

Wprowadzenie

Chromatografia (z gr. *chroma* – barwa, *grapho* – piszę) to ogólna nazwa technik laboratoryjnych służących do rozdzielania, oczyszczania i badania składu mieszanin. Niezależnie od rodzaju techniki chromatograficznej pierwszym etapem jest rozdzielenie mieszaniny, a drugim detekcja poszczególnych składników (choć niekiedy etapy te biegną równocześnie).

Odkrycie chromatografii zawdzięczamy rosyjskiemu chemikowi Michaiłowi Cwietowi, który na początku XX wieku w Warszawie zajmował się badaniem barwników roślinnych. Jego prace polegały na przepuszczaniu ekstraktu barwników z zielonych liści roślin przez kolumnę wypełnioną węglanem wapnia (kredą). Obserwował wówczas powstawanie szeregu zielonych, żółtych i pomarańczowych pasm odpowiadających poszczególnym składnikom mieszaniny, od których pochodzi nazwa tej techniki. Michaiła Cwieta uważa się także za odkrywcę karotenoidów (pigmentów pełniących pomocniczą rolę w procesie fotosyntezy i nadających charakterystyczną żółtą, pomarańczową lub czerwoną barwę różnym częściom roślin).

Techniki chromatograficzne opierają się na podziale składników mieszaniny pomiędzy dwie niemieszające się wzajemnie fazy. Dokonuje się to w wyniku przepuszczenia roztworu badanej mieszaniny przez specjalnie spreparowane złożo, zwane **fazą stacjonarną (nieruchomą)**. Jest to najczęściej porowaty adsorbent, czyli związek zdolny do gromadzenia na swojej powierzchni cząsteczek substancji. Drugą fazę, tzw. **fazę ruchomą (eluent)**, stanowi ciecz lub gaz. Składniki próbki poruszają się w trakcie procesu chromatografii razem z fazą ruchomą, przy czym szybkość ich migracji zależy od oddziaływań, które tworzą się pomiędzy składnikami mieszaniny a fazą stacjonarną oraz ruchomą. Najprościej ujmując, jeśli substancje silnie wiążą się z adsorbentem (np. poprzez wiązania wodorowe), to poruszają się wolniej, jeśli zaś substancje wykazują duże powinowactwo do fazy ruchomej, to poruszają się szybciej. W ten sposób dokonuje się rozdziału (separacji) składników mieszaniny.

Metody chromatograficzne klasyfikuje się według różnych kryteriów. Pierwszym z nich jest rodzaj zastosowanego eluentu. Pod tym względem wyróżnią się:

- **chromatografię cieczową** (LC, z ang. *liquid chromatography*), w której rolę eluenta (fazy ruchomej) pełni ciekły rozpuszczalnik, a najczęściej mieszanina rozpuszczalników.
- **chromatografię gazową** (GC, z ang. *gas chromatography*), w której eluentem jest gaz, zwykle hel, argon, wodór lub azot.
- **chromatografię nadkrytyczną**, tzw. **fluidalną** (SFC, z ang. *supercritical fluid chromatography*), w której wykorzystuje się płyn w stanie nadkrytycznym (ogrzany do odpowiednio wysokiej

temperatury i odpowiednio sprężony w ten sposób, że zanika różnica między gazem a cieczą), najczęściej stosuje się nadkrytyczny tlenek węgla(IV) (CO_2).

Z kolei ze względu na rodzaj fazy stacjonarnej wyróżnia się:

- **chromatografię kolumnową** (CC, z ang. *column chromatography*), w której fazę stacjonarną stanowi adsorbent umieszczony w specjalnej kolumnie, mającej postać długiej rurki z kranikiem u wylotu; przepływ mieszaniny przez kolumnę z fazą nieruchomą dokonuje się na zasadzie grawitacyjnej lub wspomagany jest przez zwiększenie ciśnienia,
- **chromatografię jonowymienną** (IC, z ang. *ion chromatography*), stanowiącą w istocie szczególnie rodzaj chromatografii kolumnowej – kolumna chromatograficzna jest wypełniona tu specjalnie spreparowanym złożem (żywicą jonowymienną) obdarzonym ładunkiem; złożę to łatwo wymienia jony z kationami i anionami znajdującymi się w fazie ruchomej (w badanej mieszaninie);
- **chromatografię planarną**, gdy faza stacjonarna leży w płaszczyźnie, a w szczególności:
 - **chromatografię bibułową**, w której rolę fazy stacjonarnej pełni pasek bibuły filtracyjnej (lub specjalnej bibuły chromatograficznej), a rozdział mieszaniny opiera się na działaniu sił kapilarnych,
 - **chromatografię cienkowarstwową** (TLC, z ang. *thin layer chromatography*).

