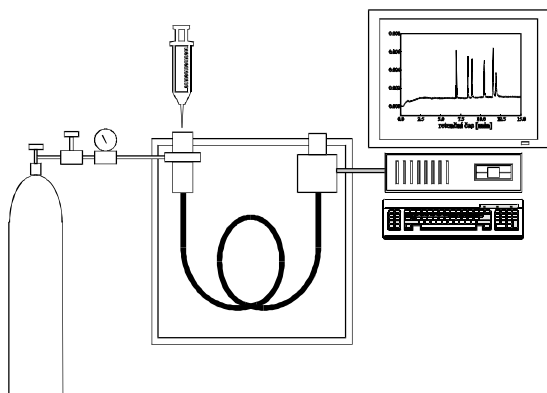


Gas Chromatography, GC

PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE, GC

Plynový CHROMATOGRAF



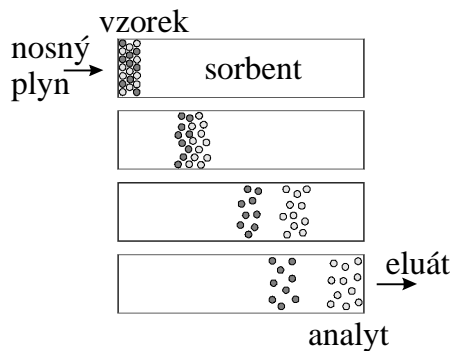
SEPARACE v GC

probíhá v kapilární nebo náplňové koloně, která obsahuje **stacionární** (nepohyblivou) **fázi** (sorbet) a **mobilitní** (pohyblivou) **fázi** (nosný plyn, inertní plyn či eluent).

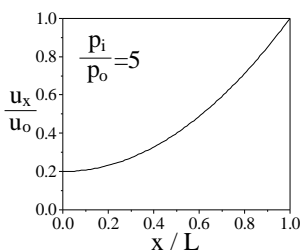
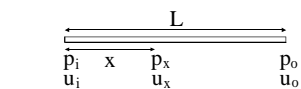
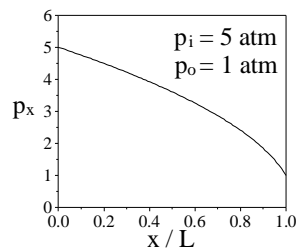
Rozdílné analyty mají rozdílnou **afinitu** k sorbetu.

Různé analyty vykazují různou **distribuci** mezi sorbetem a eluentem nebo **adsorpci** na sorbetu.

Rozdílné analyty jsou rozdílně **zadržovány** a rozdílně **zpožd'ovány** (retardovány).



LINEÁRNÍ RYCHLOST NOSNÉHO PLYNU



KOMPRESIBILITNÍ FAKTOR, j

$$j = \frac{3}{2} \cdot \frac{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^2 - 1}{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^3 - 1}$$

p_i tlak na vstupu do kolny
 p_o tlak na výstupu z kolny

průměrná lineární rychlost mobilní fáze

$$\bar{u} = \frac{B_o \cdot \Delta p}{\eta \cdot \epsilon \cdot L} = \frac{B_o \cdot (p_i - p_o)}{\eta \cdot \epsilon \cdot L}$$

$$\bar{u} = j \cdot u_o$$

B_o specifická permeabilita kolony [m^2]
 Δp tlakový spád [Pa]
 η dynamická viskozita [Pa s]
 ϵ vnitřní porozita sorbetu
 L délka kolony [m]

RETENČNÍ OBJEMY v GC

mrtvý retenční objem

$$V_M = t_M \cdot F_m$$

retenční objem

$$V_{R,i} = t_{R,i} \cdot F_m$$

redukovaný retenční objem

$$V'_{R,i} = t'_{R,i} \cdot F_m = V_{R,i} - V_M$$

čistý retenční objem je redukovaný retenční objem

korigovaný na stlačitelnost nosného plynu

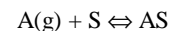
$$V_N = t'_{R,i} \cdot F_m \cdot j = V'_{R,i} \cdot j$$

specifický retenční objem je čistý retenční objem vztažený na 1 g nebo 1 m^2 stacionární fáze a vztažený na 0 °C (tj. 273,15 K)

$$V_g = \frac{273,15 \cdot V_N}{w_L \cdot T_c}$$

$$V_s = \frac{273,15 \cdot V_N}{S \cdot T_c}$$

ADSORPCE



$$K_{D,A} = \frac{(a_A)_{AS}}{(a_A)_g} = \frac{(c_A)_{AS} \cdot (\gamma_A)_{AS}}{(c_A)_g \cdot (\gamma_A)_g}$$

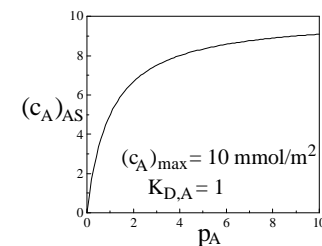
$$(c_A)_{AS} = \frac{K_{D,A}}{R \cdot T} \cdot p_A$$

Henryho adsorpční izoterma

$$(c_A)_{AS} = konst \cdot p_A$$

Langmuirova adsorpční izoterma

$$(c_A)_{AS} = (c_A)_{max} \cdot \frac{K_{D,A} \cdot p_A}{1 + K_{D,A} \cdot p_A}$$



ROZPOUŠTĚNÍ (ABSORPCE)

Raoultův zákon

$$p_B = p_B^0 \cdot x_B$$

p_B parciální tlak složky B nad směsí kapalin

p_B^0 tlak (tenze) nasycených par složky B

x_B molární zlomek složky B v kapalné směsi

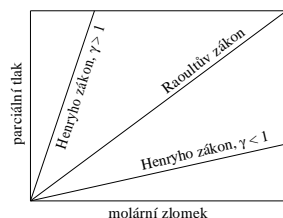
$$p_B = p_B^0 \cdot \gamma_B \cdot x_B$$

$$\gamma_B = \gamma_B(x_B)$$

pokud $x_B \ll 1$, pak γ_B je konstantní a platí

Henryho zákon

$$p_B = H_B \cdot x_B$$



VLIV TEPLOTY NA SEPARACI

teplota nástřikové hlavy, T_{inj}

teplota termostatu kolony, T_c

teplota detektoru, T_d

$$T_c > T_{var}, T_{inj} \geq T_c, T_d > T_c$$

Vyšší teplota kolony vede k rychlejší analýze.

Vyšší teplota kolony vyžaduje vyšší tlak nosného plynu na vstupu do kolony pro zachování jeho lineární rychlosti kolonou.

izotermická analýza, $T_c = konst.$

analýza s **teplotním gradientem**, $T_{c,1} \rightarrow T_{c,2}$

DERIVATIZACE ANALYTU

vede ke snížení jeho bodu varu (T_{var})

kyselina benzoová (249 °C), anilin (184 °C),
benzanilid (117 °C)

derivatizace aminokyselin

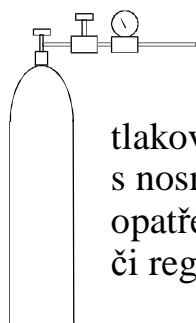
aminokyselina

+ isopropylalkohol \rightarrow isopropylester

+ trifluoracetanhydrid \rightarrow trifluoracetamid

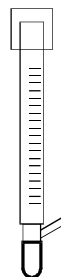
NOSNÝ PLYN

N_2, H_2, He, Ar



tlaková láhev
s nosným plynem
opatřená regulátorem tlaku
či regulátorem průtoku

bublinkový
průtokoměr



DÁVKOVÁNÍ VZORKU

se provádí do nástřikové hlavy opatřené **septem**, která je **vyhřívána** na zvolenou teplotu a **proplachována** nosným plynem

plynné vzorky

injekční stříkačky o objemu 10 až 1000 μ l

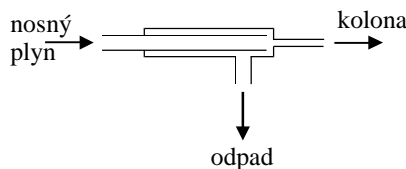
kapalné vzorky

injekční stříkačky o objemu 1 až 100 μ l

tuhé vzorky

roztok ve vhodném rozpouštědle

split/splitless dávkovač



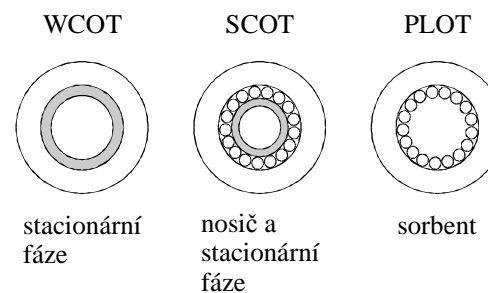
KOLONY

a) náplňové kolony

skleněné nebo z nerezové oceli
o průměru 1 až 6 mm a délce 0,5 až 5 m
s adsorbentem (GSC)
se stacionární fází na inertním nosiči (GLC)

b) kapilární kolony

dříve skleněné nebo z nerezové oceli
dnes výhradně křemenné s polyimidem
o průměru 0,1 až 0,5 mm
o délce 10 až 100 m
WCOT wall coated open tubular
SCOT support coated open tubular
PLOT porous layer open tubular
s chemicky vázanou stacionární fází



ADSORBENTY v GC

aktivní uhlí, grafitizované uhlí

dělení plynů a lehkých uhlovodíků

silikagel

dělení anorganických plynů a nízkovroucích kapalin

molekulová síta (krystalické hlinítokřemičitany)

*5A dělení plynů a lehkých uhlovodíků
4A jako sušidla*

porézní polymery (vinylbenzenové kopolymery)

komerčně tzv. Porapaky

*dělení nízkomolekulárních uhlovodíků,
anorganických plynů, alkoholů,
esterů a ketonů*

KAPALNÉ STACIONÁRNÍ FÁZE v GC

Carbowaxy (polyethylenglykoly)

Ucony (polypropylenglykoly)

polární stacionární fáze
s rostoucí M_r , klesá polarita

Polyestery (např. polyethylenglykoladipáty,
polypropylenglykoladipáty,
polyethylenglykolsukcináty)

polární stacionární fáze

Silikonové stacionární fáze (polysiloxany)

