

# 醫藥用的 CHROMATOGRAPHY

—— 揚 雄 譯自「What's New(No. 228)」

## 〔引言〕

把醫學由主觀的技藝(Subjective art) 變成客觀的科學(Objective Science), Chromatography 的地位可能比任何獨立實驗方法都重要。Chromatography 被普遍地直接應用於代謝疾患、營養和肺機能的研究。如 Steroids、Amino Acids、fatty acids、glucosides 以及體內微量無機物的確認與定量, Chromatography 因其迅速與正確性的可靠已成為診斷學上不可或缺的工具。雖然 Chromatography 利用物性以作成分的分離, 今日不呈色成分之得藉其而分離, Chromatography 之字義容有不妥切處。

現代 Chromatography 的基本原理造端於五十餘年前蘇俄植物學家 Michael Tswett 之用 Petrol ether 抽取綠葉, 再把該抽取液倒入裝有碳酸鈣作吸着劑(Absorbent) 的直柱 (Vertical Column), 如是, Tswett 氏確認綠葉含葉綠素及葉紅素 (Chlorophyll and Carotene) 兩成分。色素被碳酸鈣吸着而滯留其中, 以更多的洗液濾過該 Column, 呈色的各段成分物質依不同速率

移動, 分離成各種特殊顏色的色帶, 稱作 Chromatogram。各成分依上述方法分離後, 尚需用化學或物理的方法更進一步作定性及歸類。

基於 Tswett 氏的原理, 現代 Chromatography 的觀念由於被分析物之種類, 分離方法的不同, 其間實有差異。雖然在混合液及分離技巧上有基本的改良, 各類 Chromatography 僅基於一個共通原理: 即藉成分在兩種物質(或曰, 相(phase)) 的分佈(distribution) 不同, 各成分物質得以分離。兩相之一為靜相(Stationary Phase), 如 Tswett 氏實驗中之 CaCO<sub>3</sub> 是; 另一為動相(Moving Phase), 抽取綠葉中色素之 Petrol ether 濾過相廣大的表面積, 其中成分得以分離, 是為動相。各成分物質依其與靜相的吸着力或反比的速率移動而分離於焉完成。即曰: 受靜相吸着較牢固之成分物質, 移動慢; 如是, 當該抽取液流經此系統, 即分離矣。

依 Chromatography 發生於兩相的概念, 物體固、液、汽三相, 取兩相的組合, Chromatography 分類如下表:

Type of Chromatography	Method of Separation	Moving Phase	Stationary Phase
Liquid-Solid (LSC)	Adsorption	liquid	solid
Liquid-liquid (LLC)	Partition	liquid	liquid on inert supports starch, paper or glass
Gas-Solid (GSC)	Adsorption	gas	solid, as silica gel
Gas-liquid (GLC)	Partition	gas	liquid on inert granules

在液相一固相系統(LSC, 為 Tswett 氏首創。) 動相流經靜相之活性吸着區, 分離作用即告完成。二十世紀三十年代, Binkemley 氏及其同事發現此種系統最適於從苜蓿 (Alfalfa) 分離出抗出血性的維他命 K, (Antihemorrhagic Vitamin K), 雖然最初所得的粗品僅含 0.001% 之微量純品而已。在液相系統之 Chromatography (LLC), 其分離之程序是利用檢體所含之各成分對兩液相之溶解度不同的原理而非吸着作用。例如澱粉、纖維素、玻璃等惰性物質附上一層液體, 可視為靜相, 另一液體或溶液中之檢體則可視為動相。纖維素在操作上常被用為 inert Supporting Material。眾所週知的 Paper Chromatography, 因其

對化學之進展及實用有特殊貢獻, 創設人 Martin Syngde 兩氏同獲 1952 年度 Nobel prize 化學獎。物體液中 Steroids 和 Amino acids 的確定泰辛和 Paper Chromatography; 本法的優點有 (1) 構造備簡單。(2) 對多數的分析都容易操作。

