



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

Papírová a tenkovrstvá chromatografie

Jednou z nejrozšířenějších analytických metod je bezesporu chromatografie, umožňující účinnou separaci látek nutnou pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci složek sledovaného vzorku. K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti v systému dvou fází – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé). Různé látky se liší ve svých adsorpčních vlastnostech, v hodnotách rozdělovacích koeficientů, ve svých rozměrech či ve svých nábojích, což lze vše využít v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení. Stacionární fázi může být pevná látka (papír, SiO_2 , Al_2O_3) ale i kapalná fáze zakotvená na pevném nosiči, mobilní fázi pak bývá kapalina či plyn. Z hlediska provedení uspořádání chromatografického zařízení) dělíme chromatografii na plošnou a sloupcovou, z hlediska určujícího mechanismu dělení látky mezi stacionární a mobilní fází pak chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a další.

Papírová chromatografie byla po určitou dobu v praxi nejpoužívanější metodou plošné chromatografie. Její největší výhodou je ekonomicky nenáročné chromatografické médium, využitelné pro separaci širokého množství látek od anorganických iontů až k složitým biomolekulám. Základním separačním mechanismem je v případě papírové chromatografie rozdělovací rovnováha mezi vodou či jiným rozpouštědlem zakotveným v papíru a použitou mobilní fází. U látek s velkým počtem polárních skupin se často uplatňuje jejich silná interakce přímo s celulózou, v takových případech převládá adsorpční mechanismus dělení. Důležitou charakteristikou použitého chromatografického papíru (jedná se o speciální papír, ne např. obyčejný filtrační papír) je průtoková rychlost mobilní fáze – podle ní rozlišujeme chromatografické papíry s rychlým, standardním a pomalým průtokem. Rychlost průtoku významně ovlivňuje dobu separace a samozřejmě i její účinnost. Dodávány jsou však i papíry speciálně upravené – např. hydrofobizované apod.

Před použitím nastříháme chromatografický papír na proužky o minimální délce 10 cm a šířky podle počtu nanášených vzorků. Chromatografii na papíře provádíme buď ve vzestupném provedení, kdy je papír zavěšen v chromatografické komoře a spodním okrajem je namočen do mobilní fáze anebo v sestupném provedení, kdy je papír zavěšen ve vaničce



evropský
sociální
fond v ČR



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

s mobilní fází a ta putuje dolů. Vzorek nanášíme na vyznačený start, který by měl být alespoň 1 cm nad hladinou mobilní fáze, rozestupy mezi jednotlivými nanášenými vzorky by měly být alespoň 0,5 až 1 cm, od okraje papíru pak minimálně 1 cm. Vzorek se nanáší po odstranění rušících látek (např. extrakcí) ve vhodném rozpouštědle mikropipetou či injekční stříkačkou tak, aby skvrna vznikající na startu nebyla příliš rozměrná (raději postupné nanášení po oschnutí předchozí dávky). Při přípravě a nanášení vzorku je třeba brát v úvahu, že příliš velké množství analyzované látky ve vzorku zapříčiňuje tvorbu rozvleklých skvrn. Optimální množství látky ve vzorku se pohybuje v rozmezí 0,1 až 100 μg v závislosti na její rozpustnosti v mobilní fází (čím méně je rozpustná, tím menší množství látky) a na citlivosti detekce. Protože nanášený objem se pohybuje v rozmezí 2 až 20 μl , pohybuje se vhodná koncentrace nanášeného roztoku v rozmezí 0,1 až 5%. Před zahájením vyvíjení chromatogramu je potřeba naplnit chromatografickou komoru (vyšší skleněná nádoba s víkem a stojánkem pro uchycení papíru) mobilní fází a přibližně 15 až 20 min nechat ustavit v komoře rovnováhu par mobilní fáze. Volba složení mobilní fáze ovlivňuje pohyblivost chromatografovaných látek podle pravidla podobné rozpouští podobné. Proto pro polární látky se používají směsi polárních organických rozpouštědel (alkoholy) s vodou a přísadkou kyseliny či báze, nepolární látky se pak chromatografují ve směsích nepolárních rozpouštědel (v takovém případě je třeba atmosféru komory sytit vodními parami z mističky s vodou). Pohyblivost látky na chromatogramu se vyjadřuje hodnotou R_F , která se určuje jako poměr vzdálenosti, kterou urazí skvrna stanovené látky ku vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla. Při papírové chromatografii je vhodná vzdálenost, kterou urazí na chromatogramu čelo rozpouštědla asi 5 až 10 cm. Detekce chromatografovaných látek se provádí po vyjmutí papíru a jeho vysušení buď přímo vizuálně, pokud jsou chromatografované látky barevné, nebo se využívá jejich fluorescence pod UV zářením, či se provádí postřik detekčním činidlem za vzniku barevných skvrn. Univerzální detekční činidlo představuje konc. kyselina sírová, protože většina organických látek pod jejím dehydratačním vlivem uhelnatí a tvoří tmavé skvrny (obvykle je nutno zahřát). To ovšem platí i pro samotný chromatografický papír, takže je lépe využít v tomto případě specifitějších detekčních činidel. Podle polohy skvrny látky ve vzorku ve srovnání se standardem, případně i stejného chování při detekci určujeme kvalitu látky,



