

Corso di Laboratorio di Chimica Analitica

TLC - Cromatografia su strato sottile

Prof. Salvatore Andini

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

Argomento selezionato: TLC: tecnica ed applicazioni

Destinatari: triennio di un Istituto Tecnico indirizzo Chimico

PREREQUISITI

- ✓ Concetti di base di *Chimica Generale* ;
- ✓ Nozioni di base della *Chimica Organica*;
- ✓ Conoscenza della *Cromatografia* quale tecnica di separazione e purificazione;
- ✓ Conoscenza dei quattro diversi tipi di cromatografie: Adsorbimento, scambio ionico, ripartizione e esclusione molecolare.

OBIETTIVI DIDATTICI COGNITIVI

- Apprendimento degli aspetti teorici sulla cromatografia TLC;
- Comprensione della TLC come tecnica, prevalentemente, analitica;
- Comprensione dei vari fattori che incidono sulla separazione dei costituenti di una miscela;
- Criteri per la scelta della fase mobile e della fase stazionaria.

OBIETTIVI DIDATTICI OPERATIVI

- Conoscenza dei materiali, della vetreria e delle apparecchiature da utilizzare durante una TLC;
- Acquisizione le abilità manuali per eseguire una TLC
- Imparare ad operare in laboratorio, consapevolmente ed attivamente, nel rispetto delle norme di sicurezza.

TALE UNITÀ DIDATTICA È PENSATA PER ESSERE SVOLTA DUE LEZIONI FRONTALI + UNA ESERCITAZIONE DI LABORATORIO

Argomenti :

1. Generalità sulla TLC;
2. Materiali impiegati: Supporto, Fase Stazionaria, Fase Mobile;
3. Come esprimere la qualità delle prestazioni di una TLC: Selettività, Efficienza, Risoluzione, Capacità;
4. Criteri per la scelta della Fase Mobile e della Fase Stazionaria;
5. Tecnica operativa della TLC: Deposizione del campione, Camera Cromatografica, Eluizione, Visualizzazione dei risultati (UV - Rivelazione con reagenti chimici);
6. Usi comuni della TLC;
7. Vantaggi e svantaggi della TLC;
8. **ESPERIENZA DI LABORATORIO:**

Analisi qualitativa di una miscela di amminoacidi

TLC

Thin Layer Chromatography - Cromatografia su strato sottile

tecnica prevalentemente analitica

separazione di composti contenuti in una miscela

purificazione

identificazione qualitativa e/o
quantitativa.

TCL in Fase Diretta

fase stazionaria polare (es. gel di silice)

fasi mobili non polari per svolgere l'eluizione.

**MECCANISMI DI
ADSORBIMENTO**

TLC in Fase Inversa

fase stazionaria modificata chimicamente (oppure imbevuta con sostanze non polari)

fase mobile relativamente polare

**MECCANISMI DI
RIPARTIZIONE.**

SUPPORTO

Vetro - Permette di visualizzare meglio le macchie dal dietro della lastra.

Plastica - Alcuni solventi organici possono intaccare tale tipo di lastra.

Alluminio - Tali lastre non possono essere usate in ambienti alcalini o acidi per acidi minerali.



Analitica: 250 μ m

Preparativa: 50-2000 μ m

FASE STAZIONARIA

Fase stazionarie solide

L'interazione (adsorbimento) di questi materiali con la fase mobile dipende dalla geometria delle particelle che le costituiscono.

L'attività: esprime la capacità di adsorbire le sostanze in termini quantitativi, ma più spesso è riferita semplicemente all'entità dell'adsorbimento.

Fase stazionarie liquide

Impiegate nella cromatografia a fasi inverse.

sostegno inerte (lastrine di gel di silice G oppure Kieselguhr) rivestito di un liquido più o meno lipofilo (idrocarburi, oli e grassi vegetali, glicoli, siliconi...)

Gel di silice

È costituito da acido silicico (H_4SiO_4) amorfo altamente poroso ottenuto, sotto forma di particelle dure e leggermente opache, trattando il vetro solubile, silicato di sodio ($2\text{Na}_2\text{O SiO}_2$), con acido solforico. Il gel ha una struttura amorfa simile a quella del vetro.

Ossidi di alluminio o allumina

allumina di tipo basico

l'attività dipende dalla quantità di acqua presente in esso;

Cellulosa in polvere

evoluzione della cromatografia su carta

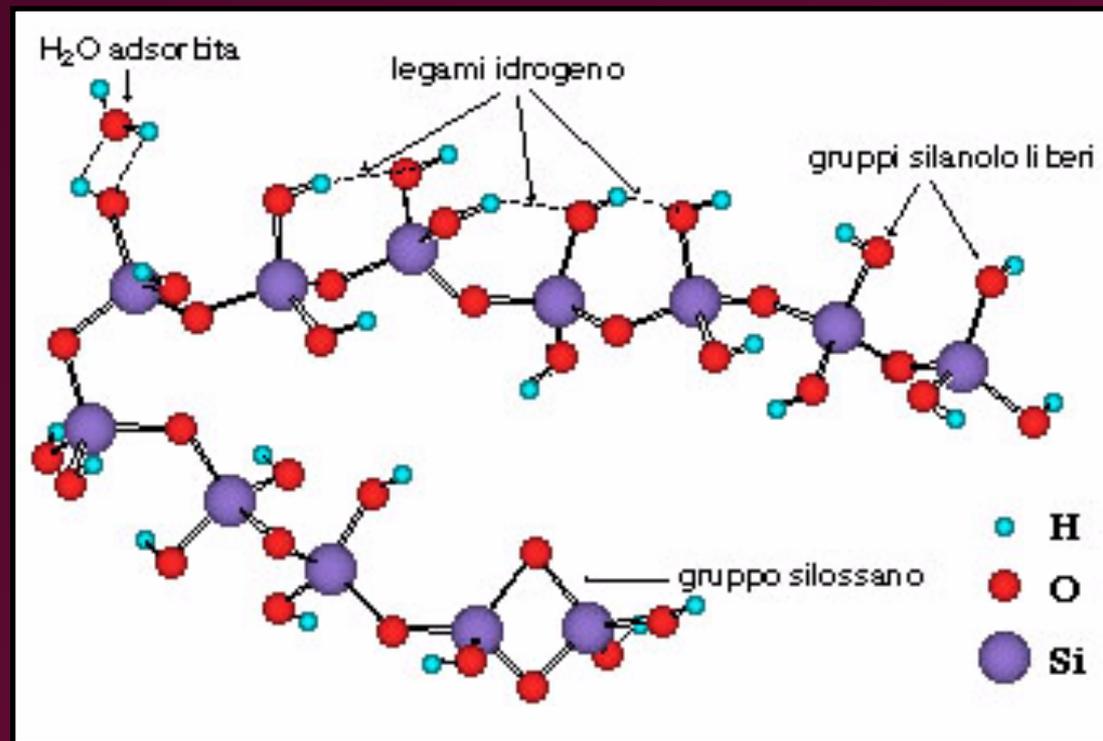
tempi di esecuzione più brevi

la preparazione di strati più omogenei

minore diffusione delle macchie;

