



浙江大学

ZheJiang University

柱色谱





浙江大学

Zhejiang University

一、实验目的:

1. 了解柱色谱分离混合物的原理及其用途
2. 掌握柱色谱的实验操作技术





浙江大学

Zhejiang University

二、基本原理

色谱法分离有机化合物是利用混合物各组分在某一物质中的吸附或溶解性能（分配）的不同，或亲和性能的差异，使混合物的各组分随着流动的液体或气体（称流动相），通过另一种固定不动的固体或液体（称固定相），进行反复的吸附或分配作用，从而使各组分分离。根据操作条件不同，可以分为柱色谱、薄层色谱、纸色谱等。

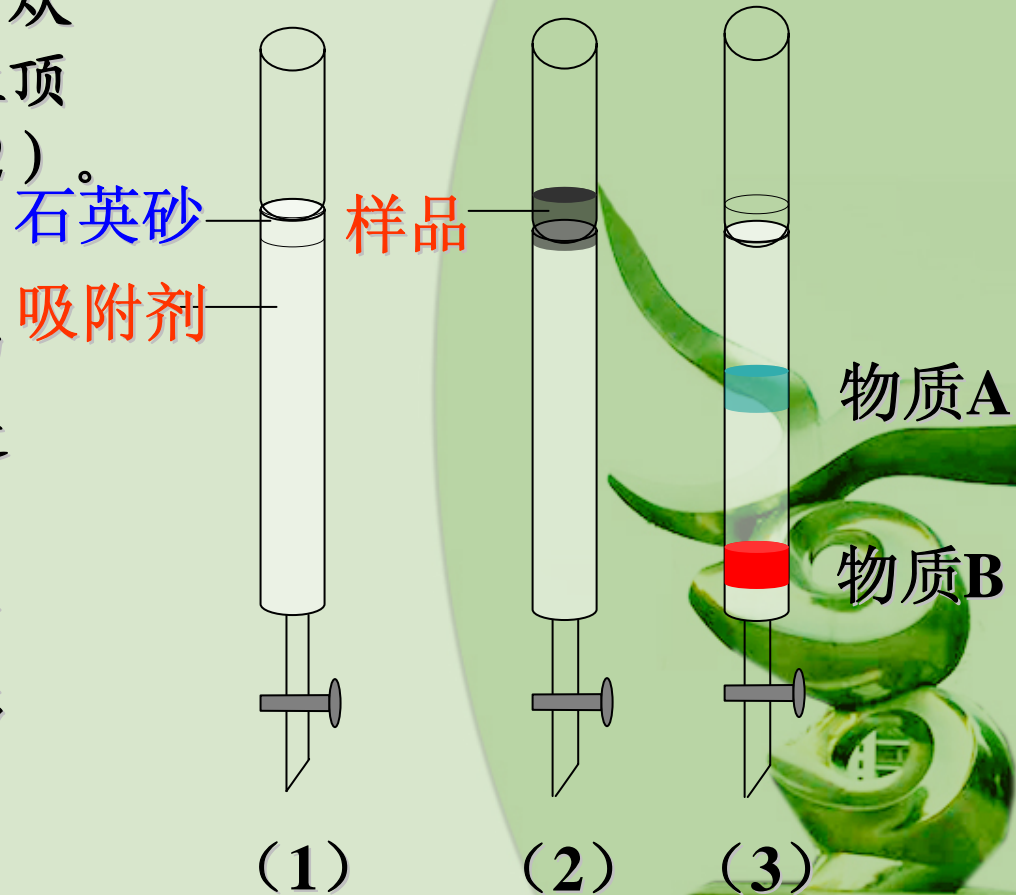


浙江大学

Zhejiang University

如将**硅胶**或 **Al_2O_3** 等吸附剂（固定相）装入玻璃管中（如图1），从柱顶加入样品（A，B），再从柱顶加入淋洗剂（流动相）（图2）。

A、B两组分随流动相的流动而向下移动。A、B在两相不断进行着的溶解、吸附、再溶解、再吸附过程中，**由于吸附能力的差异**，不同组份随流动相移动的速度不同，从而达到分离（图3）。





