

Příloha V

PREPARATIVNÍ TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE JAKO SOUČÁST VARIABILNÍCH POSTUPŮ EXPERIMENTÁLNÍ VÝUKY BUDOUCÍCH UČITELŮ CHEMIE V PLZNI

VÁCLAV RICHTR – MILAN KRAITR – VLADIMÍR NÁPRAVNÍK

Abstract:

Preparative thin-layer chromatography (TLC) as a variable part of laboratory practice in future chemistry teachers education at the University of West Bohemia (WBU) in Pilsen

Characterization of the content of laboratory practice in the organic chemistry teaching at Department of Chemistry Faculty of Education, WBU, is given. Theory and practical realization of TLC is discussed. Attention is paid above all to the preparation of preparative thin layer without use of demanding equipment and to detection possibilities. The optimum performance of preparative TLC, including time sequences of basic operations, is discussed on an example of birch bark extract treatment.

Experimentální výuka organické chemie se v průběhu let zúžila na několik příprav povinných pro všechny studenty. Výběr prací (příprava ethyl-acetátu, kyseliny adipové, kyseliny benzoové, nitrobenzenu a o- a p-nitrofenolu zahrnuje většinu základních operací a umožňuje jak práci v makroměřítku, tak v semimikrotechnice. Vedle těchto prací jsou zařazovány práce variabilní, které jsou zadávány individuálně tak, aby nakonec všichni účastníci cvičení získali přehled o širokém spektru laboratorních technik, na které by jinak nezbyl čas. Nově sem byla přiřazena preparativní tenkovrstvá chromatografie. Její výhodou je to, že se dá rozčlenit na několik krátkodobých vzájemně izolovaných etap a může tak podobně jako řada dalších prací vyplnit „prostoje“, vznikající v průběhu přípravy výše uvedených produktů. Jedná se o univerzálně využitelnou metodu, která aplikovaná na přípravu betulinu z březové kůry¹ a umožňuje získání betulindiacetátu a lupeolacetátu pro další využití. Na variantu využívající k detekci žhavý drát upozorňují ve své laboratorní příručce Gasparič a Churáček², kteří citují původní práci Bloomera a Edera³ z roku 1968. Přesto, že jsou proveditelné i jiné varianty⁴, pro didaktické využití v řadě triterpenoidních sloučenin se metoda detekce žhaveným drátem jeví jako velmi vhodná pro svou podobnost s detekcí analytické TLC vypalováním na elektrickém vařiči..

Zařazení preparativní tenkovrstvé chromatografie do systému šesti cvičení po 10 vyučovacích hodinách s týdenním intervalem, je dobře proveditelné v následujícím harmonogramu:

1. cvičení

- a) Příprava tenké vrstvy nalitím silikagelu na desku (ponechání do příště pro jiného účastníka cvičení).
- b) Aktivace dřívě nalité vrstvy a nanesení dělené směsi balonkem na start.
- c) Vložení desky s dělenou směsí do chromatografické nádoby (akvária) a vyvolání chromatogramu.

2. cvičení

Detekce chromatogramu elektricky žhaveným drátem, porovnání s analytickou TLC, sejmutí jednotlivých zón do připravených trubic k extrakci do odvážených baněk a nalití promývacího rozpouštědla.

3. Cvičení

Odestilování rozpouštědel z odvážených baněk, provedení analytické TLC z jednotlivých baněk a následné vyhodnocení experimentu. Konečnými produkty jsou čistý betulin-diacetát a lupeol-acetát.

Experimentální činnost:

- a) Příprava tenké vrstvy: Na skleněnou desku rozměrů 20 x 50 cm nalijeme suspenzi 45 g silikagelu pro tenkou vrstvu (např. MERCK nebo LSL 5/40 μ pro TLC s obsahem 13% sádry a luminoforem nebo bez luminoforu) a destilované vody (kolem 80 ml), takové konzistence, aby se dobře roztékala, ale nebyla příliš řídká. Dokonalou vrstvu vytvoříme tak, že po hrubém rozprostření suspenze po povrchu desky např. hrdlem baňky, ve které byla suspenze připravována, poklepáváme prsty na spodní část desky, udržované ve vodorovné poloze. V této poloze pak desku ponecháme vyschnout (obvykle do příštího dne).
- b) Aktivace dřívě připravené vrstvy a nanesení směsi látek: Před nanášením roztoku dělených látek (acetylovaný extrakt březové kůry) vložíme dřívě připravenou desku na 30 minut do sušárny nastavené na teplotu 70 °C. Po vyjmutí desky ze sušárny a jejím vychladnutí rozpustíme asi 100 mg acetylovaného extraktu březové kůry (převážně směs betulin-diacetátu a lupeolacetátu, jejíž složení si předem ověříme analytickou TLC⁴ v 1 až 2 ml chloroformu. Vzniklý roztok nanášíme na start preparativní desky skleněným balonkem nebo injekční stříkačkou tak, aby vznikl souvislý proužek šířky 2 – 3 mm. (Nanášení je vhodné předem nacvičit s čistým rozpouštědlem. Dodržení šířky a linearitý proužku je nutné pro zachování účinnosti chromatografie.

