

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

Chromatografie je analytická metoda, při které dochází k **separaci** (rozdělení) **jednotlivých složek**, které tvoří analyzovaný vzorek. Je založena na opakovaném ustanovení rovnováh mezi dvěma fázemi, „**mobilní**“ (pohybující se) a „**stacionární**“ (pevnou nebo vázanou) **fází**. Mobilní fáze unáší vzorek prostorem (nejčastěji „kolonou“), ve kterém dochází k separaci jeho složek. Tento prostor je vyplněn stacionární fází, která různou měrou interaguje se složkami vzorku. Protože je míra ovlivnění rychlosti pohybu pro jednotlivé složky vzorku odlišná, dochází k jejich vzájemné separaci.

Pro stručnost výkladu se budeme věnovat pouze tenkovrstvé, plynové a kapalinové chromatografii a tomu, co nám tyto separační metody mohou poskytnout.

V **tenkovrstvé chromatografii** (TLC, Thin Layer Chromatography = chromatografie na tenké vrstvě) se **stacionární fáze** nanáší na destičky ze skla, hliníku či plastu. Stacionární fáze musí proto dobře ulpívat na zvoleném podkladu a být ve formě jemných částic jednotné velikosti (mezi 1 – 5 μm). V tab. 1 je přehled nejčastějších stacionárních fází spolu s typy látek, které se na nich dobře dělí.

Tab. 1 Přehled stacionárních fází pro TLC:

Stacionární fáze	Dělené analyty
Silikagel	Látky málo rozpustné ve vodě, kyselé a neutrální
Celuloza	Látky rozpustné ve vodě
Křemelina	Hydrofilní neutrální látky
Alumina (Al_2O_3)	Hydrofilní zásadité látky

Mobilní fázi je směs organických rozpouštědel, někdy ve směsi s vodnou fází. Nejčastěji se používá ethanol, aceton, chloroform, benzen a hexan.

Způsob analýzy je následující: Na TLC destičku je nanesen vzorek a destička je umístěna do vyvíjecí komory nasycené parami mobilní fáze tak, aby její spodní část zasahovala cca 0,5 cm do mobilní fáze (viz obr. 1). Linie startu (neboli místo, kam dávkujeme vzorek, který necháme zaschnout) je nad hladinou mobilní fáze. Následně dochází ke vztlínání mobilní fáze vzhůru stacionární fází po povrchu destičky. Mobilní fáze rozpouští složky vzorku a unáší je vzhůru po povrchu destičky. Jelikož jednotlivé složky vzorku interagují se stacionární fází různě (tzn. jsou různě intenzivně brzděny oproti čelu mobilní fáze), dochází k jejich vzájemnému rozdělení. Separace probíhá, dokud čelo mobilní fáze nedosáhne vrchního detekčního okraje destičky (cca 10 – 20 cm).

Detekce rozdělených složek vzorku může probíhat několika způsoby:

a) **Barevné sloučeniny** lze sledovat přímo proti zbarvení mobilní fáze.

b) **Bezbarvé sloučeniny**:

b₁) Některé sloučeniny po vystavení destičky UV záření **fluoreskují**.

b₂) Pokud vzorek obsahuje látky, které nefluoreskují, jsou tyto po separaci a expozici destičky UV záření viditelné jako tmavá skvrna na fluoreskující ploše. Ta vznikne tak, že se do stacionární fáze přimíchají navíc fluoreskující látky (např. křemičitan zinečnatý). Tomuto jevu se říká **zhášení fluorescence**.

b₃) Použití specifických činidel: Destička se postříká specifickým činidlem, které s analytem vytvoří barevnou sloučeninu (např. ninhydrin pro aminokyseliny, acidobazické indikátory pro kyselé a zásadité sloučeniny, bromfluorescein pro nenasycené sloučeniny).

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

Výsledkem TLC analýzy je „vyvolaná“ destička (viz obr. 2), která obsahuje skvrny reprezentující jednotlivé oddělené složky z analyzovaného vzorku.

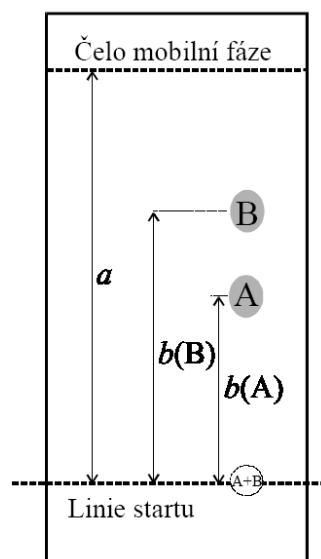
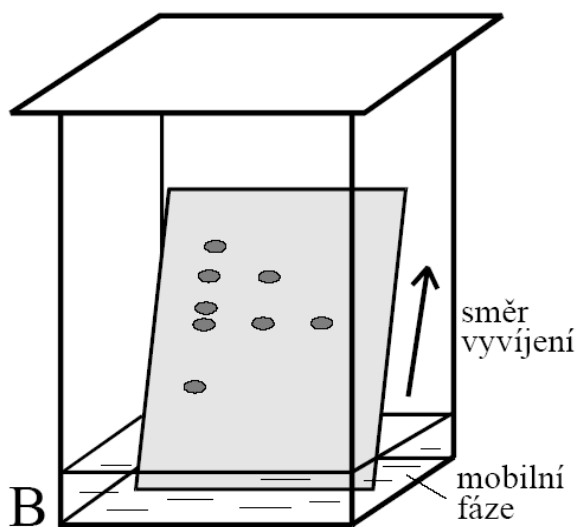
Identifikace jednotlivých skvrn (složek vzorku) se provádí na základě výpočtu retardačního faktoru R_F , pro který platí:

$$R_F = b/a$$

a = vzdálenost mezi čelem mobilní fáze (tj. linií, kam až dostoupila mobilní fáze během separace) a linií startu

b = vzdálenost středu skvrny separované látky od linie startu.

