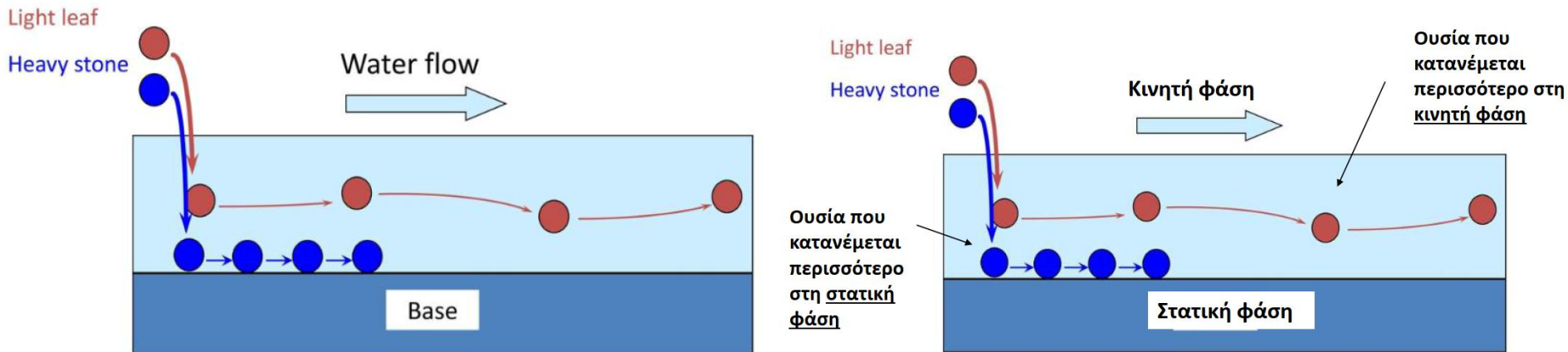


# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΑ

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας **κινούμενης** και μια **στατικής** φάσης.



«Η χρωματογραφία μοιάζει με τη ροή ενός ποταμού»

Ο διαφορετικό βαθμός αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του δείγματος σε ορισμένα φυσικά χαρακτηριστικά όπως π.χ. το μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα, την διαλυτότητα.

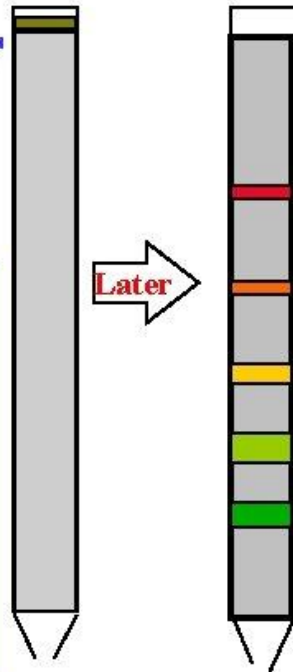
Ανακαλύφθηκε από τον Ρώσο βοτανολόγο Chromatography Mikhail Semyonovich Tsvett, ο οποίος διαχώρισε φυτικές χρωστικές με χρήση στήλης ανθρακικού ασβεστίου (1901).

## Original Chromatography Experiment

**Start:** A glass column is filled with powdered limestone ( $\text{CaCO}_3$ ).

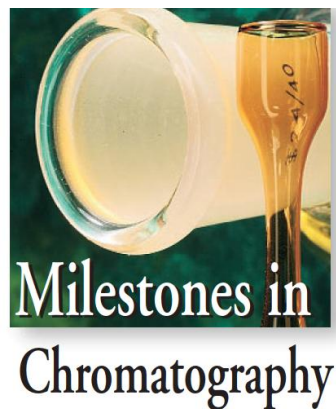
An EtOH extract of leaf pigments is applied to the top of the column.

EtOH is used to flush the pigments down the column.



**End:** A series of colored bands is seen to form, corresponding to the different pigments in the original plant extract. These bands were later determined to be chlorophylls, xanthophylls and carotenoids.





## Milestones in Chromatography

### The Birth of Partition Chromatography

In June of 1941, almost exactly 60 years ago, the (British) Biochemical Society held its 214th meeting in London, at the National Institute for Medical Research. At this meeting, A.J.P. Martin and R.L.M. Synge, two young chemists (Martin was 31 and Synge 26) presented a paper on the separation and determination of the mono-amino monocarboxylic acids present in wool using a new method (1). This lecture and its subsequent detailed publication represent the birth of partition chromatography (2).

Exactly 10 years later, Martin and another young scientist, 29-year-old A.T. James, submitted the manuscript of a major paper that described an extension of partition chromatography in which the mobile phase was a gas (3). This publication represents the birth of gas-liquid partition chromatography (GLPC).



Οι Martin και Synge υπήρξαν και οι δύο φοιτητές στο Πανεπιστήμιο του Cambridge απ' όπου αποφοίτησαν το 1932 και το 1936 αντιστοιχα.

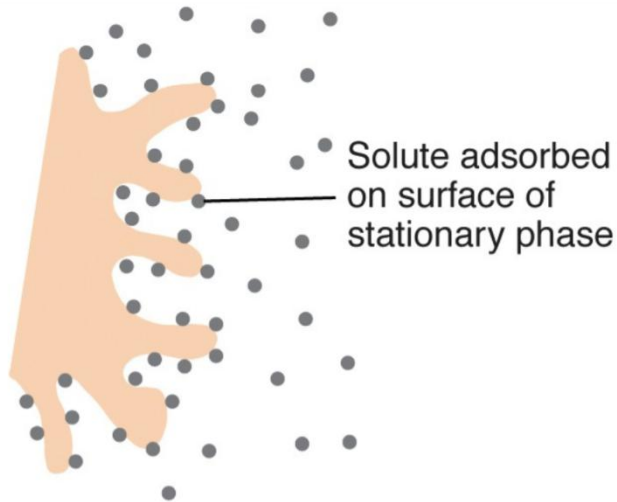
Εργαθίδρυσαν πολλές βασιικές τεχνικές στην χρωματογραφία κατανομής, πχ χρωματογραφία χάρτου, αέρια χρωματογραφία, HPLC, κλπ.

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΑ

Ανάλογα με τη **φύση της κινούμενης** και της στατικής φάσης, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως **αέριος ή υγρή**.