Kieselguhr

acido silicico amorfo di origine fossile (terra di diatomee);



FASE MOBILE

La polarità è fondamentale per la scelta dell'eluente è da essa che dipende l'entità del trascinarsi delle sostanze lungo la lastrina in una TLC

potere eluente: capacità relativa dei vari solventi di far muovere una sostanza su una fase stazionaria

serie eluotropa: Il potere eluente dei più comuni solventi organici, puri ed in miscele, ordinato secondo *polarità crescente*

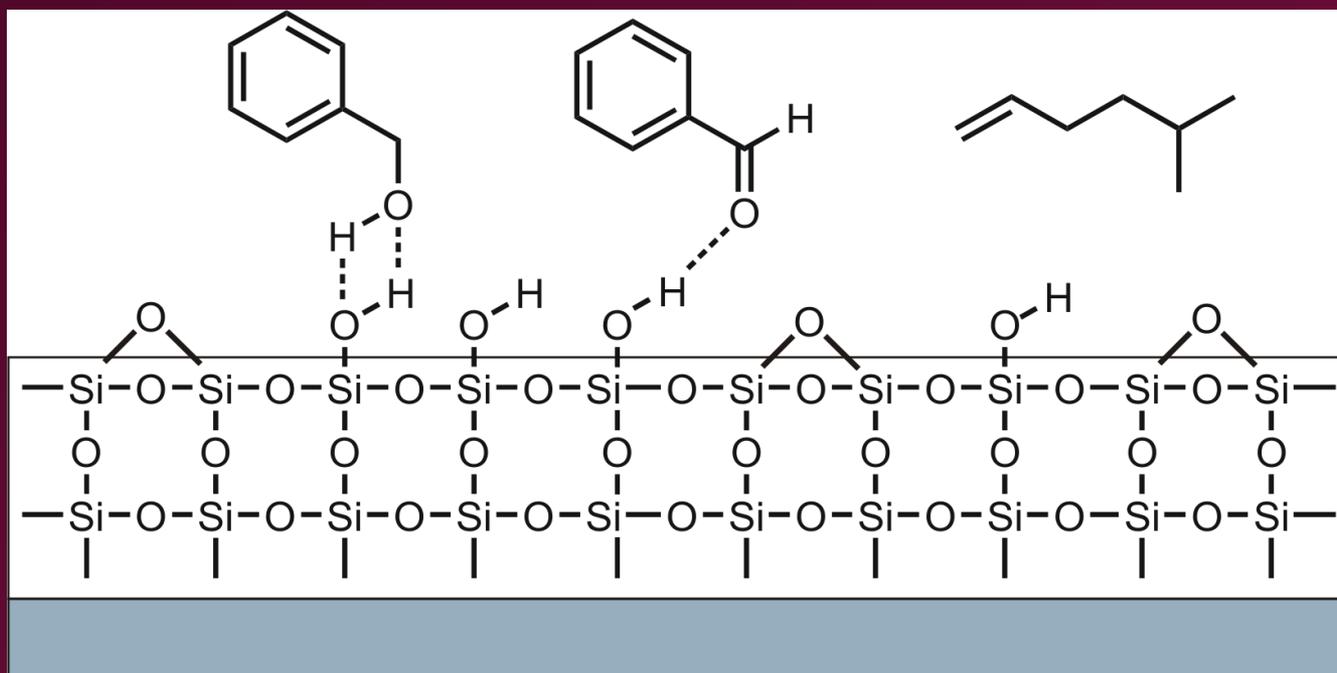


Miscele o solventi puri	composizione
Benzene	
Benzene/cloroformio	1+1
Cloroformio	
Cicloesano/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/acetone	95+5
Benzene/acetone	9+1
Benzene/acetato d'etile	8+2
Cloroformio/dietiletere	9+1
Benzene/metanolo	95+5
Benzene/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	8+2
Benzene/acetone	8+2
Cloroformio/metanolo	99+1
Benzene/metanolo	9+1
Cloroformio/acetone	85+15
Benzene/dietiletere	4+6
Benzene/acetato di etile	1+1
Cloroformio/dietiletere	6+4
Cicloesano/acetato d'etile	2+8
Acetato di butile	
Cloroformio/metanolo	95+5
Cloroformio/acetone	7+3
Benzene/acetato di etile	3+7
Acetato di butile/metanolo	99+1

serie eluotropa su *gel di silice*.

Quando la fase mobile sale lungo la silice, i composti in essa disciolti sono in grado di interagire con i gruppi polari della silice. Le interazioni in gioco sono principalmente **dipolo-dipolo** e formazione di **legami ad idrogeno** e dunque quanti più polari sono i composti, tanto più verranno trattenuti dalla fase stazionaria.

Fase Mobile



SCELTA DELLA FASE MOBILE E DELLA FASE STAZIONARIA

1. Le due fasi devono necessariamente interferire tra loro il meno possibile;
2. In qualche misura i componenti della miscela da separare devono interagire con le due fasi;
3. Il campione deve essere solubile nell'eluente;
4. Con le comuni fasi stazionarie solide gli idrocarburi non sono affatto adsorbiti e sono i primi ad essere eluiti, l'affinità per tali tipi di fasi stazionarie decresce nel seguente ordine: acidi, alcoli, ammine, tioli, aldeidi, chetoni, esteri, eteri, alcheni, alcani;
5. Per la scelta dell'eluente si fa riferimento alla serie eluotropa;
6. L'attività dell'adsorbente è determinante per la cromatografia in fase diretta, mentre, per quella in fase inversa sono determinanti anche piccole differenze nella polarità del materiale scelto.
7. $R_f \leq 0,5$; $\Delta R_f \geq 0,1$; il ΔR_f tra due componenti della miscela deve essere il più alto possibile.

