

PLANÁRNÍ (PLOŠNÁ) CHROMATOGRAFIE

a) papírová chromatografie (PC)

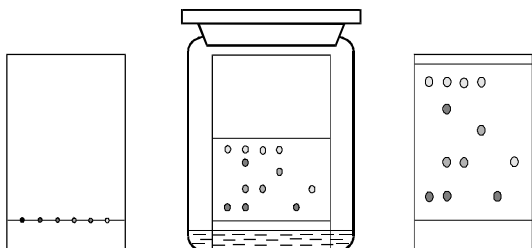
rozdělovací - stacionární fáze je kapalina zachycená v papíře a mobilní fáze je též kapalná

b) tenkovrstvá chromatografie (TLC)

rozdělovací - stacionární fáze je kapalina zachycená v tenké vrstvě a mobilní fáze je také kapalná
adsorpční - stacionární fáze je tuhý adsorbent, který je součástí tenké vrstvy, a mobilní fáze je kapalná

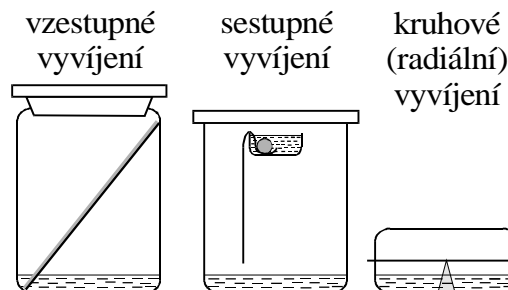
Princip dělení analytů při PC a TLC :

Vzorek se nanese ve formě malé kulaté skvrny na papír nebo tenkou vrstvu a poté se mobilní fáze nechá vzlínat póry papíru nebo tenké vrstvy. Mobilní fáze unáší dělené látky ze vzorku, které se více či méně zpoužďují interakcí (rozpuštění nebo adsorpce) se stacionární fází, a tím se vzájemně dělí.



Vzorky rozpuštěné v těkavém rozpouštědle se nanáší na **start**. Nanášíme 0,1% až 5% roztoky v množství 200 nl až 20 µl do skvrn o průměru 2 až 6 mm.

Chromatogram se **vyvíjí** v uzavřené chromatografické **komoře**, která je dobře nasycena parami mobilní fáze.



opakované vyvíjení (eluent o jiné polaritě)
dvojměrné vyvíjení

Vyvíjení se ukončí **vybráním** chromatogramu z vyvíjecí komory, když čelo mobilní fáze dosáhne téměř protilehlého okraje papíru či tenké vrstvy.

Čelo mobilní fáze se označí měkkou tužkou.

Chromatogram se **vysuší** a skvrny nebarevných analytů je třeba před vyhodnocováním chromatogramu **detegovat** použitím vhodné detekční metody.

Detekční metody

a) ponoření nebo postříkání chromatogramu vhodným činidlem H₂SO₄ (pouze TLC), KMnO₄, I₂

b) fluorescence luminoforů v UV záření

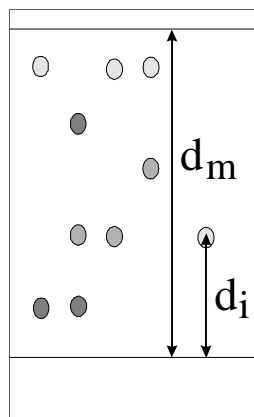
c) zhášení fluorescence tenkovrstvé desky nadopované fluorescenčním indikátorem

KVALITATIVNÍ VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAMU

Jednotlivé separované analyty se charakterizují tzv.

retardačním faktorem (R_F).

$$R_{F,i} = \frac{u_i}{u_m} = \frac{d_i}{d_m} = \frac{1}{1+k}$$



u_i rychlost skvrny i-tého analytu

u_m rychlost (čela) mobilní fáze

d_i vzdálenost středu skvrny i-tého analytu od startu

d_m vzdálenost čela mobilní fáze od startu

Analyty identifikujeme

a) porovnáním poloh skvrn analytů a standardů chromatografovaných na témže chromatogramu

b) porovnáním hodnot retardačních faktorů (R_F) analytů s publikovanými hodnotami změřenými za stejných experimentálních podmínek

c) porovnáním R_M hodnot

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) = \log k$$

R_M na rozdíl od R_F závisí aditivně na strukturálních prvcích chromatografované látky

d) porovnáním hodnot relativních retardačních faktorů

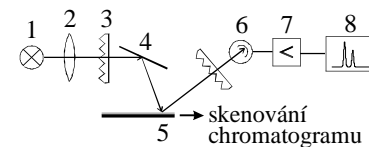
$$R_{F,rel,i} = \frac{R_{F,i}}{R_{F,s}}$$

