

有机化学小常识（异构体比例确定、熔点和色谱相关知识）

一、 异构体比例的确定

有机合成实验中，经常会遇见一个反应生成两种不同的异构体（如：syn 和 anti；exo 和 endo）。这种情况下，必须要确定这两种异构体的比例。确定异构体比例时一般遵循以下原则：

（1）确定异构体的比例可以采用 ^1H NMR、GC 或 HPLC，但是归根结底还是需要 ^1H NMR 法。采用 ^1H NMR 法确定异构体比例时，最好选用同一位置的氢。绝对不可以使用 SP^3 杂化的氢对 SP^2 杂化的氢求比例，因为杂化不同，相同数目氢的积分面积可能不一致。

（2）通过 ^1H NMR 法确定比例时一定不能分离。通常反应的后处理做到柱层析或减压蒸馏之前，否则得出的数据不可靠。例如：某反应生成了 exo 和 endo 两个异构体，分别为 95 mg 和 5 mg，那么这两种异构体的真正比例应该是 19: 1。假如柱层析时每个异构体损失了 3 mg，那么但是如果通过柱层析后算出的比例是 92: 2，也就是 46: 1，这与真实的情况已经相差很大了。

二、 色谱法

色谱法的种类较多，按使用的流动相和固定相的不同，可将色谱法分为以下几类：气相色谱、液相色谱、离子色谱、薄层色谱和纸色谱。

色谱分析的全过程主要包括四个步骤：样品的采集、样品的制备、色谱分析和数据处理与结果的表达。色谱分析样品的采集和制备是一个非常重要的和复杂的过程，通常将色谱样品的采集和样品的制备统称为色谱分析样品的处理。由于色谱分析技术涉及的样品种类繁多、样品组成及其浓度复杂多变、样品物理形态范围广泛，对色谱分析方法的直接分析测定构成的干扰因素特别多，所以需要选择并进行科学和有效的处理方法及其技术。样品的制备和处理方法及其技术必须遵循下面的原则：

- （1） 收集的样品必须具有代表性。
- （2） 取样方法必须与分析目的一致，并且采集到你想要的样品。
- （3） 分析样品制备过程中尽可能防止和避免预测定组分发生化学变化或者丢失。
- （4） 在样品处理过程中，如果将欲测定组分进行化学反应时（例如：将不能气化的预测定组分转化成可气化物质的衍生化过程，或者将不适合测定的组分通过化学反应转化成适合测定的物质），这一变化必须是已知的和定量的完成。
- （5） 在分析样品制备过程中，要防止和避免预测定组分的玷污，尽可能减少无关化合物引入制备过程。
- （6） 样品的处理过程尽可能简单易行。

此外，在实际分析样品之前，某些样品可能会发生变化（例如光化学过程、微生物和空气中的氧所引起的变化），致使被测定的物质发生变化。因此，在制备样品之后应当尽可能快的进行分析，或者使用合适的方法消除这些干扰（不使这些变化发生），做好样品的保存。

（一）气相色谱法 GC

1、气相色谱对样品的要求是气体或者是可气化的液体或固体。气相色谱法具有高效、快速、灵敏和应用范围广等显著特点，这主要表现在：

（1）分离效率高：不但能够分离一般化合物，而且能够使非常复杂的混合物，如石油、煤焦油中的多达上百个组分得到有效分离。也可以使性质相近、较难分离的有机同系物、异构体得以分离。采用特殊固定液，还可以分离手性异构体，这是其他分析方法所无法比拟的。

(2) 灵敏度高：可以检测出 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (10^{-6}) 级甚至 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (10^{-9}) 级的物质质量。采用富集装置，检出量还可进一步下降。因而，气相色谱法特别适合于大气中痕量有机污染物的分析、检测。

