

The background of the slide features a light blue gradient with faint, white chemical structures and chromatography patterns. The chemical structures include a complex heterocyclic ring system with a carbonyl group and a nitrogen atom, and a simpler structure with a hydroxyl group. The chromatography patterns consist of several parallel diagonal lines, suggesting a separation process.

CHROMATOGRAFIA

Chromatografia jest metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku ich różnego podziału między dwie fazy układu chromatograficznego ruchomą i nieruchomą

faza nieruchoma (stacjonarna, sorbent)

ciało stałe lub ciecz unieruchomiona na nośniku, na których zachodzi proces rozdzielania składników badanej mieszaniny.

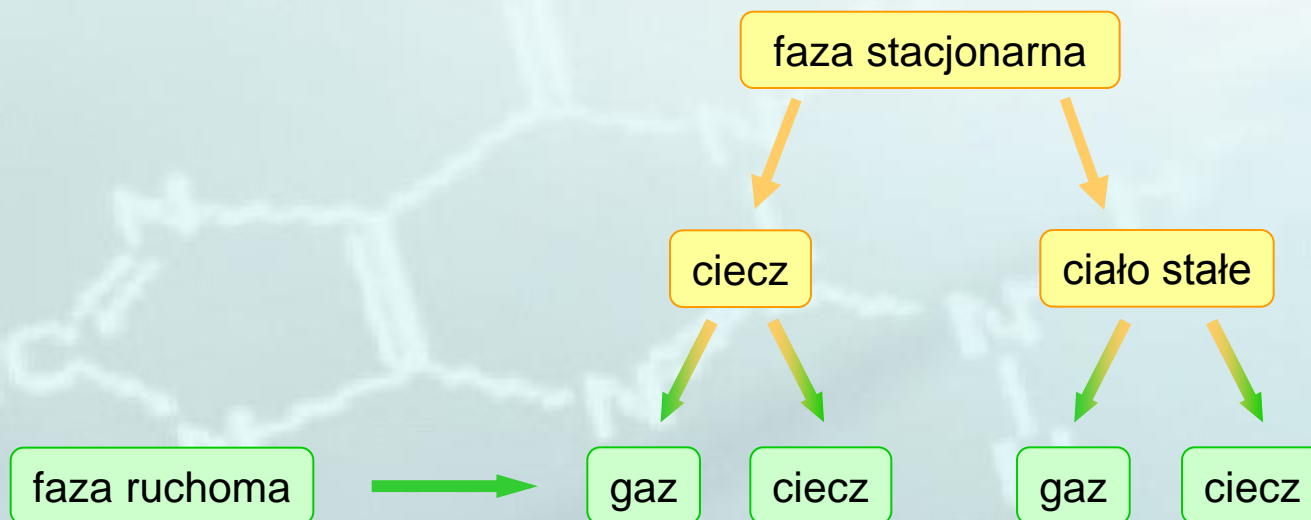
faza ruchoma (eluent)

ciecz lub gaz wykorzystywane do rozdzielania składników badanej mieszaniny.

elucja

wymywanie składników rozdzielanej mieszaniny przez eluent.

UKŁADY CHROMATOGRAFICZNE



PODZIAŁU TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH można dokonać ze względu na:

1. Stan skupienia fazy ruchomej

- ♦ **gaz** - chromatografia gazowa,
- ♦ **ciecz** - chromatografia cieczowa,
- ♦ **fluid** - chromatografia fluidalna.

2. Stan skupienia fazy stacjonarnej

- ♦ **ciało stałe** - chromatografia adsorpcyjna,
- ♦ **ciecz naniesiona na nośnik** - chromatografia podziałowa.

3. Naturę zjawisk będących podstawą procesu chromatograficznego

- ♦ **chromatografia adsorpcyjna**

rozdział mieszanin następuje dzięki różnemu powinowactwu adsorpcyjnemu poszczególnych składników mieszaniny względem fazy stacjonarnej

- ♦ **chromatografia podziałowa**

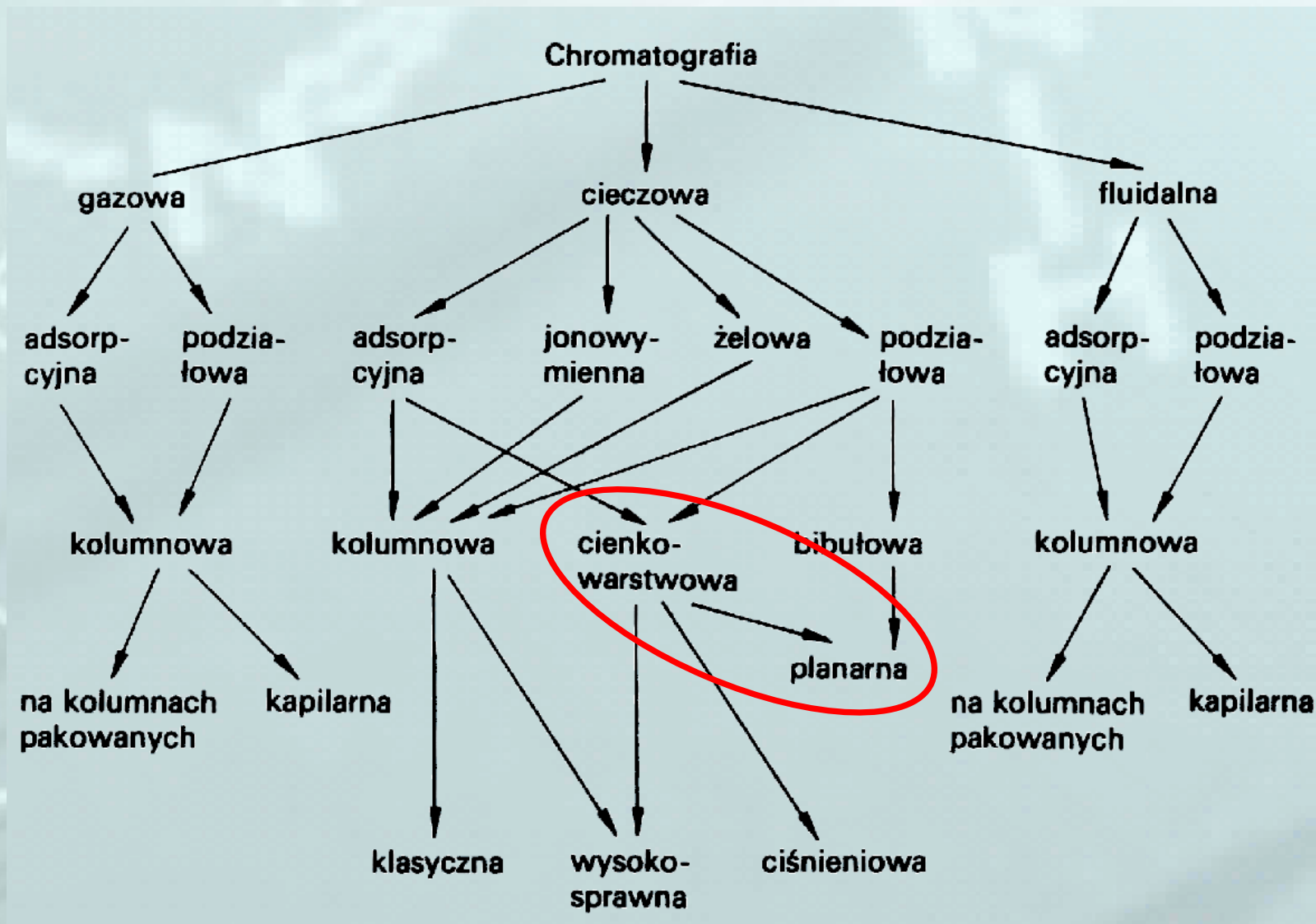
rozdział mieszanin następuje dzięki różnicom w wartościach współczynników podziału składników między dwie nie mieszające się fazy: stacjonarną i ruchomą

- ♦ **chromatografia jonowymienna**

podstawą rozdziału jest wymiana jonowa między jonami z roztworu, a jonami związanymi z fazą stacjonarną, która stanowią jonity

