

近代分离分析技术基础知识

上 册

上海市化工七·二一工人大学

1 9 7 4 . 10 .

运用近代科学知识和方法研究中医中药，使它同西医西药结合起来，创造中国统一的新医学，新药学。

前 言

在继承祖先的医药遗产中，发掘、整理，提高祖国药学创造中国统一的新药学的工作正在健康地蓬勃地进行着。为了便于在提取分离和寻找中草药的化学和有效成份，我们特编写“近代分离分析技术基础知识”一书。本书涉及内容为研究中草药有效成份工作中必不可少的近代技术。

本书共有十三个章节，分成二册。上册为“薄层层析法”、“纸上层析法”、“柱层析法”、“离子交换”、“电渗析”、“电泳”、“分子筛”、“定相色层分析”等组成，主要介绍分析鉴定的先进技术和方法。下册为“高速液体层析”、“紫外-可见分光光度法”、“红外分光光度法”、“核磁共振”、“质谱”等组成，主要为有机化合物的结构测定工作作一些介绍。

参加本书编写的还有上海药物研究所、上海药品检验所、上海医药工业研究院等单位，特此致谢。

上海化工“七二一”工人大学

中草药提炼工艺组

近代分离分析技术基础知识 (上册)

目 录

第一章	薄层层析法	1
第二章	纸上层析法	14
第三章	柱层析法	18
第四章	离子交换	25
第五章	电泳析	32
第六章	电泳	44
第七章	分子筛	48
第八章	气相色谱分析	58

第一章 薄层层析法

§ 1-1 概 述

薄层层析法是近年来发展的一种微量、快速、操作简单的分析方法。在中草药各种成分的提取与分离过程中，经常使用薄层层析法进行定性、定量分析工作。从而了解中草药各成分的分离情况，及时地指导提取工作顺利开展。

薄层层析法是将吸附剂（固定相），均匀薄铺在玻璃板上，点加试样后，用适当的溶剂作展开剂（即流动相）进行展开而达到分离鉴定的目的。

例如：铺有吸附剂氧化铝的玻板上，在点A处，点上含有生物碱汉防己甲乙素的试样后，在层析缸中用氯仿—乙醇乙醚混合液展开，展开后用碘化铋钾试剂喷雾显色，即得（B）、（C）二个斑点，（图1-1），它在图谱上的位置是用比移值（ R_f ）来表示的。

