

薄層層析

一、目的：利用薄層層析法（thin-layer chromatography，簡稱為 TLC）來分離及鑑別混合物之成分。

二、實驗技能：學習萃取及薄層層析等實驗技能。

三、原理：

層析法（原意色圖分析，chromatography）是一種高效率分離混合物的方法。層析法廣泛的定義為利用不同的化合物在靜相（stationary phase）與動相（mobile phase）之間的分布不同來分離混合物的方法。其中靜相可為固體或被吸附在惰性擔體（support）表面的液體，而動相可為液體或氣體。吸附式層析（adsorption chromatography）是利用靜相固體對各化合物的吸附力不同，經由動相的連續沖提（elution），以達分離的效果。而分配式層析（partition chromatography），乃是利用溶解度的特性，其基本原理與萃取相似。層析的種類繁多，管柱層析（column chromatography）和薄層層析是實驗室裡常用，較經濟簡便的方法。

本實驗將以薄層層析法分離植物葉片萃取液之各成分；另用於分析鑑定日常服用的止痛藥中所含有的主成分乙醯胺酚和少量的咖啡因。

（一）薄層層析片：

薄層層析片是以鋁礬土（alumina）、矽膠（silica gel）或其它含有膠結劑（常用的是硫酸鈣）的物質，在水中混成稀泥後，均勻塗布在乾淨的玻璃片、鋁片或膠片上，待乾燥後就形成了厚度約 0.2 mm 的靜相薄層。層析片可以自製，或直接採購市面上所販售的各種層析片。

（二）層析展開：

待分離的混合物利用毛細管輕輕地點在層析片底端，然後放入含有展開劑（developing solvent）的密閉容器（展開槽）中，展開劑由於毛細作用，通過試樣點上升，混合物中的各成分物與靜相之吸附程度不同，與動

相的親和力也不同，當展開劑流經吸附劑時，上述二力綜合的結果造成各成分物具有不同的移動速率，因此混合物最後能在靜相的薄層上分離。如圖 1。

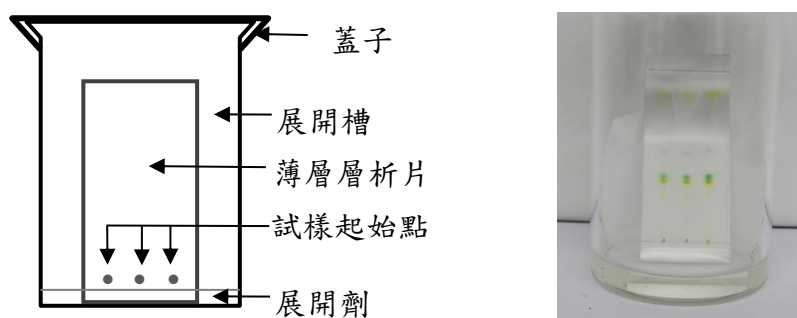


圖 1 薄層層析與展開

若混合物是有顏色的，可以肉眼分辨之；若無色則可以用物理或化學方法呈色，由呈色點的中心位置計算各成分移動的距離，與展開劑移動的距離之比值，得 R_f 值（retention value，滯留值）； R_f 值為該化合物於此展開劑的特性值，可作鑑定之用。

$$R_f = \frac{\text{化合物上升高度}}{\text{展開劑前沿上升高度}}$$

一般而言，藉由考量混合物中各成分物的特性，選擇適當的靜相及展開劑，可找出分離混合物之最佳條件。

（三）薄層層析的靜相與展開劑：

薄層層析常使用具有高極性的矽膠作為吸附劑，因此化合物的極性越高，與靜相之間的作用力越強，上升的高度就越低， R_f 值越小；反之，低極性的化合物 R_f 值較高。展開劑均為常用的揮發性溶劑，有極性高低之分；實驗室中常用的低極性展開劑為正己烷，高極性展開劑為乙酸乙酯。若所使用的展開劑會使試樣點均隨著展開劑一起跑到 TLC 片頂端，代表所是用的展開劑極性過高。若試樣點均不隨著展開劑移動，則代表展開劑的極性過低，應該調整³。適當的挑選展開劑系統的極性，可以調整化合物在層析片上爬升的位置。因此可用正己烷及乙酸乙酯調配成各種極性的展開劑來使用。要獲得最佳的分離效果，需選擇適當的展開劑，展開劑的分離效果不完全與其極性有關，不同結構的展開劑與化合物的作用方式不同，分離效果其實不易預測，多做嘗試是不二的法門。