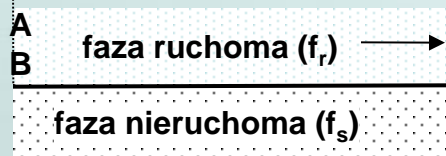
- ♦ **chromatografia żelowa (chromatografia sitowa, sączenie molekularne)**

o rozdziale decydują rozmiary cząstek substancji oraz żelu wypełniającego kolumnę

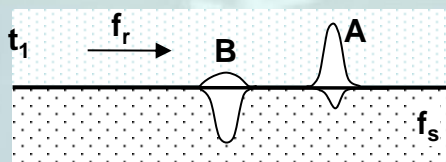


ISTOTA ROZDZIELANIA CHROMATOGRAFICZNEGO

$t = 0$



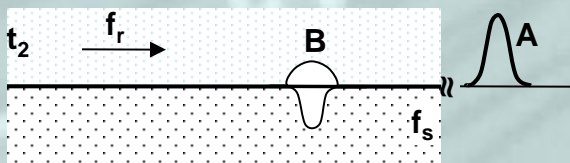
W momencie wprowadzenia mieszaniny substancji A i B do fazy ruchomej (czas $t=0$) zaczyna się proces jej rozdzielania.



W czasie t_1 obserwuje się różny podział składników mieszaniny między obie fazy.

Substancja A wykazuje mniejsze powinowactwo względem fazy stacjonarnej (oddziałuje z fazą nieruchomą znacznie słabiej) niż substancja B, a co za tym idzie porusza się wzdłuż sorbentu znacznie szybciej niż substancja B.

dodatkowo w chromatografii kolumnowej:



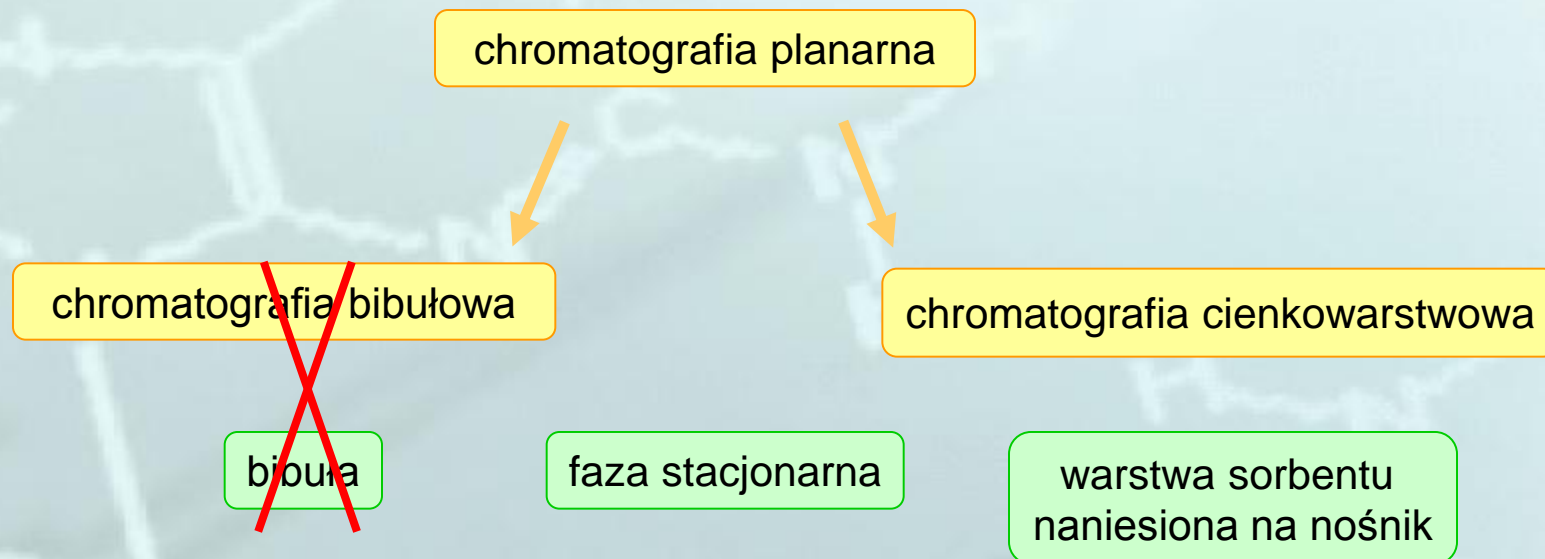
W czasie t_2 składnik A został oddzielony i opuścił układ chromatograficzny.



W czasie t_3 oba składniki mieszaniny zostały rozdzielone i opuściły układ chromatograficzny.

CHROMATOGRAFIA PLANARNA

Chromatografia planarna jest odmianą chromatografii ciekowej, w której faza nieruchoma jest umieszczona na płaszczyźnie



CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

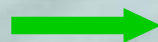
TLC – Thin Layer Chromatography

faza stacjonarna
(sorbent)

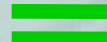


sorbent osadzony na nośniku
PŁYTKA CHROMATOGRAFICZNA

faza ruchoma
(eluent)



ciecz



pojedynczy rozpuszczalnik
lub mieszanina rozpuszczalników

The background of the slide features a light blue gradient with faint, white chemical structures and a thin, diagonal-lined pattern, likely representing a TLC plate. The text is centered in a yellow rounded rectangle with a thin orange border.

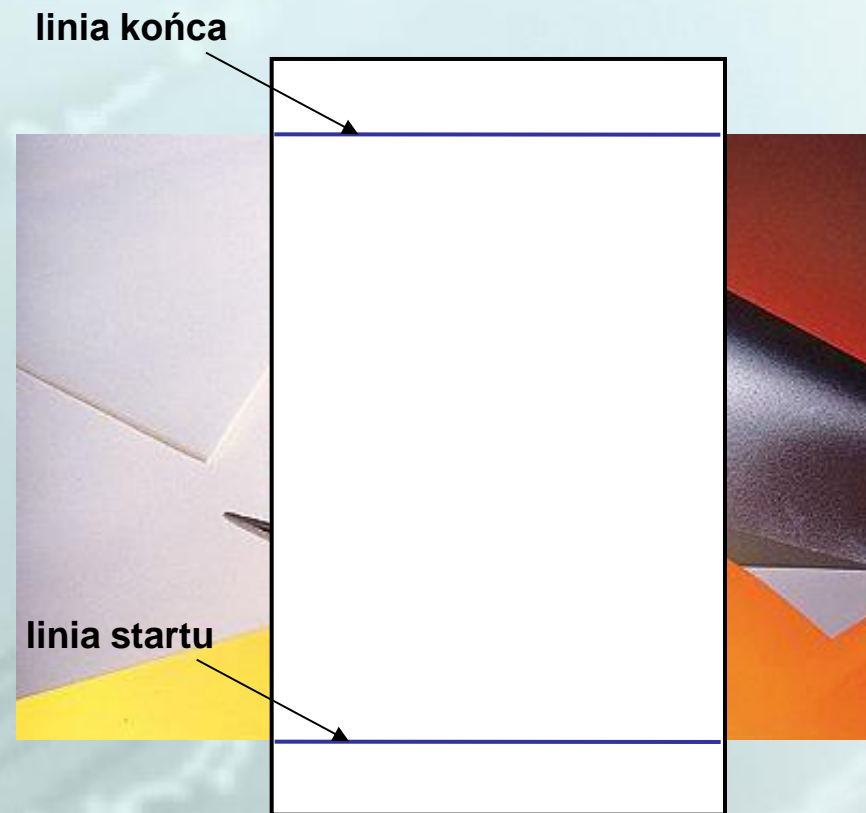
ETAPY PROCESU CHROMATOGRAFICZNEGO W TLC

ETAP I - PRZYGOTOWANIE PŁYTKI

Z arkusza np. 20x20 cm wycina się płytkę o wymiarach odpowiednich do przeprowadzanego oznaczenia.

W odległości 1-2 cm od brzegu płytki rysuje się tzw. linię startu, na którą będzie nanosić się próbki. Na linii można delikatnie zaznaczyć miejsca nanoszenia próbek.

