

# 薄层色谱法

---

(Thin-layer Chromatography, TLC)

# 目 录

- 一 前言
- 二 基本参数
- 三 薄层层析的操作
- 四 特殊的薄层
- 五 应用举例



# 一.前言

---

定义:

薄层色谱法通常指以吸附剂为固定相的一种液相色谱法。即将固定相在玻璃、金属或塑料等光洁的表面上均匀地铺成薄层，试样点在薄层的一端，流动相借毛细作用流经固定相,使被分离的物质展开。

常用的薄层色谱法以吸附剂为固定相,属于吸附色谱的范畴

# 特点

## 薄层色谱与液相色谱法比较

HPLC	TLC
每次只能分析一个样品	在一块板上点上多个样品同时进行分离
对样品制备要求高，必须不含可吸留在柱上的杂质，否则柱性能受损	用毕一次弃去，可直接用样品的粗提物点样
可用检测器种类较少	展开后可用多种手段检测

# 薄层色谱与柱层析和纸层析比较

---

(1) 快速 (数十秒~数十分钟)

(2) 分离效率高 (多柱路)

(3) 灵敏度高

(斑点扩散小, 比纸色谱高10-100倍)

(4) 显色方法多样 (腐蚀性显色剂)

(5) 图象易保存

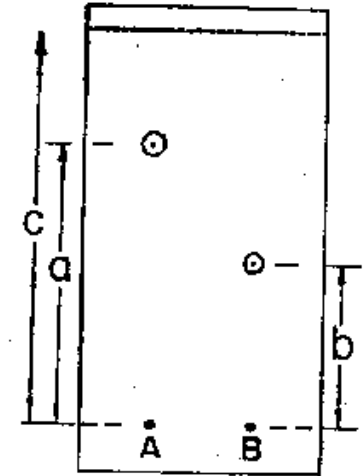
## 二. 基本参数

### □ 比移值 ( $R_f$ )

$R_f$  = 原点至组分点中心的距离 / 原点至流动前沿的距离

组分A的  $R_f = a/c$

组分B的  $R_f = b/c$



### □ 相对比移值，即相对于某一物质x的 $R_f$ 值，用 $R_x$ 表示。

其定义为： $R_x$  = 组分的 $R_f$ 值 / 物质x的 $R_f$ 值

组分A相对于物质B的“相对比移值”  $R_B = a/b$

# 三. 薄层色谱的操作

---

- 吸附剂的选择
- 薄层板的制作
- 展开剂的选择
- 点样
- 展开
- 定位与显色
- 薄层层析的定量测定

# (一) 薄层层析用的吸附剂

---

- 常用的薄层层析吸附剂有 *硅胶*、*氧化铝*、*纤维素*、*聚酰胺*等。
- 吸附剂的选择：首先决定于 *样品成分* 的性质，即它们的 *溶解性*、*酸碱性*、*极性* 以及是否与吸附剂起 *化学反应* 等；
- 其次要考虑吸附剂、载体是否容易得到及其价格等。



表 5-1 薄层色谱用硅胶的技术参数

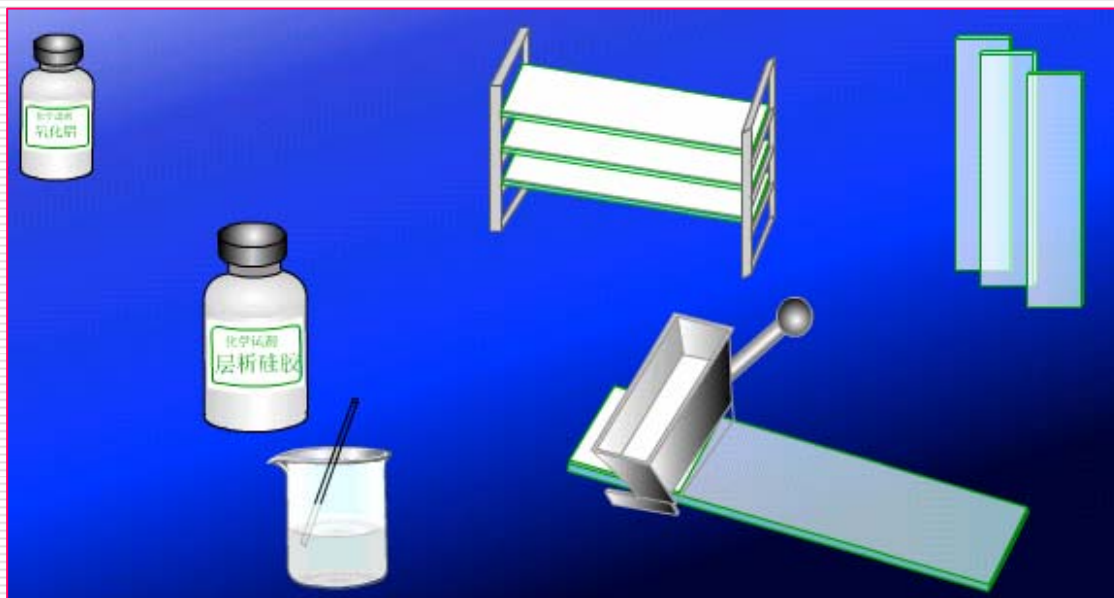
项目	范围值	典型值	项目	范围值	典型值
密度/(g/cm <sup>2</sup> )	0.3~0.5	约 0.4	孔体积/(mL/g)		0.8
比表面积/(m <sup>2</sup> /g)	400~600	约 500	pH 值	5~7	7.0
孔径/nm	2~15	6.0	粒度/ $\mu$ m	10~50	40

表 5-2 常用薄层用硅胶的特征

硅胶商品名称	黏合剂	荧光添加剂	应 用
硅胶 H	无	无	薄层色谱,干柱色谱
硅胶 G(TyPe60)	煨石膏	无	薄层色谱,干柱色谱
硅胶 GF254	煨石膏	锰激活的硅酸锌( $Zn_2SiO_4:Mn$ )波 长 254nm	在波长为 254 nm 紫外灯照 射下荧光检出
硅胶 GF365	煨石膏	银激活的硫化锌、硫化镉 ( $ZnS \cdot CdS; Ag$ )波长 365nm	在波长为 365nm 紫外灯照 射下荧光检出
硅胶 HF254	无	锰激活的硅酸锌( $Zn_2SiO_4:Mn$ ) 波长 254nm	薄层色谱,干柱色谱不易显 色或易与显色剂起化学反应 的化合物

