



# 平面色谱法

仪器分析 | 药物化学与药物分析教研室 | 张晓勤  
2023年9月19日

# » 学习目标

- ◆ 记忆：常用的固定相、流动相（展开剂）以及显色方法；
- ◆ 理解：薄层色谱和纸色谱的原理；
- ◆ 应用：薄层色谱和纸色谱定性定量分析待测组分；
- ◆ 评价：平面色谱法的进展。

# C 目录

CONTENTS

概述

1

平面色谱法的分类和  
有关参数

2

薄层色谱法

3

纸色谱法

4



# 1 Part one

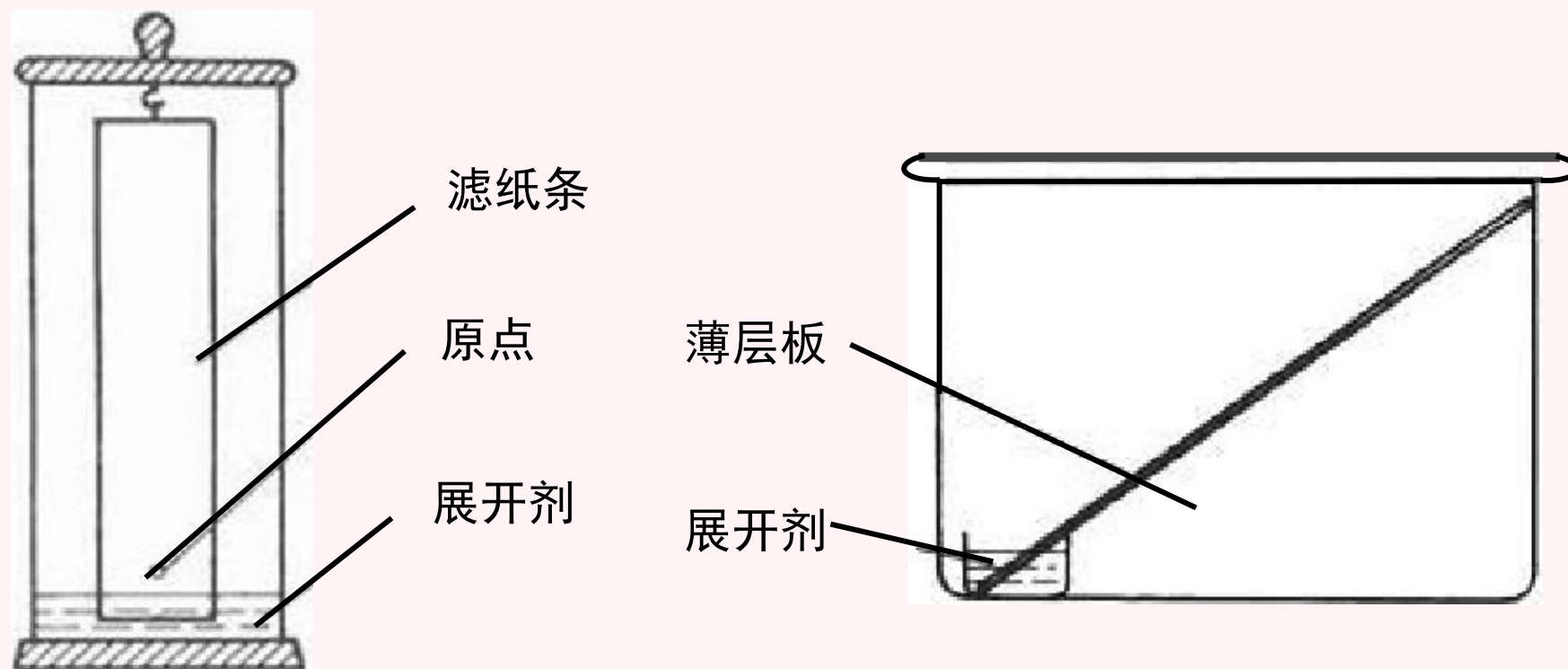


## 概述



# 平面色谱法 (planar chromatography)

**平面色谱法：**将**固定相**涂布于平面的载板上（薄层色谱）或以纸纤维为载体（纸色谱），**流动相**通过毛细管作用流经固定相，被分离物质在两相上因分配系数不等而分离。



# » 拓展阅读

## 高效薄层色谱法简介

高效薄层色谱 (high performance thin layer chromatography, HPTLC) 基于传统薄层色谱 (TLC) 发展而来。HPTLC以自动化和仪器化设备为载体, 使用标准化的预制板作为固定相, 在继承传统薄层色谱分析方法固有优点的同时, 也突破了精密度和重现性差等瓶颈的限制。使得其在中草药成分以及中成药的分析研究和食品分析领域有了广泛的应用。与传统TLC相对比, HPTLC的优势主要体现在以下3个方面: (1) 运行仪器化。目前, HPTLC已具备一整套完整的仪器化操作平台, 在点样、展开、浸渍衍生和扫描定量过程中均实现了半自动甚至全自动化, 提高分离后相邻斑点的分辨率, 显著扩展了应用范围。(2) 色谱固定相标准化。目前, 高效能的商业化预制板已经普及。随着固定性材料合成技术的不断创新, 相继解决了薄层板厚度不均、易碎和易崩裂等问题, 使得薄层板在实用性和坚固性方面得到了很大的提升。(3) 色谱固定相材料种类多元化。种类多样化的固定相, 如 $\text{NH}_2$ -硅胶、 $\text{C}_2$ -硅胶、 $\text{C}_{18}$ -硅胶等、改性纤维素、氧化铝、金属有机框架材料和树脂等可供选择。因此显著拓展HPTLC分析方法的应用范围。

HPTLC作为分离-检测一体化平台将多维检测手段高效集成融合, 特别是对很多无法与常规柱色谱联用的离线分析方法表现出无障碍的兼容性, 尤其适用中草药成分以及中成药的分析研究和食品分析样品基质复杂、目标化合物结构差异大等情况。常见的与HPTLC连用的检测手段主要有5种: 光谱、质谱、生物传感、表面增强拉曼和图像分析。这种联用检测策略迥异于常规的柱色谱分析, 极大地提升了检测的灵活性和实用范围。

