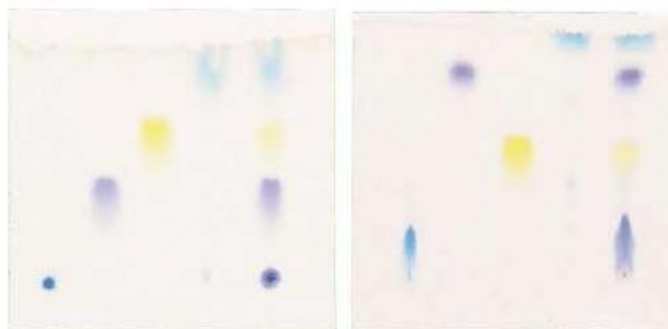


## Chromatografie na tenké vrstvě - princip funkce

Kat. číslo 109.3148



**Principy a praktická použití chromatografie na tenké vrstvě**

### Obsah a cíle výuky

- Simulovat rozdělení barviv pomocí stanoveného souboru v Excelu při různých koeficientech rozdělení a zjistit účinky pomocí grafiky v Excelu.
- Sledovat u několika příkladů základní příkazy výpočtu v Excelu pro výpočet koncentrace.
- Dokázat pracovat experimentálně čistě a vést protokoly o pokusech.
- Vyzkoušet si při oddělování směsí barviv, že chromatografie na tenké vrstvě poskytuje překvapivé výsledky.

### V sadě jsou obsaženy následující komponenty:

#### Barviva

- A brilantová modř
- B modro-červená
- C žlutá
- D světle modrá
- E směs barviv A-D

#### Roztoky

- F roztok octanu draselného (10x koncentrovaný)
- G citronan sodný rozpuštěný v isopropanolu
- 1x celulózové desky pro DC 10x20 cm
- 20x kapilární mikropipety ze skla – objem 5  $\mu$ l

### Potřebné příslušenství (není součástí sady):

- 250ml kádinky
- Pravítko
- Tužka
- Pipety (5 ml nebo 10 ml)
- Pipetovací pomůcka nebo balonek na pipety

### ÚVOD

Chromatografie na tenké vrstvě je chemický/biologický proces oddělování pro analýzu molekulárních směsí. Používá se navíc pro oddělování směsí anorganických iontů a biochemických složek (například proteinů, tuků, cukrů, aminokyselin a pigmentů). Slovo „chromatografie“ (z řečtiny) znamená „psát barvou“ (chroma = barva, graphein = psát). V chemii se pod tímto pojmem nerozumí žádná malovací technika, ale řada technik pro analytické separování látek dohromady: papírová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě, plynová chromatografie a další moderní metody. Chromatografie měla velký význam chemii přírodních látek a biochemii, protože s její pomocí lze velmi snadno oddělovat látky ze směsi a identifikovat jednotlivé složky. Erwin Chargaff například pomocí chromatografických technik významným způsobem přispěl k vysvětlení struktury DNA. V moderních laboratořích se chromatografie provádí automatizovaně a vyhodnocuje se pomocí počítače.

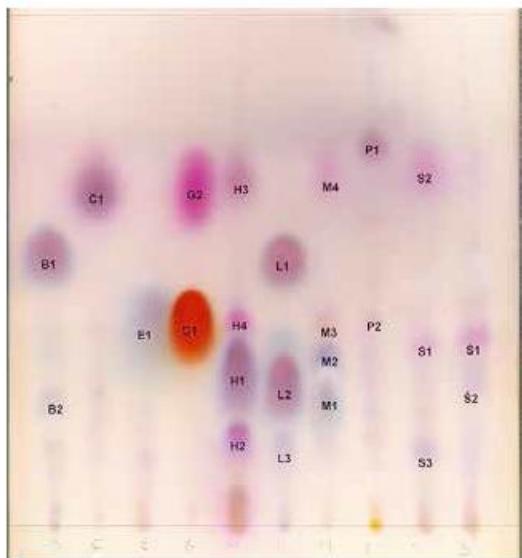
Poprvé použil chromatografii ruský botanik Tswett v roce 1903 k oddělení barviv listu (chroma, řecky = barva). Ve třicátých letech 20. století se tato metoda používala výhradně k separování pigmentů. Teprve od roku 1940 se začaly používat papírové proužky nebo proužky z křemičitého gelu po oddělování substancí rozpustných ve vodě, například aminokyselin a cukru. V současnosti se používají téměř výhradně destičky z plastu, hliníku nebo skla, které jsou potaženy tenkou vrstvou velmi jemně zrnité látky (např. prášek z buničiny nebo oxidu hlinitého).

