

第十九章 平面色谱法

plane chromatography

yqyu@shmu.edu.cn

● 平面色谱法是在平面上进行分离的一种色谱方法

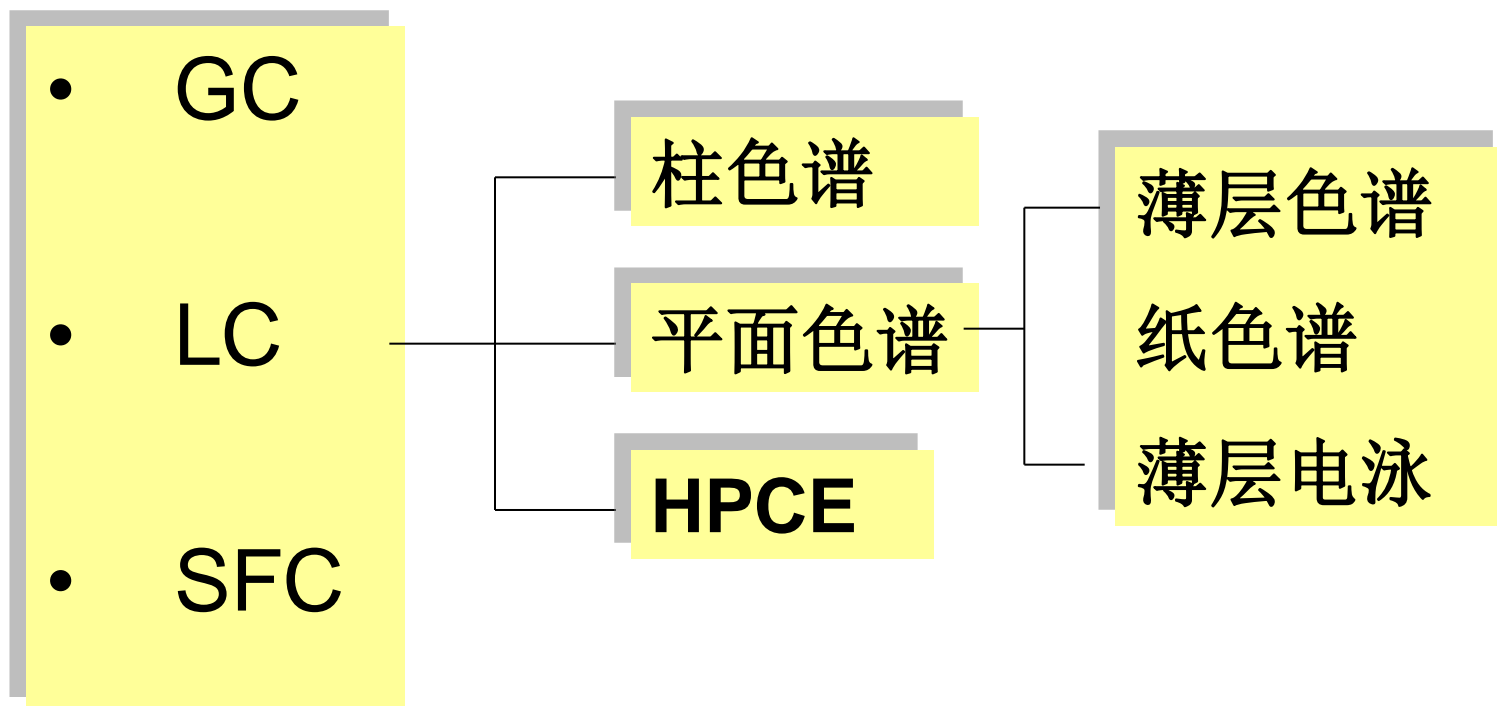
● 操作简便，无需昂贵仪器设备

● 历史简介

- 20世纪40年代，纸色谱法
- 20世纪60年代，薄层色谱法
- Stahl于1965年出版了《薄层色谱法》一书
- 20世纪80年代，出现了仪器化薄层色谱法

