

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρωματογραφία είναι μια εργαστηριακή τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τον διαχωρισμό μιγμάτων οργανικών ενώσεων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην **κατανομή** ενώσεων που πρέπει να διαχωριστούν σε δύο φάσεις. Η μία φάση παραμένει ακίνητη (στατική φάση), ενώ η δεύτερη βρίσκεται σε συνεχή ροή (κινητή φάση). Η επιλογή των δύο φάσεων γίνεται με τρόπο ώστε τα συστατικά του μίγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση, κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους.

Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς:

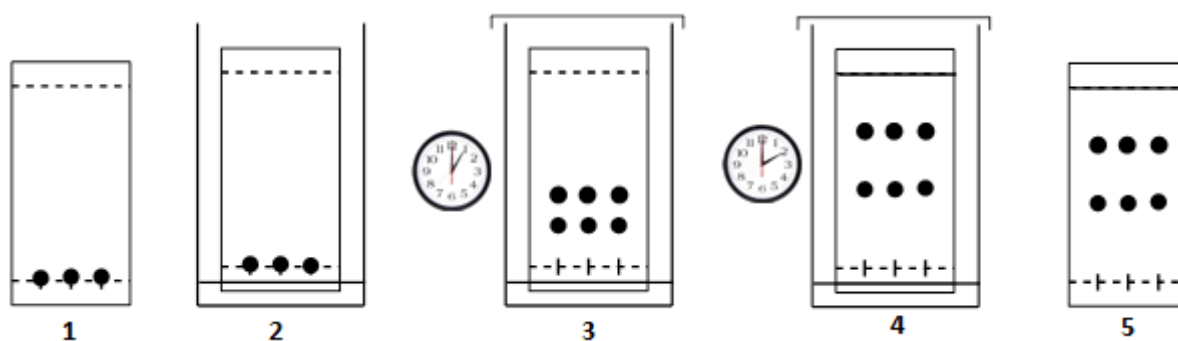
- α. **τη φύση της κινητής φάσης** (υγρή ή αέρια) ή **της στατικής** (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα)
- β. το **μηχανισμό διαχωρισμού** (προσρόφηση, ιοντοανταλλαγή, κατανομή, μέγεθος μορίων)
- γ. **το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση** (στήλη, λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα, χαρτί).

A. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Χ.Λ.Σ.) - Thin Layer Chromatography (T.L.C)

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική που μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό: του αριθμού των συστατικών ενός μίγματος χημικών ενώσεων, της ταυτότητας μιας ένωσης σε ένα μίγμα συγκρίνοντάς τη με γνωστή ένωση κ.α.

Μία πλάκα **χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας** (πλάκα TLC) είναι μία πλάκα από γυαλί, μέταλλο, ή πλαστικό το οποίο είναι επικαλυμμένο με ένα λεπτό στρώμα ενός στερεού προσροφητικού υλικού **-στατική φάση-** (συνήθως διοξείδιο του πυριτίου/SiO₂/silica gel ή σπανιότερα διοξείδιο του Αργιλίου/Al₂O₃/Alumina κ.α.). Μια μικρή ποσότητα του μίγματος που πρόκειται να αναλυθεί τοποθετείται κοντά στο κάτω μέρος αυτής της πλάκας (1). Η πλάκα TLC στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα δοχείο που

περιέχει διαλύτη -**θάλαμος ανάπτυξης**-, έτσι ώστε μόνο το κάτω μέρος της πλάκας είναι στο υγρό (2). Αυτό το υγρό - **μέσο έκλουσης ή διαλύτης ανάπτυξης**- είναι η κινητή φάση, και υψώνεται αργά στην πλάκα TLC μέσω τριχοειδούς φαινομένου (3). Όταν ο διαλύτης φθάσει στην κορυφή της πλάκας (4), η πλάκα απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης, ξηραίνεται, και τα διαχωρισμένα συστατικά του μίγματος επισημαίνονται(5). Εάν οι ενώσεις είναι έγχρωμες, είναι ορατές. Τις περισσότερες φορές οι ενώσεις είναι άχρωμες, έτσι χρησιμοποιείται είτε UV ακτινοβολία είτε ατμοί ιωδίου είτε διάφορα χημικά αντιδραστήρια για την εμφάνιση των ενώσεων.



