

T É M A: CHROMATOGRAFIE

Vypracoval/a:

Třída:

Spolupracoval/a:

Datum:

ANOTACE:

V této laboratorní práci se žáci seznámí s metodou TLC chromatografie a jejím využitím pro oddělování jednotlivých barviv ze směsi na papíru a rozdělení aminokyselin na tenké vrstvě. Součástí práce je také izolace směsi barviv z rostlinného materiálu.

TEORIE:

Chromatografie je dělicí metoda, která se používá pro rozdělování směsi látek, které mají velmi podobné fyzikální a chemické vlastnosti. Látky s takto podobnými vlastnostmi nelze rozdělit běžnými dělicími metodami, jako jsou například filtrace, krystalizace nebo destilace.

Metodu chromatografie objevil ruský botanik Michail Semjonovič Cvet (1872 – 1919), když se pokoušel rozdělit barviva v listech a květech rostlin. Nazval ji chromatografie (barvopis). Dnes již název chromatografie není úplně výstižný, neboť touto metodou se oddělují také látky nebarevné. Chromatografie se používá např. v analytické chemii pro důkaz přítomnosti některých látek ve zkoumaném vzorku nebo ve farmacii k důkazu přítomnosti některých léčiv.

Princip chromatografie: na pevný nosič (tzv. stacionární fáze) nanese směs látek, které chceme rozdělit. Přes nosič s rozdělovanou směsí putuje tzv. mobilní (pohyblivá) fáze – rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel. Dochází k postupnému ustavování několika fázových rovnováh mezi tyto dvě nemísitelné fáze, které jsou vůči sobě v pohybu. Jednotlivé látky jsou mobilní fází unášeny různou rychlostí, protože mají různě velkou schopnost se na pevné fázi zachytit (adsorbovat). Tímto způsobem dojde k jejich oddělení.

Nejjednodušším způsobem provedení chromatografie je **plošná chromatografie**. Ta se provádí buď na papíře (**papírová chromatografie**) nebo na speciálních vrstvách (vrstva sorbentu = celulózy, oxidu hlinitého nebo silikagelu nanesená na podložce (skleněné, hliníkové) – tzv. **tenkovrstvá chromatografie** (TLC)).

Pevnou (stacionární) fázi v nejjednodušším provedení může tedy být

- filtrační papír
- speciální chromatografický papír (upravený na různou rychlost průtoku mobilní fáze, případně s dalšími speciálními úpravami povrchu – např. hydrofobizovaný papír)
- křída
- vrstva oxidu hlinitého nanesená na skleněné destičce
- speciální chromatografické fólie, např. Silufol

Mobilní fázi může být voda, běžná rozpouštědla (ethanol, aceton apod.) nebo směs více rozpouštědel. Mobilní fázi volíme podle typu látek, které chceme oddělovat. Platí pravidlo: *“podobné rozpouští podobné”*; pro látky s polárním charakterem používáme polární rozpouštědla, pro nepolární látky použijeme rozpouštědla nepolární.

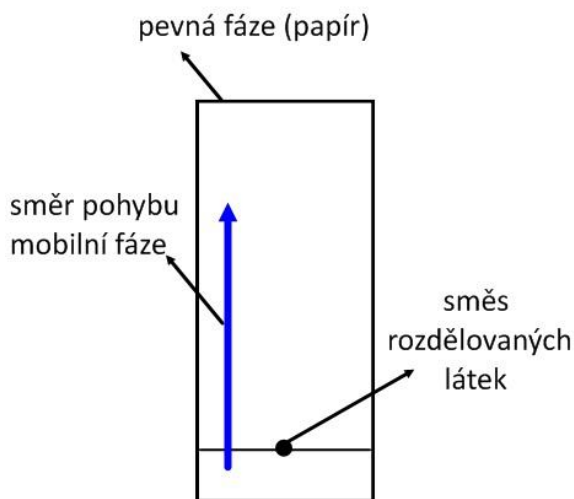
Postup při chromatografickém oddělování látek na papíře nebo tenké vrstvě:

- 1) směs dělených látek rozpustíme ve vhodném rozpouštědle
- 2) směs látek nanese na start na papíru nebo tenké vrstvě
- 3) přes stacionární fázi se směs protéká mobilní fází, která od sebe oddělí jednotlivé složky směsi
- 4) chromatogram (papír, tenká vrstva) s oddělenými látkami vysušíme a dále vyhodnotíme