$$\text{比移值 } (R_f) = \frac{\text{原点到层析斑点中心的距离}}{\text{原点到展开剂前沿线的距离}}$$

I：起始线

II：前沿线

A：原点

B：汉防己甲素斑点

C：汉防己乙素斑点

$$\text{甲素 } R_f = \frac{2.5}{1.5} = 0.50$$

$$\text{乙素 } R_f = \frac{5}{1.5} = 0.33$$

通常我们比较图谱上的斑点显色情况，和比移值大小（或与标准品相比），来鉴定各物质的组份。

§ 1-2 基 本 原 理

一些多孔性物质的颗粒，它的表面具有极大的吸附性能。

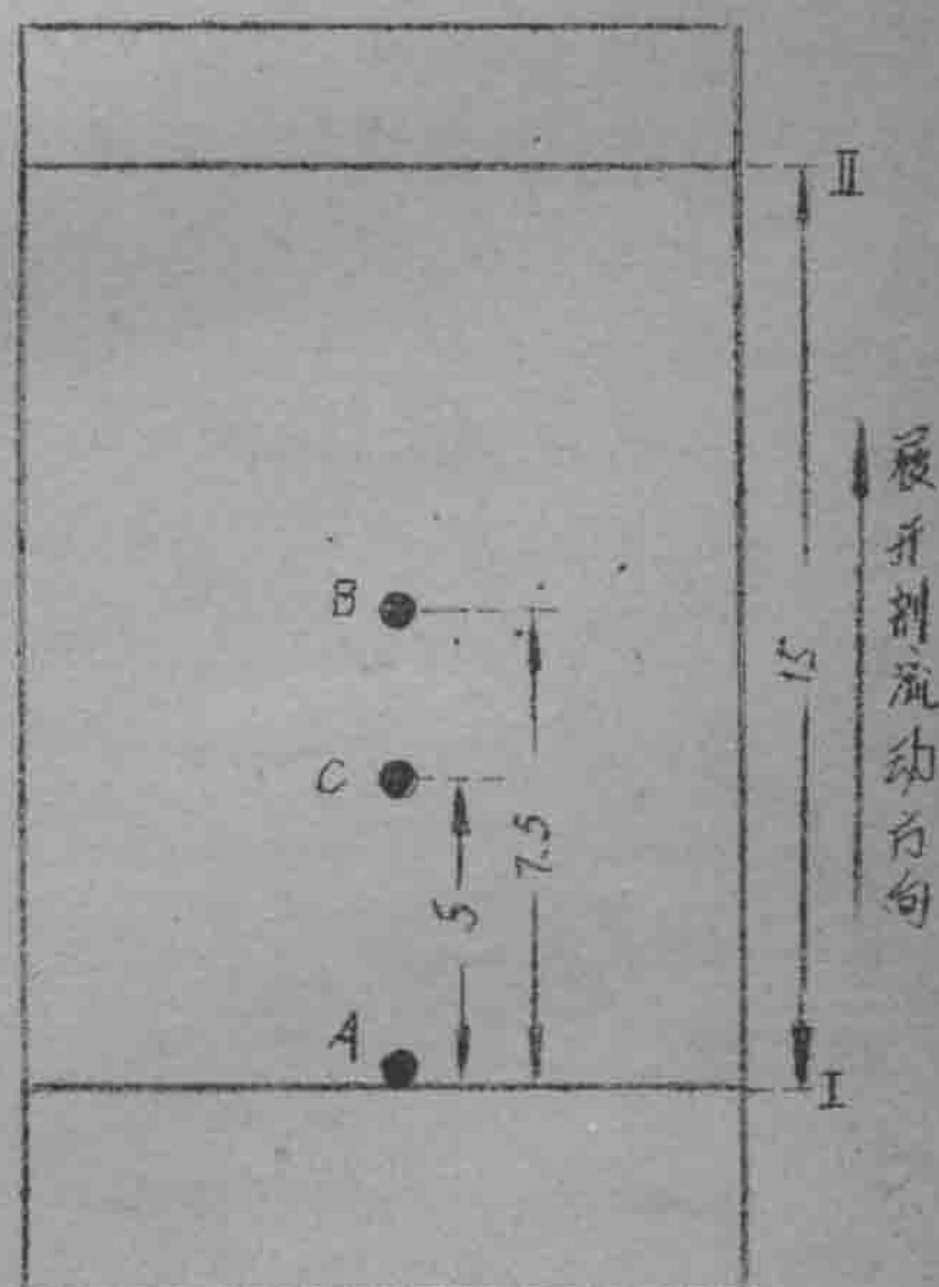


图1-1

其吸附能力对不同极性的物质，具有不同的吸附能力，例如氧化铝颗粒对极性大的物质吸附力强，对极性小的物质吸附能力相应地减弱。生物碱以阿乙甲乙素为例极性不同，乙素的极性 > 甲素，故氧化铝对乙素的吸附能力 > 甲素，当展开剂不断地流过原点(A)时，在原点上的甲乙素混合试样，对吸附剂氧化铝不断地发生：溶解——吸附——溶解——再溶解——再吸附——再溶解……的过程。如此循环往复，经过一定时间后，甲乙素就逐渐分开，甲素移动较快在前，乙素移动较慢在后，绘出色谱即得上述图谱。

所以用氧化铝或硅胶等作吸附剂的层离也叫做吸附层离，(另外用硅胶、纤维素等作支持剂的薄层层离亦称分配薄层层离，其原理见下章纸层离)。

因此我们可以知道在一定条件下，进行展开时，物质的极性越大，层离后的R_F值越小，相反，物质的极性越小，则R_F值就大了，这是因为物质极性越大，被吸附剂吸附的能力也就越强，则与展开剂亲和力减弱，随展开剂移动的距离亦小，故R_F值小(如乙素)，而极性小的化合物被吸附剂吸附的能力就较弱，则随展开剂移动的距离就大，故R_F值就大(如甲素)。

为什么以阿乙乙素的极性会 > 甲素呢？

因为一般的有机化合物的极性与分子结构中基团的类型和数目有关。常见的基团按其极性由小到大的顺序排列如下：

烷基 (—CH₃ , —CH₂—)

烯基 (—CH=CH—)

醚基 (—OCH₃ — OCH₂—)

酯基 (—COOR)

酮基 (>C=O)

醛基 (—CHO)

硫醇 (—SH)

胺基 (—NH₂)

醇基 (—OH)

酚基 (Ph—OH)

羧基 (—COOH)

极性由小到大的

在判断物质极性大小时，如果两个分子的基本母核相同，则分子中基团的极性越大，

整个分子的极性也大。分子中极性基团的数量越多，则整个分子的极性也越大。

所以汉经已甲素与乙素，它二个分子基本内核相同（见主核碱基例），差别在甲素具有一个（ $-\text{OCH}_3$ ）基团，而乙素为一个（ $-\text{OH}$ ）基团。我们知道（ $-\text{OH}$ ）的极性 $>$ （ $-\text{OCH}_3$ ）基团，故所以乙素的极性 $>$ 甲素。

相反，当分子中非极性基团占优势时，则整个分子的极性也就小了。如正丁醇与乙醇比较，二者的极性基团相同，都有（ $-\text{OH}$ ）基团，但正丁醇中的非极性基团为四个碳键，乙醇为二个碳。所以乙醇极性 $>$ 正丁醇。事实也如此乙醇可以与水任意混合，而正丁醇和水则分为二层，只能部分溶解。

各物质的 R_f 值（ R_f ）随操作条件的不同而改变。如层析性物质展开时， R_f 值对温度影响很大。因酸性条件下能抑制它的解离，降低它的极性，因而 R_f 值上升，相反 R_f 值增大在碱性下，由于形成了相应的盐，极性增大，因而 R_f 值下降，甚至于能使 $R_f=0$ （不能展开），因此我们不能把 R_f 值看作是其物质固定不变的物理常数，只有在相同操作条件下的 R_f 值才可作鉴定比较。

1-3 吸附剂

用于薄层分离的吸附剂（或支持剂）有氧化铝、硅胶、聚酰胺、纤维素、硅藻土等，其中氧化铝、硅胶能适用于各种化合物的分离鉴别，故应用最广。

为了控制薄层的厚度及得到恒定的 R_f 值，故选用吸附剂颗粒应大小均匀，约在200目左右，如果颗粒太大，则在展开时溶剂推进的速度太快，分离效果不好。反之，如果颗粒太细，展开时又太慢，得出不集中的斑点，分离效果也不好。若颗粒大小不一，则展开的前沿不齐，并得到畸形斑点，故颗粒大小应固定在一定范围内。

