

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**Εργαστήριο Οργανικής Χημείας**



**9<sup>ο</sup> Εργαστήριο  
Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)**

**Δρ Καψή Μαργαρίτα, Χημικός**

Ηράκλειο 2023-2024

## Διαχωρισμός Μιγμάτων

Διαχωρισμός ουσιών με **διαφορετικές** χημικές και φυσικές ιδιότητες

π.χ μίγμα άμμου και αλατιού

Διαχωρισμός ουσιών με **παρόμοιες** χημικές και φυσικές ιδιότητες

π.χ φυτοφάρμακα σε νερό

Η λύση του προβλήματος ήταν η ανάπτυξη πολλών μεθόδων, οι οποίες ανήκουν στην ίδια “οικογένεια” τεχνικών διαχωρισμού γνωστές ως **χρωματογραφία**

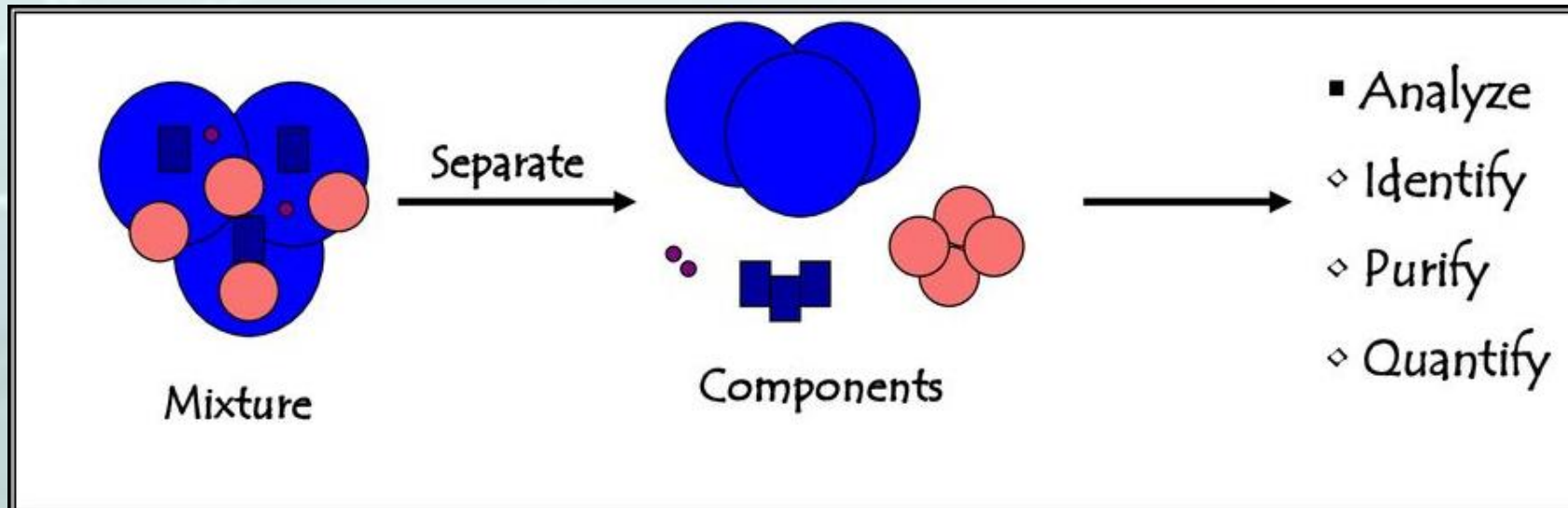
Χρώμα + Γράφω



διαχωρίζονται σε **χρωματισμένες ζώνες** μέσα στη στήλη.

## Χρωματογραφία

Χρωματογραφία είναι μια τεχνική για τον διαχωρισμό μιγμάτων στα συστατικά τους προκειμένου να αναλυθεί, να αναγνωρισθεί, να καθαριστεί και / ή να ποσοτικοποιηθεί το μείγμα ή τα συστατικά .



## Διαχωρισμός Μιγμάτων

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των συστατικών του μίγματος σε ορισμένες ιδιότητες:

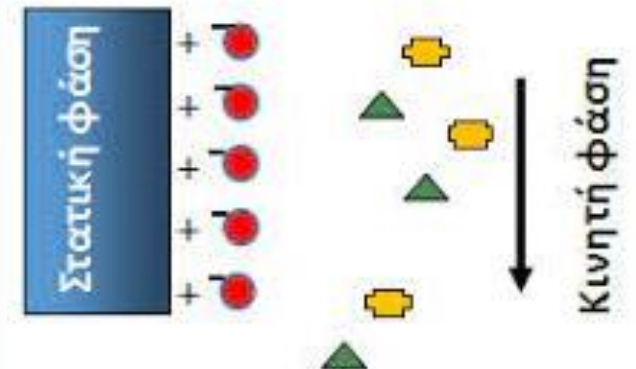
- ✓ Σημείο ζέσεως (πτητικότητα)
- ✓ Πολικότητα
- ✓ Ηλεκτρικά φορτία (για ιοντικές ενώσεις)
- ✓ Μέγεθος μορίων

Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής «στήλης».

