

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

VYUŽITÍ CHROMATOGRFIE VE VÝUCE CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Eva Jordánová

Učitelství pro střední školy, obor Učitelství biologie a chemie pro střední školy

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.

Plzeň, 2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně
s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 24. června 2016

.....
vlastnoruční podpis

NA TOMTO MÍSTĚ BYCH RÁDA PODĚKOVALA VEDOUCÍMU PRÁCE ZA ODBORNÉ VEDENÍ A
TRPĚLIVOST.

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
Fakulta pedagogická
Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva JORDÁNOVÁ**
Osobní číslo: **P13N0211P**
Studijní program: **N7504 Učitelství pro střední školy**
Studijní obory: **Učitelství biologie pro střední školy
Učitelství chemie pro střední školy**
Název tématu: **Využití chromatografie ve výuce chemie**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznámit se s historií chromatografie.
2. Seznámit se s tříděním a principy chromatografických metod.
3. Seznámit se se současným stavem zařazení chromatografických metod do výuky chemie - posouzení užívaných učebnic.
4. Zvážit možnosti zařazení chromatografických metod do výuky chemie.
5. V souvislosti s bodem 4 doplnit experimentální část přípravy budoucích učitelů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **40 stran**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Učebnice chemie ZŠ a SŠ.

Kvíčala J.: Laboratorní technika organické chemie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 1998.

Richtr V., Kraitr M.: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie, Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni, Plzeň 2004.

Časopisy Biologie-Chemie-Zeměpis.

Časopisy Journal of Chemical Education.

Vedoucí diplomové práce:

Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.


Katedra chemie

Datum zadání diplomové práce: **15. března 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. června 2015**


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka




Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. března 2014



FAKULTA PEDAGOGICKÁ
ZÁPADOČESKÉ
UNIVERZITY
V PLZNI

V Plzni dne 19. ledna 2015
č.j. ZCU-001387/2015/Z

Rozhodnutí

Dle ust. čl. 55 odst. 3 Studijního a zkušebního řádu v platném znění (dále jen studijní a zkušební řád) rozhodla děkanka

takto:

Studentce **Evě Jordánové**, nar. 11. dubna 1991, bytem Litvínovice 74, České Budějovice studující ve studijním programu **Učitelství pro střední školy**, studijní obor **biologie-chemie** se určuje náhradní termín odevzdání diplomové práce s názvem „**Využití chromatografie ve výuce chemie**“ do **30. června 2016**.

Odůvodnění:

Studentka byla povinna odevzdat kvalifikační práci dle jejího zadání nejpozději do 30. 6. 2015. Studentka, aniž by odevzdala kvalifikační práci, podala k děkance včas podle čl. 55 odst. 2 studijního a zkušebního řádu žádost o stanovení náhradního termínu odevzdání kvalifikační práce s odůvodněním zahraniční stáže.

Děkanka s ohledem na důvody uvedené v žádosti vyhověla žádosti studentky a v souladu s ust. čl. 55 odst. 3 studijního a zkušebního řádu stanovila studentce náhradní termín pro odevzdání kvalifikační práce.

Poučení:

Proti tomuto rozhodnutí není opravného prostředku.

Všechny náležitosti týkající se této změny si vyříd'te na příslušné katedře.


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka FPE ZCU v Plzni

OBSAH

Úvod	3
1 HISTORIE CHROMATOGRAFIE	4
1.1 PŘED CVETEM A JEHO PRŮLOMEM – DOBA PŘEDCHROMATOGRAFICKÁ	4
1.1.1 Chromatografie ve starověku	4
1.1.2 Blízcí předchůdci chromatografie – 19. Století.....	5
1.2 MICHAJL SEMJONVIČ CVET.....	7
1.3 MEZIVÁLEČNÉ OBDOBÍ.....	8
1.4 PAPIROVÁ A TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 CHROMATOGRAFIE - ÚVOD.....	10
2.2 PRINCIP CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	10
2.3 TŘÍDĚNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	11
2.4 CHARAKTERISTIKY CHROMATOGRAFICKÝCH METOD DĚLENÝCH NA ZÁKLADĚ MECHANISMU SEPARACE	12
2.5 PLANÁRNÍ CHROMATOGRAFIE	14
2.5.1 Papírová chromatografie.....	14
2.5.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	15
2.5.2.1 Výběr vhodné mobilní fáze pro TLC	18
2.5.2.2 Dvojrzměrná TLC.....	19
2.6 SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE	20
2.7 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 CHROMATOGRAFIE FIXŮ.....	22
3.1.1 Chromatografie na křídě.....	22
3.1.1.1 Porovnání výsledků dělení za použití různých rozpouštědel: voda, methanol, ethanol, aceton.....	24
3.1.2 Papírová chromatografie.....	26
3.1.3 Chromatografie na silufolu	28
3.1.4 Chromatografie na kruhovém filtračním papíru	29
3.1.5 Chromatografie na pruhu bavlněné látky.....	30
3.1.6 Chromatografie na kávových filtrech spojená s výrobou motýlů.....	32
3.2 CHROMATOGRAFIE INKOUSTŮ DO PLNÍCÍCH PER	34
3.3 CHROMATOGRAFIE SMĚSI INDIKÁTORŮ	37
3.3.1 Identifikace methylované a thymolftaleinu v jejich směsi.....	37
3.3.2 Identifikace methylované a thymolové modři v jejich směsi	38
3.3.3 Identifikace methylované, thymolftaleinu, methylované a thymolové modři v jejich směsi	39
3.3.4 Identifikace methylované a fluoresceinu v jejich směsi.....	40
3.3.5 Identifikace jednotlivých barviv v univerzálním indikátoru (Čůta – Kámen).....	41
3.3.6 Celkové zhodnocení.....	43
3.4 CHROMATOGRAFIE POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV	44
3.4.1 Barviva z lentilek.....	44
3.4.2 Barvy na vajíčka	45
3.5 CHROMATOGRAFIE BARVIV V ROSTLINNÉM MATERIÁLU	48
3.5.1 Pokus z učebnice ²⁷	48
3.5.2 Pokus z učebnice ²⁸	49
3.5.3 Pokus z učebnice ¹⁸	50
3.5.4 Pokus z učebnice ²⁸	52

3.5.5	Pokus z učebnice ²⁹	53
3.5.5.1	Úkol číslo 1	54
3.5.5.2	Úkol číslo 2	54
3.5.5.3	Úkol číslo 3	54
3.5.5.4	Zhodnocení úkolů číslo 1, 2, 3.....	55
3.5.6	Pokus z učebnice ³⁰	56
3.5.7	Pokus z literatury ³¹	58
3.5.8	Celkové zhodnocení.....	62
3.6	CHROMATOGRRAFIE AMINOKYSELIN	63
3.6.1	Chromatografie aminokyselin na základě učebnice ²⁰ a Praktických cvičení z lékařské chemie ³⁴	63
3.6.2	Dvojměrná chromatografie bílkovinného hydrolyzátu na základě učebnice ²⁰	65
3.6.3	Opakované vyvíjení chromatogramu	68
ZÁVĚR.....		70
RESUMÉ		72
SEZNAM LITERATURY		73

Úvod

Chromatografie, která je dnes velmi využívanou metodou v analytické chemii, se v různé míře zařazuje do výuky na školách. V různé míře se jí zabývají také učebnice a jiná literatura sloužící učitelům a žákům v učení a vyučování. Tato práce je členěna do třech hlavních oddílů. Je jimi historie chromatografie, teoretická část a experimentální část.

Chromatografie je pozoruhodná metoda, protože geniálně využívá základních přírodních zákonů, které byly pozorovány již v dávné historii. Plinius popisuje testování kvality barvy, Runge se zabývá barvivy z estetického hlediska, ale ani jeden z nich nedokázal vědecky popsat a využít to, co se objevovalo před jejich očima. Tento primát připadl až Cvetovi, který ve svých sloupcích rozdělával přírodní barviva. Ve třicátých a čtyřicátých letech devatenáctého století došlo k objevu papírové a tenkovrstvé chromatografie, které dále zjednodušily a zpřístupnily metodu širokým vrstvám výzkumníků. Chromatografie, jejímž smyslem je rozdělení jednotlivých složek směsi, se dále dělí podle různých kritérií, například dle mechanismu separace, skupenství mobilní fáze nebo v závislosti na uspořádání. Teoretická část vysvětluje princip chromatografie a rovněž poskytuje čtenáři přehledné dělení chromatografických metod. Je však zvláště zaměřena na chromatografii papírovou, tenkovrstvou a sloupcovou. Ty jsou dále využívány v experimentální části práce, která má sloužit jako inspirace učitelům na školách. Experimentální část nabízí celou řadu experimentů týkajících se chromatografie fixů, inkoustů do plnicích per, směsi indikátorů, potravinářských barviv, barviv v rostlinném materiálu a aminokyselin. Tato práce obsahuje: porovnání učebnic zejména z hlediska pokusů, případné modifikace experimentů, doporučení a zhodnocení. Nabízí také experimenty, které se v učebnicích zatím neobjevují a je možné tak rozšířit přípravu budoucích i stávajících učitelů.

1 HISTORIE CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je dnes široce rozšířená metoda, nebylo tomu však vždy a její moderní historie sahá pouhé jedno století do minulosti. Sám její vznik a rozvoj je velmi zajímavou kapitolou vývoje vědy. Z metody neznámé se stala metodou přehlíženou a nakonec se stala široce přijímanou a populární. Rozvinula se celá řada jejích forem, od klasické Cvetovy metody přes papírovou chromatografii až po plynovou nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Dějiny bohužel nebyly milostivé k samému zakladateli, který se nedožil ocenění.

Dějiny chromatografie jsou tak příběhem, který je zajímavý a vypovídá nejen o technickém vývoji chromatografické metody, ale o vědeckém vývoji a lidské společnosti obecně. Podívejme se tedy na milníky a zajímavou historii jedné chemické metody, která je součástí vědy a pokroku lidské civilizace.

1.1 PŘED CVETEM A JEHO PRŮLOMEM – DOBA PŘEDCHROMATOGRAFICKÁ

1.1.1 CHROMATOGRRAFIE VE STAROVĚKU

Chromatografie jako taková byla objevena až Cvetem na počátku 20. století. Lze najít ale i dřívější aktivity, které jí připomínají. Záměrně píšeme o aktivitách, poněvadž nebyly nikterak teoreticky podchycené a jednalo se o pouhé empirické počínání. Někteří autoři nacházejí chromatografii již ve starozákonních dobách, konkrétně u Mojžíše.¹

„Když Mojžíš odvedl Izrael od Rudého moře, vydali se k poušti Šur. Tři dny šli pouští, aniž našli vodu. Když potom přišli do Mary, nemohli místní vodu pít, neboť byla hořká. (A proto se jmenuje Mara, Hořkost.) Tehdy lid reptal proti Mojžíšovi. „Co máme pít?“ říkali. Mojžíš tedy volal k Hospodinu a Hospodin mu ukázal kus dřeva. Když jej hodil do vody, voda zeslédla.“²

Dnes může být tato událost interpretována jako užití iontově výměnné chromatografie. Mojžíš ale nepochybně neznal nic připomínající chromatografický princip, jen obecné pozorování té doby, že některé keře „vysají“ hořkost z vody.³

Za dalšího adepta na titul prvního vědce zabývajících se chromatografií bývá označován Plinius Starší. V obou domnělých chromatografických experimentech šlo o důkaz kvality produktu. V prvním případě šlo o purpur, což bylo barvivo velmi populární

v antickém Římě. Ve druhém případě šlo o test *aeruginis*, octanu měďnatého, který Římané vyráběli z mědi a silného octa, a který byl využíván jako populární léčivo.^{3, 4, 5}

V prvním případě je označován za předchůdce papírové chromatografie, protože jako test poctivosti purpuru popisoval namočení kousku látky do roztoku barviva. Nepojednával ale o vývinu barvy a vytvoření jednoduchého chromatogramu. Jednalo se pouze o pozorování intenzity barvy. Plinius se rozhodně o ničem složitějším nezmiňuje. „*Zhruba desátý den je celý obsah kotle v tekutém stavu a v tom se namočí látka, která byla očištěná, aby byla učiněna zkouška; ale dokud není barva shledána uspokojivou podle přání výrobce, pokračuje se ve varu*“.⁴

Octan měďnatý, *aeruginis*, byl často falšován sloučeninou zvanou *copperas* neboli síranem železnatým. Kromě testu ohněm nabízí Plinius i chemický test. Jedná se o otření octanu měďnatého o list papyru napuštěný duběnkovým roztokem, který obsahuje kyselinu gallovou. Papyrus by měl okamžitě zčernat. Jedná se bezpochyby o chemickou reakci, s chromatografií ale nemá nic společného, protože nedochází k žádnému rozdělování. „*Podvod také může být zjištěn za pomoci listu papyru, který byl namočen v roztoku duběnek; neboť zčerná okamžitě po přetření pravou aeruginis*“.⁵

1.1.2 BLÍZCÍ PŘEDCHŮDCI CHROMATOGRAFIE – 19. STOLETÍ

Zajímavou postavou v historii chromatografie je německý chemik Friedlieb Ferdinand Runge, který se zasloužil o pokrok v několika oblastech chemie. Původně studoval medicínu, ale stále více se zaměřoval na chemii, ke které se dostal přes zkoumání toxických látek v rostlinách a posléze se zaměřil na výzkum bioaktivních rostlinných látek obecně. Objevil kofein a chinin, když hledal, které látky obsažené v plodech kávy a v kůře chinovníku způsobují jejich účinky na člověka. Zajímavostí je, že kofein objevil na popud Goetheho, kterého navštívil, a který mu věnoval kávová zrna právě s návrhem, aby v nich objevil účinné látky. Později se zabýval psaním učebnic a pracoval v barvířském průmyslu. Právě práce v tomto odvětví ho přivedla k zájmu o barviva. Napsal několik knih o chemii barev. Ve třetím svazku se píše: „*Kapka se ohraničuje pravidelným okrajem, který je hnědý a dokonce dvakrát až třikrát tmavší než hnědý střed. Člověk přitom může také pozorovat, jak se s časem vyvíjí účinek soli chromu... Důvodem je papírem způsobené dělení látek, které vykazují přítomnost soli chromu; tmavě hnědá látka se shlukuje na okraji, zatímco méně zabarvená zůstává ve prostřed.*“⁶ V knize je možné nalézt několik podobných

odkazů. Vzápětí po této citaci autor dělá reklamu své jiné publikaci, a to *Zur Farben-Chemie: Musterbilder für Freunde des Schönen*. Ta však představuje odluku od jeho chemického přístupu a zdůvodňuje, proč právě Runge nemůže být považován za otce chromatografie.³

Runge se totiž rozhodl zaměřit na estetickou a ne chemickou stránku jeho papírových „chromatogramů“. Ve vzniklých obrazcích začal spatřovat projevy zvláštních sil přírody – pudu utváření (*Bildungstrieb*). Dnes by se jeho chápání dalo označit až za mystické, v tehdejší době však vzbudil ve veřejnosti silný ohlas, což dosvědčuje získaná medaile na Světové výstavě v Paříži 1855 a také ocenění na Světové průmyslové výstavě v Londýně 1862. Svoje výtvořky dal do souvislosti s teorií Karla von Reichenbacha, který tvrdil, že příroda je prodchnuta silami specifické formy magnetismu, který mohou někteří senzitivní lidé vycítit. Runge věřil, že jeho obrázky jsou následkem právě této síly, a že tuto sílu je možno zachytit vědeckými postupy, protože jeho obrázky jsou reprodukovatelné, pokud je dodržen stejný postup.³

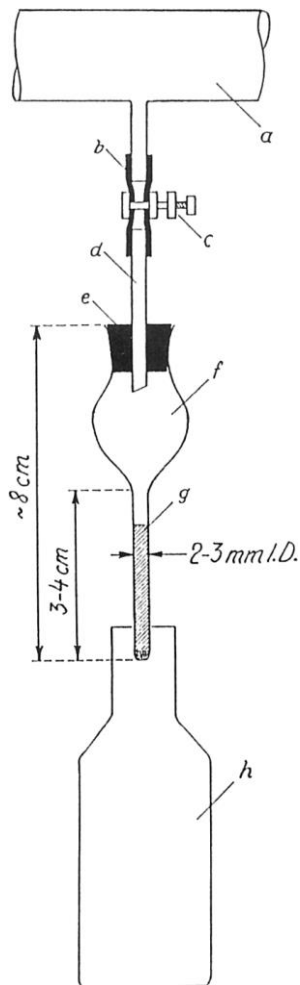
Kromě Rungeho lze nalézt i další předchůdce chromatografie. Patří do ní vědci, kteří se zabývali ropou a jejím rozdílným složením v různých nalezištích. Na přelomu 19. a 20. století se David T. Day domníval, že rozdíl ve složení ropy je způsoben retardačním faktorem látek při jejich průchodu různými zemskými vrstvami tzv. filtrační hypotéza. Při svých pokusech přišel na to, že při filtraci dochází k určité separaci jednotlivých komponent ropy, protože lehčí frakce se pohybují rychleji. Na Daje navázal Joseph Gilpin. Základem jeho zařízení byl jeden až dva metry dlouhý válec o průměru 3 cm naplněný fullerovou hlinkou. Ten byl pak postaven do ropného vzorku, který se nechal vzlínat přibližně 24 hodin. Proces mohl být urychlen vakuovou pumpou. Poté byl obsah opatrně vyjmut, po vrstvách nařezán a vyzískány z něj ropné vzorky, které pak byly fyzikálně změřeny. Díky tomu byly zjištěny rozdíly v hustotě a viskozitě jednotlivých vrstev. S obdobnými výsledky, ale jiným postupem pracoval i Němec Carl Enger. Ten sice zvolil jiný design laboratorního zařízení, ale výsledek byl stejný – fyzikální popis ropných směsí s menším a větším retardačním faktorem vyzískaných ze surové ropy filtrací přes fullerovu hlinku. V jejich práci tedy nedošlo k oddělení jednotlivých uhlovodíků, a proto lze těžko mluvit o chromatografii jako takové. V padesátých letech jejich práce ale nabyla ještě

politický význam, když skupina západních vědců začala tvrdit, že vynálezcem chromatografie je Day.³

