

Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας TLC

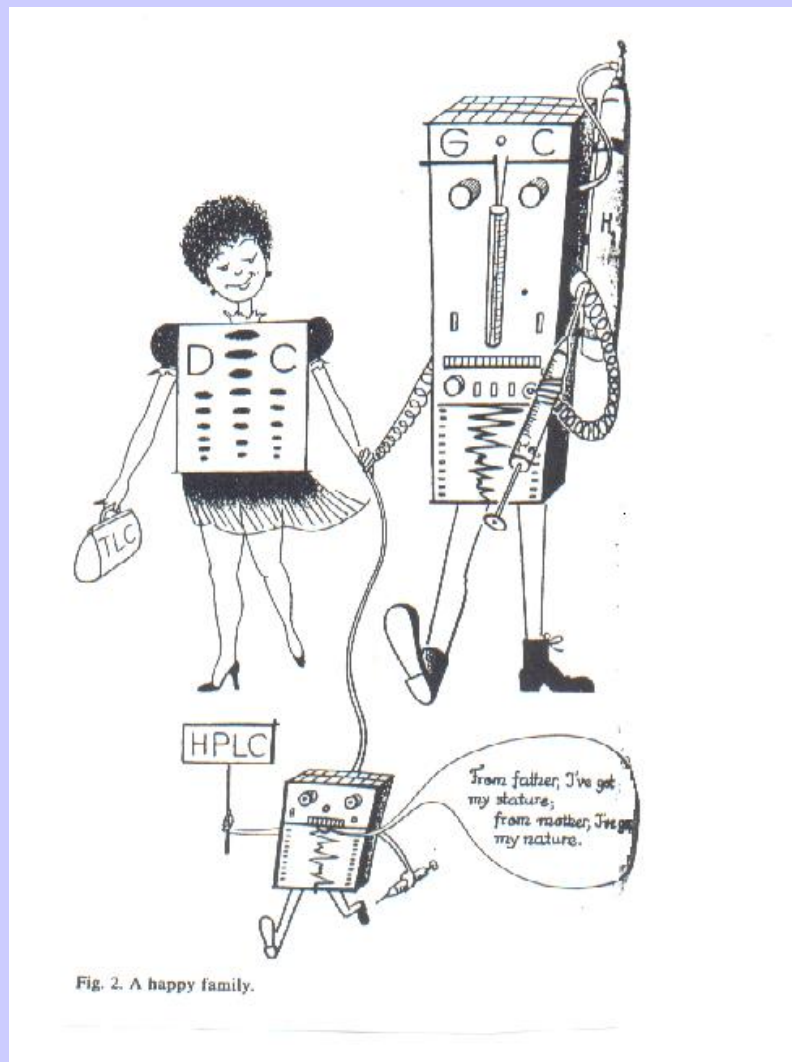
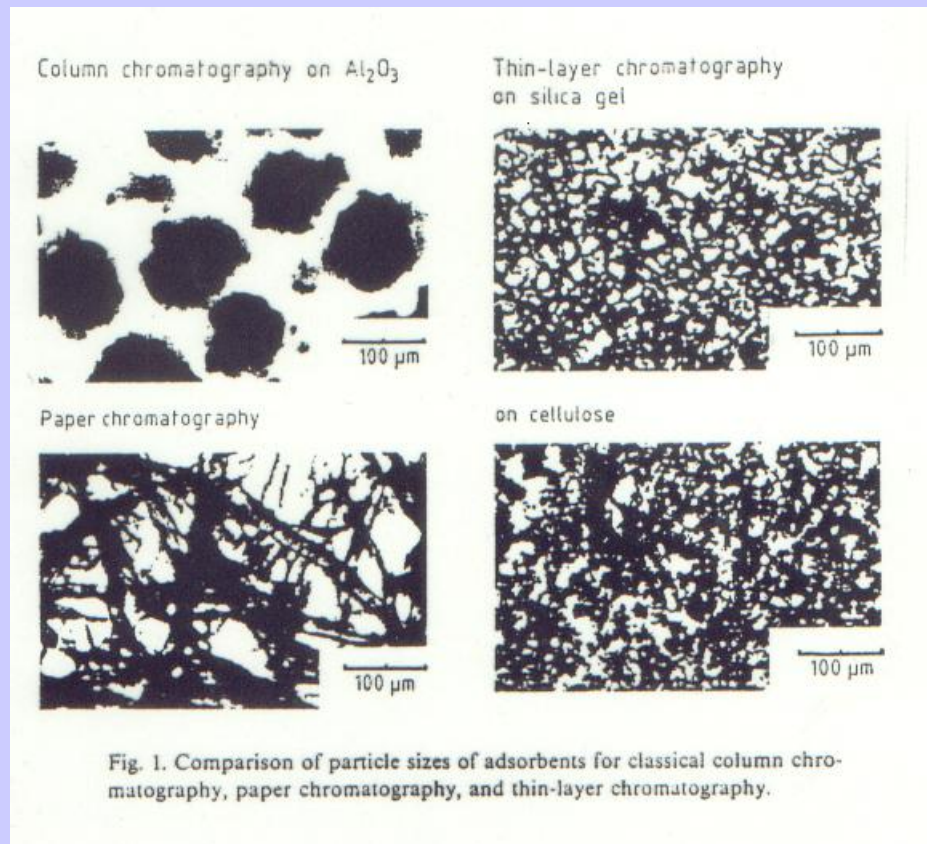


Fig. 2. A happy family.

Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας TLC






Εφαρμογές TLC

- Έλεγχος καθαρότητας μιας ουσίας (ιδιαίτερη εφαρμογή έχει στην ανίχνευση συγγενών ουσιών και αποτελεί μέθοδο που προτείνεται στις φαρμακοποιίες
- διαχωρισμός και ταυτοποίηση συστατικών μείγματος
- Ημι-ποσοτικός ή ποσοτικός προσδιορισμός ενός ή περισσότερων συστατικών μείγματος.
- Προσδιορισμός φυσικοχημικών παραμέτρων (λιποφιλία)
- Προσδιορισμός σταθερών σύνδεσης
- Προσδιορισμός βιοδραστικότητας
- Συνδυασμός με διατάξεις συνδυαστικής Χημείας

Πλεονεκτήματα TLC

Η TLC είναι:

-  φτηνή δεδομένου ότι δεν απαιτεί δαπανηρό εργαστηριακό εξοπλισμό και απαιτεί κατανάλωση πολύ μικρότερων ποσοτήτων διαλύτη (5% της κατανάλωσης διαλύτη που απαιτεί η HPLC).
-  φιλική στο περιβάλλον
-  υπόκειται σε ελάχιστους περιορισμούς. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση οποιοσδήποτε διαλύτης διαλύει τις προς ανάλυση ουσίες, ρυθμιστικά διαλύματα οποιουδήποτε pH, ακόμη και ισχυρά αντιδραστήρια, δεδομένου ότι οι πλάκες που αποτελούν την στατική φάση είναι αναλώσιμα προϊόντα και χρησιμοποιούνται μια μόνο φορά σε αντίθεση με τις ακριβές στήλες της HPLC οι οποίες προορίζονται για πολλές αναλύσεις και καταστρέφονται κάτω από ισχυρές συνθήκες διαλυτών pH και αντιδραστηρίων.

Πλεονεκτήματα TLC



Δεν υπάρχει παρεμπόδιση από δείγματα προηγούμενων αναλύσεων. Στην HPLC τυχόν μη αντιστρεπτή προσρόφιση μιας ουσίας στην στατική φάση διαφεύγει από την ανάλυση, ενώ είναι δυνατόν να μεταβάλλει την διαχωριστική ικανότητα της στήλης ή και να εμφανιστεί σε άλλες αναλύσεις αργότερα (memory effect). Σε τέτοια περίπτωση στην TLC απλώς θα φανεί κάποιο υπόλειμμα στο σημείο εκκίνησης.



Μεγάλη ευελιξία. Εκτός της ποικιλίας στατικών και κινητών φάσεων υπάρχει δυνατότητα επιλογής και του τρόπου ανάπτυξης της χρωματογραφίας. (πολλαπλή ανάπτυξη, κλιμακωτή ανάπτυξη, κυκλική, αντικυκλική, οριζόντια) Οι διαφορετικές τεχνικές ανάπτυξης αυξάνουν την διαχωριστική ικανότητα, η οποία στη βάση του αριθμού των θεωρητικών πλακών/ ανά μονάδα μήκους υπολείπεται της HPLC.

Πλεονεκτήματα TLC



Γρήγορη. Στην πλάκα τοποθετούνται μέχρι και 20 ουσίες. Περισσότερες από μια πλάκες τοποθετούνται στον ίδιο θάλαμο και οι ουσίες διαχωρίζονται υπό ταυτόσημες συνθήκες. Συνήθως ο χρόνος ανάλυσης δεν ξεπερνά τις 2 ώρες και 10 λεπτά ενώ μειώνεται σε λίγα μόνο λεπτά αν εφαρμοστεί πίεση



Δυνατότητα πολλών επιλογών ανίχνευσης. Συχνά ανιχνεύονται ουσίες που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με άλλη μέθοδο.



Δυνατότητα εφαρμογής των δειγμάτων χωρίς προηγούμενη κατεργασία.







Αποθήκευση των διαχωρισθισών ουσιών. Δυνατότητα αντιδράσεων πάνω στην πλάκα

Πλεονεκτήματα TLC



Συμπληρωματικότητα ως προς την HPLC. Ουσίες με υψηλές τιμές k' και συνεπώς πλατιές κορυφές και χαμηλό διαχωρισμό και ευαισθησία στην HPLC αντιστοιχούν σε χαμηλές τιμές R_f , εμπίπτουν δηλαδή στην περιοχή όπου η TLC παρέχει τον υψηλότερο διαχωρισμό και ευαισθησία. Υπο αυτήν την έννοια οι δύο μέθοδοι είναι δυνατόν να θεωρηθούν αλληλοσυμπληρωματικές ανάλογα με την φύση των εξεταζομένων ουσιών.

