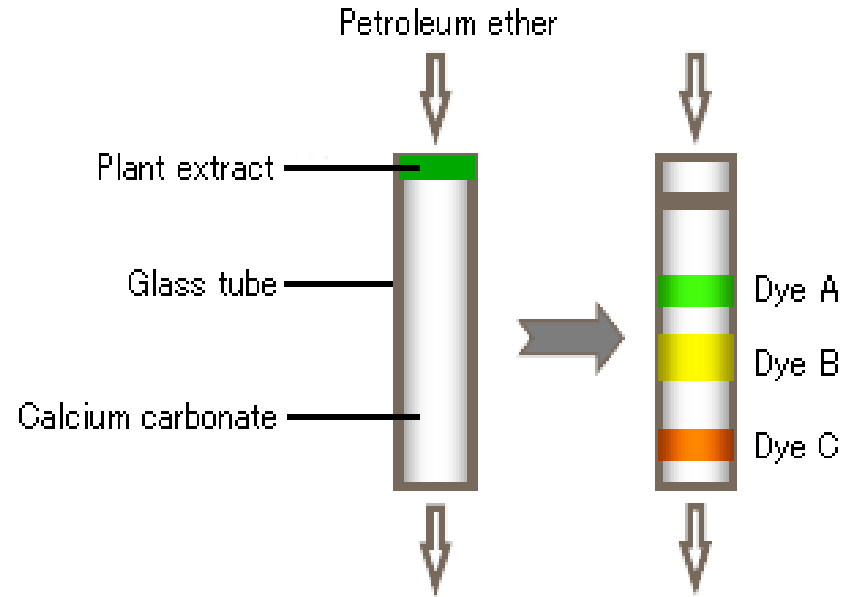
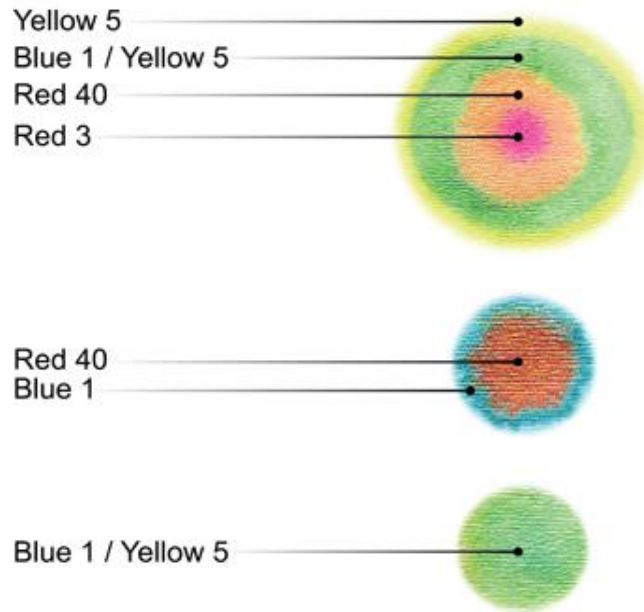


柱色谱

Column Chromatography

一、色谱简介——历史



1900年以前：发现混合颜色可在纸上扩散并形成色带。

1905年，俄国植物学家**米哈伊尔.茨维特** (M.G. Tswett) 实现了植物色素的分离。

1906年，米哈伊尔.茨维特命名此方法为**色谱法** (*Chromatography*) 。

一、色谱简介——用途



- ◆ 色谱法是**分离**、**提纯**和**鉴定**有机化合物的重要方法之一
- ◆ 2项诺贝尔化学奖——色谱法
- ◆ 12项诺贝尔化学奖——与色谱法直接相关

