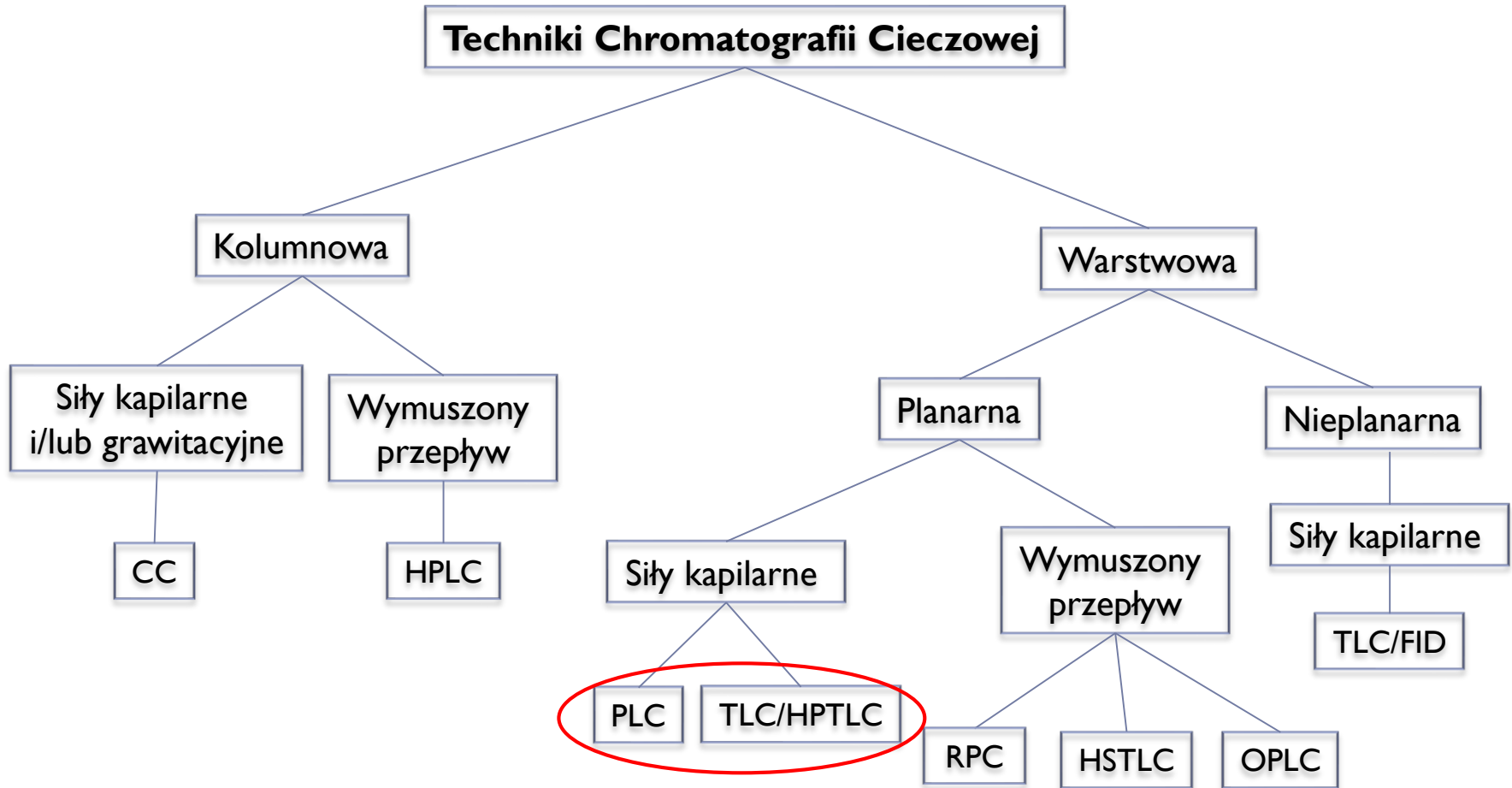


Metody chromatograficzne w chemii i  
biotechnologii, **wykład 8**

Chromatografia TLC

# Gdzie jest TLC?

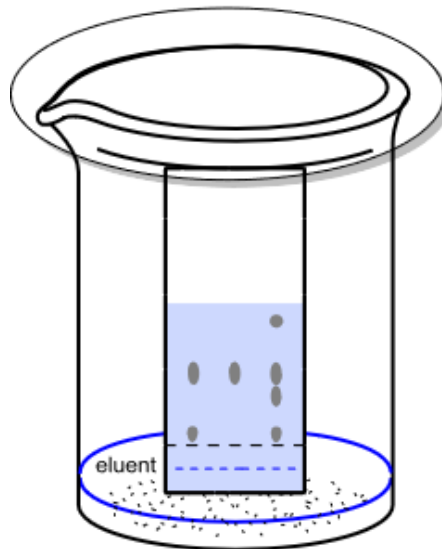


▶ RPC – Rotation Planar Chromatography, OPLC – Overpressured Planar Liquid chromatography, HSTLC – High Speed Thin Layer Chromatography

# TLC – na czym polega

---

- ▶ Przebieg analizy:
  - ▶ Naniesienie próbki na fazę stacjonarną
  - ▶ Rozwinięcie chromatogramu
  - ▶ Wizualizacja chromatogramu
  - ▶ Oznaczanie ilościowe i jakościowe składników próbki



# Zalety TLC

---

- ▶ Na warstwie chromatograficznej można równocześnie rozdzielać kilka różnych próbek,
- ▶ Proces rozdzielania może być w każdej chwili zatrzymany,
- ▶ Rozdzielane próbki nie muszą być wstępnie oczyszczane,
- ▶ Obniżone koszty analizy około 30%
- ▶ Metoda jest mało pracochłonna
- ▶ Można wykorzystać różne, selektywne sposoby wizualizacji i analizy plamek np. skanery i densytometry



# Wady TLC

---

- ▶ Ograniczona powtarzalność wyników
- ▶ Wyniki rozdzielania zależą od wielu procesów, które trudno jest standaryzować
- ▶ Zmiany w składzie fazy ruchomej w czasie rozwijania chromatogramu
- ▶ Wzrastające rozmycie plamki (poszerzenie pasma) powodowane zmniejszaniem się szybkości fazy ruchomej wraz z pokonywaną odległością



# Podstawowe zastosowania TLC

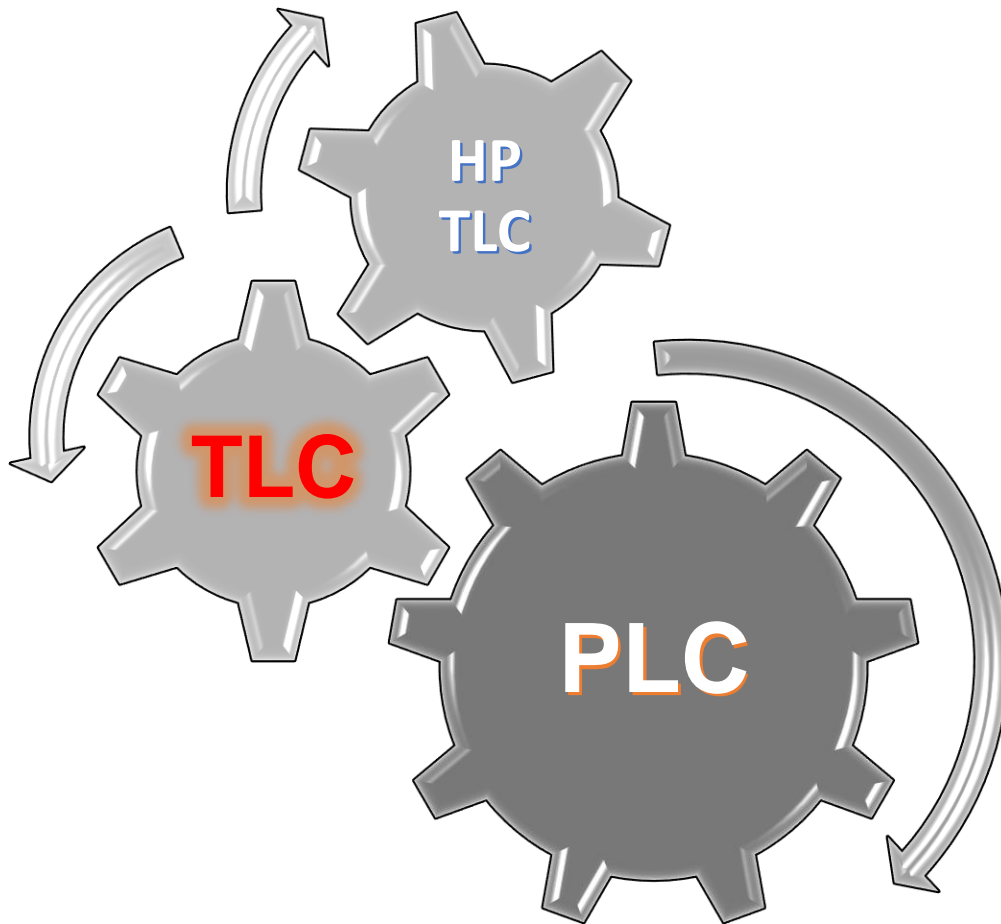
---

- ▶ Określenie ilości składników w mieszaninie
- ▶ Potwierdzenie lub wykluczenia obecności danej substancji
- ▶ Monitorowanie postępu reakcji chemicznych
- ▶ Optymalizacja warunków dla chromatografii kolumnowej
- ▶ Analiza frakcji uzyskanych techniką chromatografii kolumnowej



