

## CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Chromatografia jest metodą rozdzielania polegającą na zróżnicowanym podziale składników mieszaniny pomiędzy dużą objętościowo fazę ruchomą (ciecz lub gaz) i fazę stacjonarną (ciało stałe lub ciecz). W wyniku kombinacji tych faz opracowano odpowiednie metody chromatograficzne.

W chromatografii cienkowarstwowej (TLC - Thin Layer Chromatography) fazę stacjonarną stanowi cienka warstwa adsorbenta (tlenek glinu, żel krzemionkowy, celuloza) naniesiona na płytkę szklaną lub aluminiową folię. Wymienione materiały mają silnie rozwiniętą powierzchnię, na której w drodze kolejnych adsorpcji i desorpcji następuje wymiana cząsteczek między ciałem stałym a cieczą przepływającą nad powierzchnią ciała stałego. Niekiedy wymiana między fazami może polegać na podziale między cieczą organiczną a wodą, która w niewielkich ilościach znajduje się na nośniku. Sposób postępowania w analitycznej chromatografii cienkowarstwowej jest prosty. Na powierzchnię małej płytki pokrytej cienką warstwą adsorbenta nanosi się kapilarą kroplę badanej mieszaniny w odległości ok. 1 cm od brzegu płytki, następnie płytkę zanurza się tym końcem w komorze chromatograficznej, zakrytym naczyniu wyłożonym bibułą, zawierającym na dnie eluent. Rozpuszczalnik wskutek działania sił kapilarnych w warstwie adsorbenta podnosi się w górę płytki, a wraz z nim wędrują na różną wysokość składniki mieszaniny. Jeśli rozdział dotyczy substancji barwnych, ich plamki na chromatogramie są łatwo widoczne. W przypadku substancji bezbarwnych płytkę z rozwiniętym chromatogramem poddaje się działaniu odpowiedniego wywoływacza, np. par jodu.

Suchą płytkę umieszcza się w zamkniętym naczyniu zawierającym na dnie kryształki jodu. Na płytce pojawiają się brązowe plamy składników mieszaniny, które należy zaznaczyć tuż po wyjęciu płytki, gdyż wskutek parowania jodu, plamy znikają na powietrzu.

Inny sposób wywołania chromatogramu polega na spryskaniu płytki stężonym kwasem siarkowym, który powoduje zwęglenie substancji organicznych. Pozycje związków bezbarwnych, fluoryzujących pod wpływem promieniowania nadfioletowego, można określić, umieszczając płytkę w świetle odpowiedniej lampy.

Wielkością charakteryzującą położenie plamki na chromatogramie jest współczynnik  $R_f$  obliczany następująco:

$$R_f = \frac{\text{odległość przebyta przez substancję}}{\text{odległość przebyta przez czoło rozpuszczalnika}}$$

Na współczynnik  $R_f$  mają wpływ: rodzaj eluenta, aktywność i struktura adsorbenta, nasycenie komory parami rozpuszczalnika, temperatura. Jeśli więc stosujemy chromatografię cienkowarstwową w celu identyfikacji związku, należy nanieść na tę samą płytkę substancję wzorcową.

Chromatografię cienkowarstwową stosuje się ponadto do określania ilości składników mieszaniny, kontroli czystości związku oraz jako próbę wstępną przy doborze warunków do chromatografii kolumnowej.

### TLC barwników roślinnych

Celem ćwiczenia jest potwierdzenie przydatności chromatografii cienkowarstwowej do rozdziału barwników roślinnych zawartych w liściach pietruszki.

Barwniki roślinne odgrywają poważną rolę w metabolizmie organizmów żywych. Do najbardziej rozpowszechnionych należą związki z grupy chlorofilu i karotenoidów, biorące udział między innymi w procesie fotosyntezy.

Chlorofil jest magnezoporfiryną zawierającą układ złożony z czterech pierścieni pirolowych połączonych wiązaniami  $\alpha$ -metinowymi. Chlorofil *a* barwy żółto-zielonej różni się chemicznie od chlorofilu *b* tym, że w miejsce jednej grupy metylowej w pozycji C3 chlorofilu *a* wchodzi grupa aldehydowa. Chlorofil *a* i *b* mają po dwa kwasowe łańcuchy boczne, przy czym jeden z nich zestryfikowany jest alkoholem metylowym, a drugi tworzy ester z fitolem ( $C_{20}H_{39}OH$ ). Fitol jest alkoholem o długim łańcuchu, zbudowanym z czterech jednostek izoprenowych. Charakterystyczną cechą fizyczną chlorofilu jest ich silna czerwona fluorescencja.

Karotenoidy tworzą grupę około 100 naturalnych barwników świata roślinnego, żółtych, pomarańczowych i czerwonych. Wspólną ich cechą jest rozpuszczalność w tłuszczach i w rozpuszczalnikach tłuszczowych. Są to związki wysoko nienasycone posiadające 40 atomów węgla zbudowane z ośmiu połączonych ze sobą reszt izoprenoidowych. Wszystkie karotenoidy posiadają układ sprzężonych wiązań podwójnych w łańcuchu węglowym, które są skłonne do tworzenia izomerów geometrycznych *cis*-i *trans*-.

### **Przygotowanie wyciągu z liści pietruszki**

Około 2,0 g liści pietruszki uciera się w moździerzu z 10 cm<sup>3</sup> mieszaniny aceton - eter naftowy (1:1) przez około 5 min. Ekstrakt przesącza się przez sączek fałdowany.

W przypadku pojawienia się warstwy wodnej ekstrakt należy przelać do małego rozdzielacza i oddzielić warstwę organiczną. Ciemnozieloną warstwę organiczną odparowuje się do małej objętości (około 2 cm<sup>3</sup>).

Wykonanie oznaczenia:

Na gotową płytkę o wymiarach szkiełka mikroskopowego pokrytą żelem krzemionkowym nanieść punktowo kapilarą 3 plamki w odległości około 0,5 cm od brzegu i około 1 cm od dołu płytki. Przygotować komorę do rozwijania (zamknięty słoik wyłożony bibułą) zawierającą eluent, czyli eter naftowy - alkohol etylowy bezwodny - toluen (40 : 4,5 : 15) do wysokości 0,5 cm. Następnie umieścić płytkę w komorze i rozwinąć chromatogram. Gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się w odległości 1 cm od górnej krawędzi płytki, należy ją wyjąć, zaznaczyć czoło rozpuszczalnika i po wysuszeniu obliczyć  $R_f$  dla poszczególnych barwnych plamek.

$R_f$  barwników roślinnych dla układu eter naftowy - alkohol etylowy bezw. - benzen (40:4,5:15) wynoszą odpowiednio:

karoten 0,97

chlorofil *a* 0,81

chlorofil *b* 0,60

ksantofile 0,00-0,30

Na chromatogramie mogą pojawić się barwne plamy produktów degradacji chlorofilu.