



薄层色谱法

杨寿钧

(中国科学院微生物研究所,北京)

薄层色谱法是近20年来迅速发展起来的一种微量而快速的色谱方法。它是把吸附剂或支持剂涂布在玻璃或塑料板上成一薄层,把要分析的样品滴加到薄层上,然后用适当的溶剂展开而达到分离、鉴定和定量的目的^[1-4]。由于这种方法具有快速、微量、灵敏度高、操作简便、仪器设备简单等许多优点,现在已成为一种应用范围日趋广泛的重要分析方法。

根据薄层色谱的基本原理,可将此方法分为吸附、分配、离子交换、凝胶过滤四种类型。现将这几类方法作一简要介绍,最后介绍一些实验方法。

吸附薄层色谱

这是薄层色谱的主要类型。它是利用吸附剂在各种溶剂中对不同化合物的吸附能力的强弱来达到分离的目的。在吸附薄层色谱法中,最重要的是吸附剂和展开剂的选择。

一、吸附剂的选择

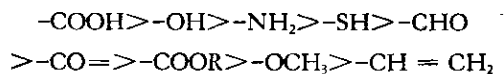
用于吸附薄层色谱的吸附剂应满足以下要求:

1. 具有一定吸附能力;
2. 化学性质稳定,不与展开剂和样品发生化学反应;
3. 颗粒大小在一定范围内。

常用的吸附剂有硅胶、氧化铝、聚酰胺粉末等,此外还有磷酸钙(镁)、碳酸钙、淀粉和蔗糖

等。由于硅胶、氧化铝、聚酰胺等的吸附性能好,故是应用最早和最广的。

选择吸附剂时,首先应考虑分离物质的极性和化学稳定性,一般说来,极性吸附剂(如硅胶、氧化铝)对分子内含极性基团多,不饱和程度大的化合物,吸附力很强,用极性弱的溶剂展开时,往往不易展开。因此,对极性强的化合物,一般用极性弱的吸附剂,极性弱的化合物则用极性强的吸附剂。不同官能团的化合物的极性强弱的顺序是:



由于硅胶略带酸性,对碱性化合物吸附力较强,用中性溶剂展开时,碱性化合物往往留在原点或拖尾而不能很好地分离,因而适用于分离酸性或中性物质;氧化铝则略带碱性,因此适合分离碱性或中性物质。有时可用稀酸或稀碱(0.1—0.5N)改变吸附剂的酸碱性,以便更好地分离某类或某类中的某种化合物。也可用一定pH值的缓冲液代替水来制备薄板。

为了确定吸附剂的活性,使用前一般要标定它的活性。氧化铝的活性,可按 Hermanek 的方法标定^[5],具体方法是:取厚度为0.6毫米的未加粘合剂用干法制成的氧化铝板,滴加含有对甲氧基偶氮苯、苏丹黄、苏丹红、对氨基偶氮苯各20毫克和30毫克偶氮苯溶于50毫升重蒸无水四氯化碳中的溶液0.02毫升,用四氯化碳展开,根据各种染料的R_f值来确定氧化铝的

吸附活性(见表1)。硅胶的活性可用 Stahl 的方法标定。方法是:取对二甲氨基偶氮苯、靛酚(Indophenol)、苏丹红各10毫克溶于1毫升丙酮中,将此溶液点在硅胶薄板上,斑点直径1—2毫米,用正己烷:醋酸乙酯=9:1(体积比)展开,三种染料中,如对二甲氨基偶氮苯走得最快,苏丹红最慢,则该硅胶相当于II级活性氧化铝。

表1 氧化铝吸附活性和偶氮染料的 Rf 值

染料	活性分级(按 Brockmann 和 Schodder 的标准)			
	II	III	IV	V
偶氮苯	0.59	0.74	0.85	0.95
对二甲氨基偶氮苯	0.16	0.49	0.69	0.89
苏丹黄	0.01	0.25	0.57	0.78
苏丹红	0	0.10	0.33	0.56
对氨基偶氮苯	0	0.03	0.08	0.19

吸附剂的颗粒大小对展开速度、分离效果和 Rf 值都有显著影响。如果颗粒太大,制成的薄板疏松,溶剂展开太快,则分离效果不好;颗粒太细,展开速度慢,斑点不集中,容易扩散;颗粒大小不均匀,斑点也不好。因此,要获得均匀的薄层和恒定的 Rf 值,吸附剂一定要选择大小范围固定的颗粒。一般无机吸附剂以 0.07—0.1 毫米(即 150—200 目),薄层厚度以 0.25—1.0 毫米为宜;硅胶薄层的厚度,应以上述正己烷-醋酸乙酯为溶剂展开 30—60 分钟时,溶剂前进 10 厘米为宜;有机吸附剂聚酰胺的颗粒稍大,为 0.1—0.2 毫米(即 70—140 目),薄板厚 1—2 毫米。