(3) 分析速度快：一般在几分钟或几十分钟内可以完成一个试样的分析。

(4) 应用范围广：适用于沸点低于 400°C 的各种有机或无机试样的分析。

2、气相色谱样品的制备

气相色谱样品的制备相对液相色谱样品来讲简单一点，一般来讲，只要除去不溶性物质和高沸点物质即可。通常可以通过过硅胶短柱的方法除去无机物等不溶性物质。选用的溶剂最好只含有 C、H、O 元素，如异丙醇、乙酸乙酯等。除特殊情况外，溶剂不要含有卤族元素，否则检测样品时氢火焰监测器会烧掉溶剂生成酸，从而破坏检测器。气相色谱样品的浓度要求不是很严格，通常浓度稍低会更好一些。

(二) 液相色谱法 HPLC

作为对高沸点、热不稳定有机化合物及生化试样的高效分离分析方法，高效液相色谱法在分析化学中占有重要地位。高效液相色谱与气相色谱两者的分析对象几乎涉及了所有的有机化合物。随着生物有机化学工业的迅速发展，高效液相色谱的作用将会更加重要。

1、高效液相色谱法的类型

依据分离机理和固定相的不同，高效液相色谱法一般可分为以下几种类型：

(1) 吸附色谱（液-固吸附色谱）：以固体吸附剂为固定相，如硅胶、氧化铝等，目前较常使用的是 $5-10\ \mu\text{m}$ 的硅胶吸附剂。流动相可以是各种不同极性的一元或多元溶剂。分离原理是组分在两相间经过反复多次的吸附与解吸分配平衡。

(2) 分配色谱（液-液分配色谱）：早期通过在担体上涂渍一薄层固定液制备固定相，与流动相一起构成液液两相，各组分在两相间分配系数的不同，经反复多次分配平衡而实现分离。现多为化学键合固定相，即用化学反应的方法通过化学键将固定液结合在担体表面。通常反应发生在硅胶表面的 Si-BBOH 基团上，形成硅氧碳键型 (Si-O-CBB)，硅氧硅碳型 (Si-O-Si-CBB)，硅碳型 (Si-CBB) 和硅氮型 (Si-NBB) 四种类型。以第二种应用较多，如十八烷基键合硅胶柱（简称碳十八柱，ODS 柱）。

(3) 离子交换色谱：固定相为离子交换树脂 (H^+ 或 OH^-)，流动相为无机酸或无机碱的水溶液。各种离子因它们与树脂上的交换基团的交换能力的不同而得到分离。

(4) 凝胶色谱（空间排阻色谱）：以凝胶为固定相。凝胶是一种经过交联的、具有立体网状结构和不同孔径的多聚体的通称。如葡聚糖凝胶、琼脂糖等软质凝胶；多孔硅胶、聚苯乙烯凝胶等硬质凝胶；具有较好特性的可控孔径玻璃珠等。凝胶色谱法又称凝胶渗透法、凝胶过滤法。当试样随流动相进入分离柱时，试样中的小分子扩散、渗透到孔穴内部，而大分子则被排阻在孔穴之外，不同大小的分子，可通过的孔穴大小、数目不同，走过的路径和需要的时间不同，被排阻的大分子首先被流动相带出，其他不同大小的分子依次流出。当以疏水性的聚苯乙烯凝胶为固定相，非水溶剂（四氢呋喃）作流动相时，可用来测定聚合物的分子量分布。以亲水性的葡聚糖凝胶为固定相，水溶液为流动相，可分离多肽、蛋白质等。高效液相色谱已经具有了很高的分离能力，随着新型高选择性填料的发展，柱效还可能提高，但很难通过采用毛细管液相色谱柱来大幅度提高柱效，这主要是由于液体阻力较大，柱压太高，且进样量少时组分信号将淹没在高压泵的脉冲之中，难于检测。

2、高效液相色谱法的应用

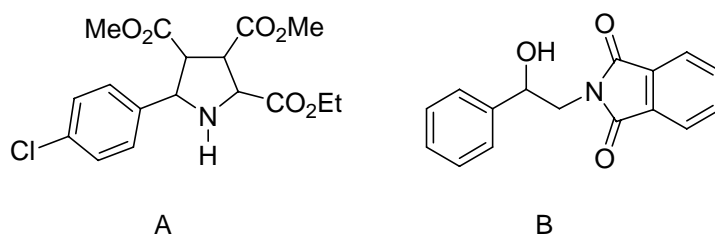
高效液相色谱的应用范围十分广泛，特别是对于高沸点、热稳定性差及具有生理活性物质的分离分析更能发挥其优越性。水不溶性物质的分析：对于水不溶性物质的分析，如苯系物、稠环芳烃等，考虑样品的溶解，需要使用有机溶剂作为流动相，分离方式可以是正相法也可以是反相法。如采用反相液-液色谱法分析稠环芳烃时，使用十八烷基键合硅胶固定相

