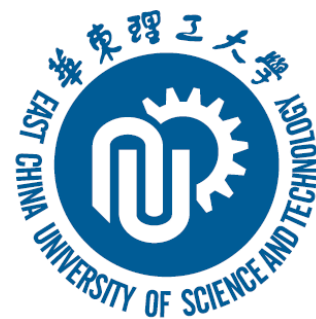
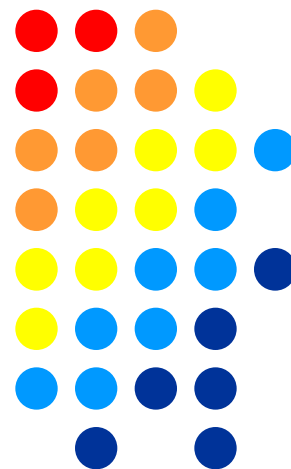


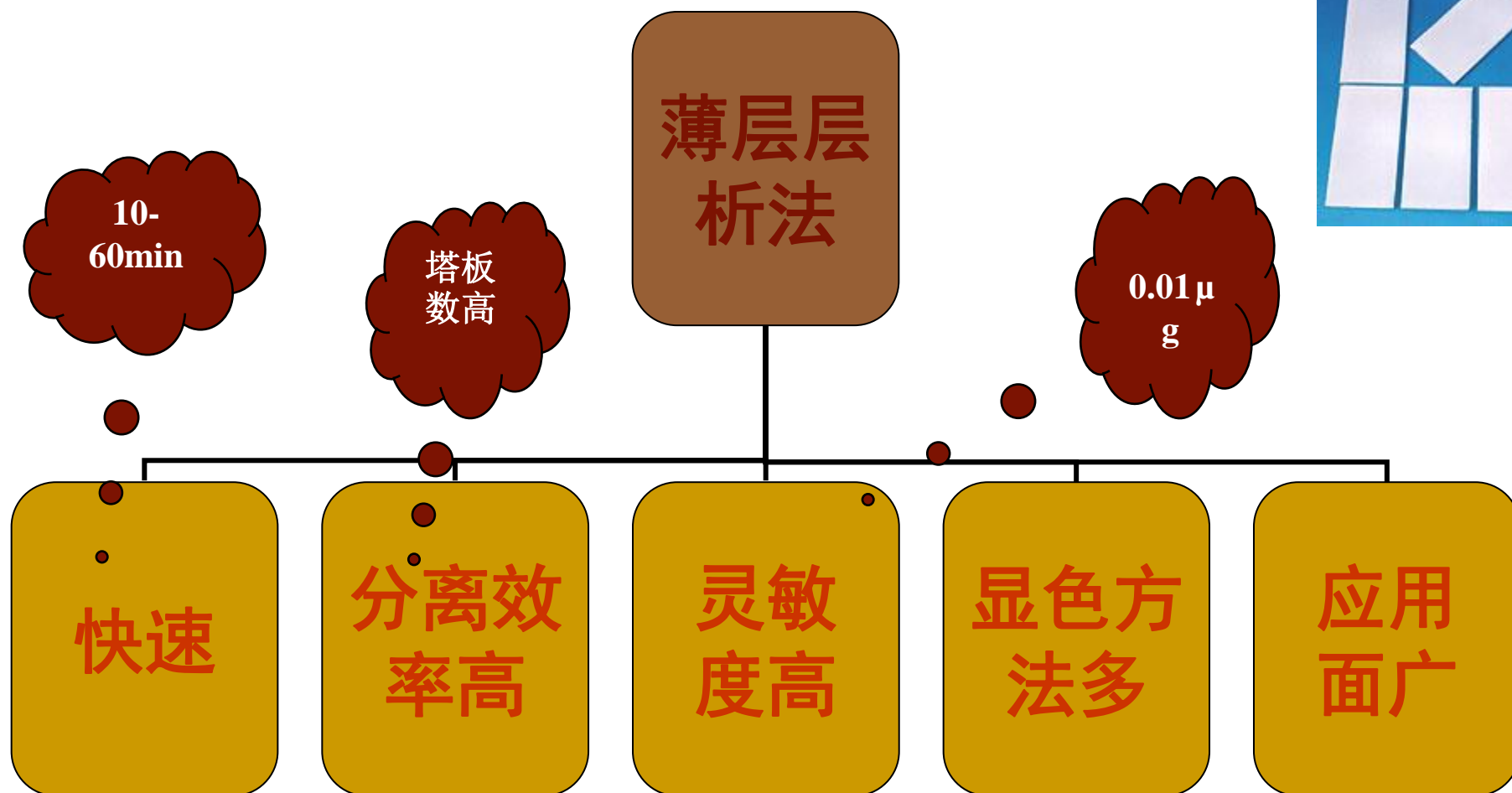
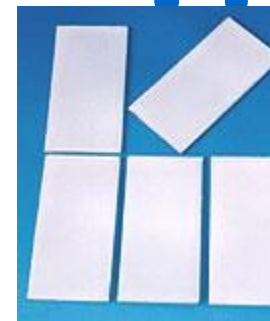
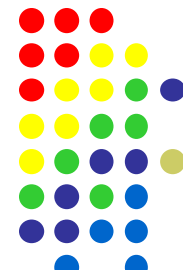
色层分析法实验技术

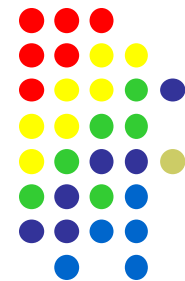


- 4.5 薄层层析
- 4.6 柱层析
- 4.7 纸层析



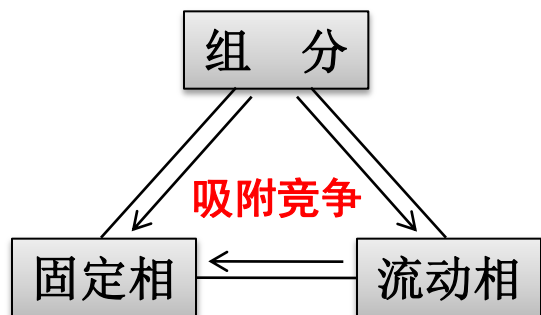
4.5 薄层层析法实验技术





4.5.1 薄层层析参数

(1) 技术参数：比移值 R_f

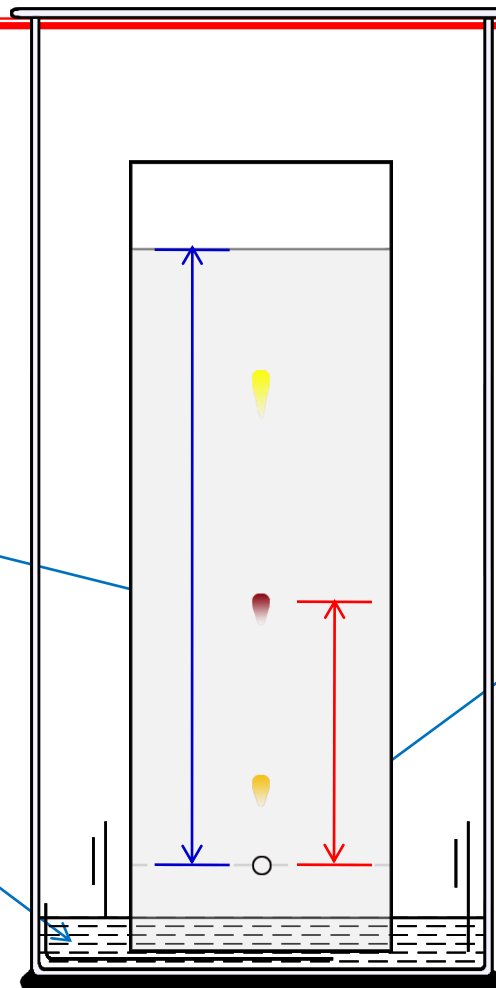


$$R_f = \frac{\text{原点至斑点中心间的距离}}{\text{原点至溶剂前缘间的距离}}$$

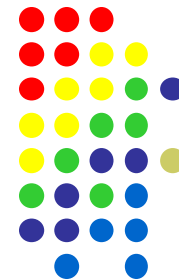
吸附剂
(固定相)

展开剂
(流动相)

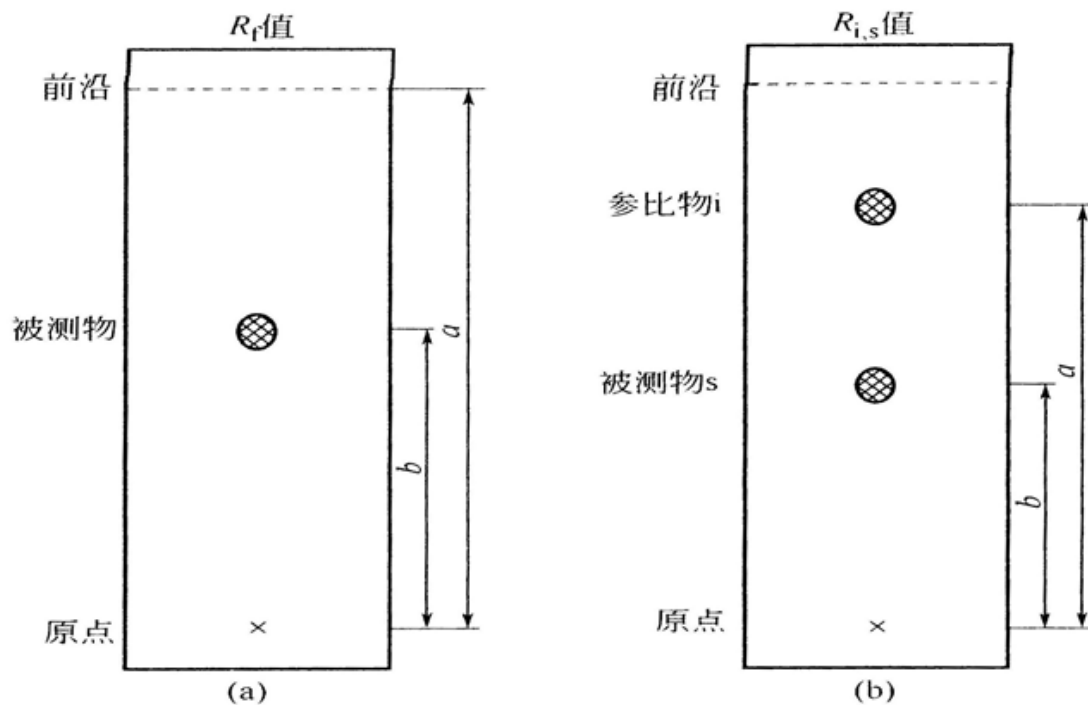
样品点
(多组分)



薄层色谱 (TLC, 薄层层析)

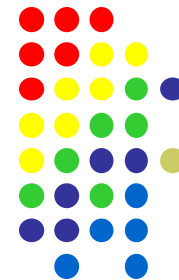


(1) 技术参数：相对比移值 $R_{i,s}$



$$R_f = b / a$$

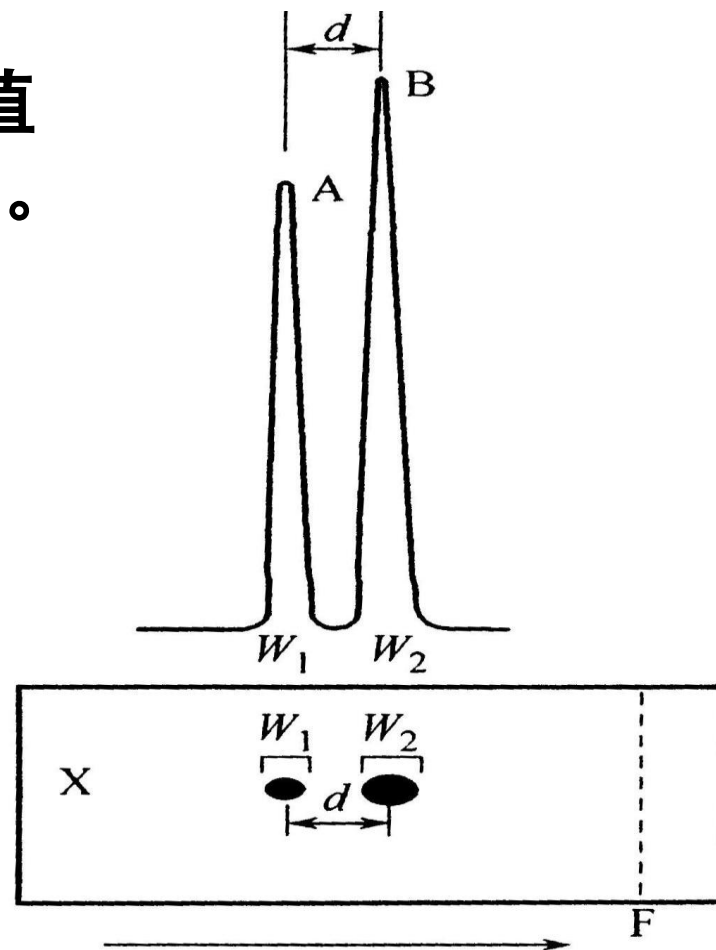
$$R_{i,s} = R_s / R_i = b/a$$

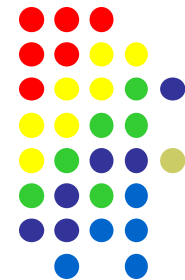


(3) 技术参数：分离度 R_s

一对斑点层析时移动距离的差值
与两个斑点底宽和的比值的2倍。

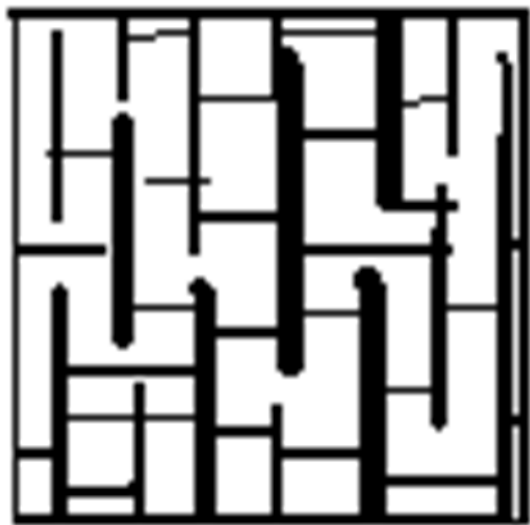
$$R_s = \frac{d}{\left(\frac{W_1 + W_2}{2}\right)}$$





