

TENKOVSTVÁ CHROMATOGRRAFIE VE VÝUCE CHEMIE

Václav Richtr, Milan Kraitr

SOUHRN: Jsou podány nezbytné obecné charakteristiky chromatografických metod, podrobněji je pojednáno o tenkovrstvé chromatografii v analytické i preparativní verzi. Práce je určena především učitelům a studentům učitelství chemie.

Klíčová slova: tenkovrstvá chromatografie, preparativní tenkovrstvá chromatografie, pokusy pro výuku chemie.

1 ÚVOD

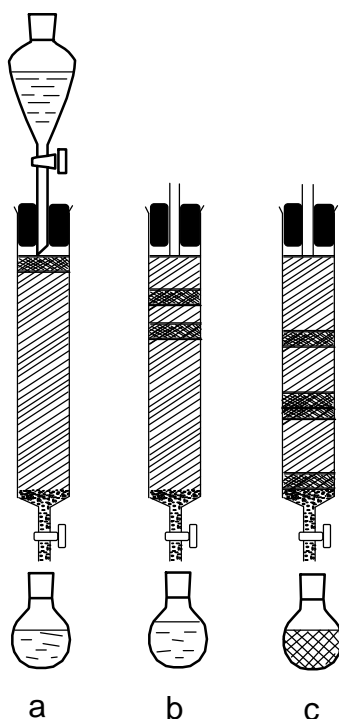
Chromatografie je jednou z nejvýznamnějších separačních technik v chemické laboratoři a má nezastupitelné místo i ve výuce chemie na různých stupních škol.

Přestože název chromatografie naznačuje spojitost metody s barevností látek, nemá podstata metody s barevností nic společného a chromatografie se užívá převážně k dělení směsí bezbarvých látek. Od začátku 20. století, kdy byla objevena, našla uplatnění v mnoha oborech, kde se objevuje v podobě nejjednodušších metod s minimálními nároky na vybavení (papírová a tenkovrstvá chromatografie) i metod využívajících nákladná zařízení (např. plynová nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Ve všech případech mají chromatografické metody stejné základní principy. Vedle klasické chromatografie adsorpční a rozdělovací se dnes užívají speciální metody - chromatografie ionexová, gelová permeační, afinitní aj. Pro čtenáře, který se nepotřebuje zabývat všemi metodami obšírně a přitom chce o problematice chromatografických metod získat základní představu, je vhodné studium příslušných partií v odborné literatuře s širším zaměřením, např.¹⁻³.

Více informací o chromatografických metodách podává řada dalších publikací, především z oblasti laboratorní techniky^{4,5}. V tomto směru zasluhuje zvláštní pozornost rozsáhlá monografie J. Churáčka a kol.⁶. Velmi cenné informace o vybraných chromatografických metodách poskytují specializované publikace, např.⁷⁻¹⁰. Bohatým zdrojem informací, směřujících do oblasti didaktického využití, jsou původní práce autorů zveřejněné v odborných časopisech a sbornících¹¹⁻²³. Problematice tenkovrstvé chromatografie ve výuce chemie je věnována monografie K. Koláře²⁴.

2 Z HISTORIE CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

O objev chromatografie se zasloužil ruský botanik M. S. Cvět, který se již v průběhu své disertační práce zajímal o adsorpci barviv na bílkoviny (1901). Na základě získaných zkušeností později vypracoval systematickou metodiku dělení směsí látek, které se dosud rozdělit nedařilo⁵. Postupoval tak, že velmi pomalu filtroval roztok látek určených k dělení (např. směs listových barviv) ve vhodném rozpouštědle sloupcem (kolonkou) obsahujícím jeden z vybraných nerozpustných práškových adsorbentů (např. uhlíctan vápenatý). Směs látek se adsorbovala ve formě úzkého proužku v horní části sloupce (obr. 1). Pak sloupec promýval buď tímž, nebo jiným vhodným rozpouštědlem (eluentem), přičemž se jednotlivé složky směsi posouvaly sloupcem (vymývaly se) různou rychlostí podle své adsorbovatelnosti. Tak vznikla řada od sebe oddělených barevných proužků.



Obr. 1 **Princip Cvětovy adsorpční chromatografie směsi barviv**

a – počátek chromatografie, b – postupné dělení barviv podle adsorbovatelnosti, c – nejméně adsorbovaná složka vytéká do předloženého jímadla

Nejrychleji postupující proužky při dostatečném promývání opustily kolonku (byly obsaženy v eluátu, jímaném do nádob) jako první. V jiných případech Cvět sloupec z kolonky prostě vytlačil a vykrájel z něho barevné proužky, načež rozdělená barviva z povrchu adsorbentů extrahoval. První z těchto pokusů (dělení listových barviv na uhlíctanu vápenatém) uskutečněný v roce 1903 je dosud spojován se vznikem chromatografie jako vědního oboru. Souvisí také s názvem

chromatografie (z řeckého chroma - barva, grafó - píši). Z dalších historických údajů je zřejmé, že teprve roku 1931 začíná pozvolný nástup objevů, které vyvrcholily vypracováním metodiky papírové chromatografie jako jedné z forem rozdělovací chromatografie, za kterou v roce 1952 Martin a Synge obdrželi Nobelovu cenu⁵. Svého času papírová chromatografie patřila k nejvýznamnějším analytickým metodám²⁵. Její význam byl poněkud oslaben až objevem tenkovrstvé chromatografie, která svým plošným uspořádáním papírovou chromatografií připomíná, ale je založena (až na některé výjimky) na principu adsorpční chromatografie, známé již z dob Cvětových.

3 PRINCIP CHROMATOGRRAFIE A DŮLEŽITÉ ZÁKLADNÍ POJMY

Chromatografie je separační metoda použitelná k analytickým i preparativním účelům, při které se dosahuje rozdělení směsi na základě rozdílné migrace jejích složek v systému dvou fází - nepohyblivé (stacionární) a pohyblivé (mobilní).

Stacionární fázi může tvořit pevná látka nebo kapalina zachycená v pevném porézním materiálu (nosiči). Mobilní fázi tvoří kapalina (kapalinová chromatografie), nebo plyn (plynová chromatografie).

