



# 中心科学实验

## 实验报告

系 \_\_\_\_\_ 专业 学号 \_\_\_\_\_ 姓名 \_\_\_\_\_

日期 2025.3.22 成绩 \_\_\_\_\_ 指导教师 \_\_\_\_\_

### 薄层色谱与柱色谱

#### 1 实验目的

- (1) 学习色谱分离法
- (2) 使用薄层色谱分离法
- (3) 使用柱色谱分离法

#### 2 实验原理

##### 色谱分离法：

利用混合物各组分在某一物质（固定相）中的吸附或溶解性能（即分配）不同，或其它亲和作用性能差异，混合物溶液（流动相）在流经该物质时，进行反复的吸附或分配作用，从而将各组分分开的方法。

流动相：气体、液体、超临界流体

固定相：液体、固体

色谱分离法分类（按操作条件的不同）：柱色谱、薄层色谱、纸色谱、气相色谱、液相色谱

色谱分离法分类（按组分在固定相中作用原理不同）：

吸附色谱：吸附能力的差异

排阻色谱（凝胶色谱）：分子尺寸的大小不同

分配色谱：两相中分配系数的不同

离子交换色谱：亲和力的差异

亲和色谱：特异性亲和力

##### 色谱法的应用：

色谱法具有样品用量少、分离效能好、分析速度快、检测灵敏度高、适用范围广和操作简便等特点。

在合成化学中的应用主要包括以下几个方面：

1. 分离混合物
2. 精致提纯化合物
3. 利用比移值（R<sub>f</sub>）鉴定化合物
4. 跟踪反应进程

##### 薄层色谱：

以吸附剂为固定相的一种液相色谱法。即将固定相（吸附作用）在玻璃、金属或塑料等光洁的表面上均匀地铺成薄层，试样点在薄层的一端，流动相（解吸附作用）借助毛细作用流经固定相，使被分离的物质展开。

$$\text{比移值 } (R_f) = \frac{\text{斑点中心至起始线的距离}}{\text{溶剂前沿至起始线的距离}}$$



# 中心科学实验

## 实验报告

系 \_\_\_\_\_ 专业 学号 \_\_\_\_\_ 姓名 \_\_\_\_\_

日期 2025.3.22 成绩 \_\_\_\_\_ 指导教师 \_\_\_\_\_

一般操作过程: 制板、点板、展开、显色

### 柱色谱:

柱层析法是吸附、解吸、再吸附和再解吸的过程。一般极性大的物质易被固定相吸附，极性小的物质不易被固定相吸附。由于不同化合物吸附能力不同，因而在洗脱时以不同的速度沿柱向下流动，吸附能力弱的组分随溶剂首先流出。在连续洗脱过程中，不同组分或不同色带就能分别收集，从而达到分离纯化的目的。

#### 固定相:

固定相（吸附剂）几乎可以是任何物料，只要不溶解于流动相即可。这些化合物均用其粉状或磨细的形式。

常用的吸附剂：氧化铝，硅胶，氧化镁，碳酸钙，活性炭或纤维素粉。

选择吸附剂的首要条件：不与被分离物或展开剂发生化学反应。

吸附能力与以下几点有关：

- (1) 吸附剂颗粒大小（200~300 目）
- (2) 吸附剂含水量（6%~10%，II~III 级）

#### 流动相:

通常根据被分离物中各组分的极性、溶解度和吸附活性等来考虑。先将带分离的样品溶于尽量少的非极性溶剂中，从柱顶流入柱中，依次增大溶剂的极性，将不同化合物依次洗脱（梯度洗脱）。

#### 常用洗脱剂的极性：

石油醚 < 环己烷 < 四氯化碳 < 甲苯 < 苯 < 二氯甲烷 < 氯仿 < 乙醚 < 乙酸乙酯 < 丙酮 < 乙醇 < 甲醇 < 水 < 乙酸

#### 柱色谱操作过程:

##### 装柱:

湿法装柱：①在烧杯中依次倒入称量好的吸附剂和一定体积的溶剂，间歇性搅拌数次，在搅拌下装柱，装柱时可用橡胶棒轻敲柱壁，并用橡胶单联球压紧。②直接在柱中加入一定体积的溶剂，然后缓慢加入吸附剂，必要时可用橡胶棒轻敲柱壁，使硅胶平整均匀，并用单联球压紧。

