

Zajęcia nr 2

Chromatografia. Nomenklatura związków organicznych II

1. Zakres materiału:

- podział i krótka charakterystyka metod chromatograficznych, adsorbenty stosowane w chromatografii, rozpuszczalniki stosowane w chromatografii (szereg eluotropowy)
- zastosowanie i wykonanie chromatografii cienkowarstwowej TLC, wybór rozpuszczalnika,
- wartość R_f ,
- preparatywna chromatografia TLC
- sączenie molekularne,
- nazewnictwo eterów, aldehydów, ketonów, kwasów karboksylowych, estrów, amin, amidów.

2. Literatura:

- Mariusz Rosiński, Dorota Piasecka-Kwiatkowska, Jerzy R. Warchalewski, *Przegląd metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności*, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 3 (44), 5-22.
- Piotr Kowalski *Laboratorium chemii organicznej, Techniki pracy i przepisy BHP* (Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 2004).
- Harold Hart, *Chemia organiczna. Krótki kurs*, (Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008).

3. Teoria

Chromatograficzne metody rozdzielania substancji

Chromatografia, „pisanie kolorem” (gr. *chroma* = kolor + *graphe* = pisanie) jest techniką służącą do rozdzielania lub badania składu mieszanin związków chemicznych. W metodzie tej następuje rozdział mieszaniny składników pomiędzy dwie fazy: fazę nieruchomą – stacjonarną (bibuła filtracyjna, cienka warstwa adsorbentu naniesiona na płytkę, wypełnienie kolumny) oraz dużą objętościowo fazę ruchomą – mobilną (ciecz lub gaz). Faza ruchoma stanowi tu siłę napędową procesu, z kolei faza nieruchoma odgrywa rolę siły hamującej migrację składników. Rozdział substancji pomiędzy obie fazy następuje na skutek różnicy współczynników podziału składników mieszaniny pomiędzy obydwie fazy. Szybkość migracji substancji jest tym większa, im mniejszy jest współczynnik podziału (mniejsze powinowactwo składnika do fazy stacjonarnej).

W ogólnym przypadku, chromatograficzny rozdział substancji następuje w wyniku przepuszczenia roztworu badanej mieszaniny przez specjalnie spreparowaną fazę stacjonarną. Podczas przepływu eluentu (fazy ruchomej) przez fazę stacjonarną następuje proces elucji czyli wymywania zaadsorbowanych (lub związanych) substancji. Intensywność tego procesu jest różna dla poszczególnych składników mieszaniny. Jedne składniki są zatrzymywane w fazie stacjonarnej dłużej, a inne krócej (inna jest retencja), dzięki czemu może następować ich separacja.

Chromatografia stosowana jest zarówno do badań jakościowych, ilościowych, jak i dla celów preparatywnych. Sprzężenie, chromatografii gazowej z innymi metodami, na przykład spektrometrią masową lub spektrofotometrią w podczerwieni, znacznie rozszerza możliwości identyfikacji rozdzielanych składników.

Podział metod chromatograficznych

Metody chromatograficzne można klasyfikować według wielu kryteriów. W zależności od stanu skupienia fazy ruchomej, czyli medium wymywającego (eluentu), rozróżnia się następujące techniki chromatograficzne:

- chromatografia cieczowa, w której eluentem jest ciekły rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników,
- chromatografia gazowa, w której eluentem jest gaz (hel, argon, azot, rzadziej wodór),
- chromatografia fluidalna, w której eluentem jest ciecz w stanie nadkrytycznym (fluid).

Ze względu na stan skupienia fazy nieruchomej – stacjonarnej wyróżniamy układy:

Faza ruchoma	Faza stacjonarna	Typ chromatografii
gaz	ciecz	GLC gas – liquid chromatography
ciecz	ciecz	LLC liquid – liquid chromatography
gaz	ciało stałe	GSC gas – solid chromatography
ciecz	ciało stałe	LSC liquid – solid chromatography

Zależnie od rodzaju zjawisk odpowiedzialnych za podział substancji wyróżnia się:

- chromatografię rozdzielczą (podziałową)** – o zachowaniu się mieszaniny poddanej rozdzielaniu decyduje współczynnik podziału poszczególnych składników pomiędzy dwie nie mieszające się ze sobą ciecz. Fazę stacjonarną stanowi rozpuszczalnik bardziej polarny zaadsorbowany w postaci cienkiej warstwy na odpowiednim nośniku, a fazą ruchomą jest układ o mniejszej polarności (w chromatografii z odwróconymi fazami układ faz jest odwrotny). Nośnikiem fazy stacjonarnej najczęściej jest żel krzemionkowy, celuloza, ziemia okrzemkowa, skrobia ziemniaczana, kauczuk.
- chromatografię adsorpcyjną** – podstawą rozdziału jest niejednakowa skłonność składników mieszaniny do adsorpcji fizycznej i chemicznej na powierzchni fazy stacjonarnej (ciało stałe). Jako fazę stacjonarną stosuje się tlenek glinu, żel krzemionkowy, węgiel aktywny, syntetyczne i naturalne krzemiany, tlenki, siarczany i fosforany wapnia i magnezu. Fazę ruchomą stanowi ciecz lub gaz.
- chromatografię jonowymienną** – wykorzystywane jest zjawisko różnych zdolności do wymiany jonów przez składniki mieszaniny z wymiennicem jonowym. Fazę stacjonarną stanowi odpowiednio przygotowana żywica jonitowa.
- chromatografię żelową (sitową lub sączenie molekularne)** – rozdzielanie polega na zróżnicowanej dyfuzji cząsteczek w pory fazy stacjonarnej. Cząsteczki na tyle duże, że ich dyfuzja jest wykluczona, szybko są wypłukiwane przez fazę ruchomą. Cząsteczki mniejsze zatrzymują się na materiale nośnym i są wypłukiwane w następnej kolejności.