Podle uspořádání stacionární fáze se rozlišuje chromatografie sloupcová a plošná (planární), která je reprezentována chromatografií papírovou a chromatografií tenkovrstvou.

Papírová chromatografie využívá jako stacionární fázi speciální (chromatografický) papír, který může být pro méně náročné práce (i pro demonstraci) nahrazen papírem filtračním, který na rozdíl od papíru chromatografického nemá tak přesně definované vlastnosti (jedná se především o rychlost průtoku mobilní fáze, měrné množství vázané mobilní fáze, jeho mechanickou pevnost a přítomnost stopových nečistot⁷). Co se týče mechanismu papírové chromatografie, jedná se až na některé výjimky o rozdělování mezi dvě fáze (stacionární a mobilní), přičemž papír je nosičem stacionární (zakotvené) fáze. Pokud papír není před chromatografií upravován, je stacionární fází voda v papíru, jejíž obsah je v rovnováze se vzdušnou vlhkostí. Při impregnaci se na papíru mohou zakotvit i jiná rozpouštědla, a to jak polární (např. alkoholy, formamid apod.), tak nepolární (uhlovodíky). Potom se samozřejmě musí vhodně volit i fáze mobilní. Rozdělení složek chromatografované směsi se řídí Nernstovým rozdělovacím zákonem a celý proces si lze představit jako opakovaně probíhající jednoduchá rozdělení látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, analogická ustavení rovnováhy při opakovaném vytřepávání v dělicí nálevce.

Chromatografie na tenké vrstvě se od chromatografie papírové liší především tím, že jako stacionární fáze je užíván jemnozrnný sorbent umístěný buď volně nebo fixovaný vhodným pojivem v tenké vrstvě na podkladovou desku (adsorpční chromatografie), případně stacionární fáze zakotvená na nosiči

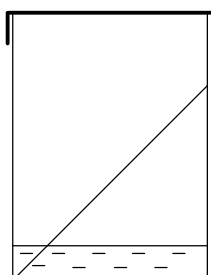
(rozdělovací chromatografie). V některých případech lze užít i jiný jemně upravený materiál specifických vlastností. Potom i v plošném uspořádání může probíhat dělení látek jinými mechanismy podobně jako při chromatografii sloupcové (výměna iontů, efekt molekulového síta atd.). Nejčastěji se však tenkovrstvá chromatografie realizuje jako adsorpční. V porovnání s chromatografií papírovou má některé přednosti, ke kterým v analytickém provedení patří především méně rozměrné zařízení a vyšší rychlost analýzy. V preparativním provedení tenkovrstvá chromatografie umožňuje dělení podstatně větších množství směsí (v závislosti na jejich složení) než chromatografie papírová vzhledem k tomu, že tloušťka vrstvy adsorbentu může činit až 3 mm. Při takové tloušťce vrstvy se však již začínají projevovat nežádoucí efekty, které zhoršují dělicí schopnost.

4 TENKOVrstVÁ CHROMATOGRAFIE (TLC)

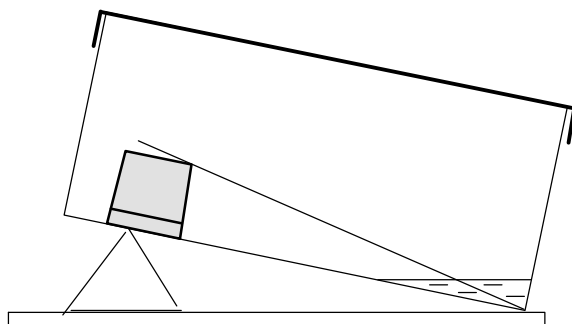
Tenkovrstvá chromatografie představuje velmi jednoduchou, ale značně účinnou chromatografickou metodu. Její podstatou je rozdělení jednotlivých složek směsi na základě jejich odlišné interakce se sorbentem, který je nanesen v tenké vrstvě na pevnou podložku. Pohyblivou fází je v tomto případě organické rozpouštědlo o vhodné polaritě. Volba nejvhodnějšího sorbentu (stacionární fáze), detekčního činidla a zejména pak rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel za účelem co nejlepšího rozdělení jednotlivých složek reakční směsi vyžaduje zpravidla značnou dávku trpělivosti a zkušeností.

TLC slouží především ke sledování průběhu reakcí. Vedle toho je jedním z ukazatelů čistoty produktů. Průběh chromatografického procesu poskytuje také nezbytné informace pro správnou volbu mobilní fáze při separaci reakční směsi kolonovou nebo preparativní tenkovrstvou chromatografií. Tenká vrstva stacionární fáze je tvořena buď volně sypaným sorbentem nebo připravena jako fixovaná s použitím vhodného pojiva (škrob, sádra), které však nejen ovlivňuje dělicí schopnosti zhotovené vrstvy, ale i možnosti detekce chromatogramu⁷. V současné době jsou častěji využívány *fixované tenké vrstvy*, se kterými je dobrá manipulace, a které poskytují dobře reprodukovatelné výsledky. Tyto vrstvy jsou připravovány rozprostřením suspenze sorbentu ve vodě na vhodnou podložku (nejčastěji podložní mikroskopická sklíčka). Na trhu je rovněž dostatečný sortiment kvalitních hotových tuzemských i zahraničních fixovaných vrstev v různých rozměrech. Nejčastěji je jako podložka využívána hliníková nebo plastová fólie²⁶⁻²⁸. Vlastní chromatografie se provádí obvykle vzestupným způsobem. Fixované tenké vrstvy se do chromatografické komory mohou vkládat téměř kolmo (obr. 2), zatímco volně sypané tenké vrstvy vyžadují opatrnější manipulaci a do chromatografické komory se vkládají šikmo (obr. 3). Komerčně vyráběné fixované tenké vrstvy (silikagel, oxid hlinitý, celulóza) jsou mechanicky různě pevné a některé (se sádrou přidanou jako pojivo) umožňují i vypálení na vařiči. Mají tu výhodu, že se mohou po detekci přímo kopírovat a tak usnadňují i registraci výsledků chromatografie. *Sypané tenké vrstvy* (sorbent bez pojiva)

poměrně věrně simulují průběh chromatografie na sloupci a mohou být užitečné při plánování separace sloupcovou chromatografií. Dělicí schopnost sypaných vrstev je obvykle ve srovnání s vrstvami fixovanými horší. Příprava tenkých vrstev sypaných spočívá v rovnoměrném rozprostření sypkého sorbentu na vhodnou podložku pomocí tyčinky, opatřené dvěma prstenci vymezujícími tloušťku požadované vrstvy. V případě přípravy *litych vrstev* se postupuje obdobně s tím rozdílem, že stejně upravenou tyčinkou se na podložní sklíčka narovnaná na skleněnou desku nalije a rovnoměrně rozprostře předem připravená a nalitá suspenze (např. na 20 podložních mikroskopických sklíček rozměrů 75 x 26 mm se nanáší suspenze 20 g silikagelu pro TLC v takovém množství vody, aby vznikla řídká kaše, která se na ploše roztéká, ale nestéká).