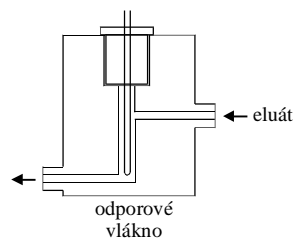
(např. methylpolysiloxan SE-30,
fenylmethylpolysiloxan OV-17,
fenylpolysiloxan SE-54,
kyanopropylpolysiloxan SP-2340)

často používané
široký rozsah polarit

DETEKTORY

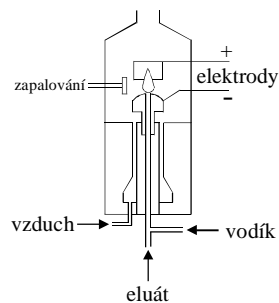
a) tepelně vodivostní detektor, TCD

univerzální, nedestruktivní, středně citlivý

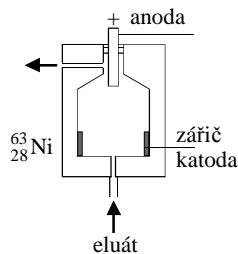


b) plamenový ionizační detektor, FID

selektivní, destruktivní, velmi citlivý



c) detektor elektronového záchytu, ECD
selektivní, nedestruktivní, středně citlivý



d) hmotnostní spektrometr, MS

vysoce specifický, destruktivní, velmi citlivý

TCD : všechny látky lišící se tepelnou
vodivostí od nosného plynu

FID : uhlovodíky

ECD : halogenderiváty (pesticidy) a
nitroderiváty

CHARAKTERIZACE DETEKTORŮ

základní linie, šum a drift, píků

odezva detektoru (signál detektoru), R
diferenciální veličina (výška píku)

$$R = S \cdot c \quad \text{nebo} \quad R = S \cdot \frac{dm}{dt}$$

citlivost detektoru, S

plocha pod eluční křivkou, A
integrální veličina (plocha píku)

$$A = \int_{t_1}^{t_2} R dt = \frac{S}{Mh} \cdot \frac{m}{F_m} \quad \text{nebo} \quad A = \int_{t_1}^{t_2} R dt = S \cdot m$$

časová konstanta, τ ($3\tau \rightarrow 95\%$)

$$R_t = R_\infty \cdot (1 - e^{-t/\tau})$$

lineární dynamický rozsah

$$A = b \cdot c$$

detekční limit, LOD 3σ

limit stanovení, LOS 10σ

ANALYTICKÁ INFORMACE Z CHROMATOGRAMU

RESULTS

Peak	RT(min)	Height	Area	W0.5
1	5.723	1.957	8.872	0.023
2	12.561	5.457	96.121	0.048
3	15.887	2.827	73.266	0.073
4	22.975	0.773	6.001	0.102

kvalitativní informace :

poloha píku - retenční čas
→ retenční faktor - druh látky

(metoda standardů nebo MS detekce)

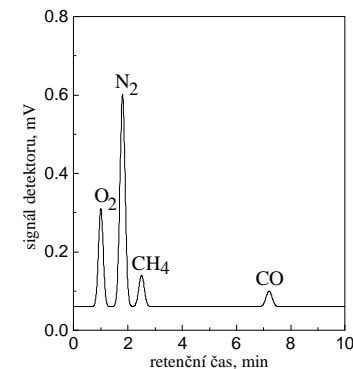
kvantitativní informace :

plocha píku → množství, koncentrace látky

- metoda vnitřní normalizace
- metoda absolutní kalibrace (kalibrační přímky)
- metoda vnitřního standardu
- metoda standardního přídávku

GC 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 μ l (35 °C)
teplota termostatu kolony : 35 °C
detekce : TCD (140 °C)



GC isopropylesteru FENYLALANINU (N-TFA)

kolona: křemenná kapilární, 25 m x 0,250 mm
stacionární fáze :

PERMABOND® L-CHIRASIL-VAL

nosný plyn : 1,2 ml/min H₂ (0,6 bar)

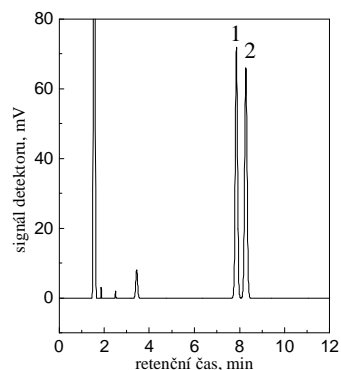
dávkování : 0,5 µl (1% roztok v CH₂Cl₂)

splitter (dělič) : 1:50

teplota termostatu kolony : 150 °C

detekce : FID (260 °C)

1. D-fenylalanin, 2. L-fenylalanin



GC polychlorovaných bifenyľů (PCB)

kolona: FS-SE-54-DF-0,35; 50 m x 0,25 mm ID

stacionární fáze: SE-54 (*fenylpolysiloxan*)

nosný plyn: N₂ (1,2 bar)

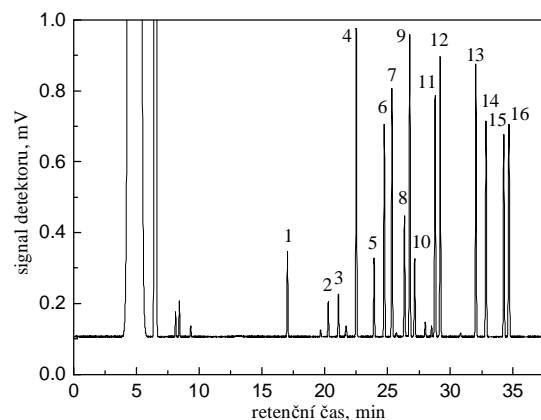
dávkování: 1 µl (200 - 800 pg/µl v CH₂Cl₂)

splitter (dělič): 1:70

teplota kolony: 80 °C → 280 °C, 8 °C/min

detekce : ECD (260 °C)

1. 2-chlorbifenyľ, 2. 4-chlorbifenyľ, 3. 2,2'-dichlorbifenyľ,
4. 2,4-dichlorbifenyľ, 5. 4,4'-dichlorbifenyľ, 6. 3,5,3'-trichlorbifenyľ,
7. 2,4,4'-trichlorbifenyľ, 8. 2,5,2',5'-tetrachlorbifenyľ,
9. 2,4,6,4'-tetrachlorbifenyľ, 10. 3,4,4'-trichlorbifenyľ,
11. 2,3,4,6,2'-pentachlorbifenyľ, 12. 2,3,4,4'-tetrachlorbifenyľ,
13. 2,3,4,5,2'-pentachlorbifenyľ, 14. 2,4,5,2',4',5'-hexachlorbifenyľ,
15. 2,3,4,2',4',5'- hexachlorbifenyľ, 16. 2,3,4,5,2',3'- hexachlorbifenyľ



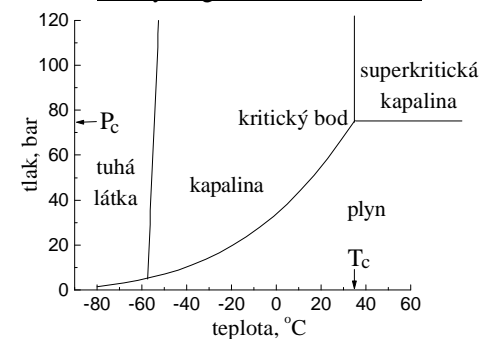
SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIE, SFC

mobilní fáze je **superkritická kapalina**

CO₂ : kritická teplota, T_c = 35 °C

kritický tlak, P_c = 75 bar (7,5 MPa)

fázový diagram oxidu uhličitého



oxid uhličitý

40 °C : 72 bar → 0,22 g/ml , 400 bar → 0,96 g/ml

80 °C : 72 bar → 0,14 g/ml , 400 bar → 0,82 g/ml

Hustota a rozpouštěcí schopnost superkritické kapaliny se blíží hustotě a rozpouštěcí schopnosti kapalin. Viskozita superkritické kapaliny se blíží viskozitě plynů.

SEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY

cíl - rozdělení vzorku na 2 nebo více podílů odlišného složení - zvýšení obsahu jedné nebo více složek

- Principy:
- extrakce (kapalina, tuhá látka)
 - chromatografie
 - elektroforetické metody

separace:

- dělení před vlastní analýzou
- současně analytická metoda

Další separační postupy - v širším slova smyslu

- Destilace (jednoduchá d., rektifikace)
- Ab sorpce (rozpuštění plynu v kapalině, reakce)
- Ad sorpce (pohlcování par a plynů na povrchu pevných látek)
- Výměna iontů (separace kationtů nebo aniontů z roztoku výměnou zpravidla za H^+ , OH^-)
katex - výměna kationtů, anex - vým. aniontů
- Dialýza (separace látek při průchodu membránou)
Koncentrační spád = gradient, membrána mezi roztokem a rozpouštědlem, velikost molekul
- Elektrodialýza (zrychlení dialýzy potenciálním spádem)
- Ultrafiltrace (polopropustná membrána, makromolek. látky, koloidy, 2-2000 mm), tlak
- Reverzní osmóza - (částice menší než 2 mm, menší póry, vyšší tlak)

Extrakce

úplné nebo částečné rozdělení směsi tuhých nebo kapalných látek. Selektivní roz pouštění - pevné látky

Soxhletův extraktor, Twisselmanův extraktor

Kapalné látky

Rovnovážné rozdělení rozpustěné látky mezi 2 rozpouštědla (voda, org. rozp.) - Nerustův rozdělovací zákon $k = \frac{c_2}{c_1}$

Rozdělovací konstanta $K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{ag}}$ rovnovážné koncentrace určité formy látky

Rozdělovací poměr $D = \frac{c(A)_{org}}{c(A)_{ag}} = \frac{\sum [A_i]_{org}}{\sum [A_i]_{ag}}$
 $D > 1$ má význam není konstantní

Výtěžek extrakce = $f(V_{org}/V_{ag} = r; n - \text{počet extrakcí})$

$R_A = \frac{m(A)_{org}}{m(A)_{org} + m(A)_{ag}}$ procentické vyjádření, $E = 100 R_A$

$R = 1 - \frac{1}{(r \cdot D + 1)^n}$ nevyextrahovaný zbytek je roven $\frac{1}{(r \cdot D + 1)^n}$

Separční faktor $\alpha = \frac{K_{D,A}}{K_{D,B}} > 1$ (konvence)
dělení látek A, B

Obohacovací faktor $S = \frac{R_A}{R_B}$ poměr výtěžků dělení

Extrakce kapalina-kapalina - diskontinuální (dělicí nálevka) / kontinuální

barviva, tuky, sacharidy, dusíkaté látky, heterocykly, mykotoxiny, stopové prvky, rezidua vevodě, půdě, rostliny, živočišný materiál.

