

番茄酱中提取番茄红素

(学习实验技术-柱色谱)

一、实验原理

柱色谱，又称柱层析 (column chromatograph)，是有机物分离提纯的一种重要手段。常分为吸附柱色谱和分配柱色谱，前者常用氧化铝和硅胶作为吸附剂，后者则以吸附在惰性固体（如硅藻土）的活性液体作为吸附剂。将液体样品（或已溶解的样品）从柱顶加入到已装好的色谱柱中，各组分被吸附在柱的上端，然后用洗脱剂（流动相）进行淋洗。根据样品各组分在吸附剂（固定相）上的吸附能力不同，一般极性大的吸附能力强，极性小的吸附能力弱，当用洗脱剂淋洗时，各组分在洗脱剂中的溶解度也不一样，因而，被解吸能力也不同。根据“相似相溶”原理，一般先用非极性溶剂，然后逐渐增大极性，吸附能力最弱的组分首先随洗脱剂流出，吸附能力强的后流出。若是有色物质，则在柱上可直接看到色带。若是无色物质，可先分段收集一定体积的洗脱液，然后通过薄层色谱逐个鉴定，再把相同组分的收集液合并，蒸除溶剂，即得单一纯物质。

色谱条件的选择对能否获得满意的分离效果很关键。

1、吸附剂的选择

常用的吸附剂有氧化铝、氧化镁、硅胶、碳酸钙和活性炭等。选择的首要条件是没有化学作用。吸附能力与吸附剂的颗粒大小有关，颗粒大，流速快分离效果差，颗粒太细则流速太慢。

吸附剂的活性和含水量有关，含水量越高，活性越低，吸附剂的吸附能力越弱，反之，吸附能力越强。吸附剂按其相对的吸附能力可粗略分为：1) 强吸附剂如低含水量的氧化铝、硅胶和活性炭等。2) 中等吸附剂如碳酸钙、硫酸钙和氧化镁等。3) 弱吸附剂如蔗糖、淀粉和滑石粉等。

吸附剂的吸附能力还取决于被吸附物质的结构。化合物含有极性较大基团时，吸附性也较强。

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

常用吸附剂硅胶和氧化铝：

1) 硅胶

性能温和，属于无定形多孔物质，市售略显酸性，适用于极性较大的物质，如醇、羧酸、酯、酮、胺等。较粗粒径的硅胶即目数较小的适于分离易于分离的混合物，较细粒径的硅胶即目数较大的适于分离不易分离的。

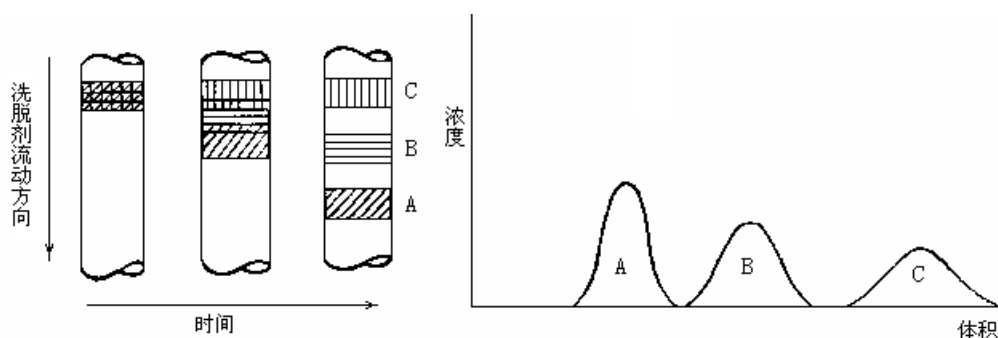
2) 氧化铝

分为酸性、中性和碱性。酸性氧化铝 pH 为 4~4.5，是适于分离羧酸、氨基酸等酸性物质；中性氧化铝 pH 为 7.5，应用较广，适用于醛、酮、醌、酯等化合物以及对酸、碱敏感的化合物的分离；碱性氧化铝 pH 为 9~10，适用于碳氢化合物、胺类、生物碱以及其他有机碱的分离。

2、洗脱剂的选择

一般根据待分离化合物的极性、溶解度和吸附剂活性等因素而定。当被分离物质为弱极性组分，一般选用弱极性溶剂为洗脱剂，反之，则选极性强的。一般溶剂的极性和介电常数有关，通常认为介电常数大于 15 的溶剂为极性溶剂，小于 15 的为弱极性、非极性或无极性溶剂。当使用一种溶剂不能很好分离时，可使用一系列极性逐渐增大的溶剂进行“梯度洗脱”，使吸附在层析柱上的各个组分逐个被洗脱出来。

一般先用薄层色谱法选好合适的溶剂，使所要分离的化合物 R_f 值在 0.3 左右。正己烷、石油醚 < 环己烷 < 四氯化碳 < 三氯乙烯 < 二硫化碳 < 甲苯 < 苯 < 三氯甲烷 < 环己烷-乙酸乙酯 (80:20) < 二氯甲烷-乙醚 (80:20) < 二氯甲烷-乙醚 (60:40) < 环己烷-乙酸乙酯 (20:80) < 乙醚 < 乙醚-甲醇 (99:1) < 乙酸乙酯 < 丙酮 < 正丙醇 < 乙醇 < 甲醇 < 水 < 吡啶 < 乙酸。所选溶剂必须纯净和干燥，否则影响吸附剂的活性和分离效果。柱色谱分离示意图 1 如下：