## (二) 薄层板的制作

层析板是用专门的涂布器把浆状的吸附剂（纸浆、纤维素、硅胶、中性氧化物、聚酰胺、多孔性玻璃粉，硅烷化键合硅胶等）均匀地涂在在薄层板（玻璃板、金属板或弹性塑料板）上，干燥（**110°C**活化）后即可使用。



### (三) 薄层层析中展开剂的选择

---

主要根据极性的不同来选择流动相展开剂。

各种展开剂按其极性不同排序为：

烷烃<烯烃<醚类<硝基化合物<二甲胺<酯类<  
酮类<醛类<硫醇<胺类<酰胺<醇类<酚类<羧  
酸

# 选择薄层条件的简图

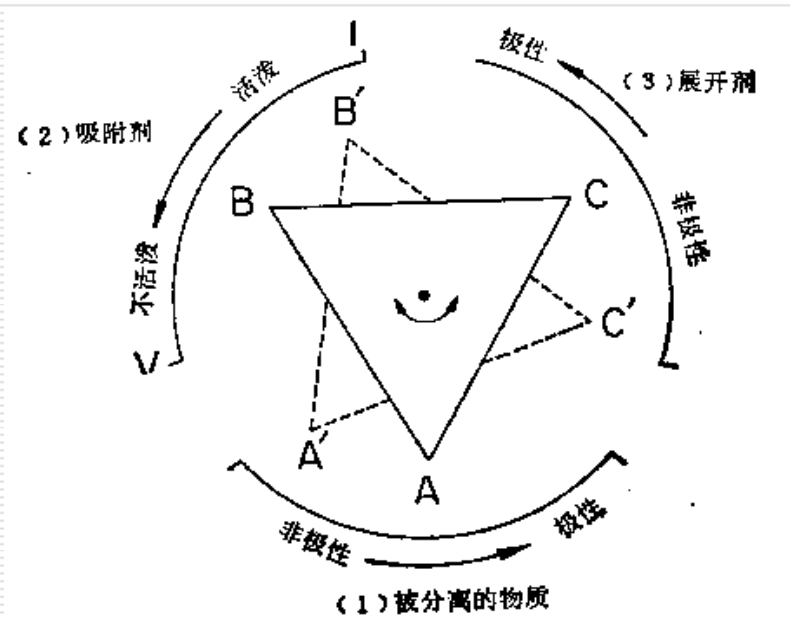


图2 化合物的极性、吸附剂的活度及展开剂极性间的关系

## Stahl设计的用以选择薄层条件的简图

(1) 为被分离化合物的极性 (2) 为吸附剂的活度 (3) 为展开剂的极性。若将这三个因素各自固定在圆周的三分之一，转动圆盘正中的三角形，如果角A指向极性物质，则角B指向活度小的吸附剂，角C就指向选用极性展开剂；如转到A'，B'，C'处则又要作另外的选择组合。

# 多元展开剂中各种溶剂的作用

---

- 极性较大的溶剂可以使化合物在薄层上移动。
- 极性较小的溶剂降低极性大的溶剂的洗脱能力，使 $R_f$ 值降低。
- 中等极性的溶剂往往起着使极性相差较大溶剂混合均匀的作用。
- 在展开剂中加入少量酸、碱可以使某些极性物质斑点集中，提高分离度。
- 用粘度太大的溶剂时需要加入一种溶剂以降低展开剂的粘度，加快展开速度。
- 例如环己烷-丙酮-二乙胺-水（**10:5:2:5**）这个系统中，水是极性大的溶剂，环己烷是极性小的溶剂，后者的加入可以降低分离物质的 $R_f$ 值，丙酮起着混匀整个系统及降低展开剂粘度的作用，少量二乙胺的加入控制了展开剂的pH值以使分离后的斑点不致拖尾，分离清晰。

---

在具体工作中，展开剂的选择还必须进一步通过实践，一般可用下列三种方法：

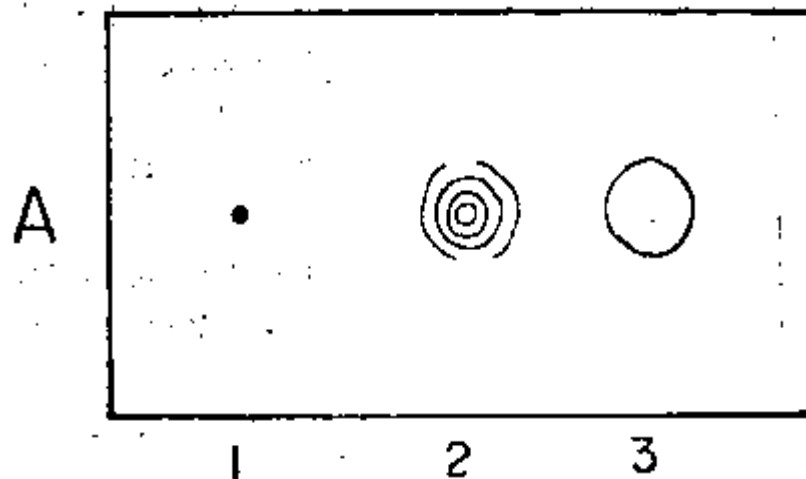
(1) 查阅文献

(2) 微型薄层：用小玻片铺上薄层，用各种经初步选择认为可能应用的展开剂展开，从而选择适当的展开剂，再用于一般的薄层层析。用微型薄层，节省材料和时间。

(3) 微量圆环技术

# 微量圆环技术

将试样溶液点于已准备好的薄层上，点成同样大小的圆点，用毛细管吸取各种经初步选择认为可能应用的展开剂，加到试样点中心，让展开剂自毛细管中慢慢流出进行展开。



## 微量圆环技术

- 1 用环己烷展开
- 2 用苯展开
- 3 用氯仿展开

## (四) 点 样

### 1. 样品溶液

一般用甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等挥发性有机溶剂，最好用与展开剂极性相似的溶剂溶解试样，配成0.5%~1%的试液。

