

Mikrosady TLC

TLC analgetika / drogy

Obj. č. 103.7269



Úvod	2
Princip a provádění TLC	3
Příprava vzorku · Nanesení vzorku	3
Vývoj chromatogramu · Zviditelnění oddělených látek	4
Vyhodnocení chromatogramů na tenké vrstvě	5
Mikrosady (Mikro-Sets) TLC	
Mikrosady TLC pro chromatografii na tenké vrstvě	6
Mikrosada TLC A	7
Popis mikrosady TLC A pro začátečníky · Informace pro objednání	7
Příklady separace - mikrosada TLC A	
Separace směsi barviv rozpustných v tucích / lipofilních	8
Separace směsi antrachinonových barviv	9
Separace směsi potravinářských barviv	10
Separace barviv značkovačů	11
Mikrosada TLC F1	12
Popis mikrosady TLC F1 · Informace pro objednání	13
Příklady separace - mikrosada TLC F1	14
Separace aminokyselin (modelová směs a moč)	14
Separace kationtů těžkých kovů	16
Mikrosada TLC F2	18
Popis mikrosady TLC F2 · Informace pro objednání	19
Příklady separace - mikrosada TLC F2	20
Analýza jedlých tuků	20
Analýza tuků a cholesterolu v krvi	22
Mikrosada TLC F3	24
Popis mikrosady TLC F3 · Informace pro objednání	25
Příklady separace - mikrosada TLC F3	26
Separace analgetik (léků na bolest)	26
Analýza drog na příkladu chinovníku	28
Mikrosada TLC M	30
Popis mikrosady TLC M · Informace pro objednání	31
Další produkty pro TLC	32
Informace pro objednání	32
Vrstvy MN pro TLC	33
Literatura	34
Bezpečnostní pokyny	36
H-věty · P-věty	37

Úvod

V posledních desetiletích trvale rostl význam chemické analytiky látek, kontroly v průběhu výroby, navazujících kontrol kvality a čistoty vyrobených produktů, a v neposlední řadě i analýz zaměřených na farmaka, potraviny a životní prostředí.

Své povné místo mezi metodami, které jsou použitelné pro řešení těchto úkolů, si přitom vydobyla chromatografie na tenké vrstvě (TLC) – v angličtině Thin Layer Chromatography (TLC). Jedná se o efektivní analytickou a preparační metodu, která téměř kompletně nahradila původní papírovou chromatografii. V řadě oblastí se stala standardní metodou pro rutinní analýzy. Vyznačuje se přitom nejenom rychlostí, přesností a vysokou citlivostí, ale především svou hospodárností.

Společnost MACHEREY-NAGEL provází TLC již od jejich začátků, tedy od šedesátých let, kdy byl zahájen vývoj a výroba řady sorbentů a inovativních poživ. K nim patří především silikagel, celulóza, oxid hlinitý a polyamid, případně odpovídajícím způsobem modifikované materiály pro speciální separační úlohy.

Tyto v praxi ověřené sorbenty nanášíme v našem závodě strojně nejenom na skleněné desky, ale i na polyesterové a hliníkové fólie. Tím šetříme čas analytiků, který by jinak museli věnovat časově náročné a nákladné přípravě ručně potažených destiček a fólií; strojní nanášení navíc zaručuje větší rovnoměrnost vrstev.

Mikrosady TLC jsme vytvořili zejména pro potřeby výuky ve školách a provozech, tyto sady těží jak z rychlosti dané metody, tak i vynikajících vlastností našich prefabrikovaných fólií pro TLC - POLYGRAM®. Prefabrikované fólie pro TLC samozřejmě nejsou použitelné pouze pro výuku, ale i pro rychlou kontrolu výrobků ještě ve fázi výroby ve vědeckých a průmyslových laboratořích. Současně chceme prostřednictvím mikrosad TLC podnítit zájem o řešení dalších úloh a o vlastní výzkum.

Sada pro začátečníky (mikrosada TLC A, viz strany 7–11) se vyznačuje především tím, že pomocí jednoduchých rozpouštědel jsou separovány vzorky, které mají svou vlastní barvu, takže odpadá nutnost jejich barvení. Všechny potřebné pomůcky jsou součástí sady.

Sady pro pokročilé (mikrosady TLC F1, F2, F3, viz strany 12–29) jsou vhodné pro zkušenější uživatele, protože je očekávána jejich větší zručnost. Část vzorků si totiž musí připravit sami, pro identifikaci látek je vedle toho používán nástřik reagentů. Každá sada pro pokročilé byla vyvinuta pro určitou skupinu separací z oboru fyziologické a farmaceutické analytiky.

