Laboratorio di Chimica Organica

Modulo del corso di Chimica Organica con Laboratorio

Prof. Federica Battistin

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche - Edificio C11

Via L. Giorgieri, 1 – 3° piano, stanza 331

Email: federica.battistin@units.it

Cromatografia su strato sottile (TLC)

La cromatografia su strato sottile su silice sfrutta la diffusione per capillarità di un solvente lungo una lastrina di silice. La silice è la fase stazionaria ed è polare. L'eluente (un solvente o una miscela di solventi) è meno polare della silice ed è la fase mobile.

Polarità: Una molecola è polare quando le sue cariche elettriche non sono distribuite in modo uniforme. Una parte della molecola è un po' più negativa e un'altra un po' più positiva, perché alcuni atomi (come O e N) attirano gli elettroni più di altri (C e H).



Preparazione del campione

Soluzioni **molto diluite** utilizzando solventi la cui miscela di composti da separare è completamente solubile

Fase stazionaria

Gel di silice (polare)

Fase mobile

Vari solventi (o miscele di solventi) a diversa polarità

Tipici eluenti a crescente polarità sono:

- Etere di petrolio
- Miscele etere di petrolio/acetate di etile
- Diclorometano

Quanto spinge l'eluente: i solventi del laboratorio

Etere di petrolio
C_5H_{12}, C_6H_{14}

→

Diclorometano
CH_2Cl_2

→

Acetato di etile
$CH_3COOCH_2CH_3$

→

Acetone
CH_3COCH_3

→

Metanolo
CH_3OH

meno polare — **più polare**

Eluente più polare

Le macchie salgono di più

Miscele

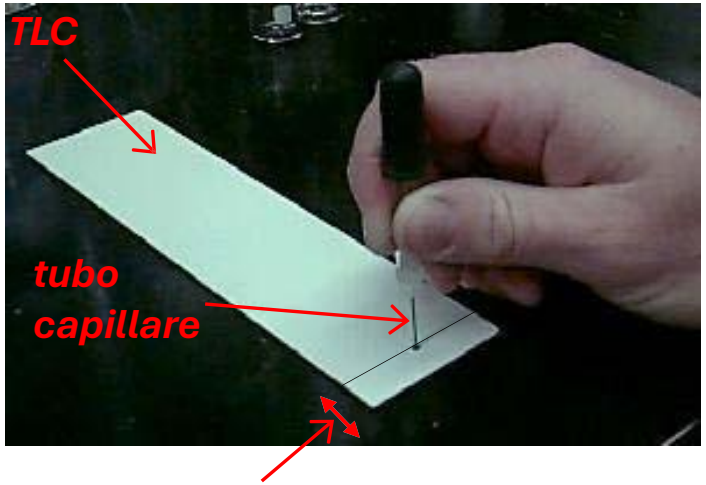
Si possono mescolare due solventi per regolare la polarità

Attenzione al metanolo

Al massimo 10% in diclorometano: la silice può staccarsi

Caricamento del campione

La soluzione della miscela da separare va depositata sulla superficie, posandone con un tubo capillare o pipetta Pasteur una piccola goccia su una linea che segna l'inizio del processo di eluizione

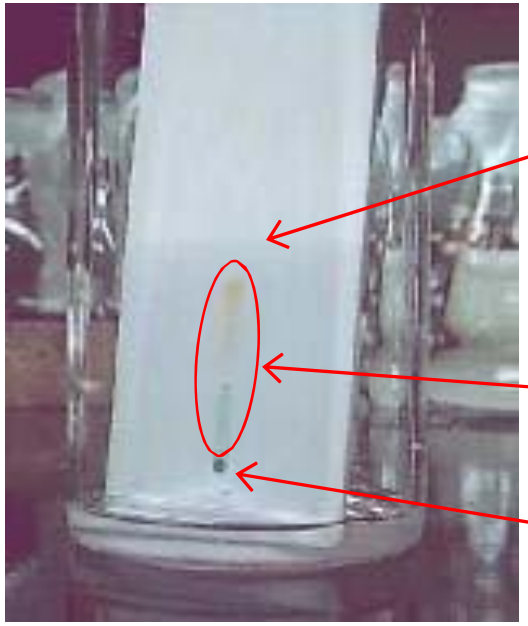


Circa 1 cm dal bordo inferiore *(al di sopra dell'altezza del solvente nella camera di eluizione)*

