

separační metody



## Chromatografické metody

Distribuce látky mezi dvě fáze:

### **stacionární fáze**

nepohyblivá - ukotvený materiál

### **mobilní fáze**

pohyblivá - obsahuje dělené látky,  
které mají různou afinitu ke stacionární fázi.

Vzorek je unášen mobilní fází.

Složky s vyšší afinitou se zachycují a zpožďují → nastává dělení.

## Chromatografie - základní rozdělení

Dle povahy mobilní fáze:

- **kapalinová chromatografie** (MF kapalina)
- **plynová chromatografie** (MF plyn)

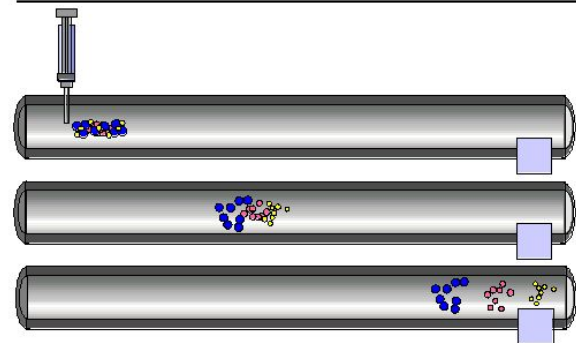
Dle uspořádání stacionární fáze:

- **kolonová chromatografie** (SF je umístěna v koloně)
- **plošné techniky**
  - **papírová chromatografie** (SF je lokalizovaná na papíru)
  - **tenkovrstvá chromatografie** (SF je v tenké vrstvě na podložce - sklo, Al-folie, ...)

Dle povahy převládajícího děje, který předchází separaci:

- **rozdělovací chromatografie** (rozdílná rozpustnost složek ve SF (**l**) a mobilní fázi (**l, g**))
- **adsorpční chromatografie** (rozdílná míra adsorpce složek na povrchu SF (**s**))
- **iontově-výměnná chromatografie** (rozdílné elektrostatické síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze – iontoměniče a ionty vzorku)
- **gelová chromatografie** (separace složek o rozdílné velikosti molekul podle velikosti porů stacionární fáze gelu – molekulově síťový efekt)
- **afinitní chromatografie** (na základě selektivní afinity složek vzorku ke stacionární fázi)

## Separation by Chromatography



# separační metody

*plošné chromatografické techniky*

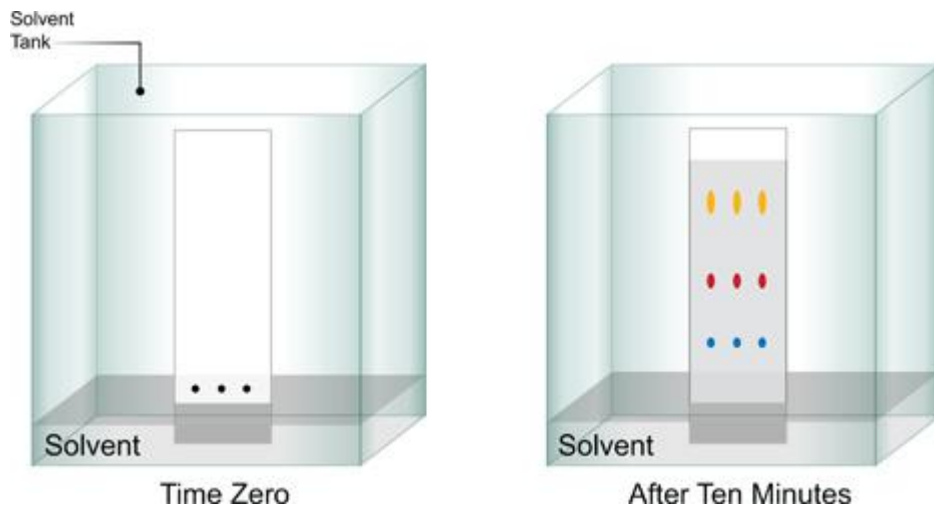
## planární techniky kapalinové chromatografie

Stacionární fáze na ploše;

**PC** - papírová chromatografie (Paper Chromatography)

**TLC** - tenkovrstvá (Thin Layer Chromatography)

1. vzorek nanesen mikropipetou na **start**
2. podložka se okrajem ponoří do **mobilní fáze**
3. MF **vzlíná** a unáší složky (tím rychleji, čím méně se poutají k SF)
4. před dosažením konce plochy vyvíjení ukončeno a označeno **čelo**



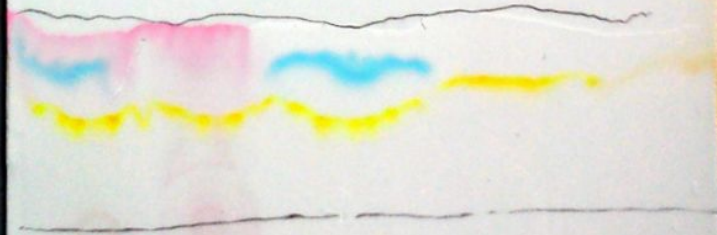
### Stacionární fáze:

**papír** (SF: voda poutaná celulosou)  
**tenké vrstvy** zrnitého materiálu  
na podložce (Al, sklo) -  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$

### Mobilní fáze:

směsi rozpouštědel (voda, alkoholy,  
organické kyseliny, ...)

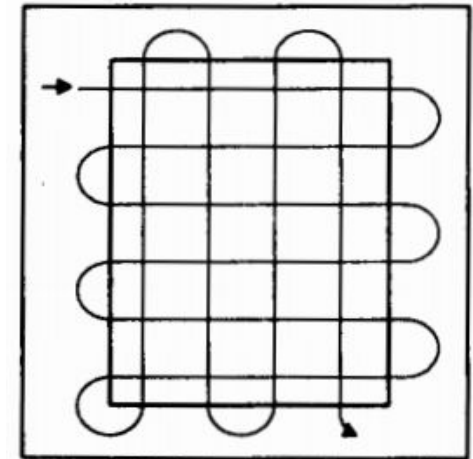
MMS/acetone  
#1000  
cerise  
alens  
zuta