# Chromatografia planarna

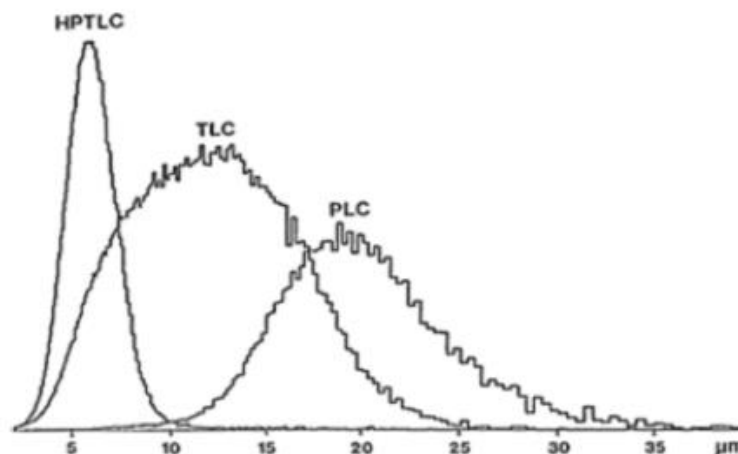
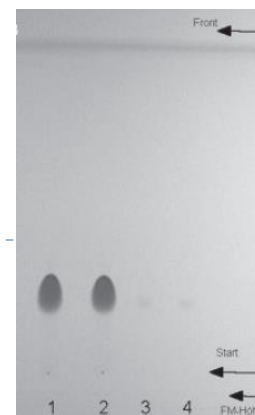
---



# Płytki chromatograficzne

## ▶ Płytki

- ▶ Szklane, aluminiowe lub z tworzywa sztucznego (tereftalan polietylowy)
- ▶ Płytki do rozdzielania analitycznego TLC: grubość warstwy sorbentu 0,1 – 0,25 mm (0,25 mm – silikażel, 0,1 mm – celuloza poliamid)
- ▶ Płytki do rozdzielania preparatywnego (PLC): grubość warstwy sorbentu 0,5 – 2 mm
- ▶ Płytki wysokosprawne (HPTLC) – grubość warstwy sorbentu 0,20 mm adsorbenty o mniejszych rozmiarach i węższych frakcjach sitowych,



▶ Rozkład wielkości cząstek w TLC – żel krzemionkowy



# Porównanie konwencjonalnej TLC i wysokosprawnej HPTLC

Parametr	TLC	HPTLC
Wielkość płytki w cm	20 × 20	10 × 10, 10 × 20
Grubość warstwy, $\mu\text{m}$	100 – 250	200
Przeciętna wielkość ziaren, $\mu\text{m}$	20	5 – 15
Objętość próbki, $\mu\text{L}$	1 – 5	0,1 – 0,2
Średnica plamki, mm W chwili startu Po rozwinięciu	3 – 6 8 – 15	1,0 – 1,5 2 – 6
Droga rozwijania, cm	10 – 15	3 – 6
Czas rozwijania, min	30 – 200	3 – 6
Granice wykrywalności Adsorpcja światła, ng, Fluorescencja, pg	1 – 5 50 – 100	0,1 – 0,5 5 – 10
Liczba próbek na płytkę	10	18 – 36
Wysokość półki teoretycznej, $\mu\text{m}$	30	5 - 20
Liczba półek teoretycznych	< 600	< 5000
Separation number	7 – 10	10 – 20

# Adsorbenty

---

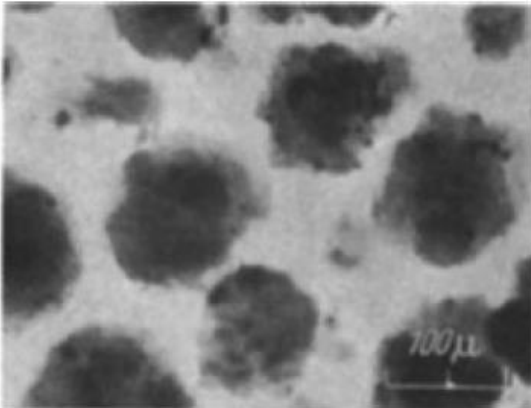
- ▶ Żel krzemionkowy (90% analiz)
- ▶ Tlenki glinu (Alumina)
- ▶ Adsorbenty organiczne
  - ▶ **Celuloza i jej pochodne**
  - ▶ Skrobia (ziemniaczana)
  - ▶ Sacharoza
  - ▶ Mannitol
  - ▶ Dekstran (żel, związki hydrofilowe, zasada sita molekularnego)
- ▶ Poliamidy (poliamid zwykły i acetylowany)
- ▶ Wymieniacze jonowe
- ▶ Adsorbenty niepolarne: np. silikażel modyfikowany C-8

---

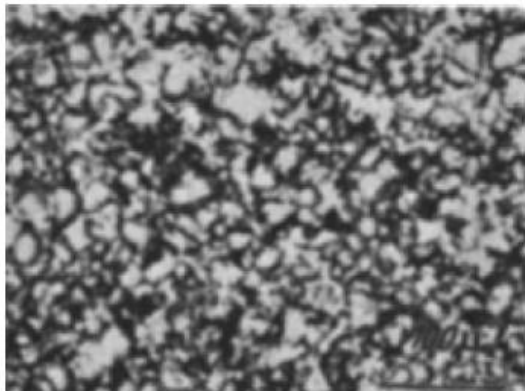
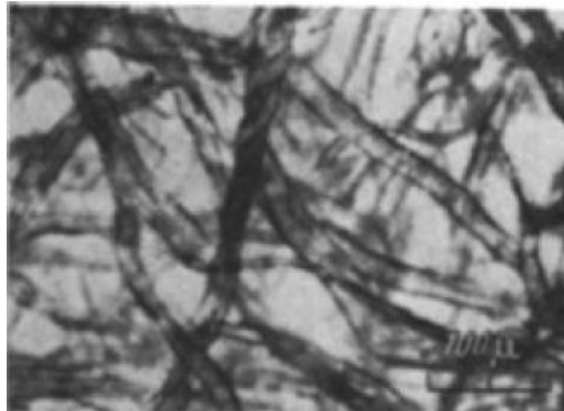
▶ Adsorbent na podłożu zwykle osadzony jest przy użyciu środka wiążącego np. gipsu lub polimeru organicznego, rzadziej skrobi (01 -20%), który powoduje, że warstwa adsorbentu jest trwała mechanicznie

# Adsorbenty

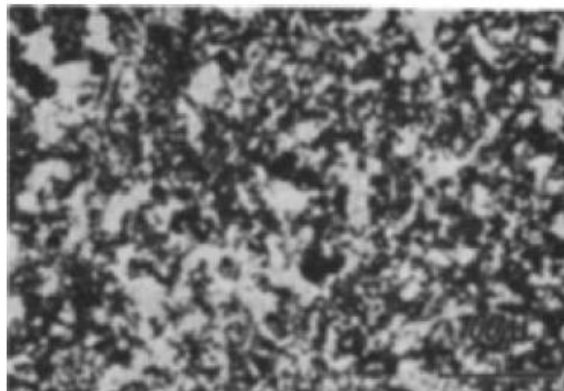
*Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for Column Chromatography*



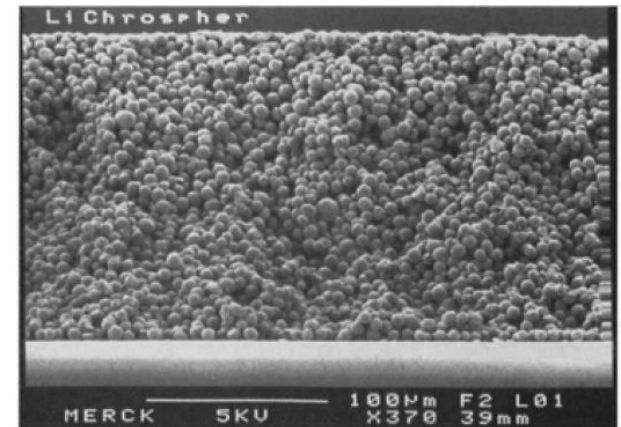
*Cellulose fibres for PC*



*Silica gel for TLC*



*Cellulose powder for TLC*



**Figure 13** Scanning electron micrograph of a cross section of an HPTLC plate made with spherical 6–8 μm LiChrospher particles.

