

# ΠΕΙΡΑΜΑ 7

## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΟΣ T.L.C

### Θεωρητικό μέρος

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (Thin Layer Chromatography – T.L.C.), χρησιμοποιείται πάρα πολύ 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. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδος 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 στιβάδος είναι :

- α) Παρακολούθηση της πορείας μιας αντίδρασης. Παίρνοντας πολύ μικρά δείγματα από μια αντίδραση, μπορούμε να προσδιορίσουμε την ταχύτητα της.
- β) Προσδιορισμός της ταυτότητας μιας χημικής ενώσεως. Εάν δυο χημικές ενώσεις που έχουν τοποθετηθεί στο ίδιο πλακίδιο TLC δίνουν ίδια  $R_f$ , μπορεί να είναι ίδιες. Αν δίνουν διαφορετικά  $R_f$  αποκλείεται να είναι ίδιες. Δύο ουσίες με παρεμφερή χημική σύνταξη μπορεί να δώσουν ίδια  $R_f$  χωρίς να είναι ταυτόσημες.
- γ) Προσδιορισμός του αριθμού των συστατικών ενός μίγματος.
- δ) Προσδιορισμός της καταλληλότητας μεθόδων καθαρισμού. Η αποτελεσματικότητα μιας εκχύλισης, ανακρυστάλλωσης, απόσταξης μπορεί να ελεχθεί με την μέθοδο TLC.
- ε) Επιλογή των κατάλληλων διαλυτών έκλουσης για μια χρωματογραφία στήλης, καθώς και των προσροφητών. Πάντα η TLC προηγείται της χρωματογραφικής στήλης. Με την βοήθεια της TLC επιλέγουμε τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών έκλουσης, έτσι ώστε, όταν θα διαχωρίσουμε ένα μίγμα ενώσεων με χρωματογραφία στήλης, τα συστατικά να παρουσιάζουν αρκετή διαφορά στα  $R_f$ .
- στ) Παρακολούθηση της πορείας διαχωρισμού με χρωματογραφία στήλης κατά την διάρκεια του διαχωρισμού τα κλάσματα που λαμβάνονται ελέγχονται με TLC, για να διαπιστώσουμε πότε αρχίζει να βγαίνει από την στήλη το κάθε συστατικό, οπότε θα πρέπει να αλλάξουμε διαλύτη.
- ζ) Σε παρασκευαστική κλίμακα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποσοτικό προσδιορισμό, με την χρησιμοποίηση μεγάλων πλακών π.χ. 15×15 cm, οι οποίες επιστρώνονται με προσροφητικό υλικό σε ειδικές συσκευές και σε μεγάλο σχετικά πάχος. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να διαχωρίσουμε μίγματα βάρους περίπου 10 mg.

### **Παρασκευή των χρωματογραφικών πλακών – προσροφητές και διαλύτες.**

Τα συνήθη υλικά για την επικάλυψη των πλακιδίων TLC είναι η αλουμίνα ( $Al_2O_3$ ), το Silica Gel ( $SiO_2$ ) και η κυτταρίνη. Η αλουμίνα σε άνυδρη μορφή είναι πολύ δραστική και προτιμάται σε διαχωρισμούς άπολων ενώσεων όπως υδρογονάνθρακες, αιθέρες, αρωματικές ενώσεις κ.α. που δεν φέρουν πολικές ομάδες. Για τον διαχωρισμό πολικών ενώσεων προτιμάται το Silica Gel π.χ. οξέα, αλκοόλες, αμίνες. Πολύ πολικές ενώσεις δεν ανέρχονται σχεδόν καθόλου στην αλουμίνα, ενώ άπολες ενώσεις, ειδικά αν και ο διαλύτης είναι άπολος, έχουν πολύ μεγάλα  $R_f$  σε Silica Gel. Εάν η ουσία είναι πολύ πολική π.χ. ένα οξύ και ο προσροφητής είναι η αλουμίνα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί σαν διαλύτης μια πολική ένωση, (τα όμοια διαλύουν όμοια), για να μπορεί να μεταφερθεί και να έχουμε ικανοποιητικό διαχωρισμό. Συχνά στην πράξη χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών, ανάλογα με την επιθυμητή πολικότητα.