## 薄層層析法

Thin layer Chromatography 為 liquid-liquid System 的一個新奇改進, 乃以玻璃代紙作 Inert Support。本法之優點是分析度之明確並不影響 Paper Chromatography 所具的可靠性。本法對於微如 0.02 μg 檢體的分析特別有用。glucosides、Steroids、alkaloids、lipids、fats



fatty acids, oils, waxes, 及 inorganic Compounds 的分離亦皆採用本法。

## 氣體層析法

早在二次大戰前雖已發明了 Gas-Solid Chromatography (GSC)，因其適用範圍小，檢驗繁雜並且可能發生 Gas-liquid System (即 gas Chromatography)，故未被廣泛使用。gas-liquid Chromatography 雖然是新近發明的，並不被認為是一種新奇方法。不過在分析具有高沸點或低沸點的成分物質時，確是一個呼價很高的技術。其重要性猶如解決疑難問題時，吾人從普遍方法中所採最簡便者。本法通常被廣用於肺機能測驗及麻醉時氣體的分析，法醫學、藥理學上化學物質的分析，Steroids 和 fatty acids 的蒸汽高溫分離，食品飲料的測驗以及生物學上各方面的探討。Gas Chromatography 有很多別名，或稱作 gas Partition Chromatography, Vapor Phase Chromatography, Vapor fractometry, 其基本的操作並無差異。操作原理，是動相的氣體被含有為液體包裹之惰性粒子或矽粘膠 (Silicagel) 的靜相吸着，而引起的一種利用物性的分離。猶如他類型之 Chromatography，由於各成分氣體對靜相和力的不同，混合氣體得以分離。氣體流經 Column 時，其為靜相吸着最牢者，速率最小，比對靜相毫無效應之成分氣體移動慢，故滯留於 Column 的尾端。成分滯留於 Column 後，再用 thermistor 來檢查及測量。thermistor 是一種特別的陶製物，具有很高的 thermal Coefficient。周圍氣體導熱度的不同，溫度即微呈變化，對電阻就引起明顯的變異。導熱度因各種被測氣體而異，其在 thermistor 之導電度亦相應各有區別。此種相異的電阻再用連於高靈敏度的電位計上的惠斯登電橋來測量。每一個被測定的成分都有一特殊曲線或稱作 Chromatogram，與已知的標準曲線相比，即可完全確認。

## 呼吸氣體的分析

Gas-liquid Chromatography 可以代替  $N_2$ -Analyzer 或由 Scholander, Haldane 兩氏所創的準確而繁複的方法來分析呼吸的氣體。選用適當的 Column 及足量速率的 Carrier Gas，二氧化碳、氧、氮的分離在七分鐘內完成且不失其準確性；使用舊法，便需三分十鐘。本法的缺點是不能分離氮和氧的混合氣體。(此因無適當之 Column 可取也

) 因為氮在吾人肺部或血液中之含量甚微並且大概都有定量，故對每一種 Reference gas 或 Column System 都應加上一個 Correction factor。氮之含量雖微 (0.94%)，在空氣中却有其重要性。

## 生物體液氣體之測定

Gas-fluid Chromatography 對生物體液 (尤其是血液) 中氣體之測定比 Van Slyke manometric Method 較簡便，因後者需要高度訓練的技術人員的操作。Lukas 及 Ayres 兩氏和 GLC 及 Van Slyke Method 測定血液氧含量的結果作一比較，發現前者能精確地測到 0.03ml 的檢體。二氏並且發現 GLC 比用 Spectrophotometric Method 的結果精確，GLC 不受制於 inactive form 的 Hemoglobin，該物質與氧結合，Spectrophotometric 的分析就發生了誤差。由生物體液抽取氣體遇到了一些困難，有人提出真空抽取法，取代法或 "Stripping" 法 (即不斷地通氣的氣流入 reaction mixture) 等各式各樣的建議。倫敦的一個工業團體 (Scientific Industries International) 提出一個可能解決困難的辦法，即採用一種稱作 Natelson microgasometer 能自動控制的機器，從 0.03ml 檢體準確地定量二氧化碳、氮、氧和麻醉氣體。