Vlastnosti látek a rozdělovací poměr

A) Kovalentní molekulové organické sloučeniny jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech

- lipofilní charakter; roste s počtem skupin $-CH_2-$ v homologických řadách; lipofilní: estery, halogen-deriváty)
- hydrofilní charakter: skupiny $-OH, =CO, -COOH, -NH_2$
 $-O-$

B) ionty - jsou el. nabitá a v H_2O hydratovaná \Rightarrow neextrahují se do org. rozpouštědel samotné \Rightarrow

extrakce $\left\{ \begin{array}{l} \text{chela'tu}^\circ - \text{komplexní sloučeniny} \\ \text{elektroneutrální} \\ \text{iontových asociátů } (M^+ A^-) - \text{elektroneutrální} \\ \text{organická zásada } [HA^+, B(C_6H_5)_4^-] \\ \text{tetrafenylboritan} \\ \text{bezbarvé ionty} \Rightarrow \text{barevné asociáty:} \\ [HA^+, C_{12}H_{14}N_3SO_3^-] - \text{extrakční} \\ \text{org. zá's.} \quad \text{metyloranž} \quad \text{fotometrie} \end{array} \right.$

extrakce organických protolytů (odštěpují H^+)



$$D = \frac{C(HA)_{org}}{C(HA)_{aq}} = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{aq} + [A^-]_{aq}} \quad K_D = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{aq}}$$

$$D < K_D \quad D = f(pH, pK_a)$$

Disociaci slabé kyseliny je třeba potlačit okyselením vodné fáze.

PŘÍKLADY EXTRAKCÍ

IV

- 1) Extrakce kyselého léčiva - kyselina barbiturová a její deriváty -
vzorek se okyslí (potlačení disociace) HCl a extrahuje do chloroformu \Rightarrow odpaření \Rightarrow odparek, vázkové stavení
- 2) Extrakce bazického léčiva - anestetikum prokain
chlorid prokainia, pH 8, extrakce do chloroformu
acidimetrická titrace v nevodném prostředí

Chromatografie

Botanik M.S. Cvet - poc. 20. stol. - dělení rostlinných barviv - chloroplasty, na sloupci praškového sorbentu.

Princip: prostorové oddělení složek analyzované směsi v důsledku jejich nerovnoměrného pohybu (migrace) definovaným směrem ve vymezeném prostoru

Migrace - v soustavě 2 fází: ● stacionární ● mobilní

stacionární fáze - kapalná L liquid
pevná S solid

mobilní fáze - plynná G gas
kapalná L liquid

Příčina rozdílné migrační rychlosti:

Interakce systému dělených látek a obou chromatografických fází.

Síly: hybná x brzdivá

Hybná síla: tok mobilní fáze - působí stejně na všechny látky

Brzdivá síla: tzv. retence - je selektivní

Interakce látky a obou fází = vratná sorpce na stacionární fázi.

opakovaná sorpce - desorpce ↓ různé mechanismy dynamická rovnováha

Doba strávená částicí látky v < mobilní / stacionární > fázi závislá na dané látce a na fázích.

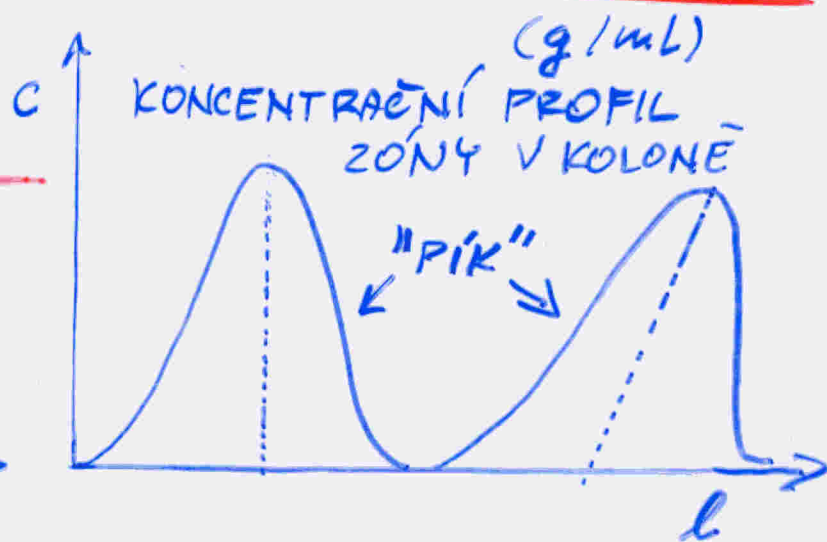
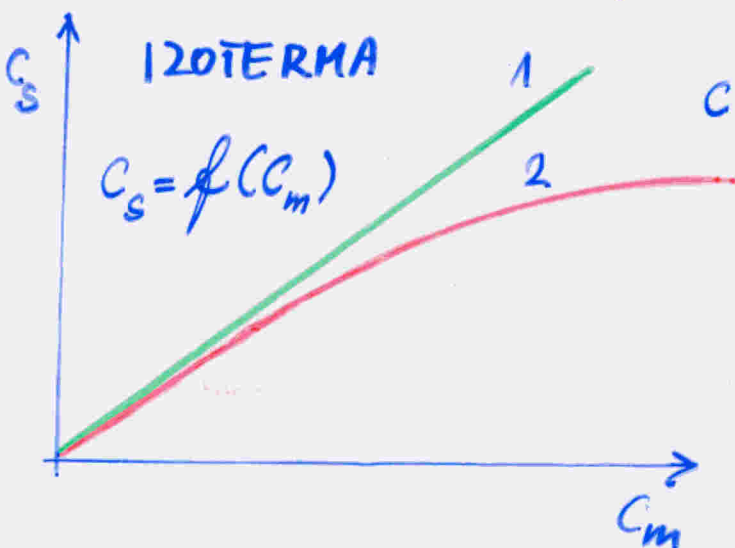
Ustavení sorpční rovnováhy - rozdělení látky mezi 2 fáze ②

Hmotnostní distribuční koeficient látky A v daném systému fází

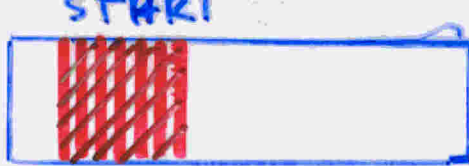
$$D_g = \frac{m(A)_s / m_s}{m(A)_m / V_m} = \frac{C_s}{C_m}$$

$m(A)_s$ - hmotnost látky obsažené v množství m_s stacionární fáze (gram / gram)

$m(A)_m$ - hmotnost látky obsažené v objemu V_m mobilní fáze



Separací faktor $\alpha = \frac{D_A}{D_B} > 1$



3

A+B tok mobilní fáze

A B

Zóna vzorku → rovnováha mezi oběma fázemi

nespojité posun částic po malých úsecích

chromatografické zóny jednotlivých látek postupují

různou rychlostí, která závisí na průměrné době

setrvalosti částic v každé z obou fází.

Následuje detekce :

- chemicky
- fyzikálně chemicky
- fyzikálně

Klasifikace chromatografických metod

Kritéria : 1) prostorové uspořádání

2) skupenství mobilní fáze

3) povaha separačního děje

ad 1) geometrie stacionární fáze (chromatografické lože

C - chromatografie

a) sloupcová = kolonová chrom. - CC (svislé u.)

b) plošné uspoř. FBC : a) papírová ch. PC

b) tenkovrstva'ch. TLC

ad 1a) svislá trubice s náplní (zrnitost)

mobilní fáze : • plynná

• kapalná (vytéká jako tzv. efluent)

Kolony : náplňové (částice 10 μm), tlak

kapilární - dlouhé, úzké, místo náplně povlaky na stěnách

ad 1b) planární - plošné uspořádání

x) speciální filtrační papír

β) tenká vrstva práškovitého sorbentu na podložce

Samovolné prosakování stacionární fáze

vlivem kapilarity.

ad 2) Skupenství mobilní fáze

a) kapalina = kapalinová chromatografie LC

x) stacionární fáze kapalná (nanesená na pevném nosiči) = LLC (liquid-liquid chromat.)

β) stacionární fáze pevná - (silikagel, Al₂O₃)
LSC - (liquid-solid chromat.)

b) plyn = plynová chromatografie GC

x) stacionární fáze kapalná GLE
(gas-liquid chromatography)

β) stacionární fáze pevná GSC

ad 3) Porada separačního děje

a) Adsorpční chromatografie

Tuhá stac. fáze, mobilní je x) kapalná LSC
Al₂O₃, silikagel β) plynná GSC

b) Rozdělovací chromatografie

Kapalná stacionární fáze, mobilní fáze je
fixovaná na tuhém nosiči x) kapalná LLC
extrakce kapalina-kapalina β) plynná GLC
rozpuštění plynů

c) Iontově výměnná chromatografie

pouze pro elektrolyty a jen s kapalnou mobilní fází. Stacionární fáze - měnič iontů (ionexy)

d) Gelová chromatografie

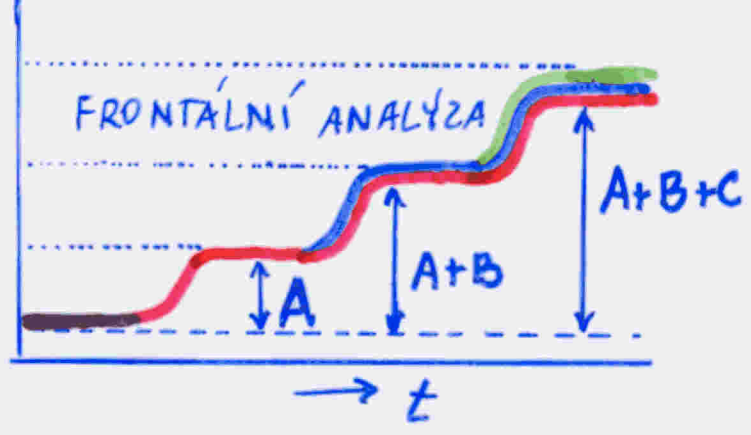
Distribuce látek mezi 2 fáze podle velikosti molekul. Stacionární fáze: GEL, do jehož pórů pronikají z roztoku molekuly podle své velikosti a v závislosti na rozměrech pórů.

