

## 有机化学色谱学实验基本操作规范建议

李厚金<sup>1,\*</sup>, 吴琳<sup>2</sup>, 孙兴文<sup>3</sup>, 郑媛<sup>4</sup>, 刘占祥<sup>5</sup>, 蔡双莲<sup>6</sup>, 熊英<sup>7</sup>, 余广鳌<sup>8</sup>, 刘庆文<sup>9</sup>, 韩杰<sup>10</sup>, 杜欣<sup>11</sup>, 袁呈山<sup>12</sup>, 张奇涵<sup>13</sup>, 张剑荣<sup>2,\*</sup>, 张树永<sup>14,\*</sup>

<sup>1</sup> 中山大学化学学院, 广州 510006

<sup>2</sup> 南京大学化学化工学院, 化学国家级实验教学示范中心(南京大学), 南京 210023

<sup>3</sup> 复旦大学化学系, 化学国家级实验教学示范中心(复旦大学), 上海 200433

<sup>4</sup> 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 化学国家级实验教学示范中心(中国科学技术大学), 合肥 230026

<sup>5</sup> 浙江大学化学系, 化学国家级实验教学示范中心(浙江大学), 杭州 310058

<sup>6</sup> 湖南大学化学化工学院, 长沙 410082

<sup>7</sup> 武汉大学化学与分子科学学院, 化学国家级实验教学示范中心(武汉大学), 武汉 430072

<sup>8</sup> 华中师范大学化学学院, 武汉 430079

<sup>9</sup> 吉林大学化学学院, 长春 130012

<sup>10</sup> 南开大学化学学院, 化学国家级实验教学示范中心(南开大学), 天津 300071

<sup>11</sup> 大连理工大学化学学院, 辽宁 大连 116024

<sup>12</sup> 兰州大学化学化工学院, 兰州 730000

<sup>13</sup> 北京大学化学与分子工程学院, 化学国家级实验教学示范中心(北京大学), 北京 100871

<sup>14</sup> 山东大学化学与化工学院, 济南 250100

**摘要:** 薄层色谱、柱色谱、纸色谱实验是有机化学实验的基本内容。熟练掌握并运用色谱技术分析、纯化、鉴定有机化合物是高校化学类专业学生必须掌握的基本实验技能。目前各高校色谱学实验的训练内容、要求和标准各不相同, 达成的教学效果也存在较大差距。本文针对薄层色谱、柱色谱、纸色谱实验提出了基本操作与规范建议, 希望能为国内同行开展实验教学以及科研实践提供参考。

**关键词:** 有机化学实验; 薄层色谱; 柱色谱; 纸色谱; 操作规范

**中图分类号:** G64; O6

## Basic Operations and Specification Suggestions for Organic Chemical Chromatography Experiments

Houjin Li<sup>1,\*</sup>, Lin Wu<sup>2</sup>, Xingwen Sun<sup>3</sup>, Yuan Zheng<sup>4</sup>, Zhanxiang Liu<sup>5</sup>, Shuanglian Cai<sup>6</sup>, Ying Xiong<sup>7</sup>, Guangao Yu<sup>8</sup>, Qingwen Liu<sup>9</sup>, Jie Han<sup>10</sup>, Xin Du<sup>11</sup>, Chengshan Yuan<sup>12</sup>, Qihan Zhang<sup>13</sup>, Jianrong Zhang<sup>2,\*</sup>, Shuyong Zhang<sup>14,\*</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China.

<sup>2</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (Nanjing University), School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China.

<sup>3</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry (Fudan University), Department of Chemistry, Fudan University,

收稿: 2024-08-24; 录用: 2024-09-13; 网络发表: 2024-09-24

\*通讯作者, Emails: ceslhj@mail.sysu.edu.cn (李厚金); jrzhang@nju.edu.cn (张剑荣); syzhang@sdu.edu.cn (张树永)

基金资助: 广东省本科高校教学质量与教学改革工程建设项目(化学实验教研室); 广东省高等教育教学改革项目; 中山大学本科教学质量工程项目; “教育部化学实验教学改革创新虚拟教研室”项目; 教育部2022年基础学科拔尖学生培养计划研究项目(20221008)

Shanghai 200433, China.

<sup>4</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (University of Science and Technology of China), School of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China.

<sup>5</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (Zhejiang University), Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China.

<sup>6</sup> College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China.

<sup>7</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (Wuhan University), College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China.

<sup>8</sup> College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

<sup>9</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (Jilin University), College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China.

<sup>10</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (Nankai University), College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China.

<sup>11</sup> School of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning Province, China.

<sup>12</sup> College of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China.

<sup>13</sup> National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (Peking University), College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China.

<sup>14</sup> School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China.

**Abstract:** Chromatography experiments are a fundamental experimental skill that must be mastered by the students majoring in chemistry in universities. Thin-layer chromatography, column chromatography, and paper chromatography experiments constitute the basic content of organic chemistry experiments. However, the training content, requirements, and standards for chromatography experiments vary among different universities, and lead to disparities in teaching outcomes. This article puts forward basic operation and standard suggestions for organic chemical layer chromatography, column chromatography and paper chromatography experiments, hoping to provide references for domestic peers in conducting experimental teaching and scientific research practices.

**Key Words:** Organic chemistry experiment; Thin layer chromatography; Column chromatography; Paper chromatography; Operation standard

薄层色谱(Thin Layer Chromatography, 简称TLC)、柱色谱(Column Chromatography, 简称CC)和纸色谱是最常用的色谱技术, 适用于有机化合物的分离、纯化、鉴定, 具有灵活、快速、经济、结果准确可靠等优势, 在化学、生物学和药学等领域应用广泛。色谱是化学类专业学生必须掌握的一项基本实验技能。然而, 各高校选用的教材不同, 开设的实验项目并不完全一致, 训练的内容、要求、标准不同, 达成的教学效果也存在差距<sup>[1-5]</sup>。针对以上情况, 化学“101计划”《基础化学实验》教材编写组、教育部化学实验教学改革创新虚拟教研室有机化学实验操作规范建设小组经过充分调研, 广泛征求意见, 讨论形成了该基本操作规范建议, 希望对同行有参考价值。

## 1 薄层色谱法

### 1.1 基本原理与应用

薄层色谱法是将适宜的固定相涂布于玻璃板或铝片上成一均匀薄层, 将样品点于薄层板的一端, 在展开容器内用适宜的溶剂(展开剂)展开, 使样品中所含成分分离, 而后采用合适的方法显色, 或采用薄层扫描仪扫描, 与相应的对照物按同法所得的色谱图的比移值( $R_f$ )作对比, 从而进行鉴别、监测或含量测定的方法。根据固定相的不同, 薄层色谱法可分为吸附色谱法、分配色谱法、离子交换色谱法、凝胶色谱法等, 其中应用较多的是吸附和分配色谱法。

以硅胶为吸附剂的薄层吸附色谱最常用。在展开过程中, 组分在固定相和流动相(展开剂)之间发生多次吸附-解吸, 极性大的组分与硅胶表面的硅醇基团( $\text{Si-OH}$ )和硅氧烷键( $\text{Si-O-Si}$ )的吸附作用强, 随展开剂移动慢, 展开一段时间后, 组分在薄层板上被分离, 形成不同距离的斑点。