Od drugiego końca płytki w takiej samej odległości od jej brzegu wyznacza się tzw. linię końca.



Nośnik, na którym osadzony jest sorbent może być z aluminium, szkła lub poliestru.

ETAP II - NANOSZENIE PRÓBEK

Na linii startu nanosi się próbkę rozdzielanej mieszaniny oraz wzorce.

Próbki należy nanosić tak, aby nie uszkodzić sorbentu.

Gdy roztwór jest rozcieńczony i musimy nanieść większą ilość substancji wówczas nanosimy próbki kilkakrotnie, za każdym razem odparowując rozpuszczalnik.

Średnica pojedynczej plamki nie powinna być większa niż 2 mm.

Próbki nanosi się za pomocą:

- ♦ automatycznych aplikatorów (100 nl – 100 μ l),
- ♦ mikropipet,
- ♦ mikrostrzykawek.



ETAP III - ROZWIJANIE CHROMATOGRAMÓW

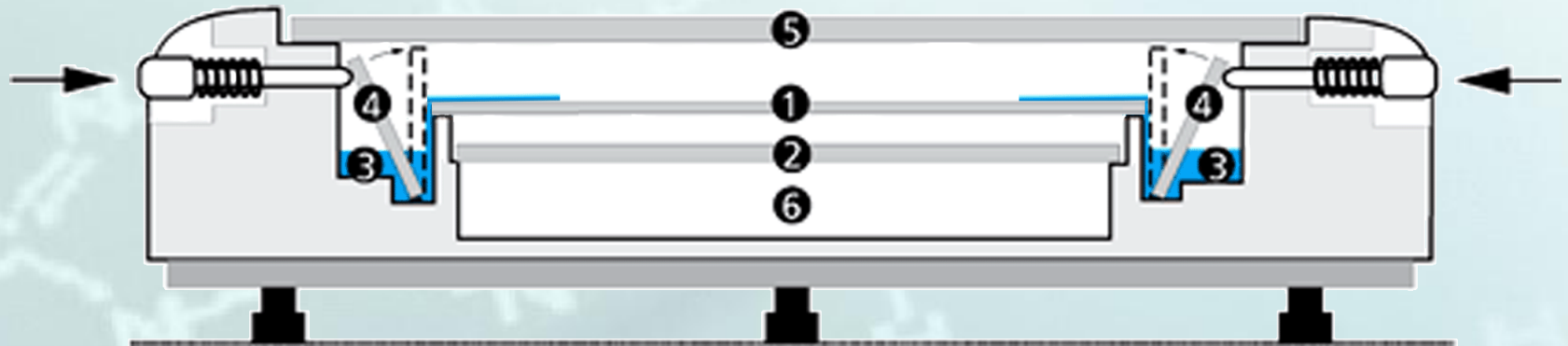
komory chromatograficzne

pionowe

poziome



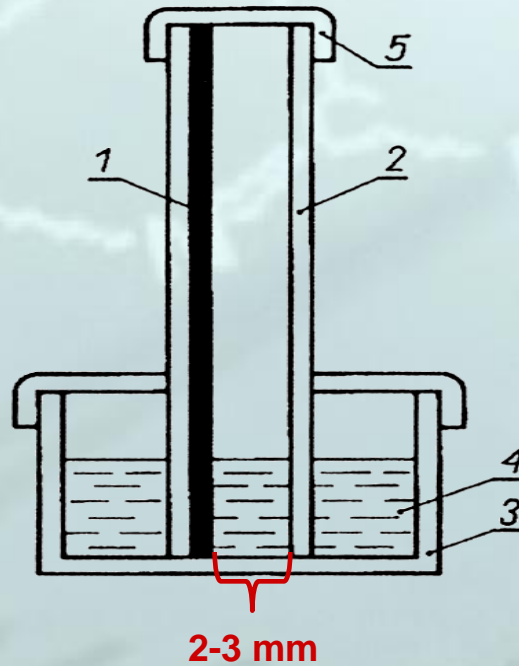
ZASADA DZIAŁANIA KOMORY POZIOMEJ



1 - płyta chromatograficzna, 2 - płyta szklana, 3 - zbiornik eluentu,
4 - płyta dociskowa, 5 - pokrywa szklana, 6 - przestrzeń kondycjonująca.

KOMORY TYPU „SANDWICH”

♦ pionowe

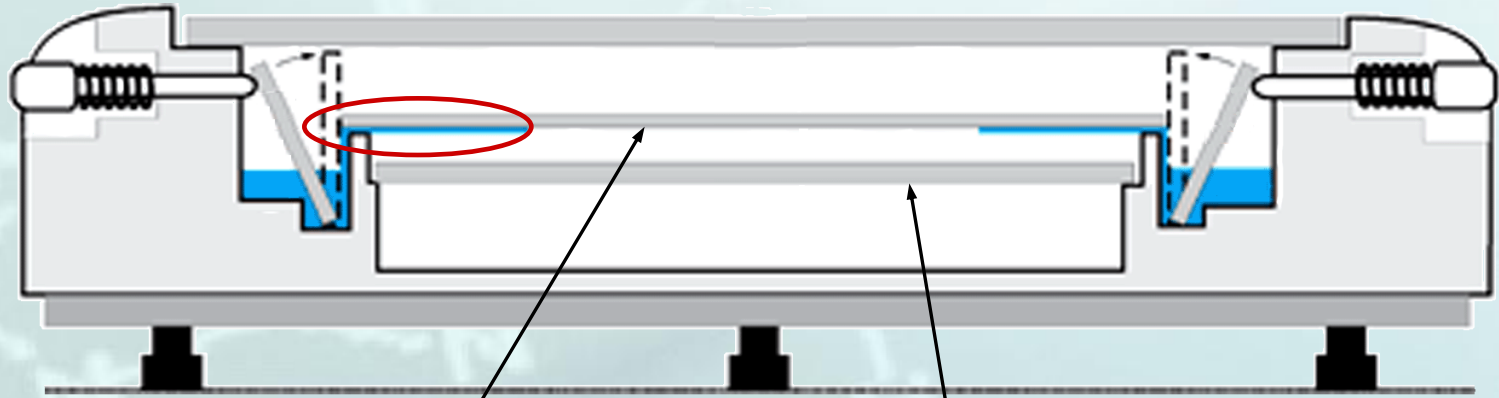


- 1 – płytka chromatograficzna,
- 2 – płytka szklana ograniczająca przestrzeń komory,
- 3 – zbiornik eluentu,
- 4 – eluent,
- 5 – pokrywa.

Komory typu „sandwich” mają bardzo małą objętość. Przestrzeń, w której znajdują się pary rozpuszczalnika jest ograniczona dlatego nie jest konieczne kondycjonowanie komory.

Zastosowanie komory typu „sandwich” zmniejsza 10-20 krotnie zużycie eluentu.

♦ poziome



plytka chromatograficzna
ułożona sorbentem do dołu

plytka szklana ograniczająca
przestrzeń komory

ROZWIJANIE CHROMATOGRAMÓW W KOMORZE PIONOWEJ

W komorze chromatograficznej znajduje się eluent w takiej ilości, aby po wstawieniu płytki nie przekraczał on linii startu.

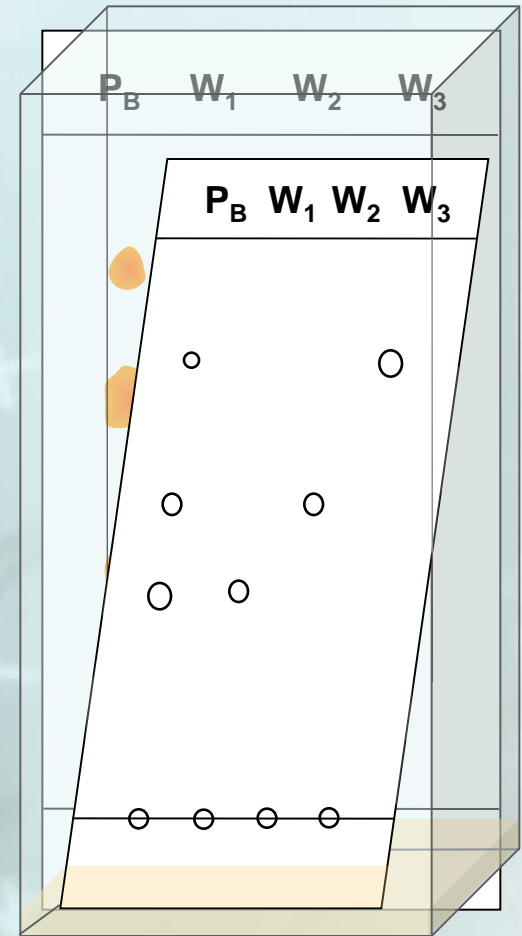
W momencie zetknięcia się z sorbentem eluent zaczyna się poruszać wzdłuż płytki.