W niniejszym ćwiczeniu zapoznamy się z techniką TLC, w której fazę stacjonarną pełni cienka warstwa adsorbentu naniesiona na płytkę. Warstwa rozdzielcza (nieruchoma) pełni tę samą funkcję, co bibuła filtracyjna w chromatografii bibułowej.

Wszystkie adsorbenty stosowane w chromatografii cienkowarstwowej muszą spełniać kilka podstawowych warunków. Przede wszystkim:

- nie mogą one reagować ani z substancjami rozdzielanymi (w przeciwieństwie do jonowego złoża w IC) ani z fazą ruchomą (mieszaniną rozpuszczalników), czyli powinny być możliwie biernie chemicznie,
- stosowane rozpuszczalniki nie mogą rozpuszczać stosowanego adsorbentu,
- wielkość ziaren powinna zapewnić odpowiednią szybkość filtracji.

Adsorbenty są **materiałami porowatymi**, czyli zbudowanymi z ziaren o określonej średnicy (najczęściej od 2 do 60 μm), pomiędzy którymi znajdują się wolne przestrzenie (pory). Adsorbenty mają dużą powierzchnię całkowitą, którą zawdzięczają właśnie obecności małych ziaren (każde z nich ma niewielką powierzchnię, ale sumarycznie dają one imponujące wartości!). Dzięki temu możliwe jest oddziaływanie badanych substancji ze złożem porowatym.

Adsorbenty dzielą się na **polarne** i **niepolarne**. Do polarnych należą: tlenek krzemu(IV) (SiO_2 , tzw. żel krzemionkowy), tlenek glinu (Al_2O_3) oraz odpowiednio spreparowane tlenki,

siarczany(VI), węglany i ortofosforany(V) litowców. Najczęściej wykorzystuje się tlenek krzemu(IV) i tlenek glinu.

Atomy tlenu znajdujące się na powierzchni żelu krzemionkowego występują w postaci grup hydroksylowych ($-OH$), co nadaje temu nośnikowi właściwości bardzo słabego kwasu i powoduje jego wysoką polarność. Cząsteczki związku chemicznego wprowadzone na powierzchnię żelu krzemionkowego ulegają procesowi adsorpcji, przy czym związki niepolarne wiążą się z powierzchnią wyłącznie siłami dyspersyjnymi i indukowanymi oddziaływaniami dipolowymi. Są one dużo słabsze od tych, które tworzą się w przypadku adsorpcji substancji polarnych, zawierających grupy polarne takie jak $C-O$, $C=O$, $O-H$, $N-H$, $N=O$, $C-Cl$ itd. W tym przypadku powstają silne oddziaływania dipolowe, a nawet wiązania wodorowe. A zatem, im bardziej polarna jest cząsteczka, tym silniej będzie się adsorbowała na powierzchni żelu krzemionkowego i wolniej będzie przesuwana wraz z fazą ruchomą. Podobnie zachodzą procesy na powierzchni tlenku glinu.

Do adsorbentów niepolarnych zalicza się m.in. węgiel aktywny, sacharozę, skrobię i specjalnie modyfikowany żel krzemionkowy, którego grupy $-OH$ zostały podstawione ugrupowaniami niepolarnymi. Hydrofobowa powierzchnia tych adsorbentów utrudnia wiązanie się z nimi cząsteczek polarnych.

Fazę ruchomą (eluent) w chromatografii cienkowarstwowej stanowią rozpuszczalniki organiczne i ich mieszaniny. Jest oczywiste, że stosowany rozpuszczalnik:

- nie może reagować z analizowanymi substancjami,
- powinien rozpuszczać składniki mieszaniny (przynajmniej w niewielkim stopniu),
- musi być względnie łatwy do usunięcia (np. lotny),
- powinien być bezpieczny i niezbyt drogi.

Przeływ eluenta wzdłuż fazy stacjonarnej odbywa się pod wpływem **sił kapilarnych**, tj. podciągania cieczy wbrew sile grawitacji. Przemieszczanie się rozpuszczalników przez warstwę fazy stacjonarnej, na której została zaadsorbowana próbka, powoduje wymywanie (**elucję**) składników próbki z podłoża i ich przemieszczanie w kierunku ruchu eluenta. Skuteczność eluowania zależy od powinowactwa zarówno substancji, jak i eluenta do fazy stacjonarnej, bowiem zaadsorbowana substancja może zostać „wyparta” z adsorbenta przez rozpuszczalnik tylko wtedy, gdy wykazuje ona większe od niej powinowactwo do adsorbenta.

