



Pracownia studencka  
**Zakładu Analizy Środowiska**

## **Teoria do ćwiczeń laboratoryjnych**

**Chromatografia cienkowarstwowa**

**MONITORING ŚRODOWISKA**

## Chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin Layer Chromatography*, TLC)

Chromatografia jest jedną z głównych technik separacyjnych stosowanych przede wszystkim w analizie związków chemicznych. Chromatografia jest oparta na systemie dwóch niemieszających się faz: fazy stacjonarnej (nieruchomej) oraz fazy ruchomej, która porusza się wzdłuż fazy stacjonarnej. Próbkę jest wprowadzana do kolumny w postaci wąskiego pasma, co znaczy, że ma niewielką objętość. Składniki próbki są separowane dzięki temu, iż w różny sposób dzielą się pomiędzy obie fazy i tym samym przemieszczane są przez fazę ruchomą z różną prędkością. Składniki próbki, które wykazują większe powinowactwo do fazy ruchomej poruszają się znacznie szybciej niż składniki, które wykazują większe powinowactwo do fazy stacjonarnej, i tym samym te pierwsze wcześniej opuszczają układ chromatograficzny. Tak więc separacja składników próbki jest spowodowana różnymi szybkościami migracji poszczególnych składników próbki w układzie chromatograficznym.

Chromatografia cieczowa jest rodzajem chromatografii, w której fazą ruchomą jest ciecz, natomiast fazą stacjonarną jest ciało stałe lub ciecz osadzona na nośniku.

Chromatografię cieczową możemy podzielić na:

- chromatografię kolumnową,
- chromatografię planarną.

Chromatografia planarna jest rodzajem chromatografii cieczowej, w której faza stacjonarna tworzy płaszczyznę. Można ją wykonywać dwoma sposobami: na bibule lub na cienkich warstwach sorbentów osadzonych na podłożu w postaci płytek lub folii. Chociaż ogólne zasady chromatografowania na cienkich warstwach (chromatografia cienkowarstwowa, TLC) i na bibułach (chromatografia bibułowa) są identyczne, to jednak TLC ma przewagę wynikającą z:

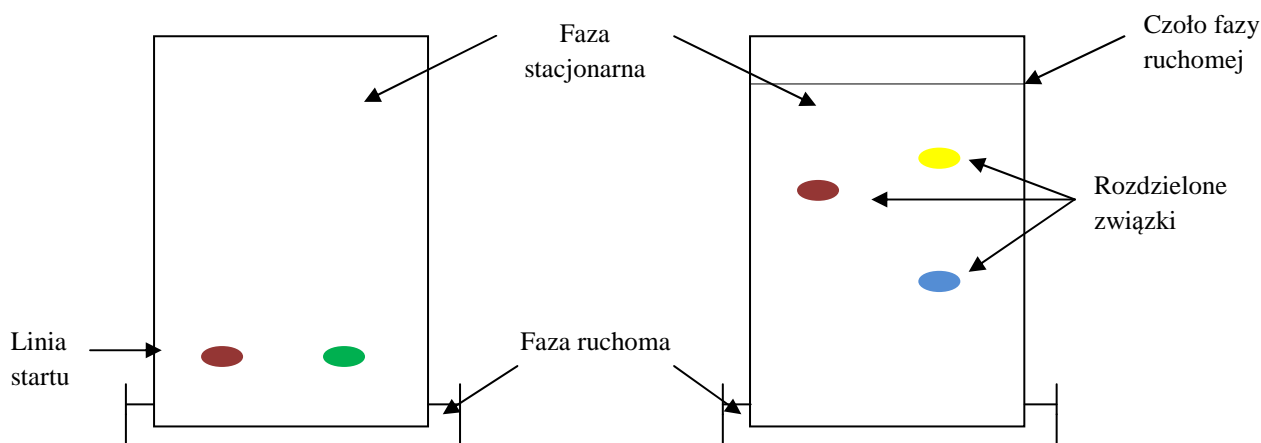
- możliwości użycia większej ilości różnorodnych sorbentów, które mają lepsze właściwości niż celuloza, z której wykonane są bibuły;
- czas rozwijania chromatogramów jest zwykle krótszy;
- rozdzielczość i wykrywalność chromatografowanych substancji jest lepsza;
- adsorbenty są bardziej odporne na odczynniki do wywoływania chromatogramów.