二、展开剂的选择

吸附色谱中,样品的分离效果往往主要取决于展开剂的选择。选择展开剂的主要根据是溶剂极性的强弱。在同一吸附剂上,溶剂的极性越强,对某一化合物的洗脱能力也越强,该化合物的 Rf 值也越大,反之,Rf 值则小。各种溶剂的极性顺序(也称洗脱顺序)(见表2),表中由上到下极性逐渐增强。

当用一种溶剂展开时,如果发现斑点走不动或移动很小,就应考虑用极性较强的溶剂,如

表2 各种溶剂的极性顺序

单种溶剂	单种溶剂和混合溶剂(混合体积比)	
石油醚	苯	(接左列)
环己烷	苯:氯仿(1:1)	环己烷:醋酸乙酯(2:8)
四氯化碳	氯仿	醋酸丁酯
三氯乙烷	环己烷:醋酸乙酯(8:2)	氯仿:甲醇(95:5)
甲苯	氯仿:丙酮(9:5)	氯仿:丙酮(7:3)
苯	苯:丙酮(9:1)	苯:醋酸乙酯(3:7)
二氯甲烷	苯:醋酸乙酯(8:2)	醋酸丁酯:甲醇(99:1)
氯仿	氯仿:乙醚(9:1)	苯:乙醚(1:9)
乙醚	苯:甲醇(95:5)	乙醚:甲醇(99:1)
醋酸乙酯	苯:乙醚(6:4)	乙醚
吡啶	环己烷:醋酸乙酯(1:1)	乙醚:二甲基酰胺(99:1)
丙酮	氯仿:乙醚(8:2)	醋酸乙酯
正丙醇	苯:丙酮(8:2)	醋酸乙酯:甲醇(99:1)
乙醇	氯仿:甲醇(99:1)	氯仿:丙酮(1:1)
甲醇	苯:甲醇(9:1)	氯仿:甲醇(9:1)
水	氯仿:丙酮(85:15)	二氧六环
	苯:乙醚(4:6)	丙酮
	苯:醋酸乙酯(1:1)	甲醇
	氯仿:乙醚(6:4)	二氧六环:水(9:1)

先用石油醚,后改用加了 10%、20% 或 50% 苯的石油醚;或先用苯,后改用加了 1%、2% 或 5% 乙醇的苯等。

选择吸附剂和展开剂时,可以参考图 1^[2]。

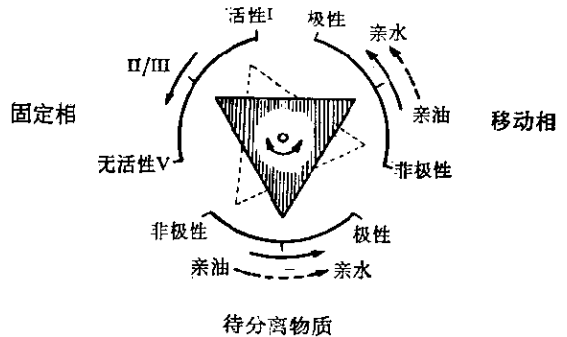


图1 吸附色谱中三种主要可变因子之间的关系示意图。(图中间的三角形一角随待分离物质的极性转动,其余两角为固定相和流动相的极性。)

根据待分离物质的极性大小,可以大体决定应采用的吸附剂和展开剂的极性范围。或者先取一块宽 2.5 厘米的薄板,间隔 2 厘米点上待测样品,用毛细管吸取不同的展开剂在斑点中间展开,显色后可看到不同的色环。如果某一溶剂能很好地把样品的各成分展开成一个清晰

的圆环,这种溶剂就是合适的。

在实际工作中,很难用一种溶剂达到很好的分离效果,往往要用二种或三种溶剂相混合。要选择到好的展开剂,应借鉴已有的资料,进行反复的摸索。

最近发展起来的聚酰胺,是一种新型有机吸附剂,该化合物分子中含有许多氨基和羰基,这些基团能和被分离物之间形成氢键。不同化合物之间形成的氢键的牢固程度不同,用适当溶剂展开后,可以把被吸附的物质按氢键的牢固程度加以分离。

