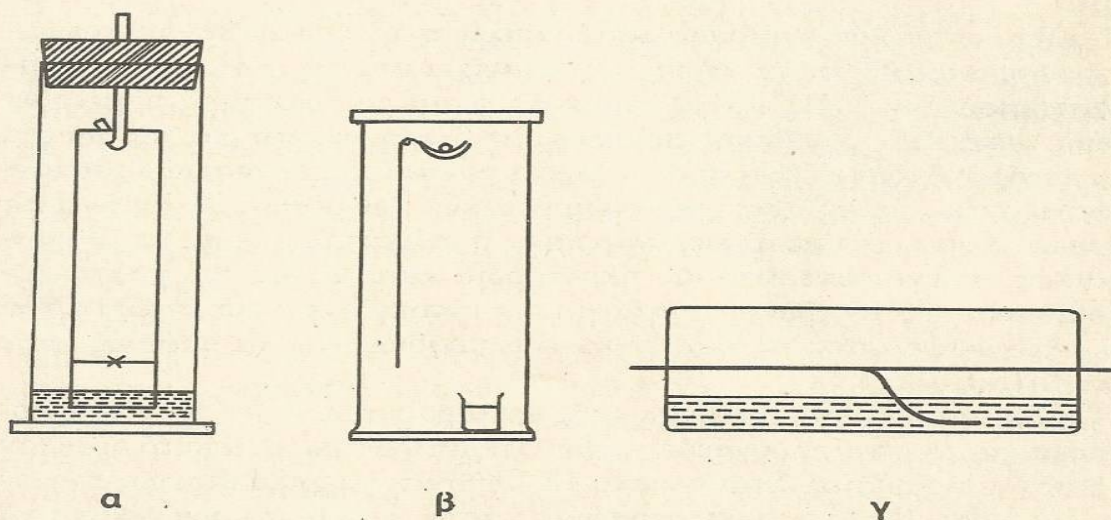


18-2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), που αναπτύχθηκε κυρίως από το Stahl (1950-1958), είναι τεχνική υγρής χρωματογραφίας (πίνακας 17-1) και καθιερώθηκε, ως μία από τις σπουδαιότερες χρωματογραφικές τεχνικές. Η στατική φάση και ο μηχανισμός, στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος, είναι παρόμοιοι με αυτούς της χρωματογραφίας στήλης (σελ. 467), γι' αυτό και η άλλη ονομασία της τεχνικής είναι *χρωματογραφία ανοικτής στήλης*. Η τεχνική λήψεως του χρωματογραφήματος είναι η ίδια με αυτή της χρωματογραφίας χάρτη, αντί όμως χάρτη χρησιμοποιείται υάλινη πλάκα (ή φύλλο αργιλίου ή πλαστικού), επιστρωμένο με λεπτή ομοιόμορφη στιβάδα (συνήθως πάχους 100-300 μm) ξηρού και λεπτότατα διαμερισμένου (μέγεθος σωματιδίων 5-50 μm) προσροφητικού υλικού, όπως π.χ. ενεργοποιημένου διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), οξειδίου του αργιλίου (alumina), μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (cellulose powder), γης διατόμων (kieselguhr), πολυαμιδίου, κλπ. Το προσροφητικό υλικό προσκολλάται στην πλάκα συνήθως με τη βοήθεια συνδετικών υλικών (ένυδρο θειικό ασβέστιο (γύψος), άμυλο, πολυβινυλοαλκοόλη).

Αν και η TLC συνήθως λειτουργεί ως χρωματογραφία προσροφήσεως, με τη χρησιμοποίηση διαλυτών αναπτύξεως που περιέχουν υψηλής πολικότητας διαλύτες (ύδωρ, μεθανόλη) ο πολικός διαλύτης προσροφάται ισχυρώς από το υλικό της στιβάδας, οπότε ο μηχανισμός δια-



Σχήμα 18-1. Διατάξεις για (α) ανιούσα, (β) κατιούσα και (γ) οριζόντια χρωματογραφία χάρτη.

χωρισμού γίνεται συνδυασμός κατανομής-προσροφήσεως. Είναι επίσης δυνατή η εκτέλεση διαχωρισμών κατανομής (με κορεσμό του προσροφητικού υλικού με πολικό διαλύτη, π.χ. ύδωρ), ιονανταλλαγής (με επίστρωση των πλακών με ιονανταλλακτική ρητίνη), μοριακού αποκλεισμού (με επίστρωση των πλακών με κατάλληλη υδροπηκτή), και αντίστροφης φάσεως (με σιλανοποίηση διοξειδίου του πυριτίου ή γης διατόμων, οπότε στην επιφάνειά τους προστίθενται μη πολικές μεθυλικές ομάδες).

Το κρίσιμο στάδιο στην ανάλυση με TLC είναι η παρασκευή ομοιόμορφης λεπτής στιβάδας στις πλάκες. Στο εμπόριο διατίθενται ειδικές συσκευές για το σκοπό αυτό (πλάκες, επιστρωτήρες ρυθμιζόμενου πάχους, οριζόντια βάση στηρίξεως, θήκες φυλάξεως). Οι επιστρωμένες πλάκες ξηραίνονται, αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα στους 110 °C στο πυριατήριο (ενεργοποίηση), και φυλάσσονται σε ξηραντήρα. Στο εμπόριο πωλούνται έτοιμες πλάκες από διάφορα υλικά, επιστρωμένες με διάφορους τύπους προσροφητικών υλικών και σε στιβάδες διαφόρου πάχους.

Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται οι ίδιες με τη χρωματογραφία στήλης (σελ. 469). Στην TLC προσροφήσεως η ικανότητα εκλούσεως των διαλυτών αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητάς τους (π.χ. εξάνιο→ακετόνη→αλκοόλη→ύδωρ). Προτιμούνται κινητές φάσεις ενός διαλύτη ή το πολύ δύο ή τριών διαλυτών, επειδή οι μεικτοί διαλύτες χρωματογραφούνται οι ίδιοι, καθώς ανέρχονται στη λεπτή στιβάδα, με αποτέλεσμα να αλλάζει βαθμιαία η σύσταση της κινητής φάσεως.