B. Επιλογή Διαλύτη

Η επιλογή του διαλύτη έκλουσης/κινητής φάσης εξαρτάται από την στατική φάση της πλάκας TLC. Έτσι, την περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ως στατική φάση το διοξείδιο του πυριτίου/SiO₂/silica gel :

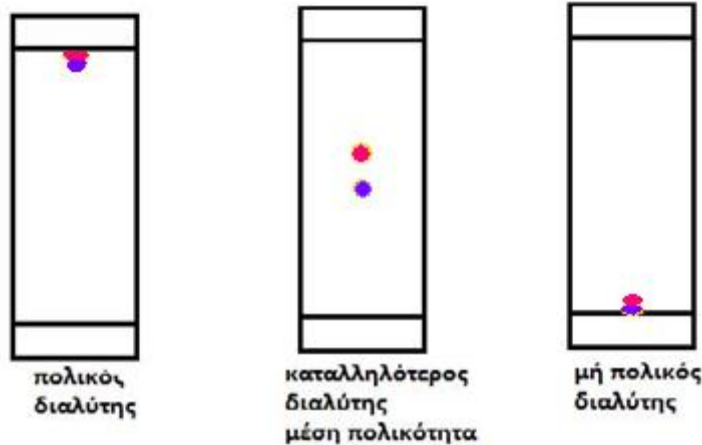
- Ένας **πολικός διαλύτης** ή μίγμα διαλυτών, μπορεί να απομακρύνει τις διαλυμένες ουσίες από τις θέσεις προσρόφησης και οι ενώσεις να μετακινηθούν υψηλότερα προς το μέτωπο διαλύτη.
- Ένας **μη πολικός διαλύτης** μόλις που μπορεί να καταφέρει να τις μετακινήσει.

Για πλάκες TLC καλυμμένες με διοξείδιο του πυριτίου, η ισχύς του μέσου έκλουσης αυξάνει με την ακόλουθη σειρά:

Εξάνιο
Πετρελαϊκός αιθέρας
Κυκλοεξάνιο
Τολουόλιο
Διχλωρομεθάνιο
Διαιθυλαιθέρας
Οξικός αιθυλεστέρας
Ακετόνη
Αιθανόλη
Μεθανόλη
Ακετονιτρίλιο

Αύξηση ικανότητας
έκλυσης όταν η
στατική φάση είναι
 SiO_2

Όταν πρέπει να προσδιοριστεί ο καταλληλότερος διαλύτης ή μίγμα διαλυτών για να αναπτυχθεί ένα χρωματογράφημα γίνεται μια σειρά δοκιμών. Παρατηρώντας προσεκτικά και καταγράφοντας τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας σε κάθε σύστημα διαλύτη διαπιστώνει κανείς ότι όσο αυξάνεται η πολικότητα του συστήματος διαλυτών, όλα τα συστατικά του μίγματος κινούνται γρηγορότερα (και αντίστροφα με τη μείωση της πολικότητας). **Το ιδανικό σύστημα διαλύτη είναι απλά το σύστημα που δίνει τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος.**



Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το εξάνιο, ο πετρελαϊκός αιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας. Ο διαιθυλαιθέρας αποφεύγεται, γιατί είναι πολύ εύφλεκτος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη) και ακετόνη. Το οξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα μικρές συγκεντρώσεις, γιατί είναι μη-πτητικό και πολύ πολικό. Οι χλωριωμένοι διαλύτες διχλωρομεθάνιο ή χλωροφόρμιο έχουν καλή διαχωριστική ικανότητα, αλλά είναι τοξικοί και θα πρέπει να αποφεύγονται.

Γ. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης και του προσροφητή.

Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στον ανταγωνισμό ανάμεσα στη διαλυμένη ουσία και την κινητή φάση για τη σύνδεσή τους σε θέσεις πάνω στη στατική φάση. Έτσι, αν χρησιμοποιηθεί το οξείδιο του πυριτίου ως στατική φάση (πολικό) και αναλυθούν δύο ενώσεις που διαφέρουν σε πολικότητα με τη μία **πιο πολική ένωση** να έχει **ισχυρότερη αλληλεπίδραση** με το οξείδιο του πυριτίου, τότε η απομάκρυνση της από τις θέσεις σύνδεσης είναι δυσκολότερη. Πολικά μόρια έχουν την τάση να κινηθούν με μικρότερη ταχύτητα σε σχέση με τα μη πολικά.

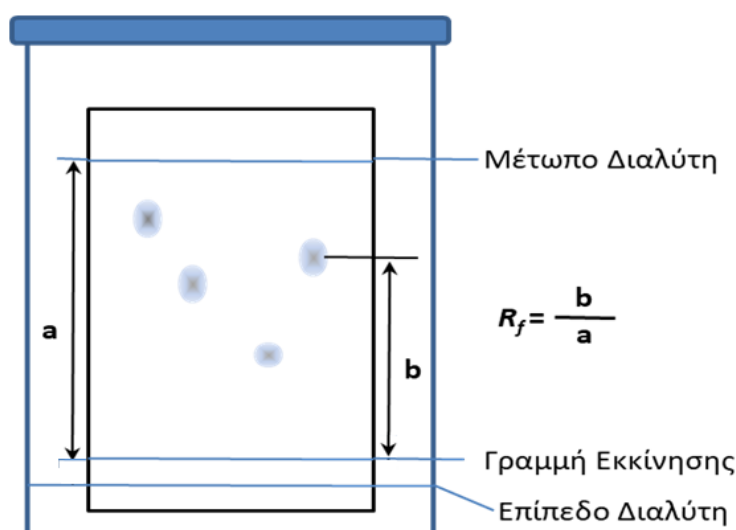
Η δύναμη με την οποία μία οργανική ένωση συνδέεται με ένα προσροφητικό εξαρτάται από την ισχύ των ακόλουθων τύπων αλληλεπιδράσεων:

- ιόντων-διπόλου (πχ οξέα)
- δεσμού υδρογόνου (πχ αλκοόλες, αμίνες)
- διπόλου-διπόλου (πχ αλδεΐδες κετόνες)
- δυνάμεις Van der Waals (πχ αλκάνια, αλκυλαλογονίδια κα)

↑
Αύξηση
προσρόφησης

Δ. Ο συντελεστής κατακράτησης, R_f

Ο συντελεστής κατακράτησης, R_f , ορίζεται ως η απόσταση που διανύεται από την ένωση διαιρούμενη με την απόσταση που διανύεται από τον διαλύτη.



Για παράδειγμα, εάν μία ένωση διανύσει 2,0 cm και το μέτωπο του διαλύτη διανύσει 5,0 cm, το R_f είναι 0,4.

Το R_f για μια ένωση είναι σταθερό μόνο εάν οι συνθήκες χρωματογραφίας παραμένουν σταθερές. Δηλαδή:

- σύστημα διαλυτών
- προσροφητικό υλικό
- πάχος του προσροφητικού υλικού
- ποσότητα του δείγματος
- θερμοκρασία

Οι παράγοντες αυτοί είναι δύσκολο να διατηρηθούν σταθεροί από πείραμα σε πείραμα. Όσο μεγαλύτερο είναι το R_f μιας ένωσης, τόσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση που διανύει στην πλάκα TLC. Κατά τη σύγκριση δύο διαφορετικών ενώσεων που μελετούνται κάτω από ίδιες συνθήκες χρωματογραφίας, η ένωση με το **μεγαλύτερο R_f** είναι η **λιγότερο πολική**, επειδή δεν αλληλεπιδρά ισχυρά με τον πολικό προσροφητή στην πλάκα TLC. Επιπλέον, αν είναι γνωστές οι δομές των ενώσεων στο μίγμα, μπορεί να προβλεφθεί ότι μια ένωση με χαμηλή πολικότητα θα έχει μεγαλύτερη τιμή R_f από μία πολική ένωση.

