



青島科技大學

Qingdao University of Science & Technology

# 有机化学实验

基础化学实验中心

山东省省级实验教学示范中心



# 色谱法

**Chromatography**



# 实验内容

- 1 实验目的
- 2 实验原理
- 3 薄层色谱



- 4 柱色谱
- 5 思考题



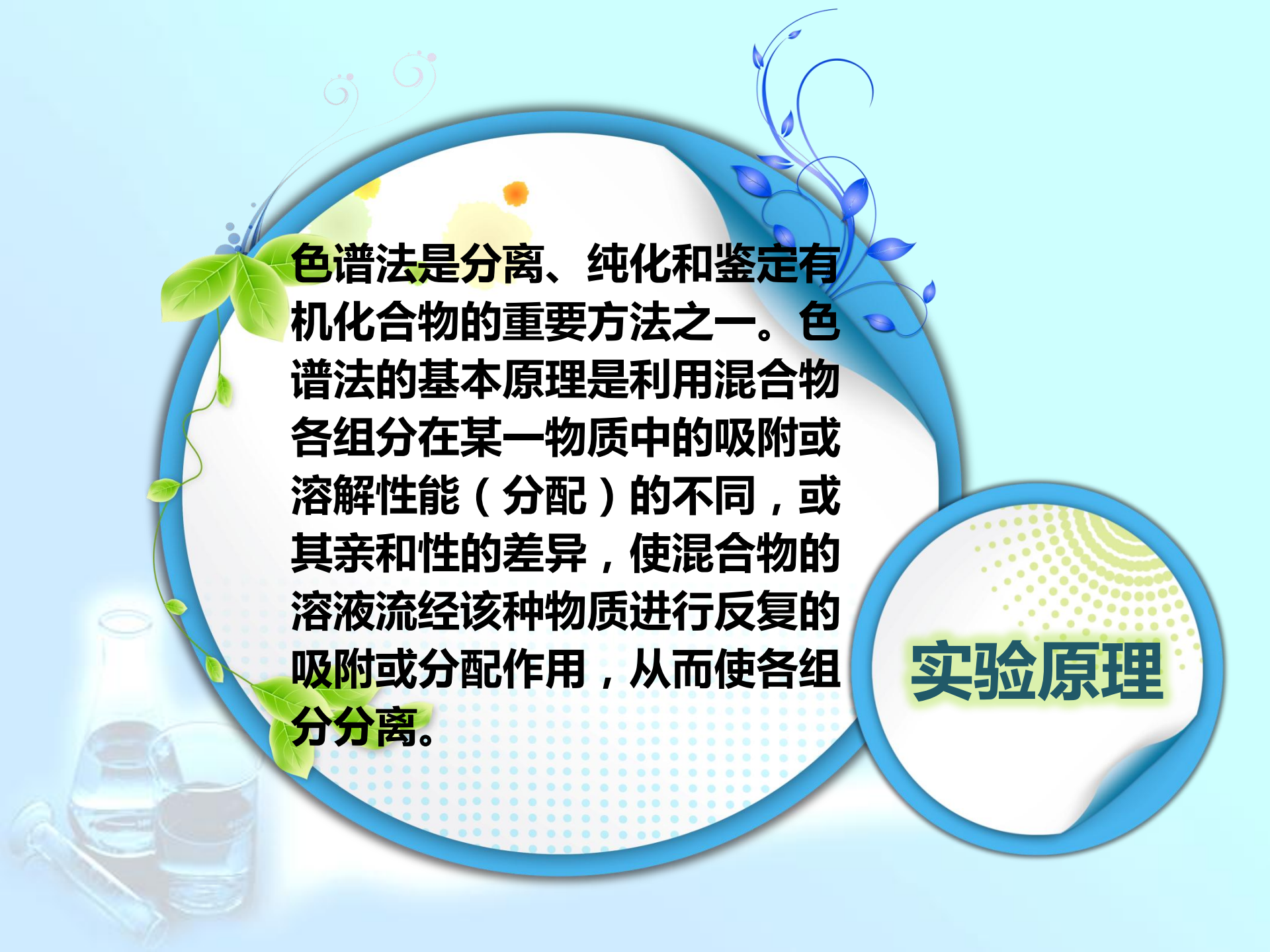
# 实验目的

**1. 掌握色谱法的原理与应用**

**2. 掌握薄层色谱法的操作技术**

**3. 掌握柱色谱法的操作技术**





**色谱法**是分离、纯化和鉴定有机化合物的重要方法之一。色谱法的基本原理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，或其亲和性的差异，使混合物的溶液流经该种物质进行反复的吸附或分配作用，从而使各组分分离。