Przebieg analizy chromatograficznej w obu wariantach chromatografii planarnej obejmuje następujące etapy:

- naniesienie próbki na fazę stacjonarną;
- rozwinięcie chromatogramu;
- wizualizację chromatogramu;
- oznaczenie jakościowe i ilościowe składników próbki.

Termin chromatografia cienkowarstwowa oznacza proces chromatograficzny prowadzony na cienkiej warstwie fazy stacjonarnej naniesionej na podłoże z płytek szklanych lub folii aluminiowych czy polimerowych (Rys. 1.). Konieczne jest dostosowanie do indywidualnych analiz odpowiedniej fazy stacjonarnej i ruchomej, sposobu wizualizacji oraz rejestracji chromatogramów.

W wielu technikach chromatograficznych wykorzystuje się dwa zjawiska: podziału substancji między dwie różne fazy ciekłe – obowiązuje tu prawo podziału Nernsta i adsorpcji substancji na nośniku, czyli fazy stacjonarnej. Technika chromatografii cienkowarstwowej łączy w sobie te dwa zjawiska, ponieważ polega na poruszaniu się substancji chromatografowanych z różną prędkością wraz z ciekłą fazą ruchomą przez cienką warstwę stałego adsorbenta naniesionego na płytkę. Towarzyszą temu procesy adsorpcji i desorpcji oraz podział między ciekłą fazą organiczną i wodą, która w niewielkich ilościach znajduje się na nośniku. Tak więc warunki procesu są trudne do jednoznacznej definicji i kontroli eksperymentalnej. Związane jest to m.in. z obecnością par rozpuszczalnika i ich kontaktem z warstwą fazy stacjonarnej. Ponieważ skład par może ulegać zmianie w kolejnych eksperymentach (jest zależny od objętości komory chromatograficznej, stanu nasycenia komory parą rozpuszczalników przed rozpoczęciem procesu rozwijania oraz od temperatury) szczególnie ważne jest zachowanie powtarzalnych warunków rozwijania chromatogramu.



**Rys. 1.** Chromatografia cienkowarstwowa. Płytkę przygotowaną do rozdzielu z naniesionymi plamkami badanych próbek (po lewej), płytka po wykonaniu rozdzielu (po prawej)

Próbkę nanosi się na płytkę TLC z postaci roztworu o bardzo małej objętości, tworząc małą plamkę w punkcie startowym (Rys. 1.). Proces chromatograficzny przeprowadza się w odpowiednich komorach chromatograficznych (Rys. 2.). Płytki umieszcza się w komorze chromatograficznej, w której na dnie znajduje się faza ruchoma. W wyniku działania sił kapilarnych faza ruchoma wędruje w górę płytki. Jest to proces rozwijania chromatogramu **metodą wstępującą**. **Proces separacji składników próbek naniesionej na płytkę TLC nazywamy rozwijaniem**. Oddziaływanie substancji znajdujących się w próbce z adsorbentem oraz z poruszającym się rozpuszczalnikiem powoduje rozdzielenie się składników próbki na płytce i poszczególne składniki tworzą oddzielne plamki. **Plami rozdzielanych składników należy z kolei uwidocznić, czyli wywołać**. Chromatogramy wywołuje się najczęściej odczynnikami chemicznymi, które tworzą barwne związki z analitami. Często ogląda się chromatogramy

TLC oświetlane lampą wytwarzającą promieniowanie UV, aby zobaczyć substancji wykazujące właściwości fluorescencyjne pod wpływem promieniowania UV. Fluorescencja jest to zjawisko emitowania przez niektóre związki chemiczne światła pod wpływem naświetlania zewnętrznym promieniowaniem.



