

# Laboratorio di Preparazioni Estrattive

Esercitazione di Laboratorio  
Separazione mediante ripartizione  
e  
Cromatografia su strato sottile



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Cromatografia TLC e  
Ripartizione

## CROMATOGRAFIA

La cromatografia è una tecnica analitica per separare specifiche sostanze in una miscela

E' una tecnica efficace per separare componenti di miscele complesse.

Le separazioni si basano su interazioni fisico-chimiche a livello molecolare tra il supporto cromatografico, le sostanze da separare e taluni componenti del solvente mobile.

Le separazioni avvengono in una colonna (*colonna cromatografica*) o su una lastra (*TLC*)

# IMPIEGHI DELLA CROMATOGRAFIA

Le applicazioni della cromatografia interessano un vasto campo della chimica, dall'inorganica all'organica, sia di sintesi che naturale.

In particolare la cromatografia è una tecnica indispensabile nella chimica di sintesi e delle sostanze organiche naturali, per isolare e purificare i componenti di miscele di varia natura, e in campo biologico per purificare polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, virus e anche cellule.

## CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (TLC)



La **cromatografia su strato sottile** o **TLC**, è una tecnica cromatografica di semplice preparazione; questo la rende particolarmente adatta per l'esecuzione di valutazioni qualitative o semi-quantitative.

Come tutte le cromatografie, si basa sulla diversa separazione di diverse sostanze tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con esse.

## PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO

Tutti i componenti della miscela sono depositati sulla lastra (fase stazionaria) e sono trasportati (eluiti) da un solvente (fase mobile) che si muove.

Nella TLC l'eluente si muove dal basso verso l'alto attraverso un strato sottile per capillarità.

I composti si muovono con diversa velocità, in base alla diversa affinità della sostanza analizzata, verso un eluente e verso la fase stazionaria.

Si ha separazione poiché i composti più affini all'eluente si muovono di più sulla lastra, mentre quelli più affini alla fase stazionaria sono più trattenuti.

## FASE STAZIONARIA

La fase stazionaria è generalmente uno strato dallo spessore uniforme di circa 1 mm di materiale adsorbente, depositato su una lastra di vetro o plastica. Lo spessore può essere anche molto inferiore se il supporto è di alluminio.

Il materiale adsorbente può essere gel di silice, allumina, cellulosa in polvere o polvere di diatomee, tutti materiali polari.

## 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.



Fase stazionaria (0.2 - 0.5 mm)

Supporto solido

Analitica: 250 $\mu$ m  
Preparativa: 50-2000  $\mu$ 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.

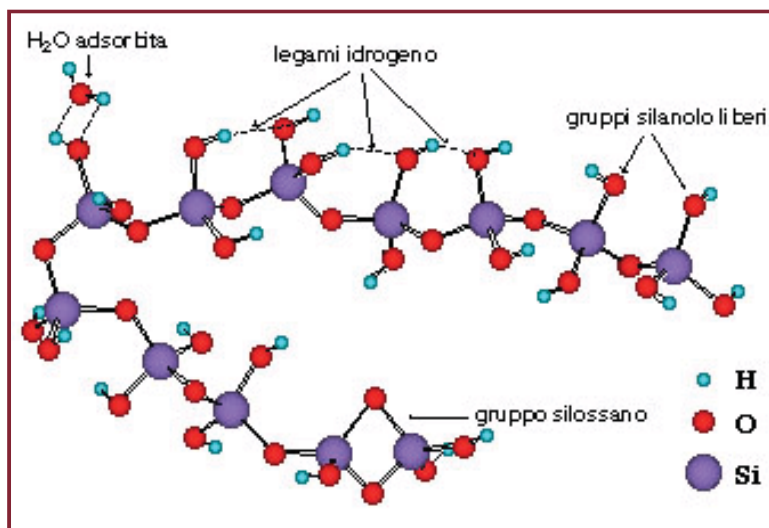
### Fase stazionarie liquide

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...). Il principio della cromatografia diventa quello della **ripartizione** in quanto abbiamo due liquidi.