1.2 MICHAJL SEMJONVIČ CVET.

Cvet se narodil 14. května 1872 v severní Itálii. Jeho otec byl ruský úředník. Matka, která zemřela krátce po porodu, byla z italské rodiny usazené v Turecku, sama však vyrostla v Rusku. Do svých 24 let pak žil ve Švýcarsku, kde také získal doktorát z botaniky na univerzitě v Ženevě. Po získání doktorátu se rozhodl přestěhovat do Ruska, kde doufal ve slibnou budoucnost. Narazil však na uzavřené a hierarchické akademické prostředí, kde jeho zahraniční doktorát byl spíš na obtíž. V roce 1901 získal ruský magisterský titul na univerzitě v Kazani a tím mohl získat místo na ruských univerzitách. Přestěhoval se do Varšavy, kde působil dalších 14 let, nejdříve na univerzitě a poté na polytechnice. Za války byl institut přesunut do Nižního Novgorodu. V roce 1917 získal Cvet profesorskou pozici na univerzitě v Tartu, ale záhy musel znovu prchnout před německou armádou. Začal působit na univerzitě ve Voroněži, ale byl vážně nemocný a roku 1919 zemřel.³

Právě ve Varšavě měl 21. března 1903 přednášku, která je považována za moment vzniku chromatografie. V následujících letech promluvila do jeho výzkumu politická nestabilita. Japonsko-ruská válka a nepokoje s ní spojené vedly k zavření univerzit. Laboratoře sice byly dále otevřené, ale situace byla neklidná. Cvet toho využil k zahraničním cestám, při kterých procházel zahraniční knihovny a sbíral vzorky rostlin. V létě 1905 zaslal dva články do žurnálu Německé botanické společnosti, ve kterých poprvé popsal chromatografii jiným jazykem než rusky, a tak překročil mezinárodní bariéru. O rok později svoji metodu předvedl před publikem Německé botanické společnosti v Berlíně.³



Obrázek 1: Cvetův chromatograf. Je patrné, že konstrukce je velmi jednoduchá. Rozpouštědlo se vzorky procházelo trubičkou s adsorbentem. Ten byl pak vytlačen tyčinkou a rozřezán. a – dělička, b – gumová hadička, c – kohoutek, d – skleněná trubička, e – korek, f – zásobník rozpouštědla, g – chromatografický sloupec (průměr 2 – 3 mm), h – láhev na sběr eluentu

Nová metoda však byla přijata velmi kriticky, mezi její největší kritiky patřil mimo jiné i laureát Nobelovy ceny Richard Willstätter. Cvet však nadále pokračoval ve zdokonalování své metody a v roce 1910 vydal ve Varšavě rusky psanou knihu *Chromofyly v rostlinném a živočišném světě*. Pokračoval ale i v psaní článků do zahraničních žurnálů. V roce 1911 jich bylo publikováno sedm. Z této doby mimo jiné pochází termín karotenoid, který Cvet navrhl, a který se uchytil. Do jeho další vědecké činnosti však zasáhly zdravotní problémy a válka, po níž záhy zemřel.³

1.3 MEZIVÁLEČNÉ OBDOBÍ

Mezi světovými válkami zažila chromatografie velký rozvoj. Ten ale nastal až poměrně dlouho po jejím objevu. Ve dvacátých letech k ní bylo přistupováno s nedůvěrou pod vlivem jejích kritiků. Situace se změnila ve třicátých letech, kdy začala být rozšířenou metodou. Její vzestup se pojí s laboratoří v Heidelbergu, kde však její rozvoj ukončil

nástup Adolfa Hitlera k moci – řada pracovníků byla židovského původu. Naštěstí se o metodu začali zajímat i jinde a tak nedošlo k jejímu pozapomenutí, jako v případě Cvetovy práce. V tomto období začala být chromatografie také používána i na anorganické látky. Do té doby byla její doménou oblast organických barviv. O její rozšíření do anorganické chemie se zasloužil Georg-Maria Schwab z Univerzity Mnichov.³

1.4 PAPIŘOVÁ A TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE

Její vznik je datován dnem 25. března 1944, kdy byla prezentována na výročním zasedání Britské biochemické společnosti skupinou kolem Archera Johna Portera Martina (držitele Nobelovy ceny za chromatografii 1952). Využil ji pro separaci aminokyselin a metoda se záhy rozšířila pro svoji velkou jednoduchost. Navíc byla součástí prvních pokusů s papírovou chromatografií využita dvojrozměrná technika – chromatogram se po první separaci otočil o devadesát stupňů a bylo použito jiné rozpouštědlo.³

Tenkovrstvá chromatografie má svoje počátky v Charkově u Nikolaje Izmajlova. Chtěl najít rychlejší alternativní metodu ke sloupcové chromatografii. Pokryl mikroskopové sklíčko adsorbentem, na nějž nanesl vzorek a ten zakápl rozpouštědlem. Vznikly tak kroužky separovaných látek. Ve čtyřicátých a padesátých letech metoda prošla několika inovacemi. Místo zakápnutí rozpouštědlem se přiblížila papírové chromatografii - – v kontejneru bylo sklíčko namočeno do mobilní fáze. Díky tomu bylo možné vytvářet dvojrozměrné chromatogramy podobně jako při využití papíru. Adsorbent byl zafixován ke sklíčku například kukuřičným škrobem. Pro zvýšení účinnosti byly zmenšovány částice adsorbentu. Byla také vyvinuta metoda tenkovrstvé chromatografie pod tlakem.³

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 CHROMATOGRAFIE - ÚVOD

Chromatografie patří mezi významné separační techniky, které se využívají k rozdělení směsi látek na jednotlivé složky anebo k oddělení jedné konkrétní látky ze směsi.^{7,8} Protože jsou to právě přírodní látky, které spolu často tvoří složité směsi, využívá se chromatografie v současné době hlavně při výzkumech týkajících se přírodních látek a v biochemii.^{8,9} Příkladem je celá řada léčiv, jejichž výroba vyžaduje jen určité izolované látky v co nejčistější formě.¹⁰

Název „chromatografie“ napovídá, že tato metoda je spjata s barevnými látkami, neboť řecky *chroma* znamená barva, ale převážné využití této metody patří směsím látek, jež jsou bezbarvé.⁸ Příkladem takového dělení bezbarvých látek je experiment zaměřený na dělení směsi aminokyselin na jednotlivé složky (viz kap. 3.6). Příkladem dělení barevných směsí je například chromatografie fixů (viz kap. 3.1).

2.2 PRINCIP CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

Principem chromatografie je dělení jednotlivých složek směsi v závislosti na jejich afinitě k fázím. Fáze jsou dvě a to stacionární a mobilní.¹⁰ Mobilní fáze může být plynná nebo kapalná, zatímco fáze stacionární může být tvořena pevnými částicemi nebo kapalinou zachycenou na pevném nosiči.⁸ I když existuje celá řada typů chromatografických metod, tak je zde uvedeno několik znaků, které mají chromatografické metody společné.¹¹

Vzorek je unášen mobilní fází, která prochází fází stacionární tvořenou například oxidem hlinitým, silikagelem, papírem a tak dále. Formy uspořádání mohou být různé. Může jí být proužek papíru, tenká vrstva na skleněné destičce (uspořádání planární) nebo částičky stacionární fáze ve sloupci. V průběhu unášení vzorku mobilní fází přes fázi pevnou se jednotlivé složky směsi pohybují různou rychlostí.¹¹ Během samotného procesu dochází k opakovanému střídavému přecházení složek směsi do jednotlivých fází. Platí zde princip rovnováhy, kterému se celý systém v průběhu dělení přibližuje. Pro popis rozdělení jednotlivých složek mezi obě fáze se využívá tzv. distribuční (rozdělovací) konstanta $K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$, která je definována poměrem rovnovážné koncentrace dané složky ve stacionární fázi $[A]_s$ a ve fázi mobilní $[A]_m$.⁷ Mobilní i stacionární fázi je nutno vybírat

s ohledem na fyzikální a chemické vlastnosti směsí, které jsou děleny. Výsledkem procesu je to, že se složky rozdělí průchodem přes sorbent, kde mohou být následně detekovány a měřeny. Složky směsi lze porovnat na základě jejich retardačního faktoru R_F , který je dán podílem rychlosti pohybu rozpuštěné látky a rychlosti pohybu rozpouštědla.¹¹

2.3 TRÍDĚNÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

V průběhu let od objevení chromatografie došlo k vývoji celé řady chromatografických metod, které je možno rozdělit v rámci několika kritérií. Pokud je základním kritériem dělení skupenství mobilní fáze, jde o chromatografii plynovou nebo kapalinovou.^{7,8} Obě chromatografie lze dále rozlišit také na základě spojení se stacionární fází. Kapalinová chromatografie se odehrává ve spojení kapalina – pevná látka nebo kapalina – kapalina, zatímco plynová chromatografie se odehrává ve spojení s kapalinou, dále pak s pevnou látkou.⁷ Přehledné dělení metod dle skupenství mobilní fáze včetně mechanismu separace poskytuje následující tabulka.¹²

Název typu chromatografie	Mechanismus separace	Metoda	Užívaná zkratka
Plynová chromatografie	síťový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích	GSC
	adsorpce	plynová adsorpční chromatografie	
	rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
Kapalinová chromatografie	síťový efekt	gelová permeační chromatografie	GPC
	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	chemisorpce	iontově výměnná chromatografie	IEC
	specifické interakce biomolekul	afinitní chromatografie	

Na základě mechanismu separačního procesu je možné rozdělit chromatografii na afinitní, adsorpční, ionexovou, rozdělovací a gelovou.^{9,10} Rozdělení chromatografických metod podle tohoto kritéria včetně uvedení povahy probíhajícího procesu shrnuje následující tabulka.¹⁰

Název chromatografické metody	Povaha probíhajícího procesu
afinitní	specifická interakce s afinantem
adsorpční	adsorpce
ionexová	elektrostatická interakce a difúze
rozdělovací	extrakce, rozpouštění
gelová	difúze

Dalším kritériem pro dělení chromatografických metod je forma uspořádání pevné fáze. Podle tohoto kritéria je rozlišována chromatografie planární a sloupcová. Planární chromatografie se dále dělí na papírovou a tenkovrstvou.⁸ Sloupcová chromatografie je členěna na chromatografii sloupcovou plynovou a kapalinovou.¹³

Forma uspořádání pevné fáze	Další dělení
planární chromatografie	papírová
	tenkovrstvá
sloupcová chromatografie	plynová
	kapalinová

2.4 CHARAKTERISTIKY CHROMATOGRFICKÝCH METOD DĚLENÝCH NA ZÁKLADĚ MECHANISMU SEPARACE

Adsorpční chromatografie je jednou z nejstarších metod. Principem metody je rozdělení jednotlivých složek směsi na základě jejich rozdílné afinity na povrch adsorbentu v průběhu obtékání mobilní fází, jež unášejí dělenou směs.^{7,9} Navázání látek na povrch adsorbentu umožňují polární síly, které působí mezi povrchem pevné fáze a dělenou látkou a také polární síly, které působí mezi povrchem stacionární fáze a mobilní fází.⁷ Adsorpční chromatografii je možno provést v systému pevná látka – kapalina, ale i pevná látka – plyn. Při pěnové analýze dochází k sorpčním jevům v systému plyn – kapalina.¹⁰ Při adsorpční chromatografii se nejčastěji jako stacionární fáze používá silikagel, uhličitán vápenatý (CaCO_3), oxid hlinitý (Al_2O_3), aktivní uhlí nebo hydroxylapatit. Forma provedení je buď sloupcová nebo tenkovrstvá.⁹

Afinitní chromatografie je diskutovanou metodou už jen díky svému označení „chromatografie“, neboť je otázkou, zda jde o chromatografii jako takovou. Pro celý proces je příznačná probíhající selektivní sorpce a desorpce.¹⁰ Afinitní chromatografie je charakteristická biochemickými interakcemi látek. Jedná se například o interakce enzym – substrát a protilátka – antigen. Substrát nebo antigen se naváže na sorbent, jímž se následně naplní sloupec. V průběhu vymývání sloupce dochází k průběžnému vymývání

enzymu či protilátky z kolony. Tato metoda se používá v biochemii například k vymývání protilátek, které jsou obsaženy v krevním séru.⁹

Gelová chromatografie se nejčastěji používá v chemii preparativní. Využití stejně jako u afinitní chromatografie je nejčastější v biochemii, zde konkrétně v souvislosti s biopolymery. K dělení látek dochází na základě velikosti jednotlivých molekul. Pórovitý gel neboli molekulové síto zadržuje malé molekuly, které se vnořují dovnitř částic gelu. Velké molekuly se naopak vymývají. Sloupcem procházejí molekuly na základě velikosti, nejprve projdou největší molekuly. Další molekuly se vymývají podle klesající velikosti. Klíčovým faktorem pro tuto chromatografii je velikost gelových pórů. Gelová chromatografie se uskutečňuje v systému, kde stacionární fází tvoří kapalina v gelu a mobilní fází je opět kapalina. Velmi užívaným typem je gelová permeační chromatografie, při které se dělí látky, jejichž molekulové hmotnosti jsou blízké. Vyrábí se různé typy gelů, nejpoužívanějšími jsou Sephadexy.⁹

Při rozdělovací chromatografii dochází k separaci látek mezi rozpouštědly, která se buď nemísí, nebo jen omezeně. Dělení je popsáno rozdělovací konstantou K , jež je odlišná jak pro každou složku obsaženou ve směsi, tak i pro rozpouštědla. Pevnou fází tvoří kapalina, jež je připevněna na inertním nosiči. Pohyblivá fáze přes fází pevnou přetéká a složky obsažené ve směsi se tak mohou mezi fázemi rozdělit.⁷ Jedna z možných a častých forem tohoto typu chromatografie je chromatografie papírová.⁹

Ionexová chromatografie je využitelná pro látky, které nesou náboj.⁹ Sorbent je uzpůsoben k tomu, aby zachytil určité ionty, které vymění za jiné, jež pošle přímo do roztoku.¹² Jedná se o reverzibilní děj, který charakterizuje rovnice $R^+A^- + B^- \leftrightarrow R^+B^- + A^-$. „ R^+A^- je měnič iontů s navázaným aniontem A^- - anex a B^- odpovídá aniontům v roztoku. Měnič kationtů – katex obsahuje záporně nabitě skupiny, které reversibilně vážou kationty.“⁷ Velkou roli hraje jak velikost náboje, tak i poloměr hydratovaného iontu, neboť ovlivňují ionty v jejich afinitě k ionexu. Při této vazbě je potřeba také počítat s působením van der Waalsových sil a s existencí polárních interakcí. Dalším aspektem je vliv pH a iontová síla, které rovněž ovlivňují síly vazeb. Chromatografii lze s úspěchem provést u látek, které mají patrné rozdíly v nábojích.^{7,9}

2.5 PLANÁRNÍ CHROMATOGRRAFIE

2.5.1 PAPIROVÁ CHROMATOGRRAFIE

Papírová chromatografie, která funguje na principu chromatografie rozdělovací, využívá papíru jako nosiče stacionární fáze. V laboratorní praxi se používá papír chromatografický nebo také filtrační.⁸ Hydrofilní vlastnosti filtračního papíru napovídají, že voda navázaná na papíru je právě tou již zmíněnou stacionární fází, následkem čehož je možné separovat látky ve vodě rozpustné. Při separaci látek nerozpustných nebo omezeně rozpustných ve vodě je nutné přistoupit k převrácení fází. Toho se docílí jediné tak, že vlastnosti nosiče, které jsou hydrofilní, se změní na hydrofobní. Změnu je možné provést prostřednictvím acetylce papíru, kdy vzniklá acetylcelulosa, která je hydrofobní nebo impregnační papíru polárními (např. propylenglykol, formamid) nebo nepolárními rozpouštědly (parafínový olej, petrolej).^{7,13} Hlavní složkou chromatografického papíru, vyrobeného z lintersových vláken, je celulóza. Před samotným provedením chromatografie je důležité si všimnout vlastností papíru. Jak dlouho bude celý proces trvat a jak kvalitní bude výsledek, závisí na rychlosti průtoku pohyblivé fáze, jejíž pomalý průtok způsobí poměrně ostrý tvar stop. Podstatnou roli hraje také kapacita a mechanická pevnost papíru. Provést chromatografii většího množství směsi je možné díky papíru o větším průměru. Jestliže papír obsahuje stopové nečistoty, mohou se projevit jejich rušivé vlivy během detekce nebo mohou směs látek navazovat na sebe. Celý proces dělení se uskutečňuje na principu Nernstova rozdělovacího zákona a je určen distribuční konstantou K_D . Složky směsi, jejichž K_D je menší než 1 se pohybují pomaleji než složky s K_D větší než 1.^{cit 13} Konečná identifikace látek ve směsi se uskutečňuje pomocí retardačního faktoru R_F .⁷

Papírová chromatografie se často uskutečňuje jako chromatografie kruhová, kdy se chromatografovaná látka nanáší v kružnici kolem středu papírového čtverce nebo kruhu. Rozpouštědlo je přiváděno knotem, který vede do středu papíru. Zajímavým jevem, jehož příčinou je difúze, je rozšiřování pruhů chromatografované látky směrem k okraji papíru (viz obr. 2). Výhodou kruhové chromatografie je lepší separace látek než při klasickém lineárním uspořádání.¹⁴



