



浙江大学

ZheJiang University

薄层色谱



浙江大学

ZheJiang University

一、实验目的

- 1、了解薄层色谱法分离有机物的方法。
- 2、掌握薄层色谱法的实验操作技术。



二、基本原理

- 薄层色谱法是将固定相吸附剂均匀地涂在玻璃板上制成薄层板，试样中的各组分在固定相和作为展开剂的流动相之间不断地发生溶解、吸附、再溶解、再吸附的分配过程。不同物质上升的距离不同而形成彼此分开的斑点从而达到分离。薄层色谱可分为吸附薄层色谱（以硅胶氧化铝等吸附剂）、分配薄层色谱（用硅藻土和纤维素等）和离子交换薄层色谱。



- 薄层色谱是近年来发展起来的一种微量、简单并能快速分离和定性分析少量物质的色谱法，它兼备了柱色谱和纸色谱的优点。适用于少量样品（几到几十微克，甚至 $0.01\ \mu\text{g}$ ）的分离；若在制作薄层板时，把吸附层加厚，将样品点成一条线，则可分离多达 500mg 的样品。因此又可用来精制样品。故此法特别适用于挥发性较小或在较高温度易发生变化而不能用气相色谱分析的物质。此外，在进行化学反应时，常利用薄层色谱观察原料斑点的逐步消失来判断反应是否完成。



基本操作过程

- (1) 根据被分离物质的性质选择吸附剂，最常用的是硅胶和氧化铝，其次是纤维素、硅藻土、聚酰胺等；
- (2) 薄层板的制备；
- (3) 点样；
- (4) 展开；
- (5) 显色， R_f 值计算。



三、具体操作

- 1、选择吸附剂
 - (1) 硅胶：微酸性极性固定相，适用于酸性、中性物质分离（可制备成酸性不同或碱性硅胶扩大使用范围）。
 - (2) 氧化铝：碱性极性固定相，适用于碱性、中性物质分离（可制备成中性或酸性氧化铝扩大使用范围）。
 - (3) 纤维素：含有羟基的极性固定相，适用于分类亲水性物质。
 - (4) 聚酰胺：含有酰胺基极性固定相，适用于酚类、醇类化合物的分离。



浙江大学

ZheJiang University

最常用的吸附剂是硅胶G（含有煨石膏作黏合剂）、硅胶H（不黏合剂或其他添加剂）、硅胶HF₂₅₄（含有荧光剂，可在254nm 紫外光下观察）、硅胶GF₂₅₄（含有煨石膏和荧光剂），其次有硅藻土、硅藻土G、氧化铝、氧化铝G、微晶纤维素、微晶纤维素F₂₅₄等。



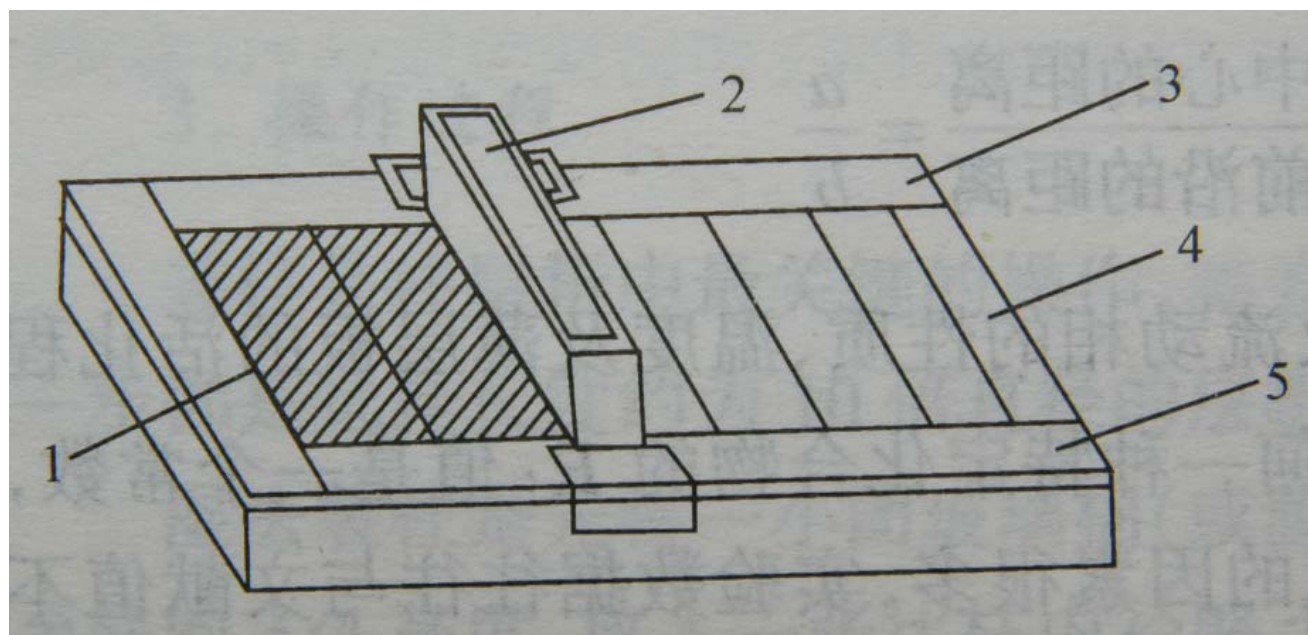
吸附剂颗粒大小,一般要求直径为 $10 \sim 40 \mu\text{m}$ 。薄层涂布,一般可分无粘合剂和含粘合剂两种;前者系将固定相直接涂布于玻璃板上,后者系在固定相中加入一定量的粘合剂,一般常用 $10 \sim 15\%$ 煨石膏($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 在 140°C 烘4小时),混匀后加水适量使用,或用羧甲基纤维素钠水溶液($0.5 \sim 1.0\%$)适量调成糊状,均匀涂布于玻璃板上。