(四) 點樣：

點樣時樣品必須先以適當的溶劑稀釋，樣品濃度不可太高，亦不可重複點樣太多次，點上過多的樣品會超過靜相的負荷，產生分離變差及拖尾現象，影響分離效果。點樣前，先用鉛筆在層析片上距一端約 0.5~1 cm 處輕輕畫一橫線作為起始線，再畫一短線垂直交於起始線，此兩線交點處即為試樣起始點的位置。以一張寬約 2 cm 的層析片為例，可在起始線上畫 2~3 個試樣起始點位置，保持相鄰試樣點間距約 0.5 cm，同時並排展開。用內徑小於 1 mm 的毛細管吸取樣品溶液，小心輕點於試樣起始點上，樣品擴散直徑不可超過 2 mm。因若試樣點過大，向上展開時會有擴散現象，使試樣點直徑增大，造成 R_f 值相近的點因為重疊而不易區分，分離效果變差。注意：無論在點樣或以鉛筆畫記時，切勿用力而造成刮傷或破壞薄層，且要等試樣點之溶劑揮發後，才能進行展開，如圖 2。

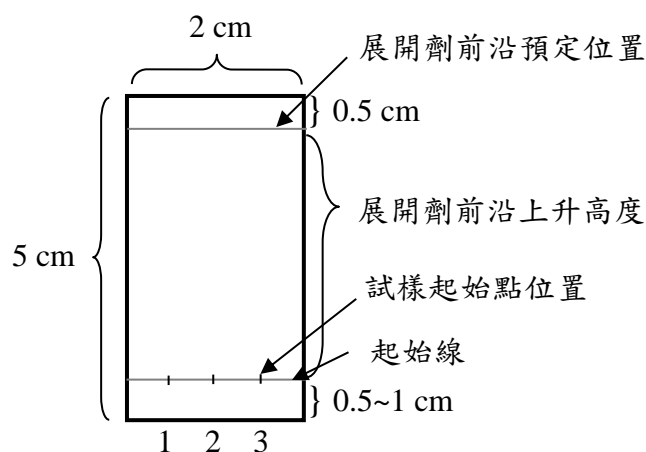


圖 2 薄層層析片畫記

(五) 展開：

試樣要在密閉且充滿飽和蒸氣的展開槽中進行展開。展開槽中加入高度約為 0.3 cm 的展開劑，在展開槽側壁先立放一張剪裁過的長形濾紙，下端浸泡在展開劑中，使整張濾紙潤濕，這樣可使槽內的蒸氣很快地達到氣液平衡後，加速展開劑的上升。使用鑷子夾取層析片上端，再將起始線的一端小心地向下放入展開槽中心，並使薄片頂端依靠在槽壁，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。注意：起始線必須高於展開劑的水平線，以避免試樣點溶入下方的展開劑中。展開時要蓋上蓋子保持密閉，讓展開劑上升到接近薄片的頂端時取出（展開劑不可超出薄片頂端），並立即以鉛筆標出展開劑的前沿位置（或先標記位置），待展開劑揮發後，以顯像法觀察並標示成分點位置，計算各點的 R_f 值，及記錄所用的展開劑。

（六）顯像：

試樣展開後，若樣品本身帶有顏色，可以直接觀察試樣點的位置。然而大多數的樣品是無色的，因此必須選擇適當的顯像方式。實驗室常用的顯像方法為使用紫外線（ultraviolet）顯色。對具有螢光性（fluorescence）的化合物，若將層析片放在紫外燈下照射，可觀察到這些螢光物質的亮點。如果樣品本身不發螢光，但是具有吸收紫外線的特性，則可使用事先混有吸收 254 nm 波長紫外線之螢光劑的層析片，在 254 nm 波長紫外線照射下，具有化合物的位置因為化合物吸收了紫外線造成螢光劑無法激發而呈現一暗點，其餘地方都是亮的螢光，如此可明顯判別會吸收紫外光之各成分的位置。

（七）薄層層析的用途：

一個化合物在層析片上展開的 R_f 值，是化合物在該分析條件下的特性參數，可用以判斷兩化合物是否為相同的化合物， **R_f 值不同的，必為不同化合物；但 R_f 相同的，則不一定是相同的化合物。**TLC 也可用於決定混合物中至少含有多少種成分物，或作為管柱層析沖提劑選擇的參考，或用來檢視分離純化如結晶、萃取、蒸餾和管柱層析的離析成效，還可用以追蹤化學反應的進行程度。