Η πορεία διαχωρισμού είναι παρόμοια με αυτή της χρωματογραφίας χάρτη. Το προς χρωματογράφιση διάλυμα τοποθετείται στην πλάκα με μικροσιφώνιο ή μικροσύριγγα (1-10 μL διαλύματος 1%, δηλ. 10-100 μg ουσίας), σε μικρή απόσταση από το ένα άκρο της. Με τη βοήθεια πλαστικών οδηγών (template) καθορίζονται οι θέσεις των κηλίδων των δειγμάτων κατά καθορισμένα διαστήματα και η επιθυμητή απόσταση μετώπου του διαλύτη. Ακολούθως η πλάκα φέρεται στο θάλαμο χρωματογραφείας, που περιέχει το διαλύτη αναπτύξεως και έχει κορεσθεί από τους ατμούς του διαλύτη (τοποθετούνται φύλλα χάρτη διηθήσεως εμποτισμένα με την κινητή φάση στα τοιχώματα του θαλάμου), και εμβαπτίζεται σε αυτόν κατά την πλευρά που τοποθετήθηκε το δείγμα. Υπάρχει η δυνατότητα τοποθέτησεως περισσότερων της μίας πλακών σε κάθε θάλαμο με την ύπαρξη ειδικών θηκών. Ο διαλύτης προσροφάται στη λεπτή στιβάδα και ανερχόμενος (ανιούσα χρωματογραφία, σελ. 428) παρασύρει τα συστατικά του μείγματος με διαφορετικές ταχύτητες και έτσι πετυχαίνεται ο διαχωρισμός τους. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος η πλάκα ξηραίνεται (με ρεύμα αέρα ή στο πυρια-

τήριο) και ακολουθεί εμφάνιση του χρωματογραφήματος, που γίνεται με τις ίδιες μεθόδους που περιγράφηκαν στη χρωματογραφία χάρτη (σελ. 430). Οι τιμές R_F των διαφόρων κηλίδων χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ουσιών, με σύγκρισή τους με αυτές πρότυπων ουσιών, που χρωματογραφούνται παράλληλα με τα δείγματα στην ίδια πλάκα. Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων κάτω από ακτινοβολία UV γίνεται σε ειδικούς θαλάμους, που διαθέτουν λυχνίες βραχέος (254 nm) και μακρού (360 nm) μήκους κύματος ακτινοβολίας. Μη φθορίζουσες ουσίες μπορούν να εντοπισθούν με την προσθήκη ανόργανου φθορίζοντος δείκτη στο προσροφητικό υλικό της πλάκας. Κατά την παρατήρηση στο UV οι κηλίδες των ουσιών θα φαίνονται μαύρες σε φθορίζον πεδίο.

Η TLC παρουσιάζει τα παρακάτω σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων τεχνικών υγρής χρωματογραφίας (χάρτη και στήλης): 1) Έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (λόγω του πολύ μικρού μερισμού του υλικού επιστρώσεως), γι' αυτό και παρέχει καθαρότερες και περισσότερο ευδιάκριτες κηλίδες, απ' ό,τι η χρωματογραφία χάρτη. 2) Είναι περισσότερο ευέλικτη από την χρωματογραφία χάρτη, γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλία στατικών φάσεων και διάφοροι μηχανισμοί διαχωρισμού, έναντι ενός μόνον υλικού και ενός μηχανισμού στη χρωματογραφία χάρτη. 3) Είναι ταχύτερη από τη χρωματογραφία χάρτη, π.χ. ο χρόνος αναπτύξεως χρωματογραφήματος στην TLC από ξηροπηκτική διοξειδίου του πυριτίου είναι 20-30 λεπτά, ενώ ο ίδιος διαχωρισμός στη χρωματογραφία χάρτη απαιτεί τουλάχιστον 2-3 ώρες. Με τη χρήση επιστρωμένων αντικειμενοφόρων πλακών μικροσκοπίου μπορούν να επιτευχθούν χρόνοι αναπτύξεως μέχρι και 5 λεπτών. 4) Χρησιμοποιείται εύκολα στο διαχωρισμό υδρόφοβων ουσιών, π.χ. υδρογονανθράκων, οι οποίοι διαχωρίζονται δύσκολα στο χάρτη. 5) Κατά την εμφάνιση χρωματογραφημάτων TLC μπορούν να χρησιμοποιηθούν και δραστικά μέσα, που δε χρησιμοποιούνται στο χάρτη, διευκολύνοντας έτσι την ανίχνευση ορισμένων ουσιών. Π.χ. με ψεκασμό της πλάκας με πυκνό H_2SO_4 ανιχνεύονται εύκολα οι οργανικές ουσίες, που δίνουν μαύρες κηλίδες από άνθρακα. 6) Η TLC είναι πολύ ευαίσθητη και απαιτεί μικρότερες ποσότητες προσροφητικού μέσου και δείγματος (από μερικά μg έως 1 mg) από τη χρωματογραφία στήλης. 7) Επιτρέπει την εύκολη παραλαβή των ουσιών, που έχουν διαχωρισθεί, με απόξυση κάθε κηλίδας μαζί με το επίστρωμα και εκχύλισή του με κατάλληλο διαλύτη (μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ειδική συσκευή από σωλήνα Craig με υποδοχεία διαλύτη, που συνδέεται με αντλία κενού), σε αντίθεση με τη χρωματογραφία στήλης. 8) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ποσοτική ανάλυση (ποσοτική TLC).

Το μειονέκτημα της TLC έναντι της χρωματογραφίας χάρτη είναι η μεγαλύτερη δυσκολία καταγραφής και διατηρήσεως των αποτελεσμάτων (τα χρωματογραφήματα στο χάρτη διατηρούνται ευκολότερα και για περισσότερο χρόνο).