(ODS 柱), 甲醇-水为流动相, 采用线性梯度淋洗方式 (甲醇: 水 = 20%~100%), 紫外检测器, 可以分离苯、萘、联苯、菲、蒽、芘、苯并芘等多种稠环芳烃。水溶性物质的分析: 对于可离解的水溶性试样, 如有机酸碱化合物。离子交换树脂作为固定相, 无机酸碱的水溶液为流动相, 采用离子交换的分离方式进行分析。对于溶于水, 不离解的试样, 可采用反相液-液分配色谱的分离方式。

3、液相色谱样品的制备

液相色谱样品的制备要求相对严格一些。一般遵循以下原则:

- (1) 样品一定要纯化干净, 除去乙酸乙酯等有紫外吸收的溶剂。
- (2) 样品的浓度要小些。这里提供给大家一个经验规则: 70~100 mg 样品加入 3 mL 异丙醇, 从中取出一滴, 加入 1 mL 溶剂即可。当然, 不同化合物的紫外吸收强弱和溶解度各不相同, 特殊情况下应该具体情况具体分析。
- (3) 溶解样品所用的溶剂原则上应该尽可能的与流动相一致。通常, 为了操作上的方便, 用异丙醇溶解样品即可。
- (4) 固体样品制备, 通常情况下从待分析样品中取出一点即可。但存在一些极端的情况, 化合物溶解度差, 容易析出, 相当于重结晶, 因此存在样品 ee 值分布不均匀, 需要注意以下几个方面的问题: a) 柱层析分离样品时, 样品可能由于溶解性的原因在柱子上析出, 使得从柱层析所得到的若干试管产品 ee 值不一样。b) 柱层析分离得到的样品在旋转蒸发脱去溶剂时, 通常情况下瓶壁上的样品首先析出, 瓶底的样品最后析出。这样就会造成瓶中样品 ee 值分布不均匀。c) 固体样品制备时必须保证样品完全溶解, 否则溶解的和未溶解的样品 ee 值不同。解决这些问题较好的方法是: 将全部样品用溶解度好的溶剂 (例如二氯甲烷等) 全部溶解, 从中取出一滴, 脱去溶剂后加入异丙醇使其全部溶解。这样所得数据是比较准确的。
- (5) 液体样品制备相对比较简单, 从中取出一滴即可, 因为不存在分布不均匀和溶解度差等问题。



据两个例子: 化合物 A 在柱分离后, 旋转蒸发除去溶剂, 得到白色固体。由于脱溶过程中, 瓶壁上的样品首先析出, 瓶底的样品最后析出。这样就造成瓶中样品分布不均匀, 从而使得同一瓶中不同位置的样品 ee 值不同, 经 HPLC 确认可相差 10 个百分点左右。化合物 B 在柱层析时, 使用石油醚、乙酸乙酯混合溶剂洗脱过程中, 由于 B 的溶解度不理想, 很容易在柱子上析出, 经 HPLC 确认前面几试管和后面几试管的 ee 值不同, 可以相差 4、5 个百分点。考虑到 B 在二氯甲烷中溶解度较好, 最后在洗脱剂中加入一定量的二氯甲烷解决 B 的溶解度问题, 避免了其在柱子上析出, 使该问题得到了解决。

三、熔点的测定

熔点, 实质上是该物质固、液两相可以共存并处于平衡的温度。测定物质的熔点时需要注意以下方面的问题:

- (1) 同一化合物, 由于重结晶时采用的溶剂不同, 可能造成晶型不同, 此时熔点差别可能会比较大, 有时候甚至相差 20℃。因此报道化合物的熔点时, 必须在后面注明重结晶的溶剂。
- (2) 同一化合物, 重结晶后用油泵抽一段时间与不用油泵抽相比, 温度也可能相差 10℃