Kolejny podział metod chromatograficznych wynika z różnego sposobu umieszczenia nośnika:

- chromatografia kolumnowa** – nośnik fazy stacjonarnej umieszczony jest w kolumnie chromatograficznej, którą stanowi rura szklana, przewężona w dolnej swej części, o stosunku wysokości fazy stacjonarnej (L) do kwadratu wewnętrznej średnicy kolumny (D^2) wynoszącym co najmniej 20. Lepsze warunki rozdziału otrzymuje się, gdy stosunek L/D^2 przyjmuje większe wartości (od 90 do 150). Faza ruchoma przemieszcza się pod wpływem siły grawitacyjnej.
- chromatografia planarna** – możliwa tylko w chromatografii cieczowej. W jej ramach można wyróżnić:
 - technikę cienkowarstwową TLC** (ang. *Thin Layer Chromatography*) – faza stacjonarna naniesiona jest na odpowiednie podłoże (płytki szklane lub aluminiowe) w postaci cienkiej warstwy. Faza ruchoma przenoszona jest w wyniku działania sił kapilarnych.
 - technikę bibułową** – fazą stacjonarną jest bibuła (100% celulozy) o izotropowym układzie włókien, fazą ruchomą – homogenna mieszanina rozpuszczalników zawierająca wodę. Wykonuje się techniką wstępującą (rozpuszczalnik migruje od dolnego końca bibuły zanurzonego w eluencie) lub zstępującą (spływową; rozpuszczalnik migruje od górnego końca bibuły zanurzonego w eluencie). Stosowana jest głównie do rozdziału aminokwasów, peptydów, sacharydów i nukleotydów.

W preparatywnej chemii organicznej największe zastosowanie mają chromatografie: adsorpcyjna i rozdzielcza, ze względu na przydatność tych technik do całkowitego lub częściowego rozdzielania składników mieszanin reakcyjnych.

Adsorbenty stosowane w chromatografii

Adsorbenty stosowane w chromatografii powinny wykazywać odpowiednią selektywność i aktywność w stosunku do rozdzielanych substancji oraz nie mogą z nimi reagować.

Adsorbenty można podzielić na dwie grupy:

- adsorbenty polarne** – wykazują zmienną aktywność w zależności od zawartości w nich wody i rozpuszczalników organicznych. Należą do nich przede wszystkim tlenek glinu, żel krzemionkowy oraz siarczany, fosforany i węglany magnezu i wapnia, celuloza. Adsorbują się na nich dobrze związki o charakterze polarnym.
- adsorbenty niepolarne** – wykazują zdolność do silnego wiązania rozpuszczalników węglowodorowych. Należą do nich węgiel aktywny, grafit, talk. Adsorpcja związków zależy od wielkości cząsteczek i od długości łańcuchów węglowych.

Adsorbenty stosowane w chromatografii adsorpcyjnej winny charakteryzować się szczególnie rozwiniętą powierzchnią, gdyż substancja adsorbowana wiąże się z nią pod postacią warstewki monomolekularnej. Takie właściwości wykazują zwłaszcza tlenek glinu i węgiel aktywny.

Zastosowanie tlenku glinowego jako adsorbentu z reguły ogranicza się do związków o niezbyt wielkiej polarności. Związki silnie polarne (cukry, aminokwasy), związane z Al_2O_3 , z trudem ulegają elucji.

Węgiel aktywny wykazuje szczególne powinowactwo do związków aromatycznych; ich elucja może być przeprowadzona przy użyciu rozpuszczalników o budowie aromatycznej.

Szereg aktywności adsorbentów pod względem wiązania związków organicznych przedstawia się następująco:

celuloza < skrobia < sacharoza < $CaSO_4$ < silikażel < MgO < Al_2O_3 < węgiel aktywny.

Zdolność adsorpcyjna związków organicznych zależy więc od ich polarności oraz wielkości i polaryzowalności cząsteczek. Poszczególne grupy związków można ułożyć w następujący szereg, w zależności od ich *wzrastającego powinowactwa* do polarnych środków adsorbujących:

chlorowcopochodne węglowodorów < etery < aminy trzeciorzędowe, związki nitrowe < estry < ketony, aldehydy < aminy pierwszorzędowe < amidy kwasowe < kwasy karboksylowe.

Rozpuszczalniki stosowane w chromatografii

Podobne obserwacje odnoszą się do stosowanych rozpuszczalników. Wynika z nich, że zaadsorbowana substancja może zostać wyparta z adsorbentu przez rozpuszczalnik wykazujący większe powinowactwo do tego adsorbentu niż wymywana substancja.

Rozpuszczalniki można zestawić w *szereg eluotropowy* według ich *wzrastających zdolności* wymywania (eluowania) adsorbowanej substancji z powierzchni adsorbentu polarnego (Tabela 1).

Tabela 1. Szereg eluotropowy rozpuszczalników.

1. eter naftowy	7. chlorek metylenu	13. n-propanol
2. cykloheksan	8. chloroform	14. etanol
3. disiarczek węgla	9. tetrahydrofuran	15. metanol
4. tetrachlorek węgla	10. octan etylu	16. woda
5. toluen	11. aceton	17. kwas octowy
6. benzen	12. butan-2-on	18. pirydyna

Zastosowanie niepolarnego adsorbentu (np. węgla aktywnego) wymaga użycia rozpuszczalników (wymienionych w powyższym szeregu eluotropowym) w odwrotnej kolejności, a więc elucję należy rozpoczynać rozpuszczalnikami najbardziej polarnymi. Najczęściej jednak stosuje się odpowiednio dobraną mieszaninę dwóch lub więcej rozpuszczalników.

Podsumowując, przy doborze warunków chromatografii adsorbcyjnej należy więc pamiętać o następujących zasadach ogólnych:

- związki polarne adsorbują się silniej niż związki niepolarne,
- chromatografowanie substancji polarnych wymaga stosowania słabszego adsorbentu i polarnego eluentu,
- chromatografowanie substancji niepolarnych wymaga zastosowania silniejszego adsorbentu i niepolarnego eluentu.

Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC – thin layer chromatography) służy jako niezwykle efektywna i wygodna metoda szybkiej analizy jakościowej oraz w preparatyce do rozdzielu niewielkich ilości substancji. Termin ten oznacza proces chromatograficzny prowadzony na cienkiej warstwie fazy stacjonarnej naniesionej na podłoże z płytek szklanych lub folii aluminiowych czy polimerowych. Przede wszystkim stosuje się ją do:

- a. określania liczby składników w mieszaninie,
- b. potwierdzenia lub wykluczenia obecności danej substancji,
- c. monitorowania postępu reakcji chemicznych,
- d. znalezienia optymalnych warunków dla chromatografii kolumnowej,
- e. analizy frakcji uzyskanych techniką chromatografii kolumnowej.