### 2. 点样量

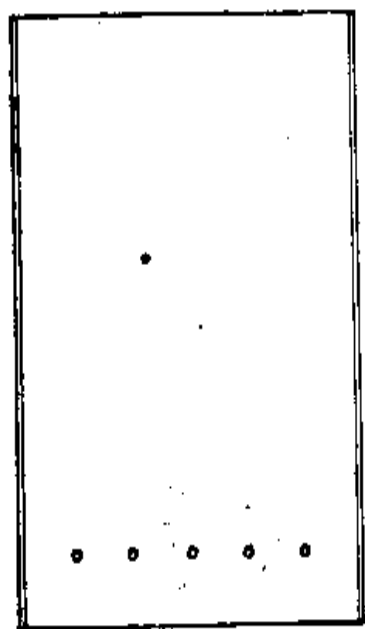
点样量的多少与薄层的性能、厚薄及显色剂的灵敏度有关。一般来说，样品量最小为几ng，常用量为几至几十 $\mu\text{g}$ ，制备型的分离可以点样到mg量。总之点样量随分离目的而定。

### 3. 点样方式

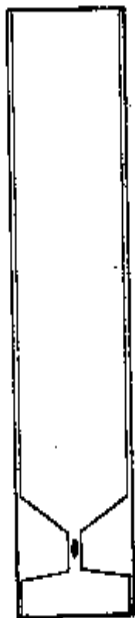
最好是直径3—5mm的圆点。



# 常用的点样方式



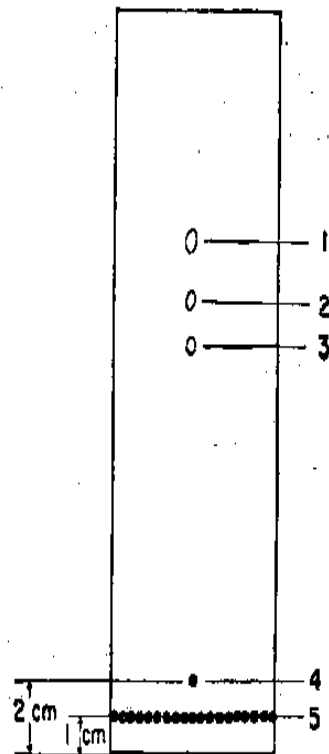
a 一般点样



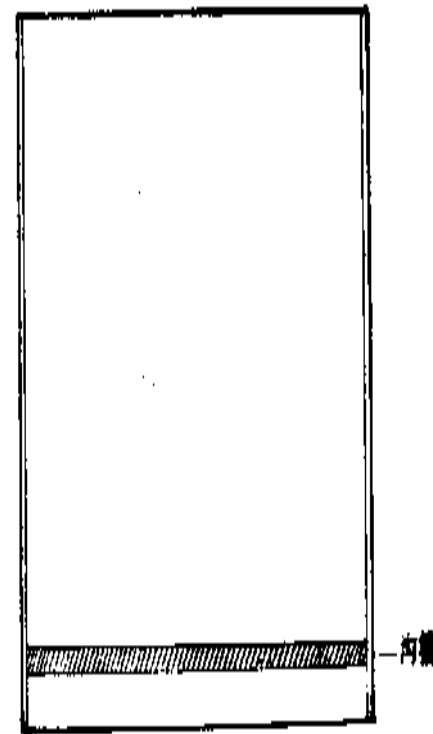
b 径向薄层



c 条状点样



d 线形小孔点样



e 样品填入沟槽

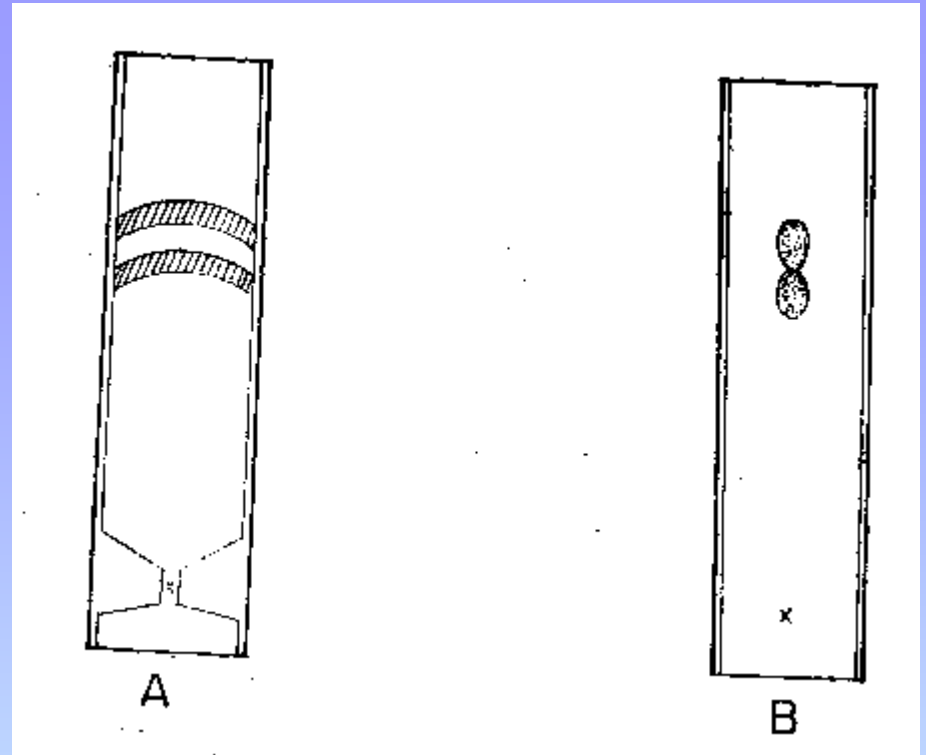
a 一般点样

b 径向点样

c 条状点样

d 线形小孔点样

e 样品填入沟槽



径向展开与普通展开的区别

## 4. 点样容器

- 定容毛细管
- 微量注射器
- 点样器

## (五) 展 开

1. 水蒸气的影响
2. 溶剂蒸气的影响
3. 展开槽
4. 展开方式
5. 几种新型的展开技术
6. 展开操作



# 1.水蒸气的影响

---

在吸附薄层色谱的展开过程中，空气的相对湿度以及展开槽中的水蒸气必须严格控制，微量的水也能对色谱分离结果产生较大的影响。

硅胶薄层板吸附水蒸气的速度很快，**0.25mm**厚、**20×20cm**的薄层板在**50%**相对湿度中约**3**分钟就失去活性的一半，而**15**分钟时吸附的水分已达到最大值，因此，点样速度的快慢，空气相对湿度的大小，都可以影响分离以及重现性。

