

Separační metody

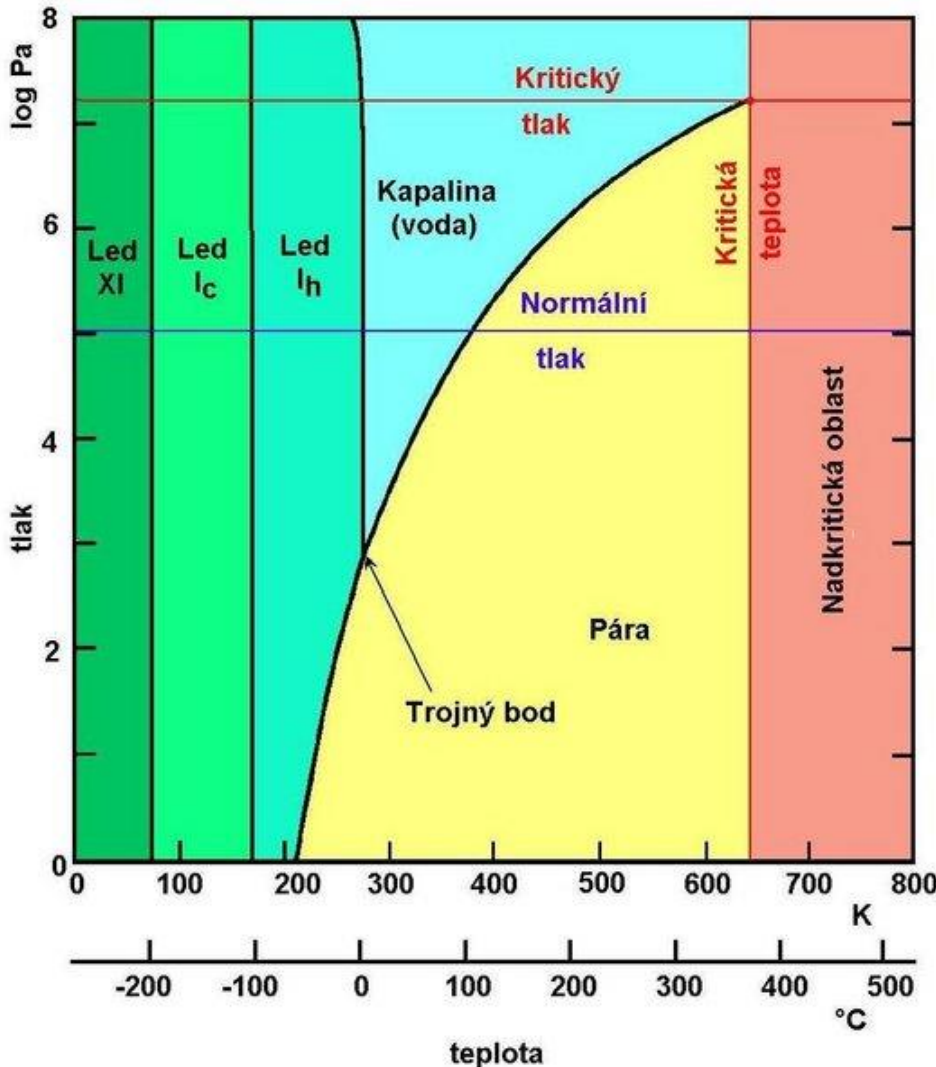
- využívají se k **izolování (separaci)** dokazované nebo stanovované složky z analyzované směsi a k odstranění rušivých (interferujících) komponent analyzovaného roztoku (účel **získání čistých složek**)
- **Separace** (dělení) → operace, při níž se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení
- **Rozdělení separačních metod**
Metody založené na různých:
 - distribuci jednotlivých složek mezi dvě fáze
 - rychlosti pohybu jednotlivých složek v téže fázi

Separáční metody

založené na fázových rovnováhách

Fáze	Separáční metoda
Plyn - kapalina	Destilace (kapalina → plyn)
	Plynov chromatografie (GLC) (headspace metody)
Plyn - pevn fáze	Sublimace (tuh látka → plyn)
	Plynov chromatografie (GSC)
	Molekulov síta
Kapalina - kapalina	Extrakce z kapaliny do kapaliny
	Kapalinov chromatografie (LLC, GPC)
Kapalina - pevn fáze	Zonln taven (tuh látka → kapalina)
	Frakční krystalizace
	Srážení
	Kapalinov chromatografie (LSC, IEC)
	Extrakce pevnou fází
	Molekulov síta

Fázový diagram



Fázový přechod je fyzikální pojem, označující skokovou změnu makroskopických vlastností termodynamického systému (fáze) při změně termodynamické proměnné (např. teploty).

fázový diagram jednosložkové soustavy (vody)