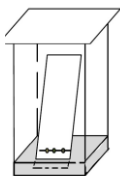
Technika chromatografii cienkowarstwowej łączy w sobie dwa zjawiska: podziału substancji między dwie różne fazy ciekłe – obowiązuje tu prawo podziału Nernsta i adsorpcji substancji na nośniku, czyli fazy stacjonarnej. W metodzie tej substancje chromatografowane poruszają się z różną prędkością wraz z ciekłą fazą ruchomą przez cienką warstwę stałego adsorbentu 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. W związku z tym warunki procesu są trudne do jednoznacznej definicji i kontroli eksperymentalnej.

W chromatografii cienkowarstwowej adsorbent (zazwyczaj z dodatkiem gipsu) nakładany jest w postaci papki na odtłuszczonej płytce za pomocą specjalnych urządzeń (powlekaczy). Grubość warstwy adsorbentu uzależniona jest od rodzaju przeznaczenia:

- a. do analizy jakościowej używa się płytek o grubości nośnika ok. 0.25 mm,
- b. przy analizie ilościowej grubość warstwy wynosi ok. 2 mm.

Płytki do chromatografii cienkowarstwowej można przygotowywać samodzielnie. Jednakże dostępne w handlu gotowe produkty charakteryzują się dużo lepszą jakością (równomierność warstwy nośnika, aktywność adsorbentu) z czym wiąże się lepsza powtarzalność wyników analizy chromatograficznej.

Próbkę nanosi się na płytkę TLC w postaci roztworu o bardzo małej objętości, tworząc małą plamkę w punkcie startowym. Płytki umieszcza się w komorze chromatograficznej (Ryc. 1), 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. Oddziaływanie substancji znajdujących się w próbce z adsorbentem oraz z poruszającym się rozpuszczalnikiem powoduje rozdzielanie się składników próbki na płytce i poszczególne składniki tworzą oddzielne plamki. Plamki rozdzielanych składników należy uwidocznić, by ostatecznie zidentyfikować skład próbki.



Ryc. 1. Komora chromatograficzna z zanurzoną płytką.

Tok postępowania przy wykonywaniu chromatografii cienkowarstwowej jest następujący:

1. Przygotowanie płytki

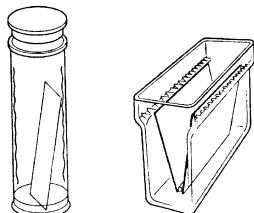
Należy zaznaczyć miękkim ołówkiem grafitowym (ostrożnie, by nie zdrapać adsorbentu) linię startu, która powinna znajdować się na węższym boku płytki w odległości 8-15 mm od krawędzi.

2. Naniesienie substancji na płytkę

Za pomocą specjalnych mikropipet lub kapilar na linii startu nanosi się substancję w postaci ok. 0.5-3%-ego roztworu (w łatwo lotnym rozpuszczalniku). Zbyt duże ilości naniesionych substancji prowadzą do pogorszenia efektu rozdzielania, a mianowicie do tworzenia tzw. „ogonów”. Średnica powstałej plamki powinna być jak najmniejsza (1.5-2 mm, maksymalnie 5 mm) i znajdować się około 15 mm od bocznej krawędzi płytki. Plamkę naniesionej próbki należy odpowiednio wysuszyć.

3. Rozwijanie chromatogramu

Rozwijanie chromatogramu prowadzi się w specjalnych komorach chromatograficznych, w ostateczności można używać dużych słoje ze szczelną pokrywką (Ryc. 2).



Ryc. 2. Komory chromatograficzne.

Do komory wlewamy rozpuszczalnik do wysokości ok. 0.5 cm zwracając przy tym uwagę, aby poziom rozpuszczalnika znajdował się poniżej linii startowej na płytce. Wewnątrz komory ustawia się bibulę, która nasiąkając rozpuszczalnikiem utrzymuje nasycenie komory jego parami. Płytkę wstawiamy do komory linią startową do dołu i zakrywamy szczelnie pokrywą. Gdy rozpuszczalnik osiągnie wysokość ok. 1 cm od górnej krawędzi płytki, wyjmujemy ją z komory i pozostawiamy do wyschnięcia. Ołówkiem zaznaczamy linię, do której dotarł rozpuszczalnik („czoło rozpuszczalnika”).

4. Wywoływanie chromatogramu

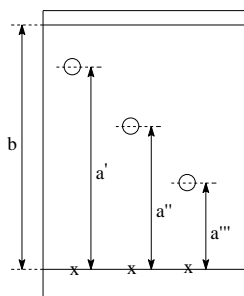
Wywoływanie chromatogramów przeprowadza się w przypadku związków barwnych w świetle widzialnym. Dla związków z grupami chromoforowymi stosuje się naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym. Związki bezbarwne wywołujemy przez wstawienie chromatogramu do pojemnika z jodem. Większość związków, z wyjątkiem nasyconych węglowodorów i chlorowcopochodnych, tworzy z parami jodu barwne kompleksy, ukazujące się w postaci brunatnych lub fioletowych plam. Niekiedy można chromatogramy spryskiwać odpowiednimi roztworami substancji, które reagują z rozdzielanymi związkami (Ryc. 3). W temperaturze pokojowej lub po ogrzaniu pojawiają się barwne produkty.



Ryc. 3. Przykładowe spryskiwacze stosowane w chromatografii.

5. Identyfikacja substancji

Podstawowym parametrem w chromatografii cienkowarstwowej, który określa położenie substancji na chromatogramie, jest współczynnik opóźnienia R_f (ang. *retardation factor*). Jest to stosunek drogi migracji substancji (a) do drogi przebytej przez fazę ruchomą (b): $R_f = a/b$. Inaczej mówiąc, substancje rozdzielane identyfikuje się na podstawie stosunku szybkości przemieszczania się badanej substancji do szybkości wędrowania rozpuszczalnika (Ryc. 4).



Ryc. 4. Ilustracja pomiaru współczynnika R_f :
a = odległość od linii startu do środka plamy;
b = odległość od linii startu do czoła rozpuszczalnika.

