

Extrakce

Přechod složky mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi (separační metoda).

Extrahované látky přecházejí do fáze rozpouštědla.

1. extrakce z tuhých látek

S > složka > **L**

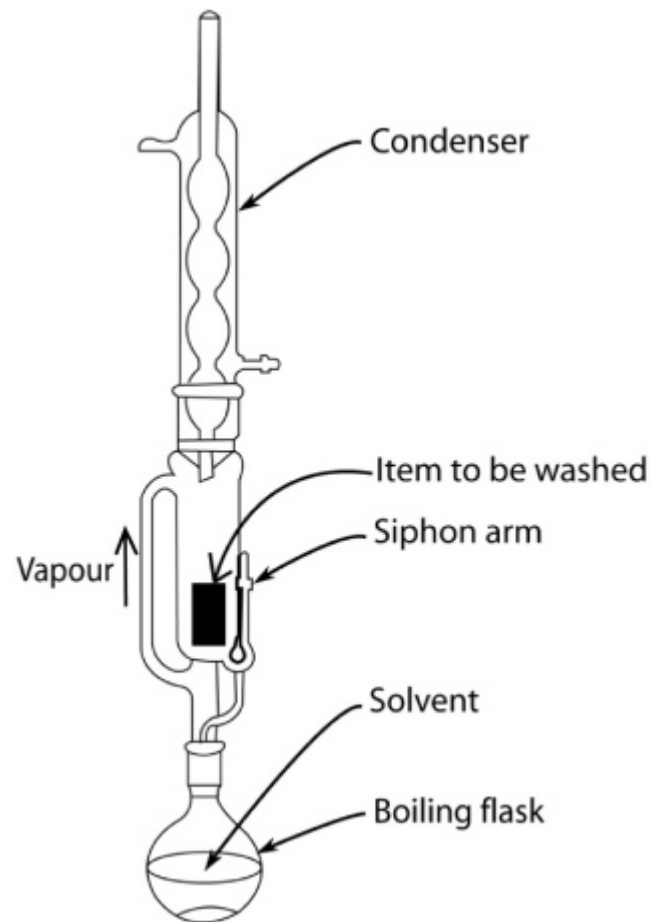
Z tuhého materiálu se rozpouští selektivně požadovaná složka ve vhodném rozpouštědle (ostatní složky ne).

Macerace: luhování z pevných látek studeným rozpouštědlem

Digesce: macerace horkým rozpouštědlem

Aplikace:

extrakce silic, stanovení tuků



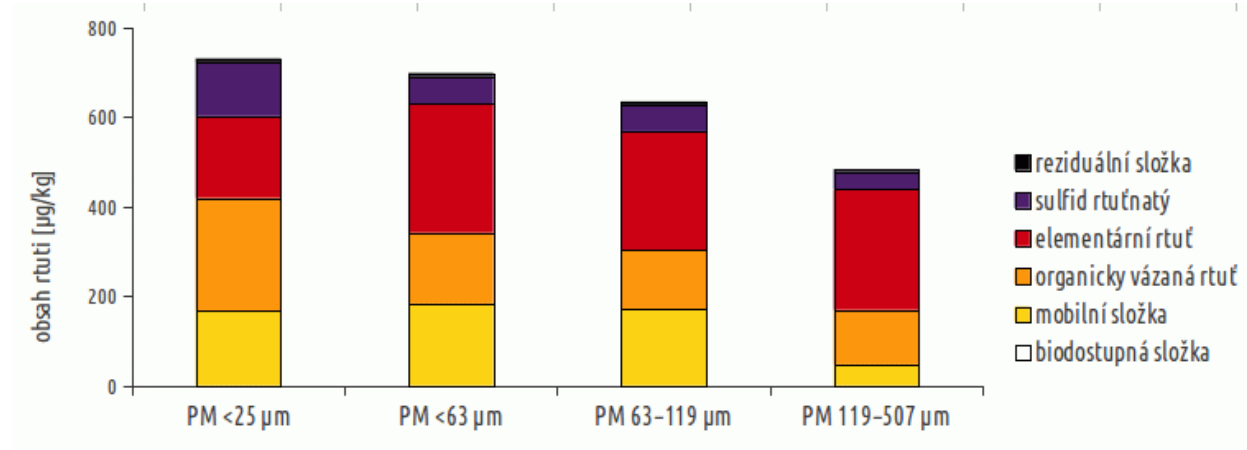
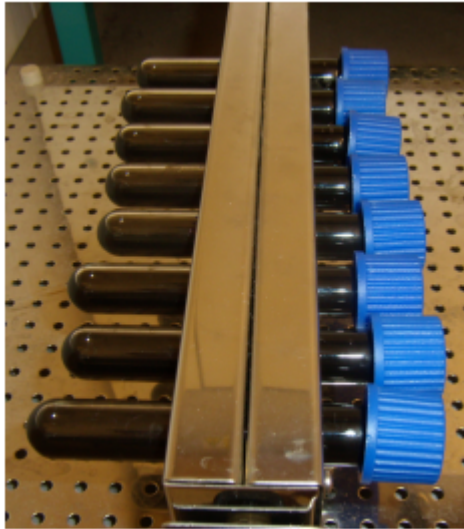
Soxhletův extraktor ([gif](#))

sekvenční extrakce

extrakce pevného vzorku
do několika různých činidel

→ **frakcionace**
(rozdělení do skupin)

Příklad:
městský polétavý prach



extrakce z kapaliny na pevnou fázi

L > složka > S

SPE (Solid phase extraction) – na povrchu pevné fáze se selektivně adsorbuje z roztoku požadovaná složka.



Provedení:

- čištění látek
- zakoncentrování
- výměna rozpouštědel

Sorbenty:

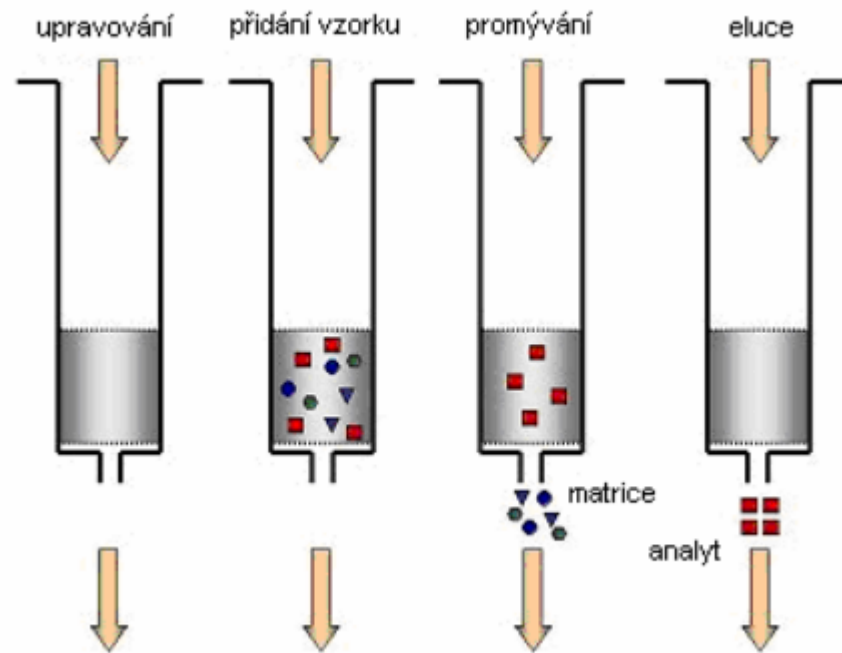
~ 50 μm částice silikagelu s vázanou fází:

polární (-OH, NH_2 , ...)

nepolární (C8, C18, ...)

