

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

Porovnání účinnosti preparativní HPLC a TLC

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Eva Jordánová

Přírodovědná studia, obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň, 2013

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

Plzeň, 20. července 2013

.....

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce Doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc. za jeho vstřícnost a trpělivost při práci v laboratoři a při vypracování bakalářské práce.

Anotace

Tato práce si klade za cíl zvýšit efektivitu preparativní vysokoúčinné kapalinové chromatografie tak, aby mohla úspěšně konkurovat již zavedené preparativní tenkovrstvé chromatografii a mohla být s úspěchem zapojena do vědeckovýzkumné činnosti studentů. Experimentální část práce je zaměřena na izolaci čistého betulinu ze směsi pomocí chromatografických metod. Je zde popsána analytická a preparativní tenkovrstvá chromatografie.

Klíčová slova: chromatografie, tenkovrstvá chromatografie (TLC), preparativní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), betulin

Annotation

Aim of this paper is on increase in effectivity of preparative high-performance liquid chromatography in such way, that it could compete already introduced preparative thin-layer chromatography and it could be successfully used by the students in their scientific activity. Experimental part of the paper focuses on isolation of the pure betulin from the mixture using the chromatographical methods. There is described analytical and preparative thin-layer chromatography.

Key words: chromatography, thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), betulin

Obsah

1 ÚVOD	1
2 TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Chromatografie	2
2.1.1 Princip chromatografie	2
2.1.2 Dělení chromatografických metod	3
2.1.3 Chromatografické metody vhodné pro využití v chemii triterpenoidních sloučenin	4
2.1.3.1 Sloupcová chromatografie	4
2.1.3.2 Planární chromatografie	5
2.1.3.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	6
2.1.3.3.1 TLC v analytickém provedení	12
2.1.3.3.2 Preparativní TLC	14
2.1.3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) preparativní	15
2.1.3.4.1 Preparativní pístové čerpadlo CPI 03 (LABIO a.s.)	17
2.1.3.4.2 Přepínací čtyřcestný ventil CI 03 s dávkovací smyčkou ..	18
2.1.3.4.3 Preparativní kolona Bioshoper PSI 200	19
2.1.3.4.4 Refraktometrický detektor RIDK 102	20
2.1.3.4.5 Stolní sběrač frakcí FCC 100 T (LABIO a.s.)	22
2.1.3.4.6 Chromatografický program CSW 32	23
2.1.3.4.7 Pracovní postup	23
2.1.3.4.8 Možnosti vylepšení preparativní HPLC	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Izolace betulinu z březové kůry	26
3.2 Příprava tenkých vrstev pro analytickou TLC	27
3.3 Příprava tenkých vrstev pro preparativní TLC	27
3.4 Volba vhodné rozpouštědlové soustavy pro TLC chromatografii	27
3.5 Izolace čistého betulinu ze směsi	28

3.5.1	Analytická tenkovrstvá chromatografie vzorků E1 – E4.....	29
3.5.2	Zpracování vzorku E2.....	30
3.5.2.1	Analytická tenkovrstvá chromatografie vzorků E5 – E9	31
3.5.3	Zpracování vzorku E7.....	31
3.5.3.1	Preparativní tenkovrstvá chromatografie vzorku E7.....	31
3.5.4	Zpracování vzorku E12.....	33
3.6	Úprava kapalinového chromatografu	34
4	ZÁVĚR.....	35
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	36
6	RESUMÉ.....	37

1 ÚVOD

Katedra chemie FPE ZČU se dlouhodobě zabývá chemií triterpenoidních sloučenin, při které jsou využívány extrakty přírodních surovin. K velmi významnému zdroji těchto sloučenin patří především březová kůra, která obsahuje velké množství betulinu¹. Pro běžnou práci se betulin koncentruje opakovanou krystalizací z ethanolu, přičemž se doprovodné sloučeniny hromadí v matečných loužích. Pro přeměny betulinu je však výhodné mnohdy využívat betulin analyticky čistý, který se v konečné fázi získává chromatografickými metodami. Chromatografické metody jsou nezbytné při sledování průběhu chemických přeměn a následné izolaci jejich produktů. Vzhledem k tomu, že se jedná vesměs o pevné látky rozpustné v nevodných rozpouštědlech a pracuje se s různými kvanty látek, musí tomu odpovídat i užití chromatografické metody. Nejčastěji se jedná o adsorpční chromatografii v planárním provedení, méně často o sloupcovou chromatografii. Protože je na katedře k dispozici kapalinová chromatografie (HPLC) v preparativním provedení jako zařízení pro semimikrochromatografii, bylo by zajímavé vyhodnotit možnosti jejího využití jako alternativy dosud využívaných metod. Vzhledem k tomu, že je v systému HPLC využívána kolona se silikagelovou náplní, nabízejí se i možnosti vzájemného porovnání. Celé zařízení HPLC je tvořeno propojením jednotlivých dílů tenkými kovovými trubičkami a připojením jímače frakcí silnější polyethylenovou hadičkou, které zajišťuje pevné nastavení vyústění systému nad jednotlivé zkumavky jímače frakcí. Dosud se při zpracování malých množství látek (50 – 100 mg) s výhodou užívá preparativní tenkovrstvá chromatografie, která na rozdíl od sloupcové chromatografie umožňuje rozdělení procesu do časově krátkých etap. Toto řešení je vzhledem k časovým možnostem studentů zajímavé.

HPLC v podstatě svým provedením proces sloupcové chromatografie velmi urychluje. Nabízí se, zda v současném provedení nejsou nějaké možnosti dalšího zefektivnění tak, aby tato metoda zaujala srovnatelné místo s preparativní TLC a mohla být větší měrou využívána při zapojování studentů do vědeckovýzkumné činnosti katedry.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografie

Chromatografie patří mezi separační metody, které slouží k separaci jednotlivých složek ze směsi.² Objev chromatografických metod spadá do doby okolo roku 1900 a významnou roli hrál ruský botanik M. Cvět. Chromatografie nabyla významu až skoro o padesát let později a o to se zasloužili Syng a Martin, kteří za svoje úspěchy v rozšíření chromatografie získali Nobelovu cenu.³ Separační metody jsou známy již z minulých dob, je řazena mezi ně například filtrace, sedimentace nebo srážecí reakce. Pro dnešní využití, kde by uvedené metody nemusely postačit, je nutné zařadit i další metody, které se využívají například ke studiu antibiotik, směsí barviv či aminokyselin. Právě k takovým účelům byla vyvinuta adsorpční chromatografie. Pro další separační postupy byly objeveny plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, roztrpávání, papírová chromatografie, afinitní chromatografie, iontově výměnná chromatografie a jiné. Metody jsou uplatnitelné jak v analytické a preparativní chemii tak i v chemické technologii.²

2.1.1 Princip chromatografie

Princip chromatografie lze spatřovat v rozdělení složek, které jsou nestejněměrné na základě rozdílné afinity zkoumaných složek vzhledem k systému, kde jsou dvě fáze – stacionární a mobilní. Stacionární fáze je nepohyblivá a vyplňuje separační prostor, zatímco mobilní fáze se pohybuje tak, že určitý vzorek nese prostorem, kde probíhá separace. Jednotlivé složky zkoumaného vzorku jsou postupně zastavovány během jejich pohybu separačním prostorem. To znamená, že pouze část z původního množství dané látky postupuje dále s pohyblivou fází.²

Jakmile je daná látka vložena do systému, kde má proběhnout chromatografie, rozdělí se mezi fází mobilní a stacionární, aby dosáhla tzv. sorpční rovnováhy. Sorpční rovnováhy je však nemožno dosáhnout, protože je stále rušena mobilní fází, která se pohybuje. V prvním oddělení zóny je koncentrace chromatografované látky v pohyblivé části větší než v rovnovážné části, proto zde dochází k sorpci, při níž látka přestupuje z fáze pohyblivé do fáze stacionární. Úplně jinou možnost lze zaznamenat na druhém konci, kde je detekována desorpce. To znamená, že látka naopak z fáze stacionární přejde do fáze pohyblivé. Mezi předním oddělením a zadním oddělením zóny není

možno pozorovat sorpci ani desorpci, protože je tam ustalován rovnovážný stav nebo přesněji stav, který se rovnováze alespoň přibližuje.²

2.1.2 Dělení chromatografických metod

Existuje celá řada různých dělení chromatografických metod. Metody je možno klasifikovat podle toho, jakým způsobem probíhá separační proces nebo dle toho, jaká technika je k práci využívána, ale nejčastěji jsou chromatografické metody rozdělovány dle jednotlivých fází, kde probíhá separace. Nejjednodušší dělení metod je ve dvě základní skupiny, u kterých hraje svou roli fáze pohyblivá, podle které jsou tyto dvě skupiny děleny. Je to chromatografie kapalinová a plynová.²

Základní rozdělení chromatografických metod je zřejmé z tabulky.⁴

Tabulka 1 Přehled nejdůležitějších chromatografických metod

Mobilní fáze	Separační mechanismus	Metoda	Užívaná zkratka
plyn	síťový efekt	Plynová chromatografie na molekulových sítěch	GSC
	adsorpce	Plynová adsorpční chromatografie	
	rozdělování	Plynová rozdělovací chromatografie	GLC
kapalina	síťový efekt	Gelová permeační chromatografie	GPC
	adsorpce	Kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	rozdělování	Kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	chemisorpce	Iontová výměnná chromatografie	IEC
	specifická interakce biomolekul	Afinitní chromatografie	

2.1.3 Chromatografické metody vhodné pro využití v chemii triterpenoidních sloučenin

Podle průběhu separace lze rozdělit chromatografii na rozdělovací, adsorpční, iontově výměnnou, afinitní, gelovou atd...² V souvislosti s využitím chromatografie v chemii triterpenoidních sloučenin je tato část věnována rozdělovací a adsorpční chromatografii.

