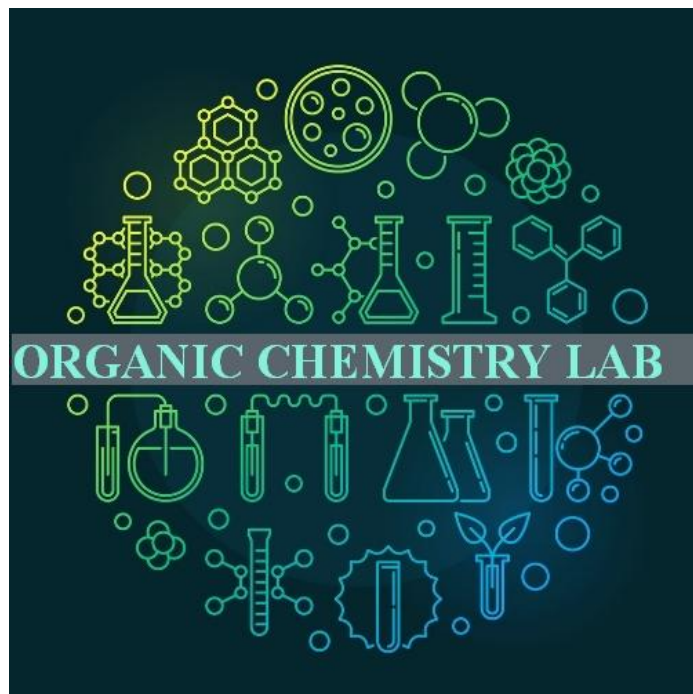


Εργαστηριακή άσκηση 8



Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας

Δομή της παρουσίασης

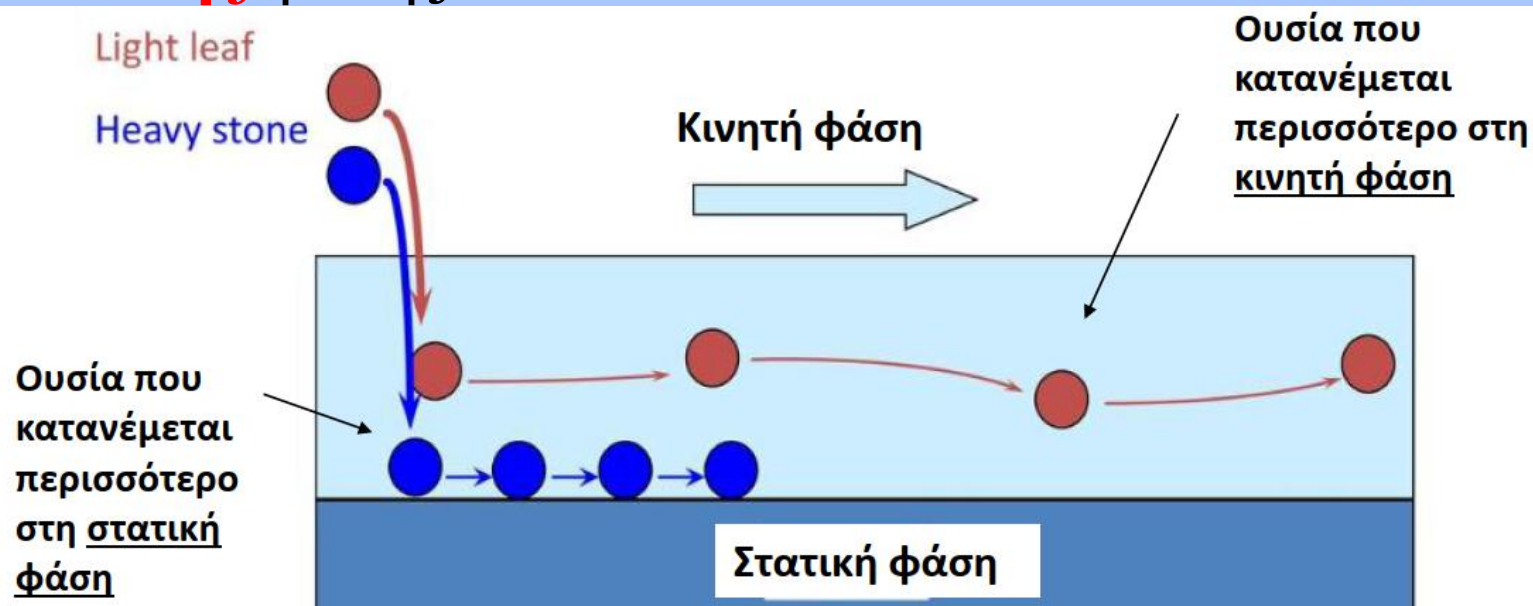
1. Θεωρητικό υπόβαθρο

3. Λυμένα παραδείγματα

4. Ασκήσεις για αναφορά

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΑ

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



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.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΑ

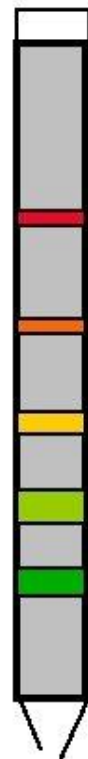
Ανακαλύφθηκε από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Semyonovich Tsvett, ο οποίος διαχώρισε φυτικές χρωστικές με χρήση στήλης ανθρακικού ασβεστίου (1901).



Original Chromatography Experiment

Start: A glass column is filled with powdered limestone (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.

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).

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

Ανέπτυξαν πολλές βασικές τεχνικές στην χρωματογραφία κατανομής, πχ χάρτου, αέρια χρωματογραφία, HPLC, κλπ.

The Birth of Partition Chromatography

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).



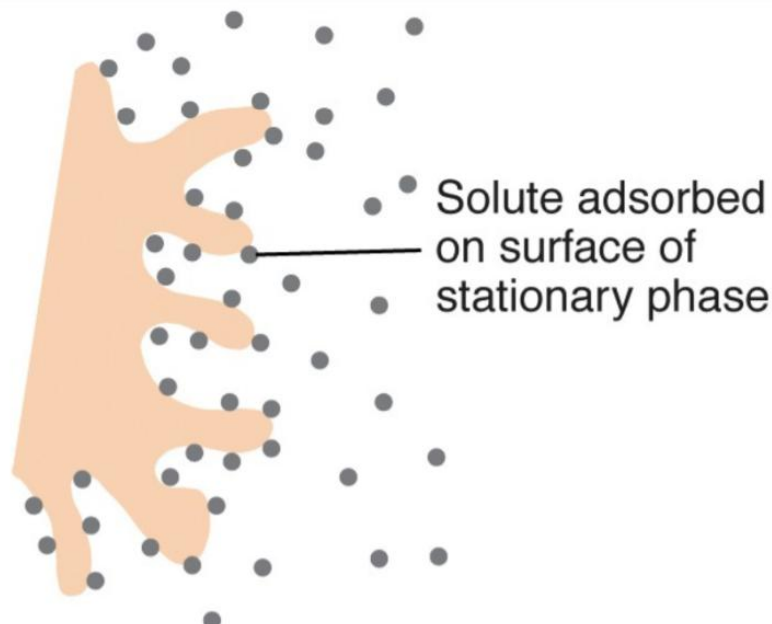
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΑ

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.

