

Metody separační

Klíčový požadavek

- rozdělení vzorku na jednotlivá chemická individua nebo alespoň na jednodušší směsi**

DŮLEŽITÉ POJMY

- SELEKTIVITA**
- ROZSAH POUŽITELNOSTI**
- FRAKCIONAČNÍ KAPACITA**

Metody separační

SELEKTIVITA

- **SCHOPNOST LÁTKY DĚLIT NA ZÁKLADĚ JEDNÉ ČI VÍCE JEJICH VLASTNOSTÍ**
 - **dle bodu varu**
 - **dle těkavosti (tenze par)**
 - **dle distribuce v různých kapalných fázích**
 - **dle molekulové hmotnosti**
 - **dle strukturních vlastností**
 - **dle optické otáčivosti**

Metody separační

ROZSAH POUŽITELNOSTI

- **JAKÉ TYPY LÁTEK LZE DANOU METODOU DĚLIT - otázka „univerzálnosti“ či „specificity“ dané metody**
 - nízkomolekulární / makromolekulární
 - těkavé / netěkavé
 - polární / nepolární
 - anorganické / organické

Metody separační

FRAKCIONAČNÍ KAPACITA

- **MAXIMÁLNÍ POČET SLOŽEK, KTERÝ MŮŽE BÝT ROZDĚLEN V JEDNÉ OPERACI**
 - jednoduchá extrakce - 2 části
 - frakční destilace - několik desítek frakcí
 - GC na kapilární koloně - několik set

Metody separační

TYPY METOD

- **METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÝCH ROVNOVÁHÁCH**
 - kapalina-pára, kapalina-kapalina, kapalina-pevná fáze, plyn-pevná fáze
- **METODY ZALOŽENÉ NA ODLIŠNÉ POHYBLIVOSTI**
 - V SILOVÉM POLI
 - PŘES MEMBRÁNU

Metody separační

- **METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÝCH ROVNOVÁHÁCH**
 - destilace
 - plynová rozdělovací chromatografie
 - plynová adsorpční chromatografie
 - extrakce
 - kapalinová rozdělovací chromatografie
 - gelová permeační chromatografie
 - frakční krystalizace
 - zonální tavení

Metody separační

- **METODY ZALOŽENÉ NA ODLIŠNÉ POHYBLIVOSTI**

- **V SILOVÉM POLI**

- elektroforesa
 - isotachoforesa
 - termodifuze
 - ultracentrifugace

- **PŘES MEMBRÁNU**

- ultrafiltrace
 - dialyza
 - reversní osmosa

Metody separační

- **METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÝCH ROVNOVÁHÁCH**

- rovnovážná distribuce složek vzorku mezi dvě fáze
- pro každou složku J - distribuce mezi fáze 1 a 2 charakterizovaná distribuční konstantou

- $K_{D,J} = (c_J)_1 / (c_J)_2$ - poměr koncentrací

- praktické analytické vyjádření pomocí koncentrací, nikoli pomocí aktivit, a proto je korektnější mluvit
 - o DISTRIBUČNÍM KOEFICIENTU než
 - o DISTRIBUČNÍ KONSTANTĚ

Metody separační

- **METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÝCH ROVNOVÁHÁCH**

- rovnovážná distribuce složek vzorku mezi dvě fáze
- popis KAPACITNÍM POMĚREM k_J - poměr
látkových množství

- $k_J = (n_J)_1 / (n_J)_2 = [(c_J)_1 V_1] / [(c_J)_2 V_2] = K_{D,J} V_1/V_2$

- obvyklejší popis v chromatografii

- označení tam též jako KAPACITNÍ (RETENČNÍ) FAKTOR

Metody separační

- **METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÝCH ROVNOVÁHÁCH**
 - mají-li se látky dělit - musí se lišit jim odpovídající hodnoty $K_{D,J}$ resp. k_J
 - **SEPARAČNÍ FAKTOR α_{IJ} (separační poměr)**
 - $\alpha_{IJ} = K_{D,I} / K_{D,J} = k_I / k_J$
 - dosazuje se tak, aby poměr byl ≥ 1
 - **JE VHODNĚJŠÍ PŘÍMO POSUZOVAT $k_I, k_J, k_X \dots$**

