

## Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

### 8.1 Εισαγωγή

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (*Thin-Layer Chromatography*, TLC) είναι μια πολύ σημαντική τεχνική για τον ταχύτατο διαχωρισμό και την ποσοτική ανάλυση μικρών ποσοτήτων υλικού. Εφαρμόζεται στην ανάλυση μιγμάτων και προϊόντων αντίδρασης σε μικρής κλίμακας και μικροκλίμακας πειράματα. Η τεχνική αυτή είναι στενά συνδεδεμένη με τη χρωματογραφία στήλης. Στην πραγματικότητα, η TLC μπορεί να θεωρηθεί απλά ως *ανάστροφη* χρωματογραφία στήλης, με το διαλύτη να ανέρχεται αντί να κατέρχεται.

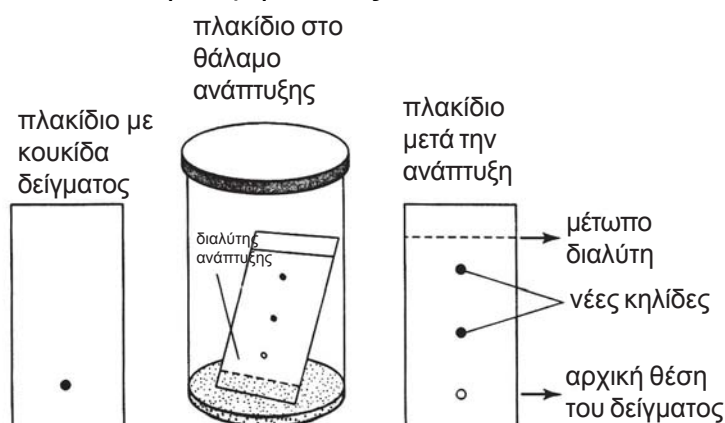
### 8.2 Αρχές Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας.

Όπως η χρωματογραφία στήλης, η TLC είναι μια τεχνική κατανομής υγρού-στερεού. Αλλά, η μετακινουμένη υγρή φάση δεν επιτρέπεται να διεισδύει σε βάθος στο προσροφητικό; αντίθετα, υποχρεώνεται να ανέρχεται σε μια λεπτή στοιβάδα του προσροφητικού που επενδύει μια επιφάνεια στήριξης. Η πλέον τυπική επιφάνεια στήριξης είναι ένα γυάλινο πλακίδιο, αλλά και άλλα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Μια λεπτή στοιβάδα του προσροφητικού επαλείφεται στο πλακίδιο και αφήνεται να ξηρανθεί. Ένα επικαλυμμένο και ξηρό πλακίδιο γυαλιού αποτελεί το πλακίδιο λεπτής στοιβάδας. Όταν ένα πλακίδιο λεπτής στοιβάδας τοποθετείται κατακόρυφα σε ένα δοχείο που περιέχει μια αβαθή στοιβάδα διαλύτη, ο διαλύτης ανέρχεται στη στοιβάδα του προσροφητικού στο γυαλί λόγω της τριχοειδούς δράσης.

Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, το δείγμα τοποθετείται στο πλακίδιο πριν ο διαλύτης επιτραπεί να ανέλθει στη στοιβάδα του προσροφητικού. Το δείγμα συνήθως τοποθετείται ως μια μικρή κηλίδα στη βάση του πλακιδίου (Εικόνα 8.1). Το πλακίδιο γεμίζει κηλίδες με διαδοχικές τοποθετήσεις διαλύματος του δείγματος με τη βοήθεια μιας τριχοειδούς πιπέτας. Όταν η γεμάτη πιπέτα ακουμπά το πλακίδιο, η τριχοειδής δράση απελευθερώνει το περιεχόμενο της στο πλακίδιο, και μια μικρή κηλίδα δημιουργείται.

Καθώς ο διαλύτης ανέρχεται στο πλακίδιο, το δείγμα κατανέμεται μεταξύ της κινουμένης υγρής φάσης και της στατικής στερεής φάσης (Εικόνα 8.1). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, εσείς αναπτύσσετε ή τρέχετε, το πλακίδιο λεπτής στοιβάδας. Στην ανάπτυξη, τα διάφορα συστατικά του τοποθετηθέντος μίγματος διαχωρίζονται. Ο διαχωρισμός οφείλεται στο γεγονός ότι η διαλυμένη ουσία υπόκειται σε πολλές ισορροπίες που αναπτύσσονται μεταξύ της κινούμενης και της στατικής φάσης. Όπως και στη χρωματογραφία στήλης, το λιγότερο πολικό συστατικό προχωρεί γρηγορότερα από το περισσότερο πολικό συστατικό. Ο διαχωρισμός είναι το αποτέλεσμα της διαφοράς των ταχυτήτων με τις οποίες τα διάφορα

συστατικά του μίγματος προχωρούν ανοδικά στο πλακίδιο. Κάθε μια από τις πολλές ενώσεις που αποτελούν το μίγμα έχει τις δικές της χαρακτηριστικές ιδιότητες διάλυσης και προσρόφησης, που εξαρτώνται από τις χαρακτηριστικές ομάδες της ένωσης. Γενικά, η στατική φάση είναι ισχυρά πολική και ισχυρά δεσμεύει πολικές ενώσεις. Η κινούμενη υγρή φάση είναι συνήθως λιγότερο πολική από ότι το προσροφητικό και πολύ εύκολα διαλύει τις ενώσεις που είναι λιγότερο ή καθόλου πολικές. Έτσι, ενώσεις που είναι περισσότερο πολικές προχωρούν πολύ αργά ανοδικά, ή καθόλου, ενώ μη πολικές ενώσεις μετακινούνται πολύ γρήγορα όταν ο διαλύτης είναι ικανοποιητικά μη πολικός.



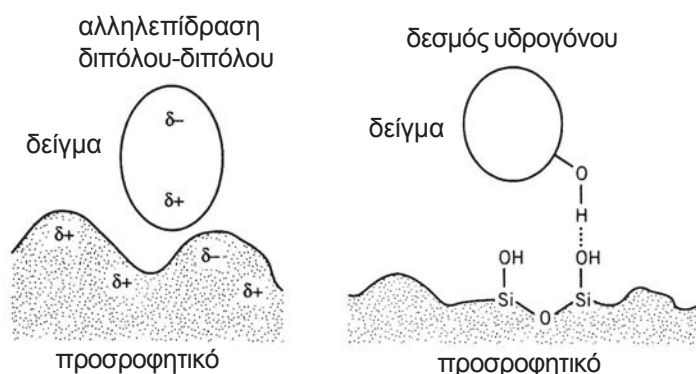
**Εικόνα 8.1** Ένα TLC πλακίδιο πριν, κατά τη διάρκεια, και μετά την αλληλεπίδραση με το διαλύτη ανάπτυξης

Όταν το πλακίδιο λεπτής στοιβάδας έχει αναπτυχθεί, απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης και αφήνεται να ξηραθεί έως ότου ο διαλύτης απομακρυνθεί. Αν το μίγμα που αρχικά τοποθετήθηκε στο πλακίδιο έχει διαχωριστεί, θα υπάρχει μια κάθετη σειρά κηλίδων στο πλακίδιο. Κάθε κηλίδα αντιστοιχεί σε μια διαχωρισθείσα ένωση του αρχικού μίγματος. Αν τα συστατικά του μίγματος είναι έγχρωμες ενώσεις, οι διάφορες κηλίδες θα είναι ορατές μετά από την ανάπτυξη. Πολύ συχνά όμως, οι κηλίδες δεν είναι ορατές γιατί αντιστοιχούν σε άχρωμες ενώσεις. Αν οι κηλίδες δεν είναι ορατές, μπορούν να γίνουν ορατές μόνο με τη χρήση μεθόδου εμφάνισης. Συχνά, οι κηλίδες μπορούν και βλέπονται όταν το πλακίδιο τοποθετείται σε υπεριώδες φως; η λάμπα υπεριώδους είναι μια κοινή μέθοδος εμφάνισης. Επίσης κοινή είναι και η χρήση ατμών ιωδίου. Τα πλακίδια τοποθετούνται σε ένα θάλαμο που περιέχει κρυστάλλους ιωδίου και αφήνονται για μικρό διάστημα. Το ιώδιο αντιδρά με τις διάφορες ενώσεις που είναι απορροφημένες στο πλακίδιο και δίνει έγχρωμα σύμπλοκα που είναι εύκολα ορατά. Επειδή το ιώδιο συχνά αλλάζει τις διάφορες ενώσεις με αντίδραση, τα συστατικά του μίγματος δεν μπορεί να επανακτηθούν όταν θα χρησιμοποιηθεί ιώδιο.

### 8.3 Η διαδικασία της προσρόφησης

Η **προσρόφηση** είναι η διαδικασία κατά την οποία μόρια ενός αερίου, υγρού, ή στερεού σε διάλυμα αλληλεπιδρούν με την *επιφάνεια ενός στερεού*, που καλείται προσροφητικό. Η

προσρόφηση είναι καθαρά ένα επιφανειακό φαινόμενο που εξαρτάται από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ του προσροφητικού και του δείγματος. Αυτές οι δυνάμεις προέρχονται από αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, ιόντος-διπόλου και δεσμών υδρογόνου. Η επιφάνεια ενός προσροφητικού δεν είναι λεία, διαθέτει ασυνέχειες, ρωγμές, λόφους με κέντρα θετικών και αρνητικών φορτίων. Το δείγμα δεσμεύεται στο προσροφητικό διαμέσου ηλεκτροστατικών έλξεων μεταξύ των κέντρων φορτίων του με εκείνα τα φορτία που βρίσκονται στην επιφάνεια του προσροφητικού. Οι θέσεις της επιφάνειας του προσροφητικού όπου το δείγμα συνδέεται καλούνται περιοχές σύνδεσης (Εικόνα 8.2). Ιόντα και ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή ταχύτατα δεσμεύονται με το προσροφητικό.



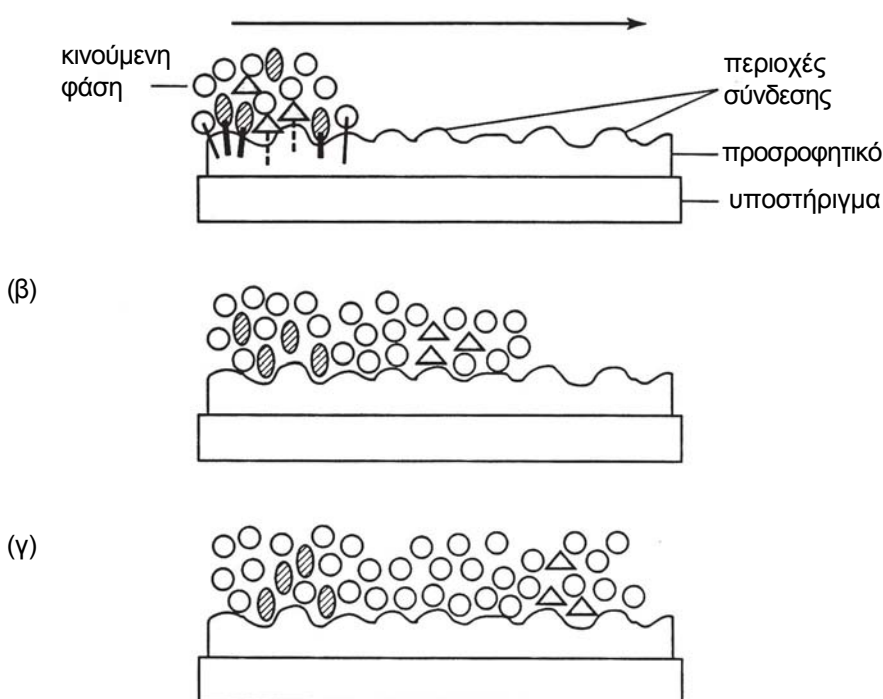
**Εικόνα 8.2** Περιοχές σύνδεσης προσροφητικού που δείχνουν δύο είδη αλληλεπιδράσεων: διπόλου-διπόλου και δεσμού υδρογόνου

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα TLC προσροφητικά είναι το διοξείδιο του πυριτίου και η αλουμίνα. Το διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$  με έναν απροσδιόριστο αριθμό μορίων ύδατος) λαμβάνεται από την υδρόλυση των πυριτικών αλάτων. Έχει πολωμένους Si-O και O-H δεσμούς που αλληλεπιδρούν με τα δίπολα του δείγματος. Μπορεί επίσης να δημιουργήσει δεσμούς υδρογόνου, ειδικά με ενώσεις όπως είναι οι αλκοόλες (R-OH), φαινόλες (Ar-OH), αμίνες (R-NH<sub>2</sub>), αμίδια (R-CO-NHR'), και καρβοξυλικά οξέα (R-COOH). Η αλουμίνα είναι το οξείδιο του αργιλίου ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  με έναν απροσδιόριστο αριθμό μορίων ύδατος) που λαμβάνεται από την αφυδάτωση του υδροξειδίου του αργιλίου. Και η αλουμίνα και το διοξείδιο του πυριτίου είναι διαθέσιμα με διαφορετικά μεγέθη μορίων. Οι τύποι που χρησιμοποιούνται κανονικά για TLC έχουν μια μέση διάμετρο περίπου 0.025 mm με ευρεία κατανομή; μερικά μόρια είναι τόσο μικρά με διάμετρο 0.005 mm και άλλα τόσο μεγάλα με διάμετρο 0.045 mm.

Για να καταλάβουμε πως λειτουργεί ο διαχωρισμός στην επιφάνεια του προσροφητικού, θα πρέπει να εξετάσουμε εκτενέστερα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του προσροφητικού και του δείγματος και μεταξύ του προσροφητικού και της κινούμενης φάσης. Στην ακόλουθη συζήτηση θα υποθέσουμε ότι η κινούμενη φάση διαλύει εξίσου καλά όλα τα συστατικά του δείγματος για το οποίο έχει τις παρόμοιες συγγένειες. Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κινούμενης φάσης και των διαφορετικών διαλυτών ουσιών μπορούν να θεωρηθούν αρκετά παρόμοιες και όχι κρίσιμες για το διαχωρισμό.