### 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 ( $2Na_2O SiO_2$ ), 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

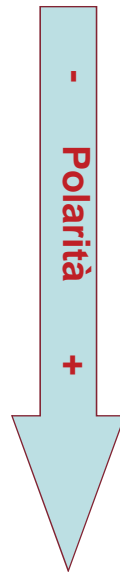
La fase mobile è un solvente opportunamente scelto (od una miscela di solventi), capace di separare i componenti della miscela da analizzare e poco affine per polarità alla fase stazionaria scelta.

## 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

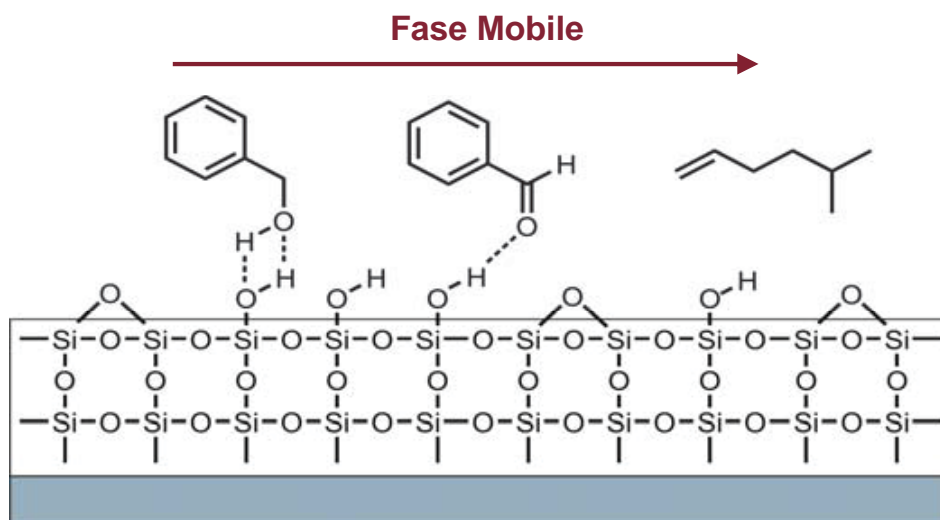
**Serie eluotropa:** Il potere eluente dei più comuni solventi organici, puri ed in miscele, ordinato secondo *polarità crescente*



serie eluotropa su gel di silice.

Miscela 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

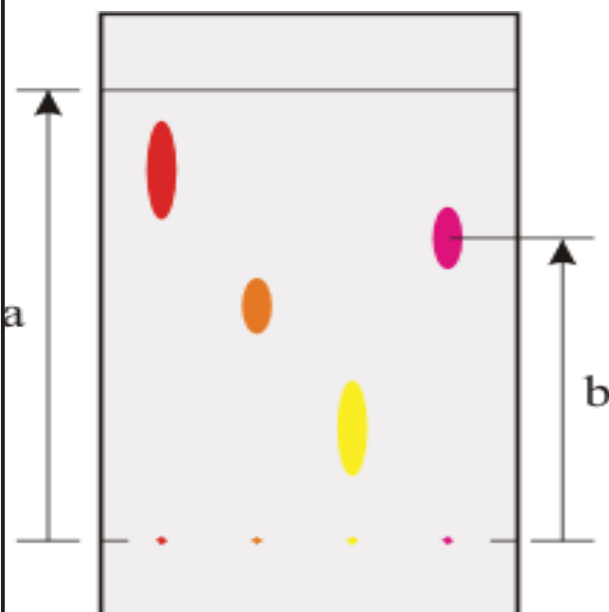
Quando la fase mobile sale lungo la silice, i composti in essa disciolti sono in grado di interagire con i gruppi polari della silice. Le interazioni in gioco sono principalmente **dipolo-dipolo** e formazione di **legami ad idrogeno** e dunque quanti più polari sono i composti, tanto più verranno trattenuti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



## 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  $\Delta R_f$  tra due componenti della miscela deve essere il più alto possibile.