S použitím sady materiálů (mikrosada TLC M, viz strany 30–31), která umožňuje rovněž samostatné chromatografické analýzy na tenké vrstvě, mohou být prováděny jednotlivé pokusy ze sad pro pokročilé.

Vedle sady materiálů je předpokládána dostupnost obvyklého laboratorního vybavení (například digestoře, ochranných rukavic, fénu, sušicí komory, hmoždíře).

Toto rozšíření tak umožňuje pokračovat konsekventně po cestě zajímavou krajinou analytické chemie. Všem mikrosadám je společné to, že jsou všechny separace prováděné na prefabrikovaných TLC fóliích POLYGRAM® s velikostí 4 x 8 cm, které jsou často používány i pro rutinní analýzy.



Princip a provádění TLC

U chromatografie na tenké vrstvě (TLC) se jedná o vícestupňový proces separace. Na tomto procesu se podílí rozpouštědla nebo jejich směsi, molekuly vzorku a vhodný sorbent. U TLC je tento sorbent tvořen tenkou vrstvou – pro analytické účely má tato obvykle tloušťku 0,1 až 0,25 mm – nanesenou na nosič (skleněná destička, polyesterová nebo hliníková fólie).

U pokusů z našich sad je separovaná směs látek nanesena na polyesterovou fólii TLC a umístěna do separační komory naplněné vývojkou (rozpouštědlem). V řadě případů je chromatografická separace dokončena již po několika minutách. Látky s vlastním zabarvením jsou viditelné ihned, bezbarvé látky jsou zviditelněny postříkáním vhodnou identifikační reagensií (zajišťuje vznik barevných sloučenin).

Pokud je k dispozici UV lampa a pokud prostřední sorpční vrstva obsahuje vhodný fluorescenční indikátor, mohou být látky často lokalizovány při pozorování chromatogramu pod UV světlem.

Pro lepší pochopení separace v rámci chromatografie na tenké vrstvě popisujeme v následujícím pět kroků, které jsou postupně prováděny:

1. Příprava vzorku

Vzorek pro chromatografickou separaci musí splňovat řadu předpokladů, pokud chceme dosáhnout dobrého rozdělení látek. Není možné, abychom se na tomto místě věnovali podrobnostem. Pouze zde upozorníme, že pro nasycení a předčištění separovaných vzorků může být potřebných i více pracovních operací.

V sadě pro začátečníky jsou příklady separace zvoleny tak, aby nebyly komplikované pracovní operace potřebné. Jedná se o cíleně složená barviva, případně jejich směsi, které je možné použít bez nutnosti další přípravy. Závěrem je pak uveden i příklad z každodenního života (separace barviv z popisovačů), přičemž i tento vzorek je možné nanést bez jakékoli přípravy.

U sad pro pokročilé musí již uživatel sám provést určité pracovní operace. K nim patří mechanické rozmělnění vzorku, extrakce, filtrace, úprava a odběr vzorku. Prostřednictvím těchto vlastnoručně prováděných operací při přípravě vzorku chceme uživateli umožnit nahlédnout do pracovních technik, které jsou v průmyslové výrobě běžné a

jejichž provedení je opět předpokladem pro úspěšnou separaci při chromatografii na tenké vrstvě.

Na rozdíl od sady pro začátečníky, která obsahuje vzorky s konkrétním složením, se sady pro pokročilé věnují úlohám blízkým praxi. Podrobnostem se budeme věnovat u jednotlivých příkladů.

2. Nanesení vzorku

Způsob nanášení vzorku se řídí cílem chromatografické separace. Pro analytickou separaci s následným kvalitativním vyhodnocením je nanášení prováděno bodově pomocí kapiláry nebo mikropipety, při kvantitativním vyhodnocení pak bodově nebo ve formě úseček (většinou 1 cm). Pro preparační separaci je doporučeno nanášení ve formě pásu v celé šířce destičky.

U následujících příkladů separace je zkoumaná směs, případně srovnávací roztok nanášen na prefabrikované fólie TLC bodově pomocí skleněné kapiláry. Tyto kapiláry smí být použity vždy pouze pro nanesení jednoho vzorku, protože jinak by mohlo dojít ke kontaminaci jiného vzorku zbytky toho předchozího.