Pracovní způsoby chromatografie

Směs látek A+B+C, sorpce: $A < B < C$

1) Frontální chromatografie

Vzorek kontinuálně v mobilní fázi



Používá se omezeně. V čistém stavu se získá pouze látka A, nejslaběji sorbovaná.

2) Vytěšňovací chromatografie

Vzorek se zavádí diskontinuálně (jednorázově), pak se přivádí s mobilní fází látka D, která má větší afinitu (lépe se sorbuje) ke stacionární fázi než jakou mají složky vzorku A, B, C, a proto je bude postupně vytěšňovat.

Rozdělovací plynová chromatografie - převládá (10)
Adsorpční plynová chromatografie - jen v malém množství

- Rozdělovací ch.: kapalná stacionární fáze zakotvená na nosiči nosiče - silikáty syntetické. Zakotvená fáze málo těkavá. Polárnost zakotvené fáze taková, aby sorpce byla značná.
polyetylen glykoly → hexadekan
polární nepolární

APLIKACE PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

- analýza pesticidů, nerozložených zbytků v půdě (tzv. stanovení reziduí), organo fosforové sloučeniny, estery org. kyselín

KVALITATIVNÍ ANALÝZA

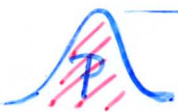
Kvalitativní informace - klíčový parametr

- Srovnávání se standardními látkami - vnitřní standard

$$\frac{t_{R,X}}{t_{R,S}} = \text{retenční poměr}$$

- Použití selektivního nebo specifického detektoru

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

 h - výška píku Plocha píku - elektronické integrovatery
plocha píku - kvantitativní parametr

Metoda $\left\{ \begin{array}{l} \text{vnějšího} \\ \text{vnitřního} \end{array} \right\}$ Standardů \rightarrow kalibrace
 \rightarrow přidávek standardů
látky - poměry ploch

$$\underline{V_R = t_R \cdot F_M}$$

(7)

t_M - mrtvý čas - jestliže se látka nesorbuje.

Retenční faktor: $R = \frac{t_M}{t_R}$ $0 < R < 1$ (souvisí s distribučním koeficientem)

$$D = C_s / C_m$$

Delící účinnost kolony, selektivita

Teoretické patro - vrstva v koloně, v níž dochází k ustavení rovnováhy. Je to vrstva takové výšky, že se v ní dosáhne obnovení porušené distribuční rovnováhy dříve, než se mobilní fáze přesune k další vrstvě.

H - výškový ekvivalent teoretického patra
délka kolony = L, $n = L/H$ počet pater

van Deemterova rovnice, u - rychlost toku mobilní fáze (cm s^{-1})

$$\underline{H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u}$$

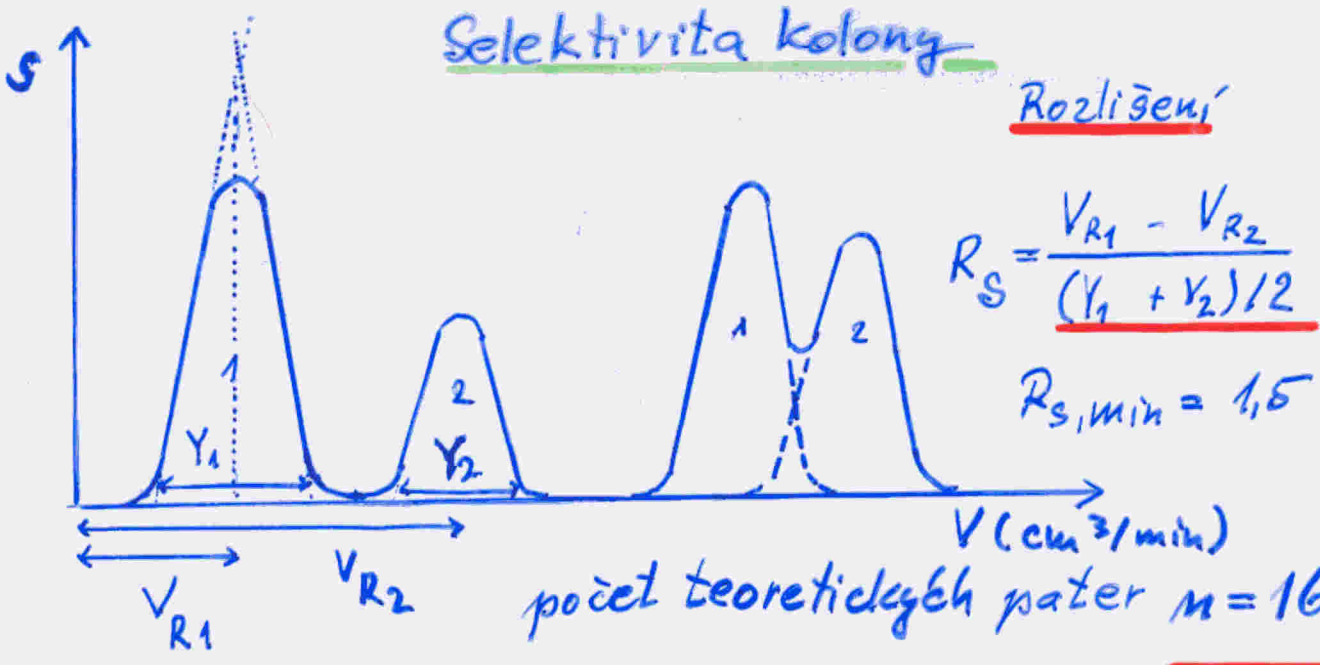
A - velikost tvar částic naplně kolony, jejich stěsnání, zrnitá struktura lože \Rightarrow "vitivá difuze" \Rightarrow rozšiřování zóny migrující látky \Rightarrow méně selektivní dělení. $A \neq f(u)$

B - vliv podélné difuze (směr toku mobilní fáze)
B klesá s rostoucí rychlostí u .

C - vyjadřuje skutečnost, že přechod látky z jedné fáze do druhé vyžaduje určitý čas. Tento příspěvek roste s rychlostí toku u . malý - adsorpce, extrakce
velký - iontová, gelová

Selektivita kolony

Rozlišení



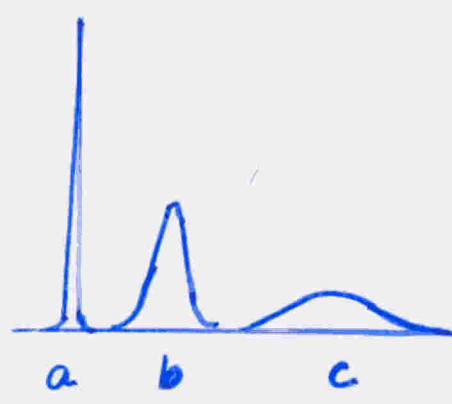
$$R_S = \frac{V_{R1} - V_{R2}}{(Y_1 + Y_2)/2}$$

$$R_{S, \min} = 1,5$$

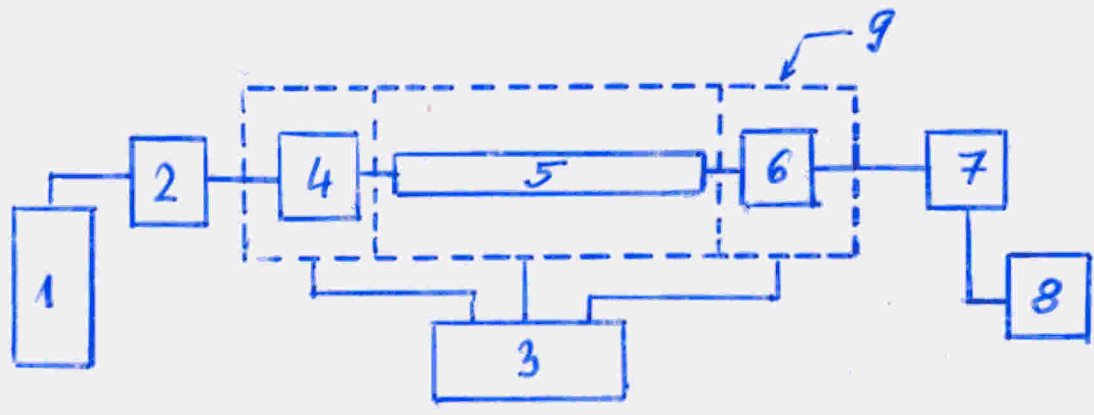
počet teoretických pater $n = 16 \left(\frac{V_R}{Y} \right)^2$

výškový ekvivalent teor. patra $H = L/n$
 $L =$ délka kolony

poměr počtu teoretických pater
 $a : b : c = 100 : 10 : 1$



PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE



- 1 - zdroj nosného plynu
- 2 - regulace a měření průtoku nosného plynu
- 3 - řídicí a programovací jednotka
- 4 - dávkovací zařízení
- 5 - kolona
- 6 - detektor
- 7 - zapisovač
- 8 - integračtor
- 9 - termostat

- Separáčnı́ a současne analytická metoda
- Kvalitativnı́ i kvantitativnı́ analyza kapalných a tuhých vzorků, které lze převést bez rozkladu do plynné fáze v rozsahu pracovní teploty (do 400°C), a analyza plynů

