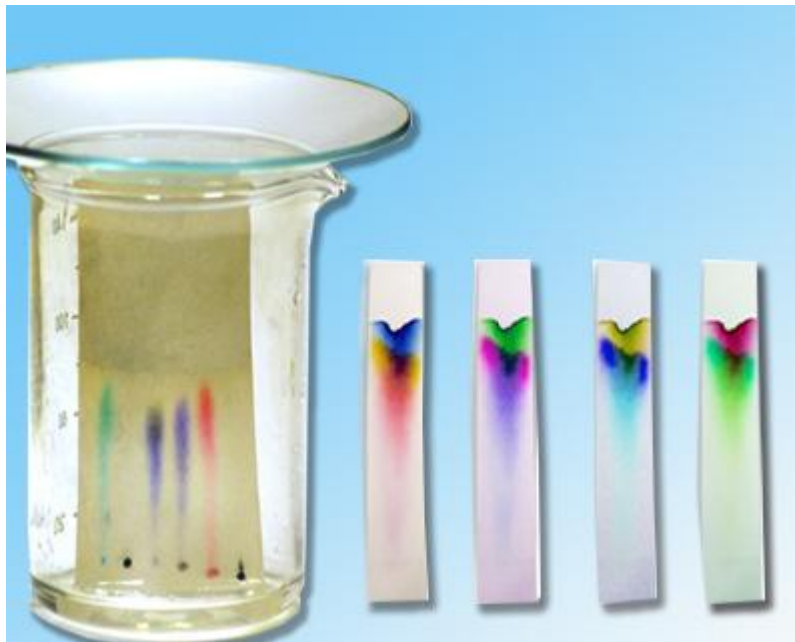


Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



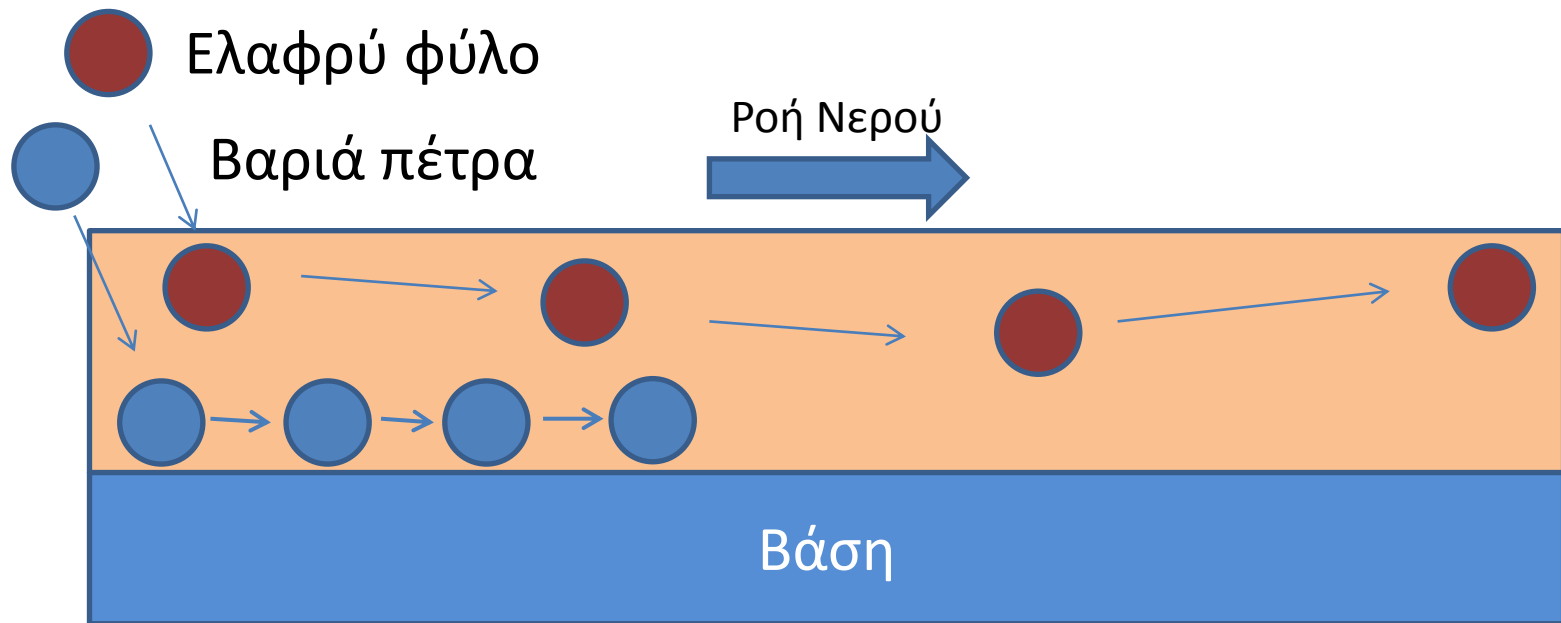
Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Κωνσταντίνα Μητάνη
Ακαδημαϊκή Υπότροφος, ΠΘ

