



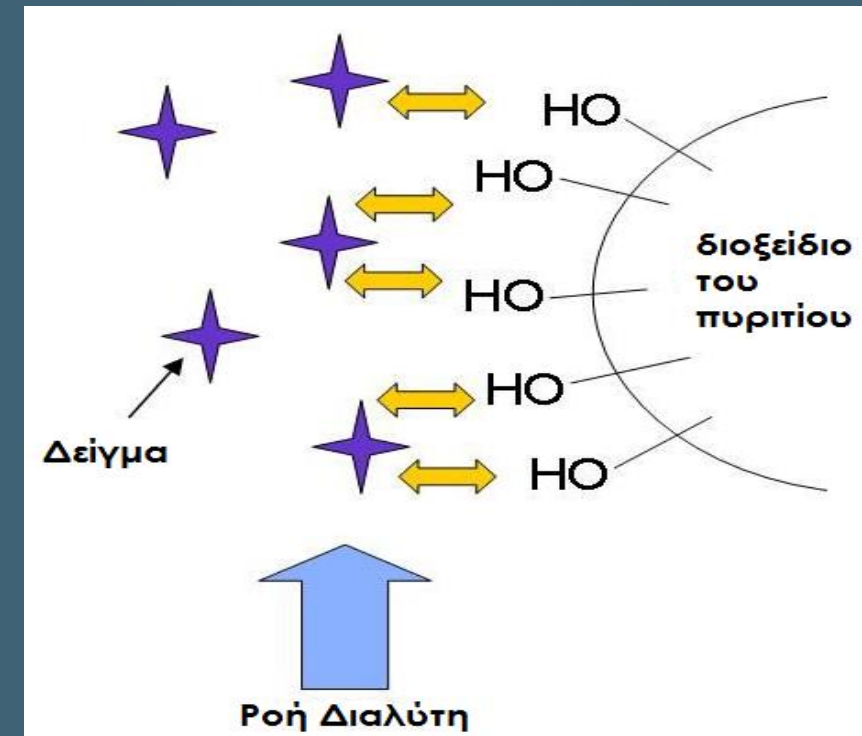
ΑΣΚΗΣΗ 4

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ

Η **ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ** είναι μια εργαστηριακή τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για

1. την ανάλυση
2. 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**).
- Τα συστατικά του μίγματος 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.





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).

Α.Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Χ.Λ.Σ.)

Thin Layer Chromatography (T.L.C)

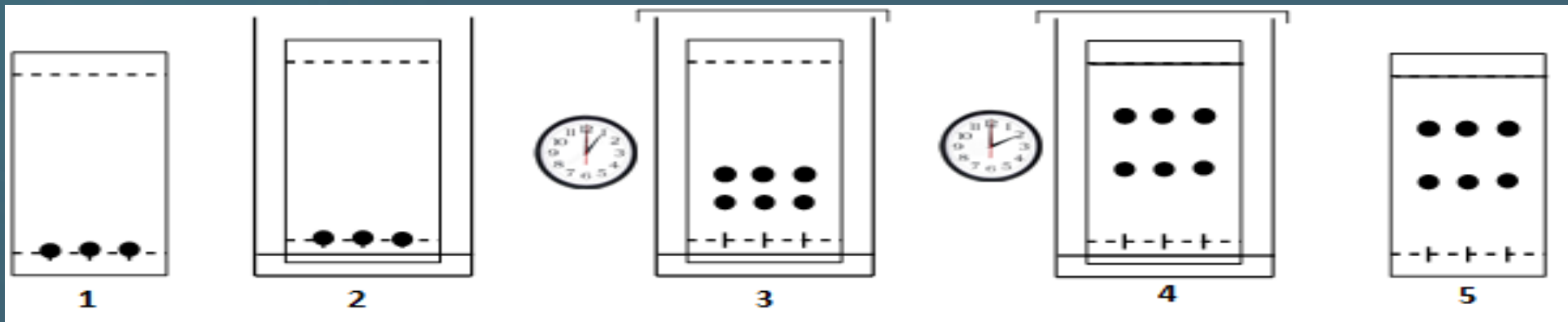
Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό.....

- 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/ SiO_2 /silica gel ή σπανιότερα διοξείδιο του Αργιλίου/ Al_2O_3 /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 - **μέσον 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.