第一节 分类和原理

一、分类



二、平面色谱法参数

(一) 定性参数

1. 比移值 (R_f)

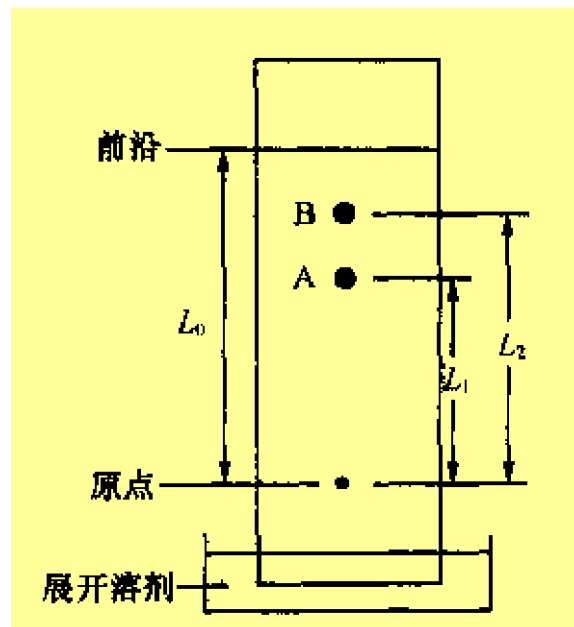
$$R_f = L/L_0$$

影响因素

- 组分结构和性质
- 固定相和流动相种类和性质
- 展开条件等

最佳范围 0.3~0.5

可用范围 0.2~0.8



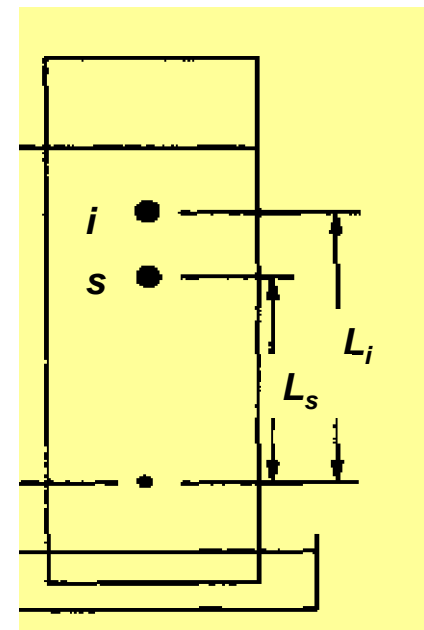
2. 相对比移值 (R_r)

$$R_r = R_{f(i)} / R_{f(s)} = L_i / L_s$$

纯物质加入试样中
或试样中某已知组分

同样条件下测定

$s+i$



在一定程度上消除系统误差
具较高的重现性和可比性

(二) 相平衡参数

1. 分配系数 (K) 和保留因子 (k)

2. 相互关系

$$R' = \frac{1}{1+k} \quad \Rightarrow \quad R_f = \frac{1}{1+k} \quad \Rightarrow \quad k = \frac{1 - R_f}{R_f}$$

$$k = \frac{1 - R_f}{R_f} \quad \Leftrightarrow \quad k = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m} \quad \Leftrightarrow \quad R_f = \frac{1}{1 + K \frac{V_s}{V_m}}$$