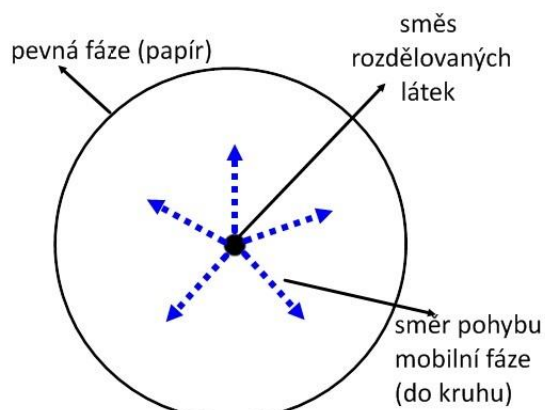
Start by měl být min. 1 cm nad hladinou mobilní fáze, mezi jednotlivými nanášenými vzorky by měly být rozestupy alespoň 0,5 až 1 cm, od okraje papíru pak minimálně 1 cm. Vzorek se nejčastěji nanáší opakovaně, aby koncentrace látek byla dostatečná. Při manipulaci s papírem nebo tenkou vrstvou držíme vrstvu pouze za okraje, abychom ji nezničili nebo neznečistili.

Při chromatografii se používají různé **způsoby uspořádání**:

- sestupné – mobilní fáze protéká přes pevnou fázi směrem dolů
- vzestupné – mobilní fáze stoupá po pevné fázi směrem nahoru (nejčastější uspořádání): směs dělených látek vzlíná po nosiči nestejnou rychlostí. Nejnižší se zachytí látky, které mají největší schopnost adsorpce, nejvýše dospějí látky s nejmenší schopností adsorpce.
- kruhové – mobilní fáze vzlíná od středu směrem k vnějšímu okraji kruhového filtračního papíru



Obrázek 1: Vzestupné uspořádání papírové chromatografie



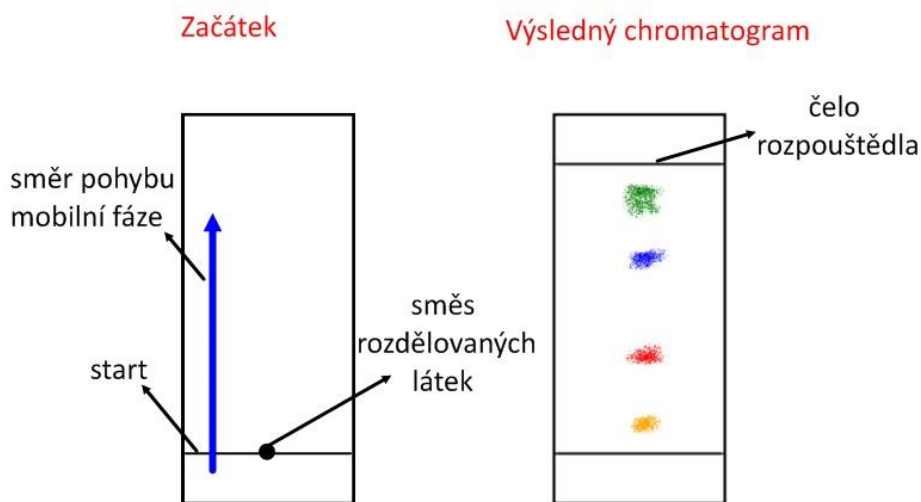
Obrázek 2: Kruhové uspořádání papírové chromatografie

Výsledkem chromatografie je tzv. **chromatogram** – papír nebo vrstva fáze, na které jsou viditelné oddělené jednotlivé složky směsi. Jde tedy o záznam chromatografie.

Při vyhodnocení chromatogramu mohou nastat dva základní případy:

- 1) oddělené látky jsou barevné, tedy viditelné pouhým okem
- 2) oddělené látky nejsou viditelné. V takovém případě je musíme "zviditelnit"

- postříkáním vhodným detekčním činidlem – které s látkou tvoří barevnou sloučeninu
- UV – zářením: některé látky (hlavně látky aromatické – s benzenovým jádrem) pohlcují UV záření a jsou pod UV lampou viditelné jako barevná skvrna.