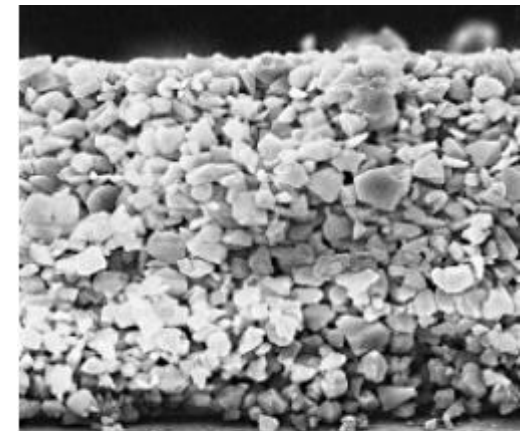
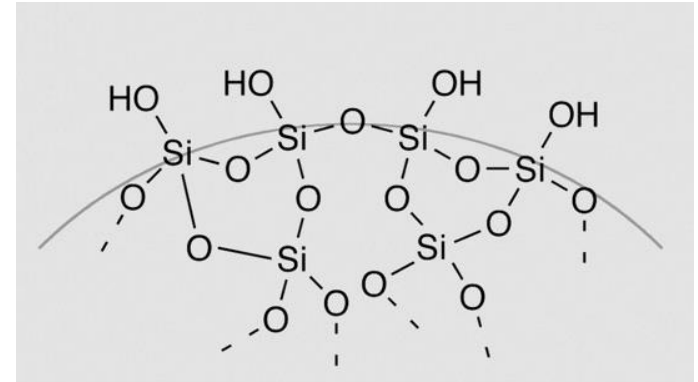
# Silika żel (silica gel)

- ▶ Średnica porów (D) – dystrybucja grup silanolowych.  
(D - 40,60,80,100 Å, typowo 60)
- ▶ Objętość właściwa porów – maks. obj. fazy ruchomej, która może penetrować złożę.  
(V<sub>p</sub>, 0.5-2 mL/g, typowo 0,8)
- ▶ Powierzchnia właściwa (S) – związana z gęstością grup silanolowych, mówi o pojemności absorpcyjnej silikażelu.  
(200 – 800 m<sup>2</sup>/g, typowo 400 – 600)

$$D [A] = \frac{4V_p}{S_{BET}} * 10^4$$

**Table 1 Typical Silica Gel Pore Sizes and Surface Areas**

Pore size, Å	40	60	100	150	200	300	500	800	1000
Surface area, m <sup>2</sup> /g	600	480	270	175	130	90	55	45	30



**Cross section through aluminum sheet showing silica layer at magnification x500**



# Tlenki glinu

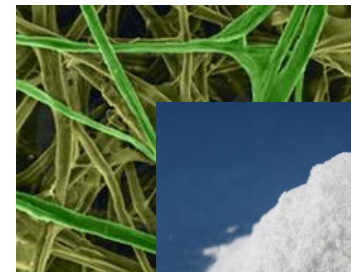
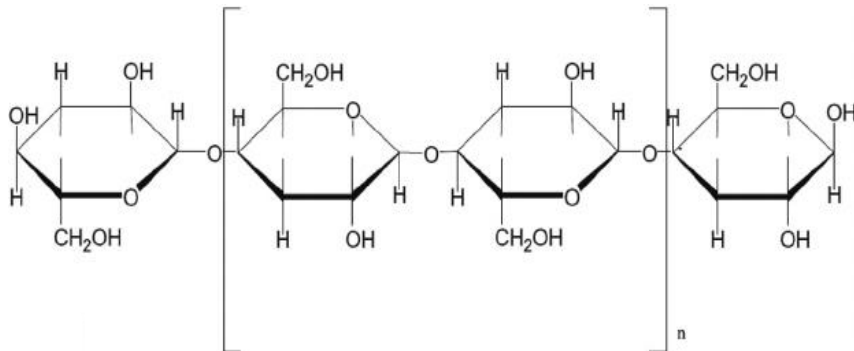
---

- ▶ Formuła ogólna:  $\text{Al}_2\text{O}_3$
  - ▶ Grupy odpowiedzialne za oddziaływania:  $-\text{OH}$  i  $\text{O}^{2-}$
  - ▶ Średnica porów: 4 – 5 nm
  - ▶ Występują w trzech odmianach: *zasadowy* (pH 9-10), *obojętny* (pH 7.0-8.0) i *kwaśny* (pH 4.0-4.5)
  - ▶ Stosunkowo mała pojemność sorpcyjna
  - ▶ Właściwości protonowo-akceptorowe silniejsze niż dla silikażelu
  - ▶ Zastosowania – analiza alkaloidów, steroidów, terpenów oraz innych związków aromatycznych i alifatycznych
- 



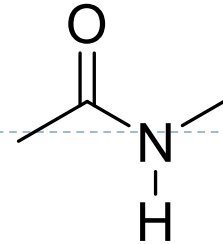
# Celuloza

- ▶ „Papier” (złóże i nośnik) lub rozpylona na płytce szklanej, aluminiowej lub PTFE
- ▶ Naturalne włókna lub mikrokrystaliczna
- ▶ Analiza związków hydrofilowych, np. kwasów fosforowych, glikozydów, aminokwasów, alkoholi, barwników, cukrów
- ▶ Celuloza acetylowana – odwrócony układ faz
- ▶ Celulozowe wymiennicze jonowe (proteiny, aminokwasy, enzymy, kwasy nukleinowe, estry, cukry, witaminy, hormony, wirusy.)



# Poliamidy

---



- ▶ Adsorbenty organiczne (poliamid 6- kaprolaktam, poliamid 11- undekanoamid )
  - ▶ Poliamid zwykły (normalny układ faz)
  - ▶ Poliamid acetylowany (odwrócony układ faz)
  - ▶ Mogą być wielokrotnie regenerowane eluentem o dużej sile elucji
  - ▶ Trzy mechanizmy rozdziału: absorbcja, podział, wymiana jonowa
  - ▶ Zastosowanie: analiza fenoli, kwasów karboksylowych, aminokwasów, glikozydów, nukleozydów i pestycydów,
- 



# Eluenty - szereg elutropowy

- ▶ Obowiązują takie same zasady doboru eluentów jak w chromatografii kolumnowej

n-Pentan  
 n-Heksan  
 Cykloheksan  
 Czterochlorek węgla  
 Eter izopropylowy  
 Chloroform  
 Chlorek metylenu  
 Eter dietylowy  
 Tetrahydrofuran  
 Octan etylu  
 Dietyloamina  
 Acetonitryl  
 Dioksan  
*tert*-Butanol  
 n-Butanol  
 Izopropanol  
 Etanol  
 Metanol  
 Woda

Moc elucyjna, Polarność

Normalny układ faz

Odwrócony układ faz

**Table 1. TLC  $R_f$  Values Determined Using Different Eluents**

Eluent Composition	$R_f$ ( $A_v \pm SD$ , $N = 10$ )			
	Cyclo- hexanone	Diethyl Malonate	1-Hexa- decene	1-Octanol
100% ether	.64 ± .02	.70 ± .02	.83 ± .02	.59 ± .03
90% ether 10% pentane	.63 ± .02	.69 ± .01	.82 ± .01	.58 ± .02
70% ether 30% pentane	.55 ± .02	.63 ± .01	.81 ± .01	.48 ± .01
50% ether 50% pentane	.48 ± .03	.55 ± .03	.78 ± .02	.34 ± .02
30% ether 70% pentane	.35 ± .02	.38 ± .02	.79 ± .02	.23 ± .02
10% ether 90% pentane	.15 ± .01	.15 ± .01	.77 ± .02	.07 ± .01
100% pentane	.01 ± .01	.01 ± .01	.68 ± .02	.00 <sup>a</sup>

NOTE: The developing chamber was a wide-mouth jar with a filter-paper wick and screw-cap lid.

<sup>a</sup>Compound remained on the baseline.

