**18. KVALITATIVNÍ ANALÝZA – tenkovrstvÁ chromatografie (TLC)**

**CÍLE ÚLOHY:**

* seznámit se s principem tenkovrstvé chromatografie
* využít metodou pro separaci směsí barviv v rostlinném materiálu
* porovnat chování různých vyvíjecích soustav při separaci směsi barviv

**TEORIE:**

*Chromatografie umožňuje účinnou separaci látek, která je nutná pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek sledované látky. Různé látky se liší svými adsorpčními vlastnostmi, rozdělovacími koeficienty, svými rozměry, náboji atd., což se využívá v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení.*

*K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé). Stacionární fází může být pevná látka (papír, SiO2, Al2O3) ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči, mobilní fází pak bývá kapalina nebo plyn. Podle způsobu uspořádání chromatografického zařízení dělíme chromatografii na plošnou a sloupcovou, z hlediska určujícího mechanismu dělení látky mezi stacionární a mobilní fázi pak chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou atd.*

***Papírová chromatografie*** *byla po dlouhou dobu v praxi nejpoužívanější 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 (často se jedná 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.*

***Tenkovrstvá chromatografie*** *(TLC,**Thin Layer Chromatography) je případem plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Provádí na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina), který je nanesen na vhodné podložce (sklo, kovová fólie, plast). Vzorek se nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy obdobně jako v případě papírové chromatogvrafie. 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 vzlínající směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky (cca 1 – 2 cm). Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekce se určí jednotlivé skvrny. K detekci se používají stejné postupy jako v papírové chromatografii, často se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou (fluoreskující při osvětlení UV zářením). Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhášejí, takže se pod UV lampou objevují na chromatogramu v podobě tmavých skvrn. 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 časově velmi nenáročná, 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*.

**PRINCIP:**

V tenkovrstvé chromatografii (TLC) se stacionární fáze nanáší na destičky ze skla, hliníku či plastu, stacionární fáze musí proto dobře ulpívat na zvoleném podkladu a být ve formě jemných částic jednotné velikosti (mezi 1 – 5 μm). Mobilní fází je směs organických rozpouštědel, někdy ve směsi s vodnou fází. Nejčastěji se používá ethanol, aceton, chloroform, benzen a hexan.

Na TLC destičku je nanesen vzorek a destička je umístěna do vyvíjecí komory nasycené parami mobilní fáze tak, aby její spodní část zasahovala minimálně cca 0,5 cm do mobilní fáze. Linie startu a nadávkovaným vzorkem je umístěna nad hladinou mobilní fáze. Dochází ke vzlínání mobilní fáze vzhůru stacionární fází po povrchu destičky. Mobilní fáze rozpouští složky vzorku a unáší je vzhůru po povrchu destičky. Jelikož jednotlivé složky vzorku interagují se stacionární fází různě (tzn. jsou různě intenzivně brzděny oproti čelu mobilní fáze), dochází k jejich vzájemnému rozdělení. Separace probíhá, dokud čelo mobilní fáze nedosáhne cca 1 – 2 cm pod vrchní detekční okraj destičky (vyznačíme tzv. čelo).

Detekce rozdělených složek vzorku může probíhat několika způsoby:

* barevné sloučeniny lze sledovat vizuálně
* bezbarvé sloučeniny – osvětlení UV zářením (některé sloučeniny po vystavení destičky UV záření fluoreskují), pokud vzorek obsahuje látky, které nefluoreskují, jsou tyto často po separaci a expozici destičky UV záření viditelné jako tmavá skvrna na fluoreskující ploše (ta vznikne tak, že se do stacionární fáze přimíchají navíc fluoreskující látky (např. křemičitan zinečnatý) a tomuto jevu se říká zhášení fluorescence nebo se detekují použitím specifických činidel (destička se postříká specifickým činidlem, které s analytem vytvoří barevnou sloučeninu (např. ninhydrin pro aminokyseliny, acidobazické indikátory pro kyselé a zásadité sloučeniny, bromfluorescein pro nenasycené sloučeniny).

V TLC se nejčastěji využívá těchto dvou separačních principů – adsorpce (separované látky jsou poutány na povrch sorbentu) a rozdělovací rovnováhy (separované látky se rozdělují mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, tj. stacionární fáze je kapalina zakotvená na vhodném nosiči). Migrační chování jednotlivých separovaných látek vyjadřuje získaný chromatogram, kde pro každou separovanou látku můžeme definovat hodnotu retenčního (retardačního) faktoru:



*kde:* *a* je vzdálenost mezi čelem mobilní fáze (tj. linií, kam až dostoupila mobilní fáze během separace) a linií startu,

 *b* je vzdálenost středu skvrny separované látky od linie startu.

