

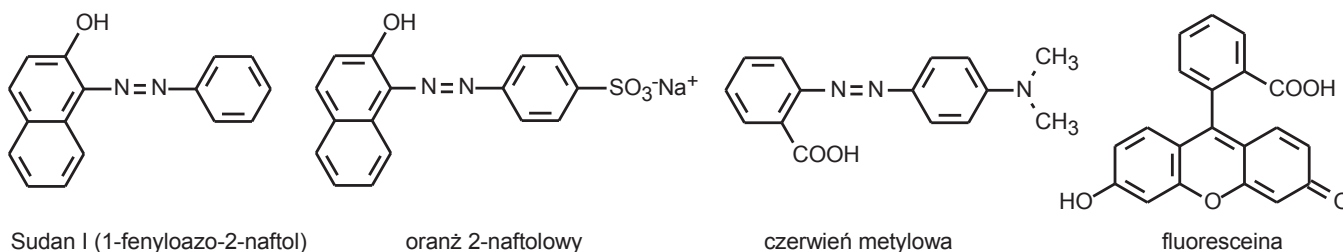
## CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA I KOLUMNOWA

### 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 \(Sudan I\)](#) ,      [czerwień metylowa](#),      [oranż 2-naftolowy](#),      [fluoresceina](#).

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

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

rozpuszczalniki:      (po ok. 10 - 40 cm<sup>3</sup>):

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

### **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 cienkowarstwowej**

*Przygotowanie płytki chromatograficznej.* Na płycie chromatograficznej o wymiarach ok.  $7 \times 3$  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 kapilar<sup>1</sup> (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 napełnia się do wysokości ok. 3 - 5 mm eluentem, czyli mieszaniną toluenu i acetonu w stosunku objętościowym 3:1 (v/v).<sup>2</sup> Korzystnie jest wyłożyć ścianki każdej komory (ok.  $\frac{3}{4}$  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 np. przy użyciu taśmy klejącej) 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, wyrównując go szklanym precikiem. Odważa się 5 g żelu krzemionkowego i dokładnie miesza w małej zlewce z toluenem, tak aby otrzymać

---

<sup>1</sup> Zużyte kapilary umieszcza się w pojemniku **SZKŁO-odpady** lub w przygotowanym na każdej z sal pojemniku opisanym „zużyte kapilary”.

<sup>2</sup> Nie należy korzystać z komór napełnionych eluentem podczas zajęć innych grup ćwiczeniowych – skład eluentu mógł ulec zmianie wskutek szybszego parowania bardziej lotnego składnika. Zawartość komory należy wylać do pojemnika **O**, wysuszyć i wprowadzić świeżą porcję eluenta z oznakowanych pojemników.

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 (min. 5 mm) 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. 0,5 cm czystego piasku. Następnie bardzo ostrożnie przy pomocy pipetki Pasteura wprowadza się roztwór przeznaczony do rozdziału. Otwiera się kran kolumny, a gdy poziom roztworu wprowadzanego roztworu zrówna się z górną powierzchnią piasku, wkrapla się kilka mililitrów toluenu. Gdy badana substancja zostanie zaadsorbowana w górnej części kolumny, napełnia się kolumnę ok. 10 cm<sup>3</sup> toluenu i rozpoczyna się wymywanie najmniej polarnych barwników. **Poszczególne barwne 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 wymycia z kolumny wszystkich składników mieszaniny.

Eluowanie poszczególnych składników mieszaniny można przyspieszyć przyłączając do górnego otworu kolumny gumową gruszkę z wężykiem zakończonym igłą do strzykawki osadzoną w gumowym korku. Delikatne zwiększenie ciśnienia powoduje szybszy wypływ eluatu. Operację taką można wykonywać tylko pod nadzorem prowadzącego, gdyż nieumiejętne posługiwanie się gruszką może doprowadzić do wyrwania korka lub zniszczenia wypełnienia kolumny.