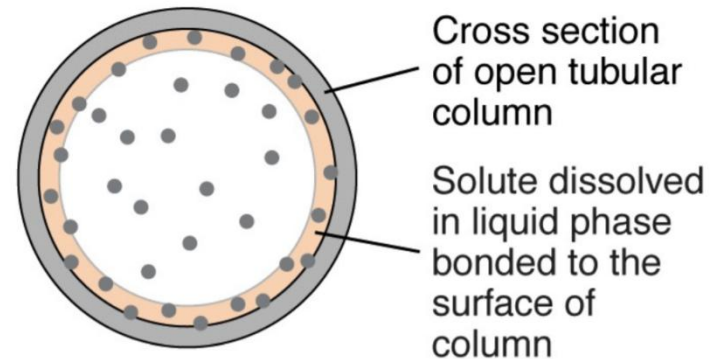
Ανάλογα με την **τεχνική συγκράτησης της στατικής φάσης**, έχουμε χρωματογραφία **στήλης, λεπτής στιβάδας και χαρτοχρωματογραφία**.

Ανάλογα με την **αρχή στην οποία στηρίζεται ο διαχωρισμός**, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται σαν **προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής ή πηκτής**.



Adsorption chromatography

Διαχωρίζει ενώσεις με βάση την προσρόφηση τους στην επιφάνεια μη τροποποιημένων σωματιδίων

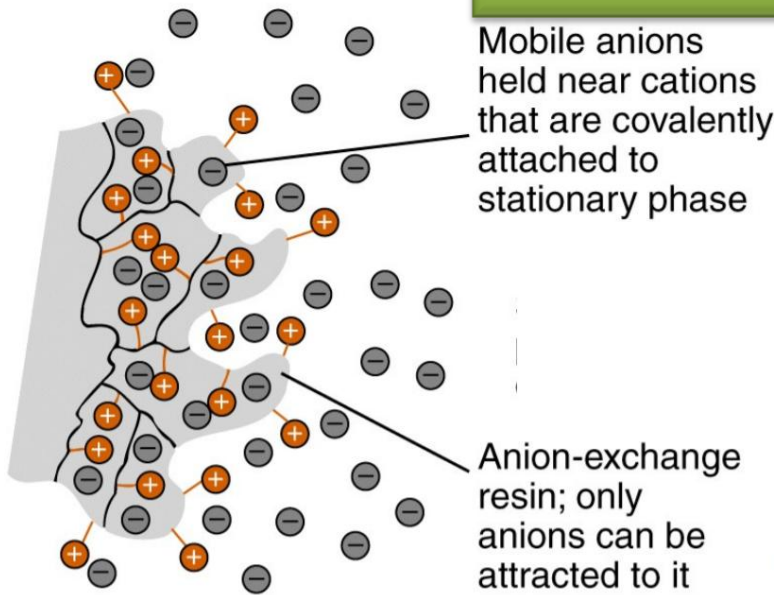


Partition chromatography

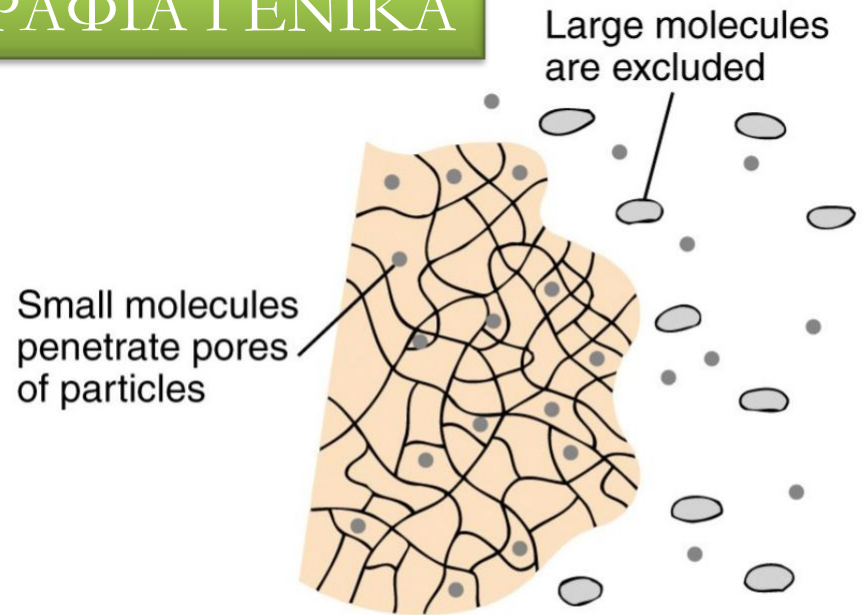
Οι ενώσεις διαχωρίζονται με βάση την κατανομή τους ανάμεσα σε μια υγρή κινητή φάση υγρή στατικά φάση που βρίσκεται προσδεμένη σε στερεό υπόστρωμα



# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΑ



Ion-exchange chromatography



Molecular exclusion chromatography

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με προσρόφηση των ενώσεων πάνω σε υλικό που περιέχει φορτισμένες θέσεις στην επιφάνεια του. Αυξημένη συγκέντρωση ενός ανταγωνιστικού ιόντος προστίθεται στην κινητή φάση με σκοπό την έκλυση των ουσιών από την στήλη.

Καθώς ένα μίγμα ουσιών διέρχεται μέσω της στατικής φάσης τα μικρά μόρια μπορούν να εισέλθουν στους διαθέσιμους πόρους του υλικού, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια όχι. Έτσι οι ενώσεις διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

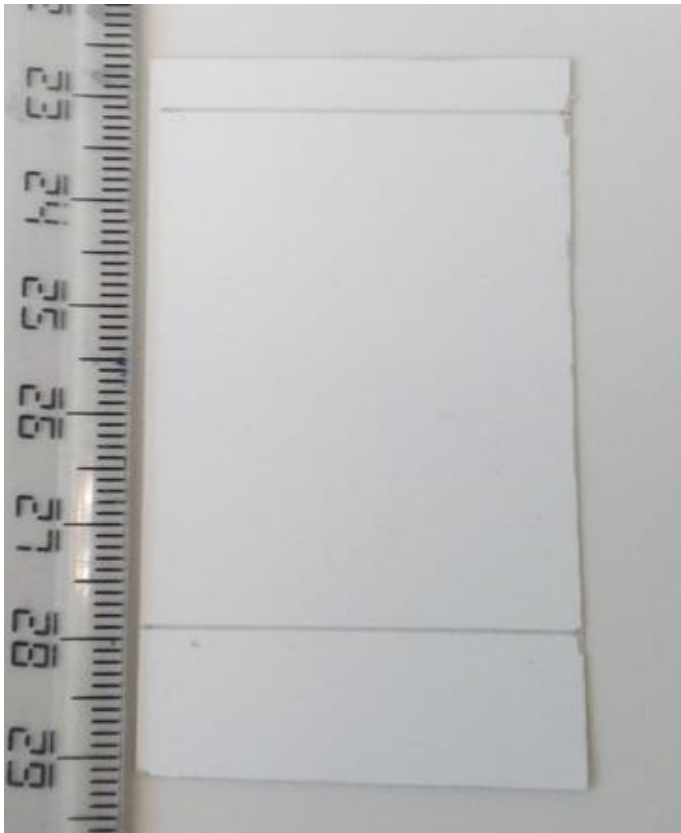
Αποτελεί την χρωματογραφική τεχνική κατά την οποία η στατική φάση αποτίθεται σαν μία λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινο ή πλαστικό πλακίδιο

