

T É M A: CHROMATOGRAFIE

Vypracoval/a:

Třída:

Spolupracoval/a:

Datum:

ANOTACE:

Cílem této laboratorní práce je provést TLC chromatografické stanovení dvou organických látek – chininu a mentolu - a jejich detekce UV zářením. Před samotnou chromatografií žáci musí izolovat látky z vhodného zdroje pomocí dalších separačních metod. Výsledkem práce by měl být chromatogram, na kterém je provedeno stanovení látky ze vzorku a jeho srovnání se standardem (určení R_f obou látek).

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.

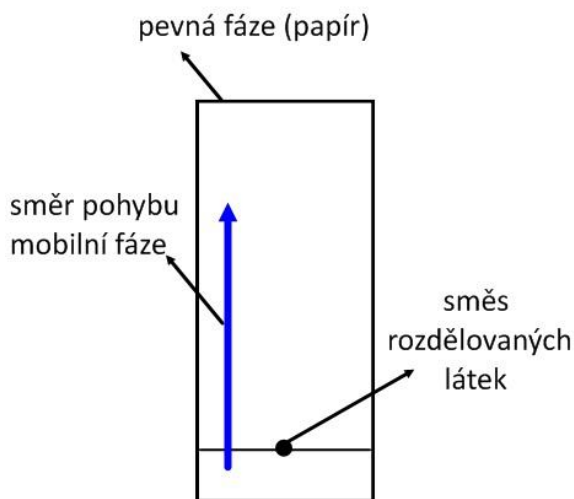
Postup při chromatografickém oddělování látek na papíře nebo tenké vrstvě:

- 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

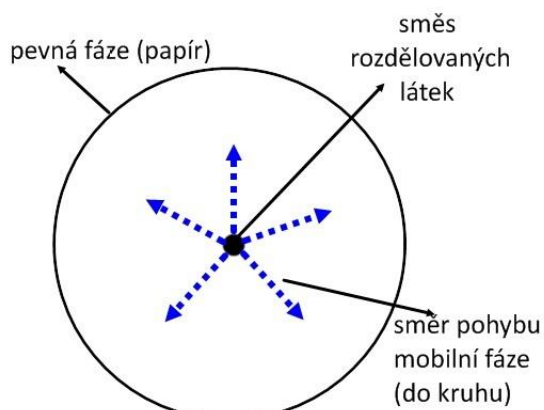
Start by měl být min. 1 cm nad hladinou mobilní fáze, mezi jednotlivými nanášenými vzorky by měly být rozestupy alespoň 0,5 až 1 cm, od okraje papíru pak minimálně 1 cm. Vzorek se nejčastěji nanáší opakovaně, aby koncentrace látek byla dostatečná. Při manipulaci s papírem nebo tenkou vrstvou držíme vrstvu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



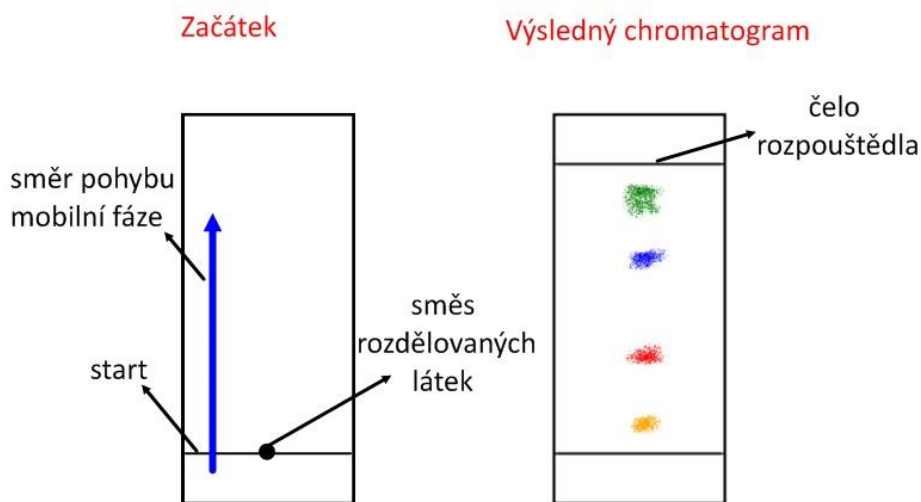
Obrázek 2: Kruhové uspořádání papírové chromatografie

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 materiál: nějaký produkt, potravinu apod. obsahující chinin a listy máty
4. V laboratoři budete dále potřebovat: plášť, nůžky, měkkou tužku, pravítko.