1966年以后,出现了铺在塑料片基上的聚酰胺薄膜^[5]。在进行薄层色谱时,该种材料应用方便,灵敏度较高,展开速度快,因而应用范围日趋广泛。特别是用于分析氨基酸衍生物时,其效率超过了纸色谱、纸电泳、硅胶薄层色谱^[6,7]。

分配薄层色谱

分配薄层色谱的基本原理和纸色谱一样,但前者具有更多优点。

1. 展开迅速、分离时间短。这是薄层色谱最大的优点。分离时间一般只需几分钟到几十分钟。纸色谱则往往需要几小时到十几小时。

2. 样品需要少;灵敏度高。一般只要几微克到几十微克样品,甚至有时可以只要 0.01 微克,灵敏度比纸色谱高 10—100 倍。

3. 可以采用腐蚀性强的显色剂。如可以使用浓硫酸等。而纸色谱不能使用它们。

4. 薄层色谱不须预先饱和,温度对 Rf 值的影响也不如对纸色谱那样大。

分配薄层色谱中,常用的支持剂是纤维素、硅藻土等,以吸附在纤维素中与羟基结合的水为固定相,有机溶剂为移动相。

分配色谱是根据不同化合物在固定相中和移动相中分布常数的不同而达到分离的目的。当一物质在固定相中的量大于移动相中的量时,分离物质移动少,Rf值小,反之,则 Rf 值大。所以,在分配薄层色谱中决定被分离物质 Rf 值主要因素是分离物质的分布常数。由于分配色谱中水作为固定相,水的极性很强,因此极性强

的物质在水中的溶解度大,即在固定相中的量大于移动相中的量,Rf 值就小。如果分子中的其它基团不改变,整个分子的极性会随着碳链的延长而降低,Rf 值就会增大。倘若提高展开剂的极性,往往可以增强洗脱能力,Rf 值变大。另外,溶剂的 pH 值会改变弱酸弱碱的解离度,解离度大则极性强,因而会改变化合物的分布常数,从而相应地改变它的 Rf 值。

常用于分配薄层色谱中的纤维素颗粒,其大小比硅胶稍大,一般为 70—140 目(0.1—0.2 毫米)厚度以 1—2 毫米为宜。用脱脂棉或色谱滤纸以 2.5NHCl 煮沸 15 分钟,过滤,用水洗至中性,即可得到微晶形的纤维素^[2]。用这种纤维素制薄板,厚薄均匀,展开时斑点集中,分离效果好。纤维素用无水醋酸酐处理,所得醋酸纤维素的羟基被乙酰基取代,从而降低了纤维素的极性,可用来分离亲脂性物质。

离子交换薄层色谱

离子交换薄层色谱是最近才发展起来的一种方法。原则上说,适用于离子交换柱色谱的离子交换剂均可用来作为薄层,但最早应用和应用最广泛的离子交换剂要算离子交换纤维素和离子交换葡聚糖凝胶(Sephadex)等。用离子交换纤维素制薄板,不必加粘合剂,一些须加粘合剂制板的离子交换剂,也常用纤维素作粘合剂。离子交换薄层色谱的分离效果取决于所分离物质的净电荷数,洗脱液的 pH 和离子强度。对同一种离子交换剂,所分离物质净电荷越多,交换吸附越牢,洗脱时不易被解吸,因而 Rf 值小。为了提高分离效果,可以增加洗脱液的离子强度,如用 DEAE-纤维素薄层分离 4 种单核苷酸时^[3],三磷酸核苷酸的净电荷最多,Rf 值最小,提高洗脱液的离子强度,可提高 Rf 值。

薄层凝胶过滤

细粒或超细粒的葡聚糖凝胶可以制成薄层^[7,8]。由于凝胶的分子筛效应,可以把分子量大小的物质分开,这样的薄层色谱称为薄

层凝胶过滤。这种方法常用于分离或分析生物大分子。

薄层凝胶过滤和其它薄层色谱一样,具有许多优点,如快速、微量、分辨率高、多种样品可在同一薄板上分析以便于比较等。但也有其特点。该种薄板在色谱分离过程中始终保持湿的状态,因此操作时(如点样、显色等)和其它色谱不同。样品是用小滤纸片蘸湿分析样品后放在薄板上,分离后的样品斑点利用湿纸或醋酸纤维膜复盖在凝胶表面上,使被分离物质转移到滤纸上,然后把滤纸或醋酸纤维膜风干后显色(凝胶板不能干燥,否则会破坏整个色谱系统)。

