

无机合成化学

第四章 薄层色谱及柱层析

— 反应的监测、样品验纯及提纯

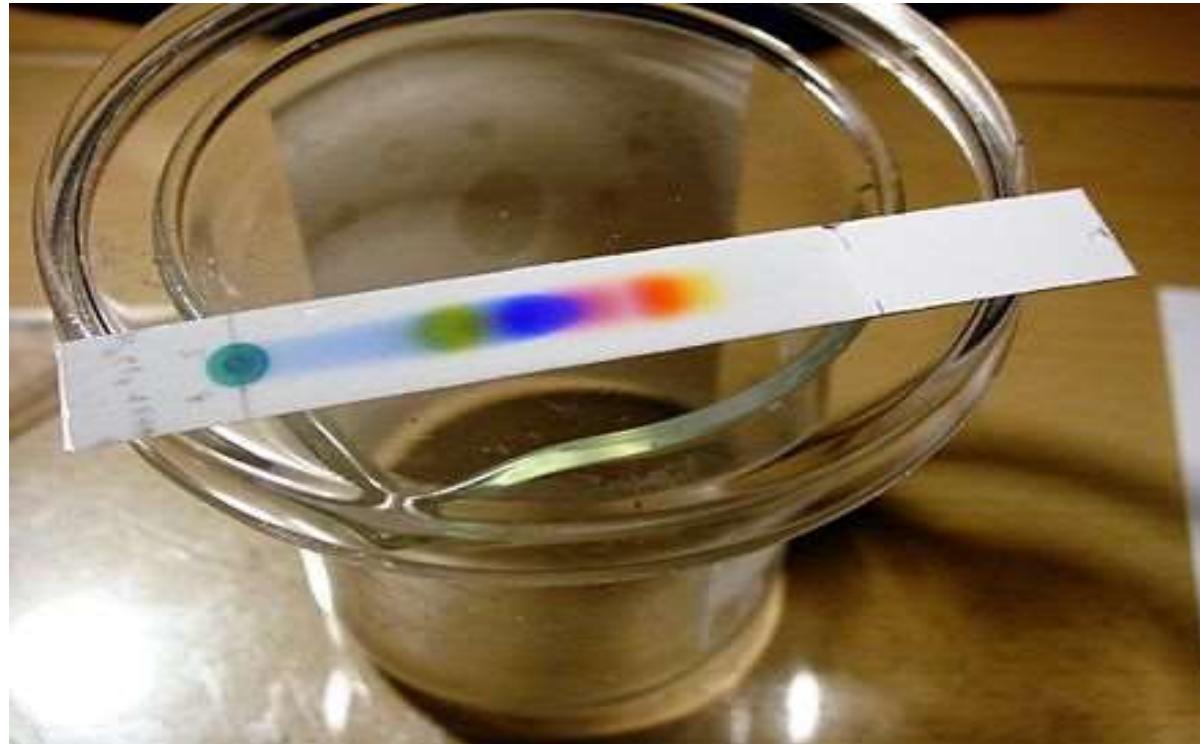
张文华

苏州大学材料与化学化工学部

Email: whzhang@suda.edu.cn

日期: 2024-04-02/09

黑色墨水的薄层色谱



什么是薄层色谱(Chromatography)?

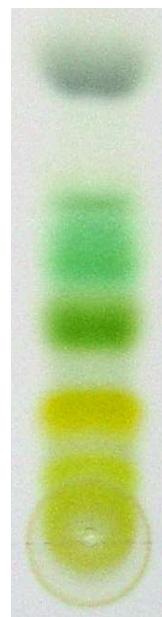
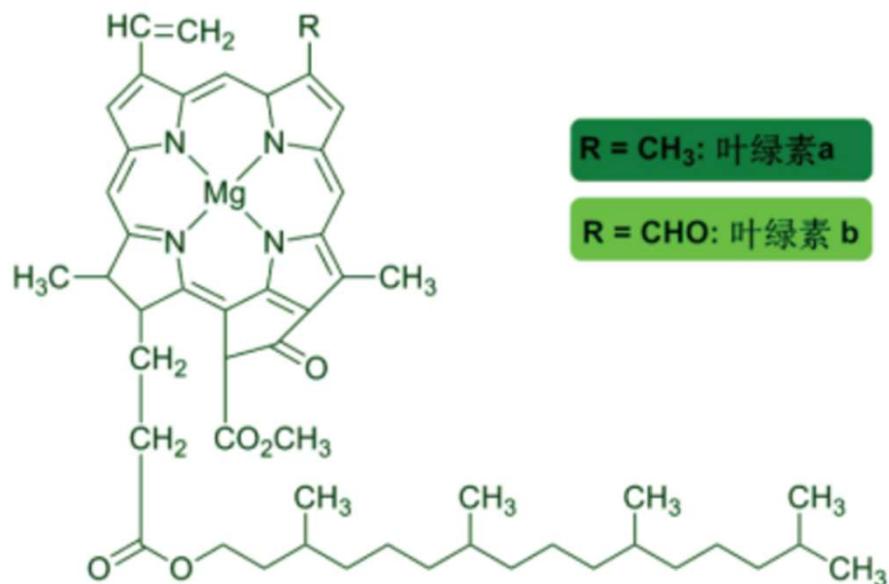
“色谱法”这个名称来自于薄层色谱法的一些早期实验。

色谱一词来自希腊语chroma, 意为“颜色”和graphein, 意为“书写”。这是一种分离具有不同颜色的物质的技术。色谱可以非常复杂，且使用复杂昂贵的仪器，例如GC-MS或HPLC。但最基本、最重要和最古老的技术是薄层色谱或TLC (Thin Layer Chromatography)。

薄层色谱通过物质对固定相（通常是TLC中的硅胶）和流动相（溶剂或溶剂混合物）的亲和力不同来分离混合物的不同化学成分。它们不一定是有色化合物，无色化合物也可用多种方法利用TLC加以识别。

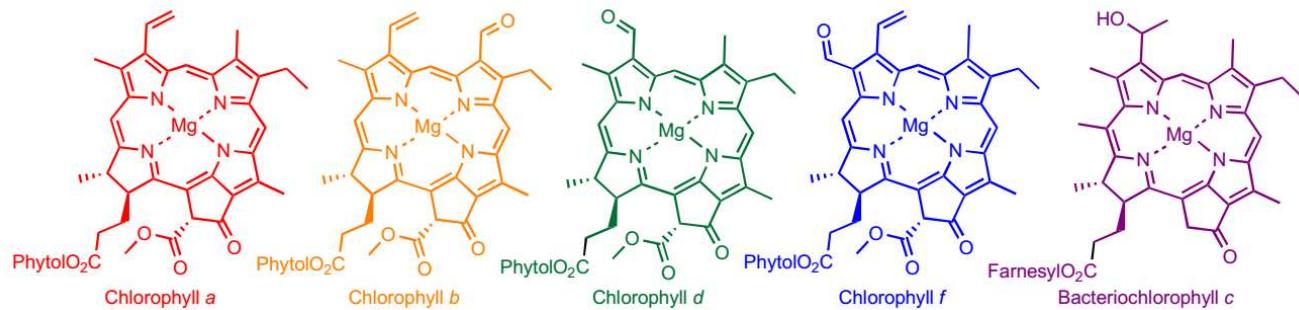
什么是薄层色谱?

TLC 最初用于分离植物提取物中的色素。这些色素（如叶绿素）具有不同的颜色，并通过固定相以不同的速率洗脱，因此它们可以被分离并易于观察：



19世纪初，俄国化学家、色层分析法创始人茨韦特 (M. C. M. Tswett) 用吸附色层分析法证明高等植物叶子中的叶绿素有两种成分叶绿素a 和叶绿素b。

薄层色谱 VS 重结晶?



头条 @小忻姐

色谱法的创始人是俄国的植物学家茨维特 (M. Tswett)。1906年，俄国植物学家茨维特发表了他的实验结果：为了分离植物色素，他将含有植物色素的石油醚提取液倒入装有碳酸钙粉末的玻璃管中，并用石油醚自上而下淋洗，由于不同的色素在碳酸钙颗粒表面的吸附力不同，随着淋洗的进行，不同色素向下移动的速度不同，从而形成一圈圈不同颜色的色带，使各色素成分得到了分离。他将这种分离方法命名为色谱法(chromatography)。

DOI: 10.1038/s41557-022-01052-6

什么是薄层色谱？

在 TLC 中，首先使用沉积在玻璃或铝片上的支撑物作为固定相（常见的是硅胶），在同一条线上点含有化合物的混合物。然后用有机溶剂洗脱 TLC，不同的化合物将以不同的速率向上移动，从而实现不同组分的分离。

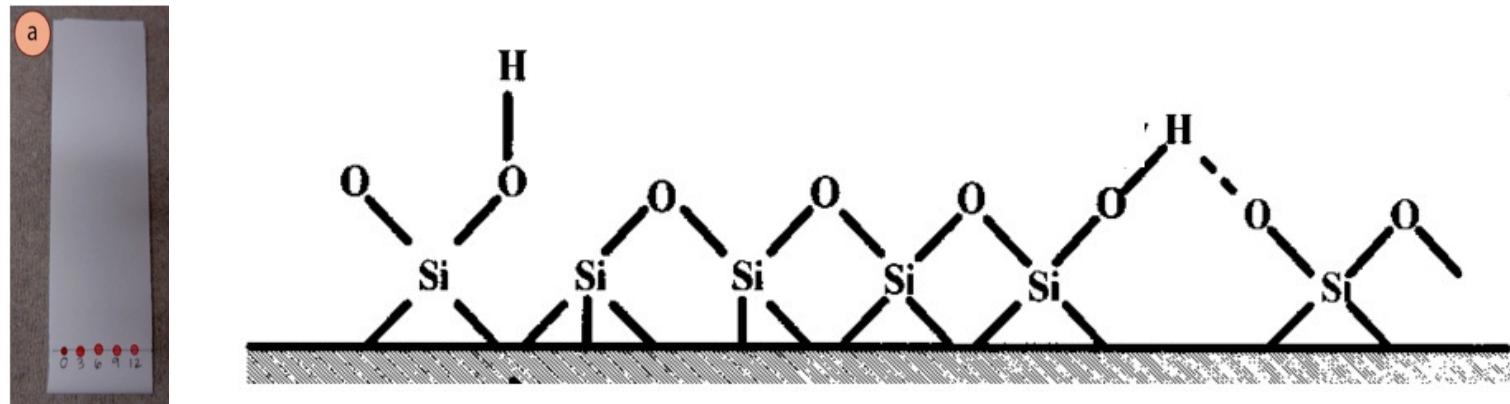
什么是薄层色谱?

