

Tyndtlagschromatografi

Tyndtlagschromatografi eller TLC, som det ofte forkortes, er en teknik som har fortrængt tidligere tiders papirchromatografi. Det skyldes, at TLC er både hurtigere og mere fleksibel.

11.3.1 TLC-teknikken

TLC udføres på en plade af glas, plast eller metal-folie, som er påført et tyndt lag chromatografisk materiale, der fungerer som stationær fase.

Teknikken kan udføres både som adsorptionschromatografi og som fordelingschromatografi.

Tyndtlaget, stationær fase

Den stationære fase kan være cellulosepulver eller silicagel, men også mange andre typer stationær fase er tilgængelige.

Kornstørrelsen for silicagelen ligger typisk på 20-40 μm , hvilket giver en overflade på 4-600 m^2 pr. gram.

Små kornstørrelser giver større overflade. Der- ved øges kontaktfladen mellem stationær fase og eluent, og chromatograferingens effektivitet øges.

TLC-plader købes normalt færdigfremstillede, da det kræver en del rutine selv at lave dem.

Aktivering af pladerne

Chromatograferingen kan udføres som adsorptionschromatografi med en vandfri eluent eller som fordelingschromatografi.

Hvis metoden er adsorptionschromatografi, så skal man sikre sig, at pladerne er vandfri, inden de anvendes. De skal aktiveres.

Aktiveringen foregår ved at tørre pladerne i et varmeskab, f.eks. ved 120 °C.

Prøvepåsatning

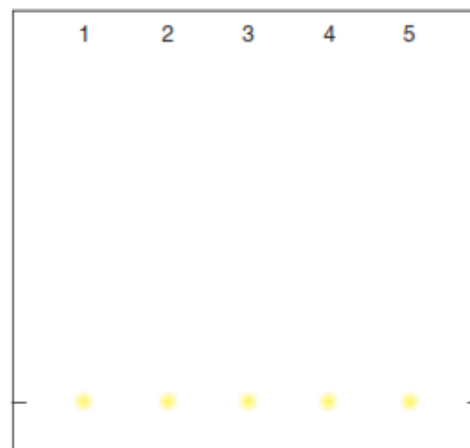
Der påsættes meget små mængder prøve for at få så afgrænsede pletter som muligt, typisk 10-20 μL .

Hvis opløsningernes koncentration af prøvekomponenter er lav, kan man opkoncentrere pletterne ved at påsætte prøve flere gange oven i den samme plet med tørring imellem hver påsætning.

Opløsningerne sættes på pladen med en mikropipette eller et kapillarrør.

Den påsatte plet skal være så koncentreret som muligt, da den under chromatograferingen vil brede sig noget ud på grund af diffusion fra pletten.

I figur 11.3 er vist, hvorledes man påsætter en række pletter nederst på pladen. Pletterne er dels prøven og dels en række udvalgte standarder, som kan forekomme i prøven.



Figur 11.3. TLC-plade med påsatte prøver og standarder.

De påsatte pletter markeres øverst på pladen med et nummer, som eventuelt kan indrives forsigtigt i tyndtlaget.

Nederst på pladen er en markering i hver side af pladen, som angiver i hvilken højde pletterne er påsat.

Man må ikke markere de enkelte påsætningssteder, da dette ville forstyrre chromatograferingen, når eluenten skal suges op gennem tyndtlaget.

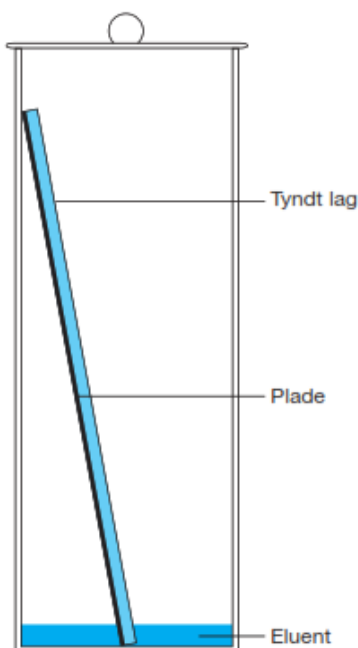
Chromatograferingen

Chromatograferingen udføres ved at anbringe en plade i et chromatografkar med eluent i bunden. Eluenten skal stå så lavt, at den ikke når op til påsætningsstederne.

Karret er ofte et glaskar med tilhørende låg, som vist i figur 11.4.