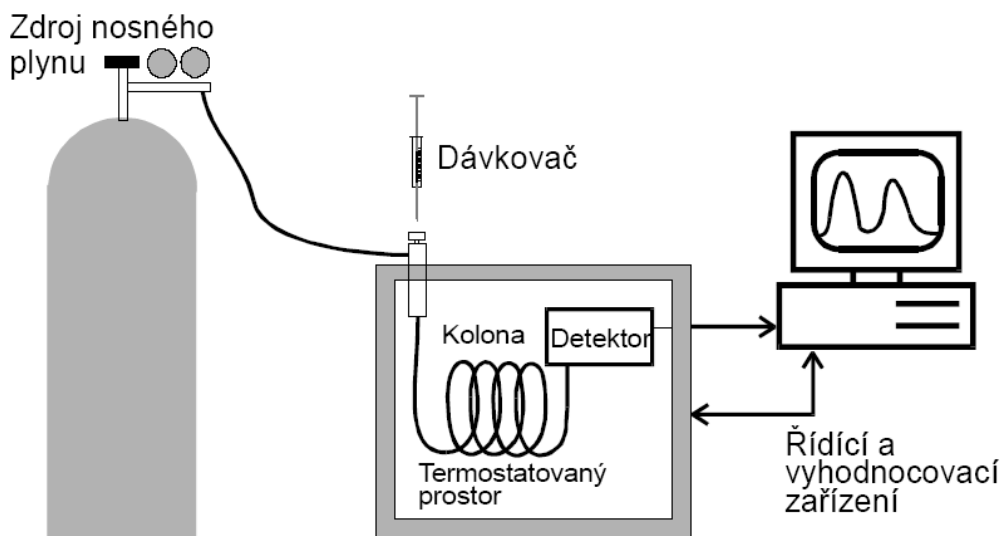
Retardační faktory pro určitý separační systém (určitá stacionární fáze na TLC desce a mobilní fáze) se určují na základě vyhodnocení skvrn standardů (chemicky čisté látky).



Obr. 1 Vyvíjecí komora pro TLC chromatografie.

Obr. 2 TLC destička s rozděleným vzorkem.

Plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) je metoda vhodná k separaci, identifikaci a stanovení vzorků obsahujících plynné nebo těkavé kapalně látky (tj. lze je zplynit bez jejich rozkladu do 500°C). Schéma plynového chromatografu je znázorněno na obr. 3:



Obr. 3 Schéma plynového chromatografu.

Cvičení KATA – Analytická chemie

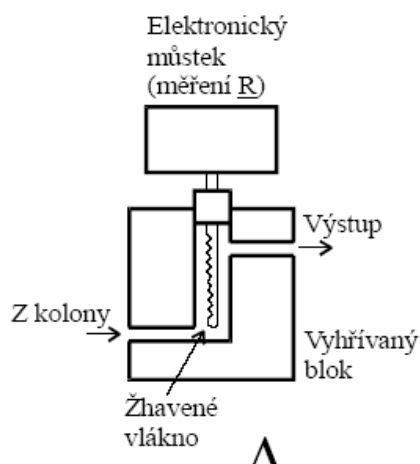
Chromatografie

Mobilní fázi bývá nosný plyn (nejčastěji dusík, helium, vodík), který je bez přestání vháněn do chromatografu. **V dávkovači dojde k jednorázovému nadávkování vzorku.** Nosný plyn pak unáší vzorek dále separační kolonou, kde dojde k separaci složek vzorku.

Separční kolona je do spirály stočená kovová nebo skleněná trubice o délce 1 - 6 m a vnitřním průměru 2 - 4 mm. Separční kolona obsahuje **stacionární (vázanou) fázi**, která interaguje (= brzdí) se složkami vzorku a ty jsou v separační koloně v důsledku této interakce různě zadržovány a děleny do samostatných zón. Každá zóna obsahuje (v ideálním případě jen) jednu složku vzorku. Jako stacionární fáze se v plynové chromatografii používá např. kapalina nanesená na inertním (= netečném) nosiči vyplňujícím separační kolonu nebo tuhá látka (adsorbent) vyplňující kolonu.

Po rozdělení vzorku na jednotlivé složky v separační koloně jsou tyto dále unášeny mobilní fází do **detektoru**, který je zařazen za separační kolonu. Detektor **reaguje na změny složení mobilní fáze**, tj. je schopen zaregistrovat zónu složky vzorku.

Univerzálním detektorem je například **katarometr (tepelně vodivostní detektor)**, který je schematicky znázorněn na obr. 4. Je tvořen tenkou kovovou spirálou, žhavenou průchodem elektrického proudu. Elektrický odpor spirály R závisí na její aktuální teplotě a ta je závislá na tepelné vodivosti okolí. Každá plynná látka má odlišnou tepelnou vodivost. Pokud se tedy do prostoru detektoru dostane zóna složky vzorku vystupující ze separační kolony, dojde ke změně tepelné vodivosti a tím ke změně teploty, tj. i elektrického odporu R spirály. Tuto změnu registruje **řídící a vyhodnocovací zařízení** připojené k chromatografu. Jako detektor lze s výhodou použít např. také hmotnostní spektrometr („GC-MS“).



