

高效薄层层析简介

安登魁

A Brief Introduction to High Performance Thin Layer Chromatography

An Dengkui

提 要

高效薄层层析 (HPTLC) 是由薄层层析 (TLC) 进一步发展而来的, 是 TLC 的第二代产物。本文仅就此法近二、三年的发展途径 (HPTLC 予制薄板与程序控制多次展开方式 “PMD” 结合) 予以简介。着重介绍 HPTLC 与一般 TLC 予制薄板的效能比较以及 PMD 的原理、效能与装置, 并兼提信息量在评价层析系统上的应用。

薄层层析 (TLC) 与其他层析方法一样也在向着自动化、标准化、高效化以及计算化等方向发展。

本文仅对其高效化予以扼要简介, 并兼提一下信息量在评价层析系统上的初步应用。

一、高效薄层层析 [1] [2] [3] [4]

高效薄层层析 (High Performance TLC; HPTLC) 是在七十年代中期由一般 TLC 发展形成的。

填料的革新已使经典液谱向高效液谱方向发展; 同样, 吸附剂的革新也使一般 TLC 向着 HPTLC 发展。

所谓“高效”是指层析柱或层析板的分离效能, 如用理论塔板数 (N) 表示, 应在 5,000 左右, 甚至 5,000 以上。例如, 由硅胶 60 制作的 HPTLC 予制薄板, 其分离效能, 即塔板高度 (H) 可达 $12\mu\text{m}$ (硅胶 60 是因其微孔大小仅为 60\AA , 故以硅胶 60 称之)。

HPTLC 予制薄板是怎样设计出来的呢?

近几年来, 由于对吸附剂粒度大小与薄层厚度之间、薄层层析展开距离与理论塔板高度之间的关系有了进一步认识与理解, 促进了 HPTLC 予制薄板的诞生。

1977 年, Halpaap 与 Rippahhn 为此进行了比较广泛的研究。他们利用三种不同颜色的染料为试验对象, 在所用硅胶、粘合剂、添加的指示剂、薄板铺制方法、展开溶剂、展开容器、容器饱和程度、温度以及点样方式与工具完全相同的条件下, 比较系统地考察了不同

粒度的吸附剂、不同薄层厚度的薄板、不同展开距离、不同点样量与分离效能之间的关系。展开后均用薄层扫描仪测量,并用电子计算机处理所得的3240个数据,计算获得其分离效能理论塔板高度(H)数值。据此,得出以下三点结论:

1. 如欲获得最佳分离效能,即塔板高度(H)数值小,应该根据吸附粒度的大小,选择不同的展开距离。粒度较小时,则展开距离宜小;粒度较大时,则展开距离可长些。

2. 理论塔板高度(H)受点样量的影响特别大,点样量越小,分离效能越高,也就是板高(H)数值越小,越有利于分离。

3. 薄层厚度并不是越薄越好,薄层过薄反而会使分离效能变差。

HPTLC 预制薄板就是根据上述实验结果,用硅胶60为吸附剂,如同一般 TLC 预制板一样,控制制作条件而成的。

由 HPTLC 预制板与一般TLC预制板的比较(参见图 I)可见:

一般TLC的板高(H)为 $30\mu\text{m}$, 而 HPTLC 的板高(H)仅为 $12\mu\text{m}$ 。这样,后者比前者在分离效能上提高了60%,一般TLC需展开 10cm 时所达到的最佳分离效能,而 HPTLC 只需展开 3—7 cm 即可达到。

HPTLC 采用可见、紫外光进行检测时的检出范围可达 $100\text{pg}\sim 100\text{ng}$; 如能产生萤

光,检出限度可低至 10pg 。精密度较高。根据浓度,标准偏差为 $1\sim 10\%$ 。

薄层层析的主要缺点之一就是薄板的活度较柱层析更难于控制使之稳定。为了使 HPTLC 预制薄板保持一定活度,可以采取事先浸渍适当试剂的办法。这样做,既可使 HPTLC 薄板活度稳定,同时又可使 HPTLC 具有更广泛的适应性。