Rozpuszczalnik pozostały w kolumnie usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem, mocując końcówkę otwartego kranika kolumny w korku osadzonego w szyjce kolby ssawkowej. Tubus kolbki ssawkowej podłącza się do pompki wodnej (lub membranowej). Po włączeniu pompki resztki rozpuszczalnika zostają odessane do kolbki ssawkowej.<sup>1</sup> Przesuszony żel krzemionkowy wysypuje się do pojemnika N (odpady stałe, niepalne).

Alternatywną metodą opróżnienia kolumny jest podłączenie wężykiem dolnego wylotu kolumny do króćca tłoczącego pompy membranowej przy jednoczesnym wprowadzeniu górnego otworu kolumny do pojemnika N (odpady stałe, niepalne) – tę operację można wykonywać tylko pod nadzorem prowadzącego ćwiczenia.

---

<sup>1</sup> Resztki rozpuszczalnika umieszcza się w pojemniku O (odpady ciekłe, palne, bez fluorowców), a wysuszony żel krzemionkowy w pojemniku N (odpady stałe, niepalne).

### 3) Potwierdzenie skuteczności rozdziału

Na dowód skuteczności rozdziału należy wykonać kolejny chromatogram cienkowsarstwowy, tym razem nanosząc na węższą płytkę (ok.  $7 \times 2$  cm) tylko próbki rozdzielonych frakcji. Ze względu na duże rozcieńczenie barwników w zebranych frakcjach, każdy roztwór trzeba nanosić wielokrotnie (ok. 20 razy) w to samo miejsce, nie dopuszczając jednak do rozszerzenia się plamek.<sup>1</sup> Wysuszoną 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 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.).

**Załącznik 1. Wyciągi z kart charakterystyk substancji stosowanych w ćwiczeniu *Chromatografia***


nazwa związku (synonimy)	<b>Aceton (<i>Propan-2-on, Keton dimetylowy</i>)</b>		
numer CAS	67-64-1	charakterystyka	ciecz, <i>tw.</i> = 56 °C, <i>d</i> = 0,79 g/cm <sup>3</sup>
zwroty H	<p>H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.</p> <p>H319 Działa drażniąco na oczy.</p> <p>H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.</p> <p>EUH066 Powtarzające się narażenie może powodować wysuszenie lub pękanie skóry.</p>		
zwroty P	<p>P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła/iskżenia/otwartego ognia/gorących powierzchni. Palenie wzbronione.</p> <p>P261 Unikać wdychania pyłu/ dymu/ gazu/ mgły/ par/ rozpylonej cieczy.</p> <p>P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.</p>		
znaki ostrzegawcze / inne zagrożenia	 <b>NIEBEZBIECZEŃSTWO!</b>		<p>Substancje ciekłe łatwopalne (Kat. 2)</p> <p>Działanie drażniące na oczy (Kat. 2)</p> <p>Działanie toksyczne na narządy docelowe - narażenie jednorazowe (Kat. 3)</p> <p>Kontakt z mieszaniną nitrującą lub stęż. kwasem azotowym(V) może spowodować wybuch.</p>
inne informacje, uwagi	<p>Może być szkodliwa przy wdychaniu, po spożyciu i w przypadku absorpcji przez skórę. Może powodować podrażnienie układu oddechowego i skóry. Pary mogą wywoływać uczucie senności i zawroty głowy.</p>		


nazwa związku (synonimy)	<b>Czerwień metylowa (<i>Kwas 4-dimetyloamino-azobenzeno-2'-karboksylowy</i>)</b>		
numer CAS	493-52-7	charakterystyka	ciało stałe, <i>tt.</i> = 181 - 182°C
zwroty H	Nie dotyczy – nie została sklasyfikowana jako substancja niebezpieczna zgodnie z GHS		
zwroty P	P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.		
Piktogramy i hasło ostrzegawcze / inne zagrożenia	brak	brak	
inne informacje, uwagi	<p>Może być szkodliwa przy wdychaniu, spożyciu lub absorpcji przez skórę. Może powodować podrażnienie układu oddechowego, skóry i ucu.</p> <p>W razie kontaktu może spowodować powstanie trudnych do usunięcia barwnych plam na skórze i odzieży.</p>		