Η κύρια εφαρμογή της TLC είναι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ουσιών σε πολύπλοκα μείγματα (φάρμακα, εκχυλίσματα φυτών, βιοχημικά παρασκευάσματα, αιθέρια έλαια, βιταμίνες, αμινοξέα, στεροειδή, σάκχαρα, διαλύματα ανόργανων ουσιών, κλπ.). Η αντιστοιχία των τιμών R_F γνωστών ουσιών και της άγνωστης ουσίας είναι ένα κριτήριο ταυτοποίησης (αν και όχι αποδεικτικό). Η επανάληψη της TLC με άλλο διαλύτη αυξάνει σημαντικά την αξιοπιστία της δοκιμής. Συνήθως τα αποτελέσματα της TLC ή της χρωματογραφίας χάρτη συνδυάζονται με εκείνα που λαμβάνονται με άλλες τεχνικές (φασματοσκοπίες UV, IR, NMR, φασματομετρία μαζών, υγροχημική ανάλυση, κλπ.). Η TLC, όπως και οι άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, είναι πολύ χρήσιμη για την ανίχνευση προσμείξεων, π.χ. σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες. Εάν στο χρωματογράφημα μίας ουσίας εμφανισθεί μόνο μία κηλίδα, τότε δεν υπάρχουν προσμείξεις (ή, εάν υπάρχουν, βρίσκονται σε ποσότητες μικρότερες του ορίου ανιχνεύσεως της τεχνικής). Π.χ. το ακετυλοσαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) και το σαλικυλικό οξύ μπορούν να διαχωρισθούν με TLC. Εάν ένα δείγμα πρώτης ύλης ασπιρίνης δώσει χρωματογράφημα με μία μόνο κηλίδα, που αντιστοιχεί στην τιμή R_F της ασπιρίνης, τότε μπορούμε να πούμε ότι η περιεκτικότητα της ύλης σε σαλικυλικό οξύ είναι μικρότερη από το όριο ανιχνεύσεώς του με την TLC.

Ποσοτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Οι ουσίες, που διαχωρίστηκαν με την TLC, μπορούν να προσδιορισθούν με απόξωση του προσροφητικού υλικού στην περιοχή κάθε κηλίδας, εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη και μέτρηση με κατάλληλη αναλυτική τεχνική, π.χ. φασματοφωτομετρία, φθορισμομετρία και πολaroγραφία.

Άλλη τεχνική είναι η μέτρηση της επιφάνειας της κηλίδας, η οποία είναι ανάλογη του λογαρίθμου της ποσότητας της ουσίας. Η επιφάνεια μπορεί να μετρηθεί εύκολα, εάν σημειωθεί η κηλίδα σε διαφανές χιλιοστομετρικό χάρτη. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η διάμετρος της κηλίδας, το τετράγωνο της οποίας είναι ανάλογο του λογαρίθμου της ποσότητας της ουσίας.

Με τη βοήθεια εμπορικών διαθέσιμων οργάνων (πυκνομέτρων, σελ. 220) είναι δυνατός ο άμεσος ποσοτικός προσδιορισμός των διαχωρισμένων ουσιών στην πλάκα. Τα όργανα αυτά σαρώνουν την πλάκα πολλές φορές, ώστε να επιτρέπουν τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων. Από τα λαμβανόμενα καταγραφήματα (κορυφές ισχύος ανακλώμενης ή

διερχόμενης ακτινοβολίας, ως προς χρόνο (απόσταση) σαρώσεως), υπολογίζεται το εμβαδό κάθε κορυφής και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Μπορεί επίσης να μετρηθεί η ισχύς του φθορισμού, που εκπέμπεται, οπότε αυξάνεται σημαντικά η ευαισθησία των προσδιορισμών. Για αύξηση της ακριβείας χρησιμοποιείται η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου, το οποίο χρωματογραφείται στην ίδια πλάκα. Η επαναληπτικότητα και η ακρίβεια των προσδιορισμών αυξάνονται σημαντικά (1-3%), εάν χρησιμοποιηθούν ειδικά αυτόματα όργανα τοποθετήσεως κηλίδων (sample spotters). Η υψηλής επαναληπτικότητας χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (HPTLC), που πετυχαίνεται με τα όργανα αυτά, χρησιμοποιείται ευρύτατα για ταχείς και ακριβείς αναλύσεις πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών.

20-2. ΥΓΡΗ-ΣΤΕΡΕΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΕΩΣ

Η προσρόφηση των συστατικών ενός μείγματος από την επιφάνεια ενός προσροφητικού υλικού βασίζεται στο γεγονός, ότι τα άτομα, ιόντα ή μόρια, που αποτελούν την επιφάνεια του υλικού, λόγω της απουσίας της προστατευτικής δομής που υπάρχει στο εσωτερικό του, παρουσιάζουν αυξημένη ενέργεια, που προσδίνει επιφανειακή ενεργότητα στο υλικό. Οι δυνάμεις προσροφήσεως μπορεί να είναι ηλεκτροστατικές (ιονικές), διπόλου-διπόλου, διπόλου-επαγομένου διπόλου, δυνάμεις London, ή συνδυασμός των δυνάμεων αυτών. Το προσροφητικό υλικό πρέπει να έχει μεγάλο εμβαδό επιφάνειας, που να διαθέτει μεγάλο αριθμό χημικώς ενεργών κέντρων.

Η ισορροπία προσροφήσεως ενός συστατικού του μείγματος στην ενεργή επιφάνεια περιγράφεται από τη γραφική παράσταση της συγκεντρώσεως του προσροφημένου συστατικού, C_s , ως προς τη συγκέντρωσή του στην υγρή κινητή φάση, C_M . Σε σταθερή θερμοκρασία, η παράσταση αυτή αποτελεί την ισόθερμο προσροφήσεως και μπορεί να είναι: α) Γραμμική, που είναι η επιθυμητή κατάσταση και δείχνει ότι η επιφάνεια δεν έχει κορεσθεί. Η κλίση της γραμμικής ισοθέρμου δίνει το συντελεστή κατανομής K ($K=C_s/C_M$). Κυρτή (καμπύλωση προς τα κάτω), όταν η ταχύτητα και ο συντελεστής κατανομής ελαττώνονται αυξανόμενης της συγκεντρώσεως του συστατικού.

γ) Κοίλη (καμπύλωση προς τα ανω), ασυνήθιστη περίπτωση, που εμφανίζεται όταν μαζί με την προσρόφηση γίνεται και χημική αντίδραση.

Προσροφητικά υλικά. Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο υλικό για την παρασκευή στατικής φάσεως προσροφήσεως είναι η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (Silica gel, $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$). Το μέγεθος των πόρων, η ενεργή επιφάνεια και το pH της επιφάνειας της στατικής φάσεως εξαρτώνται από τις συνθήκες παρασκευής της (καταβύθιση με οξίνιση διαλυμάτων πυριτικών). Τα ενεργά κέντρα προσροφήσεως είναι οι επιφανειακές ομάδες Si-O-H, που ενεργοποιούνται με θέρμανση της πηκτής στους 200 °C για την εκδίωξη του ύδατος, που προσροφάται απ' αυτές από την ατμόσφαιρα. Η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου είναι ασθενώς όξινη και εξαιτίας αυτού, αλληλεπιδρά ισχυρά με βασικά συστατικά.