# 平面色谱法特点



固定相一次使用，样品预处理简单，对被分离物质没有限制

分离能力强，展开时间短，一次可以同时展开多个试样

所用仪器简单，操作方便

**缺点：** 自动化程度低，分辨率和重现性较差

# 2 Part two

## 平面光谱法 的分类和有 关参数

# » 一、平面色谱法的分类

## 薄层色谱法：

分离机制

吸附薄层色谱法

分配薄层色谱法

分子排阻薄层色谱法

离子交换薄层色谱法

分离效能

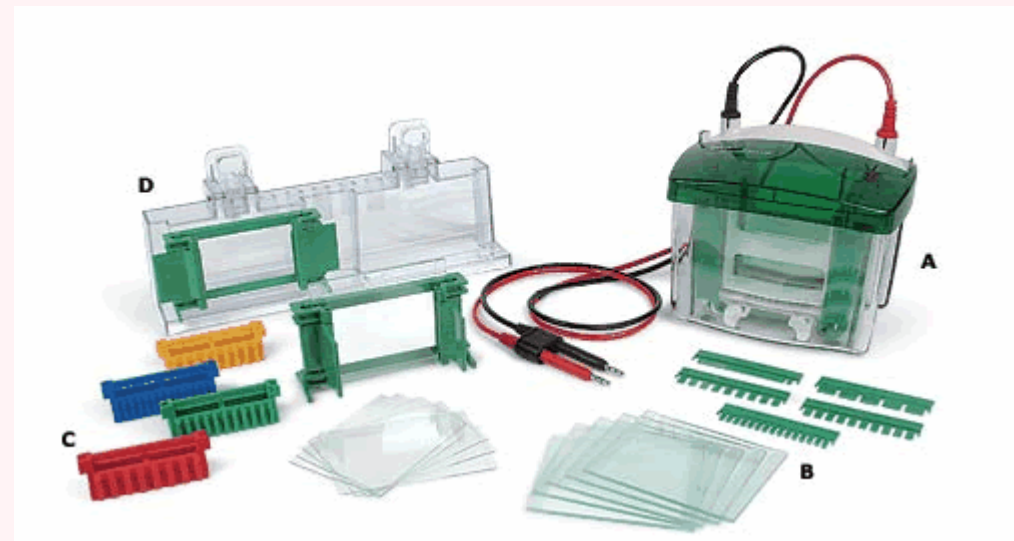
经典薄层色谱法

高效薄层色谱法 (HPTLC)

# » 一、平面色谱法的分类

纸色谱法：分配色谱

薄层电泳法



## » 二、平面色谱法的参数

- 定性参数
- 相平衡参数
- 分离参数

# 1、定性参数

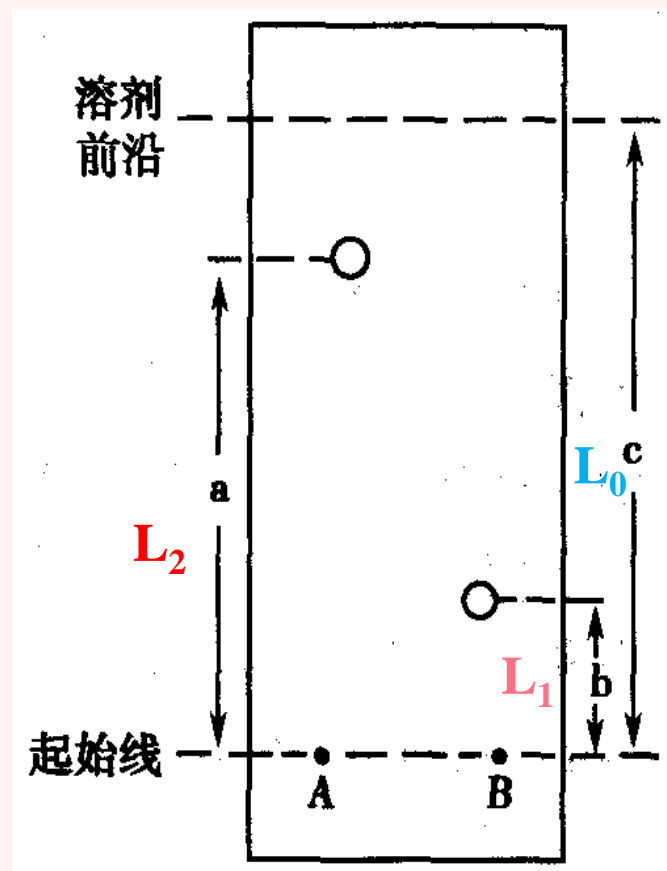
## □ 比移值 (retardation factor, $R_f$ )

溶质移动距离与流动相移动距离之比。

$$R_f = \frac{\text{原点至组分斑点中心距离}}{\text{原点至溶剂前沿距离}} = \frac{a}{c}$$

$a$ 、 $b$ 为原点至斑点中心的距离， $c$ 为原点至溶剂前沿的距离

✓  $R_f=0.2\sim 0.8$  (常用) ;  $0.3\sim 0.5$  (最佳)

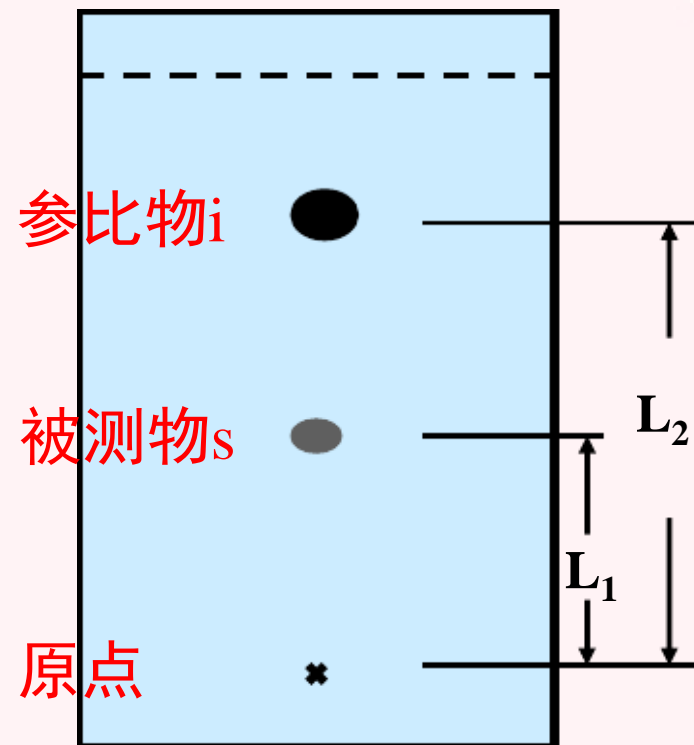


# 1、定性参数

□ 相对比移值 (relative retardation factor,  $R_r$ )

$$R_r = \frac{R_{f(i)}}{R_{f(s)}} = \frac{\text{原点到组分斑点中心距离}}{\text{原点到参考物斑点中心距离}} = \frac{L_1}{L_2}$$

- ✓ 与组分、色谱条件、参考物质有关。
- ✓  $R_r$  值可以大于1，也可以小于1。
- ✓ 重现性和可比性均比  $R_f$  值好，能消除系统误差  
(参考物质与组分在完全相同的条件下展开)