Obr. 4 Schéma tepelně vodivostního detektoru (TCD – Thermal Conductivity Detector).

Kapalinová chromatografie (LC, Liquid Chromatography) je metoda vhodná k separaci analytů rozpouštěných ve vhodné kapalině tvořící mobilní fázi. Dělení látek ze vzorku probíhá v separační koloně, která obsahuje **stacionární (nepohyblivou) fázi** („sorbent“) a **mobilní (pohyblivou) fázi** („eluent“). Dělené látky mají rozdílnou **afinitu** ke stacionární fázi, podléhají tak různé **distribuci** (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fázi a jsou tedy rozdílně **zadržovány** a **zpožd'ovány** (retardace). Analyty tedy doputují v různých časech (kvalitativní hledisko) do detektoru, kde způsobí příslušnou odezvu, která je mírou jejich obsahu (kvantita) ve vzorku. V tab. 2 je uveden přehled stacionárních a mobilních fází nejčastěji používaných pro LC.

Lze použít různé způsoby, jak přimět mobilní fázi (rozpouštědlo) k toku fází stacionární. Sloupcová chromatografie využívá gravitační působení Země na mobilní fázi v zásobníku,

Cvičení KATA – Analytická chemie

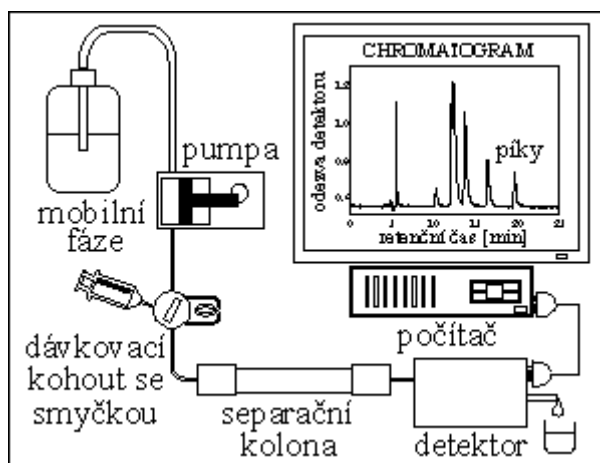
Chromatografie

kteřá následně protéká kolonou samospádem. Takové separace jsou pomalé a málo účinné, protože hustota stacionární fáze (popř. velikost styčné plochy interagující s analytem) je malá.

S použitím vysokotlakých čerpadel lze dosáhnout průtoku mobilní fáze a eluce jednotlivých složek separovaných směsí v reálných časech i pro stacionární fáze s větším interakčním působením (polymery apod.). Moderní analytická chemie tak postupně přechází k chromatografiím typu **HPLC** (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography, tj. vysokoúčinná kapalinová chromatografie) a **UPLC** (**U**ltra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography, tj. v překladu extrémně účinná kapalinová chromatografie). Metoda UPLC využívá kapalinových chromatografů, speciálně konstrukčně upravených pro práci při extrémních tlacích (až 15000 PSI, tj. cca 100 MPa), její výhodou je výrazné zkrácení retenčních časů a úspora rozpouštědel.

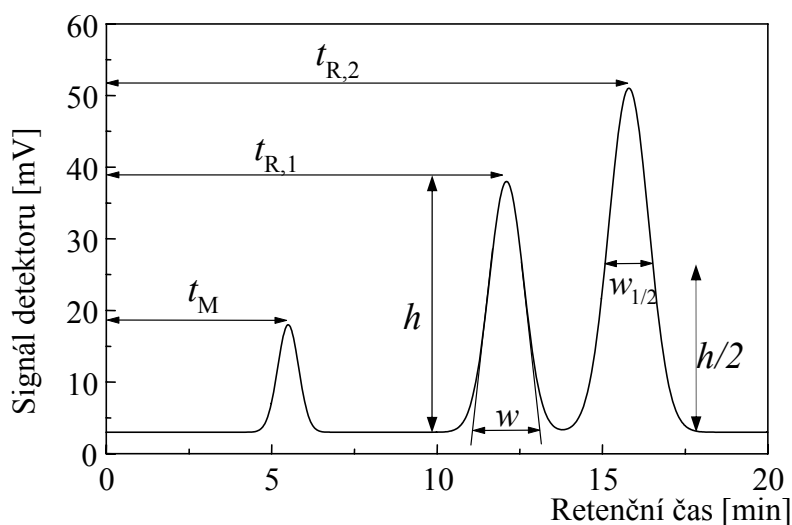
Nevyužívá se jen isokratické (složení mobilní fáze je konstantní) eluce, ale i eluce gradientové (složení mobilní fáze se v průběhu analýzy mění). Jako detektory lze použít UV/VIS absorpční spektrometrický detektor (pro měření při více vlnových délkách s diodovým polem), spektrofluorimetrický, refraktometrický (využívající lom světla), vodivostní, amperometrický detektor a hmotnostní spektrometr („LC-MS a LC-MS/MS“).

Blokové schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obr. 5.



Obr. 5 Schéma kapalinového chromatografu.

Výsledkem chromatografické analýzy je záznam zvaný „chromatogram“ (viz obr. 6), který obsahuje píky reprezentující jednotlivé oddělené složky z analyzovaného vzorku.



