



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΑΝΟΙΚΤΑ ακαδημαϊκά
μαθήματα ΠΠ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ενότητα : Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC

Διδάσκοντες: Κων/νος Τσιτσιλιάνης, Καθηγητής
Ουρανία Κούλη, Ε.ΔΙ.Π.
Μαρία Τσάμη, Ε.ΔΙ.Π.

Πολυτεχνική Σχολή
Τμήμα Χημικών Μηχανικών

Σκοπός

Η εξοικείωση των φοιτητών με την πειραματική τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, TLC, κατανοώντας τον μηχανισμό ανάπτυξης του χρωματογραφήματος και συγκεκριμένα τον ρόλο της κινητής και ακίνητης φάσης με σκοπό τον επιτυχή διαχωρισμό και την ταυτοποίηση αμινοξέων με τη μέθοδο TLC.

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ανήκει στην γενικότερη κατηγορία υγρής χρωματογραφίας και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ενώσεων με παραπλήσια δομή.

Για τον διαχωρισμό πολικών μορίων όπως τα αμινοξέα η ακίνητη φάση είναι η silica gel (διοξείδιο του πυριτίου) η οποία επιστρώνεται πάνω σε γυαλί ή φύλλο πλαστικού ή αλουμινίου (υλικό επίστρωσης).

Η κινητή φάση (διαλύτης ανάπτυξης) συνήθως είναι κάποιος οργανικός διαλύτης ή μίγμα οργανικών διαλυτών.

Διαχωρισμός αμινοξέων

Ο διαχωρισμός των αμινοξέων οφείλεται στην διαφορετική ταχύτητα κίνησής τους διαμέσου της ακίνητης φάσης (πλακίδιο).

Καθώς ο διαλύτης κινείται λόγω τριχοειδών φαινομένων πάνω στο πλακίδιο, τα αμινοξέα συμπαράσύρονται με διαφορετική ταχύτητα.

Συγκεκριμένα τα αμινοξέα, τα οποία συγκρατούνται ισχυρότερα από την ακίνητη φάση, κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης.

Αντίθετα τα αμινοξέα τα οποία συγκρατούνται ασθενέστερα από την ακίνητη φάση, κινούνται ταχύτερα.

Εργαστηριακός εξοπλισμός

- πλακίδιο TLC (έτοιμη πλάκα εμπορίου με Silica gel σε φύλλα αλουμινίου)
- δοκιμαστικοί σωλήνες
- τριχοειδείς σωλήνες
- γυάλινο δοχείο (θάλαμος ανάπτυξης)
- κοινό διηθητικό χαρτί
- πλαστική μεμβράνη

Απαιτούμενα υλικά

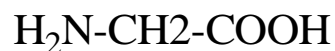
- διάλυμα γλυκίνης
- διάλυμα αλανίνης
- διάλυμα φαινυλαλανίνης
- μίγμα αιθανόλης-νερού, 8:2 (v/v)
- διάλυμα νινυδρίνης, 0.3 % κ.ό. σε η-βουτανόλη

Πειραματική τεχνική TLC

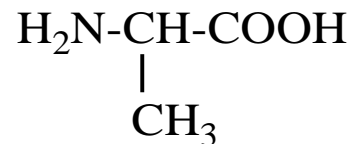
1. Παρασκευή διαλυμάτων αμινοξέων

Σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες ετοιμάζονται τα δείγματα Α, Β, Γ και Δ με διάλυση 1mg αμινοξέος σε 1 ml νερό.

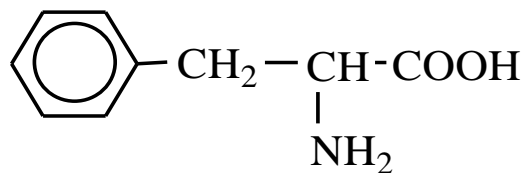
Α : διάλυμα γλυκίνης



Β : διάλυμα αλανίνης



Γ : διάλυμα φαινυλαλανίνης

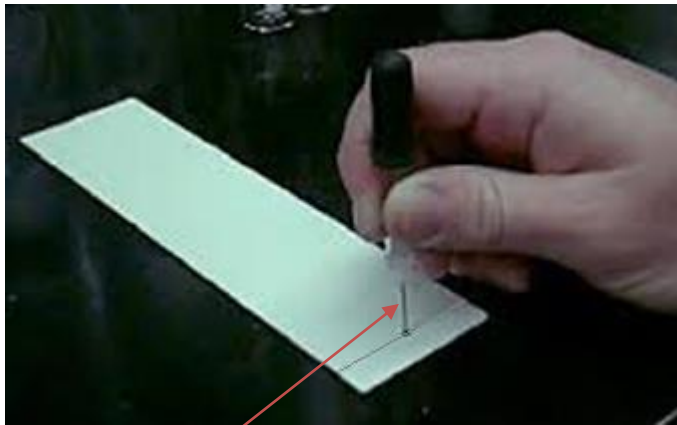


Δ : μίγμα με δύο από τα παραπάνω αμινοξέα

2. Τοποθέτηση του δείγματος επάνω στο πλακίδιο

Στο πλακίδιο σημειώνονται με μολύβι :