薄层用的氧化铝、硅胶都可以在市场上买到，氧化铝分为碱性、中性、酸性三种规格：

碱性氧化铝：适用于生物碱和中性物质的分离，对分离酸性物质及对碱不稳定的物质（如内酯、酯）不适用。

中性氧化铝：适用于生物碱、挥发油、苷类、糖类、萜类、某些酯及弱碱中不稳定的化合物。

酸性氧化铝：适用于酸性和一些中性物质，目前应用不多。

都可用硅胶代替使用。

硅胶：具有微酸性，吸附能力较氧化铝弱一些，可分离一些酸性或中性物质，如有机酸、氨基酸、糖类、维生素等。（它又能吸收本身重量 50% 以上的水份，可作为分配薄层层离中作支持剂用）

聚酰胺：适用于黄酮类、酚性等化合物的分离。

硅藻土、纤维素主要是分配层离，利用它们作载体，可以吸附水或缓冲液、甲酰胺等而用于薄层层离。

氧化铝的活性与活化：

供层离用的氧化铝可分成五级，其活性大小与含水量有关，水份增大，活性下降吸附能力变弱，反之水份减小，其吸附能力增强。故可以用加热除去水份增强它的活性，或者因加入足量的水份在密闭容器中振荡均匀，放置 3-4 小时的方法来调整它的活性，以供使用，其关系见下表

表 1-1 氧化铝和硅胶的含水量与活性关系

氧化铝加入水量%	活 性	硅胶加入水量%
0	I	0
3	II	5
6	III	15
10	IV	25
15	V	35

活化方法：

一般将需活化的氧化铝置于 200°C 左右电炉内，加热 6 小时后取出，置于干燥密闭的容器中，冷却，备用，得到的氧化铝活性在 I~II 级左右。须注意的是加热温度不可超过 500°C 以上，否则氧化铝表面活性破坏，其活性反而下降。

氧化铝活性测定方法：

薄层层离法：

取 0.02 毫升偶氮染料液（偶氮苯 30 毫克、对甲氧基偶氮苯、苏丹黄、苏丹红、对氨基偶氮苯各 20 毫克溶于 50 毫升重蒸干燥的四氯化碳中）点加到氧化铝薄层板上（薄层厚 0.6

系水)，用干燥四氯化碳提取，根据其展开的R_F值而确定其性质（见表1-2）

表1-2 氧化铝和偶氮染料R_F值的关系（×100）

偶氮染料 \ 活性类别	I	II	IV	V
偶氮苯	59	74	85	15
对甲基偶氮苯	16	49	69	84
苏丹黄	1	25	57	78
苏丹红	0	10	33	56
对氨基偶氮苯	0	3	8	19

氧化铝柱法：

取各种染料偶氮苯（1）、对甲基偶氮苯（2）、苏丹黄（3）、苏丹红（4）、对氨基偶氮苯（5）、对羟基偶氮苯（6），各20毫克溶于10毫升苯中，加干燥石油醚（沸程60-90℃）稀释至50毫升，然后取10毫升此溶液，分别通过内径为1.5厘米，长10~15厘米的层析柱，其中装有5厘米高的待测活性的氧化铝，待溶液全部通过，立即以20毫升干燥的石油醚及苯（4:1）混合液洗脱，流速为20~30滴/分，然后根据染料在氧化铝柱中的位置（见表1-3），判断氧化铝的活性。

表1-3 测定氧化铝活性简表

活性类别	I	II	III	IV	V
柱顶吸附	0	3	4	5	6
柱底吸附	1	2	3	4	5
流出液中	x	1	2	3	4

硅胶的活性测定，亦可采用柱层析法。

3-1-4 展 开 剂

层析的结果与展开剂的选择关系极大，各种极性不同的溶剂，都可作为展开剂来使用，通常极性小的溶剂，对被分离的

混合样品中极性小的物质亲和力强。在展开过程中使它移动较快。从而与一些极性较大的物质加以分离，达到分离鉴别的目的。同理：对极性大的溶剂来讲，也由于对不同极性物质的亲和力和不同，使它移动分离。但在实际工作上，还要考虑吸附剂的影响，通常对要求分离极性小的物质时，一般选用吸附活性大些的吸附剂，以极性小的溶剂作展开剂。反之分离极性大的物质，选用吸附活性小的吸附剂，以极性大的溶剂作展开剂。但物质的极性，吸附剂的吸附活性在一定情况下均是固定时，所以主要是根据展开剂的极性大小来选择，先可以用单独一种溶剂来展开，再如加其它溶剂，使其极性加大或减小。例如，某物质用氯仿去展开，发现所得R_F值太大（一般希望R_F在0.2~0.8间），即选用的展开剂极性太大，则可用极性小些的苯：氯仿=1:1混合溶剂去展开。若所得R_F值太小，即选用的展开剂极性太小，则可加入甲醇，增加展开剂的极性去展开，可经过多次实验寻找出分离效果最适宜的展开剂。并且要求在分离二个以上的混合物时，它们R_F值的差别，最好>0.05，以免斑点重叠。

