

SEPARAČNÍ METODY

Využití separačních metod

- izolace analytu
- oddělení analytu od matrice (přečištění)
- zakoncentrování analytu
- stanovení analytu (analytů) ve vícesložkové směsi

Druhy separačních metod

- Srážení a spolusrážení (koprecipitace)
- Destilace
- Extrakce tuhá látka – kapalina
- Extrakce tuhá látka – superkritická tekutina
- Extrakce kapalina – kapalina
- Sorpční metody ve vsádkovém uspořádání
 - adsorbenty
 - iontoměniče
- Chromatografické metody
- Elektromigrační metody

Extrakce kapalina – kapalina

- je možná mezi dvěma nemísitelnými (omezeně mísitelnými) kapalnými fázemi
- látka rozpuštěná ve fázi (kapalině) 1 přechází při protřepávání obou kapalin částečně do fáze 2
- po ustavení rovnováhy je poměr koncentrací rozpuštěné látky (*solutu*) v obou fázích konstantní

Distribuční konstanta

$$K_D = [S]_2 / [S]_1$$

$[S]_{1,2}$ jsou rovnovážné koncentrace *solutu* ve fázích 1 a 2

při extrakci v systému voda-organická fáze (např. CHCl_3 , amylalkohol, ethylether, hexan, cyklohexan, toluen...) je

$$K_D = [S]_{\text{org}} / [S]_{\text{aq}}$$

Distribuční (rozdělovací) poměr D

je poměr celkové koncentrace všech forem solutu ve fázi 2 k celkové koncentraci všech forem solutu ve fázi 1 po ustavení rovnováhy.

$$D = c_{S2} / c_{S1}$$

pro systém voda-organické rozpouštědlo

$$D = c_{\text{org}} / c_{\text{aq}}$$

Výtěžek extrakce solutu z vodné fáze organickým rozpouštědlem

Výtěžek je procentní podíl množství (nebo hmotnosti) solutu v organické fázi k počátečnímu množství (hmotnosti) solutu ve vodné fázi před extrakcí

Výtěžek po 1. extrakci

$$E_1 = 100 \cdot D / (D + r^{-1}) \quad [\%]$$

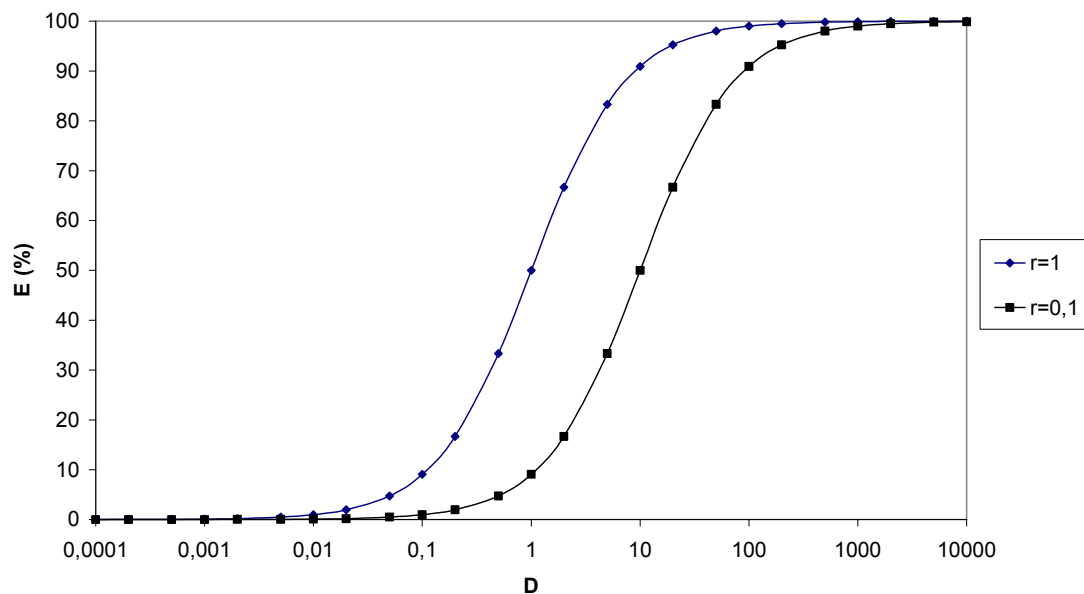
$$r = V_{\text{org}} / V_{\text{aq}}, \quad r^{-1} = V_{\text{aq}} / V_{\text{org}}$$