## 2、相平衡参数

$$R_f = \frac{1}{1 + KV_s / V_m}$$

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

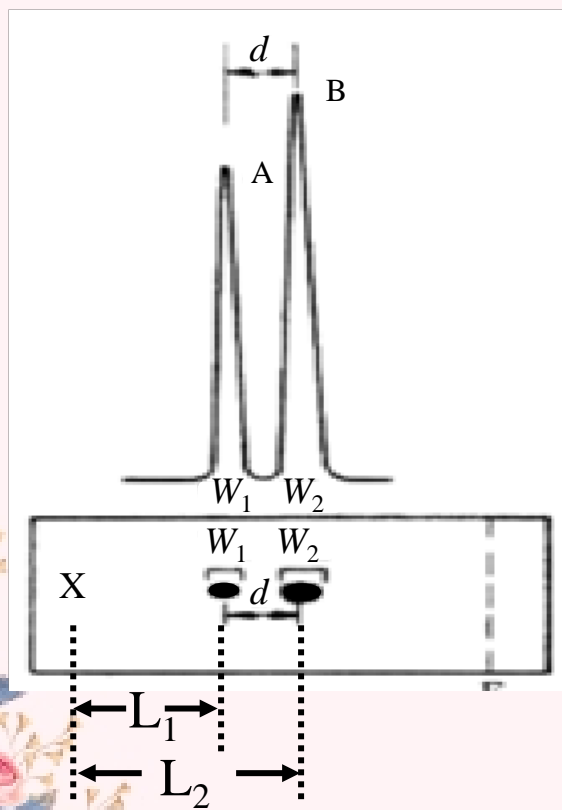
### 讨论

- ✓  $R_f$ 与 $K$ 有关，即与组分性质、平面板和展开剂的性质有关： $K \uparrow$ 大， $R_f \downarrow$ 小；
- ✓ 在吸附或分配薄层色谱法中，改变流动相的极性可改变 $k$ ，改变分离组分 $R_f$ ；
- ✓  $K$ 或 $k=0$ ， $R_f=1$ ， $a=c$ ：组分不被固定相保留，随流动相移至溶剂前沿；
- ✓  $R_f=0$ 的组分， $K$ 或 $k=\infty$ ， $a=0$ ：组分停留在原点，完全被固定相所保留。

### 3、分离度

□ 两相邻斑点中心距离与两斑点平均宽度的比值

$$R = \frac{2(L_2 - L_1)}{(W_1 + W_2)} = \frac{2d}{(W_1 + W_2)}$$

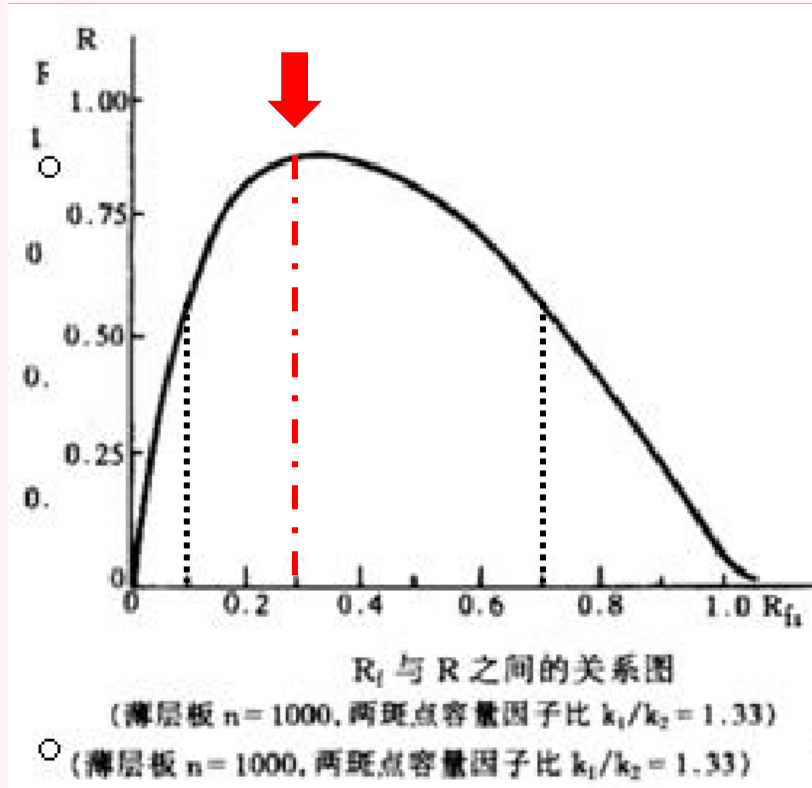


■  $L_2$ 、 $L_1$ 分别为原点至两斑点中心的距离， $d$ 为两斑点中心间的距离， $W_1$ 、 $W_2$ 为两斑点的宽度

#### 结论

- ✓ 相邻两斑点间距离越大，斑点越分散，分离度越大，分离效率越高；
- ✓ 当  $R > 1$  时，相邻斑点可达到基线分离。

## ※ TLC分离度与比移值的关系



- ✓  $R_f = 0.3$  时  
分离度  $R$  最大
- ✓  $R_f = 0.2 \sim 0.5$  时  
分离度  $R$  变化不大
- ✓  $R_f < 0.1$  或  $R_f > 0.7$  时  
分离度  $R$  急剧下降



# 3 Part three



# 薄层色谱 法



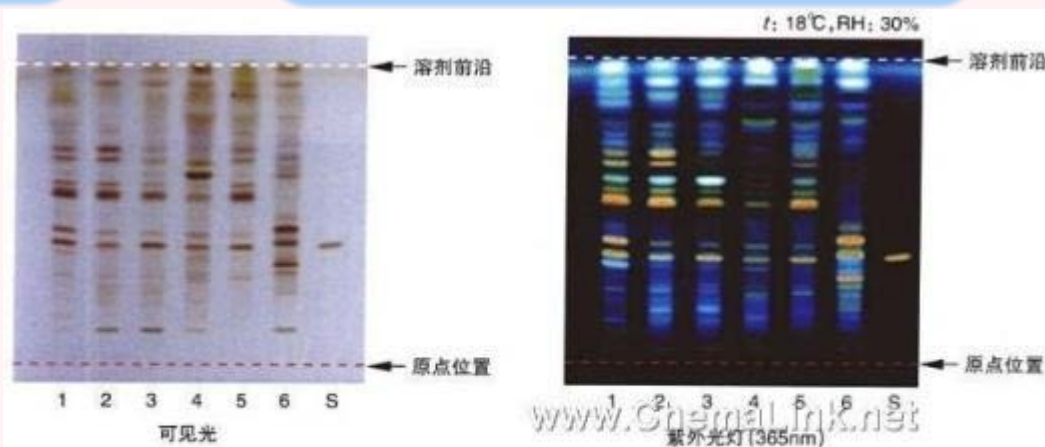
# 薄层色谱法 TLC

□ 将**固定相**均匀涂布在表面光滑的**平板**上，形成薄层而进行**色谱分离和分析**的方法。

细粉状的吸附剂或载体

玻璃板、塑料板或铝箔

点样，展开，显色



S. 黄芪甲苷  
1. 黄芪(产自山西浑源)  
2. 黄芪(产自四川)  
3. 黄芪(产自甘肃)

4. 黄芪(产自吉林)  
5. 黄芪(产自哈尔滨)  
6. 梭果黄芪(非药典品种)

