

層析法

- 國立臺灣大學化學系，大學化學實驗一暨實驗二，第二版，國立臺灣大學出版中心：台北，民國九十五年。
- 版權所有，若需轉載請先徵得同意；疏漏之處，敬請指正。
- 臺大化學系普化教學組葉芝嵐助教、佘瑞琳講師，2009年4月14日。

一、目的：利用管柱層析 (column chromatography) 及薄層層析法 (thin layer chromatography, TLC) 來分離及辨別混合物。

二、實驗技能：學習萃取、管柱層析及薄層層析等實驗技能。

三、原理：

層析法 (chromatography) 是利用化合物在靜相與流動相之間的分配差異以分離混合物的方法。層析法依據靜相 (stationary phase) 與流動相 (mobile phase) 之不同，分為管柱層析、薄層層析、氣液層析 (gas liquid chromatography, GC) 等。

薄層層析是吸附性色層分析的一種，將吸附劑如矽膠或礬土均勻塗佈在鋁片、膠片或玻璃板上形成薄層，作為層析靜相，再將混合物試樣點附在此薄層靜相上，以液體展開劑作為流動相，透過毛細作用由下往上移動。由於不同的化合物與靜相之吸附力和流動相間溶解度的差異，當展開劑上升、流經所吸附的試樣點時，吸附力弱的物質移動快，吸附力強的移動慢。由於各種物質移動的速率不同，使混合物最後在靜相薄層上分開，達到分離目的。一個化合物在層析片上上升的高度與展開劑上升高度的比值，是化合物在該分析條件下的特性參數，稱為 R_f 值。利用 R_f 值，可以判斷兩化合物是否為相同的化合物。除了可用來判斷兩化合物是否為相同，或是不同，也可用於決定混合物中至少含有多少種成分物、作為管柱層析沖提劑選擇的參考，或用來檢視分離純化方法的離析成效，還可以追蹤化學反應的進行程度。

管柱層析是在直立的玻璃管柱中，裝填已經用沖提劑潤濕的吸附性固態填充物，例如矽膠或礬土，作為靜相，要分離的混合物由管柱頂端載入，再以液態沖提劑 (eluent) 作為流動相，利用化合物與靜相之間的吸附力及化合物與沖提劑間溶解度的差異，造成各成分物被沖提的速率不同，而達到區帶分離的目的。影響管柱層析分離效率的因素包含：

- (一) 靜相的材料：現今最常使用的靜相材料是矽膠以及礬土。矽膠和礬土都是極性高的材料，與極性化合物的吸附力較強。因此沖提時，高極性的化合物在管柱上的滯留時間較長，低極性的化合物在管柱上的滯留時間較短。填充靜相的用量一般視分離的難易程度而定，原則上約為待分離試樣重量的 25 至 30 倍。

- (二) 管柱徑長比：管柱長度與內徑的比例約為 4：1 至 8：1 較為合適。
- (三) 管柱的填充：管柱填充的好壞會直接影響分離的效果。若填充物上端表面不平整、管柱中有氣泡或裂痕，會破壞分離區帶的平整，使分離效果變差。填充物充填越緊密，分離效果越好。
- (四) 流動相的極性：當使用矽膠或礬土這種高極性的填充物時，沖提劑極性越高，化合物在管柱上的滯留時間越短；反之沖提劑的極性越低，化合物在管柱上的滯留時間越長，適當調整沖提劑的極性可以讓混合物以適當速度流出。
- (五) 沖提速率：沖提的速率太快時，靜相填充物與試樣之吸附作用未達平衡，區別力變小，造成分離效果變差。然而沖提速率放慢，雖較易達到平衡，但擴散的問題加劇，造成分離區帶變寬，區帶重疊機會增高，這會造成分離所需時間加長而且分離效果變差。一般沖提速度以每分鐘沖提液降低 2.5 公分的高度為佳，也可以在沖提液面施加壓力以提高流速。
- (六) 試樣的載入：未經稀釋的試樣絕不可直接載於靜相上，否則會超出填充物頂端的負荷，造成分離區帶變寬。通常使用沖提劑將試樣配製為 5%~10% 的溶液，然後載於靜相上。試樣溶液載入靜相時，必須等待溶液完全進入靜相，才可加入沖提劑開始沖提。試樣載入時的技術好壞會影響填充物上端的平整，為了保護靜相的上端，通常會加上一層乾淨的海砂或無水硫酸鈉作為緩衝。
- (七) 流出液的收集：流出液分成小部分 (fraction) 收集於試管中，每一部分的量如果太多則分離區帶重疊機率增高，但若每次收集量太少，會得到太多含有收集液的試管需要分析，影響效率。可概略以每次收集管柱體積的一半為準，視分離的難易再做調整，越困難的分離，區帶重疊機率越高，因此每次要收少一些。收集到的各部分以薄層層析或其它方法分析，然後決定收集那些部分。