Separáční metody

založené na fázových rovnováhách

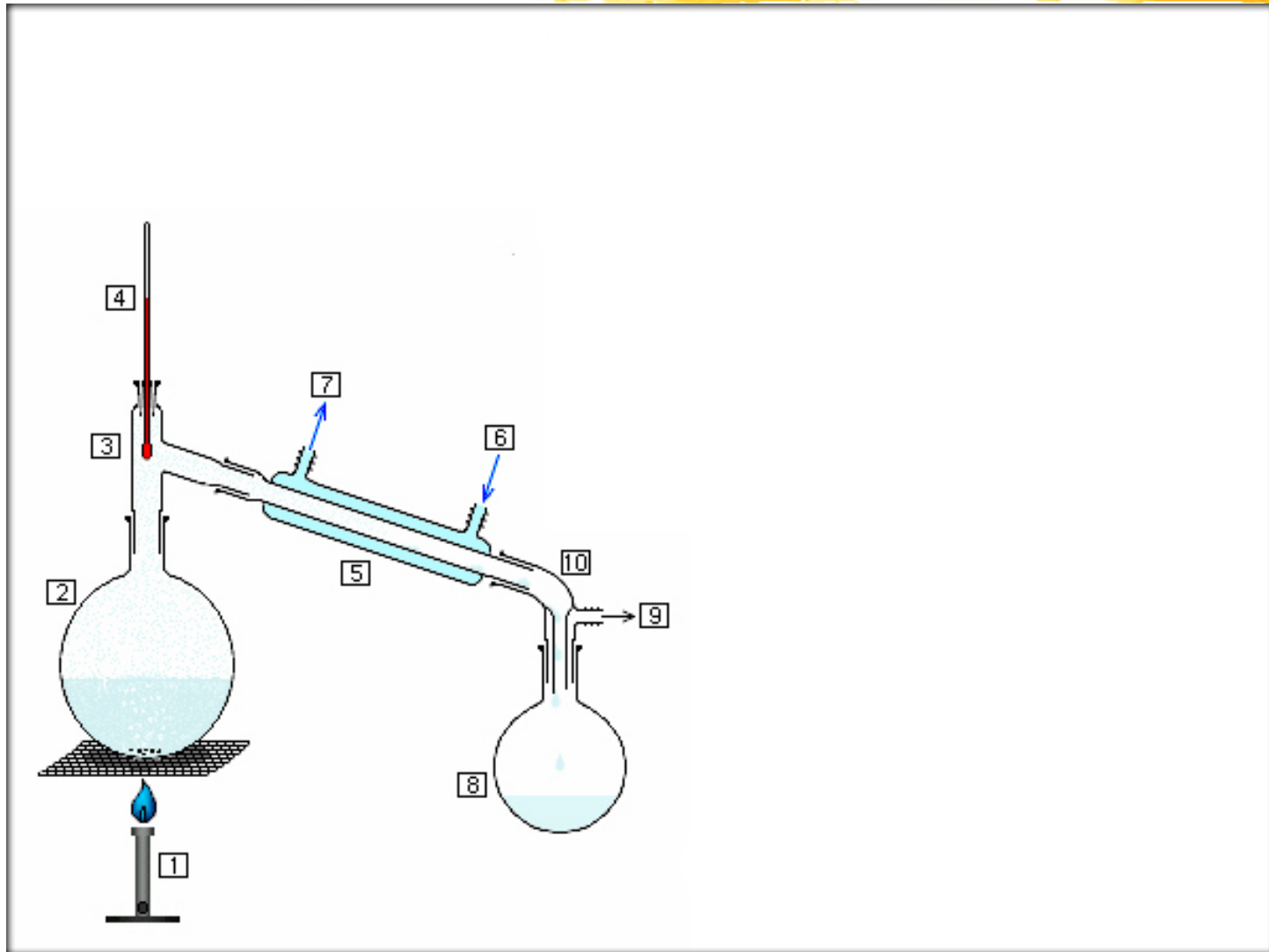
□ Destilace

- neselektivn separační metoda k **dělení složek kapaln směsi**
- část směsi převedena odpařenm do parn fáze, odděleně zkondenzována, získá se kondenzát obohacen těkavějšmi složkami, v neodpařen části se koncentrují méně těkavé složky
- nejčastější využití destilace, resp. rektifikace při analýze ropy, ropných produktů, org. rozpouštědel apod.

□ Extrakce

- selektivn separační metoda založené na **přenosu látky z jedné kapaln fáze do druh**, která je v podstatě nemsiteln s první fází
- použiteln pro vzorky kapaln i tuhé (**přenos z pevn fáze do kapaln**), pro org. látky a biochemick materiály
- proveden v děliči (nejjednodušší), v extraktoru (např. Soxhletův)

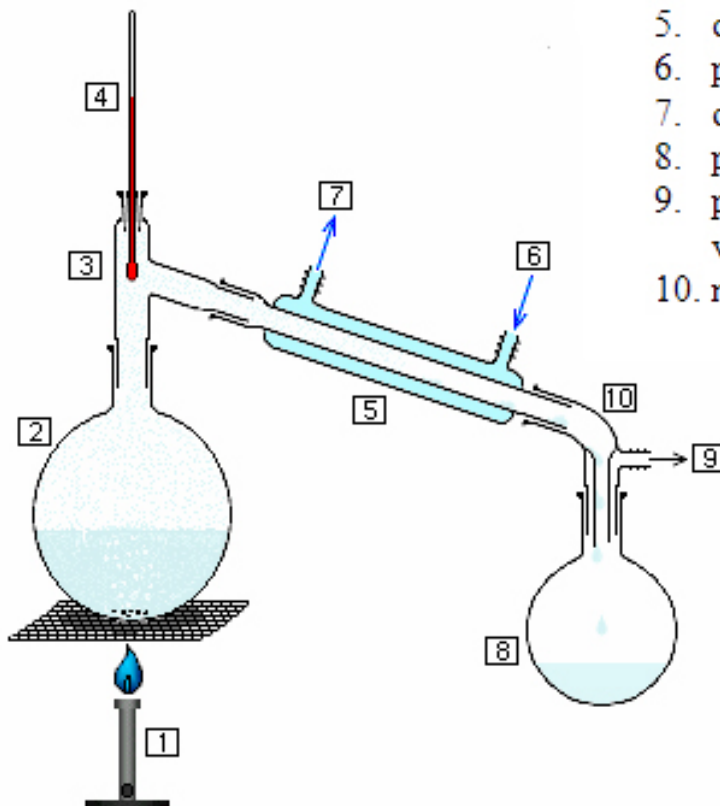
Destilace



Destilace

Obr. 1: Destilační aparatura

1. zdroj tepla (kahan, topné hnízdo aj.)
2. destilační baňka
3. destilační hlava (nástavec)
4. teploměr
5. chladič
6. přívod chladicí vody
7. odtok chladicí vody
8. předloha (jímadlo na destilát)
9. přívod vakua (vodní vývěva nebo motorová vývěva)
10. nástavec



Fázový diagram

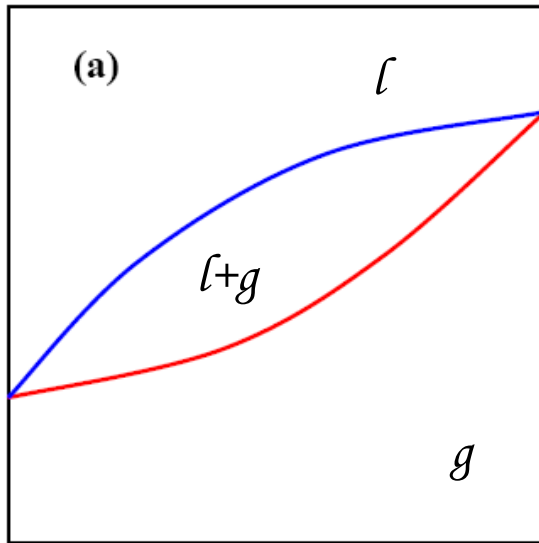
Dvousložková soustava

Zopakujte si:

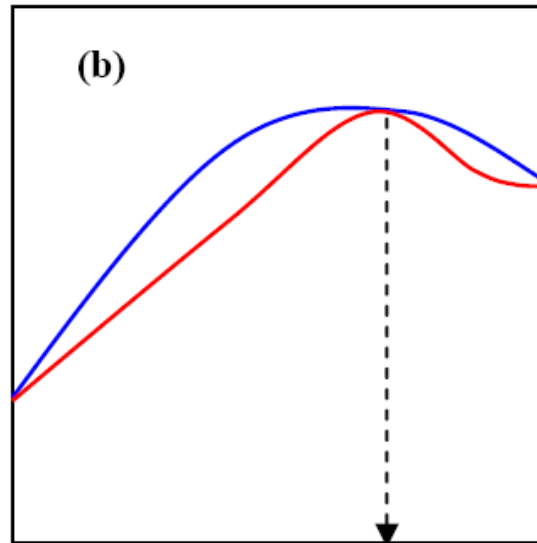
Gibbsův zákon fází ($v + f = s + 2$)

Raoultův zákon, Daltonův zákon

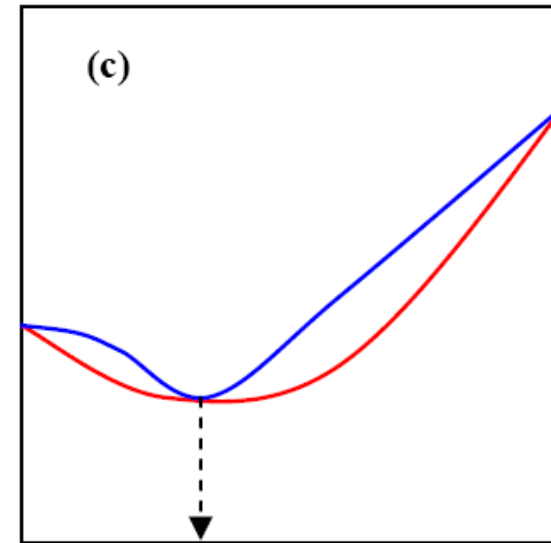
Ideální chování



$\rightarrow x_A, y_A$



$\rightarrow x_A, y_A$



$\rightarrow x_A, y_A$

vznik azeotropické směsi

Separáční metody

založené na fázových rovnováhách

□ Sublimace

- přechod látky z tuhého skupenství do skupenství plynného
- Použití:
 - k čištění a izolaci krystalických látek od netěkavých nebo málo těkavých příměsí

□ Srážení (původně zejména v gravimetrii)

