

Separáční metody

Jana Sobotníková

e-mail: jana.sobotnikova@natur.cuni.cz

www.natur.cuni.cz/~suchan

přednášky ke stažení v SIS

SEPARAČNÍ (DĚLICÍ) METODY

- založeny na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze
- zvyšují selektivitu a specifičnost v analytické chemii
- využití pro kvalitativní i kvantitativní analýzu, tj. důkaz, identifikaci a stanovení
- umožňují izolaci složek v chemicky čisté formě

dělení srážením, elektrolýza, destilace, krystalizace, dialýza, extrakce, chromatografické metody, elektromigrační separační metody

dělení chromatografie

- a) plynová (GC) (adsorpční a rozdělovací)
- b) **superkritická fluidní (SFC)**
- c) kapalinová (LC)
 - kolonová (HPLC)
(adsorpční, rozdělovací, **gelová, iontově výměnná a afinitní**)
 - planární (plošná)
(**papírová a tenkovrstvá**)

ROZDĚLENÍ SEPARAČNÍCH METOD

Pracovní postup	Druh fáze	Mechanismus separačního procesu				
		rozpuštnost	adsorpce	výměna iontů	tenze par	velikost částic
jednostupňový	pevná/kapalná	(spolu) srážení elektrodepozice extrakce	spolusrážení	spolusrážení	x	sedimentace
	kapalná/kapalná	extrakce elektrodepozice	x	x	x	x
	kapalná/plynná	x	x	x	destilace	x
	pevná/plynná	x	x	x	sublimace	sedimentace
mnohostupňový/ kontinuální	pevná/kapalná	kontinuální extrakce krystalizace, zónové tavení	LSC	IEC	x	SEC
	kapalná/kapalná	kontinuální a Craigova extrakce, LLC	x	x	x	x
	kapalná/plynná	GLC	x	x	rektifikace	x
	pevná/plynná	x	GSC	x	x	x
	pevná/nadkritická tekutina	SFE	SFC	x	x	x

CHROMATOGRRAFIE

- je **separační** a současně i **analytická** metoda
- poskytuje **kvalitativní** a **kvantitativní** informace o vzorku

využívá distribuce látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze:

- **mobilní** (pohyblivou)
- **stacionární** (nepohyblivou)

různá hlediska dělení chromatografie

povaha mobilní fáze: plynová (GC) x kapalinová (LC)

způsob provedení: kolonová (sloupcová) x plošná (planární)

princip separace: rozdělovací x adsorpční x iontově výměnná x vylučovací
x biospecifická (afinitní)

pracovní postup: eluční (analytický účel) x frontální x vytěšňovací

účel: analytická x preparativní (preparační)

CHROMATOGRRAFIE V PLOŠNÉM USPOŘÁDÁNÍ

Papírová chromatografie (Paper Chromatography, PC)

rozdělovací - SF je kapalina zachycená v papíru a MF je též kapalná
- starší a jednodušší metoda

Tenkvrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC)

rozdělovací - SF je kapalina zachycená na tenké vrstvě a MF je také kapalná

adsorpční - SF je tuhý adsorbent, který je součástí tenké vrstvy, a MF je kapalná

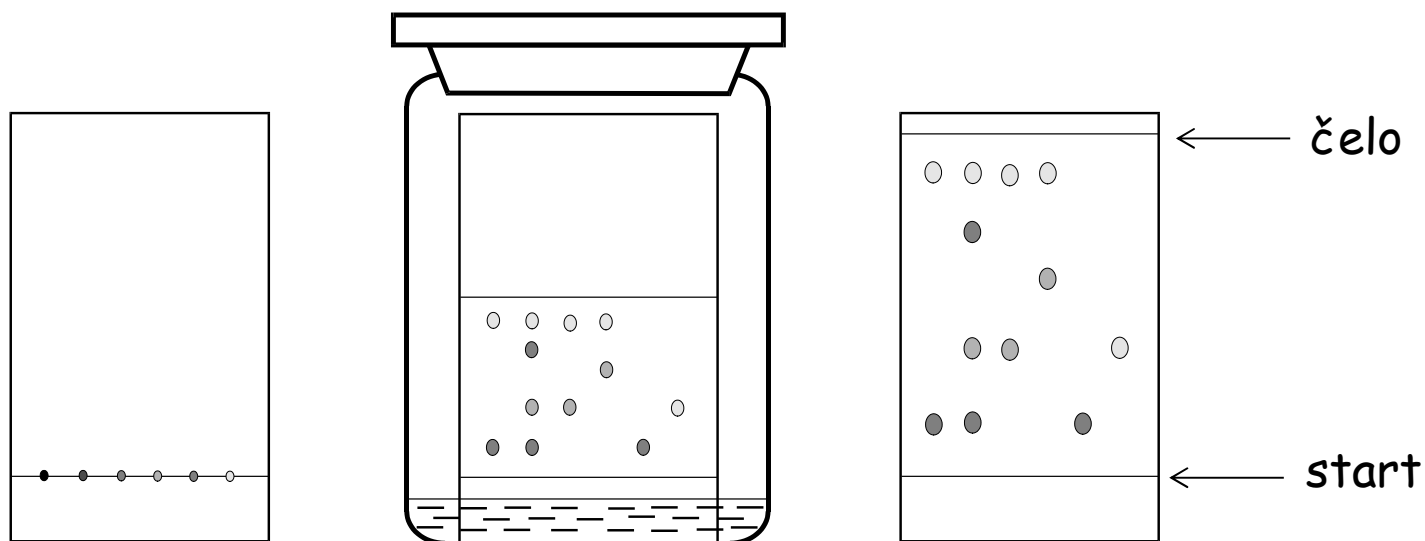
- jednoduchá, levná metoda, vyžaduje minimální instrumentaci

