

ĆWICZENIE 5

SUBLIMACJA I CHROMATOGRAFIA

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodami oczyszczania i rozdziału substancji organicznych.

Sublimacja jest metodą, za pomocą której można wyodrębnić i oczyścić stałe substancje organiczne. Sublimacja jest procesem, w którym substancja stała przechodzi bezpośrednio w stan pary, przy stałej temperaturze. Po oziębieniu pary przechodzą w fazę stałą pomijając stan cieczy. W procesie sublimacji pary substancji kondensują się i układają się w regularną sieć krystaliczną, czyli sublimat. Procesowi można poddać większość substancji, które charakteryzują się określoną prężnością pary, zwaną prężnością sublimacji. Jest ona uzależniona od ciśnienia zewnętrznego oraz temperatury. Sublimacji ulegają substancje wykazujące dużą prężność pary w temperaturze niższej od ich temperatury topnienia. Do tych substancji należą m.in. kamfora, kwas bursztynowy, kwas alicylowy. Proces sublimacji wykorzystuje się m. in. do wyizolowania substancji z produktów roślinnych.

a) Ćwiczenie praktyczne: Sublimacja kofeiny z kawy (teofiliny z herbaty i teobrominy z kakao)

Aparatura i szkło: parowniczką, krążek bibuły filtracyjnej, lejek, wata, termometr.

Odczynniki: kawa, herbata, kakao.

Parowniczkę, w której znajduje się kawa (herbata, kakao) przykryć krążkiem bibuły filtracyjnej, a następnie lejkiem, tak by brzegi jego wychodziły poza brzegi parowniczkę. Lejek obłożyć wilgotną watą. Cały zestaw wolno ogrzewać przy pomocy mikropalnika. Substancje wyizolowane z produktów poddanych procesowi sublimacji krystalizują na powierzchni bibuły filtracyjnej. Są to kofeina, teofilina i teobromina (pochodne ksantyny). Napisać ich wzory strukturalne.

b) Ćwiczenie praktyczne: Oczyszczanie kamfory przez sublimację

Aparatura i szkło: łaźnia piaskowa, zlewka o poj. 250 cm³, kolba okrągłodenna, termometr.

Odczynniki: mieszanina kamfory z kwasem bursztynowym.

Odważyć 1g mieszaniny kamfory i kwasu bursztynowego i umieścić próbkę w zlewce. Na zlewce ustawić kolbę okrągłodenną z kilkoma kawałkami pokruszonego lodu. Cały zestaw ogrzewać w łaźni piaskowej. Zaobserwować zachodzące zjawisko. Wysublimowana kamfora znajduje się na powierzchni kolby. Kamforę zebrać za pomocą szpachelki na bibułę i pozostawić do osuszenia.

Chromatografia jest metodą rozdzielania i identyfikacji substancji. Chromatografia jest to zespół metod rozdzielania mieszaniny substancji na poszczególne składniki lub grupy. W procesie chromatografii wykorzystuje się zjawisko adsorpcji selektywnej, w której wykorzystuje się różną zdolność adsorpcji poszczególnych związków chemicznych na powierzchni odpowiednio rozdrobnionych ciał stałych, tzw. adsorbentów. Rozdział składników mieszaniny następuje między dwie fazy:

- fazę ruchomą – *eluent*, którą stanowi odpowiednio dobrany rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników,
- fazę nieruchomą – stacjonarną, którą najczęściej jest substancja stała.

Faza ruchoma spełnia rolę czynnika wymywającego, czyli *eluującego*. Fazę nieruchomą stanowi nośnik o właściwościach adsorpcyjnych. Obie fazy różnią się istotnie stopniem polarności, mianowicie faza stacjonarna jest bardziej polarna od fazy ruchomej, przez co uzyskuje się swobodę poruszania tej fazy w stosunku do stacjonarnej. Faza ruchoma przemieszczając się wraz z cząsteczkami substancji rozdzielanej podlega oddziaływaniu fazy stacjonarnej w ten sposób, że cząsteczki bardziej polarne zatrzymują się na nośniku polarnym, natomiast cząsteczki mniej polarne i apolarne migrują dalej wraz z eluentem. W ten sposób cząsteczki substancji rozdzielanej zatrzymują się na nośniku stacjonarnym w różnych odległościach od linii startu, konsekwencją czego jest selektywny rozdział składników analizowanej substancji.

Klasyfikacja metod chromatograficznych według następujących kryteriów:

- zachodzące zjawiska fizykochemiczne - chromatografia adsorpcyjna, podziałowa, osadowa, jonowymienna;
- technika prowadzenia procesu chromatograficznego - chromatografia kolumnowa, bibułowa, cienkowarstwowa, gazowa.

Celem ćwiczenia jest rozdział i identyfikacja połączeń organicznych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej i bibułowej. W chromatografii cienkowarstwowej *TLC* fazą stacjonarną jest warstwa adsorbenta grubości ok. 250 μ naniesiona na płytkę szklaną. W chromatografii bibułowej fazą stacjonarną jest bibuła.

c) Ćwiczenie praktyczne: Rozdział i identyfikacja pochodnych ksantyny metodą chromatografii cienkowarstwowej

Aparatura i szkło: zestaw do chromatografii cienkowarstwowej (płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym, komory chromatograficzne), naczynko szklane, kapilary.

