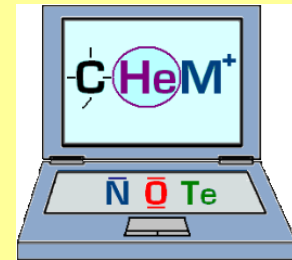


Metody separační

- **Základní pojmy a přehled metod**



Evropský sociální fond

Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

Metody separační

Klíčový požadavek

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

DŮLEŽITÉ POJMY

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

Metody separační

SELEKTIVITA

- **SCHOPNOST LÁTKY DĚLIT NA ZÁKLADĚ JEDNÉ ČI VÍCE JEJICH VLASTNOSTÍ**
 - dle bodu varu (*destilace, frakční destilace*)
 - dle těkavosti (tenze par) (*sublimace*)
 - dle distribuce v různých kapalných fázích (*extrakce – vytřepávání*)
 - dle molekulové hmotnosti (*GPC – SEC, SDS-ELFO*)
 - dle strukturních vlastností (*afinitní chromatografie*)
 - dle optické otáčivosti (*chirální separace*)

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
 - **Chromatografické metody – vysoká frakcionační kapacita**

Metody separační

ROZSAH POUŽITELNOSTI

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

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 („transport pomocí elektřiny“)



- isotachoforesa („transport pomocí elektřiny“)
- termomodifuse („transport při teplotním gradientu“)
- ultracentrifugace („odstředivé síly“)
- sedimentace („gravitace“)

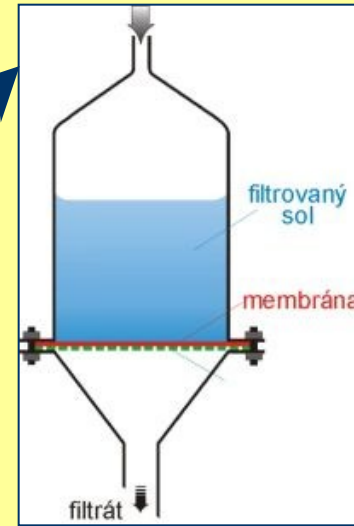
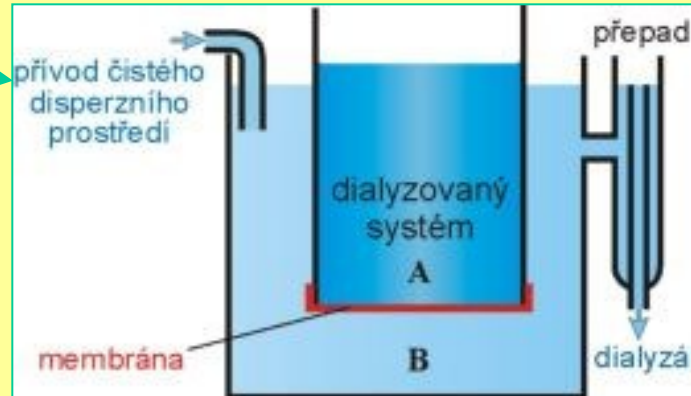
Metody separační

- METODY ZALOŽENÉ NA ODLIŠNÉ POHYBLIVOSTI

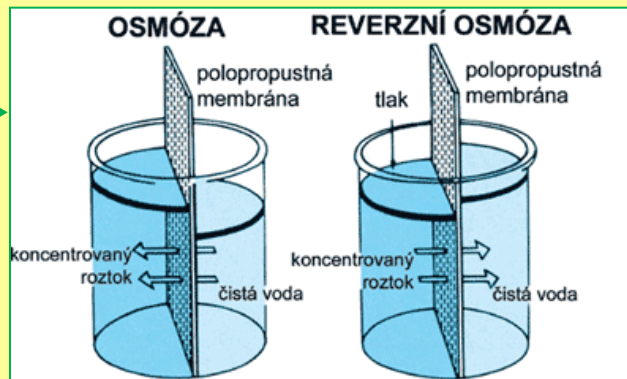
- PŘES MEMBRÁNU

- ultrafiltrace – zachycuje makromolekuly

- dialyza
oddělí
nízkomolekulární
látky



- reversní osmosa – působení většího tlaku než je osmotický



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 – v KOLONĚ
 - obecný pojem - **SORBENT - NÁPLŇ KOLONY**
 - **STACIONÁRNÍ FÁZE – PAPÍR, TENKÁ VRSTVA**

CHROMATOGRRAFIE

– STACIONÁRNÍ FÁZE

- KAPALINA NA NOSIČI
 - GLC, LLC - ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRRAFIE
- TUHÁ LÁTKA
 - GSC, LSC - ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE – adsorbent
 - IEC - IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE – ionex, iontoměnič
- GEL - „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**

CHROMATOGRRAFIE

- **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

CHROMATOGRRAFIE

– 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**
 - » $R_{F,J} = u_j / u = d_j / d = 1 / [1 + k_j]$
 - » Ize 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

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

– $H_{J, \text{ef}} = L / n_{\text{ef}, J}$

– 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

– nepravidelné vzdálenosti mezi částicemi sorbentu

» různá šíře kanálků

» vyšší rychlost mobilní fáze v širších kanálcích

– obtékání částic sorbentu ✕ přímočarý tok

» vyšší lineární rychlost mobilní fáze při přímočarém toku

– ZÁVISLOST NA VELIKOSTI A TVARU ČÁSTIC
SORBENTU

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)