## planární techniky kapalinové chromatografie

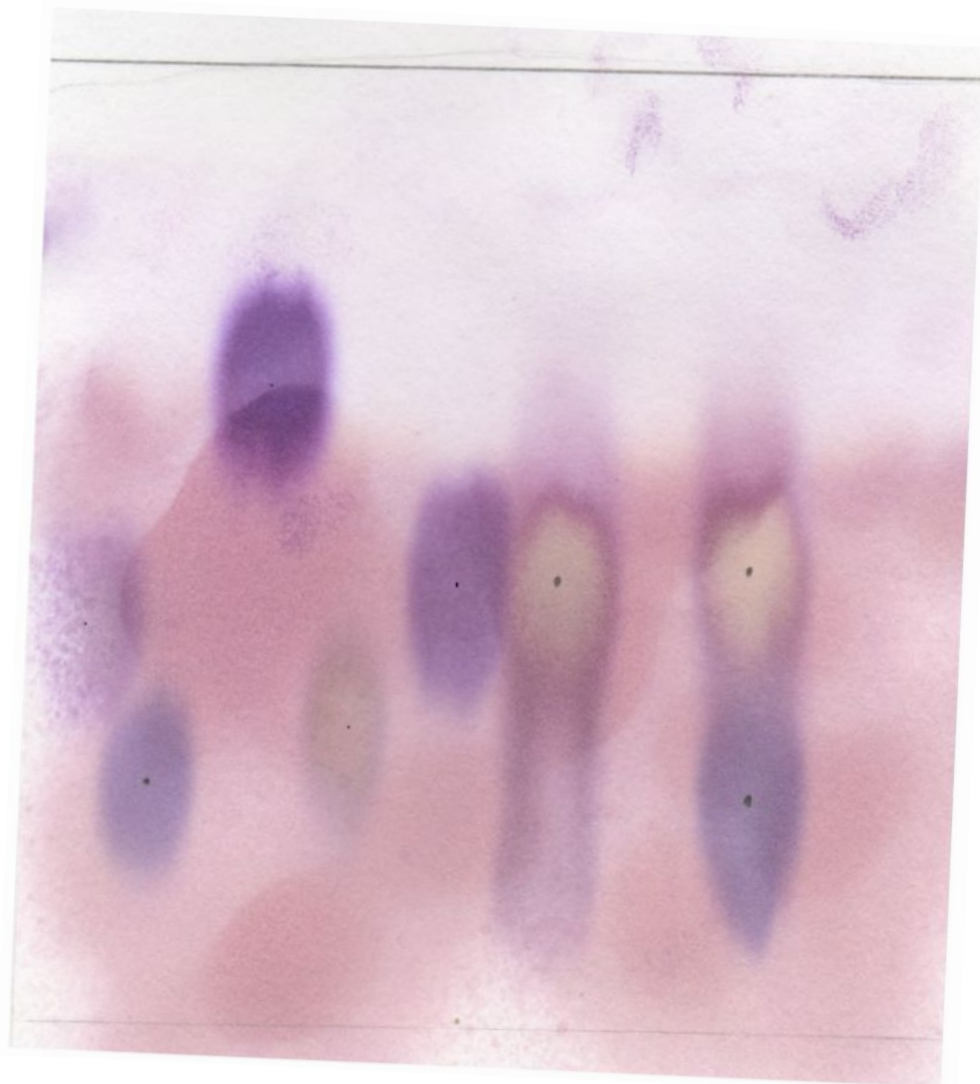
### chemická detekce skvrn

Činidlo	Rozpouštědlo	Detekuje
Anilin, difenylamin	aceton	redukující sacharidy
Bromkrezolová zeleň	ethanol	organické kyseliny a zásady
Oxid molybdenový	kyselina sírová	fosfolipidy
Ninhydrin	ethanol	aminokyseliny, aminy
Rhodamin B	ethanol	kovy (Au, Bi, Cd, Fe, Hg, Mo, Sb, Tl, V, W)



vedení postřiku činidlem

*činidla používaná k chemické detekci skvrn*

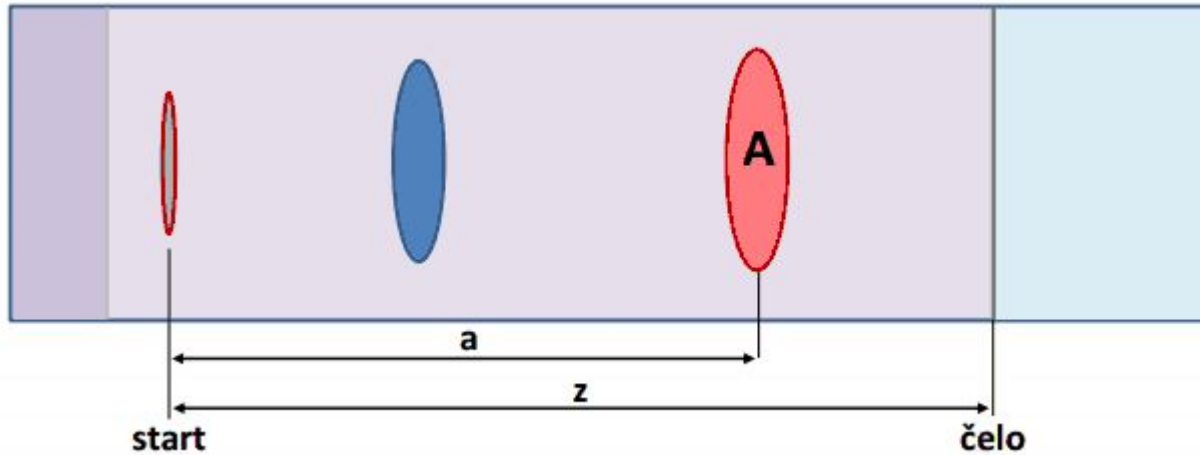


*zviditelnění skvrn při separaci aminokyselin pomocí ninhydrinu*



## planární techniky kapalinové chromatografie

### kvalitativní analýza



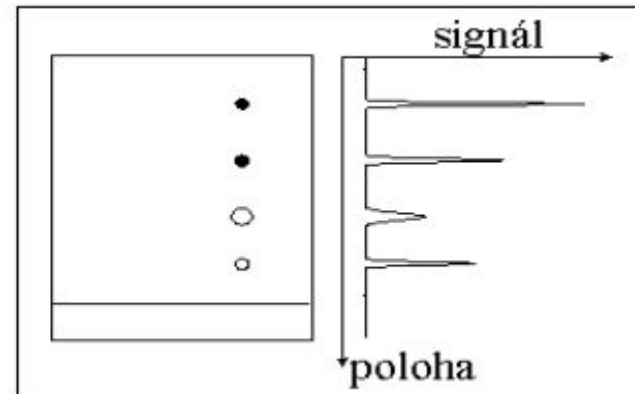
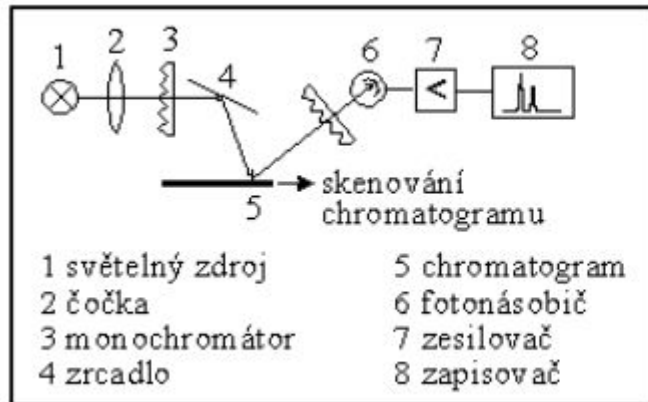
Retenční faktor pro látku A:  $R_f = \frac{a}{z}$   $0 \leq R_f \leq 1$

Hodnota  $R_f$  odpovídá kvalitě, „intenzita“ skvrny odpovídá kvantitě.