# » 一、薄层色谱法的分离原理

## 分离机制

吸附薄层色谱

分配薄层色谱

空间排阻薄层色谱

离子交换薄层色谱

# (一) 吸附薄层色谱法 (以吸附剂为固定相)

- **原理**: 组分在薄层板上吸附、解吸附、再吸附、再解吸附的过程。
- 吸附系数不等, 实现分离。
- 一般极性强的组分 $K$ 大,  $R_f$ 值小; 极性弱的组分 $K$ 小,  $R_f$ 值大。



## (二) 分配薄层色谱法 (以液体为固定相)

□ **原理**: 组分在固定相和流动相之间的分配系数不同, 在薄层板上进行无数次分配, 产生差速迁移得到分离 (分配系数大, 在板上移动慢,  $R_f$ 小)

□ **分类**: 正相薄层色谱、反相薄层色谱



固定相: 水 (硅胶载体),  
流动相: 极性较弱的有机溶剂。

极性强的组分 $K$ 大,  $R_f$ 值小。



固定相: 烷基化学键合相,  
流动相: 水或水-有机溶剂。

极性强的组分 $K$ 小,  $R_f$ 值大。

## 薄层色谱与高效薄层色谱比较

参数	TLC	HPTLC
板尺寸/cm	20×20	10×10
颗粒直径/ $\mu\text{m}$	10~40	5, 10
颗粒分布	宽	窄
点样量/ $\mu\text{l}$	1~5	0.1~0.2
原点直径/mm	3~6	1~1.5
展开后斑点直径/mm	6~15	2~5
展开时间/min	30~200	3~20
精密度RSD/%	$\pm 10$	$\pm 5$
最小检出限 (吸收 /ng)	1~5	0.1~0.5

## 二、吸附薄层色谱法的吸附剂和展开剂

### 吸附剂

亲脂性

硅胶

氧化铝

乙酰化纤维素

聚酰胺

亲水性

纤维素

离子交换纤维素

硅藻土

聚酰胺

# (一) 吸附剂 (固定相)

## 1、硅胶：最常用的吸附剂， $\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$

□ 硅胶：多孔性微粒，表面带有硅醇基，呈弱酸性

□ 吸附的原因——**氢键**的作用——吸附**活性中心**

硅胶含水量%	0	5	15	25	38
活性级	I	II	III	IV	V

活性： 高  低

含水量多，级数高，吸附能力弱， $R_f$ 大；  
含水量少，级数低，吸附能力强， $R_f$ 小。

**分离效率**：与其粒度、孔径及表面积等有关。

**硅胶粒度**越小，粒度越均匀，粒度分布越窄，其分离效率越高。

## □ 常用硅胶：

- 硅胶H——不含粘合剂
- 硅胶G——硅胶和煅石膏混合而成
- 硅胶HF254——不含粘结剂，含荧光指示剂  
254 nm呈现强绿色荧光背景
- 硅胶GF254——同时含粘结剂和荧光指示剂  
254 nm呈现强绿色荧光背景
- 硅胶HF254+365——不含粘结剂，含荧光剂  
254 nm和356 nm呈现荧光背景

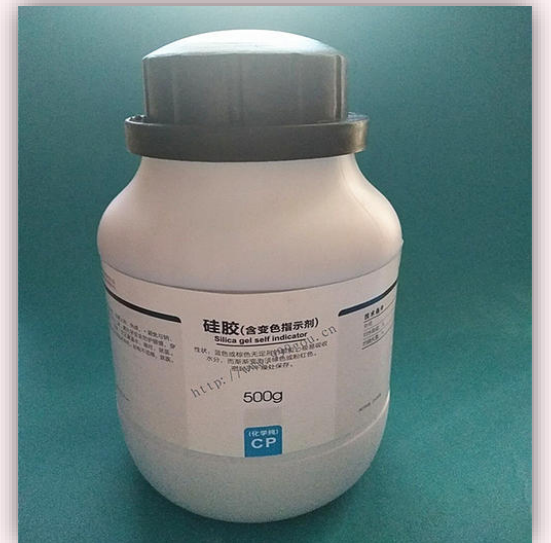
## □ 硅胶特性

- ✓ 物质极性高，吸附能力强——强极性吸附中心，不易洗脱

吸水 → 占用活性位点 → 失活

方法：105°C~110°C烘干30min（活化），吸附力最大  
500°C烘干（不可逆失水）→ 无吸附力

- ✓ 适用：硅胶具微酸性，可以分析酸性或中性物质



## 2、氧化铝:由氢氧化铝在400~500°C灼烧而成

□ 吸附的原因——**氢键**的作用

氧化铝含水量%	0	3	6	10	15
活性级	I	II	III	IV	V

活性： 高  $\longrightarrow$  低

- ✓ 碱性（pH 9~10）：分离碱性及中性化合物。如生物碱等。
- ✓ 酸性（pH 4~5）：用于分离酸性及中性物质。如酸性色素、氨基酸等。
- ✓ 中性（pH 7.5）：用途最广，适用于分析酸性碱性及中性物质，如生物碱、挥发油、甙体等。



## (二) 展开剂 (流动相)

### 溶剂强度 ( $\epsilon^0$ )

- 液-固吸附色谱法的流动相为有机溶剂，其洗脱能力主要由其极性决定
- 溶剂的洗脱能力可用Snyder提出的溶剂强度 (solvent strength)  $\epsilon^0$ 来定量表示， $\epsilon^0$ 为溶剂分子在单位吸附剂表面上的吸附自由能
- 下表列出了以硅胶为吸附剂时一些纯溶剂的 $\epsilon^0$ 值