Współczynnik R_f w danych warunkach doświadczalnych oraz w danym układzie chromatograficznym jest wartością stałą i charakterystyczną dla danej substancji, choć jako kryterium tożsamości związku nie może być stosowany bezpośrednio, a tylko w porównaniu z substancją wzorcową, naniesioną na tym samym chromatogramie. Układ rozwijający (faza ruchoma) musi być tak dobrany, aby była wyraźna różnica pomiędzy R_f analizowanych związków, aby związki nie zostawały na miejscu nałożenia plamki, oraz aby nie migrowały z czołem rozpuszczalnika (wtedy wartość R_f wynosi 1).

W praktyce rzadko udaje się odtworzyć warunki chromatografii tak, by uzyskać identyczne wartości R_f , gdyż zależą one od, nawet niewielkich, zmian w następujących czynnikach:

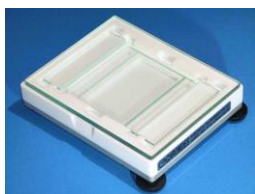
- wymiary ziaren adsorbentu,
- skład rozpuszczalnika i stopień nasycenia atmosfery komory parami rozpuszczalnika,
- aktywacja i warunki przechowywania płytek,
- grubość warstwy adsorbentu,
- temperatura otoczenia.

Do zalet chromatografii cienkowarstwowej można zaliczyć:

- krótki czas wykonania chromatogramu,
- dobry rozdział związków,
- wygodną obserwację we wszystkich stadiach rozdziału,
- dużą szybkość przepływu rozpuszczalnika, co skraca czas rozwijania chromatogramu.

Chromatografia cienkowarstwowa znalazła również zastosowanie w preparatyce. W wersji **preparatywnej TLC** rozdział mieszaniny prowadzi się na płytkach o grubszej, na przykład 2 mm, warstwie adsorbentu. Rozdzielaną mieszaninę nanosi się nie punktowo, ale w linii na długości kilkunastu centymetrów. Po rozdziale warstwę adsorbentu zawierającą wydrebniony składnik mieszaniny zeszkrobuje się, a sam składnik ekstrahuje (wypłukuje) rozpuszczalnikiem i po zateżeniu oraz odsączeniu adsorbentu otrzymuje w stanie czystym.

W ostatnich latach opracowano nowy sposób rozwijania chromatogramów na cienkich warstwach w pozycji poziomej (Ryc. 5). Sposób ten wymaga mniejszej ilości układu rozwijającego i umożliwia wielokrotne użycie płytek.



Ryc. 5. Komora pozioma do chromatografii cienkowarstwowej.

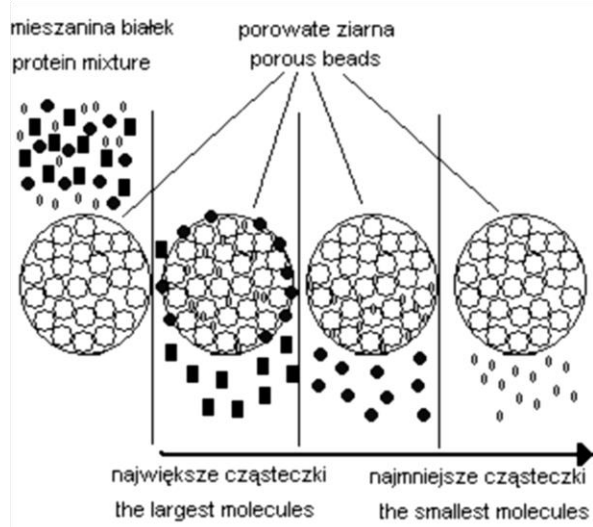
Sączenie molekularne

Sączenie molekularne po raz pierwszy zostało wprowadzone w roku 1959 przez Pera Flodina i Jerkera Poratha. Jest to rodzaj chromatografii cieczowej, w której wykorzystuje się fizyczne i chemiczne właściwości odpowiednio spreparowanego polisacharydu znanego pod nazwą Sephadex (*SE*paration *PH*armacia *DEX*tran). Technika ta umożliwia analityczny bądź preparatywny rozdział substancji różniących się masą cząsteczkową.

Sephadex jest handlową nazwą złoża stanowiącego poprzecznie usieciowane łańcuchy dekstranu (roślinnego polisacharydu glukozy), w którym występują wiązania α -1,6-, α -1,3-, α -1,4-glikozydowe. Żel ten ma postać granulek o średnicy 10-300 μ m. Cząsteczki sefadeksów zawierają liczne grupy hydroksylowe, dlatego substancje te łatwo pęcznieją w wodzie i roztworach elektrolitów, gdyż cząsteczki wody bez przeszkód wnikają w przestrzeń sieci molekularnej. Usieciowanie wpływa na zdolność wchłaniania wody, co decyduje o właściwościach rozdzielczych żelu. Cząsteczki te posiadają trójwymiarową strukturę sieci przestrzennej. Im więcej tworzy się „oczek” tej sieci, tym są one mniejsze. Produkowane są złoża, w których stopień usieciowienia określa cyfra znajdująca się przy dużej literze „G” (od G-10 do G-200), przy czym im większa cyfra tym niższe usieciowienie. *Im mniejszy stopień usieciowania, tym więcej wody wchłania sefadeks.* Na przykład 1 g sefadeksu G-10 wiąże 1 g wody (usieciowanie jest wyjątkowo gęste i przestrzeń mała). Natomiast 1 g sefadeksu G-200 wiąże 20 g wody, co wskazuje na duże „oczka” sieci.

Jeśli przez kolumnę wypełnioną sefadeksem przepływa roztwór zawierający cząsteczki o różnej wielkości, to molekuly większe od największych przestrzeni sieci bez przeszkód wypływają z kolumny, omijając ziarna żelu. Cząsteczki o mniejszych rozmiarach przenikają do

wnętrza sieci przestrzennej, tym głębiej, im mniejsze są ich wymiary w porównaniu ze średnicą „oczek”. Usuwanie tych cząsteczek z wnętrza ziaren sefadesu jest tym trudniejsze im mniejsze są te cząsteczki. Z tego względu rozdział składników mieszaniny na sefadesie przebiega w kolejności malejących rozmiarów cząsteczek poszczególnych składników, co pokrywa się z ich malejącymi masami cząsteczkowymi (Ryc. 6).



Ryc. 6. Mechanizm separacji cząsteczek na podstawie wielkości i kształtu przy zastosowaniu sączenia molekularnego [1].