nazwa związku (synonimy)	<b>Etanol (Alkohol etylowy) o stęż. 95 %</b> <b>Etanol skażony eterem dietylowym (Anodyna)</b>		
numer CAS	64-17-5	charakterystyka	ciecz, <i>tw.</i> = 78° C, <i>d</i> = 0,789 g/cm <sup>3</sup>
zwroty H	H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.		
zwroty P	P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła/iskrzenia/otwartego ognia/gorących powierzchni. Palenie wzbronione.		
znaki ostrzegawcze / inne zagrożenia	 <b>UWAGA!</b>		Substancja łatwopalna (Kat. 2)
inne informacje, uwagi	<p><b>Etanol skażony (anodyna) nie nadaje się do spożycia! Działa szkodliwie po połknięciu.</b></p> <p>Może być szkodliwy przy wdychaniu i w przypadku absorpcji przez skórę.. Powoduje podrażnienie układu oddechowego, skóry i oczu..</p>		

nazwa związku (synonimy)	<b>1-Fenyloazo-2-naftol (Sudan I)</b>		
numer CAS	842-07-9	charakterystyka	ciało stałe, <i>tt.</i> = 131 - 133°C
zwroty H	<p>H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.</p> <p>H341 Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne.</p> <p>H351 Podejrzewa się, że powoduje raka.</p> <p>H413 Może powodować długotrwałe szkodliwe skutki dla organizmów wodnych.</p>		
zwroty P	<p>P280 Stosować rękawice ochronne.</p> <p>P281 Stosować wymagane środki ochrony indywidualnej.</p>		
Piktogramy i hasło ostrzegawcze / inne zagrożenia	 <b>UWAGA!</b>		<p><b>Działanie uczulające na skórę (Kat.1)</b></p> <p>Rakotwórczość (Kat. 2)</p> <p>Działanie mutagenne na komórki rozrodcze (Kat. 2)</p>
inne informacje, uwagi	<p>Przechowywać w chłodnym miejscu. Przenosić i przechowywać wyłącznie w zamkniętych naczyniach.</p> <p>Starannie myć ręce po każdej operacji z udziałem tego związku. W razie kontaktu może spowodować powstanie trudnych do usunięcia barwnych plam na skórze i odzieży. Ślady ze skóry można usunąć etanolem, a następnie roztworem chloranu(I) sodu.</p> <p>W przypadku pożaru tworzą się niebezpieczne produkty rozkładu - tlenki węgla i azotu.</p>		

nazwa związku (synonimy)	<b>Fluoresceina</b>		
numer CAS	2321-07-5	charakterystyka	ciało stałe, <i>tt.</i> = 320°C
zwroty H	Nie dotyczy – nie została sklasyfikowana jako substancja niebezpieczna zgodnie z GHS		
zwroty P	P261 Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.		
piktogramy i hasło ostrzegawcze  / inne zagrożenia	brak		brak
inne informacje, uwagi	W razie kontaktu może spowodować powstanie trudnych do usunięcia barwnych plam na skórze i odzieży.		

nazwa związku (synonimy)	<b>Oranż 2-naftolowy (Sól sodowa kwasu 4-(2-hydroksy-1-naftylazo)benzenosulfonowego, Oranż <math>\beta</math>-naftolowy, Oranż II)</b>		
numer CAS	633-96-5	charakterystyka	ciało stałe, <i>tt.</i> = brak danych
zwroty H	H315 Działa drażniąco na skórę. H319 Działa drażniąco na oczy. H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.		
zwroty P	P261 Unikać wdychania pyłu/ dymu/ gazu/ mgły/ par/ rozpylonej cieczy. P305+P351+P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.		
piktogramy i hasła ostrzegawcze  / inne zagrożenia	 <b>UWAGA!</b>		Drażniące na skórę (Kat. 2) Działanie drażniące na oczy (Kat. 2) Działanie toksyczne na narządy docelowe - narażenie jednorazowe (Kat. 3)
inne informacje, uwagi	W razie kontaktu może spowodować powstanie trudnych do usunięcia barwnych plam na skórze i odzieży.		

