

2

CHROMATOGRAFIA

Zagadnienia teoretyczne *Charakterystyka metody chromatograficznej, elementy układu chromatograficznego, chromatografia ciekłowa (kolumnowa i cienkowarstwowa), chromatografia gazowa. Najczęściej stosowane fazy nieruchome i ruchome. Czynniki powodujące rozdzielanie się mieszanin, faza ruchoma, faza nieruchoma, struktura substancji). Szereg eluotropowy rozpuszczalników. Współczynnik R_F , czas i objętość retencji. Sposób wywoływania chromatogramów. Schemat chromatografu gazowego i ciekłowego. Interpretacja chromatogramu.*

Sprawdzono w roku 2017 przez A. Halkę-Grysińską

Teoria

Metody rozdzielcze i proces rozdzielania

Co to jest rozdzielanie (ang. separation)? Znaczenie słowa rozdzielanie wydaje się zrozumiałe dla każdego, niemniej zdefiniowanie w sposób precyzyjny i pełny jest trudne. Rozdzielanie może być przeprowadzone w różny sposób, może dotyczyć bardzo zróżnicowanych mieszanin, może być prowadzone w różnym celu (analityczny, preparatywny) oraz w różnej skali (laboratoryjnej, przemysłowej).

Ogólnie rozdzielanie jest procesem, w którym mieszanina jest podzielona przynajmniej na dwie frakcje o zróżnicowanym składzie. Powszechnym celem rozdzielania jest spowodowanie wzrostu wartości ułamka molowego jednego składnika początkowej mieszaniny względem innych składników.

Rozdzielanie jest uzyskiwane poprzez wykorzystanie metod fizycznych, jak również reakcji chemicznych.

W poniższej tabeli zestawione są najbardziej znane metody rozdzielcze. Kryteriami, które służą do klasyfikacji metod rozdzielczych są:

- cel,
- rodzaj rozdzielanej mieszaniny,
- fizyczne i chemiczne zjawiska wykorzystywane w rozdzielaniu.

Tabela 1. Metody rozdzielcze

Gaz - ciecz	Gaz – ciało stałe	Ciecz - ciecz	Ciecz – ciało stałe
Destylacja	Adsorpcja	Ekstrakcja	Strącanie
Chromatografia gaz - ciecz	Sublimacja	Chromatografia w układzie ciecz – ciecz	Krystalizacja
	Sita molekularne	Wykluczanie	Wymiana jonowa
			Topnienie strefowe
			Adsorpcja
			Wykluczanie
			Sita molekularne
			Klatracja

W 1903 roku, w Warszawie chemik rosyjski Cwiet napelnił rurkę szklaną węglanem wapnia (ciało stałe) i przepuścił przez nią, a właściwie przez złożę węglanu wapnia, benzynowy wyciąg z liści zawierających rozpuszczony chlorofil. Cwiet zauważył, że chlorofil rozdzielił się na trzy pasma o różnym zabarwieniu. Przepuszczenie przez kolumnę dodatkowych ilości benzyny spowodowało, że barwne pasma chlorofilu przesunęły się ku dołowi kolumny. Przemysławiając kolumnę w dalszym ciągu benzyną, można było kolejno wymywać z kolumny poszczególne pasma (frakcje) chlorofilu i zbierać je w oddzielnych naczyniach.

Opierając się na podanym opisie można stwierdzić, że układ chromatograficzny składa się z następujących elementów:

- **fazy nieruchomej** (w tym przypadku węglanu wapnia),
- **fazy ruchomej** (benzyna),
- **mieszaniny** rozdzielanych substancji.

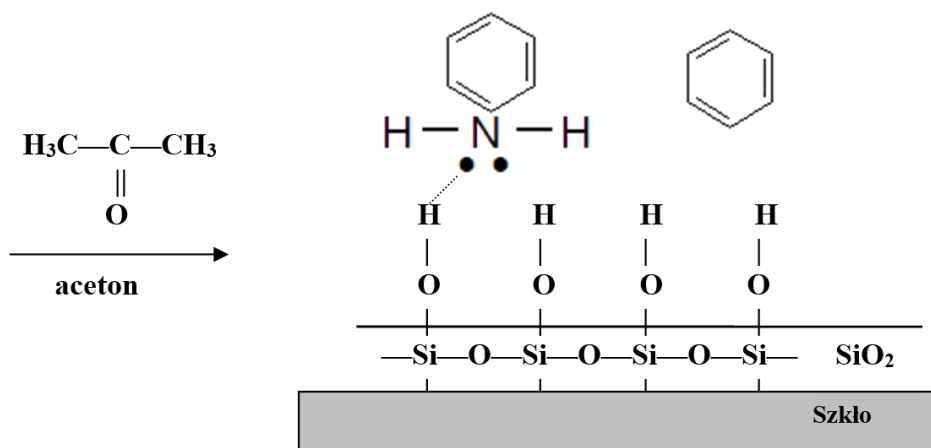
Wymienione elementy występują w **każdym układzie chromatograficznym**. Warunkiem, który musi być spełniony, aby nastąpił proces rozdzielenia substancji, jest **ruch jednej fazy względem drugiej fazy**. W opisanym wyżej doświadczeniu wyciąg benzynowy lub benzyna stanowiła fazę ruchomą poruszającą się względem fazy nieruchomej, którą stanowiło wypełnienie kolumny, tj. węglan wapnia.

W wyniku przepuszczania mieszaniny przez kolumnę nastąpiło rozdzielenie składników mieszaniny, a więc poszczególne frakcje chlorofilu **wędrowały z różną prędkością**.

Zastanówmy się z czego wynika to zróżnicowanie prędkości poruszania się poszczególnych frakcji w czasie procesu chromatograficznego.

Bardzo często fazą nieruchomą w typowym układzie chromatograficznym jest żel krzemionkowy. Budowa żelu i jego właściwości zostały opisane w skrypcie „**ADSORPCJA**”. Załóżmy, że na płytkę szklaną nałożyliśmy cienką, 0,25 mm, warstwę żelu krzemionkowego

(chromatografia cienkowarstwowa) i rozdzielamy mieszaninę składającą się z benzenu i aminobenzenu, stosując jako fazę ruchomą – aceton (**Rys. 1**).