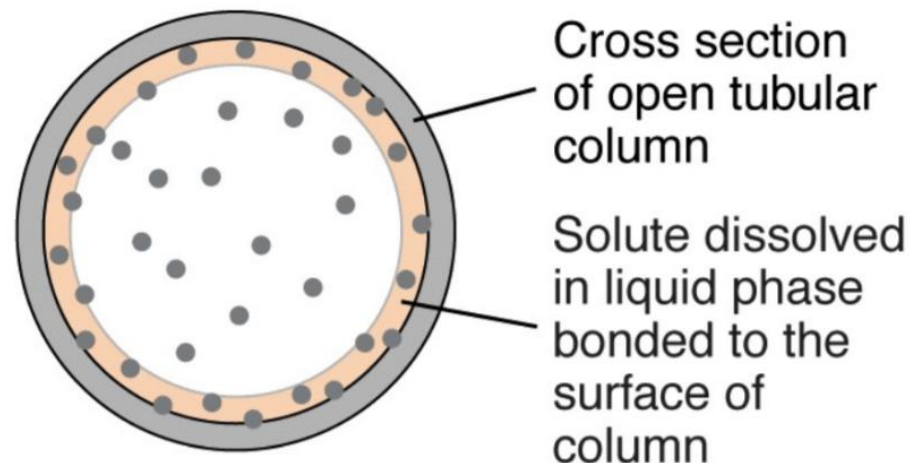
Ανάλογα με την **αρχή στην οποία στηρίζεται ο διαχωρισμός**, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται σαν προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής ή πηκτής ή μοριακού αποκλεισμού.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΑ



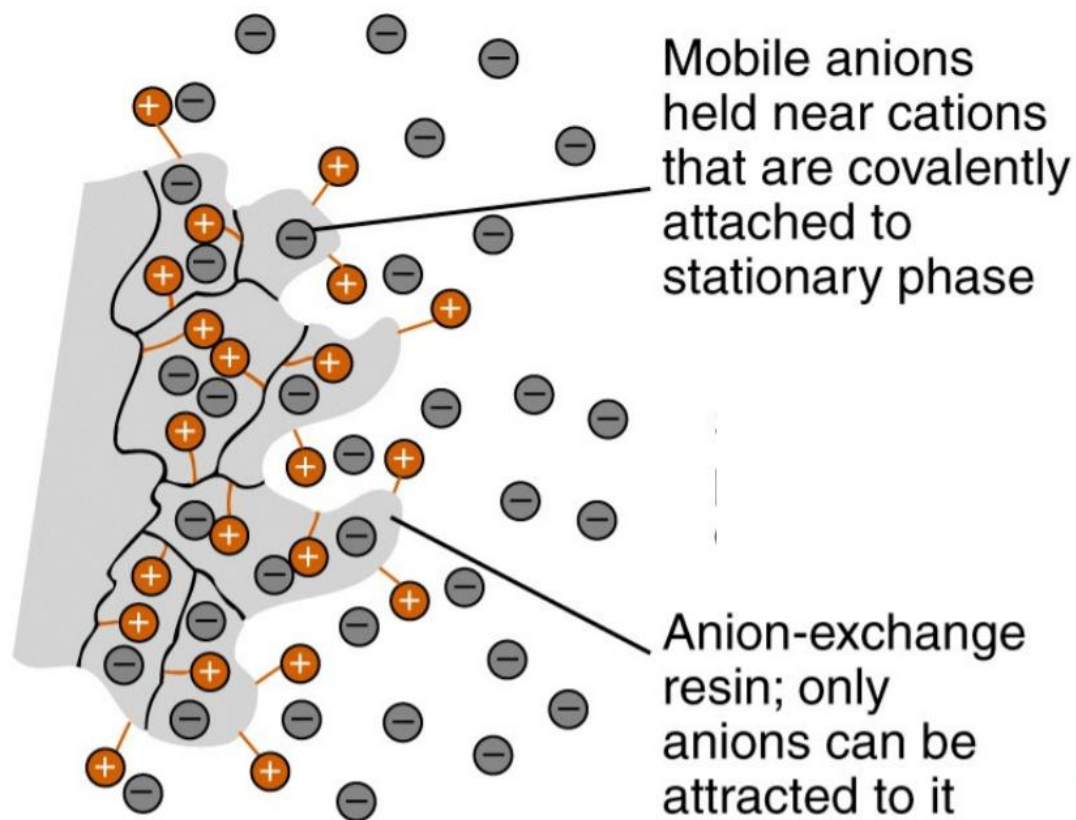
Χρωματογραφία προσρόφησης

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



Χρωματογραφία κατανομής

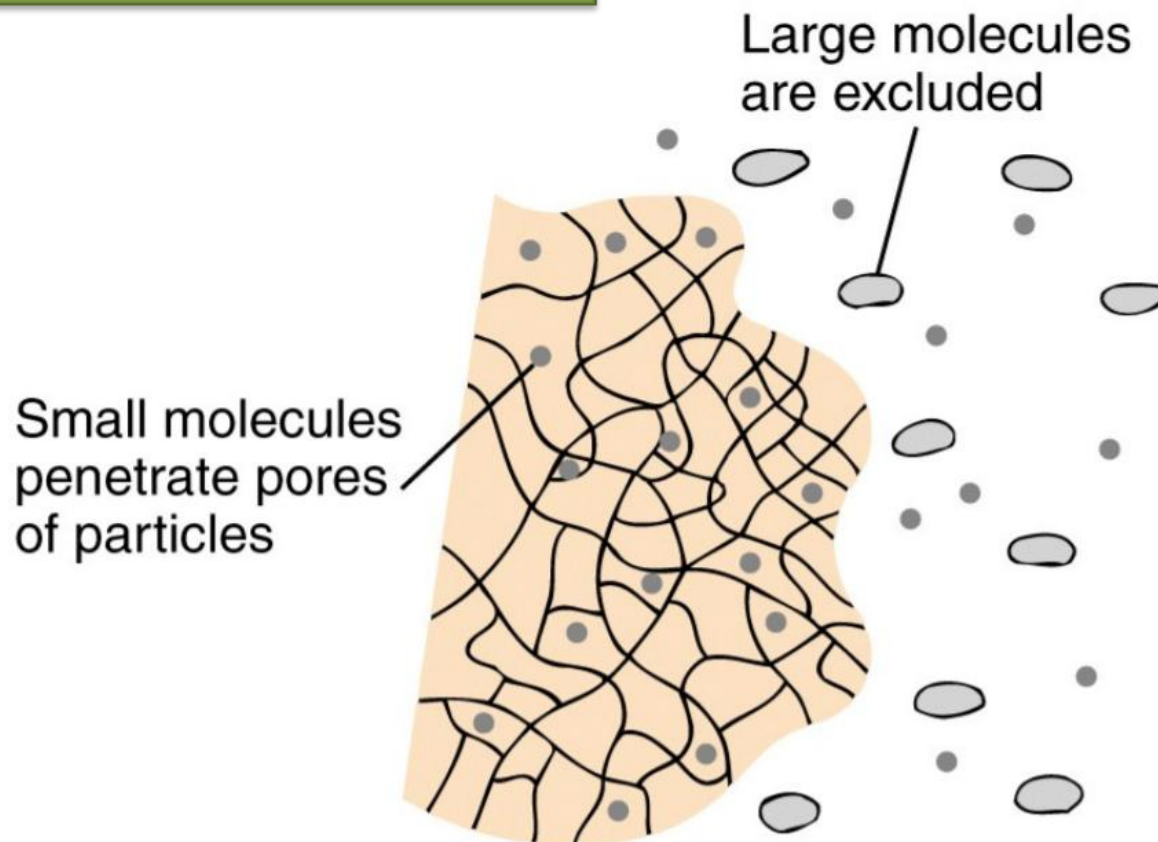
Οι ενώσεις διαχωρίζονται με βάση την κατανομή τους ανάμεσα σε μια υγρή κινητή φάση υγρή στατικά φάση που βρίσκεται συνδεδεμένη σε στερεό υπόστρωμα



Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με προσρόφηση των ενώσεων πάνω σε υλικό που περιέχει φορτισμένες θέσεις στην επιφάνεια του.

Χρωματογραφία ιονταλλαγής

Αυξημένη συγκέντρωση ενός ανταγωνιστικού ιόντος προστίθεται στην κινητή φάση με σκοπό την έκλυση των ουσιών από την στήλη.



Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

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

Αποτελεί την εξέλιξη της χρωματογραφίας χάρτου.

Στην TLC έχουμε μια κινητή (διαλύτης) και μια σταθερή-στατική φάση.

Η στατική φάση είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη σε γυάλινο ή αλουμινένιο πλακίδιο και συνήθως αποτελείται από SiO_2 (silica) ή Al_2O_3 (αλούμινα).