Rozpoczyna się proces, który nazywa się rozwijaniem chromatogramu, który kończy się gdy eluent osiągnie linię końca.

W wyniku oddziaływania substancji chromatografowanych z sorbentem i fazą ruchomą następuje rozdzielenie mieszaniny na poszczególne składniki.

Na płytce otrzymujemy szereg plamek odpowiadających poszczególnym składnikom mieszaniny. Otrzymujemy chromatogram.

Składniki, które oddziałują silniej z sorbentem niż z eluentem dają plamki położone bliżej linii startu. Plamki położone dalej od linii startu odpowiadają substancjom oddziałującym silniej z eluentem niż z sorbentem.

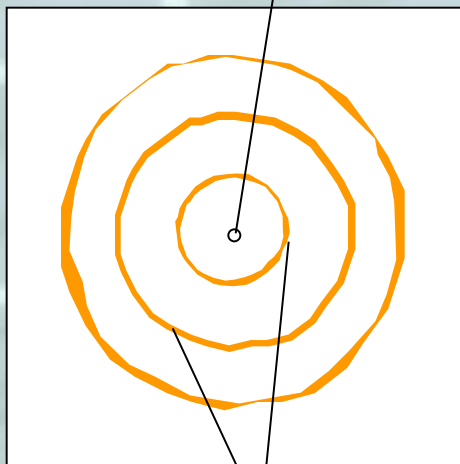


ROZWIJANIE CHROMATOGRAMÓW W KOMORZE POZIOMEJ

- ♦ „od brzegu do brzegu”,
- ♦ **jednoczesne rozwijanie od przeciwległych brzegów,**
- ♦ **odśrodkowe.**

pojedynczej próbki

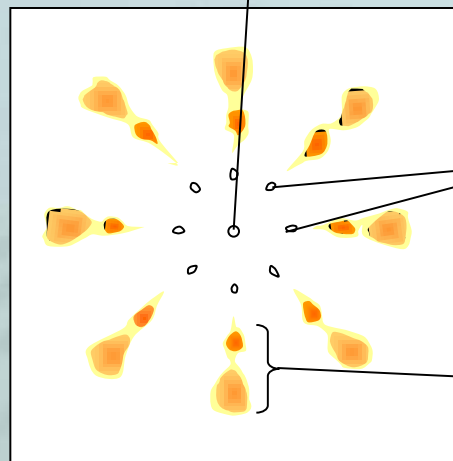
**miejsce naniesienia próbki
i doprowadzenia eluentu**



**okręgi rozdzielonych
składników próbki**

kilku próbek

**miejsce doprowadzenia
eluentu**

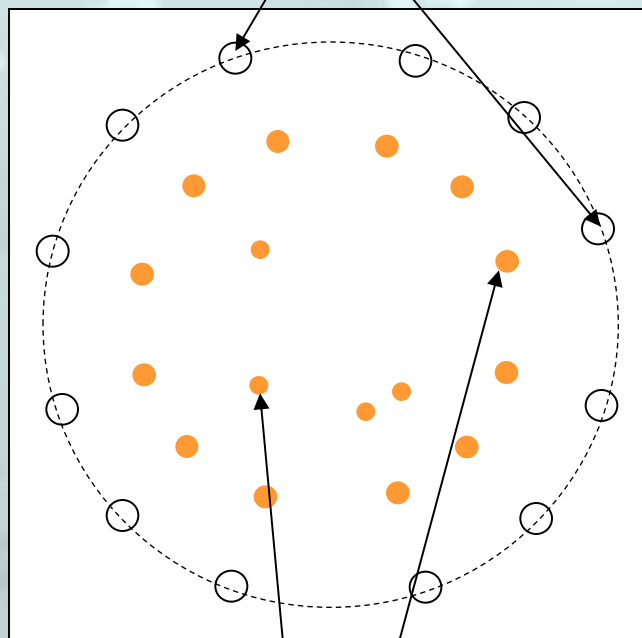


miejsca naniesienia próbek

**plamki rozdzielonych
składników próbki**

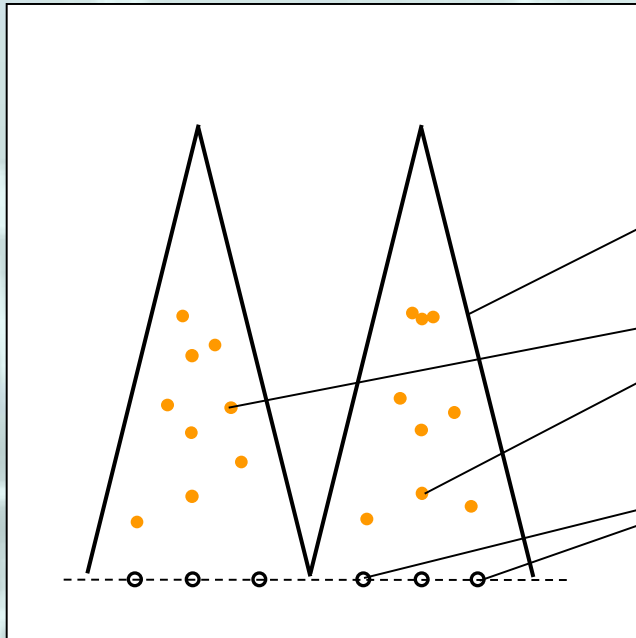
♦ dośrodkowe rozwijanie chromatogramu

miejsca naniesienia próbek



plamki rozdzielonych
składników próbki

Zalety **dośrodkowego** rozwijania chromatogramów wykorzystuje się stosując płytki z trójkątnie ukształtowanymi w wyniku usunięcia sorbentu fragmentami.



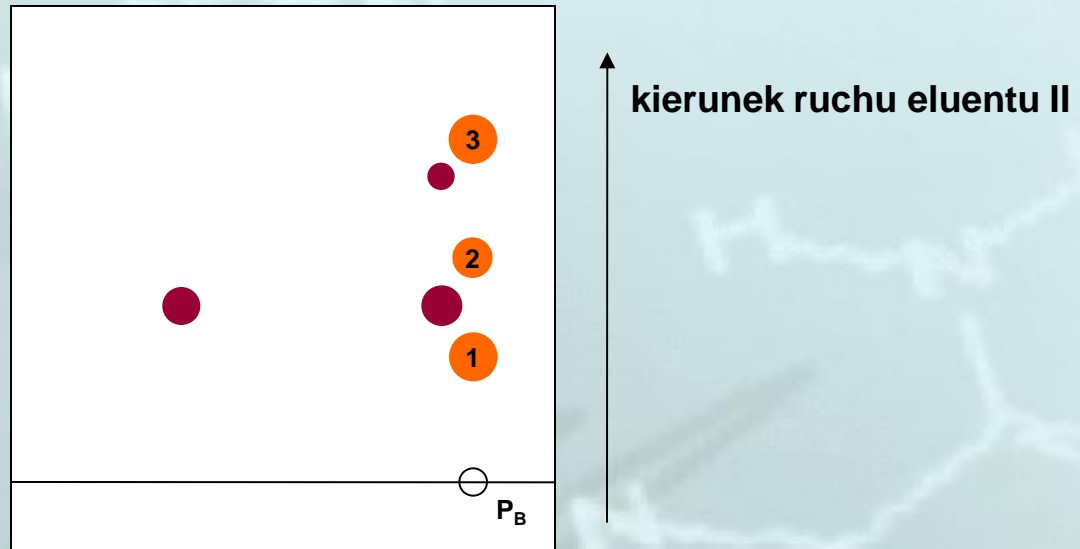
linie tworzące boki trójkąta powstałe przez usunięcie sorbentu