常用溶剂的极性次序是：

己烷（石油醚）<四氯化碳<甲苯<苯<二氯甲烷<乙醚<氯仿<叔丁醇<醋酸乙酯<正丁醇<丙酮<异丙醇、无水乙醇<甲醇<水<吡啶<有机酸类<酸碱的水醇液等。

作展开剂的溶剂应该是具有一定规格的纯品，如乙醚中含少量水或氯仿中含有少量乙醇都大大改变它的分离能力，通常用重蒸馏或干燥脱水方法处理。若配制混合溶剂应具有固定配比，均匀混合，并且在严格要求时只使用一次，不然都会使实验结果不易重现。在作酸或碱性物质的层析时，常在展开剂中加入酸性物质（甲酸、醋酸、磷酸）、碱性物质（二乙胺、氨水、吡啶）来展开。

§ 1-5 操作方法

一、制板

常用薄板可分加粘合剂的硬板和不加粘合剂的软板两种板型。

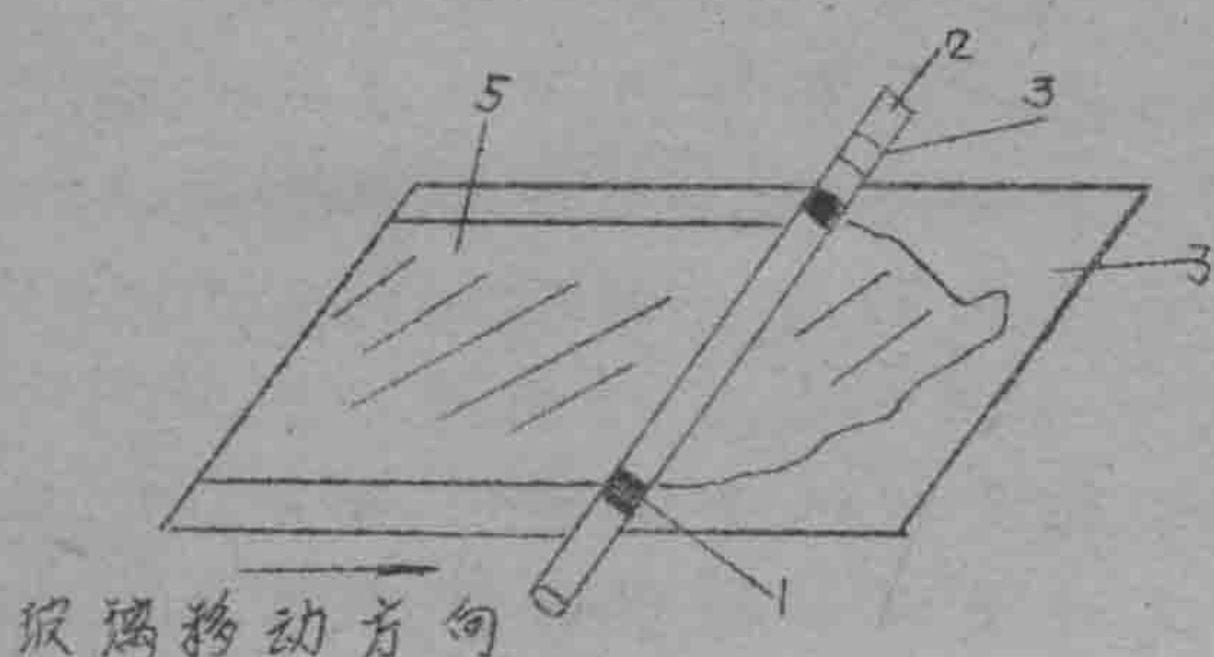
薄板所用的玻璃板大小均可自由选择，小的有10厘米片，大的有20×20厘米左右。主要根据分析工作实际需要选用。玻

玻璃板表面光滑，边缘整齐，清洁，若附有杂质，则刮得硬板吸附剂易剥落。

1. 软板的制备

选用一根直径约1厘米左右玻璃管，在两端绕以圈胶布，胶布的厚度视所需的薄层厚度而定，通常在0.25到1毫米左右。

把干的吸附剂倒在玻璃板上，玻璃板一端固定，防止移动。然后用玻璃管压在玻璃板上，把吸附剂顺一个方向推动，即成薄层（见图1-2）制成的薄层必须光滑、平整、厚度均匀，才能获得良好分离效果。



1. 胶布卷或铜卷（厚0.25~1毫米）
2. 直径均匀玻璃管
3. 玻璃板
4. 防止玻璃滑动的卷
5. 制成的薄层

最好用环形铜片套在玻璃管两端，以螺丝固定距离，这样只需调节铜片距离，可制得不同宽度的薄层。

图1-2 软板的制备

由于聚酰胺、纤维素较轻，干推较难，常加入溶剂调成糊状，湿推制板，待溶剂挥发后使用。另也有用纤维素粉加水调成糊状，湿推制板，室温干燥后使用。

2. 硬板的制备

软板的制备方法比硬板方便，但由于无粘合剂，薄层易吹散、松散，并只能安放于近水平方向展开，而硬板无此缺点，实际工作中应用很广。

氧化铝、硅胶常加入的粘合剂有：铍石膏（G），羧甲基纤维素（CMC），淀粉等，用铍石膏制成硬薄板，其机械性能较差，易脱落，但能耐强腐蚀性试剂的作用，反之，用CMC、淀粉的薄板机械性能较强，可用铅笔写字，用CMC的板甚至用水冲洗也无碍，但它们都不宜在用强腐蚀性试剂时加垫。