4.5.2 薄层层析原理

溶剂在薄层中的流速问题



展开剂前缘移动的距离 L ，展开时间 t ，
比例常数 k ，表面张力 γ ，展开剂的黏度 η

$$L = (kt)^{1/2} \quad k \propto \frac{\gamma}{\eta}$$

$$L^2 = kt$$

展开剂前缘移动的速度 v_f

$$v_f = \frac{dL}{dt} = \frac{1}{2} k^{1/2} t^{-1/2} = \frac{k}{2(kt)^{1/2}} = \frac{k}{2L}$$

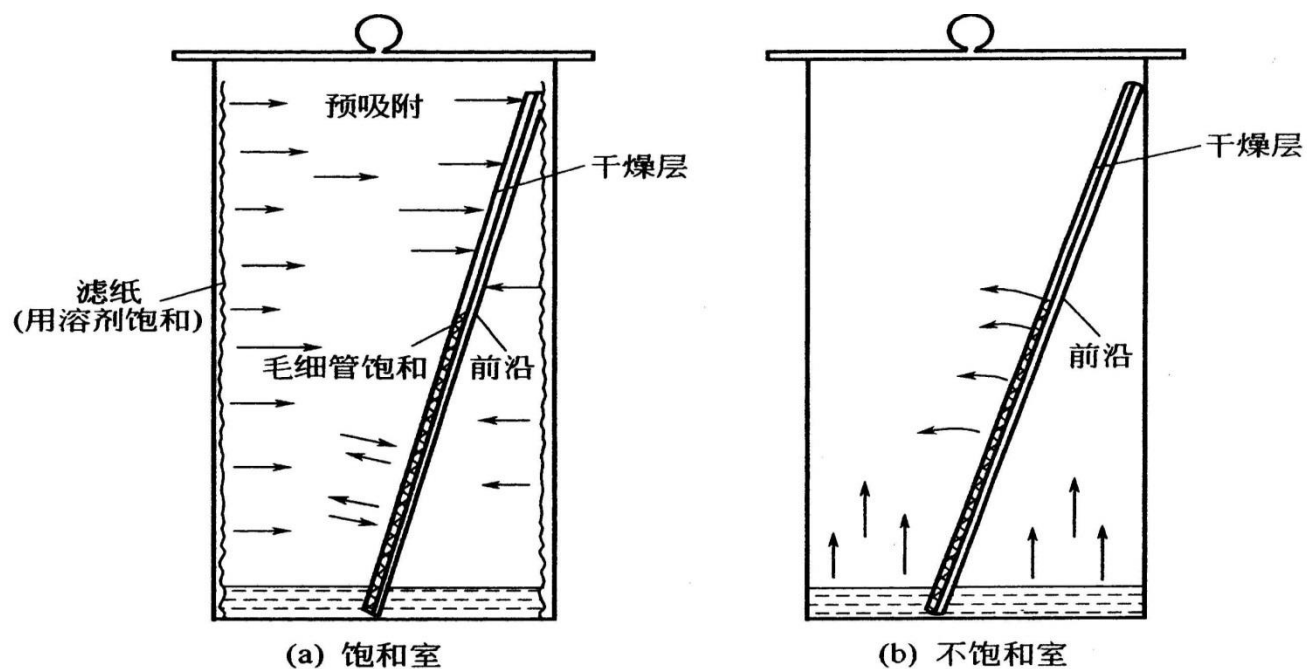
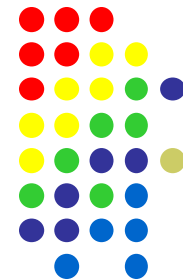


图 4-41 色谱展开时气相的影响



速率理论在薄层层析中的应用

薄层的组成是均匀的；展开剂的组成是恒定不变的；
在薄层中的任何一点在任何时候展开剂的流速都是恒定不变；
展开剂的流速比展开剂前缘移动速度稍慢些。

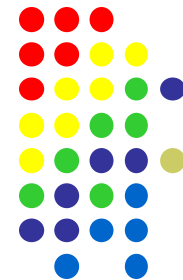
$$\bar{H} = b(L + Z_0) + \frac{a}{L - Z_0} (L^{2/3} - Z_0^{2/3}) + \frac{c}{L - Z_0} \lg \frac{L}{Z_0}$$

分子扩散项

填充项

传质项

\bar{H} 是平均塔板高； L 是展开剂前缘移动的距离；
 Z_0 是液面与原点间的距离； a , b , c 是三个常数



$$\bar{H} = b(L + Z_0) + \frac{a}{L - Z_0} (L^{2/3} - Z_0^{2/3}) + \frac{c}{L - Z_0} \lg \frac{L}{Z_0}$$

分子扩散项

填充项

传质项

$$\bar{H} = \frac{2\gamma D_m}{\theta d_p} (L + Z_0) + \frac{3}{2} A \left(\frac{d_p^5 \theta}{2D_m} \right)^{1/3} \frac{L^{2/3} - Z_0^{2/3}}{L - Z_0} + \frac{S \theta d_p^3}{2D_m} \frac{1}{L - Z_0} \lg \frac{L}{Z_0}$$

D_m 是溶质分子在展开剂中的扩散系数；

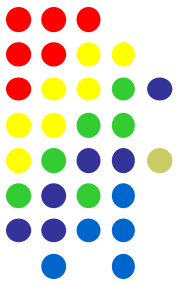
d_p 是吸附剂颗粒的平均直径；

γ 是溶剂的表面张力；

θ 是溶剂的比速度常数。

A 是随填充情况（即涂铺情况）而定的常数值

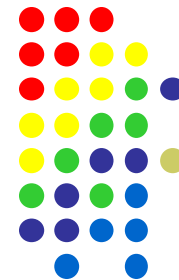
S 是随传质情况而定的常数值



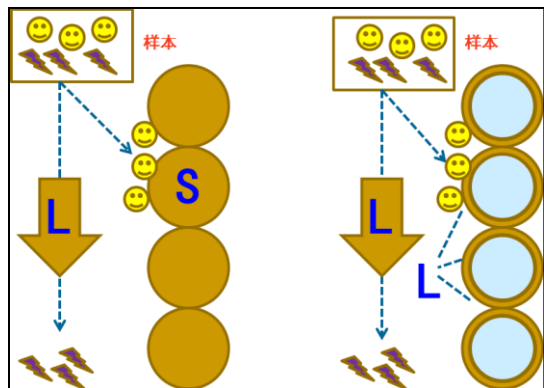
- **思考题：**

在薄层层析过程中为什么不讨论平均塔板高度与展开剂流速间的关系，而是讨论与展开距离间的关系？

4.5.3 固定相和展开剂的选择

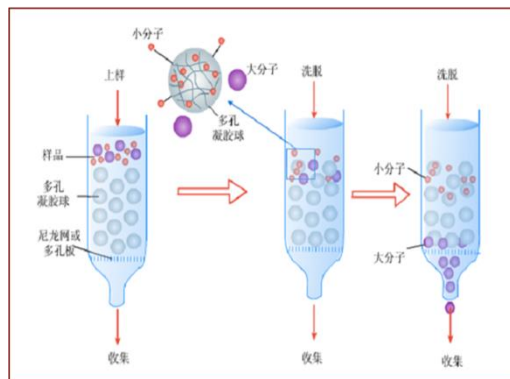


何种层析（吸附、分配、亲和、凝胶）
被分离组分性质（极性、离子、大小等）

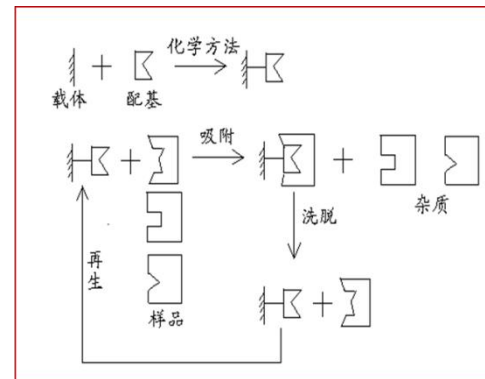


吸附层析
Adsorption
Chromatography

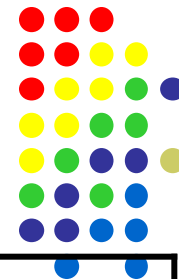
分配层析
Partition
Chromatography



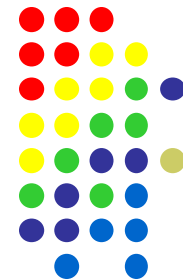
凝胶层析
Gel Chromatography



亲和层析
Affinity Chromatography



固定相	性质			被分离物质
	酸碱性	活性	分离机制	
硅胶	酸性	有	吸附/分配	几乎所有物质
氧化铝	碱性	有	吸附	碱性物质（生物碱）和固醇类
硅藻土	中性	无	分配	糖类、药物
氢氧化钙	碱性	弱	吸附	类胡萝卜素、维生素E类
磷酸钙	弱碱性	有	吸附	类胡萝卜素、维生素E类
硫酸钙	酸性	弱	吸附	脂肪酸、甘油酸
纤维素粉	中性	无	分配	染料、氨基酸
离子交换剂	酸或碱		离子交换	核酸类及其衍生物
葡聚糖凝胶	中性		排阻作用	蛋白质、核酸

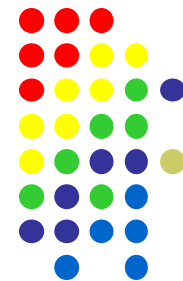


硅胶和氧化铝是薄层层析常用的固定相，属于**极性吸附剂**。

薄层吸附色谱（固定相为极性吸附剂）中，化合物的吸附能力与它们的极性成正比，具有较强极性的化合物吸附较强，即 R_f 值较小。

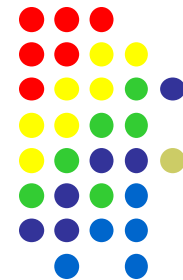
常见有机化合物的极性大小：

无机盐、离子型有机物 > 磺酸、羧酸 > 醇、酚、胺 > 醛、酮、酯
> 卤代烃、醚 > 芳香烃 > 烯 > 环烷烃 > 烷烃



- **粘合剂：**（**煅石膏：**牢度差，不能用于分离无机物；**羧甲基纤维素钠、淀粉等：**牢度好，不能用腐蚀性显色剂；**聚乙烯醇、聚丙烯酰胺：**预制板。）
- **形式：** 硅胶G、硅胶H、硅胶GF₂₅₄、硅胶HF₃₆₆