Obrázek 3: Popis chromatogramu

Důležitou charakteristikou látek při chromatografii je tzv. **retenční (retardační) faktor R_F** . Retenční faktor závisí

- na konkrétní vyvíjecí soustavě
- na povaze látky
- na dalších faktorech (např. na teplotě, množství nanesené látky)

Při dodržení teploty a uvedení soustavy rozpouštědel lze R_F použít pro srovnání látky (nalezené ve vzorku) s jejím standardem. Vztah pro výpočet R_F :

$$R_F = \frac{\text{vzdálenost od startu ke středu skvrny}}{\text{vzdálenost od startu k čelu rozpouštědla}}$$

Obrázek 4: Výpočet retenčního faktoru

Příprava:

1. Prostuduj si teoretický úvod k práci.
2. Za použití odborné literatury nebo internetových zdrojů vypracuj úkoly v závěru práce.
3. Do cvičení si dones potřebný rostlinný materiál: listy špenátu (nebo řepy či kopřiv), dřevěnou špejli.
4. V laboratoři budete dále potřebovat: plášť, nůžky, měkkou tužku, pravítko.

Poznámka: před započítáním práce si pořádně pročti pracovní postup a promysli, jak budeš postupovat, abys vše stihl. Úkoly prováděj současně, vyvíjení chromatogramu nějakou dobu potrvá.

POMŮCKY:

Třecí miska s tloučkem, odpařovací miska, filtrační nálevka, filtrační kruh, stojan, chromatografická deska Silufol, filtrační papír, skleněné kapátko, kádinka 250 ml (**vysoká**), kádinka (na vodní lázeň), vaříč, síťka, hodinové sklo (**na přikrytí kádinky**), lžička, váhy.

CHEMIKÁLIE:

Aceton, isopropanol, benzín, uhličitan vápenatý, písek (nejlépe mořský), voda.

ÚKOL 1 – CHROMATOGRRAFIE BARVIV ZELENÝCH LISTŮ

POSTUP:

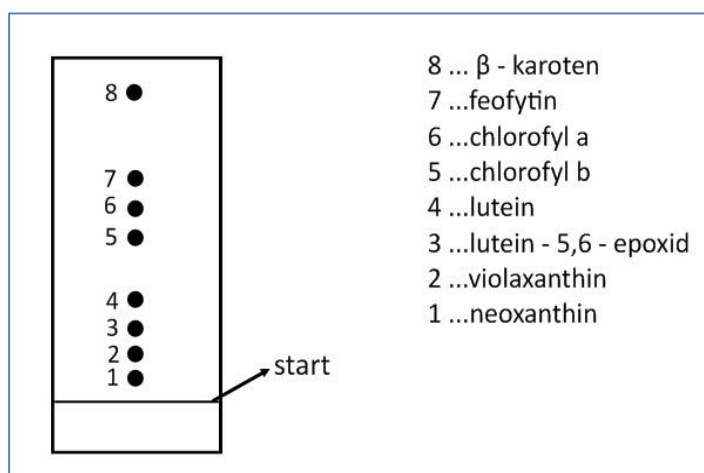
1. Navážíme asi 2 g listů ze špenátu (kopřiv, řepy) a nastříháme je na malé kousky.
2. V třecí misce listy rozetřeme s malým množstvím písku, uhličitanu vápenatého (na špičku nože) a pár (3 - 5) ml acetonu na hustou kaši.
3. Směs zfiltrujeme do odpařovací misky a odpaříme do sucha na vodní lázni.
4. Po ochlazení rozpustíme odparek v několika ml acetonu.
5. Ustříhni si pruh Silufolu o šířce asi 2 – 3 cm.
6. Ve vzdálenosti asi 2 cm od kraje nakresli měkkou obyčejnou tužkou (podle pravítka) tzv. start – na který budeš nanášet vzorek barviv. Pozor: Silufol přidržujeme pouze na okrajích.
7. Na start nanes kapátkem roztok barviv – snaž se, aby skvrna byla co nejvíce intenzivní, nanes směs opakovaně na stejné místo, vždy po předchozím vysušení.
8. Desku Silufolu umístí šikmo do kádinky, ve které je nalita vyvíjecí směs, kádinku přikryj hodinovým sklem a nechej vyvíjet chromatogram.
9. Jakmile čelo rozpouštědla dosáhne asi 1 cm od konce papíru, chromatogram opatrně vyndej, měkkou tužkou opatrně obtáhni okraje všech barevných skvrn a chromatogram usuš.
10. Proved' vyhodnocení chromatogramu

Mobilní fází je směs

benzín : isopropanol : voda (100 : 10 : 0,25)



Obrázek 5: Chromatografie listových barviv



Obrázek 6: Chromatogram - listová barviva

ÚKOL 2 – CHROMATOGRAFIE AMINOKYSELIN

POMŮCKY:

Kádinka na vyvíjení chromatogramu a hodinové sklo (na přikrytí kádinky), sušárna (110°C), Silufol (případně chromatografický nebo filtrační papír), vaříč, kapátka, rozprašovač aerosolu, tužka, pravítko.

