

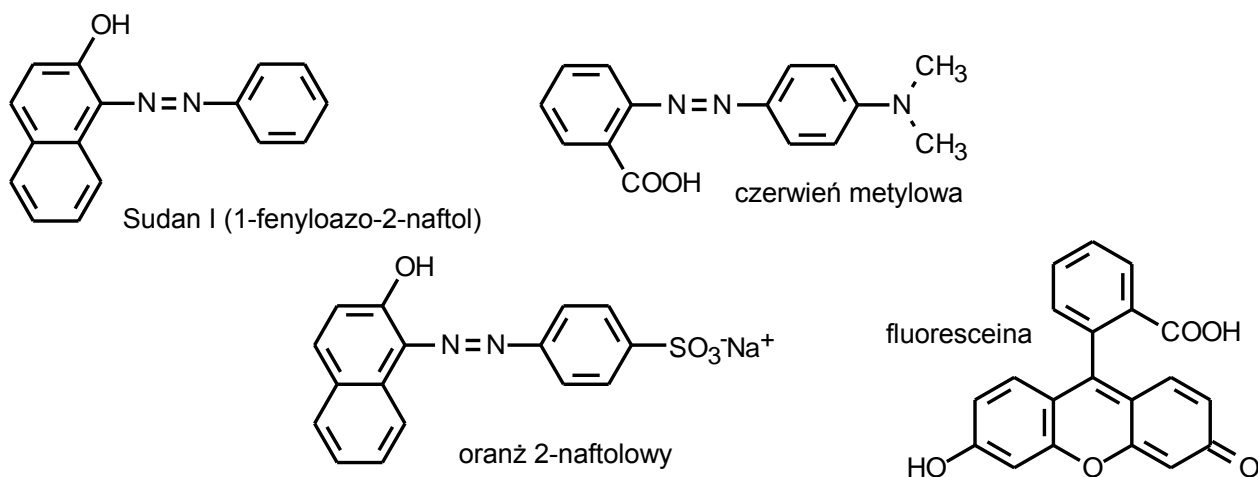
CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA I KOLUMNOWA

Obowiązujący zakres materiału teoretycznego:

Podstawy teoretyczne i zasady postępowania przedstawione są w zasadniczej części skryptu w rozdziale V.5. CHROMATOGRAFIA. Przed przystąpieniem do wykonywania ćwiczenia należy ponadto zapoznać się z wyciągami z kart charakterystyk substancji, używanych podczas wykonywania ćwiczenia.

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie analizy jakościowej roztworu mieszaniny barwników syntetycznych metodą chromatografii cienkowarstwowej. Substancjami, które mogą wchodzić w skład analizowanej mieszaniny są: Sudan I (1-fenyloazo-2-naftol), czerwień metylowa, oranż 2-naftolowy i fluoresceina (Schemat 1). Lista barwników może jednak zostać zmodyfikowana w trakcie ćwiczeń. W dalszej kolejności należy rozdzielić analizowaną mieszaninę na poszczególne składniki stosując technikę chromatografii kolumnowej i potwierdzić skuteczność rozdziału, wykonując chromatografię cienkowarstwową zebranych frakcji.



Schemat 1. Wzory strukturalne barwników syntetycznych, które mogą znajdować się w analizowanej mieszaninie.

Odczynniki:

wzorcowe roztwory barwników o stężeniu ok. 5 mg/ml sporządzone w toluenie lub etanolu:

[1-fenyloazo-2-naftol](#),

[czerwień metylowa](#),

[oranż 2-naftolowy](#),

[fluoresceina](#).

rozpuszczalniki: (po ok. 10 - 40 cm³)

[toluen](#),

[aceton](#) (oraz mieszanina toluenu i acetonu 3 : 1),

[etanol](#)

[żel krzemionkowy](#) do chromatografii kolumnowej ok. 5 - 6 g

płytki do TLC pokryte **żelem krzemionkowym**: ok. 7 × 3 cm i ok. 7 × 2 cm

Wykonanie:

UWAGA: Niektóre barwniki azowe są toksyczne – zaleca się pracę w rękawicach ochronnych, Związki barwne używane w tym ćwiczeniu mogą pozostawić trudne do usunięcia plamy na skórze i odzieży.

1) Analiza jakościowa próbki metodą chromatografii cienkowsarstwowej

Przygotowanie płytki chromatograficznej. Na płycie chromatograficznej o wymiarach ok. 7 × 3 cm zaznacza się delikatnie ołówkiem w odległości ok. 1 cm od krótkiej krawędzi tzw. linię startu. Na linii startu zaznacza się w równych odległościach pięć punktów (co ok. 5 mm), w których naniesione zostaną substancje wzorcowe i badana mieszanina. Przy pomocy włosowatych kapilar¹ (każda do innego barwnika!) nanosi się roztwory wzorcowe i roztwór badany, tak aby plamki miały nie więcej niż 2 mm średnicy. Analizowany roztwór należy umieścić w środkowym miejscu, kilkakrotnie (5 - 6 razy) dotykając kapilarą powierzchnię płytki. Roztwory porównawcze nanosi się po bokach, dwu- lub trzykrotnie w jednym miejscu. Należy pamiętać, aby nie dopuścić do uszkodzenia powierzchni adsorbentu, a plamki nie były zbyt duże, ani położone zbyt blisko siebie. W żadnym momencie nie można dotknąć powierzchni płytki palcami! Po naniesieniu roztworów powierzchnię płytki suszy się w strumieniu ciepłego powietrza (np. suszarką).