TLC 是一种廉价、快速和简单的分离混合物成分的技术。合成化学家使用它来监测化学反应和纯化。



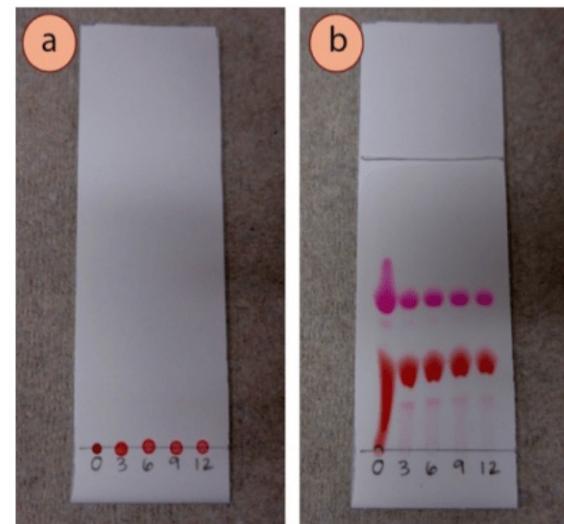
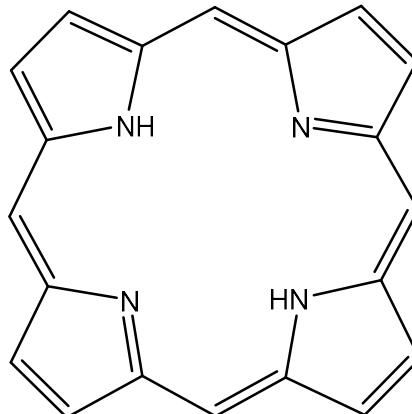
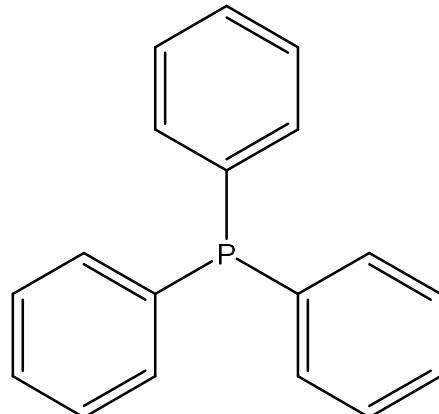
TLC 的工作机理

- TLC 板是涂有固定相 “薄层” 的玻璃/铝板，固定相通常是硅胶。在板底部上方约 1 cm 处，点不同极性混合物的溶液。
- 然后，将其垂直放置在包含一定量适当溶剂混合物的洗脱室中。溶剂通过毛细现象缓慢向上移动。
- 固定相硅胶含有 Si-O-H /Si-O 键，可根据化合物的极性以不同的方式与混合物中化合物结合。此外，根据所用溶剂的性质（极性大小），它会使不同极性的化合物向上移动的速率不同。



TLC 的工作机理

- 一般来说，极性较大的化合物会通过 TLC 板 “爬” 得较慢，而极性较小的化合物会 “爬” 得较快。
- TLC 板上出现点数量和位置，对应混合物中极性不同的化合物。
- 通常需要一个紫外灯来显示不同的点，但如果化合物颜色很深，也可以肉眼看到混合物的不同成分。



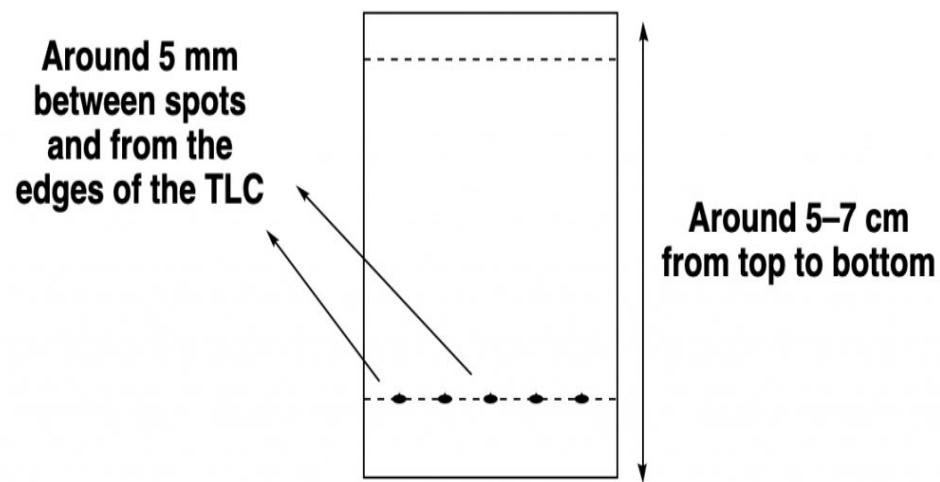
如何运行 TLC? -切TLC板

- 首先，需要切割一块适当尺寸的 TLC 板。合适的尺寸是多少取决于 TLC 的目的，以及需要分离多少个点。如果只是想看看混合物中有多少种化合物，一个点就足够了。
- TLC板一般由涂有固定相的铝制成，可用剪刀剪开。支撑材料是玻璃时，需要玻璃刀来完成。



如何运行 TLC? -点板

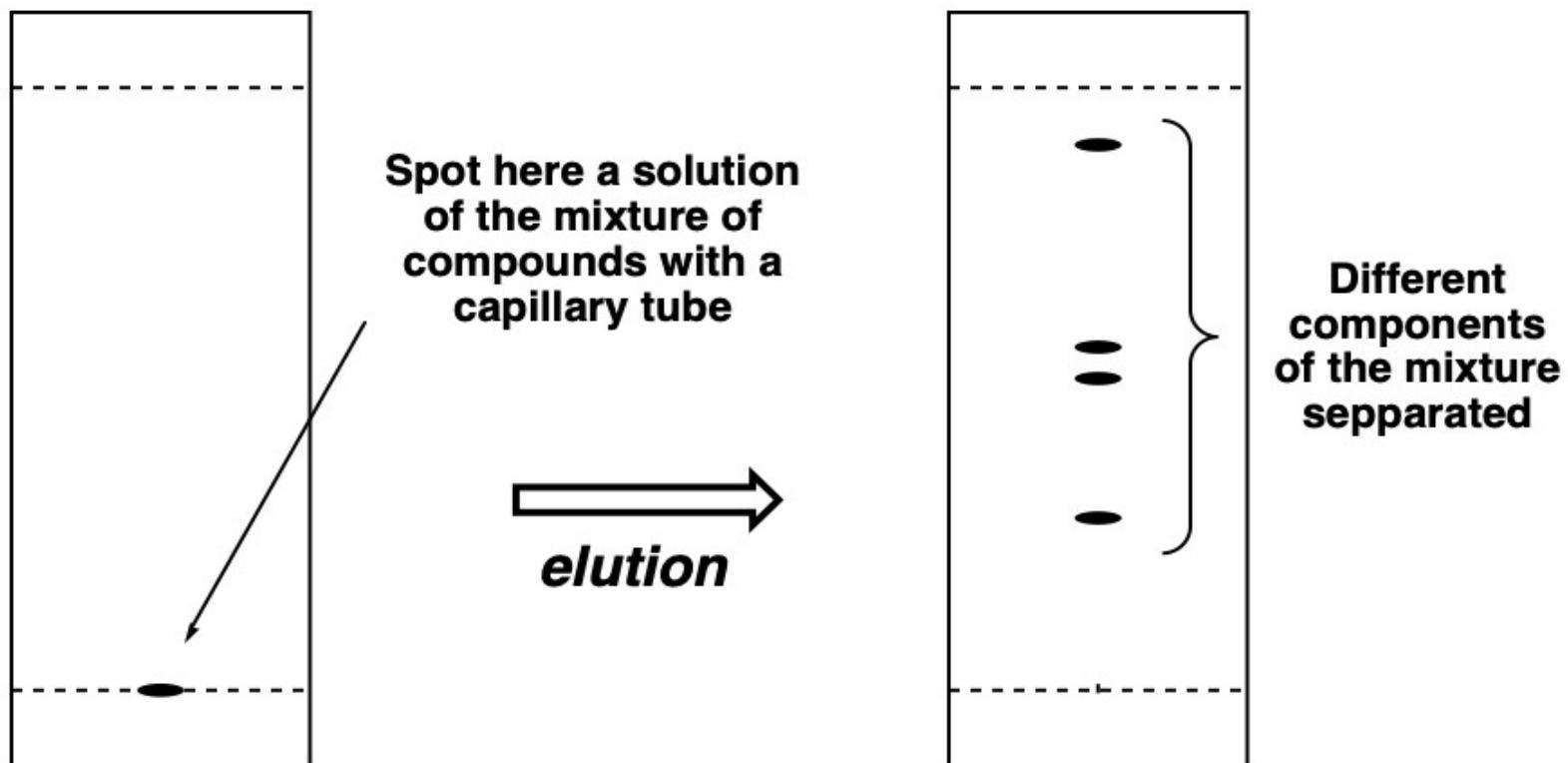
- 通常，薄层色谱板高约 5-7 厘米，从底部约 0.5-1.0 厘米处画一条线，点上混合物。**在洗脱室中混合物高于溶剂液位非常重
要！**
- 此外，在底部点样线的每个点之间留下一些间隔（这样它们就
不会相互混合！），并且 TLC 板的每个边缘也留下类似的间隔
(大约半厘米)。



如何运行 TLC? -点板

- 将混合物点板。首先，需要准备混合物的溶液。溶液通常浓度是大约 0.5–1 mL 溶剂中含有几毫克混合物/化合物。
- 用毛细管取一些混合溶液，在0.5-1cm的厘米线上轻轻压入相应的标记点（在TLC中总是用铅笔标记！钢笔墨水会被有机溶剂洗脱，铅笔石墨不会！）。
- 然后洗脱板，查看混合物中有多少化合物，以及它们的极性，只需检查不同的点即可。
- 尽可能制作非常小的样品点。非常宽的点会使不同的化合物重叠，从而导致分离效果不佳。甚至一些化合物可能会被隐藏，因为它们基本上会与其他大量斑点共同洗脱。一般来说，用稀释的溶液和更小的点。

如何运行 TLC?



如何运行 TLC? -洗脱 TLC 板

- 对于洗脱板，需要一个洗脱室，专门用于此目的。可以使用任何可以盖上盖子的玻璃容器，例如烧杯，一个干净的果酱罐。然后用大约 0.5 cm 高度的所需溶剂填充洗脱室。



如何运行 TLC? -洗脱 TLC 板

- 选择溶剂体系没有绝对的最佳起点。
- 如果提纯绝对非极性有机分子（无极性官能团，只有 C 和 H），例如萘，可从戊烷或己烷开始。
- 如果提纯具有一个或两个弱极性官能团（醚、酮、酯……）的化合物，可选择 4:1 正己烷/ EtOAc 混合物。
- 如果提纯的分子有一个或两个极性很强的基团（醇、胺等），可选择 1:1 正己烷/ EtOAc。
- 如果提纯的分子极性更强（例如糖、氨基酸等），可将正己烷换成 DCM，并保持 EtOAc 作为极性成分。初始可使用 1:1 比例的 DCM/EtOAc。
- 若使用 EtOAc 时基线不移动，可选择 9:1 DCM/ MeOH 甚至 9:1 EtOAc / MeOH。
- 如果这些都不起作用，说明极性太强，可能需要考虑使用反相 TLC（非极性固定相，而不是硅胶）。

有机溶剂极性表

化合物名称	极性	粘度	沸点	吸收波长
i-pentane(异戊烷)	0	-	30	-
n-pentane(正戊烷)	0	0.23	36	210
<u>Petroleum ether(石油醚)</u>	<u>0.01</u>	<u>0.3</u>	<u>30~60</u>	<u>210</u>
<u>Hexane(己烷)</u>	<u>0.06</u>	<u>0.33</u>	<u>69</u>	<u>210</u>
Cyclohexane(环己烷)	0.1	1	81	210
Isooctane(异辛烷)	0.1	0.53	99	210
Trifluoroacetic acid(三氟乙酸)	0.1	-	72	-
Trimethylpentane(三甲基戊烷)	0.1	0.47	99	215
Cyclopentane(环戊烷)	0.2	0.47	49	210
n-heptane(庚烷)	0.2	0.41	98	200
Butyl chloride(丁基氯；丁酰氯)	1	0.46	78	220
Trichloroethylene(三氯乙烯；乙炔化三氯)	1	0.57	87	273
Carbon tetrachloride(四氯化碳)	1.6	0.97	77	265
Trichlorotrifluoroethane(三氯三氟代乙烷)	1.9	0.71	48	231
i-propyl ether(丙基醚；丙醚)	2.4	0.37	68	220