Η Εικόνα 8.3α που είναι μια κοντινή άποψη της διατομής ενός TLC πλακιδίου επιδεικνύει τις αλληλεπιδράσεις στην επιφάνεια του προσροφητικού. Το δείγμα έχει δύο διαφορετικά συστατικά, που αντιπροσωπεύονται από ωειδή και τριγωνικά μέρη. Τα μόρια του διαλύτη απεικονίζονται ως κύκλοι. Επειδή υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός περιοχών σύνδεσης στην επιφάνεια του προσροφητικού, η *διαλυτή ουσία και τα μόρια κινούμενης φάσης πρέπει να ανταγωνιστούν* το ένα με το άλλο για να δεσμευθούν στο προσροφητικό; όσο ισχυρότερες είναι οι αλληλεπιδράσεις, τόσο σφιχτότερη είναι η σύνδεση. Στην Εικόνα 8.3α, το πάχος των γραμμών δείχνει τη δύναμη των αλληλεπιδράσεων.

(α)



(β)

(γ)

**Εικόνα 8.3** Διαχωρισμός δύο ενώσεων σε ένα TLC πλακίδιο (ωειδή και τρίγωνα). Το βέλος δείχνει την κατεύθυνση της κινούμενης φάσης.

Τα ωειδή μόρια έχουν μια πολύ ισχυρή αλληλεπίδραση με το προσροφητικό όπως υποδεικνύεται από την πολύ παχιά γραμμή, ενώ τα τρίγωνα έχουν μια πιο αδύνατη αλληλεπίδραση όπως παρουσιάζεται από τη διακεκομμένη γραμμή. Τα μόρια κινούμενης φάσης, έχουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση από τα τρίγωνα, αλλά πιο αδύνατη από ωειδή. Καθώς η κινούμενη φάση ανέρχεται κατά μήκος του πλακιδίου, *τα μόρια κινούμενης φάσης που βρίσκονται κοντά στο προσροφητικό ανταγωνίζονται με τις διαλυτές ουσίες για τις περιοχές σύνδεσης*. Αν η αλληλεπίδραση μεταξύ της κινούμενης φάσης και του προσροφητικού είναι ισχυρότερη από την αλληλεπίδραση μεταξύ του προσροφητικού και των διαλυτών ουσιών, όπως στην περίπτωση των τριγωνικών μορίων, η κινούμενη φάση μετατοπίζει τα μόρια της διαλυτής ουσίας από την περιοχή σύνδεσης τους, μακρύτερα από την επιφάνεια του προσροφητικού. Καθώς η κινούμενη φάση συνεχίζει να ανέρχεται, αυτά τα μόρια της διαλυτής ουσίας φέρονται σε μια νέα θέση στο πλακίδιο (Εικόνα 8.3β). Επειδή η κινούμενη φάση έχει

ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το προσροφητικό, τα τριγωνικά μόρια δεν δεσμεύονται αποτελεσματικά και συνεχίζουν κατά μήκος του πλακιδίου με υψηλή ταχύτητα. Στο τέλος της χρωματογραφικής ανάπτυξης, τα τριγωνικά μόρια βρίσκονται κοντά στο μέτωπο του διαλύτη (Εικόνα 8.3γ).

Αν η αλληλεπίδραση μεταξύ της διαλυτής ουσίας και του προσροφητικού είναι ισχυρότερη από την αλληλεπίδραση μεταξύ της κινούμενης φάσης και του προσροφητικού, η κινούμενη φάση κινεί ακόμα τη διαλυτή ουσία στην κατεύθυνση της ροής. Αυτό είναι ένα αποτέλεσμα της μαζικής δράσης των μορίων κινούμενης φάσης, όντας πιά πολυάριθμα από τα μόρια της διαλυτής ουσίας, μετατοπίζουν τελικά τα μόρια της διαλυτής ουσίας από τις περιοχές σύνδεσής τους, ακόμα κι αν η διαλυτή ουσία έχει την ισχυρότερη συγγένεια με το προσροφητικό. Εντούτοις, όσο ισχυρότερη η αλληλεπίδραση μεταξύ του προσροφητικού και της διαλυτής ουσίας, τόσο δυσκολότερα ο διαλύτης μπορεί να κινήσει τη διαλυμένη ουσία. Όπως φαίνεται Εικόνα 8.3γ τα ωειδή μόρια, που επιδεικνύουν την ισχυρότερη συγγένεια με το προσροφητικό, μένουν πολύ κοντά εκεί που αρχικά είχαν τοποθετηθεί.

## **8.4 Πλακίδια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας**

### **8.4.1 Εμπορικά διαθέσιμα TLC πλακίδια.**

Ο πιο εύχρηστος τρόπος είναι η χρήση TLC πλακιδίων που είναι εμπορικά διαθέσιμα και πωλούνται σε έτοιμη-προς χρήση μορφή. Πολλοί κατασκευαστές διαθέτουν γυάλινα πλακίδια επικαλυμμένα με μια σταθερή στοιβάδα αλουμίνας ή silica gel. Σε μια ευκολότερη-για χρήση-μορφή, τα πλακίδια είναι διαθέσιμα με πλαστική ή αλουμινένια επιφάνεια στήριξης. Οι πιο κοινοί τύποι πλακιδίων αποτελούνται από πλαστικά φύλλα τα οποία είναι επικαλυμμένα με silica gel και πολυακρυλικό οξύ, το οποίο χρησιμεύει ως συγκολλητικό. Ένας φθορίζον δείκτης μπορεί να έχει αναμειχθεί με το silica gel. Ο δείκτης εμφανίζει τις κηλίδες που οφείλονται σε ενώσεις του μίγματος με τη χρήση του υπεριώδους φωτός. Αν και τα πλακίδια αυτά είναι ακριβά σε σχέση με τα πλακίδια που παρασκευάζονται στο εργαστήριο, είναι πολύ πιο εύκολα στη χρήση, και παρέχουν πολύ πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Τα πλακίδια κατασκευάζονται σχεδόν ομοιόμορφα. Λόγω της ελαστικής πλαστικής πλάκας υποστήριξης, έχουν το πλεονέκτημα ότι η επίστρωση δεν κόβεται σε νιφάδες εύκολα. Τα πλαστικά ή τα αλουμινένια φύλλα μπορούν να κοπούν με το κατάλληλο ψαλίδι σε οποιοδήποτε μέγεθος.

### **8.4.2 Παρασκευή TLC πλακιδίων.**

Τα πλέον κοινά προσροφητικά που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι η aloumina G (οξειδίο του αργιλίου) και silica gel G (οξειδίο του πυριτίου). Η επισήμανση G σημαίνει ότι περιέχουν γύψο (θειικό ασβέστιο). Ο θερμανθείς γύψος  $\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  είναι ευρύτατα γνωστός ως *plaster of Paris*. Όταν εκτίθεται σε νερό ή υγρασία, ο γύψος μετατρέπεται στη σταθερή μορφή  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  που συνδέει το προσροφητικό και το

γυάλινο πλακίδιο που χρησιμοποιείται ως πλάκα υποστήριξης. Τα προσροφητικά που χρησιμοποιούνται στη TLC χρωματογραφία περιέχουν 10%-13% κατά βάρος γύψο ως συγκολλητικό. Τα προσροφητικά είναι κατά τα άλλα τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία στήλης, αλλά τα προσροφητικά της χρωματογραφίας στήλης έχουν μεγαλύτερο μέγεθος. Αντίθετα, το προσροφητικό υλικό της TLC χρωματογραφίας είναι μια λεπτή σκόνη. Το μικρό μέγεθος των κόκκων του προσροφητικού, όπως και ο πρόσθετος γύψος κάνουν ακατάλληλο το υλικό αυτό για χρωματογραφία στήλης. Σε μια στήλη, αυτά τα προσροφητικά θα δημιουργούσαν μια τόσο συμπαγή μάζα ώστε δεν θα περνούσε ο διαλύτης από τη στήλη.

**TLC πλακίδια μικροσκοπίου** Για την δουλειά ανίχνευσης όπως είναι η αναγνώριση των συστατικών ενός μίγματος ή ταυτοποίησης δύο ενώσεων, τα μικρά TLC πλακίδια που φτιάχνονται από τα πλακίδια μικροσκοπίου είναι ιδιαίτερα εύχρηστα. Αυτά τα πλακίδια φτιάχνονται πολύ εύκολα με τη βύθιση των πλακιδίων σε ένα δοχείο που περιέχει το προσροφητικό υλικό σε μορφή αιωρήματος. Αν και πολλοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του αιωρήματος, το διχλωρομεθάνιο είναι πιθανά η καλύτερη επιλογή. Έχει το πλεονέκτημα του χαμηλού σημείου ζέσης (40 °C) ενώ ταυτόχρονα δεν αφήνει το προσροφητικό να σβολιάσει. Το χαμηλό σημείο ζέσης σημαίνει ότι δεν χρειάζεται τα πλακίδια να ξηρανθούν σε φούρνο, ενώ η μη ικανότητα του να επιτρέψει το γύψο να συγκολληθεί σημαίνει ότι το αιώρημα είναι σταθερό για αρκετές μέρες. Αλλά η στοιβάδα του προσροφητικού που δημιουργείται είναι εύθραυστη και πρέπει να χρησιμοποιείται προσεκτικά. Για αυτό το λόγο, μερικοί άνθρωποι προτιμούν να προσθέσουν μια μικρή ποσότητα μεθανόλης στο διχλωρομεθάνιο έτσι ώστε να επιτρέψουν το γύψο να συγκρατηθεί πιο ισχυρά. Η μεθανόλη επιδιαλυτώνει το θειικό ασβέστιο όπως το κάνει το νερό. Πιο σταθερά πλακίδια μπορούν να γίνουν βυθίζοντας τα πλακίδια σε αιώρημα που παρασκευάζεται με νερό. Σε αυτή τη περίπτωση, αυτά τα πλακίδια πρέπει να ξηρανθούν πριν από τη χρήση τους. Επίσης, ένα αιώρημα σε νερό πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά από την παρασκευή του; αν όχι, τότε αρχίζουν να δημιουργούνται σβώλοι. Για τα πλακίδια μικροσκοπίου, ένα αιώρημα silica gel G σε διχλωρομεθάνιο είναι όχι μόνο εύκολο αλλά και κατάλληλο για τις περισσότερες χρήσεις.

**Παρασκευή του αιωρήματος.** Το αιώρημα παρασκευάζεται εύκολα σε ευρύλαιμα δοχεία με βιδωτό καπάκι. Περίπου 3 mL διχλωρομεθανίου απαιτούνται για κάθε ένα γραμμάριο silica gel G. Για ένα καλό αιώρημα χωρίς σβώλους, το silica gel πρέπει να προστεθεί στο διαλύτη ενώ το μίγμα αναδεύεται ή στροβιλίζεται. Η προσθήκη του διαλύτη στο προσροφητικό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία σβώλων στο μίγμα. Όταν η προσθήκη έχει τελειώσει, το καπάκι πρέπει να τοποθετηθεί στο δοχείο και το κλειστό δοχείο αναδεύεται ισχυρότατα για να επιτευχθεί ικανοποιητική ανάμιξη. Το αιώρημα πρέπει να αποθηκεύεται στο ερμητικά κλειστό δοχείο μέχρι τη χρησιμοποίησή του. Μερικές φορές πρέπει να προστεθεί περισσότερο διχλωρομεθάνιο για να αναπληρώσει τις απώλειες.

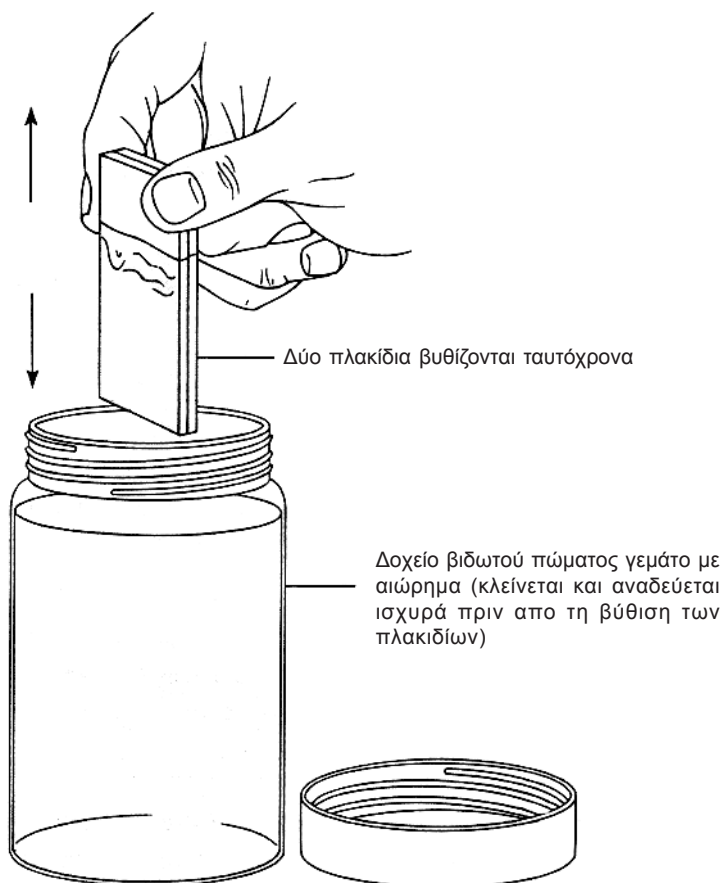
**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Να αποφεύγετε να αναπνέετε τη σκόνη του *silica gel* ή το διχλωρομεθάνιο, να παρασκευάσετε και να χρησιμοποιήσετε το αιώρημα στον απαγωγό, και να αποφεύγετε την επαφή του διχλωρομεθανίου ή του αιωρήματος με το δέρμα. Χρησιμοποιείτε πάντοτε προστατευτικά γάντια.