Aplikace

vitamíny, pesticidy ve vodě,
kyseliny ve víně, ...



*příklad aplikace SPE k přečištění nebo
zakoncentrování vzorku*

extrakce z kapaliny do kapaliny

L > složka > L

Rozdělovací rovnováha požadované složky v soustavě dvou nemísitelných kapalin

(složka přechází do kapaliny, ve které je více rozpustná).

Nernstův rozdělovací zákon:

$$K_D = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

K_D rozdělovací konstanta
(Nernstův rozdělovací koeficient)

c_{org} koncentrace složky v
organickém rozpouštědle

c_{aq} koncentrace složky ve vodě

Aplikace

extrakce chlorovaných aromatických látek

extrakce organických polutantů, K_{OW}



vytřepávání, extrakce L-L



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)

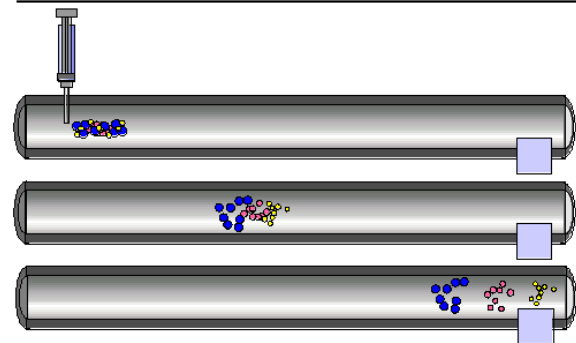
Dle uspořádání stacionární fáze:

- **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



Plynová chromatografie (GC)

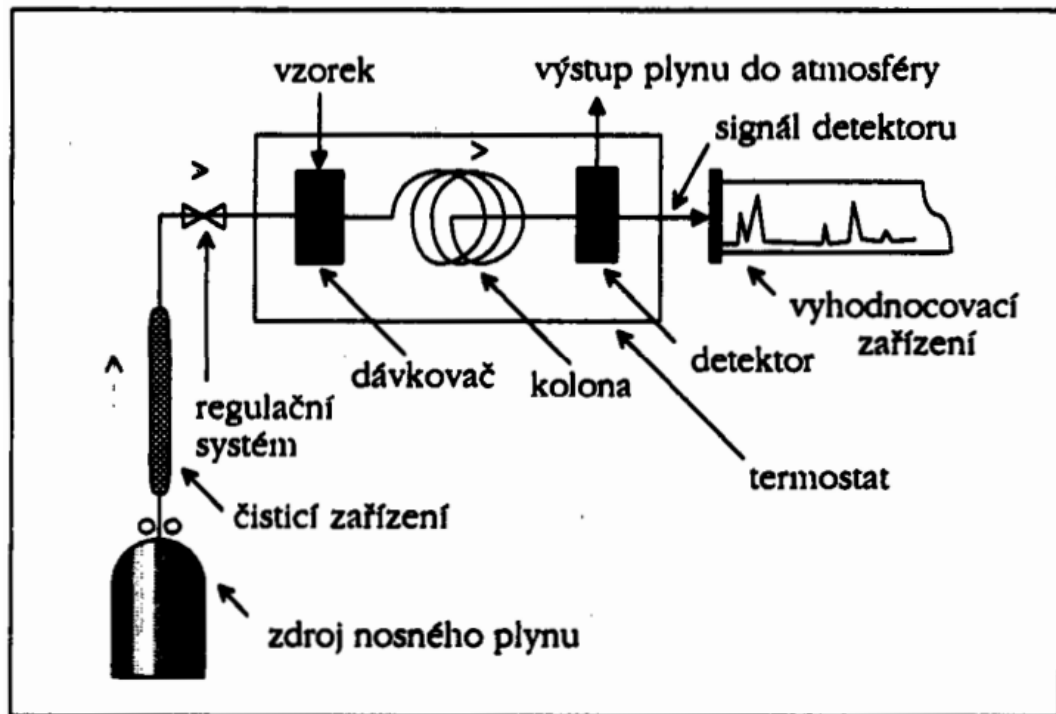
Vzorek se dávkuje do proudu plynu, kterým je unášen kolonou.

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

MF = nosný plyn (He, N, H₂)

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

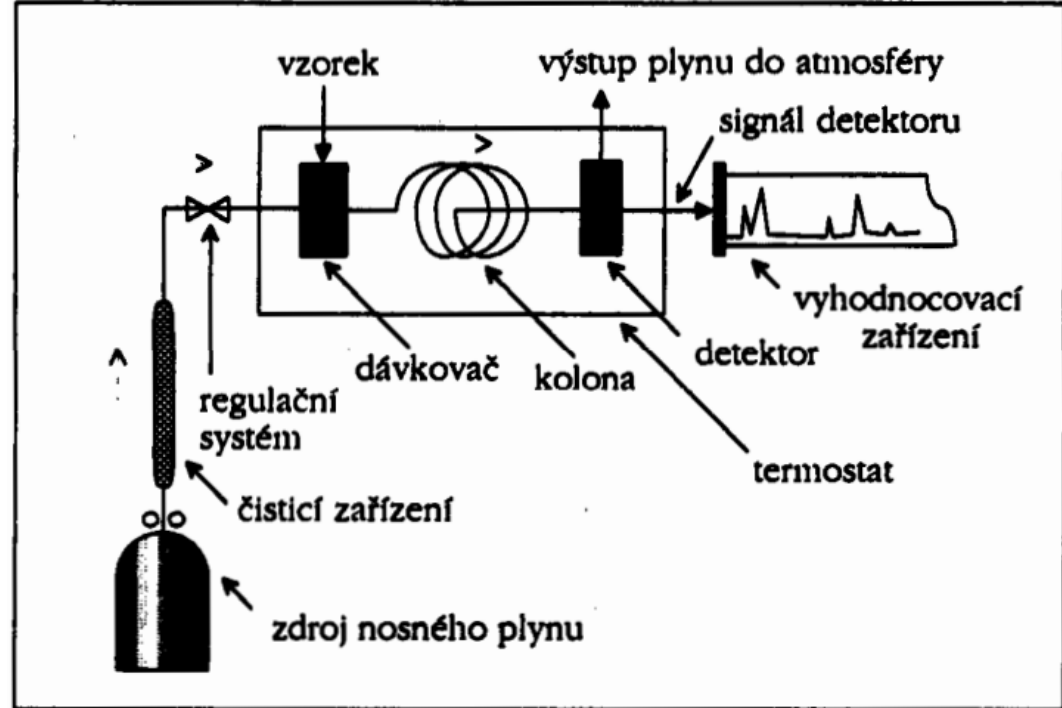
injekční stříkačky (kapalina/plyn)