一、色谱简介——分类

按操作方式：

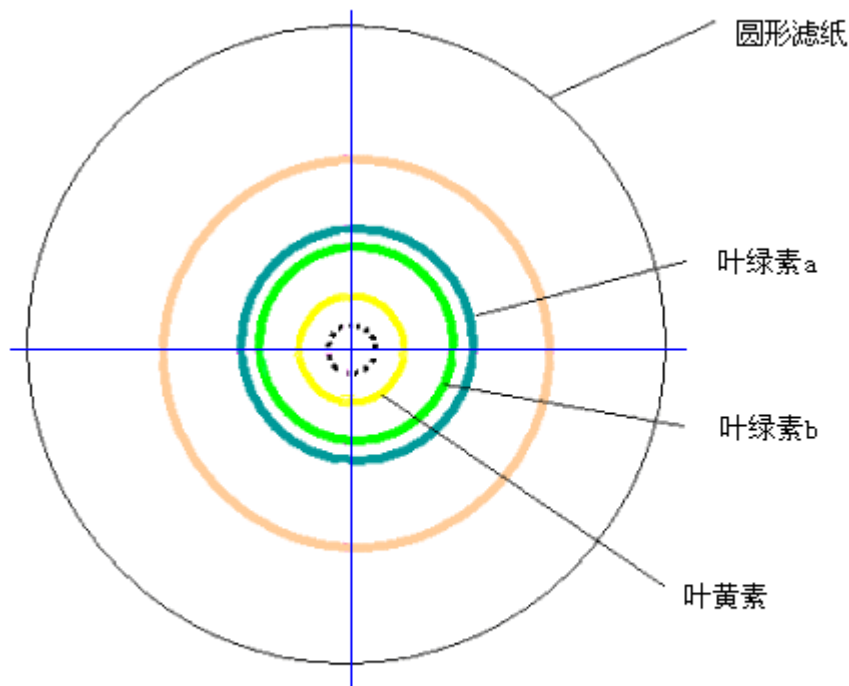
◆ 纸色谱

◆ 薄层色谱

◆ 柱色谱

◆ 气相色谱

◆ 液相色谱



菠菜提取液的辐射纸色谱

新华1#滤纸，石油醚—乙醚—甲醇（30：10：0.5）展开剂

一、色谱简介——分类

按使用方式：

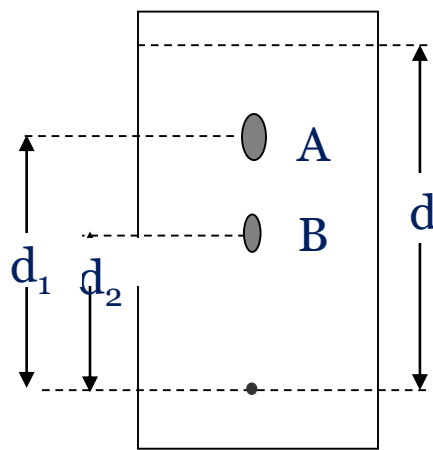
◆ 纸色谱

◆ 薄层色谱 (TLC)

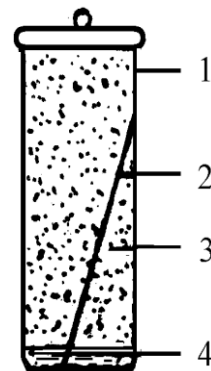
◆ 柱色谱

◆ 气相色谱

◆ 液相色谱



薄层色谱示意图



1-层析缸; 2-薄层板;

