

纯化人必读贴|柱层析的几个技巧

转自：[抗体圈](#)

柱层析就是通常所说的过柱子，又叫柱色谱，属于色谱法中使用最广泛的一种方法。对于含有多种有机物的混合样品，用重结晶无法提纯时，柱层析法可以说是有机实验中最有效的分离手段。实验室中常用的是以硅胶和氧化铝做固定相的吸附柱。硅胶层析法的分离原理是根据物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离，一般情况下极性较大的物质易被硅胶吸附，极性较弱的物质不易被硅胶吸附，整个层析过程即是吸附、解吸、再吸附、再解吸过程。虽然很多化学实验书中都叙述了柱层析的实验方法，但大多数都是比较雷同地泛泛地描述，而且有些描述在实验室中并不适用。例如，很多书中都提到装柱时先在底层铺一层石英砂，倒入固定相后再在顶部铺一层石英砂。比较繁琐，而且效果也不是很好，在实验室中不适用。根据多年来使用柱层析的操作经验，本文总结了在使用柱层析时的几个技巧：

1、硅胶的使用

初做柱层析很容易把柱子装得长了或短了，有时还会有大量的硅胶剩余，浪费硅胶，这主要是对硅胶等固定相的使用的量没有掌握。柱层析用的硅胶一般是 100-200 目，100 毫升硅胶的质量在 47 克左右，如果装一个直径是 2.8 厘米的柱子，可以装 18 厘米高。为了避免浪费硅胶和溶剂，最初学习装柱时最好对实验室中各种不同规格的柱子摸摸底。方法很简单：用量筒量出 100 毫升干硅胶，直接倒入各种规格的柱子中，敲实，用刻度尺量出硅胶在柱子中的高度，这样就可以做到心中有数了。一般在装柱的时候可以根据实验所需柱子的高度来调整硅胶的使用量，这样就可以大大地节省硅胶的使用，避免造成没有必要的浪费。称量硅胶时一般称 30-70 倍于上样量，如果极难分，也可以用 100 倍量以上的硅胶。

2、洗脱剂的使用

洗脱剂的极性可用薄层层析来确定，一般以待分离样品 Rf 值为 0.2-0.3 为宜。选择的洗脱剂应该使两相邻物质 Rf 值之差最大化。不要认为在板上爬得高分离的效果就比较好，如果 Rf 在 0.6，即使相差 0.2 也不容易在柱子上分开，因为柱子是一个多次爬板的过程，可以通过公式的比较： $0.6/0.8$ 一次的分度，肯定不如 $(0.2/0.3)$ 的三次方或四次方大。有时虽然在薄层板上看到分离的效果很好，但过柱层析时还是很难分开。这主要的原因就是薄层层析用硅胶比柱层析用硅胶要细得多，所以分离效果好。解决的办法就是降低洗脱剂的极性，一般柱层析用洗脱剂比薄层层析用的展开剂极性要再降低一倍可以达到比较好的分离效果。当所分离物质极性跨度较大时，可用采梯度洗脱的方法，即逐渐增加溶剂的极性，使吸附在硅胶上的不同化合物逐个洗脱下来。常用的展开剂极性小的用乙酸乙酯：石油醚系统；极性较大的用甲醇：氯仿系统；极性大的用甲醇：水；正丁醇：醋酸系统；拖尾可以加入少量氨水或冰醋酸。对于很难分离的化合物，一是增加柱子的长度和直径，二是减小洗脱剂的极性，这样可以很好地将混合物分开。在同样能洗脱的情况下，尽量使用毒性小的洗脱剂。例如，乙酸乙酯：石油醚系统和二氯甲烷：石油醚系统，在同样都能洗脱的情况下，应该用毒性小的乙酸乙酯：石油醚系统。另外洗脱剂在过柱子后最好也回收使用，一方面环保，另一方面也能节省部分经费，缺点是要消耗一定的人工。这里要注意的是，一般在过柱同时进行的是减压旋蒸，混合溶剂的比例由于挥发度的不同会导致极性的变化，一般会使得极性变大，在梯度淋洗时比较合适。还有一般回收的溶剂中会有少量水分，使用前先要用干燥剂干燥好才能使用。