kolona

náplňové nebo kapilární
délka 1 - 60 m

detektor

tepelně vodivostní,
plamenový ionizační



Plynová chromatografie (GC) - kolony

náplňové

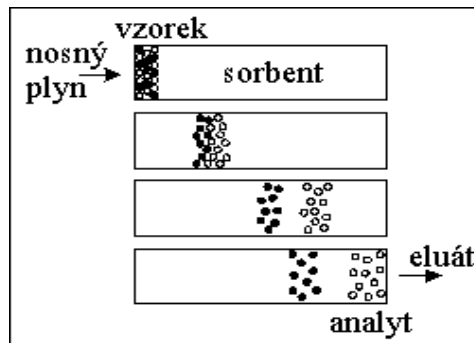
trubice naplněné sorbenty nebo

nosiči pokrytými kapalnou fází

průměr: 2 - 3 mm

délka: < 4 m

náplň: silikagel, alumina



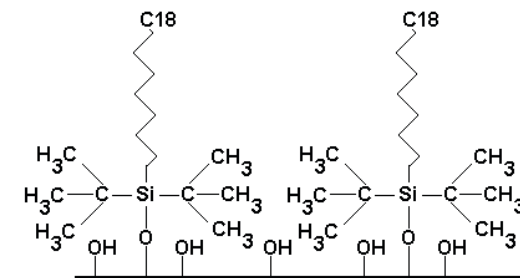
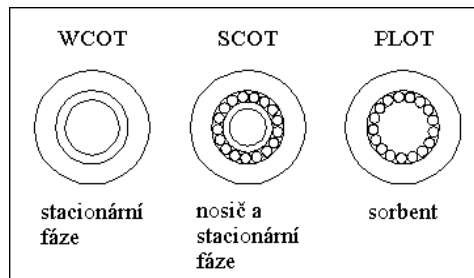
kapilární

nosič SF = vnitřní stěny kapiláry

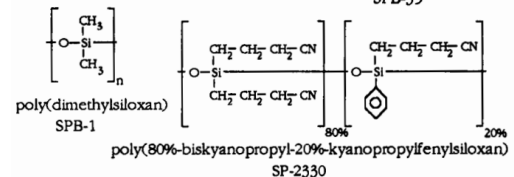
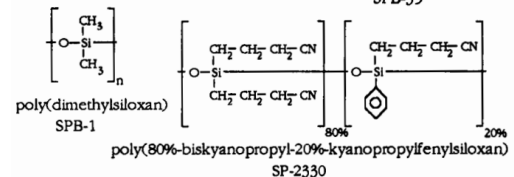
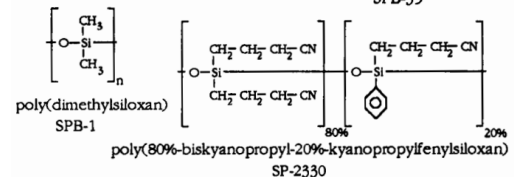
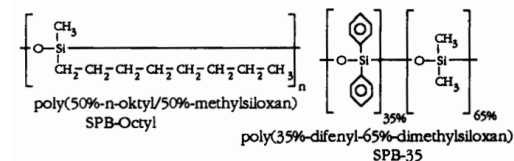
průměr: 0,1-1 mm, SF 0.25 - 5 μm