薄板浸渍的方法十分简单。取欲浸渍的试剂适量,一般多为不挥发性物质,溶于易挥发溶剂中做成溶液,将 HPTLC 预制薄板垂直地或水平地浸入该溶液中,然后取出,沥干,挥去可挥发性组份,即可。经过这样处理的薄板,在多数情况下,不再受周围湿度的影响。

常用的浸渍试剂既有亲水性试剂,如:甲酰胺、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、乙二醇、不同分子量的聚乙二醇、乙苯氧基乙醇以及各种缓冲液等,也有亲脂性试剂,如:液体石蜡、十一烷、十四烷、矿物油、硅油或油酸乙酯等(组成反相层析系统)。此外,也有利用浸渍试剂形成络合物或加成物的。例如:用硝酸银浸渍,其 Ag^+ 可与双键的 π 电子结合;用硼酸、硼砂、亚砷酸钠浸渍,可利用形成络合物的机理用于邻二羟基异构体的分离;用亚硫酸氢钠浸渍,则可与含羰基的化合物形成加成物;经三硝基苯或苦味酸浸渍的可利用络合反应以分离多环化合物。

除了利用各种不同的单一试剂进行浸渍以外,也可在同一 HPTLC 预制薄板上用两种不

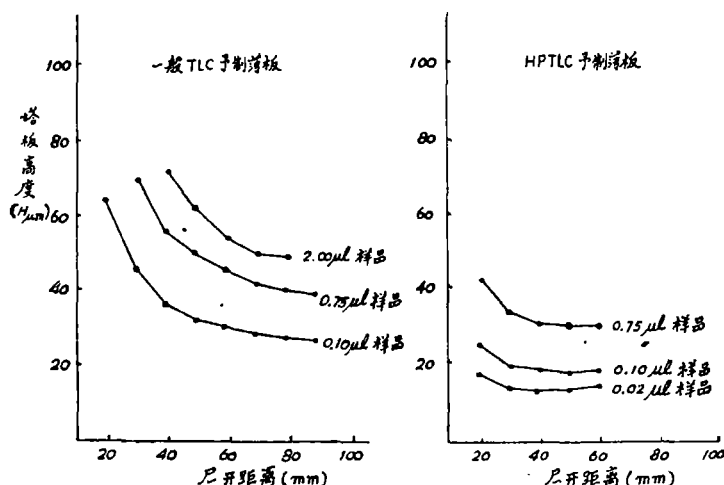


图 I HPTLC 预制薄板与一般TLC预制薄板的效能比较

同的试剂浸渍,以适用于双向展开。

现以两种阿片生物碱(罂粟碱与那可汀)的分离为例,比较一下浸渍 HPTLC 予制薄板与未经浸渍的分离效能(参见图 II)。

1978年,Guiochon 等人^[2]进一步研究认为一般TLC与HPTLC的实验过程的主要不同在于:一般TLC的展开过程是由传质阻力控制着斑点的延伸,因而斑点易于拉长;而HPTLC的展开过程是由分子扩散决定着斑点的直径,因此HPTLC的斑点比较圆整。除非供试物质的扩散系数差异很大,一般,所有斑点的大小比较接近。

同时还指出:HPTLC所用吸附剂粒度的大小,并不一定越细越好。实践证

明:10~20 μm 粒度可以获得更好的效能,而且展开速度较快,价格便宜,只是斑点稍大,但却易于点样和检测。HPTLC对吸附剂的关键要求在于:粒度范围越窄越好。

HPTLC要求点样量少,原点或原始区带要尽量集中。为此,一般多在 μl 以下,即以 nI 体积点样。如点样量过多,则易造成超载而影响分离效果。利用国产的0.1 μl 的微量注射器进行 nI 体积的点样是完全可以的。为了使原点集中,Kaiser等人采用了环炉加热法是值得参考的^[3]。

目前,HPTLC正沿着两个途径发展:其一是采用预制出售的HPTLC薄板,其二是采用程序控制多次展开方式(Programmed Multiple Development; PMD)。两者结合采用,其总分离度可与高效液谱(HPLC)媲美。

二、程序控制多次展开(PMD)