Adsorpční chromatografie hrála svou význačnou roli již v historii u objevu chromatografie M. Cvěttem, který se zabýval tím, jak se adsorbují barevné látky na proteiny.⁵ Princip adsorpční chromatografie tkví v tom, že složky látky, které se rozpustí v první fázi budou mít rozdílnou koncentraci než rozpuštěné složky látky, které se budou vyskytovat v místě setkání s druhou fází a tak to může spět až k tomu, že dojde k postupnému nakupení po povrchu této fáze, což se nazývá adsorpce.³ Látky se adsorbují na povrch adsorbentu, který je nejčastěji v pevné fázi, rozdílně. Adsorbentem může být například uhličitán vápenatý (CaCO_3), oxid hlinitý (Al_2O_3) nebo silikagel. Podle toho, jak se jednotlivé složky dané látky navazují na adsorbent, se jednotlivé složky separují mezi pohyblivou fází a fází stacionární.⁴ Adsorpce mohou probíhat také mezi kapalnou a plynnou fází nebo mezi kapalinami, jež se navzájem nemísí.² Je možno ji využívat v souvislosti s chromatografií tenkovrstvou nebo sloupcovou.⁶

Rozdělení složek určité látky mezi dvěma kapalinami, které se navzájem nemísí, je umožněno pomocí rozdělovací chromatografie. Je velmi důležité vzít v potaz rozpustnost nebo spíše afinitu složek k těmto kapalným fázím, které rozhodují o průběhu celé chromatografie. Rozdělování jednotlivých složek je charakterizováno tzv. rozdělovací neboli distribuční konstantou.² Jedna kapalina, pevně zakotvená na nosiči, představuje fází stacionární. Druhá, volně se pohybující, tvoří fází mobilní.⁴ Jako mobilní fáze může sloužit i plyn. Podle použití mobilní fáze se rozlišuje chromatografie kapalinová nebo plynová (viz. tabulka 1).

Již z názvu práce vyplývá, že bude využívána především chromatografie tenkovrstvá (TLC) a kapalinová jako vysokoúčinná metoda (HPLC). Těmto metodám je proto věnována další pozornost.

2.1.3.1 Sloupcová chromatografie

Princip sloupcové chromatografie tkví v rozdělení jednotlivých látek ve vzorku mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze je tvořena sloupcem

v chromatografické trubici. Nejčastěji je využíván silikagel, který má však nevýhodu a tou je mírná kyselost, která by mohla zapříčinit rozklad látek, jež jsou na kyselé prostředí citlivé. Hmotnost silikagelu by měla být 25 až 50 násobek hmotnosti vzorku, větší poměr je využíván při složitějších separacích nebo pokud je k dispozici menší množství vzorku než je 100 mg. Mobilní část je tvořena rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel. Při výběru je nutno se řídit eluotropickou řadou, která zde bude blíže rozvedena (viz tabulka 2). Pohyb rozpouštědla trubicí je zajištěn gravitací, lze jej ovlivňovat také tlakem. Je třeba dbát na to, aby sloupec byl homogenní, v opačném případě mohou ve sloupci vzniknout kanálky nebo praskliny. Délka chromatografické trubice vzhledem k průměru je přibližně 10:1 až 15:1. Volba délky trubice je přizpůsobena podmínkám chromatografie, poměr může být v rozmezí 2:1 až 50:1. Na konci skleněné trubice je obvykle kohout. Pokud není chromatografická trubice v dolní části opatřena fritou, je třeba napěchovat do zúžené části před kohoutem kousek vaty. Připravený vzorek, který je rozpuštěn v minimálním množství rozpouštědla, musí být nanesen na vršek sloupce. K nanášení bývá obvykle používána pipeta. Po vsáknutí roztoku vzorku je přidána pohyblivá fáze. Jímané frakce by měly být jímaný rychlostí maximálně jedné kapky za dvě sekundy. Velikost frakcí závisí na nárocích na účinnost dělení sloupce. Pokud jsou nároky na dělení větší, je potřeba, aby jímané frakce byly menšího objemu. Objem jímaných frakcí by však měl být stejný a definovaný.⁷ Obvykle se zde mluví o rozdílech zádrže, přičemž zádrž představuje množství rozpouštědla, které je zachyceno sloupcem. Nejčastěji využívanou metodou zjišťování zádrže sloupce je nalití známého množství čistého rozpouštědla na sloupec a zachycení proteklého rozpouštědla v předem podstaveném odměrném válci. Zádrž je definována jako rozdíl obou objemů rozpouštědla.

Pro zachování účinnosti chromatografie je vhodné proces nepřerušovat. Po provedení sloupcové chromatografie jsou rozpouštědla z frakcí odpařována. Pro zjištění produktů v jednotlivých frakcích je využívána tenkovrstvá chromatografie.⁷ Pokud je k dispozici kolonový chromatograf s detektorem, výsledek analýzy se promítne na chromatogramu, který zaznamenává odezvu detektoru vzhledem k času.³

2.1.3.2 Planární chromatografie

V souvislosti s kapalinovou chromatografií je zde uvedena chromatografie planární, která v současné době díky své jednoduchosti nachází široké uplatnění. Planární chromatografie je dělena dle zvolené stacionární fáze na papírovou a tenkovrstvou. Už z názvu vyplývá, že chromatografie papírová bude probíhat na

chromatografickém papíru a tenkovrstvá na tenké vrstvě látky, jež bude sorpčním mechanismem kapalinu zachycovat.³

Mobilní fáze u tohoto typu chromatografie je kapalina a je přenašečem dané látky.⁸ Výběr vhodné kapaliny je pro chromatografii velmi důležitý a je vybírána na základě znalosti polaritý látek, které mají být separovány a také polaritý fáze stacionární. Mobilní fáze jsou nazývány rozpouštědlové soustavy, kdy tyto soustavy často mají i několik složek.³ V experimentální části práce byla použita směs ethylacetát a n-hexan v poměru 3:10.

Neméně důležitý je i výběr fáze stacionární, zde je opět na výběr z několika možností. Časté využití lze připsat silikagelu, celulóze a oxidu hlinitému (Al_2O_3). Celulóza je nejčastěji využívána v papírové chromatografii pro svou schopnost afinity k vodě, kterou na sebe váže. Silikagel je nejčastěji využíván u tenkovrstvé chromatografie, možné je ale také použití již zmiňovaného oxidu hlinitého. Co se týče nanesené vrstvy stacionární fáze, měla by se tloušťka nacházet mezi 0,1 – 0,25 mm.³

Mechanismus papírové a tenkovrstvé chromatografie je rozdílný. Největší rozdíl je bezesporu v uspořádání, kdy u papírové je sestupné, zatímco u tenkovrstvé je vzestupné.³

2.1.3.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tento typ chromatografie má několik základních znaků: stacionární fáze je pevná a v ploše, mobilní fáze je kapalná, při ponoření do fáze mobilní dochází ke vzlínání, rychlost pohybu je rozdílná. Je zde několik možností detekce, jednou z nich je například detekce pomocí UV záření, která však vyžaduje speciální vybavení.^{3,8} Možnosti detekce budou v práci blíže rozvedeny.

Tenkovrstvá chromatografie jako taková zaznamenala velký rozvoj na konci padesátých let dvacátého století a hlavním představitelem byl Stahl. TLC díky poměrně jednoduchému a praktickému provedení předčila chromatografii papírovou i sloupcovou.²

Tenkovrstvá chromatografie využívá sorbentu, který je zakotven na pevném podkladu nebo může být i volně, pak se jedná o chromatografii adsorpční. Pokud je sorbent fixován na nosič, jde o chromatografii rozdělovací. Avšak adsorpční chromatografie je častější.⁵ TLC lze použít tedy jak při adsorpční chromatografii, rozdělovací, tak i iontové.⁶ I zde je volba vhodného materiálu fáze stacionární velmi důležitá a musí být tomu přizpůsobena i volba mobilní fáze.⁹

Principem TLC je tedy rozdělení složek směsi mezi fázi stacionární (silikagel) a mobilní (organické rozpouštědlo), které protéká skrz fázi stacionární.⁵ Tenkovrstvá chromatografie se dělí dle způsobu provedení na preparativní TLC a analytickou TLC. Jejich hlavní odlišnost spočívá ve velikosti chromatografických desek.⁸

Materiál pro TLC musí být vhodně zvolen a tedy splňovat určitá kritéria jako jsou čistota a zrnění. Je také důležité, aby daný materiál měl potřebné vlastnosti pro použití na daný typ chromatografie. V experimentální části práce byl použit silikagel, který dokonale splnil požadované vlastnosti pro rozdělovací chromatografii.⁹ Na trhu je k dispozici velký výběr materiálů.

Ještě předtím než je provedena vlastní chromatografie, je třeba vzorek rozpustit v rozpouštědle a zbavit ho všech nečistot, které by mohly negativně ovlivnit průběh celé chromatografie. Vhodné rozpouštědlo je voleno s ohledem na adsorbent. Například při volbě zásaditého rozpouštědla (pyridin) dojde k pevnému přichycení rozpouštědla na silikagel a znesnadní se tím jeho odstranění.⁹ Bod varu zvoleného rozpouštědla by se měl pohybovat v rozmezí 50 až 100 °C. Při výběru je důležité brát ohled na to, aby chromatografované látky měly nízký retardační faktor (R_F). Ve velmi ojedinělých případech se vzorek nanáší v práškové podobě například vzorek tkáně rostlin.² Po rozpuštění je vzorek nanesen na pomyslnou linii startu, které je nutné se držet po celou dobu nanášení, jež lze provést pomocí velmi tenkých kapilár, mikropipetek nebo mikrostříkaček. Pomyslná čára by měla být asi 1,5 – 2 cm od okraje.^{2,3,9} Aby se mohl vzorek nasáknout, musí být kapilára přiložena přímo k fixované vrstvě. K nanášení vzorku je možno kromě ručního nanesení využít také nanášení automatické. Pro úspěšné provedení chromatografie je potřeba odhadnout množství vzorku, jež bude naneseno. Závisí to samozřejmě na koncentraci. Při zvolení příliš velkého množství bude na startu látka o příliš vysoké koncentraci a pohyblivá fáze nebude moci látku rozpustit a vzniknou pruhy.⁹ Obvyklá koncentrace nanášených roztoků se pohybuje maximálně okolo 1%. Vzorek je nanášen na start chromatografické desky buď bodově nebo v prouzcích, přičemž se prokázalo, že nanášení v prouzcích má lepší výsledky.² Další rozdíl v nanášení spočívá v tom, zda je prováděna analytická TLC nebo preparativní TLC.⁵