Obr. 2 Fixovaná tenká vrstva v chromatografické komoře s mobilní fází



Obr. 3 Sypaná tenká vrstva v chromatografické komoře s mobilní fází

K chromatografii se přistupuje až po dokonalém vysušení nalité vrstvy, případně potřebné úpravě připravené vrstvy. Zkoumaný roztok se nanáší tenkou kapilárou na předem označenou startovní čáru (start) tak, aby se vytvořil co nejmenší terčík. Po odpaření rozpouštědla se deska vkládá do chromatografické komory s rozpouštědlem podle typu tenké vrstvy (viz obr. 2, 3) tak, aby nanesený vzorek nebyl ponořen do kapaliny, ale rozpouštědlo se na úroveň startu dostalo jen vztlínáním. Chromatografická komora musí být po celou dobu vztlínání rozpouštědla těsně uzavřena, aby nedocházelo k úniku par a tím k nežádoucím

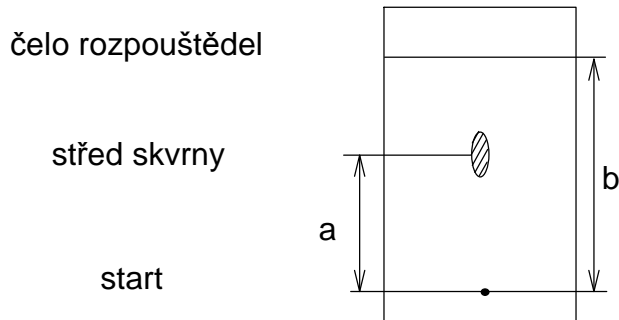
okrajovým jevům, které nepříznivě ovlivňují průběh dělení (deformace tvaru stop i dráhy, po které se stopa pohybuje^{4,5,7}). Když čelo rozpouštědla dospěje několik milimetrů od okraje destičky, destička s tenkou vrstvou se z chromatografické komory vyjme a provede se vyhodnocení chromatogramu, které je nejjednodušší u barevných látek, protože tam je přímo vidět poloha získané stopy (u chromatograficky jednotného vzorku) nebo stop (u směsi více barevných látek). V případě, že se jedná o látky bezbarvé, je potřeba získané stopy zviditelnit detekcí po předchozím zbarvení (odpaření) rozpouštědla. Pro detekci se užívá celá řada metod, z nichž některé mají téměř univerzální využití v případě použití vhodných tenkých vrstev. Např. při použití vrstev silikagelu nebo oxidu hlinitého volně sypaného nebo ve fixované vrstvě se sádrou jako pojivem se s výhodou dá použít vypálené vrstvy na elektrickém vařiči. Místa s organickou (netěkavou) látkou hnědnou. Proces se urychlí a zvýrazní, předchází-li vypálení postřik vrstvy 10% ní kyselinou sírovou. Tato metoda se nedá uplatnit u vrstev, kde je použito organické pojivo (škrob), protože při vypalování tmavne celá plocha.

Další metodou detekce je ozáření UV světlem při použití adsorbentů s obsahem fluorescenčního indikátoru. Skvrny obsahující látky absorbující ultrafialové záření se projeví jako tmavé skvrny na světlém pozadí. Pokud analyzované sloučeniny neabsorbují v UV oblasti, je možné postříkat vyvinutou destičku roztokem morinu a po usušení látky identifikovat pod UV lampou jako skvrny odlišné barvy na fluoreskujícím pozadí. V některých případech je vhodné detekci provést postřikem vhodným činidlem. Těchto činidel literatura uvádí celou řadu. Jejich použití mnohdy není univerzální a umožňuje jen detekci látek určitého typu. To je někdy výhodné i pro sledování průběhu reakce. K postřiku se užívají rozprašovače různých konstrukcí. Společným znakem těchto zařízení je tvorba jemně rozptýlených kapiček činidla a odolnost použitého materiálu k rozprašovanému činidlu.

Vzdálenost, kterou skvrna urazí při analýze na tenké vrstvě, závisí na polaritě látky a polaritě rozpouštědla. Polárnější látky jsou více zadržovány polárními skupinami silikagelu nebo jiné stacionární fáze. Na druhé straně látka o dané polaritě urazí větší vzdálenost při použití rozpouštědla o vyšší polaritě, zároveň však také dochází k jejímu většímu rozmývání. Vzdálenost skvrny a její tvar může také být významně ovlivněn rozpustností látky v mobilní fázi. Vzdálenost, kterou látka urazí na dané destičce v daném rozpouštědle, je tedy nepřímo úměrná její polaritě a udává se pomocí veličiny R_F (retardačního faktoru), která je dána rovnicí:

$$R_F = \frac{a}{b}$$

Retardační faktor je bezrozměrná veličina, nabývající hodnoty od 0 pro látky, které zůstávají na startu do 1, pro sloučeniny, které postupují s čelem rozpouštědla (obr. 4).



Obr. 4 Vyhodnocení chromatogramu R_F

Prvním krokem dělení směsi látek pomocí TLC je volba stacionární fáze (adsorbentu), při níž přihlížíme k vlastnostem chromatografovaných látek i adsorbentů, které máme k dispozici. Volíme takový adsorbent, který neváže jednotlivé složky dělené směsi příliš pevně. Pokud nemůžeme vycházet z literárních údajů, jsme nuceni orientovat se předběžnými pokusy: zkusíme nejprve dělení pomocí aktivnějšího adsorbentu; jsou-li na něm látky adsorbovány příliš pevně a nelze je vymýt ani polárnějšími rozpouštědly, volíme adsorbent o nižším stupni aktivity, atd. Pokud ani to nevede k cíli, přejdeme na jiný adsorbent.

