

Ćwiczenie nr XII

ADSORPCYJNA CHROMATOGRRAFIA CIENKOWARSTWOWA

I. Cel ćwiczenia

1. Zapoznanie się z techniką chromatografii planarnej.
2. Poznanie zasady doboru optymalnych warunków prowadzenia procesu chromatograficznego.
3. Poznanie warunków oznaczania składu mieszaniny nieznanymi substancjami.

II. Zagadnienia wprowadzające

1. Podstawy metody chromatograficznej.
2. Adsorbenty stosowane w chromatografii planarnej.
3. Dobór fazy ruchomej w badaniach chromatograficznych.
4. Parametry retencyjne w chromatografii planarnej.

Literatura obowiązująca:

1. Z. Witkiewicz „Podstawy chromatografii”, WNT Warszawa 1992, str. 148–172.
2. Z. Witkiewicz „Podstawy chromatografii”, WNT Warszawa 1995, str. 219–258.

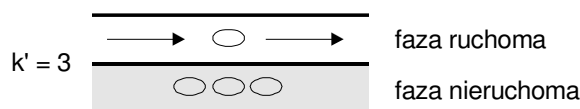
III. Część teoretyczna

III. 1. Wprowadzenie

Chromatografia należy do metod rozdzielania polegających na zróżnicowaniu szybkości migracji cząsteczek poszczególnych składników mieszaniny. Każdy układ chromatograficzny składa się z trzech elementów:

- fazy ruchomej,
- fazy nieruchomej,
- chromatografowanych substancji.

W trakcie procesu chromatograficznego badana substancja dzieli się pomiędzy dwie fazy – ruchomą i nieruchomą.



Rys. 1. Schemat podziału badanej substancji pomiędzy dwie fazy.

W adsorpcyjnej chromatografii cieczowej fazą nieruchomą jest adsorbent, fazą ruchomą ciecz jedno- lub wieloskładnikowa, a rozdział analizowanych substancji jest wynikiem różnego powinowactwa adsorpcyjnego cząsteczek rozdzielanych substancji do miejsc aktywnych adsorbentu. Różnice w powinowactwie adsorpcyjnym (selektywna adsorpcja) są wynikiem różnej budowy i charakteru chemicznego substancji. Substancje wykazujące większe powinowactwo adsorpcyjne do danego adsorbentu (silniej adsorbują się) są silniej hamowane przez adsorbent, substancje słabiej adsorbujące się szybciej poruszają się wzdłuż złoża adsorbentu. Miarą podziału substancji pomiędzy dwie fazy jest współczynnik retencji k definiowany jako:

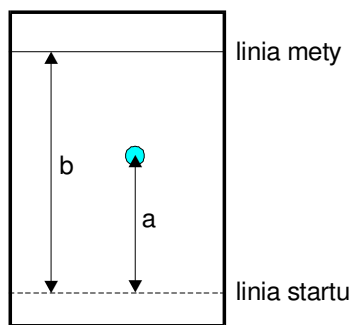
$$k = \frac{\text{ilość substancji w fazie nieruchomej}}{\text{ilość substancji w fazie ruchomej}}$$

Liczbowa wartość k jest w danej temperaturze charakterystyczna dla danej substancji w danym układzie chromatograficznym. Zależy ona od rodzaju chromatografowanej substancji (charakter chemiczny, wielkość cząsteczki, rodzaj, ilość i rozmieszczenie grup funkcyjnych).

Chromatografia cienkowarstwowa (planarna) jest metodą analityczną szeroko stosowaną zarówno w laboratoriach analitycznych jak i zakładach przemysłowych. Jest metodą pozwalającą szybko i tanio przeprowadzić analizę badanych próbek.