**Παρασκευή των πλακιδίων.** Αν τα πλακίδια μικροσκοπίου είναι διαθέσιμα, μπορείτε να τα χρησιμοποιήσετε απευθείας χωρίς καμία περαιτέρω κατεργασία. Είναι όμως οικονομικότερο να επαναχρησιμοποιήσετε τα πλακίδια μικροσκοπίου. Γιαυτό το λόγο θα πλύνετε τα πλακίδια με σαπούνι και νερό, θα τα ξεπλύνετε με νερό, και έπειτα θα τα πλύνετε με 50% υδατική μεθανόλη. Αφήνετε τα πλακίδια να ξηρανθούν σε χαρτί κουζίνας. Η χρησιμοποίησή τους πρέπει να γίνεται πιάνοντας τα από τις άκρες, επειδή τα δακτυλικά αποτυπώματα στη επιφάνεια του πλακιδίου δυσκολεύουν τη προσκόλληση του προσροφητικού στο γυαλί.

**Επικάλυψη των πλακιδίων.** Τα πλακίδια επικαλύπτονται με προσροφητικό με τη βύθιση τους σε ένα δοχείο που περιέχει το αιώρημα. Μπορείτε να επικαλύπτετε δύο πλακίδια ταυτόχρονα, πιάνοντας τα μαζί.

*Η διαδικασία επικάλυψης πρέπει να γίνεται στον απαγωγό με τη χρήση γαντιών.*

Αναδεύετε ισχυρά το αιώρημα πριν ακριβώς να βυθίσετε τα πλακίδια. Επειδή το αιώρημα κατακάθεται με την παραμονή, πρέπει να αναδεύετε με αυτόν το τρόπο κάθε φορά πριν τη βύθιση του ζεύγους των πλακιδίων. Το βάθος του αιωρήματος στο δοχείο πρέπει να είναι περίπου 7.5 εκατοστά, και τα πλακίδια πρέπει να βυθίζονται στο αιώρημα κατά τέτοιο τρόπο ώστε η περιοχή ύψους περίπου 0.5 cm από τη κορυφή να μην καλύπτεται. Η βύθιση των πλακιδίων πρέπει να πραγματοποιείται



**Εικόνα 8.4** Βύθιση πλακιδίων για επικάλυψη (χρήση γαντιών)

ήπια. Τα πλακίδια πρέπει να κρατιούνται απο την κορυφή (Εικόνα 8.4), απο την περιοχή που δεν θα καλυφθεί. Τα πλακίδια βυθίζονται και απομακρύνονται με μια αργή αλλά σταθερή κίνηση. Η διαδικασία βύθισης διαρκεί περίπου 2 δευτερόλεπτα. Κάποια πρακτική εξάσκηση χρειάζεται για να επιτευχθεί ο σωστός χρόνος. Μετά τη βύθιση, τοποθετείτε το καπάκι στο δοχείο, και κρατάτε τα πλακίδια για ένα λεπτό ώστε ο περισσότερος διαλύτης να εξατμιστεί. Διαχωρίζετε τα πλακίδια και τα αφήνετε πάνω σε χαρτί κουζίνας ώστε να ολοκληρωθεί η ξήρανση.

Τα πλακίδια πρέπει να είναι επακριβώς επικαλυμμένα; δεν θα πρέπει να υπάρχουν γραμμές και λεπτές κηλίδες όπου φαίνεται το γυαλί διαμέσου του προσροφητικού. Τα πλακίδια δεν θα πρέπει να έχουν λεπτή και κυματώδη επικάλυψη.

Δύο συνθήκες έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία λεπτών πλακιδίων γεμάτων γραμμές. Πρώτον, το αιώρημα θα μπορούσε να μην έχει αναμιχθεί καλά πριν τη διαδικασία βύθισης; το προσροφητικό μπορεί να έχει κατακαθίσει στο πάτο του δοχείου, και το λεπτό αιώρημα στη κορυφή του δοχείου δεν μπορεί να επικαλύψει σωστά τα πλακίδια. Δεύτερον, το αιώρημα απλά μπορεί να μην είναι αρκετά πυκνό; περισσότερο silica gel G πρέπει να προστεθεί στο αιώρημα ώστε να αποκτήσει τη σωστή σύσταση. Αν το αιώρημα είναι αρκετά πυκνό, η επικάλυψη των πλακιδίων θα είναι παχιά, γεμάτη γραμμές και κυματώδης. Για να διορθώσετε μια τέτοια κατάσταση, αραιώνετε το αιώρημα με αρκετό διαλύτη ώστε να πετύχετε τη κατάλληλη σύσταση.

Τα πλακίδια με την ακατάλληλη επικάλυψη μπορούν να σκουπιστούν με μαλακό χαρτί και να επαναχρησιμοποιηθούν. Να προσέχετε να πιάνετε τα πλακίδια πάντοτε απο τις άκρες, έτσι ώστε να αποφεύγετε τις δακτυλιές στην επιφάνεια του πλακιδίου.

Εναλλακτικά, επειδή αυτή η μεθοδολογία δεν ενεργοποιεί το γύψο-συγκολλητή, μπορείτε να χρησιμοποιήσετε νερό. Σε μια κωνική φιάλη θα ζυγίσετε μια ποσότητα προσροφητικού και θα προσθέσετε νερό.

α. για το silica gel G χρησιμοποιείται την 1:2 αναλογία silica gel G προς νερό.

Περίπου 2.5 gr silica gel και 5 gr νερό είναι κατάλληλα για αρχή.

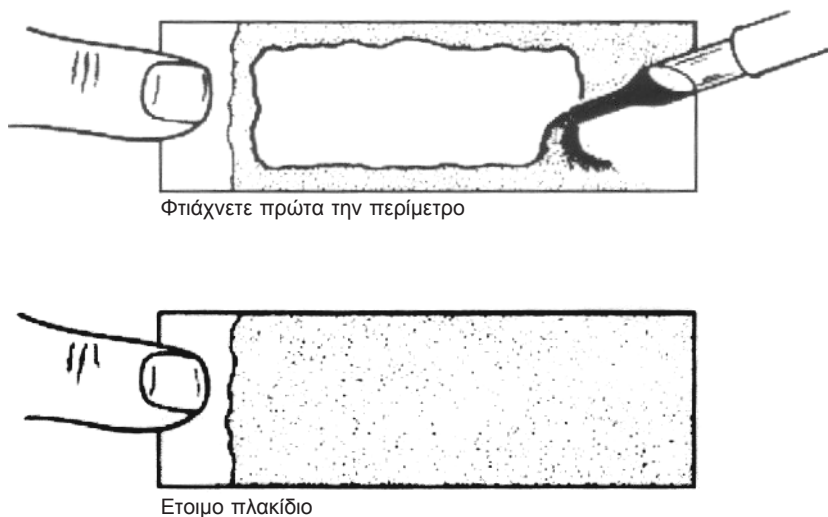
β. για την αλουμίνα G χρησιμοποιείται την 1: 1 αναλογία αλουμίνα G προς νερό.

Περίπου 2.5 gr αλουμίνα G και 2.5 gr νερό είναι κατάλληλα για αρχή.

Καλύπτετε τη φιάλη και αναδεύετε καλά έτσι ώστε όλη η ποσότητα του προσροφητικού να είναι υγρή. Αυτό το υλικό πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως. Για να απλώσετε το μίγμα θα χρησιμοποιήσετε ένα ιατρικό σταγονόμετρο (Εικόνα 8.5). Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιήσετε πιπέτες μιας χρήσης γιατί βουλώνουν πολύ εύκολα. Φτιάχνετε πρώτα τη στρώση στη περίμετρο του πλακιδίου και στη συνέχεια γεμίζετε τον ελεύθερο χώρο. Αφήνετε περίπου 0.5 cm απο τη κορυφή για να μπορείτε να πιάσετε το πλακίδιο. Αμέσως κτυπάτε ελαφρά το πλακίδιο στη βάση για να κάνετε όσο το δυνατόν πιο επίπεδη την επιφάνεια του προσροφητικού. Επαναλαμβάνετε τη διαδικασία σε όσα περισσότερα πλακίδια μπορείτε. Αφήνετε τα πλακίδια



να στεγνώσουν στην επιφάνεια. Επειτα αφήνονται στη ζεστή επιφάνεια του μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να ξηρανθούν. Προσοχή, αν η επιφάνεια είναι πολύ ζεστή, το νερό θα εξατμιστεί γρήγορα και θα αποτινάξει το προσροφητικό έξω από το πλακίδιο.

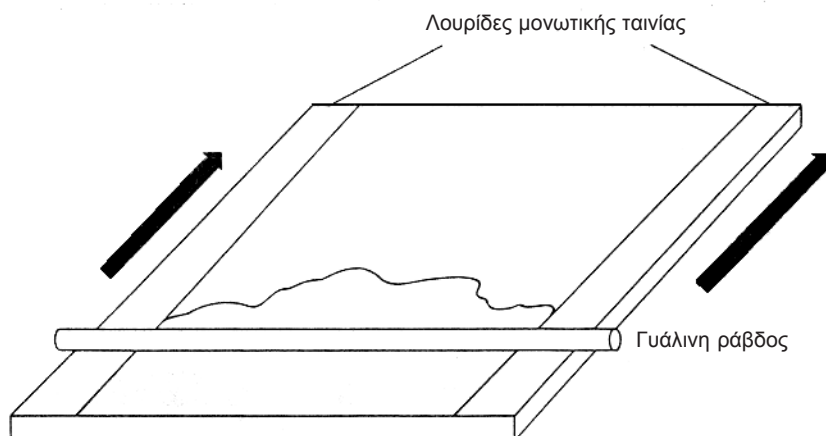


Εικόνα 8.5 Απλώνοντας προσροφητικό σε TLC πλακίδιο

### Μεγαλύτερα πλακίδια λεπτής στοιβάδας Για

διαχωρισμούς όπου χρησιμοποιούνται μεγαλύτερες ποσότητες υλικού, ή για δύσκολους διαχωρισμούς, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μεγαλύτερα πλακίδια λεπτής στοιβάδας. Πλακίδια με διαστάσεις 20-25 cm<sup>2</sup> είναι ευρύτατης χρήσης. Με τα μεγαλύτερα πλακίδια είναι επιθυμητό να έχουμε μεγαλύτερου πάχους επικάλυψη, και ένα υδατικό αιώρημα του προσροφητικού πρέπει να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή τους. Αν χρησιμοποιηθεί silica gel G, τότε το αιώρημα δημιουργείται με την αναλογία 1 gr silica gel G σε 2 mL νερό. Το πλακίδιο που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να έχει πλυθεί και να έχει ξηρανθεί. Τοποθετούμε δύο γραμμές μονωτικής ταινίας κατά μήκος των δύο ακρών της πλάκας. Θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε περισσότερες από μια γραμμή μονωτικής ταινίας αν μια παχύτερη επικάλυψη είναι επιθυμητή. Το αιώρημα παρασκευάζεται, αναδεύεται καλά, και χύνεται στα μη-προστατευμένα άκρα της πλάκας.

Ενα βαρύ κομμάτι γυαλίνης ράβδου, μεγαλύτερο από το πλάτος της πλάκας, χρησιμοποιείτε για να απλώσουμε το αιώρημα πάνω στη πλάκα. Ενώ η ράβδος ακουμπά τη μονωτική ταινία, σπρώχνουμε τη ράβδο από το άκρο όπου έχει τοποθετηθεί το αιώρημα προς το αντίθετο άκρο (Εικόνα 8.6). Μετά το άπλωμα του αιωρήματος, οι μονωτικές ταινίες

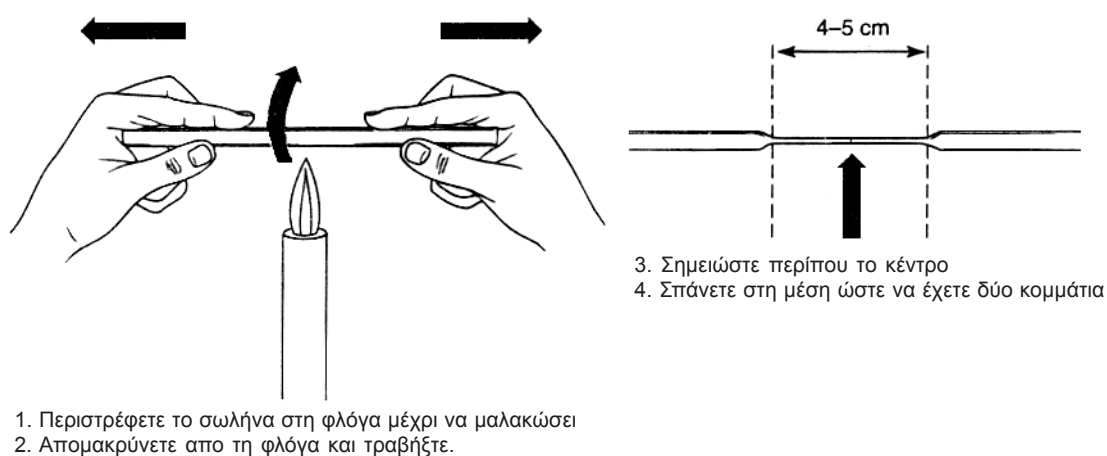


Εικόνα 8.6. Παρασκευή ενός μεγάλου πλακιδίου λεπτής στοιβάδας.

απομακρύνονται και οι πλάκες ξηραίνονται στους 110 °C για 1 ώρα περίπου. Πλάκες διαστάσεων 10-25 cm<sup>2</sup> παρασκευάζονται πολύ εύκολα με αυτόν τον τρόπο. Η παρασκευή μεγαλύτερων πλακών παρουσιάζει δυσκολίες. Πολλά εργαστήρια διαθέτουν μια αυτοματοποιημένη διάταξη για τη δημιουργία τέτοιων πλακών.