Plynová chromatografie ~ mobilnı́ fáze je plynná

- Zdroj nosného plynu - tlak. nádob, => čištění, sušení, regulace průtoku, mobil. fáze: N₂, H₂, Ar
- Dávkovač - injekční mikrostříkačka (1-20 μl) 50 ml/min
- Kolona
 - náplňová φ 2-5 mm, L = 50 cm, m = 10³, 20 μl
 - kapilární φ 0,5 mm, L = 10-100 m, m = 10⁴, 1 μl (navinutá) 1 ml/min

- Detektor :
 - tepelně vodivostní (katharometr)
 - plyn obtéká žharené vlákno, změna odporu s odvodem tepla, 2 kolony { referenční měrná } => rozdíl vodivosti => el. signál
 - plamenový ionizační - eluát se zavádí do hořáku mezi 2 elektrodami - ionizace v plameni => vedení proudu => signál
 - det. elektronového záchytu - ionizace nosného plynu (N₂) zářením β => N₂⁺, => mezi 2 elektrodami el. proud. Obsah halogenů ve vzorku => záchyt elektronů => snížení ionizace => snížení proudu, selektivní detektor, derivatizace
 - detekce atomovou spektrometrií (plamen, plazma)
 - hmotnostní spektrometrie (GC-MS)

Rozdělovací plynová chromatografie - převládá
Adsorpční plynová chromatografie - jen v malém míře

- Rozdělovací ch.: kapalná stacionární fáze zakotvená na nosiči nosiče - silikáty syntetické. Zakotvená fáze málo těkavá. Polárnost zakotvené fáze taková, aby sorpce byla značná.
polyetylen glykoly → hexadekan
polární nepolární

APLIKACE PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

- analýza pesticidů, nerozložených zbytků v půdě (tzv. stanovení reziduí), organo fosforové sloučeniny, estery org. kyselín

KVALITATIVNÍ ANALÝZA

- Kvalitativní informace - eluční parametry
- Srovnávání se standardními látkami - vnitřní standard
 $\frac{t_{R,X}}{t_{R,S}}$ = retenční poměr
- Použití selektivního nebo speciálního detektoru

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

h - výška píku Plocha píku - elektronické integroátory
plocha píku - kvantitativní parametr

Metoda $\left\{ \begin{array}{l} \text{vnějšího} \\ \text{vnitřního} \end{array} \right\}$ Standardy \rightarrow kalibrace
 \rightarrow přiblížené standardní látky - poměry ploch

KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Původně chrom. na sloupci sorbentu se samovolným průtokem mobilní fáze - historicky nejstarší forma chromatografie. - málo účinná

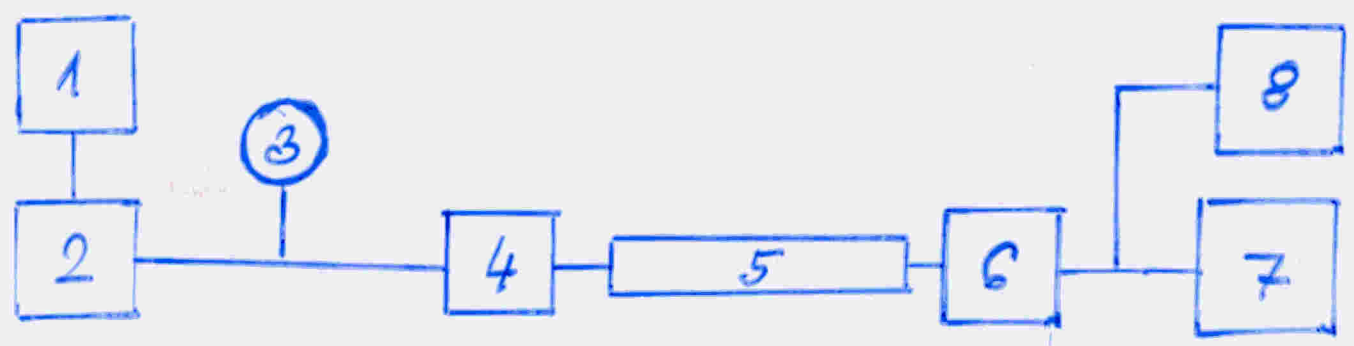
50. a 60. léta - rozvoj plynové chrom. => kapalin. ch. na novém základě (1970)

VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

HPLC

High-Performance Liquid Chromatography

VYSOKÝ TLAK



- 1 - zásobník mobilní fáze
- 2 - čerpadlo
- 3 - manometr
- 4 - dávkovač
- 5 - kolona
- 6 - detektor
- 7 - zapisovač
- 8 - integrátor

Vysoký tlak - důvod: jemnozrnná náplň kolon 10µm

čerpadlo - pístové, nebo tlakem plynu až 30MPa

dávkování - injekční stříkačkou (septum - pryžová membrána)

- a) přímo s přerušením toku mobilní fáze (snížení přetlaku)
- b) 6-ti cestným kohoutem s dávkovací smyčkou - čerpadlo je nepřerušeno

Kolona $\left\{ \begin{array}{l} \text{nerezová} \\ \text{skleněná} \end{array} \right. \begin{array}{l} 30-500 \text{ mm dlouhá} \\ 2-8 \text{ mm široká} \end{array}$

jemné zrnění sorbentu

za kolonou přítokový detektor

pro odělené složky směsi tzv. sběrač frakcí

SYSTEMY FÁZÍ PRO KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHII

A) ADSORPČNÍ CHROMATOGRAPHIE

Mechanismus = adsorpce látky na stacionární fázi -
- TĚM ADSORBENTU

ADSORPCE = obohacení fázového rozhraní látkou
na úkor její koncentrace v mobilní fázi

Adsorpční izoterma vždy nelineární, jen nízké koncentrace
Povaha adsorpčních sil:

a) fyzikální adsorpce - kohezivní síly - málo polární:
• adsorbent
• látka

b) chemisorpce - vznik chemické vazby (např. vodíkové)
silně polární:
• adsorbent
• látka

STACIONÁRNÍ FÁZE

Polární adsorbenty: silikagel, Al_2O_3

Nepolární adsorbenty: aktivní uhlí

1) SILIKAGEL $SiO_2 \cdot x H_2O$, chemisorpční aktivita - OH
chemisorpce vodíkovými vazbami
aktivace = sušení při vyšší T (dehydratace)
do 10% H_2O - odstupňovaná aktivita

Silikagel - mírně kyselý => adsorbuje bazické látky (13)

2) Oxid hlinitý - a) elektrofilní centra - váže látky
s násobnými vazbami
a volnými el. páry

b) O^{2-} - váže kyseliny

Adsorbenty - kulovité částice 10 μm , porézní ^{plošně}
_{objemově}
+ porézně

MOBILNÍ FÁZE

voli se tak, aby:

1. vhodná selektivita
2. přiměřené eluční parametry

Rozpouštědla s různou eluční mohutností (účinností)

Eluční účinnost rozpouštědla závisí na
jeho adsorbovatelnosti na stacionární fázi

↓
závisí na polárnosti rozpouštědla

Na polárních adsorbentech roste eluční účinnost
od méně polárních \rightarrow k polárnějším
eluotropická řada

heptan \rightarrow cyklohexan \rightarrow tetrachlormetan \rightarrow toluen \rightarrow
 \rightarrow toluen \rightarrow ether \rightarrow chloroform \rightarrow aceton \rightarrow acetonitril \rightarrow
 \rightarrow acetonitril \rightarrow etanol \rightarrow metanol \rightarrow kyselina octová

Směsi, např. benzen - etanol 95:5

vždy menší podíl polárnějšího

B) ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE

Mechanika musí

Distribuce látky mezi dvěma kapalnými fázemi:

Kapalná stacionární fáze je fixována na pevném nosiči

- jemně zrněný nosič povlečený tenkým filmem stacionární kapaliny

→ kapalinové extrakci. Sorpční izoterma lineární - velký konc. rozsah

- nosič = silikagel, křemelina, skleněné kuličky (drsný povrch) syntetické silikačky; musí být INERTNÍ (nereaguje)

- zakotvená (fixovaná) kapalná fáze musí:

* rozpuštět dělené látky

* být pemě fixována na nosič (NESMÍ SE VYMÝVAT)

↓
často chemickou vazbou

↑ POLÁRNĚJŠÍ NEŽ POHYBLIVÁ (mobilní)
tzv. "normální" systém

(stacionární)
ZAKOTVENÁ

FAZE → MÉNĚ POLÁRNÍ NEŽ POHYBLIVÁ (mobilní)

tzv. systém "obrácených fází"

RPS - reverse phase system
(převažující v současné době)

Rozdělovací rovnováha musí být posunuta ve prospěch stacionární fáze, aby docházelo k dělení.

→ POLÁRNÍCH LÁTEK v NORMÁLNÍ SYST.

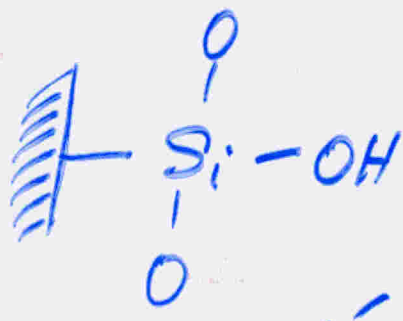
Dělení → MÉNĚ POLÁRNÍCH LÁTEK v SYST. OBRAČENÝCH FÁZÍ

↓
Lze dělit i iontové sloučeniny ve formě elektroneutralních IONTOVÝCH ASOCIÁTŮ

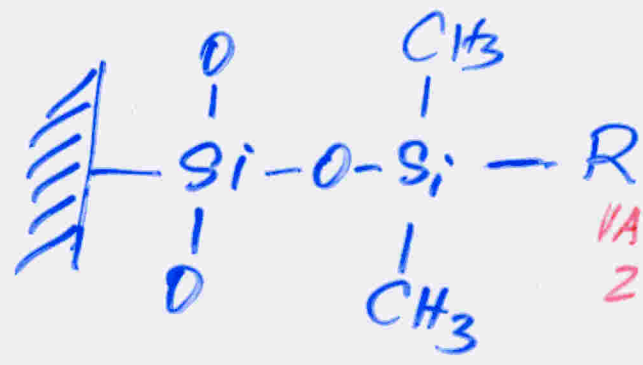
Chemicky vázané fáze: silylace skupin -OH

silikagely => vazba -O-Si-C....

