

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

PLANÁRNÍ CHROMATOGRFIE V EXPERIMENTÁLNÍ VÝUCE

CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Anna Váňová

Učitelství pro SŠ, obor Chemie - Geografie

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

Plzeň 2022

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

V Plzni, 30. června 2022

.....
vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ:

Děkuji váženému panu doc. Mgr. Václavu Richtrovi, CSc. za cenné rady a jeho odborné vedení mé práce a za jeho trpělivost.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	3
ÚVOD	4
1 TEORETICKÁ ČÁST	5
1.1 ISOPRENOIDY	5
1.1.1 Terpenoidy.....	5
1.1.1.1 Triterpeny.....	5
1.1.1.1.1 Betulin	5
1.2 SEPARAČNÍ METODY	6
1.2.1 Extrakce	7
1.2.2 Destilace	8
1.2.3 Chromatografie.....	8
1.2.3.1 Preparativní chromatografie	9
1.2.3.2 Analytická chromatografie	9
1.2.3.3 Sloupcová a planární chromatografie	10
1.2.3.3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	10
1.2.3.3.2 Papírová chromatografie	11
1.2.3.4 Retardační faktor	12
1.2.3.4.1 Výpočet retardačního faktoru	12
1.2.3.5 Použití TLC a papírové chromatografie	13
1.3 STANOVENÍ TEPLoty TÁNÍ	13
1.4 ACETYLACE VZORKŮ BETULINU A PŘEMĚNA BETULINU-DIACETÁTU NA BETULIN-MONOACETÁT	14
1.4.1 Acetylce	14
1.5 CHEMIKÁLIE – ROZPOUŠTĚDLA	15
1.6 CHROMATOGRÁFIE V KURIKULÁRNÍCH DOKUMENTECH	16
1.6.1 Rámcový vzdělávací program (RVP)	16
1.6.2 Školní vzdělávací program (ŠVP).....	17
1.6.3 Tematický plán.....	18
1.7 CHROMATOGRÁFIE V UČEBNÍCÍCH CHEMIE	19
1.7.1 Učebnice chemie pro ZŠ	19
1.7.1.1 Chemie 8 – pro základní školy a víceletá gymnázia (Fraus ⁽¹⁸⁾).....	19
1.7.1.2 Chemie 8 – úvod do obecné a anorganické chemie (Nová škola ⁽¹⁹⁾).....	22
1.7.1.3 Chemie I – pro 8. ročník ZŠ a víceletá gymnázia (Prodos ⁽²⁰⁾).....	23
1.7.1.4 Základy praktické chemie 1 pro 8. ročník ZŠ (Fortuna ⁽²¹⁾)	25
1.7.2 Učebnice chemie pro SŠ	26
1.7.2.1 Chemie pro střední školy 1a (Scientia ⁽²²⁾)	26
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
2.1 PRÁCE SE SKLEM	28
2.1.1 Zhotovení kapilár	28
2.1.2 Zhotovení balónku	28
2.2 ČIŠTĚNÍ BETULINU PO ZÍSKÁVÁNÍ Z BŘEZOVÉ KŮRY	29
2.3 ACETYLACE VZORKU A A VZORKU B, PŘEMĚNA BETULINU-DIACETÁTU NA BETULIN-MONOACETÁT	30
2.3.1 Acetylce vzorku A a vzorku B	30
2.3.2 Přeměna betulin-diacetátu na betulin-monoacetát.....	31
2.3.3 Ověřovací TLC vzorku A a vzorku B.....	32
2.4 PREPARATIVNÍ TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRÁFIE VZORKU A A VZORKU B, VÝPOČET R _F	33
2.5 POKUSY POUŽITÉ V UČEBNÍCÍCH CHEMIE PRO ZŠ A SŠ	40
2.5.1 Pokus z učebnice Fraus (kap. 1.7.1.1).....	41

2.5.2	Pokus z učebnice Nová škola (kap. 1.7.1.2)	42
2.5.3	Pokus z učebnice Prodos (kap. 1.7.1.3)	43
2.5.4	Pokus z učebnice Fortuna (kap. 1.7.1.4).....	43
2.5.5	Pokus z učebnice Scientia (kap. 1.7.2.1).....	46
2.6	NÁVRH LABORATORNÍ PRÁCE ZA POUŽITÍ TLC VE VÝUCE NA SŠ	46
2.6.1	Laboratorní práce: separace a TLC barviv jehličí smrku (⁽²⁹⁾)	46
2.6.1.1	Ověření navržené laboratorní práce	47
2.6.2	Laboratorní práce: separace a TLC barviv listí Javoru	50
2.6.3	Porovnání obou TLC (jehličí a listí).....	51
ZÁVĚR.....		53
RESUMÉ		55
SEZNAM LITERATURY		56
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ		58

SEZNAM ZKRATEK

RVP	rámcový vzdělávací program
ŠVP	školní vzdělávací program
TLC	tenkovrstvá chromatografie
ZČU	Západočeská univerzita

Úvod

Tato diplomová práce navazuje a zároveň rozvíjí dříve zpracovanou bakalářskou práci, která se věnovala jednoduchým reakcím lupenových derivátů a chromatografii na tenké vrstvě.

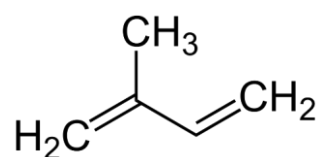
Konkrétně se tato práce zabývá planární chromatografií a její aplikací do výuky chemie. Ukazuje na konkrétních příkladech práci s betulinem, jeho získáváním a jeho následným zpracováním pomocí planární chromatografie. Betulin patří mezi triterpeny, které spadají do přírodních látek zvaných terpeny.

V rámci výuky organické chemie a laboratorních cvičení z organické chemie probíhá na katedře chemie Fakulty pedagogické ZČU v Plzni izolování přírodních látek. Sem patří již výše zmiňovaný betulin, který je možné získat z kůry břízy bělokoré. Získávání betulinu (viz kap. 1.2.1) je popsáno podrobně ve skriptech ⁽¹⁾. Triterpenům obecně je věnováno velké množství článků, které je možné najít převážně v časopise Collection of Czechoslovak Chemical Communications, konkrétně jejich identifikací, přípravou sloučenin a popisem struktur. Více o dělení, systému a přehledu je možné najít v literatuře ⁽²⁾.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ISOPRENOIDY

Přírodní látky, které jsou odvozeny od isoprenu, se nazývají isoprenoidy. Základní stavební jednotka je již zmíněný isopren (systematicky: 2-methylbuta-1,3-dien) (obr. 1). Isoprenoidy jsou původu jak rostlinného, tak živočišného a dělíme je do dvou skupin – steroidy a terpenoidy.



Obrázek 1: isopren (2-methylbuta-1,3-dien)

1.1.1 TERPENOIDY

Terpenoidy jsou jak základní uhlovodíky, tak jejich deriváty. Můžeme je klasifikovat podle počtu isoprenových jednotek: monoterpeny – složeny ze 2 isoprenových jednotek s celkovým počtem uhlíku 10, seskviterpeny – složeny ze 3 isoprenových jednotek s celkovým počtem uhlíků 15, diterpeny – složeny ze 4 isoprenových jednotek s celkovým počtem uhlíků 20, triterpeny – složeny ze 6 isoprenových jednotek s celkovým počtem uhlíků 30, tetraterpeny – složeny z 8 isoprenových jednotek s celkovým počtem uhlíků 40 a polyterpeny, které se skládají z n isoprenových jednotek a celkem obsahují $5n$ atomů uhlíku (kde n je velké kladné číslo).

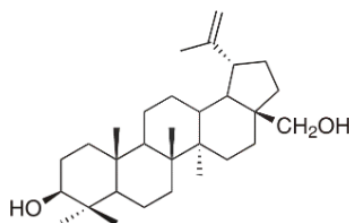
1.1.1.1 Triterpeny

Triterpeny jsou složeny z 6 isoprenových jednotek, tedy ze 30 atomů uhlíku. Nejčastěji se jedná o látky pevné, objevující se v přírodě buď volně či jako vázané ve formě glykosidů nebo esterů ⁽³⁾. Neznámější triterpeny mají čtyři nebo pět kruhů – jsou tetracyklické nebo pentacyklické a bylo prokázáno, že vznikají z acyklického skvalenu ⁽⁴⁾.

1.1.1.1.1 Betulin

Betulin (obr. 2) je pentacyklickým triterpenem, který je derivátem triterpenu lupeolu. Betulin je hojně obsažen v březové kůře, ale lze jej nalézt i jinde v přírodě. Mezi jeho zajímavé vlastnosti patří antimykotické a antibakteriální působení. Díky tomu březová

kůra neplesniví, nehnije a je dobře hořlavá. Betulin také propůjčuje březové kůře její typicky bílou barvu ⁽³⁾. Betulin a jeho deriváty mají svoji funkci také v lékařství, konkrétně bylo prokázáno, že působí protivirově (např. proti-HIV) a má i protizánětlivé účinky ⁽⁵⁾.



Obrázek 2:betulin

1.2 SEPARAČNÍ METODY

Separační metody jsou využívány, když je potřeba rozdělit vícesložkové vzorky na jednotlivé části podle složení. Když se jedná o ideální případ, dojde k tomu, že každá část obsahuje právě jednu složku. Při separaci je možné provádět operace dělení od dvou složek (např. extrakce) až po několik desítek složek (např. plynová chromatografie) ⁽⁶⁾.

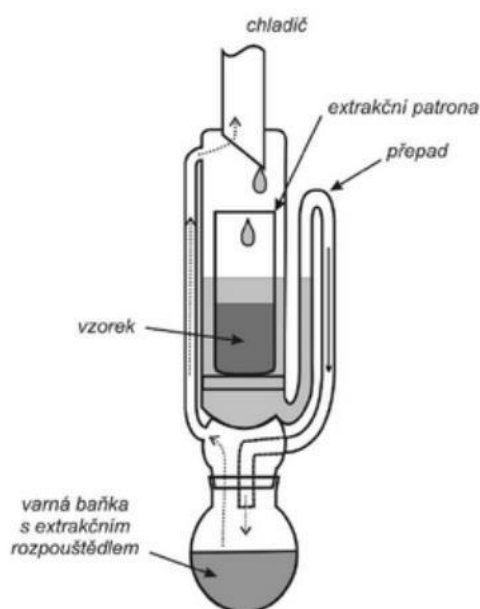
Separační metody je možné dělit podle rozdílů v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze, viz tabulka 1 ⁽⁶⁾.

Tabulka 1: Metody založené na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze ⁽⁶⁾.

Plyn – kapalina	plyn – tuhá fáze	kapalina – kapalina	kapalina – tuhá fáze
plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	plynová adsorpční chromatografie (GSC)	extrakce	kapalinová adsorpční chromatografie (LSC)
destilace	sublimace	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)	iontově výměnná chromatografie (IEC)
plynové dělení	molekulová síta	gelová permeační chromatografie (GPC)	molekulová síta
			srážení
			zonální tavení
			frakční krystalizace

1.2.1 EXTRAKCE

Pro izolaci látek můžeme jako jednu z metod využít extrakci. Princip extrakce je migrace jedné složky mezi dvěma kapalinami. Tyto dvě kapaliny spolu nejsou mísitelné. Další možností extrakce je přechod mezi pevnou fází a kapalinou ⁽⁶⁾. Extrakci je možno provádět jak za studena, tak i za horka a je možno ji provádět pro malá i větší množství látek ⁽⁷⁾. Soxhletův aparát je jedním z velmi účinných extraktorů. Používá se pro extrahování pevné látky do látky kapalné. Jeho velká účinnost je způsobena tím, že pracuje kontinuálně ⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Schéma a princip Soxhletova extraktoru je znázorněn na obrázku 3 (cit.⁽⁶⁾).



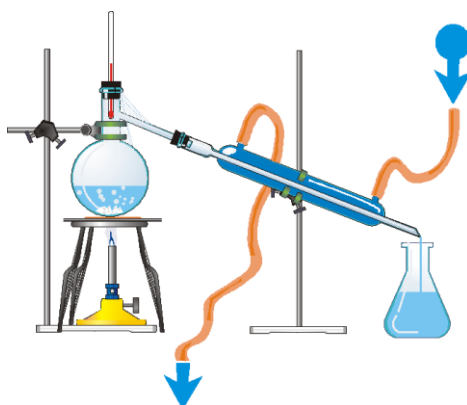
Obrázek 3: Soxhletův extraktor (převzato z ⁽⁶⁾)

Díky zahřívání varné baňky a jejího obsahu, dochází k vypařování rozpouštědla. To ve formě par postupuje vzhůru trubicí do chladiče, kde dochází ke kondenzaci par rozpouštědla. Zkapalněné páry odkapávají do těla extraktoru, na jehož dně se nachází extrakční patrona, v níž je umístěn extrahovaný materiál. Patrona je vyrobena z porézního materiálu, nejčastěji z papíru. Zde dochází k extrakci. V momentě, kdy dosáhne množství extraktu k bodu přepadu (vrcholu U-trubice), dostává se extrakt zpět do varné baňky, odkud se opět díky zahřívání proces opakuje. Jakmile je ukončena extrakce, je možné provést destilaci a oddělit tak extrakční činidlo od extrahované látky ⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

1.2.2 DESTILACE

Destilace také patří mezi separační metody. Jedná se o způsob oddělování kapalných látek podle rozdílné teploty varu. Je používána v průmyslu (zpracování ropy) či potravinářství (výroba destilátů). Existuje několik druhů destilace, například frakční destilace, rektifikace, prostá destilace, destilace za sníženého tlaku nebo destilace vodní parou⁽⁸⁾.

Obecně lze destilaci popsat jako postup oddělování dvou nebo více kapalin na základě těkavosti. Při zahřátí směsi začne do plynné fáze přecházet nejprve látka těkavější (s nižší teplotou varu), plynná fáze postupuje z varné baňky do chladiče, skrz který protéká studená voda, a díky tomu dochází ke kondenzaci plynné fáze a získání destilátu. Ve varné baňce zůstává látka či směs látek, které jsou méně těkavé (mají vyšší teplotu varu). Prostá destilace je zobrazena také na obrázku 4 níže.



Obrázek 4: destilace (převzato z⁽⁹⁾)

1.2.3 CHROMATOGRRAFIE

Jedna z nejvýznamnějších separačních metod je chromatografie. Kromě použití v chemické laboratoři ji můžeme najít i v učebnicích chemie pro ZŠ i SŠ. Historie vzniku chromatografie je datována od začátku 20. století. M. S. Cvět roku 1903 použil chromatografii pro oddělení složek směsi barviv. Od pokusu se odvíjí i název chromatografie – pochází z řečtiny a znamená *chroma* – barva a *grafó* – píši. S barevností má ale tato metoda málo společného. Principem chromatografie je pohybování složek směsi v systému, který je složen ze dvou fází. Stacionární fáze, tedy nepohyblivá, může být tvořena kapalinou, zachycenou v pevném nosiči, nebo pevnou látkou. Mobilní fáze, tedy

pohyblivá, může být tvořena plynem (v případě plynné chromatografie) nebo kapalinou (v případě kapalinové chromatografie) ⁽⁶⁾ ⁽¹⁰⁾.

Lze využít dělení dle experimentálního provedení – buď chromatografie plošná, nebo chromatografie sloupcová. Do první řadíme papírovou a tenkovrstvou chromatografii a do druhé plynovou či kapalinovou sloupcovou chromatografii ⁽¹¹⁾.

Chromatografii můžeme dělit také podle účelu – na preparativní chromatografii, kdy je účelem získání většího množství čistých látek, a analytickou chromatografii, kdy je účelem identifikace látky a určení její koncentrace ve směsi.

1.2.3.1 Preparativní chromatografie

Jak již bylo zmíněno výše v kapitole 1.2.3, preparativní chromatografie je využívána pro získávání většího množství čisté látky k dalšímu použití. Od analytické chromatografie se liší zejména ve velikosti chromatografických desek. U preparativní chromatografie jsou využívány desky větší, v rozměrech 20 x 20 cm, a větší (například 20 x 50 cm). Rozdíl je i tloušťka tenké vrstvy, kdy u preparativní chromatografie je až 3 mm. Zároveň je vzorek, který je určený ke chromatografii, nanášen v souvislé linii, široké asi 2 až 3 mm. Je možné vzorek nanášet po kapkách nebo ze skleněného balónku či z injekční stříkačky. Pro nanášení z balónku je potřeba zručnost a zkušenost laboranta, protože na dodržení linearitu proužku a dodržení šířky závisí úspěšnost a účinnost prováděné chromatografie. Je tedy vhodné si nanášení nejprve vyzkoušet a procvičit nanečisto ⁽¹⁰⁾.

Podrobně je preparativní chromatografie popsána v kapitole 2.4 v experimentální části práce.

1.2.3.2 Analytická chromatografie

Analytická chromatografie, jak bylo také zmíněno v kapitole 1.2.3, je využívána pro účely zjištění složení a koncentrace látek. Oproti preparativní chromatografii je využíváno menších rozměrů chromatografických desek (např. 5 x 5 cm), stejně tak je využíváno desek s tenčí vrstvou. Rozdílem je i způsob nanášení vzorku na start desky. U analytické chromatografie jsou používány vrypy, do kterých je nanášen vzorek v izolovaných bodech, viz kapitola 2.3.3 v experimentální části práce.