## TECNICA CROMATOGRAFICA

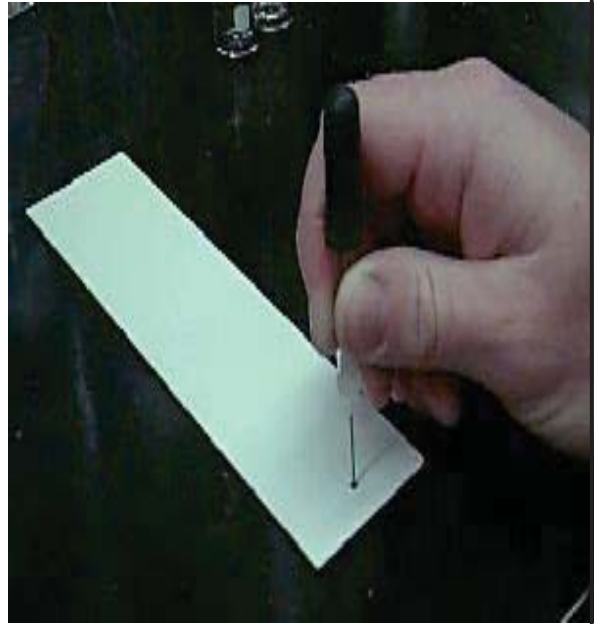


La traccia arancione è la sostanza più affine con l'eluente in quanto ha percorso un tragitto più lungo.

La traccia gialla rappresenta una sostanza meno affine all'eluente (o più trattenuta dalla fase stazionaria), ha percorso una distanza minore.

# SEMINA

La semina viene effettuata con il nostro campione da analizzare, tramite un apparecchio chiamato microsiringa o con un semplice capillare di vetro aperto; questo procedimento deve essere fatto accuratamente



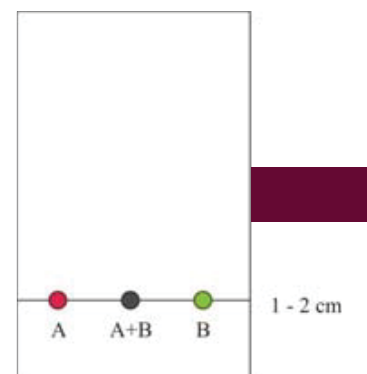
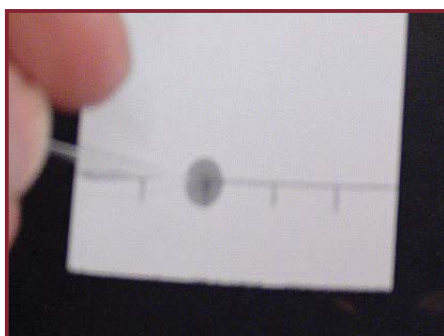
## Come operiamo?