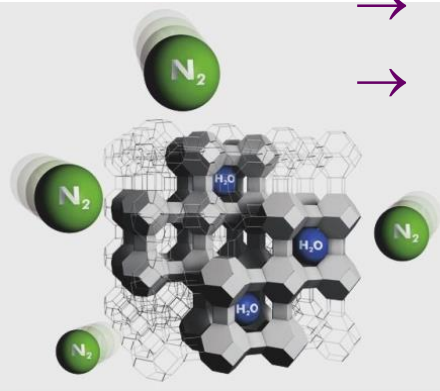
- působením roztoku srážedla, plynu nebo pevné práškové látky (jediná látka se vyloučí v podobě sraženiny, nebo naopak jediná látka zůstane v roztoku rozpuštěna)
- Rozpustnost sraženin je popsána **součinem rozpustnosti**
- Podle velikosti a tvaru částic rozeznáváme **sraženiny koloidní**, **amorfní** a **krystalické** (rychle vylučované sraženiny jsou zpravidla **amorfní** nebo **mikrokrystalické**, sraženiny vylučované pozvolna jsou krystaličtější a čistší)
- provádět ze zředěných roztoků, vyšší teplota roztoku při srážení účinně potlačuje vliv adsorpce

Separáční metody

založené na fázových rovnováhách

□ Molekulov síta

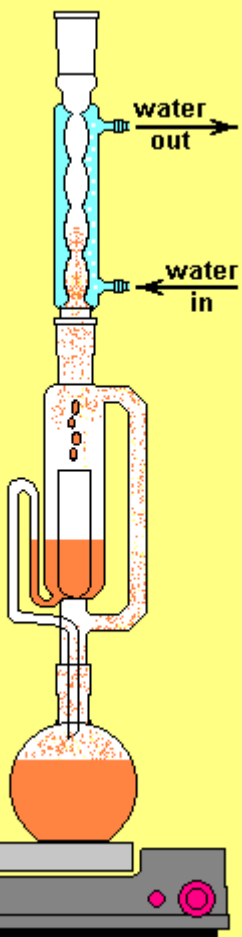
- syntetick zeolity, krystalick hlinitokřemičitany $Me_x[(AlO_2)_y(SiO_2)_z] \cdot mH_2O$, Me = kovov kation, např. Na^+, K^+, Ca^{2+} atd.
- trojrozmrn krystalov mřížka je prostoupena pravidelnm systémem dutin navzájem propojených otvory jednotných rozměrů
- Použit:
 - odstraňování vody z plynů a kapalin
 - dělení nízkomolekulárních látek v plynn fázi
 - separace látek v kapaln fázi podle velikosti a tvaru molekul (molekuly o průřezu menším, než je otvor síta, vstupují dovnitř a jsou zadržovány, molekuly vššho průřezu zůstávají vně v okolním médiu)



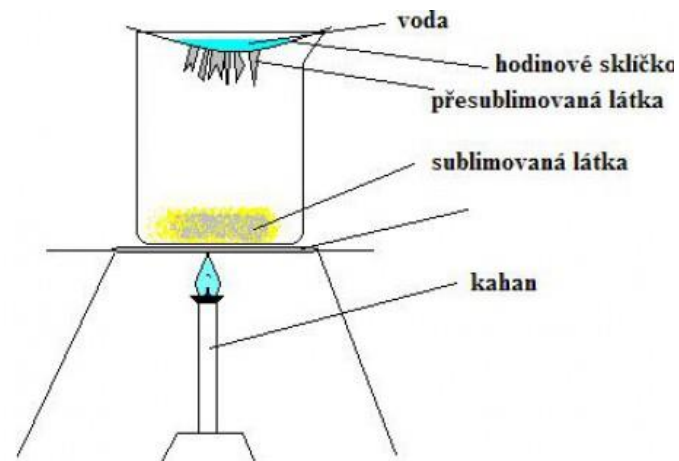
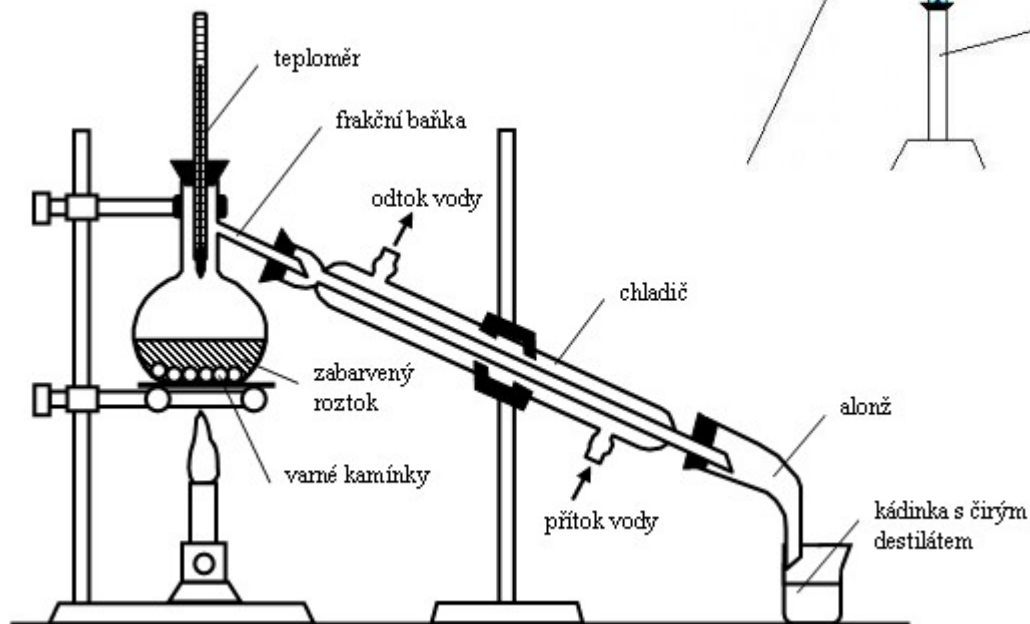
Separáční metody

založené na fázových rovnováhách

Extrakce



Destilace



Sublimace

Separační metody

založené na fázových rovnováhách



□ Techniky provedení separace

- **jednostupňová (srážení, extrakce, sublimace)**
- **mnohastupňové (extrakce)**
- **kontinuální (chromatografie, destilace)**

Separáční metody

založené na různé rychlosti pohybu častic

Hnací síla	Fáze	Dělení astic	Metoda
Magnetick pole	Plyn	Ionty	Hmotnostn spektrometrie
Elektrick pole	Kapalina	Ionty	Elektroforéza
			Izotachoforéza
			Elektrodialýza
Koncentran gradient	Plyn, kapalina	molekuly	Difúze v plynn fázi
			Dialýza

Separáční metody

založené na různé rychlosti pohybu částic

□ Separace v silovém poli

- dělení látek na základě rozdílných migračních rychlostí v silovém poli, např. gravitačním, elektrickém nebo teplotním
- základem těchto separací jsou **difúzní procesy**
- patří sem
 - **molekulární difúze** (převod hmoty; hnací silou je rozdíl koncentrační gradient)
 - **tepelná difúze** (hnací silou je gradient teploty)
- v některých případech dochází k nucené difúzi **působením vnějšího silového pole**
- patří sem
 - **elektroforéza** (migrace v elektrickém poli)
 - **ultracentrifugace** (difúze v gravitačním poli)
 - **hmotnostní spektrometrie** (separace nabitých částic v mag. poli podle jejich hmotnosti a náboje)

