

Wpływ polarności fazy ruchomej na rozdział barwników metodą chromatografii cienkowarstwowej-TLC

Porównanie migracji barwników jonowych i lipofilowych na płytkach z żelem krzemionkowym

Wprowadzenie

Chromatografia cienkowarstwowa, TLC, jest prostą i szybką metodą rozdzielania składników mieszanin. W metodzie tej substancje nanoszone są na płytkę pokrytą fazą stacjonarną, najczęściej żelem krzemionkowym, a następnie rozwijane za pomocą odpowiednio dobranej fazy ruchomej, czyli eluentu.

Skuteczność rozdziału chromatograficznego zależy przede wszystkim od różnic w oddziaływaniu analizowanych związków z fazą stacjonarną i fazą ruchomą. Żel krzemionkowy jest fazą polarną, dlatego związki polarne i jonowe zwykle silniej się na nim zatrzymują, natomiast związki mniej polarne łatwiej migrują z mniej polarnymi eluentami.

W ćwiczeniu analizowana będzie migracja sześciu barwników: czerwieni metylowej, zieleni bromokrezolowej, błękitu patentowego, błękitu Sudanu, rózu bengalskiego oraz oranżu metylowego. Barwniki te różnią się budową chemiczną, polarnością, jonowością oraz rozpuszczalnością, dlatego stanowią dobry model do obserwacji wpływu rodzaju eluentu na przebieg rozdziału chromatograficznego.

Do rozwijania chromatogramów zostaną zastosowane cztery fazy ruchome o różnej polarności: chloroform, octan etylu, metanol oraz mieszanina n-butanol : kwas octowy lodowaty : woda w stosunku 4 : 1 : 1. Porównanie chromatogramów uzyskanych w różnych eluentach pozwoli ocenić, który układ najlepiej rozdziela badane barwniki oraz jak polarność fazy ruchomej wpływa na wartości współczynnika R_f .

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu polarności fazy ruchomej na migrację i rozdział wybranych barwników metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym.

Studenci porównają chromatogramy uzyskane w czterech różnych eluentach, wyznaczą wartości R_f dla poszczególnych barwników oraz określą, który układ eluentów zapewnia najlepszy rozdział analizowanej mieszaniny.

Sposób wykonania ćwiczenia

1. Płytki TLC pokryte żelem krzemionkowym są bardzo podatne na uszkodzenie mechaniczne oraz zanieczyszczenie powierzchni. Wszystkie czynności należy wykonywać w czystych rękawiczkach. Płytki należy chwycić wyłącznie za krawędzie, nie dotykając powierzchni pokrytej żelem krzemionkowym. Nie należy zginać, pocierać ani uszkadzać powierzchni płytki.
2. Z płytki chromatograficznej pokrytej żelem krzemionkowym o wymiarach 20 cm × 20 cm wyciąć płytki o wymiarach 10 cm × 10 cm.
3. Na każdej płytce, w odległości około 1 cm od dolnej krawędzi, zaznaczyć ołówkiem miejsca nanoszenia próbek. Nie należy rysować ciągłej linii startu. Należy zaznaczyć 8 równomiernie rozmieszczonych kropek: 6 kropek dla poszczególnych barwników oraz 2 kropki dla mieszaniny barwników.
4. Punkty startowe powinny być rozmieszczone w równych odległościach od siebie, tak aby po rozwinięciu chromatogramu plamy nie nakładały się na siebie. Należy zachować odstęp od bocznych krawędzi płytki.
5. Nie należy używać długopisu ani markera, ponieważ barwniki z tuszu mogą rozpuszczać się w eluencie i zakłócać wynik rozdziału.
6. Przygotować cztery komory chromatograficzne przeznaczone do rozwijania płytek w następujących eluentach:
 - o chloroform,
 - o octan etylu,
 - o metanol,
 - o n-butanol : kwas octowy lodowaty : woda = 4 : 1 : 1.
7. Przygotować mieszaninę n-butanol : kwas octowy lodowaty : woda = 4 : 1 : 1, mieszając:
 - 20 ml n-butanolu,
 - 5 ml kwasu octowego lodowatego,
 - 5 ml wody.
 - Po przygotowaniu mieszaniny sprawdzić, czy eluent jest klarowny i jednorodny. Jeżeli mieszanina jest mętna, rozwarstwiona lub zawiera widoczne zanieczyszczenia, należy zgłosić to asystentowi prowadzącemu ćwiczenie.
8. Do bocznych ścianek każdej komory chromatograficznej przyłożyć paski bibuły filtracyjnej. Bibułę zwilżyć odpowiednim eluentem tak, aby przylegała do ścianek komory. Celem tego etapu jest nasycenie atmosfery komory parami fazy ruchomej.
9. Do odpowiednich komór wlać niewielką objętość eluentu, tak aby poziom cieczy znajdował się poniżej punktów startowych po wstawieniu płytki chromatograficznej.
10. Komory chromatograficzne szczelnie zamknąć i kondycjonować przez około 15 minut.