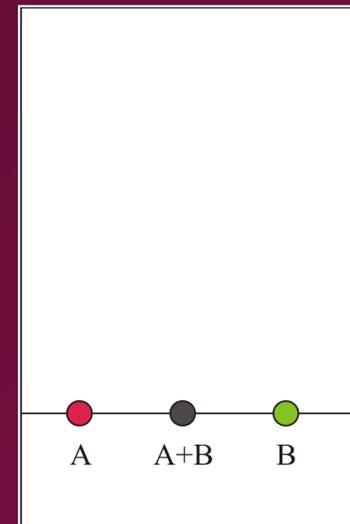
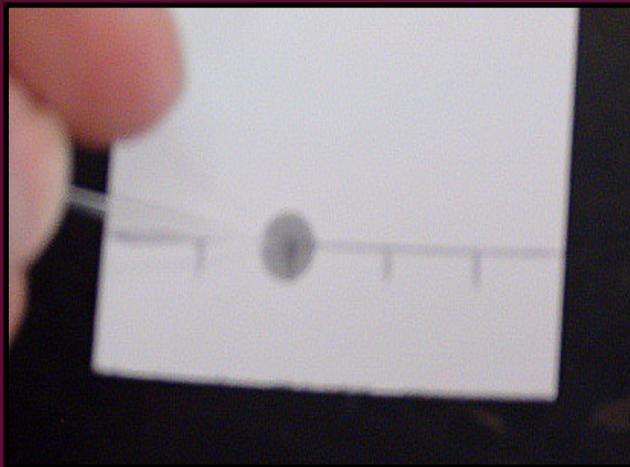
Come operiamo?

Deposizione del campione

Il campione deve essere deposto alla base della lastrina, con l'aiuto di un capillare come macchia (deposizione a goccia) o come striscia (deposizione lineare), nel modo più compatto possibile.

Il campione deve essere deposto senza intaccare lo strato di fase stazionaria.

Se il campione è molto diluito, occorre depositare il campione più volte e perciò è utile asciugare la macchia con un phon in modo da evitare un allargamento eccessivo.



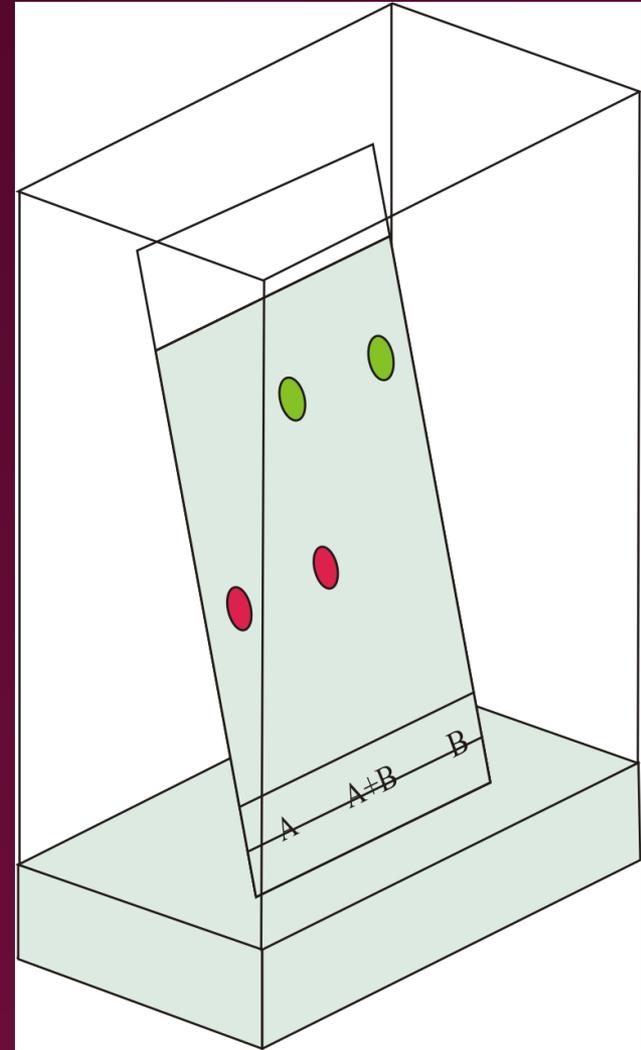
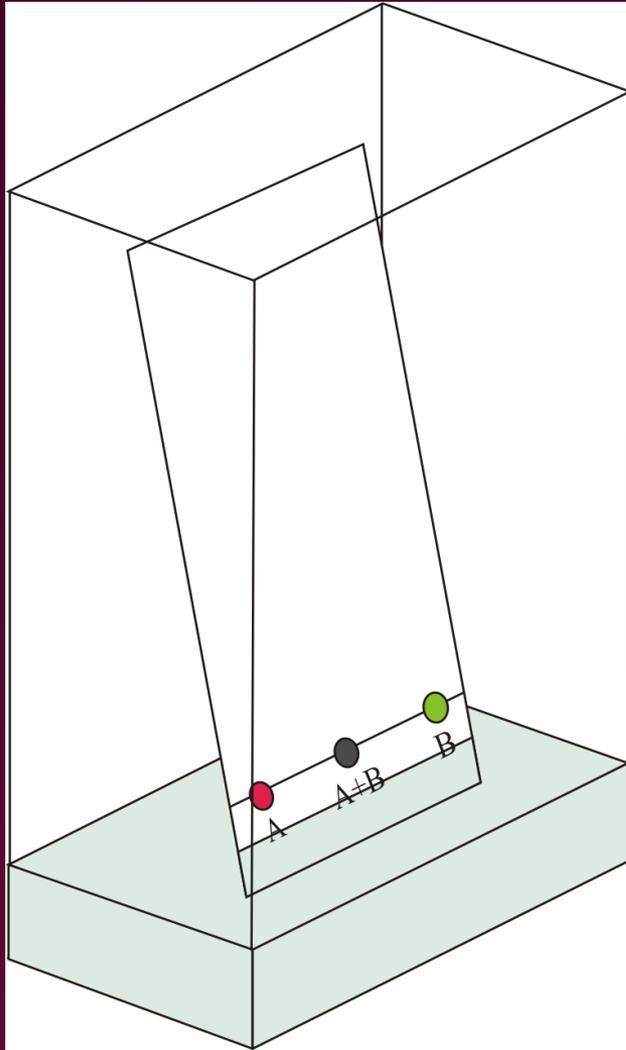
Camera cromatografica

Recipiente, generalmente, di vetro di forma e volume opportuno dotato di un coperchio a tenuta;

L'eluente deve essere versato nel recipiente, in modo da raggiungere il livello di 0,5-1 cm; poi si chiude il coperchio e si lascia a condizionare;