Rys. 1. Płytką szklaną pokrytą żelazem krzemionkowym; strzałka wskazuje kierunek rozwijania chromatogramu (przeptywu acetonu)

Zarówno benzen, jak i aminobenzen mogą adsorbować się na powierzchniowych grupach —OH żelaz krzemionkowego z tym, że silne wiązanie wodorowe wytworzy się między atomem azotu grupy aminowej i grupą —OH żelaz (zaznaczone kropkami), natomiast słabe oddziaływanie wystąpi między powierzchniowymi polarnymi grupami —OH i niepolarną cząsteczką benzenu. Wynika z tego, że aminobenzen będzie adsorbował się bardzo silnie, natomiast benzen – słabo.

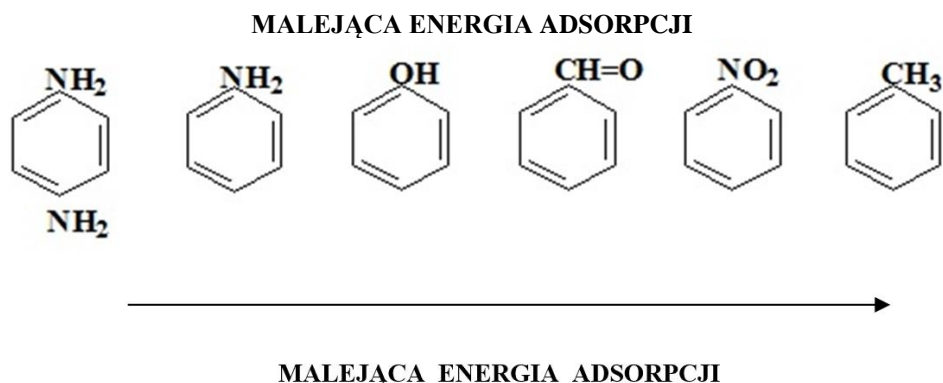
Cząsteczki acetonu (faza ruchoma) też mogą adsorbować się na powierzchni żelaz krzemionkowego, tworząc dość silne wiązanie wodorowe między powierzchniową grupą —OH i atomem tlenu grupy =C=O . Istnieją więc tutaj konkurencyjne oddziaływania między trzema cząsteczkami: benzenu, aminobenzenu i acetonu, które jednocześnie chcą zaadsorbować się na powierzchni. Największą energią adsorpcji dysponuje aminobenzen, on też będzie najsilniej adsorbowany, i może konkurować, o miejsce na powierzchni z cząsteczkami acetonu, natomiast cząsteczka benzenu będzie miała rzadką okazję zaadsorbować się na nie zajętej chwilowo grupie —OH . Proces chromatograficzny będzie przebiegał więc następująco: cząsteczki aminobenzenu będą większość czasu przebywać w fazie nieruchomej i tylko niewielką część czasu w fazie ruchomej, benzen natomiast – odwrotnie.

Cząsteczki substancji rozdzielanych **poruszają się tylko wtedy, kiedy znajdują się w fazie ruchomej**. Wynika z tego, że chromatografowane cząsteczki muszą ulegać desorpcji i przejść do fazy ruchomej. Rozdzielenie mieszaniny jest więc wynikiem wielokrotnie zachodzących procesów adsorpcji i desorpcji z tym, że aminobenzen adsorbuje się bardzo silnie i rzadko ulega desorpcji, natomiast cząsteczki benzenu przeciwnie: adsorbują się bardzo słabo i łatwo ulegają desorpcji pod wpływem fazy ruchomej. Konsekwencją takiego zachowania się substancji jest to, że aminobenzen przebywa niewielką drogę (dystans), zaś dystans

przebyty przez benzen jest duży. W obu przypadkach desorpcję aminobenzenu i benzenu powodują cząsteczki acetonu, które występują w dużym nadmiarze w stosunku do substancji chromatografowanych oraz mają dosyć dużą energię adsorpcji.

Procesy zachodzące w czasie chromatografii adsorpcyjnej można traktować jako rywalizację między cząsteczkami substancji rozdzielanych i fazy ruchomej o możliwość zaadsorbowania się na centrach adsorpcji fazy stacjonarnej. Jeżeli cząsteczki substancji rozdzielanych różnią się między sobą budową strukturalną, tzn. jakością i liczbą grup funkcyjnych, to z różną energią oddziałują z powierzchniowymi centrami adsorpcji. Te cząsteczki, które adsorbują się silnie, desorbują się słabo i większą część czasu spędzają nieruchomo w fazie stacjonarnej, te natomiast, które adsorbują się słabo – większą część czasu spędzają w fazie ruchomej. Wcześniej stwierdziliśmy, że cząsteczki chromatografowanej substancji poruszają się tylko wtedy, kiedy znajdują się w fazie ruchomej.

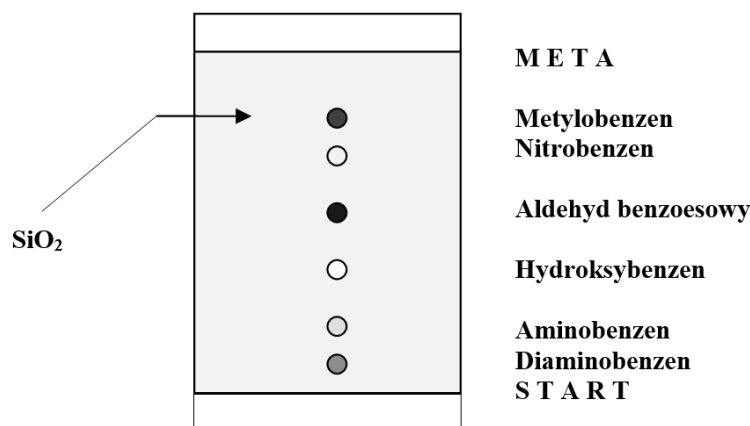
Elementami powodującymi zróżnicowanie zachowania się substancji rozdzielanych są najczęściej grupy funkcyjne. Na **Rys. 2** przedstawiono szereg substancji, pochodnych benzenu, według malejącej energii adsorpcji na żelu krzemionkowym:



Rys. 2. Porównanie energii adsorpcji różnych grup funkcyjnych

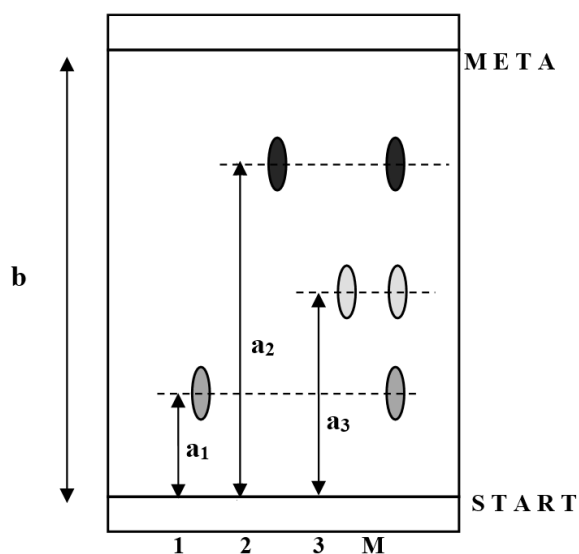
Z przedstawionego szeregu wynika, że najsilniej na żelu krzemionkowym adsorbuje się aminobenzen, najslabiej zaś metylobenzen. Jeżeli w cząsteczce występują dwie grupy funkcyjne (np. dwie grupy —NH_2 w p-diaminobenzenu), to substancja taka adsorbuje się jeszcze silniej niż substancja zawierająca w cząsteczce tylko jedną grupę funkcyjną.

Gdybyśmy chromatografowali mieszaninę złożoną z substancji o strukturach przedstawionych na **Rys. 2**, to (przy zastosowaniu odpowiedniej fazy ruchomej) rozdzieliłyby się one prawdopodobnie tak, jak pokazano na **Rys. 3**:



Rys. 3. Chromatogram cienkowarstwowy otrzymany w czasie rozdzielania pochodnych benzenu odpowiednią fazą ruchomą

Położenie plamek na cienkowarstwowym chromatogramie określa się na podstawie wartości współczynnika opóźnienia, R_F . Współczynnik ten można wyliczyć z chromatogramu w sposób pokazany na Rys. 4.



Rys. 4. Chromatogram cienkowarstwowy trzech substancji wzorcowych 1, 2, 3 oraz mieszaniny M składającej się prawdopodobnie z tych substancji

Współczynnik R_F można wyliczyć ze wzoru:

$$R_F = \frac{a_i}{b} = \frac{\text{dystans przebyty przez substancję (w cm)}}{\text{dystans przebyty przez fazę ruchomą (w cm)}}$$

Położenie plamek na chromatogramie określa się w stosunku do drogi przebytej przez front fazy ruchomej. Jest oczywiste, że wartość współczynnika R_F mieści się w granicach:

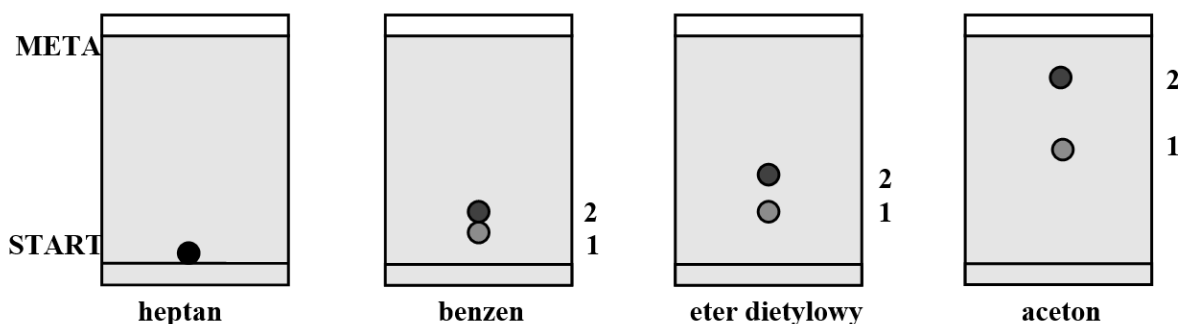
$$0,0 < R_F < 1,0$$

Jeżeli wartość współczynnika R_F jest równa lub bliska zeru, znaczy to, że substancja adsorbuje się bardzo silnie i niewiele czasu spędza w fazie ruchomej. W przypadku wysokich

wartości współczynnika R_F (**0,6 – 0,9**) jest odwrotnie. Na **Rys. 4** substancje wzorcowe **1, 2, 3** przebyły takie same drogi (mają takie same wartości R_F), jak odpowiednie substancje w mieszaninie **M**. Można więc przypuszczać, że w mieszaninie występują substancje **1, 2 i 3**.

Siła elucyjna rozpuszczalników

Z dotychczasowych rozważań wynika, że rozdzielenie się mieszaniny na składniki zależy od rodzaju substancji i ich oddziaływania z fazą nieruchomą. Innym czynnikiem wpływającym na rozdzielanie się mieszaniny jest rodzaj fazy ruchomej. Spróbujmy mieszaninę aminobenzenu i hydroksybenzenu rozdzielić na żelu krzemionkowym, stosując kolejno różne fazy ruchome, np. heptan ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_5\text{CH}_3$), benzen, eter dietylowy ($\text{C}_2\text{H}_5\text{—O—C}_2\text{H}_5$) i aceton. Efekty rozdzielania przedstawiono na **Rys. 5**.

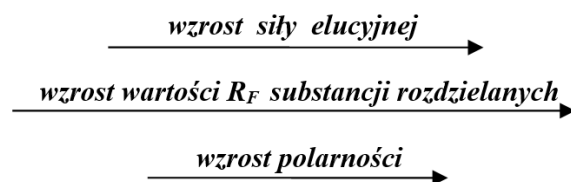


Rys. 5. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na migrację substancji (1 - aminobenzen, 2 - hydroksybenzen)

Z **Rys. 5** wynika, że kiedy stosujemy heptan jako fazę ruchomą, substancje praktycznie pozostają na starcie. Heptan jest rozpuszczalnikiem **niepolarnym**, nie ma grup funkcyjnych i dlatego bardzo słabo adsorbuje się na powierzchni żelu; w konsekwencji nie jest w stanie spowodować desorpcji rozdzielanych substancji. Inaczej aceton, który posiada dosyć silnie polarną grupę karbonylową =C=O i dlatego może konkurować z rozdzielanymi substancjami o miejsce na powierzchni adsorbentu, powodując tym samym ich desorpcję.