Τι είναι η Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία αποτελεί μια ομάδα μεθόδων διαχωρισμού ανόργανων, οργανικών ή οργανο-μεταλλικών ενώσεων, με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες.

Βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των ουσιών ενός δείγματος μεταξύ μιας κινητής και μιας στατικής φάσης, ενώ ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών συγγένειας των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις.

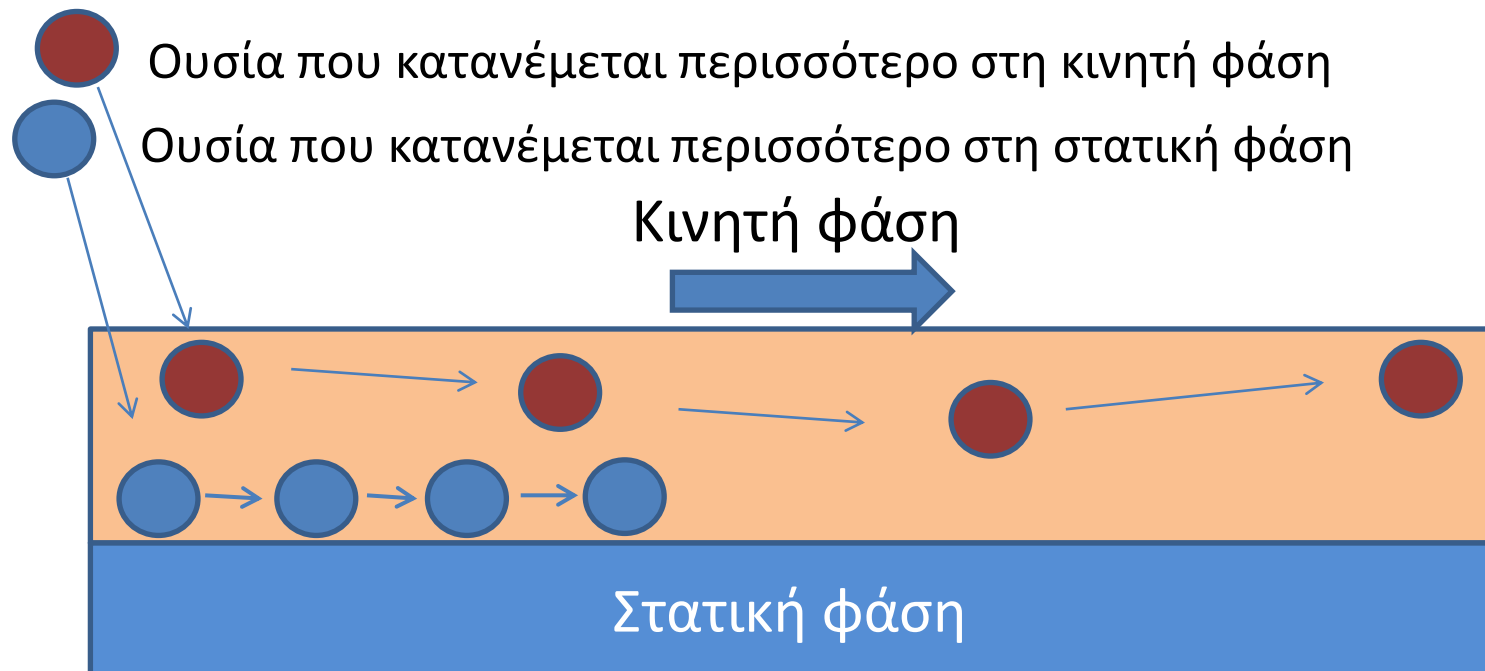


Η χρωματογραφία μοιάζει με τη ροή ενός ποταμού

Τι είναι η χρωματογραφία

Στη χρωματογραφία τα συστατικά ενός μείγματος μεταφέρονται διαμέσου μίας στατικής φάσης με τη βοήθεια της ροής μίας κινητής φάσης.

Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις. Αυτός οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του δείγματος σε ορισμένα φυσικά χαρακτηριστικά όπως π.χ. το μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα, την διαλυτότητα.



Αρχές χρωματογραφίας

Η **βάση** όλων των τύπων χρωματογραφίας είναι ο λεγόμενος **συντελεστής κατανομής (K_d)**, ο οποίος περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο μια ένωση κατανέμεται ανάμεσα σε δυο μη αναμίξιμες φάσεις, όπως είναι η στατική και η κινητή φάση.