délka: 15 - 60 m

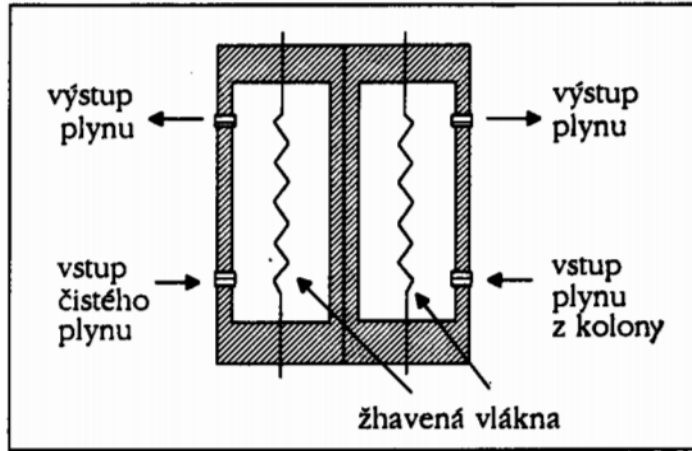
zvnějšť pokryť polyimidem



Silikagel



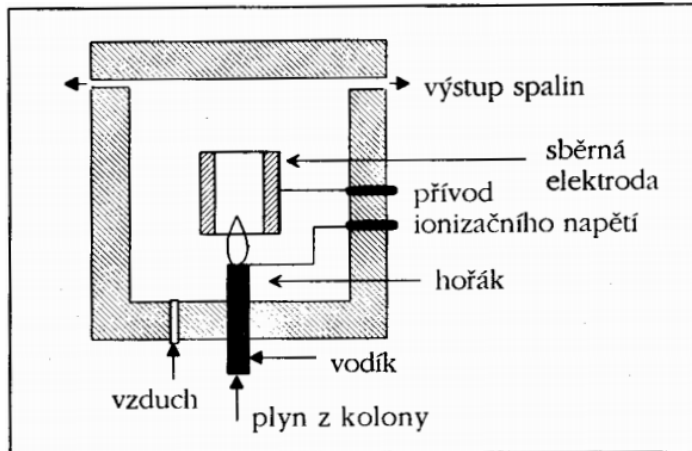
Plynová chromatografie (GC) - detektory



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

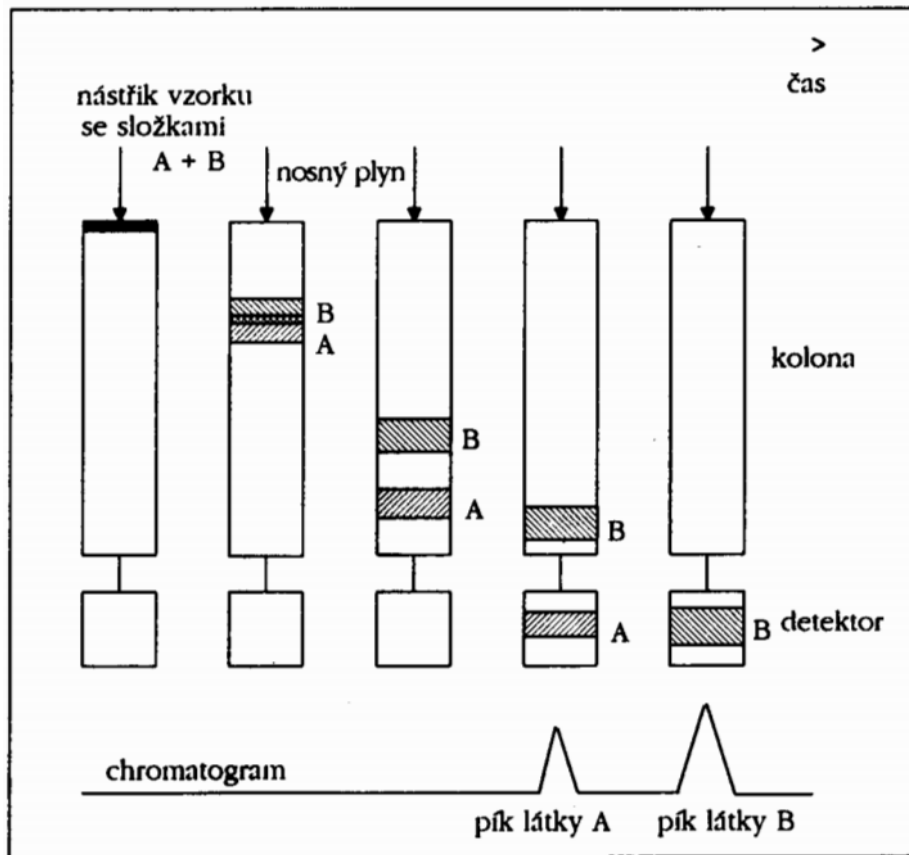
spalování výstupního plynu v plameni

přítomnost složky zvýší ionizaci → proud vhodné pro většinu látek

další typy

detektor elektronového záchytu, atomový emisní

Plynová chromatografie (GC) - pracovní postup



eluční metoda

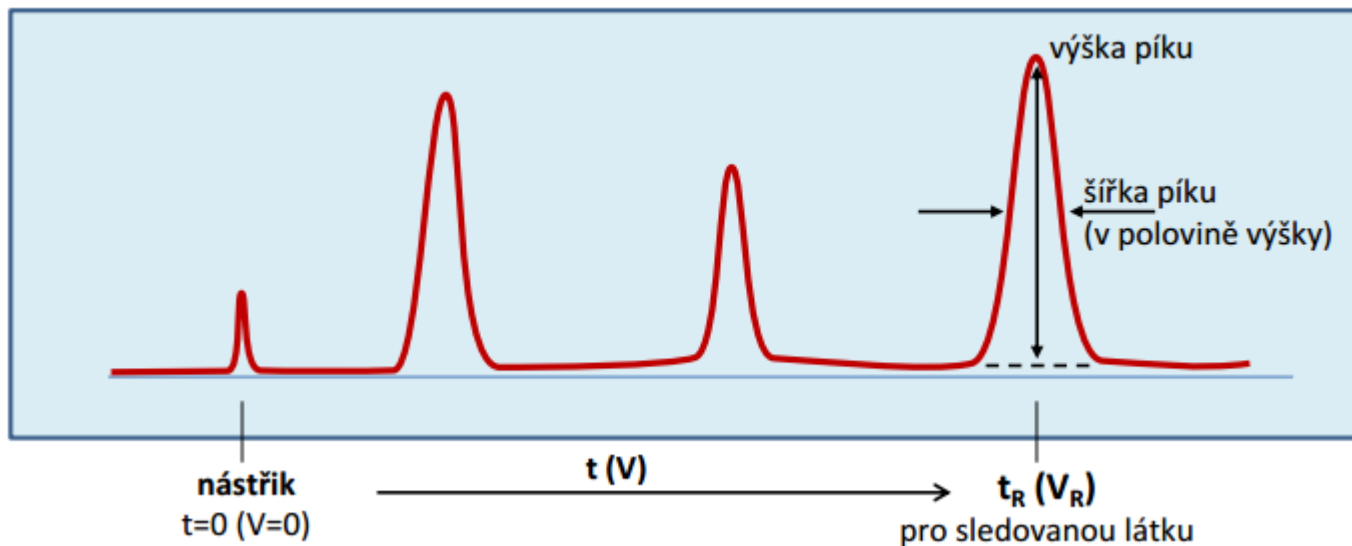
(nejběžnější)

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) - chromatogram



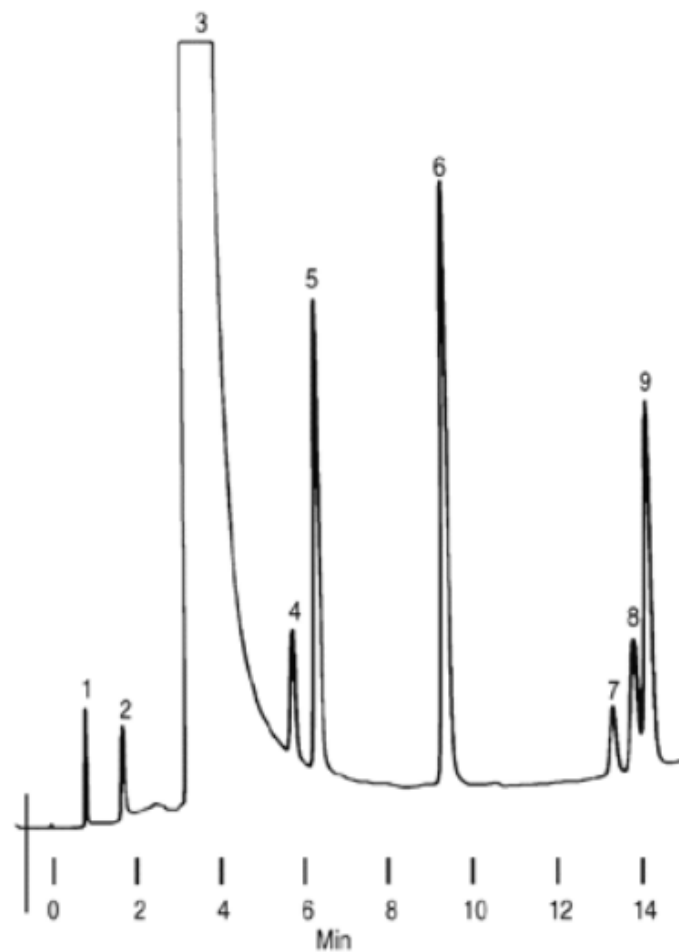
kvalitativní analýza
x
kvantitativní analýza

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)

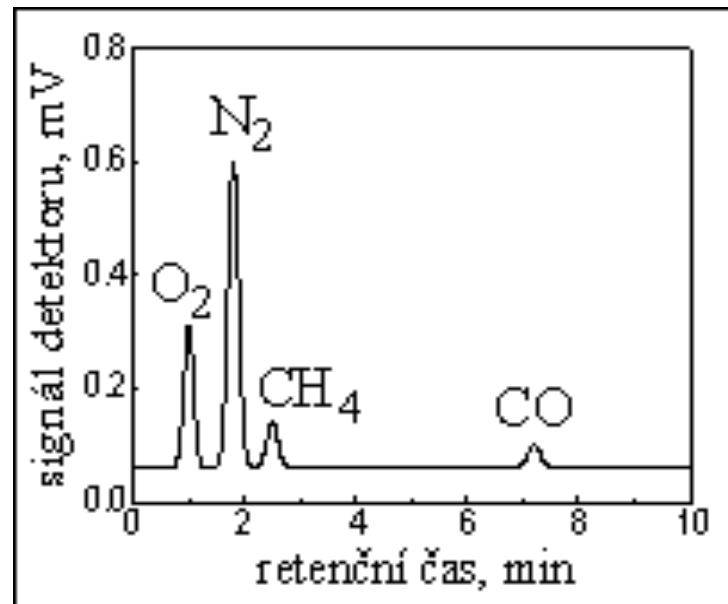
stacionární fáze : molekulové síto 5A

nosný plyn : 30 ml/min He

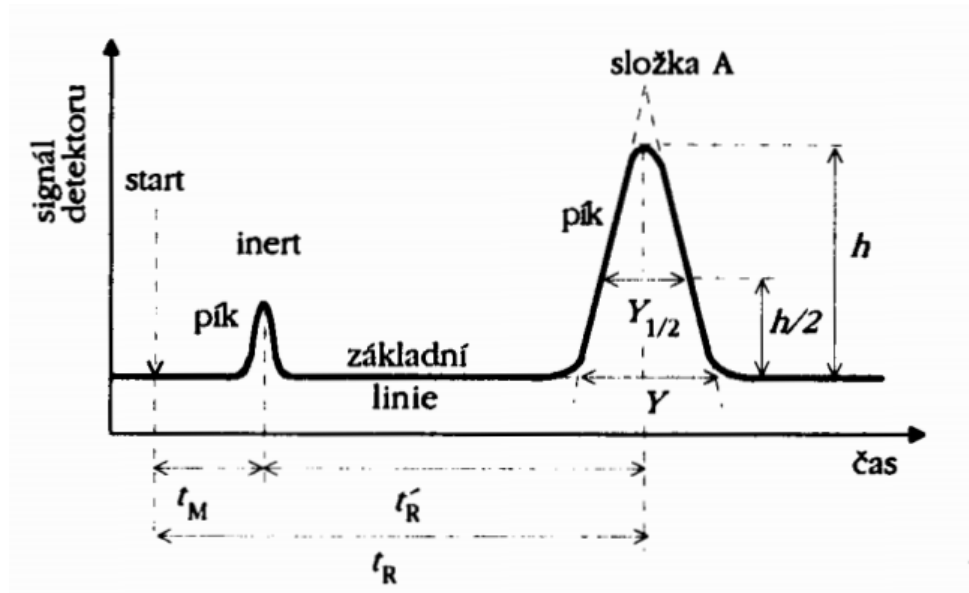
dávkování : 100 mL (35 °C)

teplota termostatu kolony : 35 °C

detekce : TCD (140 °C)