Eluizione

Lo sviluppo del cromatogramma è uno sviluppo ascendente



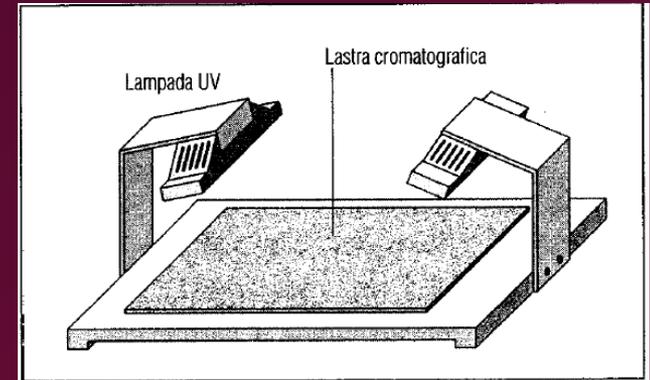
Lo sviluppo ascendente della lastrina è quello più comunemente impiegato, l'eluente migra verso l'alto attraverso uno strato di fase stazionaria per capillarità

- Quando lo sviluppo è completato estrarre la lastra dalla camera cromatorafica;
- Segnare il fronte del solvente;
- Asciugare la lastrina all'aria o con l'aiuto di un phon, se le sostanze non sono termolabili si può porre il tutto in una stufa per qualche minuto a 100-105°C;
- Cerchiare con la matita le macchie visibili...

Visualizzazione dei risultati

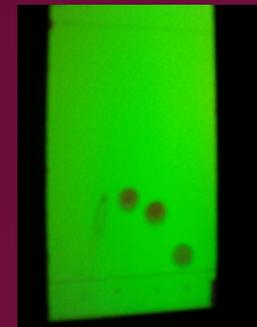
Rivelazione con luce UV

Presenza di cromofori → lampada UV (254 e 366 nm)



Se invece le sostanze da rivelare non possiedono cromofori, si può usare una lastra la cui fase stazionaria, prima o dopo l'eluizione, viene impregnata di una sostanza fluorescente ai raggi UV. Illuminando la lastra con le apposite lampade, si osservano delle macchie scure su sfondo fluorescente.

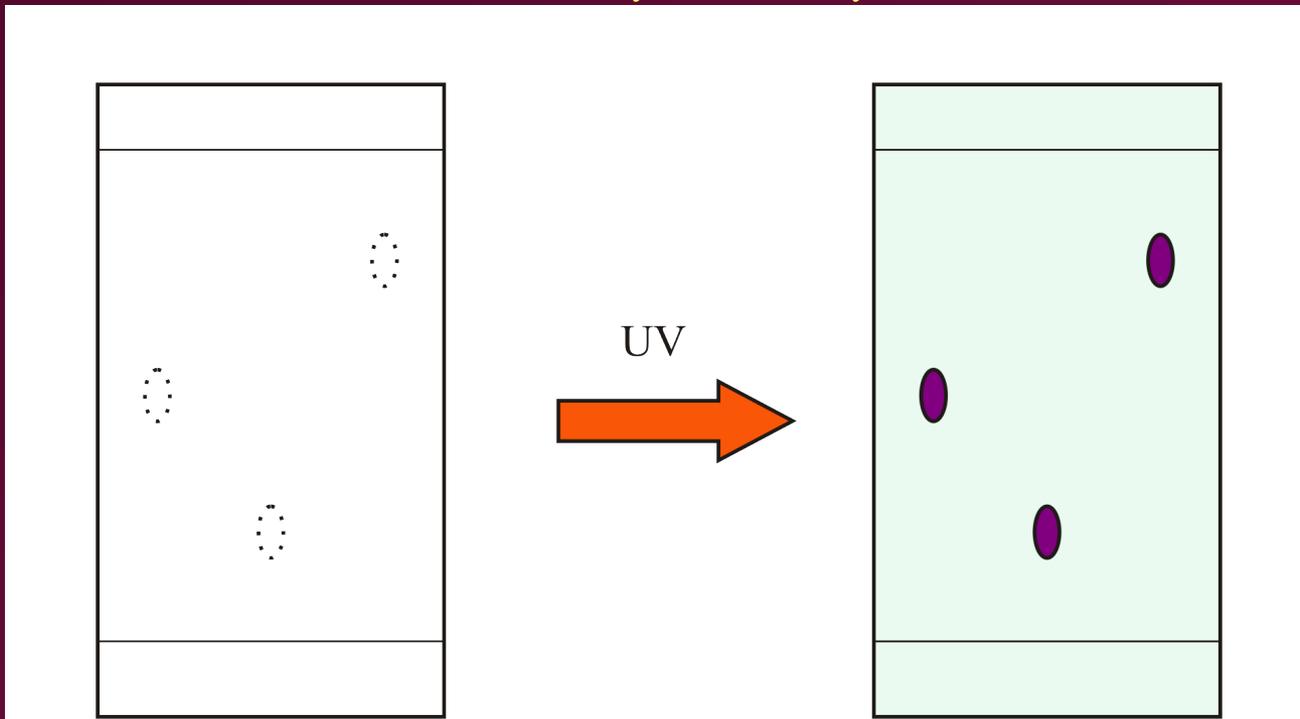
Un indicatore di fluorescenza molto usato è un silicato di zinco e magnesio attivato che a 254 nm dà una fluorescenza verde.



La silice delle lastre per TLC F_{254} è imbevuta di Fluoresceina, una sostanza in grado di assorbire la luce ultravioletta a 254 nm e riemettere luce per fluorescenza.

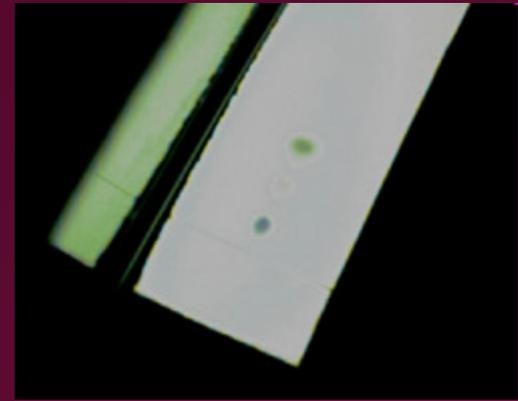
Quando la piastrina è esposta alla luce UV, appare di una intensa colorazione verde.

Quanto sulla lastrina sono presenti dei composti in grado di assorbire la radiazione UV, ma non di riemettere luce per fluorescenza, in corrispondenza delle macchie dei composti compare una colorazione viola.