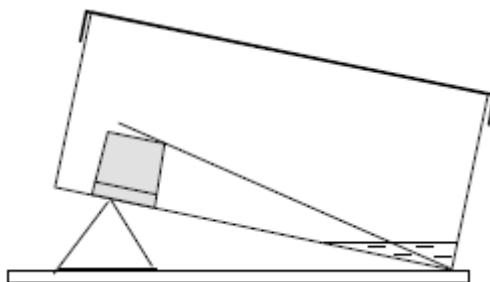
1.2.3.3 Sloupcová a planární chromatografie

Chromatografie může být podle uspořádání stacionární fáze buď sloupcová, tedy kolonová, nebo plošná, tedy planární. V průběhu sloupcové chromatografie prochází látka skrz sloupec v podobě zón. Zároveň je rozdíl mezi analytickou a preparativní variantou sloupcové chromatografie. Více se lze dočíst v literatuře ⁽¹¹⁾. Planární chromatografie spočívá v tom, že látka putují na chromatogramu v podobě různě širokých pruhů (preparativní chromatografie) nebo v podobě skvrn (analytická chromatografie). V případě kruhové chromatografie látka putují ve tvaru mezikruží, či v případě rozdělení kružnice ve tvaru výseče mezikruží. Velikost/intenzita skvrny/pruhu odpovídá množství látky a poloha/pozice odpovídá identitě jednotlivé složky směsi ⁽¹¹⁾. Planární (plošnou) chromatografii je možno ještě znovu rozdělit na tenkovrstvou chromatografii (kapitola 1.2.3.3.1) a papírovou chromatografii (kapitola 1.2.3.3.2) ⁽¹⁰⁾.

1.2.3.3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

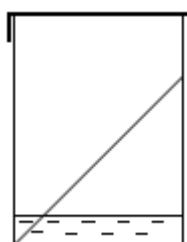
Tenkovrstvá chromatografie neboli chromatografie na tenké vrstvě (TLC) je jedním z několika typů chromatografie. Jedná se o jednoduchou, levnou a rychlou metodu. Díky těmto vlastnostem je možné ji využít také jako didaktickou pomůcku při výuce. Nejčastěji je využívána adsorpční chromatografie, kdy je sorbent buď fixován pojivem nebo volně umístěn v tenké vrstvě na podkladové desce. Oproti papírové chromatografii (kap. 1.2.3.3.2) má výhodu v případě analytické chromatografie v menší velikosti a zároveň je rychlejší. V případě preparativní chromatografie umožňuje oproti papírové chromatografii práci s větším množstvím směsi díky tloušťce tenké vrstvy až 3 mm.

Pro zdárný průběh TLC je nejprve potřeba mít vhodný podklad. Na hliníkovou, skleněnou nebo plastovou destičku různých velikostí (viz kap. 1.2.3.1 a kap. 1.2.3.2) je nanášena stacionární fáze. Pokud je použita forma sypaného sorbentu, je vrstva upravována pomocí skleněné tyčinky s gumovými konci, které určují tloušťku a rovnoměrnost rozložení sypané vrstvy. Na takto připravenou chromatografickou desku je nanášen vzorek. Chromatografická deska je pak vložena do chromatografické komory pod nízkým sklonem, aby se stacionární fáze nesesypala do mobilní fáze (obr. 5).



Obrázek 5: schéma sypané TLC v chromatografické komoře s mobilní fází (převzato z: ⁽¹⁰⁾)

Pokud je použita fixní forma sorbentu, je tekutá směs nalita na připravenou destičku. Litá vrstva je následně rozprostřena, aby byla tenká a rovnoměrná. Poté je třeba nechat tekutou směs zaschnout. Na takto připravenou desku se opět nanáší vzorek a vkládá se do chromatografické komory. Zde je možné vkládat desku i pod větším sklonem než u sypané vrstvy, protože nehrozí sesutí do mobilní fáze (obr. 6).



Obrázek 6: schéma lité TLC v chromatografické komoře s mobilní fází (převzato z: ⁽¹⁰⁾)

Nejčastěji je používán jako stacionární fáze silikagel či oxid hlinitý a jako pojivo sádra nebo škrob. Kromě těchto dvou nejčastějších stacionárních fází je možné použít také např. celulózu, acetylcelulózu či polyamid ⁽¹¹⁾. Konkrétní postup lití chromatografické desky je popsán v literatuře ⁽¹⁰⁾. Pro zjednodušení práce je možné chromatografické lité desky zakoupit již hotové, takže je ušetřen čas s jejich výrobou. Zároveň použitím komerčně vyráběných chromatografických desek je zajištěna lepší a stejnoměrnější kvalita.

Mobilní fáze je zjišťována nejčastěji experimentálně, nejčastěji za použití eluotropické řady (viz kap. 1.5). Současně ale volba mobilní fáze vychází z polaritativy a rozpustnosti chromatografovaných látek a také podle požadavků na dělení.

1.2.3.3.2 Papírová chromatografie

Principem papírové chromatografie je průchod rozpouštědla (mobilní fáze) papírem kde dochází k separaci látek ⁽¹¹⁾. Pro použití papírové chromatografie je potřeba speciální

chromatografický papír. Pokud se ale nejedná o náročnou práci či pokud jde o demonstrační pokus, je možné chromatografický papír nahradit filtračním papírem. Rozdíl mezi těmito papíry je v tom, že filtrační papír nemá přesně definované vlastnosti, mezi které patří například mechanická pevnost či přítomnost stopových nečistot^{(10) (11)}.

U papírové chromatografie nese stacionární fázi papír. Tou je obvykle voda obsažená v papíru (množství vody v papíru je v rovnováze s vlhkostí vzduchu). Pokud je papír před použitím naimpregnován, mohou být použita i jiná rozpouštědla. Následně je potřeba vhodně zvolit také mobilní fázi⁽¹⁰⁾.

Pro samotnou chromatografii je nejprve potřeba oddělit vhodně velký kus chromatografického papíru. Na tento papír vyznačíme start a místa pro nanesení vzorků. Dle literatury⁽¹¹⁾ je minimální vzdálenost při provádění papírové chromatografie mezi startem a čelem 10 cm. Vzdálenost určení startu a nanášení vzorků na start se liší dle toho, jestli se jedná o vzestupnou (3 – 5 cm od okraje) nebo sestupnou (10 cm od okraje) chromatografii. Místa pro nanášení vzorků na start je vhodné volit alespoň 2 cm od bočních krajů papíru a rozestupy by měly také činit alespoň 1,5 – 2 cm. K popisu chromatogramu je dobré používat obyčejnou tužku, která nemá ostrý hrot, aby nedošlo k poničení chromatografického papíru⁽¹¹⁾.

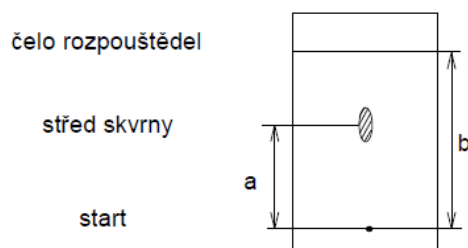
1.2.3.4 Retardační faktor

Každá látka má v předem daných podmínkách svou charakteristickou rychlost migrace. Tato rychlost migrace určuje její polohu na chromatogramu⁽¹¹⁾. Jedná se o poměr vzdálenosti středu složky od startu (místa nanesení vzorku) ke vzdálenosti čela a startu (místo, kam dovlínala mobilní fáze). Retardační faktor nabývá hodnoty v intervalu $<0;1>$. Ideální hodnota retardačního faktoru je asi mezi 0,2 a 0,8. Jedná se o bezrozměrnou veličinu⁽⁶⁾.

1.2.3.4.1 Výpočet retardačního faktoru

Pokud známe vzdálenost, kterou urazí složka od startu (značeno a), a vzdálenost startu od čela rozpouštědla (značeno b) (obr. 7), můžeme vypočítat hodnotu retardačního faktoru ze vzorce

$$R_F = \frac{a}{b}$$

Obrázek 7: výpočet R_F (převzato z: ⁽¹⁰⁾)

Výpočet R_F je ale velmi závislý na několika faktorech (chyby laboranta, teplota místnosti, stárnutí stacionární fáze, druh papíru, vlhkost, dostatečné utěsnění komory...), proto se může stát, že hodnoty R_F kolísají. I tak je ale využívání výpočtu R_F vhodné. Například při jednorázové analýze – k dokumentaci o přibližném chování látky za daných parametrů, nebo pokud jde o vypracovávání nových metod – určení, zda je soustava vhodná a účinná ⁽¹¹⁾.

1.2.3.5 Použití TLC a papírové chromatografie

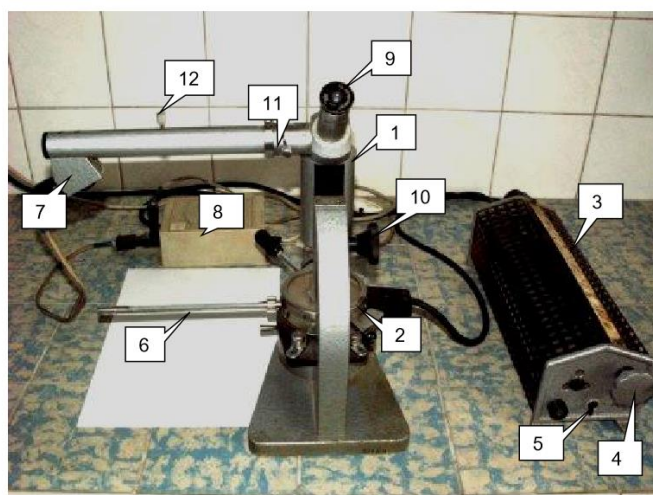
Použití TLC a papírové chromatografie je různorodé. Je možné je využít např. při kvalitativní analýze. Ať už jde o zkoušku čistoty látky nebo o analýzu známé směsi. Účinnost chromatografie je zvláště u analýzy směsí velmi účinná. Další možností využití TLC a papírové chromatografie je identifikace analyzované látky, kdy analyzovanou látku porovnáváme se známou látkou. Mezi využití patří také chromatografie derivátů, systematická analýza, určování struktury organických sloučenin, preparativní dělení nebo kvantitativní analýza ⁽¹¹⁾. Zároveň je možné využívat oba typy chromatografie ve výuce chemie na základních, středních i vysokých školách.

1.3 STANOVENÍ TEPLoty TÁNÍ

Mezi jednu z fyzikálních vlastností všech látek řadíme teplotu tání. Teplota tání není jedna konkrétní teplota, ale interval teplot, který je stanovován experimentální cestou. Spodní hodnota odpovídá teplotě, kdy dojde k prvnímu natavení krystalků látky a horní hodnota odpovídá teplotě, kdy vzorek zcela roztaje ⁽¹²⁾.

Tuto metodu lze využít také k určení neznámé látky, případně ke zjištění, jestli je látka znečištěná (jelikož znečištěné látky mají nižší bod tání, než čisté látky a interval teplot tání je u čistých látek úzký oproti znečištěným látkám s větším rozsahem teplot tání).

Určení teploty tání je možné provádět několika způsoby – s pomocí tenké kapiláry propojené s teploměrem ve vodní lázni, nebo pomocí bodotávku. Bodotávek je obecně nějaký kovový blok, který je možné zahřát na konkrétní teploty. Na něj se pokládá vzorek. Jedním z typů bodotávku je např. Koflerův blok (obr. 8), který je vhodný pro práci s velmi malými množstvími látek (má vzhled mikroskopu, ke kterému je připojen reostat).



Obrázek 8: Koflerův blok: 1-mikroskop, 2-kovový blok, 3-reostat, 4-klička pro regulaci teploty, 5-vypínač ohřevu, 6-teploměr, 7-osvětlení teploměru, 8-trafo k napájení žárovek, 9-okulár, 10-ostření mikroskopu, 11-ostření stupnice teploměru, 12-nastavení sledování stupnice teploměru (převzato z: ⁽¹²⁾)

Tato práce se ale podrobněji stanovováním teploty tání nezabývá.

1.4 ACETYLACE VZORKŮ BETULINU A PŘEMĚNA BETULINU-DIACETÁTU NA BETULIN-MONOACETÁT

1.4.1 ACETYLACE

Acetylace je typem chemické reakce, při níž dochází k obohacení organické sloučeniny o acetylovou funkční skupinu. Acetylová funkční skupina (CH_3CO) nahrazuje v organické sloučenině aktivní vodíkový atom, kdy dojde ke vzniku esteru organické sloučeniny, tedy acetátu.

Příkladem acetylace je např. acetylace kyseliny salicylové a vzniku acylpyrinu či acetylace celulózy a vznik acetylcelulózy.

Deacetylace je odstranění acetylové funkční skupiny (CH_3CO). Jedná se o opak acetylace.

Postup přeměny betulinu-diacetátu na betulin-monoacetát je detailněji popsán v experimentální části práce v kapitole 2.3.2.

1.5 CHEMIKÁLIE – ROZPOUŠTĚDLA

Aby byla chromatografie úspěšná, je potřeba zvolit vhodné rozpouštědlo. Volba rozpouštědla může být provedena experimentálně, a to dle zkušeností experimentátora. Je ale vhodné čerpat a vycházet z takzvané eluotropické řady ⁽¹¹⁾. Eluotropická řada je uspořádána podle klesající relativní permitivity v tomto pořadí:

- | | | |
|--------------------|-----------------|----------------------|
| 1. Voda | 6. Aceton | 11. Benzen |
| 2. Methanol | 7. Pyridin | 12. Toluen |
| 3. Kyselina octová | 8. Ethyl-acetát | 13. Chlorid uhličitý |
| 4. Ethanol | 9. Diethylester | 14. Cyklohexan |
| 5. Popan-1-ol | 10. Chloroform | 15. Hexan |

Rozpouštědla, která jsou uvedena na prvních příčkách řady (voda, methanol, kyselina octová, ethanol,...) je možno použít pro eluci složek ve směsi s vysokou polaritou. Rozpouštědla uvedená na posledních příčkách řady (... , chlorid uhličitý, cyklohexan, hexan) jsou vhodná pro vymývání méně polárních složek ze směsi. Jsou také vhodnou volbou pro jemnější dělení směsí ⁽¹⁰⁾.

Mezi zásady, které je při volbě vhodného rozpouštědla dodržovat, patří: dělená směs látek musí být v rozpouštědle rozpustná, dělená směs a její složky by měly být poutány k vybranému adsorbentu tak akorát – ani příliš málo (směs by se nerozdělila a postupovala by v čele rozpouštědla), ani příliš pevně (směs by zůstala na startu). Pokud jsou tedy složky směsi vázány tak akorát, je možné následně uplatnit rozdíly v jejich retardačních faktorech ⁽¹⁰⁾.

Dle autora ⁽¹³⁾ publikace platí poučka, že podobné se rozpouští v podobném. Tedy, že polarita rozpouštědla se musí podobat polaritě rozpouštěných látek.

V této práci bylo použito několik rozpouštědel jakožto mobilní fáze. Ve většině případů byla použita směs n-hexanu a ethyl-acetátu, a to v poměru 10:3. U chromatografie na velké desce (viz kap. 2.4) 100 ml n-hexanu a 30 ml ethyl-acetátu a u chromatografie na

malé chromatografické desce (viz kap. 2.3.3) 1 ml n-hexanu a 0,3 ml ethyl-acetátu. Tato množství byla zvolena podle velikosti chromatografických desek a chromatografických kyvet.

Dalšími rozpouštědly byl ethanol a dále voda. Tato rozpouštědla byla použita u pokusů, které se vyskytovaly v učebnicích pro ZŠ a SŠ (viz kap. 2.5).

Jako rozpouštědlo při nasávání vzorku a přenosu na chromatografické desky byl použit chloroform, nacházející se téměř uprostřed eluotropické řady. Chloroformu bylo používáno vždy velmi malé množství. U malé chromatografické desky se jednalo přibližně o jednu kapku z pipety pro rozpuštění malého množství vzorku a přenos skleněnou kapilárou na desku. U velké chromatografické desky bylo použito množství asi 1-2 ml při rozpouštění 80 mg vzorku acetylce (viz kap. 2.4) a následně za použití skleněného balónku nanášeno na chromatografickou desku. Po nanesení vzorků na chromatografické desky bylo vždy využito časového odstavu, aby se chloroform jakožto rozpouštědlo stihl odpařit.

U navrhované laboratorní práce byl jako rozpouštědlo pro extrakci použit aceton. Jako rozpouštědlo použité coby mobilní fáze byl zvolen diethylether (viz kap. 2.6).

1.6 CHROMATOGRÁFIE V KURIKULÁRNÍCH DOKUMENTECH

1.6.1 RÁMCOVÝ VZDĚLÁVACÍ PROGRAM (RVP)

RVP udává a vymezuje povinný rozsah, obsah a podmínky vzdělávání. RVP jsou závaznými dokumenty pro tvorbu školních vzdělávacích programů (ŠVP) a stanovují konkrétní cíle a formy vzdělávání⁽¹⁴⁾.