Rozpouštědla jsou volena především podle jejich schopnosti danou látku rozpustit, podle jejich selektivity a polarit. Je nutné dbát na to, aby rozpouštědla nebyla ničím znečištěna.² Při rozhodování, jaké rozpouštědlo má být zvoleno, je dobré řídit se poučkou, že podobné se rozpouští v podobném. Jestliže má daný vzorek úplně rozdílnou polaritu než rozpouštědlo, chromatografie se nepovede, neboť vzorek bude pořád na startu a nebo bude pokračovat pořád dál s čelem. Je důležité si uvědomit, že

výběr rozpouštědla má vliv na R_F látek, které jsou od sebe děleny. Hodnota R_F nesmí být příliš nízká ani vysoká. Proto se rozpouštědla třídí do eluotropních řad.^{2,5}

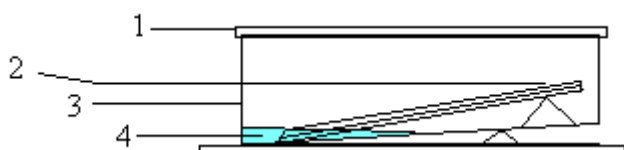
Tabulka 2 **Eluotropní řada**

voda
methanol
ethanol
propan-1-ol
aceton
ethyl-acetát
diethylether
chloroform
benzen
toluen
chlorid uhličitý
cyklohexan
hexan

Rozpouštědla, která jsou uvedena hned na začátku tabulky, mohou být použita jako eluenty těch látek, které mají vysokou polaritu, naopak ta rozpouštědla, která se nacházejí na konci tabulky, mohou být použita při jemném dělení směsi.⁵ Velmi často jsou dnes využívány i směsi dvou rozpouštědel v případě, že je potřeba upravit eluční účinek prvního rozpouštědla.^{5,9} Při volbě vhodného rozpouštědla je dobré řídit se literaturou, která uvádí, v jakých soustavách je nejlepší danou látku rozpustit. Pokud daná látka není v literatuře uvedena, volba je řízena těmi látkami, které jsou dané sledované látce podobné. Pokud je chromatografována látka, jež je povahově zcela neznámá, je nejdříve provedena chromatografie s tím rozpouštědlem, které se nachází

v polovině eluotropní řady.² Podle R_F sledované látky jsou pak zvolena rozpouštědla čistá nebo ve směsi.

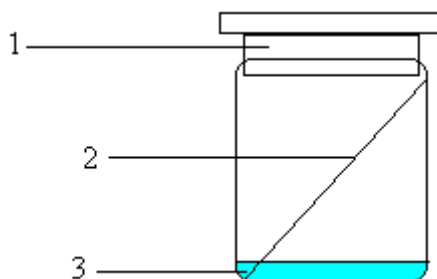
Vyvíjení probíhá rozdílně u sypaných vrstev a fixovaných.⁹ Chromatografie na tenké vrstvě je vzestupná, sestupná se uplatňuje při chromatografii papírové, kdy se papír pověsí dovnitř nádoby, kde je rozpouštědlo.⁶ Chromatografická deska musí být dána s nanesenou látkou na startu k vyvíjení až po odpaření rozpouštědla, ve kterém byl vzorek rozpuštěn.⁵ U sypaných vrstev musí být deska umístěna šikmo ve skleněné vaně, úhel by měl být 20° , konec desky zasahuje do rozpouštědla tak, aby se nanesený vzorek nesmácel, ale byl vymýván až vzlínáním. Vana je uzavřena skleněnou deskou. Lepší účinek je dosažen opakovaným vymýváním.⁹



Obr. 1 Vyvíjení sypaných vrstev

1. skleněná deska
2. sypaná vrstva na desce
3. skleněná vana
4. rozpouštědlo

U fixovaných vrstev jsou dvě možnosti vyvíjení a to buď ve skleněné komoře nebo chromatografie mezi dvěma deskami, které jsou skleněné. Je možné vyvíjet i více desek jednorázově za pomoci speciálních držáků. V chromatografické komoře je možno naráz vyvíjet dvě desky, když jsou postaveny do písmene V.⁹ Při vyvíjení v chromatografické komoře musí být nalité na dně nádoby takové množství rozpouštědla, aby nedosahovalo úroveň startu, na start se musí dostat samo procesem vzlínání. Je důležité, aby komora byla dokonale uzavřena, aby nedošlo k ucházení par, které by mohlo způsobit okrajové jevy, a stopy jednotlivých látek by byly zdeformovány a detekce by byla značně znesnadněna. Vzlinání se nechá probíhat tak dlouho, dokud nedosáhne kousek (pár milimetrů) pod okraj chromatografické desky. Pak je destička vyjmuta z chromatografické komory a následuje detekce.⁵



Obr. 2 **Chromatografická skleněná komora**

1. krycí deska
2. chromatografická deska
3. rozpouštědlo

Jak již bylo řečeno, vyvíjecí komory musí být zabezpečeny před únikem par, aby během vyvíjení nedocházelo ke změně složení eluentu. Komory jsou ve většině případů skleněné a pravoúhlé, rozměr musí korespondovat s rozměrem chromatografické desky. Okraj komor by měl být zabroušen tak, aby do nich přesně zapadala zabroušená krycí deska. Pro speciální případy jsou dostupné na trhu i krycí desky, které mají dva kohouty, díky nimž je umožněno do komory vpouštět inertní atmosféru.²

Existuje několik možností, jak látky detekovat. Přímá detekce se uplatňuje v případě, že látky, které jsou chromatografovány, jsou barevné a jejich skvrny je možno spatřit pouhým okem. Týká se to například rostlinných barviv. Druhým způsobem je detekce pomocí UV záření, které je velmi časté, ale jak již bylo zmíněno, vyžaduje speciální vybavení. Podmínkou pro detekci pomocí UV záření je, aby adsorbent obsahoval složku, která fluoreskuje. Poté co je deska osvětlena, jsou viděny tmavé skvrny tam, kde se látky rozdělily.⁶ V případě, že adsorbent neobsahuje fluoreskující složku, je deska postříkána roztokem morinu a místa, kde se látky rozdělily, se budou jevit pod UV lampou jako skvrny na fluoreskujícím pozadí.⁵ Některé látky, například alkaloidy, pod UV lampou svítí – fluoreskují samy.⁶

Při detekci je možné využít specifické zabarvení tak, že chromatografická deska je postříkána činidlem, které reaguje se separovanými látkami takovým způsobem, že se vytvoří barevné skvrny. Jako poslední možnost stojí za zmínku izotopové techniky, kde vzniká radioaktivita, která se pak změří. Její vznik musí být podmíněn poznačením látek radioaktivními izotopy.⁶

Jednou z možností identifikace zkoumané látky je její porovnání se standardem při TLC. Látka je identifikována nejčastěji na základě R_F .⁹ Retardační faktor je veličina, jež je bezrozměrná a vyjadřuje vzdálenost, kterou urazí stopa dané složky od startu na chromatografické desce. R_F se pohybuje mezi hodnotami 0 až 1. Pokud je R_F roven nule, znamená to, že látka je na startu a naopak pokud je roven jedné, látka jde společně

s čelem dál.⁵ Hodnota R_F je však závislá na mnoha aspektech, proto je kolikrát těžké ji reprodukovat. Na hodnotu může mít vliv teplota, aktivita vrstvy, množství vzorku na chromatografické desce, velikost komory, postup při přípravě chromatografické desky a další. Pokud je chromatografická deska nechána přibližně hodinu na vzduchu ještě předtím, než je nanesen vzorek, reprodukovatelnost se zvýší. Nejen hodnota R_F , ale také tvar stopy podléhá mnoha faktorům, díky nimž může být výpočet znesnadněn. V nejlepším případě by stopy popřípadě pruhy měly být od sebe dobře odděleny.⁹ Pro výpočet R_F je využíván vzorec $R_F = a / b$, kde a vyznačuje délku mezi startem a čelem pohyblivé fáze a b vyjadřuje vzdálenost stopy respektive jejího středu od startu.^{3,5} Aby byla identifikace spolehlivější, doporučuje se, aby se zkoumaná látka nacházela okolo středu chromatogramu. Právě tam je dělení látek neúčinnější.⁹

K dokumentaci TLC je opět možné využít několik možností, kdy se používá původní chromatogram nebo vytvořené fotografie či obrázky. Ty je však nutné náležitě popsat. Při rozhodnutí pro využití původního chromatogramu je nutné brát ohled na typ vrstvy, která byla pro chromatografii použita. Sypané vrstvy půjdou uchovat jen těžko, ale fixované vrstvy lze postříkat takovým přípravkem, který vrstvu zpevní tak, že je možno ji vlepít do protokolu.

Pro úspěšnou chromatografii je potřebné dodržet hned několik zásad a to volbu vhodných podmínek a také znalost vhodnosti látek. Látky, jež jsou vhodné pro chromatografii, jsou dobře detekovatelné. Tyto látky musí být dobře rozpustné v rozpouštědle, které je voleno samozřejmě s ohledem na látku, která má být chromatografována, aby látka mohla být nanášena v potřebné koncentraci na start. Také je nutné, aby se dobře rozpouštěla v mobilní fázi. Látka musí být netěkavá, aby během probíhající chromatografie nevytěkala. Poslední podmínkou je jistá odolnost látky v souladu s podmínkami, které jsou pro chromatografii zvoleny.⁹

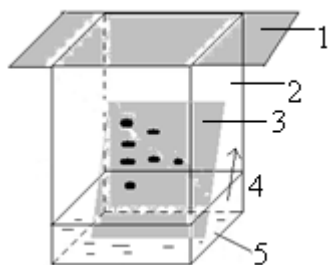
Pokud je potřeba chromatografovat látku, která nevyhovuje výše uvedeným podmínkám, musí být látka poupravena po chemické stránce a to znamená, že je vhodné ji změnit na vyhovující derivát. Některé složité molekuly je naopak nutno pozměnit na jednodušší, které jsou snadnější pro identifikaci.⁹

Výhodou TLC je bezesporu malá časová náročnost, snadné provedení a nenáročnost na nákladné laboratorní experimentální přístroje. Pro TLC není potřeba velkého množství látek nebo rozpouštědel.⁶

2.1.3.3.1 TLC v analytickém provedení

Analytická TLC je prováděna na deskách menších rozměrů než je tomu u preparativní TLC. Lze použít mikroskopická sklíčka o rozměrech 75 x 26 mm.⁸ Tloušťka vrstvy by měla být maximálně 2 mm, u větší tloušťky hrozí během vysoušení popraskání.⁹