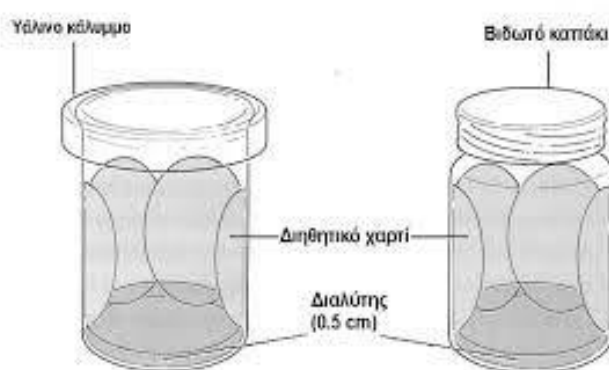
Το R_f παρέχει στοιχεία για την ταυτότητα μιας ένωσης. Όταν ένα τυχαίο δείγμα και ένα πρότυπο δείγμα μιας ένωσης αναπτύσσονται στο ίδιο χρωματογράφημα και βρεθούν να έχουν την ίδια τιμή R_f , είναι πιθανό (αλλά όχι σίγουρα) να είναι ταυτόσημα. Εάν έχουν διαφορετικές τιμές R_f , είναι σίγουρα διαφορετικές ενώσεις.

Ε. Διαδικασία Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας

Βήμα 1 : Προετοιμασία του δοχείου ανάπτυξης

Το δοχείο ανάπτυξης είναι ένας ειδικά σχεδιασμένος θάλαμος ή ένα βάζο με καπάκι.

- Προσθέστε διαλύτη μέσα στον θάλαμο σε ύψος ελάχιστα μικρότερο από 0,5 εκατοστά.



- Για τον κορεσμό του θαλάμου με ατμούς διαλύτη τοποθετείστε στο εσωτερικό του ποτηριού διηθητικό χαρτί.
- Κλείστε τον θάλαμο ανάπτυξης για να επέλθει κορεσμός.

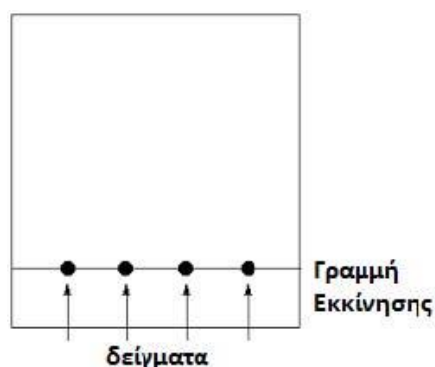
Βήμα 2 : Προετοιμασία της πλάκας Οι πλάκες TLC που χρησιμοποιούνται έχουν διαστάσεις 20 cm X 20 cm. Κάθε μεγάλο φύλλο κόβεται σε πλάκες οι οποίες έχουν ύψος 5 εκατοστά και διάφορα πλάτη ανάλογα με τα αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν. Ο χειρισμός των πλακών πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε να μην καταστραφεί η επίστρωση του προσροφητικού υλικού και να μην λεκιαστεί.

- Μετρήστε 0,5 cm από το κάτω μέρος της πλάκας με έναν χάρακα και χρησιμοποιώντας ένα μολύβι και σχεδιάστε μια γραμμή κατά μήκος της.

Αυτή είναι η **γραμμή εκκίνησης**.

- Κάτω από τη γραμμή, σημειώστε ελαφρά το όνομα ή τους κωδικούς των δειγμάτων που θα αναλύσετε. Αφήστε αρκετό χώρο μεταξύ των δειγμάτων. Τοποθετήστε περίπου 4 δείγματα σε πλάκα εύρους 5 εκατοστών.