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

kvantitu pak odhadujeme z porovnání velikosti či intenzity zabarvení skvrn vzorku a standardu.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je případem plošné chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Vlastní chromatografický experiment se provádí na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina) naneseného na vhodné podložce (sklo, kovová fólie). Vzorek se ve velmi malém množství (μl) nanáší na začátek vrstvy (start) společně se standardy obdobně jako v případě papírové chromatografie. Po zaschnutí nanesených vzorků se vrstva vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel (mobilní fáze) tak, aby startovní linie byla nad hladinou a komora se uzavře. Dodržují se obdobná pravidla jako u papírové chromatografie, vyvíjení chromatogramu probíhá tak dlouho, dokud se čelo vzlínající směsi rozpouštědel nepřiblíží k okraji desky. Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekce se zjistí, kam doputovaly látky obsažené ve vzorku. K detekci se používají stejné postupy jako v papírové chromatografii, mnohdy se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou, fluoreskující při osvětlení UV zářením. Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhasíjí, takže se pod UV lampou objevují na chromatogramu v podobě tmavých skvrn. Využívají se i další způsoby detekce, založené na postřiku chromatogramu vhodným činidlem, které se stanovovanou látkou vytváří barevnou sloučeninu.

Papírovou a tenkovrstvou chromatografií lze stanovovat širokou škálu organických i anorganických látek při vysoké citlivosti a nízké ekonomické náročnosti. Metoda je povětšinou i časově velmi pohotová, takže je velmi rozšířená v průmyslu v oblasti mezioperační kontroly. Vzhledem ke své univerzálnosti je vhodná i pro první orientaci ve složení neznámého vzorku v oblasti sledování znečištění životního prostředí, medicíně i chemickém výzkumu.

Stanovení cukrů v ovocných šťávách

Chromatografické chování cukrů je v hlavní míře určeno hydrofilním charakterem jejich molekuly, daný velkým počtem hydroxylových skupin. Díky nim se dobře rozpouští ve



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

vodě, ale také silně interagují zejména s celulozou, což způsobuje jejich obtížnou eluovatelnost při chromatografii na papíře či na celulóзовých tenkých vrstvách. Při chromatografii na silikagelu je nutné použití pufrovaných roztoků, protože jinak dochází k rozdělení chromatografické skvrny na dvě, náležející otevřené a cyklické formě cukru. Pro detekci cukrů je k dispozici velké množství detekčních činidel, často je používán anisaldehyd či naftoresorcinol v kyselině sírové, roztok směsi anilinu s difenylaminem v kyselině fosforečné, amoniakální roztok dusičnanu stříbrného, benzidin, močovina či síran ceričitý. Prvá tři činidla dávají mnohdy specifické barevné reakce s jednotlivými monosacharidy a disacharidy, takže již ze zbarvení skvrny lze určit, o který z monosacharidů se jedná. Cukry lze chromatografovat rovněž jako deriváty – např. hydrazony a osazony, acetáty, methyl či amino deriváty.

