Kaiser)	76
一、	点样体积	77
二、	毫微克级点样量的装置	79
三、	在湿薄层上点样	82
第六章	高效薄层色谱: 展开, 数据和结果 (H. Halpaap, J. Rippahn)	86
一、	引言	86
二、	预涂 HPTLC 板的展开	87
三、	HPTLC 板的色谱效率	93
四、	色谱的特征	98
五、	HPTLC 的优点	109
第七章	薄层色谱分离的重现性研究 (D. Jänchen)	118
一、	实验	122
二、	用展开溶剂组分以外的物质改善固定相	123
三、	展开剂的组分对预处理薄层的影响	125
四、	V_0 的规则: 即干燥薄层对溶剂的预吸附	127
五、	TLC-HPLC 转换: 兼容实验的探讨; 通过 气相平衡能比得上液相平衡吗?	130
第八章	定量“高效薄层色谱”-HPTLC 的潜力和经验 (U. B. Hezel)	134
一、	绪言	134
二、	点样技术	138

三、HPTLC 测定中的光度测量操作法	142
四、重现性	152
五、定性的初步试验	154
六、实例	154
七、用于 HPTLC 色谱的光度测定仪器的要求	163
第九章 定量薄层色谱中一种新的高效薄层的应用	
(J. Rippahn, H. Halpaap)	172
附录	190
R_f , OR_f 和 k 值的相互转换关系	190
线性回归曲线的 HP-65 计算机程序	191

序言和导论

本书的出版,正是许多同行积极从事分析研究的工作,而且将薄层色谱看作是一种比较不重要的分析手段的时候。另外相当多的科学家把他们的精力集中在 HPLC 问题上。HPLC 称为高压液体色谱法,即高效液体色谱方法。一般分离柱——很难在最佳条件下操作。样品组分在柱体上的不可逆吸附,往往限制了其应用的普遍性。用 TLC 方法可以避免 HPLC 的许多缺点。

本书不是想怀疑 HPLC。的确,对应用 HPLC 的人来说它是具有意义的。现在可以提供一种优良,快速,廉价且足够精密的 HPLC 预试技术,它能为某些分析问题选择方法。该技术被称为 HPTLC——高效薄层色谱,同时作者也充分意识到该符号的含意。

下列表征表格指出 HPTLC 的潜力:

分离容量: 一次试验中最多可将四十种物质完全分离。

分离效率: 每分钟可分离五个以上组分(平均时间)。

分析能力: 1. HPTLC 作为 HPLC 的预试技术: 分析一个样品或一组物质。

2. HPTLC 作为常规技术: 用微量环形技术在一次单一试验中最多能分析十二个样品; 用常量环形技术最多可分析八个样品, 用线形技术最多可分析四十个样品。用连续流动方法能成功地分析十个以上样品。

定性分析: R_f 值接近 0.5 范围内, 当应用环形技术(U-室 CAMAG)时, 真实 R_f 值的相对标准偏差为 $\pm 1\%$ 。

定量分析: 在毫微克级范围内应用线形技术的相对标准偏差为 $\pm 2.3\%$ 或更小。100×100 mm 板的环形技术的相对标准偏差为 $\pm 1.5\sim\pm 1\%$ 或小于这个值。

在定性分析中 R_f 值范围: 在环形 TLCU 室中, 控制移动相的流动和了解气相的组成。 $R_{f\text{ 真实}}$ 从 0.01~1.00。

在定量分析中 R_f 值范围: R_f 从 0.5~0.7, 比率为 1:10,000。这个方法具有在毫微微克级的操作能力。

点样量: 在 100 毫微升范围中的精确度: 没有记忆效应和系统误差的情况下, 湿板上点样时精度为所用体积的 $\pm 1\%$ 。

数据的转换: 当应用多组分移动相于环形连续流动方法时, 从 HPTLC 转换到 HPLC 也是可能的。

时间: 每次分析时间可短到 120 秒钟。

HPTLC 取决于一些可变因素的综合作用, 它包括:

