

A papír- és vékonyréteg kromatográfia gyakorlata

Dr. Lázár István

**Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2009.**

Tartalomjegyzék

1.	A kromatográfiákról általánosan.....	4
1.1.	Oszlopkromatográfia, síkkromatográfia	5
2.	A vékonyréteg kromatográfia alapjai.....	8
2.1.	A vékonyréteg kromatográfia anyagai, eszközei, alapvető technikái	9
2.1.1.	Kromatográfiás rétegek.....	9
2.1.2.	Kifejlesztő kádák, kifejlesztési technikák	14
2.1.3.	Az eluens kiválasztása	18
2.1.4.	Mintafelvétel.....	21
2.1.5.	Lemezek szárítása, hőkezelése.....	24
2.1.6.	Láthatóvá tétel.....	25
2.1.7.	Előhívás	26
3.	A vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatok menete.....	29
3.1.	Oldatsorozatok, minták előkészítése.....	29
3.2.	Lapok levágása, minták felcseppentése	29
3.3.	Kifejlesztés, előhívás	31
4.	Vékonyréteg kromatogramok elemzése.....	33
4.1.	Alapfogalmak.....	33
4.2.	Mennyiségi meghatározás a folterület alapján	35
4.3.	Mennyiségi meghatározás műszeres denzitometriás módszerrel.....	36
4.4.	Minőségi és mennyiségi kiértékelés digitális fényképek alapján.....	36
4.4.1.	A CP-Atlas program használata	36
5.	Mérési feladatok.....	43
5.1.	Kokamidopropil-betain kimutatása	43
5.2.	Édesköményolaj vizsgálata	46
5.3.	Aminosavak hidrofób kölcsönhatás kromatográfiája	48
5.4.	Aminosavak elválasztása papírkromatográfiával	50
5.5.	Aminosavak elválasztása cellulóz rétegen.....	52
5.6.	Aminosavak elválasztása szilikagél rétegen.....	53
5.7.	Emberi bőr felületén lévő aminosavak azonosítása	54
5.8.	Ételfestékek elválasztása papírkromatográfiával.....	56
5.9.	Ételfestékek elválasztása cellulóz vékonyrétegen	57
5.10.	Ételfestékek elválasztása fordított fázisú rétegen	59

1. A KROMATOGRÁFIÁKRÓL ÁLTALÁNOSAN

A modern elválasztástechnikai és analitikai eljárások legnagyobb jelentőségű és legszélesebb körben használt változatai a különböző kromatográfiai technikák, amelyek egy anyag összetételére, tisztaságára nézve szolgáltatnak adatokat. Kromatográfiai eljárások nélkül ma már nem képzelhető el a modern vegyipar, az egészségügy, vagy a környezetvédelem egyetlen ága sem.

A kromatográfia olyan eljárások gyűjtőneve, amelyek során egy mozgó hordozóközeggel elegyedő, vagy abban oldódó vizsgálati minta alkotóit a mozgó közeg, a mozgó közeggel érintkező álló közeg valamint a minta komponensei közötti eltérő erősségű, reverzibilis kölcsönhatások alapján választjuk szét.

A minta továbbítását végző mozgó közeget mozgó fázisnak, a szétválasztási művelet során álló közeget álló fázisnak nevezzük.

1. táblázat A különböző kromatográfiai technikák csoportosítása az álló és mozgó fázis halmazállapota és az elválasztás alapjául szolgáló fizikai jelenség alapján

Álló fázis	Mozgó fázis	Fizikai jelenség	Kromatográfia
folyadék	gáz	abszorpció	GC (kapilláris, vagy nedvesített töltetű)
szilárd	gáz	adszorpció	GC (töltetű)
folyadék	folyadék	megoszlás	LC, HPLC, TLC (fordított fázisú) papírkromatográfia (PC)
szilárd	folyadék	adszorpció, ioncsere, méretkizárás, affinitás, hidrofób kölcsönhatás	LC, HPLC, TLC (normál fázisú), géلكromatográfia (GPC), ionkromatográfia (IC), affinitás kromatográfia, hidrofób kölcsönhatás kromatográfia
szilárd	szuperkritikus folyadék	adszorpció	szuperkritikus folyadékkromatográfia (SCF)
folyadék	szuperkritikus folyadék	megoszlás	SCF

Halmazállapota szerint a mozgó fázis gáz, folyadék, illetve szuperkritikus állapotú folyadék lehet, ennek alapján megkülönböztetünk gázkromatográfiát (GC), folyadékkromatográfiát (LC), illetve szuperkritikus folyadékkromatográfiát (SFC). Az állófázis mindhárom esetben folyékony vagy szilárd halmazállapotú lehet. A folyadékkromatográfia nagy, illetve ultranagy hatékonyságú változatát az alkalmazandó nyomás alapján nagynyomású, illetve ultranagy nyomású folyadékkromatográfiának ((ultra-)high pressure liquid chromatography, HPLC, UHPLC) nevezzük.

Az elválasztás fizikai alapja lehet adszorpció valamilyen porózus szilárd anyag felületén, abszorpció (egy gáz oldódása folyadékban), megoszlás két folyadékfázis között, molekulaméret szerinti eltérő vándorlási sebesség egy gélvázban, ioncsere folyamat az álló és mozgó fázisban lévő ionos specieszek között, speciális affinitás a mintakomponensekkel szemben, illetve vizes oldatokban mutatott hidrofób kölcsönhatás az apoláris molekulareszek között.

1.1. Oszlopkromatográfia, síkkromatográfia

Ha az állófázis egy csőben helyezkedik el, akkor valamilyen fajta oszlopkromatográfiáról beszélünk. Az oszlop hosszúsága, átmérője, töltete vagy belső bevonata változó lehet, az alkalmazástól és a minta mennyiségétől függően. A mozgó fázis gáz, folyadék, vagy szuperkritikus folyadék lehet. A különböző oszlopkromatográfias technikákat az ultranagy érzékenységgű analitikai kémiától egészen a több kilogrammos minták preparatív elválasztásáig, a laboratóriumoktól a gyógyszeriparig mindenhol elterjedten használják. A hagyományos, kis nyomású oszlopkromatográfias elválasztásokkal (az „oszlopozásokkal”) szinte minden szerves kémiai laboratóriumban találkozhatunk.

A síkkromatográfias technikáknál az állófázis egy valamilyen vastagságú porózus réteg, amelyen keresztül a réteg síkjában (és nem a lapra merőlegesen!) áramlik a folyékony mozgófázis. (Síkkromatográfiaiban csak folyékony mozgófázist lehet használni.) A réteg anyaga, kiterjedése és vastagsága az alkalmazástól és a minta mennyiségétől függ.

A rétegekromatográfiaiban a réteg anyaga lehet természetes vagy kémiaileg módosított papír (ez a hagyományos papírkromatográfia, PC), illetve valamilyen hordozóra felvitt, minimális mennyiségű inert ragasztóval rögzített porózus anyag (rétegekromatográfia), ami leggyakrabban szilikagél, kémiaileg módosított szilikagél,

alumínium-oxid, cellulóz, kémiaailag módosított cellulóz, polimer, vagy ioncserélő gyanta.

Amikor a réteg vastagsága néhány tized milliméter, akkor vékonyréteg kromatográfiáról (thin layer chromatography, TLC) beszélünk. Ha nagyon finom és egyenletes szemcseméretű anyagból készül a vékonyréteg lapon az állófázis, akkor a létrehozott vékonyréteg különösen nagy felbontóképességű lesz. Az ilyen rétegeket használó technikát nagy felbontóképességű vékonyréteg kromatográfiának (high performance thin layer chromatography, HPTLC) nevezzük.

Azt a megoldást, amikor jelentős nyomással préselik át a mozgófázist a rétegen túlnyomásos vékonyréteg kromatográfiának (OPLC vagy OPTLC) nevezzük. Ennek a technikának számos előnye van, például nagyon gyors, on-line módban is használható, a vele kidolgozott módszerek könnyen adaptálhatók HPLC készülékekre. Az OPLC készülékek a hozzájuk való szélezett lapok magas ára, valamint a rugalmatlan lapformátum miatt csak szűk felhasználói körben terjedtek el.

A rétegekromatográfia – az oszlopkromatográfiához hasonlóan – nagyobb anyagmennyiségek szétválasztására is használható, ezt a technikát preparatív rétegekromatográfiának hívjuk. A réteg vastagságát, kiterjedését a minta mennyiségének függvényében csak egy határig növelhetjük. Preparatív célokra sem használunk 5 mm-nél vastagabb és 200 mm-nél hosszabb vagy szélesebb réteget, mert a minta egyenletes felvitelét már nem lehet megoldani, a nagy lapok nehezek, törékenyek, porladnak, rosszul kezelhetők.

A papírkromatográfia az 1950-es években volt nagyon népszerű, de néhány, elsősorban biológiai és biokémiai alkalmazáshoz még ma is széles körben használjuk. Megvalósításához még a vékonyréteg kromatográfiánál is kevesebb eszköz kell. A papírkromatográfiának soha nem volt műszeres változata, de a modern digitális képfeldolgozási módszerekkel lehetőség van a számítógépes kiértékelésre. A professzionális PC vizsgálatokhoz olyan kromatográfiás papírokat gyártanak (ezek lényegében nagyon finom rostozatú, sima felületű szűrőpapírok), amelyekkel meg lehet közelíteni a normál TLC felbontóképességét. A futtatást 10–50 cm-es kifejlesztési távolságon végezzük. A PC-t részben kiszorította a nagyobb felbontóképességet adó, mikrokristályos cellulóz rétegen végzett vékonyréteg kromatográfia. A papírkromatográfiát továbbra is használjuk például a növényi színezékek gyors, olcsó szétválasztására, illetve a pépesített szűrőpapír állófázison végzett preparatív oszlopkromatográfiás elválasztásokhoz szükséges módszerfejlesztésekhez. Olyan esetekben is előnyös lehet, ahol további vizsgálatok végzéséhez (pl. hamvasztáshoz, radioizotópos vizsgálatokhoz) ki kell vágni a foltot

anélkül, hogy abból anyagveszteség lenne (a vékonyréteg könnyen porlik, lepereg, nem hamvasztható). Az oktatásban, bemutató kísérletekben is szívesen használjuk a PC-t annak kis költségigénye és egyszerű megvalósíthatósága miatt. A módszer fejlettségének csúcspontján használt eszközök egy része (pl. a spirálkád) jórészt feledésbe merült, mintapéldányaik esetenként kromatográfia történeti kiállításokon láthatók.

2. A VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIA ALAPJAI

A vékonyréteg kromatográfia napjainkban is a legismertebb, legszélesebb körben használt analitikai eljárás. Elterjedtsége főként egyszerűségének, olcsóságának köszönhető, ugyanis alapszinten nagyon kicsi az eszközigénye. A preparatív kémiai laboratóriumokban a reakciók nyomon követésére, a termékek tisztaságvizsgálatára, azonosítására használják.

Megfelelő pontosságú eszközökkel kiegészítve azonban a műszeres vékonyréteg kromatográfia széles körben használható, kvantitatív analitikai eljárás is, amivel gyorsan és költséghatékonyan 15-20 minta egyidejű mérését meg lehet oldani. A műszeres TLC óriási előnye az összes többi analitikai eljárással szemben az, hogy a vékonyréteg lap egy egyszer használatos eszköz, arra bármilyen szennyezett minta felcseppenthető, nem kell azzal foglalkozni, hogy egyes komponensek irreverzibilisen kötődnek-e az állófázishoz, vagy vannak-e benne makroszkópikus, lebegő szennyezések. Az egy minta vizsgálatára felhasznált oldószer mennyisége sokkal kisebb, mint a hagyományos HPLC-nél, és összevethető az UHPLC oldószerfelhasználásával.

Természetesen a vékonyréteg kromatográfia – minden pozitívuma mellett is – nem egy mindenre megoldást kínáló módszer. Érzékenysége, pontossága, felbontóképessége, szelektivitása jelentősen elmarad a HPLC mögött, de a módszer korlátai által biztosított térben lényegében ugyanazokat a feladatokat lehet vele megoldani, ugyanolyan állófázisokon. Gyakori, hogy a gyógyszergyártás során a reakcióelegyeknek a gyártásközi gyors ellenőrzését műszeres TLC-vel végzik, míg a késztermék minősítését, tisztaságvizsgálatát HPLC-vel és/vagy GC-vel. A műszeres TLC nagy felhasználói közé tartoznak a gyógynövény készítményeket előállító laboratóriumok is, amelyek munkájára jellemző, hogy a szezonálisan, nagyon sok egyedi termőterületről begyűjtött alapanyagot minél hamarabb, egymással párhuzamosan minősíteni kell.

2.1. A vékonyréteg kromatográfia anyagai, eszközei, alapvető technikái

2.1.1. Kromatográfiai rétegek

A legáltalánosabban használt réteg a szilikagél, amely normál TLC, illetve nagy felbontó képességű HPTLC minőségben is hozzáférhető. Mivel a porózus, nagy felületű anyagok jó adszorbensei a laboratóriumi gőzöknek, a rétegeket a laboratóriumi levegőtől lehetőleg elzárva, tiszta levegőjű helyiségben, szorosan lezárt dobozban tároljuk. Ideális esetben a szilikagélből illetve alumínium-oxidból készült rétegeket az aktivitás minél tökéletesebb megőrzése érdekében ellenőrzött páratartalmú szekrényben tartják.

A hordozó lap anyaga lehet üveg, alumínium, illetve műanyag. A legkönnyebben az alumínium hordozós, a legnehezebben az üveg hordozós lapok vágathatók. Az alumínium hordozó jól bírja az egyenetlen hőterhelést (pl. lángban való hevítést), de korrodeálódik savas és lúgos reagensek, valamint agresszív anyagok (pl. jódgáz) hatására. A műanyag hordozós rétegek sok helyen népszerűek, jó a vegyszerállóságuk, de csak korlátozottan hőállóak. Az üveg hordozó kémiaiilag a legellenállóbb, egyenetlen hőeloszlásban jól melegíthető, de törékeny és a vágása gyakorlatot igényel.

A rétegek tipikus méretei: 20 cm * 20 cm (TLC), 10 cm * 20 cm (TLC, HPTLC), 10 cm * 10 cm (HPTLC), 5 cm * 20 cm (TLC), 5 cm * 7,5 cm (HPTLC, TLC), illetve egyes alumínium hordozós rétegből 20 cm * 10 cm-es tekercseket is előállítanak.

A kifejlesztési távolság normál TLC-s analitikai vizsgálatnál 8-16 cm, míg HPTLC esetében 4-8 cm.

Az állófázis lehet szilikagél, alumínium-oxid, cellulóz, szénhidrogén láncokkal kémiaiilag módosított szilikagél (C8, C18, stb.), poliamid, erős vagy gyenge típusú (funkcionalizált polisztirol ill. cellulóz alapú) ioncserélő gyanta.

Polaritásuk alapján két nagy csoportra oszthatjuk az állófázisokat: normál fázisra (ilyen pl. a szilikagél, az alumínium-oxid), illetve fordított fázisra (ilyenek pl. a C8, C18 rétegek).

A normál fázisra az a jellemző, hogy erősen poláris és hidrofil az állófázis felülete, ezért leginkább a poláris anyagok elválasztására használjuk. A teljesen apoláris oldószerek (pl. a hexán) nem tudják a felületen megkötött anyagokat lemosni, a poláris oldószerek azonban a polaritásuktól függően képesek az adszorbeálódott komponensek kiszorítására (deszorpciójára). A legpolárisabb oldószerek (pl. víz, ecetsav) a legerősebbek, ezek gyakorlatilag az összes megkötött anyagot leoldják a normál fázis felületéről.