$R_{F,rel,i}$ je relativní retardační faktor

tj. retardační faktor chromatografované látky vztažený k retardačnímu faktoru standardu

KVANTITATIVNÍ VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAMU

a) Analyty můžeme stanovit přímo na chromatogramu pomocí **fotodenzitometru**, který nám převede skvrny analytů na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství příslušného analytu ve skvrně.



1 světelný zdroj

2 čočka

3 monochromátor

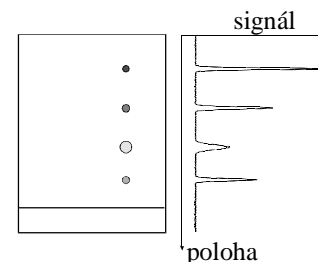
4 zrcadlo

5 chromatogram

6 fotonásobič

7 zesilovač

8 zapisovač



b) Analyty se **extrahují** z chromatogramu a stanoví se vhodnou metodou v roztoku.

PAPÍROVÁ CHROMATOGRAFIE (PC)

rozdělovací chromatografie

celulóзовý filtrační papír (99 % α -celulózy)

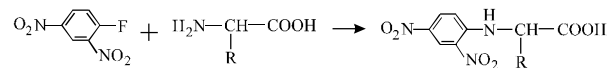
Stacionární fáze je většinou **voda** zachycená na papíře.

Jako mobilitní fáze se používají organická rozpouštědla nebo jejich směsi, které se s vodou nemísí nebo mísí omezeně.

Chromatogramy lze vyvíjet sestupně, radiálně popř.

vzestupně. Vyvíjení chromatogramu v PC je pomalejší než v TLC

Sestupná PC aminokyselin



dinitrofenylderiváty aminokyselin

●	Asp
●	Gly
●	Ala
○	Met
●	Val
●	Leu

eluent : cyklohexan 60%

isopropanol 36%

50 mM benzoát draselný 4%

detekce : žluté skvrny

TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE

je jednoduchá, rychlá a často používaná chromatografická metoda, se kterou se dají realizovat všechny metody kapalinové chromatografie.

Tenkovrstvou chromatografií lze charakterizovat jako chromatografií v otevřené koloně.

Na tenké vrstvě je podstatně méně stacionární fáze, a tudíž analýza na tenké vrstvě může být velmi rychlá v porovnání s kolonou.

Všechny nanesené látky se musí objevit mezi startem a čelem rozpouštědla; nic nemůže zůstat v koloně.

Tenkovrstvou chromatografií je možno realizovat v **klasické (TLC)** nebo **vysokoučinné (HPTLC)** experimentální podobě.

TLC

Používají se prakticky všechny stacionární fáze jako pro kolonovou chromatografií se zrnitostí 5 až 40 μm .

Stacionární fáze :

oxid hlinitý, silikagel,

celulóza, iontoměnič, polyamid a

silikagel s -C18, -NH₂ nebo -CN skupinami

Stacionární fáze jsou nanášeny na **skleněných deskách** nebo **hliníkových fóliích**.

Tenké vrstvy mohou obsahovat **fluorescenční indikátor** UV₂₅₄ k usnadnění detekce analyzovaných látek.

Mobilní fáze :

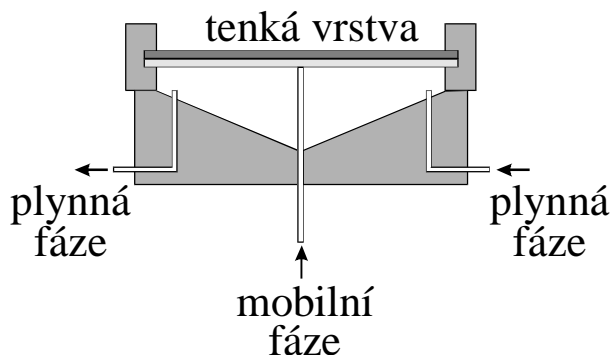
cyklohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi

HPTLC

Používají se stejné druhy **stacionární fáze** jako v TLC, avšak s velmi malou zrnitostí a velkou homogenitou zrnitosti.