浙江大学

Zhejiang University

吸附剂吸附有机化合物的能力与化合物的结构有关，分子的极性越小，吸附能力越弱。分子的极性越大，吸附能力越强。吸附能力最弱的组分最先随淋洗剂流出，分别收集各组分。若待纯化物质是有色物质，则在柱上可以直接看到色带，若是无色物质，可用薄层色谱鉴定。





浙江大学

Zhejiang University

分离效果主要取决于化合物的结构，吸附剂的性质及淋洗剂的极性。

1. 吸附剂

选择的吸附剂绝不能与待分离的物质及淋洗剂发生化学反应。常用的吸附剂有**硅胶**、氧化铝、氧化镁、碳酸钙和活性炭等。有机实验室用的最多的为硅胶。

吸附能力与吸附剂的颗粒大小有关。颗粒越小，表面积越大，吸附能力越高，分离效果好，但淋洗剂的流速太慢。反之则反。

用于柱色谱的硅胶一般为100-200目，200-300目，300-400目及400目以上。





浙江大学

Zhejiang University

2. 溶质的结构和吸附能力

化合物的吸附性和它们的极性成正比，化合物分子中含有极性较大的基团其吸附性较强。氧化铝对各种化合物的吸附性按下列顺序递减。

酸、碱 > 醇、胺、硫醇 > 酯、醛、酮
> 芳香族化合物 > 卤代物、醚 > 烯 >
饱和烃。





3. 淋洗剂

试样吸附在氧化铝柱上后，用合适的溶剂进行洗脱，这种溶剂称为**淋洗剂**。洗脱剂的极性不能过大（将被分离物全部洗脱，起不到分离效果）或过小（各组分仍被吸附留在固定相），常用洗脱溶剂的极性按以下次序递增：

己烷、石油醚 < 环己烷 < 四氯化碳 < 二氯
乙烯 < 二硫化碳 < 甲苯 < 苯 < 二氯甲烷 < 三氯
甲烷 < 乙醚 < 乙酸乙酯 < 丙酮 < 丙醇 < 乙醇 <
甲醇 < 水 < 吡啶 < 乙酸





能否完全分离每一个组份最关键的是选择合适的淋洗剂，可以运用薄层色谱来选择淋洗剂， R_f 太大或太小都不好，一般以 $R_f = 0.3$ 为好。淋洗剂可以是单一溶剂，也可以是混合溶剂，**最常用的是石油醚/乙酸乙酯**，改变不同的比例，一般都能得到满意的分离效果。必要时，还可以进行梯度淋洗，在保证好的分离效果的同时可以加快速度。





浙江大学

Zhejiang University

洗脱剂的选择还要考虑以下方面:

1. 对试样的溶解度不能过大（洗脱过快过多）或过小（谱带分散，甚至不易完全分开）。
2. 在常温至沸点的温度范围内可与被分离物长期共存无反应，也不被吸附剂或被分离物催化发生自身反应。
3. 沸点较低，利于回收。
4. 毒性小，较安全。
5. 价格便宜，来源方便。





浙江大学

Zhejiang University

4. 溶解试样的溶剂

若待分离的样品为固体，必须选择合适的溶解剂溶解后才能上样。选择溶剂是要注意以下几点：

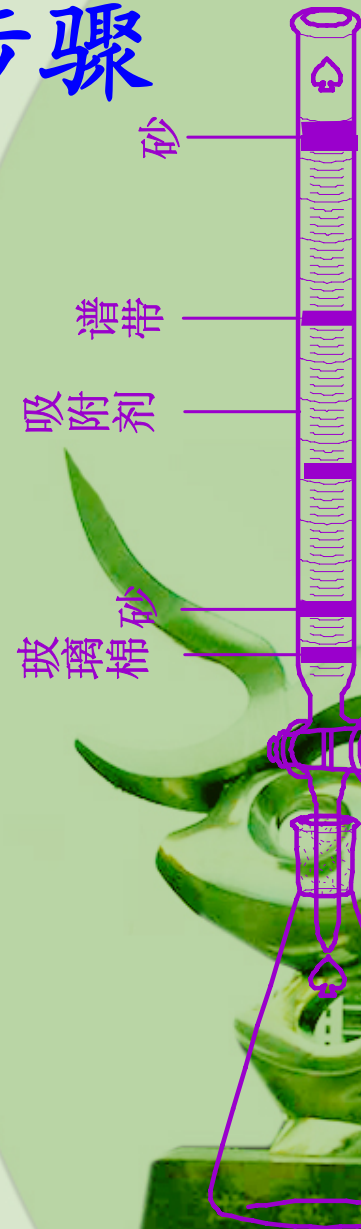
- (1) 溶剂和氧化铝不能起化学反应。
- (2) 溶剂的极性应比淋洗剂极性小一些，否则试样不易被氧化铝吸附，影响分离效果。
- (3) 溶剂对试样的溶解度不能太小，因溶液的体积增加，易使色谱分散。