c) Vyvíjení chromatogramu:

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. Do takto připraveného akvária, na jedné straně podloženého, nalijeme tolik rozpouštědla, aby vystačilo na celou chromatografii a aby jeho hladina neomývala startovní linii. Složení rozpouštědel volíme experimentálně podle obecně platných zásad^{2, 4}. (V našem případě byla použita směs n-hexanu a ethyl-acetátu (10:3)). Když čelo rozpouštědel dosáhne téměř okraje desky, desku vyjmeme a zbylé rozpouštědlo slijeme zpět do zásobní láhve. Na desce označíme polohu čela rozpouštědel a ponecháme ji v digestoři vyschnout.

d) Detekce: Dokonale rozpouštědel zbavenou preparativní tenkou vrstvou položíme na vhodnou podložku (např. laboratorní zvedáček) nebo přidržíme v ruce, a ve dvou místech ve směru start – čelo se dotkneme elektricky žhaveným odporovým drátem. V místech, kde jsou obsaženy složky dělené směsi, dochází ke zhnědnutí v důsledku uhlíkatění organické látky. Vzniklé stopy po porovnání s analytickou TLC využijeme k rozdělení plochy preparativní desky na zóny, které po seškrábnutí zuhlíkatělých částí odděleně sejmemo na papír, rozmělníme a vsypeme do trubice, kam nalijeme rozpouštědlo v takovém množství, aby postačilo k extrakci a nepřeteklo z baňky, protože obvykle sloupcem protéká ještě po skončení cvičení. Jeho složení volíme tak, aby dobře eluovalo všechny adsorbované látky (např. n-hexan s větším obsahem ethyl-acetátu).

e) Po oddestilování rozpouštědel provedeme srovnávací TLC se standardy a dosušení baněk při 105 °C do konstantní hmotnosti a závěrečné zhodnocení, které je patrné z následujícího schematického přehledu zpracování matečných louhů po krystalizaci betulin-diacetátu. Na výše popsanou desku bylo nanášeno balonkem 108 mg směsi ve 2 ml chloroformu a balonek byl vypláchnut ještě 1 ml chloroformu. Složení dělené směsi, stejně jako složení čtyř frakcí (I až IV) je patrné z přiložených obrázků.

Preparativní tenká vrstva po detekci žhavým odporovým drátem

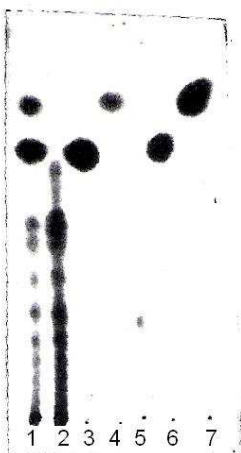
	2	2	2		
	I	II	III	IV	
	2	2	2		
1					3

1 – start

2 – místa, kde došlo k výrazné karbonizaci (zhnědnutí)

3 – čelo rozpouštědel

I, II, III a IV – pruhy adsorbentu, které po odstranění zuhelnatělých částí seškrábneme k eluci



TLC frakcí preparativní chromatografie na desce DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄

vyvoláno směsí n-hexan-ethyl-acetát (10:3), detegováno postřikem 10%ní H₂SO₄ a vypálením.

1.....dělená směs

2, 3, 4, 5.....frakce I, II, III a IV

6betulin-diacetát

7lupeol-acetát

Materiálová bilance: Na preparativní desku bylo nanášeno 108 mg acetylovaného extraktu. V úhrnu bylo získáno 102,1 mg, tj. 94,5% nanášených látek takto: frakce I (47,5 mg); II (27,6 mg); III (11,3 mg); IV (15,7 mg).

Poznámka: Při chromatografii neacetylovaného extraktu je výhodné použít polárnější soustavu rozpouštědel (zvýšit obsah ethyl-acetátu).

Literatura

1. Trnka T. a kol: Praktikum z organické chemie. SPN, Praha 1986.
2. Gasparič J., Churáček J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin. Laboratorní příručka. SNTL, Praha 1981.
3. Bloomer J. L., Eder W. R.: J. Chromatogr. **34**, 548 (1968).
4. Richtr V., Kraitr M.: In: Sborník Fakulty pedagogické ZČU v Plzni, Chemie XX, str. 57. ZČU, Plzeň 2004.