### Πίνακας διαλυτών κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας

1. Πετρελαϊκός αιθέρας σ.ζ. 40-60 °C
2. Πετρελαϊκός αιθέρας σ.ζ. 60-80 °C
3. Τετραχλωράνθρακας
4. Κυκλοεξάνιο
5. Βενζόλιο
6. Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>)
7. Διαιθυλαιθέρας
8. Οξικός αιθυλεστέρας
9. Αιετόνη
10. Αιθανόλη
11. Μεθανόλη
12. Πυριδίνη
13. Οξικό οξύ

### Σειρά ανάπτυξης ενώσεων στην χρωματογραφία, κατά σειρά μειωμένης ταχύτητας :

1. Αλκάνια
2. Αλκυλαλογονίδια
3. Αλκίνια
4. Διένια
5. Αρωματικοί υδρογονάνθρακες
6. Αρωματικά αλογονίδια
7. Αιθέρες
8. Εστέρες
9. Κετόνες
10. Αλδεΐδες
11. Αμίνες
12. Αλκοόλες
13. Φαινόλες
14. Καρβοξυλικά οξέα
15. Σουλφονικά οξέα

Σήμερα παρασκευάζονται και διατίθενται στο εμπόριο έτοιμες πλάκες σε μεγάλη ποικιλία. Οι έτοιμες πλάκες εξυπηρετούν καλύτερα γιατί υπάρχει επαναληψιμότητα των μετρήσεων, χωρίς πολλά πειραματικά σφάλματα, έχουν ομοιόμορφο πάχος στο προσροφητικό υλικό και κόβονται σε όποιο μέγεθος θέλουμε. Μπορούμε να φτιάξουμε γυάλινα πλακίδια TLC με την παρακάτω διαδικασία: Πλένουμε καλά τα πλακίδια με σαπούνι και νερό και στην συνέχεια με διάλυμα μεθανόλης 50% w/ v και τα ξηραίνουμε καλά. Στην συνέχεια· ετοιμάζουμε σε ένα ευρύλαιμο πωματισμένο δοχείο ένα αιώρημα π.χ. 35 gr Silica Gel στο οποίο έχει προστεθεί γύψος και μια ουσία που φθορίζει σε 10 ml μίγματος χλωροφορμίου και μεθανόλης (2:1). Αναδεύουμε το αιώρημα επί 1 λεπτό, βυθίζουμε μέσα σε αυτό δυο πλακίδια διαστάσεων π.χ. 25×75 mm (τα πλακίδια τοποθετούνται σαν ένα ενιαίο σώμα) και στην συνέχεια τα ανασύρουμε αργά και τα αφήνουμε να ξεραθούν. Μετά της εξάτμιση του διαλύτη ξεχωρίζουμε προσεκτικά τα δυο πλακίδια και στην συνέχεια τα ενεργοποιούμε με θέρμανση για 10 λεπτά στους 130 °C. Εάν οι πλάκες δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως φυλάσσονται σε ξηραντήρα CaCl<sub>2</sub>.

### Τεχνική τοποθέτησης του δείγματος

Η τοποθέτηση του μίγματος που θέλουμε να διαχωρίσουμε γίνεται με την βοήθεια ενός τριχοειδούς σωλήνα, που μπορεί να κατασκευαστεί από πιπέτες Pasteur εύκολα. Η τοποθέτηση του δείγματος μπορεί να γίνει και με ειδικές μικροσύριγγες. Η πλάκα χρωματογραφίας χαράσσεται με μολύβι σε απόσταση περίπου 1 cm από την στενή πλευρά του πλακιδίου και τοποθετείται το δείγμα με τριχοειδή σωλήνα πάνω στην ίδια ευθεία και σε απόσταση 1 cm το ένα από το άλλο.

Τα δείγματα είχαν καταρχήν διαλυθεί σε ένα πτητικό διαλύτη π.χ.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Σε απόσταση περίπου 5 cm από το ίδιο άκρο του πλακιδίου σημειώνουμε με μολύβι το ανώτερο όριο στο οποίο επιτρέπεται να προσχωρήσει ο διαλύτης.