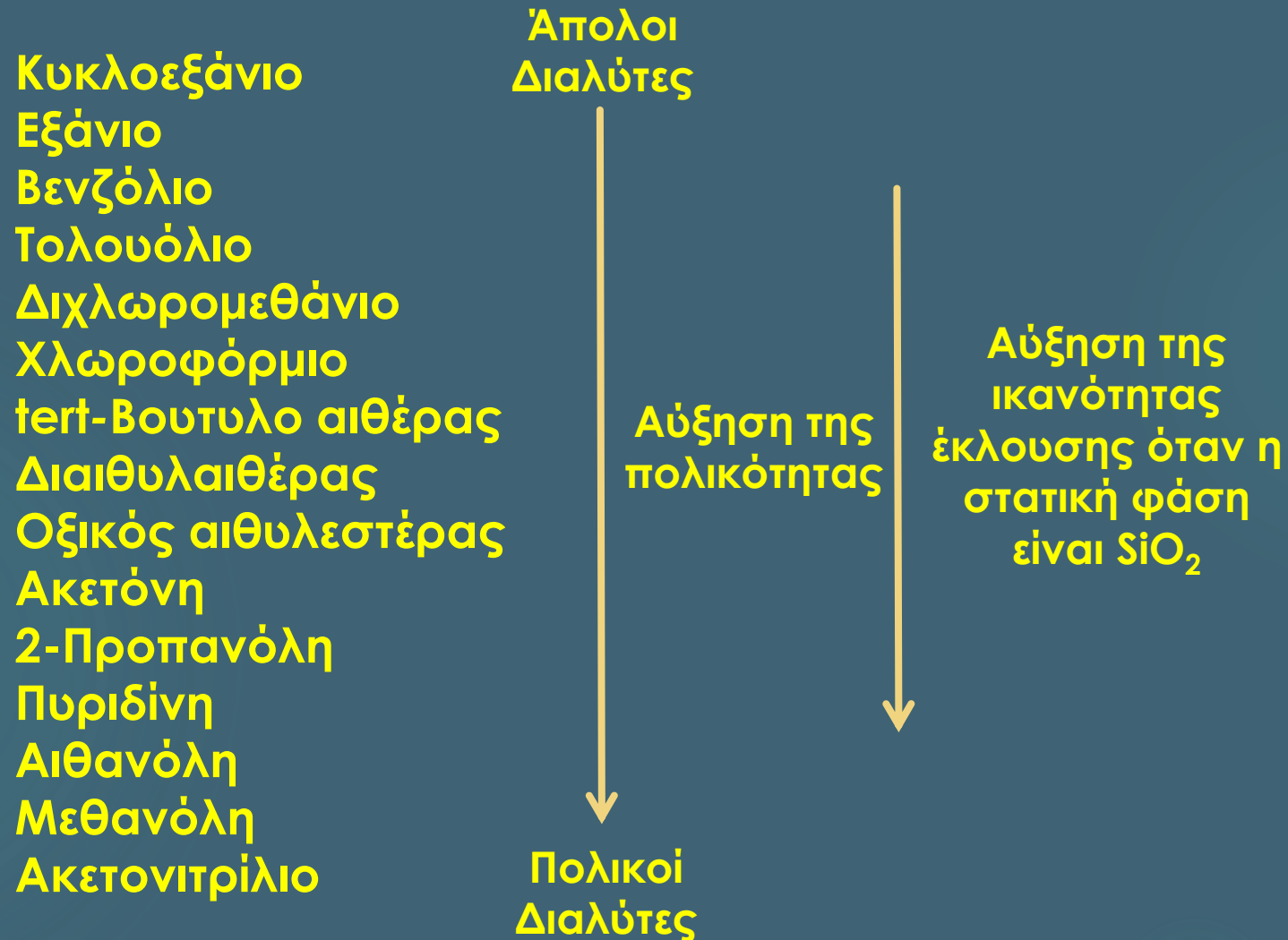


B. Επιλογή Διαλύτη

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 :

