



# 層析法

2023/06/16 修訂

## 領取專用器材：

- 研鉢與杵（2組共用）
- 單孔橡皮塞
- 玻璃管柱
- 塑膠滴管
- 長玻璃滴管（229 mm）

## 使用時再取：

- 薄層層析片（ $2 \times 5$  cm）
- TLC用毛細管
- 鋁箔紙
- 紫外燈

## 準備個人器材：

- 綠色葉片3~5片，1 g
- 燒杯（30、150 mL）
- 錐形瓶（50、125 mL）
- 試管（20支）
- 試管架
- 玻棒
- 漏斗
- 鑷子





# 實驗目的與原理

## ■ 目的

利用管柱層析（CC）及薄層層析（TLC）分離及辨別混合物

## ■ 原理

利用化合物在靜相與流動相間的分配差異以分離混合物

## ■ 技能

- 萃取
- 管柱層析
- 薄層層析



# 步驟1：葉片色素萃取



- 取約1 g葉片，剪成小碎片置於研鉢
- 加入10 mL正己烷/乙酸乙酯（8：2，v/v）萃取劑，研磨至溶液呈深綠色
- 吸取出約2 mL左右之萃取液置於量筒中，記錄體積

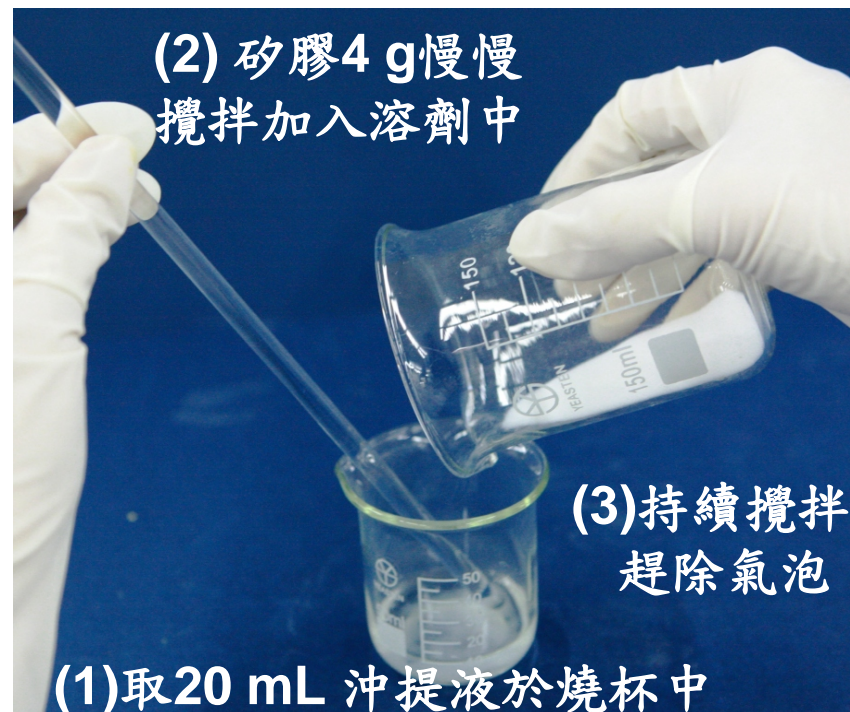
- ✓ 取約3-5片顏色為深綠色且柔軟之葉片
- ✓ 萃取液因揮發，可能只剩約2 mL，不足時可補加



# 步驟1：準備管柱層析靜相

## 1. 準備矽膠靜相

- 準備60 mL之正己烷/丙酮（7：3，v/v）沖提劑
- 取20 mL沖提劑於100 mL燒杯
- 秤取4 g矽膠，慢慢攪拌加入沖提劑中
- 攪拌至成稀泥狀且沒有氣泡

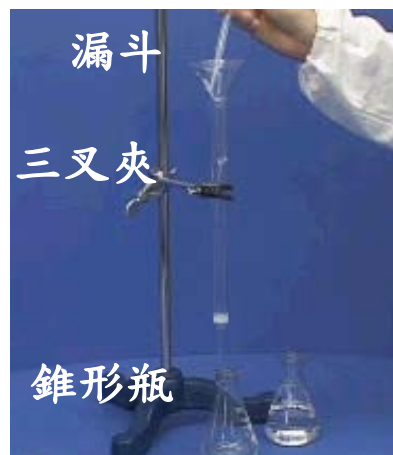




# 步驟2：填充層析管柱

## 2. 填充管柱

### (1) 架設管柱



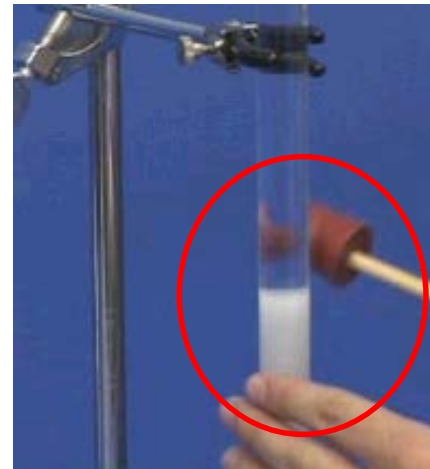
- 三叉夾固定管柱
- 管柱上方加置漏斗
- 下方以錐形瓶盛接
- 先加適量沖提劑趕除擋片內氣泡