- η γραμμή εκκίνησης (γραμμή παράλληλη προς τη βάση της πλάκας και σε απόσταση 1cm περίπου από τη βάση.
- οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων (κηλίδες), οι οποίες θα πρέπει να απέχουν από τα άκρα της πλάκας και μεταξύ τους 1.5-2 cm.



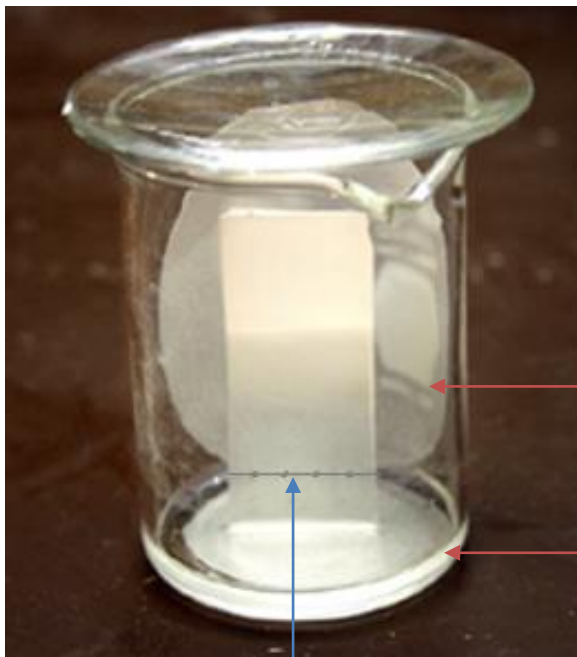
τριχοειδές σωληνάκι

Με τριχοειδές σωληνάκι τοποθετούνται τα δείγματα πάνω στο πλακίδιο υπό μορφή κηλίδας διαμέτρου μικρότερης των 5 mm.

3. Ανάπτυξη χρωματογραφήματος

Μόλις ξηρανθούν οι κηλίδες, η πλάκα τοποθετείται με προσοχή στον θάλαμο ανάπτυξης, όπου υπάρχει το υγρό ανάπτυξης (κινητή φάση) μίγμα αιθανόλης-νερού 8:2 (v/v).

Το υγρό ανάπτυξης δεν πρέπει να διαβρέχει την θέση που τοποθετήθηκε η κηλίδα του δείγματος.



Τοποθετείται κοινό διηθητικό χαρτί στα τοιχώματα και το δοχείο ανάπτυξης καλύπτεται με μεμβράνη χωρίς να μετακινηθεί.

κοινό διηθητικό χαρτί

υγρό ανάπτυξης

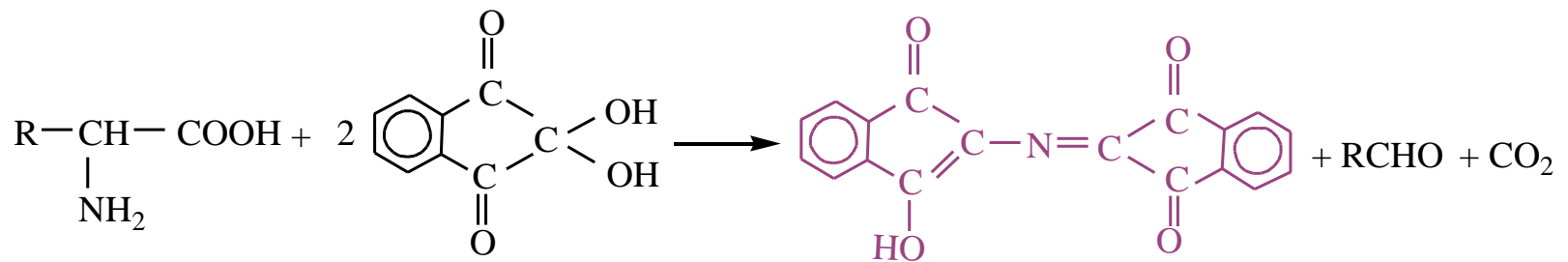
γραμμή εκκίνησης

Απομακρύνεται το πλακίδιο 2cm πριν τη κορφή της πλάκας σημειώνεται το μέτωπο του διαλύτη και το πλακίδιο ξηραίνεται στο πυριαντήριο στους 100⁰C.