Difúze

□ difúze se řídí Fickovým zákonem

□ pro jeden směr x

□ D ... difúzní koef. m²/s

□ J ... difúzní tok

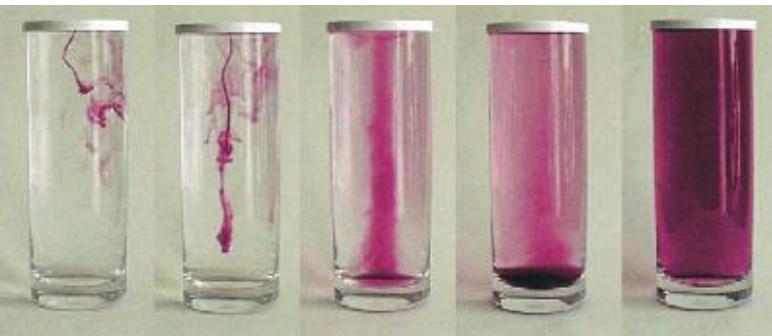
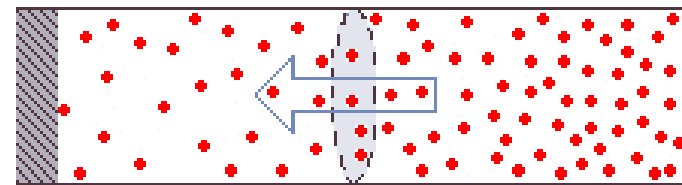
$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

$$J = \frac{1}{A} \frac{dm}{dt}$$

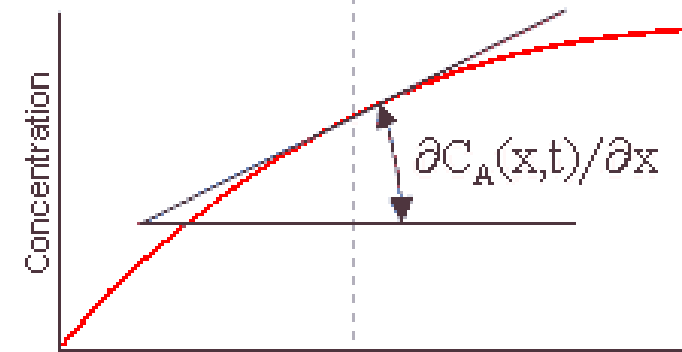
A – plocha průřezu

m – hmota

t - čas



$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2}$$



Elektroforéza

- separace v elektrickém poli

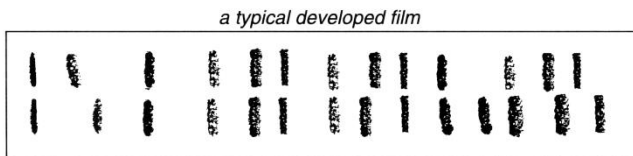
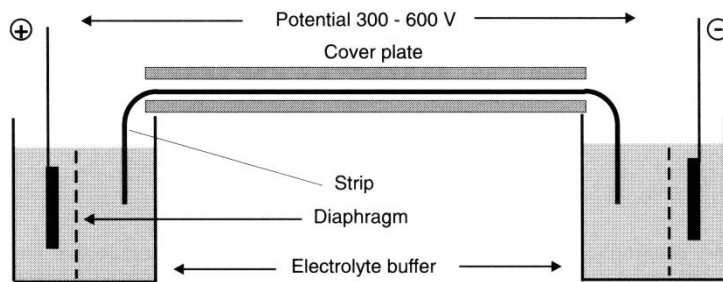


Figure 8.1—Principle of zone electrophoresis. Each compartment is separated by a membrane to contamination of the electrolyte by secondary products formed at the electrodes. The size and the the charge carried by each species depends on the chemical medium in which they are found experiment can be carried out at constant current, constant voltage or constant power.

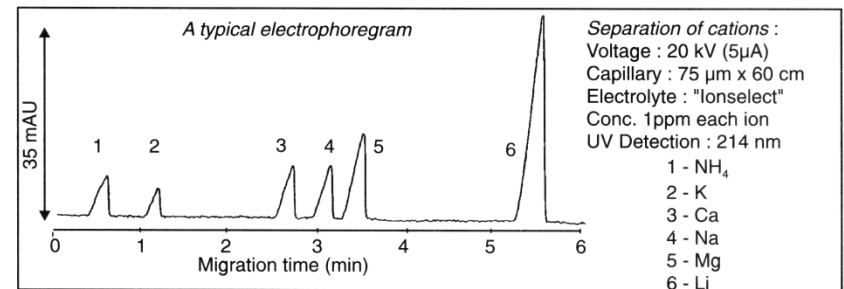
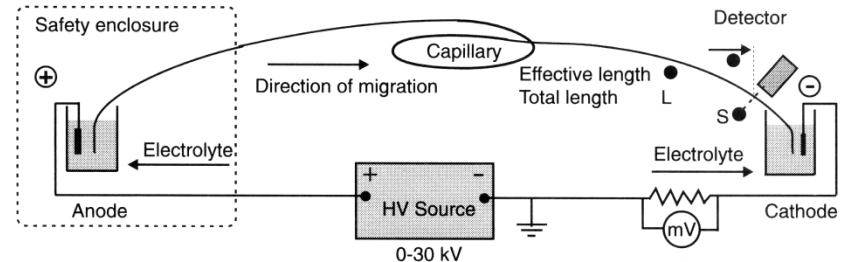
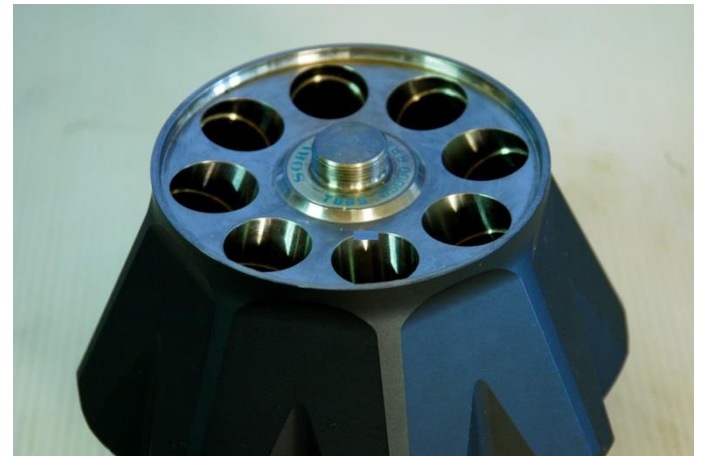
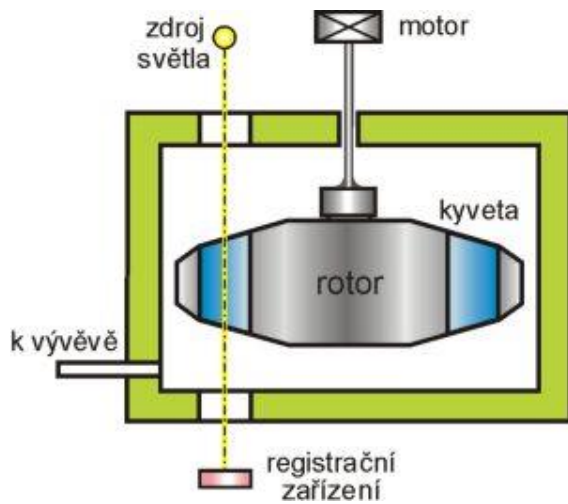


Figure 8.3—Schematic of a standard capillary electrophoresis instrument. The electrolyte is an aqueous ionic solution that has been filtered and degassed. It can contain several additives. There are several processes that can be used to introduce the sample into the capillary (cf. 8.4). The use of voltages above 30 kV is rare because they require special insulation. The length of the capillary (L) and the effective distance of migration (l) must not be confused since the latter is shorter by 10 or 20 cm.