由于薄层凝胶过滤具有上述优点,样品斑点的移动距离的倒数和分离物质的分子量成线性关系,因此,可用来测定生物高分子的分子量^[9]。该方法可以与电泳法相结合以提高灵敏度。虽然这一方法还在不断改进中,但在生物化学研究中,很有前途。

薄层凝胶过滤时采用的葡聚糖凝胶交联度应比较大(一般为 Sephadex G25, G50),交联度小的不易制板。薄层厚度以 0.5 毫米最佳。制成的薄板须先用下行法以缓冲液引流10—15小时达到平衡。展开速度不应太快,不超过4厘米/小时。

薄层色谱的实际操作

薄层色谱的实际操作过程包括制板、点样、展开、显色和定量等步骤,现分述如下:

一、制板

薄层板的制备是把吸附剂或支持剂均匀地涂布在底板上成一薄层。常用的底板为玻璃或塑料。底板要先洗干净,玻璃板最好用铬酸洗液浸泡过夜再洗净。薄板规格通常为10×20厘米或20×20厘米。微量薄层色谱使用的底板可采用2.5×7.5厘米的显微镜用的载片。

把吸附剂涂布在底板上有两种方法。吸附剂不含粘合剂时,可直接铺一薄层,称为干法制板;若含有粘合剂时,则应先用水将吸附剂调

湿后再涂成薄层,称为湿法制板。涂布的方法有多种,最方便的方法是采用涂布器(如图2A),也可以简单地用一根两端缠有适当厚度胶布的玻璃棒,胶布的厚度即为薄层厚度,借玻璃棒的滚动铺成均匀的薄层(图2B)。或用较厚的玻璃条代替粘在玻璃棒两端的胶布,放在底板两边,底板与玻璃条厚度之差即为薄层厚度,再用另外一块玻璃条把倒在中间的吸附剂刮向一边。制板时要用力均匀,不宜移动太快。制得的薄层必须光滑、平整、厚度均匀,才能获得良好的分离效果。

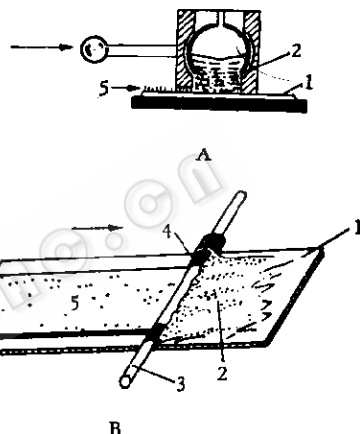


图2 薄板的制备

- 1: 底板; 2: 吸附剂; 3: 玻璃棒;
4: 胶布; 5: 涂好的薄层

(一) 硅胶薄层

硅胶是薄层色谱最常用的吸附剂。市售的硅胶G(色谱用硅胶)中已含有13%的煅石膏。使用时取1份硅胶G与2份水和数滴乙醇,在研钵中调成均匀的糊状,立即铺层,如时间过长,糊状物会凝固。

以淀粉为粘合剂时,可取28.5克硅胶和1.5克淀粉混匀,加入75毫升蒸馏水,在沸水浴上加热,不断搅拌直至形成均匀粘稠的糊状物,然后涂布。

以羧甲基纤维素(CMC)为粘合剂时,可取1—1.5份中等粘度的CMC溶于100份蒸馏水中,待完全溶解后,加入55份硅胶,调拌成糊状,然后制成薄层。

制好的薄层板在室温或80℃烘箱中干燥,

再在105—110℃烘箱中活化 30 分钟,保存在干燥器中备用。

(二) 氧化铝

常用的氧化铝活性为 II—III 级。用氧化铝 G (含有 5% 的煅石膏) 制板时,取 1 份氧化铝 G 用 2 份蒸馏水调成糊状涂布薄层。然后在 200—220℃ 至少烘 4 小时,制成的薄层板活性为 II 级,在 150—160℃ 烘 4 小时,则其活性为 III—IV 级。制好的薄板均应在以 I 级氧化铝为干燥剂的干燥器内放置 24 小时,以保证达到所需活性。

(三) 硅藻土

以煅石膏为粘合剂时,取 7 克硅藻土,0.4 克煅石膏,加 40 毫升水调匀后涂布薄层;或用 30 克硅藻土 G,60 毫升水调成糊状涂板,放置 5—10 分钟,在 100—105℃ 干燥 30 分钟,随即使用。