Mezi oxidem hlinitým a silikagelem je rozdíl hlavně v tom, že hliník má větší koordinační schopnost než křemík. Proto je oxid hlinitý vhodnějším adsorbentem pro středně polární látky. Deaktivovaný oxid hlinitý lze použít pro silně polární látky. Látky schopné vytvářet intermolekulární vodíkové můstky (alkoholy, kyseliny apod.) se na oxidu hlinitém zadržují pevněji než na silikagelu, protože dochází k donor-akceptorové interakci aktivního vodíku s kovovým atomem za tvorby vodíkové vazby typu chelátu.

Seřadíme-li jednotlivé funkční skupiny podle klesající adsorptivity na polárním adsorbentu, dostaneme tuto řadu: $R-SO_3H$, $R-COOH$, $R-CONH_2$, $R-OH$, $R-NH_2$, $R-COOCH_3$, R_1-NH-R_2 , $R-NO_2$, $R-OCH_3$, $R-Cl$ a $R-H$. Určitý vliv na adsorptivitu má také polarizovatelnost molekuly a velikost dipólového momentu, která se může uplatnit při dělení izomerů⁷.

Nejvhodnější rozpouštědlový systém pro danou směs látek je většinou zjišťován experimentálně na základě zkušeností a je zaznamenáván jako součást pracovního protokolu. Při volbě rozpouštědel se vychází z tzv. *eluotropické řady*. V této řadě jsou rozpouštědla řazena podle klesající relativní permitivity v pořadí: voda, methanol, ethanol, propan-1-ol, aceton, ethyl-acetát, diethylether, chloroform, benzen, toluen, chlorid uhličitý, cyklohexan, hexan.

Rozpouštědla stojící v eluotropické řadě nejvýše jsou vhodnými eluenty i pro vymytí složek směsí s vysokou polaritou. Velmi dobré eluenty jsou též pyridin a kyselina octová. Jejich účinnost je způsobena tím, že pyridin uvolňuje i chemicky vázané báze a současně je dobře rozpouští; podobně kyselina octová ruší chemisorpci fenolů a organických kyselin.

Nejnižší členy eluotropické řady nebo jejich směsi jsou naopak rozpouštědly vhodnými k jemnějšímu dělení směsí. Pro volbu nejvhodnějšího rozpouštědla platí několik zásad. Prvním požadavkem je, aby v použitém rozpouštědle byla dělená směs látek rozpustná; zpravidla je nejvýhodnější to rozpouštědlo, v němž se všechny složky směsi ještě rozpouštějí. Dalším požadavkem je, aby dělené látky nebyly na zvoleném adsorbentu poutány ani příliš pevně, ani příliš málo. V prvním případě směs zůstává na startu, v druhém případě směs látek bez rozdělení postupuje v čele rozpouštědel. Obě mezní možnosti ukazují, že nejvýhodnější je případ dělení směsi za podmínek, kdy jsou její složky adsorbovány středně pevně a mohou se uplatnit rozdíly v jejich R_F .

Rozdíly mezi jednotlivými členy eluotropické řady je zapotřebí někdy zmenšit, zvláště v tom případě, kdy jde o dělení látek o velmi blízké adsorptivitě. Za tím účelem se používá směsi dvou v řadě sousedících rozpouštědel. Přídavek rozpouštědla polárnějšího k méně polárnímu je nutno stupňovat pouze velmi pomalu. Zpravidla jej přidáváme nejprve asi 1-2%, pak 5-10% a konečně asi 50%; směs rozpouštědel se totiž poměrně rychle blíží vlastnostem rozpouštědla polárnějšího. Vlastnosti rozpouštědlové soustavy ověřené při TLC jsou neobyčejně cenné pro preparativní provedení TLC a při chromatografii sloupcové, kdy se sloupec promývá postupně rozpouštědly od nejméně polárních k nejpolarnějším.

V běžných chromatografiích se neuvádějí všechna rozpouštědla eluotropické řady, ale jen některá (tzv. zkrácená eluotropická řada). Keil²⁹ např. tento výběr omezuje na řadu petrolether - benzen - ethylether - ethanol, v některých případech se řada rozšiřuje o methanol. V souvislosti s prokázanými karcinogenními účinky benzenu je snaha toto rozpouštědlo nahradit jinými. Z eluotropické řady rozpouštědel je zřejmá možnost jeho náhrady toluenem, který je však méně těkavý. Výhodná je náhrada benzenu kombinací petroletheru s etherem. V některých případech (podle typu chromatografovaných sloučenin) jsou využívány i řady zcela originální. Např. Kvíčala⁴ uvádí řadu tvořenou z běžných rozpouštědel a jejich směsí:

Petrolether < petrolether - dichlormethan (5:1) < petrolether - dichlormethan (1:1) < dichlormethan < dichlormethan - ethylacetát (5:1) < dichlormethan - ethylacetát (1:1) < ethylacetát < ethylacetát - ethanol (2:1) < ethanol < ethanol- kys. octová (2:1) < kys. octová.

Při použití nečištěných rozpouštědel na bázi halogenderivátů uhlovodíků je potřeba počítat s přítomností 1-2% ethanolu, který výrazně zvyšuje celkovou polaritu rozpouštědla.

V některých případech se produkty dělí pouze v málo polárních rozpouštědlech, kde rozdíl R_F je velmi malý, ale při použití polárnějších rozpouštědel se dělení zhoršuje. V tom případě je výhodné použít vícenásobné eluce, tj. po provedení eluce a odpaření rozpouštědla destičku znovu vložit do vyvíjecí komůrky a chromatografii zopakovat. (Tento postup je využíván často u TLC preparativní. V kapitole věnované této metodě bude uveden i princip opakovaného vyvíjení chromatogramu.)