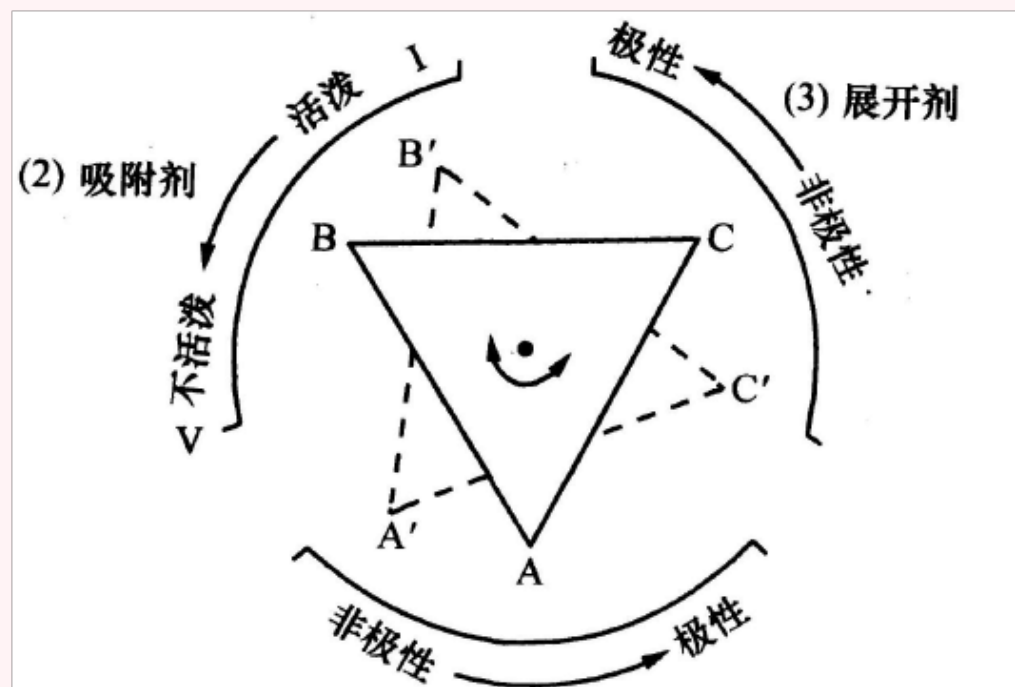
溶剂	溶剂强度/ $\epsilon^0$	溶剂	溶剂强度/ $\epsilon^0$
正戊烷	0.00	甲基叔丁基醚	0.48
正己烷	0.00	乙酸乙酯	0.48
三氯甲烷	0.26	乙腈	0.52
二氯甲烷	0.40	异丙醇	0.60
乙醚	0.43	甲醇	0.70

## (二) 展开剂 (流动相)

- 同吸附柱色谱
- 极性强的溶剂洗脱能力强
- 常用溶剂的极性强弱顺序：

水 > 酸 > 吡啶 > 甲醇 > 乙醇 > 正丙醇 > 丙酮 > 乙酸乙酯 > 乙醚  
> 三氯甲烷 > 二氯甲烷 > 甲苯 > 苯 > 三氯乙烷 > 四氯化碳 > 环己  
烷 > 石油醚。