适宜的相对湿度范围也决定于溶质和溶剂的极性。

## 2. 溶剂蒸气的影响

“边缘效应”：**Stahl**在用氯仿-甲醇（**95：5**）为展开剂展开麦角生物碱时发现，对同一种生物碱，在薄层板中部的 $R_f$ 值比在边缘的 $R_f$ 值小，称此现象为“边缘效应”（**edge effect**）。

展开槽中被展开剂蒸气饱和和后再进行展开就可以消除。

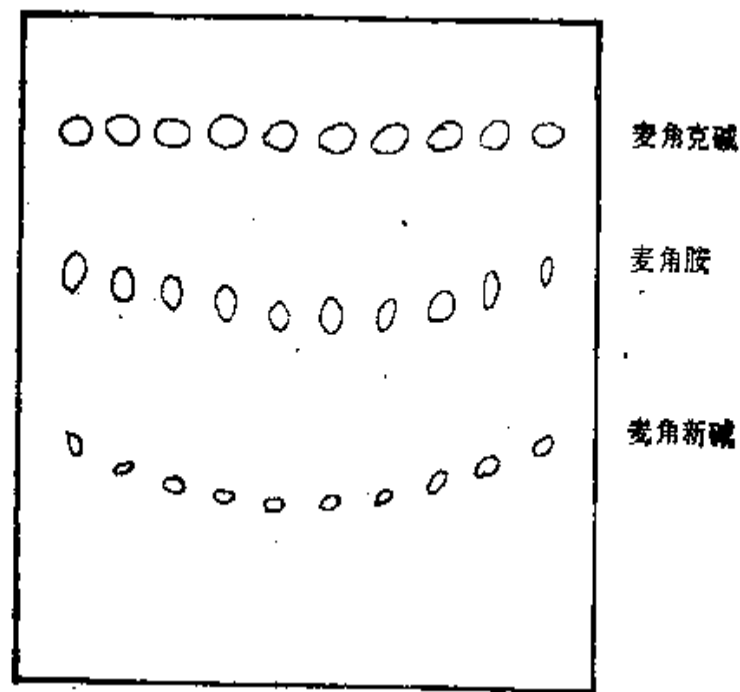
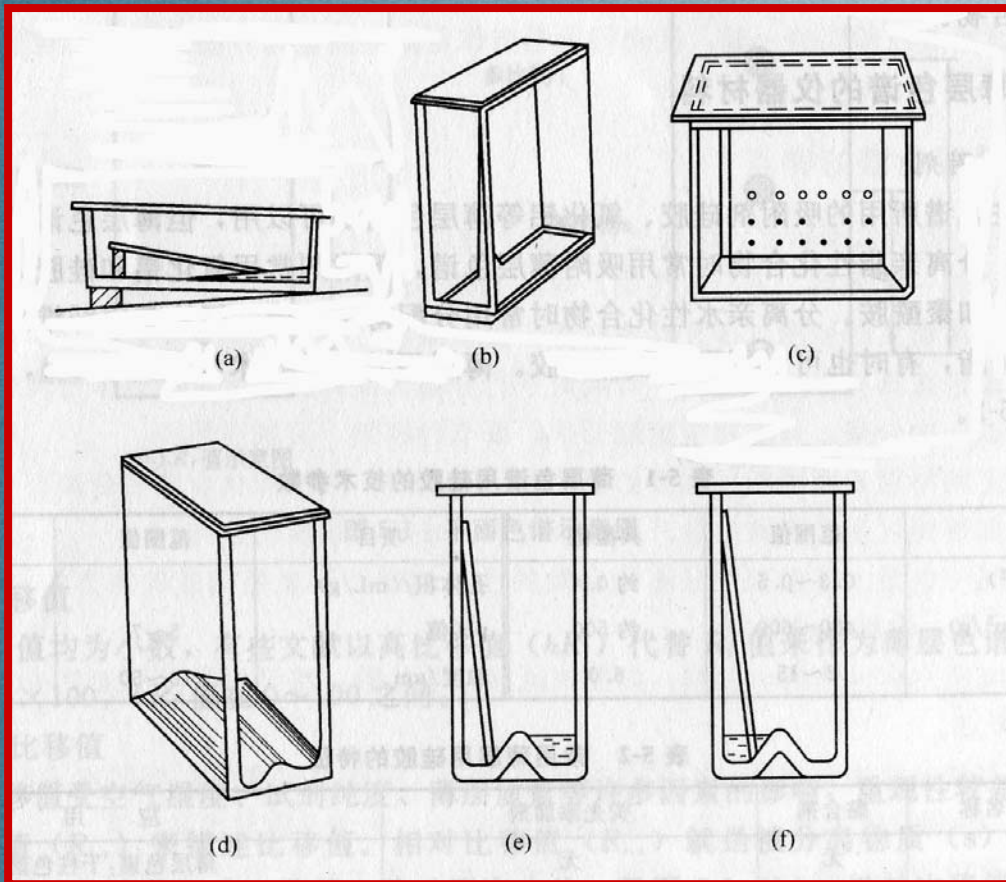


图5 在未饱和展开槽中薄层板上出现的“边缘效应”

### 3. 展开槽

- 普通展开槽
- 双底展开槽
- 水平展开槽



## 4. 展开方式

---

- (1) 近水平展开：将点样后的薄层板下端浸入展开剂**0.5cm**，薄层上端垫高使薄层与水平成**5-10°**的角。
- (2) 上行展开：将点样后的薄层放在盛有展开剂的直立型的展开槽中，展开剂由薄层下端借毛细管作用上升至前沿。
- (3) 下行展开
- (4) 双向展开





