



## ΜΑΘΗΜΑ 7<sup>ο</sup>

# ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ



Δρα. Κουκουλίτσα Αικατερίνη

Χημικός

Εργαστηριακός Συνεργάτης Τ.Ε.Ι Αθήνας

ckoukoul@teiath.gr



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ➤ Ανάλογα με τη φυσική κατάσταση των 2 φάσεων

#### Χρωματογραφία

- Στερεού-υγρού
- Υγρού-υγρού
- Αερίου-υγρού

#### Στάσιμη φάση

- στερεό
- υγρό
- αέριο

#### Κινητή φάση

- υγρό
- υγρό
- υγρό

### ➤ Ανάλογα με τη τεχνική που χρησιμοποιείται

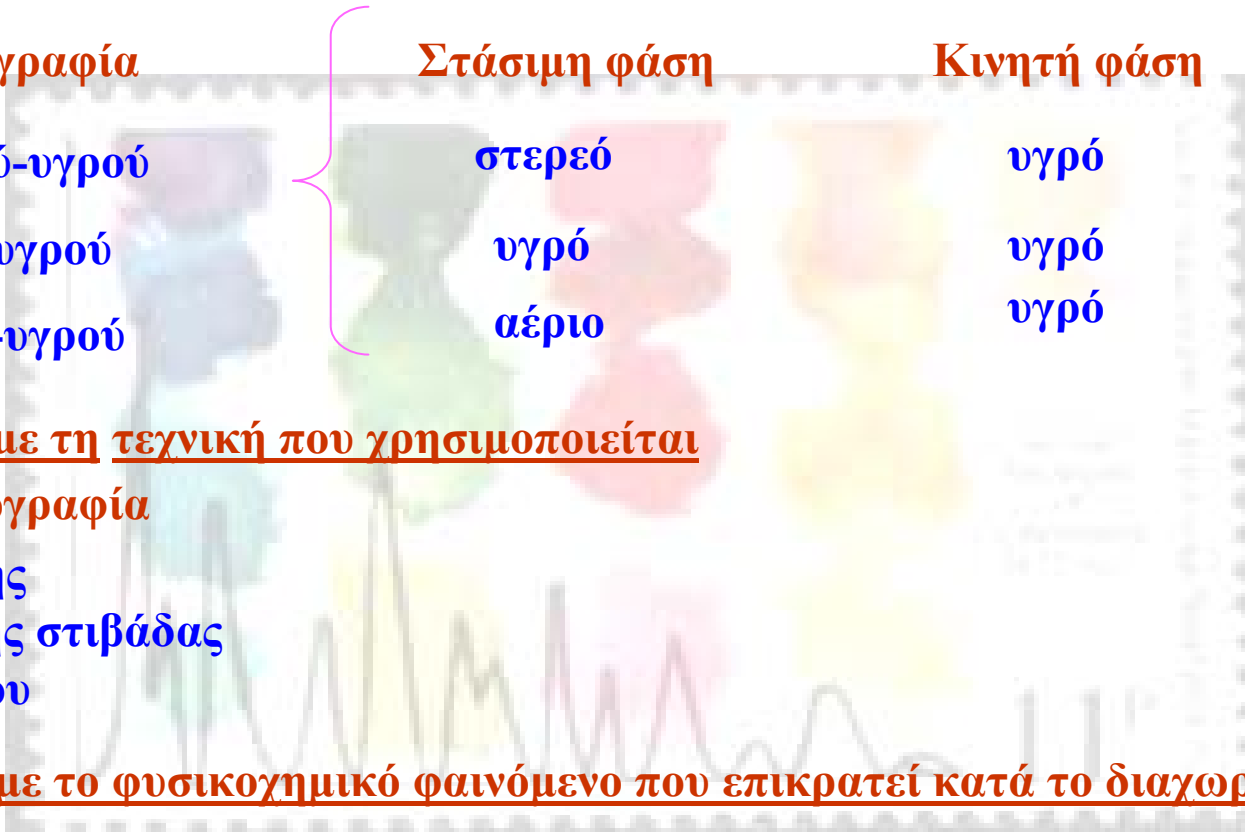
#### Χρωματογραφία

- Στήλης
- Λεπτής στιβάδας
- Χάρτου

### ➤ Ανάλογα με το φυσικοχημικό φαινόμενο που επικρατεί κατά το διαχωρισμό

#### Χρωματογραφία

- Προσροφήσεως
- Ιοανταλλαγής
- Κατανομής





## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ▪ Στερεού-υγρού

➤ Ο διαχωρισμός βασίζεται κυρίως στην **προσρόφηση** των συστατικών του μίγματος από τη στάσιμη στερεή φάση σε διαφορετικό, για κάθε συστατικό, ποσοστό και ένταση, γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ειδικότερα ως **χρωματογραφία προσροφήσεως**

➤ Στη χρωματογραφία στερεού-υγρού συμπεριλαμβάνονται και οι **ιοντοανταλλακτικές στήλες**. Η λειτουργία βασίζεται στην **ανταλλαγή ιόντων** μεταξύ ακίνητης στερεής και κινητής υγρής φάσης. Χαρακτηρίζεται ως **χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής**

