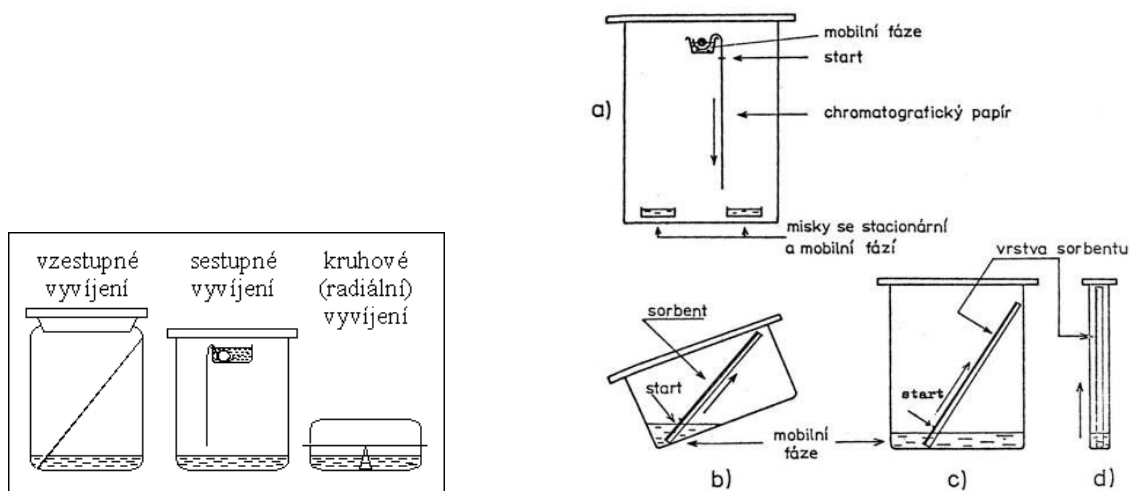


Papírová a tenkovrstvá chromatografie

Jednou z nejrozšířenějších analytických metod je bezesporu chromatografie, umožňující účinnou separaci látek nutnou pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci složek sledovaného vzorku. K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé). Různé látky se liší ve svých adsorpčních vlastnostech, v hodnotách rozdělovacích koeficientů, ve svých rozměrech či ve svých nábojích, což lze vše využít v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení. Stacionární fází může být pevná látka (papír, SiO_2 , Al_2O_3) ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči, mobilní fází pak bývá kapalina či plyn. Z hlediska provedení (uspořádání chromatografického zařízení) dělíme chromatografii na plošnou a sloupcovou, z hlediska určujícího mechanismu dělení látky mezi stacionární a mobilní fází pak chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a další.

Papírová chromatografie byla po určitou dobu v praxi nepoužívanější metodou plošné chromatografie. Její největší výhodou je ekonomicky nenáročné chromatografické médium, využitelné pro separaci širokého množství látek od anorganických iontů až k složitým biomolekulám. Základním separačním mechanismem je v případě papírové chromatografie rozdělovací rovnováha mezi vodou či jiným rozpouštědlem zakotveným v papíru a použitou mobilní fází. U látek s velkým počtem polárních skupin se často uplatňuje jejich silná interakce přímo s celulózou, v takových případech převládá adsorpční mechanismus dělení. Důležitou charakteristikou použitého chromatografického papíru (jedná se o speciální papír, ne např. obyčejný filtrační papír) je průtoková rychlost mobilní fáze – podle ní rozlišujeme chromatografické papíry s rychlým, standardním a pomalým průtokem. Rychlost průtoku významně ovlivňuje dobu separace a samozřejmě i její účinnost. Dodávány jsou však i papíry speciálně upravené – např. hydrofobizované apod.

Před použitím nastříháme chromatografický papír na proužky o minimální délce 10 cm a šířky podle počtu nanášených vzorků. Chromatografii na papíře provádíme buď ve vzestupném provedení, kdy je papír zavěšen v chromatografické komoře a spodním okrajem je namočen do mobilní fáze anebo v sestupném provedení, kdy je papír zavěšen ve vaničce s mobilní fází a ta putuje dolů.



