

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Chromatografia – (gr. chromatós = barwa + grapho = pisze) podstawowa technika analityczna lub preparatywna służąca do rozdzielania i identyfikacji związków chemicznych w mieszaninie.

Jest to fizykochemiczna metoda rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku ich różnego powinowactwa do fazy stacjonarnej i ruchomej. Substancje migrując ulegają podziałowi ilościowemu pomiędzy dwie fazy (ruchomą i nieruchomą). Każdą substancję charakteryzują określone parametry retencji.

Charakterystyka TLC

Forma metody – planarna

Mechanizm sorpcji – stosowane są wszystkie mechanizmy sorpcji: podział, adsorpcja, wymiana jonowa, wykluczenie, powinowactwo i chiralna. Składniki rozdzielają się na podstawie szybkości migracji zależnej od powinowactwa do faz.

Nośnik – płytki szklane, aluminiowe, plastikowe.

Faza stacjonarna – drobnoziarniste sorbenty stałe o wielkości ziarna 10-30 μm – żel krzemionkowy, celuloza, żywice jonowymienne, tlenek glinu, ziemia okrzemkowa, selektory chiralne. Grubość warstwy sorbentu 0,2-2,5 mm. Może zawierać czynnik fluoryzujący.

Faza ruchoma – pojedyncze rozpuszczalniki lub ich mieszaniny o różnej polarności – od niepolarnych węglowodorów do polarnych alkoholi, wody oraz rozpuszczalników kwasowych i zasadowych. Rozpuszczalnik porusza się dzięki siłom kapilarnym.

Komory – różne naczynia o kształtach prostopadłościennych lub cylindrycznych, szczelnie zamknięte.

Substancja rozdzielana przenoszona jest wraz z fazą ruchomą przez płaskie złożę fazy stacjonarnej metodą pionową (wstępującą) lub horyzontalną.

Wizualizacja

Przy pomocy odczynników chromogennych tworzących połączenia barwne ze wszystkimi lub niektórymi substancjami rozdzielanymi, oświetlanie promieniami UV, utlenianie i zwęglanie kwasem siarkowym (spryskiwanie), działanie par jodu, skanowanie densytometryczne – pomiar natężenia promieniowania odbitego od powierzchni po naświetleniu jej promieniowaniem UV/VIS (powstają piki wskazujące na obecność substancji absorbującej),

wykrywanie substancji znakowanych wskaźnikami promieniotwórczymi (klisza fotograficzna, liczenie scyntytacji, skanowanie licznikiem Geigera-Müllera),

Analiza jakościowa.

Odbyw się na podstawie: porównania parametrów retencyjnych uzyskanych dla substancji badanej i wzorcowej (R_F) najlepiej w kilku układach chromatograficznych; porównania widma spektrofotometrycznego dla plamy substancji badanej i wzorcowej (przy użyciu densytometru); analize innymi metodami instrumentalnymi (IR, NMR, spektrometria mas) po uprzedniej ekstrakcji substancji oznaczanych z płytki chromatograficznej.

Analiza ilościowa

A. Metody bezpośrednie – pomiary ilościowe przeprowadza się z zastosowaniem densytometrów skaningowych rejestrujących absorbancję lub fluorescencję plam substancji analizowanych w zakresie promieniowania VIS lub UV, której miarą jest pole powierzchni pików na densytogramie. Zarejestrowane powierzchnie pików substancji oznaczanych są porównywane z polami powierzchni pików substancji wzorcowych o znanym stężeniu.

- Fotodensytometria – w oznaczeniu stosowany jest pomiar światła odbitego lub przepuszczonego UV lub VIS.
- Fluorymetria – pomiar natężenia światła emitowanego przez substancje fluoryzujące.

B. Oznaczenie pośrednie – sorbent z powierzchni płytki zawierający plamkę substancji oznaczanej jest ekstrahowany odpowiednim rozpuszczalnikiem a otrzymany roztwór poddaje się analizie inną metoda instrumentalną np. spektrofotometryczną w zakresie UV lub fluorymetryczną.

