

EXPERIMENT 6: CHROMATOGRAPHY

A Separation and Purification Technique

INTRODUCTION

Chromatography is a technique that may be used to separate the components of a mixture as well as to identify organic substances and examine their purity. Chromatography encompasses several techniques such as column, thin-layer, paper, gas liquid, etc. chromatography. Two principles are basically involved in chromatography: adsorption (as in thin-layer chromatography) and partition (as in paper chromatography), and certain terms are common to both types of chromatography.

In adsorption chromatography, separation depends on the selective desorption of the components of a mixture by the eluent (mobile phase) from the surface of a solid adsorbent (stationary phase). The adsorbent may be packed in a column (column chromatography) or spread as a thin layer on a glass plate as in thin-layer chromatography.

In partition chromatography, separation depends on partition of the components of a mixture between the stationary and mobile phases. The mobile phase may be a liquid (liquid-liquid partition chromatography) or a gas (gas-liquid partition chromatography).

ANALYSIS OF CHROMATOGRAMS

In thin layer and paper chromatography, substances are characterized by their R_f -values (retardation factor). The R_f -value is a number (less than one) which is characteristic of a compound for a given adsorbent and developing solvent. It is defined as:

$$R_f = \frac{\text{distance traveled by the compound}}{\text{distance traveled by the solvent}}$$

In gas-liquid chromatography, compounds are characterized by their retention times.

الكروماتوغرافيا هي تقنية تُستخدم لفصل مكونات الخليط، وكذلك لتحديد المواد العضوية وفحص نقائها. تشمل الكروماتوغرافيا عدة تقنيات مثل كروماتوغرافيا العمود، والطبقة الرقيقة، والورق، والغاز والسائل، وغيرها. هناك مبدآن أساسيان في الكروماتوغرافيا: الامتزاز (كما في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة) والتجزئة (كما في كروماتوغرافيا الورق). وتوجد مصطلحات مشتركة بين كلا النوعين من الكروماتوغرافيا.

في كروماتوغرافيا الامتزاز، يعتمد الفصل على الامتزاز الانتقائي لمكونات الخليط بواسطة المذيب (الطور المتحرك) من سطح مادة ماصة صلبة (الطور الثابت). يمكن تعبئة المادة الماصة في عمود (كروماتوغرافيا العمود) أو نشرها كطبقة رقيقة على لوح زجاجي كما في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

في كروماتوغرافيا التوزيع، يعتمد الفصل على توزيع مكونات الخليط بين الطورين الثابت والمتحرك. قد يكون الطور المتحرك سائلاً (كروماتوغرافيا التوزيع السائل-السائل) أو غازياً (كروماتوغرافيا التوزيع الغازي-السائل).

في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والورقية، تُصنف المواد بقيمة R الخاصة بها (عامل التباطؤ). قيمة R هي رقم (أقل من واحد) يميز المركب لمادة ماصة معينة ومذيب تطويع. تُعرف على النحو التالي:

في كروماتوغرافيا الغاز السائل، تُصنف المركبات بأوقات احتجازها.

هذا أحد تطبيقات كروماتوغرافيا الامتزاز، حيث تُفرد مادة ماصة، عادةً ما تكون هلام السيليكا أو الألومينا، كطبقة رقيقة على سطح حامل، مثل لوح زجاجي أو شريحة مجهرية. يُوضع المزيج عند أحد طرفي اللوح المطلي، ومع تحرك الطور المتحرك (سائل) لأعلى على المادة الماصة الصلبة بفعل الخاصية الشعرية، تُزال مكونات المزيج الممتزة وتُحمل بمعدلات مختلفة بواسطة المذيب المتحرك.

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)

This is one application of adsorption chromatography in which an adsorbent, usually silica gel or alumina, is spread out as a thin layer on an inert surface, such as a glass plate or microscope slide. The mixture is applied at one end of the coated plate and, as the mobile phase (a liquid) moves up the solid adsorbent by capillary action, the adsorbed components of the mixture get desorbed and carried along at different rates by the moving solvent.

Adsorption of the components of the mixture, on the surface of the adsorbent, occurs to differing extents depending on their structural features and polarity. The more strongly adsorbed a given compound is, the slower it is transported by the mobile phase, and conversely, the more weakly adsorbed the compound is, the faster it is transported up the stationary phase.

The result is that the components of the mixture are separated into different zones or spots (Figure 20).