Jako fáze stacionární je často používána slabá vrstva silikagelu nanesená na mikroskopické sklíčko nebo již zakoupená fixovaná vrstva. Rozpuštěný vzorek je nanesen na start. Při analytické TLC jsou pokládány na chromatografickou desku jednotlivé body s dostatečnou vzdáleností od sebe.⁵ Po odpaření rozpouštědla je chromatografická deska vložena do komory s připravenou pohyblivou fází a po uzavření komory proběhne vyvíjení. Poté co čelo pohyblivé fáze je ve vhodné vzdálenosti, může být chromatografická deska podrobena detekci. Jednotlivé látky jsou detekovány dle jejich polohy, jež je určena retardačním faktorem (R_F).⁹ Chromatografie probíhá vzestupně (viz obr. 3).³



Obr. 3 **Proces vzestupného vzlínání**

1. víko chromatografické komory
2. chromatografická komora
3. chromatografická deska
4. proces vzlínání
5. mobilní fáze

Velmi využívanou možností detekce u analytické TLC je vypalování na elektrickém vaříči. Je však třeba dbát na to, aby tenká vrstva neobsahovala pojivo obsahující organickou látku, neboť detekce probíhá tak, že organické látky tmavnou a pokud by organické pojivo bylo přítomno, celá chromatografická deska by zčernala a vyhodnocení chromatografie by nebylo možné. Pokud je ještě před vypalováním chromatografická deska postříkána 10% kyselinou sírovou, pak celý proces probíhá rychleji a skvrny jsou lépe vidět (viz obr. 4).⁵

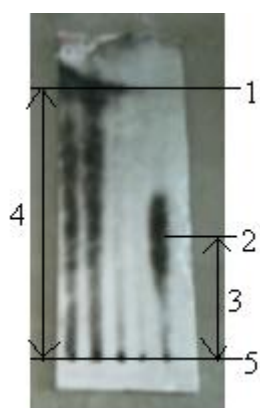


1 2 3 4 5

Obr. 4 Detekce provedená vypálením na elektrickém vařiči

1. stopa číslo 1 obsahující betulin a lupeol
2. stopa číslo 2 obsahující betulin a lupeol
3. stopa číslo 3
4. stopa číslo 4
5. stopa číslo 5 obsahující čistý betulin

Identifikace jednotlivých stop probíhá na základě R_F . Již z obrázku (viz obr.5) vyplývá, že je při identifikaci nutné vždy porovnání se známou látkou například s čistým betulinem. Je zde také možnost využít pro identifikaci znalostí vztahu mezi chováním látky při chromatografii a strukturou dané látky, kdy je pro porovnání využita jiná látka, která má strukturu co nejbližší zkoumané látce. Potom lze identifikovat danou látku na základě například bodu tání nebo infračervenou spektroskopií. Tuhle možnost nelze však doporučit bez předchozích zkušeností.⁹



Obr. 5 Identifikace na základě R_F

1. čelo rozpouštědla
2. střed stopy
3. b = vzdálenost středu stopy od startu
4. a = délka mezi startem a čelem pohyblivé fáze
5. start

2.1.3.3.2 Preparativní TLC

Jak již bylo uvedeno, tenkovrstvá chromatografie může být provedena dvěma způsoby a to buď analyticky nebo preparativně. Na preparativní TLC jsou využívány chromatografické desky o rozměrech 20 x 20 cm, toto je nejpoužívanější rozměr, mohou být i jiné například 25 x 50 cm. Nanesená vrstva je silná maximálně 3 mm.⁸ Vrstvy mohou být jak sypané tak lité, a to buď bez pojiva nebo s pojivem. Na nanášení vrstev jsou využívány nanášečky nebo skleněné tyčinky s hadičkou z pryže nebo plastu nebo je možné místo hadičky použít obyčejnou lepenku. Možnost přípravy lité desky je taková, že je smíchán adsorbent s vodou a následně nalit na chromatografickou desku. Množství jak vody tak adsorbentu je třeba mít předem vyzkoušeno.⁵

Již bylo řečeno, že rozdíl mezi analytickou a preparativní TLC tkví ve velikosti chromatografické desky, ale je zde také rozdíl v nanášení chromatografované látky na start. Na start je nanesena souvislá čára maximálně o průměru 2 až 3 mm, aby byla chromatografie účinná. K nanášení lze s úspěchem využít balonek. Jakmile se odpaří rozpouštědlo ze startu, je vložena chromatografická deska do akvária s víčkem, které na akvárium těsně doléhá.⁵ Při provádění preparativní TLC, kde je používána deska o rozměrech 20x20 cm, je možno využít komoru o rozměrech 21x21x6 cm.²

V blízkosti startu vytvoří dělená látka pruh, který je obklopen pruhy, jež vytvořily ostatní složky směsi. Lepšího rozdělení jednotlivých pruhů je možno docílit odpařením rozpouštědla z chromatografické desky a následným vzlínáním týchž rozpouštědel po stejné chromatografické desce. Někdy je potřeba tento proces vícekrát opakovat.¹⁰ Princip uvedeného opakovaného procesu spočívá v tom, že při opakování se stane každý pruh o mírně odlišném R_F v podstatě startem. Je třeba dbát na to, aby byla při opakování použita nová směs rozpouštědel o stejném poměru. Jestliže je opakovaný postup využit u bezbarvých látek, je důležité si podmínky opakování předem zkusit na analytické chromatografické destičce.⁵

Pro izolaci barevné látky stačí odebrat příslušný pás adsorbentu a následuje extrakce pro získání potřebné látky. Pro extrakci je opět nutné vybrat vhodné rozpouštědlo. Bohužel však většina látek je bezbarvých, proto se přistupuje k účelné detekci. Jedna z možností je použití UV-lampy s pomocí UV indikátoru. Ne vždy je UV-lampa k dispozici, proto se nabízí další metoda, která je založena na získaném přehledu o složení jednotlivých pásů, které je důležité si načrtnout na chromatografické desce a z každého pásu je odebrán vzorek, jehož složení se zjistí klasickou analytickou chromatografií, následuje extrakce jednotlivých pásů. Druhá z metod využívá dotyku elektrického žhavého odporového drátu ve dvou místech, vždy ve směru start – čelo.

V místech, kde jsou obsaženy organické látky, dojde k zuhelnatění a tím pádem ke zhnědnutí. Ještě než je sejmuta vrstva z chromatografické desky k extrakci, je nezbytné odstranit zuhelnatěné pruhy, jinak hrozí znehodnocení izolované látky.⁵

Výhodou preparativní TLC je bezesporu jednoduchost provedení. Jednodušší je nanést směsi látek, které mají velký rozdíl hodnot R_F , zatímco u látek, jejichž hodnoty R_F jsou blízké, je potřeba dávat pozor na preciznost nanášení vzorku.² Za další výhody je považováno malé spotřebování rozpouštědla a možnost chromatografickou desku nechat opakovaně vyvolat. Nevýhodou je jednoznačně nízká kapacita.⁷



Obr. 6 Nanesený souvislý pruh vzorku na chromatografickou desku



Obr. 7 Balonek k nanášení vzorku

2.1.3.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) preparativní

Preparativní HPLC neboli preparativní vysokotlaká kapalinová chromatografie je jednou z nejlepších a hlavně nejúčinnějších způsobů, jak rozdělit látky, které by byly separovány pomocí obyčejné kolonové chromatografie jen obtížně.⁷ Jak už z názvu vyplývá, jedná se o dělení, jež probíhá za zvýšeného tlaku a má vysoký stupeň automatizace dělicího procesu.^{6,11} Mezi obyčejnou kolonovou chromatografií a HPLC je několik rozdílů. Prvním rozdílem je využití kolon, které jsou z hlediska průměru větší

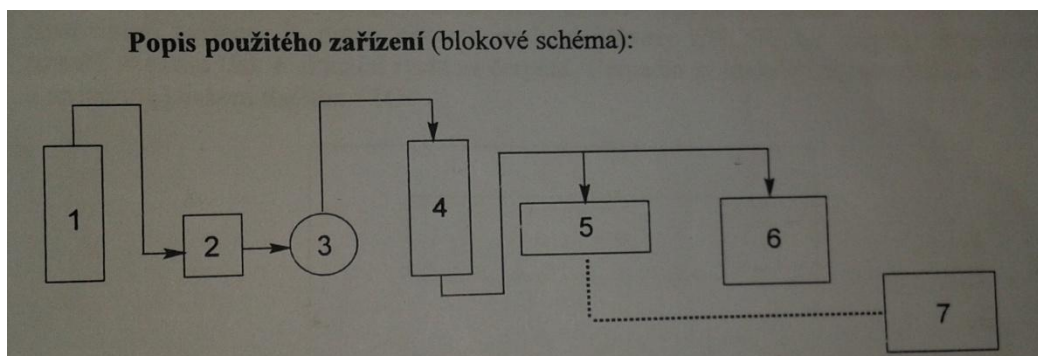
a také cenově nákladnější. Druhou odlišností je využití pump, díky nimž může mobilní fáze protékat ve větších objemech. Dalším vylepšením oproti obyčejné kolonové chromatografii je injekční zařízení, které zprostředkuje nástřik směsi látek, jež mají být děleny, do roztoku. V poslední řadě je výhodou automatický sběrač frakcí.⁷

Náplň chromatografické kolony je vybírána v závislosti na typu chromatografie, který je uplatněn. U HPLC je většinou kolona s náplní dodána přímo firmou. Aby došlo k precizní separaci látek, je třeba dbát na správnost naplnění kolony.⁶

Při rozdělování látek pomocí HPLC jsou sledovány dvě veličiny – eluční objem a eluční čas. Eluční objem je objem pohyblivé fáze, který proteče od doby, kdy je nanesena separovaná látka na kolonu do doby, než bude nejvyšší koncentrace separované látky v eluátu. Eluční čas sleduje časový průběh operace. Další sledovanou veličinou je mrtvý objem kolony, což je celkový objem, který zabírá pohyblivá fáze. Pokud je nanesena na kolonu inertní látka, bude její eluční objem roven elučnímu objemu mrtvému. Eluční objem je tedy charakterizován vzorcem $V_R = V_R' + V_M$, kdy V_R' je skutečný eluční objem a V_M mrtvý objem kolony.⁶

Metoda HPLC je využitelná při správné volbě kolony a mobilní fáze pro nejrůznější typy sloučenin, tedy i pro triterpeny. Důležité je, aby všechno, co se na kolonu nanese, bylo z kolony vymyto. Proto je nutné předem zkoumanou látku otestovat na materiálu, který tvoří stacionární fázi. K tomu je vhodná tenkovrstvá chromatografie. Jako mobilní fázi lze opět jako u TLC použít směs n-hexanu a ethylacetátu. Pokud R_F nejvíce pohyblivé složky ve směsi přesáhne 0,3; je třeba snížit podíl ethylacetátu ve směsi rozpouštědel. Pokud naopak má R_F hodnotu nízkou, podíl ethylacetátu ve směsi musí být zvýšen. Poté může být směs triterpenoidní sloučeniny v přiměřeném objemu chloroformu rozpuštěna a nanesena na kolonu. Během separačního procesu jsou pozorovány změny indexu lomu v souvislosti s jímáním jednotlivých frakcí na monitoru počítače.¹²

Na katedře chemie FPE ZČU je užíván chromatografický systém firmy LABIO a.s., který je znázorněn schématem (viz obr. 8).