5 PREPARATIVNÍ TLC

Preparativní provedení tenkovrstvé chromatografie se od analytického liší především v rozměrech chromatografických desek, které jsou obvykle 20 x 20 cm, ale mohou být i větší (např. 25 x 50 cm), přičemž tloušťka vrstvy bývá až 3 mm. Vrstva může být buď sypaná nebo litá s pojivem nebo bez pojiva. Sypané i lité vrstvy nanášíme pomocí vhodných nanášeček. Úspěchu dosáhneme i při použití skleněné tyčinky, která je na krajích opatřena tenkou pryžovou nebo plastovou hadičkou, případně vhodným počtem závitů lepenky, vymezujících tloušťku vrstvy (viz kap. 4). Dobrých výsledků při přípravě lité vrstvy můžeme dosáhnout i tak, že potřebné množství adsorbentu ve směsi s vodou (poměr složek je nutno předem vyzkoušet) vlijeme na desku. Na desku 20 x 20 cm se používá 20 - 25 g silikagelu pro TLC. Po hrubém rozprostření například skleněnou zátkou dosáhneme vytvoření souvislé hladké vrstvy mírným poklepem prsty na spodní část desky při jejím současném naklánění ve všech směrech.

Další rozdíl od analytického provedení spočívá v tom, že koncentrovaný roztok látky určené k chromatografii nanášíme na start tak, aby vznikl 2 až 3 mm široký souvislý proužek. Postupujeme buď tak, že klademe kapičku vedle kapičky, nebo si nacvičíme nanášení v souvislém proužku přímo z balonku, nebo z injekční stříkačky. Dodržení šířky a linearit proužku je nutné pro zachování účinnosti chromatografie. Množství nanášené látky je nutno určit experimentálně a je závislé na složení dělené směsi, které zjistíme předem (viz kap. 4).

K vyvíjení chromatogramu přistoupíme až po důkladném odpaření rozpouštědel ze stopy na startu.

Jako chromatografická nádoba nejlépe poslouží akvárium vhodných rozměrů, zakryté tak, aby nemohlo docházet k odpařování rozpouštědel během jejich postupu po desce. Zakrytí můžeme provést např. alobalem převrstveným slabým molitanem. Na molitan položíme skleněnou desku, kterou je vhodné zatížit. Na těsnosti zařízení závisí úspěch celé chromatografie, neboť je nutné, aby čelo rozpouštědel postupovalo rovnoměrně v celé šířce desky.

Soustavu rozpouštědel užitých k chromatografii je vhodné vyzkoušet na malé desce, připravené na podložním mikroskopickém sklíčku ze stejného adsorbentu (viz kap. 4). Je-li dělená směs pestřejší, je vhodnější pro chromatografii volit méně polární rozpouštědla. Izolovaná látka tak vytvoří na preparativní tenké vrstvě souvislou chromatografickou zónu (pás) blízko startu, obklopenou pásy dalších složek dělené směsi. Necháme-li po úplném odpaření rozpouštědel opět vzlínat stejná rozpouštědla po celé délce desky, dojde k poněkud lepšímu rozložení pásů dělené směsi. V některých případech docílíme potřebné rozdělení směsi až po několikanásobném vysušení desky a vzlínání nových rozpouštědel. Princip tohoto postupu spočívá v tom, že při opakovaném vnoření preparativní desky do rozpouštědla se jednotlivé pásy látek o nepatrně odlišných R_F stávají startem pro novou chromatografii. U bezbarvých látek je nezbytné podmínky opakované eluce vyzkoušet na malé analytické desce. Při použití směsi rozpouštědel je vhodné

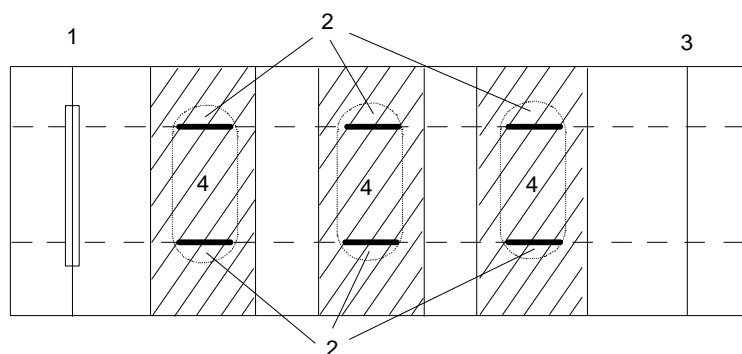
použít vždy novou směs o stejném složení. Při pouhém doplňování by docházelo k nedefinované změně složení směsi ve prospěch méně těkavého rozpouštědla.

V případě, že izolovaná látka je barevná, můžeme po odpaření rozpouštědel přistoupit k sejmutí příslušného pásu adsorbentu a k extrakci vhodným rozpouštědlem za účelem získání izolované složky. Většinou však izolované látky bývají bezbarvé a nezbyvá než se rozhodnout pro vhodnou metodu detekce. Máme-li k dispozici vhodný zdroj UV záření, můžeme využít světélkování nebo zhášení při použití vhodného UV indikátoru, který je součástí tenké vrstvy nebo častěji jeho roztokem vrstvu před ozářením postříkneme.

Pokud vhodnou UV-lampu k dispozici nemáme, můžeme postupovat některou z níže uvedených metod:

a) Preparativní tenkou vrstvu si ve směru od startu k čelu rozměříme na řadu stejných dílků a špachtlí odebereme postupně vzorky adsorbentu na kapkovací desku. Potom ke každému vzorku na kapkovací desce přikápneme 1 až 2 kapky vhodného rozpouštědla a vzápětí přiložíme skleněnou kapiláru, kterou běžně užíváme k nanášení roztoků na tenkou vrstvu. Jestliže adsorbent obsahuje některou složku dělené směsi, ta přechází do roztoku, který je kapilárou nasát. Přítomnost jednotlivých složek v kapilárách pak identifikujeme běžnou tenkovrstvou chromatografií. Postupujeme-li pečlivě, můžeme při optimální volbě „sondy“ na preparativní tenké vrstvě získat dobrý přehled o složení jednotlivých pásů této vrstvy a přistoupit k extrakci např. v chromatografické trubici. Je-li adsorbent s pojivem po sejmutí v kouscích, rozmělníme jej před plněním do trubice v přeloženém archu křídového papíru na prášek. Po vsypání prášku do trubice v případě potřeby trubici poklepeme ve svislé poloze o dřevěnou podložku při otevřeném kohoutu tak, aby před vlitím rozpouštědla byl sloupec pokud možno homogenní a došlo k dokonalému vymytí organické látky.

b) Preparativní tenkou vrstvu položíme na vhodnou podložku (např. laboratorní zvedáček) a ve dvou místech ve směru start - čelo (obr. 5) se dotkneme elektricky žhaveným odporovým drátem. V místech, kde jsou obsaženy složky dělené směsi, dochází ke zhnědnutí v důsledku uhelnatění organické látky.