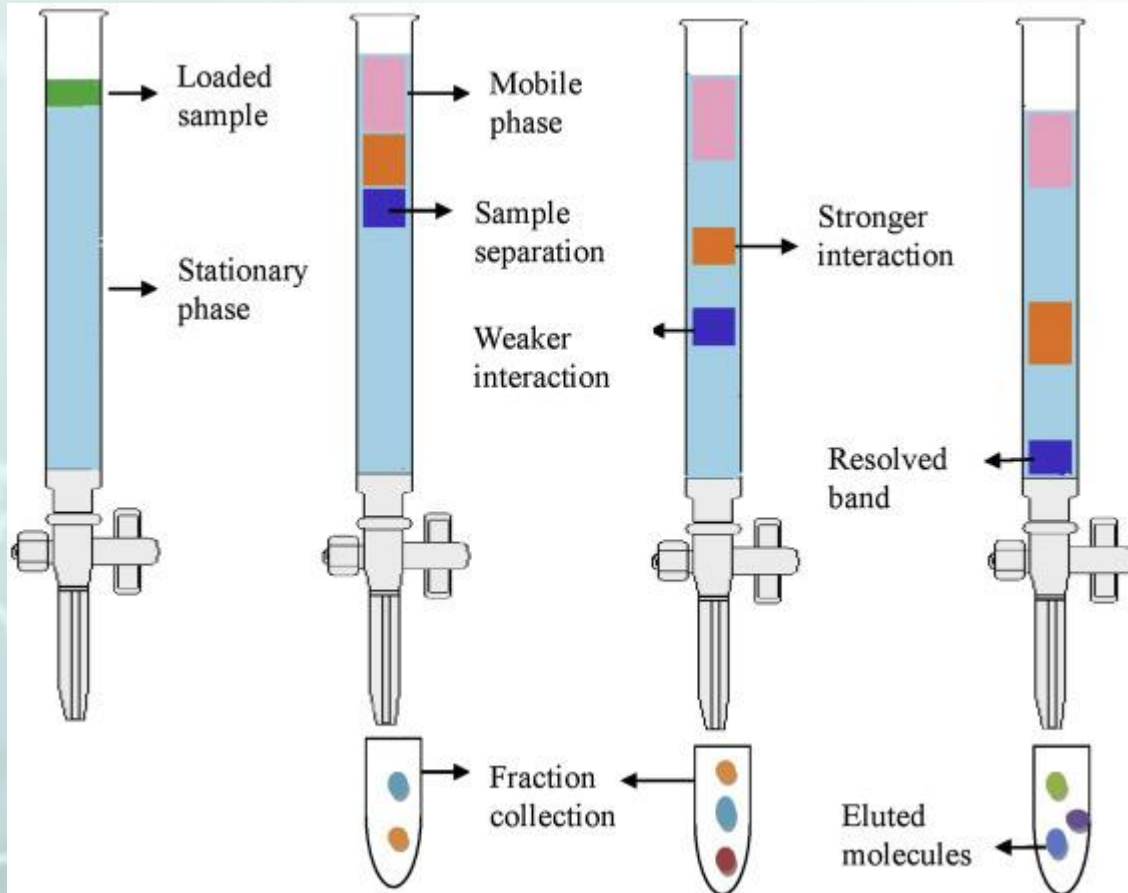
Εκλεκτική μετακίνηση μεταξύ μιας κινούμενης και μιας ακίνητης φάσης.

**Στατική (ακίνητη) φάση** μπορεί να είναι στερεό ή υγρό.

**Κινητή φάση** μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και **ρέει** διά μέσου της στατικής φάσης μεταφέροντας τα διάφορα συστατικά

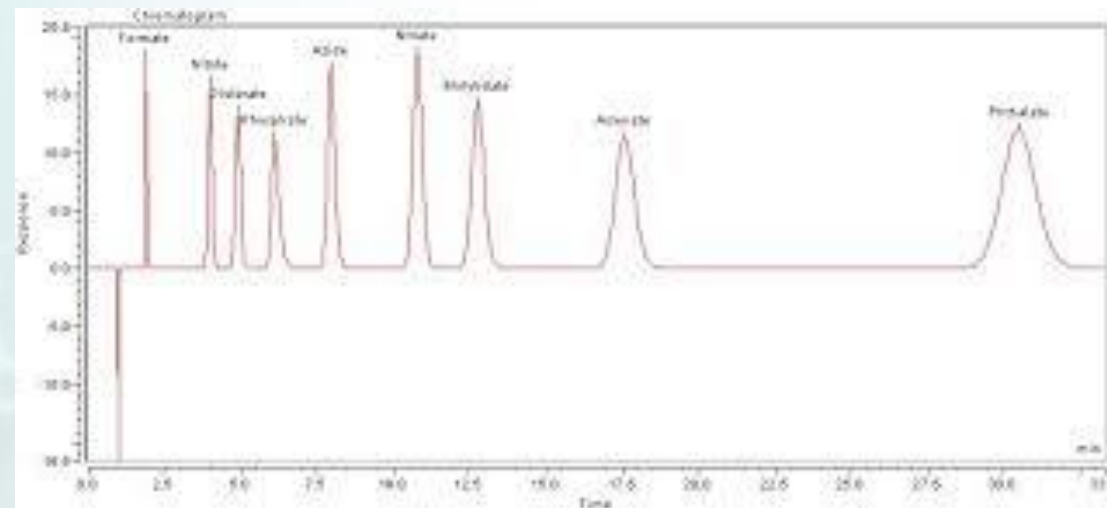


## Μηχανισμός διαχωρισμού σε κολώνα χρωματογραφίας



### Μηχανισμοί στη χρωματογραφία:

- Προσρόφηση
- Κατανομή
- Ιοντοανταλλαγή
- Μοριακός αποκλεισμός
- Χημική συγγένεια



Τα προς διαχωρισμό μόρια **αλληλεπιδρούν διαφορετικά** με τα μόρια της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να κινούνται με **διαφορετικές ταχύτητες** μέσα ή πάνω στη στατική φάση κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους.

Ανάλογα με το είδος της κινητής και στατικής φάσης, το μέσο στήριξης της στατικής φάσης και το μηχανισμό διαχωρισμού, τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος οι χρωματογραφικές μέθοδοι ταξινομούνται ως εξής:

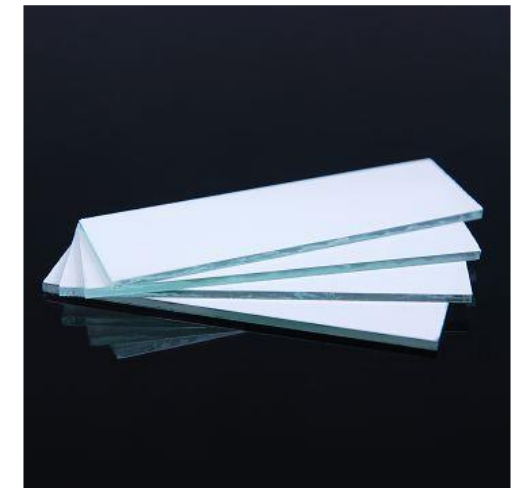
Κινητή φάση	Στατική φάση	Μηχανισμός	Μορφή στατικής φάσης	Είδος χρωματογραφίας
Υγρή	Στερεή	Προσρόφηση	Στήλη	Χρωματογραφία προσρόφησης σε στήλη
			Λεπτή στοιβάδα προσροφητικού υλικού	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
			Χαρτί	Χρωματογραφία σε χαρτί
		Ιοντοανταλλαγή	Στήλη	Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε στήλη
			Χαρτί	Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής σε χαρτί
			Χημική συγγένεια	Στήλη
		Μοριακός αποκλεισμός	Στήλη	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
	Υγρή (σε στερεό φορέα)	Κατανομή	Στήλη	Χρωματογραφία κατανομής σε στήλη
Χαρτί			Χρωματογραφία κατανομής σε χαρτί	
Αέρια	Στερεή	Προσρόφηση	Στήλη	Αέρια-στερεή χρωματογραφία
	Υγρή (σε στερεό φορέα)	Κατανομή	Στήλη	Αέρια-υγρή χρωματογραφία

## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)

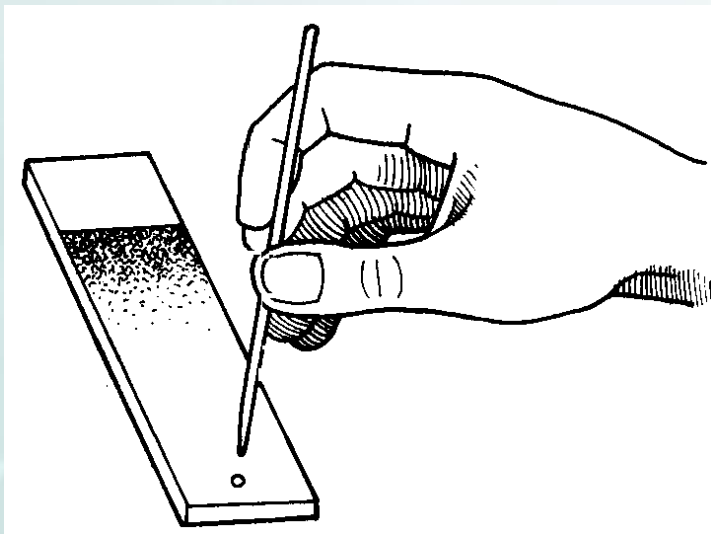
Αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού στερεού-υγρού. Στο TLC η υγρή κινητή φάση δεν διυλίζεται κατά την κίνησή της προς τα κάτω ανάμεσα από μόρια ρητίνης, αλλά πραγματοποιεί **ανοδική πορεία** μέσα σε ένα λεπτό στρώμα προσροφητικού μέσου (στατική φάση) **Alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )** ή **Silica gel ( $\text{SiO}_2$ )**, **μη κορεσμένου σε μόρια ενός πολικού διαλύτη** ή κάποιο μίγμα διαλυτών (**διαλύτης ανάπτυξης**). Μπορεί να είναι αέρια ή υγρή.

### Πλεονεκτήματα

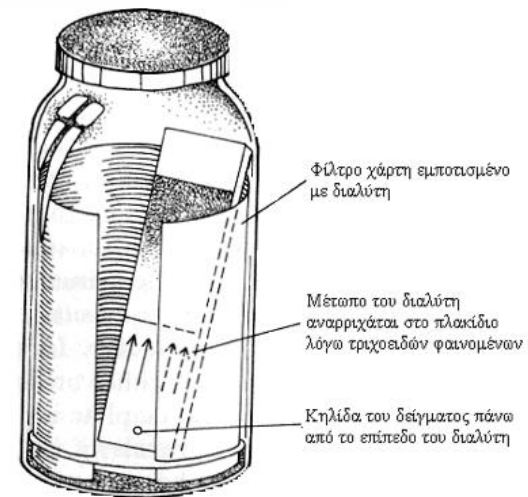
- ✓ Απλή και γρήγορη προετοιμασία των δειγμάτων
- ✓ Μικρό κόστος
- ✓ Απλή και σύντομη διαδικασία
- ✓ Άμεση σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων
- ✓ Ταυτόχρονη ανάλυση σχετιζόμενων και μη σχετιζόμενων δειγμάτων
- ✓ Μικρός όγκος δείγματος (μερικά μικρόλιτρα)



## Φόρτωση δείγματος-προτύπων στο TLC & Ανάπτυξη

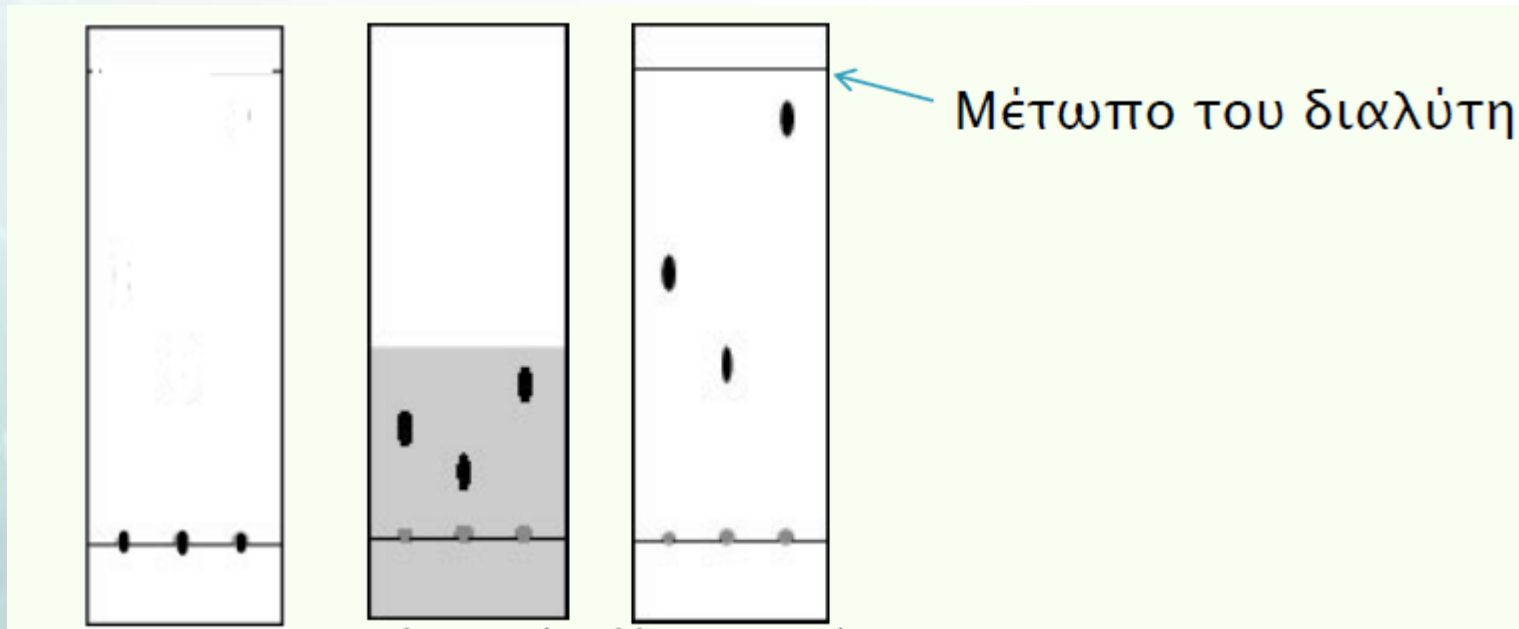


Το δείγμα τοποθετείται σε μικροσκοπικές κηλίδες κοντά στη βάση του πλακιδίου. Τριχοειδή φαινόμενα επιδρούν στη μεταφορά του δείγματος στο προσροφητικό μέσο και δημιουργείται μία μικρή κηλίδα του δείγματος