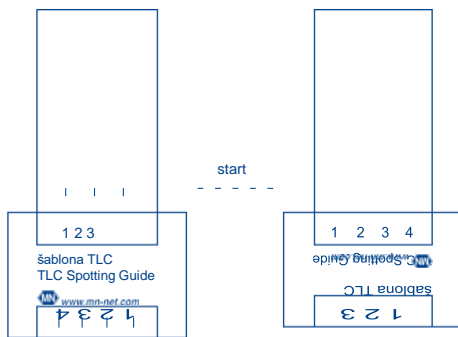
Kapiláry se plní při ponoření do organických zkušebních roztoků velice rychle i samy od sebe, u vodních roztoků je vzestup hladiny v kapiláře výrazně pomalejší, případně je nutné si pomoci kloboučkem (balonkem) pro pipety. Při vyprazdňování je nutné nastavit kapiláru kolmo k povrchu a její konec opatrně přiložit k vrstvě. Kolmo proto, aby došlo k samovolnému vyprázdnění kapiláry, a opatrně proto, aby nedošlo k poškození vrstvy. Poškození vrstvy má za následek vznik skvrn s nepravidelnými okraji. Aby byly nanesené skvrny co nejmenší a nejkompaktnější, je někdy nutné nanést několik dávek po sobě - vždy ale až po zaschnutí předchozí dávky (proudem studeného nebo horkého vzduchu, v sušící komoře). To platí zejména pro vodní zkušební roztoky.

Pro usnadnění nanášení doporučujeme použít nanášecí šablonu (TLC šablonu), která je koncipována speciálně pro naše prefabrikované fólie pro TLC. Následující obrázky demonstrují bezchybné nanesení vzorku pomocí zmíněné šablony.



V závislosti na tom, zda chceme nanášet tři nebo čtyři látky, vložíme fólii do odpovídajícího rámečku šablony na neklouzavém podkladu. Tím je nastavena správná vzdálenost startovní čáry a bodů nanášení. Kromě toho je šablona na spodní straně podél startovní čáry vyfrézovaná, takže při nasávání roztoků do vrstvy sorbentu na fólii nedochází k poruchám.

U pokusů ze sady pro začátečníky je vždy využíváno rozdělení pouze do tří výchozích bodů. U pokusů pro pokročilé je používána i strana šablony umožňující dávkování ve čtyřech bodech.



Pro pozdější vyhodnocení chromatogramu na tenké vrstvě jsou před nanášením vzorků vyznačeny polohy startovních bodů a startovní čáry na vrstvě TLC pomocí měkké tužky.

3. Vyvolání chromatogramu

Po nanášení je nutno nechat zcela odpařit rozpouštědlo použité pro vzorky (zhruba 10 minut), případně urychlit vysychání použitím fény. Poté je nutné umístit TLC fólii do separační komory (skleněná nádoba se šroubovacím uzávěrem) naplněné zhruba 10 ml vývojky a opatrně našroubovat víčko, přitom je nutno nádobu jednou rukou přidržovat a pevně ji přitom přitlačovat k desce stolu.



Hladina kapaliny se nesmí během této operace pohybovat. Vývojka nesmí v žádném případě nerovnoměrně zasahovat nanesené skvrny nebo je omývat. Působením kapilárního jevu stoupá vývojka vrstvou nahoru a způsobí separaci látek.

Poté, co vývojka dosáhne požadované výšky/délky trasy (zhruba 6 až 7 cm), je proces separace ukončen. Nyní je možné vyjmout TLC fólii ze separační komory a tužkou ihned vyznačit úroveň čela vývojky.

Ve všech uvedených příkladech se obejdeme bez sycení komory. Pokud je však potřebné zajistit reprodukovatelné podmínky vzlinání, je v mnoha případech výhodné sycení atmosféry v komoře parami vývojky. V tomto případě je nutno vložit separační komoru na vnitřní straně svým chromatografickým papírem (MN 260, REF 814030) a poté naplnit do komory 15 ml vývojky namísto jinak dostačujících 10 ml.

4. Zviditelnění oddělených látek

Po vyvolání chromatogramu je nutno separované látky zviditelnit, pokud tyto nemají žádné vlastní zbarvení. K nespecifickému zviditelnění patří pozorování pod UV světlem, pokud vrstva obsahuje fluorescenční indikátor, nebo zbarvení v jódové komoře.

Specifických barevných reakcí je možné dosáhnout postříkáním odpovídající indikační reagensy. Použití je možné i kombinací uvedených postupů. Alternativně s postříkáním může být TLC fólie do indikační reagensie i krátce ponořena.

U příkladů separace v sadě pro začátečníky se jedná vždy o barviva, to znamená látky, které je možné pozorovat i bez nutnosti následného barvení.