Χρησιμοποιείται σε σημαντικό βαθμό σε ένα εργαστήριο οργανικής χημείας τόσο για τον διαχωρισμό ενώσεων με παραπλήσια χημική σύνταξη, όσο και για την ταυτοποίηση ενώσεων που παρασκευάστηκαν από μια συνθετική πορεία.

## Χειρισμός με γάντια

Έλεγχος ώστε το προσροφητικό υλικό να μην έχει απομακρυνθεί από το πλακίδιο

Χάραξη γραμμών εκκίνησης, μετώπου διαλύτη με προσοχή ώστε να μην διαταρακτεί το προσροφητικό υλικό

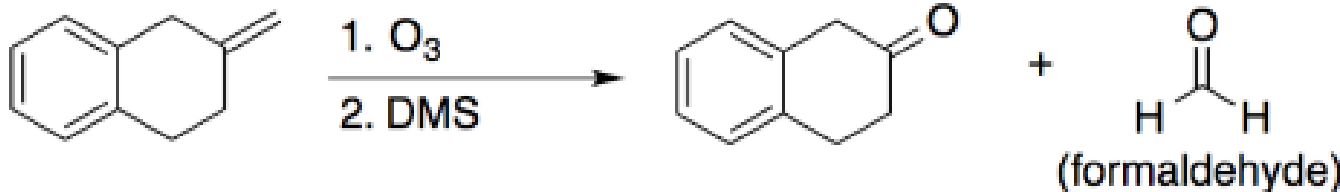


# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (Thin Layer Chromatography – T.L.C.), είναι μια τεχνική ευαίσθητη, απλή, γρήγορη, φθηνή και μ' αυτήν μπορούν να ανιχνευτούν ενώσεις που είναι σε χαμηλές συγκεντρώσεις (100 ppm περίπου).

Οι κυριότερες χρήσεις της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος είναι :

- Παρακολούθηση της πορείας μιας αντίδρασης.
- Προσδιορισμός της ταυτότητας μιας χημικής ενώσεως.
- Προσδιορισμός του αριθμού των συστατικών ενός μίγματος.
- Προσδιορισμός της καταλληλότητας μεθόδων καθαρισμού (Αποτελεσματικότητα).
- Επιλογή των κατάλληλων διαλυτών έκλουσης για μια χρωματογραφία στήλης, καθώς και των προσροφητών.
- Παρακολούθηση της πορείας διαχωρισμού με χρωματογραφία στήλης.
- Σε παρασκευαστική κλίμακα για διαχωρισμό των συστατικών μίγματος.



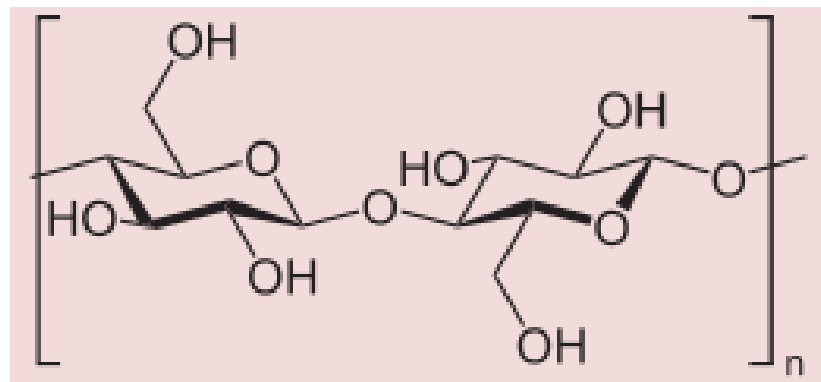
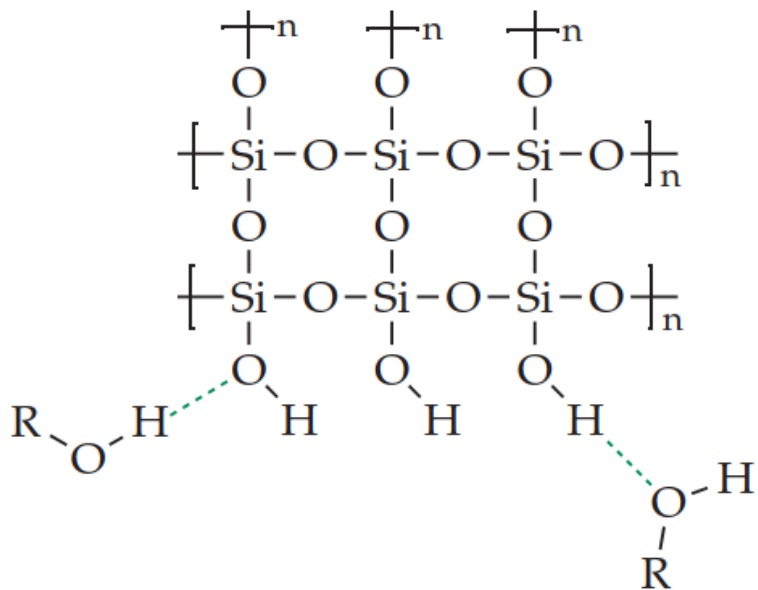
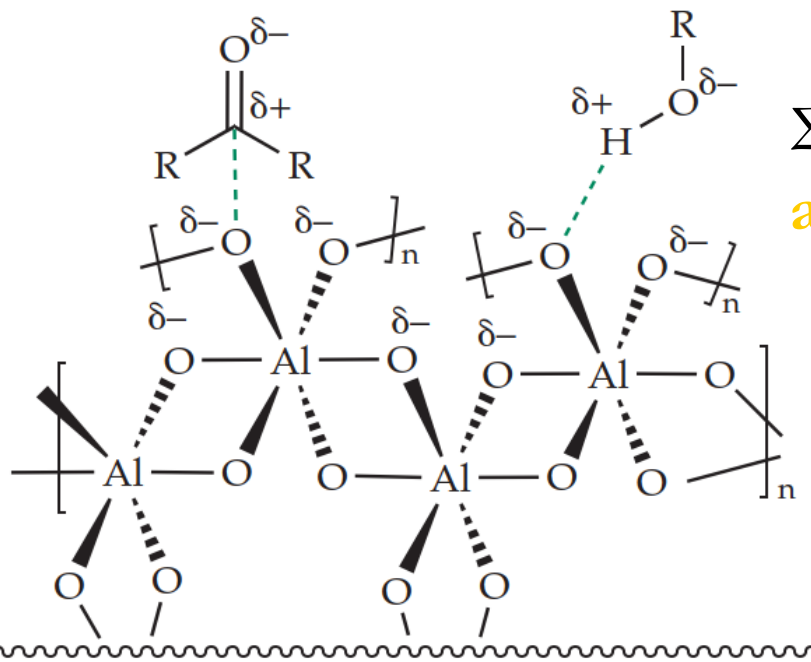
# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

Χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις

Συνήθως χρησιμοποιούνται **silica (SiO<sub>2</sub>)**,  
**alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)**, **κυτταρίνη**

Η Αλούμινα είναι πολύ δραστική μια και είναι  
ιοντικό στερεό

Η σίλικα είναι στερεό ομοιοπολικού  
πλέγματος





Η ειλουστική ισχύς εξαρτάται από τρία πράγματα:

1. Την ισχύ αλληλεπίδρασης ουσίας με κινητή φάση
2. Την ισχύ αλληλεπίδρασης ουσίας με στατική φάση και
3. Την ισχύ αλληλεπίδρασης κινητής φάσης με στατική φάση

Πίνακας διαλυτών κατά  
σειρά αυξανόμενης  
πολικότητας

Πετρελαϊκός αιθέρας

Κυκλοεξάνιο

Διαιθυλαιθέρας

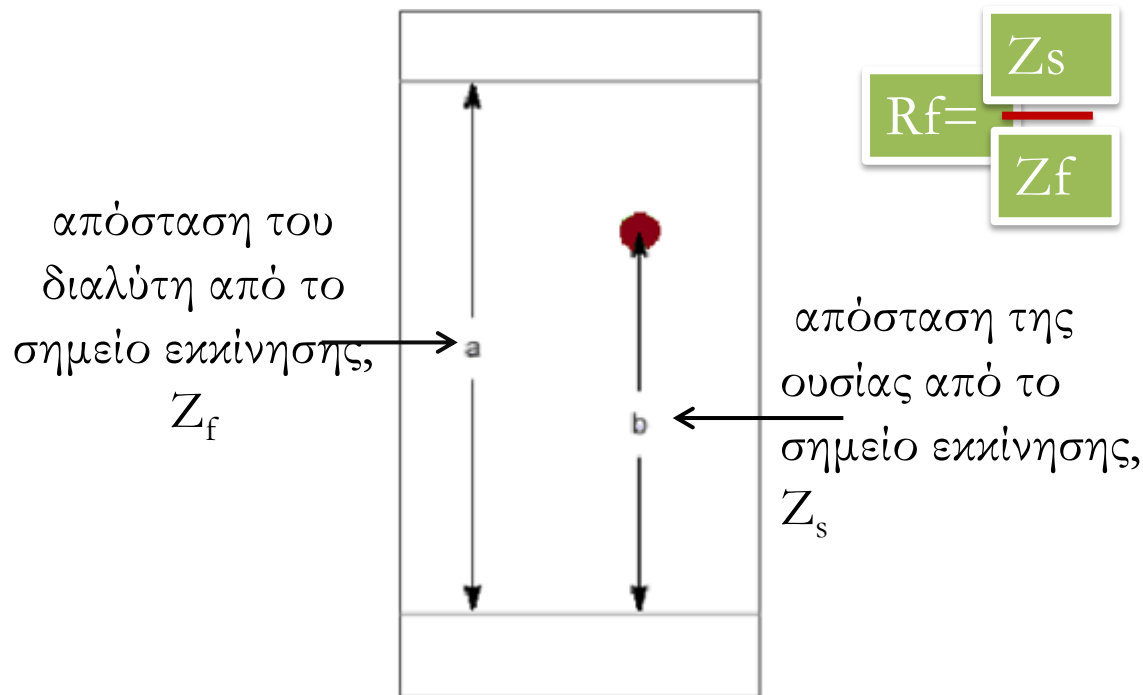
Οξικός αιθυλεστέρας

Ακετόνη

Αιθανόλη

Μεθανόλη

Οξικό οξύ



Διαφορετικό  $R_f \rightarrow$  άλλη ουσία

Ίδιο  $R_f \rightarrow$  πιθανόν ίδια ουσία

## Ποσοτικοποίηση της κίνησης της ουσία στο πλακίδιο

Οι τιμές  $R_f$  εκτός από την φύση των ουσιών επηρεάζονται και από τους εξής παράγοντες, οι οποίοι πρέπει να λαμβάνονται πάντα υπ' όψη, ώστε οι τιμές να είναι επαναλήψιμες:

- Το μέγεθος των σωματιδίων διαφορετικών παρτίδων προσροφητικού υλικού
- Η σύνθεση του διαλύτη ανάπτυξης και ο βαθμός κορεσμού του θαλάμου με τους ατμούς του διαλύτη
- Οι συνθήκες ενεργοποίησης και αποθήκευσης των πλακιδίων
- Το πάχος της προσροφητικής στιβάδας



Έχουμε το παρακάτω πλακίδιο TLC που περιέχει τις ενώσεις Α, Β και Γ και ως διαλύτης ανάπτυξης έχει χρησιμοποιηθεί Πετρελαικός αιθέρας και στατική φάση σίλικα



1. Προσδιορίστε τις τιμές  $R_f$  .
2. Ποια ένωση Α, Β, ή C, περιμένετε να είναι περισσότερο πολική;
3. Πως θα επηρεαζόταν οι τιμές  $R_f$  εάν ως διαλύτης ανάπτυξης χρησιμοποιούταν αιετόνη;