Chemie jako vzdělávací obor patří do vzdělávací oblasti *Člověk a příroda*. Téma chromatografie, jakožto separační metody neboli metody oddělování složek směsí, spadá do vzdělávacího obsahu *Obecné chemie*. Očekávaným výstupem v RVP k učivu *Soustavy látek a jejich složení* je: „Žák využívá odbornou terminologii při popisu látek a vysvětlování chemických dějů.“ (obr. 9) (cit.⁽¹⁵⁾).

5.3.2 Chemie

Vzdělávací obsah

OBECNÁ CHEMIE

Očekávané výstupy

žák

- ▶ využívá odbornou terminologii při popisu látek a vysvětlování chemických dějů
- ▶ provádí chemické výpočty a uplatňuje je při řešení praktických problémů
- ▶ předvídá vlastnosti prvků a jejich chování v chemických procesech na základě poznatků o periodické soustavě prvků
- ▶ využívá znalosti o částicové struktuře látek a chemických vazbách k předvídání některých fyzikálně-chemických vlastností látek a jejich chování v chemických reakcích

Učivo

- soustavy látek a jejich složení
- veličiny a výpočty v chemii
- stavba atomu

Obrázek 9: RVP chemie – obecná chemie – soustavy látek a jejich složení (převzato z: ⁽¹⁵⁾)

1.6.2 ŠKOLNÍ VZDĚLÁVACÍ PROGRAM (ŠVP)

Školní vzdělávací program (ŠVP) je vytvářen pro každou školu zvlášť, je tvořen na základě a v souladu s RVP. Je již pak na konkrétních školách, jak si ŠVP utvoří, jak bude podrobný, jestli bude členěný do předmětů či do modulů. ŠVP musí vycházet ze vzdělávacích záměrů a zohledňovat potřeby a možnosti žáků, reálné podmínky a možnosti školy, postavení v regionu a sociální prostředí ⁽¹⁴⁾.

Jako příklad byl zvolen ŠVP 4letého gymnázia v Plzni na Mikulášském náměstí (obr. 10). Jak je možné vidět, ŠVP vychází z RVP (možnost porovnání s obr. 9). Tematickým celkem jsou soustavy látek a jejich složení – z tohoto tematického celku vychází očekávané výstupy žáků. Šipkou je zvýrazněný očekávaný výstup, který je úzce spojen s chromatografií, konkrétně: „Žák navrhne dělení složek směsi sedimentací, filtrací, krystalizací, sublimací a destilací.“ ⁽¹⁶⁾. Právě zde by mohla být uvedena jako jedna ze separačních metod chromatografie.

ŠVP mohou být více obsáhlé (jako např. uvedený ŠVP Mikulášského gymnázia) či relativně stručné – jen mírně rozvíjí RVP a podrobnější rozpracování je pak na jednotlivých vyučujících v rámci tvorby tematického plánu a příprav na výuku.

ROČ	TÉMA	VÝSTUP	UČIVO	MEZIPŘEDMĚTOVÉ VZTAHY, PRŮŘEZOVÁ TÉMATA, POZNÁMKY
1.	1.1. Soustavy látek a jejich složení	<p>Žák:</p> <ul style="list-style-type: none"> • popíše soustavu a určí její typ • rozliší směs homogenní a heterogenní • určí vlastnosti různých druhů směsí • vysvětlí rozdíl mezi směsí a chemicky čistou látkou • vymezí pojem chemický prvek a chemická sloučenina • vymezí pojem atom, molekula a ion • rozpozná v reálné situaci různé typy soustav • posoudí a odliší v reálné situaci chemická individua a směsi látek • navrhne dělení složek směsi sedimentací, filtrací, krystalizací, sublimací a destilací • pojmenuje základní chemické nádoby a pomůcky a sestaví jednoduchou aparaturu 	<p>Soustava a její typ. Směs homogenní a heterogenní. Vlastnosti různých druhů směsí. Roztoky. Rozdíl mezi směsí a chemicky čistou látkou. Prvek a chemická sloučenina. Atom, molekula, ion.</p>	<p>F, Bi OSV EnV MV</p>

Obrázek 10: ŠVP chemie – první ročník 4letého gymnázia Plzeň (převzato z: ⁽¹⁶⁾)

1.6.3 TEMATICKÝ PLÁN

Tematický plán bývá vytvářen učiteli a vychází z ŠVP. Tematické plány jsou upravovány a zpracovávány pro každý předmět, ideálně pro každou třídu zvlášť. Slouží jako osnova/vodítko pro vyučujícího v průběhu roku, na základě tematického plánu je učitel schopen odhadnout, jestli stíhá vyložit plánované učivo.

Tematické plány mohou být málo podrobné nebo také velmi obsáhlé – záleží na konkrétních vyučujících. Jako příklad je uveden tematický plán gymnázia Náchod. Jedná se o tematický plán pro kvintu/1. ročník (obr. 11)(cit. ⁽¹⁷⁾).

1. Základní chemické pojmy	15h / září - říjen
-rozdělení základních chem. látek, názvosloví, vzorce sloučenin	
-charakteristika látek	
(směs, látka chem. čistá, prvek, sloučenina, atom, molekula, Ar, Mr, at. lhm. jednotka)	
-látkové množství	
-výpočty z chem. vzorců	
2. Složení a struktura látek	27h / listopad - březen
-stavba atomu	
(jádro, radioaktivita, elektronový obal, základní a excit. stav,	
typy orbitalů, elektro pozitivita, elektronegativita)	
-PSP a závěry z ní vyplývající	
-stavba molekul	
(chem. vazba, vaznost, koval.vazba, slabé vaz. interakce,	
vlastnosti látek jako důsledek struktury a povahy vazeb)	
3. Chemické reakce	24h / březen - červen
- pojem a rozdělení reakcí	
-chemická kinetika	
-chemická rovnováha a její ovlivňování	
-základní typy reakcí, jejich charakteristika, význam a použití	
(reakce acidobazické, redoxní, srážecí a komplexotvorné).	
-základy termochemie	
Laboratorní cvičení	
Náplň 15 jednodenních laboratorních cvičení:	
1. Seznámení s chemickou laboratorní, laboratorní řád, bezpečnost práce v chem. laboratorii (význam a účel práce v chem. laboratorii, práce s plynem a el. proudem, chemikálie, chemické sklo apod.).	
2. Vybavení chemické laboratoře (chemické sklo, porcelánové nádoby, kovové pomůcky).	
3. Dělicí metody (fyzikální – chemický děj).	
4. Dělicí metody (filtrace, krystalizace, sublimace, destilace).	
5. Roztoky – pojem roztok, složení roztoků (hmotnostní a objemová koncentrace, příklady výpočtů).	
6. Roztoky – směšovací rovnice, příklady výpočtů.	
7. Příprava roztoků.	
8. Roztoky- molární koncentrace, příklady výpočtů.	
9. Sledování závislosti rychlosti chem. reakce na koncentraci roztoku.	
10. Sledování závislosti rychlosti chem. reakce na teplotě.	
11. Výpočty z chemických rovnic – kvalitativní a kvantitativní význam chem. rovnic.	
12. Výpočty z chemických rovnic – příklady výpočtů.	
13. Acidobazické reakce	
14. Redoxní děje	
15. Srážecí reakce	

Obrázek 11: tematický plán – gymnázium Náchod – chemie pro kvintu/1. ročník (převzato z: ⁽¹⁷⁾)

V tematickém plánu jsou zvýrazněna témata týkající se chromatografie. Jedná se o téma směsí v úvodu školního roku – patří do tematického celku základní chemické pojmy a je probíráno v září – říjnu v průběhu 15 vyučovacích hodin. Dále je téma možno zařadit ke 4. laboratorní práci, která se týká dělicích metod (filtrace, krystalizace, sublimace, destilace) ⁽¹⁷⁾.

Tento tematický plán není úplně obsáhlý, ale je možné si udělat představu o časových možnostech a dotacích jednotlivých témat.

Bohužel nebyl nalezen ŠVP ani tematický plán, který by obsahoval explicitně zmíněnou chromatografii. To značí také to, že tato separační metoda není zcela rozšířena ve výuce a není často používána či jí není dáván takový důraz.

1.7 CHROMATOGRRAFIE V UČEBNÍCÍCH CHEMIE

1.7.1 UČEBNICE CHEMIE PRO ZŠ

Chromatografie jako jedna ze separačních metod se objevuje také v jednotlivých učebnicích chemie pro základní školy. Ve většině učebnic, které byly pro potřebu této práce použity, je chromatografie zařazována v učebnicích pro 8. ročník základní školy. Chemie jako vyučovací předmět je dle RVP zařazován do učebních plánů právě od 8. ročníku základní školy.

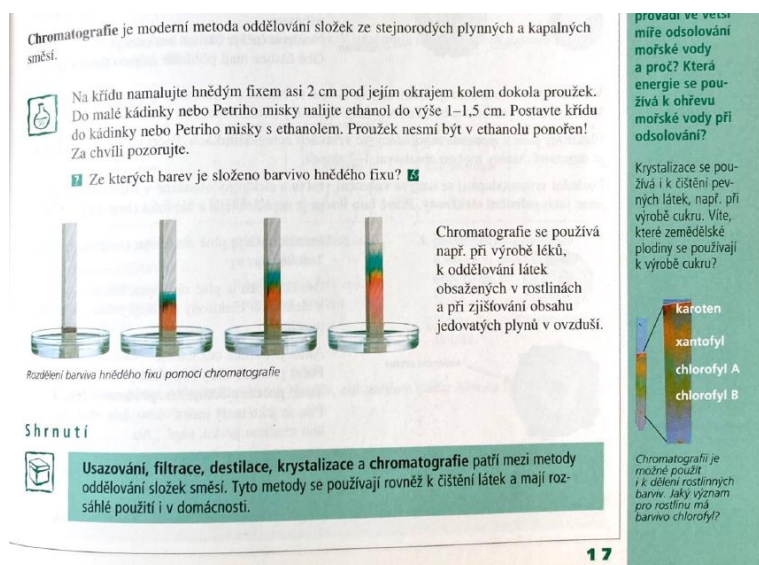
V použitých učebnicích se téma chromatografie zařazuje do podkapitoly oddělování směsí. Téma směsí je probíráno v rámci kapitoly *vlastnosti látek*. Kapitola vlastnosti látek je zařazována v učebnicích chemie hned ze začátku. Nejčastěji se v učebnicích vyskytuje část *Proč se učit chemii*, která patří do kapitoly úvod a hned na ni navazuje kapitola *Vlastnosti látek*.

Níže v následujících kapitolách budou detailněji probrány jednotlivé učebnice chemie pro základní školy s uvedenými příklady využití chromatografie ve výuce.

1.7.1.1 Chemie 8 – pro základní školy a víceletá gymnázia (Fraus ⁽¹⁸⁾)

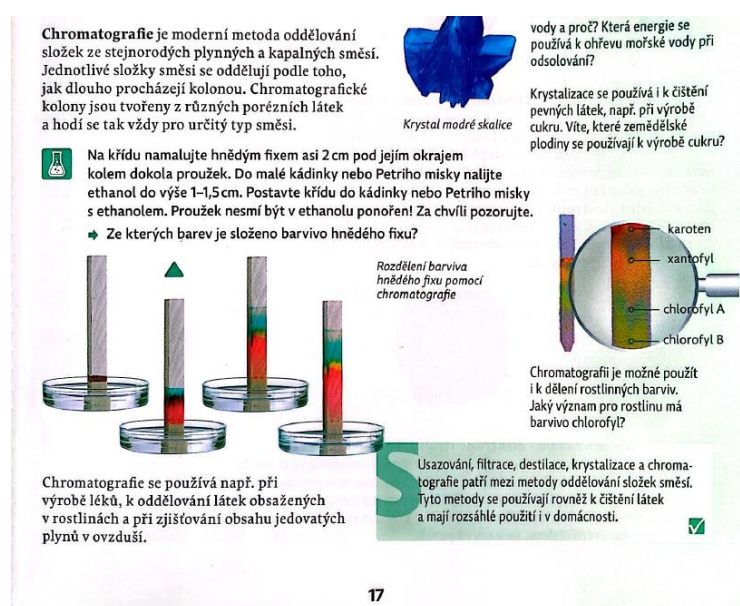
Tato učebnice od nakladatelství Fraus (rok vydání 2018), je tvořena stejně, jako je popsáno výše v kapitole 1.7.1. Jedná se o aktualizovanou verzi učebnice, která vyšla v roce

2006 (obr. 12). Informace o chromatografii jsou zde ale až na grafické zpracování identické, proto je zde použita pro rozbor pouze novější verze zmiňované učebnice⁽¹⁸⁾.



Obrázek 12: chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁸⁾)

Kapitola *Vlastnosti látek* začíná na straně 6 a pokračuje až do strany 17, na které se nachází část právě o chromatografii. Informace o oddělování složek směsí se žáci mohou dočíst na stranách 16 a 17. K chromatografii je v této podkapitole krátký odstavec, kde je popisováno, o jakou metodu se jedná a na jakém principu dochází k oddělování jednotlivých složek směsí. Kromě krátkého popisu je v učebnici uveden i příklad pokusu (obr. 13)(cit. ⁽¹⁸⁾).

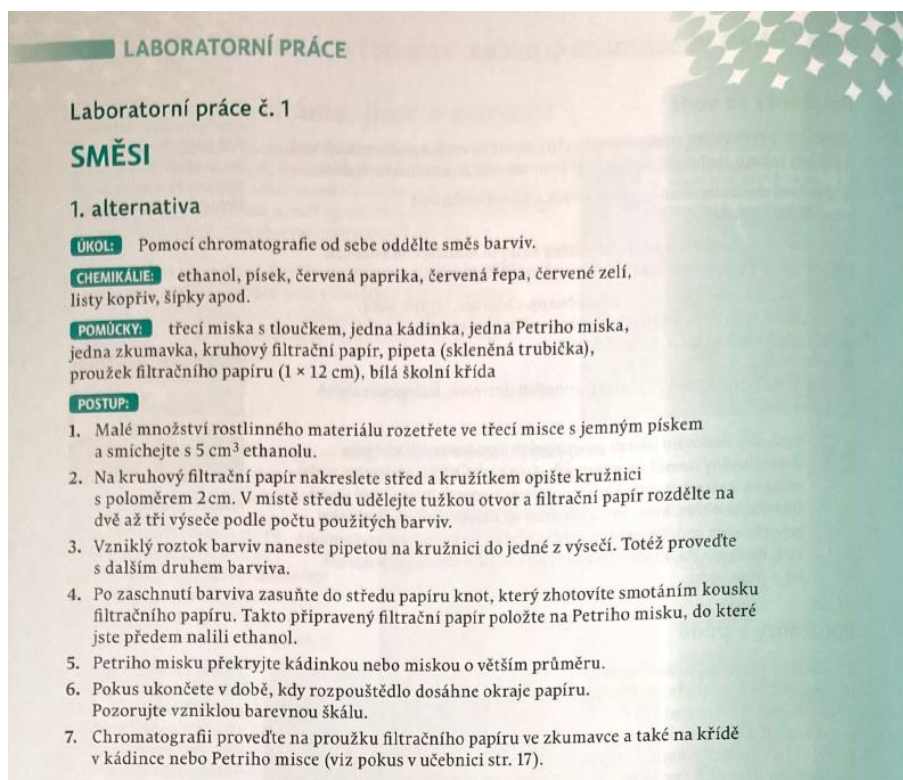


Obrázek 13: chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁸⁾)

Uvedený pokus pro demonstraci chromatografie je jednoduchý na provedení, tudíž si ho mohou vyzkoušet i žáci, jelikož není nikterak nebezpečný. Principem pokusu je použití školní křídly, na kterou je nanese barva z hnědého fixu ve výšce asi 2 cm od spodního okraje, a to ve formě proužku kolem dokola celé křídly. Následně je křída ponořena do ethanolu, který je nalit do Petriho misky (ve vrstvě asi 1 až 1,5 cm). Nakreslený proužek fixou se ale nesmí hladiny ethanolu dotýkat. Poté je třeba chvíli vyčkat a pozorovat, co se bude dít. V učebnici je uvedeno i několik fotografií z průběhu pokusu, takže si svůj výsledek mohou žáci s učebnicí porovnat ⁽¹⁸⁾.

Nakonec je v učebnici uvedeno i několik příkladů, k čemu se dá chromatografie použít i mimo školní prostředí (výroba léčiv, dělení rostlinných barviv nebo zjišťování množství jedovatých plynů v atmosféře) ⁽¹⁸⁾.

V poslední části učebnice se také nachází osm návodů k laboratorním pracím, které je možné využít ve výuce. Hned první laboratorní práci na straně 126 je téma směsi, jejíž první alternativa se týká chromatografie (obr. 13). Kromě varianty uvedené v učebnici na straně 17 jsou zde také dva další příklady provedení pokusu chromatografie. Jedním z nich je použití kruhového filtračního papíru, do kterého je vytvořen ve středu otvor. Kolem otvoru je pomocí kružítka vykreslena kružnice o průměru 4 cm. Tato kružnice je rozdělena na několik výsečí podle počtu vzorků. Vzorky jsou nanášeny na výseče kružnice. Do otvoru ve středu je vložen knot, který je zhotoven z filtračního papíru. Takto připravený filtrační papír je položen na Petriho misku, ve které je připraven ethanol. Toto celé je následně překryto kádinkou nebo jinou miskou. Pokus je ukončen v momentě, kdy rozpouštědlo dosáhne okraje filtračního papíru. Nakonec následuje pozorování vzniklého výsledku barevné škály. Další variantou je použití proužku filtračního papíru, na který je také nanášen vzorek barviva, který je pak vložen do zkumavky s ethanolem. Vzorek se ale nesmí dotýkat hladiny ethanolu ⁽¹⁸⁾.