## planární techniky kapalinové chromatografie

### kvantitativní analýza

**denzitometricky** - zjišťuje se stupeň ztmavnutí v místě skvrny



# separační metody

*kolonová chromatografie: kapalinová*

## kapalinová chromatografie (LC)

kolonové uspořádání

**MF:** kapalina (interaguje)

klasické provedení

**skleněná kolona**

délka ~ 50 cm

průměr ~ 2 cm

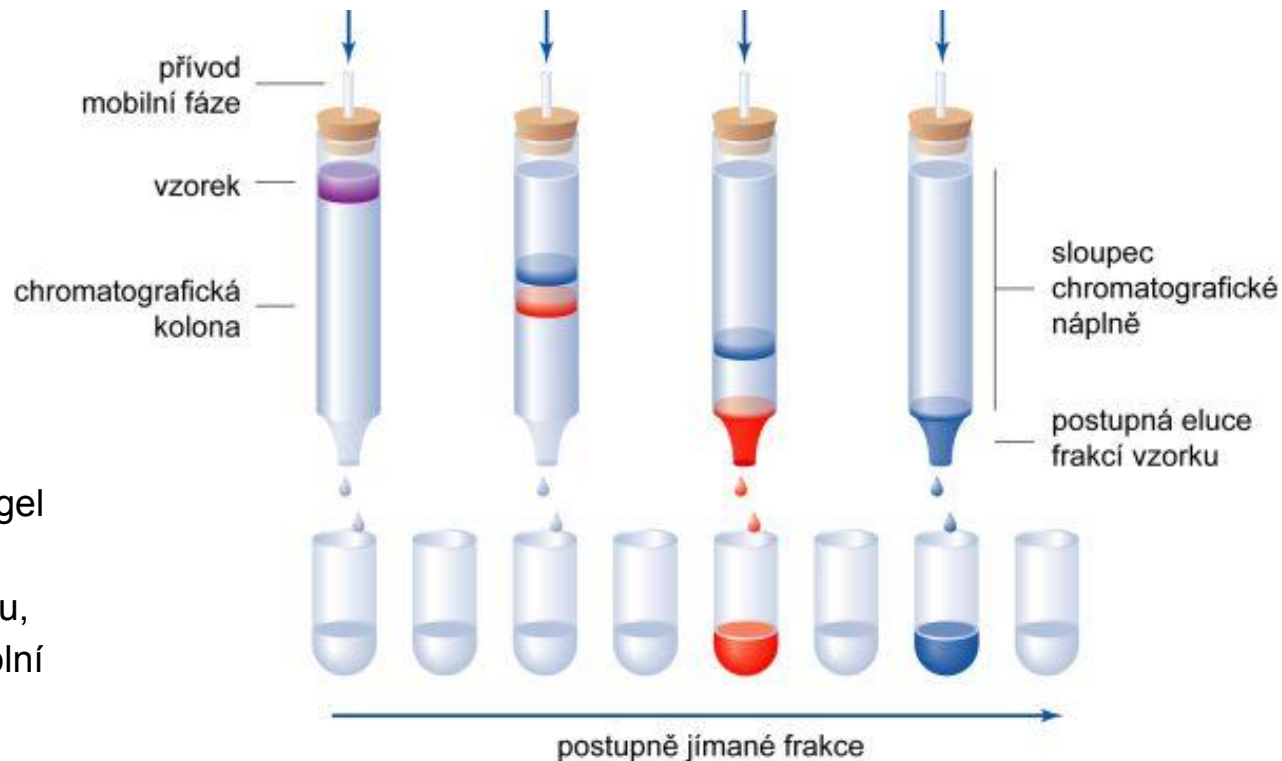
**náplň**

zrnitý sorbent ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), silikagel

MF gravitací tlačena kolonou,

sošky různě sorbovány náplní

→ dělení



# HPLC

High Performance Liquid Chromatography - vysokoučinná kapalinová chromatografie

## čerpadlo (pumpa)

pístové nebo membránové  
průtok ~ 1 až 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  bez kolísání,  
tlak 35 MPa

## dávkovací zařízení

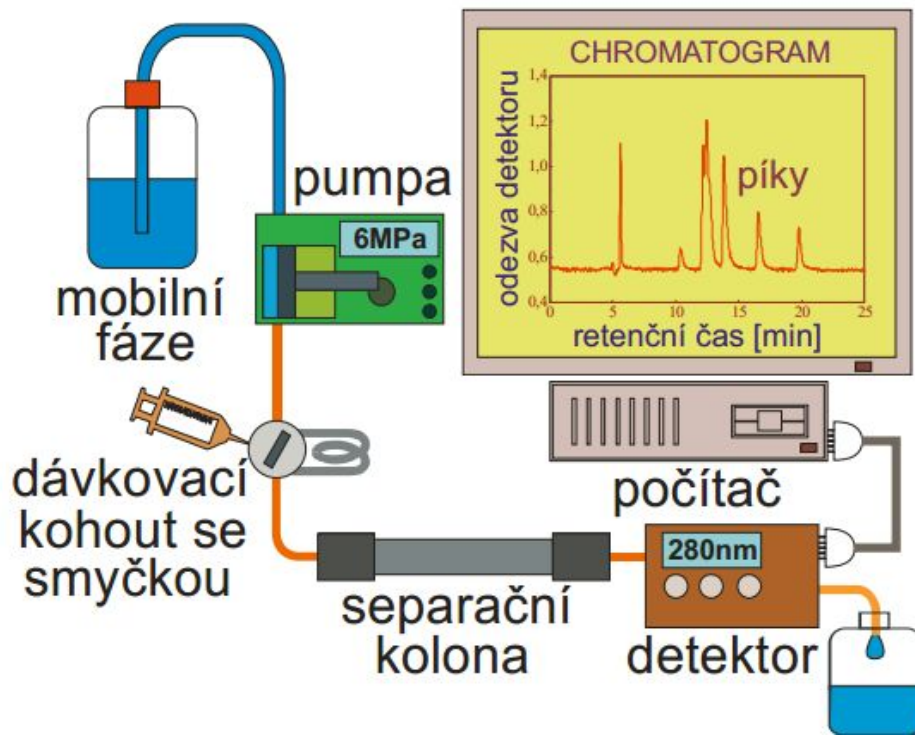
injekční zařízení  
obtokový dávkovací kohout (10  $\mu\text{l}$ )

## kolony

pouze náplňové, nerez  
délka 10 - 25 cm,  
v.průměr 0.5 cm

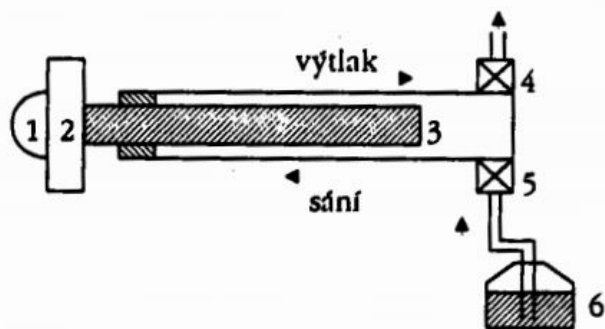
## detektor

fotometrický, refraktometrický,  
fluorescenční, vodivostní, hmotnostní



# HPLC chromatograf

## čerpadlo pístové, membránové



- 1 - elektromotor
- 2 - převodní mechanismus
- 3 - píst
- 4 - výtláčny ventil
- 5 - sací ventil
- 6 - zásobník mobilní fáze

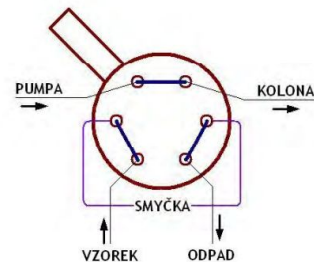
## kolony

pouze náplňové  
rozmanité možnosti

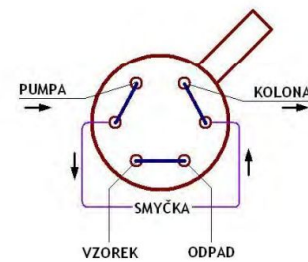


## šesticestný ventil

### PLNĚNÍ SMYČKY



### NÁSTŘIK



## HPLC chromatograf - detektory

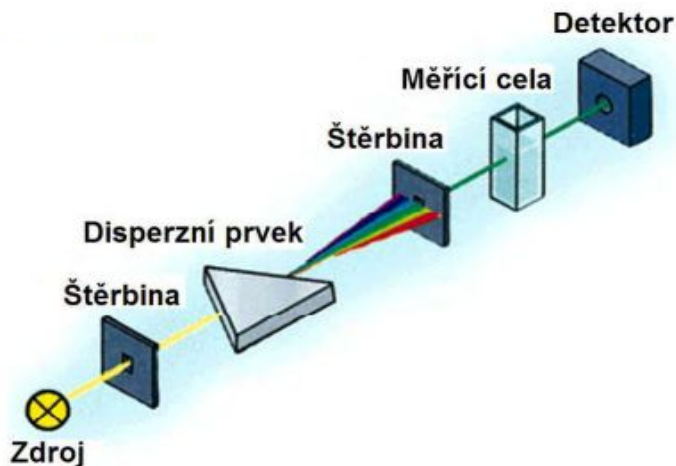
### fotometrický detektor

nejběžnější

měří se absorbcí eluátu

musí být zajištěna dostatečná absorpční dráha

možnost změny vlnové délky



### Lambert-Beerův zákon

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A ... absorbance

$\varepsilon$  ... absorpční koeficient

c ... koncentrace látky

l ... délka absorpční vrstvy

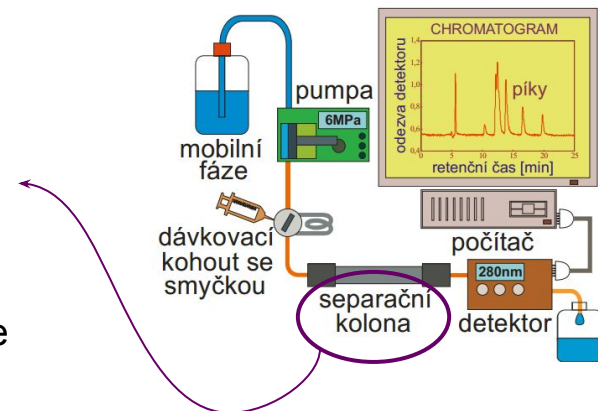
### další detektory:

fluorescenční, refraktometrický, vodivostní

## kapalinová chromatografie (LC) podle chemického principu dělení složek

kapalinová chromatografie

- adsorpční chromatografie
- rozdělovací chromatografie
- ionexová chromatografie
- gelová permeační chromatografie





# Adsorpční kapalinová chromatografie

## princip

přitažlivé síly mezi SF a analytem  
pro polární látky  $M < 1000$ , **SF v pevném stavu**  
**vhodné pro:** polární látky (cukry), bazické látky