Obr. 8 Základní komponenty preparativního systému HPLC dodaným firmou LABIO pro práci v semimikroměřítku

1. zásobní láhev s eluentem
2. preparativní pístové čerpadlo CPI 03 (LABIO a.s.), rozsah průtoku 1 – 200 ml.min⁻¹, maximální nominální tlak 15 MPa
3. přepínací čtyřcestný ventil CI 03 s dávkovací smyčkou o objemu 5 ml
4. preparativní kolona LMP Bioshoper PSI 200, zrnitost 10 µm, velikost 25x250 mm
5. refraktometrický detektor RIDK 102 (ECOM spol. s.r.o.) s bypassem pro práci při vysokých průtocích
6. stolní sběrač frakcí FCC 100 T (LABIO a.s.)

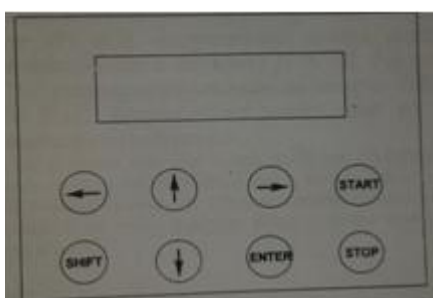
Pro sledování průběhu chromatografie a zpracování výsledků na počítači je použit jednonábový integrátor CSW (7). Všechny díly systému HPLC jsou spojeny vysokotlakou kapilárou kromě propojení přívodu rozpouštědla k čerpadlu a k sběrači frakcí, zde je spojovacím článkem polyethylenová hadička.¹² Právě u polyethylenové hadičky vznikl poznatek, že by bylo místo původní hadičky lepší použít hadičku o menším průměru (viz experimentální část).

2.1.3.4.1 Preparativní pístové čerpadlo CPI 03 (LABIO a.s.)

Výhodou tohoto typu čerpadla je, že je vhodný také k čerpání tekutin, které podléhají korozi. Proto se na stavbě čerpadla podílí nerezová ocel, polytetrafluorethylen, safír a rubín. Čerpadlo se skládá ze dvou čerpacích hlav a motoru, který změnou otáček řídí průtok. Během chromatografie není využíván celý výkon čerpadla, ale jen jeho část. Průtok by měl být menší než 10 ml.min⁻¹. Na přístroji je umístěn displej a klávesnice, což umožňuje nastavení potřebných úkonů například rychlost průtoku nebo tlakový limit. Vzadu se nachází připojení kabelu pro zajištění přívodu elektrické energie.¹²



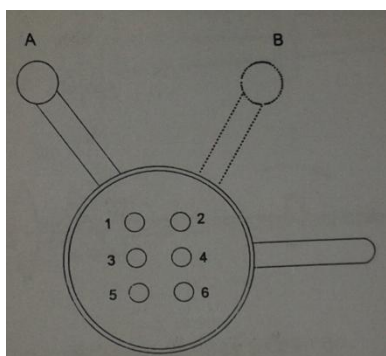
Obr. 9 Preparativní pístové čerpadlo CPI 03 (LABIO a.s.)



Obr. 10 Ovládací panel čerpadla

2.1.3.4.2 Přepínací čtyřcestný ventil CI 03 s dávkovací smyčkou

Díky přepínacímu čtyřcestnému ventilu, který je spojen s dávkovací smyčkou, je možné dodávat směs látek, jež jsou připraveny k separaci, do vysokotlakého systému před kolonou. K dávkování slouží injekční stříkačka. Funkce přepínacího ventilu je popsána pomocí obrázku (viz obr. č. 11). Pokud chromatografie probíhá, je nechán ventil v poloze A, jestliže je nanášen vzorek se směsí, která má být separována, je ventil dán do polohy B.¹²



Obr. 11 Přepínací ventil

1. nanášení vzorku
2. odtok rozpouštědla, zatímco se plní smyčka analyzovaným roztokem
3. připojení plnicí smyčky
4. připojení plnicí smyčky
5. přívod rozpouštědla od čerpadla
6. odvod rozpouštědla, případně analyzovaného roztoku

2.1.3.4.3 Preparativní kolona Bioshoper PSI 200

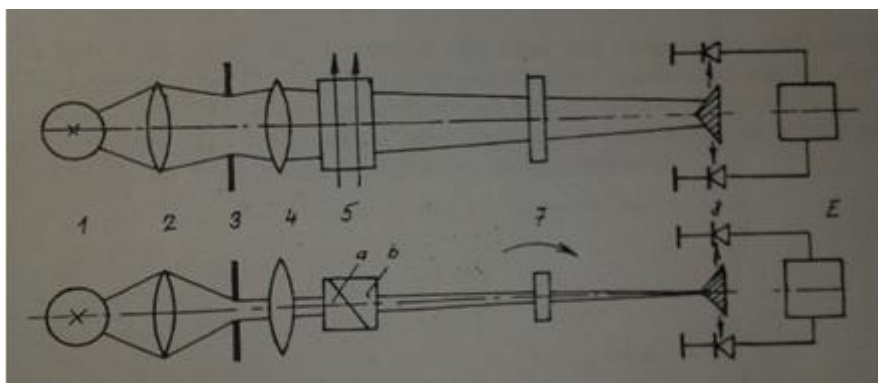
Náplň preparativní kolony o rozměru 25x250 mm je porézní silikagel, jehož póry mají velikost 20 nm. Tento porézní silikagel má specifický povrch 180 m²/g. Zadrž kolony je zjištěna experimentálně, a to 90 ml. V tomto systému je důležitá, vzhledem k nepřítomnosti předklonky, čistota chromatografované směsi, jinak by mohlo dojít až k deaktivaci kolony. Nejen nečistoty, ale také vysoce polární látky mohou kolonu deaktivovat, obojího se lze zbavit přefiltrováním přes sloupec silikagelu. Následující kontrola je provedena pomocí tenkovrstvé chromatografie.¹²



Obr. 12 Preparativní kolona Bioshoper PSI 200

2.1.3.4.4 Refraktometrický detektor RIDK 102

Refraktometr je vlastně diferenciální detektor, díky němuž se zjišťuje koncentrace rozpuštěných látek v efluentu prostřednictvím výchylek indexu lomu. Principem činnosti refraktometru je zjišťování indexu lomu mezi pohyblivou fází a efluentem, jež přichází z preparativní kolony. Změny jsou zaznamenány pomocí úchytkových metod. Funkci přístroje dokonale vystihuje následující schéma (viz obr.13).



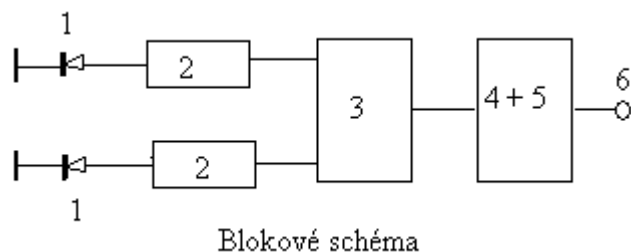
Obr. 13 Schéma funkce přístroje

1. žárovka
2. kondenzor
3. štěrba
4. ohnisko objektivu
5. skleněná kyveta
7. planparalelní deska
8. dvojice fotodiod

Žárovka vyzařuje světlo, které pokračuje kondenzorem a vyprodukuje v ohnisku objektivu a na štěrbině zdroj osvětlení, jež lze definovat. Prostor a slouží k průtoku čistého rozpouštědla, zatímco prostor b je využíván k průtoku efluentu, který přichází z preparativní kolony. V případě, že bude index lomu v prostoru a i b stejný, dojde k tomu, že paprsek nebude vychýlen a projde rovně kyvetou. Zatímco při lišícím se indexu lomu v jednom z prostorů se paprsek vychýlí a díky hranolu se rozpojí na dvě části, jež dopadnou na dvojici fotodiod. Rozdílový signál z fotodiod je úměrný vychýlení paprsku, to znamená, že i rozdílu indexu lomu. Tímto přístrojem lze zachytit také odchylky paprsku, které jsou menší než $0,1 \mu\text{m}$. Součástí přístroje je také planparalelní deska, jejímž otáčením se zapříčiní paprskové výchylky. Optický systém na začátku měření by měl být na optické nule.¹²

Princip elektroniky tkví v tom, že fotodiody předávají signály dále na proudové zesilovače, jež dané signály zesílí. Diferenciální zesilovač vytvoří ze dvou signálů pouze jeden, který bude úměrný rozdílu indexu lomu efluentu a pohyblivé fáze

v kyvetě. Poté aktivní filtr potlačí nechtěné vlivy například šum. Citlivost refraktometru a měřítko zápisu na zapisovači je možné přenastavit odporovým děličem, který se nachází na výstupu aktivního filtru. Následující schéma (viz obr. 14) je zařazeno z důvodu lepšího pochopení činnosti elektroniky.¹²



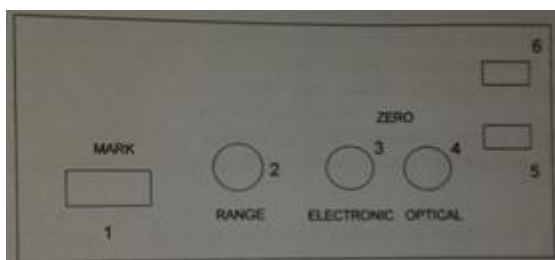
Obr. 14 **Schéma činnosti elektroniky**

1. fotodiody
2. zesilovače
3. diferenciální zesilovač
4. aktivní filtr
5. odporový dělič
6. zapisovač