制板的方法：先在研钵中调制好研磨均匀的吸附剂，可先加入几滴乙醇，防止气泡，放置片刻后，倾倒入适量（使厚度适当）在清洁的玻璃板上，用手将玻璃板按一个方向推动，使吸附剂

均匀涂在板上，这是一个关键，制得薄板表面要光滑，无水层，不含气泡，放置在水平台面上，空气干燥后进行处理，亦有并放两块3毫米厚的玻璃，中间夹一块2毫米玻璃，把吸附剂倒在中间的玻璃片上，然后用另一块边缘光滑的玻璃片，把吸附剂刮匀一边，空气干燥后即可。

吸附剂与水块比例及活化条件，无统一规定，均是按各工作者实际操作经验决定的，加水块量太少，凝结太快会给制板时带来操作上的麻烦，而加水量太多时，必须防止吸附剂在板未凝结前下沉，制得不均匀的薄板，故加水量要适当。

一般常用：

氧化铝：0.5% CMC = 1克：1.5 ~ 2 毫升 110℃ 活化 20 分钟。

硅胶：0.5% CMC = 1克：2 ~ 2.5 毫升 110℃ 活化 20 分钟。

制得的薄板一般均先空气干燥或 60℃ 以下干燥后再进行活化。

在实践中很多分析工作者均因定制板条件不利造成，直接使用。也有空气干燥后不活化直接使用，也获得良好的分离效果。

活化处理后薄板置于干燥器中备用。

有时上述薄层尚不能达到分离效果，可在吸附剂中加入硅胶、碱液或缓冲液，以改变吸附性能，而达到分离目的。有的物质（本身无荧光）找不到合适的显色剂，而在薄层上喷荧光物质（0.04% 荧光钠水液或 0.5% 桑色素乙醇液等），这样在紫外光背景下，被鉴试样呈现暗色斑点，也特别适用于酯类、醛类、酮类等物质的检出较为普遍。

3. 聚酰胺薄膜的制备

生物研究所应用聚酰胺薄膜成功地分离了许多氨基酸衍生物，聚酰胺薄膜具有灵敏度高、速度快等优点，超过了过去对这类化合物分析所用的纸层析、纸电泳、硅胶薄板等方法，它还能用于鉴别酚类、酯类、硝基化合物、羧类等化合物。

聚酰胺薄膜是将 20% 聚酰胺甲酰胺溶液，涂在玻璃片基上，当甲酰胺挥发后，在片基上形成一层均匀紧密的多孔薄膜（厚 0.15 mm）。层离展开时，展开剂沿着细孔行散，如聚酰胺溶液浓度过高细孔较少，展开速度慢，反之，浓度过低，膜就疏松，孔多，展开速度过快，被分离物质易扩散，故一般采用高浓度

量的聚酰胺配成 20% 浓度为宜。

涤纶片基的处理：用 10% NaOH : 95% 乙醇 = 1:1，溶液浸泡过夜，除去片基表面上的苯丁树脂和油质，直至表面不挂灰为上。

制膜方法：

将洗净的涤纶片基，趁湿紧贴在玻璃板上，片基约 0.1 mm 厚，在片基右侧贴上宽 0.1 mm 的聚氯乙炔条，待片基表面晾干后，置于通风橱中，一盛可调节水平位置的玻璃板上，将聚酰胺溶液倒在片基上，用玻璃棒推动，使液体均匀铺在片基上，甲酸是极易挥发具腐蚀性的酸，故操作时应注意安全，让甲酸慢慢挥发过夜，次日，在空气中吹干裁成所需大小，备用即可。

20g 聚酰胺可制膜面积为 $50 \times 90 \text{ cm}^2$ 。

层析时可在膜上用炭画铅笔书写与标记，操作时可将膜卷成圆筒形，膜在内层，底面在外层，外套上一个涤纶圈，置于层析缸中进行层析。

薄膜的再生：

用丙酮与次氯水 1:1 或丙酮与甲酸 1:1 的溶液浸泡 6 小时，再用乙醇洗滌，晾干后即可。如膜的表面保护得好，可反复同至 10 多次，即使膜损坏，还可再用上述洗液或浓盐酸浸泡，除去薄膜回收片基，这样就更节约了。

不同片基也可用玻璃片，使用方便效果也很好，有人反复再生使用多达三十多次，制备方法同上。

在制薄层让甲酸挥发过程中，可在水平板下垫放 30℃ 左右水浴，在有水蒸汽情况下，让甲酸缓缓挥发，使形成细孔均匀一致。

二、点样

将样品用合适的溶剂溶解，尽量避免用水，因水溶液易扩散，并且不易挥发除去，而影响吸附剂的活性。一般用乙醇、丙酮、氯仿，最好采用与展开剂极性相近的溶剂或低沸点的溶剂。若样品已是溶液，一般均直接点样。