Μειονεκτήματα TLC

-  Λιγότερο επαναλήψιμα αποτελέσματα, τα οποία συχνά εξαρτώνται από την εμπειρία και δεξιοτεχνία του αναλυτή.
-  Χαμηλότερος αριθμός θεωρητικών πλακών συγκριτικά με την HPLC
-  Χαμηλότερη ευαισθησία από την HPLC.
-  Δυσκολία στον έλεγχο και σταθεροποίηση των πειραματικών συνθηκών.

Χρωματογραφικά μεγέθη

$$R_f = \frac{\text{απόσταση της ουσίας από το σημείο εκκίνησης, } Z_s}{\text{απόσταση του διαλύτη από το σημείο εκκίνησης, } Z_f}$$

$$R_x = \frac{\text{απόσταση της ουσίας από το σημείο εκκίνησης, } Z_s}{\text{απόσταση της ουσίας αναφοράς από το σημείο εκκίνησης, } Z_x}$$

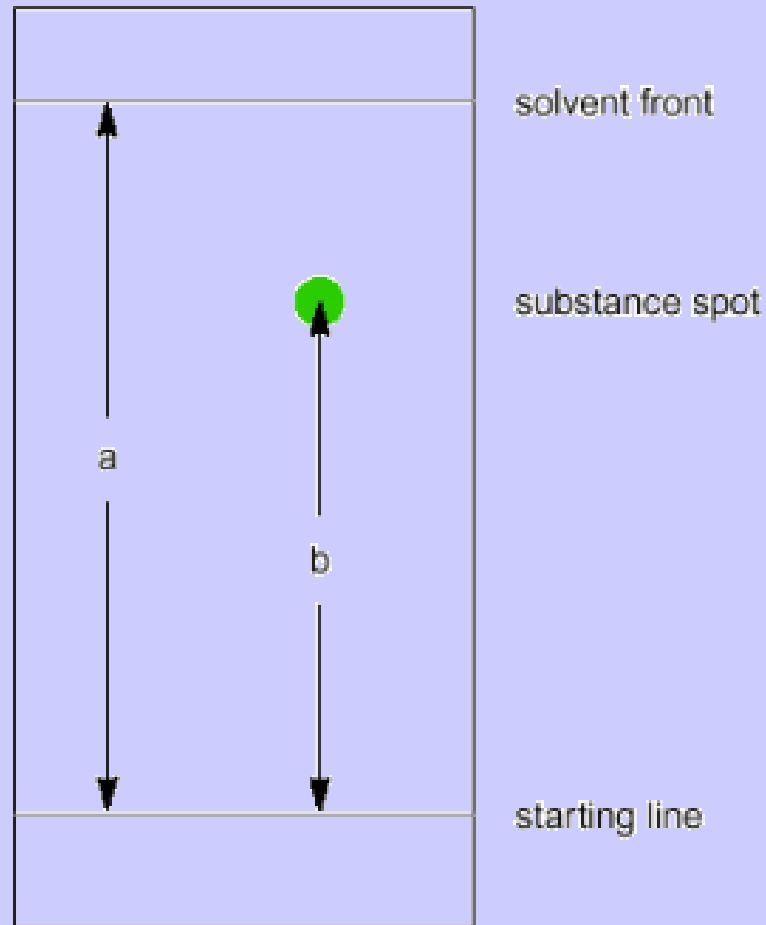
$$k = \left[\frac{1}{R_f} - 1 \right] \quad R_M = \log \left[\frac{1}{R_f} - 1 \right]$$

$$N = 16 \left[\frac{Z_s}{W_s} \right]^2 = 16 \left[\frac{R_f Z_f}{W_s} \right]^2$$

$$R_f = Z_s / Z_f$$

$$N = \frac{L}{H} = 16 \frac{t_r^2}{w^2}$$

Χρωματογραφικά μεγέθη



Στατικές Φάσεις -Πλάκες

➤ **Υλικά στήριξης (supports for sorbent layers):**

Γυαλί

Ευκαμπτα φύλλα πλαστικού, συνήθως τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο

Φύλλα αλουμινίου.

Συνηθη μεγέθη: 20x20 . Επίσης 20x40 ή 10x20 και 10x10

➤ **Υλικά επίστρωσης:**

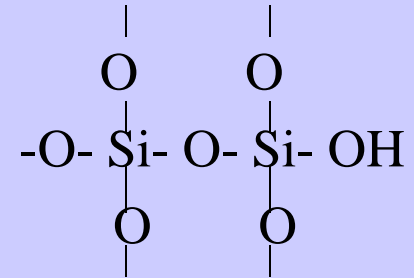
μέγεθος σωματιδίων 250 μm και το πάχος της στιβάδας 0.25mm)

➤ **Συνδετικά υλικά**

➤ **Δεικτες υπεριώδους.**

Στατικές Φάσεις -Πλάκες Υλικά επίστρωσης

Πήγμα οξειδίου του πυριτίου
(Μηχανισμός προσρόφησης)



Πυκνότητα πακεταρίσματος, Εμβαδόν ειδικής επιφανείας,
ειδικός όγκος πόρων, μέση διάμετρος πόρων, περιεκτικότητα σε
επιφανειακά υδροξύλια, ικανότητα πρόσληψης νερού.
pH . 7

Φυσικά χαρακτηριστικά στατικής φάσης

Πυκνότητα πακεταρίσματος

$$P = v / (V + v)$$

v = Ειδικός όγκος του σκελετού

V = ειδικός όγκος του συστήματος κοιλοτητων (ειδικός όγκος των πόρων, specific pore volume, ml/g). Προσδιορίζεται με διείδυση αερίων και υγρών στη βάση ισοθέρων προσρόφησης και εκρόφησης (desorption)

$P = 0.48$ σημαίνει ότι το μισό περίπου του υλικού πληρούται με στερεό σκελετό

Εμβαδόν ειδικής επιφανείας O (Specific surface area) :

το άθροισμα της εξωτερικής επιφανείας των κόκκων και της εσωτερικής επιφανείας των τοιχωμάτων των πόρων (m^2/g).

Φυσικά χαρακτηριστικά στατικής φάσης

● Μέση Διάμετρος Πόρων

$$r = \frac{2 \times \text{ειδικός όγκος πόρων}}{\text{εμβαδόν ειδικής επιφανείας}}$$

● Περιεκτικότητα σε επιφανειακά υδροξύλια

● Μέγεθος σωματιδίων

Στατικές Φάσεις -Πλάκες Υλικά επίστρωσης

**Οξείδιο του αργιλίου, Alumina
(Μηχανισμός προσρόφησης)**

pH, όξινο, ουδέτερο , αλκαλικό,

Για την επαναληψιμότητα του διαχωρισμού πρέπει να ελέγχεται η περιεκτικότητα σε προσροφημένο νερό, το οποίο δυνατόν να δεσμεύει τις δραστικές θέσεις στη επιφάνεια της Alumina.

Ενεργοποίηση (συνήθως 30 min σε 75-110C).

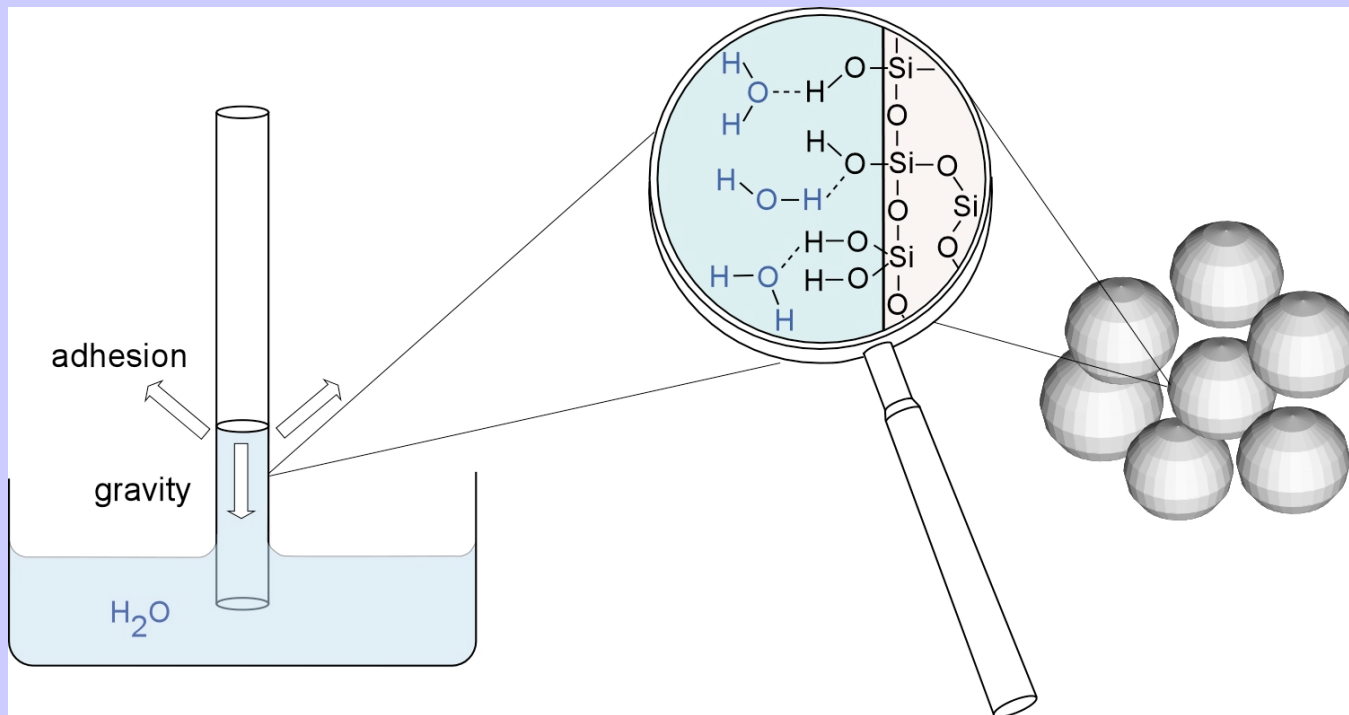
Ανάλογα με την περιεκτικότητα σε νερό διακρίνονται 5 βαθμοί ενεργότητας