薄层板



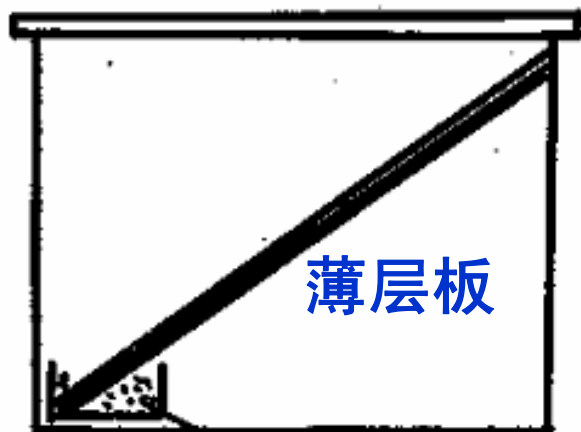
玻璃板  
上涂吸附剂层

$\text{SiO}_2$   
 $\text{Al}_2\text{O}_3$

上行法

下行法

层析缸



展开剂

薄层板

层析缸



滤纸条

展开剂

薄层板

# 几种新型的展开技术

---

- (1) 程序蒸气展开 (Vapor-programmed, VP)
- (2) 圆形色谱 (Radial Chromatography)
- (3) 热板色谱 (Hot plates Chromatography)
- (4) 多次展开 (Multiple Development)
- (5) 程序多次展开 (programmed Multiple Development, PMD)
- (6) 阶式展开 (stepwise development)
- (7) 梯度展开 (gradient development)

# 6 展开操作

---

## 1. 展开槽的密闭

目的是使展开槽被展开剂蒸气饱和并使展开剂组成不变。

## 2. 展开槽的饱和

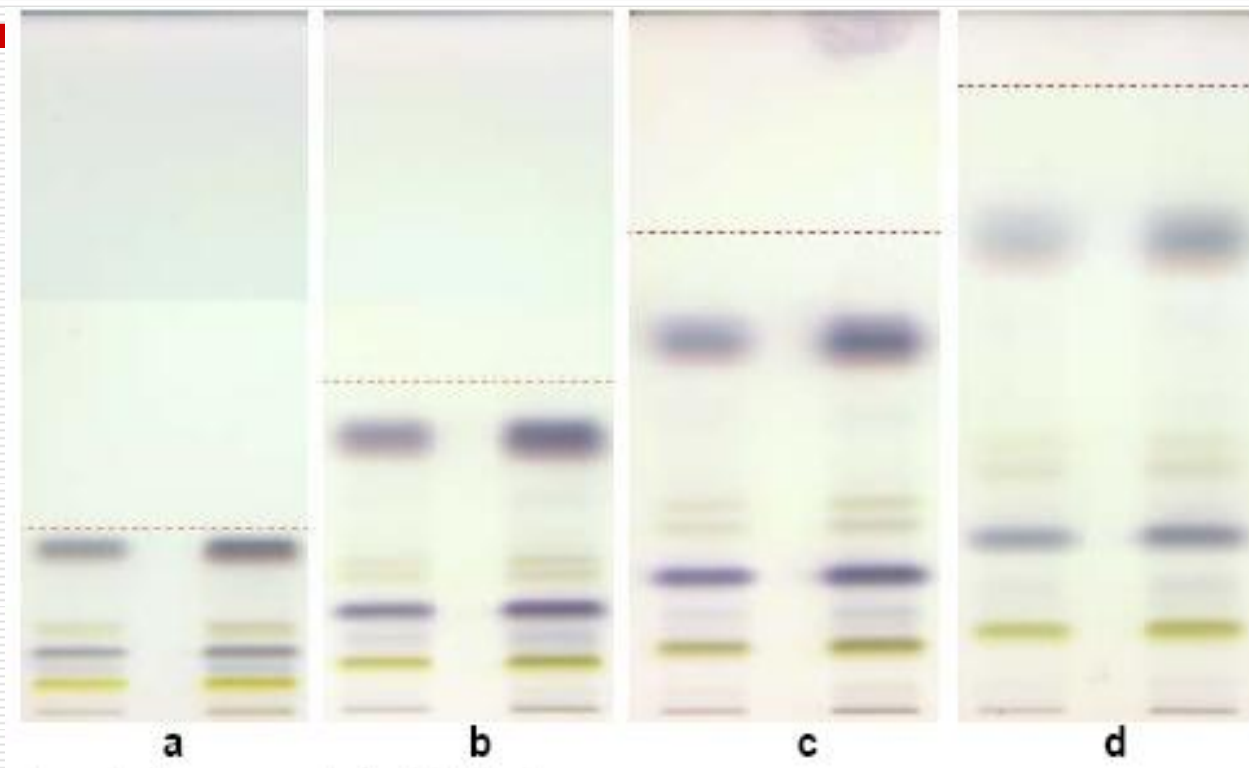
为避免“边缘效应”，在薄层板用展开剂蒸气饱和和有时是必要的。

## 3. 展开距离

常规薄层最长展距为**20cm**；高效薄层展距最长为**10cm**。

## 4. 展开温度

## 展距对结果的影响



展距对结果的影响，硅胶HPTLC 分离洋甘菊油，  
a) 3 cm、b) 5 cm、c) 7 cm、d) 9 cm。

## (六) 薄层层析的定性检测

---

展开完毕后，把薄层从层析缸中取出，用铅笔划出或小针刺出展开剂前缘的位置，随即进行显色，以确定各个斑点的位置、 $R_f$ 值和显色情况，从而判断试样中含有哪些组分。