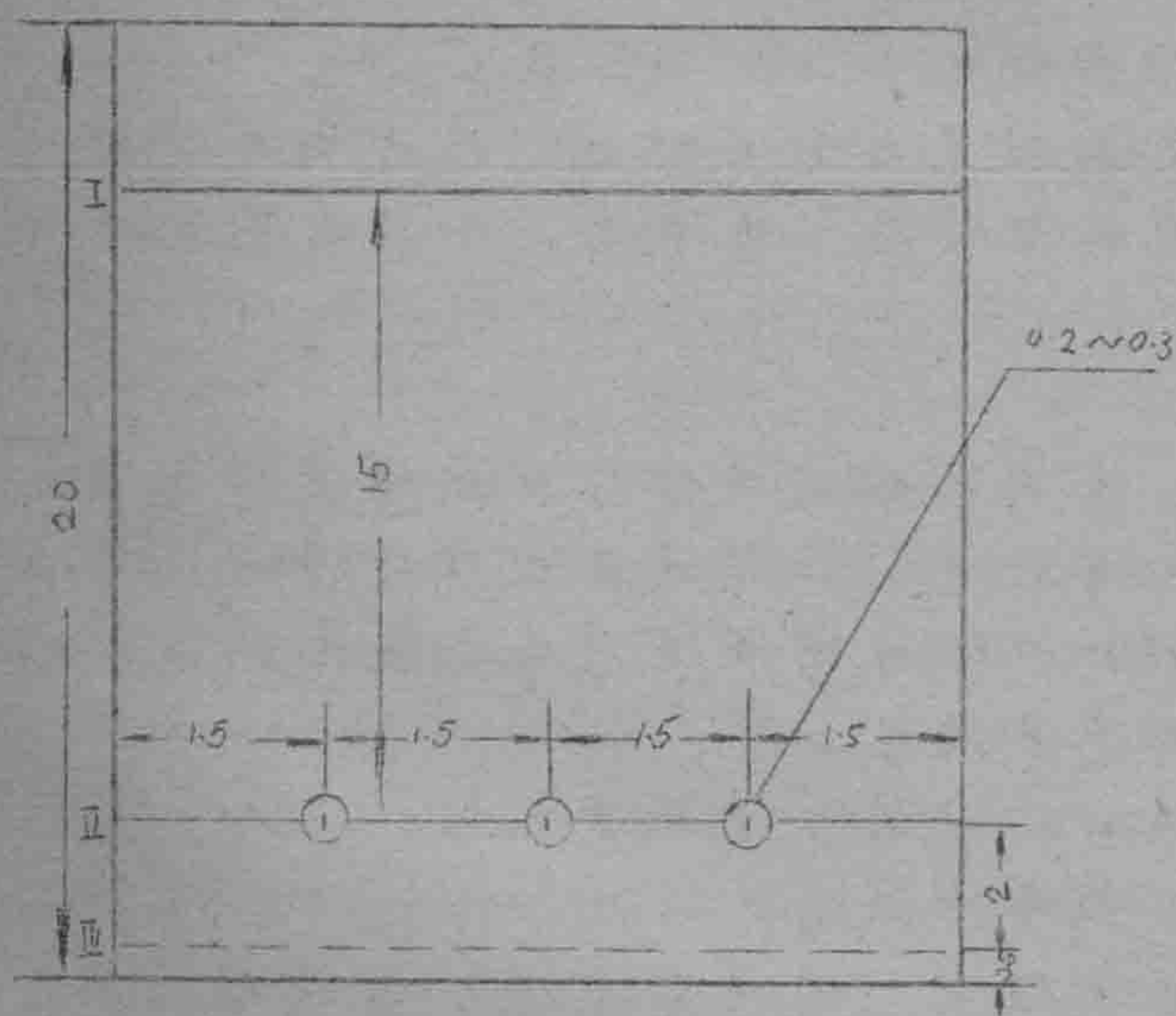
样品量多少才合适，须多次实践才能决定。因所加样品的量与显色剂的灵敏度，吸附剂的性能，薄层厚度有关。样品量太少时，含量少的成份不易检出，太多时，又容易产生斑尾扩散或拖尾现象，影响分离效果。一般在 50 微克左右。每次加样

后，点样斑点直径不超过 $2 \sim 3$ 毫米。

试样溶液也不宜过稀，因重复点加时间过长，易使原样品扩散，影响鉴别。

点样方法可用内径 1 毫米左右管口平整的毛细管，吸取试样液，轻轻接触到薄层的起始线处。让溶剂自然挥发干后，（或用电吹吹干），再去展开。

几个样品同时点在一块板上时，须在同一起始直线上，点样的间隔为 1.5 厘米左右，靠边缘的点样点不能距边过近，以免误差。（见图 1-2）



I 前缘线
II 起始线
III 展开剂浸入高度（单位：厘米）

三、展开
容器：形状可自由选择，常用的是长方形玻璃缸或大试管。要求密闭，小体积的通常均预先加入展开剂，待溶剂蒸气达到饱和后再进行层析。

方法：上行法：薄板直接浸入展开剂中

进行展开。

下行法：展开剂自薄板上端渐渐向下展开，展开速度较上行法快。

双向展开：先后两个不同方向（垂直方向），同同一种或两种展开剂展开。

多次展开：同一个方向，多次用不同展开剂展开。

上行法应用较广，玻璃板只能同近水平（ $10 \sim 20^\circ$ 角）上行或下行展开。展开时薄板上点样点不能浸入溶剂中，一般距溶剂液面约 2 厘米。薄板浸入溶剂 0.5 厘米左右，展开时间亦各不相同，一般展开 30 分钟，展距约 $10 \sim 15$ 厘米左右，取出在前缘线处作记后用电吹风或放干燥箱中干燥，溶剂的存在通常会影