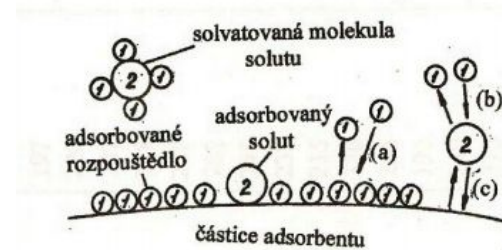
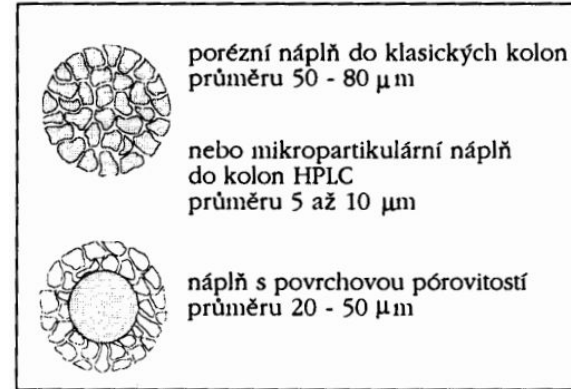
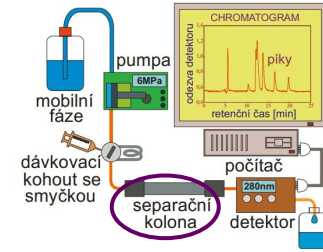
## adsorbenty

velký povrch, adsorpční místa  
silikagel (polární kyselý)  
 $Al_2O_3$  (polární bazický)  
aktivní uhlí (nepolární)

## mobilní fáze

nepolární analyty: nepolární MF  
polární analyty: polární MF

**eluční síla mobilní fáze:** pentan < benzen < ethanol < aceton  
**retenční časy analytů:** uhlovodíky < aminy < alkoholy



# Rozdělovací kapalinová chromatografie

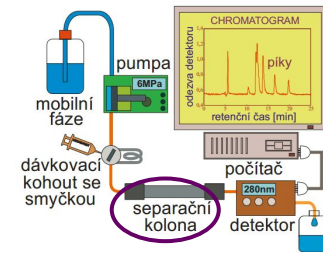
## princip

rozdělení analytů mezi dvě nemísitelné kapaliny (jedna kapalina MF, druhá SF)

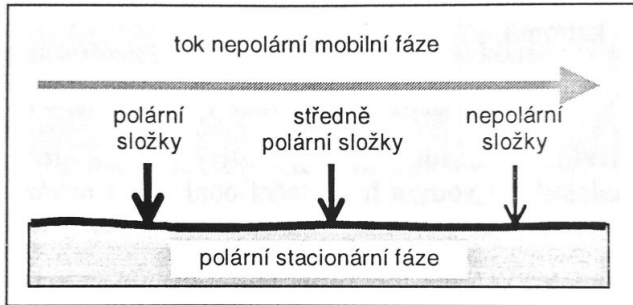
MF unáší analyty, **SF je zakotvená kapalina**

**vhodné pro:** menší až střední molekuly; slabě až středně polární (NPC) nebo všech polarit (RPC)

>> *Složka vzorku tráví více času v té fázi, ve které je rozpustnější* <<



## stacionární fáze



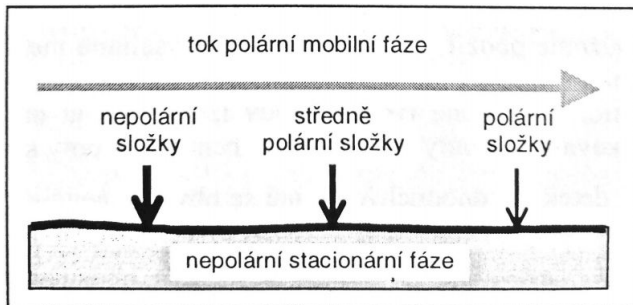
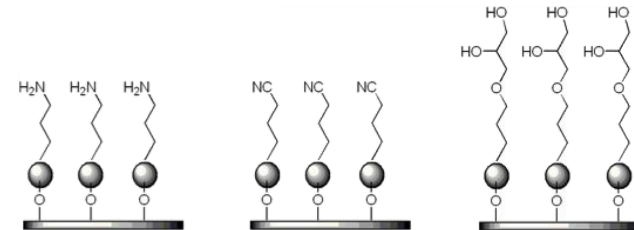
polární „normální fáze“ NPC

SF: např. voda na silikagelu

MF: nepolární (hexan)

retence roste s polaritou

vhodné pro: mírně polární analyty



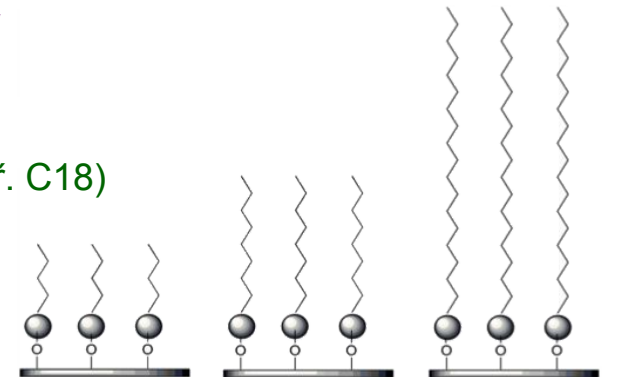
nepolární „obrácené fáze“ RPC

SF: uhlovodíky na silikagelu (např. C18)

MF: polární (voda, acetonitril)

retence klesá s polaritou

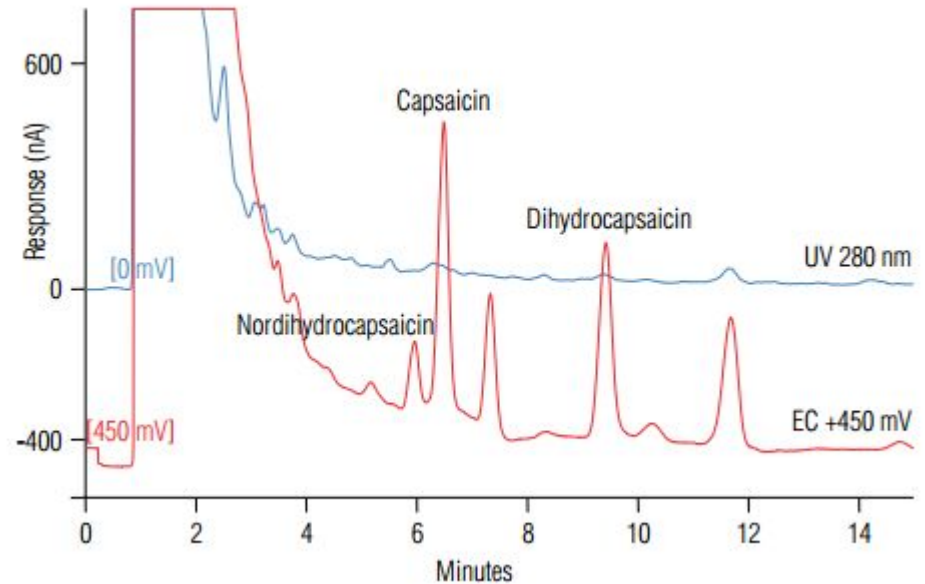
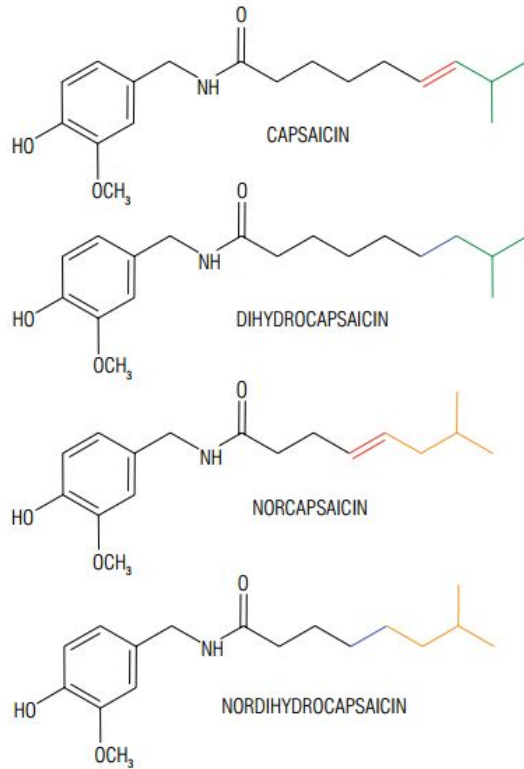
vhodné pro: většinu látek