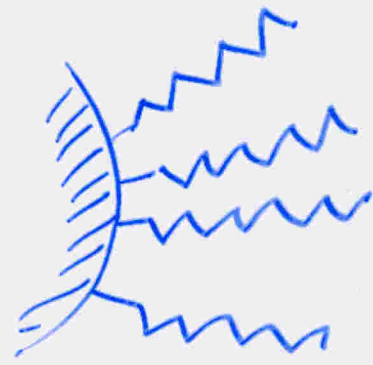
OZNAČENÍ	VÁZANÝ ZBYTEK	CHARAKTER
RP-8	-Si(CH ₃) ₂ -C ₈ H ₁₇	NEPOLÁRNÍ
RP-18	-Si(CH ₃) ₂ -C ₁₈ H ₃₅	NEPOLÁRNÍ
FENYL	-Si(CH ₃) ₂ -C ₆ H ₅	MÍRNĚ POLÁRNÍ
AMINO	-Si(CH ₃) ₂ -C ₃ H ₆ -NH ₂	STŘEDNĚ POLÁRNÍ
NITRO	-Si(CH ₃) ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₄ -NO ₂	" - "
KYANO	-Si(CH ₃) ₂ -(CH ₂) _n -CN	POLÁRNÍ



NEUPRAVENÝ
POVRCH
SILIKABELU



VÁZANÝ
ZBYTEK

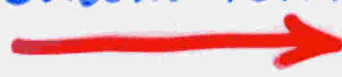


ORIENTACE FÁZE
NA POVRCHU
ČÁSTIC NOSIČE

Chromatografie RPS - platí eluotropická
řada v obráceném pořadí

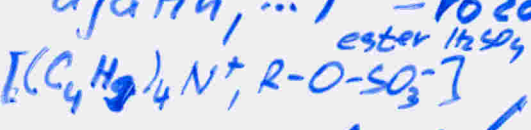
H₂O → metanol → ... → aceton → ... → ether → ... → heptan

eluční účinnost (mohutnost)



Chromatografické dělení kyselé a bazické látek
kombinací organického rozpouštědla s vodným roztokem
tlumiče (pufra)

Iontové sloučeniny - iontové asociáty
a sociální otudivlo součásti mobilní fáze, např. tenzid =
ionogenní povrchově aktivní látka (např. septonex,
ajatin, ...) - rozdělovací mechanismus, RPS

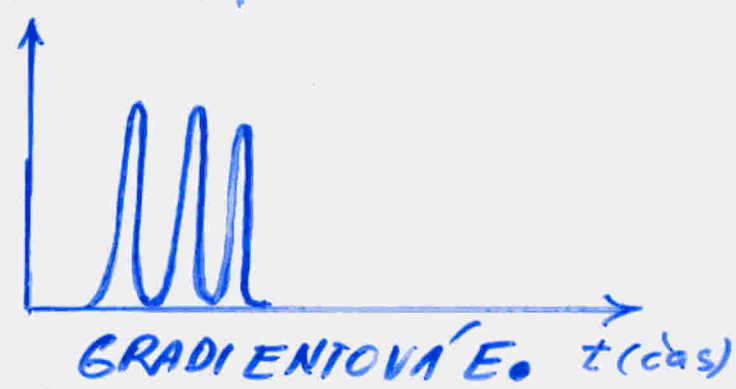
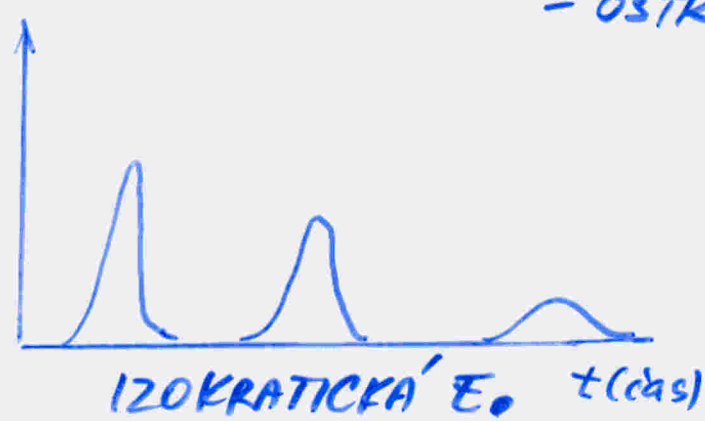


KONSTANTNÍ SLOŽENÍ: IZOKRATICKÁ ELUCE

MOBILNÍ FÁZE

MĚNÍ SE SLOŽENÍ
V PRŮBĚHU ELUCE: GRADIENTOVÁ ELUCE

GRADIENTOVÁ ELUCE - ZKRAČENÍ RETENČNÍCH ČASŮ
- OSTRĚJŠÍ PÍKY

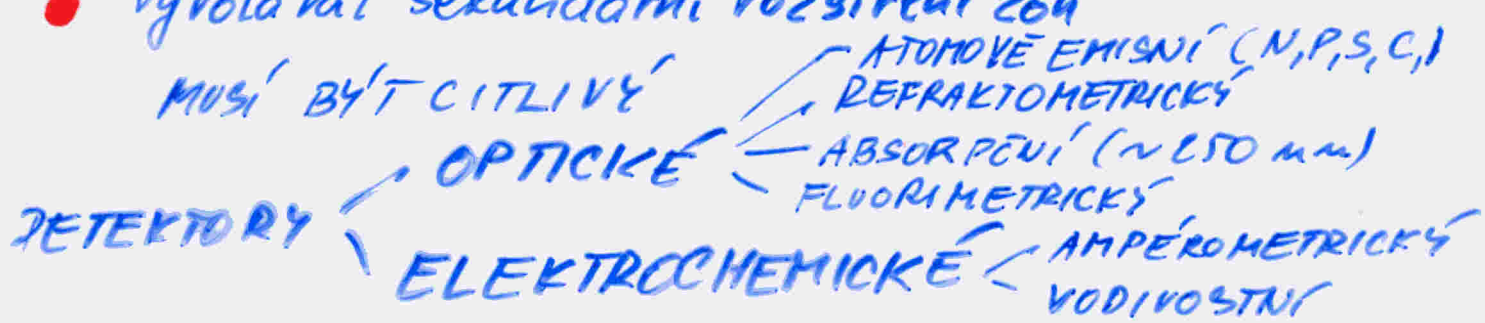


DETEKTORY
V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAPHII

DETEKTOR NESMÍ:

- reagovat na mobilní fázi
- ovlivňovat detekované látky
- vyvolávat sekundární rozšíření zón

MUSÍ BÝT CITLIVÝ



C) IONTOVÁ CHROMATOGRRAFIE

IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE

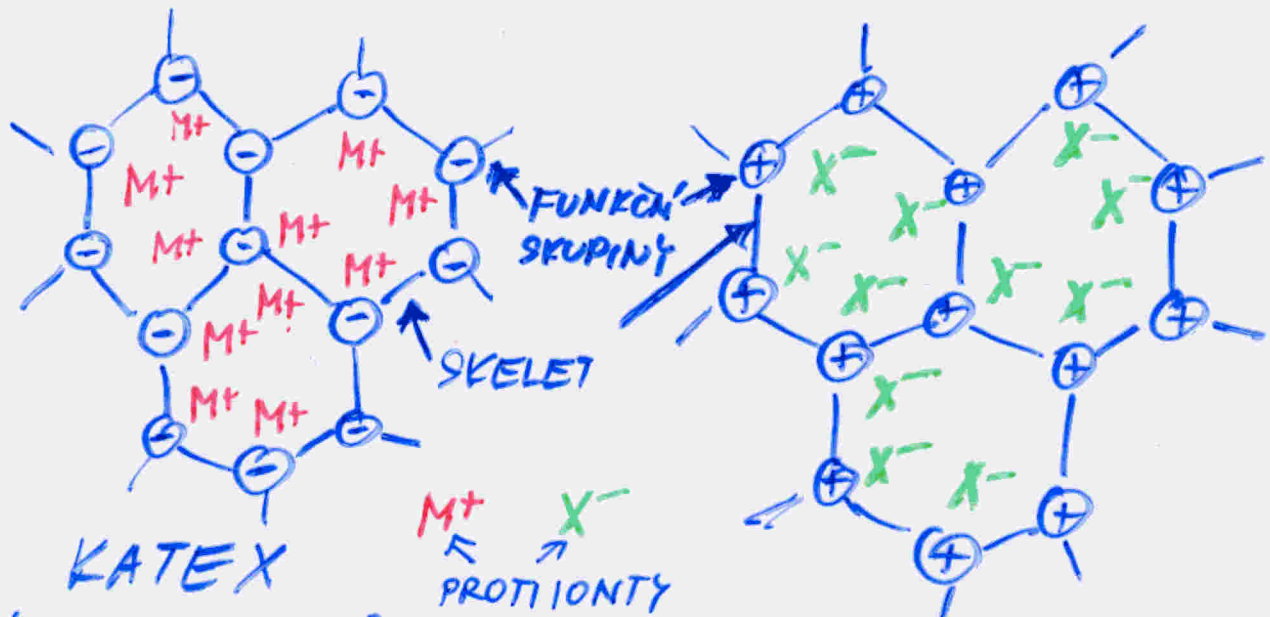
STACIONÁRNÍ FÁZE - MĚNICE IONTŮ = IONEXY

MOBILNÍ FÁZE - ROZTOKY ELEKTROLYTŮ

DĚLÍ SE POUZE IONTY

IONEXY = MAKROMOLEKULÁRNÍ ELEKTROLYTY

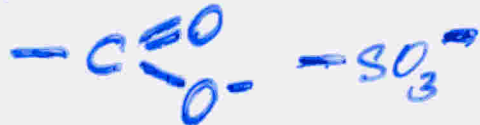
NEROZPUSTNĚ VEVODĚ A V POLÁRNÍCH ROZP.