### Εφαρμογή του δείγματος: τοποθέτηση της κηλίδας στο πλακίδιο.

**Παρασκευή της μικροπιπέτας:** Για τη τοποθέτηση του δείγματος, που πρόκειται να διαχωρισθεί, στο πλακίδιο λεπτής στοιβάδας, κάποιος πρέπει να χρησιμοποιήσει μια μικροπιπέτα. Η μικροπιπέτα δημιουργείται πολύ εύκολα από ένα μικρό τριχοειδή σωλήνα όπως είναι αυτοί που χρησιμοποιούμε στο προσδιορισμό του σημείου τήξης. Ο τριχοειδής

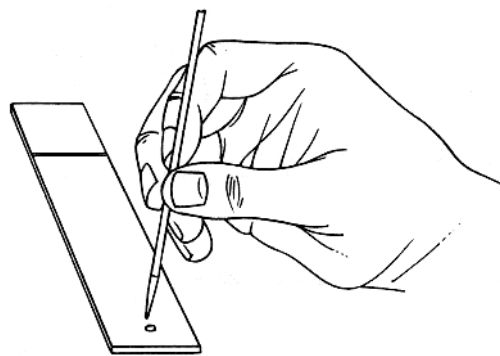


**Εικόνα 8.7** Κατασκευή τριχοειδούς σταγονομέτρου από σωλήνα σημείου τήξης

σωλήνας θερμαίνεται στο μέσο, με λύχνο, με ταυτόχρονη περιστροφή έως ότου μαλακώσει. Όταν ο σωλήνας είναι μαλακός, απομακρύνεται από τη φλόγα, ενώ το θερμανθέν τμήμα του σωλήνα εφελκείται προς τα έξω μέχρις ότου ένα συμπιεσμένο τμήμα 4-5 cm δημιουργηθεί. Μετά τη ψύξη, ο τριχοειδής σωλήνας κόβεται στη μέση και έτσι δημιουργούνται δύο τριχοειδείς μικροπιπέτες (Εικόνα 8.7).

**Τοποθέτηση της κηλίδας στο πλακίδιο** Για να τοποθετήσετε το δείγμα στο πλακίδιο, ξεκινήστε με τη τοποθέτηση περίπου 1 mg της στερεάς ένωσης ή μια σταγόνα μιας υγρής ένωσης σε ένα μικρό δοχείο ή δοκιμαστικό σωλήνα. Διαλύστε το δείγμα σε μερικές σταγόνες ενός πτητικού διαλύτη. Το διχλωρομεθάνιο είναι συνήθως ο κατάλληλος διαλύτης. Αν θέλετε να δοκιμάσετε διάλυμα, τότε αυτό μπορεί να γίνει απευθείας. Το μικρό τριχοειδές σταγονόμετρο που έχει κατασκευασθεί όπως περιγράφηκε, γεμίζεται με τη βύθιση του τραβηγμένου άκρου του στο διάλυμα που θα εξεταστεί. Αδειάζετε την πιπέτα με το άγγιγμα της ελαφρά στο πλακίδιο λεπτής στοιβάδας σε ένα σημείο περίπου 1 cm από τη βάση (Εικόνα 8.8). Η κηλίδα πρέπει να είναι τόσο ψηλά, ώστε να μην διαλύεται στο διαλύτη ανάπτυξης. Είναι σημαντικό να αγγίζετε το πλακίδιο πολύ ελαφριά και να μην δημιουργήσετε μια τρύπα στο προσροφητικό. Όταν η πιπέτα

ακουμπά το πλακίδιο, το διάλυμα μεταφέρεται στο πλακίδιο ως μια μικρή κηλίδα. Η πιπέττα πρέπει να ακουμπήσει το πλακίδιο για μικρό χρονικό διάστημα και έπειτα να απομακρυνθεί. Αν η πιπέττα συνεχίσει να ακουμπά το πλακίδιο, όλο το περιεχόμενο της πιπέττας θα μεταφερθεί στο πλακίδιο. Απαιτείται μόνο μικρή ποσότητα του δείγματος. Συχνά είναι απαραίτητο να φυσάτε στο πλακίδιο καθώς τοποθετείτε το δείγμα. Αυτό βοηθά στη δημιουργία



**Εικόνα 8.8.** Τοποθέτηση του δείγματος σε TLC πλακίδιο.

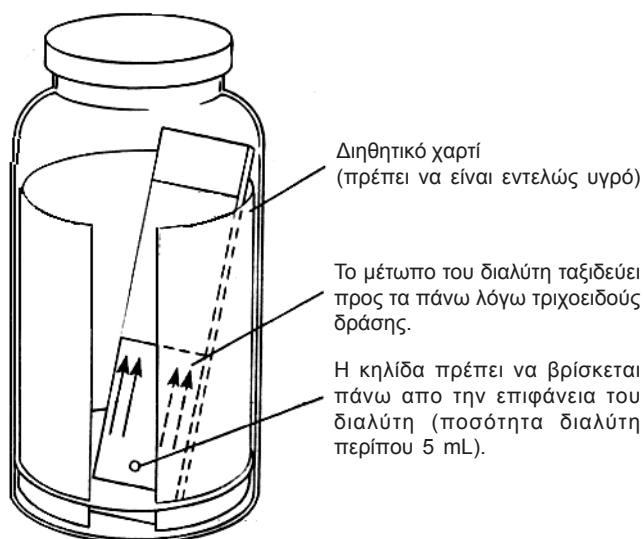
μικρής κηλίδας με την εξάτμιση του διαλύτη προτού διαχυθεί στο πλακίδιο. Όσο μικρότερη κηλίδα δημιουργηθεί, τόσο καλύτερος θα είναι ο διαχωρισμός. Αν απαιτείται, πρόσθετη ποσότητα δείγματος μπορεί να τοποθετηθεί επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία. Είναι προτιμότερο να επαναλαμβάνετε αυτή τη διαδικασία με μικρές ποσότητες αντί της τοποθέτησης μιας μεγάλης ποσότητας. Ο διαλύτης πρέπει να εξατμιστεί πριν από την τοποθέτηση νέας ποσότητας δείγματος. Αν η κηλίδα δεν είναι μικρή (περίπου 2 mm διάμετρος), τότε ένα νέο πλακίδιο πρέπει να ετοιμαστεί. Το τριχοειδές σταγονόμετρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές, αρκεί να πλένεται μεταξύ των συνεχών χρήσεων. Αυτό πραγματοποιείται με την επαναλαμβανόμενη βύθιση του σε μικρή ποσότητα του διαλύτη και τό άγγιγμα σε χαρτί κουζίνας για να αδειάσει.

Περίπου το πολύ τρεις διαφορετικές κηλίδες μπορούν να τοποθετηθούν σε TLC πλακίδιο μικροσκοπίου. Η κάθε κηλίδα πρέπει να απέχει 1 cm τουλάχιστον από τη βάση, και όλες οι κηλίδες πρέπει να τοποθετηθούν σε ίση απόσταση μεταξύ τους, μια κηλίδα θα πρέπει να βρίσκεται στο κέντρο του πλακιδίου. Λόγω της διάχυσης, οι κηλίδες τείνουν να μεγαλώσουν σε διάμετρο καθώς το πλακίδιο αναπτύσσεται. Μην τοποθετείτε σε ένα τέτοιο πλακίδιο περισσότερες από τρεις κηλίδες για να αποφύγετε την ανάμιξη των διαφορετικών κηλίδων που θα έχει σαν αποτέλεσμα να μπερδέψετε τα δείγματα. Τα μεγαλύτερα πλακίδια μπορούν να δεχθούν περισσότερες κηλίδες.

### **8.5 Κατασκευή του θαλάμου ανάπτυξης**

Ενας κατάλληλος θάλαμος ανάπτυξης για TLC πλακίδια μικροσκοπίου μπορεί να γίνει από ένα ευρύλαιμο βάζο. Εναλλακτικά, ένα θάλαμος ανάπτυξης μπορεί να δημιουργηθεί από ένα ποτήρι ζέσης, το ανοικτό άκρο του οποίου καλύπτεται με αλουμινόχαρτο. Το εσωτερικό του βάζου ή του ποτηριού ζέσης πρέπει να καλυφθεί με διηθητικό χαρτί, χωρίς αυτό να εξέχει έξω από το βάζο ή το ποτήρι ζέσης. Ενα μικρό κάθετο άνοιγμα (πλάτος 2-3 cm) πρέπει να αφαιρεθεί στο διηθητικό χαρτί για να μπορείτε να παρατηρείτε την ανάπτυξη. Πριν από την ανάπτυξη, το διηθητικό χαρτί πρέπει να υγρανθεί σχολαστικά με το διαλύτη ανάπτυξης. Το υγρό διηθητικό

χαρτί βοηθά τη διατήρηση του θαλάμου ανάπτυξης κορεσμένου σε ατμούς διαλύτη, άρα υποβοηθά την ταχύτητα της ανάπτυξης. Όταν ο θάλαμος κορεστεί, ρυθμίζεται το επίπεδο του διαλύτη στο πάτο του θαλάμου να έχει ύψος περίπου 5 mm, και ο θάλαμος κλείνεται (ή καλύπτεται με αλουμινόχαρτο), και αφήνεται μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Ένας σωστός θάλαμος ανάπτυξης απεικονίζεται στην Εικόνα 8.9.



**Εικόνα 8.9.** Θάλαμος ανάπτυξης που περιέχει ένα πλακίδιο που αναπτύσσεται

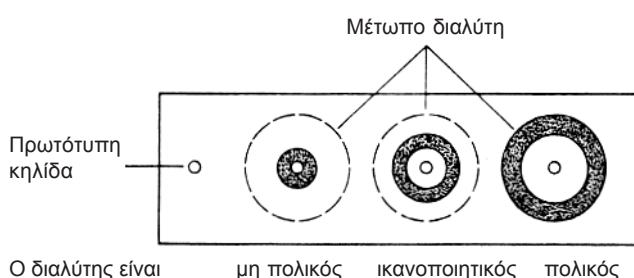
### 8.6 Ανάπτυξη του TLC πλακιδίου.

Όταν η κηλίδα έχει τοποθετηθεί στο πλακίδιο και ο διαλύτης ανάπτυξης έχει επιλεγεί, το πλακίδιο τοποθετείται στο θάλαμο για ανάπτυξη. Το πλακίδιο πρέπει να τοποθετηθεί στο θάλαμο προσεκτικά έτσι ώστε η επικαλυμμένη επιφάνεια του πλακιδίου να μην ακουμπά το διηθητικό χαρτί. Επιπρόσθετα, η επιφάνεια του διαλύτη στο θάλαμο πρέπει να είναι χαμηλότερα από το ύψος της κηλίδας στο πλακίδιο, αλλιώς το δείγμα θα διαλυθεί στο διάλυτη αντί να χρωματογραφηθεί. Όταν το πλακίδιο τοποθετηθεί σωστά, το καπάκι του θαλάμου επανατοποθετείται και περιμένουμε ο διαλύτης να αρχίσει την ανοδική του πορεία λόγω της τριχοειδούς δράσης. Αυτό λαμβάνει χώρα σχετικά γρήγορα. Καθώς ο διαλύτης ανέρχεται, το πλακίδιο γίνεται ορατά υγρό. Όταν ο διαλύτης φθάσει περίπου 5 mm από την κορυφή του πλακιδίου, σημειώνεται αμέσως με ένα μολύβι όπου έφθασε το μέτωπο του διαλύτη. Το μέτωπο του διαλύτη δεν επιτρέπεται να περάσει την κορυφή του πλακιδίου. Το πλακίδιο πρέπει να απομακρυνθεί πριν συμβεί αυτό. Στην πραγματικότητα το μέτωπο δεν θα περάσει την κορυφή, αλλά οι κηλίδες που βρίσκονται σε ένα εντελώς υγρό πλακίδιο έχουν την τάση να μεγαλώνουν λόγω των φαινομένων διάχυσης. Όταν το πλακίδιο έχει ξηρανθεί, πρέπει να σχεδιάζεται το περίγραμμα κάθε χρωματισμένης κηλίδας με μολύβι. Αν οι κηλίδες δεν είναι ορατές, μια μέθοδος εμφάνισης πρέπει να χρησιμοποιηθεί.

**Επιλογή του διαλύτη.** Ο διαλύτης ανάπτυξης που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τα συστατικά που πρόκειται να διαχωρισθούν. Μπορεί να χρειαστεί να δοκιμάσετε αρκετούς διαλύτες πριν επιτύχετε ένα σωστό διαχωρισμό. Επειδή τα πλακίδια μικροσκοπίου φτιάχνονται πολύ εύκολα και αναπτύσσονται γρήγορα, μια εμπειρική επιλογή δεν είναι δύσκολο να γίνει. Ο διαλύτης που μετακινεί όλο το δείγμα στο μέτωπο του διαλύτη είναι πολύ πολικός. Αντίθετα, ο διαλύτης που δεν μετακινεί καθόλου το δείγμα δεν είναι πολικός.

Το διχλωρομεθάνιο και το τολουόλιο είναι διαλύτες ενδιάμεσης πολικότητας και αποτελούν καλές επιλογές για το διαχωρισμό μιας μεγάλης ποικιλίας χαρακτηριστικών ομάδων. Για υδρογονάνθρακες, η πρώτη καλή επιλογή είναι το εξάνιο, ο πετρελαικός αιθέρας (λιγροίνη) ή το τολουόλιο. Το εξάνιο ή ο πετρελαικός αιθέρας με διαφορετικές αναλογίες τολουολίου ή διαιθυλαιθέρα δίνουν μίγματα διαλυτών μετρίας πολικότητας που είναι χρήσιμα για διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες. Πολικές ενώσεις μπορεί να απαιτήσουν τη χρήση οξικού αιθυλεστέρα, ακετόνης, ή μεθανόλης.

Ενας γρήγορος τρόπος για να προσδιορίσετε ένα κατάλληλο διαλύτη γίνεται με την τοποθέτηση αρκετών κηλίδων δείγματος σε ένα μόνο πλακίδιο. Οι κηλίδες πρέπει να τοποθετηθούν σε απόσταση 1 cm η μια απο την άλλη. Ενα τριχοειδές σταγονόμετρο γεμάτο με διαλύτη ακουμπά απαλά σε μια κηλίδα. Ο διαλύτης αναπτύσσεται προς τα έξω κυκλικά. Το μέτωπο του διαλύτη σημειώνεται με ένα μολύβι. Ενας διαφορετικός διαλύτης εφαρμόζεται σε κάθε κηλίδα. Καθώς ο διαλύτης κινείται προς τα έξω, οι κηλίδες διαστέλλονται ως ομοκέντροι δακτύλιοι. Από την εμφάνιση αυτών των δακτυλίων μπορείτε να κρίνετε την καταλληλότητα του διαλύτη.



