

Ćwiczenie 1: Wprowadzenie do chromatografii cienkowarstwowej. Identyfikacja składników mieszaniny aldehydów i ketonów za pomocą TLC.

Cel ćwiczenia: Zapoznanie z metodą chromatografii cienkowarstwowej. Określenie wpływu stężenia próbki oraz polarności eluentu na rozdział mieszaniny związków o różnej strukturze. Analiza jakościowa mieszaniny związków za pomocą chromatografii cienkowarstwowej.

Część teoretyczna: Podstawy chromatografii adsorpcyjnej, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii cienkowarstwowej. Wpływ rodzaju fazy stacjonarnej, fazy ruchomej oraz budowy analizowanego związku na proces elucji. Metody wizualizacji chromatogramów.

Wykonanie ćwiczenia:

Część I: Wprowadzenie do metody TLC.

1. Przygotowujemy 5 mL 20% roztworu 4-dimetyloaminobenzaldehydu w dichlorometanie.
2. Sporządzamy szereg rozcieńczeń powyższego roztworu: 2%, 0,2% oraz 0,02% w dichlorometanie, każdy po 5 mL.
3. Przygotowujemy 5 mL 2% roztworu 4-dietylaminobenzaldehydu w DMSO.
4. Nanosimy na jedną płytkę TLC cztery próbki w dichlorometanie, następnie płytkę suszymy. Na tę samą płytkę nanosimy roztwór w DMSO.
5. Płytkę rozwijamy w eterze izopropylowym, suszymy, a następnie wizualizujemy za pomocą par jodu.

Część II: Analiza wpływu polarności eluenta na R_f związku.

1. Na cztery płytki TLC nanosimy kapilarą roztwory aldehydów i ketonów, suszymy, a następnie wkładamy płytki do komory chromatograficznej zawierającej następujące eluenty:
dla płytki 1: octan etylu,
dla płytki 2: octan etylu : heksan (1:1) (v/v),
dla płytki 3: eter izopropylowy,
dla płytki 4: eter izopropylowy : heksan (1:1) (v/v).
2. Po rozwinięciu każdą płytkę suszymy, a następnie wywołujemy parami jodu (płytki 1, 2, 3) lub roztworem 2,4-dinitrofenylohydrazyny (płytki 4).
3. Na podstawie wartości R_f określamy: 1) wpływ polarności rozpuszczalnika na rozwinięcie chromatogramu oraz 2) powinowactwo określonych związków do fazy stacjonarnej.

Część III: Analiza jakościowa mieszaniny.

1. Na płytkę TLC nanosimy badaną mieszaninę aldehydów i ketonów oraz wzorce.
2. Na podstawie wniosków z pierwszej części ćwiczenia dobieramy eluent, rozwijamy, a następnie suszymy płytkę TLC.
3. Używając jednej z poznanych metod wizualizacji wywołujemy płytkę TLC, a następnie identyfikujemy składniki badanej mieszaniny poprzez porównanie wartości R_f .

Sprawozdanie: Wykaz sprzętu i odczynników (wraz ze wzorami strukturalnymi). Opis wykonanego ćwiczenia wraz z obserwacjami. Opis płytki TLC (R_f , sposób wizualizacji, kolory plamek itd.). Identyfikacja składników badanej mieszaniny. Określenie zależności pomiędzy strukturą związku chemicznego, a jego powinowactwem do fazy stacjonarnej. Wnioski.

Ćwiczenie 2: Wydzielenie lecytyn z żółtka jaja kurzego. Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej do analizy tłuszczów.

Cel ćwiczenia: Wykorzystanie charakterystycznych odczynników wywołujących chromatogramy do potwierdzenia lub wykluczenia obecności określonych grup funkcyjnych. Określenie budowy chemicznej wydzielonego związku.

Część teoretyczna: Tłuszcze, fosfolipidy, lecytyna - budowa chemiczna oraz reakcje charakterystyczne. Metody wizualizacji chromatogramów.

Wykonanie ćwiczenia:

Część I: Izolacja frakcji lipidowej.

1. Żółtko dokładnie oddzielamy od białka do zlewki, następnie dodajemy 75 mL mieszaniny eteru etylowego : etanol (5:1) (v/v) i odstawiamy na 10 min, mieszając co jakiś czas szklaną bagietką.
2. Roztwór sączymy przez sączek zwilżony mieszaniną eterowo-alkoholową do kolby okrągłodennej ze szlifem. Pozostałość na sączku dodatkowo przemywamy ok. 20 mL mieszaniny rozpuszczalników.
3. Rozpuszczalnik odparowujemy na wyparce, a do oleistej pozostałości dodajemy 10 mL eteru etylowego.

Część II: Ustalenie składu jakościowego próbki.