以上。

(3) 重结晶时，有的溶剂可能会与化合物形成包和物。一旦形成包和物，溶剂就不能被油泵抽掉。

(4) 测定熔点时应注意观察在初熔前是否有萎缩或软化、放出气体以及其他分解现象。例如一物质在 112℃ 开始萎缩，在 113℃ 时有液滴出现，在 114℃ 时全部液化，应记录如下：熔点 113-114℃，112℃ 萎缩。

(5) 有的样品较长时间加热易分解，可先将溶液热至低于样品熔点 20℃ 时，再放入样品测定。而有的化合物只能测得分解点而测不到熔点，即到一定温度时样品完全分解而不熔化，这时应记录为：130.5℃ (分解)。测定易升华样品的熔点，应用两端封闭的熔点管，并将熔点管全部浸入液体中测定。对于易吸潮的样品，也可用两端封闭的熔点管测定。

(6) 市售的温度计，其刻度可能不准确，因此，常需对测熔点用的温度计进行校正。其方法是可以标准温度计与之比较校正之，若无标准温度计，可采用纯有机化合物的熔点作为标准进行校正。

(7) 当温度接近样品的熔点时，控制温度上升的速度为 1-2 °C/min，当样品结晶的棱角开始变圆时为初熔，结晶形状完全消失为全熔，记录这两个温度。

下面举一例说明：

化合物 $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{NHTs}$ 的熔点，因重结晶溶剂的改变而不同。如：59-61℃ (正己烷，乙醚)^[1]；64-65℃ (乙醇，水)^[2]；63-66℃ (正己烷，二氯甲烷)^[3]。

四、 薄层色谱溶剂极性的选择：TLC

TLC 是实验室常用的检测手段，一般对展开剂选择：

- (1) 极性小的用乙酸乙酯：石油醚系统；
- (2) 极性较大的用甲醇：氯仿系统，甲醇：氯仿对于胺类比较好；
- (3) 极性大的用甲醇：水；正丁醇：醋酸系统。
- (4) 拖尾可以加入少量三乙胺或冰醋酸。

关于显色：

含有苯环，芳环，多共轭键对紫外有强吸收的化合物，可用紫外光显色。没有紫外吸收或紫外吸收很弱的化合物，需要使用显色剂显色。

茚三酮适合含氮的（伯、仲）胺化合物。碘能使大多数化合物显色，尤其是含氮化合物（有些酰胺是不灵敏的）。浓硫酸或者乙醇-硫酸靠炭化发黑显色，电炉加热也是此原理。高锰酸钾和磷钼酸铵是无机物溶液显色剂。以上是通用显色剂。

这些都不灵时，要找专用显色剂。常用的是：(1) 磷钼酸显色剂：磷钼酸 5 %-10 % 的乙醇溶液，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。(2) CAM 显色剂：钼酸铵 9.6 g，硫酸钼 0.4 g，10 % 硫酸水溶液 200 ml，混匀，极淡的黄色溶液，棕色瓶密闭保存，喷板，加热，白色背景，还原性物质显深蓝色斑点。其它的显色剂还有：

显色剂	化合物
苯胺邻苯二甲酸酯	碳水化合物，糖类
溴甲酚绿	羧酸
二甲氨基苯甲醛	氨基酸，多肽
磷钼酸	苯酚类
茚丹明	类酯类

五、柱层析

(1) 称量。200-300 目硅胶，称 30-70 倍于上样量；如果极难分，也可以用 100 倍量的

硅胶。干硅胶的视密度在 0.4 左右，所以要称 40g 硅胶，用烧杯量 100ml 也可以。

(2) 搅成匀浆。加入干硅胶体积一倍的溶剂用玻璃棒充分搅拌。如果洗脱剂是石油醚/乙酸乙酯/丙酮体系，就用石油醚拌；如果洗脱剂是氯仿/醇体系，就用氯仿拌。如果不能搅成匀浆，说明溶剂中含水量太大，尤其是乙酸乙酯/丙酮，如果不与水配伍走分配色谱的话，必须预先用无水硫酸钠久置干燥。氯仿用无水氯化钙干燥，以除去 1% 的醇。如果样品对酸敏感，不能用氯仿体系过柱。