四、儀器與材料：綠色葉片數片 (約 1 g)、研鉢與杵 (2 組共用)、量筒 (10 mL)、管柱及支撐架、長玻璃滴管 (229 mm) 及橡皮帽、錐形瓶 (50 mL)、矽膠 (230~400 網目, 4 g)、薄層層析片 (2×5 cm)、燒杯 (30、50 mL 各一 1 個)、小試管 (13×100 mm, 40 支)、玻棒、毛細管、小漏斗、鋁箔紙、鑷子、試管架

五、藥品：正己烷 (C_6H_{14})、乙酸乙酯 ($CH_3CO_2C_2H_5$)、丙酮 (CH_3COCH_3)、無水硫酸鈉 (Na_2SO_4)

六、實驗步驟：

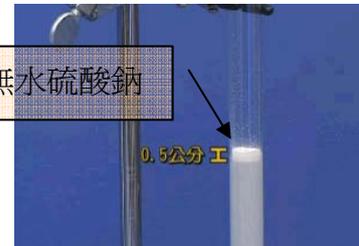
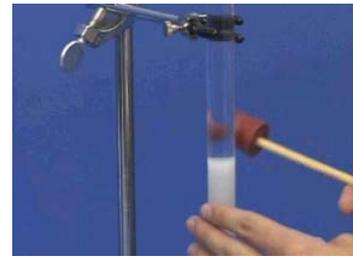
實驗步驟	示範
(一) 萃取	

<p>1</p>	<p>取葉片（綠且柔軟者較佳）約 1 g，剪成小碎片並置於研鉢中，加入 10 mL 體積比為 8：2 的正己烷與乙酸乙酯混合液，研磨至溶液部分呈深綠色。溶液部分因揮發之故可能只剩下約 2 mL，以吸管取出溶液部分置於 10 mL 量筒中，記錄體積。若體積少於 2 mL，則酌量加入少許上述之正己烷與乙酸乙酯混合液於研鉢中以溶解其中之殘留，然後吸取出加入量筒中。</p>	
<p>(二) 管柱層析</p>		
<p>2</p>	<p>準備矽膠靜相</p> <p>(1) 沖提液：準備 70 mL 體積比為 7：3 的正己烷與丙酮溶液作為沖提液。</p> <p>(2) 秤取約 4 g 矽膠（230 ~ 400 網目）於 50 mL 燒杯中，取適量（約 10 mL）的正己烷與丙酮（7：3）沖提劑於另一燒杯中，將靜相填充物慢慢攪拌加入於溶劑中，混合攪拌至成一稀泥狀且沒有氣泡存在為止。</p>	
<p>3</p>	<p>填充管柱</p> <p>(1) 架設玻璃管柱：玻璃管柱以廣用夾垂直夾放於鐵架上，上方放置一漏斗，下方放置一錐形瓶以盛接沖提劑。</p> <p>(2) 加沖提劑：經由漏斗加入適量沖提劑於管柱中，以趕除玻璃擋片內的氣泡。</p> <p>(3) 填充管柱：以玻璃棒將稀泥狀填充物攪拌均勻，快速倒入管柱中，剩餘在燒杯及黏附在管壁上的填充物，以滴管吸取沖提劑沖洗入管柱。</p>	 

(4) 趕除氣泡：填充物沉降過程中，應不時輕敲管壁，以趕除氣泡並讓填充物平整而緊實。

(5) 緩衝層：待沖提劑液面落至填充靜相頂端，加入厚度約為 0.5 cm 為緩衝層。用吸管吸取少許沖提液，沿著管柱壁小心沖下，讓粘滯於管柱壁上之硫酸鈉沖下。

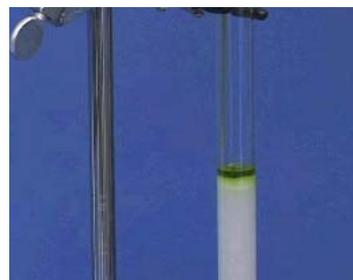
註：沖提液流出速度慢，可由管柱上方將沖提液以滴管抽出，以減少等待的時間。目前所有用過的沖提液均為乾淨的，可合併再使用。