分配薄层色谱法以多孔性物质作为支持剂,将极性溶剂固定在支持剂上形成固定相。用另一种极性较小的溶剂作为流动相来洗脱。混合物中各组分在固定相与流动相之间按其分配系数进行反复多次分配,在流动相中分配系数大的成分移动速度快,从而使混合物中各组分达到彼此分离的目的。

薄层色谱设备简单、操作方便、展开速率快,一般仅需几到十几分钟,显色容易、直观,应用比较广,主要包括:①柱色谱分离条件探索;②化学反应进程监测;③分离纯化过程检测。在柱色谱、结晶、萃取等分离纯化过程中,将分离出来的组分或纯化所得的产物溶样点板,根据展开后的斑点情况判断分离纯化的效果;④确定混合物中的组分数目。混合物溶液点样展开后出现几个斑点,就说明混合物中至少有几个组分;⑤确定两个或多个样品是否为同一物质。将各样品点在同一块薄层板上,若分别使用不同展开剂展开后各样点爬升的高度均相同,则大体上可以判定为同一物质;若爬升高度不同,则肯定不是同一物质;⑥根据薄层板上各组分斑点的相对浓度可粗略地判断各组分的相对含量;⑦快速分离出少量纯净样品。例如,制备型薄层板的面积大,薄层更厚,一次可分离数十甚至上百毫克的样品,适合于快速从混合物中分离出少量纯化合物。

## 1.2 试剂和仪器

薄层色谱法所需的试剂和仪器有:薄层板、固定相、羧甲基纤维素钠,展开剂、点样毛细管、层析缸、显色缸、三用紫外分析仪。

### 1.2.1 薄层板

最常用的薄层板是玻璃板,要求表面干净、平滑,其大小可根据样品量、组分种类和数目、展开方式来确定。检测用小板通常用载玻片(7.5 cm × 2.5 cm)或狭长板(20 cm × 2.5 cm),制备分离常用较大规格的薄板(如20 cm × 20 cm)。

### 1.2.2 固定相

常用的固定相有硅胶、氧化铝、硅藻土、纤维素、聚酰胺及纤维素。

#### (1) 硅胶

硅胶是薄层色谱最常用的固定相,化学通式为 $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ,化学惰性。硅胶H不加任何添加剂;硅胶G加有13%煅石膏(又称熟石膏,  $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ )为黏合剂;硅胶HF<sub>254</sub>加有有机荧光素,荧光素在波长254 nm的紫外光下发黄绿色荧光;硅胶GF<sub>254</sub>同时加有煅石膏和荧光素。

固定相颗粒要求大小适当、粒度均匀。颗粒过大,展开时溶剂推进速率太快,分离效果不好;颗粒太小,展开太慢,斑点拖尾不集中,分离效果也差。薄层色谱用硅胶的粒度通常为200–300目。粒度较粗的硅胶,例如60–90目的用作柱色谱吸附剂,使用时应予注意。

硅胶适用于分离中性物质,酸性和碱性物质与硅胶作用强,如用中性溶剂展开,斑点拖尾严重,分离效果差。为了得到满意的分离效果,可改变硅胶酸碱性。例如,可用稀酸或稀碱液(0.1–0.5 mol·L<sup>-1</sup>)或一定pH的缓冲溶液代替水制备酸性或碱性的薄层;也可在展开剂中加入少量的酸或碱进行展开。

硅胶的吸附活性取决于含水量,吸附层析一般采用含水量为10%–12%的硅胶;含水量小于1%的活性最高;若吸水量超过17%,吸附力极弱不能用作吸附剂,但可作为分配层析中的支持剂。用加热脱水法可使硅胶活化,当硅胶加热至100–110 °C时,硅胶表面因氢键所吸附的水分即能被除去。

#### (2) 氧化铝

氧化铝( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )具有较高的吸附容量,分离效果好,价格低廉,应用较广泛。氧化铝有碱性、中性和酸性三种。碱性氧化铝(pH 9–10)适用于碱性物质(如胺、生物碱)、碳氢化合物、甾体化合物等的分离。但这种吸附剂能引起被吸附的醛和酮的缩合、酯和内酯的水解、醇羟基的脱水、乙酰糖的去乙酰化、维生素A和K等的破坏等不良副反应,所以,含有这些化合物时不宜用碱性氧化铝分离。中性氧化铝(pH 7–7.5)适用于醛、酮、醌、某些苷类及在酸碱溶液中不稳定的酯、内酯等化合物的分离;酸性氧化铝(pH 3.5–4.5)适用于天然及合成的酸性物质如有机酸、氨基酸等的分离。

#### (3) 硅藻土

硅藻土中的 $\text{SiO}_2$ 通常占80%以上,最高可达94%,还含有少量的 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CaO}$ 、 $\text{MgO}$ 、 $\text{K}_2\text{O}$ 、

Na<sub>2</sub>O、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>和有机质。优质硅藻土的Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>含量为3%–6%，Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>含量一般为1%–1.5%。硅藻土细腻、松散、质轻、多孔、吸水、渗透性强，其吸附性能与孔径大小有关，适合于不同类型化合物的分离。

#### (4) 聚酰胺

聚酰胺薄膜层析是1966年后发展起来的一种薄层层析方法，具有灵敏度高、分辨力强、展开迅速和操作简便等优点，已用于酚类、醌类、硝基化合物、氨基酸及其衍生物、核酸碱基、核苷、核苷酸、杂环化合物、合成染料、磺胺、抗菌素、环酮、杀虫剂及维生素B等化合物的分析。

#### (5) 纤维素

纤维素是中性支持剂，需在吸附水、缓冲溶液或甲酰胺等之后才能用于薄层层析，适用于氨基酸、糖类、核酸等亲水性物质的分离。

### 1.2.3 展开剂

展开剂的极性大小以及对被分离组分的溶解度大小对于分离效果非常重要。常用展开剂的极性按如下次序递增：己烷和石油醚<环己烷<四氯化碳<三氯乙烯<二硫化碳<甲苯<苯<二氯甲烷<氯仿<乙醚<乙酸乙酯<丙酮<丙醇<乙醇<甲醇<水<吡啶<乙酸。