Retardační faktory pro určitý separační systém (určitá stacionární fáze na TLC desce a mobilní fáze) se určují na základě vyhodnocení skvrn standardů (chemicky čisté látky). Metoda patří mezi metody kapalinové chromatografie.

*Obr 18.1: Příklad TLC destičky s rozděleným rostlinným vzorkem .*

**Použité vybavení:**

***Chemikálie:***

Ethanol C2H5OH , křemičitanový písek (příp. mořský písek), uhličitan vápenatý bezvodý CaCO3, propan-2-on C3H6O (aceton), benzen C6H6, benzín technický, n-heptan  C7H16.

*Rostlinná barviva:* barviva obsažená v listech zelených rostlin (např. muškát) a červené paprice.

***Laboratorní pomůcky:***

Skleněné pipetky (kapiláry) podle počtu zkoumaných barviv, chromatografické desky Polygram SIL G/UV254, (příp.Alugram SIL G), tlustostěnná skleněná vyvíjecí hranolová komora, 100ml odměrný válec, 5ml odměrný válec, měkká tužka (tvrdost HB), pravítko, třecí miska s tloučkem, baňka kónická, filtrační nálevka, filtrační papír, mikrozkumavky, tyčinka, filtrační papír.

***Přístroje:***

Třepačka GFL 3005

**SchÉma pracovního postupu:**

18.1. Rostlinná barviva

18.2. Příprava vzorků obsahujících rostlinná barviva k chromatografické separaci

18.3. Příprava vyvíjecí soustavy a příprava chromatogramů jednotlivých barviv

 18.4. Dělení rostlinných barviv metodou tenkovrstvé chromatografie

 18.5. Identifikace analyzovaných barviv a porovnání jejich chování v jednotlivých vyvíjecích soustavách

 18.6. Vyhodnocení chromatografické analýzy a zpracování dat do protokolu

**18.1. Obecná charakteristika stanovovaných látek**

První zmínky o používání rostlinných barviv pocházejí ze starověké Číny a Indie. Výhradně přírodní barviva byla používána k barvení do poloviny 18. století, do doby, než chemický průmysl začal produkovat syntetické náhražky těchto barviv. V poslední době zájem o přírodní barviva opět stoupá vlivem zdravotních a environmentálních problémů souvisejících s používáním barviv syntetických.

*Rostlinná barviva jsou organické látky různého složení mající pro rostliny životní význam. Rozdělujeme je na barviva rozpustná v tucích (lipochromy) a ve vodě (hydrochromy). K lipochromům patří zelené chlorofyly, žluté xantofyly a červené karoteny. Chlorofyly mají význam pro fotosyntézu, naproti tomu xantofyly a karoteny způsobují žluté, oranžové a červené zbarvení listů, květů a plodů. Mezi hydrochromy patří především anthokyany, které způsobují modré, červené, fialové až černé zbarvení zejména květů a plodů.*

*Výsledkem separace listových lipochromů (chlorofyl a, chlorofyl b, karotenoidy) s využitím plošné chromatografie je chromatogram s rozdělenými barvivy, kde mají jednotlivá listová barviva charakteristické zbarvení: chlorofyl a – zelené, chlorofyl b – modrozelené, xanthofyly – žluté, karotenoidy – oranžové, feofytin – šedé.*

**18.2. Příprava vzorků obsahujících rostlinná barviva k chromatografické separaci**

1. listy zelených rostlin (např. muškátu) rozstříhat na menší kousky a rozetřít v třecí misce

 s malým množstvím propraného křemičitanového písku (příp. písku mořského) a s uhličitanem

 vápenatým (na špetku nože) kaši. Poté směs přelít malým množstvím lihu a znovu roztírat.

 Směs zfiltrovat přes buničitou vatu do odpařovací misky (kádinky) a následně odpařit

 do sucha na vodní lázni.

 Po zchladnutí rozpustit hmotu v několika kapkách lihu. Takto zahuštěný extrakt převést

 do mikrozkumavky.

b) kousek červené papriky rozetřít v třecí misce s 10 ml technického benzínu, převést

 do kónické baňky, ústí zlehka zazátkovat a umístit na 15 minut na třepačku. Získaný extrakt

 zfiltrovat přes buničitou vatu do odpařovací misky a na vodní lázni zahustit na poloviční

 objem, poté převést do mikrozkumavky (paprika obsahuje přes 40 nepolárních barviv

 většinou na bázi karotenoidů, proto je potřeba použít méně polární vyvíjecí soustavu).