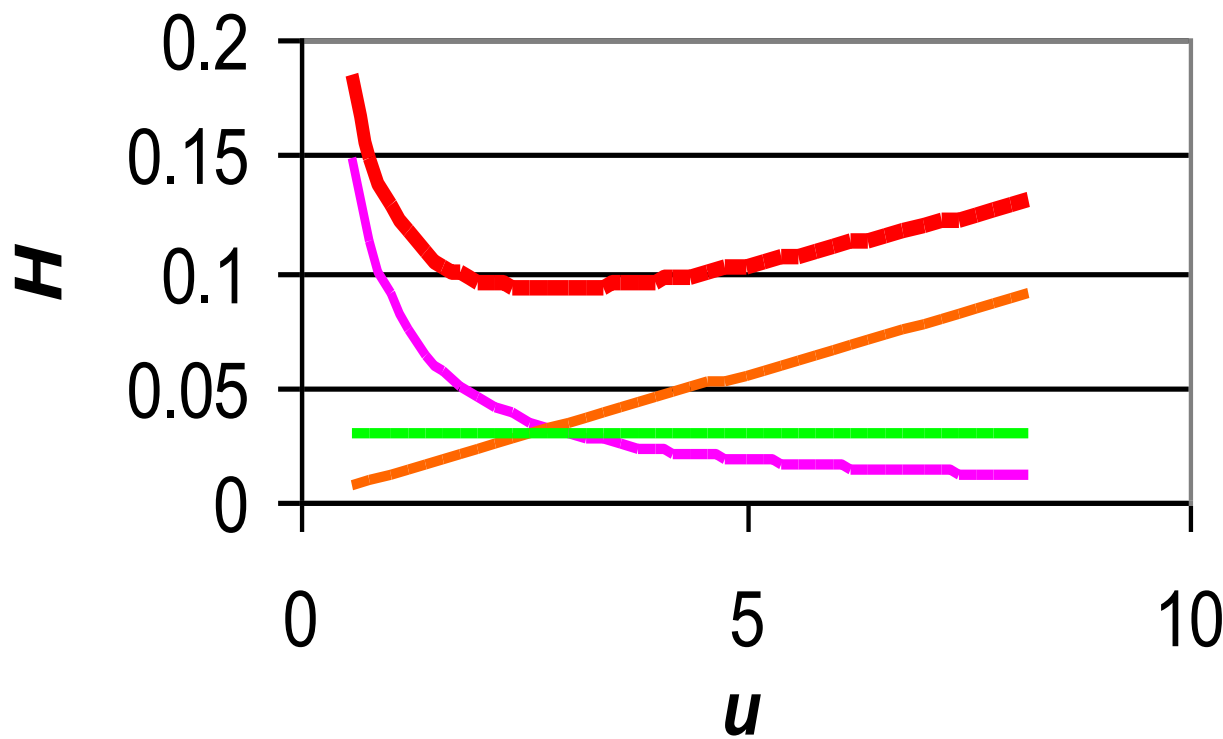
• ODPOR PROTI PŘENOSU HMOTY VE STACIONÁRNÍ FÁZI

- 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)

$$H = A + B/u + C u$$



- celkem
- difuze B/u
- odpor proti pohybu Cu
- turbulentni difuze A

CHROMATOGRRAFIE

– VLIVY OVLIVŇUJÍCÍ TERMODYNAMIKU SEPARAČNÍHO PROCESU

• VLIV OBJEMU STACIONÁRNÍ FÁZE

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

$$k_J = (t_{R,J} - t_M) / t_M = V_{R,J}' / V_M$$

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

necht' $V_M = V_m$ pak

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

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

– VLIVY OVLIVŇUJÍCÍ TERMODYNAMIKU SEPARAČNÍHO PROCESU

• VLIV TEPLoty

– zvýšení teploty - růst kinetické energie molekul

» redukce sil zadržujících molekulu jak v mobilní, tak ve stacionární fázi

- otázka, zda dojde k větší redukci sil v mobilní či ve stacionární fázi

- souvisí se znaménkem parciální molární enthalpie Δh_{s-m} ,

spojené s převodem 1 mol složky ze stacionární do mobilní fáze

– VLIVY OVLIVŇUJÍCÍ TERMODYNAMIKU SEPARAČNÍHO PROCESU

• VLIV TEPLoty

- $dK_{D,J} / dT = - \Delta h_{s-m} / RT^2$
- hodnota parciální molární enthalpie Δh_{s-m} se výrazně liší pro různé typy chromatografie
 - největší hodnoty v PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII
 - podstatně menší hodnoty v KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII
- ROZDĚLENÍ NEDĚLITELNÝCH SLOŽEK PO ZMĚNĚ TEPLoty - složky se liší velikostí či tvarem molekuly
 - složky se liší podstatou interakce se stacionární fází

CHROMATOGRRAFIE

– ROZLIŠENÍ SLOŽEK - definice

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

– 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

CHROMATOGRRAFIE

- **Plynová chromatografie - GC**

- **Fyzikálně-chemická metoda dělení plynů a par využívající rozdělování složky mezi dvě nestejnorodé fáze, nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní), přičemž pohyblivou fází je plyn.**

- dělení nejen plynů, ale i obecně všech **těkavých látek**, bez ohledu na jejich skupenství při laboratorní teplotě (bod varu do 400°C)
- **NESMÍ DOCHÁZET K ROZKLADU LÁTEK**
- stacionární fází pevná látka - chromatografie plyn-pevná látka (**GSC**)
adsorpční vlastnosti stacionární fáze, vlastnosti nosného plynu
- stacionární fází kapalina - chromatografie plyn-kapalina (**GLC**).
rozpuštění složky ve stacionární fází
kapalina tvořící stacionární fází nanesená ve formě tenkého filmu
na vhodném nosiči s velkým povrchem