Vlastní povrch přitom ukazuje náboje, které umožňují velmi jednoduché oddělení polárních substancí.

Tato vrstva se nazývá stacionární fáze. Oddělovaná směs se nyní bodově nanese v blízkosti dolního okraje destičky. Poté se destička postaví do nádoby, která obsahuje malé množství kapaliny. Tato kapalina se nazývá fluidizační prostředek nebo mobilní fáze.

Fluidizační prostředek nyní ve vrstvě stoupá pomocí kapilární síly do výšky. Jakmile kapalina dosáhne skvrny směsi, jsou částice směsi vystaveny přitažlivé síle stacionární fáze na jedné straně a přitažlivé síle mobilní fáze na straně druhé. V závislosti na poměru sil zůstane částice u počátečního bodu nebo putuje s mobilní fází nahoru.

Síly a tím i putování částice závisí jak na druhu materiálu vrstvy a fluidizačním prostředku, tak i na druhu částice. Ve většině případů lze materiály vrstev a směsi fluidizačních prostředků kombinovat tak, aby různé druhy částic směsi putovaly různě daleko a navzájem se od sebe separovaly.



Tento obrázek (zdroj: Wikipedia) ukazuje sken desky s křemičitým gelem (silikagel G), na níž bylo vyvinuto 10 olejů s mobilní fází obsahující toluen/ethylacetát (poměr 93:7 v/v). Nakonec byla deska postříkána vanilinem rozpuštěným v kyselině sírové a usušena.

Zleva doprava byly separovány následující oleje:

|   |            |
|---|------------|
| B | bergamot   |
| C | cedr       |
| E | eukalyptus |
| G | hřebíček   |
| H | cajeput    |
| L | levandule  |
| M | máta       |
| P | pomeranč   |
| S | pinie      |
| S | borovice   |

Přitom byly bezpečně identifikovány následující komponenty

|          |               |
|----------|---------------|
| B1 a L1: | linalol       |
| B2 a L2: | linalylacetát |
| E1:      | cineol        |
| G1:      | eugenol       |
| G2:      | carophyllene  |

Komponenty, které nebylo možné zcela bezpečně určit:

|     |         |
|-----|---------|
| C1: | cedrol  |
| M3: | mentol  |
| P1: | limonen |

### Fáze chromatografie

#### Stacionární fáze

Při chromatografii na tenké vrstvě se používá stacionární fáze na nosném materiálu (hliníková fólie, plastická fólie nebo skleněná deska), na níž se separují analyzované látky. Stacionární fáze může být například buničina, oxid hlinitý nebo křemičitý gel. Je velmi jemná a rovnoměrně rozdělená na nosném materiálu.

#### Mobilní fáze: rozpouštědlo

Kapalná fáze se pohybuje pomocí kapilárních sil stacionární fází a transportuje přitom látky směsi substancí.

#### Nanesení vzorků substancí

Na fólii pro chromatografii na tenké vrstvě se pomocí kapiláry nanese vzorky bodově na startovní čáru a nechají se zaschnout.

#### Separace substancí

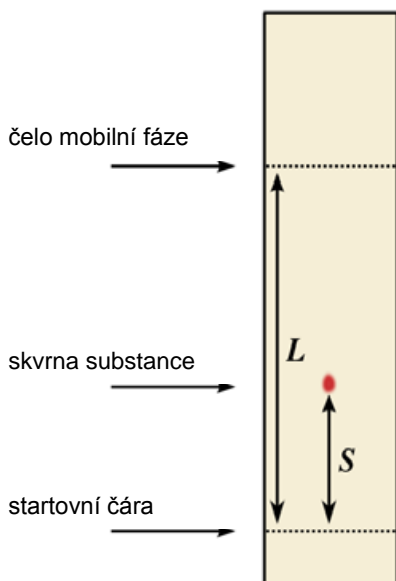
Po nanesení vzorků se postaví fólie svisle do chromatografické nádoby, která obsahuje přesně tolik mobilní (kapalně) fáze, aby se startovní čára s nanesenými vzorky nacházela půl centimetru nad hladinou kapaliny. Na základě kapilárních sil začne mobilní fáze procházet stacionární fází a unáší s sebou přitom vzorky substancí. Během

