

CHROMATOGRAFIA

Chromatografia, „pisanie kolorem” (z greckiego *chroma* oznacza ‘kolor’ oraz *graphe* oznacza ‘pisanie’) jest techniką służącą do rozdzielania lub badania składu mieszanin związków chemicznych. W metodzie tej następuje rozdział mieszaniny składników pomiędzy dwie fazy: fazę nieruchomą – stacjonarną (bibuła filtracyjna, cienka warstwa adsorbentu naniesiona na płytkę, wypełnienie kolumny) oraz dużą objętościowo fazę ruchomą – mobilną (ciecz lub gaz). Faza ruchoma stanowi tu siłę napędową procesu, z kolei faza nieruchoma odgrywa rolę siły hamującej migrację składników. Rozdział substancji pomiędzy obie fazy następuje na skutek różnicy współczynników podziału składników mieszaniny pomiędzy obydwie fazy. Szybkość migracji substancji jest tym większa, im mniejszy jest współczynnik podziału (mniejsze powinowactwo składnika do danej fazy).

W ogólnym przypadku, chromatograficzny rozdział substancji następuje w wyniku przepuszczenia roztworu badanej mieszaniny przez specjalnie przygotowaną fazę stacjonarną. Podczas przepływu eluentu (fazy ruchomej) przez fazę stacjonarną następuje proces wymywania zaadsorbowanych (lub związanych) substancji. Intensywność tego procesu jest różna dla poszczególnych składników mieszaniny. Jedne składniki są zatrzymywane w fazie stacjonarnej dłużej, a inne krócej (inna jest retencja), dzięki czemu może następować ich separacja. Chromatografia stosowana jest zarówno do badań jakościowych, ilościowych, jak i dla celów preparatywnych. Sprzężenie, chromatografii gazowej z innymi metodami, na przykład spektrometrią masową lub spektrofotometrią w podczerwieni, znacznie rozszerza możliwości identyfikacji rozdzielanych składników.

PODZIAŁ METOD CHROMATOGRFICZNYCH

Metody chromatograficzne można podzielić stosując wiele kryteriów. W zależności od stanu skupienia fazy ruchomej, czyli medium wymywającego (eluentu), rozróżnia się następujące techniki chromatograficzne:

- chromatografia cieczowa, w której eluentem jest ciekły rozpuszczalnik lub mieszanina rozpuszczalników,
- chromatografia gazowa, w której eluentem jest gaz (zwykle wodór lub hel),
- chromatografia fluidalna, w której eluentem jest ciecz w stanie nadkrytycznym (fluid).

Rodzaje metod w zależności od stanu skupienia fazy nieruchomej podsumowuje Tabela 1.

Tabela 1. Podział chromatografii ze względu na stan skupienia fazy nieruchomej (stacjonarnej)

Faza ruchoma	Faza stacjonarna	Typ chromatografii
gaz	ciecz	GLC gas – liquid chromatography
ciecz	ciecz	LLC liquid – liquid chromatography
gaz	ciało stałe	GSC gas – solid chromatography
ciecz	ciało stałe	LSC liquid – solid chromatography

Zależnie od rodzaju zjawisk odpowiedzialnych za podział substancji wyróżnia się:

- chromatografię rozdzielczą (podziałową) – o zachowaniu się mieszaniny poddanej rozdzielaniu decyduje współczynnik podziału poszczególnych składników pomiędzy dwie nie mieszające się ze sobą cieczce. Fazę stacjonarną stanowi rozpuszczalnik bardziej polarny zaadsorbowany w postaci cienkiej warstwy na odpowiednim nośniku, a fazę ruchomą jest układ o mniejszej polarności (w chromatografii z odwróconymi fazami układ faz jest odwrotny). Nośnikiem fazy stacjonarnej najczęściej jest żel krzemionkowy, celuloza, ziemia okrzemkowa, skrobia ziemniaczana, kauczuk.
- chromatografię adsorpcyjną – podstawą rozdziału jest niejednakowa skłonność składników mieszaniny do adsorpcji fizycznej i chemicznej na powierzchni fazy stacjonarnej (ciało stałe). Jako fazę stacjonarną stosuje się tlenek glinu, żel krzemionkowy, węgiel aktywny, syntetyczne i naturalne krzemiany, tlenki, siarczany i fosforany wapnia i magnezu. Fazę ruchomą stanowi ciecz lub gaz.