Dla konkretnego adsorbentu rozpuszczalniki można ułożyć w **szereg** według wzrastających zdolności do eluowania (wymywania z fazy nieruchomej, przesuwania substancji w kierunku mety) substancji rozdzielanych:

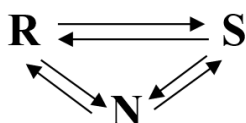
heptan < benzen < chloroform < eter dietylowy < octan etylu < aceton < metanol < woda



Ułożone w podanej kolejności rozpuszczalniki nazywamy **szeregiem eluotropowym**. Szereg eluotropowy jest charakterystycznym dla konkretnego adsorbentu. Przyjrzyjmy się budowie strukturalnej podanych rozpuszczalników:

heptan	nie ma wiązań podwójnych, ani grup funkcyjnych,
benzen	ma wiązania podwójne,
chloroform	ma sprotonizowany atom wodoru,
eter dietylowy	ma atom tlenu z wolnymi parami elektronowymi,
octan etylu	ma grupę =C=O oraz atom tlenu z wolnymi parami elektronów,
aceton	ma grupę =C=O, a więc wiązanie podwójne i wolne pary elektronowe,
metanol	ma atom tlenu i częściowo sprotonizowany atom wodoru.

Należy podkreślić, że począwszy od chloroformu, każdy następny rozpuszczalnik wykazuje moment dipolowy i dlatego silnie oddziałuje zarówno z fazą nieruchomą, jak i z rozdzielanymi substancjami. Można tu pokazać następujący schemat układu chromatograficznego, gdzie **N** oznacza fazę nieruchomą, **R** – fazę ruchomą (rozpuszczalnik) i **S** – substancję – jeden ze składników rozdzielanej mieszaniny:



Efektom tych oddziaływań, między wymienionymi powyżej trzema elementami układu chromatograficznego jest, np. w chromatografii cienkowarstwowej, **TLC** – odpowiednia wartość współczynnika **R_F**.

W uzupełnieniu podanych powyżej informacji należy dodać, że kolejność rozpuszczalników w podanym szeregu eluotropowym dotyczy jednego rodzaju adsorbentu – żelu krzemionkowego. Dla innych adsorbentów (tlenek glinu, florisil, poliamid, modyfikowany chemicznie żel krzemionkowy) szeregi eluotropowe charakteryzują się różną kolejnością rozpuszczalników. Aczkolwiek dla adsorbentów polarnych kolejność ta jest podobna, natomiast dla adsorbentów niepolarnych jest zwykle odwrotna.

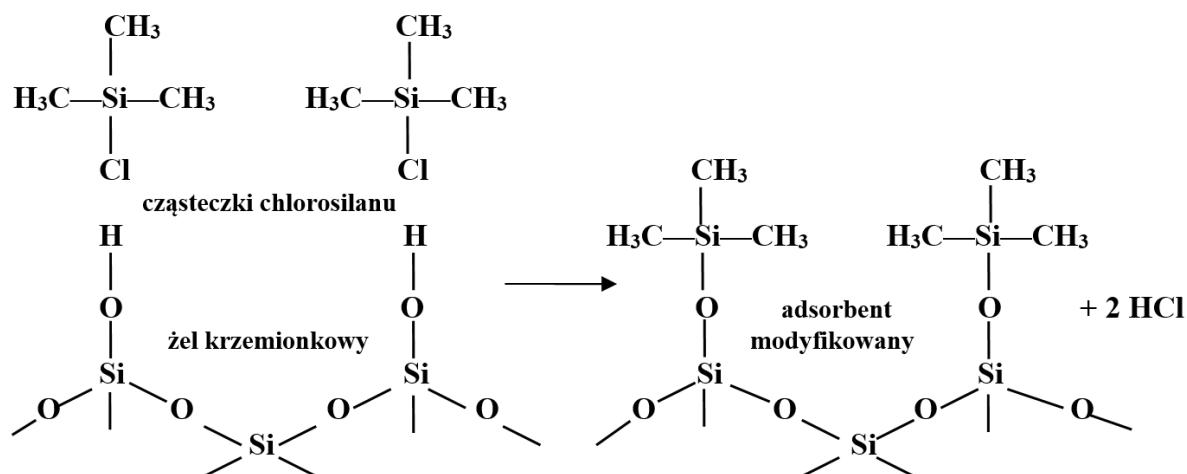
Faza nieruchoma w chromatografii ciekowej

Fazami nieruchomymi najczęściej używanymi w chromatografii ciekowej są adsorbenty omówione w skrypcie „**ADSORPCJA**”, a więc:

**żel krzemionkowy,
tlenek glinu,
poliamid,
wymieniacze jonowe.**

Adsorbenty te są silnie rozdrabniane, a następnie segregowane tak, aby otrzymać ziarna o średnicy **10 – 20 μm**, tj. **0,01 – 0,02 mm**.

Bardzo popularne są adsorbenty otrzymane w wyniku reakcji powierzchniowych grup —OH żelu krzemionkowego i chlorosilanów. Reakcję taką przedstawiono na **Rys. 6**:



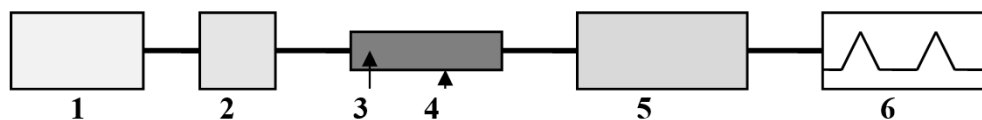
Rys. 6. Otrzymywanie adsorbentu nowego typu o modyfikowanej powierzchni

Charakter powierzchni adsorbentu zmienił się z polarnego (żel krzemionkowy) na niepolarny (adsorbent modyfikowany), ponieważ nie ma tutaj grup —OH , a w zamian pojawiły się na powierzchni niepolarne grupy —CH_3 .

Bardzo popularne obecnie, zwłaszcza w tzw. chromatografii z odwróconymi fazami, są adsorbenty, które po reakcji z chlorosilanami mają powierzchnię pokrytą łańcuchami węglowodorowymi mającymi w łańcuchu 8 lub nawet 18 atomów węgla (tzw. adsorbenty typu **RP-8**, lub **RP-18**).