Metody separační

- METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÝCH ROVNOVÁHÁCH
 - VÝTĚŽEK LÁTKY J
 - poměr hmotnosti látky v jedné fázi vůči její celkové hmotnosti v soustavě

$$R_J = (m_J)_1 / [(m_J)_1 + (m_J)_2]$$

CHROMATOGRRAFIE

- **DĚLENÍ MEZI DVĚ FÁZE**
 - 1) **POHYBLIVÁ (KAPALINA, PLYN) - MOBILNÍ**
 - plyn - **PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE**
 - kapalina - **KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE**
 - tekutina v nadkritickém stavu - **SFC**
 - 2) **NEPOHYBLIVÁ - STACIONÁRNÍ** - velmi široká paleta „zakotvených“ fází resp. materiálů
 - obecný pojem - **SORBENT - NÁPLŇ KOLONY**

CHROMATOGRRAFIE

– STACIONÁRNÍ FÁZE

- KAPALINA NA NOSIČI
 - GLC, LLC - ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE
- TUHÁ LÁTKA
 - GSC, LSC - ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE
 - IEC - IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE
- KAPALINA V PÓRECH SORBENTU
 - GPC - GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

CHROMATOGRRAFIE

- **VZOREK** - dělená směs
- **SLOŽKA** - látky obsažené ve vzorku

- **ELUČNÍ CHROMATOGRRAFIE**

- vzorek je unášen **MOBILNÍ FÁZÍ**
- **MOBILNÍ FÁZE** postupuje kolonou naplněnou **SORBENTEM**
- **DĚLENÉ SLOŽKY POSTUPUJÍ POMALEJI NEŽ MOBILNÍ FÁZE** - jsou **RETARDOVÁNY**,
dochází k jejich **RETENCI**,
charakterizované **RETENČNÍM ČASEM**

CHROMATOGRRAFIE

- **VZOREK** - dělená směs
- **SLOŽKA** - látky obsažené ve vzorku
 - **VYTĚSŇOVACÍ CHROMATOGRRAFIE**
 - **MOBILNÍ FÁZE** je vytěsňujícím činidlem
 - **MOBILNÍ FÁZE** tlačí vzorek před sebou
 - **FRONTÁLNÍ CHROMATOGRRAFIE**
 - **VZOREK** slouží jako **MOBILNÍ FÁZE**
- **PŘÍSTROJ** - **CHROMATOGRAF**
- **ZÁZNAM** - **CHROMATOGRAM**

CHROMATOGRAFIE

- **KOLONOVÁ** - průtok mobilní fáze řízen
zvnějšku
 - stacionární fáze je v objemu kolony či na povrchu kapiláry
- **PLANÁRNÍ** - pohyb mobilní fáze dán
kapilárními silami
 - stacionární fáze je uspořádána v rovinné ploše na vhodném podkladu
 - papírová chromatografie, tenkovrstevná - TLC
 - orientační „screening“ - levné, rychlé

CHROMATOGRRAFIE

– CHROMATOGRAM

- retenční křivky, chromatografické vlny
- PÍKY PRO JEDNOTLIVÉ LÁTKY (FRAKCE)
- ODEZVA DETEKTORU (úměrná koncentraci) **proti**
 - RETENČNÍ VZDÁLENOSTI
 - RETENČNÍMU ČASU
 - RETENČNÍMU OBJEMU
- pro přepočty nutno znát
 - rychlost posunu papíru
 - objemovou rychlost mobilní fáze - F_m