**Rys. 2.** Komora do chromatografii cienkowarstwowej

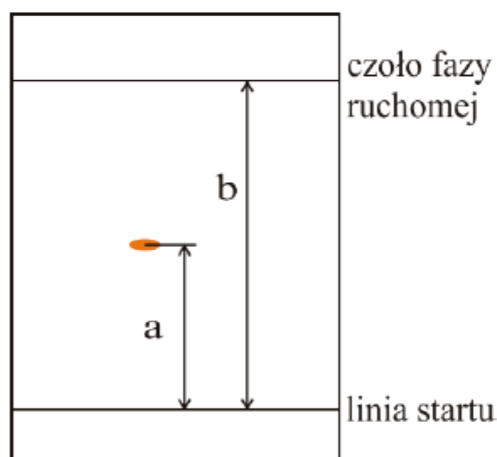
TLC wykorzystuje się głównie do:

- określenia ilości składników w mieszaninie;
- potwierdzenie lub wykluczenia obecności danej substancji;
- monitorowania postępu reakcji chemicznych;
- znalezienia optymalnych warunków dla chromatografii kolumnowej;
- analizy frakcji uzyskanych techniką chromatografii kolumnowej.

Podstawowym parametrem w chromatografii cienkowarstwowej, który określa położenie substancji na chromatografie, jest **współczynnik opóźnienia  $R_F$** . Jest to stosunek drogi migracji substancji (a) do drogi przebytej przez fazę ruchomą (b):

$$R_F = a/b$$

Sposób jego wyznaczania jest pokazany na rysunku 3. Współczynnik opóźnienia przyjmuje wartości od 0 do 1. Jeśli  $R_F = 0$  oznacza to, że chromatografowana substancja w danym układzie chromatograficznym pozostaje na starcie, gdyż zbyt silnie oddziałuje z fazą stacjonarną i nie ma oddziaływań z fazą ruchomą. Z kolei  $R_F = 1$  świadczy o tym, że substancja nie oddziałuje z fazą stacjonarną i wędruje z czołem rozpuszczalnika. Optymalna wartość współczynnika  $R_F$  powinna zawierać się w przedziale 0,2 – 0,8. Wówczas warunki chromatograficzne są najbardziej stabilne. Współczynnik opóźnienia jest charakterystyczny dla danej substancji w danych warunkach chromatograficznych i może służyć do jej identyfikacji. Wartość współczynnika  $R_F$ , podobnie jak innych parametrów retencji, zależy od rodzaju analitu, rodzaju fazy ruchomej i fazy stacjonarnej, a także nasycenia komory i temperatury.



Rys. 3. Sposób pomiaru współczynnika opóźnienia

Jeżeli dana substancja ma tę samą wartość współczynnika opóźnienia, jaką ma wzorzec, wyznaczoną w takich samych warunkach chromatograficznych, to prawdopodobnie jest identyczna ze wzorcem. Najczęściej analizę jakościową wykonuje się w ten sposób, że na jedną płytkę TLC nanosi się badaną próbkę oraz obok nanosi się również wzorzec. Po rozwinięciu płytki sprawdza się, która plamka badanej próbki ma taką samą wartość współczynnika opóźnienia jak wzorzec.

Najbardziej popularną fazą stacjonarną stosowaną w TLC jest żel krzemionkowy – polarny adsorbent o ogólnym wzorze sumarycznym  $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Jest to materiał porowaty, amorficzny. Stosowany jest jako polarna faza stacjonarna w chromatografii w normalnym układzie faz.

W chromatografii cienkowarstwowej stosuje się takie same fazy ruchome jak w kolumnowej chromatografii cieczerwowej. Rozpuszczalniki, które są bardziej polarne powodują mniejszą retencję związków w chromatografii w normalnym układzie faz. Czyli im większa polarność fazy ruchomej tym wartość współczynnika opóźnienia analizowanego związku chemicznego jest mniejsza. Rozpuszczalniki sklasyfikowane według wzrastającej mocy elucyjnej nazywamy szeregiem eluotropowym rozpuszczalników.