VÝMĚNA KATIONTŮ

VÝMĚNA ANIONTŮ

KYSELE FUNKČNÍ SKUPINY



ZÁŠADITE FUNKČNÍ SKUPINY

$-NR_3^+$ vázou elektrostaticky anionty

vázou elektrostaticky kationty

H-cyklus
Ca-cyklus

ZPŘÍSTUPNĚNÍ SKUPIN
NABOBTNÁNÍM
MĚNICE (TUNÝGEJ)

OH-cyklus
Cl⁻-cyklus

DUTINY IONTO MĚNICE - OBSAŽENA KAPALINA = VNITŘNÍ ROZTOK
VÁZANÉ IONTY MOHOU BÝT ZAMĚNĚNÝ VE STECHIOMETRICKÉM
POMĚRU S IONTY STEJNĚHO ZNAMÉNKA Z VNĚJŠÍHO ROZTOKU

VÝMĚNA IONTŮ PROBÍHÁ DIFÚZÍ => POTŘEBUJE ČAS

- VSTAVENÍ ROVNOVÁHY:
- ČÁST IONTŮ SE VÁŽE MĚNICEM
 - ČÁST ZŮSTÁVA VE VNĚJŠÍM ROZTOKU

distribuční koeficient $D = \frac{m(A)_i / m}{m(A) / V} = \frac{[A]_i}{[A]}$

$m(A)_i$ - látkové množství iontu A vázané iontoměničím

$m(A)$ - " - ve vnějším roztoku

m - hmotnost sušiny ionexu

V - objem roztoku

Afinita různých iontů k ionexu různá

MĚNIČ V CYKLU IONTŮ B JE VE STYKU S ROZTOKEM IONTŮ A, PŘIČEMŽ IONTY A MAJÍ VŮČI MĚNIČI VĚTŠÍ AFINITU NEŽ B



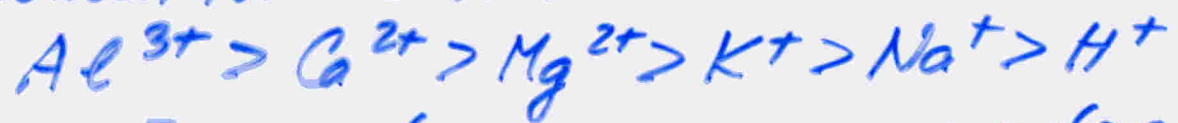
$\frac{[A]_i \cdot [B]}{[A] \cdot [B]_i} = \frac{D_A}{D_B} = K_{s_B}^A$ SELEKTIVITNÍ KOEFICIENT PRO DVOJICI A, B

JE TO SEPARAČNÍ FAKTOR

POŘADÍ AFINIT IONTŮ K MĚNIČI ZAŘEŽÍ:

- NA VLASTNOSTECH IONTŮ
- NA FUNKČNÍ SKUPINĚ IONTO MĚNIČE

NAPŘÍKLAD: - SO_3H JE DISOCIOVÁNA V CELEÉM ROZSAHU PH => MOŽNOST IONTOVÉ VÝMĚNY. MALÁ AFINITA K H^+ , POŘADÍ:



SLABĚ KYSELÝ KATEX: -COOH, MALÁ DISOCIACE,

VELKÁ AFINITA K H^+ , AŽ VYSŠÍ PH

POŘADÍ AFINITY ZÁVISÍ NA PH, NAPŘ. PŘI PH=7 (19)



ANEXY: SILNĚ BAZICKÉ - NR_3^+
V CELEM ROZSAHU PH, MALÁ AFINITA K OH^-
SLABĚ BAZICKÉ - NR_2
SE IONIZUJÍ V MÁLO ALKALICKÉM AŽ KYSELÉM PROSTĚ.



VÝMĚNA IONTŮ ZÁVISÍ $\left\{ \begin{array}{l} \text{NA AFINITĚ} \\ \text{NA POMĚRU KONCENTRACÍ} \\ \text{IONTŮ} \end{array} \right.$

ROVNOVÁHU LZE ZVRÁTIT VYSOKOU KONCENTRACÍ IONTŮ (NADBYTKEM) S MENŠÍ AFINITOU. \rightarrow PRINCIP REGENERACE MĚNICE

MAVI MÁLNÍ MNOŽSTVÍ IONTŮ - VÝMĚNNÁ KAPACITA

- PRYSKYŘIČNÉ MĚNICE (kopolymer styrenu a divinyl- ϕ částic 50 μm benzenu)
- CELULÓZA
- DEXTRANOVÝ GEL

VÝMĚNNÁ KAPACITA = LÁTKOVÉ MNOŽSTVÍ CHEMICKÝCH EKUIVALENTŮ IONTŮ NA 1 GRAM SUCHÉHO MĚNICE, NAPŘ. (Ca²⁺)/g. NAPŘÍKLAD SILNĚ KYSELÝ KATEX $\sim 4-5 \text{ mmol/g}$

DALŠÍ KATEXY: SILIKABEL, CELULÓZA, FOSFORECNAN ZIRKONIČTÝ

KOLONOVÁ IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE:

STACIONÁRNÍ FÁZE - NABOBTNALÝ MĚNĚČ, MOBILNÍ - ELEKTROLYT

KAPALNÉ IONTOMĚNICE

ORGANICKÉ SLOUČENINY S KYSELÝMI NEBO ZÁSADITÝMI FUNKČNÍMI SKUPINAMI; DELŠÍ UHLÍKATÉ ŘETĚZCE ZPŮSOBUJÍ NEROZPUSTNOST VE VODĚ.

DI-(2-ETHYLHEXYL)FOSFOREČNÁ KYSELINA (DEHPA)



TRI-N-OKTYLAMIN $(C_8H_{17})_3N$ - ANEX

D) GELOVÁ CHROMATOGRRAFIE

GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

DISTRIBUCE DĚLENÝCH LÁTEK PODLE VELIKOSTI MOLEKUL - MEZI 2 FÁZĚ

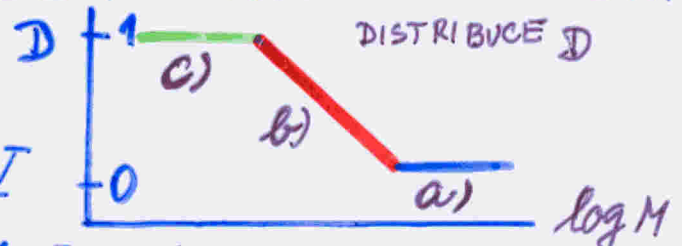
STACIONÁRNÍ FÁZE - GEL = MIKROPORÉZNÍ MŘÍŽ

HYDROFILNÍ GELY - PRO VODNÉ ROZTOKY

HYDROFÓBNÍ GELY - PRO ORG. ROZPODŠTĚDLA

DEXTRANOVÝ GEL SEPHADEX ~ POLYSACHARID DEXTRON

POLYAKRYLAMIDOVÉ GELY



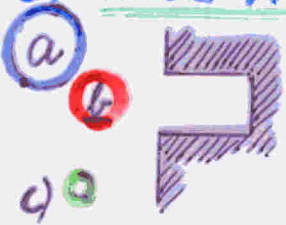
MOLEKULOVĚ SÍTOVÝ EFEKT

MOLEKULY PRONIKAJÍ DO PÓRŮ GELU - VRATNÝ DĚJ

a) VELKÉ MOLEKULY - NEMOHOU PRONIKAT - DO PÓRŮ SE NEDOSTANOU ZŮSTAVAJÍ VE VNĚJŠÍM ROZTOKU A JSOU UNAŠENY MOBILNÍ FÁZÍ

b) STŘEDNÍ MOLEKULY - ČÁSTEČNĚ SE SORBUJÍ DLE MOLÁRNÍ HMOTNOSTI

c) MALE MOLEKULY - SE SORBUJÍ NEOMEZENĚ BEZ ROZDÍLU MOLEKUL. HMOTNOSTI



MOBILNÍ FÁZE - PUFRY TLUMIVÉ ROZTOKY PRO

ZAJIŠTĚNÍ PH A IONTOVÉ SÍLY $M=10^3-10^7$

DISTRIBUČNÍ IZOTERMA JE LINEÁRNÍ

PLANAŘNÍ CHROMATOGRRAFIE

(21)

Podstata stejná jako u kolonové chromatografie

Odlišné uspořádání a vyhodnocení, (vrstva < 1mm)

A) Tenká vrstva zrnitého sorbentu na podložce (TLC)

B) List speciálního chromatografického papíru (PC)

1) Jen kapalinová, ne plynová

2) Pohyb mobilní fáze - prosakování kapilárními sítkami

pohyb - vzestupný (PC, TLC)

 \ sestupný (PC)

CHROMATOGRRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ

ČÁSTICE SORBENTU 10 μm FIXOVANÉ NA PODLOŽCE (FOLIEAL)

PŘEVAŽUJE PRINCIP ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE (POLYMER)

SORBENT: Al_2O_3 , silikagel (alufol, silufol) - Ložě

sílně polární a anorganické látky - také rozdělovací
a iontově výměnný princip

výsledky - závislost na nahodilých vlivech - nutná zkušenost

vzorek se nanaší mikropipetou na suchou desku (fol.)

startovní zóna, souběžně větší počet vzorků, pak odpařit

kvantitativní analýza - definovaný objem

vyvíjení - vzestupné - mobilní fáze vzlíná vzhůru

uzavěřená komora, nasycená parami mobilní fáze,

na dně cca 1cm do výšky mobilní f. (30 minut před)

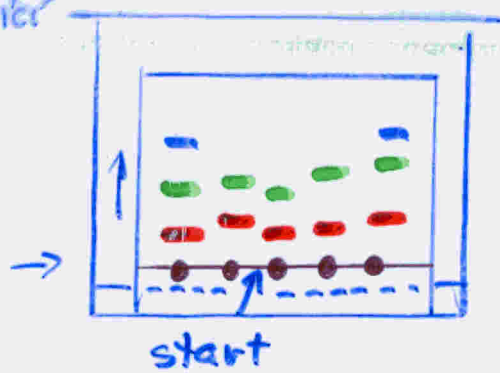
postupuje fronta - vyvíjení se ukončí, než dosáhne konce

trvá 5 - 30 minut.