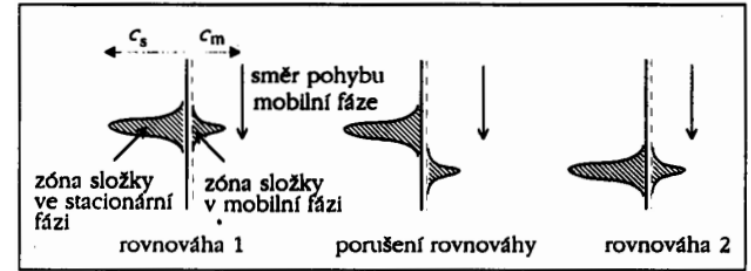


Účinnost separace v chromatografii



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

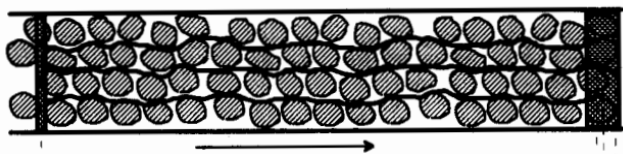
t_r ... retenční čas

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.

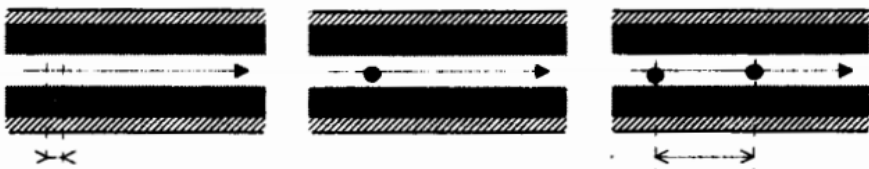


H_B Molekulární difúze

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

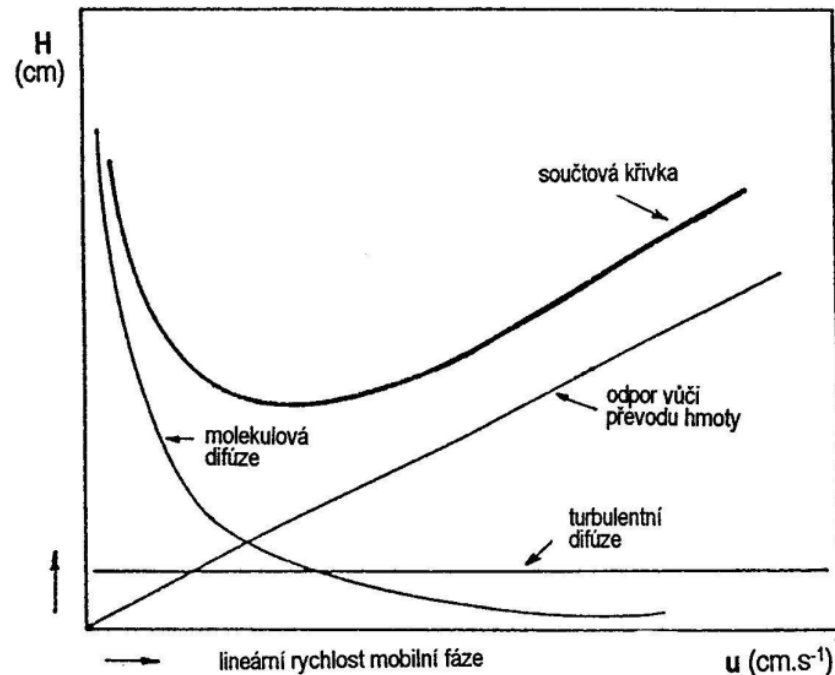
H_C Odpor proti převodu hmoty

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



van Deemterova rovnice

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



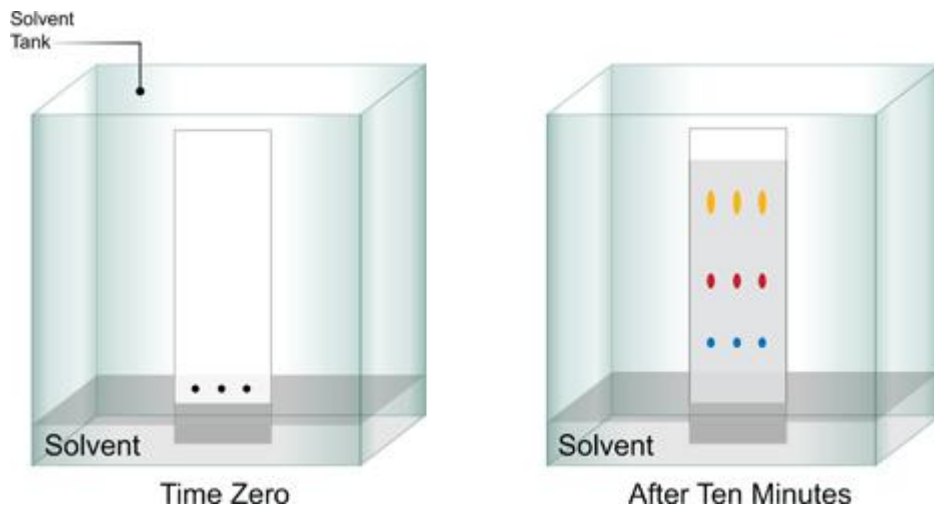
planární techniky kapalinové chromatografie

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:

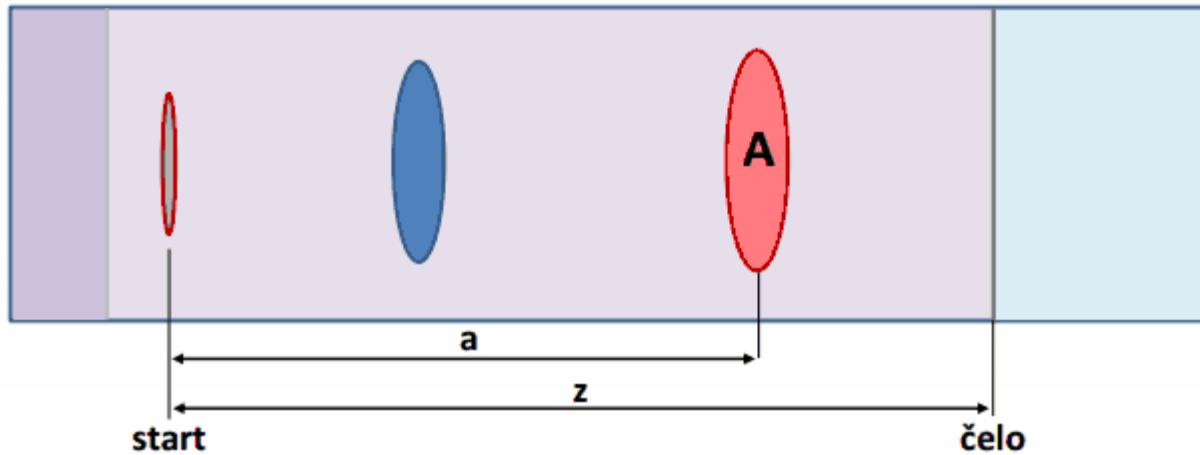
papír (SF: voda poutaná celulosou)
tenké vrstvy zrnitého materiálu
na podložce (Al, sklo) - Al_2O_3 , SiO_2