三、柱色谱操作步骤

1. **装柱**：取清洁、干燥色谱柱，在玻璃管底铺一层玻璃棉或脱脂棉，轻轻塞紧，再在玻璃棉上盖一层厚约 0.5cm 的石英砂（若柱子已带砂芯就不需这一步），而后将吸附剂（硅胶或氧化铝）装入管内（**湿法**或**干法**）。





浙江大学

Zhejiang University

湿法 将石油醚装入管内，约为柱高的四分之三，而后将吸附剂与石油醚调成糊状，慢慢地倒入管中。此时应将管的下端活塞打开，控制流出速度为 1 滴 /s ，并轻轻敲打柱身使其装紧。

干法 将石油醚装入管内，约为柱高的四分之三，在柱的上端放一干燥漏斗，使吸附剂均匀地经干燥漏斗成一细流慢慢装入管中，时时轻轻敲打柱身，使装填均匀。此时应将管的下端活塞打开，控制流出速度为 1 滴 /s ，





浙江大学

Zhejiang University

装柱的高度一般为柱长的 $2/3$ ，也可以根据待分离样品的性质调整。柱越长，分离效果越好，但速度也越慢，反之则反。

装柱时还得注意以下几点：

- (1) 柱子必须装直、紧，不能有气泡，否则影响分离效果；
- (2) 柱子上端必须装平，然后在上面盖一层石英砂；
- (3) 在整个装柱过程中，溶剂液面必须高于吸附剂表面。





2. **加样**: 液体样品直接上样, 若为固体样品, 将待分离的试样用适当的溶剂溶解后备用。

将吸附剂上多余的石油醚放出, 直到柱内液体表面与吸附剂表面相切时, 停止放出溶剂。沿管壁加入试样溶液, 注意不要使溶液把吸附剂冲松浮起, 试样溶液加完后, 开启下端旋塞, 使液体渐渐放出, 至液面与吸附剂表面相切(勿使吸附剂表面干燥), 用少量溶剂洗涤样品瓶, 再转移到柱子上(每次1-2 mL, 2-3次), 使样品转移完全且把柱子壁上的样品洗干净, 再用淋洗剂洗脱。



浙江大学

Zhejiang University

4. 洗脱和分离

不断加入淋洗剂，并保持一定高度的液面，在整个操作中勿使吸附剂表面的溶液流干，一旦流干，再加淋洗剂，易使层析柱产生气泡和裂缝，影响分离效果。

必要时梯度淋洗。





浙江大学

Zhejiang University

5. 收集

收集洗脱液，如待分离试样各组分有颜色，在层析柱上可直接观察。洗脱后分别收集各个组分。在多数情况下，化合物没有颜色，收集洗脱液时，多采用等份收集，每份洗脱剂的体积随所用吸附剂的量及试样的分离情况而定。收集的每份洗脱剂的体积越小，分离效果越好。





浙江大学

ZheJiang University

由于吸附剂表面活性较大，有时可能促使某些成分破坏，所以应尽量在一定时间内完成一个柱色谱的分离，以免试样在柱上停留的时间过长，发生变化。





浙江大学

Zhejiang University

四、相关问题及及注意事项

1. 装柱（层析柱及硅胶等吸附剂必须干燥）
2. 上样（沿管壁加入试样溶液，少量多次洗干净留在管壁的样品）
3. 洗干净色谱柱（吸附剂不能倒入水槽，洗涤时不要打破活塞）





浙江大学

Zhejiang University

五、思考题

1. 还有更好的装柱方法吗？
2. 设计其它的上样方法。
3. 若被分离物质没有颜色，如何收集洗脱液，如何检测有无完全分离？