• 2、薄板的制备

薄层板的好坏将决定分离的效果。薄层板应该尽量均匀且厚薄一致。

(1) 使用铺板器：将洁净干燥的玻璃板置于铺板器中间，在铺板槽中倒入糊状物，自左向右推，将糊状物均匀地涂在玻璃板上。见下图：



1、吸附剂薄层，2、涂布槽，3、玻璃夹板，4、玻璃板，5、玻璃夹板



- (2) 倾注法：将调成糊状物倒在玻璃板上，或用角匙舀到玻璃板上，再用玻璃棒或角匙铺平并用手捏住玻璃板一角，轻轻碰敲桌面，使薄层表面**均匀**并除去糊状物中的气泡。



- 3、薄层板的活化

将涂好的薄层板水平放置于室温下晾干后（应避免阳光直射，以防开裂），放在烘箱内加热活化。硅胶板需在烘箱内慢慢升温至105-110度后保温30分钟；氧化铝板需在200-220度烘4小时，可得到活性I级的薄板，吸附层的活性随含水量的降低而增加。活化好的薄板应保存在干燥器中备用。



• 4、点样

将待测样品溶在极性尽可能低的溶剂中配成1%的溶液。用一支平口的细毛细管蘸取少量样品溶液点在薄板上，点样基线距底边1-2cm，样点直径在1-1.5mm之间，点间距离可视斑点扩散情况以不影响检出为宜，距边缘在5mm（以免边缘效应影响分离）。点样时必须注意勿损伤薄层表面。正常斑点应是圆形或椭圆形色斑。



- **注意:**
- (1) 点样量对分离效果影响很大, 而且还与显色剂灵敏度、吸附剂类型有关。样品量少, 展开后斑点不清晰, 影响观察; 样品量过多, 展开后拖尾严重, 易造成 R_f 值接近的斑点相连。
- (2) 样品浓度过稀, 可在同一斑点处重复多次点样 (应让溶剂挥发后再点)。
- (3) 点样后一定要等溶剂挥发后才能把薄板放入层析缸中展开。



• 5、展开

展开剂的选择与柱色谱洗脱剂类似。展开剂的极性增大次序为：石油醚→环己烷→二硫化碳→四氯化碳→二氯乙烯→苯→二氯甲烷→氯仿→乙醚→四氢呋喃→乙酸乙酯→丙酮→丁酮→正丁醇→乙醇→甲醇→水→冰醋酸→吡啶→有机酸。要求所选的展开剂对薄层吸附剂有一定亲和力，能把被分离物从吸附剂表面解析下来，但又不能过强，否则被解析下来的物质不易再吸附。当单一溶剂不能满足要求时，可用多元混合溶剂作展开剂。



- 薄层层析有多种展开方式，可分为上行、下行、双向展开等。展开时均需在密闭的容器（展开缸）中进行，且该容器内应使流动相的蒸气饱和。
- **(1) 上行法：**在缸中加入足够量的展开剂，将点好样品的薄层板放入展开缸的展开剂中，浸入展开剂的深度为距薄层板底边0.5~1.0cm（切勿将样点浸入展开剂中），密封缸盖，待展开前沿离薄板上端1cm时，取出薄层板，并用铅笔轻轻画下溶剂前沿，晾干。