Obr. 5 Preparativní tenká vrstva po detekci žhavým odporovým drátem:

- 1 – start, 2 – místa, kde došlo ke karbonizaci (zhnědnutí), 3 – čelo,
- 4 – pruhy adsorbentu, které po odstranění zuhelnatělých částí seškrábáme k eluci

Tato místa si označíme a z neporušené části označených pruhů nanese metodou popsanou v postupu a) vzorek na analytickou tenkou vrstvu, abychom identifikovali obsaženou organickou látku. Před sejmutím příslušných částí adsorbentu z desky do trubice k extrakci musíme zuhelnatělou dráhu po žhavém drátu odstranit např. seškrábnutím špachtlí, aby nedošlo k znehodnocení izolované látky rozkladnými produkty. Označené pruhy adsorbentu (viz obr. 5) z desky sejmem a po rozmělnění (je-li to nutné) adsorbent vsypeme do připravené a označené chromatografické trubice k extrakci.

c) V některých případech využíváme k detekci postřik vhodným činidlem, které s izolovanou složkou reaguje za vzniku barevné sloučeniny. V takovém případě před postřikem desku zakryjeme vhodnou šablonou tak, aby k reakci došlo jen v úzkých pruzích v celé délce desky a neznehodnotila se celá plocha. Další zpracování je stejné jako po detekci žhavým drátem (viz postup b)).

6 PRAKTICKÉ APLIKACE CHROMATOGRFICKÝCH METOD

Chromatografické metody obecně a tenkovrstvá chromatografie zvláště za předpokladu znalosti obecných principů metody umožňují modifikaci experimentu prakticky na míru. Učitelé chemie mají dobré zkušenosti s papírovou chromatografií barevných látek (rostlinných barviv, černého barviva fixu atd.) v provedení popisovaném v učebnicích chemie, např.^{30,31}. Papírová chromatografie je dobře dostupná každému experimentátorovi, protože je v krajním případě proveditelná i s obyčejným filtračním papírem, samozřejmě na úkor kvality chromatogramu. V případě, že není třeba zdůrazňovat její mechanismus (jedná se o chromatografii rozdělovací), obvykle pro první přiblížení vyhovuje. Snadno dostupné jsou i další chromatografické metody. Ve školním provedení má primát chromatografie tenkovrstvá, která má obvykle rychlejší průběh, zpravidla se jedná o chromatografii adsorpční (viz kap. 4, 5). Záleží na odhodlání, fantazii a možnostech vyučujícího, ke kterému z komerčně dodávaných materiálů^{26,27,28} se přikloní. V případě hotových vrstev jsou velmi vhodné tenké vrstvy silikagelu na hliníkovém podkladu s anorganickým pojivem a fluorescenčním indikátorem, který nebrání dalšímu zpracování bez využití UV záření a umožňuje i detekci UV světlem. Na rozdíl od klasického Silufolu, dodávaného v minulosti firmou Kavalier Votice, umožňují i vypálení po postřiku 10%-ní kyselinou sírovou. Dříve používaný silufol tuto operaci zcela vylučoval, protože jako pojivo obsahoval škrob. Výše uvedené desky s anorganickým pojivem jsou dodávány v různých rozměrech (např. 20x20 cm v balení po 25 kusech). Jejich nevýhodou je vysoká cena, která by pro běžnou školní praxi mohla sehrát méně významnou roli v případě společného nákupu komerčního balení více zájemci. Výhodou těchto desek je to, že umožňují odstříhávání proužků. V běžné praxi se používají proužky rozměrů podložního mikroskopického sklíčka (7,5x2,5 cm) i menší. Firma Merck uvedené desky dodává pod označením DC - Alufolien Kiesselgel 60 F₂₅₄. Na trhu

jsou i obdobné materiály dodávané jinými firmami. Jiné řešení se odvíjí od zhotovení tenkých vrstev z materiálů komerčně dodávaných firmami již s pojivem (sádrou), nebo bez pojiva^{26,27,28}. Zde je často možno využít i materiály, které bez užitku leží v některých školních sbírkách. Např. na 20 g silikagelu "Silpearl" - tj. silikagelu pro TLC skláren Kavalier Votice se ke zhotovení kaše na nanášení na podložní sklíčka přidává 1,5 g sádry (alabastrové) a asi 40 ml vody (viz kap. 4). V případě, že se v použité vodě rozpustí 2 g dusičnanu stříbrného, získají se destičky, které není při chromatografii bezbarvých látek nutno před vypálením stříkat 10%-ní H_2SO_4 , ale musí se uchovávat v temnu. Takto upravené destičky v místě výskytu stopy organické látky po zahřátí vykazují tmavé stopy vyredukovaného stříbra. Obdobných návodů lze v doporučené literatuře nalézt celou řadu.

Pro inspiraci závěrem uvádíme několik praktických aplikací TLC barevných i bezbarvých směsí.

6.1 CHROMATOGRAFIE ROSTLINNÝCH BARVIV

Dále uvedený postup je příkladem analytické aplikace TLC. Metoda byla vypracována na katedře chemie FPE ZČU v Plzni jako součást rozsáhlého výzkumu za účelem sledování působení exhalací SO_2 na porosty různých variant borovice v různých částech ČR modifikací postupů popsanych v literatuře³². Za předpokladu zpracování většího množství vzorků v různých časových odstupech byl celý postup vypracován tak, aby umožňoval dobrou reprodukovatelnost výsledků a semikvantitativní vyhodnocení vzorků zpracovávaných ve stejný den. To lze zajistit extrakcí přírodního materiálu za definovaných podmínek a nanesením srovnávaných vzorků na jednu tenkou vrstvu. Má-li být dále uvedený postup modifikován pro demonstraci ve výuce, není potřeba extrahovat tak velké množství materiálu a rozmělnění je možno provádět klasickým způsobem, tj. rozdrčením materiálu s příměsí písku a acetonu ve třecí misce bez následné centrifugace.

