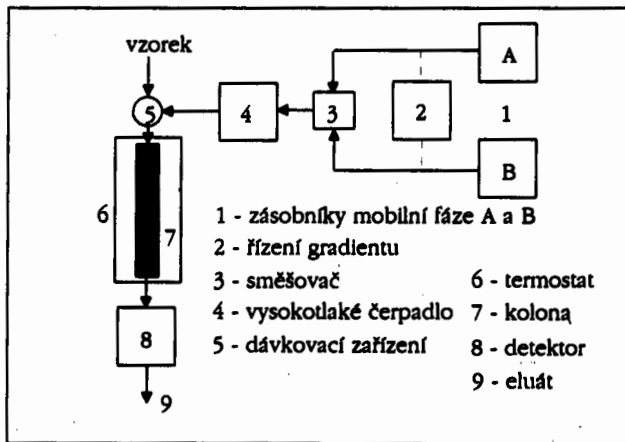


2.2.4 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale rovněž velmi výrazně použitá mobilní fáze. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace - adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii.

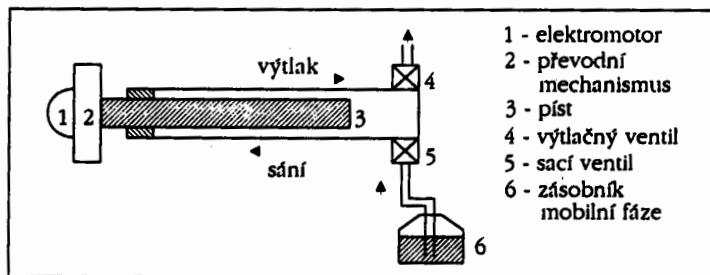
2.2.4.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

V klasické kapalinové chromatografii plníme skleněnou trubici délky asi 0,5 m a průměru asi 2 cm dole zakončenou fritou a kohoutem zrnitým sorbentem, jakým je například oxid hlinitý, na horní vrstvu náplně dávkuje malé množství vzorku a pak přidáváme mobilní kapalnou fázi. Při postupu kolonou se složky vzorku od sebe separují a v různých časech opouštějí spodní část kolony. Toto klasické kolonové provedení se stalo základem vysokotlaké neboli vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography). K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutné pracovat při vysokém tlaku.



Obr.25 Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf může obsahovat ve srovnání s plynovým chromatografem zásobníky více kapalin a je možné naprogramovat gradientové zařízení pro řízení změn ve složení výsledné mobilní fáze. Zůstává-li složení mobilní fáze stálé, hovoříme o izokratické eluci. Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Pístové čerpadlo je na obrázku 26. Membránové čerpadlo se liší tím, že má prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou. Ten je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou. Obvykle pracují dvě čerpadla tak, aby na sebe navazovaly fáze výtaku a fáze sání. Řízení mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulsů. Dávkování injekční stříkačkou přes pryžové septum proti vysokému tlaku je možné z hlediska těsnosti do tlaků 10 MPa. Výhodnější je dávkování obtokovým dávkovacím kohoutem, jehož podstata byla zmíněna u plynové chromatografie. Kolony používáme pouze náplňové. Jsou z tlustého borosilikátového skla pro nižší tlaky nebo z nerezové oceli pro vysoké tlaky kolem 50 MPa. Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké (5 až 30 cm). Náplně jsou popsány v dalších kapitolách.