### 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 asciugacapelli in modo da evitare un allargamento eccessivo.





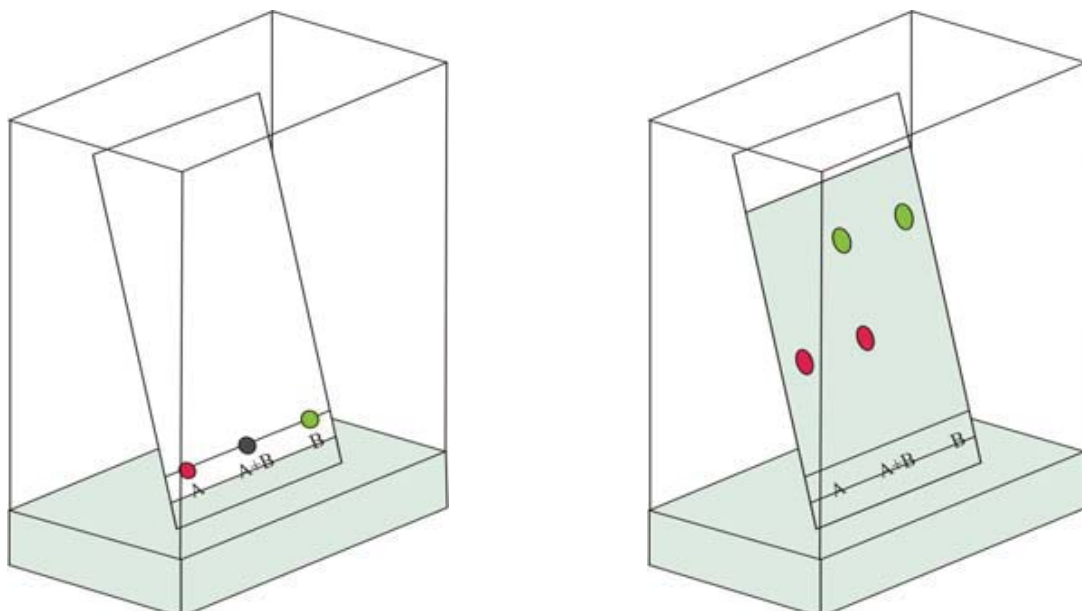
## Camera cromatografica

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

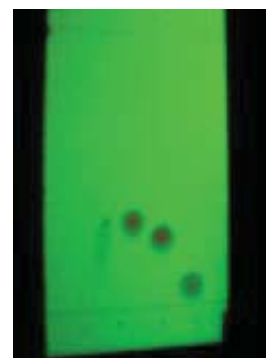
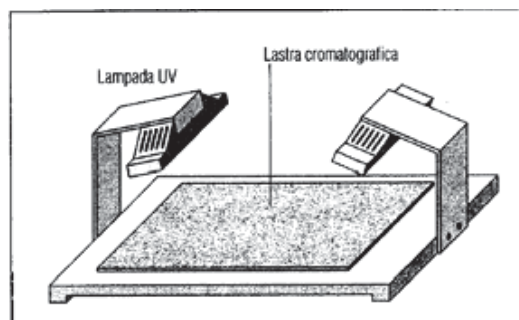
- Quando lo sviluppo è completato (solvente ad 1 cm dal bordo superiore) estrarre la lastra dalla camera cromatorafica;
- Segnare il fronte del solvente;
- Asciugare la lastrina all'aria o con l'aiuto di un phon, se le sostanze non sono termolabili si può porre il tutto in una stufa per qualche minuto a 100-105°C;
- Cerchiare con la matita le macchie visibili
- Calcolare i parametri come descritto più avanti

## Visualizzazione dei risultati

### ***Rivelazione con luce UV***

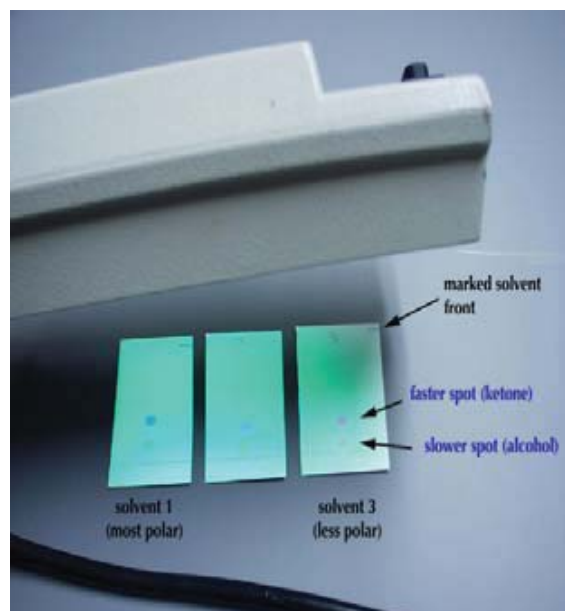
Presenza di cromofori  lampada UV (254 e 366 nm)

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 da una fluorescenza verde.