### ▪ Υγρού-υγρού

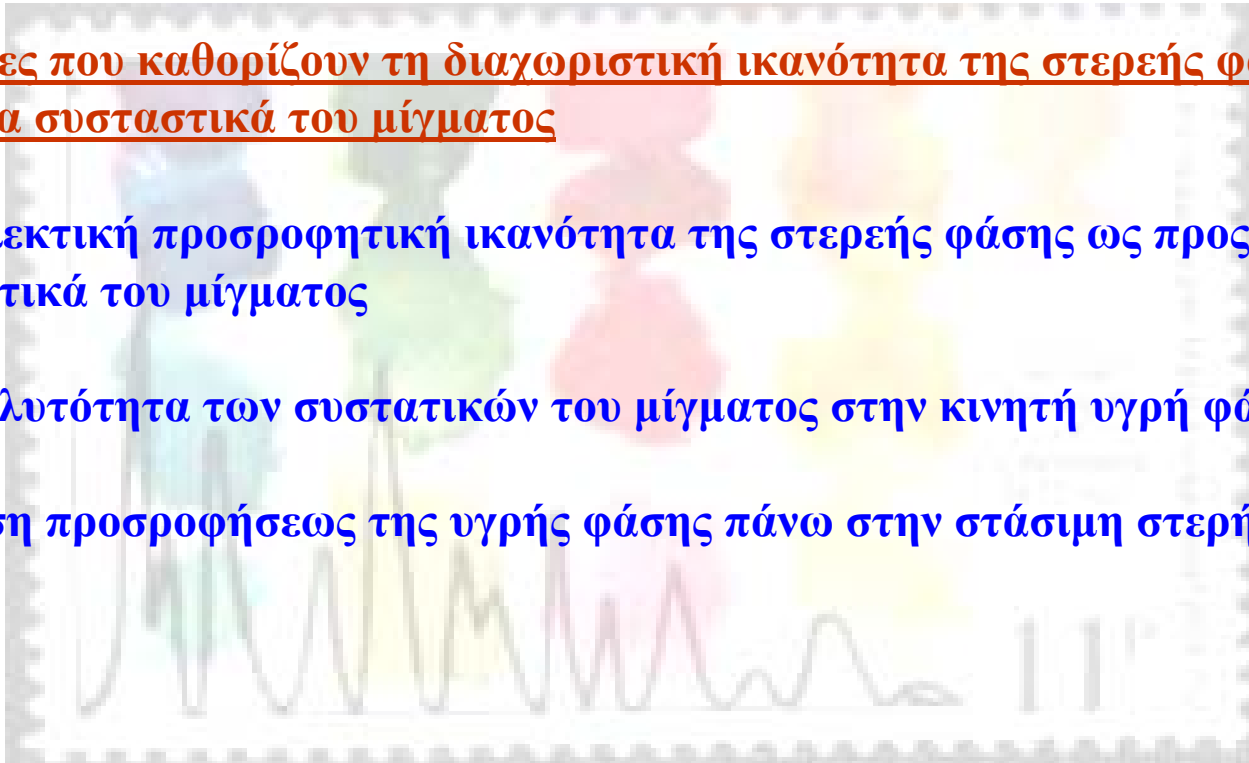
Ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό **συντελεστή κατανομής** των συστατικών του μίγματος στις δύο υγρές φάσεις. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται και ως **χρωματογραφία κατανομής**



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

➤ Παράγοντες που καθορίζουν τη διαχωριστική ικανότητα της στερεής φάσης ως προς τα διάφορα συστατικά του μίγματος

- Η εκλεκτική προσροφητική ικανότητα της στερεής φάσης ως προς τα διάφορα συστατικά του μίγματος
- Η διαλυτότητα των συστατικών του μίγματος στην κινητή υγρή φάση
- Η τάση προσροφήσεως της υγρής φάσης πάνω στην στάσιμη στερή φάση





## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### ΥΛΙΚΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

Αλουμίνα	$\text{Al}_2\text{O}_3$
Ενεργός άνθρακας	C
Florisil	$\text{MgO}/\text{SiO}_2$ (άνυδρο)
Silica gel	$\text{SiO}_2$
Άσβεστος	CaO
Μαγνησία	MgO
Ανθρακικό μαγνήσιο	$\text{MgCO}_3$
Ανθρακικό ασβέστιο	$\text{CaCO}_3$
Ανθρακικό κάλιο	$\text{K}_2\text{CO}_3$
Ανθρακικό νάτριο	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
Τάλκης	$\text{MgO}/\text{SiO}_2$ (ένυδρο)
Ζάχαρη	
Άμυλο	
Ινουλίνη	

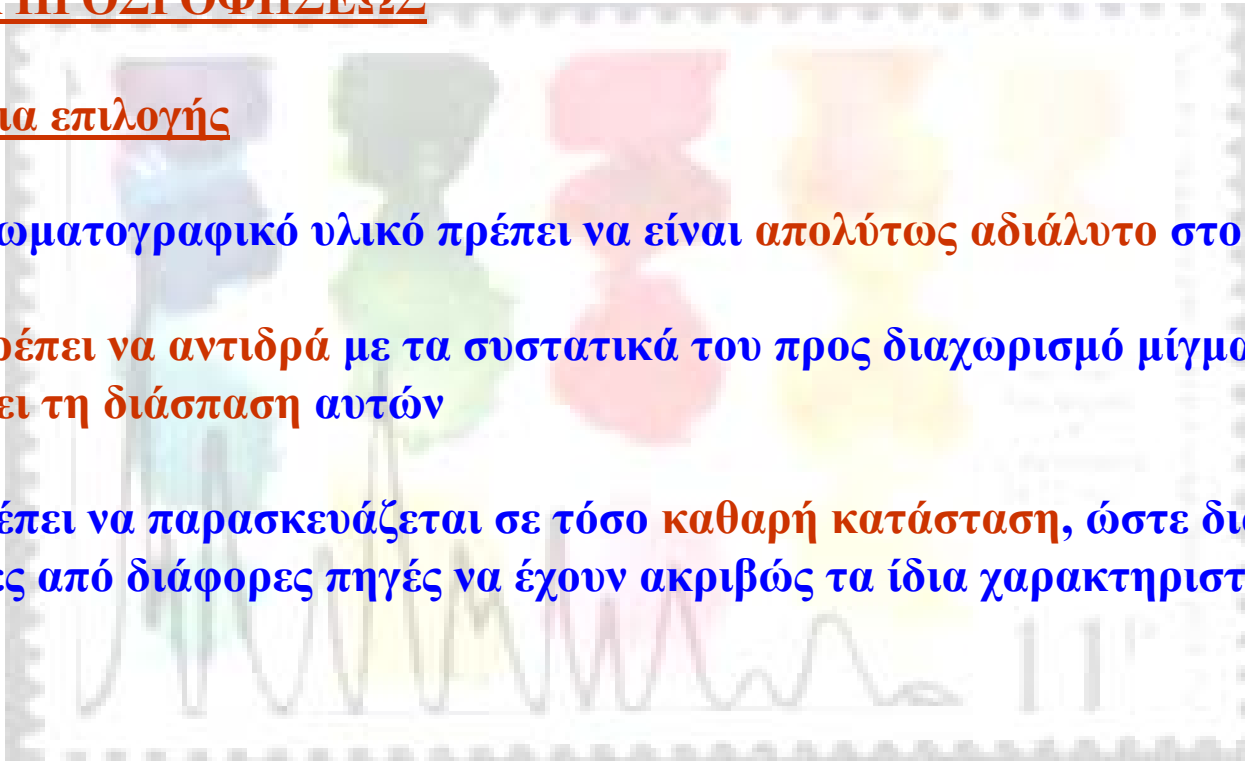


## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### ΥΛΙΚΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