展开剂的选择

- 吸附层析

展开剂对被分离组分有一定的溶解度

展开剂对被分离组分有适当的亲和力

- 分配层析

展开剂选择各组分溶解度相差大的溶剂

4.5.4 薄层层析法实验技术

● 制备薄层板：

干法——软板，湿法——硬板

定性定量时薄层厚度为0.2-0.3mm

制备薄层的厚度要求约为0.5-2mm

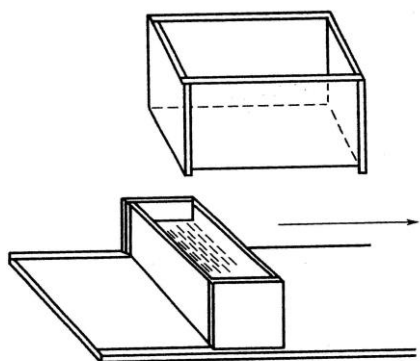
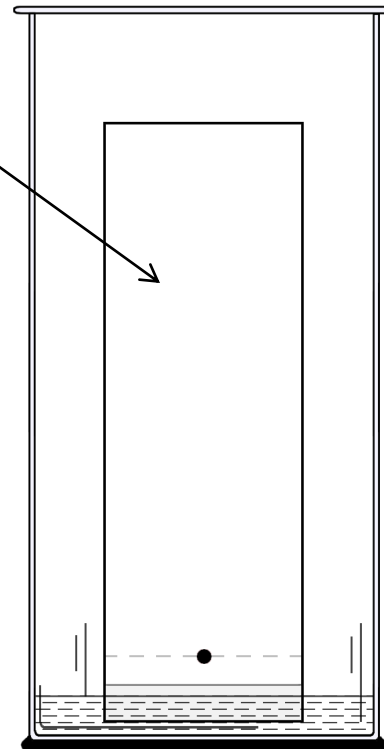


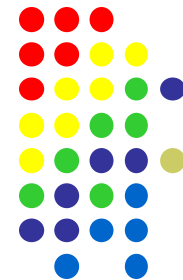
图 2-3 手工简易涂布器



薄层板



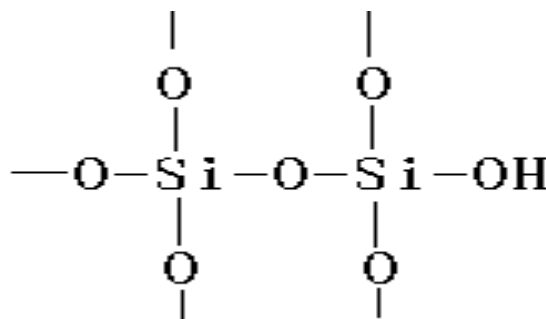
层析缸

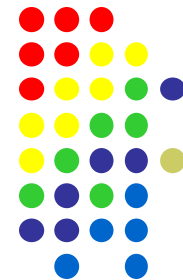


活化

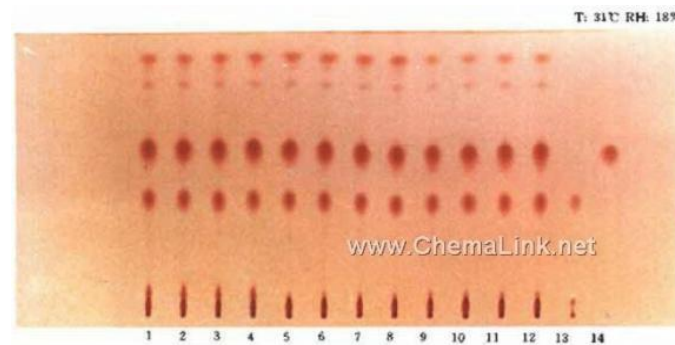
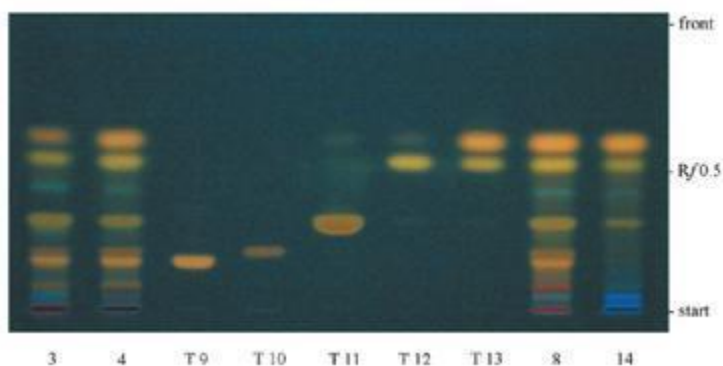
形式： 硅胶G、硅胶H、硅胶GF₂₅₄、硅胶HF₃₆₀

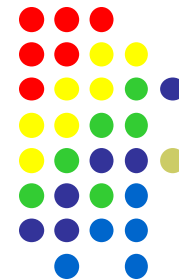
粘合剂（**煅石膏**：牢度差，不能用于分离无机物；**羧甲基纤维素**：牢度好，不能用腐蚀性显色剂；**淀粉**：不能用于分离有机物）





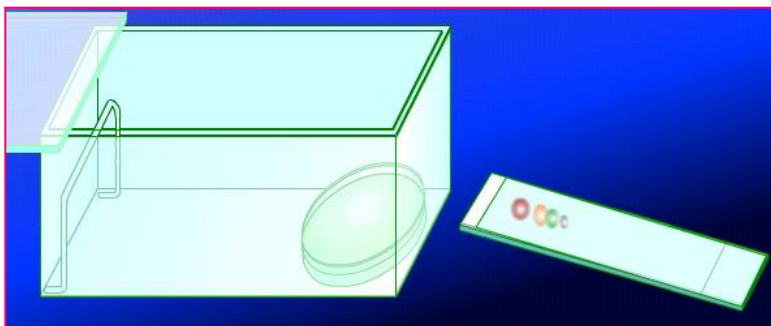
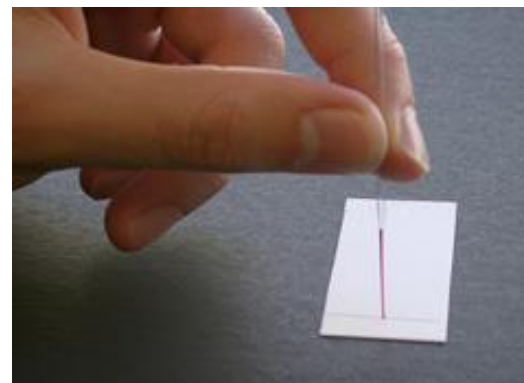
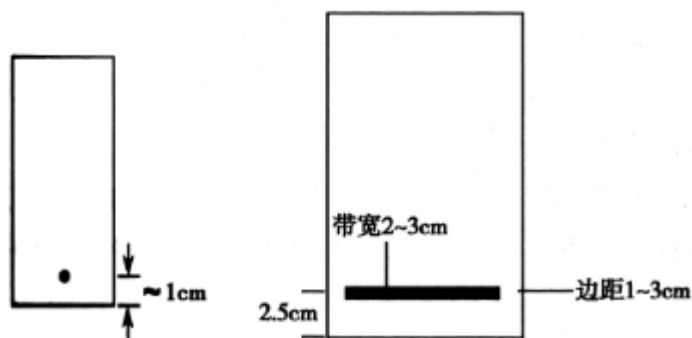
- 络合薄层：加入络合剂；
- 涂布固定液的薄层：如甲酰胺、硅烷油等
- 高效薄层：极细均匀的吸附剂；

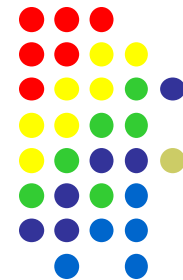




● 点样:

溶解试样的溶剂，点液集中，点量精确，点样量适当





● 展开：

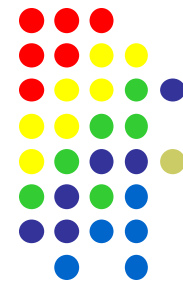
对硅胶和氧化铝

溶剂的极性大 \rightarrow 溶剂对化合物的解吸能力强 $\rightarrow R_f$ 值大

常用展开剂的极性大小顺序：

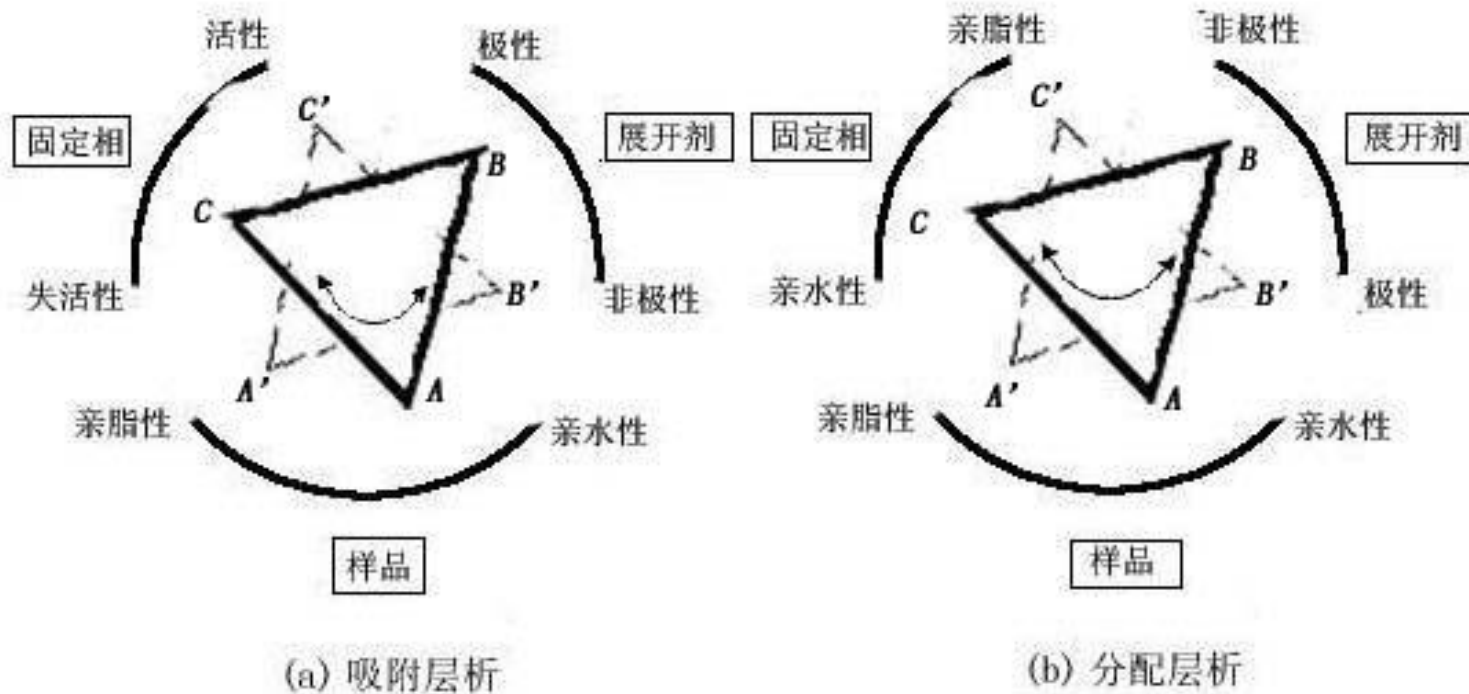
己烷、石油醚 < 环己烷 < 四氯化碳 < 三氯乙烯 < 二硫化碳 < 甲苯
< 苯 < 二氯甲烷 < 氯仿 < 乙醚 < 四氢呋喃 < 乙酸乙酯 < 丙酮 <
正丁醇 < 丙醇 < 乙醇 < 甲醇 < 水 < 冰乙酸 < 吡啶 < 乙酸

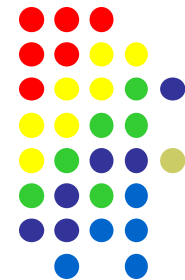
如果单一展开剂分离效果不显著，可选用混合溶剂。



4.5 薄层层析法实验技术

三角图形法





4.5 薄层层析法实验技术

微量圆环技术

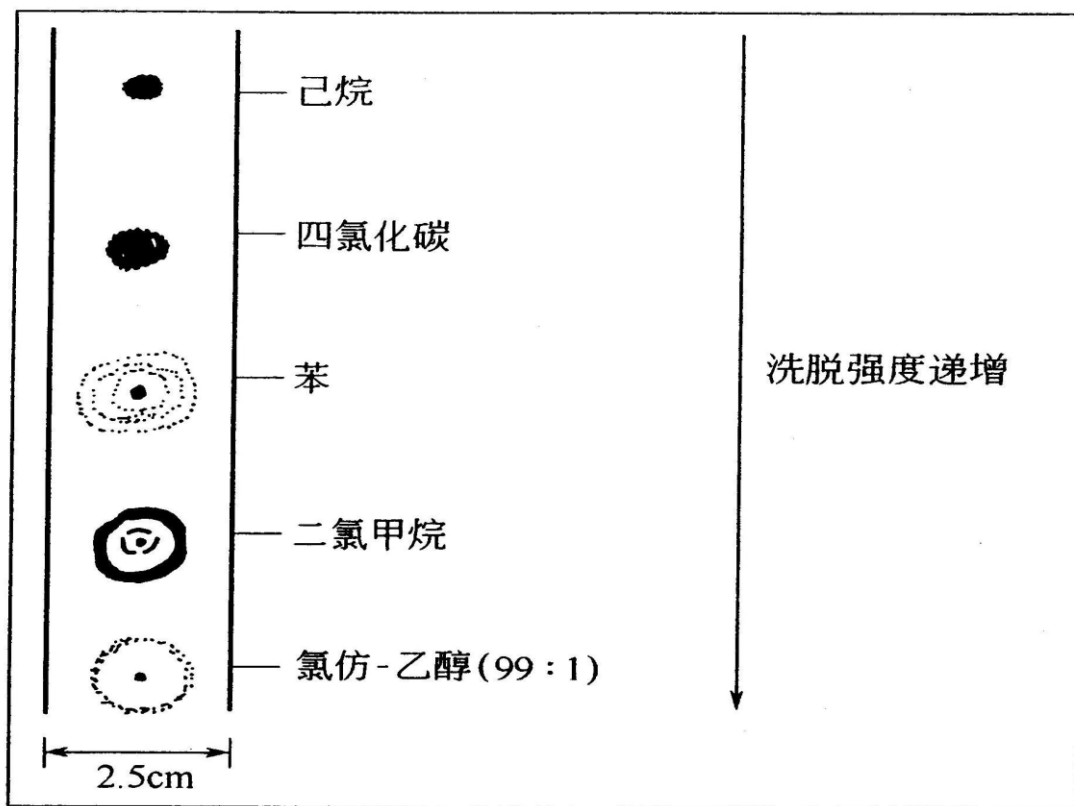
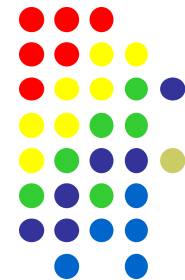


