

CHROMATOGRAFIA JAKO METODA WYODRĘBNIANIA I OCZYSZCZANIA ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH

Zakres materiału:

- podział technik chromatograficznych,
- podstawowe pojęcia stosowane w chromatografii,
- chromatografia cienkowarstwowa (TLC)-opis techniki, sorbenty, rozpuszczalniki, techniki detekcji,
- chromatografia bibułowa.

Chromatografia jest to metoda chemicznej analizy instrumentalnej, w której dokonuje się podziału substancji (w przeciwnym kierunku) między fazę nieruchomą i fazę ruchomą. Fazę nieruchomą może stanowić bibuła filtracyjna, cienka warstwa adsorbentu naniesiona na płytkę lub wypełnienie kolumny. Fazę ruchomą stanowi natomiast roztwór ciekły (chromatografia cieczowa) lub gazowy (chromatografia gazowa). W metodzie tej wykorzystywana jest:

1. Różnica w zdolności adsorpcyjnej fazy stacjonarnej względem różnych składników znajdujących się w fazie ruchomej,
2. Różnica wielkości współczynnika podziału składników rozdzielanych,
3. Różnica wielkości cząsteczek separowanych składników,
4. Zatrzymywanie jonów na podłożu jonitowym.

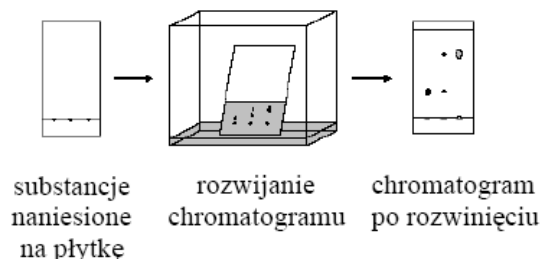
Stopień rozdziału można zwiększyć dobierając zarówno odpowiedni rozpuszczalnik (eluent), jak i substancję tworzącą fazę stacjonarną. Obraz analizy chromatograficznej otrzymany bezpośrednio w fazie stacjonarnej (np. barwne plamy w chromatografii bibułowej pochodzące od poszczególnych składników) lub wykres przedstawiający wyniki analizy w postaci pików odpowiadających rozdzielanym składnikom (uzyskany dzięki zastosowaniu odpowiedniego detektora) nosi nazwę chromatogramu.

Chromatografia może być stosowana do badań jakościowych, ilościowych i dla celów preparatywnych. Sprzężenie chromatografii gazowej z innymi metodami, np. spektrometrią masową lub spektrofotometrią w podczerwieni, znacznie rozszerza możliwości identyfikacji rozdzielanych składników badanej próbki.

Chromatografia cienkowarstwowa

Różne techniki chromatograficzne wykorzystują dwa zjawiska: podziału substancji między dwie różne fazy ciekłe – obowiązuje tu prawo podziału *Nernsta* i adsorpcji substancji na nośniku, czyli fazie stałej. Znana od kilkudziesięciu lat chromatografia cienkowarstwowa - TLC (z angielskiego: *thin layer chromatography*) – łączy w sobie obydwa te zjawiska, gdyż polega ona na poruszaniu się substancji organicznych z różną prędkością wraz z ruchomą fazą ciekłą przez cienką warstwę stałego adsorbenta naniesionego na płytkę szklaną, blaszkę aluminiową lub podłoże plastikowe. Towarzyszą temu procesy adsorpcji i desorpcji oraz podział między ciekłą fazą organiczną i wodę, która w niewielkich ilościach znajduje się na nośniku. Różnicowanie nośników (np. tlenek glinu, żel krzemionkowy, celuloza) oraz rozpuszczalników (lub ich kombinacji), czyli tzw. układów rozwijających, pozwala na rozdział mieszanin związków oraz ich identyfikację. Sposób postępowania w analitycznej chromatografii cienkowarstwowej jest prosty. Polega on na naniesieniu kapilarą roztworów badanych substancji na płytki pokryte adsorbentem w odległości około 1 cm od brzegu płytki, którą następnie zanurza się tym końcem w niewielkiej ilości rozpuszczalnika umieszczonego w zamkniętej komorze rozwijającej, której ścianki wyłożone są bibułą. Wznoszący się rozpuszczalnik rozwija chromatogram. W momencie kiedy czoło rozpuszczalnika osiągnie zaznaczoną wcześniej na płytce linię mety, wyjmuje się płytkę z komory, suszy ją i analizuje chromatogram. Jeśli rozdział dotyczy substancji barwnych, ich plamki na chromatogramie są

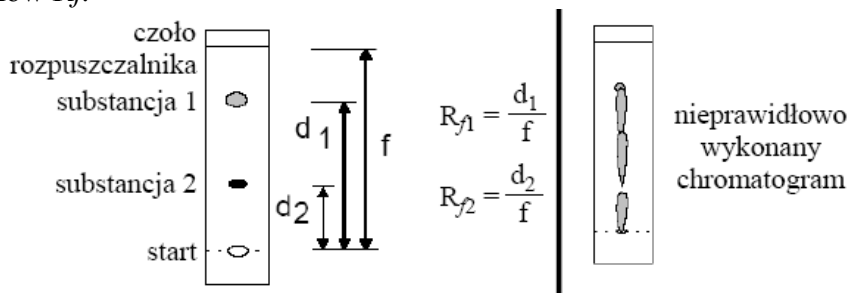
łatwo dostrzegalne. W przypadku substancji bezbarwnych, plamki chromatogramu wywołuje się np. przez spryskiwanie płytki substancjami dającymi ze związkami badanymi reakcje barwne (np. kwasem siarkowym(VI)), przez umieszczenie płytki w komorze wypełnionej parami jodu, które zabarwiają plamki lub obserwację płytek w świetle ultrafioletowym wywołującym fluorescencję. Poniższy rysunek przedstawia kolejne etapy wykonywania chromatogramu.



