

ΠΕΙΡΑΜΑ 8

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Θεωρητικό μέρος

Η χρωματογραφία στήλης αποτελεί μια πολύ απλή και εύχρηστη μέθοδος. Είναι η παλαιότερη και η πιο συνηθισμένη χρωματογραφική μέθοδος, όταν θέλουμε να διαχωρίσουμε μίγμα ενώσεων που έχουν παραπλήσιες ιδιότητες και δεν μπορούν να διαχωρισθούν με τις κλασικές μεθόδους διαχωρισμού. Η θεωρία της χρωματογραφίας στήλης είναι ανάλογη με αυτήν της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος. Και στις δυο τεχνικές υπάρχει η ακίνητη φάση (προσροφητικό υλικό) και η κινητή φάση (ο διαλύτης ανάπτυξης ή έκλουσης). Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδος ο διαλύτης αναπτύσσεται πάνω σε μια λεπτή στιβάδα και κινείται προς τα πάνω λόγω τριχοειδούς φαινομένου, στην χρωματογραφία στήλης ο διαλύτης ρέει προς τα κάτω λόγω βαρύτητας. Όπως και στην TLC ο διαχωρισμός του μίγματος οφείλεται στην διαφορετική κατανομή που έχουν τα διάφορα συστατικά του μίγματος στην κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης) και στην ακίνητη φάση (προσροφητικό υλικό). Για κάθε ουσία του μίγματος υπάρχει μια διαφορετική τιμή του συντελεστή κατανομής στην κινητή και στην ακίνητη φάση. Για κάθε χρονική στιγμή μια ορισμένη ποσότητα της κάθε ουσίας του μίγματος θα είναι προσροφημένη στην ακίνητη φάση και η υπόλοιπη θα έχει διαλυθεί στον διαλύτη έκλουσης. Κάθε μόριο για ορισμένο χρόνο (t_1) θα βρίσκεται προσροφημένο στην ακίνητη φάση, δηλαδή θα είναι ακίνητο, και τον υπόλοιπο χρόνο (t_2) θα ρέει μαζί με τον διαλύτη έκλουσης. Εάν ο χρόνος t_1 είναι μικρότερος σε σχέση με τον t_2 τότε η ουσία θα εγκαταλείπει γρήγορα την στήλη. Αντίθετα αν ο χρόνος t_1 είναι πολύ μεγαλύτερος του t_2 τότε η ουσία θα εγκαταλείπει πιο αργά την στήλη. Το κλάσμα της κάθε ουσίας του μίγματος που βρίσκεται διαλυμένο σε κάθε χρονική στιγμή στον διαλύτη έκλουσης καθώς και αυτό που βρίσκεται προσροφημένο στην ακίνητη φάση, είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων όπως :

- 1. Η πολικότητα της ουσίας,**
- 2. Η πολικότητα του διαλύτη έκλουσης και**
- 3. Η ενεργότητα του προσροφητικού υλικού.**

Εάν μια ουσία χ προσροφάται πολύ ισχυρά από την ακίνητη φάση, κρατείται στην κορυφή της στήλης και δεν εκλύεται. Για να εκλουσθεί θα πρέπει να προσθέσουμε τέτοιο διαλύτη έκλουσης, που η ουσία χ , αφενός να διαλύεται πολύ καλά σ' αυτόν, αφ' ετέρου ο διαλύτης να προσροφάται το ίδιο ή εντονότερα από την ουσία χ στο προσροφητικό υλικό, έτσι ώστε να πάρει την θέση της πάνω στην στερεά φάση, και να εκλουσθεί γρήγορα.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιούμε για τον διαχωρισμό του μίγματος δεν είναι ο ίδιος σε όλη της διάρκεια του πειράματος, αρχίζουμε με άπολο διαλύτη για να παραλάβουμε τα μη πολικά συστατικά και συνεχίζουμε με διαλύτες περισσότερο πολικούς. Για να έχουμε ομαλή μετάβαση από τον ένα διαλύτη στον άλλο, χωρίς να παρατηρηθούν ρωγμές στην στήλη, παρασκευάζουμε μίγματα διαλυτών στα οποία προσθέτουμε ολοένα και περισσότερο ποσοστό από τον πιο πολικό διαλύτη. Απότομη αλλαγή στην πολικότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούμε δημιουργεί έκλυση θερμότητας λόγω της προσρόφηση τους από την ακίνητη φάση, με συνέπεια την δημιουργία φυσαλίδων και ρωγμών στην στήλη. Η σειρά με την οποία εκλύονται γενικά οι