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

POMŮCKY:

2 stojany, 2 držáky, varná baňka, vaříč (kahan), sítko, vodní chladič, teploměr, pryžové hadice, odměrný válec, dělicí nálevka, kádinka, zkumavky, chromatografická deska Silufol, filtrační papír, skleněné kapátko, kádinka 250 ml, Erlenmayerova baňka, hodinové sklo, UV - lampa.

CHEMIKÁLIE:

Léčivé přípravky, doplňky stravy a potraviny obsahující chinin, standardní roztok chininu (1%), 0,1M – HCl, máta peprná (čerstvé nebo sušené listy), butanol, kyseliny octové, ethanol, ethylacetát, toluen, voda.

ÚKOL 1 – CHROMATOGRAFIE CHININU

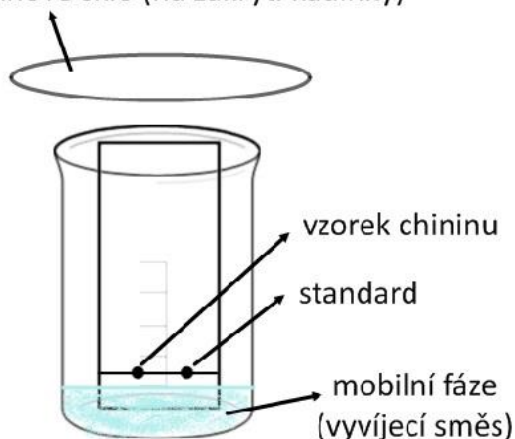
POSTUP:

Pokud by byl k dispozici léčivý přípravek s obsahem chininu, potom se provádí izolace chininu následujícím postupem: V třecí misce rozetři léčivý přípravek (případně jinou pevnou látku) obsahující chinin.

Ze směsi vyextrahuj chinin 0,1M – kyselinou chlorovodíkovou. (Na 10 g přípravku použijeme asi 75 ml HCl. HCl s rozetřeným léčivem protřepeme v Erlenmayerově baňce). Extrakt zfiltruj a filtrát použij k samotnému stanovení.

1. Ustříhni si pruh Silufolu o šířce asi 3 – 4 cm.
2. Ve vzdálenosti asi 2 cm od kraje nakresli měkkou obyčejnou tužkou (podle pravítka) tzv. start – na který budeš nanášet 2 vzorky - vzorek chininu z potraviny a standard. Pozor: Silufol přidržíme pouze na okrajích.
3. Na start naneseš kapátky vzorky – snaž se, aby skvrna byla co nejvíce intenzivní, naneseš směs opakovaně na stejné místo, vždy po předchozím vysušení.
4. Desku Silufolu umístíš šikmo do kádinky, ve které je nalita vyvíjecí směs, kádinku přikryješ hodinovým sklem a necheš vyvíjet chromatogram.
5. Jakmile čelo rozpouštědla dosáhne asi 1 cm od konce Silufolu, chromatogram opatrně vyndeš, chromatogram necheš nejprve volně oschnout a potom usuš v sušárně při 60°C.
6. Provedeš vyhodnocení chromatogramu – detekce chininu se provádí pod UV lampou. Srovnáš skvrnu chininu standardu a chininu z léčiva (potraviny), jejich velikost a intenzitu.
7. Obkreslíš skvrnu měkkou tužkou a vypočteš R_f faktor.

hodinové sklo (na zakrytí kádinky)