3、装柱子的技巧

柱层析的装柱非常重要，装柱的效果会直接影响层析分离效果。有湿法装柱和干法装柱等两种方法。湿法装柱很简单，使用也最普遍，就是先用比固定相多一倍的洗脱剂将固定相活成匀浆，柱子底部先用脱脂棉塞紧，然后倒入洗脱剂将脱脂棉中气泡赶出。用漏斗将活好的固定相倒入柱子中，打开底部活塞，将柱子中高出固定相的溶剂放出。期间不断用橡皮棒敲打，将固定相敲实，做到密实均匀无气泡即可。很多时候用加压的方法可以很高效地装好柱子，而且在柱子中没有气泡产生。干法装柱与湿法装柱刚好相反的是，它是将干燥的吸附剂从柱子上端直接加入到一个空的柱子中，然后用油泵抽柱子底部，相当于减压过柱，直到柱子变得很结实，再用淋洗剂“走柱子”。干法装柱的一个缺点就是在装入洗脱剂后，由于溶剂和固定相之间的吸附放热，所以柱子容易变花，影响分离效果。解决的方法是：

- (1) 固定相一定要添加结实；
- (2) 一定要用较多的溶剂“走柱子”，直到柱子的下端不再发烫，恢复到室温后再撤去压力。无论使用哪种方法装柱，最后都要求所装的柱子结实、匀称、无气泡。

4、上样的技巧

上样也有湿法和干法之分：湿法一般用淋洗剂溶解样品，也可以用二氯甲烷、乙酸乙酯等，但溶剂越少越好。再用胶头滴管转移得到的溶液，沿着层析柱内壁缓慢地均匀加入。在不用海沙的情况下，尽量不要破坏硅胶面。加样后，打开柱底活塞，让固定相充分地吸附所加样品。然后再加入一些洗脱剂，再充分地吸附后将一团脱脂棉塞至接近硅胶表面。然后就可以放心地加入大量洗脱剂，而不会冲坏硅胶表面。很多样品在上柱前是粘乎乎的，一般没关系。有的时候上样后在硅胶上又会析出，这一般都是比较大量的样品才会出现，是因为硅胶对样品的吸附饱和，而样品本身也是比较好的固体才会析出，这就需要先重结晶样品，得到大部分的产品后剩余的产品再柱分。如果不能重结晶也没关系，直接过柱就行，样品会随着淋洗剂流动而慢慢溶解，最后随着洗脱剂流出。有些样品溶解性差，能溶解的溶剂又不能上柱（比如 DMF, DMSO 等，会随着溶剂一起走，显色是一个很长的脱尾），这时就必须用干法上柱了。干法过柱是把待分离的样品用少量溶剂溶解后，在加入少量硅胶，拌

匀后再旋去溶剂。一般样品和硅胶按 1: 1 的量混合，硅胶使用的量也可以少一些，但是要保证在旋干后，不能看到明显的固体颗粒，让样品都吸附在硅胶的表面上。然后小心地加入到装好的柱子中，加入洗脱剂洗脱。

5、过柱的技巧

柱层析按过柱时的压力可以分为：加压，常压，减压。压力可以增加淋洗剂的流动速度，减少产品收集的时间，但是会减低柱子的塔板数。所以其他条件相同的时候，常压柱是效率最高的，但是时间也最长，例如一些天然化合物的分离，有时一个柱子过几个月也有可能。减压柱能够减少硅胶的使用量，但是由于大量的空气通过硅胶会使溶剂挥发，有时会在柱子外面有水汽凝结，另外有些比较易分解的东西可能得不到，而且还必须同时使用水泵抽气，噪音大，时间长，所以减压过柱用得比较少。加压过柱是一种比较好的方法，与常压柱类似，但用外加压力可以使淋洗剂走的快些。压力的提供可以是压缩空气，双连球或者小气泵（用鱼缸供气的加压泵就行）。特别是在容易分解的样品的分离中很适用。一般压力不可过大，不然溶剂走的太快就会减低分离效果。因为加压过柱效率高，分离效果较好，所以加压过柱在普通的有机化合物的分离中是非常适用的。一些低沸点溶剂装柱时往往会在柱子中产生气泡，使柱子变花，利用加压过柱法在装柱时就可以有效地解决这个问题，而且可以使柱子很快装实。随着科技的发展，色谱法的技术也日新月异，但柱层析实验技术还是比较简单和实用的，每个科研工作者在使用柱层析时，可以根据自己的实际情况来不断地摸索，不断地总结和提高柱层析的实验技术。