يحدث امتزاز مكونات الخليط على سطح المادة الماصة بدرجات متفاوتة اعتماداً على خصائصها الهيكلية وقطبيتها. كلما كان المركب الممتز أقوى، كان نقله أبطأ بواسطة الطور المتحرك، وعلى العكس من ذلك، كلما كان المركب الممتز أضعف، كان نقله أسرع لأعلى الطور الثابت. والنتيجة هي فصل مكونات الخليط إلى مناطق أو بقع مختلفة (الشكل 20).

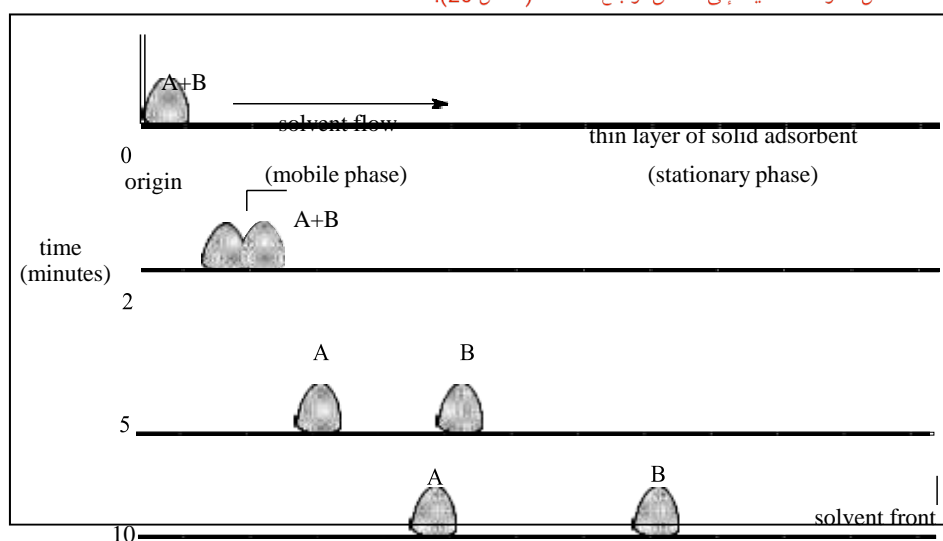


Figure 20. Separation by thin-layer chromatography

Separation by thin-layer chromatography depends on the kind and activity of the adsorbent (stationary phase), the polarity of the eluent (mobile phase) and on the chemical nature of the components of the mixture. The most common adsorbents employed in TLC are silica (SiO₂).

يعتمد الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على نوع ونشاط المادة الماصة (الطور الثابت)، وقطبية المذيب (الطور المتحرك)، وعلى الطبيعة الكيميائية لمكونات الخليط. أكثر المواد الماصة شيوعاً المستخدمة في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة هي السيليكا (SiO₂).

ويتم تحديد نشاط هذه الممتزات إلى حد كبير من خلال، (Alb03.xH₂O) والالومينا (xH₂O) محتواها المائي. بالنسبة لمادة ماصة ومركب معين، كلما زادت قطبية الشاطئ، زادت قدرته على إزاحة مركب من سطح المادة المازة، وبالتالي زادت إعادة القيمة.

xH₂O) and alumina (Al₂O₃. xH₂O), and the activity of these adsorbents is largely determined by their water content. For a given adsorbent and compound, the greater the polarity of the eluent, the greater is its ability to dislodge a compound from the surface of the adsorbent, and therefore the higher the R_f-value.

Eluting power of solvents: قوة الإذابة للمذيبات:

Acetic acid > Ethyl alcohol > Acetone > Diethyl ether > Dichloromethane > Hexane.

GENERALIZED EXPERIMENTAL PROCEDURE

تحضير ألواح TLC PREPARATION OF TLC PLATES

Large glass plates (20x20 cm) are commonly used for quantitative separations, while microscope slides are usually used for qualitative purposes. A homogeneous slurry of the adsorbent in a volatile organic solvent (chloroform or dichloromethane) is poured over the glass plates and allowed to air-dry at room temperature. Microscope slides can be coated, two at a time, by dipping them into the slurry for some time then holding them vertically to air-dry. The jar of adsorbent must be shaken thoroughly before each use to homogenize the slurry. Three steps are involved in TLC: **spotting, developing, and visual**

① ② ③

Spotting. The mixture to be analyzed is dissolved in a suitable solvent (1% solution). With a drawn capillary tube, a small amount of this solution is spotted on the TLC plate about 1 cm from the bottom (Figure 21). The spots should have a diameter not larger than 1-2 mm, since larger spots result in "tailing" and overlapping of close spots. Once the solvent evaporates from the spots, the plate is ready for developing.