διάφορες ομόλογες σειρές, από μια στήλη, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Πρώτα ειλοούνται τα αλιάνια και τελευταία τα οξέα.

Σειρά έκλουσης διαφόρων ομόλογων σειρών :

1. Αλιάνια, 2. Αλιένια, 3. Διένια, 4. Αρωματικοί υδρογονάνθρακες, 5. Αιθέρες, 6. Εστέρες, 7. Κετόνες, 8. Αλδεΐδες, 9. Αμίνες, 10. Αλιοόλες, 11. Φαινόλες, 12. Οξέα

Προσροφητικά υλικά

Τα πιο συνηθισμένα προσροφητικά υλικά με σειρά μειωμένης προσροφητικής ικανότητας είναι:

Αλουμίνια (Al_2O_3)		Σειρά Προσροφητικής Ικανότητας
Ενεργοποιημένος άνθρακας		
Florisil (μίγμα SiO_2 , MgO και Na_2SO_4)		
Silica Gel (SiO_2)		
Μαγνησία (MgO)		
Ανθρακικό μαγνήσιο ($MgCO_3$)		
Ανθρακικό ασβέστιο ($CaCO_3$)		
Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3)		
Τάλκης (MgO , SiO_2)		
Ζάχαρη ($C_{12}H_{22}O_{11}$)		
Κυτταρίνη		

Το προσροφητικό υλικό δεν θα πρέπει να αντιδρά με τον διαλύτη έκλουσης ή με τα συστατικά του μίγματος που θα διαχωριστεί, θα πρέπει να είναι σε σταθερή μορφή και τυποποιημένο για να έχουμε επαναλήψιμα αποτελέσματα. Το μέγεθος των κόκκων πρέπει να είναι κατάλληλο. Εάν ένα προσροφητικό υλικό έχει πάρα πολύ μικρούς κόκκους παρουσιάζει μεγαλύτερη προσροφητική ικανότητα, άλλα συνήθως καθυστερεί στην ροή του διαλύτη. Εάν έχει μεγάλους κόκκους έχει κακή προσροφητική ικανότητα και ακόμη δημιουργούνται ακανόνιστες ζώνες ή "κανάλια" στην χρωματογραφική στήλη, μέσα από τα οποία περνά ο διαλύτης και γίνεται αναποτελεσματικός ο διαχωρισμός.

Το μέγεθος των κόκκων μετράται με την τιμή Mesh που δηλώνει τον αριθμό των σωματιδίων σε ορισμένο όγκο. Η τιμή Mesh των προσροφητικών υλικών που συνήθως χρησιμοποιείται κυμαίνεται από 50 έως 250 Mesh.

Το Silica Gel διατίθεται σε μια μορφή ενεργότητας και έχει επιφάνεια περίπου $500\text{ m}^2/\text{gr}$.