Στατικές Φάσεις -Πλάκες

Υλικά επίστρωσης

- Κυτταρίνη (μηχανισμός κατανομής)
 - Αρχέγονη ινώδης κυτταρίνη και μικροκρυσταλλική κυτταρίνη
 - κυτταρίνη ιοντοανταλλαγής
 - ακετυλιωμένη κυτταρίνη (μηχανισμός αντιστρόφου φάσεως)
- Πολυαμίδιο (Σχηματισμός δεσμών υδρογόνου)
- Γη διατόμων
- Sephadex. Τροποποιημένες γέλες δεξτρανών
- **Αντιστρόφου φάσεως στατικές φάσεις**
- **Χειρόμορφες φάσεις**

Ανάπτυξη μέσω τριχοειδών φαινομένων



Χειρόμορφη Χρωματογραφία

Application 32 Enantiomeric drugs

Optical purity of D-penicillamine

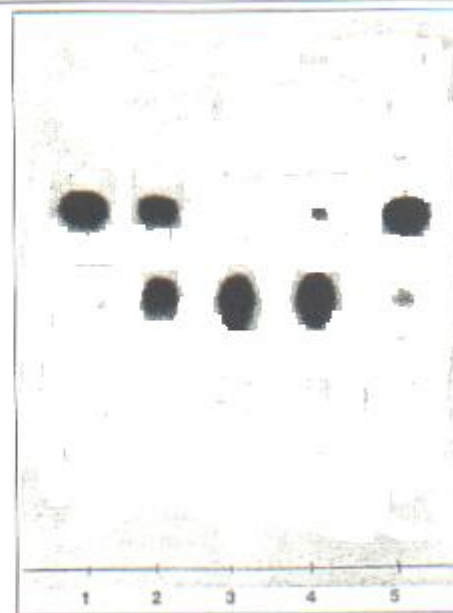
J. Martens, K. Günther and M. Schickedanz, Arch. Pharm. (Weinheim) 319 (1986) 461-465

For penicillamine it is important to control the optical purity, because only D-penicillamine is pharmaceutically highly active, while L-penicillamine is toxic. Penicillamine is derivatized with formaldehyde to form enantiomeric 5,5-dimethyl-4-thiazolidine carboxylic acids. The reaction mixture can be applied directly – without sample clean-up – on the CHIRALPLATE.

The figure shows a chromatogram of different penicillamine samples after derivatization. R_f values were found to be 0.48 for D-5,5-dimethyl-4-thiazolidine carboxylic acid and 0.62 for L-5,5-dimethyl-4-thiazolidine carboxylic acid.

1. L-5,5-dimethyl-4-thiazolidine carboxylic acid (L-3),
2. D,L-5,5-dimethyl-4-thiazolidine carboxylic acid (D,L-3),
3. D-5,5-dimethyl-4-thiazolidine carboxylic acid (D-3),
4. 3% L-3 in D-3,
5. 3% D-3 in L-3

Layer: CHIRALPLATE
Eluent: Methanol/water/acetonitrile
(50:50:200, v/v/v)
Developing time: About 30 min
Detection: 0.1% ninhydrin spray reagent



Ενόργανη TLC , HP- TIC

Πλάκες Υψηλής απόδοσης:

Λεπτότερη επίστρωση (0.10- 0.20 mm έναντι 0.25 mm)

Μικρότερο μέσο μέγεθος σωματιδίων (7μm έναντι 12-20μm)

Μικρότερη κατανομή στο μέγεθος των σωματιδίων



➤ Καλύτερος βαθμός διαχωρισμού σε απόσταση ανάπτυξης περίπου 50% μικρότερη, 50 mm έναντι 100-120 mm

➤ Βελτιωμένες οπτικές ιδιότητες- καλύτερη ακρίβεια κατά την αξιολόγηση με πυκνομετρία

Ενόργανη TLC , HP- TLC

➤ Πλάκες Υψηλής απόδοσης:



Μικρότερη διάχυση



➤ Βελτιωμένος βαθμός διαχωρισμού

➤ Όριο ανίχνευσης 10 φορές χαμηλότερο

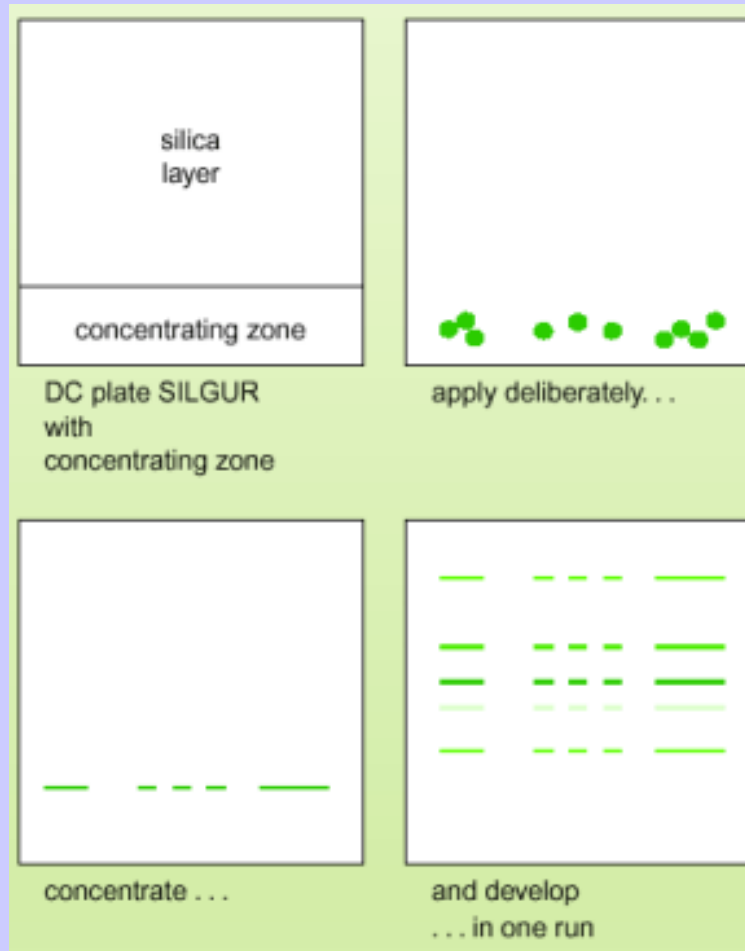
➤ Καλύτερος λόγος κόστους απόδοσης

Ενόργανη TLC , HP- TLC

Οι Πλάκες Υψηλής Απόδοσης απαιτούν:

- **όγκο δείγματος 1/10 ως 1/5 του όγκου που εφαρμόζεται σε συμβατικές πλάκες**
- **ακριβή τοποθέτηση των δειγμάτων**
- **Κατάλληλο εξοπλισμό για την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος**

Πλάκες με ζώνη συγκέντρωσης



Κινητές φάσεις - Διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό

- Διαλύτες που δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, μη πολικοί διαλύτες (υδρογονάνθρακες, αδρανείς)
- Δότες και δέκτες πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου (νερό, αλκοόλες, αμίνες- για πολύ πολικές ενώσεις
- Πρωτονιοδότες σε δεσμούς υδρογόνου (CHCl_3)
- Πρωτονιοδέκτες δεσμούς υδρογόνου (αλδεύδες, αιθέρες, εστέρες κ.π.)

Πολικότητα διαλύτη-εκλουστική ισχύς

Ο διαλύτης επιλέγεται με πολικότητα αντίθετη ως προς τη στατική φάση:

Πολική στατική φάση → Μη πολική κινητή φάση



Πολικές ουσίες συγκρατούνται στη στατική φάση
Μη πολικές εκκλούνται με την κινητή φάση

Μη πολική στατική φάση → Πολική κινητή φάση



Πολικές ουσίες εκκλούνται με την κινητή φάση
Μη πολικές συγκρατούνται στη στατική φάση

Πολικότητα διαλύτη-εκλουστική ισχύς

- Η πολικότητα είναι σύνθετη ιδιότητα εξαρτώμενη από διάφορες φυσικές ιδιότητες:
- Ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου
- Διπολική ροπή (μέγεθος της ανισοκατανομής της ηλεκτρονικής πυκνότητας στο μόριο)
- Διηλεκτρική σταθερά (ικανότητα επιδιαλύτωσης ιόντων)

Πολικότητα διαλύτη-εκλουστική ισχύς

Εκλουστική Ισχύς (Solvent strength)

ϵ_0 :ενέργεια προσρόφησης ανά μονάδα προσροφητικού υλικού

(Snyder)  ανάλογη της διηλεκτρικής σταθεράς ϵ

(νερό: $\epsilon=80$ εξάνιο: $\epsilon=1.9$)

Εκλυστική σειρά με βάση την διαλυτότητα κορεσμού σε νερό

(αιθανόλη: Διαλυτότητα ∞ εξάνιο: Διαλυτότητα= 0.014

Δείκτης πολικότητας P'

(Νερό: $P' =9.0$ εξάνιο: $P' =0.0$)

ϵ^D Al ₂ O ₃	ϵ^D SiO ₂	solvent	ri	UV cutoff	η (cP) at 20°C	Hildebrand solubility parameter δ	polarity index (Snyder)	BP (°C)
0.01	0.01	i-octane	1.404	197-210	0.5	7	0.4	99.2
0.01	0.03	n-hexane	1.375	195	0.313	7.3	0	68.9
0.04	0.04	cyclohexane	1.427	200	0.98	8.2	0	80.7
0.04		n-decane	1.412	210	0.92	7.8	0.3	174.1
0.18	0.12	carbon tetrachloride	1.466	265	0.97	8.6	1.7	76.5
0.28	0.22	i-propyl ether	1.368	220	0.33-0.37	7.3	2.2	68.3
0.29	0.23	toluene	1.496	285	0.59	8.9	2.3	101.6
0.32	0.25	benzene	1.501	280	0.65	9.2	3	80.1
0.36-0.4	0.26	chloroform	1.443	245	0.57	9.2	3.4-4.4	61.2
0.4	0.32	dichloromethane	1.424	232	0.44	9.6	3.4	40
0.42	0.32	methylene chloride	1.424	233	0.44	9.7	3.4	39.8
0.45	0.35	tetrahydrofuran	1.408	212-230	0.55	9.1	4.2	66
0.49	0.38	ethylene dichloride	1.445	230	0.79	9.7	3.7	83.5
0.51	0.39	methyl ethyl ketone (MEK)	1.379	330	0.43	9.3	4.5	80
0.56-0.58	0.47-0.53	acetone	1.359	330	0.32	9.6	5.4	56.3
0.55-0.65	0.5	acetonitrile	1.344	190	0.37	11.7	6.2	81.6
0.58	0.38-0.48	ethyl acetate	1.37	256	0.46-0.47	9.1	4.3	77.1
0.6	0.46	methyl acetate	1.362	260	0.37-0.45	9.2	4.4	56.3
0.62	0.41	dimethyl sulfoxide	1.478		2.24	12.8	6.5	189
0.71		pyridine	1.51	305-330	0.94	10.7	5.3	115.3
0.74		methoxyethanol, 2-	1.401	220	1.72		5.7	124.6
0.82		propanol, 2-	1.38	210+	2.35		4.3	82.4-117.7
0.88	0.68	ethanol	1.361	205-210	1.2	12	5.2	78.3
0.95	0.73	methanol	1.329	205	0.6	13.7	6.6	64.7
large		acetic acid	1.372	210	1.1-1.26	12.4	6.2	117.9
large		water	1.333	180	1	21	9	100