Ένα άλλο κοινό προσροφητικό υλικό είναι το τριοξείδιο του αργιλίου (alumina, $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), που ενεργοποιείται με πύρωση στους 1100 °C. Ολονύκτια πύρωση στους 400 °C στον αέρα παρέχει ένα υψηλής ενεργότητας προσροφητικό υλικό (βαθμός ενεργότητας I). Με εξισορρόπηση του υλικού αυτού με ύδωρ, λαμβάνονται υλικά μικρότερης ενεργότητας (βαθμός ενεργότητας II, III, IV και V, με περιεκτικότητα σε ύδωρ 3, 6, 10 και 15%, αντίστοιχα). Το ενεργοποιημένο τριοξείδιο του αργιλίου είναι ασθενώς βασικό και συμπεριφέρεται ως να έχει διαφορετικά ενεργά κέντρα. Έτσι, τα βασικά κέντρα προσροφούν ισχυρώς όξινα συστατικά, τα ηλεκτρονιόφιλα κέντρα (πιθανώς Al^{3+}) προσροφούν ακόρεστες ενώσεις, οι αρωματικές ενώσεις αντιδρούν με ένα φαινομενικό μηχανισμό μεταφοράς φορτίου (ηλεκτρονιοδότες), ενώ κάποια κέντρα αντιδρούν με εστέρες, ανυδρίτες, αλδεΐδες και κετόνες.

Εκτός από τα δύο προηγούμενα κοινά προσροφητικά υλικά, χρησιμοποιούνται σπανιότερα η κυτταρίνη (για υψηλής πολικότητας ουσίες, που δεν μπορούν να εκλουσθούν από στατική φάση πηκτής διοξειδίου του πυριτίου ή Al_2O_3), ο ενεργοποιημένος ξυλάνθρακας, το ένυδρο οξείδιο του μαγνησίου (magnesia, $\text{MgO} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, ιδιαίτερα χρήσιμο για ολεφίνες και αρωματικές ενώσεις) και το συγκαθίζημα διοξειδίου του πυριτίου και οξειδίου του μαγνησίου (florisil).

Διαλύτες. Η κινητή φάση (διαλύτης) στη χρωματογραφία προσροφήσεως στήλης ανταγωνίζεται τα συστατικά του μείγματος στην κατάληψη των θέσεων προσροφήσεως της στατικής φάσεως. Η σχετική ικανότητα εκλούσεως μίας ουσίας από τη στήλη, που παρουσιάζουν οι διάφοροι διαλύτες, αποδεικνύεται πρακτικώς ανεξάρτητη από την ουσία, και επομένως η έκλουση είναι περισσότερο αποτέλεσμα εκτοπίσεως της ουσίας από το προσροφητικό υλικό της στατικής φάσεως παρά της κατανομής της ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων. Η ισχύς εκλούσεως (eluent strength, ϵ°) ενός διαλύτη εκφράζει την ενέργεια

προσροφήσεως του διαλύτη ανά μονάδα επιφάνειας και όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της ε° , τόσο ο διαλύτης είναι ισχυρότερος, ο παράγοντας χωρητικότητας k' (σχέση 17-20) μικρότερος και ο χρόνος (όγκος) συγκρατήσεως μικρότερος. Για κάθε υλικό προσροφήσεως έχουν κατασκευασθεί κατάλογοι σχετικής ισχύος εκλούσεως (εκλουτροπική σειρά, *elutropic series*) με βάση την ισχύ του πεντανίου, για το οποίο εξ ορισμού η τιμή της ε° ισούται με το μηδέν. Στον πίνακα 20-1 δίνεται η εκλουτροπική σειρά για το τριοξείδιο του αργιλίου (η ίδια σειρά ισχύει και για την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου με τιμές ε° μικρότερες κατά 80%, κατά μέσο όρο).

Πίνακας 20-1. Εκλουτροπική σειρά τριοξειδίου του αργιλίου

Διαλύτης	ε°	Διαλύτης	ε°
Φθοριοαλκάνια	-0,25	Διχλωρομεθάνιο	0,42
κ-Πεντάνιο	0,00	Τετραϋδροφουράνιο	0,45
ισο-Οκτάνιο	0,01	1,2-Διχλωροαιθάνιο	0,49
κ-Επτάνιο	0,01	Βουτανόνη-2	0,51
κ-Δεκάνιο	0,04	Ακετόνη	0,56
Κυκλοεξάνιο	0,04	Διοξάνιο	0,56
Κυκλοπεντάνιο	0,05	Οξικός αιθυλεστέρας	0,58
Διθειάνθρακας	0,15	Οξικός μεθυλεστέρας	0,60
Τετραχλωράνθρακας	0,18	Πεντανόλη-1	0,61
1-Χλωροπεντάνιο	0,26	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	0,62
ισο-Προπυλαιθέρας	0,28	Ανιλίνη	0,62
ισο-Προπυλοχλωρίδιο	0,29	Νιτρομεθάνιο	0,64
Τολουόλιο	0,29	Ακετονιτρίλιο	0,65
1-Χλωροπροπάνιο	0,30	Πυριδίνη	0,71
Χλωροβενζόλιο	0,30	Προπανόλη-2	0,82
Βενζόλιο	0,32	Αιθανόλη	0,88
Βρωμοαιθάνιο	0,37	Μεθανόλη	0,95
Διαιθυλαιθέρας	0,38	Αιθανοδιόλη-1,2	1,11
Χλωροφόρμιο	0,40	Οξικό οξύ	πολύ μεγάλη