PMD原理依据是展开溶剂前沿通过薄层上的斑点时所发生的斑点再浓集现象(Spot reconcentration)。粗略地说:斑点再浓集的过程就是斑点的“下沿”去赶“上沿”的过程(参见图 III)。

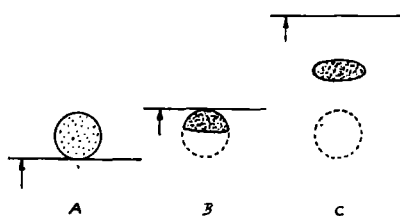


图 III 斑点再浓集示意图

- A 示展开溶剂的前沿恰好展至斑点的下沿
B 示展开溶剂展至斑点的上沿时,斑点的下沿移行了原斑点高度的 R_f 倍
C 示浓集为原斑点高度的 $(1-R_f)$ 倍的斑点继续移行

在一般TLC中斑点的再浓集现象一般只发生一次,因而这种现象往往易被忽略,甚至

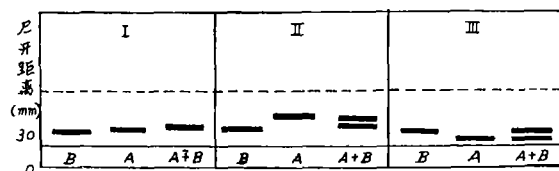


图 II 罂粟碱(A)与那可汀(B)的分离

I、未浸渍薄板;展开剂为石油醚-氯仿(2:8)+氨气

II、用5%液体石蜡的石油醚溶液浸渍;展开剂为甲醇-水(6:4)

III、用20%乙二醇的甲醇液浸渍;展开剂为石油醚-甲醇(9:1)

还会怀疑这种现象是否存在。

采用同样展开溶剂、同一展开方向、同样展开距离的单向多次展开 (Unidimensional Multiple Development; UMD) 的 TLC 中, 斑点的再浓集现象即可反复发生。经单向多次展开 n 次后, 斑点即浓集为原斑点高度的 $(1-R_f)^n$ 倍。单向多次展开的分离效能开始是上升的, 但是, 达到一个最大值后, 即随着展开次数(n)的加多而开始下降 (参见图 IV)。

PMD 也是采用同样展开溶剂、同一展开方向, 但展开距离逐次加大。每次展开之间, 薄层板始终与展开溶剂接触, 利用控制蒸发的方法 (加热或通气流) 使经过展层的薄层板上的溶剂挥干, 随即开始下一次的展开。PMD 的突出特点是能使斑点相互分离的同时, 完成多次展开而分离效能不致降低 (参见图 V), 并确保斑点集中。当然, 斑点的再浓集并不是无限制地浓集下去, 经过一定次数的展开后, 斑点的再浓集与斑点的扩散达到动态平衡时, 即处于稳定状态。