## Rozdělovací kapalinová chromatografie

ukázka: dělení kapsaicinoidů z chilli papričky:

SF: C18, MF: Acetonitril/Acetát



# Iontově výměnná chromatografie IEC

## princip

působení elektrostatických sil mezi + a - ionty

dělení probíhá na základě:

- elektrických vlastností
- množství a druhu nabitých funkčních skupin

*Ionty s vyšším nábojem vytěsňují ty s nižším.*

## Stacionární fáze:

**anex:** kladný náboj (např.  $-N^+R_3$ ,  $NH_2$ )  
měnič aniontů

**katex:** záporný náboj (např.  $-SO_3^-$ ,  $-COO^-$ )  
měnič kationtů

## Kationty:

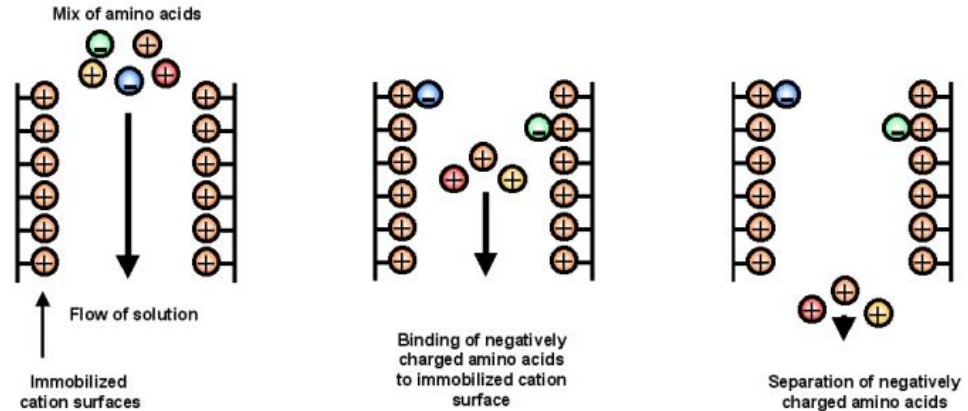
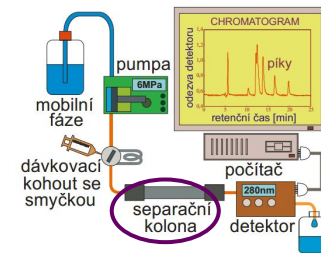
$Ag^+ > Cs^+ > K^+ > Na^+ > H^+$

## Anionty:

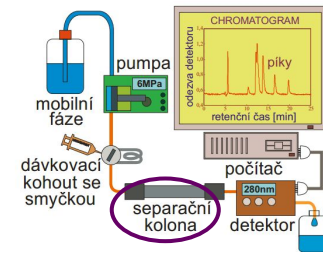
$NO_3^- > PO_4^- > OH^- > F^-$

## Vhodné pro

- biochemické aplikace ( izolace bílkovin, separace nukleových kys., ... )
- separace léčiv



# Gelově permeační chromatografie GPC



## princip

molekuly separovány podle velikosti

- jsou zadržovány v důsledku svého pronikání (permeace)
- nedochází k interakci mezi látkou a SF

## stacionární fáze:

pro látky rozpustné ve vodě: **hydrofilní gely** (sephadex)

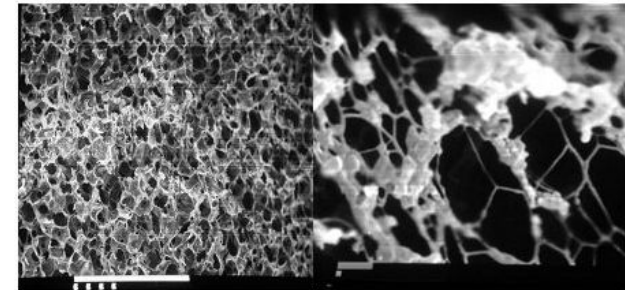
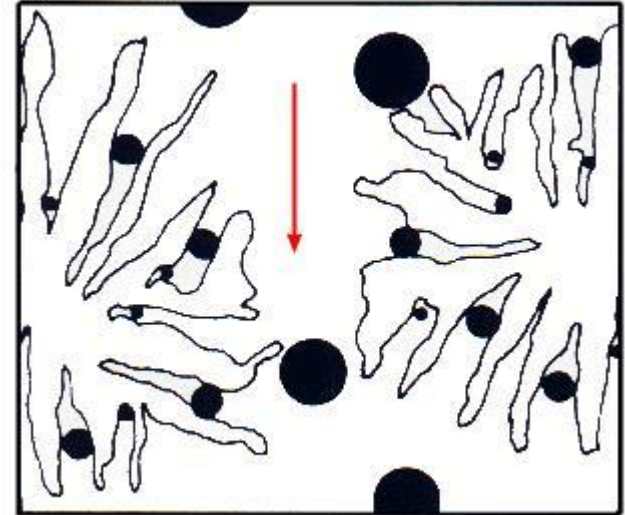
pro nerozpustné ve vodě: **hydrofobní gely** (styrigel)