Chromatografia cieczowa

W praktyce stosuje się zarówno cieczową chromatografię kolumnową, jak i chromatografię cienkowarstwową. Na **Rys. 7** przedstawiono schemat chromatografu cieczowego. Faza nieruchoma (**3**) znajduje się w metalowej kolumnie (**4**), przez którą płynie faza ruchoma tłoczona pod zazwyczaj wysokim ciśnieniem (rzędu 0,5 – do 40 MPa) przy pomocy pompy (**1**). Chromatografowaną mieszaninę wprowadza się do kolumny (**4**) przy pomocy specjalnego dozownika (**2**). Mieszanina substancji rozdziela się w kolumnie i pierwszy składnik wędrujący najszybciej wpływa do detektora (**5**). Detektor jest czuły na zmianę stężenia w fazie ruchomej i w chwili pojawienia się substancji w detektorze (zmiana stężenia), reaguje on zmianą napięcia elektrycznego, które po wzmocnieniu jest rejestrowane przez rejestrator graficzny (**6**). Rejestrator rejestruje wszystkie zmiany stężenia kolejno pojawiających się, rozdzielonych substancji w kolumnie, w postaci serii pików, które nazywamy chromatogramem.



Rys. 7. Schemat blokowy chromatografu cieczowego

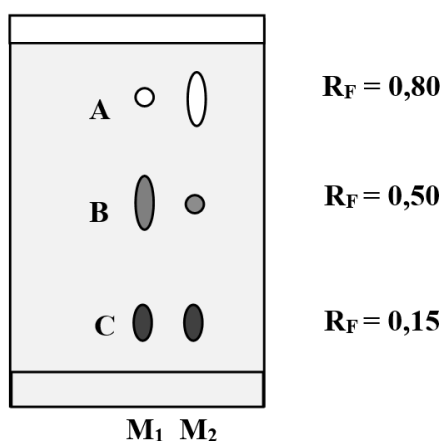
Chromatografia cienkowarstwowa (skrót angielski **TLC** – **Thin Layer Chromatography**) różni się od cieczowej chromatografii kolumnowej (skrót angielski **HPLC** – **High Performance Liquid Chromatography**) tylko sposobem wykonania doświadczenia i aparaturą.

W chromatografii cienkowarstwowej adsorbent jest rozłożony cienką warstwą na płytce szklanej lub plastikowej; w chromatografii kolumnowej jest umieszczony w kolumnie. Rozpuszczalnik (faza ruchoma) porusza się po płytce chromatograficznej dzięki siłom kapilarnym, natomiast w chromatografii kolumnowej musi być tłoczony przy pomocy pompy.

W chromatografii kolumnowej detektor wykrywa substancje wypływające z kolumny i przedstawia w postaci chromatogramu. Położenie plamek na chromatogramie cienkowarstwowym ustala się przeprowadzając często barwną reakcję z reagentem dającym barwny produkt (barwne plamki na chromatogramie). Jeżeli badane substancje fluoryzują w czasie naświetlania promieniami UV, można je wykryć pod specjalną lampą UV, wytwarzającą promieniowanie w zakresie 254 lub 360 nm.

Tak więc, cieczowa chromatografia kolumnowa i chromatografia cienkowarstwowa to dwie różne techniki tego samego rodzaju chromatografii.

Interpretacja chromatogramów



Rys. 8. Porównanie chromatogramu TLC mieszanek M₁ i M₂ o różnym stężeniu

W przypadku chromatogramu **TLC**, interpretację chromatogramu przeprowadzamy na podstawie wyliczonych wartości R_F . Substancja **A** ma wysoką wartość współczynnika R_F , co oznacza, że przebyła dużą drogę, a więc większość czasu spędziła w fazie ruchomej. Oznacza to także, że substancja **A** lepiej się desorbuje niż adsorbuje. Zupełnie inaczej zachowuje się

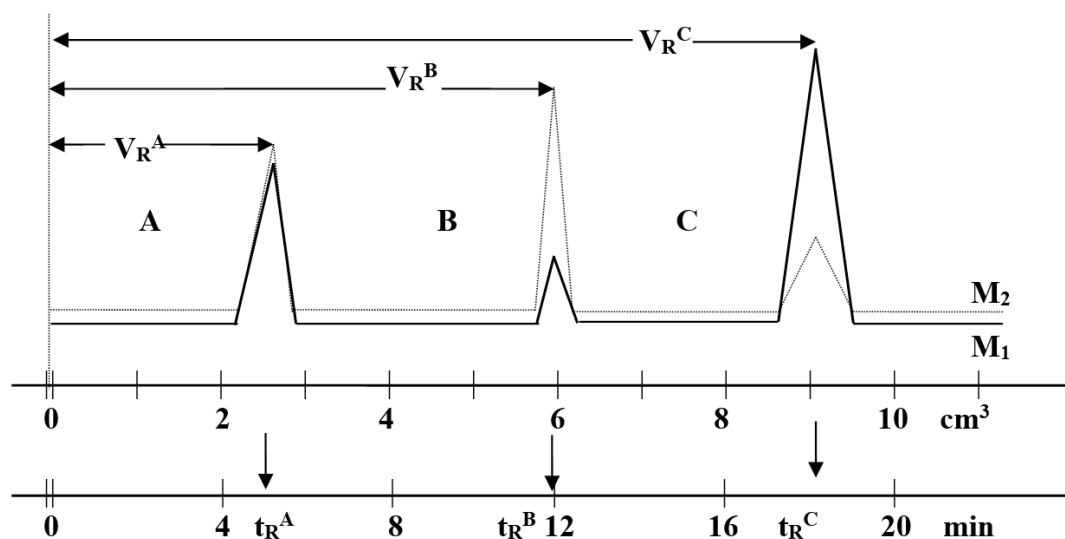
substancja **C**. W przypadku substancji **B**, która ma R_F równe ok. **0,50**, możemy powiedzieć, że substancja ta połowę czasu spędza w fazie nieruchomej, a drugą połowę w fazie ruchomej.