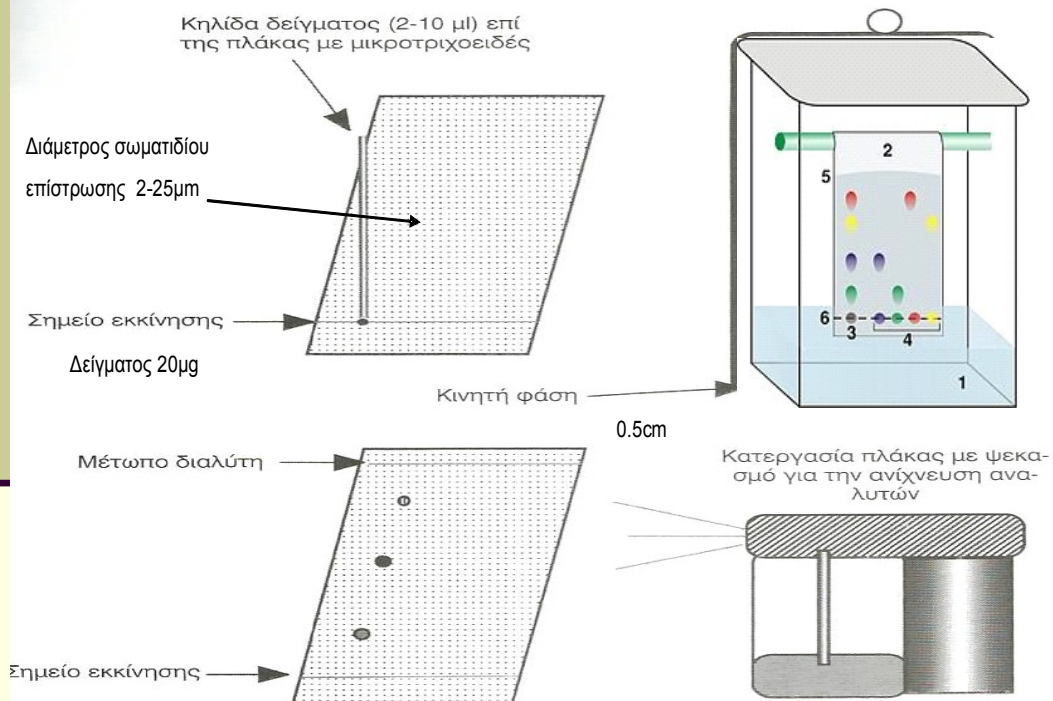
Στην πράξη χρησιμοποιείται μία *βαθμίδωση (gradient) ισχύος εκλούσεως*. Αρχικά εκλούνται τα συστατικά που συγκρατούνται ασθενέστερα, με ένα διαλύτη Α μικρής ισχύος εκλούσεως. Ακολούθως, ένας δεύτερος διαλύτης Β, μεγαλύτερης ισχύος εκλούσεως, αναμειγνύεται με τον Α, είτε σε ξεχωριστά στάδια, είτε συνεχώς, οπότε αυξάνεται η ισχύς εκλούσεως του μεικτού διαλύτη και πετυχαίνεται έτσι σταδιακή έκλουση όλων των συστατικών. Η ισχύς εκλούσεως δεν είναι συνάρτηση της σχετικής συστάσεως του μεικτού διαλύτη και μικρός όγκος διαλύτη μεγάλης ε° μπορεί να αλλάξει σημαντικά την ε° ενός διαλύτη μικρής ισχύος εκλούσεως.

Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

- Αρχή
- Οργανολογία/Χρωματογράφημα TLC
- Στατικές – κινητές φάσεις
- Ανίχνευση
- Εφαρμογές
- TLC Υψηλής Απόδοσης



Οργανολογία Ανάπτυξη χρωματογραφήματος



Σύσταση κινητής και στατικής φάσης μηχανισμού

Υάλινη πλάκα ή φύλλο αργιλίου επιστρωμένο με στατική φάση:

- Στοιβάδα λεπτόκοκκου προσροφητικού υλικού (5-50μm)
π.χ. διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2), οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3), γη διατόμων (SiO_2 , Al_2O_3 , Na_2O , K_2O)
Μηχανισμός: Δυνάμεις προσρόφησης
- Ποσοστό του πολικού διαλύτη προσροφάται μερικώς στη στατική φάση
Μηχανισμός: Δυνάμεις προσρόφησης- κατανομής
- Σιλανοποίηση του προσροφητικού υλικού με πολικό (κανονική φάση) ή μη πολικό (αντίστροφη φάση) διαλύτη.
Μηχανισμός: Δυνάμεις κατανομής
- Επίστρωση της πλάκας με ιονανταλλακτική ρητίνη.
Μηχανισμός: Δυνάμεις ιονανταλλαγής
- Επίστρωση της πλάκας με κατάλληλη υδροπηκτική.
Μηχανισμός: μοριακός αποκλεισμός

Διαμοριακές δυνάμεις

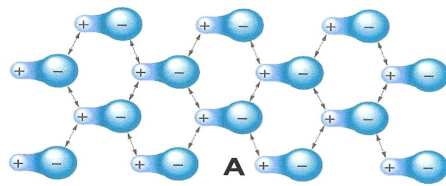
Πολλές από τις φυσικές ιδιότητες των υγρών, αλλά και ορισμένων στερεών, μπορούν να ερμηνευθούν με βάση τις διαμοριακές δυνάμεις, δηλαδή τις ελκτικές δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ μορίων.

Μεταξύ ουδέτερων μορίων υπάρχουν τρεις τύποι ελκτικών δυνάμεων:

οι δυνάμεις διπόλου–διπόλου,
οι δυνάμεις διασποράς ή δυνάμεις London και
οι δυνάμεις δεσμών υδρογόνου.

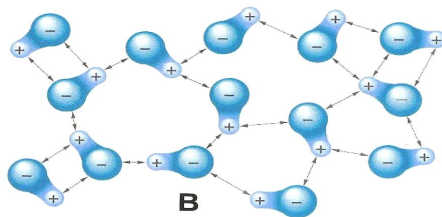
Ο όρος δυνάμεις van der Waals είναι ένας γενικός όρος που συμπεριλαμβάνει τις διαμοριακές δυνάμεις διπόλου–διπόλου και τις δυνάμεις London.

Δυνάμεις διπόλου–διπόλου



Στερεό HCl

Η δύναμη διπόλου–διπόλου είναι μια ελκτική διαμοριακή δύναμη που προκύπτει από την τάση πολικών μορίων να ευθυγραμμίζονται έτσι ώστε το θετικό άκρο ενός μορίου να είναι κοντά στο αρνητικό άκρο ενός άλλου μορίου.



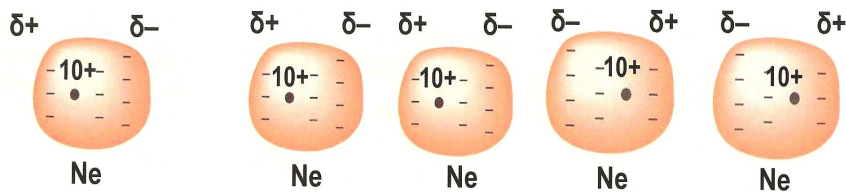
Υγρό HCl

(A) Στη στερεά φάση, τα πολικά μόρια τείνουν να ευθυγραμμισθούν έτσι ώστε τα θετικά άκρα να "βλέπουν" τα αρνητικά.