Τα πλακίδια περιέχουν ουσίες φθορισμού έτσι ώστε σε μια λάμπα Υν να φθορίζει όλο το 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.

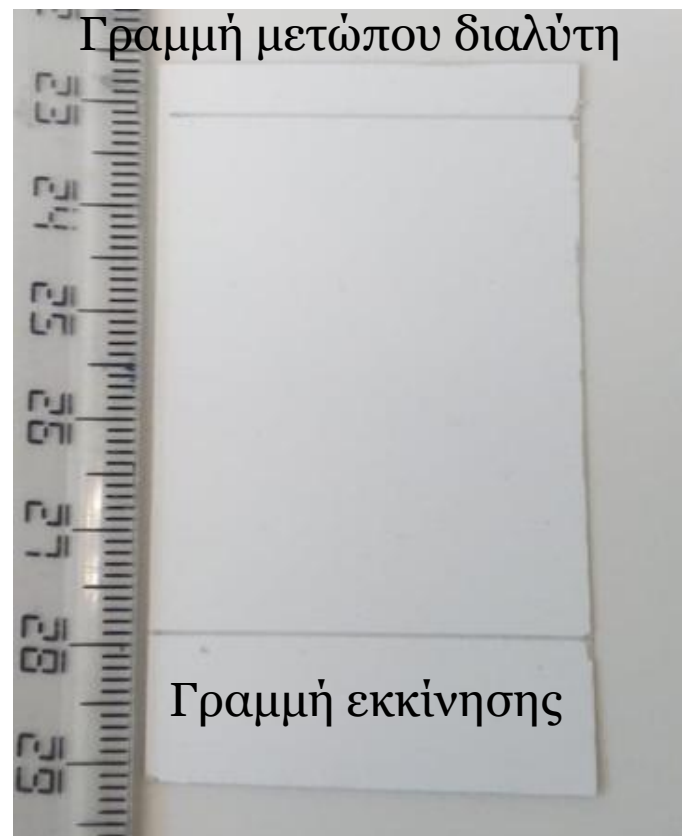
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΟΣ

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).

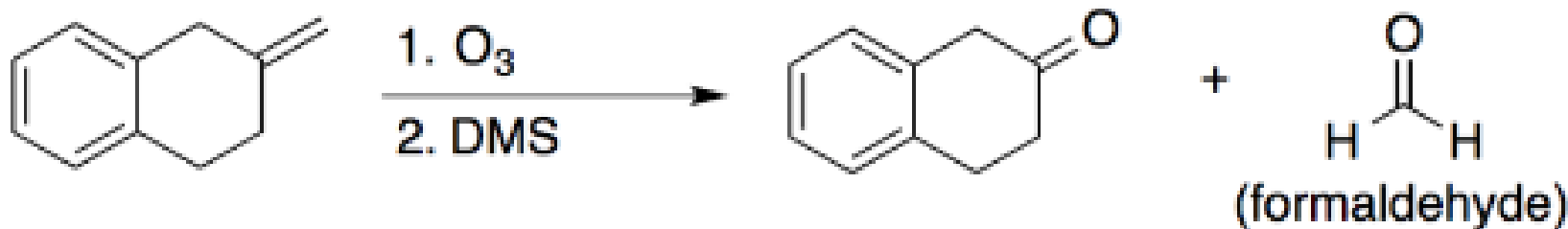
Χειρισμός με γάντια

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

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



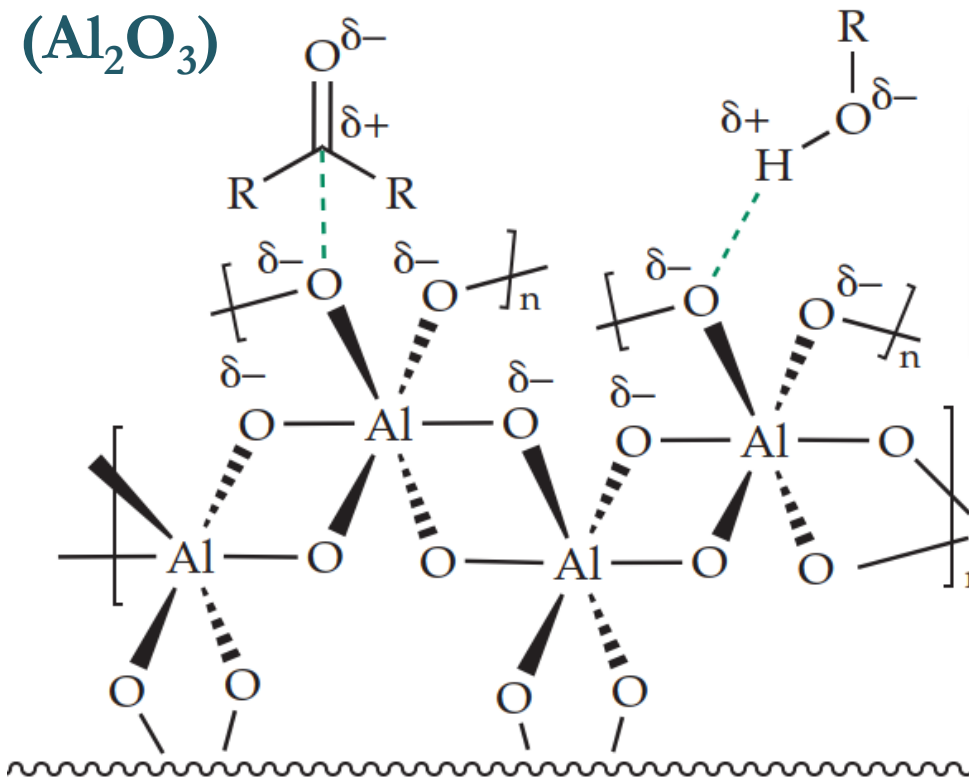
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ



Οι κυριότερες χρήσεις:

- ☐ 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.

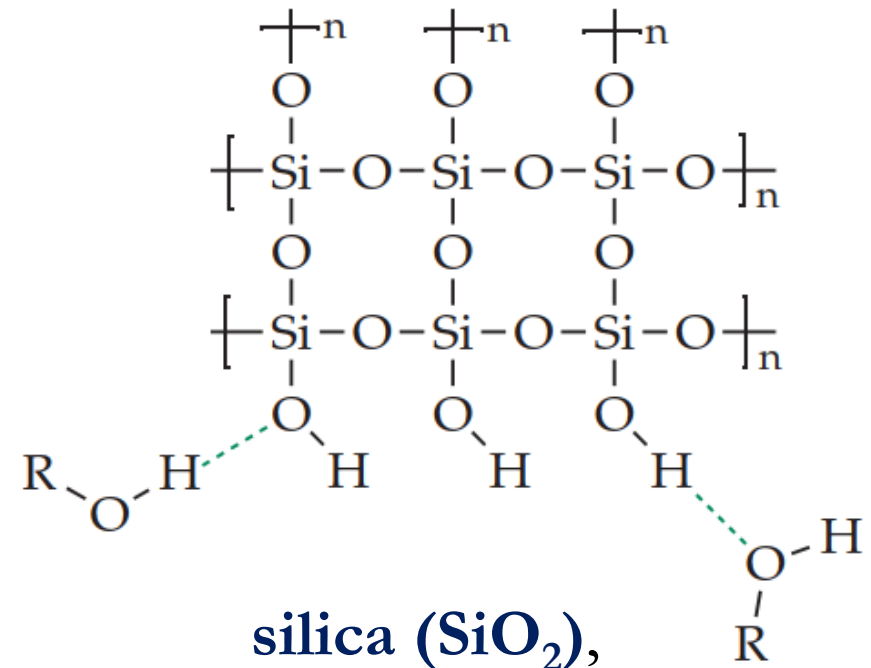
alumina
(Al_2O_3)



Χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις

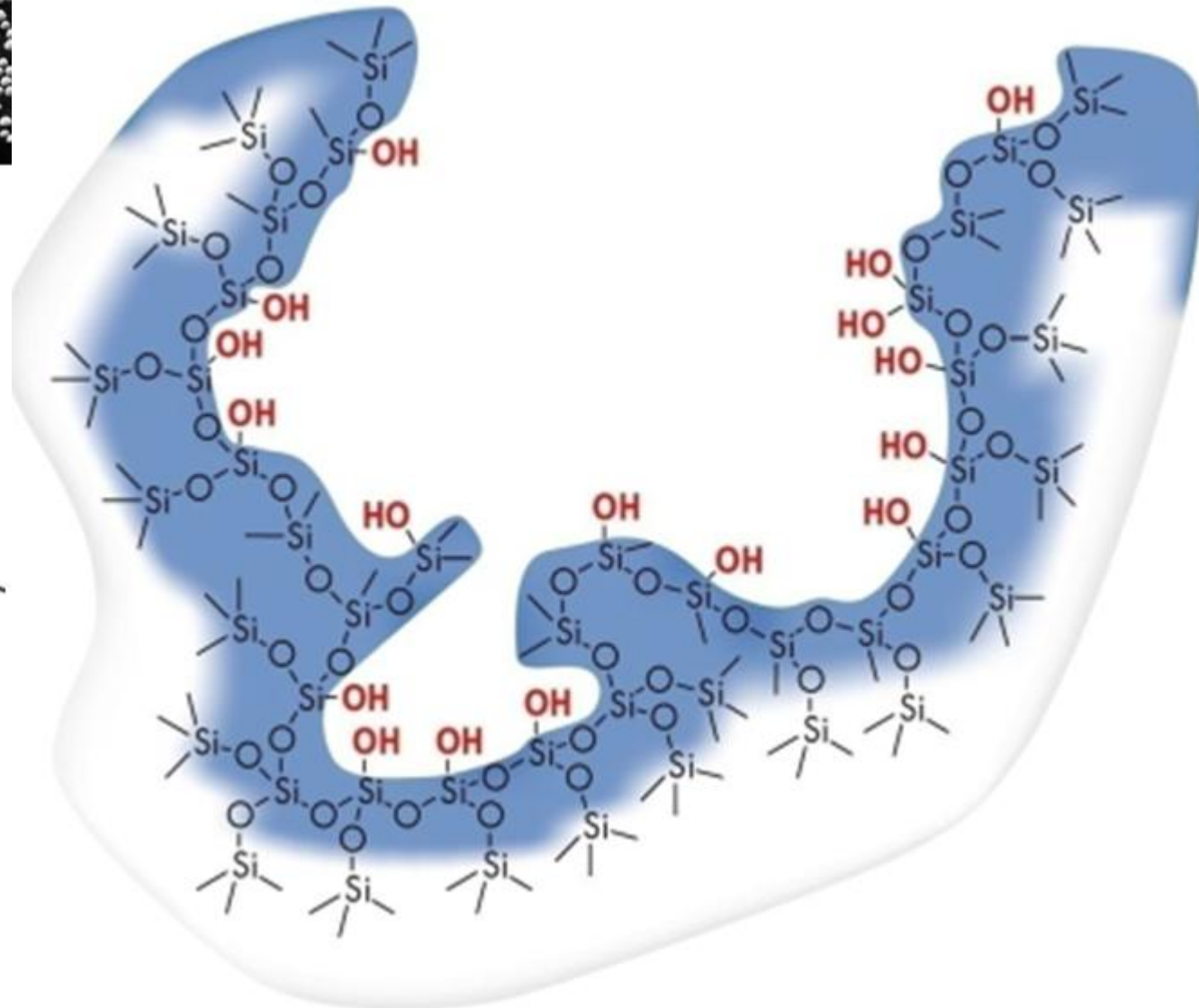
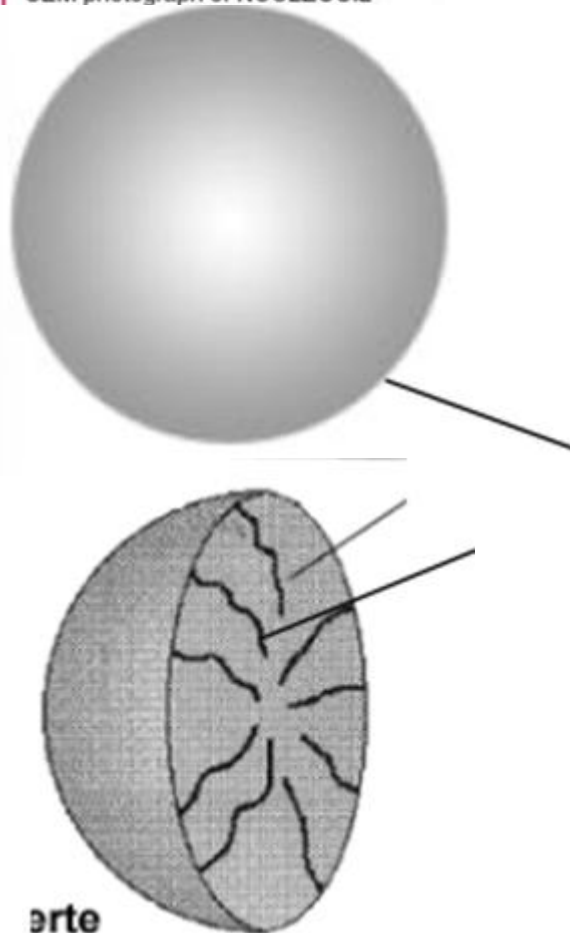
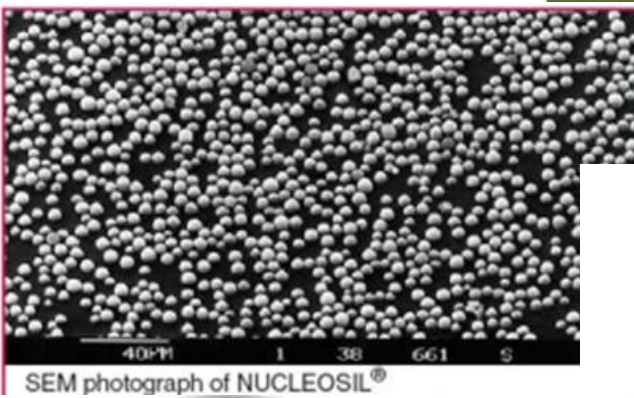
Η Αλούμινα είναι πολύ δραστική μια και είναι ιοντικό στερεό

Η σίλικα είναι στερεό ομοιοπολικού πλέγματος



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

Χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις



Το κλειδί για έναν επιτυχημένο χρωματογραφικό διαχωρισμό είναι η κινητή φάση.

Με την χρησιμοποίηση διαφορετικών διαλυτών είτε καθαρούς είτε ως μείγματα, υπάρχει η δυνατότητα να ρυθμιστεί η πολικότητα της κινητής φάσης και να επηρεαστεί κατάλληλα η ισορροπία μεταξύ της ελεύθερης και της προσροφημένης κατάστασης μιας υπό μελέτης ουσίας

Για την εύρεση της βέλτιστης κινητής φάσης χρησιμοποιείται αρχικά ένας μη πολικός διαλύτης όπως το εξάνιο. Εάν τα συστατικά του μείγματος δεν μετακινούνται πολύ μακριά, προστίθεται πολικός διαλύτης, όπως αιθέρσα ή οξικός αιθυλεστέρας. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας συνδυασμός δύο διαλυτών είναι η καλύτερη επιλογή..