Vysokoúčinná tenkvrstvá chromatografie (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC)

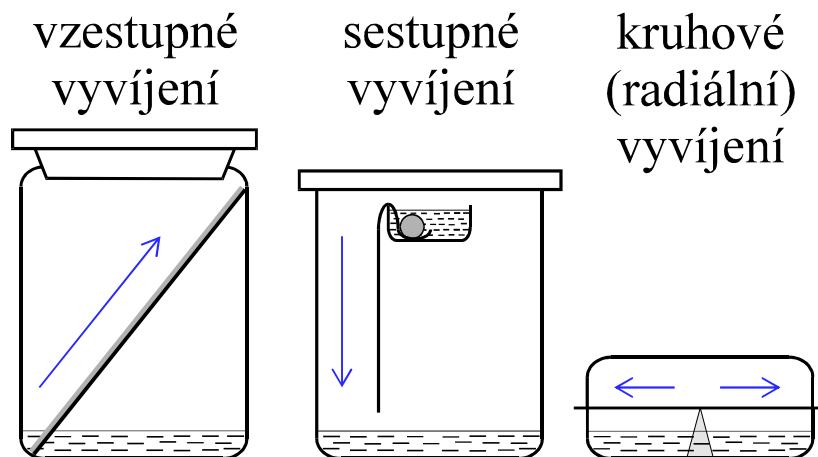
- využívá účinné SF o malé a jednotné velikosti částic, instrumentaci pro automatické dávkování, vyvíjení (čerpadlo) a detekci ⇒ srovnatelná metoda s HPLC

Postup dělení analytů při PC a TLC

Vzorek nanese ve formě malé kulaté skvrnky na papír nebo tenkou vrstvu a poté necháme MF vzlínat póry papíru nebo tenké vrstvy. MF unáší dělené látky ze vzorku, které se více či méně zpoždí interakcí (rozpuštěním nebo adsorpcí) se SF, a tím se vzájemně dělí.



- Vzorky rozpuštěné v těkavém rozpouštědle nanášíme na **start**. Nanášíme 0,1% až 5% roztoky v množství 200 nl až 20 μ l do skvrn o průměru 2 až 6 mm.
- Chromatogram vyvíjíme v uzavřené chromatografické komoře, která je dobře nasycena parami mobilní fáze.



opakované vyvíjení (eluent o jiné polaritě)

dvojrozměrné vyvíjení (vyvíjení v navzájem kolmých směrech)

- Vyvíjení ukončíme vybráním chromatogramu z vyvíjecí komory, když MF dosáhne téměř protilehlého okraje papíru či tenké vrstvy.
- Místo, kam doputovala MF, tzv. čelo, si označíme měkkou tužkou.
- Chromatogram vysušíme a skvrny nebarevných analytů detekujeme použitím vhodné detekční metody.
- Při pomalé migraci látek můžeme použít techniku přetečení mobilní fáze (nelze označit čelo MF)

Detekční metody v plošné chromatografii

- chemické a fyzikální způsoby detekce

- chemický způsob detekce je postřik vhodným činidlem a fyzikální způsob detekce je interakce s UV nebo IČ zářením

1) ponoření nebo postřik chromatogramu vhodným činidlem

- konc. HNO_3 nebo H_2SO_4 (pouze TLC), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KMnO_4 , I_2 (organické látky)
- fluorescamin (aminy, peptidy, sulfonamidy); ninhydrin (aminy, AMK, aminocukry); dithizon (ionty kovů); acidobazické indikátory (kyseliny a zásady)

2) fluorescence luminoforů v UV záření (excitace při 254 nm)

3) zhášení fluorescence tenkovrstvé desky nadopované fluorescenčním indikátorem (např. hořčíkem aktivovaný křemičitan zinečnatý)

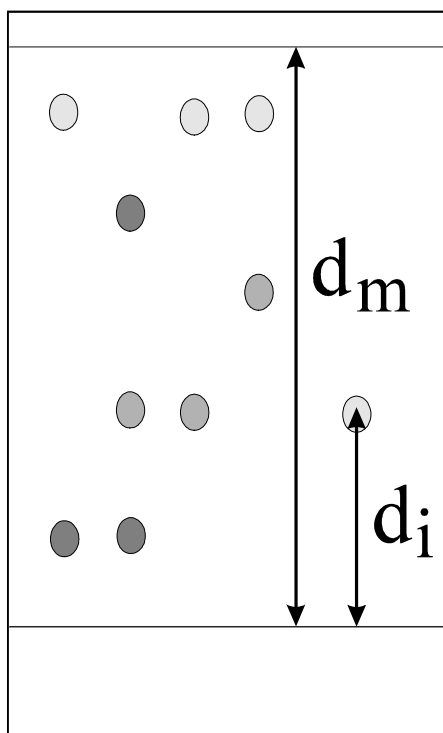
-
- mineralizace analytů IČ zářením

- převedení nebarevných analytů derivatizací na barevné před vlastní analýzou

- biologický způsob detekce (růst mikroorganismů)

Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu

Jednotlivé separované analyty jsou charakterizovány **retardačním faktorem R_F** .



$$R_{F,i} = \frac{u_i}{u_m} = \frac{d_i}{d_m} = \frac{1}{1+k}$$

u_i rychlost skvrny i-tého analytu

u_m rychlost (čela) mobilní fáze

d_i vzdálenost středu skvrny i-tého analytu od startu

d_m vzdálenost čela mobilní fáze od startu

$R_F \in \langle 0, 1 \rangle$

$R_F = 0$ látka nemigruje, zůstává na startu

$R_F = 1$ látka se nezadržuje, migruje s čelem rozpouštědla

Nízká opakovatelnost R_F : zejména pokud stacionární fáze, mobilní fáze a její páry nejsou v rovnováze.

Identifikace analytů

- 1) porovnáním poloh skvrn analytů a standardů chromatografovaných na témže chromatogramu
- 2) porovnáním hodnot retardačních faktorů R_F analytů s publikovanými hodnotami, změřenými za stejných experimentálních podmínek

- 3) porovnáním R_M hodnot

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) = \log k$$

R_M na rozdíl od R_F závisí aditivně na strukturních prvcích analytu

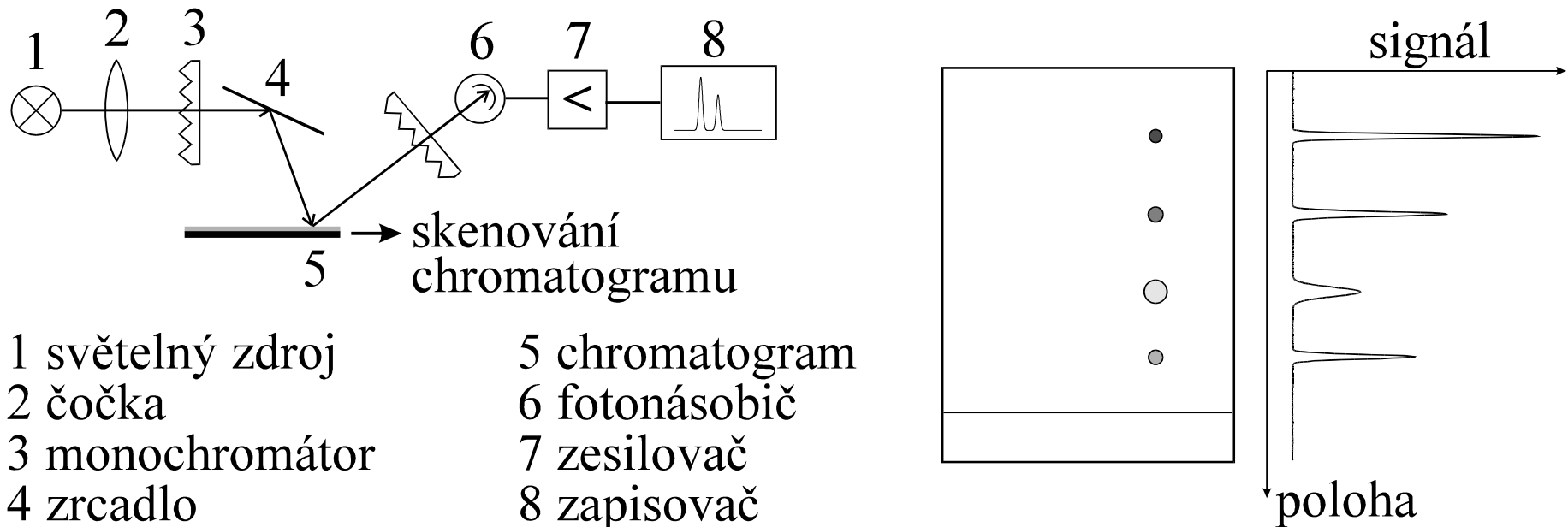
- 4) porovnáním hodnot relativních retardačních faktorů

$$R_{F,rel,i} = \frac{R_{F,i}}{R_{F,s}}$$

$R_{F,rel,i}$ je relativní retardační faktor tj. retardační faktor chromatografované látky vztažený k retardačnímu faktoru zvoleného standardu

Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu

- 1) Analyty můžeme stanovit přímo na chromatogramu pomocí **fotodenzitometru**: převedení skvrny analytů na chromatogram s píky, plocha píku je úměrná množství příslušného analytu ve skvrně.



- 2) **Extrakce analytů** z chromatogramu (vystřížení či seškrábnutí skvrny) a stanovení vhodnou metodou v roztoku.