Εάν ο διαλύτης περάσει αυτό το όριο αρχίζει να επιβραδύνεται η ταχύτητα ανόδου του διαλύτη λόγω της μεγάλης εξάτμισης του και αρχίζει να συσσωρεύεται ουσία στο μέτωπο του διαλύτη. Τοποθετούμε το πλακίδιο στο θάλαμο ανάπτυξης ο οποίος μπορεί να είναι ένα ποτήρι των 100 ml, στο οποίο περιέχεται ο διαλύτης ανάπτυξης σε ύψος περίπου 5 mm. Το δοχείο είναι εσωτερικά καλυμμένο με διηθητικό χαρτί, οπότε όταν αυτό διαβρέχεται από τον διαλύτη, βοηθά στο να διατηρείται η ατμόσφαιρα στο δοχείο κορεσμένη σε διαλύτη και να αποφεύγεται η εξάτμιση του από το πλακίδιο κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Τοποθετείται το καπάκι στο δοχείο ή ύαλος ωρολογίου ή αλουμινόχαρτο και το δοχείο δεν μετακινείται καθόλου. Ο διαλύτης ανέρχεται στο πλακίδιο λόγω τριχοειδούς φαινομένου και όταν φθάσει στο προκαθορισμένο σημείο, βγάζουμε αμέσως το πλακίδιο, και αφού εξατμισθεί ο διαλύτης κάνουμε εμφάνιση ή ανίχνευση των κηλίδων και μετρούμε το  $R_f$ .

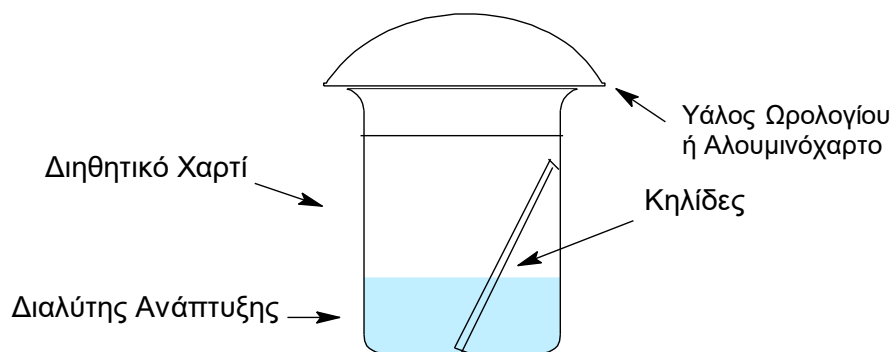
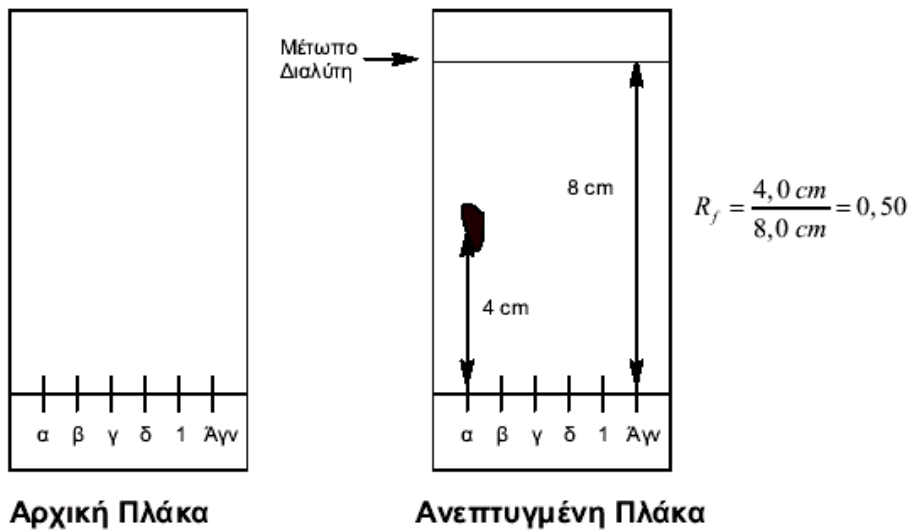
**Το  $R_f$  είναι ο λόγος της απόστασης που διανύει μια ουσία από την αρχική θέση προς την απόσταση που διανύει ο διαλύτης. Το  $R_f$  είναι χαρακτηριστική ιδιότητα της κάθε ένωσης για δεδομένες συνθήκες (διαλύτης, προσροφητής, θερμοκρασία, κ.λ.π).**

Πρέπει να προσέξουμε έτσι ώστε κατά την τοποθέτηση του δείγματος η διάμετρος της αρχικής κηλίδας να μην ξεπερνά τα 3 mm, μεγάλες κηλίδες θα έχουν σαν αποτέλεσμα να εμφανισθούν "ουρές" και θα είναι δύσκολος ο διαχωρισμός του μίγματος καθώς θα υπάρχουν επικαλύψεις και όχι επιτυχής εντοπισμός όλων των κηλίδων, τα ίδια αποτελέσματα θα έχουμε εάν θα χρησιμοποιήσουμε πυκνά διαλύματα.