Development of the Chromatogram. The eluent, also called developing solvent, is chosen based on the nature and polarity of the compounds being studied. It is best to choose the solvent that will give a satisfactory separation within the range of 0.2-0.8 R_f values. The plate is

تستخدم ألواح زجاجية كبيرة (20x20 سم) عادة للفصل الكمي، بينما تُستخدم شرائح المجهر عادة للأغراض النوعية. يُسكب معلق متجانس من المادة الماصة في مذيب عضوي متطاير (الكلوروفورم أو ثنائي كلورو الميثان) على الألواح الزجاجية ويُترك ليُجف في الهواء في درجة حرارة الغرفة. يمكن طلاء شرائح المجهر، اثنتين في كل مرة، عن طريق غمسها في المعلق لبعض الوقت ثم إمساكها عمودياً لتجف في الهواء. يجب رج وعاء المادة الماصة جيداً قبل كل استخدام لضمان تجانس المعلق. تتضمن عملية الفصل الكروماتوغرافي الطبقي الرقيق (TLC) ثلاث خطوات: وضع العينة، والتظهير، والفحص البصري

وضع النقاط. يُذاب الخليط المراد تحليله في مذيب مناسب (محلول 1% متقوب، تُوضع كمية صغيرة من هذا المحلول على لوحة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) على بُعد حوالي 1 سم من الأسفل (الشكل 21). يجب ألا يتجاوز قطر النقاط 1-2 مم، لأن النقاط الأكبر حجماً تؤدي إلى "ذيل" وتداخل النقاط المتقاربة. بمجرد تبخر المذيب من النقاط، تصبح اللوحة جاهزة للتطوير.

تطوير الكروماتوجرام. يُختار المذيب المستخدم في عملية الإذابة، والذي يُسمى أيضاً مذيب التطوير، بناءً على طبيعة وقطبية المركبات قيد الدراسة. من الأفضل اختيار المذيب الذي يُعطي فصلاً مرضياً ضمن نطاق قيم R_f من 0.2 إلى 0.8. اللوحة هي

توضع في حجرة تطوير (مثل كأس مغطى) تحتوي على المذيب ومبطنة بورق ترشيح مشبع بالمذيب للمساعدة في تشبع الجو بأبخرة المذيب. عندما تصل جبهة المذيب إلى خط النهاية، تُزال الصفيحة من الكأس وتوضع على سطح العمل لتجف في الهواء.

placed in a developing chamber (e.g., a covered beaker) containing the solvent and lined with filter paper soaked in the solvent to help saturate the atmosphere with solvent vapors. When the solvent front reaches the finish line, the plate is removed from the beaker and placed on the bench top to air-dry.

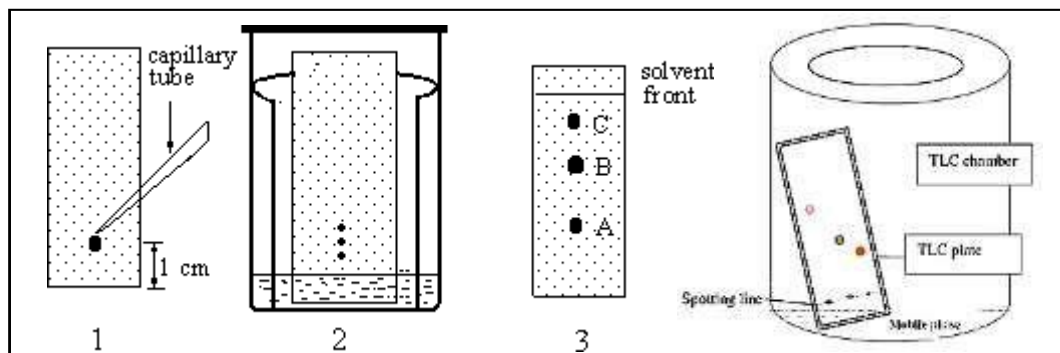


Figure 21. Steps in the TLC technique

تصوير البقع، يتم تحديد مواقع المركبات على اللوحة وفقاً لخصائصها:

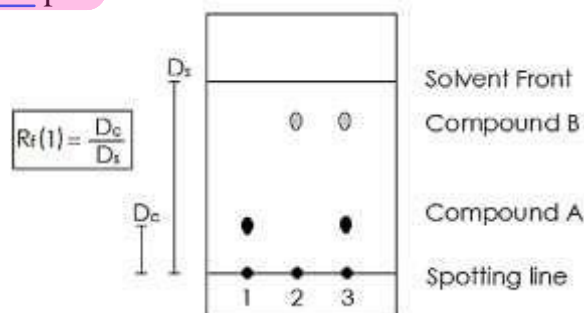
Visualization of Spots. Compounds on the plate are located according to their characteristics:

- If the spots are colored, they can be observed in ordinary light.
- If the compounds are colorless, they can be seen under UV-light or using iodine staining where they appear as dark spots on a white background.
- Colorless spots may also be located with an indicator. Most organic compounds form complexes with iodine giving dark brown spots when the plate is exposed to iodine vapor.

أ. إذا كانت البقع ملونة، فيمكن ملاحظتها في الضوء العادي.

ب. إذا كانت المركبات عديمة اللون، فيمكن رؤيتها تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية أو باستخدام تلوين اليود حيث تظهر كبقع داكنة على خلفية بيضاء.

Sulfuric acid may also be used to make colorless spots visible. Most organic compounds turn black when sprayed with sulfuric acid.

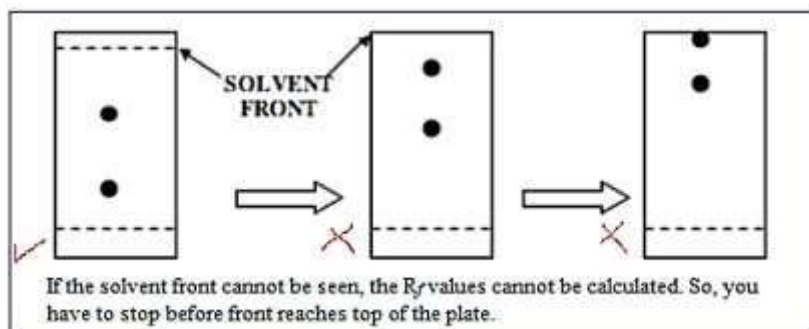


ج. يمكن أيضاً تحديد البقع عديمة اللون باستخدام مؤشر. تشكل معظم المركبات العضوية معقدات مع اليود، مما يعطي بقعا بنية داكنة عند تعريض الصفيحة لبخار اليود. يمكن أيضاً استخدام حمض الكبريتيك لجعل البقع عديمة اللون مرئية. تتحول معظم المركبات العضوية إلى اللون الأسود عند رشها بحمض الكبريتيك.

اترك اللوحة تتطور حتى يصبح المذيب على بعد نصف سنتيمتر تقريبًا أسفل أعلى اللوحة. أخرج اللوحة من الكأس وقم بتحديد جبهة المذيب فورًا بقلم رصاص.

Notes:

○ Allow the plate to develop until the solvent is about half a centimeter below the top of the plate. Remove the plate from the beaker and immediately mark the solvent front with a pencil.



○ A pure substance produces one spot on the TLC plate while an impure substance produces two or more spots.

تنتج المادة النقية بقعة واحدة على لوحة TLC بينما تنتج المادة غير النقية بقعتين أو أكثر.

OBJECTIVES

1. Determining the R_f -value for *o*- and *p*-nitroaniline by *TLC*.
2. Separating a mixture of two dyes by paper chromatography.
3. Determining the constituents of an analgesic drug by *TLC*.

Having done this experiment, you will have seen the use of *TLC* and paper chromatography in the separation of mixtures and in the characterization of organic compounds.

EXPERIMENTAL

MATERIALS NEEDED	<p><u>Glassware:</u> 2 Microscope slides,, capillary tubes, beaker (200 mL), Petri dish with cover, filter paper, UV lamp.</p> <p><u>Chemicals:</u> stock solutions (1% in acetone) of <i>o</i>-nitrophenol, and <i>p</i>-nitrophenol, green dye, 5 mL dichloromethane, 20 mL isoprophyl alcohol, 1 mL methanol, 6 mL benzene, 3 mL ether, 1 mL acetic acid and analgesic tablet (Remin, Revanin, Paracetamol or Excedrin), stock solutions (5% in acetone) of aspirin, phenacetin, salicylamide, caffeine, acetaminophen.</p>
-------------------------	---

TLC EXAMINATION OF ISOMERIC NITROANILINES



Prepare the developing chamber by placing a filter paper inside a 200mL beaker and adding 5 mL dichloromethane. Cover the beaker while preparing the *TLC* plates as described before. Dip a capillary tube into a 1% solution of *p*-nitroaniline in acetone and touch it to the *TLC* plate at the origin.