$$k = \frac{1 - R_f}{R_f}$$



$$k = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$



$$R_f = \frac{1}{1 + K \frac{V_s}{V_m}}$$

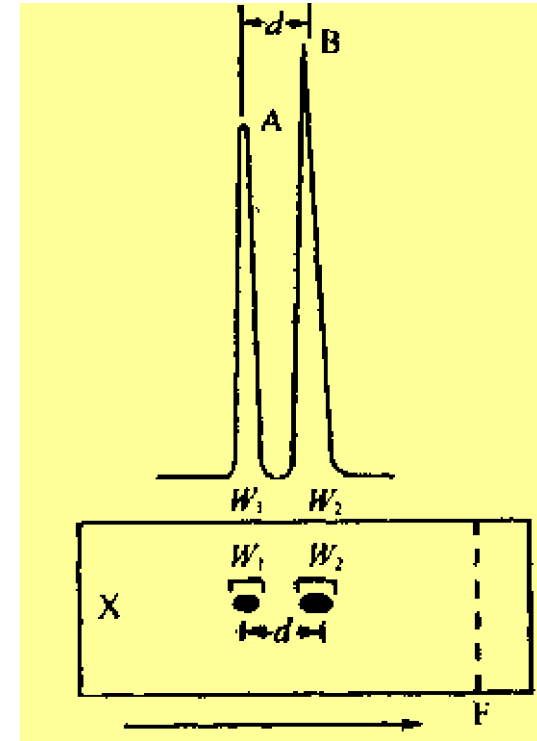
- R_f 为1的组分， $K(k)=0$ ，表示该组分不被固定相保留
- R_f 为0的组分， $K(k)=\infty$ ，表示该组分完全被固定相所保留（停留在原点）
- 当 V_s/V_m 固定时， R_f 由 K 决定
- K 不等是分离的前提
- 当实验条件固定时， K 只与组分性质有关

(三) 分离参数

1. 分离度 (resolution R)

$$R = \frac{2d}{W_1 + W_2}$$

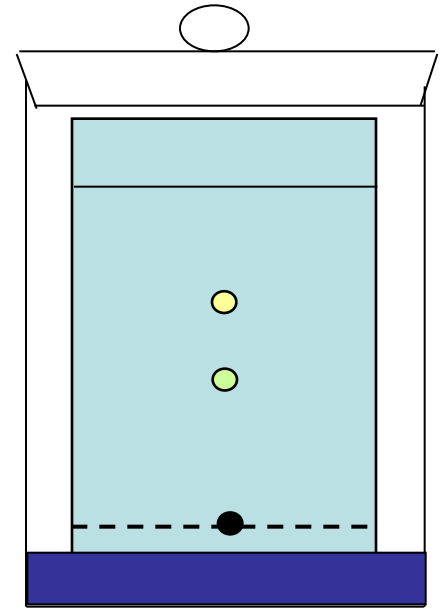
在平面色谱法中: $R > 1$



第二节 薄层色谱法 (thin layer chromatography; TLC)

TLC的特点

- 分离能力较强，结果直观
- 分析速度快，min
- 试样预处理简单，对被分离组分性质没有限制
- 上样量较大
- 所用仪器简单，操作方便



一、薄层色谱法的主要类型

- 吸附薄层色谱法

固定相为吸附剂

一般极性大的组分移动速度慢

- 分配薄层色谱法

固定相为液体（吸附于载体上）

	固定相	展开剂
正相	含水硅胶	弱极性有机溶剂
反相	烷基化化学键合相	水-有机溶剂

(三) 高效薄层法 (high performance thin layer chromatography; HPTLC)