Přístroj se tedy skládá ze dvou částí – snímací a elektronické. Obě části jsou v jedné konstrukci z hliníkových slitin. Ovládací prvky se nachází v přední části přístroje, zatímco vývody kyvety a připojení kabelů se nachází v zadní části. Je důležité mít na paměti, že asi hodinu před provedením vlastní chromatografie, je potřeba zapnout právě diferenciální refraktometr.¹²



Obr. 15 **Refraktometrický detektor RIDK 102**



Obr. 16 Přední panel přístroje

1. tlačítko označovače („MARK“) záznamu
2. přepínač rozsahu měření
3. nastavení elektronické nuly přístroje
4. nastavení optické nuly přístroje
5. tlačítko vypínače přístroje
6. kontrolka provozu přístroje

2.1.3.4.5 Stolní sběrač frakcí FCC 100 T (LABIO a.s.)

Jak už z názvu vyplývá, tak hlavní funkcí sběrače frakcí je sbírání jednotlivých frakcí kapalin. Součástí sběrače frakcí je pole, kde se nachází sto pozic ve dvaceti řadách. V každé řadě se vyskytuje pět zkumavek, jejichž objem je 100 ml. Samostatný sběrač se nachází nad polem. Sběrač zahrnuje vozík, který se pohybuje nad polem díky elektromotorům. Důležitou součástí vozíku je hadička, na niž je napojena výstupní kapilára.¹²

Displej s klávesnicí na ovládání se nalézá vpravo nahoře, hlavní vypínač na boční straně. Na klávesnici lze nastavit pomocí podkladů od firmy LABIO časový program pro sériovou chromatografii, ale pro chromatografii triterpenoidních sloučenin je výhodnější využití manuálního ovládání, při němž je nejlepší nastavit na jímači časovou konstantu 0,1 min. Posun vozíku jímače frakcí probíhá v souvislosti s pozorováním průběhu procesu na monitoru počítače.¹²

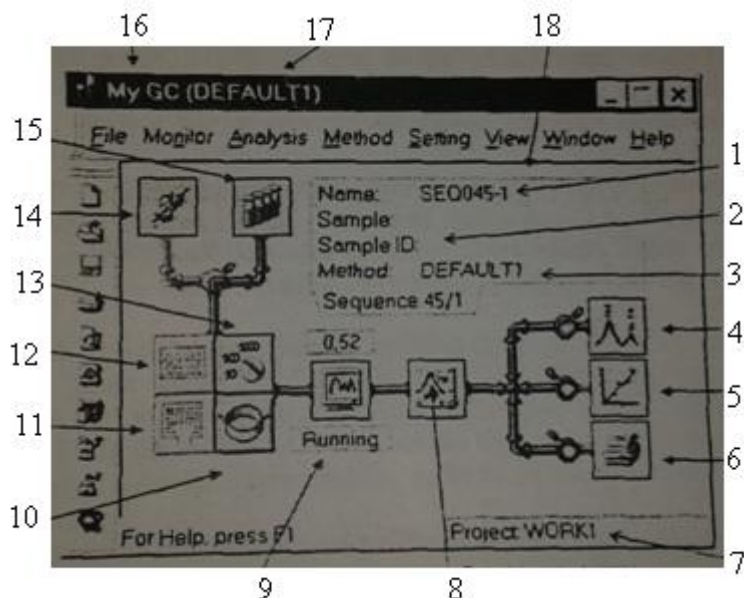


Obr. 17 Část sběrače frakcí

1. posuvný vozík sběrače s vyústěním nad jednotlivými zkumavkami
2. soubor zkumavek

2.1.3.4.6 Chromatografický program CSW 32

Po zapnutí počítače je potřeba spustit chromatografický program CSW 32. Následující schéma je využito k popsání jednotlivých ikon.¹²



Obr. 17 Kanálové okno

1. jméno chromatogramu
2. popis vzorku
3. jméno použité metody
4. zobrazení chromatogramu
5. tvorba kalibračních křivek
6. tisk
7. jméno projektu (=podadresáře)
8. podmínky vyhodnocení analýzy
9. sledování analýzy
10. podmínky analýzy
11. přímé řízení GC/LC
12. sledování stavu GC/LC
13. podmínky sběru dat
14. start/stop analýzy
15. sekvenční tabulka
16. jméno detektoru
17. jméno zobrazené metody
18. stavová tabulka

2.1.3.4.7 Pracovní postup

Pro práci s přístrojem je nutné držet se několika zásadních kroků. Nejprve je uveden postupně do provozu v potřebném časovém sledu celý chromatografický systém. Asi hodinu před vlastní chromatografií je zapnut diferenciální refraktometr.

Poté následuje doplnění mobilní fáze, jejíž složení odpovídá charakteru chromatografované směsi, což je určeno již dříve pomocí tenkovrstvé chromatografie. Následuje zapnutí počítače a připravení chromatografického programu ke spuštění. Program je spuštěn ikonou CSW 32 a nastaven podle schématu (viz obr.17). Vzorek se připraví k nástřiku na kolonu (~ 50 mg v 1 ml chloroformu). V CSW programu se zaznamenají podmínky analýzy. Název vzorku je nutno zaznamenat do souboru, do kterého se nasbíraná data uloží. Po zapnutí hlavního vypínače čerpadla a kontrole nastavení provozních parametrů musí být přepnut ventil plnicí smyčky do polohy „B - plnění” (viz obr.11) a stříkačkou vpraven celý objem připraveného vzorku a následně ještě 0,5 ml chloroformu k propláchnutí stříkačky. Stiskem tlačítka „Start” je uvedeno v činnost čerpadlo v již dříve nastaveném režimu (obvykle aktuální průtok 6 – 9 ml.min⁻¹). Dále je třeba spustit záznam průběhu analýzy, díky němuž je možné průběh analýzy sledovat. Použitý program umožňuje průběžnou volbu časového rozsahu i rozsahu napětí sledovaného záznamu. Čtyřcestný ventil se přepne do polohy „A - analýza” (viz obr.11) a současně je stisknuto tlačítko „MARK” na refraktometru. Tím dojde k označení času vstupu vzorku do chromatografického systému (na kolonu). Od tohoto okamžiku by se po průtoku asi 90 ml eluátu (zádrž kolony) měla objevit první změna (výchylka) na záznamu průběhu chromatografie, svědčící o tom, že do refraktometru vstoupil eluát s obsahem chloroformu, který má jiný index lomu než použitá mobilní fáze tvořená směsí n-hexanu a ethyl-acetátu, která je čas od času do srovnávací komůrky refraktometru doplňována injekční stříkačkou. Při každé změně (výchylce) v záznamu průběhu analýzy stejně jako v případě naplnění jímadla (zkumavka objemu 100 ml) se musí provést změna pozice jímače frakcí při současném stisku tlačítka „MARK” refraktometru. Tímto způsobem je docíleno ve spojení s TLC po oddestilování rozpouštědla z jednotlivých frakcí oddělení složek dělené směsi. Po eluci všech frakcí vzorku záznam průběhu analýzy je ukončen stisknutím tlačítka „STOP” (viz obr.17). V novém okně se objeví záznam celého průběhu chromatografie včetně změn pozice vozíku jímače frakcí po stisknutí tlačítka „MARK” refraktometru. Tento záznam, který se automaticky ukládá, lze i vytisknout. Jednotlivé frakce jsou zbaveny rozpouštědla oddestilováním v předem odvážené baňce s varným kamínkem. Následuje provedení kontroly složení frakcí pomocí TLC a případné pospojování. Nakonec je provedeno celkové vyhodnocení dělení.¹¹

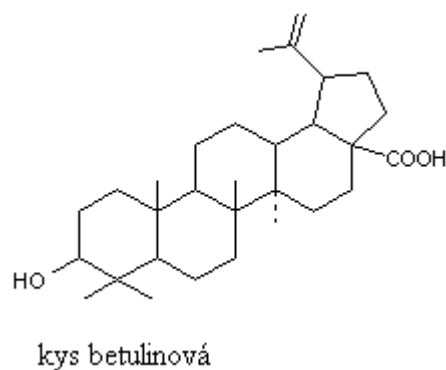
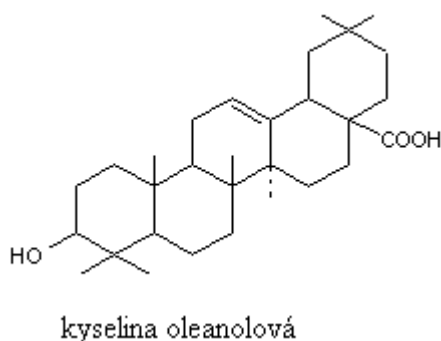
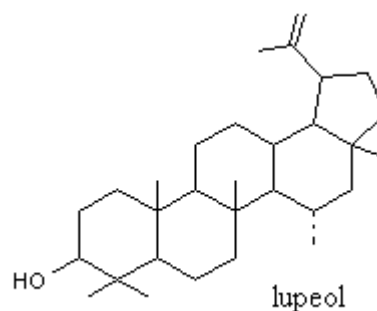
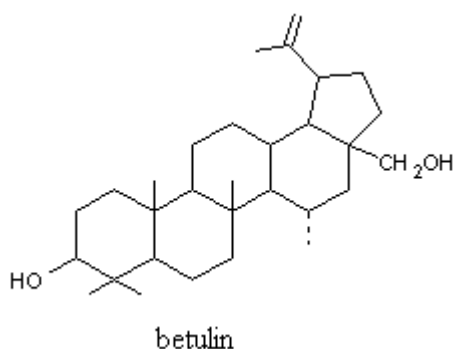
2.1.3.4.8 Možnosti vylepšení preparativní HPLC

Již v úvodu bylo poukázáno na to, že propojení všech součástí systému je provedeno tenkými kovovými trubičkami. Propojení od detektoru k jímači frakcí je však provedeno polyethylenovou hadičkou vnitřního průměru 4 mm. Při délce hadičky 2 m jednoduchým výpočtem dosazením do vzorce pro výpočet objemu válce $V = \pi \cdot r^2 \cdot l$ vychází, že hadička zadržuje cca 25 ml rozpouštědla. Při průtoku 8 ml rozpouštědla kolonou to znamená, že od zaregistrování změny indexu lomu detektorem proteče ještě 25 ml roztoku předchozího složení. Toto lze v praxi ošetřit tím, že se vymění zkumavka jímače frakcí s odpovídajícím zpožděním, tedy například při běžně používaném průtoku 8 ml za minutu po cca 3 minutách. Velmi znepokojivé však bylo zjištění, že uvnitř sloupce kapaliny dochází k jejímu promíchávání. Ve výsledku to znamená, že se velmi snižuje dělicí účinek kolony. Po konzultacích s pracovníky firmy LABIO a.s. bylo přikročeno k náhradě této 4 mm hadičky hadičkou o vnitřním průměru 1,5 mm. Toto rozhodnutí teoreticky sníží při zachování délky hadičky 2 m množství kapaliny mezi detektorem a jímadlem z původních 25 ml na 3,5 ml. Toto množství kapaliny při nastavení rychlosti čerpadla na 8 ml za minutu proteče za necelých 30 vteřin (přesně 26,2 sec.). Významné je to, že v hadičce průměru 1,5 mm nedochází k promíchávání kapaliny a tím je zaručeno, že se zpožděním 26 sec. přichází do jímadla (zkumavky) jímače frakcí kapalina detegovaného složení.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Izolace betulinu z březové kůry