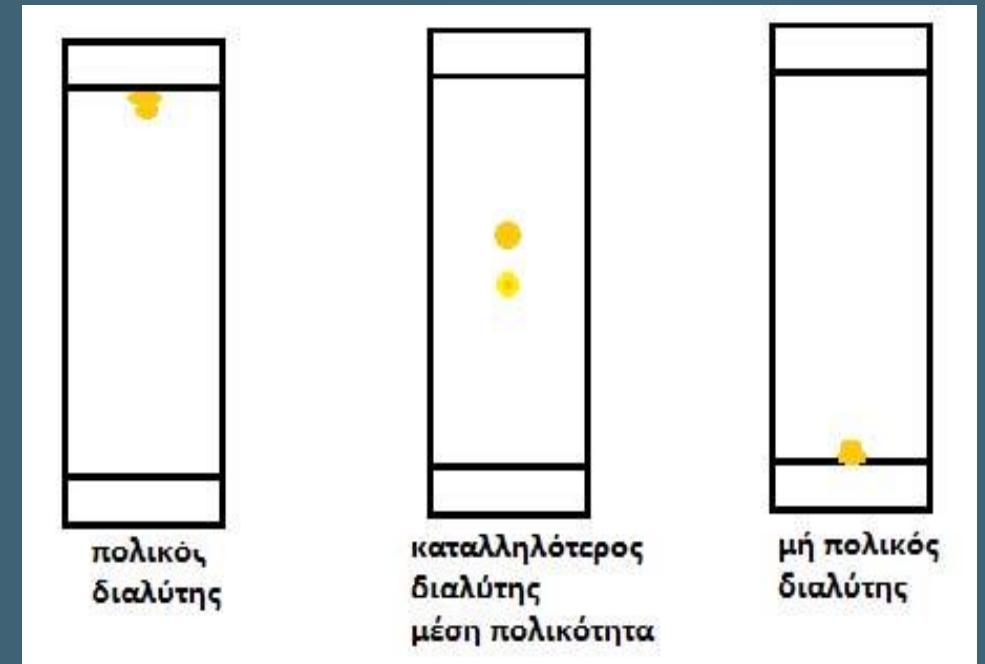
- Ένας **πολικός διαλύτης** ή μίγμα διαλυτών, μπορεί να απομακρύνει τις διαλυμένες ουσίες από τις θέσεις προσρόφησης και οι ενώσεις να μετακινηθούν υψηλότερα προς το μέτωπο διαλύτη.
- Ένας **μη πολικός διαλύτης** μόλις που μπορεί να καταφέρει να τις μετακινήσει.

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



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 δισαιθυλαιθέρας αποφεύγεται, γιατί είναι πολύ εύφλεκτος.
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη) και ακετόνη.
- Το οξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε 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.
- Πολικά μόρια έχουν την τάση να κινηθούν με μικρότερη ταχύτητα σε σχέση με τα μη πολικά.

Αλκάνια
Αλκυλαλογονίδια
Αλκένια
Διένια
Αιθέρες
Εστέρες
Κετόνες
Αλδεΐδες
Αμίνες
Αλκοόλες
Φαινόλες
Καρβοξυλικά οξέα
Σουλφονικά οξέα

Αύξηση
της
Προσρό-
φησης
όταν η
στατική
φάση είναι
SiO₂

- Η δύναμη με την οποία μία οργανική ένωση συνδέεται με ένα προσροφητικό εξαρτάται από την ισχύ των ακόλουθων τύπων αλληλεπιδράσεων:
- ιόντων-διπόλου (πχ οξέα)
 - διπόλου-διπόλου (πχ αλδεΐδες κετόνες)
 - δεσμού υδρογόνου (πχ αλκοόλες, αμίνες)
 - δυνάμεις Van der Waals (πχ αλκάνια αλκυλαλογονίδια κ.α.)