Obrázek 2: rozšiřující se pruhy látek směrem k okrajům papíru

2.5.2 TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE (TLC)

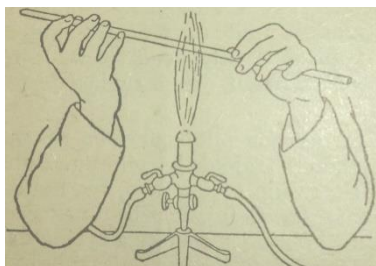
Na rozdíl od papírové chromatografie protéká pohyblivá fáze tenkou vrstvou stacionární fáze.⁸ Tenkou vrstvu tvoří jemnozrnný sorbent (např. silikagel nebo oxid hlinitý) nanesený na podložce, kterou může být například skleněná destička, hliníková nebo plastová fólie.^{8, 11, 13} Při chromatografii kyselějších látek je výhodnější použít silikagel než oxid hlinitý, který je lepší pro zásadité směsi.¹⁵ Ve většině případů se tenkovrstvá chromatografie uskutečňuje jako chromatografie adsorpční, během níž je sorbent, představující stacionární fázi, na podložce volně nasypáný nebo již fixovaný pomocí pojiva (škrob nebo sádra). Pojivo má vliv jak na samotný separační proces, tak i na následnou detekci. I přesto se fixované vrstvy hlavně díky snadnější manipulaci těší častějšímu využití než vrstvy sypané. Lité vrstvy je možné vyrobit i v běžných laboratorních podmínkách tak, že se rozmíchá silikagel s vodou, čímž se získá suspenze, která je následně nalita na skleněnou desku vyskládanou podložními sklíčky. Suspenzi je nutné za pomoci upravené skleněné tyčinky rovnoměrně rozprostřít po celé ploše desky. Dalším krokem je schnutí. Hliníkové a plastové fólie s fixovanými vrstvami je možné zakoupit, příkladem je Silufol (vrstva silikagelu na hliníkové fólii) hojně využívaný v experimentální části práce. Sypané vrstvy, jejichž nevýhodou oproti fixovaným vrstvám je horší manipulace a také separace látek, se připravují rozprostřením sorbentu po podložce. Výhodou sypaných vrstev je jejich využití při plánování dělení látek kolonovou chromatografií. Je možné, aby stacionární fáze byla zakotvená přímo na nosiči, potom však jde o chromatografii rozdělovací. S materiálem se specifickými vlastnostmi lze též dosáhnout síťového efektu nebo mechanismu, který je založen na výměně iontů.⁸

Tenkovrstvou chromatografií lze rozdělit na dva typy podle provedení a to na chromatografii analytickou a preparativní. Preparativní tenkovrstvá chromatografie, která

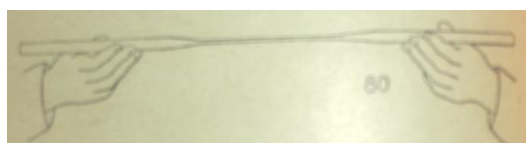
může proběhnout na vrstvách dosahujících maximální výšky 3 mm, se využívá při separacích velkých množství látek. Analytická tenkovrstvá chromatografie, jejíž výhodou je bezesporu malá velikost potřebného zařízení, je realizována při menších množství látek.⁸

Použití TLC se doporučuje v případech jako je posuzování čistoty určité látky, ověřování správného průběhu reakce, popřípadě ověření správného výběru rozpouštědla pro preparativní TLC nebo sloupcovou chromatografii.⁸

Vzorek se nanáší na start v blízkosti dolního okraje destičky pomocí tenké kapiláry.^{8,11} Vzhledem k tomu, že nanášený vzorek nesmí být příliš koncentrovaný, je často potřeba jej zředit vhodným rozpouštědlem. Příliš koncentrovaný vzorek je příčinou špatné separace látek (viz obr. 88).¹⁵ Kapiláry na nanesení vzorku lze zhotovit vytáhnutím skleněné trubičky. Skleněná trubička se nahřívá nad plamenem kahanu do té doby než sklo změkne a poté se vytáhne do kapiláry o požadovaném průměru (viz obr. 3, 4).¹⁶ Nutno podotknout, že k vytahování kapilár je potřeba jistá dávka praxe.



Obrázek 3: nahřívání skleněné trubičky nad kahanem (převzato z literatury¹⁶)



Obrázek 4: vytáhnutí kapiláry (převzato z literatury¹⁶)

Jakmile se odpaří rozpouštědlo z naneseného vzorku, tak se chromatografická destička ponoří v téměř vertikální poloze (v případě fixovaných vrstev) nebo v šikmé poloze (v případě sypaných vrstev) do rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel, které představují mobilní fázi. Chromatografie se realizuje v zakryté chromatografické komoře (viz obr. 5). Zakryté proto, aby chromatografie probíhala v atmosféře naplněné parami rozpouštědla, a nedošlo tak k deformacím skvrn.^{8,11} Během vzlínání, které se uskutečňuje díky kapilárnímu efektu, se jednotlivé složky dělí na základě R_f . Po chromatografické destičce urazí složky směsi různé vzdálenosti, což má za následek dělení látky na její

jednotlivé složky. Pohyb látky po chromatografické destičce závisí na absorpční kapacitě pevné fáze jak pro rozpouštědlo, tak i pro rozpuštěnou látku. Je důležité vzít v potaz rozpustnost směsi látek v rozpouštědlu.¹¹ Proces se ukončuje vyjmutím destičky z komory. Destička musí být vyjmuta ještě před tím, než čelo rozpouštědla dosáhne okraje destičky. Poté se přistupuje k dalšímu kroku a tím je detekce nebo rovnou vyhodnocení chromatogramu.⁸

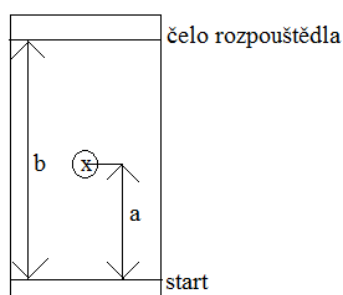


Obrázek 5: vyvíjení látek na fixované vrstvě adsorbentu v chromatografické komoře

Jestliže je provedena chromatografie s bezbarvými látkami, je potřeba provést detekci, aby samotné vyhodnocení bylo možné.⁸ Detekce probíhá postříkáním destičky roztokem, se kterým chromatografovaná látka tvoří barevné sloučeniny. V případě, že chromatografovanými látkami jsou barviva, lze tento krok přeskočit, neboť se rovnou oddělí barevné složky směsi.¹¹ Další možností detekce je pomocí UV světla. Tato možnost využívá přítomnosti fluorescenčního indikátoru v adsorbentu. Po ozáření destičky UV světlem ztmavnou stopy, které absorbují v UV oblasti. Vzhledem ke světlému pozadí je možné následné vyhodnocení chromatogramu. Jestliže se nejedná o látky absorbující záření v UV oblasti, pak je nutné chromatogram postříkat roztokem morinu a po vysušení provést vyhodnocení ozářením chromatogramu UV lampou. Jako detekce se dá v některých případech použít i postřík kyselinou sírovou a následné vypálení na vařiči, kdy dojde ke ztmavnutí stop. Tato varianta je možná, pokud je chromatografická destička tvořena vrstvou oxidu hlinitého nebo silikagelu. Velmi podstatnou roli zde hraje také pojivo. Škrob jako pojivo není vhodný, protože by během vypalování na vařiči došlo ke ztmavnutí po celé ploše destičky. Tomuto jevu nepodléhá například sádra.⁸

Při vyhodnocení chromatogramu se identifikují složky směsi, které se dělí na základě svého R_F . Hodnota R_F se vypočítá podle rovnice:

$R_F = \frac{a}{b} = \frac{\text{vzdálenost start–střed skvrny}}{\text{vzdálenost start–čelo rozpouštědla}}$ (viz obr. 6). Z rovnice vyplývá, že hodnota R_F se pohybuje v rozmezí od nuly do jedné. Čím je hodnota R_F blíže nule, tím blíže startu se skvrna nachází a naopak. Pokud se hodnota R_F vynásobí stem, jedná se pak o hodnotu hR_F . Jestliže není možné zjistit přesně střed skvrny a je nutné přistoupit k měření jejích okrajů, je potřeba tuto skutečnost zaznamenat do protokolu.¹³ Častým postupem při identifikaci je vyvíjení směsi látek a standardu naneseného na chromatografické destičce vedle směsi. Následuje porovnání R_F látek.¹¹



Obrázek 6: vizualizace výpočtu R_F ¹², (x = stopa látky)

2.5.2.1 Výběr vhodné mobilní fáze pro TLC

V průběhu chromatografie urazí složky látek různou vzdálenost. Tato skutečnost závisí nejen na polaritě dané látky, ale také na polaritě mobilní fáze, kterou představuje rozpouštědlo anebo směs rozpouštědel. Při použití polárnějších rozpouštědel se složky směsi pohybují rychleji směrem dopředu a uražené vzdálenosti jsou tím pádem větší. Dalším důležitým aspektem je rozpustnost látky v použitém rozpouštědlu.¹⁵ V průběhu chromatografického dělení dochází ke styku adsorbentu a rozpouštědla, které adsorbent také adsorbuje, přičemž rozpouštědla o vysoké polaritě jsou adsorbována pevněji. Složky směsi, kterou máme v úmyslu dělit, by neměly být adsorbovány příliš moc ani málo, platí zde pravidlo zlaté střední cesty.¹⁷ Při výběru rozpouštědel je možné se řídit doporučeními v literatuře anebo je lze volit na základě vlastních zkušeností při práci v laboratoři.^{8,15} Každá směs látek je unikátní a z toho důvodu je také unikátní výběr rozpouštědel. Tento výběr není vůbec snadný a často probíhá na základě metody pokus – omyl.¹⁵

Bezmyšlenkovitému zkoušení rozpouštědel lze předejít díky tzv. eluotropické řadě, ve které jsou rozpouštědla seřazena na základě klesající relativní permitivity. Na začátku řady se nachází rozpouštědla, která mají velkou polaritu a lépe se v nich rozpouští polárnější látky. Zatímco na konci řady se vyskytují rozpouštědla nepolární, která jsou

využívána při chromatografii nepolárních látek.⁸ V této práci je uvedena eluotropická řada sestavená Trappem:¹⁷

Voda
Methanol
Ethanol
Propanol
Ethylacetát
Ethylether
Chloroform
Methylenchlorid
Benzen
Toluen
Trichlorethylen
Chlorid uhličitý
Cyklohexan
Hexan

↓
klesající polarita
klesající relativní permitivita

Nutno podotknout, že na začátku řady stojí velmi dobré eluenty, k nimž se však také řadí kyselina octová nebo pyridin. Pro běžnou potřebu se užívá i tzv. zkrácených eluotropických řad:¹⁷

ethanol
ethylether
benzen
petrolether

Přestože jsou rozpouštědla v eluotropické řadě sestupně seřazena, pořád mezi nimi existují rozdíly. Důvod, proč se často volí použití směsi rozpouštědel namísto jednoho, je právě snaha tyto rozdíly zmenšit.¹⁷ Během míchání směsí je dobré mít na paměti, že větší vliv na vlastnosti pohyblivé fáze má vložení polárnějšího rozpouštědla do směsi než naopak.⁹ Pokud však složky směsi mají minimální rozdíly v R_F , pak přidávání polárnějších rozpouštědel bude spíše na úkor kvality výsledků chromatografie. Tento problém se řeší tzv. vícenásobnou elucí, kdy se nechá chromatografická destička s nanesenými vzorky vyvíjet a po uschnutí se vyvíjení i několikrát opakuje (viz kap. 3.6.3).¹⁷

2.5.2.2 Dvojrozměrná TLC

Dvojrozměrná neboli dvoudimenzionální chromatografie je typická tím, že se nejprve nechá vyvíjet chromatografická deska v určitém rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel a po usušení se přetočená o 90° nechá vyvíjet v jiném systému

rozpouštědel.^{7,15} Tato metoda se používá tehdy, jestliže v jednom směru vytvořená stopa obsahuje více složek, které však v jiné soustavě rozpouštědel vykazují odlišné hodnoty R_F .⁷ Použití takového uspořádání je typické pro dělení peptidů nebo aminokyselin (viz kap. 3.6.2). Dvojměrná chromatografie se nemusí týkat pouze TLC, běžná je i u chromatografie papírové.¹⁴

2.6 SLOUPCOVÁ CHROMATOGRAFIE

Fázi stacionární tvoří látka, která je vložena do kovové či skleněné trubice. Na vzniklý sloupec je nanesen vzorek, který se dělí vlivem průtoku mobilní fáze, jež způsobí pohyb jednotlivých složek směsi. Náplň kolony je závislá na složení chromatografované směsi, příkladem může být silikagel nebo oxid hlinitý. Naplnit kolonu lze běžně v laboratoři nebo je též možné ji zakoupit, což je běžně využíváno zejména pro vysokotlakou chromatografii (HPLC), neboť kvalitní separace látek je závislá na správné technice naplnění.⁷ V souvislosti se sloupcovou chromatografií je důležité objasnění několika pojmů jako je eluční objem, eluční čas, skutečný eluční objem a mrtvý objem. Eluční objem V_R nebo také eluční čas t_R se rovná celkovému objemu pohyblivé fáze, která proteče sloupcem v časovém rozmezí od nanesení vzorku po skončení chromatografie. Eluční objem je dán součtem skutečného elučního objemu a mrtvého objemu: $V_R = V_R' + V_M$. Mrtvý objem je možné určit experimentálně a to tak, že se na sloupec nanese inertní látka, která ničím nezadržována prochází sloupcem. Její výsledný eluční objem odpovídá mrtvému objemu. Z rovnice vyplývá, že skutečný eluční objem se získá rozdílem elučního a mrtvého objemu.⁹

V této práci je uvedena chromatografie na křídě jako typ sloupcové chromatografie (viz kap. 3.1.1 a kap. 3.5.3).

2.7 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

I když se s plynovou chromatografií během výuky na základních a středních školách setkáme minimálně, jedná se o chromatografickou metodu se širokým uplatněním v analytické chemii, proto je dobré její podstatu znát. Používá se například v potravinářství, petrochemickém průmyslu ale i k analýzám v oblasti životního prostředí.¹²

Plynová chromatografie se liší od kapalně především mobilní fází, kterou je v tomto případě nosný plyn (žárovkový dusík, argon, helium nebo elektrolytický vodík). Chromatografie se odehrává v častějším systému plyn – kapalina nebo v méně častém plyn – pevná látka. Adsorbentem může být například aktivní uhlí, silikagel, grafitické saze nebo alumina. Nejčastější použití plynové chromatografie je v kombinaci s dalšími analytickými metodami, jako je infračervená spektroskopie nebo hmotnostní spektrometrie. Tato metoda nachází využití nejen v separaci látek, ale také v měření různých veličin například bodu varu, aktivních koeficientů nebo tlaku par. Velkou výhodou inertního plynu je jeho malá viskozita a dobrá stlačitelnost. Je to právě stlačitelnost, která plynovou chromatografii odlišuje od kapalinové, neboť průtok mobilní fáze je rozdílný.¹² Rychlost průtoku je příčinou rychlosti pohybu složek směsi kolonou, kde dochází k separaci látek.^{10,12} Materiálem na výrobu kolon pro chromatografii je sklo nebo používanější nerezová ocel. Třetí možností je teflon, jestliže předchozí dvě možnosti nejsou pro chromatografii vyhovující.¹⁰

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 CHROMATOGRRAFIE FIXŮ

3.1.1 CHROMATOGRRAFIE NA KŘÍDĚ

Jedná se o modifikaci sloupcové chromatografie, kde chromatografický sloupec tvoří školní křída (CaCO_3) a postup mobilní fáze je tvořen vzlínáním podobně jako u chromatografie tenkovrstvé.

Chemikálie: ethanol

Pomůcky: křída, kádinky, fixy (hnědá, černá, modrá, zelená – Koh-I-Noor Hardtmuth), pravítko

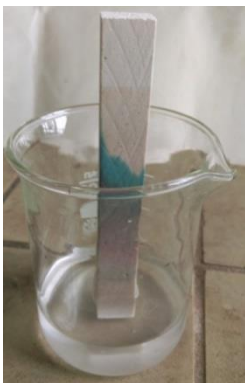
Předpokládaná doba trvání: 10 minut

Nejprve jsem namalovala na bílou křídu pruh hnědou fixou 2 cm od okraje křídy. Poté jsem do kádinky o objemu 100 ml nalila ethanol tak, aby jeho hladina byla ve výšce 1,5 cm ode dna. Křídu jsem postavila do kádinky s ethanolem a nechala jsem vzlínat rozpouštědlo po křídě. Pozorovala jsem, jak se rozkládá hnědá barva na jednotlivé barvy, které jsou v ní obsaženy (viz obr. 7).¹⁸



Obrázek 7: dělení barev v hnědém fixu (Koh-I-Noor Hardtmuth)

Dále jsem si vzala jinou křídu a namalovala jsem na ní pruhy: z jedné strany černou fixou (viz obr. 8), z druhé strany hnědou fixou, ze třetí strany modrou fixou (viz obr. 9) a ze čtvrté strany zelenou fixou (viz obr. 10). Dále jsem pokračovala stejným způsobem jako v předchozím pokusu.¹⁸



Obrázek 8: dělení barev v černém fixu (Koh-I-Noor Hardtmuth)



Obrázek 9: dělení barev v modrém fixu (Koh-I-Noor Hardtmuth)



Obrázek 10: dělení barev v zeleném fixu (Koh-I-Noor Hardtmuth)

Vzniklé barvy po rozdělení barevných fixů s použitím ethanolu byly následující: hnědý fix - oranžová, růžová, fialová a modrá barva; černý fix - růžová, fialová a modrá barva; modrý fix - modrá a růžová barva; zelený fix – zelená a modrá barva (viz obr. č. 7 až 10).