**实验原理**

# 色谱法

根据作用原理  
不同分类

吸附色谱

分配色谱

离子交换色谱

排阻色谱

根据操作条件  
不同进行分类

薄层色谱

柱色谱

纸色谱

气相色谱

高效液相色谱



# 固定相与流动相

## 固定相

用于与样品发生吸附作用的固定不动的物质。在混合物样品流经固定相的过程中，由于各组分与固定相吸附力的不同，就产生了速度的差异，从而将混合物中的各组分分开。

## 流动相

流动相也称展开剂或洗脱剂，在色谱过程中起到将吸附在固定相上的样品洗脱的作用。

# 薄层色谱

——Thin Layer Chromatography  
( TLC )





A diagram illustrating the applications of thin-layer chromatography (TLC). It features a central circular graphic with the text '薄层色谱的应用' (Applications of Thin-layer Chromatography) and a blue curved line connecting five numbered points. In the bottom left corner, there is a faint image of laboratory glassware including a flask, a beaker, and a test tube.

# 薄层色谱的应用

01

适用于少量样品的分离

02

精制样品

03

化合物鉴定

04

跟踪有机反应进程

05

柱色谱的先导，确定洗脱剂

# 薄层色谱实验步骤

吸附剂的选择  
1

薄层板的制备  
2

点样  
3

展开  
4

显色  
5

计算 $R_f$ 值  
6

# 吸附剂的选择



## 吸附剂 的选择

▮ 氧化铝极性比硅胶大，常用于中性或偏碱性的小极性物质的分析分离。

▮ 在薄层色谱中所用的吸附剂颗粒比柱层析用的要小很多，一般**260目**以上。

颗粒太大，展开剂移动速度快，分离效果不好；反之，颗粒太小，溶剂移动太慢，斑点不集中，效果也不理想。



## 薄层板的制备

(1) 50 mL烧杯中放置7 g **硅胶HF254** , 逐渐加入5%羧甲基纤维素钠水溶液7 mL , 研磨成均匀的糊状。

(2) 将配制好的浆料倾注到清洁干燥的载玻片上 , 拿在手中轻轻的左右摇晃 , 使其表面均匀平滑 , 然后放在水平的台面上**自然晾干**。

(3) 放入烘箱中在**110℃恒温0.5 h**进行活化 , 即制得薄层板。



# 点样

**样品1.** 甲基橙与亚甲基兰的乙醇混合溶液；

展开剂：95% 乙醇

**样品2.** 苯甲酸与苯甲酸乙酯的乙醇混合溶液；

展开剂：石油醚（60 ~ 90℃）：乙酸乙酯  
( 体积比 ) = 4 : 1



## 点样

- 将样品溶于低沸点溶剂，配成1 %的溶液；
- 先用铅笔在距薄层板两端0.5~1 cm处轻轻划一横线作为起止线，用内径小于1 mm毛细管吸取样品，在起始线上小心点样，斑点直径一般不超过2 mm。
- 点样要轻，不可刺破薄层。
- 一根点样管只能点一种样品。
- 若样品溶液太稀，可重复点样，但应待前次点样的溶剂挥发后方可重新点样，以防样点过大，造成拖尾、扩散等现象，而影响分离效果。
- 若在同一板上点几个样，样品点之间间距约1~1.5 cm。