PAPÍROVÁ CHROMATOGRRAFIE (PC)

rozdělovací chromatografie

celuloseový chromatografický papír (95 - 99 % α -celulosy)

- tloušťka (mm), plošná hmotnost (g m^{-2}), kapacita (mg), savost
- modifikované papíry: acetylované, etherifikované, iontově výměnné skupiny

Stacionární fáze

- **voda** zachycená na papíru
- papír impregnovaný polárním rozpouštědlem (formamid, dimethylformamid)
- papír impregnovaný nepolárním rozpouštědlem (parafínový, silikonový olej)

Mobilní fáze

- voda + nižší alkoholy
- organická rozpouštědla a jejich směsi o různé polaritě

Vývoj chromatogramu **sestupně**, popř. **vzestupně** (papír stočený do ruličky nebo nahoře připnutý do spony)

Vyvíjení chromatogramu v PC je pomalejší než v TLC

Sestupná PC aminokyselin

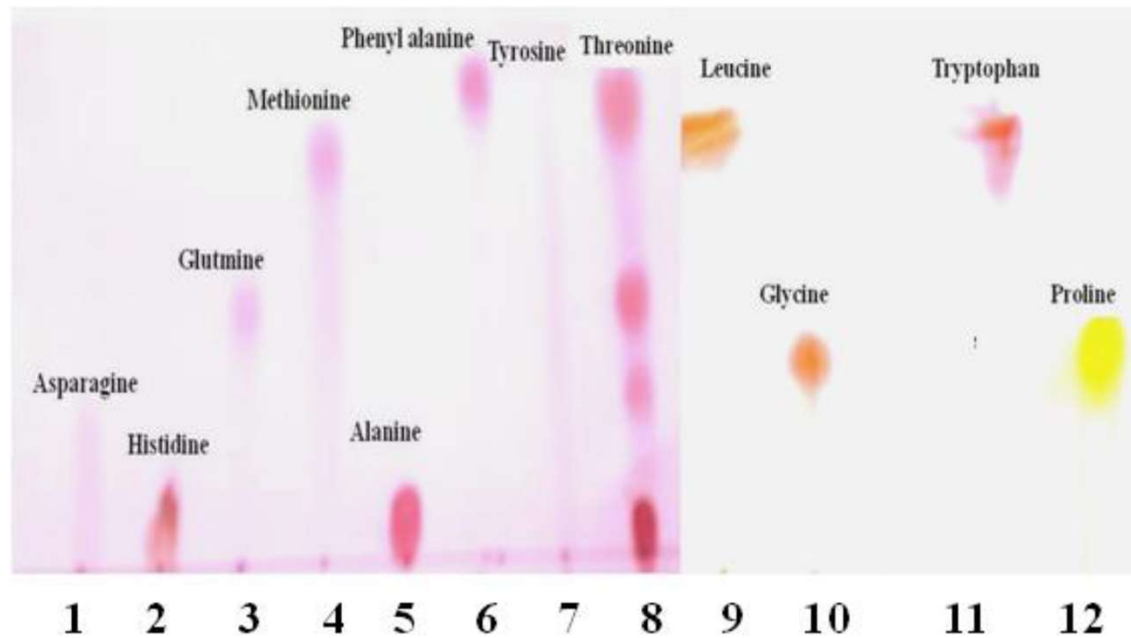
dinitrofenylderiváty aminokyselin

eluent: cyklohexan-isopropanol-50 mM benzoát draselný

60 % - 36 % - 4 %

detekce: žluté skvrny

○	Asp
○	Gly
●	Ala
○	Met
○	Val
●	Leu



MF: *n*-butanol-CH₃COOH-voda 12:5:3 (v/v)

detekce: SnCl₂ + ninhydrin

TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE (TLC)

- jednoduchá, rychlá a často používaná chromatografická metoda
- můžeme realizovat všechny metody kapalinové chromatografie (NP, RP, IEC)
- TLC lze charakterizovat jako chromatografii v otevřené koloně
- Na tenké vrstvě je podstatně méně SF, analýza může být velmi rychlá v porovnání s kolonou
- Všechny nanesené látky se musí objevit mezi startem a čelem rozpouštědla, nic nemůže zůstat v koloně

Tenkovrstvou chromatografií je možno realizovat v **klasické (TLC)** nebo **vysokoučinné (HPTLC)** experimentální podobě.

- používáme prakticky všechny stacionární fáze jako pro kolonovou chromatografii, jen s větší zrnitostí (průměr částic 30 - 50 μm).

Stacionární fáze

oxid hlinitý, silikagel, křemelina, polyamid (adsorbenty)

celulosa, chemicky vázané fáze na silikagel (-C18, -NH₂, -CN skupiny)

iontoměniče

- SF jsou nanášeny na **skleněných deskách** nebo **hliníkových fóliích**, zpevněné škrobem nebo sádrou
- Tenké vrstvy mohou obsahovat **fluorescenční indikátor** UV₂₅₄ k usnadnění detekce analyzovaných látek