## vhodné pro:

analyty  $M > 500$

proteiny

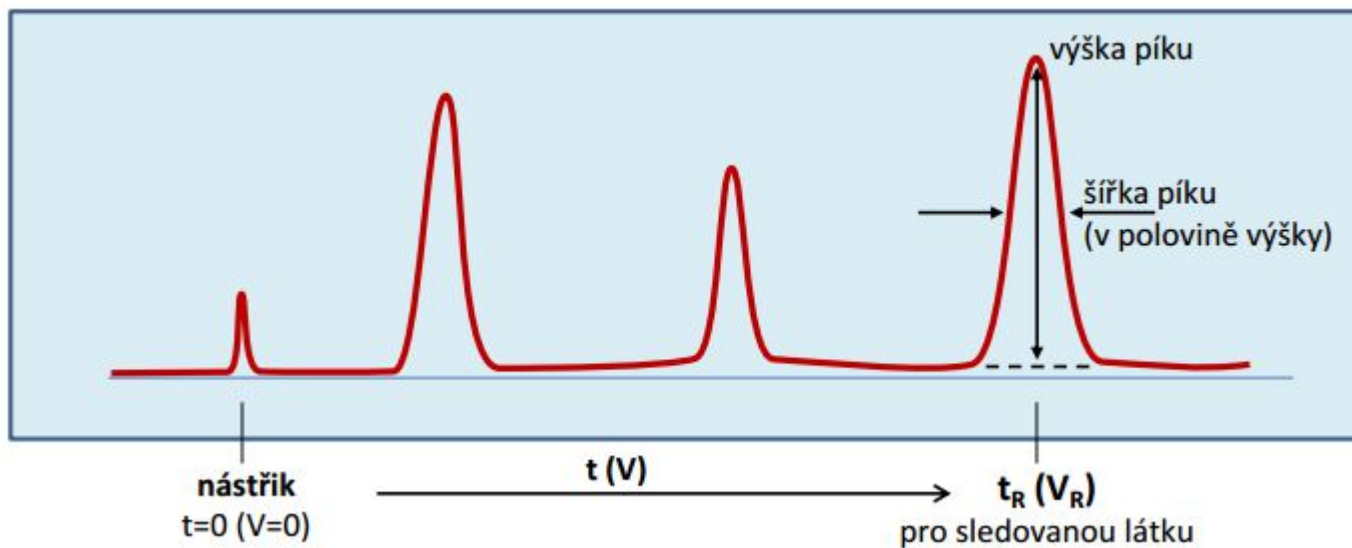
biopolymery



# separační metody

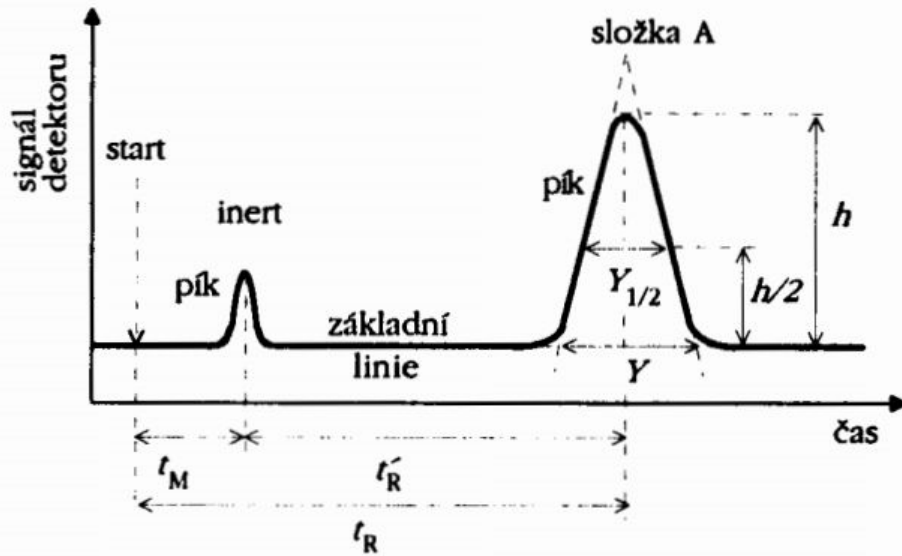
*principy separace*

## Chromatogram



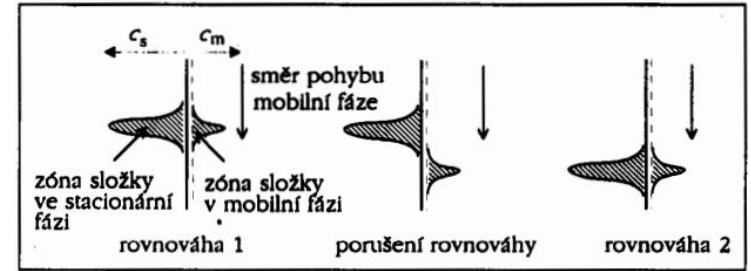
kvalitativní analýza  
x  
kvantitativní analýza

## Účinnost separace v chromatografii



## teoretické patro $H$

pomyslná část kolony, na které dochází k ustavení rovnováhy



## počet teoretických pater $n$

popisuje účinnost kolony

$$n = 16 \left( \frac{t_R}{Y_t} \right)^2 \quad n = 5,54 \left( \frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2$$

$Y$  ... šířka píku v základně

$Y_{1/2}$  ... šířka píku v polovině výšky

$t_r$  ... retenční čas

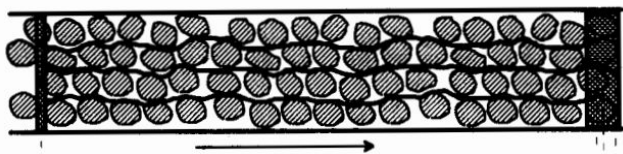


## Účinnost separace v chromatografii

K rozšiřování zón v koloně přispívají **tři děje**.  
Sleduje vliv rychlosti MF  $u$  na účinnost separace.

### $H_A$ Turbulentní difúze

molekuly MF protékají mezi zrnky SF.  
Lineární rychlost nemá žádný vliv.

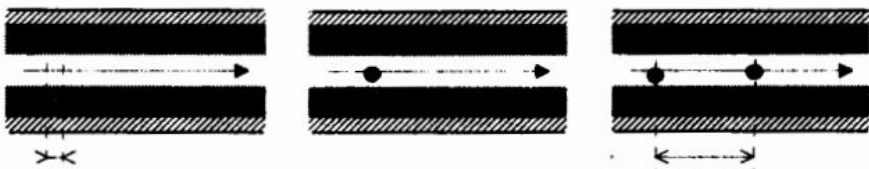


### $H_B$ Molekulární difúze

molekuly difundují do míst s nižší koncentrací  
narůstá s časem → nepřímo úměrný rychlost

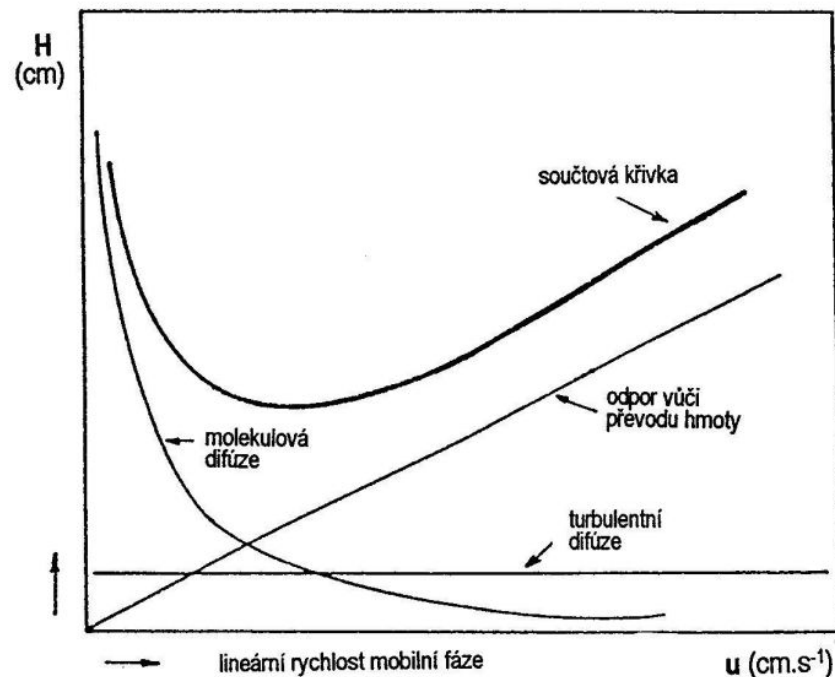
### $H_C$ Odpor proti převodu hmoty

molekuly pronikají různě hluboko do SF  
rychlá MF způsobí, že ostatní více uniknou  
→ přímo úměrný rychlost MF



## van Deemterova rovnice

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$



# separační metody

*kolonová chromatografie: plynová*

## Plynová chromatografie (GC)

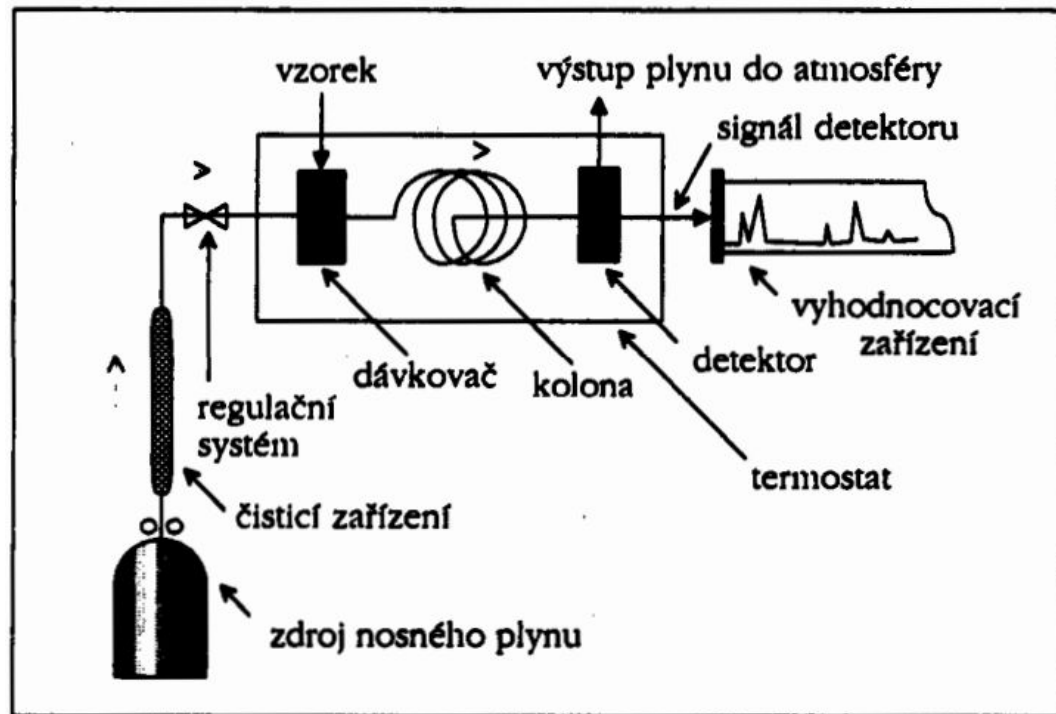
Vzorek se dávkuje do proudu plynu, kterým je unášen kolonou.