## ANALISI A UV

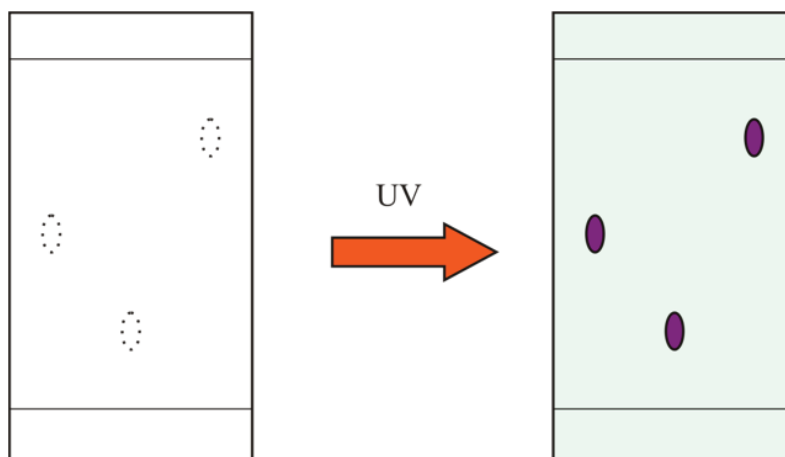
Qualora non sia possibile osservare direttamente le macchie di campione sulla superficie della lastrina - caso molto frequente - si può ricorrere all'osservazione sotto luce ultravioletta o alla reazione con reagenti che sviluppano composti colorati



La silice delle lastrine per TLC  $F_{254}$  è imbevuta di Fluoresceina, una sostanza in grado di assorbire la luce ultravioletta a 254 nm e rimettere 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 rimettere luce per fluorescenza, in corrispondenza delle macchie dei composti compare una colorazione viola.



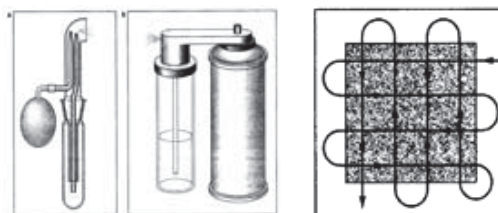
### Rivelazione con reagenti chimici

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**.



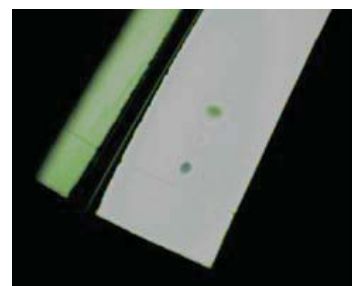
### Esempi di soluzioni coloranti di uso generale per in TLC

REAGENTI	PREPARAZIONE	UTILIZZO
$KMnO_4$ in $H_2SO_4$	Miscelare 0,5 g di permanganato con 15 mL di $H_2SO_4$ concentrato	Per usi generali
Ninidrina	Aggiungere 3 mL di acido acetico glaciali a 100 mL di una soluzione allo 0,3% di ninidrina in n-butanolo. Nebulizzare e scaldare la lastrina a 100°C, finché si forma il colore.	Adatto per amminocidi, ammine e amminoruccheri.
Verde di bromocresolo	Soluzione allo 0,04% in etanolo	Per acidi e basi organiche
2,7'-diclorofluoresceina	Soluzione allo 0,2% in etanolo	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 amminocidi 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 etanolo.	Per lipidi, steroli, lattoni, composti fenolici, chetoni, idrossiacidi, acidi grassi insaturi.