Mobilní fáze „podobné se rozpouští v podobném“

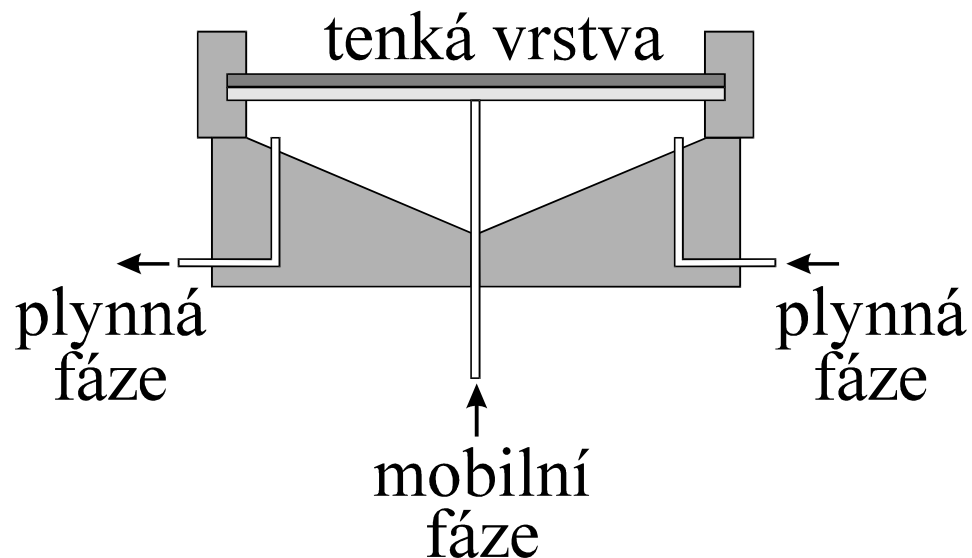
nepolární cyklohexan, toluen, chloroform, dichlormethan

polární aceton, ethanol, methanol, voda; amoniak, kyselina octová

- Hnací silou pohybu mobilní fáze (MF) jsou **kapilární síly**. Rychlost pohybu MF závisí na velikosti pórů stacionární fáze \Rightarrow **průtok MF není konstantní a nelze ho kontrolovat** (platí pro TLC a PC)

HPTLC

- používáme chemicky stejné druhy **stacionárních fází** jako v TLC, avšak s velmi malou zrnitostí ($15 \mu\text{m}$) a velkou homogenitou zrnitosti
- **mobilní fázi** dopravuje na SF mikročerpadlo (průtok $\approx 1 \mu\text{l s}^{-1}$) pro zajištění rovnoměrného toku eluentu tenkou vrstvou \Rightarrow dosahujeme vyšší separační účinnost než v TLC a PC
- vyvíjení chromatogramu probíhá ve **vyvíjecích komorách** s možností regulace složení plyné fáze, protože průtok eluentu tenkou vrstvou závisí na tlaku a složení plyné fáze nad vrstvou



- možnost automatizace (automatické nanášení vzorků s dobrou opakovatelností)

Srovnání experimentálních parametrů TLC a HPTLC

Sorbent silikagel	TLC	HPTLC
Zrnění (μm)	30 - 50	10 - 15
Velikost pórů (nm)	8 - 50	6
Specifický povrch (m^2g^{-1})	-	500
Tloušťka vrstvy SF (mm)	0,1 - 0,25	0,15
Formát vrstvy (cm \times cm)	20 \times 20	5 \times 5; 10 \times 10
HETP (μm)	25 - 40	15
Průměr nanesených skvrn (mm)	2 - 6	0,2 - 1,5
Průměr rozdělených skvrn (mm)	5 - 15	0,5 - 2
Doba potřebná k separaci (min)	10 - 200	2 - 15
Množství látky ve skvrně (μg)	0,05 - 10	0,005 - 1

TLC ŠTĚPŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

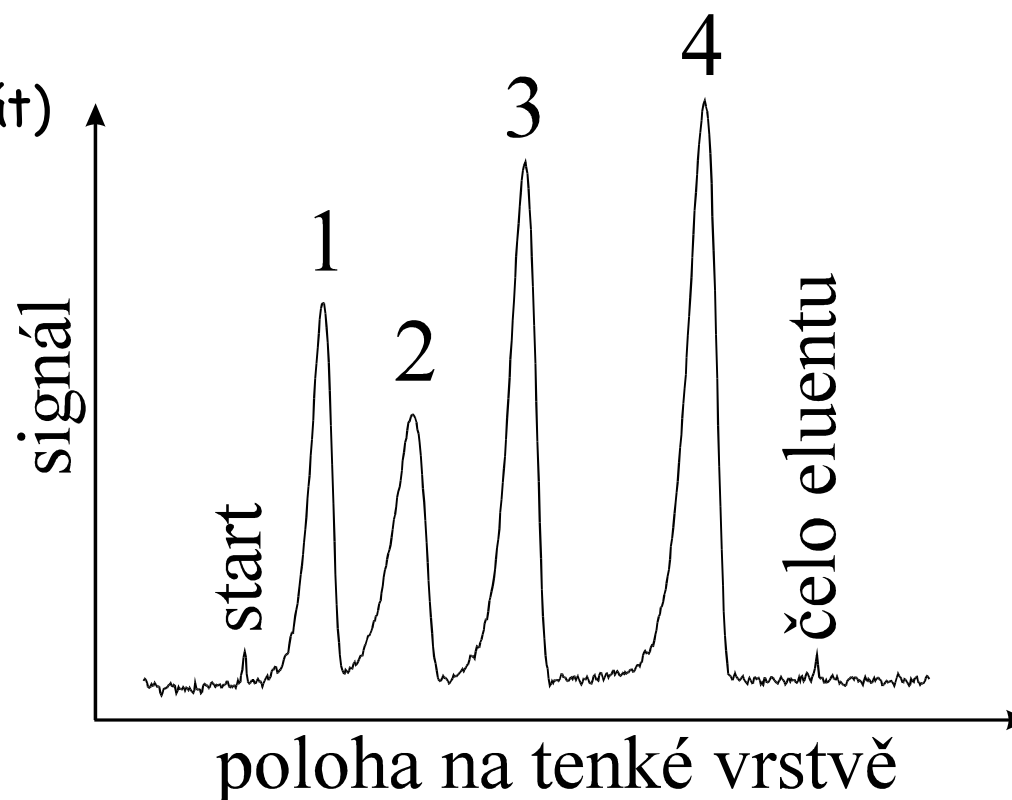
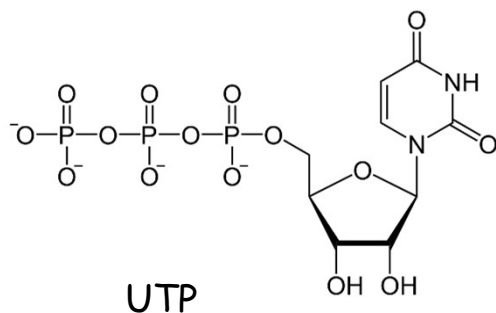
tenká vrstva: Nano-SIL NH₂ / UV