干法装柱：在柱子下端连接水泵减压抽气的同时，将吸附剂通过长径漏斗缓缓倒入柱内。抽紧后快速加入溶剂。当溶剂充满柱体时，迅速拔掉橡胶管。

##### 上样:

湿法上样：将样品溶液在不扰动吸附剂层面的情况下，加到柱体上面。用少量清洁溶剂洗涤烧瓶，待液面下降至吸附剂层面处后，后洗涤液冲洗柱壁 2~3 次，再用少量清洁溶液重复上述操作；

干法上样：将样品溶液在搅拌下加入样品量 3~5 倍的吸附剂，晾干或旋蒸至粉末状，然后在不扰动吸附剂层面的情况下，加到柱体上面。

##### 洗脱:

洗脱剂的选择是柱色谱分离的重要环节。通常先用非极性溶剂洗脱出极性小的部分，再慢慢加大极性进行洗脱（梯度洗脱）。



# 中心科学实验

## 实验报告

系 \_\_\_\_\_ 专业 学号 \_\_\_\_\_ 姓名 \_\_\_\_\_

日期 2025.3.22 成绩 \_\_\_\_\_ 指导教师 \_\_\_\_\_

收集：

1) 用试管收集洗脱液，通过 TLC 确定不同组分的分布（建议间隔取样，节省时间）。2) 分别收集不同的组分于合适大小的圆底烧瓶中，通过旋转蒸发仪脱除溶剂，再通过机械泵脱除残留溶剂。

### 3 实验风险评估及预防措施

#### 3.1 化学品危险性评估及应急措施

实验中使用了较多有机溶剂，一些低沸点有机溶剂易挥发且有毒。不能使用敞口瓶取用这些有机溶剂，避免在密闭情况下加热，在实验中应注意避免吸入过多挥发蒸汽。

硅胶和中性氧化铝，呈粉状固体，容易发生扬尘，应注意避免吸入粉尘。

#### 3.2 设备危险性评估及应急措施

玻璃仪器较多，注意轻拿轻放避免碰倒打碎，导致划伤。

#### 3.3 操作过程危险性评估及应急措施

挥发性有机溶剂不慎撒到桌面时，应立刻用湿布擦干净，避免吸入。

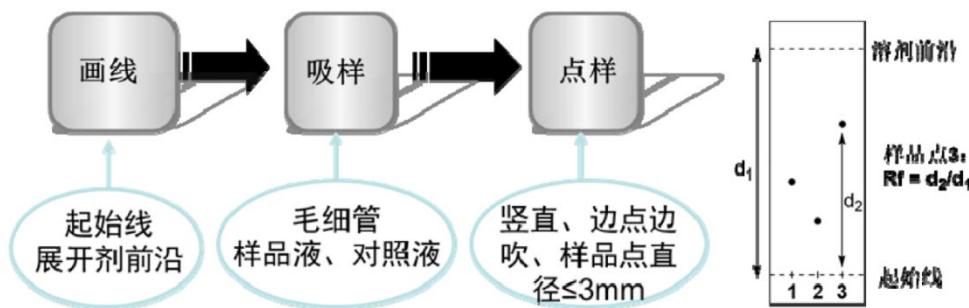
## 4 实验部分

### 4.1 薄层色谱

标准化合物的  $R_f$  值测定及未知样结构判断：

样品为乙酰苯胺标样和肉桂酸乙酯标样；提供展开剂：PE/EA (5:1,10:1)。PE：石油醚；EA：乙酸乙酯。

注意：2 个样品点在一块色谱板上，中间增加一个混合点。尝试 2 个极性溶剂中  $R_f$  值的变化，每人需要 2-3 块色谱板，每种极性展开剂每人需 2-3 mL。



### 4.2 柱色谱

柱色谱分离肉桂酸乙酯与乙酰苯胺无色混合物：

1. 取无色混合物 110 mg (含 100 mg 肉桂酸乙酯和 10 mg 乙酰苯胺)，用少量二氯甲烷溶解备用 (通风橱锥形瓶中)。

2. 利用薄层色谱法确定标样肉桂酸乙酯和乙酰苯胺的大致含量 (仅分离收集主要成分) 和洗脱剂 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}$ ) 比例 (提示： $\text{PE/EA} = 10:1$ )。