- 在现代色谱理论指导下，以经典薄层色谱法为基础发展起来的一种薄层色谱技术。

- 特点

分离效率高
分析速度快
检测灵敏度高

高效薄层色谱法与经典薄层色谱法比较见表19-3

二、吸附薄层色谱的吸附剂和展开剂

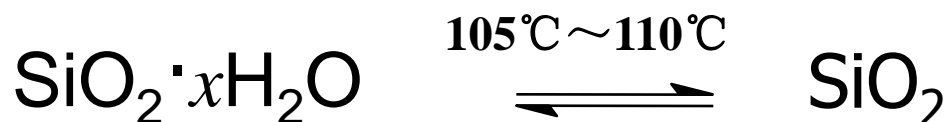
(一) 吸附剂

- 吸附薄层色谱法的固定相为吸附剂
- 常用的吸附剂有硅胶、硅藻土、氧化铝、纤维素、聚酰胺薄膜等
- 一般要求粒径为 $5\sim 40\mu\text{m}$

1. 硅胶

- 表面带有硅醇基呈弱酸性，与极性基团形成氢键而表现其吸附性能，不同组分的极性基团因与硅醇基形成氢键的能力不同而被分离。

- 吸附能力



- 含水量越多，级数越高，吸附能力越弱， R_f 值越大

与分离效率有关的因素：

- 粒度和孔径 硅胶粒度↓，均匀性越好，分离效率↑
- 表面积 硅胶表面积↑，则与样品之间的相互作用↑

氧化铝和硅胶含水量与活性的比较

硅胶含水量%	活性级	氧化铝含水量%
0	I	0
5	II	3
15	III	6
25	IV	10
38	V	15

2. 氧化铝

碱性、中性和酸性。活性也与含水量有关，含水量越高，活性越低。

3. 聚酰胺

酰胺基可与酚、羧酸、氨基酸等形成氢键，对这类物质有高的选择性。

商品出售的薄层色谱用氧化铝和硅胶有

- 氧化铝（硅胶） **G**，表示含有粘合剂煅石膏
- 氧化铝（硅胶） **H**，表示不含有粘合剂
- 氧化铝（硅胶） **HF₂₅₄**，表示不含粘合剂而含有荧光物质；在**254nm**波长紫外光下呈强烈黄绿色荧光背景

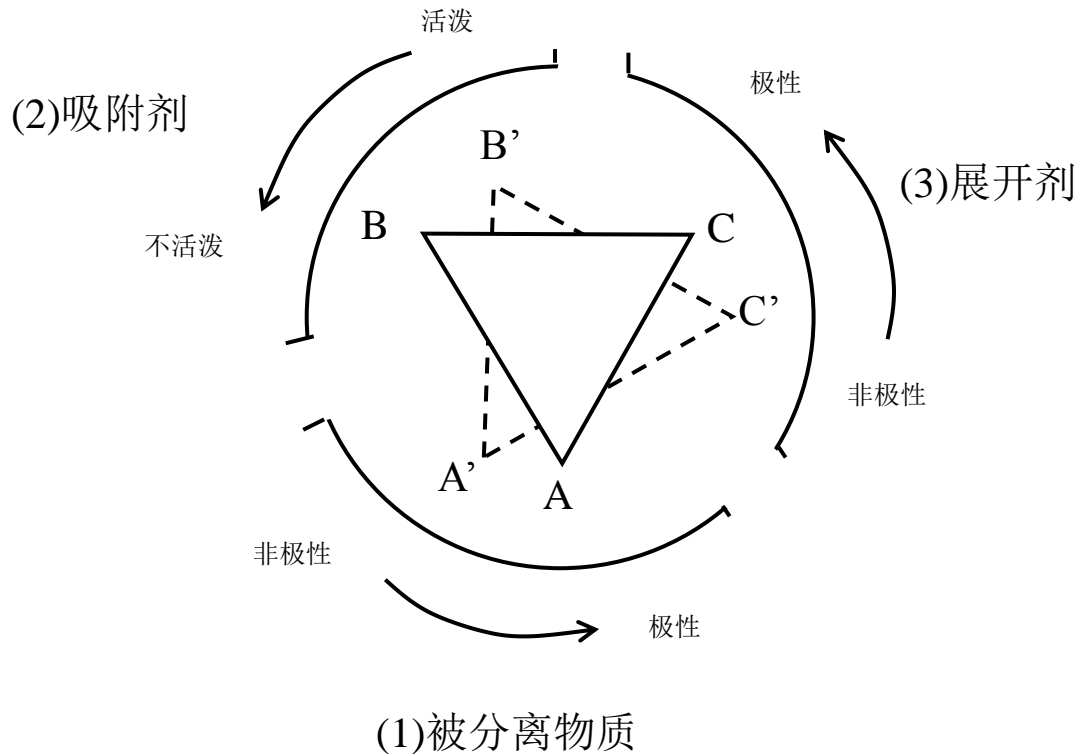
(二) 展开剂

展开剂的选择

- 根据被分离物质的极性、吸附剂的活度和展开剂的极性三者的相对关系进行选择
- 先用单一溶剂展开，然后根据分离效果进行调整，经常使用混合展开剂
- 分离酸碱组分时，展开中加入少量酸、碱