**Εικόνα 8.10.** Μέθοδος ομοκέντρων κύκλων για τον έλεγχο διαλυτών ανάπτυξης

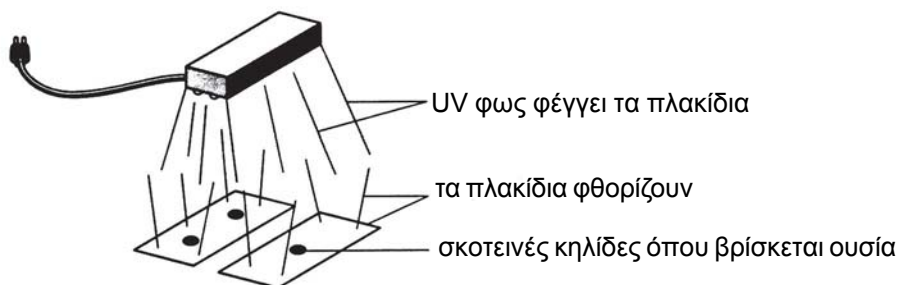
Διάφορα είδη συμπεριφοράς διαλυτών απεικονίζονται στην Εικόνα 8.10.

**Μέθοδοι εμφάνισης.** Είναι καλοτυχία όταν οι ενώσεις που διαχωρίζονται με TLC είναι έγχρωμες, επειδή ο διαχωρισμός τους μπορεί να γίνει ορατός. Πιο συχνά όμως, οι ενώσεις είναι άχρωμες. Σε αυτήν την περίπτωση οι διαχωρισθείσες ενώσεις πρέπει να γίνουν ορατές είτε με κάποιο αντιδραστήριο ή με κάποια μέθοδο. Τα αντιδραστήρια που οδηγούν σε χρωματισμό των κηλίδων αποτελούν τα αντιδραστήρια εμφάνισης, ενώ οι μέθοδοι που μας επιτρέπουν να βλέπουμε τις διαχωρισθείσες κηλίδες είναι οι μέθοδοι εμφάνισης.

Το αντιδραστήριο εμφάνισης που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι το ιώδιο. Το ιώδιο αντιδρά με πολλές οργανικές ενώσεις και δίνει σύμπλοκα τα οποία έχουν είτε καφέ είτε κίτρινο χρώμα. Σε αυτή τη μέθοδο, το αναπτυχθέν και ξηρό πλακίδιο τοποθετείται σε ένα ευρύλαιμο βάζο μαζί με μερικούς κρυστάλλους ιωδίου. Το βάζο κλείνεται και μπορεί να θερμανθεί ελαφρά. Το βάζο γεμίζει με ατμούς ιωδίου και οι κηλίδες αρχίζουν να εμφανίζονται. Όταν οι κηλίδες είναι ικανοποιητικά έντονες, το πλακίδιο απομακρύνεται απο το βάζο και σχεδιάζουμε το περίγραμμα των κηλίδων με ένα μολύβι. Η εμφάνιση των κηλίδων δεν είναι μόνιμη. Η εμφάνιση τους προέρχεται απο τη δημιουργία συμπλόκων του ιωδίου με τις οργανικές ενώσεις. Καθώς το ιώδιο εξαχνώνεται απο το πλακίδιο, οι κηλίδες ατονούν. Ετσι, πρέπει να σημειωθούν αμέσως. Σχεδόν όλες οι ενώσεις, εκτός απο τους υδρογονάνθρακες και τα αλκυλαλογονίδια δίνουν σύμπλοκα με το ιώδιο. Η ένταση των κηλίδων δεν αντιστοιχεί στην περιεκτικότητα των ενώσεων

στο δείγμα.

Η πλέον χρήσιμη μέθοδος εμφάνισης είναι η λάμπα υπεριώδους (UV) (Εικόνα 8.11). Στο υπεριώδες φως, οι ενώσεις δείχνουν ως λαμπερές κηλίδες στο πλακίδιο. Κάποιες ενώσεις λαμπρούν πολύ ισχυρά στο UV φως λόγω του φθορισμού που παρουσιάζουν. Μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση δεικτών φθορισμού στο προσροφητικό υλικό των πλακιδίων. Ένα μίγμα σουλφιδίων του ψευδαργύρου και καδμίου συχνά χρησιμοποιείται. Ένα τέτοιο πλακίδιο φθορίζει ολόκληρο σε UV φως. Αλλά, μαύρες κηλίδες εμφανίζονται στη θέση των διαχωρισθέντων ενώσεων, επειδή οι ενώσεις καταστέλλουν το φθορισμό.



**Εικόνα 8.11** TLC πλακίδια με δείκτες φθορισμού που γίνονται ορατά με UV φως

Επιπρόσθετα, ένας μεγάλος αριθμός χημικών μεθόδων εμφάνισης υπάρχει. Οι μέθοδοι αυτές είτε καταστρέφουν μόνιμα είτε αλλοιώνουν τις διαχωρισθείσες ενώσεις. Αρκετές από τις μεθόδους αυτές χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση χαρακτηριστικών ομάδων. Τα αλκυλαλογονίδια εμφανίζονται με το ψεκασμό του πλακιδίου με ένα αραιό διάλυμα νιτρικού αργύρου. Αλογονίδια του αργύρου δημιουργούνται. Αυτά τα αλογονίδια καταστρέφονται με την έκθεση στο φως, δημιουργώντας μαύρες κηλίδες (ελεύθερος άργυρος) στο πλακίδιο.

Οι περισσότερες χαρακτηριστικές ομάδες γίνονται ορατές αν καούν με θειικό οξύ. Πυκνό θειικό οξύ ψεκάζεται στο πλακίδιο, το οποίο στη συνέχεια θερμαίνεται σε φούρνο στους 110 °C για να ολοκληρωθεί το κάψιμο. Δημιουργούνται έτσι μόνιμες κηλίδες.

## 8.7 Η $R_f$ τιμή

Οι συνθήκες της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας περιλαμβάνουν:

1. Σύστημα διαλυτών
2. Προσροφητικό
3. Πάχος στοιβάδας προσροφητικού υλικού
4. Σχετική ποσότητα των δειγμάτων.

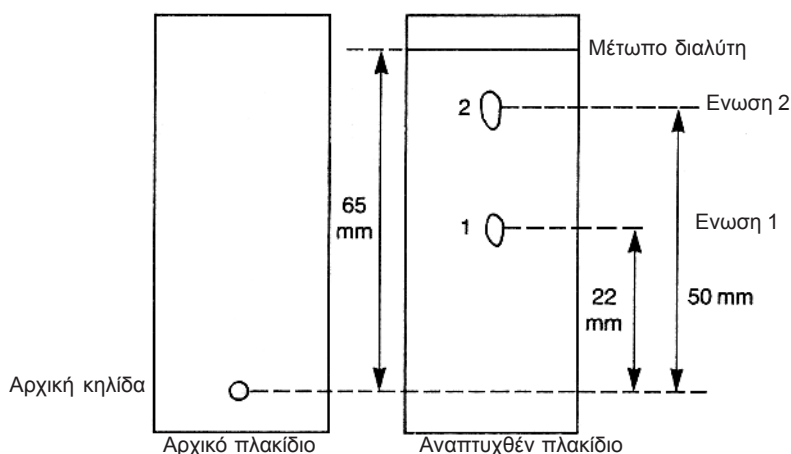
Σε μια ορισμένη ομάδα συνθηκών, μια δοθείσα ένωση πάντοτε ταξιδεύει ορισμένη απόσταση σχετικά με την απόσταση που διανύει το μέτωπο του διαλύτη. Αυτή η σχέση της απόστασης που διανύει η ένωση προς την απόσταση που διανύει το μέτωπο του διαλύτη καλείται **τιμή  $R_f$** . Το σύμβολο  $R_f$  είναι ο παράγοντας επιβράδυνσης και εκφράζεται σαν δεκαδικό κλάσμα.

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση που διανύεται απο την ένωση}}{\text{Απόσταση που διανύεται απο το μέτωπο του διαλύτη}}$$

Όταν οι συνθήκες της μέτρησης είναι απόλυτα καθορισμένες, η τιμή  $R_f$  είναι σταθερή για μια δοθείσα ένωση και αντιστοιχεί σε φυσική ιδιότητα αυτής της ένωσης.

Η τιμή  $R_f$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ένωσης, αλλά όπως και κάθε άλλη μέθοδος ταυτοποίησης που βασίζεται σε ένα μόνο δεδομένο, η τιμή  $R_f$  επιβεβαιώνεται καλύτερα με επιπρόσθετα στοιχεία. Πολλές ενώσεις μπορούν να έχουν την ίδια  $R_f$  τιμή, όπως επίσης πολλές ενώσεις μπορούν να έχουν το ίδιο σημείο τήξης.

Δεν είναι πάντοτε δυνατόν, στη μέτρηση της τιμής  $R_f$ , να βρούμε ακριβώς τις ίδιες τιμές που χρησιμοποίησε κάποιος άλλος ερευνητής. Έτσι, η τιμή  $R_f$  τείνει να είναι χρήσιμη σε ένα ερευνητή στο ίδιο εργαστήριο από ότι διάφοροι ερευνητές σε πολλά εργαστήρια. Η εξαίρεση είναι όταν δύο ερευνητές χρησιμοποιούν τα ίδια TLC πλακίδια της ίδιας εταιρείας, όπως είναι τα εμπορικά διαθέσιμα πλακίδια, ή γνωρίζουν τις ακριβείς πληροφορίες της κατασκευής των πλακιδίων. Παρόλα αυτά, η τιμή  $R_f$  μπορεί να είναι ένας χρήσιμος οδηγός. Αν και δεν μπορείς να βασίζεσαι στις ακριβείς τιμές, οι σχετικές τιμές μπορούν να βοηθήσουν κάποιο άλλο ερευνητή να ξέρει ή τι να περιμένει. Κάποιος που χρησιμοποιεί τιμές  $R_f$  που έχουν δημοσιευθεί, βρίσκει ότι είναι καλή ιδέα να τις συγκρίνει με πρότυπες ενώσεις των οποίων οι τιμές  $R_f$  είναι γνωστές.



$$R_f(\text{Ενωσης 1}) = \frac{22}{65} = 0.34 \quad R_f(\text{Ενωσης 2}) = \frac{50}{65} = 0.77$$

Εικόνα 8.12. Υπολογισμός τιμών  $R_f$

Για τη μέτρηση της τιμής  $R_f$  για μια δοθείσα ένωση, μετρούμε την απόσταση που η ένωση έχει διανύσει απο το σημείο στο οποίο αρχικά τοποθετήθηκε. Για κηλίδες οι οποίες δεν είναι πολύ μεγάλες, μετρούμε το κέντρο της μετακινηθείσας κηλίδας. Για μεγάλες κηλίδες, η μέτρηση πρέπει να επαναληφθεί σε ένα νέο πλακίδιο, με λιγότερη ουσία. Για κηλίδες που δείχνουν ουρά, η μέτρηση πρέπει να γίνει στο κέντρο βάρους της κηλίδας. Η πρώτη απόσταση που μετρήθηκε διαιρείται με την απόσταση που διάνυσε το μέτωπο του διαλύτη στο ίδιο πλακίδιο. Ένας δοκιμαστικός υπολογισμός των τιμών  $R_f$  δύο ενώσεων απεικονίζεται στην Εικόνα 8.12.

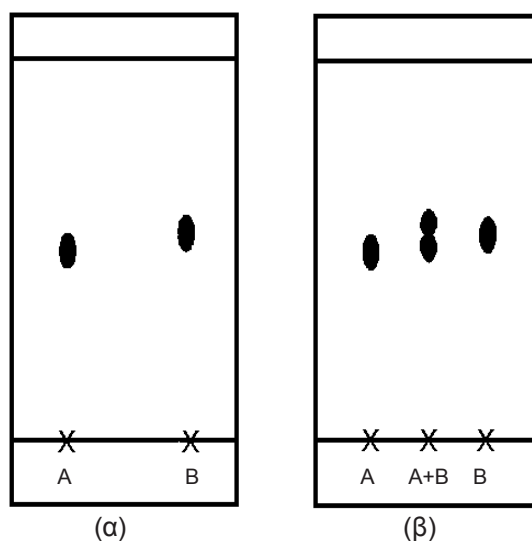
## 8.8 Εφαρμογές της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας στην οργανική χημεία

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας έχει σημαντικές εφαρμογές στην οργανική χημεία. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις παρακάτω περιπτώσεις:

1. Στην ταυτοποίηση δύο ενώσεων ότι είναι ίδιες.
2. Στη διευκρίνιση του αριθμού των συστατικών ενός μίγματος.
3. Στη διευκρίνιση του κατάλληλου διαλύτη για διαχωρισμό με χρωματογραφία στήλης.
4. Για την παρακολούθηση του διαχωρισμού χρωματογραφίας στήλης.
5. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας μιας χρωματογραφίας στήλης, μιας ανακρυστάλλωσης, ή μιας εξάχνωσης.
6. Για την παρακολούθηση της πορείας μιας αντίδρασης.