Obrázek 14: laboratorní práce – chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁸⁾)

1.7.1.2 Chemie 8 – úvod do obecné a anorganické chemie (Nová škola ⁽¹⁹⁾)

Tato učebnice, vydaná nakladatelstvím Nová škola (rok vydání 2017), odpovídá téměř přesně tomu, jako bylo popsáno v kapitole 1.7.1. Kapitola *Složení a třídění směsí* začíná na straně 12, podkapitola *Oddělování směsí* se objevuje od strany 16 a končí stranou 21, kde se také nachází informace ohledně chromatografie. Nejprve je uvedeno, co chromatografie je a na jakém principu funguje. Dále je zde uvedeno využití. Kromě základních informací jsou zde uvedeny i zajímavosti a propojení mezi předměty – chemií a přírodopisem. Následně je uveden pokus i s postupem (obr. 15)(cit. ⁽¹⁹⁾). V učebnici od nakladatelství Nová škola je uveden jiný pokus, než je tomu v učebnici od nakladatelství Fraus, který je popsán výše v kapitole 1.7.1.1.

SLOŽENÍ A TRÍDĚNÍ SMĚSÍ

CHROMATOGRRAFIE

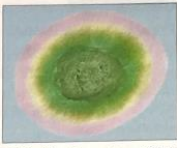
Chromatografie je oddělování složek směsí na základě jejich rozdílné schopnosti vázat se ke dvěma látkám, s nimiž jsou ve styku. Jedna látka bývá pevná (např. křída), druhou je rozpouštědlo (např. voda).

Využití: Např. při získávání barviv z rostlinných směsí nebo k zjišťování chemických látek přidávaných do potravin (tzv. E-kódů).


Z Mezi barviva obsažená v rostlinách patří např. chlorofyl a karoten.

Př Jaký význam má zelené listové barvivo (chlorofyl) pro rostliny?

U **ODDĚLOVÁNÍ POTRAVINÁŘSKÝCH BARVIV ZE SMĚSÍ CHROMATOGRAFIÍ NA KŘÍDĚ**
Do misky s vodou namočte a zamíchejte čokoládové lentičky. Dříve, než se lentičky celé rozpustí, přefiltrujte směs barviv přes sítko. Filtrát nalijte do misky a do jejího středu upevněte bílou školní křidu tak, aby spodní část zasahovala do roztočtu, a ponechte po dobu asi 15 minut. Pokus ukončete, dosáhne-li vztlínající voda hranice asi 1 cm od horního okraje křídly. Křidu nechejte uschnout a pokus (oddělování barviv) vyhodnoťte.



Výsledek chromatografického dělení rostlinných barviv (chromatogram)



Pozorování a závěr:
Většina barviv je namíchána z různých složek, které mají různou velikost částic. Ty jsou unášeny rozpouštědlem různou rychlostí. Tím dojde v křídě k jejich oddělení. Vzniká chromatogram.

Z Uvedený pokus lze provádět také se „savým papírem“.

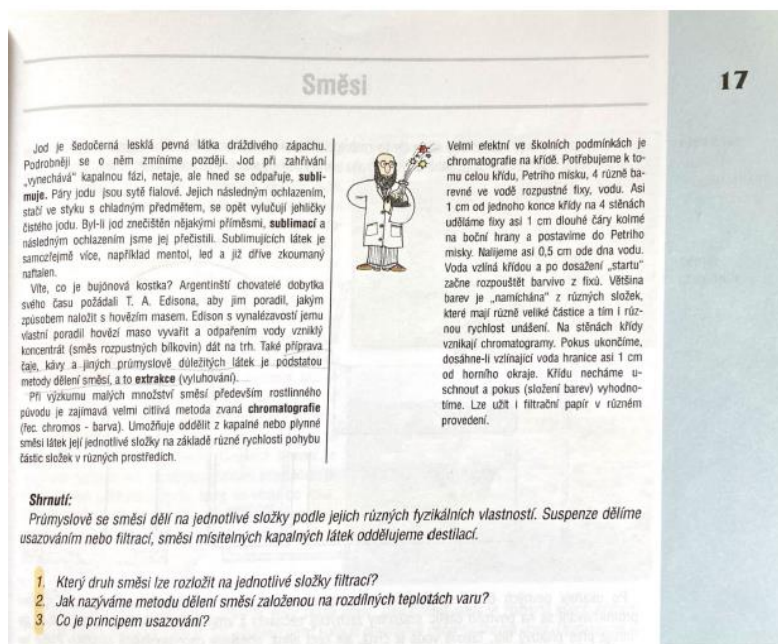
Obrázek 15: chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁹⁾)

V této učebnici je uveden pokus, který je prováděn také na křídě, ale barvivo je získáváno z namočených lentilek. Tento pokus je jednoduchý na přípravu, je k němu potřeba pouze školní křída, Petriho miska, sítko a malé množství lentilek. Kromě pokusu je tu uvedeno i vyhodnocení. Pokud by žáci prováděli tento pokus samostatně, mohou si své výsledky porovnat se svou učebnicí.

V učebnici je také zobrazen výsledek chromatografie (chromatogram) dělení rostlinných barviv, o kterém je v učebnici od nakladatelství Fraus pouze písemná zmínka, nikoliv obrazové vyjádření.

1.7.1.3 Chemie I – pro 8. ročník ZŠ a víceletá gymnázia (Prodos ⁽²⁰⁾)

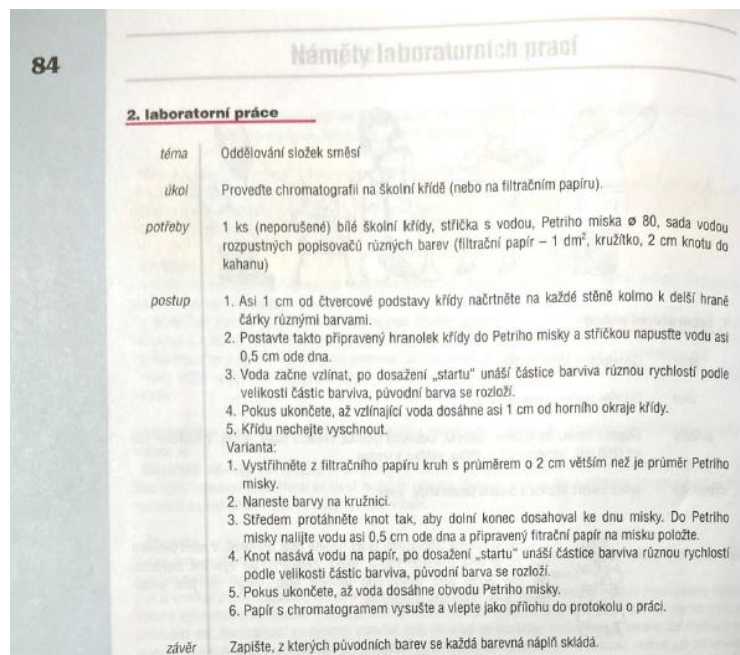
Tato učebnice, vydaná nakladatelství Prodos (rok vydání 2001), má mírně odlišné řazení kapitol, než je zmiňováno v kapitole 1.7.1. První kapitolou je shodně kapitola Úvod, druhá kapitola se ale liší – zde je vložena kapitola *Zkumavkou to začíná* a až poté následuje kapitola *Směsi*. Kapitola *Směsi* začíná na straně 10 a končí na straně 20. Téma chromatografie je zmíněno v učebnici jen krátce, na straně 17 (obr. 16)(cit. ⁽²⁰⁾).



Obrázek 16: chromatografie – učebnice chemie I (převzato z: ⁽²⁰⁾)

Zde je uvedeno podobné množství informací jako v předchozích zmíněných učebnicích. Je tady popsán také pokus na školní křídě s pomocí barevných fixů a vody. Rozdílem mezi touto a dříve zmíněnými učebnicemi není jen v řazení kapitol, ale také v množství obrazového materiálu, doplňujících otázek či zajímavostí. Je možné, že je to ovlivněno rokem vydání, učebnice od sebe dělí asi 17 let.

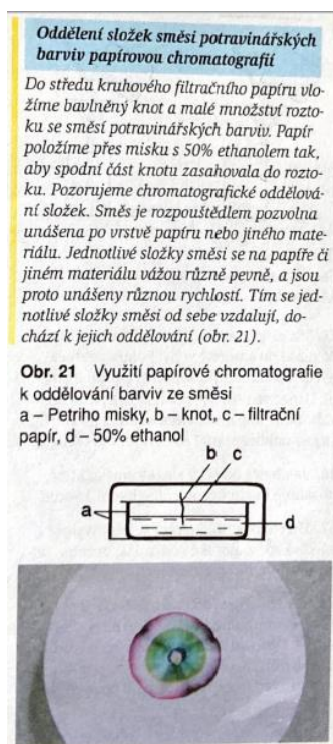
Pokus se školní křídou a barevnými fixy je i s modifikací na filtračním papíře uveden také na konci učebnice mezi laboratorními pracemi. Konkrétně tato laboratorní práce č. 2 je na straně 84 (obr. 17).



Obrázek 17: laboratorní práce – chromatografie – učebnice chemie I (převzato z: ⁽²⁰⁾)

1.7.1.4 Základy praktické chemie 1 pro 8. ročník ZŠ (Fortuna ⁽²¹⁾)

Učebnice Základy praktické chemie 1 od nakladatelství Fortuna (rok vydání 1999), je řazena stejně jako je psáno v kapitole 1.7.1. Nejprve je kapitola *Úvod do chemie* a další podkapitoly. Poté následuje kapitola *Látky a směsi kolem nás*, kde je podkapitola *Jak oddělujeme složky směsi*. Zde je zmíněna i chromatografie. Podkapitola *Jak oddělujeme složky směsi*, se nachází na stranách 16 a 17, chromatografie na straně 17 (obr. 18) (cit. ⁽²¹⁾).



Obrázek 18: chromatografie – učebnice základy praktické chemie (převzato z: ⁽²¹⁾)

V této učebnici je chromatografie zmíněna jen okrajově a to konkrétním příkladem pokusu. Chybí tady obecný popis chromatografie jako separační metody. Nejprve je v učebnici popsáno, že je potřeba připravit kruhový filtrační papír a bavlněný knot. Z chemikálií je potřeba připravit ethanol (50% koncentrace) a roztok směsi potravinářských barviv. Toto je podobné, jako v učebnici od nakladatelství Nová škola (kap. 1.7.1.2) při pokusu s lentilkami. Z mého pohledu je ale pokus s lentilkami pro žáky zajímavější, protože se s nimi přece jen mohou spíše setkat v každodenním životě, než s potravinovými barvivy. Další zmínky o chromatografii se v této učebnici nevyskytují.

1.7.2 UČEBNICE CHEMIE PRO SŠ

1.7.2.1 Chemie pro střední školy 1a (Scientia ⁽²²⁾)

Jedinou dostupnou učebnicí chemie pro střední školy v knihovně fakulty Pedagogické v Plzni, ve které se nachází zmínka o chromatografii, je Chemie pro střední školy 1a od nakladatelství Scientia (rok překladu a vydání v ČR 1996). Řazení kapitol v této učebnici je mírně odlišné od učebnic pro základní školy. V této učebnici je místo úvodu předmluva k českému vydání učebnice, hned na to následuje kapitola *Látky a jejich vlastnosti*, která je rozdělena do 14 podkapitol. Podkapitola 1.11 s názvem *Dělení směsí* zmínku

o chromatografii neobsahuje, protože je tu ještě podkapitola 1.12 *Další způsoby dělení směsí*. Zde jsou uvedeny méně časté metody oddělování směsí, mezi kterými je i chromatografie, konkrétně papírová chromatografie (obr. 19)(cit. (22)).

Obr. 28.1 Dělení dvou kapalin v dělicí nálevce Obr. 28.2 Odšťeďování urychluje proces usazování

P 28.1 Připravte v kádince směs písku s polystyrenovými kuličkami a zalijte vodou. Vysvětlete své pozorování.

P 28.2 Proťepcejte v dělicí nálevce benzín (zabarvený jodem) s vodou a opět je rozdělte.

P 28.3 Pozorujte podle obr. 28.3 složení černých barev fixu. Zkuste i jiné fixy a inkousty a přesvědčte se, zda jde o čisté látky nebo směsi. Jako rozpouštědlo použijte vodu nebo směs vody (2 díly), butanolu (2 díly) a octa (1 díl). Napište protokol.

Při **extrakci (vyložení)** se využívá **různé rozpustnosti složek ve směsi**. Tímto způsobem je možné vyloužit (extrahovat) vodu kuchyňskou sůl ze soli kamenné, právě tak jako rostlinný tuk ze semen vhodným rozpouštědlem.

Chromatograficky (dělení směsi spočívá v **zachycení jednotlivých složek na nosiči**) lze rychle a šetrně rozdělit **velmi malé dávky směsí**. Nakreslíme-li fixem (tužkou s plstovým hrotem) proužek kolem otvoru uprostřed kruhového filtru a necháme-li vsakovat rozpouštědlo ze středu filtru, vznikají různobarevné zóny (obr. 28.3, P 28.3). Barva fixu je tvořena směsí látek s barvicími účinky. Princip chromatografického dělení tady spočívá v tom, že se **jednotlivé složky zachytí** (adsorbují) na vláknech papíru **nestojně pevně**. Barva nejméně pevně zachycená je rozpouštědlem dopravena nejdále od středu filtru. Vzhledem k tomu, že dělení probíhá na papíru, hovoříme o **papírové chromatografii**.

Obr. 28.3 Papírová chromatografie. Černé barvivo fixu je rozděleno na jednotlivé složky různé barvy

Tab. 28.4 Některé důležité postupy dělení směsí a jejich použití

Dělicí postup	Příklad použití	Různé vlastnosti složek
sedimentace	čištění odpadních vod	hustota
odšťeďování	oddělení smetany od mléka	hustota
filtrace	čištění vody	velikost částic
odpaření	vypařování soli	bod varu
destilace	odsolování vody	bod varu
vytavení	získávání kořalky	bod tání
extrakce	získávání sýry	rozpustnost
magnetické dělení	získávání tuku	magnetizace
chromatografie	dělení barviv	adsorpce

28

Obrázek 19: chromatografie – učebnice chemie pro střední školy 1a (převzato z: (22))

V této učebnici je uveden stejný pokus, jako v učebnicích od nakladatelství Prodos (kap. 1.7.1.3) a Fortuna (kap. 1.7.1.4), jen s mírnou modifikací při použití barviva. Kromě principu, popisu a obrázku papírové chromatografie je v učebnici i návod k pokusu – použití jiných inkoustů a fixů ke zjištění, zda se jedná o čisté látky či směsi, včetně druhu rozpouštědla – buď čistá voda či směs vody, butanolu a octa v poměru 2:2:1.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 PRÁCE SE SKLEM

Pro provádění chromatografie a uchovávání vzorků, je potřeba si zhotovit skleněné pomůcky, mezi které patří zhotovení tenkých skleněných kapilár pro nanášení vzorku na chromatografickou desku či zhotovení skleněných balónků pro uchovávání nebo přenášení malého množství kapaliny.

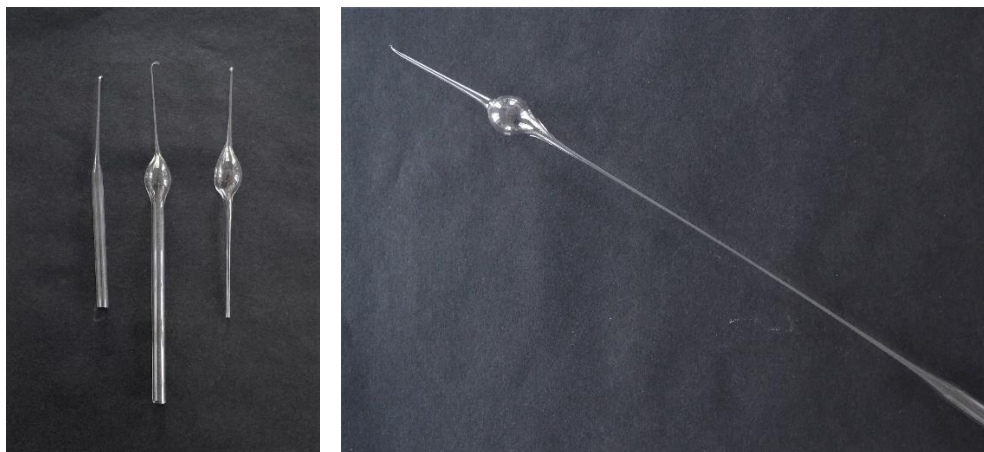
2.1.1 ZHOTOVENÍ KAPILÁR

Pro zhotovení tenké skleněné kapiláry je potřeba skleněná trubice (místo skleněné trubice lze také využít zkumavku) a plynový kahan. Vzhledem k malé náročnosti zhotovení skleněných kapilár lze tento postup provádět také při laboratorních cvičeních se studenty.