# 中心科学实验

## 实验报告

系 \_\_\_\_\_ 专业 学号 \_\_\_\_\_ 姓名 \_\_\_\_\_

日期 2025.3.22 成绩 \_\_\_\_\_ 指导教师 \_\_\_\_\_

注意：根据每个标样的比移值在 0.3~0.5 间，确定相应的洗脱剂比例。

### 3. 干法装柱

(1) 取一支色谱柱，在柱子的收缩部塞一团脱脂棉花；固定在铁架台上。在棉花上铺一层粗石英砂。

(2) 往色谱柱加入 200 目-300 目硅胶，至合适高度 (10-15 cm)。

(3) 加入 10:1 的石油醚/乙酸乙酯溶液，至溶剂浸湿柱内硅胶。

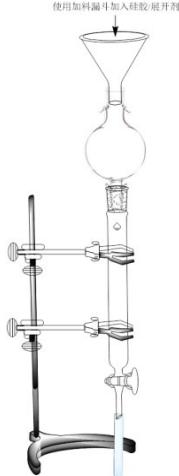
### 4. 湿法装柱

(1) 取一根色谱柱，在柱子的收缩部塞一团脱脂棉花；在棉花上铺一层粗石英砂或海沙(也可用无水硫酸钠代替)。注意：具砂板层析柱可省去此步。

(2) 用 100 mL 烧杯量取约 50-60 mL 200-300 目硅胶。注意：硅胶的量需保证硅胶柱体长约 12-15 厘米。

(3) 边搅拌混有 100 mL 石油醚和 10 mL 乙酸乙酯的溶剂 (置于 400-500 mL 烧杯)，边倒入已量取好的硅胶，调成糊状。

(4) 在搅拌下通过加料漏斗装柱，装柱时可用洗耳球或单联球轻敲柱壁，用单联球多次加压将柱子压紧。请不要把柱子压干，以免在柱中引入空气。注意：该步骤中的溶剂可继续用于后续洗脱。



### 5. 湿法上样

(1) 取少量的洗脱剂在 5 mL 圆底烧瓶或锥形瓶中溶解已备好的肉桂酸乙酯和乙酰苯胺混合物。

(2) 当溶剂的液面刚好流至硅胶面时，将样品溶液在不扰动吸附剂层面的情况下，加到柱体上面。用极少量的洗脱剂洗涤瓶子 2 次。同时沿柱壁转移溶液至柱上注意：每次都需要待液面刚好流至硅胶面时，再转移新的液体至柱上。

(3) 如果需要，最后用少量清洁溶剂对柱壁洗涤 1~2 次。

### 6. 当溶剂的液面刚好流至硅胶面时，通过加料漏斗铺一层粗石英砂或海沙。

### 7. 洗脱：该实验中两化合物极性相差较大，建议直接使用 PE/EA 10:1 洗脱。收集洗脱液容器：试



# 中心科学实验

## 实验报告

系 \_\_\_\_\_ 专业 学号 \_\_\_\_\_ 姓名 \_\_\_\_\_

日期 2025.3.22 成绩 \_\_\_\_\_ 指导教师 \_\_\_\_\_

管

8. 通过薄层层析确定不同组分的分布。
9. 分别收集不同组分于 100 mL 的圆底烧瓶中，通过旋转蒸发仪脱除溶剂（水浴温度 45 °C），用少量乙酸乙酯将浓缩后的产物转移到 10 mL 的烧瓶；并用少量溶剂洗涤烧瓶，并合并到 10 mL 烧瓶中。注意：EA 总量控制在 5 mL 以内。
10. 旋转蒸发仪旋蒸至无溶剂馏出；再通过机械泵脱除残留溶剂（5 min）。
11. 计算回收率。
12. 用单联球将硅胶柱中的溶剂全部压出后，把废弃的硅胶倒入专门的垃圾桶中，溶剂倒入无卤废弃溶剂桶中。