Πολικότητα διαλύτη-εκλουστική ισχύς

Μείγματα διαλυτών

- Αύξηση της εκλουστικής ισχύος ϵ_0 μειώνει το διαχωρισμό και αυξάνει το R_f
- Μείωση της εκλουστικής ισχύος ϵ_0 αυξάνει το διαχωρισμό και μειώνει το R_f
- Για δεδομένο ϵ_0 η εκλεκτικότητα είναι μέγιστη εάν ο ισχυρότερος διαλύτης είναι σε ποσοστό είτε $< 5\%$ είτε $> 50\%$
- Εκλεκτικότητα μπορεί να επιτευχθεί με αντικατάσταση του ισχυρού διαλύτη με άλλον ισχυρό

Πολικότητα διαλύτη-εκλουστική ισχύς

- Για τον συνολικό δείκτη πολικότητας P' μείγματος διαλυτών ισχύει:
- $P' = F_a P'_a + F_b P'_b + F_c P'_c \dots$

οπου F_n το κλάσμα του κάθε διαλύτη και P'_n ο δείκτης πολικότητας του καθαρού διαλύτη

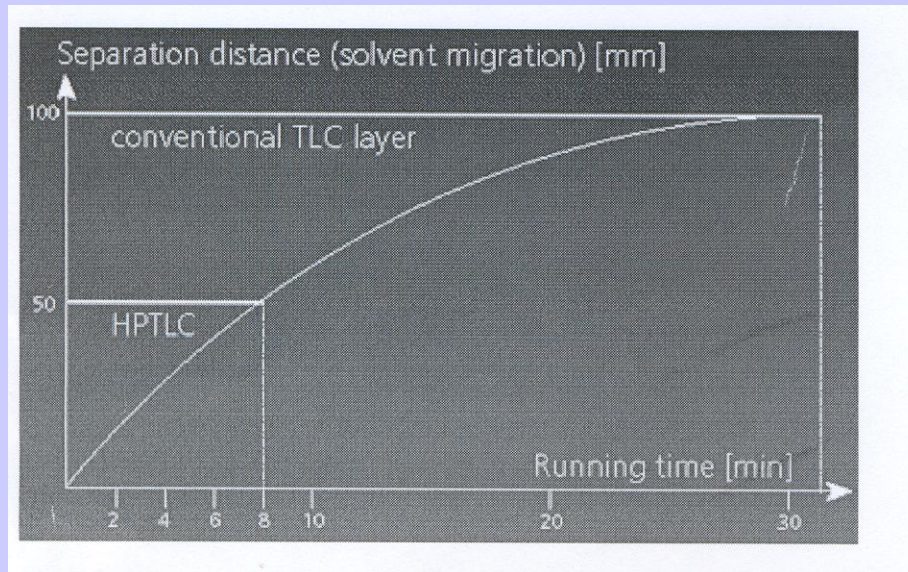
Κινητές φάσεις μπορεί να έχουν ίδιες τιμές ϵ_0 ή P' αλλά διαφορετική εκλεκτικότητα

Σύγκριση των πλακών στην TLC και HP-TLC

Table I: Comparison of modern TLC and HPTLC plate materials

Feature	TLC	HPTLC
Particle size distribution (mm)	2–40	2–10
Average particle size (mm)	10–15	5
Layer thickness (mm)	250	100–200
Separation distance (mm)	100–150	30–70
Optimal separation distance (mm)	120	60
Running time for optimum separation distance (min)	30–60	8–20
Solvent consumption (mL) (Twin trough chamber)	25–50 (20x20cm)	10–20 (20 × 10 cm) 5–10 (10 × 10 cm)
Detection limit, absorbance (ng)	100–1000	10–100
Detection limit, fluorescence (ng)	1–100	0.1–10
Comparison of prices per plate (glass back) normalised: 20 × 20 cm TLC plate = 1	1 (20 × 20 cm)	1.2 (20 × 10 cm) 0.8 (10 × 10 cm)

Χρόνος ανάπτυξης σε συμβατική και HP-TLC



Χρωματογραφικά χαρακτηριστικά

$(Z_f)^2 = \kappa t$ όπου κ σταθερά ταχύτητας

$$\kappa = 2K_0 d_p (\gamma/\eta) \cos\theta,$$

$$K_0 = 6-8 \times 10^{-3}$$

- K_0 σταθερά διαπερατότητας,
- d_p μέση διάμετρος σωματιδίων,
- γ η επιφανειακή τάση της κινητής φάσης,
- η το ιξώδες της κινητής φάσης,
- θ η γωνία επαφής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης
- t ο χρόνος

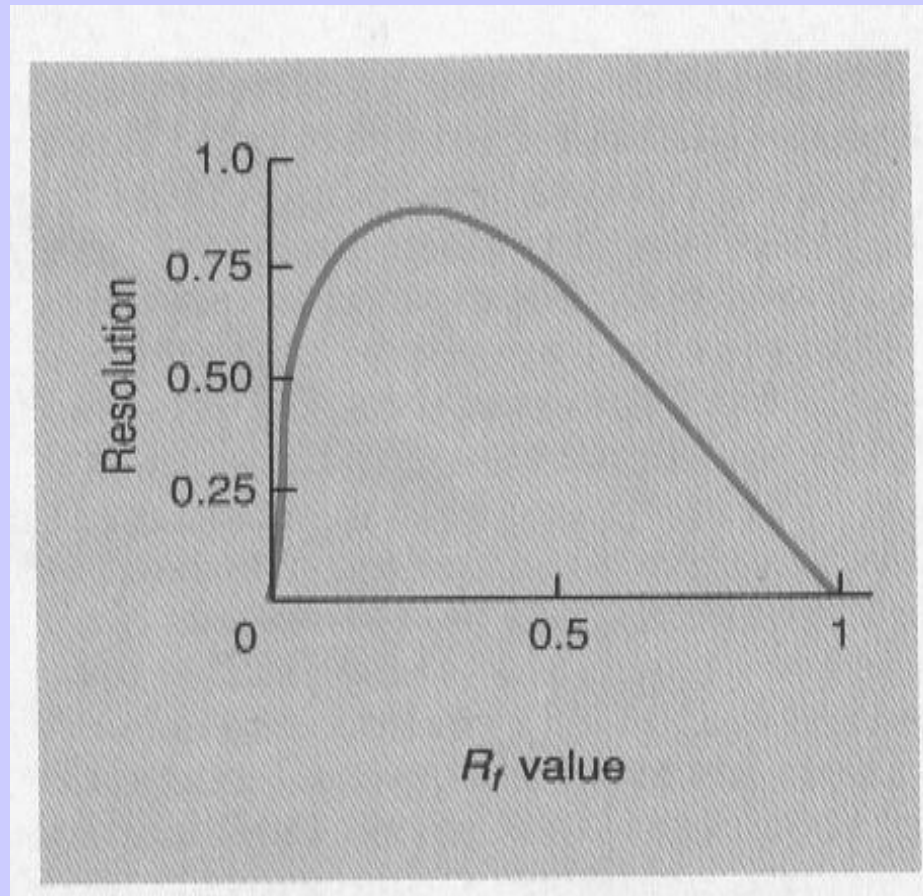
Χρωματογραφικά χαρακτηριστικά

$$R_s = \frac{2d}{w_1 + w_2}$$

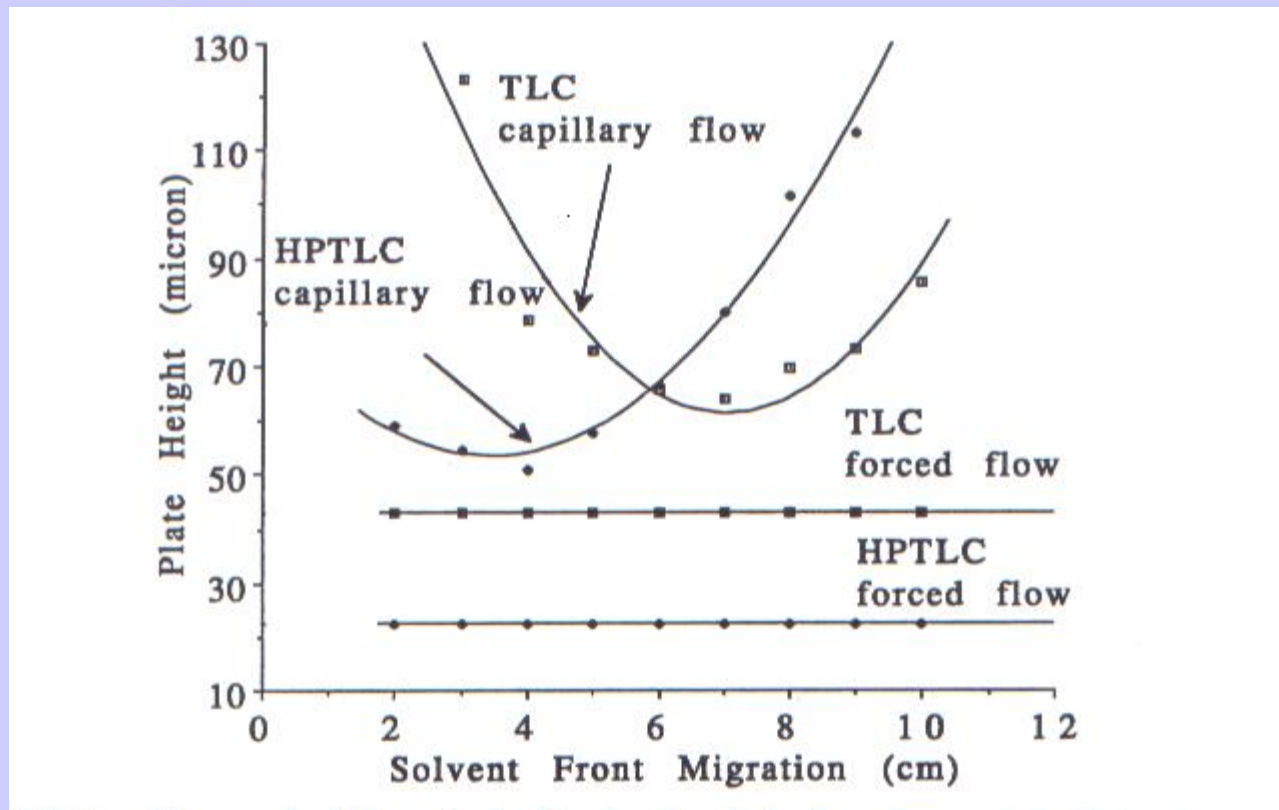
$$R_s = \frac{\sqrt{N_f} \cdot 2}{4[(k_1/k_2) - 1][1 - R_f \cdot 2]}$$