1. Na pięć płytek TLC nanosimy ekstrakt lipidowy, a następnie rozwijamy w układzie chloroform : metanol : woda (65:25:4) (v/v). Dla wszystkich płytek droga elucji powinna być ta sama.
2. Płytki suszymy, a następnie wywołujemy:
płytką 1: roztworem kwasu siarkowego w etanolu, następnie płytkę suszymy suszarką i kontrolujemy pojawienie się plamek,
płytką 2: parami jodu, kontrolując pojawienie się plamek,
płytką 3: odczynnikiem Dragendorffa, następnie płytkę suszymy suszarką i kontrolujemy pojawienie się plamek,
płytką 4: roztworem molibdenianu amonu, następnie płytkę umieszczamy na nasłonecznionej powierzchni, w razie potrzeby kontynuujemy w domu,
płytką 5: roztworem ninhydryny, następnie płytkę umieszczamy w suszarce i kontrolujemy pojawienie się plamek.

3. Na podstawie obecności na płytce TLC plamek o konkretnym zabarwieniu ustalamy obecność określonych grup funkcyjnych.

Sprawozdanie: Wykaz sprzętu i odczynników (wraz ze wzorami strukturalnymi). Opis wykonanego ćwiczenia wraz z obserwacjami. Opis płytki TLC (R_f , sposób wizualizacji, kolory plamek itd.). Identyfikacja składu jakościowego próbki. Wnioski.

Ćwiczenie 3: Wydzielenie barwników z papryki oraz ich rozdział za pomocą chromatografii kolumnowej.

Cel ćwiczenia: Zapoznanie z metodą chromatografii kolumnowej. Zastosowanie chromatografii kolumnowej do rozdziału mieszaniny barwników.

Część teoretyczna: Barwniki naturalne w papryce. Sposoby izolacji barwników z produktów naturalnych.

Wykonanie ćwiczenia:

Część I: Izolacja barwników z papryki.

1. 15 g sproszkowanej ostrej papryki umieszczamy w zlewce, zalewamy 200 mL dichlorometanu i mieszamy bagietką przez 15 min.
2. Sączymy zawiesinę na lejku przez sączek karbowany do kolby okrągłodennej ze szlifem.
3. Ok. 0,5 mL roztworu przenosimy do eppendorfy i pozostawiamy jako wzorzec, a resztę roztworu odparowujemy do sucha na wyparce.
4. Oleistą pozostałość rozpuszczamy w 10 mL chloroformu.

Część II: Rozdział mieszaniny barwników.

1. Na kolumnę chromatograficzną zawierającą 20 g żelu krzemionkowego наносimy ok. 2 mL rozdzielanej mieszaniny barwników.
2. Elucję prowadzimy za pomocą chloroformu, aż do zejścia z kolumny ostatniego barwnego pasma.
3. Określamy ilość barwnych frakcji i ich możliwy skład.

Sprawozdanie: Wykaz sprzętu i odczynników (wraz ze wzorami strukturalnymi). Opis wykonanego ćwiczenia wraz z obserwacjami. Określenie wydajności procesu chromatografowania. Wnioski.

Ćwiczenie 4: Wyodrębnienie *o*-nitroacetanilidu z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą chromatografii kolumnowej z użyciem elucji gradientowej.

Cel ćwiczenia: Wyodrębnienie *izomeru orto* z mieszaniny poreakcyjnej nitrowania acetanilidu za pomocą chromatografii kolumnowej.

Część teoretyczna: Podstawy chromatografii kolumnowej, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii kolumnowej grawitacyjnej. Sposoby elucji, ich dobór, wady i zalety.

Wykonanie ćwiczenia:

Część I: Przygotowanie kolumny, eluentów i próbki do rozdzielania.

1. Przygotujemy po 200 mL eluentów: I chloroform : octan etylu (10:1) (v/v); II chloroform : octan etylu (2:1) (v/v)
2. Kolumnę chromatograficzną przygotowujemy tak jak na poprzednich zajęciach.
3. 200 mg mieszaniny poreakcyjnej nitrowania acetanilidu rozpuszczamy w minimalnej ilości octanu etylu. Jeżeli mieszanina nie rozpuszcza się całkowicie, należy przesączyć ją przez watkę za pomocą pipety Pasteura. Ok. 0,5 mL roztworu przenosimy do eppendorfy i pozostawiamy jako wzorzec do TLC.
4. W celu śledzenia elucji *o*-nitroacetanilidu z kolumny, przygotowujemy dwie komory chromatograficzne dla dwóch eluentów oraz płytki TLC.

Część II: Elucja gradientowa.

1. Próbkę наносimy na kolumnę chromatograficzną i rozpoczynamy elucję z użyciem eluenta I.
2. Elucję prowadzimy do zejścia żółtego izomeru *orto* z kolumny.
3. Rozpoczynamy elucję eluentem II.
4. Elucję prowadzimy do momentu zejścia z kolumny wszystkich składników mieszaniny poreakcyjnej, co kontrolujemy za pomocą analizy TLC.
5. Wybrane frakcje zawierające oczyszczony *o*-nitroacetanilid przelewamy do zważonej kolby, odparowujemy eluent i ważymy.

Sprawozdanie: Wykaz sprzętu i odczynników (wraz ze wzorami strukturalnymi). Opis wykonanego ćwiczenia wraz z obserwacjami. Opis płytki TLC (R_f , sposób wizualizacji, itd.). Określenie wydajności procesu chromatografowania. Wnioski.