# 展开

## 展开剂的选择原则

1

展开剂的选择要根据**样品的极性、溶解度和吸附剂的活性**等因素来考虑。理想的展开剂应能使混合物分离后各组分的 $R_f$ 值相差尽可能大。

2

极性小的及中等的一般采用**石油醚和乙酸乙酯**作展开剂，极性大的一般采用**二氯甲烷和甲醇**作展开剂。

3

如上述系统不适合可尝试使用**石油醚和丙酮、三氯甲烷和甲醇**等展开体系。

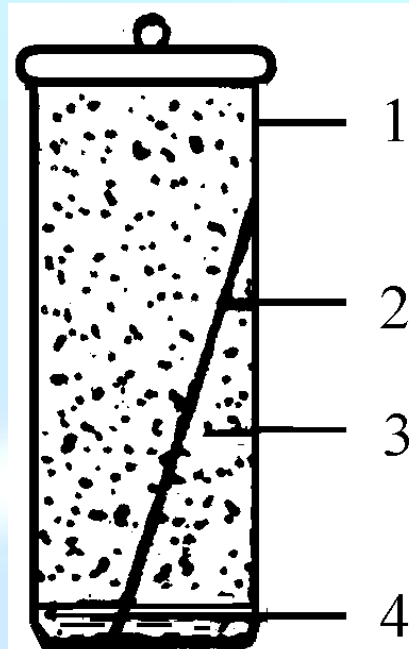
4

强酸或强碱性物质由于在薄层板拖尾严重，所以分别在展开体系中加入**少量乙酸或三乙胺**。



# 展开

- 展开时薄层板底部浸入展开剂的高度约**0.5 cm**。注意样品点决不能浸到展开剂中。
- 展开剂离薄层板上缘约**1 cm**时应停止走板，取出晾干。板取出后要及时标记展开剂前沿，否则展开剂挥发后难以确定。



## 显色

- (1) 若样品**组分本身有颜色**，可以直接看到斑点的位置；
- (2) 对于**荧光物质**，可在紫外灯下观察其**荧光斑点**；
- (3) 对于非荧光物质，可用**硅胶GF254**制成的薄板展开，而后在紫外灯照射下，**绿色荧光背景**下将呈现**暗色斑点**，多环芳烃基团等多用此发显色；
- (4) **显色剂显色法**。



# 显色

显色剂	配制方法	适用范围
浓硫酸	5 mL浓硫酸加 100 mL乙醇	大多数有机化合物在加 热后可显出黑色斑点
碘蒸气	将单质碘放入碘瓶内	很多有机化合物显黄棕 色
磷钼酸、乙 醇溶液	5%磷钼酸、乙醇溶液喷 后烘干	还原物质显蓝色
香兰素-硫 酸	香兰素溶于100 mL乙醇 中，再加入0.5 mL浓硫酸	高级醇及酮显绿色