حضّر حجرة التطوير بوضع ورقة ترشيح داخل كأس زجاجي سعة 200 مل وإضافة 5 مل من ثنائي كلورو الميثان. غطّ الكأس أثناء تحضير ألواح TLC كما هو موضح سابقًا. اغمس أنبوبًا شعريًا في محلول 1% من بارا-نيتروأنيلين في الأسيتون، ثم لامسه بلوحة TLC عند نقطة البداية.

After the solvent has evaporated from the spot, place the slide in the developing chamber. When the solvent front has reached the finish line, remove the slide and allow the solvent to evaporate. Locate the center of the spot and calculate the R_f -value. Repeat the procedure with *o*-nitroaniline.

بعد تبخر المذيب من البقعة، ضع الشريحة في حجرة التطوير. عندما تصل جبهة المذيب إلى خط النهاية، أزل الشريحة واترك المذيب يتبخر. حدد مركز البقعة واحسب قيمة R_f . كرر الإجراء مع أورثو-نيتروأنيلين.

On a new slide, place the spots of *p*-nitroaniline and *o*-nitroaniline side by side at the origin so that the two compounds run parallel on the same slide. Calculate the R_f -value for each. Repeat using a mixture of the two compounds in addition to the single compounds as references. Place one spot of the mixture in the middle and a spot of each isomer on either side of the mixture. Note the resolution of the mixture into two spots and compare the R_f -values obtained for the mixture and for the individual compounds.

على شريحة جديدة، ضع بقعتي بارا-نيتروأنيلين وأورثو-نيتروأنيلين جنبًا إلى جنب عند نقطة الأصل بحيث يسير المركبان بالتوازي على نفس الشريحة. احسب قيمة R_f لكل منهما. كرر ذلك باستخدام خليط من المركبين بالإضافة إلى المركبات المفردة كمرجع. ضع بقعة واحدة من الخليط في المنتصف وبقعة من كل متصاوغ على أحد جانبي الخليط. لاحظ فصل الخليط إلى بقعتين وقارن قيم R_f المحسوبة للخليط وللمركبات الفردية.

ANALYSIS OF ANALGESIC DRUGS BY TLC

تحليل الأدوية المسكنة بواسطة TLC



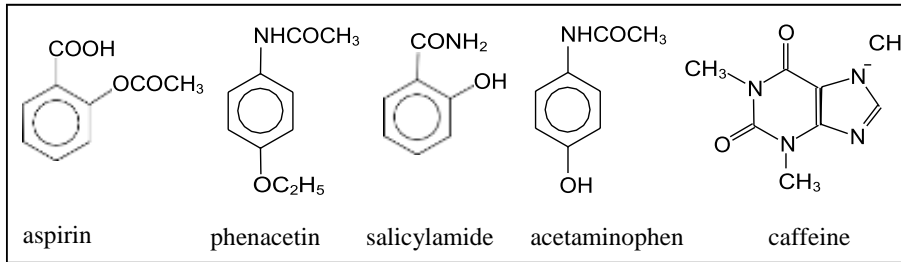
In many non-prescription analgesic drugs such as Remin, Revacod, Revanin, Paracetamol, Excedrin etc., the active ingredient is one or more of the compounds listed below. The constituents of an analgesic drug may be qualitatively determined by *TLC* using suitable reference samples. Introduce a small piece of an analgesic tablet into a test tube, add 1 mL of methanol and stir well. Allow the insoluble material to settle and use the supernatant liquid for spotting on the *TLC* plate.



في العديد من الأدوية المسكنة التي لا تستلزم وصفة طبية، مثل ريمين، وريفاكود، وريفانين، وباراسيتامول، وإكسيدرلين، وما إلى ذلك، يكون المكون النشط واحدًا أو أكثر من المركبات المدرجة أدناه. يمكن تحديد مكونات الدواء المسكن نوعيًا بواسطة *TLC* باستخدام عينات مرجعية مناسبة. ضع قطعة صغيرة من قرص مسكن في أنبوب اختبار، وأضف 1 مل من الميثانول وحرك جيدًا. اترك المادة غير القابلة للذوبان تترسب، واستخدم السائل الطافي لوضعه على لوحة *TLC*.