## [麻醉藥氣體的分析]

在施行麻醉過程中，基於慣例，吾人亟需分析呼吸入之有機物蒸汽的混合氣體。雖然由 GLC 所作的分析並非連續性者，但因其迅捷、準確、方便，用來分析麻醉藥混合氣體、肺臟換氣程度却很有用。氧、二氧化碳、二氧化氮混合氣體在 2.5 分鐘內可以分離就緒。若反覆採用特別的 Column，該檢體的分離僅費 1 分鐘。若檢體內再混入 Propane ether, fluothane, 6 種成分氣體的分離便需 4.5 分鐘。Haladay 氏曾記述一個體格健碩六十歲的男病人，接受剖腹手術時死亡，沒有時間決定他的呼吸程度和呼吸率 (也就是肺的換氣程度) 的不準確為其致死原因之一。GLC 雖不能連續地測驗呼吸氣體，但可以縮短分析所需的時間，完善地提出週期性的警告，自動地決定肺臟換氣程度及麻醉深度。若在手術過程中，用 Chromatography 不斷提出對麻醉程度的警告，或許可能拯救病人的生命。

## [法醫學和藥理學對 GLC 的應用]

在毒物學和藥理學上吾人用 Paper Chromat-



ography及Gas Chromatography檢查血液或尿中之酒精，毒物及麻醉藥品。Maricq和Molle 兩氏就曾用GLC檢驗血及尿中所含之酒精。Street和Niyogi兩氏混合應用Paper Chromatography及ionotophoresis (離子透析法)把barbiturate、Salicylate、Acetophenetidin三種混合物分離。Parker氏用GLC從血液，尿和組織分離確定了23種Barbituric Acid的衍生物。僅一類的barbiturate即有37種之多，對其定性的工作當然繁雜不堪；所幸，其中僅六、七種為常用藥品而已。為測定GLC是否適用於檢查生體中之物質，驗屍官曾用本法對16具屍體作深入的檢查，都能找出一種或多種barbiturates的存在。所有含1至5  $\mu\text{g}$  的檢體其被吸附時間和標準樣品被吸附的時間作一比較，都能準確地測出其含量。Machata氏記述一病歷：一個素患健忘症的34歲病人到精神科診所檢查求治。當他服下抗生素（為改善Pulmonary Condition）及Paraldehyde後，竟意外地死了，驗屍時發現肺不正常，並且在肺、腦、胃中有Paraldehyde之強烈臭味。上述三器官經過去血，並抽取其中藥物，再經過Chromatography的分析定性，知道該患者死於Paraldehyde的中毒，而非死於不良的Pulmonary Condition。

### 〔膽汁中脂肪酸之確定〕

Blomstrand和Ekdahl兩氏研究健康及病變的fatty acids時，採用Chromatography分析了人類膽汁中fatty acid的類型。發現純Lecithin含Palmitic、Stearic、oleic、linoleic和Arachidonic acids。對特殊病例試作檢查：沒有患胆病及病情單純或複雜的胆結石所有病人中，其胆汁內fatty acids的類型並無甚差異。有這樣兩個病人，一個患膽結石致膽囊管閉塞；一個由於總輸膽管和膽囊管的上部周圍生了癌，致患White bile。兩人膽汁內fatty acid的含量多了58%至35%，並且各fatty Acids間的比值都起了變化，此或由於膽囊管閉塞前，肝臟之脂類代謝作用受損所致。