Rozwijanie chromatogramu. Komorę chromatograficzną napelnia się do wysokości ok. 3 - 5 mm eluentem, czyli mieszaniną toluenu i acetonu w stosunku objętościowym 3:1 (v/v). Korzystnie jest wyłożyć ścianki każdej komory (ok. ¾ obwodu) bibułą – zapewnia to wysycenie całej objętości komory

parami eluenta i zapobiega nadmiernemu odparowywaniu eluenta z płytki. Po włożeniu płytki komory nie wolno poruszać, do czasu zakończenia rozwijania! Gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się kilka milimetrów od górnej krawędzi, płytkę wyciąga się pęsetką, zaznacza miejsce, do którego dotarło czoło rozpuszczalnika (linię "mety") i suszy. Na podstawie porównania barw oraz przesunięcia (R_f) plamek pochodzących od substancji wzorcowych oraz od składników mieszaniny, ustala się skład analizowanej próbki. Chromatogram należy dołączyć (wkleić) do sprawozdania.

2) Rozdział poszczególnych składników mieszaniny metodą chromatografii kolumnowej

Przygotowanie kolumny i rozdział barwników. Do kolumny chromatograficznej wlewa się kilka mililitrów eluentu (toluen) i na dno wprowadza mały kłębek waty. Odważa się 5 g żelu krzemionkowego i dokładnie miesza w małej zlewce z toluenem, tak aby otrzymać rzadką papkę, która nie zawiera pęcherzyków powietrza. Otrzymaną zawiesinę wlewa się przez lejek do kolumny, otwiera kran i spuszcza nadmiar rozpuszczalnika. Kran zamyka się, gdy eluent znajdzie się kilka milimetrów nad poziomem nośnika. Nie wolno dopuścić do "zapowietrzenia" kolumny! Rozdział na takiej kolumnie byłby całkowicie nieefektywny. Kolumnę ostukuje się i na powierzchnię nośnika wprowadza warstwę ok. 1 cm czystego piasku. Następnie bardzo ostrożnie przy pomocy pipetki Pasteura wprowadza się roztwór przeznaczony do rozdziału. Otwiera się kran kolumny i jednocześnie wkrapla się kilka mililitrów toluenu. Gdy badana substancja zostanie zaadsorbowana w górnej części kolumny, napełnia się kolumnę ok. 10 cm³ toluenu i rozpoczyna się wymywanie najmniej polarnych barwników. **Poszczególne frakcje spływające z kolumny zbiera się osobno do dużych fiolek, starając się dokładnie oddzielić poszczególne barwniki.** Gdy zebrane zostaną pierwsze frakcje lub gdy okaże się, że żadne związki nie są eluowane przez toluen, należy zmienić eluent na mieszaninę toluenu i acetonu w stosunku 3:1 (v/v). W trakcie rozdziału będzie trzeba stopniowo zmieniać rozpuszczalnik na bardziej polarny (czysty aceton, a ostatecznie etanol), aż do wycięcia z kolumny wszystkich składników mieszaniny.

Rozpuszczalnik pozostały w kolumnie usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem, mocując końcówkę otwartego kranika kolumny w korku osadzonym w szyjce kolby ssawkowej. Tubus kolbki ssawkowej podłącza się do pompki wodnej (lub membranowej). Po włączeniu pompki resztki rozpuszczalnika zostają odessane do kolbki ssawkowej.²

3) Potwierdzenie skuteczności rozdziału

Na dowód skuteczności rozdziału należy wykonać kolejny chromatogram cienkowarstwowy, tym razem nanosząc na węższą płytkę (ok. 7 × 2 cm) tylko próbki rozdzielonych frakcji. Ze względu na duże

¹ Zużyte kapilary umieszcza się w pojemniku **SZKŁO-odpady**.

² Resztki rozpuszczalnika umieszcza się w pojemniku **O** (odpady ciekłe, palne, bez fluorowców), a wysuszony tlenek glinu w pojemniku **N** (odpady stałe, niepalne).

rozcieńczenie barwników w zebranych frakcjach, każdy roztwór trzeba nanosić wielokrotnie (ok. 20 razy) w to samo miejsce, nie dopuszczając jednak do rozszerzenia się plamek.¹ Wsuszoną płytkę umieszcza się w komorze, w której eluentem jest mieszanina toluenu i acetonu w stosunku 3:1. Po rozwinięciu, na podstawie otrzymanego chromatogramu, określa się czy wszystkie składniki analizowanej próbki zostały otrzymane jako roztwory czystych związków. Chromatogram należy dołączyć (wkleić) do sprawozdania.

Ilość barwników w zebranych frakcjach jest tak mała (poniżej 1 mg), że trudno byłoby wyodrębnić je z roztworów w czystych postaciach. Gdy końcowy chromatogram zostanie zaakceptowany przez prowadzącego ćwiczenia, frakcje można umieścić w pojemniku **O** (odpady ciekłe, palne, bez fluorowców).

Sprawozdanie

Sprawozdanie z każdego z ćwiczeń A i B musi zawierać:

1. Krótki opis wykonanych czynności (w punktach).
2. Dołączone chromatogramy z obliczonymi wartościami współczynników R_f i identyfikacją wszystkich widocznych plamek.
3. Krótką interpretację uzyskanych wyników (jednoznacznie określenie składu analizowanej próbki, opinię o skuteczności rozdziału mieszaniny metodą chromatografii kolumnowej wraz z uzasadnieniem, wskazanie przyczyn ewentualnych błędów, opinię o czystości wzorców itp.).