(B) Στην υγρή φάση, η συνηθισμένη τυχαία κίνηση των μορίων καταστρέφει εν μέρει την ευθυγράμμιση των πολικών μορίων που είχαμε στη στερεή φάση.

Δυνάμεις διασποράς ή δυνάμεις London

Προέλευση των δυνάμεων London



Το ηλεκτρονικό νέφος του ατόμου μπορεί να παραμορφωθεί έτσι ώστε ένα μέρος του ατόμου να εμφανίζεται λιγάκι πιο αρνητικό από το υπόλοιπο και κατά συνέπεια να διαθέτει κάποια διπολική ροπή (στιγμιαίο δίπολο).

Αν το άτομο αυτό βρεθεί κοντά σε ένα δεύτερο άτομο Ne, τότε τα ηλεκτρόνια του 2ου ατόμου απωθούνται. Δημιουργείται τότε ένα **στιγμιαίο δίπολο** εξ επαγωγής και εμφανίζεται μια ελκτική δύναμη ανάμεσά τους (δύναμη διασποράς).

Η κίνηση των ηλεκτρονίων στα άτομα έχει αλλάξει αλλά αυτό γίνεται ταυτόχρονα και στα δύο άτομα με αποτέλεσμα τη διατήρηση της ελκτικής δύναμης ανάμεσά τους.

Δεσμός υδρογόνου

Μόρια που έχουν την ομάδα $-OH$ υπόκεινται σε μια πρόσθετη ελκτική δύναμη που λέγεται δεσμός υδρογόνου.

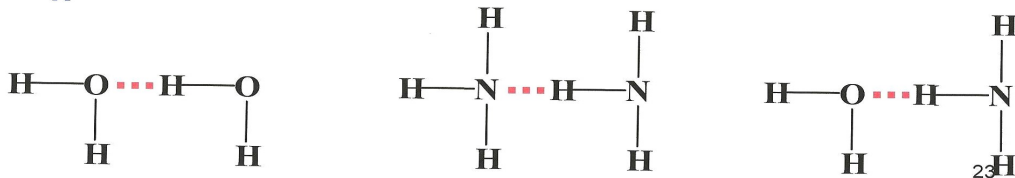
Δεσμός υδρογόνου είναι μια ασθενής έως μέτρια ελκτική δύναμη η οποία υπάρχει μεταξύ ενός ατόμου υδρογόνου συνδεδεμένου ομοιοπολικά με ένα πολύ ηλεκτραρνητικό άτομο, X , και ενός μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων ενός άλλου μικρού, ηλεκτραρνητικού ατόμου, Y .

Ο δεσμός υδρογόνου παριστάνεται με τρεις κουκίδες ανάμεσα στα άτομα H και Y .

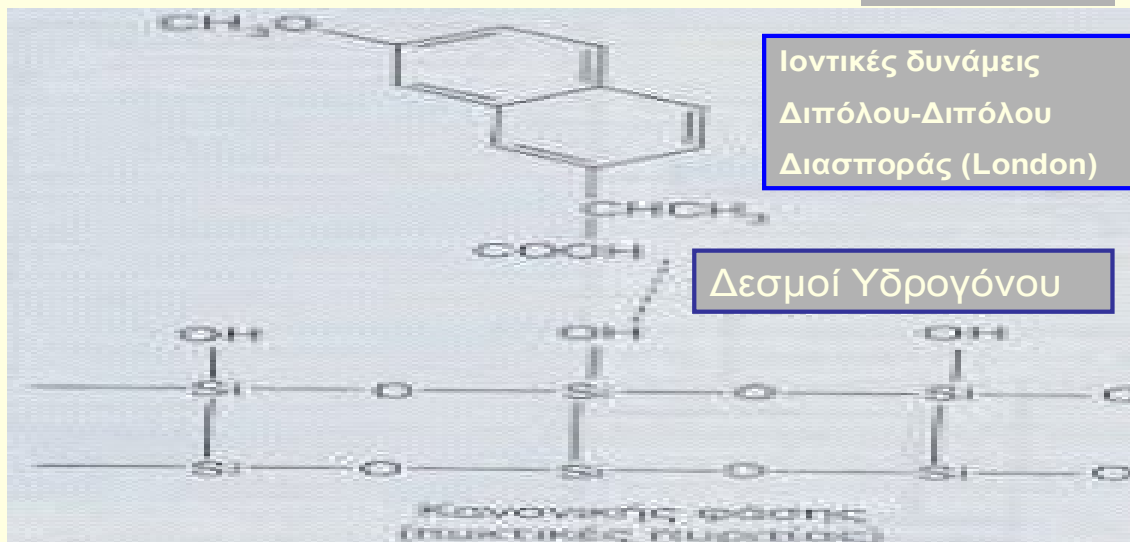


($X, Y = F, O, N$)

Π.χ.

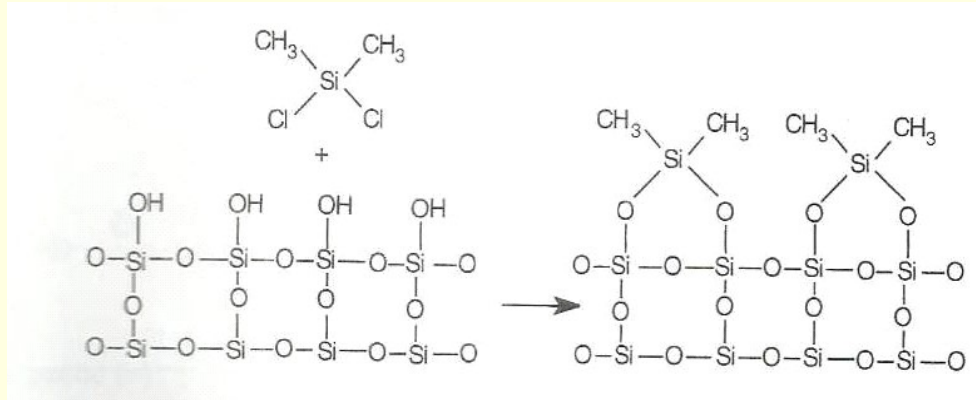


Στατικές φάσεις



Τροποποίηση προσροφητικών υλικών στην TLC

- Σιλανοποιημένο πηγμα οξειδίου του πυριτίου



Συντελεστής μερισμού $P = \frac{C_{octanol}}{C_{water}}$

Τροποποίηση προσροφητικών υλικών στην TLC

Κατεργασία Οξειδίου του πυριτίου με KOH

- Εφαρμόζεται σε ουσίες με βασικές ιδιότητες (αντισταμινικά, συμπαθομιμητικές αμίνες κ.λ.π.)
- Οι κινητές φάσεις συνήθως περιέχουν ένα βασικό συστατικό (εξασφάλιση μη ιονισμού της ουσίας).