Tok postępowania przy wykonywaniu sączenia molekularnego jest następujący:

1. Przygotowanie żelu

Należy odważyć odpowiednią ilość żelu do żaroodpornego naczynia i dodać roztwór pełniący rolę eluentu. Całość trzeba ogrzewać do wrzenia przez pewien czas, celem usunięcia zaadsorbowanego powietrza i napęczenia żelu, po czym pozostawić do swobodnego ochłodzenia.

2. Przygotowanie kolumny

Szklaną rurę należy umieścić pionowo w statywie i zamknąć dolny wylot przy pomocy polietylenowego wężyka i zaciskacza. Na dno kolumny układa się odrobinę waty, przy zamkniętym zaciskaczu wlewa niewielką porcję rozpuszczalnika, przez otwarcie zaciskacza wpuszcza się rozpuszczalnik do przewężenia kolumny, po czym zamyka zaciskacz. Długą bagietką należy wycisnąć powietrze z waty i następnie wlać jednorodną zawiesinę żelu do kolumny. Wierzch żelu zabezpieczyć trzeba krążkiem bibuły filtracyjnej, po czym upakować żel w kolumnie przez otwarcie zaciskacza i przepuszczenie przez kolumnę porcji rozpuszczalnika o objętości równej objętości złoża żelu.

3. Naniesienie próbki substancji

Próbkę substancji w postaci roztworu (wskazane jest sporządzenie roztworu w rozpuszczalniku przeznaczonym do elucji) należy nanieść na powierzchnię żelu za pomocą odpowiedniej pipety. Trzeba wykonywać to bardzo ostrożnie, tak by nie zburzyć wierzchniej warstwy żelu (substancja jest wtedy wymywana równomiernie). Otwierając wylot kolumny należy poczekać do całkowitego wnिकnięcia próbki w żel, zamknąć wylot i nanieść niewielką porcję rozpuszczalnika, spłukując resztki substancji z wewnętrznych ścianek kolumny, znów poczekać aż wnिकnie, po czym wprowadzić delikatnie kolejną porcję fazy ruchomej.

4. Zbieranie frakcji

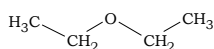
Od momentu naniesienia substancji oczyszczanej do całkowitego jej wyeluowania należy zbierać wypływające frakcje w ściśle określonych objętościach do niewielkich naczyń (probówki, kolby stożkowe).

5. Wyznaczenie współczynnika podziału – szczególnie w analizie ilościowej mieszanin związków naturalnych o dużej masie cząsteczkowej, takich jak białka, peptydy, enzymy, hormony, kwasy nukleinowe, itp.

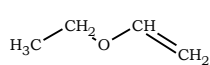
Nomenklatura związków organicznych

Nazewnictwo eterów

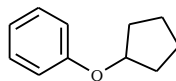
1. Etery proste, nie zawierające grup funkcyjnych, nazywa się używając słowa „eter” i podając w kolejności alfabetycznej nazwy dwóch grup organicznych przyłączonych do atomu tlenu lub w przypadku eterów symetrycznych dodając przedrostek di- przed nazwą grupy.



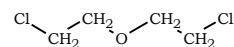
eter dietylowy



eter etylowo-winyłowy

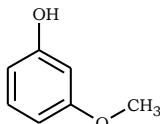


eter cyklopentylowo-fenylowy

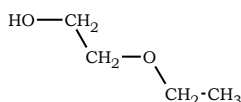


eter bis(2-chloroetylowy)

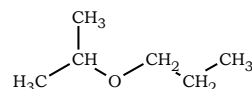
2. Jeżeli w cząsteczce znajdują się inne grupy funkcyjne, część eterowa nazywana jest podstawnikiem alkoksylowym, zawierającym w nazwie fragment -oksy za nazwą odpowiedniego węglowodoru.



3-metoksyfenol



2-etoksyetanol
(eter monoetylowy glikolu etylenowego)



2-propoksypropan

Nazewnictwo eterów cyklicznych i epoksydów

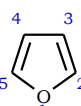
1. Etery cykliczne należą do związków heterocyklicznych i, w większości przypadków, posiadają nazwy zwyczajowe. Preferowane są jednak nazwy wynikające z reguł nazewnictwa związków heterocyklicznych, omówionych w dalszej części. Numerację w tego typu związkach zaczyna się od atomu tlenu.



oksiran
(tlenek etenu)



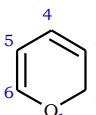
1,4-dioksan



furan



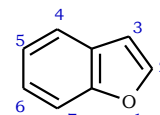
oksolan,
tetrahydrofuran
(THF)



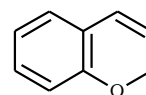
α-piran
(2H-piran)



γ-piran
(4H-piran)

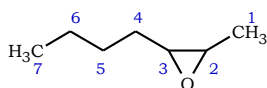


benzofuran
(kumaran)

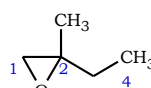


chromen

2. W przypadku epoksydów należy podać lokanty obu atomów węgla połączonych mostkiem tlenowym i do nazwy węglowodoru dodać przedrostek epoksy-.



2,3-epoksyheptan



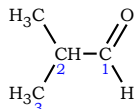
1,2-epoksy-2-metylobutan

Nazewnictwo aldehydów i ketonów

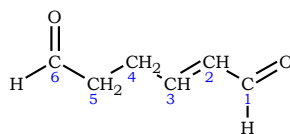
1. Grupa aldehydowa występująca w łańcuchu głównym (nie jako podstawnik) zawsze zyskuje numer 1. Do nazwy macierzystego alkanu zawierającego tyle samo atomów węgla co aldehyd dodajemy końcówkę -al.