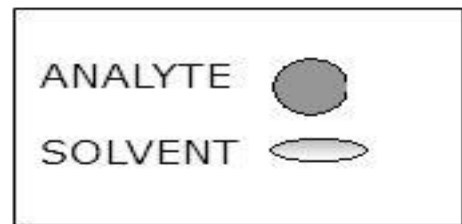
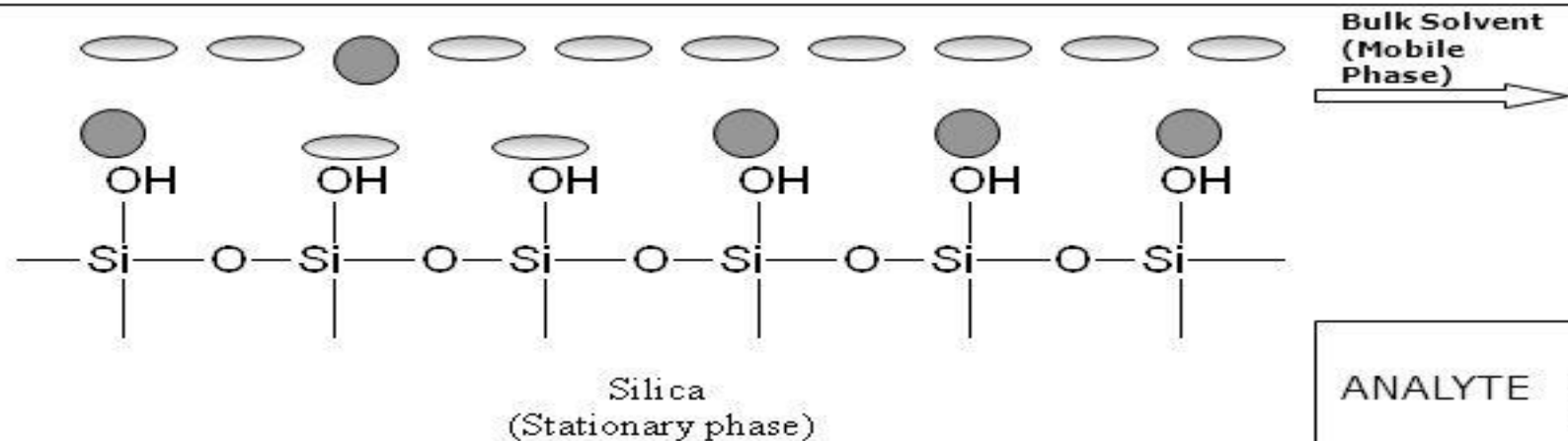
**Ασθενής Προσρόφηση
μη πολικές ομάδες**

-CH=CH₂, -X, -OR, -CHO, -CO₂R, -NR₂, -NH₂, -OH, -CONR₂, -CO₂H.