A leggyakrabban használt kromatográfias normál állófázis a szilikagél, emellett elterjedten használják az alumínium-oxidot. Mivel mindkét anyag erősen hidrofil, a levegőből a nedvességet elnyelik, a relatív páratartalom függvényében folyamatosan változik a felületi aktivitásuk. Reprodukálható mérésekhez ki kell küszöbölni a változó páratartalom okozta bizonytalanságot, ezért először szárítószekrényben aktiválják a réteget, majd teljesen száraz, illetve szabályozott páratartalmú kamrákban tárolják azokat a felhasználásig.

A szilikagél felülete mindig savas kémhatású a szilanol csoportok disszociációja miatt. Amennyiben oszlopkromatográfias célra neutrális vagy bázisos szilikagél felületre van szükségünk, a szilikagélt vizes szuszpenzióban NaOH-dal vagy más erős bázissal semlegesíteni kell, utána pedig a kiszűrt szilikagélt szárítószekrényben 110 °C hőmérsékleten legalább 2 órán át szárítani/aktiválni kell. Az aktivált szilikagélt légmentesen záródó dobozban tároljuk felhasználásig. Szilikagél réteg esetén kisebb a mozgásterünk, a pH-t nem tudjuk mérni, de tapasztalati úton kidolgozható olyan mártásos vagy szórásos eljárás, amellyel bázisos felületet hozhatunk létre.

Alumínium-oxidból készen kaphatók a bázisos, semleges ill. savas kémhatású változatok, amelyek aktivitása eredeti állapotban általában Brockmann-II, de más aktivitások is beállíthatók úgy, hogy a réteget ellenőrzött páratartalmú szekrényben hosszabb ideig (esetleg napokig) kondicionáljuk.

A fordított fázis felülete apoláris, ezért az apoláris anyagokat tartja vissza a legerősebben. A visszatartás mechanizmusa fordított fázis esetén megfelel a komponensek két, egymással nem elegyedő folyadék közötti megoszlásának, ugyanis a felületen lévő C18 láncok úgy viselkednek, mintha egy kémiaileg kötött, vékony paraffin olaj film vonná be a szemcsék felületét. A használt eluens ezt a kémiaileg kötött, álló folyadékfilmet nem tudja leoldani, így a minta komponensei a folyamatos folyadék-folyadék extrakciónál ismert módon valamilyen koncentrációarányban, dinamikus egyensúlyban oszlanak meg az álló és a mozgó fázis között. Eluensként az oldószerek közül a kis és közepes polaritású szerves oldószerek (pl. acetonitril,

dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid) a legnagyobb erejűek, a víz erősen poláris oldószer, ezért eluotróp ereje nagyon kicsi.

Fontos megjegyeznünk, hogy a fordított fázisú rétegek esetén vizet önmagában nem használhatunk eluensként, ugyanis nem nedvesíti a réteget, hanem leperreg róla. Fordított fázis esetén mindig egy szerves oldószer és egy vizes oldat elegyét használjuk, a víztartalmat szükségtelenül ne emeljük 40% fölé, különben nedvesítési problémák jelentkezhetnek. Általános tapasztalat, hogy a vizes-szerves oldatok viszonylag nagy viszkozitása miatt a rétegek kifejlesztése sokkal tovább tarthat, mint amit normál fázis esetén megszoktunk.

Kevert fázisként viselkednek azok a kémiailag kötött szorbensek, amelyek apoláris láncot és poláris csoportokat is tartalmaz, ilyenek lehetnek pl. a ciano-propil vagy aminopropil-csoportokat tartalmazó szilikagélek. A kevert fázisok normál és fordított fázisként is használhatók.

Mind a normál, mind a fordított fázis esetén a leggyakrabban nem egy, hanem több komponensű elegyet használunk eluensként, mert így a rétegen a komponensek szétválasztását finomabban szabályozni tudjuk. Az OPLC készülékeken, illetve a legmodernebb automata futtatókádakon kívül nincs mód a kifejlesztés során folyamatosan változó összetételű eluens használatára, azaz gradiens elúcióra.

Az UV-elnyelésre képes komponensek kimutatására előnyösen használhatók a fluoreszkáló adalékot tartalmazó fluoreszcens rétegek, amelyek egy vagy két hullámhosszon történő gerjesztés hatására halványzöld illetve halványkék fényel fluoreszkálnak. A két leggyakoribb hullámhossz a 254 nm és a 366 nm. Ilyen réteget használva a fényelnyelésre képes anyagok világos alapon sötét foltként jelennek meg az UV-lámpa alatt.

A vékonyréteg lapok jelölésére nincs szabvány, de a gyártók többsége nagyjából hasonló gyakorlatot követ. Egy átlagos szilikagél lap példája kapcsán nézzük, hogy mit tüntetnek fel a rétegek dobozán.

DC-Fertigplatten
Kieselgel 60 F₂₅₄

TLC plates silica gel 60 F₂₅₄
pre-coated 50 plates 10x20 cm
layer thickness 0.25 mm

A „DC Fertigplatten” ill. „TLC pre-coated plates” a vékonyréteg kromatográfiára használható, gyári készítésű lemezeket jelzi németül ill. angolul, a Kieselgel (Silica gel) = szilika gél németül ill. angolul adja meg a réteg kémiai összetételét, a név utáni 60-as szám a szilikagél pórusméretét adja meg Angströmben (1 Å = 0,1 nm).

Az F betű a réteg fluoreszkáló tulajdonságát jelzi, a 254 pedig a fluoreszcencia kiváltásához szükséges UV-fény hullámhosszát adja meg nm-ben, ami esetünkben 254 nm. Kovalensen módosított felületű gél esetén az RP betűk a fordított fázisú tulajdonságot, a betűk után következő szám pedig a kovalensen kapcsolódó szénlánc szénatomszámát (hosszúságát) adja meg. A CN betűk a cianopropil, Diol a dihidroxi-alkil, NH₂ az aminopropil oldalláncokra utalnak. A királis elválasztásokra alkalmas réteget CHIR felirat jelzi. Amennyiben nem üveglap hordozón van a réteg, általában megadják a hordozó minőségét, pl. alufólia hordozó (Alufolien ill. Aluroll). Külön feltüntetik azt is, ha koncentráló zónás a réteg.

Az elmondottak alapján önállóan gyakorolhatjuk a rétegek felismerését a következő címkék felhasználásával:

Art. 13726
HPTLC-Fertigplatten
RP-2 F₂₅₄ S
 für die Nano-DC

Art. 5547
HP-TLC-Alufolien Kieselgel 60
 (ohne Fluoreszenzindikator)
 für die Nano-DC

Art. 14285
HPTLC-Fertigplatten CHIR
 mit Konzentrierungszone
 25 Platten 10 x10 cm
 Konz.-Z.: 2,5 cm x 10 cm

DC-Alufolien
Aluminiumoxid 60 F₂₅₄
neutral (Typ E)
 25 Folien 20x20 cm

Pontos és reprodukálható vizsgálatokat csak akkor tudunk végezni, ha az általunk használt rétegnek minden vizsgálat megkezdésekor ugyanakkora a felületi aktivitása. A felületi aktivitás fogalmát Snyder vezette be, és a gyakorlatban Brockmann által kidolgozott mérési módszer terjedt el. Mind az alumínium-oxidok, mind a szilikagélek jellemzésére használják. A Brockmann skálán az I. fokozat jelzi a legnagyobb, V. fokozat a legkisebb aktivitást. Az I. fokozat annyira aktív, hogy az ilyen alumínium-oxidot vízgőz nyomok eltávolítására használják különböző gázokból. Normál levegőn néhány tíz másodperc alatt annyi vizet vesz fel, hogy elveszíti az I. aktivitását. A II. aktivitás az első, amely már normál körülmények között kezelhető és még nagyon aktív.

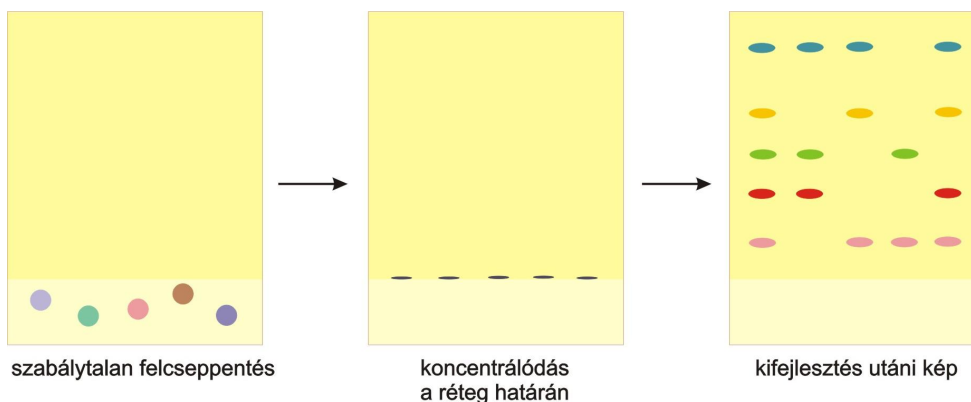
A relatív páratartalmat tömény sóoldatokkal, illetve megadott összetételű tömény kénsav-víz elegyekkel lehet beállítani. A kromatográfiás tárolószekrények aljában elhelyezhető, perforált lappal lezárt tetejű tálcába öntik a nedvességtartalmat szabályozó oldatot, majd ugyanabban a göztérben tárolják a rétegeket is. A

behelyezéstől számítva több óra alatt áll be a gőztéri egyensúly. A következő táblázatban megadjuk néhány telített sóoldat fölötti gőztér relatív páratartalmát.

2. táblázat Telített sóoldatok és az általuk biztosítható relatív páratartalom értékek 25 °C hőmérsékleten

Telített oldat	Relatív páratartalom (%RH) 25 °C-on
LiCl	11,30
CH ₃ COOK	22,51
MgCl ₂	32,78
K ₂ CO ₃	43,16
Mg(NO ₃) ₂	52,89
NaCl	75,29
KCl	84,34
KNO ₃	93,58
K ₂ SO ₄	97,30

A nedvességtartalom ingadozásának hatását a gyakorlatban legkönnyebben úgy tudjuk kiküszöbölni, ha osztott aljú ikerkamrát használunk és a réteget a kifejlés megkezdése előtt a kamra gőztérében legalább 10-15 percig kondicionáljuk.



1. ábra Koncentráció zónás vékonyréteg lap működési elve.

A minták minél élesebb sávban történő felvitelét, ezáltal pedig az elválasztóképesség növelését lehet elérni az ún. koncentráció zónás rétegekkel. A koncentráció zóna egy olyan, kb. 2,5 cm szélességű, inaktív porózus anyagból (pl. kovaföldből) készült sáv a lapok alsó részén, amelynek az a szerepe, hogy a felcseppentett foltokat az aktív

réteg szélén egyetlen csíkká tömörítse a futás első pillanataiban. Alkalmazásával le tudjuk csökkenteni a cseppentési hibák egy részét és a kapott kromatogram vékonyabb, élesebb sávokat tartalmaz. A koncentráló zóna működését az 1. ábra szemlélteti. A normál rétegek közül a legáltalánosabban használt fajták, a HPTLC-s rétegek közül pedig mindegyik fajta kapható koncentráló zónás kivitelben is.

A koncentráló zónás lapoknak csak az egyik szélén van zóna, így azok vágása csak egy irányban, a zónára merőlegesen végezhető el a zóna megtartása mellett. Ha pl. egy 20x20-as normál TLC-s lapot mindkét oldalon elfelezünk, akkor két olyan negyedünk lesz, amely koncentráló zónás, és két olyan, amely semmiben nem különbözik a hagyományos lapoktól.

2.1.2. Kifejlesztő kádak, kifejlesztési technikák

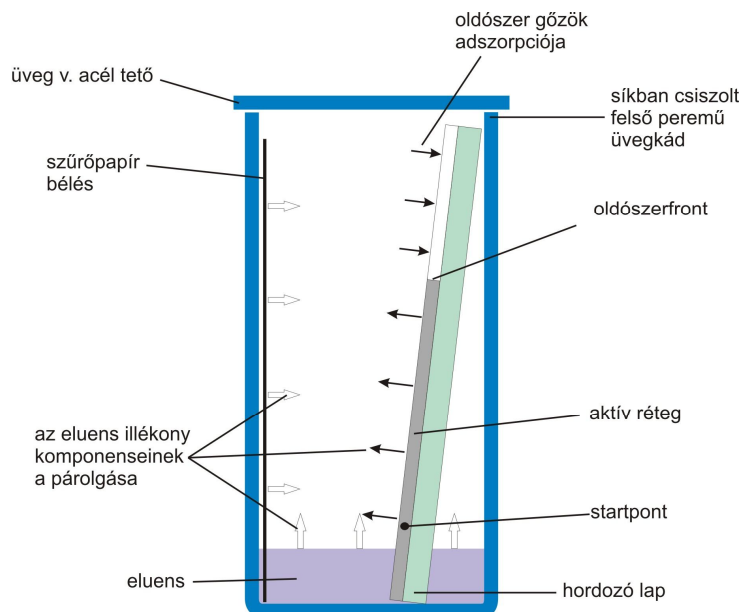
Vékonyréteg kromatográfias célokra általában öntött üvegből vagy ragasztott üveglapokból készült, sima vagy osztott aljú, csiszolt tetejű kádakat használnak, amelyek mérete a kapható TLC lapokéhoz igazodik. A jól záródó tető nagyon fontos része a kromatográfias kádnak, mert ez akadályozza meg az oldószerek elillanását a kádból. A kád geometriai méretei még akkor is jelentősen befolyásolják a futási képet, ha minden egyéb paramétert állandó értéken tartunk. Laboratóriumok között átvihető, reprodukálható eredményeket csak azonos típusú kádak használatával lehet elérni, ezért a kád méretét, típusát mindig meg kell adni.



2. ábra Bal oldalon egy osztott aljú, normál típusú professzionális kromatográfias kád látható acél tetővel, a kádban 10x10 cm-es rétegek futtathatók. Jobb oldalon egy kromatográfias kádként használt tárgylemez festő kád látható, amiben maximum 40 mm széles, 66 mm magas lapok futtathatók. Ez utóbbi típust csak magas forráspontú oldószerek esetén célszerű használnunk, ugyanis a tetejükön nincs síkcsiszolat, ezért rosszul zárnak.

Vizes oldatok használata esetén a gőztér telítettségének viszonylag kicsi a jelentősége, de szerves oldószereket használva a kádak gőztérének az adott oldószerre nézve telítettnek kell lenniük. Ezt azért tudjuk elérni, hogy a kamra belső falát szűrőpapírral béleljük ki úgy, hogy a papír beleér az eluensbe és legalább a réteg tetejéig felnyúl. A gőztéri telítéshez normál típusú, 10 cm magas kádak esetén kb. 10-15 perc, a 20 cm magas kádaknál kb. 30-60 perc kell. A normál típusú kádak belső tere kb. 40-50 mm vastagságú, míg az ún. szendvicskádaké (amelyekben a kromatográfiai lap két üveglap között, mintegy szendvicsként helyezkedik el) csupán 2-4 mm. A szendvicskádákban a lokális gőztelítést maga a réteg is elvégezheti, ekkor az előadszorpció háttérbe szorul, aminek következtében azonban teljesen különböző futási képet kapunk, mint normál kádak esetén.