## 实验室常用的显色剂

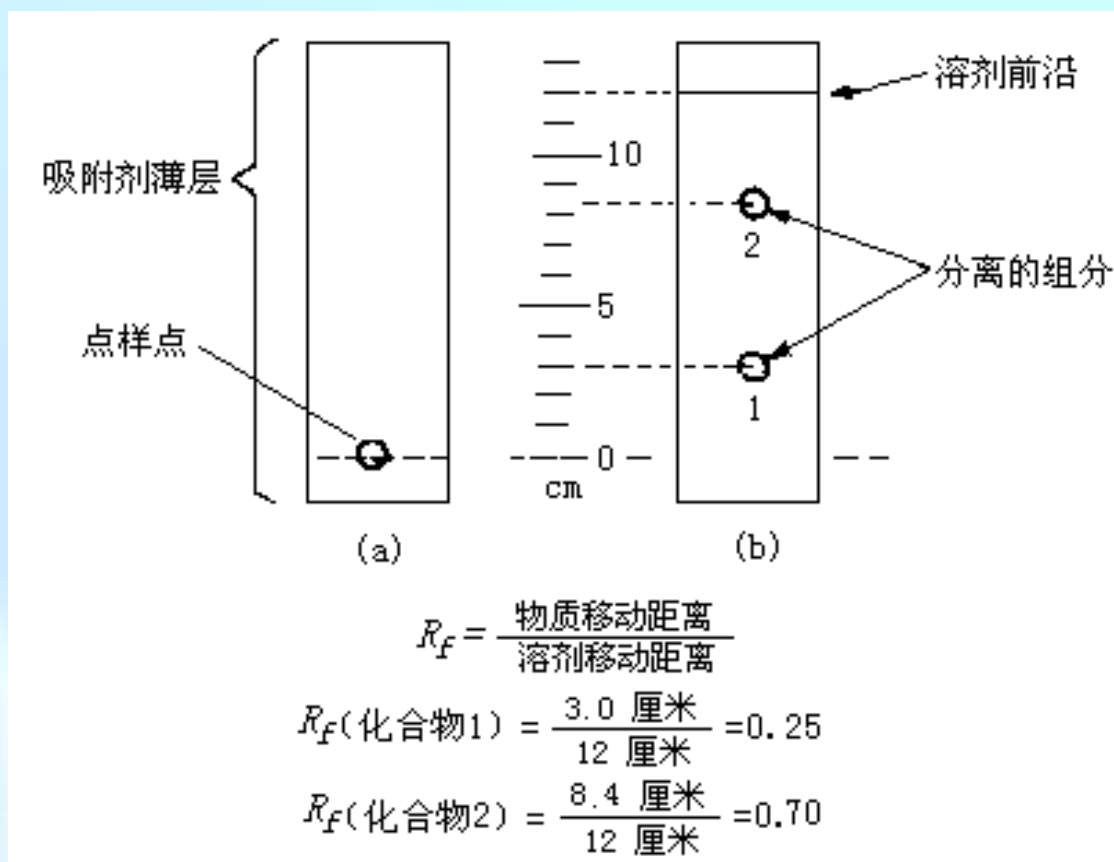


# 计算 $R_f$ 值

样品中某组分移动离开原点中心的距离

$R_f =$

展开剂前沿距原点中心距离



# 计算 $R_f$ 值

- 甲基橙与亚甲基兰样品均有**颜色**，可直接观测。
- 苯甲酸与苯甲酸乙酯两样品为无色，展开后在**紫外灯下观察为暗斑**。
- 每个样品均需记录样品位置，计算 $R_f$ 值，并列**表记录**。

距 离 \ 样 品	有色样品		无色样品	
	亚甲基兰	甲基橙	苯甲酸	苯甲酸乙酯
样品移动距离				
展开剂移动距离				
$R_f$ 值				

# 柱色谱

——Column Chromatography



# 柱色谱实验步骤

吸附剂的选择  
1

洗脱剂的选择  
2

装柱  
3

上样  
4

洗脱  
5

分离成分的收集  
6



# 吸附剂的分类

01

常用的吸附剂有**氧化铝、硅胶、氧化镁、碳酸钙和活性炭等**，颗粒大小一般以通过100-150目左右筛孔为宜。颗粒太大，洗脱时溶剂推进太快，分离效果不好，反之如果颗粒太小，展开慢而造成拖尾不集中，分离效果也不好。

02

**氧化铝**一般可分为酸性、中性和碱性三种。氧化铝的极性比硅胶大，比较适合用于分离极性较小的化合物如烃、醚、醛、酮、卤代烃等。

03

**硅胶**适合用于分离极性较大的化合物如羧酸、醇、胺等，而非极性化合物在硅胶上吸附较弱，分离较差。





# 吸附剂的选择

01

选择吸附剂的首要条件是与被吸附物及展开剂均**无化学作用**。

02

吸附剂的活性与其**含水量有关**，含水量越高、活性越低，吸附剂的吸附能力越弱；反之则吸附能力越强。

03

吸附剂的吸附能力不仅仅取决于吸附剂本身，还取决于**被吸附物质的结构**，化合物的吸附性与它们的极性成正比。

酸和碱 > 醇、胺、硫醇 > 酯、醛、酮 > 芳香族化合物  
> 卤代物 > 醚 > 烯 > 饱和烃

# 吸附剂的用量

## 层析柱、吸附剂和待分离样品的经验选择关系

样品量(g)	吸附剂用量(g)	柱的直径(mm)	柱高(mm)
0.01	0.3	3.5	30
0.1	3.0	7.5	60
1	30	16	130
10	300	35	280