图 5-2 点滴试验法



原则：先用单一溶剂，再用混合溶剂
在硅胶薄层上分离生物碱：

单一溶剂：环己烷、苯、氯仿

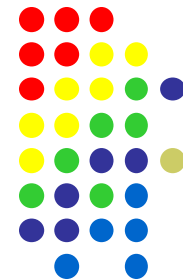
混合溶剂：苯-氯仿（9：1，1：1）

环己烷-氯仿-二乙胺（5：4：1）

苯-乙酸乙酯-二乙胺（7：2：1）

苯-正庚烷-氯仿-二乙胺（60：50：10：0.2）

二乙胺：改变极性，调整酸碱度，增大试样的
溶解度



聚酰胺薄层

展开剂洗脱能力的大小顺序：

水<乙醇<甲醇<丙酮<稀氢氧化铵（钠）溶液<甲酰胺<二甲基甲酰胺

在聚酰胺薄层上用混合展开剂：

水-乙醇（1:1）

水-甲醇（1:1）

水-乙醇-乙酰基丙酮（4:2:1）

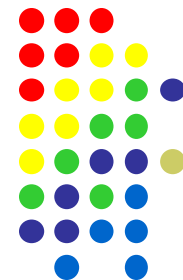
水-乙醇-丁酮-乙酰基丙酮（13:3:3:1）

水-乙醇-乙酸-二甲基丙酰胺（6:4:2:1）

二甲基甲酰胺-苯（3:97）

数值分析方法

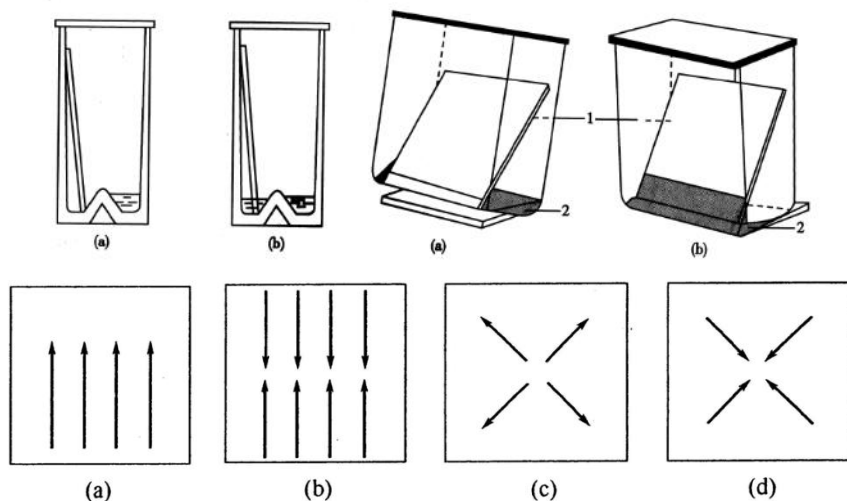
用56种展开剂分离22种磺胺类药物找到最佳系统组合



上行展开
多次展开

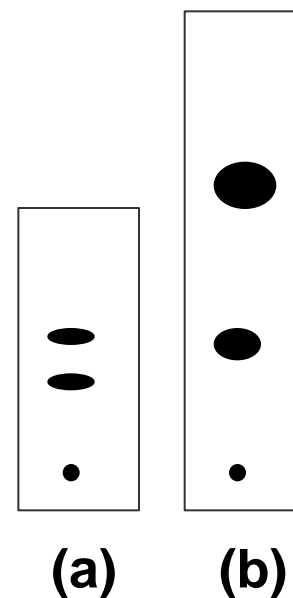
下行展开
连续展开

径向展开
双向展开



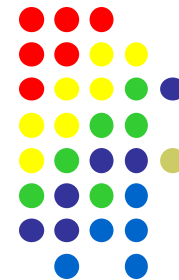
薄层层析的基本展开形式

(a)、(b) 线性；(c) 环形；(d) 向心

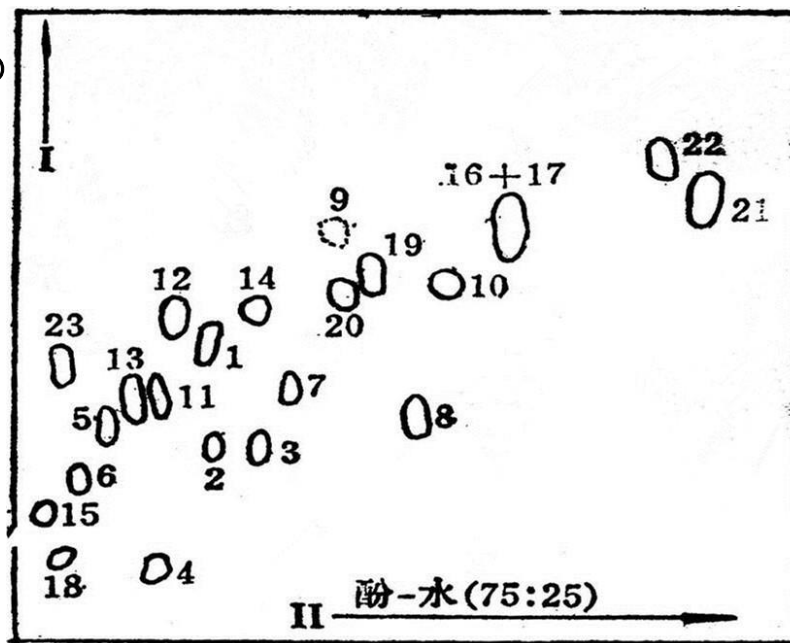


两种展开方式对比图

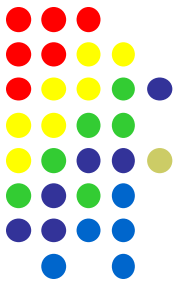
(a)多次展开法；(b)一次展开法



氯仿—甲醇—氨水 (17%)
(40: 40: 20)



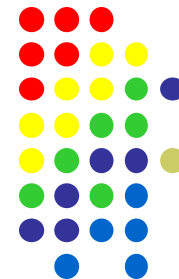
23种氨基酸的双向层析图



全自动展开仪ADC2 (瑞士)

全自动控制薄层活化、
预平衡，展开缸饱和，
展开距离及干燥等所有
展开步骤，实时监控并
报告展开温度及湿度。





影响因素：边缘效应

混合展开剂极性和挥发度的不同

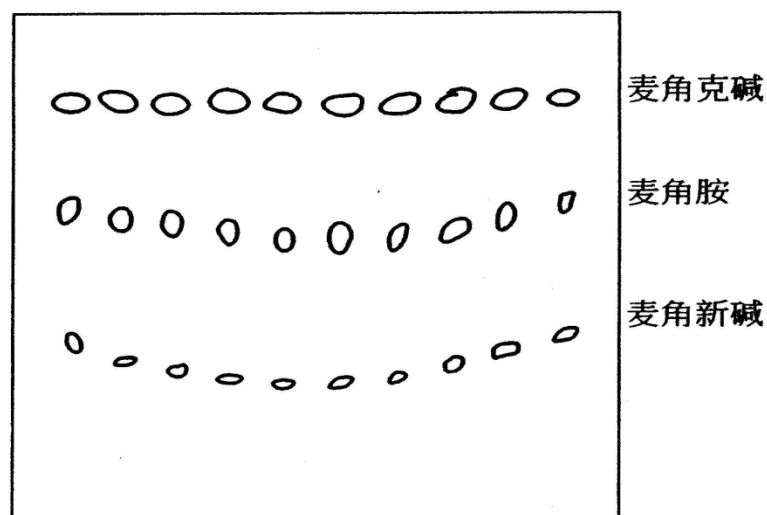


图 4-42 在未饱和展开室中薄层板上出现的“边缘效应”示意图

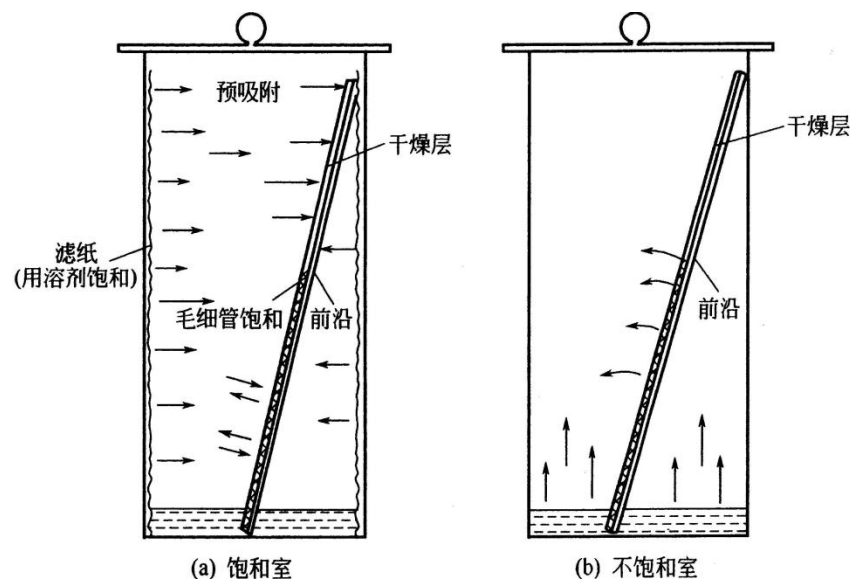
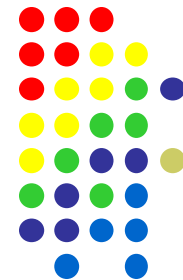


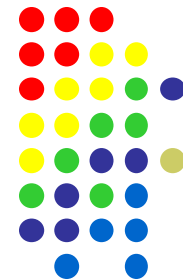
图 4-41 色谱展开时气相的影响

氯仿-甲醇 (95: 5) 为展开剂分离麦角生物碱
氯仿：极性较弱，沸点较低



● 思考题

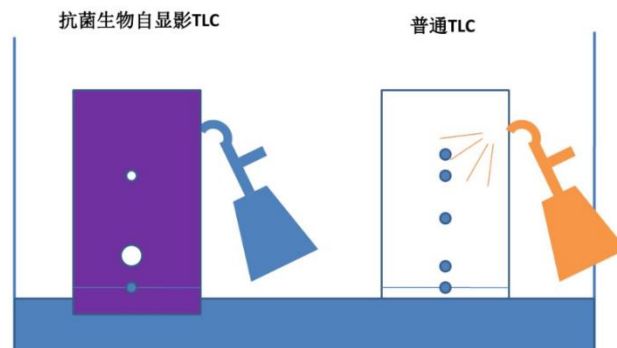
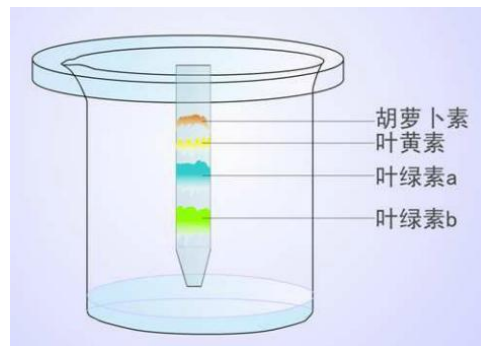
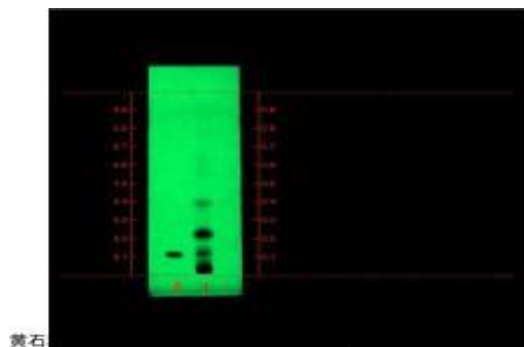
用 Al_2O_3 薄层层析分离并测定氨基蒽醌中的 α -氨基蒽醌时，用环己烷-丙酮(3:1)的混合溶剂为展开剂。你认为下列三种溶剂中选用哪一种来溶解试样最为合适？为什么？吡啶、二氧六烷、丙酮，他们的沸点分别为 116°C ， 101°C ， 56°C ，溶剂极性和试样在他们之中的溶解度都依次递减。