W chromatografii cienkowarstwowej parametrem retencyjnym, wyznaczanym wprost z chromatogramu jest wielkość R_F wyrażana jako:

$$R_F = \frac{a}{b} = \frac{\text{dystans przebyty przez środek plamki}}{\text{dystans przebyty przez czoło fazy ruchomej}}$$

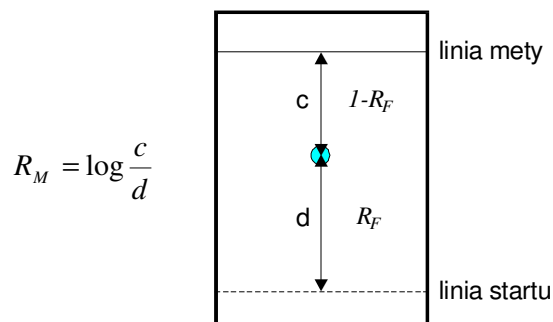


Rys. 2. Sposób obliczania R_F z chromatogramu.

Współczynnik retencji k związany jest z wielkością R_F następująco:

$$k' = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad \text{lub} \quad \log k' = \log \frac{1 - R_F}{R_F} = R_M \quad (1)$$

Wartość współczynnika R_M obliczona z chromatogramu wynosi:

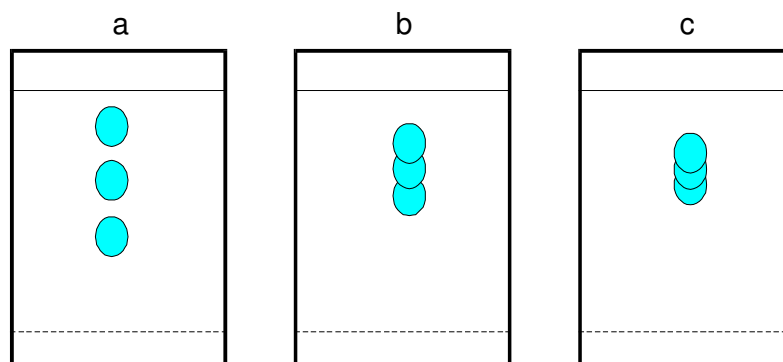


Rys. 3. Sposób obliczania R_M z chromatogramu.

W zależności od układu chromatograficznego wartość R_F substancji może osiągać wartość $0 \leq R_F \leq 1$. Substancja bardzo silnie adsorbująca się w danym układzie osiąga wartość $R_F = 0$ (zostaje na linii startu). Gdy jej adsorpcja jest minimalna wędruje z czołem fazy ruchomej i wówczas jej $R_F = 1$.

Wielkość R_F (R_M) jest więc również charakterystyczna dla analizowanej substancji. Oznacza to, że wykonując pomiary na danym adsorbencie, w danej temperaturze z użyciem ściśle określonej fazy ruchomej otrzymamy powtarzalne wyniki nawet w długim odstępie czasowym.

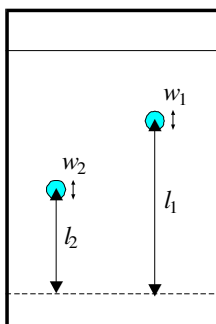
Jednym z celów analitycznych, wykorzystujących chromatografię cienkowarstwową, jest podział próbki (mieszaniny) na pojedyncze składniki. Prowadząc analizę nieznaną mieszaniny możemy na podstawie wartości R_F wzorców substancji i wartości R_F substancji otrzymanych z rozdzielania mieszaniny określić jej skład.



Rys. 4. a – bardzo dobry, b – wystarczający, c – zły rozdział modelowej mieszaniny na poszczególne składniki.

Wielkością charakteryzującą rozdział chromatograficzny jest wielkość R_s :

$$R_s = \frac{2(l_1 - l_2)}{w_1 + w_2}$$



Rys. 5. Sposób obliczania R_s z chromatogramu.

gdzie l_1 i l_2 to odległości środków plamek substancji 1 i 2 od linii startu, w_1 i w_2 są szerokościami tych plamek. Wartość R_s powyżej 0.9 daje już wystarczający rozdział składników mieszaniny. Na wartość R_F (R_M) analizowanej substancji ma wpływ wiele czynników:

- rodzaj i jakość adsorbentu (jednorodność wielkości ziarna, jednorodność warstwy adsorbentu, grubość warstwy),
- rodzaj fazy ruchomej (siła elucyjna poszczególnych składników fazy ruchomej i ich ilość zawarta w fazie ruchomej),
- struktura analizowanej substancji (wielkość molekuly, ilość, jakość i rozmieszczenie grup funkcyjnych w cząsteczce),
- temperatura,
- kształt i wielkość plamki (dokładność dozowania, ilość zadozowanej substancji),
- warunki prowadzenia procesu rozwijania chromatogramu (kształt i wielkość komory chromatograficznej, stopień wysycenia komory parami fazy ruchomej).