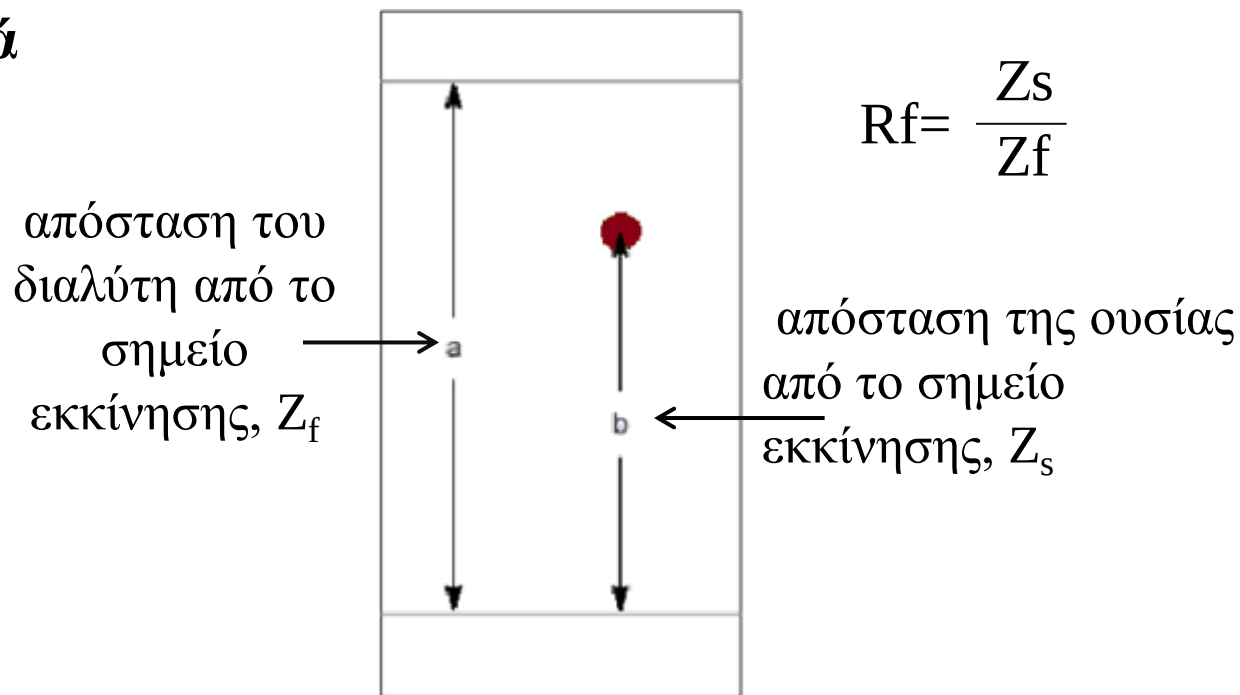
Εάν οι κηλίδες παραμείνουν κοντά στην γραμμή εκκίνησης, αυξάνεται το ποσοστό του πολικού διαλύτη. Εάν βρίσκονται κοντά στο μέτωπο του διαλύτη, αυξάνεται το ποσοστό του άπολου.

Η εκλουστική 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

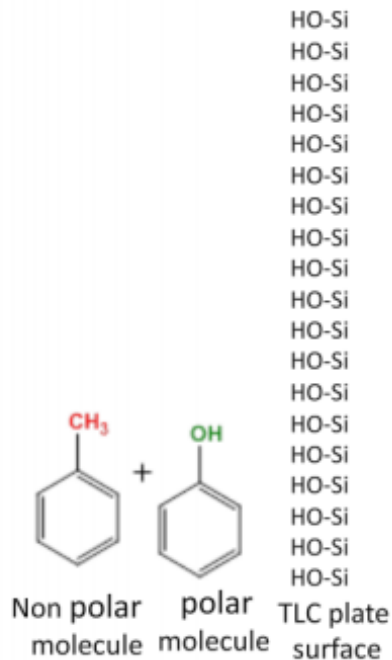
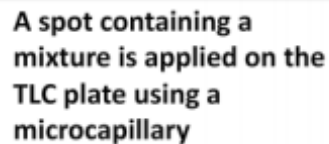
Ίδιο $R_f \rightarrow$ πιθανόν ίδια ουσία

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:

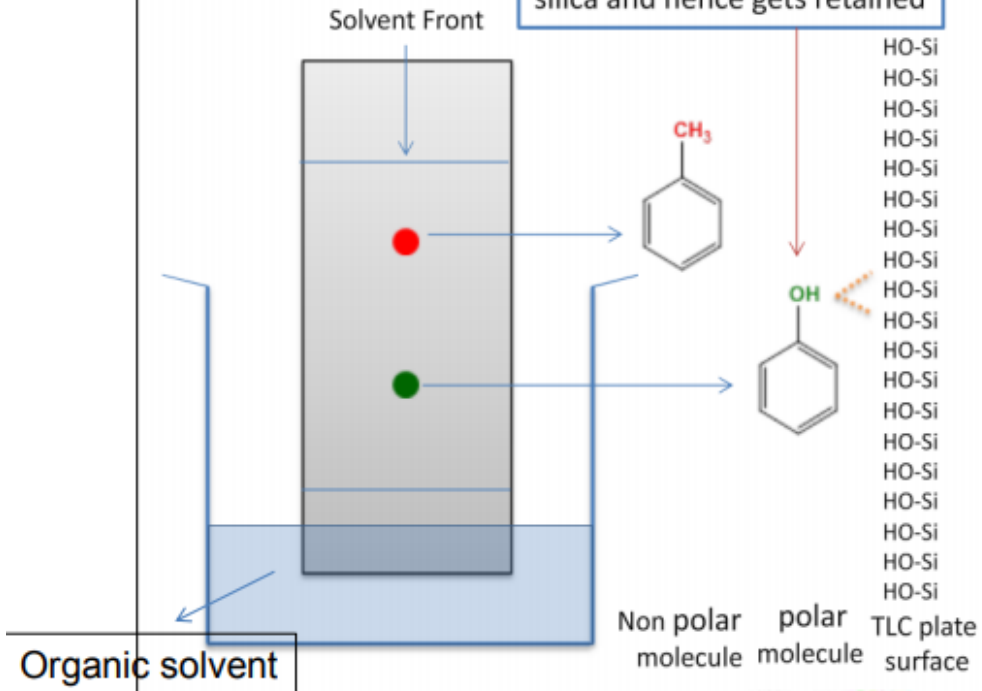
- Το μέγεθος των σωματιδίων διαφορετικών παρτίδων προσροφητικού υλικού
- Η σύνθεση του διαλύτη ανάπτυξης και ο βαθμός κορεσμού του θαλάμου με τους ατμούς του διαλύτη
- Οι συνθήκες ενεργοποίησης και αποθήκευσης των πλακιδίων
- Το πάχος της προσροφητικής στιβάδας

Διαδικασία διαχωρισμού μίγματος ουσιών



As the solvent rises the mixture gets separated/resolved

Polar molecule is capable of H-bond interactions with silica and hence gets retained



- 1. Διαθέτουμε μια πολική ένωση.** Που περιμένουμε να έχει μεγαλύτερο R_f στην αλούμινα ή στην σίλικα;
- 2. Διαθέτουμε τις κινητές φάσεις εξάνιο και 1-προπανόλη**
Ποια περιμένουμε να κινηθεί γρηγορότερα σε στατική φάση αλούμινα ή σίλικα;

