

20. Chromatografia cienkowarstwowa wskaźników kwasowo-zasadowych *

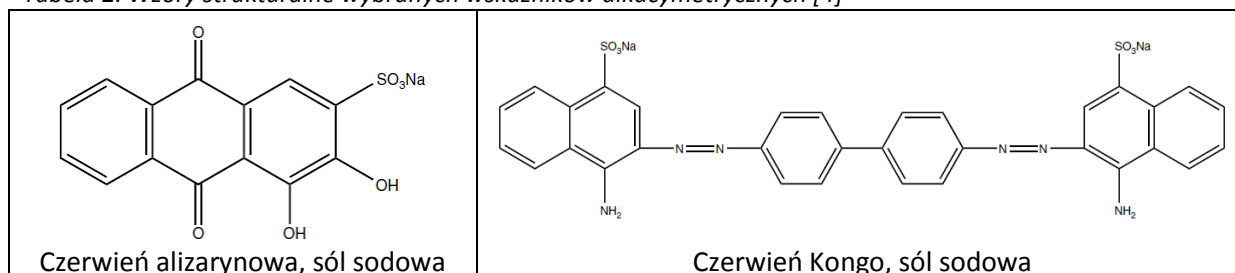
Wskaźniki kwasowo-zasadowe. Wskaźniki kwasowo-zasadowe, wskaźniki pH, czy indykatory pH są to substancje, których używa się w laboratoriach chemicznych w celu wizualizacji punktu końcowego miareczkowania alkacymetrycznego w wyniku zmiany ich koloru w zależności od pH środowiska, w jakim się znajdują [1-3]. Tworzą one grupę związków organicznych o charakterze słabych kwasów lub słabych zasad, które reagując z wodą tworzą sprzężone układy kwas-zasada, przy czym oba człony są inaczej zabarwione. W środowisku kwaśnym występują formy sprotonowane, a w zasadowym zdeprotonowane. Główną cechą strukturalną, jaka się zmienia pomiędzy kwasową i zasadową formą wskaźnika, jest zmiana w koniugacji elektronowej, tj. powstawanie różnych struktur rezonansowych tych cząsteczek. Zmiana koniugacji elektronowej w zależności od pH roztworu powoduje zmianę koloru, co wskazuje na koniec miareczkowania alkacymetrycznego. Układy z wysoko sprzężonymi wiązaniami elektronowymi absorbują i odbijają pewien zakres fal promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym.

Wskaźniki pH mogą być jednobarwne (np. fenoloftaleina), gdy tylko jeden z członów jest zabarwiony – druga lub pozostałe formy są bezbarwne, dwubarwne (np. oranż metylowy) lub wielobarwne (np. czerwień alizarynowa), gdy każda z form jest inaczej zabarwiona. Stosuje się również mieszaniny wskaźników, które stopniowo zmieniają barwę w szerokim zakresie pH – wskaźniki takie nazywamy uniwersalnymi. Istnieją również wskaźniki fluorescencyjne, które albo zmieniają barwę fluorescencji, albo zaczynają fluoryzować przy odpowiednim pH.

