

層析法

- 國立臺灣大學化學系，大學化學實驗一暨實驗二第 5 版，國立臺灣大學化學系：台北，民國 111 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（2017.03）、余瑞琳講師（2024.09）。

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（retention factor）。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：

深綠色葉片數片 (約 1 g)、薄層層析片 (2 × 5 cm)、研鉢與杵、管柱、長玻璃滴管 (229 mm)、橡皮帽、量筒 (10 mL)、廣用夾、錐形瓶 (50 mL)、燒杯 (30、150、400 mL 各 1 個)、小試管 (13 × 100 mm, 20 支)、試管架、玻棒、毛細管、小漏斗、鋁箔紙、鑷子。

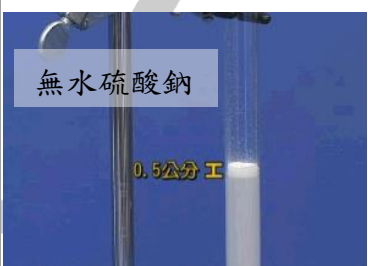
共用：剪刀、紫外光燈、加壓球。

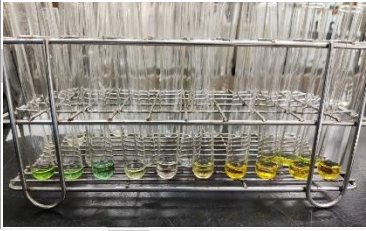
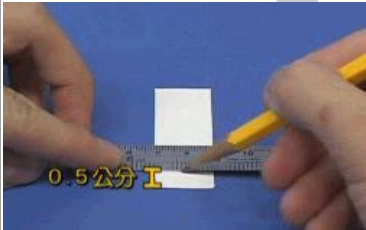
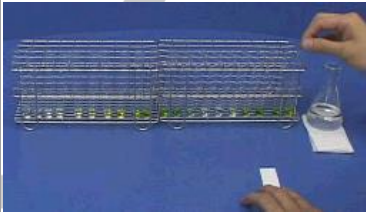
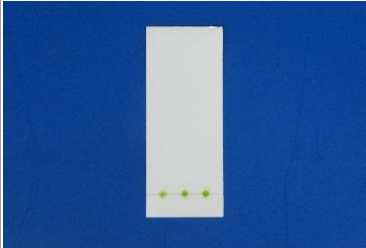
五、藥品：

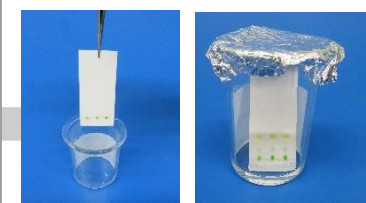
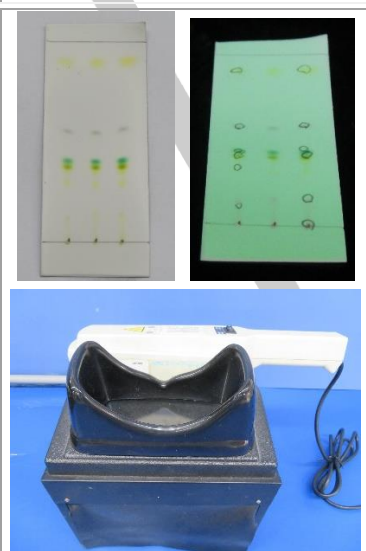
正己烷 (hexane, C_6H_{14})，乙酸乙酯 (ethyl acetate, $CH_3CO_2C_2H_5$)，丙酮 (acetone, CH_3COCH_3)，無水硫酸鈉 (anhydrous sodium sulfate, Na_2SO_4)，矽膠 (silica gel)。

六、實驗步驟：

步驟		圖例
(一) 萃取		
1.	取葉片 (深綠且柔軟者較佳) 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萃取液，研磨至溶液呈深綠色。有機溶劑易揮發，若體積少於 2 mL，可酌量加入萃取液再次研磨，然後吸取出加入量筒中。	
(二) 管柱層析		