常用混合展开剂 表19-3

化合物极性、吸附剂活度和展开剂极性间的关系





三、薄层色谱操作方法

(一) 薄层板的制板

选择 5cm×20cm、10cm×20cm、20cm×20cm

涂布 不加粘合剂
加粘合剂如5~15%石膏
或 0.25~0.75%CMC-Na

活化

涂布  晾干  活化  干燥器中备用
0.2~0.3mm 110 °C, 30min

(二) 点样

- 配样溶剂的选择

取决于待分析化合物的类型和特性，相似相溶
合适的样品浓度应为**0.01%~0.1%**

- 点样量

影响展开后样品的形状
点样量一般为几微升
考虑灵敏度

(三) 展开

- 器皿

使用的器皿一般为长方形密闭玻璃缸，称为层析缸或色谱缸。

- 方式

常用上行法，另外还有下行法、径向展开、多次展开。

- 防止边缘效应

产生原因
层析缸蒸气饱和

(四) 斑点的定位

1. 有色物质

日光下观察

2. 有紫外吸收/荧光

普通板，荧光板

紫外灯下观察

3. 无色物质

喷洒显色剂

通用型

碘、硫酸、荧光黄等

专用型

某个或某一类官能团

四、定性和定量分析

(一) 定性分析

R_f

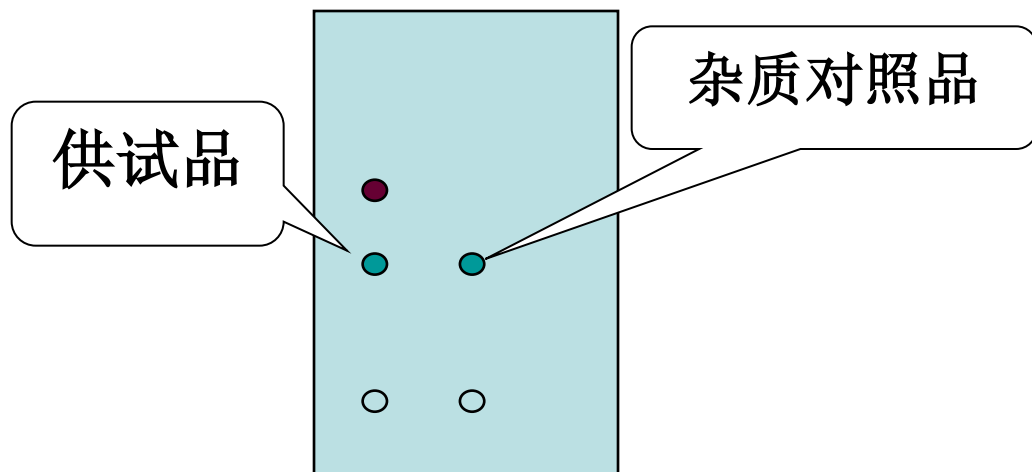
R_r

(二) 杂质检查

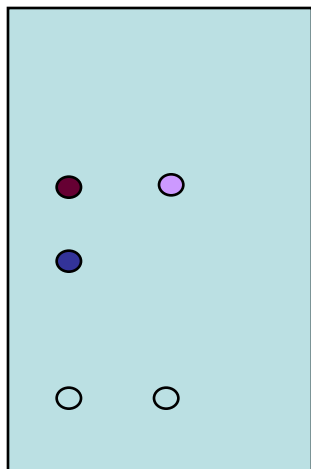
1. 杂质对照品比较法

2. 主成分自身对照法

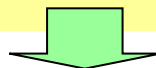
1. 与对照品比较



2. 主成分自身对照法

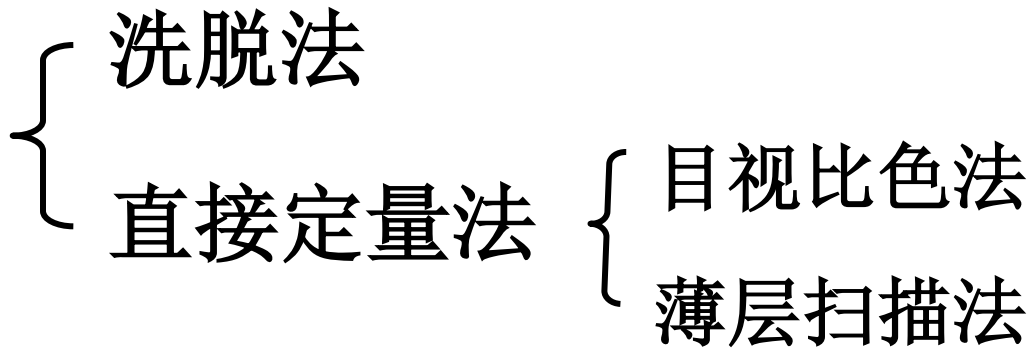


配制一定浓度的供试品溶液



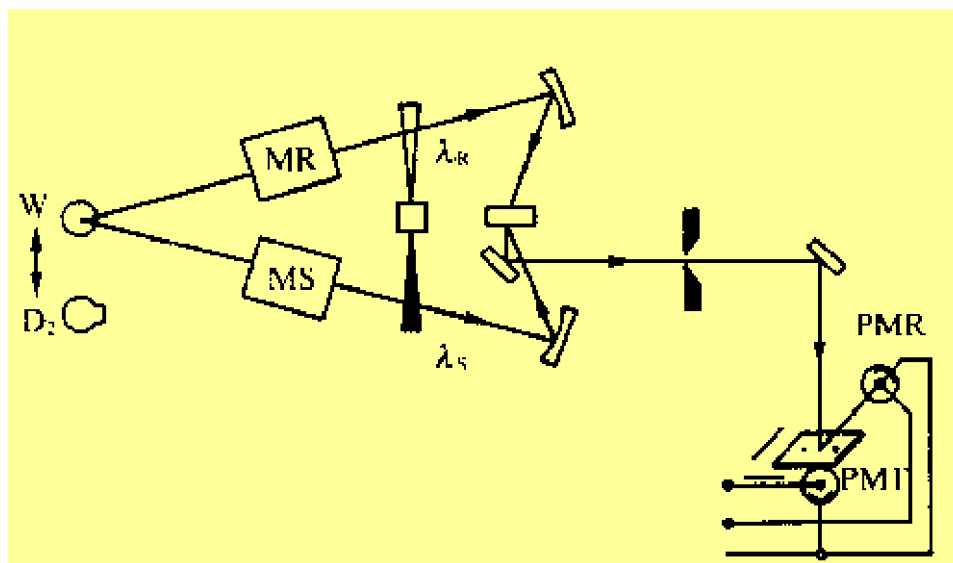
稀释至低浓度作为对照品溶液

(三) 定量方法



五、薄层扫描法简介

- 用一定波长的光束照射展开后的薄层板，测定薄层色谱斑点的吸光度 A （或荧光强度 F ）随展开距离 l 的变化，所记录的 $A \sim l$ （或 $F \sim l$ ）曲线称为薄层色谱扫描图，利用薄层扫描图进行定量及定性分析的方法成为薄层扫描法