U sad pro pokročilé jsou separovány i látky, které jsou bezbarvé - tak jak je tomu zpravidla v praxi. Pro zviditelnění je používán postřík vhodnými reagensy (například reagensie podle Dragendorff-Muniera, kyselinou molybdatu-fosforečnou, ninhydrinem, rubeanovodíkem).

Reagensie pro postřík podle Dragendorff-Muniera je obecně používána pro prokazování sloučenin obsahujících dusík, jako jsou alkaloidy a terciární aminy. Skládá se ze zásaditého dusičnanu bismutitého, kyseliny vinné a jodidu draselného a vytváří komplex draselno-tetraiodobismutičnanu. Prokazované sloučeniny obsahující dusík jsou kyselinou vinnou protonovány a vytvářejí oranžově zbarvené (zčásti žluté resp. červené až hnědé) iontové páry tvaru $[BiI_4]^- [HNR_3]^+$.

Kyselina molybdatofosforečná, rozpuštěná v etanolu, je používána jako reagentce ve spreji pro prokazování redukcujících látek (například tuků, mastných kyselin, alkoholů). Zahřátím na 120 °C (horkovzdušným fénem nebo v sušicí komoře) po postříkání vyvolané TLC fólie dojde ke zbarvení skvrn látek tmavě modrou barvou, označovanou rovněž jako »molybdenová modř«.

Pro prokazování aminokyselin, aminů a aminocukrů je možno použít roztok ninhydrinu v etanolu, který vytvoří po zahřátí na 110 °C rezavé skvrny s analyty.

Těžké kovy je možné zviditelnit použitím *rubeanovodíku*. Po dokončení separace jsou TLC destičky postříkány rubeanovodíkem v etanolu. Těžké kovy jsou pak viditelné až po následném vystavení skvrn parám amoniaku (25 % roztok amoniaku na hodinovém sklíčku nebo v kádince).



Další podrobnosti o reagenciích pro postříkání jsou uvedeny v rámci popisu pokusů u jednotlivých mikrosad. K technice postříkání je však nutno dodat, že tyto reagentce smí být stříkány zásadně pouze pod digestoř. TLC fólii je nutno položit při postříkání na list filtračního papíru. Většinou postačuje naplnit do rozprašovače 5–10 ml roztoku. Postříkání je prováděno ze vzdálenosti cca 15 cm pomocí gumového balonku nebo - pokud je k dispozici - tlakového vzduchu. Vždy je lepší, pokud je vrstva postříkána dvakrát - rovnoměrně a v tenké vrstvě (s usušením mezi oběma nástřiky), než když je na ni nastříkána pouze jedna silná vrstva. Při příliš silném postříkání dojde k pohybu skvrn. Zpravidla je TLC fólie po nástřiku sušena.

Po zviditelnění jsou zóny obtaženy tužkou, aby byla poloha skvrn patrná i po jejich pozdějším vyblednutí.

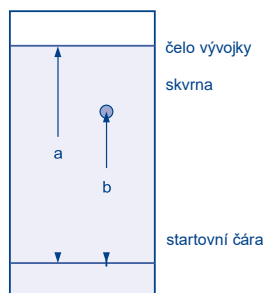
5. Vyhodnocení chromatogramů na tenké vrstvě

Vyhodnocení je závislé na cíli chromatografie. Při kvalitativním hodnocení často postačuje pouze lokalizace prokazovaných látek. To je velice jednoduše prováděno použitím srovnávacích látek.

Veličinou často používanou při hodnocení je hodnota R_f (retenční faktor) nebo jeho stonásobek hR_f . Hodnota R_f je definována následovně:

$$R_f = \frac{\text{vzdálenost startovní čáry - těžiště skvrny}}{\text{vzdálenost startovní čáry - čelo vývojký}} = \frac{b}{a}$$

tzn. hodnoty R_f leží mezi 0 a 1, v nejpříznivějším případě mezi 0,1 a 0,8 resp. 10–80 u hR_f .



Abyste byli jisti, že jsou dobře reprodukovatelné hodnoty R_f , je však potřebné pečlivě nasycení atmosféry v komoře a udržování ostatních parametrů, jako je například složení vývojký, teplota, atd., na konstantní úrovni.

S využitím odpovídajícího kalibračního měření je možné provádět i kvantitativní vyhodnocování. Při něm je využívána buď plocha skvrn látek, nebo je přímo na vrstvě provedeno denzitometrické vyhodnocení. Posledně uvedená metoda však klade vysoké nároky na vybavení.

Při provádění všech pokusů dbejte bezpečnostních pokynů na etiketách a v tomto návodu k použití (viz strany 36–38). Použité chemikálie předejte k odborné likvidaci podle předpisů o ochraně životního prostředí.