Obr. 6 Modelový chromatogram dvousložkového vzorku.

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

Tab. 2 Přehled stacionárních a mobilních fází pro kapalinovou chromatografii:

LC	separace díky...	stacionární fáze / skupiny	mobilní fáze
GPC – gelová permeační (SEC - vylučovací) chromatografie	dělení molekul analytů v pórech gelu (stac. fáze)	polystyren zesíťovaný divinylbenzenem; silikagel	vodné pufrý, acetonitril a kys. trifluoroctová (TFA)
LLC – rozdělovací chromatografie	rozdílné rozpustnosti (distribuci) molekul analytů mezi dvě nemísitelné kapaliny	ethylenglykol, skvalan nepolární: $\equiv\text{Si}\sim\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ $\sim\text{C}_8\text{H}_{17}$ $\sim(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$ polární: $\sim(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$ $\sim(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ $\sim\text{O}\text{-}(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$	normální fáze: pentan, heptan, chloroform reverzní fáze: methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda
LSC – adsorpční chromatografie	rozdílné adsorpci molekul analytů na povrchu (aktivních centrech) tuhé fáze	silikagel (SiO_2) polární, kyselý alumina (Al_2O_3) polární, bazický aktivní uhlí téměř nepolární, jen zřídka	pentan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril, ethanol, methanol, voda (eluční síla v řadě roste)
IEC – iontově výměnná chromatografie	rozdílné výměnné adsorpci analyzovaných iontů na povrchu iontového měniče	$\sim\text{COO}^-$, $\sim\text{SO}_3^-$, $\sim\text{NH}_3^+$, $\sim\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ $\sim\text{SO}_3^-\text{H}^+ + \text{Na}^+ \leftrightarrow$ $\leftrightarrow \sim\text{SO}_3^-\text{Na}^+ + \text{H}^+$	roztoky anorg. kyselin a zásad o dané iontové síle a pH

Vysvětlivka: „~“ znamená, že uvedená funkční skupina je vázána na atom křemíku silikagelu jako nosiče, čili jedná se o systém s reverzními fázemi.

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

Z chromatogramu lze vyčíst:

- t_R ... **retenční čas analytu** (složka vzorku) = doba, která uplyne od nadávkování analyzovaného vzorku do detekce příslušného analytu v detektoru, tj. do vykreslení píku analytu v chromatogramu; udává polohu píku, nese **kvalitativní informace** o analytu (tj. jaký analyt je obsažen ve vzorku)
- t_M ... **mrtvý retenční čas** = retenční čas analyzované látky, která není zadržována na stacionární fázi (projde kolonou nejrychleji)
- A a h ... **plocha a výška píku** v chromatogramu nesou **kvantitativní informaci** o analyzované látce (jaké množství analytu je obsaženo ve vzorku).
- w ... **šířka píku** při základně
- $h/2$ ($w_{1/2}$)... **polovina výšky píku (šířka píku v polovině jeho výšky)**

Z těchto dat lze vypočítat:

Redukovaný retenční čas t'_R je doba, kterou stráví analyt ve stacionární fázi a vypočte se:

$$t'_R = t_R - t_M$$

Retenční (kapacitní) faktor k příslušného analytu vyjadřuje míru interakce tohoto analytu se stacionární fází. Udává, kolikrát déle trvá analytu projití separační kolonou než nezadržované látky a lze jej vypočítat:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Počet teoretických pater n a **výškový ekvivalent teoretického patra H** [mm] udává míru účinnosti separační kolony. Účinná kolona poskytuje úzké, souměrné a navzájem oddělené zóny analytů (píky v chromatogramu). Účinnost kolony roste s rostoucím n a klesajícím H , které lze vypočítat:

$$n = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad ; \quad H = \frac{L}{n}$$

L ... celková délka separační kolony [mm]

Rozlišení píků dvou analytů v chromatogramu $R_{1,2}$ charakterizuje míru oddělení jednotlivých zón analytů v separační koloně. Lze jej vypočítat z retenčních časů obou analytů $t_{R,1}$ a $t_{R,2}$ [mm] a šířek píků těchto analytů při základně w_1 a w_2 [mm]. Látky jsou považovány za oddělené pro $R_{1,2} \geq 1,5$.

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2}$$

Plochu symetrického píku A lze vypočítat z výšky píku h [mm] a jeho šířky v polovině výšky $w_{1/2}$ [mm].