plamki rozdzielonych składników próbki

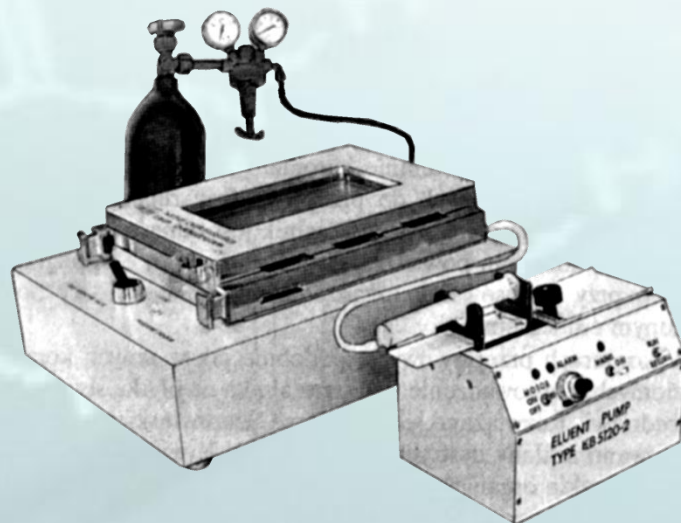
miejsca naniesienia próbek

♦ dwukierunkowe rozwijanie chromatogramów

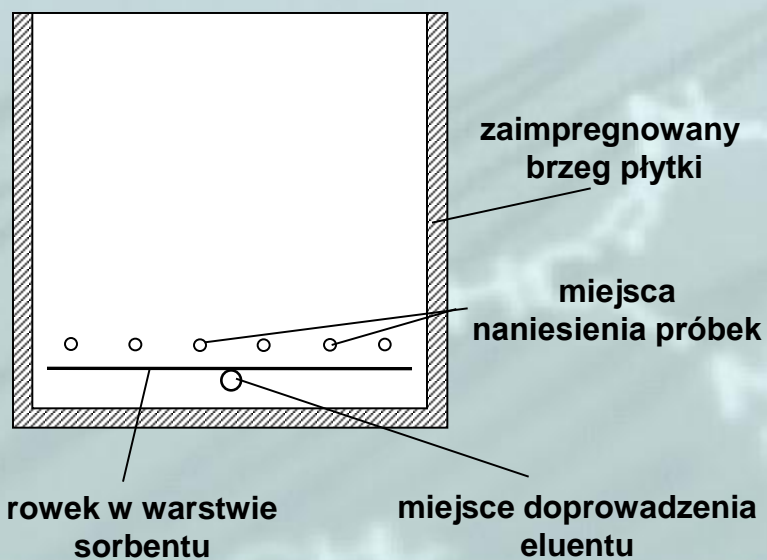
W przypadku złożonych mieszanin, których składniki nie rozdzielają się po jednokrotnym chromatografowaniu stosuje się **rozwijanie dwukierunkowe** prostopadłe.



ROZWIJANIE CHROMATOGRAMÓW W KOMORZE CIŚNIENIOWEJ



płytką do rozwijania chromatogramu w komorze ciśnieniowej



ETAP IV - WIZUALIZACJA CHROMATOGRAMÓW

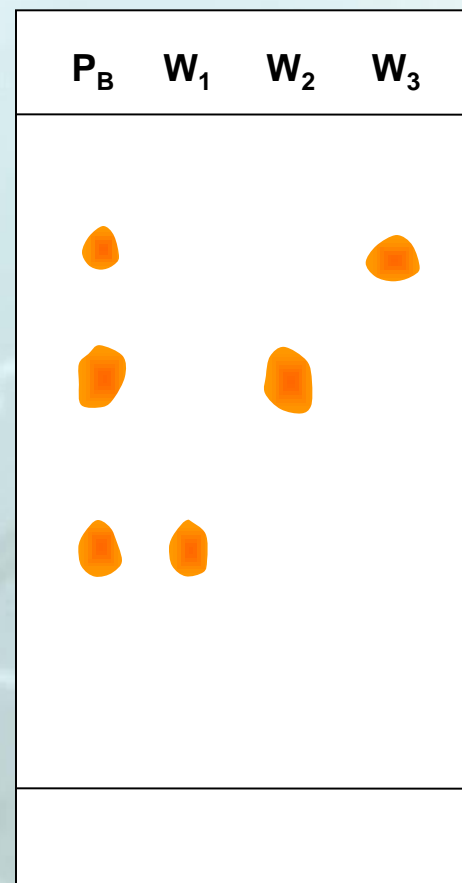
Gdy składniki rozdzielanej mieszaniny są barwne na chromatogramie otrzymuje się serię barwnych plamek, dzięki czemu łatwo ocenić otrzymane wyniki.

Częściej jednak zdarza się, że wszystkie lub niektóre składniki mieszaniny są bezbarwne.

Bezpośrednia analiza wyników jest wtedy niemożliwa.

Konieczne jest uwidocznienie plamek rozdzielonych substancji.

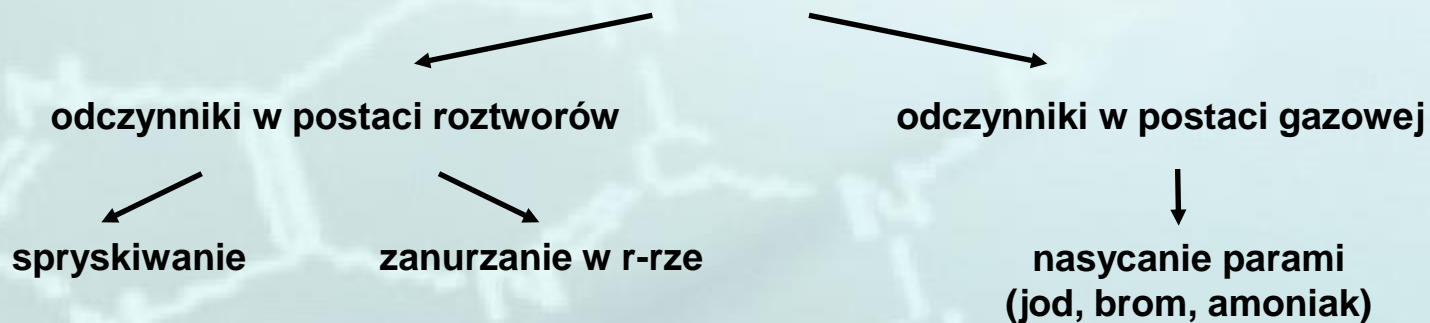
W celu uwidocznienia plamek przeprowadza się tzw. **wizualizację (wywołanie) chromatogramu.**



SPOSOBY WIZUALIZACJI CHROMATOGRAMÓW

1.

wizualizacja metodami chemicznymi



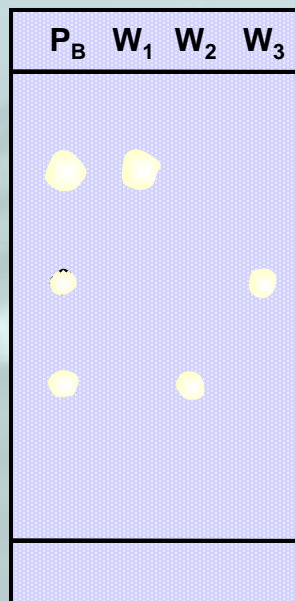
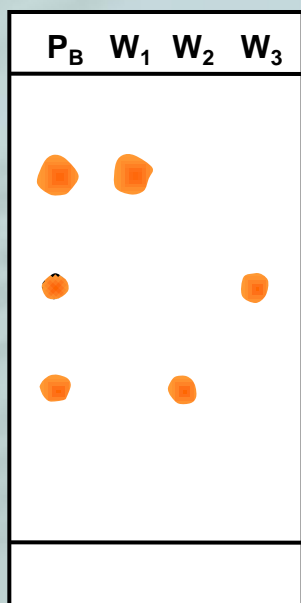
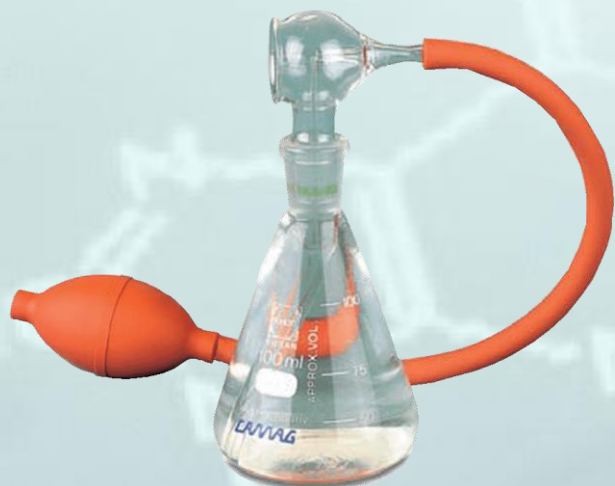
Odczynniki do wizualizacji chemicznej