Plynová chromatografie - GC

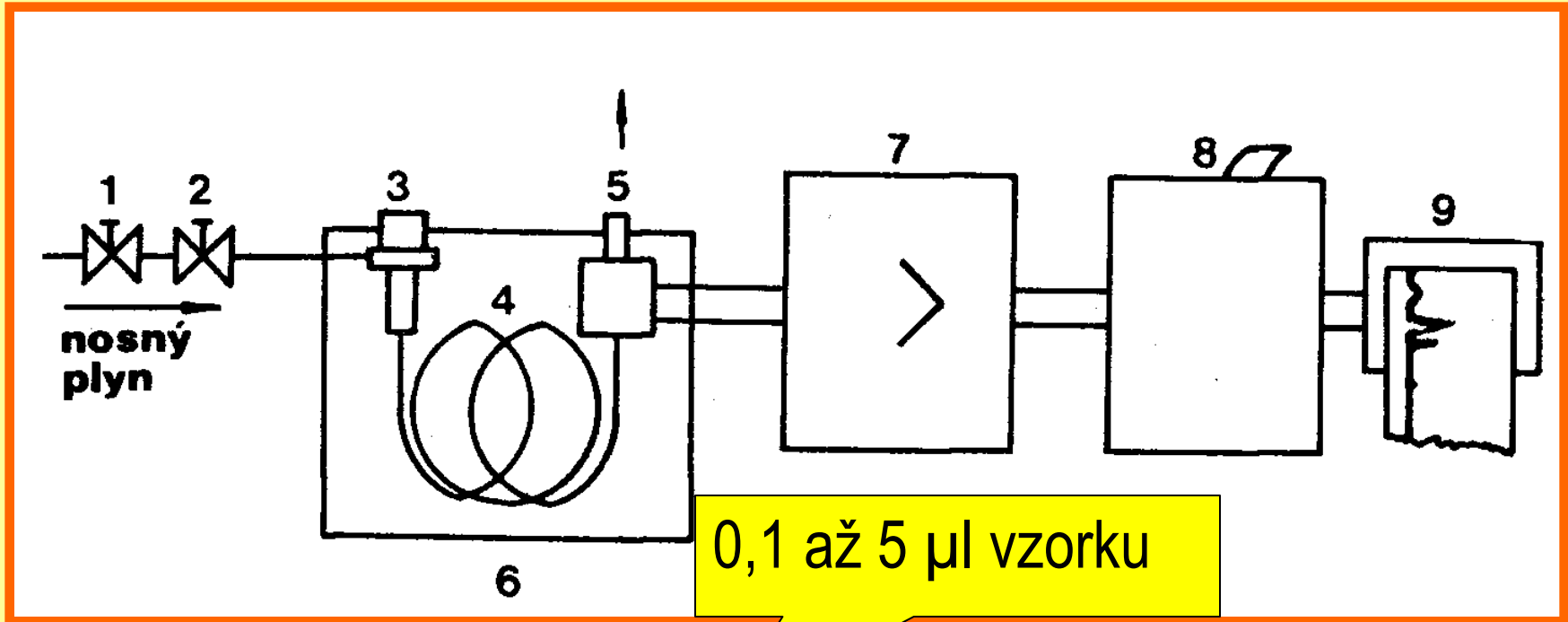
- při separaci dělené složky nesený kolonou inertním nosným plynem
- složky se dělí mezi nosný plyn a stacionární fázi
- stacionární fáze selektivně zadržuje určité komponenty na základě jejich rozdílných distribučních konstant dělení na koloně → vytvoří se zóny složek
 - vliv tenze par (bodu varu), vliv polaritý látek
 - („**PODOBNÉ SE ROZPOUŠTÍ V PODOBNÉM**“)
 - nepolární látky zadržovány nepolární stacionární fází
- více či méně rozdělené komponenty postupně opouští kolonu v proudu nosného plynu
- výstup z kolony sledován detektorem jako závislost odezvy detektoru na čase

Plynová chromatografie - GC

- MOBILNÍ FÁZE = NOSNÝ PLYN
 - transport látek
 - sám nepřechází do stacionární fáze
 - používají se „PERMANENTNÍ PLYNY“
 - helium, dusík, argon, vodík - vysoká čistota,
bez kyslíku
 - problém STLAČITELNOST PLYNŮ
 - **LINEÁRNÍ RYCHLOST** TOKU MOBILNÍ FÁZE
NENÍ KONSTATNÍ
 - nelineární TLAKOVÝ SPÁD na koloně
 - pokles tlaku na koloně - na výstupu běžně
atmosférický tlak
 - zvýšení lineární rychlosti

Plynová chromatografie - GC

• zařízení - PLYNOVÝ CHROMATOGRAF



1. Regulace tlaku nosného plynu

3. Dávkoč s vyhříváním-**NÁSTRĚK**

5. **Detektor** s vyhříváním

7. Zesilovač signálu detektoru

9. Zapisovač (datastanice)

2. Regulace **průtoku** nosného plynu

4. Chromatografická **kolona**

6. **Termostat** – nastavení teploty

8. Integrátor

Plynová chromatografie - GC

- Kolony pro plynovou chromatografii
 - **náplňové** - trubice naplněné granulovaným materiálem
 - **kapilární** - OTEVŘENÉ - nosičem stěny kapiláry
 - PLNĚNÉ - stacionární fáze zakotvena na stěnách i na náplňovém nosiči

	Náplňové		Kapilární	
	Analytické	Preparativní	Otevřené	Plněné
Vnitřní průměr d [mm]	2 - 6	6 a více	0.1 – 0.5	0.3 – 1.0
Délka L [m]	0.5 - 6	2 - 6	10 - 100	0.5 - 50
H [mm]	1	1 - 5	0.3 – 0.5	0.5