Dělení vzorku mezi MF (plyn) a SF - kapalinu nebo tuhou látku.

**MF** = nosný plyn (He, N, H<sub>2</sub>)

**SF** = trubice naplněné sorbenty nebo kapiláry s pokrytou vnitřní stěnou

vhodné pro: snadno zplynitelné látky (M<1000) - plyny, organické molekuly, organokovové látky



## Plynová chromatografie (GC) - instrumentace

### zdroj nosného plynu

tlaková láhev - H, N, He, Ar

### regulační systém

stálý/programově řízený průtok

### dávkovač

injekční stříkačky (kapalina/plyn)

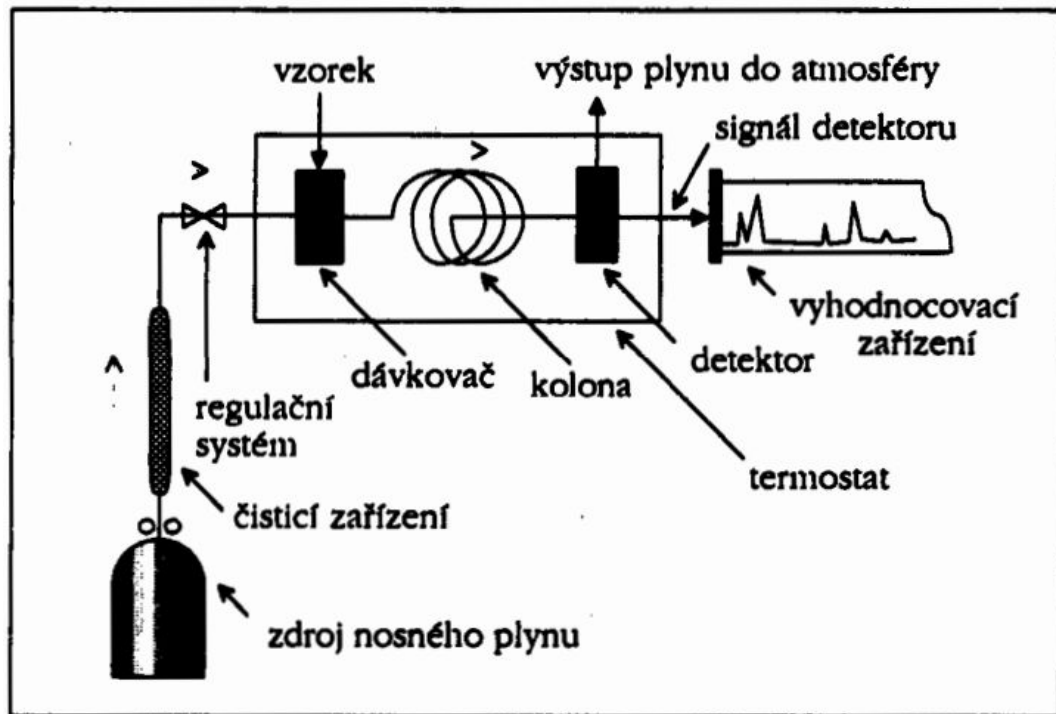
### kolona

náplňové nebo kapilární

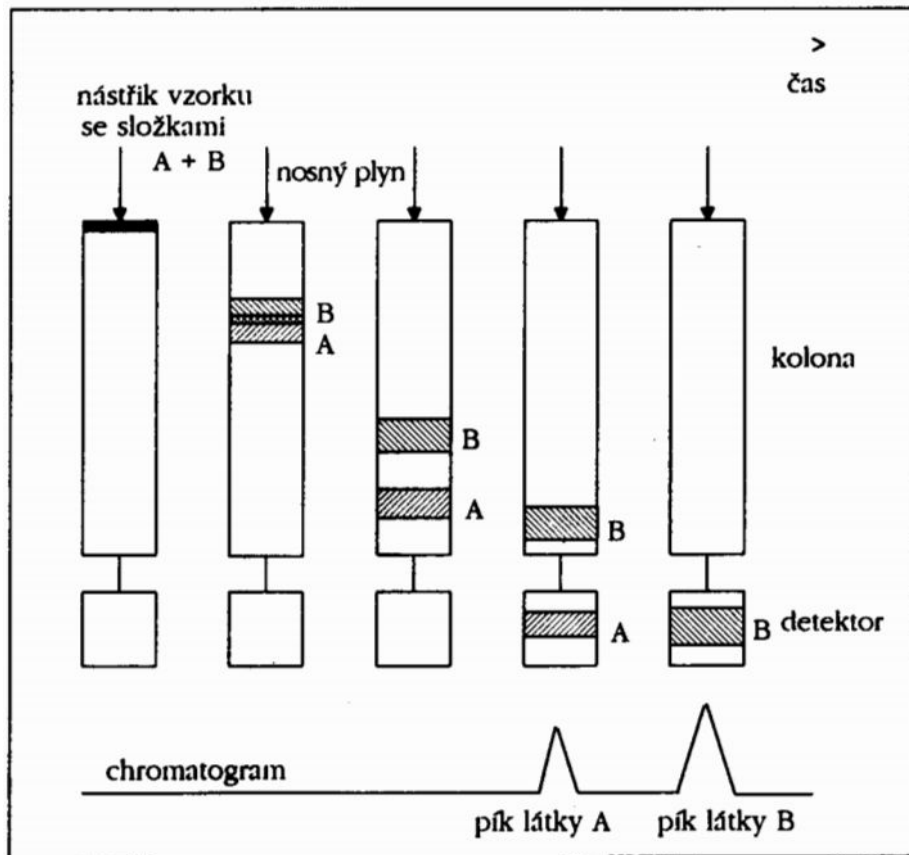
délka 1 - 60 m

### detektor

tepelně vodivostní,  
plamenový ionizační



## Plynová chromatografie (GC) - pracovní postup



### eluční metoda

(nejběžnější)

vzorek se jednorázově  
dávkuje do proudu plynu

z kolony vychází nejdříve  
nejméně zadržovaná složka

čas, za který vyjde složka z  
kolony je charakteristický (pro  
identifikaci)

## Plynová chromatografie (GC) - kolony

### náplňové

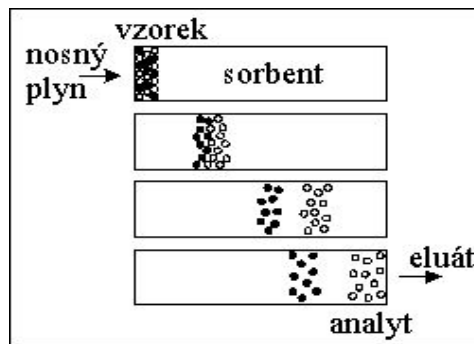
trubice naplněné sorbenty nebo

nosiči pokrytými kapalnou fází

průměr: 2 - 3 mm

délka: < 4 m

náplň: silikagel, alumina



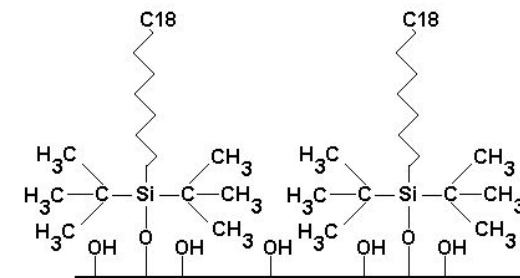
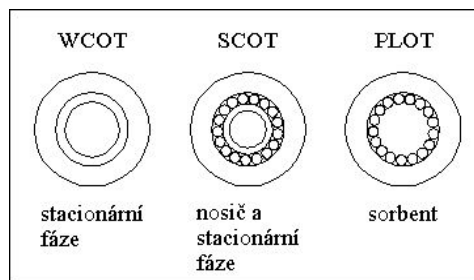
### kapilární

nosič SF = vnitřní stěny kapiláry

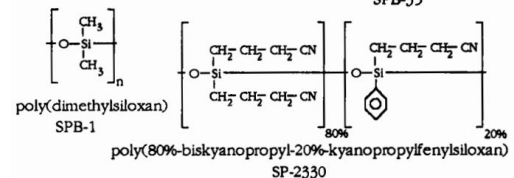
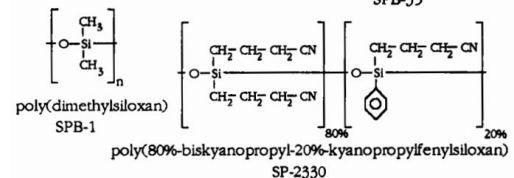
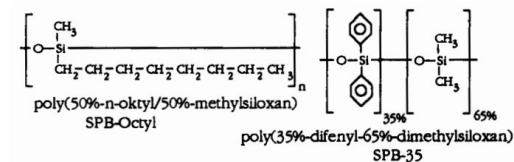
průměr: 0,1-1 mm, SF 0.25 - 5  $\mu\text{m}$

