

一. 實驗名稱: 色層分析法

二. 實驗方程式: 無 (本次實驗不涉及化學變化)

三. 實驗原理: 層析法可分為吸附層析法、分配層析法及離子交換層析法。依操作不同又可分成氣相層析及液相層析法, 其中我們主要討論液相層析法中的 TLC、CC 及 PC。

1. 薄膜層析法 (TLC):

屬於吸附層析法, 利用混合物中各成份對固定相的吸附力不同, 當移動相流經固定相時, 吸附力弱的成份會隨流動相迅速向前移動, 吸附力強的滯留在後, 以此達成分離。

(1) R_f 值計算: 一個化合物在薄層板上升的高度 / 展開液上升高度 = R_f 值 (Rate of flow)

(2) 展開液 (沖提液, 移動相): 當展開劑的極性遠大於各個組成份的極性, 則展開劑將代替化合物被固定相吸附, 使各個組成份幾乎留在流動相中導致 R_f 很高, 反之各個組成份將牢牢吸附在固定相上沒有移動 ($R_f = 0$), 因此展開液的選擇與待測物有關。

(3) 固定相: 為固定不動的吸附劑, 可用矽膠或氧化鋁, 前者用於極性較大的化合物, 後者用於較小的。平衡常數 K 可用來表示化合物的吸附力, K 越小對固定相吸附力越強。

(4) 顯色: TLC 展開後若樣本無色, 可以

1. 噴顯色劑 2. 紫外燈顯色 (若含發光的物質) 3. 碘薰顯色 (形成含碘錯合物)

烷和鹵化烷無效

2. 管柱層析法 (CC):

屬於吸附層析法, 可分為乾填法和濕填法。在濕填法中矽膠粉會與液體混合後加入, 樣本加入時

管柱層析法同樣用對固定和移動相的吸附力較弱的成分 (通常是極性較小

於沖提前是否使用液體。在濕填法的狀態, 目前濕填法較常見。

分離, 用沖提液不斷沖刷來提取對處理的量遠多於 TLC。

3. 濾紙層析法 (PC):

主要用於多官能基團或高極性化合物 (如: 醇、胺、羧酸) 的分离。原理較複雜, 固定相是濾紙中的水, 而流動相是事前被飽和的溶劑。利用濾紙的毛细管作用使溶劑在濾紙上緩緩上升, 因樣品中的各個成份的移動速率不同, 在隨溶劑上升的過程中被分離。其餘顯色與點樣的操作類似 TLC。

四. 注意事項:

1. CC

- ① 管柱內不可有水, 以免出現斷層。
- ② 充填矽膠的量約為管柱高度的一半。

2. TLC

- ① 滴點不可浸入液面。
- ② 每次沖提液須重新配。
- ③ TLC 沖提液與管柱層析比例不同。
- ④ TLC 板平行放入液面。

3. 勿直視紫外線燈。

4. 廢液處理:

- ① 含正己烷之沖提液可倒入“不含鹵素有機廢液桶”
- ② 含二氯甲烷之沖提液 必須 倒入“含鹵素有機廢液桶”

五. 實驗步馬 & 實驗觀察:

• 管柱層析法 (Column Chromatography; CC) 分離二茂鐵與二苯醌 (乾填):

① 取一玻璃滴管之管身作為管柱, 並填入適量棉花。

• 棉花的用途是避免矽膠粉流失之用, 太少或不密實會導致無法達成目的, 而太多會造成堵塞, 使滴漏過程 (②-③) 變的緩慢。

② 在準備好的管柱中裝入矽膠粉約六分滿。

• 實驗用矽膠粉便宜但容易受潮而結塊, 因此需確保器材乾燥。

• 此外, 由於矽膠粉細小, 易被吹起, 造成吸入之風險 (長期下來會堆積於肺部導致纖維化), 因此需在抽氣櫃中進行。

③ 放入少量樣本 (= 二茂鐵與二苯醌之混合物)