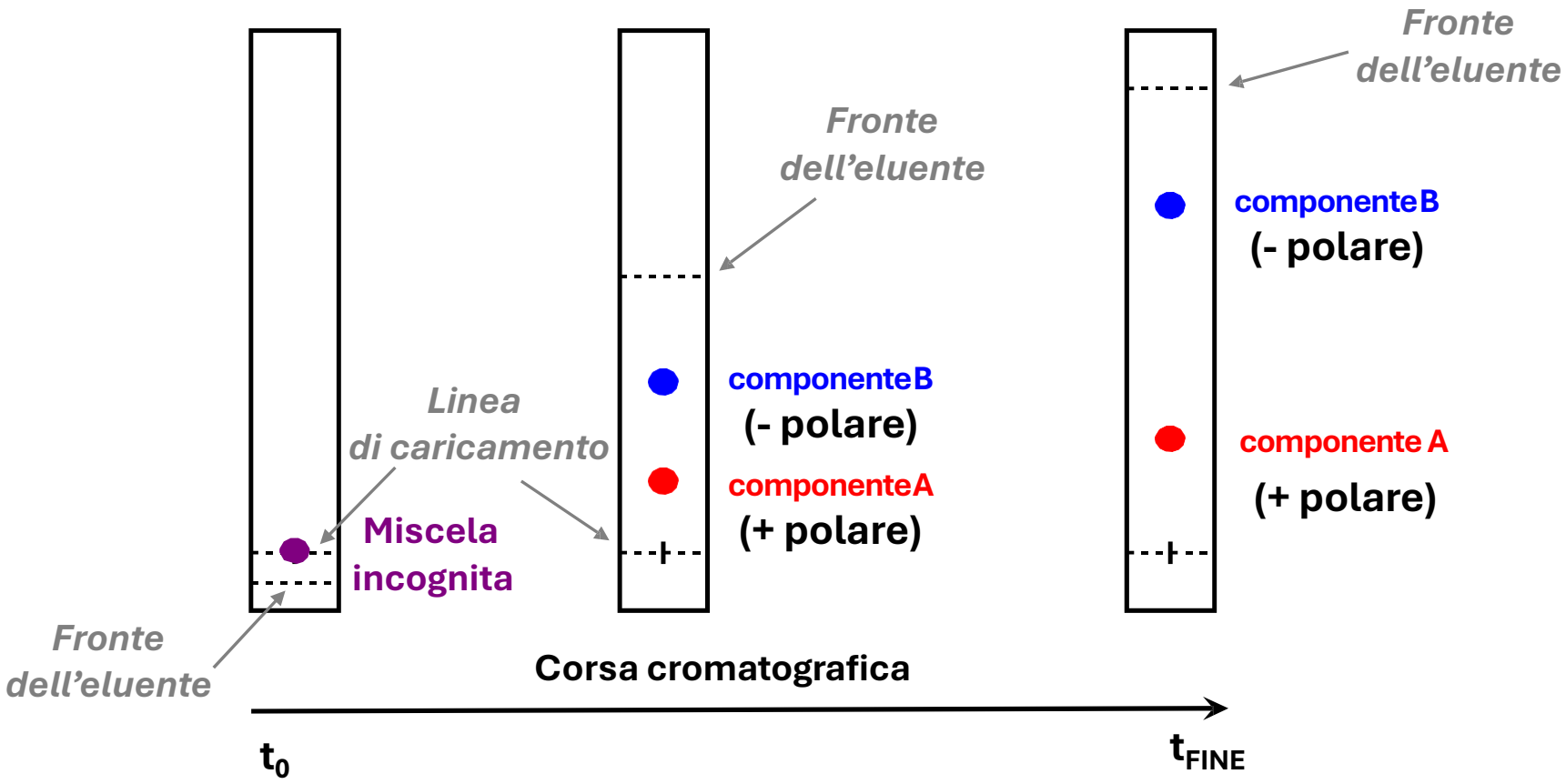
Sulle TLC si scrive solo a MATITA!

Sviluppo della TLC

La TLC viene inserita in un contenitore chiuso (camera di sviluppo o camera di eluizione) contenente sul fondo la fase mobile che per capillarità fluisce sulla fase fissa trascinando gli analiti e separandoli



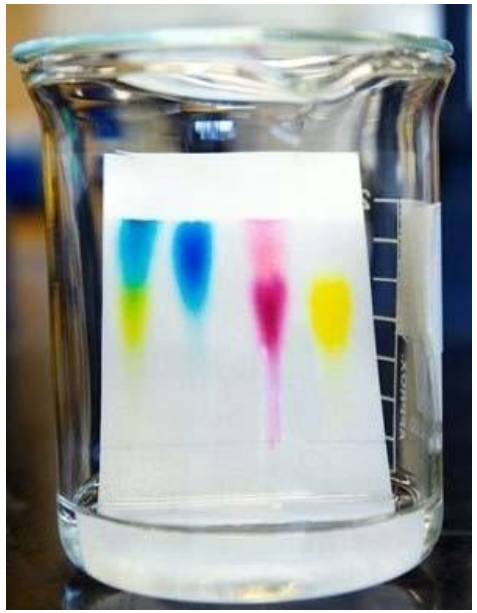
Quando il fronte dell'eluente è a pochi mm dal bordo superiore, si estrae la lastra, si segna la posizione del solvente e si aspetta qualche minuto che si asciughi