Plynová chromatografie - GC

- **Kolony pro plynovou chromatografii**
 - náplňové - trubice naplněné granulovaným materiálem
 - sklo, nerezová ocel, měď, polymery
 - náplň - nosič křemelina, na ni zakotvena stacionární fáze - GLC
 - náplň - adsorbent - silikagel, alumina, aktivní uhlí, zeolity, mikroporézní polymery (kopolymery) - GSC
 - kapilární - až statisíce pater na délku kolony
 - **zvýšení povrchu stěn naleptáním**
 - **stěny - tavený křemen** (vnější povlak polyimid pro potlačení křehkosti křemene)
 - WCOT (WALL COATED OPEN TUBULAR)
 - PLOT (POROUS LAYER OPEN TUBULAR)
 - **mechanicky nanesená či chemicky vázaná stacionární fáze**

Plynová chromatografie - GC

- Kolony pro plynovou chromatografii
 - stacionární fáze
 - **substituované polysiloxany**
 - » nepolární - substituce methylovými skupinami
 - » středně polární - substituce fenylovými skupinami
 - » silně polární - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$, -CH=CH-CN
 - **skvalan** (isoalkan C_{30}) - velmi nepolární
 - **Carbowax 20 M** (na bázi polyethylenglykolu) - silně polární stacionární fáze

Plynová chromatografie - GC

- **Detektory**

- stabilita signálu v čase
- velká citlivost
- rychlá odezva na změnu složení eluentu

- **PLAMENOVÝ IONIZAČNÍ DETEKTOR - FID**

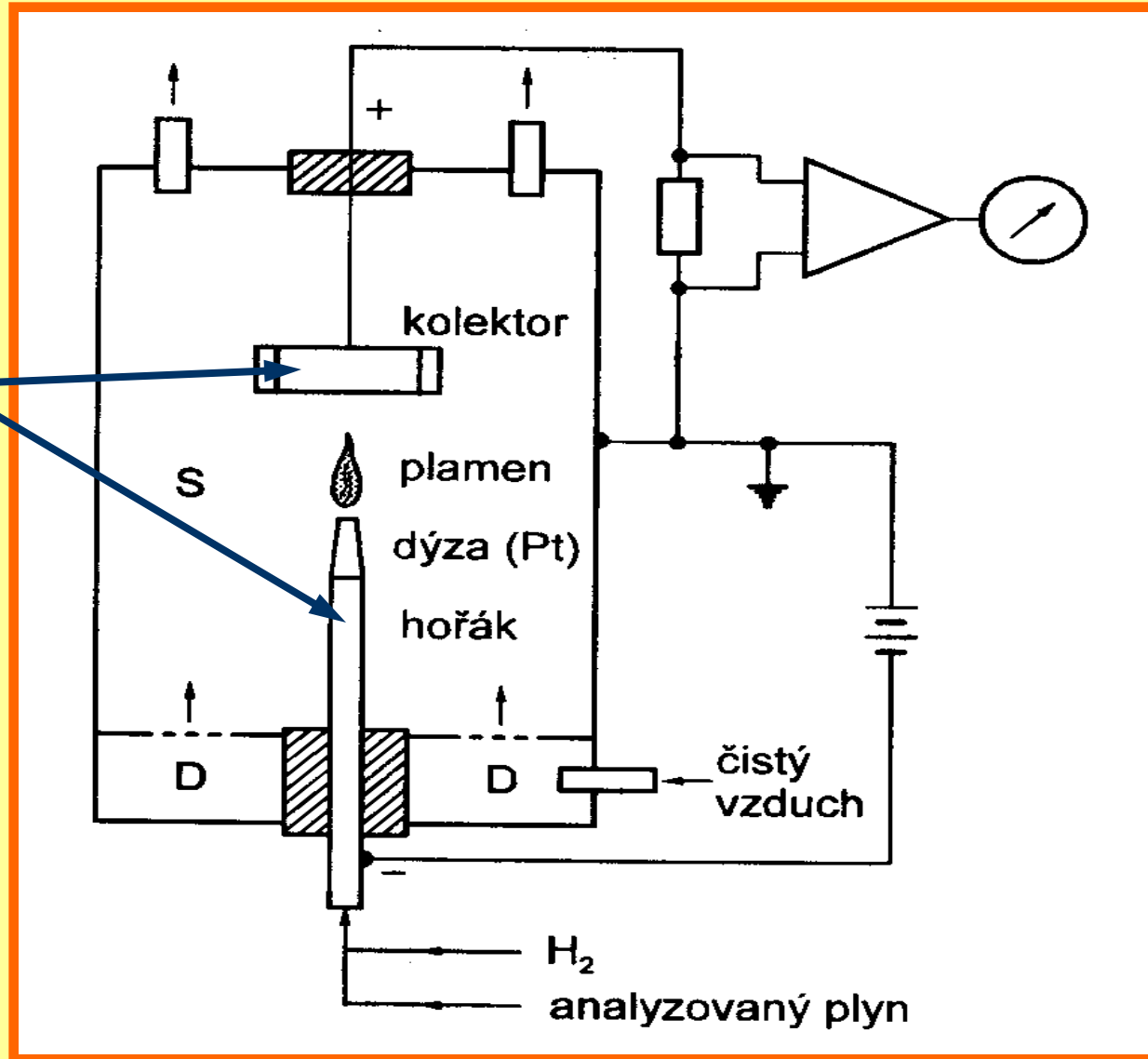
- (Flame Ionization Detector)

- hořáček s přívodem nosného plynu (eluentu) a vodíku
 - » spálením složek - ionty a elektrony - elektrický tok mezi elektrodami (max. 300 V)
 - » citlivé na uhlovodíkové skupiny
 - » **NECITLIVÉ** - NH_3 , H_2O , H_2S , oxidy dusíku, síry atp.