$$K_d = C_S / C_M$$

- Είναι η **συγκέντρωση του συστατικού στη στατική φάση προς την συγκέντρωση του συστατικού στην κινητή φάση**
- Ο **διαχωρισμός στηρίζεται** στον **διαφορετικό συντελεστή κατανομής** των συστατικών ενός μίγματος σε ένα ορισμένο σύστημα.

Χρωματογραφία: ιστορικά στοιχεία

Εφευρέτης της χρωματογραφίας ήταν ο εξαιρετικά παρατηρητικός Ρώσος βοτανολόγος **Μιχαήλ Σεμιόνοβιτς Τσβετ** (Tswett, 1872- 1919)

Το 1906, κατάφερε να διαχωρίσει τις **βασικές χρωστικές των φυτικών κυττάρων** όπως είναι οι χλωροφύλλες (πράσινο χρώμα), τα καροτένια (πορτοκαλί χρώμα) και οι ξανθοφύλλες (κίτρινου χρώματος)

- Μέσο: **Γυάλινη στήλη**
- Ως στατική φάση: **CaCO_3**
- Κινητή φάση: **Πετρελαϊκός αιθέρας/ αιθανόλη**

Οι ενώσεις που περιέχονταν στο δείγμα, **κατανέμονταν διαφορετικά μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης**, γεγονός που τις οδήγησε στο να κινούνται με **διαφορετική ταχύτητα και να διαχωριστούν εξερχόμενες από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές**

Επειδή η χρωματογράφιση ενός τέτοιου μίγματος οδήγησε σε εμφάνιση **ζωνών διαφορετικού χρώματος**, ονόμασε την τεχνική «**χρωματογραφία**»



Εφαρμογές Χρωματογραφίας

Σήμερα η χρωματογραφία αποτελεί την καλύτερη τεχνική:

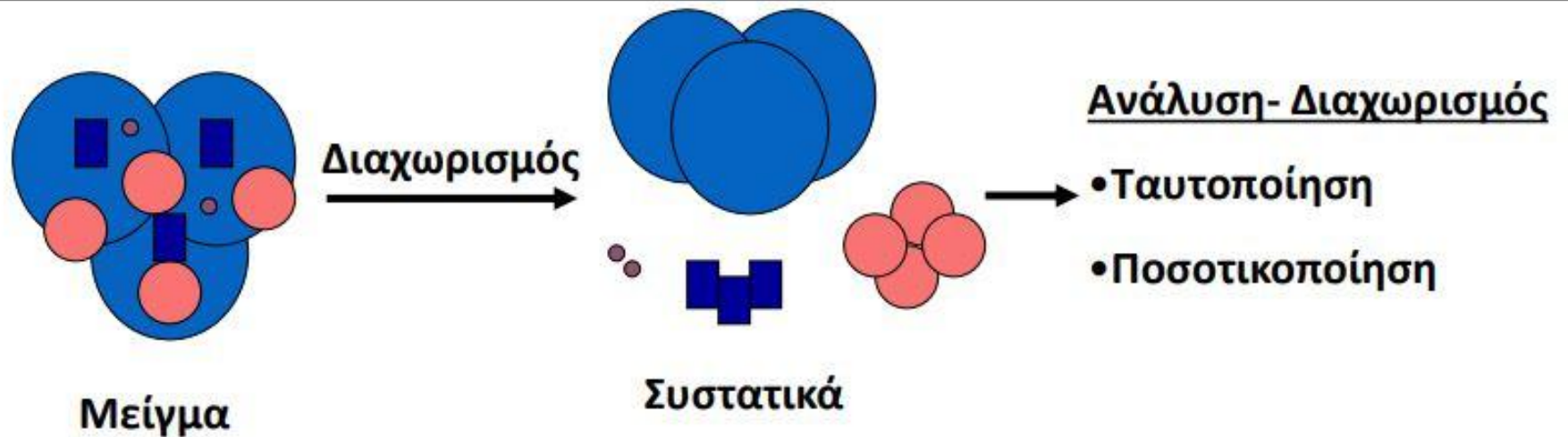
- Διαχωρισμού και αναλύσεως πολύπλοκων μειγμάτων
- Απομόνωσης ευπαθών ουσιών, έγχρωμων και άχρωμων

Βιομόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως αμινοξέα, ολιγοπεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες και διάφορα είδη λιπιδίων που βρίσκονται στο αίμα ή λοιπές βιολογικές εκκρίσεις ή σε διαλύματα υγρών, ανιχνεύονται, διαχωρίζονται και ποσοτικοποιούνται σε σύντομο χρόνο με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων.

Εφαρμογές στη Χημεία και Άλλες Επιστήμες:

Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακευτική, Επιστήμη Περιβάλλοντος, Επιστήμη Τροφίμων, Γεωπονία

Στόχος της Χρωματογραφίας



Είδη χρωματογραφίας

Ορισμός κατά [International Union of Pure and Applied Chemistry \(IUPAC\)](#): Χρωματογραφία είναι η φυσική μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία **τα διαχωριζόμενα συστατικά κατανέμονται σε δύο φάσεις**, μία είναι στάσιμη ακίνητη (στατική φάση) ενώ η άλλη (κινητή φάση) κινείται σε καθορισμένη διεύθυνση

- A. Με βάση **το είδος της κινητής και της στατικής φάσης**
- B. Με βάση **τη χωροταξία της στατικής φάσης** (chromatographic bed)
(Λεπτής στοιβάδας, χάρτου, στήλης)
- C. Με βάση **το μηχανισμό διαχωρισμού**

A. Χρωματογραφία: Κατάταξη με βάση το είδος της κινητής φάσης

- Η κινητή φάση μπορεί να **είναι υγρή ή αέρια** και **κινείται** **διαμέσου** και **κατά μήκος της στατικής φάσης**.
- Η **στατική φάση** (ή ακίνητη) μπορεί να είναι **στερεή** (στρώμα στερεού) ή **υγρή** (στρώμα υγρού), ακινητοποιημένη επάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα.

Για την αέριο χρωματογραφία:

- αερίου-υγρού (GLC)
- Αερίου-στερεού (GSC)

Για την υγρή χρωματογραφία

- υγρού-υγρού (LLC)
- υγρού-στερεού (LSC)

		Κινητή φάση		
		Αέρια	Υγρή	Στερεά
Στατική Φάση	Αέρια			
	Υγρή	Αέριος Χρωματογραφία	Υγρή χρωματογραφία	
	Στερεά			

Β. Κατάταξη με βάση τη χωροταξία της στατικής φάσης (chromatographic bed)

- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC, Thin Layer chromatography) - η στατική φάση είναι ένα λεπτό στρώμα απορροφητικού υλικού στρωμένου σε μία πλάκα (silica gel or alumina)
- Χρωματογραφία χάρτου (PC, Paper chromatography) – η στατική φάση είναι ένα διηθητικό χαρτί επενδεδυμένο με κυτταρίνη
- Χρωματογραφία στήλης (CC, Column chromatography) - η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος, TLC