Výtěžek n-krát opakované extrakce

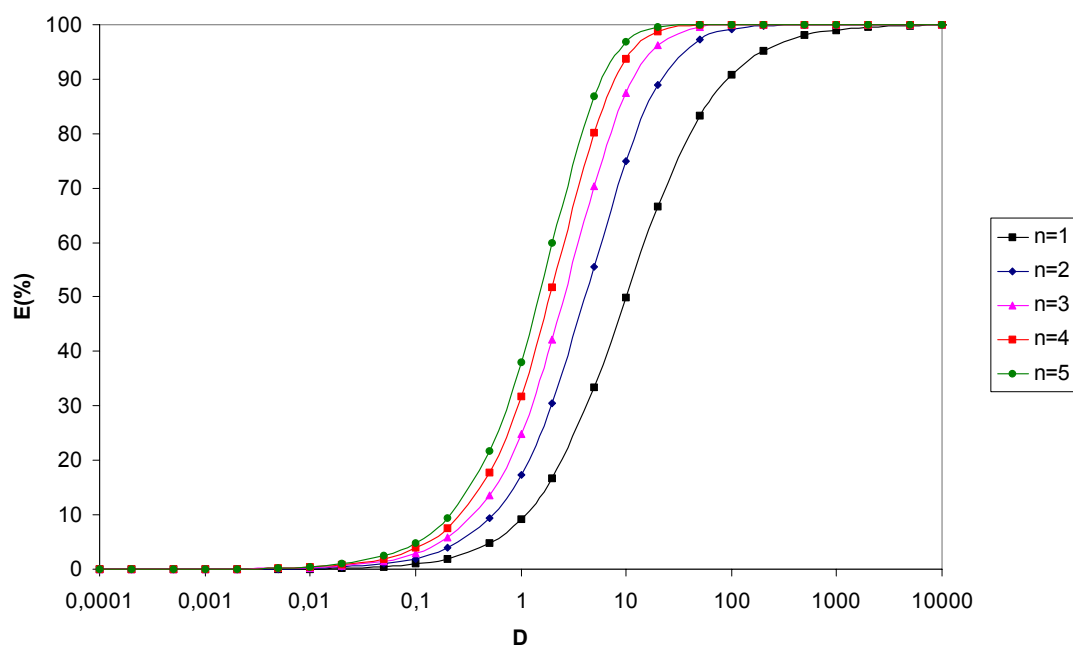
$$E_n = 100 \cdot \{1 - [1 / (1 + D \cdot r)]^n\} \quad [\%]$$

Separace extrakcí kapalina – kapalina

podmínkou pro účinné oddělení látky A od látky B např. extrakcí z vodného prostředí do organického rozpouštědla je značná odlišnost hodnot distribučního poměru. Je-li např. $D_A > 10^4$ a $D_B = 1$, extrahuje se složka A kvantitativně a složka B z 50%. Pro oddělení obou látek je nutné, aby $D_A \cdot D_B \approx 1$