### 〔動脈粥狀硬化與脂肪酸的關係〕

利用GLC，很多人正在探索fatty acids與Atherosclerosis的關係。Botcher氏從屍體取28條動脈加以檢查，發現其在lipid代謝方面並無大的障礙。依肉眼對動脈壁的觀察，把此28條動脈分作四組，且用GLC分析其中之Phospholipid、free fatty acids、Cholesterol esters及glycerides。粥狀硬化的動脈有顯著的變異：Cholesterol-ester fatty Acid增加29%到46%並且和其粥狀硬化的程度有關；但飽和的脂肪酸減少了31—17%；Mono-unsaturated acids相對地並無變化。Lawrie氏把18個局部缺血心臟病患者的血清內三種脂類重要成分的脂肪酸與16個健康者的脂肪酸作一比較，並未發現兩者之間有何差別。Botcher氏比較血清和粥狀硬化動脈組織內脂肪酸的濃度，發現兩者大致相同，僅粥狀硬化動脈組織內oleic acid的濃度較高而已。雖然對動脈粥狀硬化的研究尚

無定論，Sinclair氏提出一個頗可置信的假說。他指出，在工業進步的國家，食物短缺不飽和脂肪酸，且在食品製造過程中，可能導入unnatural fats。吾人可想像食品內該脂肪起了如是之變化導致血液中的Cholesterol，飽和及不飽和脂肪酸的酯化作用。此不正常形成的脂類對動脈粥狀硬化多少有關係，恰似血液中Phospholipids引起了酯化促進血液凝固，並使冠狀動脈堵塞的機會增加一樣。

### 〔工業上的應用〕

食品、飲料和化粧品工業已採用GLC，牛奶、飲料、香料等產品內和其滋味、香味或氣味有關的揮發性物質。雖然食物的營養價值與其味道並無關係，但滋味和香味之真確直接影響食品之銷路。食品及飲料商洞悉此理，正致力於與這道有關成分的追尋，使其成品更受大眾歡迎。由Flavor of Swiss和Blue Cheese的成分分析，其功效並且可以複製，產生了品質均一的成品。縱然牛油或其他食品中添加了1%濃度的附加物，吾人猶能檢驗其存在。GLC和Scintillation Counter并用，能夠測出食品中揮發物質（如Sr<sup>90</sup>）的放射強度。計算咖啡、茶中香味物質或成品混合之程序現在都用gas Chromatography來測定。釀酒工業採用gas Chromatography來測定其酒精濃度，定性各成分及區別產品的品質。香料工業所遇到的困難與研究人體時所遭受的困難初無二致，如何建立微量物質（如thio-ether）與人體有關的關係一樣，如從香料分離出能永保其香氣的微量成分是非常重要的。雖然欲從人體中或香料中尋出這種微量成份的真確性質似乎不太可能。利用GLC，吾人已知，某些營養素對人體之重要性猶如iodine和Citral對真質香料產品之不可缺少。

### 〔分類學上之應用〕

為了研究不同地理區域上的同種動物，其組織的檢體，都經Paper Chromatography或electrophoresis而加以分析。分析的結果顯示，同一種動物之檢體有一定的Chromatographic pattern，且與其體型、年齡無關。不同種的動物就有一定且易於識別的差異。一般言之，分類學上流源越接近的兩個或兩個以上的種，其Chromatogram越相近。總之，Chromatography不僅對分類學有用，在地理分佈學的遺傳進化學的研究亦有用處。由是，利用生物化學的方法，種系間之關係已漸趨明朗。

### 〔結語〕

雖然Chromatography有各式各樣的應用。如上述，本文僅就其在醫藥或應用科學上某一部來證明它的準確性。理論言之，大部分的物質皆能由Chromatography分離，如果再和Nuclear Magnetic resonator、光譜儀或Mass Spectrograph聯合使用，Column內檢體所含之各成分皆能被自動地分析。再與Magnetic tape recorder并用，就成了一個自動指示計。如是，gas Chromatography極像臨床或研究室內一部接合的儀器，自動地提出分析報告，對患者的診斷為一種不或缺的利器。