Visualizzazione

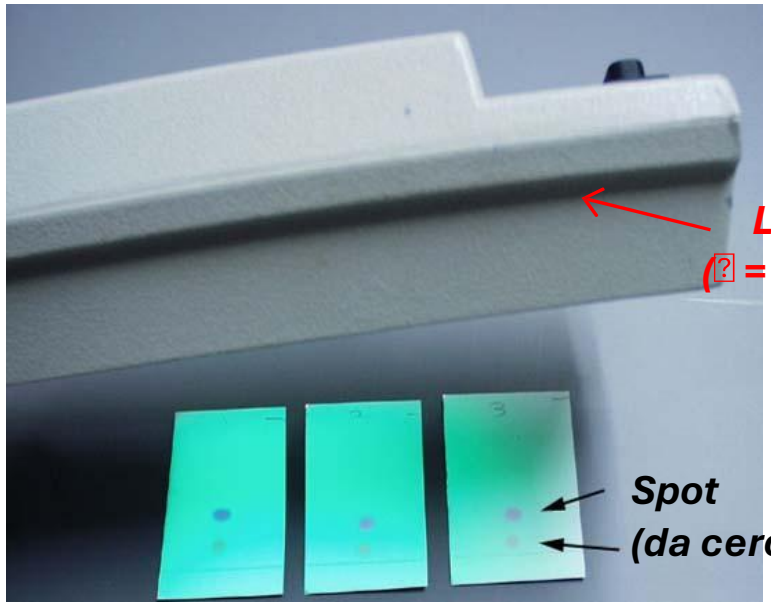
- Composti che assorbono luce visibile

composti aromatici coniugati, polieni etc.



- Composti che assorbono luce UV (λ < 400 nm):

composti aromatici, dieni, nitroderivati, composti carbonilici e carbossilici coniugati, etc.



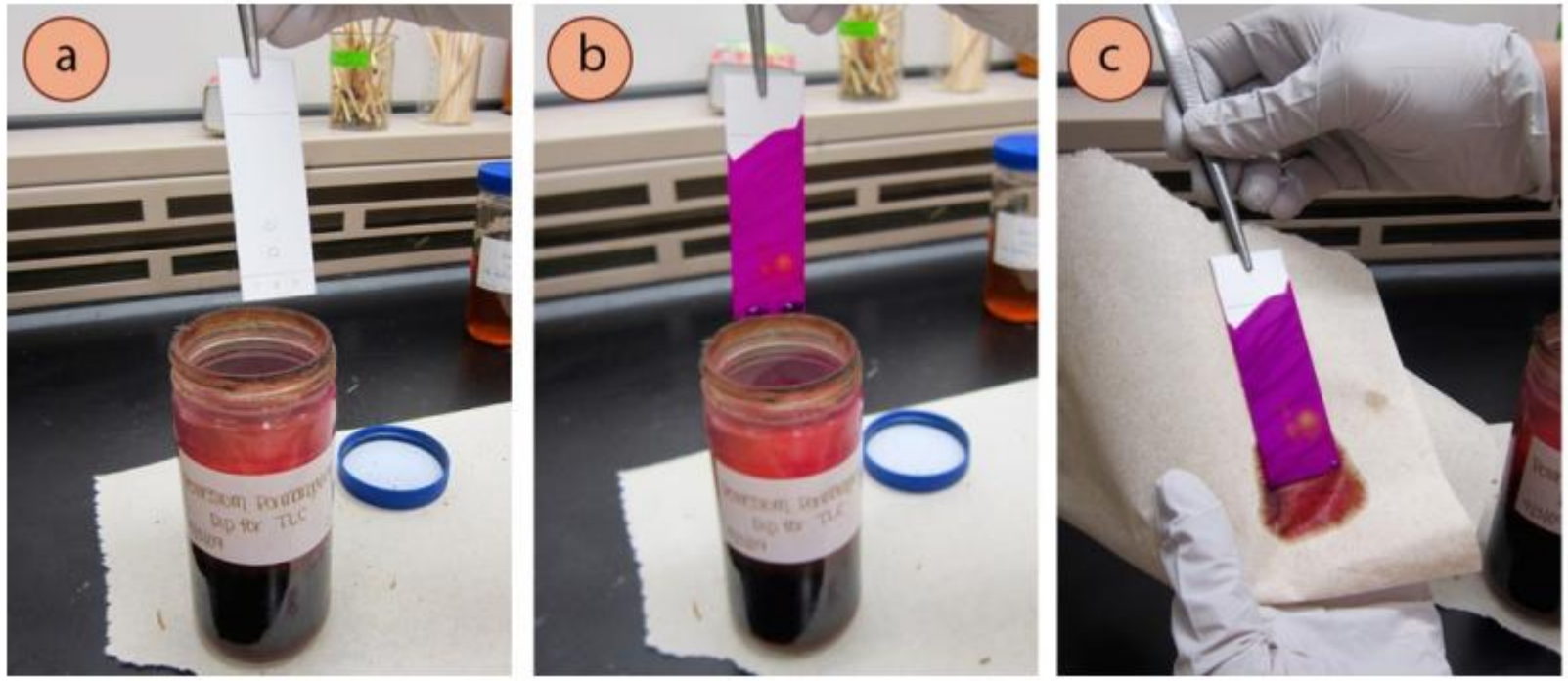
può essere necessario addizionare alla fase stazionaria un indicatore di fluorescenza per visualizzare meglio le macchie