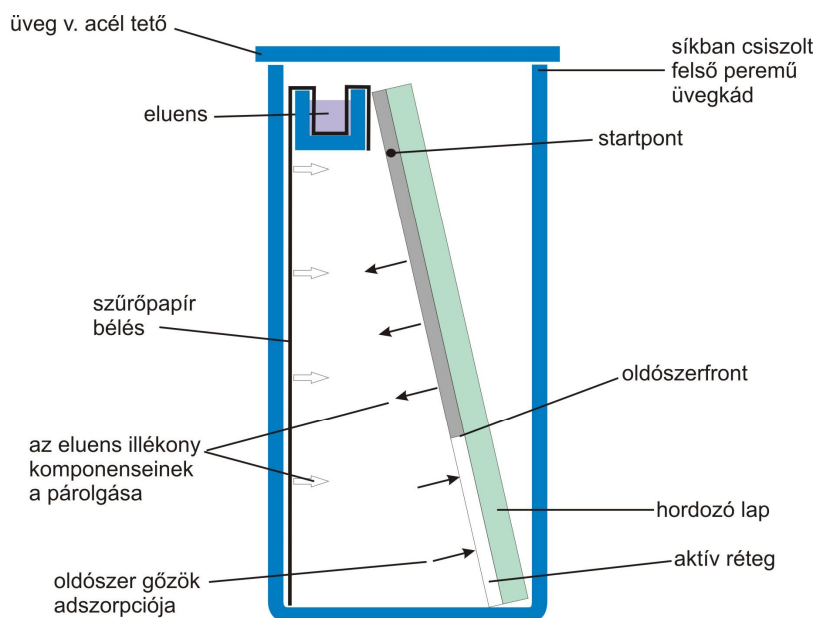
A kromatográfiai kádban lévő TLC lap elhelyezkedése álló (vertikális), illetve fekvő (horizontális) lehet. Fekvő réteg esetén a futásirány nyilvánvalóan csak vízszintes lehet, az eluens előrehaladását csak a kapilláris erők biztosítják, a gravitáció nincs rá hatással. Álló réteg esetén a futásirány (az eluens áramlásának iránya) felfelé, illetve lefelé is lehet.



3. ábra Felfelé kromatográfia telített gőztérű normál kádban. Üres nyilak jelzik az eluens párolgását a folyadékfelszínen és a szűrőpapír bélésen, tele nyilak a már átitatott rétegen. A még száraz rétegen megtörténik az oldószer-gőzök adszorpciója, előtelítése. A foltok rétegen túli futtatása nem lehetséges.

A felszálló futásirányt használjuk a leggyakrabban, mert ennek legegyszerűbb a megvalósítása. Az eluent a kapilláriserők szívják fel a rétegben. Mivel a felszívódás iránya a gravitációval ellentétes irányú, felszálló futtatásnál az eluens front haladási sebessége időben folyamatosan csökken. Az áramlás megszűnik, miután a front elérte a réteg felső peremét. Illékony oldószerek esetén a porózus réteg felületén az oldószerfront látszólagos megállása után is folytatódik a párolgás. Az elpárolgott térfogat pótlására az alsóbb régiókban továbbra is fennmarad az áramlás, ami egy idő után jelentősen meg tudja változtatni a kromatogramot. Az oldószer áramlás mellett másik zavaró tényező az, hogy a diffúzió időben fokozatosan szélesíti a foltokat, ezért a felbontóképesség egy határon túl már nem növelhető a réteg hosszúságának a növelésével. A kívánt kifejllesztési távolság elérése után a vékonyréteget minél hamarabb el kell távolítani a kádból.

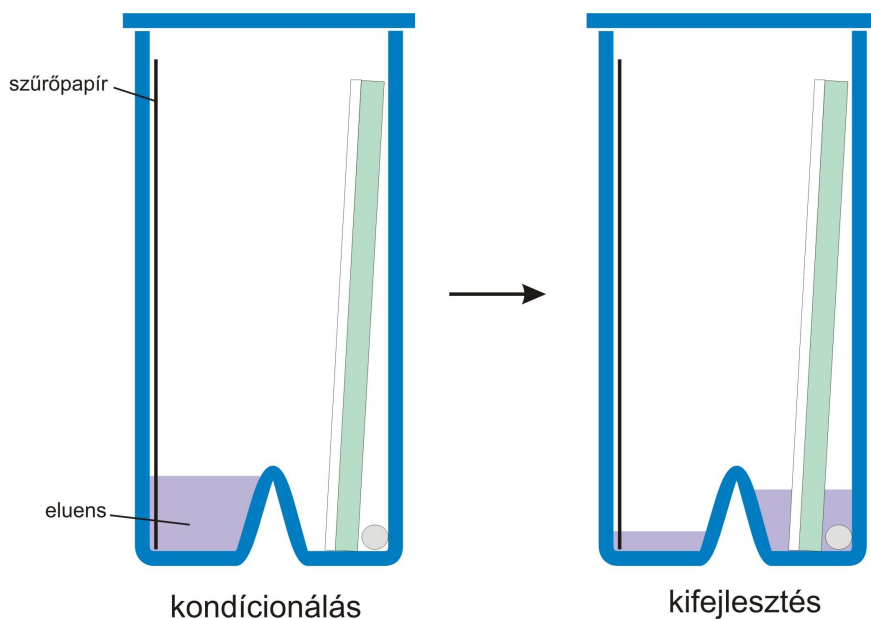
Leszálló eluensáramlást valamivel nehezebb megvalósítani, ahhoz általában speciális elrendezés és egyedi készítésű kiegészítő betét szükséges, azt kereskedelmi forgalomban nem lehet beszerezni. Ekkor az eluens egy átnedvesített szűrőpapír csíkból szívódik át a rétegre, felülről lefele halad a rétegben, mozgását a gravitáció is segíti. Ebben az esetben lehetőség van arra, hogy a folyadékáramlást a réteg alsó peremének az elérése után is fenntartsuk, ugyanis a porózus réteggel mint kapillárisrendszerrel összekötött alsó és felső kamra közlekedőedényként működik. A leszálló elrendezést ritkán használjuk.



4. ábra Leszálló kromatográfia telített gőzterű normál kádban. Üres nyilak jelzik az eluens párolgását a folyadékfelszínen, tele nyilak a már átítatott rétegen. A még

száraz rétegen megtörténik az oldószergőzök adszorpciója, előtelítése. A kifejlesztés nem áll meg akkor, amikor az eluens eléri a réteg alját, hanem tovább folytatódhat (azaz a túlfuttatás lehetséges).

Osztott aljú, ún. ikerkádakkal könnyű megvalósítani a gőztéri telítést és a kondicionálást, ennek módját láthatjuk az 5. ábrán. A felcseppentett réteget az ikerkád száraz felébe helyezük, a szükséges ideig várunk arra, hogy a gőzök előadszorpciója megtörténjen, majd a kádat óvatosan addig döntjük oldalra, amíg az eluens átfolyik a másik téréfélre. Ezután a kádat visszaállítjuk az eredeti állásába, és megvárjuk a futás végét. Az átöntés során gondoskodni kell arról, hogy a réteg ne mozduljon el, vagy ne tapadjon fel a kamra falára. Legegyszerűbb, ha a száraz téréfélben a réteg mögé egy kis üvegrudat fektetünk, ami távtartóként működik. (Egyes kádtípusoknál ez az áttöltés problémás lehet, ilyenkor inkább felnyitjuk a kádat és kézzel áthelyezzük a réteget az eluensbe.)



5. ábra Kondicionálás és kifejlesztés ikerkamrában.

A főként HPTLC rétegekhez használt horizontális futatókádak olyan felépítésűek, hogy mind szendvicskádaként, mind pedig normál kádaként használhatók. A vertikális kádakkal összevetve ebben az esetben is más lesz a kapott futási kép, de a határozott geometria, a jól kézben tartható kondicionálási körülmények miatt az eredmények jól

reprodukálhatóak. A kád telített és telítetlen góztérrel történő futtatásra egyaránt alkalmas. Egyidejűleg két különböző összetételű futtatószeret is használhatunk, ugyanis egymással szemben két, teljesen azonos felépítésű eluenstartályt és startlapot tartalmaz. Ugyanazon a lapon egyidejűleg két független mintasorozatot is analizálni lehet, ilyenkor a futtatást egymással szemben végezzük. Egy-egy vizsgálatnak rendkívül kicsi az oldószerigénye, egy 10 cm x 10 cm-es lap teljes kifejlesztéséhez 3-3,5 cm³ eluens elegendő.



6. ábra Horizontális futtatókád.

2.1.3. Az eluens kiválasztása

A megfelelő eluens kiválasztása a folyadékkromatográfia egyik legnehezebb feladata. Az analitikai elválasztások, vizsgálatok legnagyobb része nem végezhető el csupán egyetlen oldószernek a felhasználásával. Az eluens komponenseinek egymással elegyíthetőnek kell lenni. Amennyiben lehetőség van rá, törekszünk az egymáshoz közeli forráspontú oldószerek használatára, hogy a futás közben, illetve a kondicionálás során az illékonyabb komponens kipárolgása miatt lehetőleg minél kevésbé változzon meg az eluens összetétele. Az eluensnek oldania kell a minta összes komponensét. Lehetséges ugyan olyan futtatást is végezni, amikor az eluens egyáltalán nem oldja a minta bizonyos komponenseit, de az lényegét tekintve egy szelektív kicsapással egybekapcsolt, rosszul reprodukálható kromatográfias vizsgálatnak felel meg. A teljes oldhatatlanság ritka, ezért a csapadékot adó anyag önmaga is lassan, folyamatosan szivárog, rontja a képet. Amennyiben lehetséges, kerüljük az ilyen módszereket. A csapadékos foltból nehezen oldódnak ki a bezárt

anyagok, így előfordulhat, hogy a korábban egy foltot adó komponensek is hosszú, folyamatosan kioldódó csík formájában jelennek meg. Nem tudhatjuk azt sem, hogy a felcseppentési foltnál keletkező csapadék nem torzítja-e a koncentrációkat.

3. táblázat Az oldószerek Snyder-féle eluotróp sorozata

	$\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$	$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2(\text{OH})_2)$	$\epsilon^\circ(\text{C18})$
n-Pentán	0.00	0.00	
n-Hexán	0.00-0.01	0.00-0.01	
i-Oktán	0.01	0.01	
Ciklohexán	0.04	0.03	
Szén-tetraklorid	0.17-0.18	0.11	
Xilol	0.26		
Toluol	0.20-0.30	0.22	
Benzol	0.32	0.25	
Dietil-éter	0.38	0.38-0.43	
Diklór-metán	0.36-0.42	0.32-0.32	
Kloroform	0.36-0.40	0.26	
1,2-Diklór-etán	0.44-0.49		
Metil-etil-keton	0.51		
Aceton	0.56-0.58	0.47-0.53	8.8
1,4-Dioxán	0.56-0.61	0.49-0.51	11.7
Tetrahydro-furán	0.45-0.62	0.53	3.7
Metil-t-butyl-éter	0.3-0.62	0.48	
Etil-acetát	0.58-0.62	0.38-0.48	
Dimetil-szulfoxid	0.62-0.75		
Dietil-amin	0.63		
Acetonitril	0.52-0.65	0.50-0.52	3.1
1-Butanol	0.70		
Piridin	0.71		
2-Metoxi-etanol	0.74		
n-Propanol	0.78-0.82		10.1
i-Propanol	0.78-0.82	0.60	8.3
Etanol	0.88		3.1
Metanol	0.95	0.70-0.73	1.0
Etilén-glikol	1.11		
Dimetil-formamid	nagy	nagy	7.6
Víz	nagyon nagy	nagyon nagy	
Ecetsav	nagyon nagy	nagyon nagy	

Annak eldöntésére, hogy milyen oldószerekből álljon az eluens, próbafuttatásokat végzünk. A próbafuttatásoknak nem kell teljes értékű kromatogramot szolgáltatniuk, csak azt kell megmutatniuk, hogy mely oldószerek eluálják jól és melyek rosszul a vizsgálati minta komponenseit. A lehető legegyszerűbb vizsgálatot néhány perc alatt el lehet végezni, mert már egy-két foltnyi távolságra való elmozdulás is sok információt szolgáltat.

A megfelelő futtatószer kiválasztása történhet több kis kádban történő egyidejű futtatással, vagy külön erre a célra kidolgozott, sokcsatornás horizontális kifejlesztő kádban (ún. Vario kádban). Ha már ismerjük, vagy eldöntöttük az eluens minőségi összetételét, a mennyiségi arányok beállítása további vizsgálatokat igényel. (A legkevesebb kísérlethől a legnagyobb felbontóképesség megtalálását a Prizma modell segítségével végezhetjük, aminek tárgyalása meghaladja a lehetőségeinket, de részletes leírása a szakirodalomban könnyen megtalálható.)

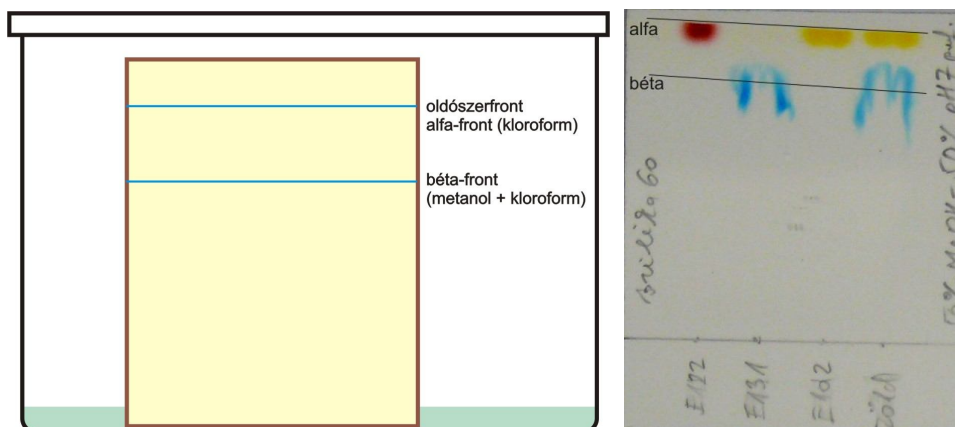
A mindennapi gyakorlatban a legnagyobb segítséget az oldószer kiválasztásához az eluotróp sorozat jelenti. Az egyes oldószerek egymáshoz viszonyított elúciós (leoldó) képességét, azaz az eluotróp erejét (ϵ^0) egy kísérletileg megállapított ún. eluotróp sorozatban foglalták össze. Ez a sorozat elsőként alumínium-oxid állófázisra lett kidolgozva, de kis módosítással átvihetők az eredmények szilikagélre is a köv. képlet alapján:

$$\epsilon_{\text{szilikagél}}^0 = 0,77 \cdot \epsilon_{\text{alumínium-oxid}}^0$$

Mára már kidolgozták a fordított fázisra vonatkozó, részleges eluotróp sorozatot is. Az eluotróp sorozat ismertebb tagjait a következő táblázatban foglaltuk össze.

Oldószerkelet esetén az eredő ϵ^0 érték nem lineárisan, hanem logaritmikusan változik az elegy komponenseinek móltörtjeivel.

Ha az eluens alkotóinak nagyon különböző a polaritása (pl. kloroform–metanol elegy), akkor a rétegen a futás közben megtörténik az oldószerkomponensek szétválása (frontális szeparációja) is, ami a fő front (ún. α -front) mellett másodlagos oldószerfront (β -front) kialakulását okozza. Ez szemmel gyakran nem látható, de megfelelő festési eljárással kimutatható. A második front helyzete a használt oldószerkelet összetétele mellett még sok más paramétertől, így a lemez víztartalmától is függ, teljesen reprodukálható kromatogramot csak mindenben azonos körülmények között lehet kapni. Amennyiben mód van rá, érdemes az eluensünket olyan oldószerekből készíteni, amelyek polaritásai nem állnak nagyon messze egymástól.



7. ábra Bal oldalon a másodlagos oldószerfront kialakulása látható erősen eltérő polaritású oldószerkeverék használata esetén. A béta-front szabad szemmel gyakran nem látható, de a közelébe eső foltokra jelentős hatása lehet. Jobb oldalon egy olyan kromatogram látható, amelynél a metanol-víz eleggyel ételfestékeket választottunk szét. A metanol alfa-frontja mögött kialakuló vizes béta front nem jól definiált, helyzete a réteg lokális nedvességtartalmától függ, ezért szabályos áramlás helyett kiszámíthatatlan módon fut, a kék színezék foltját örvénylásszerűen összezavarja.