Wszystkie wymienione wyżej czynniki mogą powodować, że kształt plamek będzie odbiegał od idealnie symetrycznego. Czynniki te będą bowiem wpływać na liniowość izotermy adsorpcji testowej substancji. W niektórych układach możemy się nawet liczyć z występowaniem tzw. „ogonowania” substancji. W takim przypadku wartość R_F substancji określamy biorąc pod uwagę maksimum stężenia w ogonującej próbce (środek najintensywniej zabarwionego obszaru plamki). Bardzo silne ogonowanie próbki jest dla nas informacją, że wybraliśmy nieodpowiedni układ rozwijający (adsorbent + faza ruchoma), nie dowodzi braku wprawy w wykonywaniu tego typu analiz. Można więc stwierdzić, że **trudność wykonywania analizy polega przede wszystkim na odpowiednim dobraniu układu chromatograficznego, czyli dobraniu najlepszych (optymalnych) warunków jej prowadzenia.**

III. 2. Optymalizacja warunków analizy chromatograficznej

W optymalizowaniu warunków prowadzenia analizy chromatograficznej w adsorpcyjnej chromatografii cieczowej główną uwagę należy więc skupić na odpowiednim doborze adsorbentu i fazy ruchomej. Niezbędne jest więc poznanie właściwości najczęściej stosowanych adsorbentów.

Adsorbenty ogólnie można podzielić na polarne i niepolarne.

Lp.	Rodzaj adsorbentu	Typowy przedstawiciel
1.	polarny nieorganiczny (hydrofilowy)	żel krzemionkowy, tlenek glinowy, krzemian magnezu
2.	niepolarny nieorganiczny	węgiel aktywowany, sadza grafitowana
3.	chemicznie modyfikowane fazy polarne	aminopropyłowe, cyjanopropyłowe, diolowe fazy związane
4.	chemicznie modyfikowane fazy niepolarne	silanizowany żel krzemionkowy, RP: C ₂ , C ₄ , C ₈ , C ₁₈
5.	polarne organiczne	celuloza, chityna, poliamid

Najbardziej racjonalnym kryterium klasyfikacji adsorbentów jest podział na podstawie ich porowatej struktury, chemicznego charakteru powierzchni, powierzchniowego rozłożenia ładunków elektrycznych itp.

W adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej najczęściej stosuje się żel krzemionkowy i tlenek glinowy.

III. 2.1. Żel krzemionkowy

Właściwości chromatograficzne adsorbentu otrzymanego przez polimeryzację kwasu krzemowego zależą od metody otrzymywania i termicznej aktywacji. Powierzchnie właściwe tak otrzymanych adsorbentów zawierają się w granicach od 100 m²/g do 800 m²/g. W stosowanych w chromatografii cienkowarstwowej żelach

krzemionkowych (ok. 500 m²/g), przy całkowicie zhydroksylowanej powierzchni odległość między sąsiednimi powierzchniowymi grupami OH wynosi ok. 5Å. Takie odległości nie pozwalają na utworzenie między nimi mostków wodorowych. Wobec tego o właściwościach adsorpcyjnych żelu krzemionkowego decydują swobodne i bliźniacze grupy hydroksylowe. Żel krzemionkowy wykazuje silne powinowactwo do substancji i rozpuszczalników elektronodonorowych i elektronoakceptorowych. Wielkość adsorpcji rośnie wraz ze wzrostem liczby wiązań podwójnych i polarnych grup funkcyjnych występujących w cząsteczkach chromatografowanych substancji. Obecność grup funkcyjnych zwiększa na ogół powinowactwo adsorpcyjne, przy czym efekt ten rośnie w kolejności:



Adsorpcja chromatografowanych substancji na żelu krzemionkowym jest przede wszystkim wynikiem tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy grupami funkcyjnymi substancji, a miejscami aktywnymi adsorbentu.