3-展开剂蒸气; 4-展开剂

图3 直立式层析缸示意图

TLC主要用途：

(1)判断两个化合物是否相同

(2)确定混合物中含有的组分数

(3)为柱色谱选择展开剂,监视柱色谱分离效果

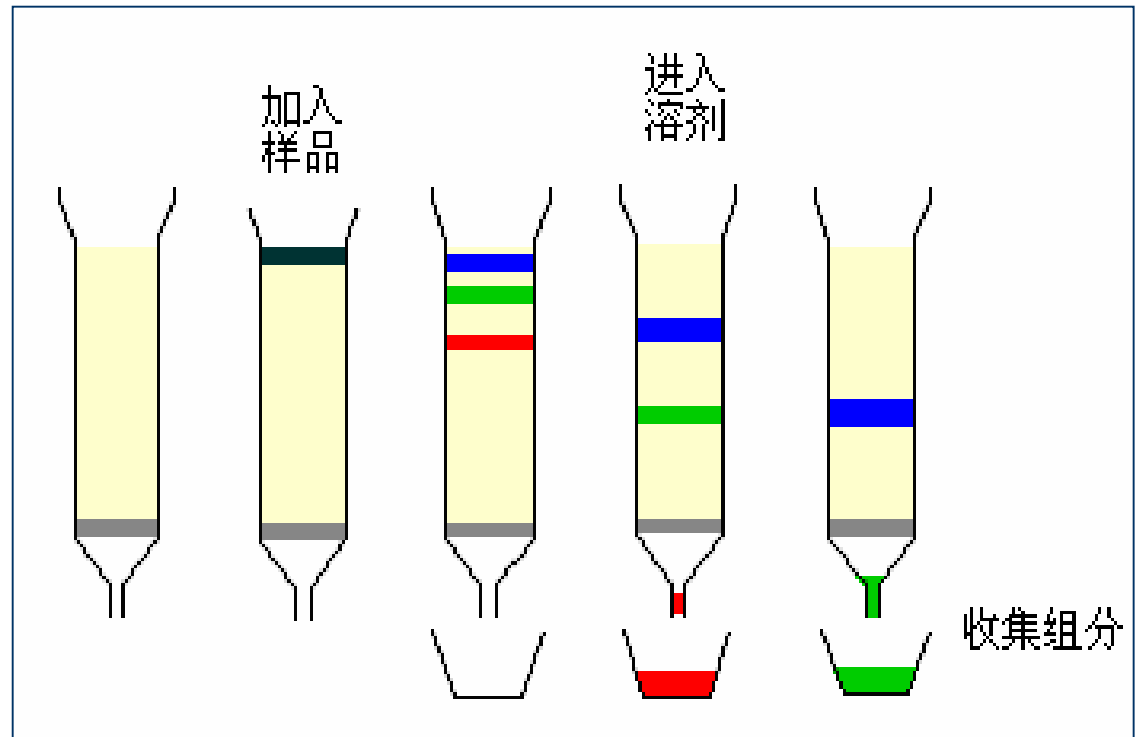
(4)检测反应过程

(5)分离少量化合物

一、色谱简介——分类

按使用方式：

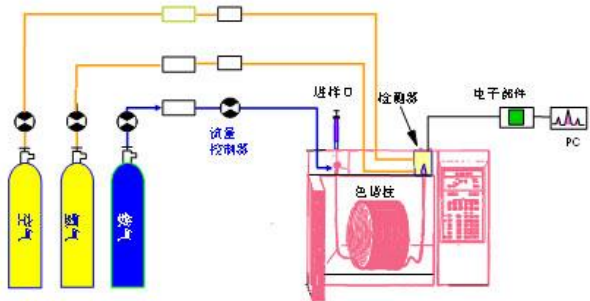
- ◆ 纸色谱
- ◆ 薄层色谱
- ◆ 柱色谱
- ◆ 气相色谱
- ◆ 液相色谱



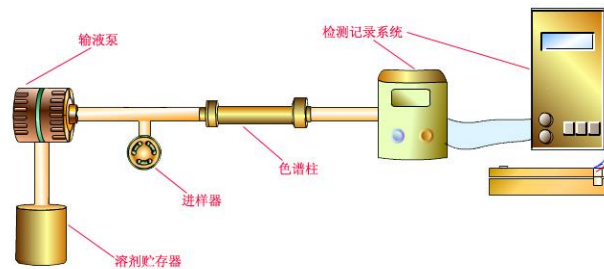
一、色谱简介——分类

按使用方式：

- ◆ 纸色谱
- ◆ 薄层色谱
- ◆ 柱色谱
- ◆ 气相色谱
- ◆ 液相色谱



高效气相色谱仪



高效液相色谱仪

一、色谱简介——原理

分离原理

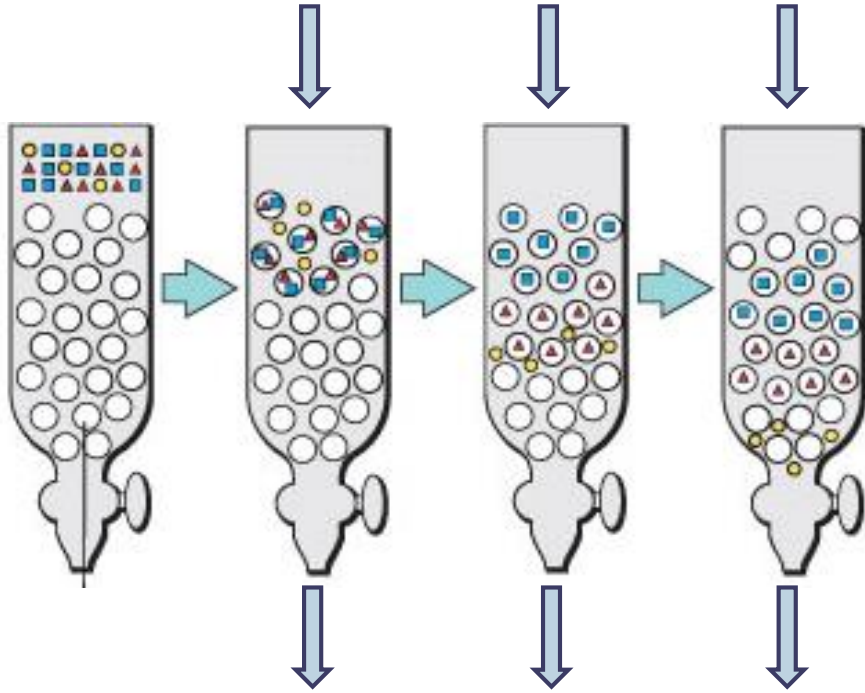
- ◆ 吸附色谱 吸附能力的差异
- ◆ 排阻色谱 分子尺寸大小的不同
- ◆ 分配色谱 两相中分配系数的不同
- ◆ 离子交换色谱 离子交换能力的差异
- ◆ 其它

□ **色谱法**是利用混合物中各组分在某一物质中的吸附或溶解性能（即分配）的不同，或者其他亲和作用性能的差异，使混合物的溶液流经该种物质，进行反复的吸附或分配等作用，从而将各组分分开。

