

# Vees lahustuvate vitamiinide planaarkromatograafiline määramine.

31.08.15

<http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/vita.pdf>

## 1 Sissejuhatus

### 1.1 Meetodi olemus.

Planaarkromatograafia on kromatograafiliste meetodite perre kuuluv ainete lahutamise ja määramise meetod, mis võimaldab teostada keeruliste segude komponentide kvalitatiivset ja vahel harva ka kvantitatiivset analüüsi. Määratavad ained kantakse kapillaari, mikrosüstla või spetsiaalse aplikaatori abil sorbendikihi laigu või triibuna. Sorbendikihi võib kasutada klaas-, plast- või metallplaadile kantud peeneteralise materjali (silikageeli, tselluloosi, alumiiniumoksiidi, ioniidi) kihti paksusega 0,05...0,2 mm. Sorbendi asemel võib kasutada ka poorset materjali (paberit, plasti jne.).

Laigu või triibu tsentri pealekandmise kohta plaadil nimetatakse stardijooneks. Ainete lahutamiseks asetatakse plaat otsapidi kromatografeerimisnõus paiknevasse eluenti, mis kapillaarjõudude toimel hakkab liikuma piki sorbendi kihti ülespoole. Eluendi, sorbendi ja lahutatavas segus olevate ainete molekulide vahel eksisteerivate vastasmõjude tõttu toimub eluendi liikumise käigus segu lahutumine komponendideks. Elueerimisprotsess lõpetatakse kui eluendi front on jõudnud plaadi ülaservast 5-10 mm kaugusele. See kaugus tähistatakse plaadil ning seda joont nimetatakse lõpujooneks.

Eluendi poolt läbitud vahemik (elueerimistee  $h_0$ , mm) saadakse stardijoonest ja lõpujoone vahelise distantsi mõõtmisel.

Lahutatud ainete nähtavaks tegemiseks (juhul kui nad ei ole värvilised) kasutatakse mitmeid võtteid: keemilised reaktsioonid, fluorestsentsindikaatorite lisamine sorbendikihti plaatide valmistamise käigus või nende lahustega plaadi pritsimine koos järgneva vaatlusega ultravioletvalguses.

Kuna ainete poolt läbitud vahemaa on erinev, saab nende erinevat liikuvust kasutada ainete kvalitatiivseks määramiseks. Seega iseloomustab ainelaigu tsentri kaugus stardijoonest  $h_x$  (mm) seda, millise ainega on tegemist. Paremini iseloomustab aineid nende liikuvust (suhteline retentsioon), mis leitakse järgmisest valemist:

$$R_F = \frac{h_x}{h_0}$$

Eeldusel, et sorbendikihi on kantud alati sama suur kogus proovi, saab ainete kvantitatiivseks määramiseks kasutada ka laigu intensiivsust: mida suurem laik seda rohkem on segus antud komponenti. Laikude intensiivsust hinnatakse võrdlemisel uuritava aine kindlate koguste laikude intensiivsusega kas visuaalselt või densitomeetrit (optilise tiheduse mõõtmise seade) kasutades.

### 1.2 Vees lahustuvad vitamiinid.

Vees lahustuvatest vitamiinidest on ravis ja profülaktilises meditsiinis enamkasutatavad vitamiin C (askorbiinhape), B<sub>1</sub> (tiamiin), B<sub>2</sub> (riboflaviin), B<sub>6</sub> (püridoksiin), B<sub>3</sub> (niatsiin ehk nikotiinhape) ja B<sub>5</sub> (pantoteenhape).

### 1.3 Vees lahustuvate vitamiinide planaarkromatograafiline määramine.

Vitamiinisegu komponentideks lahutamine toimub silikageelsorbendil, mis on kantud õhukese kihina alumiiniumlehele koos kinnitava ainega. Lahutatud ainete visualiseerimiseks asetatakse elueeritud ja kuivatatud plaat ultravioletvalgusallika alla. Tabelis on toodud vitamiinide  $R_F$  väärtused ja laikude värvus ultravioletvalguses.