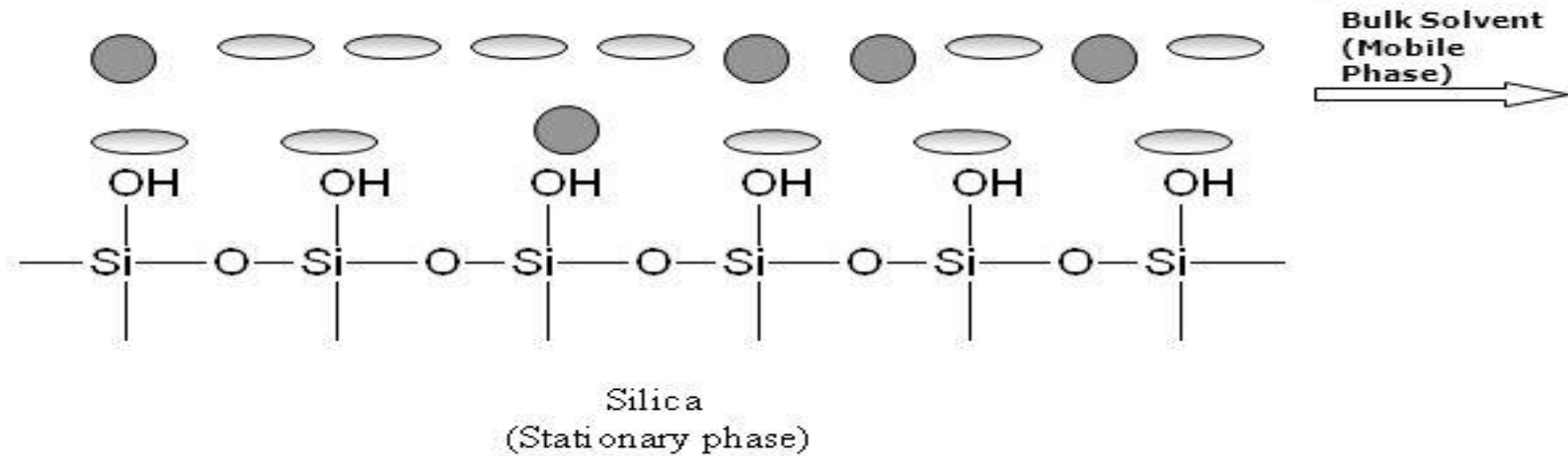
**Ισχυρή Προσρόφηση
πολικές ομάδες**

ANALYTE POLARITY VS. STATIONARY PHASE

Polar analyte binds to the SiO_2 sites, so it sticks and moves *slowly*

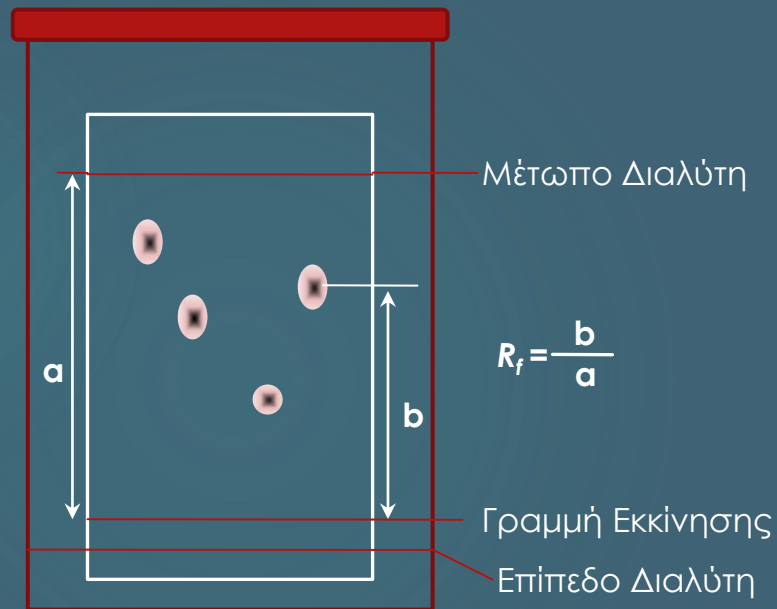


Nonpolar analyte doesn't bind to SiO_2 sites so it doesn't stick and moves *quickly*



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.



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

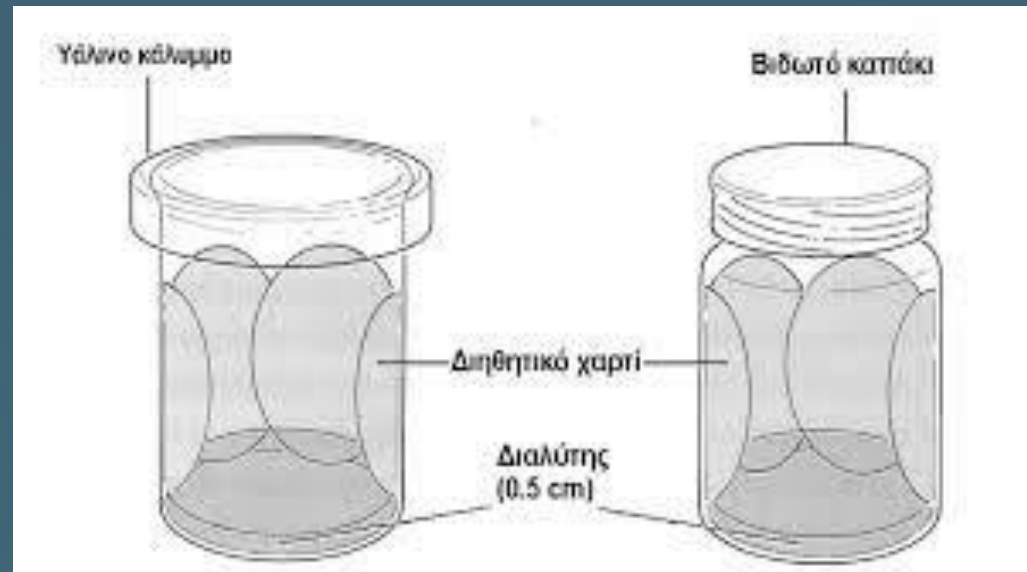
- σύστημα διαλυτών
- προσροφητικό υλικό
- πάχος του προσροφητικού υλικού
- ποσότητα του δείγματος
- θερμοκρασία

Ε. Διαδικασία Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας

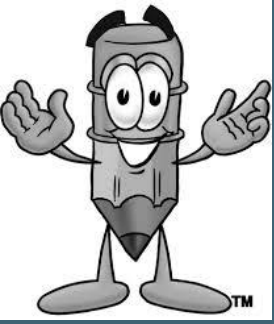
Βήμα 1 : Προετοιμασία του δοχείου ανάπτυξης

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 ανάπτυξη για να επέλθει κορεσμός.