4. Εμφάνιση του χρωματογραφήματος

Για την εμφάνιση του χρωματογραφήματος το πλακίδιο ψεκάζεται με διάλυμα νυνιδρίνης (χημικός τρόπος) και τοποθετείται στο πυριαντήριο στους 100⁰C για 5 λεπτά. Τα αμινοξέα αντιδρούν με το διάλυμα νυνυδρίνης και δίνουν έγχρωμα (βιολετί) παράγωγα και ανιχνεύονται.

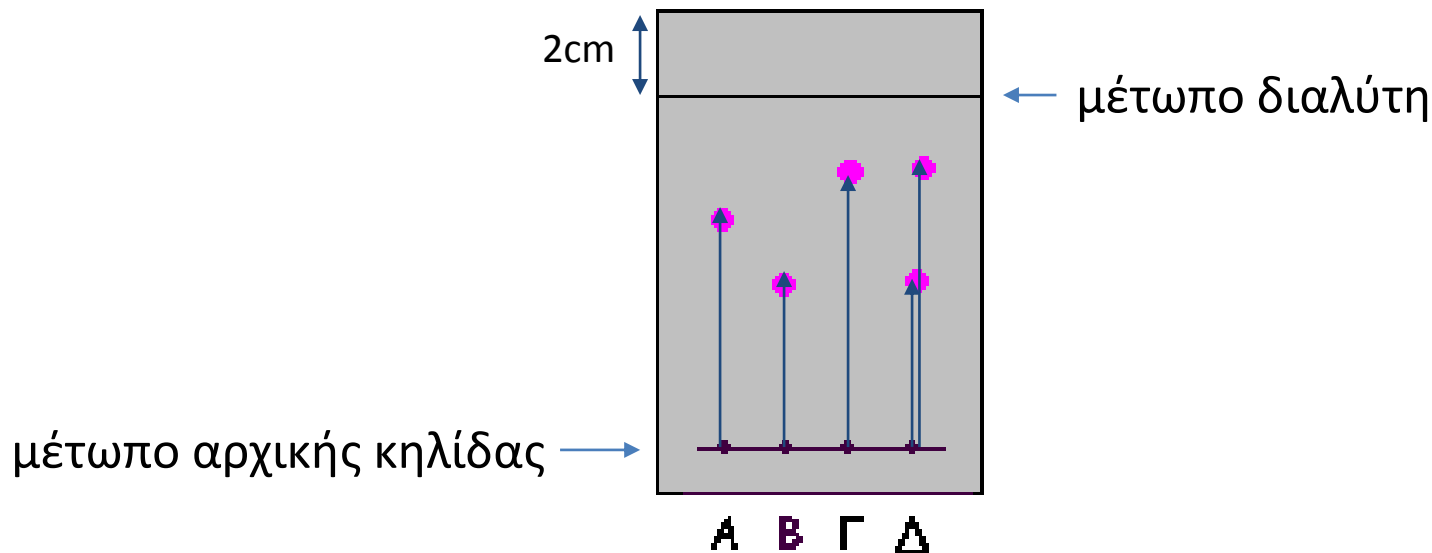
Αντίδραση αμινοξέων με διάλυμα νυνυδρίνης



έγχρωμο παράγωγο

5. Υπολογισμός R_f

Σημειώνονται οι κηλίδες και υπολογίζονται τα R_f των αμινοξέων Α, Β, και καθώς και του μίγματος Δ.



R_f : ο λόγος της απόστασης που διάνυσε κάθε αμινοξύ προς την απόσταση που διάνυσε ο διαλύτης έκλυσης

Βιβλιογραφία

1. Δ. Παπαϊωάννου, Γ. Σταυρόπουλος και Θ. Τσεγενίδης “Εισαγωγή στην Πειραματική Οργανική Χημεία”, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα (1996)
2. Κ. Τσιτσιλιάνης, Ουρ. Κούλη “Εργαστήριο Οργανικής Χημείας”, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα (2014)

ΤΕΛΟΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ

Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.0.

Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Πανεπιστήμιον Πατρών, Καθηγητής, Κωνσταντίνος Τσιτσιλιάνης . «Εργαστήριο Οργανικής Χημείας». Έκδοση: 1.0. Πάτρα 2015.

Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:

<https://eclass.upatras.gr/courses/CMNG2164/>

Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Ως Μη Εμπορική ορίζεται η χρήση:

- που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
- που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
- που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.