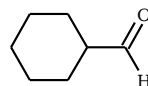
metanal
(formaldehyd)
(aldehyd mrówkowy)



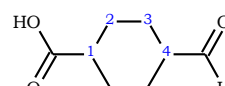
2-metylopropanal



heks-2-enodial

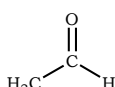


cykloheksano-
karboaldehyd

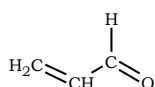


kwas 4-formylo-
cykloheksanokarboksylowy

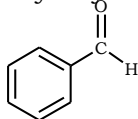
2. W przypadku obecności innej grupy funkcyjnej mającej pierwszeństwo przed grupą aldehydową stosuje się przedrostek -formylo (metanoilo-) ze wskazaniem lokantu.
3. Powszechnie stosowane są nazwy zwyczajowe aldehydów:



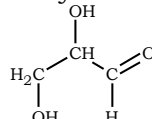
aldehyd octowy
(acetaldehyd)



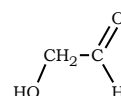
aldehyd akrylowy
(akrylaldehyd)



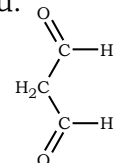
aldehyd benzoowy
(benzaldehyd)



aldehyd glicerynowy
(gliceroaldehyd)

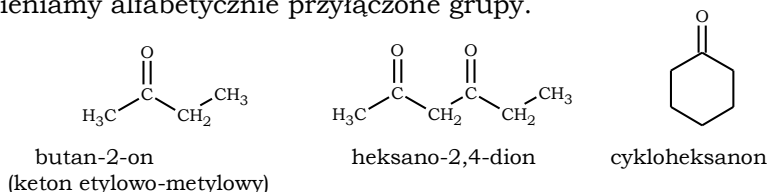


aldehyd glikolowy
(glikolaldehyd)

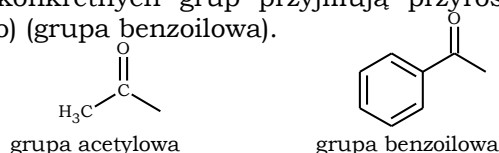


aldehyd malonowy
(propano-1,3-dienal)

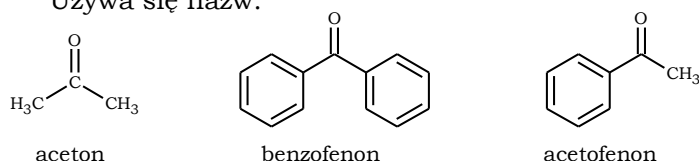
4. Ketony numerujemy tak, aby karbonylowy atom węgla miał najniższy lokant. Do nazwy macierzystego alkanu dodajemy końcówkę -on i podajemy numer atomu węgla karbonylowego. W nomenklaturze grupowo-funkcyjnej podajemy słowo „keton” i wymieniamy alfabetycznie przyłączone grupy.



5. Jeżeli grupa R-C=O jest traktowana jako podstawnik, wówczas przyjmuje nazwę acyl. Nazwy konkretnych grup przyjmują przyrostki -yl, -il: acetyl(o) (grupa acetylowa), benzoil(o) (grupa benzoilowa).

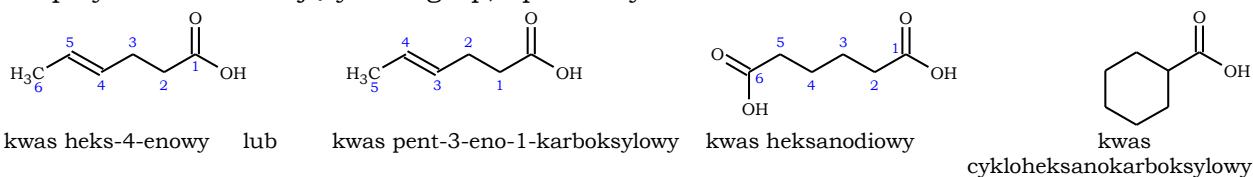


6. Używa się nazw:



Nazewnictwo kwasów karboksylowych

- Numerujemy atomy węgla w łańcuchu węglowodorowym przypisując grupie karboksylowej cyfrę 1. Nazwę tworzymy przez podanie słowa kwas i dodanie przyrostka -owy do nazwy węglowodoru.
- Jeżeli w cząsteczce występuje więcej niż jedna grupa karboksylowa to do nazwy dodajemy przyrostek oznaczający ilość grup, np. -diowy.

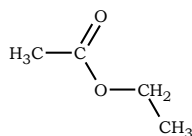


3. Używa się nazw zwyczajowych wielu kwasów:

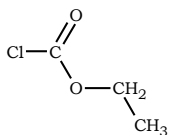
Wzór	Nazwa kwasu	Nazwa grupy acylowej
HCOOH	mrówkowy metanowy	formyl-
CH ₃ COOH	octowy etanowy	acetyl-
CH ₃ CH ₂ COOH	propionowy propanowy	propionyl- propanoil-
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	masłowy butanowy	butyryl- butanoil-
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	walerianowy pentanowy	waleryl- pentanoil-
C ₁₅ H ₃₁ COOH	heksadekanowy palmitynowy	palmitoil-
C ₁₆ H ₃₃ COOH	oktadekanowy stearynowy	stearoil-
HOOC-COOH	szczawiowy etanodiowy	oksalil-
HOOC-CH ₂ -COOH	malonowy propanodiowy	malonyl-
C ₆ H ₅ COOH	benzenokarboksylowy benzoesowy	benzoil-

Nazewnictwo estrów

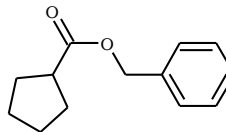
Nazwę estru tworzy się wymieniając jako pierwszy człon nazwę anionu kwasu karboksylowego, a jako drugi człon resztę alkilową bądź arylową.



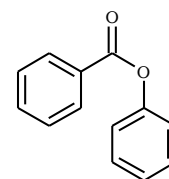
octan etylu
(etanian etylowy)



chloromrówczan etylu
(chlorometanian etylowy)



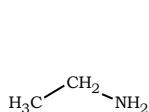
cyklopentanokarboksylan benzylu



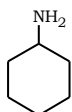
benzoesan fenylu

Nazewnictwo amin

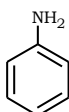
- Nazwy I-rzędowych amin tworzy się dodając przyrostek -amina do nazwy macierzystego węglowodoru lub stosując przedrostek -amino, gdy grupa aminowa nie jest grupą główną. Utrzymuje się nazwę zwyczajową dla I-rz. aminy aromatycznej: anilina.



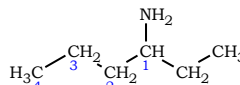
etyloamina



cykloheksyloamina

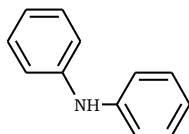


fenyloamina
(anilina)

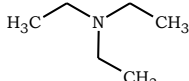


1-etylobutyloamina

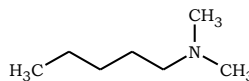
- Symetryczne II- i III-rzędowe aminy nazywa się dodając przedrostek di-, tri- do przyrostka -amina lub wymieniając alfabetycznie wszystkie podstawniki. Niesymetryczne aminy traktuje się jako podstawione aminy I-rzędowe.