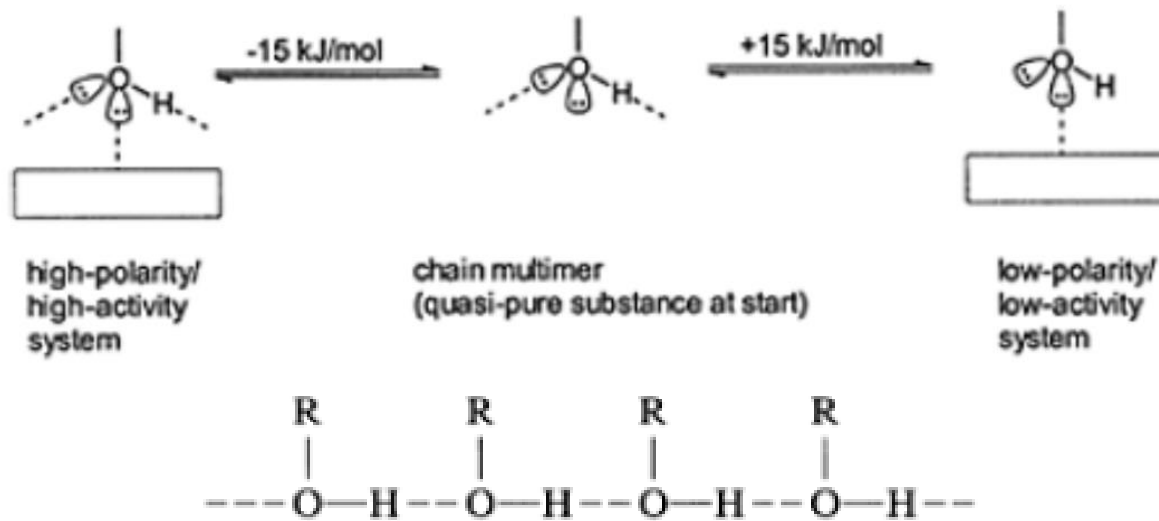


# Dobór adsorbenta i fazy mobilnej

---



# Układy chromatograficzne



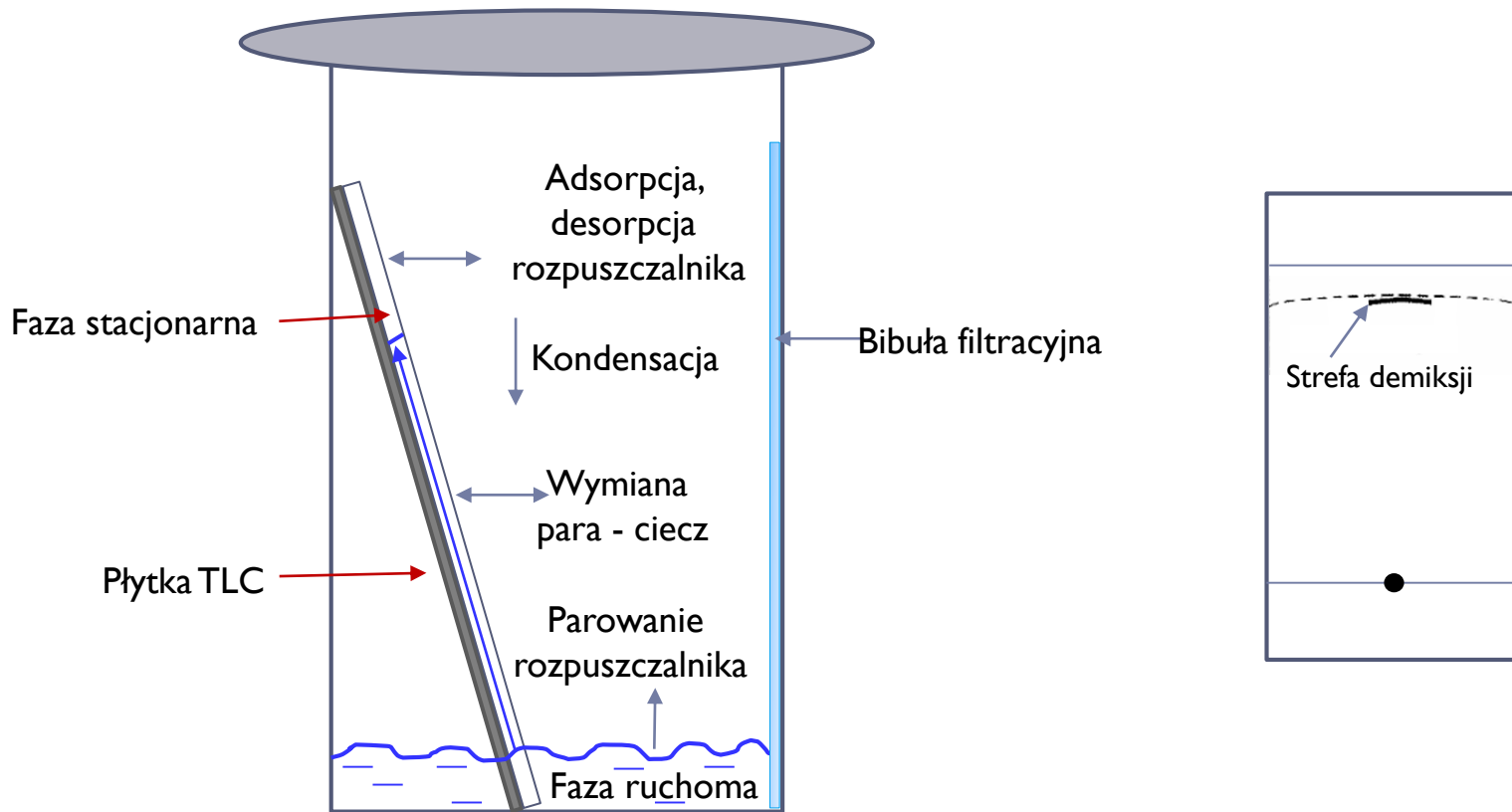
Stationary phase	Mobile phase	$\Delta\mu_{\text{CH}_2}$ (kJ/mol)	$\Delta\mu_{\text{OH}}$ (kJ/mol)
Cellulose paper	Decalin	-0.57	+15.12
Cellulose powder	Decalin	-0.22	+11.16
Magnesium silicate	$\text{C}_6\text{H}_6 + (\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , 9:1 (v/v)	-0.28	-7.79
Alumina	$\text{C}_6\text{H}_6 + (\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , 9:1 (v/v)	-0.12	-12.46
Silica	$\text{C}_6\text{H}_6 + \text{CH}_3\text{OH}$ , 9:1 (v/v)	0	-15.31

# Rozwijanie chromatogramu – rodzaje komór

---



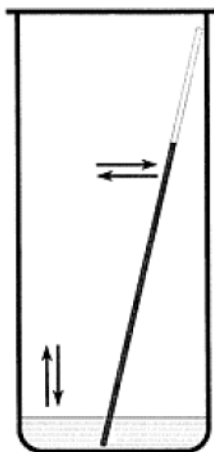
# TLC – zasada procesu rozdzielania



# Zależność podziału od naczynia

how the separation of the compounds is affected by

1. the type of container used (e.g., 250-mL beaker, wide-mouth jar),
2. the presence or absence of a filter-paper “wick” inside the container, and
3. how well the container is sealed (open, plastic wrap, watch glass, screw cap).



**Figure 3** Scheme of thermodynamic equilibria between the gaseous and liquid mobile-phase components in a presaturated chromatographic chamber.

**Table 2. TLC  $R_f$  Values Determined Using Different Types of Developing Chambers**

Developing Chamber	$R_f$ ( $A_v \pm SD$ , $N = 10$ )			
	Cyclohexanone	Diethyl Malonate	1-Hexadecene	1-Octanol
wide-mouth jar no wick no lid	1.00 ± .00	1.00 ± .00	1.00 ± .00	1.00 ± .00
wide-mouth jar no wick plastic-wrap lid	.75 ± .02	.82 ± .03	1.00 ± .01	.63 ± .02
wide-mouth jar filter-paper wick plastic-wrap lid	.49 ± .04	.56 ± .04	.83 ± .04	.42 ± .04
wide-mouth jar filter-paper wick screw-cap lid	.48 ± .03	.55 ± .03	.78 ± .02	.34 ± .02
250-mL beaker no wick no lid	1.00 ± .00	1.00 ± .00	1.00 ± .00	1.00 ± .00
250-mL beaker filter-paper wick no lid	1.00 ± .00	1.00 ± .00	1.00 ± .00	1.00 ± .00
250-mL beaker filter-paper wick plastic-wrap lid	.51 ± .04	.58 ± .04	.82 ± .05	.42 ± .03
250-mL beaker filter-paper wick watch-glass lid	.69 ± .08	.78 ± .06	.99 ± .03	.53 ± .06

NOTE: The eluent was 50% ether/50% pentane.

# Teoria i mechanizm w TLC

---

- ▶ Transfer fazy ruchomej przez cienką warstwę adsorbenta wzdłuż płytki TLC jest indukowany przez siły kapilarne

$$\Delta E_m = -\frac{2\gamma V_n}{r}$$

$\gamma$  – napięcie powierzchniowe

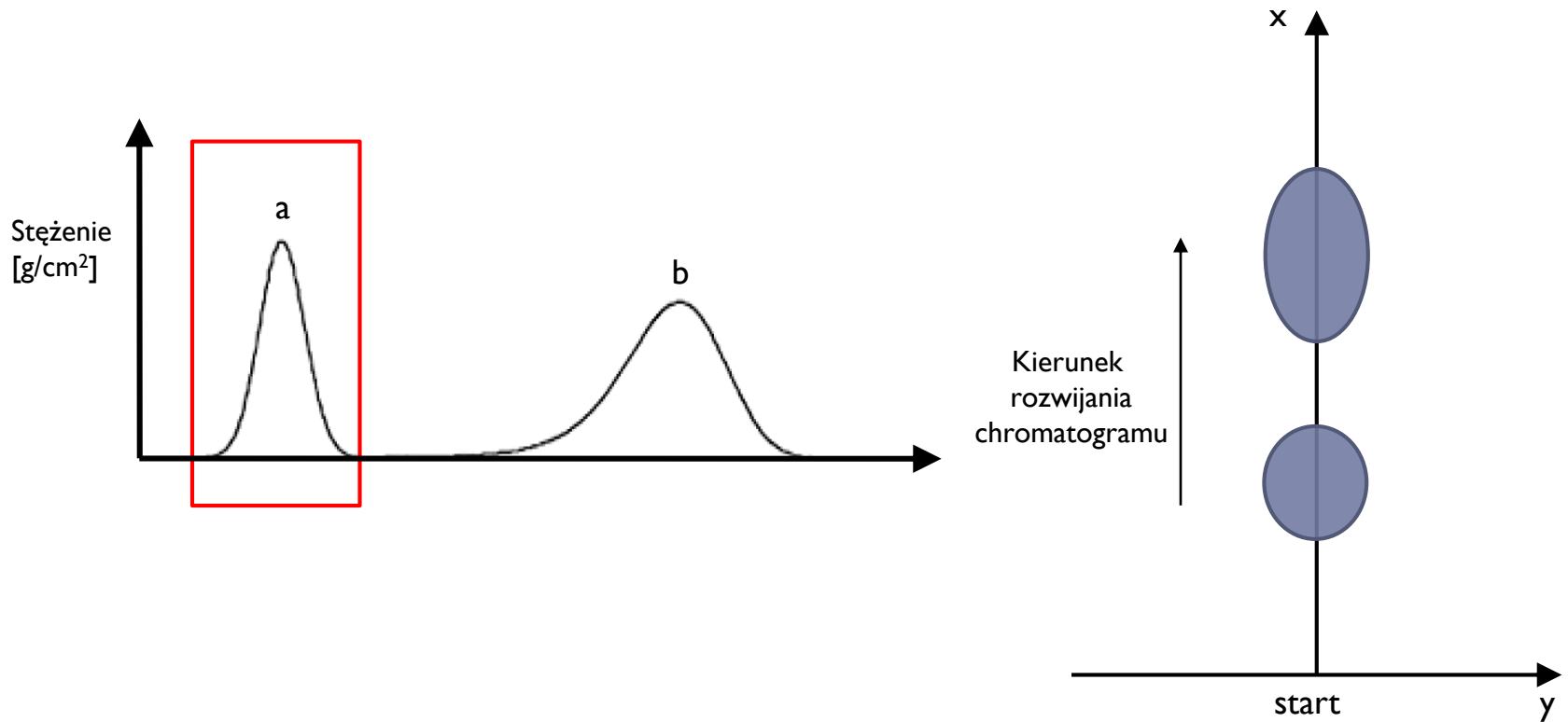
$V_n$  - objętość molalna rozpuszczalnika