Βήμα 2 : Προετοιμασία της πλάκας

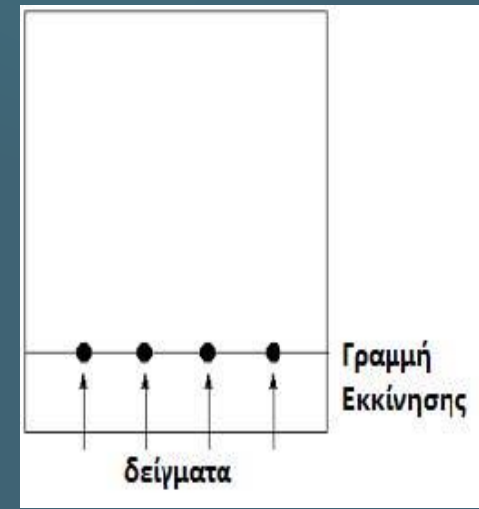
Ο χειρισμός των πλακών πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή έτσι ώστε να μην καταστραφεί η επίστρωση του προσροφητικού υλικού και να μην λεκιαστεί.

- 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.



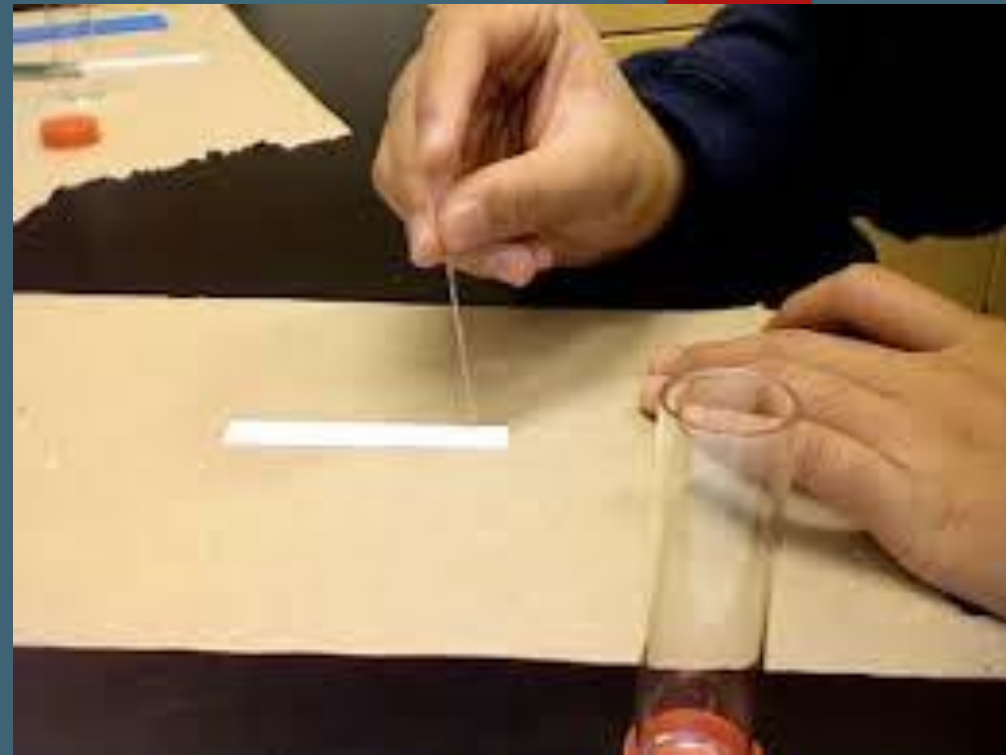
Βήμα 3 : Τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα TLC.

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 ένα τριχοειδές σωλήνα το μέσα στο διάλυμα και, στη συνέχεια, αγγίξτε απαλά την άκρη του πάνω στην επισημασμένη θέση για το δείγμα πλάκα TLC.