1. 比最好的 HPLC 分离材料还好的一种具有最佳分离能力的涂层材料。

2. 输送移动相的新方法。

3. 新的铺薄层方法。

4. 有显著改进的点样法。

5. 能取得充分数据和处理的系统。

在书里讨论了这样一个完全系统和程序。应该知道, 因为分析方法的逐步改进, 自从 E. Stahl 开辟工作以来, 它已成为一种有力的工具。至今所获得的成果以及新方法的展望, 足以将这项技术称为第二代薄层色谱。然而最后的评价还将留给应用这新方法的人们。

尽管我们希望用几个新方法的说明来纠正某些偏见, 但

本书不偏重于理论。当“相”的条件为最佳时,我们将断言在 5×5 cm 板上于 150 秒内能得到具有很高精度的真实 R_f 值。而真实 R_f 值能直接转换为色谱上更有用的容量因子 $k = t_s/t_m$ 。即使我们所指吸附色谱也能实现转换,这里通常是用不同极性的有机溶剂混合物淋洗。这也证明目前 TLC 中提出板的高度是很有意义的。精确地测定基本的色谱数据,例如不容易测到的相比率之类的数据是可能的和有用的。本书将详细叙述 HPTLC 应用于定量分析。

在 Ute, Hezel, J. Blome, D. Jaenchen; H. Halpaap, J. Rippahn 和 R. E. Kaiser 紧密的合作中 HPTLC 得到了发展。色谱研究所的 J. Bolme 首先进行这项研究工作,并证实了环形 TLC 的主要优点, L. V. Andreev 指出超薄层 TLC 涂层的效率, F. Eisenbeiss 制备了没有粘结剂的 5μ 板,这种板能在 13 秒钟内分离出 10 种染料^[1], D. Jaenchen 将新室的样机,给样系统和带有 CAMAG 给样系统的附件结合起来,制造成一种在技术上有用的工具。H. Halpaap 制备一种通用的 HPTLC 板,此板仅被本书的作者使用。在这次写作时,这种除了基于吸附分离以外应用的板是买不到的。

J. Blome 在他的论文“环形展开技术的优点、范围和缺点”中,对最近 150 年内薄层色谱方面进行了评述,在较早时期已认识到环形技术优于线形技术。在那个色谱方法被恢复和承认之前,它的命运仍似乎如此,这些先前获得的知识必湮没无闻。除了在以后要讨论的 F. Eisenbeiss 所做的工作以外,目前已能做到的缩短分析时间这件事已不是什么新颖的成就。同样在连续流动的移动相的 TLC 中控制点样量也已早有其他人应用过。

可靠、快速和廉价的分析数据是需要的,假使数据再精确些,或提供一个可以运算的数据的基准,问题将更容易解决。误差的最终来源将是对数据解释上的错误。

J. Goldman 和 R. R. Goodall 最近报告在 60 秒之内迁移距离 20 mm 的 TLC 分离技术^[2~8, 1969~1973]。1967 年 E. Stahl 讨论了分析时间的缩短作为涂层材料粒子大小的一个函数^[9]。H. Halpaap 是首先研究者之一,在他的论文“Erzielung von reproduzierbaren, Trennungen durch Verwendung standartisierter Sorbentien in definierten Systemen”^[10, 1973]中,研究了不同颗粒大小对展开时间、 R_f 值和板高的影响。L. V. Andreev 在他叙述到用微量薄层色谱快速分离时,已相当注意我们今天所谓的 HPTLC。尽管在目前的文献中能找到的数据不象当时在捷克 Novaky CSSR 在 1973 年会议中给人那样深刻的印象。这次会议的结果在当时实在是值得注意的^[11]。

可以从不同观点来观察 HPTLC 的潜在能力和范围,而且各方面都着重于新的、最佳的板的应用。由于常规的点样量抵消了新的涂层材料的优异分离能力,因此连续的常规技术将导致意想不到的结果,主要为 HPTLC 板展开的新环形分离室将给出令人信服的结果:在几秒钟的时间内能获得准确的数据,TLC 板的大小可减小 60%,仅需 1/1000 的移动相,同时分析时间可减少到十分之一。与通常的 TLC 比较,精确度能改善 10 倍。基本上这些就是所谓 HPTLC 的概念,这个方法将适用于那些目前所用的 TLC 或者这个领域里的新方法。用 HPLC 难以解决的问题,而 HPTLC 却可能提供了解决的可能性。