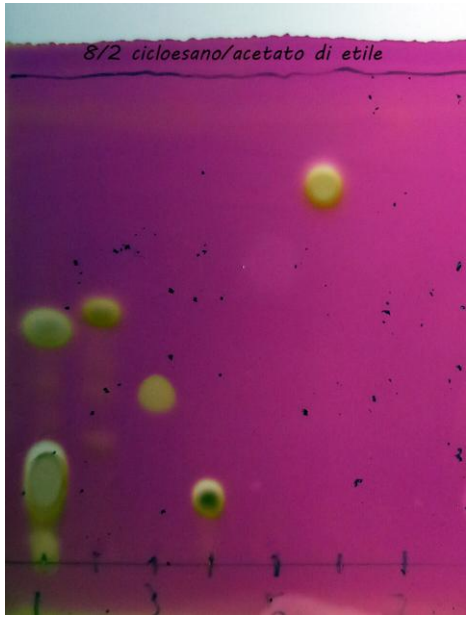
Visualizzazione

Composti che NON assorbono luce all'UV

Immergere le TLC nella soluzione a base di $KMnO_4$

Le macchie appariranno gialle o marrone chiaro su uno sfondo viola chiaro o rosa.





Indossare i **guanti** e avere sempre a disposizione un **pezzo di carta assorbente** quando si lavora con la soluzione **di $KMnO_4$: macchia!**

Rivelatori: come vedere le macchie

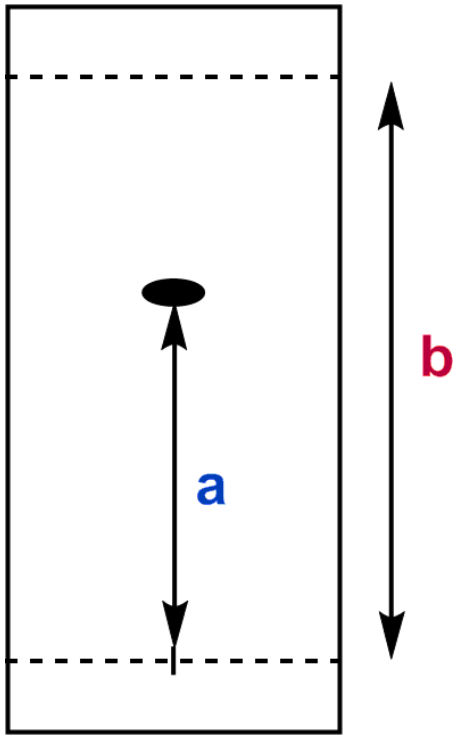
Metodo	Cosa rivela	Come appare
Luce visibile	Composti colorati	Macchie colorate
Lampada UV (254 nm)	Aromatici, dieni, nitroderivati, carbonilici coniugati	Macchie scure su fondo fluorescente
Permanganato ($KMnO_4$)	Composti ossidabili: doppi legami, OH, aldeidi	Macchie gialle su fondo viola

Il colore non basta per identificare una macchia: serve il confronto dell'Rf (fattore di ritenzione)

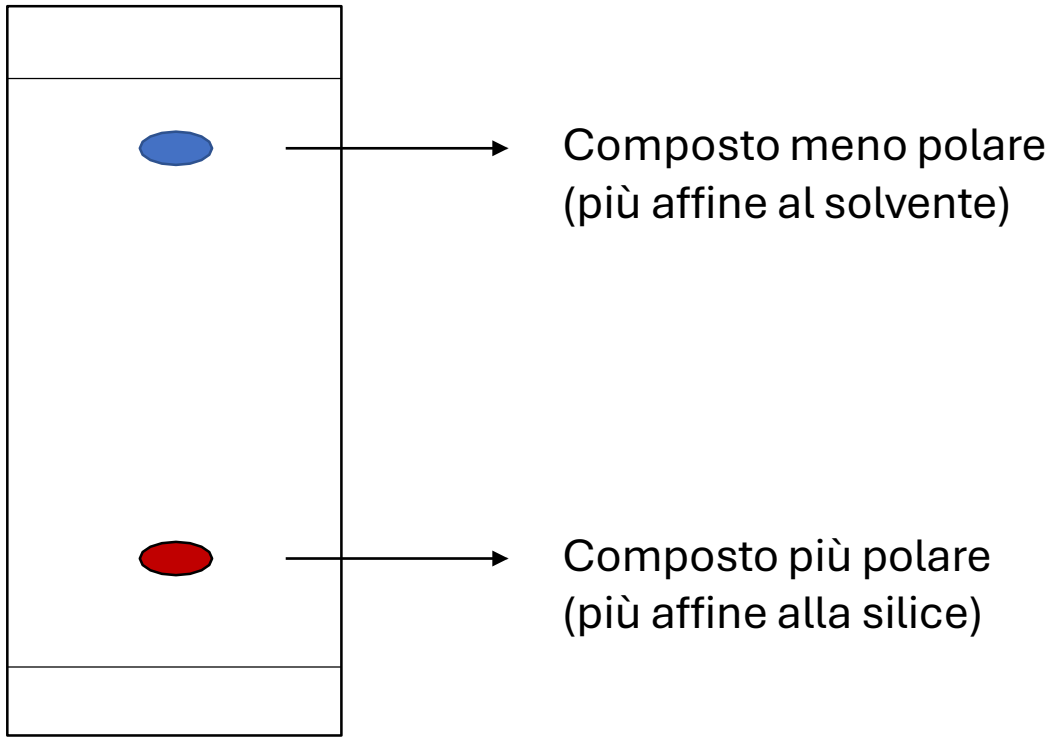
Valutazione quali-quantitativa

Il colore delle macchie non è un parametro sufficiente per l'identificazione degli spot