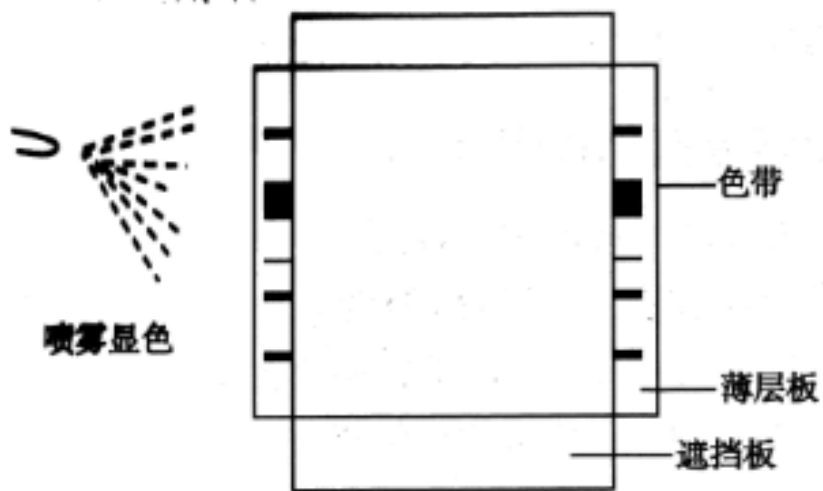


■ 显色:

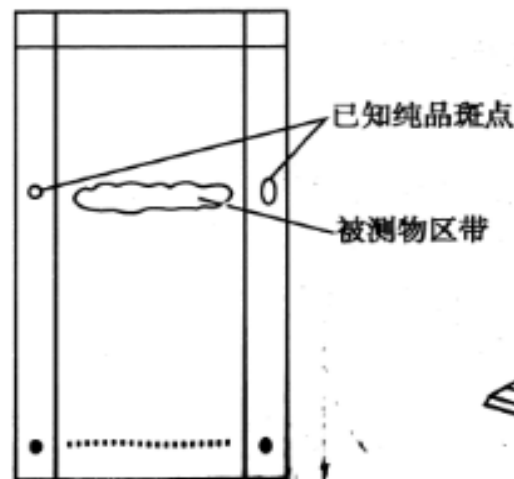
- (1) 在日光下观察，划出有色物质的斑点位置；
- (2) 在紫外灯下观察有无暗斑或荧光斑点；
- (3) 荧光法：有紫外吸收可激发荧光物质，呈不同颜色荧光斑点；
荧光猝灭法：无紫外-可见吸收和不显荧光者，紫外光下呈暗斑；
- (4) 既无色、又无紫外吸收的物质可用显色剂。

显色：蒸汽熏、喷雾、生物自显影等。

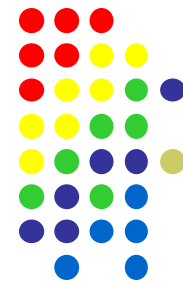




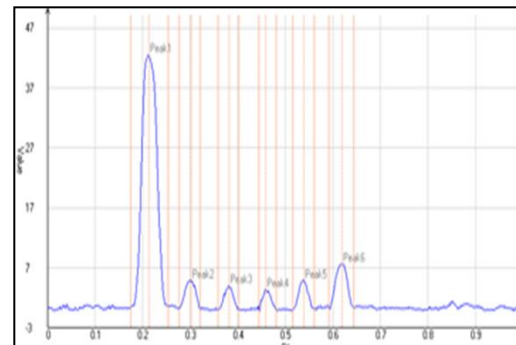
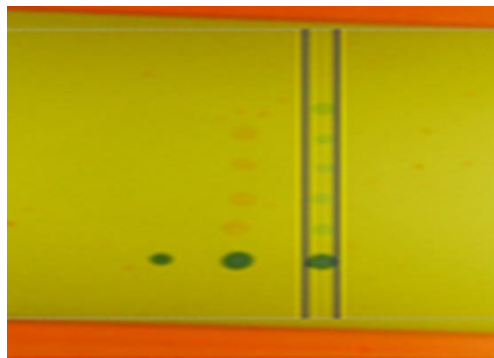
制备薄层显色



参比物定位



- **定性**：比移值，斑点的显色特性，斑点的原位光谱扫描，与其他分析技术的联用。
- **定量**：目视比较半定量法，洗脱法（误差约为1-5%），薄层扫描仪。



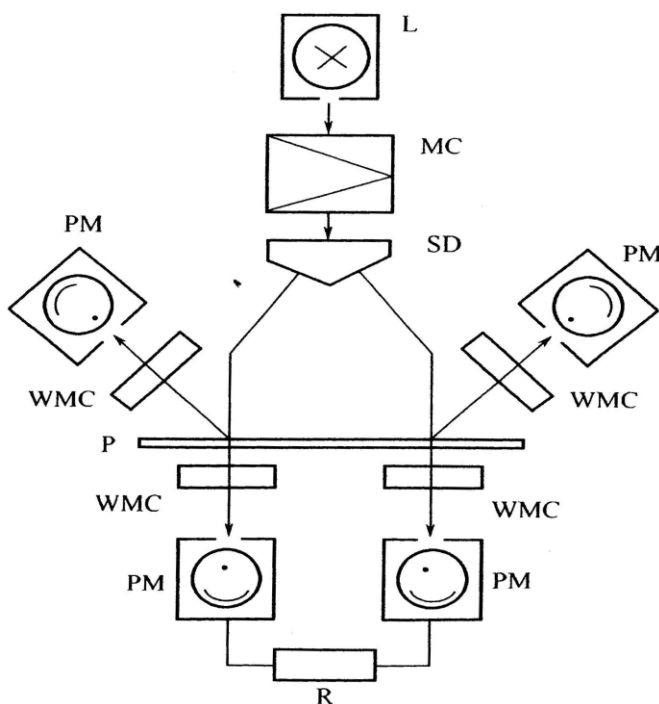
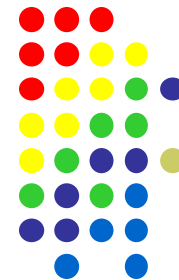
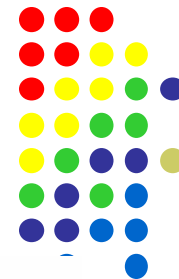


图 7-8 单波长、双光束扫描仪光路图

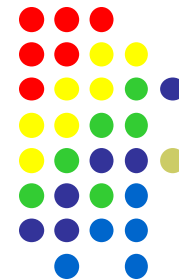
L—光源；MC—单色器；SD—光路切分装置；WMC—楔形补偿器；
PM—光电检测器；P—薄层板；R—比例调节器

- 双波长消除薄层不均匀所引起的基线波动；
- 采用微小光束，曲折形的扫描方式消除斑点中被测组分的分布不均匀；
- 采用背景补偿消除薄层所用的吸附剂中可能含有杂质和显色不均匀性；
- 散射参数校正后吸光度和浓度之间成线性关系。

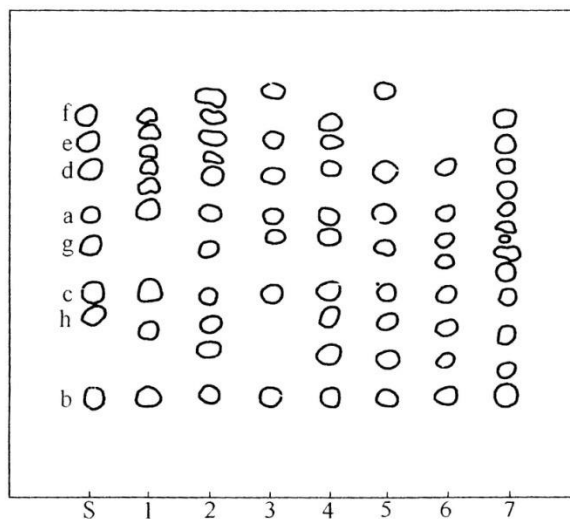


- 瑞士CAMAG9 (长玛) 公司, 质量优异, 价格昂贵, 主流薄层色谱扫描仪为SCANNER-III。
- 德国迪塞克公司, 产品系列齐全, 质量优异, 主流扫描仪为CD-60
- 日本SHIMADEU (岛津) 公司销售量大, 其主流扫描仪为CS-9300、CS-9301。
- 上海科贺生化技术有限公司





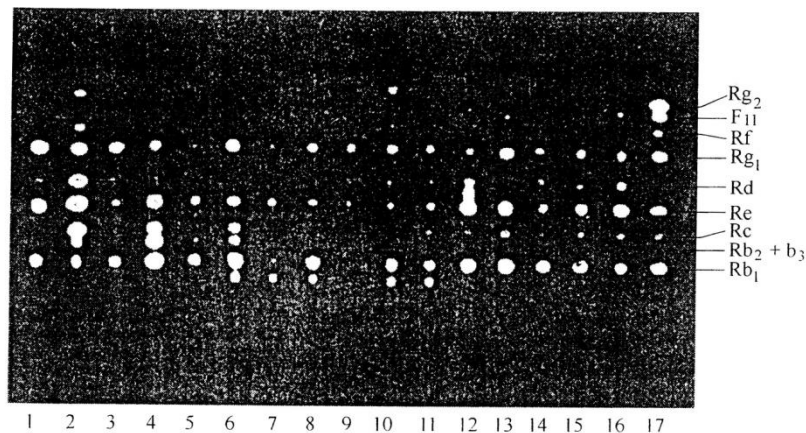
4.5.6 应用技术



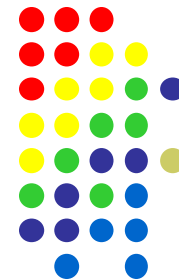
聚酰胺薄膜

苯-甲醇-丁酮-甲酸 (7: 1: 1.5: 0.5) 为展开剂

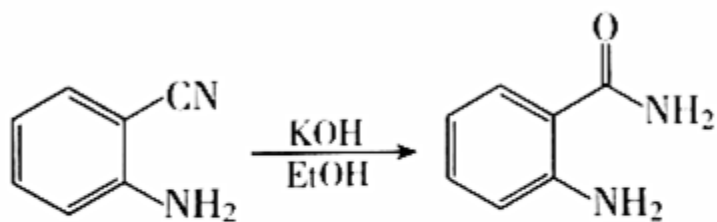
分离了7种黄芩中8种黄芩苷及苷元



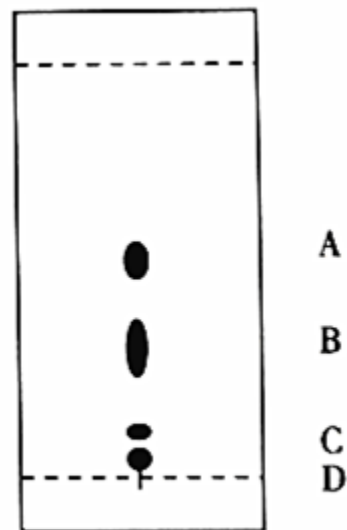
人参皂苷的分离图谱



反应终点的控制

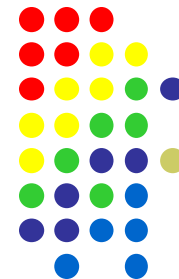


(a)



(b)

邻氰基苯胺的水解反应 (a) 和TLC示意图 (b)

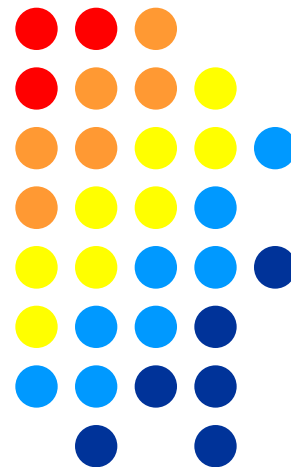
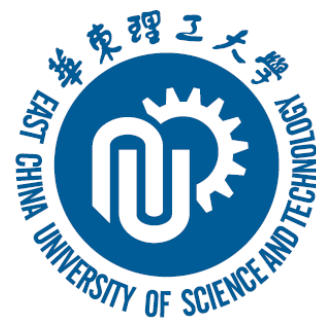