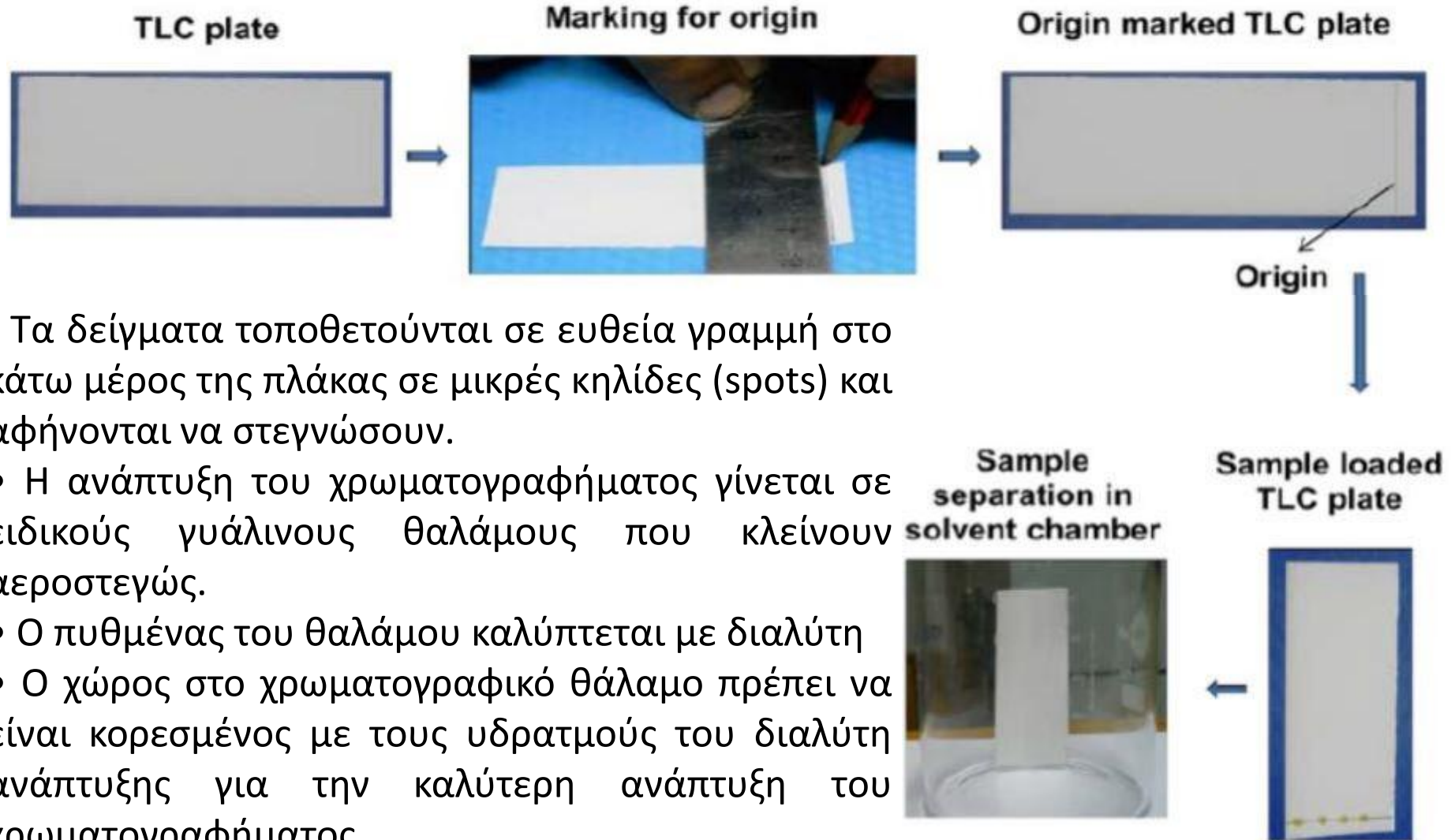
κινητή φάση = υγρή

στατική φάση = λεπτό στρώμα προσροφητικού υλικού – adsorbent material- (silica gel or alumina, πάχους περίπου 0.25mm) στρωμένου σε μία πλάκα.