Dvourozměrné vyvíjení - složité směsi - jediný vzorek -

se parace v jednom směru a znovu dle zón ve směru 90°

Komora - řešení



(22)

Po odpaření rozpouštědla z vrstvy - lokalizace zón = detekce, nejčastěji optická, označení zón ihned po detekci

- 1) fluorescence při ozáření UV světlem (derivatizace)
- 2) zhašení fluorescence na desce s fluorescenční přísadou (tmavé skvrny na desce při ozáření)
- 3) Chemická detekce - skupinové barevné reakce
roztok detekčního činidla se rozprašuje na chromatogram jako aerosol

Eluční parametry v TLC

$R_F = \frac{LA}{L_F}$ - Retenční faktor je poměr vzdálenosti zduž látky a celé mobilní fáze od startu.

celo

R_F tabelované, ale přesto se souběžně analyzují standardy

$$R_F = \frac{A_m}{A_m + D \cdot A_s} = \frac{1}{1 + D \cdot \frac{A_s}{A_m}}$$

$A_{s,m}$ - přirůzy mobilní a stacionární fáze

D - distribuční koeficient

$$D \cdot \frac{A_s}{A_m} = \frac{1}{R_F} - 1$$

$\frac{A_s}{A_m}$ je pro dané pokusné podmínky přibližně konstantní

$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$ - má aditivní povahu

KVALITATIVNÍ ANALÝZA - podle R_f , srovnání s tabelovanými hodnotami a se standardy (23)

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

vyhodnocení $\left\{ \begin{array}{l} \text{in situ - na chromatogramu} \\ \text{po eluci - skvrna (zóna) se ze sorbentu} \\ \text{vylouží a vyluh se hodnotí} \end{array} \right.$

Polokvantitativní srovnání vizuální, zóny vzorku se zónami souběžně chromatografovaných standardů s odstupňovaným obsahem látky vizuální = subjektivní

$$P = f(\log m), \text{ chyba } 5-10\%$$

v určitém rozsahu je plocha zóny lineární funkcí logaritmu obsahu m dané látky.

Objektivní metody - lepší přesnost (1-2%)
in situ:

a) Denzitometrie - měření intenzity odraženého světla, která se v oblasti zóny v důsledku světelné absorpce snižuje. Viditelná nebo ultravioletová oblast Monochromati zoražené světlo dopadá štěrbinou na chromatogram a odražené přichází na fotodetektor.

Zapísač - signál v čase - píky

přístroje: $\left\{ \begin{array}{l} \text{jedno paprskové} \\ \text{dvou paprskové} \end{array} \right.$

$$P = k \cdot \log m$$

integrátor, tiskárna

b) Fluorimetrie - fluorescenční záření vzniká v ozářené zóně na chromatogramu, je však měřeno ve směru odlišném od směru budícího záření

CHROMATOGRAFIE NA PAPIŘE

Sorbent - homogenní filtrační papír z čisté celulózy
definovaná - tlouška i porozita

papír = nosič, stacionární fáze = zakotvená vlhkost
hygroскопické celulózy (5-10%) = normální systém
se zakotvenou polární fází!

mobilní fáze = středně polární (alkoholy - butanol,
s přísádkem kyseliny nebo zásody pro dělení organických
protolytů)

Obrácený systém fází RPS - zakotvená nepolární fáze
(tekutý parafin, silikonový olej)

Rozdíly proti TLC: Papír má hrubší porozitu než TL
=> menší účinnost dělení => nutná delší dráha mobilní
fáze (50 cm) => doba vyvíjení až několik hodin.

Shrnutí: Planární chromatografie je jednoduchá
metoda, která nevyžaduje (s výjimkou objektivních
metod hodnocení) náročné instrumentální vybavení.

Aplikace: např. dělení alkaloidů - přírodní base -
se zásaditou mobilní fází. Organické polykarbo-
xylové kyseliny v kyselé mobilní fázi. Glykosidy
Pesticidy, rezidua, mykotoxiny, nitrosaminy.

ELEKTROFOREZA

25

Elektrokinetické jevy - iontová atmosféra iontů,
elektrická dvojitá vrstva - při styku roztoku s pevnou fází

Elektrokinetický jev = relativní pohyb jedné fáze
vzhledem ke druhé, vyvolaný vnějšími potenciálovými
spádem, nebo naopak - vznik potenciálového spádu
(a elektrického pole) pohybem jedné fáze vůči druhé.

1) Elektroforeza = pohyb částic v el. poli
opakem je

2) Sedimentační potenciál (inverzní děj) - vzniká
na krajích roztoku - je vyvolán pohybem částic
nesoucích elektrickou dvojitou vrstvu roztokem,
například vlivem gravitace.

3) Elektroosmóza - proudění kapaliny v elektrickém
poli vzhledem k pevné fázi - stěna kapiláry, diafragma)
Síly vyvolávající elektroosmózu lze kompenzovat
síly hydrostatickou

4) Proudový potenciál - inverzní jev k elektroosmóze
vzniká při protlačování roztoku elektrolytu porézním
materiálem.

ELEKTROFOREZA - analytické využití

Putování nabitých částic pravého roztoku i koloidních
částic kapalinou prostředím vlivem elektrického
pole.

Detekční metody - rozdílná rychlost putování

Hybná síla = intenzita elektrického pole

Brzdná síla = tření v kapalině, podmíněné viskozitou,
Stokesův zákon - úměrnost tření poloměru částic
a viskozitě

Nabitá částice je charakterizována elektroforetickou
pohyblivostí = rychlost při jednotkové intenzitě pole:

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$$

e. pohyblivost - absolutní - pro nekonečně zředěné roztoky
- efektivní - je úměrná vodivosti
- nižší než absolutní, vzájemné interakce iontů

Možnosti cíleného ovlivnění efektivní pohyblivosti
volbou podmínek = složení elektrolytů migračního prostředí.

IONTY SILNÝCH ELEKTROLYTŮ - STAĀLÁ POHYBLIVOST

IONTY SLABÝCH ELEKTROLYTŮ - POHYBLIVOST ZÁVISÍ NA
REAKCÍCH

SLABÁ KYSELINA

1) $\text{pH} \gg \text{pK}_a$ \Rightarrow úplně
disociovaná kyselina
ve formě aniontů
 \approx pohyblivost

2) $\text{pH} \ll \text{pK}_a$ \Rightarrow potlačena
disociace \Rightarrow nepohyblivé
neutrální molekuly

3) $\text{pH} \approx \text{pK}_a \pm 2$

PROTOLYTICKÉ
REAKCE
VLIV PH

KOMPLEXOTVORÉ R.
KATION + ZÁPORNÉ
NABITÉ LIGANDY

ud 3) Rovnovážná směs iontů
a molekul určitým poměrem,
charakterizovaná disociačním
stupněm, putuje určitou rychlostí
nemůže se rozdělit na nepohyblivé a

Elektroforetické chování jednosytných protolytů 27

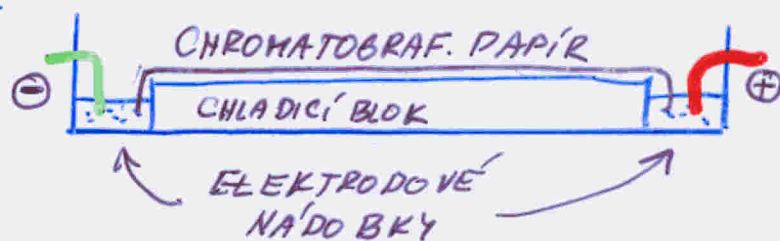
$$U = \mu_{HB} \cdot \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} + \mu_B \cdot \frac{K_a}{K_a + [H^+]}$$

pro elektro neutrální částici je příslušný člen roven 0

ZÓNOVÁ ELEKTROFOREZA ZE

NOSICOVÁ ELEKTROFOREZA

Provedení: 1) na papíře
2) v gelu



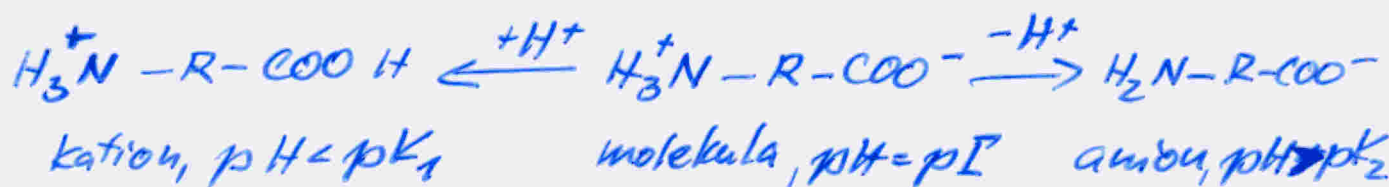
Analýza proteinů

Imunoelektroforeza - analýza bílkovin krevního séra
s imunochemickou identifikací

IZOELEKTRICKÁ FOKUZACE IEF

Pouze pro dělení amfolytů, které mohou existovat
v kationtové, elektro neutrální a aniontové formě.

Aminokyseliny, peptidy, proteiny



v základním elektrolytu se mění pH plynně od
jedné elektrody ke druhé!

IZOTACHOFORÉZA ITP

Nespojitá soustava elektrolytů, v ustáleném stavu
je rychlost pohybu všech iontů stejná (jsou rozděleny)

Nespojiť test parametru analýzy: skoková zmena od zóny k zóne. (Intenzita pole, elektrický odpor, koncentrace, teplota, optické vlastnosti, pH)

Operačný systém 2 základných elektrolytů:

28

vedoucí elektrolyt - má pohyblivost μ_L
koncový elektrolyt - má pohyblivost μ_T
analyzovaný vzorek - " - μ_X

Musí platit

$$\underline{\mu_L > \mu_X > \mu_T}$$

Zóny iontů putují odděleně stejnou rychlostí

$$\underline{\mu_2 > \mu_A > \mu_B > \mu_T}$$

Kontrola životního prostředí, stanovení kationtů,
aniontů - nelze současně