### 1.3 实验步骤

这里主要介绍硅胶和氧化铝薄层色谱的实验步骤(图1)。

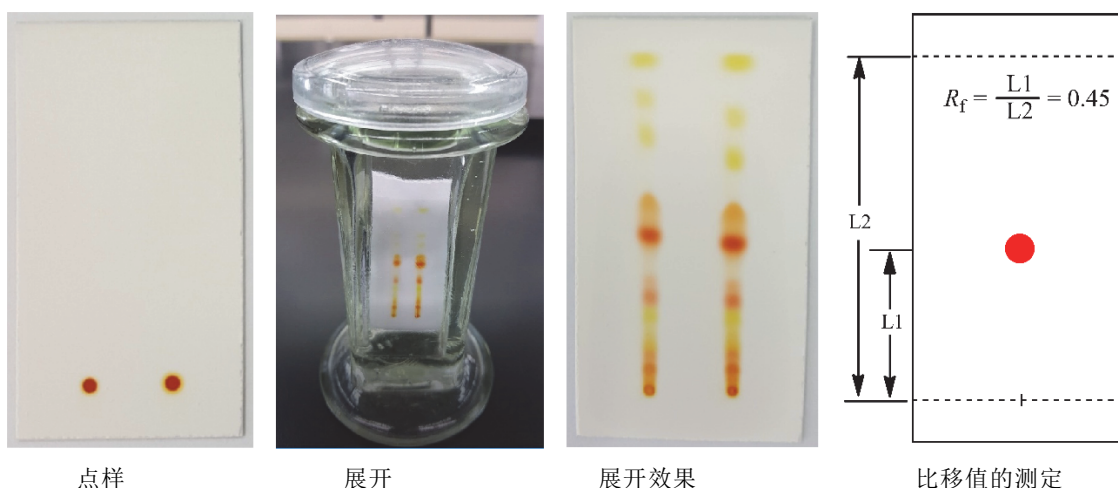


图1 薄层色谱实验过程图示

实验样品为辣椒红色素，展开剂为V(石油醚):V(乙酸乙酯)=9:1

#### 1.3.1 薄层板制作

薄层板制作是指将固定相均匀地涂布在玻璃板上，形成一薄层。薄层涂布一般可分无黏合剂和含黏合剂两种，常用黏合剂为10%–15%煅石膏或用5%–7%羧甲基纤维素钠(CMC)水溶液。CMC溶液的配制方法：将0.6 g CMC加入100 mL蒸馏水中，煮沸使其充分溶解，静置过夜，取上层清液。

将待铺的载玻片平放在水平台面上，将吸附剂置于干净研钵内，按照每克硅胶G(或者GF<sub>254</sub>)加2–3 mL蒸馏水(或3–4 mL约6‰ CMC溶液)，或每克氧化铝加1–2 mL蒸馏水的比例研磨成糊状。研磨匀浆的稀稠一般通过拿起研棒时匀浆下滴的情况来判断，越稠越难下滴。匀浆的稀稠会影响板的平滑度，如果铺板用的匀浆过稠，容易造成层纹；如果过稀，水蒸发后板表面较粗糙。另外，匀浆的稀稠还会影响板涂层的厚度，涂层厚，显色不那么明显；涂层薄，点样易过载。

用不锈钢药匙舀取糊状物倒在载玻片上迅速涂布均匀，也可轻敲载玻片边缘，或将载玻片托在手中，前后左右稍稍倾斜，靠糊状物的流动性使之分布均匀，涂布成0.25–0.5 mm厚度，然后再平放在台面上，使其固化定型并晾干。如含有煅石膏，在固化的过程中煅石膏会吸收水形成新的固体，

反应式为： $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O} + 3/2\text{H}_2\text{O} = \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

制得的薄层要求厚薄均一，没有纹路，没有团块凸起。要求在研磨糊状物和涂铺薄层板时应动作迅速，一次研匀，一次倾倒，一次铺成。

待涂敷固定相的薄层阴干至表面无水渍后，将薄板移入烘箱内活化。硅胶薄板在105–110 °C烘焙0.5–1 h即可；氧化铝薄板在200–220 °C烘焙4 h，其活性约为II级；若在150–160 °C烘焙4 h，活性相当于III–IV级。如果是用CMC作为黏合剂，需严格控制烘焙温度，以免温度过高引起纤维素碳化而使薄层变黑。活化后的薄层板在烘箱内自然冷却至接近室温，取出后立即放入干燥器内保存备用。薄层板在空气中不能放置太久，否则会吸潮降低活性。

有部分早期版本的实验教材中写到，可用低沸点有机溶剂如95%乙醇，将硅胶调成糊状铺板，然后在空气中挥干乙醇后即可使用。这种方法制得的薄层板吸附剂在玻璃板上附着力差，容易脱落，不便操作，且挥发性溶剂易造成环境污染。该方法目前已很少被采用。

### 1.3.2 市售薄板

市售薄板有铝板、玻璃板。玻璃板已经做成了适宜的尺寸，可以直接选用。市售的铝板规格是20 cm × 20 cm，需要将其裁成合适大小备用。

### 1.3.3 样品溶解

溶解样品的溶剂一般是无水乙醇、甲醇、氯仿、乙酸乙酯等。样品溶液的含水量越小越好。如果溶剂对样品溶解度过高，极性太大，会使样品溶液在薄板上点样后发生空心现象。通常而言，大约0.5%–2.5%的样品浓度比较适合薄层色谱分析。如果是未知样品，可先称取1 mg样品溶解在1 mL的溶剂中，先测试该样品展开效果，再进行调整。

### 1.3.4 薄板标记

对于分析用的薄层色谱，点样前可用铅笔在距薄层板一端约1 cm (高效薄板可以为约0.5 cm)处轻轻地画一条水平横线作为“起始线”，并在线上拟点样的位置做好标记。

### 1.3.5 点样

用内径小于1 mm的平口毛细管吸取样品溶液，垂直轻轻触碰薄板，将样品溶液小心地点在“起始线”上，具体的上样量可以根据浓度进行调节。在点样处形成一个圆形的斑点，样品斑点的直径一般不应超过2 mm。点样的样品不能太浓，点样量不能太多，否则展开后斑点会变大，拖尾严重。如果样品溶液太稀需要重复点样，可以边用冷、热风交替吹干，须待前一次点样的溶剂挥发之后再点样。点样时毛细管的下端应轻轻接触吸附剂层，如果用力过猛，将吸附剂层戳成一个孔，会影响吸附剂层的毛细作用，也可能影响展开后样品的 $R_f$ 值。若要在同一块板上点两个以上样点时，样品点之间的距离以展开后不造成斑点重叠交叉为准，通常以0.5–1.0 cm为宜。如果采用市售高效薄板，样点间距可以适当减低。点样后需待样点上溶剂挥发干，才能放入层析缸中展开。

### 1.3.6 配制展开剂

展开剂的选择是由被分离物质的极性决定，被分离物极性小，选用极性较小的展开剂；被分离物极性大，选用极性较大的展开剂。环己烷和石油醚是最常使用的非极性展开剂，适合于非极性或弱极性样品；氯仿和甲苯是中等极性的展开剂，可用作多官能团化合物的分离；乙酸乙酯、丙酮或甲醇适合于分离极性较强的样品。若单一展开剂不能很好分离，也可采用2种或者多种不同极性的可以互溶的溶剂按一定比例混合配制。不互溶的不适合配制，比如甲醇-石油醚就不互溶。

### 1.3.7 展开

在层析缸中加入展开剂，溶剂高度要低于薄板点样高度，要确保点样点不会浸没在展开剂中。对于分析用的小板，展开剂的高度要低于0.5 cm。

轻轻摇动层析缸，使缸内展开剂挥发，让蒸气充满层析缸。大容器要达到溶剂蒸气饱和所需的时间比小的长，比如分离制备薄层用的大层析缸，达到蒸气饱和可能需要30 min。

如果使用混合溶剂做展开剂且各溶剂的挥发性差异较大，缸内蒸气未饱和将导致板上的展开剂

挥发，薄层板边缘与中间的展开剂比例不同，因此样品在边缘和中间展开的距离也不同，这种现象称为边缘效应，严重时会影响分离效果。

如果需要更换溶剂，必须等层析缸中前一次的溶剂挥发干净后，再加入新的溶剂。层析缸放于桌面静置待蒸气饱和，备用。

将已点样的层析板，放入层析缸内，动作应该尽量轻、快。若是分析用的小板，宜用镊子夹取，若是分离制备的大板，应该戴手套用手捏住板的顶部拿取，尽可能避免用手直接接触硅胶表面，以免沾污薄板。