Ultracentrifugace

- separace v gravitačním poli
- sedimentace
 - sedimentační rychlost
 - s ... sedimentační konstanta, jednotka Svedberg ($1 S = 10^{-13} s$)
 - úhlová rychlost
 - vzdálenost od osy otáčení

$$\frac{dx}{dt} = s\omega^2 x$$



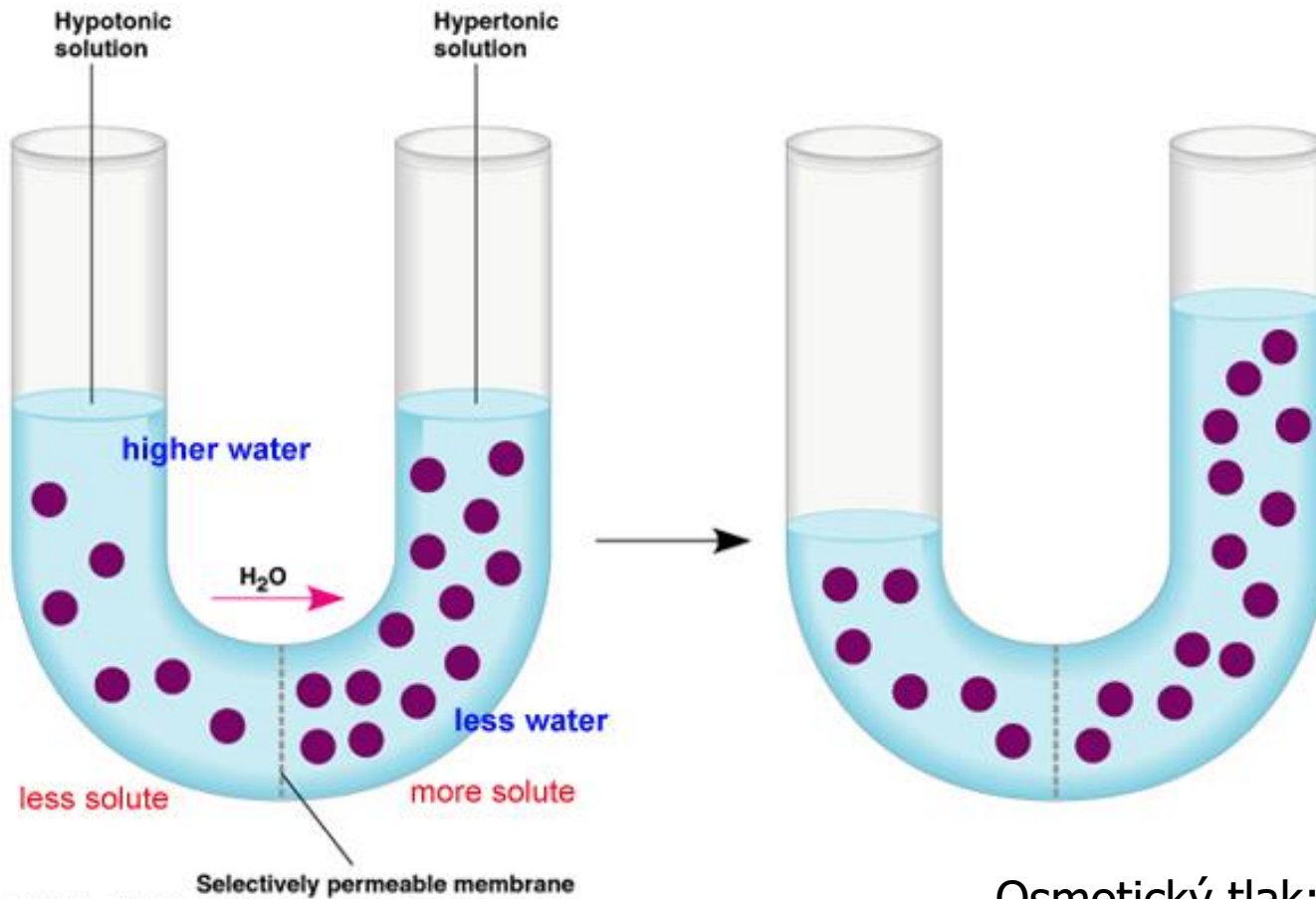
Separáční metody

založené na různé rychlosti pohybu částic

□ Membránové separace

- využívají rozdílů v rychlosti pohybu jednotlivých složek směsi, složky jsou transportovány difúzí přes omezující rozhraní, obvykle **polopropustná membrána**, hnací silou je gradient chemických nebo elektrochemických potenciálů
- patří sem
 - **ultrafiltrace** (k oddělování makromolekulárních látek a koloidních částic (vel. 5-100 nm) z roztoků; hnací silou je hydrostatický tlak)
 - **obrácená osmóza** (separování látek s rel. molekul. hmotností 500 a vyšší; hnací silou opět hydrostatický tlak značně vyšší než pro ultrafiltraci)
 - **dialýza** (membránová separace; hnací silou je rozdíl koncentrací na obou stranách polopropustné přepážky)
 - **elektrodialýza** (rozdíl od dialýzy \Rightarrow hnací silou je rozdíl elektrických potenciálů)

Osmóza



©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Osmotický tlak: $\pi = cRT$

Chromatografie

- jedna z nejvýznamnějších moderních analytických metod
- umožňuje dělení, identifikaci a stanovení velkého počtu organických i anorganických látek
- objevil ji botanik Cvet (v roce 1903 zveřejněna práce o separaci listových barviv na sloupci sorbentu)
- klasická kolonová (sloupcová) chromatografie byla mnoho let na pokraji zájmu za chromatografií papírovou, tenkovrstvou a zejména plynovou
- po zavedení vysokoúčinných kolon a s rozvojem chromatografické instrumentace se stala HPLC jednou z klíčových moderních analytických metod
- v současné době se rozvoj chromatografických metod odehrává zejména v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie a plynové chromatografie
- v praxi stále dosud nachází značné uplatnění tenkovrstvá chromatografie (HPTLC), pro speciální aplikace je někdy vhodné použití superkritické fluidní chromatografie

Chromatografie



- ❑ využívá distribuci (dělení) látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi (jedna je mobilní a druhá stacionární)
 - Stacionární fáze – nepohyblivá
 - Mobilní fáze – pohyblivá
- ❑ Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze, pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen, složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány → při pohybu se zadržují, více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji → složky se postupně od sebe separují, na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované

Chromatografie

- Kolonou naplněnou sorbentem postupuje určitou rychlostí mobilní fáze
- Na začátku kolony umístíme vzorek, který obsahuje složky 1 a 2
- Mobilní fáze unáší vzorek ke konci kolony, obě složky postupují pomaleji než mobilní fáze, a z toho složka 2 pomaleji než složka 1
- Obě složky jsou retardovány, z toho složka 2 je retardována více než složka 1
- Při postupu vzorku kolonou jsou molekuly složek buď v mobilní fázi → pohybují se stejnou rychlostí jako mobilní fáze, nebo jsou drženy na povrchu sorbentu → nepohybují se vůbec
- Při průchodu kolonou každá molekula vzorku přejde mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět
- V každém okamžiku musí být systém velmi blízko rovnováhy, kdy počet sorbovaných molekul se přibližně rovná počtu molekul desorbovaných

Chromatografie



- Doba, kterou průměrná molekula určité složky setrvává na povrchu sorbentu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbentem → určuje pořadí, v jakém složka vychází z kolony
- Čím větší je interakce, tím později složka vychází → tím větší má **retenční čas**
- Na výstupu z kolony vycházejí obě složky oddělené

Chromatografie

přehled nejdůležitějších technik

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Chromatografická technika	Symbol
Plyn (plynová chromatografie)	Kapalina	Plynová rozdělovací chrom.	GLC
	Tuhá látka	Plynová adsorpční chrom.	GSC
Kapalina (kapalinová chromatografie)	Kapalina	Kapalinová rozdělovací chrom.	LLC
		Gelová permeační chrom.	GPC
		Papírová rozdělovací chrom.	PC
		Tenkovrstvá rozdělovací chrom.	TLC
	Tuhá látka	Kapalinová adsorpční chrom.	LSC
		Tenkovrstvá adsorpční chrom.	TLC
		Iontově výměnná chrom.	IEC