V dalším experimentu jsem vyměnila barevné fixy za černé a porovnávala jsem fixy od dvou různých výrobců – Centropen a Koh-I-Noor Hardtmuth. Opět jsem fixami namalovala pruhy, každý z jedné strany křídly. Pozorovala jsem vztlínání ethanolu po křídě a dělení barev.



Obrázek 11: dělení barev v černém fixu (Centropen)



Obrázek 12: dělení barev v černém fixu (Koh-I-Noor Hardtmuth)

Černý fix (Centropen) se rozdělil na tmavě modrou, žlutou a světle modrou (viz obr. 11). Druhý černý fix (Koh-I-Noor Hardtmuth) se rozdělil na růžovou, fialovou a modrou (viz obr. 12). Tímto pokusem jsem tedy dokázala, že ačkoliv se jedná o dvě černé fixy, tak jejich složení není stejné.

3.1.1.1 Porovnání výsledků dělení za použití různých rozpouštědel: voda, methanol, ethanol, aceton

Chemikálie: voda, methanol, ethanol, aceton

I v tomto případě je postup shodný jako v předchozích případech (viz kap. 3.1.1), co se však mění, jsou použítá rozpouštědla. Nejprve jsem použila jako rozpouštědlo vodu. Porovnávala jsem dělení dvou černých fixů od různých výrobců, opět značky Centropen a Koh-I-Noor Hardtmuth.¹⁹

Po použití vody jsem pokračovala dalšími rozpouštědly. Jako předlohu jsem si vzala eluotropní řadu, proto jsem pokračovala methanolem, ethanolem a poté až acetonem.¹⁹



Obrázek 13: černý fix Centropen (použitá rozpouštědla zleva: voda, methanol, ethanol, aceton)



Obrázek 14: černý fix Koh-I-Noor Hardmuth (použitá rozpouštědla zleva: voda, methanol, ethanol, aceton)

Při závěrečném porovnání dělení barev za použití různých rozpouštědel doporučuji používat ethanol. Pokud není možné použít ethanol, lze použít vodu, ale výsledné barvy nebudou tak zřetelné. I přesto se však domnívám, že jako důkaz dělení barev černého fixu je voda dostačujícím vyvíjecím činidlem.

Použití methanolu pro tento pokus nedoporučuji. Nejenže jeho použití je na školách z hlediska legislativy problematické, ale také barvy nejsou tak zřetelné jako v případě použití ethanolu. Proto mi připadá poměrně zbytečné používat problematický methanol, pokud je ethanol k dispozici. Použití vidím jako přínosné v případě, že bych chtěla žákům ukázat výsledky dělení za použití různých rozpouštědel. Potom však pokus s methanolem je nutné provést jako pokus demonstrační.

Aceton pro tento experiment není vhodný, protože látky zůstávají při dělení prakticky na startu. Z toho vyplývá, že je potřeba použít polárnější rozpouštědlo jako je například mnou již doporučený ethanol.

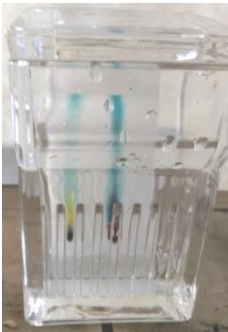
3.1.2 PAPIROVÁ CHROMATOGRAFIE

Chemikálie: ethanol, aceton

Pomůcky: chromatografická komora, 2 filtrační papíry (3,9 x 8,5 cm), kancelářské sponky, 2 různé černé fixy (Centropen a Koh-I-Noor Hardtmuth), pravítko, nůžky

Předpokládaná doba trvání: 10 - 15 minut

Na první filtrační papír jsem namalovala dvěma různými černými fixami tečky, asi 2 cm od okraje papíru. Na druhý filtrační papír jsem tento postup zopakovala, ale tento papír jsem srolovala do ruličky a zajistila na obou koncích kancelářskými sponkami. Do chromatografické komory jsem nalila ethanol do výšky 1,5 cm a vložila jsem do ní papír, uzavřela jsem komoru a nechala jsem rozpouštědlo vzlínat (viz obr. 15). Když čelo rozpouštědla dosáhlo výšky asi 1 cm od horního okraje, proužek filtračního papíru jsem vyjmula. U obou filtračních papírů jsem provedla stejný postup.²⁰



Obrázek 15: vyvíjení v chromatografické komoře



Obrázek 16: zleva: černý fix Centropen, černý fix Koh-I-Noor Hardtmuth



Obrázek 17: zleva: černý fix Koh-I-Noor Hardtmuth, černý fix Centropen; filtrační papír byl při vyvíjení srolovaný do ruličky

Když jsem provedla chromatografii na křídě s použitím acetonu (viz kap. 3.1.1.1), tak látky zůstaly na startu. Proto, když jsem prováděla chromatografii na filtračním papíru, rozhodla jsem se, že vedle ethanolu (viz obr. 16, 17) použiji také aceton (viz obr. 18). Výsledky chromatografie totiž závisí nejen na volbě rozpouštědla, ale také na volbě stacionární fáze.



Obrázek 18: použití acetonu jako rozpouštědla (zleva: černý fix Centropen, černý fix Koh-I-Noor Hardtmuth)

Při pozorování bylo zjištěno, že vyvíjení probíhalo rychleji na filtračním papíře, který byl předtím srolovaný do ruličky (viz obr. 17). Tvar stopy byl také jiný, proto i tímto pokusem si mohou žáci vyzkoušet, jak se bude tvar stopy měnit v závislosti na uspořádání filtračního papíru. Výhodou je, že výsledný chromatogram si mohou žáci nalepit do sešitu, barvy i po několika týdnech zůstanou stejné.

Při tomto pokusu jsem sice využila možnosti vyvíjení v chromatografické komoře, ale postačí i jiná nádoba, kterou je možné přikrýt sklíčkem nebo jiným víkem. Důležité je, aby otvor byl zakryt.

Ačkoliv v návodu je doporučováno jako rozpouštědlo použít vodu, methanol nebo aceton²⁰, doporučuji jednoznačně ethanol, i když v návodu uveden není. Jak je patrné již na obrázku (viz obr. 18), při použití acetonu látky zůstaly na startu. Dobré zkušenosti s ethanolem jsem již měla u chromatografie na křídě (viz kap. 3.1.1), proto jsem tuto

zkušenost aplikovala i při použití filtračního papíru. Upozorňuji na to, že rozpouštědlo je nutné vybírat také v závislosti na výrobci fixu. Pak je možné, že při jiném zastoupení barevných složek může být vhodným rozpouštědlem i aceton.

3.1.3 CHROMATOGRAFIE NA SILUFOLU

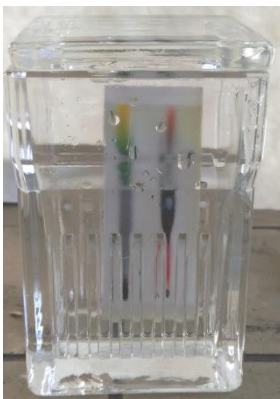
Chromatografie na silufolu je nejčastěji popisovaný způsob tenkovrstvé chromatografie.

Chemikálie: ethanol

Pomůcky: chromatografická komora, silufol (7,6 x 3 cm), 2 různé černé fixy (Centropen a Koh-I-Noor Hardtmuth), pravítko, nůžky

Předpokládaná doba trvání: 10 - 15 minut

Postup v tomto pokusu je obdobný jako postup při chromatografii na filtračním papíru (viz kap. 3.1.2). Na destičku silufolu jsem namalovala dvěma různými černými fixami tečky, asi 1 cm od kraje destičky. Destičku silufolu jsem vložila do chromatografické komory s ethanolem, komoru jsem uzavřela a rozpouštědlo jsem nechala vzlínat (viz obr. 19). Pozorovala jsem, jak se černé fixy rozkládají na jednotlivé barvy (viz obr. 20).²⁰



Obrázek 19: vyvíjení v chromatografické komoře



Obrázek 20: zleva: černý fix Centropen, černý fix Koh-I-Noor Hardtmuth

Nezávisle na pokusu z učebnice, kterým jsem se původně inspirovala²⁰, jsem se rozhodla k použití ethanolu, s nímž jsem již měla dobré zkušenosti. V porovnání s filtračním papírem (viz kap. 3.1.2) nebo s křídou (viz kap. 3.1.1) byla provedená chromatografie vidět nejlépe právě na silufolu. Proužek silufolu si mohou studenti nalepit do sešitu. Výsledek chromatografie je dobře vidět i po několika týdnech.

3.1.4 CHROMATOGRAFIE NA KRUHOVÉM FILTRAČNÍM PAPÍRU

Chemikálie: ethanol

Pomůcky: Petriho miska, fixy (hnědá, černá, modrá, zelená – Koh-I-Noor Hardtmuth), pravítko, nůžky, kruhový filtrační papír ($r = 4,5$ cm), nůžky, tužka, kružítko

Předpokládaná doba trvání: 10 - 15 minut

Ve středu kruhového filtračního papíru jsem vystříhla díрку tak velkou, abych mohla protáhnout dírkou do ruličky stočený a zmáčkнутý filtrační papír, který mi posloužil jako knot. Našla jsem si takový kruhový filtrační papír, který byl větší než Petriho miska. Asi 1,5 cm od dírky jsem nakreslila tužkou kružnici, na kružnici jsem namalovala fixami tečky (viz obr. 21) popřípadě čárky (viz obr. 22), kdy každá barva zaujímala asi $\frac{1}{4}$ kružnice. Ethanol jsem nalila do Petriho misky do výšky 0,5 cm. Kruhový filtrační papír s provlečeným knotem jsem položila na Petriho misku. Je nutné, aby knot byl ponořen do rozpouštědla, protože rozpouštědlo vzlíná právě po knotu. Když rozpouštědlo dosáhlo obvodu Petriho misky, papír jsem vyjmula a dala usušit.¹⁹



Obrázek 21: fixy jsou nanášeny v bodech



Obrázek 22 fixy nanesené ve formě čar

Protože jsem pracovala s filtračním papírem, jako tomu již bylo (viz kap. 3.1.2) a osvědčil se mi ethanol jako rozpouštědlo, provedla jsem pokus právě s ním, ačkoliv v návodu byla uvedena jak vyvíjecí činidlo voda.¹⁹

Kružnici okolo středu jsem sice udělala tužkou, ovšem v ideálním případě by bylo lepší kružítko, výsledný kruh by byl zajisté přesnější. Fixou je lepší spíše dělat čárky než pouze body, výsledek je efektnější a připomíná duhu, proto se zde nabízí možnost mezipředmětového vztahu. Chromatogram lze dále použít například ve výtvarné výchově.

3.1.5 CHROMATOGRRAFIE NA PRUHU BAVLNĚNÉ LÁTKY

Předpokládaná doba trvání: 10 – 15 minut

Při dělení barviv, které jsou obsaženy ve fixách, není nutné se orientovat pouze na běžné chromatografické materiály. Chromatografii je možné provést také na pruhu bavlněné bílé látky. K provedení pokusu jsem použila pruh bílé látky, kádinku a jako rozpouštědlo ethanol a vodu. Upozorňuji však na to, že je potřeba látku vhodně uchytit, aby nespadla do rozpouštědla.



Obrázek 23: zelený fix (Koh-I-Noor Hardtmuth) – rozpouštědlo: ethanol



Obrázek 24: černý fix (Koh-I-Noor Hardtmuth) – rozpouštědlo: ethanol



Obrázek 25: hnědý fix (Koh-I-Noor Hardtmuth) – rozpouštědlo: ethanol



Obrázek 26: černý fix (Koh-I-Noor Hardtmuth) – rozpouštědlo: voda

Z vyzkoušených rozpouštědel doporučuji ethanol (viz obr. 23, 24, 25), barvy jsou daleko zřetelnější a lze uvažovat i o dalším použití výsledného chromatogramu například v hodinách výtvarné výchovy. Ovšem i při použití vody (viz obr. 26) k dělení došlo, proto i toto rozpouštědlo je možné doporučit, zvláště v případě mladších žáků, kde je žádoucí se vyhnout použití ethanolu.

Domnívám se, že pro žáky bude zajímavá propojenost s praxí. Je totiž patrné, co se stane, pokud si žák omylem pomaluje oblečení fixem a pak se jej snaží odstranit vodou. Výsledkem je vytvoření různobarevné mapy.

3.1.6 CHROMATOGRAFIE NA KÁVOVÝCH FILTRECH SPOJENÁ S VÝROBOU MOTÝLŮ

Pomůcky: kádinky (popř. skleničky nebo kelímky), fixy (hnědá, černá, modrá, zelená – Koh-I-Noor Hardtmuth), nůžky, bílé kávové filtry, plyšové drátky, provázek

Předpokládaná doba trvání: 20 minut (nutné počítat se sušením)

Nejdříve jsem si vzala bílý kávový filtr, jehož rohy jsem nůžkami zastříhla dokulata, aby motýl měl ve výsledku kulatá křídla. Filtr jsem dále rozstříhla i podélně z obou stran, aby bylo možné jej rozložit a doprostřed nakreslit kruh fixou jedné barvy. Po nakreslení kružnice okolo středu jsem jej zpátky přeložila do původního stavu a poté ještě jednou podélně napůl. Takto jsem jej vložila do skleničky s vodou, aby nebyla kružnice namalovaná fixou ponořena ve vodě. Nechala jsem vzlínat rozpouštědlo, poté jsem filtr vyjmula a nechala jsem jej usušit.²¹

Druhou fází úkolu bylo vytvoření motýla. Usušený filtr jsem rozložila a ve středu jsem jej zmáčkla a zafixovala plyšovým drátkem, který jsem vytvarovala do tvaru tykadel. Motýlka jsem ve středu zavěsila na provázek.²¹ Celý postup práce je patrný z obrázků (viz obr. 27 až 31).



Obrázek 27: modrý fix



Obrázek 28: zelený fix



Obrázek 29: černý fix



Obrázek 30: hnědý fix



Obrázek 31: motýli zavěšení na provázcích

Za velkou výhodou považují skutečnost, že tento pokus lze využít i v případě, že žáci nemají chemii. Například jej lze implementovat do hodin výtvarné výchovy už na prvním stupni základní školy. Žáci tak hravou formou poznávají rozdělování látek již v tak nízkém věku. K tomuto pokusu není zapotřebí ani laboratoře, lze jej s úspěchem provést i doma, tudíž tento pokus nemusí být inspirací pouze pro učitele, ale také pro rodiče. Pokud jsou děti malé a nechceme použít sklo, lze skleničku vyměnit za plastový kelímek a vyvíjení může proběhnout i v něm.

Organizaci je možné přizpůsobit časovým podmínkám, které jsou k dispozici. To znamená, že žáci mohou buď vyrábět několik motýlků každý samostatně anebo každý žák může vyrobit jednoho motýlka jinou fixou. Po skončení úkolu je možné motýlky pověsit na nástěnku, barvy zůstanou stejné po dlouhou dobu.

3.2 CHROMATOGRAFIE INKOSTŮ DO PLNÍCÍCH PER

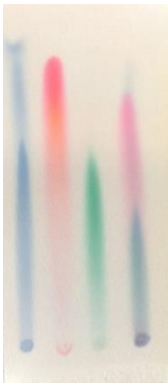
Chemikálie: destilovaná voda, ethanol, inkousty do plnicích per (modrá, červená a zelená barva - Koh-i-noor Hardtmuth)

Pomůcky: kapiláry, chromatografická komora, silufol, filtrační papír, nůžky, pipety, pipetovací balónek

Předpokládaná doba trvání: 20 minut

V tohoto pokusu jsem se inspirovala minulostí, konkrétně dobou, kdy se chromatografická analýza inkoustů využívala v kriminalistice. Tuto metodu popsal poprvé v roce 1951 Dr. Souder na konferenci International Association for Identification. Metoda byla založena na skutečnosti, že jeden inkoust je složen z více barviv. Proto jsem nejdříve udělala chromatografii modrého inkoustu, k rozložení na jednotlivá barviva ovšem nedošlo, tudíž jsem pokus modifikovala.²²

Pomocí kapilár jsem nanesla jednotlivé barvy inkoustů (modrá, červená a zelená barva) a jejich směs v poměru 1 : 1 : 1 na start destičky silufolu a také na pruh filtračního papíru. Destičku jsem nechala vyvíjet v chromatografické komoře. Jako vyvíjecí činidlo jsem použila destilovanou vodu (viz obr. 32, 33).²²

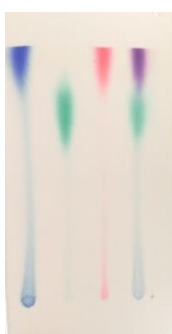


Obrázek 32: výsledný chromatogram – silufol (zleva: modrá, červená a zelená barva, směs barev)



Obrázek 33: výsledný chromatogram – filtrační papír (zleva: červená, zelená a modrá barva, směs barev)

Na výsledném chromatogramu, zejména při použití silufolu (viz obr. 32), je patrné, že ve směsi lze s určitostí identifikovat modrou a červenou barvu, zelenou nikoliv. Z toho důvodu jsem se rozhodla změnit rozpouštědlo, při jehož výběru jsem se řídila eluotropní řadou. Záměrně jsem nepoužila v řadě následující methanol vzhledem k jeho problematickosti použití na školách. Jako vyvíjecí činidlo jsem tedy zvolila ethanol (viz obr. 34).