Mobilní fází je směs

butanol-kyselina octová-voda (75:10:15)

Obrázek 5: Chromatografie chininu

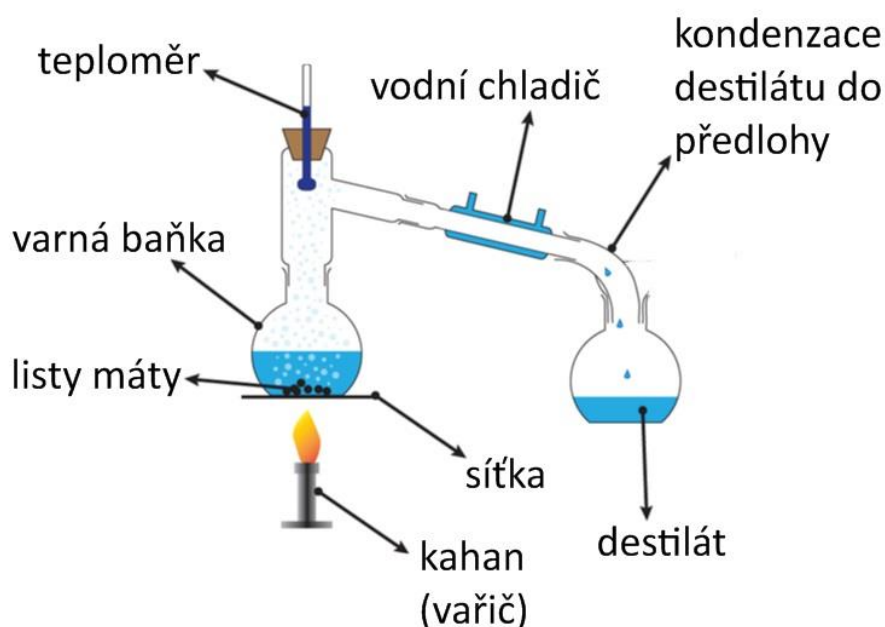
Doplňky stravy a další přípravky s chininem: Tonik, vrbová kůra, železité sladové víno – MALTOFERROCHIN, Magister Stock, Likér Squash Energy, energetické nápoje – např. Big Shock Bitter, grapefruit (chinin dává hořkou chuť dužnině), chinin – kůra, některé šampony, např. <http://www.drmax-lekarna.cz/klorane-sampon-s-chininem-proti-vypadavani-vlasu-400ml.html>, kondicionéry na vlasy...

ÚKOL 2 – CHROMATOGRAFIE MÁTY PEPRNÉ

POSTUP:

1. 10 g listů máty peprné (může být i sušená) nastříhej a nasypej do destilační baňky (250 ml).
2. Sestavíme destilační aparaturu
3. Do baňky přilej 200 ml vody a začneme zahřívát. Jakmile začne odkapávat do předlohy destilát, odměř ho asi 40 ml a potom destilaci ukonči. Destilát může být zakalený díky ve vodě nerozpustným silicím z máty peprné.
4. Destilát převed' do dělicí nálevky, k destilátu přidej 10 ml etheru a protřepej. Spodní vrstvu (vodnou) odpusť – mentol se extrahuje do etheru. Pro chromatografii budeme tedy používat etherovou vrstvu.
5. Ustřižni si pruh Silufolu široký asi 2 -3 cm, měkkou tužkou ve výšce asi 2 cm nakresli start.
6. Nanes vzorek kapátkem na Silufol.
7. Do vysoké kádinky nalij vyvíjecí směs asi do výše 2 cm.
8. Do kádinky vlož Silufol tak, aby spodní konec sahal do vyvíjecí směsi, ale start byl nad její hladinou. Přikryj kádinku hodinovým sklem.
9. Nechej vyvíjet chromatogram do té doby, dokud čelo rozpouštědla sahá asi 2 – 3 cm od kraje Silufolu.
10. Detekce mentolu: Skvrna mentolu je viditelná pod UV světlem (254 nm). Chceme – li, aby byla viditelná i při denním světle, musíme TLC folii postříkat detekčním činidlem.