未知物结构剖析

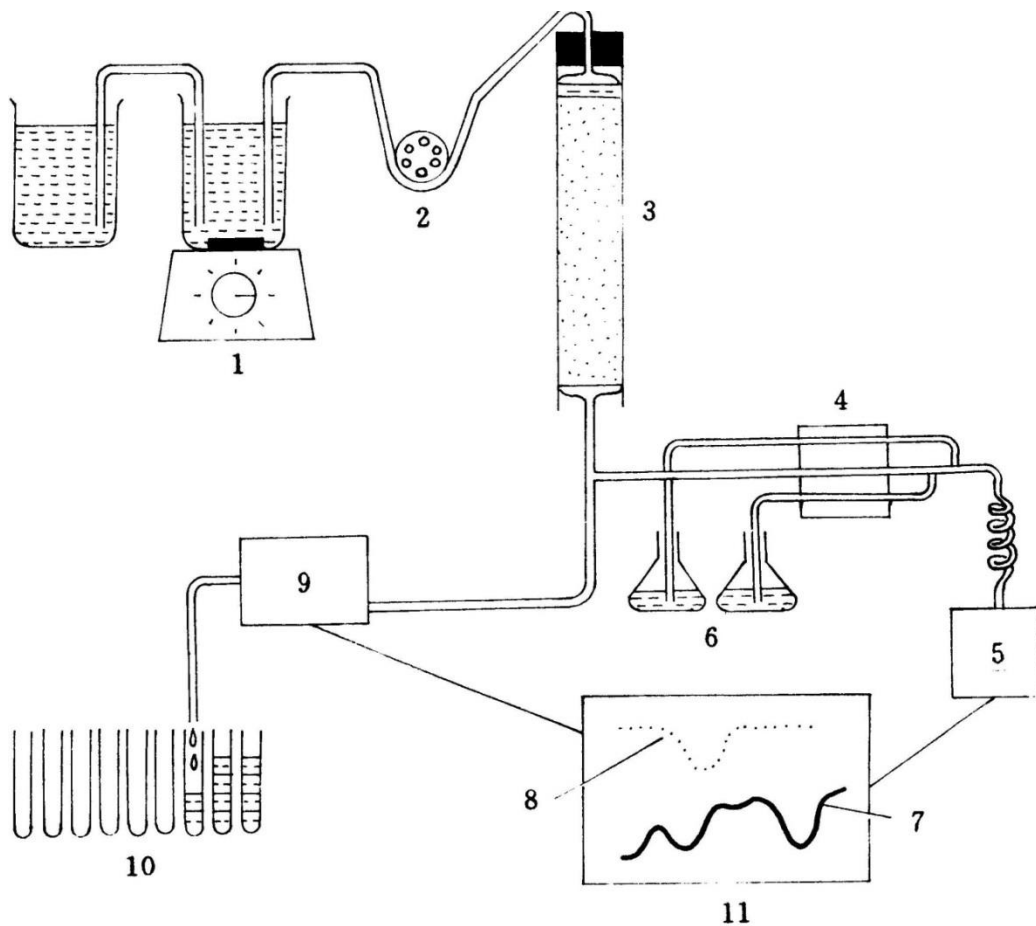
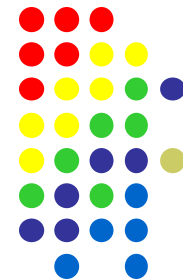
1 2	3 4 5	6	7	
0 0	0 0 0	0	0 0 0	

在薄层上分离良好的层析条件，对于柱层析是很有参考价值的。也可用薄层分离制备成品，把粗制品点在较厚、较大的制备型薄层板上分离杂质，可达到制备纯品的目的

4.6 柱层析实验技术

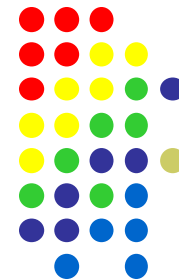


柱层析实验技术



- 蠕动泵
- 层析柱
- 检测器
- 流分收集器

4.6.1 层析柱的制备



干法装柱

湿法装柱

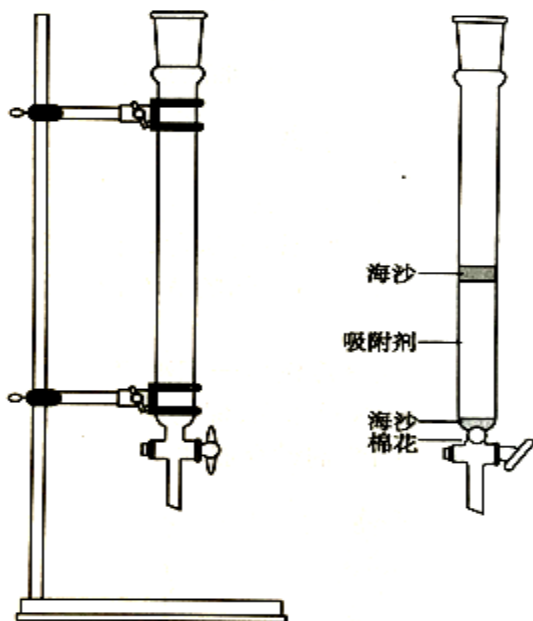


图 6-1 色谱柱的填充

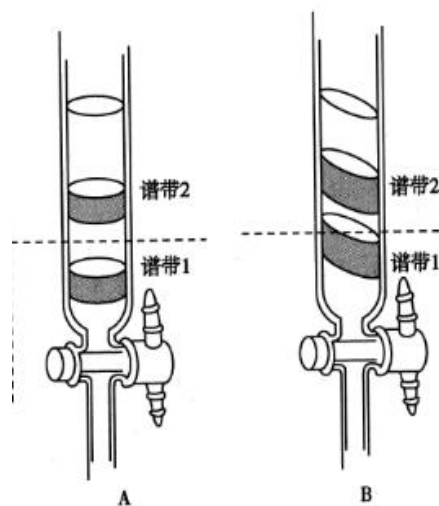


图 6-5 水平的(A)和非水平的(B)谱带前沿的对比

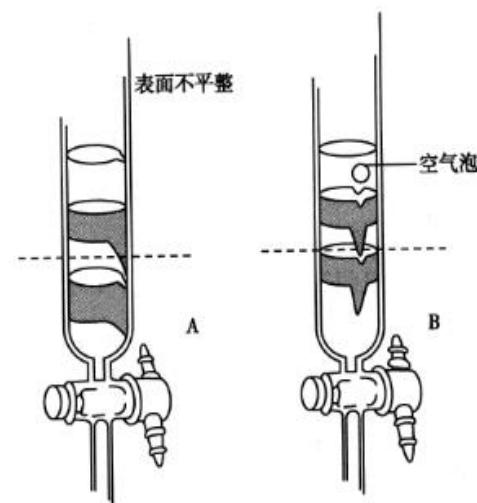
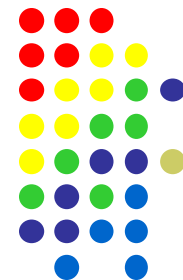
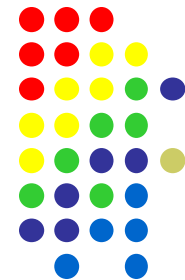


图 6-6 表面不平整(A)或空气泡(B)造成的沟流



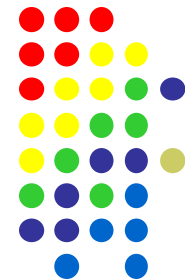
- 粗长的柱子好（长：塔板数高，粗：样品层薄）
一般柱子径高比1:5-10；
- 硅胶量一般是样品的30-40倍（ R_f 在0.2-0.4，杂质相差0.1以上），可增加到100倍；
- 提高分离度，如果是极性固定相时，如硅胶，可增加柱长（不可过长，扩散）或减少淋洗剂的极性；
- 装柱溶剂极性不大于过柱淋洗剂；



4.6.2 样品的制备与上样

- 被分离物为液体
尽量除去极性溶剂（吸附层析）；
- 被分离物样品为极性较小的固体
溶于流动相或极性小的溶剂/载体吸附固定相溶剂中；
- 被分离物样品为难溶性固体
吸附于载体表面，固体上样；
- 上样量要小

4.6.3 洗脱与分离



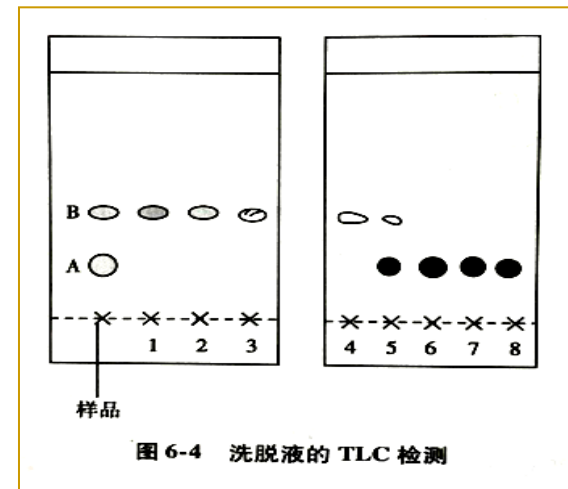
- 洗脱剂选择以薄层色谱为依据

通常比过板时极性小；

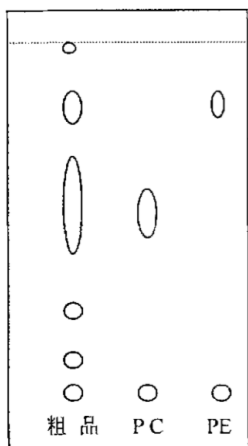
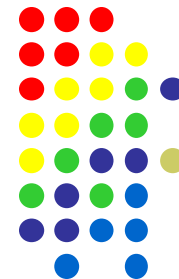
避免使用毒性大的溶剂；

混合溶剂考虑挥发程度不同对极性的影响；

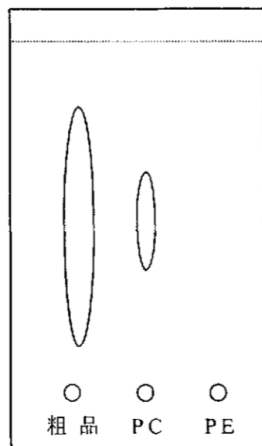
R_f 值接近的化合物分离，尝试极性相近但由不同溶剂组成的混合体系；



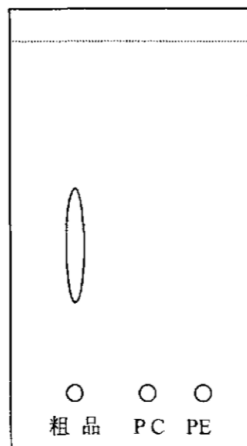
硅胶柱层析同时分离纯化卵磷脂和脑磷脂



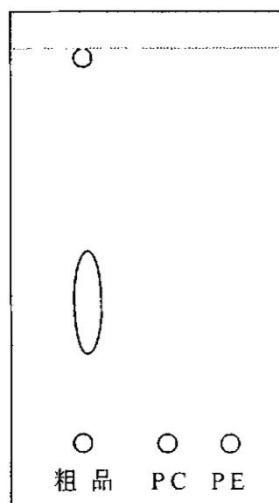
氯仿-甲醇 1: 1



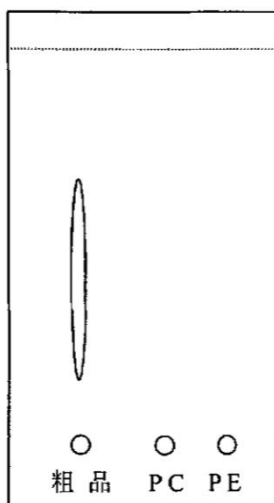
甲醇-乙酸 3: 1



正己烷-异丙醇 1: 1



正己烷-乙酸乙酯 1: 1



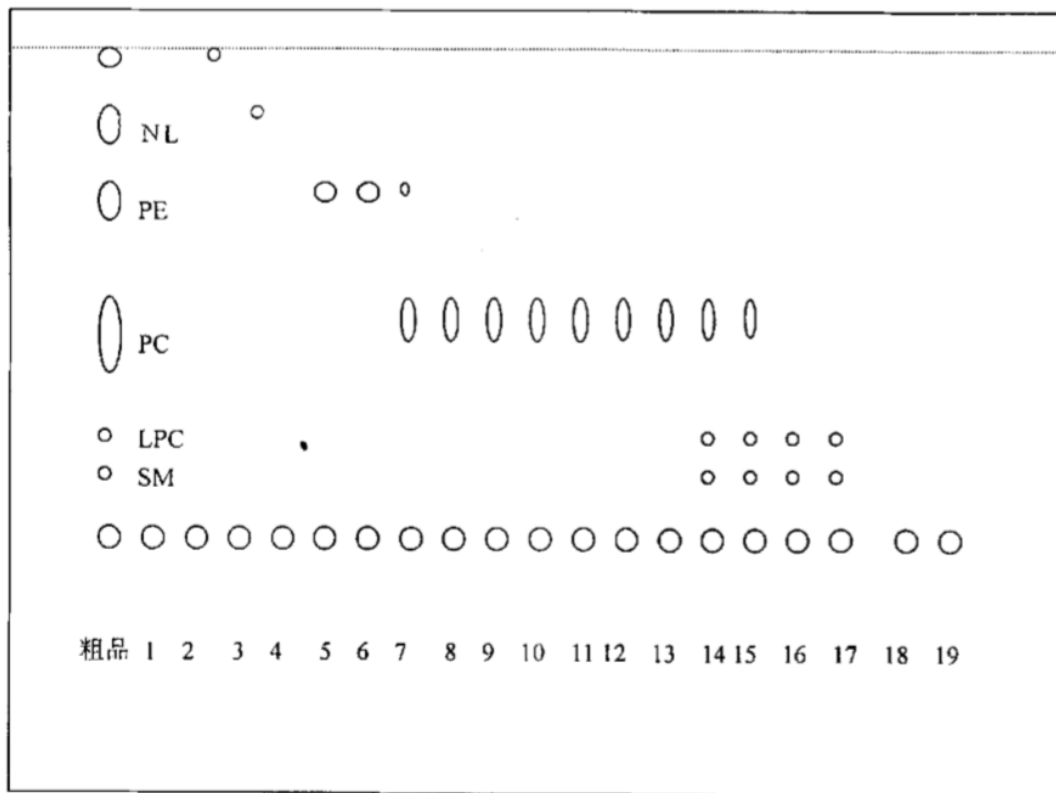
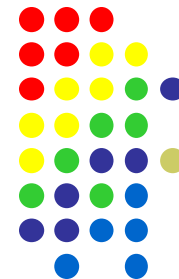
95%乙醇