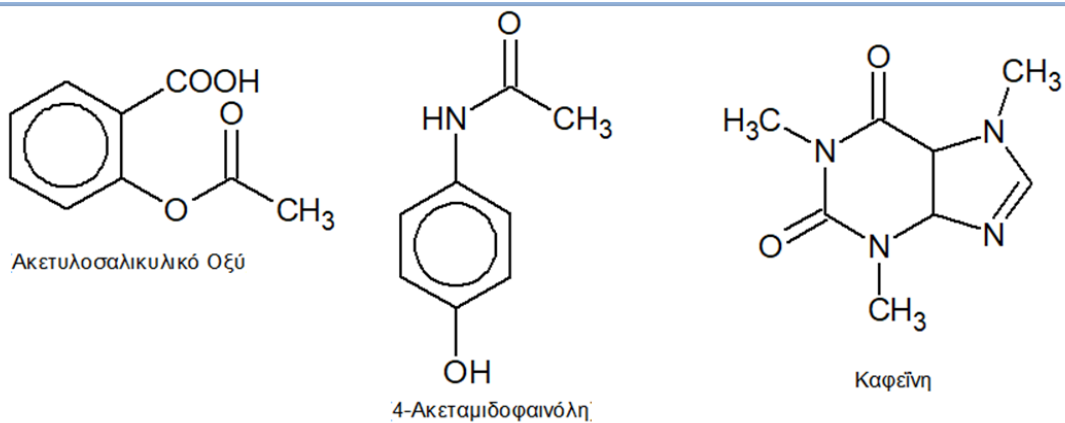
### **Εμφάνιση πλάκας χρωματογραφίας**

Εάν οι ενώσεις είναι έγχρωμες οι θέσεις των κηλίδων καθορίζονται αμέσως. Άχρωμες κηλίδες μπορούν να γίνουν ορατές με διάφορους τρόπους:

- α)** Μεταφορά της πλάκας σε κλειστό χώρο που είναι κορεσμένος με ατμούς ιωδίου. Οι ατμοί ιωδίου σχηματίζονται εάν σε ένα δοχείο τοποθετηθούν λίγοι κρύσταλλοι ιωδίου. Το ιώδιο απορροφάται από τις οργανικές ενώσεις και σχηματίζονται αμέσως ορατές καφέ κηλίδες. Μόλις εμφανισθούν οι κηλίδες σημειώνεται αμέσως η θέση τους με μολύβι ή με καρφίτσα, γιατί το  $\text{I}_2$  εξαχνώνεται γρήγορα και οι κηλίδες εξαφανίζονται.
- β)** Ψεκασμός των πλακιδίων με διάφορα αντιδραστήρια όπως π.χ.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , διάλυμα  $\text{KMnO}_4$ , διάλυμα νυδρίνης εάν πρόκειται για αμινοξέα κ.α. Τα διαλύματα αυτά αντιδρούν με άχρωμα συστατικά των κηλίδων και δίνουν έγχρωμες ενώσεις.
- γ)** Φωτίζοντας το πλακίδιο με υπεριώδες φως διαπιστώνουμε τον αριθμό και την θέση των κηλίδων. Στο προσροφητικό υλικό έχει προστεθεί ένας δείκτης φθορισμού, έτσι ώστε όταν το πλακίδιο παρατηρηθεί κάτω από υπεριώδες φως 254 nm οι κηλίδες που απορροφούν να διακρίνονται. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να αποφεύγουμε την επίδραση της ακτινοβολίας UV στα μάτια καθ' όσον είναι πολύ επικίνδυνη.



Ανίχνευση των δραστικών ουσιών σε αναλγητικά φαρμάκων. Τα περισσότερα αναλγητικά φάρμακα έχουν σαν δραστική ουσία μια ή περισσότερες από τις τρεις παρακάτω ουσίες και καφεΐνη.