- R_s = βαθμός διαχωρισμού (resolution)
- N_f ο αριθμός των θεωρητικών πλακών για ζώνη (κηλίδα) που προχωρά με το μέτωπο του διαλύτη,
- k ο παράγοντας χωρητικότητας (σταθερά ισορροπίας)
- Οι δείκτες 1, 2 αντιστοιχούν στις επί μέρους ζώνες (κηλίδες), ο μεγαλύτερος αριθμός αντιστοιχεί στη ζώνη με το υψηλότερο R_f

Βαθμός διαχωρισμού συναρτήσει του R_f



Ύψος θεωρητικών πλακών σε συνάρτηση με την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος



Αριθμός διαχωρισμού (Separation number)

Πόσα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν σε μια πλάκα, χωρίς αλληλοεπικαλύψεις

Ο αριθμός διαχωρισμού εξαρτάται από την στατική φάση, την κινητή φάση (εκλουστική ισχύ ϵ^0 του διαλύτη) και τη φύση των ουσιών

Για ουσίες με χαμηλή ή μέτρια πολικότητα:

$$SN(\text{ silica}) < SN(\text{ alumina})$$

Για περισσότερο πολικές ουσίες (φαινόλες)

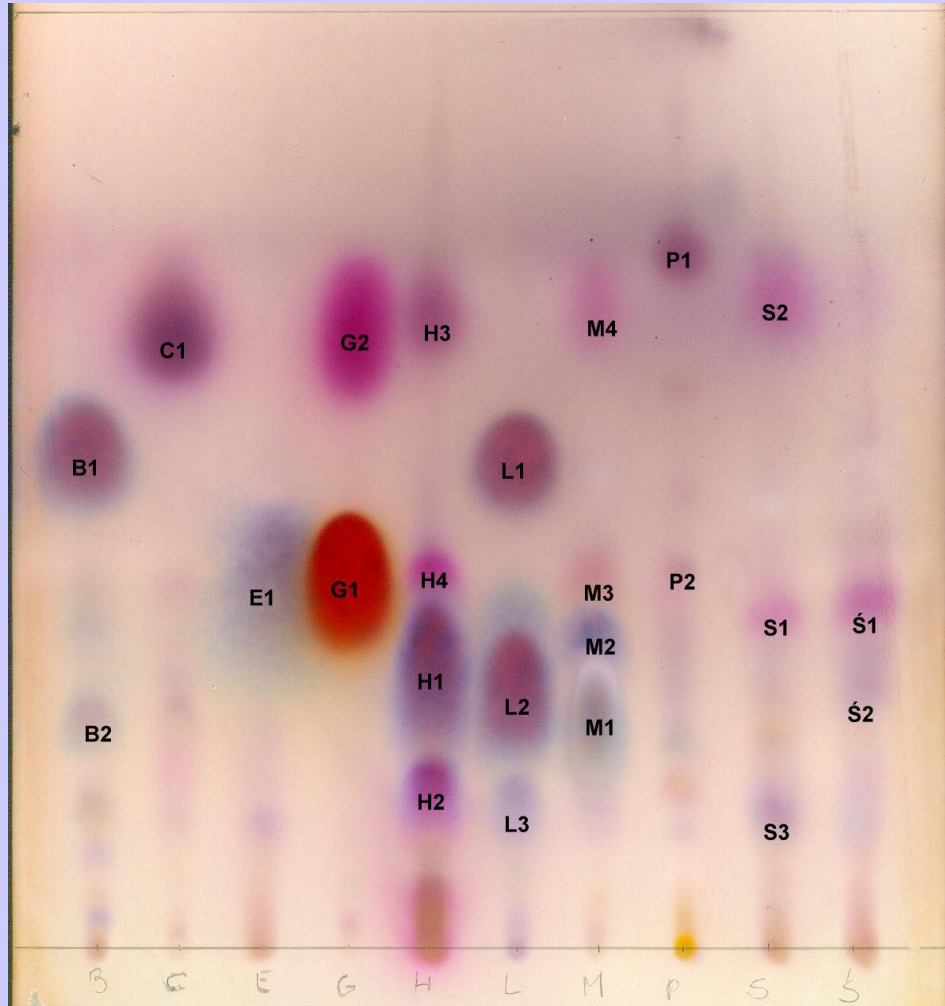
$$SN(\text{ alumina}) < SN(\text{ silica})$$

$$\epsilon^0_{\text{ακετόνης}} > \epsilon^0_{\text{χλωροφορμίου}}$$



$$SN_{\text{ακετόνης}} > SN_{\text{χλωροφορμίου}}$$

Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου



Τεχνικές ανάπτυξης

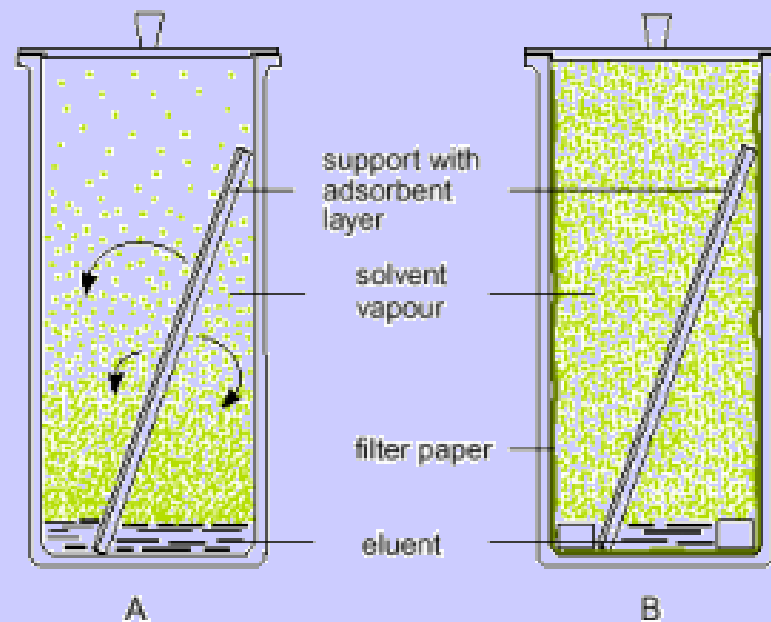
- Ανιούσα ή γραμμική ανάπτυξη
- Οριζόντια ανάπτυξη
- Ανάπτυξη σε δυο διαστάσεις
- Συνεχής ανάπτυξη
- Πολλαπλή ανάπτυξη
- Αυτόματη Πολλαπλή ανάπτυξη (AMD)
- Κυκλική και αντικυκλική ανάπτυξη

Τεχνικές ανάπτυξης

- **Κορεσμός** του κώδωνα

εξαρτάται απο την πτητικότητα του διαλύτη, τη θερμοκρασία και την ταχύτητα ανάπτυξης