当只要求适中的精确度和重现性时,HPTLC 并不需要

贵重的仪器。在这种情况下, HPTLC 几乎在任何地方都是可以进行的。所有必需的工具, 包括化学品均能方便地取得。

本书第一章简短地介绍了 TLC 理论。然后 J. Blome 叙述了环形展开技术的理论和实践。再下面一章讨论了 U-室。除了精确测定真实 R_f 值外, 定性 HPTLC 可用于常规分析以及作为 HPLC 方法的快速预试技术。连续流动微量 TLC 是这个方法的另一个重要方面。本书第一部分最后一节介绍了 HPTLC 方法中的标准点样技术。由于这些都是精确度和定量数据的基础, 作者还要在以下章节中叙述。Ute Hezel 所著 HPTLC 定量中的潜力和经验是一篇很严密的论文。通过定量数据的质量和这些方法的实用性显示出她在环形微量 TLC 方面的卓越工作成就。

D. Jaenchen 在他的“TLC 重现性的考察”一文中强调最后的成果, 这些虽然都很重要, 却还没有发表, 例如吸附 TLC 的相对湿度问题和 TLC 分布中相似效应问题。

另一篇论文“在定量 TLC 中新高效薄层的应用”是由 J. Rippahn 和 H. Halpaap 写的。在一个最佳 TLC 板展开的条件下作者筛选了许多材料, 它就是 HPTLC 重要的辅助材料。不恰当地应用, 例如点 1 毫米大小的斑点——这种板的效能就象普通的材料一样。通过小型化和其它技术, 在 TLC 中可以容易地实现气相、液相和固相的物理和物理化学条件的调节和控制。假使条件选择正确, 就能获得很好的结果。

本书以一套表格结束, 它包括了 H. Halpaap 的新数据, 这套详细的数据表示各种移动相对硅胶的极性序列。(以前文献中所列表格有错误。)

本书作者认为 HPTLC 作为一种新的具有竞争能力的分

析方法是有可能解答复杂的分离课题。编者相信这些研究工作对读者将会有所收益。

A. 茨拉脱坎斯

R. E. 卡爱塞

1976年11月1日

参 考 文 献

[1] F. Eisenbeiss-Darmstadt, private communication; very narrow silica gel 60, approximately $5\ \mu\text{m}$, layer without binder, mechanically unstable, but highly permeable. Public experiment during a HPLC-seminar at the Institute for Chromatography, Bad Dürkheim, 1973. Separation number higher than 20, migration distance 20 mm migration time 13 second, 10 components, completely separated. Layer permeability strongly increased after two years of storage, stable sharpness of separation.

[2] J. Goldman and R. R. Goodall, *J. Chromatog.* 32 (1968) 24.

[3] J. Goldman and R. R. Goodall, *J. Chromatog.* 40 (1969) 345.

[4] J. Goldman and R. R. Goodall, *J. Chromatog.* 47(1970) 386.

[5] J. Goldman and R. R. Goodall, *J. Chromatog.* 71(1972) 297.

[6] J. Goldman and R. R. Goodall, *J. Chromatog.* 73 (1972) 161.

[7] J. Goldman and R. R. Goodall, *J. Chromatog.* 78 (1973) 7.

[8] J. Goldman and R. R. Goodall, *J. Chromatog.* 78 (1973) 153.

[9] E. Stahl, *Z. f. Analytische Chemie* 236 (1968) 294~310.

[10] H. Halpaap, *J. Chromatog.* 78(1973)77~78

[11] L. V. Andreev, ref. in *Chemical Abstr.* 81 (1974) 9487u
L. V. Andreev. ref. in *Chemical Abstr.* 78 (1973) 4069k Discussions in a conference during the Bratislava-Chromatography meeting fall, 1973, in Novaky.