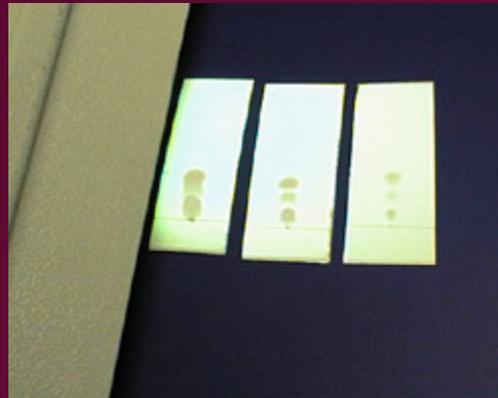




Lampada UV



Rivelazione di due composti

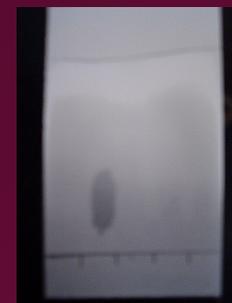


Tre deposizioni a concentrazione differente. Una elevata concentrazione diminuisce l'efficienza della separazione

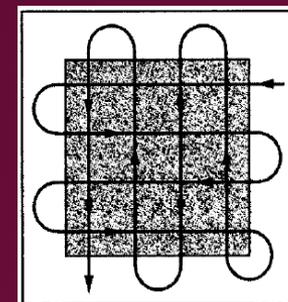
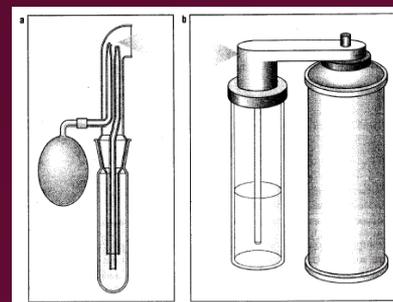
Rivelazione con reagenti chimici

-I vapori di iodio sono un agente di rivelazione di uso generale, non specifico, adatto per la maggior parte dei composti organici.

La posizione delle macchie va segnalata non appena si estrae la lastrina dalla vasca, poiché lo iodio evapora rapidamente per esposizione all'aria e le macchie scompaiono.



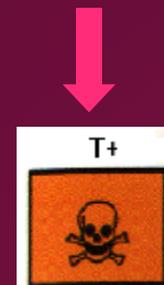
-Possiamo bruciare le sostanze organiche spruzzando acido solforico ed anidride cromica.



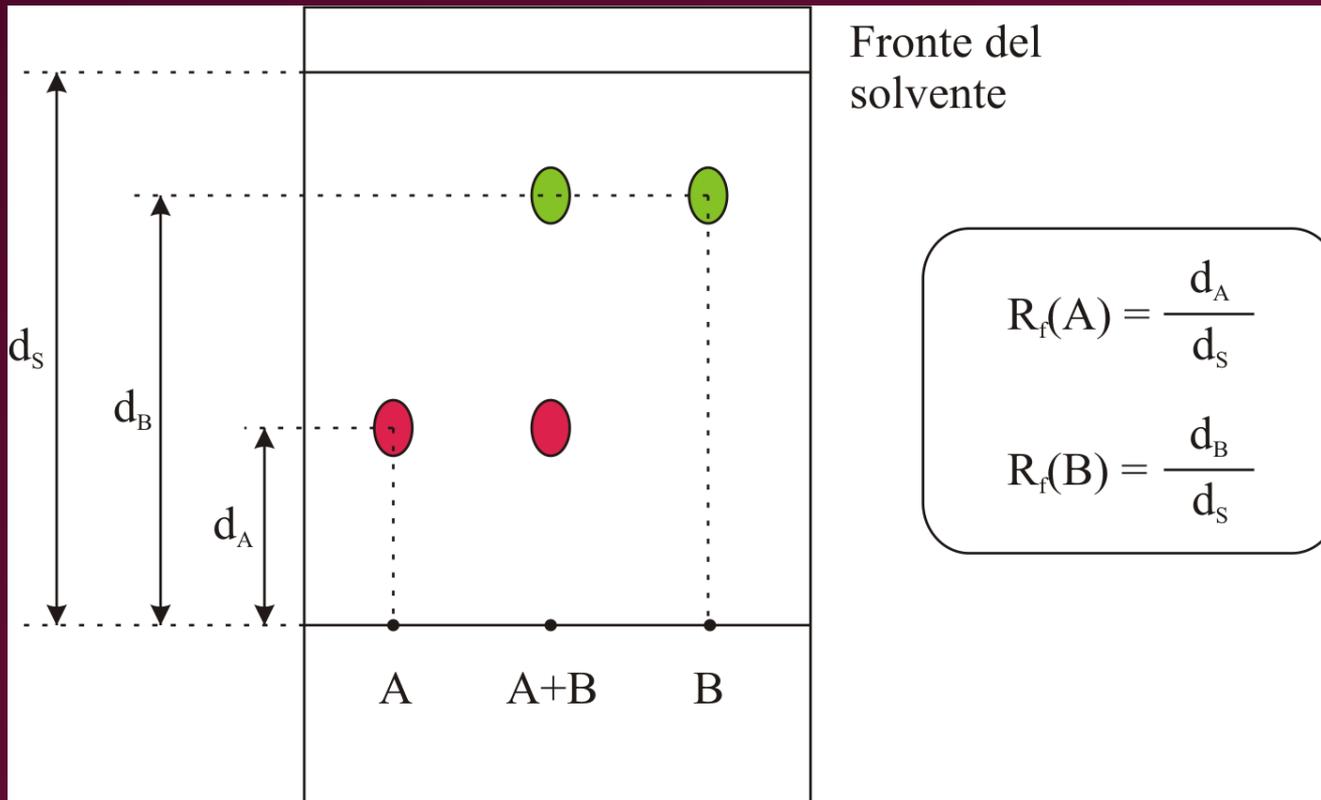
Esempi di soluzioni coloranti di uso generale per in TLC

REAGENTI	PREPARAZIONE	UTILIZZO
KMnO ₄ in H ₂ SO ₄	Miscelare 0,5 g di permanganato con 15 mL di H ₂ SO ₄ concentrato	Per usi generali
Ninidrina	Aggiungere 3 mL di acido acetico glaciale a 100 ml di una soluzione allo 0,3% di ninidrina in n-butanol. Nebulizzare e scaldare la lastrina a 100°C, finché si forma il colore.	Adatto per amminoacidi, ammine e amminozuccheri.
Verde di bromocresolo	Soluzione allo 0,04% in etanol	Per acidi e basi organiche
2',7'-diclorofluoresceina	Soluzione allo 0,2% in etanol	Per lipidi saturi e insaturi
Cloruro di ferro(III)	Soluzione al 2,7% in HCl 2M	Per fenoli e acidi fenolici
Fluorescamina	Soluzione allo 0,05% in acetone	Per amminoacidi primari, ammine, peptici e proteine
Iodoplatinato di potassio	Soluzione allo 0,15% di iodoplatinato di potassio e al 3% di KI in HCl diluito.	Per alcaloidi, ammine e composti azotati organici.
Acido fosfomolibdico	Soluzione al 10% in etanol.	Per lipidi, steroli, lattoni, composti fenolici, chetoacidi, idrossiacidi, acidi grassi insaturi.