CHROMATOGRRAFIE

– ZPŮSOBY OVLIVNĚNÍ DĚLENÍ SLOŽEK

- **termodynamika separačního procesu**
 - **ovlivnění interakce mezi složkami a sorbentem**
 - » **změna poloh píků**

- **kinetika separačního procesu**
 - **ovlivnění pohybu složek v mobilní fázi**
 - **ovlivnění přenosu hmoty ve stacionární fázi**
 - » **ovlivnění šířky píků**

CHROMATOGRAFIE

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

- MRTVÝ retenční čas - t_M - retenční čas složky, která není v koloně zadržována
 - odpovídá tomu MRTVÝ retenční objem V_M
 - » kromě GPC roven objemu mobilní fáze v koloně V_m
 - » $V_M = t_M F_m$ (F_m - objemová rychlost mobilní fáze)

• LINEÁRNÍ RYCHLOST MOBILNÍ FÁZE - u

– délka kolony L

» $u = L / t_M$

CHROMATOGRRAFIE

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

- ZADRŽOVANÉ SLOŽKY - A, B, ... J, Z
- LINEÁRNÍ RYCHLOST ZADRŽOVANÉ SLOŽKY J

– $u_J = L / t_{R,J}$

– z toho vyplývá RETARDAČNÍ FAKTOR - RELATIVNÍ RETENCE

$$k_J = (n_J)_s / (n_J)_m$$

– $R_{F,J} = u_J / u = (n_J)_m / [(n_J)_m + (n_J)_s] = 1 / [1 + k_J]$

» pravděpodobnost výskytu složky J v mobilní fázi

↗ k_J - kapacitní poměr látky J, daný vztahem

↗ $k_J = (n_J)_s / (n_J)_m = K_{D,J} V_s / V_m$

CHROMATOGRRAFIE

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

• JAK Z CHROMATOGRAMU URČIT KAPACITNÍ POMĚRY ?

- $u_J = L / t_{R,J} = u / [1 + k_J] = (L / t_M) / [1 + k_J]$
- $1 / t_{R,J} = 1 / t_M [1 + k_J]$
- $t_{R,J} = t_M [1 + k_J]$
- $k_J = (t_{R,J} - t_M) / t_M$, kde $(t_{R,J} - t_M) = t_{R,J}'$
- $t_{R,J}'$ - REDUKOVANÝ RETENČNÍ ČAS
- analogicky se definuje redukováný retenční objem a redukováná retenční vzdálenost

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

- JAK Z CHROMATOGRAMU URČIT KAPACITNÍ POMĚRY ?

- pro PLANÁRNÍ CHROMATOGRAFII

- VZDÁLENOST ČELA ROZPOUŠTĚDLA OD STARTU

- » d

- VZDÁLENOST STŘEDU SKVRNY SLOŽKY J OD STARTU

- » d_J

- RETARDAČNÍ FAKTOR

- » $R_{F,J} = u_J / u = d_J / d = 1 / [1 + k_J]$

- » lze takto odvodit vztah mezi měřenými vzdálenostmi a kapacitním poměrem látky J

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

• JAK POPSAT TVAR PÍKU (PARAMETRY PÍKU) ?

– ideální tvar GAUSSOVA KŘIVKY

h_J - úměrné c_J

– $h_J = h_{J,\max} \exp [-(V - V_{R,J})^2 / (2 \sigma_v^2)]$

» σ_v - směrodatná odchylka normálního rozdělení,
kde distribuční funkce odpovídá Gaussově křivce

» $2 \sigma_v$ - šířka píku **složky J** v inflexních bodech
(v objemových jednotkách)

» $4 \sigma_v$ - šířka píku na nulové linii - Y (Y_v, Y_t)

» šířka píku v polovině výšky - FWHM - $Y_{h/2}$

» inflexní body - ve výšce $0.607 h_{J,\max}$

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

• JAK URČIT POČTY PATER ?