Betulin je pentacyklický triterpen, který se nachází ve větší míře (cca 30 %) ve vnějších vrstvách březové kůry. Je obsažen také ve vnitřních vrstvách, ale tam je ho méně. V březové kůře jsou také obsaženy i jiné další triterpeny jako například lupeol, kyselina oleanolová a kyselina betulinová.¹



Nejprve je Soxhletův extraktor (500 ml) naplněn březovou kůrou, která je zvážená a nastříhaná na velmi drobné částičky. Poté je Soxhletův extraktor napojen na baňku (1 l) se 600 – 700 ml ethanolu, která je posazena do vodní lázně. Jakmile extrakce proběhne (cca 6 – 8 hodin), náplň je nutné vyměnit a nechat znovu proběhnout extrakci vařícím ethanolem. Doba extrakce je opět asi 6 – 8 hodin. Všechny extrakt se však ani za varu nerozpustí a část zůstane. Díky ochlazení dojde ke krystalizaci a vykristalizuje velký podíl betulinu, který je odsát a promyt chladným ethanolem. Na promytí postačí malé množství. Ethanol je oddestilován z matečných louhů a je možné ho vrátit do lahve. Tento ethanol může být použit pouze ke stejným účelům. Čistota z obou podílů, krystalického i z matečných louhů, je porovnána na tenké vrstvě oxidu hlinitého. Jako vyvíjecí směs je použita směs benzen-ether, jejichž poměr je určen experimentálně. Po vyschnutí chromatogramu proběhne detekce pomocí elektrického

vaříče. Úplně čistý betulin se připravuje chromatografickou separací betulindiacetátu, acetylací surového diolu nebo hydrolyzou na volný betulin.¹

Od doby, kdy byla skripta napsána se problematika chromatografických metod dále vyvíjela. Ukázalo se, že tenké vrstvy litého silikagelu svými vlastnostmi obvykle původně užívaný oxid hlinitý předčí. Proto i v tomto případě je kontrola složení extraktu prováděna na tenkých vrstvách silikagelu. Obecná snaha omezení používání benzenu vedla k náhradě dříve oblíbené rozpouštědlové soustavy benzen – ether směsí n-hexan – ethylacetát. V tomto případě je vhodné používat směs n-hexan – ethylacetát v poměru 10:3.

3.2 Příprava tenkých vrstev pro analytickou TLC

Pro přípravu plastinek bylo nutné umýt skleněnou desku a mikroskopická sklíčka nejprve ethanolem a poté destilovanou vodou. Na velkou skleněnou desku bylo vedle sebe poskládáno 20 mikroskopických sklíček. Podle počtu sklíček byl navážen silikagel značky Merck (Kieselgel 60 G), to znamená, že na 20 sklíček bylo naváženo 20 g silikagelu. Silikagel byl smíchán s 52 ml destilované vody a vzniklá suspenze, která byla dobře rozmíchána, byla nalita rovnoměrně na vyrovnaná mikroskopická sklíčka na desce. Pro dokonalé rozprostření suspenze po všech sklíčkách byla použita skleněná tyčinka, jež byla z obou stran opatřena kousky gumové hadice. Poté se nechala suspenze na sklíčkách několik dní uschnout. Jednotlivá sklíčka byla opatrně od sebe oddělena a ze stran očištěna od zbytků vrstvy.

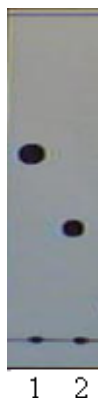
3.3 Příprava tenkých vrstev pro preparativní TLC

Pro tento typ chromatografie byla k dispozici chromatografická deska o rozměrech 20x20 cm, jež byla opět nejdříve umyta ethanolem a poté destilovanou vodou. Bylo naváženo opět jako v předchozím případě 20 g silikagelu značky Merck (Kieselgel 60 G), který byl rozpuštěn v 52 ml destilované vody. Vzniklá suspenze byla dokonale rozmíchána a opatrně nalévána na chromatografickou desku. Rovnoměrného rozprostření suspenze po desce bylo dosaženo mírným nakláněním a poklepáváním prsty zespod desky.

3.4 Volba vhodné rozpouštědlové soustavy pro TLC chromatografii

Vhodná rozpouštědlová soustava pro TLC je určena experimentálně. Jako nejvýhodnější rozpouštědlo pro TLC byla zvolena směs ethylacetátu a n-hexanu

v poměru 3:10. Zkoumané látky se v systému rozpouštědel odliší svým R_F (viz obr.18).¹¹ Betulin má podle jednoduchého výpočtu dosazením do vzorce pro výpočet retardačního faktoru $R_F = a / b$, retardační faktor 0,34. R_F lupeolu podle výpočtu je 0,57. To znamená, že rozdíl jejich R_F se rovná hodnotě 0,23. Experimentálně bylo zjištěno, že při použití směsi n-hexanu a ethylacetátu v poměru 20:1 a 10:1 zůstává betulin na startu, proto je pro tento účel zcela nevhodná.



Obr. 18 Porovnání R_F lupeolu a betulinu

1. lupeol
2. betulin

3.5 Izolace čistého betulinu ze směsi

Bylo získáno 1 g neznámé látky obsahující čistý betulin. Danou látku bylo potřeba převést do roztoku a následně promýt přes sloupec silikagelu. Jako rozpouštědlo byl použit ethylester kyseliny octové. 1 g látky byl tedy rozpuštěn ve 135 ml rozpouštědla. Vzhledem k tomu, že látka nebyla zcela rozpuštěna pouze mírným protřepáním baňky s roztokem v ruce, byla využita k rozpouštění třepačka a následně přidáno 65 ml rozpouštědla.

Byla připravena chromatografická trubice. Na konec trubice byl upěchován kousek vaty, na nějž následně vloženo kolečko filtračního papíru. Poté bylo nasypáno do sloupce 40 g silikagelu a sloupec byl připevněn ke stojanu pomocí chladičového držáku. Po sestavení aparatury byla nalita do sloupce rozpuštěná látka a pod sloupec postaven odměrný válec pro odečítání objemu, jenž proteče sloupcem.

V první fázi celkově proteklo sloupcem 119 ml roztoku. Ve druhé fázi bylo přidáno 100 ml rozpouštědla a proteklo celkem 80 ml roztoku, ale v této fázi nebylo protékání zcela ukončeno. Ve třetí fázi bylo přidáno 100 ml rozpouštědla a proteklo 95 ml roztoku. V poslední fázi bylo přidáno 45 ml rozpouštědla a proteklo 134 ml roztoku.

Tabulka 3 Objem roztoku v jednotlivých baňkách

Frakce	Objem roztoku
E1	119 ml
E2	80 ml
E3	95 ml
E4	134 ml

Z jednotlivých baňek bylo oddestilováno rozpouštědlo a to tak, že byla nejprve sestavena destilační aparatura. Předem zvážená baňka s varným kamínkem byla opatrně vložena do topného hnízda, napojena na chladič, který byl propojen s baňkou, kam odkapávalo oddestilované rozpouštědlo. Destilace nebyla provedena úplně do sucha, malý zbytek rozpouštědla byl odpařen volně v topném hnízdě za současného přidržování baňky rukou. Páry rozpouštědla byly odsáty vodní vývěvou a poté byla baňka vložena do sušárny na úplné vysušení. Po vyjmutí ze sušárny a následném vychladnutí byla baňka se vzorkem zvážena.

Tabulka 4 Hmotnost vzorků v jednotlivých baňkách po destilaci

Frakce	Hmotnost vzorku
E1	0,4866 g
E2	0,3224 g
E3	0,1582 g
E4	0,1265 g

3.5.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie vzorků E1 – E4

U vzorků E1 – E4 byla po destilaci provedena analytická TLC. Nejprve byly vzorky rozpuštěny v malém množství chloroformu, poté byly nanесeny tenkou kapilárou na připravenou plastinku a to tak, že nad dolním okrajem vytvořily v jedné linii body. Vzorky byly porovnávány s čistým betulinem, který byl nanесen jako pátý bod. Po nanесení a odpaření rozpouštědla byla plastinka opatrně dána do chromatografické komory, do níž byla nalita směs n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3. V komoře musí nanесené body ležet nad hladinou směsi rozpouštědel. Poté byla chromatografická deska uzavřena a po vystoupení rozpouštědel několik milimetrů pod horní okraj byla plastinka z komory pomocí pinzety vyjmuta, postříkána 10% kyselinou sírovou a vypálena na vařiči. Plastinka byla ponechána na vařiči tak dlouho, dokud se neobjevily zuhelnatělé skvrny organických látek. Z vyhotovené analytické TLC

(viz obr.19) lze usuzovat, že vzorek E1 a E2 obsahují stopy betulinu, který je však znečištěn dalšími látkami. Pro další manipulaci byl použit vzorek E2, protože prokazoval menší míru znečištění než vzorek E1.



Obr. 19 Analytická TLC vzorků E1 – E4

1. E1
2. E2
3. E3
4. E4
5. čistý betulín

3.5.2 Zpracování vzorku E2

Ze vzorku E2 bylo vyjmuto 120 mg látky, která byla rozpuštěna v 50 ml ethylesteru kyseliny octové a promyta přes sloupec silikagelu. V první fázi celkově proteklo sloupcem 20 ml roztoku. Ve druhé fázi bylo přidáno 45 ml rozpouštědla a proteklo celkem 30 ml roztoku. Ve třetí fázi bylo přidáno 35 ml rozpouštědla a proteklo 20 ml roztoku a v poslední fázi bylo přidáno 30 ml rozpouštědla a proteklo opět 20 ml roztoku.