- c. chromatografię jonowymienną – wykorzystywane jest zjawisko różnych zdolności do wymiany jonów przez składniki mieszaniny z wymiennicem jonowym. Fazę stacjonarną stanowi odpowiednio przygotowana żywica jonitowa.
- d. chromatografię żelową (sitową lub sączenie molekularne) – rozdzielanie polega na zróżnicowanej dyfuzji cząsteczek w pory fazy stacjonarnej. Cząsteczki na tyle duże, że ich dyfuzja jest wykluczona, szybko są wypłukiwane przez fazę ruchomą. Cząsteczki mniejsze zatrzymują się na materiale nośnym i są wypłukiwane w następnej kolejności.

Kolejny podział metod chromatograficznych wynika z różnego sposobu umieszczenia nośnika:

- a. chromatografia kolumnowa – nośnik fazy stacjonarnej umieszczony jest w kolumnie chromatograficznej, którą stanowi rura szklana, przewężona w dolnej swej części, o stosunku wysokości fazy stacjonarnej (L) do kwadratu wewnętrznej średnicy kolumny (D^2) wynoszącym co najmniej 20. Lepsze warunki rozdziału otrzymuje się, gdy stosunek L/D^2 przyjmuje większe wartości (od 90 do 150). Faza ruchoma przemieszcza się pod wpływem siły grawitacyjnej.
- b. chromatografia planarna – możliwa tylko w chromatografii cieczowej. W jej ramach można wyróżnić:
 - a. technikę cienkowarstwową TLC (ang. *Thin Layer Chromatography*) – faza stacjonarna naniesiona jest na odpowiednie podłoże (płytki szklane lub aluminiowe) w postaci cienkiej warstwy. Faza ruchoma przenoszona jest w wyniku działania sił kapilarnych.
 - b. technikę bibułową – fazą stacjonarną jest bibuła (100% celulozy) o izotropowym układzie włókien, fazą ruchomą – homogenna mieszanina rozpuszczalników zawierająca wodę. Wykonuje się techniką wstępującą (rozpuszczalnik migruje od dolnego końca bibuły zanurzonego w eluencie) lub zstępującą (spływową; rozpuszczalnik migruje od górnego końca bibuły zanurzonego w eluencie). Stosowana jest głównie do rozdziału aminokwasów, peptydów, sacharydów i nukleotydów.

W preparatywnej chemii organicznej największe zastosowanie mają chromatografie: adsorpcyjna i rozdzielcza, ze względu na przydatność tych technik do całkowitego lub częściowego rozdzielania składników mieszanin reakcyjnych.

ADSORBENTY STOSOWANE W CHROMATOGRAFII

Adsorbenty stosowane w chromatografii powinny wykazywać odpowiednią selektywność i aktywność w stosunku do rozdzielanych substancji oraz nie mogą z nimi reagować.

Adsorbenty można podzielić na dwie grupy:

- a. adsorbenty polarne – wykazują zmienną aktywność w zależności od zawartości w nich wody i rozpuszczalników organicznych. Należą do nich przede wszystkim tlenek glinu, żel krzemionkowy oraz siarczany, fosforany i węglany magnezu i wapnia, celuloza. Adsorbują się na nich dobrze związki o charakterze polarnym.
- b. adsorbenty niepolarne – wykazują zdolność do silnego wiązania rozpuszczalników węglowodorowych. Należą do nich węgiel aktywny, grafit, talk. Adsorpcja związków zależy od wielkości cząsteczek i od długości łańcuchów węglowych.

Adsorbenty stosowane w chromatografii adsorpcyjnej winny charakteryzować się szczególnie rozwiniętą powierzchnią, gdyż substancja adsorbowana wiąże się z nią pod postacią warstewki monomolekularnej. Takie właściwości wykazują zwłaszcza tlenek glinu i węgiel aktywny.