### (2) 填充靜相



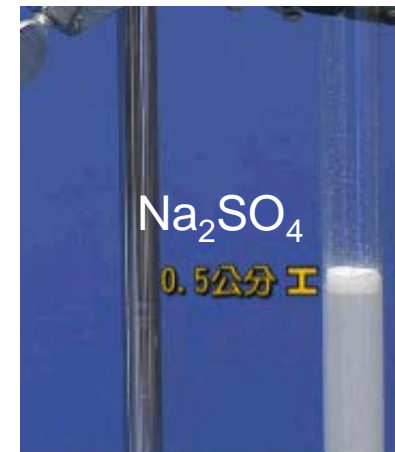
- 矽膠漿料攪拌均勻
- 快速倒入管柱
- 使用沖提劑沖洗剩餘矽膠

### (3) 趕除氣泡



- 迅速輕敲管壁
- 趕除氣泡並讓矽膠填充緊實平整

### (4) 加緩衝層



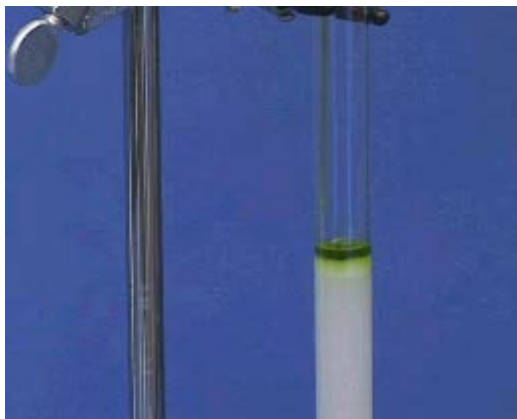
- 沖提劑落至靜相頂端
- 加約0.5 cm 無水硫酸鈉
- 少許沖提液沖下殘餘硫酸鈉



# 步驟3：管柱層析之載樣沖提

## 3. 載樣與沖提

### (1) 載入試樣



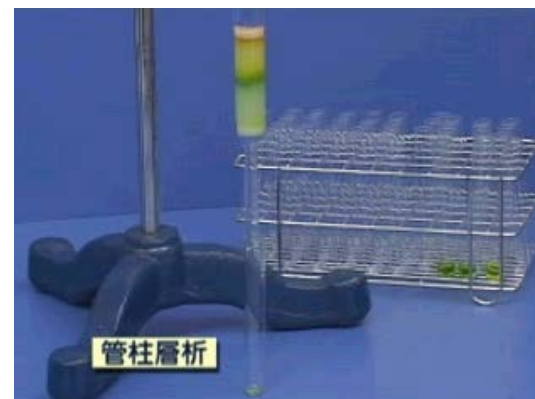
- 待沖提劑落至靜相頂端
- 以長玻璃滴管取試樣
- 沿管柱內壁環形加入

### (2) 淋洗器壁



- 試樣完全吸入於靜相
- 以滴管環形加入少量沖提劑淋沖器壁
- 待沖提劑沒入靜相後再重複一次淋洗

### (3) 沖提分離與收集

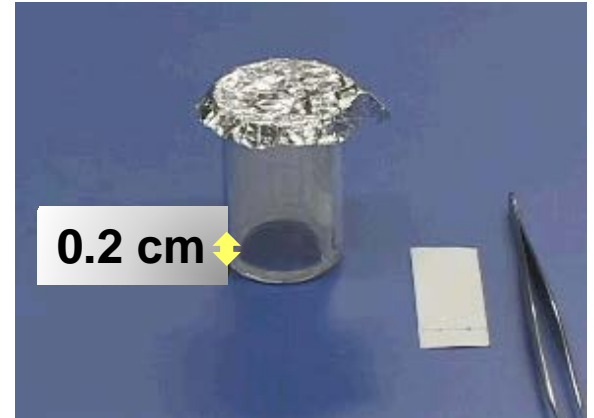
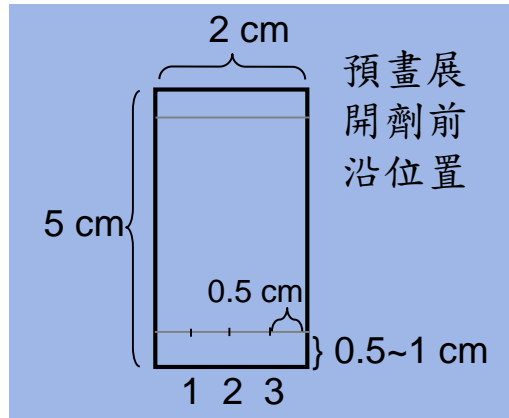
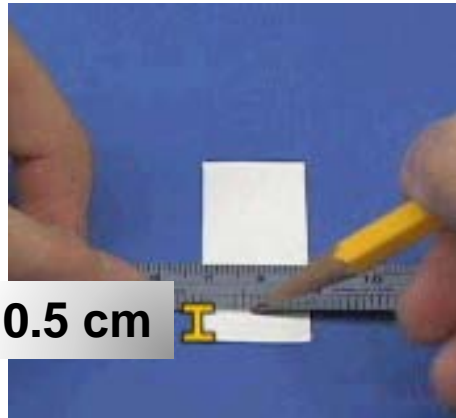