ATTENZIONE A LAVORARE SOTTO CAPP A E CON PROTEZIONI IN QUANTO IL PIÙ DELLE VOLTE SI TRATTA DI SOSTANZE ALTAMENTE TOSSICHE E NOCIVE.



Una volta individuate tutte le macchie di sostanza, esse possono essere caratterizzate dal **fattore di ritardo (R_f)**, che esprime l'affinità relativa della sostanza per il sistema fase mobile/fase stazionaria:

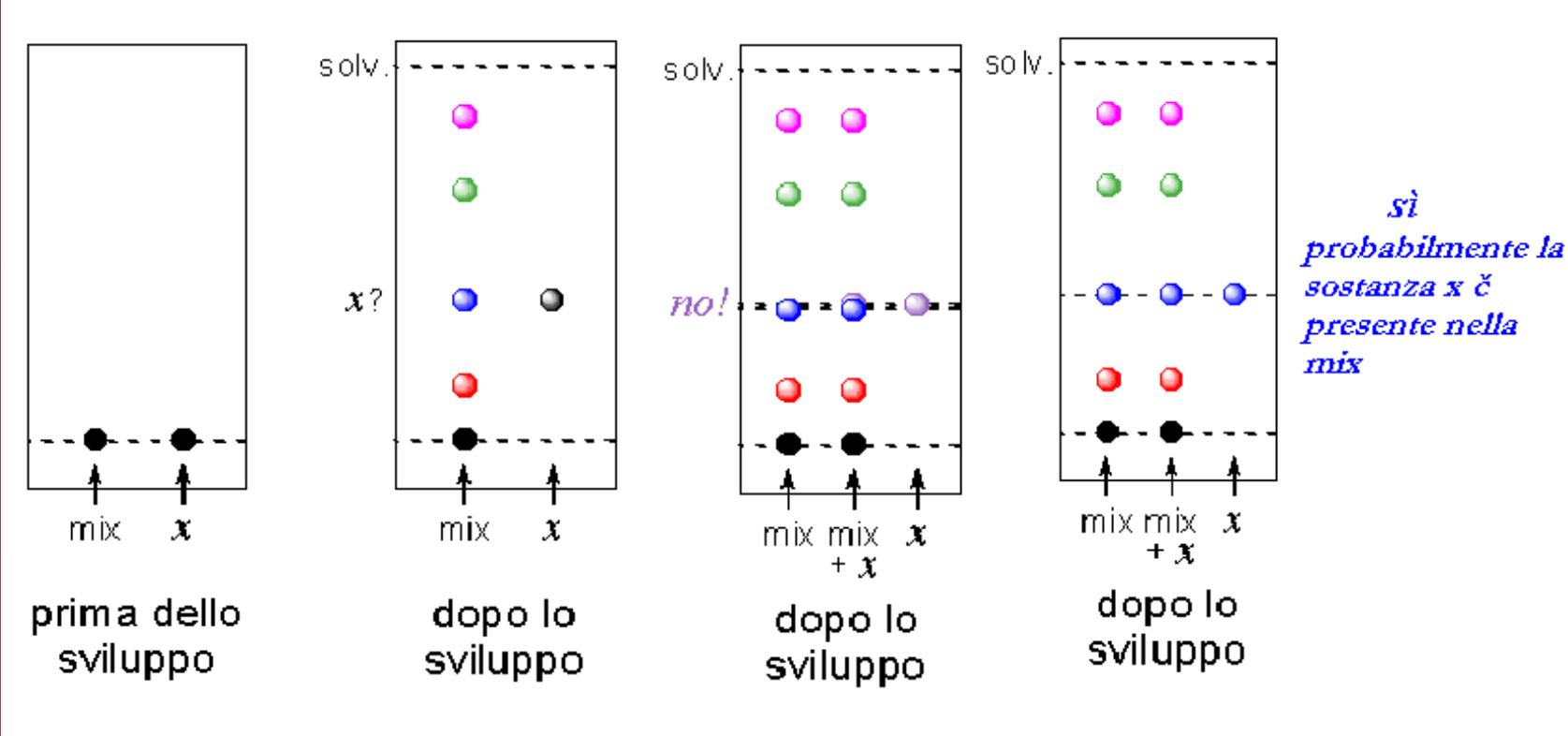


Per un dato sistema cromatografico, il fattore di ritenzione di una sostanza è una costante caratteristica della stessa in condizioni sperimentali riproducibili!!!

Il fattore di ritenzione dipende da:

- natura chimica e attività della fase stazionaria;
- struttura dei pori presenti nei granuli della fase stazionaria;
- spessore dello strato;
- temperatura e grado di saturazione dell'ambiente;
- composizione della fase mobile.

- I valori di R_f possono essere usati per identificare una sostanza per confronto con degli standard;
- Il valore di R_f non è una costante fisica ed il confronto DEVE ESSERE FATTO SOLO tra macchie presenti sulla stessa lastrina e sviluppate nello stesso modo e contemporaneamente;
- Due sostanze che hanno lo stesso valore di R_f , nelle medesime condizioni cromatografiche, potrebbero essere identiche; invece quelle che hanno diversi valori di R_f sicuramente non lo sono!



LA QUALITÀ DELLE PRESTAZIONI DI UNA TLC :

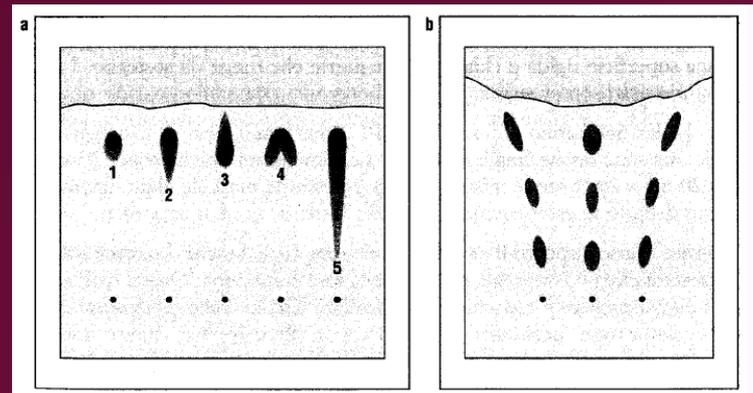
SELETTIVITÀ: è una misura della differenziazione del comportamento degli analiti nel sistema cromatografico

Fattore di ritenzione o di ritardo (R_f) come:

$$R_f = \frac{D_i}{D_{el}}$$

dove D_{el} e D_i sono rispettivamente la distanza percorsa dall'eluente e dal componente i-esimo della miscela.