展开的方式有斜靠式、直立式、卧式、下行式、双向式等，目前最常见的是斜靠式。不论何种展开方式，展开容器必须密闭盖紧。

在展开过程中，层析缸要静置在桌面上，不得挪动，以免影响展开效果。

待溶剂前沿接近薄板顶端约1 cm (高效薄板可以为约0.5 cm)处时，将薄板取出，用铅笔沿着溶剂前沿处轻轻画一条线。

在制备薄层层析中，为了获得更好的分离效果，有时可采用双向展层和分次展层。双向展层是将试样点在方形薄层板的一角，溶剂沿薄层板的一个方向展开，然后再沿垂直方向作第二次展开，两次展开可采用不同的溶剂系统，使复杂混合物得到较好的分离。分次展层是先用一种溶剂展开至一定距离后，将薄层板取出，待溶剂挥发后再按同一方向用第二种溶剂展开。

### 1.3.8 斑点显示

展开完成后，将薄层板从层析缸中取出，于室温挥发至干或在烘箱中干燥。然后根据被分离物质的种类和性质，选择合适的方法观察记录斑点的情况。有颜色的物质可以直接观察，其他可采用通用显色法。理想的显色方法需灵敏度高、斑点颜色稳定、斑点与背景的对比度好、斑点的大小及颜色的深度与物质的量成正比。主要显色法有：

(1) 紫外照射法：样品在加有荧光素的薄层板上展开后，在三用紫外分析仪中，用波长为254 nm或者365 nm的紫外灯照射，原来在紫外灯下无荧光的物质可被显示鉴别，有荧光物质则更明显。该显色法方便，不破坏样品。

(2) 碘蒸气法：将展开后的薄层板放入充满碘蒸气的碘缸。大多数有机化合物遇碘蒸气发生吸附作用显黄-黄棕色斑点。碘显色均匀细腻，对于薄层色谱的定性、定量检测更加直观、准确。但是固体碘的挥发受温度的影响很大，温度低时挥发慢，温度高时挥发快，这对显色过程、显色时间造成一定的影响。碘显色后在空气中放置时，碘会挥发导致斑点褪色。多数情况下碘是一种非破坏性的显色剂，可将化合物刮下作进一步处理，在制备薄层色谱中特别有用。该法通用性强，可与紫外照射法结合使用。

(3) 喷雾显色法：喷雾显色剂常用硫酸、重铬酸钾或其他混合溶液，对绝大多数有机物有效，但有破坏性，故此类显色剂不适用于定量测定或制备薄层。无机吸附剂制作的薄层板经此类显色剂喷雾后，被分离的有机物斑点即显色。在喷雾显色时，不加黏合剂的薄层要小心操作，以免吹散吸附剂。以CMC为黏合剂的硬板不宜用硫酸显色，因为硫酸也会使CMC碳化变黑，使整板呈黑色而显不出斑点位置。

几种常用的喷雾显色剂如下：

① 硫酸：通用。喷洒剂：5%的浓硫酸乙醇溶液，或15%的浓硫酸正丁醇溶液，或浓硫酸-醋酸(体积比1:1)。喷洒后处理：在空气中干燥15 min，再加热至110 °C直至出现颜色。

② 重铬酸钾-硫酸：检查一般有机物。喷洒剂：5 g重铬酸钾溶于100 mL 40%硫酸。喷洒后处理：加热到150 °C至斑点出现。

③ 香草醛-硫酸：检查高级醇类、酚类、甾体、萜类、芳香油。喷洒剂：1 g香草醛溶于100 mL浓硫酸，或0.5 g香草醛溶于100 mL硫酸-乙醇(体积比4:1)中。喷洒后处理：室温或120 °C加热至斑点显色。

④ 三氯化铈(Carr-Price试剂): 检查甾体、萜类、皂类。喷洒剂: 25 g三氯化铈溶于75 g氯仿中(亦可以用氯仿或四氯化碳的饱和溶液)。喷洒后处理: 100 °C加热5 min, 于紫外灯下检示荧光。

⑤ 茚三酮: 检查氨基酸及氨基糖。喷洒剂: 0.3 g茚三酮溶于100 mL正丁醇, 加入3 mL醋酸; 或0.2 g茚三酮溶于100 mL乙醇(或丙酮)。喷洒后处理: 110 °C加热至斑点出现。

⑥ 磷钼酸显色剂: 检查胺类物质。5%–10%磷钼酸乙醇溶液, 淡黄色, 久置变为浅绿色, 不影响使用。浸板或喷板, 加热, 浅黄色背景, 还原性物质显蓝绿色斑点, 如果斑点太浓, 可能显深黄色。

### 1.3.9 测定比移值

比移值( $R_f$ )是原点至斑点中心的距离与原点至展开剂前沿的距离的比值。薄层斑点有时不呈圆形, 可能拖尾且浓度不均一, 前浓后稀, 这时用斑点的“重心”来代替几何中心计算 $R_f$ 值会更准确。

在薄层、溶剂、温度等实验条件恒定的情况下,  $R_f$ 值为定值, 不随溶剂移动距离的改变而变化, 因此, 可根据 $R_f$ 值来鉴定化合物。实际应用中常通过待检测样品与对照品的 $R_f$ 值是否一致来判断。好的层析效果, 应该是各组分的 $R_f$ 值在0.3–0.7之间并对被分离物质有适当的选择性。

## 2 柱色谱

### 2.1 柱色谱原理

利用色谱柱将混合物中各组分分离开来的操作称为柱色谱。其分离原理与薄层色谱相同, 依据其作用原理又可分为吸附柱色谱、分配柱色谱和离子交换柱色谱等, 其中吸附柱色谱应用最广。

### 2.2 试剂和仪器

#### 2.2.1 色谱柱

实验所用的色谱柱一般为玻璃柱, 其中高硼硅玻璃比普通玻璃性能稍好。

色谱柱的尺寸(直径与高度之比)选择应根据被分离物的量以及分离难易程度而定, 一般在1:8到1:50之间。柱身细长, 分离效果好, 但可分离的量小, 且分离所需时间长; 柱身短粗, 分离效果较差, 但一次可以分离较多的样品, 且所需时间短。如果待分离物各组分离较难分离, 宜选用细长的柱子; 如果要处理大量的较易分离的或对分离纯度要求较低的样品时, 则可选用粗而短的柱子。

色谱柱底部最好具有砂芯, 但砂芯比较难清洗, 用久了易堵塞。如果没有砂芯, 则在装柱时需将色谱柱底部加棉花, 防止吸附剂随洗脱剂漏下。柱下部的活塞最好是聚四氟乙烯材质的; 如果是普通的玻璃活塞, 最好不涂真空油脂, 以免污染产品。色谱柱顶部管口建议为标准磨口, 可以方便连接储液球、导气管、空心塞等。