– TEORETICKÝCH a EFEKTIVNÍCH

$$– n_{\text{teor},J} = (V_{R,J} / \sigma_v)^2 = (t_{R,J} / \sigma_t)^2$$

$$– n_{\text{teor},J} = 16 (t_{R,J} / Y_t)^2 = 16 (V_{R,J} / Y_v)^2$$

$$– n_{\text{teor},J} = 5,545 (t_{R,J} / Y_{h/2,t})^2$$

$$– n_{\text{teor},J} = 6,282 (t_{R,J} h_{J, \max} / A)^2$$

» kde h je výška píku, A je plocha píku

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

• JAK URČIT POČTY PATER ?

– TEORETICKÝCH a EFEKTIVNÍCH

$$- n_{\text{ef},J} = (V_{R,J}' / \sigma_v)^2 = (t_{R,J}' / \sigma_t)^2$$

$$- n_{\text{ef},J} = 16 (t_{R,J}' / Y_t)^2 = 16 (V_{R,J}' / Y_v)^2$$

$$- n_{\text{ef},J} = 5,545 (t_{R,J}' / Y_{h/2,t})^2$$

$$- n_{\text{ef},J} = 6,282 (t_{R,J}' h_{J, \text{max}} / A)^2$$

» kde h je výška píku, A je plocha píku

– DŮLEŽITÉ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

• JAK URČIT VÝŠKU (VÝŠKOVÝ EKVIVALENT)

PATER ?

– TEORETICKÝCH a EFEKTIVNÍCH

– $H_{J,teor} = L / n_{teor,J} = \sigma_J^2 / L$ (souvislost s rozptylem /šířkou/ zóny složky J)

– $H_{J,ef} = L / n_{ef,J}$

– menší hodnota H_J - účinnější kolona

– slouží k porovnávání kolon různých délek

CHROMATOGRRAFIE

– teorie CHROMATOGRAFICKÉHO PROCESU

• Teorie chromatografického patra - ROVNOVÁŽNÁ

– Tato teorie postuluje pět výchozích zjednodušujících předpokladů:

1. Celá kolona je rozdělena na velké množství elementárních jednotek – pater.
2. Na každém patře dochází k distribuci složky mezi mobilní a stacionární fázi a tato distribuce dosáhne rovnovážného stavu.
3. Hodnota distribuční konstanty zůstává stejná na všech patrech.
4. Difúzi ve směru toku lze zanedbat.
5. Průtok mobilní fáze není kontinuální, ale probíhá po malých přírůstcích, které mají objem patra.

CHROMATOGRRAFIE

- VLIVY ZPŮSOBUJÍCÍ ROZŠIŘOVÁNÍ ZÓNY
(ŠÍŘKU PÍKU)
- van Deemterova teorie - **DYNAMICKÁ**
 - VÍŘIVÁ DIFUSE V MOBILNÍ FÁZI
 - MOLEKULÁRNÍ /PODÉLNÁ/ DIFUSE V MOBILNÍ FÁZI
 - ODPOR PROTI PŘENOSU HMOTY V MOBILNÍ FÁZI
 - ODPOR PROTI PŘENOSU HMOTY VE STACIONÁRNÍ FÁZI
- vlivy působí současně a jsou vzájemně nezávislé
- $H = H_F + H_L + H_M + H_S$

CHROMATOGRRAFIE

– VLIVY ZPŮSOBUJÍCÍ ROZŠIŘOVÁNÍ ZÓNY (ŠÍŘKU PÍKU)

- VÍŘIVÁ DIFUSE V MOBILNÍ FÁZI

- ZÁVISLOST NA VELIKOSTI A TVARU ČÁSTIC
SORBENTU

- » CO NEJUŽŠÍ DISTRIBUCE VELIKOSTI ČÁSTIC -
ideálně JEDNOTNÁ VELIKOST ČÁSTIC

- » JEDNOTNÝ TVAR ČÁSTIC
ideálně SFÉRICKÉ ČÁSTICE

- » otázka „kvality“ naplnění kolony

- » minimální vliv lineární rychlosti mobilní fáze -
prakticky nezávislé na u

CHROMATOGRRAFIE

– VLIVY ZPŮSOBUJÍCÍ ROZŠIŘOVÁNÍ ZÓNY (ŠÍŘKY PÍKU)