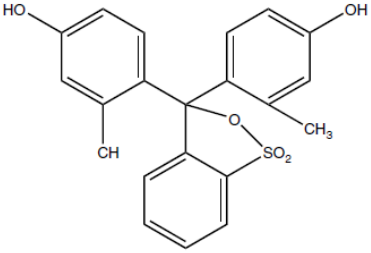
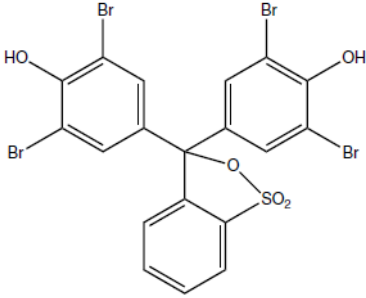
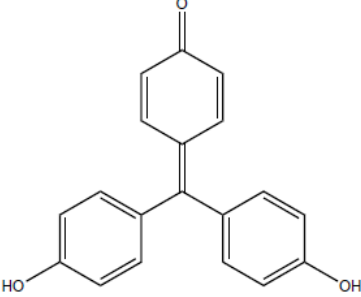
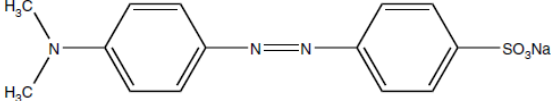
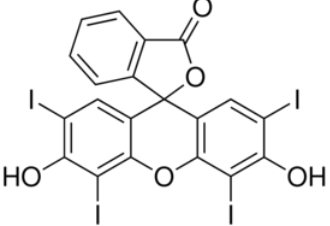
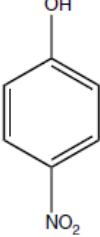
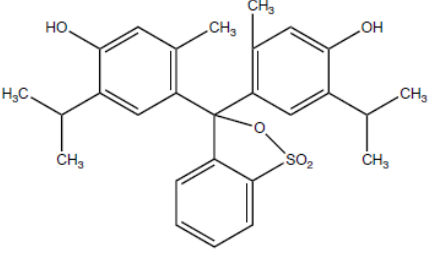
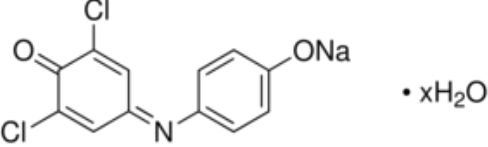
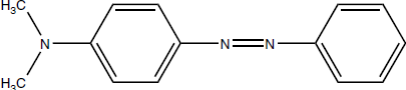
Tabela 1. Wybrane wskaźniki alkacymetryczne [1-3]

Wskaźnik	Zakres pH zmiany barwy	Zabarwienie w roztworze	
		Roztwór kwaśny	Roztwór zasadowy
Czerwień alizarynowa	3.5-6.5 9.4-12.0	żółty-czerwony	pomarańczowy-fioletowy
Czerwień Kongo	3.0-5.0	niebieski-czerwony	czerwony
Purpura krezolowa	1.2-2.8 7.4-9.0	czerwony-żółty	żółty-purpurowy
Błękit bromofenolowy	3.0-4.6	żółty-niebieskopurpurowy	niebieskopurpurowy
Auryna	6.6-8.0	żółty	czerwony
Oranż metylowy	3.0-4.4	czerwony-żółty	żółty
Erytrozyna B	0.0-3.6	pomarańczowy-fluoryzująco czerwony	fluoryzująco czerwony
<i>p</i> -Nitrofenol	5.6-7.6	bezbarwny	żółty
Błękit tymolowy	1.2-2.8 8.0-9.6	czerwony-żółty	żółty-niebieski
2,6-Dichloroindofenol	brak danych	czerwony	niebieski
Żółcień metylowa	2.9-4.0	czerwony-żółty	żółty

Tabela 2. Wzory strukturalne wybranych wskaźników alkacymetrycznych [4]



* Ćwiczenie oparte na artykule: Daniel D. Clark, Analysis and identification of acid-base indicator dyes by thin-layer chromatography, *Journal of Chemical Education* **84** (2007) 1186-1187.

 <p>Purpura krezolowa</p>	 <p>Błękit bromofenolowy</p>
 <p>Auryna</p>	 <p>Oranz metylowy, sól sodowa</p>
 <p>Erytrozyna B</p>	 <p>p-Nitrofenol</p>
 <p>Błękit tymolowy</p>	 <p>2,6-Dichloroindofenol, sól sodowa</p>
 <p>Żółcień metylowa</p>	

Chromatografia cienkowarstwowa. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) jest prawdopodobnie jedną z najszybszych, najprostszych, najtańszych i najczęściej używanych technik analitycznych, stosowanych w celu oznaczenia obecności i/lub czystości składników w roztworach, poprzez rozdział składników mieszaniny. TLC umożliwia rozdział składników mieszaniny dzięki różnemu podziałowi składników pomiędzy fazą stacjonarną i ruchomą. W klasycznej chromatografii cienkowarstwowej fazą stacjonarną jest żel krzemionkowy, tlenek glinu lub ziemia orzechowa, które są mocno polarne. Są one zaadsorbowane na szkle, aluminium lub poliestrze. Fazą ruchomą – eluentem – może być każdy rozpuszczalnik lub dowolna kombinacja rozpuszczalników, które zapewniają pożądany rozdział. W czasie eksperymentu TLC nanosi się punktowo, używając kapilary, bardzo małą ilość roztworu np. na żel krzemionkowy (fazę stacjonarną) znajdujący się na płytce TLC, a następnie płytkę umieszcza się w komorze chromatograficznej zawierającej eluent (fazę ruchomą), w celu rozwinięcia chromatogramu. W czasie gdy eluent wznosi się po płytce chromatograficznej, składniki mieszaniny migrują pomiędzy żelem krzemionkowym i eluentem, pozwalając na rozdział składników dzięki niejednakowym oddziaływaniom międzycząsteczkowym. Stopień rozdziału składników określa się