Pracovní postup: 2 g čerstvě sebraných jehlic borovice byly jemně příčně rozřezány ostrým nožem a přeneseny do achátové třecí misky, kde byly rozetřeny s 5 ml acetonu, 0,3 g uhličitanu hořečnatého a 0,3 g předem propraného a vysušeného jemného písku. Zhomogenizovaná směs byla převedena do předem označené centrifugační zkumavky, zazátkována a vložena do lednice (zajišťující nejen nízkou teplotu, ale i temno) na dobu, než obdobným způsobem byly zpracovány i další vzorky. Po odstředění byla čirá kapalina z jednotlivých zkumavek nanášena kapilárou (stejného průměru k dosažení stejného objemu) na start chromatografické desky "Silufol" (20x20 cm) ve vzdálenosti 1-2 cm od sebe. Toto nanášení bylo prováděno bez přímého dopadu slunečního záření, aby se zabránilo nežádoucímu rozkladu některých barviv. Po odpaření rozpouštědla je možné na start jednotlivé vzorky nanést opakovaně za účelem zvýšení množství dělených barviv. Jako vyvíjecí nádoba bylo použito akvárium, kryté před únikem par rozpouštědel (viz kap. 5), chráněné černým flanelem před působením světla. K vyvíjení chromatogramu byla užita směs benzenu a diethyletheru (4:1). Když čelo rozpouštědla dostoupilo téměř k okraji desky, byly stopy barviv hned označeny (na mokřem chromatogramu jsou znatelnější). V ideálním případě se podaří získat až 6 stop v pořadí od čela oranžová, modrozelená (chlorofyl a), světlezelená (chlorofyl b), žlutá, dvakrát světle žlutá. Některé stopy však poměrně rychle mizí a nejdéle zůstanou stopy zelené (chlorofyl a, b) a oranžová v čele (β -karoten).

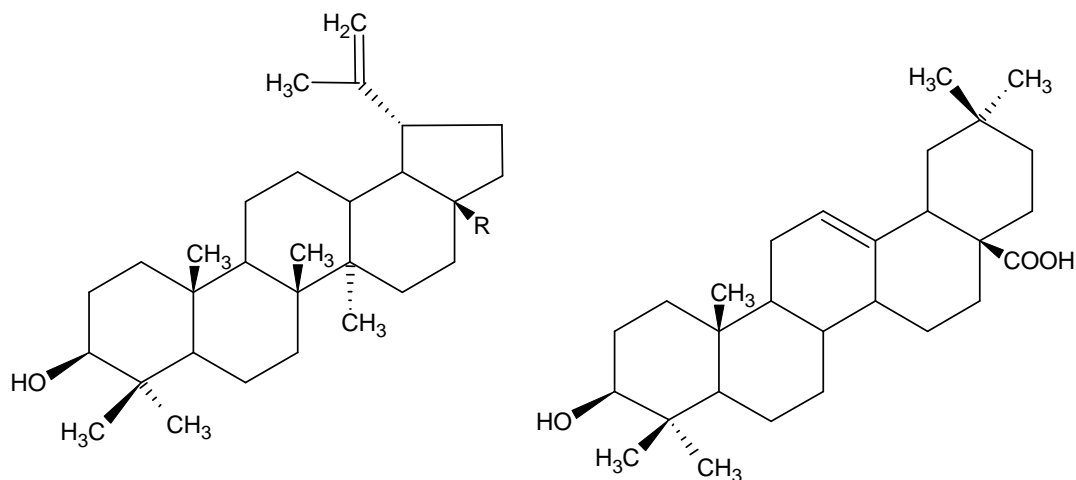
Poznámky:

- Deska silufolu byla před použitím aktivována 30 minutovým zahřátím v sušárně na 60°C a chováním v exsikátoru nad silikagelem.
- Lepšího dělení se dosahuje na destičce DC-Alufolien Kiesselgel 60 F₂₅₄. S dobrým výsledkem je možno použít litou vrstvu silikagelu na skleněné desce (viz kap. 5). Chromatografie je úspěšná i na deskách Lucefol (prášková celulóza s pojivem), v minulosti dodávaných firmou Kavalier. Tyto desky se však neaktivují a pracuje se s nimi za podmínek papírové chromatografie s použitím některé rozpouštědlové soustavy uvedené v lit.³² (str. 467), např. benzin - benzen - chloroform - aceton - isopropylalkohol (50 : 35 : 10 : 0,5 : 0,17), která dělí nejlépe. Použitelná je však i námi doporučená soustava benzen - diethylether (4:1), případně jiný odpovídající rozpouštědlový systém bez benzenu (viz kap. 4).

6.2 CHROMATOGRAFIE BEZBARVÉ SMĚSI

Velmi často je třeba chromatograficky dělit směs bezbarvých látek. Obecný postup je uveden v kap. 4. V praxi se může jednat např. o dělení reakční směsi, o identifikaci izolované složky apod. Dobrým příkladem je chromatografie ethanolického extraktu březové kůry. Tato práce je zařazena do základních cvičení z organické chemie při přípravě učitelů chemie na FPE ZČU v Plzni nejen k důkazu složení extraktu, ale i k demonstraci účinnosti krystalizace.

Extrakt pro tuto práci je získáván 8 hodinovou extrakcí březové kůry ethanolem v Soxhletově extraktoru. Pro extrakci je výhodnější bílá vrchní vrstva kůry, která může obsahovat až 30% betulinu (spodní vrstvy ho obsahují méně). Kromě betulinu jsou v extraktu obsaženy i další triterpeny, z nichž nejvýznamnější je lupeol, kyselina oleanolová a betulinová³³.