Η αλουμίνια υπάρχει σε τρεις μορφές, όξινη, βασική και ουδέτερη. Η ουδέτερη μορφή διατίθεται σε διάφορες τιμές ενεργότητας, ανάλογα με το ποσοστό ενυδάτωσης της. Η αλουμίνια του εμπορίου έχει ενεργότητα I, είναι τελείως άνυδρη και έχει μεγάλη προσροφητική ικανότητα. Με προσθήκη νερού στην άνυδρη αλουμίνια, ανάδευση και αφήνοντας το μίγμα για μια ώρα να ισορροπήσει, παρασιευάζονται άλλες τέσσερις ποιότητες ένυδρης

αλουμίνας με τιμή ενεργότητας II, III, IV και V, που περιέχουν αντίστοιχα 1.9, 4.3, 7.6 και 15 επί τοις εκατό κατά βάρος νερό. Η προσροφητική ικανότητα μειώνεται με την αύξηση του βαθμού ενυδάτωσης.

Τα πιο συνηθισμένα προσροφητικά υλικά είναι: **Silica Gel** και η **ουδέτερη αλουμίνα** με ενεργότητα II ή III, 150 Mesh.

Διαλύτες

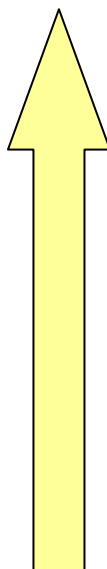
Η εκλουστική ικανότητα ενός διαλύτη έχει σχέση με δυο παράγοντες :

- i. Το βαθμό της διαλυτικής του ικανότητας στα διάφορα συστατικά του μίγματος.
- ii. Από τον βαθμό προσρόφησης του στην ακίνητη φάση. Οι πολικοί διαλύτες προσροφούνται ισχυρά σχεδόν από όλα τα προσροφητικά μέσα και ειδικά από την αλουμίνα. Διαλύουν αρκετά καλά τις πολικές ενώσεις του μίγματος.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται διάφοροι διαλύτες έκλυσης κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας και εκλουστικής ικανότητας πολικών ενώσεων σε προσροφητικό υλικό αλουμίνα.

Διαλύτες έκλυσης

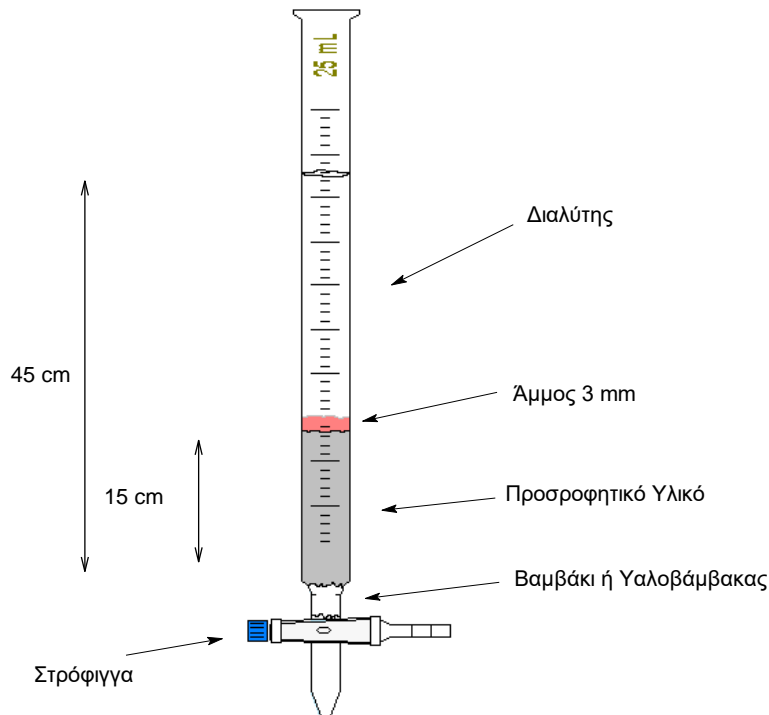
Οργανικά οξέα
Πυριδίνη
Νερό
Μεθανόλη
Αιθανόλη
Ακετόνη
Οξικός αιθυλεστέρας
Αιθέρας
Χλωροφόρμιο
Βενζόλιο
Τετραχλωράνθρακας
Κυκλοεξάνιο
Πετρελαϊκός Αιθέρας
n-πεντάνιο



Αυξανόμενη διαλυτική ικανότητα των πολικών ενώσεων του μίγματος και αυξανόμενη εκλουστική ικανότητα στην αλουμίνα.