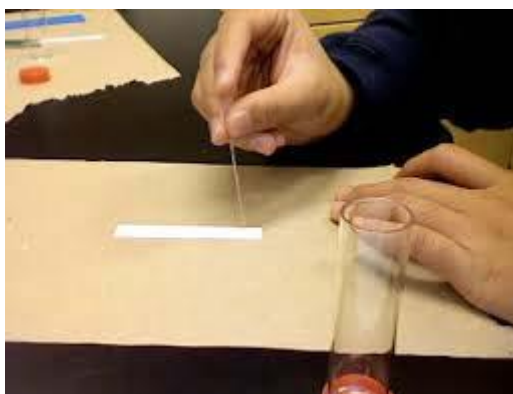
ΠΡΟΣΟΧΗ: μην πιέσετε το μολύβι και τραυματίσετε την επίστρωση.



Βήμα 3 : Τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα TLC.

Αν το δείγμα δεν είναι ήδη σε διάλυμα, διαλύστε περίπου 1 mg σε 1 mL ενός πτητικού διαλύτη όπως: εξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, ή διχλωρομεθάνιο. Αν το δείγμα είναι πολύ συμπυκνωμένο θα πρέπει να αραιωθεί.

- Βυθίστε έναν τριχοειδή σωλήνα μέσα στο διάλυμα και, στη συνέχεια, αγγίξτε απαλά την άκρη του πάνω στην επισημασμένη θέση για το δείγμα στη πλάκα TLC.



Μην αφήσετε την κηλίδα να γίνει πάρα πολύ μεγάλη, μπορείτε να αγγίξετε και να ανασηκώσετε τον τριχοειδή αμέσως από τη πλάκα.

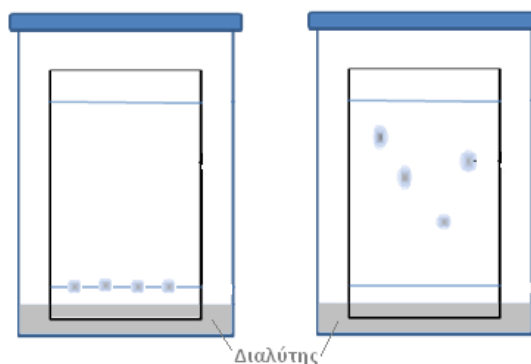
- Επαναλάβετε το τελευταίο βήμα πολλές φορές και η κηλίδα θα παραμείνει μικρή.

Βήμα 4 : Ανάπτυξη της πλάκας

- Τοποθετήστε την πλάκα TLC που προετοιμάσατε στο θάλαμο ανάπτυξης, κλείνοντας το καπάκι, και αφήστε το σε ηρεμία στον πάγκο σας. Ο διαλύτης θα μετακινηθεί πάνω στην πλάκα TLC μέσω τριχοειδών.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Βεβαιωθείτε ότι ο διαλύτης δεν καλύπτει το σημείο εκκίνησης του δείγματος.

- Αναπτύξτε το χρωματογράφημα έως ότου ο διαλύτης είναι περίπου μισό εκατοστό κάτω από την κορυφή της πλάκας (**μέτωπο του διαλύτη**).
- Αφαιρέστε την πλάκα από το θάλαμο ανάπτυξης και σημειώστε το μέτωπο του διαλύτη με ένα μολύβι.
- Αφήστε την πλάκα να στεγνώσει.



Βήμα 5 : Η εμφάνιση των κηλίδων

- Αν υπάρχουν διακριτές έγχρωμες κηλίδες σχεδιάστε το περίγραμμά τους ελαφρά με ένα μολύβι.