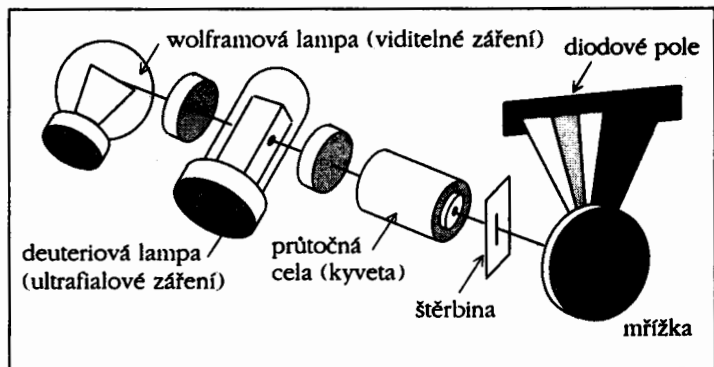
Obr.26 Schéma pístového čerpadla

2.2.4.2 Detektory v kapalinové chromatografii

○ Fotometrický detektor

Nejčastěji používané jsou fotometrické detektory. Měří absorbanci mobilní fáze vycházející z kolony. Pro optimální citlivost detektoru musí být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné květy, již prochází paprsek absorbovaného záření. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti (například 254 nm - rtuťová výbojka), složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru.

Nejdokonalejší jsou schopny pomocí diodového pole proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. Detektor může zachytit až 1 pg složky. Citivost je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu látky.

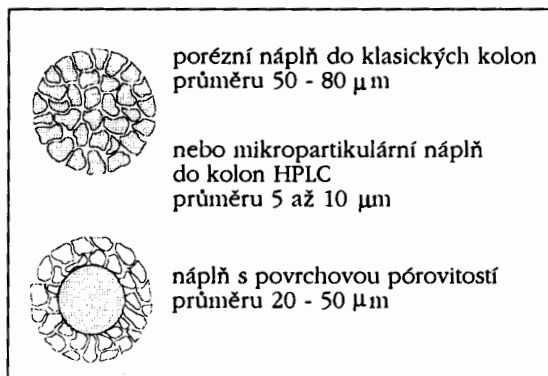


Obr.27 Schéma fotometrického diode array detektoru (DAD)

- **Refraktometrický detektor** měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se výchylka. Tento typ detektoru sice není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Při jeho použití je třeba přísně udržovat konstantní teplotu.
- **Fluorimetrický detektor** je založen na principu fluorescence, jak je vysvětlen v části Optické metody. V podstatě jde o schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor zachytí i 10^{-11} g látky. Je vysoce selektivní. Vhodně lze kombinovat s fotometrickým detektorem.
- **FTIR detektor** je univerzálním detektorem. Zpracovává infračervená spektra složek v mobilní fázi.
- **Elektrochemické detektory** jako **vodivostní** nebo **voltametrické** lze použít tam, kde jsou v roztocích obsaženy ionty respektive složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě.
- **Hmotnostní spektrometr** jako detektor je použitelný nejen v plynové, ale i v kapalinové chromatografii.

2.2.4.3 Kapalinová chromatografie na polárních adsorbentech

Jako polární adsorbenty v LSC se používají zrnité materiály na bázi silikagelu, který jeví kyselé vlastnosti, a méně často na bázi oxidu hlinitého, který má zásadité vlastnosti a někdy uplatňuje nevhodné katalytické účinky. Pro dobrou adsorpci je nutný velký povrch těchto adsorbentů. Kulovité částice adsorbentu v sobě obsahují póry. Částic adsorbentu může být kulička zhotovená z tohoto materiálu, kterou prostupují póry v celém objemu, nebo může jít o adsorbent s povrchovou pórovitostí, který obsahuje kulovité inertní jádro, na jehož povrchu jsou mikročástičky adsorbentu.



Obr.28 Částice adsorbentů pro kolonovou chromatografii

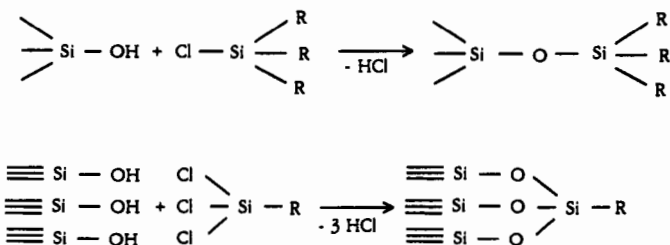
Mobilní fáze hraje v kapalinové chromatografii neméně významnou roli než stacionární fáze. Neměla by mít příliš velkou viskozitu, aby nekladla velký odpor proti převodu hmoty a protékala kolonou při určitém tlaku s dostatečnou rychlostí. Neměla by chemicky narušovat nebo vymývat stacionární fázi.