有机溶剂极性表

化合物名称	极性	粘度	沸点	吸收波长
Toluene(甲苯)	2.4	0.59	111	285
p-xylene(对二甲苯)	2.5	0.65	138	290
Chlorobenzene(氯苯)	2.7	0.8	132	-
o-dichlorobenzene(邻二氯苯)	2.7	1.33	180	295
Ethyl ether(二乙醚；醚)	2.9	0.23	35	220
Benzene(苯)	3	0.65	80	280
Isobutyl alcohol(异丁醇)	3	4.7	108	220
<u>Methylene chloride</u> (二氯甲烷)	<u>3.4</u>	<u>0.44</u>	<u>40</u>	<u>245</u>
Ethylene dichloride(二氯化乙烯)	3.5	0.78	84	228
n-butanol(正丁醇)	3.7	2.95	117	210
<u>n-butyl acetate</u> (醋酸丁酯；乙酸丁酯)	<u>4</u>	<u>-</u>	<u>126</u>	<u>254</u>
n-propanol(丙醇)	4	2.27	98	210
Methyl isobutyl ketone(甲基异丁酮)	4.2	-	119	330
Tetrahydrofuran(四氢呋喃)	4.2	0.55	66	220
<u>Ethyl acetate</u> (乙酸乙酯)	<u>4.30</u>	<u>0.45</u>	<u>77</u>	<u>260</u>

有机溶剂极性表

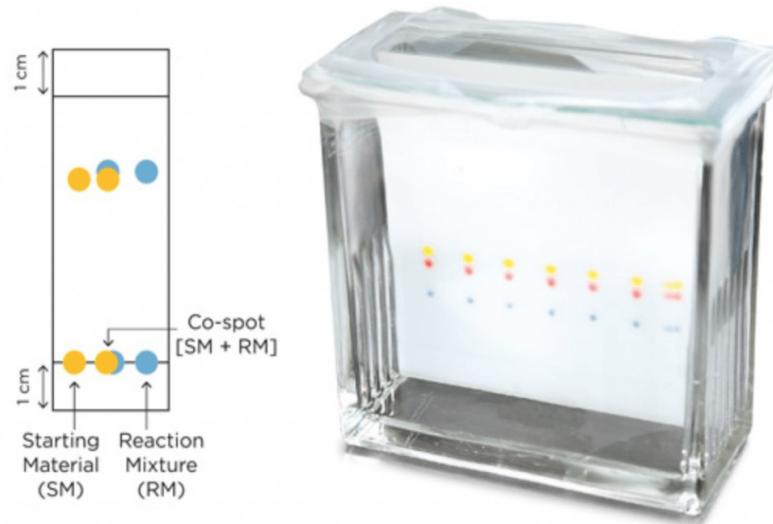
化合物名称	极性	粘度	沸点	吸收波长
i-propanol(异丙醇)	4.3	2.37	82	210
<u>Chloroform(氯仿)</u>	<u>4.4</u>	<u>0.57</u>	<u>61</u>	<u>245</u>
Methyl ethyl ketone(甲基乙基酮)	4.5	0.43	80	330
Dioxane(二恶烷; 二氧六环; 二氧杂环己烷)	4.8	1.54	102	220
Pyridine(吡啶)	5.3	0.97	115	305
<u>Acetone(丙酮)</u>	<u>5.4</u>	<u>0.32</u>	<u>57</u>	<u>330</u>
Nitromethane(硝基甲烷)	6	0.67	101	330
<u>Acetic acid(乙酸)</u>	<u>6.2</u>	<u>1.28</u>	<u>118</u>	<u>230</u>
<u>Acetonitrile(乙腈)</u>	<u>6.2</u>	<u>0.37</u>	<u>82</u>	<u>210</u>
Aniline(苯胺)	6.3	4.4	184	-
Dimethyl formamide(二甲基甲酰胺)	6.4	0.92	153	270
<u>Methanol(甲醇)</u>	<u>6.6</u>	<u>0.6</u>	<u>65</u>	<u>210</u>
Ethylene glycol(乙二醇)	6.9	19.9	197	210
<u>Dimethyl sulfoxide(二甲亚砜 DMSO)</u>	<u>7.2</u>	<u>2.24</u>	<u>189</u>	<u>268</u>
Water(水)	10.2	1	100	268

常见的洗脱剂组合

- 石油醚/乙酸乙酯
- 石油醚/丙酮
- 石油醚/乙醚
- 石油醚/二氯甲烷
- 二氯甲烷/乙酸乙酯
- 二氯甲烷/甲醇
- 乙酸乙酯/甲醇

如何运行 TLC? -洗脱 TLC 板

- 另外，重要的是溶剂液面应低于样品的初始点！否则会被稀释，无法获得干净的分离。
- 一旦洗脱室准备就绪，只需将 TLC 垂直放入内部，然后等待溶剂通过毛细作用上升。当溶剂到达顶部的90% 左右时取出 TLC 板。



如何运行 TLC? -洗脱 TLC 板

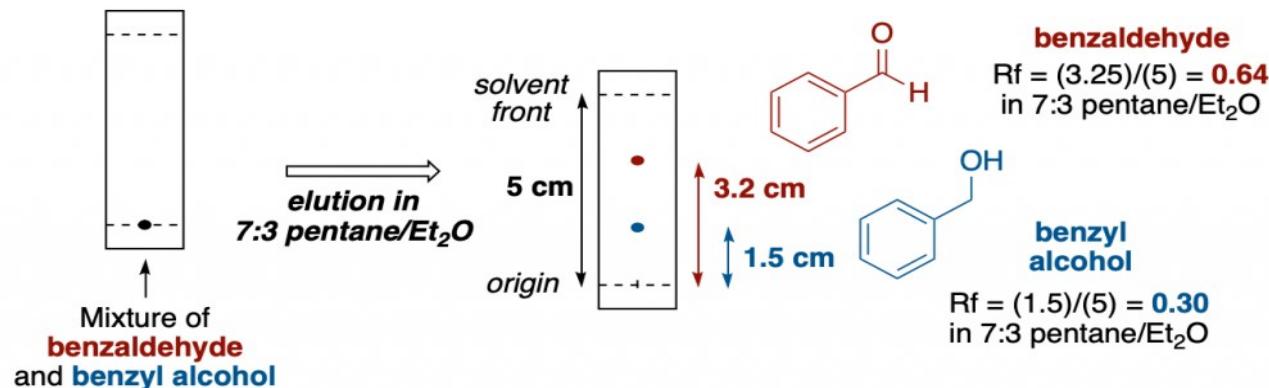
- 在板干燥之前，标记洗脱液前部（板上液位已达到的线）。将它来确定每个点/化合物的**比移值(Retention Factor; R_f)**。
- 将TLC板吹干（使用压缩空气、吹气或等待.....）
- 如果化合物颜色很深，则不需要其他辅助器材，直接看TLC板就行了。
- 大多数时候，有机化合物是不可见的，但它们会吸收紫外线。因此，只需使用紫外线灯。
- 最后，有很多染色溶液可用于显影以轻松分辨每种化合物的出现位置。

如何运行 TLC? - 确定不同化合物的比移值

- 什么是**比移值**?
- 在薄层色谱中, **比移值**(R_f) 指原点到斑点中心的距离与原点到溶剂前沿的距离的比值。
- 要计算 R_f 的值, 只需应用这个简单的公式: R_f (点) = (点移动的距离)/(溶剂前端移动的距离)

如何运行 TLC? - 确定不同化合物的比移值

- 在使用 7:3 戊烷/乙醚作为溶剂的 TLC 板中洗脱苯甲醛和苯甲醇的混合物后，这两种化合物会移动一定距离。
- 苯甲醛的极性低于相应的苯甲醇，因此很容易被指认为上面一个点。
- 在测量两个点移动的距离后，可以确定该溶剂混合物中每种化合物的比移值。例如，对于苯甲醛，它从原点移动了 3.2 厘米。溶剂总共移动了 5 厘米。因此我们可以说**苯甲醛在 7:3 戊烷/乙醚中的Rf为 3.2/5 = 0.64**。



如何运行 TLC? - 确定不同化合物的比移值

比移值很大程度上取决于所使用的溶剂系统和 TLC 的固定相。修改其中任何一个， R_f 将会改变。**在报告比移值时，必须为每种化合物指定这些参数。**

第一次尝试不成功，则优化溶剂系统重新运行 TLC

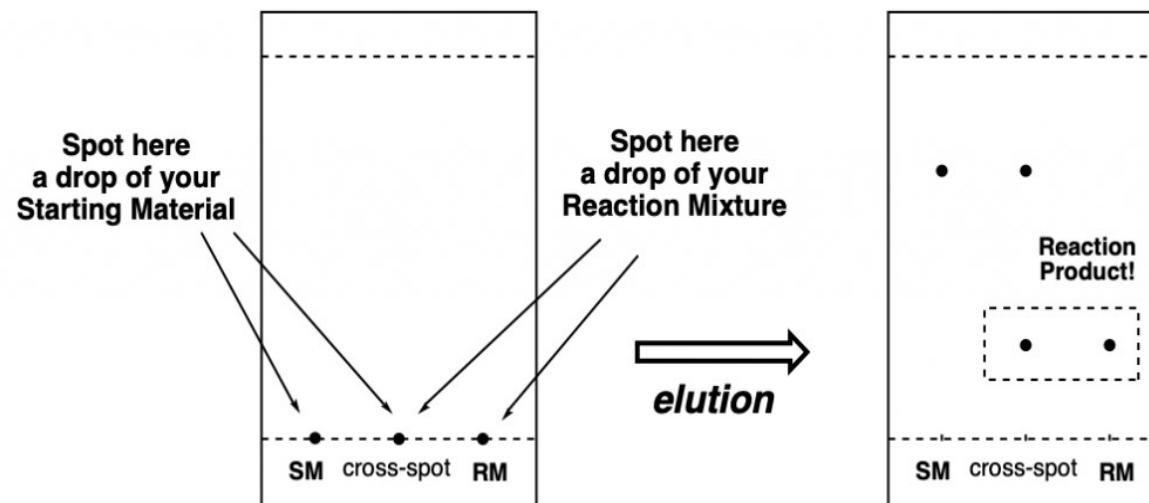
- 在处理新化合物时常见的情形：很多时候首选的溶剂体系并不合适，可能混合物中的所有化合物一起洗脱到 TLC 的顶部；或者在基点没有移动；或者可能介于两者之间，但分离不完美。在任何这些情况下，需要不断调整溶剂体系，直到找到最适合的溶剂体系。
- 即使对于非常有经验的化学家来说，快速柱色谱纯化之前进行 3-4 个反应粗品的 TLC 板也很常见。

TLC用于反应监测

- TLC 的主要用途是监测化学反应。在化学转化中，通常含有起始原料 (SM)，它会被消耗以产生产物。在大多数情况下，该产物的极性与 SM 不同。这意味着它们在 TLC 中将具有不同的比移值，将能够通过 TLC 将它们分开。
- 通常需要使两种化合物的比移值都在 0.2 和 0.8 之间的溶剂混合物。主要的想法是可以看到两个点都分别显色，而不是一起显色。这样可以看到你的反应混合物中是否还有 SM，或者它是否全部被消耗掉。