Zastosowanie tlenku glinowego jako adsorbenta z reguły ogranicza się do związków o niezbyt wielkiej polarności. Związki silnie polarne (cukry, aminokwasy), związane z Al_2O_3 , z trudem ulegają elucji.

Węgiel aktywny wykazuje szczególne powinowactwo do związków aromatycznych; ich elucja może być przeprowadzona przy użyciu rozpuszczalników o budowie aromatycznej.

Szereg aktywności adsorbentów pod względem wiązania związków organicznych przedstawia się następująco:

celuloza < skrobia < sacharoza < $CaSO_4$ < silikażel < MgO < Al_2O_3 < węgiel aktywny

Zdolność adsorpcyjna związków organicznych zależy więc od ich polarności oraz wielkości i polaryzowalności cząsteczek. Poszczególne grupy związków można ułożyć w następujący szereg, w zależności od ich *wzrastającego powinowactwa* do polarnych środków adsorbujących:

chlorowcopochodne węglowodorów < etery < aminy trzeciorzędowe, związki nitrowe < estry < ketony, aldehydy < aminy pierwszorzędowe < amidy kwasowe < kwasy karboksylowe

ROZPUSZCZALNIKI STOSOWANE W CHROMATOGRAFII

Podobne obserwacje odnoszą się do stosowanych rozpuszczalników. Wynika z nich, że zaadsorbowana substancja może zostać wyparta z adsorbenta przez rozpuszczalnik wykazujący większe powinowactwo do tego adsorbenta niż wymywana substancja.

Rozpuszczalniki można zestawić w *szereg eluotropowy* (Tabela 2) według ich wzrastających zdolności wymywania (eluowania) adsorbowanej substancji z powierzchni adsorbenta polarnego:

Tabela 2. Szereg eluotropowy rozpuszczalników

1. eter naftowy	7. chlorek metylenu	13. n-propanol
2. cykloheksan	8. chloroform	14. etanol
3. disiarczek węgla	9. tetrahydrofuran	15. metanol
4. tetrachlorek węgla	10. octan etylu	16. woda
5. toluen	11. aceton	17. kwas octowy
6. benzen	12. butan-2-on	18. pirydyna

Zastosowanie niepolarnego adsorbenta (np. węgla aktywnego) wymaga użycia rozpuszczalników (wymienionych w powyższym szeregu eluotropowym) w odwrotnej kolejności, a więc elucję należy rozpoczynać rozpuszczalnikami najbardziej polarnymi. Najczęściej jednak stosuje się odpowiednio dobraną mieszaninę dwóch lub więcej rozpuszczalników.

CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC – *thin layer chromatography*) służy jako niezwykle efektywna i wygodna metoda szybkiej analizy jakościowej oraz w preparatyce do rozdzielenia niewielkich ilości substancji. Termin ten oznacza proces chromatograficzny prowadzony na cienkiej warstwie fazy stacjonarnej naniesionej na podłożu z płytek szklanych lub folii aluminiowych czy polimerowych. Przede wszystkim stosuje się ją do:

- określenia liczby składników w mieszaninie,
- potwierdzenia lub wykluczenia obecności danej substancji,
- monitorowania postępu reakcji chemicznych,
- znalezienia optymalnych warunków dla chromatografii kolumnowej,
- analizy frakcji uzyskanych techniką chromatografii kolumnowej.

Technika chromatografii cienkowarstwowej łączy w sobie dwa zjawiska: podziału substancji między dwie różne fazy ciekłe – obowiązuje tu prawo podziału Nernsta i adsorpcji substancji na nośniku, czyli fazie stacjonarnej. W metodzie tej substancje chromatografowane poruszają się z różną prędkością wraz z ciekłą fazą ruchomą przez cienką warstwę stałego adsorbenta naniesionego na płytkę. Towarzyszą temu procesy adsorpcji i desorpcji oraz podział między ciekłą fazą organiczną i wodą, która w niewielkich ilościach znajduje się na nośniku. W związku z tym warunki procesu są trudne do jednoznacznej definicji i kontroli eksperymentalnej.