III. 2.2. Tlenek glinowy

Tlenki glinowe stosowane w chromatografii mają zwykle strukturę $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ i powierzchnię właściwą 100–200 m²/g. Model budowy powierzchni zaproponowany przez Lippensa i Periego wskazuje, że tworzą ją jony O^{2-} oraz jony Al^{3+} . Jony glinu wypełniają 2/3 pozycji im przypadających, pozostałe nie wypełnione miejsca tworzą tzw. defekty powierzchni. Tlenek glinowy zawiera także różne ilości wody w postaci różnych powierzchniowych grup hydroksylowych lub w postaci zaadsorbowanej.

Na powierzchni tlenku glinowego istnieją cztery rodzaje centrów aktywnych:

- jony Al^{3+} (kwasowe),
- jony O^{2-} (zasadowe),
- zjonizowane grupy $-\text{OH}$ (zasadowe),
- protonowe defekty powierzchni (elektronoakceptorowe).

Na aktywnych miejscach kwasowych (jony Al^{3+}) adsorbują się większość substancji. Szczególnie silnie adsorbują się na nich cząsteczki węglowodorów nienasyconych lub aromatycznych ulegające polaryzacji w polach elektrycznych. Na zasadowych miejscach aktywnych (jony O^{2-}) adsorbują się głównie cząsteczki mające jedną lub więcej grup kwasowych. Protonowe defekty powierzchni zachowują się podobnie jak miejsca aktywne o charakterze kwasowym.

Adsorpcja na grupach $-\text{OH}$ nie odgrywa większej roli. Świadczy o tym fakt, że adsorpcyjna aktywność tlenku glinowego wzrasta z podwyższeniem temperatury aktywacji (usuwanie grup OH).

Tak więc oddziaływania adsorpcyjne na tlenku glinowym mają charakter elektrostatyczny.

III. 2.3. Fazy ruchome

W chromatografii najczęściej stosuje się dwuskładnikowe fazy ruchome. Skład fazy ruchomej powinien być tak dobrany, aby mogła być ona użyta w wybranej technice chromatografii planarnej, a przede wszystkim zapewnić optymalną zdolność rozdzielczą układu. Rozpuszczalniki wchodzące w skład fazy ruchomej nie powinny:

- reagować w sposób nieodwracalny z fazą nieruchomą,
- reagować w sposób nieodwracalny z chromatografowaną substancją (zmieniać jej charakter chemiczny),
- zawierać nawet śladowych ilości zanieczyszczeń.

W adsorpcyjnej chromatografii cieczowej składniki faz ruchomych różnią się najczęściej znacznie siłą elucyjną. Mieszając poszczególne rozpuszczalniki w odpowiednich ilościach (stężeniach) możemy sterować siłą elucyjną fazy ruchomej. Pomocnymi w wyborze odpowiedniego składu fazy ruchomej są tzw. szeregi eluotropowe. Są to empiryczne zestawienia rozpuszczalników od najmniej polarnych do silnie polarnych uporządkowane dla danego typu adsorbentu. Na podstawie szeregów eluotropowych można stwierdzić, że mieszaniny różnych rozpuszczalników, dla pewnych ściśle określonych dla nich stężeń, mają takie same właściwości elucyjne.

Jeżeli składniki fazy ruchomej znacznie różnią się siłą elucyjną to podczas rozwijania chromatogramu mamy do czynienia ze zjawiskiem demiksji. Na skutek selektywnej adsorpcji składników mieszanej fazy ruchomej na płytce tworzą się strefy o różnym składzie, na granicy których tworzy się front zwany frontem demiksji. O obecności frontu demiksji możemy się przekonać, gdy chromatografowana substancja znajdzie się na jego czole. Wówczas jej plamka będzie spłaszczona i rozmyta w kierunku prostopadłym do poruszania się fazy ruchomej.