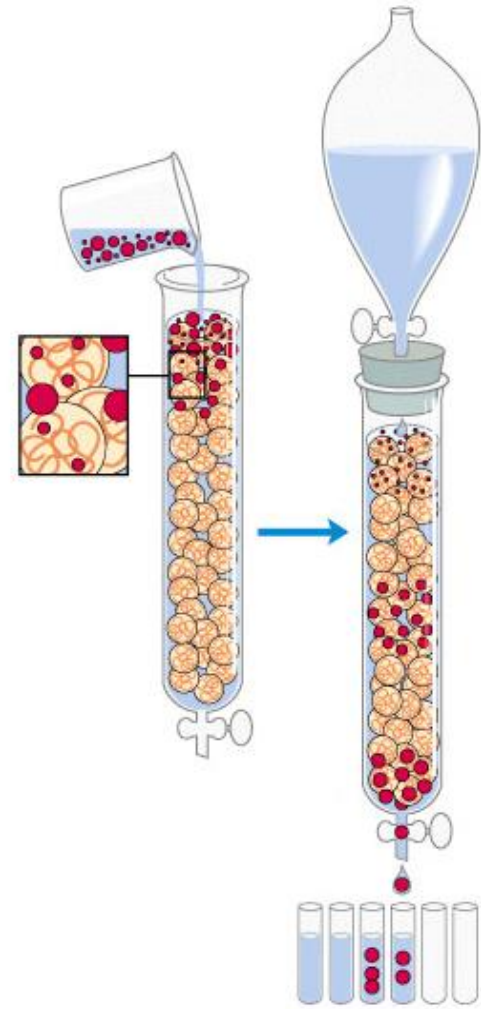
□ 其中流动的体系成为**流动相**，流动相可以是液体，也可以是气体。

□ 固定的物质称为**固定相**，可以是固体，也可以是液体（吸附在支持剂上）。

一、色谱简介——原理



吸附色谱示意图



排阻色谱示意图

二、吸附色谱——三要素

吸附剂（固定相）

洗脱剂（流动相）

试样

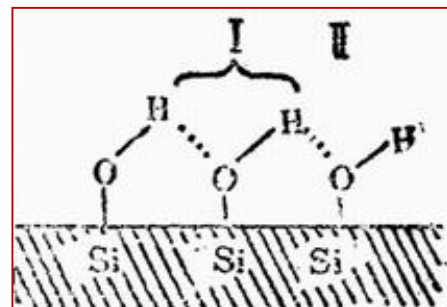
(1) 硅胶 (silica gel)

- 由弹性多聚硅酸脱水制成，其吸附中心是硅醇基
- 性能稳定、惰性、吸附容量大、易制成不同尺寸的颗粒
- 可用于分离酸性和中性物质

(2) 氧化铝 (alumina)