Inne procedury w TLC

Dwuwymiarowa TLC – stosowana dla pełnego rozdzielania substancji o podobnych właściwościach chemicznych. Pojedynczą próbkę rozwija się po naniesieniu w polu startowym umieszczonym w rogu płytki. Składniki są częściowo rozdzielone wzdłuż jednego boku płytki. Chromatogram po wysuszeniu i obróceniu o 90° rozwijany jest ponownie z użyciem fazy ruchomej o innym składzie. Otrzymuje się dwuwymiarową mapę składników.

Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC) –stosowane są płytki pokryte cieńszą warstwą (0,1 mm grubości) bardzo drobnoziarnistego sorbentu (średnia wielkość ziarna 5 μm). Zwiększa się czułość i rozdzielczość rozdziału.

OKREŚLENIE TOŻSAMOŚCI WYBRANYCH ALKALOIDÓW METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

W analizie jakościowej wykorzystuje się położenie pików na chromatogramach. Obserwacje można prowadzić w zakresie UV dla składników nie wymagających barwienia, jak również po uprzednim wybarwieniu chromatogramów. Do identyfikacji wykorzystywane są także widma absorpcji zarejestrowane densytometrycznie w UV bezpośrednio z chromatogramu charakterystyczne dla badanych składników.

Analizę jakościową składników w TLC prowadzi się na podstawie położenia plamek na chromatogramie pochodzących od poszczególnych substancji (maksimum piku na densytogramie). Wielkością charakteryzującą przemieszczanie się badanej substancji jest współczynnik opóźnienia, który określa stosunek drogi migracji danego składnika (A) do całkowitej drogi przebytej przez fazę ruchomą (B): $R_F = A / B$. Wartość R_F stanowi podstawę analizy jakościowej. Natomiast analiza ilościowa opiera się na porównaniu wielkości plamek i intensywności ich zabarwienia.

Celem ćwiczenia jest zaznajomienie studentów z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej w analizie jakościowej związków organicznych na przykładzie oznaczania wybranych alkaloidów.

Odczynniki:

Roztwory wzorcowe: metanolowe roztwory wybranych alkaloidów:

0,5 % siarczan atropiny

0,5 % chlorek chininy

0,5 % fosforan kodeiny

0,5 % chlorowoderek lidokainy

0,5 % chlorowoderek polokainy

Faza stacjonarna: płytki aluminiowe TLC pokryte żelem krzemionkowym (Kieselgel 60) z czynnikiem fluoryzującym F_{254}

Faza ruchoma:

metanol – amoniak 25% (50 : 0,5 v/v)

Odczynnik Dragendorffa:

A. 0,85 g zasadowego azotanu (V) bizmutu (III) (hydroksyazotanu(V) bizmutu(III)) rozpuścić w 10 mL lodowatego kwasu octowego i 40 mL wody

B. 8 g jodku potasu rozpuścić w 20 mL wody

Roztwór podstawowy : roztwory A i B zmieszane w stosunku 1 : 1

Roztwór dodatkowy : mieszanina 2 mL lodowatego kwasu octowego i 10 mL wody

Odczynnik wywołujący stanowi mieszanina roztworu podstawowego i uzupełniającego zmieszanych w proporcji **1 : 3**

Aparatura:

Lampa UV (254/366) firmy CAMAG

Densytmetr Scanner 3 z oprogramowaniem winCATS4 firmy CAMAG

Wykonanie oznaczenia:

1. Na płytce nanieść za pomocą kapilary roztwory wzorcowe oraz badane mieszaniny w odległości 1 cm od dolnej krawędzi płytki (linia startu) i 1 cm od jej brzegów. Między brzegami nanoszonych pasm zachować 0,5 cm odstępy. Roztwory nanosić porcjami, kilkakrotnie, po odparowywaniu rozpuszczalnika.
2. Po całkowitym wyschnięciu plamek, płytki umieścić w komorze chromatograficznej (nasyconej fazą ruchomą przez 15 minut). Chromatogramy rozwijać do wysokości 0,5 cm od górnej krawędzi płytki.
3. Płytki wysuszyć w temperaturze pokojowej.
4. Wybarwić płytki za pomocą odczynnika Dragendorffa przygotowanego bezpośrednio przed użyciem.
5. Obliczyć wartości współczynników opóźnienia dla każdej plamki; wzorców oraz wszystkich składników badanej próbki.
6. Na podstawie porównania wartości R_F uzyskanych dla substancji wzorcowych oraz składników próbek badanych określić tożsamość alkaloidów w otrzymanych do badania próbkach.