- **(2) 下行法:** 在展开缸的盖子上装一个小钩, 将展开的纸片钩住, 并通过一滤纸条将展开剂和纸片连起来。待展开剂前沿离纸片下端1cm时, 取出纸片, 并用铅笔轻轻画下溶剂前沿, 晾干。
- **(3) 双向法:** 通常用于分离组分复杂的混合物。一般操作是取一块方形的薄板, 在角上点样, 展开后取出晾干。将薄板转90度, 换另一种展开剂再次展开, 可取得较好的分离效果。



• 6、显色

展开后的薄板晾干溶剂后可采取若干方法对板上的组分进行定位。

- (1) **光学检测**: 对于无色样品, 可采用带荧光剂的吸附剂做薄板, 展开后在紫外光 (254nm 或 365nm) 下显暗色斑点。优点是方便、不破坏被检测物质。
- (2) **碘蒸气法**: 对于在光学条件下不显色的物质, 可将薄板置于含有少量碘晶体的密闭容器中。许多物质能与碘可逆地作用呈棕色斑点。



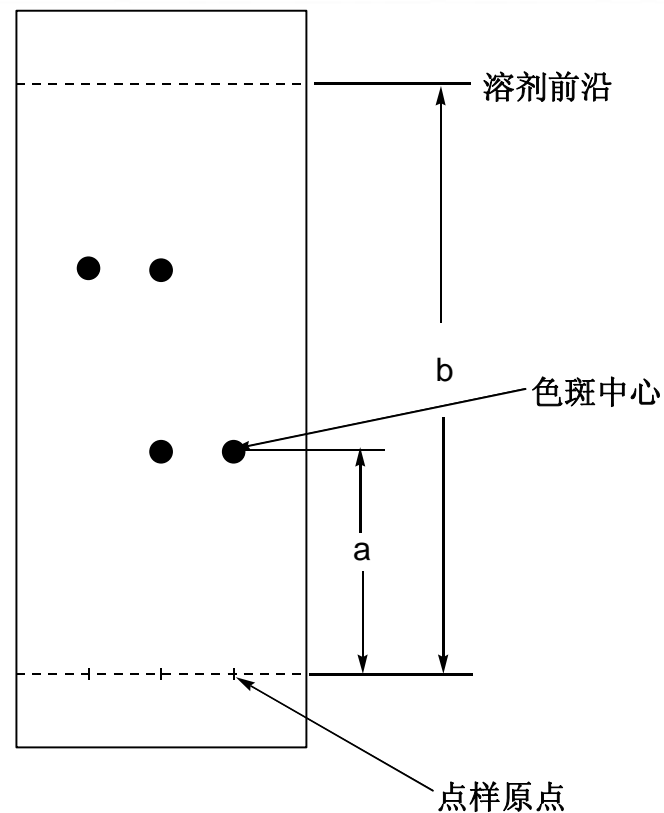
- **(3) 试剂显色:** 必须根据被分析化合物的性质来选择某一显色剂, 以喷雾方式直接喷到薄层板上可显示不同颜色的斑点。某些显色剂喷了以后还要在80-100度加热几分钟才能显色, 如茚三酮与氨基酸的显色反应。



- (7) 计算Rf值

Rf值随被分离物质的结构、固定相及流动相的性质、温度和薄板的活化程度等因素不同而变。当实验条件一定时，任何一个特定化合物的Rf值是一个常数。这也是为什么薄层色谱能定性分析的依据。点样原点

Rf值的计算很简单，只要用尺测量原点到色斑中心的距离除以原点到溶剂前沿的距离即可。



$$R_f = \frac{\text{原点到色斑中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}} = \frac{a}{b}$$



四、注意事项

- 1、薄层板的制备是实验的关键点之一。铺板必须厚薄均匀一致，不能开裂。
- 2、点样的圆点必须小且浓度要高些，但不能太高，以免引起拖尾现象。
- 3、点样后要等溶剂挥发尽才能将薄板放入展开缸中展开。
- 4、展开结束后，取出薄板要立刻用铅笔画下溶剂前沿。



五、思考题

- 1、为什么不能用开裂的薄板来展开？
- 2、薄板展开时如果展开缸不密闭会引起什么结果？
- 3、要分离一个酸性化合物，使用哪种吸附剂比较好？