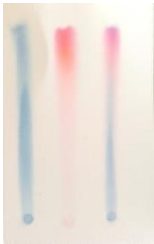


Obrázek 34: výsledný chromatogram – silufol (zleva: modrá, zelená a červená barva, směs barev)

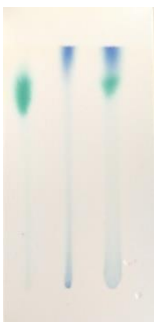
Při použití ethanolu jsem pozorovala, že ve směsi lze dobře identifikovat modrou a zelenou barvu, ovšem červenou nikoliv. Vzhledem k této skutečnosti navrhuji pracovat se směsí dvou barev místo tří a volit mezi použitím destilované vody a ethanolu vzhledem k přítomným barvám. Jestliže chceme oddělit směs barvy modré a červené (viz obr. 36) nebo směs zelené a červené barvy (viz obr. 35), postačí destilovaná voda. V případě směsi barev zelené a modré (viz obr. 37), bude nutné použít ethanol.



Obrázek 35: výsledný chromatogram – silufol (zleva: červená a zelená barva, směs barev), rozpouštědlo: destilovaná voda



Obrázek 36: výsledný chromatogram – silufol (zleva: modrá a červená barva, směs barev), rozpouštědlo: destilovaná voda



Obrázek 37: výsledný chromatogram – silufol (zleva: zelená a modrá barva, směs barev), rozpouštědlo: ethanol

Díky časové nenáročnosti a jednoduché proveditelnosti tento pokus doporučuji zařadit do běžných laboratorních cvičení ve školách. Vzhledem k tomu, že nejde pouhým okem rozeznat, jaké barvy jsou ve směsi inkoustu, nabádá toto cvičení žáky k tomu, aby zjistili, které barvy jsou přítomny. Je možné dát žákům k dispozici destilovanou vodu a ethanol, budou mít tak možnost v praxi poznat, které rozpouštědlo je více vhodné a následně v laboratorním protokolu jedno doporučit a doporučení zdůvodnit. Nabízí se žáky rozdělit do dvojic popřípadě menších skupinek a skupinkám dát různé směsi inkoustů, aby tak všichni žáci neměli stejnou směs a neměli možnost nechat se zlákat k opsání řešení od spolužáků. Učitel má tím pádem možnost kontroly, zda všichni poctivě pracovali. Práce ve dvojicích nebo skupinkách je přínosná i pro žáky z hlediska utužování vztahů, nutnosti spolupráce a rozdělení si úkolů. Vzhledem k tomu, že při nanášení vzorků je nutné pracovat s kapilárami, je potřeba žákům práci s nimi

předvést, neboť tato manipulace nemusí být ze začátku snadná. Za velkou výhodu považují, že si žáci mohou výsledné chromatogramy nalepit rovnou do sešitu, jelikož barvy neblednou.

Pro tento pokus doporučuji silufol, pokud je k dispozici, barvy jsou na něm výraznější. Na filtračním papíře jsou výsledné barvy bledší, ale je rovněž využitelný.

3.3 CHROMATOGRRAFIE SMĚSI INDIKÁTORŮ

Chemikálie: ethanol; methanol; 0,1 molární roztok hydroxidu sodného (NaOH); methyloranž, thymolftalein, methylčerveň, thymolová modř, fluorescein, univerzální indikátor Čůta – Kámen, amoniak, kyselina chlorovodíková (HCl)

Pomůcky: silufol (destičky 2,7 x 7,6 cm), kapiláry, pipety (1 ml, 2 ml), Petriho misky, kádinky, odměrné válce, analytické váhy, pipetovací balónek

Předpokládaná doba trvání: 25 minut (na 1 experiment)

3.3.1 IDENTIFIKACE METHYLORANŽE A THYMOLFTALEINU V JEJICH SMĚSI

Pro větší názornost jsem nejprve provedla chromatografii směsi dvou barviv a to methyloranže a thymolftaleinu.²³

Navázila jsem si na analytických vahách 10 mg methyloranže a 10 mg thymolftaleinu. Každé barvivo jsem rozpustila v 10 ml ethanolu. Poté jsem vytvořila směs obou barviv tak, že jsem smíchala 0,1 ml roztoku methyloranže a 0,1 ml roztoku thymolftaleinu. Na destičku silufolu jsem nanesla asi 1, 2 cm od okraje kapilárou roztok methyloranže, roztok thymolftaleinu a směs obou barviv. Nechala jsem destičku vyvíjet v chromatografické komoře tak dlouho, dokud čelo nedosáhlo výšky asi 1 cm od kraje destičky. Poté jsem ponořila destičku do par chlorovodíku (viz obr. 38) a následně do par amoniaku (viz obr. 39).²³



Obrázek 38: chromatogram po ponoření do par chlorovodíku (zleva methyloranž, thymolftalein, směs)



Obrázek 39: chromatogram po ponoření do par amoniaku (zleva methyloranž, thymolftalein, směs)



Obrázek 40: chromatogram po 1 minutě (zleva methyloranž, thymolftalein, směs)

3.3.2 IDENTIFIKACE METHYLČERVENĚ A THYMOLOVÉ MODŘI V JEJICH SMĚSI

Ve druhém pokusu, který jsem provedla stejným způsobem jako první experiment (viz kap. 3.3.1), jsem identifikovala methylčerveně a thymolovou modř v jejich směsi. Směs obsahovala roztoky obou barviv v poměru 1 : 1.²³



Obrázek 41: chromatogram po ponoření do par chlorovodíku (zleva methylčerveň, thymolová modř, směs)



Obrázek 42: chromatogram po ponoření do par amoniaku (zleva methylčerveň, thymolová modř, směs)



Obrázek 43: chromatogram po 12 minutách (zleva methylčerveň, thymolová modř, směs)

3.3.3 IDENTIFIKACE METHYLORANŽE, THYMOLOFTALEINU, METHYLČERVENĚ A THYMOLOVÉ MODŘI V JEJICH SMĚSI

Také v tomto případě jsem opakovala postup (viz kap. 3.3.1) s tím rozdílem, že jsem použila pro pokus čtyři barviva a identifikovala jsem jejich přítomnost v připravené směsi. Směs jsem získala smícháním roztoků methyloranže, thymolftaleinu, methylčerveně, thymolové modři v poměru 1 : 1 : 1 : 1. Pro tento experiment bylo nutné použít destičku silufolu o větších rozměrech (4,3 x 7,9 cm).²³



Obrázek 44: chromatogram po ponoření do par chlorovodíku (zleva methyloranž, thymolftalein, methylčerveň, thymolová modř, směs)



Obrázek 45: chromatogram po ponoření do par amoniaku (zleva methyloranž, thymolftalein, methylčerveň, thymolová modř, směs)



Obrázek 46: chromatogram po 16 minutách (zleva methyloranž, thymolftalein, methylčerveň, thymolová modř, směs)

3.3.4 IDENTIFIKACE METHYLORANŽE A FLUORESCEINU V JEJICH SMĚSI

Na destičku silufolu jsem nanesla roztok methyloranže, fluoresceinu a jejich směsi (1 : 1). Postup je analogický prvnímu pokusu (viz kap. 3.3.1).²³



Obrázek 47: chromatogram po vyjmutí z chromatografické komory (zleva methyloranž, fluorescein, jejich směs)



Obrázek 48: chromatogram po ponoření do par chlorovodíku (zleva methyloranž, fluorescein, jejich směs)



Obrázek 49: chromatogram po ponoření do par amoniaku (zleva methyloranž, fluorescein, jejich směs)

3.3.5 IDENTIFIKACE JEDNOTLIVÝCH BARVIV V UNIVERZÁLNÍM INDIKÁTORU (ČŮTA – KÁMEN)

V tomto experimentu jsem stejně jako v kapitole 3.3.3 nanesla nejdříve jednotlivá barviva, v tomto případě methyloranž, thymolftalein, thymolová modř a nakonec univerzální indikátor Čůta – Kámen (viz obr. 50 a 51). Poté jsem zkoumala, jaká barviva jsou v univerzálním indikátoru obsažena.²³



Obrázek 50: chromatogram po ponoření do par chlorovodíku (zleva methyloranž, thymolftalein, thymolová modř, univerzální indikátor Čůta – Kámen)



Obrázek 51: chromatogram po ponoření do par amoniaku (zleva methyloranž, thymolftalein, thymolová modř, univerzální indikátor Čůta – Kámen)

Vzhledem k velikosti chromatografické komory jsem na další destičku silufolu nanesla methylčerveň, fluorescein a opět univerzální indikátor Čůta – Kámen (viz obr. 52 a 53).



Obrázek 52: chromatogram po ponoření do par chlorovodíku (zleva fluorescein, methylčerveň, univerzální indikátor Čůta – Kámen)



Obrázek 53: chromatogram po ponoření do par amoniaku (zleva fluorescein, methylčerveně, univerzální indikátor Čůta – Kámen)

3.3.6 CELKOVÉ ZHODNOCENÍ

Tento experiment doporučuji pro ilustraci smyslu využití chromatografie. Žákům lze na něm názorně demonstrovat, jak je možné identifikovat složky v dané směsi. Pro využití ve vyučovací hodině bych doporučila připravit směs indikátorů a nechat žáky určovat, jaké indikátory jsou nebo naopak nejsou ve směsi obsaženy. Nedoporučuji však použít indikátor univerzální, jelikož jednotlivé složky v něm nebylo možné s jistotou určit, jak je možné vidět na obrázcích (viz obr. 50 až 53).

Zajímavým prvkem je změna barev po ponoření do par kyseliny (HCl) a následně do par zásady (NH₃). Stopy thymolftaleinu byly vidět až po ponoření do par amoniaku. Pokud bych chromatogram s thymolftaleinem a methyloranží neponořila do par amoniaku, thymolftalein by nebylo možné určit. Je potřeba ovšem myslet také na to, že skvrny rychle vyblednou. První vyblednutí jsem pozorovala dříve, než uběhla jedna minuta. V případě methylčerveně a thymolové modři došlo ke změně barev, kdy po ponoření do par kyseliny chlorovodíkové měla methylčerveň barvu sytě růžovou a thymolová modř žlutou. Po ponoření do par amoniaku žlutou barvu naopak získala methylčerveň a thymolová modř zmodrala. Po dvanácti minutách získaly všechny skvrny světle žlutou barvu.

Z časového hlediska je tento pokus proveditelný během jedné vyučovací hodiny. Například methyloranž a fluorescein je možné oddělit i sloupcovou chromatografií (viz literatura²³), ale sloupcová chromatografie trvá v rozmezí několika hodin až dní.

U tohoto experimentu je nutné si uvědomit, že methanol patří mezi toxické látky a nakládání s nimi je žákům na druhém stupni ZŠ a na nižším stupni víceletého gymnázia

zakázáno. Žáci na vyšším stupni víceletého gymnázia a čtyřletého gymnázia mohou s těmito látkami pracovat pouze v případě, pokud jsou důkladně proškoleni a pokus se odehrává pod dohledem učitele nebo jiné odpovědné osoby.²⁴ Už z tohoto důvodu bych tento pokus řadila k pokusům demonstračním.

3.4 CHROMATOGRÁFIE POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV

3.4.1 BARVIVA Z LENTILEK

Chemikálie: destilovaná voda, ethanol

Pomůcky: kruh filtračního papíru ($r = 6,25$ cm), kádinka, stříčka, Petriho misky, filtrační papír na knot, nůžky, lentilky Orion, pipety, pipetovací balónek

Předpokládaná doba trvání: 20 minut

Ve středu kruhu filtračního papíru jsem si vystříhla díрку tak, abych tudy mohla provléci knot, který jsem zhotovila rovněž z filtračního papíru, který jsem předtím pevně srolovala. Připravila jsem si kádinku, na níž jsem dala kruh, jehož knot zasahoval do vody v kádince. Rychle jsem si namočila lentilku a dala ji do středu kruhu – tam, kudy jsem provlékla knot. Když čelo rozpouštědla dosahovalo vzdálenosti asi 1 cm od okraje kruhu, kruh jsem vyjmula.²⁵

Tento pokus nemohu doporučit. Zkoušela jsem jej s různě barevnými lentilkami včetně doporučených zelených a hnědých²⁵, ale rozdělení barviv jsem u žádných nepozorovala. Proto jsem položila lentilky na filtrační papír a na každou z nich jsem kápala destilovanou vodu, lentilky jsem sejmula a papír nechala uschnout. Na filtračním papíře se objevily barevné skvrny, ale k rozdělení opět nedošlo. Přikápala jsem pomocí pipety na skvrny ethanol. Po uschnutí jsem opět přidala destilovanou vodu, nicméně výsledek byl stejný (viz obr. 54).



Obrázek 54: lentilky Orion, zleva: modrá, fialová, oranžová

V případě bonbonů lze říci, že závisí také na výrobci, avšak v návodu²⁵ je uvedeno „lentilky“, proto jsem pro experiment použila klasické lentilky Orion, které se dají běžně sehnat v supermarketech.

3.4.2 BARVY NA VAJÍČKA

Chemikálie: barvy na velikonoční vejčíčka – červená, modrá, zelená (značka OVO), destilovaná voda, chlorid sodný (NaCl)

Pomůcky: Petriho misky, chromatografická komora, kapiláry, stříčka, laboratorní lžička, analytické váhy, kádinka, pipeta, silufol, filtrační papír, nůžky, pipetovací balónek

Předpokládaná doba trvání: 20 minut (na jeden pokus)

Na jednotlivé Petriho misky jsem vysypala potravinářská barviva (zelené, modré a červené). Stříčkou jsem k barvivům přikápla několik kapek vody, abych získala roztok. Podle návodu jsem si připravila 0,5% roztok NaCl, který jsem nalila do chromatografické komory. Rozpuštěná barviva jsem za pomoci kapilár nanesla na start chromatografické destičky ze silufolu (3 x 7,6 cm) a nechala jsem odpařit rozpouštědla. Destičku jsem vložila do chromatografické komory a pozorovala jsem vyvíjení. Po vyjmutí jsem destičku nechala usušit.²⁶



Obrázek 55: výsledný chromatogram (zleva zelené barvivo, modré barvivo, červené barvivo), rozpouštědlo: 0,5% roztok NaCl

Tento pokus jsem opakovala ovšem za použití jiného rozpouštědla – destilované vody (viz obr. 56).²⁶



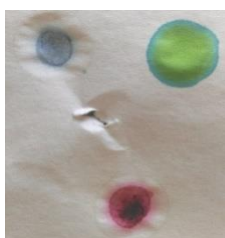
Obrázek 56: výsledný chromatogram (zleva zelené barvivo, modré barvivo, červené barvivo), rozpouštědlo: destilovaná voda

Dále jsem změnila nejen rozpouštědlo, ale také stacionární fázi. Namísto silufolu (viz obr. 55, 56) jsem zvolila kruhový filtrační papír (viz obr. 57). Ve středu kruhu filtračního papíru jsem udělala díрку, do které jsem provlekla knot zhotovený z jiného kruhu filtračního papíru. Kapilárou jsem nanasla roztoky barviv ve formě teček v kruhu 1 cm od středu papíru. Knotem jsem kruh ponořila do destilované vody a nechala jsem vzlínat rozpouštědlo, dokud čelo nedosáhlo vzdálenosti asi 2 cm od okraje kruhu.²⁶

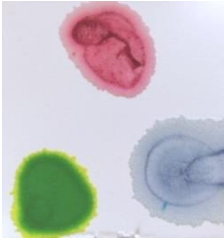


Obrázek 57: výsledný chromatogram (zleva modré barvivo, zelené barvivo, červené barvivo), rozpouštědlo: destilovaná voda

Je zajímavé si všimnout, jak velkou roli hraje při chromatografii výběr chromatografického materiálu. Roztok barviv jsem nanasla na silufol (viz obr. 59) a také na filtrační papír (viz obr. 58) bez vyvíjení. I tak dochází k dělení v případě zeleného barviva.



Obrázek 58: nanesená barviva na filtračním papíru



Obrázek 59: nanesená barviva na silufolu

Pro tento experiment jsem zvolila barvy na vajíčka, ačkoli je v původním návodu doporučováno použití lentilek nebo také gumových medvídků.²⁶ Vycházela jsem z předchozího pokusu (viz kap. 3.4.1), kde jsem ověřila, že výběr lentilek pro chromatografii není příliš šťastný. Použila jsem barvy na vajíčka značky OVO; konkrétně barvu červenou, modrou a zelenou. Jak je vidět na výsledném chromatogramu, modrá a červená barva se nedělí, což je zřejmé již po přečtení složení. Modrá barva obsahuje pouze potravinářské barvivo E132 Indigotin. Červená barva je složena také z jednoho potravinářského barviva, kterým je E122 Azorubin. Změna nastává u zelené barvy, která obsahuje potravinářská barviva E102 Tartrazin a E133 Brill. Blue FCF. Již z názvu lze vylučovací metodou odvodit, že barvivo E133 Brill. Blue FCF bude mít barvu modrou a E102 Tartrazin bude mít barvu žlutou. Právě přítomnost těchto dvou barviv jsem ověřila v provedené chromatografii. Při rozhodnutí použít jiných barev, doporučuji pečlivě číst složení, aby k dělení barev vůbec došlo.

Jako rozpouštědlo jsem použila 0,5% roztok NaCl, který je doporučován v návodu²⁶, ale také destilovanou vodu. Obě rozpouštědla lze s úspěchem použít, změnu jsem pozorovala pouze na výsledném tvaru jednotlivých stop. Při použití 0,5% roztoku NaCl je nutno počítat s časem na výpočet a přípravu tohoto roztoku.

Vzhledem k tomu, že k provedení pokusu by mělo stačit 30 minut, ve zbývající části vyučovací hodiny lze nechat žáky nanést vzorky na filtrační papír a silufol a upozornit je tak na důležitost výběru materiálu pro chromatografii.