\*注：具体选择应视样品的分离情况而定。



# 洗脱剂的选择



01

通常根据被分离物中**各组分的极性**、溶解度和吸附剂活性来考虑。

02

一般洗脱剂的选择是通过**薄层色谱**实验来确定的；

03

洗脱剂的极性**不得大于**样品中各组分的极性；

04

所用洗脱剂必须**纯粹和干燥**

# 洗脱剂的选择

01

## 柱色谱常用的洗脱剂及其洗脱能力：

己烷、石油醚 < 环己烷 < 四氯化碳 < 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。

02

## 实验室一般常用的几种体系：

石油醚(正己烷)/ 乙酸乙酯体系

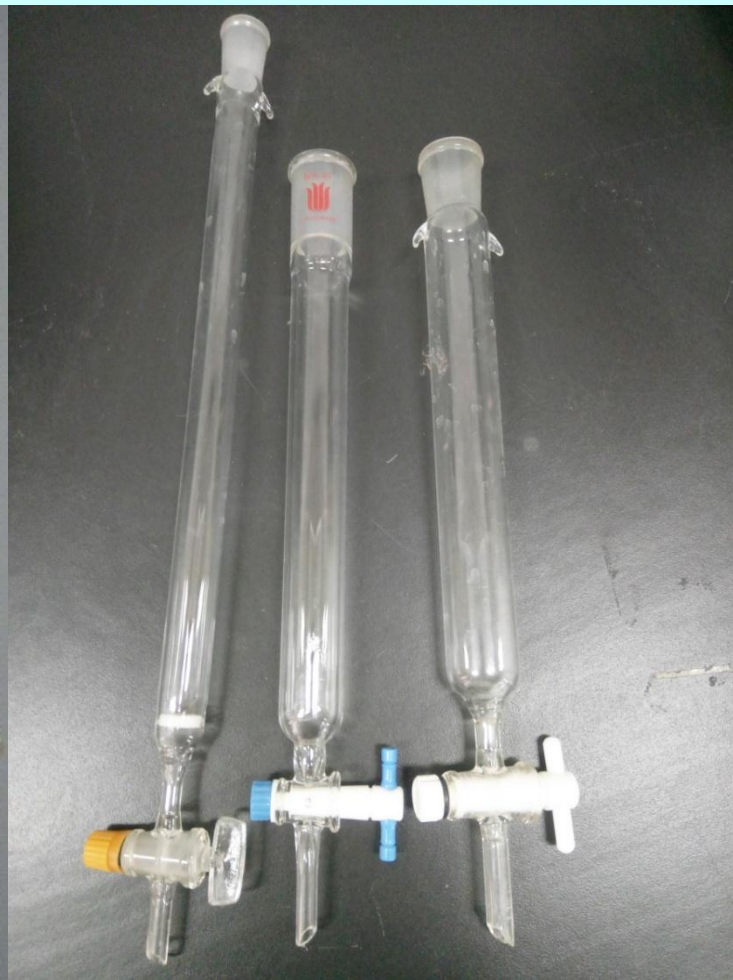
二氯甲烷(氯仿)/甲醇体系

对于**氨类、酰胺类**化合物，为防止其产生拖尾现象，可在洗脱剂中加入少量的**三乙氨、氨水或醋酸**。

# 装柱 之柱子的选择



细颈玻璃管或带旋  
塞的滴定管



带有**特氟龙**旋塞和底  
部配备砂芯的层析柱



## 装柱 之前期准备

01

装柱一定要在抽风良好的**通风橱**中进行，并带好口罩，以防吸入过多的硅胶或氧化铝粉尘而对身体产生致命伤害。

02

装柱之前，先将柱洗净、干燥，然后将柱子垂直固定在铁架台上。

03

如果色谱柱下端没有砂芯横隔，就用小团脱脂棉，用玻璃棒推至柱底，再在上面铺一层**0.5 cm厚的石英砂**，然后进行装柱。



## 装柱 之干法装柱

(1) 首先将干燥的吸附剂经漏斗，均匀地成一细流慢慢装入柱内，中间不应间断，时时轻轻敲打玻璃管，使柱子填装得尽可能均匀，适当的紧密。