IV. Część doświadczalna

A. Aparatura i odczynniki

1. Sprzęt:
 - komory do chromatografii planarnej – 2 szt.,
 - ponumerowane od (1) do (11) kolbki o poj. 25 cm³ zawierające testowe substancje – 11 szt.,
 - kolbki miarowe o poj. 50 cm³ – 4 szt.,
 - pipety o poj. 5 cm³ – 5 szt.,
 - zlewka o poj. 50 cm³ – 1 szt.,
 - płytki chromatograficzne pokryte SiO₂ (lub Al₂O₃),
 - pocięte kawałki bibuły,
 - pipetki do nakraplania substancji,
 - eksykator.
2. Odczynniki:
 - heksan, czterochlorek węgla, toluen, chlorek etylenu, aceton,
 - numerowane kolbki z substancjami: (1) 2-nitroanilina, (2) 3-nitroanilina, (3) 4-nitroanilina, (4) mieszanka I, (5) 2-nitrofenol, (6) 4-metylo-2-nitroanilina, (7) 2-metylo-5-nitroanilina, (8) mieszanka II, (9) 2-metylo-4-nitroanilina, (10) sudan II, (11) sudan III.

B. Program ćwiczenia

1. Przygotowanie faz ruchomych.
2. Przygotowanie płytek do analizy.
3. Rozwinięcie chromatogramów.

C. Sposób wykonania ćwiczenia

1. Przygotowanie faz ruchomych.
Sporządzić po 5 cm³ następujących faz ruchomych:
 - heksan + czterochlorek węgla 3:2,
 - heksan + toluen 3:2,
 - heksan + chlorek etylenu 3:2,
 - heksan + aceton 3:2.
2. Przygotowanie płytek do analizy.

Płytki chromatograficzne wykorzystywane do ćwiczenia otrzymano przez podział płytki o większych rozmiarach. Substancje należy nanosić wzdłuż nie ciętego boku. Substancje należy nakraplać w odległości 1 cm jedna od drugiej zachowując odległość od boków płytki również 1 cm. Substancje nakraplać pipetkami 0.7 cm od początku płytki w taki sposób, aby jej

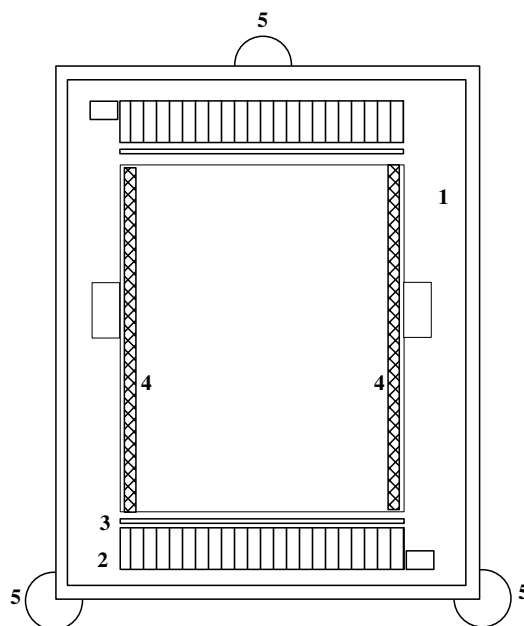
plamka na adsorbencie miała średnicę max. 3 mm. W przypadku nakroplenia większej plamki nie wymieniać płytki. Miejsce, w którym będą nakraplane substancje **delikatnie oznaczyć ołówkiem, aby nie zdrapać adsorbentu** (malutki punkt). Miejsce nakroplenia substancji to linia startu. Linie mety (odległość na którą będziemy rozwijać chromatogram) również **bardzo delikatnie zaznaczyć ołówkiem** w odległości 9 cm od linii startu.

Substancje nanosić na płytkę szklanymi kapilarkami. Do każdej substancji należy stosować inną kapilarkę. Substancje można nakropić od razu na wszystkie cztery płytki, a następnie płytki nie rozwijane w danej chwili ponownie umieścić w eksyktorze. Po nakropieniu substancji **kapilarki bardzo dokładnie umyć acetonem**, osuszyć bibułą i umieścić w pojemniku.