Úkol: Stanovte cukry přítomné ve vzorku ovocné šťávy

Chemikálie : Acetátový pufr pH=5 o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

aceton

roztok anisaldehydu v kyselině octové (1:100 objemově)

konc. H_2SO_4

standardy glukózy, fruktózy a sacharózy (0,5% vodné roztoky – uchovávat v chladu)

vzorek ovocné šťávy (ředit 10x).

Pomůcky: Chromatografická vyvíjecí komora

chromatografická tenká vrstva typu Silikagel G

mikropipeta

odměrné válce 50, 25 a 5 ml

3 ks kádinka 150 ml

Petriho miska o průměru min. 12 cm

pinzeta

fixýrka



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

umělohmotná miska.

Postup:

Připravíme si 50 ml mobilní fáze o složení aceton-voda (9:1). Mobilní fázi nalijeme do vyvíjecí komory ve vrstvě okolo 1 cm a komoru uzavřeme. Na SiO₂ destičce si vyznačíme tužkou startovní linii a starty pro jednotlivé vzorky a standardy (1 cm od okraje a 0,5 cm od sebe). Vrstvu pak impregnujeme v 0,02 M roztoku acetátového pufru (naředíme 10x zásobní roztok, stačí cca 20 ml pufru) v Petriho misce. Po vyjmutí necháme vrstvu okapat a lehce oschnout. Na start nanese standardy a studovaný vzorek mikropipetou v množství 5 µl. Po oschnutí skvrn vložíme destičku do komory a uzavřeme. Necháme chromatogram vyvíjet, dokud hladina vzlínající mobilní fáze nedosáhne cca 1 cm pod okraj destičky. Poté destičku vyjmeme, označíme čelo rozpouštědla a necháme oschnout volně na Petriho misce. Detekci provedeme roztokem anisaldehydu v kyselině octové, ke kterému těsně před postřikem přidáme 0,2 ml koncentrované kyseliny sírové (na 10 ml roztoku anisaldehydu). Po vybarvení vyhodnotíme polohy a barvy skvrn standardů a vzorku a určíme přítomné cukry. Z porovnání intenzity zbarvení skvrn vzorku a standardů odhadneme obsah jednotlivých cukrů ve vzorku ovocné šťávy. Stanovíme rovněž R_F pro jednotlivé standardy a vzorky.

Stanovení alkaloidů (chininu) v léčivém přípravku

Chromatografické chování alkaloidů se v první řadě odvíjí od toho, že v kyselém prostředí jakožto dusíkaté báze tvoří soli, kdežto v alkalickém prostředí jsou přítomny jako volné báze. Tyto báze jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, soli naopak ve vodě či alkoholech, čímž je dána základní volba rozpouštědel pro vyvíjení chromatogramu. Při chromatografii na papíře se obvykle volí soustavy kyselé, protože v případě chromatografie volných bazí je třeba papír impregnovat formamidem. Při detekci alkaloidů lze využít jejich fluorescenci v UV, kdy navíc z intenzity fluorescence lze srovnáním ze standardem opět odhadovat i kvantitu zjištěného alkaloidu ve studovaném vzorku. Z chemické detekce je použitelné Dragendorffovo činidlo (roztok hydroxid-dusičnanu bizmutitého a KI v kyselině octové), se kterým reaguje většina alkaloidů.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

Úkol: Stanovte chinin ve vzorku léčiva

Chemikálie :

Kyselina octová

Butanol

0,1 M HCl

1% stand. roztok chininu

vzorek léčiva s obsahem chininu

Pomůcky :

Chromatografická vyvíjecí komora

stojánek

chromatografický papír (např. Whatman)

mikropipeta

odměrné válce 100 a 25 ml

3 ks kádinka 150 ml

Petriho miska o průměru min. 12 cm

pinzeta

třecí miska

Erlenmayerova baňka 100 ml

nálevka ve stojanu

filtrační papír.