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



Lampada UV



Rivelazione di due composti



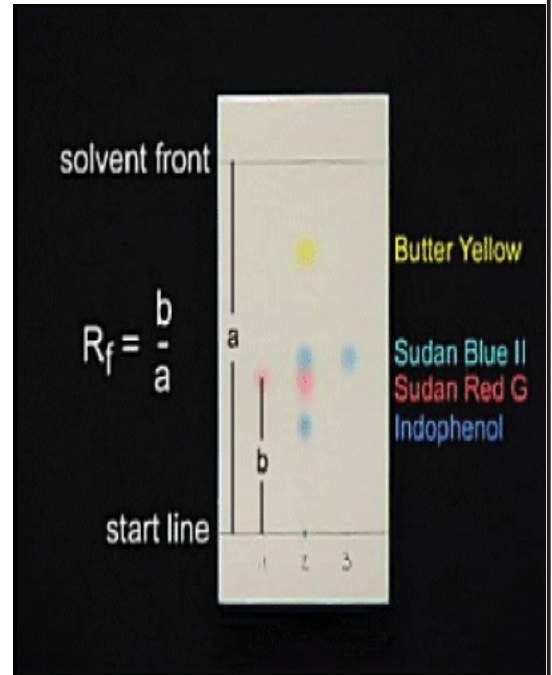
Tre deposizioni a concentrazione differente. Una elevata concentrazione diminuisce l'efficienza della separazione

# ANALISI DATI

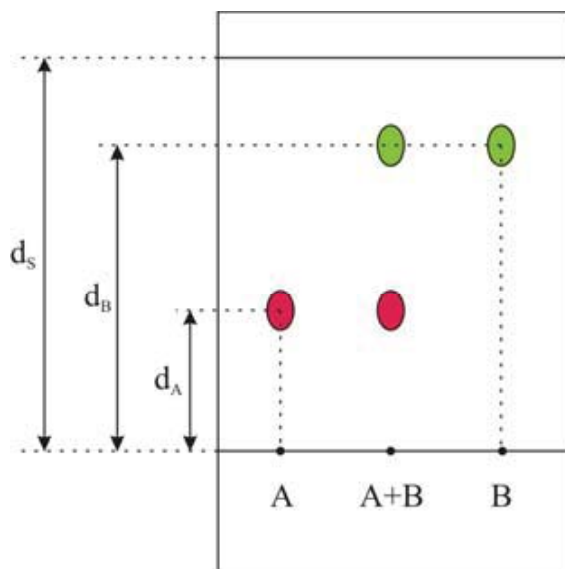
L'analisi dei dati si basa su un fattore chiamato:  $R_f$

$R_f = \frac{\text{corsa della macchia}}{\text{corsa dell'eluente}}$

Ogni sostanza ha un  $R_f$  diverso.