Τεχνική γεμίματος της στήλης

Στηρίζουμε την καθαρή και στεγνή στήλη που είναι κλειστή από το κάτω μέρος με στρόφιγγα σε κατακόρυφη θέση. Στο κάτω μέρος τοποθετείτε τεμάχιο υαλοβάμβακα ή βαμβακιού με την βοήθεια γυάλινης ράβδου και στην συνέχεια ένα μικρό στρώμα άμμου (περίπου 3 cm).



Με μια πιπέτα ρίχνουμε στα τοιχώματα μικρές ποσότητες διαλύτη για πέσει η άμμος που τυχόν παρέμεινε πάνω σ' αυτά. Προσθέτουμε στην στήλη διαλύτη προσεκτικά με ένα χωνί, χωρίς να χαλάσει το επίπεδο στρώμα άμμου, θα πρέπει το ύψος του διαλύτη να είναι περίπου 10 cm μέσα στην κολώνα.

Στην χρωματογραφική στήλη προστίθεται ο πολτός που έχει δημιουργηθεί από την ανάμειξη του προσροφητικού υλικού με τον διαλύτη. Η ανάμειξη έχει γίνει σε καθαρό και στεγνό ποτήρι με συνεχή ανάδευση, έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Κατά την διάρκεια της προσθήκης η στρόφιγγα της στήλης είναι ανοιχτή. Με ελαφρά χτυπήματα στα τοιχώματα της στήλης προσπαθούμε να αποφύγουμε το σχηματισμό φυσαλίδων. Όταν το προσροφητικό υλικό κατακαθίσει καλά και πάρει το ύψος που θέλουμε (περίπου 15 cm), κλείνουμε την στρόφιγγα ώστε να παραμείνει διαλύτης σε ύψος 2 cm πάνω από το προσροφητικό υλικό. Ξεπλένουμε τα τοιχώματα της στήλης με διαλύτη για να πέσει τυχόν προσροφητικό υλικό που έχει προσκολληθεί σ' αυτά. Ξαναπερνάμε διαλύτη που είχαμε μαζέψει σε κωνική φιάλη, όταν προσθέτουμε το πολτό πάλι στην κολώνα και ανοίγουμε την στρόφιγγα μέχρι να κατέβει σε ύψος 2 cm πάνω από το προσροφητικό υλικό. Ακολουθεί προσθήκη νέας ποσότητας άμμου ώστε να σχηματιστεί στρώμα πάχους 3 mm περίπου. Ξεπλένουμε τα τοιχώματα με διαλύτη για να πέσει η άμμος που είναι πάνω σ' αυτά και ανοίγουμε την στρόφιγγα για να κατέβει ο διαλύτης μέχρις ότου η στάθμη του να είναι στο ίδιο επίπεδο με την πάνω επιφάνεια του στρώματος της άμμου και η στήλη είναι έτοιμη για την εισαγωγή του δείγματος.

Πρέπει να προσέχουμε έτσι ώστε η στάθμη του διαλύτη ποτέ να μην είναι κάτω από την στάθμη της άμμου, δηλαδή να μην αφήνετε ποτέ την στήλη να ξηραθεί καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Εάν συμβεί αυτό σημαίνει την είσοδο αέρα με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν "κανάλια" μέσα από τα οποία θα διέρχεται ο διαλύτης και θα έχουμε ασαφή όρια στις στιβάδες και κακό διαχωρισμό. Με έναν άλλο τρόπο προσθέτουμε κατ' αρχήν τον διαλύτη μέχρι η στάθμη του να φθάσει τα 3/4 του ύψους της στήλης, ανοίγουμε λίγο την στρόφιγγα και αρχίζουμε να προσθέτουμε το προσροφητικό υλικό σιγά-σιγά με χωνί στερεών με μικρό στέλεχος και κτυπώντας απαλά την στήλη, αποφεύγουμε τον σχηματισμό φυσαλίδων. Μπορούμε επίσης να προσθέσουμε σιγά-