Wielkością charakteryzującą przesuwanie się badanej substancji w systemie adsorbent - układ rozwijający, czyli położenie plamki na chromatogramie, jest współczynnik R_f definiowany następująco:

$$R_f = \frac{\text{droga przebyta przez substancję}}{\text{droga przebyta przez rozpuszczalnik}}$$

Poniższy rysunek przedstawia sposób obliczania współczynnika R_f dla dwóch substancji. Po prawej stronie przedstawiony jest nieprawidłowo wykonany chromatogram, gdy stężenie substancji naniesionej na płytkę było zbyt wysokie. W tej sytuacji niemożliwe jest wyliczenie współczynników R_f .



W przypadkach skrajnych R_f może być równy 0 - oznacza to, że substancja jest całkowicie adsorbowana i pozostaje na starcie, lub R_f może być równy 1, co oznacza, że substancja nie jest adsorbowana, porusza się z czołem rozpuszczalnika. W praktyce analitycznej należy unikać takich skrajności. Na współczynnik R_f mają wpływ: rodzaj, aktywność i struktura adsorbentów, układy rozwijające, nasycenie komory oraz temperatura. Korzyści, które płyną z zastosowania chromatografii cienkowsarstwowej, a więc np. ostrość rozdziału, duża czułość i szybkość tej techniki, powodują, że znajduje ona szerokie zastosowanie w praktyce laboratoryjnej.

Wykonanie ćwiczenia:

A. TLC syntetycznych barwników organicznych

Celem ćwiczenia jest wykrycie, który z barwników organicznych znajduje się w próbce otrzymanej do analizy.

1. Na gotową płytkę pokrytą żelem krzemionkowym nanieść kapilarą roztwory wzorców oraz badaną próbkę.
2. Następnie umieścić płytkę w komorze zawierającej eluent, czyli mieszaninę toluenu i acetonu w stosunku 3:1 i rozwija chromatogram.
3. Gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się w odległości 1 cm od górnej krawędzi płytki, wyjąć płytkę przy pomocy pęsety, zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika i po wysuszeniu obliczyć wartości R_f dla poszczególnych plamek.
4. Na podstawie obliczonych wartości R_f oraz barwy plamek określić skład badanej próbki.

B. Chromatografia cienkowarstwowa barwników terpenowych i pirolowych

W moździerz umieszcza się ok. 2 g posiekanej natki pietruszki (lub innego materiału roślinnego, zawierającego chlorofil) i rozciera z niewielką ilością krzemionki i szczyptą Na_2CO_3 . Następnie dodaje się 10 ml acetonu i rozciera powtórnie. Drugą porcję liści rozciera się w analogiczny sposób z eterem naftowym (5 ml) a po roztarciu przenosi się do kolbki, dodaje się 22 ml eteru etylowego i 2 ml etanolu i po zatkaniu korkiem mieszaninę wytrząsa się energicznie przez około 5 minut. Roztwór acetonowy i eterowy należy przesączyć przez watę do dwóch oddzielnych kolbek i suszyć bezwodnym siarczanem magnezu przez ok. 5 minut. Następnie pobrać po 1 ml każdego z roztworów, przelać do małych zlewek i ogrzewać suszarką w celu odparowania do 1/10 objętości.

W tym czasie przygotować trzy komory chromatograficzne, na ich dno nalać po około 0,5 cm eluentów: do pierwszej mieszaninę benzen/aceton (7:3), do drugiej heksan/aceton/tetrachlorek węgla (3:1:1), do ostatniej czysty heksan. Komory odstawić do nasycenia parami rozpuszczalników co trwa około 10 minut. Na trzech płytkach chromatograficznych narysować miękkim ołówkiem linię w odległości ok. 1 cm od jednego z krótszych boków płytki. Na linii zaznaczyć, w równych odstępach od siebie i boków płytki, dwa punkty startowe. Za pomocą kapilary nanieść po kilka mikrolitrów badanych roztworów do uzyskania plamek o średnicy $<0,5$ cm. Po wysuszeniu w strumieniu ciepłego powietrza czynność nanoszenia próbek powtórzyć. Płytki umieścić w komorach chromatograficznych i odczekać aż czoło rozpuszczalnika osiągnie wysokość około 10 cm. Następnie wyjąć płytki z komór, wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza i oglądać plamy, pochodzące od rozdzielonych związków, w świetle widzialnym, UV-254 nm oraz UV-366 nm a następnie wywołać parami jodu.

W protokole nie należy powielać opisu ćwiczenia!

Protokół powinien zawierać:

- Tytuł ćwiczenia, nazwiska osób wykonujących ćwiczenie, numer grupy, datę
- Dołączone chromatogramy z obliczonymi wartościami R_f dla ćwiczenia A oraz interpretację tych wyników.
- Informację, jakie rozpuszczalniki lub ich mieszaniny zostały użyte w próbach rozdzielania barwników zawartych w tuszu pisaka/pisaków; jak również wytypowanie i uzasadnienie, który z rozpuszczalników jest najskuteczniejszy.