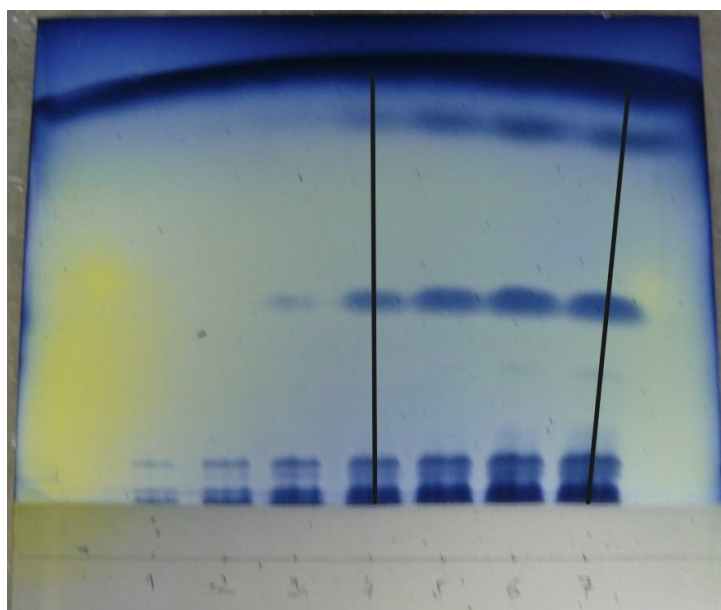
2.1.4. Mintafelvétel

Az egyes mintákat a vékonyréteg lap megadott helyére, az ún. startvonalra, azon belül a startpontokra kell minél pontosabban, minél egyenletesebben felvinnünk.

A kamra típusa, a futtatás módja részben befolyásolhatja, hogy a startvonalat és a startpontokat hová helyezzük. Általános szabály, hogy 20 cm x 20 cm-es normál TLC-s lapnál egyik szélén sem lehet folt a lap szélétől számított 20 mm-en belül és a startvonal 20 mm-re legyen a lap alsó szélétől. A minták nem lehetnek 10 mm-nél közelebb egymáshoz, de vannak módszerek, ahol akár 20 mm távolságot is előírnak. 10 cm x 10 cm-es HPTLC-s lemeznél a két szélétől számítva 10-15 mm-en belül nem lehet folt, és a minták legalább 6 mm-re legyenek egymástól. Álló kádnál a startvonal kb. kb. 15 mm magasan legyen, de horizontális kádnál a 10 mm is megfelelő.

Láttuk, hogy a rétegek teljes felületén párolgás játszódik le. A nem tökéletesen telített gőzterű kamráknál a párolgás különösen jelentős a lemezek széle felé haladva. Ennek következtében az eluens nem csak a startvonalra merőleges irányba mozog, hanem a lap közepe felől is áramlik a lap széle felé. A foltok nem

párhuzamos egyenesek mentén fognak elhelyezkedni, hanem valamelyest sugárirányban kifelé tartva. Ezt a jelenséget peremhatásnak nevezzük. Magas forráspontú oldószerek esetén a peremhatást gyakran észre sem lehet venni, de annál erősebben jelentkezik, minél kisebb az eluens valamely komponensének a forráspontja. Nagyon illékony eluens használatkor a gőztér telítése és a lap kondicionálása különösen fontos.



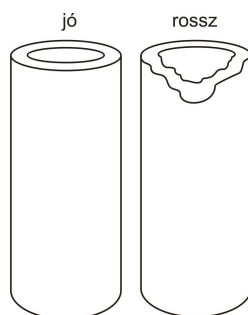
8. ábra Peremhatás jelentkezése 10 x 10 cm-es, koncentráló zónás HPTLC lapon, a réteget 3 mm vastag, telítetlen gőztérű, szendvics elrendezésű horizontális kádban futtattuk. Az eluens diklór-metán volt, aminek a forráspontja nagyon alacsony, csak 42 °C. Jól látható, hogy az eluensfront nem egyenes, hanem félkörívben hajlott, és az oldalsó minták foltjai a középponthoz képest sugárirányban kifelé sodródnak.

A minta felvitele történhet egy kapillárisból történő felcseppentéssel, vagy szórással. Az automata berendezések csak nagy mintaszámnál használatosak, általában vagy szabadkézi felcseppentéssel, vagy mechanikus kézi felcseppentő berendezéssel dolgozunk.

A kvalitatív analízisekhez elegendő, ha házilag készített kapillárist használunk a minták felcseppentésére. A kapillárisokat egyszer használatos Pasteur-pipettákból (szivornyákból) készíthetjük a legkönnyebben, ugyanis azok alacsony lágyuláspontú üvegből vannak, egyszerű gázégővel is könnyen olvashatók. A kapillárisoknak

nem szabad sem nagyon vastagnak, sem túlságosan vékonyak lenniük, ezért a kihúzott cső két széle és a közepe sem megfelelő vastagságú. Egy idő után mindenkiben kialakul a tapasztalat és már ránézésre meg tudja állapítani, hogy milyen a jó méret. Olyan hosszúságú kapillárist célszerű használni, amit kézzel kényelmesen meg tudunk fogni. A felcseppentést alapvetően befolyásolja a kapilláris végének az alakja. Merőleges vágással kapott sima él a megfelelő, a kicsorbult peremű kapillárist annyira a réteghez kell nyomni, ami már károsítja a réteget.

Kapilláris vágásához (valójában nem vágjuk, hanem karcoljuk) éles üvegvágó penge, vagy éles peremű kerámialap (pl. törött porcelán tál egy darabja) szükséges. Érdemes a vágandó kapillárist a két körmünk közé csiptetni, majd a vágó pengét a körmünk felületén csúsztatva odavezetni a kapillárishoz, ahol egyetlen mozdulattal, finoman végighúzzuk az üvegen. Ne nyomjuk erősen, mert eltöri a csövet! Amennyiben jól karcoltuk meg, a karcolás oldalán finoman megnyomva a kapillárist az minimális erő hatására eltörik és a vágási él szabályos lesz.



9. ábra Jól és rosszul vágott (törött) kapilláris végek.

Kvantitatív, pontos munkához alapvető fontosságú, hogy a kalibráló törzsoldatokból illetve az ismeretlenekből pontosan ismert térfogatot cseppentsünk fel, amire nem alkalmasak a házi készítésű kapillárisok. A legpontosabb eredményt gyári készítésű, állandó térfogatú, kalibrált mintabemérő kapillárisokkal tudjuk elérni, amelyekhez töltőceruzaszerű befogó adaptert is vásárolhatunk. A bemérő kapillárisok hegyét addig tartjuk a mintaoldatba bemártva, amíg színültig megtelnek, majd utána egy vagy több részletben ürítjük ki a lemezre. A 0,5 és az 1 mikroliteres kapillárisokkal akár egy részletben is fel lehet a rétegekre vinni a mintákat, az 1 mikroliternél nagyobb térfogatokat azonban csak a kapilláris többszöri, rövid ideig a réteghez történő érintésével tudunk felcseppenteni úgy, hogy a folt mérete ne legyen túl nagy. Mindig tartsuk szem előtt, hogy azért kell kicsi foltot cseppenteni, mert a lehető legjobb felbontást szeretnénk elérni. A felcseppentési foltnál lényegesen nagyobbak lesznek a kifejlesztett foltok, kisebbek pedig sohasem!. Figyeljünk arra is, hogy a koncentráció zónára történő cseppentéskor a foltok nagyon szétfutnak, tehát ilyenkor

10 mm távolságra tegyük egymástól a foltokat még akkor is, hogy ha HPTLC-s réteget használunk.



10. ábra Egy doboznyi 1 mikroliteres bemérő kapilláris, valamint a hozzájuk tartozó adapter. A bemérő kapillárisok meglehetősen költségesek, ami korlátozza a használatukat.

Vannak, akik 1-10 mikroliter térfogatú, lapos tűvégű Hamilton-fecskendővel viszik fel a mintákat a lapra. Megfelelő gyakorlattal ez az eljárás is ugyanolyan jól használható, mint a bemérő kapilláris, de gyakorlatlan kézben kisebb pontosságú és több hibalehetőséget rejt. A fecskendő tökéletes elmosásáról minden minta után gondoskodni kell. Semmilyen módon nem javasolhatók felcseppentésre a műanyag hegyű automata pipetták, ugyanis az azokból történő folyadékkiáramlást nem lehet finoman szabályozni, a pipettahegy vége ritkán egyenes, a nehéz pipettával pedig nagyon könnyen felsérthetjük az érzékenyebb réteget.

Preparatív rétegek használatakor a mintát nem pontokban, hanem egy folytonos vonal mentén visszük fel. Oda kell figyelnünk azonban, hogy ne tömítsük el a réteg pórusait, különben teljesen kiszámíthatatlan, örvénylásszerű képet kapunk a várt szép elválasztás helyett.

2.1.5. Lemezek szárítása, hőkezelése

A lemezek szárításához csak egy hajszáritóra van szükség.

Színreagensek alkalmazása esetén gyakran előfordul, hogy a bepermetezés után 10-20 percig megadott hőfokon kell tartani a lemezt. A termosztált hevítőlap

professzionális, mennyiségi analízishez nélkülözhetetlen. Kvalitatív vizsgálatokhoz egyszerűbb megoldás is megfelelő lehet, amilyen például a szabályozható hőmérsékletű elektromos rezsó, a fűthető mágneses keverő, vagy egy hőlégfúvó pisztoly. Mivel a lemez felületéről a hevítéskor a reagens oldószere és maga a reagens is párolog, szükség esetén megfelelő szellőztetésről vagy elszívásról gondoskodni kell.

2.1.6. Láthatóvá tétel

Fluoreszcens rétegen az UV elnyelésre képes foltokat UV-fénnyel besugározva láthatóvá tehetjük. Világos alapon sötét színű foltokat láthatunk, a sötétedés mértéke arányos a koncentrációval. Fluoreszcens indikátor nélküli réteget használunk abban az esetben, ha valamilyen kémiai reakcióval egyes komponensek fluoreszkáló származékká alakíthatók. Ilyen esetben UV-fény hatására sötét háttéren világos foltokat látunk, a fénykibocsátás mértéke arányos a koncentrációval.



11. ábra UV-kabinet. Megfelelő adapterrel ellátva az ablakon keresztül le is lehet fényképezni a réteget, vagy a redőny részleges félrehúzása után puha ceruzával körülrajzolhatjuk a foltokat.

Az UV-lámpáknak van kézi változata, vagy vannak dobozba szerelt változatok, ezek az ún. UV-kabinetek. Az ilyen néződobozok elsősorban szabad szemmel történő megtekintésre használatosak. Esetenként meg lehet oldani a rétegek fényképezését is, de a kissé oldalirányú nézőpont következtében a képen a függőleges élek távlatilag egymás felé tartanak. Ez nem zavarja sem a minőségi, sem a félkvantitatív

mennyiségi kiértékelést. Professzionális célra olyan UV-VIS-megvilágító dobozok/asztalok is forgalomban vannak, amelyek több oldali lámpát és beépített kamerát tartalmaznak.

Az UV-VIS detektálás egy speciális készüléke a vékonyréteg kromatográfiaszkenner, az ún. denzitométer. A denzitométerek olyan reflexiós fotométerek, amelyek néhány század milliméter széles sávokban az egész rétegről teljes spektrumot vesznek fel, amelyek csíkonkénti számítógépes kiértékelésével az egyes foltokban lévő anyagok kémiai minősége és mennyisége is meghatározható.

2.1.7. Előhívás

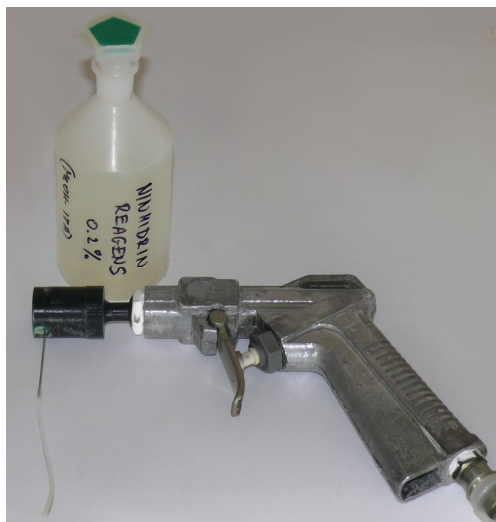
Amennyiben egy vagy több komponens nem tehetővé láthatóvá UV-fénnyel, valamilyen reagens alkalmazásával színes vegyületekké alakítjuk azokat. A reagenst a legáltalánosabban pumpás hajlakkszóróból, vagy sűrített gázos festékszóróból porlasztjuk a rétegre. A porlasztás során mindig gondoskodni kell a megfelelő elszívásról, szellőztetésről! A mindenki által belélegzett laboratóriumi levegőbe nem porlaszthatunk bele irritáló, agresszív, maró vagy toxikus anyagokat! (Alapvető munkavédelmi szabály, hogy a tiszta vízen és a tiszta levegőn kívül minden anyag veszélyesként kezelendő.) Porlasztáskor mindig viseljünk védőszemüveget!

A színreagensek között vannak olyan általánosan használható reagensek, amelyek erősen oxidálnak vagy roncsolnak, különösen hevítés hatására. Ilyen roncsoló reagensek a foszformolibdénsav, a tömény kénsav, tömény kénsav és ecetsav-anhidrid elegye, kénsavban oldott kálium-dikromát vagy kálium-permanganát, tömény kénsav és salétromsav elegye, tömény kálium-hidroxid. Ezekkel különösen vigyázzunk, mert a ruházatot, a bútorokat, jegyzőkönyvet, stb. is pillanatok alatt tönkre tehetik!

Vannak olyan szerves reagensek, amelyek valamilyen funkciós csoporttal színes vegyületet adnak, míg másokkal nem. Ezeket a reagenseket specifikusan, bizonyos vegyületcsoportok kimutatására tudjuk felhasználni. Nagyon sok ilyen reagens van, ezek felsorolása is messze meghaladja a lehetőségeinket, ezért csak néhány jellemző példát adunk meg. A következő táblázatban összefoglalóan láthatjuk néhány általánosabban használható színeképző reagens összetételét és az alkalmazásuk körülményeit. Gyakran nem csak egy, hanem több módszert v. reagenst is használhatunk egymás után, ezek az ún. előhívási protokollok. A protokollok végrehajtása során kapott kromatogramokat minden lépés után rögzítenünk kell (jegyzőkönyv, fénykép, rajzolás, stb.).

4. táblázat A legáltalánosabban használt színreagensek.

Reagens neve	Összetétel	Használat	Szín	Vegyületek köre
Kénsav	cc. H_2SO_4 vagy 50% kénsav	beszórás hevítés 110- 120 °C-on néhány percig	barna v. fekete foltok	nagyjából univerzális
Kénsav- dikromát	3 g $K_2Cr_2O_7$ 20 ml vízben oldva, majd 20 ml cc. kénsavval hígítva	beszórás hevítés 110 °C- on néhány percig	barna v. fekete foltok	univerzális
Fluoreszcein	50%-os vizes- metanolos nátrium- fluoreszcein oldat (50 mg/100 ml)	beszórás vizsgálat 366 nm UV fényben	fluoreszkáló foltok	sokféle szerves vegyület
Jódgőz	Jód kristályok	a lemezt jódkristályokat tartalmazó kádba állítani	barna foltok	sokféle szerves vegyület
Dragendorff- reagens	$K[BiI_4]$, ecetsavas KI- oldatban	beszórás	narancsbarna v. vöröses foltok	aminok, amidok, nitrogéntartalmú vegyületek
Ninhidrin	95 tf. alkoholos ninhidrin oldat (0,2%- os), és 5 tf. ecetsav (10%)	beszórás hevítés 110 °C- on néhány percig	sárga, rózsaszín v. ibolya színű foltok	aminosavak, aminok
Foszfor- molibdénsav	5% foszfor- molibdénsav etanolban	beszórás hevítés 120 °C, 10-15 perc	kék foltok	nagyon sokféle szerves vegyület



12. ábra Házi készítésű reagensszóró pisztoly, amely 2-3 bar nyomású inert gázzal működtethető. Kereskedelmileg beszerezhetők festékszóró aeroszolos flakonok, valamint akkumulátoros, egyedi reagensszóró készülékek is. Szükség esetén pumpás dezodoros flakonból is jól lehet porlasztani a reagenseket.