2.	(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液。 (2) 沖提液：準備 60 mL 體積比為 7：3 的正己烷與丙酮溶液作為沖提液。 註：管柱層析法請參考實驗技能與示範影片。	
3.	(1) 準備矽膠靜相：取適量（約 20 mL）的正己烷與丙酮沖提液於 150 mL 燒杯中。 (2) 以燒杯秤取約 4 g 矽膠，慢慢攪拌加入於此沖提液中，混合攪拌均勻至成一矽膠漿狀且沒有氣泡存在為止。	
4.	填充管柱： (1) 準備一枝鉛筆套組著橡皮塞備用。 (2) 經由漏斗加適量（約 5 mL）沖提液於管柱中，以趕除玻璃擋片內的氣泡。 (3) 以玻棒一面攪拌一面快速的將矽膠漿經漏斗倒入管柱中。剩餘在燒杯中的矽膠儘量借助於滴管以沖提液將之沖入管柱中。 (4) 盡快輕敲管壁使矽膠填充均勻且上方平整。因沖提液流出速度較慢，可由管柱上方將過多的沖提液以滴管抽出，以減少等待的時間。目前所有用過的沖提液均為乾淨的，均可合併再使用。 (5) 待沖提液液面落至矽膠頂端之水平時，倒入約 0.5 cm 厚無水硫酸鈉做為緩衝層（硫酸鈉不會吸附試樣，因此並不需要鋪的平整），可用滴管吸取少許沖提液沿著管柱壁小心沖下粘滯於管柱壁上之硫酸鈉。靜待沖提液落至矽膠頂端之水平，在此靜待空檔準備好 20 支收集用的試管並置於試管架中。	   無水硫酸鈉 0.5公分高
5.	載入試樣： (1) 當沖提液落至矽膠頂端之水平時，將置於量筒中之樹葉萃取液以長滴管抽取出約 1 mL，滴管伸入玻璃管柱內，盡量靠近層析靜相沿著管柱壁小心地環形均勻加入（餘留少量進行薄層層析）。 (2) 待加入之萃取液已完全吸附於矽膠上時，取少量沖提液沿著管柱壁小心將粘滯於管柱壁上之萃取液沖下，待此沖提液沒入矽膠頂端之水平時，再重複一次沖洗。	

	等到沖提液沒入矽膠頂端之水平時，加入新的沖提液至玻璃管柱的頂端。 (3) 注意記錄在這一連串動作中管柱上所觀察到的變化，並可開始以試管收集沖提液，約每 1 mL 換一支試管，收集到管柱中有顏色的試樣均被沖提出來。 注意：若分離的過程中，不小心使沖提劑低於填充物表面，將會使填充物龜裂，嚴重影響分離效果。	 
6.	層析結束後處理： (1) 將玻璃管柱倒夾在燒杯上方，讓溶劑滴乾，直接倒出固態填充物。 (2) 或可使用加壓球連接倒夾之管柱，擠壓橡皮球加速將填充物排出，棄置於廢固體回收桶中。廢液倒入有機溶劑回收桶中。	
(三) 薄層層析		
7.	點樣： 於裁剪好的薄層層析片距底端 0.5 cm 處，以鉛筆畫一條橫線，並在底端橫線標上 r 及欲比對之試管號碼。	
8.	用毛細管吸取量筒中留下的葉片萃取液，點在薄層層析片 r 的位置上。再將管柱分離中所得具有顏色的試樣依序點在標好號碼的位置上，待其風乾。 註 1：試樣點的直徑不可超過 2 mm。試樣點濃度若太稀，不易觀察分析的結果，可重複點樣數次；但樣品濃度若太高，會產生拖尾現象，可加入適量溶劑稀釋濃度。 註 2：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，就可重複使用，繼續在層析片上點下一個試樣。	 

9.	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 0.3 cm 的展開劑（體積比為 7:3 的正己烷與丙酮溶液），讓濾紙下端浸在展開劑中，使濾紙潤濕。小燒杯蓋上鋁箔紙，讓展開槽充滿飽和蒸氣。	
10.	層析展開： 層析片上試樣點的溶劑揮發後，以鑷子夾住層析片，將層析片有試樣點的一端向下放入展開槽中心位置，讓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。迅速蓋上蓋子，保持氣密，讓展開劑向上爬升。 注意：試樣點必須高於展開劑，以避免試樣點溶入展開劑中。	
11.	顯像、標示與記錄： (1) 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。 (2) 立即以鉛筆標出展開劑的前沿位置及試樣點位置。 (3) 待乾燥後，量測每一試樣點的中心位置與起點的距離，計算其 R_f 值，比對各分離成分。 註：本實驗所使用之層析片是混有螢光劑的矽膠，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。	
12.	實驗結束後，矽膠、廢液、層析片及毛細管分別棄置於指定的回收處。	

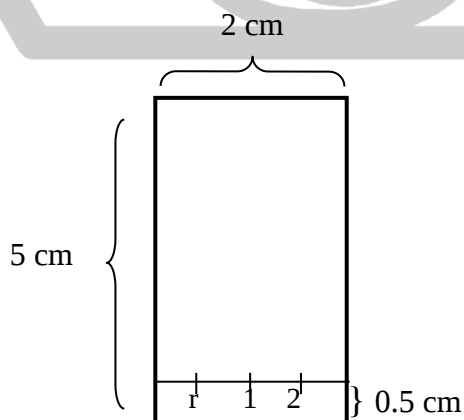


圖 薄層層析片