Σε όλες αυτές τις εφαρμογές, η TLC έχει το πλεονέκτημα ότι πολύ μικρές ποσότητες δείγματος είναι απαραίτητες. Με άλλα λόγια, το υλικό δεν χαραμίζεται. Με πολλές από τις μεθόδους εμφάνισης, λιγότερο από το ένα δέκατο του μικρογραμμίου ( $10^{-7}$  gr) μπορεί να ανιχνευθεί. Αντίθετα, δείγματα που περιέχουν μέχρι ένα μιλιγραμμάριο μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Με τις παρασκευαστικές πλάκες που είναι μεγάλες (περίπου  $30 \text{ cm}^2$ ) και έχουν ένα σχετικά παχύ στρώμα προσροφητικού ( $> 500 \mu\text{m}$ ), είναι συχνά δυνατόν να διαχωριστούν  $0.2-0.5 \text{ gr}$  σε μια φορά. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της TLC είναι ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν πτητικές ενώσεις, γιατί αυτές θα εξατμιστούν από το πλακίδιο.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορεί να επαληθεύσει ότι δύο ενώσεις που υποπτευόμαστε ότι είναι ίδιες, είναι στην πραγματικότητα ίδιες. Απλά τοποθετούμε κηλίδες και των δύο ενώσεων δίπλα δίπλα σε ένα απλό πλακίδιο και αναπτύσσουμε το πλακίδιο. Αν και οι δύο ενώσεις διανύσουν την ίδια απόσταση στο πλακίδιο (έχουν την ίδια τιμή  $R_f$  τότε πολύ πιθανά είναι ίδιες. Αν οι θέσεις των κηλίδων είναι διαφορετικές, οι ενώσεις σίγουρα δεν είναι ίδιες. Είναι σημαντικό να τοποθετήσετε και τις δύο ενώσεις στο ίδιο πλακίδιο. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν εμείς κατασκευάζουμε τα πλακίδια. Δύο τέτοια πλακίδια δεν έχουν ποτέ το ίδιο στρώμα προσροφητικού. Όταν χρησιμοποιούνται πλακίδια του εμπορίου, αυτή η προφύλαξη δεν είναι απαραίτητη, αν και δεν αποτελεί κακή ιδέα.

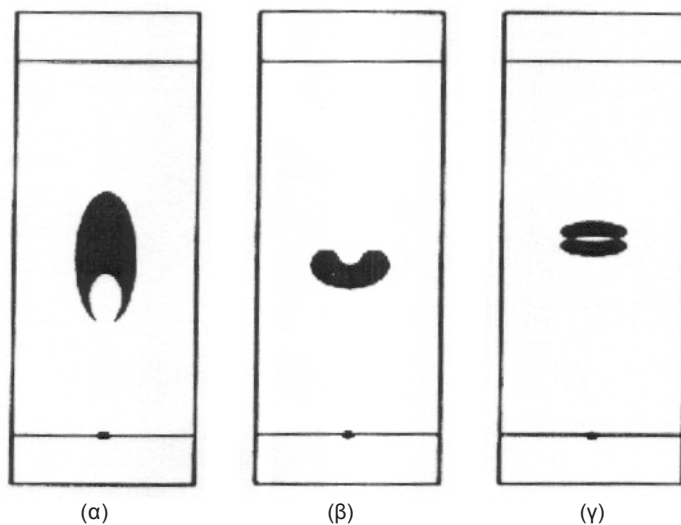


**Εικόνα 8.9.** (α) Δύο ενώσεις με παραπλήσιο  $R_f$  μπορούν να διακριθούν ακόμη και στο ίδιο πλακίδιο. (β) Διπλή κηλίδα σχήματος οκτώ, που υποδηλώνει δύο διαφορετικές ενώσεις

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορεί να διευκρινίσει αν ένα δείγμα είναι μια απλή ένωση ή μίγμα. Μια απλή ένωση δίνει μια κηλίδα ανεξάρτητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη. Αντίθετα, ο αριθμός των ενώσεων ενός μίγματος μπορεί να επαληθευτεί με τη χρήση διαφόρων διαλυτών σε ένα μίγμα. Προσοχή πρέπει να λαμβάνεται γιατί είναι πολύ δύσκολο για ενώσεις με παραπλήσιες ιδιότητες, π.χ. ισομερή, να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης

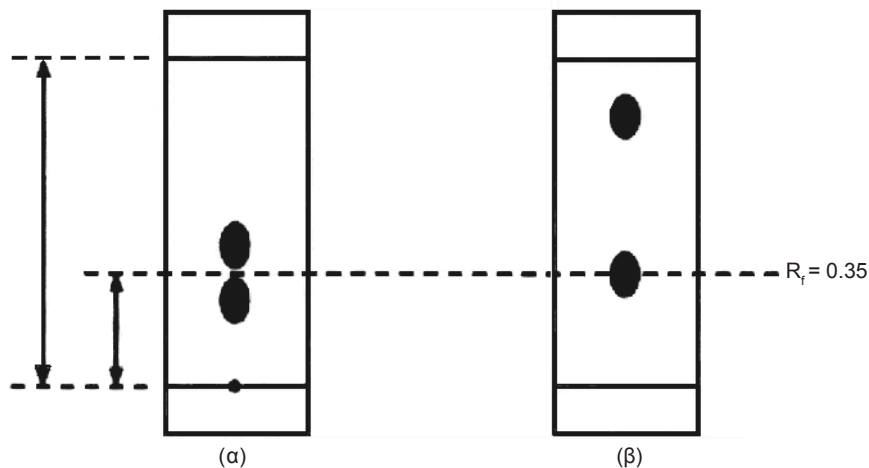


που μπορεί να διαχωρίσει το μίγμα. Η ανικανότητα διαχωρισμού δεν είναι η απόλυτη απόδειξη ότι το δείγμα είναι μια καθαρή ένωση.



**Εικόνα 8.13.** Συχνά παράδοξα TLC σχήματα καθαρών ενώσεων. (α) Η ένωση περιέχει ισχυρή όξινη ή βασική χαρακτηριστική ομάδα. (β) Η επιφάνεια του προσροφητικού έχει διαταραχθεί στην εφαρμογή της κηλίδας. (γ) Η ένωση τοποθετήθηκε ως διάλυμα σε πολύ πολικό διαλύτη

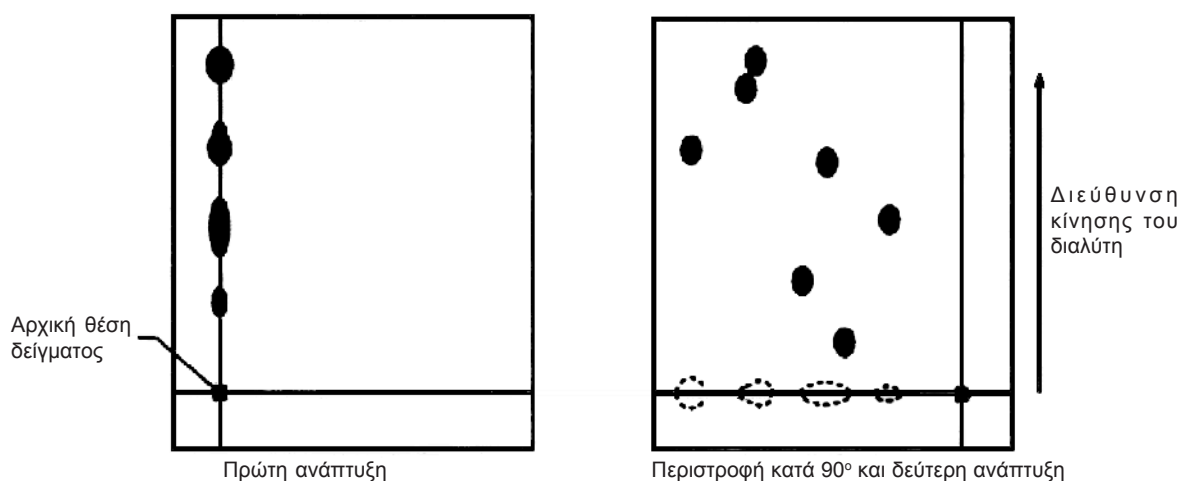
Πολλές ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν με πολλαπλές αναπτύξεις του πλακιδίου με ένα μη πολικό διαλύτη. Με αυτή τη μέθοδο, απομακρύνετε το πλακίδιο μετά την πρώτη ανάπτυξη και το αφήνετε να ξηραθεί. Μετά την ξήρανση, τοποθετείται στο θάλαμο ανάπτυξης ξανά και αναπτύσσεται μια φορά ακόμη. Αυτό διπλασιάζει το μέγεθος του πλακιδίου. Μερικές φορές, αρκετές αναπτύξεις είναι απαραίτητες. Όταν πρέπει να διαχωριστεί ένα μίγμα, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας για να επιλέξουμε τον κατάλληλο διαλύτη για το διαχωρισμό του μίγματος με χρωματογραφία στήλης. Μπορούμε να δοκιμάσουμε διάφορους διαλύτες σε πλακίδιο επικαλυμμένο με το ίδιο προσροφητικό που θα χρησιμοποιήσουμε στη στήλη. Ο διαλύτης που διαχωρίζει καλύτερα τις ενώσεις πολύ πιθανά θα δουλεύει το ίδιο καλά και στη χρωματογραφία στήλης. Αυτά τα μικροκλίμακας πειράματα



**Εικόνα 8.14.** Αναλυτική TLC μίγματος ενώσεων που αναπτύχθηκε με τον κατάλληλο διαλύτη για flash χρωματογραφία στήλης. (α) Οι ενώσεις δεν διαχωρίζονται καλά. (β) Οι ενώσεις διαχωρίζονται

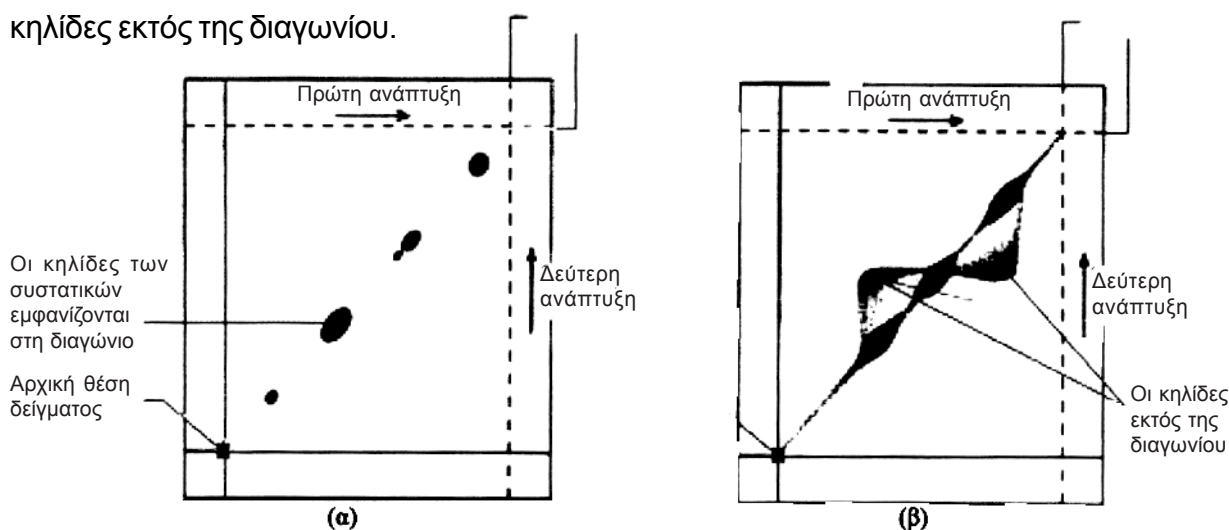
γίνονται γρήγορα, χρησιμοποιούν πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, και γλυτώνουν χρόνο που θα σπαταληθεί για το διαχωρισμό του μίγματος με χρωματογραφία στήλης (Εικόνα 8.14).

Μια διαφορετική τεχνική ανάλυσης χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας είναι η διδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Σε αυτή την τεχνική, το δείγμα τοποθετείται κοντά στο ένα άκρο ενός τετράγωνου πλακιδίου. Το πλακίδιο αναπτύσσεται στο θάλαμο ανάπτυξης και στη συνέχεια ξηραίνεται. Το πλακίδιο περιστρέφεται κατά 90° και εισάγεται ξανά στο θάλαμο ανάπτυξης και αναπτύσσεται (Εικόνα 8.15). Η τοποθέτηση της αρχικής κηλίδας γίνεται κατά



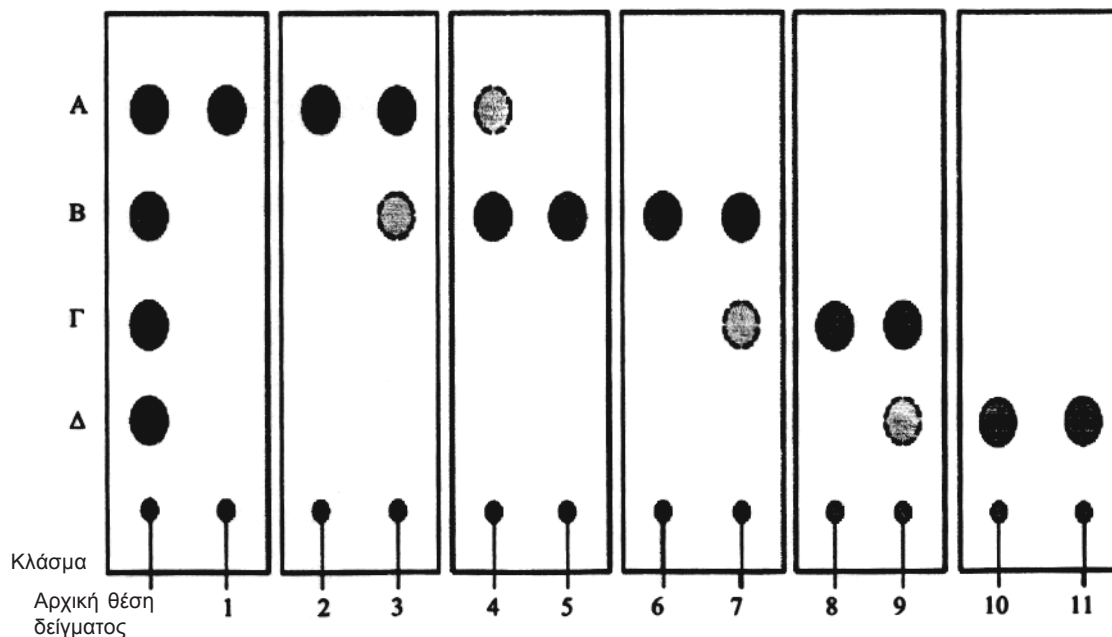
**Εικόνα 8.15.** Στάδια ανάπτυξης πλακιδίου διδιάστατης χρωματογραφίας

τέτοιο τρόπο, ώστε να μην βρεθεί κάτω από την επιφάνεια του διαλύτη στο θάλαμο ανάπτυξης. Η τεχνική αυτή μας επιτρέπει να επαληθεύουμε τη σύσταση διαφόρων μιγμάτων. Το σημαντικότερο γεγονός αυτής της τεχνικής είναι ότι μας επιτρέπει να διαπιστώσουμε το αν ένα μίγμα προϊόντων που παρατηρείται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορεί να οφείλεται στην αστάθεια μιας καθαρής ένωσης (Εικόνα 8.16). Όταν το δείγμα αποτελείται από σταθερές ενώσεις τότε μετά τη δεύτερη ανάπτυξη όλες οι κηλίδες θα πρέπει να βρίσκονται στη διαγώνιο. Αντίθετα, αν η ένωση μας διασπάται στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, θα παρατηρήσουμε κηλίδες εκτός της διαγωνίου.