Postup: Vyvinutou TLC folii krátce ponoř do detekčního činidla (nebo ji postříkej činidlem z fixírky), poté ji krátce zahřej přímo na plotýnce vařiče (nastavit na mírný výkon). Po zahřátí se objeví různé skvrny. Skvrna mentolu je modrá – fialová a je nejblíže startu.



Mobilní fáze (vyvíjecí směs):
toluen – ethylacetát (95 : 5)

Obrázek 6: Destilační aparatura pro izolaci mentolu z máty peprné

VYPRACOVÁNÍ:

Chromatografie chininu:

Uveď, u kterých látek bylo stanovení chininu provedeno – název látky (výrobce, případně další informace).

Pokud jsi pro srovnání použil také standard (čistý chinin), spočítej retenční faktor.

Vyhodnoť, zda v použitých výrobcích (potravinách, zdrojích ...) je opravdu přítomen chinin a stručně slovně zhodnoť, v jakém množství.

- 1) Standardní látka pro TLC chininu:
(Výrobce:)
 $R_f =$

- 2) Použitá látka (látky) obsahující chinin:

Chromatografie alkaloidů máty peprné:

Uveď, u kterých látek bylo stanovení mentolu provedeno – název látky (výrobce, případně další informace).

Pokud jsi pro srovnání použil také standard (čistý mentol), spočítej retenční faktor.

Vyhodnoť, zda v použitých zdrojích (máta) případně i jiných výrobcích (mentolová mast) je opravdu přítomen mentol a stručně slovně zhodnoť, v jakém množství.

1) Standardní látka pro TLC mentolu:

(Výrobce:)

$R_f =$

2) Použitá látka (látky) obsahující mentol:

Nalep si získané chromatogramy (s popisem):

FOTODOKUMENTACE:

Obrázek 7: Izolace chininu z materiálu

Obrázek 8: Zdroje chininu

Obrázek 9: Destilace – izolace mentolu

Obrázek 10:

ZÁVĚR:

Zhodnot' stručně výsledek své práce

SHRNUTÍ:

Na základě získaných poznatků z laboratorního cvičení a s použitím odborné literatury nebo internetových zdrojů vypracuj následující úkoly.

1. Proč při TLC chromatografii nanášíme na start vedle vzorku látky také standard? Jaký je význam této standardní látky?
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. V praxi se dnes hodně využívá přístrojového provedení chromatografie. Uveď dva základní druhy této metody a vysvětli (jednou větou) hlavní rozdíl mezi oběma způsoby provedení.
4. Chinin patří mezi látky heterocyklické. Vysvětli tento pojem.
5. Chinin je jednou z látek, u kterých se objevuje tzv. fluorescence. Čím je fluorescence u chininu způsobena?
6. Co se stane (co uvidíme), posvítíme – li na Tonik ve sklenici UV lampou?
7. Jaké účinky na lidský organismus má chinin? K čemu se jako léčivo používá?
8. Mentol patří mezi isoprenoidy. Jejich základní jednotkou je isopren. Zapiš jeho vzorec a systematický název a zařaď tuto látku do příslušné skupiny sloučenin.
9. Doplň následující text a podtržené termíny vysvětli.
Mentol je součástí mátové silice. Z chemického hlediska jej řadíme mezi monoterpeny, kam patří dále např., nebo Jako většina terpenů má lipofilní charakter. Je to krystalická látka charakteristického zápachu. Má lokální anestetické účinky.

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>
- [05] *Seznam: Český lékopis* [citováno 26. 07. 2013]. Dostupný
WWW:<http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Mentholum_racemicum.htm>

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 – žák
Cílová skupina	Žák, 18 – 19 let
Anotace	Pracovní list určen jako návod pro žáky - 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: TLC chromatografie chininu a mentolu, určení retenčního faktoru, využití standardu a detekce látky UV světlem.