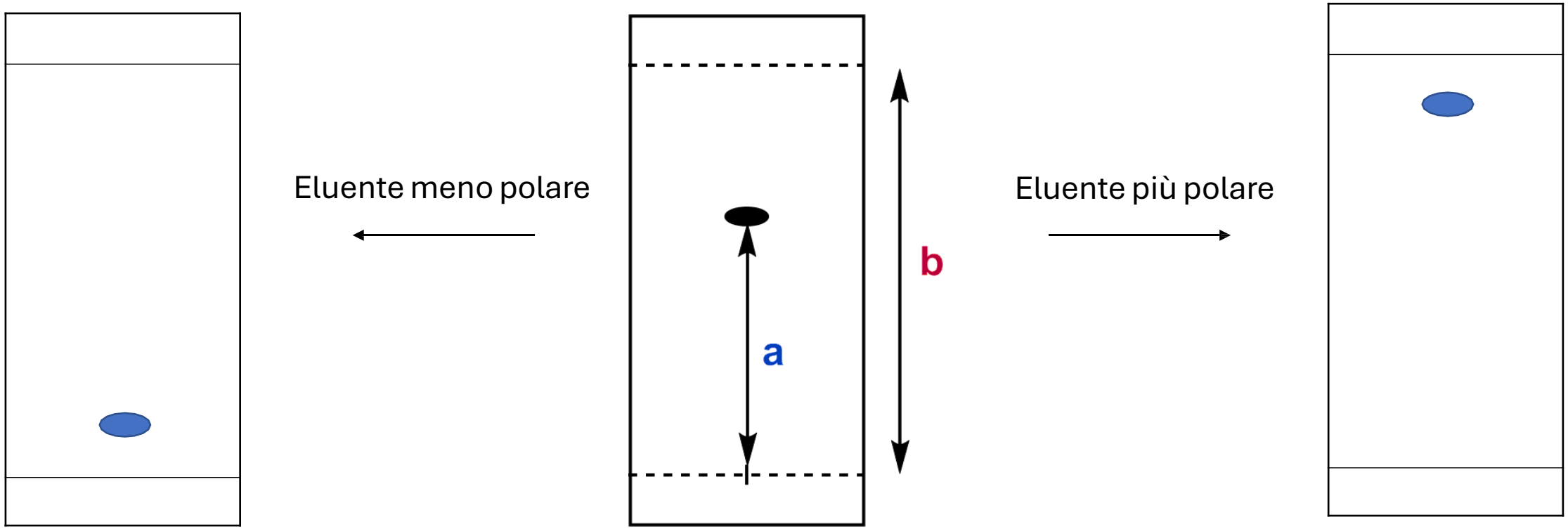
→ **R_f (fattore di ritenzione, fattore di ritardo) =** $\dfrac{\textit{distanza percorsa dall'analita (a)}}{\textit{distanza percorsa dall'eluente (b)}}$



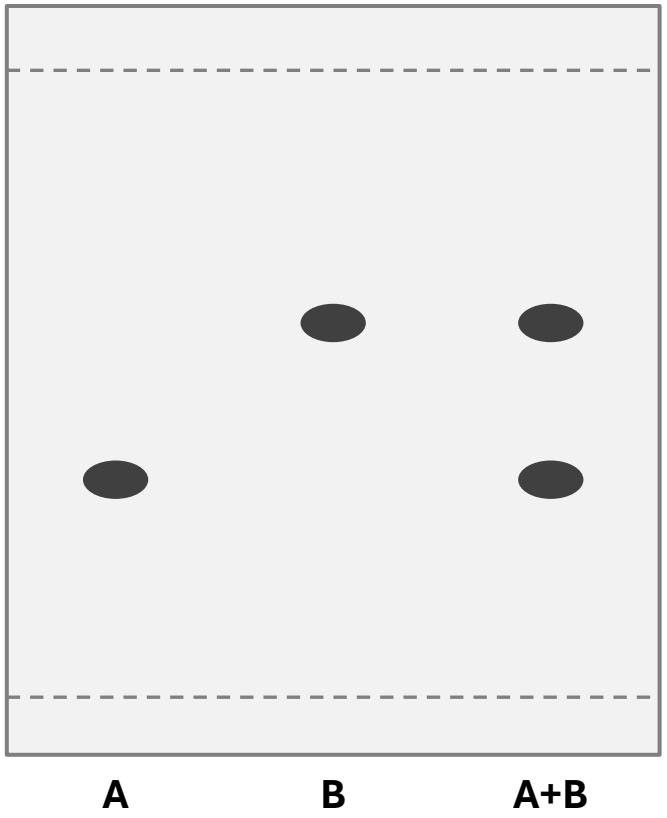
Cosa ci dice l'R_f?



Come influire sull'R_f?