eluent: aceton/voda 30/70 (v/v) + 0,2 mol dm⁻³ (NH₄)₂SO₄

objem vzorku: 0,3 μl

detekce: fotodenzitometr, UV při 254 nm

- píky:
1. UTP (uridintrifosfát)
 2. UDP (uridindifosfát)
 3. UMP (uridinmonofosfát)
 4. uridin (uracil-ribosa)



TLC BARBITURÁTŮ

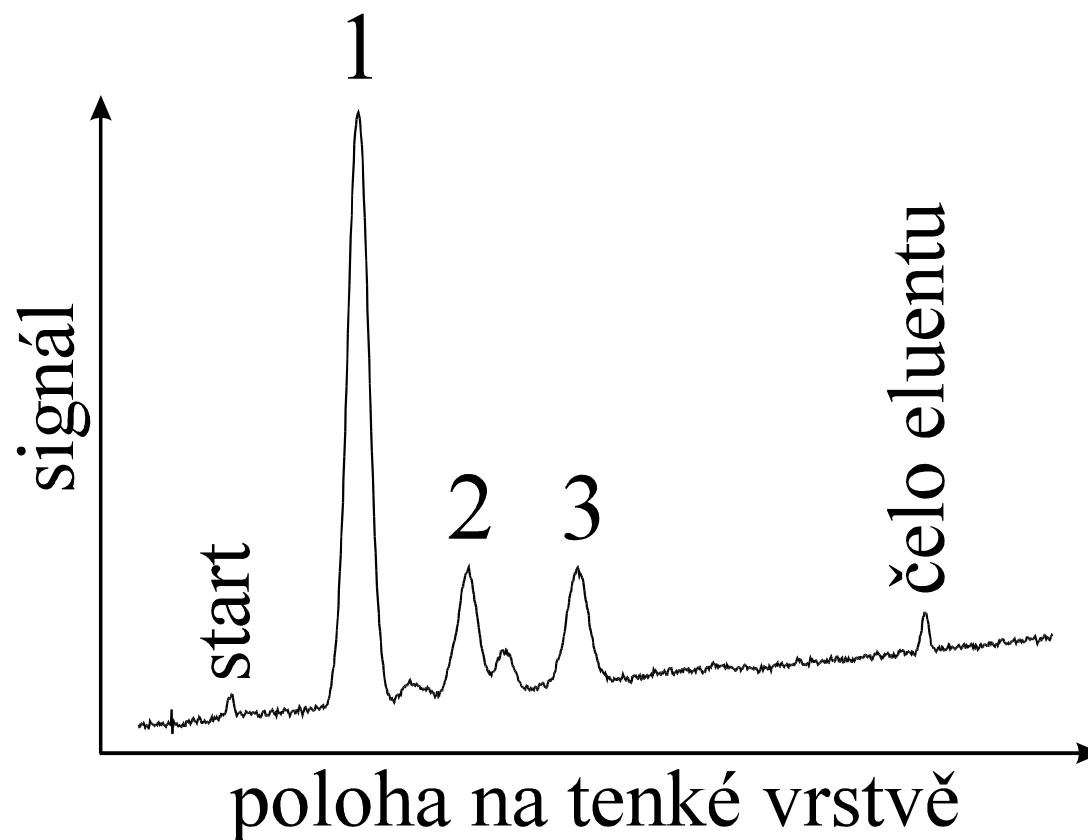
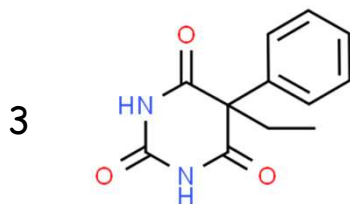
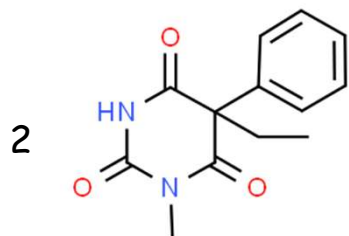
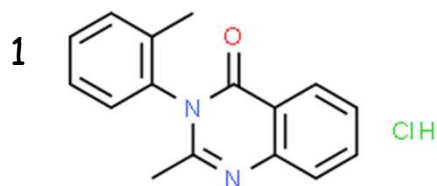
tenká vrstva: RP-18W / UV254