♦ uniwersalne

reagują z wieloma związkami zawierającymi różne grupy funkcyjne np. nadmanganian potasu, pary jodu

♦ grupowe

reagują z z określoną grupą związków chemicznych np. ninhydryna (aminokwasy), sole diazoniowe (aminy aromatyczne, fenole), odczynnik Dragendorffa- HBIl_4 (alkaloidy, wiele związków o charakterze zasadowym)



2. Naświetlanie przy zastosowaniu lampy UV emitującej promieniowanie o dł. fali 254 nm

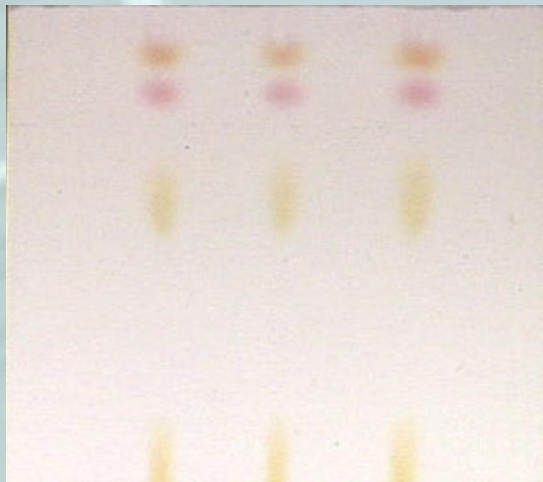
lampa UV



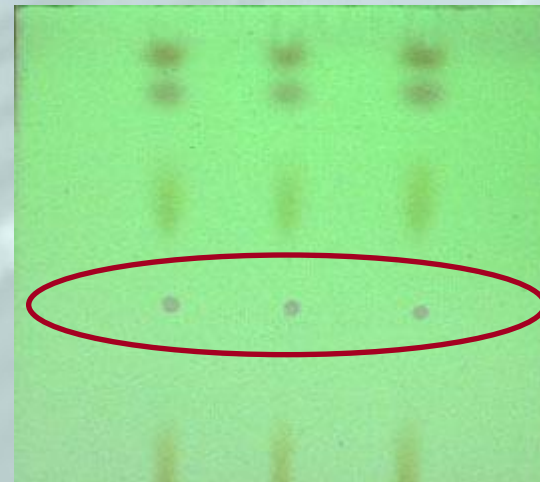
lampa UV z komorą



płytki nie naświetlana lampą UV



płytki naświetlana lampą UV

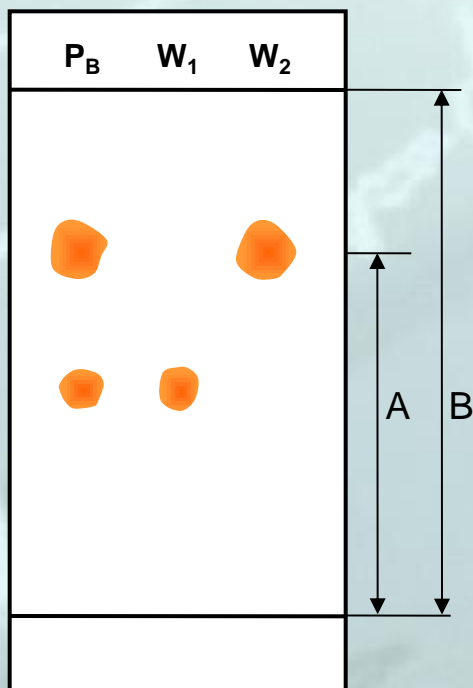


3. Metoda ciekłokrystaliczna

W metodzie tej porowatą przezroczystą folię nasycy się ciekłym kryształem. Folia w świetle spolaryzowanym ma jednakową barwę na całej powierzchni. Po dociśnięciu folii do płytki substancje znajdujące się na niej – po rozdzieleniu mieszaniny – w postaci plamek przechodzą do ciekłego kryształu. W wyniku tego uporządkowana struktura ciekłego kryształu przekształca się w ciecz izotropową i na folii pojawiają się plamki o barwie różniącej się w świetle spolaryzowanym od tła. Plamki te są odbiciem chromatogramu znajdującego się na płytce.

ANALIZA JAKOŚCIOWA

Parametrem, który **charakteryzuje substancję jakościowo** w danym układzie chromatograficznym tzn. w określonych warunkach rozdziału jest tzw. **współczynnik opóźnienia R_f** (Retardation Factor).



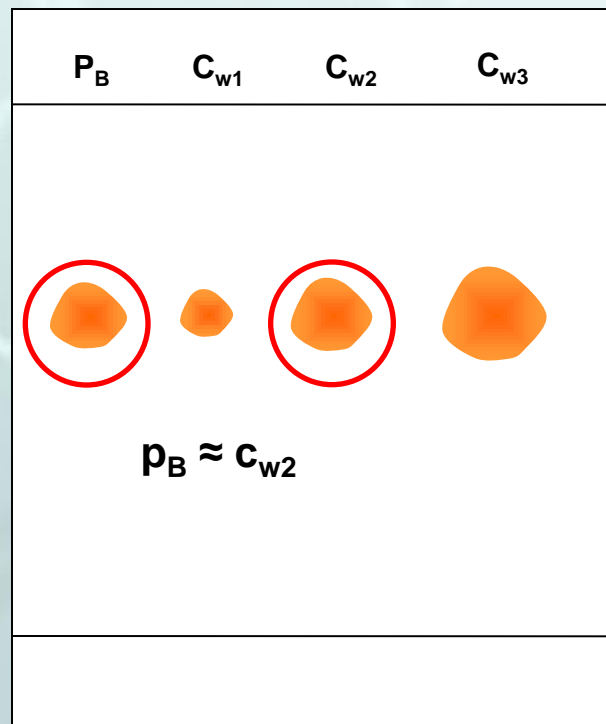
$$R_f = \frac{A}{B}$$

A – droga migracji substancji chromatografowanej mierzona od linii startu do środka plamki,

B – droga migracji eluentu mierzona od linii startu do czoła fazy ruchomej (linia końca).

Identyfikacja substancji polega na porównaniu wartości jej współczynnika R_f z wartością R_f wzorca otrzymaną w warunkach identycznych jak stosowane podczas analizy.

ANALIZA ILOŚCIOWA

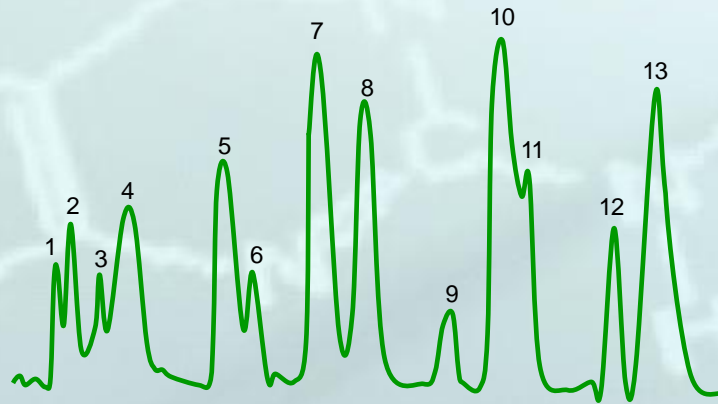


$$C_{w1} < C_{w2} < C_{w3}$$

Przy wykorzystaniu chromatogramów plamkowych możliwe jest zatem jedynie **półilościowe oznaczenie zawartość substancji próbce.**

W celu otrzymania dokładnej zawartości substancji rozdzielanych stosuje się metodę zwaną densytometrią.