Závislost výtěžku extrakce na hodnotě distribučního poměru pro $r=1$ a $r=0,1$



Závislost výtěžku opakované extrakce na hodnotě distribučního poměru pro $r=0,1$

CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Princip

- k separaci látek dochází na základě distribuce mezi 2 fáze: *mobilní* (pohyblivou) a *stacionární* (nepohyblivou)
- *stacionární fáze* je uspořádána buď plošně nebo kolonově (tj. ve sloupci); vrstvou stacionární fáze protéká *mobilní fáze*
- dělené látky obsažené (rozpuštěné) v mobilní fázi mají různou afinitu ke stacionární fázi a jsou různou měrou ve svém pohybu zdržovány: vykazují různou *retenci*

Rozdělení chromatografie podle uspořádání

- chromatografie v plošném (planárním) uspořádání
 - papírová chromatografie (PC, *paper chromatography*)
 - tenkovrstvá chromatografie (TLC, *thin layer chromatography*)
- chromatografie v kolonovém (sloupcovém) uspořádání

Rozdělení chromatografie podle skupenství fází

- kapalinová chromatografie (LC, *liquid chromatography*): mobilní fáze je kapalina
 - chromatografie kapalina-tuhá látka (LSC): stac. fáze = tuhá látka
 - chromatografie kapalina-kapalina (LLC): stac. fáze = kapalina
- plynová chromatografie (GC, *gas chromatography*): mobilní fáze je plyn
 - chromatografie plyn-kapalina (GLC): stac. fáze = kapalina
 - chromatografie plyn-tuhá látka (GSC): stac. fáze = tuhá látka
- superkritická fluidní chromatografie (SFC)

Základní rozdělení podle separačního principu (mechanismu)

- adsorpční chromatografie
- rozdělovací (partiční) chromatografie

CHROMATOGRRAFIE V PLOŠNÉM USPOŘÁDÁNÍ

patří sem techniky kapalinové chromatografie

- papírová chromatografie (PC) – dnes málo používaná
- tenkovrstvá chromatografie (TLC)
 - vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC)

Planární chromatografie slouží

- jako nenáročná metoda kvalitativní analýzy (důkazy, identifikace)
- pro ověřování čistoty látek
- k preparativním účelům
- k semikvantitativní analýze (TLC)
- k rychlé kvantitativní analýze (HPTLC, TLC-FID)

Chromatografické materiály

- papír – běžný rozměr 25-30 x 50-80 cm
 - Whatman 1: pro běžné použití
 - Whatman 3: pro preparativní papírovou chromatografii
- tenké vrstvy jemného zrnitého materiálu na podložce (sklo, Al) – běžný rozměr 20 x 20 cm
 - anorganické sorbenty: Al_2O_3 , SiO_2
 - organické materiály: mikrokrystallická celulóza, polyamid

Charakter planární chromatografie

- rozdělovací: PC a TLC na celulóze
- adsorpční: TLC na anorganických sorbentech

Mobilní fáze v PC a TLC

směsi rozpouštědel (voda, organické kyseliny, alkoholy, ketony, estery, aminy, amoniak...)

Obvyklý postup v PC nebo TLC

- roztoky vzorků a standardních látek se na plochu (papír, desku) nanášejí na linii startu mikropipetou (objem desítek μl) a proudem vzduchu se odpaří rozpouštědlo
- papír nebo deska se nechá vyvíjet v chromatografické komoře (mobilní fáze se v papíru nebo vrstvě pohybuje kapilár. silami)
- po vyjmutí z komory se označí tužkou linie rozpouštědla
- chromatogram se vysuší a rozdělené složky (pokud nejsou barevné) se detekují postříkem roztokem detekčního činidla nebo se zviditelní při pozorování v UV (fluoreskující látky, látky zhášející fluorescenci činidla), skvrny se označí tužkou, vypočítají se hodnoty R_F detekovaných složek vzorku a standardních látek
 $R_F = \text{vzdálenost skvrny od startu} / \text{vzdál. čela rozpouštědla od startu}$
- látky se identifikují podle hodnoty R_F a podle barvy skvrn
- kvantitativní vyhodnocení chromatogramu je možné měřením intenzity skvrn pomocí *denzitometru*