W chromatografii cienkowarstwowej adsorbent (zazwyczaj z dodatkiem gipsu) nakładany jest w postaci papki na odtłuszczonej płytce za pomocą specjalnych urządzeń (powlekaczy). Grubość warstwy adsorbenta uzależniona jest od rodzaju przeznaczenia:

- do analizy jakościowej używa się płytek o grubości nośnika ok. 0,25 mm,
- przy analizie ilościowej grubość warstwy wynosi ok. 2 mm.

Płytki do chromatografii cienkowarstwowej można przygotowywać samodzielnie. Jednakże dostępne w handlu gotowe produkty charakteryzują się dużo lepszą jakością (równomierność warstwy nośnika, aktywność adsorbenta) z czym wiąże się lepsza powtarzalność wyników analizy chromatograficznej.

Próbkę nanosi się na płytkę TLC w postaci roztworu o bardzo małej objętości, tworząc małą plamkę w punkcie startowym. Płytkę umieszcza się w komorze chromatograficznej, w której na dnie znajduje się faza ruchoma. W wyniku działania sił kapilarnych faza ruchoma wędruje w górę płytki. Jest to proces rozwijania chromatogramu metodą wstępującą. Oddziaływanie substancji znajdujących się w próbce z adsorbentem oraz z poruszającym się rozpuszczalnikiem powoduje rozdzielanie się składników próbki na płytce i poszczególne składniki tworzą oddzielne plamki. Plamki rozdzielanych składników należy uwidocznić, by ostatecznie zidentyfikować skład próby.

Tok postępowania przy wykonywaniu chromatografii cienkowarstwowej jest następujący:

1. Przygotowanie płytki i naniesienie substancji na płytkę

Za pomocą specjalnych mikropipet lub kapilar na linii startu nanosi się substancję w postaci ok. 0,5-3%-ego roztworu (w łatwo lotnym rozpuszczalniku) w odległości ok. 15-20 mm od krawędzi płytki, na węższym jej boku. Zbyt duże ilości naniesionych substancji prowadzą do pogorszenia efektu rozdzielania, a mianowicie do tworzenia tzw. „ogonów”. Średnica powstałej plamki powinna być jak najmniejsza (1,5-2 mm, maksymalnie 5 mm) i znajdować się około 15 mm od bocznej krawędzi płytki. Plamkę naniesionej próbki należy odpowiednio wysuszyć.

2. Rozwijanie chromatogramu

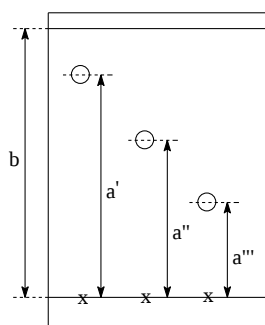
Rozwijanie chromatogramu prowadzi się w specjalnych komorach chromatograficznych, w ostateczności można używać dużych słoików ze szczelną pokrywką. Do komory wlewamy rozpuszczalnik do wysokości ok. 0,5 cm zwracając przy tym uwagę, aby poziom rozpuszczalnika znajdował się poniżej linii startowej na płytce. Wewnątrz komory ustawia się bibułę, która nasiąkając rozpuszczalnikiem utrzymuje nasycenie komory jego parami. Płytkę wstawiamy do komory linią startową do dołu i zakrywamy szczelnie pokrywą. Gdy rozpuszczalnik osiągnie wysokość ok. 1 cm od górnej krawędzi płytki, wyjmujemy ją z komory i pozostawiamy do wyschnięcia. Ołówkiem zaznaczamy linię, do której dotarł rozpuszczalnik („czoło rozpuszczalnika”).