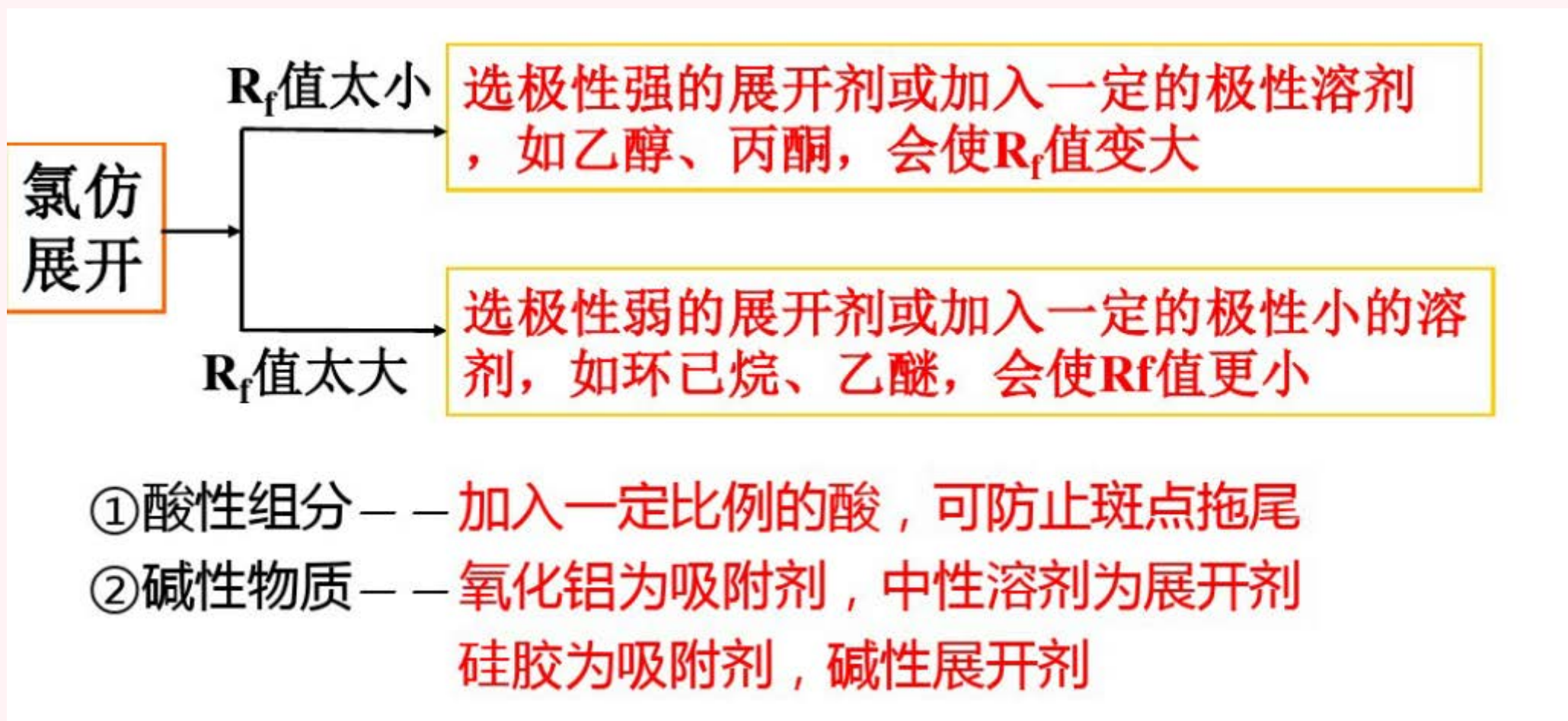
## 展开剂的选择——根据被分离物质的极性



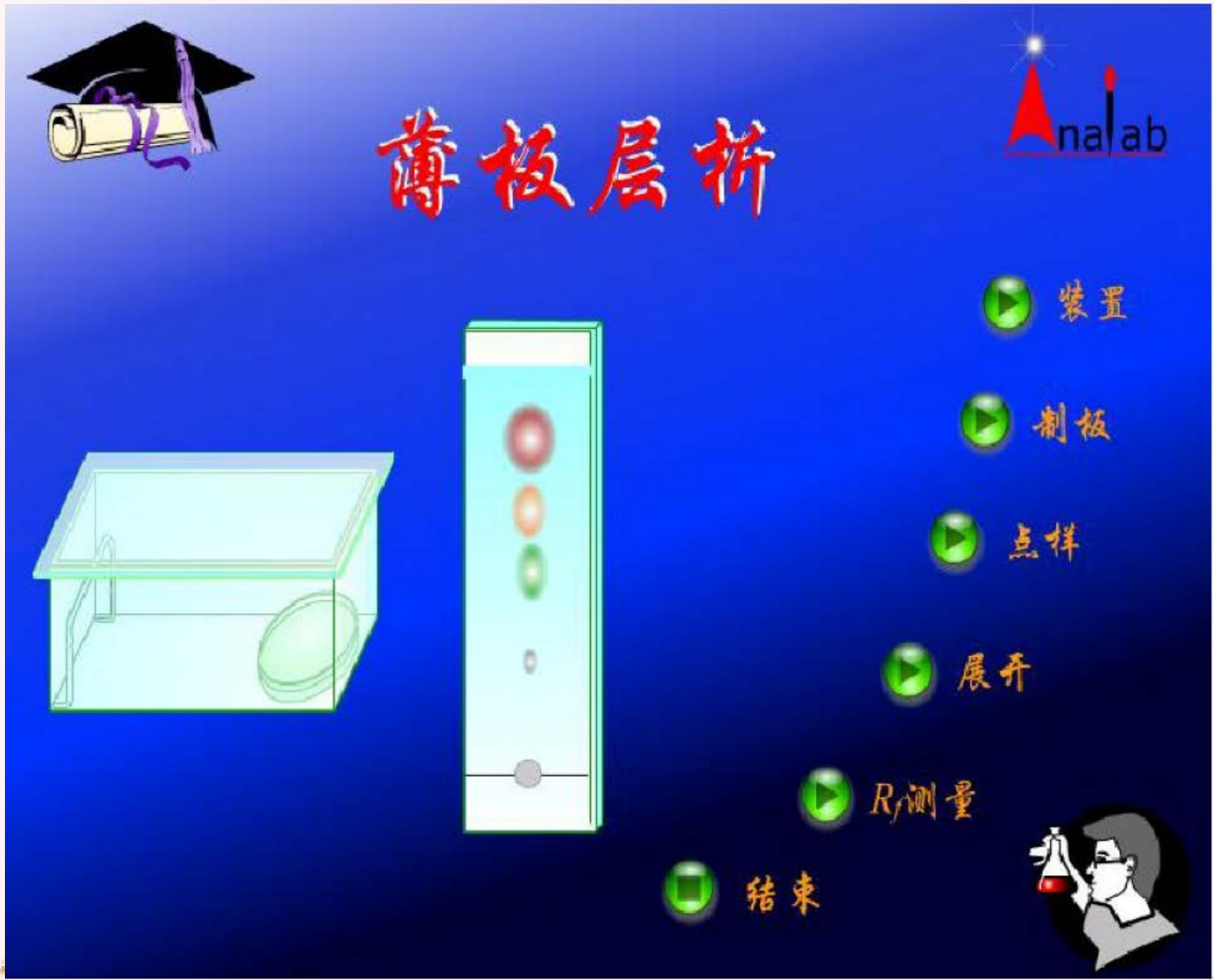
极性组分——吸附活性小的薄层板，极性大的展开剂

非极性组分——吸附活性大的薄层板，极性小的展开剂

## 展开剂的选择——以感兴趣 $R_f$ 值是否在0.3~0.5间为衡量标准



# » 三、薄层色谱操作方法



The image is a blue-themed instructional slide for Thin Layer Chromatography (TLC). At the top left is an icon of a graduation cap and diploma. At the top right is the 'Analab' logo. The central title '薄板层析' is written in large red characters. Below the title, on the left, is a 3D wireframe illustration of a rectangular TLC chamber. In the center is a vertical diagram of a TLC plate with a white baseline at the bottom and a yellow solvent front at the top. Five colored spots (red, orange, green, grey, and grey) are shown at different heights on the plate. To the right of the plate is a vertical list of six steps, each preceded by a green circular play button icon: '装置' (Setup), '制板' (Plate Preparation), '点样' (Spotting), '展开' (Development), 'R<sub>f</sub>测量' (R<sub>f</sub> Measurement), and '结束' (End). At the bottom right is a small cartoon illustration of a person wearing glasses and holding a flask with red liquid.