11. Na zaznaczonych punktach startowych nanieść niewielkie ilości roztworów badanych barwników:
 - czerwień metylowa,
 - zieleń bromokrezolowa,
 - błękit patentowy,
 - błękit Sudanu,
 - róż bengalski,
 - oranż metylowy,
 - mieszanina wszystkich barwników.
13. Plamki powinny być małe i możliwie skoncentrowane, najlepiej o średnicy około 2 mm. Zbyt duże plamki mogą powodować rozmycie, ogonowanie oraz nakładanie się plam po rozwinięciu chromatogramu.
14. W razie potrzeby naniesienie próbki można powtórzyć, ale każdą kolejną porcję należy nanosić dokładnie w to samo miejsce dopiero po wyschnięciu poprzedniej plamki.
15. Przygotowane płytki dokładnie osuszyć suszarką i wstawić ostrożnie do komór chromatograficznych. Należy upewnić się, że poziom eluentu znajduje się poniżej punktów startowych i nie zalewa naniesionych plamek.
16. Rozwijać chromatogram do momentu, gdy front eluentu znajdzie się około 1 cm od górnej krawędzi płytki.
17. Wyjąć płytkę z komory i natychmiast zaznaczyć ołówkiem położenie frontu eluentu.
18. Płytkę wysuszyć suszarką pod dygestorium.
19. Po wysuszeniu zaznaczyć położenie widocznych plam barwników. Dla każdej plamy zmierzyć odległość środka plamy od punktu startowego oraz odległość frontu eluentu od punktu startowego.
20. Obliczyć wartość współczynnika R_f dla każdego barwnika według wzoru:

$$R_f = \frac{\text{odległość środka plamki od punktu startowego}}{\text{odległość frontu eluentu od lini startu}}$$

21. Porównać chromatogramy uzyskane w czterech różnych eluentach i określić, który z nich najlepiej rozdziela badaną mieszaninę barwników.
22. Wyniki zestawić w tabeli, uwzględniając nazwę barwnika, zastosowany eluent, obliczoną wartość R_f i obserwowaną liczbę rozdzielonych barwników.

Barwnik	Metanol	Octan etylu	Chloroform	n-butanol : woda : kw. octowy = 4:1:1
<i>Czerwień metylowa</i>				
<i>Zieleń bromokrezolowa</i>				
<i>Błękit patentowy</i>				
<i>Błękit Sudanu</i>				
<i>Róż Bengalski</i>				
<i>Oranż metylowy</i>				
<i>Liczba rozdzielonych barwników</i>				

Opracowanie wyników

W opracowaniu należy porównać migrację poszczególnych barwników w różnych fazach ruchomych. Szczególną uwagę należy zwrócić na różnice między barwnikami jonowymi i bardziej polarnymi a barwnikami lipofilowymi. Należy wskazać, które barwniki pozostawały blisko punktu startowego, które migrowały z frontem eluentu oraz w którym układzie uzyskano najlepszy rozdział plam.

W celu zaliczenia ćwiczenia proszę odpowiedzieć na poniższe pytania.

1. Który z zastosowanych eluentów jest najlepszy do rozdzielania związków lipofilowych i dlaczego?
2. Dlaczego barwniki jonowe/polarne, takie jak oranż metylowy lub błękit patentowy, słabo migrują w chloroformie lub octanie etylu na płytce pokrytej żel krzemionkowym?
3. Który z zastosowanych eluentów najlepiej rozdzielił badaną mieszaninę barwników? Uzasadnij odpowiedź, odnosząc się do wartości R_f i wyglądu plam na chromatogramie.
4. Dlaczego tej samej wartości R_f nie można traktować jako stałej cechy barwnika, niezależnej od warunków chromatografii?
5. Co może oznaczać sytuacja, w której jedna naniesiona substancja daje na chromatogramie np. dwie plamy zamiast jednej?

Odpowiedzi powinny uwzględniać polarność eluentu, charakter barwnika oraz oddziaływania substancji z polarną powierzchnią żelu krzemionkowego.