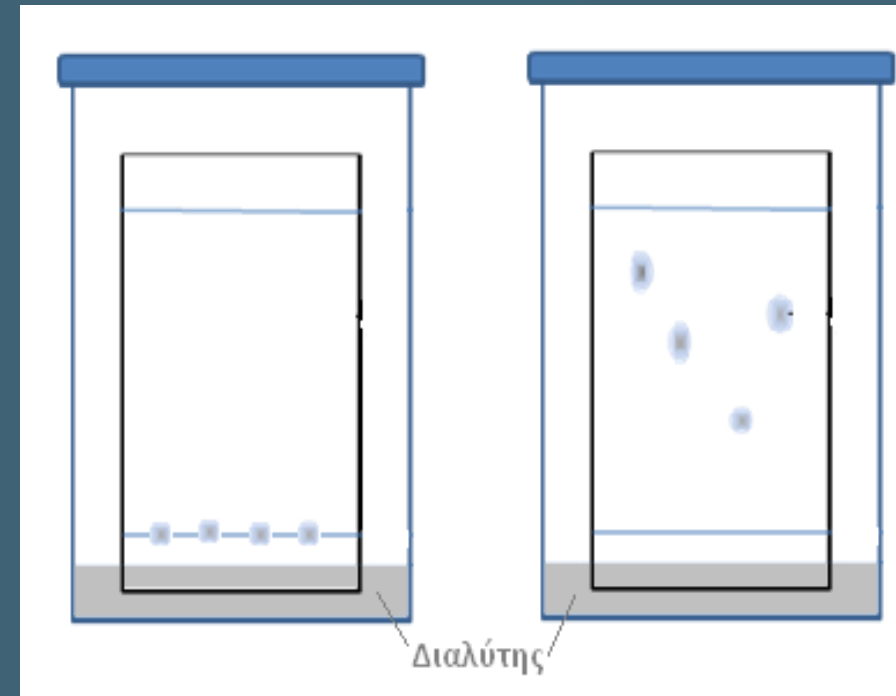
Μην αφήσετε την κηλίδα να γίνει πάρα πολύ μεγάλη, μπορείτε να αγγίξετε και να ανασηκώσετε το τριχοειδές αμέσως από τη πλάκα.

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.

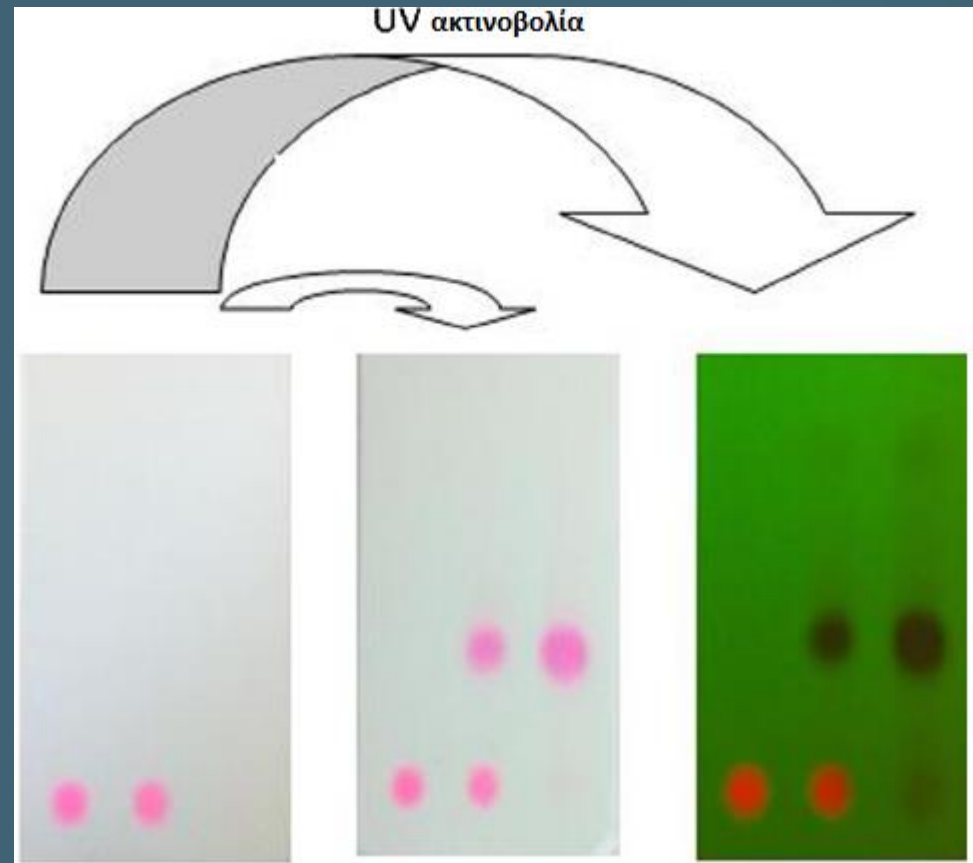
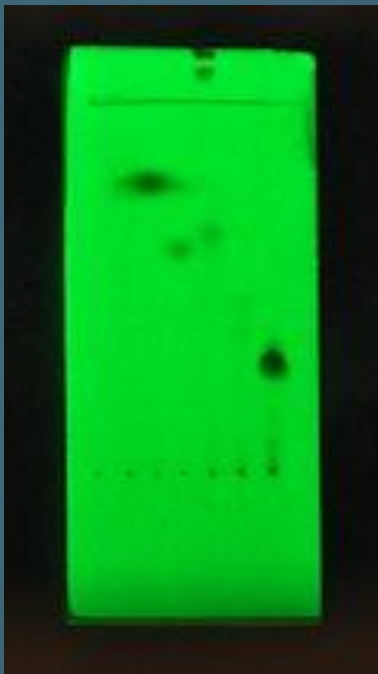