响显色效果。例如在有机酸分离时，加入了甲酸或乙酸，若不除去，那整个薄板都显色，无法进行鉴别，但亦有很多在溶剂存在下显色的。

四、显色

通常先在日光下观察，划出有色物质的斑点位置，然后在紫外光下观察荧光斑点，并用小针或铅笔作记，最后利用各物质的特性反应，使之显色，再于日光或紫外光下观察斑点显色情况，加以鉴别。

软板：

1. 喷雾法：因软板未加粘合剂，当薄层展开结束后，趁展开剂尚未挥发完全，吸附剂呈潮湿状态时，立即喷雾显色剂，再观察斑点。使用低沸点的展开剂如乙醚、丙酮时，操作格外要注意，切勿吹散薄层。

2. 碘蒸气法：展开后，让展开剂挥发完全，放置在用碘蒸气饱和的密闭器皿中，显色，许多有机物能与碘生成棕色斑点。

3. 压板法：展开后，让展开剂尚未全部挥发，残留少许时，取另一同样大小清洁玻璃板，上涂均匀的显色剂，即覆盖在薄层上压紧，使之显色。须注意的是：残留的展开剂须适当，太干，吸附剂粘在另一玻璃板上，而破坏色谱；太潮，不能立即显色，或得到不清晰的色谱。而选用的显色剂粘度须较大些，才能在玻璃板上涂成一层均匀薄层，涂的量也要适当，太少，显色不完全，太多，则使吸附剂糊化，这些均需多次实验才能获得满意结果。

4. 侧吹法：展开后，让展开剂挥发后，将薄层一侧微微浸入显色剂中，以与展开方向相垂直地进行侧吹显色。显色剂很快地扩散至全部薄层，取出，加热干燥，即可显出清晰的斑点。但若被检物能被显色剂展开时，此法即不能采用。

硬板：

通常将显色剂直接喷雾于硬板上，根据显色剂的不同，有立即显色，亦有须加热至一定温度才显色。

一些化合物的常用显色剂，见“中草药有效成份提取和分离”一书附录，如各种方法都不能显色，可从用紫外光背景法或加热显色法。

§1-6 薄层层析在提取与分离工作中的应用

一、用于鉴定工作：

单一化合物的鉴别，可与标准品对照，通常采用几种不同展开剂展开将化合物推至板的不同位置（前、中、后），观察结果，只有待检样品在几种条件下都得到单一色斑，而且 R_f 值与标准品一致时，方可认定为同一化合物。

在鉴定混合物时，理想的结果是：检出的组分数目最多，布满全板，斑点圆而集中，斑点之间界限清晰。但实际工作中，这样理想结果是难以做到的，通常采用下列方法补充。

1. 适当延长展开距离

2. 径向薄层

方法如图 1-4 所示，刮去板上点线以外部分时，再进行点样，展开后斑点成为条带状，有利于鉴定。

3. 多次展开

第一次，可用极性稍强溶剂展开，使样品中极性大的组分分开，被推至溶剂前沿处堆积，当展开至全薄层长的 $1/2$ 处，取出样品溶剂至干，再按同一方向，用极性较小的溶剂作第二次展开推至薄层尽头，这时可以进一步分离。