載入試樣

沖提劑落至填充靜相頂端時，以長玻璃滴管抽取試樣溶液，儘量靠近填充硫酸鈉層的表面，沿著管柱壁順著環形小心加入。

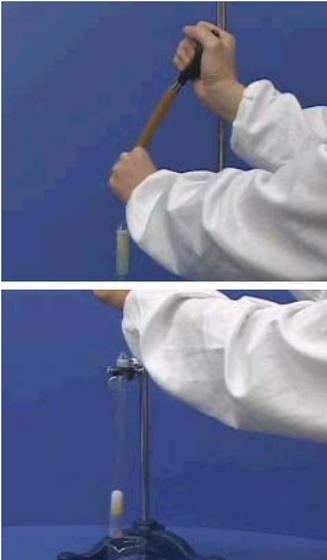
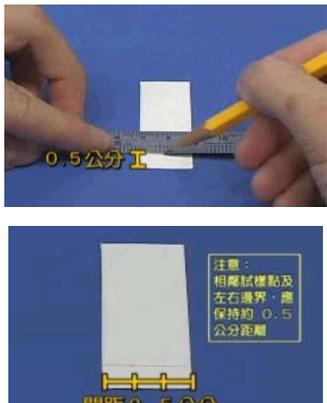
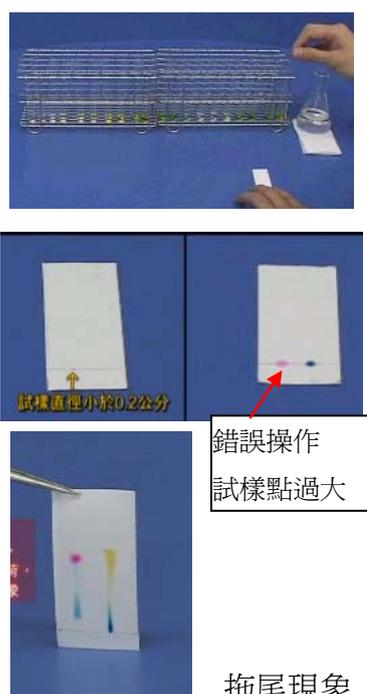
待試樣溶液完全吸入於填充靜相時，取少量沖提劑沿管柱壁將粘滯於管柱壁上之試樣溶液沖洗下去，待沖提劑沒入填充矽膠靜相後，再重複一次沖洗動作。

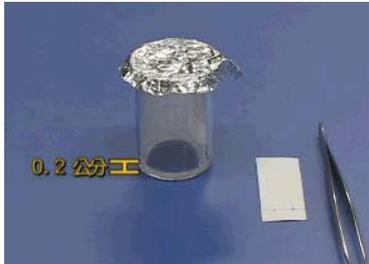
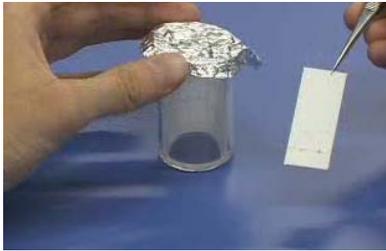


沖提分離與收集

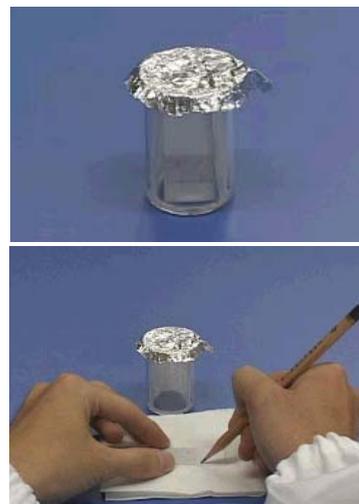
加沖提劑至玻璃管柱頂端，以試管收集沖提液，每 1 mL 換一支試管，到管柱中有顏色的試樣均被沖提出來。收集得到不同顏色的試管，再以薄層層析法分析判定分離效果。