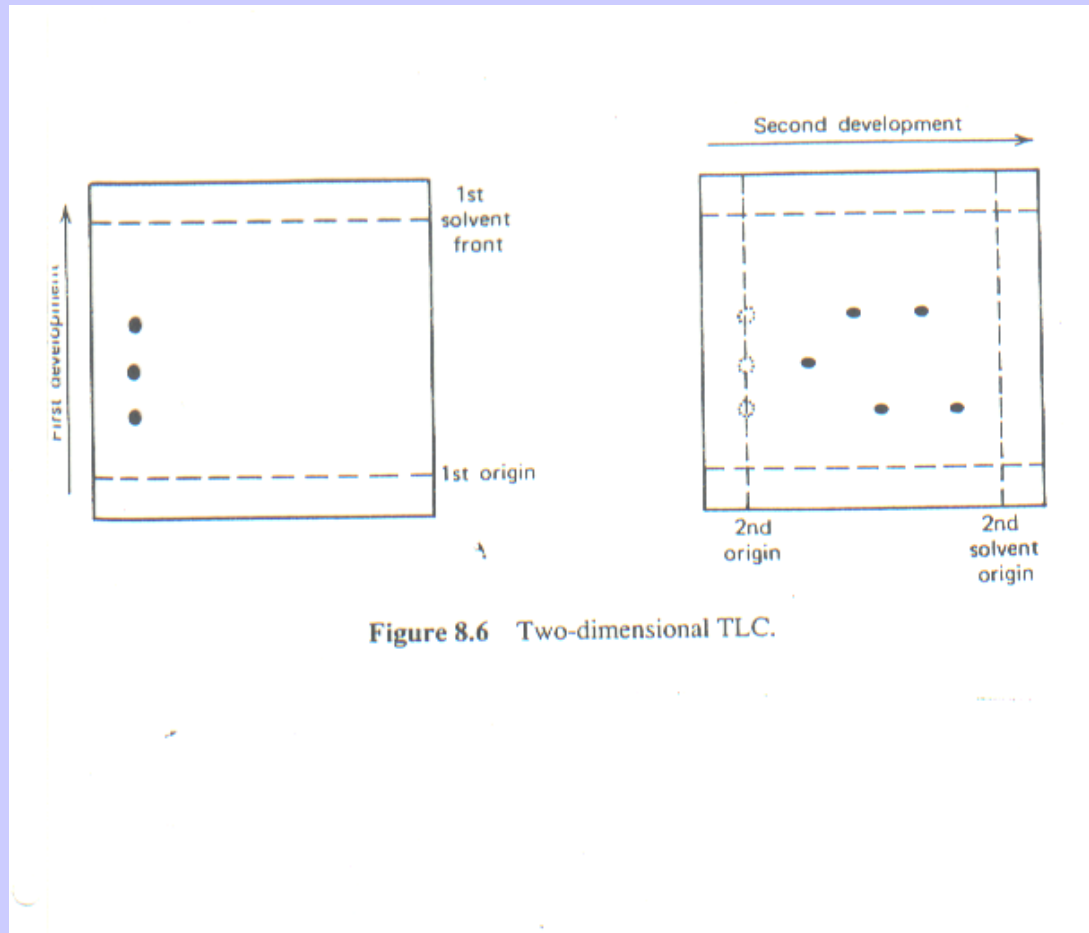
Κορεσμός του κώδωνα



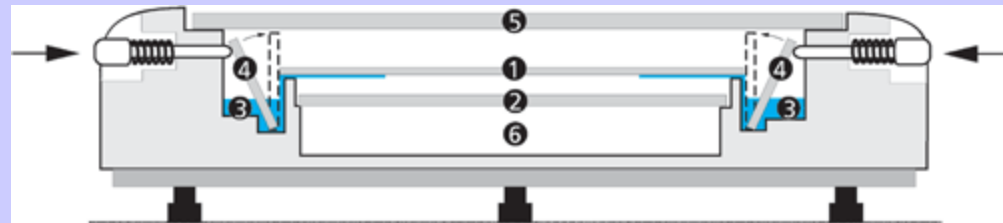
Developing chambers and saturation

- A) chamber with normal saturation. The arrows stand for the evaporation of the eluent from the layer and the dots symbolise the vapour density.
- B) chamber lined with filter paper, saturated with eluent vapour

Τεχνικές ανάπτυξης - Ανάπτυξη σε δυο διαστάσεις

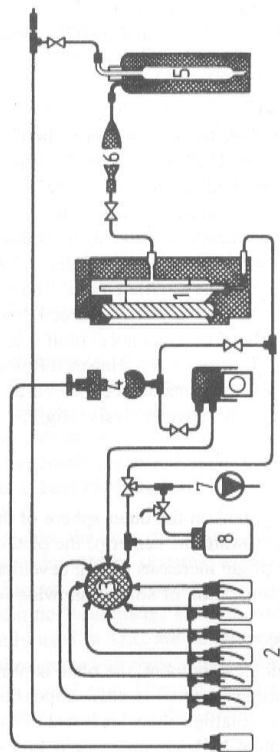


Κώδωνας οριζόντιας ανάπτυξης



- 1 HPTLC plate (layer facing down)
- 2 glass plate for sandwich configuration
- 3 reservoir for developing solvent
- 4 glass strip
- 5 cover plate
- 6 conditioning tray

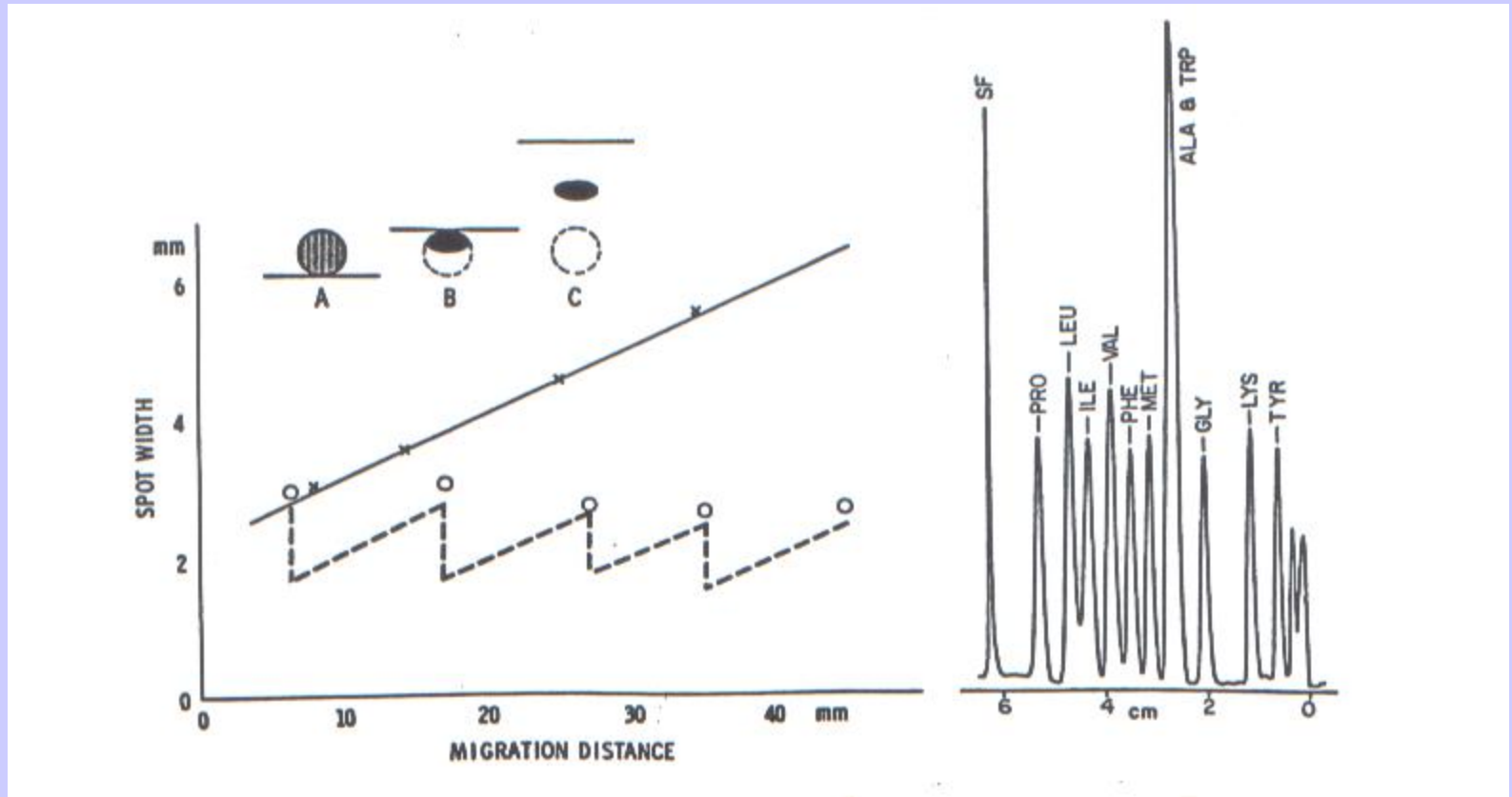
Κώδωνας πολλαπλής αυτόματης ανάπτυξης



Flow diagram of the Automated Multiple Development System. 1, Developing chamber; 2, eluent reservoir bottles; 3, 7-port valve; 4, gradient mixer; 5, wash bottle for the preparation of the gas phase; 6, gas phase reservoir; 7, vacuum pump; 8, waste collection bottle. (Reproduced with permission from CAMAG.)



Πολλαπλή αυτόματη ανάπτυξη



Τρόποι ανίχνευσης

- Φυσικές μέθοδοι – Χημικές μέθοδοι
- Καταστρεπτικές - μή καταστρεπτικές
- Γενικές (universal) - ειδικές (specific).

Τρόποι ανίχνευσης

Παραγωγοποίηση επι της στατικής φάσης χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια

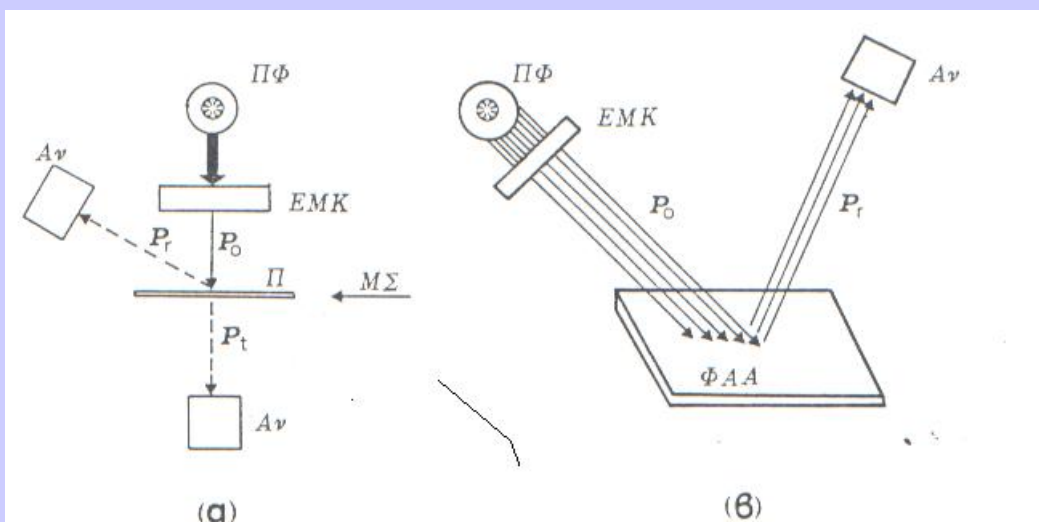
Χρησιμοποιείται ψεκασμός ή εμφύσηση
Προτιμάται η εμφύσηση εάν είναι δυνατόν
Εαν απαιτούνται δύο διαδοχικές αντιδράσεις γίνεται διαδοχικός ψεκασμός