Výsledné chromatogramy si mohou žáci nalepit do sešitu. Barvy zůstanou stejné a na rozdíl od listových barviv (viz kap. 3.5) nebo aminokyselin (viz kap. 3.6) nedojde k jejich vyblednutí.

3.5 CHROMATOGRRAFIE BARVIV V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

Vzhledem k tomu, že chromatografie listových barviv nebo spíše obecněji rostlinného materiálu je vedle chromatografie fixů nejčastěji se vyskytující pokus v učebnicích pro základní a střední školy, rozhodla jsem se provést pokusy z několika učebnic a jejich výsledky následně okomentovat.

3.5.1 POKUS Z UČEBNICE²⁷

Chemikálie: aceton, technický benzín

Pomůcky: listy špenátu, třecí miska s tloučkem, filtrační nálevka, filtrační papír, stojan, železný kruh, křížová svorka, kádinka, silufol (3 x 7,6 cm), vyvíjecí komora, kapilára, váhy, odměrný válec, nůžky

Předpokládaná doba trvání: 30 minut

Nejprve jsem si navážila 4 g špenátu a následně jsem si v odměrném válci odměřila 10 ml acetonu. Navážený špenát jsem smíchala s 10 ml acetonu ve třecí misce a třela. Vzniklou suspenzi jsem přefiltrovala přes filtrační papír. Do vyvíjecí komory jsem nalila benzín a nechala jsem nasytit komoru jeho parami. Vystříhla jsem si destičku silufolu (3 x 7,6 cm) a na destičku jsem nanasla tenkou kapilárou vzorek (tři tečky vedle sebe). Destičku silufolu s nanesenými vzorky jsem nechala vyvíjet v chromatografické komoře, dokud nedosáhlo čelo rozpouštědla výšky asi 1 cm od okraje destičky. Poté jsem nechala destičku uschnout.



Obrázek 60 výsledný chromatogram listů špenátu

V zadání je uvedeno použití zkumavky s korkovou zátkou místo chromatografické komory. Domnívám se, že místo chromatografické komory lze použít i jinou skleněnou nádobu s víkem. Tření listů špenátu s acetonem bez písku bylo značně obtížné, odkazují

proto na dále uvedené pokusy, kde byl použit mořský písek, a výsledná chromatografie byla zřetelnější. U tohoto experimentu látky zůstaly prakticky blízko startu.

Ačkoliv na konci návodu stojí, že bych měla na chromatogramu vidět barvu zelenou, modrozelenou, oranžovou a žlutou, tak byla na destičce vidět barva žlutá a zelená až modrozelená (viz obr. 60).

3.5.2 POKUS Z UČEBNICE²⁸

Chemikálie: ethanol, technický benzín, destilovaná voda

Pomůcky: listy čerstvého špenátu, písek mořský, odměrný válec, vata, třecí miska s tloučkem, filtrační nálevka, stojan, železný kruh, křížová svorka, kádinka, chromatografická komora, kapilára, silufol (3 x 7,6 cm), váhy

Předpokládaná doba trvání: 30 minut

Na vahách jsem si navážila 3,3 g čerstvých listů špenátu a 0,8 g mořského písku. Přidala jsem 7 ml ethanolu a vzniklou směs jsem třela ve třecí misce. Poté jsem směs přefiltrovala přes smotek vaty. V odměrném válci jsem namíchala směs ethanolu, vody a benzínu v poměru 10:2:5 a nalila jsem ji do chromatografické komory, aby se komora nasýtila parami. Vzorek jsem nanesla kapilárou na destičku silufolu (3 x 7,6 cm). Nanesla jsem 2 tečky vedle sebe, které jsem nechala vysušit a postup jsem opakovala třikrát, aby koncentrace vzorku na startu byla dostatečná. Po odpaření rozpouštědel jsem destičku vložila do chromatografické komory a směs rozpouštědel jsem nechala vzlínat. Dávala jsem pozor, aby čelo rozpouštědla nedosáhlo úplného okraje destičky.

V návodu nebylo uvedeno přesné množství ethanolu, se kterým se měl špenát rozetřít ve třecí misce. Na rozdíl od předchozího pokusu (viz kap. 3.5.1) byl v návodu uveden písek, díky němuž šlo tření listů špenátu daleko lépe. I když výsledek vypadá podstatně lépe než v předchozím případě (viz obr. 60), tento pokus doporučit nelze, protože rozpouštědla se nemísí a vytváří se vrstvy. Tento pokus jsem třikrát opakovala. V prvním případě (viz obr. 61) jsem jej prováděla v chromatografické komoře, kde už byly vytvořeny vrstvy a ve druhém případě jsem se snažila co nejvíce vrstvy promíchat (viz obr. 62). Ve třetím případě jsem odlila ze směsi jen část a tuto část jsem nalila do chromatografické komory (viz obr. 63).

I když pokus nedoporučuji vzhledem k nemísení se rozpouštědel, tak ve výsledku lze konstatovat, že je vidět to, co je uvedeno v návodu. To znamená, že lze zaznamenat na chromatogramu zelenou barvu, žlutou barvu i oranžovou barvu. V návodu je uvedena charakteristika jednotlivých barev. Zelená barva obsahuje chlorofyl, žlutá barva xantofyly a oranžová barva karoteny.



Obrázek 61: výsledný chromatogram (případ 1), listy špenátu, (v chromatografické komoře byly vytvořeny vrstvy rozpouštědel)



Obrázek 62: výsledný chromatogram (případ 2), listy špenátu, (vrstvy rozpouštědel jsem se snažila co nejvíce promíchat)



Obrázek 63: výsledný chromatogram (případ 3), (odlila jsem část ze směsi rozpouštědel a tuto část jsem použila pro vyvíjení destičky)

3.5.3 POKUS Z UČEBNICE¹⁸

Chemikálie: ethanol

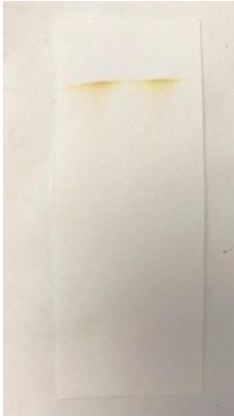
Pomůcky: listy čerstvého špenátu, písek mořský, odměrný válec, třecí miska s tloučkem, filtrační nálevka, stojan, železný kruh, křížová svorka, kádinka, chromatografická komora, kapilára, silufol (3 x 7,6 cm), váhy, nůžky, filtrační papír

Předpokládaná doba trvání: 45 minut

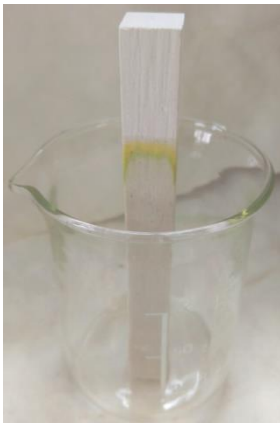
Na vahách jsem si navázila do třecí misky 3,3 g listů čerstvého špenátu s 0,8 g mořského písku. Poté jsem vzniklou směs třela se 7 ml ethanolu. Na kruh filtračního papíru jsem udělala 1,5 cm od středu tužkou kružnici, na níž jsem opakovaně nanasla kapilárou vzorek, papír jsem vždy nechala uschnout. Ve středu kruhu jsem udělala otvor, kterým jsem provlekla knot z několikrát přeloženého filtračního papíru. Dala jsem na sebe dvě Petriho misky, jedna byla o větším průměru, a dovnitř jsem nalila ethanol. Mezi Petriho misky jsem vložila kruhový filtrační papír s naneseným vzorkem tak, aby knot zasahoval do rozpouštědla a nechala jsem rozpouštědlo po knotu vzlínat. Pokus jsem opakovala také na pruhu filtračního papíru (3 x 7,6 cm) (viz obr. 65) a na křídě (viz obr. 66). Postup byl stejný s tím rozdílem, že pruh filtračního papíru jsem nechala vyvíjet v chromatografické komoře a vzorek jsem nanasla ve formě teček. Křídlo jsem nechala vyvíjet v kádince.



Obrázek 64: chromatografie na kruhovém filtračním papíru, listy špenátu



Obrázek 65: chromatografie na pruhu filtračního papíru, listy špenátu



Obrázek 66: chromatografie na křídě, listy špenátu

I když je v návodu uveden objem ethanolu, se kterým se listy mají rozetřít, tak hmotnost listů chybí. Tento pokus jsem dělala jak na filtračním papíru, tak i na křídě. Použití filtračního papíru bych nedoporučila, protože látka je unášena zároveň s čelem rozpouštědla, z tohoto důvodu by bylo vhodnější použít méně polární rozpouštědlo než ethanol. Rozdělení látky na žlutou a zelenou barvu je na filtračním papíru vidět nepatrně (viz obr. 64, 65). Na křídě je rozdělení vidět lépe (viz obr. 66).

3.5.4 POKUS Z UČEBNICE²⁸

Chemikálie: aceton, technický benzín

Pomůcky: lusk červené papriky, písek mořský, třecí miska s tloučkem, kapilára, chromatografická komora, odměrný válec, pravítko, silufol, váhy

Předpokládaná doba trvání: 25 minut

Nejdříve jsem si na vahách navážila 10 g červené papriky a ve třecí misce jsem ji rozetřela s 1,1 g mořského písku a s 5 ml acetonu. Do chromatografické komory jsem nalila benzín a nechala jsem ji nasytit jeho parami. Poté jsem si vystříhla destičku silufolu

(3 x 7,6 cm) a na start jsem opakovaně nanesla kapilárou vzorek (tři tečky vedle sebe). Destičku jsem vložila do chromatografické komory a nechala jsem vzlínat rozpouštědlo.



Obrázek 67: výsledný chromatogram, lusk červené papriky

Výsledek pokusu vypadal velmi povedeně. Na chromatogramu se vzorek rozložil na oranžovou, červenou a žlutou barvu (viz obr. 67). U tohoto experimentu je ale potřeba, aby si žáci pořídili fotografii, neboť žluté skvrny po sedmi hodinách vybledly. Po několika dnech se z červených skvrn staly žluté. Jedná se o vliv světla a vzdušného kyslíku na nestabilní barviva.

Po celkovém zhodnocení a vzhledem k výsledku bych tento pokus jednoznačně doporučila.

3.5.5 POKUS Z UČEBNICE²⁹

Chemikálie: uhličitan vápenatý (CaCO_3), destilovaná voda, ethanol, technický benzín

Pomůcky: listy čerstvého špenátu, písek mořský, třecí miska s tloučkem, kapilára, kádinky, váhy, chemické kleště, nůžky, odměrný válec, pravítko, vaříč, Petriho miska, pipeta, držák na pipetu, pipetovací balónek, stojan, nálevka, vata, železný kruh, křížová svorka

Po navážení 20 g listů čerstvého špenátu jsem je v kádince smíchala s 0,7 g jemně mletého uhličitanu vápenatého (CaCO_3) a přilila jsem 125 ml vroucí destilované vody. Po dvou minutách jsem listy vyjmula a rozstříhala na malé kousky. Listy jsem třela ve třecí misce s 1,7 g mořského písku. Poté jsem přidala 9 ml ethanolu a směs znovu třela. Směs ještě více zezelenala.

Vzniklou zelenou směs jsem přefiltrovala přes smotek vaty a dále jsem pracovala dle jednotlivých úkolů (viz kap. 3.5.5.1, 3.5.5.2, 3.5.5.3).

3.5.5.1 Úkol číslo 1

Proužek filtračního papíru (3 x 20 cm) jsem uchytila a ponořila jsem jej do přefiltrovaného roztoku. Dávala jsem pozor, aby se proužek nedotýkal stěn nádoby. Roztok jsem nechala vzlínat.²⁹ Výsledný chromatogram je zobrazen na obrázku 68.

Předpokládaná doba trvání: 2 hodiny 15 minut (s přípravou)



Obrázek 68: výsledný chromatogram, listy špenátu, úkol číslo 1

3.5.5.2 Úkol číslo 2

Doprostřed kruhu filtračního papíru ($r = 6,25$ cm) jsem kapilárou opakovaně nanasla přefiltrovaný roztok. Kruh jsem položila na Petriho misku a nabrala jsem 1 ml ethanolu do pipety, jejíž konec jsem ucpala bříškem prstu. Pipetu jsem uchytila a dala jsem ji do středu kruhu filtračního papíru, pustila jsem prst a nechala jsem ethanol vzlínat.²⁹ Výsledek experimentu je možné vidět na obrázku 69.

Předpokládaná doba trvání: 1 hodina (s přípravou)



Obrázek 69: výsledný chromatogram, listy špenátu, úkol číslo 2

3.5.5.3 Úkol číslo 3

Asi 1 ml přefiltrovaného roztoku jsem nalila do zkumavky a přidala jsem 2 ml benzínu. Směs jsem protřepala a dala jsem ji do krabice, abych zabránila průniku světla do zkumavky. Asi po 30 minutách jsem zaznamenala, že směs byla podstatně světlejší než na začátku před přidáním technického benzínu a uplynutí třiceti minut (viz obr. 70, 71).²⁹

Předpokládaná doba trvání: 50 minut (s přípravou)



Obrázek 70: směs před přidáním benzínu



Obrázek 71: směs po přidání benzínu a uplynutí 30 minut

3.5.5.4 Zhodnocení úkolů číslo 1, 2, 3

V prvním úkolu (viz kap. 3.5.5.1) došlo k rozdělení barviv na pruhu filtračního papíru. Je možno rozlišit žlutou a zelenou barvu, nicméně tento pokus bych k prokázání rozdělení listového barviva na jednotlivé složky nedoporučovala. Existují už takové pokusy, které vedou k výsledkům, kde jsou jednotlivé stopy zřetelně vidět (viz kap. 3.5.6 a 3.5.7).

Ve druhém experimentu (viz kap. 3.5.5.2) bych nesouhlasila s provedením. Nevím, jestli cílem má být ukázat žákům či studentům, že chromatografii lze provést i s použitím pipety, což je uspořádání jistě netradiční, ale podle mého názoru místo pipety stačí udělat knot z filtračního papíru a prostrčit jej středem kruhu. Provedení, uvedené v pokusu, je složité vzhledem k manipulaci a také je časově náročnější. Rozdělení listových barviv, které lze vidět na obrázku (viz obr. 69), je vidět velmi špatně až vůbec.

Třetí úkol (viz kap. 3.5.5.3) spočíval spíše v pozorování, kdy došlo ke znatelnému zesvětlení směsi. Ve spodní vrstvě lze vidět tmavší zelenou barvu a v horní světle zelenou až žlutou barvu (viz obr. 71). Tyto tři pokusy bych do výuky nedoporučila zařadit, ačkoliv jim nelze vytknout jistou netradičnost.

3.5.6 POKUS Z UČEBNICE³⁰

Předpokládaná doba trvání: 30 minut

Chemikálie: technický benzín, aceton, destilovaná voda

Pomůcky: listy čerstvého špenátu, písek mořský, třecí miska s tloučkem, kapilára, váhy, nůžky, odměrný válec, pravítko, stojan, nálevka, vata, železný kruh, křížová svorka, silufol, filtrační papír

Po navážení 20 g listů čerstvého špenátu se 2 g mořského písku jsem směs třela ve třecí misce. Poté jsem přidala 70% aceton. Vzniklou směs jsem přefiltrovala přes smotek vaty. Do chromatografické komory jsem nalila benzín a nechala jsem komoru nasytit jeho parami. Filtrát jsem opakovaně kapilárou nanasla na start destičky silufolu (3 x 7,6 cm) a nechala jsem ji vyvíjet v chromatografické komoře.



Obrázek 72: dělení barviv listů špenátu, před filtrací (na silufolu)



Obrázek 73: dělení barviv listů špenátu, po filtraci (na silufolu)



Obrázek 74: dělení barviv listů špenátu, po filtraci (na filtračním papíru)

Ačkoliv jsem se inspirovala pokusem v uvedené učebnici³⁰, postup bylo nutné upravit. Domnívám se, že zahřívání směsi ve vodní lázni je problematické vzhledem k faktu, že pokud bych nechala směs vřít, jak se v návodu uvádí, tak by se aceton vypařil. Je však možné zkumavku zazátkovat zátkou s procházející trubičkou. Také je potřeba si uvědomit, že pracujeme s hořlavinou, proto je nutné použít vařič a nikoliv kahan. Nejsem si zcela jistá, že je tento krok nutnou součástí pokusu. Tuto část jsem vynechala i vzhledem ke skutečnosti, že jsem měla dobré zkušenosti s podobným pokusem (viz kap. 3.5.4).

Chromatografii jsem prováděla třikrát. Poprvé jsem pokus provedla bez filtrace na destičce silufolu (viz obr. 72). Podruhé jsem pokus provedla až po filtraci na destičce silufolu (viz obr. 73) a nakonec jsem se inspirovala návodem, kde byl použit k chromatografii filtrační papír (viz obr. 74). Doporučuji při provádění filtrace dávat pozor na velikost smotku vaty, jelikož při použití příliš velkého kusu se stane to, že se veškerá tekutina vsákne do vaty. Na chromatogramu je patrné, že se vzorek rozdělil na zelenou, žlutou a modrozelenou barvu (viz obr. 72, 73). Dále potom jsou patrné zbytky, které jsou vidět žlutě.

Tento pokus doporučuji, ale v pozměněné formě, kterou zde navrhuji. Oceňuji, že v návodu je uvedena přesná hmotnost listů špenátu a křemenného písku a je zde také

uveden objem acetonu. Jeví se mi však jako nepřehledné to, že vyvíjecí rozpouštědlo není uvedeno přímo v návodu, ale až na obrázku, jež je umístěn pod textem. Chromatografii doporučuji provádět na silufolu, kde je dělení barviv jednoznačně zřetelnější. Dělení barviv bylo zřetelné jak před filtrací, tak i po filtraci. Na filtračním papíře rozdělení jednotlivých složek není tak dobře vidět jako při použití silufolu, navíc dochází k unášení barviv spolu s čelem rozpouštědla.