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

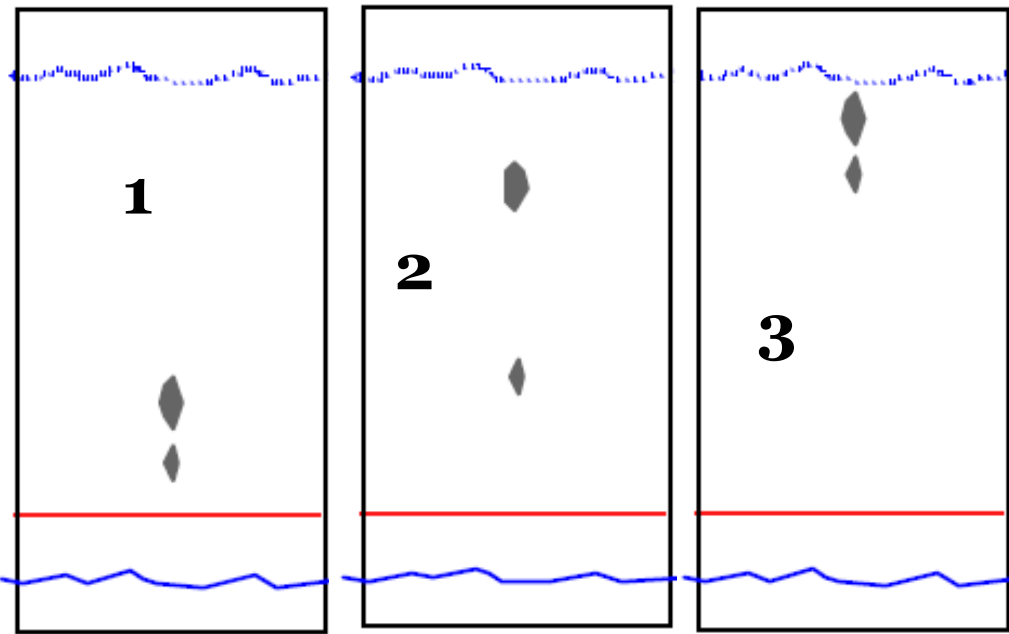


1. Προσδιορίστε τις τιμές R_f .
2. Ποια ένωση Α, Β, ή C, περιμένετε να είναι περισσότερο πολική;
3. Πως θα επηρεαζόταν οι τιμές R_f εάν ως διαλύτης ανάπτυξης χρησιμοποιούνταν ακετόνη;
4. Πως θα επηρεαζόταν οι οι τιμές R_f εάν άλλαζε μόνο η στατική φάση στο πλακίδιο σε alumina;



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 είναι περισσότερο πολική

3. Πως θα επηρεάζονταν οι τιμές R_f εάν άλλαζε μόνο η στατική φάση στο πλακίδιο σε alumina;

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



Ένας φοιτητής προσπαθεί να πετύχει έναν διαχωρισμό με TLC.

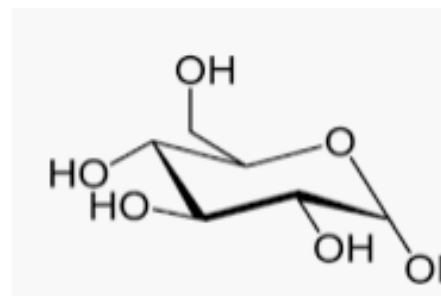
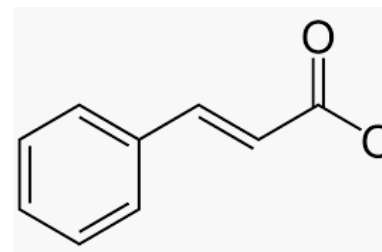
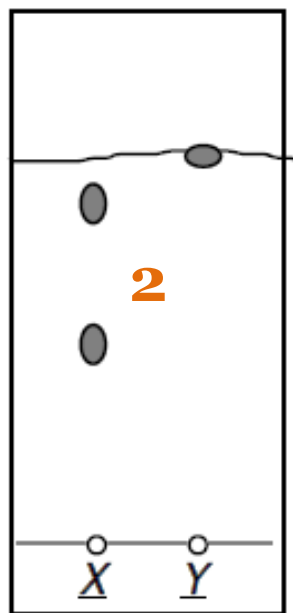
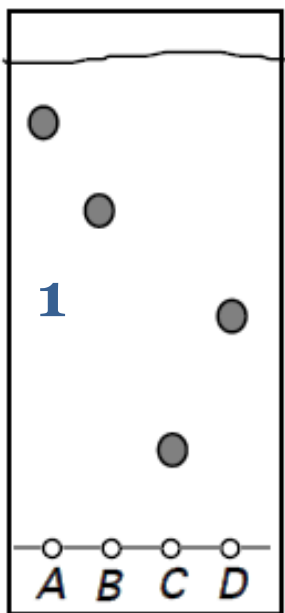
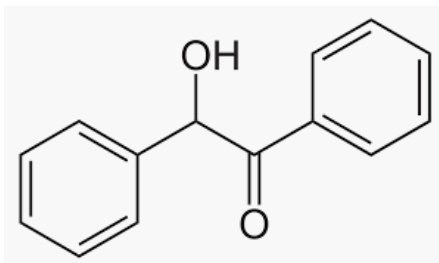
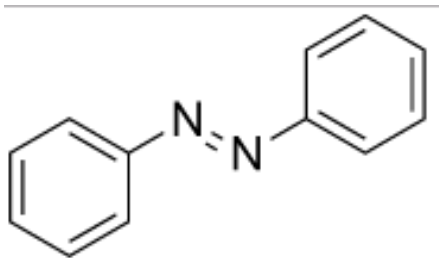
Στο πλακίδιο 1 τρέχει τις παρακάτω 4 ενώσεις:

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^ο πλακίδιο τοποθετείται μίγμα Y.

Τι παρατήρηση έχετε να κάνετε σχετικά;



Can you answer?

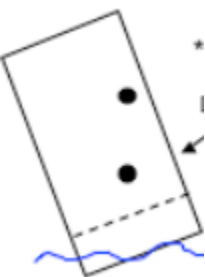
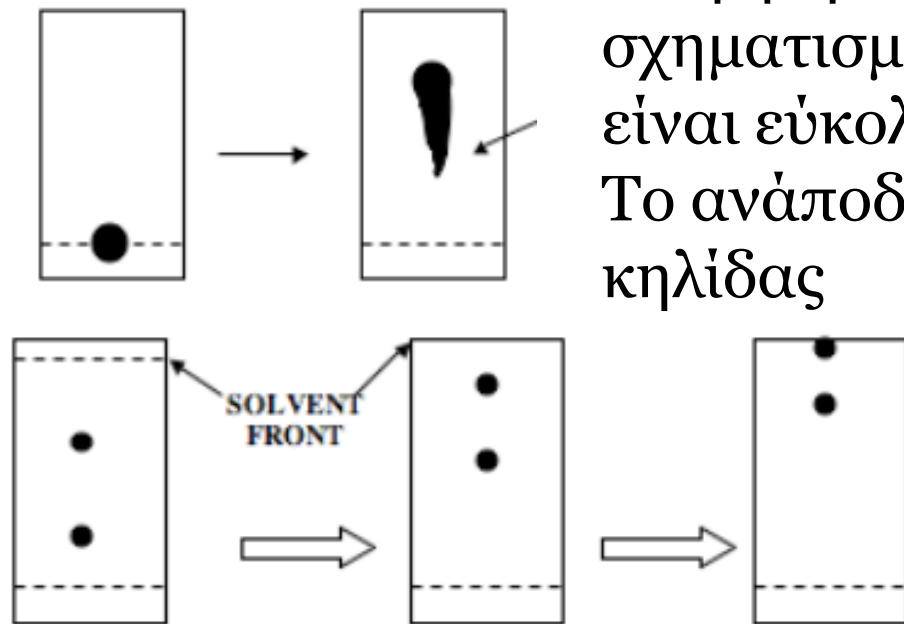


Κάποιες παρατηρήσεις:

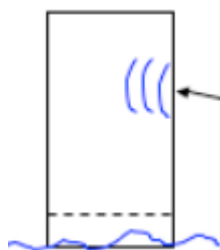
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

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.

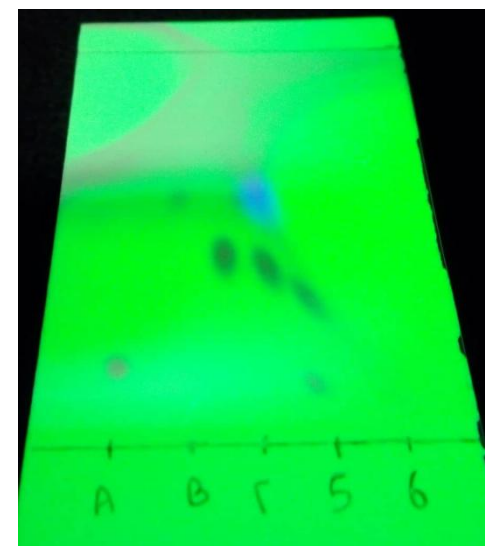
Εάν ο διαλύτης ξεπεράσει την γραμμή που έχει σχεδιαστεί ως «μέτωπο» τα R_f δεν μπορούν να προσδιοριστούν.