W przypadku adsorbentów polarnych największym powinowactwem do nośnika cechują się związki o polarnych cząsteczkach. Rozpuszczalniki niepolarne (np. cykloheksan, toluen, chloroform) mogą wymyć z powierzchni polarnego adsorbenta jedynie związki niepolarne, zaś rozpuszczalniki polarne (aceton, etanol, metanol), które mają duże powinowactwo do nośnika, eluują skutecznie zarówno związki polarne, jak i niepolarne.

Chromatografia cienkowarstwowa jest szybką metodą pozwalającą określić, ile związków wchodzi w skład badanej mieszaniny, jak również dokonać ich identyfikacji (o ile dysponuje się odpowiednimi wzorcami analizowanych substancji). Dobór odpowiedniego adsorbenta i układu rozwijającego (mieszaniny rozpuszczalników) umożliwi rozdział niemal dowolnej mieszaniny związków organicznych. Zaletami metody TLC są:

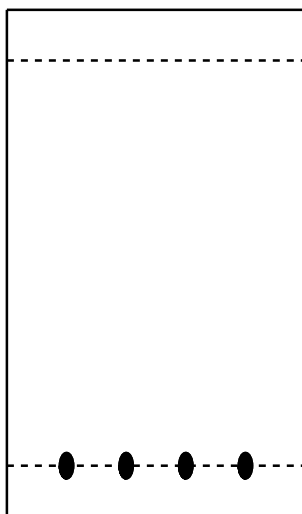
- krótki czas wykonania,
- minimalne zużycie materiałów,
- prostota wykonania.

Powoduje to, że jest to bodaj najczęściej używana metoda wstępnej identyfikacji związków organicznych, kontroli ich czystości, pozwala także na śledzenie postępu reakcji chemicznej.

Sposób postępowania w chromatografii cienkowarstwowej jest prosty. Polega na naniesieniu na płytkę z warstwą odpowiedniego adsorbenta próbki analizowanej substancji oraz substancji wzorcowych, następnie rozwinięciu chromatogramu odpowiednim układem rozpuszczalników i zaobserwowaniu jego wyglądu.

Adsorbent jest naniesiony najczęściej na arkusze z folii aluminiowej lub poliestrowej, dzięki czemu można łatwo przyciąć je do płytek o żądanych rozmiarach.

Przed naniesieniem próbek należy ostrożnie, za pomocą ołówka (nie długopisem!) tzw. linię startu w odległości około 1 cm od dolnego, krótszego brzegu płytki, oraz linię mety w odległości zazwyczaj 0,5 cm od górnej, krótkiej krawędzi płytki. Na tak przygotowaną płytkę wprowadza się próbki substancji badanych oraz wzorcowych poprzez zanurzenie cienkiej kapilary lub pipetki w roztworze i dotknięcie (delikatnie!) warstwy adsorbenta. Powoduje to przeniesienie kropli roztworu (badanego lub wzorcowego), przy czym należy dążyć do tego, by plamka na płytce była możliwie mała, ale wyraźna.



Płytkę do TLC z 4 plamkami

Między punktami nanoszenia poszczególnych substancji należy zachować odległości około 0,5 – 1 cm, a skrajne plamki startowe nie powinny znajdować się bliżej niż 0,5 cm od brzegu płytki (patrz: rysunek obok). Po naniesieniu danej plamki należy poczekać, aż stosowany rozpuszczalnik odparuje (plamka powinna być sucha). Po naniesieniu wszystkich plamek trzeba dokładnie wysuszyć płytki w strumieniu ciepłego powietrza z suszarki. Niedokładne wysuszenie powoduje rozmazywanie się plamek w czasie rozwijania chromatogramu. Opisanie czynności należy wykonywać delikatnie, w żadnym razie nie można dotykać powierzchni adsorbentu palcami.