Plynová chromatografie - GC

PLAMENOVÝ IONIZAČNÍ DETEKTOR - FID

elektrody

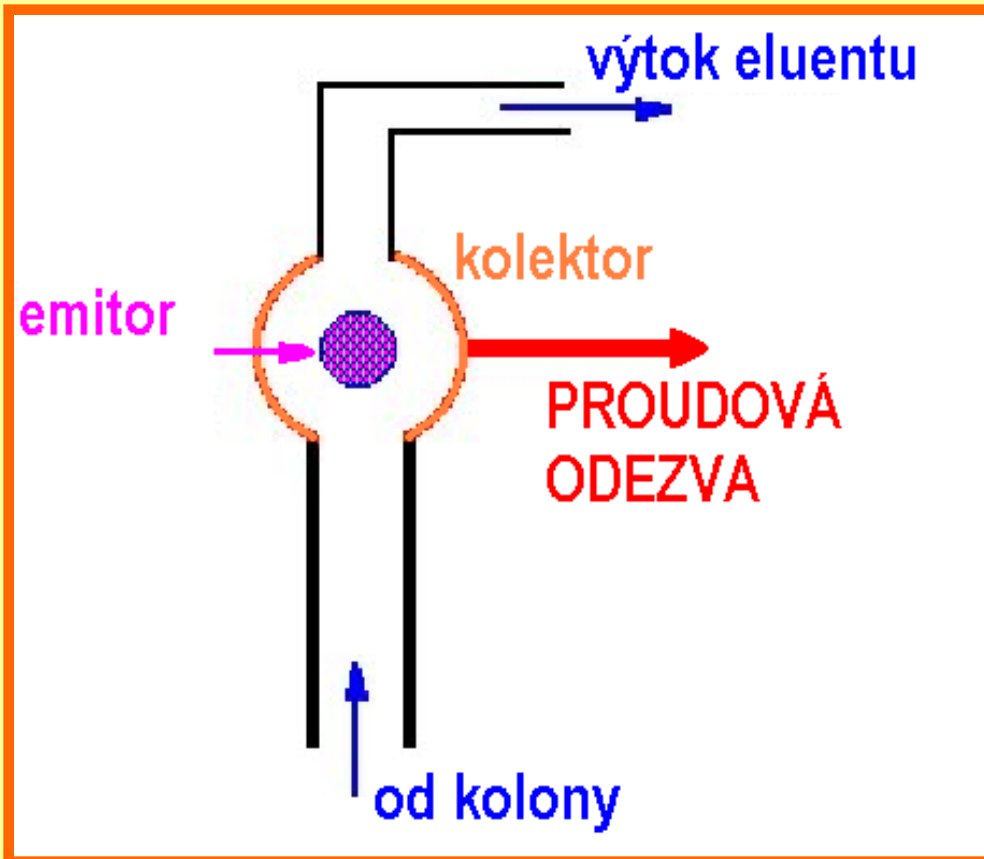


Plynová chromatografie - GC

- **Detektory**

- **DETEKTOR ELEKTRONOVÉHO ZÁCHYTU - ECD**

- (Electron Capture Detector) - dvě elektrody s vloženým napětím



EMITOR -

zdroj měkkého radioaktivního záření - ^{63}Ni - záření β

KOLEKTOR -

záznam proudu mezi elektrodami

Plynová chromatografie - GC

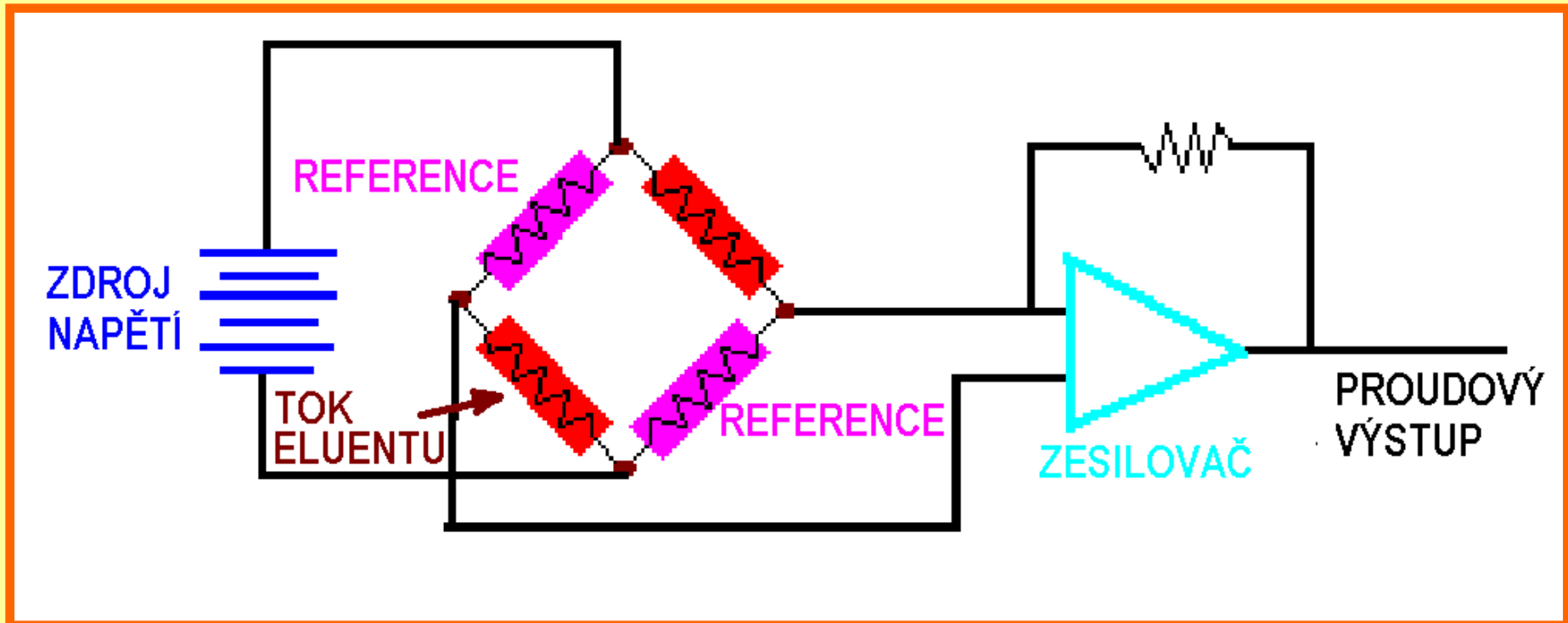
- **DETEKTOR ELEKTRONOVÉHO ZÁCHYTU - ECD**
 - ionizace nosného plynu zářením β
 - vhodné nosné plyny - N_2 , $Ar+CH_4$
 - záchyt elektronů β záření molekulami složek
 - snížení hodnoty ionizačního proudu
 - vyhodnocují se změny proudu při průtoku eluentu detektorem
 - vhodný pro - konjugované karbonylové sloučeniny,
 - nitrily, organokovové sloučeniny
 - sloučeniny obsahující více atomů halogenů - např. pesticidy