## 5 数据记录和处理

### 5.1 标准化合物的 $R_f$ 值测定及未知样结构判断：

$$R_f(\text{乙酰苯胺}) = 4.8 / 40 = 0.120$$

$$R_f(\text{肉桂酸乙酯}) = 37 / 40 = 0.925$$

$$R_f(\text{未知样}) = 4.8 / 40 = 0.120$$

### 5.2 柱色谱

在第 3, 4 根试管中的溶液中测出产物（左图为 1, 3, 5 试管的薄层色谱结果），收集第 3, 4 根试管中的溶液于烧瓶蒸干溶剂，转移至小烧瓶中，称重（右图）。



$$\text{产物质量} = 42.743 - 42.657 = 0.085 \text{ g}$$

$$\text{样品混合物中肉桂酸乙酯质量} = 0.105 \text{ g}$$

收率为 80.95%。

## 6 结果与讨论

### 6.1 标准化合物的 $R_f$ 值测定及未知样结构判断：

未知样薄层色谱中出现了两条线，考虑画图测量存在系统误差， $R_f$  值分别与乙酰苯胺、肉桂酸乙酯差距在容许范围内，可以判断此未知样为二者的混合物。



# 中心科学实验

## 实验报告

系 \_\_\_\_\_ 专业 学号 \_\_\_\_\_ 姓名 \_\_\_\_\_

日期 2025.3.22 成绩 \_\_\_\_\_ 指导教师 \_\_\_\_\_

### 6.2 柱色谱

产率为 80.95%，可以认为本次实验比较成功。损失的原因和解决方法：

- i. 实验有明显的系统误差，初始样品的量很少，质量相对于称量所用的烧瓶差距很大，系统误差无法忽略。可以增加样品的质量来减少误差；
- ii. 最后存在转移产物的步骤，不可避免地存在损失；
- iii. 旋蒸时有少部分溶液被带走，造成损失。可以控制沸腾程度来减少误差。

## 7 思考题

### 7.1 预测三苯基甲醇、联苯、苯甲酸和苯甲酸甲酯混合物从氧化铝柱洗脱的顺序。

氧化铝是极性固定相，极性越强的化合物吸附越牢，越难洗脱。因此洗脱顺序：联苯→苯甲酸甲酯→三苯基甲醇→苯甲酸。

### 7.2 在柱色谱分离过程中，若每次收集的洗脱液量较多会带来什么影响？

洗脱液量过大导致不同组分混合，交叉污染，收集的馏分纯度下降。

### 7.3 色谱柱装好以后，在待分离的化合物溶液上柱之前，一定要使液面下降到硅胶柱水平切线，为什么？

若液面过高直接加样，可能冲散硅胶层，导致装柱不均匀或产生气泡/裂隙，影响分离效率。液面降至切线可确保样品平缓吸附于固定相表面。

### 7.4 假设有一个化学家在一个星期五的下午开始进行柱层析分离实验，但在当两种化合物被分离到柱的四分之三处时离开实验室，他在星期一返回时发现从柱上分离出来的化合物是混合物，请推测一下原因。注意：该柱在周末期间未干。

长时间静置会导致已分离的化合物因分子自由扩散重新混合。

### 7.5 番茄红素分离收率低的主要原因是分离过程中产物的氧化。一旦结晶，它就相当稳定。推测番茄红素光化学空气氧化主要产物。

双键断裂生成羰基化合物，或形成环氧化物、过氧化物等产物。

### 7.6 用自己的话定义如下三个术语：“流动相(mobile phase)”、“固定相(stationary phase)”“洗脱(elution)”。

流动相：携带样品通过固定相的溶剂；固定相：色谱柱中静止的相；洗脱：用流动相将吸附在固定相上的组分逐步带出色谱柱的过程。

### 7.7 在同一种展开剂中通过 TLC 测定化合物 X 和 Y 混合物的 Rf 值 (X: 0.75; Y: 0.52)。如果用柱色谱法以与展开剂组分相同的溶剂为流动相分离该混合物，X 和 Y 这两种化合物中哪一种更容易被吸附在柱子顶部？解释一下。

TLC 中 Y 的 Rf 值低，表明其与固定相作用强，X 优先洗脱。

### 7.8 请问你还知道哪些色谱方法？它们的用途有什么不同？

气相色谱：分离挥发性化合物；离子交换色谱：分离带电分子。