Tak przygotowaną płytkę umieszcza się ostrożnie, przy pomocy pęsetki lub szczypec w komorze chromatograficznej. Można do tego celu użyć odpowiednio wysokiej zlewki przykrywanej szalką Petriego. Do komory wlewa się eluent na wysokość około 0,5 cm. Komora powinna być wysycona parami eluenta, gdyż skraca to czas rozwijania (wpływa także korzystnie na jakość rozdzielania). Szybkie wysycenie komory parami eluenta można osiągnąć przez wyłożenie ścianek komory bibułą filtracyjną. Eluent zwilży fragment bibuły i będzie z niego odparowywać, powodując wysycenie wnętrza komory (zlewki) gazowymi rozpuszczalnikami.

Po włożeniu płytki do komory nie wolno nią poruszać aż do momentu zakończenia rozwijania chromatogramu (chromatogram rozwija się poprzez wędrówkę cieczy w górę płytki), tj. gdy czoło eluenta osiągnie linię mety. Wówczas należy wyjąć płytkę z komory (szczypcami lub pęsetką) i dokładnie wysuszyć).

Odczytanie wyników jest proste, gdy analizowane składniki są barwne. Cechą charakterystyczną każdej substancji identyfikowanej metodą TLC jest **współczynnik opóźnienia**, R_f (z ang. *retardation factor*). Określa się go jako stosunek odległości przebytej przez plamkę do odległości przebytej przez rozpuszczalnik, tj. odległości od linii startu do linii mety. Z definicji, wartości R_f zawierają się w przedziale od 0 do 1. Gdy $R_f = 0$, to substancja jest całkowicie (w danych warunkach) zaadsorbowana i pozostaje na starcie, natomiast gdy $R_f = 1$, to substancja jest bardzo słabo adsorbowana, rozpuszcza się doskonale w fazie ruchomej i porusza się razem z czołem rozpuszczalnika.

Współczynnik opóźnienia powinien mieć dla danej substancji stałą wartość w tych samych warunkach doświadczalnych. W praktyce jednak rzadko udaje się dokładnie odtworzyć wartości R_f . Nawet gdy zastosuje się ten sam adsorbent i eluent, to nie można uniknąć różnic, których przyczyną mogą być:

- ilość wilgoci w nanoszonym roztworze (silnie polarna woda skutecznie adsorbuje się na powierzchni polarnych adsorbentów),
- stopień nasycenia komory parami rozpuszczalnika,
- drobne różnice w składzie fazy ruchomej (zwłaszcza przy stosowaniu mieszanin),
- poziom aktywacji płytek i jakość adsorbenta.

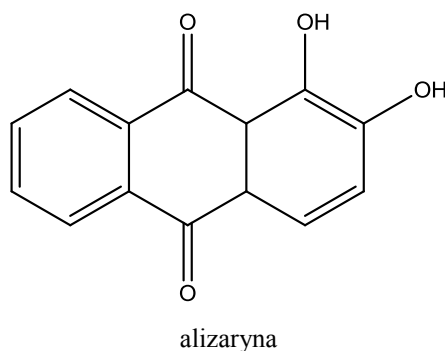
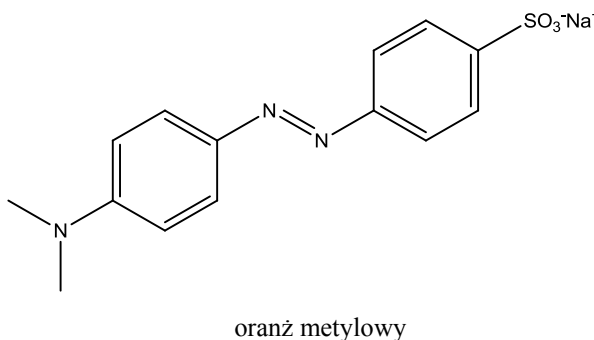
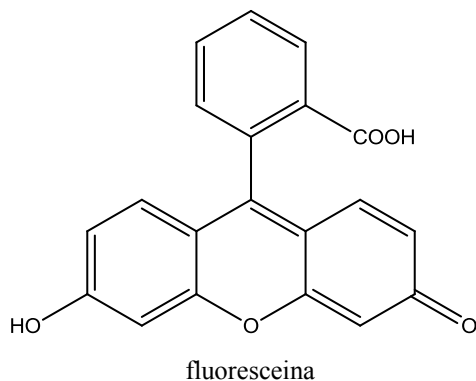
Porównanie wartości współczynnika R_f substancji badanej i wzorca stanowi podstawę do jej identyfikacji pod warunkiem, że chromatografia była wykonywana w ten sam sposób (np. na tej samej płytce).