$r$  – średnica kapilary

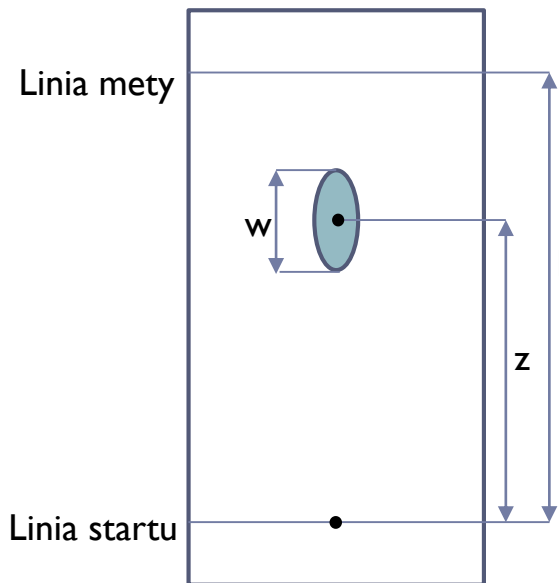
---



# Wędrówka przez złożę



# Poszerzenie plamek - ilość półek



$$N = \frac{16lz}{w^2} = 16 \frac{z^2}{l^2}$$

$$N = \frac{l}{H}$$

Małe wartości **H** = duża sprawność:

Małe rozmiary uziarnienia złoża

Mała lepkość fazy ruchomej

Małe cząsteczki substancji analizowanej

H zależy od prędkość przepływu fazy ruchomej

Prędkość rozchodzenia się rozpuszczalnika maleje wraz z odległością, stąd w różnych miejscach płytki jest różna liczba półek teoretycznych - sprawności muszą być zgłaszane w odniesieniu do związku o określonej wartości  $R_f$ , takiej jak 0,5 lub 1,0.





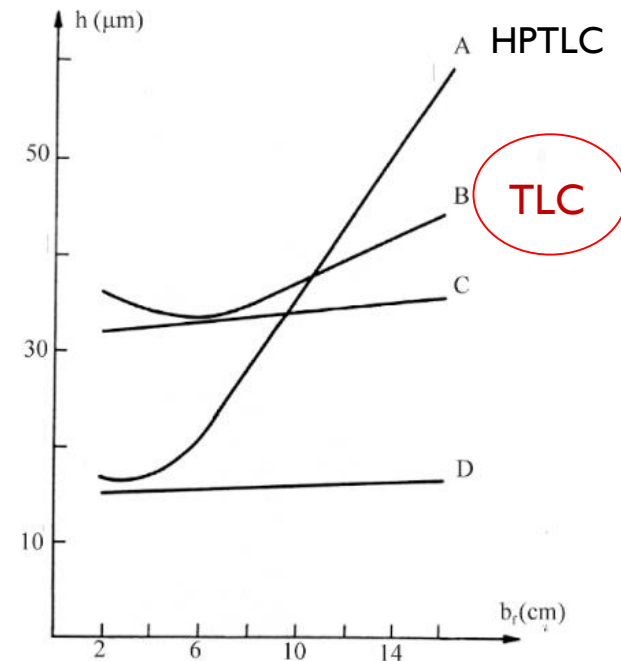
# Rozdzielczość - podział

## Równanie van Deemtera

$$H = A + \frac{B}{\bar{\mu}} + C\bar{\mu}$$

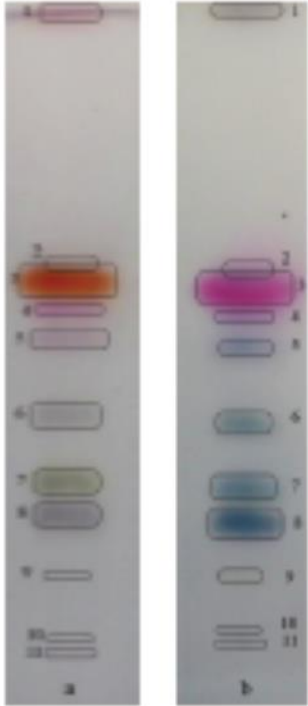
$u$  – przepływ przez fazę stacjonarną;  
A, B, C - stałe wskazujące  
udział procesów rozmycia (poszerzenia plamki)  
w wartości  $H$  równania  $N = l/H$

Stałe A,B,C zależą od: parametrów mikroporowatego złoża,  
właściwości fazy ruchomej  
i analizowanej substancji,  
temperatury.



Rys. 12.3. Zmiany średniej wysokości półki teoretycznej ( $h$ ) w funkcji odległości migracji ( $b_r$ ):  
A- płytka wysokosprawna, rozwijanie konwencjonalne, B- płytka konwencjonalna, rozwijanie konwencjonalne, C- płytka konwencjonalna, rozwijanie wysokociśnieniowe, D- płytka wysokosprawna, rozwijanie wysokociśnieniowe.

# Dlaczego *dyfuzja* jest problemem?



(a)

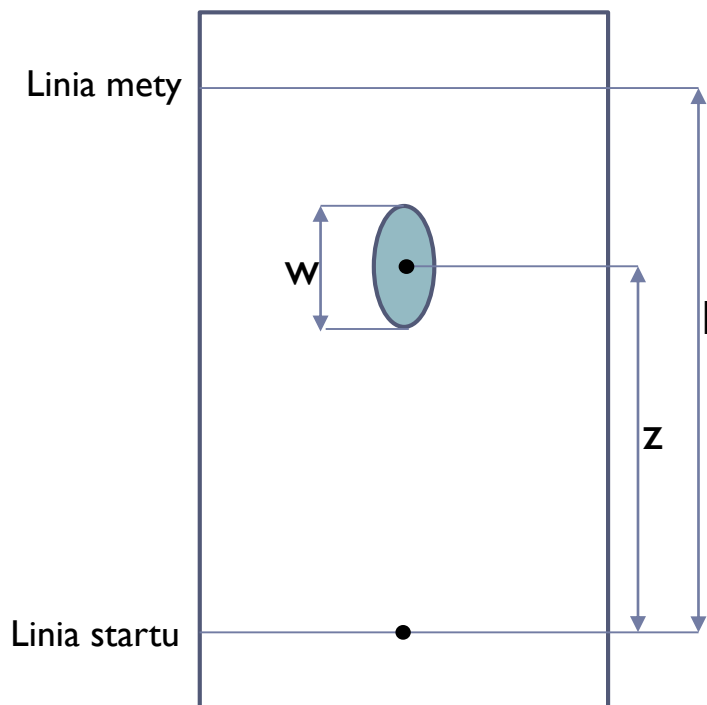
(b)



(a)



# Współczynnik podziału ( $R_f$ )



$$R_f = \frac{z}{l}$$

$$R_f = \frac{t_m}{t_m + t_s} = \frac{1}{1 + k}$$

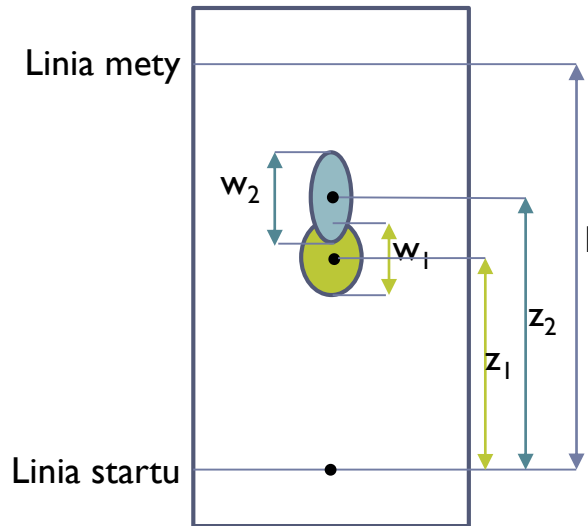
$$0,2 < R_f < 0,8$$

$t_m, t_s$  – czas przebywania substancji w fazie ruchomej  
i w fazie stacjonarnej  
 $k$  – współczynnik retencji