Samotné zhotovení skleněné kapiláry probíhá při zahřívání skleněné trubice v nesvítivé části plamene nad plynovým kahanem. Trubicí je potřeba opatrně pomalu otáčet, aby docházelo k rovnoměrnému prohřívání celé trubice a ne jen její části. Toto je zásadní pro kvalitní vytažení skleněné kapiláry. V momentě, kdy sklo začíná měknout a trubice má jakoby svítivý povrch, je možné vytáhnout skleněnou trubicí z plamene a vytáhnout kapiláru. Kapilára by měla být rovnoměrná. Je tedy potřeba v místech, kde se kapilára začíná rozšiřovat, trubicí naříznout nožičkem a kraje odlomit⁽¹⁾.

2.1.2 ZHOTOVENÍ BALÓNKU

Zhotovení skleněného balónku je zobrazeno na fotografiích (obr. 20, 21). Nejprve je potřeba vytáhnout tenkou kapiláru, jako je popsáno v kapitole 2.1.1. Dalším krokem je opatrné vyfouknutí balónku. U tohoto kroku je nutné dávat pozor a mít zkušenost, aby nedošlo k přefouknutí balónku, jelikož by pak neměl dostatečnou pevnost a byl by moc křehký. Následně je na řadě vytažení druhé kapiláry na opačné straně balónku. Nakonec se nožičkem nařízne kapilára a odlomí se zbytek trubice. Takto je balónek připraven k přenášení malého množství kapaliny. V případě uchovávání kapaliny dojde k zatavení konců kapilár. Pevnost balónku je ozkoušena po vyfouknutí poklepáním balónkem o desku pracovního stolu⁽¹⁾.

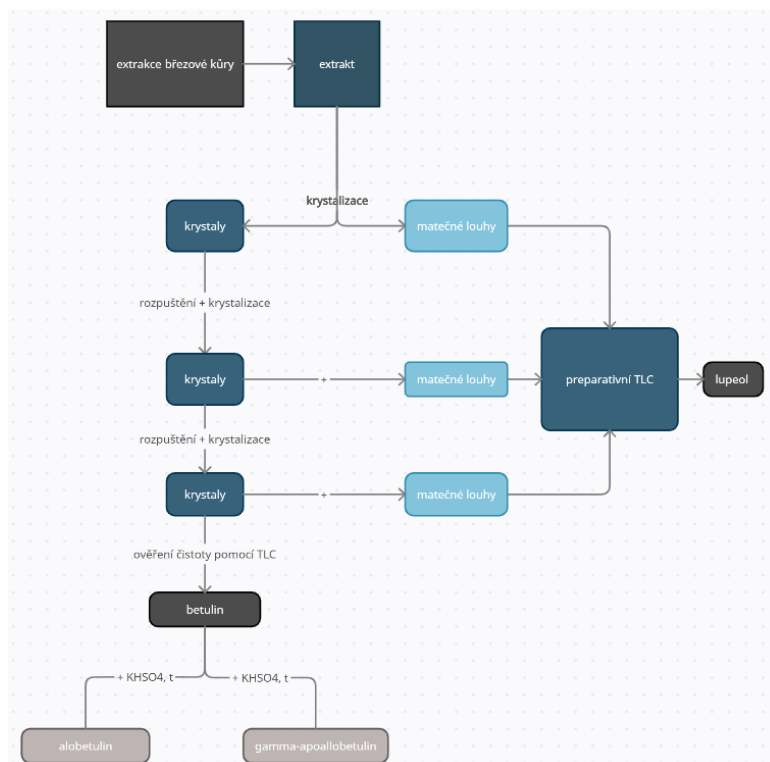


Obrázek 20: 1 – vytažení kapiláry, 2 – vyfouknutí balónku, 4 – odříznutí zbytku trubice

Obrázek 21: 3 – vytažení druhé kapiláry

2.2 ČIŠTĚNÍ BETULINU PO ZÍSKÁVÁNÍ Z BŘEZOVÉ KŮRY

Pro získání betulinu pro tuto práci byl použit postup, který je popsán v kapitole 1.2.1, tedy s pomocí Soxhletova extraktoru. Následně probíhalo čištění získaného vzorku betulinu, a to podle schématu přiloženého níže (obr. 22). Nejprve byla provedena krystalizace, ze které byly získány krystaly a matečný louh. Poté následovalo opětovné rozpuštění krystalů a opětovná krystalizace, opět se získáním krystalů a matečného louhu. Tento postup byl ještě jednou zopakován. Získané matečné louhy byly spojeny a byla provedena preparativní TLC, díky které bylo zjištěno, že matečné louhy obsahovaly lupeol. Lupeol ale není součástí této práce. Získané krystaly byly použity pro provedení TLC, aby bylo zjištěno, jestli jsou krystaly čisté. (Zde je možné pozorovat jednu z možností využití TLC – ověřování čistoty látek.) Po provedení TLC bylo zjištěno, že krystaly jsou čisté, takže následovalo tavení s KHSO_4 na bodotávku za získání allobetulinu a γ -apallobetulinu.

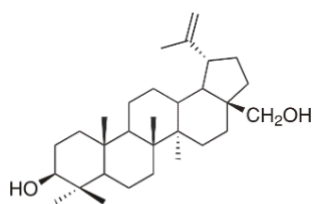
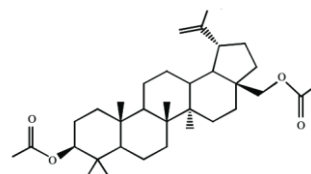


Obrázek 22: schéma čištění extraktu březové kůry při zisku betulinu

2.3 ACETYLACE VZORKU A A VZORKU B, PŘEMĚNA BETULIN-DIACETÁTU NA BETULIN-MONOACETÁT

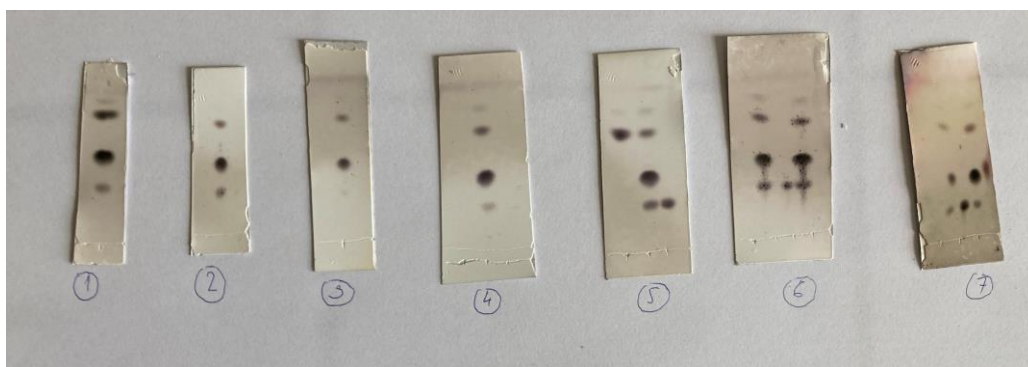
2.3.1 ACETYLACE VZORKU A A VZORKU B

Postup přeměny betulinu (obr. 23) na betulin-diacetát (obr. 24): 150 ml betulinu (I) bylo v předem odvážené lékovce rozpuštěno v 0,5 ml suchého pyridinu. Ke vzniklému roztoku bylo z pipety přikapáno 0,5 ml acetanhydridu. Přechodně se začala vylučovat krystalická sraženina, která se po chvíli stání rozpustila. Asi po dvou hodinách stání vzniklého roztoku při laboratorní teplotě se začaly vylučovat krystaly betulin-diacetátu III, které velmi rychle vyplnily celý prostor lékovky. Po 24 hodinách byla reakce ukončena a matečný louh byl odsát skleněným balonkem (odsátí matečného louhu lze provést též např. injekční stříkačkou s náležitě dlouhou jehlou nebo pipetou opatřenou gumovým balonkem). Zbylé krystaly byly opakovaně promyty postupným přidáním a následným odsátím 0,5; 0,5 a 1 ml destilované vody. Po vysušení při 110 °C bylo získáno 158 mg produktu, jehož identita byla prokázána TLC (viz obr. 30 v kap.2.3.3).

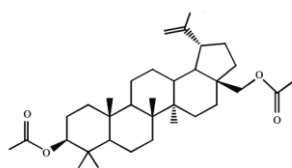
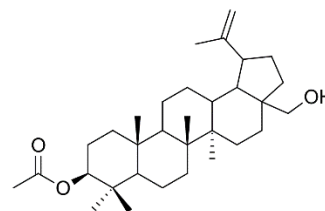
Obrázek 23: betulin ⁽²³⁾Obrázek 24: betulin-diacetát ⁽²⁴⁾

2.3.2 PŘEMĚNA BETULIN-DIACETÁTU NA BETULIN-MONOACETÁT

Přeměna betulin-diacetátu (obr. 26) na betulin-monoacetát (obr. 27): 110 mg betulin-diacetátu bylo rozpuštěno v 0,6 ml ethylalkoholu. Ke vzniklému roztoku byly přidány 2 ml roztoku hydroxidu draselného připraveného rozpuštěním 117 mg hydroxidu draselného ve 20 ml ethylalkoholu. V hodinových intervalech byly kapilárou odebírány vzorky reakční směsi na analytickou destičku silikagelu pro srovnání s výchozím betulin-diacetátem. Po řádném odpaření rozpouštědel byla destička vnořena do směsi hexanu a ethylacetátu (10:3) a po vystoupení čela rozpouštědel téměř k okraji destičky detekována postříkem 10% H₂SO₄ a vypálením. Vznik monoacetátu byl patrný již po první hodině. Po čtyřech hodinách se složení reakční směsi již prakticky nemění (viz obr. 25).

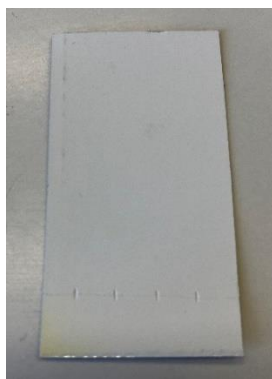


Obrázek 25: **1** – TLC reakční směsi po 1 hodině, **2** – TLC reakční směsi po 2 hodinách, **3** – TLC reakční směsi po 4 hodinách, **4** – TLC reakční směsi po 7 hodinách, **5** – betulin-diacetát, reakční směs, betulin, **6** – filtrát, betulin, filtrát, **7** – filtrát, betulin, krystaly, betulin-monoacetát

Obrázek 26: betulin-diacetát ⁽²⁴⁾Obrázek 27: betulin-monoacetát ⁽²⁵⁾

2.3.3 OVĚŘOVACÍ TLC VZORKU A A VZORKU B

Nejprve byla odstřižena část z velkého plátu chromatografické desky. Následně nanášeno malé množství vzorku A, vzorku B a standardu čistého betulinu na druhou stranu použité chromatografické desky. Na odstřiženou část chromatografické desky byla do spodní části asi půl centimetru od okraje udělána tenká rýha, do které byly v podobných rozestupech udělány tři vrypy. (obr. 28)



Obrázek 28: chromatografická deska s rýhou a vrypy

S pomocí pipety bylo na jednotlivé vzorky postupně nanášeno rozpouštědlo. Jako rozpouštědlo byl použit chloroform. Poté za použití kapilár, vyrobených dle postupu popsaného v kapitole 2.1.1, byla postupně po zakápnutí vzorku rozpouštědlem nasáta směs do kapiláry. Takto nasátá směs byla nanášena na připravenou chromatografickou desku. Vzorek A na první pozici, vzorek B na druhou pozici a standard čistého betulinu na třetí pozici. Do vývojové komory byla s pomocí pipet připravena směs rozpouštědel n-hexanu a ethylacetátu v poměru 10:3 (v mililitrech). Do vývojové komory se směsí rozpouštědel byla vložena chromatografická deska s nanesenými vzorky a standardem a komora byla přiklopena preparačním sklem (obr. 29).



Obrázek 29: vývojová komora s chromatografickou deskou a nanesenými vzorky a standardem.

Poté, co mobilní fáze vyvzlínala až téměř k hornímu okraji chromatografické desky, byla chromatografická deska vyjmuta a v digestoři s pomocí balonku rovnoměrně postříkána roztokem kyseliny sírové. Následně byla chromatografická deska položena na elektrický vaříč, který byl zapnut. Jakmile se na chromatografické desce začaly objevovat stopy vzorků a standardu a vaříč byl vypnut.

Dle provedené tenkovrstvé chromatografie bylo zjištěno, že acetylace u obou vzorků byla úspěšná, viz obr. 30.



Obrázek 30: chromatografická deska s nanesenými standardem a vzorky – A: vzorek A, B: vzorek B, 1: čistý betulin

2.4 PREPARATIVNÍ TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE VZORKU A A VZORKU B, VÝPOČET R_F

Pro provedení preparativní tenkovrstvé chromatografie byla nejprve připravena chromatografická deska. Pro skleněnou desku o velikosti asi 20 x 20 cm bylo použito 20 g silikagelu a 48 g destilované vody. Nanášení kašovitě směsi je podrobněji popsáno v bakalářské práci ⁽²⁶⁾ a ve článku ⁽²⁷⁾. Po zaschnutí byla takto zhotovená chromatografická deska připravena k použití (obr. 31).



Obrázek 31: preparativní chromatografická deska (20 x 20 cm)

Takto připravenou chromatografickou desku je před nanesením vzorku vhodné položit na okraj stolu tak, aby laborant měl poznačené místo, kam má přibližně nanášet vzorek z balónku. V tomto případě se jedná o černou linku, která tvoří hranici mezi dlaždicí a šedou lištou na kraji pracovního stolu.

Vzhledem k tomu, že bylo zjištěno, že acetylace obou vzorků betulinu byla úspěšná, bylo možné vzorky pro preparativní chromatografii spojit. (Vzorku B bylo jen malé množství, takže bylo doplněno vzorkem A). Do lékovky s označením vzorku B bylo na analytických vahách naváženo 80 mg vzorku acetylce betulinu (obr. 32). Takto připravený vzorek byl rozpuštěn asi v 1 ml chloroformu.



Obrázek 32: 80 mg vzorku acetylce betulinu

Následně bylo potřeba dostat směs do předem připraveného skleněného balónku (viz kap. 2.1.2.2.1.2). Pro tento úkon bylo použito topné hnízdo, ve kterém došlo k nahřátí balónku. Díky nahřátí balónku se lépe nasála směs z lékovky. Postup nahřívání bylo třeba několikrát zopakovat. V momentě, kdy byl vzorek z lékovky přesunut do balónku, byla lékovka ještě vypláchnuta malým množstvím chloroformu. Tento zbytek byl také přesunut do balónku.

V dalším kroku byla směs nanášena pomocí balónku v 2-3 mm široké souvislé linii na chromatografickou desku. Díky regulaci teploty balónku rukou byla směs nanesena na chromatografickou desku (obr. 33).



Obrázek 33: nanášení směsi pomocí balónku na chromatografickou desku

Takto nanosená směs byla ponechána na desce k zaschnutí. Jak bylo zmíněno v kapitole 1.2.3, je nutné, aby se rozpouštědlo před vložením do vyvíjecí chromatografické komory zcela odpařilo.

Mezitím, co docházelo k odpaření chloroformu z nanosené směsi, byla připravena chromatografická komora. Do dostatečně velké skleněné komory bylo připraveno přiměřené množství směsi rozpouštědel sloužících jako mobilní fáze. Jednalo se o směs n-hexanu a ethyl-acetátu v poměru 10:3, jak bylo zmíněno v kapitole 1.5, v množství 100 ml n-hexanu a 30 ml ethyl-acetátu.

Do takto připravené chromatografické komory byla vložena chromatografická deska s naneseným vzorkem tak, aby linie, kam byl nanesen vzorek, nebyla ponořena do směsi rozpouštědel. Pro tento účel byla do chromatografické komory vložena baňka, o kterou byla pod sklonem opřena chromatografická deska. Chromatografická komora byla uzavřena pomocí molitanu v igelitu a zatížena skleněnou deskou, aby byla dostatečně utěsněna (obr. 34).

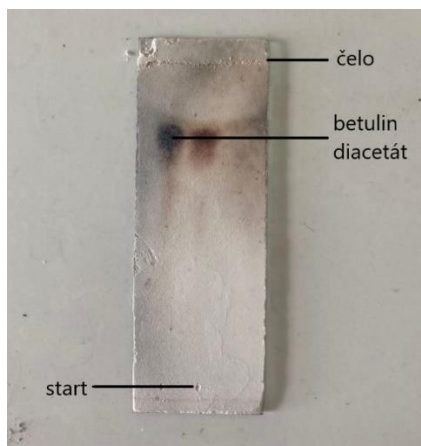


Obrázek 34: chromatografická deska v chromatografické komoře se směsí rozpouštědel

Takto byla aparatura ponechána a vyvíjení bylo ukončeno, až když čelo rozpouštědel bylo asi půl cm od horního okraje desky.