A rétegek dokumentálásának alapvető feltétele, hogy mind UV-fényben, mind látható fényben felvételt tudjunk azokról készíteni. A normál fényben történő fényképezés nyilvánvalóan nem jelent problémát. Az UV-fényt kézi, illetve dobozba szerelt UV-lámpával biztosítjuk. Az UV-lámpát a réteg fölött helyezük el és célszerű egy állványon rögzíteni. Ahhoz, hogy ne hamis színek legyenek a fényképen, a fényképezőgép optikája elé egy vastagabb üveglapot helyezünk, ami az UV-sugárzást kiszűri. A fotózáshoz akár a mobiltelefonunk kameráját is használhatjuk.

A kapott digitális képeket egyrészt a jegyzőkönyvünk számára kinyomtatjuk, másrészt megfelelő kromatográfiai programmal mennyiségileg és minőségileg ki is tudjuk értékelni. A kiértékeléssel külön fejezetben foglalkozunk.

3. A VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIÁS VIZSGÁLATOK MENETE

Miután megismerkedtünk a kádák és rétegek alapvető tulajdonságaival, nézzük, hogy hogyan történik egy kromatográfiás vizsgálat elvégzése!

- 1) Kalibráló oldatok elkészítése, ismeretlenek méréshez előkészítése.
- 2) Réteg levágása, minták felcseppentése.
- 3) A réteg kondicionálása, lehetőleg a kádban.
- 4) A réteg kifejtése, majd szárítása
- 5) A szemmel láthatató foltok dokumentálása.
- 6) A láthatatlan foltok egy vagy több lépéses láthatóvá tétele, lépésenkénti dokumentálással.
- 7) Mosogatás, takarítás, rendcsinálás, előkészítés a következő méréshez.
(Az analitikában a tisztaság nem fél egészség, hanem alapvető követelmény!)
- 8) A kromatogramok kinyomtatása, jegyzőkönyvben rögzítése.
- 9) A kromatogramok kiértékelése, az eredmények jegyzőkönyvben rögzítése.

3.1. Oldatsorozatok, minták előkészítése

Az általános kémiai gyakorlat szerint járunk el az oldatsorozatok előállításánál. Mivel a vizsgálatoknak nagyon kicsi az oldatigénye, a módszernek pedig relatíve nagy a hibája, általában elegendő, ha automata pipetták használatával végezzük a hígításokat.

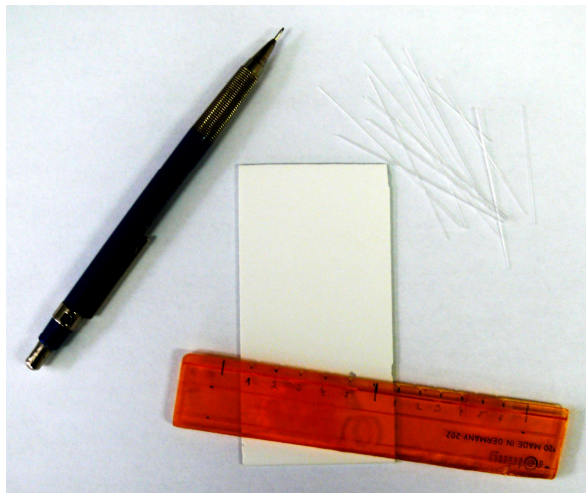
3.2. Lapok levágása, minták felcseppentése

A legelső dolog a vékonyréteg lap előkészítése a minták felcseppentéséhez. A lapokat lehetőleg az élüknél fogva, illetve a hátlapot tartva kezeljük. Az aktív réteget ne fogjuk meg csupasz kézzel, mert az ujjlenyomatunk rajta marad! Ha van rá lehetőség, érdemes vékony gumikesztyűt használni. Ha nem az egész lapot akarjuk felhasználni, úgy le kell vágni belőle a szükséges darabot. Csúnya és pazarló dolog össze-vissza vagdalni egy lapot. A helyes gyakorlat szerint mindig egy teljes lapszélességű csíkot vágunk le, majd abból szabjuk le a kívánt méretet.

Amikor ollóval vágjuk a lapot, figyeljünk oda arra, hogy bal kezünkben legyen a használni kívánt darab, jobb kezünkben az olló. Ez azért fontos, mert az olló a vágás során enyhén meghajlítja/megtöri a réteget és a hajlásnál az állófázis leválhat a hordozó lemezről. Az alumínium hordozójú lapokat könnyebb vágni, mint egyes műanyag hordozójúakat, amelyekről a réteg kifejezetten könnyen lepattan.

Barkácskéssel úgy vágunk réteget, hogy a vágási vonalhoz illesztünk egy vonalzót (lehetőleg fémvonalzót), stabilan rányomjuk a rétegre, majd a kés hegyével többször is végighaladunk a vágási vonal mentén. Először finoman nyomva lekaparjuk a réteget, majd erősebben nyomva annyiszor végighaladunk a vonalon, amíg a vágási vonal mentén elválik a két fél egymástól.

A legnehezebb és a legnagyobb gyakorlatot az üveg hordozójú lapok vágása jelenti, amelyekből 20 mm-nél keskenyebb darabokat vágástechnikai problémák miatt nem készítünk. A vágáshoz sima, tiszta asztalfelületre, alátétnek tiszta papírlapra, vonalzóra, jelölő tollra és egy jó minőségű üvegvágóra van szükség. Kerek üvegvágó is használható, de nagyon finom vágást csak vídia vagy gyémánt hegyű szerszámmal lehet végezni. A nagy lapot réteggel lefelé fordítva letesszük az asztalra helyezett tiszta papírlapra, bejelöljük egy-egy pontban a vágási egyenes két végét. (A bejelöléshez legjobb a finom hegyű táblafilc, az ugyanis szárazon letörölhető a vágás után.) A vonalzót odaillesztjük a vonal mellé (figyelni kell, hogy az üvegvágó fejének megfelelő vastagsággal elcsúsztassuk), majd a lap egyik szélétől a másikig határozott mozdulattal végigkarcoljuk az üvegfelületet. (Több karcolás néha javít, néha ront a helyzeten.) A megkarcolt lap alá egy hurkapálcát helyezünk úgy, hogy a pálcá pontosan a karcolás alatt legyen. Egyik kezünkkel rögzítjük a lemez egyik végét a papíron, majd a túlsó oldalon határozottan lefelé megnyomjuk a lap másik felét. Ha minden rendben megy, akkor az üveg a karcolás mentén könnyen, egyenes vonalban elpattan. Előfordul, hogy bekarcoláskor vagy pattintáskor a lap nem a kívánt helyen törik, hanem valahol máshol. Ennek az oka az üvegben lévő rejtett feszültség, vagy a nem megfelelő vágás lehet.



13. ábra Minimálisan szükséges eszközkészlet a TLC-hez.

A felcseppentés előtt húzzuk meg a startvonalat, jelöljük ki a startpontokat! A foltok alatti részt felhasználjuk a minta azonosítójának felírására, a réteg két oldalán lévő csíkot pedig az eluens összetételének, illetve a réteg típusának a felírására. Ne írjunk semmit sem a futtatási területre. Csak nagyon puha ceruzát használjunk!

A felcseppentést úgy végezzük, hogy a kapillárist belemerítjük az oldatba, majd kivesszük és óvatosan, kis mozdulatokkal, többször egymás után hozzáérintjük a réteghez a kívánt pontban. Két részlet között szükség lehet a folt megszáraitására. Igyekezzünk azonos méretű foltokat felcseppenteni! Normál rétegnél a folt átmérője 2-4 mm legyen, HPTLC-s rétegnél a cseppek kétszer olyan közel kerülhetnek egymáshoz, ezért a foltok csak 1-2 mm átmérőjűek lehetnek. Mennyiségi vizsgálatokhoz kalibrált kapilláris használata szükséges, amit a térfogatától és a réteg anyagától, vastagságától függően egy vagy több részletben ürítünk ki.

Tipikus felcseppentési koncentráció: kb. 1-10 mg/ml, tipikus felcseppentett térfogat: 0,50–5,0 mikroliter.

3.3. Kifejlesztés, előhívás

A kádakról szóló fejezetben már részletesen láttuk a telített gőztér jelentőségét. Amennyiben ikerkáddal dolgozunk, lehetőség van a réteg már leírt, kádban történő kondicionálására. Amennyiben egyszerű káddal dolgozunk, béleljük ki a kádnak a réteggel szemközti falát szűrőpapírral, öntsük bele az eluenst, zárjuk le a kádat,

rázzuk meg, hogy a fal megnedvesedjen, majd 15 percig hagyjuk állni. Ezután a kádat csak annyi időre nyitjuk fel, amíg a feleseppentett réteget beleállítjuk, majd visszazárjuk. Az időzítő órán beállítjuk a futás idejét. Amennyiben nem ismerjük a szükséges időt, időközönként ellenőrizzük az oldószerfront helyzetét.

Miután elértük a kívánt futási távolságot, kivesszük a réteget és hajszáritóval megszáritjuk.

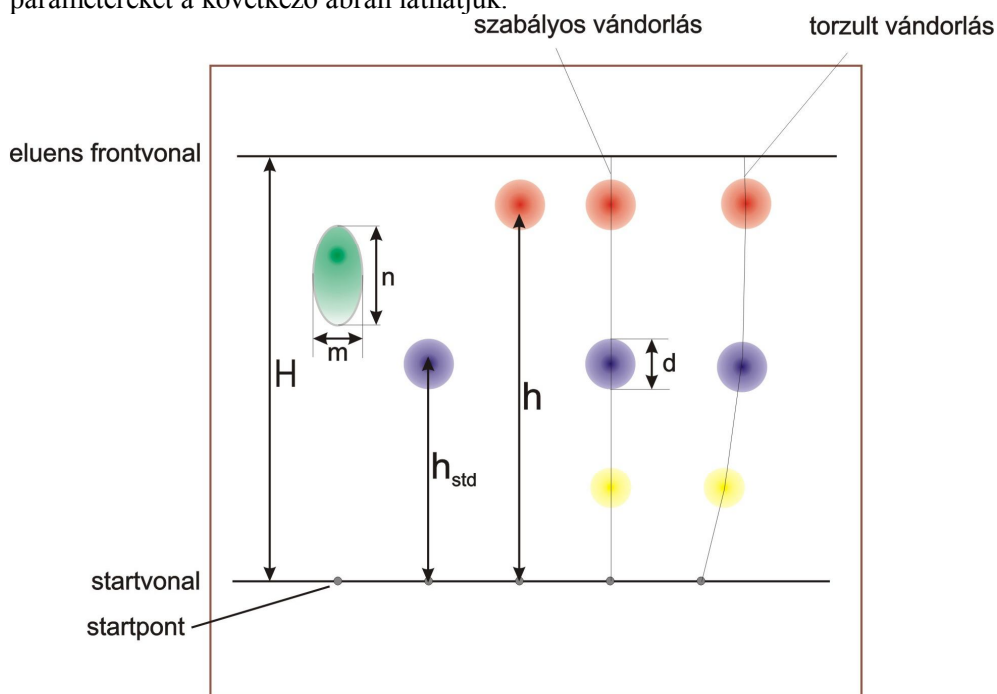
A módszerben előírt előhívási/vizualizációs módot használva láthatóvá tesszük a foltokat és dokumentáljuk a kromatogramot.

Magát a kifejlesztett lemezt nincs értelme a jegyzőkönybe beragasztani, mert a réteg lepereg, üveg hordozó esetén pedig nem fér bele a füzetbe és törékeny is. (Papírkromatogramot be lehet ragasztani.) A vékonyréteg lapok helyett azok kinyomtatott képét ragasszuk be. Fényképezőgép és nyomtató híján irodai fénymásolót is használhatunk, de ekkor a másolás előtt tegyünk egy-egy átlátszó fóliát a réteg alá és fölé, nehogy beszennyezzük a fénymásoló belsejét a reagenssel! Amennyiben sem nyomtató, sem fénymásoló nem áll a rendelkezésünkre, akkor a legősibb módszer szerint egy fehér papírlapot a rétegre helyezünk, és ceruzával arra átmásoljuk a réteg és a foltok körvonalait.

4. VÉKONYRÉTEG KROMATOGRAMOK ELEMZÉSE

4.1. Alapfogalmak

A vékonyréteg kromatogramokat kifejlesztésük után minőségileg illetve mennyiségileg ki kell értékelnünk. A kiértékeléshez szükséges alapvető paramétereket a következő ábrán láthatjuk.



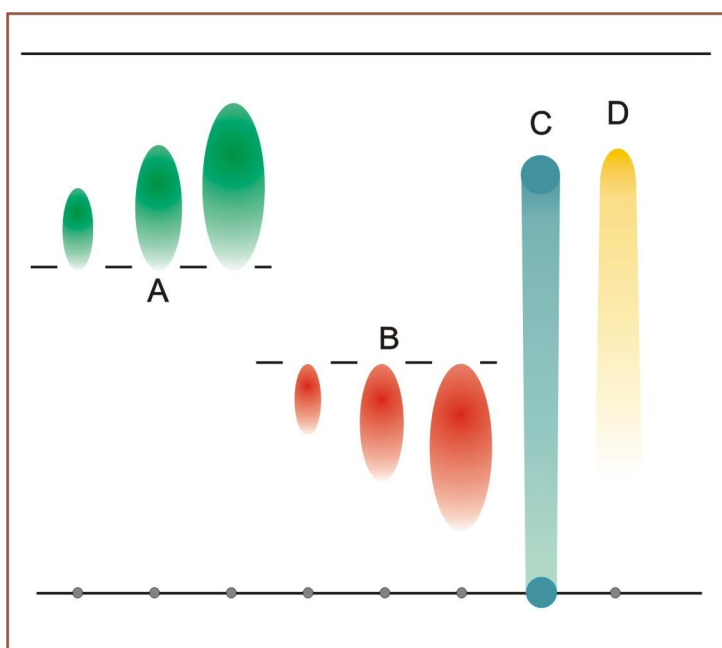
14. ábra Vékonyréteg kromatogram a legfontosabb alapfogalmak és a közvetlenül mérhető paraméterek feltüntetésével.

Két folt azonosságának vagy különbségének az eldöntését a retenciók faktorok (R_f) alapján végezzük. Az R_f értéket a következő képlettel definiáljuk:

$$R_f = \frac{h}{H}$$

ahol h = a kiválasztott folt középpontjának távolsága a felcseppentés helyétől, H = az oldószerfront távolsága a startvonalától számítva.

Az ideális folt tökéletesen kör alakú, míg a reális foltok jelentős hányada inkább ellipszis alakú. Ellipszis alakú folt esetében a mennyiség függvényében változik az R_f érték is, tehát ilyen anyagoknál a minőségi azonosítás önmagában az R_f alapján meglehetősen bizonytalan, vagy nem is lehetséges. A következő ábrán a vékonyréteg kromatogramok esetén leggyakrabban tapasztalható foltalak torzulásokra láthatunk példákat.



15. ábra Jellemző foltalak torzulások a vékonyréteg kromatográfiában.

Az A és B anyagok mennyiségétől függően vagy a foltok alja, vagy a teteje van egy egyenesben. Nyilvánvaló, hogy a foltok középpontjára számított R_f értékek nem állandóak, hanem a koncentrációtól függenek, így minőségi azonosításra nem alkalmasak. A foltípustól függően azonban a folt aljára vagy tetejére számolt R_f értékek nagyjából állandók.

A C típusú folt olyan anyagnál jelentkezik, amelynek egy vagy több komponense csak nagyon gyengén oldódik az eluensben. Az ilyen kromatogramok nem értékelhetők, meg kell változtatni az eluens összetételét. A D típusú folt akkor jelentkezik, ha nagyon erős az adszorpció az állófázison (pl. szilikagélen az aminok), vagy ha a rétegen folyamatosan bomlik az anyag.