Odczynniki: wzorcowy roztwór kofeiny, teobrominy i teofiliny, roztwór metanolu i chloroformu (w stosunku obj. 2:3) – do rozpuszczenia pochodnych ksantyny, eluent: trichlorometan i etanol (w stosunku obj. 9:1), alkoholowy roztwór jodu i alkoholowy roztwór HCl – do wywołania chromatogramu.

Wykonanie: Krążek bibuły z sublimatem kofeiny, teofiliny lub teobrominy (z poprzedniego ćwiczenia) pociąć na drobne kawałki, umieścić w naczynku szklanym i dodać niewielką ilość roztworu metanolu i chloroformu, w celu rozpuszczenia pochodnych ksantyny. Na płytce szklanej z żelem krzemionkowym zaznaczyć linię startu ok. 0,5 cm od dolnej krawędzi płytki. Na linii startu nanieść przy pomocy kapilary, po kropli wzorcowego roztworu teofiliny, teobrominy, kofeiny oraz badanej próbki, w odstępach ok. 0,5 cm oraz w odległości 0,5 cm od krawędzi płytki. Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej, w której znajduje się eluent. Gdy front rozpuszczalnika osiągnie linię odległą o 0,5 cm od górnej krawędzi płytki, wysuszyć na bibule i spryskać roztworem wywołującym.

Na podstawie otrzymanego chromatogramu, wyznaczyć współczynnik R_f (współczynnik przesunięcia) dla poszczególnych składników mieszaniny i substancji

wzorcowych, korzystając z zależności: $R_f = \frac{A}{B}$,

gdzie: A - odległość plamy substancji rozdzielonej od linii startu.

B - odległość frontu rozpuszczalnika od linii startu.

Poniżej podano zabarwienie plamki na chromatogramie oraz współczynniki przesunięcia dla analizowanych pochodnych ksantyny:

- kofeina – plamka czerwonobrazowa, $R_f = (0,57-0,78)$,
- teobromina – plamka szaroniebieska, $R_f = (0,22-0,47)$,
- teofilina – plamka fioletowoniebieska, $R_f = 0,26$.

d) Ćwiczenie praktyczne. Rozdział i identyfikacja barwników zawartych w pisakach za pomocą chromatografii bibułowej

Aparatura i szkło: bibuła Whatmana w postaci krążka i paska, szalki Petriego (komora chromatograficzna).

Odczynniki: pisaki kolorowe, eluent: propanol, 25% roztwór wodny amoniaku, woda (w stosunku obj. 8:2:2).

Wykonanie: Wyciąć krążek bibuły o średnicy większej o 0,5 cm od średnicy komory chromatograficznej. W środku krążka umieścić zwinięty w formie walca pasek bibuły o wym. 20x2 cm. Zaznaczyć linię startu w odległości 1,5-2 cm od środka krążka i nanieść na niej kropki kolorowymi pisakami. Odstęp między pisakami powinien wynosić ok. 1–1,5 cm. Do szalki Petriego wlać eluent i umieścić na niej przygotowany krążek bibuły z naniesionymi pisakami. Zwinęty pasek bibuły umieszczony w środku krążka powinien dotykać dna szalki. Umożliwia on przenikanie rozpuszczalnika na powierzchnię bibuły, a tym samym rozwinięcie chromatogramu i rozdział barwników. Rozdział barwników zawartych w pisakach jest szybki i umożliwia rozróżnienie kilku barwnych składników danego pisaka, które znajdują się w różnej odległości od linii startu. Gdy front rozpuszczalnika osiągnie linię znajdującą się ok. 1 cm od brzegu bibuły, wyjąć i wysuszyć chromatogram. Podać wnioski.

e) Ćwiczenie praktyczne. Wykrywanie kwasu askorbinowego (witaminy C) w soku z kiszonej, pomarańczy lub cytryny

Odczynniki: substancja wzorcowa (tabletkę witaminy C rozpuszczoną w wodzie), sok z kiszonej kapusty, cytryny lub pomarańczy, eluent: etanol i benzen w stosunku 3:1, wywoływacz chromatogramu - jod.

Wykonanie: Niewielką ilość badanego soku wlać do probówki i dodać wody do połowy jej objętości. Po wymieszaniu bagietką, roztwór nanieść przy pomocy kapilarki na linię startową płytki chromatograficznej. W odległości 2,5 cm od powstałej plamy nanieść kroplę substancji wzorcowej. Po wysuszeniu plam, płytkę umieścić w komorze chromatograficznej zawierającej etanol i benzen. Gdy mieszanina rozpuszczalników znajdzie się w odległości ok. 2 cm od górnej krawędzi płytki, należy ją wyjąć z komory chromatograficznej i przenieść do drugiej komory, na dnie której umieszczono niewielką ilość jodu. Chromatogram nasycony parami jodu identyfikuje witaminę C zawartą w soku.

Na podstawie otrzymanego chromatogramu, w ćwiczeniach 1a, 1b, 1c, wyznaczyć współczynnik R_f (współczynnik przesunięcia) dla poszczególnych składników mieszaniny i substancji wzorcowych, korzystając z zależności: $R_f = \frac{A}{B}$,

gdzie: A - odległość plamy substancji rozdzielonej od miejsca (środk) nałożenia na płytce.

B - odległość frontu rozpuszczalnika od miejsca nałożenia próbki.