#### 2.2.2 吸附剂

吸附剂的选择应综合考虑其种类、酸碱性、粒度及活性等因素。柱色谱中最常用的吸附剂是硅胶或氧化铝。常用硅胶为60–90目的粗硅胶, 如果用颗粒较小的200–300目的硅胶H或HF<sub>254</sub>, 洗脱剂的流动会较慢, 常需要加压使洗脱剂流动更快。氧化铝的粒度一般为100–150目。吸附剂用量应为被分离样品的30–50倍。对于难以分离的混合物, 吸附剂的用量可达100倍甚至更高。

#### 2.2.3 洗脱剂

常选用石油醚、乙酸乙酯、氯仿、甲醇。一般先在薄层色谱板上试选, 初步确定后再上柱分离。如果所有色带都行进较慢则应改用极性较大、溶解性也较大的溶剂, 反之则改用极性和溶解性都较小的溶剂, 直至获得满意的分离效果。

由于薄层色谱采用的是上行法, 而柱色谱则是下行法, 且薄层色谱的硅胶添加了黏合剂, 薄层色谱和柱色谱两者选用的硅胶目数、比表面积也可能不一样, 因此, 不能简单地将薄层色谱的溶剂套用于柱色谱。一般柱色谱的洗脱剂极性要低于薄层色谱的洗脱剂极性。按照经验, 薄层色谱展开时 $R_f$ 值为0.2–0.3的溶剂比较适合于作为柱色谱的洗脱剂。

柱色谱洗脱剂的用量往往较大, 故最好使用单一溶剂以利回收。只有在选不出合适的单一溶剂时才使用混合溶剂。混合溶剂一般由两种可以无限混溶的溶剂组成, 极性小的可用石油醚–乙酸乙酯

系统：极性较大的用氯仿-甲醇系统；极性大的用甲醇-水-正丁醇-醋酸系统；有拖尾现象的可以在洗脱剂中加入少量氨水或冰醋酸。

如果必须在色谱过程中改变洗脱剂，不能把一种溶剂迅速换成另一种溶剂，而应当将极性稍大的溶剂按一定的体积百分率逐步提高其比例，直至所需要的配比。要避免因溶剂极性增加过快而导致后面的色带行进过快，追上前面的色带，造成交叉带。但如果两色带间有很宽的空白带，不会造成交叉，则亦可直接换成后一种溶剂。另外，有些溶剂如乙醚、氯仿、二氯甲烷与硅胶作用会放热，若洗脱剂极性梯度增加太快，易在硅胶柱中产生气泡，导致分离效率下降。

洗脱剂的选择除了考虑分离效果外，还应当考虑：① 在常温至沸点的温度范围内，可与被分离物长期共存而不发生任何化学反应，也不被吸附剂或被分离物催化而发生自身的化学反应；② 沸点较低以利回收；③ 无毒或者毒性较小，操作安全、环保；④ 价格相对便宜，购买方便；⑤ 回收溶剂一般不应作为最终纯化产物的洗脱剂。

### 2.2.4 待分离的混合物

根据待分离样品组分的分子结构，可估计其极性和溶解性能，若化合物的极性较大，则易被吸附而较难被洗脱，宜选用吸附力较弱的吸附剂和极性较大的洗脱剂。反之亦然。硅胶和氧化铝对各种化合物的吸附性大致按以下次序递减：酸和碱>醇、胺、硫醇>酯、醛、酮>芳香族化合物>卤代物、醚>烯>饱和烃。可用薄层色谱开展预分离实验为柱色谱实验摸索条件。若各组分极性差别较大，易于分离，可选用较为短粗的柱子，使用较少的吸附剂；若各组分极性相差甚微，则难于分离，宜选用细长的柱子并使用较大量的吸附剂。

### 2.2.5 其他物品

有储液漏斗、接收容器、加压或减压设备、脱脂棉花、石英砂(洗净烘干)。如果色谱柱吸附剂装得比较高，顶部可装液空间较小时，可在柱顶连接一个洗脱剂储液漏斗。接收洗脱剂的容器，可根据柱容积大小以及洗脱剂的体积确定选用锥形瓶或者试管。柱色谱有常压、加压、减压3种方法。可通过空压机、小气泵或者双连球加压，以增加洗脱剂的流速，减少产品的收集时间。但压力过大，溶剂流动太快，会降低柱子的塔板数，降低分离效果。减压可使用减压泵抽气，但由于大量的空气通过色谱柱会使溶剂挥发，有时在柱子外面还会有水汽凝结，一般不推荐使用。

## 2.3 实验操作

### 2.3.1 拌样

拌样可使样品均匀地吸附在硅胶表面，以增强分离效果。取一大大小合适的烧杯，加入适量吸附剂，滴加样品溶液，用玻棒搅拌均匀，在通风橱中挥发至干。拌样硅胶用量应尽可能少，要确保样品都均匀吸附在硅胶表面，在溶剂挥发干后硅胶应分散均匀、不成团、无样品颗粒析出。若有样品颗粒没有吸附在硅胶上，则应重新用溶剂溶解后再补加硅胶重新拌样。如果样品量较多，可以在圆底烧瓶中加适量溶剂溶解，然后倒入适量硅胶，通过旋转蒸发抽干溶剂，使样品均匀吸附在硅胶表面(图2)。

### 2.3.2 装柱

有干法装柱和湿法装柱两种方法。

#### (1) 干法装柱

取一带有砂芯的玻璃色谱柱，若没有砂芯，需在柱底垫一层脱脂棉以防吸附剂漏下。棉花不能拧成团，否则溶胀后会严重降低洗脱剂流速。先将色谱柱竖直固定在铁支架上，关闭活塞。可以在棉花上加一层约5 mm高的石英砂。将硅胶通过漏斗慢慢装入柱内，中间不应间断。也可用橡皮槌轻轻敲打柱身使硅胶装填均匀、紧密。柱装好后，打开下端活塞，然后倒入洗脱剂洗脱以排尽柱内空气，并保持硅胶上方有一定高度的液面。