Plynová chromatografie - GC

• Detektory

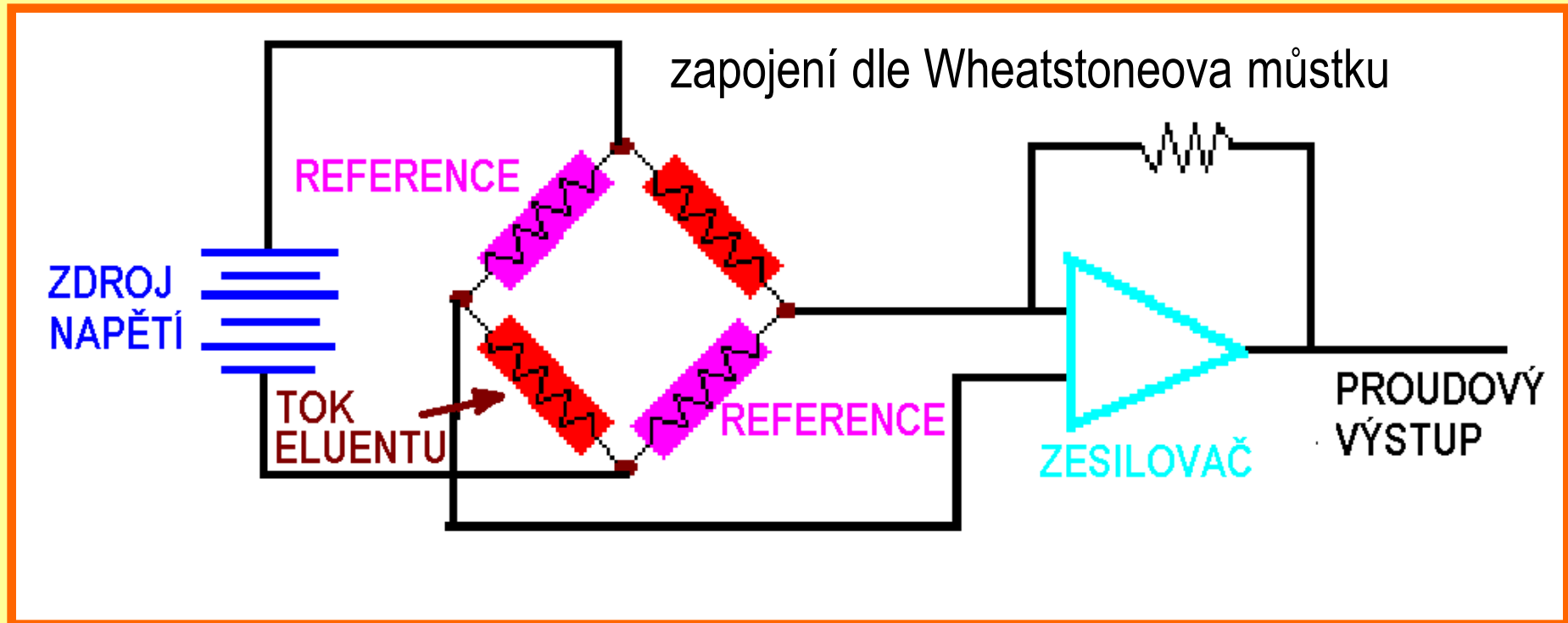
– TEPELNĚ VODIVOSTNÍ DETEKTOR - TCD

- (Thermal Conductivity Detector) - odporové vlákno umístěné v proudu eluentu - vyhřáté na určitou teplotu, a to o cca 100°C vyšší než teplota okolního termostatovaného bloku



• TEPELNĚ VODIVOSTNÍ DETEKTOR - TCD

- při průchodu čistého nosného plynu o stálém průtoku - žádná změna teploty vlákna (žádná změna jeho odporu)
- při průchodu eluentu se složkami - změna tepelně vodivostních vlastností plynu - **změna teploty vlákna** - změna jeho odporu
- vhodný nosný plyn s velkou tepelnou vodivostí - He, H₂