专用词说明

为了帮助读者理解全部章节中所使用的各种专门词,我们作出下列说明。

HPTLC——高效薄板层析色谱。

R_f 也可以写成 R_f 或 R_F 。

用 $RR_f = R_{f_0}$ 标明的数据是用环形 TLC 方法得到的。

薄板 TLC 和线形 TLC 是同义语,并和环形 TLC 有区别。

在这本书中所用的符号是采用盖斯著的“Die Parameter der Dc” (TLC 的参数)。净保留时间 t_r 和死时间 t_m 是用来强调与洗提方法有关的主要理论关系。考虑到这些时间数值时,我们必须考虑到这些时间值意味着迁移距离,无疑的,他们是相对迁移距离。有关色谱数据的所有时间是用相对值来表示的。

第一章 薄层色谱(TLC)的理论浅说

R. E. Kaiser

这部分将叙述一些基本公式的实际应用,有助于常规 HPTLC 最佳条件的选择,以及把数据从 HPTLC 转换到 HPLC。这虽然已经超越了 Geiss^[1]的工作范围,但仍不代表 TLC 完整的理论论述。

一、 R_f 值和 k 值

R_f 值定义为迁移距离的比率。

$$R_f = \frac{z_{\text{物质}}}{z_{\text{移动相}}} \quad (1-1)$$

当溶剂前沿的精确位置($z_{\text{移动相}}$)不能确定时,系统误差将影响 TLC 的这一定性基本指标。移动相的损失或已经存在于薄层中的移动相组分的堆积也影响 R_f 值。在第一种情况下 R_f 值系统地变得太大,在第二种情况下,变得太小。这些 R_f 值都不能用以计算 k 值。

而当满足以下条件时,可以得到真实的 R_f 值:

- 沿分离轨迹无梯度变化;
- 移动相无损失;
- 前沿正确位置能计算或测定而无误差;
- 排除了由于预蒸发引起的任何影响。

取得以上条件的实验手段是一个技术问题在本章不予介绍。

符号 k 为物质的容量因子, 定义为: 在固定相中保留时间与在移动相中保留时间之比。

$$k = \frac{t_s}{t_m} \quad (1-2)$$

这是物质定性色谱最简单最基本的公式。在 TLC 中, 所有物质都在同一周期 $1 \times t_m$ 中出现。

在洗脱色谱中, 只是在 $1 \times t_m$ 周期之后才能测定。具有容量因子 k 的物质将在 $k \times t_m$ 时间之后流出。

这种简单观察引导出 R_f 和 k 之间的基本关系。

假设物质的 R_f 值为 0.1, 将需 $9 \times t_m$ 的时间才能达到原先溶剂前沿的位置, 也就是说如果我们用连续流动 TLC, 这和洗脱柱色谱基本相同。

于是, 我们可列出公式:

$$R_f = \frac{1}{k+1} \quad (1-3)$$

因为 $k = \frac{t_s}{t_m}$, 我们能推断 $\frac{t_m}{t_{ms}} = R_f = \frac{t_m}{t_m + t_s}$; 此外 $t_{ms} = t_m + t_s$, 即物质保留在固定相和移动相中的总保留时间或总时间。换言之, 物质从原点到前沿时间和在洗脱柱色谱中物质从进样到出口的保留时间是相似的。由于绝对时间值之间的关系是清楚且确定的, 因此应用 k 值是有利的。

然而, 这不能保证数值的正确性, 因为 t_m 和 t_s 与同样的或不同的色谱条件是不相关的。在温度变化的时候, t_s 和 t_m 多半都有变化; 但在大多数情况下, 其方向和幅度不同。在很大程度上, k 是“相”的化学状态的函数。只有当“相”都相同时才能把 HPTLC 数据转换到 HPLO 系统。

封闭(吸附)柱必须使其色谱活性表面的化学状态达到稳定。对敞开式薄层系统需要同样的平衡条件。当移动相流动