chromatografie se podél dráhy neustále vytváří nová rovnováha mezi roztokem látky (v mobilní fázi) a adsorpcí látky (ve stacionární fázi). Pokud vyjmete fólii z nádoby a usušíte ji, nachází se „skvrna“ každé složky vzorku v určité výšce chromatogramu (přičemž se množství barviv mobilní a stacionární fáze po usušení fólie na každém místě sečtou). Separace se realizuje tak, že se substance

- rozpustí a dále transportují v různé míře,
- usadí na stacionární fázi s různou stálostí (adsorpce).

### Hodnota R<sub>f</sub> (zdroj obrázku: Wiki)

Čím lépe se substance v putujícím rozpouštědle rozpustí a čím menší je jeho afinita k nosnému materiálu, tím rychleji a dále bude putovat s rozpouštědlem. Z toho vyplývá jako charakteristická veličina hodnota R<sub>f</sub> („Ratio of front“) substance (dráha putování substance / celková dráha putování rozpouštědla). Maximální hodnota R<sub>f</sub> tak je 1, většinou je však výrazně nižší.



Závisí na chemické struktuře substance, nosném materiálu a směsi rozpouštědel (za předpokladu sycení komory a konstantní teploty při pokusu).

*Jonas Hostettler z oddělení chemie na Univerzitě v Basileji vyvinul malý simulační program, který poskytl veřejnosti. Tento program je vhodný jako doplnění spíše suchopárných vysvětlení procesů při vícenásobném rozdělení (prezentace pomocí*

*projektoru, využití domácího počítače nebo v počítačové místnosti) --- <http://www.chemie.unibas.ch/~huber/MVTutorial/index.html>*

### Průběh pokusu

Při tomto pokusu se separuje směs různých barviv na desce z buničiny ve dvou různých rozpouštědlech. Při každém pokusu by proto měla mobilní fáze končit maximálně v polovině desky. Poté se deska otočí a začne druhý pokus – získáte tak výsledky k porovnání, které se na desce nacházejí přibližně zrcadlově, a můžete je přímo porovnat. Oddělované substance obsahují různé náboje a polární skupiny, různou molekulární hmotnost, mají různou geometrii a rovněž se liší poloha a počet jejich dvojitých vazeb CC.

Po provedení pokusu byste měli bezpodmínečně označit čelo mobilní fáze, abyste mohli spolehlivě určit hodnotu R<sub>f</sub>.

### Příprava

Rozdělte desku špičatými nůžkami na osm stejných dílů (5x5 cm).

Rozpusťte pufr octanu draselného (10x): přidejte na 1 ml pufru vždy 9 ml vody.

Připravte pro každou skupinu dvě kádinky, označené písmenem F a G.

Přidejte do každé kádinky F 4 ml pufru F a do každé kádinky G 4 ml pufru G (přesně tolik, aby bylo pokryto dno kádinky).



### Laboratorní bezpečnost

Vždy pamatujte na používání laboratorních pláště, ochranných brýlí a rukavic!

### Všeobecné pokyny k nanášení barviv

Opatrně uchopte DC fólii, nepoškozte svými prsty nebo ohýbáním bílou vrstvu! Opatrně vyznačte – bez poškození nánosu – startovní čáru ve výšce 15 mm.

Na startovní čáru nyní naneste různé barvy pomocí kapilární pipety. Dbejte na to, abyste nanesli vždy co nejmenší množství, nechte je zaschnout, poté na stejné místo znovu krátce naneste stejnou barvu. U každé barvy naneste raději více malých skvrnek přes sebe než jednu obrovskou skvrnu!