(W = wetttable, smočitelná, nesilanizovaná)

eluent: methanol/voda 45/55 (v/v)

detekce: fotodenzitometr, UV při 254 nm

píky: 1. Revonal
2. Prominal
3. Luminal



TLC TRIAZINOVÝCH PESTICIDŮ

tenká vrstva: Nano-DURASIL-20 UV254

eluent: chloroform/aceton 95/5 (v/v)

detekce: fotodenzitometr, UV při 254 nm

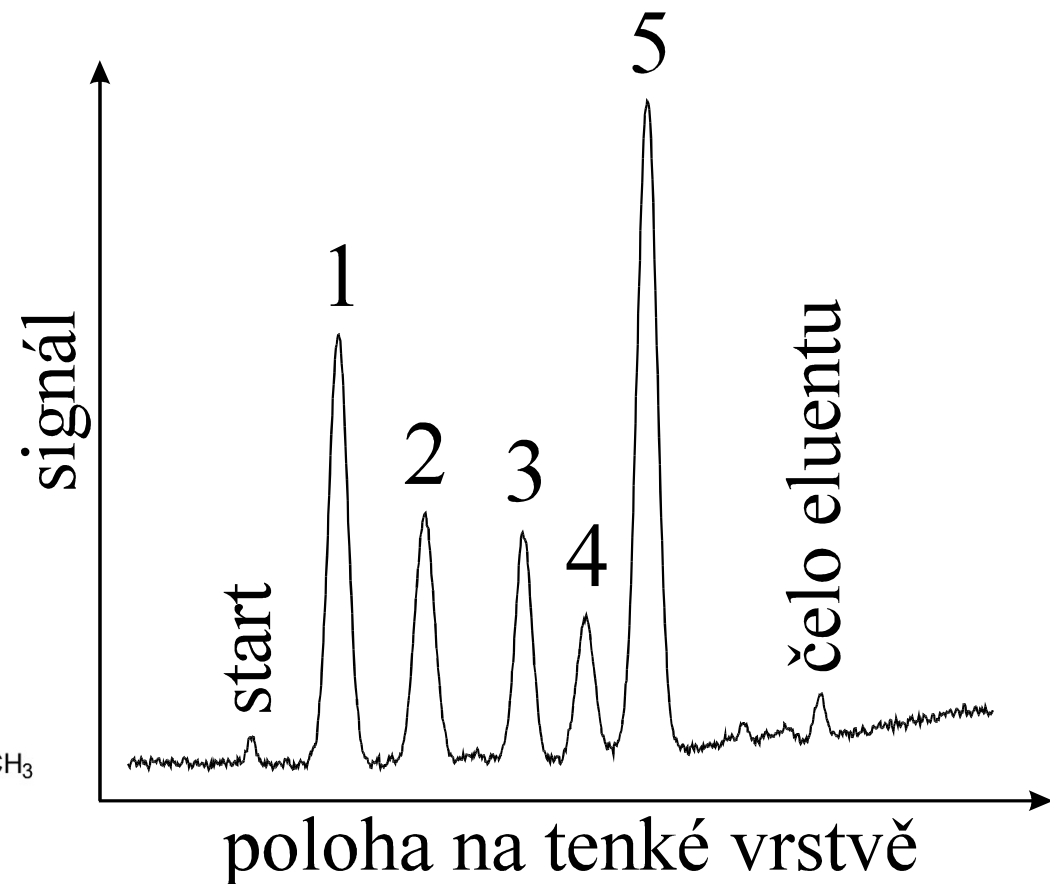
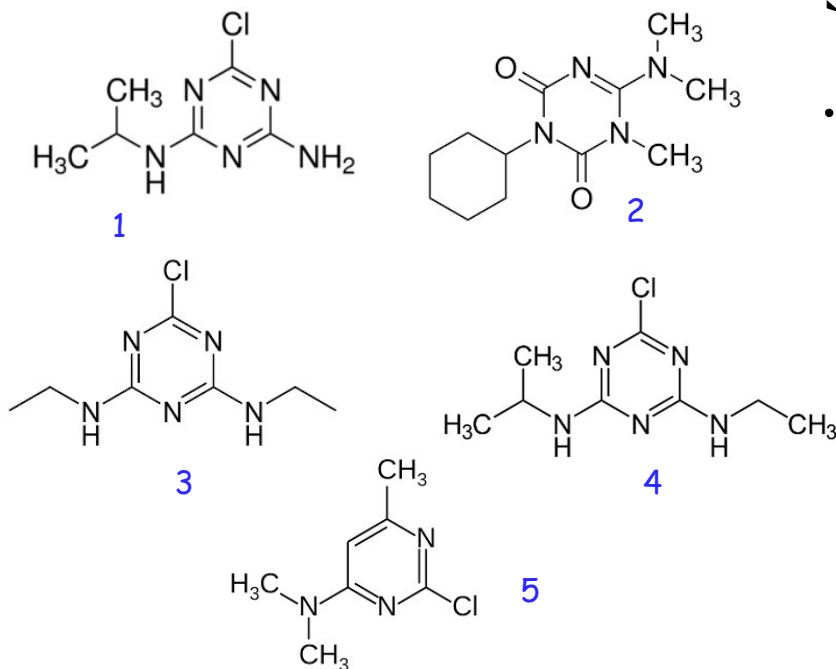
píky: 1. Desethylatrazin