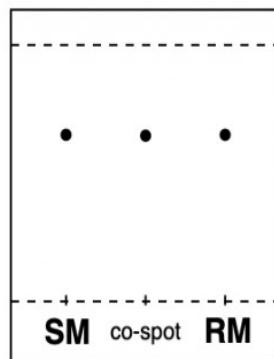
TLC用于反应监测

方法是在 TLC 上点三个点，一个含有 SM，另一个含有反应混合物 (RM) ，最后一个在中间（共点或交叉点），其为SM 和RM的混合物。通过这种方式，可以在洗脱后清楚地看到SM 实际上反应形成了新产品。如果 SM 和产品的Rf非常相似，交叉点尤其重要，否则很难看出反应混合物中是否真的有新产品或只有 SM。

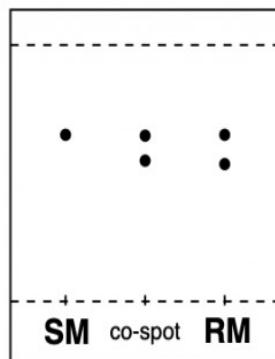


TLC用于反应监测

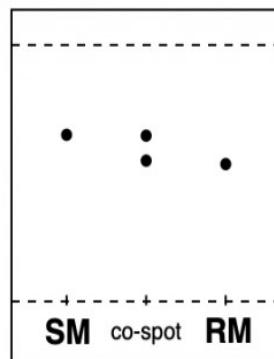
如下图，很容易看出反应是否正在进行，但反应尚未完成，或者是否所有的 SM 都已被消耗并且 RM 上只有产品。此外，如果碰巧有反应产物样品，可以为该产品添加另一个点，然后再添加一个产物和反应混合物的共点。通过这种方式，您可以确认已形成所需的产品。



**the reaction
has not proceeded**
(e.g. failed reaction,
reaction time = 0,
or before adding
a catalyst or reagent)



**the reaction
is not finished**
(there is still some
starting material)

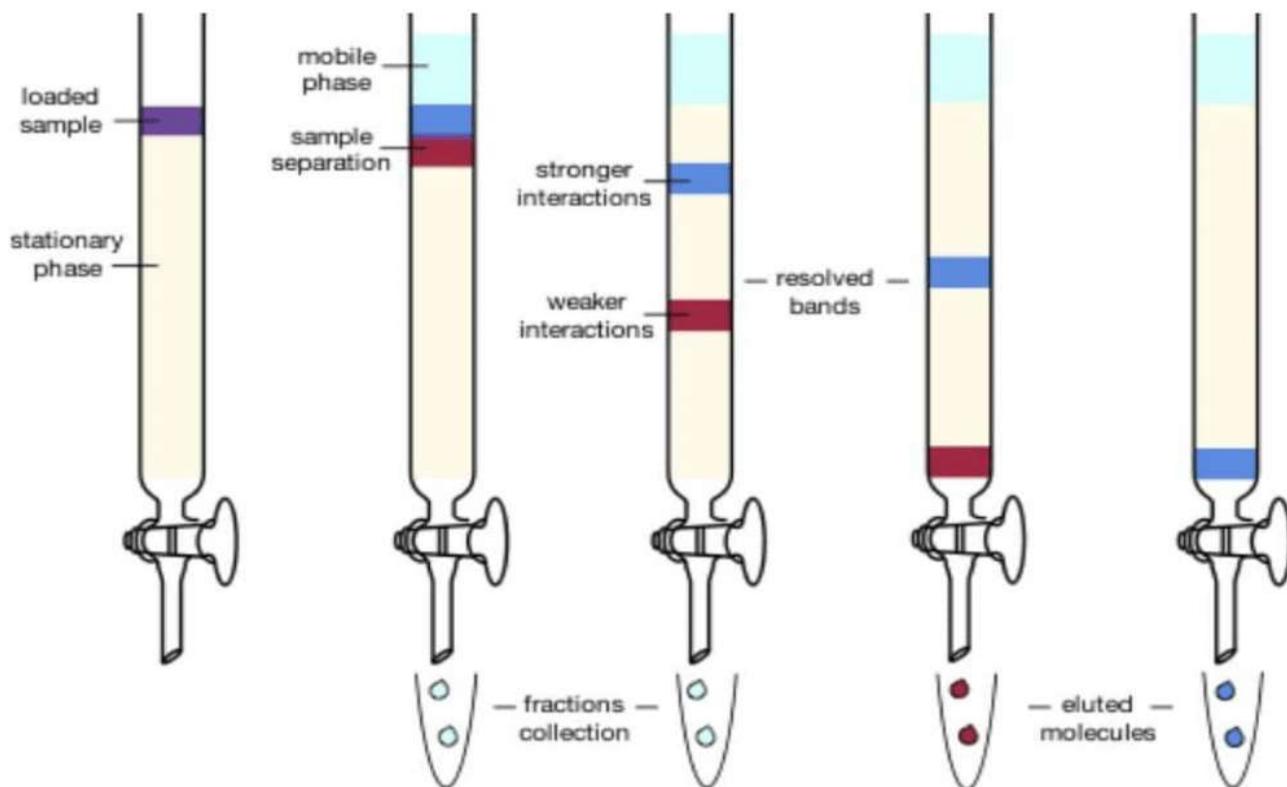


**the reaction
is finished**
(there is only product
on the reaction
mixture, all starting
material is gone)

柱色谱法提纯化合物时 TLC的应用

- TLC的另外一个应用场景是利用柱色谱法提纯化合物时。
- 什么是柱色谱？
- 柱色谱法是一种根据相对极性以规模化分离化合物的方法。
- 柱色谱法原理与 TLC 完全相同。用一个装有固定相（通常也是硅胶）的玻璃柱。在固定相之上，放置了想要分离的化合物的混合物，称为“粗产品”。
- 然后，将溶剂从上到下通过色谱柱，有时通过施加压力来辅助（这就是我们所说的“快速柱色谱”，flash chromatography）。这使得混合物中的不同化合物以不同的速率通过固定相洗脱。

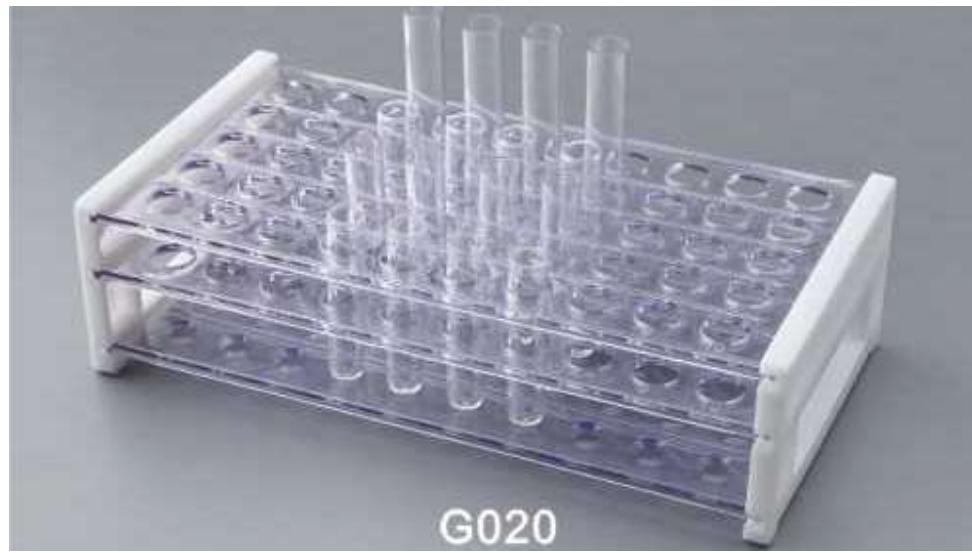
柱色谱法提纯化合物时 TLC的应用



一般是用硅胶，硅胶注意目数，目数越高，代表硅胶颗粒越细，分离效果就越好。但是相应的，用越细的硅胶，产物在柱子上的移动就越慢，这会需要更大的压力，或者更长的时间。Flash柱的话，硅胶目数推荐**200-400目**，比较容易分离的体系，需要用更低目数来节约时间。
目 (mesh) 是指每英寸筛网上的孔眼数目。50目就是指每英寸上的孔眼是50个，每平方英寸上的孔眼是 $50 \times 50 = 2500$ 个；500目就是指每英寸上的孔眼是500个，每平方英寸上的孔眼是 $500 \times 500 = 250000$ 个。目数越高，孔眼越多。除了表示筛网的孔眼外，它同时用于表示能够通过筛网的粒子的粒径，目数越高，粒径越小。

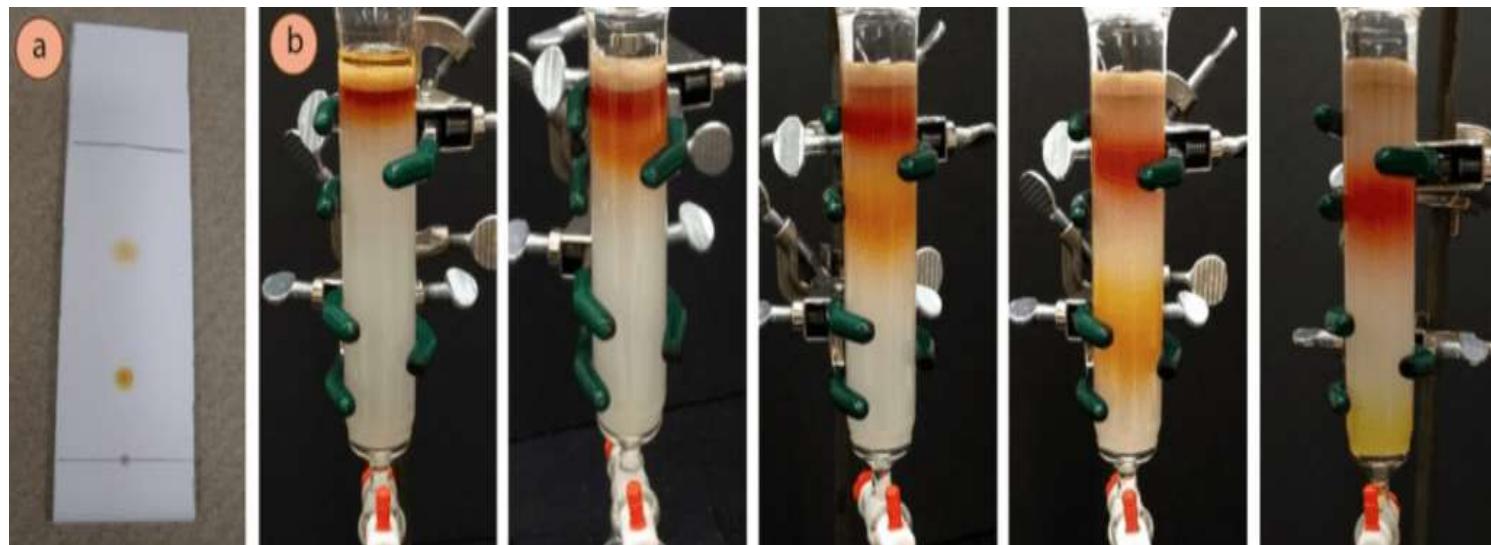
柱色谱法提纯化合物时 TLC 的应用

- 每种化合物的洗脱速率取决于其在特定溶剂系统中的 R_f (即极性)。它们将以与其在 TLC 中洗脱的点相同的相对速率从柱中出来。
- 从柱底出来的不同馏分被收集在不同的试管中。将混合物的每种化合物放在不同的试管中。然后我们可以通过蒸除去溶剂，得到纯净物。