**Nyní se můžete pustit do pokusu!**

1. Dostanete dvě DC desky, označte jednu písmenem F a druhou písmenem G.
2. Začněte nanášet na desku F barvy (po vyznačení startovní čáry tužkou). Začněte nejprve s barvivem B (brilantová modř) na levé straně.
3. Předtím, než nanese na startovní čáru zleva doprava všechna barviva s rozstupem 2 cm, musíte pipetu pokaždé důkladně vypláchnout vodou, jinak se barevné pigmenty jednotlivých látek smíchají.
4. Nyní naneste 1  $\mu$ l C (žlutá) a poté vypláchněte pipetu.
5. Teď je na řadě 1  $\mu$ l D (světle modrá) – nezapomeňte vypláchnout pipetu!
6. Nakonec následuje 1  $\mu$ l E (neznámá směs) – pipetu vypláchněte a celou proceduru zopakujte s deskou G.
7. Nechte obě desky 5 min. schnout.

**Začínáme s vlastní chromatografií:**

1. Pro vyvinutí nyní postavte připravenou desku do hermeticky uzavíratelné nádoby, do níž jste předtím nalili roztok F (octan draselný) v takovém množství, aby se deska namočila zhruba do poloviny vzdálenosti mezi spodní hranou desky a startovní čárou.
2. Startovní skvrny by se měly namočit teprve v průběhu kapilárního putování rozpouštědla.
3. Ihned po vložení desky vyvíjecí nádobu hermeticky uzavřete, aby došlo k syčení desky výparů z rozpouštědla (syčení komory). I když při pokusu může zůstat komora otevřená (!), pro správnou chromatografii s citlivými látkami je syčení komory enormně důležité pro získání dobrých výsledků.
4. Počkejte 12 minut, během této doby by se však deska neměla úplně nasáknout fluidizačním prostředkem (nechte mobilní fázi vystoupat maximálně do poloviny desky).
5. Zamezte během chromatografie výkyvům teploty. Ideální jsou klimatizované místnosti!
6. Nyní vyjměte desky z nádob a nechte je ve vodorovné poloze oschnout na kusu papíru.
7. Vypočítejte hodnotu  $R_f$  obou desek.

**Otázky:**

1. Liší se hodnoty  $R_f$  jednotlivých barevných složek podle toho, s jakým fluidizačním prostředkem byly separovány?

2. Jaká barviva jsou lépe rozpustná ve fluidizačním prostředku F, jaká ve fluidizačním prostředku G?
3. Jaká barviva se nejlépe absorbovala ve fluidizačním prostředku F, jaká ve fluidizačním prostředku G?
4. Myslíte si, že kdybyste měli roztok s vyšším podílem isopropanolu než fluidizační prostředek G, rozpustilo by se v něm barvivo A lépe nebo hůře než v F nebo G?
5. Jak můžeme pomocí chromatografie na tenké vrstvě identifikovat složky směsi s neznámými látkami?

**Otázky + odpovědi:**

1. Liší se hodnoty  $R_f$  jednotlivých barevných složek podle toho, s jakým fluidizačním prostředkem byly separovány?  
**Hodnoty  $R_f$  obou chromatografických desek se musí lišit, protože se hodnota  $R_f$  vypočítá ze vzdálenosti konce mobilní fáze a konkrétní skvrny barviva.**
2. Jaká barviva jsou lépe rozpustná ve fluidizačním prostředku F, jaká ve fluidizačním prostředku G?  
**Barviva C a D se lépe rozpouštějí v F. Látky B a D se spíše rozpustí v G.**
3. Jaká barviva se nejlépe absorbovala ve fluidizačním prostředku F, jaká ve fluidizačním prostředku G?  
**V roztoku F se nejlépe absorbuje barvivo A, nejhůře barvivo D.**
4. Předpokládejme, že máte roztok s vyšším podílem isopropanolu než fluidizační prostředek G – rozpustilo by se v něm barvivo A lépe nebo hůře než v F nebo G?  
**Barvivo A by putovalo rychleji, protože je lépe rozpustné ve vodné fázi isopropanolu rozpouštědla G. Rozpouštědlo F neobsahuje žádný isopropanol, a proto by zde barvivo A setrvalo na startovní čáře ( $R_f = 0$ ).**
5. Jak můžeme pomocí chromatografie na tenké vrstvě identifikovat složky směsi s neznámými látkami?  
**Můžeme porovnat neznámé látky s chováním při separaci známých látek v různých rozpouštědlech a vyvodit z toho, jaké vlastnosti se jich musí týkat. Porovnáme-li hodnoty  $R_f$ , můžeme (pokud jsou stejné) identifikovat také jednotlivé složky.**