Identyfikacja związku na podstawie  
porównania wartości  $R_f$  oraz barwy plamki próbki z wzorcem

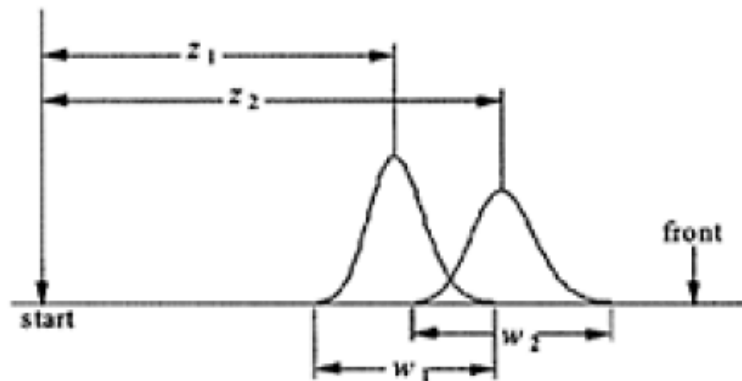


# Współczynnik podziału $R_f$ i współczynnik rozdziału $R_s$



$$R_s = \frac{l(R_{f(2)} - R_{f(1)})}{0,5(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = \frac{z(2) - z(1)}{0,5(w_1 + w_2)}$$



pożądane  $R_s > 1$

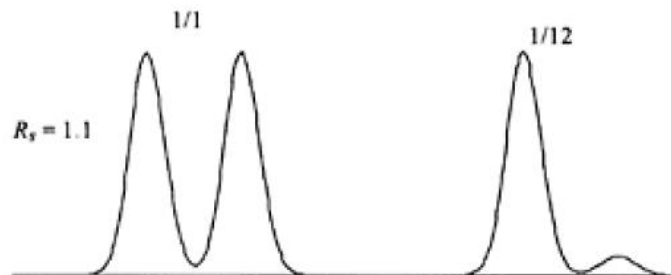
# Rozdział jako funkcja $R_S$ i selektywność rozdziału



$$R_S = 0,25 \left( \frac{K_2}{K_1} - 1 \right) \sqrt{\bar{R}_f N} (1 - \bar{R}_f)$$



$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} > 1$$

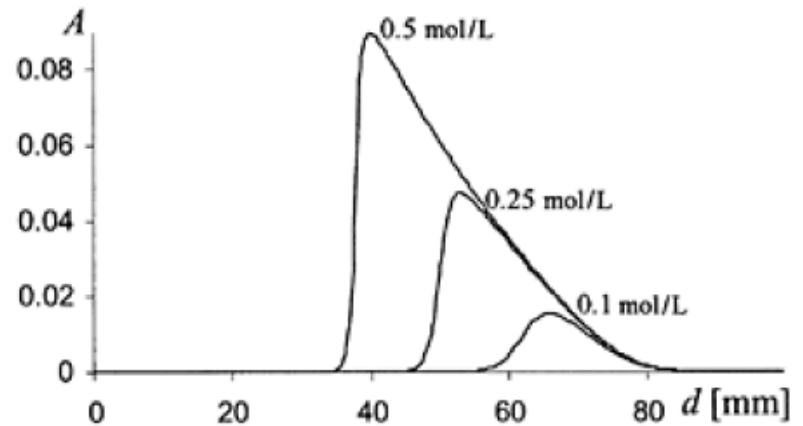
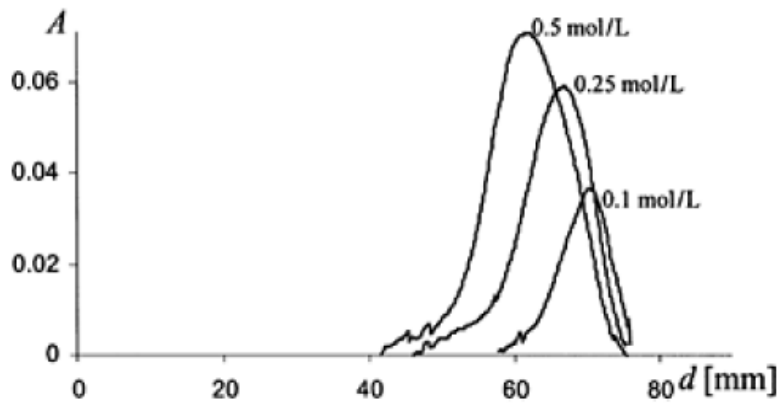


Zmiana składu fazy ruchomej  
Zmiana pH fazy ruchomej  
Zmiana fazy stacjonarnej  
Zmiana temperatury



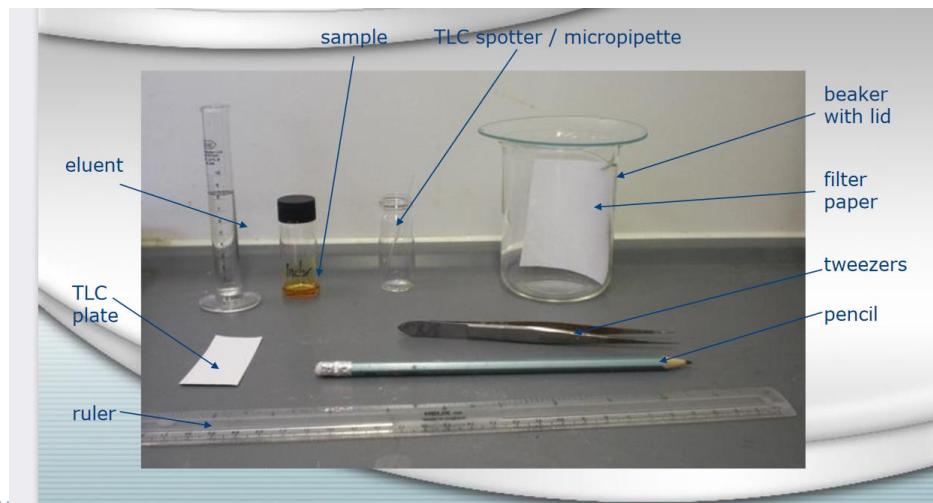
# Ddziaływania międzycząsteczkowe- wpływ na podział

---



# Przebieg procesu chromatograficznego/ Wpływ na efektywność

- ▶ Przygotowanie próbki do analizy
- ▶ Nanoszenie próbki na płytkę
- ▶ Rozwijanie chromatogramu
- ▶ Detekcja substancji na warstwie
- ▶ Ilościowa i jakościowa interpretacja chromatogramu



# Przygotowanie próbki

---

## ▶ Próbka

- ▶ Nie musi być oczyszczona!
- ▶ Musi być rozpuszczona (najlepiej w fazie ruchomej lub w lotnym rozpuszczalniku o mniejszej sile elucji)
- ▶ Średnica plamki do 2 mm (optymalnie 1 mm), objętość próbki ~ 1  $\mu$ l, masa ~ 1 - 5 ng

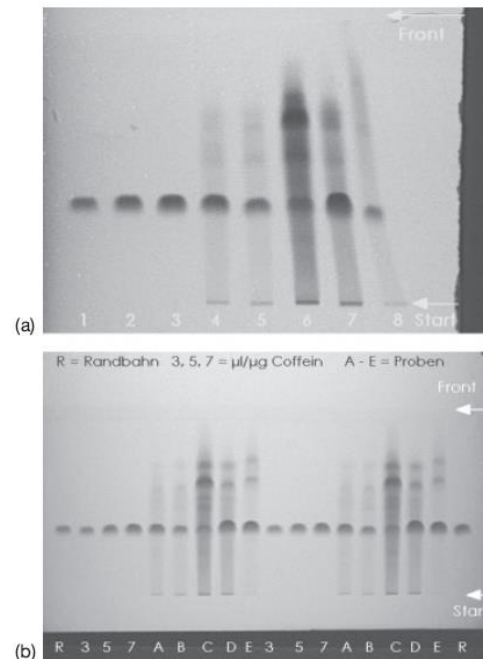
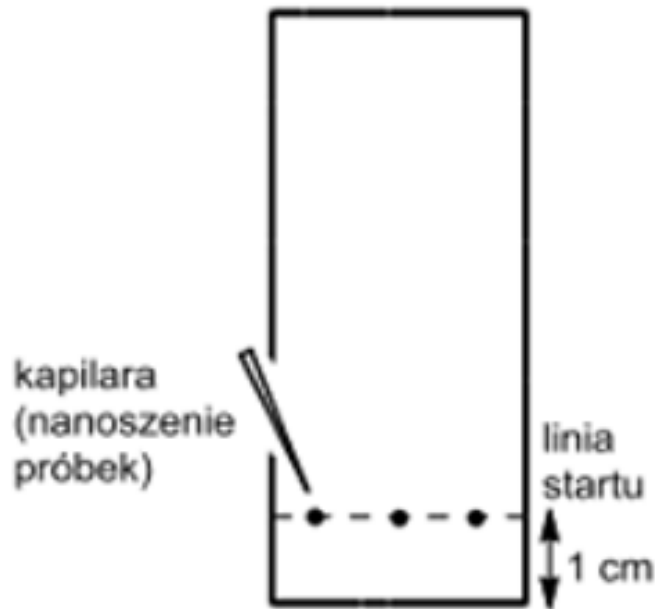