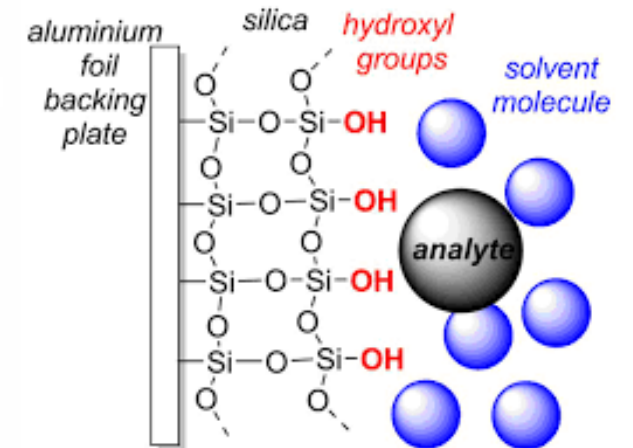


Το πλακίδιο TLC τοποθετείται όρθιο σε δοχείο που περιέχει κινητή φάση, έτσι ώστε η επιφάνειά της να βρίσκεται **χαμηλότερα** από την κηλίδα του δείγματος και ένα φύλλο διηθητικό χαρτί, το οποίο διαβρέχεται από τον διαλύτη προκειμένου το δοχείο να είναι **κορεσμένο σε ατμούς του διαλύτη**. Ο διαλύτης **αναρριχάται** στο προσροφητικό μέσο εξαιτίας **τριχοειδών φαινομένων**. Μόλις το μέτωπο του διαλύτη φτάσει 5 mm πριν το πάνω άκρο, το πλακίδιο απομακρύνεται και ο διαλύτης εξατμίζεται με ρεύμα αέρα

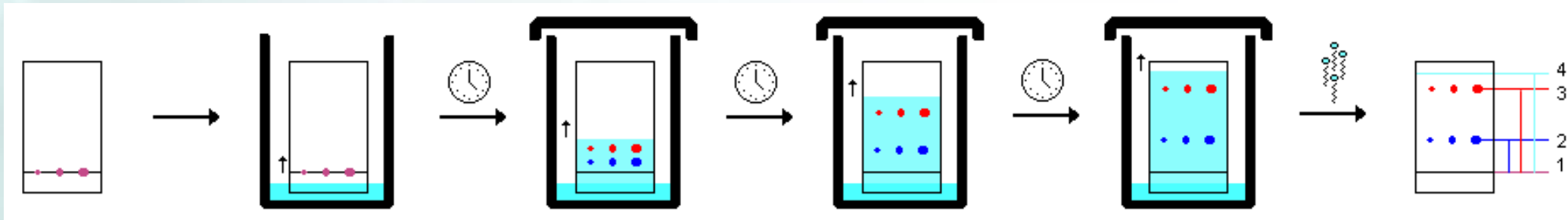
Καθώς ο διαλύτης αναπτύξεως ανεβαίνει πάνω στο πλακίδιο με το προσροφητικό υλικό, **συμπαρσύρει** τις ουσίες του εξεταζόμενου μίγματος.



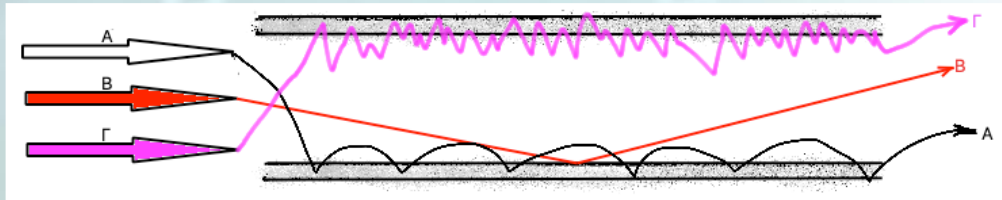
Δεν πρέπει ο διαλύτης να φτάσει το πάνω άκρο του πλακιδίου, γιατί οι κηλίδες θα διαχυθούν αν ακινητοποιηθεί ο διαλύτης και επίσης οι ουσίες που κινούνται πάνω στο μέτωπο του διαλύτη (λόγω ισχυρής αλληλεπίδρασης με αυτόν) θα εξέλθουν από το πλακίδιο.



## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ TLC

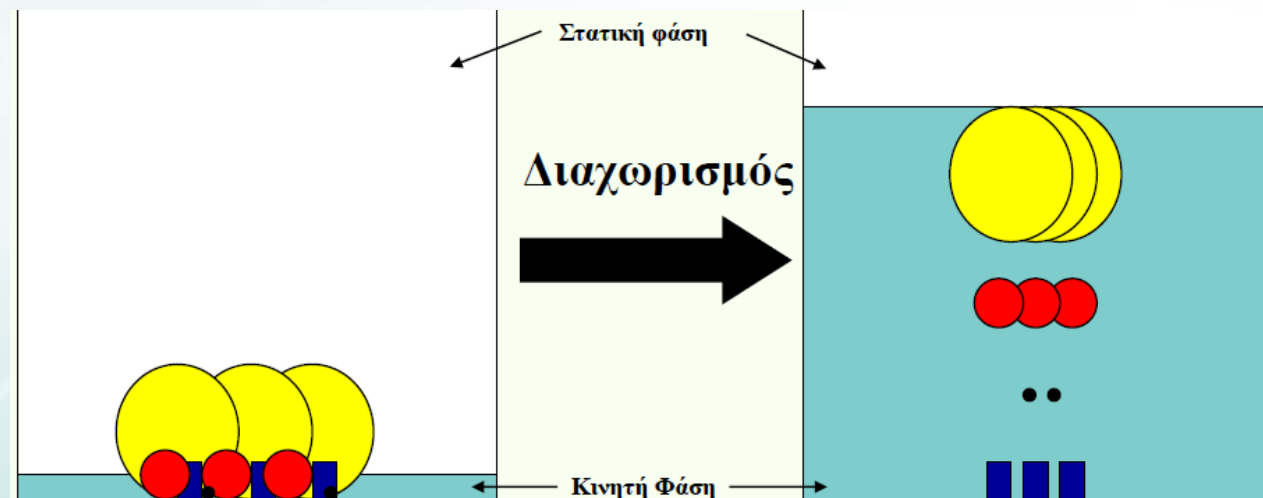


Τα συστατικά του δείγματος εμφανίζουν **διαφορετική ισχύ αλληλεπίδρασης** με τις 2 φάσεις (κινητή και στατική), με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται



Έτσι, ουσίες που είναι **περισσότερο πολικές** μετακινούνται **ΑΡΓΑ** ή και **ΚΑΘΟΛΟΥ** πάνω στο προσροφητικό μέσο, ενώ οι **άπολες ουσίες** μετακινούνται **ΠΟΛΥ ΓΡΗΓΟΡΑ** αν η κινητή φάση είναι άπολη.