#### Szereg eluotropowy:

n-Heptan < n-Heksan < Cykloheksan < Czterochlorek węgla < Eter izopropylowy < Chloroform < Chlorek metylenu < Eter metylo-*tert*-butylowy < Tetrahydrofuran < Octan etylu < Trietyloamina < Acetonitryl < Dioksan < *tert*-Butanol < *n*-Butanol < Izopropanol < Etanol < Metanol < Woda

Ogólne zasady postępowania z płytkami TLC są następujące:

- powierzchni płytek nie wolno dotykać palcami;
- przy cięciu płytki nożyczkami nie wolno zniszczyć warstwy fazy stacjonarnej;
- dobrze jest usunąć ukruszoną część fazy stacjonarnej z brzegu, który był przecięty, za pomocą szpatułki lub delikatnie przesuwać palcem po krawędzi płytki;
- na płytce **delikatnie** zaznaczamy **miękkim ołówkiem** jedynie punkt startowy i ewentualnie linię końcową czoła fazy ruchomej za pomocą niewielkiej kreski o szerokości 0,5 cm z boku płytki. Opis nanoszonych próbek najlepiej zamieścić w zeszycie laboratoryjnym a nie na płytce TLC. Zniszczenie powierzchni fazy stacjonarnej poprzez rysowanie na płytce powoduje błędy w analizach TLC;
- aby udokumentować wykonaną analizę TLC można wywołaną płytkę sfotografować, zeskanować lub zamieścić jej rysunek wykonany w skali 1:1.

Nanoszenie próbki na płytkę TLC:

- punkt startowy, gdzie nanosi się próbkę, nie powinien być za nisko na płytce TLC, aby nie zanurzyć plamki w fazie ruchomej przy wkładaniu płytki do komory chromatograficznej;
- im mniejsza jest objętość naniesionego roztworu próbki tym lepiej. Przy analizie jakościowej nanosi się od 0,5 do 2,0  $\mu\text{l}$  roztworu próbki, przy określaniu czystości próbki - około 10  $\mu\text{l}$  aplikowanych w niewielkich porcjach;
- plamka naniesionej próbki powinna być jak najmniejsza. Średnica plamki nie powinna przekraczać 2 mm;
- należy także starannie wybrać rozpuszczalnik do rozpuszczenia próbki. Im mniejsza siła elucyjna rozpuszczalnika tym lepiej, bo uzyskuje się plamkę o mniejszej średnicy. Im lotniejszy rozpuszczalnik, tym łatwiej go usunąć.
- plamkę naniesionej próbki należy odpowiednio wysuszyć. W przypadku lotnych związków rozpuszczonych w lotnym rozpuszczalniku, pozostawia się płytkę na kilka minut w temp. pokojowej, nie używa się suszarki do włosów. W przypadku termicznie stabilnych substancji, rozpuszczonych w chloroformie lub metanolu, płytkę pozostawia się na 20 minut w suszarce w temperaturze bliskiej temperatury wrzenia rozpuszczalnika. Tu stosowanie suszarki do włosów może być niewystarczające.

Rozwijanie chromatogramów TLC:

- niezbędne jest odpowiednie wcześniejsze nasycenie komory chromatograficznej oparami fazy ruchomej;
- **każda płytka „ma prawo” do swojej własnej fazy ruchomej.** Oznacza to, że nie wolno używać komory chromatograficznej napełnionej jedną fazą ruchomą do rozwijania kolejnych płytek TLC, zwłaszcza, jeśli używa się fazy ruchomej będącej mieszaniną kilku rozpuszczalników. Komorę

należy napełniać świeżą fazą ruchomą przed rozwijaniem każdej płytki. W komorach, w których płytka jest częściowo zanurzona w fazie ruchomej, może nastąpić zmiana składu fazy ruchomej podczas chromatografowania. Jeżeli faza ruchoma jest jednoskładnikowa, to sprawdza się jej czystość i ilość, i ewentualnie uzupełnia lub wymienia;

- najlepiej używać świeżo przygotowanej fazy ruchomej. Przechowywane przez długi czas roztwory fazy ruchomej mogą zmieniać swój skład i w sposób negatywny wpływać na wynik analizy;
- komora chromatograficzna nie powinna stać pod wyciągiem laboratoryjnym w trakcie rozwijania chromatogramu. Przepływ powietrza zmienia temperaturę, a to wpływa na rozdzielanie chromatograficzne;
- **nie wolno także poruszyć komory chromatograficznej** w trakcie rozwijania chromatogramu.

#### Literatura:

1. Skrypt „Techniki separacyjne” UG
2. Z. Witkiewicz, „Podstawy chromatografii”, WNT, Warszawa 2000.