poprzez obliczenie wartości współczynników opóźnienia (R_f), wartości charakterystycznych dla danych substancji. Oblicza się je jako stosunek odległości jaką przebył składnik od linii startu do odległości jaką przebył eluent. Jeżeli rozdzielone składniki nie są naturalnie barwne, ich obecność można stwierdzić np. poprzez oświetlanie płytki promieniowaniem UV, spryskiwanie, zanurzanie lub wywoływanie płytki w specyficznym roztworze lub parach wywoływacza lub poprzez pirolizę.

Cel ćwiczenia. Celem niniejszego ćwiczenia jest rozdział chromatograficzny mieszaniny dwóch wskaźników kwasowo-zasadowych na płytkach TLC oraz ich identyfikacja.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Warunki bezpieczeństwa. W toku analizy używane są palne rozpuszczalniki organiczne oraz stężony amoniak. Należy zachować wysoką ostrożność, unikać źródeł ognia. Odpady zlewać do odpowiednio oznaczonych pojemników. Przygotowanie roztworu eluentu oraz rozdział wykonywać tylko i wyłącznie w działającym dygestorium.

Wskazówki do poprawnego wykonania analizy.

- Obchodź się delikatnie z płytkami TLC – nigdy nie dotykaj palcami powierzchni płytki, aby jej nie zabrudzić – trzymaj płytkę za krawędzie lub pincetą.
- Linie startu, linię czoła rozpuszczalnika oraz rozdzielone składniki zaznaczaj tylko ołówkiem – nigdy nie używaj długopisu, pióra ani markera, gdyż tusz zabrudzi płytkę w czasie rozwijania chromatogramu.
- Używaj ołówka oraz kapilary bardzo delikatnie, aby nie zniszczyć złoza na płytce.
- Nakładaj na płytkę bardzo małe ilości cieczy kapilarą – plamki nie powinny mieć więcej niż 2 mm średnicy – spójrz na linijkę!
- Używaj za każdym razem czystych kapilar, aby nie zabrudzić używanych odczynników oraz nie zakłócić eksperymentu.
- Zanim umieścisz płytkę w komorze odczekaj kilka minut, aż cały rozpuszczalnik zawarty w próbce odparuje – może on zakłócić wyniki eksperymentu TLC.

Sprzęt	Odczynniki
<ul style="list-style-type: none">- butelka ze szlifem na 100 ml,- cylinder miarowy na 25 ml,- cylinder miarowy na 10 ml,- 2 zlewki o pojemności 250 ml,- 2 szalki Petriego,- 3 płytki TLC,- kapilary,- plastikowa pinceta,- linijka,- ołówek,- suszarka do włosów	<ul style="list-style-type: none">- propan-1-ol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$,- 28 % roztwór amoniaku, $\text{NH}_{3(\text{aq})}$,- 1 M roztwór kwasu solnego, HCl - rozpylacz- metanolowe roztwory czystych wskaźników pH,- metanolowy roztwór mieszaniny wszystkich wskaźników pH.

PROCEDURA

Przygotowanie roztworu eluentu. W tym celu zmieszaj ze sobą w stosunku objętościowym 6:1 propan-1-ol oraz 28% roztwór amoniaku, tak by uzyskać około 50 ml roztworu. Jeżeli eksperyment będzie trwał dłużej niż 1,5 godziny przygotuj nową, świeżą porcję eluentu.

Wykonanie analizy. Na każdej z trzech otrzymanych płytek TLC narysuj delikatnie ołówkiem linie proste około 1 cm od dołu płytki (linia startu – patrz Rysunek 1).