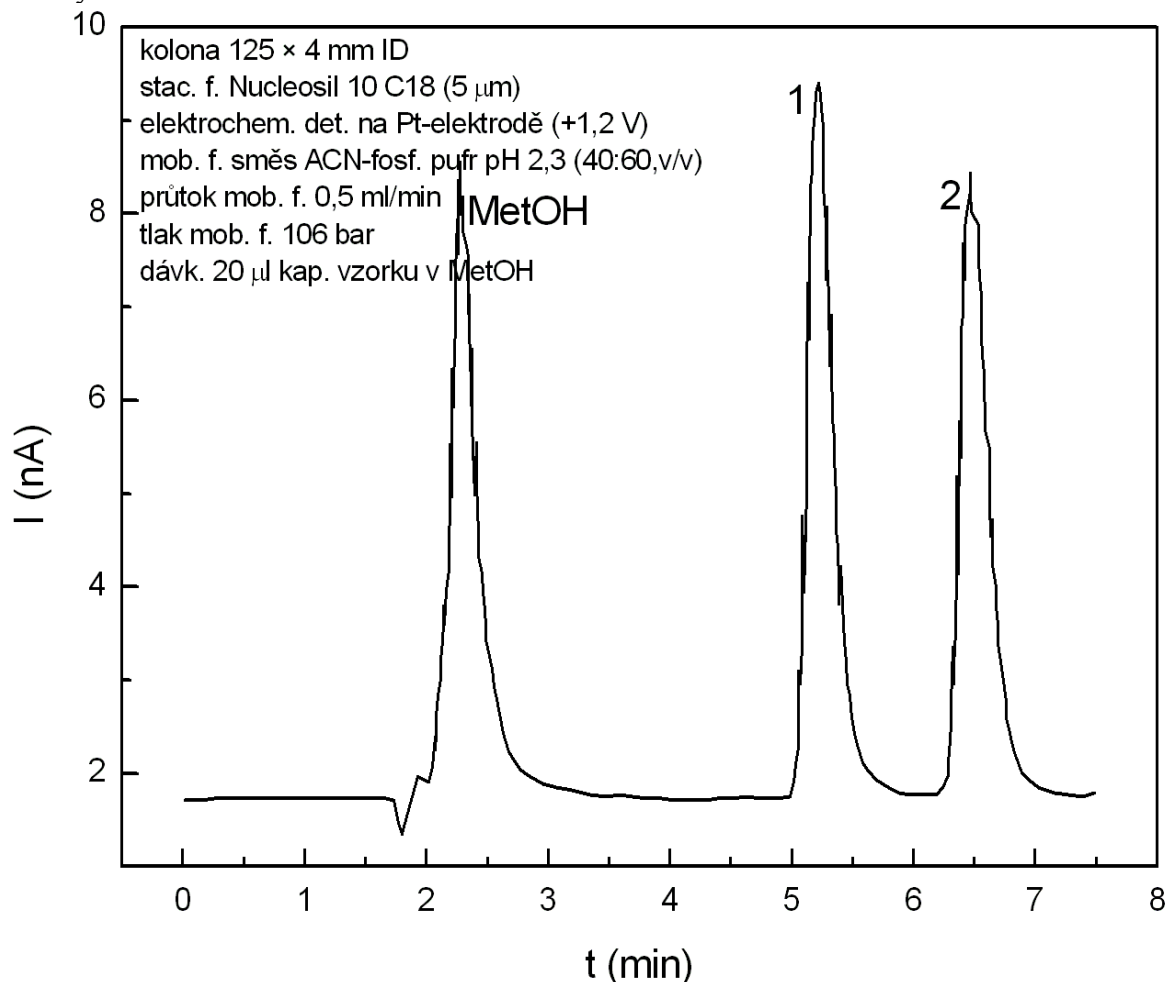
$$A = 1,064 \cdot h \cdot w_{1/2}$$

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

Příklady určené k řešení na semináři:

- 1) Vzorek obsahující oxidovatelné deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků byl analyzován reverzní HPLC (viz údaje na chromatogramu). V chromatogramu byly zaznamenány pouze tři píky, z nichž první odpovídal metanolu obsaženému ve vzorku. Před provedením této analýzy byly za stejných experimentálních podmínek změřeny kapacitní faktory látek v tabulce.



<i>látka</i>	<i>k_i</i>
benzylamin	1,12
2-naftylamin	1,25
1-naftylamin	1,80
2-naftol	2,15
1-naftol	2,69

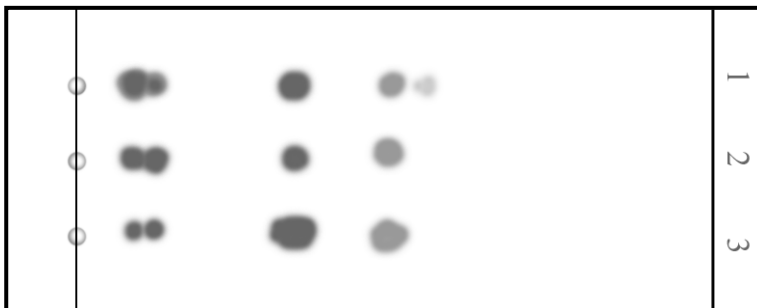
- Určete mrtvý čas a vypočítejte mrtvý objem použité separační kolony.
- Určete retenční časy a vypočítejte redukované retenční časy obou neznámých látek.
- Vypočítejte retenční objemy, redukované retenční objemy a retenční faktory obou neznámých látek.
- Porovnáním retenčních faktorů identifikujte obě neznámé látky.
- Určete výšku píku a šířku píku v polovině výšky pro oba identifikované analyty.
- Vypočítejte plochy píků obou identifikovaných analytů.
- Vypočítejte počty teoretických pater a výškové ekvivalenty teoretického patra dané separační kolony pro oba identifikované analyty.
- Vypočítejte rozlišení píků pro identifikované látky.