#### Κριτήρια επιλογής

- Το χρωματογραφικό υλικό πρέπει να είναι **απολύτως αδιάλυτο** στο διαλύτη
- **Δεν πρέπει να αντιδρά με τα συστατικά του προς διαχωρισμό μίγματος ή να καταλύει τη διάσπαση αυτών**
- **Θα πρέπει να παρασκευάζεται σε τόσο καθαρή κατάσταση, ώστε διάφορες παρτίδες από διάφορες πηγές να έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά**





## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΕΩΣ

- **Πολικοί διαλύτες** προσροφώνται έντονα από το σύνολο σχεδόν των προσροφητικών υλικών και εμφανίζουν **μεγάλη εκλουτική ικανότητα**
- **Πολικές ουσίες** διαλύονται σε **πολικούς διαλύτες** ενώ **μη πολικές ουσίες** σε **μη πολικούς διαλύτες**

### ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΕΚΛΟΥΣΕΩΣ

Πετρελαϊκός αιθέρας (εξάνιο, πεντάνιο)  
Κυκλοεξάνιο  
Τετραχλωράνθρακας  
Βενζόλιο  
Διχλωρομεθάνιο  
Χλωροφόρμιο  
Αιθέρας (άνυδρος)  
Οξικός αιθυλεστέρας (άνυδρος)  
Ακετόνη (άνυδρη)  
Αιθανόλη  
Μεθανόλη  
Νερό  
Πυριδίνη

Αύξηση της  
εκλουτικής  
ικανότητας σε  
αλουμίνα



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ



<http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/colchrom/images/adsorbents.jpg>

Διάφοροι τύποι χρωματογραφικών στηλών

<http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/colchrom/colchromproc.html>

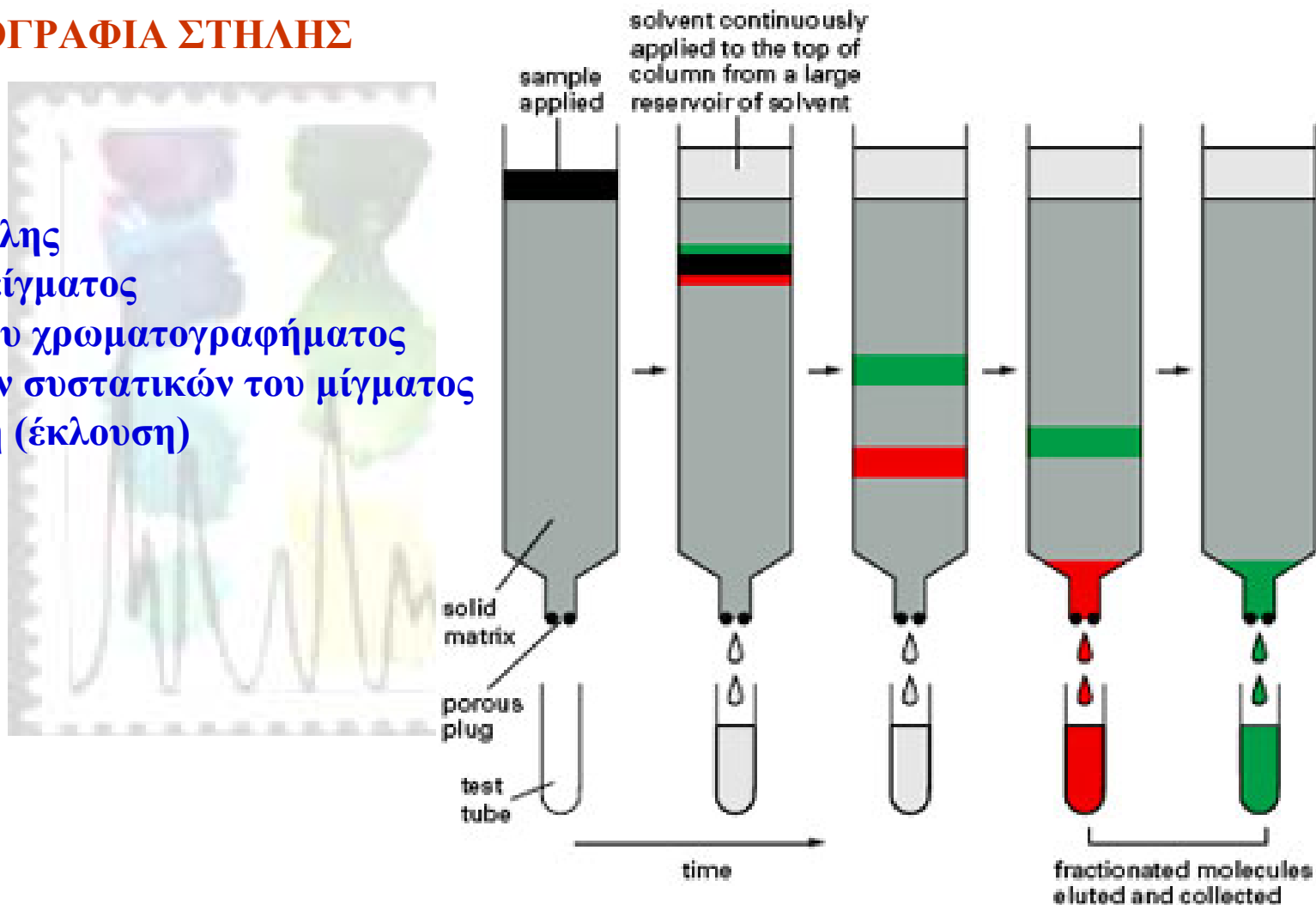




## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

- Γέμισμα στήλης
- Εισαγωγή δείγματος
- Ανάπτυξη του χρωματογραφήματος
- Εξαγωγή των συστατικών του μίγματος από τη στήλη (έκλυση)