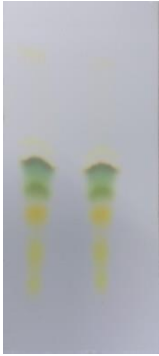
3.5.7 POKUS Z LITERATURY³¹

Chemikálie: aceton, technický benzín, hexan, propan-2-ol, mořský písek, uhličitán vápenatý (CaCO_3)

Pomůcky: listy špenátu, sladká mletá paprika, listy prvosenky bezlodyžné (*Primula vulgaris*), listy ředkve seté (*Raphanus sativus*), barva na vlasy - henna (značka: Lush, odstín: Caca Brun), třecí miska s tloučkem, filtrační nálevka, filtrační papír, vata, stojan, železný kruh, křížová svorka, kádinka, silufol (3 x 7,6 cm), vyvíjecí komora, kapilára, váhy, odměrný válec, nůžky, laboratorní lžička, chromatografická komora

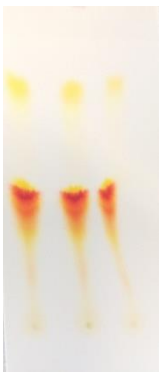
Předpokládaná doba trvání: 35 min (na 1 experiment)

Nejprve jsem si navázila 2 g listů čerstvého špenátu, k nimž jsem přidala 0,3 g mořského písku a uhličitán vápenatý (CaCO_3) na špičce laboratorní lžičky. Poté jsem směs třela pomocí tloučku ve třecí misce. Do rozetřené směsi jsem nalila 1 ml acetonu a po chvíli 5 ml benzínu. Směs jsem promíchala. Následně jsem provedla filtraci přes smotek vaty. Během probíhající filtrace jsem si připravila roztok benzínu, propan-2-olu a destilované vody v poměru 100 : 10 : 0,25. Roztok jsem nalila do chromatografické komory a nechala jsem ji nasytit parami směsi rozpouštědel. Na destičku silufolu o rozměrech 3 x 7,6 cm jsem za pomocí kapiláry nanasla vzorek ve formě teček na start. Destičku jsem vložila do chromatografické komory se směsí rozpouštědel a chromatogram jsem nechala vyvíjet. Výsledek chromatografie je zobrazen na obrázku 75.



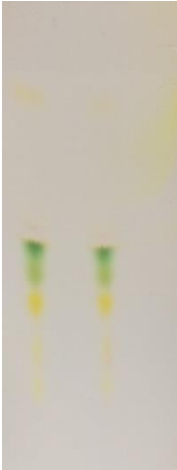
Obrázek 75: výsledný chromatogram, listy čerstvého špenátu

Navážila jsem si 2 g sladké mleté papriky, k nimž jsem přidala 0,3 g mořského písku a uhličitan vápenatý (CaCO_3) na špičce laboratorní lžičky. Do rozetřené směsi jsem nalila 1 ml acetonu a po chvíli tření 10 ml hexanu. Ostatní kroky jsou stejné jako v předchozím experimentu s listy čerstvého špenátu. Výsledný chromatogram je znázorněn na obrázku 76.



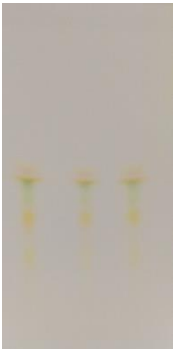
Obrázek 76: výsledný chromatogram, sladká mletá paprika

Navážila jsem si 2 g listů prvosenky bezlodyžné (*Primula vulgaris*), k nimž jsem přidala 0,3 g mořského písku a uhličitan vápenatý (CaCO_3) na špičce laboratorní lžičky. Do rozetřené směsi jsem nalila 1 ml acetonu a po chvíli tření 5 ml hexanu. Dále jsem pokračovala stejně jako v prvním pokusu. Výsledný chromatogram je znázorněn na obrázku 77.



Obrázek 77: výsledný chromatogram, listy prvosenky bezlodyžné

Navázila jsem si 2 g listů ředkve seté (*Raphanus sativus*), k nimž jsem přidala 0,3 g mořského písku a uhličitan vápenatý (CaCO_3) na špičce laboratorní lžičky. Do rozetřené směsi jsem nalila 1 ml acetonu a po chvílce tření 5 ml hexanu. Dále jsem pokračovala stejně jako v ostatních případech. Výsledek je opět zaznamenán pomocí obrázku (viz obr. 78).

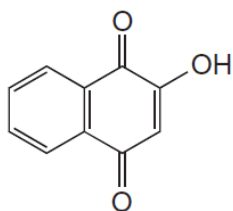


Obrázek 78: výsledný chromatogram, listy ředkve seté

Na vahách jsem si navázila 2 g henny (značka: Lush, odstín: Caca Brun) a smíchala jsem ji s 0,3 g mořského písku a uhličitanem vápenatým (CaCO_3). Směs jsem rozetřela a nalila jsem do ní 1 ml acetonu a po chvíli také 5 ml technického benzínu. Následující postup byl stejný jako v předešlých případech.

Henna (*Lawsonia inermis*) je rostlina, která se pěstuje v Indii, severní a východní Africe a také v Austrálii. Tato rostlina obsahuje lawson (2-hydroxy-1,4-naftochinon) (viz obr. 78), což je barvivo, jehož obsah v rostlině se blíží jednomu procentu. Naftochinon se vyskytuje v rostlině v glykosidické formě, která se nazývá hennosid A, B a C; z kterého se již zmiňovaný lawson uvolňuje procesem hydrolýzy a oxidací aglykonu. Kromě lawsonu listy henny obsahují také flavonoidní barvivo luteolin. Extrakty z henny obsahující právě

lawson se používají k barvení vlasů, nehtů, ale i k malování na kůži, dále k barvení textilií zejména hedvábí a vlny, přičemž dojde ke zbarvení do oranžova až dohněda.³²



Obrázek 79: lawson (2-hydroxy-1,4-naftochinon)

Jak jsem již uvedla v popisu experimentu, použila jsem hennu, která je zpracovaná k barvení vlasů. V popisu produktu je uvedeno, že kromě extraktu z henny obsahuje celou řadu látek, jako je například indigo, mletá káva, prášek z kopřivy a jiné.³³ Výsledný chromatogram je znázorněn na obrázku 80.



Obrázek 80: výsledný chromatogram, henna (značka: Lush, odstín: Caca Brun)

Poslední chromatografii jsem provedla se žlutými listy dubu letního (*Quercus robur*), abych dokázala, že se na chromatogramu jasně projeví, že listy už chlorofyl neobsahují (viz obr. 81).



Obrázek 81: chromatogram žlutých listů dubu letního

3.5.8 CELKOVÉ ZHODNOCENÍ

Pokud bych měla porovnat pokusy z učebnic pro základní a střední školy a experiment z literatury³¹, volila bych variantu zmíněnou jako druhou, tj. experiment z literatury³¹. Tento pokus je spolehlivý a výsledky dělení jsou naprosto zřetelné. Je ovšem důležité důsledně si vybrat materiály, se kterými budeme pracovat. Doporučila bych zvolit listy, které jsou výrazně zelené. Důkazem toho je porovnání výsledků chromatografie listů čerstvého špenátu (viz obr. 75), prvosenky bezlodyžné (viz obr. 77) a ředkve seté (viz obr. 78). Nejtmavší listy z uvedených měl špenát, nejsvětlejší naopak ředkev setá, což platí i pro výsledné chromatogramy. Shrnu bych to, že čím tmavší materiál, tím budou výsledky provedené chromatografie zřetelnější.

I když je v návodu uveden technický benzín jako jedno z rozpouštědel³¹, v případě chromatografie sladké mleté papriky, prvosenky bezlodyžné a ředkve seté jsem jej nahradila hexanem. Zatímco hexan je jeden typ uhlovodíku, benzín je směs několika. Ačkoliv je jeho použití možné, do výuky bych jej nezařadila vzhledem k jeho toxicitě.

Co se týče identifikace jednotlivých látek na chromatogramu, v literatuře²⁷ autoři uvádějí identifikaci složek na základě barev (chlorofyl a – zelená, chlorofyl b – modrozelená, xanthofyly – žlutá, karoteny – oranžová). Takto lze žákům nebo studentům přiblížit, jaká barviva se vyskytují v listech, ovšem je potřeba zdůraznit, že k přesnému určování látek je zapotřebí porovnat je se standardy. Jako důkaz přítomnosti či nepřítomnosti chlorofylu postačí porovnání žlutých a zelených listů. Výsledný chromatogram listů dubu letního (viz obr. 81) postrádá modrou a modrozelenou stopu na rozdíl od ostatních chromatogramů, takže lze s určitostí říci, že neobsahuje chlorofyl. Je proto dobré provést chromatografii zelených i žlutých listů, aby žáci mohli výsledné chromatogramy porovnat a o přítomnosti či nepřítomnosti chlorofylu se sami také přesvědčit. Zde by bylo vhodné upozornit žáky na proces žloutnutí listů na podzim.

Bezesporu zajímavým pokusem je chromatografie henny (*Lawsonia inermis*). Vzhledem k tomu, že se henna používá i v dnešní době k barvení vlasů, je vhodné experiment zařadit do výuky také například pro studenty, kteří studují obor kadeřník nebo jiné obory související s vlasovou kosmetikou. Použila jsem produkt, který je již určen přímo k barvení, proto obsahuje příměsi. Z toho důvodu není možné s jistotou identifikovat jednotlivé složky, neboť bych je musela opět porovnat se standardy.

Není nutné se omezit pouze na barviva v listech, lze také provést chromatografii například mleté papriky, kde dominuje výrazná oranžová stopa (viz obr. 67, 76), která je dle literatury²⁷ typická pro karoteny.

Je nutné si výsledky chromatografie vyfotit co možná nejdříve, protože již po deseti minutách jsem zaznamenala první blednutí barvy. Po několika dnech barvy vybledly zcela.

3.6 CHROMATOGRRAFIE AMINOKYSELIN

Jedná se o chromatografii bezbarvých látek s následnou detekcí (zviditelněním) chromatogramu. Jako detekční činidlo se používá roztok ninhydrinu, který s aminokyselinami vytváří různě zbarvené sloučeniny.

3.6.1 CHROMATOGRRAFIE AMINOKYSELIN NA ZÁKLADĚ UČEBNICE²⁰ A PRAKTICKÝCH CVIČENÍ Z LÉKAŘSKÉ CHEMIE³⁴

Chemikálie: L-lysin, glycin, L-cystein, destilovaná voda, ethanol, butanol, koncentrovaná kyselina octová, ninhydrin, aceton

Pomůcky: analytické váhy, laboratorní lžička, hodinová sklíčka, pipety, chromatografická komora, odměrné válce, silufol, kapiláry, pravítko, nůžky, fixírka, sušárna, stojan, laboratorní kleště, křížová svorka

Předpokládaná doba trvání: 50 minut

Nedříve jsem si navázila jednotlivé aminokyseliny – L-lysin (0,0289 g), glycin (0,0231 g) a L-cystein (0,0248 g). Poté jsem si do pipety nabrala 1 ml destilované vody a aminokyselinu v ní rozpustila. V případě L-cysteinu jsem si všimla špatné rozpustnosti, proto jsem přidala kapku ethanolu. Vytvořila jsem si také směs aminokyselin a to tak, že jsem smíchala stejné objemy roztoků jednotlivých aminokyselin.

Do chromatografické komory jsem nalila směs rozpouštědel, kterou jsem si předem připravila smícháním butanolu, kyseliny octové a vody v poměru 4 : 1 : 1. Zatímco jsem nechala nasytit komoru parami rozpouštědla, vystříhla jsem si destičku silufolu (3 x 7,6 cm), na jejíž start jsem nanasla kapilárou rozpuštěné aminokyseliny a nakonec jejich směs. Destičku jsem vložila do chromatografické komory a nechala jsem ji vyvíjet. Když čelo rozpouštědla dosáhlo asi 1 cm od okraje destičky, destičku jsem z komory vyjmula a nechala jsem odpařit rozpouštědla.

Poslední fází tohoto pokusu byla příprava roztoku ninhydrinu, který jsem použila jako detekční činidlo. Smíchala jsem 0,1 g ninhydrinu; 0,25 ml koncentrované kyseliny octové a roztok jsem doplnila acetonem na 50 ml. Usušený chromatogram jsem důkladně postříkala roztokem ninhydrinu a dala jsem jej do sušárny, která byla nastavena na 80 °C. V krátkých časových intervalech jsem sledovala vývoj chromatogramu. Asi po osmi minutách byly stopy zřetelné (viz obr. 82) a detekci jsem ukončila.



Obrázek 82: chromatogram aminokyselin (zleva L-lysin, glycin, L-cystein, směs)



Obrázek 83: chromatogram aminokyselin (zleva L-lysin, glycin, L-cystein, směs), opomenuté vysušení

Považuji za vhodné studenty seznámit s chromatografií aminokyselin vzhledem k významu této metody zejména ve zdravotnictví. Vidím zde jako nezbytné studentům vysvětlit propojení s praxí, kdy chromatografií lze stanovit aminokyseliny v krvi nebo v moči. Jejich nález přispívá k diagnostice nemocí.¹⁴

Výsledkem experimentu je chromatogram (viz obr. 82), na němž lze pozorovat jednotlivé stopy aminokyselin. Tento pokus trvá déle vzhledem k nutnosti navážení

aminokyselin a míchání roztoků. Nicméně pokud studentům roztoky připravíme dopředu, nebude problém pokus zvládnout v klasické vyučovací hodině.

Jak jsem již v postupu upozornila, je potřeba si dávat pozor na horší rozpouštění L-cysteinu v destilované vodě, což lze vyřešit přidáním menšího množství ethanolu. Avšak po nanesení roztoků na start je důležité neopomenout důkladné vysušení. Na obrázku 83 je vidět, co se stane, když je vysušení opomenuto. Horší rozpustnost také může zkomplikovat chromatografii a to tak, že koncentrace L-cysteinu na startu nebude dostatečná. Nanesla jsem proto látku na start, nechala jsem destičku vysušit a tento postup jsem zopakovala třikrát za sebou. Je potřeba si dávat pozor, aby látka byla nanášena vždy na stejné místo. Při práci s ninhydrinem je vhodné použít ochranné rukavice, jinak dojde k podráždění za vzniku modrofialových skvrn. Studentům je dobré toto upozornění vysvětlit v návaznosti na to, že to je důkaz použití ninhydrinu jako detekčního činidla. Lidská pokožka obsahuje aminokyseliny, proto dojde též k detekci.

Pokud se vyžaduje, aby studenti měli v sešitech záznam, doporučuji výsledný chromatogram vyfotit. Druhý den po provedené chromatografii jsem již zaznamenala vyblednutí stop.

3.6.2 DVOJROZMĚRNÁ CHROMATOGRRAFIE BÍLKOVINNÉHO HYDROLYZÁTU NA ZÁKLADĚ UČBNICE²⁰

Chemikálie: fenol, destilovaná voda, bílkovinný hydrolyzát Maggi, butanol, koncentrovaná kyselina octová, ninhydrin, aceton

Pomůcky: pipeta, chromatografická komora, odměrné válce, silufol, kapiláry, pravítko, nůžky, fixírka, sušárna, stojan, laboratorní kleště, křížová svorka, skleněný zvon, skleněná tyčinka, analytické váhy

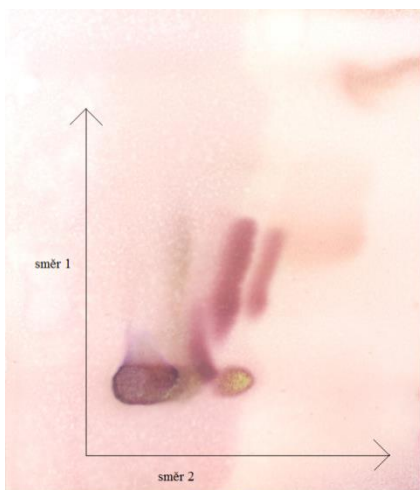
Předpokládaná doba trvání: 7 – 8 hodin

Do rohu chromatografické desky silufolu jsem nanášela bílkovinný hydrolyzát Maggi tak, aby nanášený vzorek byl ve vzdálenosti alespoň 1,5 cm od obou okrajů desky. Pro první vyvíjení jsem použila směs rozpouštědel butanol, kyselina octová a voda v poměru 4 : 1 : 1, tak jako tomu bylo v předešlém pokusu (viz kap. 3.6.1). Chromatogram jsem nechala vyvíjet ve velké kádince pod skleněným zvonem. Vyvíjení trvalo tři hodiny a třicet minut. Po vyjmutí desky je potřeba nechat ji důkladně usušit, nejlépe do druhého

dne. Z časových důvodů jsem s chromatografickou deskou pracovala po uplynutí jednoho týdne.

Poté jsem přistoupila k druhé fázi pokusu. Začala jsem přípravou druhé směsi rozpouštědel. Smíchala jsem fenol a vodu v poměru 4 : 1, konkrétně 4 g fenolu a 1 ml destilované vody. Chromatografickou desku s naneseným roztokem jsem nechala vyvíjet a to tak, že jsem ji otočila o 90 stupňů. Nanesený roztok byl tedy opět na startu. Vyvíjení trvalo tři hodiny. Před postříkání roztokem ninhydrinu je nutné chromatogram opět nechat vysušit.

Po uplynutí jednoho týdne jsem postříkala desku detekčním činidlem - roztokem ninhydrinu, který jsem připravila stejným způsobem, jako tomu bylo v předchozím pokusu (viz kap. 3.6.1). Desku jsem vložila do sušárny při teplotě 80°C a po 10 minutách jsem ji vyjmula.