有色物质经展开后呈现明显的色斑，很易判断。

对于无色物质，可根据化合物的性质，用 **物理检出法**、**化学检出法**、**酶与生物检出法**和**放射性检出法**进行显色。

# 1 物理检出法

## 1. 紫外光

一般来说，对于未知化合物，展开后在用显色剂以前，都应先在紫外灯下进行察看。紫外光常用两种波254nm与365nm。

如果化合物能吸收紫外光同时放出荧光，可用此荧光定位。

## 2. 碘

元素碘的最大特点是与物质的反应往往是可逆的，当化合物定位以后在空气中放置时，碘即升华挥去，可以回到组分的原来状态，有利于薄层的进一步处理。

## 3. 水

水可作为一种非破坏性显色剂，用于硅胶薄层，当许多憎水性化合物展开后，用水喷薄层板，对光观察，在半透明的薄层板上，显出白色不透明的斑点。

## 2. 化学检出法

化学检出法是在薄层上使用一种或数种化学试剂与被检出物质反应，生成有颜色的化合物而定位。这种试剂叫**显色剂**。

显色剂一般分为两类，即通用显色剂和专属性显色剂。

# 1 通用显色剂

(1) 浓硫酸或**50%**的硫酸溶液：极大多数有机物质，喷此种显色剂后立刻或在加热到**110—120℃**并经数分钟后出现棕色到黑色斑点。

(2) 酸碱指示剂溶液：例如**0.3%**溴甲酚绿甲醇溶液，在绿色背景上显现黄色斑，表示是脂肪族羧酸。

常用的通用显色剂还有：**5%**磷钼酸乙醇、碱性高锰酸钾溶液、硝酸银-氢氧化铵试剂、荧光显色剂等。

# 2 专属性显色剂

指能使某一类或少数几类官能团或化合物显色的试剂。

例如**2%**，**4-**二硝基苯肼乙醇溶液喷后在**120℃**加热**10**分钟，醛酮在黄橙色背景上显红色或橙色斑。



### 3 原位化学衍生化

---

在色谱分析的综合技术中，尤其对痕量组分的检测，衍生化反应已成为重要手段之一。

在薄层色谱中，有些化合物本身无色，又无紫外吸收与荧光，同时也找不到合适的显色剂，或者有性质近似的化合物共存很难分离，这时可考虑在原位进行适当的化学反应，使之产生紫外吸收、荧光、显色，或使性质发生较大差异以利于分离。

## 4 生物与酶检出法(bioautography)

---

生物检出法又称生物自显影法是用生物检定法检出薄层上具有生物效应的物质如抗生素的方法。基于检出物质的生物活性，将薄层板与已培养有适当微生物的琼脂表面接触，并置适宜温度的培育箱内，经过一段时间后观察抑菌点，有抗生素斑点处的培养基微生物生长受到抑制，整个琼脂板出现了抑菌点，由此抑菌点可对该抗生素组分定位。

酶检出法实际上是一种酶抑制技术，用于薄层色谱检出某些有机磷农药。

## 5 放射显影法 (Autoradiography)

---

就是用含放射性同位素的化合物在薄层上显示位置的方法。具体方法是使薄层上同位素的辐射线透过照相底片，显影以后由于银粒而显出潜影，在一定剂量范围内，放射性物质斑点使底片所呈暗度与斑点中放射性物质的浓度成正比，因此不仅可定位，还可定量。

## (七) 薄层层析的定量测定

---

- 展开后，薄层分离所得斑点中化合物可进一步定量，其测定方法可分为两大类：
- 一类为*洗脱测定法*，将所需测定的斑点中的组分用适当溶剂洗脱，再选用适当方法定量；
- 另一类为*直接测定法*，色谱分离后，直接用肉眼观察比较或用仪器扫描斑点而测定其含量。

# 1 洗脱测定法

## 1 斑点的定位

2 斑点的洗脱:用吸集器将斑点位置的吸附吸下,然后用洗脱溶剂洗脱。

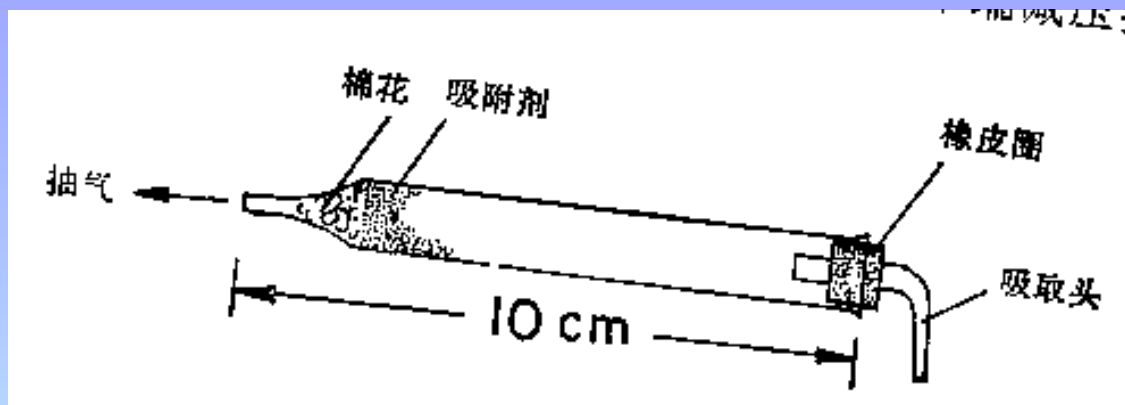
## 3 测定

(1)紫外分光光度法:洗脱液调整至一定体积,在此化合物最大吸收波长处测定。同时把样品斑点相应位置薄层吸附剂同样取下做空白对照。

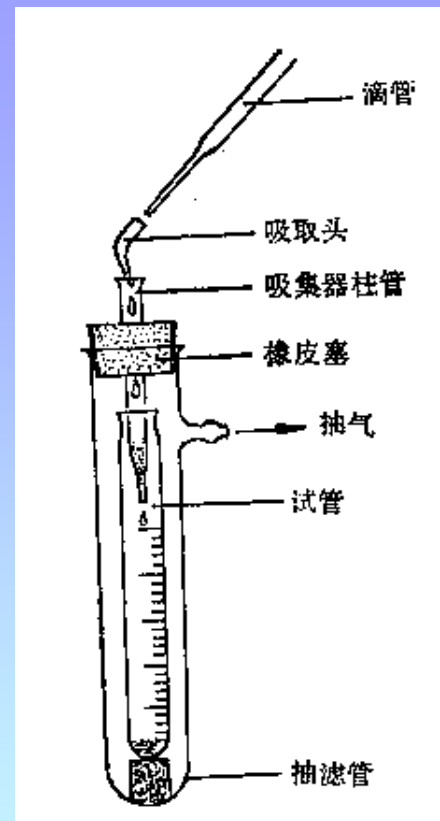
(2)比色法:选择灵敏度高、专属性好的比色反应测定化合物含量,是比较常用的方法。