• 由於二茂鐵為橘黃色化合物, 此樣本將呈現橘黃色。

• 管柱層析法可以處理極微量的樣本, 而最多可處理量與管柱的大小、長短有關。

④ 用 micropipette 吸取 5 ml 正己烷作為沖提液, 將沖提液滴入管柱至全滿, 待液面下降後再度滴入直到所有黃色物質都流入下方放置的燒杯。

• 收集之黃色溶液含有二茂鐵, 是否包含其它物質將在 TLC 法中檢驗。

⑤ 完成收集後將此黃色收集液標示為 A, 完成第一次的沖提。

• 需將完全收集後之燒杯以錶玻璃或其它方式蓋/罩住避免溶劑大量揮發。

• 溶液 A 為透明黃色的澄清液體, 將在 TLC 法中進一步分析其溶質成份是否單一。

⑥ 重覆 ④~⑤ 步, 但改取 5 ml 二氯甲烷作為沖提液, 收集所得之溶液標記為 B。

• 溶液 B 為透明無色之澄清液體, 將和溶液 A 一同檢驗。

• 假如出現沉澱物可能是流失的矽膠, 為步驟一失誤導致。

• 薄層層析法 (Thin Layer Chromatography; TLC):

① 取一小片 TLC 片, 並用 UV 燈確定為乾淨無污染的。

• TLC 片為金屬片, 一面塗上矽膠粉而成, 因此可以看見一面為金屬, 一面為白色塗層, 即 "Thin Layer"。

• 需注意不得觸摸有塗層的那一面, 否則會造成污染, 假如在 UV 燈下看到指紋或其它紋路應更換其它乾淨的 TLC 片, 避免干擾結果觀察。

• 在 UV 燈下, 乾淨的 TLC 片應該呈現螢光綠色。

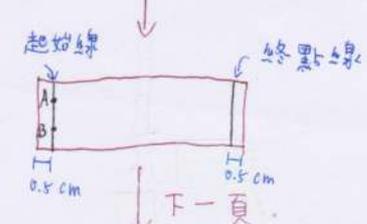
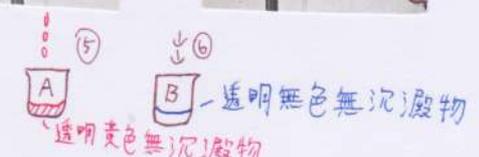
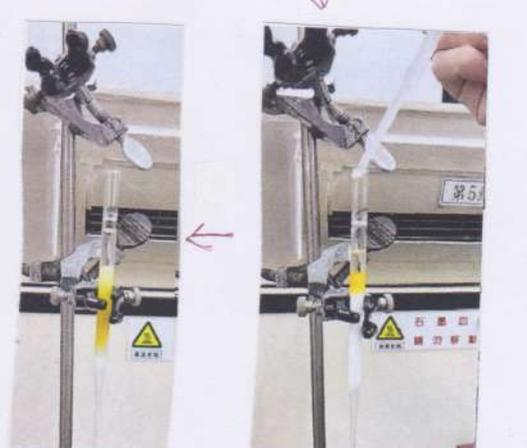
② 在檢查完的 TLC 片上下各 0.5 cm 的地方以 2B 鉛筆畫線, 並在其中一端 (設為起始線) 做上 A、B 兩點的記號。