Cvičení KATA – Analytická chemie

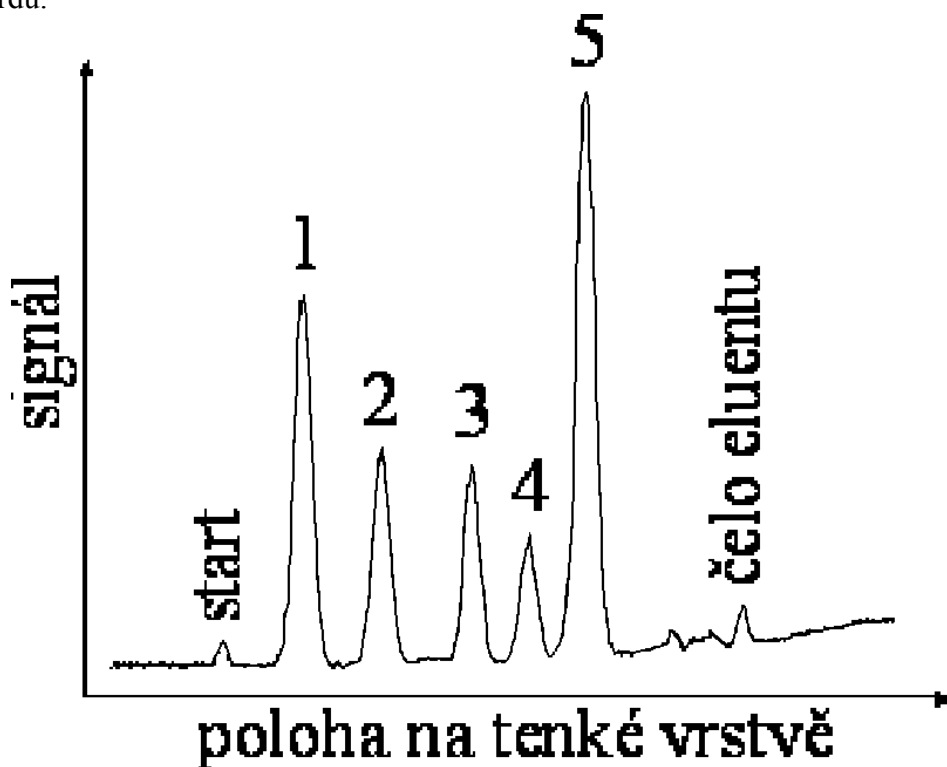
Chromatografie

- 2) Na tenkovrstvém chromatogramu vidíte separaci alkaloidů extrahovaných z máku (separace je prováděna na papíru impregnovaném hydrogencitrátem sodným, jako mobilní fáze je použita směs butanolu a 5% kyseliny citronové). Které z alkaloidů uvedených v tabulce se v máku nacházejí? Identifikujte jednotlivé skvrny. Ve kterém vzorku se nachází nejvíc morfinu a je tudíž nejnáchylnější ke zneužití?

Alkaloid	R _F
Akonitin	0,72
Kodein	0,14
Morfin	0,11
Papaverin	0,54
Sparteín	0,20
Thebain	0,33



- 3) Při HPLC analýze byl zjištěn retenční čas dimethylarseničné kyseliny 6,78 min a šířka píku při základně 0,82 min. Vypočítejte počet teoretických pater kolony a výšku teoretického patra, je-li délka kolony 25 cm.
- 4) V HPLC analýze kyseliny máselné a isomáselné byly zjištěny tyto parametry: Retenční čas kyseliny máselné 6,37 min, šířka píku při základně 1,1 min; retenční čas kyseliny isomáselné 4,89 min, šířka píku při základně 0,9 min; mrtvý čas 0,29 min. Vypočítejte rozlišení a kapacitní faktor obou kyselin.
- 5) Vyhodnoťte následující chromatogramy TLC pesticidů:
- Vypočítejte retardační faktory všech pesticidů.
 - Vypočítejte relativní retardační faktory všech pesticidů vzhledem k Desethylatrazinu jako standardu.



Nano-DURASIL-20 UV₂₅₄; chloroform / aceton 95 / 5 (v / v):

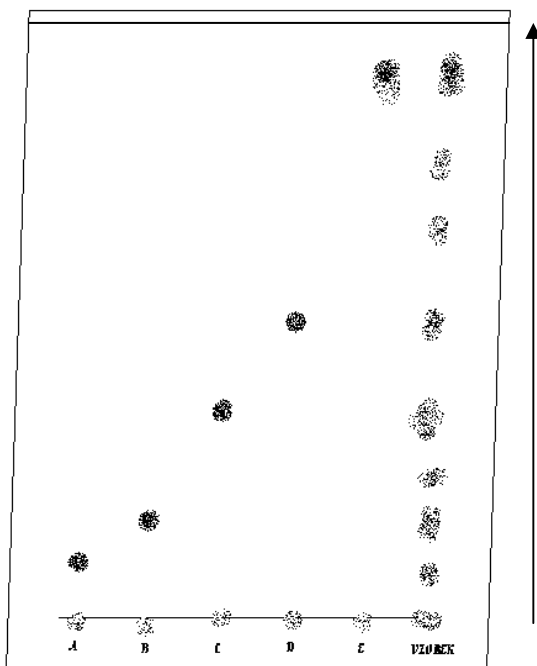
Pořadí: 1. Desethylatrazin; 2. Hexazinon; 3. Simazin; 4. Atrazin; 5. Crimidin

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

Příklady k samostatnému procvičení:

- 1) Vyhodnoťte následující chromatogram vzorku směsi barevných indikátorů. Vyvíjecí lázeň obsahovala ethanol a kyselinu octovou.



Podle zón standardů v chromatogramu přiřadíme skvrny jednotlivým látkám ve vzorku.