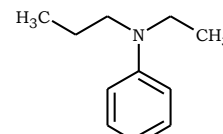
difenyloamina



trietyloamina

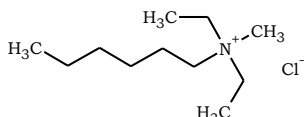


N,N-dimetylopentyloamina

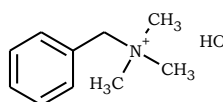


N-etylo-N-propyloanilina

- Sole i wodorotlenki zawierające czterowiazalny atom azotu $R_4N^+X^-$ nazywa się dodając do nazwy podstawników związanych z atomem azotu przyrostek -amoniowy i umieszczając nazwę anionu na początku nazwy jako oddzielne słowo.



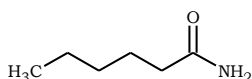
chlorek dietyloheksylometyloamoniowy



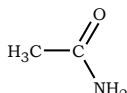
wodorotlenek benzylotrimetyloamoniowy

Nazewnictwo amidów

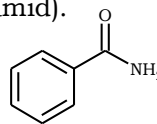
- Nazwy pierwszorzędowych amidów z niepodstawioną grupą NH_2 tworzy się przez zamianę końcówki -oil (-yl) w nazwie odpowiedniej grupy acylowej (pochodna kwasu karboksylowego) na -amid i łącznika „o”, np. etanoamid (etan + o + amid).



heksanoamid



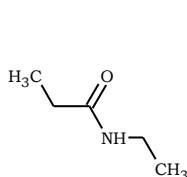
etanoamid
(acetamid)



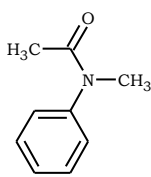
benzamid

- Nazwy podstawionych amidów tworzy się ze wskazaniem rodników. Konieczne jest podanie miejsca podstawienia rodnika przez umieszczenie w nazwie dużej litery N (od symbolu azotu). Nazwy N-fenylopodstawionych amidów tworzy się przez zastosowanie przyrostka -

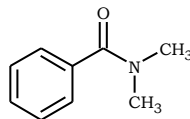
anilid (od rodnika pochodzącego od aniliny). Lokanty podstawników w reszcie aminowej oznacza się wskaźnikami górnymi (primami).



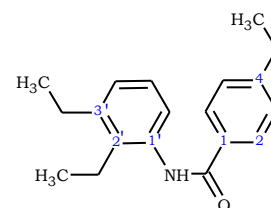
N-etylopropanoamid



N-fenyl-N-metyloacetamid
(N-metyloacetanilid)



N,N-dimetylobenzamid



2',3',4-trietylbenzanilid

Tabela 2. Pierwszeństwo i nomenklatura grup funkcyjnych

Grupa funkcyjna	Przyrostek	Przedrostek
kwasy karboksylowe -COOH	kwas -owy kwas -karboksylowy	karboksy-
bezwodniki kwasowe -CO-O-CO-	bezwodnik -owy bezwodnik -karboksylowy	
estry -CO-OR	-an -ylu -karboksylan -ylu	alkoksykarbonylo-
halogenki kwasowe -CO-X	halogenek -oilu	halokarbonylo-
amidy -CO-NH ₂ (H=R ₁ , R ₂)	-amid -karboksamid	karbamilo-
nitryle -CN	-nitryl -karbonitryl	cyjano- cyjanek
aldehydy -CHO	-al -karboaldehyd	okso-
ketony R-CO-R ₁	-on	okso-
alkohole -OH	-ol	hydroksy-
fenole Φ-OH	-ol	hydroksy-
tiole -SH	-tiol	sulfanylo-
aminy -NH ₂	-amina	amino-
alkeny	-en	alkenylo-
alkiny	-in	alkinylo-
alkany	-an	alkilo-

Grupy podrzędne

etery R-O-R ₁	-alkoksy
sulfidy -R-S-	-alkilosulfanylo
halogenki -X	-halo
związki nitrowe -NO ₂	-nitro
związki nitrozo -NO	-nitrozo

CHROMATOGRAFIA

Instrukcja wykonania ćwiczenia

1. Przygotowanie komory chromatograficznej.

Do komory chromatograficznej wyłożonej bibułą nalać mieszaninę rozpuszczalników propan-1-ol – amoniak (70:30) (układ rozwijający). Komorę zamknąć i odstawić na kilkanaście minut celem nasycenia komory parami rozpuszczalników.

2. Przygotowanie chromatogramu.

Na płytce chromatograficznej, wzdłuż krótszego boku płytki, zaznaczyć delikatnie ołówkiem linię startu w odległości 1 cm od brzegu.

3. Nanoszenie substancji.

Za pomocą cienkiej kapilary na linii startu w równych odległościach nanieść kolejne roztwory wzorcowe aminokwasów i ich mieszaninę. Plamki można suszyć ostrożnie zimnym strumieniem powietrza.

4. Rozwijanie chromatogramu.

Płytkę włożyć do uprzednio przygotowanej komory chromatograficznej tak, aby dolna krawędź była w momencie zanurzenia możliwie równoległa do powierzchni cieczy w komorze. Należy zwrócić uwagę, aby krawędzie boczne nie dotykały ścian komory, gdyż powoduje to nierównomierne wznoszenie się rozpuszczalnika. Rozwijanie prowadzić do chwili, aż poziom rozpuszczalnika na płytce osiągnie wysokość około 0.5 cm od góry. Płytkę należy następnie wyjąć, zaznaczyć linię czoła rozpuszczalnika i wysuszyć dokładnie suszarką.

5. Wywoływanie chromatogramu.

Wysuszoną płytkę spryskać w pozycji pionowej roztworem ninhydryny, następnie ogrzać ciepłym strumieniem powietrza (można użyć suszarki do włosów). Zaznaczyć plamki odpowiednich aminokwasów.

6. Opis ćwiczenia.

W opisie należy zrobić rysunek wykonanego chromatogramu, obliczyć wartości R_f aminokwasów oraz wskazać skład badanej mieszaniny.

Zestaw aminokwasów do nanoszenia na chromatogram:

- DL-alanina,
- L-leucyna,
- L-lizyna,
- mieszanina aminokwasów.