(2) 加入洗脱剂，并打开下端活塞，用洗脱剂洗涤，除去吸附剂中可溶性杂质及驱赶气泡，直至柱身均匀无气泡且柱中上端吸附剂界面不再下移为止。

(3) 柱子装好后再铺一层石英砂，以防加入样品或洗脱时冲动吸附剂表面，影响层析效果。

**缺点：**是容易使柱中混有气泡，另外吸附剂也可能发生溶胀。

## 装柱 之湿法装柱

(1) 用洗脱剂**中极性最低**的洗脱剂将吸附剂调成糊状，向柱中加入约**3/4**柱高的洗脱剂，再将调好的吸附剂边敲边倒入柱中，同时打开柱子的下端活塞，在色谱柱下面放一个干净并干燥的锥形瓶，接收洗脱剂。

(2) 待所有的吸附剂全部装完后，用流下的洗脱剂转移残留的吸附剂，并将柱内壁残留的吸附剂淋洗下来。

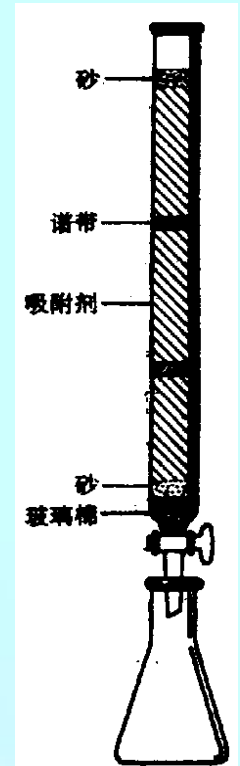
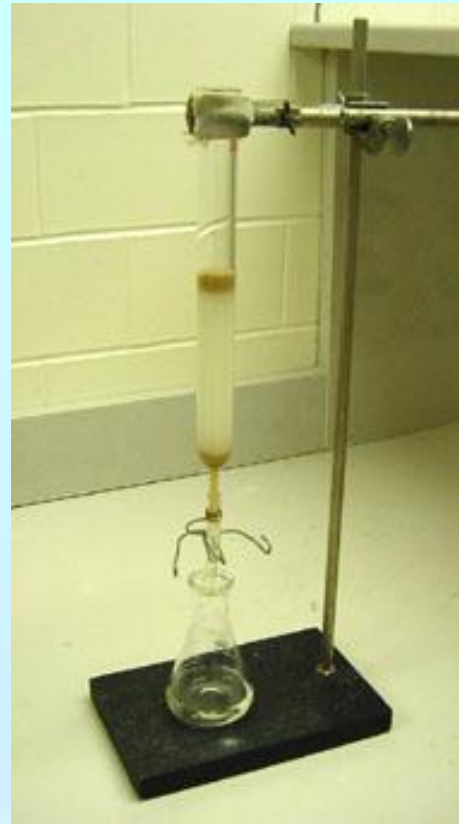
(3) 柱子填充完毕后，再在上面加一层约0.5 cm厚的石英砂。

**注意:** (1) 装柱时应不断敲打色谱柱，以使色谱柱**填充均匀并没有气泡**。

(2) 柱内洗脱剂的高度始终**高于吸附剂最上端**，否则柱内会出现裂痕和气泡。



# 装柱



柱色谱装置



# 上样

加样一般按待分离物的性质而分为**液体上样**和**固体上样**两种。

**液体上样**：把要分离的试样配制成适当浓度的溶液。

**固体上样**：当待分离样品为固体时不能直接上样，一般采用拌吸附剂上样法。



# 洗脱

- 1、洗脱剂的流速对柱色谱分离效果具有显著影响。
- 2、洗脱可采用**分段洗脱和梯度洗脱**等方法。
- 3、不管何种洗脱方法，在整个洗脱过程中，洗脱液要始终保持一定的高度，绝对避免吸附剂表面的溶剂流干。