	<p>注意：沖提過程要隨時補充沖提劑不可讓沖提劑沒入矽膠靜相，這會造成矽膠管柱裂縫。</p>	
6	<p>管柱層析結束後處理</p> <p>玻璃管柱倒夾在燒杯上方，讓溶劑滴乾，固態填充物即可順利倒出，棄置於廢固體回收桶中。廢液倒入指定的回收桶中。</p> <p>註：可用加壓球連接倒夾之管柱，擠壓橡皮球加速將所填充之矽膠排擠出。</p>	
(三) 薄層層析		
7	<p>層析片：</p> <p>於裁剪好的薄層層析片上距底端 0.5 cm 處，以鉛筆輕畫一橫線作為起始線，起始線上可點 2 到 3 個試樣，一起併排展開，但相鄰試樣點應至少保持約 0.3 cm 距離，以避免展開時因擴散現象而導致樣品重疊。</p>	 <p>注意：相鄰試樣點及左右邊界，應保持約 0.5 公分距離</p>
8	<p>點樣</p> <p>用毛細管吸取少量量筒中留下葉片萃取殘液點在薄層層析片上作為參考點。</p> <p>再將管柱分離中所得具有顏色的試樣依序點上，待其風乾。</p> <p>註：觸點試樣時，毛細管以垂直角度快速、輕巧地點觸層析片後，移開毛細管，讓溶劑揮發。</p> <p>試樣點的直徑不可超過 0.2 cm，試樣點越小，分離效果越好。試樣點過大時，R_f 值相近的點常因擴散現象而重疊不易區分，導致分離的效果變差。</p>	 <p>試樣直徑小於0.2公分</p> <p>錯誤操作 試樣點過大</p> <p>拖尾現象</p>

<p>重覆點樣：樣品濃度若太稀，不易觀察分析的結果，因此，等試樣點的溶劑揮發之後，可在同一位置重覆點樣數次，以提高濃度。</p> <p>稀釋試樣：樣品濃度若太高，過多的樣品會造成靜相的負荷，產生拖尾現象，影響分離效果，可加入適量溶劑稀釋濃度。</p> <p>更換試樣：用過的毛細管，以紙巾將管內的溶液吸引出，再用乾淨的溶劑潤洗 2-3 次，就可重覆使用，繼續在層析片上點下一個試樣。</p>	 <p>重覆點樣</p>  <p>更換試樣</p>
<p>9 展開</p> <p>(1) 準備展開槽：在 30 mL 燒杯中放一張剪裁過的長形濾紙，加入高度約為 0.2 cm 的展開溶劑（使用管柱層析所用之沖提液為展開劑），讓濾紙下端浸在展開劑中，使濾紙潤濕。小燒杯蓋上鋁箔紙，讓試樣在密閉且充滿飽和蒸氣的展開槽中進行展開。</p> <p>(2) 放置層析片：確定層析片上試樣點的溶劑已揮發後，以鑷子夾住層析片，將層析片畫有起始線的一端向下放入展開槽中心位置，並使層析片頂端依靠在槽壁，斜立於槽中，兩邊不要碰觸到器壁或濾紙，以免產生邊際效應而致試樣展開歪斜影響展開結果。</p> <p>注意：試樣點必須高於展開劑的水平線約 0.3 公分，以避免試樣點溶入下方的展開劑中。</p>	 <p>0.2 公分</p>    <p>注意：起始線必須高於展開劑的水平線。</p> <p>起始線 展開劑</p>

(3) 展開：迅速蓋上蓋子，保持氣密，讓展開劑以毛細作用向上爬升。當展開劑上升到接近層析片的頂端適當距離時取出層析片，並立即以鉛筆標出展開劑的前沿位置。



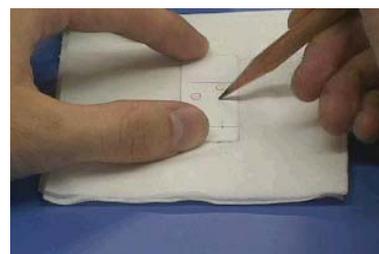
顯像、標示與記錄

試樣展開後，因樣品本身帶有顏色，可直接觀察試樣點的位置。

10

本實驗所使用之層析片是混有螢光劑的矽膠，也可在波長 254 nm 紫外光下照射，具有化合物的位置會呈現一暗點。

用鉛筆標示各試樣點的中心位置，計算及登錄各點的 R_f 值，同時登錄所使用的展開劑。



11

實驗結束後，廢液、層析片及毛細管棄置於指定的回收處中。