For at opnå en god chromatografering skal luften i karret være ensartet mættet med mobil fase. For at opnå dette fores karret indvendigt med sugende papir således, at lidt eluent suges op og fordamper direkte fra papiret.

Når pladen anbringes i karret, suges eluenten op gennem tyndtlaget på grund af kapillareffekten i det porøse lag.



Figur 11.4. TLC-kar med eluent og TLC-plade.

Prøvens komponenter vil bevæge sig opad i forskelligt tempo, der primært afhænger af eluentens styrke.

Elueringen tager fra en halv til to timer afhængigt af tyndtlagets porøsitet og den valgte eluent.

Fremkaldelse

En prøves komponenter vil ofte være farveløse, eller så svagt farvet, at de påsatte pletter ikke umiddelbart kan ses.

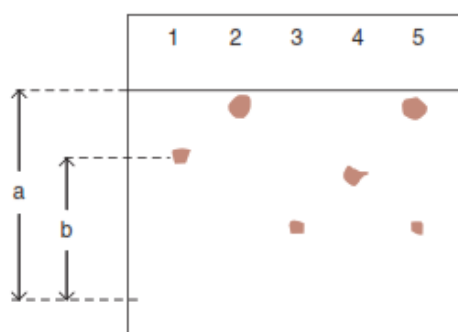
For at kunne lokalisere pletterne er det derfor nødvendigt at fremkalde dem.

Det gøres ved at spraye pladen med en letfordampelig opløsning af et reagens, der kan danne en farvet forbindelse med prøvens komponenter.

En anden fremkommelig vej er at lokalisere pletterne under UV-lys, eventuelt efter at pladen er sprayet med et reagens, der sammen med prøvekomponenterne danner en fluorescerende forbindelse.

Kvalitativ bestemmelse

Når pladen er chromatograferet og pletterne fremkaldt, kan pladen se ud som vist i figur 11.5.



Figur 11.5. TLC-plade efter chromatografering.

Plettens vandring bestemmes ved at måle afstanden fra påsætningsstedet til plettens centrum. Denne afstand er markeret som b for pletten til venstre i figuren.

Hvis pletten er meget varierende i styrke, så måles til centrum af det område med kraftigst farveintensitet.

Desuden måles væskefrontens vandring. Den er markeret som afstanden a i figuren.

Forholdet mellem plettens vandring og væskefrontens vandring defineres som retentionsfaktoren R_f .

$$R_f = \frac{\text{plettens vandring}}{\text{væskefrontens vandring}}$$

Vandringerne udmåles i cm eller mm, og man identificerer pletterne ved at sammenligne R_f værdier.

På den viste plade, figur 11.5, er prøven markeret som plet nummer 5, og man kan se, at den består af to komponenter.

Ved at sammenligne prøvepletternes R_f -værdier med R_f for standardpletterne 1-4 kan man identificere prøvens komponenter.

I figuren svarer R_f -værdierne for standardplet nummer 2 og standardplet nummer 3 til prøvens (nummer 5) to pletter.

I praksis ser resultatet ikke altid så pænt ud, som figur 11.5. Det kan være vanskeligt at identificere pletter med næsten samme vandringsslængde, og måske er væskefronten trukket skæv, så to ens komponenter i hver sin side af pladen ikke vandrer lige langt.

Derfor bruges R_f -værdierne til identifikationen i stedet for blot at anvende vandringsslængderne direkte.

11.3.2 TLC's anvendelighed

TLC er en hurtig og nem metode til kvalitativ bestemmelse af mange stoffer.

Den kan også anvendes til bestemmelse af stoffers renhed, f.eks. i forbindelse med syntese, for at vurdere, om der skal foretages en yderligere oprensning af produktet.

Det afgøres ved at undersøge, om der er pletter fra udgangsstoffer eller mellemprodukter på TLC-pladen efter chromatograferingen.

Metoden kan også anvendes til at give et fingerpeg om, hvilken eluent der er anvendelig til HPLC-analyser.

Det er muligt at udføre kvantitativ bestemmelse, f.eks. ved at skrabbe de enkelte pletter af pladen efter chromatograferingen og oprense komponenten. Efterfølgende kan de koncentrationsbestemmes spektrofotometrisk.

Det er dog en besværlig metode, og i de fleste tilfælde vil man anvende HPLC direkte på prøveblandingen i stedet for, jf. kapitel 9.