# Nanoszenie próbek

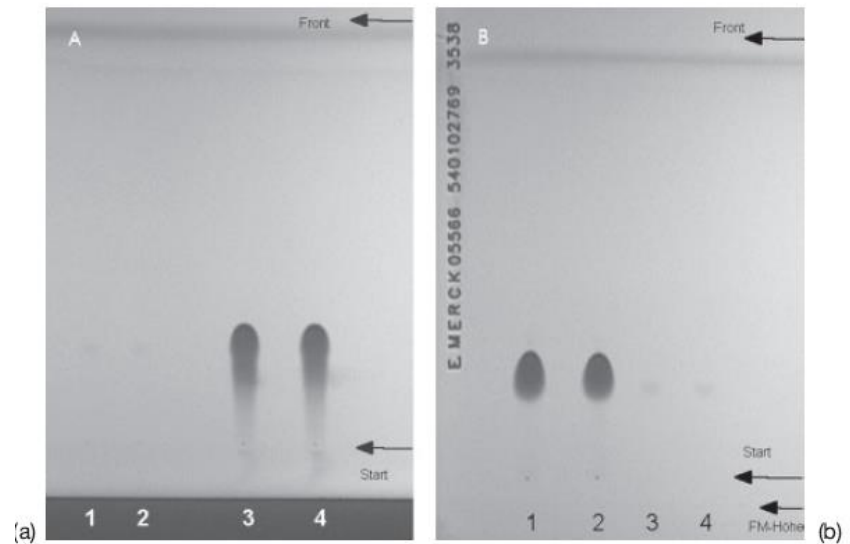
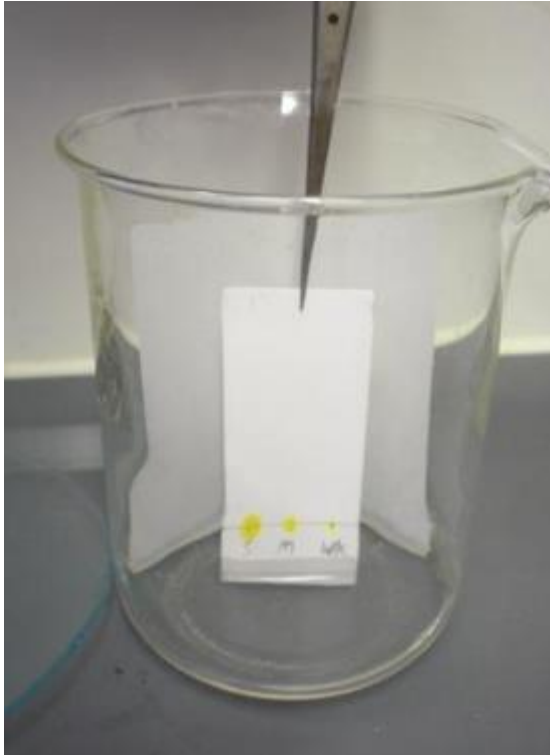


- ▶ Przy pomocy kapilar, mikropipet lub dozowników (UWAGA: nie wolno naruszyć warstwy adsorbenta)
- ▶ Wpływ na jakość rozdzielania oraz dokładność oznaczeń ilościowych i jakościowych



**Figure 15. Influence of the cutting angle on the chromatographic result when using aluminum foil**  
(a) Poorly cut right-hand edge of the foil  
(b) Foil correctly cut by the manufacturer  
Four coffee samples and one tea sample, each containing three concentrations of caffeine, applied to a TLC aluminum foil RP 18 F<sub>254s</sub> (Merck Article No. 1.05559)

# Przygotowanie komory chromatograficznej

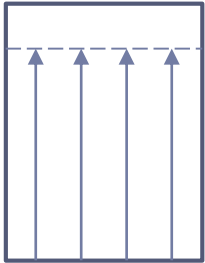


**Figure 25. Influence of the solvent level when the sample is located too near to the bottom edge of the plate**

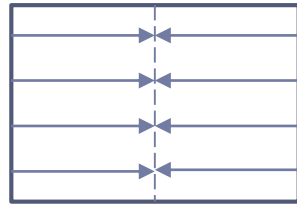
- (a) Application zones were partially immersed in the solvent during development
- (b) Solvent level was at a sufficient distance from the application zones

# Rozwijanie chromatogramu

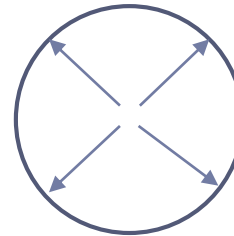
## ► Różne kierunki rozwijania chromatogramów



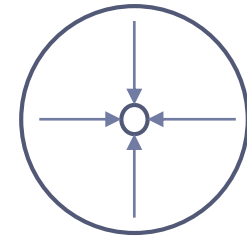
**Liniowe**



Liniowe z dwóch stron



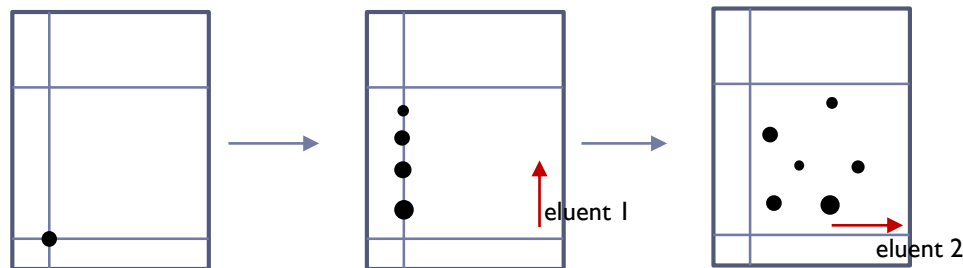
Kołowe



Dośrodkowe kołowe

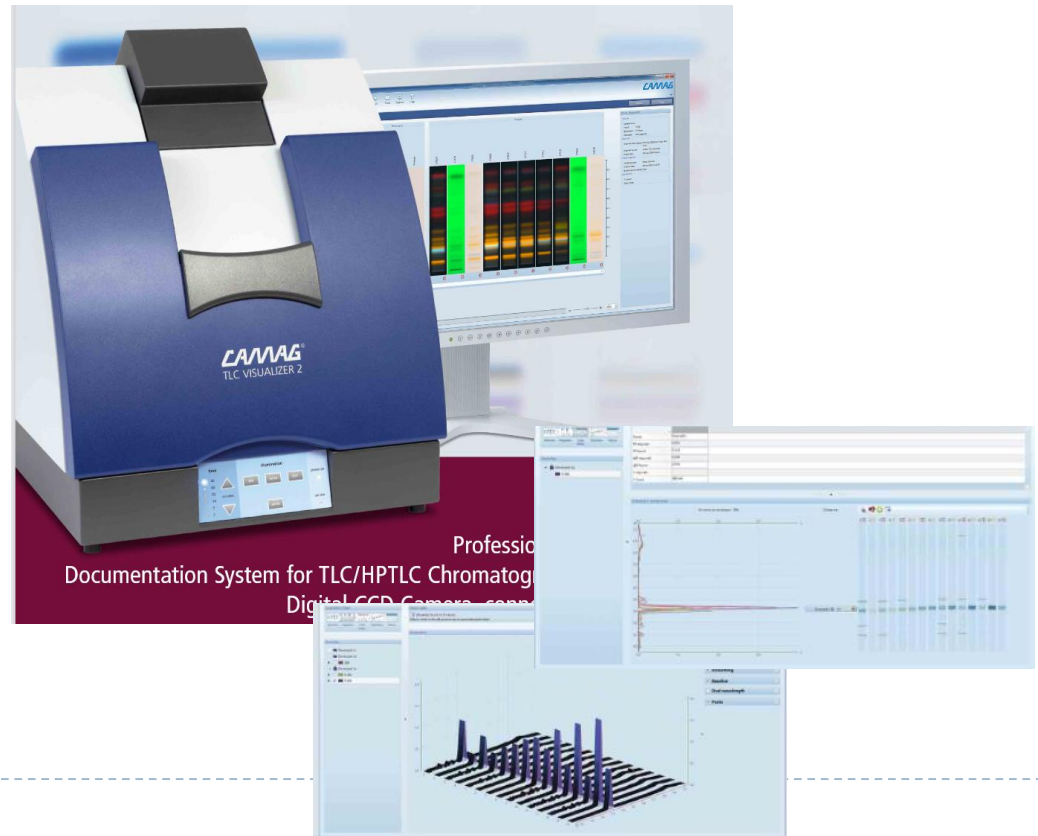
## ► Rozwijanie ze zmianą eluenta

## ► Dwukierunkowe prostopadłe rozwijanie chromatogramów



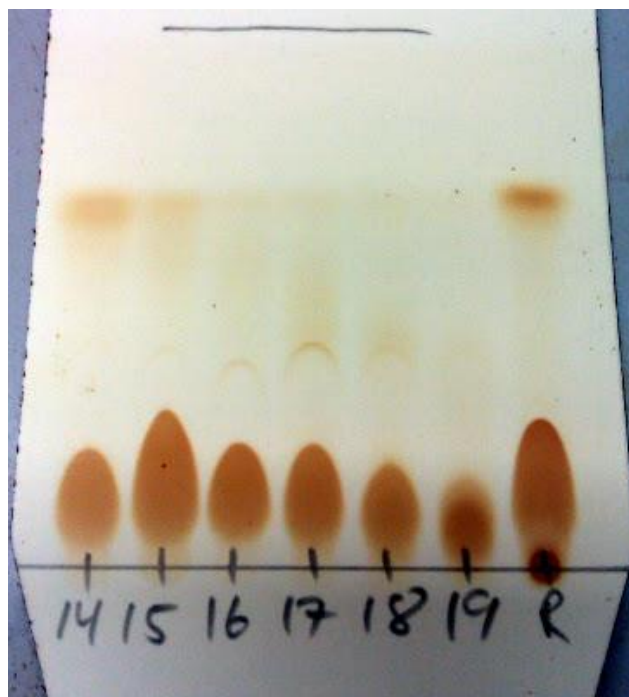
# Wizualizacja chromatogramu

- ▶ UV (254 nm, 366 nm)
- ▶ Wskaźniki fluoryzujące np.  $F_{254}$ ,  $F_{366}$ )