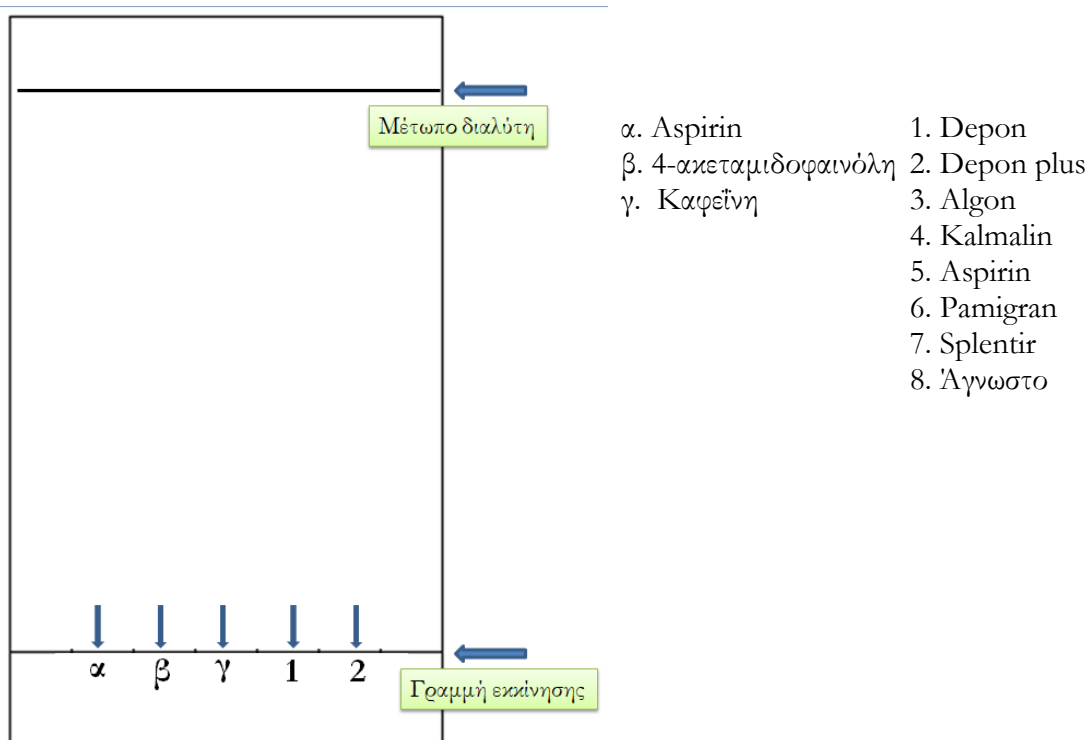
Απαιτούμενα αντιδραστήρια, φάρμακα και υλικά:

- Διαλύματα των παραπάνω 3 ουσιών σε αιθανόλη συγκέντρωσης 2% w/v για να χρησιμοποιηθούν για standards.
- Αναλγητικά φάρμακα όπως: Depon, Algon, Kalmalin, Aspirin, Pamigran, Splentir, Depon Plus.
- Διαλύτης ανάπτυξης, μίγμα οξικού αιθυλεστέρα-οξικού οξέος 95-5

- Πλακίδια TLC με Silica Gel ή αλουμίνα με δείκτη φθορισμού.
- Τριχοειδής σωλήνες και λάμπα UV.

### Πειραματικό μέρος

Τα πλακίδια είναι κομμένα σε διαστάσεις 5×6,5 cm. Κάθε φοιτητής χρειάζεται 6 πλακίδια. Όλες οι εργασίες θα γίνουν φορώντας γάντια και οι μεταφορές των πλακιδίων θα γίνονται με τσιμπίδα. Με μολύβι χαράζετε μια ελαφριά γραμμή σε απόσταση περίπου 10 mm από το στενό άκρο του πλακιδίου. Σε απόσταση περίπου 10 mm μεταξύ τους γράψτε τα γράμματα (α, β, γ, δ) και τον αριθμό 1 με μολύβι. Τοποθετήστε με τριχοειδή σωλήνα τα standards στα σημεία (α, β, γ, δ). Στο ένα προσδέστε με τριχοειδή δείγμα από το φάρμακο Depon, το οποίο προηγούμενα έχει λειοτριβηθεί καλά και έχει διαλυθεί μικρή ποσότητα του σε αιθανόλη.