(四) 纤维素

用纤维素时,不须加粘合剂。取 10 克纤维素粉,用 50—60 毫升丙酮调成糊状,涂布薄层。在 100℃ 干燥 2—5 分钟;或取 2—3 克纤维素粉加 12—18 毫升蒸馏水,在研钵中调成糊状,涂布薄层,在 105℃ 干燥 10 分钟即可使用。

(五) 聚酰胺

用于薄层色谱的聚酰胺粉,颗粒约为 0.1—0.2 毫米大小。其中所含单体可用二甲基酰胺:冰醋酸:水:乙醇(5:10:30:20)混合液洗去。取 5 克聚酰胺,加入 45 毫升甲醇(3份)-氯仿(2份)混合液,或加入同体积的苯(2份)-甲醇(3份)混合液,调成糊状涂布薄层。制好的薄板在室温下风干后即可备用。

二、点样

将样品用毛细管滴加到距薄层底部 2 厘米处。样品应溶解在易挥发的溶剂(如乙醇、丙酮)中。样品的滴加量视显色剂的灵敏度而定,通常为几到几十微克,体积为一到十几微升。加样过多,斑点易拖尾,分离效果不好。斑点直径一般不应超过 2—3 毫米,斑点间距离为 2—3 厘米。

三、展开

要在密闭的器皿中进行,器皿体积愈小,溶剂在器皿中愈易饱和,展开更为迅速。展开时,无须事先在器皿中饱和薄层。可以进行上行、下行、单向、双向和分次展开,现分述如下。

(一) 上行法

将薄层一端浸入展开剂中,展开剂由下向上借毛细管作用扩展。这是最常用的方法。

(二) 下行法

将展开剂用滤纸引到薄层板上,由上向下展开。由于展开剂会不断由薄板下端流出,所以各种被分离物的 R_f 值差别更明显,分离效果会更好。

(三) 双向法

先在一种溶剂中展开后,将薄板干燥,再转 90 度,用另一展开剂展开。

(四) 分次展开

分离混合组份时,某一溶剂只能分离某些组份。此时可用数种展开剂先后进行展开。

四、显色

通常用显色剂喷雾显色。喷雾必须均匀,不应有液滴。有的显色剂可立即显色,有的则须加热。凡可用于纸色谱的显色剂,也适用于薄层显色。各类化合物的显色剂,可查阅文献^[1,2]。

如果被分离物质在紫外光下有荧光时,可在紫外光下直接观察。亦可在吸附剂中加入荧光物质制成荧光板,在紫外光下,有样品斑点处不显荧光。通常荧光检测要比用显色剂显色方便和灵敏。

五、定量

可分直接在薄层上测定和洗脱测定两种。

(一) 直接测定

样品含量在一定范围内,斑点面积(A)的平方根和样品重量(W)的对数成直线关系。即

$$\sqrt{A} = m \lg W + c$$

m 和 c 对某一类化合物而言是一常数。因

此可根据样品的斑点面积测定其含量。

也可以用光密度计扫描测定斑点的光密度,或将薄层显色后拍成照片,再测定底板的光密度。光密度计扫描测定的灵敏度高、准确。

(二) 洗脱测定

将显色斑点和吸附剂一同刮下来,用适当的溶剂将被分离物质从吸附剂上洗脱下来进行定量。如果显色剂干扰定量测定,则可以同时展开几份相同样品,将其中一点显色,然后刮下另一样品中处于相同位置处的吸附剂刮下,用洗脱剂洗脱后进行定量测定。

参 考 文 献

[1] 章育中:《仪器分析及其在生理科学中的应用》,第二册,科学出版社,北京,1965,第120页。

- [2] Stahl, E.: *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook* 2nd ed. (Tr. by Ashworth, M. R. F.) Springer-Verlag 1969.
- [3] Randerath, K.: *Thin-Layer Chromatography*, (Tr. by D. D. Libman) Verlag Chemie, Academic Press, 1963.
- [4] Touchstone, J. C.: *Quantitative Thin-Layer Chromatography*, Wiley, New York, 1973.
- [5] Wang, K. T. and I. S. Y.: *J. Chromatogr.*, 24: 458, 1966.
- [6] Wang, K. T. and I. S. Y.: *J. Chromatogr.*, 27: 318, 1967.
- [7] 周远聪等:生物化学与生物物理进展,1975年,第1期,38页。
- [8] Jehansson, B. G.: *Thin-Layer Gel Filtration and Related Methods, New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein* (ed. by Niederwieser, A. and G. Pataki), Ann. Arbor Science Pub. inc. 1971, p. 249.
- [9] Morris, C. J. O. R.: *J. Chromatogr.*, 16: 167, 1964.