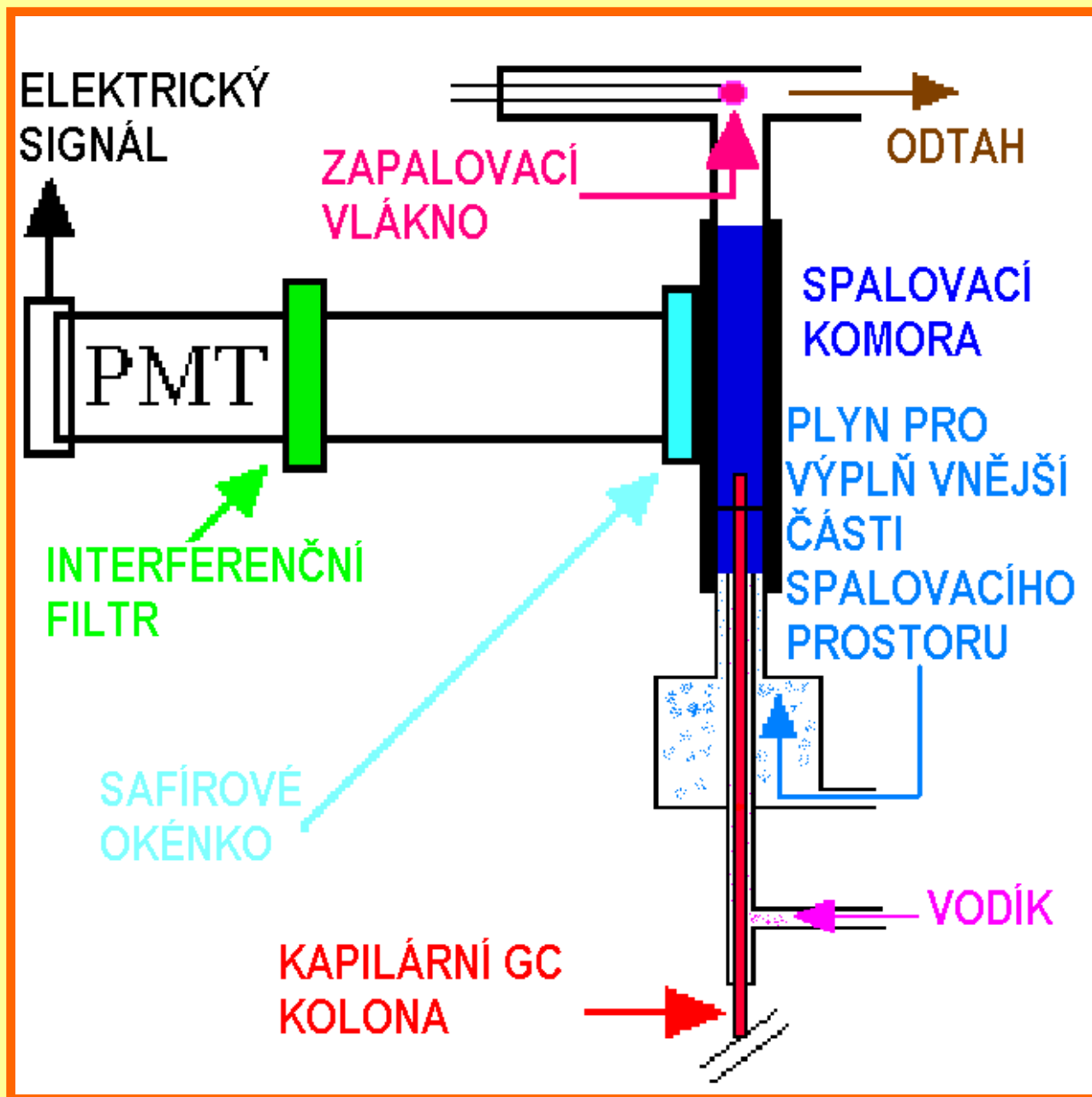
Plynová chromatografie - GC

- **TEPELNĚ VODIVOSTNÍ DETEKTOR - TCD**
 - **KATAROMETR**
 - teplota bloku a vlákna volena tak, aby nedocházelo ke kondenzaci složek eluentu
 - univerzální detektor - odezva prakticky na všechny látky
 - široký lineární dynamický rozsah
 - **MALÁ CITLIVOST**
 - **VHODNÝ PRO ANALÝZU NEUHLOVODÍKOVÝCH PLYNŮ**

Plynová chromatografie - GC

- **PLAMENOVÝ FOTOMETRICKÝ DETEKTOR - FPD**
 - (Flame Photometric Detector)
 - **moderní varianta - pulzní**
 - **měření chemiluminiscence**
 - **emise při spalování složek ve vodíkovém plameni**
 - **měření fotonásobičem s předřazeným interferenčním filtrem**
 - » **fosfor 525 a 565 nm**
 - » **síra 390 nm**

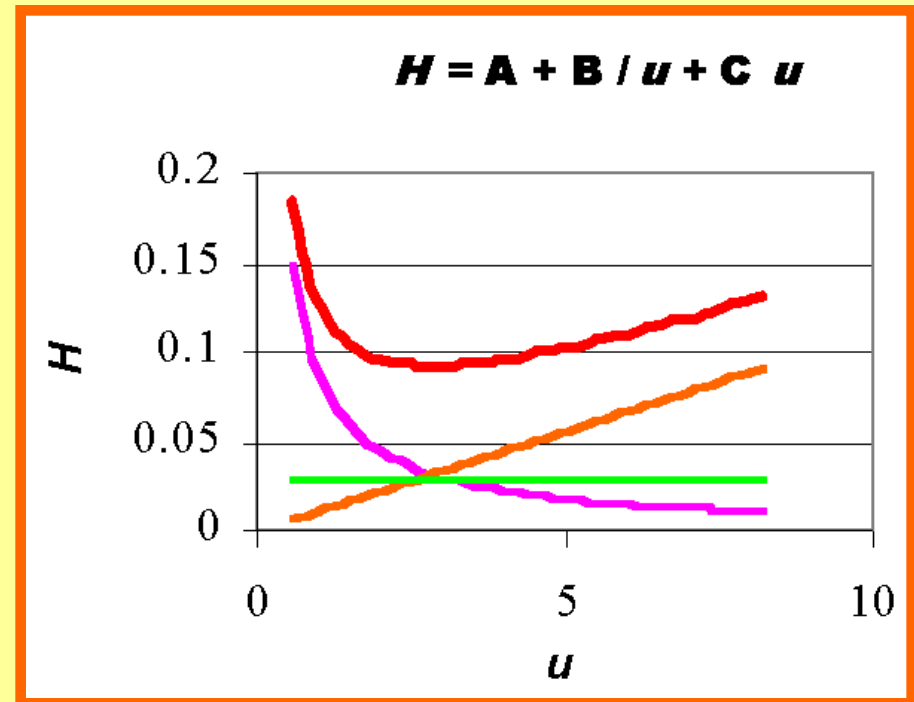
• PLAMENOVÝ FOTOMETRICKÝ DETEKTOR - FPD



Plynová chromatografie - GC

- KINETIKA V GC - z van Deemterovy teorie
 - náplňové kolony $H = A + B/\bar{u} + C \bar{u}$
 - B - faktor difúze, C - odpor přenosu hmoty (stac.)
 - » \bar{u} - průměrná lineární rychlost plynu
 - odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi (tj. v plynné fázi) lze mnohdy zanedbat