Mobilní fáze:

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

planární techniky kapalinové chromatografie

kvalitativní analýza



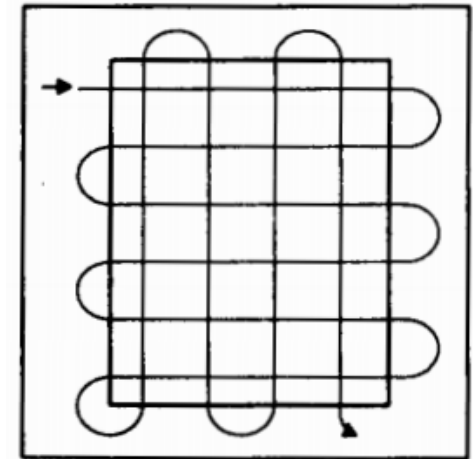
Retenční faktor pro látku A: $R_f = \frac{a}{z}$ $0 \leq R_f \leq 1$

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

planární techniky kapalinové chromatografie

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)



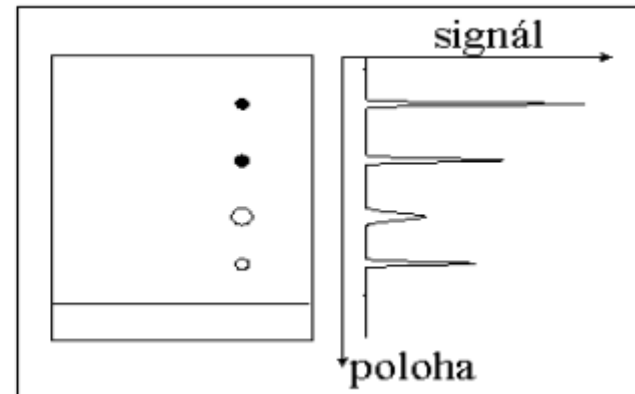
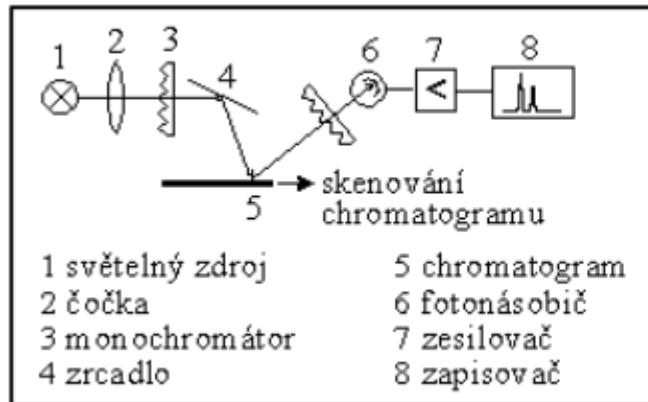
vedení postřiku činidlem

činidla používaná k chemické detekci skvrn

planární techniky kapalinové chromatografie

kvantitativní analýza

denzitometricky - zjišťuje se stupeň ztmavnutí v místě skvrny



kapalinová chromatografie (LC)

kolonové uspořádání

MF: kapalina (interaguje)

klasické provedení

skleněná kolona

délka ~ 50 cm

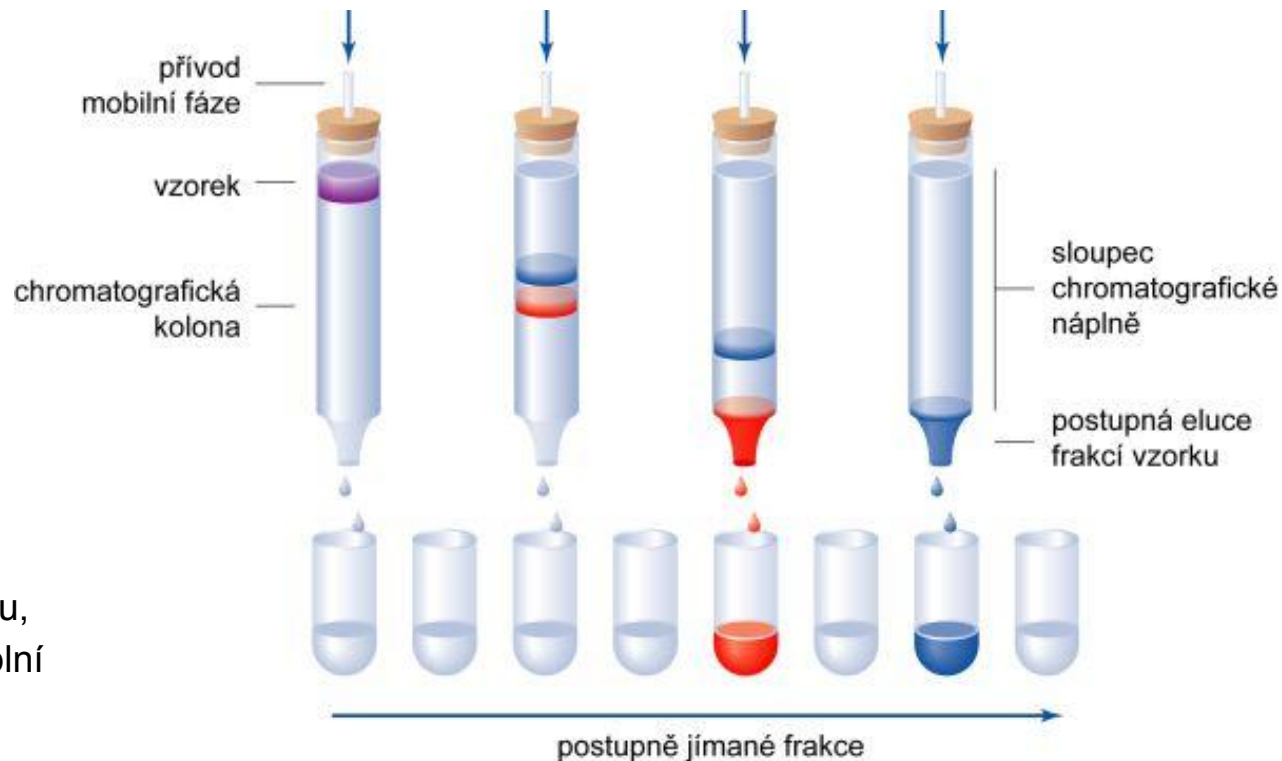
průměr ~ 2 cm

náplň

zrnitý sorbent (Al_2O_3)

MF gravitací tlačena kolonou,
složky různě sorbovány náplní

→ dělení



HPLC chromatograf

High Performance Liquid Chromatography - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

čerpadlo (pumpa)