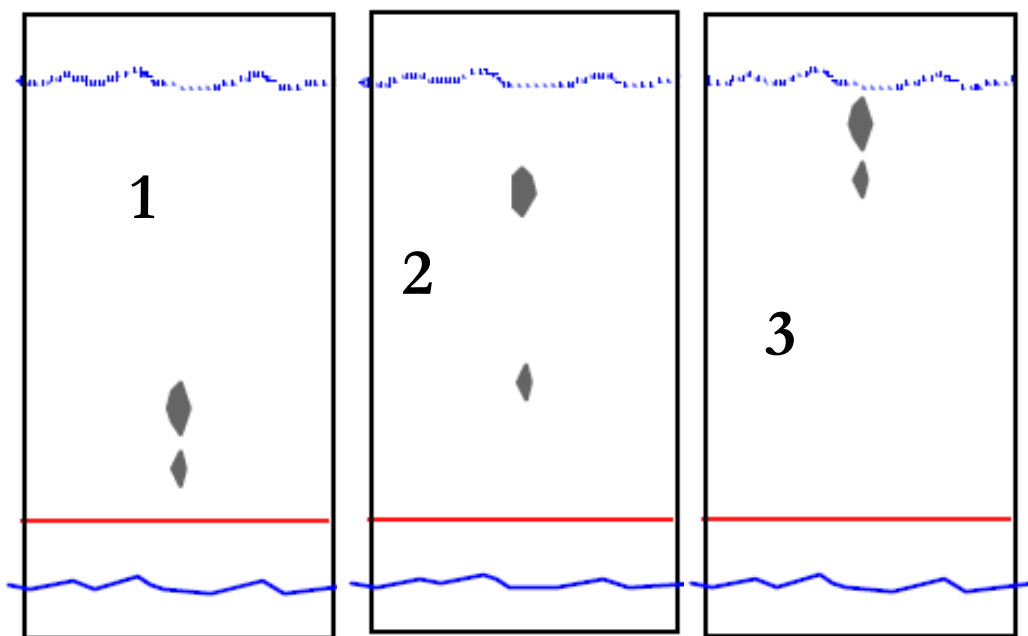
4. Πως θα επηρεαζόταν οι οι τιμές  $R_f$  εάν άλλαζε μόνο η στατική φάση στο πλακίδιο σε alumina;

Can you answer?



Κάνετε τρεις φορές ανάπτυξη μίγματος 2 ουσιών αλλάζοντας κάθε φορά την σύσταση της κινητής φάσης και κρατώντας την στατική φάση ίδια.

1. Που περιμένετε να είναι περισσότερο πολική η κινητή φάση



2. Ποια ουσία περιμένετε να περισσότερο πολική

Can you answer?



3. Ποιο πείραμα είναι περισσότερο αποτελεσματικό σε σχέση με τον διαχωρισμό των ουσιών

4. Σε ποια περίπτωση πιστεύεται ότι η ανάπτυξη θα τελειώσει πιο γρήγορα



Μια μικρή ιστορία με 2 ερωτήσεις:

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

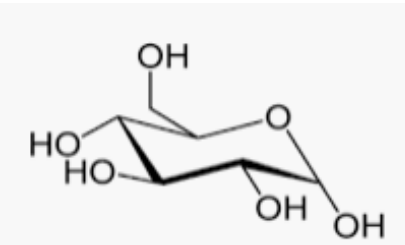
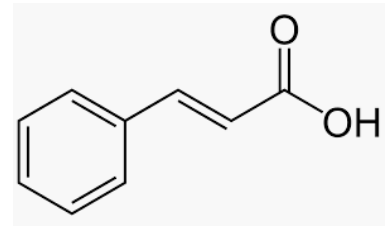
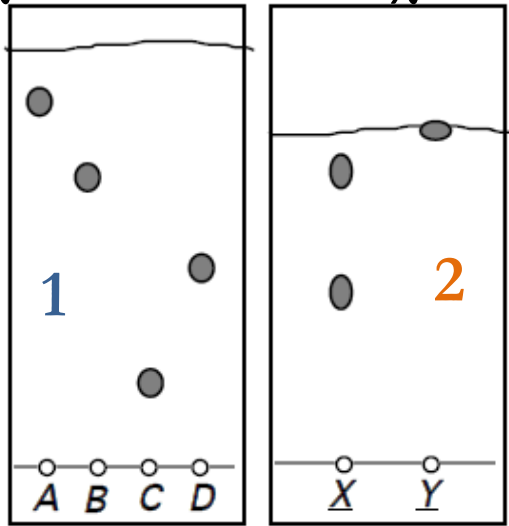
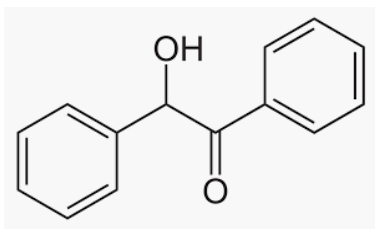
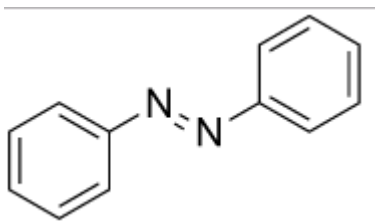
Ένας φοιτητής προσπαθεί να πετύχει έναν διαχωρισμό με TLC.

Στο πλακίδιο 1 τρέχει τις παρακάτω 4 ενώσεις:

**A (Azobenzene), B (Benzoin), C (Cinnamic acid), και D (Glucose)**

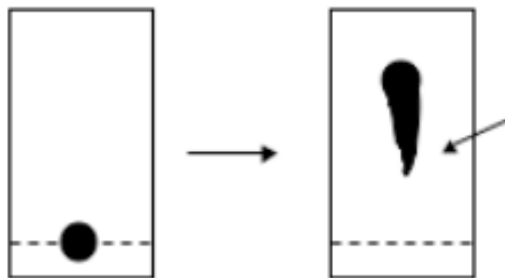
Στο πλακίδιο 2 αναπτύχθηκε μίγμα (X) με 2 από αυτές τις ενώσεις.

1. Είναι δυνατόν να εκτιμήσουμε ποιες ουσίες είναι από τις τιμές  $R_f$
2. Παράλληλα στο 2<sup>ο</sup> πλακίδιο τοποθετείται μίγμα Y. Τι παρατήρηση έχετε να κάνετε σχετικά;

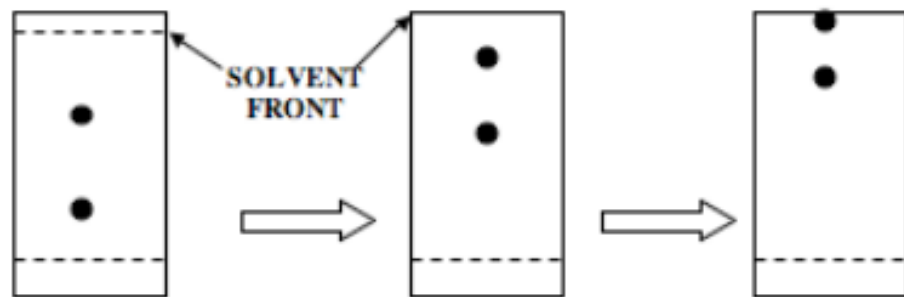


Can you answer?