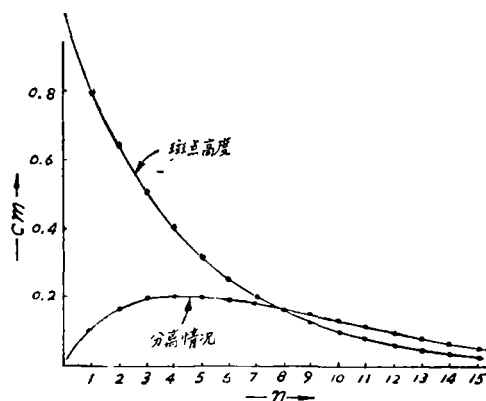


图 IV UMD展开次数与斑点高度、分离情况的关系

一般, 斑点的高度可以浓集至 1—2mm, 但与样品载量及薄板质量密切相关。为此, HPTLC 是采用 PMD 与 HPTLC 预制薄板的结合。

PMD “吹气展开装置” 如图 VII 所示。

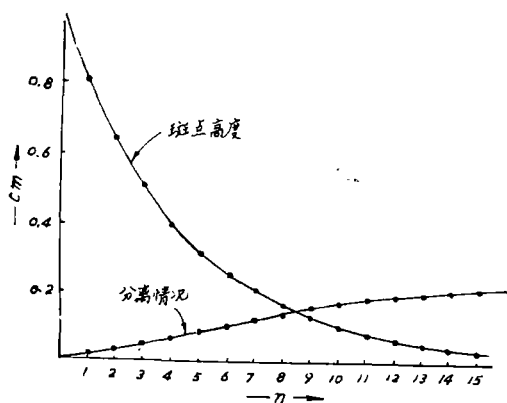


图 V PMD展开次数与斑点高度、分离情况的关系

也可将夹心式展开装置稍加改进, 采用加热或不加热空气流吹风, 使薄层板挥干。

为了进一步说明问题, 有必要介绍一下1977年11月在荷兰阿姆斯特丹举行的关于层析法进展第十二届国际专题讨论会的情况^[3]。会上、除对 HPTLC 方法本身进行了讨论以外, 还提出了若干篇论文涉及到纤克量 (10^{-9} 克) 药物的分析。例如, Finimore 等人从血清中分离出治疗精神病的药物, 并用紫外进行定量测定; Faber 利用 PMD 技术, 通过荧光检测了洋地黄毒甙等药物; Ritter 利用 TLC 扫描仪测定了血浆及尿中 muzolimine

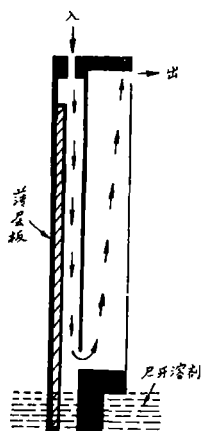


图 VII PMD用吹气展开装置示意图

的含量(先与4-二甲氨基桂皮醛作用后,再测定); Kreuzig 则以高度自动化仪器,利用 HPTLC 分析了短杆菌肽及抗菌素发酵液中的其他组分。通过这些报告和讨论, HPTLC 的优点在很多人脑子里是清楚了,但也有不同的意见。尽管如此,会上一致认为: HPTLC 的发展是值得欢迎的。与一般TLC相比、HPTLC的速度更快,灵敏度更高,成效更大。

三、 信息量在评价层析系统上的应用^{[6][7]}

通常对一种层析系统的评价往往称之为“良好”、“很好”或“较差”等等,缺乏确切的数值指标。最近, De Clercq 利用信息量(Information Content; I)的计算客观地评价多种系统,如与数值分类法(Numerical Taxonomic Technique)结合,也可进行几个系统最佳化结合应用的选取。

根据 Shannon 方程:

$$I = - \sum_{k=1}^m \frac{\gamma_k}{n} \log_2 \left(\frac{\gamma_k}{n} \right)$$

式中: n 为供试药物的数目

m 为将 R_f 值(0.00~0.99)分成为m个组;

γ_k 为第 k 组中供试药物出现的个数。

当利用某一系统对几个药物进行薄层层析,测得其各个药物的 R_f 值后,即可获得上述数据,代入 Shannon 方程进行计算,求得其 I 值。

系统不同,供试药物的层析行为不同,也就是 R_f 值不同,以之计算的 I 值也就不同。

I 值越大,说明该系统对供试药物的分离越好。也就是说,供试药物在m个组中分布均匀。

如果 n 个药物都集中在一个组中,即都集中在第 k 组中,那么 $\gamma_k = n$, $\frac{\gamma_k}{n}$ 就等于 1,

其对数值为 0,则 I 值为 0。说明该系统最不好,未能将供试药物分开,都集中在一个组中了。

由上可见,信息量是描绘与评价层析系统的一种数学尺度。

参 考 文 献

- [1] Zweig G et al: Anal Chem 50(5):50R, 1978
- [2] Guiochon G et al: J Chromatogr Sci 16(4):152, 1978
- [3] Aue W A: J Chromatogr Sci 16(3):128, 1978
- [4] Halpaap H and Rippahn J: Chromatographia, 10(10):613, 1977;
10(11):643, 1977
- [5] Jupille T H: J Am Oil Chem Soc 54(4):179, 1977
- [6] De Clercq H et al: J Pharm Sci 66:1269, 1977
- [7] 清水恒雄等: ボンセキ, 37(1):33, 1978