حضّر محاليل ميثانولية مخففة من المركبات المرجعية، وضع أكبر عدد ممكن منها على نفس اللوحة. استخدم مزيجاً من المذيبات: البنزين: الإيثر: حمض الأسيتيك (2:1:0.3) لتطوير الكروماتوغرامات. افحص اللوحات المطورة تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية، وحدد تركيب قرص المسكن.

Make dilute methanolic solutions of the reference compounds and spot as many of them as possible on the same plate. Use a solvent mixture of benzene: ether: acetic acid (2:1:0.3) to develop the chromatograms. Examine the developed plates under ultraviolet light and determine the composition of the analgesic tablet.



في هذه التجربة، سيتم فحص صيغة طعام خضراء (مكونة من عنصر أصفر وآخر أزرق) باستخدام الكروماتوغرافيا الورقية، وذلك باستخدام طبق بتري (قطره 10 سم) كحجرة تطوير (الشكل 22).

التحليل الكروماتوغرافي الورقي للصبغة

PAPER CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF A DYE



In this experiment green food coloring (composed of a yellow and a blue component) will be examined by paper chromatography using a Petri dish (10 cm in diameter) as a developing chamber (figure 22).

Locate the center of a circular piece of filter paper by folding it in half. Make sure that the filter paper has a diameter slightly larger than that of the Petri dish.

Using a melting point capillary tube with both sides open, apply a small spot of food coloring at the center of the paper.

حدد مركز قطعة دائرية من ورق الترشيح عن طريق طيها إلى نصفين. تأكد من أن قطر ورقة الترشيح أكبر قليلاً من قطر طبق بتري. باستخدام أنبوب شعري لقياس درجة الانصهار مفتوح الطرفين، ضع نقطة صغيرة من ملون الطعام في منتصف الورقة.

Punch a small hole at the center and through it insert a small strip of filter paper rolled together to make a wick (Figure 22). Put 20-30 mL of the developing solvent (isopropyl alcohol - water 2:1) into the Petri disk and rest the filter paper on the rim of the dish making sure that the wick dips into the solvent.

Cover the paper with the Petri dish cover and leave the chromatogram to develop undisturbed for 10 minutes until the colors separate into distinct circles. Remove the paper chromatogram and allow to air-dry. Calculate the R_f -values for the yellow and the blue dye.

انقب ثقباً صغيراً في المنتصف، وأدخل من خلاله شريطاً صغيراً من ورق الترشيح ملفوفاً معاً لتشكيل فتيل (الشكل 22). ضع 20-30 مل من المذيب المظهر (كحول الأيزوبروبيل - ماء 2:1) في قرص بتري، وضع ورق الترشيح على حافة الطبق مع التأكد من غمر الفتيل في المذيب. غط الورقة بغطاء طبق بتري، واترك الكروماتوجرام يتطور دون تحريك لمدة 10 دقائق حتى تنفصل الألوان إلى دوائر واضحة. أزل الكروماتوجرام الورقي واتركه يجف في الهواء. احسب قيم R_f للصبغة الصفراء والأزرقاء.

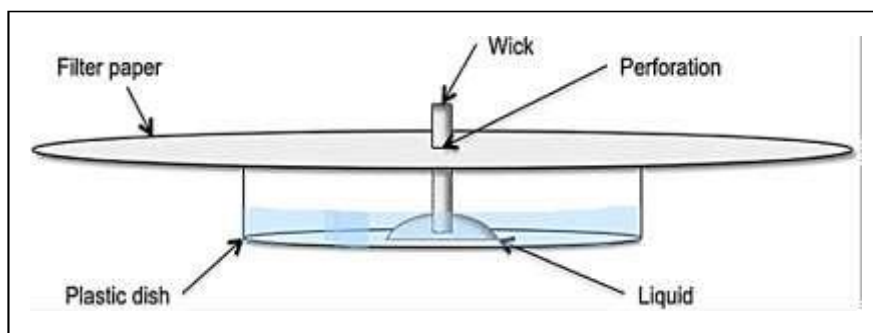


Figure 22. Paper chromatography using a Petri dish



Useful links

Thin Layer and Paper Chromatography

<https://www.youtube.com/watch?v=w65S1dqrSAY>