Tabulka pravítkem naměřených hodnot: (a = 80,5 mm)

označení	název	b (mm)	R_F
A	krystalová violet	[7,2	0,0894]
B	malachitová zeleň B	[12,9	0,160]
C	neutrální červeň	[27,5	0,342]
D	methylenová zeleň	[39,3	0,488]
E	naftylová červeň	[71,5	0,888]
VZOREK:	1. skvrna	[5,5	0,0683]
	2. skvrna	[12,0	0,149]
	3. skvrna	[18,5	0,230]
	4. skvrna	[26,0	0,323]
	5. skvrna	[38,7	0,481]
	6. skvrna	[51,2	0,636]
	7. skvrna	[60,0	0,745]
	8. skvrna	[72,0	0,894]

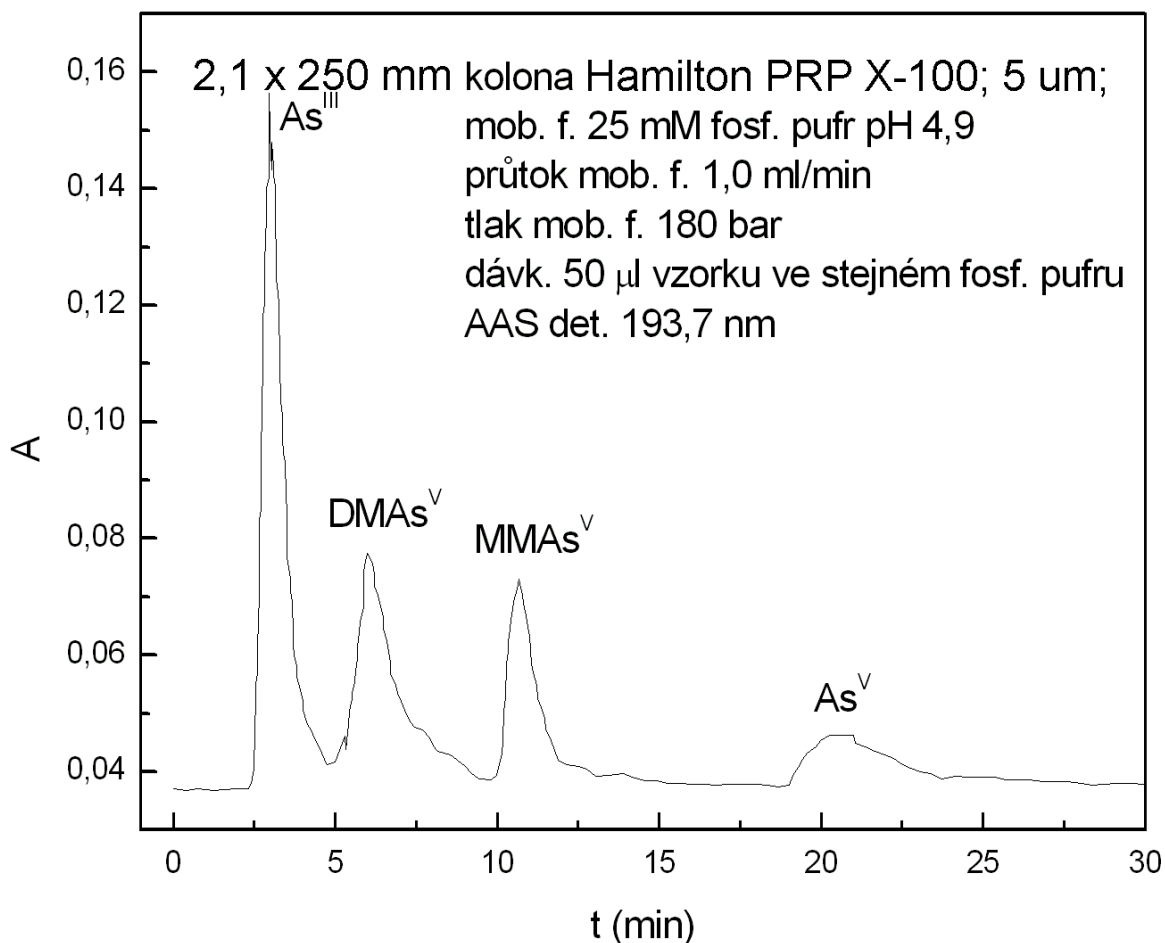
Podle hodnot retardačního faktoru určíme látky ve vzorku. Vzorek obsahuje 8 barevných látek, z nichž 5 bylo identifikováno:

[pořadí skvrn	standard	rel. odchylka
1.	krystalová violet	23,6 %
2.	malachitová zeleň B	6,9 %
4.	neutrální červeň	5,4 %
5.	methylenová zeleň	1,5 %
8.	naftylová červeň	0,7 %]
3.; 6. a 7.	neidentifikovány	

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

- 2) Při speciální analýze sloučenin arsenu v pitné vodě byl za pomoci iontové chromatografie a atomového absorpčního spektrometru jako detektoru získán následující chromatogram.