Postup:

Připravíme si mobilní fázi o složení butanol-kyselina octová-voda (75:10:15 ml). Mobilní fázi nalijeme do vyvíjecí komory a komoru uzavřeme. Vzorek léčiva homogenizaci na třecí misce extrahujeme kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v Erlenmayerově baňce (na 10 g vzorku 75 ml kyseliny). Po filtraci extrakt použijeme přímo k vlastnímu chromatografickému stanovení. Na SiO_2 destičce si vyznačíme tužkou startovní linii a starty pro vzorek a standard (minimálně 1 cm od okraje a 0,5 cm od sebe). Na start nanášíme standard a studovaný vzorek mikropipetou v množství 5 μl . Po oschnutí skvrn pověsíme papír do komory na věšáček tak, aby spodní část zasahovala do mobilní fáze a start byl přítom nad hladinou a uzavřeme. Necháme chromatogram vyvíjet, dokud hladina vztlínající mobilní fáze nedosáhne dráhy 7 - 10 cm. Poté papír vyjmeme a necháme nejprve



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

oschnout volně na Petriho misce a krátce dosušíme v sušárně při mírně zvýšené teplotě (do 60°C). Detekujeme pod UV lampou. Z porovnání intenzity zbarvení skvrn vzorku a standardu odhadneme obsah chininu ve vzorku. Stanovíme rovněž R_F pro standard a vzorek.

Stanovení vitamínů skupiny B v droždí

Vitaminy skupiny B jsou rozpustné ve vodě, od čehož se odvíjí i používané vyvíjecí soustavy pro jejich chromatografické stanovení na tenké vrstvě - jejich důležitou součástí je voda. Pověštinou jsou používány kyselé vyvíjecí soustavy s kyselinou octovou, neboť v nich jsou tyto látky stabilnější vůči oxidaci vzdušným kyslíkem. Další nevýhodou látek ze skupiny vitamínů je jejich citlivost ke světlu, což je právě významné u vitamínů skupiny B. Proto je třeba vzorky i chromatogramy chránit před přímým slunečním zářením. Detekce vitamínů skupiny B je vcelku jednoduchá, protože některé z nich jsou barevné a všechny fluoreskují či naopak zhaší fluorescenci pod UV zářením.

Úkol: Stanovte vitamíny skupiny B přítomné ve vzorku kvasnic

Chemikálie :

- Kyselina octová
- Aceton
- Methanol
- Toluen
- standarty vitamínů skupiny B
- vzorek droždí.

Pomůcky :

- Chromatografická vyvíjecí komora
- chromatografická tenká vrstva typu Silikagel G
- mikropipeta
- odměrné válce 50, 25 a 5 ml
- kádinka 150 ml (3 ks)
- Erlenmayerova baňka 100 ml
- Petriho miska o průměru min. 12 cm



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

Pinzeta
Fixýrka
třecí miska
nálevka
filtrační papír.

Postup:

Připravíme si mobilní fázi o složení CH_3COOH -aceton-methanol-toluen (v poměru 2,5:2,5:10:35 ml). Mobilní fázi nalijeme do vyvíjecí komory ve vrstvě okolo 1 cm a komoru uzavřeme. Odvážený 1 g vzorku droždí po homogenizaci na třecí misce s 2 ml kyseliny octové převedeme do Erlenmayerovy baňky dalším podílem kyseliny octové do celkového objemu 5 ml a důkladně obsah baňky promícháme. Po filtraci extrakt použijeme přímo k vlastnímu chromatografickému stanovení. Na destičce typu Silikagel G si vyznačíme tužkou startovní linii a starty pro vzorek a standardy (1 cm od okraje a 0,5 cm od sebe). Na start nanese standardy a studovaný vzorek mikropipetou v množství 5 μl . Po oschnutí skvrn vložíme destičku do komory (start musí být nad hladinou mobilní fáze) a uzavřeme. Necháme chromatogram vyvíjet, dokud hladina vztlínající mobilní fáze nedosáhne cca 1 cm pod okraj destičky. Poté destičku vyjmeme, označíme čelo rozpouštědla a necháme oschnout volně na Petriho misce. Detekci provedeme přímo na základě zbarvení barevných vitaminů skupiny B, jednak pod UV lampou pro ostatní (B_6). Vyhodnotíme polohy a barvy skvrn standardů a vzorku a určíme přítomné vitaminy. Z porovnání intenzity zbarvení skvrn vzorku a standardů odhadneme obsah jednotlivých vitaminů ve vzorku a vypočteme jejich přibližný obsah v mg/g vzorku. Určíme rovněž R_F pro jednotlivé standardy a vzorky.