(3) 装柱。打开柱下活塞，将匀浆一次倾入柱子内。随着沉降，会有一些硅胶沾在柱子壁上，用石油醚（氯仿）将其冲入柱中。

(4) 压实。沉降完成后，加入更多的石油醚，用双联球或气泵加压，直至流速恒定。柱床约被压缩至 9/10 体积。无论走常压柱或加压柱，都应进行这一步，可使分离度提高很多，且可以避免过柱时由于柱床萎缩产生开裂。

(5) 上样。干法湿法都可以。石英沙是没必要的。上样后，加入一些洗脱剂，再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。

(6) 过柱和收集。柱层析实际上是在扩散和分离之间的权衡。太低的洗脱强度并不好，推荐用梯度洗脱。收集的例子：10 mg 上样量，1 g 硅胶，0.5 mL 收一馏分；1-2 g 上样量，50 g 硅胶（200-300 目），20-50 mL 收一馏分。

(7) 检测。要更多地使用专用喷显剂，如果仅用紫外灯，会损失较多产品，紫外的灵敏度一般比喷显剂底 1-2 个数量级。

(8) 送谱。收集的产品旋干，在送谱前通常需要重结晶。如果样品太少或为液体，可过一小凝胶柱，作为送谱前的最后纯化手段。可除去氢谱 1.5ppm 左右所谓的“硅胶”峰。

六、重结晶

(1) 重结晶时选择溶剂的顺序

与“相似相溶”的原理背道而驰就行了，大极性的东西，用中等极性的溶剂结晶；小极性的东西，用较大极性的溶剂。这样，有一半以上的情况是适合的。

(2) 什么情况下考虑用混合溶剂？

先试：石油醚（正己烷）、乙醚、乙酸乙酯、乙醇、水，再试：丙酮、甲醇、乙腈、苯、氯仿、乙酸、吡啶等。如果还不行，就只好混合了。乙醚可以利用其挥发性或沿玻璃向上爬而使沉淀析出的特性。丙酮如不与水配伍，应加以干燥。

(3) 用混合溶剂时（比如乙醇加水）加多少水才合适？

混合溶剂法：用过量热的良溶剂溶解，过滤，加热，缓慢加入不良溶剂至有浑浊，加热至澄清，静置等待。

(4) 重结晶的产率如何提高？

用分级结晶法。积累的母液过柱子。

(5) 重结晶时经常得到油状液，并不析出晶体，如何解决？

不好办。首先建议用其他纯化方法。如果一定要用结晶法，以下经验可能有帮助：(a) 过柱预纯化，粗分离后再结晶；(b) 石油醚热提-冷却法；(c) 选低沸点的溶剂如乙醚等。

备注：

(1) 关于用乙醚重结晶。回流乙醚时，要加一冷凝管。不断从上口加乙醚，直至混浊消失，有时候是因为溶解的较慢，而不是不能溶，所以要有耐心。如果加入很多乙醚还有少量沉淀不溶，则将其滤去，滤液浓缩至有固体析出，再加热，加入少量乙醚使澄清。自然放冷，可得晶型较好的结晶。过滤。用少量乙醚洗晶体。洗涤液合并入母液，在盛母液的瓶口蒙一层滤纸，或塞一团卫生纸，让乙醚自然挥发，而不能落入灰尘，直到有满意数量的晶体出来（别太贪了，挥发干了就又要重来）。

(2) “石油醚热提-冷却法”也是用来对付油状物的方法，加入石油醚，沸腾，倾出上清液，底部油继续加入石油醚热提取，直至石油醚层无色，则基本提取完全。冷却后一般会析出晶体。

参考文献:

- (1) Miyata, O., *Tetrahedron*, 2000, **56**, 6199
- (2) Wedekind, *Chem. Ber.*, 1909, **42**, 3941
- (3) Caddick, S., *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 1024