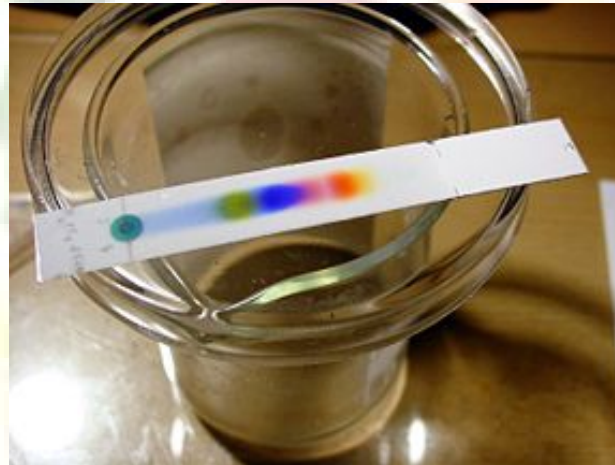




## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (Thin Liquid Chromatography)

- Το προσροφητικό υλικό χρησιμοποιείται με τη μορφή μιας **λεπτής στιβάδας** (πάχους περίπου 0.25 mm) πάνω σε μια γυάλινη ή πλαστική πλάκα



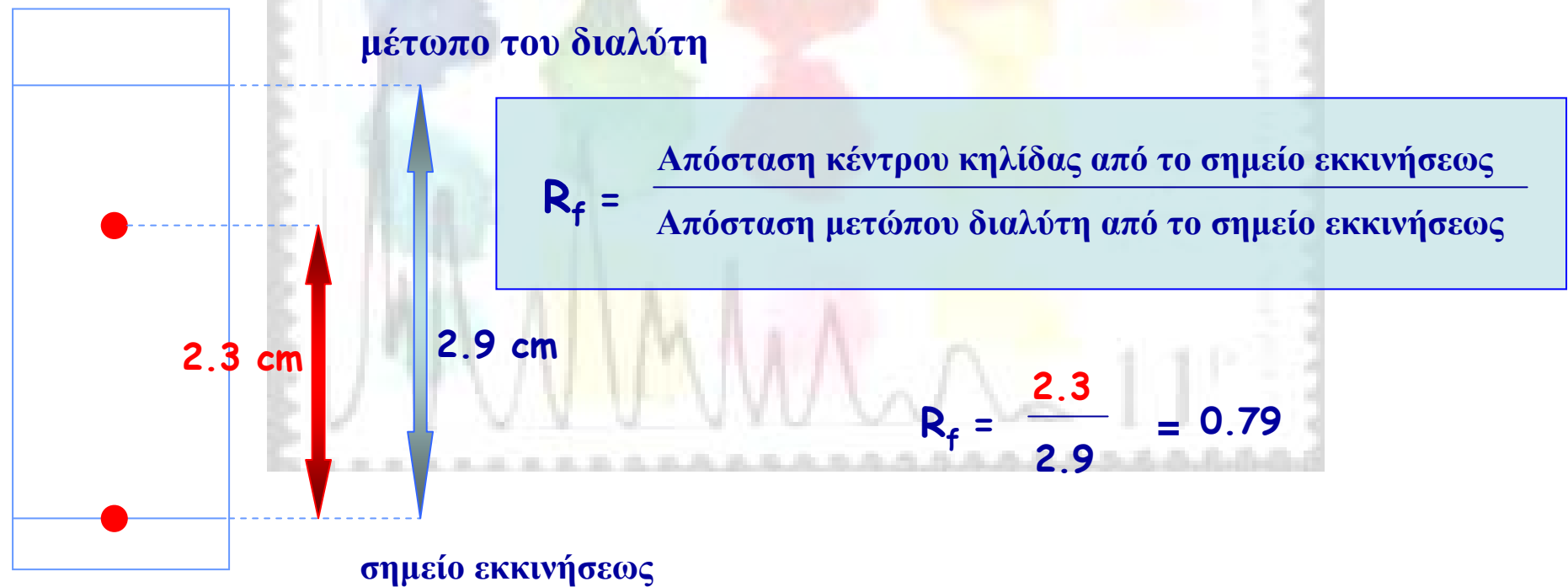
- Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στην **αναλυτική χημεία** λόγω της μικρής ποσότητας του προσροφητικού υλικού
- Στην **παρασκευαστική χημεία** βρίσκει εφαρμογή με την χρησιμοποίηση στιβάδων μεγάλου πάχους (~ 2 mm) και τοποθέτηση του δείγματος σε μια σειρά κελίδων ή σε λεπτή ταινία



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (Thin Liquid Chromatography)

- Χρησιμοποιείται στη αναλυτική χημεία για την εξακρίβωση της ταυτότητας διαφόρων ουσιών.





## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

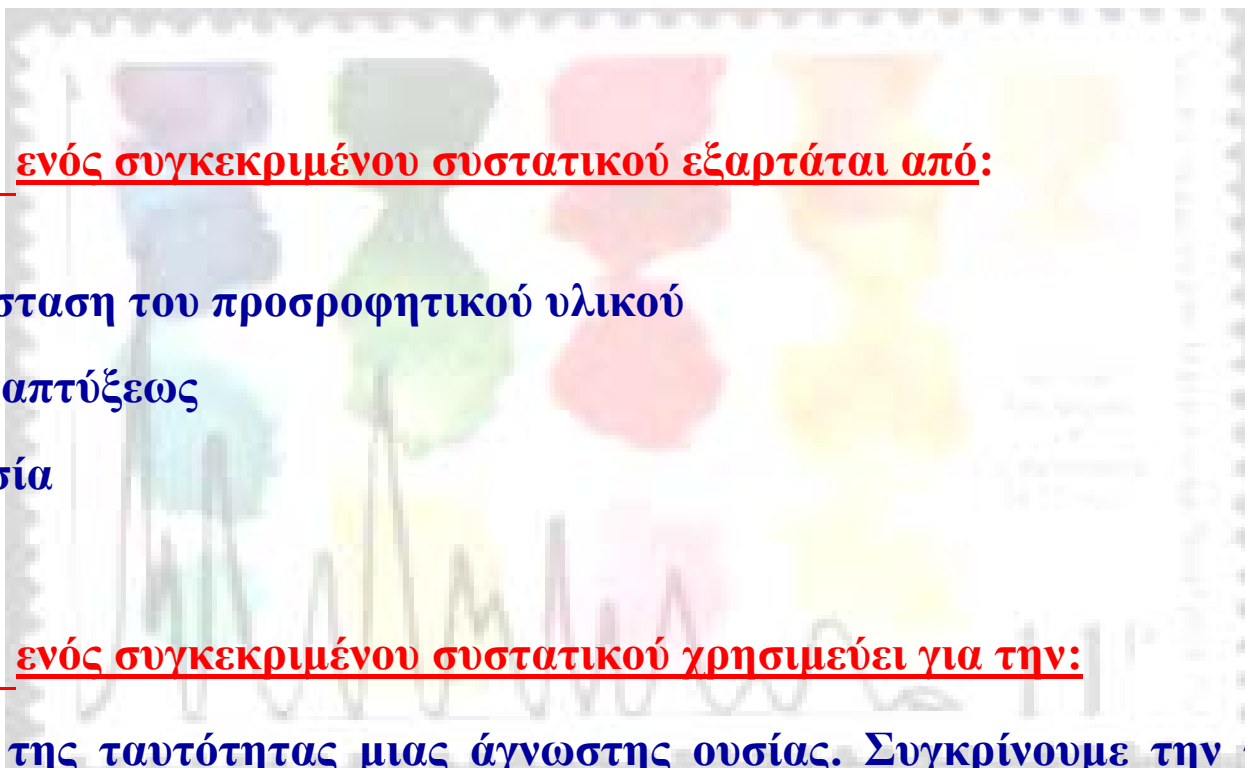
### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (Thin Layer Chromatography)

➤ Η τιμή  $R_f$  ενός συγκεκριμένου συστατικού εξαρτάται από:

- Ακριβή σύσταση του προσροφητικού υλικού
- Διαλύτη αναπτύξεως
- Θερμοκρασία

➤ Η τιμή  $R_f$  ενός συγκεκριμένου συστατικού χρησιμεύει για την:

εξακρίβωση της ταυτότητας μιας άγνωστης ουσίας. Συγκρίνουμε την τιμή  $R_f$  της ουσίας με την τιμή  $R_f$  της βιβλιογραφίας ή μιας ουσίας “μάρτυρα”, δηλ. μιας γνωστής ουσίας



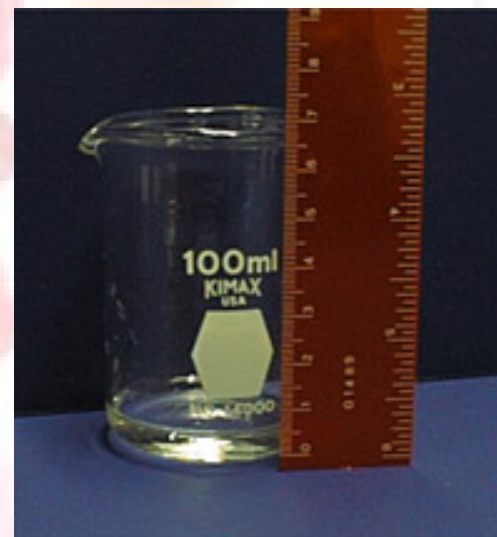


## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας



Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος γίνεται σε ειδικούς γυάλινους θαλάμους που κλείνουν αεροστεγώς με εσφυρισμένα γυάλινα πόματα.

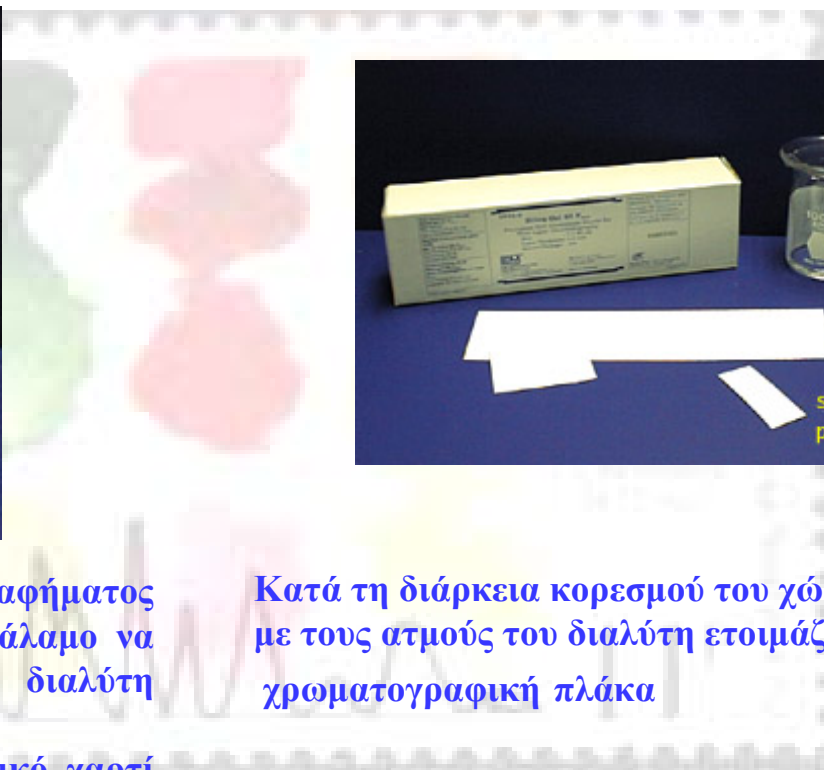
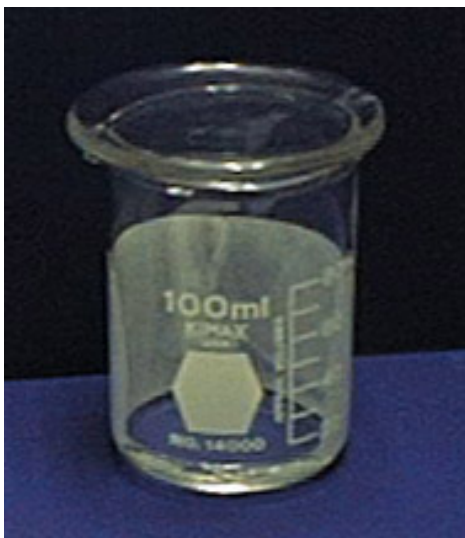


Ρίχνουμε στο θάλαμο το διαλύτη αναπτύξεως σε τόση ποσότητα ώστε η στάθμη του να είναι μερικά χιλιοστά (~5) πάνω από τον πυθμένα του δοχείου



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας



Για την καλή ανάπτυξη του χρωματογραφήματος πρέπει ο χώρος στο χρωματογραφικό θάλαμο να είναι κορεσμένος με τους ατμούς του διαλύτη αναπτύξεως.