## Αναπαράσταση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)



Η στατική φάση είναι ισχυρά πολική και αλληλεπιδρά ισχυρά με πολικές ουσίες. Η κινητή φάση είναι συνήθως λιγότερο πολική και διαλύει ευκολότερα τις λιγότερο πολικές ή άπολες ουσίες.

Συστατικά	Συγγένεια στη ΣΤΑΤΙΚΗ φάση	Συγγένεια στην ΚΙΝΗΤΗ φάση
Μπλε	-----	Αδιάλυτο στην κινητή φάση
Μαύρο	✓✓✓✓✓✓	✓✓
Κόκκινο	✓✓	✓✓✓✓✓✓
Κίτρινο	✓	✓✓✓✓✓✓✓✓✓✓✓✓

## Εμφάνιση κηλίδων στο TLC

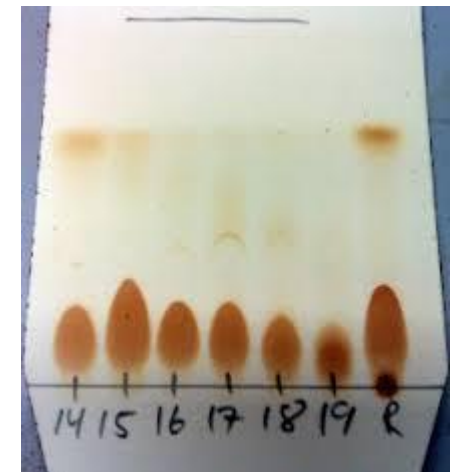
Απαιτείται η **εμφάνιση των κηλίδων**, η οποία μπορεί να γίνει:

- ✓ Με χρώση των κηλίδων με διάφορες χρωστικές, όπως διάλυμα  $\text{KMnO}_4$
- ✓ Διάλυμα Cerium (δημητρίου)
- ✓ Με έκθεση του πλακιδίου σε ατμούς ιωδίου
- ✓ Με έκθεση του πλακιδίου σε υπεριώδη ακτινοβολία.



## Χρώση με ατμούς Ιωδίου

- ✓ Το ιώδιο αντιδρά με πολλές οργανικές ενώσεις προς σχηματισμό έγχρωμων **συμπλόκων** (καφέ ή κίτρινα). Εκτός από τους κορεσμένους υδρογονάνθρακες και τα αλκυλαλογονίδια, σχεδόν όλες οι υπόλοιπες οργανικές ουσίες σχηματίζουν σύμπλοκα με το ιώδιο.
- ✓ Το πλακίδιο μετά την ανάπτυξη και το στέγνωμά του τοποθετείται σε δοχείο με αεροστεγές καπάκι, το οποίο περιέχει κρυστάλλους ιωδίου.
- ✓ Όταν οι κηλίδες χρωματιστούν αρκετά, το πλακίδιο απομακρύνεται από το δοχείο και σημειώνεται **άμεσα** με μολύβι η θέση τους.
- ✓ Η χρώση των κηλίδων ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΜΟΝΙΜΗ, γι' αυτό η θέση τους σημειώνεται ΑΜΕΣΩΣ.



## Έκθεση του πλακιδίου σε υπεριώδη ακτινοβολία

- ✓ Πολλές ενώσεις όταν φωτιστούν με υπεριώδες φως φθορίζουν.
- ✓ Σημειώνεται η θέση των κηλίδων όσο το πλακίδιο βρίσκεται κάτω από το υπεριώδες φως.
- ✓ ΠΡΟΣΟΧΗ!! ΒΛΑΒΕΡΗ αλληλεπίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας με το γενετικό υλικό των κυττάρων του ΔΕΡΜΑΤΟΣ και των ΜΑΤΙΩΝ!!
- ✓ Τα αλκυλαλογονίδια μπορούν να εμφανιστούν μετά από ψεκασμό του πλακιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου.
- ✓ Τα αλογονίδια του αργύρου που σχηματίζονται διασπώνται στο φυσικό φως προς μεταλλικό άργυρο, ο οποίος βάφει μαύρο το σημείο που βρίσκεται (μόνιμη χρώση κηλίδων).

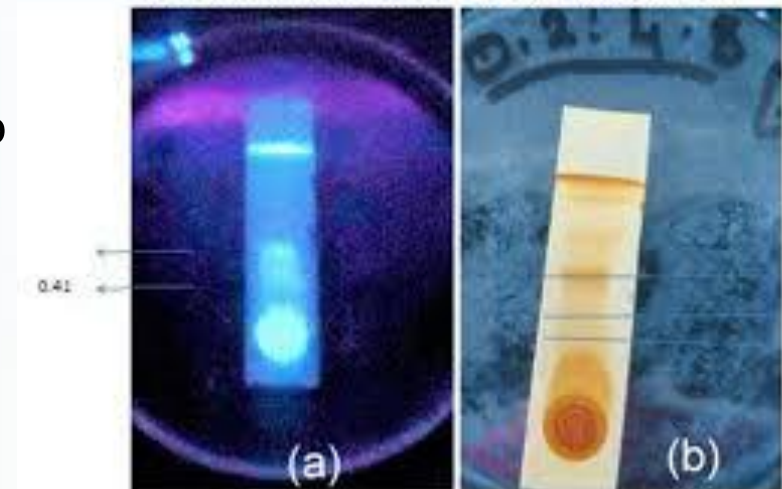


Figure 4.5: TLC under (a) Short UV (b) Iodine chamber

## Επιλογή κινητής φάσης

- Εξαρτάται από την πολικότητα των συστατικών του μίγματος.
- Συχνά γίνονται δοκιμές με διαφορετικές κινητές φάσεις πριν επιτευχθεί ικανοποιητικό αποτέλεσμα.
- Σε πολλές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η χρήση μίγματος διαλυτών για ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

**Πίνακας 2. Διαλύτες για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας**

Πετρελαϊκός αιθέρας  
Κυκλοεξάνιο  
Τετραχλωράνθρακας  
Βενζόλιο  
Χλωροφόρμιο  
Μεθυλοχλωρίδιο  
Διεθυλαιθέρας  
Οξικός αιθυλεστέρας  
Ακετόνη  
Πυριδίνη  
Αιθανόλη  
Μεθανόλη  
Νερό  
Οξικό οξύ

Η πολικότητα των διαλυτών αυξάνεται από πάνω προς τα κάτω.

## ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΕΠΙΒΡΑΔΥΝΣΗΣ Rf

Ο λόγος των αποστάσεων που καλύπτει η ουσία και ο διαλύτης ονομάζεται **συντελεστής επιβράδυνσης**

$$R_f = \frac{D_1}{D_2}$$

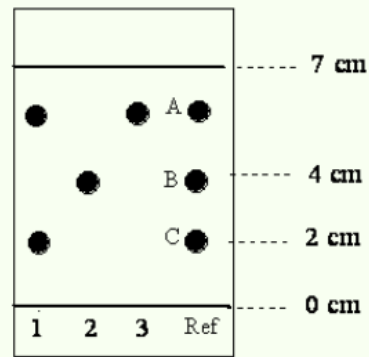
όπου D<sub>1</sub> η απόσταση που διανύει η ουσία και D<sub>2</sub> η απόσταση που διανύει ο διαλύτης

### Η ανάπτυξη TLC επηρεάζεται:

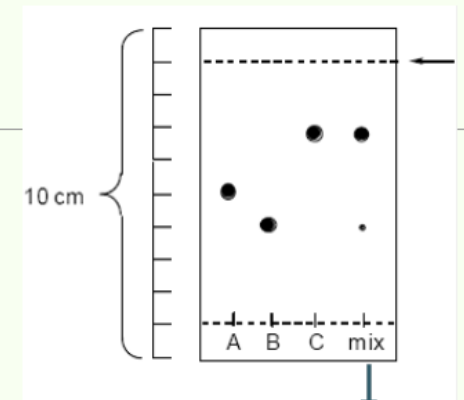
- Το σύστημα του διαλύτη (κινητή φάση)
- Το προσροφητικό μέσο (στατική φάση)
- Το πάχος του στρώματος του προσροφητικού μέσου
- Την ποσότητα του δείγματος που τοποθετείται στο πλακίδιο

**Μια συγκεκριμένη ένωση μετακινείται πάντοτε κατά ΙΔΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ σε σχέση μέτωπο του διαλύτη, όταν τα παραπάνω είναι σταθερά!!**

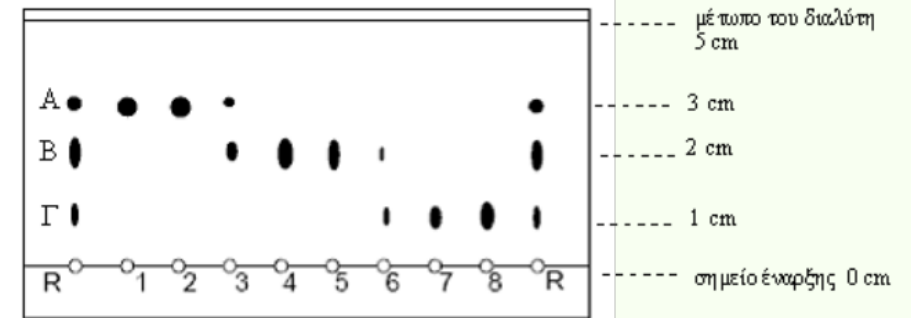
## Παραδείγματα



διαλύτης ανάπτυξης:  
μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα- οξικού αιθυλεστέρα 10:1.

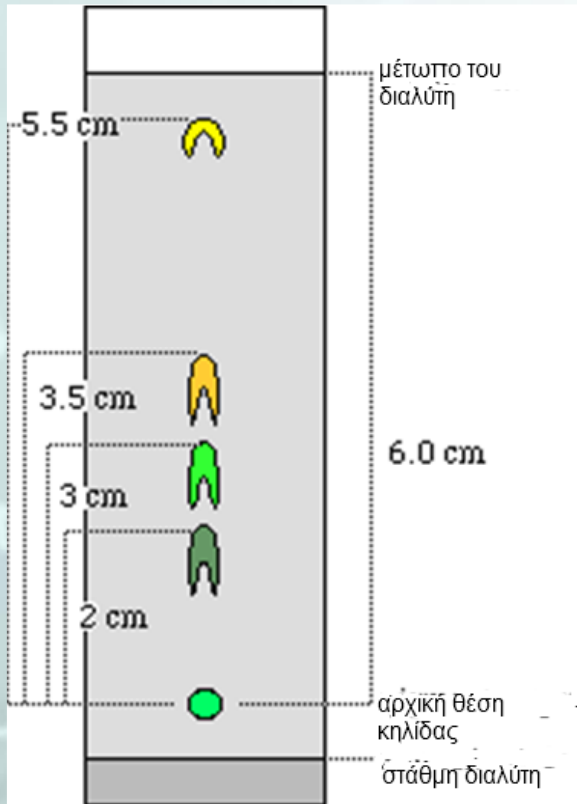


Στο μίγμα περιέχεται η ένωση B και η C



**Η τιμή Rf μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ταυτοποιηθεί μία άγνωστη ουσία, αλλά είναι απαραίτητα και άλλα δεδομένα.**

## Υπολογισμός $R_f$



$$1\eta R_f = 2/6$$

$$2\eta R_f = 3/6$$

$$3\eta R_f = 3,5/6$$

$$4\eta R_f = 5,5/6$$

## Εφαρμογές TLC

- ✓ Προσδιορισμό του **κατάλληλου διαλύτη** για διαχωρισμό με χρωματογραφία κολώνας
- ✓ Έλεγχο του **διαχωρισμού** των συστατικών μίγματος με χρωματογραφία κολώνας
- ✓ Έλεγχο του **καθαρισμού** μιας ουσίας από προσμίξεις με κρυστάλλωση ή εκχύλιση
- ✓ Έλεγχο της **πορείας** μιας αντίδρασης

Το κύριο μειονέκτημα του TLC είναι ότι δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πτητικές ενώσεις