W tym ćwiczeniu analiza polegać będzie na analizie składu mieszaniny barwników. Mieszanina ta może zawierać od 1 do 3 związków spośród następujących:

- fluoresceina.

- oranż metylowy,
- alizaryna,

Poniżej przedstawiono struktury tych związków.



Substancje te należą do grupy wskaźników pH, tj. związków zmieniających swe zabarwienie wraz ze zmianami odczynu. Spośród nich największą polarnością charakteryzuje się oranż metylowy (jest to związek o charakterze soli), mniejszą – fluoresceina (zawiera kwasową grupę karboksylową, -COOH), a najmniejszą – alizaryna.

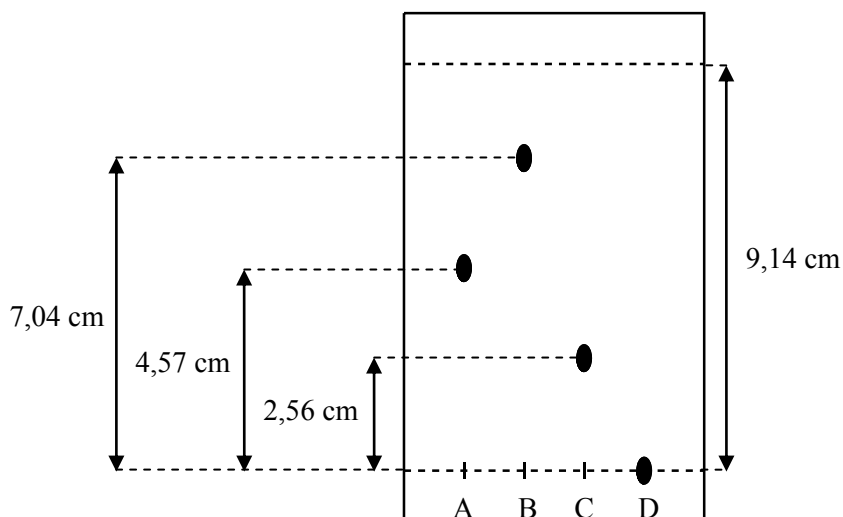
Literatura

1. T. Lipiec, Z. S. Szmal, *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*, wyd. PZWL, Warszawa 1997 (rozdz. 7.3.1. – 7.3.2., 7.3.3.1., 7.3.5.2.).

Zagadnienia do opracowania przed przystąpieniem do ćwiczenia

1. Wyjaśnij, czym jest chromatografia i jakie jest jej zastosowanie.
2. Wyjaśnij pojęcia: faza stacjonarna, faza ruchoma, elucja.
3. Objasnij (rozwiń i krótko skomentuj) skróty: GC, LC, SFC, CC, TLC, IC, R_F.

4. Jakie wymagania powinna spełniać faza stacjonarna i faza ruchoma, by można było je zastosować w technikach chromatograficznych?
5. Wymień znane Ci adsorbenty polarne i niepolarne.
6. Opisz starannie, w jaki sposób dokonuje się rozdział substancji w chromatografii cienkowarstwowej.
7. Podaj definicję współczynnika opóźnienia. Oblicz współczynniki opóźnienia dla plamek na poniższym rysunku.



8. Wymień czynniki wpływające na wartość współczynnika opóźnienia.
9. Narysuj wzory strukturalne oranżu metylowego, alizaryny i fluoresceiny, a następnie uszereguj te związki zgodnie z rosnącym powinowactwem do polarnego adsorbentu.

Zadania do wykonania przed przystąpieniem do ćwiczenia

- Zadanie 1.** Obejrzyj film na stronie <https://www.youtube.com/watch?v=ryvD0gCROsU>, a następnie wskaż występujące na nim błędy (w wykonaniu oraz w komentarzu).

Wykonanie

Sporządzić 8 cm³ roztworu eluenta: mieszaniny toluenu i acetonu w stosunku objętościowym 3:1. W tym celu do zlewki wprowadzić 6 cm³ toluenu (C₆H₅CH₃), 2 cm³ acetonu (CH₃COCH₃), wymieszać, a następnie przelać do wysokiej zlewki, która będzie stanowić komorę chromatograficzną, w takiej ilości, by utworzyła się na dnie warstwa eluenta o grubości 1 cm. Do tej zlewki włożyć kawałek bibuły filtracyjnej (na około ¾ obwodu) i przykryć odwróconą do góry dnem szalką Petriego.