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



$$R_f(A) = \frac{d_A}{d_s}$$

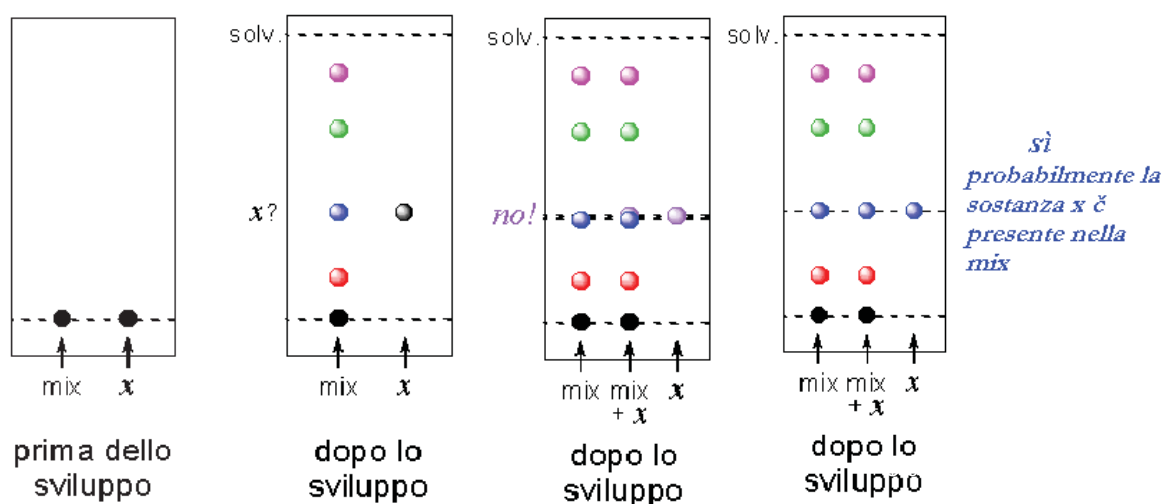
$$R_f(B) = \frac{d_B}{d_s}$$

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

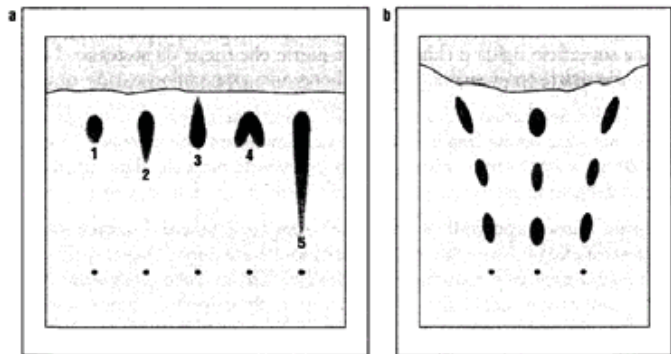
**SELETTIVITÀ:** è una misura della differenziazione del comportamento degli analiti nel sistema cromatografico

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

*Fattore di ritenzione o di ritardo ( $R_f$ ) come:*

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.

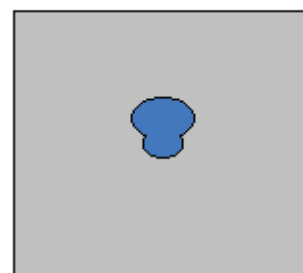
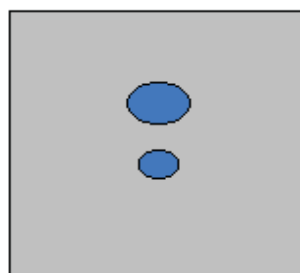
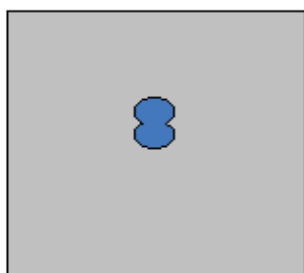
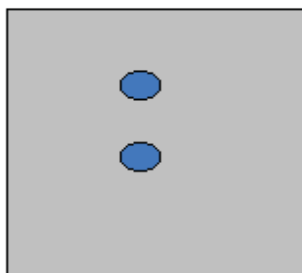
selettività  
efficienza



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**  
**Efficienza**  
**Risoluzione**