• MOLEKULÁRNÍ DIFUSE V MOBILNÍ FÁZI

- při nástřiku vzorku - úzká zóna s vysokým obsahem složek (přes celý průřez kolony)
- okolo (před a za zónou) mobilní fáze s primárně nulovou (nízkou) koncentrací složek
 - » koncentrační spád - difuze látek v souladu s Fickovými zákony
 - » otázka hodnoty difusních koeficientů složek
 - » otázka setrvání složek v mobilní fázi
 - » otázka volné difuse v náplňových kolonách
 - » otázka vlivu lineární rychlosti mobilní fáze - $1/u$
 - » vyšší rychlost - omezení rozsahu difusního pohybu

CHROMATOGRRAFIE

– VLIVY ZPŮSOBUJÍCÍ ROZŠIŘOVÁNÍ ZÓNY (ŠÍŘKY PÍKU)

- ODPOR PROTI PŘENOSU HMOTY V MOBILNÍ FÁZI
 - tok mobilní fáze kanálky - nízká rychlost toku u povrchu stacionární fáze, vyšší ve středu toku kanálkem - různé „proudy“
 - přestup molekul složek mezi různými proudy difusním pohybem - překonávaná vzdálenost souvisí s průřezem kanálků, který je úměrný velikosti částic sorbentu
 - vliv lineární rychlosti mobilní fáze
 - přímá úměrnost k u

CHROMATOGRRAFIE

– VLIVY ZPŮSOBUJÍCÍ ROZŠIŘOVÁNÍ ZÓNY (ŠÍŘKY PÍKU)

• ODPOR PROTI PŘENOSU HMOTY VE STACIONÁRNÍ FÁZI

- difuze složek do vrstvy stacionární fáze -
 - DO RŮZNÉ HLOUBKY - různé opoždění