Vysvětlivky: As^{III} arsenitanový anion
 $DMAs^V$ dimethylarseničná kyselina
 $MMAs^V$ monomethylarseničná kyselina
 As^V arseničnanový anion

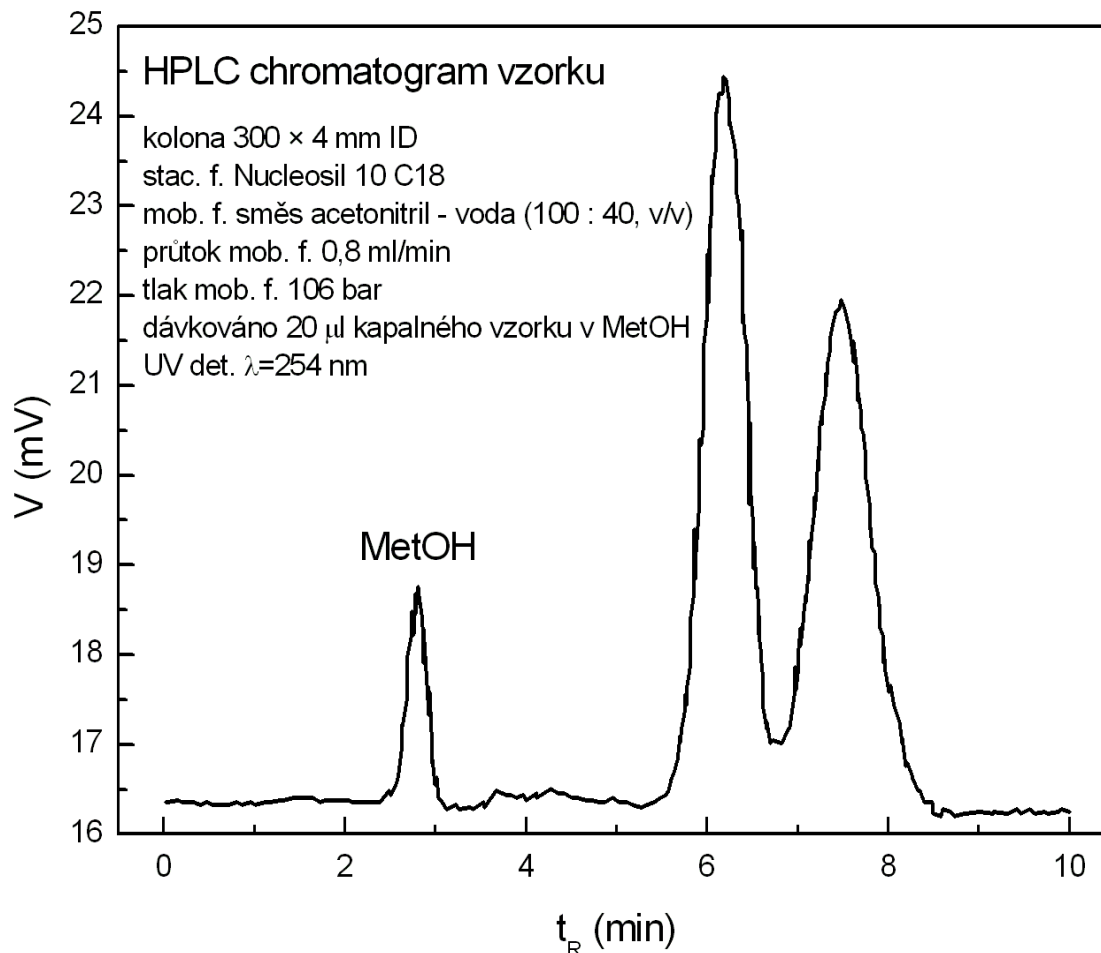
- Určete retenční časy a retenční objemy eluujících látek.
- Určete výšky píků a šířky píků v polovině výšky.
- Vypočítejte plochy píků identifikovaných analytů.
- Vypočítejte počty teoretických pater a výškové ekvivalenty teoretického patra dané separační kolony pro všechny analyty.
- Vypočítejte rozlišení sousedních píků pro identifikované látky.

látká	$[t_R (min)]$	$V_R (ml)$	$A (min)$	n	$H (mm)$
As^{III}	[2,9	2,9	0,0886	15	16,7]
$DMAs^V$	[6,0	6,0	0,0447	24	10,4]
$MMAs^V$	[10,7	10,7	0,0346	95	2,6]
As^V	[20,6	20,6	0,0321	264	0,3]

Cvičení KATA – Analytická chemie

Chromatografie

- 3) Vzorek obsahující polyaromatické uhlovodíky byl analyzován reverzní HPLC. V chromatogramu byly zaznamenány pouze tři píky, z nichž první odpovídal metanolu obsaženému ve vzorku. Před provedením této analýzy byly změřeny retenční faktory benzenu, naftalenu, bifenyly, fenanthrenu a anthracenu na stejné koloně za stejných experimentálních podmínek a byly získány hodnoty uvedené v tabulce.



- Určete mrtvý čas a vypočítejte mrtvý objem použité separační kolony. [2,83 min; 2,27 ml]
- Určete retenční časy a vypočítejte redukované retenční časy obou neznámých látek.
- Vypočítejte retenční objemy, redukované retenční objemy a retenční faktory obou neznámých látek.
- Porovnáním retenčních faktorů identifikujte obě neznámé látky.
- Určete výšku píku a šířku píku v polovině výšky pro oba identifikované analyty.
- Vypočítejte plochy píků obou identifikovaných analytů.
- Vypočítejte počty teoretických pater a výškové ekvivalenty teoretického patra dané separační kolony pro oba identifikované analyty.
- Vypočítejte rozlišení píků pro identifikované látky. [0,737]

<i>látka</i>	k_i	t_R (min)	t_R' (min)	V_R (ml)	V_R' (ml)	k	A (mV·min)	n	H (mm)
benzen	1,12								
naftalen	1,23	[6,17	3,34	4,9	2,7	1,18	4,706	719	0,42]
bifenyl	1,69	[7,46	4,63	6,0	3,7	1,64	4,523	574	0,52]
fenanthren	2,18								
anthracen	2,73								