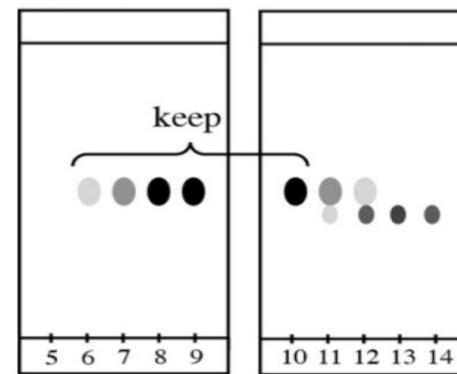
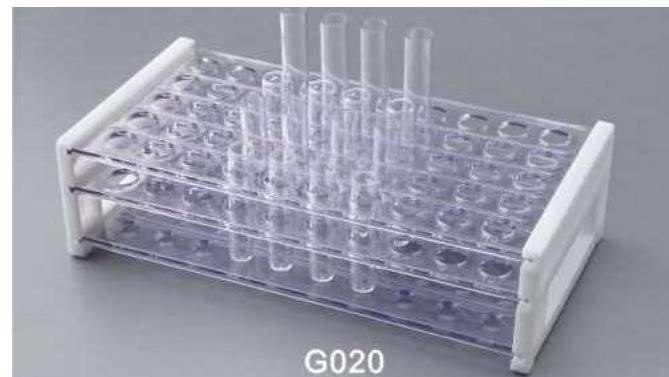
我们如何将 TLC 用于柱色谱？

- 在运行快速柱层析之前，需要选择适合纯化的溶剂体系。
- 理想情况下，要分离的产物在给定的洗脱液（溶剂混合物）中的Rf应约为 0.4，以实现平稳的柱纯化。在 TLC 上产生此结果的溶剂混合物将是运行大规模柱色谱纯化的绝佳选择。



对柱色谱中的馏分进行TLC

- 在运行柱层析之后，通常会得到几十个管子，里面装满了溶解了不同化合物的洗脱液。必须再次使用TLC。
- 从馏分 5 到 10，只有化合物一。可以混合这些馏分，浓缩得到纯化合物 1。
- 馏分 11 和 12 具有两种化合物的混合物。通常把这种混合组分扔掉（有时实际上并不关心杂质，也许它不影响下一步的合成！）。
- 馏分 13 和 14 含有纯化合物 2。如果还需要这个化合物，也将它们浓缩。
- TLC 对于反应监测和产物纯化都极为重要，这是任何合成实验室的两个基石。



检查每个部分的内容

- 有时 TLC 还不够，不知道柱色谱出来的每个不同馏分中的化合物/产物是什么。可以蒸发溶剂进行 NMR（蒸发溶剂相对耗时）。
- 可以使用 GC-MS（气相色谱-质谱仪）或 LC-MS（液相色谱-质谱仪），ESI-MS（电喷雾-质谱仪）快速分析所有不同的馏分，并了解每个化合物的分子量。
- 另一个仪器是 TLC-MS。与 GC-MS 或 LC-MS 相比，这种技术在化学实验室中的应用通常要少得多。此仪器会自动刮掉洗脱 TLC 上的各个点，并进行 MS 分析，因此通常可以在不到一分钟的时间内检查 TLC 的每个点上的分子量。
- **结晶进行最终的结构确定。**

关于比移值和色谱柱

- 使化合物的Rf为 0.4 的洗脱液是通常的经验法则，但当然也有许多例外。如果有两个在洗脱液中Rf非常接近的化合物，这可能还不够。两种化合物在 TLC 中显示为两个不同的点并不意味着它们会从色谱柱中分离出来。
- 柱带就像更宽的 TLC 点，特别是当扩大纯化规模时。想象一下 TLC 样品超载，得到两个大的无法分开的重叠点。这更接近于柱色谱中实际发生的情况。
- 出于这个原因，有时 Rf 为 0.4 并不能解决问题。如果斑点的间隔 Rf 小于 0.15，通常需要更保守一些，选择 Rf 约为 0.3 甚至更低的洗脱液。
- 增强这种纯化效果的另一个技巧是使用更粗的色谱柱，这对分离有很大帮助。使用更长的色谱柱通常没有帮助，因为只是加厚了条带并使它们重叠得更多！
- 相反地，有时感兴趣的化合物在溶剂混合物中Rf 为 0.7-0.9。这种情况下可以将化合物快速地分离在前几个试管中。

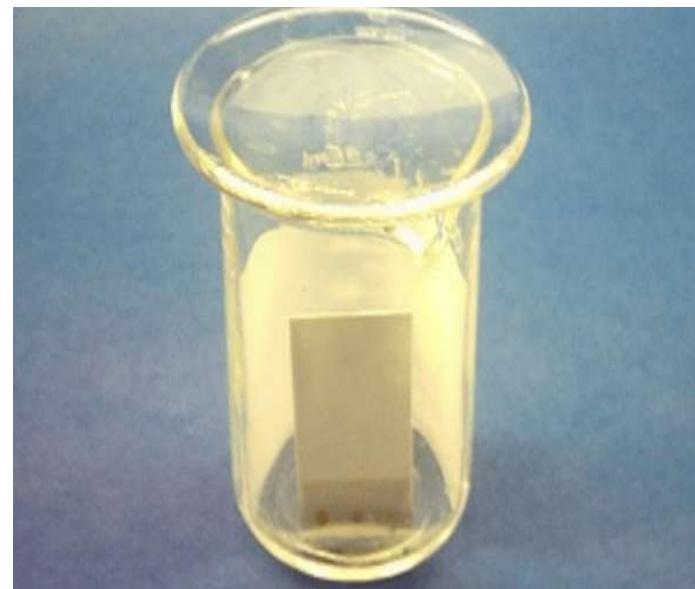
薄层色谱材料-制作毛细管与洗脱室

- 在TLC 中，必须使用毛细管点板。毛细管可以购买，也可以自己制作。
- 洗脱室可以购买。也可用简单的容器替代。
- 一个好的洗脱室的关键要尽可能饱和的气氛。这样，溶剂就不会在通过板的过程中蒸发，这会导致洗脱液前端移动不均匀。不利于分离，因此始终确保的洗脱室是一个合理封闭的系统。如下图所示，可以在洗脱 TLC 之前将一张滤纸放入腔室内一段时间。



薄层色谱材料-TLC 洗脱室

- 溶剂将通过滤纸上升（与通过 TLC 的原理相同），有助于用洗脱液使洗脱室室内的气氛饱和。这将使洗脱液以更均匀的方式上升到 TLC 板上。
- 此外，耐心等待，将洗脱液与滤纸一起留在腔室中一段时间，再TLC。



薄层色谱材料-替代固定相

- 超过 95% 的情况下，将在涂有硅胶作为固定相的板中进行 TLC。但是有一些非常特殊的情况可以考虑不同的固定相。
- 硅胶 (SiO_2) 呈微酸性，因此某些化合物对这些酸性条件非常敏感。在这些情况下，可以首先尝试在洗脱液中添加碱性溶剂来中和硅胶（典型条件是在溶剂混合物中添加 2-5% 的三乙胺）。
- 很多时候这可以解决问题，但在其他情况下还不够。对于这些情况，有替代固定相，例如中性氧化铝(Al_2O_3)

薄层色谱材料-替代固定相

- 另一种替代固定相是反相。
- 典型的硅胶固定相具有很强的极性，使用极性远低于 SiO_2 的溶剂系统洗脱板。这适用于大部分有机分子。但是，如果使用极性极强的分子，会发现它们堵在 SiO_2 中，而且无论使洗脱液具有多大极性，它们都不会移动。
- 对于这些情况，可以使用反相色谱，其中固定相是非极性的（它保留的极性化合物要少得多），并且将使用极性溶剂（例如 MeOH ）作为洗脱液。常用的填料弱极性分子修饰的硅胶。如 C_{18} 十八烷基键合球形硅胶， C_8 辛烷键合球形硅胶， NH_2 氨基键合球形硅胶，二醇基键合球形硅胶，苯基键合球形硅胶等。

薄层色谱材料-替代固定相

- 但这些替代固定相有一些缺点：
- 它们不是标准方法，而且很多时候在实验室中找不到氧化铝或反相的 TLC 板。
- 可用性较低，通常比硅胶更昂贵。
- 一般来说，分离度和分辨率更差。但有时（虽然很少）它们是唯一的出路，所以这些替代方案是存在的！
- 简单的滤纸可以作为固定相，但分离效果差，可用于极其简单有色组分的分离。

薄层色谱材料的可视化

- 有时化合物会吸收可见光，不需要显像剂。当它们从TLC板上洗脱下来时，可以直接观测。这对于高度共轭的化合物（例如多环芳烃或多烯）和有机金属化合物（例如二茂铁衍生物）很常见。可以随时运行 TLC 和柱色谱纯化，知道化合物在硅胶上的位置。
- 然而，大多数有机化合物对可见光的吸收不够强。所以你必须使用可视化试剂/工具。最常见的只是使用紫外灯。以这种方式可以观察到大多数具有最少共轭的有机化合物。

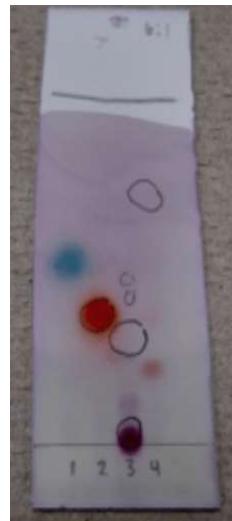
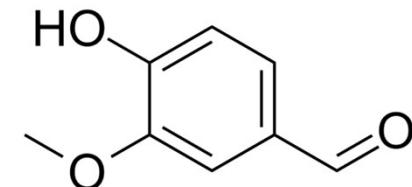


薄层色谱材料-染色剂

- 有些化合物不吸收紫外灯通常使用的波长。例如具有很少官能团的高度脂肪族化合物。
- 对于这些情况可使用染色剂。TLC 的染色剂基本上是一种或多种化合物的溶液，可以在洗脱后将板浸入其中。他们将与产品发生反应，并帮助轻松可视化所有不同的斑点/化合物。
- 即使目标化合物吸收强烈的紫外线（甚至可见光），如果可以的话，还是建议对板进行染色。因为混合物的其他成分可能以杂质的形式存在，在典型的 UV-Vis 条件下无法观察到这些成分。

薄层色谱材料-染色解决方案

- 酸性香兰素/香草醛(Acidic Vanillin)
- 常使用香草醛溶液做染色剂。酸性香兰素 容易制备，而且加热后，它对大多数官能团很敏感。很多时候，有机化合物功能的微小变化会导致香兰素染色和加热后 TLC 板的颜色发生变化。如果起始材料和产品的 R_f非常接近。仍然可以通过颜色区分它们！



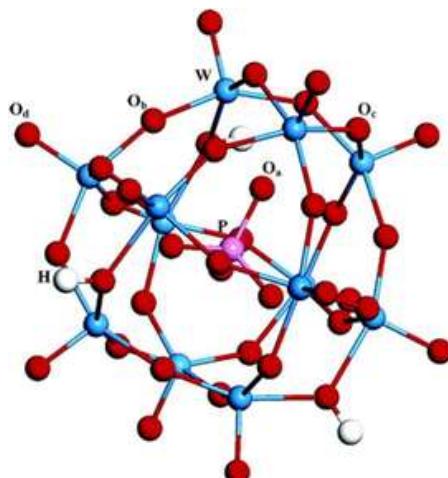
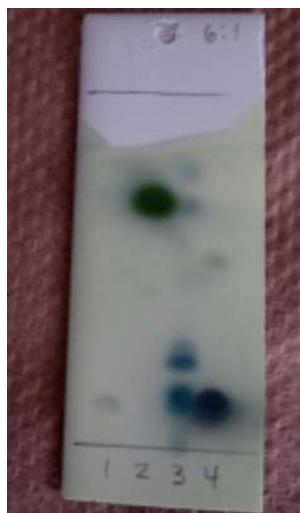
香草醛浓硫酸显色原理是使羧基脱水，增加双键结构，再经双键位移，双分子缩合等反应生成共轭双键系统，又在酸作用下形成阳碳离子盐而显色。是一种通用显色剂