CAPACITÀ: massima quantità di campione che può essere utilmente caricato sulla lastrina.



EFFICIENZA: attitudine del sistema a conservare compatta la macchia durante la corsa cromatografia; si quantifica con il cosiddetto numero di piatti teorici N.

Un **piatto teorico** è la più piccola zona adiacente in cui il soluto raggiunge un equilibrio tra fase mobile e stazionaria.

Numero di piatti teorici (N) :

$$N = 16 \left(\frac{D_i}{w_i} \right)^2 = 16 \left(\frac{R_f \cdot D_{el}}{w_i} \right)^2$$

w_i : larghezza della macchia del composto i-esimo.

Maggiore è N maggiore sarà la risoluzione e, quindi, tanto più compatte saranno le macchie al termine dell' eluizione.

L'efficienza dipende da:

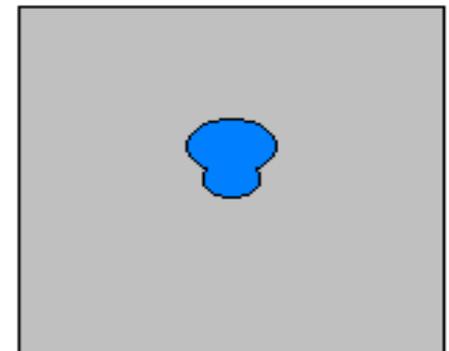
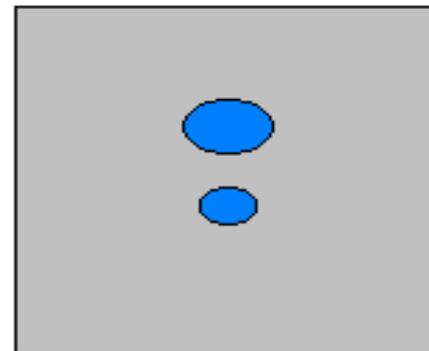
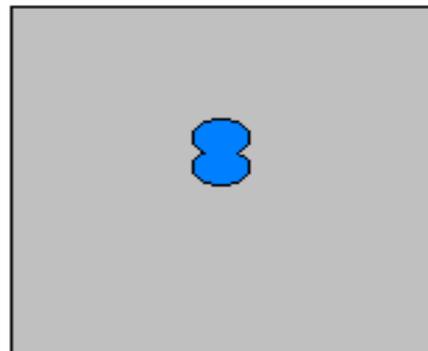
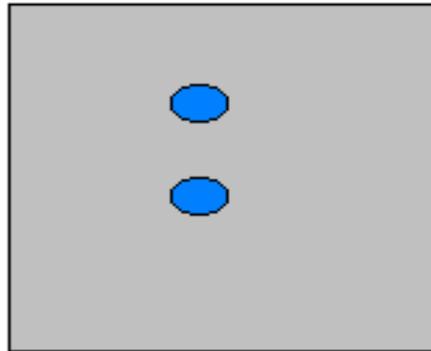
- Granulometria: deve essere la più piccola possibile, pur consentendo velocità di flusso dell'eluente non troppo basse;
- Distribuzione granulometrica: deve essere la più piccola possibile;
- Qualità dell'impaccamento: lo strato sottile deve essere il più uniforme e omogeneo possibile;
- Geometria delle particelle: le particelle devono essere il più possibile sferiche.

RISOLUZIONE (R_s): attitudine del sistema a fornire alla fine della corsa cromatografica delle macchie ben distanziate.

selettività
efficienza  risoluzione

$$R_s = \frac{d}{\frac{(w_A + w_B)}{2}}$$

dove: d è la distanza tra i centri delle macchie A e B, mentre; w_A e w_B sono il diametro della macchia A e di quella B.