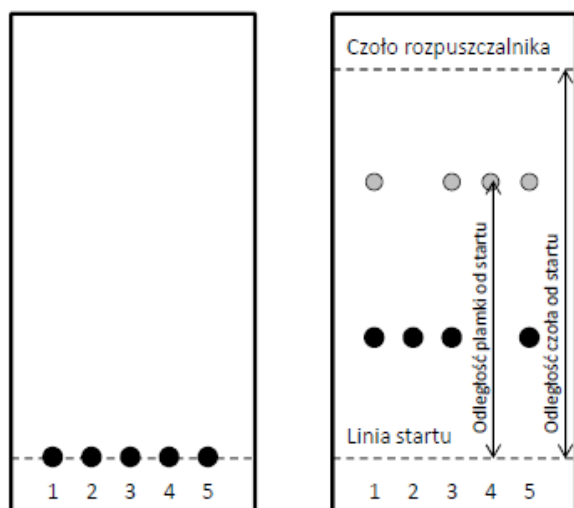
Używając cienkiej kapilary nałóż na linię startu pierwszej płytki małą kroplę otrzymanej do analizy mieszaniny (średnica plamki około 2 mm). W odległości około 1 cm od pierwszej plamki umieść na linii startu drugą kroplę **mieszaniny wszystkich wskaźników** (użyj nowej kapilary). Pozostaw płytkę do wyschnięcia na około 5 minut. Wlej do zlewki około 20 ml roztworu eluentu. Włóż ostrożnie do zlewki płytkę TLC, przykryj zlewkę szalką Petriego i rozwijaj tak długo chromatogram, aż czoło rozpuszczalnika dotrze do około 4/5 wysokości płytki. Wyciągnij płytkę z komory i zaznacz delikatnie ołówkiem wysokość czoła rozpuszczalnika oraz obrysuj wszystkie plamki. Narysuj w dzienniku laboratoryjnym dokładny szkic chromatogramu – zaznacz linię startu oraz czoła rozpuszczalnika, położenie wszystkich plamek i ich barwy

(barwy zapisać póki płytka jest mokra) oraz inne zaobserwowane szczegóły. Oblicz wartość R_f dla wszystkich rozdzielonych składników mieszanin. Porównaj zaobserwowane kolory oraz obliczone wartości współczynników R_f dla wszystkich plamek odpowiadających rozdzielonym składnikom analizowanej mieszaniny ze znanymi kolorami odpowiednich wskaźników w alkalicznym pH (eluent ma pH równe około 9-10) oraz wartości R_f z Tabeli 3 w celu wstępnej identyfikacji składników badanej mieszaniny.

Tabela 3. Właściwości TLC wybranych wskaźników alkacymetrycznych. Wartości R_f podano dla fazy stacjonarnej Silufol® Avalier Czechoslovakia ON684080 JK253422

Wskaźnik	R_f	Kolor plamki na rozwiniętym chromatogramie	
		Roztwór zasadowy	Roztwór kwaśny
Czerwień alizarynowa	0.00	fioletowy	jasno żółty
Czerwień Kongo	0.30	pomarańczowy	Purpurowy/fiolet-róż
Purpura krezolowa	0.30	szaro-purpurowy	czerwony
Błękit bromofenolowy	0.40	ciemno niebieski	żółty
Auryna	0.50	różowy	żółty
Oranż metylowy	0.60	żółty	Czerwony/intensywny róż
Erytrozyna B	0.70	ostry różowy	jasno pomarańczowy/bezbarwny
<i>p</i> -Nitrofenol	0.80	jasno żółty	bezbarwny
Błękit tymolowy	0.75	musztardowy	Purpurowy/fiolet
2,6-Dichloroindofenol	0.85	indygo	jasno fioletowy
Żółcień metylowa	0.90	żółty	Czerwony/intensywny róż

Drugiej i trzeciej płytce TLC należy użyć w celu określenia dokładności wstępnej identyfikacji składników badanej mieszaniny. Używając cienkiej kapilary nałóż na linię startu drugiej płytce malutką kroplę (średnica plamki około 2 mm) otrzymanej do analizy mieszaniny. W odległości około 0,5 cm od pierwszej plamki umieść na linii startu drugą kroplę zawierającą czysty roztwór wskaźnika, który podejrzewasz, że znajduje się w twojej próbce (pamiętaj, żeby za każdym razem używać nowej kapilary!!!). Następnie w odległości 0,5 cm (trzecia plamka) umieść ponownie kroplę badanej mieszaniny, a **na niej** kroplę roztworu podejrzewanego czystego wskaźnika. W sposób analogiczny umieść na linii startu drugi podejrzewany czysty wskaźnik (czwarta plamka) oraz badaną mieszaninę + drugi czysty roztwór podejrzewanego wskaźnika (plamka piąta) jak na Rysunku 1. Całość wykonaj ponownie na trzeciej płytce TLC.