- optimální střední lineární rychlost plynu v minimu hyperboly



Plynová chromatografie - GC

- **KINETIKA V GC - z van Deemterovy teorie**
 - náplňové kolony
 - $H = A + B/\bar{u} + C \bar{u}$
 - » \bar{u} - průměrná lineární rychlost plynu
 - tvar hyperboly značně ovlivněn použitým nosným plynem - ovlivňuje molekulární difuzi
 - nižší molekulární difuze pro hustší plyny
 - » vyšší tlak
 - » vyšší molární hmotnost plynu - vhodnější argon či dusík než vodík a hélium - obzvláště pro nízké rychlosti

Plynová chromatografie - GC

- **KINETIKA V GC - z van Deemterovy teorie**
 - kapilární kolony
 - $H = A + B/\bar{u} + C \bar{u}$
 - » \bar{u} - průměrná lineární rychlost plynu
 - **teorie se zjednodušuje** - není náplň kolony a problematika její geometrie
 - $H = B/\bar{u} + C \bar{u}$
 - **ODPADÁ TURBULENTNÍ DIFUSE**
 - **MALÁ TLOUŠŤKA FILMU NA STĚNÁCH** - malý objem stacionární fáze
 - **souměřitelné odpory proti přenosu hmoty ve stacionární a mobilní fázi**

Plynová chromatografie - GC

- **VLIV TEPLoty**

- S ROSTOUCÍ TEPLOTOU SE RETENČNÍ ČASY ZKRACUJÍ

- otázka teploty varu analyzovaných složek a jejich vzájemných rozdílů

- málo těkavé složky - dlouhé retenční časy, široké píky
 - hodně těkavé složky - krátké retenční časy, více těkavých látek eluováno zároveň

- » **PROGRAMOVANÁ TEPLota TERMOSTATU**

- » **TEPLoTNÍ PROGRAM** - lineární růst teploty a isothermické prodlevy

Plynová chromatografie - GC

- **KVALITATIVNÍ ANALÝZA**
 - **IDENTIFIKACE SLOŽEK**
 - k detekci využít metodu umožňující identifikaci látek - MS, IČ, UV - detekce
 - porovnání retenčních časů složek s retenčními časy standardů **za stejných podmínek chromatografického dělení**
 - takové porovnání je třeba provést opakovaně při opakované analýze směsi na kolonách s odlišnou stacionární fází

Plynová chromatografie - GC

- **KVANTITATIVNÍ ANALÝZA**

- 1. krok - **MĚŘENÍ PLOCH PÍKŮ**

- » **INTEGRACE, KOREKCE NA PRŮBĚH POZADÍ**

- **DALŠÍ ZPRACOVÁNÍ**

- **METODA VNITŘNÍ NORMALIZACE**

- **METODA ABSOLUTNÍ KALIBRACE**

- **METODA VNITŘNÍHO STANDARDU**

- **METODA STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU**

Plynová chromatografie - GC

- **KVANTITATIVNÍ ANALÝZA**

- **METODA VNITŘNÍ NORMALIZACE**

- změření ploch všech píků - A_1 , A_2 až A_n

- procentový podíl píku A_j k sumě ploch všech píků

- předpoklad stejné závislosti odezvy na koncentraci (obsahu) pro všechny jednotlivé složky analyzované směsi

Plynová chromatografie - GC

- **KVANTITATIVNÍ ANALÝZA**

- **METODA ABSOLUTNÍ KALIBRACE**

- **METODA VNĚJŠÍHO STANDARDU**

- **separátní** dávkování známého množství analyzované směsi a známých množství standardů složek směsi za jinak identických podmínek

- porovnání naměřených ploch píků (výšek píků)

- » kalibrační křivky pro jednotlivé složky směsi

- » „určení bodů ‘nad’ a ‘pod’ pro jednotlivé složky

Plynová chromatografie - GC

- **KVANTITATIVNÍ ANALÝZA**
 - **METODA VNITŘNÍHO STANDARDU**
 - **METODA RELATIVNÍ či NEPŘÍMÁ**
 - přidání známého množství vhodně zvolené „nové“ látky („standardu“) **do** analyzovaného vzorku neznámé směsi
 - » přidávaná látka musí poskytovat pík separovaný od píků složek analyzované směsi
 - » přidávaná látka nesmí rušit/ovlivňovat dělení neznámé směsi
 - » otázka závislosti plochy píků na koncentraci pro složky dělené směsi a pro standard

Plynová chromatografie - GC

- Kvantitativní analýza

- **METODA STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU**

- PŘÍDAVKY DEFINOVANÉHO MNOŽSTVÍ STANDARDU STANOVOVANÉ SLOŽKY KE ZNÁMÉMU MNOŽSTVÍ ANALYZOVANÉ SMĚSI

- 1. krok - chromatografická analýza známého množství neznámé analyzované směsi
 - 2. krok - chromatografická analýza známého množství neznámé analyzované směsi s definovaným přídavkem standardu