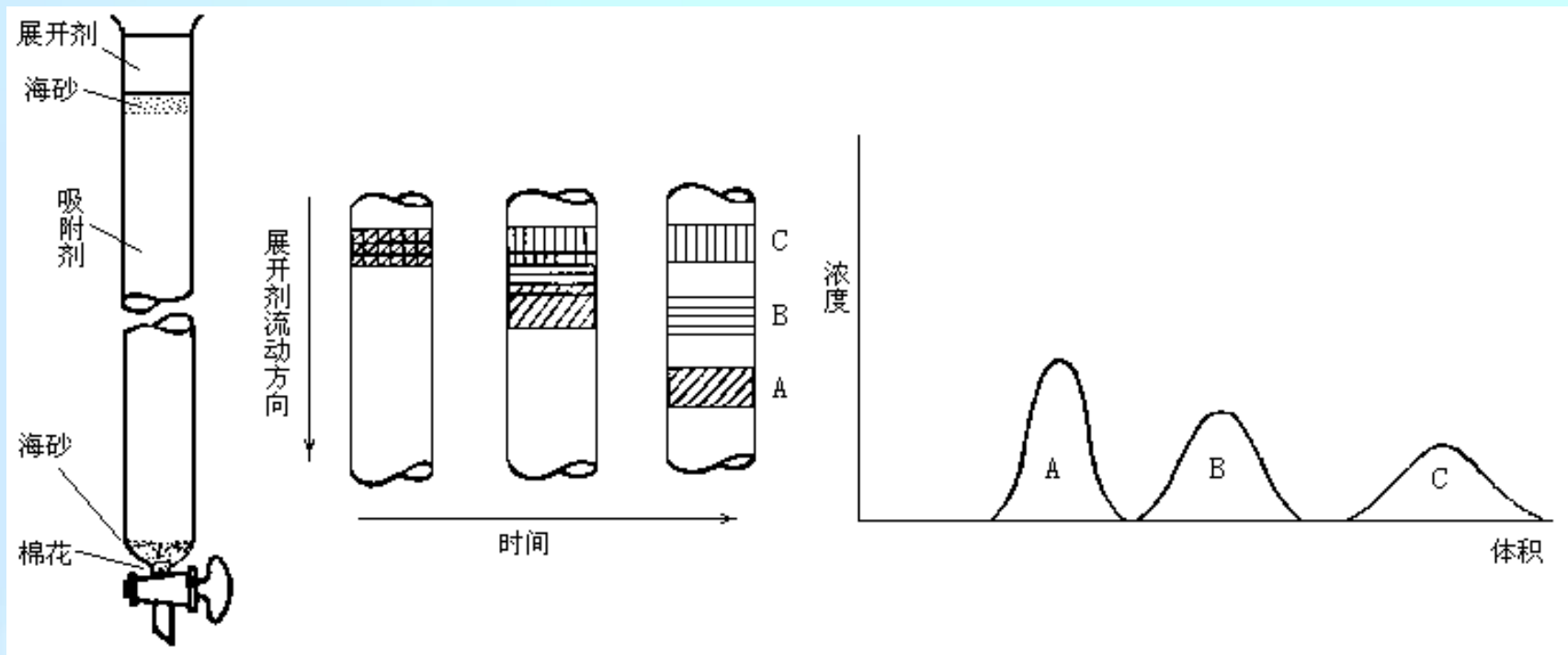
## 分离成分的收集

如果样品各组分**有颜色**，在柱上分离的情况可直接观察出来，分别收集各个组分即可。

在多数情况下化合物**无颜色**，一般采用多份收集，每份收集量要小，对每份洗脱液，采用**薄层色谱**作定性检查。



# 柱色谱分离示意图



# 本次柱色谱实验

➤ **样品：甲基橙与亚甲基蓝的混合物**

➤ **洗脱剂（流动相）：95%乙醇和水**

➤ **吸附剂（固定相）：层析用中性氧化铝**



# 思考题

01

柱色谱实验中，若装柱时，柱中有气泡或填装不均匀，对分离效果有何影响？

02

如何选择柱色谱用洗脱剂？

03

影响比移值 $R_f$ 的因素有哪些？

04

展开剂的液面高出薄板的斑点，将会产生什么后果？

05

如何确定混合物各组分在薄板上的位置？如果斑点出现拖尾现象，这可能是什么原因引起的？

# 谢谢大家!

基础化学实验中心

山东省省级实验教学示范中心