柱色谱分离示意图 1

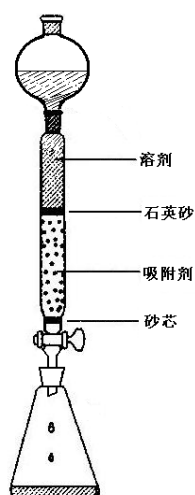
二、色谱操作步骤

柱色谱的分离效果还与色谱柱的大小和吸附剂的用量有关，一般吸附剂的用量为待分离样品的 30~40 倍，柱高和直径一般为 7.5:1。

1、装柱

装柱是柱色谱最关键的操作，装柱质量直接影响分离效果。装柱前，先将空柱洗净干燥，然后垂直固定在铁架台上。如果色谱柱下端没有砂芯横隔，取一小团脱脂棉或玻璃棉，用玻璃棒将其推至柱底，再在上面铺一层 0.5~1cm 厚的石英砂。若有砂芯横隔，则直接装柱即可。柱

色谱装置如图 2



柱色谱装置如图 2

色谱柱的装填有干法装柱和湿法装柱。

1)、干法

在色谱柱的上端放一个干燥漏斗，将吸附剂以细流连续倒入柱中，并轻轻敲打柱身，使其填充均匀，可以用真空水泵抽密实均匀，再加入洗脱剂使其全部润湿。

2)、湿法

将吸附剂用极性最小的洗脱剂调成糊状，在柱内加入约 3/4 柱高的极性最小的洗脱剂，再将调好的吸附剂边敲边通过漏斗倒入柱中，同时打开柱子下端活塞，并用干净干燥的锥形瓶接收洗脱剂。当装入的吸附剂达一定高度时，用接收的洗脱剂将柱内壁的吸附剂淋洗下来。在整个过程中不断轻敲打柱身，使色谱柱填充均匀并无起泡。柱子填充完后，在吸附剂上端覆盖一层约 0.5cm 厚的石英砂。注意：在整个装柱过程中，柱内洗脱剂的高度始终不得低于吸附剂最上端，否则柱内出现裂缝和气泡。

2、加样

先将柱内洗脱剂排至稍低于石英砂表面但一定要高于吸附剂层，加入样品（液体样品直接加入，若浓度低可浓缩后加入，固体样品应先用少量溶剂溶解后再加入）。加完样品，打开旋塞，使液体样品进入石英砂层后，再用少量洗脱剂将壁上的样品淋洗下来，待这部分液体的液面和吸附剂表面相齐时，即可打开安置在柱上的装有洗脱剂的滴液漏斗的活塞，加入洗脱剂进行洗脱。

洗脱剂流出速度一般控制在 5-10 滴/min，太慢可适当加压。

3、分离收集样品组分

若样品有颜色，可根据不同的色带用锥形瓶收集，然后分别蒸除洗脱剂即得纯组分。但大多数有机物无颜色，只能分段收集洗脱液，再用薄层色谱或其他方法鉴定各段洗脱液的成分，相同成分合并，蒸除洗脱剂即得纯组分。

三、实验目的

1. 学习从天然产物中提取有机化合物的方法
2. 学习用柱层析法分离提纯有机化合物的基本原理和方法

四、仪器与试剂

- 1、试剂：番茄酱 10g，乙酸乙酯 20ml，石油醚 200—250ml，硅胶 100~200 目，300~400 目，二氯甲烷，石英砂。
- 2、仪器：层析柱，加压（缓冲）球，双链球，试管，层析缸，薄层板等。

五、实验步骤

1、称取 10g 番茄酱，加入 10mL (0.5mol/L) NaOH 水溶液皂化 20 min，搅拌均匀，不时摇动。加入 20mL 乙酸乙酯，在电加热套中回流加热 0.5h，抽滤、滤液洗涤、分离得到上清液，旋蒸浓缩至 1/5（约 2~3ml）以备柱层析用。

2、用干法或湿法装柱（层析柱的装填参见《综合化学实验》附件一），先用石油醚作洗脱剂，然后逐渐增大极性（乙酸乙酯：石油醚=1：5，2：5，3：5），进行淋洗。收集各洗脱液组分并浓缩，作光谱分析。其中含 β -胡萝卜素为黄色流出液、番茄红素为深色红色流。

六、实验注意事项

沉淀物较细，为避免滤纸的毛细孔堵塞，抽滤时可用助滤剂，即在布氏漏斗上的滤纸表面，铺一层厚的 3~5mm 的助滤剂，然后抽滤。助滤剂可用硅藻土或活性炭。

七、思考题

1. 有时在柱层析洗脱过程中，色带不整齐而成斜带，对分离效果有何影响，应如何避免？
2. 层析柱中有气泡会对层析有何影响，怎样除去气泡？
3. 柱色谱中，分离无色混合物时，如何获得所需组分？
4. 柱色谱中，分离液体混合物和固体混合物时，如何装柱？