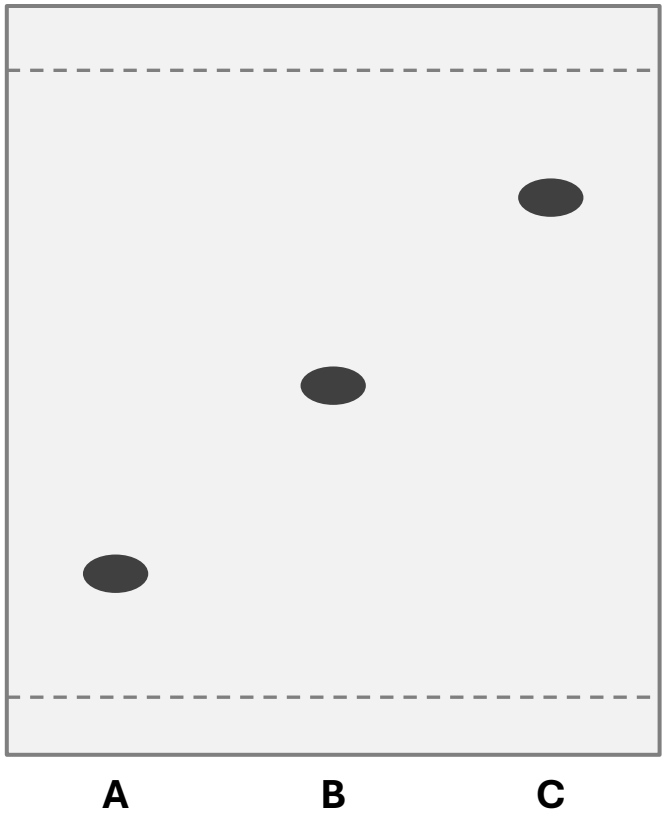


La macchia sovrapposta (co-spotting)



1. Si depositano il composto A, il composto B e una macchia con entrambi.
2. Se gli Rf sono diversi, la corsia mista mostra due macchie.
3. Se coincidono, una sola: i composti potrebbero essere lo stesso, da confermare con un altro eluente.

Esempio svolto: calcolo dell'Rf



Macchia	a (cm)	b (cm)	Rf = a / b
A	1,0	5,0	0,20
B	2,5	5,0	0,50
C	4,0	5,0	0,80

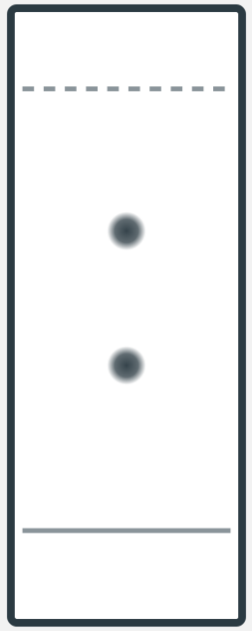
Quale composto è più polare?

A: ha l'Rf più basso, quindi più affinità per la silice.

Intervallo utile per una separazione: Rf tra 0.2 e 0.5.

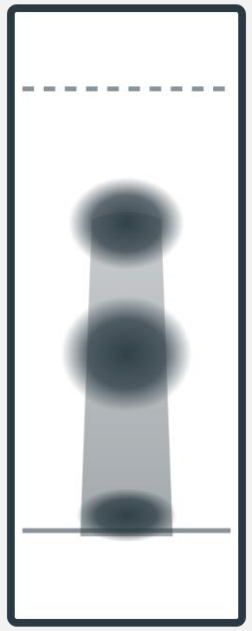
Quanto campione si mette sulla lastra

Lastre dopo l’eluizione: linea di partenza in basso, fronte del solvente in alto



Quantità giusta

- Macchia piccola e rotonda (1-2 mm)
- Macchie ben separate
- Rf misurato dal centro della macchia



Troppo concentrato

- Macchia grande, spesso con coda
- Macchie sovrapposte: separazione non valutabile
- Rf impreciso



Troppo diluito

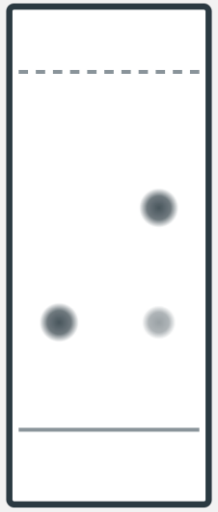
- Macchia debole o invisibile
- Si ripassa sullo stesso punto, asciugando tra un passaggio e l’altro

Macchia grande o con coda: si diluisce il campione e si ripete la TLC.

Macchia invisibile: si ripassa sullo stesso punto.

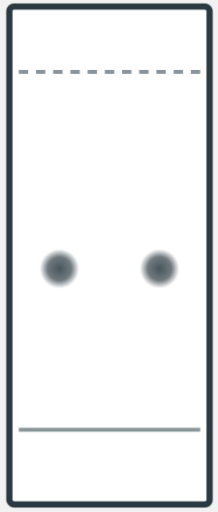
Perché si fa una TLC

1 Controllare la reazione



Il materiale di partenza sta scomparendo? Sta comparendo il prodotto?

2 Controllare il prodotto



Una sola macchia o più di una? Lo stesso Rf dello standard?

Esperienze 2-4, 6

3 Capire come separare



Quale eluente distanzia bene le macchie? Serve per purificare dopo.