- 由氢氧化铝在300~400°C时脱水制得
- 分为中性、酸性和碱性三种，适用不同性质的试样

(3) 其它：活性炭、聚酰胺、纤维素、硅藻土、硅酸镁等。



二、吸附色谱——三要素

吸附剂（固定相）

洗脱剂（流动相）

试样

吸附剂的基本要求：

- 具有适度的活性较大的比表面积。
- 与洗脱剂及被分离物质不起化学反应。
- 不溶于洗脱剂中。
- 要有一定的均匀粒度。

二、吸附色谱——三要素

吸附剂（固定相）

洗脱剂（流动相）

试样

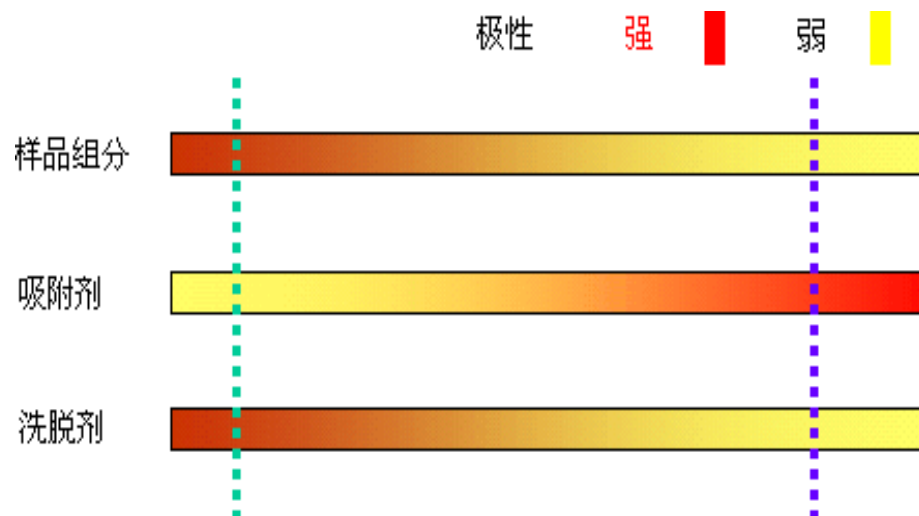
试样与固定相间的吸附力应适当：

如二者吸附太强，则不易将试样从吸附剂上洗脱，会造成试样损失；如二者吸附太弱，则分离效果较差。

选择规律：

样品极性较大，则应选用吸附性较弱（即活性较低）的吸附剂，用极性较大的溶剂进行洗脱。

组分的极性较弱，应选用吸附性较强（即活性较高）的吸附剂，用极性较小的溶剂进行洗脱。



二、吸附色谱——三要素

吸附剂（固定相）

洗脱剂（流动相）

试样

A. 单一溶剂洗脱

石油醚、正己烷 < 二氯甲烷 < 氯仿 < 乙酸乙酯 < 丙酮 < 异丙醇 < 乙醇 < 甲醇

非极性溶剂 | 中等极性溶剂 | 强极性溶剂

B. 混合溶剂洗脱（常用）

石油醚/乙酸乙酯, 石油醚/丙酮, 石油醚/二氯甲烷, 二氯甲烷/ 甲醇, 等等

- 除了“极性”，洗脱剂对试样的“溶解性”要好。
- TLC可为柱色谱选择展开剂（ $R_f \approx 0.2-0.6$ ），监视柱色谱分离效果。

二、吸附色谱——三要素

吸附剂（固定相）

洗脱剂（流动相）

试样

试样成分的性质：

- 在给定的条件下，各个成分的分离情况，与被分离物质的结构和性质有关。
- 对极性吸附剂而言，被分离物质的极性越大，两者吸附作用也越强。
- 具有极性基团的化合物，其吸附能力按下列顺序增加：

Cl^- , Br^- , $\text{I}^- < \text{C}=\text{C} < -\text{OCH}_3 < -\text{CO}_2\text{R} < \text{C}=\text{O}, -\text{CHO} < -\text{SH} < -\text{NH}_2 < -\text{OH} < \text{CO}_2\text{H}$