3. Wywoływanie chromatogramu

Wywoływanie chromatogramów przeprowadza się w przypadku związków barwnych w świetle widzialnym. Dla związków z grupami chromoforowymi stosuje się naświetlanie promieniowaniem ultrafioletowym. Związki bezbarwne wywołujemy przez wstawienie chromatogramu do pojemnika z jodem. Większość związków, z wyjątkiem nasyconych węglowodorów i chlorowcopochodnych, tworzy z parami jodu barwne kompleksy, ukazujące się w postaci brunatnych lub fioletowych plam. Niekiedy można chromatogramy spryskiwać odpowiednimi roztworami substancji, które reagują z rozdzielanymi związkami. W temperaturze pokojowej lub po ogrzaniu pojawiają się barwne produkty.

4. Identyfikacja substancji

Podstawowym parametrem w chromatografii cienkowarstwowej, który określa położenie substancji na chromatogramie, jest współczynnik opóźnienia R_f (ang. *Retardation factor*). Jest to stosunek drogi migracji substancji (a) do drogi przebytej przez fazę ruchomą (b): $R_f = a/b$. Inaczej mówiąc, substancje rozdzielane identyfikuje się na podstawie stosunku szybkości przemieszczania się badanej substancji do szybkości wędrowania rozpuszczalnika (Rys. 1).



Rys. 1. Ilustracja pomiaru współczynnika R_f .

- a - odległość od linii startu do środka plamy;
- b - odległość od linii startu do czoła rozpuszczalnika.

Współczynnik R_f w danych warunkach doświadczalnych oraz w danym układzie chromatograficznym jest wartością stałą i charakterystyczną dla danej substancji, choć jako kryterium tożsamości związku nie może być stosowany bezpośrednio, a tylko w porównaniu z substancją wzorcową, naniesioną na tym samym chromatogramie. Układ rozwijający (faza ruchoma) musi dobrać być tak, aby była wyraźna różnica pomiędzy R_f analizowanych związków, aby związki nie zostawały na miejscu nałożenia plamki, oraz aby nie migrowały z czołem rozpuszczalnika (wtedy wartość R_f wynosi 1).

W praktyce rzadko udaje się odtworzyć warunki chromatografii tak, by uzyskać identyczne wartości R_f , gdyż zależą one od, nawet niewielkich, zmian w następujących czynnikach:

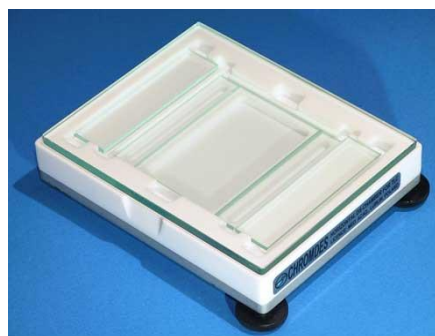
- a. wymiary ziaren adsorbenta,
- b. skład rozpuszczalnika i stopień nasycenia atmosfery komory parami rozpuszczalnika,
- c. aktywacja i warunki przechowywania płytek,
- d. grubość warstwy adsorbenta,
- e. temperatura otoczenia.

Do zalet chromatografii cienkowarstwowej można zaliczyć:

- a. krótki czas wykonania chromatogramu,
- b. dobry rozdział związków,
- c. wygodną obserwację we wszystkich stadiach rozdziału,
- d. dużą szybkość przepływu rozpuszczalnika, co skraca czas rozwijania chromatogramu.

Chromatografia cienkowarstwowa znalazła również zastosowanie w preparatyce. W wersji **preparatywnej TLC** rozdział mieszaniny prowadzi się na płytkach o grubszej, na przykład 3 mm, warstwie adsorbentu. Rozdzielaną mieszaninę nanosi się nie punktowo, ale w linii na długości kilkunastu centymetrów. Po rozdzieleniu warstwę adsorbentu zawierającą wyodrębniony składnik mieszaniny zeskrobuje się, a sam składnik ekstrahuje (wypłukuje) rozpuszczalnikiem i po zatężeniu oraz odsączeniu adsorbentu otrzymuje w stanie czystym.

W ostatnich latach opracowano nowy sposób rozwijania chromatogramów na cienkich warstwach w pozycji poziomej (Rys. 2). Sposób ten wymaga mniejszej ilości układu rozwijającego i umożliwia wielokrotne użycie płytek.