Stanovení přírodních kyselin a vitaminu C v ovocných šťávách

Pro chromatografické stanovení přírodních polykarboxylových a hydroxykyselin lze při chromatografii na papíře použít kyselé i bazické vyvíjecí soustavy. Dokonce je velmi vhodné oba typy soustav zkombinovat v dvourozměrné chromatografii. V první fázi se chromatogram vyvíjí v alkalické soustavě, po vysušení papíru se pokračuje v kolmém směru v



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

kyselé vyvíjecí soustavě. Množství nanášených kyselin by se mělo pohybovat v rozmezí od 20 do 100 μg . Při detekci těchto kyselin lze s výhodou využít acidobazické indikátory resp. lze využít i jejich redukčních účinků na stříbrné soli (dusičnan stříbrný v amoniakálním roztoku). Protože velmi obdobně se chová kyselina askorbová, vitamin C, lze současně stanovit i její obsah ve vzorku.

Úkol: Stanovte kyseliny přítomné ve vzorku ovocné šťávy

Chemikálie : Kyselina octová CH_3COOH

Butanol $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$

vzorek ovocné šťávy

standard kys. citronové (k. 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$

standard kys. jantarové (k. butandiová) $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$

standard kys. šťavelové (k. ethandiová) $(\text{COOH})_2$

standard kys. vinné (k. 2,3-dihydroxybutandiová) $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$

standard kys. askorbové $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$

roztok indikátoru methylčerveně

0,1 mol/dm⁻³ dusičnan stříbrný AgNO_3

5 mol/dm⁻³ amoniak NH_3

Pomůcky : Chromatografická vyvíjecí komora

Stojánek

chromatografický papír (např. Whatman)

mikropipeta

odměrné válce 50 a 25 ml

kádinka 150 ml (3 ks)

Petriho miska o průměru min. 12 cm

Pinzeta

nálevka ve stojanu



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Inovace bakalářského studijního oboru Aplikovaná chemie“
CZ.1.07/2.2.00/15.0247

filtrační papír.

Postup:

Připravíme si kyselou mobilní fázi o složení butanol-kyselina octová-voda (50:10:25 ml). Mobilní fázi nalijeme do vyvíjecí komory a komoru uzavřeme. Pokud vzorek ovocné šťávy obsahuje pevné částice, je nutné jej přefiltrovat. Po filtraci použijeme vzorek bez dalších úprav přímo k vlastnímu chromatografickému stanovení. Na proužku papíru si vyznačíme tužkou startovní linii a starty pro vzorek a standardy (minimálně 1 cm od okraje a 1 cm od sebe). Na start nanášíme standardy a studovaný vzorek mikropipetou v množství 5 μ l. Po oschnutí skvrn pověsíme papír do komory na věšáček tak, aby spodní část zasahovala do mobilní fáze a start byl přítom nad hladinou a komoru uzavřeme. Necháme chromatogram vyvíjet, dokud hladina vztlínající mobilní fáze nedosáhne dráhy alespoň 7 - 10 cm. Poté papír vyjmeme a necháme nejprve oschnout volně na Petriho misce a krátce dosušíme v sušárně při mírně zvýšené teplotě (do 60°C). Detekujeme nejprve pod UV lampou. Z porovnání intenzity zbarvení skvrn vzorku a standardu odhadneme obsah jednotlivých kyselin ve vzorku. Stanovíme rovněž R_F pro standard a vzorek. Další detekci provedeme roztokem indikátoru methylčerveň, opět porovnáme intenzity zbarvení a určíme R_F . Poslední detekci provedeme amoniakálním roztokem dusičnanu stříbrného (smísíme 2 ml 0,1 M- AgNO_3 a 5 ml 5 M- NH_3). Opět porovnáme intenzity zbarvení vzniklých skvrn a jejich R_F . V závěru uvedeme R_F všech standardů a jim odpovídající stanovené kyseliny ve vzorku, včetně odhadu jejich zastoupení ve vzorku v jednotkách g/ml.