四、儀器與材料：

鑷子、樣品瓶（50 mL）、薄層層析片（2 × 5 cm，4 片）、層析專用毛細管、圓形濾紙（55 mm，自行裁剪）。

共用：燒杯（30 mL，20 個）、樣品瓶（7 mL，20 個）、剪刀（10 把，裁剪濾紙）、研鉢與杵（20 組）、紫外光燈及觀察箱（4 組）。

自備：白紙、鉛筆、直尺、數位相機。

五、藥品（書寫*純物質之性質即可）：

*正己烷（*n*-hexane， C_6H_{14} ）

*丙酮（acetone， CH_3COCH_3 ）

*乙酸乙酯（ethyl acetate，EA， $CH_3CO_2C_2H_5$ ）

*咖啡因標準品（caffeine， $C_8H_{10}N_4O_2$ ，0.02 g/10 mL EA，已準備）

*乙醯胺酚標準品（acetaminophen， $C_8H_9NO_2$ ，0.01 g/10 mL EA，已準備）

萃取劑：正己烷與乙酸乙酯混合溶液（體積比 4：1，已準備）

展開劑 1：正己烷與丙酮混合溶液（體積比 7：3，已準備）

展開劑 2：乙酸乙酯與丙酮混合溶液（體積比 1：1，已準備）

長效型普拿疼溶液（0.05 g 藥粉溶於 5 mL 乙酸乙酯，已準備）

自備：深綠色葉片數片（如菠菜、阿勃勒葉、酢漿草、杜鵑葉…），止痛藥（內含咖啡因者）

六、實驗步驟：

（一）葉片萃取及薄層分析

1. 取 5~6 片深綠色且柔軟的葉片，剪成碎片置於研鉢中，加入 10 mL 正己烷與乙酸乙酯混合萃取劑（體積比 4：1），研磨至溶液呈深綠色後，避開葉片渣以乾淨滴管吸取萃取液收集至 7 mL 樣品瓶中備用。

註：有機溶劑揮發性高可能需再加 1 次萃取劑，且應於排煙櫃中進行研磨萃取。各組準備之不同葉片萃取液可供他組進行分析比較。

2. 準備展開槽：於 50 mL 樣品瓶中加入適量的體積比為 7：3 之正己烷與丙酮展開劑，立放一張自剪裁的長形濾紙，讓濾紙的長邊浸於展開劑中並貼附於器壁，蓋上瓶蓋讓展開槽充滿飽和蒸氣。

註：薄層層析之操作請參考實驗技能與示範影片。

3. 畫記：以鑷子拿取裁剪好的 TLC 片置於乾淨的紙巾上，於距底端約 0.5 cm 高度處，以鉛筆畫一條橫線，並以間隔約 0.5 cm 的距離，在此橫線上標出 3 個試樣起始點位置。再於距離頂端 0.5 cm 處預先畫記好展開劑的前沿位置（圖 2）。

註 1：裁剪後的 TLC 片應適當儲存及保持乾淨以避免污染；使用鑷子拿取層析片邊緣，不可碰觸矽膠部分以避免污染。

註 2：每次拿取 1 片 TLC 片，配合展開劑高度試畫記第一片。

4. 點樣：以毛細管吸取葉片萃取液，在 TLC 片第 1 個試樣點位置以垂直角度快速、輕巧地點觸後，移開毛細管讓溶劑揮發。第 2 及第 3 個試樣點則點另 2 種葉片萃取液，以比較不同葉片色素展開之結果。

註：若某葉片萃取液的濃度較稀，可於第 1 次點樣的溶劑揮發之後，在同一位置重覆點樣 2-3 次。

5. 層析展開：確定 TLC 片上試樣點的溶劑已揮發後，以鑷子夾住 TLC 片小心平衡地放入展開槽中，側邊勿碰觸到器壁或濾紙，迅速蓋上蓋子保持密閉，讓展開劑向上爬升。當展開劑上升到 TLC 片頂端預先畫記的展開劑前沿位置時取出 TLC 片，放在乾淨的紙上晾乾。

注意：試樣起始點必須高於展開劑的水平線約 0.3 cm，以避免試樣點溶入下方的展開劑中。

6. 顯像、標示與記錄：待 TLC 片乾燥後，觀察或拍照記錄各色點，再以短波長 254 nm 紫外光照射，觀察各成分點的位置。拍照並以鉛筆圈畫標示每一成分點的位置。