## 薄板层析

Analab

- 装置
- 制板
- 点样
- 展开
- R<sub>f</sub>测量
- 结束

# (一) 薄层板的制备

## 1、材料准备

(1) 选板：玻璃板、塑料膜、金属铝箔

表面光滑。平整清洁

(2) 固定相（吸附剂）

粘合剂：CMC-Na、煅石膏、淀粉等

(3) 流动相（展开剂）

(4) 显色剂

## 2、薄层制备（铺板）

→1份吸附剂+3份粘合剂+水

→调成糊状，均匀涂布薄层板

✓涂铺方法：

倾注法、平铺法、涂铺器、喷雾法

## 3、活化

- 铺成的薄层，置于水平台面上晾干或热风吹干；
- 薄层放置于105~110°C烘30min~1h，干燥器中备用。

**注意：**※ 吸附剂活性越高，活性级别越低；最好二级或三级  
※ 不可将刚涂布好的薄层板立即烘烤活化

## 4、点样（薄层色谱分离的重要步骤）

**注意：** ※ 溶解试样的溶剂尽量避免用水；  
※ 配置试样浓度约为0.01%~0.1%点样。

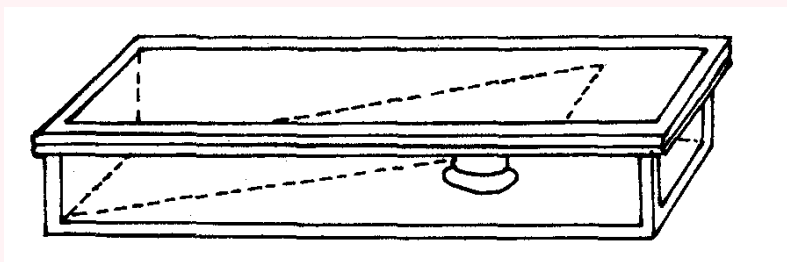
□ 点样装置：容量毛细管、自动薄层色谱点样仪

- ①点样原点应**小而圆**
- ②**多次点样**（每次挥干后），防止扩散效应
- ③点样量**勿超载**，防止拖尾
- ④点样**勿伤及**薄层表面

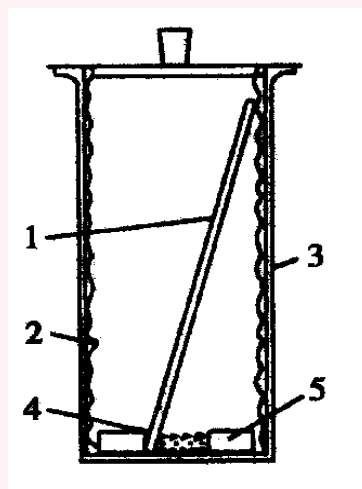
## 5、展开

展开原理：薄层一端浸入展开剂，**点样点不可接触展开剂**，展开剂借助**毛细作用**上升，带动样品中组分的迁移。

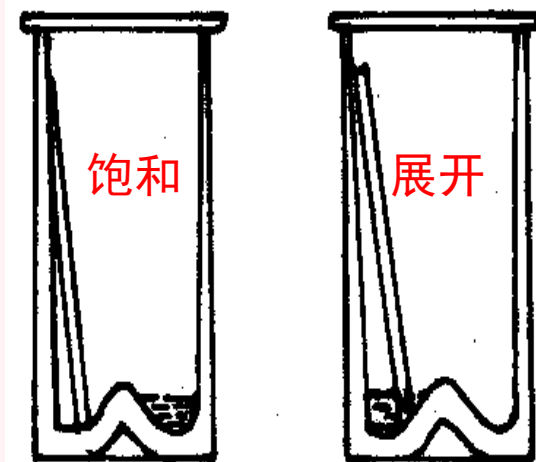
### (1) 展开装置



卧式色谱槽



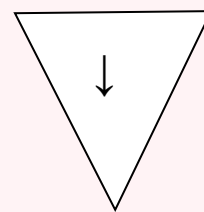
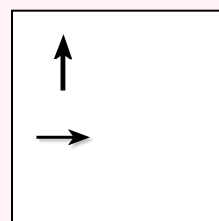
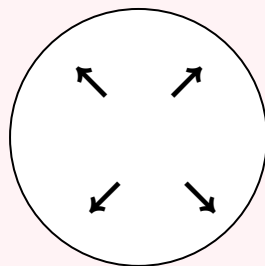
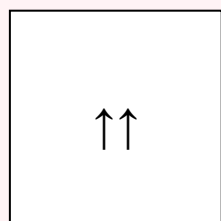
圆形色谱缸



直立双槽色谱缸

## (2) 展开方式

□ 常用：上行、下行、径向、多次、双向等展开方法



## (3) 展开过程

- 平衡系统：展开室预先用展开剂饱和（减少边缘效应）
- 浸入：点样薄板一端浸入展开剂展开（距边缘0.5~1cm）
- 展开至一定距离后取出薄板
- 挥尽溶剂

## 6、斑点的确定

- 光学检出法：直接观察、荧光显示技术
- 试剂显色法：喷雾显色法、浸渍显色法

### 有色物质

- 直接在可见光下观察
- 硅胶H（不含黏合剂的硅胶），铺板时另加黏合剂CMC-Na
- 硅胶G（含煅石膏黏合剂）

### 无色但有紫外吸收的物质

- 使用荧光薄层板，在紫外灯下观察
- 硅胶HF<sub>254</sub>、硅胶HF<sub>360</sub>、硅胶GF<sub>254</sub>、硅胶GF<sub>360</sub>

### 无色且无紫外吸收的物质

- 显色反应

薄层色谱常用通用型显色剂：

碘蒸气法

10% 硫酸乙醇溶液

0.05% 荧光黄甲醇溶液

## 7、定性分析——测定 $R_f$ 值

- 比较 $R_f$ 值或 $R_r$ 值、斑点颜色或荧光
- 常采用已知标准物质对照（同一板上展开）
- 多种展开系统的 $R_f$ 值与对照品一致。

注意：对未知样品，要几个展开体系均有一致值，或双向展开法确认。

## 8、杂质检查

□ 杂质对照品比较法——适用于杂质已知并有杂质对照品的情况

方法：根据杂质限量，取供试品溶液和一定浓度的杂质对照品溶液，分别点于同一薄层板上展开，定位后进行检查

□ 供试品溶液自身稀释对照法

方法：首先配制一定浓度的供试品溶液，然后将其稀释一定倍数得到另一低浓度溶液，作为对照溶液。将试样溶液和对照溶液在同一薄层板上展开，试样溶液中杂质斑点颜色不得比对照溶液主斑点颜色深。

## 9、定量分析

### 洗脱法

- 刮下
- 溶解
- 光度法测定
- 误差 $\pm 5\%$

### 目视比色法

- 比较色斑大小、深浅
- 误差 $\pm 10-30\%$

### 薄层扫描法

- 直接扫描
- 斑点对光的吸收强弱
- 误差 $< 5\%$

## » 四、薄层色谱的应用

- ✓ 中草药和中成药的鉴别及成分分析
- ✓ 判断合成反应进行的程度
- ✓ 药物的纯度和杂质限量试验
- ✓ 临床药物分析



4 Part four



纸色谱法

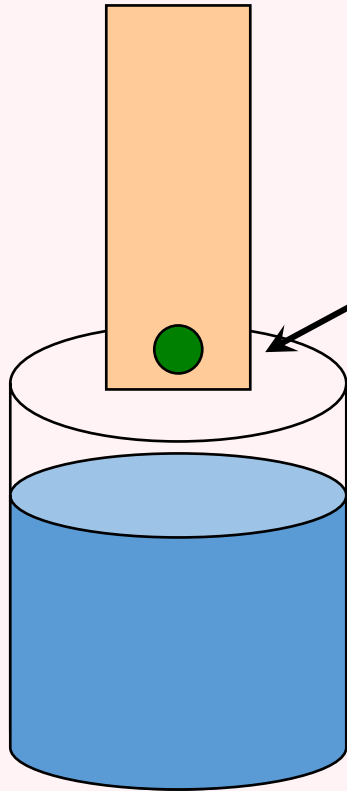


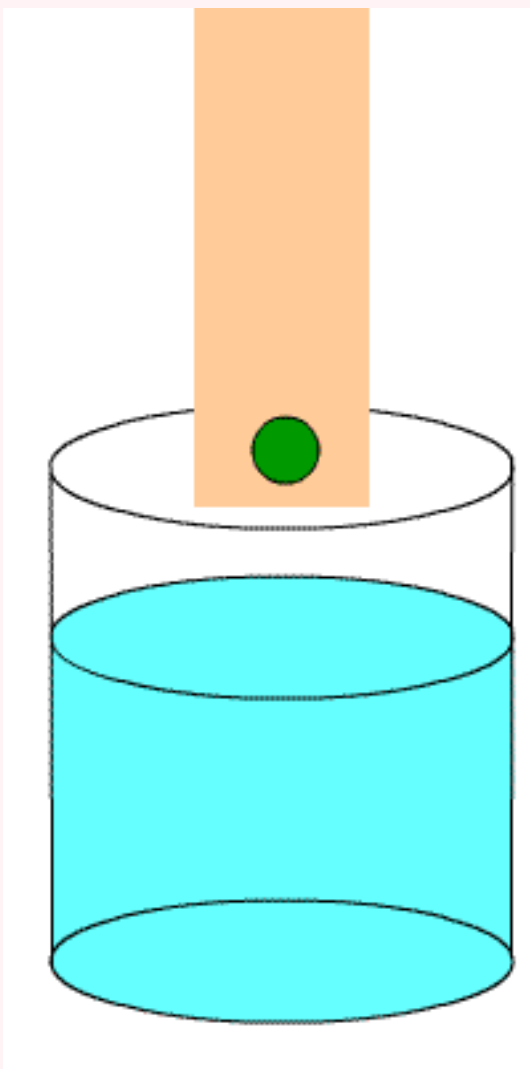
# » 一、纸色谱法的分离原理

- ✓ 固定相：纸上所含水分或其他物质（纸纤维为载体）
- ✓ 流动相：水不互溶的有机溶剂
- ✓ 分离机制：同液-液分配色谱
- ✓ 属于正相分配色谱
- ✓ 依据分配系数的不同而达到分离
- ✓ 极性或亲水性强的组分， $K$ 大， $R_f$ 值小；极性弱或亲脂性强的组分， $K$ 小， $R_f$ 值大。
- ✓ 滤纸选择：中速滤纸最常用