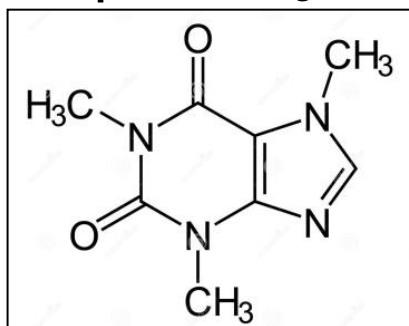
Εάν το πλακίδιο τοποθετηθεί με πλάγιο τρόπο



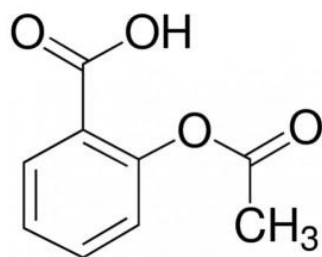
Εάν το πλακίδιο ακουμπήσει στο διηθητικό χαρτί του θαλάμου ανάπτυξης η κηλίδα ωθείται πλάγια



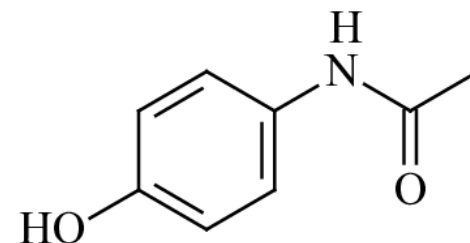
Πρότυπες ενώσεις (διάλυμα 2% σε αιθανόλη)



A. Καφεΐνη,



B. Ακέτυλοσαλικυλικό οξύ



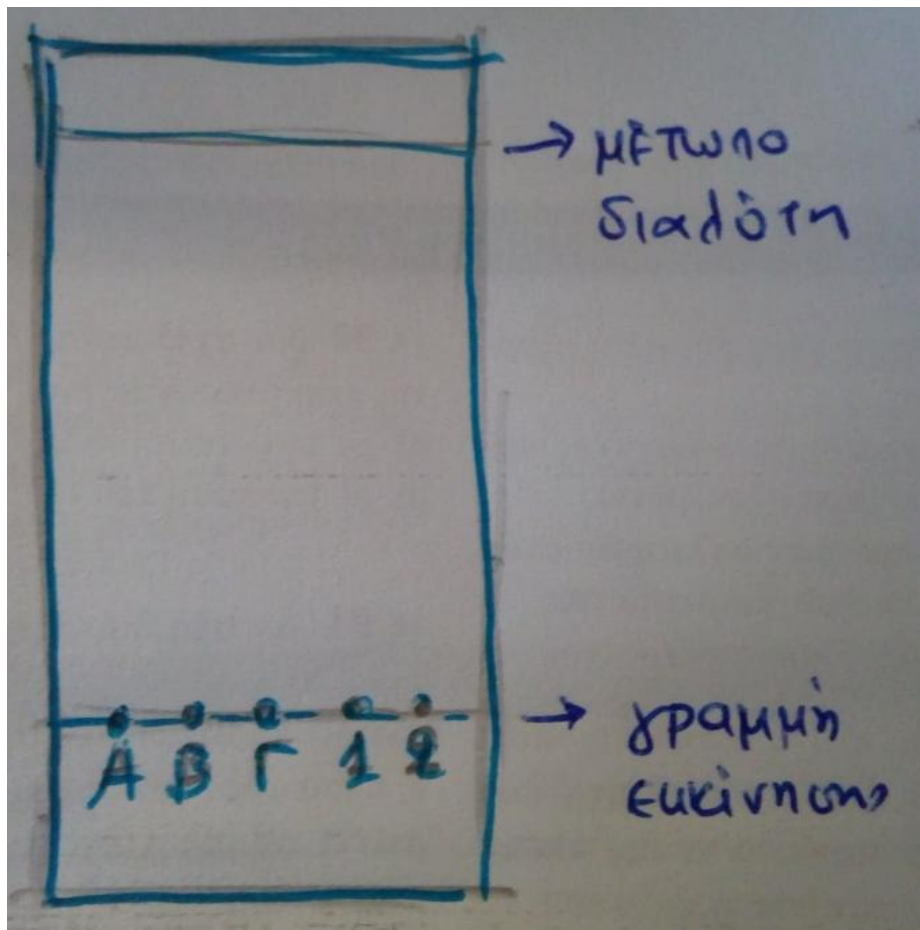
Γ. 4-ακετάμιδο φαινόλη

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 4 πλακίδια στα οποία θα φορτώσει με την χρήση τριχοειδή σωλήνα το διάλυμα μιας ουσίας

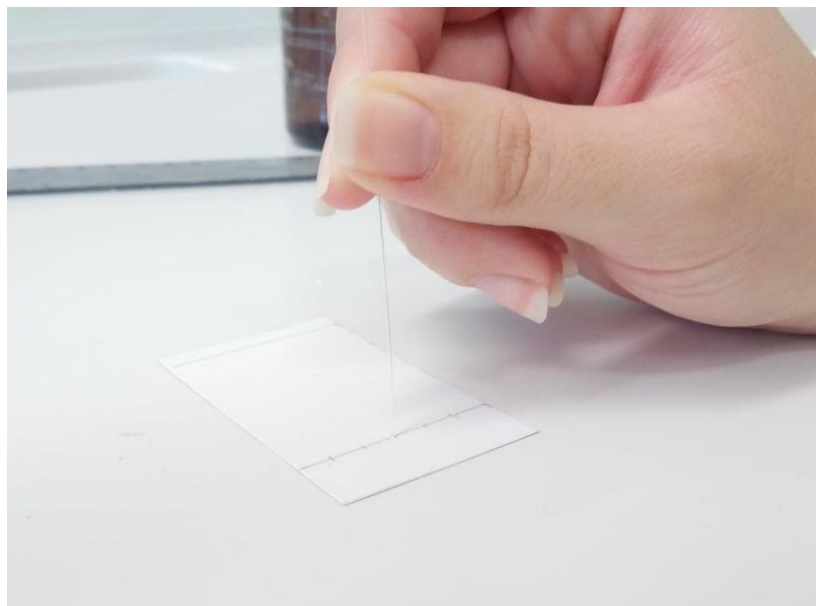


Επιλέγεται πλακίδιο χωρίς σπασίματα στην στατική φάση

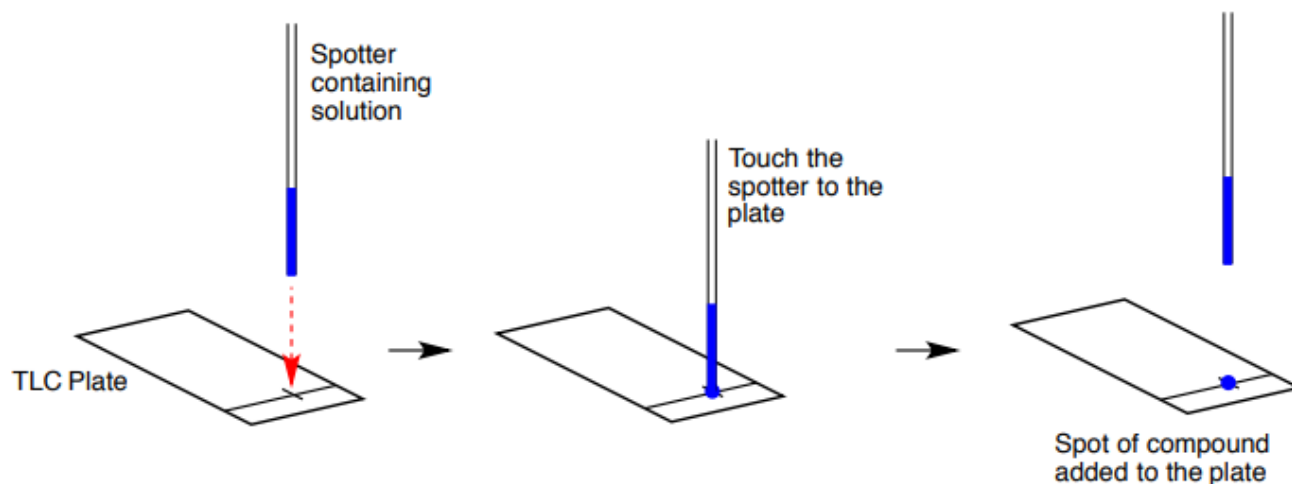
Αφήνεται από την άκρη του πλακιδίου απόσταση μερικά χιλιοστά