**18.3. Příprava vyvíjecí soustavy a přípravy chromatogramů jednotlivých barviv**

U chromatografie na tenké vrstvě převládá rozdílné využití adsorpce na tenké vrstvě sorbentu – adsorpční chromatografie. Analyzovaná směs se nanese na povrch Silufolu, příp. Alufolu

(na *Start* vyznačený tužkou), Silufol se poté umístí do mobilní fáze. Vyvíjení (vzlínání) probíhá v uzavřené tlustostěnné nádobě a k jeho přerušení dojde, jakmile rozpouštědlo dosáhne požadované výšky. Tato výška se označí tužkou (tvrdost HB) jako *Čelo* chromatogramu.

Kvalitativním parametrem pro identifikaci látky v dané vyvíjecí soustavě je hodnota retardačního faktoru *RF*. Vyvíjecí soustavu připravit do tlustostěnné nádoby tak, aby hladina mobilní fáze dosahovala do výšky 8 – 10 mm (cca 5 ml), ihned ji uzavřít víkem, aby se prostor uvnitř nádoby nasytil parami vyvíjecí soustavy.

Pro dělení použijeme vyvíjecí soustavu (*dle pokynů vyučujícího*):

1. MF1 n-propanol : H2O : kyselina octová v poměru 85 : 14 : 1
2. MF2 benzen . diethylether 4 : 1
3. MF3 benzín : H2O : 2-propanol v poměru 90 : 1 : 9
4. MF4 petrolether : isopropanol : voda v poměru 100:10:0,25

**18.4. Dělení rostlinných barviv metodou TLC**

Chromatografickou fólii nastříhat na obdélníky (vysoké 8 cm, šířka pruhu se řídí šířkou vyvíjecí nádoby), na ně zakreslit měkkou tužkou (tvrdosti HB) 1 – 1,5 cm od okraje *Start*, opatrně tak, aby nedošlo k porušení vrstvy silikagelu (což by ovlivnilo průběh analýzy). Těsně pod *Start* (příp. pod horní okraj obdélníku) udělat popisky pro pozdější identifikaci jednotlivých barviv. Na čáru *Startu* nanést kapilárou jednotlivá barviva. Na každý vzorek použít čistou kapiláru, aby se vzorky nekontaminovaly. Počkat, až se barvivo vsákne do povrchu silikagelu, nanesení vzorku opakovat, dokud nevznikne skvrna o velikosti 2–3 mm. Připravenou chromatografickou fólii vložit do vyvíjecí soustavy v mírném sklonu ke stěně vyvíjecí nádoby a vyvíjecí nádobu ihned uzavřít víkem.

Sledovat, jak mobilní fáze vzlíná, počkat cca 30 minut, nebo až MF vystoupí asi 1 cm pod horní hranu chromatografické fólie. Poté fólii výjmout a tužkou zakreslit čáru migrace *Čela* mobilní fáze. Následně se pokusit obtáhnout skvrnu, kterou po sobě zanechalo barvivo na chromatografické desce, protože po usušení desky by nemusela být dostatečně zřetelná.

**18.5. Identifikace analyzovaných barviv a porovnání jejich chování v jednotlivých vyvíjecích**

 **soustavách**

Po ukončení vyvíjení chromatogramy opatrně vyjmout, obtáhnout měkkou tužkou vzniklé skvrny a zaznamenat jejích barvu (na světle i pod UV). Poté je nechat uschnout na vzduchu, příp. je umístit na 5 minut do sušárny vyhřáté na teplotu 60 ºC. Po vysušení pravítkem změřit vzdálenost *Čela* mobilní fáze od *Startu* a vzdálenost středu skvrny od *Startu*, všechny hodnoty si zapsat.

**18.6. Vyhodnocení chromatografické analýzy a zpracování dat do protokolu**

Do protokolu vložit obrázky jednotlivých zkopírovaných chromatogramů s popisem a jejich vyhodnocením:

1. **Pokusit se identifikovat jednotlivá rostlinná barviva ve vzorku pomocí vypočtených retardačních faktorů z informace postupné eluce v každém vyvíjecím systému.**
2. **Na základě výše uvedené teorie a získaných chromatogramů:**
	* **porovnat a zdůvodnit separační chování analyzovaných látek v jednotlivých vyvíjecích soustavách (např. vliv polaritity mobilních fází, velikost skvrn, čas vyvíjení apod.)**
	* **porovnat průběh jednotlivých chromatografických analýz (např. vliv výběru mobilní fáze, typu separace atd.), zhodnotit problémy při stanovení, příp. druh případných chyb**