流动相的选择：

氯仿-甲醇、乙酸-甲醇、正己烷-异丙醇、正己烷-乙酸乙酯、95%乙醇，考察它们在硅胶板上的分离情况。

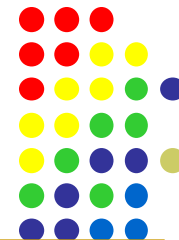
除了氯仿-甲醇体系，其它展开剂体系分离效果都不好。

各流动相体系硅胶点板展开图



硅胶柱；
洗脱：氯仿300ml、氯仿
一甲醇=(180：20)(140：
60)(100：100)(60：
140)(0：200)各200 ml洗
脱，流速3ml / min，
50ml为一个收集组分，共
收集19个组分。
在硅胶板上对收集组分点
样，将点好样硅胶板放入
层析缸中展开，展开剂为
氯仿甲醇～水16：5：1(v
/ v)，

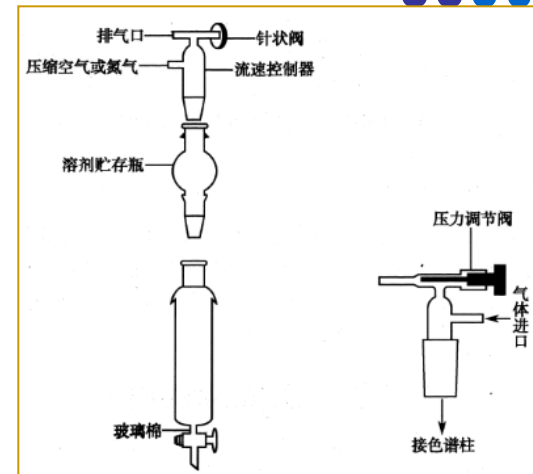
过柱组分硅胶点板展开图



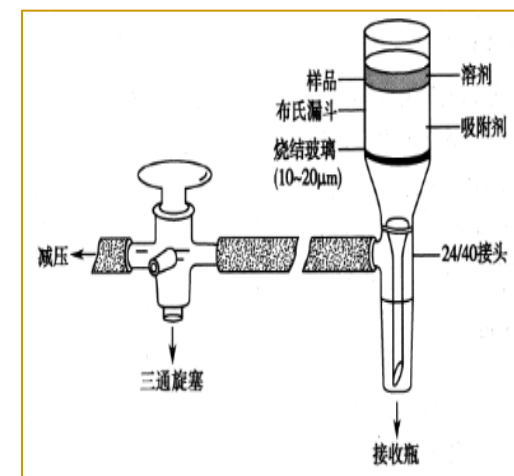
● 控制流速收集洗脱液并检测

压力可增加淋洗剂的流动速度，减少产品收集时间，但会降低柱子的塔板数。直径比较粗的柱子用常压，0.5–1滴/秒。

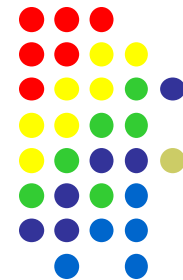
减压柱可减少固定相使用量，但大量空气通过柱子易造成溶剂挥发，易分解物质得不到。



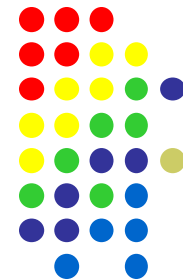
加压柱



减压柱

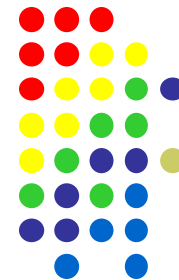


- 洗脱展开法
- 前沿分析法
- 置换展开法



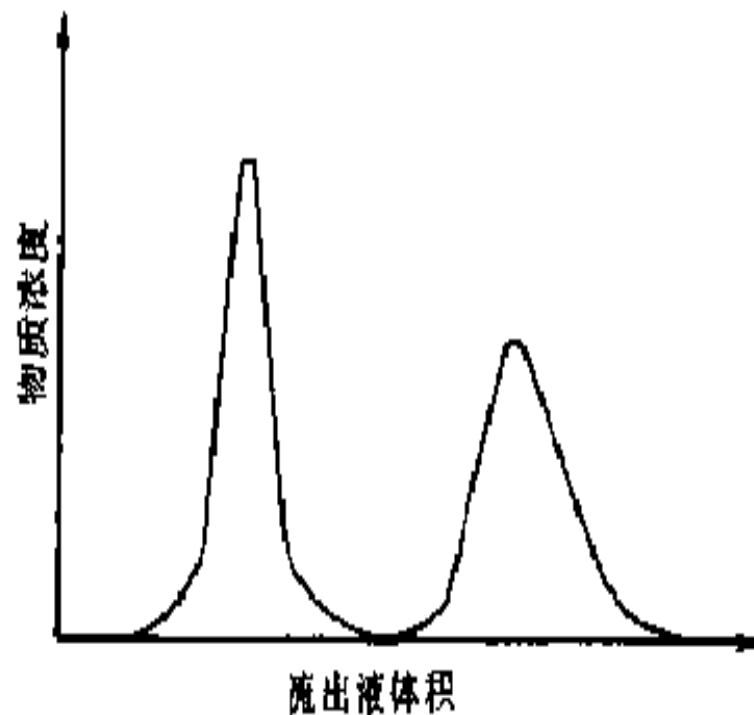
洗脱展开法

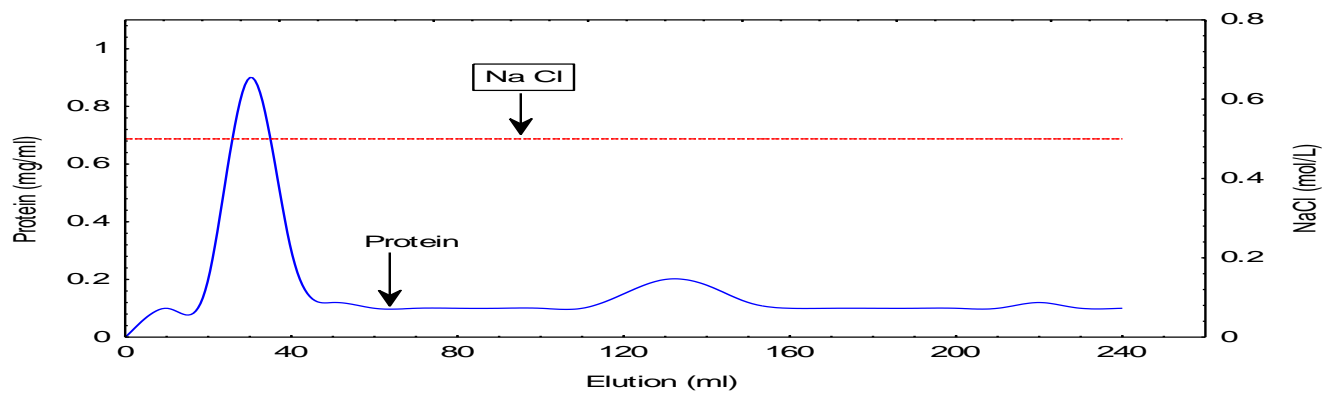
- 应用最广的一种方法。
- 先将样品输入色谱柱，随即加入一种不与固定相发生作用的溶剂或几种溶剂的混合物作为流动相冲洗。在洗脱过程中，各组分因与固定相的作用力不同而分离，并随溶剂向下移动，最后有顺序地全部流出色谱柱。



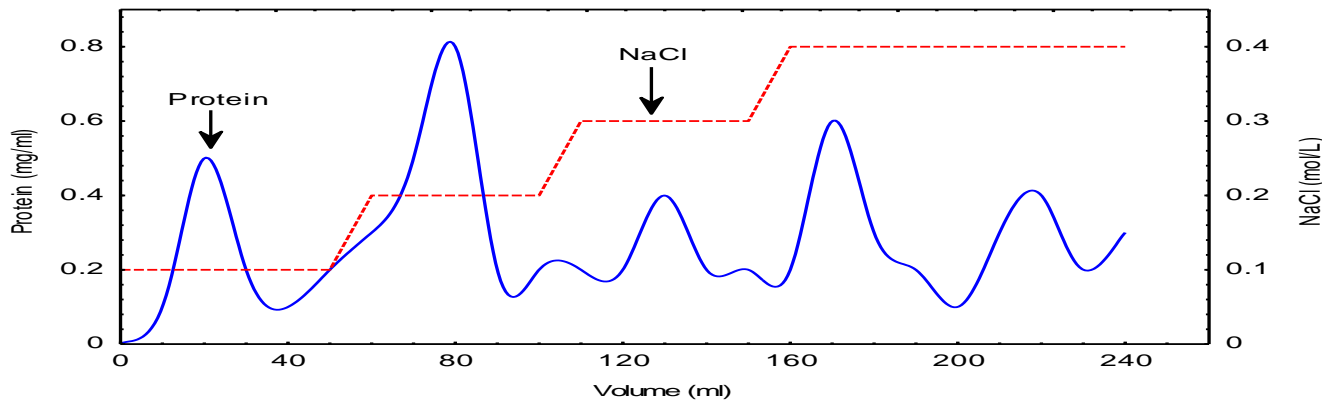
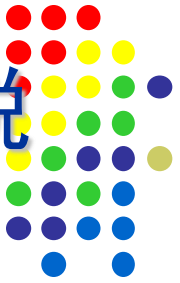
洗脱展开法

- 峰的面积与溶质含量成正比，由此可作定量分析。
- 在此法中，组分的保留体积为开始加入样品至该组分峰顶出现时所流出的液体体积。保留体积是定性分析的基础
- 恒定洗脱、分步洗脱、梯度洗脱