# TLC δύο διαστάσεων (μεγαλύτερη αναλυτική ικανότητα)

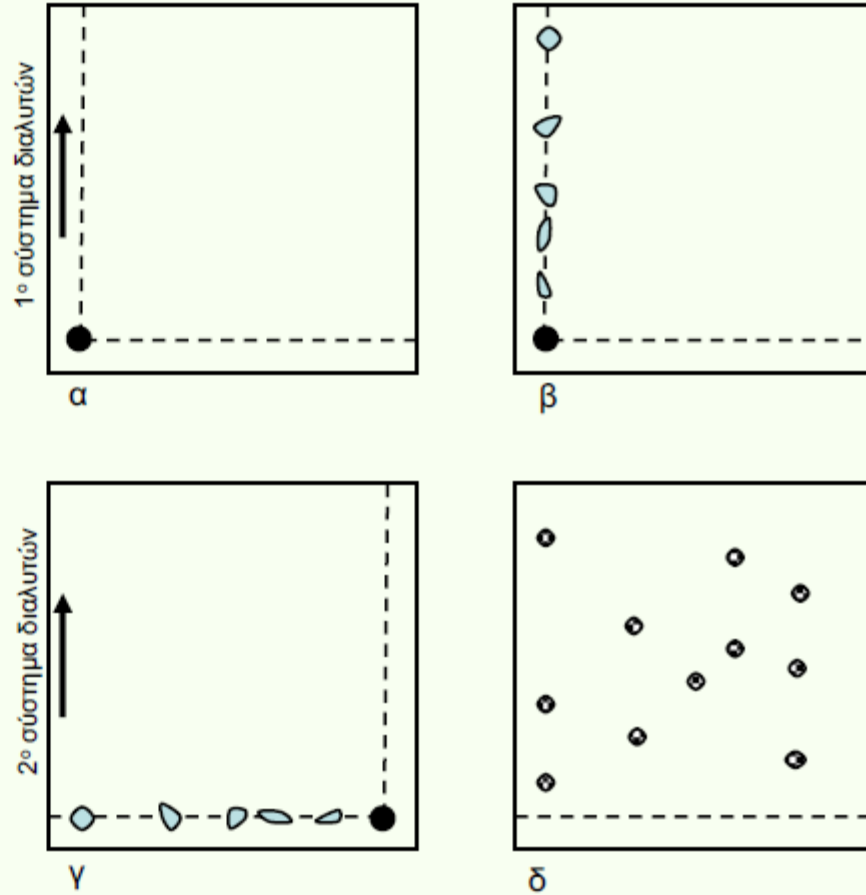
Αν το απλό TLC δε δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα, πραγματοποιείται χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας δύο διαστάσεων.

α) Τετράγωνη πλάκα TLC, η κηλίδα τοποθετείται στη μία γωνία της πλάκας πριν την ανάπτυξη με το πρώτο σύστημα διαλυτών.

β) Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης ανάπτυξης

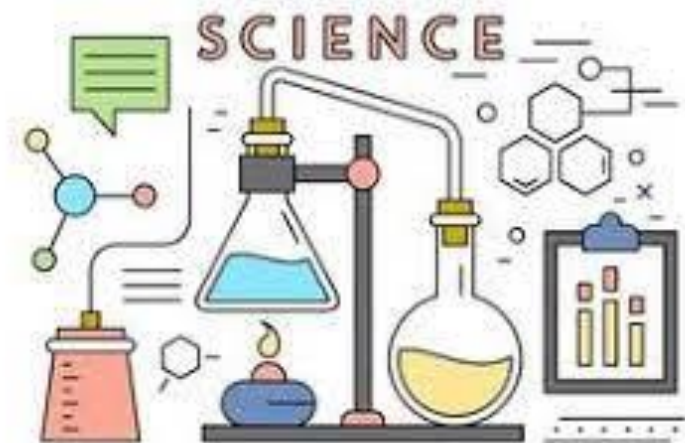
γ) η πλάκα απομακρύνεται από το δοχείο ανάπτυξης, στεγνώνεται γρήγορα και τοποθετείται στρεφόμενη κατά  $90^\circ$  σε άλλο δοχείο ανάπτυξης, που περιέχει δεύτερο σύστημα διαλυτών, έτσι ώστε η στήλη που περιέχει τις διαχωρισμένες κηλίδες από την πρώτη ανάπτυξη να είναι η γραμμή εκκίνησης για τη δεύτερη

δ) Μετά τη δεύτερη ανάπτυξη το δείγμα έχει αναλυθεί στα συστατικά του καλύπτοντας **ολόκληρη** την επιφάνεια της πλάκας



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

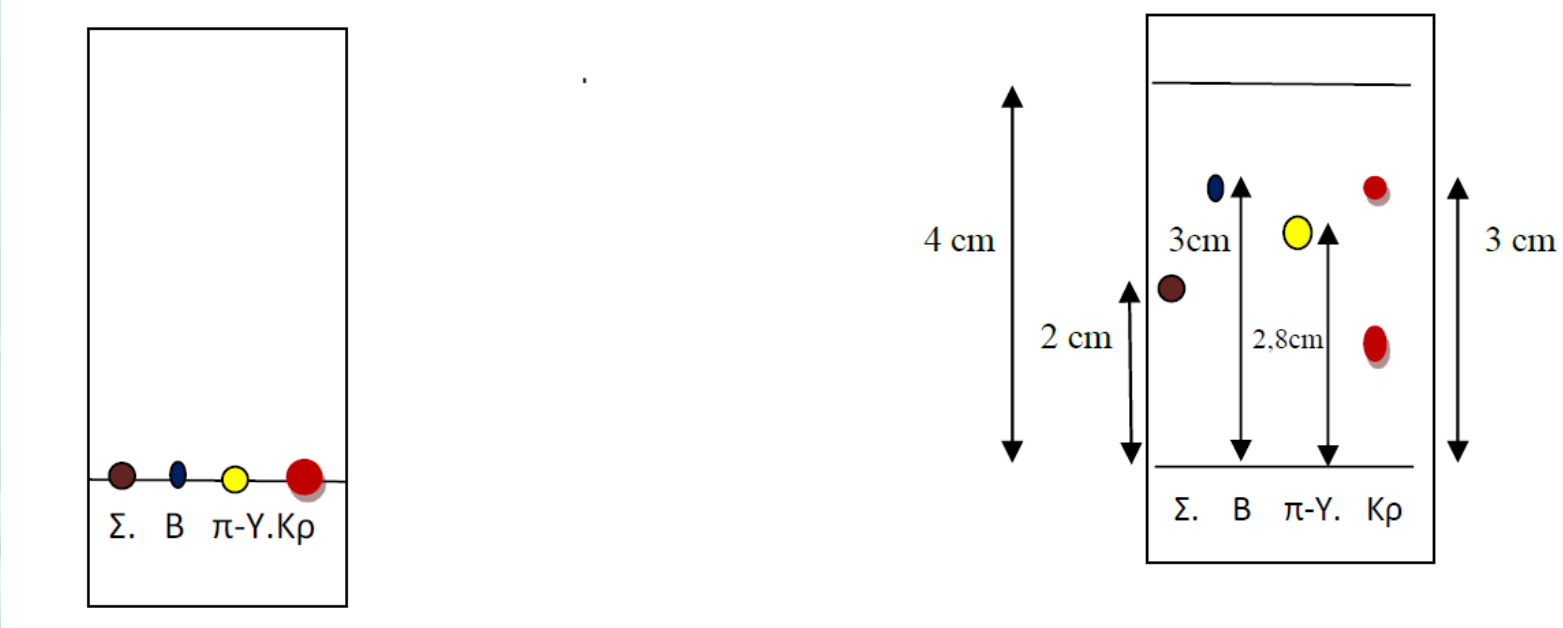
Ανίχνευση ουσιών που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στο κρασί