Selettività Elevata
Efficienza Elevata
Risoluzione Elevata

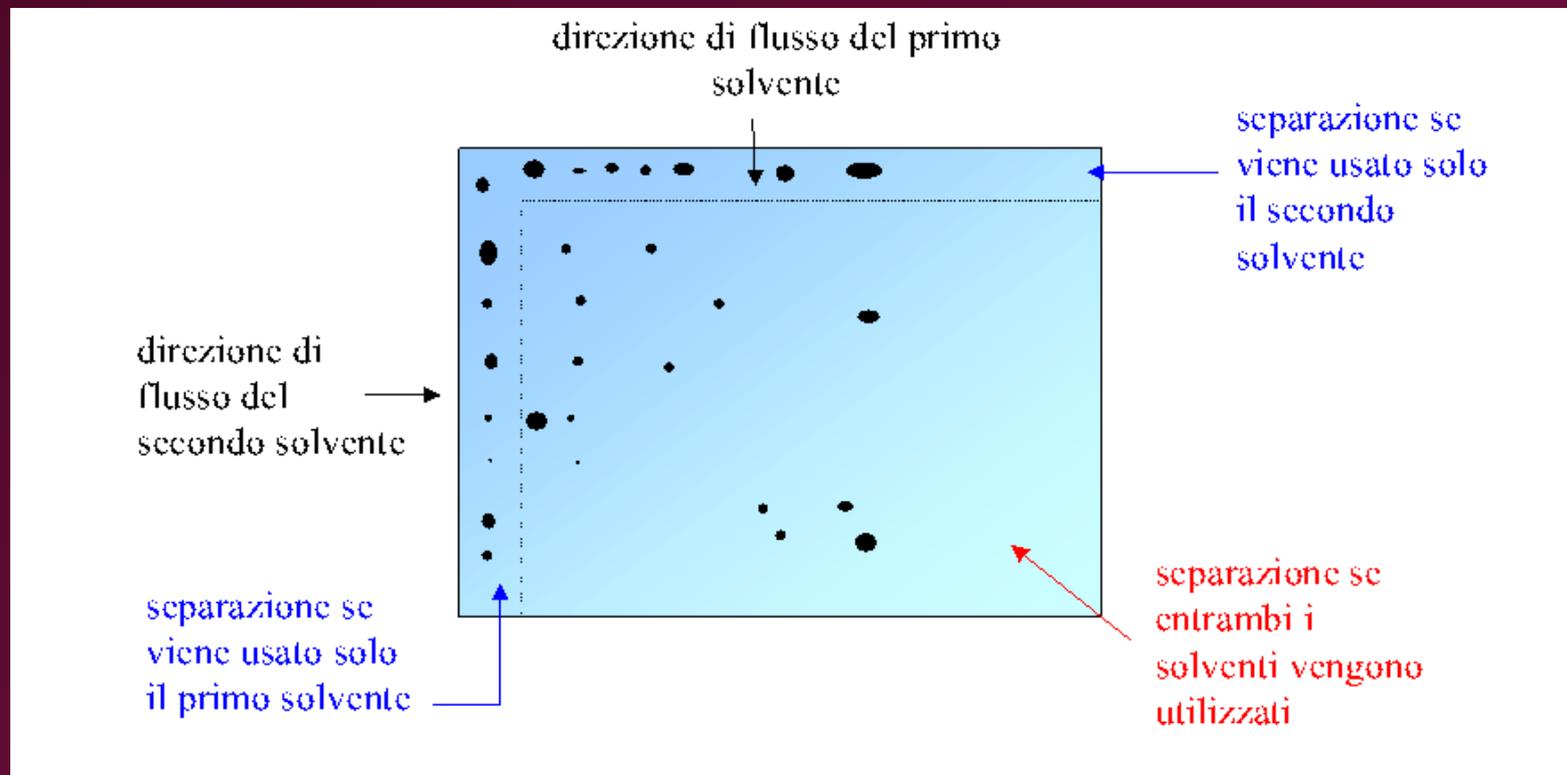
Bassa
Elevata
Insufficiente

Elevata
Bassa
Buona

Bassa
Bassa
Insufficiente

TLC bidimensionale

Il materiale da cromatografare è posto su un angolo della lastra come singola macchia, successivamente viene sviluppato in una direzione e dopo essiccamento è sviluppato con un altro eluente in una direzione perpendicolare alla prima



Usi più comuni della TLC

- ✓ Per determinare il numero di componenti una miscela;
- ✓ Per determinare l'identità di sostanze;
- ✓ Per la messa appunto delle condizioni più adatte allo svolgimento di una cromatografia su colonna;
- ✓ Per controllare il progresso di una reazione chimica;
- ✓ Per determinare l'efficacia di una purificazione;
- ✓ Per monitorare l'andamento di una cromatografia su colonna;
- ✓ Per svolgere analisi microanalitiche.

Vantaggi

- ✓ Semplicità di esecuzione
- ✓ Rapidità d'esecuzione
- ✓ Tecnica molto economica
- ✓ Richiede minime quantità di sostanza
- ✓ Tecnica sensibile
- ✓ Le lastre possono essere trattate con una varietà di sostanze chimiche che impartiscono alla fase stazionaria un'ampia gamma di proprietà

Svantaggi

Numero di piatti teorici limitato

ESERCITAZIONE DI LABORATORIO

Analisi qualitativa di una miscela di amminoacidi

ESERCITAZIONE - Analisi qualitativa di una miscela di amminoacidi

METODO

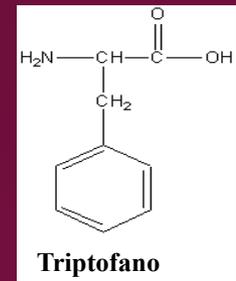
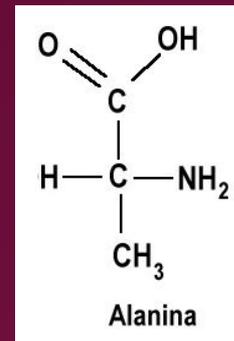
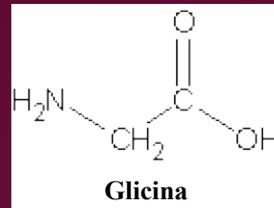
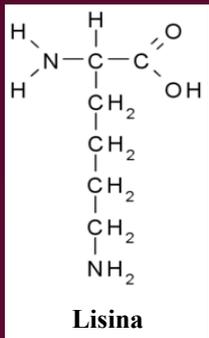
Cromatografia monodimensionale ascendente. Una miscela di amminoacidi è separata su lastrina a gel di silice usando alcool butilico - acqua - acido acetico come solvente di sviluppo e ninidrina come agente localizzatore.

SOLUZIONI

Soluzioni a titolo noto di amminoacidi:

1. Alanina 1 mg/cm³ di soluzione alcolica 0,5 M HCl
2. Lisina 1 mg/cm³ di soluzione alcolica 0,5 M HCl
3. Triptofano 1 mg/cm³ di soluzione alcolica 0,5 M HCl
4. Glicina 1 mg/cm³ di soluzione alcolica 0,5 M HCl

Soluzione che contiene una miscela incognita di amminoacidi



PROCEDIMENTO

- ✓ Segnare con la matita una linea a 1,5 cm dal bordo inferiore della lastrina.
- ✓ Depositare circa 5 microlitri di miscela incognita in porzioni.
- ✓ Depositare circa 5 microlitri di ciascuna soluzione di amminoacido a titolo noto, a fianco del campione incognito a distanza di 1 cm.
- ✓ Asciugare con il phon.
- ✓ Sviluppare il cromatogramma ponendo la lastrina nel solvente (alcool butilico / acqua / acido acetico nel rapporto 4:2:1) per 30 minuti circa.
- ✓ Asciugare la lastrina e spruzzare con soluzione di ninidrina.
- ✓ Scaldare cautamente per parecchi minuti fino a comparsa delle macchie colorate (brune per Glicina e violette per Alanina, Lisina e Triptofano).

1. Valutare per ciascun componente il fattore di ritardo (R_f) e il numero di piatti teorici (N).

2. Risalire alla composizione del campione incognito.

GESTIONE DEI RIFIUTI

- Versare il solvente di scarto dei campioni TLC e quelli contenuti nelle camere cromatografiche nei contenitore "Rifiuto Solventi Organici (TLC)".
- Porre tutti i capillari usati per la TLC nel contenitore "Vetri rotti".
- Le camere cromatografiche per la TLC, svuotate del solvente, devono essere lasciate con il coperchio aperto sotto cappa e quando asciutte devono essere riposte nel relativo scatolo. Non lavarle ne con acqua, ne con acetone e neanche con sapone!