Rys. 2. Komora pozioma do chromatografii cienkowarstwowej

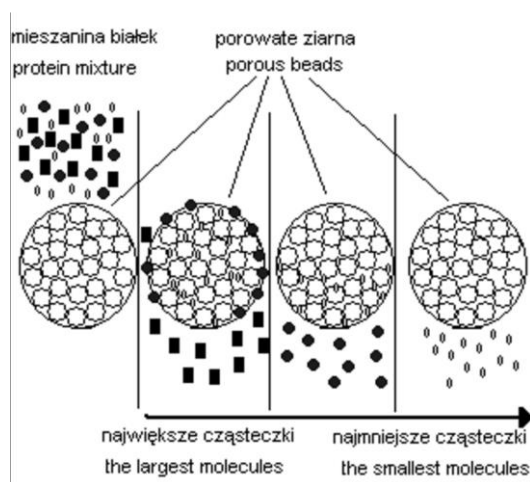
SĄCZENIE MOLEKULARNE

Sączenie molekularne po raz pierwszy zostało wprowadzone w roku 1959 przez P. Flodina. Jest to rodzaj chromatografii cieczowej, w której wykorzystuje się fizyczne i chemiczne właściwości odpowiednio spreparowanego polisacharydu znanego pod nazwą Sephadex (*SEparation PHARmacia DEXtran*). Technika ta umożliwia analityczny bądź preparatywny rozdział substancji różniących się masą cząsteczkową.

Sephadex jest handlową nazwą złoża stanowiącego poprzecznie usieciowane łańcuchy dekstranu (roślinnego polisacharydu glukozy), w którym występują wiązania α -1,6-, α -1,3-, α -1,4-glikozydowe. Żel ten ma postać granulek o średnicy 10-300 μm . Cząsteczki sefadeksów zawierają liczne grupy hydroksylowe, dlatego substancje te łatwo pęcznieją w wodzie i roztworach elektrolitów, gdyż cząsteczki wody bez przeszkód wnikają w przestrzeń sieci molekularnej. Usieciowanie wpływa na zdolność wchłaniania wody. Cecha ta decyduje o właściwościach rozdzielczych żelu. Cząsteczki

te posiadają trójwymiarową strukturę sieci przestrzennej. Im więcej tworzy się „oczek” tej sieci, tym są one mniejsze. Produkowane są złoże, w których stopień usieciowienia określa cyfra znajdująca się przy dużej literze „G” (od G-10 do G-200), przy czym im większa cyfra tym niższe usieciowienie. *Im mniejszy stopień usieciowienia, tym więcej wody wchłania sefadeks.* Na przykład 1 g sefadeksu G-10 wiąże 1 g wody (usieciowanie jest wyjątkowo gęste i przestrzenie małe). Natomiast 1 g sefadeksu G-200 wiąże 20 g wody, co wskazuje na duże „oczka” sieci.

Jeśli przez kolumnę wypełnioną sefadeksem przepływa roztwór zawierający cząsteczki o różnej wielkości, to molekuły większe od największych przestrzeni sieci bez przeszkód wypływają z kolumny, omijając ziarna żelu. Cząsteczki o mniejszych rozmiarach przenikają do wnętrza sieci przestrzennej, tym głębiej, im mniejsze są ich wymiary w porównaniu ze średnicą „oczek”. Usuwanie tych cząsteczek z wnętrza ziaren sefadeksu jest tym trudniejsze im mniejsze są te cząsteczki. Z tego względu elucja składników mieszaniny na sefadeksie przebiega w kolejności ich malejących rozmiarów cząsteczek, co pokrywa się z ich malejącymi masami cząsteczkowymi (Rys. 3).



Rys. 3. Mechanizm separacji cząsteczek na podstawie wielkości i kształtu przy zastosowaniu sączenia molekularnego.