σιγά με χωνί στερεών την απαιτούμενη ποσότητα προσροφητικού υλικού, κτυπώντας ελαφρά τα τοιχώματα της στήλης για να πακεταρισθεί καλά το υλικό. Πιέζουμε το υλικό της στήλης με μια στρόφιγγα και ρίχνουμε σιγά-σιγά τον διαλύτη μέχρι να φθάσει σε ύψος περίπου 2 cm πάνω από την επιφάνεια του προσροφητικού υλικού.

Για τον διαχωρισμό 100 mg μίγματος, συνήθως χρειάζονται 25 gr περίπου προσροφητικού υλικού. Το ύψος της στήλης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον δεκαπλάσιο της διαμέτρου. Η πυκνότητα της αλουμίνας είναι 0,9 gr/cm³ και του Silica Gel 0,4 gr/cm³ οπότε μπορεί να υπολογισθεί εκ των προτέρων η ποσότητα του προσροφητικού που θα χρησιμοποιηθεί. Επειδή συνήθως η ταχύτητα ροής του διαλύτη είναι μικρή όταν θέλουμε να διαχωρίσουμε μεγάλα μεγέθη δειγμάτων, χρησιμοποιούμε την Flash χρωματογραφία. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούμε ειδική κολώνα που μπορεί να δεχθεί μια μικρή πίεση (περίπου 50 p.s.i.) στο πάνω μέρος της, ώστε να πιέζεται ο διαλύτης και να αυξάνεται η ροή.

Προσθήκη του δείγματος

Εάν ένα μίγμα είναι στερεό, διαλύεται στην μικρότερη δυνατή ποσότητα διαλύτη, εάν είναι υγρό μπορεί να προστεθεί όπως είναι χωρίς να διαλυθεί στον διαλύτη. Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί για την διάλυση του δείγματος θα πρέπει να έχει μικρή ικανότητα έκλυσης. Η προσθήκη του δείγματος γίνεται με πιπέτα Pasteur σιγά-σιγά, αποφεύγοντας τυχόν επαφή του εισαγόμενου δείγματος με τα τοιχώματα της στήλης και προσέχοντας να μην διαταράξει η πιπέτα την επιφάνεια της άμμου.

Τη στιγμή της εισαγωγής του δείγματος θα πρέπει ο διαλύτης έκλυσης να φθάνει μέχρι την πάνω επιφάνεια της άμμου. Ανοίγουμε λίγο την στρόφιγγα, ώστε η στιβάδα του δείγματος να κατέβει πιο κάτω από την επιφάνεια της άμμου.

Εάν στα τοιχώματα της στήλης υπάρχει δείγμα, προσθέτουμε μικρές ποσότητες διαλύτη και στην συνέχεια κατεβάζουμε τον διαλύτη κάτω από το επίπεδο της άμμου.

Επιδίωξη μας είναι να κατέβει όλο το δείγμα κάτω από το επίπεδο της άμμου πριν προσθέσουμε τον διαλύτη έκλυσης και το δείγμα να έχει προσροφηθεί σε όσο το δυνατόν στενότερη ζώνη του προσροφητικού υλικού, για να έχουμε καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών του.

Προσθέτουμε τον πρώτο διαλύτη έκλυσης μέχρι την κορυφή της στήλης και αρχίζουμε να μαζεύουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml τα εξερχόμενα κλάσματα ουσιών.