délka: 15 - 60 m

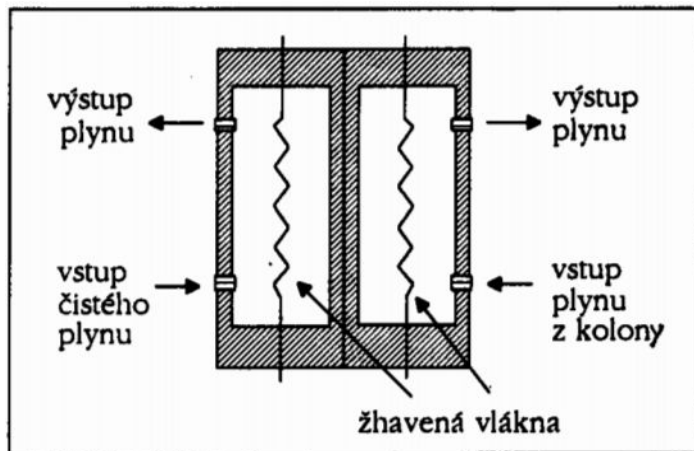
zvnější pokryta polyimidem



Silikagel



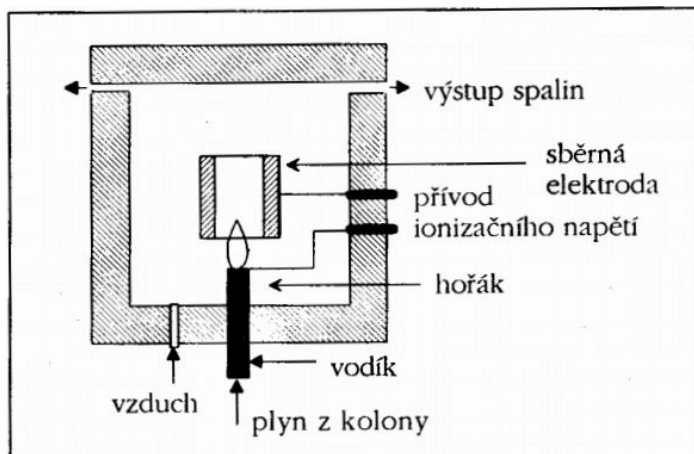
## Plynová chromatografie (GC) - detektory



### tepelně vodivostní detektor

univerzální detektor

proudící nosný plyn ochlazuje žhavené vlákno, přítomnost jiné složky změní tepelnou vodivost vychýlení el. odporu vlákna oproti srovnávacímu (Wheatstoneův můstek)



### plamenový ionizační detektor

spalování výstupního plynu v plameni

přítomnost složky zvýší ionizaci → proud vhodné pro většinu látek

### další typy

detektor elektronového záchytu, atomový emisní

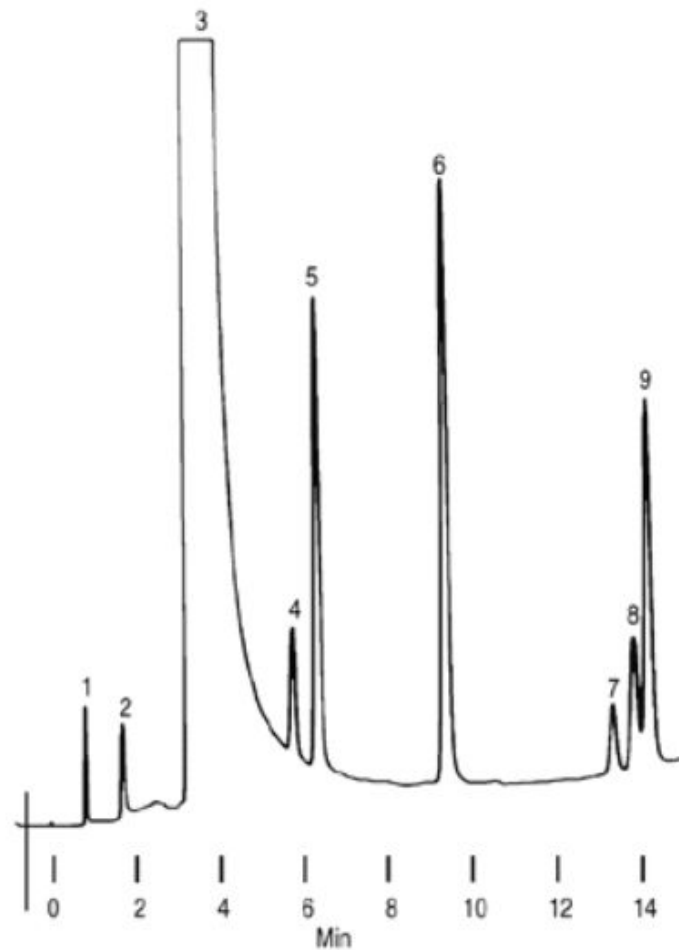
## Plynová chromatografie (GC)

### chromatogram whisky

1. Acetaldehyde
2. Methanol
3. Ethanol
4. Ethyl acetate
5. n-Propanol
6. Isobutanol
7. Acetic acid
8. Active amyl alcohol
9. Isoamyl alcohol

Číslo píku	Retenční čas [min]	Plocha píku [i.j.]
1	0,83	36
2	1,85	75
3	3,72	4800
4	5,83	120
5	6,41	1100
6	9,63	1700
7	13,43	64
8	13,98	145
9	14,33	734

Tab.2: Hodnoty odečtené z chromatogramu





## Plynová chromatografie (GC)

### chromatogram plynů ze vzduchu

kolona : náplňová, z nerezové oceli, 6' x 1/8" (183 cm x 3,2 mm)

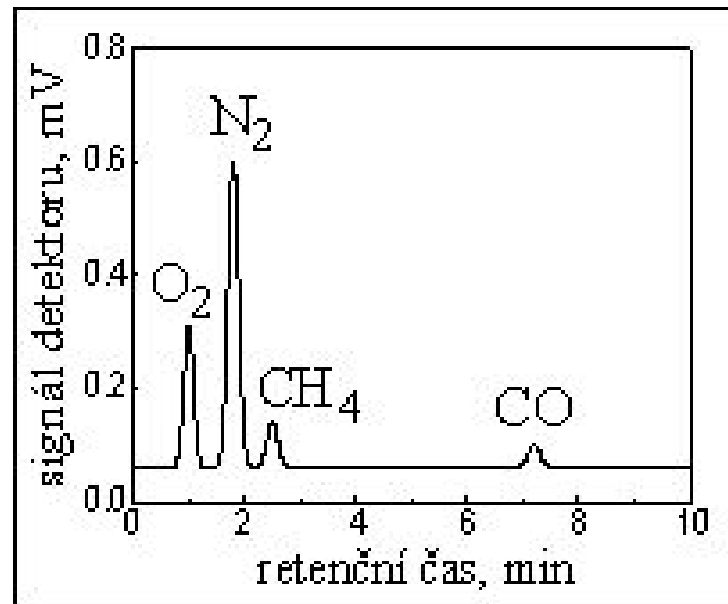
stacionární fáze : molekulové síto 5A

nosný plyn : 30 ml/min He

dávkování : 100 mL (35 °C)

teplota termostatu kolony : 35 °C

detekce : TCD (140 °C)



## Volba chromatografické metody (1.: volba SF)

### analyty s $M > 2000$ :

syntetické polymery: gelová permeační  
biopolymery: gelová permeační, obrácené fáze

### analyty s $M < 2000$ :

rozpustné ve vodě:	iontové molekuly (anorg. soli): disociovatelné molekuly (kyseliny, zásady): nedisociovatelné m. (polární sloučeniny):	iontově výměnná ch. iontově výměnná ch., obrácené fáze obrácené fáze
rozpustné v org. r.:	rozpustné v methanolu (stř. polární): rozpustné v hexanu:	obrácené fáze, normální fáze obrácené fáze