干法装柱的缺点是柱中容易混有气泡，特别是使用硅胶为吸附剂时，硅胶在溶剂中有一溶胀过程，往往会留下缝隙和气泡，影响分离效果。若气泡严重则需要重新装柱。

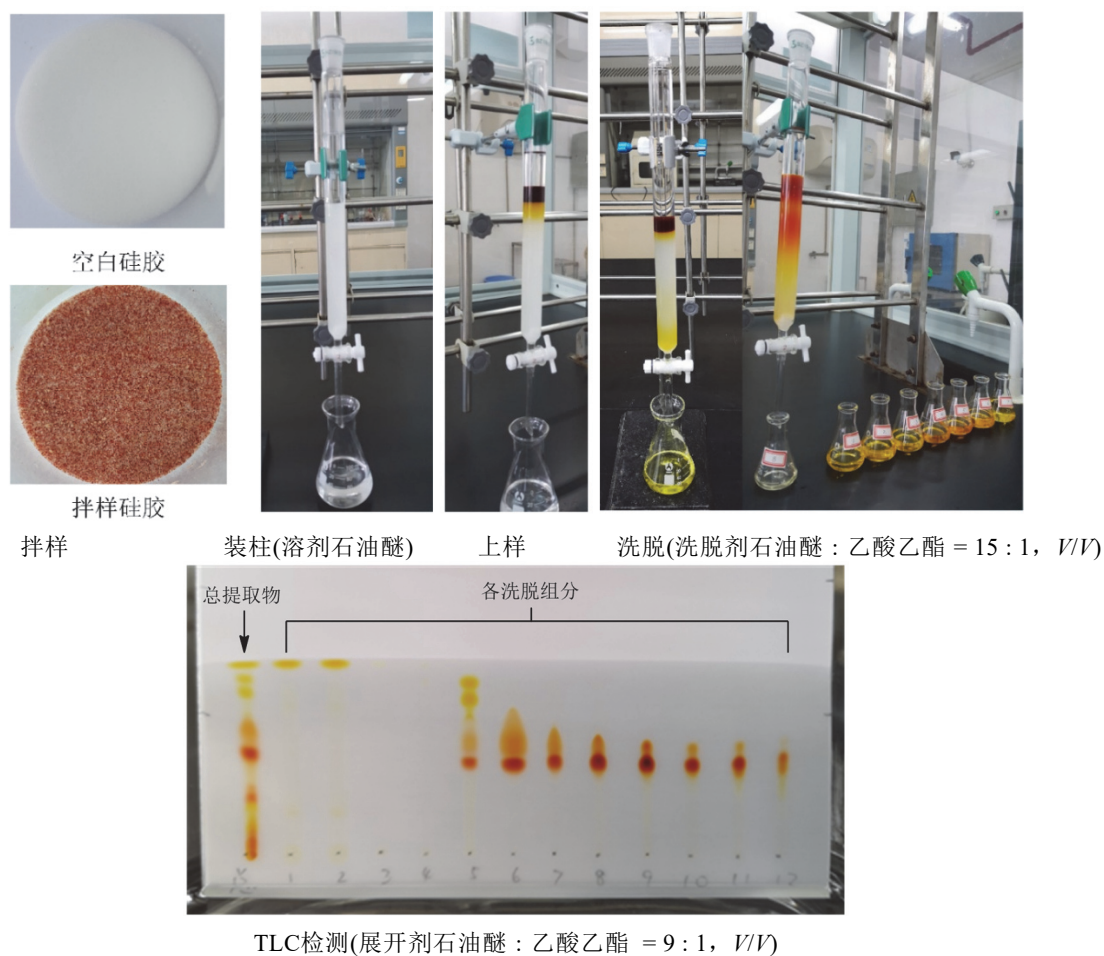


图2 柱色谱实验过程图示

实验样品为辣椒红色素

## (2) 湿法装柱

装柱溶剂要求对样品的溶解性低，最常用的是低极性溶剂石油醚。建议初学者选用石油醚。

将柱竖直固定在铁支架上，关闭活塞，加入石油醚至柱容积的1/3，用一根干净的玻璃棒将少量脱脂棉轻轻推入柱底狭窄部位，小心挤出其中的气泡，但不要将棉花压得太紧密，以免洗脱剂流出太慢。将干净的石英砂加入柱中，在脱脂棉上均匀沉积成约5 mm厚的一层。

取适量吸附剂置于烧杯中，加石油醚浸润并调成糊状。打开柱下活塞调节流速为1–2滴/秒，将调匀的吸附剂在搅拌下自柱顶缓缓注入柱中，吸附剂依靠重力和溶剂的带动，在柱中均匀沉降，不断把流出的溶剂加回柱内保持一定的液面高度。吸附剂最好一次加完。若分数次加，则会沉积为数层，在分离时易被误认为是一个色层。在装完柱后，仍需始终保持吸附剂上面有一段液柱，否则将会有空气进入吸附剂，形成气泡而影响分离效果。如果发现柱中有气泡，可趁着硅胶尚未完全沉降时，伸入细长玻棒至气泡处小心搅动或者用橡胶塞轻敲柱身设法排除，若不能排除，则应倒出重装。

沉降完成后，加入更多的石油醚，用气泵加压，使柱内吸附剂被压缩至体积、高度不变，溶剂液滴流速恒定为止。无论后续进行常压洗脱或加压洗脱，都应进行这一步，以避免过柱时由于柱床萎缩而产生开裂。

干法和湿法装柱各有优劣。干法装柱较方便，速度快，特别适合装体积较大的柱子。湿法比较均匀、紧密、结实；缺点是所需溶剂体积较大，耗时长。无论采用哪种方法，装柱后吸附剂的上表

面一定要平整,不能有裂缝或气泡,以免在上样、加溶剂时,气泡释放出来,严重时导致柱内硅胶层开裂,洗脱时样品不能平整地通过,分离效果差。建议初学者采用湿法装柱。

### 2.3.3 上样

有干法、湿法两种上样方法,采用哪种方法应根据样品的实际情况而定。要求样品中不含大于洗脱剂极性的溶剂,并使样品以尽可能小的装样高度上到柱子上。

#### (1) 干法上样

把待分离的样品用少量低沸点、大极性溶剂溶解后,加入少量硅胶,拌匀后再旋转蒸发除去(或者挥干)溶剂,将得到的粉末小心加到已装好吸附剂的柱子的顶层,注意保留足够的溶剂使加入的干粉能够恰好被溶剂覆盖以防柱中硅胶开裂。溶剂不宜太多,以免增加上样厚度。如加入的干粉层中混有气泡,应用细玻棒小心搅拌除去气泡,但要保持硅胶表面的平整。

有些样品溶解性差,能溶解的溶剂如DMF(二甲基甲酰胺)、DMSO(二甲基亚砷)等又不能上柱,就必须用干法上柱。

#### (2) 湿法上样

##### ① 样品溶液上样

适合湿法上样的应该是粘度不大且均匀的液体样品或者在小极性溶剂(极性不大于洗脱剂)中溶解度非常好的固体和液体样品。用于溶解样品的溶剂体积应越少越好。

上样时先打开活塞,控制柱子上方溶剂恰好降至硅胶面时关闭活塞。用滴管吸取样品溶液,沿柱子内壁于硅胶面上方0.5 cm以内距离均匀地加样,待样品布满硅胶面后打开活塞,继续加样,加样的速度以柱子不出现气泡为限。待所有样品上完后,用尽可能少的溶剂润洗样品瓶,将溶液加到硅胶上。另取干净滴管,吸取少量溶剂从上样处上方沿柱子内壁淋洗数次,待所有样品开始在柱子中展开后可加入大量溶剂开始过柱。若担心上样及加溶剂过程中会将柱子表面硅胶冲歪,可考虑在上样前先在柱子硅胶上加一层约5 mm高的石英砂。有些石英砂颗粒比较粗,要小心加入,不要把硅胶面弄得不平整。上样过程中应时刻保持柱内硅胶在液面下,以免形成气泡或裂纹。