» otázka tloušťky vrstvy stacionární fáze

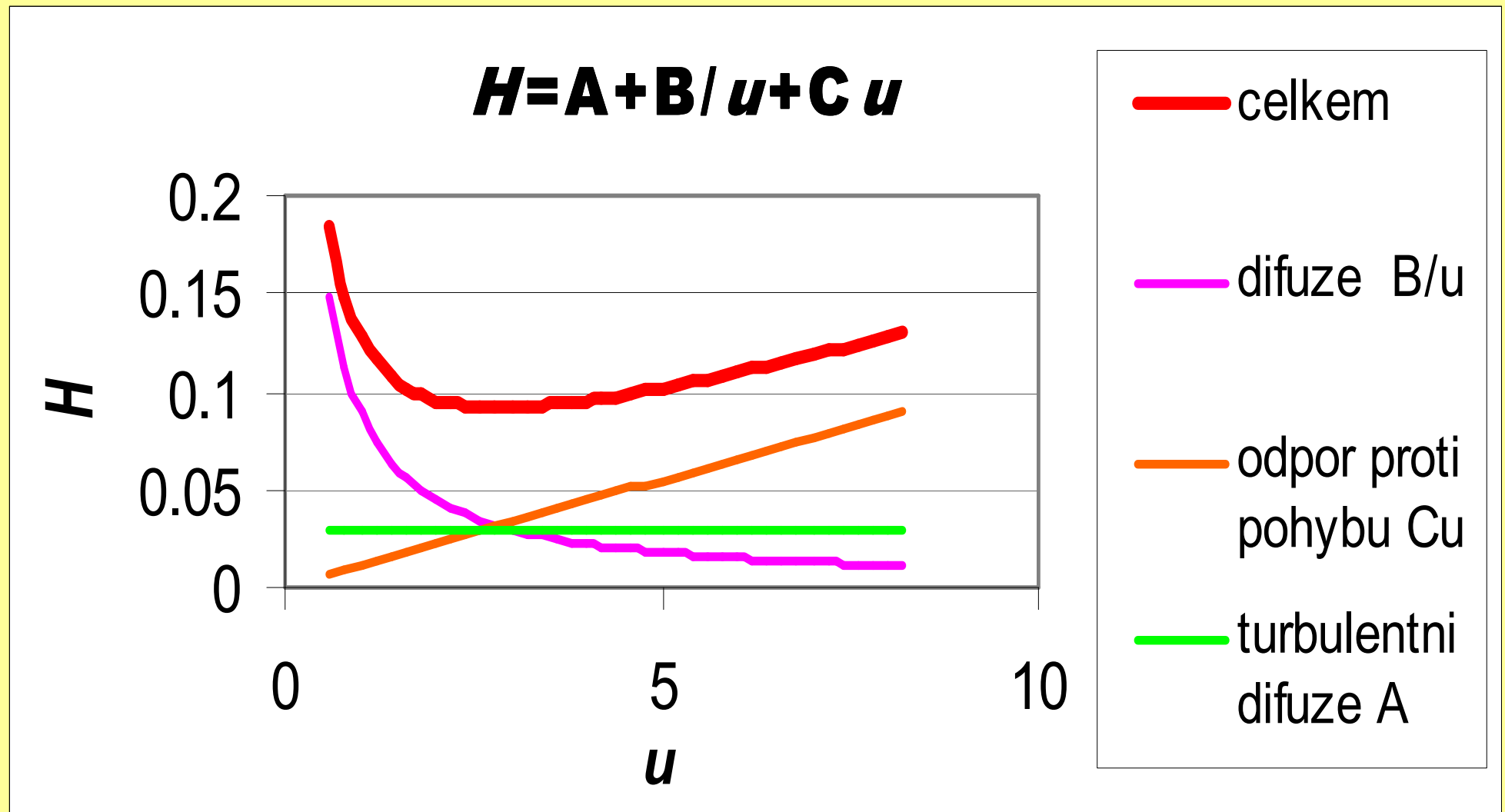
zakotvené na nosiči (na stěnách kapiláry)

- VLIV KAPACITNÍHO POMĚRU
- VLIV GEOMETRIE NÁPLNĚ KOLONY
- OTÁZKA POROSITY NÁPLNĚ KOLONY
- VLIV LINEÁRNÍ RYCHLOSTI MOBILNÍ FÁZE

- přímá úměrnost k u

CHROMATOGRRAFIE

– VLIVY ZPŮSOBUJÍCÍ ROZŠIŘOVÁNÍ ZÓNY (ŠÍŘKY PÍKU)



CHROMATOGRRAFIE

– VLIVY OVLIVŇUJÍCÍ TERMODYNAMIKU SEPARAČNÍHO PROCESU

• VLIV OBJEMU STACIONÁRNÍ FÁZE

$$V_{R,J}' = K_{D,J} V_s$$

- větší objem stacionární fáze
 - zvětšuje retenci složky - zlepšuje dělení složek
 - prodlužuje dobu analýzy
 - komplikuje přenos hmoty ve stacionární fázi

NUTNO VOLIT VHODNÝ KOMPROMIS

CHROMATOGRRAFIE

– ROZLIŠENÍ SLOŽEK - definice

- $R_{I,J} = (t_{R,J} - t_{R,I}) / 0,5 (Y_{t,J} + Y_{t,I})$

- rozdíl poloh dvou píků dělený jejich průměrnou šířkou na úrovni základní linie

- BEZROZMĚRNÁ VELIČINA

- vyšší hodnota - lepší separace

- žádná informace o parametrech, které rozlišení ovlivňují

- ČITATEL - vztah k termodynamice separačního procesu

- JMENOVATEL - vztah ke kinetice separačního procesu