1. 测定波长的选择

- 常采用双波长法

测量值： λ_s λ_R

由于从测量值中减去了薄层本身的空白吸收，所以在一定程度上消除了薄层不均匀的影响，使测定结果准确度提高。

2. 薄层扫描法

(1) 透射法

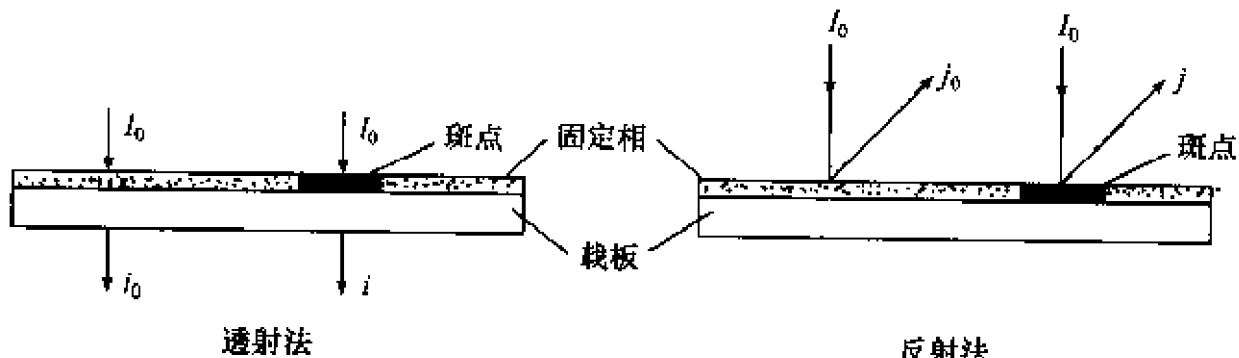
$$A = -\lg \frac{T}{T_0}$$

(2) 反射法

$$A = -\lg \frac{R}{R_0}$$

$$T_0 = \frac{i_0}{I_0} \quad T = \frac{i}{I_0}$$

$$R_0 = \frac{j_0}{I_0} \quad R = \frac{j}{I_0}$$



扫描方法

- 线形扫描 快速，但在斑点不规则和浓度不均匀时测量误差较大
- 曲折形扫描 适用于形状不规则及浓度分布不均匀的斑点

3. 散射参数的选择

- 由于吸光度与斑点中组分的量不遵守比耳定律，故校正曲线成弯曲状，需要将其校正为直线。
- 曲线校正就是将散射参数和处理方法存入计算机，计算机根据适当的修正程序，自动进行校正给出符合一定线性关系的数值，从而得到一定线性的定量工作曲线。

4. 荧光法测定

5. 定量分析方法

外标一点法

外标两点法

$$m_{\text{样}} = a + bA_{\text{样}}$$

$$b = \frac{m_1 - m_2}{A_1 - A_2}$$

$$a = m_1 - bA_1$$

第三节 纸色谱法

(paper chromatography)

一、分离原理

以纸为载体的平面色谱法。其分离原理属于分配色谱的范畴。与薄层色谱相同，纸色谱也常用比移值 R_f 来表示各组分在色谱中位置。

K 与化合物的分子结构及流动相种类和极性有关

- 当流动相一定时，化合物的极性越大或亲水性越强， **K 越大， R_f 值越小**；反之亦然。
- 当化合物一定时，流动相极性越大， **K 越小， R_f 值越大**。

三种六碳糖的 R_f 值

六碳糖	羟基数目	溶剂系统		
		正丁醇-水 R_f	正丁醇-酸-水 (4:1:5) R_f	乙酸乙酯-吡啶-水 (25:10:35) R_f
葡萄糖	5	0.03	0.17	0.10
鼠李糖	4	0.27	0.42	0.44
洋地黄毒糖	3	0.58	0.66	0.88

二、纸色谱法的实验条件

- 色谱纸的选择

纸质，型号（快、中、慢），
厚薄等

- 固定相

一般为水，也可以是**DMF**或
缓冲溶液

- 展开剂的选择

水饱和的有机溶剂等

- 操作步骤

参照**TLC**

主要色谱类型

色谱类型	分离原理	载体	固定相	展开剂	R_f 值顺序
吸附薄层	吸附		硅胶	有机溶剂	极性小的 R_f 值大
正相薄层	分配	硅胶	水	有机溶剂	极性小的 R_f 值大
反相薄层	分配	硅胶	硅胶键合相	水—有机溶剂	极性小的 R_f 值小
纸色谱	分配	纸纤维	水	水—有机溶剂	极性小的 R_f 值大