薄层色谱材料-染色解决方案

- 酸性香兰素可清楚地显示了大多数具有极性官能团的化合物。对于高非极性化合物，例如简单的烯烃或芳烃，效果不是很好。
- 酸性香兰素染色剂的配方非常简单：称取 10-15 克香草醛，用 250 毫升乙醇溶解，然后加入 2.5 毫升浓硫酸搅拌。使用时，只需浸入需洗脱 TLC 板，然后用加热枪加热。

薄层色谱材料-磷钼酸 (PMA)

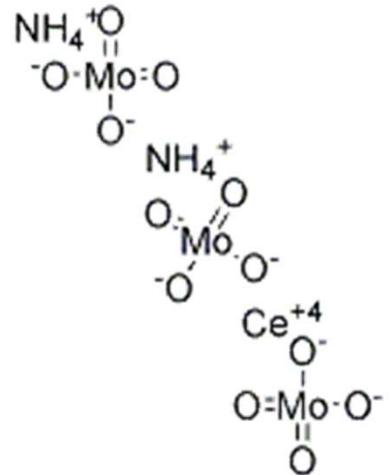
- 这是另一个常用的染色剂。它几乎可以在有机化学实验室中找到的任何东西上色。从多环芳烃到醇，从烯烃或更简单的脂肪族化合物等。
- 它提供不同的蓝绿色色调。
- PMA染色溶液也非常容易制备。只需要在 500 mL 乙醇溶解大约 5 g 磷钼酸（为此目的购买质量较差的）。



磷钼酸是通用显色剂，但不是所有化合物都能显色的，主要是有还原性基团的物质。

薄层色谱材料-钼酸铈铵

- 钼酸铈铵染色也被称为Hanessian's Stain，或简称为“蓝染色剂”。
- 它是一种水性染色剂，加热后会使斑点在淡黄色背景上变成蓝色。如果加热太多，背景也会变蓝，TLC板看起来不太好看，所以要小心！
- 配置方法：将5克钼酸铵和1克硫酸铈（或2克硫酸铈铵）溶解到100 mL水中。向该混合物中加入10 mL浓硫酸，并搅拌。



薄层色谱材料-高锰酸钾（碱性 KMnO_4 ）

KMnO_4 是最经典的一种，可能是比较便宜的选择，也比较一般。它将 TLC 板变成紫色，并且每种可能被氧化的化合物都会显示为没有区别黄色斑点。TLC 看起来也不是很漂亮，但有时它可以解决问题。

通常的配方是将 1.5 克高锰酸钾和 10 克碳酸钾溶解在 200 毫升水中。向该混合物中加入 1 mL 的 10% NaOH 水溶液，并搅拌（注意安全）。



薄层色谱材料-其他染色剂

- 还有许多其他染色剂，但它们通常对某些类型的化合物更具特异性，而不是在实验室中常规制备或使用的最佳染色剂。
- **碘蒸气室**：用一小勺碘晶体填充密封的板缸。用硅胶覆盖它。将干洗脱的 TLC 板放入此板缸中，等待棕色斑点出现。这不是最敏感的染色，但好处是 TLC 板染色后还可以用其他染色法进行染色。
- **茚三酮**：10 克茚三酮在 250 毫升乙醇中的溶液。它非常适合胺类，尤其是伯胺类。即使在加热之前，这些也会显示为绿色斑点。
- **二硝基苯肼(DNP)**：将 1 g DNP 溶解在 250 mL 2 M HCl 水溶液中。这种染料对醛和酮具有极强的选择性。这些斑点在室温下会立即变成橙色。
- **茴香醛**：将 4 mL 茴香醛溶解在 200 mL 乙醇中。然后，加入 3 mL 冰醋酸，最后加入 10 mL 浓硫酸。结果是与香草醛非常相似的染色。选择性较低且不易制备，但有时，它会在染色后产生更多种类的颜色，从而可以区分 TLC 上非常接近的点。

溶剂极性：参考指南

- 对于在实验室有经验的人来说，选择用于运行 TLC 或色谱柱的溶剂组合非常容易。或者至少是一个很好的起点。
- 但对于初学者来说，这可能是极其困难的。有很多不同溶剂组合。

溶剂的选用

总体考量

- 1) 数据基于硅胶板
- 2) 所涉及的比移值(ΔR_f)为近似值
- 3) 仅为淋洗剂的筛选提供一个好的起始溶剂（组合），溶剂的具体选用还需要进一步尝试及优化

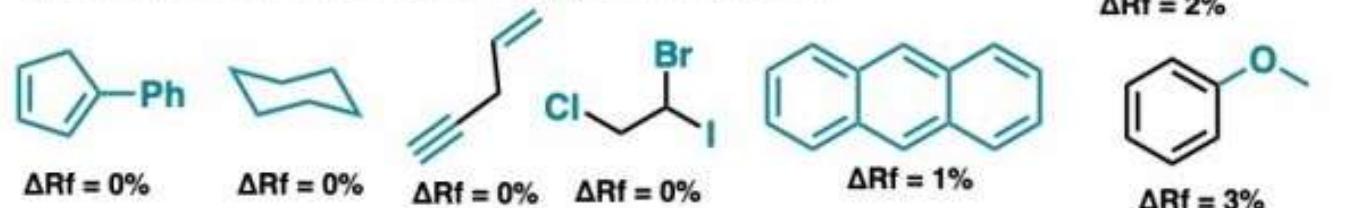
ΔR_f 的确定

- 1) 非极性溶剂：正己烷、正戊烷、环己烷；极性溶剂：乙酸乙酯、乙醚。两种溶剂的体积比例为100: 0 (非极性溶剂) 至0: 100 (极性溶剂)
- 2) 待提纯的化合物中每个官能团对极性溶剂增加的贡献度为 ΔR_f (如酚羟基 $\Delta R_f = 35\%$)，则使用的非极性溶剂：极性溶剂 = 0.65 : 0.35 (含35%的极性溶剂)
- 3) 考察化合物中所有官能团的极性溶剂增加贡献度 ΔR_f 的总和
- 4) 选择 ΔR_f 在0.4-0.8 区间内进行产物分离
- 5) 在此区间外考虑其他极性的溶剂组合

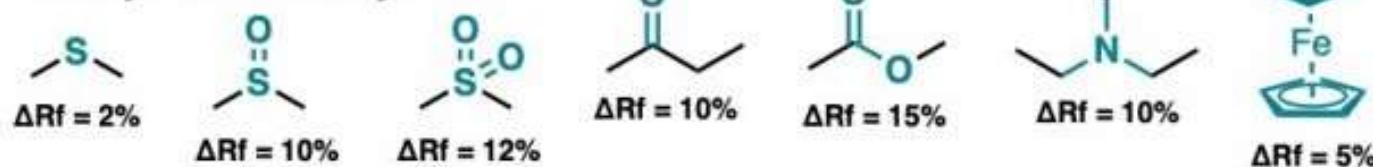
溶剂极性：薄层色谱的溶剂极性指南

B. ΔR_f Values for Most Common Functional Groups

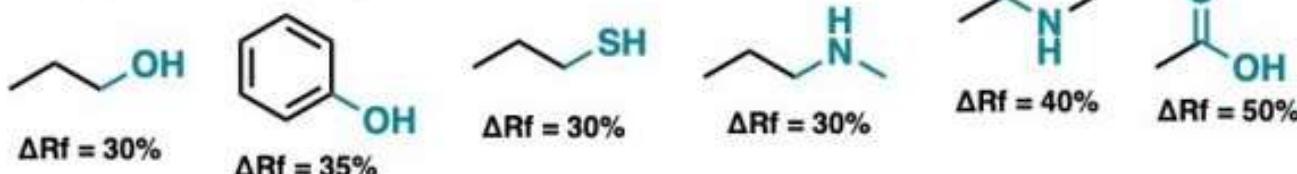
Apolar (use apolar solvent only) to Mildly Polar



Mildly Polar to Fairly Polar



Fairly Polar to Highly Polar



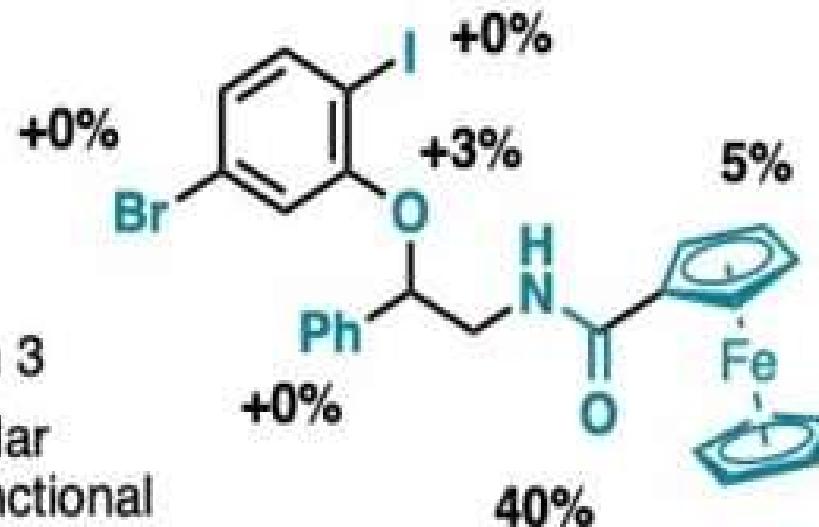
溶剂极性：薄层色谱的溶剂极性指南

C. Example of Eluent Starting Point Calculation with ΔR_f Values

Disclaimer:

Remember that these ΔR_f values are just an approximation and might not be additive, especially when counting more than 3

polar functional groups.



A good starting point would be using around 48% (ca. 50%) of ethyl acetate in hexane.