Mobilní fáze v LSC se charakterizuje svou eluční silou. Čím má rozpouštědlo větší eluční sílu, tím více se adsorbuje na stacionární fázi a tím rychleji eluuje složky, neboť s nimi soutěží o místo na povrchu adsorbentu. Eluční síla roste v pořadí n-pentan, toluen, benzen, ethylbromid, n-propanol, ethylacetát, isopropylalkohol, dioxan, ethanol, aceton. Velikost adsorpce dané složky roste s klesající hodnotou eluční síly rozpouštědla a rostoucí polaritou vlastních funkčních skupin. Nejkratší retenční časy proto budou mít nepolární alifatické uhlovodíky, po nich následují aromatické

uhlovodíky, halogensloučeniny, ethery, terciární aminy, nitrosoučeniny, ketony, aldehydy, primární aminy, alkoholy, fenoly a nejdelší retenční časy mají velmi polární karboxylové a sulfonové kyseliny.

2.2.4.4 Kapalinová chromatografie LLC

V kapalinové chromatografii LLC, kde je stacionární fází kapalina zakotvená na pevném nosiči, se využívá při separaci rozdělovací rovnováhy. Rozhodující podmínkou v LLC je vzájemná nemísitelnost mobilní a stacionární fáze. To v praxi obvykle nelze splnit a díky částečné mísitelnosti hrozí vymývání stacionární fáze z kolony. Proto se nyní nejčastěji používají jako sorbenty kapaliny, které jsou chemicky navázány na nosič. Nosičem je běžný silikagel nebo sklo. Póry mohou prostupovat celý objem kuličky nosiče nebo mohou být povrchové. Stacionární fáze se zakotvuje různými reakcemi, například silanizací silanolových skupin trialkylchlorsilany, dialkyldichlorsilany nebo alkyltrichlorsilany.



Skupinami R mohou být nepolární alkyly jako methyl, oktyl nebo oktadecyl. Tyto skupiny mohou nést i středně polární substituenty (nitro, kyano, aminoskupiny apod.). Proto lze volit zakotvené fáze různé polaroty.

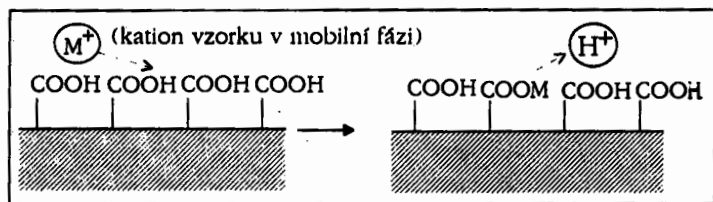
Pro separaci málo polárních a nepolárních složek se použije jako mobilní fáze polární rozpouštědlo (obvykle voda s přidavkem polárních organických rozpouštědel jakými jsou alkoholy, acetonitril, dioxan, tetrahydrofuran, aceton apod.) a nepolárních stacionárních fází. Nepolární zakotvené fáze se označují RP (reversed phases) - obrácené fáze, protože mají nižší polaritu než použitá mobilní fáze. Popsaný způsob chromatografie na nich se nazývá chromatografie na obrácených fázích. Používá se v současné době velmi hojně. Eluční

síla mobilní fáze tu roste s její klesající polaritou. Retence složek roste rovněž s jejich klesající polaritou nebo zvětšující se nepolární částí v molekulách. Separace na obrácených fázích se hodí pro látky jakékoliv polarity.

Pro separaci středně a málo polárních látek v systému LLC použijeme jako mobilní fázi nepolární rozpouštědlo, například uhlovodík s přísadou polárního rozpouštědla, a jako stacionární fázi středně polární zakotvenou fázi. Eluční síla mobilní fáze roste s její polaritou.