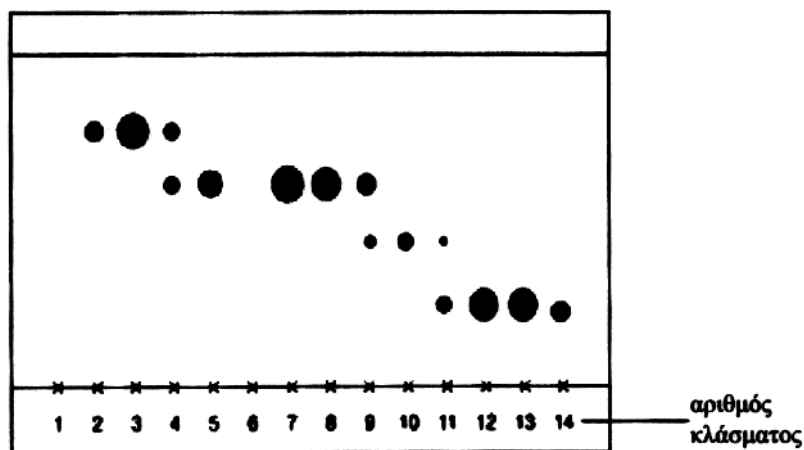
**Εικόνα 8.16.** (α) Δισδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μίγματος σταθερών ενώσεων. (β) Δισδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας στην οποία λαμβάνει χώρα αποσύνθεση.

Παρόμοια, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της πορείας της χρωματογραφίας στήλης. Μια υποθετική κατάσταση απεικονίζεται στη Εικόνα 8.17. Ο διαλύτης έχει βρεθεί ότι μπορεί να διαχωρίσει το μίγμα σε τέσσερα συστατικά (Α-Δ). Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας αυτό τον διαλύτη, μας έδωσε 11 κλάσματα των 15 mL το καθένα. Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας των διαφόρων κλασμάτων δείχνει ότι τα κλάσματα 1-3 περιέχουν το συστατικό Α, τα κλάσματα 4-7 περιέχουν το συστατικό Β, τα κλάσματα 8-9 περιέχουν το συστατικό Γ, και τα κλάσματα 10-11 περιέχουν το συστατικό Δ. Τα κλάσματα 3,4,7, και 9 δεν είναι απολύτως καθαρά.



**Εικόνα 8.17.** Παρακολούθηση διαχωρισμού μιας χρωματογραφίας στήλης

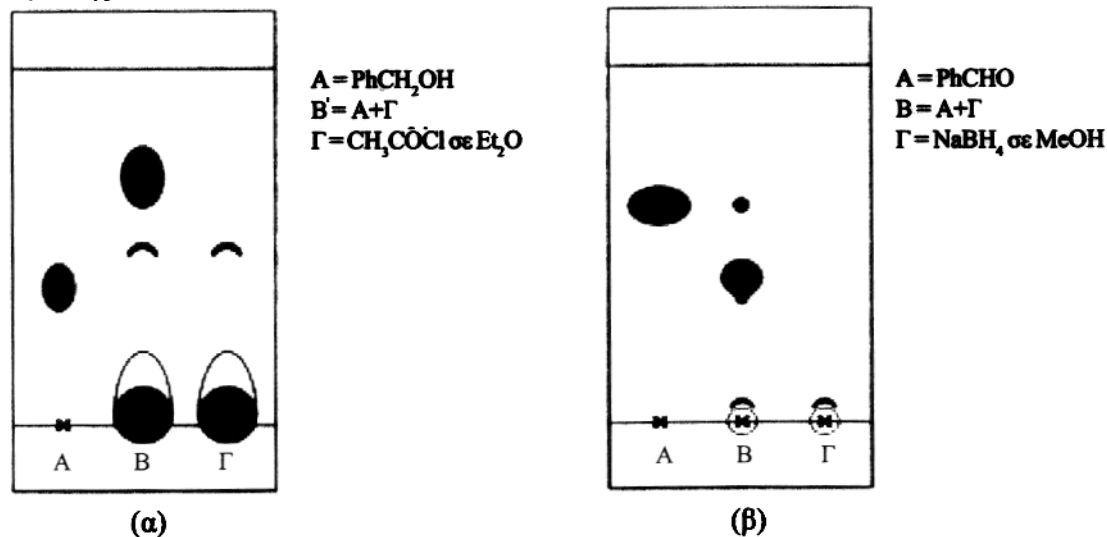
Εναλλακτικά, αντί της χρησιμοποίησης πολλών μικρών πλακιδίων χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας για το έλεγχο της χρωματογραφίας στήλης, μπορεί ο έλεγχος αυτός να γίνει σε ένα μεγαλύτερο πλακίδιο όπου σημειώνονται όλα τα κλάσματα, όπως αυτό το παράδειγμα των 14 κλασμάτων που απεικονίζεται στην εικόνα 8.18.



**Εικόνα 8.15.** TLC κλασμάτων μιας χρωματογραφίας στήλης

Τελικά, είναι συχνά δυνατόν να παρακολουθήσουμε την πορεία μιας αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, π.χ. αντίδραση του Α και Β με δημιουργία μιας άγνωστης ένωσης (Εικόνα 8.16). Σε διάφορες χρονικές στιγμές της αντίδρασης λαμβάνονται δείγματα του μίγματος της

αντίδρασης και υπόκεινται σε TLC ανάλυση. Στην περίπτωση αυτή, παρασκευάζονται δύο δείγματα αναφοράς των A και B, και τοποθετούμε στο πλακίδιο κηλίδες των καθαρών A, B, και του μίγματος της αντίδρασης. Διάφορα πλακίδια μπορούν να παρασκευαστούν σε διάφορες χρονικές στιγμές της αντίδρασης. Έτσι μπορούμε να επιλέξουμε τον ιδανικό χρόνο της αντίδρασης.



**Εικόνα 8.16.** Παράδειγμα παρακολούθησης της πορείας αντίδρασης (α) Εστεροποίηση της βενζυλικής αλκοόλης με ακετυλοχλωρίδιο. (β) Αναγωγή της βενζαλδεύδης με βορουδρίδιο του νατρίου

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* Vogel, A. I.; Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A. R. 5th ed. Longman, Harlow, UK, 1989.
2. *Experimental Organic Chemistry*, Palleros, D. R. John Wiley & Sons, New York, 2000.
3. *Experimental Organic Chemistry Standard and Microscale*, Harwood, L. M.; Moody, C.J.; Percy, J.M. 2nd ed. Blackwell Science, Oxford, UK, 1999.
4. *Organic Laboratory Techniques*, Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; Engel, R.G. Saunders Orlando, 1998.
5. *Εργαστηριακή τεχνική και Οργανικά Συνθέσεις* Αλεξάνδρου, Ν.; Βάρβογλη, Α.; Χατζημιχαλάκη, Φ. Θεσσαλονίκη, 1977.
6. *Microscale Techniques for the Organic Laboratory*, Mayo, D.W.; Ke, R.M.P.; Trumper, P.K. 2nd ed., J. Wiley & Sons, New York, 2001.
7. *The Organic Chem Lab Survival Manual*, Zubrick, J.W. 4th ed., J.Wiley & Sons, New York, 1997.

## Πρόβλημα 1

Τα αλκαλοειδή αναλύονται χρησιμοποιώντας TLC με silica gel G σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες: διαλύτης 1, χλωροφόρμιο/ακετόνη/διαιθυλαμίνη (5:4:1); διαλύτης 2, χλωροφόρμιο/διαιθυλαμίνη (9:1); και διαλύτης 3, κυκλοεξάνιο/χλωροφόρμιο/διαιθυλαμίνη (5:4:1). Τα  $R_f$  των διαφόρων αλκαλοειδών απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

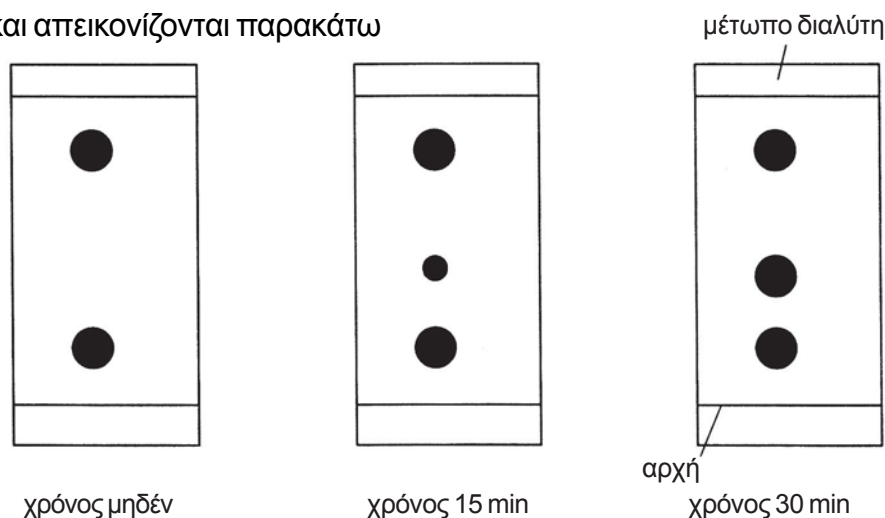
Υποθέστε ότι είσαι υπεύθυνος ενός εργαστηρίου. Ποιά διαλύτη θα χρησιμοποιούσατε για να αναλύσετε:

- (α) ένα δείγμα προερχόμενο από μια αστυνομική υπόθεση ναρκωτικών που υποπτεύονται ότι περιέχει μορφίνη, κοκαΐνη, και ακονιτίνιο?
- (β) ένα μίγμα κοκαΐνης και ρεσερπίνης?
- (γ) ένα δηλητήριο που περιέχει στρυχνίνη και ρεσερπίνη?

Αλκαλοειδές	Διαλύτης 1	Διαλύτης 2	Διαλύτης 3
μορφίνη	0.10	0.08	0.00
κινίνη	0.19	0.26	0.07
κωδεΐνη	0.38	0.53	0.16
κοκαΐνη	0.73	0.90	0.65
στρυχνίνη	0.53	0.76	0.28
ακονιτίνιο	0.68	0.90	0.35
ρεσερπίνη	0.72	0.80	0.20

## Πρόβλημα 2

Η πορεία μιας χημικής αντίδρασης ( $A+B \rightarrow \Gamma$ ) παρακολουθείται με TLC ανάλυση σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την έναρξη της αντίδρασης. Τα TLC πλακίδια του μίγματος της αντίδρασης σε χρόνο μηδέν, και μετά 15 min και 30 min αντίδρασης, τρέχουν στις ίδιες ιδανικές συνθήκες, και απεικονίζονται παρακάτω

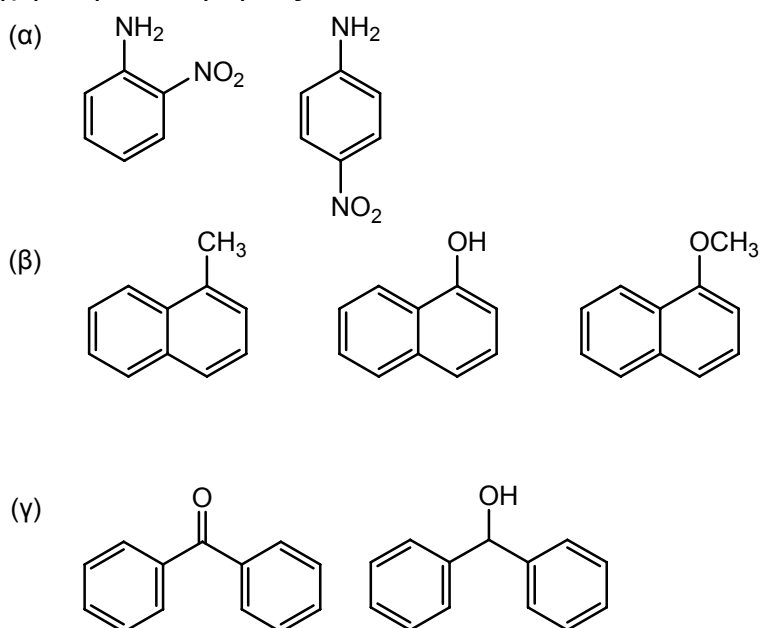


Γνωρίζοντας ότι η ένωση A είναι λιγότερο πολική από την ένωση B.

- (α) Να υπολογίσετε τα  $R_f$  όλων των κηλίδων.
- (β) Να αναγνωρήσετε τις κηλίδες και να εξηγήσετε τα αποτελέσματα TLC.

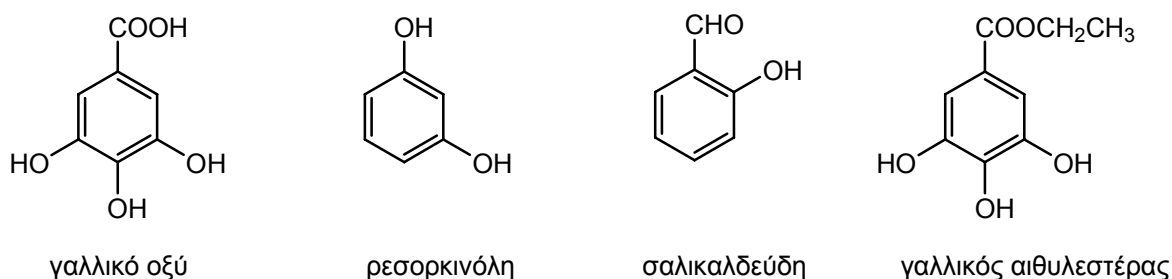
### Πρόβλημα 3

Τα ακόλουθα μίγματα αναλύονται με TLC σε silica gel χρησιμοποιώντας ένα διαλύτη μεσαίας πολικότητας. Να ονομάσετε κατά IUPAC τις ενώσεις και να τις κατατάξετε σε σειρά μειωμένης τιμής  $R_f$ . Να εξηγηθεί η απάντησή σας.