##### ② 样品拌样,然后用低极性的溶剂调匀上样

在已装好空白硅胶的柱内保持有一定高度的装柱溶剂,将用低极性的装柱溶剂(如石油醚)调匀的拌样硅胶用滴管慢慢加入色谱柱中,使之分散、均匀地沉降在空白硅胶上。加完后,待液面下降至接近拌样硅胶面时,关闭活塞,沿着柱内壁慢慢加入石油醚,反复淋洗,再打开底部活塞,如此反复小心操作数次。加溶剂时要用滴管沿色谱柱内壁缓缓加入,要始终保持硅胶上端表面平整。

在上好样后,可以在硅胶的最上层装填约5 mm的石英砂或盖张小滤纸片或再加一小团蓬松的棉花,防止添加溶剂的时候将硅胶表面冲歪。

### 2.3.4 洗脱

在实际操作中,较少采用某一固定比例的洗脱剂,常采用梯度洗脱。先使用极性较小的溶剂,使最容易脱附的组分分离,然后梯度增加极性,将极性较大的化合物依次从色谱柱中洗脱下来。控制洗脱剂的流速,洗脱剂要匀速滴下而不成股流下,以1-2滴/秒为宜。柱上端要保持一定的洗脱剂液面高度。

### 2.3.5 样品的收集

多数情况下是按一定体积等份接收。事先准备一批接收瓶,依次编号,各接收相同体积的洗脱剂(见图2)。

若待分离的混合物有颜色,在分离过程中,能分成若干个不同的色带,则可以按色带逐份收集。

若分离的是无色物质,但在紫外照射下能够显色,可使用带荧光素的吸附剂,在黑暗的环境中用紫外光照射色谱柱以显出各色带的位置,以便按色带分别接收。但在色谱柱上的显色效果远不如在薄层板上的显色效果好,操作也不是很方便。

在洗脱剂的接收过程中, 色谱柱的下嘴应伸入接收容器内, 其位置比容器的瓶口低1–2 cm即可。如果下嘴高于容器瓶口, 会出现悬空滴液接收, 因溶剂挥发会导致空气中的水汽凝结在下嘴外沿并混入接收的洗脱液, 为溶剂的回收利用和样品的干燥带来麻烦。如果洗脱剂中样品浓度高, 悬空接收还可能因溶剂挥发导致样品以固体形式析出在下嘴边沿。

### 2.3.6 检测

将所收集的洗脱液分别在薄层板上点样展开, 然后采用合适的方法显色(紫外、碘显或者使用专用喷显剂), 具有相同 $R_f$ 值的为同一组分, 可以合并浓缩处理。如仍为含几个成分的混合物, 则需要进一步用色谱法或其他方法进行分离。

经柱色谱分离纯化得到的产物, 由于含有大量溶剂, 且溶剂中的杂质也会浓缩到产品中, 如果要作结构分析, 最好再用少量溶剂洗涤除去大部分的杂质, 必要时也可进行重结晶等操作以得到纯品。

## 2.4 注意事项

- (1) 柱色谱实验需在通风橱内或者是通风良好的环境中进行。
- (2) 柱色谱所用器材和试剂均应干燥、无水。
- (3) 避免形成气泡。造成气泡的原因可能是脱脂棉中的空气未挤净, 吸附剂未充分浸润溶胀, 或者在装柱或洗脱过程中洗脱剂放出过快, 液面下降到吸附剂沉积面以下。所用溶剂在使用前最好经超声脱气处理。
- (4) 要控制洗脱剂流出的速度。一般控制流速为1–2滴/秒。
- (5) 避免色带过宽, 界限不清。应正确选择柱径与高度比、吸附剂、洗脱剂。上样过程中避免过早加大量溶剂淋洗, 造成样品溶液大幅度稀释。保证样品在柱中停留时间适宜, 洗脱过程最好一次性完成, 避免反复关停且停留时间过长。
- (6) 避免色带倾斜。避免吸附剂的顶面装得倾斜; 或者是上样不均匀; 或者是装填的硅胶在柱内一边紧, 一边松; 或柱身安装得不垂直。

## 3 纸色谱

### 3.1 基本原理与应用

纸色谱的原理涉及分配、吸附和离子交换等, 但以分配原理为主。因此, 纸色谱也被认为是分配色谱。纸色谱法常以滤纸为惰性支持物, 把一种溶剂固定在支持物上作为固定相。滤纸能吸附水, 也可吸附其他极性物质, 如甲酰胺、二甲基甲酰胺、丙二醇或缓冲溶液等, 都可作为固定相。纸色谱常以水和有机溶剂作为展开剂, 最常用的展开剂是用水饱和的正丁醇、正戊醇、酚等, 例如正丁醇 : 醋酸 : 水(体积比4 : 1 : 5或者4 : 1 : 1)展开系统。水和有机溶剂互混后形成两相: 一个是饱和了有机溶剂的水相, 一个是饱和了水的有机溶剂相。由于滤纸纤维对水有较强的亲和力, 一般能吸附其自身质量22%的水, 其中6%的水以氢键与纤维素牢固结合, 这些水即称为固定相, 被水饱和的有机相为流动相。由于物质的极性大小不同, 在两相中分配比例有所差异。极性小的物质在有机相中分配较多, 随有机相移动较快, 而极性大的物质在水相中分配较多, 移动相对较慢, 从而将极性不同的物质分开。

纸色谱法的优点是设备简单, 操作方便, 所用样品少, 分离效果好, 效率高, 可以用来分离各种组成成分, 广泛应用于科研和生产分析工作中。但是, 纸色谱法也有一些缺点, 影响比移值的因素较多, 如所用溶剂系统及其pH、温度、滤纸种类、展开的方向(上行、下行或横向), 容易出现失真等。

纸色谱常用于药品的鉴别、纯度检查和含量测定。主要用于多官能团或高极性的亲水化合物, 如醇类、羧基酸、氨基酸、糖类和黄酮类等。一般采用在相同实验条件下与对照标准物质对比以确定其异同。用作药品鉴别时, 供试品在色谱图中所显主斑点的位置与颜色(或荧光), 应与对照标准物质在色谱图中所显主斑点相同; 用作药品纯度检验时, 需取一定量的供试品, 经展开后, 按各品种

项下的规定, 检视其所显杂质斑点的个数和呈色深度(或荧光强度); 进行药品含量测定时, 需将待测色谱斑点剪下, 经洗脱后再用适宜的方法测定。

## 3.2 仪器与材料

### 3.2.1 展开容器

通常为圆形或长方形玻璃缸, 缸上具有磨口玻璃盖。用于下行法时, 盖上有孔, 可插入分液漏斗, 用以加入展开剂。在近顶端有一用支架架起的玻璃槽作为展开剂的容器, 槽内有一玻棒, 用以压住色谱滤纸。槽的两侧各支一玻棒, 用以支持色谱滤纸使其自然下垂, 避免展开剂沿滤纸与溶剂槽之间发生虹吸现象; 用于上行法时, 在盖上的孔中加塞, 塞中插入玻璃悬钩, 以便将点样后的色谱滤纸挂在钩上, 并除去溶剂槽和支架。

### 3.2.2 点样器

常用具支架的微量注射器(平口)或定量毛细管(无毛刺), 应能使点样位置正确、集中。

### 3.2.3 色谱滤纸

对色谱滤纸的要求是:

(1) 质量纯度: 纸质要纯、杂质含量要少, 无明显的荧光斑点, 也不与显色剂起作用, 以免影响分离和鉴别效果。滤纸应质地均匀, 平整无折痕, 边缘整齐, 有一定的机械强度。纸纤维应松紧适宜: 过于疏松易使斑点扩散, 过于紧密则展开速度太慢。

(2) 型号选择: 应结合分离对象、分离目的、展开剂的性质来选择。对 $R_f$ 值相差很小的化合物, 宜采用慢速滤纸。对 $R_f$ 值相差较大的化合物, 则可用快速滤纸。如果是定性鉴别, 宜选用薄型滤纸。

用于下行法时, 取色谱滤纸按纤维长丝方向切成适当大小的纸条, 离纸条上端适当的距离(使色谱滤纸上端能足够浸入溶剂槽内的展开剂中, 并使点样基线能在溶剂槽侧的玻璃支持棒下数厘米处)用铅笔划一点样基线, 必要时, 可在色谱滤纸下端切成锯齿形便于展开剂向下移动; 用于上行法时, 色谱滤纸长约25 cm, 宽度则按需要而定, 必要时可将色谱滤纸卷成筒形。点样基线距底边约2.0 cm。

## 3.3 实验操作

纸色谱和薄层色谱都属于平面色谱, 其操作方法基本相似。

### 3.3.1 色谱滤纸的准备

取具有合适长宽比的滤纸一张, 离底边2 cm处用铅笔轻轻划一条与底边平行的线, 并等距离地在在线上定点样点(原点)。

### 3.3.2 点样

点样量取决于纸的厚薄程度及显色剂的灵敏度。将供试品溶解于适宜的溶剂中制成一定浓度的溶液, 用微量注射器或定量毛细管吸取溶液, 点于点样基线上, 一次点样量不超过10  $\mu\text{L}$ 。样品量一般是几到几十微克。点样量过大时, 溶液宜分次点加, 每次点加后, 待其自然干燥、低温烘干或经温气流吹干。样点通常应为圆形, 直径2–4 mm, 点间距离为1.5–2.0 cm。

### 3.3.3 展开

纸色谱法通常采用上行法展开, 让展开剂借助纸纤维的毛细效应向上扩散。该法应用广泛, 但展开速度慢, 一般需要几个小时。还可采用下行法展开、双向展开等多种方式。但应注意的是, 即使是同一物质, 如果展开方式不同, 其 $R_f$ 值也不一样。

#### (1) 上行法

层析缸需先用溶剂蒸气饱和, 可在缸底放一装有溶剂的平皿, 或将被溶剂润湿的滤纸条附着在缸内壁上, 溶剂挥发使缸内充满饱和蒸气, 通常需时约30 min。如层析缸蒸气未饱和就开展实验, 滤纸将从展开剂中吸收水分, 展开剂也会从滤纸表面挥发, 使溶剂系统的组分发生改变, 严重时纸上会出现不同水平的溶剂前沿, 影响层析效果。

待蒸气饱和后, 在层析缸内加入适量展开剂。下降悬钩, 使色谱滤纸浸入展开剂约0.5–1.0 cm, 展开剂即经毛细作用沿滤纸上升, 除另有规定外, 一般展开至约15 cm后, 取出晾干, 按规定方法检视。

展开可以单向展开,即向一个方向进行;也可进行双向展开,即先向一个方向展开,取出,待展开剂完全挥发后,将滤纸转动90°,再用原展开剂或另一种展开剂进行展开;亦可多次展开和连续展开等。

#### (2) 下行法

将点样后的色谱滤纸的点样端放在溶剂槽内并用玻棒压住,使色谱滤纸通过槽侧玻璃支持棒自然下垂,点样基线在压纸棒下数厘米处。待蒸气饱和后,小心添加展开剂至溶剂槽内,液层高约1.5 cm,将滤纸点样面朝下放入层析溶剂中,液层不要超过点样线,将层析缸密闭。待展开剂到达距离滤纸下端边线上方约1–2 cm时取出,标明溶剂前沿位置,冷风吹干后按规定方法检测色谱斑点。

#### 3.3.4 显色

纸色谱的斑点检出方法基本上和薄层色谱法相似。但纸色谱不能使用腐蚀性显色剂,也不能在高温下显色。对于有色物质,展开后即可直接观察到各个色斑。对于无色物质,可应用各种物理和化学方法显色。用紫外灯照射可观察有机物对紫外光吸收的颜色或发出的荧光。亦可采用喷射显色剂的方法显色,先配制一定浓度的显色剂溶液,然后在通风橱中用喷雾器均匀喷洒在滤纸上,要求雾滴细而均匀。例如,氨基酸的纸色谱显色可以向滤纸上均匀喷洒0.1%茚三酮,热风吹干反应显色(或晾干后将滤纸放入烘箱中,于80–100 °C烘5 min),滤纸上即显出紫红色或黄色的氨基酸斑点。

#### 3.3.5 结果处理

用铅笔将色谱斑点轮廓和中心点描出来,测量原点至斑点中心和至溶剂前沿的距离,计算 $R_f$ 值,分析样品中的组分情况。

#### 3.4 注意事项

- (1) 画线时只能使用铅笔,其他笔的颜色易在有机溶剂中溶解,颜色会产生干扰。
- (2) 不能用手接触滤纸前沿以下的任何部位,手指上的氨基酸和油脂可能对结果会造成干扰。
- (3) 点样斑点不能太大,要防止斑点重叠。
- (4) 须在密闭容器中展开。加入展开剂后需等30 min左右,使缸内充满展开剂的饱和蒸气。
- (5) 展开剂接触滤纸时一定要均匀、保持前沿线与滤纸平行。
- (6) 展开后的滤纸在采用热风吹干或者喷显色剂后烘干时,应注意控制温度,避免温度太高。
- (7)  $R_f$ 值随分离化合物的结构、固定相与流动相的性质、温度以及纸的质量等因素而变化。当温度、滤纸等实验条件固定时,比移值就是一个特有的常数,因而可作为定性分析的依据。

## 4 结语

色谱实验技能非常重要,“点板”“过柱”已成为很多科研实验室的日常活动。然而,要做好该实验必须注意操作细节,“细节决定成败”。本文在总结实验教学以及科研实践经验的基础上,提出色谱实验基本操作与规范建议,明确了不同实验操作的适用范围和条件。指出了常见的不规范或者错误操作,同时强调实验安全、试剂成本等。本建议适用性强,有助于提高实验效率和成功率。

## 参 考 文 献

- [1] 李厚金,石建新,邹小勇.基础化学实验.第2版.北京:科学出版社,2015.
- [2] 吴美芳,李琳.有机化学实验.北京:科学出版社,2013.
- [3] 汪志勇,查正根,郑小琦.实用有机化学实验高级教程.北京:高等教育出版社,2016.
- [4] 张奇涵,关焯辉,关玲.有机化学实验.第3版.北京:北京大学出版社,2015.
- [5] 王清廉,李瀛,高坤,许鹏飞,曹小平.有机化学实验.第4版.北京:高等教育出版社,2017.