Obrázek 84: výsledný chromatogram bílkovinného hydrolyzátu Maggi (směr 1 - butanol / kyselina octová / voda v poměru 4 : 1 : 1; směr 2 - fenol / voda v poměru 4 : 1)

I v tomto experimentu jsem se inspirovala stejnou učebnicí²⁰ jako v předchozím případě (viz kap. 3.6.1), ovšem provedla jsem menší úpravu a to takovou, že jsem pro tento pokus použila místo jednotlivých aminokyselin bílkovinný hydrolyzát Maggi.

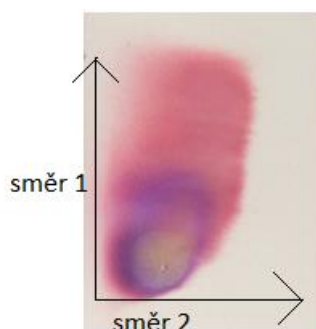
Jednotlivé chromatogramy jsem nechala vysušet jeden týden. Po prvním vyvíjení bylo vše v pořádku a mohla jsem pokračovat dál. Po uplynutí týdne po druhém vyvíjení jsem zaznamenala změnu na chromatografické desce (viz obr. 85).



Obrázek 85: 1 týden po druhém vyvíjení, chromatografie bílkovinného hydrolyzátu Maggi

Výsledný chromatogram (viz obr. 84) je důkazem toho, že bílkovinný hydrolyzáat Maggi je složen z mnoha aminokyselin. Z časových důvodů tento pokus do běžné výuky zařadit nelze. Jeho zařazení bych viděla jako možné v případě chemického kroužku. I v tomto případě je časová náročnost problematická. Řešením by bylo, kdyby vyvíjení prováděl a kontroloval učitel, což je potřebné také vzhledem k použití velmi žíravé látky – fenolu. Z toho důvodu lze tento pokus zařadit mezi demonstrační pokusy. Avšak žáci mohou v rámci kroužku monitorovat chromatografické desky po vysušení, provést detekci pomocí ninhydrinu a celý pokus zdokumentovat a vypracovat laboratorní protokol. Upozorňuji, že se jedná o aminokyseliny a vzhledem ke zkušenosti s rychlým vyblednutím doporučuji žákům připomenout, aby si pořídili fotografie.

Časovou náročnost pokusu jsem se snažila vyřešit použitím chromatografické destičky silufolu s menším rozměrem. K úspoře času sice došlo avšak na úkor kvality, proto tento postup doporučit nemohu (viz obr. 86). K nedoporučení tohoto postupu přispěl také fakt, že s takto malou destičkou se v chromatografické komoře špatně manipuluje a proto je na obrázku patrné vymytí.



Obrázek 86: výsledný chromatogram bílkovinného hydrolyzátu Maggi na malé chromatografické destičce (směr 1 - butanol / kyselina octová / voda v poměru 4 : 1 : 1; směr 2 – fenol / voda v poměru 4 : 1)

3.6.3 OPAKOVANÉ VYVÍJENÍ CHROMATOGRAMU

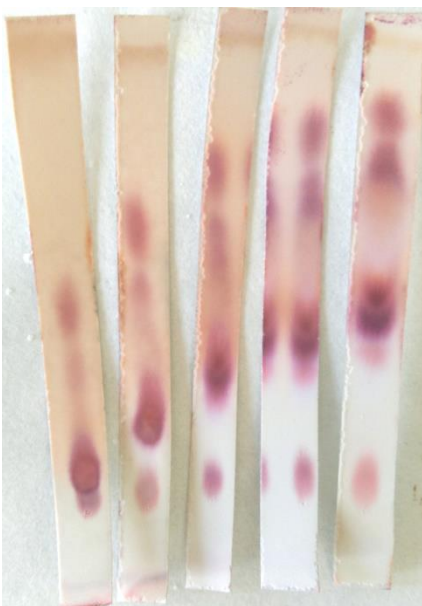
Chemikálie: bílkovinný hydrolyzát Maggi, destilovaná voda, butanol, koncentrovaná kyselina octová, ninhydrin, aceton

Pomůcky: hodinová sklíčka, pipety, chromatografická komora, odměrné válce, silufol, kapiláry, pravítko, nůžky, fixírka, sušárna, stojan, svorka, laboratorní kleště, křížová svorka

Předpokládaná doba trvání: 3 hodiny 30 minut

Ve snaze nahradit časově náročnou dvojrozměrnou chromatografií (viz kap. 3.6.2) bych ráda upozornila na opakované vyvíjení chromatogramu s naneseným vzorkem Maggi. Princip metody tkví v tom, že poté co je provedena chromatografie a chromatografická deska se nechá vysušit, tak se dá opět vyvíjet. Tento postup lze opakovat několikrát za sebou.

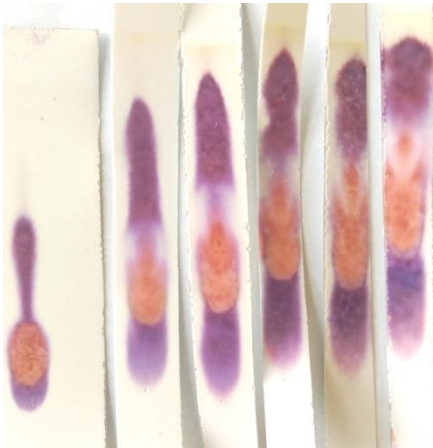
Nejdříve jsem smíchala Maggi a destilovanou vodu v poměru 1 : 10. Látku jsem nanasla pomocí kapiláry na start chromatografické desky silufolu v pěti bodech. Desku jsem nechala vyvíjet v chromatografické komoře za použití vyvíjecího rozpouštědla butanol / kyselina octová / voda v poměru 4 : 1 : 1. Po vyjmutí z komory jsem nechala destičku uschnout, odstříhla jsem první stopu a pokračovala ve vyvíjení. Tento postup jsem opakovala tak dlouho, dokud nezbyla pouze poslední stopa, to znamená pětkrát. Detekce se provádí opět roztokem ninhydrinu. Po postříku ninhydrinem je potřeba vložit jednotlivé destičky do sušárny při nastavené teplotě 80 °C.



Obrázek 87: výsledný chromatogram bílkovinného hydrolyzátu Maggi (vyvíjení provedeno zleva: 1x, 2x, 3x, 4x, 5x)

Z výsledného chromatogramu (viz obr. 87) je patrné, že došlo k posouvání startu. Též je markantní rozdíl mezi jedenkrát vyvíjeným chromatogramem a pětkrát vyvíjeným. Postupně dochází k lepší detekovatelnosti jednotlivých aminokyselin.

V souvislosti s tímto pokusem doporučuji Maggi opravdu ředit. Při zkoumání, jaký poměr Maggi a destilované vody je nejlepší, se mi nejvíce osvědčil poměr 1 : 10. Při použití koncentrovaného roztoku jsou aminokyseliny špatně detekovatelné (viz obr. 88).



Obrázek 88: výsledný chromatogram koncentrovaného roztoku Maggi (vyvíjení provedeno zleva: 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x)

I když je opakované vyvíjení podstatně časově méně náročné než dvojrozměrná chromatografie, i tak je potřeba do tohoto pokusu jistý čas investovat, tudíž bych spíše zauvažovala nad tím zařadit jej do chemického kroužku. Velkou výhodou také spatřuji v tom, že nedošlo k použití fenolu, díky čemuž nemusí být tento pokus nutně řazen mezi demonstrační. Vzhledem k postupnému blednutí aminokyselin nemá smysl si výsledný chromatogram zakládat a doporučuji jej vyfotit.

ZÁVĚR

V experimentální části práce jsou rozpracovány nejen pokusy ze stávajících učebnic a jiné literatury, ale i další experimenty, které lze s úspěchem zařadit do přípravy učitelů (viz kap. 3.1.5, 3.1.6, 3.2 a 3.6.3). Kapitola 3.1 - Chromatografie fixů obsahuje pokusy, které jsou nenáročné na čas a vybavení. Lze je provádět na křídě, filtračním papíru, silufolu nebo i na pruhu bavlněné bílé látky. Jsou zde uvedena doporučení týkající se výběru rozpouštědel. Zajímavým pokusem zejména pro mladší žáky je chromatografie na kávových filtrech spojená s výrobou motýlů (viz kap. 3.1.6), kterou lze provést i v nelaboratorních podmínkách. Chromatografie inkoustů do plnicích per (viz kap. 3.2) se v učebnicích zatím nevyskytuje. Dříve se chromatografická analýza inkoustů využívala v kriminalistice. Žáci nebo studenti mohou ve vyučovacích hodinách identifikovat jednotlivé složky směsi inkoustů. Chromatografii směsi indikátorů (viz kap. 3.3) je nutné zařadit mezi pokusy demonstrační vzhledem k nutnosti použít methanol. Pro tento experiment doporučuji připravit si směsi indikátorů samostatně v laboratoři. Nedoporučuji použít univerzální indikátor vzhledem k obtížnosti určování jednotlivých složek. V kapitole 3.4 – Chromatografie potravinářských barviv jsou uvedeny dva experimenty. Jeden experiment je věnován barvivům z lentilek (viz kap. 3.4.1) a barvám na vajíčka (viz kap. 3.4.2). Z těchto dvou pokusů doporučuji experiment s barvami na vajíčka. Chromatografie listových barviv nebo spíše obecněji rostlinného materiálu (viz kap. 3.5) je vedle chromatografie fixů nejčastěji se vyskytující pokus v učebnicích pro základní a střední školy. Po porovnání několika pokusů z učebnic doporučuji experimenty uvedené v kapitolách 3.5.4, 3.5.6, 3.5.7. Doporučuji provést chromatografii zelených i žlutých listů, kde se prokáže přítomnost či nepřítomnost chlorofylu. Zajímavým experimentem je chromatografie henny (*Lawsonia inermis*). Poslední kapitolou v experimentální části je chromatografie aminokyselin (viz kap. 3.6), kde je rovněž zahrnuta dvojrozměrná chromatografie a opakované vyvíjení chromatogramu. Zařazení dvojrozměrné chromatografie aminokyselin bych viděla jako možné v případě chemického kroužku. I v tomto případě je však na překážku časová náročnost a použití velmi žíravé látky – fenolu. Opakované vyvíjení chromatogramu je časově méně náročné, avšak přesto je možné tento experiment z časových důvodů doporučit spíše do chemického kroužku.

Teorie chromatografie je nejlépe zpracována v učebnicích^{27,28,30}, kde je srozumitelně vysvětlen princip metody. Velmi efektivní se mi jeví vysvětlení principu chromatografie v souvislosti s pokusem (viz literatura^{28, 30}), kdy si žák může celý proces představit. V literatuře²⁰ je sice téma chromatografie rozpracováno z uvedených učebnic nejpodrobněji, ale takové zpracování tématu je pro střední školy podle mého názoru zbytečně rozsáhlé. Příliš informací žáky často naopak spíše demotivuje. Také je nutné vzít v úvahu časové možnosti, kdy ve většině škol není možné zabývat se chromatografií několik hodin. Z toho důvodu bych literaturu²⁰ nedoporučila.

RESUMÉ

This diploma thesis deals with the topic of chromatography in the chemistry lessons. Chromatography, which is nowadays a widely used method in analytical chemistry, is in various rate incorporated in tuition at schools. In various rate is also dealt with by textbooks and other literature meant for teachers and students and their teaching and studying respectively. This thesis consists of three main parts. The first handles history of chromatography and is followed by the theoretical part and the experimental one. Chromatography, whose purpose is division of separate constituents from the mixture, is further divided according to various criteria, f.e. the separation mechanism, state of the mobile phase or depending on setting. Theoretical part explains the basics of chromatography and also offers clear division of the chromatography methods. Its main focus is though paper, thin-layer and column chromatography. These are later used in the experimental section, which shall serve as the inspiration for the school teachers. Experimental section also offers a ranged broad variety of experiments concerning with the chromatography of markers, pen inks, indicator mixtures, food colourants, plant pigments and amino acids. The contents of this thesis are: comparison of textbooks, especially in terms of experiments; possible modification of experiments; recommendations and conclusion. It also offers experiments, so far not present in the textbooks and that makes them possible to integrate to the education of future and contemporary teachers.

SEZNAM LITERATURY

1. Heftmann, Erich: *Chromatography — a Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods*, 3.vydání; Van Nostrand Reinhold: New York; 1975
2. *Exodus*; kapitola 15; 22-25; <http://onlineb21.bible21.cz/bible.php?kniha=exodus> ; 28. 4. 2016
3. Ettre, Leslie; Hinshaw, Johan (ed.): *Chapters in the Evolution of Chromatography*; Imperial College Press: London; 2008
4. Pliny the Elder: *The Natural History*; kniha 9; kapitola 62; <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0137%3Abook%3D9%3Achapter%3D62> ; 28. 4. 2016
5. Pliny the Elder: *The Natural History*; kniha 34; kapitola 26; <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0137%3Abook%3D34%3Achapter%3D26> ; 28. 4. 2016
6. Runge, Friedlieb Ferdinand: *Die Kunst der Farbenbereitung : mit 200 Stoffmustern, welche mit Texte eingeklebt sind*; Mittler: Berlin; 1850; pp. 264-265; dostupné přes Bayerische Staatsbibliothek http://reader.digitale-sammlungen.de/de/fs1/object/display/bsb10305762_00283.html?contextSort=score%2Cdescending&contextRows=10&context=tropfen+papier+bild&contextType=scan ; 28. 4. 2016
7. Káš, Jan; Kodíček, Milan; Valentová, Olga: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. Vydání; Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005
8. Ríchnr V., Kraitr M.: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie; *Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni*; Plzeň; 2004
9. Galuszka P.; Luhová L.: *Laboratorní technika pro biochemiky*; Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta: Olomouc; 2003
10. Mikeš O. a kol.: *Laboratorní chromatografické metody*; SNTL: Praha; 1980
11. Gerald F. Lewis: *Analytical chemistry, An Introduction*; Second Edition; MacMillan: London; 1985
12. Churáček, Jaroslav: *Analytická separace látek*; 1. vyd.; Státní nakladatelství technické literatury: Praha; 1990. 384 s. ISBN 80-03-00569-8
13. Gasparič J., Churáček J.: *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*; SNTL: Praha; 1981
14. Šaršunová, Magda; Schwarz, Vladimír; Michalec, Čestmír: *Chromatografie na tenkých vrstvách vo farmácii a v klinickej biochémií*; 2. Vydání; Osveta: Martin; 1977
15. Kvíčala J.: *Laboratorní technika organické chemie*; Vysoká škola chemickotechnologická v Praze: Praha; 1998
16. Andrlík K.; Šimek J.: *Základy laboratorní práce*; SNTL: Praha; 1953
17. Keil B. a kol.: *Laboratorní technika organické chemie*; ČSAV: Praha; 1963

18. Doulík, Pavel et al.: *Chemie 8: příručka učitele: pro základní školy a víceletá gymnázia*; 1. vyd.; Plzeň: Fraus; 2006
19. Karger, Ivo; Peč, Pavel; Pečová, Danuše. *Chemie pro 8. ročník základní školy a nižší ročníky víceletých gymnázií I: s komentářem pro učitele*; Prodos: Olomouc; 1999
20. Amann, Wolfgang et al: *Chemie pro střední školy - 2b*; 1. české vyd.; Scientia: Praha; 2000
21. <http://buggyandbuddy.com/chromatography-butterflies-separating-colors-in-markers/>; 15. 2. 2016
22. Albert W. Somerford: Comparison of Writing Inks by Paper Chromatography; in: *The Journal of Criminal Law, Criminology, and Police Science*; Vol. 43, No. 1 (May – Jun., 1952); pp. 124 – 127; Northwestern University
23. Svoboda, J.; Kratochvíl, B: *Chemie 2b (učebnice chemie pro střední školy)*; Scientia: Praha; 2000
24. Bezpečnost práce ve školní chemické laboratoři, materiál Univerzity Karlovy <https://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/navody2007/bezpecnost.pdf> ; 13. 3. 2016
25. Bílek, Martin (ed.); Rychtera, Jiří: *Laboratorní cvičení k učebnici Chemie na každém kroku*; 1. vyd.; Moby Dick: Praha; 2000
26. <https://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/navody2006/pokusy7a8.pdf> ; 30. 5. 2016
27. Banýr, Jiří a kol: *Chemie pro střední školy: Obecná, anorganická, organická, analytická, biochemie*; 1. vyd.; SPN - pedagogické nakladatelství: Praha; 1995
28. Klečková, Marta; Los, Petr: *Seminář a praktikum z chemie pro 2. stupeň základní školy*; 1. Vyd.; SPN - pedagogické nakladatelství: Praha; 2003
29. Novotný, Petr: *Poznáváme chemii: učebnice pro základní školy a nižší ročníky víceletých gymnázií. 3. Sešit*; 1. vyd.; SPN: Praha; 1996
30. Beneš, Pavel a kol.: *Základy chemie 1*; 3. vyd.; Fortuna: Praha; 2000
31. Šulcová; Martínek; Böhmová: *Náměty na pokusy z organické a praktické chemie* ; <https://web.natur.cuni.cz/~kudch/main/JPD3/navody2006/pokusy7a8.pdf>; 30. 5. 2016
32. Bechtold, Thomas; Mussak, Rita (eds.): *Handbook of Natural Colorants*; John Wiley and Sons: Chichester; 2009
33. Popis produktu henna od výrobce <https://www.lushcz.cz/shop/product/product/path/153/id/389/Henna--barvy-na-vlasy-Caca-Brun>
34. Humlová, Alena; Balvín, Miroslav: *Praktická cvičení z lékařské chemie*; https://www.lfp.cuni.cz/biochemie/dokumenty/LekChem_prakt_2.pdf; 30. 5. 2016