### Πρόβλημα 4

Οι παρακάτω φαινόλες αναλύθηκαν με TLC σε silica gel G χρησιμοποιώντας ένα μίγμα τολουολίου, μεθανόλης, και οξικού οξέος (10:2:1) ως την κινούμενη φάση. Οι μετρηθείσες τιμές  $R_f$  είναι : 0.20, 0.41, 0.63 και 0.84. Να αποδώσετε τις τιμές  $R_f$  στις δομές.

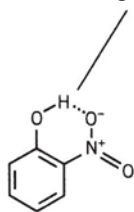


**ΒΟΗΘΕΙΑ:** Γενικά ενώσεις που είναι μόνο δέκτες δεσμών υδρογόνου (π.χ. αιθέρες, εστέρες, τριτοταγείς αμίνες, νιτροενώσεις, κ.τ.λ.) προσροφώνται λιγότερο ισχυρά από ενώσεις δότες δεσμών υδρογόνου (π.χ. αλκοόλες, φαινόλες, καρβοξυλικά οξέα, αμίνες, κ.τ.λ.). Μια ενδιαφέρουσα περίπτωση λαμβάνει χώρα όταν η ένωση μπορεί να δημιουργήσει *ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου* σε σύγκριση με παρόμοια ένωση που δημιουργεί μόνο *διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου*, π.χ. *ο*-νιτροφαινόλη και *π*-νιτροφαινόλη.

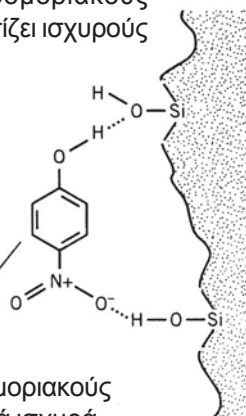
Στην περίπτωση της *ο*-νιτροφαινόλης υπάρχει ένας ισχυρός ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλικής και της νιτρο ομάδας; ως συνέπεια η *ο*-νιτροφαινόλη δεν μπορεί να αλληλεπιδρά με δεσμό υδρογόνου με το προσροφητικό. Αντίθετα, η *π*-νιτροφαινόλη

μπορεί να δρά ως δότης ή δέκτης δεσμών υδρογόνου και έτσι, προσροφάται ισχυρά στο silica gel. Σαν αποτέλεσμα, ένα μίγμα *ο*- και *π*-νιτροφαινόλης μπορεί πολύ εύκολα να διαχωριστεί σε TLC χρωματογραφία με το *ορθο*-ισομερές να μετακινείται **γρηγορότερα** απο ότι το *παρα*-ισομερές.

η *ο*-νιτροφαινόλη σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, και δεν σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς με το silica gel



η *π*-νιτροφαινόλη δεν σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, και αλληλεπιδρά ισχυρά με το silica gel



# ΠΕΙΡΑΜΑ 7

## Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Σε αυτό το πείραμα θα πρέπει με τη βοήθεια της TLC χρωματογραφίας να διαχωρίσετε

- ένα μίγμα αμινοξέων
- ένα μίγμα αναλγητικών φαρμάκων

### A Διαχωρισμός αμινοξέων

Στο εργαστήριό σας δίνεται 1 mL διαλύματος που μπορεί να περιέχει τουλάχιστον τρία από τα παρακάτω αμινοξέα:

*DL*-αλανίνη,

*L*-λευκίνη,

*L*-λυσίνη (υδροχλωρικό άλας), και

γλυκίνη

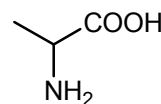
Βάση των τιμών  $R_f$  να βρείτε τα συστατικά (αμινοξέα) του αγνώστου μίγματος που σας δόθηκε.

#### Διαδικασία:

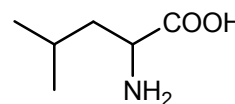
(α) Τοποθετείται μια σταγόνα από τα πρότυπα διαλύματα των αμινοξέων σε ένα μικρό δοκιμαστικό σωλήνα και αραιώνεται μέχρι όγκου 1 mL με νερό (οι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να επισημανθούν με το περιεχόμενό τους, ώστε να γνωρίζετε πάντοτε ποιό είναι το πρότυπο).

(β) Παρασκευάζεται το διαλύτη ανάπτυξης με ανάμειξη 70 mL *n*-προπανόλης με 30 mL πυκνής υδατικής αμμωνίας. Κατασκευάζεται το θάλαμο ανάπτυξης είτε από ένα άδειο δοχείο είτε με ποτήρι ζέσης, τοποθετείται το διαλύτη έτσι ώστε να καλύπτεται καλά η επιφάνεια του πυθμένα του δοχείου, και προσθέτεται το διηθητικό χαρτί. Αφήνεται το διαλύτη να διαβρέξει όλη την επιφάνεια του χαρτιού, ώστε η ατμόσφαιρα του δοχείου να είναι κορεσμένη με τους ατμούς του διαλύτη.

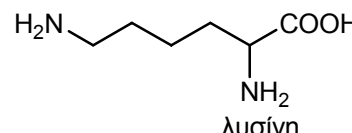
(γ) Σε ένα πλακίδιο TLC, με τη βοήθεια ενός μολυβιού, χαράσσεται (πατώντας ελαφρά) μια γραμμή όπου τοποθετείται με τη βοήθεια μικροσκοπικού σταγονομέτρου ή τριχοειδή σωλήνα μια κηλίδα (1-2 mm) από το κάθε πρότυπο δείγμα αμινοξέος και του αγνώστου μίγματος σε τέτοιο ύψος ώστε να βρίσκεται υψηλότερα



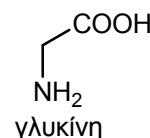
αλανίνη



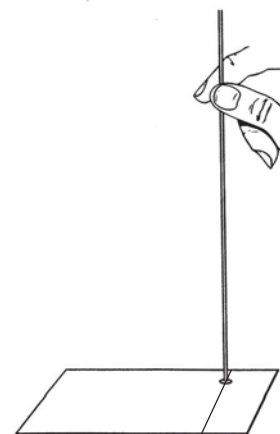
λευκίνη



λυσίνη



γλυκίνη



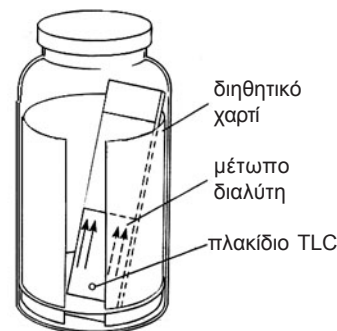
τοποθέτηση δείγματος



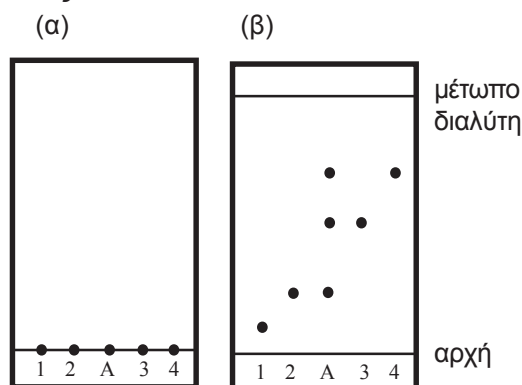
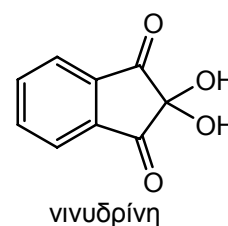
απο την επιφάνεια του διαλύτη στο θάλαμο ανάπτυξης. Το πλακίδιο αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα (οι κηλίδες δεν είναι πλέον ορατές).

(δ) Τοποθετείται το πλακίδιο στο θάλαμο ανάπτυξης μέχρις ότου το μέτωπο του διαλύτη φθάσει σε μικρό ύψος από την κορυφή του πλακιδίου (0.5 cm). Σημειώνεται με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη μόλις βγάλεται το πλακίδιο από το θάλαμο ανάπτυξης.

(ε) Ξηραίνεται το TLC πλακίδιο στον αέρα, στη συνέχεια στους 100 °C για 10 min. Ψεκάζεται με διάλυμα νινυδρίνης (η νινυδρίνη αντιδρά με τα α-αμινοξέα και δίνει έντονο χρώμα). Στη συνέχεια θερμαίνεται το πλακίδιο στους 100 °C για 5-10 min, μέχρι να αναπτυχθεί το χρώμα. Σημειώνεται κάθε κηλίδα, υπολογίζεται το  $R_f$  κάθε κηλίδας και προσδιορίζεται τη σύσταση του αγνώστου μίγματος.



θάλαμος ανάπτυξης



**Εικόνα TLC πλακιδίων:** (α) πριν από την ανάπτυξη; (β) μετά την ανάπτυξη και την εμφάνιση με νινυδρίνη. Όπου 1 είναι *DL*-αλανίνη, 2 είναι *L*-λευκίνη, A είναι το άγνωστο μίγμα, 3 είναι *L*-λυσίνη (υδροχλωρικό άλας), και 4 είναι γλυκίνη

## B Διαχωρισμός αναλγητικών φαρμάκων

Στο εργαστήριο θα σας δωθούν τα εξής αναλγητικά φάρμακα:

Depon,  
Panadol,  
Anadin, και  
Aspirin

Βάση των τιμών  $R_f$  θα προσδιοριστεί τη συμπεριφορά καθενός από τις δραστικές ενώσεις σε διάφορους διαλύτες.

### Διαδικασία:

(α) Σε ένα μικρό ποτήρι ζέσης κατεργάζεστε με μεθανόλη (5 mL)

για 1-2 min, με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου, το 1/4 της κάθε ταμπλέτας. Απομακρύνεται το ανόργανο πρόσθετο (συνήθως θειικό ασβέστιο) με διήθηση απο το μεθανολικό εκχύλισμα. Τα εκχυλίσματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν ως τα πρότυπα δείγματα (β) Σε ένα πλακίδιο TLC, με τη βοήθεια ενός μολυβιού, χαράσσεται (πατώντας ελαφρά) μια γραμμή όπου τοποθετείται με τη βοήθεια μικροσκοπικού σταγονομέτρου ή τριχοειδή σωλήνα μια κηλίδα (1-2 mm) απο το πρότυπο δείγμα panadol και aspirin σε τέτοιο ύψος ώστε να βρίσκεται υψηλότερα απο την επιφάνεια του διαλύτη στο θάλαμο ανάπτυξης. Το πλακίδιο αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 5 min (οι κηλίδες δεν είναι πλέον ορατές).

(γ) Τοποθετείστε το πλακίδιο σε θάλαμο ανάπτυξης με διαλύτη έκλουσης το διχλωρομεθάνιο

(δ) Βρείτε τις αντίστοιχες τιμές  $R_f$  με το διαλύτη έκλουσης διχλωρομεθάνιο. Η εμφάνιση των κηλίδων γίνεται με τη λάμπα υπεριώδους (254 nm) ή σε θάλαμο ιωδίου.

Επαναλαμβάνεται το ίδιο πείραμα (β), (γ), (δ) χρησιμοποιώντας διαφορετικά πλακίδια TLC και διαλύτη έκλουσης:

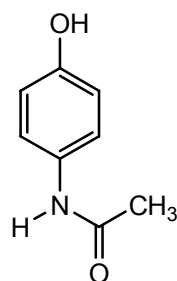
- (i) 1:1 μίγμα διχλωρομεθανίου-μεθανόλης
- (ii) οξικό αιθυλεστέρα
- (iii) 1% οξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο

προσδιορίζεται τις τιμές  $R_f$  σε κάθε ένα διαλύτη

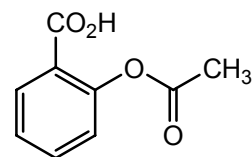
Το πείραμα επαναλαμβάνεται χρησιμοποιώντας τις κηλίδες των προτύπων δειγμάτων anadin και depom, (το anadin περιέχει καφεΐνη και θειική κινίνη), στους 4 διαλύτες έκλουσης

- (i) διχλωρομεθάνιο
- (ii) 1:1 μίγμα διχλωρομεθανίου-μεθανόλης
- (iii) οξικό αιθυλεστέρα
- (iiii) 1% οξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο

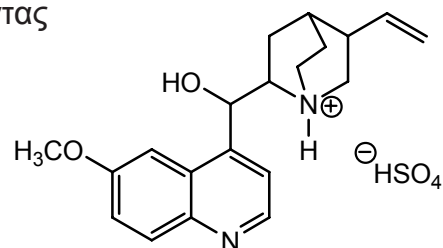
και προσδιορίζεται τις τιμές  $R_f$  σε κάθε ένα διαλύτη.



*N*-ακετυλο-4-υδροξυανιλίνη  
paracetamol  
(PANADOL)  
(DEPON)



ακετυλοσαλικυλικό οξύ  
(ASPIRIN)



θειική κινίνη  
(ANADIN)

## Καταγραφή του πειράματος

Στο εργαστηριακό τετράδιο θα

- γράφουν οι απαντήσεις των ασκήσεων
- προσδιορίζεται τη σύσταση του αγνώστου μίγματος αμινοξέων στη βάση των τιμών  $R_f$  των προτύπων αμινοξέων (Το πλακίδιο θα τοποθετηθεί στο τετράδιο)
- τοποθετηθούν όλα τα πλακίδια (τουλάχιστον οκτώ) του πειράματος των αναλγητικών φαρμάκων. Θα βρεθούν οι τιμές  $R_f$  για όλες τις κηλίδες των TLC πλακιδίων και θα συγκρίνεται τις τιμές αυτές για τα ζεύγη panadol-aspirin και anadin-depon.