Mezitím byla provedena kontrolní analytická chromatografie v menším rozměru. Ta byla prováděna na stejném podkladu (skleněná destička) s téměř stejnou stacionární fází jako preparativní chromatografie v této kapitole výše. Nejprve byly tedy provedeny dva vrypy, do kterých bylo skleněnou kapilárou nanášeno malé množství vzorku acetylcebetulinu rozpuštěné v chloroformu. V době, kdy se odpařoval chloroform, byla připravena

chromatografická komora, do které byla připravena směs rozpouštědel 1 ml n-hexanu a 0,3 ml ethyl-acetátu. Poté, co se chloroform vypařil, byla vložena chromatografická deska do chromatografické komory k vyvíjení a zakryta skleněnou destičkou. Jakmile se čelo rozpouštědel dostalo asi půl cm pod horní okraj desky, byla deska vyjmuta a bylo poznačeno místo, kam čelo rozpouštědel došlo. Pak byla deska s pomocí balónku postříkána slabou vrstvou 10% kyseliny sírové a vypálena na elektrickém vařiči (obr. 35).



Obrázek 35: analytická TLC pro výpočet R_F

Na obrázku 35 je zároveň vyznačeno čelo, start a betulin-diacetát. Tyto údaje je možné využít pro výpočet retardačního faktoru (R_F , viz kap. 1.2.3.4). Ten je vypočítán dle vzorce a postupu v kapitole 1.2.3.4. Vzdálenost mezi startem a betulin-diacetátem činila přesně 5 cm (neznámá a), vzdálenost mezi startem a čelem činila přesně 6,5 cm (neznámá b). R_F byl vypočten následovně:

$$R_F = \frac{a}{b} = \frac{5}{6,5} = 0,76923$$

V mezičase, co byla prováděna kontrolní analytická TLC, proběhl vývoj preparativní TLC a bylo přistoupeno k vyjmutí chromatografické desky z chromatografické komory. Následně bylo poznačeno čelo rozpouštědel (obr. 36).



Obrázek 36: preparativní TLC po vyjmutí z chromatografické komory (označeno čelo a start)

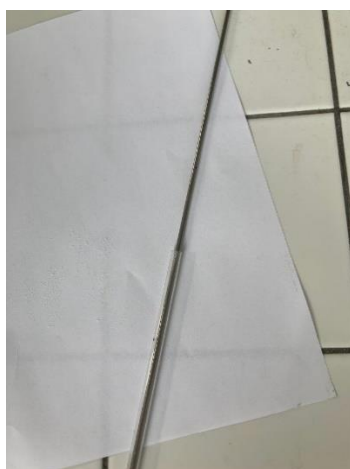
Díky tomu, že byl vypočten retardační faktor, bylo možné odhadnout, jaká bude vzdálenost, kterou urazil betulin-diacetát na preparativní TLC. Vzdálenost mezi startem a čelem byla přesně 15,5 cm, R_f byl vypočten na 0,76923, bylo postupováno následovně:

$$0,76923 = \frac{x}{15,5}$$

$$x = 0,76923 \times 15,5 = 11,92 \text{ cm}$$

Odhadovaná vzdálenost, kterou teoreticky urazil betulin-diacetát na chromatografické desce byla 11,92 cm.

Po vyznačení čela rozpouštědel na preparativní TLC bylo přistoupeno k vypálení nažhaveným ocelovým drátem, aby bylo zjištěno přesné umístění betulin-diacetátu (obr. 37, 38).



Obrázek 37: ocelový drát ve skleněné trubici k vypálení chromatografie



Obrázek 38: přiložený nažhavený ocelový drát na preparativní TLC

Po vypálení ocelovým drátem byla změřena vzdálenost mezi startem a betulin-diacetátem pro ověření R_F (obr. 39).



Obrázek 39: vypálená preparativní TLC – zuhelnatělá skvrna betulin-diacetátu

Hodnota R_F ale vyšla mírně odlišná (reálná vzdálenost od startu do středu skvrny byla 11,5 cm), což bylo způsobeno s největší pravděpodobností tím, že chromatografické desky nebyly nality ve stejnou dobu. Složení lité směsi bylo stejné, ale před provedením chromatografie byly obě desky jinak staré, a tudíž byl pravděpodobně i obsah vlhkosti mírně odlišný. Aby bylo měření co nejpřesnější, bylo by potřeba obě desky vložit na určitý čas a určitou teplotu do sušárny, což nebylo takto provedeno, a proto byl tedy výsledek R_F mírně odlišný. Ale vzhledem k tomu, že identifikace vzorku byla provedena již dříve, nebyl tento rozdíl moc důležitý.

Po změření vzdálenosti a ověření výpočtu R_f bylo přistoupeno k sejmutí zóny, kde se nacházel betulín-diacetát. Tento postup probíhá tak, že se nad a pod místem, kde došlo k zuhelnatění organické látky (betulín-diacetátu) po přiložení nažhaveného ocelového drátu, vyznačila zóna výskytu vzorku. Nejprve byl tedy odškrábnutý pruh tenké vrstvy nad zónou, kde se nacházel vzorek. Pak bylo odstraněno vše zuhelnatělé, které se nacházelo v zóně vzorku. Následovalo odškrábnutí samotné zóny se vzorkem na předem připravený čistý papír.

Poté byla na řadě extrakce vzorku ze seškrábnuté směsi. Pro toto byla vzata trubice, do které byl vložen malý smotek vaty, a na tento smotek vaty byla vsypána směs (obr. 40).



Obrázek 40: trubice s vatou a směsí z preparativní chromatografie betulín-diacetátu

S takto připravenou trubicí s vatou a vsypanou směsí bylo potřeba opatrně poklepat na měkkou podložku, aby se nevyskytovaly vzduchové mezery ve směsi a nedocházelo k obtékání rozpouštědla kolem směsi. Když byla trubice se směsí připravena, byla upevněna do stojanu. Vzhledem k tomu, že se jednalo o kvantitativní zhodnocení, bylo také přistoupeno ke zvažení baňky, do které vytékala směs rozpouštědel z trubice. Baňka byla vážena rovnou již s varným kamínkem používaným při následné destilaci směsi. Hmotnost čisté baňky s varným kamínkem byla 132,7248 g.

Pak byla připravena směs rozpouštědel. Tato směs byla zvolena na základě zkušenosti laboranta. Bylo smícháno 30 ml ethylacetátu a 30 ml chloroformu, jelikož se jedná o dostatečně polární rozpouštědla. Tato směs rozpouštědel byla nalita do trubice se vzorkem. Jakmile proběhla extrakce rozpouštědly, mohlo být přistoupeno k destilaci.

Byla sestavena destilační aparatura (obr. 41). Jako zdroj tepla bylo použito topné hnízdo, do kterého dobře pasovala baňka s extraktem. Místo alonže byla použita kádinka s vloženou nálevkou.



Obrázek 41: destilační aparatura (destilace extraktu betulin-diacetátu)

Následně byla provedena destilace. Destilace neproběhla zcela do sucha, aby se vzorek betulin-diacetátu nepřipálil. K dosušení byl vzorek v baňce přenesen do sušárny. Později byl vysušený vzorek v baňce zvážen a vypočítána hmotnost čistého betulin-diacetátu. Hmotnost baňky s vysušeným vzorkem byla 132, 7724 g. Po odečtení hmotnosti prázdné čisté baňky (132, 7248 g) vyšel výsledek čisté hmotnosti získaného betulin-diacetátu 47, 6 g. Tato hmotnost se liší od naváženého množství vzorku acetylce betulinu na betulin-diacetát. Důvodů pro tento rozdíl je více – vzorek obsahoval další příměsi, které se chromatografií oddělily, při nanášení směsi vzorku a rozpouštědla mohlo dojít ke ztrátám, při seškrabávání zóny s betulin-diacetátem mohlo dojít k seškrábnutí užší zóny, než bylo potřebné, došlo ke zuhelnatění v místě přiložení nažhaveného drátu pro zjištění a lokalizaci betulin-diacetátu a tato zuhelnatělá část byla před dalším zpracováním odstraněna.

2.5 POKUSY POUŽITÉ V UČEBNICÍCH CHEMIE PRO ZŠ A SŠ

V teoretické části této práce (kap. 1.7) jsou zmíněny některé dostupné učebnice pro základní a střední školy, ve kterých se objevuje chromatografie. V těchto učebnicích je také zmíněno několik různých pokusů.

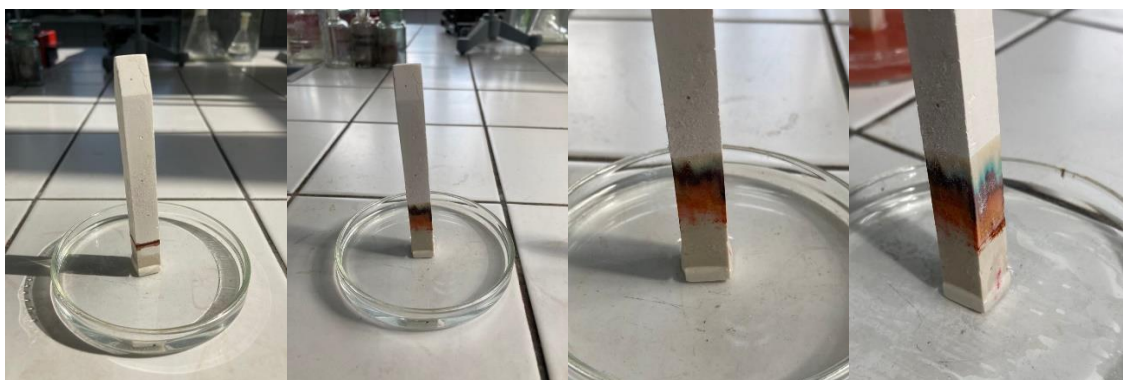
Některé opakující se pokusy byly vyzkoušeny a otestovány. Následuje jejich dokumentace a zhodnocení.

2.5.1 POKUS Z UČEBNICE FRAUS (KAP. 1.7.1.1)

Jako první byl proveden pokus, který je uveden v učebnici nakladatelství Fraus (kap. 1.7.1.1). Pro tento pokus byla zapotřebí křída, ethanol, hnědý fix a Petriho miska.

Při přípravě pokusu nebyl zaznamenán žádný velký problém. Jen je důležité si před postavením křídý do ethanolu v misce zkontrolovat, že křída dobře stojí.

Nejprve tedy byla připravena Petriho miska, do které byl nalit ethanol, mírně pod okraj, celkem asi 0,5 cm. Následně byla na křídě ze všech 4 stran hnědým fixem nakreslena linka (obr. 42) asi ve výšce 1 cm od spodního okraje. Poté byla křída vložena do Petriho misky s ethanolem tak, aby tam dobře stála a aby se linka nedotkla hladiny ethanolu. Pak bylo potřeba již jen vyčkat, až proběhne chromatografie.



Obrázek 42, 43, 44, 45: chromatografie hnědého fixu na křídě v ethanolu

Jak je možné vidět na obrázcích výše (obr. 42, 43, 44, 45), chromatografie hnědého fixu se podařila podle očekávání (obr. 12, 13 v kap. 1.7.1.1). Příprava nebyla časově náročná a rozdělení barev na křídě je pěkně vidět. Složení hnědého fixu (zn. Ikea) je dobře viditelné na obr. 44 a 45 – oranžová, červená, fialová, modrá. Je také dobře vidět, že bylo vhodně zvoleno rozpouštědlo, tedy že došlo ke kompletnímu rozdělení barev a látky nezůstaly na startu, ani nebyly unášeny všechny najednou rychle. Tento pokus byl proveden v pořádku hned napoprvé, a jak již bylo zmíněno výše, bez problémů. Proto je možné tento pokus doporučit i do výuky. Jedná se o práci s relativně bezpečnými látkami (křída, ethanol, fix) a v malých množstvích. Je tedy možné tento pokus provést jako demonstrační, ale také jako žákovský pokus.



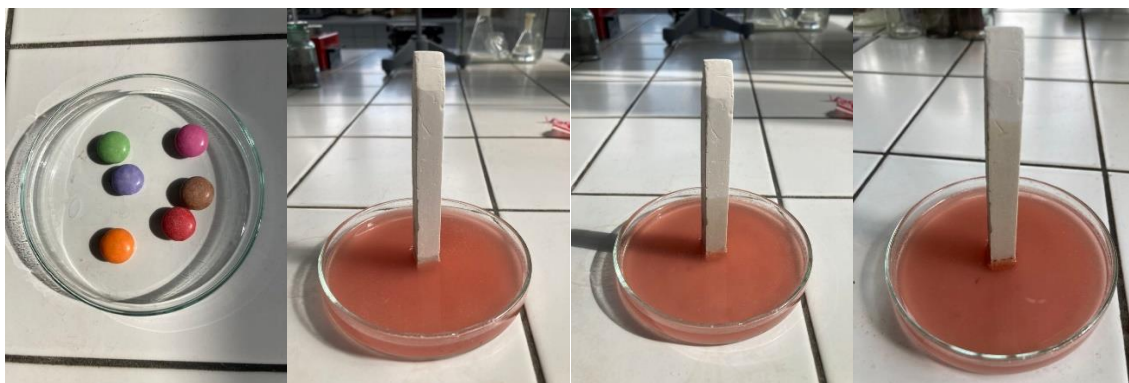
Obrázek 46: chromatografie hnědého fixu na křídě v ethanolu

2.5.2 POKUS Z UČEBNICE NOVÁ ŠKOLA (KAP. 1.7.1.2)

Jako druhý pokus byl prováděn pokus z učebnice nakladatelství Nová škola (kap. 1.7.1.2). Pomůcky pro tento pokus byly lentilky, křída, Petriho miska a voda.

Již při přípravě pokusu nastaly komplikace. V návodu ⁽¹⁹⁾ není uvedeno, jaké lentilky je vhodné použít. Proto byly pro tento pokus zakoupeny obyčejné lentilky, dostupné ve všech obchodech s potravinami – zn. Orion. Při otevření krabičky s lentilkami bylo zjištěno, že jsou lentilky dost světlé. Na obalu krabičky bylo psáno, že jsou barveny pouze přírodními barvivy. V tom byl tedy asi problém. Nicméně i tak bylo přistoupeno k provedení pokusu.

Nejprve byly vloženy lentilky do malého množství vody. Lentilky ve vodě byly míchány, dokud se nerozpustila svrchní barevná část. Poté byly zbytky lentilek z roztoku vyjmuty. Takto připravený roztok byl nalit do Petriho misky a následně byla do středu misky postavena bílá křída. Poté bylo potřeba jen počkat, než proběhne chromatografie (obr. 47, 48, 49, 50).



Obrázek 47, 48, 49, 50: chromatografie lentilek na bílé křídě ve vodě

Jak je pozorovatelné na obrázcích výše (obr. 47, 48, 49, 50), chromatografie neproběhla vůbec podle plánu a podle počátečních představ. Po ukončení chromatografie bylo na křídě možné pozorovat pouze to, že byla mokrá od vzlínající vody. Problém tedy nebyl v tom, že by chromatografie nefungovala, ale v použitém druhu lentilek. Vzhledem k tomu, jak špatně chromatografie dopadla, i přes to, že bylo nakonec použito úplně celé balení lentilek, by bylo vhodné použít jiného zdroje potravinářského barviva.

Je pochopitelné, že autoři ⁽¹⁹⁾ měli snahu využít k pokusu chromatografie nějakou surovinu, se kterou se obvykle žáci setkávají, ale v tomto případě to bylo na škodu a rozhodně by bylo vhodnější využití pokusu s barevným fixem, jako tomu bylo v předchozím pokusu (kap. 2.5.1).

Protože pokus dopadl takto špatně, bylo ozkoušeno ještě ponoření filtračního papíru do chromatografické směsi. Bohužel i tato varianta pokusu měla obdobný výsledek – došlo pouze k namočení a pokroucení filtračního papíru.

Z těchto důvodů není možné pokus do výuky doporučit a zároveň je na místě navrhnout alternativní pokus na téma chromatografie, který bude mít jistější, a hlavně názornější výsledek (viz kap. 2.5.1).

2.5.3 POKUS Z UČEBNICE PRODOS (KAP. 1.7.1.3)

Pokus v této učebnici chemie od nakladatelství Prodos je v podstatě identický s pokusem v učebnici od nakladatelství Fraus (kap. 1.7.1.1), proto nebyl samostatně zkoušen. Rozdílem mezi těmito pokusy je v použitém množství barevných fixů (zde 4, v pokusu učebnice Fraus 1) a v použitém rozpouštědle (zde voda, v pokusu učebnice Fraus ethanol). Při použití vody jako polárnějšího rozpouštědla by mohl být problém v tom, že by byly unášeny složky barviv moc rychle. Použití ethanolu je jistější.

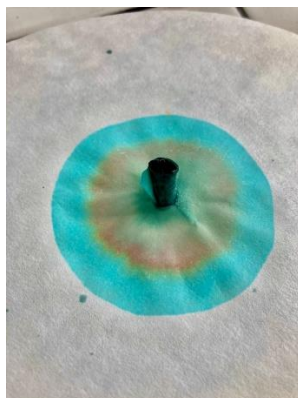
2.5.4 POKUS Z UČEBNICE FORTUNA (KAP. 1.7.1.4)

Třetím prováděným pokusem byl pokus z učebnice od nakladatelství Fortuna (kap. 1.7.1.4). Pomůcky potřebné k provedení tohoto pokusu byly Petriho miska, filtrační papír, ethanol, potravinářská barviva a knot.