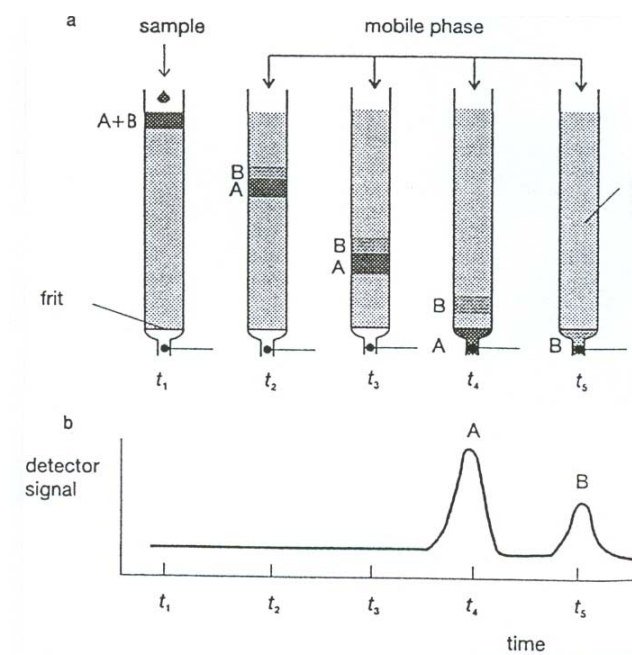
Způsoby vyvíjení chromatogramu

- sestupné (většinou v PC)
- vzestupné
- kruhové
- dvourozměrné

Některá detekční činidla

- pro aminokyseliny: ninhydrin (roztok v acetonu)
- pro cukry: anilin+ftalová kys., benzidin, naftoresorcin...
- univerzální činidlo pro organické látky: konc. H_2SO_4
- jiná možnost detekce: z analytů se předem připraví barevné nebo fluoreskující deriváty, které se pak dělí (např. dansylderiváty, 2,4-dinitrofenylderiváty aminokyselin a aminů)

ZÁKLADNÍ POJMY A VZTAHY V KOLONOVÉ CHROMATOGRAFII (LC a GC)



Veličiny

retenční čas: kvalitativní charakteristika (závisí na druhu látky)

plocha píku: kvantitativní údaj (závisí na množství látky)

Veličiny charakterizující retenci

Retenční čas a eluční (retenční) objem

$$t_R = V_R / F \quad [\text{min}]$$

V_R je eluční (retenční) objem [ml]

F je objemový průtok mobilní fáze [ml/min]

Redukovaný retenční čas t'_R

$$t'_R = t_R - t_M$$

Kapacitní poměr k

pro složku A je poměr množství látky A ve stacionární a mobilní fázi

$$k_A = n_{(A)s}/n_{(A)m} = t'_{RA}/t_M = (t_{RA} - t_M)/t_M$$

$$k_A = n_{(A)s}/n_{(A)m} = (c_{(A)s}/c_{(A)m}) \cdot (V_s/V_m) = K_{D(A)} / \beta$$

K_D je distribuční konstanta

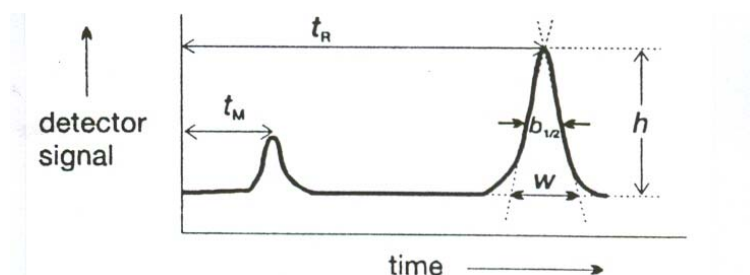
β je fázový poměr, $\beta = V_m/V_s$

Klasická teorie chromatografických pater (ideální chromatografie)

Chromatografická kolona je tvořena velkým či menším množstvím tzv. *teoretických pater*. Složky vzorku unášené tokem mobilní fáze vstupují do 1. patra kolony nerozdělené. Zde se ustavuje rovnováha mezi stacionární fází 1. patra a mobilní fází. Po ustavení rovnováhy se změní koncentrace složek v mobilní fázi a roztok dělených látek v mobilní fázi vstupuje do 2. patra, kde se opět ustavuje rovnováha mezi fázemi. Celý proces se mnohonásobně opakuje. Na počtu pater kolony je závislá *účinnost separace*.