3. Rozwijanie chromatogramu.

Wszystkie czynności związane z komorą należy wykonywać ostrożnie, aby nie stłuc szklanych elementów (Schemat komory przedstawiono na następnej stronie):

- zdjąć szklaną szybkę przykrywającą (1),
- przesunąć maksymalnie do siebie płytkę szklaną (2),
- włożyć do komory płytkę chromatograficzną z naniesionymi substancjami (adsorbentem do góry) w ten sposób, aby krawędź płytki z substancjami znajdowała się przy występie (3). Płytkę powinna leżeć na krawędziach (4),
- włączyć fazę ruchomą pod płytkę (2) nie wyjmując jej z komory. Wlew fazy ruchomej znajduje się z boku płytki (2) (płytsze wgłębienie po prawej stronie). Gdy faza ruchoma podpłynie pod płytkę (2) należy ją przesunąć w kierunku występu (3) (do oporu). O tym czy komora jest wypoziomowana świadczy układ cieczy pod płytką (2). Jeżeli ciecz gromadzi się z jednej strony płytki (2) należy śrubami (5) wypoziomować komorę tak, aby ciecz pod płytką była rozmieszczona równomiernie,
- płytkę chromatograficzną nasunąć na występ (3), przytrzymując jednocześnie płytkę (2) przy występie. W takim położeniu faza ruchoma powinna być zassana przez warstwę adsorbentu. Jeżeli faza ruchoma nie zostanie zassana należy poruszyć płytkę chromatograficzną i szklaną (2) (docisnąć je do siebie ponownie, nie należy wyjmować z komory żadnej z nich),
- gdy faza ruchoma zostanie zassana przykryć komorę szkłem (1) i czekać do momentu aż faza ruchoma dojdzie do linii mety,
- gdy faza ruchoma dojdzie do linii mety należy zdjąć (w miarę szybko) szybę (1) i odsunąć płytkę (2) od występu (3) (zasysanie fazy ruchomej zostanie przerwane) wyjąć płytkę chromatograficzną z komory i umieścić ją pod dygestorium w celu odparowania fazy ruchomej,



Rys. 7. Schemat komory chromatograficznej.

- w ten sposób rozwinąć cztery chromatogramy używając różnych faz ruchomych,
- Po rozwinięciu chromatogramu należy wyjąć z komory płytkę (2) i bibułą zebrać pozostałą fazę ruchomą. Bibułę umieścić pod dygestorium. **Gdy komora będzie sucha można zmienić fazę ruchomą.** Jeżeli w trakcie rozwijania chromatogramu zabraknie fazy ruchomej pod płytką (2) to należy ją uzupełnić nie przerywając pomiaru. W tym celu należy przesunąć od siebie szybę (1) i dołączyć fazę ruchomą przez wlot obok płytki (2).

Po rozwinięciu wszystkich chromatogramów komory osuszyć bibułą, resztki fazy ruchomej w kolbkach wylać do butelki pod dygestorium z napisem **ZLEWKI**.

D. Opracowanie wyników

1. Wykonać pomiary chromatograficzne na żelu krzemionkowym i tlenku glinu (rodzaj adsorbentu określi prowadzący ćwiczenia):
 - w przypadku żelu krzemionkowego nakraplamy substancje z kolbek (1) do (7),
 - dla tlenku glinu nakraplamy substancje z kolbek (1), (2), (3), (8), (9), (6), (10) i (11).
2. Wyznaczyć wartości R_F i R_M wszystkich substancji we wszystkich układach i umieścić je w tabeli.
3. Analizując wartości R_F i R_M testowych substancji wysunąć wnioski dotyczące ich adsorpcji w poszczególnych układach chromatograficznych.

4. Biorąc pod uwagę budowę cząsteczek testowych substancji opisać wpływ struktury substancji na wartości parametrów chromatograficznych (wzory sudanu II i sudanu III można znaleźć w katalogu Aldricha 1996–1997).
5. Na podstawie wielkości wartości R_F testowych substancji określić skład zadozowanej mieszaniny.

Ze względu na wysoką cenę płytek są one regenerowane po zakończeniu ćwiczenia. W związku z tym środek plamki substancji należy wyznaczyć jedynie przez przyłożenie linijki i odczytanie odległości.

Nie wolno obrysowywać plamek, zaznaczać środka ołówkiem lub długopisem !!!!