• 使用原子筆或其它墨水筆很可能會被有機溶劑溶解而糊掉。

• 起始線和終點線之間的距離不會影響 R_f 值結果 (除非太靠近而難以測量)。

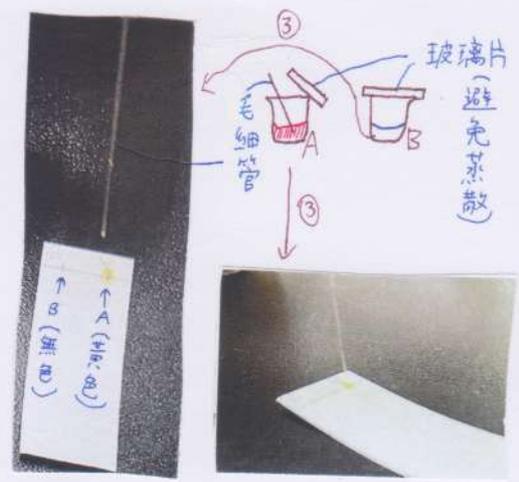


不足
多夠了



• 留下 0.5 cm 很重要(尤其是起始線), 會影響到結果(第④步時展開液不得淹過 A、B 兩點)。

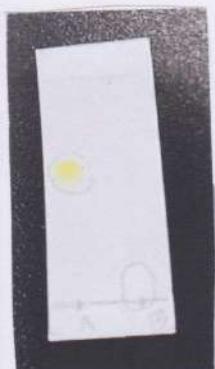
- ③ 取兩根毛细管, 分別沾取由 CC (管柱層析法) 獲取的 A、B 溶液, 在 A 和 B 兩點上點樣 3~5 次。
- 每次點樣時, 溶液量開不得超過 0.1 cm (直徑), 避免第④步中展開液淹到點樣的位置。
 - 當前一次點樣留下的液滴乾燥後才點下一滴。



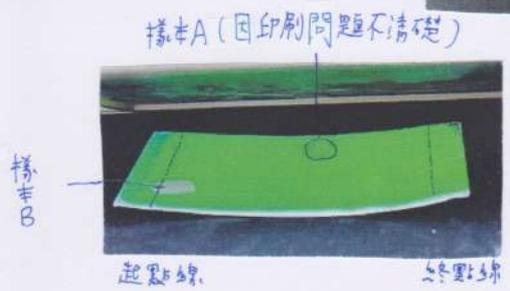
- ④ 用 micropipette 吸取 1.5 ml 正己烷加入跑片槽中, 之後將完成點樣的 TLC 片輕輕放入 (起始線朝下靠近液面), 等待正己烷 (展開液) 緩緩的因毛细作用上升到終點線時立即取出 TLC 片。
- 假如展開液淹到點樣的位置可能會將樣本溶出至展開液中, 進而導致失敗 (結果難以辨視)。
 - 可以觀察到黃點 (樣本 A) 隨展開液上升。



- ⑤ 將完成跑片之 TLC 片置於 UV 燈下觀察並記錄結果。
- 可以看到樣本 A 有向前移動 2.3 cm, 而 B 點幾乎沒有移動, 可從此觀察結果, 以及已知二茂鐵為黃色、低極性的特徵得知樣本 A 為二茂鐵, 樣本 B 為二苯酮。
 - 且兩樣本在跑片後依然維持單一點狀, 可知兩者皆為純物質, 最初的混合物樣本已在 C.C (管柱層析法) 中完成分離。



← 結果



六. 結果:

樣本 A (Ferrocene; 二茂鐵) $R_f = \frac{2.3 \text{ cm}}{3.8 \text{ cm}} = 0.605$ 樣本 B (Benzophenone; 二苯酮) $R_f = \frac{0.3 \text{ cm}}{3.8 \text{ cm}} = 0.079$

(註: 以 n-Hexane (正己烷) 用 TLC 法之展開結果)

七. 討論:

1. 管柱層析法 (CC) 中影響產物純度的因素:

管柱層析法是利用物質的極性差異進行分離的一種方法, 其中固定相 (矽膠粉) 扮演著吸附住 (拖延) 較高極性物質的角色, 使得極性較低的物質得以隨沖提液一同流過管柱。

當使用的沖提液本身的極性越高, 矽膠粉越有可能轉而吸附住沖提液, 而釋放出原先吸附住的待分離物質。

因此產物純度主要受到了矽膠粉的高度以及沖提液之極性的影響, 假如一開始就使用極性高的沖提液將無法順利的分離樣本 (容易有複數種不同極性大小的物質一起遭沖提作用帶走), 因此在進行管柱層析法時需要從極性低的沖提液開始進行。