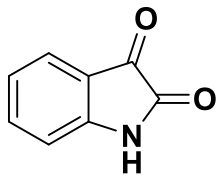
Esperienza 1

Esperienza 1 – 2 mattine

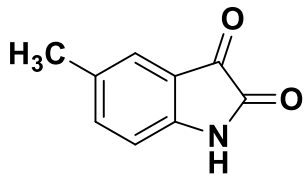
Usando

- metanolo,
- acetone,
- diclorometano,
- acetato di etile,
- etere di petrolio

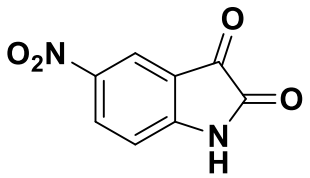
trovare sistema di eluenti per separare bene i seguenti composti:



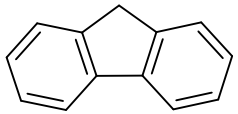
isatina



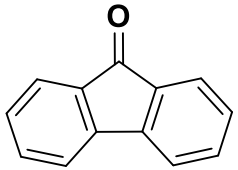
5-metilisatina



5-nitroisatina

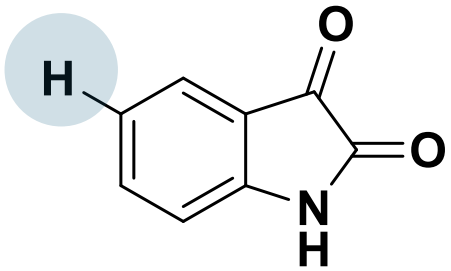


fluorene

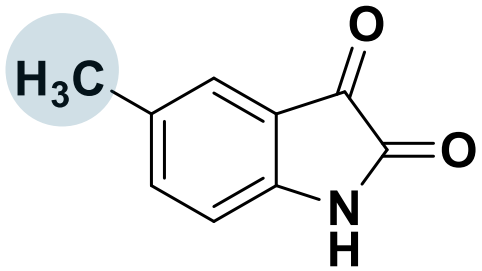


fluorenone

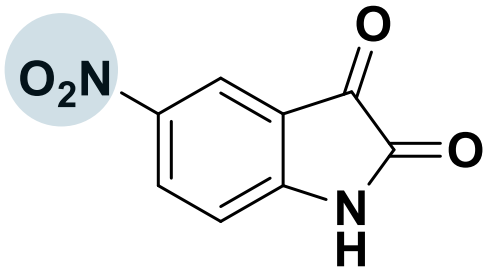
Esperienza 1: polarità e gruppi funzionali



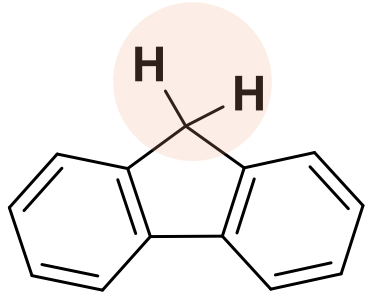
isatina



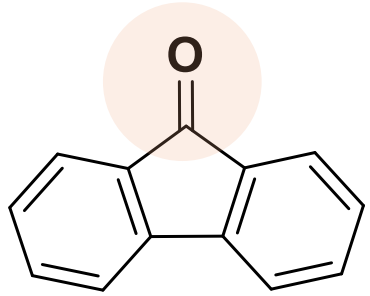
5-metilisatina



5-nitroisatina



fluorene



fluorenone

3 diversi gruppi funzionali:

- Nessuno (idrogeno)
- Metile (CH_3)
- Nitro (NO_2)

Il cambiamento di gruppo funzionale influenzerà la polarità?

Dopo aver preso dimestichezza con la separazione di molecole note, dovrete identificare **3 diversi mix** (contenenti miscele di queste molecole)

Esperienza 1: la procedura

1. Preparare il campione: prelevare una punta di spatola del campione e metterla in un piccolo becker o provetta.
   Aggiungere 2-5 mL di diclorometano per sciogliere il campione.

2. Preparare la camera di eluizione mettendo pochi mL di eluente e tenendola chiusa (si deve riempire dei vapori dell'eluente).
   Il livello dell'eluente deve essere SOTTO la linea di caricamento del campione nella TLC.

3. Tagliare una lastrina TLC: alta 5 cm, larga 2-3 cm (dipende da quanti campioni volete analizzare insieme). Tracciare una linea a 1 cm fondo della TLC (dove caricherete il campione). Segnare un punto sulla linea (vi serve da guida per caricare il campione). Se volete analizzare più campioni, separateli di 0.5 cm.

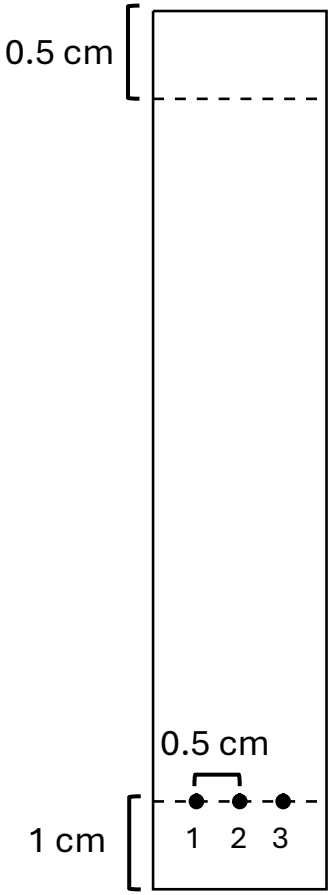
4. Depositare una piccola goccia di campione sul punto della TLC e lasciare asciugare la goccia (ci vogliono pochi secondi).