溶剂极性：薄层色谱的溶剂极性指南

- 根据其官能团分解有机化合物，并以极性溶剂百分比的形式添加了一个值，将其添加到洗脱液混合物中，以使具有该基团的化合物在TLC板上显著上升。
- 将溶剂限制为非极性溶剂（己烷、戊烷或环己烷）和极性溶剂（乙酸乙酯或乙醚）的经典混合物，因为这些溶剂的组合通常足以处理大多数有机化合物。
- 同样，这是一个近似值，这些值并不总是相加的，没有普遍的规则。
- 最具极性的基团本身通常会决定整个分子的极性。
- “小”群体的相对极性很重要。取一个具有酰胺（6:4 己烷/ EtOAc）和甲氧基（2-3% 额外极性）的分子。然后你把那个甲氧基换成醇羟基。醇羟基会额外添加 30-35% 的溶剂极性，因此反应产物斑点将出现在起始底物的下方。

溶剂极性：哪种最常见的溶剂更好？

- 出于实际目的，诸如戊烷、己烷、庚烷或环己烷之类的溶剂在极性方面是相似的。
- 但是，有几个考虑因素可能会导致选择一个或另一个。
- 己烷/ EtOAc通常是有机分离的标准混合物。然而，众所周知，正己烷是一种神经毒性化合物，这就是为什么许多人将正己烷换成环己烷或庚烷的原因。
- 这两种溶剂的唯一问题是挥发性更小，更难去除。如果需要更易挥发的替代品，可使用戊烷。这应该在目标化合物相对易挥发并且不能将其置于高真空下以完全去除溶剂的情况下使用。
- 在极性组分方面，乙酸乙酯和乙醚可以是主要的选择。乙醚更易挥发，因此通常应尽可能避免使用，除非它可以提供更好的分离效果，或者您的目标产物也易挥发。
- 此外，在配对混合溶剂时，尝试使用具有相似挥发性的溶剂，这样就不会导致一种比另一种先蒸发现实验重现性。

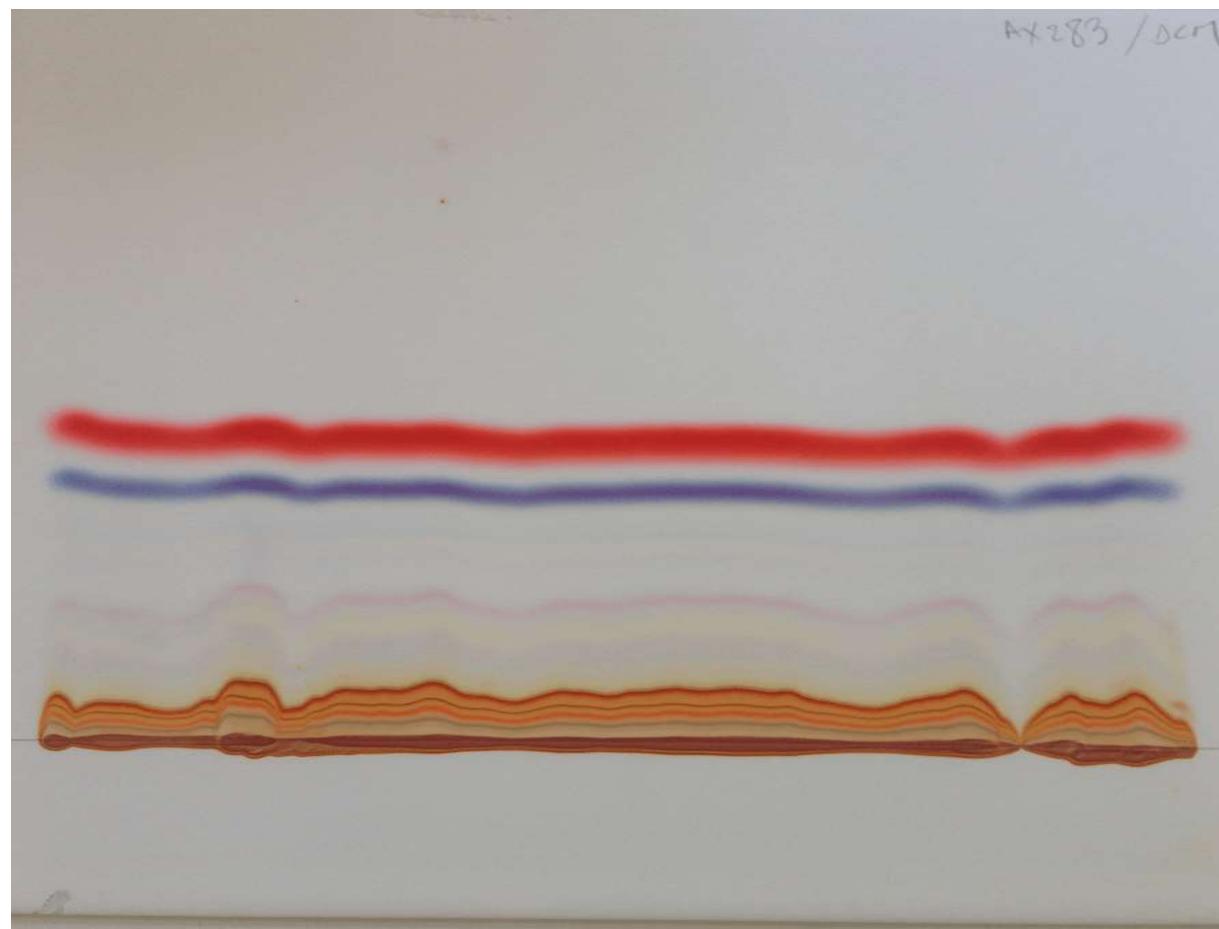
具有酸性或碱性位点的“粘性”化合物

- 作为例外，可能需要考虑将其他溶剂作为混合物的添加剂（最多 5-10%），例如 MeOH（用于极极性化合物）、三乙胺（用于具有碱性位点的化合物）和乙酸（用于具有酸的化合物）。
- 具有碱性或酸性位点的化合物，例如胺、酰胺（碱性）或羧酸（酸），有时会过多地粘在固定相的硅胶上。这会在 TLC 上产生非常宽的斑点，因此在色谱柱纯化时会产生非常宽的条带。条带/点变宽通常会使纯化复杂化，因为目标化合物可能与想要去除的副产物或杂质重叠。
- 一个简单的解决方案：在溶剂混合物中加入 2-5% 的三乙胺作为碱性化合物。这会使二氧化硅的酸性位点 Si-O-H 键失活。通过将 Et₃N 添加到您的洗脱液中，您可以将它们全部去除，化合物将自由洗脱。
- 类似地，羧酸等酸性化合物可以与硅胶中的 Si-O 键反应生成 Si-O-H，这使它们粘附在固定相上。只需添加乙酸作为添加剂，将 Si-O 位点反应生成 Si-O-H 中。这将使酸性化合物更容易通过 TLC 板或柱。

制备级薄层色谱-制备薄层色谱如何工作？

- 可以应用 TLC 进行制备级纯化，不仅要检查混合物上的不同化合物/点是如何分离的，还可分离反应混合物本身，并分离出几毫克纯产品。
- 准备一张大的 ($30 \times 30 \text{ cm}^2$) 的 TLC 板，然后，沿着一条平行于底部的线（在底部上方约 3-4 厘米处）涂抹混合物溶液（大约 0.5-1 毫升的挥发性溶剂，如 DCM），而不是单点点。通常使用 1 mL 注射器和能找到的最细的针头。必须均匀，并且需要小心不要将二氧化硅刮破。
- 干燥后，在适当的溶剂体系（由经典 TLC 仔细选择）中洗脱板，不同的化合物将被分离。显然需要一个更大的板缸。
- 之后，只需将感兴趣的条带刮下。为此，在紫外光下用铅笔标记感兴趣的条带。
- 将条带刮下后用极性溶剂（如 DCM）与的产品一起通过硅胶，使其溶解。将其过滤掉以除去 SiO_2 。
- 最后，只需去除溶剂即可得纯产品。

制备级薄层色谱-制备薄层色谱如何工作?



制备级薄层色谱：什么时候使用？

- 那么制备级TLC有哪些优势呢？
- 允许分离极性极其相似的化合物。通常，可以通过 TLC 区分两种极性相近化合物，但在柱层析后分不开。但是利用制备级TLC可以。
- 用极性较低的溶剂洗脱板数次。如果需要进行非常仔细的分离，只需使用化合物比移值约为 0.10 的洗脱液即可。然后，干燥板，并再次洗脱。重复这个过程，直到色带得到很好的区分。
- 比柱色谱更方便。只需点板化合物，将板放入洗脱室并等待溶剂上升。然后干燥并重复，直到满意的分离程度。与此同时，可以做任何其他事情。
- 当只有几毫克样品时，分离化合物效果非常好。10 mg 目标产品的色谱柱可能会很痛苦。而制备级TLC却无此问题。
- 有时可以使用相同的 $30 \times 30 \text{ cm}^2$ 洗脱几种混合物。可以将玻璃板切成两半以使用不同的洗脱液，或者只用铅笔将其标记为两半，然后沿同一平行线将每种溶液沉积在每一半中。

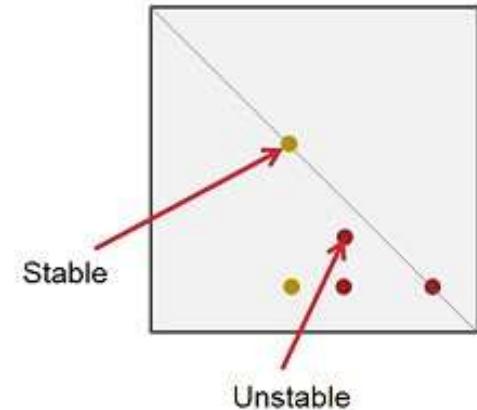
制备薄层色谱：我应该什么时候使用它？

- 但制备级 TLC 也有缺点：
- 它不是真正可放大的。使用硅胶板可分离多达 100-150 毫克的化合物。但是不能更多。制备型 TLC 非常适合纯化反应范围内的产物，或用于全合成的最后步骤，但无法获得数克级别的纯物质。
- 如果化合物不吸收紫外或可见光，将很难知道它在板上的位置。可以在一个边缘用染色剂“画”一条垂直线，然后加热。但只会将此作为最后的手段。
- 它比柱色谱法更昂贵。普通硅胶总是比商业制备 TLC 板便宜。

报告薄层色谱数据

- TLC 是一种简单但广泛使用的技术。因此，在大多数报告和期刊中，应该为实验过程提供有关 TLC 数据的信息。
- 最低限度是说明在哪种溶剂混合物中对每种化合物进行了纯化。
 -
- 最好的方法是报告的产品在某种溶剂混合物中的**比移值**(R_f)。
- 例如，报告合成苯甲醛的过程。应该提到该产品是通过XXX色谱技术纯化，使用戊烷/乙醚1：1作为洗脱液，其中产品具有的 R_f 为 0.75。

2D TLC：检查化合物稳定性



- 如何运行二维 TLC
- 制备一个方形 TLC：切一块正方形的薄层色谱板， $7 \times 7 \text{ cm}^2$ 左右。
- 将样品点在一个角落：将样品溶液点在正方形的一个角落，距离两个边界各留约 0.5-1 厘米。
- 沿一个方向洗脱板：使用对您的化合物产生大约 0.5 的 Rf 的洗脱液，并像往常一样沿一个方向洗脱板。
- 从另一个方向洗脱板：干燥您的板，然后将其旋转 90 度，使所有斑点的线在底部。在这个方向上再次洗脱。
- 分析结果：在硅胶中稳定的化合物，会出现在方板对角线的某处。

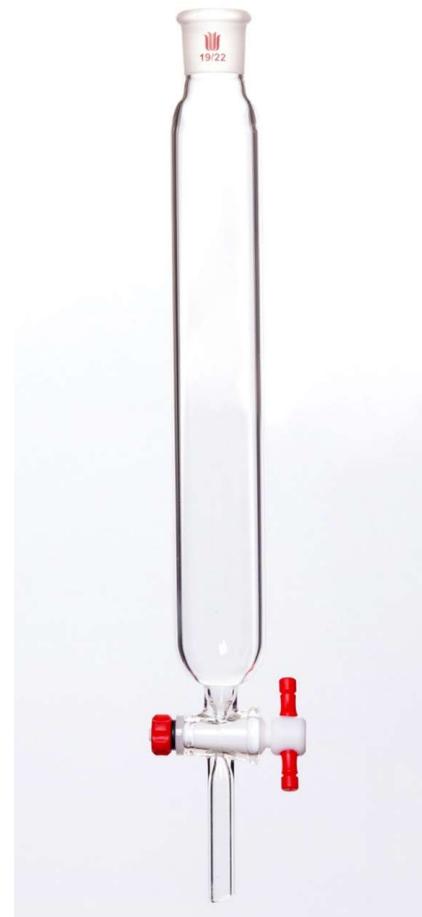
洗脱室的沙床

- 如果无法将板垂直放置在洗脱室上，或者如果想同时在同一个洗脱液上运行多个板。找一个足够大的洗脱室，并在底部铺一张沙床（约 2 厘米就够了）
- 然后，将淋洗液放入略高于沙床的洗脱室，将所需的所有 TLC 粘在沙子上。它们不会掉落，可以将许多板平行洗脱。