R = CH₂OH betulin

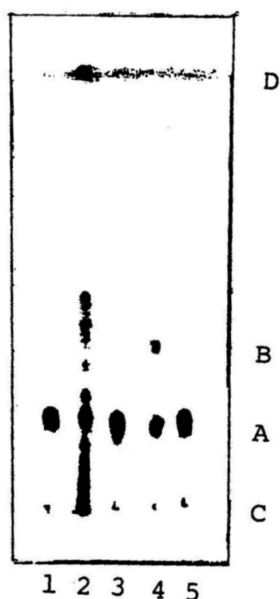
R = CH₃ lupeol

R = COOH kyselina betulinová

kyselina oleanolová

Po ukončení extrakce se extrakt přefiltruje (odstranění případných mechanických nečistot) a zahustí ke krystalizaci. Po odsátí krystalů a jejich promytí ethanolem zbývá matečný louh, který se destilací zbaví ethanolu a dosuší v sušárně při teplotě 110°C.

TLC je prováděna jak na litých vrstvách silikagelu s příměsí sádry (viz kap. 4), tak na komerčních vrstvách DC-Alufolien Kiesselgel 60₂₅₄, které umožňují kopírování a archivování (obr. 6).



Obr. 6 TLC extraktu březové kůry na desce DC-Alufolien Kiesselgel 60 F₂₅₄, vyvoláno směsí benzen – diethylether (5:1), detegováno postříkáním 10% - ní H₂SO₄ a vypálením.

- 1, 3, 5 betulin
- 2 odparek matečného louhu
- 4 krystalický podíl extraktu
- A stopa betulínu
- B stopa lupeolu
- C start
- D čelo rozpouštědel

Z uvedeného obr. 6 je patrné využití TLC k identifikaci látek porovnáním se standardem (v pozicích 1, 3 a 5 je betulin, na pozici 2 byl nanesen vzorek odparu matečného louhu po krystalizaci a na pozici 4 roztok krystalického podílu extraktu - surový betulin). Ze srovnání chromatogramu v pozici 2 a 4 je dobře vidět čistící efekt krystalizace. Zatímco na pozici 4 převládá betulin s malou příměsí lupeolu, na pozici 2 (matečný luh) se hromadí doprovodné příměsi.

7 ZÁVĚR

Cílem článku je shrnutí základních informací o problematice TLC pro inspiraci k tvůrčí práci s využitím této metody. Budeme potěšeni, poslouží-li toto pojednání k rozšíření využití tenkovrstvé chromatografie ve výuce chemie, případně k vyvinutí nových výukových aplikací TLC, které může dobře teoreticky připravený učitel s tvůrčími schopnostmi vytvářet i v relativně skromných materiálních podmínkách.

LITERATURA

1. Vodrážka Z., Krechl J.: Bioorganická chemie. SNTL, Praha 1991.
2. Košťál J.: Biochemie známá i neznámá. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha 1980.
3. Bilyk I., Nemeč R.: Vybrané laboratorní metody. Učebnice pro zdravotnické školy. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha 1988.
4. Kvíčala J.: Laboratorní technika organické chemie. VŠCHT, Praha 1998.
5. Mikeš O. a kol.: Příručka laboratorních chromatografických metod. SNTL, Praha 1961.
6. Churáček J. a kol.: Analytická separace látek. SNTL, Praha 1990.
7. Gasparič J., Churáček J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin. Laboratorní příručka. SNTL, Praha 1981.
8. Šaršúnová M., Schwarz V., Michalec Č. a kol.: Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a v klinickej biochémmi. Osveta, Martin 1977.
9. Erdelský K., Frič F.: Praktikum a analytické metody vo fyziologii rastlín. SPN, Bratislava 1979.
10. Komárek K., Franc J., Churáček J.: Reakční chromatografie v organické analýze. SNTL, Praha 1989.
11. Majerský P., Josefínová M.: Přír. Vědy Šk. **32**, 377 (1980-81).
12. Brutovská A., Liphay T., Hanuliaková D.: Přír. Vědy Šk. **32**, 217 (1980-81).
13. Šlégl J.: Přír. Vědy Šk. **34**, 259 (1982-1983).
14. Brutovská A., Liphay T.: Přír. Vědy. Šk. **34**, 104 (1982-83).
15. Scism A.J.: J. Chem. Educ. **62**, 361 (1985).
16. Feigenbaum A.: J. Chem. Educ. **63**, 815 (1986).
17. Wollrab A.: Přír. Vědy Šk. **40**, 303 (1988-89).
18. Wollrab A.: Přír. Vědy Šk. **41**, 224 (1989-90).
19. Majerský P., Pekár V.: Přír. Vědy Šk. **41**, 27 (1990-91).
20. Kolář K., Hellberg J.: Přír. Vědy Šk. **42**, 62 (1990-91).
21. Kolář K.: Biol. Chem. Zem. **2**, 140 (1993).
22. Kolář K.: Biol. Chem. Zem. **5**, 220 (1995).
23. Kolář K., Nádvorníková I., Myška K.: Purinové alkaloidy v potravinách jako výukový projekt. In: 53. zjazd chemických spoločností, str. 108, FPV UMB v Banskej Bystrici 2001.
24. Kolář K.: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie. Gaudeamus, Hradec Králové 1996.
25. Macek K., Hais I.M.: Bibliografie papírové chromatografie a přehled použití. ČSAV, Praha 1960.
26. MERCK, Chemicals Reagents, Merck KGaA, Darmstadt 1999.
27. MERCK INFO 2001 (ceník vybraných produktů - platnost od 15.2.2001).
28. Fischer Scientific, Katalog, Laboratorní technika, Pardubice 2001.
29. Keil B. a kol.: Laboratorní technika organické chemie. ČSAV, Praha 1963.
30. Beneš P., Pumpr V., Banýr J.: Základy chemie 1 (Pro 2. stupeň základní školy, nižší ročníky víceletých gymnázií a střední školy). Fortuna, Praha 1993.
31. Eisner W. a kol.: Chemie pro střední školy 1a (překlad Kratochvíl a kol.). Scientia, Praha 1996.
32. Erdelský K., Frič F.: Praktikum a analytické metody vo fyziológii rastlín. SPN, Bratislava 1979.
33. Trnka T. a kol.: Praktikum z organické chemie. SPN, Praha 1986.

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY IN CHEMISTRY TEACHING

Summary

Short general characterization of chromatographic methods and more detailed information about thin layer chromatography (both in analytical and preparative adaptation) is given. The article is directed to chemistry teachers and students.

Keywords: Thin-layer chromatography (TLC), preparative TLC, experiments for chemistry teaching.