Mobilní fáze se dodávají na vrstvu pomocí mikročerpadel ($F_m \approx 1 \mu\text{l/s}$) pro zajištění rovnoměrného toku eluentu tenkou vrstvou.

Vyvíjení chromatogramu probíhá ve **vyvíjecích komorách** s možností regulace složení plyné fáze, neboť průtok eluentu tenkou vrstvou závisí na tlaku a složení páry (plynné fáze) nad vrstvou.



TLC ŠTĚPŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

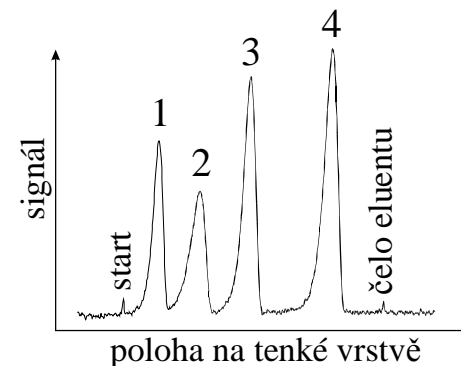
tenká vrstva : Nano-SIL NH₂ / UV

eluent : aceton/voda 30/70 (v/v) + 0,2M (NH₄)₂SO₄

objem vzorku : 0,3 μl

detekce : fotodozimetr, UV při 254 nm

- píky :
1. UTP (uridinmonofosfát)
 2. UDP (uridindifosfát)
 3. UMP (uridintrifosfát)
 4. uridin (uracil-ribóza)



TLC BARBITURÁTŮ

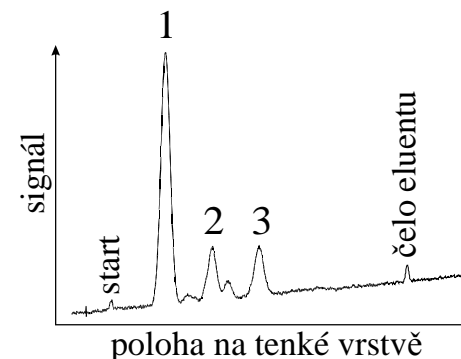
tenká vrstva : RP-18W / UV₂₅₄

(W = wetttable, smáčitelná, nesilanizovaná)

eluent : metanol/voda 45/55 (v/v)

detekce : fotodozimetr, UV při 254 nm

- píky :
1. Revonal
 2. Prominal
 3. Luminal



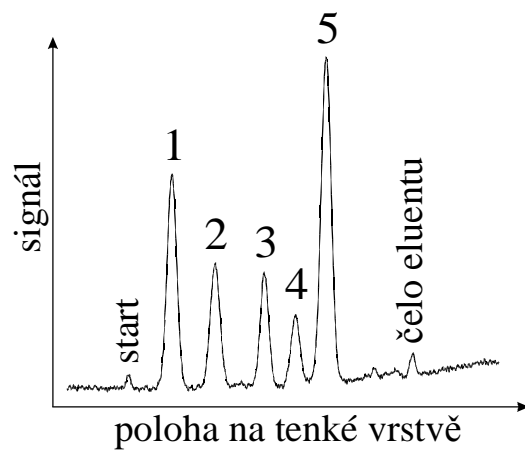
TLC PESTICIDŮ

tenká vrstva : Nano-DURASIL-20 UV₂₅₄

eluent : chloroform/aceton 95/5 (v/v)

detekce : fotodozimetr, UV při 254 nm

- píky : 1. Desethylatrazin
2. Hexazinon
3. Simazin
4. Atrazin
5. Crimidin



TLC STEROIDNÍCH HORMONŮ

tenká vrstva : Nano-SIL CN / UV

eluent : petroleter(40-60°C)/aceton 80/20 (v/v)

objem vzorku : 1 μ l

detekce : 0,2 g MnCl₂ v 60 ml metanolu s 2 ml H₂SO₄,
fotodozimetr, UV při 366 nm

- píky : 1. estriol
2. estradiol
3. estron

