

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 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 (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 a nebo v sestupném provedení, kdy je papír zavěšen ve vaničce s mobilní fází a ta putuje dolů. 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 nechat ustavit v komoře rovnováhu par mobilní fáze. Volba složení mobilní fáze ovlivňuje pohyblivost chromatografovaných látek podle pravidla podobné rozpouštění podobné. Proto pro polární látky se používají směsi polárních organických rozpouštědel (alkoholy) s vodou a přísadkou 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 ku vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla. 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 skvrn. Univerzální detekční činidlo představuje konc. kyselina sírová, protože většina organických látek pod jejím dehydratačním vlivem uhelnatí a tvoří tmavé skvrny (obvykle je nutno zahřát). To ovšem platí i pro samotný chromatografický papír, takže je lépe využít v tomto případě specifitějších detekčních činidel. Podle polohy skvrny 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 skvrn vzorku a standardu.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) 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 vhodnou podložku (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 vzlínající 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 zhasíjí, 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 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

Princip stanovení :

Vitaminy 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. Pověštinou 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 někteří z nich jsou barevné a všechny fluoreskují či naopak zhasí fluorescenci pod UV zářením.

Pomůcky :

Chromatografická vyvíjecí komora, chromatografická tenká vrstva typu Silikagel G, mikropipeta, odměrné válce 50, 25 a 5 ml, 3 ks kádinka 150 ml, Petriho miska o průměru min. 12 cm, pinzeta, fixýrka, třecí miska, Erlenmayerova baňka 100 ml, nálevka, filtrační papír.

Chemikálie :

Kyselina octová, aceton, methanol, toluen, standardy vitamínů skupiny B, vzorek droždí.

Postup stanovení :

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 20 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 zabarvení barevných vitamínů skupiny B, jednak pod UV lampou pro ostatní (B_6). Vyhodnotíme polohy a barvy skvrn standardů a vzorku a určíme přítomné vitaminy. Z porovnání intenzity zabarvení skvrn vzorku a standardů odhadneme obsah jednotlivých vitamínů ve vzorku a vypočteme jejich přibližný obsah v mg/g vzorku. Určíme rovněž R_F pro jednotlivé standardy a vzorky.

Stanovení přírodních kyselin a vitaminu C v ovocných šťávách

Princip stanovení :

Pro chromatografické stanovení přírodních polykarboxylových a hydroxykyselin lze při chromatografii na papíře použít kyselé i bazické vyvíjecí soustavy. Dokonce je velmi vhodné oba typy soustav zkombinovat v dvourozměrné chromatografii. V první fázi se chromatogram vyvíjí v alkalické soustavě, po vysušení papíru se pokračuje v kolmém směru v kyselé vyvíjecí soustavě. Množství nanášených kyselin by se mělo pohybovat v rozmezí od 20 do 100 µg. Při detekci těchto kyselin lze s výhodou využít acidobazické indikátory resp. lze využít i jejich redukčních účinků na stříbrné soli (dusičnan stříbrný v amoniakálním roztoku). Protože velmi obdobně se chová kyselina askorbová, vitamin C, lze současně stanovit i její obsah ve vzorku.

Pomůcky :

Chromatografická vyvíjecí komora, stojánek, chromatografický papír (např. Whatman), mikropipeta, odměrné válce 50 a 25 ml, 3 ks kádinka 150 ml, Petriho miska o průměru min. 12 cm, pinzeta, nálevka ve stojanu, filtrační papír.

Chemikálie :

Kyselina octová, butanol, vzorek ovocné šťávy, standardy kys. citronové, jantarové, šťavelové, vinné a askorbové, roztok indikátoru methylocervecí, 0,1 M-AgNO₃, 5 M-NH₃.

Postup stanovení :

Připravíme si kyselou mobilní fázi o složení butanol-kyselina octová-voda (50:10:25 ml). Mobilní fázi nalijeme do vyvíjecí komory a komoru uzavřeme. Pokud vzorek ovocné šťávy obsahuje pevné částice, je nutné jej přefiltrovat. Po filtraci použijeme vzorek bez dalších úprav přímo k vlastnímu chromatografickému stanovení. Na proužku papíru si vyznačíme tužkou startovní linii a starty pro vzorek a standardy (minimálně 1 cm od okraje a 1 cm od sebe). Na start nanášíme standardy a studovaný vzorek mikropipetou v množství 5 µl. Po oschnutí skvrn pověsíme papír do komory na věšáček tak, aby spodní část zasahovala do mobilní fáze a start byl přitom nad hladinou a komoru uzavřeme. Necháme chromatogram vyvíjet, dokud hladina vztlínající mobilní fáze nedosáhne dráhy alespoň 7 - 10 cm. Poté papír vyjmeme a necháme nejprve oschnout volně na Petriho misce a krátce dosušíme v sušárně při mírně zvýšené teplotě (do 60°C). Detekujeme nejprve pod UV lampou. Z porovnání intenzity zabarvení skvrn vzorku a standardu odhadneme obsah jednotlivých kyselin ve vzorku. Stanovíme rovněž R_F pro standard a vzorek. Další detekci provedeme roztokem indikátoru methylocervecí, opět porovnáme intenzity zabarvení a určíme R_F. Poslední detekci provedeme amoniakálním roztokem dusičnanu stříbrného (smísíme 2 ml 0,1 M-AgNO₃ a 5 ml 5 M-NH₃). Opět porovnáme intenzity zabarvení vzniklých skvrn a jejich R_F. V závěru uvedeme R_F všech standardů a jim odpovídající stanovené kyseliny ve vzorku, včetně odhadu jejich zastoupení ve vzorku v jednotkách g/ml.