- Η πλάκα TLC παρασκευάζεται με ανάμιξη του πήγματος πυριτίας (silica gel) με θεικό ασβέστιο (συνδετικό υλικό) και νερό. Το μίγμα απλώνεται σε ένα αδρανές φύλλο όπως γυαλί, αλουμινόχαρτο ή πλαστικό και ξηραίνεται σε ένα φούρνο. Η αλουμίνα (οξείδιο του αργιλίου) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί αντί του διοξειδίου του πυριτίου.

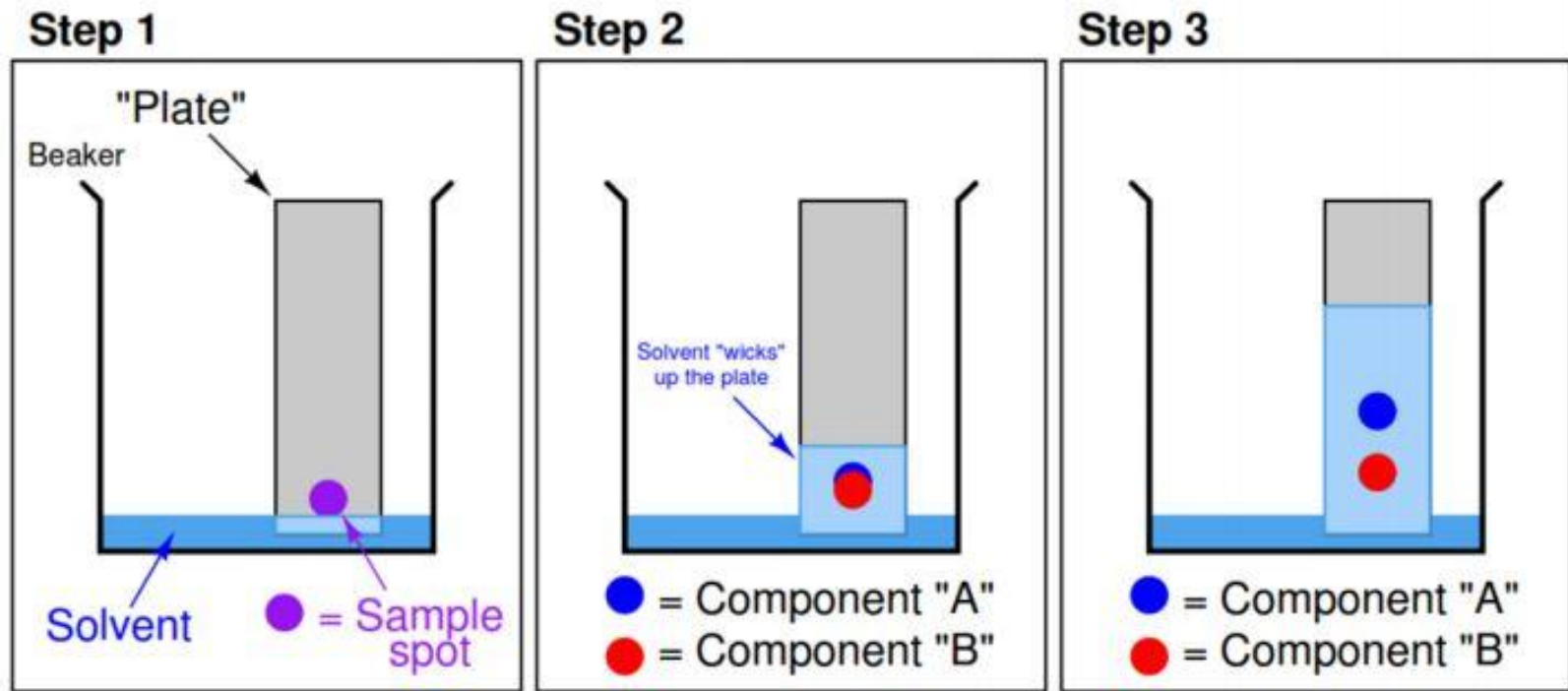
- Το πυρίτιο στην επιφάνεια της TLC περιέχει δεσμό Si-O-H και η επιφάνεια της TLC γίνεται πολύ πολική λόγω της ομάδας -OH. Έτσι οι ενώσεις μπορούν να σχηματίσουν δεσμό υδρογόνου ή μπορούν να αλληλεπιδρούν με δυνάμεις van der Waals και διπόλου-διπόλου.