Εκλουστικές σειρές και κινητές φάσεις

Έκλουστική ισχύ, ϵ°

Εκφράζει την ενέργεια προσρόφησης του διαλύτη στη στατική φάση ανά μονάδα επιφανείας. Μεγάλο ϵ° μικρή σημαίνει μικρή κατακράτηση ουσίας

Κινητή Φάση

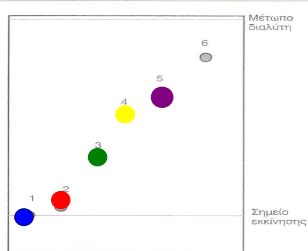
- Μείγμα μη πολικών διαλυτών (Κανονική φάση)
Στατική φάση πολική
- Μείγμα οργανικών πολικών διαλυτών με νερό (Αντίστροφη φάση), *Στατική φάση μη πολική*

Εκλουστικές σειρές και κινητές φάσεις

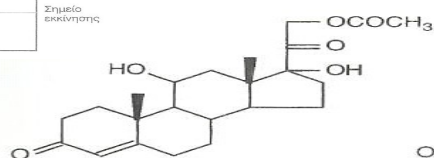
Πίνακας 13.2 Εκλουστικές σειρές

Διαλύτης	Δείκτης Πολικότητας
Εξάνιο (C_6H_{14})	0
Τολουόλιο (C_7H_8)	2,4
Διαιθυλαιθέρας ($C_4H_{10}O$)	2,8
Διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2)	3,1
Βουτανόλη (C_4H_9OH)	3,9
Χλωροφόρμιο ($CHCl_3$)	4,1
Οξικός αιθυλεστέρας ($C_2H_5COOCH_3$)	4,4
Ακετόνη (CH_3COCH_3)	5,1
Μεθανόλη (CH_3OH)	5,1
Αιθανόλη (C_2H_5OH)	5,2
Ακετονιτρίλιο (CH_3CN)	5,8
Οξικό οξύ (CH_3COOH)	6,2
Νερό (H_2O)	9

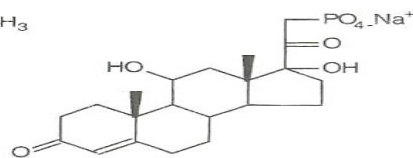
Αύξηση εκλουστικής ισχύος



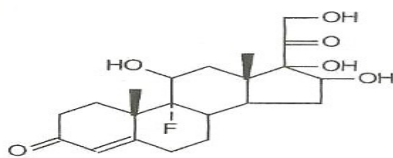
Παράδειγμα:



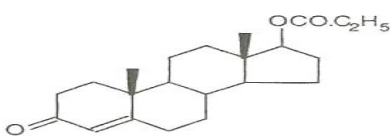
Υδροκορτιζόνη οξική



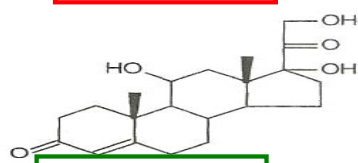
Υδροκορτιζόνη νατριούχος φωσφορική



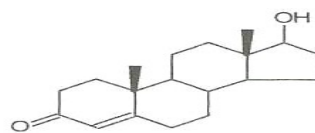
Τριαμκινόλη



Τεστοστερόνη προπιοική



Υδροκορτιζόνη



Τεστοστερόνη

Εμφάνιση χρωματογραφήματος:

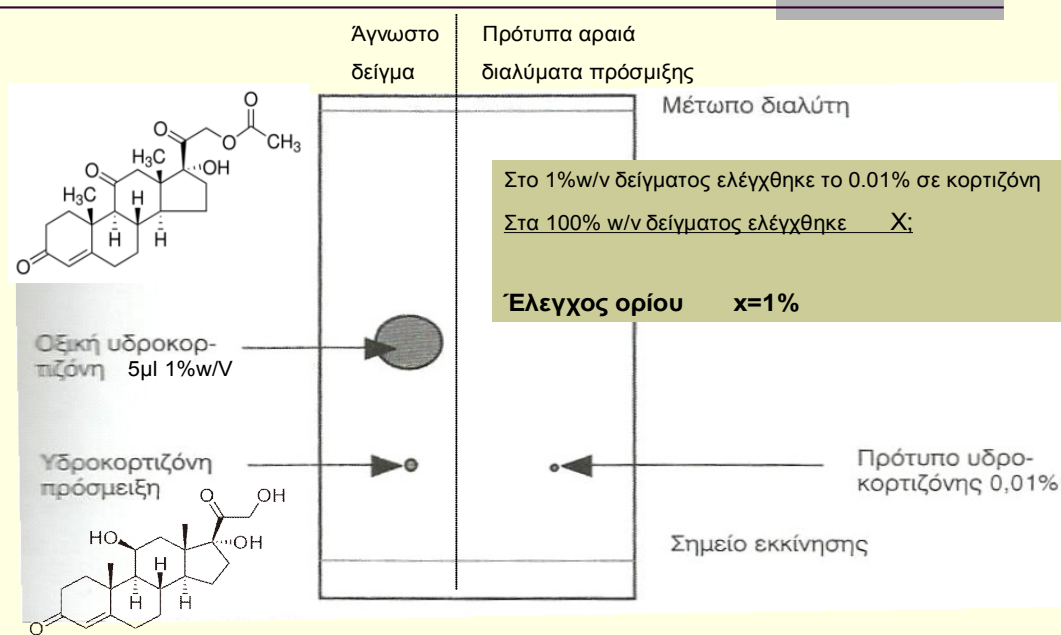
➤ Υπεριώδη ακτινοβολία

Πίνακας 13.1. Στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως στην TLC

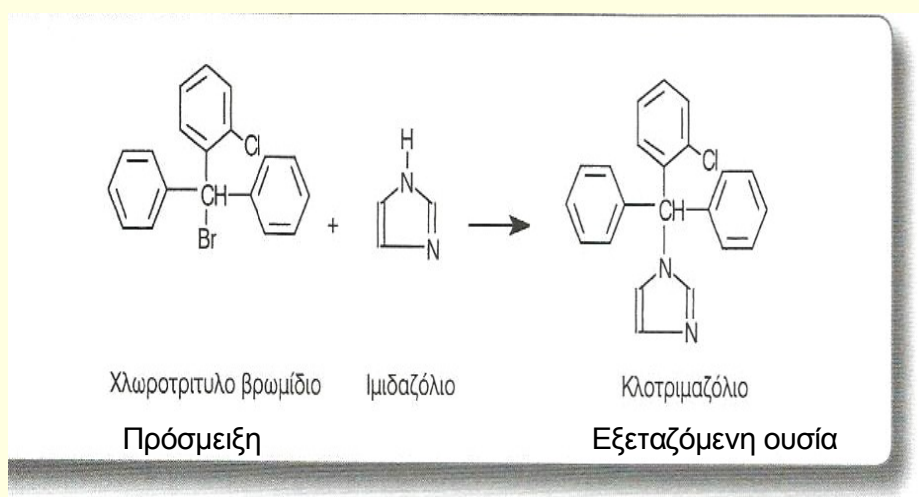
Στατική φάση	Περιγραφή	Εφαρμογές
Silica gel G	Πήγμα οξειδίου του πυριτίου με μέση διάμετρο σωματιδίων 15 μm , που περιέχει περίπου 13% θειικού ασβεστίου ως συνδετικού παράγοντα	Η ουσία φθορίζει σε <i>Σκούρο υπόστρωμα</i>
Silica gel GF ₂₅₄	Silica gel G με προσθήκη φθορίζοντος παράγοντα	Η ουσία δεν φθορίζει (σκούρα κηλίδα) <i>Φθορίζων υπόστρωμα</i>

-Εφαρμογές ανάλυσης TLC:

Έλεγχος ορίων πρόσμιξης γνωστής ουσίας

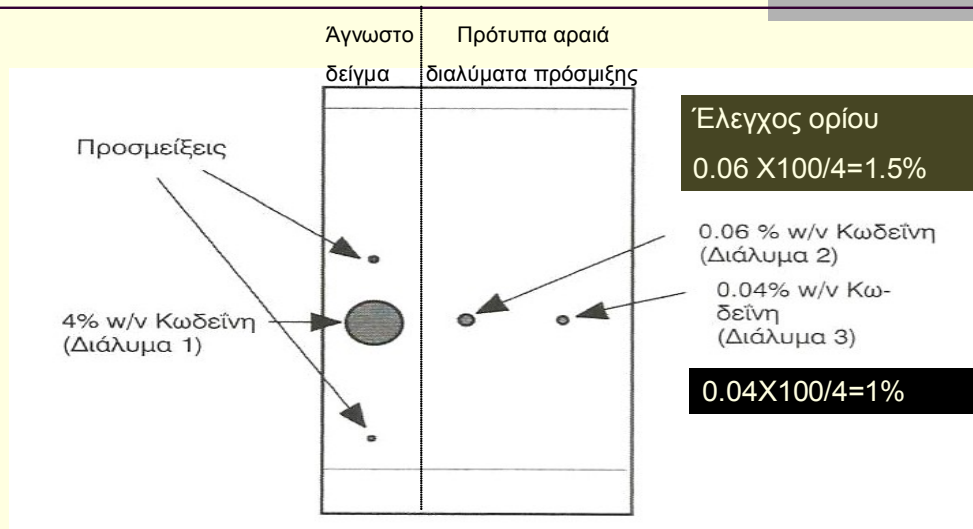


Παρασκευή κλοτριμαζόλιου



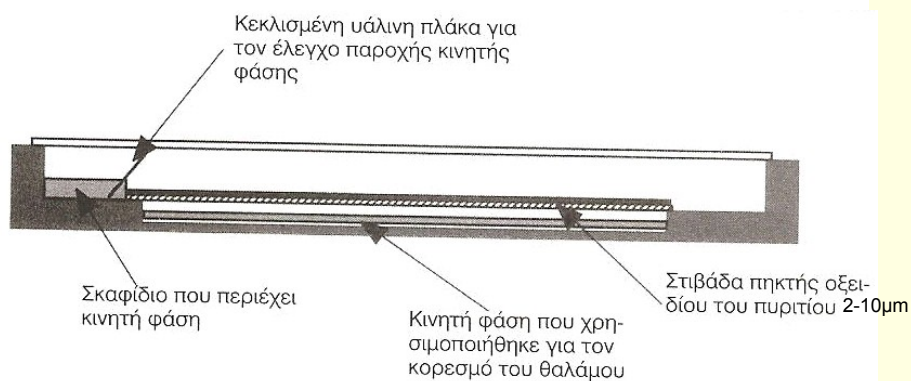
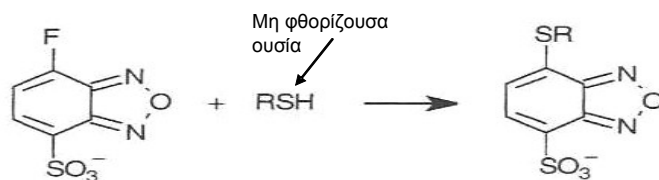
-Εφαρμογές ανάλυσης TLC-

Έλεγχος ορίων πρόσμιξης άγνωστης ουσίας



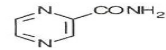
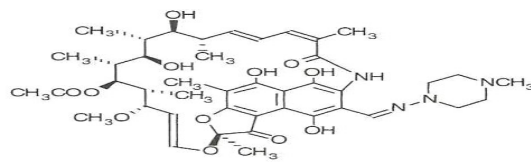
1. Εμβαδόν δευτερευουσών κηλίδων στο διάλυμα 1 < Εμβαδόν διάλυμα 2
2. Ο αριθμός δευτερευουσών κηλίδων στο διάλυμα 1 με εμβαδόν > διαλύματος 3 και $Rf_{\text{προσμ.}} > Rf_{\text{κωδεΐνης}}$ θα πρέπει να είναι < 1

Υψηλής Απόδοσης TLC (HTLC)

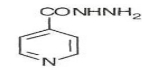


Υψηλής Απόδοσης TLC (HTLC)

ριφαμπικίνη



Πυραζιναμίδιο (P)



Ισονιαζίδιο (I)