Συνήθως προκύπτει ένα αιώρημα διότι τα έκδοχα συστατικά του φαρμάκου δεν διαλύονται αρκετά καλά στην αιθανόλη. Για να προκύψει το αιώρημα βάζουμε μια πολύ μικρή ποσότητα φαρμάκου σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσθέτουμε λίγες σταγόνες αιθανόλης. Δεν θα πρέπει η διάμετρος των κηλίδων να ξεπερνά το 1 mm. Πριν κάνουμε ανάπτυξη ελέγχουμε με την λάμπα UV εάν έχει προστεθεί αρκετή ουσία από κάθε δείγμα, εάν προστίθεται στα ίδια σημεία και άλλη σταγόνα.

Κάνετε ανάπτυξη με πολικό διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα-οξικό οξύ 95-5, σε ποτήρι που είναι σκεπασμένο με αλουμινόχαρτο. Όταν ο διαλύτης πλησιάσει 10 mm περίπου από την κορυφή του πλακιδίου το βγάξετε με τσιμπίδα και σημειώστε αμέσως με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη. Αφήνετε το διαλύτη να εξατμισθεί και στην συνέχεια παρατηρείται με λάμπα UV το πλακίδιο. Τα διάφορα συστατικά θα έχουν μορφή κηλίδας με απόχρωση πράσινο-μπλέ ή μωβ.

Σημειώστε τις κηλίδες με μολύβι ή με καρφίτσα. Προσδιορίστε ποια πρότυπα έχουν ίδια  $R_f$  με τις δραστικές ουσίες του Depon.

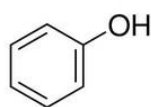
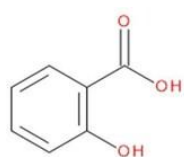
Επαναλάβετε την ίδια διαδικασία με τα φάρμακα Brufen, Aspirin, Panadol, Lonarid και με ένα άγνωστο φάρμακο.

Κατατάξετε τα αποτελέσματα σας στον παρακάτω πίνακα:

	Ακετυλοσαλικυλικό Οξύ	4-Ακεταμιδοφαινόλη	Καφεΐνη
Depon			
Depon plus			
Algon			
Kalmalin			
Aspirin			
Pamigran			
Splentir			
Άγνωστο			

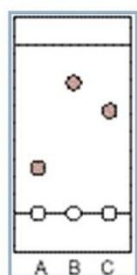
### Ασκήσεις – Ερωτήσεις

1. Γιατί στην ανάπτυξη χρησιμοποιήσατε πολικό και όχι άπολο διαλύτη;
2. Γιατί πρέπει η ανάπτυξη να γίνεται σε κλειστό θάλαμο ο οποίος έχει κορεστεί με ατμούς του διαλύτη;
3. Ποια αποτελέσματα θα είχαμε αν η στάθμη του διαλύτη ανάπτυξης ξεπερνούσε την γραμμή εκκίνησης;
4. Στο Silica Gel ή στην αλουμίνα το ακετυλοσαλικυλικό οξύ θα έχει με τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερο  $R_f$  και γιατί σε ίδια θερμοκρασία;
5. Για να διαχωρίσετε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας τις ενώσεις που φαίνονται δίπλα θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε:



- i) Στατική φάση αλούμινα και κινητή φάση εξάνιο
- ii) Στατική φάση σίλικα και κινητή φάση εξάνιο
- iii) Στατική φάση αλούμινα και κινητή φάση 1-προπανόλη
- iv) Στατική φάση σίλικα και κινητή φάση 1-προπανόλη

6. Για το πείραμα TLC που οδήγησε στο πλακίδιο που φαίνεται δίπλα χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης πετρελαικός αιθέρας και ως στατική φάση σίλικα



- i). Ποια ένωση είναι πιο πολική;
- ii). Θα άλλαζαν τα  $R_f$  και πως εάν χρησιμοποιούνταν ακετόνη ως κινητή φάση;
- iii). Θα άλλαζαν τα  $R_f$  και πως εάν χρησιμοποιούνταν αλούμινα ως στατική φάση;