Zadanie II. Rozdzielanie izomerów nitroaniliny

Wykonanie ćwiczenia jest takie same, jak przy rozdziale aminokwasów. Jako układ rozwijający zastosować mieszaninę: heksan – octan etylu (4:1). Plamki związków są barwne i wywoływanie nie jest konieczne. Opis ćwiczenia wykonać jak przy aminokwasach.

Roztwory do nanoszenia:

- o-nitroanilina,
- m-nitroanilina,
- p-nitroanilina,
- mieszanina izomerów nitroaniliny.

Zadanie III. Badanie składu barwników roślin zielonych (rozdzielanie chlorofilu a i b oraz karotenoidów – karotenu i ksantofilu)

1. Zielone liście utrzeć w moździerzu z odrobiną piasku (w celu łatwiejszego zniszczenia ścianek komórkowych) i kilkoma kroplami acetonu.

2. Za pomocą kapilary nanieść roztwór na płytkę i rozwijać w układzie aceton – toluen (1:2). Próbkę należy nanosić kilkakrotnie w tym samym miejscu, zachowując jednocześnie małą średnicę plamki.

3. Po rozwinięciu należy szybko analizować chromatogram, gdyż barwniki łatwo blakną. Plamki obu chlorofilu są blisko siebie, wyraźnie natomiast oddziela się od nich karoten i ksantofil.

4. Przerysować chromatogram i napisać wnioski.

Zadanie IV. Rozdział barwników na sitach molekularnych

1. Kolumnę chromatograficzną umieścić pionowo w statywie, zamknąć jej wylot zaciskaczem i wlać do niej około 10 cm³ roztworu elucyjnego (0.9% wodny roztwór NaCl). Następnie przy pomocy bagietki umieścić na dnie kolumny tamponik z waty uważając, aby nie powstały pęcherzyki powietrza. Ostrożnie wlać (po bagietce) do kolumny zamieszana uprzednio zawieszina żelu. Odczekać, aż na dnie kolumny uformuje się warstwa żelu 3-5 cm, po czym ostrożnie

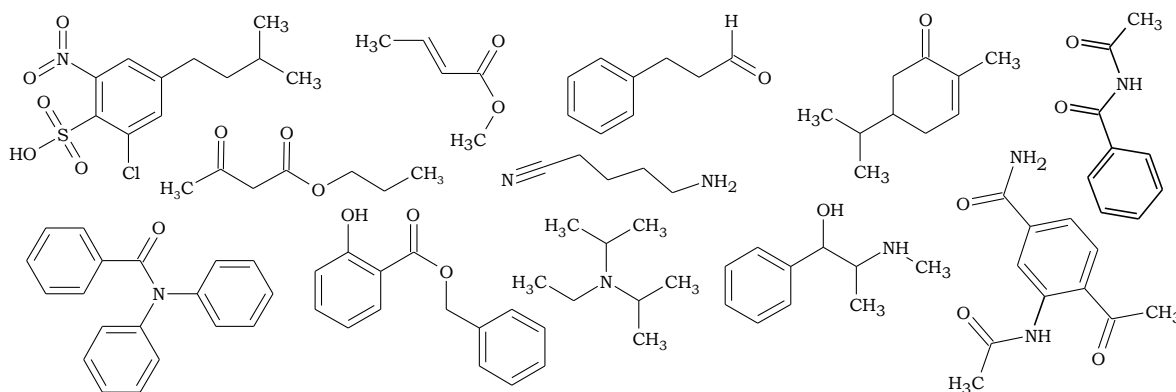
otworzyć zacisk kolumny. Roztwór powinien wypływać z szybkością 1 kropli/sek. Wysokość uformowanego żelu powinna wynosić nie więcej niż 10 cm, faza stacjonarna musi być zawsze przykryta warstwą roztworu.

2. Wyrównać poziom fazy ruchomej w kolumnie do poziomu ok. 0.5 cm nad powierzchnią złożeń fazy stacjonarnej i zamknąć odpływ z kolumny. Ostrożnie wprowadzić do kolumny około 1 cm³ mieszaniny dichromianu potasu i błękitu dextranu za pomocą pipety Pasteura i otworzyć odpływ z kolumny. Wyeluować obie substancje z kolumny, dodając w sposób ciągły roztworu NaCl i zbierając do probówek frakcje o objętości 3 cm³. Ustalić wizualnie szczyty frakcji obu związków barwnych, wnioski zapisać w sprawozdaniu.

PYTANIA SPRAWDZAJĄCE

1. Wymień techniki chromatograficzne zależne od stanu skupienia fazy ruchomej.
2. Wymień typy chromatografii zależne od stanu skupienia fazy stacjonarnej.
3. Podaj rodzaje chromatografii zależne od rodzaju zjawisk odpowiedzialnych za podział substancji.
4. Jakie znasz rodzaje chromatografii? Jakie są między nimi różnice?
5. Wymień znane adsorbenty stosowane w chromatografii.
6. Podaj szereg aktywności adsorbentów pod względem wiązania związków organicznych.
7. Co to jest szereg eluotropowy?
8. Podaj szereg 5 rozpuszczalników według ich wzrastających zdolności wymywania adsorbowanej substancji z powierzchni adsorbentu polarnego.
9. Co to jest współczynnik R_f ? Jak się go wyznacza?
10. Scharakteryzuj sefadenksy. Co oznaczają symbole G-10 i G-25?
11. Omów zasadę rozdziału substancji na sitach molekularnych.
12. Podaj zalety chromatografii cienkowarstwowej.
13. Jakie są kryteria doboru rozpuszczalnika do chromatografii?
14. Opisz krótko technikę chromatografii preparatywnej.

Nazwać następujące związki:



Narysować następujące związki:

1. eter cyklopentylowopropylowy
2. keton benzyłowometylowy
3. 4-chloropentan-2-on
4. cyklopentanokarboksylan izopropylowy
5. N-izopropyl-N-metylocykloheksanoamina
6. kwas trifenylooctowy
7. 1,3-diaminobutan
8. N-fenyl-N-izobutyloacetamid
9. chlorek 3-metoksy-2-metylobut-2-enolu
10. N-etylo-3-metoksy-N,5-dimetyloanilina
11. 4-aminosalicylan fenylowy
12. benzoesan tetrametyloamoniowy
13. kwas 2,4,6-trinitrobenzoesowy