Densytometria jest techniką pozwalającą zamienić chromatogramy plamkowe na chromatogramy pikowe.



densytogram



chromatogram plamkowy

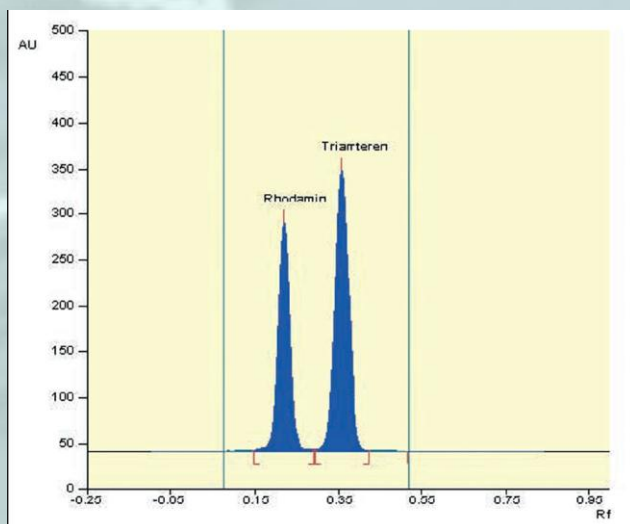
densytometr



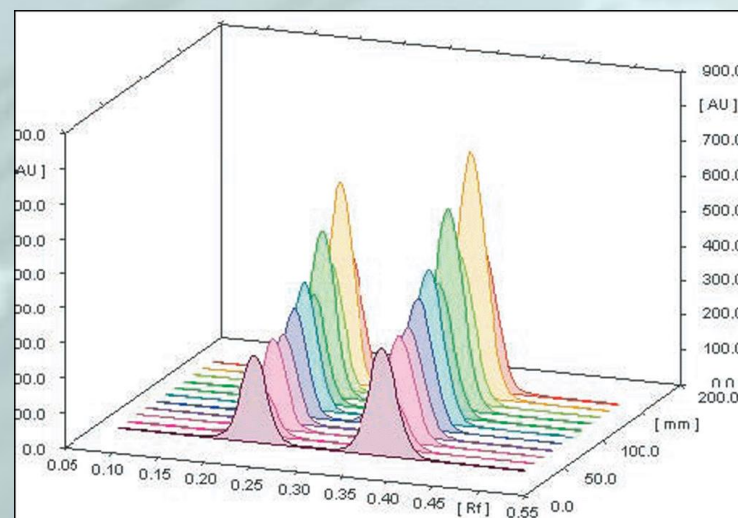
praca z densytometrem



densytogram 2D



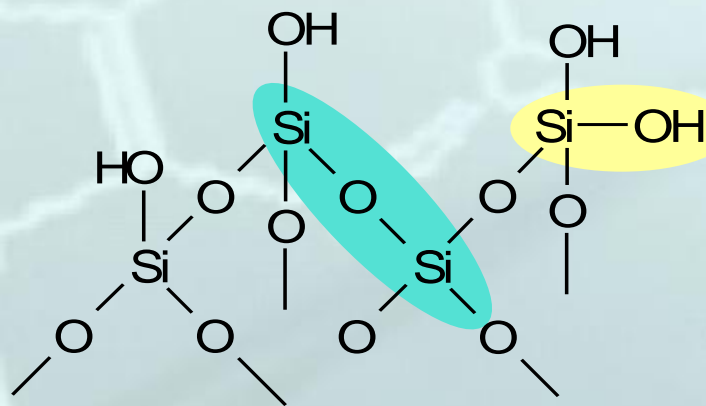
densytogram 3D dla różnych długości fali



**FAZA STACJONARNA
(SORBENT)**

RODZAJ SORBENTU wywiera znaczny wpływ na przebieg i wynik chromatografowania

♦ **żel krzemionkowy**



grupa silanolowa

grupa siloksanowa

Obecność grup hydroksylowych sprawia, że jest sorbentem polarnym zdolnym tworzyć wiązania z polarnymi związkami chromatografowanymi. Im więcej wolnych grup hydroksylowych, tym większa efektywność rozdziału. Ma największe znaczenie w TLC.

Zalety żelu krzemionkowego:

- ♦ uziarnienie o pożądanej wielkości i rozmiarach porów,
- ♦ określona powierzchnia właściwa,
- ♦ duża wytrzymałość mechaniczna.

Wady żelu krzemionkowego:

- ♦ higroskopijność żelu powodująca dezaktywację powierzchni żelu co wpływa niekorzystnie na jego właściwości i odtwarzalność wyników analizy.

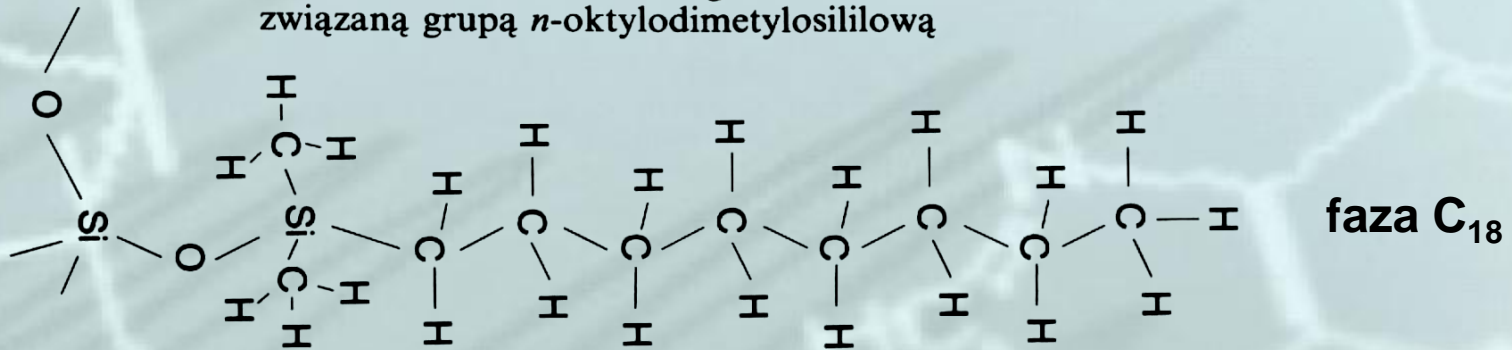
♦ modyfikowany żel krzemionkowy (fazy związane)

Modyfikacja polega na związaniu aktywnych grup hydroksylowych krzemionki za pomocą łańcuchów alkilowych o 2, 8 lub 18 atomach węgla.

REAKCJA SILANIZACJI



Schemat żelu krzemionkowego z chemicznie związaną grupą *n*-oktylodimetylosililową



♦ **tlenek glinu**

Sorbent polarny

Rozdzielanie mieszanin zawierających np. alkaloidy, fenole, steroidy, witaminy, jony metali, lipidy.

♦ **krzemian magnezu (Florisil)**

♦ **celuloza**

W postaci włóknistej (bardzo cienkie włókna) i mikrokrystalicznej.

Rozdzielanie związków hydrofilowych np.: kwasów fosforowych, fosforanów, glikozydów, aminokwasów, alkoholi i cukrów.

♦ **celuloza acetylowana**

Niepolarny sorbent, stosowany w chromatografii z eluentami zawierającymi wodę.

Rozdzielanie związków takich jak: alkaloidy, lipidy, antrachinony, nitrofenole.