Tabulka 5 Objem roztoku v jednotlivých baňkách

Frakce	Objem roztoku
E5	20 ml
E6	30 ml
E7	20 ml
E8	20 ml
E9	20 ml

Poté byla provedena destilace a vzorky v baňkách byly zváženy.

Tabulka 6 Hmotnost vzorků v jednotlivých baňkách po destilaci

Frakce	Hmotnost vzorku
E5	0,0407 g
E6	0,0138 g
E7	0,0095 g
E8	0,0021 g
E9	0,0007 g

3.5.2.1 Analytická tenkovrstvá chromatografie vzorků E5 – E9

Po zvážení vzorků E5 – E9 byla provedena analytická TLC, čímž bylo zjištěno zastoupení jednotlivých složek ve vzorku. Pro porovnání byl opět využit čistý betulin. Z vyhotovené analytické TLC (viz obr. 20) vyplývá, že vzorek E7 sice obsahuje viditelnou stopu betulinu, ale je znečištěn dalšími látkami, proto je dále zpracováván.



Obr. 20 Analytická TLC vzorků E5 – E9

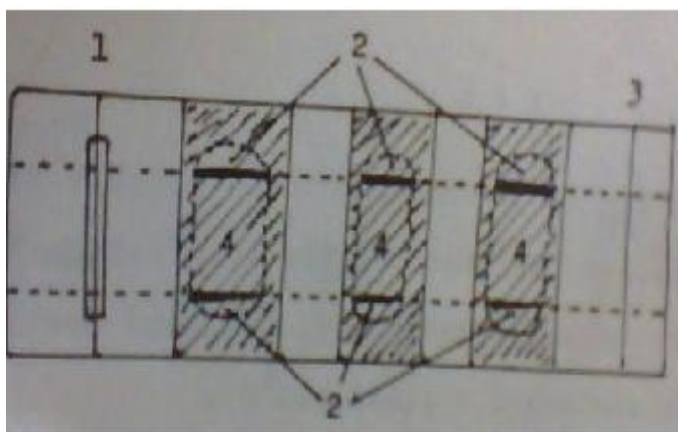
1. E5
2. E6
3. E7
4. E8
5. E9
6. čistý betulin

3.5.3 Zpracování vzorku E7

3.5.3.1 Preparativní tenkovrstvá chromatografie vzorku E7

Vzorek E7 byl rozpuštěn v malém množství chloroformu a následně byla provedena preparativní TLC. Vzorek byl nanesen na připravenou chromatografickou

desku pomocí balonku, do něž po zahřátí nad vaříčem a následném zchlazení byl nasán všechn roztok. Balonkem byl nanesen souvislý pruh vzorku o průměru 2 – 3 mm asi 2 cm nad okrajem chromatografické desky. Jakmile bylo rozpouštědlo odpařeno, byla vložena chromatografická deska do akvária, jež bylo naplněno směsí ethylacetátu a n-hexanu opět v poměru 3:10. Stejně jako u analytické TLC je třeba dbát na to, aby rozpouštědla v akváriu nedosahovala přímo na pruh naneseného vzorku, ale mírně pod něj. Je důležité, aby akvárium bylo pevně uzavřeno, proto byla použita na utěsnění molitanová deska, skleněná deska a ostatní zatěžkávací předměty, aby nedošlo k úniku par. Po vyjmutí desky a následném vysušení bylo dotknuto na dvou místech chromatografické desky žhavým odporovým drátem, který zapříčinil, že organické látky zuhelnatěly a vytvořily se pruhy (viz obr. 21).



Obr. 21 Preparativní tenká vrstva po detekci žhavým odporovým drátem¹⁰

1. start
2. zhnědlá místa
3. čelo
4. pruhy adsorbentu ke seškrábnutí k eluci

Po detekci pomocí odporového drátu jsou vidět místa výskytu organických látek. Chromatografická deska byla rozdělena na 5 úseků. Z důvodu toho, že by zuhelnatělé organické látky znehodnotily produkt, byly vypálené pruhy seškrábnuty a jednotlivé úseky pomocí pravítka seškrábnuty na papír a následně za pomoci papíru rozdrčeny, aby produkt neobsahoval velké kusy silikagelu se vzorkem. Rozdrčená směs každého pruhu byla opatrně vsypána do úzkých chromatografických trubic, která byla vespod opatřena malým kouskem vaty. Směs v trubicích byla sklepána a upevněna do držáků na stojan (viz obr. 22). Poté následovalo promytí ethylesterem kyseliny octové. Roztoky v baňkách byly dále podrobeny destilací podle již zmíněného návodu. Vzniklé produkty byly zváženy (viz tabulka 7).



Obr. 22 Chromatografické trubice s frakcemi po zpracování preparativní TLC

Tabulka 7 Hmotnost vzorků v jednotlivých baňkách po destilaci

Frakce	Hmotnost vzorku
E10	0,0114 g
E11	0,0046 g
E12	0,0038 g
E13	0,0015 g
E14	0,0005 g

Po provedení analytické TLC bylo na plastince zobrazeno, že vzorek E12 obsahuje betulin, který je opět třeba dále zpracovat z důvodu znečištění.

3.5.4 Zpracování vzorku E12

Vzorek E12 byl rozpuštěn v malém množství chloroformu a následovalo provedení preparativní TLC stejným způsobem, jak již bylo uvedeno (viz kap. 3.5.3.1). Dále pokračovalo promytí přes úzké chromatografické trubice a zvážení baněk po destilaci (viz tabulka 8). Nakonec byla provedena analytická TLC, kde výsledkem bylo porovnání vzorku E18 obsahující betulin s čistým betulinem (viz obr. 23).

Tabulka 8 Hmotnost vzorků v jednotlivých baňkách po destilaci

Frakce	Hmotnost vzorku
E15	0,0021 g
E16	0,0008 g
E17	0,0006 g
E18	0,0005 g
E19	0,0003 g



Obr. 23 Analytická TLC vzorků E15 – E19

1. E15
2. E16
3. E17
4. E18
5. E19
6. čistý betulín

3.6 Úprava kapalinového chromatografu

Původní 4 mm polyethylenová hadička svou pevností umožňuje správné nastavení vyústění nad zkumavky jímače frakce ve všech polohách jímače. Nová hadička o průměru 1,5 mm tuto pevnost nemá. Naštěstí se ukázalo, že se do původní 4 mm hadičky dá protáhnout a není nutný žádný zásah do celkového uspořádání systému. Úprava je tedy velmi jednoduchá. Spočívá v odpojení původní 4 mm hadičky od tenké kovové trubičky výstupu z přepínacího ventilu (viz obr. 8) a jejím zkrácení na straně vyústění nad zkumavky jímače frakcí. Původní hadičkou protažená 1,5 mm hadička se přímo nasadí na kovovou trubičku přívodu od kolony a v potřebné délce nechá vyčnívat z kovové trubice posuvného vozíku sběrače frakcí tak, aby kapalina v jednotlivých polohách vytékala vždy do podstavené zkumavky.

4 ZÁVĚR

V práci jsou popsány obecné principy chromatografických metod. Zvláštní důraz je kladen na chromatografické metody využívané v oblasti triterpenoidních sloučenin, jejichž studiem se katedra chemie FPE ZČU v Plzni zabývá dlouhodobě. Na základě studia funkce preparativního systému HPLC (LABIO a.s.) bylo zjištěno, že propojení sběrače frakcí, který systém jako celek předurčuje k rozsáhlému využití, je z laického pohledu nelogicky provedeno výrazně silnější (průměru 4 mm) 2 m dlouhou polyethylenovou hadičkou, zatímco ostatní součásti zařízení jsou propojeny tenkými kovovými trubičkami. Připojení sběrače ve své podstatě velmi silně znehodnocuje celkovou účinnost zařízení (viz kap. 2.1.3.4.8). Po předchozí konzultaci s pracovníky firmy LABIO a.s byla provedena úprava připojení sběrače náhradou silné hadičky průměru 1,5 mm. Tato úprava zmenšuje objem rozpouštědla mezi detektorem a jímačem frakcí z 25 ml na 3,5 ml, což má za následek snížení časového intervalu mezi detekcí složení frakce a jejím odchycení v jímadle. Tenčí hadička také zabraňuje následnému promíchávání roztoku v průběhu jeho transportu od detektoru do jímadla. Provedená úprava dává předpoklad, že v rámci dalšího období (řešení diplomové práce) bude vypracován časový harmonogram zpracování vzorku preparativní HPLC tak, aby tato metoda mohla úspěšně konkurovat již zavedené preparativní TLC.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Klinotová E., Klinot J. a kol.: Základní cvičení z organické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Praha 1980
2. Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980
3. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: Základní analytická chemie, Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha 2005
4. Káš J., Kodíček M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006
5. Richtr V., Kraitr M.: Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie, Sborník katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni, Plzeň 2004
6. Galuszka P., Luhová L.: Laboratorní technika pro biochemiky, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2003
7. Kvičala J.: Laboratorní technika organické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 1998
8. Vašíček O.: Využití metod kapalinové chromatografie k separaci oligonukleotidů modifikovaných genotoxickými látkami,
http://is.muni.cz/th/141774/prif_b/Bakalarska_prace.pdf, staženo 3.1.2013
9. Gasparič J., Churáček J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Praha 1981
10. Richtr V.: Semimikrotechnika v organické chemii, Pedagogická fakulta Západočeské univerzity v Plzni, Plzeň 1993
11. Pracovní manuál „Dělení směsi triterpenoidních sloučenin metodou preparativní HPLC“ (Závěrečná zpráva k řešení projektu FRVŠ, tem. okruh 6, spec. a – č.j. 1372/2004)
12. Podklady od firmy LABIO a.s.

6 RESUMÉ

This paper concerns with thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The common characteristic of these chromatographical designs is utilization of silica gel. The goal of these two methods' comparison is efficiency-improvement of the preparative HPLC so it can compete preparative TLC. The improvement in efficiency of preparative HPLC was achieved through the substitution of the thick tube (4 mm), which connects the fraction collector, by the thinner tube (1,5 mm). This replacement is diminishing the capacity of the dissolving agent between the detector and the fraction collector. The thinner tube also prevents later mixing of the solution during its movement from the detector to the collector. Experimental part of the paper aims on betulin, which is isolated from the birch bark and is in final phase obtained by the chromatographical methods. For this purpose was used adsorbtion chromatography in planar design.