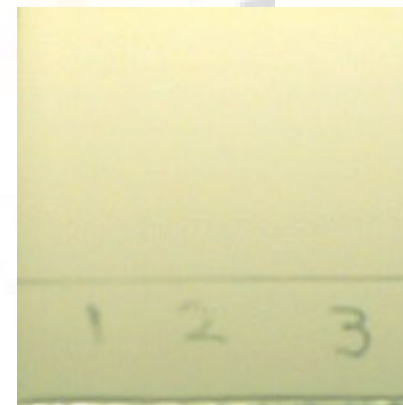
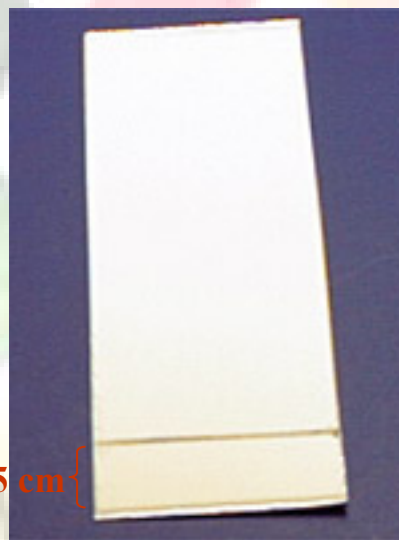
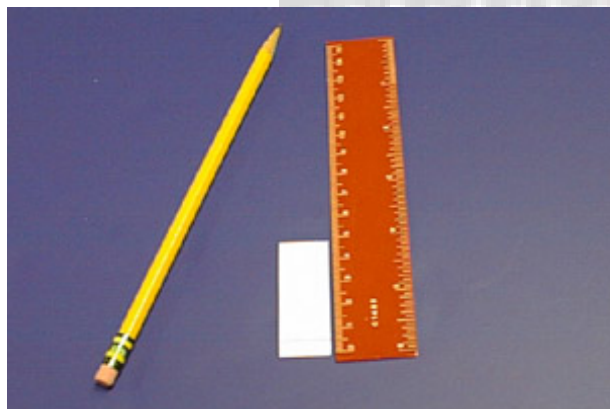
Για τον λόγο αυτό τοποθετούμε διηθητικό χαρτί στα τοιχώματα του δοχείου και κλείνουμε το δοχείο (ή το κλείνουμε και το ανακινούμε ώστε να διαβραχούν τα τοιχώματά του με τον διαλύτη αναπτύξεως).

Κατά τη διάρκεια κορεσμού του χώρου του θαλάμου με τους ατμούς του διαλύτη ετοιμάζουμε την χρωματογραφική πλάκα



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας



Σχεδιάζουμε με το μολύβι μία γραμμή στο κάτω μέρος της χρωματογραφική πλάκας και σημειώνουμε το όνομα ή τον αριθμό των δειγμάτων



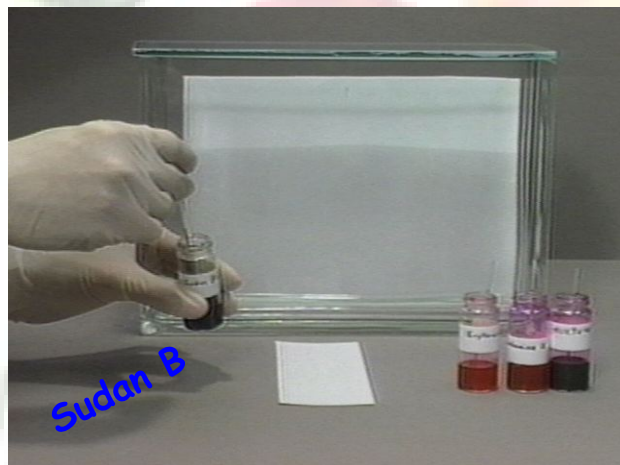
## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας

Διαχωρισμός ενός μίγματος που αποτελείται από 3 ουσίες: Sudan B, Erythrosin, και Rhodamine B.