Πειραματικό μέρος

Απαιτούμενα αντιδραστήρια – Διαλύτες – Όργανα

- 1) Ουδέτερη αλουμίνα ενεργότητας I (70-230) Mesh, 2) Μίγμα Ακετοφαινόνης και 2,6-δι-*t*-βούτυλο -4-μέθυλοφαινόλη, 3) Διαλύτες εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα, 4) Διαλύτης ανάπτυξης 20% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο, 5) Πλακίδια TLC αλουμίνας με δείκτη φθορισμού, 6) Λυχνία UV, 7) Κολώνα χρωματογραφίας

Προετοιμάστε μια κολώνα χρωματογραφίας όπως περιγράφεται στο θεωρητικό μέρος με τον δεύτερο τρόπο, δηλαδή (εισαγωγή στη στήλη διαλύτη εξανίου μετά την εισαγωγή 30 gr αλουμίνας). Εισάγεται 1 ml μίγματος δείγματος προς διαχωρισμό. Κατά την εισαγωγή του δείγματος στην κολώνα θα πρέπει ο διαλύτης να φθάνει

μέχρι την πάνω επιφάνεια της 1 άμμου. Η εισαγωγή γίνεται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur. Ανοίγουμε λίγο την στρόφιγγα, ώστε η στιβάδα του δείγματος να κατέβει λίγο πιο κάτω από το στρώμα της άμμου. Στην συνέχεια γεμίζει η κολώνα με διαλύτη εξάνιο (80 ml συνολικά) και συλλέγονται κλάσματα σε δοκιμαστικούς σωλήνες της τάξης των 5 ml. Όταν πάρετε δέκα κλάσματα, πάρετε δείγμα από κάθε ένα και ελέγξτε την σύσταση τους με TLC. Η ανάπτυξη θα γίνει με 20% οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Η ανίχνευση των κηλίδων γίνεται με λυχνία UV και η επικάλυψη των πλακιδίων θα είναι από σίλικα. Στην συνέχεια προστίθενται 40 ml 20% οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο στη στήλη και συνεχίζουν να λαμβάνουν κλάσματα.

Ασκήσεις – Ερωτήσεις

1. Ποιο θα είναι το αποτέλεσμα εάν :
 - a. Το προσροφητικό υλικό έχει πολύ μικρούς ή μεγάλους κόκκους.
 - b. Μετά την έκλυση της 2,6-δι-*t*-βούτυλο -4-μέθυλο-φαινόλη προστίθεται ένας πολύ πολικό διαλύτης π.χ. CH₃COOH για την έκλυση της άκετοφαινόνης.
2. Εάν αντί για αλουμίνα χρησιμοποιούσαμε Silica Gel με τους ίδιους διαλύτες θα άλλαζε η σειρά έκλυσης των δυο ενώσεων;
3. Ποιο θα ήταν το αποτέλεσμα εάν χρησιμοποιούσατε διαιθυλαιθέρα αντί εξάνιο στην έκλυση του μείγματος;
4. Προβλέψτε την σειρά έκλυσης από στήλη αλούμινα των παρακάτω ενώσεων: α) τριφαινυλομεθανόλη, β) βενζοϊκός μεθυλεστέρας, γ) βενζοϊκό οξύ
5. Γιατί μετά την προετοιμασία της στήλης είναι σημαντικό να μην πέσει το επίπεδο του διαλύτη κάτω από το ύψος της αλούμινα
6. Τι επίδραση έχουν οι παρακάτω παράμετροι σε ένα υδροχρωματογραφικό προσδιορισμό
 - A) Πολύ δραστικό προσροφητικό υλικό
 - B) Συλλογή πολύ μεγάλων σε όγκο κλασμάτων
 - Γ) Πολύ αργή ροή της κινητής φάσης
7. Προβλέψτε την σειρά έκλυσης από στήλη σίλικα των παρακάτω ενώσεων: α) 2-οκτανόλη, β) 1,3-διχλωροβενζόλιο, γ) *t*-βούτυλοκινολοεξάνιο, δ) βενζοϊκό οξύ