

TÉMA	SACHARIDY
Úloha 19:	Kvalitatívna analýza sacharidov tenkovrstvovou chromatografiou
Princíp:	<p>Pri chromatografii na tenkej vrstve mobilná fáza prechádza tenkou vrstvou jemnozrnného adsorbentu alebo nosiča zakotvenej fázy, ktorý je buď voľne sypaný alebo vhodne fixovaný na podložke (hliniková fólia, sklenená platnička). Chromatografia na tenkej vrstve (TLC = thin-layer chromatography) je jednou z úprav adsorpčnej chromatografie, ktorá sa používa predovšetkým ako mikroanalytická metóda pre najrôznejšie skupiny látok. Pomocou nej môžeme veľmi rýchlo a ľahko analyzovať, resp. kontrolovať čistotu látok a ak máme vhodné štandardy, môžeme zároveň jednotlivé látky v zmesi identifikovať.</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. štandardné 1 % roztoky sacharidov (arabinóza, fruktóza, glukóza, ribóza, sacharóza) 2. zmes etylesteru kyseliny octovej, izopropanolu a vody v pomere 28:24:6 (mobilná fáza) 3. chromatografické hlinikové platne s fixovanou vrstvou silikagelu (Silufol), príp. oxidu hlinitého (Alufol) 4. neznáma vzorka (zmes dvoch sacharidov)
Materiál:	chromatografická komôrka s vrchnákom, automatické pipety, sušič na vlasy, ceruzka, pravítko, varič
Postup:	<p>Na chromatografickú platňu s rozmermi 10 × 10 cm si 1,5 cm od jej spodného okraja ceruzkou (nie perom) nakreslíme štartovaciu čiaru. Na ňu, 1,5 cm od ľavého okraja, zakreslíme rovnomerne od seba šesť bodov (vzdialenosť medzi bodmi 1,5 cm). Na prvých päť z nich nanesieme po 5 µl štandardných roztokov sacharidov (arabinóza, fruktóza, glukóza, ribóza, sacharóza). Šiesty bod je určený pre 3 µl vzorky (do zošita nezabudneme zapísať číslo vzorky). Roztoky nanášame opatrne automatickou pipetou. Pri nanášaní škvŕnu sušíme sušičom na vlasy. Pozíciu toho-ktorého sacharidu, resp. vzorky zaznamenáme ceruzkou priamo na platni pod príslušnou škvŕnou. Platňu s nanesenými roztokmi vložíme do chromatografickej komôrky s mobilnou fázou, prikryjeme vrchnákom a necháme vyvíjať vzostupne (približne 30 min). Pozor, hladina mobilnej fázy nesmie byť vyššie ako 1 cm nad spodným okrajom platne. V opačnom prípade by došlo k vyplaveniu sacharidov do mobilnej fázy. Keď je čelo mobilnej fázy 0,5 až 1 cm pod horným okrajom, platňu (chromatogram) vyberieme, ceruzkou označíme čelo mobilnej fázy a chromatogram vysušíme. Detekciu sacharidov vykonáme tak, že chromatogram držíme vo vodorovnej polohe niekoľko centimetrov nad varičom. Vysoká teplota (> 150 °C) spôsobí karamelizáciu sacharidov, čo sa prejaví tvorbou svetlohnedých škvŕn. Pritom dávame pozor, aby sme nespálili celú plochu chromatogramu. Nakoniec ceruzkou označíme stredy všetkých viditeľných škvŕn.</p>
Vyhodnotenie:	<p>Určíme hodnoty R_f (retenčný faktor) pre jednotlivé štandardy ako aj pre zložky neznámej vzorky a porovnáme ich navzájom. R_f hodnoty vypočítame ako podiel vzdialenosti stredy škvŕny od štartu (A) a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (B): $R_f = A/B$. R_f je funkciou adsorpčnej schopnosti stacionárnej fázy a pre danú látku závisí od systému, v ktorom je meraný, t.j. od teploty, druhu adsorbentu a od zloženia mobilnej fázy.</p>
Záver:	<p>Uvedieme, ktoré dva sacharidy obsahovala naša vzorka. K protokolu priložíme aj chromatogram, príp. ho môžeme prekresliť do vyhodnotenia.</p>