CHEMIKÁLIE:

2% roztoky aminokyselin ve směsi voda : etanol (1 : 2), 0,2% roztok ninhydrinu v etanolu, etanol, voda.

POSTUP:

1. Do vyšší kádinky nalijeme mobilní fázi do výšky asi 2 cm.
2. Nachystáme si chromatografickou vrstvu Silufol (nebo chromatografický, případně filtrační papír) vhodné velikosti – výšku volíme podle výšky kádinky, ve které je mobilní fáze), šířka asi 5 cm. Ve vzdálenosti asi 2,5 cm od kraje nakreslíme měkkou tužkou start.
3. Na start nanese kapátky vzorky aminokyselin – 3 známé a jeden neznámý. Každý vzorek nanášíme 2 – 3 krát, mezi jednotlivým nanesením vysušíme skvrnu fénem (nebo necháme uschnout na vzduchu). Skvrny vzorků by neměly mít větší průměr než 3 – 5 mm.
4. Vrstvu s nanesenými vzorky vložíme do kádinky s mobilní fází, kádinku přikryjeme hodinovým sklem a necháme vyvíjet.
5. Jakmile se čelo rozpouštědla dostane asi 2 cm od konce fólie (asi po 45 minutách), vrstvu vyjmeme a necháme uschnout na vzduchu (nebo opatrně usušíme fénem).
6. Suchou vrstvu postříkáme s digestoří roztokem ninhydrinu a zahřejeme v sušárně na 110°C.
7. Skvrny obtáhneme tužkou, označíme jejich středy a vypočtené hodnoty R_F zapíšeme do tabulky. Do tabulky zapíšeme hodnoty R_F a barvy skvrn.
8. Určíme neznámý vzorek.

Mobilní fáze: etanol : voda (7 : 3)

VYPRACOVÁNÍ:

Tabulka 1: Chromatografie listových barviv:

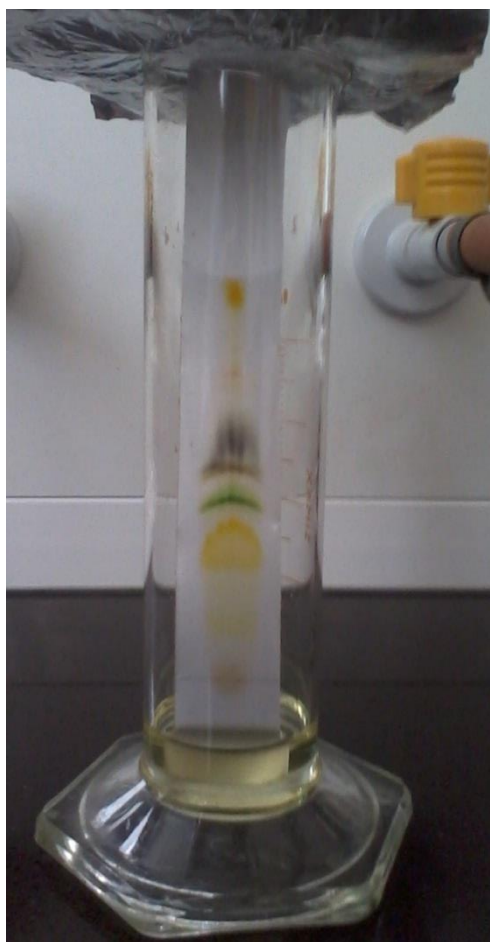
Skvrna (její barva)	Retenční faktor	Barvivo
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		

Tabulka 2: Chromatografie aminokyselin:

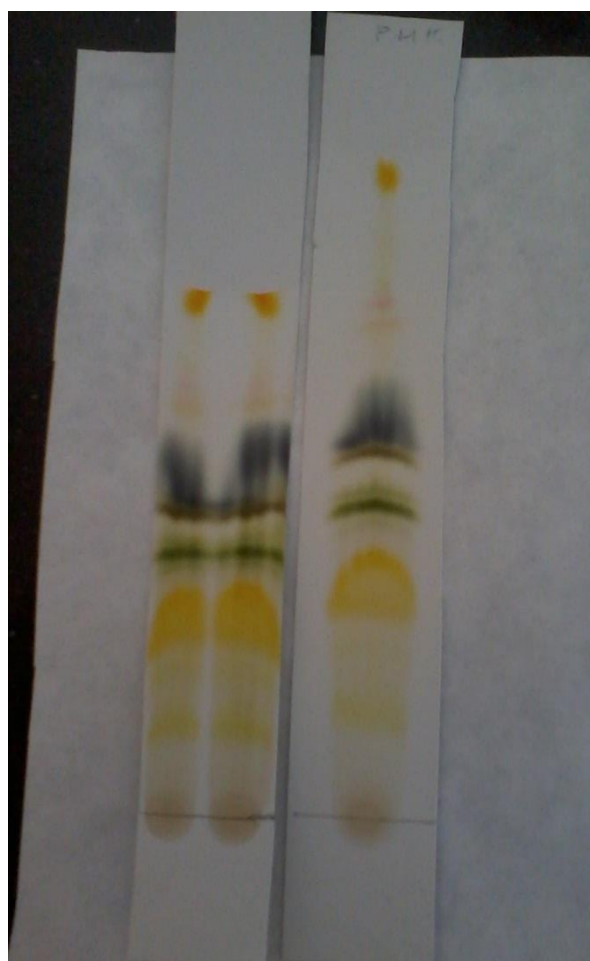
Aminokyselina	Retenční faktor	Barva skvrny
1 -		
2 -		
3 -		
Neznámý vzorek		

Nalep si získaný chromatogram (s popisem):

FOTODOKUMENTACE:



Obrázek 7: Vyvíjení chromatogramu v
odměrném válci - rozdělení listových barviv



Obrázek 8: Chromatogram - listová barviva

ZÁVĚR:

Zhodnoť stručně výsledek své práce

SHRNUTÍ:

Na základě získaných poznatků z laboratorního cvičení zdůvodni:

1. Co je stacionární fázi a co je pohyblivou fází v případě chromatografie v úkolu 1?
2. Jaký význam má retenční faktor? Je jeho hodnota závislá na velikosti chromatografického papíru nebo Silufolu (bude retenční faktor stejný, jestliže budeme provádět chromatografii na Silufolu o délce 12 cm a stejné stanovení na Silufolu o délce 5 cm)?
3. Co značí zkratka TLC? Z jakých slov pochází?
4. Vysvětli pojem "hydrofobní". Jaké slovo má opačný význam?
5. Jestliže mám jako mobilní fázi směs rozpouštědel benzín + aceton + voda, na jaký charakter (z hlediska polarity) oddělovaných látek lze usuzovat?
6. Je možné z chromatogramu (např. listových barviv) určit množství (neboli stanovit tzv. kvantitu) jednotlivých barviv v rostlinném materiálu? Zdůvodni svou odpověď.
7. Napiš podle pravdy ANO nebo NE k následujícím tvrzením:
 - a) Chromatografie je jednou ze separačních metod analytické chemie.
 - b) Její výhodou je (mimo jiné) to, že ke stanovení stačí minimum vzorku.
 - c) Chromatografie lze použít pro oddělování téměř všech látek.
 - d) Látky dělené chromatograficky musí být barevné, aby byly na chromatogramu vidět.
 - e) Záznam tenkovrstevné chromatografie se nazývá chromatograf.
 - f) Látka, její $R_F = 1$ bude na chromatogramu na čele rozpouštědla.

SEZNAM ZDROJŮ:

- [01] HRSTKA, Miroslav. *Laboratorní cvičení z chemie pro 3. ročník gymnázia*. 1. vydání. Brno: MC nakladatelství, 1998. 84 s.
- [02] HOLZBECHER; Záviš, CHURÁČEK; Jaroslav. *Analytická chemie*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1987. 664 s. 04–612–57
- [03] *Seznam: UP Olomouc* [online]. c2012 [citováno 26. 07. 2013]. Dostupný z WWW: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom_navod.htm
- [04] *Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Chromatografie* [online]. c2012 [citováno 26. 07. 2013]. Dostupný z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie_na_tenk%C3%A9_vrstv%C4%9B

METODICKÝ LIST

Název školy	Gymnázium a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Zlín
Autor	Mgr. Svatava Benešová
Vzdělávací oblast	Analytická chemie
Vzdělávací obor	Chemie
Tematický okruh	Směsi, dělení směsí.
Druh učebního materiálu	Laboratorní cvičení – student
Cílová skupina	Žák, 16 – 18 let
Anotace	Pracovní list určen jako návod pro žáky jako podklad pro laboratorní cvičení z chemie. List obsahuje teoretický úvod k použité metodě, pracovní postupy, nákresy uspořádání při chromatografii a úkoly pro samostatnou práci studentů. Náplň: metoda plošné (PC a TLC) chromatografie, dělení rostlinných barviv a dělení aminokyselin, určení retenčního faktoru.