Συχνά ακολουθεί θέρμανση της πλάκας

Τρόποι ανίχνευσης



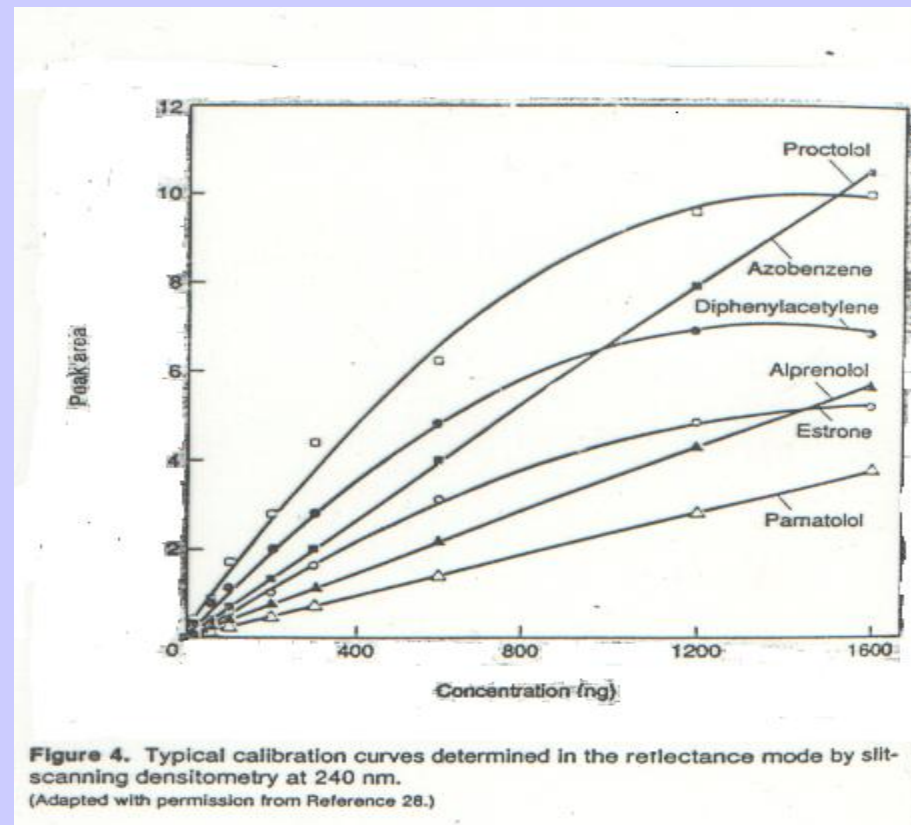
Πυκνομετρία- Ανακλαστική φασματοφωτομετρία



Σχήμα 8-14. Αρχή λειτουργίας πυκνομετρίας (α) και ανακλαστικής φασματοφωτομετρίας (β): ΠΦ: πηγή φωτός, EMK: επιλογέας μήκους κύματος, Αν: ανιχνευτής, Π: πλάκα χρωματογραφίας, ΜΣ: μηχανισμός σαρώσεως πλάκας, ΦΑΑ: φορέας αποξηραμένων αντιδραστηρίων, P_0 : ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας, P_t : ισχύς διερχόμενης ακτινοβολίας και P_r : ισχύς ανακλώμενης ακτινοβολίας.