# Gdy brak wzbudzenia przez UV

- ▶ Komora jodowa (odczynniki uniwersalny) – plamki o żółtym lub brązowym zabarwieniu



# Inne metody wizualizacji (*postchromatographic reactions*)

---



- ▶ Opary HCl (reakcja z zaadsorbowanym związkiem objawia się pojawieniem się zabarwienia do czarnego)
- ▶ Opary lub łaźnia z kwasu fosfomolibdenowego (niebieskie do czarnych plam na żółtym tle)
- ▶ Mieszanina aldehydu anyżowego i kwasu siarkowego (barwi na kolorowo obszary, gdzie zaadsorbowany jest związek organiczny)
- ▶ Chlorki antymonu (barwią miejsca adsorpcji)
- ▶  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  reaguje z zaadsorbowanym związkiem. Po ogrzaniu widoczne są fluorescencyjne plamy
- ▶ **Zasadowy, wodny roztwór  $\text{KMnO}_4$**  (na fioletowym tle - brązowe plamki produktów utlenienia)
- ▶ Odczynniki specyficzne (reagujące z grupą funkcyjną)



# Odczynniki specyficzne (reagujące z grupą funkcyjną)

Aldehydes	2,4-Dinitrophenylhydrazine
Alcohols	Lead(IV) acetate dichlorofluorescein
Amines	Ninhydrin
Carboxylic groups	2,6-Dichlorophenyl indophenyl (Tillmans' reagent)
Halogen derivatives	Ammoniacal silver nitrate (Dedonder's/Tollens' or Zaffaroni's reagent)
Ketones	2,4-Dinitrophenylhydrazine
Nitro derivatives	Benzocyanide benzyltrimethylammonium h)
Peroxides	1-Naphthol/ $N^4$ -ethyl- $N^4$ -(2-methyl-sulfonam 1,4-phenylenediamine
Phenols	7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NI
Thiols	7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (N

Związek chemiczny	Układ wywołujący
Aldehydy alifatyczne	Chlorowodorek hydrazonu 3-metylo-2-benzotiazolinonu
Alkaloidy	Heksachloroplatynian potasu, ninhydrina
Antybiotyki	Ninhydrina
Aminokwasy	Ninhydrina
Węglowodany	Roztwór kwasu siarkowego w metanolu
Lipidy	Chlorek antymonu(III), błękit tymolowy, ninhydrina, rodamina B
Kwasy karboksylowe	Zieleń bromokrezolowa
Fenole	Chloranil, kwas fosfomolibdenowy
Terpeny	Kwas fosfomolibdenowy



# TLC zastosowania praktyczne

---

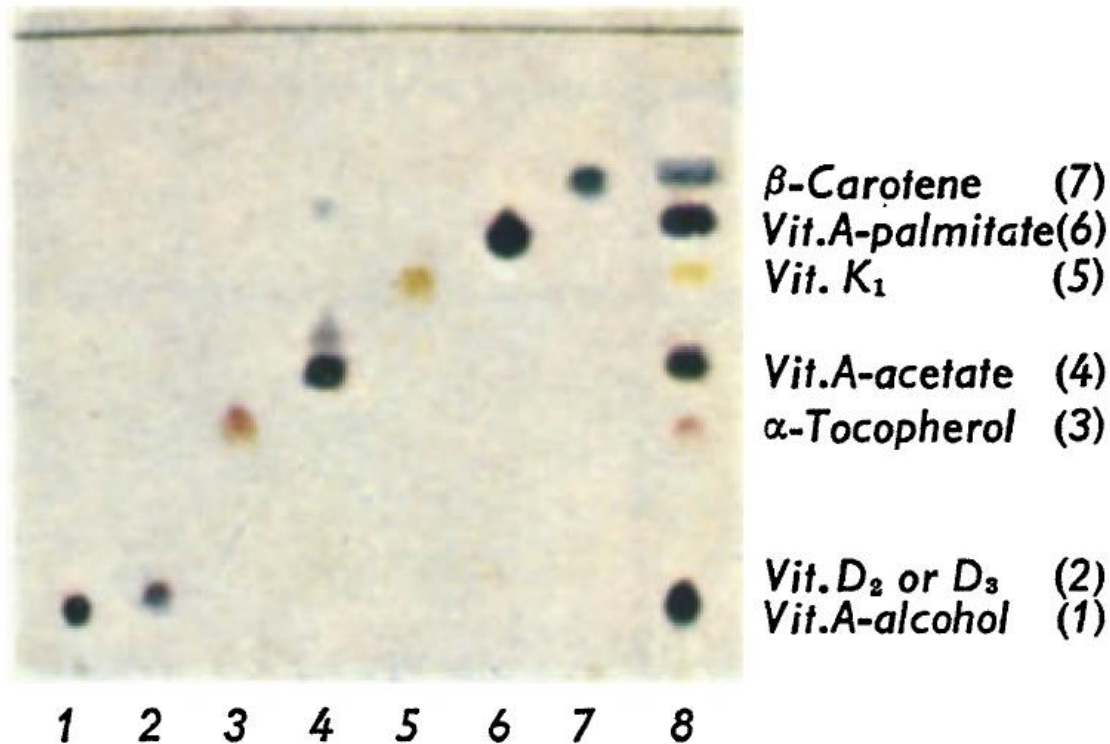


Fig. a. Separation of fat-soluble vitamins [8]. Solvent: cyclohexane-ether (80 + 20). Colours 30 sec after spraying with  $\text{SbCl}_5$ -reagent. 1, 4, 5, 6 and 7 all-trans compounds; 8 mixture 1—7; 20—40  $\mu\text{g}$  of each

---





# TLC zastosowania praktyczne

---

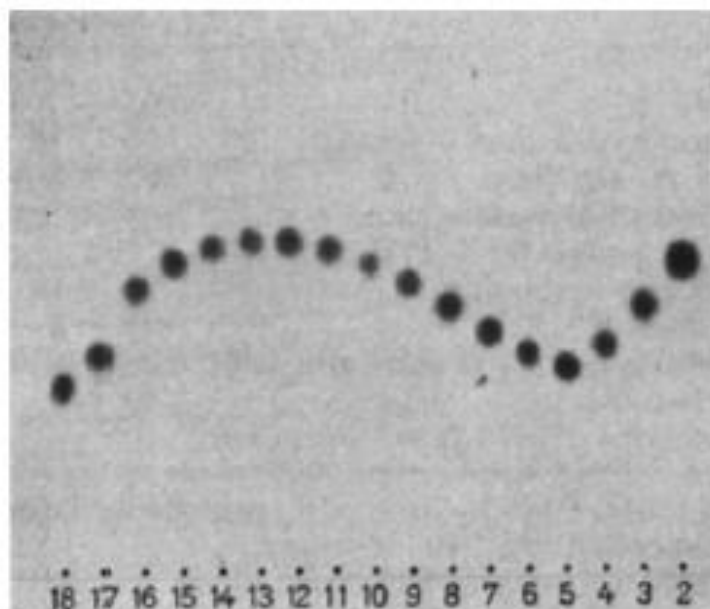


Fig. 138. Thin-layer chromatogram of the methyl esters of isomeric hydroxystearic acids [140]. Adsorbent: silica gel G; solvent: petrol ether (BP 60—70° C)-diethyl ether (50 + 50); time of run: 1 h; visualisation: carbonisation by heating with 50% sulphuric acid. The numbers 18 . . . . . 2 correspond to the position of the hydroxyl group in the esters



# Źródła

---

- ▶ E. Stahl, *Thin-Layer Chromatography*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1969
    - ▶ B. Fried, J. Sherma, *Thin-Layer Chromatography, fourth edition, revised and expanded*, Marcell Dekker, INC., New York, 2005
    - ▶ E. Matysik i wspóln., *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016,  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1813581>
    - ▶ J. J. Nash i wspóln., *Journal of Chemical Education*, **2001**, 78, 364
- 