- 加沖提劑至管柱頂端
- 以試管收集（約1 mL/支）
- 薄層層析分析各試管試樣

✓ 保持沖提劑不低於矽膠靜相，以免造成矽膠斷裂



# 步驟4：準備薄層層析試樣



- 距TLC片底端與頂端各約0.5 cm高度處，以鉛筆輕畫起始線及展開劑前沿位置線
- 在起始線上以間距0.5 cm標記 2-3 點
- 毛細管吸取葉片萃取原液 (r) 點1小點在TLC片
- 另一支毛細管取試管內流分點樣於2和3位置

- 剪裁一張合適之長方形濾紙，橫向放入於30 mL燒杯中並貼靠內壁
- 加約0.2 cm 高度之展開劑於燒杯中
- 以鋁箔蓋住杯口保持密閉系統使蒸氣壓達平衡

✓ 流分樣品濃度通常較稀，可在同一位置重覆輕點樣數次



# 步驟5：薄層層析之展開與記錄



- 以鑷子夾住TLC片放入燒杯中央
- TLC片不貼靠至杯壁和濾紙，以避免邊際效應
- 試樣點須高於展開劑，不可浸入溶劑中
- 鋁箔蓋住杯口保持密閉，靜置展開
- 展開劑上升到接近TLC片頂端0.5 cm預畫線處，取出TLC片
- 圈記各試樣點位置，計算每一試樣點 $R_f$ 值

✓ 可將TLC片置於UV燈下  
觀測各試樣點

$$R_f = \frac{\text{試樣點上升高度}}{\text{展開劑前沿上升高度}}$$





# 實驗後處理及注意事項

精簡報告

- 矽膠顆粒微小不宜吸入，可戴口罩
- 填充管柱後燒杯內殘留的矽膠先倒入矽膠回收桶，以免到處飄散
- 管柱沖提過程要隨時補充沖提劑，不可讓沖提劑沒入矽膠靜相，這會造成矽膠管柱斷裂
- 薄層層析法觸點試樣時，毛細管以垂直、快速、輕巧地點觸層析片後，移開毛細管，讓溶劑揮發
- 用過的毛細管，以紙巾將溶液吸引出，再用乾淨的溶劑潤洗2-3次，可重覆使用，繼續在層析片上點下一個試樣
- 實驗後玻璃管柱倒夾在燒杯上方讓溶劑滴乾，固態填充物即可倒出，棄置廢固體回收桶，廢液倒入指定的回收桶中
- 可用加壓球連接管柱，擠壓橡皮球將所填充之矽膠排出
- 完成清潔整理、器材清點與值日生工作



# 管柱層析注意事項

- 準備靜相時，將填充物加入於沖提劑中，混合攪拌至稀泥狀沒有氣泡
- 先加適量沖提劑趕除玻璃擋片內氣泡，再加矽膠漿料
- 管柱內靜相矽膠填充物應該平整沒有氣泡或裂痕
- 裝填無水硫酸鈉時，要待沖提劑液面落到填充矽膠靜相水平面後再加入
- 待沖提劑完全降至靜相填充物後，才可用長滴管沿著管柱壁小心、均勻的環形載入待分離試樣
- 待試樣溶液完全吸入於矽膠靜相填充物時，再加入沖提劑
- 沖提過程要注意隨時補充沖提劑，絕不可以讓沖提劑沒入靜相，造成氣泡或裂痕
- 實驗結束後，將靜相填充物棄置於廢固體回收桶中，不可倒入水槽



# 薄層層析注意事項

- 層析片應保持乾淨，用鑷子拿取，不可碰觸矽膠部分以免污染
- 用鉛筆畫記或點樣時，切勿用力，造成薄層靜相刮傷
- 以內徑小於1 mm的毛細管點樣
- 試樣點越小越好，以避免試樣重疊不易分離
- 試樣濃度不可太高，以致產生拖尾現象
- 試樣的濃度不可太稀，以免不易觀察，可同一位置重複點樣
- 試樣點的溶劑揮發之後，才能放入展開槽中進行展開
- 展開槽須保持氣密並且達到氣液平衡
- 使用鑷子夾放層析片，層析片之兩邊不可碰觸到器壁以避免邊緣效應，致試樣展開歪斜
- 試樣點必須高於展開劑，以避免試樣點溶入展開劑中
- 以紫外燈觀察時，紫外光源不可直接照射到眼睛或手部皮膚