Rysunek 1. Schemat płytki TLC przygotowanej do eksperymentu oraz wynik eksperymentu TLC potwierdzający poprawną identyfikację składników mieszaniny.

- Plamka 1: Badana mieszanina.
- Plamka 2: Roztwór zawierający czysty, znany składnik X podejrzewany o znajdowanie się w badanej mieszaninie.
- Plamka 3: Roztwór zawierający badaną mieszaninę + roztwór czystego składnika X.
- Plamka 4: Roztwór zawierający czysty, znany składnik Y podejrzewany o to, że się znajduje w badanej mieszaninie.
- Plamka 5: Roztwór zawierający badaną mieszaninę + roztwór czystego składnika Y.

Pozostaw płytki do wyschnięcia na około 5 minut. Wlej do zlewki około 20 ml roztworu eluentu. Włóż ostrożnie do zlewki płytke TLC, przykryj zlewki szalkami Petriego i rozwijaj tak długo chromatogramy, aż czoło rozpuszczalnika dotrze do około 5/4 wysokości płytek. Wyciągnij płytki z komór i zaznacz delikatnie ołówkiem wysokość czoła rozpuszczalnika oraz obrysuj wszystkie plamki. Narysuj w dzienniku laboratoryjnym dokładny szkic chromatogramu – zaznacz linię startu oraz czoło rozpuszczalnika, położenie wszystkich plamek i ich barwy (barwy zapisać póki płytka jest mokra) oraz inne zaobserwowane szczegóły.

Oblicz wartość R_f dla wszystkich rozdzielonych składników mieszanin. Wyszuszyć płytki. Wyniki tego eksperymentu powinny potwierdzić wstępną identyfikację składników badanej mieszaniny na podstawie pojawienia się i współmigracji (te same pozorne wartości R_f) składników na płytce TLC. Jeżeli żaden lub tylko jeden ze składników badanej mieszaniny został poprawnie wykryty, eksperyment należy powtórzyć, aż wszystkie składniki mieszaniny zostaną zidentyfikowane i podparte danymi z TLC.

W celu dodatkowego potwierdzenia identyfikacji składników, suchą płytkę numer 3 należy **delikatnie** spryskać rozpylaczem zawierającym roztwór HCl. Zapisać w zeszycie zmiany kolorów plamek. Porównaj teraz kolory plamek z kolorami podejrzewanych wskaźników w kwaśnym środowisku z Tabeli 3.

Obliczenia. Współczynnik opóźnienia R_f dla każdej substancji obliczyć ze wzoru:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

gdzie:

a – odległość od startu do środka plamki,

b – odległość od startu do czoła rozpuszczalnika.

Sprawozdanie

Sprawozdanie powinno zawierać następujące elementy:

- imię i nazwisko osoby przeprowadzającej analizę,
- datę analizy,
- rysunki wszystkich wykonanych chromatogramów wraz z opisem,
- wyniki analizy – liczba zidentyfikowanych wskaźników w otrzymanej analizie wraz z uzasadnieniem – tj. obliczone wartości R_f , kolory, zmiany kolorów pod wpływem HCl, i inne,
- ewentualny komentarz.

Uwaga: dla tego ćwiczenia nie ma wzoru (formularza) sprawozdania, bowiem jest ono głównie opisowe.

LITERATURA

1. Jerzy Minczewski, Zygmunt Marczenko, Chemia analityczna. 1. Podstawy teoretyczne i analiza jakościowa, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
2. Jerzy Minczewski, Zygmunt Marczenko, Chemia analityczna. 2. Chemiczne metody analizy ilościowej, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
3. Ram W. Sabnis, Handbook of acid-base indicators, CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008.
4. <http://www.sigmaaldrich.com>