Metoda sączenia molekularnego jest bardzo użyteczna do analizy ilościowej mieszanin związków naturalnych o dużej masie cząsteczkowej, takich jak białka, peptydy, enzymy, hormony, kwasy nukleinowe itp.

Tok postępowania przy wykonywaniu sączenia molekularnego jest następujący:

1. Przygotowanie żelu

Należy odważyć odpowiednią ilość żelu do żaroodpornego naczynia i dodać roztwór pełniący rolę eluenta. Całość trzeba ogrzewać do wrzenia przez pewien czas, celem usunięcia zaadsorbowanego powietrza i napęczenia żelu, po czym pozostawić do swobodnego ochłodzenia.

2. Przygotowanie kolumny

Szklaną rurę należy umieścić pionowo w statywie i zamknąć dolny wylot przy pomocy polietylenowego wężyka i zaciskacza. Na dno kolumny układa się odrobinę waty, przy zamkniętym zaciskaczu wlewa niewielką porcję rozpuszczalnika, przez otwarcie zaciskacza wpuszcza się rozpuszczalnik do przewężenia kolumny, po czym zamyka zaciskacz. Długą bagietką należy wycisnąć powietrze z waty i następnie wlać jednorodną zawiesinę żelu do kolumny. Wierzch żelu zabezpieczyć trzeba krążkiem bibuły filtracyjnej, po czym upakować żel w kolumnie przez otwarcie zaciskacza i przepuszczenie przez kolumnę porcji rozpuszczalnika o objętości równej objętości złoże żelu.

3. Naniesienie próbki substancji

Próbkę substancji w postaci roztworu (wskazane jest sporządzenie roztworu w rozpuszczalniku przeznaczonym do elucji) należy nanieść na powierzchnię żelu za pomocą odpowiedniej pipety. Trzeba wykonywać to bardzo ostrożnie, tak by nie zburzyć wierzchniej warstwy żelu (substancja jest wtedy wymywana równomiernie). Otwierając wylot kolumny należy poczekać do całkowitego wniknięcia próbki w żel, zamknąć wylot i nanieść niewielką porcję rozpuszczalnika, spłukując resztki substancji z wewnętrznych ścianek kolumny, znów poczekać aż wniknie, po czym wprowadzić delikatnie kolejną porcję fazy ruchomej.

4. Zbieranie frakcji

Od momentu naniesienia substancji oczyszczanej do całkowitego jej wyeluowania należy zbierać wypływające frakcje w ściśle określonych objętościach do niewielkich naczyń (probówki, kolby stożkowe).

5. Wyznaczenie współczynnika podziału stosuje się szczególnie w analizie ilościowej mieszanin związków naturalnych o dużej masie cząsteczkowej, takich jak białka, peptydy, enzymy, hormony, kwasy nukleinowe itp.

Przykładowe pytania sprawdzające:

1. Wymień techniki chromatograficzne zależne od stanu skupienia fazy ruchomej.
2. Wymień typy chromatografii zależne od stanu skupienia fazy stacjonarnej.
3. Podaj rodzaje chromatografii zależne od rodzaju zjawisk odpowiedzialnych za podział substancji.
4. Jakie znasz rodzaje chromatografii? Jakie są między nimi różnice?
5. Wymień adsorbenty stosowane w chromatografii.
6. Podaj szereg aktywności adsorbentów pod względem wiązania związków organicznych.
7. Co to jest szereg eluotropowy?
8. Podaj szereg 5 rozpuszczalników według ich wzrastających/malejących zdolności wymywania adsorbowanej substancji z powierzchni adsorbenta polarnego.
9. Co to jest współczynnik R_f ? Jak się go wyznacza?
10. Od czego zależy wartość współczynnika R_f ?
11. Co może wpływać na wartość współczynnika R_f ?
12. Scharakteryzuj sefadesy. Co oznaczają symbole G-10 i G-25?
13. Omów zasadę rozdziału substancji na sitach molekularnych.
14. Podaj zalety chromatografii cienkowarstwowej.
15. Jakie są kryteria doboru rozpuszczalnika do chromatografii?
16. Opisz krótko technikę chromatografii preparatywnej.