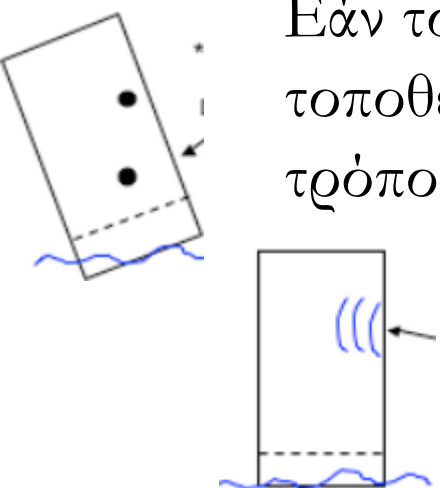




Υπερφόρτωση του δείγματος οδηγεί στον σχηματισμό «ουρών» με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολος ο προσδιορισμός των  $R_f$   
 Το ανάποδο δυσκολεύει τον εντοπισμό της κηλίδας

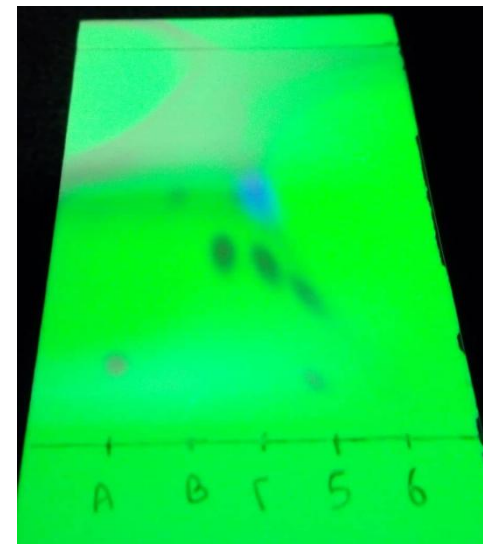


Εάν ο διαλύτης ξεπεράσει την γραμμή που έχει σχεδιαστεί ως «μέτωπο» τα  $R_f$  δεν μπορούν να προσδιοριστούν



Εάν το πλακίδιο τοποθετηθεί με πλάγιο τρόπο

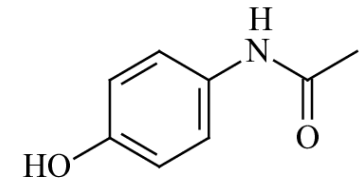
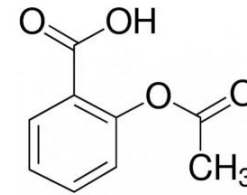
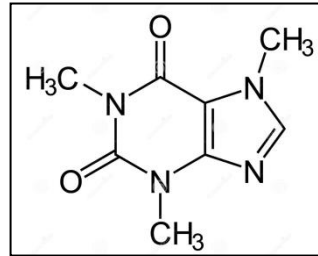
Εάν το πλακίδιο ακουμπήσει στο διηθητικό χαρτί του θαλάμου ανάπτυξης η κηλίδα ωθείται πλάγια



# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

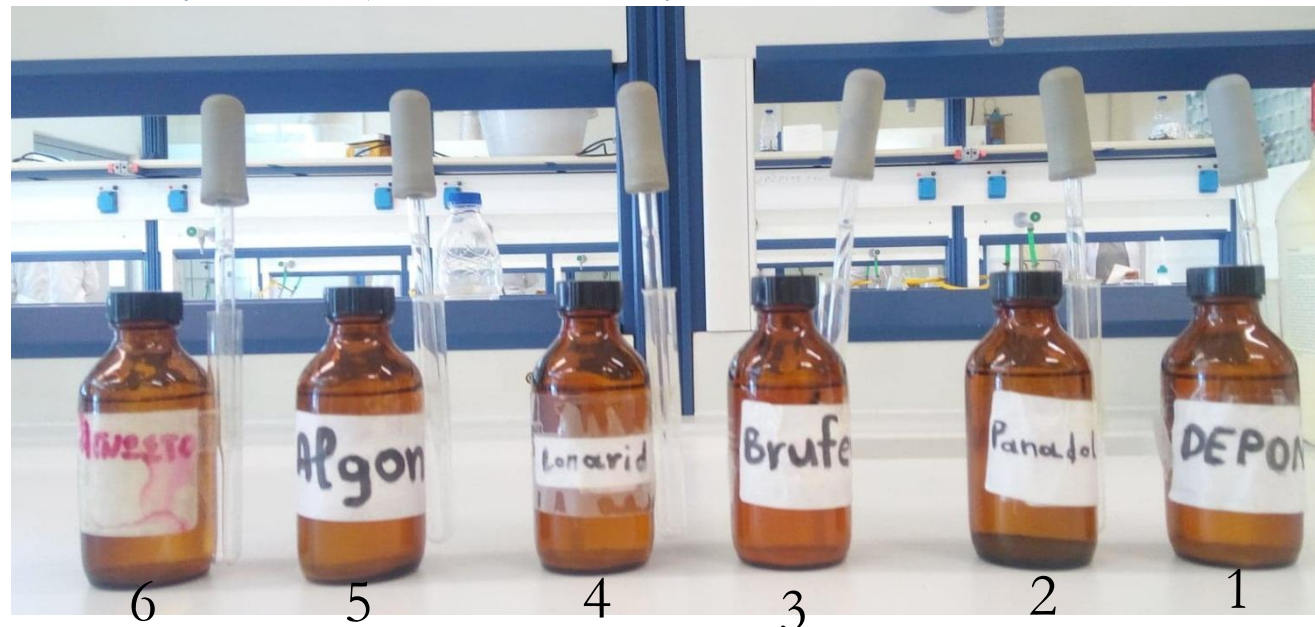
## Πειραματική διαδικασία

Πρότυπες ενώσεις (διάλυμα 1% σε αιθανόλη)