2. Hexazinon

3. Simazin

4. Atrazin

5. Crimidin



TLC STEROIDNÍCH HORMONŮ

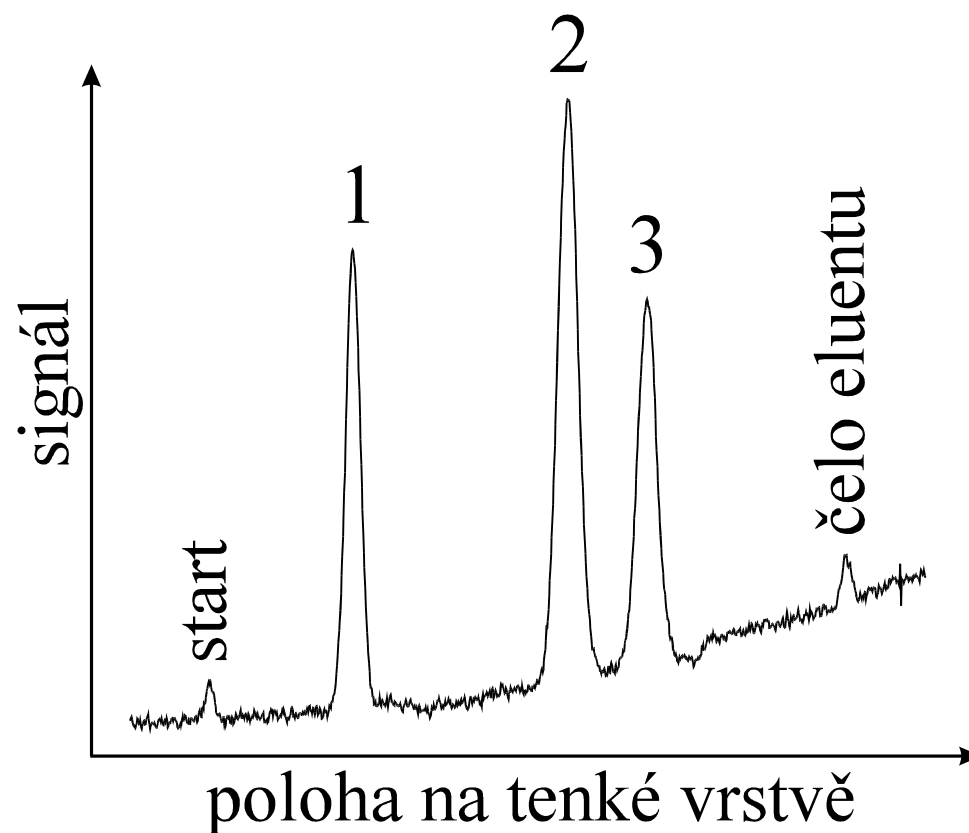
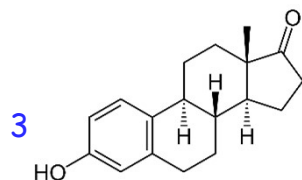
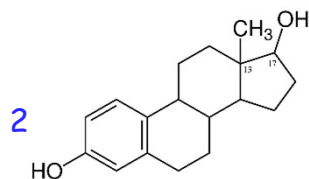
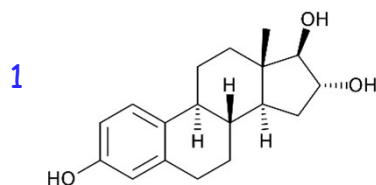
tenká vrstva: Nano-SIL CN / UV

eluent: petroleter (40-60 °C)/aceton 80/20 (v/v)

objem vzorku: 1 μ l

detekce: 0,2 g $MnCl_2$ v 60 ml methanolu s 2 ml H_2SO_4
fotodenzitometr, UV při 366 nm

píky: 1. estriol
2. estradiol
3. estron



chromatografie sacharidů na tenké vrstvě (Silufol)

- stacionární fáze: adsorbovaná voda na silikagelu
- mobilní fáze: ethylacetát-isopropanol-voda (6:4:2 v/v/v)

chromatografie fosfolipidů na tenké vrstvě (Silufol)

- stacionární fáze: adsorbovaná voda na silikagelu
- mobilní fáze: chloroform-methanol-amoniak (65:25:4 v/v/v)

chromatografie listových barviv na tenké vrstvě (Silufol)

- stacionární fáze: adsorbovaná voda na silikagelu
- mobilní fáze: benzín-isopropanol-voda (100:10:0,25 v/v/v)