(3)其它方法:极谱、库仑滴定、荧光测定等。

# 吸集器及减压洗脱装置



吸集器



减压洗脱

## 2 直接测定法

---

### 1 目测法

样品经色谱分离后，直接观察所得斑点的大小和颜色的深浅，并与标准品在相同条件下展开所得到的一系列已知不同浓度的标准斑点相比较，而近似地判断样品中所测成分的含量。

### 2 测面积法

展开后色谱上的斑点面积与化合物含量间，符合一定的线性关系。

### 3 仪器测定法

# 3 仪器测定法

用光密度计或称薄层扫描仪（**TLC Scanner**）扫描定量，该方法已成为薄层定量的主要方法。

## 1. 吸收测定法

展开后的薄层，用一定波长单色光束进行扫描，记录其吸光度的变化，得到扫描曲线。

利用样品扫描曲线上峰高或面积与标准品相比较，可得出样品含量。

## 2. 荧光测定法

化合物本身有荧光或经过适当处理后生成荧光化合物者可测量其荧光强度而进行定量。

## 3. 荧光淬灭法

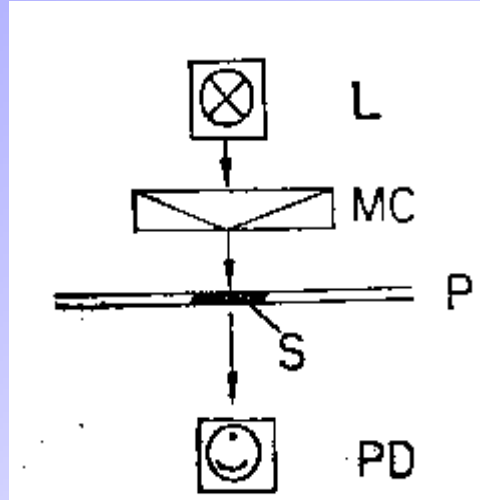
由荧光减弱的程度测出斑点中化合物的含量



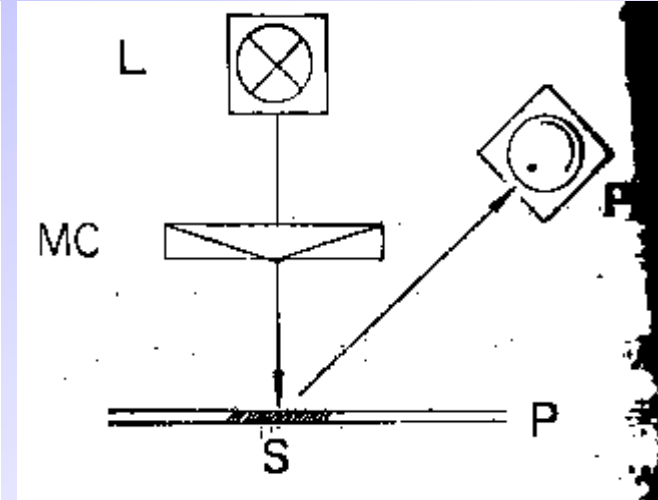
# 吸收测定法的分类

根据对光测定方式的不同，可分为三种：

- 透射法
- 反射法
- 透射—反射法



透射法扫描



反射法扫描

L 光源； MC 单色器； P 薄层板； S 斑点；  
PD 光电检测器

# 仪器测定法的两个重要参数

---

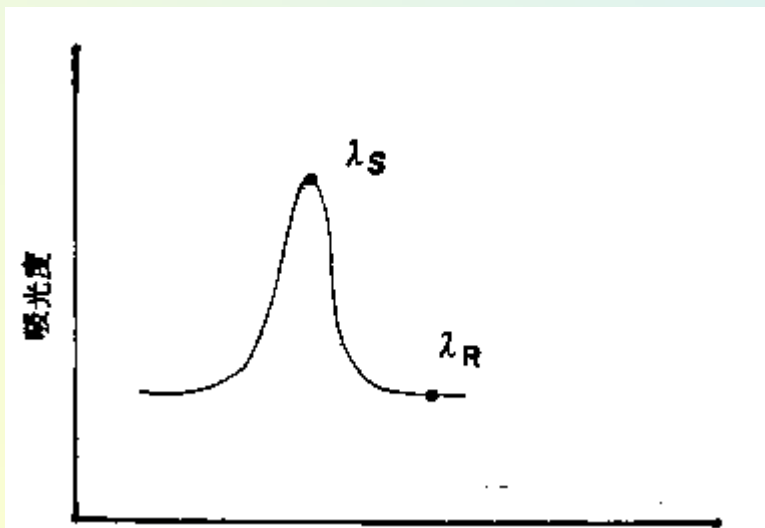
## □ 扫描波长：

(1)单波长扫描：使用一种波长的光线对薄层进行扫描。

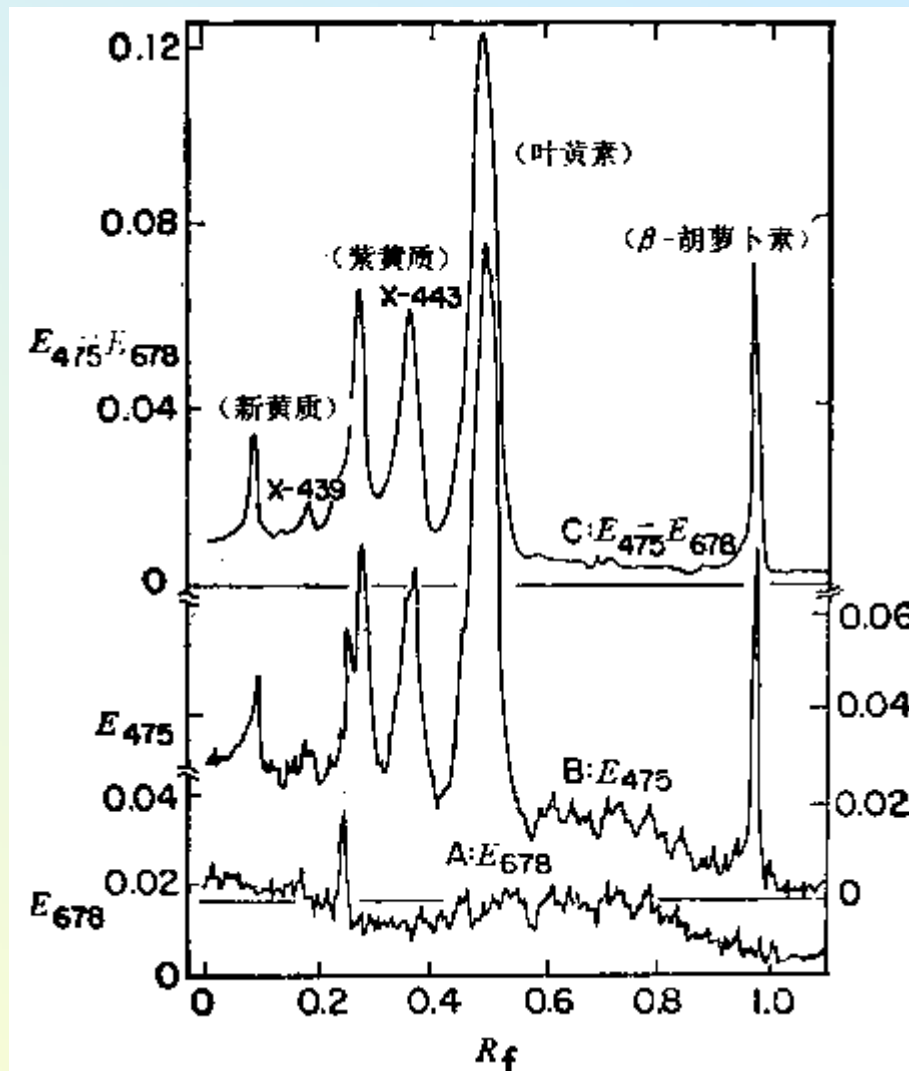
(2)双波长扫描：是采用两种不同波长的光束先后扫描所要测定的斑点，并记录下此两波长吸光度之差。