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος, TLC



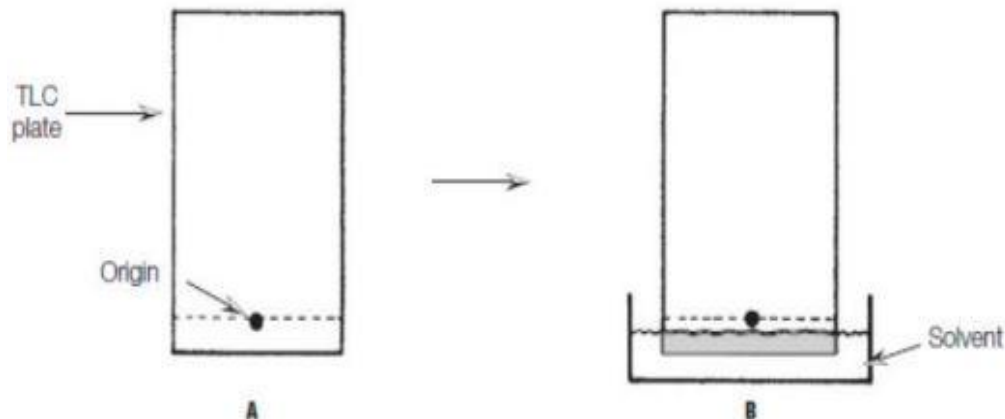
- Τα δείγματα τοποθετούνται σε ευθεία γραμμή στο κάτω μέρος της πλάκας σε μικρές κηλίδες (spots) και αφήνονται να στεγνώσουν.
- Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος γίνεται σε ειδικούς γυάλινους θαλάμους που κλείνουν αεροστεγώς.
- Ο πυθμένας του θαλάμου καλύπτεται με διαλύτη
- Ο χώρος στο χρωματογραφικό θάλαμο πρέπει να είναι κορεσμένος με τους υδρατμούς του διαλύτη ανάπτυξης για την καλύτερη ανάπτυξη του χρωματογραφήματος.
- Τοποθετούμε τη χρωματογραφική πλάκα με τις κηλίδες των δειγμάτων εντός του θαλάμου και αφήνουμε το χρωματογράφημα να αναπτυχθεί.

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος, TLC



Κάθε συστατικό του αναλυόμενου μίγματος παρασύρεται από τον διαλύτη της κινούμενης φάσης με διαφορετική ταχύτητα. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση (πολικά) κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης (μη πολική). Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση (μη πολικά), κινούνται ταχύτερα.

Ως μέτρο της ταχύτητας με την οποία κάθε ουσία κινείται πάνω στο χαρτί, λαμβάνεται ο λόγος της απόστασης της ουσίας από το σημείο εκκίνησης προς την απόσταση που διάνυσε το μέτωπο του διαλύτη από το σημείο εκκίνησης



$$R_f = \frac{\text{απόσταση της ουσίας από το σημείο εκκίνησης, } X}{\text{απόσταση του διαλύτη από το σημείο εκκίνησης, } Y}$$