Chromatografie

rozdělení metod

❑ Podle skupenství mobilní fáze

- **Kapalinová chromatografie** (Liquid Chromatography - LC) - mobilní fáze → kapalina
- **Plynová chromatografie** (Gas Chromatography - GC) - mobilní fáze → plyn

❑ Podle uspořádání stacionární fáze

- **Kolonová (sloupcová) chromatografie** – stacionární fáze umístěna v trubici (koloně)
- **Plošné (planární) techniky**
 - **Papírová chromatografie** (Paper Chromatography - PC) - stacionární fáze → součástí chromatografického papíru
 - **Tenkvrstvá chromatografie** (Thin Layer Chromatography - TLC) - stacionární fáze → umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii)

Chromatografie

rozdělení metod

☐ Podle povahy děje, který převládá při separaci

(obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá)

- **Rozdělovací chromatografie** – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn)
- **Adsorpční chromatografie** - o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka)
- **Iontově-výměnná chromatografie** - o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku
- **Gelová chromatografie** – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu); menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulový síťový efekt) – separace biomakromolekul
- **Afinitní chromatografie** – stacionární fáze je schopna vázat se ve vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu)

Chromatografie

definice pojmů



- ❑ **Fáze mobilní** – pohyblivá fáze (plyn nebo kapalina)
- ❑ **Fáze stacionární**
 - nepohyblivá fáze (často označovaná jako sorbent)
 - může mít nejrůznější podoby
 - tuhé částičky o velikosti jednotek až stovek mikrometrů
 - tenká vrstvička kapaliny nanesená na tuhých částicích
 - tenký film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry
- ❑ **Vzorek** – směs látek, která má být dělena
- ❑ **Složka 1, složka 2** atd. – látky obsažené ve vzorku

Chromatografie

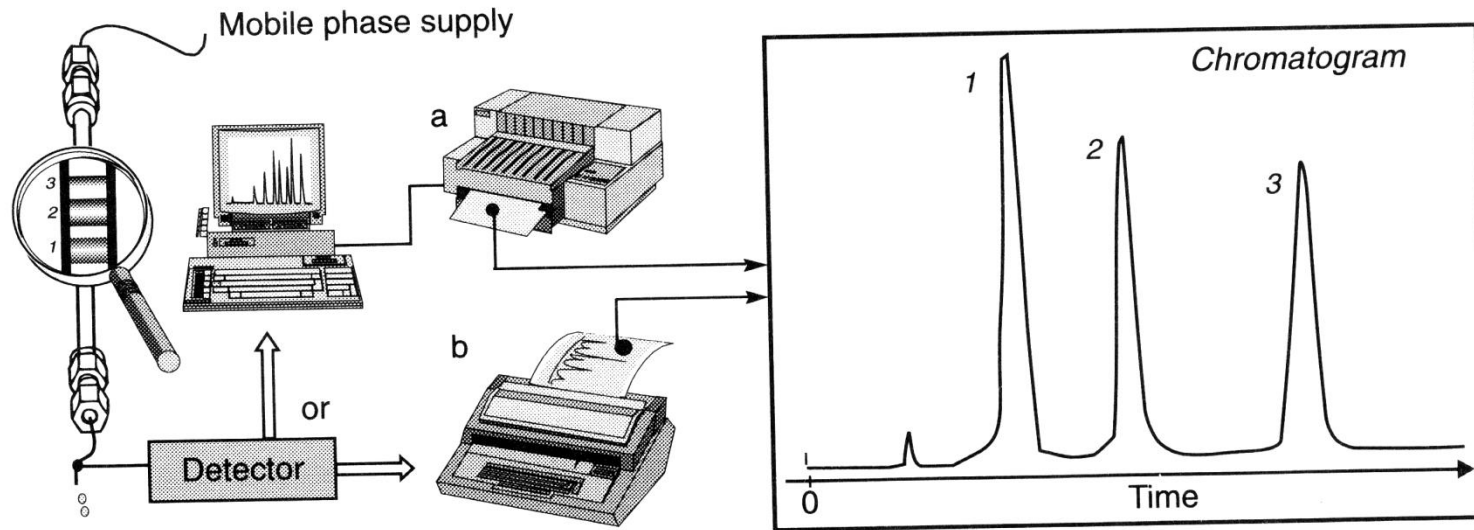


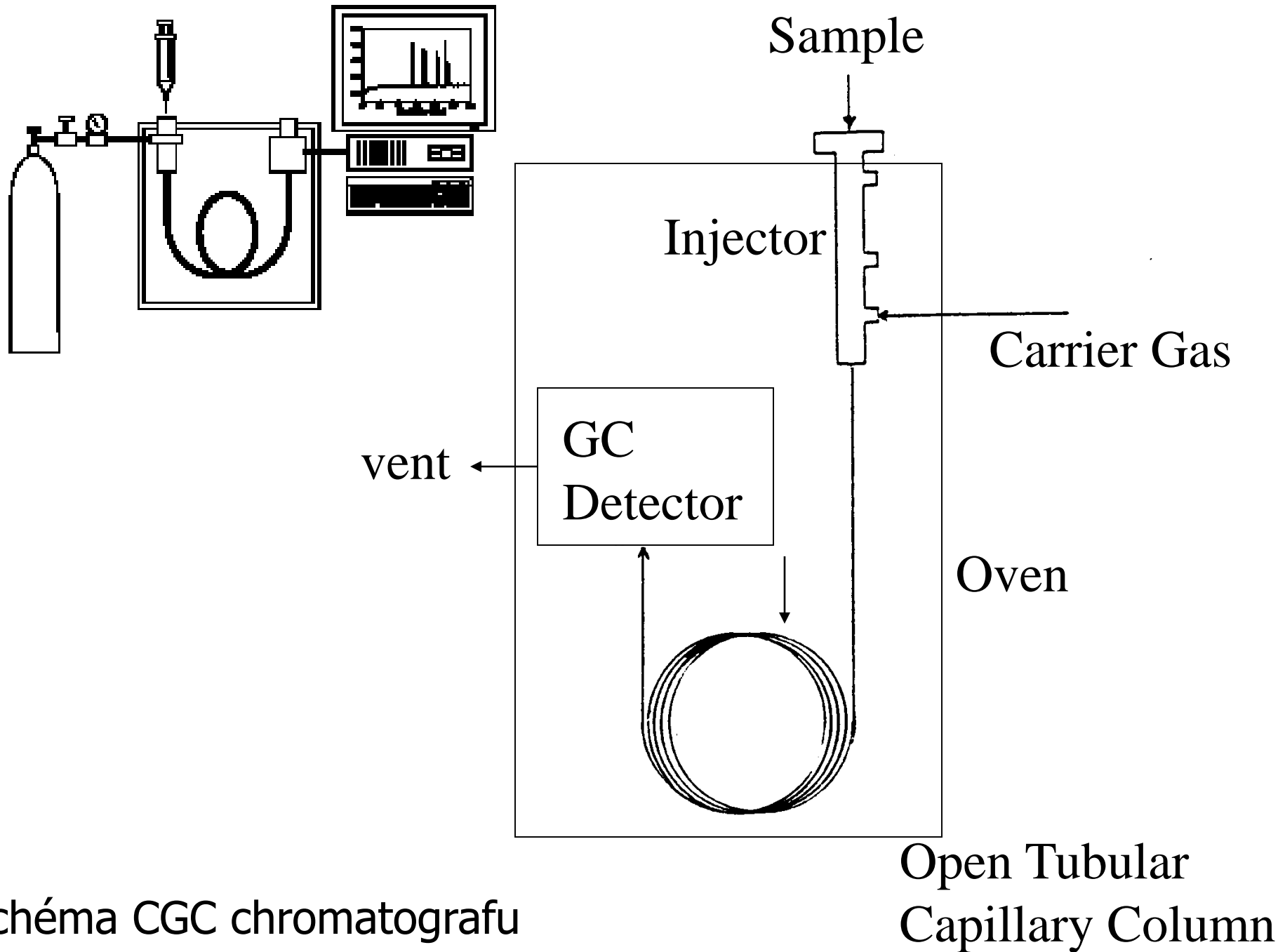
Figure 1.1—*Chromatograph and chromatogram.* The chromatogram obtained from the variation of an electrical signal as a function of time is often reconstructed from values that are digitised and stored to a microcomputer and then reproduced with the desired format (**a**, printer). Until recently, a chromatogram was obtained on-line by measuring the variation of the voltage and reproduced on a recording device (chart recorder or integrator, **b**). The reconstructed graph in the figure shows the separation of a mixture of at least three components in solution, injected from a solvent (the first peak, not numbered, belongs to the solvent).

