

六、薄層層析

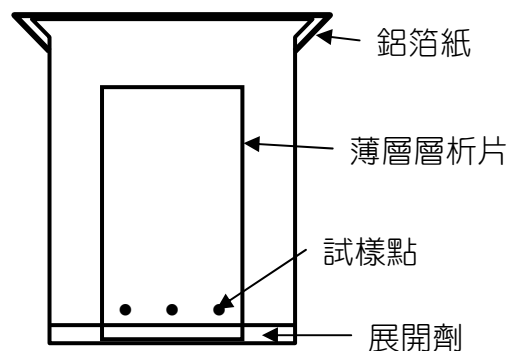


圖 6-1 薄層層析片展開

一、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。層析法依據靜相與流動相之不同，分為管柱層析 (column chromatography)、薄層層析 (thin layer chromatography, TLC)、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 (stationary phase)，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 (mobile phase)，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。

二、器材：

實驗器材包含：薄層層析片、鑷子、毛細管、展開槽、展開劑、試樣溶液、紫外光燈。

(一) 薄層層析片

薄層層析片一般以矽膠 (silica gel)、鋁礬土 (alumina) 或其它物質作為靜相吸附劑，此靜相吸附劑與膠結劑，例如常用的硫酸鈣，在水中混合成稀泥狀後，均勻的塗佈在乾淨的玻璃片、鋁片或膠片上，待乾燥後就形成了靜相的薄層。目前市面上有多種薄層層析片販售，本實驗所使用的層析片，是在所塗佈的矽膠靜相吸附劑中添加螢光劑，在波長 254 nm 的紫外光照射下，整個薄層片會發出綠色螢光，在有會吸收紫外光的試樣點的位置，則呈現暗點，因此可以很容易地快速檢測分離的結果。

(二) 毛細管

待分離的試樣溶液須使用內徑小於 1 mm 的毛細管點在層析片上，因此在正式實驗之前，首先需製作毛細管。使用測定熔點的毛細管，置於酒精燈火焰的外焰溫度較高處加熱，並同時均勻旋轉至毛細管軟化，然後離開火源，迅速往水平方向輕拉，就可以拉出細長的毛細管。使用磨砂紙輕劃毛細管，從中折斷，得到兩支細的毛細管。薄層層析所用的毛細管亦可直接購得。

(三) 展開劑

薄層層析常用具揮發性的溶劑作為展開劑，例如低極性的正己烷 (hexane)，或是高極性的乙酸乙酯 (ethyl acetate)。高極性溶劑與矽膠靜相的親和力較高，較易取代吸附於靜相上的化合物而帶動化合物上升。適當的挑選展開劑的極性，可以調整化合物在層析片上爬升的位置；因此，常用正己烷及乙酸乙酯調配成各種不同極性的展開劑，以獲得最佳的分離效果。

三、實驗操作：

(一) 點樣

1. 畫起始線

先用鉛筆在層析片上距底端約 0.5 公分處輕輕畫一橫線作為起始線，再畫一短線垂直於起始線，作為試樣的起始點。可在起始線上點 2 到 3 個試樣，一起併排展開，但是相鄰的試樣點及距離層析片左右邊界均應至少保持約 0.3 公分距離，以避免展開時因擴散現象而導致樣品重疊。

2. 觸點試樣

使用毛細管插入試樣溶液中以吸取試樣溶液，而後在層析片上起始點處以垂直的角度快速、輕巧地點觸之後，移開毛細管，讓溶劑揮發。試樣點的直徑不可超過 0.2 公分，試樣點越小，分離效果越好。當試樣點過大時， 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。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，就可以重覆使用，繼續在層析片上點下一個試樣。

3. 重覆點樣或稀釋試樣

樣品濃度要適當，如果濃度太稀，則不易觀察分析的結果，因此，等到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。樣品濃度也不可太高，因為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。

(二) 展開

1. 準備展開槽

試樣要在密閉且充滿飽和蒸氣的展開槽中進行展開。可以使用小燒杯蓋上鋁箔紙作為展開槽，在展開槽側壁放一張剪裁過的長形濾紙，加入高度約為 0.2 公分的展開劑，讓濾紙的下端浸泡在展開劑中，並使濾紙潤濕，這樣可使槽內的蒸氣很快地達到氣液平衡，加速展開劑的上升。

2. 放置層析片

確定層析片上試樣點的溶劑已經揮發後，使用鑷子夾住層析片，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，以免產生邊際效應使試樣展開歪斜影響展開結果。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。

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，待展開劑揮發後，以顯像法觀察試樣點的位置。

(三) 顯像

1. 直接觀察

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

2. 碘呈色法

將欲呈色之層析片置入一內含有碘與矽膠的廣口瓶中，蓋上瓶蓋，搖動數秒使含碘的矽膠與層析片的靜相直接接觸，由於部分有機物能與碘形成錯合物而可呈色。取出的薄層層析片由於碘的昇華，色點會慢慢消失，故取出後，應立即用鉛筆做下記號。

3. 其他呈色法

層析片也可浸泡於磷鉬酸乙醇溶液中，一秒鐘後迅速取出，置於加熱板上加熱而呈色。

(四) 標示與記錄

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。

(五) 實驗結束後處理

實驗結束後，將廢液及固體廢棄物，置於指定的回收桶中。所用器具清洗整理乾淨，完成實驗。

(六) 實驗注意事項

1. 使用內徑小於 1 毫米的毛細管點樣。
2. 裁剪後的層析片應適當儲存及保持乾淨以避免污染。
3. 用鑷子拿取層析片邊緣，不可碰觸矽膠部分以避免污染。
4. 用鉛筆畫記或點樣時，切勿用力，造成薄層靜相刮傷。

5. 試樣濃度不可太高，以致產生拖尾現象。
6. 試樣的濃度不可太稀，以免影響觀察。
7. 試樣點越小越好，以避免試樣重疊不易分離。
8. 試樣點的溶劑揮發之後，才能放入展開槽中進行展開。
9. 展開槽須保持氣密並且達到氣液平衡。
10. 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際效應，致試樣展開歪斜。
11. 試樣點必須高於展開劑，以避免試樣點溶入展開劑中。
12. 使用紫外燈觀察時要注意，紫外光源不可直接照射到眼睛或手部皮膚以免造成傷害。

四、參考資料：

1. 國立台灣大學化學系有機教研小組，*大學有機化學實驗*，第七版，國立台灣大學出版中心：台北市，**2004**。
2. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. *Introduction to Organic Laboratory Techniques: a Contemporary Approach*; Saunders College Publishing: New York, **1976**.
3. Shugar, G. J.; Shugar, R. A.; Bauman, L.; Bauman, R. S. *Chemical Technicians' Ready Reference Handbook*; 2nd. ed.; McGraw-Hill Book Co.: New York, **1981**.