- A. Καφεΐνη,
- B. Ανέτυλοσαλικυλικό οξύ και
- Γ. 4-αιετάνιδο φαινόλη

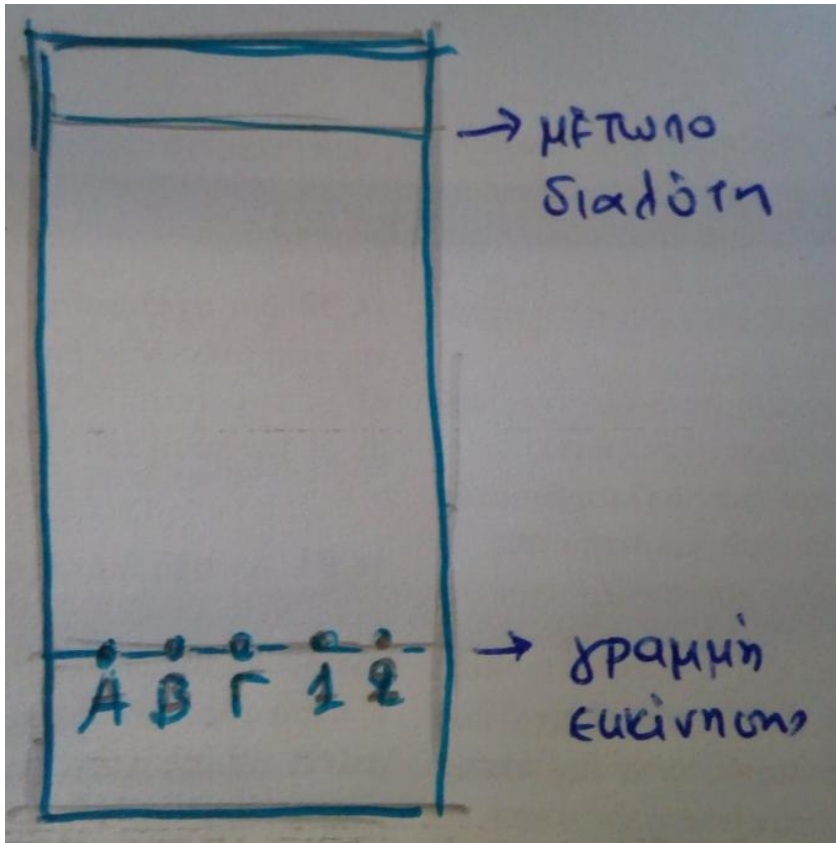
Διαλύματα προς ανάπτυξη



2 χάπια σε 50 ml  
αιθανόλης

Θα καθαρισθούν 10  
μικροί δοκιμαστικοί  
σωλήνες και θα πάρει  
κάθε ομάδα μικρή  
ποσότητα από κάθε  
διάλυμα και πρότυπο

Κάθε ομάδα θα χρησιμοποιήσει 3 πλακίδια στα οποία θα φορτώσει με την χρήση τριχοειδή σωλήνα το διάλυμα μιας ουσίας



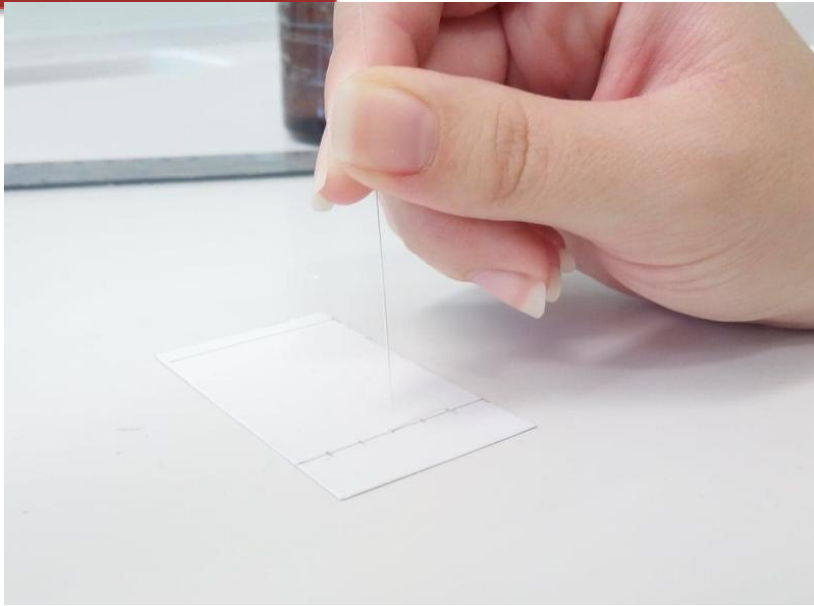
Επιλέγουμε πλακίδιο χωρίς  
σπασίματα στην στατική φάση

Αφήνουμε από την άκρη του  
πλακιδίου απόσταση μερικά  
χιλιοστά

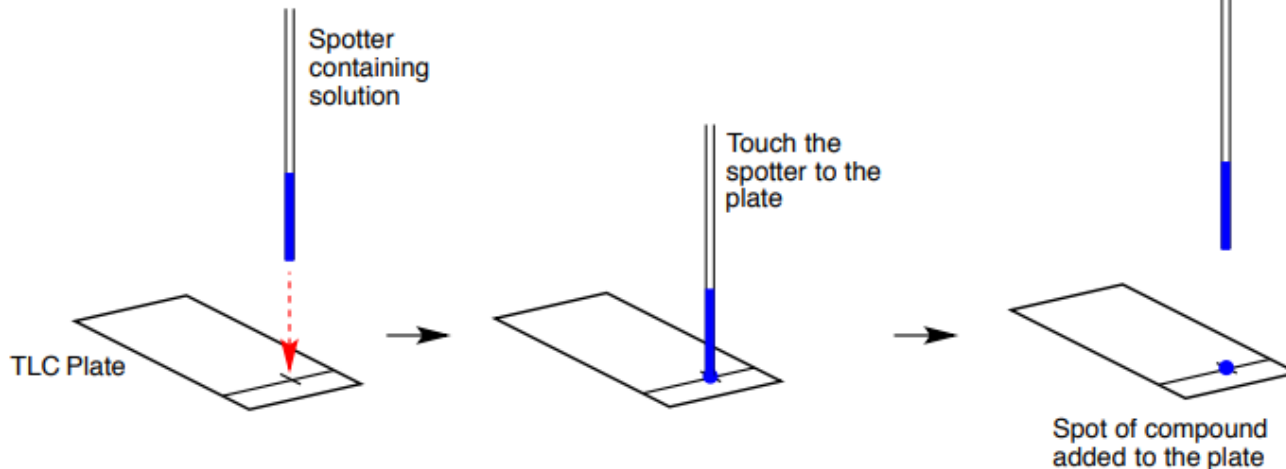
Κατά την τοποθέτηση της ουσίας  
προσέχουμε να μην  
καταστρέψουμε την στατική φάση