Zjednodušující předpoklady:

- rovnováha mezi fázemi se ustavuje okamžitě
- podélná difuze látky je zanedbatelná
- sorpční izoterma je zcela lineární
- píستový tok mobilní fáze

Odhad počtu teoretických pater

$$N = 16 \cdot (t_R/w)^2$$

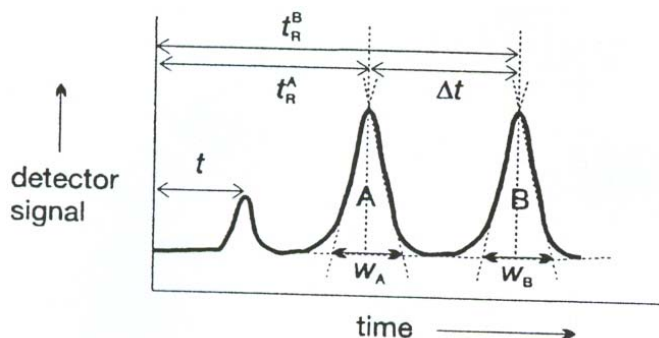
$$N = 5,54 \cdot (t_R/b_{1/2})^2$$

w – šířka píku u základní linie

b – šířka píku v polovině výšky

Rozlišení

je parametr charakterizující míru oddělení dvou píků (složek 1 a 2)



$$R_{1,2} = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2)$$

Faktory ovlivňující rozlišení

- selektivita vyjadřovaná *separačním (selektivitním) faktorem* α
 $\alpha = k_2/k_1 = t'_{R2}/t'_{R1}$ ($t'_{R2} > t'_{R1}$)
- retence později eluované složky vyjádřená jejím *kapacitním poměrem*
- účinnost vyjádřená odmocninou z počtu teoretických pater

$$R_{1,2} = (1/4) \cdot [(\alpha - 1)/\alpha] \cdot [k_2/(1 + k_2)] \cdot \sqrt{N}$$

efektivní počet pater $N_{ef} = N \cdot [k_2/(1 + k_2)]^2$

$$R_{1,2} = (1/4) \cdot [(\alpha - 1)/\alpha] \cdot \sqrt{N_{ef}}$$

Dosažení požadovaného rozlišení

$R = 1$ dostatečné

$R = 1,5$ téměř dokonalé

$R > 2$ nadbytečné

Potřebný počet efektivních pater k dosažení hodnoty rozlišení 1 a 1,5

α	$R_{1,2}=1$	$R_{1,2}=1,5$	α	$R_{1,2}=1$	$R_{1,2}=1,5$
1,005	650 000	1 450 000	1,1	1 900	4 400
1,01	163 000	367 000	1,15	940	2 100
1,02	42 000	94 000	1,25	400	900
1,05	7 100	16 000	1,5	140	320

Faktory ovlivňující retenci

- druh stacionární fáze
- teplota (především v GC)
- *eluční síla* mobilní fáze (v LC)

Faktory ovlivňující účinnost (počet pater)

- délka kolony
- uspořádání stacionární fáze v koloně
- velikost a rovnoměrnost částic stacionární fáze
- průtok mobilní fáze (rychlost toku mobilní fáze kolonou)

Faktory ovlivňující selektivitu (hodnotu α)

- povaha stacionární fáze
- rozpustnost dělených látek v mobilní fázi