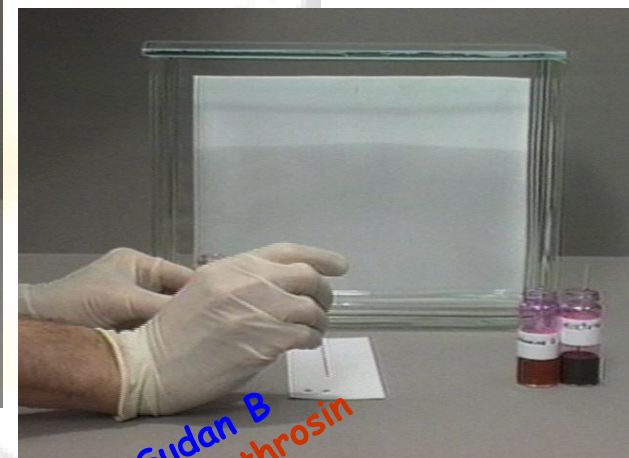


1 Sudan B  
Erythrosin  
Rhodamine B  
Mixture



Sudan B

2



Sudan B  
Erythrosin

3

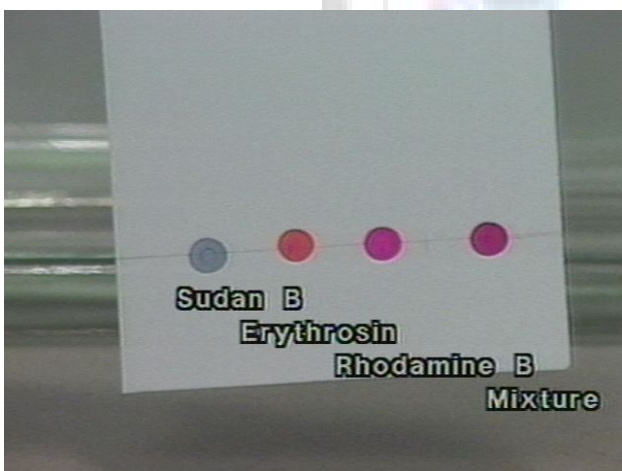




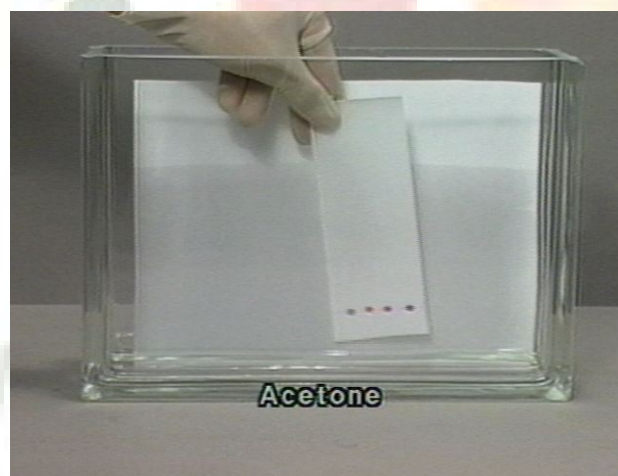
## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας

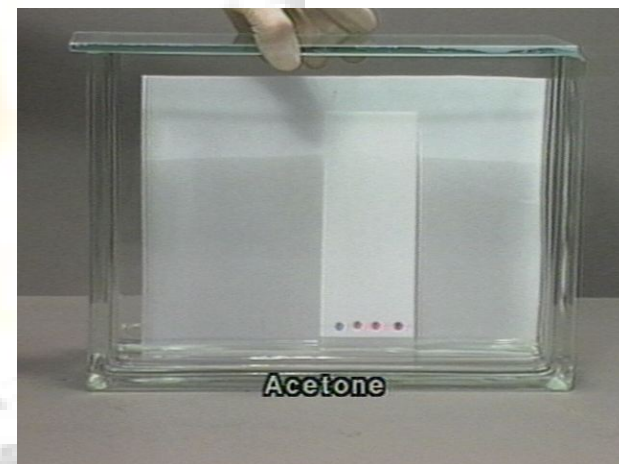
Διαχωρισμός ενός μίγματος που αποτελείται από 3 ουσίες: **Sudan B**, **Erythrosin**, και **Rhodamine B**.



4



5



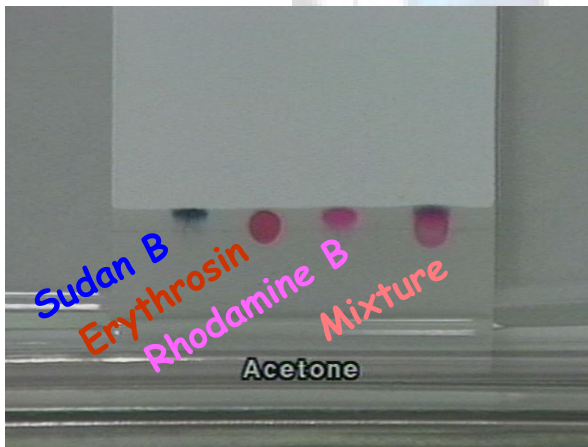
6



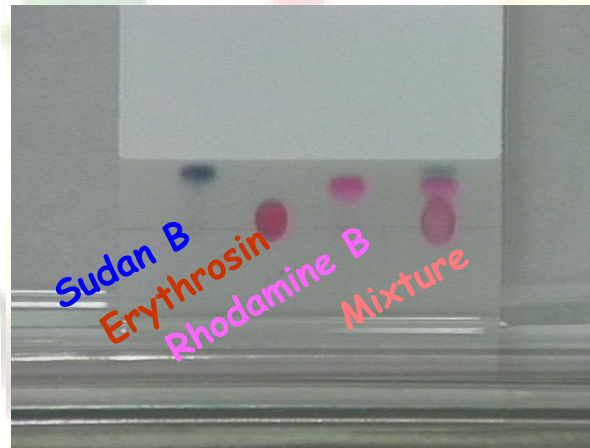
## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

### Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας

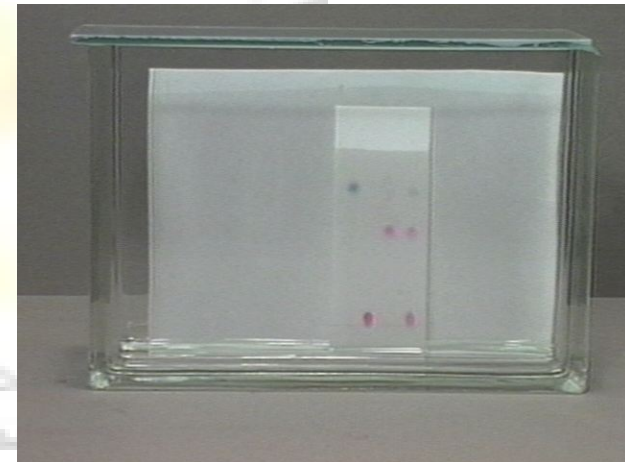
Διαχωρισμός ενός μίγματος που αποτελείται από 3 ουσίες: Sudan B, Erythrosin, και Rhodamine B.