注意：使用紫外燈觀察時，紫外光源不可直接照射到眼睛或手部皮膚以免造成傷害。

7. 量測每一成分點中心位置與起始點間的距離及展開劑前沿上升高度，計算各點之 R_f 值，並將展開及標示後之層析片黏貼於實驗紀錄紙，檢討展開成效，如拖尾、歪斜或 R_f 值偏低等，並提出改進方法。

(二) 止痛藥之 TLC 分析

8. 取一顆市售含咖啡因之止痛藥，記錄品牌及各成分含量，以研砵研磨成粉末狀，稱取約 0.05 g 藥粉置於 7 mL 樣品瓶中，加入 5 mL 乙酸乙酯以玻棒攪拌以盡量將試樣溶解（或使用準備室提供之止痛藥）。
9. 於 TLC 片上畫記 3 個試樣起始點及預定之展開劑前沿位置。於第 1 及第 2 試樣點分別輕點一次乙醯胺酚與咖啡因標準品，第 3 試樣點為待分析之止痛藥。
10. 使用步驟 2 的展開槽（內含正己烷與丙酮體積比為 7:3 之展開劑）進行 TLC 展開，當展開劑前沿達到預先畫記的位置時取出 TLC 片。

11. 待 TLC 片展開劑揮發後，於紫外燈下觀察畫記各試樣成分點位置。
12. 重新準備一張新的 TLC 片，依序輕點乙醯胺酚、咖啡因標準品及待分析之止痛藥，記錄試樣順序及點樣次數。
13. 將展開槽中原有之展開劑倒入有機溶劑回收瓶，改使用乙酸乙酯與丙酮體積比為 1:1 之溶液為展開劑進行展開，觀察記錄試樣點在不同展開劑中展開分離之結果，並檢討造成差異之原因。
14. 若觀察不到止痛藥中咖啡因的成分點，可再準備一張 TLC 片，增加止痛藥的點量次數（2~3 次），重新展開，觀察記錄分離結果。
15. 實驗結束後，廢液及毛細管分別棄置於指定的回收處。

七、參考資料：

1. 劉廣定，*有機化學實驗（甲）講義*，1988。
2. 臺大化學系，*大學有機化學實驗*，1988；pp. 47-55。
3. Pavia, D. L. *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Microscale Approach*, 1st ed.; Saunders College Pub.: Philadelphia, 1990.
4. 臺大化學系，*大學化學實驗一暨實驗二第四版修訂再刷*，2018，臺大出版中心：台北；pp. 217-230。

八、謝誌與記源：

本實驗教材源自臺大化學系蔡蘊明名譽教授於民國 89 年編寫之《大學化學實驗一暨實驗二》之有機化學基礎實驗相關教材。蔡教授以其多年有機化學領域之教學和研究經驗費心設計編寫教材，期望學生能充分瞭解有機化學實驗分離純化技能之原理及掌握操作重點。本實驗再加入常用止痛藥之成分分析，讓學生瞭解 TLC 之應用及展開劑系統對 TLC 分離成效之影響。

姓名 _____ 系別 _____ 組別 _____

學號 _____ 日期 _____

薄層層析

一、實驗數據紀錄與結果

(一) 葉片萃取液之薄層層析分離結果：

葉片種類及用量： _____

萃取溶劑及用量： _____

展開劑種類及用量： _____

結果 \ 試樣	第 1 試樣點			第 2 試樣點			第 3 試樣點		
	葉片種類								
點樣次數									
展開劑上升高度									
成分點	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值
TLC 片黏貼處									

展開結果與檢討： _____

結果 \ 試樣	第 1 試樣點			第 2 試樣點			第 3 試樣點		
	葉片種類								
點樣次數									
展開劑上升高度									
成分點	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值
TLC 片黏貼處									

展開結果與檢討： _____

(二) 止痛藥之薄層層析分離結果：

止痛藥品牌：_____

止痛藥成分及含量：_____

1. 展開劑種類及用量：_____

結果 \ 試樣	第 1 試樣點			第 2 試樣點			第 3 試樣點		
	試樣種類								
點樣次數									
展開劑上升高度									
成分點	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值
TLC 片黏貼處									

展開結果與檢討：_____

2. 展開劑種類及用量：_____

結果 \ 試樣	第 1 試樣點			第 2 試樣點			第 3 試樣點		
	試樣種類								
點樣次數									
展開劑上升高度									
成分點	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值	顏色	高度	R _f 值
TLC 片黏貼處									

展開結果與檢討：_____