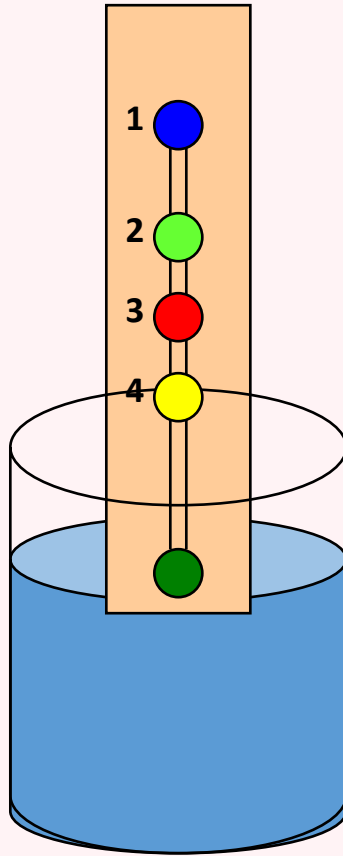
# 小实验

- 当滤纸接触到溶剂时，溶液将上升。
- 滤纸上的小圆点是4种不同的氨基酸的混合物。
- 看看接下来会发生什么事情...

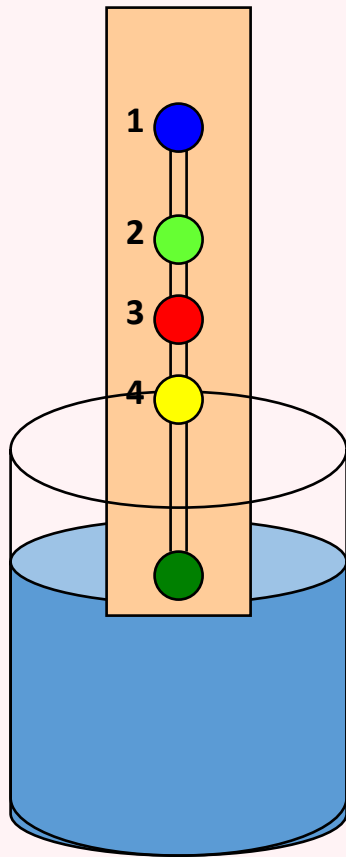




纸层析小实验动画演示

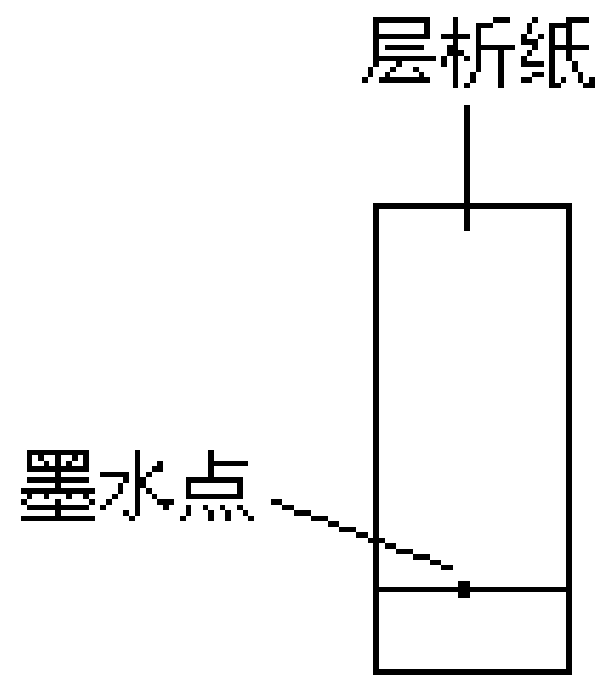
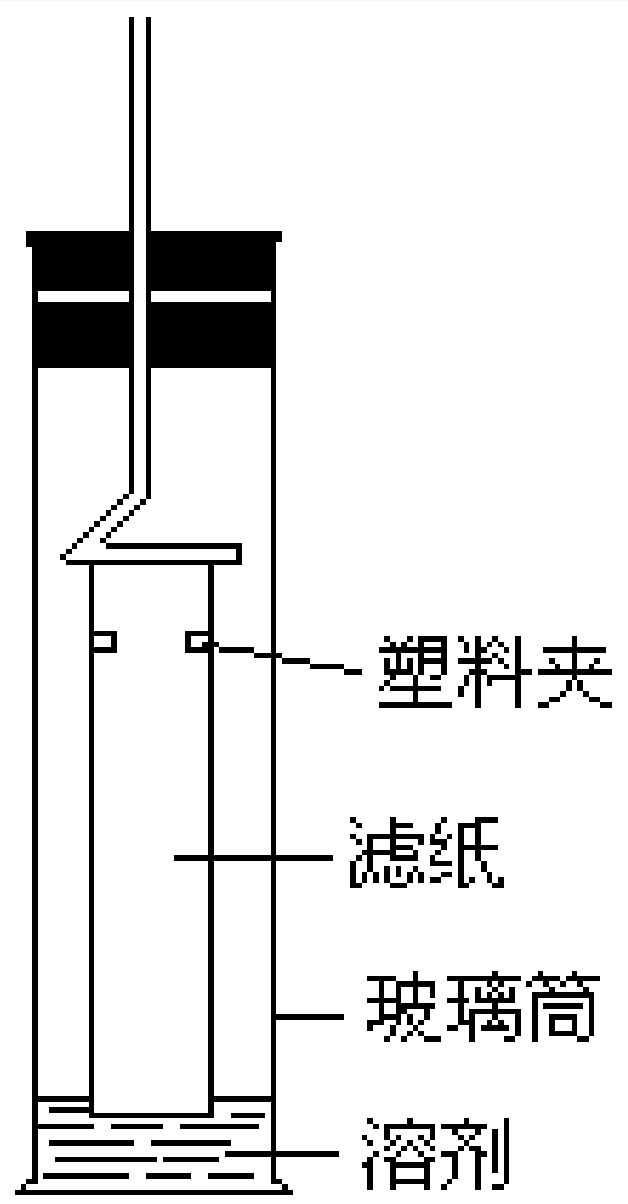


- 可以看出1号氨基酸上升的最高，在滤纸上跑得最快。
- 而4号氨基酸与滤纸的结合最紧，因此跑的速度比其他的氨基酸慢。



● 甘氨酸      ● 组氨酸      ● 缬氨酸  
● 半胱氨酸

- 这就是纸层析法。
- 对照上图，可知道1-4号的各代表什么氨基酸。
- 纸层析法是分离鉴定蛋白质的氨基酸组成的重要工具。





**感谢您的观看**