Τα περισσότερα δείγματα δεν είναι έγχρωμα και μπορούν να εμφανιστούν:

- ✓ παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) οπότε και γίνεται το περίγραμμα τους.
ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Το Υπεριώδες φως βλάπτει τα μάτια και το δέρμα! Φοράτε γάντια, γυαλιά και ΔΕΝ κοιτάτε απευθείας τον λαμπτήρα.
- ✓ παρουσία ατμών Ιωδίου (ενώσεις που έχουν πολλαπλούς δεσμούς)
ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Όσοι αντιμετωπίζετε προβλήματα υγείας που σχετίζονται με τον θυρεοειδή αδένά πρέπει να είστε ιδιαίτερα προσεκτικοί.
- ✓ μετά από ψεκασμό της πλάκας με διάφορα αντιδραστήρια και θέρμανση (π.χ. αμινοξέα με αντιδραστήριο νινυδρίνης, αλκοόλες με αντιδραστήρια που περιέχουν H_2SO_4 κ. α.).
Στην περίπτωση που τα δείγματα είναι πάρα πολύ πυκνά και οι κηλίδες των διαφόρων ενώσεων εμφανίζονται ενοποιημένες επαναλαμβάνετε τη διαδικασία.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός Εργαστηριακής Άσκησης

Εύρεση του αριθμού των συστατικών μίγματος.

Ασφάλεια: Καταγράψτε τα MSDS των αντιδραστηρίων.

Φοράτε εργαστηριακή ρόμπα, προστατευτικά γυαλιά και γάντια.

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Υλικά

- Πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας
- Θάλαμοι ανάπτυξης
- Τριχοειδείς σωλήνες
- Μολύβι, χάρακας.

Διαλύτες/Διαλύματα/Πρώτες ύλες

- Διάλυμα β καροτενίου (καρότο ή πορτοκάλι)
- Διάλυμα λυκοπενίου (χυμός Τομάτας)
- Διάλυμα άγνωστο (χυμός Σαγκουίνι)
- Μίγματα διαλυτών κυκλοεξανίου τολουολίου

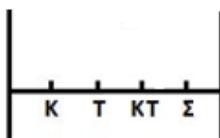
Πειραματική διαδικασία

1. Προετοιμάστε τους θαλάμους ανάπτυξης προσθέτοντας 5 mL από τα ακόλουθα συστήματα διαλυτών με αναλογίες Τολουόλιο/Κυκλοεξανίου:

Τολουόλιο	Κυκλοεξάνιο
0	10
1	9
2	8
4	6

Τολουόλιο	Κυκλοεξάνιο
5	5
6	4
8	2
10	0

2. Σημειώστε με ένα μολύβι στη πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (T.L.C.) τη γραμμή εκκίνησης (0,5 cm από το κάτω μέρος) την οποία στη συνέχεια χωρίστε σε πέντε ίσα μέρη και σημειώστε τα αρχικά κάθε εκχυλίσματος: α. Καρότου (Κ-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ), β. χυμού Τομάτας (Τ-ΛΥΚΟΠΕΝΙΟ), γ. μίγμα Καρότου- Τομάτας (ΚΤ) β. χυμού Σαγκουίνι



3. Με ένα τριχοειδή σωλήνα μεταφέρετε μια σταγόνα από κάθε εκχύλισμα στις αντίστοιχες επισημασμένες θέσεις του πλακιδίου (T.L.C.)
4. Τοποθετήστε το πλακίδιο στο θάλαμο και αναπτύξτε το χρωματογράφημα.
5. Σημειώστε με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη και τις παρατηρούμενες κηλίδες.
6. Συγκεντρώστε τα χρωματογραφήματα και φωτοτυπήστε τα.

ΕΡΓΑΣΙΑ

1. Επιλέξτε το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης.

Για τον διαλύτη αυτό

2. Καταγράψτε τον αριθμό των συστατικών των δειγμάτων.
3. Υπολογίστε τα R_f των ουσιών.
4. Από το συγκεκριμένο χρωματογράφημα έχετε τη δυνατότητα να ανιχνεύσετε την παρουσία λυκοπενίου και καροτενίου στα εκχυλίσματα. Ποια είναι τα συμπεράσματά σας;
5. Εξηγήστε τη διαφορά που παρουσιάζουν τα R_f των έγχρωμων κηλίδων **στα διαφορετικά συστήματα διαλυτών ανάπτυξης.**