Obr. 3: Chromatografie – provedení

a) *sestupné vyvíjení* – v horní části se umístí žlábek s mobilní fází

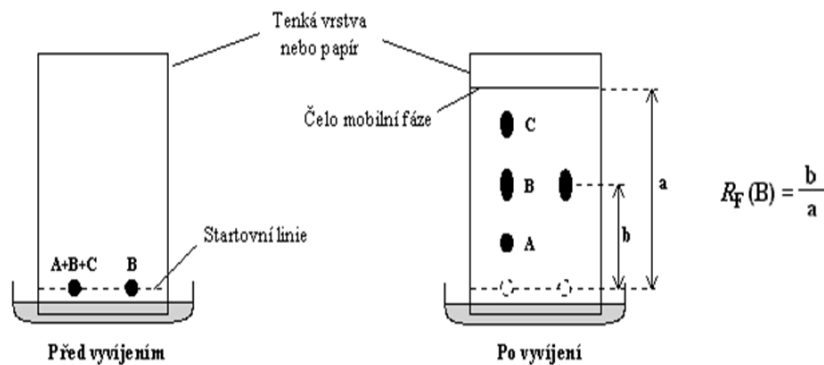
b), c), d) *vzestupné vyvíjení* – mobilní fáze se umístí na dně nádoby (s dobře těsnícím víkem) a vzlíná vzhůru

(převzato z internetu: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJAME.htm,

<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>)

Vzorek nanášíme na vyznačený start, který by měl být alespoň 1 cm nad hladinou mobilní fáze, rozestupy mezi jednotlivými nanášenými vzorky by měly být alespoň 0,5 až 1 cm, od okraje papíru pak minimálně 1 cm. Vzorek se nanáší po odstranění rušících látek (např. extrakcí) ve vhodném rozpouštědle mikropipetou či injekční stříkačkou tak, aby skvrna vznikající na startu nebyla příliš rozměrná (raději postupné nanášení po oschnutí předchozí dávky). Při přípravě a nanášení vzorku je třeba brát v úvahu, že příliš velké množství analyzované látky ve vzorku zapříčiňuje tvorbu rozvleklých skvrn. Optimální množství látky ve vzorku se pohybuje v rozmezí 0,1 až 100 µg v závislosti na její rozpustnosti v mobilní fázi (čím méně je rozpustná, tím menší množství látky) a na citlivosti detekce. Protože nanášený objem se pohybuje v rozmezí 2 až 20 µl, pohybuje se vhodná koncentrace nanášeného roztoku v rozmezí 0,1 až 5%. Před zahájením vyvíjení chromatogramu je potřeba naplnit chromatografickou komoru (vyšší skleněná nádoba s víkem a stojánkem pro uchycení papíru) mobilní fází a přibližně 15 až 20 min. nechat ustavit v komoře rovnováhu par mobilní fáze. Volba složení mobilní fáze ovlivňuje pohyblivost chromatografovaných látek podle pravidla podobné rozpouští podobné. Proto pro polární látky se používají směsi polárních organických rozpouštědel (alkoholy) s vodou a přídavkem kyseliny či báze, nepolární látky se pak chromatografují ve směsích nepolárních rozpouštědel (v takovém případě je třeba atmosféru komory sytit vodními parami z mističky s vodou). Pohyblivost látky na chromatogramu se

vyjadřuje hodnotou R_F , která se určuje jako poměr vzdálenosti, kterou urazí skvrna stanovované látky, ke vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla.



Obr. 4: Schéma chromatogramu – pohyblivost látky – hodnota R_F (retenční faktor, známý také jako retardační faktor)

(převzato z internetu: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chromatografie>)

Při **papírové chromatografii** je vhodná vzdálenost, kterou urazí na chromatogramu čelo rozpouštědla asi 5 až 10 cm. Detekce chromatografovaných látek se provádí po vyjmutí papíru a jeho vysušení buď přímo vizuálně, pokud jsou chromatografované látky barevné, nebo se využívá jejich fluorescence pod UV zářením, či se provádí postřik detekčním činidlem za vzniku barevných skvm. Univerzální detekční činidlo představuje konc. kyselina sírová, protože většina organických látek pod jejím dehydratačním vlivem uhelnatí a tvoří tmavé skvmy (obvykle je nutno zahřát). To ovšem platí i pro samotný chromatografický papír, takže je lépe využít v tomto případě specifitějších detekčních činidel. Podle polohy skvmy látky ve vzorku ve srovnání se standardem, případně i stejného chování při detekci, určujeme kvalitu látky, kvantitu pak odhadujeme z porovnání velikosti či intenzity zabarvení skvm vzorku a standardu.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC, Thin Layer Chromatography) je případem plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Vlastní chromatografický experiment se provádí na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina) naneseného na vhodné podložce (sklo, kovová fólie). Vzorek se ve velmi malém množství (μl) nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy obdobně jako v případě papírové chromatografie. Po zaschnutí nanesených vzorků se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze) tak, aby startovní linie byla nad hladinou, a komora se uzavře. Dodržují se obdobná pravidla jako u papírové chromatografie, vyvíjení chromatogramu probíhá tak dlouho, dokud se čelo vztlínající směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky. Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekce se zjistí, kam doputovaly látky obsažené ve vzorku. K detekci se používají stejné postupy jako v papírové chromatografii, mnohdy se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou, fluoreskující při osvětlení UV zářením. Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhašejí, takže se pod UV lampou objevují na