♦ **poliamid i poliamid acetylowany**

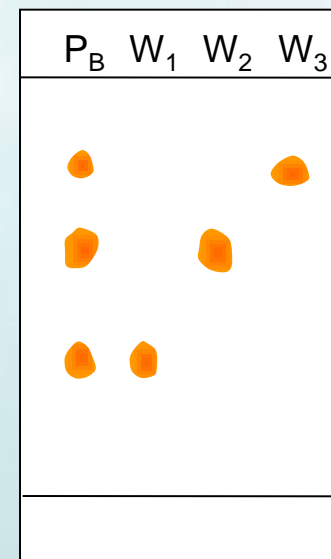
Może być wielokrotnie regenerowany poprzez usuwanie po każdym chromatografowaniu substancji obecnych na płytce eluentem o dużej sile elucji.

Rozdzielanie np.: fenoli, glikozydów, nukleozydów, pestycydów.

FAZA RUCHOMA
(ELUENT)

Prawidłowa analiza jakościowa i ilościowa TLC jest możliwa gdy:

- ♦ badana mieszanina została rozdzielona,
- ♦ plamki poszczególnych składników mieszaniny są nierozmyte,
- ♦ plamki poszczególnych składników są dobrze rozdzielone.



Taki wynik chromatografowania osiąga się wówczas gdy kierując się oczekiwanym składem analitu oraz rodzajem sorbentu dobierze się **odpowiednią fazę ruchomą**.

Siłę oddziaływań danego rozpuszczalnika z określonym sorbentem charakteryzuje tzw. **siła elucji rozpuszczalnika**.

sorbent

siłę elucji wyznaczają

wzrost siły elucji wywołuje

polarny

polarność i polaryzowalność
cząsteczek rozpuszczalnika

wzrost polarności i polaryzowalność cząsteczek
rozpuszczalnika

niepolarny

niespecyficzne siły
Van der Waalsa

wzrost rozmiarów niepolarnych fragmentów
cząsteczek fazy ruchomej

Faza ruchoma jest najczęściej mieszaniną dwóch lub trzech rozpuszczalników zmieszanych w proporcjach zapewniających optymalny rozdział badanej mieszaniny.

SZEREG ELUOTROPOWY DLA SORBENTÓW POLARNYCH

n-heksan, CCl₄, toluen, chloroform.....acetonitryl, etanol, metanol, woda, CH₃COOH

siła elucji rośnie

Dla chromatografowania na niepolarnych fazach stacjonarnych siła elucji rośnie w kierunku przeciwnym.

Ogólna zasada wyboru eluentu jest następująca:

polarna faza stacjonarna

np. żel krzemionkowy

mniej polarna faza ruchoma

np. heksan, toluen chloroform

normalny układ faz

niepolarna faza stacjonarna

np. faza C₁₈

bardziej polarna faza ruchoma

np. acetonitryl, metanol, woda

odwrócony układ faz

Zmiana składu eluentu w bardzo niewielkim zakresie wywiera duży wpływ na jakość rozdziału mieszaniny.

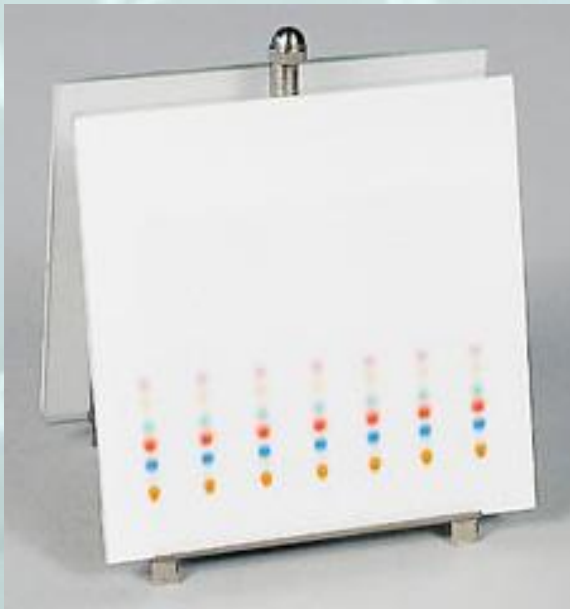
analit	faza stacjonarna	polarność eluentu
polarny	polarna	większa
słabo polarny , niepolarny		mniejsza
niepolarny	niepolarna	mniejsza
słabo polarny , polarny		większa

Rozdzielanie mieszanin za pomocą chromatografii cienkowarstwowej prowadzi się w celu:

- ♦ **analitycznym** – grubość sorbentu 0.1-0.25 mm,
- ♦ **preparatywnym** – grubość sorbentu 0.5-2 mm.

Sorbent osadza się na podłożu (płytkach) z:

- ♦ aluminium,
- ♦ tworzywa sztucznego,
- ♦ szkła.



RODZAJE PŁYTEK DO ROZDZIELANIA ANALITYCZNEGO

♦ **zwykłe (TLC)**

płytki pokryte polarnym sorbentem (najczęściej żel krzemionkowy), stosowane w normalnym układzie faz.

♦ **wysokosprawne (HPTLC – High Performance Thin Layer Chromatography)**

stosowane są sorbenty o drobniejszym uziarnieniu i węższych frakcjach sitowych niż w przypadku TLC.

♦ **płytki RP (RP-TLC – Reverse Phase Chromatography)**

płytki pokryte modyfikowanym żelem krzemionkowym, stosowane w odwróconym układzie faz.

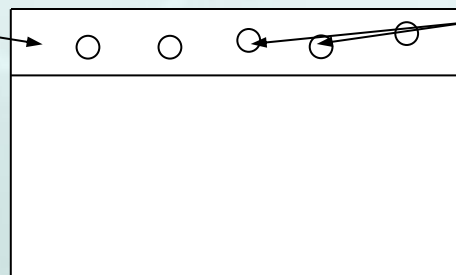
♦ **pokryte sorbentem zawierającym czynnik fluoryzujący (F254)**

Dodatek czynnika fluorescencyjnego (siarczek kadmu lub krzemian cynku) ułatwia obserwację chromatografów przy zastosowaniu lampy UV emitującej promieniowanie o długości fali 254 nm. W takich warunkach widoczne są plamki substancji gaszących fluorescencję, albo mających inną długość fali światła emitowanego pod wpływem wzbudzenia niż czynnik fluoryzujący.

Czynnik fluorescencyjny można stosować się do każdego rodzaju sorbentów.

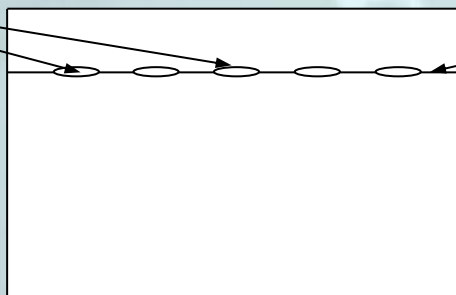
♦ ze strefą koncentracji

strefa koncentracji pokryta
szerokoporowatym
żelom krzemionkowym



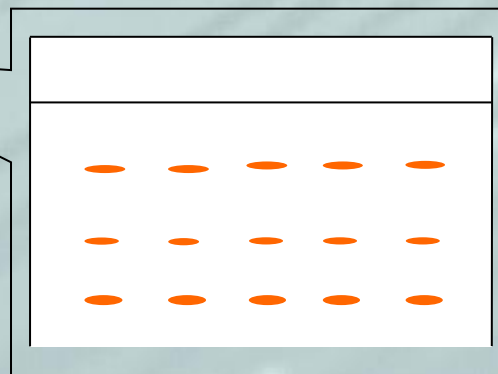
plamki naniesione w dowolnym
miejscu

koncentracja plamek na
granicy faz



linia startu – zaczyna się rozdział

chromatogram po
rozwiązaniu



PORÓWNANIE PŁYTEK TLC I HPTLC

parametr	płytki TLC	płytki HPTLC
grubość sorbentu [mm]	0,25	0,20
rozmiar cząstek sorbentu [μm]	ok. 12	ok. 7
frakcja sitowa	szeroka	wąska
droga rozwijania chromatogramu [mm]	100	50
rozdzielenie mieszaniny na składniki	dobrze	lepsze
wykrywalność analizowanych substancji	dobra	lepsza
zużycie eluentu	małe	mniejsze
wielkość chromatografowanej próbki [%]	100	ok. 10-20