Vitamiin	$R_F$	Värvus UV-kiirguses
B <sub>1</sub> (tiamiin)	0,40	violetne
B <sub>2</sub> (riboflaviin)	0,30	kollane
B <sub>3</sub> (niatsiin ehk nikotiinhape)	0,36	violetne
B <sub>6</sub> (püridoksiin)	0,49	tumesinine
C (askorbiinhape)	< 0,1	tumesinine

## 2 Töö eesmärk

Vees lahustuvate vitamiinide kvalitatiivne analüüs polüvitamiinide tablettides planaarkromatograafilisel meetodil.

## 3 Seadmed, reaktiivid ja nõud

1. Elueerimisnõu
2. Silikageeliga ja fluorestsentsindikaatoriga plaadid
3. Proovide aplikaatorid (tikud)
4. Keeduklaas 50 ml
5. Lehter
6. Filterpaber
7. Uhmer, uhmrinui
8. UV-lamp
9. Gradueeritud katseklaas
10. Klaasplaat standardlahuste valmistamiseks
11. Joonlaud
12. B<sub>2</sub> – vitamiinipulber
13. Nikotiinhappepulber (B<sub>3</sub>)
14. Askorbiinhappepulber (C)
15. Eluent (kloroform, etanool, atsetoon, konts. NH<sub>4</sub>OH mahuvahekordades 2:2:2:1)
16. Polüvitamiinitablett

## 4 Analüüsi käik

Elueerimisnõusse valada 5 ml eluenti. Nõu sulgeda kaanega ja lasta seista 10-15 min.

Samal ajal, kui toimub elueerimisnõu eluendiaurudega küllastumine, peenestatakse praktikumi juhendaja poolt antud polüvitamiinitablett uhmrus ja lisatakse ~5 ml destilleeritud vett. Saadud segu filtreeritakse läbi filterpaberi keeduklaasi. Analüüsimiseks kasutatakse filtraati.

Silikageeliplaadil märgitakse hariliku pliiatsi abil (silikageeli pinda kahjustamata!) stardijoon 6-8 mm kaugusele plaadi servast. Stardijoonele märgitakse punktadena ka pealekantavate ainete asukohad (4, sh uuritav proov), punktide vahekaugus peaks olema ~10 mm, uuritava proovi asukoht on soovitatav jätta keskele. Plaadi servast peab aine laik jääma vähemalt 5 mm kaugusele, et vältida nn ääreefekti.

Standardaineid kantakse skalpelliotsaga imeväike kogus klaasplaadile (skalpell pesta ja kuivatada korralikult enne järgmise aine võtmist), millele lisatakse selle lahustamiseks tilk deioniseeritud vett. Saadud lahused kanda tikku väävlivaba otsaga pliiatsiga markeeritud punktidele. Laigud sorbendil ei tohi olla suurema läbimõõduga kui 3 mm. Proovilaigud peavad korralikult kuivama enne kui plaat asetatakse elueerimisnõusse.

Pealekantud ainetega silikageeliplaat asetatakse elueerimisnõusse ja nõu suletakse kaanega. Elueerimine lõpetatakse, kui solvendi front on jõudnud 5-10 mm kaugusele plaadi ülaservast (võtub aega ~20-30 min). Märjalt nähtav front märgitakse koheselt pliiatsiga. Plaat kuivatatakse (kuivatusahjus 60° C, 10 min) ning seejärel määratakse laikude asukohad UV-lambi all. Laikude asukohad märgitakse pliiatsi abil piki laigu kontuuri, hiljem märgitakse ära laigu keskpunkt.

Vitamiinide sisaldumine polüvitamiini tabletis tehakse kindlaks võrreldes laikude kaugusi stardijoonest ja värvuste järgi. Saadud tulemusi võrrelda osas 1.3 olevas tabelis toodud andmetega. Selleks mõõdetakse joonlauaga elueerimistee pikkus  $h_0$  (stardijooone ja finišijooone vaheline kaugus) ja laikude tsentrite kaugused stardijoonest ( $h_x$ , mm). Arvutatakse  $R_f$ -väärtused ning võrreldakse standardite ja polüvitamiinis sisalduvate ainete  $R_f$ -väärtusi, et kindlaks määrata, millised vitamiinid sisalduvad polüvitamiini tabletis.

## 5 Töö tulemus

Polüvitamiini tabletis sisalduvate vitamiinide nimetused.