chromatogramu v podobě tmavých skvm. Využívají se i další způsoby detekce, založené na postřiku chromatogramu vhodným činidlem, které se stanovovanou látkou vytváří barevnou sloučeninu.

Papírovou a tenkovrstvou chromatografií lze stanovovat širokou škálu organických i anorganických látek při vysoké citlivosti a nízké ekonomické náročnosti. Metoda je povětšinou i časově velmi pohotová, takže je velmi rozšířená v průmyslu v oblasti mezioperační kontroly. Vzhledem ke své univerzálnosti je vhodná i pro první orientaci ve složení neznámého vzorku v oblasti sledování znečištění životního prostředí, medicíně i chemickém výzkumu.

Stanovení vitamínů skupiny B v droždí

Vitamíny skupiny B jsou rozpustné ve vodě, od čehož se odvíjí i používané vyvíjecí soustavy pro jejich chromatografické stanovení na tenké vrstvě - jejich důležitou součástí je voda. Povětšinou jsou používány kyselé vyvíjecí soustavy s kyselinou octovou, neboť v nich jsou tyto látky stabilnější vůči oxidaci vzdušným kyslíkem. Další nevýhodou látek ze skupiny vitamínů je jejich citlivost ke světlu, což je právě významné u vitamínů skupiny B. Proto je třeba vzorky i chromatogramy chránit před přímým slunečním zářením. Detekce vitamínů skupiny B je vcelku jednoduchá, protože některé z nich jsou barevné a všechny fluoreskují či naopak zhaší fluorescenci pod UV zářením.

Úkol: Stanovte vitamíny skupiny B přítomné ve vzorku kvasnic

Chemikálie :

- kyselina octová
- aceton
- methanol
- toluen
- standardy vitamínů skupiny B
- vzorek droždí.

Pomůcky :

- chromatografická vyvíjecí komora
- chromatografická tenká vrstva typu Silikagel G
- mikropipeta
- odměrné válce 50, 25 a 5 ml
- kádinka 150 ml (3 ks)
- Erlenmayerova baňka 100 ml

Petriho miska o průměru min. 12 cm

pinzeta

fixýrka

třecí miska

nálevka

filtrační papír.

Postup:

Připravíme si mobilní fázi o složení CH_3COOH -aceton-methanol-toluen (v poměru 2,5:2,5:10:35 ml). Mobilní fázi nalijeme do vyvíjecí komory ve vrstvě okolo 1 cm a komoru uzavřeme. Odvážený 1 g vzorku droždí po homogenizaci na třecí misce s 2 ml kyseliny octové převedeme do Erlenmayerovy baňky dalším podílem kyseliny octové do celkového objemu 5 ml a důkladně obsah baňky promícháme. Po filtraci extrakt použijeme přímo k vlastnímu chromatografickému stanovení. Na destičce typu Silikagel G si vyznačíme tužkou startovní linii a starty pro vzorek a standardy (1 cm od okraje a 0,5 cm od sebe). Na start nanese standardy a studovaný vzorek mikropipetou v množství 5 μl . Po oschnutí skvrn vložíme destičku do komory (start musí být nad hladinou mobilní fáze) a uzavřeme. Necháme chromatogram vyvíjet, dokud hladina vztlínající mobilní fáze nedosáhne cca 1 cm pod okraj destičky. Poté destičku vyjmeme, označíme čelo rozpouštědla a necháme oschnout volně na Petriho misce. Detekci provedeme přímo na základě zbarvení barevných vitaminů skupiny B pod UV lampou.

Vyhodnocení:

Vyhodnotíme polohy a barvy skvrn standardů a vzorku a určíme přítomné vitaminy. Z porovnání intenzity zbarvení skvrn vzorku a standardů odhadneme obsah jednotlivých vitaminů ve vzorku a vypočteme jejich přibližný obsah v mg/g vzorku. Určíme rovněž R_F pro jednotlivé standardy a vzorky.