## □ 扫描轨迹：

直线扫描、锯齿状扫描、圆形扫描



化合物斑点的吸收光谱



单波长与双波长扫描曲线的比较

## 四 特殊的薄层

1. 高效薄层色谱 (HPTLC)
2. 棒状薄层色谱 (Rod-TLC)
3. 超薄层色谱

(Ultra Thin-layer Chromatography)



# 1. 高效薄层色谱（HPTLC）

---

**HPTLC**是在普通薄层基础上发展起来的一种更为灵敏、精细的薄层技术。高效薄层是采用小颗粒吸附剂制备的均匀薄层，分离效率比普通薄层提高三倍，检出灵敏度增加，分析时间缩短。

高效薄层色谱由于吸附剂颗粒小，流动相展开速度慢，平衡易于达到，质量传递的阻滞作用往往可以忽略不计，展开后斑点的大小主要由化合物分子扩散系数决定。化合物展开后只要不走在溶剂前沿，均呈小而圆整的斑点。

## 2. 棒状薄层色谱 (Rod-TLC)

---

将样品点在薄层棒上，经点样、展开后将被分离后的色谱棒通过适当的机械传动装置，水平地穿过检测氢火焰的中心，使化合物燃烧裂解，形成离子碎片和自由电子，再由电极收集它们并产生与化合物量成正比的电流信号而测出各物质的含量。

### 3. 超薄层色谱 (Ultra Thin-layer Chromatography)

---

**2002年德国24届国际色谱研讨会上首次提出。经四氯烷基硅（键合铅）制成整块硅胶板，而不用颗粒状吸附剂。厚度10 $\mu\text{m}$ ，有孔径为1~2 $\mu\text{m}$ 的大孔，孔径为3~4nm的中孔。UTLC取代了玻璃板，不需要载体；展程1~3cm，缩短分析时间，节约展开剂；具有高分离效率和选择性。可用于分离药物、酚类、增塑剂、甾族化合物等。**

## 五 应用举例

- 棒状薄层色谱/氢火焰离子化检测器复杂混峰谱图特征提取方法的研究及应用
- 新型薄层色谱内标法测定葛根素含量
- 薄层色谱（**TLC**）与基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱（**MALDI-TOF-MS**）联用分析大脑中磷脂





# 棒状薄层色谱/氢火焰离子化检测器复杂混峰谱图特征提取方法的研究及应用

---

利用该方法分析了各种工艺的重油样品近**300**种，实现了重油样品的烃族组成的快速分析。

- 仪器：**LATROSCAN NEW MK-5**薄层色谱/氢火焰检测器分析仪
- 薄层操作：称**0.1g**重油样品，用**3mL**甲苯溶解制成分析液。移取此试液**0.8 $\mu$ L**分**4**次点在色谱棒上。色谱样移至盛正庚烷的展开槽中展开到**110mm**处，取出晾干。再将色谱移到盛有甲苯的展开槽中展到**50mm**处，晾干。将色谱棒在氢火焰上扫描通过工作站绘图，并采集数据。

# 新型薄层色谱内标法测定葛根素含量

---

- 以大豆甙元为内标物在高效硅胶薄层板上测定葛根素注射液，中药葛根及中成药玉泉丸中葛根素的含量，建立了新型TLC内标法测定葛根素的新方法。
- 仪器材料：**CS-9000**型双波长扫描仪（日本岛津），定量点样毛细管（**Drummond scientific Cop.USA**），高效硅胶**G**薄层板（青岛海洋化工厂，**200mm×100mm**，**50mm×100mm**，**30mm×100mm**）
- 薄层扫描条件：在高效硅胶**G**薄层板上以甲醇—乙酸乙酯—石油醚—水（**1.8:6:4:0.35**）为展开剂，展距为**8cm**，在**365nm**紫外光下观察斑点位置。葛根素 $R_f=0.35$ ，大豆甙元 $R_f=0.71$ 。
- 定量：锯齿反射扫描。

# 薄层色谱 (TLC) 与基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 联用分析大脑中磷脂

---

- 薄层色谱条件：  
高效硅胶60薄层板 (10×10cm) (Terck, Germany)
- 展开剂 氯仿：甲醇：水：三乙胺 (30:35:7:35 v/v/v/v)
- 层析槽 CAMAG, Switerland
- 样品量 5μL
- 显色条件 PRIMULINE (Direct Yellow 59) 溶于丙酮/水 (80:20v/v) 中，UV254nm观察紫色斑点
- 检测 取下斑点，用75μL氯仿+75μL甲醇+75μL 0.9%NaCl水溶液洗脱，涡旋搅拌，离心分离，蒸干有机相，剩余物溶于20μL基质溶液，直接用MALDI-TOF-MS检测

# 参 考 文 献

- [1]周同惠 等，纸色谱和薄层色谱，科学出版社，北京，1989
- [2]邵令娴，分离及复杂物质分析，高等教育出版社，北京，1983
- [3]Bernard F.&Joseph S., **Thin-layer Chromatography Techniques and Applications**,MANRCEL DEKEER, INC., New York, 1983
- [4] Joseph C.&Murrel F., **Practice of Thin Layer Chromatography (second edition)**, JOHN WILEY&SONS INC., New York, 1986
- [5] H.E.Hauck,**Ultra Thin-layer Chromatography, Chromatography**, 2003, 57, S-313

谢谢大家!