5. Mettere la TLC nella camera, chiudere la camera ed aspettare.

6. Togliere la TLC quando il fronte del solvente è a circa 0.5 cm dal bordo superiore della TLC.

7. Segnare il fronte del solvente.

8. Analizzare la TLC: segnare le macchie e calcolate l'R_f.
   Se non le vedete usare la lampada UV e poi immergere la TLC nella soluzione di $KMnO_4$.



Errori tipici nella TLC

Errore	Cosa succede	Come evitarlo
Soluzione campione concentrata	Code e macchie sovrapposte	Soluzione molto diluita, goccia piccola
Linea di caricamento sotto il livello dell'eluente	Il campione si scioglie nell'eluente: non si sviluppa TLC	Livello dell'eluente sotto la linea
Scrivere a penna	L'inchiostro sale con l'eluente	Solo matita
Camera di eluizione aperta	Corsa irregolare (= non confrontabile con altre corse)	Camera chiusa, qualche minuto per saturarla
Lastrina tolta troppo tardi	Fronte non segnabile (= no si può calcolare l'R_f)	Estrarla a circa 0.5 cm dal bordo e segnare subito il fronte

Dove si butta?

Quattro situazioni tratte dalle esperienze di questa lezione: in quale contenitore va il solvente?

Alogenati
C.E.R. 070703

Non alogenati
C.E.R. 070704

Acque con metalli
C.E.R. 160506

Contenitore blu
C.E.R. 150202 / 150110

Solvente	Formula bruta
Metanolo	CH_4O
Acetone	C_3H_6O
Diclorometano	CH_2Cl_2
Acetato di etile	$C_4H_8O_2$
Etere di petrolio	miscela di alcani (C_5H_{12}, C_6H_{14})

Alogenato = contiene un alogeno (**Cl**, Br, F, I).

Dove si butta?

Etere di petrolio e acetato di etile rimasto nella camera di eluizione

Alogenati
C.E.R. 070703

Non alogenati
C.E.R. 070704

Acque con metalli
C.E.R. 160506

Contenitore blu
C.E.R. 150202 / 150110

Non alogenati · 070704

Solventi senza cloro.

Solvente	Formula bruta
Metanolo	CH_4O
Acetone	C_3H_6O
Diclorometano	$CH_2\mathbf{Cl}_2$
Acetato di etile	$C_4H_8O_2$
Etere di petrolio	miscela di alcani (C_5H_{12}, C_6H_{14})

Alogenato = contiene un alogeno (**Cl**, Br, F, I).

Dove si butta?

Diclorometano con 5% di metanolo rimasto nella camera di eluizione

Alogenati
C.E.R. 070703

Non alogenati
C.E.R. 070704

Acque con metalli
C.E.R. 160506

Contenitore blu
C.E.R. 150202 / 150110

Alogenati · 070703

È quasi tutto diclorometano: il 5% di metanolo non cambia la categoria.

Solvente	Formula bruta
Metanolo	CH_4O
Acetone	C_3H_6O
Diclorometano	CH_2Cl_2
Acetato di etile	$C_4H_8O_2$
Etere di petrolio	miscela di alcani (C_5H_{12}, C_6H_{14})

Alogenato = contiene un alogeno (**Cl** cloro, Br, F, I).

Dove si butta?

DOMANDA 3 DI 4

Acetone usato per sciacquare il becher che conteneva isatina in diclorometano

Alogenati
C.E.R. 070703

Non alogenati
C.E.R. 070704

Acque con metalli
C.E.R. 160506

Contenitore blu
C.E.R. 150202 / 150110

Alogenati · 070703

L'acetone non ha cloro, ma ora contiene diclorometano: conta cosa c'era nel recipiente.

Solvente	Formula bruta
Metanolo	CH_4O
Acetone	C_3H_6O
Diclorometano	CH_2Cl_2
Acetato di etile	$C_4H_8O_2$
Etere di petrolio	miscela di alcani (C_5H_{12}, C_6H_{14})
Isatina	$C_8H_5NO_2$

Alogenato = contiene un alogeno (**Cl** cloro, Br, F, I).

Dove si butta?

TLC

Alogenati
C.E.R. 070703

Non alogenati
C.E.R. 070704

Acque con metalli
C.E.R. 160506

Contenitore blu
C.E.R. 150202 / 150110

Contenitore blu – guanti (C.E.R. 150202)

Solvente	Formula bruta
Metanolo	CH_4O
Acetone	C_3H_6O
Diclorometano	CH_2Cl_2
Acetato di etile	$C_4H_8O_2$
Etere di petrolio	miscela di alcani (C_5H_{12}, C_6H_{14})

Alogenato = contiene un alogeno (**Cl**, Br, F, I).