Elevata  
Elevata  
Elevata

Bassa  
Elevata  
Insufficiente

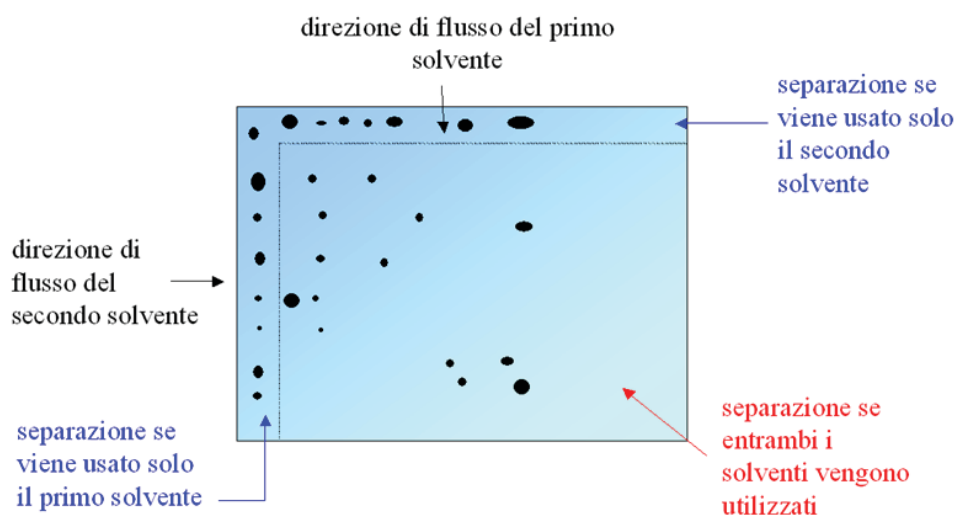
Elevata  
Bassa  
Buona

Bassa  
Bassa  
Insufficiente

Ripartizione

## 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**

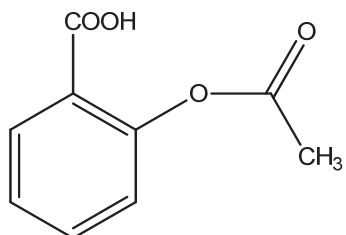
Numero di piatti teorici limitato

## GESTIONE DEI RIFIUTI

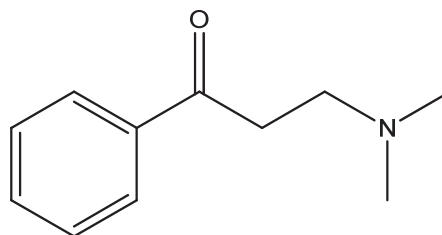
- Versare il solvente di scarto dei campioni TLC e quelli contenuti nelle camere cromatografiche nei contenitore "Rifiuto Solventi Organici (TLC)".
- Porre tutti i capillari usati per la TLC nel contenitore "Vetri rotti".
- Le camere cromatografiche per la TLC, svuotate del solvente, devono essere lasciate 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!

# Separazione dell'acido acetil salicilico da un'ammina

Data una soluzione contenente aspirina e un'ammina, mediante imbuto separatore operare una separazione sfruttando la ripartizione e le qualità acide e basiche dei composti.



Acido Acetil Salicilico



2-dimetilaminopropiofenone

## Descrizione dell'esperienza:

### Materiale utilizzato:

Bilancia  
Cilindro graduato  
Becker, Beute, Imbuto Separatore,  
Imbuto, Bacchetta  
Cotone idrofilo  
Lastrine TLC SiO<sub>2</sub>  
Capillari  
.....  
.....  
.....

### Sostanze utilizzate:

Cloroformio  
Acqua distillata  
Sodio solfato anidro  
HCl 2N  
NaOH 2N  
NaCl<sub>ss</sub>  
.....  
.....  
.....

# Procedimento:

- Prelevare esattamente 75 ml di soluzione dal matraccio contenente la soluzione di acido acetil salicilico e ammina.
- Controllare il pH con una cartina al tornasole ed aggiustarlo ad un valore acido (circa 2-3) con HCl diluito.
- Operare un'estrazione con cloroformio (50 ml x 3 volte)
- Lavare gli estratti organici riuniti con  $\text{NaCl}_{\text{ss}}$  e quindi essiccare con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
- Alcalinizzare la soluzione acquosa con NaOH diluita e procedere con l'estrazione dell'ammina con cloroformio (50 ml x 3 volte)
- Lavare gli estratti organici riuniti con  $\text{NaCl}_{\text{ss}}$  e quindi essiccare con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
- Analizzare a TLC ( $\text{SiO}_2$ ) gli estratti in essiccamento.
- Evaporare il solvente al rotavapor e calcolare le quantità dei composti dati.
- Riportare sul quaderno quanto eseguito ed ottenuto.