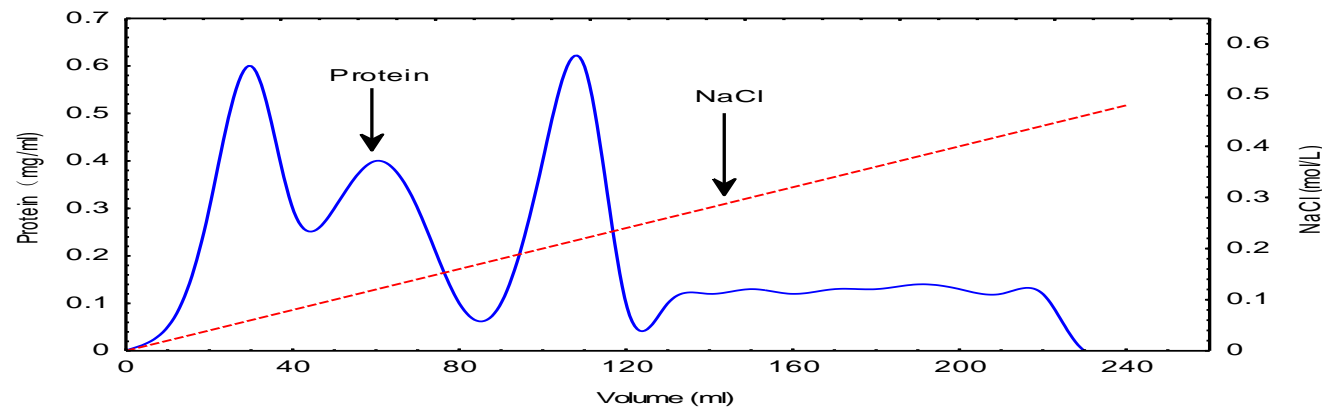




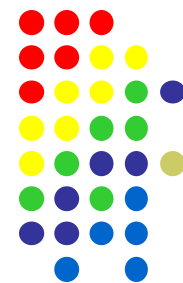
恒定洗脱



分布洗脱

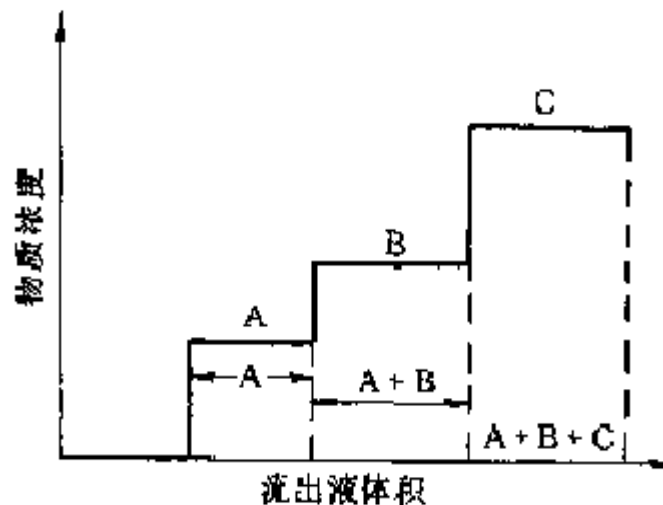


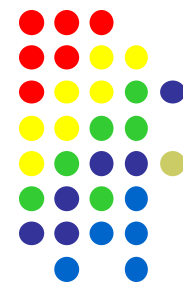
梯度洗脱



前沿分析法

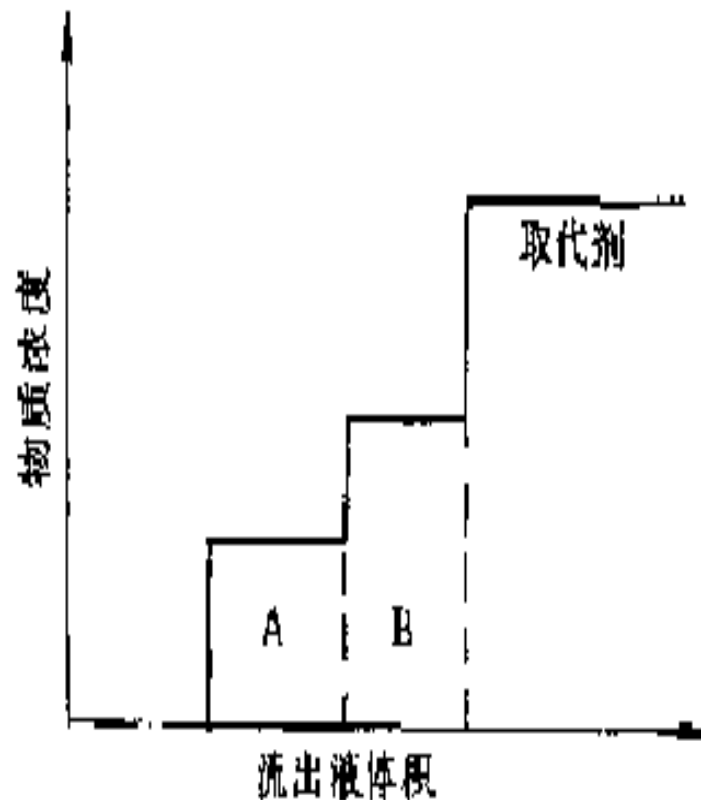
- 在前沿分析法中，样品溶液不是作为一部分进入色谱柱，而是连续不断地输入色谱柱，即样品溶液本身起流动相的作用。当溶液通过固定相时，不同组分根据与固定相作用力强弱不同，产生不同的移动速率。
- 前沿分析不能将样品中每个组分都分离回收，而只能得到其中作用力最弱的纯物质，因而一般不用于混合物的分离。但此法适合于在产品的精制中除去痕量杂质。前沿分析法的一个显著特点是分离过程中样品溶液本身就是流动相，组分的浓度不会像洗脱展开中那样逐渐稀释。

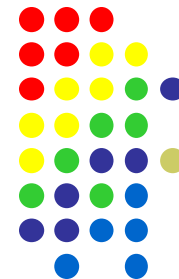




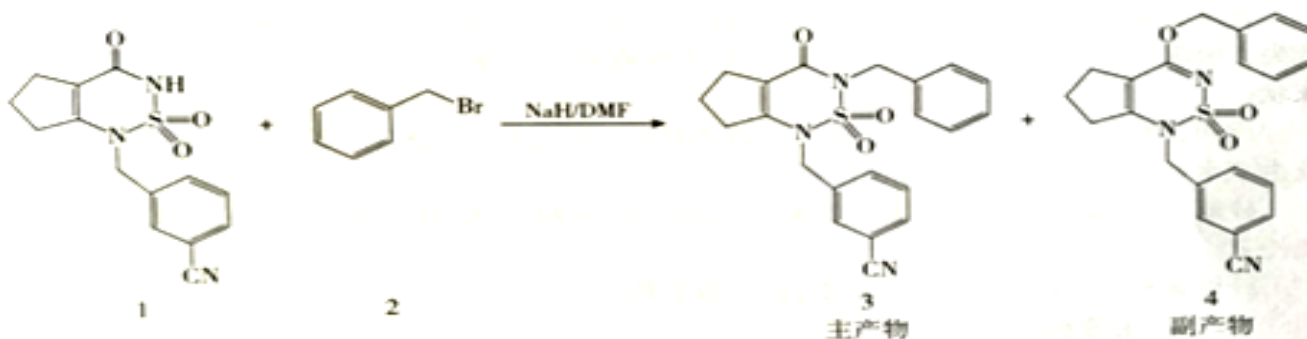
置换展开法

- 先将样品输入色谱柱，随即加入一种与固定相作用强于分离组分的溶剂或几种溶剂的混合物作为流动相冲洗。在洗脱过程中，各组分因与固定相的作用力不同而分离。
- 最先从柱中被置换出来的是作用力最弱的溶质，最后出来的是置换剂本身。





4.6.4 应用



1 单取代环戊烷并噻二嗪 2 苄基溴

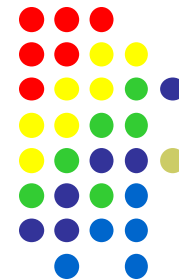
3 4 环戊烷并噻二嗪类衍生物异构体

薄层中 R_f 分别为0.3和0.2

层析柱：吸附柱层析

固定相：硅胶200-300目

流动相：乙酸乙酯：石油醚（4:1）



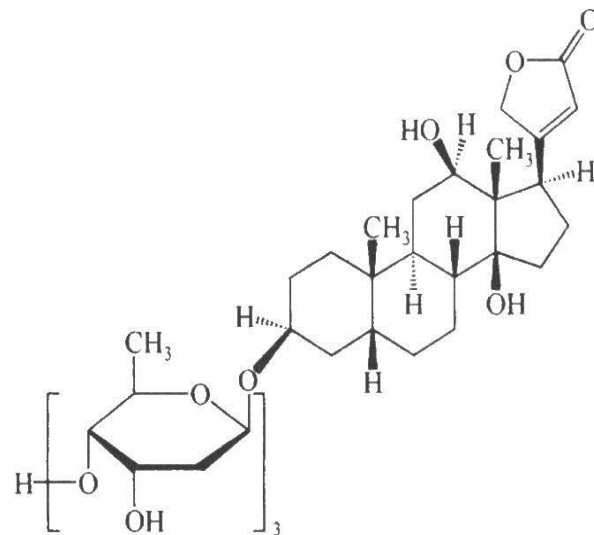
地高辛（异羟基洋地黄毒苷）的分离

层析柱：分配柱层析

固定相：硅胶80-100目

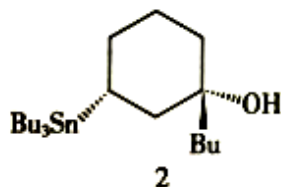
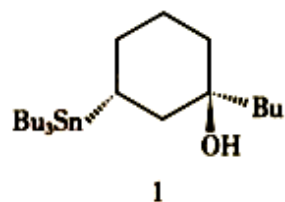
水饱和乙酸乙酯湿法装柱

流动相：水饱和的乙酸乙酯
(含0.5%甲醇)





光学异构体分离



(a)

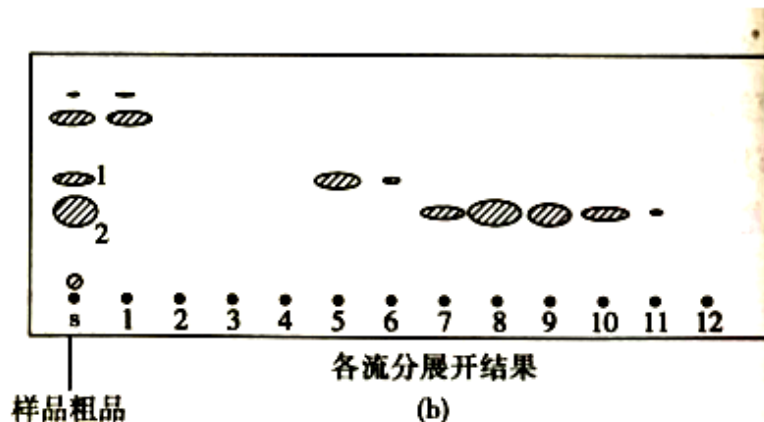


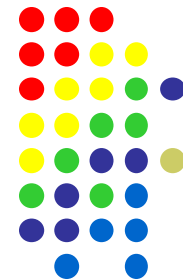
图 8-6 化合物结构(a)与各流分的收集与展开结果(b)

层析柱： 加压柱色谱

固定相： 硅胶200-300目

流动相： 乙酸乙酯-石油醚 (5:95)

4.7 纸层析法实验技术



- **分配层析**：6-7%键合水

- **滤纸要求**：

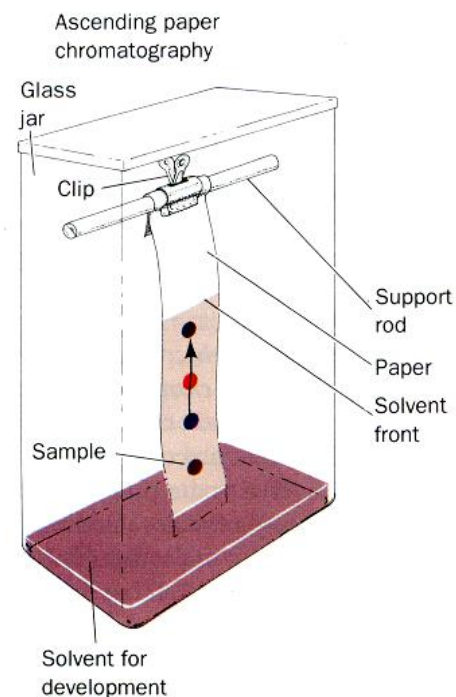
物理性状均匀—展开速率均匀；

一定的机械强度—防变形；

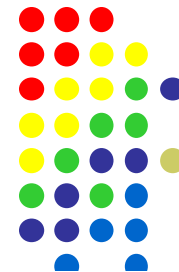
一定的纯度，定性灰分 $<0.1\%$ ，
定量灰分 $<0.05\%$ ；

厚薄、纤维松紧、纵横向；

前处理



The experimental arrangement for chromatography.



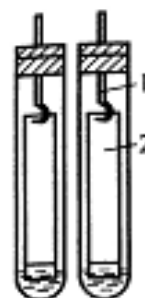
● 展开剂

$R_f: 0.05-0.85, \Delta R_f > 0.05;$

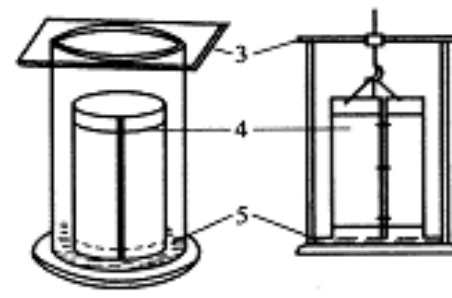
不与被分离组分反应;

层析点圆整;

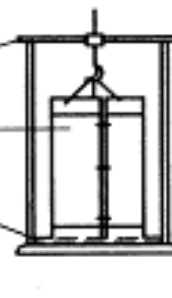
不选高沸点有机溶剂, 影响展开后干燥。



(a)



(b)



(c)

氨基酸的分离:

酚-水 (7: 3)

丁醇-醋酸-水 (4:1:2)

用茚三酮的丁醇溶液显色。