Az előző részekben láttuk, hogy milyen sok környezeti tényezőre lehet érzékeny egy vékonyréteg kromatográfiás elválasztás- Az R_f értékek szigorúan véve csak az azonos lapon, azonos körülmények között futtatott minták esetében hasonlíthatók össze! Az R_f érték bizonytalanságát úgy lehet csökkenteni, ha a foltok futását egy a vizsgált mintához hasonló kromatográfiás tulajdonságú belső standard futásával hasonlítjuk össze. A belső standard retenciós faktorára ($R_{f(\text{std})}$) vonatkoztatjuk a vizsgált folt R_f értékét, így kapjuk az R_x relatív futási index értékét, ami stabilabb és reprodukálhatóbb, mint az R_f önmagában.

$$R_{f(\text{std})} = \frac{h_{\text{std}}}{H}$$

$$R_x = \frac{R_f}{R_{f(\text{std})}}$$

4.2. Mennyiségi meghatározás a foltterület alapján

Mennyiségi meghatározást legegyszerűbben a foltterület kézi mérésével (kör vagy ellipszis területének számításával), több ponthoz tartozó kalibráló görbe felvételével, majd abból visszakereséssel végezhetünk.

A foltok területét ideális esetben mint egy kör területét számítjuk ki, a jól ismert képlet felhasználásával:

$$T = \frac{d^2 \pi}{4}$$

Ellipszis esetén a kis és a nagytengely hosszából számítjuk ki a területet:

$$T = \frac{m \cdot n \cdot \pi}{4}$$

A kalibráló egyenest úgy kapjuk, hogy a kalibráló oldat koncentrációjának függvényében ábrázoljuk az adott koncentrációkhoz tartozó foltterületet.

4.3. Mennyiségi meghatározás műszeres denzitometriás módszerrel

A folterület helyett koncentrációmeghatározásra sokkal nagyobb pontossággal lehet alkalmazni a denzitometriás eljárást. Professzionális célokra mennyiségi méréseket csak denzitométeres kiértékeléssel végeznek. Fontos tudnunk, hogy rossz felcseppentési technika, pontatlan oldatok, torzult áramlási viszonyok, nem kellően kontrollált kromatográfiai körülmények esetén a denzitométerrel kapott eredmények az elkövetett kísérleti hibák miatt nem lesznek lényegesen jobbak, mint a szimpla kézi kiértékelés eredményei.

4.4. Minőségi és mennyiségi kiértékelés digitális fényképek alapján

A vékonyréteg kromatogramok költséghatékonyabb, de műszeres jellegű mennyiségi kiértékelésre nagyon sok laboratóriumban igény van. A digitális fényképezés elterjedésével ma már nem jelent problémát a jó minőségű képek készítése. A kiértékeléshez pedig ingyenesen hozzáférhető egy olyan számítógépes program, ami nem csak szürke árnyalatokban képes a fényképek elemzésére, hanem az alap színcsatornák felbontásával olyan képeket is fel tud dolgozni, amelyek más programok esetén értékelhetetlenek (pl. halványzöld háttéren halvány rózsaszínű foltok). A továbbiakban ennek a programnak a használatával ismerkedünk meg.

4.4.1. A CP-Atlas program használata

A CP-Atlas programot mindenki ingyenesen letöltheti (<http://lazarsoftware.com>) és szabadon feltelepítheti a saját gépére, illetve megtalálható a közös számítástechnikai teremben, ahol a gyakorlatokon készített fényképek kiértékelését el lehet végezni. A program bármilyen operációs rendszeren fut (Windows, Linux, stb.), csak a Java futtatókörnyezetet igényli, az pedig a legtöbb gépen már megtalálható. Mindig a legfrissebb Java futtató környezetet célszerű használnunk, amit a Java honlapjáról ingyenesen le lehet tölteni.

Telepítés: nem kell telepíteni. A tömörített fájlt ki kell csomagolni egy könyvtárba, ahonnan a **CpAtlas.exe** fájl, vagy a CpAtlas.jar fájl közvetlenül futtatható. Az első használatkor el kell fogadni a licenz feltételeket az OK megnyomásával. Innentől a program használatra kész.

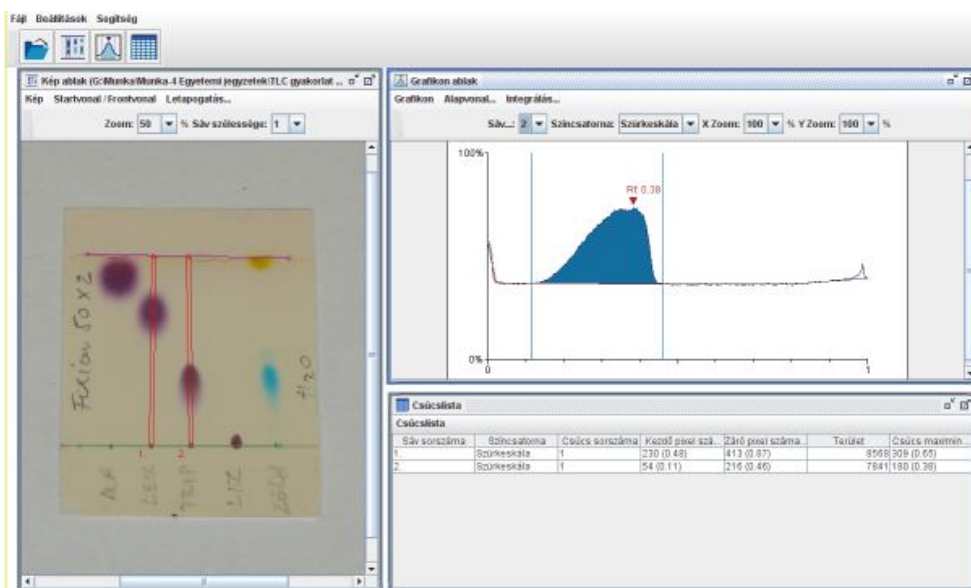
Nyelv beállítása: Ha a magyar nyelvű változatot töltöttük le az internetről, akkor eleve magyarul működik. Hiba esetén a program visszatér az angol alapértelmezéshez. A language.txt fájlt át lehet írni, így a programot minden nemzet anyanyelvére, illetve az egyes laboratóriumok házi használatára is könnyen honosítani lehet!

A program használata

A program nagyon egyszerű felépítésű, három fő ablakban található meg az összes eredmény.

Az ablakok alapértelmezésben egymás alatt találhatók és a bal felső sarokban, a menüsor alatt lévő ikonokra kattintva lehet azokat az előtérbe hozni. A továbbiakban mindenki szabadon áthelyezheti az ablakokat, ahogy az alábbi ábrán is láthatók.

Az analízishez először be kell olvasnunk a kívánt kromatogramot tartalmazó fájlt (csak jpg, png és gif használható). Nyomjuk meg az *Új analízis* gombot, majd keressük meg és nyissuk meg a kívánt fájlt. Ha szükséges, kicsinyítsük vagy nagyítsuk a képet annyira, hogy jól kezelhető legyen.



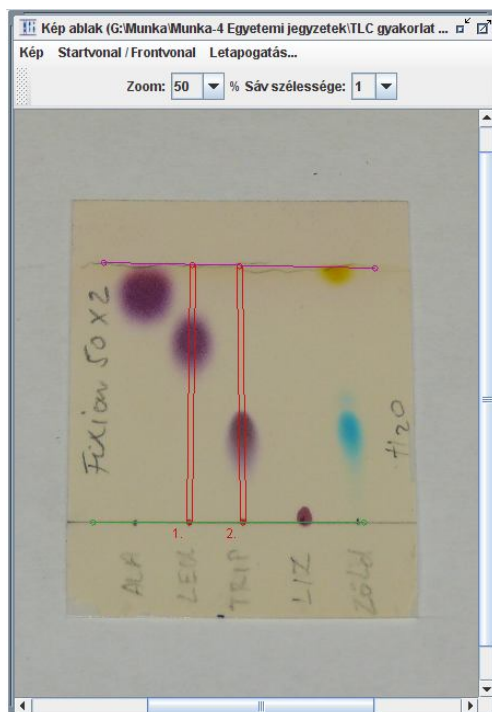
16. ábra A CP-Atlas program képernyőképe.

Következő lépésben ki kell jelölnünk a képen a startvonalat, utána pedig az oldószerfrontot. A *Kép ablak*ban nyomjuk meg *Startvonal/Frontvonal* gombot. A legördülő menüből válasszuk ki a *Startvonal megadása* pontot, majd kattintsunk a

kívánt startvonal egyik végére, utána a másik végére. Megjelenik a startvonal a képen. Amennyiben módosítani szeretnénk a startvonalat, kattintsunk valamelyik végpontjára és az egérgombot lenyomva tartva húzzuk a végpontot az új helyzetébe. Hasonlóképpen eljárva hozzuk létre az oldószerszámjelölésére szolgáló frontvonalat, ami a startvonalhoz hasonló módon módosítható. (Csak akkor lehet a startvonalat és a frontvonalat mozgatni, amikor még nincsenek kijelölve a sávok. Ha már létrehoztunk legalább egy sávot, onnantól kezdve csak a sávok pontjai mozgathatók. A startvonal vagy frontvonal későbbi módosításához ki kell törölni a sávokat, amelyekkel egyidejűleg az összes addigi eredmény is törlésre kerül.)

Hozzuk létre azokat a sávokat, amelyek mentén fel szeretnénk venni a denzitogramokat! Ezt úgy tudjuk megtenni, hogy a *Letapogatás* menüből kiválasztjuk az *Új sáv létrehozása* pontot, majd a kívánt startponthoz, utána pedig a kívánt végponthoz kattintunk. A klikkelés után a végpontok automatikusan a startvonalhoz illetve a frontvonalhoz ugranak. A sáv végpontjai az egérrel megfogva a kívánt helyre húzhatók. A két ponttal jellemzett sáv mellett használhatjuk az *Új törtvonal hozzáadása* pontot is olyan esetben, amikor rossz minőségű, torzult nyomvonalú foltosozatot kell kiértékelnünk. Ekkor a kívánt pontokba kell kattintani, majd a törtvonalat a jobb oldali egérgombbal való kattintással zárjuk le. (Általában a több pontos/vonalas objektumok lezárása a jobb oldali egérgombbal való kattintással történik.) Ne feledjük: a jó eredmény alapvető feltétele a jó kromatogram! A több pontos törtvonallal megadott sáv csak a kis futási egyenetlenség korrekciójára szolgál! Ha nagy a torzulás, inkább ismételjük meg a futtatást!) A már létrehozott sávok a végpontjuk kijelölése után a menün keresztül törölhetők. Törléskor az összes ahhoz a sávhoz tartozó adat is törlődik. Sávot létrehozni a későbbiekben is lehet.

A sávok szélessége alapértelmezésben 1 képpont, de ettől szélesebb sávot is beállíthatunk úgy, hogy a sáv végpontjára kattintunk, majd a *Sáv szélessége* legördülő listából kiválasztjuk a kívánt szélességet. Több pontos sáv szélesség esetén a párhuzamos kísérleti adatokat átlagoljuk, így a zajszintet csökkenteni tudjuk úgy, hogy megtartjuk a valódi kísérleti adatokat. (Ez nem azonos a görbe simításával, amire a *Grafikon ablakban*, a *Grafikon* menüpont alatt van lehetőség. A simításnál az adott denzitogram szomszédos pontjai kerülnek bizonyos tartományon belül, léptető módban átlagolásra, ami optikailag simábbá teszi a görbét, de a nagyon kis méretű képfájlok esetén módosíthatja az integrál értékeket.)



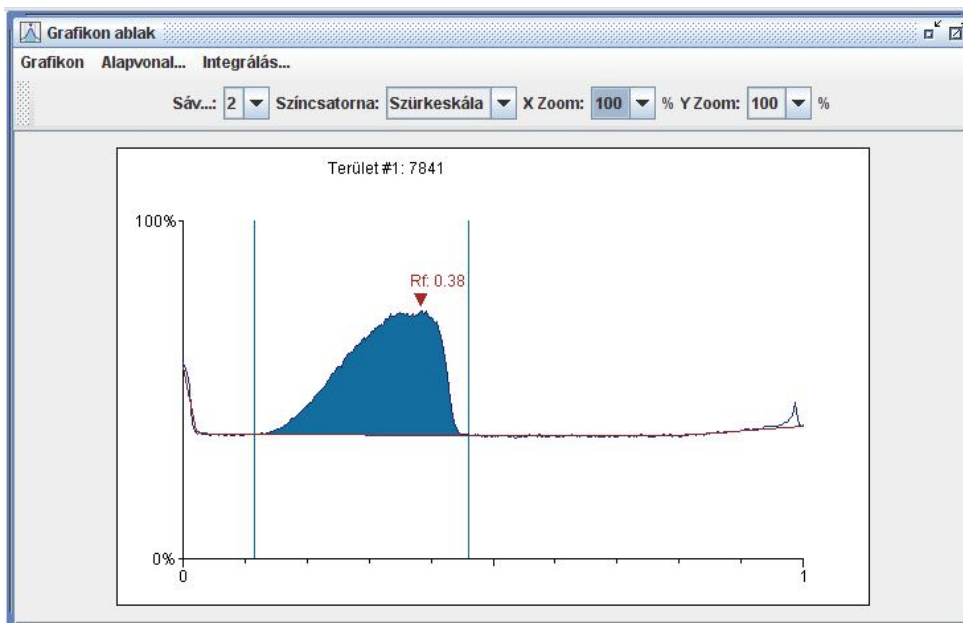
17. ábra A Grafikon ablak. A képen látható a startvonal, a frontvonal, valamint két darab létrehozott sáv.

Miután kijelöltük a sávokat, a Grafikon ablakban megjelenik a legutoljára létrehozott sávhoz tartozó denzitogram. A denzitogramon még nem szerepel az alapvonal, sem pedig a csúcsok, ezeket kézzel kell kijelölnünk. A denzitogramok között a Sáv... legördülő listával választhatunk.

Az *Alapvonal* menüpontban az *Alapvonal hozzáadása* pontot válasszuk ki alapvonal kijelöléséhez. Kattintsunk a denzitogram bal szélén a görbére, majd még annyi helyre, amennyit szükségesnek látunk. Haladjunk a görbe jobb szélé felé, majd a jobb szélén jelöljük ki az utolsó pontot. Jobb oldali klikkeléssel zárjuk le az alapvonal görbét. Az egyes pontok húzásával finoman állítsuk pontos helyére az alapvonalat!

Az *Integrálás* menüpontban válasszuk ki az *Integrál hozzáadása* menüpontot, majd kattintsunk a kívánt csúcs bal, utána pedig a jobb szélére! A denzitogramon színes, árnyékolt területként megjelenik a létrehozott csúcs. A csúcs fölött olvasható a maximális intenzitáshoz tartozó R_f érték (ez lapos tetejű, telítésben lévő csúcsoknál nem mindig használható, de az esetek többségében jól működik), valamint a csúcsa alatti terület, ami a foltban lévő anyagmennyiséggel arányos. A csúcsot határoló

egyenesek az egerrel mozgathatók, így a csúcs kezdete és vége tetszés szerint módosítható.



18. ábra A 2. sáv mentén felvett denzitogram, a kijelölt csúccsal.

A *Színcsatorna* listából kiválaszthatjuk, hogy szürkeskálás, vagy valamelyik színcsatornás kiértékelést választjuk. A program külön-külön kezeli minden sáv minden színcsatornáját, így akár csúcsként is más kiértékelést választhatunk!