Při přípravě pokusu se nenaskytl žádný problém. Byly provedeny dvě menší modifikace původního zadání z důvodu nedostatku materiálu. Místo bavlněného knotu byl

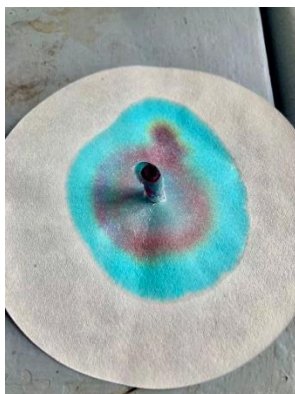
použit smotaný filtrační papír, který ale posloužil stejně vhodně. Místo potravinářských barviv na vaření byla použita barviva na barvení vajíček, tato barviva ale poskytla stejný efekt, jako obyčejná potravinářská barviva.

Nejdříve byla vytvořena směs barviv. V návodu v učebnici ⁽²¹⁾ nebylo udané barevné složení, proto byly vytvořeny 3 varianty. První varianta byla směs modrého, žlutého, zeleného, červeného a fialového barviva (obr. 51). Druhá varianta byla směs modrého, zeleného a fialového barviva (obr. 52). Třetí varianta byla směs zeleného, žlutého a červeného barviva (obr. 53). Tyto směsi byly rozpuštěny v malých množstvích vody. Následně byly použity tři kruhové filtrační papíry, do kterých byly v jejich středech vytvořeny malé díry. Pak byly z pruhů filtračního papíru, který byl smotan, vytvořeny tři knoty. Tyto knoty byly protaženy malými děrami ve filtračních papírech. Poté byla v Petriho miskách připravena rozpouštědla. Jednalo se o směs vody a čistého ethanolu. Nato byla nanesena malá množství směsí barviv do středů filtračních papírů. Takto připravené filtrační papíry s knoty a vzorky směsí byly položeny na Petriho misky naplněné rozpouštědly. Filtrační papír se nesměl dotýkat hladiny rozpouštědla. To bylo vzlínáním skrz knot dopravováno na filtrační papír se vzorky. Takto byla ponechána papírová chromatografie k vyvíjení.



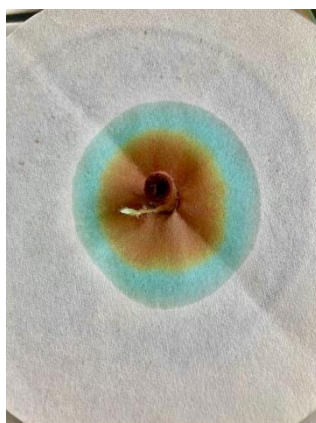
Obrázek 51: chromatografie směsi barviv na papíře v 50% ethanolu

Jak je patrné z obrázku první papírové chromatografie (obr. 51), došlo k rozdělení barviv. Nejrychleji unášené bylo modré barvivo, následovalo žluté barvivo a poté červené barvivo. Je také možné porovnat s původní směsí, kde se kromě těchto tří barev nacházela ještě zelená a fialová, které se ale nevyskytují na chromatogramu. To je způsobeno tím, že zelené barvivo je složeno z modrého a žlutého a fialové z modrého a červeného barviva.



Obrázek 52: chromatografie směsi barviv na papíře v 50% ethanolu

Obrázek druhé papírové chromatografie (obr. 52) také dokazuje, že došlo k rozdělení barviv. Opět je nejrychleji unášeno modré barvivo, následně žluté a nakonec červené. Stejně jako u první chromatografie jsou pozorovatelné tyto tři barvy i přes to, že v původní směsi byly smíchány barvy modrá, zelená a fialová.



Obrázek 53: chromatografie směsi barviv na papíře v 50% ethanolu

Poslední, třetí papírová chromatografie (obr. 53) znázorňuje také rozdělení jednotlivých barviv. Původní směs byla směs barev zeleného, žlutého a červeného barviva. Zde je pozorovatelná nejrychleji unášená modrá, pomaleji unášená žlutá a nejpomaleji unášená červená. Zde se opět zelené barvivo rozdělilo na modrou a žlutou.

Jak je možné pozorovat na obrázcích výše (obr. 51, 52, 53), chromatografie směsí barviv byla úspěšná. Ani příprava těchto pokusů nebyla náročná a nebyl problém v improvizaci při absenci některých potřebných pomůcek a chemikálií. Tento pokus je dobrou demonstrací skládání barev. Pro provedení ve výuce by bylo vhodné žákům dát rovnou namíchanou směs barviv s tím, že by se po provedení chromatografie měli snažit odhadnout původní složení barviv. V případě použití potravinářských barviv by mohl být

pokus ještě zajímavější, pokud by byla použita barviva obsahující např. kyselinu karmínovou, azorubin či košenilová červeň A – různé odstíny červené a další.

2.5.5 POKUS Z UČEBNICE SCIENTIA (KAP. 1.7.2.1)

Pokusem v jediné z mně dostupných učebnic pro SŠ (obsahující pokus a informace o chromatografii) od nakladatelství Scientia (kap. 1.7.2.1) byl alterací na kombinaci pokusů již vyzkoušených (kap. 2.5.1 a kap. 2.5.4). Proto tento pokus nebyl samostatně zkoušen. Obecně lze ale říci, že, i jak uvádí Jordánová⁽²⁸⁾ ve své diplomové práci, je vhodné jako rozpouštědlo použít místo vody buď čistý ethanol či (mnou nevyzkoušenou) směs rozpouštědel (voda, butanol, ocet, v poměru 2:2:1) uvedenou v učebnici⁽²²⁾, kde se popis pokusu nachází.

2.6 NÁVRH LABORATORNÍ PRÁCE ZA POUŽITÍ TLC VE VÝUCE NA SŠ

Vzhledem k tomu, že je TLC jednoduchou, rychlou a levnou metodou, neměl by být problém ji využívat ve výuce chemie jako demonstrační pokus či na střední škole jako součást laboratorních cvičení. Vzhledem ke slabému zastoupení pokusů chromatografie v učebnicích pro SŠ (kap. 1.7.2) by bylo vhodné zvolit pokus, který nebude pro studenty tak abstraktní, jako je například práce s betulinem. Zároveň by ale bylo vhodné zvolit pokus poněkud složitější, než jsou ukázky uvedeny v učebnicích pro ZŠ (kap. 1.7.1). Proto jsem zvolila pokus, který částečně kombinuje práci s TLC a zároveň práci s látkou, která je barevná – jehličí.

2.6.1 LABORATORNÍ PRÁCE: SEPARACE A TLC BARVIV JEHLIČÍ SMRKU (⁽²⁹⁾)

Návrh modifikace laboratorní práce, převzaté z literatury⁽²⁹⁾, separace a TLC barviv jehličí:

Úkol: Nejprve provedte extrakci jehličí, poté provedte separaci jednotlivých složek extraktu na komerční TLC desce.

Chemikálie: písek, jehličí, aceton, diethylether

Pomůcky: váha, třecí miska, nůž, odměrný válec, stojan, nálevka, filtrační papír, skleněná tyčinka, kádinka, chromatografická komora, TLC deska, skleněná kapilára/injekční stříkačka, krycí sklo, pipety

Postup:

1. Nejprve navažte 2 g jehličí, to poté nakrájejte nožem na malé kousky.
2. Všechno nakrájené jehličí přesuňte do třecí misky, do které přidejte malé množství písku a 12 ml acetonu. Tuto směs následně třete, dokud jehličí částečně neztratí svou zelenou barvu.
3. Sestavte filtrační aparaturu a směs přefiltrujte.
4. Na komerční TLC desku naneste 2-3 mm širokou souvislou linii filtrátu a nechte uschnout.
5. Připravte chromatografickou komoru, do které dejte přiměřené množství diethyletheru a vložte chromatografickou desku s naneseným vzorkem. Přikryjte chromatografickou komoru a nechte vyvíjet.
6. Jakmile dosáhne mobilní fáze asi 0,5 cm od horního okraje TLC desky, vyjměte desku z komory.
7. Pozorujte a popište výsledek TLC. (Příklady otázek: Jaký je počet skvrn?, Vypočtete R_F , Jakou mají skvrny barvu?, Jakým látkám by mohly odpovídat?,..)

2.6.1.1 Ověření navržené laboratorní práce

Pro ujištění, že je navržená laboratorní práce funkční, bylo provedeno ověření tak, že byla laboratorní práce vyzkoušena dle návodu uvedeného v kap. 2.6.1.

Pomůcky a chemikálie viz kap. 2.6.1. Z důvodu nedostatku písku byla použita skelná drť, která byla vytvořena rozdrčením zbytků skleněných trubic ve třecí misce. Tento krok je ale pro použití ve výuce velmi nevhodný, vzhledem k tomu, že při drcení skleněných trubic vznikají velmi malé a velmi ostré kousky skla. Zároveň je při přípravě skelné drti nutné mít nasazený ochranný štít, protože při drcení mohou malé kousky skla odlétávat mimo třecí misku. Ani již hotová skelná drť není vhodná pro použití při výuce. Její funkci může dobře nahradit právě v návodu zmíněný písek. Pro potřeby ověření funkčnosti návodu laboratorní práce ale skelná drť postačila.

Nejprve bylo tedy nasbíráno jehličí. Bylo použito jehličí ze smrku stříbrného. Čerstvé jehličí bylo nastříháno nůžkami na malé kousky. Poté bylo naváženo na vahách 2 g

nastříhaného jehličí. Nastříhané jehličí bylo přesunuto do třecí misky, ve které byla na začátku připravena skelná drť. Následně byl do třecí misky se skelnou drtí a nastříhaným jehličím pipetou vpraven aceton o objemu 12 ml. Již při přidání acetonu se začalo z jehličí uvolňovat zelené barvivo. Tato směs byla třena v třecí misce, dokud jehličí částečně neztratilo svou zelenou barvu. Pak byla sestavena jednoduchá filtrační aparatura a směs ze třecí misky byla přefiltrována (obr. 54).



Obrázek 54: filtrace směsi barviv z jehličí v acetonu

Vzhledem k tomu, že se jednalo o ověření funkčnosti laboratorní práce, nebylo nutné dělat chromatografii na velké desce. Proto byla odstřižena malá část z komerční chromatografické desky o rozměru asi 3x7 cm. Na tuto malou chromatografickou desku byl s pomocí skleněné kapiláry nanášen filtrát. Kapilára byla opět využita z důvodu testování laboratorní práce. Při samotné laboratorní práci lze využít na větší desce kapátko či injekční stříkačku. Filtrát byl nanášen v tenké souvislé linii asi 0,5 cm od spodního okraje chromatografické desky (obr. 55).



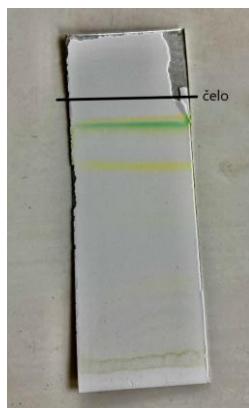
Obrázek 55: nanášení filtrátu na chromatografickou desku

Mezitím, co byl nanesen filtrát na chromatografickou desku a odpařovalo se rozpouštědlo, byla připravena chromatografická komora. Do této komory byl dle návodu pipetou odměřen diethylether. Vzhledem k tomu, že se jednalo o malou chromatografickou komoru a malou chromatografickou desku, byly použity asi 2 ml diethyletheru. Do takto připravené chromatografické komory s rozpouštědlem byla vložena chromatografická deska s naneseným vzorkem barviv jehličí a chromatografická komora byla přikryta sklíčkem. Vývoj a průběh chromatografie byl průběžně sledován (obr. 56).



Obrázek 56: chromatografie barviv jehličí v diethyletheru

Jakmile byla chromatografie hotová, byla chromatografická deska vyjmuta z komory a bylo poznačeno čelo rozpouštědla (obr. 57).



Obrázek 57: chromatografie barviv jehličí smrku stříbrného

Vzdálenost čela a startu činila přesně 6 cm. Na chromatogramu (obr. 57) je pozorovatelných několik stop barviv. Nejrychleji unášená je žlutooranžová, která má vzdálenost od startu 5,6 cm, následovaná je zelenou se vzdáleností 5,5 cm a žlutozelenou se vzdáleností 5,4 cm. Pak je odstup a objevuje se stopa výrazné žluté, která má vzdálenost

od startu 4,5 cm. Velmi málo patrné jsou ještě tři další stopy se vzdálenostmi od startu 3,3 cm, 1,7 cm a 1 cm a jedná se o nějaké bezbarvé látky.

Pokud by byl počítán R_F (kap. 1.2.3.4), vycházel by přibližně takto: první stopa: 0,933, druhá stopa 0,9, třetí 0,883, čtvrtá 0,75, pátá 0,55, šestá 0,283 a sedmá 0,166. Tento úkon může sloužit studentům k procvičení výpočtu retardačního faktoru.

Cílem této laboratorní práce není určení konkrétních složek barviv jehličí, ale důkaz toho, že zdánlivě jednobarevná přírodnina je složena z několika různých barviv.

2.6.2 LABORATORNÍ PRÁCE: SEPARACE A TLC BARVIV LISTÍ JAVORU

Pro zajímavost a porovnání byla provedena laboratorní práce také se zeleným listím javoru. Postup byl naprosto identický, až na separovaný materiál – listí javoru. Na obrázku níže (obr. 58) je možné vidět rozetřenou směs 2 g listů z javoru, skleněné drti a 12 ml acetonu.



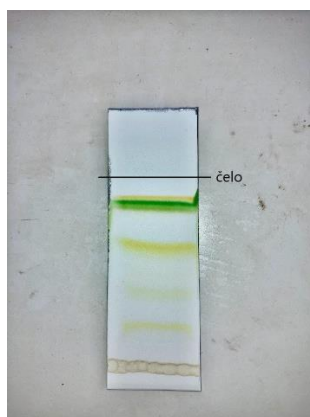
Obrázek 58: rozetřená směs javorových listů, skleně drti a acetonu

V postupu a přípravě pokusu nebyl rozdíl mezi jehličím a listím. V čem ale rozdíl byl, je chromatografie. Již od začátku chromatografie byl patrný rozdíl v barvách a také v sytosti (obr. 59).



Obrázek 59: chromatografie barviv listí v diethyletheru

Jakmile proběhla chromatografie barviv listí, byla chromatografická deska vyjmuta z komory, označeno čelo rozpouštědel a celý proces byl zdokumentován.



Obrázek 60: chromatografie barviv listí javoru

Vzdálenost čela a startu činila 4,5 cm. Na chromatogramu (obr. 60) je pozorovatelných několik stop barviv. Nejrychleji unášená je žlutooranžová, která má vzdálenost od startu 4 cm, následovaná je tmavě zelenou se vzdáleností 3,9 cm a světle zelenou se vzdáleností 3,8 cm. Pak je patrný odstup a objevuje se stopa výrazné žluté, která má vzdálenost od startu 2,9 cm. Méně patrné jsou ještě dvě další stopy se vzdálenostmi od startu 1,8 cm a 1 cm, které mají obě nažloutlou barvu.

Pokud by opět i zde probíhal výpočet R_f (kap. 1.2.3.4), vycházel by přibližně takto: první stopa 0,889, druhá stopa 0,867, třetí 0,844, čtvrtá 0,644, pátá 0,4 a šestá 0,222.

2.6.3 POROVNÁNÍ OBOU TLC (JEHLÍČÍ A LISTÍ)

Vzhledem k tomu, že byly vyzkoušeny obě varianty postupů, je možné je porovnat a zhodnotit (obr. 61).



Obrázek 61: porovnání TLC jehličí a TLC listí (vlevo jehličí, vpravo listí)

Výhodou jehličí je to, že je možné je sehnat celoročně, tedy provedení laboratorní práce není vázáno na roční období. Naopak u listí je problém v pozdních podzimních, zimních a brzkých jarních měsících s dostupností listí. Výhodou listí je ale to, že např. na podzim je možné provádět laboratorní práci s různě barevnými listy, a tudíž dokazovat různé složení barviv listů u stejného druhu listí. Pro provedení laboratorní práce ale není nutné trvat na tom, že půjde o listí, je možné použít jakoukoli zelenou rostlinu. Tím pádem by tedy odpadl problém u ročního období.

Co se zpracování týče, lepší manipulace a práce byla pozorována při zpracování listí. Lépe docházelo k rozmělnění a lépe byla získána barviva. Tomu také odpovídá sytost chromatografie, do filtrátu se dostalo větší množství barviv než z jehličí. Zároveň se u listí vyskytuje více barevných stop, takže i z didaktického hlediska se jeví listí jako lepší varianta použití při provádění laboratorní práce.

ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na použití planární chromatografie ve výuce chemie, rozbor učebnic chemie obsahujících chromatografii, testování pokusů uvedených v učebnicích a návrh laboratorní práce na téma chromatografie.