2.2.4.5 Ionově - výměnná chromatografie

Stacionární fází je ioněnič iontů. Tím je makromolekulární matrice (polystyren, celuloza, dextran apod.) nesoucí vhodné funkční skupiny kyselé nebo zásadité povahy. Každá tato funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Tento protiion je vyměňován iontem stejného znaménka náboje obsaženým v kapalně fázi. Při tom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje (Coulombovy síly).



Obr.29 Výměna iontu na povrchu iontoměniče

Iontoměniče (ionexy) se dělí na

- **Anexy**, jejichž funkční skupiny jsou zásadité (aminoskupiny, kvarterní amoniové báze) a slouží k výměně aniontů.
- **Katexy**, jejichž funkční skupiny jsou kyselé (sulfoskupiny, karboxylové skupiny) a slouží k výměně kationtů.

Iontoměniče mají různou výměnnou kapacitu, kterou lze vyjádřit v molech vyměněných iontů na 1 g iontoměniče (až 3 mmol g^{-1}).

Mezi různými ionty se nejpevněji váže ten ion, který má největší náboj a objem. Ion s větším objemem je méně hydratován molekulami vody a hydratační obal se snadněji naruší při navázání iontu na iontoměnič. Z tohoto důvodu se na iontoměnič typu katex

lépe váže draselný než sodný kation a ten lépe než lithný kation. Hlinitý kation má větší náboj a proto se váže na iontoměnič silněji než vápenatý nebo dokonce sodný kation. Roli při výměně mohou hrát i jiné faktory. Jako eluční činidlo musíme použít látku, která je schopna konkurovat iontům navázaným na iontoměnič. V případě katexů použijeme například kyselinu methylsírovou nebo chlorovodíkovou, pro anexy hydroxid sodný. Kovové ionty je možné separovat i na anexech, když je před tím převedeme do záporně nabitého komplexu vhodným komplexotvorným činidlem. Naopak anionty schopné tvořit ligandy můžeme separovat na katexech, které před tím nasytíme kationtem kovu (např. Ni^{2+}). Tyto fixované kationty poslouží jako centrální atomy komplexů vznikajících při separaci aniontů (ligandová výměna).

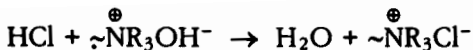
Příklady iontoměníčů dodávaných různými výrobci:

Iontoměnič	Funkční skupina	Protion	Typ
Amberlite IRA-904	$-\overset{\oplus}{N}(CH_3)_4$	Cl^-	anex, silně zásaditý
Amberlite IRA-910	$-\overset{\oplus}{N}(CH_3)_2CH_2CH_2OH$	Cl^-	anex, silně zásaditý
Dowex MWA-1	$-\overset{\oplus}{N}H_4$	OH^-	anex, slabě zásaditý
Amberlite IR-120	$-SO_3^-$	Na^+	katex, silně kyselý
Duolite C-464	$-COO^-$	H^+	katex, slabě kyselý

Iontově výměnná chromatografie se nyní často používá i pro organické látky - karboxylové kyseliny, aminokyseliny apod. Běžně se aplikuje v klasické kolonové chromatografii i za vyššího tlaku.

K detekci se obvykle používá vodivostních detektorů. Vzhledem k vysoce vodivému elučnímu činidlu by ovšem citlivost detektoru na ionty vzorku byla snížena. Proto se před detektor předřazuje zařízení potlačující jejich účinek (supresor). Toto zařízení pracuje dvěma možnými způsoby:

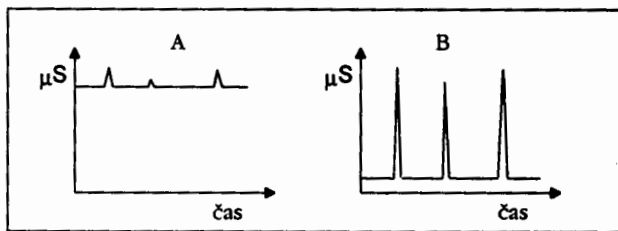
- **Chemické potlačení** vlivu iontů (neutralizace), kdy se po separaci kationtů zařadí anex v podobě mikromembrány, na jejímž povrchu se zachytí anion kyseliny a kyselý vodík se neutralizuje uvolněným hydroxidovým aniontem:



Aplikace u separace aniontů je obdobná.