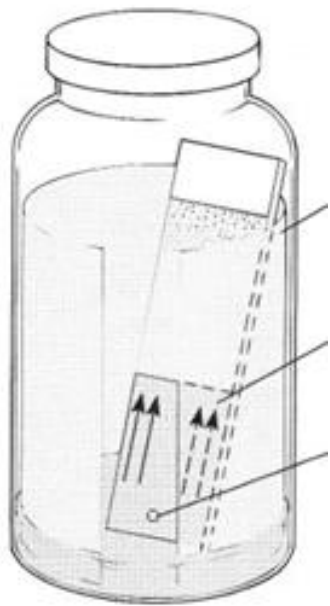
Κατά την τοποθέτηση της ουσίας προσέχουμε να μην καταστρέψουμε την στατική φάση

Κάθε φορά που προστίθεται ουσία θα ελέγχεται στην λάμπα UV



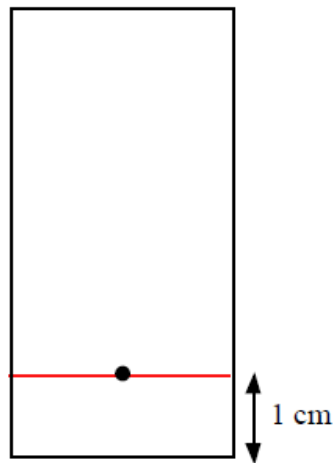
Με την χρήση του τριχοειδούς σποτάρου στο κατάλληλο σημείο. Προσέχουμε
 α) Να μην τραυματισθούμε στο μάτι με την άκρη του τριχοειδούς και
 β) Να ακουμπάμε ελαφρά ώστε να μην διαταραχθεί η στατική φάση





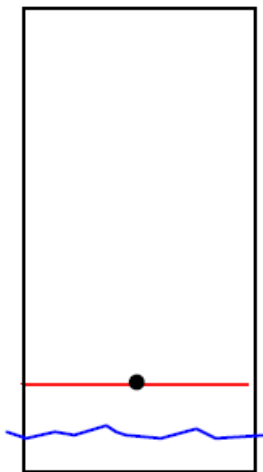
Χρησιμοποιείται θάλαμος ανάπτυξης που περιέχει την κινητή φάση

Σε ποτήρι ζέσης 150 ml προστίθενται 10 ml διαλύτη ανάπτυξης μίγμα Οξικού αιθυλεστέρα/Οξικού οξέος 95/5



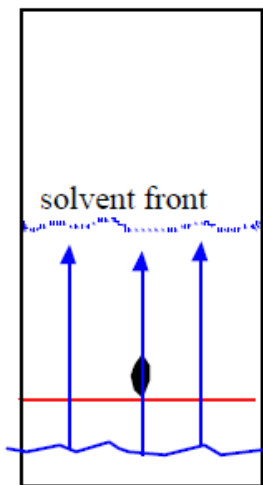
Initial TLC plate with spot

- pencil line
- initial spot



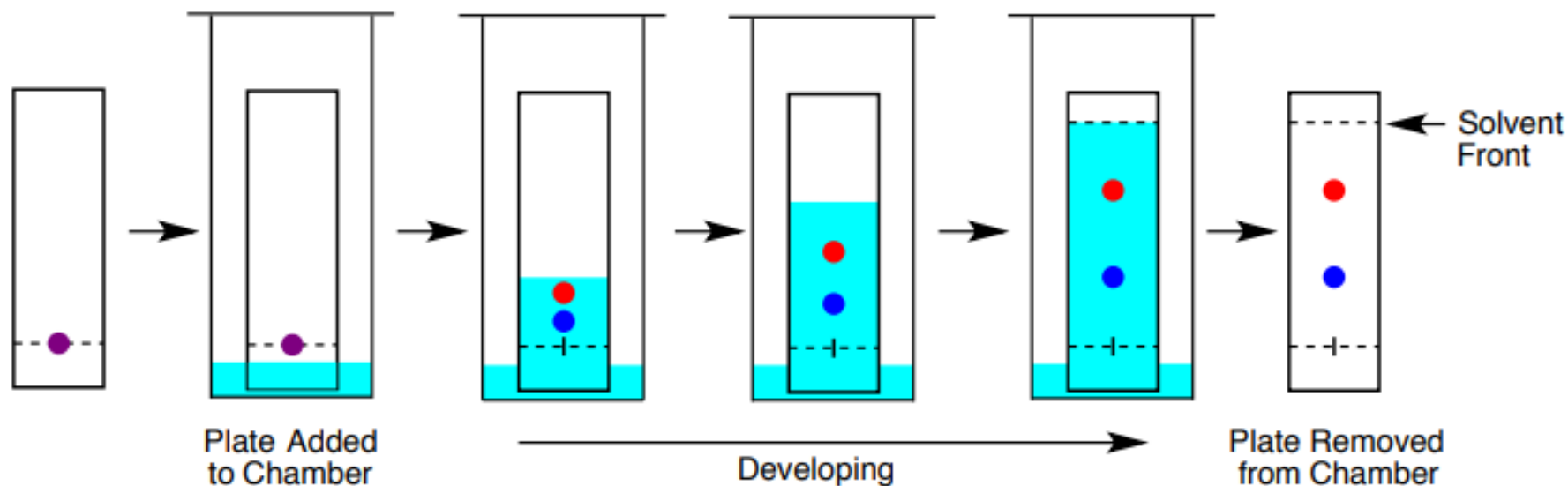
TLC plate inside the developing chamber

- 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. Θεικό οξύ

Ασκήσεις για αναφορά

1. Έχετε στην διάθεση σας τις παρακάτω στατικές φάσεις: Αλούμινα και σίλικα και τις παρακάτω κινητές φάσεις: 1-προπανόλη και εξάνιο.

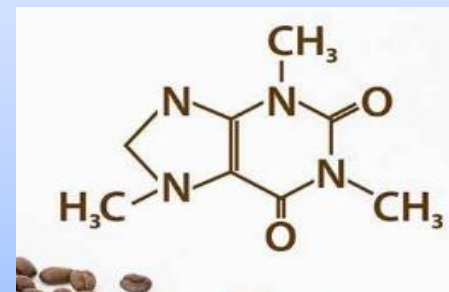
Θέλετε να μελετήσετε την ένωση καφεΐνη.

Με ποιο συνδυασμό στατικής-κινητής επιτυγχάνεται

i) Μικρότερο R_f

ii) Μεγαλύτερο R_f

iii) Μικρότερος χρόνος πειράματος



2. Ποια η σειρά έκλουσης (από το μικρότερο προς το μεγαλύτερο R_f) για τις παρακάτω ενώσεις: naphthalene, butyric acid, και phenyl acetate σε πλακίδιο silica με διαλύτη διχλωρομεθάνιο

3. Ένας φοιτητής σποτάρει μια άγνωστη ουσία σε πλακίδιο TLC και το αναπτύσσει με διαλύτη έκλουσης διχλωρομεθάνιο. Παρατηρεί ότι υπάρχει μόνο ένα spot, για το οποίο R_f είναι 0.95 Ποια είναι η γνώμη σας δείχνει το παραπάνω αποτέλεσμα ότι η άγνωστη ουσία είναι καθαρή. Τι θα μπορούσε να γίνει για επιβεβαίωση;