7



8



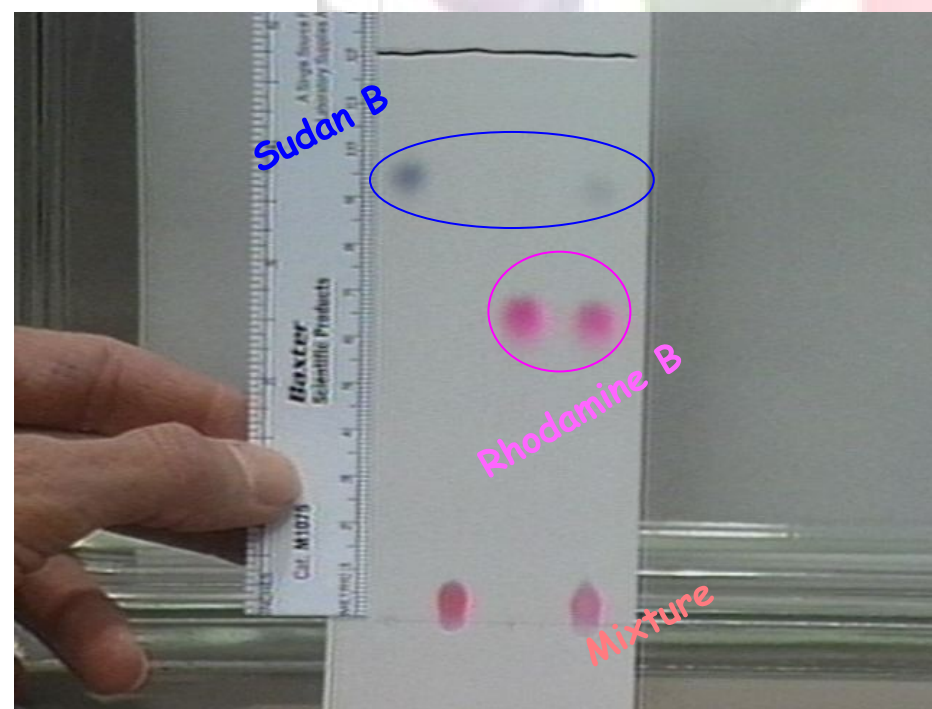
9



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας

Διαχωρισμός ενός μίγματος που αποτελείται από 3 ουσίες: Sudan B, Erythrosin και Rhodamine B



Απομακρύνουμε την πλάκα από τον χρωματογραφικό θάλαμο όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει ~1 cm κάτω από το άκρο του προσροφητικού υλικού

Σημειώνουμε το σημείο όπου έφθασε το μέτωπο του διαλύτη και η πλάκα αφήνεται για να εξατμιστεί ο διαλύτης

Σημειώνουμε τη θέση των κηλίδων και υπολογίζουμε το  $R_f$

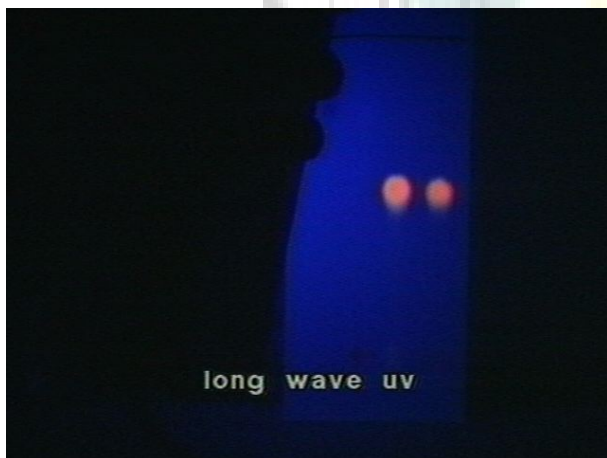
Erythrosin

10



## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

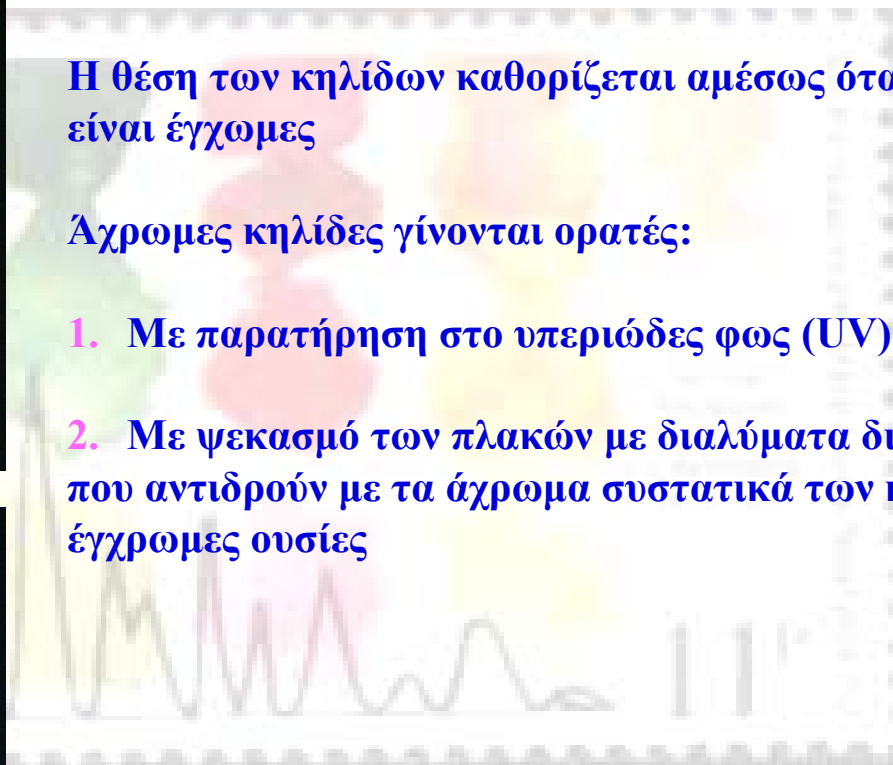
### Ανάπτυξη χρωματογραφήματος λεπτής στιβάδας



Η θέση των κηλίδων καθορίζεται αμέσως όταν οι κηλίδες είναι έγχρωμες

Άχρωμες κηλίδες γίνονται ορατές:

1. Με παρατήρηση στο υπεριώδες φως (UV)
2. Με ψεκασμό των πλακών με διαλύματα διαφόρων ουσιών, που αντιδρούν με τα άχρωμα συστατικά των κηλίδων και δίνουν έγχρωμες ουσίες





## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΣΚΗΣΗ

Διαχωρισμός μίγματος χρωστικών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

**Διαλύτης εκλούσεως:** n-προπανόλη-ακετόνη-νερό 4:1:1

**Μίγμα χρωστικών 1:1 :** α) αλκοολικό διάλυμα 0.2% Sudan III  
β) κυανό του μεθυλενίου

➤ Υπολογισμός της τιμής  $R_f$  των δύο συστατικών