含有的极性基团相同，分子量较大的化合物移动较慢。

吸附能力最弱的组分随洗脱剂首先流出

三、柱层析操作

- (1) 装柱
- (2) 加样
- (3) 洗脱与分离
- (4) 检测合并

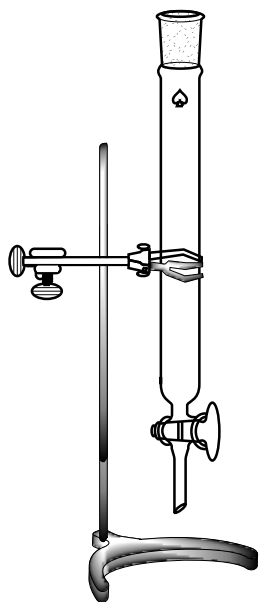


三、柱层析操作

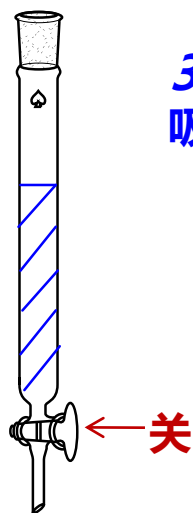
(1) 装柱——A、湿法装柱

为什么使用低极性溶剂调吸附剂？

加石英砂目的？



1. 固定柱子



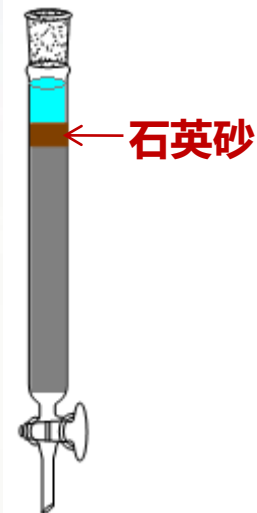
2. 加入约3/4低极性洗脱剂