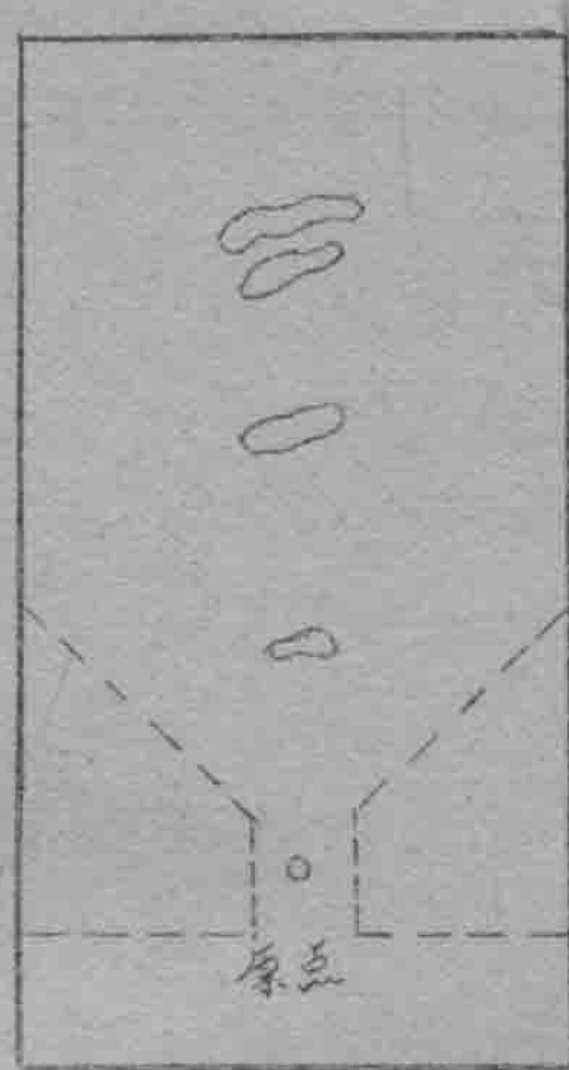


图 1-4

4. 双向展开

取一块正方形薄板，在一角距两边各为 2cm 处点上样品，先按①方向用一种展开剂展开，然后让挥发溶剂，再按②方向，用另一种溶剂展开。

5. 如上面几种方法都不行，则可将样品用几种极性不同的溶剂进行分部萃取，粗分几个简单部位后，再分别进行薄层层析。

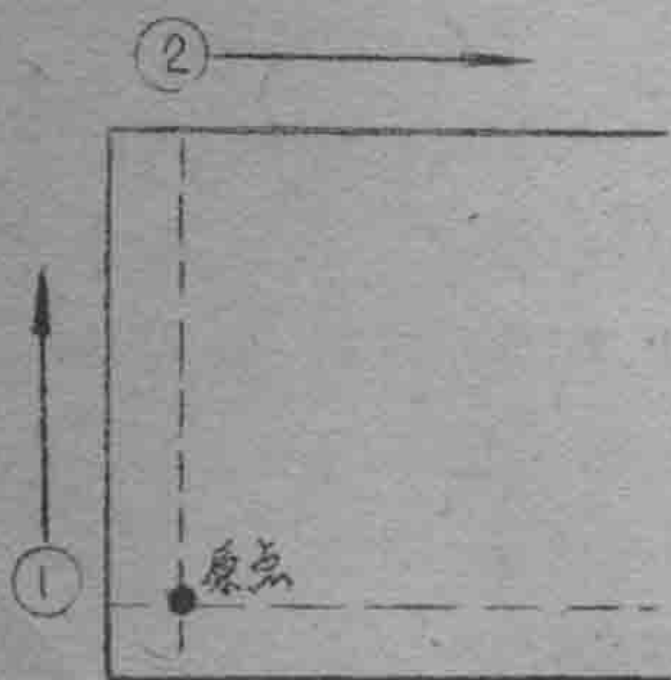


图 1-5

二、用于微量制备

在加厚薄层增加点样量后，可用于微量制备，尤其在目前紫外、红外、核磁共振、质谱等技术较普遍应用，大大简化了

微量成分的鉴定工作，因此制备性的薄层在中草药的提纯工作中就显得格外具有实际意义了。

三、用于含量测定

四、用于指导选择柱层离的分离条件：

一般吸附薄层用以指导吸附柱层离，分配薄层用以指导分配柱层离。

例如：南京药学院中草药化学组在分析喜树的提取物时，薄层鉴定发现有A、B、C三种成份（见图1-6），经与标准对照知（B）为喜树碱，另两成份不详，当即考虑用柱层分离后再进行鉴定，为了选择柱层分离条件，采用硅胶（100）薄层，用不同溶剂展开，得到下列结果：（图1-6）

R_f 展开剂	A	B	C
① 苯—氯仿 (1:1)	0.08	0	0
② 氯仿	0.26	0.06	0.06
③ 氯仿—丙酮 (9:1)	0.50	0.39	0.16
④ 氯仿—丙酮 (9:2)	0.90	0.48	0.16
⑤ 氯仿—甲醇	0.56	0.55	0.24

			A	
		A	B	A ^A _B
		B		C
	A ^A _{BC}	A ^A _{BC}	C	
①	②	③	④	⑤

图 1-6

显然，从薄层分离效果来看，③④两个系统最好，三个组份界线清晰，但同样条件搬到相应的硅胶柱上，因三者均可移动，操作麻烦，结果并不太好，对柱层来讲：最好能吸混合物中某单一组份，其余留在原点不动，因此考虑在硅胶柱上，先用溶剂①洗脱（A）组份，再改用极性稍大的溶剂②及⑤（其中甲醇在混合液中的比例逐步递增，但最多不超过5%）洗脱（B）（C），分别分离洗脱下柱，以上设想通过实践得到了证明，最后分得（A）（B）（C）三种单体，通过鉴别，确证（A）为三酯，（C）为羟基喜树碱。

目前“干柱层析”方法有了很大的发展，可以直接应用薄层层析的条件，取得与薄层一致的分层效果。

第二章 纸上层析法

§ 2-1 基本原理

在中草药各种成份的提取与分离过程中，除了使用薄层层析外，亦经常使用纸上层析法。它是利用滤纸作为持剂（载体），由于滤纸是由纤维素构成的，分子中羟基很多，具有极强的亲水性，常能吸附 20% 左右的水份，在一般条件下较难脱去，这便构成了层析过程中的水相（固定相），当展开剂（流动相）从滤纸的一端向另一端移动时，被分离的物质就在二相之间进行连续分配（相似于连续性的液——液萃取过程），因分配系数的不同，

$$\left(\text{分配系数} = \frac{\text{物质在流动相中的浓度}}{\text{物质在固定相中的浓度}} \right)$$

当展开一定时间后，混合样品中各成份跟随流动相移动的距离亦不同，从而达到分离的目的。

所以纸上层析是属分配层析，能很好分离亲水溶性物质，如糖和氨基酸等，亦有在分离极性很小物质时，采用石蜡法、硅胶法等作固定相，以水或有机溶剂作流动相，这种方法称反相纸上分配层析。

纸上层析法，它操作方便，无要制板这一手续，不过展开的时间较长，对温度等的操作条件要求比薄层层析严格，不然重现性不好。

§ 2-2 操作方法

一、层析纸

1、要求纸张厚薄均匀，平整，无折痕，边缘整齐，使展开速度均匀适当。

2、滤纸纤维的松紧程度适中，太松易使斑点扩散，太紧则流速太慢，若遇粘度大的展开剂时，则展开时间更长。

3、纸质要纯，杂质不可含得太多，并无明显的荧光斑点。