Sáv sorszáma	Színcsatorna	Csúcs sorszáma	Kezdő pixel szá...	Záró pixel száma..	Terület	Csúcs max/min ...
1.	Szürkeskála	1	230 (0.48)	413 (0.87)	8568	309 (0.65)
2.	Szürkeskála	1	54 (0.11)	216 (0.46)	7841	180 (0.38)

19. ábra a denzitogramokban kijelölt csúcsokról készült csúcslista

Minden sávhoz, minden színcsatornához, minden csúcshoz tartozó adat automatikusan átkerül a *Csúcslista ablakba*, ahol folyamatosan megtekinthető. Az egerrel kijelölve a csúcslista sorait a Ctrl+C másolás utasítással a vágólapra

másolhatjuk az ablak kijelölt tartalmát, majd azt az Excel-ben a Ctrl+V utasítással beilleszthetjük. Az összes további kiértékelést, ábrázolást az Excel-ben végezzük. Az adatok átvitele az OpenOffice táblázatkezelőjébe ugyanezen a módon lehetséges.

Fontos megjegyeznünk, hogy mind a *Kép ablak* tartalma, mind pedig a *Grafikon ablakok* tartalma jpg vagy png formátumú képként elmenthető, és mentés során még további, itt nem tárgyalt grafikus opciók (pl. feliratozás, vonalvastagság választása, stb.) is a rendelkezésünkre állnak. Az elmentett képeket fel tudjuk használni a jegyzőkönyvünkben a csúcsok, a denzitogramok dokumentálására, vagy akár tudományos közlemények illusztrálására is. A kép felbontását úgy tudjuk növelni, hogy először beállítjuk az X és Y zoom értékét 400 %-ra, majd utána exportáljuk a képet.

5. MÉRÉSI FELADATOK

A gyakorlaton arra törekszünk, hogy minél több minta felhasználásával, minél rövidebb idő alatt tanulmányozhassuk a rétegekromatográfiákkal kapcsolatos alapjelenségeket néhány érdekes és látványos kísérleten keresztül. Ahhoz, hogy a céljainkat egyetlen laborgyakorlat időtartama alatt el tudjuk érni, számos kompromisszumos megoldást használunk, amelyek az elméleti részben megadott adatoktól eltérnek. Az eltérés szándékos, így tudjuk biztosítani azt, hogy lehetőleg mindenki saját kezűleg tudjon kísérleteket végezni.

Az alapvető eltérések a következők: Nagyon kis lemezeket használunk, nagyon rövid távon futtatunk. Kis kádban dolgozunk és a kád gőzterét általában nem telítjük. A lap széléhez közel is cseppentünk, és a cseppeket nagyon közel tesszük egymáshoz.

Ugyanazt a kapillárist használjuk a minták felcseppentéséhez, így a cseppek mérete remélhetőleg nagyjából azonos lesz. A kapillárist a minták cseppentése után teljesen ki kell üríteni, majd négyszer ki kell mosni. Ezt úgy végezzük, hogy vízzel teleszívjuk, utána a végét egy szűrőpapír csíkhöz hozzáérintjük és teljesen leürítjük. Két kis vizes mosóedényt használunk, az első durva mosóból is kétszer, majd a második tiszta mosóból is kétszer szívunk fel vizet. (A nem megfelelő mosogatás a kromatogramból nagyon hamar kiderül...!)

Az elvégzendő feladatok úgy vannak beállítva, hogy a távolról sem ideális kromatográfiás körülmények ellenére is jól látható, jól értékelhető eredményeket adnak.

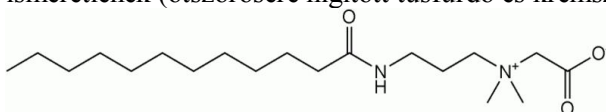
5.1. Kokamidopropil-betain kimutatása

A kokamidopropil-betain zwitterionos felületaktív anyag, amelyet általában 1-2 %-os mennyiségben használnak tusfürdőkben, folyékony szappanokban.

A gyakorlat célja az, hogy lássuk, vékonyréteg kromatográfiás módszerrel gyorsan azonosítani lehet aktív főkomponenseket kereskedelmi háztartásvegyipari termékekben. Az eljárás megfelelő kalibráló oldatsorozat felhasználásával mennyiségi meghatározásra is alkalmas.

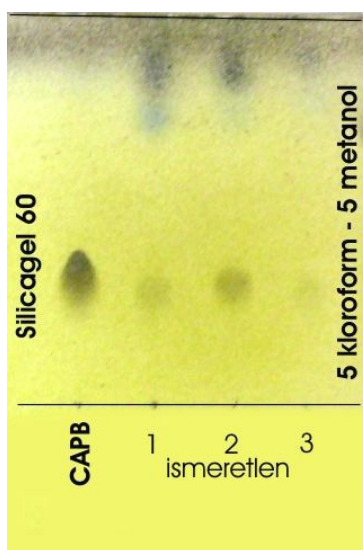
A felületaktív anyagok legnagyobb része nem tartalmaz kromofor csoportot, színtelenek és az UV-elnyelésük is nagyon kicsi, vagy nincs is. Nehéz az előhívásuk, mert kémiaiilag nagyon stabilis anyagok, csak nagyon agresszív reagensekkel lehet a túlnyomó részüket láthatóvá tenni.

Minta: kokamidopropil-betain (CAPB) standard (5 mg/ml)
ismeretlenek (ötszörösére hígított tusfürdő és krémszappan)



Réteg: szilikagél 60 F254,
Eluens: 50% kloroform, 50% metanol

Előhívás: 1) UV 254 nm
2) jódgőz
3) 5% foszformolibdénsav, hevítés
4) 50% H₂SO₄, hevítés



20. ábra CAPB tartalmú anyagok mintakromatogramja

Készítsük elő a kádat és egy 4 cm széles szűrőpapír csíkkal borítsuk be a belső felületét. Az eluensből 4-5 ml-t öntsünk a kádba, rázzuk meg körkörösén az üveget, hogy minél jobban nedvesítse meg a papírt az eluens, majd tegyük rá a kádra a tetejét.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. A kiadott standard oldatból ugyanazzal a kapillárisal 1 és 2 cseppet cseppentsük fel, majd az ismeretlenekből cseppentsünk fel 3-5 cseppet. Vigyázzunk arra, hogy lehetőleg egyforma méretű cseppeket tegyünk, mert ettől függ a felvitt anyag mennyisége. Fejlesszük ki a réteget!

Vizsgáljuk meg a réteget UV 254 nm-es fényben! Látunk-e valamilyen komponenst? Látjuk-e a CAPB standardot? Fényképezzük le a réteget UV fényben!

Állítsuk a réteget jódgőzzel teli edénybe néhány percre! Figyeljük meg, hogy mely foltok hívódnak elő!

Fülke alatt szórjuk be a réteget foszformolibdénsavval! Hajszáritó legmagasabb vagy hőlégpisztoly legalsó fokozatával melegítve hívjuk elő a foltokat! Amikor már nem változik a szín és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést. Fényképezzük le a réteget!

Fülke alatt szórjuk be a réteget 50 %-os kénsavval! (Vigyázat, nagyon agresszív és maró!) Hőlégpisztollyal vagy rezsóval hevítve hívjuk elő az eddig láthatatlan foltokat! Ha nem vigyázzunk, nagyon könnyen túlszalad a folyamat, az egész réteg bekékül, majd kifakul. Esetenként csak néhány tíz másodperces hevítés szükséges! Fényképezzük le az előhívott réteget!

A jegyzőkönyvbe kerüljenek be a kifejlesztett lap képei minden egyes előhívási fázisban!

Szoftveresen a denzitometriás integrálok alapján, vagy kézzel a foltterületek alapján értékeljük ki a kromatogramokat! Két pontos kalibráció alapján határozzuk meg, hogy hozzávetőlegesen mennyi lehet a CAPB koncentráció az eredeti termékekben! (Ne felejtsük el a hígításokat és a cseppek számát is figyelembe venni a számítások során!)

Ha csak egyetlen előhívási módot használhatna, melyiket választaná a CAPB tartalom kimutatásához?

5.2. Édesköményolaj vizsgálata

A gyakorlat célja az UV-detektálás és a mennyiségi kiértékelés alapjainak az elsajátítása, valamint színreagensek szelektivitásának vizsgálata

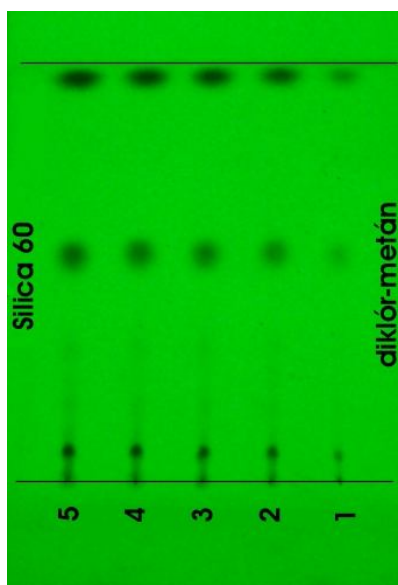
Az édeskömény olajban sok komponenst lehet kimutatni, ezek konkrét kémiai azonosítása nem célja a gyakorlatnak. A legnagyobb mennyiségben lévő komponensek növekvő R_f érték szerint az ánizsaldehid, fenchon és anetol.

Réteg: szilikagél 60 F254, 40 mm x 50 mm
Kád: szűrőpapírral kibélelt vérelemezfestő kád

Minta: kereskedelmi édeskömény illóolaj oldata

Eluens: CH_2Cl_2
Gőztér telítés: 10 perc (a réteget ezután helyezzük bele)

Előhívás: 1) UV-254 nm (sötét foltok fényes világoszöld háttéren)
2) 5% foszformolibdénsav, hevítés 110 °C-on a 1-5 percig (sötétkék foltok halvány zöldessárga háttéren)
3) 50% H_2SO_4 , hevítés 110 °C-on a szükséges ideig (1-8 perc) (további sötétkék, illetve szenesedő foltok)



21- ábra Édesköményolaj TLC mintakromatogramja UV 254 nm fényben.

Készítsük elő a kádat és egy 4 cm széles szűrőpapír csíkkal borítsuk be a belső felületét. Az eluensből 4-5 ml-t öntsünk a kádba, rázzuk meg körkörösén az üveget, hogy minél jobban nedvesítse meg a papírt az eluens, majd tegyük rá a kádra a tetejét.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. A kiadott oldatból ugyanazzal a kapillárisal a pontokba 1, 2, 3, 4, ill. 5 cseppet cseppentsük fel, vigyázzunk arra, hogy lehetőleg egyforma méretű cseppeket tegyünk, mert ettől függ a felvitt anyag mennyisége. Fejlesszük ki a réteget!

Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd 254 nm-es UV lámpa alatt nézzük meg a réteget! UV-fény alatt fényképezzük le a réteget!

Fülke alatt szórjuk be a réteget foszformolibdénsavval! Hajszárító legmagasabb vagy hőlégpisztoly legalsó fokozatával melegítve hívjuk elő a foltokat! Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést. Fényképezzük le a réteget!

Fülke alatt szórjuk be a réteget 50 %-os kénsavval! (Vigyázat, nagyon agresszív és maró!) Hőlégpisztollyal vagy rezsóval hevítve hívjuk elő az eddig láthatatlan foltokat! Ha nem vigyázzunk, nagyon könnyen túlszalad a folyamat, az egész réteg bekékül, majd kifakul. Esetenként csak néhány másodperc hevítés szükséges! Fényképezzük le az előhívott réteget!

A jegyzőkönyvbe kerüljenek be a kifejlesztett lap képei minden egyes előhívási fázisban!

Az UV-fényben készült képet szoftveresen értékeljük ki. Minden egyes mintára hozzuk létre a szürke színcsatornában a denzitogramot! Jelöljük ki a három legintenzívebb csúcsot! A csúcstáblázatban jelöljük ki az összes sort, majd exportáljuk az adatokat az Excel-be (vagy más táblázatkezelőbe)!

Minden egyes csúcsra hozzuk létre a kalibráló görbét!

Vizsgáljuk meg, hogy lineáris-e a kapott csúcsterület-cseppszám görbe! Ha nem, értelmezzük, hogy mi lehet az eltérés oka!

Nyomtassuk ki a kapott grafikonokat mindhárom komponensre (lehet közösen ábrázolva is) és ragasszuk be a jegyzőkönyvbe! Milyen hibalehetőségeket lát a szoftveres kiértékelés esetén?

Manuálisan is határozzuk meg az R_f értékeket, valamint a csúcsterületeket!

Az előzővel azonos módon Excel-ben hozzuk létre a kalibráló görbéket!

Nyomtassuk ki ezeket a görbéket is! Melyik esetben jobb a linearitás?

Melyik módszer szerinti kiértékelés igényelt több időt? Milyen hibalehetőségeket lát a manuális kiértékelés esetén?

5.3. Aminosavak hidrofób kölcsönhatás kromatográfiája

Az aminosavak izoelektromos pontja az a pH érték, amelyen az adott aminosav pontosan a zwitterionos szerkezetben található, és kifelé elektromosan semleges. Az attól kisebb pH-n kationos, az attól nagyobb pH-n anionos tulajdonságú. A pH megfelelő megválasztása lehetőséget teremt arra, hogy az aminosavakat jól megválasztott pH-n mutatott töltésük alapján ioncserélő fázisokon szétválasszuk egymástól.

Amikor polisztirol (vagy más hidrofób polimer) vázat tartalmazó ioncserélő rétegen történik az aminosavak elválasztása, nem csak a töltés mennyisége az, ami az elválasztási folyamatot irányítja. Megjelenik az aminosav molekulák apoláris részei és maga a polimer mátrix nem töltött részei között egy nem ionos jellegű, Van der Waals-féle kölcsönhatás, amit hidrofób kölcsönhatásnak nevezünk.

Azt a kromatográfiás eljárást, amely az apoláris molekularészek és az állófázis hasonló jellegű molekularészletei közötti kölcsönhatást használja fel a komponensek szétválasztására, hidrofób kölcsönhatás kromatográfiának nevezzük, és nagy a jelentősége a töltéssel rendelkező biomolekulák vises oldatokban történő elválasztásában.

A hidrofób kölcsönhatások rendkívüli szerepet játszanak a biomolekulák közötti kölcsönhatásokban. A nagyon poláris vízben az apoláris molekularészletek között

fellépő vonzóerőnek az entrópia növekedése a fő hajtóereje. Azzal, hogy két molekula hidrofób része egymáshoz közelít, vízmolekulák szorulnak ki a hidratációs szférából, így az asszociátum létrejöttét entrópiánövekedés kíséri. A hidrofób kölcsönhatások a hidrogénkötések mellett a legjelentősebb irányító erőt képviselik, amelyek meghatározzák egy fehérje molekula térszerkezetét, pl. a hajtogatottságát.

Ahhoz, hogy önmagában a hidrofób kölcsönhatás szerepét lássuk, olyan ioncserélő réteget használunk, amelyen az ioncserélő csoportok már nem aktívak, így zavartalanul láthatjuk a mátrix szerepét. A vizsgálatokhoz nagyon régen (mintegy 30 évvel ezelőtt) gyártott, Fixion 50x2 réteget használunk, ami valamikor kationcserélő tulajdonságú volt, de mára már elvesztette az ioncserélő aktivitását.

Vizsgálati anyag: A) sorozat:
alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin (0,66%)
ismeretlen oldat

 B) sorozat:
glutaminsav (0,66%), prolin (0,66%), szerin (0,66%),
triptofán(0,66%), lizin (0,66%)
ismeretlen oldat

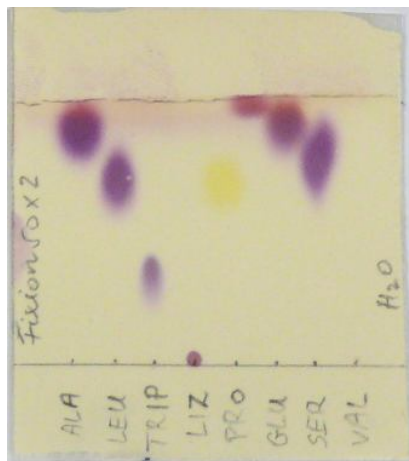
Réteg: régi Fixion 50x2 réteg, 40 mm x 50 mm
Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban, 1-1 csepp

Eluens: H₂O
Kád: vérelemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-8 perc)

Készítjük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba és tegyük rá a kádra a tetejét. Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent, majd fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszárítóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponens(ek)et tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!