Κάθε φορά που προστίθεται ουσία θα ελέγχεται στην λάμπα UV

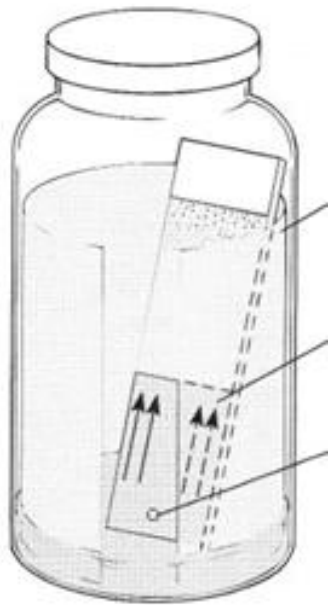




Με την χρήση του τριχοειδούς  
σποτάρουμε στο κατάλληλο σημείο.  
Προσέχουμε  
α) Να μην τραυματισθούμε στο μάτι  
με την άκρη του τριχοειδούς και  
β) Να ακουμπάμε ελαφρά ώστε να  
μην διαταραχθεί η στατική φάση

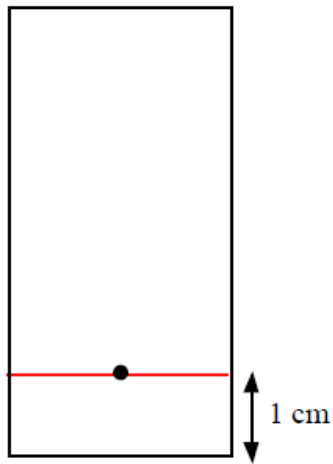






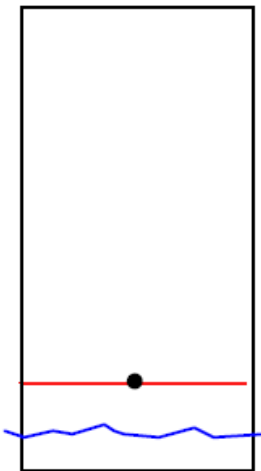
Χρησιμοποιείται θάλαμος ανάπτυξης που περιέχει την κινητή φάση

Σε ποτήρι ζέσης 300 ml προστίθενται 10 ml διαλύτη ανάπτυξης μίγμα Οξικού αιθυλεστέρα/Οξικού οξέος 95/5



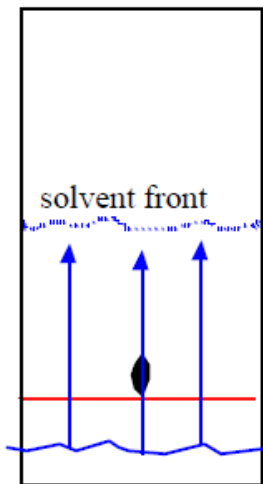
Initial TLC plate with spot

- pencil line
- initial spot



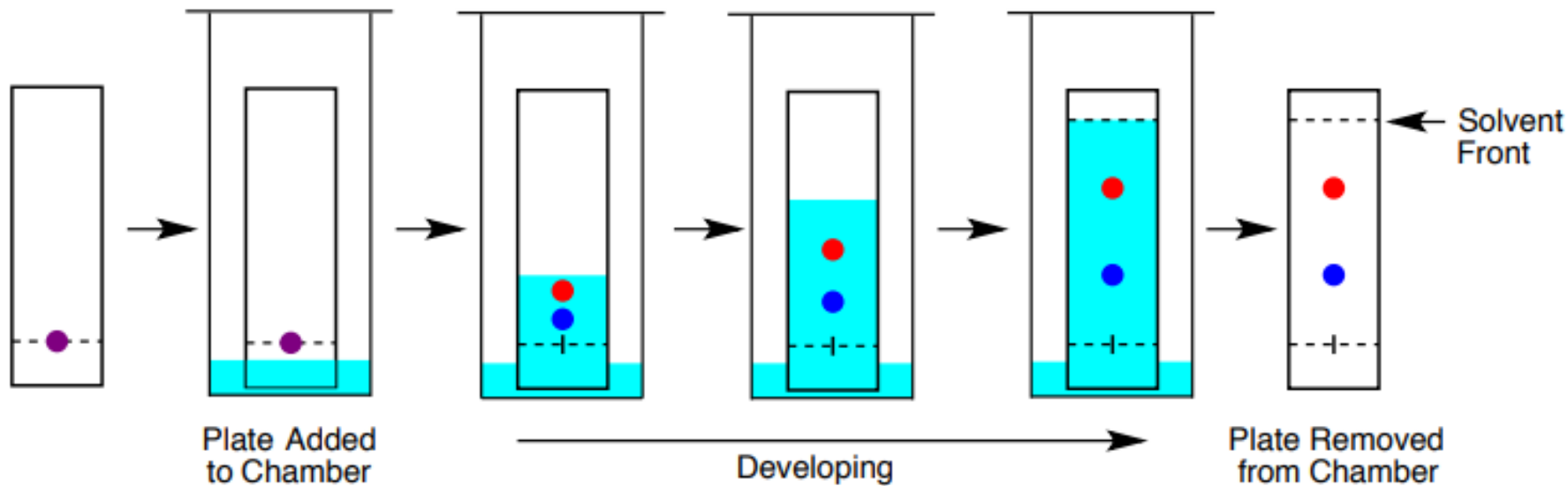
TLC plate inside the developing chamber

- solvent level



As the solvent moves up, it will cause the spot to move as well

1. Εσωτερικά τοποθετούμε διηθητικό χαρτί
2. Γραμμή εκκίνησης πάνω από το επίπεδο του διαλύτη
3. Προσέχουμε κατά την τοποθέτηση να εισέλθει κάθετα στον διαλύτη



Μετά το πέρας της ανάπτυξης, το πλακίδιο αφήνετε να στεγνώσει και στην συνέχεια γίνεται η οπτικοποίηση με την χρήση UV ή ατμούς ιωδίου ή π. Θειικό οξύ

Να συμπληρωθεί ο πίνακας στην σελ 55

Να απαντηθούν όλες οι ασκήσεις του φυλλαδίου