nazwa związku (synonimy)	<b>Toluen</b>		
numer CAS	108-88-3	charakterystyka	ciecz, $t_w.$ = 111 °C, $d$ = 0,87 g/cm <sup>3</sup> prężność pary przy 20 °C = 29 mbar temperatura zapłonu = 4°C
zwroty H	<p>H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary</p> <p>H304 Połknięcie i dostanie się przez drogi oddechowe może grozić śmiercią</p> <p>H315 Działa drażniąco na skórę.</p> <p>H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy</p> <p>H361 Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki</p> <p>H373 Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie.</p>		
zwroty P	<p>P202 Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa</p> <p>P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, iskrzenia, otwartego ognia, gorących powierzchni. Palenie wzbronione.</p> <p>P243 Przedsięwziąć środki ostrożności zapobiegające statycznemu rozładowaniu</p> <p>P260 Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy</p> <p>P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy</p> <p>P301+P310 W przypadku połknięcia natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem</p> <p>P331 Nie wywoływać wymiotów (w przypadku połknięcia)</p> <p>P303+P351+P353 W przypadku kontaktu ze skórą (lub z włosami) ostrożnie płukać wodą przez kilka minut pod strumieniem wody(prysznicem)</p> <p>P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie</p> <p>P308+P313 W przypadku narażenia lub styczności zasięgnąć porady lub zgłosić się pod opiekę lekarza</p>		
piktogramy i hasła ostrzegawcze  / inne zagrożenia	 <p><b>NIEBEZPIECZEŃSTWO!</b></p>		<p><b>Zagrożenie spowodowane aspiracją (Kat. 1)</b></p> <p>Substancja ciekła łatwopalna (Kat. 2)</p> <p>Szkodliwe działanie na rozrodczość (Kat. 2)</p> <p>Działanie drażniące na skórę (Kat. 2)</p> <p>Działanie toksyczne na narządy docelowe – powtarzane narażenia (płuca, Kat. 2)</p>
inne informacje, uwagi	<p>Z powietrzem tworzy mieszaniny wybuchowe. Trzymać z dala od źródeł ognia. Praca wyłącznie pod sprawnym wyciągiem.</p> <p><b>Kobiety w ciąży nie powinny mieć kontaktu z tym związkiem</b> (istnieją przesłanki wskazujące na możliwość szkodliwego wpływu na płód człowieka)!</p>		



nazwa związku (synonimy)	<b>Żel krzemionkowy do chromatografii kolumn.</b> <b>(Amorficzny tlenek krzemu)</b>		
numer CAS	112926-00-8  7631-86-9	charakterystyka	ciało stałe, <i>tt.</i> ok. 1700°C
zwroty H	Nie dotyczy - nie jest klasyfikowany jako substancja niebezpieczna		
zwroty P	Nie dotyczy - nie jest klasyfikowany jako substancja niebezpieczna		
piktogramy i hasło ostrzegawcze / inne zagrożenia	Związek nie znajduje się na wykazie substancji niebezpiecznych zgodnie z obowiązującymi przepisami.		Może być szkodliwa przy wdychaniu i powodować podrażnienie układu oddechowego.  Może powodować podrażnienie oczu.
inne informacje, uwagi	<b>Związek w kontakcie z wilgotnym powietrzem stopniowo zmniejsza aktywność - przechowywać pojemnik dokładnie zamknięty w suchym miejscu.</b>  Nie stwierdzono działania rakotwórczego żelu krzemionkowego, jednak ze względu na udokumentowane działanie kancerogenne krzemionki krystalicznej, amorficzną postać tlenku krzemu należy traktować z dużą ostrożnością – w szczególności unikać pylenia przy przesypywaniu, odpady umieszczać w odpowiednich pojemnikach.		