Na **Rys. 8** widzimy dwie mieszaniny M_1 i M_2 złożone z tych samych substancji, ale o różnych stężeniach o czym świadczą zróżnicowane powierzchnie plamek. Trudno jest ocenić dokładnie, jakie jest stężenie substancji, ale z pewnym przybliżeniem można stwierdzić, że substancja **C** ma takie samo stężenie w obu mieszaninach, substancji **A** jest około trzy razy więcej w mieszaninie M_2 a stężenie substancji **B** jest około trzy razy większe w mieszaninie M_1 . Mimo różnych stężeń, wartości R_F substancji są takie same. Dokładne ustalenie stężeń substancji, w porównaniu do wzorca, możliwe jest przy użyciu przyrządu zwanego **densytopetrem**.

W chromatografii kolumnowej składniki mieszaniny muszą przejść przez całą kolumnę i dopiero kiedy znajdą się w detektorze, mogą być wykryte. W ten sposób otrzymuje się chromatogram (**Rys. 9**), który można traktować jako zależność stężenia substancji od czasu trwania analizy, lub objętości fazy ruchomej przepływającej przez kolumnę.

W chromatografii cienkowarstwowej wielkością, która charakteryzuje położenie plamek na chromatogramie jest wartość współczynnika R_F . W chromatografii **HPLC** wielkością analogiczną jest objętość retencji V_R .

Objętość retencji jest to objętość fazy ruchomej, która musi przepłynąć przez kolumnę od momentu wprowadzenia substancji do układu, aż do momentu ukazania się maksimum pików w detektorze. Jeszcze inną wielkością, którą wykorzystuje się w **HPLC** jest tzw. **czas retencji** t_R , czyli czas, jaki upłynął od chwili wprowadzenia substancji do układu, do momentu ukazania się maksimum pików w detektorze. Na **Rys. 9**. strzałki pokazują czasy retencji dla substancji **A**, **B** i **C**.



Rys. 9. Chromatogram z naniesioną objętością V_R i czasem retencji t_R ; przepływ fazy ruchomej przez kolumnę wynosi $0,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Gdyby chromatografować mieszaninę składającą się z tych samych substancji **A**, **B**, **C**, (**Rys. 9**), ale o innym stężeniu (linia przerywana), to wartości V_R i t_R byłyby takie same, ale powierzchnie pod pikami – inne. Na **Rys. 9** mieszaninę **1** zaznaczono linią ciągłą, chromatogram mieszaniny **2** – linią przerywaną. W mieszaninach **1** i **2** stężenie substancji **A** jest jednakowe, substancji **B** jest więcej w mieszaninie **2**, zaś substancji **C** w tej mieszaninie jest prawie czterokrotnie mniej. Można więc stąd wyciągnąć wniosek, że powierzchnia pod pikiem, lub wysokość pików, jest proporcjonalna do stężenia chromatografowanej substancji.

Zastosowanie chromatografii w farmacji

Chromatografia jest wykorzystywana do analizy jakościowej i ilościowej zarówno farmaceutyków (kontrola jakości) jak i materiału pochodzenia biologicznego (monitorowanie poziomu stężenia substancji leczniczych, składu płynów ustrojowych, surowców, ekstraktów itp.)

Chromatografia gazowa (GC) jest niezastąpiona w analizie związków lotnych, a rozdzielanie substancji następuje w kolumnie. Obecnie kolumny pakowane (o niskiej sprawności) zostały wyparte przez kolumny kapilarne, mimo to są one ciągle preferowane w kontroli jakości i kontroli procesów chemicznych, bowiem kolumny pakowane o wysokiej pojemności osiągają zadowalającą sprawność. Poza zastosowaniem przemysłowym GC do oznaczania lotnych związków gazowych, cieszą się one powodzeniem w analizach laboratoryjnych, jak analiza osocza, moczu, śliny, wydychanego powietrza. Analiza tych próbek pozwala np. na wykrycie substancji, które są markerami określonych chorób. Chromatografia gazowa w sprzężeniu z spektrometrem mas (MS) ma zastosowanie w analizie leków w materiale biologicznym np.: benzodiazepin.

Chromatografia bibułowa kilka dziesiątek lat temu była jedyną metodą stosowaną w analizie biochemicznej do wykrywania, rozdzielania oraz oznaczania aminokwasów, peptydów, białek, kwasów nukleinowych, cukrów i innych substancji w płynach ustrojowych. Jest to metoda prosta i wygodna do oceny czystości związku oddawanego do analizy elementarnej. Obecnie rzadko stosowana.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) ma różnorodne zastosowanie w wielu dziedzinach życia, jednak nas interesuje przemysł farmaceutyczny, gdzie metodę tę stosuje się do kontroli jakości produkcji środków leczniczych i półproduktów do ich syntezy. Metodą tą przeprowadza się również badanie farmakokinetyczne, badanie metabolizmu leków w płynach ustrojowych, czy też rozkładu substancji czynnych podczas przechowywania leków. Na tej podstawie ustala się dawkowanie leku i bada biodostępność poszczególnych postaci le-

ków, a dodatkowo na podstawie badań szybkości rozkładu substancji czynnych ustala się terminy ważności leków. Metodą chromatografii cieczowej prowadzi się wiele analiz fitochemicznych, służących do standaryzacji i badania trwałości leku roślinnego. HPLC ma szerokie zastosowanie przy rozdzielaniu związków biologicznie czynnych, np. alkaloidów opium, steroidów anabolicznych, fenolokwasów itp.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) umożliwia badanie zanieczyszczeń, które mogą występować w środkach farmaceutycznych. W celu wykrycia tych zanieczyszczeń należy przeprowadzić równoległe rozdzielanie, na jednej płytce, badanej substancji i związków stanowiących potencjalnie jej zanieczyszczenie. Jest to przykład analizy jakościowej z użyciem metody TLC. Przy oznaczeniach ilościowych niezbędne staje się połączenie TLC z metodami analizy instrumentalnej, np. spektrofotometrią. Chromatografię cienkowarstwową można zastosować do wyodrębnienia pojedynczego składnika z mieszaniny i uzyskania go w ilości pozwalającej na wykonanie innych szczegółowych badań analitycznych. Pomocnymi stają się tu densytometria oraz skanowanie chromatogramów TLC, ponieważ pozwalają one na ilościowe oznaczenie rozdzielonych substancji z dużą czułością i dokładnością. Stale ulepszana konstrukcja densytometrów pozwala na przeprowadzenie pomiarów ilościowych w skali nanogramowej. Chromatografię cienkowarstwową stosuje się często w tzw. analizie przesiewowej (farmaceutycznej, biomedycznej, toksykologicznej), która pozwala na wykrycie określonych składników próbki i poddanie jej dalszej analizie bardziej dokładnymi i precyzyjnymi metodami w przypadku pozytywnego wyniku z pierwszego etapu.