- **Elektrochemické potlačení** vlivu iontů využívá elektrodialýzy přes iontově výměnné membrány (viz kapitola Membránové separace), které oddělují katodový a anodový prostor a mezi nimiž protéká eluát. Při separaci aniontů s elučním činidlem hydroxidem sodným jsou tyto membrány katexové. V anodovém prostoru vzniká elektrolýzou vody kyslík a vodíkový kation. Kation prostupuje membránu a v eluátu neutralizuje hydroxidový anion. V katodovém prostoru vzniká elektrolýzou vody vodík a hydroxidový anion. Sem se dostává z eluátu sodný kation a jako odpad odchází hydroxid sodný. Tím se vlastně eluční činidlo převádí do katodového prostoru.

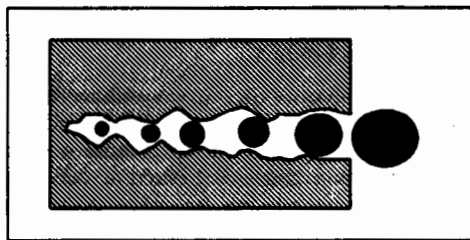
Obdobně při separaci kationtů se eluční činidlo (například methylsírová kyselina) dostává jako odpad do anodového prostoru přes anexovou membránu.



Obr.30 Porovnání signálu detektoru A - bez potlačení, B - s potlačením vlivu iontů elučního činidla

2.2.4.6 Gelová permeační chromatografie

V gelové permeační chromatografii (GPC) dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu (objem V_o), a nepohyblivou část mobilní fáze nacházející se uvnitř pórů gelu (V_p). Jednotlivé molekuly jsou separovány podle svých rozměrů. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání - permeace do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly.



Obr.31 Permeace molekul různé velikosti do póru gelu

V GPC platí retenční rovnice v tomto tvaru: $V_R = V_o + K_D V_i$

- V_R retenční objem
 K_D distribuční konstanta
 V_o volný objem kolony
 V_i objem pórů gelu

Distribuční konstanta závisí na velikosti pórů gelu a dané látkce. Velké molekuly nemohou pronikat do pórů gelu. Z toho důvodu je jejich koncentrace ve stacionární fázi nulová. Distribuční konstanta $K_D = \frac{C_s}{C_{in}} = 0$ a proto $V_R = V_o$. Hovoříme o exkluzi molekul složky. Naopak velmi malé molekuly mohou proniknout do libovolné hloubky pórů gelu a nastává totální permeace. Jejich koncentrace ve volné mobilní fázi i uvnitř pórů je tedy shodná. $K_D = 1$; $V_R = V_o + V_i$.

Proto platí pro libovolnou látku: $V_o \leq V_R \leq V_o + V_i$. Stane-li se, že zjistíme retenční objem větší než přípustná uvedená nerovnost, je to způsobeno současným uplatněním jiných mechanismů separace, například adsorpce.

Retenční objem souvisí s velikostí molekuly a tím také s její relativní molekulovou hmotností M_r . A a B jsou konstanty pro danou soustavu.

$$V_R = A - B \log M_r$$

Gel se volí podle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely, například Sephadex (dextran zesíťovaný epichlorhydrinem). Mobilní fází je voda s případným přídavkem organického rozpouštědla. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely. Patří mezi ně kopolymery styrenu

Separace metaly

a divinylbenzenu (Styragel). Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel jsou vhodné pro separaci hydrofobních i hydrofilních látek.

Kolony mají průměr až 8 mm a délku v desítkách cm. Pracuje se s nižšími tlaky než v rozdělovací a adsorpční HPLC.