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

dávkovací zařízení

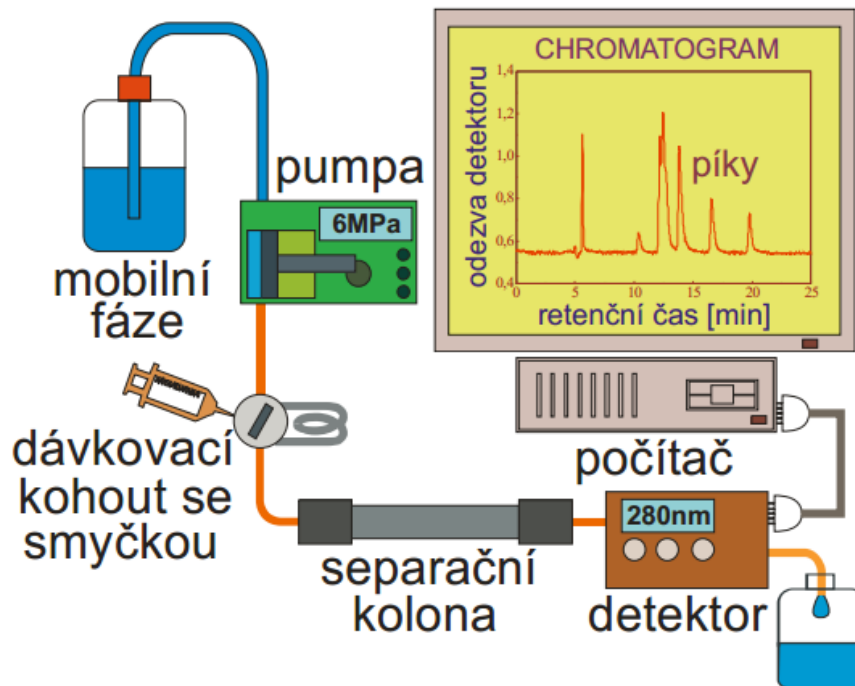
injekční zařízení
obtokový dávkovací kohout (10 μl)

kolony

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

detektor

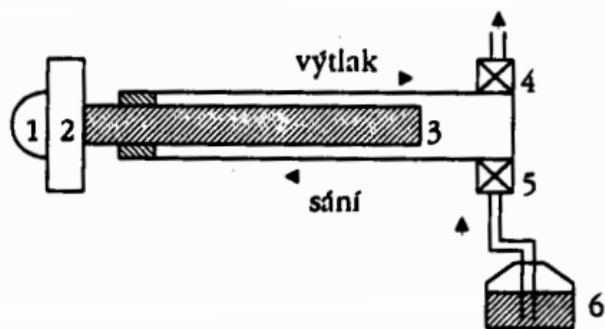
fotometrický, refraktometrický,
fluorescenční, vodivostní, hmotnostní



HPLC chromatograf

čerpadlo

pístové, membránové



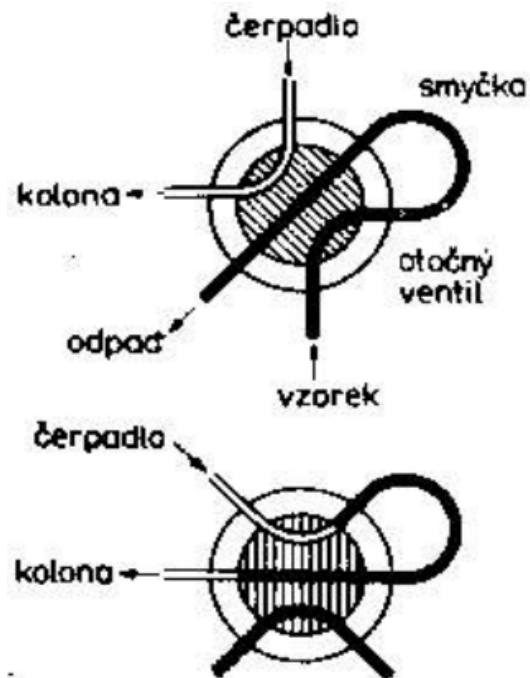
- 1 - elektromotor
- 2 - převodní mechanismus
- 3 - píst
- 4 - výtláčny ventil
- 5 - sací ventil
- 6 - zásobník mobilní fáze

kolony

pouze náplňové
rozmanité možnosti



šesticestný ventil



HPLC chromatograf - detektory

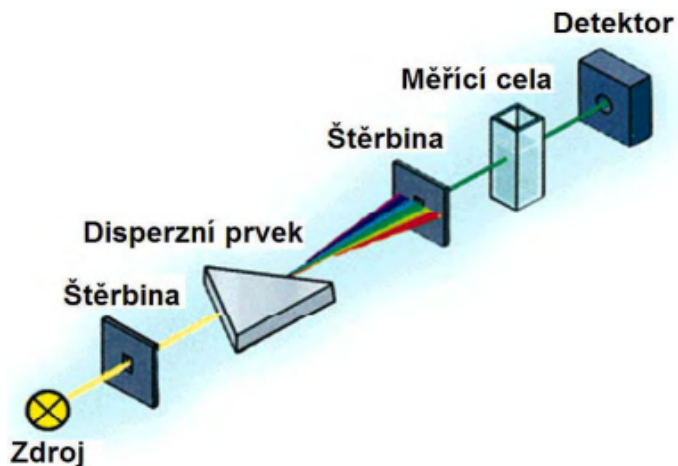
fotometrický detektor

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

ε ... absorpční koeficient

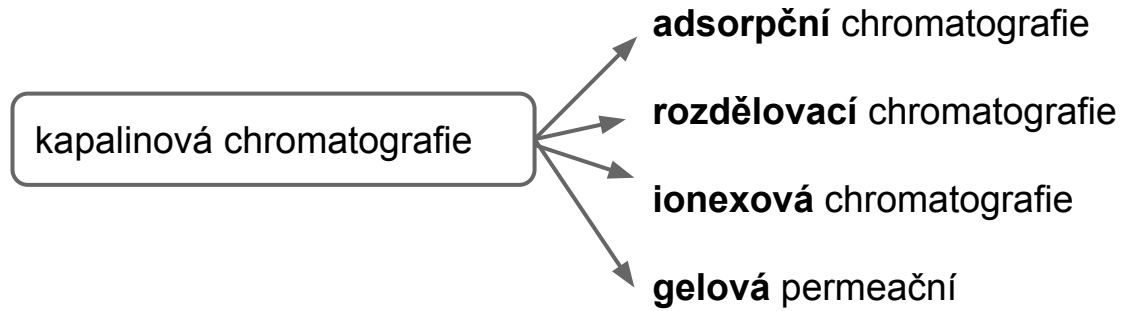
c ... koncentrace látky

l ... délka absorpční vrstvy

další detektory:

fluorescenční, refraktometrický, vodivostní

kapalinová chromatografie (LC) podle chemického principu dělení složek



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 kyselé)