V teoretické části práce je uveden zařazení a popis betulinu, kterého se týkají postupy v experimentální části práce. Následně jsou zde popisovány použité separační metody využitě v průběhu provádění experimentální části práce. Podrobněji je rozebrána separační metoda chromatografie, která je zde dělena do několika kapitol. V rámci tématu chromatografie je v kapitole 1.2.3.4 rozebírán retardační faktor. V další kapitole je část věnována stanovení teploty tání, které se ale tato práce podrobněji nevěnuje, jelikož toto bylo tématem bakalářské práce ⁽²⁶⁾. Poté teoretická část obsahuje popis acetylce betulinu a přeměny betulin-diacetátu na betulin-monoacetát, která byla prováděna na vzorku betulinu v souvislosti s experimentální částí (kap. 2.3.), a také používaná rozpouštědla. Vzhledem k tomu, že stěžejním bodem této práce je chromatografie, následuje kapitola (1.6) o jejím zařazení v rámci kurikulárních dokumentů. Zde bylo zjištěno, že se explicitně chromatografie v kurikulárních dokumentech nevyskytuje či se vyskytuje velmi okrajově. To může značit malé využívání této metody během výuky chemie. Vzhledem k malému výskytu tématu chromatografie v kurikulárních dokumentech je v následující kapitole (1.7) rozbor vybraných učebnic chemie, ve kterých se chromatografie vyskytuje. Její zastoupení v učebnicích obecně opět není nijak významné či rozsáhlé. Mnohem více se vyskytuje zmínka o chromatografii v učebnicích pro ZŠ, v učebnicích pro SŠ se chromatografie vyskytuje jen velmi málo. Zároveň se v učebnicích vyskytují jednoduché základní pokusy, které jsou zkoušeny v experimentální části práce (kap. 2.5).

Experimentální část práce je věnována nejprve práci se sklem, kde je popsáno zhotovení skleněných kapilár a skleněného balonku, používaných při nanášení směsi vzorků látek při chromatografii. Kapiláry jsou používány v pokusech týkajících se analytické chromatografie a skleněný balonek je používán při chromatografii preparativní. Pro získání čistého betulinu byla využita extrakce s pomocí Soxhletova extraktoru. Následně je popsána acetylce vzorků betulinu, kdy vzniká betulin-diacetát. Po acetylaci byla také provedena na části vzorku betulin-diacetátu jeho přeměna na betulin-monoacetát.

Úspěšnost acetylace byla ověřena s pomocí analytické TLC. Následně byla zjišťována čistota vzorku acetylace s pomocí preparativní TLC. Zároveň byl proveden výpočet retardačního faktoru, který byl porovnán s analytickou TLC. Výsledný R_F nesl malé rozdíly, které byly způsobeny několika důvody, uvedenými v kapitole 2.4. V kapitole 2.5 jsou testovány vybrané pokusy, nacházející se v učebnicích chemie. Je zde uvedeno také jejich zhodnocení. První pokus z učebnice nakladatelství Fraus ⁽¹⁸⁾ byl proveden s úspěchem, proto je možné jej doporučit k využívání ve výuce. Je jednoduchý a názorný. Ovšem pokus uvedený v učebnici od nakladatelství Nová škola ⁽¹⁹⁾ se vůbec nepodařil. Bylo to pravděpodobně způsobeno špatnou volbou lentilek. Bohužel v návodu nebyla uvedena vhodná značka, proto byly zakoupeny nejčastěji dostupné lentilky, se kterými ale pokus vůbec nevyšel. Proto tento pokus nemůže být doporučen. Je navrženo využití předchozího pokusu. Pokus uvedený v učebnici nakladatelství Fortuna byl proveden úspěšně. Rozdělení směsi barviv by mělo větší efekt v momentě, kdy by žáci dostali již namíchanou směs a nevěděli by, z jakých všech barviv je složena. I to je uvedeno v návrhu modifikace tohoto pokusu.

Poslední kapitola této diplomové práce je věnována návrhu laboratorní práce, která by byla využitelná při výuce na střední škole. Vzhledem k dříve uvedeným pokusům, které jsou rychlé a jsou vhodné např. na základní školu, nebylo nalezeno dostatek pokusů vhodných k rozšíření znalostí a také dovedností v oblasti chromatografie. Proto byla navržena laboratorní práce ve dvou modifikacích týkající se chromatografie rostlinných barviv obsažených v jehličí a listech stromů. Obě tyto verze byly vyzkoušeny a dle výsledků bylo zjištěno, že lepší výsledek byl dosažen při chromatografii listů javoru.

Obecně se tato práce zabývala chromatografií, rozšiřovala informace a znalosti uvedené v bakalářské práci ⁽²⁶⁾ a navrhovala aplikaci do výuky chemie. Práce pro mě byla přínosem, protože budu moci tyto navržené pokusy a laboratorní práce využít ve své praxi.

RESUMÉ

Tato práce je rozdělena do dvou částí – do teoretické a experimentální. Teoretická část práce obsahuje popis betulinu, patřícího do triterpenů. Dále se zabývá popisem používaných separačních metod (extrakce, destilace, TLC). Kromě toho také obecná definice acetylace a hydrogenace. V teoretické části jsou také popisována používaná rozpouštědla, klasifikace chromatografie v kurikulárních dokumentech a chromatografie vyskytující se v učebnicích chemie pro základní i střední školy.

Experimentální část práce se zabývá výrobou skleněných kapilár a skleněného balónku, provedením extrakce betulinu, acetylací a hydrogenací vzorků extrakce betulinu a následnou preparativní chromatografií vzorku acetylace betulinu a výpočtu R_F . Pak se v této části práce objevují ověřovací pokusy již zmíněných postupů vyskytujících se v učebnicích chemie. A na závěr také návrh laboratorní práce do výuky chemie na téma TLC.

This work is divided into two parts – theoretical and experimental. The theoretical part of the work contains description of betulin, which belongs to triterpenes. It also deals with the description of the used separation methods (extraction, distillation, TLC). Also there is a definition of acetylation and hydrogenation. The theoretical part describes the used solvents, the classification of chromatography in curricular documents and chromatography occurring in chemistry textbooks for ZŠ and SŠ.

The experimental part of the work deals with the manufacturing of glass capillaries and glass balloon, extraction of betulin, acetylation and hydrogenation of betulin. Next there is preparative chromatography of the sample of acetylation of betulin and calculation of R_F . Then, in this part of the work, there is verification of experiments, which were already mentioned in theoretical part and appear in chemistry textbooks. And finally, there is a design for laboratory work for the topic of TLC.

SEZNAM LITERATURY

1. **Klinotová, E., Klinot, J., Máca, B., Trnka, T., Všetečka, V.:** *Základní cvičení z organické chemie*. Praha : Skripta Přírodovědecké fakulty UK v Praze, 1980.
2. **Vašmucius, V.:** *Přehled reakcí triterpenoidních sloučenin*. Plzeň : Diplomová práce, Západočeská univerzita v Plzni, 1995.
3. **Betulinines: Triterpeny.** [Online] [Citace: 10. 6 2022.] Dostupné z : <https://www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny>.
4. **Trnka, T.:** *Organická chemie pro posluchače nechemických oborů*. Praha : Karolinum, 2002. 978-80-214-4769-1..
5. **Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J.:** *Nat. Prod. Rep.* 23, 394. 2006.
6. **Záruba, K.:** *Analytická chemie*. Praha : VŠCHT Praha, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
7. **Richtr, V.:** *Semimikrotechnika v organické chemii*. Plzeň : FPE ZČU v Plzni, 1993. ISBN 80-7043-066-4.
8. **Cídllová, H.:** *Laboratorní technika: Destilace. Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, Brno 2008.* [Online] [Citace: 23. 3. 2022.] Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/destilace.html>.
9. **Destilace. In. Pngegg.cz.** [Online] [Citace: 10. 6 2022.] Dostupné z: <https://www.pngegg.com/cs/png-csojt/download>.
10. **Richtr, V., Kraitr, M.:** *Tenkvrstvá chromatografie ve výuce* .Plzeň : Sborník katedry chemie ZČU, 2004.
11. **Gasparič, J., Churáček, J.:** *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin. Laboratorní příručka*. Praha : SNTL, 1981.
12. **Richtr, V., Rajglová, J.:** *Využití bodotávku s mikroskopem v experimentální výuce katedry chemie FPE ZČU v Plzni*. Plzeň : Sborník prací společné vědeckovýzkumné činnosti studentů a učitelů katedry chemie FPE ZČU v Plzni, 2005. 80-7020-153-3.
13. **Mikeš, O. a kol.:** *Laboratorní chromatografické metody*. Praha : SNTL, 1980.
14. **Školský zákon 561/2004 Sb.** Praha : MŠMT, 2022. [Online] [Citace: 13. 6. 2022] Dostupné z: <https://www.msmt.cz/dokumenty-3/skolsky-zakon>
15. **Rámcový vzdělávací program pro gymnázia.** Praha :MŠMT, 2007. [Online] [Citace: 13. 6. 2022] Dostupné z: <https://www.edu.cz/rvp-ramcove-vzdelavaci-programy/ramcove-vzdelavaci-programy-pro-gymnazia-rvp-g/>
16. **Školní vzdělávací program.** Plzeň : Gymnázium Mikulášské náměstí, 2021. [Online] [Citace: 13. 6. 2022] Dostupné z: https://www.mikulaske.cz/wp-content/uploads/2021/10/SVP2122v_mpr.pdf
17. **Tematický plán - chemie.** Náchod : Gymnázium Náchod, 2018. [Online] [Citace: 13. 6. 2022] Dostupné z: <https://www.gymnachod.cz/wp-content/uploads/2018/12/TP-Ch.pdf>
18. **Škoda, J., Doulík, P.:** *Chemie 8*. Plzeň : Fraus, 2018. 978-80-7489-396-4.
19. **Mach, J., Plucková, I., Šibor, J.:** *Chemie 8 - úvod do obecné a anorganické chemie*. Brno : Nová škola, 2017. 978-80-7289-922-7.

20. Karger, I., Pečová, D., Peč, P.: *Chemie I*. Olomouc : Prodos, 2001. 80-7230-027-X.
21. Beneš, P., Pumpr, V., Banýr, J.: *Základy praktické chemie 1*. Praha : Fortuna, 1999. 80-7168-638-7.
22. Eisner W., Fladt R., Gietz P., Justus A., Laitenberger K., Schierle W.: *Chemie pro střední školy 1a*. Praha : Scientia, 1996. 80-7183-043-7.
23. Betulin. In: **chemicalbook.com**. [Online] [Citace: 2. 6 2022.] Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1301612.htm.
24. Betulin diacetát. In: **chemicalbook.com**. [Online] [Citace: 2. 6 2022.] Dostupné z: https://m.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5707113.htm
25. Betulin monoacetát. In: **chemicalbook.com**. [Online] [Citace: 2. 6 2022.] Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1301612.htm
26. Váňová, A.: *Bakalářská práce. Jednoduché reakce lupanových derivátů*. Plzeň : Západočeská univerzita v Plzni, 2020.
27. Richtr, V., Kraitr, M., Nápravník, V.: *Preparativní tenkovrstvá chromatografie jako součást variabilních postupů experimentální výuky budoucích učitelů chemie v Plzni*. Plzeň : Západočeská univerzita v Plzni, 2005.
28. Jordánová, E.: *Diplomová práce. Využití chromatografie ve výuce chemie*. Plzeň : Západočeská univerzita v Plzni, 2016.
29. Separace a TLC barviv jehličí. In: **bioorganickachemie**. [Online] [Citace: 1. 6. 2022] Dostupné z: <http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/wp-content/uploads/2014/10/7-Preparativn%C3%AD-tenkovrstv%C3%A11-chromatografie-separace-barviv-jehlici%C4%8D%C3%AD-borovice.pdf>.

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ

Obrázek 1: isopren (2-methylbuta-1,3-dien)	5
Obrázek 2:betulin	6
Obrázek 3:Soxhletův extraktor (převzato z ⁽⁶⁾).....	7
Obrázek 4: destilace (převzato z ⁽⁹⁾).....	8
Obrázek 5: schéma sypané TLC v chromatografické komoře s mobilní fází (převzato z: ⁽¹⁰⁾)	11
Obrázek 6: schéma lité TLC v chromatografické komoře s mobilní fází (převzato z: ⁽¹⁰⁾). 11	
Obrázek 7: výpočet R_F (převzato z: ⁽¹⁰⁾).....	13
Obrázek 8: Koflerův blok: 1-mikroskop, 2-kovový blok, 3-reostat, 4-klička pro regulaci teploty, 5-vypínač ohřevu, 6-teploměr, 7-osvětlení teploměru, 8-trafo k napájení žárovek, 9-okulár, 10-ostření mikroskopu, 11-ostření stupnice teploměru, 12-nastavení sledování stupnice teploměru (převzato z: ⁽¹²⁾).....	14
Obrázek 9: RVP chemie – obecná chemie – soustavy látek a jejich složení (převzato z: ⁽¹⁵⁾)	17
Obrázek 10: ŠVP chemie – první ročník 4letého gymnázia Plzeň (převzato z: ⁽¹⁶⁾)	18
Obrázek 11: tematický plán – gymnázium Náchod – chemie pro kvintu/1. ročník (převzato z: ⁽¹⁷⁾).....	18
Obrázek 12: chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁸⁾).....	20
Obrázek 13: chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁸⁾).....	20
Obrázek 14: laboratorní práce – chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁸⁾)....	22
Obrázek 15: chromatografie – učebnice chemie 8 (převzato z: ⁽¹⁹⁾).....	23
Obrázek 16: chromatografie – učebnice chemie I (převzato z: ⁽²⁰⁾).....	24
Obrázek 17: laboratorní práce – chromatografie – učebnice chemie I (převzato z: ⁽²⁰⁾)	25
Obrázek 18: chromatografie – učebnice základy praktické chemie (převzato z: ⁽²¹⁾).....	26
Obrázek 19: chromatografie – učebnice chemie pro střední školy 1a (převzato z: ⁽²²⁾)	27
Obrázek 20: 1 – vytažení kapiláry, 2 – vyfouknutí balónku, 4 – odříznutí zbytku trubice. 29	
Obrázek 21: 3 – vytažení druhé kapiláry.....	29
Obrázek 22: schéma čištění extraktu březové kůry při zisku betulinu	30
Obrázek 23: betulin ⁽²³⁾	31
Obrázek 24: betulin-diacetát ⁽²⁴⁾	31
Obrázek 25: 1 – TLC reakční směsi po 1 hodině, 2 – TLC reakční směsi po 2 hodinách, 3 – TLC reakční směsi po 4 hodinách, 4 – TLC reakční směsi po 7 hodinách, 5 – betulin-diacetát, reakční směs, betulin, 6 – filtrát, betulin, filtrát, 7 – filtrát, betulin, krystaly, betulin-monoacetát	31
Obrázek 26: betulin-diacetát ⁽²⁴⁾	31
Obrázek 27: betulin-monoacetát ⁽²⁵⁾	31
Obrázek 28: chromatografická deska s rýhou a vrypy	32
Obrázek 29: vývojová komora s chromatografickou deskou a nanesenými vzorky a standardem.....	32
Obrázek 30: chromatografická deska s nanesenými standardem a vzorky – A: vzorek A, B: vzorek B, 1: čistý betulin.....	33
Obrázek 31: preparativní chromatografická deska (20 x 20 cm)	33
Obrázek 32: 80 mg vzorku acetylce betulinu	34
Obrázek 33: nanášení směsi pomocí balónku na chromatografickou desku.....	34
Obrázek 34: chromatografická deska v chromatografické komoře se směsí rozpouštědel. 35	

Obrázek 35: analytická TLC pro výpočet R_F	36
Obrázek 36: preparativní TLC po vyjmutí z chromatografické komory (označeno čelo a start).....	37
Obrázek 37: ocelový drát ve skleněné trubici k vypálení chromatografie	37
Obrázek 38: přiložený nažhavený ocelový drát na preparativní TLC	38
Obrázek 39: vypálená preparativní TLC – zuhelnatělá skvrna betulin-diacetátu	38
Obrázek 40: trubice s vatou a směsí z preparativní chromatografie betulin-diacetátu.....	39
Obrázek 41: destilační aparatura (destilace extraktu betulin-diacetátu).....	40
Obrázek 42, 43, 44, 45: chromatografie hnědého fixu na křídě v ethanolu	41
Obrázek 46: chromatografie hnědého fixu na křídě v ethanolu	42
Obrázek 47, 48, 49, 50: chromatografie lentilek na bílé křídě ve vodě.....	42
Obrázek 51: chromatografie směsi barviv na papíře v 50% ethanolu	44
Obrázek 52: chromatografie směsi barviv na papíře v 50% ethanolu	45
Obrázek 53: chromatografie směsi barviv na papíře v 50% ethanolu	45
Obrázek 54: filtrace směsi barviv z jehličí v acetonu.....	48
Obrázek 55: nanášení filtrátu na chromatografickou desku	48
Obrázek 56: chromatografie barviv jehličí v diethyletheru.....	49
Obrázek 57: chromatografie barviv jehličí smrku stříbrného.....	49
Obrázek 58: rozetřená směs javorových listů, skelné drti a acetonu.....	50
Obrázek 59: chromatografie barviv listí v diethyletheru.....	51
Obrázek 60: chromatografie barviv listí javoru.....	51
Obrázek 61: porovnání TLC jehličí a TLC listí (vlevo jehličí, vpravo listí).....	52