22. ábra Aminosavak mintakromatogramja Fixion 50x2 rétegen.

A 22. ábra alapján adjuk meg, hogy mely aminosavakat nem tudnánk egymástól megkülönböztetni ezzel az eljárással!

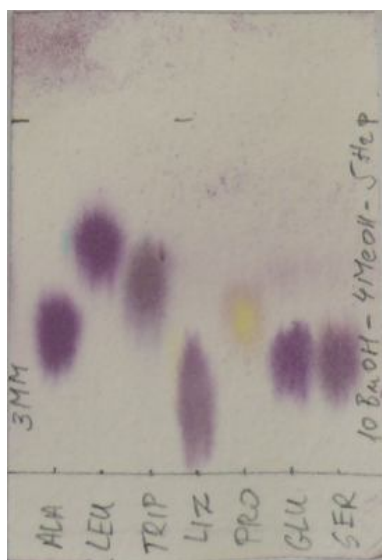
5.4. Aminosavak elválasztása papírkromatográfiával

A papírkromatográfia felbontóképessége rosszabb, mint a vékonyréteg kromatográfiáé, ezért közel azonos futási távolságon nem várhatjuk a foltok olyan szétválását, mint a rétegen. A papír rostszerkezetéből következőleg a foltok széle sem olyan éles, mint a rétegen. Mindenképpen érdekes azonban látnunk a futási képet, különösen a vékonyrétegen kapott képpel összehasonlítva.

Vizsgálati anyag: alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin (0,66%)
 prolin (0,66%), glutaminsav (0,66%), szerin (0,66%)
 ismeretlen oldat

Réteg: Whatman 3MM vagy 2CHR kromatográfiás papír

- 40 mm x 50 mm, vagy 40 mm x 66 mm
- Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban,
1-1 nagyon kicsi(!) csepp
- Eluens: 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O,
vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye
- Kád: vérelemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell
- Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-8 perc)



23. ábra Aminosava mintakromatogramja papíron.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent. Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba, majd fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszárítóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetük kézzel, illetve a szoftveres segítséggel. A

jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel ábrázolva!

5.5. Aminosavak elválasztása cellulóz rétegen

Vizsgálati anyag: alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin (0,66%)
prolin (0,66%), glutaminsav (0,66%), szerin (0,66%)
ismeretlen oldat

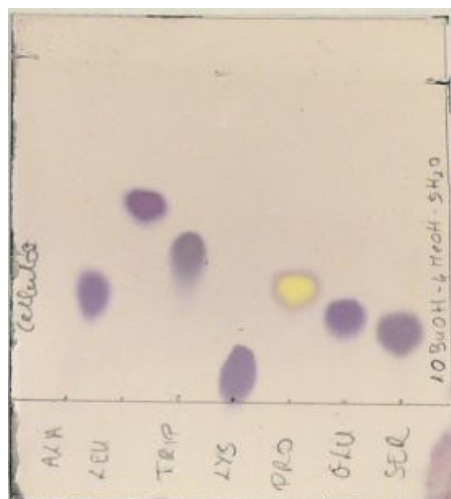
Réteg: Merck Cellulose 0,1 mm vastag vékonyréteg lap
40 mm x 50 mm

Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban,
1-1 nagyon kicsi(!) csepp

Eluens: 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O
vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye

Kád: vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-8 perc)



24. ábra Aminosavak mintakromatogramja cellulózon. Figyeljük meg, hogy minden aminosav ibolyáskék foltot ad, kivéve a prolint, ami sárgát.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlen! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszáritóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszáritóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel ábrázolva!

5.6. Aminosavak elválasztása szilikagél rétegen

Vizsgálati anyag: alanin (0,66%), leucin (0,66%), triptofán(0,66%), lizin (0,66%)
prolin (0,66%), glutaminsav (0,66%), szerin (0,66%)
ismeretlen oldat

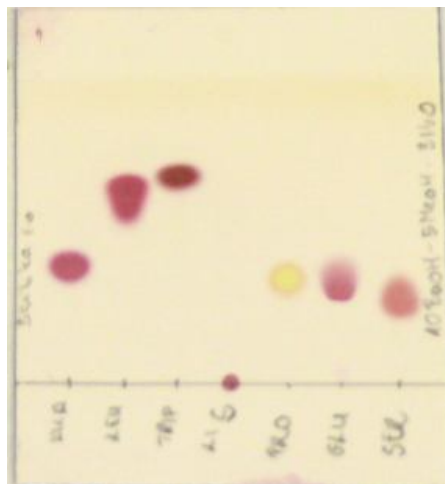
Réteg: Merck Kieselgel 60, 0,25 mm vastag vékonyréteg lap
40 mm x 50 mm

Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban,
1-1 csepp

Eluens: 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O
vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye

Kád: vérelemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszáritóval (2-8 perc)



25. ábra Aminosavak mintakromatogramja szilikagélen.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel valamilyen rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlen! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszáritóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszáritóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!

5.7. Emberi bőr felületén lévő aminosavak azonosítása

Az emberi bőr felületét hűtő és a kiszáradástól óvó izzadtság fő komponensei a víz, tejsav, karbamid, ásványi anyagok, nyomelemek, valamint szerves vegyületek, többek között aminosavak. Célunk az, hogy azonosítsuk a bőr felületéről vízzel leoldható aminosavakat a standardokkal összehasonlítva. Bár az aminosavak

koncentrációja nagyon kicsi a bőrfelületen, a ninhidrines előhívás már nagyon kis mennyiséget is láthatóvá tesz. (Ne fogjuk meg a réteg felületét csupasz kézzel, mert különben előhíváskor az ujjlenyomatunk is látható lesz!)

Minták: alanin (Ala, 0,66%), leucin (Leu, 0,66%), triptofán(Trp, 0,66%)

lizin (Lys, 0,66%), prolin (Pro, 0,66%),
glutaminsav (Glu, 0,66%), szerin (Ser, 0,66%)
bőrfelület lemosásából származó ismeretlen oldat

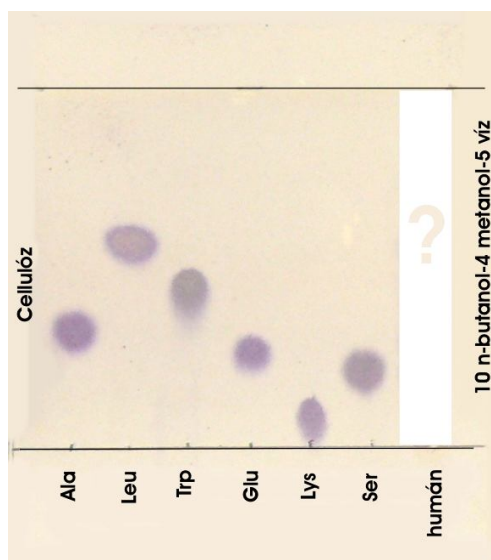
Réteg: Merck Cellulose 0,1 mm vastag vékonyréteg lap
40 mm x 50 mm

Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban,
1-1 nagyon kicsi(!) csepp

Eluens: 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O
vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye

Kád: vérelemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell

Előhívás: 0,2 % ninhidrinnel beszórás, majd melegítés hajszárítóval (2-8 perc)



26. ábra Humán bőrfelület aminosavjainak meghatározása

Öntsünk 0,5-1 ml vizet a tenyerünkbe és alaposan dörzsöljük szét! Hajlítsuk be a tenyerünket, hogy kb. 50-100 mikroliter víz összegyűljön, majd egy pipettával

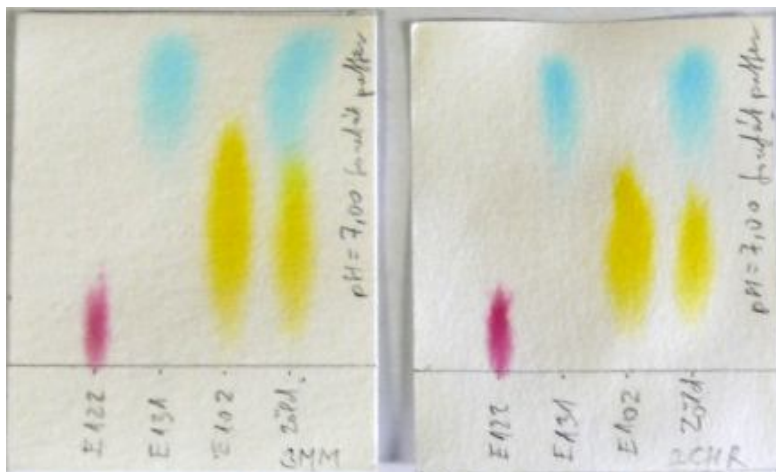
szívjuk fel és vigyük át egy mintás üvegbe! Ez az oldat lesz a vizsgálati mintánk. Mivel az oldat nagyon híg, legalább 10-15 cseppet fel kell cseppentünk ahhoz, hogy látható eredményt kapjunk. Az oldatban nagyon sok nátrium-klorid és egyéb anyagok vannak, a kifejlesztés során általában nem kapunk ideális foltokat, a sótartalom miatt a foltok közepe esetleg világos lesz.

Miután készen van a minta, vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel rövidített formában, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlen! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3-4 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval, majd fülke alatt a megadott színreagenssel szórjuk be! Hajszárítóval erősen melegítve hívjuk elő a foltokat. Amikor már nem változik a szín, és új foltok sem jelennek meg, abbahagyhatjuk a melegítést.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen aminosavak voltak a vizsgált bőrfelületen! A kiértékelést végezhetük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!

5.8. Ételfestékek elválasztása papírkromatográfiával

Réteg:	Whatman 3MM vagy 2CHR kromatográfiás papír 40 mm x 50 mm vagy 40 mm x 66 mm
Felcseppentés:	10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban, 1-1 nagyon kicsi(!) csepp
Minták:	E102, E122, E131 ételfestékek oldatai ismeretlen (kereskedelmi, ételfestéket tartalmazó oldatok)
Eluens:	pH 7 foszfát puffer vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H ₂ O elegye vagy 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H ₂ O elegye
Kád:	vérlemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell



27. ábra Ételeftestékek mintakromatogramja kétfajta típusú kromatográfiás papíron.

Vágjuk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg hajszárítóval!

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel ábrázolva!

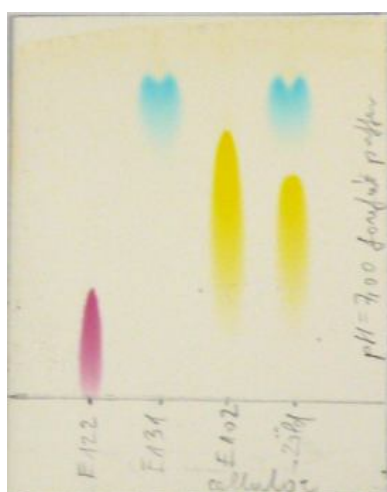
Hasonlítsuk össze a rétegen és a papíron kapott foltokat saját méréseink, vagy azok hiányában a mintakromatogramok segítségével!

5.9. Ételeftestékek elválasztása cellulóz vékonyrétegen

Réteg: Merck Cellulose réteg, 0,1 mm vastag
40 mm x 50 mm vagy 40 mm x 66 mm

Felcseppentés: 10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban,
1-1 nagyon kicsi(!) csepp

- Minták: E102, E122, E131 ételfestékek oldatai
ismeretlen (kereskedelmi, ételfestéket tartalmazó oldatok)
- Eluens: pH7 foszfát puffer
vagy 10 ml n-BuOH – 5 ml MeOH – 3 ml H₂O elegye
vagy 10 ml n-BuOH – 4 ml MeOH – 5 ml H₂O elegye
- Kád: vérelemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell



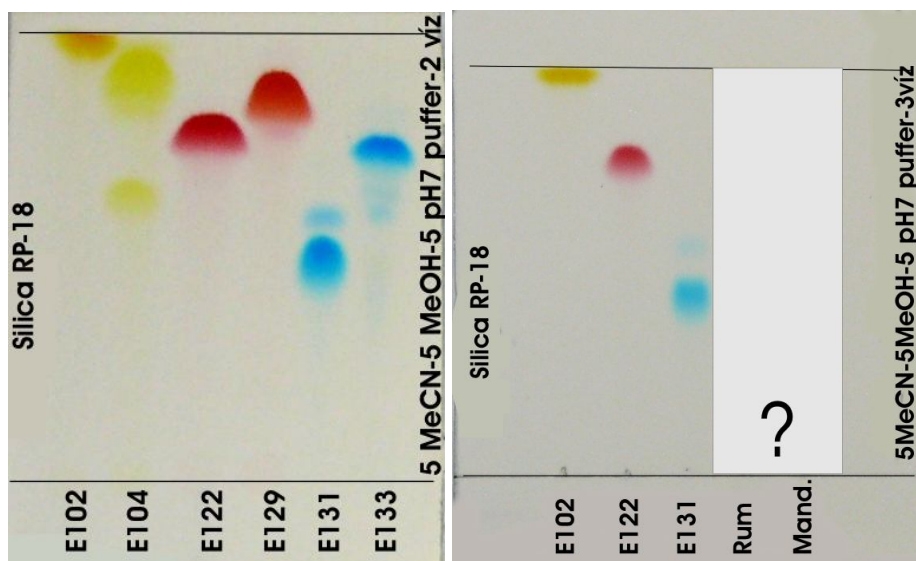
28. ábra Ételfestékek mintakromatogramja cellulóz rétegen.

Vágjunk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a standardokat és az ismeretlent! Készítsük elő a kádat, az eluensből 3 ml-t öntsünk a kádba. Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg a réteget hajszárítóval!

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetjük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel ábrázolva!

5.10. Ételfestékek elválasztása fordított fázisú rétegen

Réteg:	Merck Silica RP-18, 0,25 mm vastag (TLC-s réteg) 40 mm x 50 mm
Felcseppentés:	10 mm-re a lap alsó szélétől, egyenletes távolságokban, 1-1 nagyon kicsi(!) csepp (metanolos oldat)
Minták: oldatai	E102, E104, E122, E129, E131, E133 ételfestékek metanolos ismeretlenek (rum, keserúmandula, bonbon meggy aroma oldatok)
Eluens:	5 MeCN- 5 MeOH- 5 pH7 foszfát puffer (0,15 M)- 3 víz, vagy 5 MeCN- 5 MeOH- 5 pH7 foszfát puffer (0,15 M)- 2 víz,
Kád:	vérelemezfestő kád, telítetlen gőzterű, szűrőpapír bélés nem kell



29. ábra Ételfestékek elválasztása fordított fázison

Készítsük elő a kádat, a belsejét béleljük ki 4 cm széles szűrőpapír csíkkal. Az eluensből 4 ml-t öntsünk a kádba, majd tegyür rá a kádra a tetejét. Vágjunk le a megadott méretű réteget. Ceruzával jelöljük meg a startvonalat és az egyes minták startpontját. A startpontok alá írjuk fel, hogy milyen anyag kerül abba a pontba. A réteg szélére apró betűkkel felírhatjuk a futtatási körülményeket. Cseppentsük fel a metanolos standardokat és az ismeretleneket! A standard oldatokból és az

ismeretlenekből is legalább 5 cseppet kell használni! Minden csepp után szárítsuk meg a foltokat! Fejlesszük ki a réteget. Kifejlődés után szárítsuk meg a réteget hajszárítóval.

Táblázatosan adjuk meg a standardok, valamint az ismeretlenben lévő komponensek R_f értékeit! Állapítsuk meg, hogy milyen komponenseket tartalmazott az ismeretlenünk! A kiértékelést végezhetük kézzel, illetve szoftveres segítséggel. A jegyzőkönyvbe kerüljön be a kifejlesztett lap képe kinyomtatva, vagy kézzel átrajzolva!