3. 低极性洗脱剂将吸附剂调成糊状



4. 倒入柱中

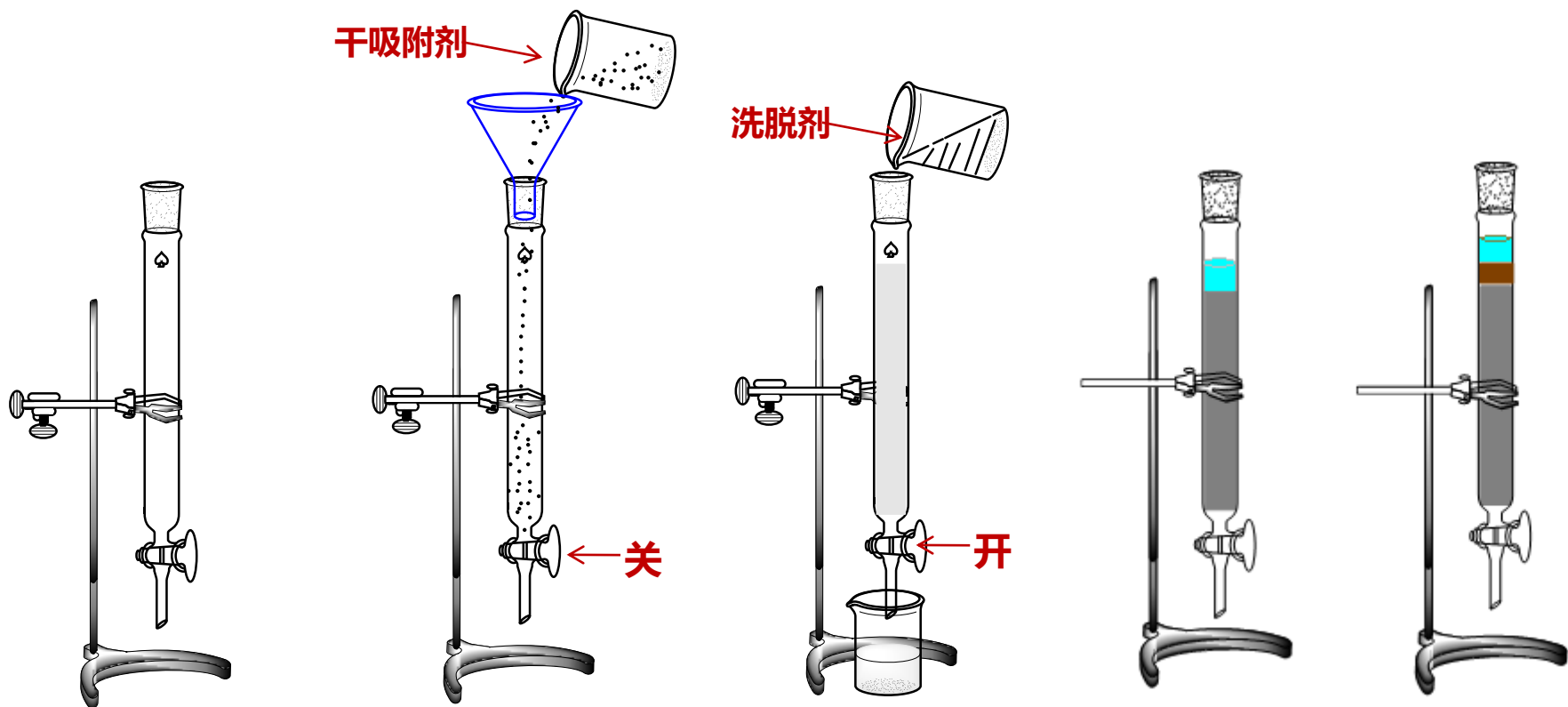
5. 敲实/勿干



6. 加石英砂 0.5 cm 厚

三、柱层析操作

(1) 装柱——B、干法装柱



1. 固定柱子

2. 倒入干的吸附剂

3. 倒入洗脱剂湿润

4. 敲实/勿干

5. 加石英砂

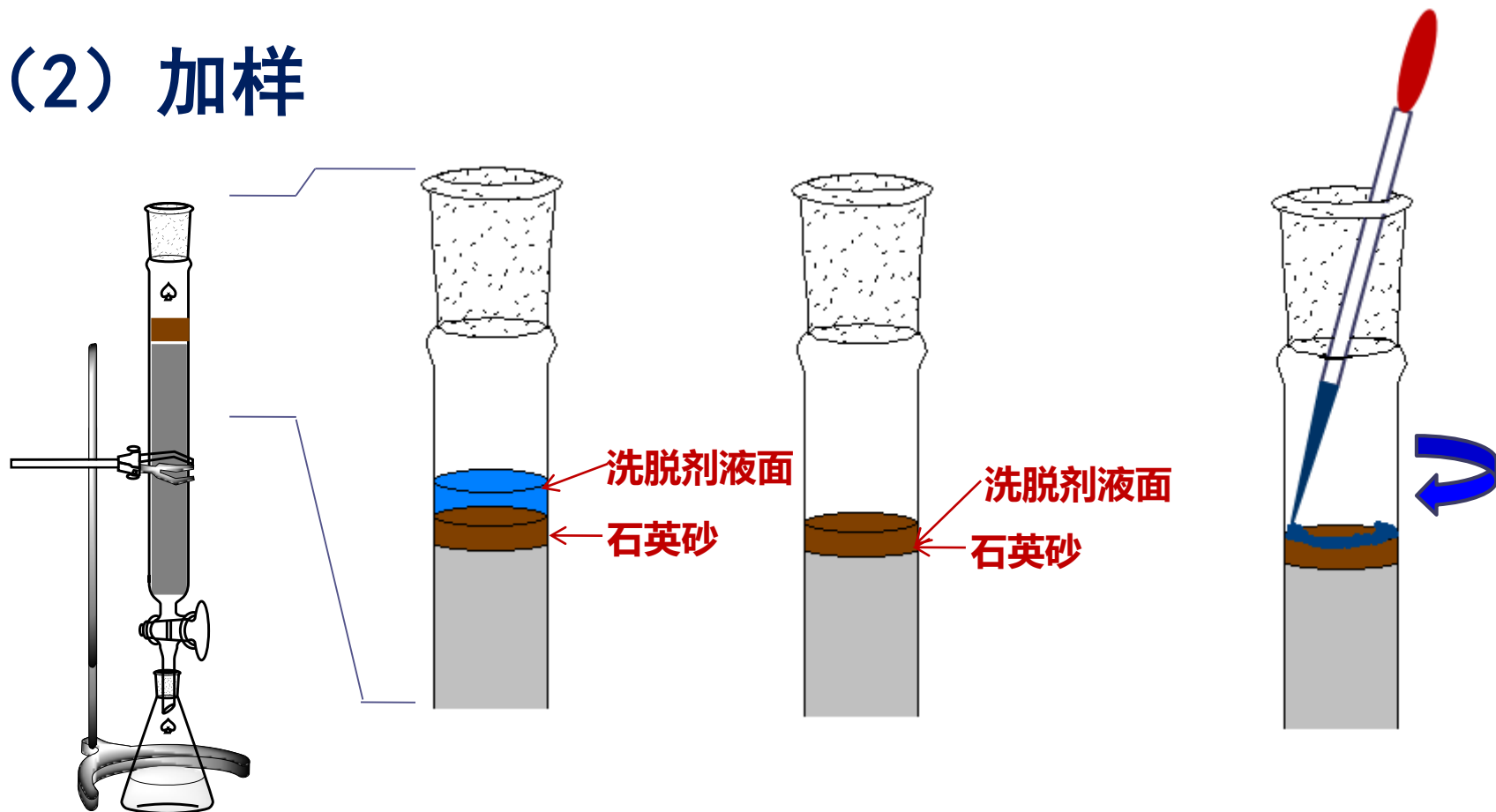
湿法装柱和干法装柱比较

	湿法装柱	干法装柱
操作	吸附剂用洗脱剂调匀后加入柱子	先加吸附剂再加洗脱剂
特点1	操作较复杂	操作较方便
特点2	填充均匀/不易产生气泡	填充不均匀/易产生气泡