Βήμα 5 : Η εμφάνιση των κηλίδων

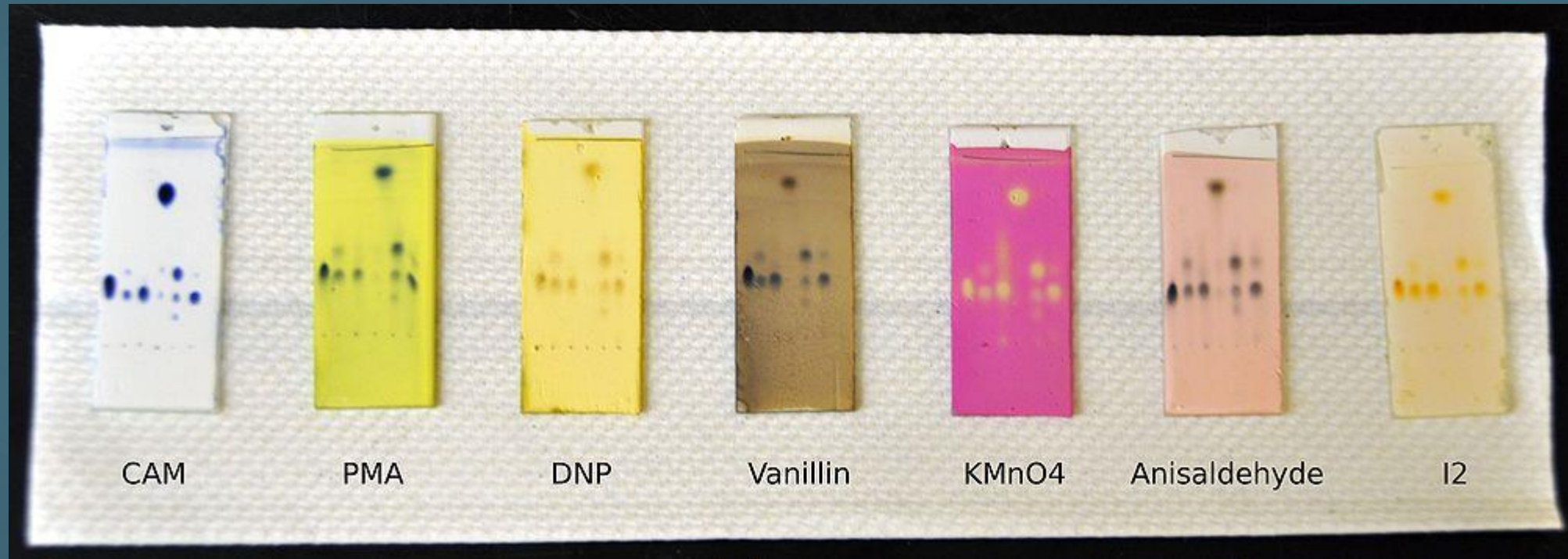
Αν υπάρχουν διακριτές έγχρωμες κηλίδες σχεδιάστε το περίγραμμά τους ελαφρά με ένα μολύβι.

Τα περισσότερα δείγματα δεν είναι έγχρωμα και μπορούν να εμφανιστούν:

- ✓ παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)
οπότε και γίνεται το περίγραμμά τους.



- ✓ παρουσία ατμών Ιωδίου (ενώσεις που έχουν πολλαπλούς δεσμούς)
- ✓ 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.).



- ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=rMGQavOMAmc>
- ▶ https://www.youtube.com/watch?v=l4u_1ST7Ezk
- ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=qdmKGskCyh8>