Al_2O_3 (polární bazický)

aktivní uhlí (nepolární)

mobilní fáze

nepolární analyty: nepolární MF

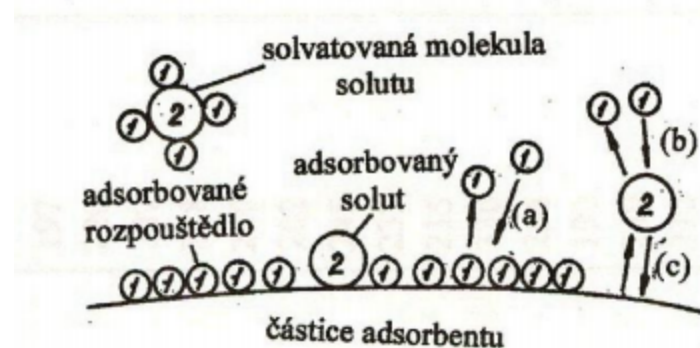
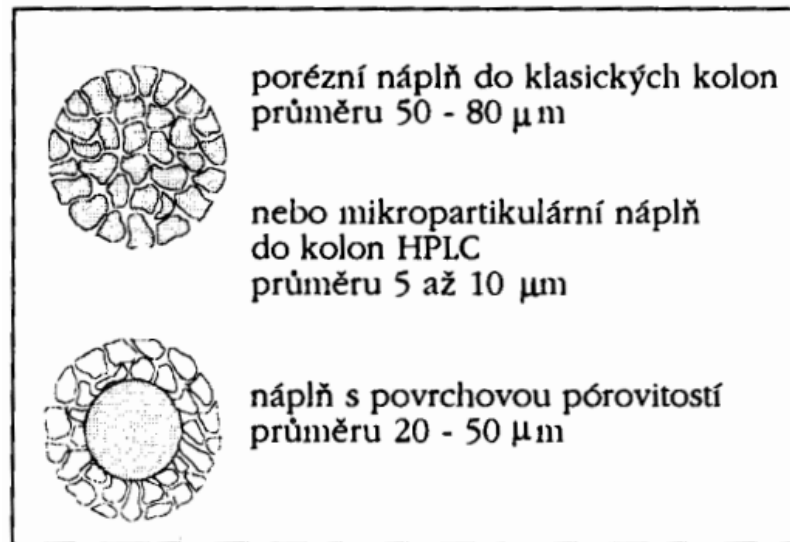
polární analyty: polární MF

eluční síla mobilní fáze:

pentan < benzen < ethanol < aceton

retenční časy analytů:

uhlovodíky < aminy < alkoholy



Rozdělovací kapalinová chromatografie

princip

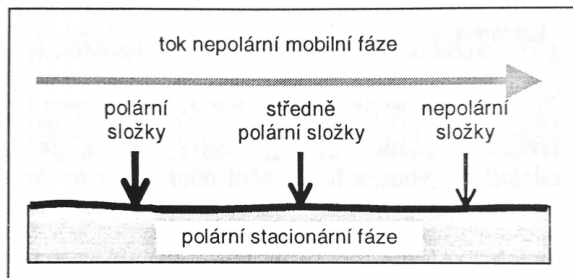
rozdělení analytů mezi dvě nemísitelné kapaliny

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

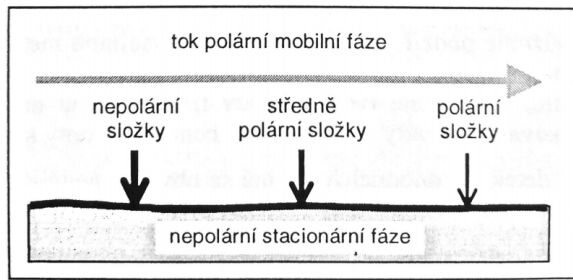
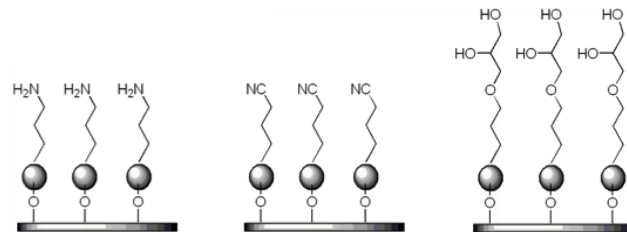


polární “**normální fáze**” NPC

např. voda na silikagelu

MF: nepolární (hexan)

retence roste s polaritou

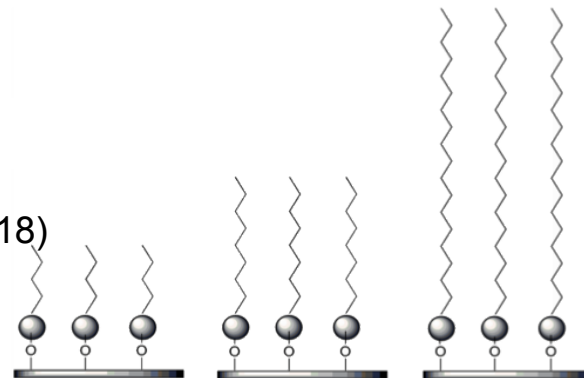


nepolární “**obrácené fáze**” RPC

uhlovodíky na silikagelu (např. C18)

MF: polární (voda, acetonitril)

retence klesá s polaritou



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:

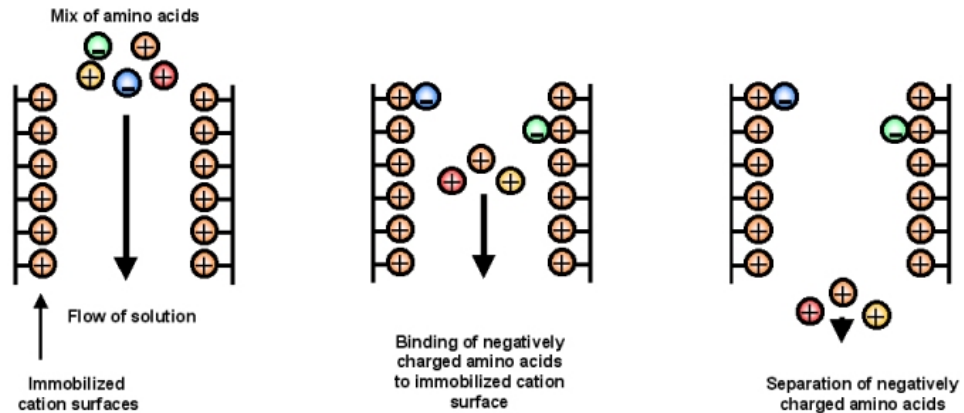
$Ag^+ > Cs^+ > K^+ > Na^+ > H^+$

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)

stacionární fáze:

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

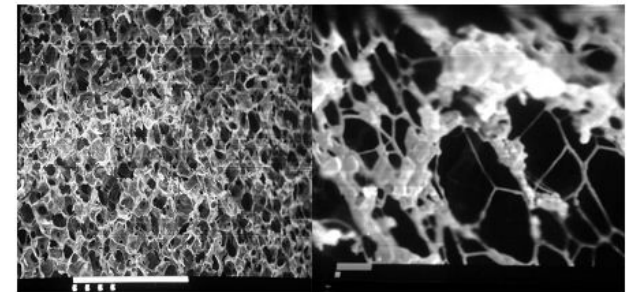
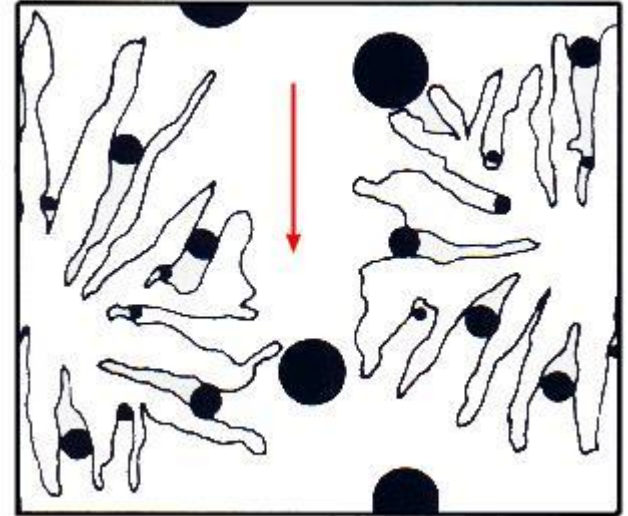
pro nerozpustné ve vodě: **hydrofobní gely** (styrigel)

vhodné pro:

analyty $M > 500$

proteiny

biopolymery



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