由于硅胶和氧化铝的溶剂化作用易使柱内形成缝隙，更宜使用湿法装柱

三、柱层析操作

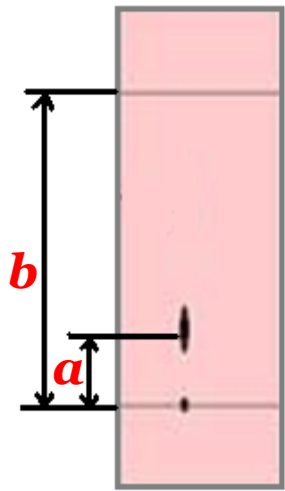
(2) 加样



1. 将石英砂上端多余的溶剂放出，直到柱内液面到达吸附剂表面停止。
2. 沿管壁缓慢、均匀滴加预先配好的样品溶液。

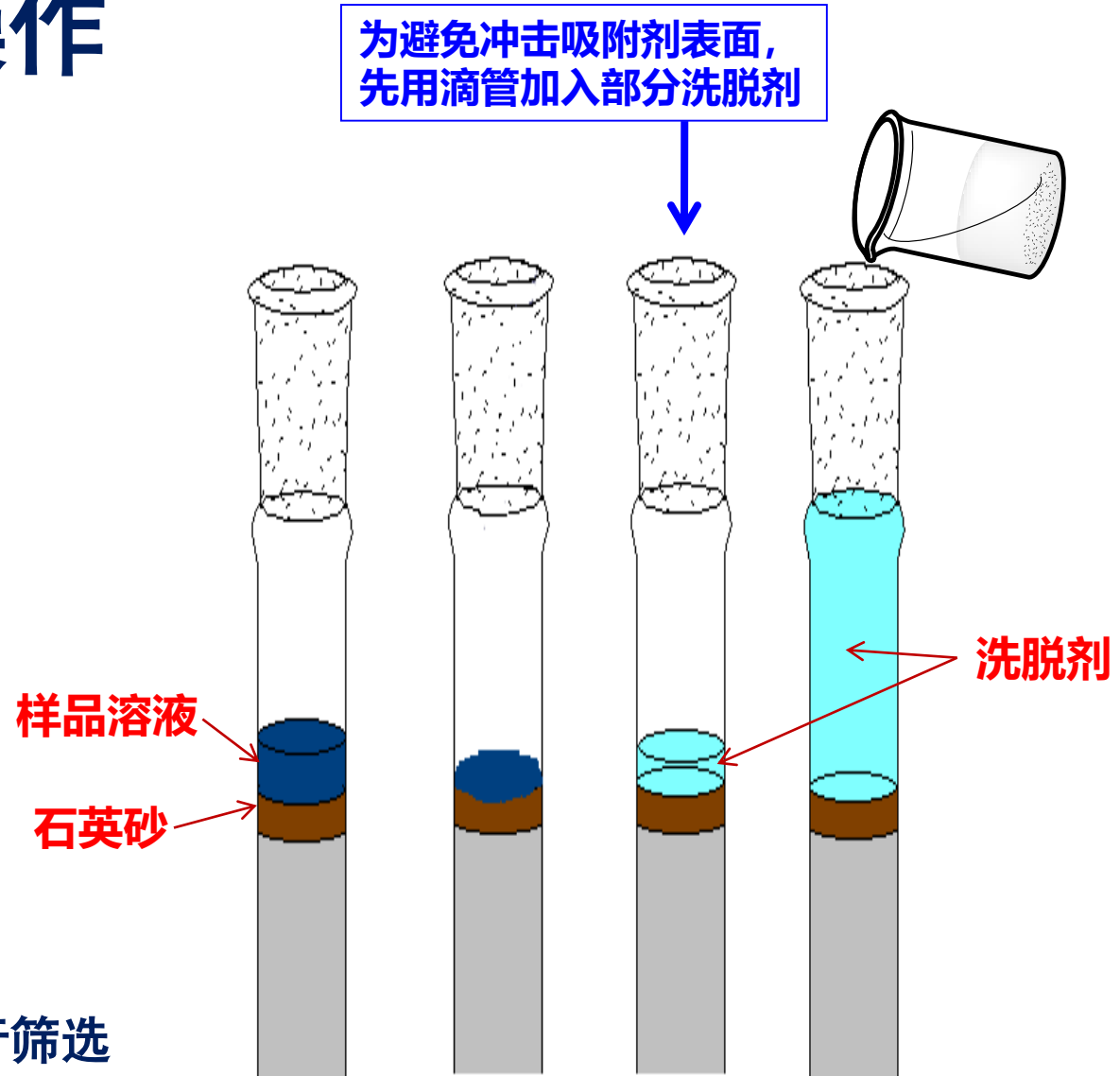
三、柱层析操作

(3) 洗脱与分离



$$R_f = 0.2 - 0.3$$

洗脱溶剂通过薄层色谱进行筛选

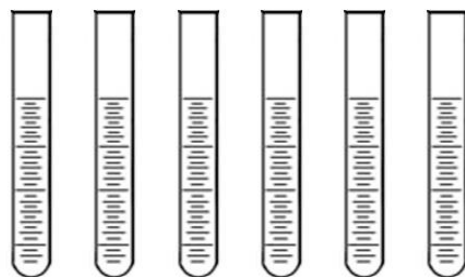
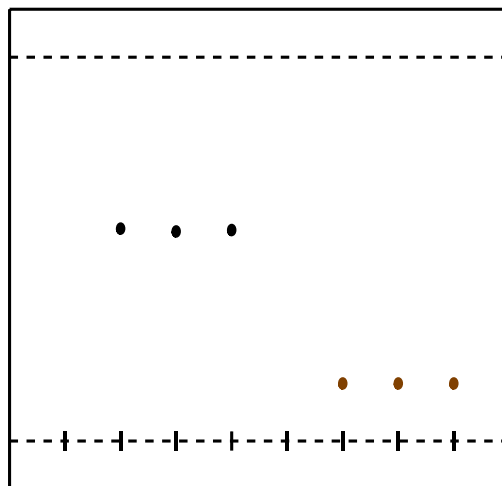


三、柱层析操作

(3) 检测合并

通过TLC检测分离情况

- 目测 (有颜色)
- 紫外灯
- 碘 (除了饱和烃和卤代烃外)
- 磷钼酸
- 2,4-二硝基苯肼 (醛和酮)
- 高锰酸钾 (易氧化)
- 茚三酮 (氨基酸)
- 三氯化铁醇溶液 (酚羟基)
-



小容量接收器皿——试管、三角瓶等



旋转蒸发仪——浓缩

四、分离二苯甲醇与二苯甲酮

装柱

将~5 g硅胶用30 mL 石油醚调成糊状，装入柱中。

加样

铺石英砂；取1 mL样品溶液，均匀滴加在石英砂上。

洗脱

石油醚：15-20 mL；
石油醚/乙酸乙酯 (20: 1) ， 洗脱二苯甲酮；
石油醚/乙酸乙酯 (2: 1) ， 洗脱二苯甲醇

梯度洗脱

收集

将二组分分别收集到不同三角烧瓶中，均要回收。

注意事项： 硅胶的上表面一定要平整，装柱要紧密、无断层。
在装柱、洗脱过程中，始终保持有溶剂覆盖吸附剂。
如何清洗层析柱？

五、思考题

- 1、装柱后在吸附剂上面铺一层石英砂有什么用途？
- 2、如何确定柱层析使用的洗脱剂？
- 3、湿法装柱时为什么使用低极性溶剂调制硅胶？
- 4、什么情况下使用梯度洗脱？