Chromatogram – záznam signálu z detektoru v čase

Plynová chromatografie



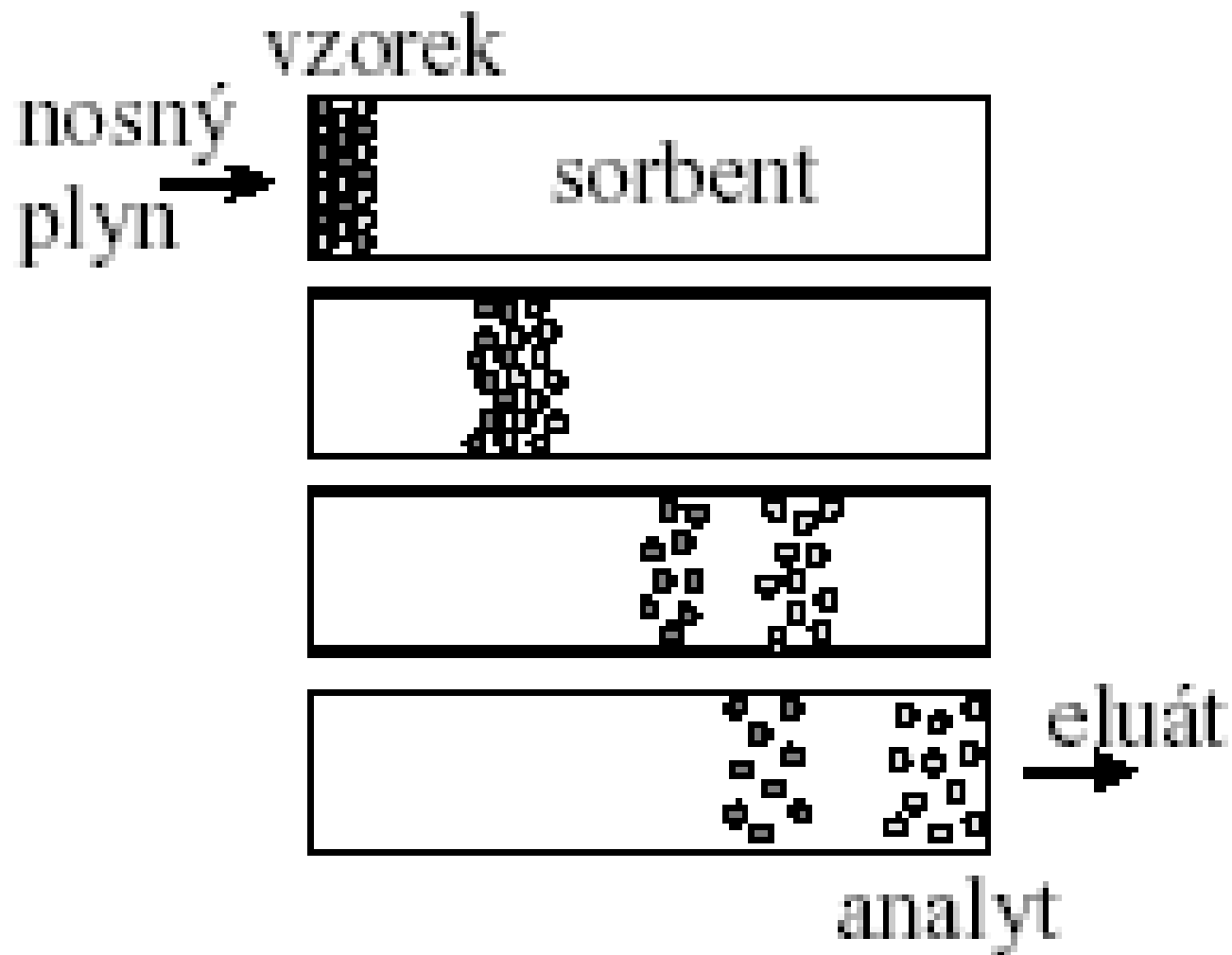
HP 5890 Gas Chromatograph



Plynová chromatografie

- Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou (vzorek se musí ihned přeměnit na plyn, aby mohl být transportován)
- Mobilní fáze → nosný plyn (He, Ar, N₂)
- V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi
- Složky opouštějící kolonu indikuje detektor
- Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek

Plynová chromatografie



GC PLYNŮ ze VZDUCHU

kolona : náplňová, z nerezové oceli

6' x 1/8" (183 cm x 3,2 mm)

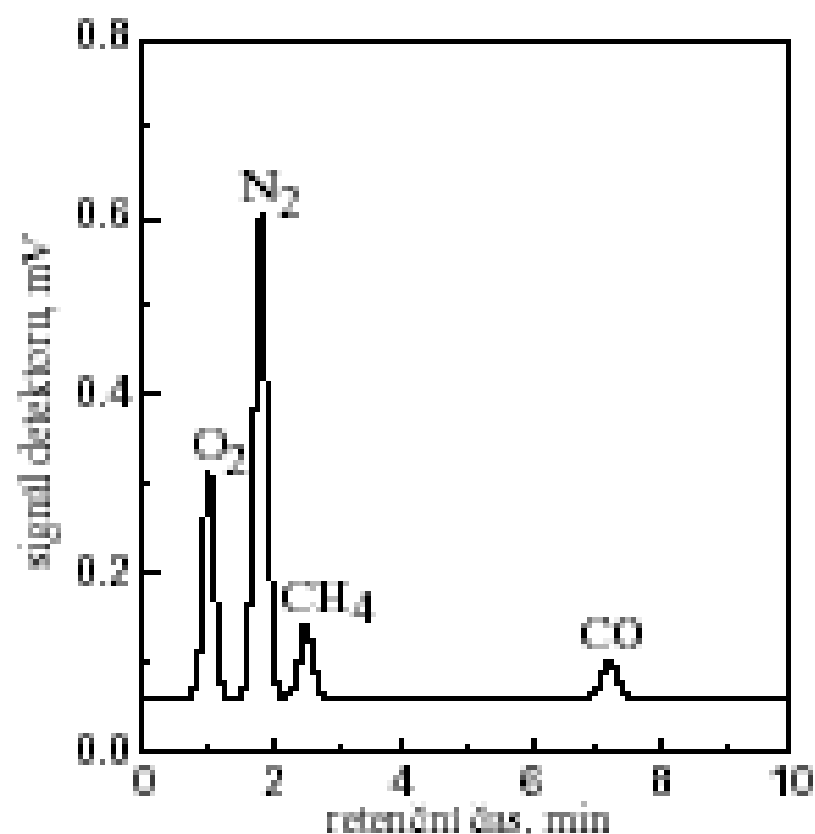
stacionární fáze : molekulové síto 5A

nosný plyn : 30 ml/min He

dávkování : 100 μ l (35 °C)

teplota termostatu kolony : 35 °C

detekce : TCD (140 °C)



GC polychlorovaných bifenyli (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)