Na płycie chromatograficznej zaznaczyć delikatnie ołówkiem w odległości około 1 cm od jej krótkiej krawędzi linię startu oraz linię mety (około 0,5 cm od przeciwległej krawędzi). Na linii startu

zakreślić w równych odległościach cztery punkty (ponumerować je pod spodem od 1 do 4). Na punktach tych zostaną naniesione substancje wzorcowe i badana mieszanina. Nanieść za pomocą pipetek po 1 kropli roztworów wzorcowych: fluoresceiny, oranżu metylowego i alizaryny, oraz badanego roztworu. Należy uważać, aby nie uszkodzić powierzchni adsorbentu, a plamki miały możliwie najmniejszą średnicę. Po naniesieniu roztworów wysuszyć płytkę za pomocą suszarki.

Po wysyceniu komory parami eluenta umieścić w niej płytkę z analizowanymi substancjami. Nastąpi rozwijanie chromatogramu. Gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się na linii mety, ostrożnie wyciągnąć płytkę i wysuszyć suszarką. Po wysuszeniu porównać barwy i położenia plamek pochodzących od substancji wzorcowych oraz od składników mieszaniny i na tej podstawie określić skład analizowanej próbki. Następnie obliczyć wartości współczynników opóźnienia (R_f) dla każdej z obecnych na chromatogramie plamek.

W raporcie wypisać skład badanej mieszaniny, obliczone wartości współczynników R_f oraz wkleić płytkę z chromatografem cienkowarstwowym.

Chromatograficzny rozdział barwników naturalnych w liściach pietruszki (opcjonalnie)

Umyć kilka listków pietruszki, osuszyć na bibule, pokroić na małe kawałki i rozetrzeć w moździerzu na możliwie jednolitą masę. Dodać 5 cm³ acetonu i rozcierać jeszcze przez około dwie minuty. Zielony roztwór zlać do rozdzielacza.

Rośliny zawierają znaczną ilość wody, która przeszkadza w chromatograficznym rozdzielaniu barwników, więc do przygotowanego roztworu dodać około 2 cm³ eteru naftowego (benzyny ekstrakcyjnej) i wytrząsać przez około 1 – 2 minuty, a następnie pozostawić do rozdzielania warstw (około 2 – 3 minuty). Górna, ciemnozielona warstwa eteru naftowego zawiera barwniki zawarte w roślinie i można je rozdzielić chromatograficznie. Należy więc spuścić dolną warstwę i odrzucić, a górną przenieść do małej zlewki.

Przygotowany ekstrakt barwników roślinnych zagęścić przez odparowanie. W tym celu przenieść zawartość zlewki do parowniczkę, którą należy umieścić na zlewce z wodą. Zlewkę ogrzewać w płomieniu palnika tak długo, aż ekstrakt barwników będzie miał ciemnozieloną barwę.

Przygotować eluent: 8 cm³ eteru naftowego (benzyny ekstrakcyjnej) zmieszać z 3 cm³ alkoholu izopropylowego (propan-2-olu, C₃H₇OH). Eluent wlać do wysokiej zlewki przykrytej odwróconą do góry dnem szalką Petriego w takiej ilości, by utworzył warstwę o wysokości około 0,5 cm. Do zlewki włożyć także prostokąt z bibuły filtracyjnej.

Na płytce chromatograficznej zaznaczyć delikatnie ołówkiem w odległości około 1 cm od jej krótkiej krawędzi linię startu oraz linię mety (około 0,5 cm od przeciwległej krawędzi). Na linii startu

nanieść za pomocą pipetki kroplę ekstraktu i wysuszyć w strumieniu powietrza z suszarki. Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej.

Gdy czoło eluenta znajdzie się na linii mety, przerwać rozwijanie i wyjąć płytkę. Obliczyć wartości współczynników opóźnienia (R_f) dla każdej z obecnych na chromatogramie plamek i porównać z danym w poniższej tabeli.

Barwnik	Barwa plamki	Współczynnik R_f
β -karoten	żółtopomarańczowa	0,80 – 0,95
feofityna	szara	0,65 – 0,70
chlorofil a	niebieskozielona	0,60 – 0,70
chlorofil b	zielona	0,50 – 0,60
ksantofile	żółta	0,20 – 0,50

Utylizacja odpadów

1. Niezużyte roztwory eluentów umieścić w pojemniku O.
2. Pozostałe próbki (mieszaniny barwników) umieścić w pojemniku O.
3. Resztkę ekstraktu barwników roślinnych umieścić w pojemniku O.