柱层析技术

- 柱层析技术也称柱色谱技术。一根柱子里先填充不溶性基质(SiO_2)形成固定相，将样品加到柱子上后用特别的溶剂洗脱，溶剂组成流动相。在样品从柱子上洗脱下来的过程中，根据混合物中各组分在固定相和流动相中的分配系数不同，将不同组分逐一分离。硅胶层析法的分离原理是根据物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离，一般情况下极性较大的物质易被硅胶吸附，极性较弱的物质不易被硅胶吸附，整个层析过程即是吸附、解吸、再吸附、再解吸过程。

柱层析技术



柱层析操作方法的选择

- 目前，柱色谱分离的操作方式，主要包括常压分离、减压分离和加压分离3种模式。加压柱：适合小于100-200 g产品的纯化。大尺寸的加压柱难以制作，用起来危险性大。减压柱：适合任何量的过柱，比加压柱快，需要减小流动相极性过柱(比加压柱小一倍)，不然会导致分离效果差。常压柱：适合大于50-100 g的产品。常压柱是分离效果最好的，但是时间也最长。常压分离是最简单的分离模式方便、简单，但是洗脱时间长。减压分离尽管能节省填料的使用量，但是由于大量的空气通过填料会使溶剂挥发，并且有时在柱子外面会有水汽凝结，以及有些易分解的化合物也难以得到，而且还必须同时使用水泵或真空泵抽气。加压分离可以加快淋洗剂的流动速度，缩短样品的洗脱时间，是一种比较好的方法，与常压柱类似，只不过外加压力使淋洗液更快洗脱。压力的提供可以是压缩空气，双连球或者小气泵等。

柱子规格的选择

- 市场上有各种规格的柱层析分离柱。柱子长了，分离效果就好。目前市场上的柱子，其径高比一般在1: 5 ~ 10范围，在实际使用时，填料量一般是样品量的30 ~ 70倍，具体的选择要根据样品的性质和含量进行具体分析。如果所需组分和杂质的分离度较大，就可以减少填料量，使用内径相对较小的柱子(如2 cm × 20 cm的柱子)；如果Rf相差不到0.1，就要加大柱子，增加填料量，比如用3 cm内径的柱子。称30-70倍于上样量；如果极难分，也可以用100倍量的硅胶。

装柱

- 柱层析色谱柱的填装主要有湿法和干法两种，湿法省事，不论干法还是湿法，硅胶（固定相）的上表面一定要平整。湿法装柱是先把硅胶用适当的溶剂拌匀后，再填入柱子中，然后再加压用淋洗剂“走柱子”，本法最大的优点是一般柱子装的比较结实，没有气泡。干法装柱则是直接往柱子里填入硅胶，然后再轻轻敲打柱子两侧，至硅胶界面不再下降为止，然后再填入硅胶至合适高度，最后再用油泵直接抽，这样就会使得柱子装的很结实。接着是用淋洗剂“走柱子”，一般淋洗剂是采用TLC分析得到的展开剂的比例再稀释一倍后的溶剂。通常上面加压，下面再用油泵抽，这样可以加快速度。干法装柱较方便，但最大的缺陷在于“走柱子”时，由于溶剂和硅胶之间的吸附放热（可以用手摸柱子明显感觉到），容易产生气泡，这一点在使用低沸点的淋洗剂时如乙醚，二氯甲烷更为明显。

装柱

- 虽然产生的气泡在加压的情况下不易察觉，但是，一旦撤去压力，如在上样、加溶剂等操作的时候，气泡就会释放出来，严重时，整个柱子变花，样品不可能平整地通过，当然也就谈不上分离了。解决的办法是：第一、硅胶一定要填结实；第二、一定要用较多的溶剂“走柱子”，一定要到柱子的下端不再发烫，恢复到室温后再撤去压力。也有介绍在硅胶的最上层填上一小层石英砂，防止添加溶剂的时候，使得样品层不再整齐。但如果小心上样，添加溶剂，则没有这个必要。柱子底端的活塞一定不要涂润滑剂，否则会被淋洗剂带到淋洗液中，可以采用聚四氟乙烯材料的阀门。干法和湿法装柱没什么实质性差别，只要能把柱子装实就行。装完的柱子应该有适度的紧密(太密了淋洗剂流速太慢)，并且一定要均匀，不然样品就会从一侧斜着流动。同时柱中不能有大气泡，大多数情况下有些小气泡没太大的影响，因为只要加压气泡就可消失。但是柱子更忌讳的是开裂，开裂会影响分离效果，甚至报废。

上样

- 上样也有干法和湿法之分：干法就是把待分离的样品用少量溶剂溶解后，在加入少量硅胶，拌匀后再旋去溶剂。如此得到的粉末再小心加到柱子的顶层。干法上样较麻烦，但可以保证样品层很平整。湿法上样就是用少量溶剂（最好就是展开剂，如果展开剂的溶解度不好，则可以用一极性较大的溶剂，但必须少量）将样品溶解后，再用胶头滴管转移得到的溶液，沿着层析柱内壁均匀加入。待溶剂层下降至石英砂面时，再加少量的低极性溶剂，然后再打开活塞，如此两三次，一般石英砂就基本是白色的了。加入淋洗剂，一开始不要加压，等溶解样品的溶剂和样品层有一段距离（ $2 \sim 4 \text{ cm}$ ），再加压，这样避免了溶剂（如二氯甲烷）等夹带样品快速下行。很多样品在上柱前粘性较大，上样后在柱上又会析出，这一般都是比较大量的样品才会出现，是因为填料对样品的吸附饱和所致。有些样品溶解性差，能溶解的溶剂（比如 DMF, DMSO 等）又不能上柱，这样就必须用干法上柱了。

溶剂的选择

- 极性小的用乙酸乙酯：石油醚系统；极性较大的用甲醇：氯仿系统；极性大的用甲醇：水：正丁醇：醋酸系统；拖尾可以加入少量氨水或冰醋酸。某种样品在这种展开剂中只显示一个点，并不等于在别的展开剂中也只显示一个点。因此在寻找展开剂时，多尝试几种比例不同，成分不同的展开剂。展开剂的极性太小，点分不开，极性太大，也分不开。淋洗剂一般采用TLC分析 ($R_f = 0.2 \sim 0.3$) 得到的展开剂的比例再稀释一倍后的溶剂。由于层析柱和薄板的不同，即使两者使用的硅胶都相同，但是在把TLC分析得到的展开剂用在柱层析时，也显得极性偏大，所以要稀释一倍，但又不能稀释太多，否则成了靠扩散作用来分离，效果也不会好。

溶剂的选择

- 选择一个合适的溶剂系统是柱层析分离的关键。在选用柱层析洗脱剂时首先要考虑三个方面的因素：溶解性，亲合性和分离度 (Resolution)。溶剂应选择价廉、安全、环保的，可以考虑石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醚、甲醇和正己烷等等。但正己烷价格较高，乙醚很易挥发，二氯甲烷和甲醇与硅胶的吸附是一个放热过程，易使柱子产生气泡。其他的溶剂用的相对较少，要依不同需要选择。常用的溶剂组合有：

Petroleumether/Ethyl acetate, Petroleum ether/Acetone, Petroleum ether/Ether, Petroleumether/ CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 /ethyl acetate, ethyl acetate/MeOH, CHCl_3 / ethyl acetate。一般把两种溶剂混合时,采用高极性/低极性的体积比为1/3的混合溶剂,如果有分开的迹象,再调整比例,达到最佳效果,如果没有分开的迹象,最好是换溶剂。

淋洗液的收集和浓缩

- 用硅胶作固定相过柱子的原理是一个吸附与解吸的平衡。如果样品与硅胶的吸附比较强的话，就不容易流出，这时可以采用氧化铝作固定相。柱层析后的淋洗液，由于使用了较多的溶剂，必须进行浓缩，如果待测物具有一定的挥发性，最好使用常压挥发溶剂，否则易导致检测结果偏低。
- 一边收集样品，一边进行薄层色谱分析。找到相应的产物点，浓缩得到产物，进行表征，分析确认。

8、注意事项

- (1) 先根据TLC方法筛选好洗脱剂，使两相邻物质R_f值之差最大化。
- (2) 将柱子必须装平整、均匀。
- (3) 考虑有限柱填料的吸附量。
- (4) 可考虑用梯度法分开并洗脱。
- (5) 敏感化合物可以尝试氧化铝充填过柱(比如醛，容易开环的化合物)
效果不错缺点是氧化铝的吸附能力稍差。需要降低流动相极性2-5倍。
- (6) 容易掉Boc (叔丁氧羰基) 基团的化合物，用三乙胺碱化硅胶柱子
后再过柱。
- (7) 酸性化合物加1/1000醋酸、碱性化合物加1/1000-1/100氨水或者三
乙胺或氨甲醇。

常见问题 (FAQ)

- **是否可将 TLC 板一直洗脱到顶部？**
- 不可以。让洗脱液到顶部会导致斑点变宽和更差的分离。此外，如果将混合物中最非极性的成分洗脱到顶部，它们可能会“消失”。
- **您如何解决 TLC 上的点很大的问题？**
- 在点样前稀释样品。
- **怎么知道一种化合物在硅胶上是否稳定？**
- 某些化合物在通过 TLC 板或柱的硅胶时会分解。可以使用 2D 薄层色谱法判断化合物是否稳定。
- **是否应该在TLC板底部点 TLC 样品？**
- 不行，应该始终在 TLC 板上点略高于洗脱液液位的样品。否则，将稀释斑点并无法得到想要的分离效果。

常见问题 (FAQ)

- **如何对较大极性化合物进行 TLC?**
- 如果化合物在使用典型溶剂组合时仍处于基线状态，选择极性更强的溶剂组合，例如 DCM/ MeOH，或使用反相 TLC。
- **如何利用TLC 知道是否完成了反应?**
- 在 TLC 中点起始材料和反应混合物。此外，用起始材料和反应混合物（共点）制作一个额外的点。如果反应完成，您将在共点中看到两个不同的点，即使两种化合物的Rf相同（雪人形状）。

常见问题 (FAQ)

- **如何报告薄层色谱?**
- 最重要的是报告使用的化合物在特定洗脱液组合中的比移值 (Rf)。
- **您如何计算 TLC 上的比移值?**
- 比移值是化合物通过硅胶板的距离相对于洗脱液前端移动的总距离。 $R_f = (\text{化合物从基线移动的距离}) / (\text{洗脱液前端到基线的距离})$ 。
- **薄层色谱中常使用什么溶剂?**
- TLC 的典型洗脱液是非极性溶剂 (通常为己烷或戊烷) 和极性溶剂 (二氯甲烷、乙醚或乙酸乙酯) 的混合物。

本节作业

本次作业任意选做至少3题，但要求进一步了解所有问题的答案

- (1) TLC法在化学合成中有哪些用途？并简述操作流程及注意事项。
- (2) 如何利用TLC法预测化合物在利用柱层析法提纯时其在硅胶上是否稳定？
- (3) 如何利用TLC来鉴别无色且对紫外光辐射不响应的化合物？此类化合物如何利用TLC法进行制备级的提纯？
- (4) 如何利用TLC法检测两个极性非常相似的化合物是否为同一化合物？
- (5) 利用柱层析法准备化合物提纯时，有哪些装柱及上样方法，简述其操作及注意点。
- (6) 与柱层析/TLC法提纯化合物相比，重结晶有哪些优缺点？