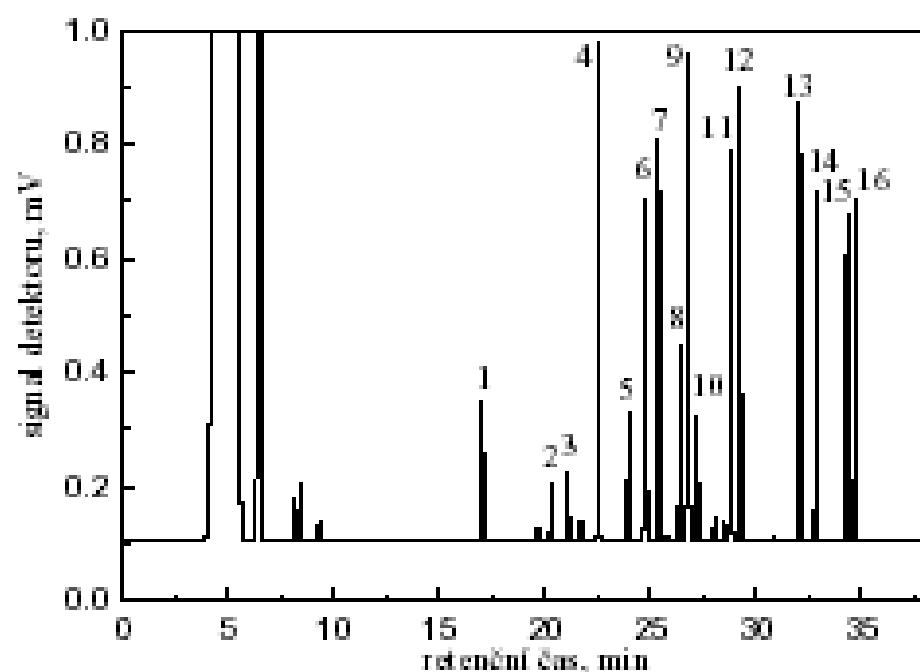
dávkování: 1 μ l (200 - 800 pg/ μ l v CH₂Cl₂)

splitter (dělič): 1:70

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

detekce : ECD (260 °C)

1. 2-chlorbifenylyl, 2. 4-chlorbifenylyl, 3. 2,2'-dichlorbifenylyl,
4. 2,4-dichlorbifenylyl, 5. 4,4'-dichlorbifenylyl, 6. 3,5,3'-trichlorbifenylyl,
7. 2,4,4'-trichlorbifenylyl, 8. 2,5,2',5'-tetrachlorbifenylyl,
9. 2,4,6,4'-tetrachlorbifenylyl, 10. 3,4,4'-trichlorbifenylyl,
11. 2,3,4,6,2'-pentachlorbifenylyl, 12. 2,3,4,4'-tetrachlorbifenylyl,
13. 2,3,4,5,2'-pentachlorbifenylyl, 14. 2,4,5,2',4',5'-hexachlorbifenylyl,
15. 2,3,4,2',4',5'-hexachlorbifenylyl, 16. 2,3,4,5,2',3'-hexachlorbifenylyl



Plynová chromatografie

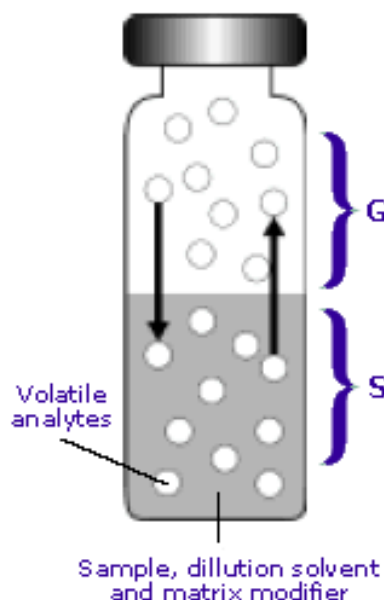


- stanovení koncentrace na základě plochy píku
- pro kvantitativní analýzu se používá vnitřní standard (IS) nebo metoda standardního přídatku
- ke vzorku se přidá látka o známé koncentraci

Head space

Basic Principles of Headspace Analysis

A headspace sample is normally prepared in a vial containing the sample, the dilution solvent, a matrix modifier and the headspace. Volatile components from complex sample mixtures can be extracted from non-volatile sample components and isolated in the headspace or gas portion of a sample vial. A sample of the gas in the headspace is injected into a GC system for separation of all of the volatile components.



Phases of the Headspace Vial

G = the gas phase (headspace)

The gas phase is commonly referred to as the headspace and lies above the condensed sample phase.

S = the sample phase

The sample phase contains the compound(s) of interest. It is usually in the form of a liquid or solid in combination with a dilution solvent or a matrix modifier.

Once the sample phase is introduced into the vial and the vial is sealed, volatile components diffuse into the gas phase until the headspace has reached a state of equilibrium as depicted by the arrows. The sample is then taken from the headspace.

Education Centre
Flash Chromatography
Headspace GC
Using Syringe Filters
Education Home

Chromatografie

Kapalinová Plynová



HPLC chromatografie

- HPLC – high performance liquid-chromatography

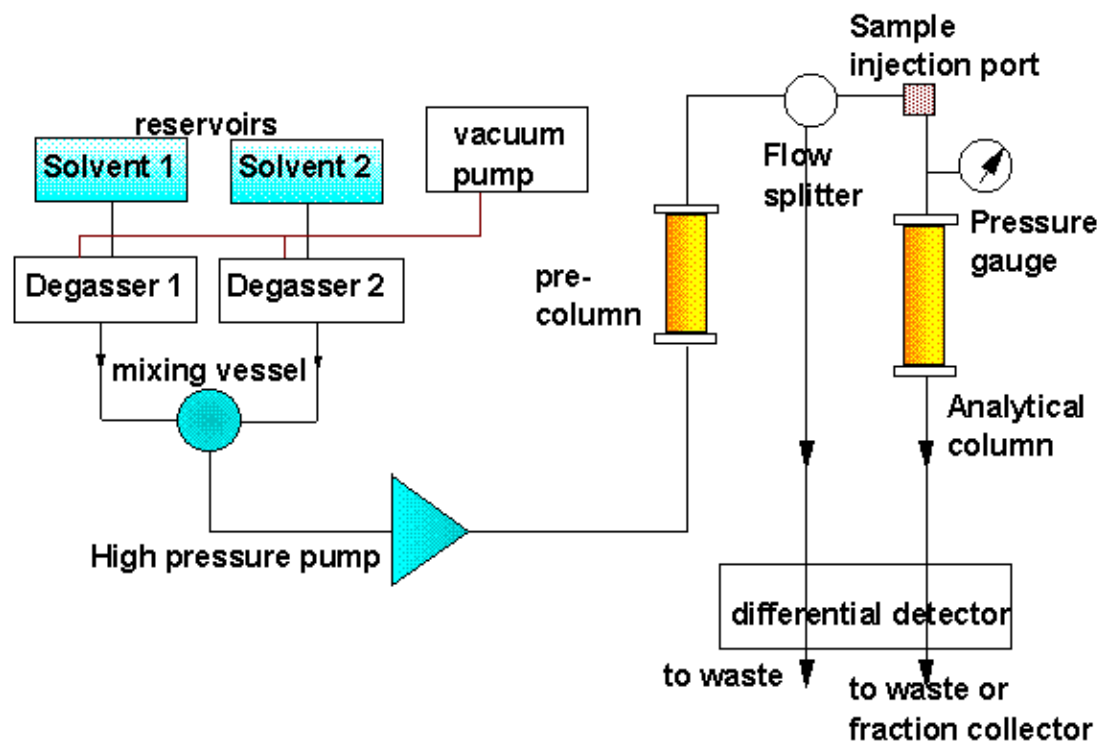


schéma HPLC přístroje

HPLC chromatografie

- princip metody