1. Σε χοάνη διαχωρισμού τοποθετούνται 20 mL δείγματος κρασιού. Γίνεται οξίνιση με διάλυμα  $H_2SO_4$  20 % κ.ο.
2. Προσθέτονται στη χοάνη 50 mL αιθέρα, τοποθετείται το πώμα της χοάνης, το μίγμα αναδεύεται ΜΙΑ ΦΟΡΑ, και με τη χοάνη ανεστραμμένη γίνεται εκτόνωση του εσωτερικού της με άνοιγμα της στρόφιγγας. Η διαδικασία της εκτόνωσης επαναλαμβάνεται τουλάχιστο δύο ακόμα φορές ή μέχρι να μην ακούγεται ο χαρακτηριστικός ήχος της εκτόνωσης αερίου κατά το άνοιγμα της στρόφιγγας.
3. Το δείγμα του κρασιού εκχυλίζεται με έντονη ανατάραξη του μίγματος κρασιού – αιθέρα μέσα στη χοάνη. Κατόπιν η διαχωριστική χοάνη τοποθετείται στη βάση της και αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να διαχωριστούν οι δύο φάσεις.
4. Η φάση του κρασιού αποχύνεται και η οργανική φάση μεταφέρεται σε κωνική φιάλη 250 mL, στην οποία προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου ( $MgSO_4$ ) για την απομάκρυνση των υδατικών υπολειμμάτων.
5. Η οργανική φάση μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 250 ή των 500 mL με προσοχή ώστε το άνυδρο θειικό νάτριο να παραμείνει στην κωνική φιάλη. Γίνεται εξάτμιση του αιθέρα σε περιστροφικό εξιτμιστή.
6. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 1 mL μεθανόλης (20 σταγόνες) και με σιφόνιο Pasteur μεταφέρεται σε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα.
7. Κάθε ομάδα παραλαμβάνει από τους υπεύθυνους ένα πλακίδιο tlc silica gel στο οποίο σημειώνεται με μολύβι ευθεία γραμμή σε απόσταση 5 mm από το ένα άκρο του.
8. Με χρήση τριχοειδούς σιφωνίου μεταφέρονται 5 – 10  $\mu$ L του δείγματος στο πλακίδιο tlc, πάνω στη γραμμή εκκίνησης. Η μεταφορά του δείγματος γίνεται με προσοχή, ώστε να μη χαραχτεί το πλακίδιο από το τριχοειδές σιφόνιο. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με καθαρά τριχοειδή σιφόνια για τα πρότυπα διαλύματα, σαλικυλικού οξέος, π-υδροξυβενζοϊκού οξέος και βενζοϊκού οξέος σε θέσεις που απέχουν ίση απόσταση μεταξύ τους. Σημειώνεται η θέση του κάθε προτύπου καθώς και του δείγματος.

9. Το πλακίδιο τίς τοποθετείται σε δοχείο χρωματογραφίας στο οποίο υπάρχει ο κατάλληλος διαλύτης (για παράδειγμα, μια κινητή φάση κατάλληλη για τις ουσίες που ανιχνεύονται σε αυτό το πείραμα είναι μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα – οξικού μεθυλεστέρα 50:50). Στα τοιχώματα του δοχείου έχει τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί το οποίο έχει εμποτιστεί με το διαλύτη (βλέπε υποσημείωση 2). Η άνοδος του διαλύτη στο πλακίδιο παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Όταν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει περίπου 5 mm πριν το άνω άκρο του πλακιδίου, αυτό απομακρύνεται από το δοχείο χρωματογραφίας και σημειώνεται ΑΜΕΣΩΣ η θέση του μετώπου με μολύβι. Κατόπιν, το πλακίδιο στεγνώνεται γρήγορα με ρεύμα αέρα.
10. Το πλακίδιο παραλαμβάνεται με λαβίδα και τοποθετείται κάτω από λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας για τον εντοπισμό των κηλίδων των ουσιών του δείγματος και των πρότυπων ουσιών. Πριν την ενεργοποίηση της λυχνίας φοριούνται ειδικά γυαλιά. ΠΡΟΣΟΧΗ: ΚΑΝΕΝΑ ΜΕΡΟΣ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ, ΚΑΙ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΤΑ ΜΑΤΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΚΤΕΘΟΥΝ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΙΩΔΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ.
- Αμέσως σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των κηλίδων στο πλακίδιο.
12. Με βαθμονομημένο χάρακα μετρώνται οι αποστάσεις που κάλυψαν το μέτωπο του διαλύτη, οι πρότυπες ουσίες και τα συστατικά του δείγματος του κρασιού. Από τα δεδομένα αυτά προσδιορίζονται οι συντελεστές επιβράδυνσης  $R_f$  για κάθε μια από τις ουσίες.

TLC δείγματος κρασιού



	<b>Απόσταση που διανύθηκε στο πλακίδιο (cm)</b>	<b>Συντελεστής επιβράδυνσης R<sub>f</sub></b>	<b>Ανίχνευση συντηρητικών στο κρασί (ΝΑΙ/ΟΧΙ)</b>
<b>Κρασί</b>			
<b>Διάλυμα σαλικιλικού οξέος</b>			
<b>Διάλυμα βενζοϊκού οξέος</b>			
<b>Διάλυμα π-υδροξυβενζοϊκού οξέος</b>			
<b>Διαλύτης</b>			

## Άσκηση Αναφοράς

1. Δύο ουσίες X και Ψ, με τη X πολύ πολικότερη της Ψ αναλύονται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, στην οποία η στατική φάση είναι πολική και η κινητή άπολη. Να προβλέψετε ποια από τις δύο ουσίες θα διανύσει μεγαλύτερη απόσταση στο πλακίδιο.



**Ευχαριστώ πολύ για την συνεργασία!**

**Καλή τύχη στις εξετάσεις!**

**[mkapsi@hmu.gr](mailto:mkapsi@hmu.gr)**