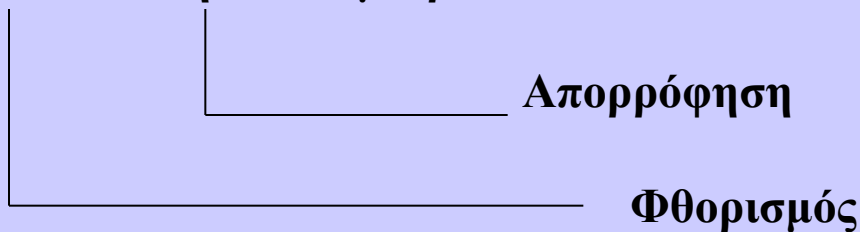
Ανακλαστική φασματοφωτομετρία

$$(1-R^2)/2R=kS+Ac/S$$



Ανακλαστική Πυκνομετρία

- Ανακλαστική Πυκνομετρία



Εξίσωση Kubelka-Munk

$$R_d = \frac{2,303\alpha C}{S} = \frac{(1-R_\infty)^2}{2 R_\infty} = K/S$$

α = μοριακός συντελεστής απορρόφησης

S = συντελεστής ανάκλασης

C = συγκέντρωση δείγματος

K = Απορρόφηση

$$R_d = \frac{\alpha x}{1 + \alpha x}$$

Σχέσεις για την εξαγωγή καμπύλης αναφοράς

$$\star y^2 = b_1 x$$

$$\star \log y = b_0 + b_1 x$$

$$\star 1/y = b_0 + b_1 x$$

$$\star y = b_1 1/x$$

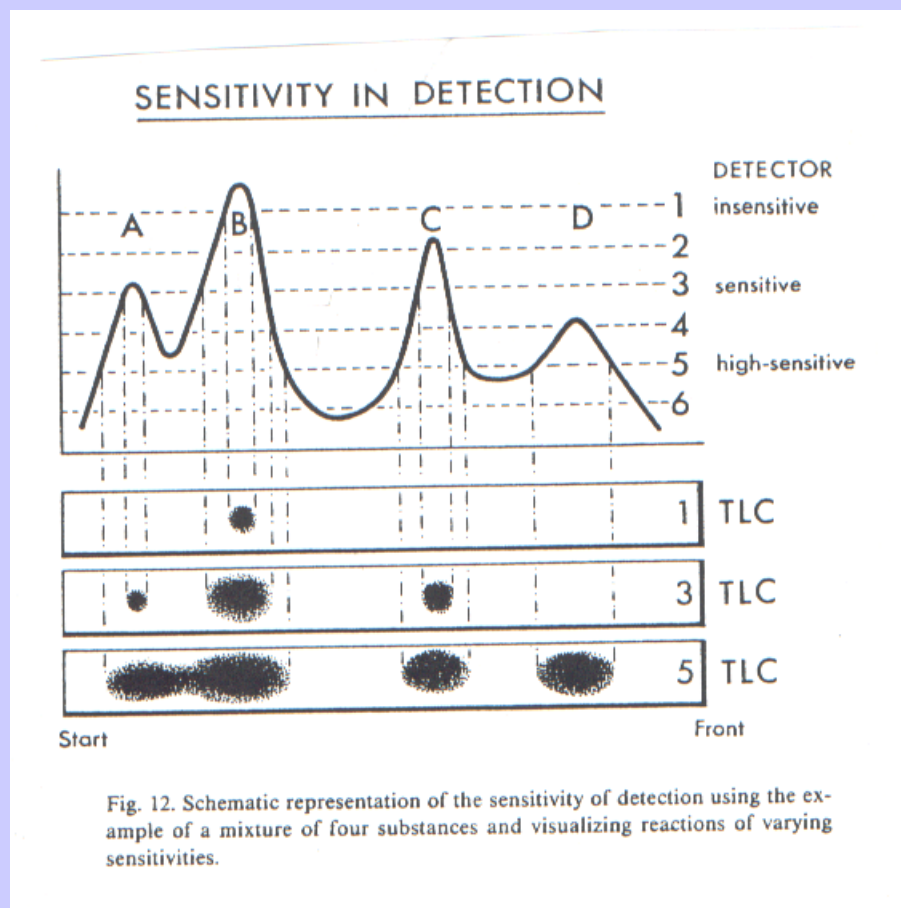
$$\star 1/y = b_0 + b_1 1/x$$

$$\star y = b_1 + \log x$$

$$\star \log y = b_1 x$$

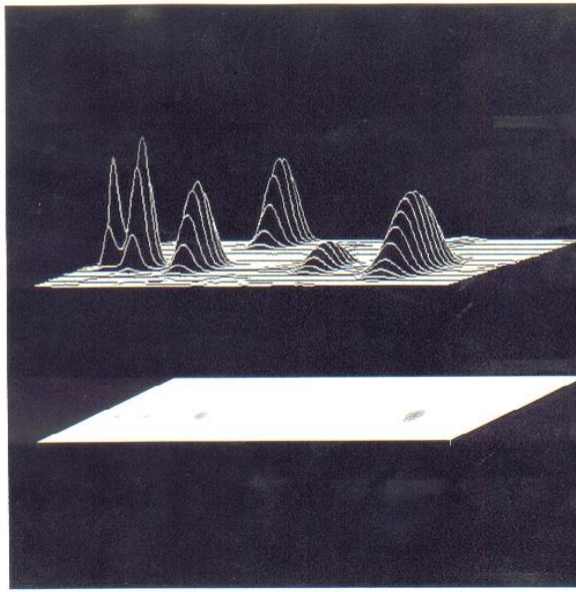
$$\star y = b_1 \sqrt{x}$$

Ευαισθησία ανίχνευσης

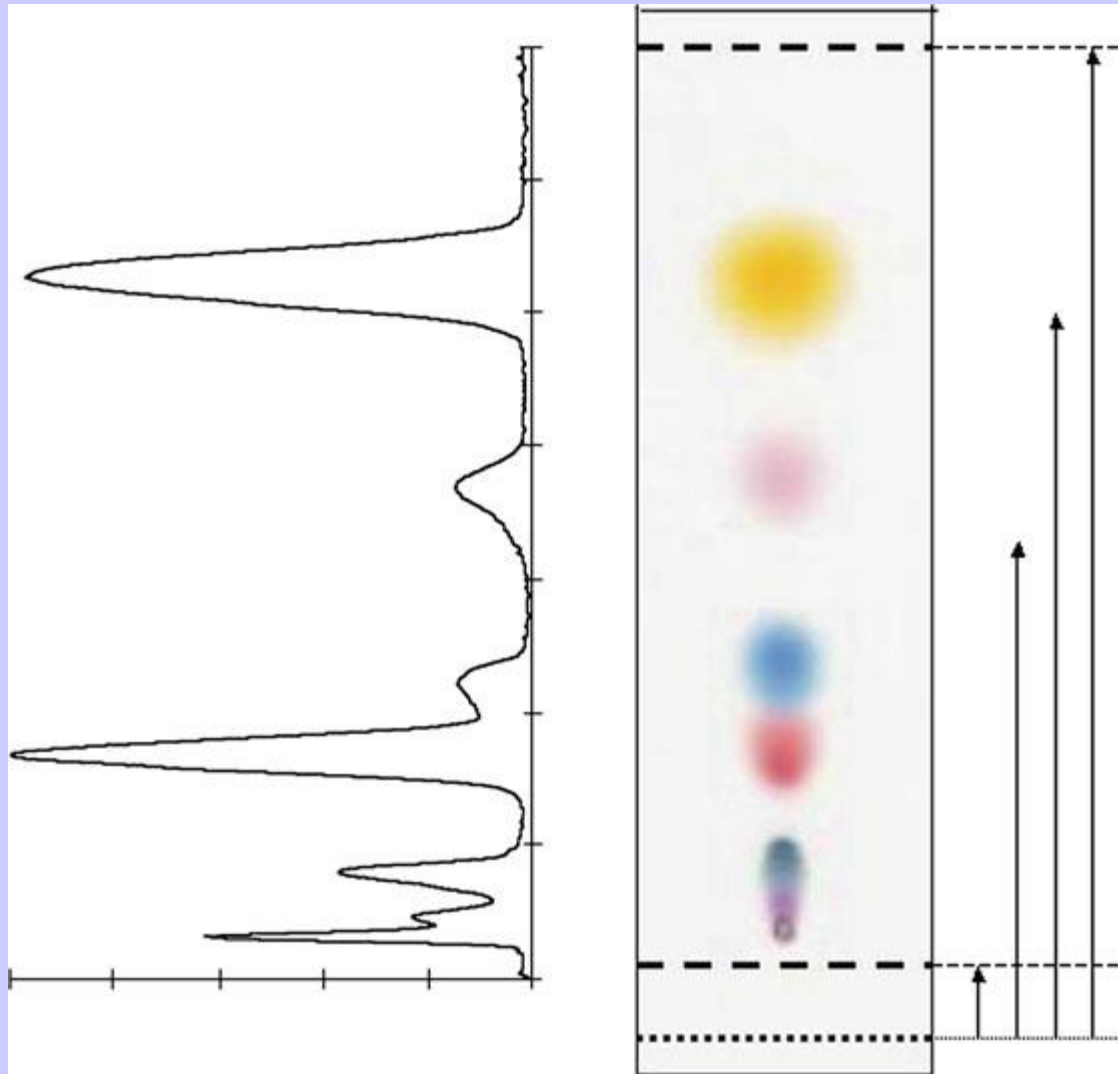


Ευαισθησία ανίχνευσης

DESAGA Densitometer CD 60
die Konsequenz der zukunftsorientierten quantitative
Dünnschicht-Chromatographie und Elektrophorese



Separation of six dyes (CAMAG III mix, no. 032.8003), with the relevant densitogram, on a SiO₂ plate, developed with toluene



Αρχές Ενόργανης TLC , HP- TLC

Βήμα 1ο :

**Εφαρμογή δειγμάτων (εως 36 δείγματα σε κάθε πλάκα)
Ακρίβεια όγκου και ακριβής θέση της κηλίδας διασφαλίζονται με
Αυτόματο εφαρμοστή δειγμάτων**



Αρχές Ενόργανης TLC , HP- TLC

Βήμα 2ο : Ανάπτυξη χρωματογραφήματος

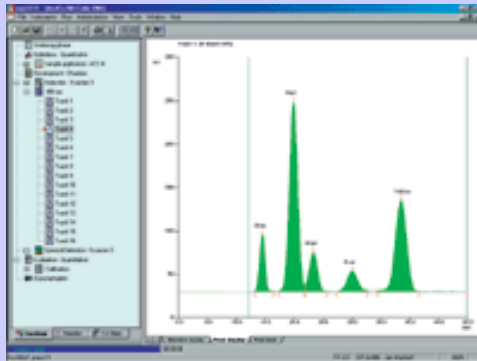
- ☺ Η κινητή φάση διανύει την προκαθορισμένη απόσταση επί της στατικής φάσης (πλάκας) με τη δράση τριχοειδών φαινομένων.
- ☺ Κατά τη διαδικασία αυτή το δείγμα αναλύεται σε κλάσματα.
- ☺ Μετά εξάτμιση της κινητής φάσης τα κλάσματα παραμένουν επί της στατικής φάσης

Αρχές Ενόργανης TLC , HP- TLC

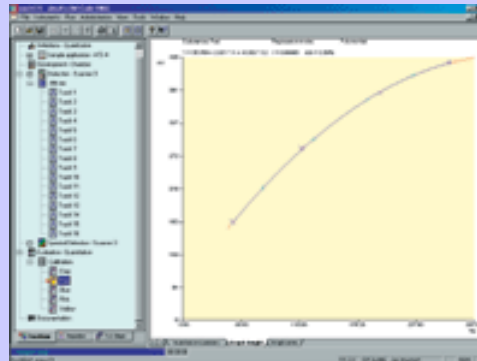
Βήμα 3ο: Αξιολόγηση του χρωματογραφήματος

- ☺ Τα δείγματα σαρώνονται με πυκνόμετρο (ντενσιτόμετρο) με με υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία
- ☺ Μετρείται η απορρόφηση ή ο φθορισμός με ανακλαστική φωτομετρία διάχυσης
- ☺ Ανάλογα με το όργανο και τις ιδιότητες του δείγματος επιτυγχάνεται ακρίβεια προσδιορισμού 1-2%
- ☺ Εναλλακτικά το χρωματογράφημα μπορεί να αξιολογηθεί με τεχνολογία video
- ☺ Πρόσθετη επεξεργασία με παραγωγοποίηση πριν ή μετά τη χρωματογράφιση είναι δυνατή

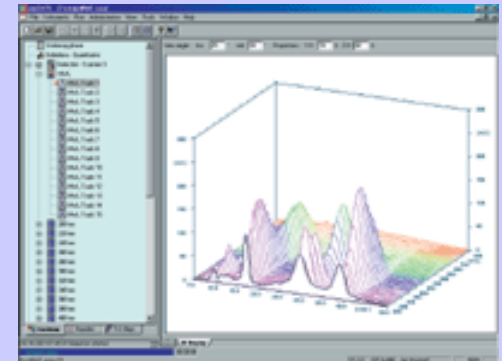
Ενέργεια TLC



Densitogram of a single track with automatic baseline correction



Calibration curve with polynomial regression



3-D view of a multi-wavelength scan with 31 wavelengths.

Ειδικές τεχνικές TLC Thermomicro, Application, Separation TAS)

SPECIAL TECHNIQUES FOR THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

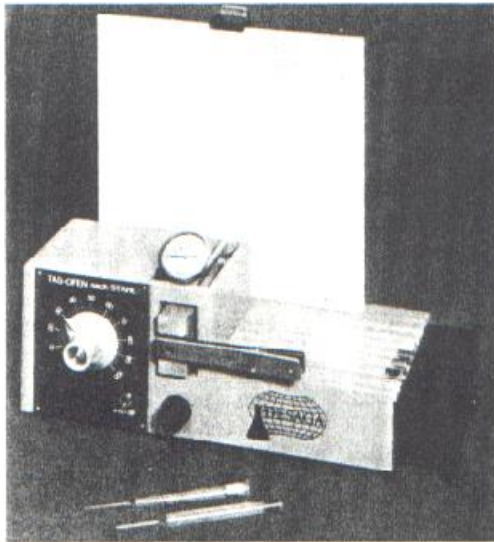


Figure 18.10 TAS oven, Courtesy of Brinkmann Instruments, Inc.

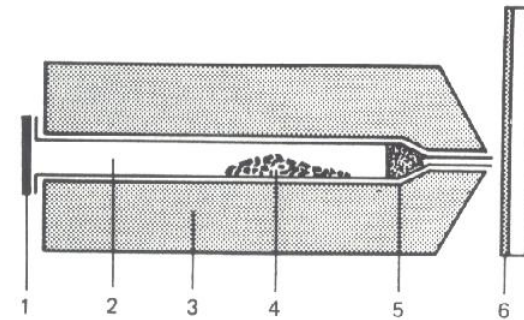


Figure 18.8. Cross section of TAS oven with cartridge and TLC plate. (1) Seal, silicone disk. (2) Glass cartridge. (3) Heating block. (4) Sample. (5) Quartz wool. (6) TLC layer. Courtesy of Brinkmann Instruments, Inc.

Ειδικές τεχνικές TLC, TAS Θερμοφρακτογράφημα

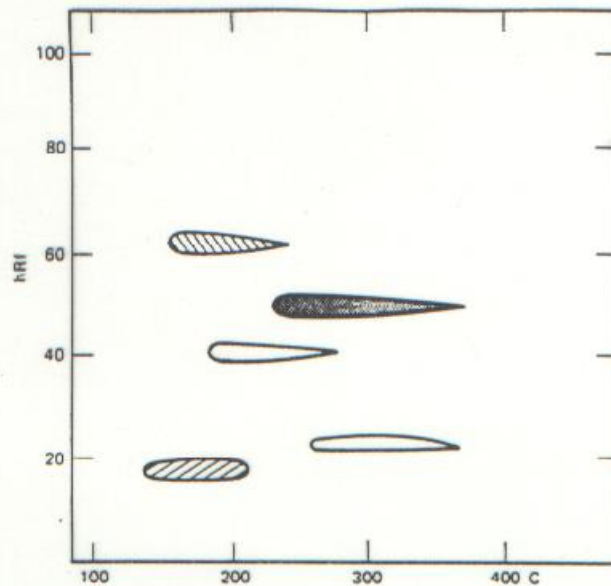


Figure 18.9. Thermofractogram. Substances separated by temperature are on the abscissa, and those separated by their chromatographic behavior on the ordinate.

Ειδικές τεχνικές TLC

In situ αντιδράσεις

- Βιοαυτογράφημα (Ανίχνευση αντιβιοτικών)
- Immunostaining (Ανίχνευση, ποσοτικός προσδιορισμός γλυκολιπιδίων)
- Ενζυμική αναστολή (Ανάλυση εντομοκτόνων)