Wykonanie ćwiczenia

2. CHROMATOGRAFIA

CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC) BARWNIKÓW

- Zadania:**
1. Zapoznanie się z techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC).
 2. Wyznaczenie wartości R_F kilku barwników w różnych układach chromatograficznych.
 3. Porównanie siły elucyjnej rozpuszczalników czystych i mieszanych.
 4. Obliczenie współczynników rozdzielania (szczegóły w podręczniku „Chemia Analityczna”, tom 2 pod redakcją Ryszarda Kocjana).

Wzory pomocnicze: $R_F = \frac{a}{b}$ (1) $k = \frac{1-R_F}{R_F}$ (2) $\alpha = \frac{k_2}{k_1} \geq 1, k_2 > k_1$ (3)

Wykonanie ćwiczenia:

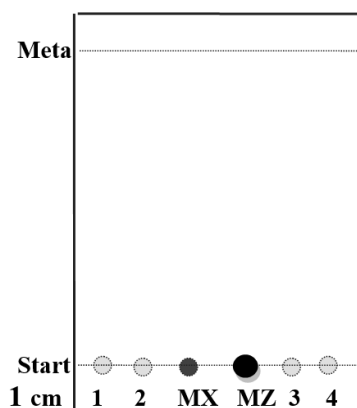
Do doświadczeń są wykorzystywane gotowe płytki szklane o wymiarach 5 x 10 cm pokryte warstwą adsorbentu o grubości 0,2 mm (żel krzemionkowy z dodatkiem spoiwa zwiększającego trwałość warstwy).

I. Rozwijanie chromatogramów czystymi rozpuszczalnikami.

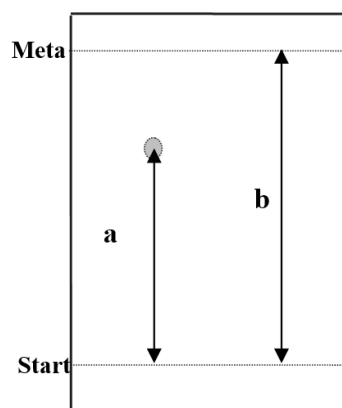
1. Na płytce chromatograficznej należy nanieść kapilarami roztwory substancji:

1. 2-nitroanilina
2. 1-aminoantrachinon
3. zielen tłuszczowa
4. czerwień olejowa
5. mieszanina
6. mieszanina

Miejsce naniesienia roztworów badanych substancji na warstwę adsorbentu (linia startowa) znajduje się w odległości 1 cm od dolnego brzegu płytki, jak na poniższym rysunku, **Rys. 1**.



Rys. 1. Przykład płytki chromatograficznej z naniesionymi na linię startu roztworami badanych substancji



Rys. 2. Sposób wyliczenia wartości R_F

2. Płytki z naniesionymi substancjami należy wstawić do poziomych komór typu **DS** zawierających czyste rozpuszczalniki (heksan, toluen, aceton).
3. Kiedy front fazy ruchomej osiągnie linię mety, należy przerwać rozwijanie chromatogramu, wyjąć płytki i osuszyć je pod dygestorium. Następnie pomierzyć dystanse przebyte przez rozpuszczalnik i plamki poszczególnych substancji, jak pokazano przykładowo na **Rys. 2**.
4. Odległości przebyte przez barwne plamki substancji należy mierzyć linijką od miejsca nakroplenia substancji (**linia startu**) do środka plamki.
5. Przy pomiarze odległości przebytej przez substancje **nie zaznaczać** ołówkiem lub tym bardziej np. długopisem konturów plamki na chromatogramie - **plytki bowiem są używane wielokrotnie**.
6. Uzyskane wyniki wpisać do Tabeli 1:

Wartości R_F wylicza się ze wzoru:

$$R_F = \frac{a}{b} = \frac{\text{dystans przebyty przez substancję w cm}}{\text{dystans przebyty przez fazę ruchomą w cm}}$$

Tabela 1. Wartości R_F barwników rozwijanych czystymi rozpuszczalnikami

Substancje	Wartości R_F		
	heksan	toluen	aceton
2-nitroanilina			
1-aminoantrachinon			
zieleń tłuszczowa			
czerwień olejowa			
Mieszanina:.....			
Składnik 1			
Składnik 2			
Składnik 3			
Mieszanina:....			
Składnik 1			
Składnik 2			
Składnik 3			

II. Obliczanie współczynnika rozdzielania, α , dla toluenu.

Tabela 2. Współczynnik rozdzielania, α , dla toluenu

Para substancji	R_F	k	α	Wnioski
Zieleń tłuszczowa Czerwień olejowa				
Zieleń tłuszczowa 2-nitroanilina				
Zieleń tłuszczowa 1-aminoantrachinon				
Czerwień olejowa 2-nitroanilina				
Czerwień olejowa 1-aminoantrachinon				
2-nitroanilina 1-aminoantrachinon				

III. Rozwijanie chromatogramów rozpuszczalnikami mieszanymi.

1. Do drugiej serii doświadczeń jako fazę ruchomą należy wykorzystać roztwory o składzie: **5, 10, 20, 30, 40%** acetonu w heksanie. Po naniesieniu chromatografowanych substancji, płytki umieścić w komorach, adsorbentem do dołu, i po upływie 15 minut, kiedy warstwa adsorbentu zostanie nasycona parami rozpuszczalnika (w celu ograniczenia zjawiska zwanego **demiksją**) rozwinąć chromatogramy.
2. Dalej postępować, jak w poprzednim doświadczeniu.
3. Otrzymane wyniki wpisać do Tabeli 3.