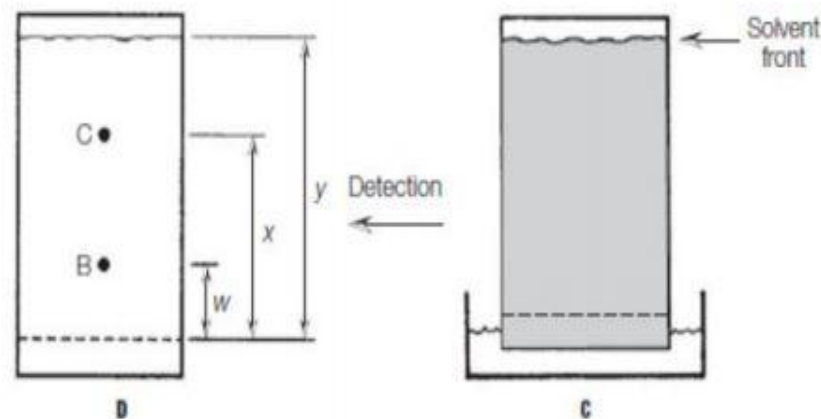
↓
Solvent development

(R_f = συντελεστής κατακράτησης)
Retention Factor

Η ταυτοποίηση γίνεται με σύγκριση του R_f της άγνωστης ουσίας με R_f καθαρών και γνωστών ουσιών, που αναλύονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

$$\text{For B, } R_f = \frac{w}{y}$$

$$\text{For C, } R_f = \frac{x}{y}$$



Εμφάνιση του Χρωματογραφήματος

Η θέση των κηλίδων καθορίζεται αμέσως όταν οι κηλίδες είναι έγχρωμες

Άχρωμες κηλίδες γίνονται ορατές:

- Με παρατήρηση στο υπεριώδες φως(UV)

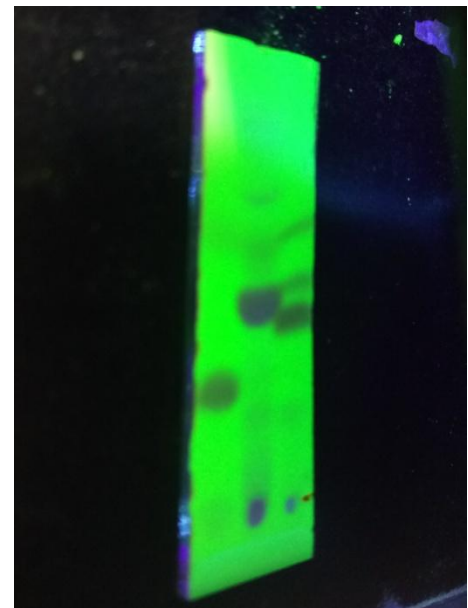
Συχνά μια μικρή ποσότητα φθορίζουσας ένωσης προστίθεται στο silica gel που επιτρέπει την απεικόνιση των κηλίδων υπό φως UV (254 nm). Η πλάκα θα φθορίζει επομένως πράσινο από μόνη της, αλλά τα σημεία της αναλυόμενης ουσίας θα καταστέλλουν τον φθορισμό.

- Με ψεκασμό των πλακών με διαλύματα διαφόρων ουσιών, που αντιδρούν με τα άχρωμα συστατικά των κηλίδων και δίνουν έγχρωμες ουσίες

Εμφάνιση του Χρωματογραφήματος



Με ατμούς ιωδίου



Με UV

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος, TLC

Πλεονεκτήματα

- **Απλή και φθηνή** τεχνική
- Μεγάλη **ευελιξία**. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση οποιοσδήποτε διαλύτης διαλύει τις προς ανάλυση ουσίες, ρυθμιστικά διαλύματα οποιουδήποτε pH, ακόμη και ισχυρά αντιδραστήρια, δεδομένου ότι οι πλάκες που αποτελούν την στατική φάση είναι αναλώσιμα προϊόντα και χρησιμοποιούνται μια μόνο φορά. Επίσης δυνατότητα επιλογής και του τρόπου ανάπτυξης της χρωματογραφίας
- **Δεν υπάρχει παρεμπόδιση** από δείγματα προηγούμενων αναλύσεων.

Μειονεκτήματα

- **Λιγότερο επαναλήψιμα αποτελέσματα**, τα οποία συχνά εξαρτώνται από την εμπειρία και δεξιότητα του αναλυτή.
- **Χαμηλότερη ευαισθησία** από την HPLC.
- **Δυσκολία στον έλεγχο και σταθεροποίηση** των πειραματικών συνθηκών.

Οπτικοακουστικό Υλικό

<https://www.youtube.com/watch?v=qdmKGskCyh8>

<https://www.youtube.com/watch?v=rMGQavOMAmc>