並且需要有充足的矽膠粉來拖延極性較高之物質的移動, 使各成分間因速率差異更大的拉開距離, 避免在沖提的過程中有少量的其它物質也一同被沖提出來 (當正在收集其中一種成分時), 尤其當待分離物中各個成分之間的極性差異越小時, 流動的速率差異也會越小, 需要用到越高的矽膠粉和更長的管柱。 (不過矽膠粉填的越高, 整個流程進行的速度會越慢)

2. TLC (薄層層析法) 中影響 Rf 值的因素:

在 TLC 中和管柱層析法一樣是利用矽膠對於不同極性物質的吸附力不同,使不同物質隨展開液上升的距離因流速產生差異來完成分析。而此上升的距離與展開液上升距離的比值就是各項純物質之 Rf 值。

假如點樣之樣本為混合物,則當中的所有組成成分都會有不同的上升高度,因此得以分辨樣本是否為混合物(且含有幾種成分)。此外同樣的物質在同一次跑片的結果當中,上升的高度將會一樣,因此也能用來分析混合物的成分。(假如在本實驗中除了 A、B 樣點外,增設一點 "X",並以尚未經過管柱層析法分離的樣本進行點樣,其結果應該會出現兩個點,且該兩點的 Rf 值會分別近似於 A、B 兩樣本的結果)

因此撇除實驗中發生的操作失誤外,對同一份樣本(純物質或混合物)在進行 TLC 跑片後,其(或其各成分)得到的 Rf 值可能會受到濕度(TLC 片受潮會導致吸附力降低)、溫度、展開液與固定相的選擇等因素的影響。

然而除了使用不同的展開液和固定相之外,其他因素的影響較小,故同一樣物質在不同次跑片後取得的 Rf 值基本上並不會有太大差異。

除此之外,因為 Rf 值為樣點上升距離與展開液上升距離的比值,所以 TLC 片的長度不太會影響結果。

3. 關於本次實驗之 TLC 片跑完後樣點 B 非預期的移動:

由於我們可以看到無論是樣點 A 或 B,它們都沒有出現分離的現象,依然分別皆保持為單一的一點,因此可以得知在管柱層析法中確實完成了兩項物質:二茂鐵(溶液 A, 黃色)、二苯酮(溶液 B, 無色)的分離。

因此可認定樣點 B 中基本上僅包含二苯酮,此為一種相對高極性的物質,我們預測其無法被低極性的展開液(正己烷)帶走,應當完全停留在原處。A 與 B

然而在結果中卻可以發現樣點 B 略為移動了約 0.3 cm,加上兩樣點的直徑都有變大的現象。我們推測這有可能是在點樣時(TLC 第 3 步中)點入太多溶液的緣故,導致樣點中含有的分子數量多而密集,在受到展開液浸潤/溶解的過程中相互碰撞,造成了略為暈開的結果。

這將導致無論樣點 A 或 B,在結果中所算出的 Rf 值將會比實際上的大上一些。

4. 使用 UV 光顯色的原理:

TLC 片上的矽膠薄層在 UV 光線照射下會產生綠色的螢光。然而我們的樣本中包含的兩項成分皆具有芳香環的官能基,它們會吸收 UV 光,使得將 TLC 片置於 UV 燈下可清楚看見樣本的分布情形。

不僅僅只有具有芳香環的化合物有此特性,許多有機化合物都有,只要具有共振或共軛結構,例如含有共軛雙鍵的化合物(來源: highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=27549)

95

perfect!

Yes!

管柱層析法 實驗報告

學系：食科2B 姓名：董子澤 學號：S10620236 組別：第五組 日期：10/5

數據及結果：

1、TLC：

沖提液名稱	結構式	用量	極性比較
n-Hexane	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	5 ml	
Dichloromethane	CH_2Cl_2	5 ml	



2、C.C：

化合物名稱	結構式	顏色	使用之沖提液	R_f 值計算
A : Ferrocene	$(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe}$	黃	n-Hexane	$2.3 \text{ cm} / 3.8 \text{ cm} = 0.605$
B : Benzophenone	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}$	透明	n-Hexane	$0.3 \text{ cm} / 3.8 \text{ cm} = 0.079$