Tabela 3. Wartości R_F barwników rozwijanych rozpuszczalnikami mieszanymi

Substancje	% v/v acetonu w heksanie				
	5	10	20	30	40
2-nitroanilina					
1-aminoantrachinon					
zieleń tłuszczowa					
czerwień olejowa					
Mieszanina:....					
Składnik 1					
Składnik 2					
Składnik 3					
Mieszanina:....					
Składnik 1					
Składnik 2					
Składnik 3					

IV. Obliczanie współczynnika rozdzielania, α , dla dwóch wybranych faz mieszaných.

Tabela 4. Zestawienie dla 10% v/v acetonu w heksanie

Para substancji	R_F	k	α	Wnioski
Zieleń tłuszczowa Czerwień olejowa				
Zieleń tłuszczowa 2-nitroanilina				
Zieleń tłuszczowa 1-aminoantrachinon				
Czerwień olejowa 2-nitroanilina				
Czerwień olejowa 1-aminoantrachinon				
2-nitroanilina 1-aminoantrachinon				

Tabela 5. Zestawienie dla 40% v/v acetonu w heksanie

Para substancji	R_F	k	α	Wnioski
Zieleń tłuszczowa Czerwień olejowa				
Zieleń tłuszczowa 2-nitroanilina				
Zieleń tłuszczowa 1-aminoantrachinon				
Czerwień olejowa 2-nitroanilina				
Czerwień olejowa 1-aminoantrachinon				
2-nitroanilina 1-aminoantrachinon				

2. CHROMATOGRAFIA

CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC) BARWNIKÓW

(schemat formularza do opracowania wyników ćwiczenia)

Data wykonania ćwiczenia:

Imię i nazwisko studenta:

GS:

Imię i nazwisko opiekuna:

1. Zadania do wykonania

1.1. Zapoznanie się z techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

1.2. Wyznaczenie wartości R_F kilku barwników w różnych układach chromatograficznych

1.3. Porównanie siły elucyjnej rozpuszczalników czystych i mieszanych

1.4. Obliczenie współczynników rozdzielania (szczegóły w podręczniku „Chemia Analityczna”, tom 2 pod redakcją Ryszarda Kocjana)

2. Wielkości stosowane

- współczynnik opóźnienia, R_F
- dystans migracji substancji, a , [cm]
- dystans migracji frontu fazy ruchomej, b , [cm]
- współczynnik retencji, k
- współczynnik rozdzielania, α

3. Równania stosowane do obliczeń

$$R_F = \frac{a}{b} \quad (1)$$

$$k = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad (2)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \geq 1, \quad k_2 > k_1 \quad (3)$$

4. Wyniki

4.1. Wyznaczenie wartości współczynników opóźnienia, R_F , i współczynników rozdzielania, α , dla barwników w układach z czystymi rozpuszczalnikamiTabela 1. Wartości R_F dla barwników; chromatogramy rozwijane czystymi rozpuszczalnikami

Substancje	Wartości R_F		
	heksan	toluen	aceton
2-nitroanilina			
1-aminoantrachinon			
zieleń tłuszczowa			
czerwień olejowa			
Mieszanina:			
Składnik 1			
Składnik 2			
Składnik 3			
Mieszanina:			
Składnik 1			
Składnik 2			
Składnik 3			

Tabela 2. Wartości współczynników rozdzielania, α ; chromatogramy rozwijane toluenem

Para substancji	R_F	k	α	Wnioski
Zieleń tłuszczowa				
Czerwień olejowa				
Zieleń tłuszczowa				
2-nitroanilina				
Zieleń tłuszczowa				
1-aminoantrachinon				
Czerwień olejowa				
2-nitroanilina				
Czerwień olejowa				
1-aminoantrachinon				
2-nitroanilina				
1-aminoantrachinon				

4.2. Wyznaczenie wartości współczynników opóźnienia, R_F , i współczynników rozdzielania, α , dla barwników w układach z mieszanymi rozpuszczalnikami

Tabela 3. Wartości R_F dla barwników; chromatogramy rozwijane mieszanymi rozpuszczalnikami

Substancje	% v/v acetonu w heksanie				
	5	10	20	30	40
2-nitroanilina					
1-aminoantrachinon					
zieleń tłuszczowa					
czerwień olejowa					
Mieszanina:					
Składnik 1					
Składnik 2					
Składnik 3					
Mieszanina:					
Składnik 1					
Składnik 2					
Składnik 3					

Tabela 4. Wartości współczynników rozdzielania, α ; chromatogramy rozwijane mieszaniną o składzie 10% v/v acetonu w heksanie

Para substancji	R_F	k	α	Wnioski
Zieleń tłuszczowa				
Czerwień olejowa				
Zieleń tłuszczowa				
2-nitroanilina				
Zieleń tłuszczowa				
1-aminoantrachinon				
Czerwień olejowa				
2-nitroanilina				
Czerwień olejowa				
1-aminoantrachinon				
2-nitroanilina				
1-aminoantrachinon				

Tabela 5. Wartości współczynnika rozdzielania, α ; chromatogramy rozwijane mieszaniną o składzie 40% v/v acetonu w heksanie

Para substancji	R_F	k	α	Wnioski
Zieleń tłuszczowa				
Czerwień olejowa				
Zieleń tłuszczowa				
2-nitroanilina				
Zieleń tłuszczowa				
1-aminoantrachinon				
Czerwień olejowa				
2-nitroanilina				
Czerwień olejowa				
1-aminoantrachinon				
2-nitroanilina				
1-aminoantrachinon				

5. Załączniki

5.1. Obliczenia (przykłady stosowanych obliczeń)

5.2. Omówienie wyników i wnioski

5.3. Wykres 1. Zależność współczynnika R_F od składu fazy ruchomej (% v/v acetonu w heksanie)

W oparciu o dokonane obliczenia i wykres:

- wymienić, które substancje znajdują się w badanej mieszaninie (porównać wartości R_F uzyskane dla wzorców i poszczególnych składników mieszanin otrzymane w układzie z toluenem jako fazą ruchomą),
- podać, które substancja adsorbuje się najmocniej, a która najsłabiej,
- uszeregować rozpuszczalniki wg wzrastającej siły elucyjnej - wybrać układ chromatograficzny charakteryzujący się najlepszym rozdzieleniem badanych substancji – wykorzystać obliczone współczynniki rozdzielania.

Podpis studenta:

Podpis opiekuna:

Data: