

	PŘEDMLUVA . . . . .	10
1	ÚVOD . . . . .	13
1.1	Charakteristika a rozdělení separačních metod . . . . .	15
1.2	Termodynamika a účinnost separace . . . . .	17
1.3	Separací metody založené na fázových rovnováhách . . . . .	18
1.3.1	Destilace . . . . .	18
1.3.2	Separace na molekulových sítích . . . . .	21
1.3.3	Ostatní metody založené na fázových rovnováhách . . . . .	22
1.4	Metody založené na rozdílech v rychlosti migrace . . . . .	23
1.4.1	Separace přes polopropustnou membránu . . . . .	23
1.4.2	Separace v silovém poli . . . . .	24
2	EXTRAKCE . . . . .	27
2.1	Interakce rozpuštěné látky s rozpouštědlem a jeho volba. Distribuční rovnováha . . . . .	27
2.2	Extrakce tuhé látky kapalinou . . . . .	30
2.3	Extrakce z kapaliny do kapaliny . . . . .	31
2.3.1	Extrakce organických látek . . . . .	31
2.3.2	Extrakce anorganických látek . . . . .	32
2.3.2.1	Extrakce kovových chelátů . . . . .	32
2.3.2.2	Extrakce iontových asociátů . . . . .	37
2.4	Volba podmínek extrakce pro dělení . . . . .	39
2.5	Praktické provedení extrakce . . . . .	41
3	ZÁKLADY CHROMATOGRRAFIE . . . . .	44
3.1	Základní principy chromatografického procesu . . . . .	45
3.1.1	Základní pojmy a definice . . . . .	47
3.2	Principy separace . . . . .	48
3.2.1	Adsorpční chromatografie . . . . .	49
3.2.2	Plynová rozdělovací (partiční) chromatografie . . . . .	51
3.2.3	Kapalinová rozdělovací (partiční) chromatografie . . . . .	53
3.2.4	Gelová permeační chromatografie . . . . .	54
3.2.5	Iontově výměnná chromatografie . . . . .	56
3.2.6	Afinní chromatografie . . . . .	57
3.3	Kinetická teorie chromatografického procesu . . . . .	58
3.3.1	Teorie chromatografického patra . . . . .	58
3.3.2	Tvar eluční křivky . . . . .	60
3.3.3	Počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra . . . . .	61
3.3.4	Rovnice van Deemterova a Giddingsova . . . . .	63
3.3.5	Rozlišení . . . . .	69
3.4	Separací proces a jeho ovlivnění . . . . .	71

3.4.1	Termodynamický aspekt separačního procesu . . . . .	72
3.4.2	Kinetický aspekt separačního procesu . . . . .	74
3.4.3	Kapacita chromatografického systému . . . . .	75
4	DETEKCE, MOŽNOSTI JEJÍHO ZLEPŠENÍ, ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLU A VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ . . . . .	77
4.1	Detekční systémy . . . . .	77
4.1.1	Odezva detektoru . . . . .	78
4.1.2	Citlivost, šum a minimální detegovatelné množství . . . . .	80
4.1.3	Záznamové a vyhodnocovací zařízení . . . . .	81
4.2	Kvalitativní analýza . . . . .	83
4.3	Kvantitativní analýza . . . . .	86
4.3.1	Měření plochy píku . . . . .	86
4.3.2	Určení obsahu složky v analyzovaném vzorku . . . . .	87
4.3.3	Přesnost a správnost analýz . . . . .	90
4.4	Derivatizace, reakční chromatografie . . . . .	91
4.4.1	Derivatizační techniky . . . . .	93
4.4.2	Derivatizace v plynové chromatografii . . . . .	93
4.4.2.1	Významnější derivatizační reakce využívané při plynově chromatografické analýze . . . . .	94
4.4.3	Derivatizace a reakční chromatografie v HPLC . . . . .	96
4.4.3.1	Teorie toku mobilní fáze derivatizačním mikroreaktorem . . . . .	100
4.4.3.2	Významnější derivatizační činidla a reakce využívané v kapalinové chromatografii . . . . .	102
5	OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO CHROMATOGRFICKOU ANALÝZU . . . . .	106
5.1	Cíle optimalizace a způsoby hledání optimálních parametrů . . . . .	106
5.2	Kritéria separace . . . . .	107
5.3	Nejdůležitější optimalizační postupy . . . . .	109
5.3.1	Postupná optimalizace podmínek separace simplexovou metodou . . . . .	109
5.3.2	Metoda okénkových diagramů . . . . .	110
5.3.3	Současná optimalizace většího počtu experimentálních parametrů . . . . .	111
5.3.4	Teoretické (deterministické) metody . . . . .	113
5.4	Matematické rozlišení vzájemně se překrývajících píků . . . . .	113
6	PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE . . . . .	116
6.1	Teoretické základy plynové chromatografie . . . . .	116
6.1.1	Proudění plynu chromatografickou kolonou . . . . .	117
6.1.1.1	Tok plynu kapilární kolonou . . . . .	117
6.1.1.2	Tok plynu v kolonách s pórovitou náplní . . . . .	118
6.1.1.3	Základní vztahy pro tok plynu chromatografickou kolonou při izotermické analýze . . . . .	119
6.1.1.4	Základní vztahy pro tok plynu chromatografickou kolonou při programované teplotě s lineárním gradientem . . . . .	122
6.1.2	Látková bilance solutu v chromatografické koloně . . . . .	123
6.1.3	Eluční charakteristiky . . . . .	123
6.1.3.1	Eluční charakteristiky naměřené za izotermických podmínek . . . . .	124
6.1.3.2	Eluční charakteristiky při programované teplotě . . . . .	125
6.1.4	Termodynamické základy plynové chromatografie . . . . .	126
6.1.4.1	Chromatografie plyn–kapalina . . . . .	126
6.1.4.2	Chromatografie plyn–adsorbent . . . . .	130
6.1.5	Rozmývání zóny solutu v plynové chromatografii . . . . .	131
6.1.5.1	Rozmývání zón v kolonách s náplní při izotermické analýze . . . . .	132
6.1.5.2	Rozmývání zón v kapilárních kolonách při izotermické analýze . . . . .	133

6.1.5.3	Rozmývání zóny solutu při programované teplotě . . . . .	133
6.2	Základní části plynového chromatografu . . . . .	134
6.2.1	Nosný plyn . . . . .	135
6.2.2	Regulace tlaku a průtoku nosného plynu . . . . .	137
6.2.3	Dávkovací systémy . . . . .	138
6.3	Chromatografické kolony . . . . .	140
6.3.1	Adsorbenty . . . . .	142
6.3.2	Stacionární kapaliny . . . . .	142
6.3.2.1	Klasifikace stacionárních kapalin . . . . .	143
6.3.2.2	Selektivita stacionárních kapalin . . . . .	144
6.3.2.3	Polarita stacionárních kapalin . . . . .	144
6.3.3	Nosiče stacionární kapaliny . . . . .	146
6.3.4	Příprava náplňových kolon . . . . .	148
6.3.5	Příprava kapilárních kolon . . . . .	148
6.3.5.1	Příprava kapilárních kolon typu WCOT . . . . .	148
6.3.5.2	Příprava kapilárních kolon s pórovitou vrstvou . . . . .	149
6.4	Termostaty . . . . .	150
6.5	Detektory . . . . .	151
6.5.1	Tepelně vodivostní detektor (TCD) . . . . .	151
6.5.2	Ionizační detektory . . . . .	153
6.5.2.1	Plamenový ionizační detektor (FID) . . . . .	154
6.5.2.2	Termoionizační detektor (TID, AFID) . . . . .	157
6.5.2.3	Detektor elektronového záhytu (ECD) . . . . .	159
6.5.2.4	Heliový a argonový detektor (HeD, ArD) . . . . .	161
6.5.3	Selektivní detektory . . . . .	161
6.6	Zpracování signálu detektoru . . . . .	162
6.7	Kvalitativní analýza . . . . .	163
6.7.1	Využití elučních dat k identifikaci složek ve vzorku . . . . .	163
6.7.1.1	Izotermická analýza . . . . .	165
6.7.1.2	Analýza s programovanou teplotou . . . . .	168
6.7.2	Charakteristika složek ve vzorku selektivními detektory . . . . .	168
6.7.3	Charakteristika složek ve vzorku kombinací plynové chromatografie s metodami klasické organické analýzy . . . . .	169
6.7.4	Identifikace složek vzorku spojením dvou nebo více chromatografických kolon . . . . .	170
6.7.5	Identifikace složek vzorku kombinací plynové chromatografie s jinými chromato- grafickými technikami . . . . .	170
6.8	Kvantitativní analýza . . . . .	172
6.9	Hodnocení separační účinnosti chromatografických kolon . . . . .	175
6.9.1	Izotermická analýza . . . . .	175
6.9.2	Analýza s programovanou teplotou . . . . .	177
6.10	Využití plynové chromatografie v praxi . . . . .	178
6.10.1	Analytická plynová chromatografie . . . . .	178
6.10.2	Preparativní plynová chromatografie . . . . .	179
6.10.3	Nadkritická parní chromatografie (SFC) . . . . .	182
6. 0.4	Fyzikálně chemické aplikace plynové chromatografie . . . . .	185
6.11	Optimalizace pracovních podmínek v plynové chromatografii . . . . .	189
7	KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE . . . . .	191
7.1	Úvod, rozdělení metod kapalinové chromatografie . . . . .	191
7.2	Kapalinová chromatografie v plošném uspořádání . . . . .	192
7.2.1	Instrumentace a materiály užívané v papírové a tenkovrstvé chromatografii . . . . .	193

7.2.2	Volba stacionární a mobilní fáze v papírové a tenkovrstvé chromatografii . . . . .	196
7.2.2.1	Volba rozpouštědlového systému v papírové chromatografii . . . . .	196
7.2.2.2	Volba sorbentu a rozpouštědlového systému v tenkovrstvé chromatografii . . . . .	198
7.2.3	Detekční systémy v papírové a tenkovrstvé chromatografii. . . . .	200
7.2.4	Využití chromatografie v plošném uspořádání v technické praxi . . . . .	201
7.3	Kapalinová kolonová chromatografie v klasickém uspořádání . . . . .	201
7.4	Vysokoúčinná kapalinová kolonová chromatografie . . . . .	202
7.4.1	Úvod . . . . .	202
7.4.2	Teorie toku mobilní fáze kolonou . . . . .	203
7.4.3	Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii . . . . .	206
7.4.3.1	Sestava kapalinového chromatografu . . . . .	206
7.4.3.2	Čerpadla mobilní fáze . . . . .	207
7.4.3.3	Tvorba gradientu mobilní fáze. . . . .	210
7.4.3.4	Zařízení pro dávkování vzorků . . . . .	211
7.4.3.5	Chromatografické kolony a jejich náplně . . . . .	213
7.4.3.6	Detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii . . . . .	219
7.4.3.7	Pomocná zařízení . . . . .	225
7.4.4	Chromatografické systémy, popis retence a mechanismus separace . . . . .	228
7.4.4.1	Chromatografie v systému kapalina–kapalina . . . . .	228
7.4.4.2	Chromatografie na polárních adsorbentech . . . . .	234
7.4.4.3	Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi . . . . .	241
7.4.4.4	Chromatografie na středně polárních chemicky vázaných fázích . . . . .	244
7.4.4.5	Chromatografie na měničích iontů, iontová chromatografie . . . . .	245
7.4.4.6	Chromatografie iontových párů . . . . .	249
7.4.4.7	Využití tvorby komplexů v kapalinové chromatografii . . . . .	250
7.4.5	Volba pracovních podmínek a optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie . . . . .	251
7.4.5.1	Volba chromatografického systému . . . . .	252
7.4.5.2	Optimalizace pracovních podmínek (časově stálých) . . . . .	254
7.4.5.3	Programovaná změna pracovních podmínek a optimalizace časového programu . . . . .	262
7.4.5.4	Stopová analýza. . . . .	270
7.4.5.5	Analýza složitých směsí, úprava vzorků . . . . .	271
7.4.6	Speciální techniky . . . . .	272
7.4.6.1	Mikrokolonová kapalinová chromatografie . . . . .	272
7.4.6.2	Preparativní kapalinová chromatografie . . . . .	274
7.4.6.3	Chromatografie optických izomerů. . . . .	275
7.4.6.4	Gelová chromatografie . . . . .	276
7.4.6.5	Afinitní chromatografie. . . . .	284
8	<b>SPOJENÍ CHROMATOGRFICKÝCH A SPEKTRÁLNÍCH METOD. . . . .</b>	<b>287</b>
8.1	Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS) . . . . .	287
8.1.1	Hmotnostní spektrometry . . . . .	288
8.2	Chromatografický vstup hmotnostního spektrometru . . . . .	292
8.2.1	Molekulové separátory . . . . .	293
8.2.2	Další podmínky pro práci molekulových separátorů . . . . .	294
8.3	Chromatogramy a hmotnostní spektra v technice GC/MS . . . . .	294
8.3.1	Chromatogramy v technice GC/MS . . . . .	295
8.3.2	Hmotnostní spektra v technice GC/MS . . . . .	295
8.3.3	Fragmentografie a hmotnostní chromatogramy . . . . .	296
8.4	Interpretace hmotnostních spekter . . . . .	297
8.5	Aplikace techniky GC/MS . . . . .	298
8.6	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). . . . .	299

8.6.1	Principy přímého spojení LC/MS . . . . .	299
8.7	Spojení kapalinové chromatografie se spektrometrií nukleární magnetické rezonance (LC/NMR) . . . . .	302
8.8	Spojení kapalinové chromatografie s infračervenou spektroskopií (LC/FTIR) . . . . .	302
8.9	Spojení kapalinové chromatografie se spektroskopií v ultrafialové a viditelné oblasti (LC/UV-VIS) . . . . .	303
9	<b>ELEKTROMIGRAČNÍ ZPŮSOBY ANALÝZY . . . . .</b>	<b>305</b>
9.1	Základní principy . . . . .	305
9.2	Zónová elektroforéza . . . . .	306
9.3	Elektroforéza s pohyblivým rozhraním . . . . .	307
9.4	Izoelektrická fokusace . . . . .	307
9.5	Izotachoforéza . . . . .	307
9.5.1	Výběr systému elektrolytů . . . . .	308
9.5.2	Optimalizace separačního procesu . . . . .	310
9.5.3	Přístrojová technika v kapilární izotachoforéze . . . . .	312
9.5.4	Kvalitativní analýza . . . . .	313
9.5.5	Kvantitativní analýza . . . . .	314
10	<b>PŘÍPRAVA VZORKU KE STOPOVÉ ANALÝZE . . . . .</b>	<b>317</b>
10.1	Odběr vzorků – obecná charakteristika . . . . .	319
10.2	Koncentrační techniky a úprava vzorků . . . . .	320
10.2.1	Extrakční techniky . . . . .	321
10.2.1.1	Extrakce tuhou látkou a sorbentem . . . . .	321
10.2.1.2	Extrakce kapalinou . . . . .	323
10.2.1.3	Extrakce plynem – analýza „head space“ . . . . .	324
10.2.2	Vymrazovací (kryogenní) techniky obohacování . . . . .	328
10.2.3	Metody využívající chemické reakce – aplikace reakční chromatografie . . . . .	329
11	<b>ANALYTICKÉ VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD V TECHNICKÉ PRAXI . . . . .</b>	<b>330</b>
12	<b>OTÁZKY, PŘÍKLADY, VÝPOČTY . . . . .</b>	<b>349</b>
13	<b>SEZNAM ČASTO POUŽÍVANÝCH SYMBOLŮ A ZAVEDENÁ TERMINOLOGIE . . . . .</b>	<b>360</b>
14	<b>CIZOJAZYČNÉ EKUIVALENTY NEJFREKVENTOVANĚJŠÍCH VÝRAZŮ . . . . .</b>	<b>365</b>
15	<b>SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY . . . . .</b>	<b>370</b>

Jedním z hlavních úkolů hospodářského a sociálního rozvoje každé společnosti je zefektivnění výrobních procesů, zvyšování produktivity práce a zejména zvyšování kvality výrobků v součinnosti s kontrolou a ochranou životního prostředí. Klíčovým bodem při řešení těchto úkolů je dokonalá znalost kvalitativního i kvantitativního složení surovin, meziproductů i finálních výrobků. Zvyšování kvality a důsledná kontrola životního prostředí si vyžadují zavádění progresivních způsobů analýzy do široké praxe.

Bouřlivý vývoj moderních separačních analytických metod v posledním dvacetiletí je charakteristický zaváděním mikroelektroniky v instrumentaci. Mikroprocesory a optoelektronické prvky zasahují významnou měrou do funkční úrovně analytické instrumentace a jsou základem všech robotizačních kroků, jejichž cílem je dosáhnout dobré reprodukovatelnosti výsledků a vysoké produktivity práce v kontrolních laboratořích. Současné trendy naznačují, že dochází k vzájemnému propojování separačních a spektrálních metod. Trendy vývoje analytické instrumentace je možno extrapolovat z frekvence publikovaných analytických metod, jež jsou uveřejňovány v hlavních analytických světových časopisech. Z přehledu je patrné, že skutečný rozvoj separačních analytických metod nastal až v roce 1965, tj. v době, kdy úroveň instrumentace dosáhla stupně, který jí umožnil masové nasazení v široké výzkumné i technické praxi. Četnost nově vyvinutých analytických metod, vyjadřovaná v procentech v posledních čtyřiceti letech a s výhledem do roku 1995, je patrná z tab. 1.1.

Tabulka 1.1. Přehled nově vyvinutých analytických metod

Metoda	Četnost (v %) v roce					
	1945	1955	1965	1975	1985	1995
analytická separace	1,5	2	12	27	35	36
analytická spektrometrie	14	26	28	30	30	28
elektrochemické analytické metody	4,5	6	10	13	15	16
radiochemické analytické metody	1	2	6	14	17	18
kolorimetrie	23	20	15	9	2	1
titrace	25	22	12	5	1	1
gravimetrie a ostatní metody	31	22	17	2	0	0

Analytická separace lsteč ~~z~~ analytických metod, používaných ~~pro~~ analytických

Hlavní dominantu v analytické ~~chemii~~ chemické. Spolu s elektromigračními metodami ~~z~~ představují dnes nejrozšířenější a ~~nejvýznamnější~~ před-

Základy chromatografie položil ~~chemik~~ chemik M. S. Cvet, který jako první ~~popisoval~~ popsal o půl století později se objevily ~~metody~~ metody i plynové chromatografie. Prvé práce ~~z~~ první v sedmdesátých letech byl Martinem a Syngem ~~z~~ z. V roce 1952 obdrželi Martin a Synges ~~práci~~ práci cenu. Bylo to spravedlivé uznání jejich ~~práci~~ práce a elektroforéza daly podnět k rozvoji ~~práci~~ práci zásadní výzkum v biochemii a medicíně ~~práci~~ práci převést organickou syntézu včetně ~~práci~~ práci.

I Československo přispělo významnou ~~práci~~ práci grafických a elektroforetických metod. Byl to ~~práci~~ práci pro analýzu plynů, později převedené do samostatného ~~práci~~ práci AV v Brně. Jeho činnost vycházela z průkopnických ~~práci~~ práci zabýval analýzou plynů v chromatografickém ~~práci~~ práci němu rozšíření a využití chromatografie nejen ~~práci~~ práci monografie o papírové chromatografii Haise a ~~práci~~ práci.

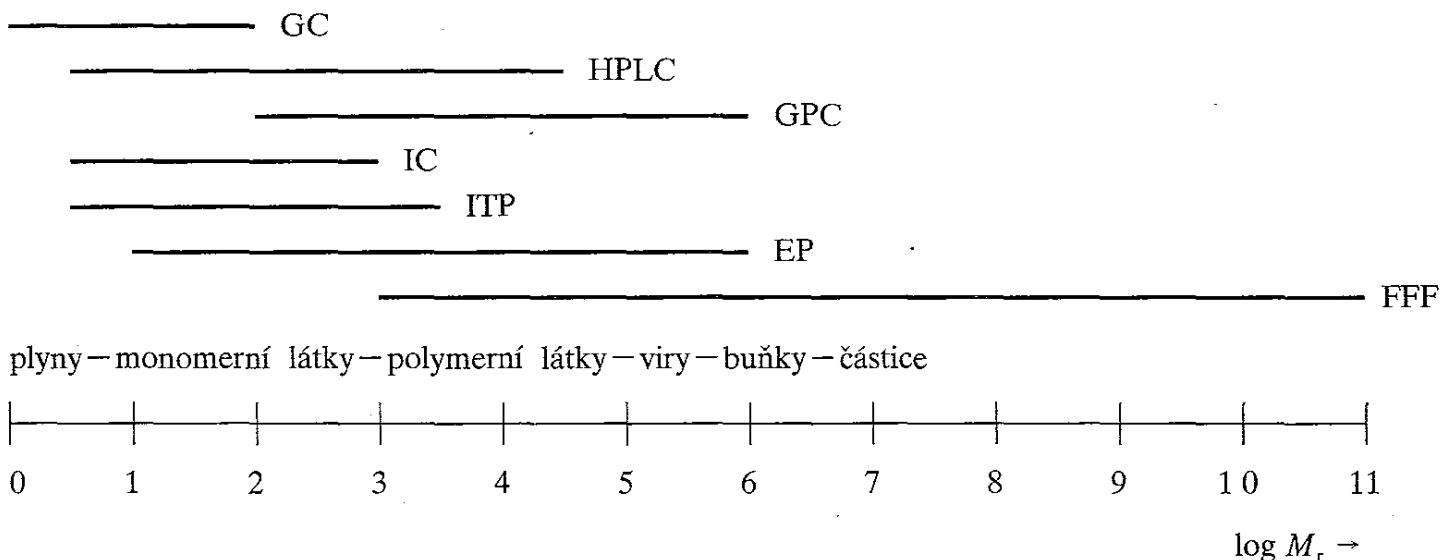
Rozsah působnosti chromatografických, elektroforetických ~~práci~~ práci metod z hlediska aplikace na separaci organických ~~práci~~ práci a anorganických sloučenin je velmi široký a pokrývá ~~práci~~ práci molekulových hmotnostech od plynů až po živé buňky ~~práci~~ práci 12.

Všechny moderní metodiky jsou charakterizovány ~~práci~~ práci mikro- až submikrometod a o rozvoj přístrojové techniky ~~práci~~ práci zační prvky, jež se týkají automatického dávkování, sběru ~~práci~~ práci dat s využitím přímého spojení přístrojů s počítačem, který ~~práci~~ práci ní úrovně novou kvalitou.

Metody analytické separace se uplatňují v oblasti stopové ~~práci~~ práci strukturní analýzy, analýzy vysokých obsahů a selektivní analýzy ~~práci~~ práci soustav. Ve všech těchto oblastech je pozornost zaměřena na ~~práci~~ práci a robotizaci na sebe vzájemně navazujících operací zasahujících ~~práci~~ práci k analýze přes jeho další zpracování (extrakci, izolaci, předseparaci ~~práci~~ práci) až po vysokoúčinnou chromatografickou techniku spojenou s automatickým ~~práci~~ práci vyhodnocením a záznamem.

V současné etapě vědeckotechnického pokroku nabývají výsledky ~~práci~~ práci analytickou chemií rozhodujícího významu, neboť jsou často podkladem ~~práci~~ práci rozhodnutí. Kromě průmyslu — a nejen chemického — je značný tlak na analytickou chemii vyvíjen i z tzv. sekundární sféry, z oblasti státní správy např. Státní technickou inspekcí ochrany ovzduší, hydrometeorologickými ústavy, inspektoráty kontroly

Tabulka 1.2. Rozsah působnosti analytických separačních metod



- GC – plynová chromatografie (Gas Chromatography)
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
- GPC – gelová chromatografie (Gel Permeation Chromatography)
- IC – iontová chromatografie (Ion Chromatography)
- ITP – izotachoforéza (Isotachopheresis)
- EP – elektroforéza (Electrophoresis)
- FFF – frakcionace průtokem silového pole (Field-Flow-Fractionation)

potravin, z oblasti zdravotnické hygienickou službou, klinickou diagnostikou a toxikologií a z oblasti zemědělství. Je požadována vysoká citlivost příslušné analytické metodiky, která by umožnila posunout mez stanovitelnosti sloučenin i prvků k co nejnižším hodnotám za současného zvyšování produktivity práce. Pro splnění všech těchto cílů mají nejlepší předpoklady právě metody chromatografické a elektroforetické, které ve spojení s metodami spektrálními budou v budoucnu zabezpečovat více než devadesát procent požadavků analýzy organických látek ve vzorcích nejrůznějších materiálů.

## 1.1 CHARAKTERISTIKA A ROZDĚLENÍ SEPARAČNÍCH METOD

Separační metody využívají různých fyzikálních, fyzikálně chemických a chemických vlastností složek vzorku k tomu, aby byl vzorek rozdělen alespoň na dva podíly odlišného složení. Cílem separace je zvýšení koncentrace jedné nebo více složek původního vzorku vzhledem k ostatním složkám přítomným ve vzorku. Separační metody je možno charakterizovat selektivitou, rozsahem použitelnosti a frakcionační kapacitou.

*Selektivita* označuje schopnost separační metody dělit látky na základě jedné nebo více vlastností. Tato vlastnost může být fyzikální, když jsou látky děleny např. na základě rozdílů v molekulových hmotnostech. Rozdíly v chemických vlastnostech jsou zpravidla způsobovány rozdílnými funkčními skupinami. Biochemické vlastnosti jsou vysoce specifické např. pro enzymy, což umožňuje jejich separaci. Zvláštním



případem je strukturální selektivita, kdy jsou látky děleny podle rozdílů ve tvaru molekuly. Někdy jsou tyto rozdíly malé, např. u cis- a trans-izomerů nebo u optických izomerů, ale existují separační metody, které jsou schopny tento typ izomerů selektivně dělit.

*Rozsah použitelnosti* charakterizuje schopnost separační metody dělit určitý typ vzorku vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem složek. Z tohoto hlediska můžeme separační techniku označit jako vhodnou pro separaci atomů, molekul nebo makromolekul, popř. vhodnou pro separaci látek těkavých nebo netěkavých.

*Frakcionační kapacita* udává maximální počet složek, který může být rozdělen v jediné operaci. Například jednoduchá extrakce může rozdělit vzorek na dvě části, plynová chromatografie na kapilárních kolónách na několik set piků. V prvním případě je frakcionační kapacita dvě, v druhém několik set.

Separací metody lze dále charakterizovat maximálním množstvím vzorku, které jsou schopny rozdělit v jediné operaci, nebo rychlostí, jakou se separační proces uskuteční. Tyto parametry většinou nejsou nezávislé a úzce souvisí s obtížností dělení, se složitostí vzorku atd.

Separacních metod je značné množství, ale ty nejdůležitější lze zařadit do dvou velkých skupin:

1. metody založené na rozdílech v rovnovážné fázové distribuci složek:

Tabulka 1.3. Separací metody založené na fázových rovnováhách

plyn – kapalina	plyn – tuhá látka	kapalina – kapalina	kapalina – tuhá fáze
destilace	sublimace	extrakce	srážení
pěnové dělení	separace na molekulových sítích	kapalinová rozdělovací (partiční) chromatografie	frakční krystalizace
plynová rozdělovací (partiční) chromatografie	plynová adsorpční chromatografie	gelová permeační chromatografie	separace na molekulových sítích
			zonální tavení
			kapalinová adsorpční chromatografie
			iontově výměnná chromatografie

Tabulka 1.4. Separací metody založené na rozdílech v rychlosti migrace

přes polopropustnou membránu	v silovém poli
ultrafiltrace	elektroforéza
obrácená osmóza	termodifúze
dialýza	ultračentrifugace
elektrodialýza	hmotnostní spektrometrie
	frakcionace tokem (FFF)
	izotachoforéza

2. metody založené na rozdílech v rychlosti migrace složek
  - a) přes polopropustnou membránu,
  - b) v silovém poli.

Přehledně jsou nejdůležitější metody uvedeny v tab. 1.3 a tab. 1.4.

## 1.2 TERMODYNAMIKA A ÚČINNOST SEPARACE

Většina separačních metod používaných v analytické chemii je založena na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze. Po dosažení rovnováhy může být distribuce složky A vyjádřena *distribuční konstantou*  $K_D$ , což je poměr rovnovážných koncentrací této složky ve dvou koexistujících fázích, např. fázích 1 a 2:

$$K_{D(A)} = \frac{[A]_1}{[A]_2} \quad (1.1)$$

K takto definované distribuční konstantě je nutno uvést několik poznámek. Z rovnice (1.1) je patrné, že  $K_D$  bude konstantní pouze v oboru velmi nízkých koncentrací. (Termodynamická distribuční konstanta, označovaná někdy symbolem  $K_D^\circ$ , musí být definována jako poměr aktivit a je funkcí pouze teploty a tlaku.) V literatuře je proto  $K_D$  často označována jako distribuční koeficient. Pokud složka A existuje v obou fázích v jediné formě, např. molekulární, lze vyjádřit vztah pro  $K_D$  pomocí rovnovážných látkových koncentrací:

$$K_{D(A)} = \frac{[A]_1}{[A]_2} = \frac{(n_A)_1 V_2}{(n_A)_2 V_1} \quad (1.2)$$

kde  $[A]_1$  a  $[A]_2$  jsou rovnovážné látkové koncentrace ve fázích 1 a 2,  $V_1$  a  $V_2$  – objemy těchto fází,  $(n_A)_1$  a  $(n_A)_2$  – látková množství. V otázce, která fáze má být uvedena v čitateli a která ve jmenovateli, existují určité konvence. V chromatografii se v čitateli uvádí fáze stacionární, v extrakci (distribuce složky mezi organickou a vodnou fází) je v čitateli fáze organická, při výměně iontů fáze měničová, při adsorpci adsorbent apod. Pokud taková konvence neexistuje, je třeba uvést, jak byla hodnota  $K_D$  vypočítána.

Separace předpokládá, že vzorek obsahuje minimálně dvě složky, které, mají-li být rozděleny metodami na základě fázových rovnováh, se musí lišit hodnotami  $K_D$ . Poměr distribučních konstant dvou složek se nazývá *separační faktor*  $\alpha$ . Alternativní názvy jsou separační poměr, separační koeficient, v chromatografii eluční, resp. retenční poměr, v destilaci relativní těkavost. Tyto pojmy nejsou identické, ale jejich výpočet vychází ze vztahu:

$$\alpha = \frac{K_{D(A)}}{K_{D(B)}} \quad (1.3)$$

Podle konvence se dosazují hodnoty  $K_D$  do poměru v rovnici (1.3) tak, aby  $\alpha > 1$ .

Pokud složky A a B existují v obou fázích v jediné formě, lze podle rovnice (1.2) vyjádřit separační faktor pomocí rovnovážných látkových koncentrací:

$$\alpha = \frac{[A]_1 [B]_2}{[A]_2 [B]_1} \quad (1.4)$$

Vhodnost použití separačního faktoru k popisu separace je problematická. Vysoké hodnoty  $\alpha$  by měly usnadňovat dělení obou složek, neboť znamenají vyšší látkovou koncentraci složky A ve fázi 1 a složky B ve fázi 2. Úspěch separace však závisí spíše na látkovém množství složky v každé fázi než na její koncentraci. Například docházeli k distribuci složky A mezi fáze 1 a 2 a z toho fáze 2 má stokrát větší objem než fáze 1, potom musí být  $K_{D(A)} = 100$ , aby se složka A rozdělila mezi obě fáze v poměru 1 : 1. Dále jsou důležité absolutní hodnoty distribučních konstant obou složek. Například mají-li složky A a B hodnoty  $K_{D(A)} = 6$  a  $K_{D(B)} = 2$ , přecházejí obě složky poměrně snadno do fáze 1. Jsou-li naopak hodnoty  $K_{D(A)} = 0,6$  a  $K_{D(B)} = 0,2$ , zůstávají obě složky převážně ve fázi 2 a přitom v obou případech máme stejnou hodnotu separačního faktoru.

Z výše uvedených důvodů je patrně nejvhodnější popsat účinnost separace jako podíl hmotnosti složky A ve fázi 1 (ze které může být izolována) k celkové hmotnosti složky A v separačním systému:

$$R_{(A)} = \frac{(m_A)_1}{(m_A)_1 + (m_A)_2} \quad (1.5)$$

kde  $R_{(A)}$  je *výtěžek* složky A.

Ve všech vztazích se předpokládá, že obě složky jsou ve fázi kapalné nebo plynné. Při adsorpci a podobných metodách se používají i jiné koncentrační jednotky než látková koncentrace.

### 1.3 SEPARAČNÍ METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÝCH ROVNOVÁHÁCH

S ohledem na to, že jednotlivým chromatografickým metodám a extrakci jsou věnovány samostatné kapitoly, budou zde stručně vysvětleny ostatní metody uvedené v tab. 1.3.

#### 1.3.1 Destilace

Destilaci lze charakterizovat jako fyzikální separační metodu, která umožňuje dělení složek kapalné směsi. Při zahřívání je část směsi převedena do parní fáze, odděleně zkondenzuje a získá se destilát obohacený těkavějšími složkami. Ve zbytku, v části, která nebyla odpařena, se koncentrují méně těkavé složky. Separace látek destilací se tedy uskutečňuje na základě jejich rozdílné těkavosti.

Pro systém, který se chová ideálně, platí základní termodynamické zákony. Pro kapalinu je to zákon Raoultův:

$$p_A = x_A p_A^\circ \quad (1.6)$$

kde  $p_A$  je parciální tlak složky A nad kapalinou,  $x_A$  – látkový zlomek složky A v kapalině,  $p_A^\circ$  – tlak par čisté složky A při teplotě systému a tlaku 101,3 kPa.

Pro plynnou fázi, která se chová jako ideální plyn, platí zákon Daltonův:

$$p_A = y_A p \quad (1.7)$$

kde  $y_A$  je látkový zlomek složky A v plynné fázi,  $p$  – celkový tlak systému.

Spojením obou zákonů dostaneme vztah platící pro rovnováhu mezi plynnou a kapalnou fází:

$$y_A = \frac{x_A p_A^\circ}{p} \quad (1.8)$$

Separční faktor  $\alpha$  [rovn. (1.3)], v destilaci nazývaný *relativní těkavost*, lze vyjádřit takto:

$$\alpha = \frac{K_{D(A)}}{K_{D(B)}} = \frac{y_A x_B}{y_B x_A} = \frac{p_A^\circ}{p_B^\circ} \quad (1.9)$$

Z rovnice (1.9) vyplývá, že v systému, který se chová ideálně, je relativní těkavost  $\alpha$  konstantou a nezávisí na poměru složek ve směsi. Předpoklad ideálního chování je v praxi splněn pouze v několika málo případech, kdy jsou destilačně děleny látky strukturně velmi blízké (izomery, stereoizomery). Většina kapalných směsí vykazuje pozitivní odchylku od vztahu (1.8), což znamená, že látkový zlomek těkavější složky v plynné fázi je vyšší, než by odpovídalo látkové koncentraci této složky v kapalně fázi. Odchylky od ideálního chování se měří experimentálně pomocí analýzy destilátu a zbytku. Z naměřených hodnot je možno vypočítat  $\gamma_A$ ,  $\gamma_B$  – aktivitní koeficienty složek A a B. Vztah pro relativní těkavost reálné binární směsi má potom tvar:

$$\alpha = \frac{\gamma_A p_A^\circ}{\gamma_B p_B^\circ} \quad (1.10)$$

Aktivitní koeficienty  $\gamma_A$  a  $\gamma_B$  jsou obecně funkcemi koncentrací, a proto i hodnota relativní těkavosti závisí na poměru koncentrací složek A a B.

Destilát je vždy obohacen těkavější složkou. Opakovaným odpařením destilátu stoupá obsah těkavější složky v párách, a tím se tato složka dále koncentruje. Tohoto efektu se využívá při *rektifikaci*. Vařák (baňka, kotlík) je opatřen rektifikační kolonou, která má nahoře zpětný chladič. Pouze malá část destilátu je z kolony odebírána, větší část se vrací jako *zpětný tok (reflux)* do kolony. Látkové množství zpětného toku dělené látkovým množstvím destilátu za stejný časový úsek se nazývá poměr zpětného toku (refluxní poměr). Kolona dosahuje maximální účinnosti při úplném zpětném toku. Dělicí účinnost kolony závisí jak na relativní těkavosti  $\alpha$ , tak i na počtu teoretických pater  $n$ , tj. na počtu postupných ustavení rovnováhy mezi kapalnou

a plynnou fází při průchodu kolonou. V rovnováze za předpokladu konstantní hodnoty relativní těkavosti  $\alpha$  platí pro rektifikaci binární směsi Fenskeho rovnice:

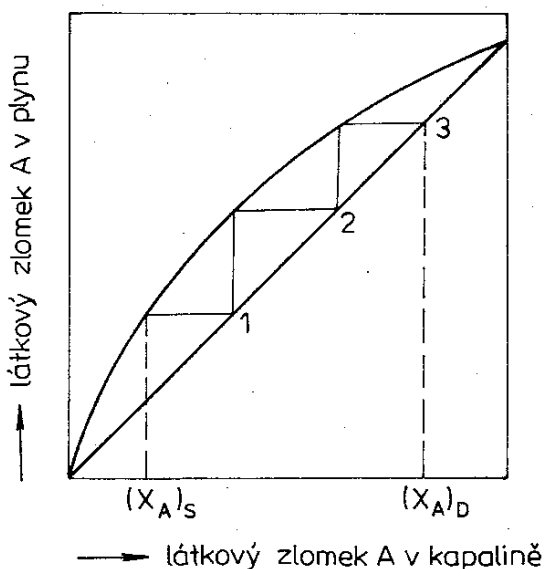
$$\frac{y_A x_B}{y_B x_A} = \alpha^n \quad (1.11)$$

Pro binární směs dále platí, že  $y_B = 1 - y_A$  a podobně  $x_B = 1 - x_A$ . U rektifikačních aparatur se předpokládá, že jedno teoretické patro se získá mezi vařákem a kolonou. Fenskeho rovnice má potom tvar:

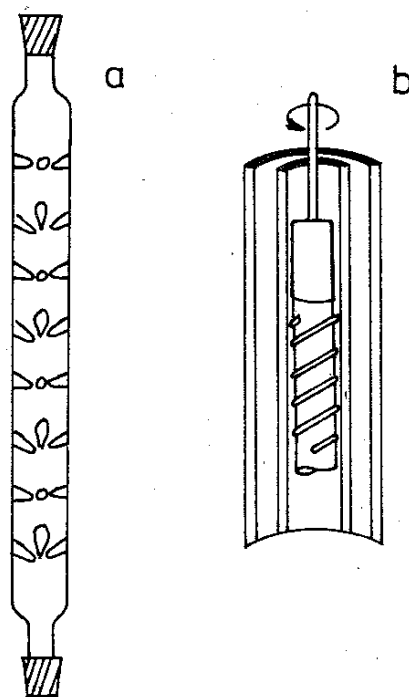
$$\frac{y_A}{1 - y_A} = \alpha^{n+1} \frac{x_A}{1 - x_A} \quad (1.12)$$

kde  $y_A$  a  $x_A$  jsou látkové zlomky těkavější složky v plynné a kapalně fázi.

Fenskeho rovnici lze použít ke stanovení počtu teoretických pater rektifikační kolony. V koloně se nechá ustavit rovnováha známé binární směsi a analyzuje se složení destilátu a zbytku. Hodnota relativní těkavosti přitom musí být známa.



Obr. 1. Diagram pro stanovení počtu teoretických pater  
 $(x_A)_S$ ,  $(x_A)_D$  – látkové zlomky těkavější složky ve výchozí směsi a v destilátu



Obr. 2. Rektifikační kolonky  
 a – Vigreux, b – rotační

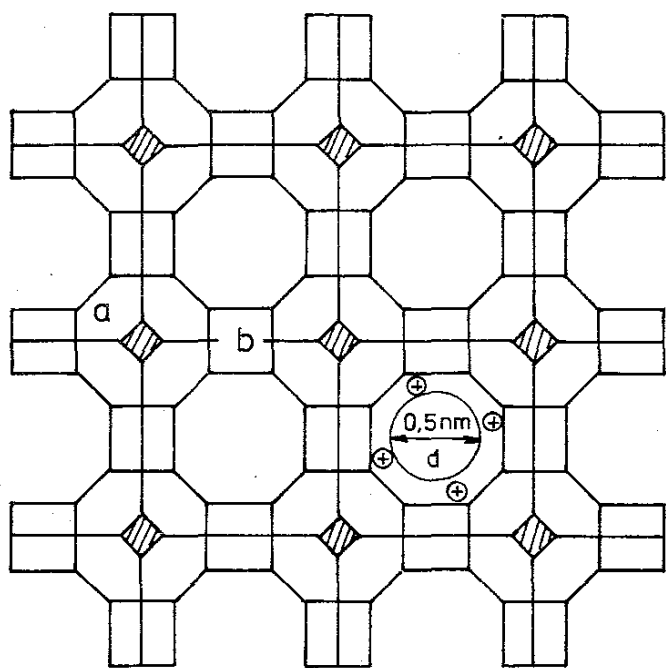
Při zjišťování počtu teoretických pater potřebných k získání destilátu o určitém složení se postupuje graficky. Je třeba mít k dispozici rovnovážný diagram kapalina–pára, který je doplněn přímkou v úhlu  $45^\circ$  (obr. 1). Tato přímka představuje stejné složení par a kapaliny na daném patře. Vycházíme ze složení v baňce  $(x_A)_S$ . Při zahřátí se dostaneme na křivku rovnovážného diagramu a po zkondenzování dostaneme kapalinu, jejíž složení odpovídá bodu 1. Postupně pokračujeme až do bodu 3, který odpovídá destilátu žádaného složení  $(x_A)_D$ . K získání tohoto destilátu je třeba kolonka s účinností tří teoretických pater.

V laboratořích jsou používány různé kolony lišící se účinností. Zatímco dříve používané kolony s prázdnou trubicí (obr. 2a) měly výškový ekvivalent teoretického patra  $H = 5$  až  $15$  cm ( $H = L/n$ , kde  $L$  je délka kolony v cm), moderní kolony s rotující výplní (obr. 2b) dosahují  $H = 0,3$  až  $0,5$  cm. Kolony délky 1 m mohou dosahovat účinnosti 200 teoretických pater, a tak oddělovat látky, které se liší bodem varu o  $0,5$  K.

V analytické chemii se destilace používá k získávání užších frakcí ze vzorků o širokém destilačním rozmezí. Získané frakce se potom analyzují dalšími separačními a identifikačními metodami. Často je destilace a rektifikace používána při analýze ropy, ropných a petrochemických produktů apod.

### 1.3.2 Separace na molekulových sítích

Tento druh separace je založen na *molekulově síťovém efektu*, ke kterému dochází, shodují-li se průměry pórů adsorbentu s molekulovými rozměry adsorbátu. Molekulová síta jsou např. syntetické zeolity (alumosilikáty), které krystalují v kubo-oktaedrických útvarech. Trojrozměrná krystalová mřížka je prostoupena pravidelným systémem dutin navzájem propojených otvory jednotných rozměrů. Po vykrytalování jsou dutiny naplněny vodou, ale působením zvýšené teploty a sníženého tlaku se voda odstraní. Molekulová síta mají dva typy dutin: malé dutiny uvnitř kubo-oktaedrů (nejsou využívány) a velké dutiny mezi kubo-oktaedry, jak ukazuje



Obr. 3. Řez krystalovou mřížkou molekulového síta 5A  
a – kubo-oktaedrická buňka, b – čtyři kyslíkové můstky

obr. 3. Vstup molekul adsorbátu do dutin je řízen vstupními otvory jednotné velikosti. Látky s *kritickým průměrem molekuly* (průměr největší kružnice opsané molekule v rovině kolmé na délku řetězce) menším, než je průměr vstupního otvoru dutinky, vstupují dovnitř a jsou zadržovány, molekuly s průměrem větším zůstávají vně v okolním médiu. Velikost otvoru je možno ovlivnit počtem a druhem kationtů přítomných v jednotkovém útvaru. V tabulce 1.5 je uveden přehled molekulových sít a jejich vlastností.

Tabulka 1.5. Molekulová síta a jejich vlastnosti

Typ	Složení	Efektivní průměr otvorů		Adsorbované látky <sup>1)</sup>
		nm		
3A	$K_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 2SiO_3$	0,38		He, H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub>
4A	$Na_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 2SiO_2$	0,42		CH <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>
5A	$CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 2SiO_2$	0,5		alkany, cyklopropan
10X	$CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 3SiO_2$	0,8		isoalkany, cyklohexan, benzen
13X	$Na_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 3SiO_2$	0,9		triethylbenzen

<sup>1)</sup> Síto zachycuje jak uvedené látky, tak i všechny látky s menším kritickým průměrem molekuly.

Molekulová síta se používají k odstraňování vody z plynů a kapalin, k separaci nízkomolekulárních látek v plynné fázi (GSC) a k separaci látek v kapalně fázi podle tvaru molekuly.

K odstranění vody je doporučováno síto 3A, které má kapacitu až 24 % hmotnosti síta a umožňuje snížit obsah vody pod  $10^{-4}$  hmotn. %.

V plynové chromatografii nacházejí uplatnění hlavně síta 5A a 13X, která velmi dobře dělí směsi permanentních plynů: H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO, popř. Ar. Zatímco na jiných náplních je dělení kyslíku a dusíku neobyčejně obtížné, molekulová síta rozdělí tyto plyny na kolonce délky 15 cm při teplotě 20 °C během několika sekund.

Separace na molekulových sítích v kapalně fázi našla největší uplatnění při dělení ropných frakcí. Síto 5A s efektivním průměrem otvorů 0,5 nm se výborně hodí pro izolaci nerozvětvených alkanů, které mají kritický průměr molekuly 0,49 nm. Kapacita síta je 10 až 33 g alkanu na 100 g síta. Ropné frakce se buď nechají protéci přes kolonu naplněnou práškovým sítím, nebo se povaří roztok frakce v inertním rozpouštědle (např. v isooktanu) s přebytkem molekulového síta. V obou případech zůstanou nerozvětvené alkany adsorbovány na sítu a do filtrátu přejdou ostatní typy uhlovodíků. Zpětné získání adsorbovaných alkanů je velmi obtížné. Síto je nutno buď rozložit kyselinami a nerozložený zbytek extrahovat, nebo lze síto extrahovat vroucím heptanem po dobu 24 hodin. Separace na molekulových sítích v kapalně fázi probíhá pomalu. I za zvýšené teploty je třeba často několik hodin k tomu, aby alkany vnikly do dutin síta. Je to způsobeno tím, že se molekula musí vzhledem k otvoru dutinky vhodně natočit. Separace na molekulových sítích v kapalně fázi se odlišuje od gelové permeační chromatografie kinetikou procesu.

### 1.3.3 Ostatní metody založené na fázových rovnováhách

*Pěnové dělení* představuje skupinu separačních metod založených na selektivní adsorpci na bublinách plynu, který prochází kapalinou (většinou vodou). Separovaná látka se koncentruje na fázovém rozhraní, tj. na pěně, která během separačního procesu vzniká. Vznik pěny usnadňují povrchově aktivní látky. Touto metodou může být čištěna řada biopolymerů (pepsin, albumin atd.). Některé ionty (např. Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>) lze izolovat z roztoku v pěně vytvořené pomocí aniontového tenzidu.

*Sublimace* spočívá v přímém vypařování tuhé látky bez toho, že by se v systému objevila kapalina. Jde o destilaci tuhé látky, při které teplota nesmí přesáhnout teplotu trojného bodu na diagramu  $p$ - $T$ . Při sublimaci jako separačním procesu může být sublimující složka produktem (a nečistoty zůstávají ve zbytku), nebo jsou sublimovány nečistoty a produktem je zbytek. V analýze ovzduší se sublimace využívá k izolaci polycyklických aromatických uhlovodíků z prachových částic.

*Zonální tavení* je metoda umožňující dodatečné vyčištění látek získaných krystalizací, popř. srážením. Základní podmínkou je snadná tavitelnost látky. Při čištění se vertikálně zavěšená trubice naplní látkou a pomalu se spouští dolů prstencem ohřátým na teplotu, která dovolí roztavení látky v úzké zóně. Po průchodu ohřivanou zónou látka opět tuhne (vykrystalizuje), ale nečistoty zůstávají v kapalně formě v oblasti ohřívání zóny. Výsledkem separace je čistá látka ve spodní části trubice a zkoncentrované nečistoty v horní části. Metoda má řadu modifikací a byla úspěšně použita k čištění fenolu, naftalenu atd.

## 1.4 METODY ZALOŽENÉ NA ROZDÍLECH V RYCHLOSTI MIGRACE

### 1.4.1 Separace přes polopropustnou membránu

Při těchto separacích jsou složky transportovány přes omezující rozhraní, kterým je polopropustná membrána. Nejjednodušší metodou je *ultrafiltrace*, která se používá k oddělování makromolekulárních látek a koloidů z roztoků. Působením hydrostatického tlaku procházejí molekuly rozpouštědla přes membránu, zatímco makromolekuly a koloidy, které jsou větší než otvory v membráně, jsou zadržovány. V případě, že velikost molekul separovaných látek je souměřitelná s velikostí molekul rozpouštědla, nelze použít k separaci mikroporézní membrány. Dělení látek s relativní molekulovou hmotností pod 500 se uskutečňuje na tzv. asymetrických nebo homogenních membránách a proces se nazývá *obrácená osmóza*. Použitý tlak je 10 až 30 MPa. Tímto způsobem lze např. odstraňovat sůl z vody.

*Dialýza* je membránová separace, při níž jsou hnací silou rozdílné koncentrace složky v kapalinách na obou stranách polopropustné přepážky. Na jedné straně přepážky je roztok vzorku a na druhé straně čisté rozpouštědlo. Rozdíl v koncentracích (koncentrační gradient) nutí rozpuštěnou látku přecházet do čistého rozpouštědla. Pokud je ve vzorku více látek schopných transportu přes membránu, budou látky s menším rozměrem molekuly přecházet rychleji. Rozpouštědlo s obsahem určité části vzorku se nazývá dialyzát. Rychlost transportu složek přes membránu postupně klesá se zmenšujícím se koncentračním gradientem. Zrychlení lze docílit pohybem obou kapalin, který může být protiproudný, souproudý nebo s křížovým tokem. Na obr. 4 je schéma protiproudné dialýzy. Látkový tok složky přes membránu  $J$  je dán látkovou bilancí:

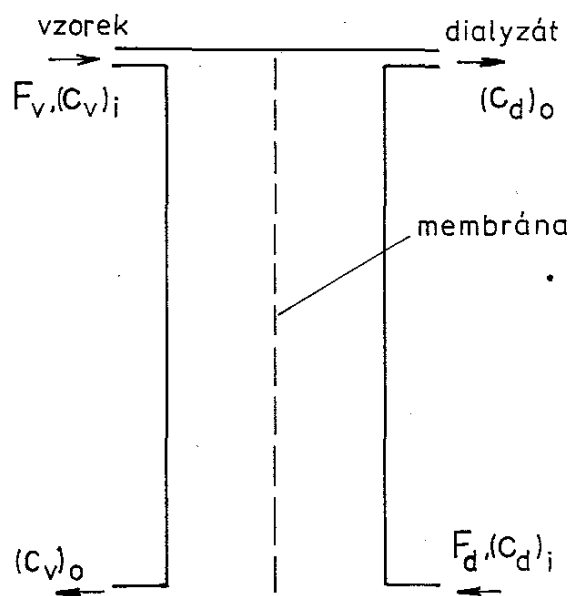
$$J = F_v(c_{v,i} - c_{v,o}) = F_d(c_{d,o} - c_{d,i}) \quad (1.13)$$



kde  $F$  je objemová rychlost (objemový průtok),  $c$  – látková koncentrace složky, indexy  $v$  a  $d$  označují vzorek a dialyzát a indexy  $i$  a  $o$  vstup a výstup (viz obr. 4). Jinak může být látkový tok  $J$  vyjádřen také vztahem:

$$J = k_D A (\overline{\Delta c}) \quad (1.14)$$

kde  $k_D$  je rychlostní konstanta, která závisí pro určitou látku na vlastnostech membrány,  $A$  – plocha membrány a  $\overline{\Delta c}$  – průměrný rozdíl koncentrací vzorku v obou kapalinách (daný jako logaritmický průměr vstupní a výstupní hodnoty).



Obr. 4. Schéma protiproudne dialýzy

$F_v, F_d$  – objemové průtoky vzorku a dialyzátu,  
 $(c)_i, (c)_o$  – odpovídající koncentrace dialyzované složky na vstupu a na výstupu ze systému

Dialýzu lze využít při odstraňování ionogenních složek z roztoků makromolekulárních látek a bílkovin. Na principu dialýzy pracuje umělá ledvina, která umožňuje odstranění močoviny, kreatinu a močové kyseliny z krve. *Elektrodialýza* se liší od dialýzy tím, že hnací silou transportu je elektrický potenciál. Tato technika, která slouží např. k odstraňování iontů, nemá zatím aplikaci v laboratorním měřítku, ale byla s úspěchem využita k odsolování mořské vody.

#### 1.4.2 Separace v silovém poli

Při těchto procesech dochází k dělení látek na základě jejich rozdílných migračních rychlostí v silovém poli, které může být tíhové, magnetické, teplotní nebo elektrické. Nejdůležitější procesy tohoto typu jsou ultracentrifugace, hmotnostní spektrometrie, termodifúze, frakcionace tokem v silovém poli, elektroforéza a izotachoforéza. V této kapitole budou uvedeny všechny metody kromě metod elektromigračních, které jsou náplní kapitoly 9.

*Ultracentrifugace* umožňuje migraci velkých molekul v homogenních roztocích. Působením odstředivé síly se molekuly pohybují směrem od středu otáčení a za nimi zůstává čistá kapalina. Pohyb rozhraní lze registrovat, a tak zjišťovat sedimentační rychlost. Na částici o jednotkové hmotnosti působí odstředivá síla, která se rovná

$r\omega^2$ , kde  $r$  je vzdálenost částice od středu otáčení a  $\omega$  je úhlová rychlost v radiánech za sekundu. Na částici o hmotnosti  $m$  v roztoku působí odstředivá síla daná vztahem:

$$F = m\omega^2 r \left( 1 - \frac{\rho}{\rho_p} \right) \quad (1.15)$$

kde  $\rho$  je hustota roztoku a  $\rho_p$  – hustota sedimentující částice. Pokud bude vzorek obsahovat dvě složky lišící se hustotou, budou jejich částice migrovat roztokem různou rychlostí. Na záznamu se objeví postupná sedimentace dvou složek. Rychlost sedimentace závisí na použité odstředivé síle, a proto byl zaveden sedimentační koeficient  $s$  jako sedimentační rychlost vztažená na jednotku odstředivé síly

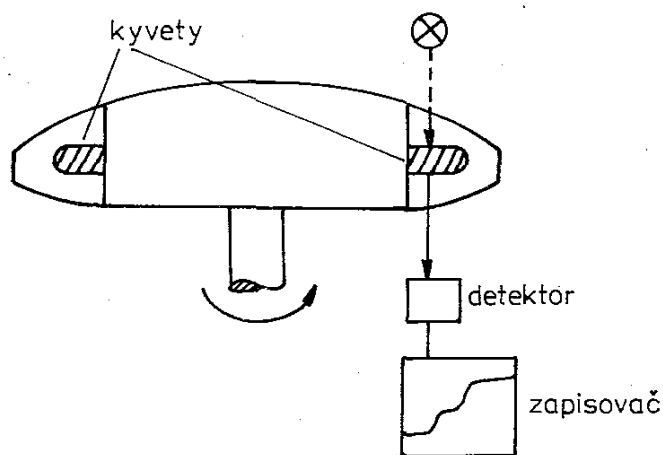
$$s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} \quad (1.16)$$

kde  $s$  má rozměr času.

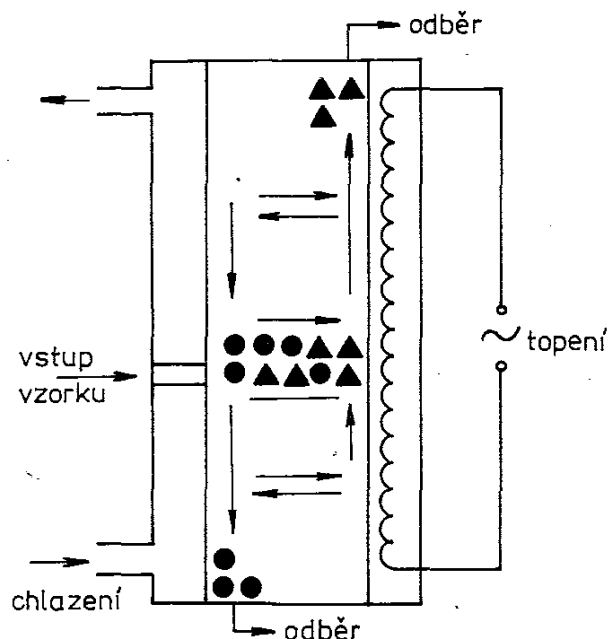
Ultracentrifuga musí umožňovat přesné měření otáček a udržování teploty. Není výjimkou použití otáček  $1\,000\text{ s}^{-1}$  a více. Analytické ultracentrifugy (obr. 5) mají malé kyvety a jsou vybaveny optickým systémem, který umožňuje sledovat koncentraci složek v různých místech kyvety. Ultracentrifugace je používána ke stanovení molekulové hmotnosti polymerů a k separaci biopolymerů a buněk.

*Hmotnostní spektrometrie (MS)* je založena na rozdílech v migraci urychlených molekulárních, popř. fragmentových iontů v magnetickém poli. I když je to separační metoda, neboť při ní dochází k separaci hmotných částic, ve většině případů je zařazena a probírána spolu s ostatními spektrálními metodami.

*Termodifúze* označuje pohyb molekul v plynech nebo kapalinách, způsobený teplotním gradientem. Molekuly složek umístěné mezi dvěma vertikálními stěnami, z nichž jedna je zahřívána a druhá chlazena, se pohybují termodifúzí ve směru kolmém na tyto stěny. Podle velikosti a tvaru molekuly se některé složky koncentrují u horké



Obr. 5. Ultracentrifuga s optickým systémem



Obr. 6. Schéma separace kapalné směsi termodifúzí

stěny, jiné u stěny chlazené. Rozdíly v hustotách potom způsobí, že složky se pohybují konvekcí: u horké stěny vzhůru, u chlazené dolů. Během postupu složek konvekcí se mnohonásobně opakuje termodifúze, a tím se dosahuje účinné separace (obr. 6). Vzdálenost obou desek musí být malá (ca 0,2 až 1,5 mm), neboť separace se zhoršuje se čtvrtou mocninou vzdálenosti. Pro dělení plyných směsí se používají chlazené skleněné trubky o světlosti ca 1 cm, v jejichž ose je napnut zahříváný drát. Termodifúzi lze charakterizovat jako tvarově selektivní separaci. V kapalně fázi lze např. separovat nerozvětvené alkany a isoalkany nebo isoalkany a cykloalkany. V horní části kolony se koncentrují dlouhé flexibilní molekuly, v dolní rigidní a kompaktní cyklické molekuly. V plyné fázi našla termodifúze použití při dělení izotopů chloru, methanů  $^{13}\text{C}$  a  $^{14}\text{C}$  apod.

*Frakcionace tokem v silovém poli* (Field Flow Fractionation, FFF) je jedna z novějších, zatím málo rozšířených separačních metod. Pokud si představíme kontinuálně pracující termodifúzi (přívod vzorku do poloviny výšky trubice a odtoky separovaných podílů nahoře a dole), potom jde o určitý případ FFF, v níž je silovým polem teplotní gradient. V obecném případě mohou být aplikována i další fyzikální pole (elektrické, tíhové, magnetické atd.). Uspořádání přístroje je značně podobné přístroji pro kapalinovou chromatografii: zásobník mobilní fáze, čerpadlo, zařízení pro nástřik vzorku, detektor a zapisovač. Namísto kolony je použita úzká štěrbin (kanál), v níž působí kolmo na její osu silové pole. Ve štěrbině migrují různou rychlostí různé složky podle rozdílů ve vlastnostech, které jsou ovlivňovány silovým polem. Mobilní fáze vytváří ve štěrbině rychlostní profil ve tvaru paraboly a různé složky se při své migraci dostávají do určitých částí tohoto profilu. Tím je potom určena jejich rychlost pohybu a složky jsou separovány. Aplikace FFF spočívá hlavně v separaci polymerů s relativní molekulovou hmotností v rozmezí  $10^3$  až  $10^{15}$  a metoda může být použita i k dělení buněk a mikroorganismů.

## 2.1 INTERAKCE ROZPUŠTĚNÉ LÁTKY S ROZPOUŠTĚDLEM A JEHO VOLBA. DISTRIBUČNÍ ROVNOVÁHA

Extrakce je dělicí metoda založená na distribuci složky mezi dvě fáze, buď tuhou a kapalnou, nebo mezi dvě kapalnou, v podstatě nemísitelné fáze. Její dělicí schopnost je podmíněna selektivní rozpustností látek (solutů) v rozpouštědlech (solventech). Přejít částice z tuhé fáze do roztoku nebo z jedné kapalnou fáze do druhé je způsoben interakcí molekul rozpouštědla s molekulami rozpouštěné látky. Selektivita působení rozpouštědla na solut závisí na povaze sil, které se uplatňují při rozpouštění. Volba vhodného rozpouštědla pak závisí na znalosti typu těchto interakcí a je důležitá nejen pro extrakční dělení, ale i pro výběr stacionární a mobilní fáze v rozdělovací chromatografii (viz dále).

Při rozpouštění látek se uplatňují tyto typy interakcí:

1. *Disperzní interakce* jsou velmi slabé a uplatňují se při rozpouštění nepolárních látek v nepolárních kapalinách. Zdrojem síly těchto interakcí je rychlá změna krátce existujících dipólů, jež vznikají při pohybu elektronů v molekule.
2. *Při interakci dipól–dipól* se uplatňují již větší síly, jejichž působením se molekuly rozpouštědla (např. vody) určitým způsobem orientují v prostoru, asociují, takže molekula solutu musí tyto přitažlivé síly mezi molekulami solventu překonat.
3. *Indukční interakce* nastává tehdy, když se nepolární molekule s elektrony  $\pi$  přiblíží polární molekula (dipól). Důsledkem indukční interakce je obecně solvatace, např. hydratace. Schopnost tvořit solváty mají tzv. aktivní rozpouštědla.
4. *Tvorba vodíkových můstků* je velmi silné interakce a může se uplatnit mezi dvěma různými molekulami (intermolekulární) nebo uvnitř téže molekuly (intra-molekulární). Atom vodíku tvořící můstek musí být vázán na atom F, O nebo N (výjimečně na atom C).

Pro volbu rozpouštědla k extrakci můžeme použít buď hrubý odhad, který vychází z klasického Liebigova pravidla: „Podobné se rozpouští v podobném“, nebo se použije semikvantitativního způsobu, který je založen na znalosti parametru rozpustnosti  $\delta$ , který zavedl Hildebrand v souvislosti s teorií tzv. regulárních roztoků. Pro kapalnou látku je parametr rozpustnosti definován jako  $\delta = (Q_{\text{výp}}/V)^{1/2}$ , pro tuhou látku je  $\delta = (Q_{\text{tání}}/m)^{1/2}$ , kde  $Q_{\text{výp}}$  je výparné teplo,  $Q_{\text{tání}}$  – teplo tání,  $V$  – objem a  $m$  – hmotnost. Látka se rozpouští tím lépe v určitém rozpouštědle, čím bližší jsou hodnoty  $\delta$  pro solut a solvent.

Parametr rozpustnosti je do určité míry měřítkem polaritý sloučeniny. Typ interakce solut–solvent je vyjádřen velikostí příspěvků  $\delta_d$ ,  $\delta_o$ ,  $\delta_a$ ,  $\delta_h$ , jimiž lze diferencovat podobné hodnoty  $\delta$  a podle nichž lze usuzovat na selektivitu rozpouštědla vzhledem k určitému solutu (viz tab. 2.1). Rozpouštědlo s velkou hodnotou  $\delta_d$  bude dobře rozpouštět sloučeniny s velkým indexem lomu, tj. látky aromatické, vyšší homology

Tabulka 2.1. Klasifikace rozpouštědel

Rozpouštědlo	$\delta$	$\delta_d$	$\delta_o$	$\delta_a$	$\delta_h$
pentan	7,1	7,1	0	0	0
diethylether	7,4	6,7	2	2	0
triethylamin	7,5	7,5	0	3,5	0
cyklohexan	8,2	8,2	0	0	0
tetrachlormethan	8,6	8,6	0	0,5	0
octan ethylnatý	8,6	7,0	3	2	0
propylamin	8,7	7,3	4	6,5	0,5
toluen	8,9	8,9	0	0,5	0
trichlormethan	9,1	8,1	3	0,5	0,3
tetrahydrofuran	9,1	7,6	4	3	0
benzen	9,2	9,2	0	0,5	0
aceton	9,4	6,8	5	2,5	0
dichlormethan	9,6	6,4	5,5	0,5	0
sirouhlík	10,0	10,0	0	0,5	0
propanol	10,2	7,2	2,5	4	4
pyridin	10,4	9,0	4	5	0
nitromethan	11,0	7,3	8	1	0
dimethylformamid	11,5	7,9	—	—	—
acetonitril	11,8	6,5	8	2,5	0
dimethylsulfoxid	12,8	8,4	7,5	5	0
methanol	12,9	6,2	5	7,5	7,5

sloučenin a deriváty obsahující halogeny a síru. Rozpouštědlo s velkou hodnotou  $\delta_o$  bude přednostně rozpouštět sloučeniny s větším dipólovým momentem (nitrosloučeniny, amidy, nitrily, sulfoxidy). Velká hodnota  $\delta_a$  nebo  $\delta_h$  poukazuje na schopnost rozpouštědla vytvářet vodíkové můstky tím, že je buď akceptorem, nebo donorem vodíku. Rozpouštědlo s velkou hodnotou  $\delta_a$  bude tedy vhodné pro rozpouštění sloučenin se skupinou —OH (kyseliny, fenoly), rozpouštědlo s velkou hodnotou  $\delta_h$  bude vhodné k rozpouštění bazických sloučenin (aminů, sulfoxidů apod.).

Při extrakci se dosahuje distribuční rovnováhy po určité době kontaktu obou fází. Uvážíme-li distribuci složky A mezi dvě nemísitelné kapalně fáze (I a II), pak pro rovnováhu platí, že

$$dG = 0 \quad (2.1)$$

kde  $G$  je Gibbsova energie. Jelikož objemovou práci, kterou systém vykonal ( $p \Delta V$ ), můžeme v tomto případě zanedbat, platí, že  $G \approx A$ , tj. Gibbsova energie se rovná přibližně Helmholtzově energii ( $A$ ). Změna  $dA$  se rovná

$$dA = \left( \frac{\partial A}{\partial T} \right)_{p, n_{AI}, n_{AII}} dT + \left( \frac{\partial A}{\partial p} \right)_{T, n_{AI}, n_{AII}} dp - \left( \frac{\partial A}{\partial n_{AI}} \right)_{T, p, n_{AII}} dn_{AI} + \left( \frac{\partial A}{\partial n_{AII}} \right)_{T, p, n_{AI}} dn_{AII} \quad (2.2)$$

za předpokladu, že složka A přechází z fáze I do fáze II. Jelikož  $(\partial A / \partial n_i) dn_i$  je chemický potenciál složky  $i$  ( $\mu_i$ ), pak v rovnováze při  $dA = 0$  a  $T = \text{konst}$ ,  $p = \text{konst}$  a je-li fáze I vodná a fáze II organická, platí

$$\mu_{A, \text{aq}} dn_{A, \text{aq}} = \mu_{A, \text{org}} dn_{A, \text{org}} \quad (2.3)$$

takže rovnováha při extrakci se ustavuje při dosažení rovnosti chemických potenciálů složky A v obou fázích:

$$\mu_{A, \text{aq}} = \mu_{A, \text{org}} \quad (2.4)$$

Vyjádríme-li chemický potenciál pomocí příslušného standardního chemického potenciálu  $\mu^\circ$ , platí

$$\mu_{A, \text{aq}}^\circ + RT \ln a_{A, \text{aq}} = \mu_{A, \text{org}}^\circ + RT \ln a_{A, \text{org}} \quad (2.5)$$

kde  $a$  je aktivita. Po vyjádření aktivit pomocí látkových koncentrací bude

$$\mu_{A, \text{aq}}^\circ + RT (\ln [A]_{\text{aq}} + \ln y_{A, \text{aq}}) = \mu_{A, \text{org}}^\circ + RT (\ln [A]_{\text{org}} + \ln y_{A, \text{org}}) \quad (2.6)$$

kde  $[A]$  jsou rovnovážné látkové koncentrace složky A a  $y_A$  jsou aktivní koeficienty.

Pro poměr rovnovážných látkových koncentrací složky v obou fázích pak vychází

$$\frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}} = \frac{y_{A, \text{aq}}}{y_{A, \text{org}}} \exp \left[ \frac{\mu_{A, \text{aq}}^\circ - \mu_{A, \text{org}}^\circ}{RT} \right] \quad (2.7)$$

Pokud uvažujeme velmi zředěné roztoky, pak  $y_{A, \text{aq}} = y_{A, \text{org}} = 1$ , a pokud předpokládáme, že obě rozpouštědla jsou dokonale nemísitelná, je rozdíl obou standardních chemických potenciálů ve vztahu (2.7) také konstantní. Při  $T = \text{konst}$  pak platí, že poměr rovnovážných koncentrací složky v obou fázích je konstantní (Nernstův rozdělovací zákon):

$$\frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}} = K_D \quad (2.8)$$

Konstanta  $K_D$  se nazývá *rozdělovací konstanta*.

Tento poměr je konstantní tehdy, pokud se částice A vyskytuje v organické i vodné fázi v téže (tj. jediné) formě, tedy látková koncentrace  $c_A = [A]$ . Jestliže

v některé fázi, nejčastěji vodné, tvoří extrahovaná částice více forem, vyjadřuje rovnovážný stav tzv. *rozdělovací (distribuční) koncentrační poměr*  $D_c$ .

$$D_c = \frac{c_{A,org}}{c_{A,aq}} \quad (2.9)$$

Rozdíl mezi  $K_D$  a  $D_c$  můžeme vysvětlit např. na extrakci pyridinu (slabé jednosytné zásady B) z vodné do organické fáze. Zatímco rozdělovací konstanta určuje poměr aktivit (resp. koncentrací) pyridinu (jako báze) v obou fázích

$$K_D = \frac{[B]_{org}}{[B]_{aq}} \quad (2.10)$$

určuje  $D_c$  poměr *celkových* rovnovážných koncentrací pyridinu v obou fázích. Pokud v organické fázi nedochází k žádné vzájemné interakci mezi molekulami B, je  $c_{B,org} = [B]_{org}$ . Ve vodné fázi se však může B protonizovat takže  $c_{B,aq} = [B]_{aq} + [HB]_{aq}$ . S použitím vztahu (2.10) a vztahu pro protonizační konstantu pyridinu ( $\beta_{H1} = [BH^+]_{aq}/[B]_{aq}[H^+]_{aq}$ ) získáme pro  $D_c$  pyridinu vztah

$$D_c = \frac{[B]_{org}}{[B]_{aq} + [BH^+]_{aq}} = K_D (1 + \beta_{H1}[H^+]_{aq})^{-1} \quad (2.11)$$

Tedy obecně  $K_D \neq D_c$ .

Zde je třeba upozornit, že  $K_D$  je definována pro přechod složky z vodné (polární) do organické (méně polární) fáze. V kapalinové rozdělovací chromatografii (LLC) s normálním poměrem fází (mobilní fáze je méně polární než stacionární fáze) má hodnota  $K_D$  používaná např. ve vztahu pro  $V_R = f(V_-, V_+)$  převrácenou hodnotu rozdělovací konstanty pro extrakci.

## 2.2 EXTRAKCE TUHÉ LÁTKY KAPALINOU

Používá se nejčastěji k izolaci jedné nebo více složek z přírodního materiálu nebo z technických produktů. Extrahuje se obvykle v přístroji, v kterém se jednoduchým způsobem realizuje opakovaná extrakce, aby výtěžek izolace byl co největší. Materiál, z něhož složku extrahujeme, se musí obvykle rozmělnit. Rozpouštědlo volíme tak, aby se v něm co nejselektivněji rozpouštěla složka, kterou chceme izolovat. Je výhodné, má-li použité rozpouštědlo nízký bod varu, aby je bylo možno odstranit destilací od izolované složky, aniž by došlo k jejím ztrátám těkáním. Nejčastěji používaným přístrojem pro extrakci tuhé látky kapalinou je Soxhletův extraktor nebo extraktor podle Twisselmana. Jejich funkce je podobná a lze ji objasnit na příkladu izolace tuku z olejniny (semene).

Vzorek olejniny se rozmělní a naváží se do tvarovaného papírového zásobníku (tzv. patrony), který se uzavře vatou, zbavenou extrahovatelných složek. Zásobník se vzorkem se vloží do střední části extraktoru, která se nasadí na varnou baňku s vhodným rozpouštědlem (např. hexanem, petroletherem). Na střední část se nasadí

zpětný chladič. Rozpouštědlo v baňce se uvede do mírného varu, jeho páry stoupají postranní trubicí do zpětného chladiče, kde kondenzují, a kondenzát kape na patronu ve střední části extraktoru. Objem rozpouštědla ve střední části se postupně zvětšuje, rozpouštědlo přitom extrahuje tuk ze vzorku a když hladina rozpouštědla dosáhne ohybu prepádové trubičky, přeteče roztok tuku v rozpouštědle zpět do destilační baňky, což se několikrát opakuje. Když je všechn tuk extrahován, rozpouštědlo se z baňky oddestiluje, jeho poslední zbytky se odstraní v sušárně a přírůstek hmotnosti destilační baňky se rovná hmotnosti izolovaného tuku.

## 2.3 EXTRAKCE Z KAPALINY DO KAPALINY

Výběr vhodných podmínek pro dělení látek extrakcí z kapaliny do kapaliny je složitější než při extrakci tuhé látky kapalinou. Obecně platí, že částice, jež má přejít přes fázové rozhraní z vodné do organické fáze, musí být elektroneutrální. Způsob, kterým splníme tuto podmínku, je u organických látek (kovalentních sloučenin) jiný než u látek anorganických (iontových sloučenin).

### 2.3.1 Extrakce organických látek

Pokud není organická látka protolyt, splňuje uvedenou podmínku elektroneutrality (tj. nemá žádný náboj). Pro dosažení velkého výtěžku extrakce stačí najít vhodné rozpouštědlo, tedy takové, v němž se látka dobře rozpouští a jež je téměř nemísitelné (nebo omezeně mísitelné) s vodou. K odhadu hodnoty rozdělovací konstanty stačí vypočítat poměr rozpustnosti látky v organickém rozpouštědle a ve vodě.

Je-li organická látka protolyt (tj. kyselina nebo zásada), je třeba nalézt vhodné rozmezí pH vodného roztoku pro maximální možný výtěžek extrakce v určité extrakční soustavě. Pro organickou zásadu (jednosytnou) je to takové rozmezí pH, v němž pro druhý člen v závorce vztahu (2.11) platí  $\beta_{H1}[H^-] \ll 1$ .

Pro rozdělovací poměr jednosytné organické kyseliny HA platí obdobně

$$D_c = \frac{[HA]_{org}}{[HA]_{aq} + [A^-]_{aq}} = \frac{K_D}{1 + (\beta_{H1}[H^+])^{-1}} = K_D \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad (2.12)$$

kde  $K_a$  je disociační konstanta kyseliny, takže pro extrakci organické jednosytné kyseliny bude mít pH takové rozmezí hodnot, pro něž platí, že  $\beta_{H1}[H^+] \gg 1$ .

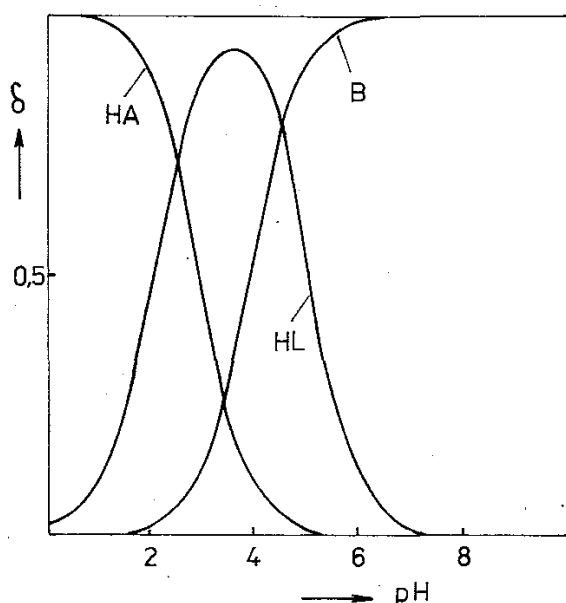
Vhodné rozmezí pH pro extrakci slabých organických kyselin a zásad se najde nejlépe z tzv. distribučního diagramu, který je v tomto případě grafickým vyjádřením závislosti distribučního koeficientu  $\delta$  na pH. Distribuční koeficient elektroneutrální (extrahovatelné) částice je pro jednosytnou kyselinu HA  $\delta = [HA]/([HA] + [A^-]) = 1/(1 + K_a[H^+]^{-1})$  a pro jednosytnou zásadu B  $\delta = [B]/([BH^+] + [B]) = 1/(1 + [H^+]K_a^{-1})$ , kde  $K_a$  je v tomto případě disociační konstanta konjugované kyseliny  $BH^+$ . Pro extrakci je vhodná taková oblast pH, kde  $\delta$  má maximální hodnotu a nemění se.



U elektroneutrálních amfolytů je oblast optimálního pH pro extrakci mnohem užší než u kyselin nebo zásad. Distribuční koeficient elektroneutrálního amfolytu HL je

$$\delta[\text{HL}]/([\text{H}_2\text{L}^+] + [\text{HL}] + [\text{L}^-]) = 1/([\text{H}^+] K_{a1}^{-1} + 1 + K_{a2}[\text{H}^+]^{-1}) \quad (2.13)$$

Distribuční diagramy kyseliny HA, zásady B a amfolytu HL jsou na obr. 7.



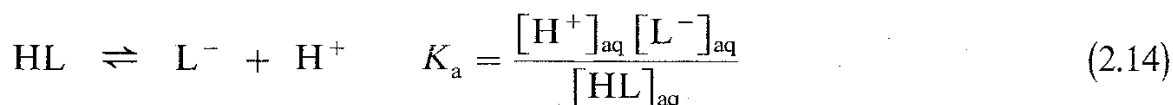
Obr. 7. Distribuční diagramy kyseliny HA ( $pK_a = 3$ ), zásady B ( $pK_a = 4$ ) a amfolytu HL ( $pK_{a1} = 2$ ,  $pK_{a2} = 5$ )

### 2.3.2 Extrakce anorganických látek

Většina anorganických látek je iontové povahy. K převedení iontu z vodné fáze přes fázové rozhraní do fáze organické je třeba odstranit náboj iontu. Dosáhne se toho buď tvorbou chelátu (elektroneutrálního), nebo tvorbou iontového asociátu.

#### 2.3.2.1 Extrakce kovových chelátů

Uvažujme nejprve ideální extrakční soustavu, v níž probíhají pouze tyto rovnováhy kovového iontu  $M^{n+}$  a chelatotvorného činidla HL s příslušnými konstantami a nedochází k žádným změnám extrahované částice v organické fázi: disociace činidla:

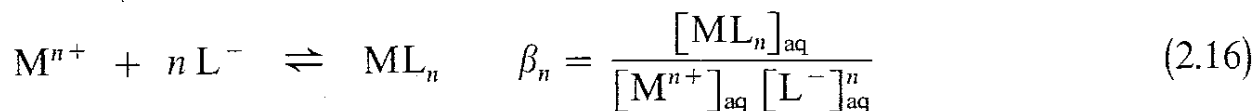


distribuce činidla (č) mezi vodnou a organickou fází:

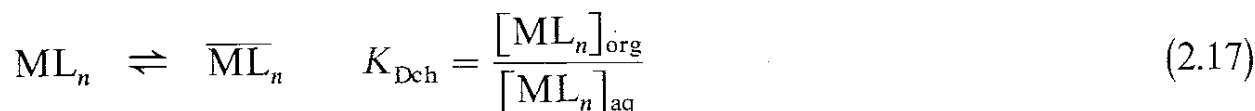


(v rovnicích značí pruh nad symbolem přítomnost částice v organické fázi)

tvorba chelátu (elektroneutrálního):



extrakce chelátu (ch):



Rozdělovací (koncentrační) poměr kovu je

$$D_M = \frac{c_{M,\text{org}}}{c_{M,\text{aq}}} \quad (2.18)$$

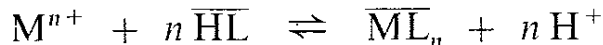
Vzhledem k podmínkám vymežujícím ideální soustavu platí, že

$$D_M = \frac{[\overline{ML}_n]_{\text{org}}}{[M^{n+}]_{\text{aq}}} \quad (2.19)$$

Po dosazení z rovn. (2.14 až 2.17) získáme

$$D_M = \frac{K_{\text{Dch}} \beta_n K_a^n}{K_{\text{Dc}}^n} \frac{[\text{HL}]_{\text{org}}^n}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}^n} = K_{\text{ex}} \left( \frac{[\text{HL}]_{\text{org}}}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}} \right)^n \quad (2.20)$$

Konstanta  $K_{\text{ex}}$  se nazývá *extrakční konstanta* a je vlastně rovnovážnou konstantou reakce (dvoufázové)



Pro teoretické studium extrakce chelátu obvykle vyjadřujeme závislost  $\log D_M$  na pH; zlogaritmováním vztahu (2.20) a úpravou dostaneme

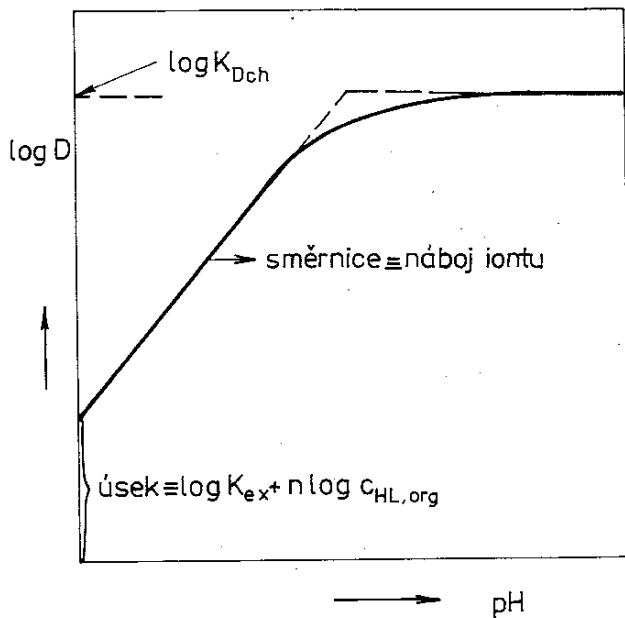
$$\log D_M = \log K_{\text{ex}} + n \log [\text{HL}]_{\text{org}} + n \text{pH} \quad (2.21)$$

V praxi často volíme  $c_{\text{HL}} \gg c_M$ , pak se při extrakci původní koncentrace činidla v podstatě nemění, je konstantní a vztah (2.21) můžeme psát jako

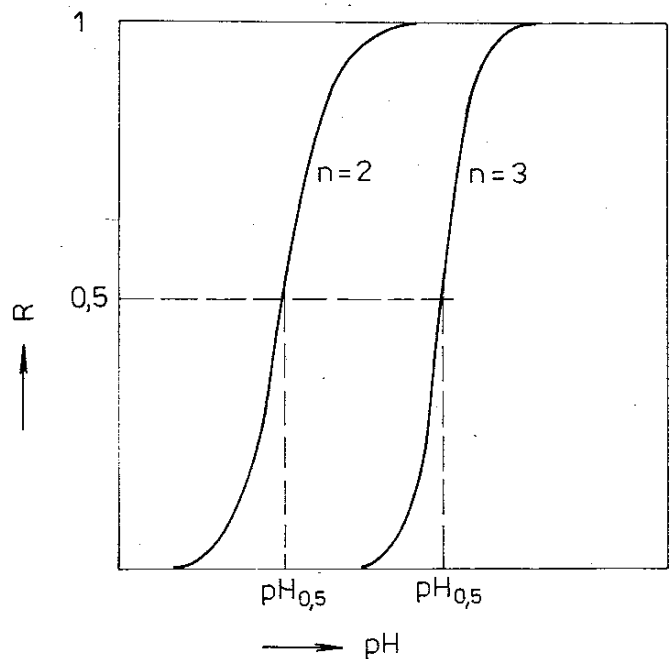
$$\log D_M = k + n \text{pH} \quad (2.22)$$

Podle této přímkové závislosti roste  $\log D_M$  s pH, pokud ve vodném roztoku převládá ion  $M^{n+}$ . Jsou-li v roztoku takové podmínky, že převládá částice  $ML_n$ , přestává záviset  $D_M$  na  $[\text{H}^+]$ , takže závislost  $\log D_M = f(\text{pH})$  pro  $[\text{HL}]_{\text{org}} = \text{konst}$  má tvar uvedený v obr. 8.

Někdy je výhodné použít k extrakci menší než stechiometrické množství činidla. Jde potom o tzv. *substechiometrickou extrakci*, jejíž předností je, že použitým látkovým množstvím činidla můžeme řídit látkové množství kovu převedené do organické fáze. Předpokladem však je, že stabilita extrahovaného chelátu je dostatečně velká a že zvolíme vhodné pH vodné fáze (vyšší než tzv. prahové pH). Substechiometrická extrakce se používá při radiometrických metodách analýzy (při neutronové aktivační analýze a izotopovém zředování).



Obr. 8. Závislost  $\log D$  na  $\text{pH}$  při ideálním průběhu extrakce chelátu  $\text{ML}_n$



Obr. 9. Závislost výtěžku extrakce ( $R$ ) na  $\text{pH}$  pro ionty s různým nábojem a různou hodnotou extrakční konstanty  $K_{ex}$  při extrakci chelátu  $\text{ML}_n$  (konstantní koncentrace činidla a  $V_{org} = V_{aq}$ )

Pro praktické posouzení vhodnosti extrakční soustavy je výhodné sledovat závislost výtěžku extrakce  $R$  [definovaného rovn. (1.5)] na  $\text{pH}$ . Získáme sigmoidní křivky (obr. 9), jejichž část kolem inflexního bodu je téměř lineární a má směrnici rovnou náboji extrahovaného iontu. Hodnota  $\text{pH}$ , při níž proběhne extrakce z 50 % (výtěžek  $R = 0,5$  při  $r = V_{org}/V_{aq} = 1$ , kde  $V_{org}$  je objem organické fáze a  $V_{aq}$  – objem vodné fáze), se nazývá  $\text{pH}$  poloviční extrakce ( $\text{pH}_{0,5}$ ) a je užitečnou hodnotou pro posouzení dělitelnosti dvou kovových iontů extrakcí jejich chelátů závislou na hodnotě  $K_{ex}$ :

$$\text{pH}_{0,5} = -\frac{1}{n} \log K_{ex} - \log [\text{HL}]_{org} \quad (2.23)$$

V reálných soustavách se při extrakci chelátů uplatní kromě rovnováh popsaných vztahy (2.14) až (2.17) ještě rovnováhy další. Pro kvantitativní popis reálných extrakčních soustav je výhodnější uvažovat extrakční rovnováhu



s extrakční konstantou

$$\kappa_{ex} = \frac{[\overline{\text{ML}}_n]_{org}}{[\text{M}^{n+}]_{aq} [\text{L}^-]_{aq}^n} \quad (2.24)$$

kteřou lze vyjádřit pomocí dílčích rovnováh (2.16) a (2.17) jako

$$\kappa_{ex} = K_{Dch} \beta_n \quad (2.25)$$

Rozdělovací poměr kovu  $D_M$  v ideální soustavě by se vypočítal pomocí této extrakční konstanty takto:

$$D_M = \frac{[ML_n]_{\text{org}}}{[M^{n+}]_{\text{aq}}} = \kappa_{\text{ex}} [L^-]_{\text{aq}}^n \quad (2.26)$$

Poněvadž se v literatuře uvádějí častěji extrakční konstanty  $K_{\text{ex}}$ , je výhodné znát vztah mezi  $\kappa_{\text{ex}}$  a  $K_{\text{ex}}$ :

$$\kappa_{\text{ex}} = K_{\text{ex}} (K_{\text{Dc}}/K_a)^n \quad (2.27)$$

který lze odvodit z rovnosti  $D_M$  ze vztahů (2.20) a (2.26).

Další rovnováhy, které se v reálných soustavách uplatní, považujeme za tzv. vedlejší reakce a pak je výhodné počítat s tzv. podmíněnou extrakční konstantou  $\kappa'_{\text{ex}}$  a podmíněnou koncentrací  $[L']_{\text{aq}}$

$$D_M = \kappa'_{\text{ex}} [L']_{\text{aq}}^n \quad (2.28)$$

Vedlejšími reakcemi kovového iontu jsou nejčastěji tvorba jiných než elektro-neutrálních komplexů s L, tvorba hydroxokomplexů (hydrolýzou iontu  $M^{n+}$ ), komplexů se složkami tlumivého roztoku, s maskujícími činidly apod. Jelikož se do vztahu (2.28) dosazuje koncentrace aniontu ve vodné fázi a obvykle je známa koncentrace extrakčního činidla ve fázi organické, přepočteme  $c_{\text{HL,org}}$  na koncentraci, jakou by činidlo mělo, kdyby bylo veškeré převedeno do vodné fáze, a to ze vztahu

$$c_{\text{HL,org}} V_{\text{org}} = [L']_{\text{aq}} V_{\text{aq}} \quad (2.29)$$

a protonizaci  $L^-$  na HL i přechod této částice zpět do organické fáze považujeme za vedlejší reakce.

Podmíněná extrakční konstanta  $\kappa'_{\text{ex}}$  se vypočte z hodnoty konstanty  $\kappa_{\text{ex}}$  takto:

$$\kappa'_{\text{ex}} = \kappa_{\text{ex}} \frac{\alpha_{M1} \alpha_{n,\text{org}}}{\alpha_M \alpha_L^n} \quad (2.30)$$

kde  $\alpha$  jsou koeficienty vedlejších reakcí. Jsou definovány jako podíl podmíněné koncentrace (nejčastěji celkové) ke koncentraci rovnovážné, např.

$$\alpha_M = [M']/[M^{n+}] \quad (2.31)$$

Nenastává-li žádná vedlejší reakce, je  $\alpha = 1$ , neboť  $[M'] = [M^{n+}]$ . Čím větší je hodnota  $\alpha$ , tím hlouběji proběhla vedlejší reakce. Koeficient vedlejší reakce kovového iontu např. s hydroxidovými ionty  $\alpha_{\text{M(OH)}}$  se rovná

$$\begin{aligned} \alpha_{\text{M(OH)}} &= \frac{[M^{n+}] + [M(\text{OH})_1^{(n-1)+}] + [M(\text{OH})_2^{(n-2)+}] + \dots + [M(\text{OH})_x^{(n-x)+}]}{[M^{n+}]} = \\ &= 1 + \beta_1 [\text{OH}^-] + \beta_2 [\text{OH}^-]^2 + \dots + \beta_x [\text{OH}^-]^x \end{aligned} \quad (2.32)$$

Podobně  $\alpha_{\text{M(X)}}$ ,

$$\alpha_{\text{M(X)}} = 1 + \beta_1 [\text{X}] + \beta_2 [\text{X}]^2 + \dots \quad (2.33)$$

a celkový koeficient vedlejší reakce  $\alpha_M$  je dán součtem dílčích koeficientů vedlejších reakcí, zmenšenému o  $(p - 1)$ , kde  $p$  je počet dílčích koeficientů vedlejších reakcí. V každém dílčím koeficientu vedlejší reakce se totiž počítá s koncentrací iontu  $M^{n+}$  a v celkovém součtu  $p$  dílčích koeficientů se může tato koncentrace uplatnit pouze jednou.

Tedy

$$\alpha_M = \alpha_{M(OH)} + \alpha_{M(X)} + \alpha_{M(L)} + \dots + (1 - p) \quad (2.34)$$

kde  $\alpha_{M(L)}$  je koeficient vedlejší reakce extrahovaného iontu s extrakčním činidlem, tj. takové reakce  $M^{n+}$  s  $L^-$ , jejímž produktem není extrahovatelný elektroneutrální komplex  $ML_n$ .

Koeficient vedlejší reakce činidla  $\alpha_L$  zahrnuje protonizaci aniontu a přechod HL do organické fáze, takže

$$\alpha_L = \alpha_{L(H)} + \alpha_{L(org)} - 1 \quad (2.35)$$

Je-li činidlo jednosytnou kyselinou, je

$$\alpha_{L(H)} = \frac{[HL] + [L^-]}{[L^-]} = 1 + [H^+]/K_a \quad (2.36)$$

a

$$\alpha_{L(org)} = \frac{[L]_{aq} V_{aq} + [HL]_{org} V_{org}}{[L]_{aq} V_{aq}} = 1 + \frac{K_{Dč}}{K_a} [H^+] r \quad (2.37)$$

kde  $r$  je poměr objemů organické a vodné fáze. Protože extrahovaný chelát nepodléhá v organické fázi obvykle žádným vedlejšími reakcím, je nejčastěji  $\alpha_{ML_n,org} = 1$ .

Při výběru extrakčního činidla postupujeme podle toho, zda je cílem extrakce pouze koncentrování kovového iontu, nebo zda je vedle koncentračního efektu sledován též efekt separační. V prvním případě je rozhodující výtěžek extrakce  $R$ , který je tím větší, čím větší je extrakční konstanta  $K_{ex}$  (resp.  $\alpha_{ex}$ ), čím větší je koncentrace extrakčního činidla, čím menší je koncentrace vodíkových iontů [viz rovn. (2.20)] a čím větší je poměr objemů organické a vodné fáze ( $r$ ). Výtěžek jednorázové extrakce se totiž rovná [(viz str. 18)]

$$R = \frac{D_c r}{1 + D_c r} = \frac{D_m}{1 + D_m} \quad (2.38)$$

kde  $D_m$  je distribuční hmotnostní poměr. Při extrakci, jejímž cílem je koncentrace, musíme někdy volit malou hodnotu  $r$ .

Při extrakci, jejímž cílem je separace (např. iontu A od iontu B), musí být hodnota separačního faktoru  $\alpha$  (viz str. 17) dostatečně velká:

$$\alpha = D_A/D_B \quad (2.39)$$

Hledáme tedy takovou extrakční soustavu (činidlo a rozpouštědlo), pro něž jsou dostatečně rozdílné hodnoty  $K_{ex,A}$  a  $K_{ex,B}$ . Pokud takovou soustavu nenajdeme,

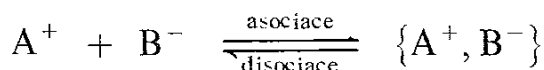
hledáme maskující činidlo, které by poskytlo hodnotu  $\alpha_{A(X)}$  dostatečně odlišnou od hodnoty  $\alpha_{B(X)}$ , neboť uvážíme-li pro jednoduchost dělení dvou iontů stejného náboje ( $A^{n+}$ ,  $B^{n+}$ ), pak se jejich separační faktor  $\alpha$  rovná

$$\alpha = \frac{\alpha'_{ex.A}}{\alpha'_{ex.B}} = \frac{\alpha_{ex.A} \frac{1}{\alpha_A \alpha_1^n}}{\alpha_{ex.B} \frac{1}{\alpha_B \alpha_1^n}} = \frac{K_{ex.A} \alpha_B}{K_{ex.B} \alpha_A} \quad (2.40)$$

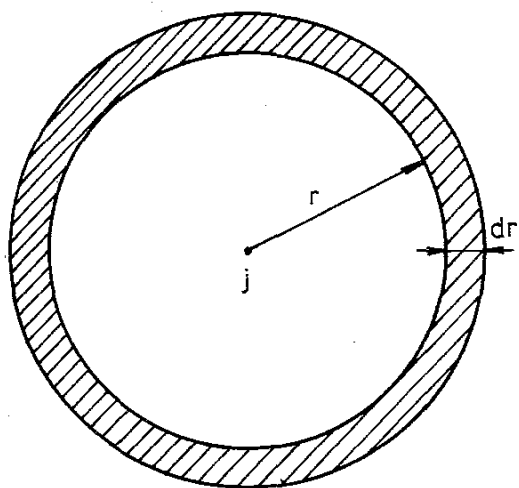
Není-li tedy samotný poměr  $K_{ex.A}/K_{ex.B}$  dostatečně velký, je třeba dosáhnout toho, aby  $\alpha_B$  bylo mnohem větší (tedy B bylo zamaskováno) než  $\alpha_A$ . Ze vztahu (2.40) lze vypočítat potřebnou hodnotu  $\alpha_B$ , a jelikož ta závisí hlavně na hodnotě  $\alpha_{B(X)}$  [viz rovn. (2.34)], lze podle toho nalézt vhodné maskující činidlo. Hodnoty  $\alpha_{M(OH)}$  a  $\alpha_{M(X)}$  pro běžná činidla a kovové ionty jsou tabelovány.

### 2.3.2.2 Extrakce iontových asociátů

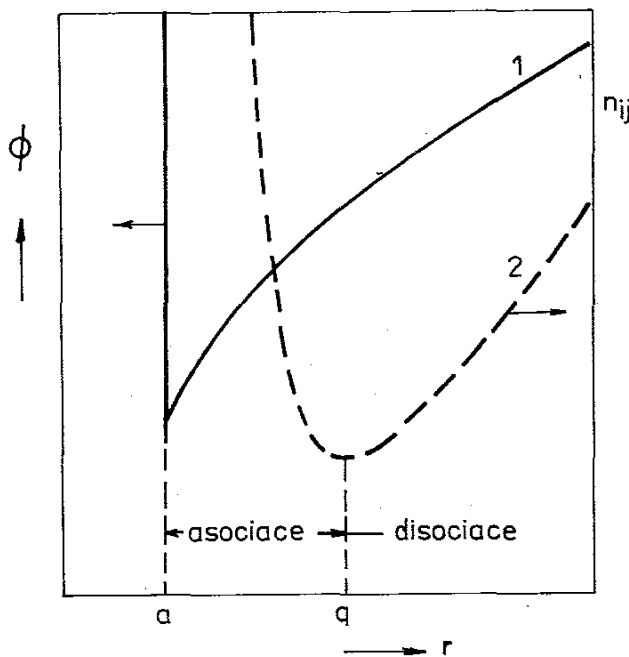
Iontové asociáty (nebo iontové páry) jsou shluky opačně nabitých iontů, které vznikají jejich asociací, jež je elektrostatické povahy:



Podle Bjerrumovy teorie, vycházející ze zjednodušujících předpokladů (ionty kulového tvaru, nedeformovatelné, s bodovým nábojem, prostředí s homogenní relativní permitivitou), je průměrný počet iontů  $i$  ( $n_{ij}$ ), jež se vyskytují kolem opačně nabitého



Obr. 10. Uvažované mezikouli kolem iontu  $j$  při tvorbě iontového asociátu s iontem  $i$



Obr. 11. Průběh závislosti potenciální energie  $\Phi$  při interakci dvou opačně nabitých iontů (křivka 1) a pravděpodobnosti výskytu druhého iontu (křivka 2) na vzdálenosti obou opačně nabitých iontů  $r$

iontu  $j$  v jednotce objemu mezikouli o tloušťce  $dr$ , ve vzdálenosti (malé)  $r$  od bodového náboje iontu (obr. 10) dán vztahem

$$n_{ij} = \frac{N_A c_i}{1\,000} 4\pi r^2 dr \exp[\Phi_{ij}/kT] \quad (2.41)$$

kde  $N_A$  je Avogadrova konstanta,  $c_i$  – látková koncentrace iontů  $i$ ,  $k$  – Boltzmanova konstanta.  $\Phi_{ij}$  je potenciální energie opačně nabitých iontů

$$\Phi_{ij} = \frac{|z_i||z_j|e^2}{\epsilon r} \quad (2.42)$$

kde  $z_i$  a  $z_j$  jsou nábojová čísla iontů,  $e$  – jednotkový náboj,  $\epsilon$  – relativní permitivita prostředí a jednotkou objemu je  $1\text{ cm}^3$ . Existuje minimum funkce (2.41), tj. minimální počet iontů  $i$  v mezikouli o tloušťce  $dr$  a vzdálenosti  $r_{\min} = q = |z_i||z_j|e^2/2\epsilon kT$ . V tomto případě je potenciální energie obou iontů rovna  $\Phi_q = 2kT$ , jak lze zjistit dosazením  $q$  za  $r$  do vztahu (2.41).

Opačně nabité ionty se mohou v roztoku vyskytovat v různých vzdálenostech a podle toho rozlišujeme různé oblasti. Nejmenší vzdálenost, na jakou se mohou přiblížit, je  $a$ , což je zhruba součet krystalových poloměrů obou iontů. Je-li  $a < r < q$ , nastává asociace iontů, při  $r > q$  nastává jejich disociace (obr. 11).

Asociovaný podíl je pro uni-univalentní elektrolyt dán vztahem

$$\delta_{as} = \frac{4\pi N_A c_i}{1\,000} \left( \frac{z^2 e^2}{\epsilon k T} \right)^3 Q(b) \quad (2.43)$$

kde  $Q(b)$  je integrál, jehož hodnota je tabelována pro různé hodnoty parametru  $a$ . Rovnovážná konstanta asociace iontů elektrolytu 1–1 je  $K = [\{A^+, B^-\}]/[A^+][B^-]$ . Definičně je asociovaný podíl  $\delta_{as} = [\{A^+, B^-\}]/c_A$  a podíly volných iontů  $\delta_A = [A^+]/c_A$  a  $\delta_B = [B^-]/c_B$ . Vyjádříme-li rovnovážnou konstantu asociace pomocí jednotlivých podílů, získáme

$$K = \frac{\delta_{as} c_A}{\delta_A \delta_B c_A c_B} \quad (2.44)$$

Jelikož u elektrolytu 1–1 je  $c_A = c_B = c$  a  $\delta_A \approx \delta_B \approx 1$ , platí

$$K = \delta_{as} c^{-1} \quad (2.45)$$

Dosazením za  $\delta_{as}$  ze vztahu (2.43) vyjádříme  $K$ :

$$K = \frac{4\pi N_A}{1\,000} \left( \frac{z^2 e^2}{\epsilon k T} \right)^3 Q(b) \quad (2.46)$$

Z toho vztahu vyplývá, že stabilita iontového asociátu nezávisí na druhu iontu (pokud neuvažujeme jeho velikost) a je určována fyzikálními parametry (relativní permitivitou prostředí, nábojem iontu, teplotou).

Kvantitativní popis chemických rovnováh, které se uplatňují při extrakci iontových asociátů, je mnohem složitější, než tomu bylo u extrakce chelátů. Jedním z iontů,

který se podílí na tvorbě iontového asociátu, je obvykle ion komplexní (např.  $\text{FeCl}_4^-$ ), který vzniká vícestupňovou rovnováhou. Uplatňuje se solvatace iontů ve vodné i organické fázi včetně solvatace protonů, takže distribuce kovu mezi obě fáze je podmíněna mnoha rovnováhami, jejichž kvantitativní popis je nesnadný i vzhledem k tomu, že vodná fáze při tomto typu extrakce mívá větší iontovou sílu než při extrakci kovových chelátů.

## 2.4 VOLBA PODMÍNEK EXTRAKCE PRO DĚLENÍ

Dosud uvedená podmínka pro dělení extrakcí – velká hodnota faktoru  $\alpha$  – není podmínkou jedinou. Například dostatečně velkou hodnotou je  $10^6$  a lze ji dosáhnout při  $D_A = 10^6$  a  $D_B = 1$ . Při  $r = 1$  by se tedy složka A extrahovala kvantitativně, avšak současně s ní by do extraktu přešlo 50 % složky B. Proto musí být splněna ještě druhá podmínka, že

$$D_A D_B \approx 1 \quad (2.47)$$

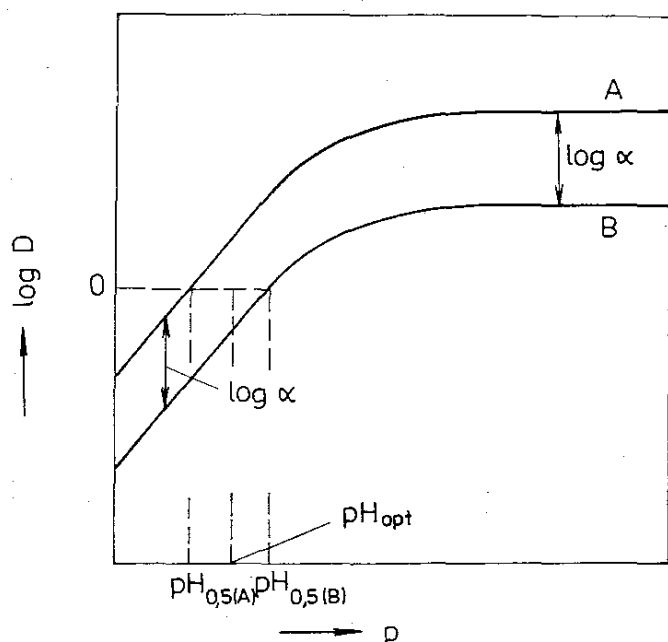
Při dělení organických látek je třeba zvolit vhodné rozpouštědlo a u protolytů též vhodné pH vodné fáze, jak bylo uvedeno v odd. 2.3.1. Při dělení kovových iontů je třeba zvolit vhodné extrakční činidlo, jeho koncentraci, rozpouštědlo, pH vodné fáze, popř. druh a koncentraci maskujícího činidla.

Při dělení dvou kovových kationtů téhož náboje extrakcí ve formě chelátů je hodnota  $\alpha$  nezávislá na pH, jak vyplývá z tohoto vztahu:

$$\alpha = \frac{D_A}{D_B} = \frac{K_{\text{ex},A}}{K_{\text{ex},B}} = \frac{K_{D,A} \beta_{nA}}{K_{D,B} \beta_{nB}} \quad (2.48)$$

Poněvadž musí být splněna i podmínka (2.47), existuje určité optimální pH pro dělení, které vypočteme ze vztahu

$$\text{pH}_{\text{opt}} = \frac{1}{2}(\text{pH}_{0,5(A)} + \text{pH}_{0,5(B)}) \quad (2.49)$$



Obr. 12. Průběh závislosti  $\log D = f(\text{pH})$  pro extrakci dvou iontů stejného náboje ve formě chelátu a volba optimálního pH ( $\text{pH}_{\text{opt}}$ )



který lze odvodit z podmínky (2.47) dosazením  $K_{ex}$  a vyjádřením  $K_{ex}$  pomocí  $pH_{0,5}$  (viz též obr. 12).

Je-li náboj dělených iontů různý ( $A^{m+}$ ,  $B^{n+}$ ), závisí  $\alpha$  na koncentraci  $H^+$  i na koncentraci činidla:

$$\alpha = \frac{K_{ex,A}}{K_{ex,B}} \left( \frac{[HL]_{org}}{[H^+]_{aq}} \right)^{(m-n)} \quad (2.50)$$

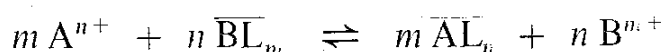
V tomto případě lze nalézt vhodné pH pro dělení pouze tehdy, je-li  $K_{ex,A} > K_{ex,B}$  a současně  $m > n$ .

Selektivita dělení se zvětší tzv. reextrakcí (stripováním). Například je třeba rozdělit směs iontů  $Hg^{II}$ ,  $Pb^{II}$ ,  $Zn^{II}$  a  $Mn^{II}$ . Extrahujeme-li tuto směs např. při pH 4 v přítomnosti diethyldithiokarbamidanu sodného, zůstane ve vodné fázi pouze  $Mn^{II}$ , ostatní ionty přejdou do organické fáze. Jestliže tuto organickou fázi pak protřepáváme (reextrahujeme) postupně roztoky kyseliny chlorovodíkové o různé koncentraci, dosáhneme rozdělení zřejmého ze schématu v tab. 2.2.

Tabulka 2.2. Schéma extrakce a reextrakce, dělení  $Hg^{II}$ ,  $Pb^{II}$ ,  $Zn^{II}$ ,  $Mn^{II}$

Operace	Fáze	
	organická	vodná
—	—	Hg, Pb, Zn, Mn
přídavek diethyldithiokarbamidanu, extrakce při pH 4	Hg, Pb, Zn	Mn
reextrakce 0,4M-HCl	Hg, Pb	Zn
reextrakce 4M-HCl	Hg	Pb

K zvýšení selektivity dělení lze použít i tzv. výměnných reakcí při extrakci. Extrakčním činidlem může být totiž i vhodně zvolený roztok chelátu. Pak proběhne reakce



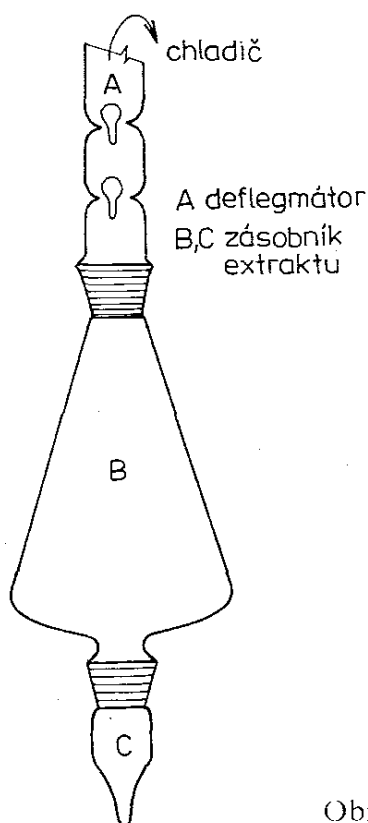
Má-li být tato rovnováha posunuta vpravo, musí být  $K_{ex,A} > K_{ex,B}$ . Rovnovážnou konstantu této výměny lze vyjádřit pomocí extrakčních konstant:

$$K_{v.i.} = \frac{[AL_n]_{org}^m [B^{m+}]_{aq}^n}{[BL_m]_{org}^n [A^{n+}]_{aq}^m} = \frac{K_{ex,A}^m}{K_{ex,B}^n} \quad (2.51)$$

Těchto výměnných extrakcí lze použít nejen pro dělení, ale též při fotometrickém stanovení měřením absorbance extraktu, kdy lze chelát s malým absorpčním koeficientem ( $\epsilon_\lambda$ ) přeměnit na chelát s absorpčním koeficientem větším. Například při stanovení stop olova v pitné vodě se extrakcí izoluje z vody diethyldithiokarbamidán olovnatý, který se třepáním s měďnatou solí převede na diethyldithiokarbamidán měďnatý, jehož  $\epsilon_\lambda$  ve viditelné oblasti je větší než  $\epsilon_\lambda$  olovnatého chelátu.

Podmínky, které určují výtěžek extrakce, a tedy úspěch extrakční separace, jsou: extrakční soustava (tj. rozpouštědlo, popř. extrakční činidlo), podmínky ve vodné fázi a technika extrakce.

Rozpouštědlo pro extrakci z tuhé fáze do kapaliny i pro extrakci z kapaliny do kapaliny volíme nejen s přihlédnutím k teorii extrakce. Je třeba uvážit i praktické aspekty. Použijeme-li extraktu ke stanovení izolované složky, nesmí rozpouštědlo rušit při jejím stanovení (např. při fotometrickém stanovení složky v extraktu musí

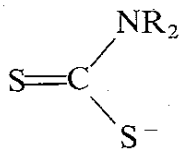


Obr. 13. Koncentrátor podle Kuderny a Danishe

mít rozpouštědlo zanedbatelně malý absorpční koeficient při vlnové délce použité ke stanovení složky). Použijeme-li extrakce k obohacení (k prekoncentraci), požadujeme obvykle, aby rozpouštědlo mělo nízký bod varu a šlo oddělit od izolované složky destilací. Výhodné k tomu je (zvláště při izolaci stopových složek) zařízení podle Kuderny a Danishe (obr. 13). V něm je možné zabustit destilací extrakt z původního objemu (v části B + C) několika set mililitrů na konečný objem několika málo (< 10) mililitrů (v části C). Po odpaření většiny rozpouštědla za atmosférického tlaku, tj. zbývá-li roztok jen v části C, se připojí část C k rotační odparce a zbytek rozpouštědla se odstraní za sníženého tlaku.

Dále volíme rozpouštědlo s přihlédnutím k jeho toxicitě, hořlavosti, ceně apod.

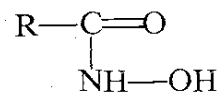
Jde-li o extrakci chelátů, musíme zvolit vhodné chelatotvorné činidlo. Nejčastěji používaná chelatotvorná extrakční činidla patří do skupiny dithiokarbamidů (I),  $\beta$ -diketonů (II), hydroxamových kyselin (III), diarylthiokarbazonů (IV), dále jsou to některé azosloučeniny [např. (V)] a deriváty 8-chinolinolu (VI).



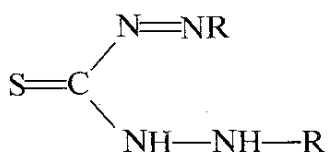
I



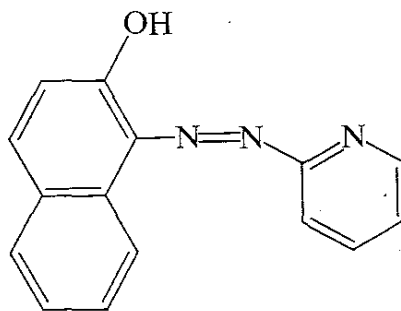
II



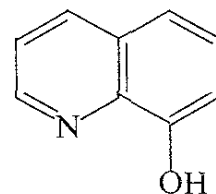
III



IV



V



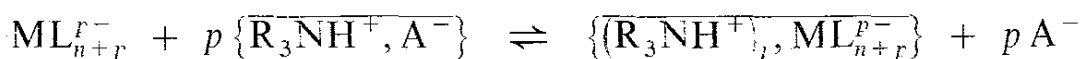
VI

K extrakci větších množství kovových iontů nebo k jejich extrakční separaci ve větším měřítku (např. v hydrometalurgii) se často využívá soustavy iontových asociátů. Extrakční činidla, jež se při tom uplatňují, můžeme rozdělit do tří základních skupin:

1. činidla (rozpouštědla) tvořící extrahovatelné solváty,
2. aminy,
3. tzv. oniové soli.

K první skupině patří kyslíkatá rozpouštědla (např. ketony, ethery) a některé organofosforové sloučeniny (např. tributylfosfát, trioktylfosfinoxid). Solvují buď kovový ion, nebo proton a kladný náboj tohoto solvátu se vyrovnává při tvorbě iontového asociátu nábojem buď obyčejného, nebo komplexního aniontu. Například vodné roztoky  $\text{Fe}^{\text{III}}$  lze v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové extrahovat diethyl-etherem a předpokládá se extrakce iontového asociátu  $\{\text{H}(\text{H}_2\text{O})_x\text{S}_y^+, \text{FeCl}_4^-\}$ .

K druhé skupině patří primární, sekundární, terciární aminy a jejich soli obvykle s více než 15 atomy C. Extrakci kovového iontu  $\text{M}^{n+}$  pomocí aminu (např. terciárního) lze popsat obecnou reakcí



kde L je ligand s jedním záporným nábojem a  $\text{A}^-$  je anion běžné kyseliny. Velmi často  $p = 1$ . Podle průběhu této reakce (vyměňuje se komplexní anion z vodné fáze za běžný anion v organické fázi) bývají vysokomolekulární aminy komerčně označovány jako kapalné měniče iontů.

Jako oniové soli nazýváme soli typu  $\text{R}_2\text{As}^+$ ,  $\text{R}_4\text{P}^+$  apod. Patří sem např. chlorid tetrafenylarsonia, který se používá k analytické separaci některých kyslíkatých aniontů extrakcí z kapaliny do kapaliny.

Úpravou podmínek ve vodné fázi před extrakcí rozumíme nastavení vhodné hodnoty pH, přidavek maskujícího činidla apod., jak bylo podrobně uvedeno v před-

cházejících oddílech. Pro dobré rozdělení fází po extrakci je třeba zajistit též dostatečnou iontovou sílu vodné fáze. Při extrakci iontových asociátů se docílí zvýšením iontové síly vodné fáze též zmenšení relativní permitivity roztoku a hlavně zmenšení aktivity vody. Tím se zvýší stabilita iontového asociátu a usnadní se záměna molekul vody v hydratačním obalu centrálního iontu molekulami solvatačního činidla. Toto příznivé působení indiferentního elektrolytu na výsledek extrakce se označuje jako *vysolování*.

Jednorázová extrakce z kapaliny do kapaliny se provádí v dělicích nálevkách. Pro analytické účely, kdy je třeba kvantitativně oddělit obě fáze a převést je do jiných nádob, nevyhovují zcela dělicí nálevky dodávané pro účely preparativní. Dobrá dělicí nálevka pro analytické účely má mít krátký stonek a jádro kohoutu i zátku z plastu, nejlépe z Teflonu. Skleněná jádra běžně dodávaných dělicích nálevek je třeba utěsnit tukem na kohouty, který se však organickým rozpouštědlem vymývá a tvorbou emulze znesnadňuje ostré rozdělení organické a vodné fáze. Dělicí nálevka je vhodná pro extrakci rozpouštědlem těžším než voda. Jestliže izolovaná složka přechází do rozpouštědla lehčího než voda, je výhodnější použít k extrakci zabroušenou zkumavku vhodné velikosti a po rozdělení fází odsát horní organickou fází pipetou nebo injekční stříkačkou.

I když se extrakce z kapaliny do kapaliny též nazývá vytřepávání, není vhodné obě fáze intenzívně protřepávat, neboť některá rozpouštědla vytvářejí špatně odstranitelnou emulzi. Nejvhodnější způsob promíchávání obou fází je rotace zkumavek nebo převrácení dělicích nálevek. Rozdělení obou fází lze urychlit odstředěním extrakční směsi. K ostrému rozdělení obou fází lze použít speciálně upravených filtračních papírů (např. Whatman 1 PS). Tento filtrační papír je silanizován, takže jím projde z extrakční směsi méně polární organická fáze, kdežto vodná fáze se na tomto separátoru fází zadrží.

Jestliže je třeba k dosažení potřebného výtěžku dělení extrakci opakovat, pak lze kvantitativnost separace pro analytické účely zajistit pouze při malém počtu opakování (nejvýše 3 až 4krát). Pokud výpočtem vychází, že k zajištění potřebného výtěžku je třeba extrakci vícenásobně opakovat, je výhodnější použít tzv. extrakční chromatografii, což je typ rozdělovací kapalinové chromatografie, při níž je organická fáze (extrakční činidlo a rozpouštědlo) zakotvena na vhodném, inertním nosiči a kolonou protéká vodný roztok, jehož složení odpovídá vodné fázi při extrakci. Zachycenou složku lze z kolony eluovat vodnou fází změněného složení. Tato eluce odpovídá reextrakci, o níž byla zmínka již dříve. Vícenásobná extrakce z kapaliny do kapaliny, prováděná kontinuálním protiproudým způsobem (tzv. craigování), používaná dříve hlavně pro preparativní účely, se dnes většinou nahrazuje rozdělovací chromatografií v preparativním měřítku.

Chromatografie je separační technika, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Při dělení dochází k opakovanému transportu molekul složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní. Přitom se chromatografický systém natolik přiblíží rovnováze, že distribuci složky mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční konstantou. *Distribuční (rozdělovací) konstanta* složky A je poměr rovnovážných koncentrací složky v obou fázích, přičemž podle konvence se koncentrace složky ve fázi stacionární uvádí v čitateli:

$$K_D(A) = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s V_m}{(n_A)_m V_s} \quad (3.1)$$

kde  $(n_A)_s$  a  $(n_A)_m$  jsou látková množství složky A ve fázi stacionární a mobilní,  $V_m$  a  $V_s$  – objem mobilní a stacionární fáze v chromatografickém systému. Trvalý pohyb mobilní fáze však zabrání dosažení skutečné termodynamické rovnováhy a posune molekuly složek k další části stacionární fáze, kde se znovu vytvoří přibližně rovnovážný stav. Interakce složky a chromatografických fází jsou určujícím faktorem pro rychlost migrace složky v chromatografickém systému. Rozdíly v rychlostech migrace potom umožňují rozdělení složek.

Roztřídění chromatografických metod je předmětem častých sporů, neboť někdy se při separaci uplatňují současně dva mechanismy, jindy zase podstata separačního

Tabulka 3.1. Přehled nejdůležitějších chromatografických metod

Mobilní fáze	Separací mechanismus	Metoda	Užívaná zkratka
plyn (plynová chromatografie)	síťový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítích	GSC
	adsorpce rozdělování	plynová adsorpční chromatografie plynová rozdělovací chromatografie	GLC
kapalina (kapalinová chromatografie)	síťový efekt	gelová permeační chromatografie	GPC
	adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	chemisorpce specifické interakce biomolekul	iontově výměnná chromatografie afinitní chromatografie	IEC

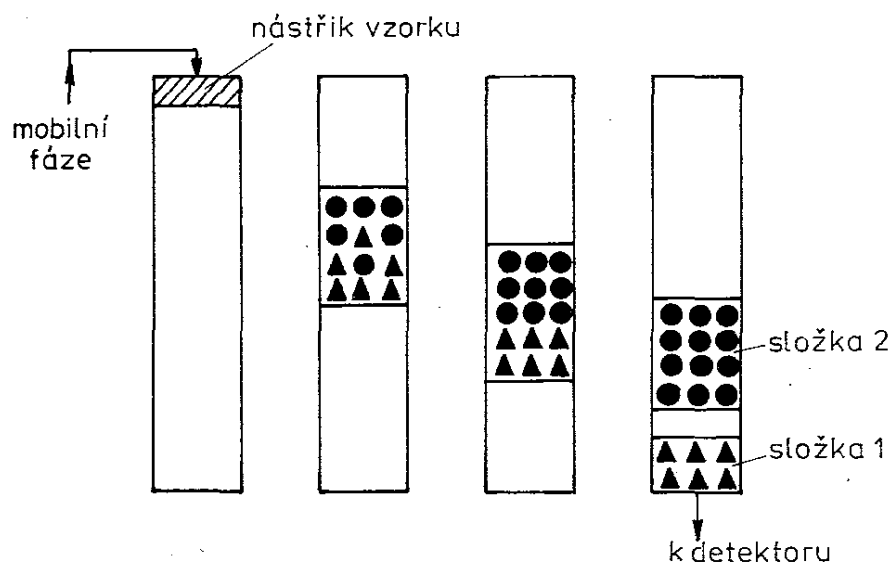
mechanismu není zcela objasněna. Roztřídění v tab. 3.1 je založeno v první řadě na skupenství, v němž se nachází mobilní fáze, a dále na separačním mechanismu.

V kapalinové chromatografii existuje ještě další třídění, a to podle formy, jakou zaujímá stacionární fáze, na chromatografii sloupcovou a chromatografii na tenké vrstvě. Toto třídění není založeno na rozdílných separačních principech, ale má význam pouze jako konkrétní pracovní technika.

### 3.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY CHROMATOGRAFICKÉHO PROCESU

K objasnění principu chromatografické separace je třeba definovat některé pojmy. Fáze pohyblivá (plyn nebo kapalina) bude bez ohledu na skupenství označována jako *fáze mobilní*. Fáze nepohyblivá – *stacionární* – může mít v chromatografii velmi rozdílnou formu. Někdy jsou to částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, jindy je to tenká vrstvička kapaliny nanesená na tuhých částicích nebo film kapaliny na vnitřní straně kapiláry. Pro jednoduchost bude ve všeobecném popisu používán název *sorbent* jako pojem pro jakoukoli formu stacionární fáze. Dále budeme předpokládat, že sorbentem je naplněna kolona, přes kterou postupuje fáze mobilní. Směs látek, která má být dělena, bude označována jako *vzorek* a látky v ní obsažené budou nazývány složka 1, složka 2 atd. Nyní můžeme ve stručnosti popsat chromatografický proces.

Přes kolonu naplněnou sorbentem postupuje určitou rychlostí mobilní fáze. Na začátek kolony umístíme vzorek, který obsahuje složky 1 a 2. Mobilní fáze unáší vzorek ke konci kolony, přičemž složka 2 postupuje pomaleji než složka 1. Říkáme, že složka 2 je retardována více než složka 1. Při postupu vzorku kolonou jsou molekuly složek buď v mobilní fázi (potom se pohybují stejnou rychlostí jako mobilní fáze), nebo jsou na sorbentu (potom se nepohybují vůbec). Při průchodu kolonou každá molekula vzorku přejde mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět. Doba, po kterou průměrná molekula dané složky setrvává na povrchu sorbentu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbentem a určuje pořadí, v jakém složka eluuje (vychází) z kolony. Čím větší interakce, tím později složka eluuje – má větší retenční čas. Celý proces je znázorněn na obr. 14.



Obr. 14. Chromatografické dělení vzorku o dvou složkách  
▲ – složka 1,  
● – složka 2

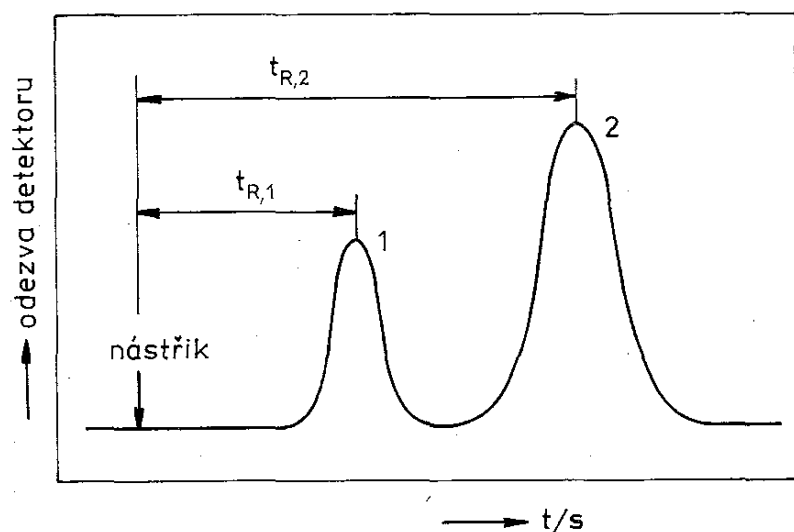
Na výstupu z kolony vycházejí obě složky odděleně a mezi nimi je zóna čisté mobilní fáze. Přitom stojí za povšimnutí, že šířka zón obou složek je větší, než je původní zóna vzorku, a šířka zóny složky 2 je větší než zóny složky 1. Takto popsané uspořádání se nazývá *eluční chromatografie* na rozdíl od podstatně méně užívané vytěšňovací, popř. frontální chromatografie.

Charakteristickým rysem *vytěšňovací chromatografie* je použití mobilní fáze, která se na stacionární fázi adsorbuje silněji než kterákoli jiná složka vzorku. Mobilní fáze funguje jako vytěšňovací činidlo, které tlačí celý vzorek před sebou, a výsledný chromatogram tvoří stupně, kde nejsou jednotlivé složky odděleny zónou čisté mobilní fáze.

*Frontální chromatografie* je založena na průchodu vzorku kolonou bez použití mobilní fáze. Je třeba velkého množství vzorku, protože vzorek sám slouží jako mobilní fáze. V koloně dochází k rozdělení, ale pouze první složku dostáváme čistou. Druhá složka je ve směsi s první, třetí složka ve směsi s první a druhou atd. Výsledný chromatogram tvoří stupně.

Přístroje, na nichž se chromatografická separace provádí, se nazývají *chromatografy*. Důležitou částí chromatografu je detektor, který deteguje složku vycházející z kolony. Signál z detektoru se přenáší na zapisovač a jako výsledek obdržíme záznam chromatografické separace – *chromatogram*.

Hypotetickou separaci z obr. 14 na chromatogramu znázorňuje obr. 15.



Obr. 15. Chromatogram separace dvousložkové směsi  
1 – složka 1, 2 – složka 2,  
 $t_{R,1}$  – retenční čas složky 1,  
 $t_{R,2}$  – retenční čas složky 2

Na obr. 15 jsou dvě vlny, které ukazují, v jakém sledu opouštěly separované složky chromatografickou kolonu. Vlnám říkáme chromatografické vlny, retenční křivky nebo nejčastěji *píky*. Nástrík označuje okamžik, kdy byl vzorek vnesen do kolony. Na ose  $y$  se vynáší odezva detektoru, která je zpravidla funkcí koncentrace eluované složky v mobilní fázi, na ose  $x$  čas. Pro výpočet retenčních časů složek  $t_{R,1}$  a  $t_{R,2}$  stačí znát rychlost posunu papíru zapisovače. Z obr. 15 můžeme usoudit, že separaci dvousložkového vzorku lze ovlivnit dvěma způsoby. Při prvním způsobu upravíme separační podmínky tak, aby rozdíl v retenčních časech obou složek byl co největší. Ovlivnění velikosti interakce mezi sorbentem a složkou nazýváme *termodynamickým aspektem separace*.

Druhý způsob spočívá v ovlivnění šířky píků. Můžeme úspěšně separovat dvě složky i při menším rozdílu v retenčních časech za předpokladu, že píky budou tak úzké, aby nedošlo k jejich překryvu. Naopak při velké šířce obou píků bude docházet k jejich překrytí i při velkém rozdílu v retenčních časech. Tato ovlivnění nazýváme *kinetickým aspektem separace*.

### 3.1.1 Základní pojmy a definice

Již dříve byl uveden pojem retenčního času  $t_R$  a jako doplněk k němu zavedeme pojem *mrtvý retenční čas*  $t_M$ , což je retenční čas složky, která není v koloně zadržována, tj. retenční čas složky, která se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Každému retenčnímu času  $t_R$  přísluší určitý *retenční (eluční) objem*  $V_R$ . Mrtvému retenčnímu času odpovídá příslušný retenční objem, který se nazývá *mrtvý retenční objem*  $V_M$ . Ve většině případů je  $V_M$  totožný s objemem mobilní fáze v koloně, pro který byl již zaveden symbol  $V_m$ . Mobilní fáze protéká kolonou objemovou rychlostí  $F_m$  s rozměrem např.  $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$  a střední lineární rychlostí  $\bar{u}$  s rozměrem  $\text{cm s}^{-1}$ . Platí vztah:

$$V_M = F_m t_M = V_m \quad (3.2)$$

Označíme-li délku kolony  $L$  (v cm), dostaneme vztah pro střední lineární rychlost mobilní fáze:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} \quad (3.3)$$

Libovolná složka A, která je v koloně retardována, postupuje lineární rychlostí  $u_A$ :

$$u_A = \frac{L}{t_{R,A}} \quad (3.4)$$

Poměr lineárních rychlostí  $u_A/\bar{u}$  je označován jako *retardační faktor*  $R_F$  a vyjadřuje pravděpodobnost, že molekula složky A se nachází v mobilní fázi:

$$R_F = \frac{u_A}{\bar{u}} = \frac{(n_A)_m}{(n_A)_m + (n_A)_s} = \frac{1}{1 + k} \quad (3.5)$$

Pokud bude molekula trvale jen v mobilní fázi, bude  $(n_A)_s \rightarrow 0$  a  $R_F \rightarrow 1$ . Naopak jestliže molekula zůstane ve stacionární fázi, bude  $(n_A)_m \rightarrow 0$  a  $R_F \rightarrow 0$ . Poslední vztah v rovn. (3.5) vyplývá z definice:

$$k = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} = K_D \frac{V_s}{V_m} \quad (3.6)$$

kde  $k$  se nazývá *kapacitní poměr (kapacitní faktor)* a je jednou z nejužívanějších retenčních veličin. Vztah mezi  $k$  a  $K_D$  je zřejmý z rovn. (3.6).

Z rovnice (3.5) dostaneme:

$$u_A = \bar{u} R_F = \frac{\bar{u}}{1 + k} \quad (3.7)$$



Po substituci za  $u_A$  a  $\bar{u}$  z rovn. (3.3) a (3.4) získáme vztah:

$$\frac{L}{t_{R,A}} = \frac{L}{t_M(1+k)} \quad (3.8)$$

Z rovnice (3.8) získáme vztah pro kapacitní poměr:

$$k = \frac{t_{R,A} - t_M}{t_M} = \frac{V_{R,A} - V_M}{V_M} = \frac{V'_{R,A}}{V_M} \quad (3.9)$$

Zatímco rovn. (3.6) definuje kapacitní poměr, rovn. (3.9) ukazuje, jak je možno velmi jednoduše kapacitní poměr vypočítat. Na chromatogramu stačí odečíst retenční čas složky a mrtvý retenční čas nebo ještě lépe změřit odpovídající vzdálenosti. Rozdíl retenčního objemu složky a mrtvého retenčního objemu se nazývá *redukovaný retenční objem* a označuje se symbolem  $V'_R$ . Obdobně rozdíl  $(t_R - t_M)$  se označuje  $t'_R$  a nazývá se *redukovaný retenční čas*. Z rovnice (3.9) je patrné, jak lze z chromatogramu získat i další údaje, neboť za předpokladu  $V_m = V_M$  platí:

$$V_R = V_M + K_L V_s \quad (3.10)$$

$$V'_R = K_D V_s \quad (3.11)$$

U chromatografie na tenké vrstvě (popř. na papíře) je obvyklé měřit dvě veličiny: vzdálenost čela rozpouštědla od startu  $l$  a vzdálenost středu skvrny od startu  $l_A$ :

$$R_F = \frac{u_A}{\bar{u}} = \frac{l_A}{l} \quad (3.12)$$

Podle vztahu (3.5) platí:

$$k = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad (3.13)$$

Označíme-li logaritmus kapacitního poměru symbolem  $R_M$ , dostaneme s použitím rovn. (3.6) vztah:

$$\log k = R_M = \log \left( \frac{1 - R_F}{R_F} \right) = \log K_L + \log \frac{V_s}{V_m} \quad (3.14)$$

V daném chromatografickém systému je poměr  $V_s/V_m$  konstantní a změna  $R_M$  tedy přímo odráží změnu distribuční konstanty.

## 3.2 PRINCIPY SEPARACE

Interakce složky v chromatografickém systému mohou být posuzovány ze dvou hledisek. V makroměřítku jde o rovnováhy mezi dvěma fázemi, v mikroměřítku jde o charakter intermolekulárních sil. Pro potřeby chromatografie je vhodnější zabývat se fázovými rovnováhami podle základních principů uvedených v tab. 3.1.

Je na místě připomenout, že při skutečné chromatografické separaci nezřídka

dochází k současnému uplatnění dvou i více separačních mechanismů a že jeden a týž sorbent může dělit látky na základě několika zcela odlišných principů. Tak např. alumina, známý sorbent dělící v prostředí hexanu aromatické uhlovodíky na principu adsorpční chromatografie, může dělit bílkoviny ve vodě na principu gelové chromatografie a ve vodném roztoku methanolu alkaloidy na principu iontové výměny. Následující popis jednotlivých mechanismů je vhodný z hlediska didaktického, ale je třeba pamatovat na to, že situace v reálných chromatografických systémech je zpravidla složitější.

### 3.2.1 Adsorpční chromatografie

Na tomto principu pracuje jak kapalinová, tak i plynová chromatografie (LSC a GSC) a závěry jsou platné pro oba typy. Jde o rovnováhu mezi jednou fází o daném objemu a povrchem adsorbentu. Objemy fází, mezi kterými dochází k partičnímu procesu (rozdělování), mají při výpočtech v chromatografii značný význam. Zpracování dat z GSC a LSC je ztíženo nutností zahrnout do výpočtu povrch tuhé fáze, na kterém dochází k adsorpci. Při *adsorpci* molekul z plynu nebo z roztoku na tuhých adsorbentech se předpokládá, že tyto molekuly jsou zachycovány v silovém poli na povrchu tuhé fáze a že na tomto povrchu setrvávají. Pokud molekuly pronikají přes rozhraní tuhé fáze a difundují do jejího objemu, kde vytvářejí tuhé roztoky, jde o proces, který nazýváme *absorpce*. V praxi se velmi často setkáváme s tím, že oba procesy probíhají současně. Všeobecně se rozlišuje fyzikální adsorpce a chemisorpce.

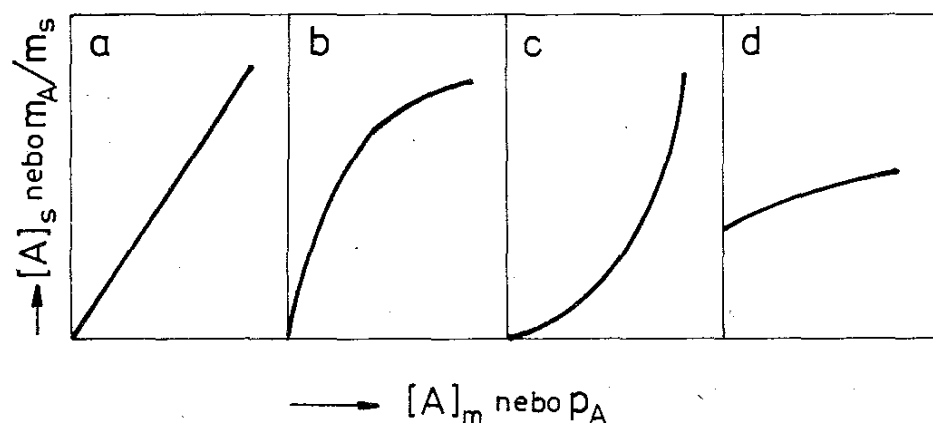
*Fyzikální adsorpce* je založena na van der Waalsových silách působících mezi adsorbátem a adsorbentem. Energie těchto interakcí jsou většinou velmi malé, ale rychlost fyzikální adsorpce je velká. Při fyzikální adsorpci z roztoků vytváří složka na povrchu adsorbentu většinou pouze monomolekulární vrstvu, protože musí při sorpci předem vytěsnit již adsorbovanou mobilní fázi. Při sorpci plynů na tuhých sorbentech může dojít k interakci mezi první sorbovanou vrstvou a molekulami vzorku v plynné fázi. Výsledkem je vytváření další vrstvy adsorbátu na povrchu tuhé fáze. Nutnou podmínkou pro vícevrstvou adsorpci je, aby proces probíhal při teplotě nižší, než je kritická teplota adsorbátu.

V *chemisorpci* zase naopak dochází ke vzniku iontové nebo kovalentní vazby a energie řádově odpovídá vzniku vazby při chemické reakci. Kapacita povrchu je značně menší než při fyzikální adsorpci, protože složka reaguje pouze na aktivních centrech adsorbentu. Rychlost chemisorpce je menší a zvyšuje se s teplotou exponenciálně. Skutečné chromatografické separace organických molekul se zpravidla pohybují mezi těmito dvěma extrémy, tj. mezi fyzikální adsorpcí a chemisorpcí. I když jsou známy případy, kdy jsou adsorpční energie velké, nedochází zpravidla ke skutečnému vzniku chemické vazby. Vedle van der Waalsových sil, které tvoří podstatu interakcí mezi nepolární složkou a nepolárním sorbentem, se podílí na adsorpci někdy též tvorba intermolekulárních vodíkových můstků a přenos elektronů mezi adsorbátem a adsorbentem.

K popisu adsorpční rovnováhy se běžně používají adsorpční izotermy. Tyto izotermy se neliší, ať již jde o adsorpci z plynu nebo adsorpci z roztoku. Ideální chování systému lze vystihnout jednoduchou rovnicí (3.1), kde  $[A]_s$  je rovnovážná koncentrace sorbované složky A v tuhé fázi a  $[A]_m$  je rovnovážná koncentrace složky A v mobilní fázi. Bývá zvykem vyjadřovat  $[A]_s$  jako zlomek povrchu (nebo počtu aktivních center), který je obsazen sorbovanou složkou A. Potom je  $[A]_m$  nahrazena látkovým zlomkem složky A v mobilní fázi. V některých případech, zejména pro adsorpční rovnováhy plyn–tuhá fáze, vyjadřujeme distribuční konstantu  $K_D$  pomocí hmotnosti sorbované složky  $m_A$ , hmotnosti adsorbentu  $m_s$  a parciálního tlaku složky A v mobilní fázi  $p_A$ .

$$\frac{m_A}{m_s} = K_D p_A \quad (3.15)$$

Rovnice (3.15) a (3.1) vystihují lineární adsorpční izotermu na obr. 16a. Pro reálné systémy vyhovuje tato izoterma jen výjimečně, a to v oboru velmi nízkých koncentrací.



Obr. 16. Základní typy adsorpčních izoterm .  
a – lineární,  
b – Langmuirova,  
c – anti-Langmuirova,  
d – chemisorpční

V adsorpční chromatografii mají izotermy nejčastěji tvar, který dobře vystihuje Langmuirova rovnice:

$$[A]_s = \frac{wz[A]_m}{1 + w[A]_m} \quad (3.16)$$

kde  $w$  je adsorpční koeficient a  $z$  – počet volných aktivních center na povrchu adsorbentu. Tato izoterma byla odvozena za předpokladu, že adsorbát může vytvořit na povrchu nejvýše monomolekulární vrstvu. V oboru velmi nízkých koncentrací lze ve jmenovateli zanedbat součin  $w[A]_m$  proti 1. Z rovnice (3.16) tak získáme rovnici přímky a říkáme, že v oboru velmi nízkých koncentrací je průběh Langmuirovy izotermy lineární. Langmuirova izoterma je znázorněna na obr. 16b. Podobný průběh má empirická Freundlichova izoterma:

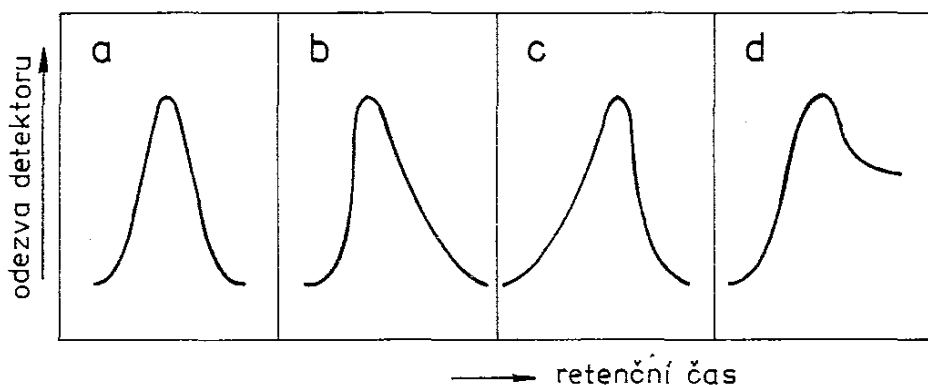
$$[A]_s = k_a [A]_m^{1/z} \quad (3.17)$$

kde  $k_a$  je konstanta úměrnosti a  $z$  – konstanta větší než 1. Na rozdíl od Langmuirovy izotermy se hodnota  $[A]_s$  při vysokých koncentracích neblíží k limitní hodnotě.

Z praxe jsou známy i další tvary adsorpčních izoterm, např. konkávní tvar na obr. 16c, tzv. anti-Langmuirova izoterma. Vyskytuje se v takových případech, kdy první vrstva sorbovaných molekul usnadňuje a zvyšuje další adsorpci.

Na obrázku 16d je uvedena izoterma, která vystihuje ty případy, kdy dochází k chemisorpci. Energie interakce je podstatně větší než v předchozích případech a často dochází k nevratné adsorpci. Ve většině případů je chemisorpce v chromatografii nežádoucí. Chemisorpce je nejčastěji způsobena silnou vazbou mezi vodíkovými můstky, přenosem elektronů a acidobazickou interakcí mezi adsorbátem a adsorbentem.

V rovnicích (3.16) a (3.17) je možno nahradit členy  $[A]_s$  a  $[A]_m$  výrazy  $m_A/m_s$  a  $p_A$ , jak je ukázáno v rovn. (3.15). V této formě jsou také používány pro GSC.



Obr. 17. Tvary píků odpovídajících izotermám  
a – lineární,  
b – Langmuirově,  
c – anti-Langmuirově,  
d – chemisorpční

Typ adsorpční izotermy většinou ovlivňuje i tvar chromatografického píku. Pokud chromatografická separace probíhá za takových podmínek, že je ji možno popsat lineární izotermou, získáme symetrický pík, jak je uvedeno na obr. 17a. Stejný tvar píku získáme, pokud pracujeme v lineární části Langmuirovy, popř. anti-Langmuirovy izotermy. Při práci v nelineární části Langmuirovy izotermy získáme asymetrický pík protažený směrem k vyšším retenčním časům, jak ukazuje obr. 17b. Retenční časy se zkracují se stoupající velikostí nástřiků. Anti-Langmuirova izoterma je reprezentována pikem s opačnou asymetrií než v předchozím případě (obr. 17c). Nevyskytuje se v chromatografii příliš často. Byla pozorována v kapalinové chromatografii, kdy větší nástřiky složky zvýší afinitu stacionární fáze k dané složce. U chemisorpce, uvedené na obr. 17d, jde o nevratné zadržení části složky ve stacionární fázi.

### 3.2.2 Plynová rozdělovací (partiční) chromatografie

Tato metoda je založena na partičním procesu složek mezi plynnou mobilní a kapalnou stacionární fází. Složky se dělí na základě různé rozpustnosti v kapalně fázi. Dosažení rovnováhy je možno popsat distribuční konstantou  $K_D$ , definovanou jako poměr rovnovážných koncentrací složky ve dvou koexistujících fázích [viz rovn. (3.1)]. Rozpustnost složky ve stacionární fázi bude záviset na tlaku par čisté složky při teplotě systému a dále na mezimolekulárních silách v kapalně fázi. V ideálním případě by měl platit Raoultův zákon, kde by rozpustnost složky v kapalně

stacionární fázi měla záviset pouze na tlaku par čisté složky a na jejím parciálním tlaku:

$$x_A = \frac{p_A}{p_A^c} \quad (3.18)$$

kde  $x_A$  je látkový zlomek složky A v kapalně stacionární fázi,  $p_A$  – parciální tlak složky A v plynné mobilní fázi,  $p_A^c$  – tlak par čisté složky A při teplotě systému.

V kapalně fázi je však složka A vystavena dalšímu působení intermolekulárních sil, což způsobuje odchylku od Raoultova zákona:

$$x_A = \frac{p_A}{\gamma_A p_A^c} \quad (3.19)$$

kde  $\gamma_A$  je aktivitní koeficient složky A v kapalně fázi. O povaze intermolekulárních sil bude pojednáno dále.

Aktivitní koeficient  $\gamma_A$  může nabývat hodnot větších než 1 (kladná odchylka od Raoultova zákona), nebo menších než 1 (záporná odchylka od Raoultova zákona) a je v obecném případě funkcí koncentrace složky A v kapalně fázi. V plynové chromatografii většinou pracujeme s tak malým množstvím vzorku, že při rozpuštění složky v kapalně fázi můžeme předpokládat vznik nekonečně zředěného roztoku. V takovém případě je  $\gamma_A$  konstanta a rovn. (3.19) můžeme zapsat:

$$p_A = \gamma_A p_A^c x_A = H_A x_A \quad (3.20)$$

kde  $H_A$  je Henryho konstanta zahrnující aktivitní koeficient i tlak par čisté složky A při teplotě systému.

Do rovnice (3.20) můžeme dosadit za parciální tlak  $p_A$  součin celkového tlaku  $p$  a látkového zlomku složky A v plynné fázi  $y_A$  a dostaneme:

$$\frac{x_A}{y_A} = \frac{(n_A)_s (\sum n)_m}{(n_A)_m (\sum n)_s} = \frac{p}{H_A} \quad (3.21)$$

kde  $(n_A)_s$  a  $(n_A)_m$  jsou celková látková množství ve stacionární a mobilní fázi v chromatografické koloně. Dosazením z rovn. (3.1) a úpravou získáme vztah

$$K_D = \frac{p V_m (\sum n)_s}{(\sum n)_m k V_s} = \frac{RT (\sum n)_s}{H_A V_s} \quad (3.22)$$

Substituce v rovn. (3.22) byla provedena ze stavové rovnice ( $R$  – plynová konstanta,  $T$  – termodynamická teplota) za předpokladu ideálního chování plynné fáze. S výjimkou konstanty  $H_A$  lze většinu členů rovn. (3.22) snadno zjistit. Konstanta  $H_A$  je součinem dvou konstant, a to aktivitního koeficientu  $\gamma_A$  a tlaku par čisté složky  $p_A^c$ . Konstantní hodnotu  $\gamma_A$  můžeme předpokládat v případě, že každá molekula složky A v kapalně fázi je obklopena molekulami této fáze a vzájemné interakce molekul složky A jsou zanedbatelné. Aktivitní koeficient je možno rozložit na dva příspěvky:

$$\ln \gamma_A = \ln (\gamma_A)_T + \ln (\gamma_A)_V \quad (3.23)$$

kde  $(\gamma_A)_T$  je termická a  $(\gamma_A)_V$  – atermická složka aktivního koeficientu. Pro termický příspěvek platí vztah:

$$\ln(\gamma_A)_T = \frac{\Delta \mathcal{H}_E}{RT} \quad (3.24)$$

kde  $\Delta \mathcal{H}_E$  je molární dodatková entalpie rozpouštění. Záporná hodnota dodatkového tepla rozpouštění odpovídá hodnotě  $(\gamma_A)_T < 1$ , a tedy negativní odchylce od Raoultova zákona. U kladných hodnot, které jsou v plynové chromatografii běžnější, je tomu obráceně.

Pro atermický příspěvek platí vztah:

$$\ln(\gamma_A)_V = -\frac{\Delta \mathcal{S}_E}{R} \quad (3.25)$$

kde  $\Delta \mathcal{S}_E$  je molární dodatková entropie míšení. V praxi se používá upravený tvar:

$$\ln(\gamma_A)_V = 1 + \ln \frac{\mathcal{V}_A}{\mathcal{V}_s} \quad (3.26)$$

kde  $\mathcal{V}_s$  a  $\mathcal{V}_A$  jsou molární objemy stacionární fáze a složky A. Atermický příspěvek vždy způsobuje negativní odchylku od Raoultova zákona. Složky s větším molárním objemem jsou méně retardovány, pokud mají stejný tlak par jako složky s menším molárním objemem.

### 3.2.3 Kapalinová rozdělovací (partiční) chromatografie

Je založena na partičním procesu složky mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. Hnací silou partičního procesu je rozdíl koncentrací složky v obou fázích. Systém má snahu dostat se do rovnováhy, přičemž musí být splněna termodynamická podmínka:

$$(\Delta G)_{T,p} = 0 \quad (3.27)$$

kde  $(\Delta G)_{T,p}$  je změna Gibbsovy energie (volné entalpie) při konstantní teplotě a tlaku.

Jestliže je např. složka A distribuována mezi dvě nemísitelné kapalně fáze, lze dosažení rovnováhy vyjádřit pomocí chemických potenciálů, neboť chemický potenciál je totožný s parciální molární Gibbsovou energií:

$$(\mu_A)_s = (\mu_A)_m \quad (3.28)$$

kde  $(\mu_A)_s$  a  $(\mu_A)_m$  jsou chemické potenciály složky A ve fázi stacionární a mobilní. Hodnotu chemického potenciálu složky A v kterékoli fázi můžeme vyjádřit:

$$\mu_A = \mu_A^\circ + RT \ln a_A \quad (3.29)$$

kde  $\mu_A^\circ$  je chemický potenciál složky A ve zvoleném standardním stavu,  $a_A$  – aktivita složky A. V rovnováze musí platit:

$$(\mu_A^\circ)_s + RT \ln (a_A)_s = (\mu_A^\circ)_m + RT \ln (a_A)_m \quad (3.30)$$

$$RT \ln \frac{(a_A)_s}{(a_A)_m} = (\mu_A^\circ)_m - (\mu_A^\circ)_s \quad (3.31)$$

kde  $(a_A)_s$  je aktivita složky A ve stacionární fázi a  $(a_A)_m$  je aktivita této složky ve fázi mobilní.

Poměr aktivity složky A ve stacionární fázi k aktivitě téže složky v mobilní fázi je znám jako termodynamická distribuční konstanta  $K_D^\circ$  a tedy platí:

$$RT \ln K_D^\circ = -\Delta\mu_A^\circ \quad (3.32)$$

Rovnice (3.32) je Nernstův distribuční zákon, který udává vztah mezi termodynamickou distribuční konstantou  $K_D^\circ$  a rozdílem standardních chemických potenciálů. Protože hodnoty standardních chemických potenciálů jsou konstantní, je konstantní i jejich rozdíl i termodynamická distribuční konstanta. Při experimentálních měřeních jsou však zřídka dostupné hodnoty aktivit, proto používáme distribuční konstantu  $K_D$ , která je s termodynamickou distribuční konstantou spojena vztahem:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(\gamma_A)_m}{(\gamma_A)_s} K_D^\circ \quad (3.33)$$

kde  $(\gamma_A)_m$  a  $(\gamma_A)_s$  jsou aktivitní koeficienty složky A ve fázi mobilní a stacionární.

Spojením rovnic (3.32) a (3.33) dostaneme vztah pro distribuční konstantu

$$K_D = \frac{(\gamma_A)_m}{(\gamma_A)_s} \exp \frac{-\Delta\mu_A^\circ}{RT} \quad (3.34)$$

Důležitá je volba standardních stavů. Zatímco pro plynnou fázi zpravidla považujeme za standardní stav ideální plyn A (chování složky A) o jednotkové aktivitě a za teploty systému, pro kapalnou fázi jsou obvyklé dvě možnosti. Pokud zvolíme čistou složku A při teplotě a tlaku systému, tj.  $a_A = 1$ , je v rovnováze rozdíl standardních chemických potenciálů této složky v obou fázích nulový a rovn. (3.34) přechází na poměr aktivitních koeficientů. Pokud pracujeme s velmi malými koncentracemi složky A, volíme obvykle jako standardní stav složku A při nekonečném zředění. V případě, že aproximujeme aktivitu složky A v obou fázích koncentracemi (poměr aktivitních koeficientů je přibližně roven 1), závisí distribuční konstanta pouze na rozdílu standardních chemických potenciálů, který je obecně nenulový.

### 3.2.4 Gelová permeační chromatografie

Tato chromatografická metoda dělí látky na základě tzv. síťového efektu. Částice sorbentu obsahují póry o známé velikosti a tyto póry jsou zaplněny tzv. stagnující mobilní fází, tj. mobilní fází, která se nepohybuje. Objem stagnující mobilní fáze v koloně odpovídá objemu pórů a značí se  $V_i$ . Při dělení vzorku využívají jeho nejmenší molekuly největší část stagnující mobilní fáze, větší molekuly využívají jen část pórů a všechny molekuly, jejichž průměr je větší než vstupní otvor pórů, vycházejí z kolony s elučním objemem odpovídajícím objemu mobilní fáze

v prostoru mezi zrny sorbentu (intersticiálnímu objemu  $V_0$ ). Poslední uvedený případ označujeme jako totální exkluzi. Eluční objem jakékoli molekuly v gelové permeační chromatografii je dán rovnicí:

$$V_R = V_0 + K_D V_i \quad (3.35)$$

kde  $K_D$  je formální obdoba distribuční konstanty, jejíž hodnota leží v intervalu 0 až 1. Pokud by hodnota  $K_D$  dosáhla vyšší hodnoty, znamená to, že v systému dochází k uplatnění dalších mechanismů, např. k adsorpci. Rovnice (3.35) vyjadřuje eluční objem, ale neříká nic o tom, na čem závisí distribuční konstanta.

Nejjednodušším geometrickým modelem vycházejícím z fázové rovnováhy (rovnováha mezi koncentracemi složky v mobilní fázi a ve stagnující mobilní fázi) je Porathův model. Vycházel z představy uniformity pórů kuželového tvaru, jak je znázorněno na obr. 18.

Z této geometrické představy vychází vztah pro distribuční konstantu:

$$K_D = A(1 - d_s/d_m)^3 \quad (3.36)$$

kde  $A$  je konstanta úměrnosti,  $d_s$  – efektivní průměr molekuly separované složky,  $d_m$  – maximální průměr póru (základna kužele). Rovnovážný model, který navrhl de Vries a spolupracovníci, respektuje skutečně existující distribuci velikosti pórů:

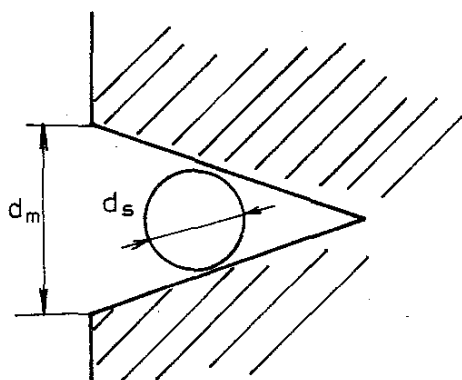
$$V_R = V_0 + \int_R^\infty \varphi(r) dr \quad (3.37)$$

kde  $\varphi(r) dr$  je celkový objem pórů s poloměrem mezi  $r, r + dr$  a  $R$  je poloměr molekul separované složky.

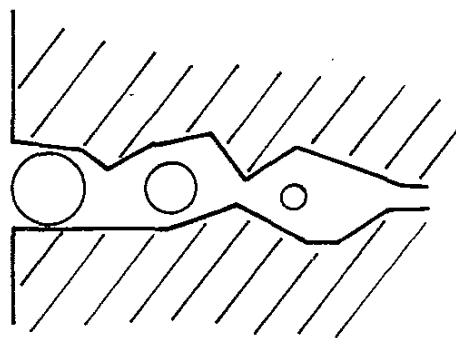
Když vyjádříme distribuční konstantu pro pór o velikosti poloměru  $r$  a složku o efektivním poloměru  $R$ , dostaneme

$$K_{D(R,r)} = \frac{c_i}{c_o} \quad (3.38)$$

kde  $c_i$  je koncentrace složky ve stagnující mobilní fázi,  $c_o$  – koncentrace složky v intersticiální mobilní fázi.



Obr. 18. Kuželový pór podle Poratha  
 $d_m$  – maximální průměr póru,  $d_s$  – efektivní průměr molekuly



Obr. 19. Omezená přístupnost nepravidelného póru



Formální rovnici pro eluční objem přepíšeme do tvaru:

$$V_R = V_o + \frac{c_i}{c_o} V_i \quad (3.39)$$

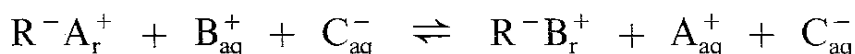
a rovn. (3.37) upravíme na tvar

$$V_R = V_o + \int_R^{r_{\max}} K_{D(R,r)} \varphi(r) dr \quad (3.40)$$

Současné představy předpokládají, že póry jsou poměrně nepravidelné (obr. 19) a že rozhodujícím kritériem není objem pórů, ale dostupnost částí jednotlivých pórů a distribuce velikostí všech pórů v gelové matici. Rozhodujícím parametrem pro separaci složek pomocí gelové permeační chromatografie je hydrodynamický průměr molekuly, což je průměr koule, kterou opíše molekula při volné rotaci v prostoru. V plynové chromatografii se setkáváme se síťovým efektem při separaci na molekulových sítích. Molekulová síta jsou alumosilikáty s velkými dutinami. Vstup do těchto dutin je řízen vstupními otvory jednotné velikosti. Látky s kritickým průměrem molekuly (průměrem největší kružnice opsané molekule v rovině kolmé na délku řetězce) menším, než je průměr vstupního otvoru dutiny, vstupují dovnitř a jsou zadržovány, molekuly s průměrem větším zůstávají vně v okolním médiu.

### 3.2.5 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie může být charakterizována jako výměnná adsorpce. Sorbent zachycuje určitý druh iontů a namísto toho vysílá do roztoku jiný ion. Většina těchto výměn probíhá ve vodných roztocích a jejich podstatou jsou chemisorpční reakce:



kde  $R^-$  představuje fixované iontové místo na měniči iontů,  $A_r^+$  – potenciálně zaměnitelný protiion,  $B_{aq}^+ + C_{aq}^-$  – zcela disociovanou iontovou sloučeninu – složku BC. Ion  $B^+$  je na měniči iontů zadržen, zatímco ion  $A^+$  přechází do mobilní fáze. Ionty  $A^+, B^+, C^-$  jsou v chromatografickém systému pohyblivé, zatímco ion  $R^-$  je pevně vázán. Tento chromatografický systém může být považován za soustavu dvou elektrolytů oddělených polopropustnou membránou. V takovém případě dochází ke vzniku Donnanova potenciálu, který je roven rozdílu elektrických potenciálů měniče iontů a vodného roztoku elektrolytu. Tímto potenciálem lze vysvětlit, proč na měniči iontů nacházíme malé množství iontů nesoucích stejný náboj jako fixovaná iontová místa. Transport v iontově výměnné chromatografii je ovlivněn nejen koncentračním gradientem, ale i Donnanovým potenciálem.

Výměnná reakce znázorněná výše uvedenou rovnicí může být popsána rovnovážnou konstantou:

$$K = \frac{[B^+]_r [A^+]_{aq}}{[B^+]_{aq} [A^+]_r} \quad (3.41)$$

kde  $[A^+]_{aq}$  a  $[A^+]_r$  jsou rovnovážné látkové koncentrace iontu  $A^+$  v mobilní a stacionární fázi (podobně pro ion  $B^+$ ). Náboje obou iontů jsou stejné, tj.  $+1$ . Pokud by např. ion A měl náboj  $+2$  a ion B  $+1$ , potom by se v rovn. (3.41) vyskytovaly látkové koncentrace iontu B podle zásady elektroneutality v druhé mocnině. Úvodem bylo řečeno, že iontově výměnná chromatografie je založena na chemisorpčních reakcích, tj., že skutečně dochází k chemické reakci. Na druhé straně je možno ovšem celou řadu jevů vysvětlovat na principu fyzikálních interakcí. Nejde tedy o jednoznačně vymezenou kategorii a záleží spíše na kritériu chemické reakce. Uvedený příklad reprezentuje chemickou reakci, která se běžně používá při demineralizaci vody, kdy je ion  $B^+$  zadržen na měniči iontů tak dlouho, dokud není vytěsněn nějakým jiným kationtem.

V chromatografických systémech je však obvyklé pracovat eluční technikou. V takovém případě dávkujeme do kolony složku BC a jako mobilní fázi používáme roztok obsahující ion  $A^+$  (nejčastěji složku AC). Měníč iontů přichází přitom neustále do styku s iontem  $A^+$ . Ion  $B^+$  vytěsňuje ion  $A^+$  z fixovaného iontového místa, ale později je z tohoto místa přebytkem iontu  $A^+$  sám vytěsněn a postupuje kolonou ve směru toku mobilní fáze. Vyšší koncentrace iontu  $A^+$  v mobilní fázi posune rovnováhu podle rovn. (3.41) v neprospěch sorbovaného iontu  $B^+$ .

Iontově výměnná chromatografie není tak selektivní, aby bylo možno dělit větší skupinu kovových iontů na základě jejich rozdílné interakce s měničem iontů. Velké množství separací kovových iontů se provádí s využitím koordinačních sloučenin těchto kovů. Ionty jako  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  a další jsou děleny ve formě komplexů s chlorem na měniči aniontů. Přímá iontová výměna se využívá zejména při dělení alkalických kovů, kdy jako mobilní fáze slouží zředěná kyselina chlorovodíková. Ionty alkalických kovů potom soutěží o iontové místo na měniči s hydroxoniovými ionty.

### 3.2.6 Afinitní chromatografie

Je určena k separaci biologických makromolekul, které lze jinak velice obtížně separovat, neboť rozdíly ve fyzikálně chemických vlastnostech těchto látek jsou malé. Na druhé straně je známo, že antigeny mohou vázat protilátky (antigenově specifické receptory), inhibitory mohou vytvářet komplexy s enzymy apod. Afinitní chromatografie je založena na tom, že na nosič je navázán kovalentní vazbou vhodný ligand, který je schopen vytvářet specifický komplex s určitou biologickou makromolekulou.

Do kolony naplněné takto připravenou stacionární fází se vnese roztok vzorku a po promytí zůstává určitý druh biomolekul vázaný v koloně, zatímco ostatní složky vzorku jsou vymyty. Vytvořený komplex je reverzibilní a při použití vhodného tlumivého roztoku nebo rozpustného protiligandu lze vázané biomolekuly z komplexu uvolnit. Kolona je potom připravena pro další separaci.

Jako nosiče pro navázání ligandu se používají částice, jejichž základem jsou polysacharidy (celulosa, agarosa, zesíťovaný dextran – Sephadex), nebo zesíťovaný

polyakrylamid, popř. pórovitá skla. Nosič se aktivuje nejčastěji reakcí s bromkyanem, což umožňuje následné navázání ligandu. Jako ligandy slouží např. specifické inhibitory, na kterých lze separovat enzymy, dále lektiny, na kterých se dělí různé glykoproteiny a nukleové kyseliny (tak lze např. izolovat informační ribonukleovou kyselinu), a bílkovinné antigeny, např. lidský sérový albumin, který umožňuje izolovat antigenově specifické receptory z lymfocytů apod.

### 3.3 KINETICKÁ TEORIE CHROMATOGRAFICKÉHO PROCESU

Základní principy chromatografické separace, o nichž bylo pojednáno na základě fázových rovnováh v odd. 3.2, vystihují dobře retenční chování látek, ale nemohou zcela charakterizovat chromatografický systém, který je svou podstatou dynamický. V zóně složky postupující chromatografickým ložem existují koncentrační gradienty jako základní podmínka nerovnováhy systému. Jejich vznik souvisí s neustále se pohybující mobilní fází, která unáší molekuly složky. Koncentrační gradienty způsobují, že v systému dochází ke kinetickým procesům, jako jsou difúzní pochody a převod hmoty. Výsledkem kinetických procesů je rozšiřování zóny složky během jejího postupu chromatografickým ložem.

Kinetiku chromatografického procesu se snažila vystihnout celá řada teorií, z nichž teorie chromatografického patra (Martin), teorie dynamická (van Deemter), model nahodilého kroku (Giddings) a nerovnovážné teorie (Giddings) jsou nejznámější. V tomto oddílu bude uvedena teorie chromatografického patra a teorie dynamická s přihlédnutím k některým závěrům Giddingsovým.

#### 3.3.1 Teorie chromatografického patra

Rozšiřování zóny složky během jejího postupu kolonou se pokoušela vysvětlit *teorie chromatografického patra*, kterou poprvé zveřejnili Martin a Syngge v r. 1941. Tato teorie je založena na pěti zjednodušujících předpokladech:

1. Chromatografická kolona je hypoteticky rozdělena na množství elementárních jednotek – pater.
2. Na každém patře dojde okamžitě k ustavení rovnováhy.
3. Hodnota distribuční konstanty je stejná v celé koloně a nezávisí na koncentraci.
4. Axiální difúze v koloně je zanedbatelná.
5. Tok mobilní fáze je diskontinuální, děje se po malých objemových přírůstcích.

Schematicky je vyznačena část kolony na obr. 20. Dojde-li k pohybu mobilní fáze o malý objem  $dV$ , dojde současně i k pohybu malého látkového množství separované složky  $dn_A$  z patra  $(p - 1)$  na patro  $p$ , který lze vyjádřit

$$dn_A = (c_{m(p-1)} - c_{m(p)}) dV \quad (3.42)$$

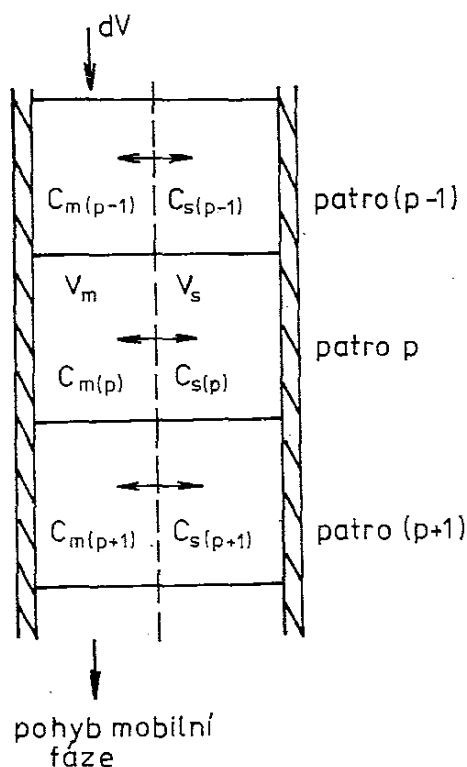
kde  $c_{m(p-1)}$  a  $c_{m(p)}$  jsou koncentrace složky v mobilní fázi na patře  $(p - 1)$  a  $p$ . Pro okamžité ustavení rovnováhy na patře  $p$  (s použitím diferenciálního vyjádření

$dc_s = K_D dc_m$ ) můžeme distribuci látkového množství  $dn_A$  mezi obě fáze na patře  $p$  zapsat:

$$dn_A = v_s dc_{s(p)} + v_m dc_{m(p)} \quad (3.43)$$

a po úpravě:

$$dn_A = (v_s K_D + v_m) dc_{m(p)} \quad (3.44)$$



Obr. 20. Model chromatografického patra  
 $V_s$  a  $V_m$  – objemy stacionární a mobilní fáze na jednom patře,  $c_m$  a  $c_s$  – koncentrace separované složky v mobilní a stacionární fázi

Výraz  $(v_s K_D + v_m)$  můžeme označit jako objem patra (jde o výraz formálně shodný s výrazem pro retenční objem) a vyjádřit pohyb mobilní fáze pomocí nové veličiny  $v$ , která na rozdíl od  $dV$  nemá běžný rozměr objemu:

$$dv = \frac{dV}{(v_s K_D + v_m)} \quad (3.45)$$

Po provedení dvou substitucí (za  $dn_A$  a  $dV$ ) v rovn. (3.44) získáme základní rovn. (3.46), která v diferenciální formě popisuje změnu koncentrace složky na patře  $p$  v závislosti na objemu mobilní fáze, jenž tímto patrem protekl:

$$dc_{m(p)} = [c_{m(p-1)} - c_{m(p)}] dv \quad (3.46)$$

Zvolíme-li počáteční podmínky tak, že  $c_{m(0)} = c_m^0$ , kde  $c_{m(0)}$  označuje koncentraci složky v mobilní fázi na patře, na kterém se uskutečnil nástřik, a  $c_m^0$  je koncentrace složky na tomto patře před zahájením separace ( $v = 0$ ), získáme z rovnice vztah:

$$c_{m(0)} = c_m^0 e^{-v} \quad (3.47)$$

a odtud pro libovolné  $n$ -té patro:

$$c_{m(n)} = c_m^0 \frac{e^{-v} v^n}{n!} \quad (3.48)$$

kde  $c_{m(n)}$  označuje koncentraci složky v mobilní fázi na  $n$ -tém patře. Jestliže je celkový počet pater  $n$ , pak je tato koncentrace shodná s koncentrací na výstupu kolony tak, jak ji zaznamená detektor. Tato funkce [rovn. (3.48)] se nazývá Poissonova a pro dostatečně velké  $n$  ji lze přibližně aproximovat funkcí Gaussovou. S použitím Stirlingovy aproximace  $n! = e^{-n} n^n \sqrt{2\pi n}$  a po nahrazení  $v$  elučním objemem  $V_R$  a objemem proteklé mobilní fáze  $V$  dostaneme z rovn. (3.48) úpravami vztah:

$$c = c_{\max} \exp \frac{-n(V - V_R)^2}{2V_R^2} \quad (3.49)$$

kde  $c_{\max}$  je koncentrace složky v maximu píku,  $n$  – počet elementárních úseků kolony (pater).

Teorie chromatografického patra narazila hned zpočátku na řadu námitek proti pěti zadaným předpokladům. V dnešní době je od této teorie upuštěno, ale v praxi se ujalo vyjadřování účinnosti chromatografických kolon počtem pater, popř. výškovým ekvivalentem teoretického patra.

### 3.3.2 Tvar eluční křivky

Z teorie chromatografického patra (odd. 3.3.1) vyplynulo, že eluční křivka (pík) má tvar Poissonova rozdělení, které při velkém počtu pater může být nahrazeno rozdělením Gaussovým. Pro jednotkovou plochu pod křivkou můžeme zapsat Gaussovu funkci

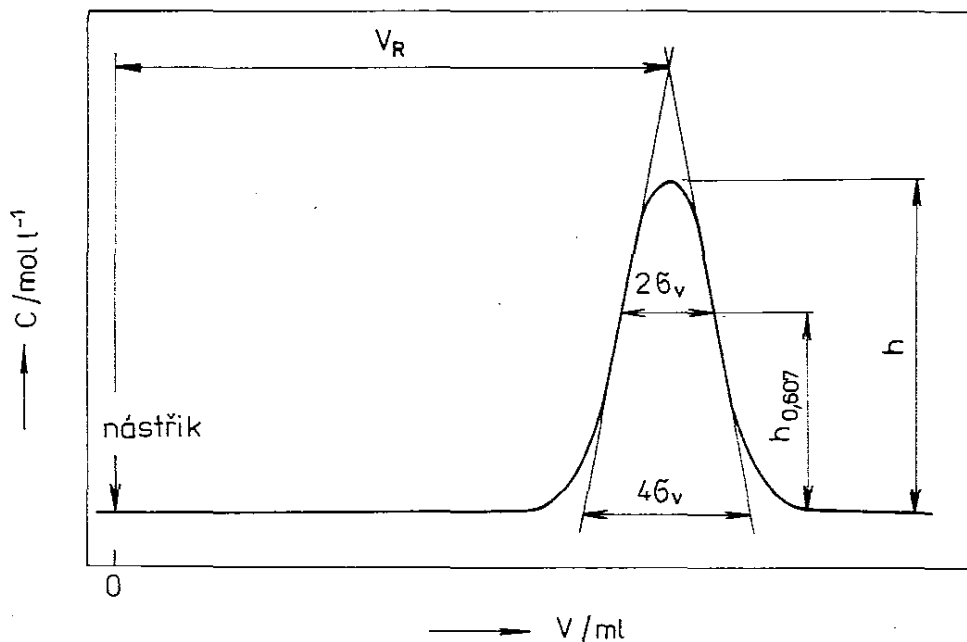
$$f(x) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \exp \frac{-(x - \mu)^2}{2\sigma^2} \quad (3.50)$$

kde  $\mu$  je střední hodnota,  $\sigma$  – směrodatná odchylka náhodné veličiny  $x$ . Pro chromatografickou eluční křivku, kterou detektor zaznamenává např. v souřadnicích  $V$ - $c$ , z toho vyplývá rovnice

$$c = \frac{n_0}{\sigma_V \sqrt{2\pi}} \exp \frac{-(V - V_R)^2}{2\sigma_V^2} = c_{\max} \exp \frac{-(V - V_R)^2}{2\sigma_V^2} \quad (3.51)$$

kde  $c$  je látková koncentrace složky,  $n_0$  – látkové množství složky v systému (odpovídá nástřiku),  $V_R$  – retenční objem této složky. Směrodatná odchylka  $\sigma_V$  je v objemových jednotkách. Rovnice (3.51) není na rozdíl od rovn. (3.50) uvedena pro jednotkovou plochu, ale pro plochu odpovídající konkrétnímu látkovému množství složky. Rovnice (3.51) také ukazuje, že maximální koncentrace složky bude při  $V = V_R$ . Znamená to, že výška píku bude záviset jak na množství složky nastříknutém do kolony, tak i na směrodatné odchylce. Názorně to ukazuje obr. 21, kde je také patrné, že šířka píku v inflexních bodech je  $2\sigma$  a tam, kde tangenty v inflexních bodech protínají nulovou linii, je šířka píku  $4\sigma$ . Pokud do kolony nastříkujeme stejná množství složky, budou výšky píků záviset pouze na hodnotě směrodatné odchylky. S rostoucí hodnotou  $\sigma$  poroste šířka píku a jeho výška se bude snižovat.

Máme zájem na tom, aby píky byly co nejužší, neboť tím se zlepšuje separace složek a je také možno snížit mez stanovitelnosti. Proto je směrodatná odchylka (přesněji její čtverec – rozptyl) používána pro vyjadřování účinnosti kolony.



Obr. 21. Parametry eluční křivky vyjádřené Gaussovou funkcí

$V_R$  – retenční objem,  
 $\sigma_v$  – směrodatná odchylka v objemových jednotkách,  
 $h_{0.607}$  – výška, ve které leží inflexní body

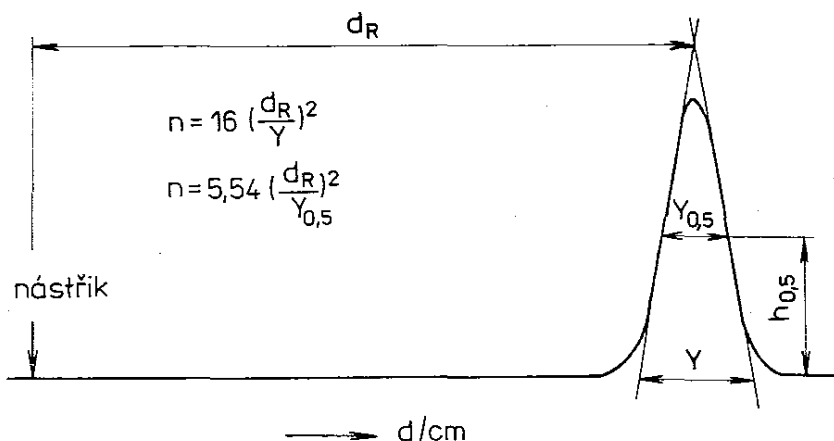
### 3.3.3 Počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra

Účinnost chromatografické kolony se vyjadřuje bezrozměrnou veličinou  $n$ , která se podobně jako v destilaci nazývá *počet teoretických pater*. Základní vztah, který získáme z rovn. (3.49) a (3.51), je jednoduchý:

$$n = \frac{V_R^2}{\sigma_v^2} = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} = \frac{L^2}{\sigma_L^2} \quad (3.52)$$

kde  $V_R$  je retenční objem,  $\sigma_v$  – směrodatná odchylka v objemových jednotkách. Ke stejnému výsledku dospějeme i s použitím délkových ( $L$  a  $\sigma_L$ ) nebo časových ( $t_R$  a  $\sigma_t$ ) údajů. Čím je větší  $n$ , tím méně se zóna složky rozšíří během průchodu kolonou a tím je chromatografická kolona účinnější.

V praxi používáme pro výpočet  $n$  podle vztahů, které jsou uvedeny na obr. 22, retenční vzdálenosti  $d_R$  a šířky píky v polovině jeho výšky  $Y_{0,5}$  nebo na úrovni nulové



Obr. 22. Určení počtu teoretických pater z chromatogramu  
 $d_R$ ,  $Y$ ,  $Y_{0,5}$  jsou měřeny v délkových jednotkách.

linie  $Y$ . Je samozřejmé, že  $d_R$  i  $Y_{0,5}$ , popř.:  $Y$  musí být ve stejných délkových jednotkách.

Počet teoretických pater není pro určitou kolonu konstantní, ale závisí na kapacitním poměru složky, která byla pro výpočet použita. V kapalinové chromatografii a v plynové chromatografii na kapilárních kolonách hodnoty  $n$  klesají s rostoucím kapacitním poměrem složek. V plynové chromatografii na náplňových kolonách je tomu naopak. Tento nedostatek má odstranit bezrozměrná veličina  $n_{ef}$ , označovaná jako *počet efektivních pater*:

$$n_{ef} = 5,54 \frac{(d_R - d_M)^2}{Y_{0,5}^2} = n \left( \frac{k}{k+1} \right)^2 \quad (3.53)$$

kde  $d_M$  je retenční vzdálenost nezadržované složky.

Součástí optimalizace chromatografického systému je časová složka, tj. čas, za který může být separace úspěšně provedena. U veličin  $n$  a  $n_{ef}$  tato složka chybí, a proto byl zaveden pojem počet efektivních pater za sekundu  $n_{ef}/t_R$  (rozměr  $s^{-1}$ ). Tuto veličinu získáme, vydělíme-li počet efektivních pater příslušným retenčním časem složky.

Při údajích o počtu teoretických pater je vždy nutné udávat délku kolony  $L$ , aby bylo zřejmé, s jakou kolonou bylo určitého počtu pater dosaženo. K porovnání kolon různých délek se používá *výškový ekvivalent teoretického patra*  $H$ , někdy nazývaný pouze výška patra:

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{16} \left( \frac{Y_t}{t_R} \right)^2 = \frac{\sigma^2}{L} \quad (3.54)$$

Výškový ekvivalent teoretického patra má rozměr délky a lze jej formálně označit jako délku kolony připadající na jedno teoretické patro. Poslední vztah v rovn. (3.54) definuje  $H$  jako rozptyl (druhou mocninu směrodatné odchylky) zóny složky vztažený na jednotku délky kolony. Čím menší je rozptyl, tím je kolona účinnější.

Během vývoje chromatografie se objevují snahy vzájemně srovnávat nejrůznější chromatografické systémy, zejména co do účinnosti. Když byl počet teoretických pater nahrazen výškovým ekvivalentem teoretického patra, bylo možno porovnávat účinnost kolon bez ohledu na jejich délku.

Další parametr, který ovlivňuje účinnost kolon, je průměr částic náplně kolony  $d_p$ . Tato skutečnost vedla zejména v kapalinové chromatografii k používání tzv. *redukováné výšky teoretického patra*  $h$ , která je dána rovnicí

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (3.55)$$

Je důležité, aby  $H$  i  $d_p$  byly udány ve stejných délkových jednotkách. Redukovaná výška teoretického patra umožňuje porovnávat kolony bez ohledu na jejich délku a na průměr částic sorbentu. Protože účinnost kolony, ať již vyjádřená jako  $n$ ,  $H$ ,

nebo  $h$ , závisí na lineární rychlosti toku mobilní fáze  $u$  (viz dále), používá se v souvislosti s  $h$  další bezrozměrný parametr, tzv. *redukovaná rychlost toku mobilní fáze*:

$$v = \frac{ud_p}{D_m} \quad (3.56)$$

kde  $D_m$  je difúzní koeficient složky v mobilní fázi ( $\text{v cm}^2 \text{s}^{-1}$ ). Lineární rychlost toku mobilní fáze  $u$  má rozměr  $\text{cm s}^{-1}$  a průměr částic sorbentu má rozměr  $\text{cm}$ . Redukovaná lineární rychlost toku mobilní fáze vyjadřuje transport hmoty jak prouděním, tak i difúzí.

### 3.3.4 Rovnice van Deemterova a Giddingsova

Skutečnost, že chromatografický systém nikdy není v rovnováze, se odráží v dynamické teorii van Deemtera a spolupracovníků. Podle této teorie je rozšiřování zóny složky během chromatografického procesu způsobeno čtyřmi faktory, které jsou vzájemně nezávislé a aditivní. Jsou to:

1. vířivá (turbulentní) difúze v mobilní fázi,
2. molekulární (axiální) difúze v mobilní fázi,
3. odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi,
4. odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi.

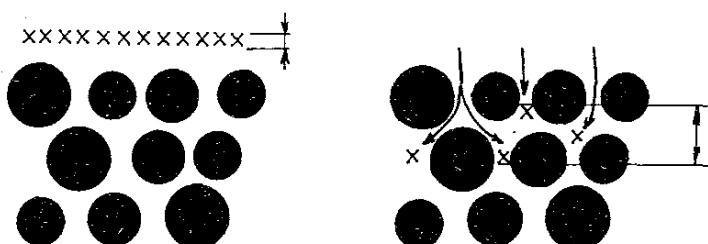
Tyto vlivy přispívají k celkové hodnotě výškového ekvivalentu teoretického patra, takže označíme-li jejich příspěvky symboly  $H_F$ ,  $H_L$ ,  $H_M$  a  $H_S$ , můžeme psát

$$H = H_F + H_L + H_M + H_S \quad (3.57)$$

kde  $H$  je celková výška teoretického patra zkoumaného chromatografického systému,  $H_F$  – příspěvek vířivé difúze,  $H_L$  – příspěvek molekulární difúze,  $H_S$  – příspěvek odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi,  $H_M$  – příspěvek odporu proti převodu hmoty ve fázi mobilní. Všechny příspěvky jsou v konzistentních délkových jednotkách. Jednotlivé vlivy budou nyní uvedeny podrobně a bude vysvětlen jejich význam.

#### Vířivá difúze v mobilní fázi

Jednotlivé molekuly vzorku v mobilní fázi procházejí mezi částicemi sorbentu. Částice sorbentu jsou uspořádány nepravidelně, tj. vzdálenosti mezi jednotlivými částicemi – kanálky – se liší velikostí, jak ukazuje obr. 23.



Obr. 23. Rozšiřování zóny složky vířivou difúzí  
Separované částice postupují nejrychleji  
v širokých kanálcích.



Mobilní fáze proudí v širších kanálcích rychleji než v kanálcích užších a také molekuly vzorku postupují různou rychlostí podle toho, ve kterém kanálku se nalézají. Přitom některé molekuly postupují přímočaře, jiné sledují proud obtékající částici sorbentu. Obrázek 23 ukazuje, jakým způsobem dochází k rozšíření chromatografické vlny. Uvedený kvalitativní popis naznačuje, že vířivá difúze bude úměrná velikosti částic sorbentu a jejich tvaru. Menší částice umožní vyšší homogenitu náplně kolony; zmenší rozdíly ve velikosti kanálku. Obtékání sférických částic bude odlišné od obtékání nepravidelných částic. Vliv vířivé difúze lze vyjádřit vztahem:

$$H_F = 2\lambda d_p \quad (3.58)$$

kde  $\lambda$  je bezrozměrný geometrický faktor, který je závislý na velikosti částic sorbentu a na uspořádání náplně. S klesajícím průměrem částice  $d_p$  roste hodnota  $\lambda$ .

Pro kapilární kolony (bez náplně) je člen  $H_F$  nulový. Důležité je, že vliv vířivé difúze je nezávislý na lineární rychlosti toku mobilní fáze  $u$ . V grafu  $H \sim u$  bude příspěvek členu  $H_F$  představovat rovnoběžku s osou  $x$ . Obtížná je ovšem představa vířivé difúze při nulové hodnotě  $u$ . Někteří autoři proto předpokládají, že při extrémně nízkých hodnotách  $u$  se hodnota  $H_F$  blíží k nule.

#### Molekulární difúze v mobilní fázi

Složka na začátku kolony vytvoří úzkou zónu. Při eluci tato zóna o vysoké koncentraci postupuje kolonou a na obou stranách zóny vznikají koncentrační gradienty. Podle Fickova zákona budou molekuly vzorku difundovat z místa o vyšší koncentraci složky do místa o koncentraci nižší. Tato difúze probíhá jak ve směru toku mobilní fáze, tak i proti němu. Protože ve většině případů zóna složky zaujímá celý průřez kolony, uvažujeme difúzi pouze v podélné (axiální) ose. Základním vztahem pro výpočet příspěvku molekulární difúze je Einsteinova rovnice:

$$\sigma^2 = 2D_m t_M \quad (3.59)$$

kde  $\sigma$  je směrodatná odchylka v šířce chromatografické zóny,  $D_m$  – difúzní koeficient složky v mobilní fázi (v  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $t_M$  – doba, kterou stráví průměrná molekula složky v mobilní fázi. Jestliže  $t_M = L/\bar{u}$ , kde  $L$  je délka kolony, můžeme psát:

$$\sigma^2 = \frac{2D_m L}{\bar{u}} \quad (3.60)$$

Po substituci za  $\sigma^2$  z rovn. (3.54) dostaneme vztah:

$$H_L = \frac{2D_m}{\bar{u}} \quad (3.61)$$

V náplňových kolonách nemohou molekuly složky volně difundovat, proto se do rovn. (3.61) zavádí ještě bezrozměrný faktor  $\gamma$ , který zohledňuje složitou dráhu molekul:

$$H_L = \frac{2\gamma D_m}{\bar{u}} \quad (3.62)$$

Hodnota  $\gamma$  závisí na povaze náplně chromatografické kolony a zpravidla se používá hodnota 0,6. Pro kapilární a otevřené kolony  $\gamma = 1,0$ . V plynové chromatografii jsou běžné hodnoty difúzních koeficientů  $10^{-1} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , zatímco v kapalinové chromatografii je obvykle  $D_m \approx 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Často se v kapalinové chromatografii tento příspěvek zanedbává. Při mimořádně nízké lineární rychlosti mobilní fáze se může v kapalinové rozdělovací chromatografii uplatnit i vliv molekulární difúze ve stacionární fázi:

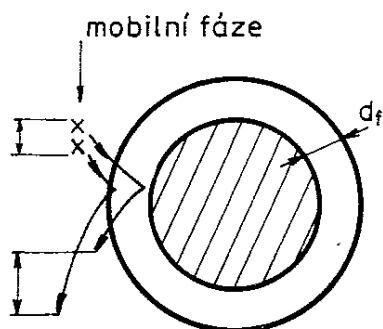
$$H_L = \frac{2\gamma D_m + \gamma' k D_s}{\bar{u}} \quad (3.63)$$

kde  $\gamma'$  je faktor úměrnosti,  $k$  – kapacitní poměr složky,  $D_s$  – difúzní koeficient složky ve stacionární fázi.

Z rovnice (3.62) je zřejmé, že vliv molekulární difúze v mobilní fázi podstatně klesá se stoupající lineární rychlostí toku  $u$ . V grafu  $H \sim u$  bude příspěvek  $H_L$  představovat větev hyperboly.

Odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi

Tento vliv lze ukázat např. v partiční chromatografii (GLC a LLC), i když se významně uplatňuje i v ostatních chromatografických technikách. Jak ukazuje obr. 24, je na povrchu nosiče nanášena stacionární fáze o tloušťce filmu  $d_f$ . Molekuly složky difundují z proudu mobilní fáze do vrstvy stacionární fáze a zpět. Přitom některé molekuly pronikají pouze pod povrch této vrstvy, zatímco jiné do hloubky.



Obr. 24. Rozšiřování zóny složky odporem proti převodu hmoty ve stacionární fázi  
Separované částice pronikají do různé hloubky stacionární fáze ( $d_f$  – tloušťka vrstvy stacionární fáze).

Molekula, která pronikne do hloubky, stráví více času ve stacionární fázi a opozdí se za molekulou, která pronikne pouze pod povrch. Pohyb mobilní fáze způsobí, že zóna vzorku v mobilní fázi „předbíhá“ odpovídající zónu vzorku ve stacionární fázi, a tak dochází k rozšíření píku.

Kvantitativně lze vliv odporu proti převodu hmoty vyjádřit vztahem:

$$H_s = \frac{\psi d_f^2 \bar{u}}{D_s} \frac{k}{(k + 1)^2} \quad (3.64)$$

kde  $\psi$  je konfigurační faktor, který zahrnuje vliv geometrie náplně. Ostatní symboly mají stejný význam jako v dříve uvedených rovnicích.

Pro sorpci na tuhém povrchu platí vztah:

$$H_s = 2\psi t_d \bar{u} \frac{k}{(k + 1)^2} \quad (3.65)$$

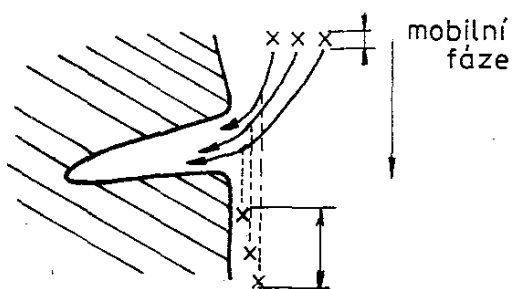
kde  $t_d$  je čas potřebný k desorpci průměrné molekuly vzorku (čas, po který setrvává průměrná molekula ve stacionární fázi během jednoho kroku sorpce–desorpce).

U adsorpční chromatografie v plynné fázi (GSC), ale zvláště v kapalně fázi (LSC) se setkáváme s pojmem stagnující mobilní fáze. Mobilní fáze vyplní póry adsorbentu, ale dále s hlavním tokem nepostupuje – stagnuje. Molekuly vzorku, které se sorbují na tuhém povrchu, musí překonávat různou vzdálenost podle toho, na kterém místě póru se sorbují (obr. 25).

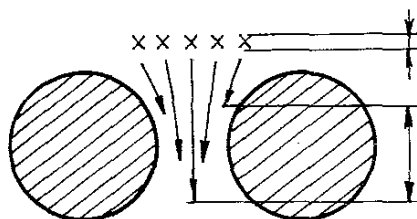
Vliv stagnující mobilní fáze na výšku teoretického patra  $H_{SM}$  je důležitý zejména v gelové chromatografii, kde se teoreticky neuplatňuje žádná sorpce. Pro kulovou pórovitou částici platí v GPC vztah:

$$H_{SM} = \frac{d_p^2 \bar{u}}{30D_m} \frac{k}{(k+1)^2} \quad (3.66)$$

Odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi je přímo úměrný lineární rychlosti toku mobilní fáze. V grafu  $H \sim u$  bude člen  $H_s$  (právě tak jako člen  $H_{SM}$ ) představovat přímkou procházející počátkem. Strmost přímky bude vzrůstat s tloušťkou filmu stacionární fáze  $d_f$ , popř. se středním desorpčním časem  $t_d$ .



Obr. 25. Rozšiřování zóny složky vlivem stagnující mobilní fáze  
Separované částice pronikají do různé hloubky póru naplněného mobilní fází.



Obr. 26. Rozšiřování zóny složky odporem proti převodu hmoty v mobilní fázi  
Maximální rychlosti dosahují částice postupující ve středu kanálku.

## Odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi

Proudí-li mobilní fáze kanálky mezi částicemi náplně nebo kapilární kolonou, je tento tok složen z jednotlivých proudů, které mají různou lineární rychlost. U povrchu sorbentu, resp. u stěn kapiláry je rychlost téměř nulová, zatímco ve středu toku dosahuje maxima (obr. 26).

Molekuly složky, pokud postupují s jednotlivými proudy, postupují v určitém okamžiku různou rychlostí. Difúzí dochází k přestupu z jednoho proudu do druhého, a tak jsou vyrovnávány vzniklé rozdíly. Protože vzdálenost, kterou musí molekuly překonat difúzním pohybem, je dána průměrem kanálků a průměr kanálků je přímo úměrný velikosti částic sorbentu, můžeme říci, že člen  $H_M$  je přímo úměrný velikosti částic sorbentu  $d_p$  a nepřímo úměrný difúznímu koeficientu složky v mobilní fázi  $D_m$ .

Dále lze vyvodit, že velikost  $H_M$  bude přímo úměrná lineární rychlosti  $u$ , neboť na

této rychlosti závisí, zda molekuly mohou mít dost času k uskutečnění difúzního pohybu. Výsledný vztah má tvar:

$$H_M = \frac{\omega d_p^2 u}{D_m} \quad (3.67)$$

kde  $\omega$  je faktor daný typem náplně (uvádí se přibližná hodnota  $\omega = 1,3$ ).

Odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi je přímo úměrný rychlosti toku mobilní fáze. V grafu  $H \sim u$  bude člen  $H_M$  podle rovn. (3.67) představovat přímku procházející počátkem. V systémech kapalinové chromatografie bylo zjištěno, že při vyšších rychlostech mobilní fáze jsou skutečné hodnoty  $H_M$  menší, než odpovídá rovn. (3.67). Vlivem turbulence dochází k zakřivení přímky pro vyšší hodnoty  $u$ . Dále byla zjištěna složitá závislost členu  $H_M$  na kapacitním faktoru měřené složky. V plynové chromatografii se zpravidla tento člen zanedbává, neboť vysoká hodnota  $D_m$  činí příspěvek  $H_M$  málo významným.

Na začátku tohoto oddílu bylo uvedeno, že van Deemterova teorie předpokládá nezávislost a aditivnost jednotlivých příspěvků. Znamená to, že celkový výškový ekvivalent teoretického patra je roven:

$$H = H_F + H_L + H_M + H_S + H_{SM} \quad (3.68)$$

Vysoké hodnoty difúzních koeficientů v plyné fázi dovolují v plynové chromatografii zanedbat členy  $H_M$ , popř.  $H_{SM}$ , a tak pro plynovou rozdělovací chromatografii (GLC) má van Deemterova rovnice tvar:

$$H = \underbrace{2\lambda d_p}_{H_F} + \underbrace{\frac{2\gamma D_m}{\bar{u}}}_{H_L} + \underbrace{\frac{\psi d_f^2 \bar{u}}{D_s} \frac{k}{(k+1)^2}}_{H_S} \quad (3.69)$$

kde  $\bar{u}$  je střední lineární rychlost toku mobilní fáze, neboť vlivem stlačitelnosti plynů tato rychlost není v celé koloně stejná.

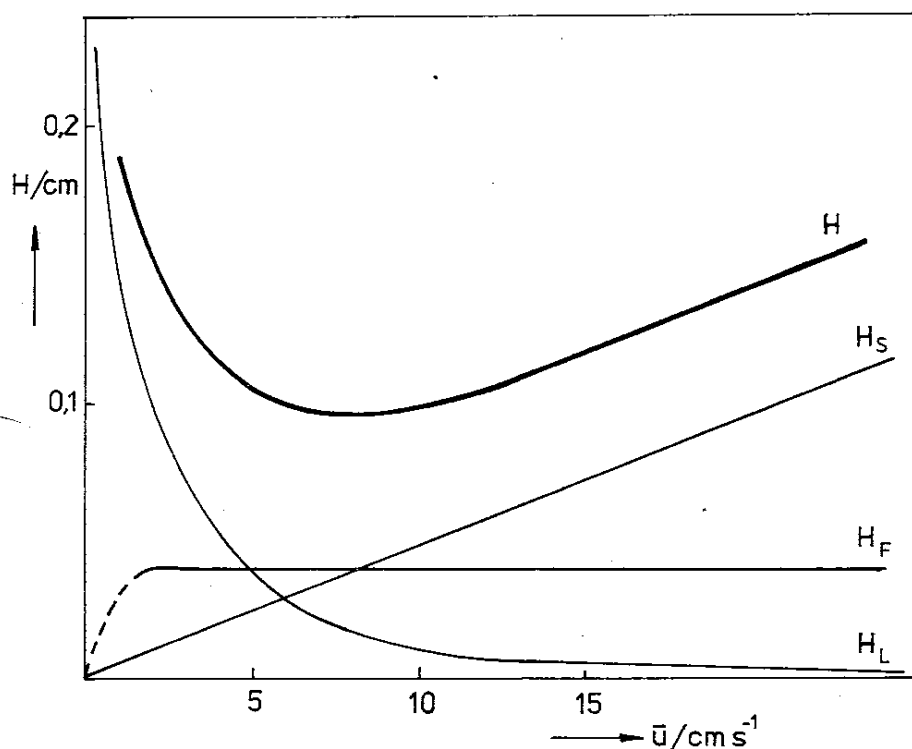
V praxi se většinou nepoužívá rozvinutý tvar van Deemterovy rovnice, ale vyjádření závislosti  $H$  na střední lineární rychlosti toku mobilní fáze  $\bar{u}$ , které nám umožňuje optimalizovat účinnost chromatografické kolony:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (3.70)$$

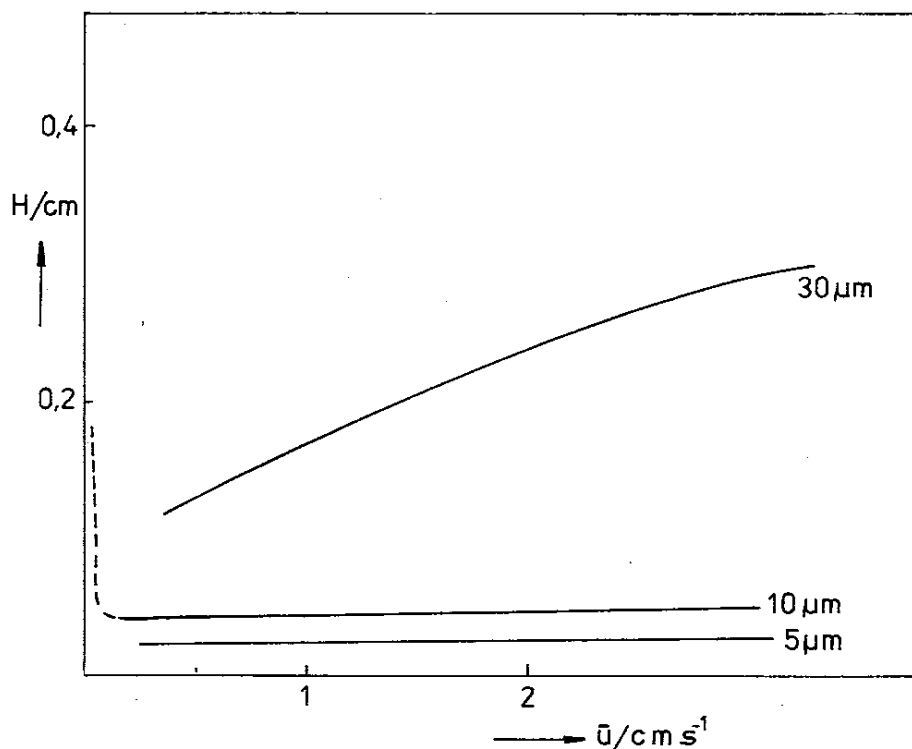
kde  $A$  (v cm),  $B$  (v cm s<sup>-1</sup>) a  $C$  (v s) jsou konstanty pro daný chromatografický systém (složka–nosný plyn–kolona) a pro danou teplotu. Na obrázku 27 jsou ukázány příspěvky jednotlivých členů rovnice. Součtová křivka má tvar hyperboly s minimem, které vystihuje optimální lineární rychlost toku mobilní fáze.

Při aplikaci van Deemterovy teorie na kapalinovou chromatografii je třeba znovu upozornit na rozdíly v hodnotách difúzních koeficientů. Průměrná hodnota  $D_m \approx 10^{-5}$  cm s<sup>-1</sup> má za následek, že molekulární difúzi v kapalinové chromatografii můžeme většinou zanedbat. Křivka  $H \sim u$  nemá minimum, neboť toto mini-

num leží v oblasti tak nízkých hodnot  $u$ , kde se již běžně nepracuje. Ze vztahů pro ostatní příspěvky vyplývá, že v kapalinové chromatografii by závislost  $H \sim u$  měla představovat přímku vytínající na ose  $H$  úsek odpovídající členu  $H_F$  – vířivé difúzi.



Obr. 27. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$  na střední lineární rychlosti toku mobilní fáze  $\bar{u}$  v plynové chromatografii  $H_F$  – příspěvek vířivé difúze,  $H_L$  – příspěvek molekulární difúze,  $H_S$  – příspěvek odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi



Obr. 28. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$  na střední lineární rychlosti toku mobilní fáze  $\bar{u}$  v kapalinové chromatografii (ukázka pro tři různá zrnění sorbentu  $d_p = 5, 10, 30 \mu\text{m}$ )

V praxi se tyto závěry nepotvrdily. Experimentálně změřené závislosti nejsou tak strmé, jak by vyplývalo z van Deemterovy teorie, a při vyšších rychlostech toku mobilní fáze přechází závislost na tvar konvexní křivky, jak ukazuje obr. 28. Při použití sorbentu o malém průměru částic je tato závislost v podstatě přímková a účinnost kolony málo závisí na lineární rychlosti toku mobilní fáze. Giddings

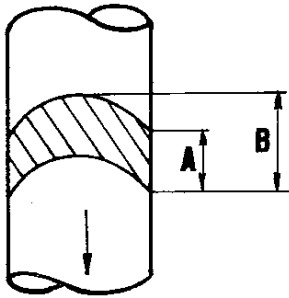
zjistil, že vliv vířivé difúze a odporu proti převodu hmoty jsou vzájemně závislé, a tento poznatek formuloval v rovnici:

$$H = \frac{1}{\frac{1}{H_F} + \frac{1}{H_M}} + H_S = \frac{1}{\frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{D_m}{\omega d_p^2 u}} + \frac{\psi d_f^2 u}{D_s} \frac{k}{(k+1)^2} \quad (3.71)$$

Rovnice (3.71) se nazývá Giddingsova a vyhovuje pro většinu případů v kapalinové chromatografii.

K rozšiřování elučních zón v chromatografii přispívají i některé další faktory, z nich nejdůležitější je nestejná rychlost mobilní fáze v koloně a mimokolonové příspěvky.

První faktor lze demonstrovat následujícím způsobem: Při průchodu mobilní fáze naplněnou kolonou dochází k deformaci zóny složky, jak ukazuje obr. 29. Ve středu kolony postupuje mobilní fáze (a tím i část zóny složky) pomaleji než u stěn kolony. Výsledkem je, že směrodatná odchylka v šířce zóny je rovna hodnotě B místo očekávané teoretické hodnoty A.



Obr. 29. Profil zóny složky v chromatografické koloně

Mimokolonové příspěvky představují rozšíření chromatografických píků v nastřikovacím zařízení, v detektoru, spojovacích trubicích atd. Tento příspěvek je úměrný celkovému objemu těchto částí. Rozptyl v šířce chromatografické zóny je roven součtu rozptylů v koloně a ve všech ostatních částech:

$$\sigma_{\text{celkový}}^2 = \sigma_k^2 + \sigma_n^2 + \sigma_d^2 + \sigma_s^2 \quad (3.72)$$

kde indexy k, n, d, s značí kolonu, nastřikovací zařízení, detektor a spoje. Mimořádný význam mají mimokolonové příspěvky ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Objemy všech částí aparatury mají být co nejmenší, aby se zamezilo mimokolonovému rozmývání píků, a tím snížení účinnosti kolony. Při použití mikrokolon v kapalinové chromatografii bylo nutno přestavět detektory tak, aby objem cely klesl z 8 až 10  $\mu\text{l}$  na 1 až 3  $\mu\text{l}$ , protože mimokolonové rozmytí bylo nepříjemně velké.

### 3.3.5 Rozlišení

Podstatou problému v chromatografii je dosáhnout separace složek vzorku, protože již v úvodu byla definována chromatografie jako separační technika. Ať již jde o analytickou, nebo preparativní chromatografii, ať vzorek obsahuje dvě

složky, nebo několik set, vždy zůstává smyslem chromatografického experimentu dosáhnout rozdělení těchto složek.

Rozdělení může být dokonalé nebo neúplné a je vhodné tento stupeň kvantitativně vyjádřit. V praxi se používá míra relativní separace dvou sousedních píků  $j, i$  – rozlišení  $R_{ij}$ , které je definováno rovnicí:

$$R_{ij} = \frac{t_{R,j} - t_{R,i}}{0,5(Y_j + Y_i)} \quad (3.73)$$

kde  $t_{R,j}$  a  $t_{R,i}$  jsou retenční časy složek  $j$  a  $i$ ,  $Y_j, Y_i$  – odpovídající šířky píků na úrovni nulové linie. Platí, že složka  $j$  eluuje později než složka  $i$ .

Rovnice (3.73) definuje rozlišení jako vzdálenost vrcholů dvou sousedících píků dělenou průměrnou šířkou těchto píků na úrovni nulové linie. Rozlišení je veličina bezrozměrná a v rovn. (3.73) musí být použity veličiny ve stejných jednotkách. Větší hodnota rozlišení znamená lepší separaci dvou složek a naopak. Při hodnotě  $R_{ij} = 1,0$  se dva stejně velké symetrické píky překrývají asi 2 %.

Rovnice (3.73) definuje rozlišení a umožňuje kvantitativní vyjádření tohoto parametru, ale neříká nic o tom, které parametry chromatografického systému je třeba změnit, aby se změnilo rozlišení. Již předem lze říci, že velikost rozdílu elučních časů je záležitostí termodynamickou, zatímco průměrná šířka píků je záležitostí kinetickou. Skutečnou rovnici rozlišení lze odvodit z rovn. (3.73) s použitím některých dříve uvedených vztahů a za určitých zjednodušujících předpokladů. Jestliže v rovn. (3.73) nahradíme retenční časy kapacitními poměry,  $t_R = t_M(1 + k)$ , potom dostaneme vztah:

$$R_{ij} = \frac{t_M(k_2 - k_1)}{0,5(Y_1 + Y_2)} \quad (3.74)$$

Dále použijeme rovnici z obr. 22:

$$Y_i = \frac{4}{\sqrt{n}} t_R$$

Výraz pro  $Y_i$  použijeme k substituci za  $Y_1$  a  $Y_2$ . Současně však budeme předpokládat, že obě šířky píků se příliš neliší, a že tedy  $Y_2 = Y_1$ . Tento předpoklad je zpravidla splněn:

$$R_{ij} = \frac{\sqrt{n_1} t_M(k_2 - k_1)}{4t_{R,1}} \quad (3.75)$$

Po opětné substituci za  $t_R$  platí:

$$R_{ij} = \frac{\sqrt{n_1} (k_2 - k_1)}{4 (1 + k_1)} \quad (3.76)$$

Zlomek na pravé straně rovn. (3.76) vynásobíme  $k_1$ , a to jak čitatele, tak jmenovatele:

$$R_{ij} = \frac{\sqrt{n_1} (k_2 - k_1)}{4} \left( \frac{k_1}{1 + k_1} \right) \quad (3.77)$$

Poměr dvou kapacitních faktorů  $k_2/k_1$  je totožný s poměrem dvou distribučních konstant (při konstantním poměru mobilní a stacionární fáze v koloně) a nazývá se retenční poměr  $r_{2,1}$ :

$$R_{ij} = \frac{\sqrt{n_1}}{4} (r_{2,1} - 1) \left( \frac{k_1}{1 + k_1} \right) \quad (3.78)$$

Rovnice (3.78) se někdy nazývá skutečná rovnice rozlišení. Rozlišení je ovlivňováno třemi do značné míry nezávislými faktory. První člen – kinetický – udává, že rozlišení je přímo úměrné druhé odmocnině počtu pater kolony. Druhý člen – termodynamický – udává, že rozlišení je přímo úměrné retenčnímu poměru  $r_{2,1}$  a blíží se k nule, když se retenční poměr blíží 1. Třetí člen – kapacitní – udává, že rozlišení roste s rostoucí hodnotou kapacitního poměru a blíží se k nule, když se kapacitní poměr blíží k nule.

Rovnice (3.78) vyhovuje pro ty případy, kdy  $t_{R,1}$  a  $t_{R,2}$  nejsou příliš odlišné, tj. ve většině praktických případů. Jestliže  $t_{R,1} \ll t_{R,2}$ , potom používáme pozměněný tvar:

$$R_{ij} = \frac{\sqrt{n_2}}{4} \left( \frac{r_{2,1} - 1}{r_{2,1}} \right) \left( \frac{k}{k + 1} \right) \quad (3.79)$$

V těch případech, kdy  $r_{2,1} \leq 1,2$ , dávají rovn. (3.78) a (3.79) přibližně stejné výsledky.

V literatuře se též objevuje rovnice pro rozlišení, k jejímuž odvození nebyla použita dříve zmíněná zjednodušení, např.  $Y_1 = Y_2$ . Tato rovnice by měla být přesnější:

$$R_{ij} = \frac{\sqrt{\bar{n}}}{4} \left( \frac{r_{2,1} - 1}{r_{2,1} + 1} \right) \left( \frac{\bar{k}}{1 + \bar{k}} \right) \quad (3.80)$$

kde  $k = 0,5(k_1 + k_2)$ . Také tato rovnice pro  $r_{2,1} \leq 1,2$  poskytuje výsledky nepříliš rozdílné od rovn. (3.78).

### 3.4 SEPARAČNÍ PROCES A JEHO OVLIVNĚNÍ

Jak bylo konstatováno v úvodu odd. 3.1, separaci jakéhokoli vzorku obsahujícího alespoň dvě složky lze ovlivnit v podstatě dvěma způsoby:

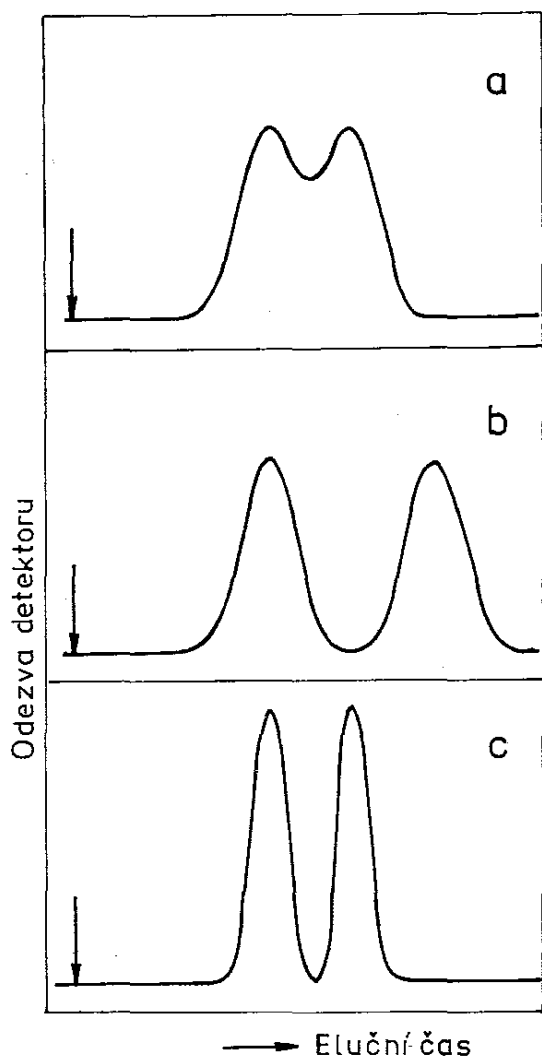
a) zásahy do chromatografického systému, které změni sílu interakce mezi složkami vzorku a sorbentu,

b) zásahy do chromatografického systému, které ovlivní šířky zón eluujících složek (v praxi jde vždy o zúžení zón).

Na obrázku 30 je znázorněno, jak těmito zásahy můžeme docílit rozdělení dvou-složkové směsi, která se v daném systému dělila neúplně (obr. 30a). Změnou síly interakce složek a sorbentu můžeme získat chromatogram, který je na obr. 30b. Říkáme, že ovlivňujeme termodynamický aspekt separace. Jestliže zvýšíme separační



účinnost chromatografického systému bez toho, že bychom měnili ostatní podmínky, získáme chromatogram, který je na obr. 30c. V tomto případě ovlivňujeme kinetický aspekt separace.



Obr. 30. Ovlivnění separačního procesu  
 a – neúplně rozdělené složky, b – rozdělení  
 dosažené ovlivněním termodynamického aspektu,  
 c – rozdělení dosažené změnou kinetického  
 aspektu

### 3.4.1 Termodynamický aspekt separačního procesu

Ze základní rovnice pro retenční objem [rovn. (3.10) na str. 48] vyplývá, že retenční objem závisí na třech parametrech.

První z nich, mrtvý retenční objem  $V_M$ , není významný, neboť představuje parametr, který je stejný pro všechny separované složky v daném chromatografickém systému.

Distribuční konstanta  $K_D$  má klíčovou úlohu při ovlivňování termodynamického aspektu separace. Možnosti její změny jsou dány separačním mechanismem, na jehož základě separace probíhá, a o těchto principech bylo podrobně pojednáno v odd. 3.2. Distribuční konstanta je však také funkcí teploty a tím je dáno, že teplota je dalším parametrem, který může ovlivnit termodynamiku separačního procesu.

I když chromatografická kolona představuje dynamický systém, který by měl být hodnocen statisticky, můžeme za výslednici sil působících na molekulu v jedné fázi považovat rozdíl statických a dynamických sil. Statické síly působí mezi molekulami a dynamické síly mají snahu porušit molekulární asociace. Výsledkem zvýšení teploty bude zvýšení kinetické energie molekuly a redukce sil, které zadržují molekulu

v určité fázi. Redukce bude platit jak pro stacionární, tak i pro mobilní fázi a výsledné ovlivnění retence složky zvýšením teploty bude záviset na znaménku a na velikosti molární entalpie  $\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}$ , spojené s převodem 1 molu složky ze stacionární do mobilní fáze:

$$\frac{d \ln K_D}{dT} = - \frac{\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}}{RT^2} \quad (3.81)$$

Po integraci dostaneme:

$$\log K_D = \frac{\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}}{2,303 RT} + A \quad (3.82)$$

kde  $A$  je integrační konstanta.

Z rovnice (3.82) je patrná rozhodující úloha molární entalpie  $\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}$ . Tato energie se podstatně liší podle toho, o jaký druh chromatografie jde. Největších hodnot dosahuje v plynové chromatografii, průměrně kolem  $40 \text{ kJ mol}^{-1}$ . V plynové partiční chromatografii (GLC)  $\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}$  představuje molární teplo vypařování z roztoku, tj. vypařování složky z kapalně stacionární fáze:

$$\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m} = \Delta\mathcal{H}_{\text{vyp}} - \Delta\mathcal{H}_E \quad (3.83)$$

kde  $\Delta\mathcal{H}_{\text{vyp}}$  je molární výparné teplo složky a  $\Delta\mathcal{H}_E$  – molární dodatkové teplo rozpouštění. V plynové adsorpční chromatografii (GSC) představuje  $\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}$  teplo adsorpční. Tato tepla jsou v plynové chromatografii vždy kladná. Potřebné hodnoty  $\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}$  získáme graficky vynesemím hodnot  $\log K_D$  proti  $1/T$  výpočtem ze směrnice přímky. (V plynové chromatografii se vynáší logaritmus specifického retenčního objemu  $\log V_g$  proti  $1/T$ .)

V kapalinové chromatografii je  $\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}$  podstatně menší a může být i negativní. Ve většině chromatografických systémů je zpravidla objem stacionární fáze mnohem menší než objem fáze mobilní a změny entropie spojené s převodem jsou velmi malé. K přiměřené retenci složky je potom třeba, aby  $\Delta\mathcal{H}_{s \rightarrow m}$  bylo kladné. V kapalinové chromatografii jsou běžné hodnoty kolem  $10 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Z toho vyplývá, že teplota je podstatně méně důležitý parametr v kapalinové chromatografii v porovnání s chromatografií plynovou.

Když se dvě složky nedělí při určité teplotě, existuje v jakémkoli chromatografickém systému určitá pravděpodobnost, že se tyto složky rozdělí při teplotě jiné. Tato pravděpodobnost má reálné vyhlídky na úspěch ve dvou případech:

- a) složky se liší velikostí nebo tvarem molekuly,
- b) složky se liší podstatou interakce se stacionární (někdy i mobilní) fází.

V kapalinové chromatografii může zvýšení teploty přinést zvýšení hodnoty difúzních koeficientů a snížení viskozity mobilní fáze, a tak příznivě ovlivnit kinetický aspekt separace.

Poslední parametr, který může ovlivnit hodnotu retenčního objemu, je objem stacionární fáze  $V_s$  v chromatografickém systému. Tento termín má poměrně jednoznačný význam v plynové a kapalinové partiční chromatografii, kde představuje

celkový objem stacionární fáze mechanicky nanesené na nosiči, popř. fáze, která je s nosičem spojena chemickou vazbou. V adsorpční chromatografii, ať již plynové, nebo kapalinové, má zpravidla význam hmotnosti adsorbentu v daném chromatografickém systému a v gelové chromatografii zase představuje tzv. intersticiální objem, tj. objem všech pórů vyplněných stagnující mobilní fází v koloně. V iontové výměnné chromatografii nejlépe vystihuje tento parametr celkový počet fixovaných iontových míst v chromatografickém systému a obdobně je tomu u afinitní chromatografie. V praxi to znamená, že můžeme poměrně snadno měnit hodnotu  $V_s$  v případě partiční chromatografie, kdy je stacionární fáze mechanicky nanesená na nosiči. V ostatních případech je to buď velmi složité, nebo dokonce nemožné. Zvýšení hodnoty  $V_s$  znamená větší kapacitu kolony (možnost nástřiku většího vzorku), zvýšení retenčních objemů všech složek, a tím i zvýšení kapacitního členu skutečné rovnice rozlišení [rovn. (3.78)]. Na druhé straně však vyšší hodnota  $V_s$  přináší prodloužení doby analýzy a zhoršení kinetiky procesu, neboť narůstá odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi [viz rovn. (3.64)]. Malé množství stacionární fáze v koloně přináší jiné nebezpečí, kterým je neúplné pokrytí povrchu nosiče stacionární fází. V takovém případě může dojít ke vzniku smíšeného separačního mechanismu (partiční proces ve stacionární fázi a adsorpce na nepokrytém nosiči), což vede vždy ke zhoršení separační účinnosti. Regulace objemu stacionární fáze v koloně je běžně využívána v plynové partiční chromatografii, kde analytické náplňové kolony obsahují ca 3 až 5 hmotn.% stacionární fáze, zatímco preparační kolony obsahují této fáze 15 až 20 hmotn.%.

### 3.4.2 Kinetický aspekt separačního procesu

Všechny parametry, které mohou ovlivnit kinetiku separačního procesu, jsou shrnuty v rovnici van Deemterově [rovn. (3.69)] a Giddingsově [rovn. (3.71)]. Jsou to: lineární rychlost toku mobilní fáze  $u$ , průměr částic sorbentu  $d_p$ , difúzní koeficienty složky v mobilní a stacionární fázi  $D_m$  a  $D_s$ , tloušťka filmu stacionární fáze  $d_f$  a kapacitní poměr složky  $k$ . Vzhledem k tomu, že rovn. (3.69) a (3.71) jsou vztaženy k výškovému ekvivalentu teoretického patra  $H$ , je nutno ještě uvažovat délku kolony  $L$ , aby mohla být výstižena celková účinnost chromatografické kolony. Z výše uvedených parametrů mají menší význam difúzní koeficienty, které se v plynové chromatografii mohou ovlivnit volbou nosného plynu a v kapalinové chromatografii teplotou. Tloušťka filmu stacionární fáze a kapacitní poměr byly již zmíněny v odd. 3.4.1.

Vliv lineární rychlosti toku mobilní fáze  $u$  lze kvalitativně posoudit z obr. 27 a 28. Značný význam má optimalizace  $u$  především v plynové chromatografii, kde křivky vyjadřující závislost  $H \sim \bar{u}$  vykazují zřetelně minimum. Jak bude ukázáno v kap. 6, význam optimalizace hodnoty  $u$  je větší u nosných plynů s vyšší viskozitou ( $N_2$ , Ar) než u plynů s viskozitou nižší ( $He$ ,  $H_2$ ). Ve všech případech přinášejí malé lineární rychlosti toku mobilní fáze nebezpečí podstatného zhoršení účinnosti vlivem molekulární difúze. V kapalinové chromatografii, pokud jsou používány

sorbenty o průměru částic 3 až 10  $\mu\text{m}$ , nemá optimalizace  $u$  podstatný vliv. Většinou se snažíme, pokud to technický stav zařízení dovoluje, pracovat při vyšších lineárních rychlostech, a tak zkracovat dobu analýzy. Podstatný význam má však optimalizace  $u$  v kapalinové chromatografii, jsou-li použity sorbenty o průměru částic  $d_p > 20 \mu\text{m}$ . Stručně lze shrnout, že snížení lineární rychlosti toku mobilní fáze kolonou přináší vždy zvýšení účinnosti. V praxi nedochází k použití tak malých průtoků mobilní fáze, aby se uplatnil vliv molekulární difúze.

Průměr částic sorbentu  $d_p$  značně ovlivňuje účinnost chromatografického systému. Obecně platný závěr, že zmenšení částic přináší vždy zvýšení účinnosti, má některá praktická omezení. V plynové chromatografii malé částice sorbentu zvyšují odpor kolony, což znamená vzrůst tlakového spádu. Znamená to, že na začátku kolony, vlivem kompresibility nosného plynu, je průtok podstatně menší, než odpovídá optimální hodnotě, a ke konci kolony je tomu naopak. Výsledkem je kompromis, který omezuje velikost částic sorbentu používaných v plynové chromatografii na interval asi  $d_p = 0,12$  až  $0,25 \text{ mm}$ . Toto omezení neplatí v kapalinové chromatografii, kde můžeme stlačitelnost kapalin ve většině případů zanedbat. V současnosti jsou běžně dostupné kolony s průměrem částic  $3 \mu\text{m}$  a zřídka se při analytických separacích používají kolony plněné částicemi většími než  $10 \mu\text{m}$ . Používání částic o průměru  $d_p < 3 \mu\text{m}$  naráží na problémy značného odporu kolony a na technické problémy při třídění sorbentů. Délka kolon plněných sorbenty o  $d_p = 3 \mu\text{m}$  zpravidla nepřevyšuje  $15 \text{ cm}$ .

Délka kolony je posledním parametrem, kterým můžeme zvýšit separační účinnost chromatografického systému. Jsme přitom omezeni technickými problémy, jako je tlakový spád, a dalšími problémy, které vyplývají z racionální úvahy. Dělíme-li na určité koloně vzorek o dvou složkách a dosáhneme-li rozlišení  $R_{ij} = 0,5$ , potom potřebujeme k dosažení  $R_{ij} = 1,0$  teoreticky kolonu čtyřikrát delší. Kolona čtyřnásobné délky nemá ale nikdy čtyřikrát větší účinnost než kolona původní, ať již vlivem tlakového spádu (v GC), nebo vlivem nestejnomyšerného naplnění (v LC). Zhruba lze odhadnout, že k dosažení dvojnásobku hodnoty rozlišení potřebujeme kolonu pětikrát až šestkrát delší. Tím se však prodlouží na pětinašobek i více doba analýzy, a proto k prodlužování délky kolony přistupujeme spíše výjimečně.

### 3.4.3 Kapacita chromatografického systému

Jako u každé separační metody i u chromatografie je frakcionační kapacita definována jako maximální počet komponent, které může metoda rozdělit v jediné operaci. Nicméně v chromatografii se používá pro tento pojem název *kapacita píků*, tj. nejvyšší počet separovatelných píků v daném chromatografickém systému. Jestliže máme chromatogram, který obsahuje řadu píků, počínaje píkem č. 1 a konče píkem č.  $z$ , potom šíře kteréhokoli píku v souboru je nepřímou úměrnou druhé odmocnině počtu teoretických pater  $\sqrt{n}$  [rovn. (3.52)]. Přitom předpokládáme, že hodnota  $n$  je přibližně stejná pro všechny uvažované složky a není funkcí kapacitního poměru. Z této úvahy vyplývá, že kapacita píků  $\Phi$  poroste úměrně druhé odmocnině počtu

teoretických pater. Další parametr, který ovlivňuje kapacitu píků chromatografického systému, je vzdálenost mezi prvním a posledním eluujícím píkem. Tato vzdálenost poroste s rostoucí hodnotou poměru kapacitních faktorů  $k_2/k_1$ . Lze shrnout, že

$$\Phi \sim \sqrt{n} \frac{k_2}{k_1} \quad (3.84)$$

Kapacita píků je především závislá na účinnosti chromatografického procesu a běžně dosahuje hodnot 10 až 100 s tím, že u neúčinnějších chromatografických kolon, jako jsou kapilární kolony v plynové chromatografii, může dosahovat několika set. Na druhé straně v gelové permeační chromatografii existuje problém omezené kapacity píků. Distribuční konstanta v GPC může nabývat hodnot 0 až 1 a eluční objemy všech látek (pokud se dělí na principu exkluze) se pohybují mezi  $V_0$  až  $V_0 + V_i$ . Máme zájem na tom, aby hodnota  $V_i$  byla co nejvyšší, ale jsme omezeni mechanickými vlastnostmi gelu. Se stoupajícím poměrem  $V_i/V_0$  stoupá objem pórů na objemovou jednotku náplně a gel se stává měkkým nebo křehkým. Tím je limitován i počet píků, který může být v GPC na kolonce o dané účinnosti rozdělen. Přibližně se uvádí, že gelová chromatografie rozliší zhruba třetinu píků v porovnání s ostatními typy kapalinové chromatografie.

Další úvahy o kapacitě chromatografického systému mohou vycházet z otázky, jak velký vzorek lze na kolonu nastříknout, aniž by byla ovlivněna její účinnost. Experimentálně bylo zjištěno, že velikost nástřiku nemá žádný vliv na účinnost, jestliže vzorek zaujme v koloně prostor odpovídající  $\sqrt{n}/2$ . To znamená, že v koloně o 1 000 teoretických patrech může nástřik obsadit asi 16 pater, tj. 1,6 % z celkové délky kolony. Má-li kolona stejných rozměrů účinnost 5 000 teoretických pater, může vzorek obsadit již 35 pater, ale pouze 0,7 % z celkové délky kolony. Z tohoto pozorování plyne, že zvýšenou pozornost při dávkování vzorku do kolony je třeba věnovat především u účinných kolon.

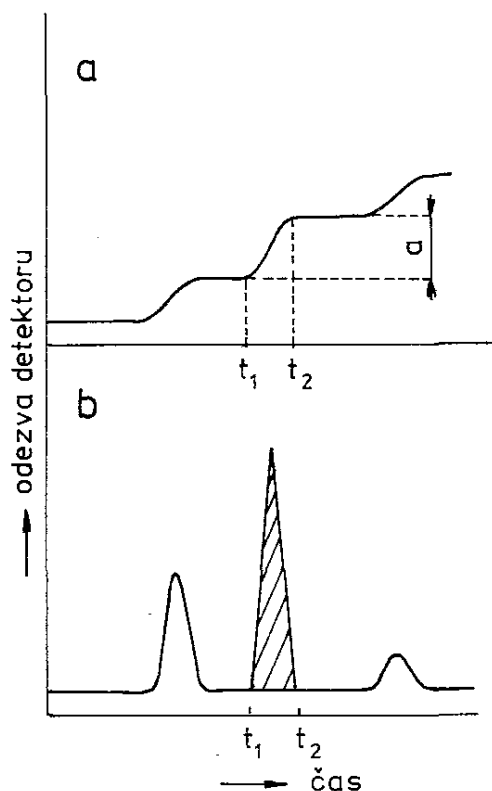
## 4 Detekce, možnosti jejího zlepšení, zpracování signálu a vyhodnocování výsledků

V této kapitole bude pojednáno o detektorech, zapisovačích, integrátorech, metodách kvalitativní i kvantitativní analýzy a metodách statistického zpracování výsledků. S ohledem na to, že v plynové a kapalinové chromatografii jsou podstatně odlišné detektory, budou na tomto místě uvedena pouze základní kritéria pro jejich hodnocení a jednotlivé detektory budou podrobně probrány v kapitolách 6 a 7. Také kvalitativní analýza, která může s výhodou využít vlastnosti specifických detektorů, je omezena pouze na některé základní poznatky s tím, že ostatní postupy budou uvedeny v dalších kapitolách.

### 4.1 DETEKČNÍ SYSTÉMY

Detektory v chromatografii mají za úkol zaznamenat rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku. Jsou umístěny zpravidla na konci kolony a analyzují tzv. efluent. Mobilní fáze se může skládat z několika komponent a také zóna eluující z kolony může obsahovat směs několika složek. Detektor potom zaznamenává celkovou změnu některé vlastnosti efluentu.

V chromatografii se vžil trojí způsob klasifikace detektorů, z nichž každý má pro kvantitativní analýzu určité opodstatnění. Podle časové závislosti odezvy se detektory



Obr. 31. Chromatogram a – integrální. Výška  $a$  je úměrná celkové hmotnosti složky eluované v časovém intervalu  $(t_2 - t_1)$ ; b – diferenciální. Šrafovaná plocha je úměrná celkové hmotnosti složky eluované v časovém intervalu  $(t_2 - t_1)$ .

dělí na integrální a diferenciální. *Integrální detektory* poskytují odezvu úměrnou celkovému množství látky prošlé detektorem od začátku až do daného okamžiku (obr. 31a). *Diferenciální detektory* dávají odezvu odpovídající okamžité koncentraci detegované složky v detektoru (obr. 31b).

Druhý způsob dělí detektory na *nedestrukční* a *destrukční*, tj. na detektory, ve kterých při detekci nedochází k chemickým změnám detegované látky, a na detektory, ve kterých se detegovaná látka nevratně mění.

Třetí způsob klasifikace rozeznává detektory koncentrační a detektory hmotnostní. *Koncentrační detektory* reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v efluentu  $dm/dV$  nezávisle na přívodu složky do detektoru. *Hmotnostní detektory* naproti tomu reagují na změnu hmotnostního toku detegované složky  $dm/dt$  do detektoru.

Z analytického hlediska je výhodné brát v úvahu kombinaci všech tří klasifikací, tj. hodnotit detektory např. jako diferenciální hmotnostní destrukční, diferenciální koncentrační nedestrukční atd.

#### 4.1.1 Odezva detektoru

Detektor zpracovává vstupní signál (úměrný změně některé vlastnosti efluentu) na signál výstupní – odezvu –, která je buď zaznamenána zapisovačem, nebo měřena digitálně. Převodník mezi vstupním a výstupním signálem má za úkol zajistit lineární vztah mezi koncentrací složky v efluentu a odezvou detektoru.

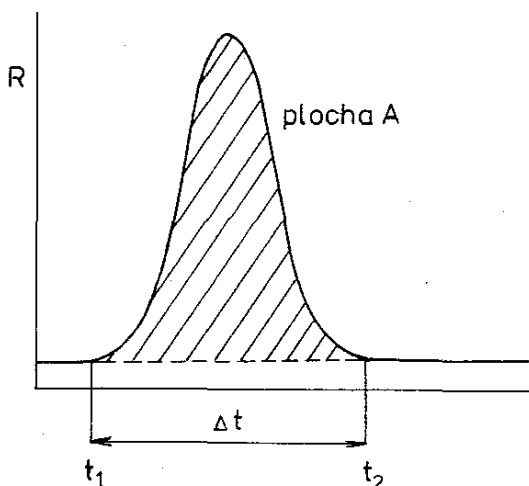
Uvažujeme-li detektor zaznamenávající koncentraci, což je v praxi nejběžnější, obdržíme v ideálním případě vztah:

$$R = k\varrho_A \quad (4.1)$$

kde  $R$  je odezva detektoru (např. v mV),  $k$  – konstanta úměrnosti,  $\varrho_A$  – hmotnostní koncentrace eluující složky. Tento lineární vztah není zcela splněn pro všechny detektory.

O lineární závislosti odezvy na koncentraci pro určitý detektor se přesvědčíme, vyneseme-li do grafu hodnoty  $\log R$  proti odpovídajícím hodnotám  $\log \varrho_A$ . Oblast, kde se směrnice pohybuje v intervalu 0,98 až 1,02, se nazývá *lineární dynamický rozsah detektoru*.

Odezva koncentračního nebo hmotnostního detektoru je různým způsobem ovlivňována objemovou rychlostí toku mobilní fáze.



Obr. 32. Záznam koncentračního detektoru

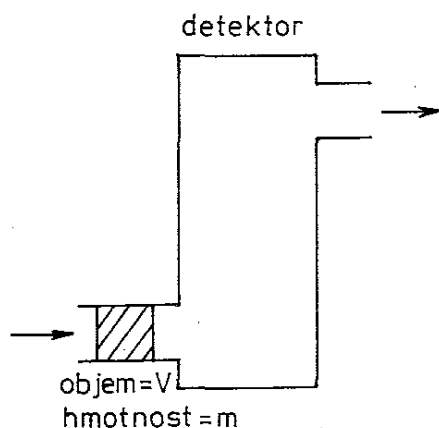
Jestliže znázorníme závislost odezvy detektoru  $R$  na čase  $t$ , obdržíme křivku, která je na obr. 32. Vyšrafovaná plocha  $A$  bude vyjádřena ve tvaru:

$$A = \int_{t_1}^{t_2} R dt \quad (4.2)$$

Pro koncentrační detektor můžeme hodnotu  $R$  nahradit výrazem v rovn. (4.1) a obdržíme:

$$A = k_1 \int_{t_1}^{t_2} \varrho_A dt \quad (4.3)$$

kde  $k_1$  je konstanta úměrnosti.



Obr. 33. Pohyb složky koncentračním detektorem

Nyní předpokládejme, že eluovaná látka vchází do detektoru ve formě válečku, v němž je její hmotnostní koncentrace konstantní (obr. 33) a rovná  $m/V$ , kde  $m$  je celková hmotnost komponenty ve válečku a  $V$  – objem válečku. Koncentrace  $\varrho_A$  je konstantní a potom platí:

$$A = k_1 \varrho_A \int_{t_1}^{t_2} dt = k_1 \varrho_A (t_2 - t_1) \quad (4.4)$$

po úpravě:

$$A = \frac{k_1 m}{V} \Delta t \quad (4.5)$$

kde  $V = F_m t$  a  $F_m$  je objemová rychlost toku mobilní fáze. Po dosazení za  $\Delta t = V/F_m$  dostaneme:

$$A = \frac{k_1 m}{V} \frac{V}{F_m} = \frac{k_1 m}{F_m} \quad (4.6)$$

Z rovnice (4.6) vyplývá, že plocha vlny je přímo úměrná celkové hmotnosti komponenty a nepřímo úměrná průtoku (objemové rychlosti) mobilní fáze. Proto musí být pro kvantitativní analýzu průtok mobilní fáze konstantní.

Pro detektory reagující na změnu hmotnostního toku ( $dm/dt$ ), jako např. pro plamenový ionizační detektor (FID), platí:

$$R = k_2 (dm/dt) \quad (4.7)$$



kde  $k_2$  je konstanta úměrnosti,  $m$  – hmotnost složky v detektoru,  $R$  a  $t$  mají stejný význam jako v předchozím případě. Potom:

$$A = \int_{t_1}^{t_2} R dt = k_2 \int_{t_1}^{t_2} (dm/dt) dt \quad (4.8)$$

Řešením tohoto integrálu získáme

$$A = k_2 m \quad (4.9)$$

Z rovnice (4.9) vyplývá, že pro tyto detektory je plocha píku úměrná celkové hmotnosti eluované složky, ale na rozdíl od předchozích detektorů je plocha píku pro detektory reagující na rychlost přívodu hmoty nezávislá na objemové rychlosti toku mobilní fáze.

#### 4.1.2 Citlivost, šum a minimální detegovatelné množství

Citlivostí detektoru se rozumí směrnice závislosti odezvy na koncentraci (pro koncentrační detektor) nebo na hmotnostním toku složky do detektoru (pro hmotnostní detektor). V obou případech je citlivost totožná s konstantou úměrnosti z rovn. (4.1). V prvním případě dostáváme vztah:

$$k_1 = \frac{R}{\varrho} \quad (4.10)$$

kde  $k_1$  je např. v  $\text{mV ml g}^{-1}$  nebo v jednotkách absorbance vztažených na hmotnostní koncentraci.

Pro hmotnostní detektory je citlivost  $k_2$  dána rovnicí

$$k_2 = \frac{R}{(dm/dt)} \quad (4.11)$$

a může mít rozměr např.  $\text{C s g}^{-1}$ . V tomto případě je citlivost závislá na velikosti průtoku mobilní fáze detektorem.

Šum detektoru je důsledkem kolísání některých experimentálních parametrů (průtoku mobilní fáze, teploty, napětí v síti apod.) a projevuje se rozkmitaným zápisem nulové linie. V době, kdy detektorem neprochází žádná složka, signál osciluje periodicky kolem střední hodnoty. Jako šum označujeme šířku pásu, ve kterém jsou zahrnuta všechna minima a maxima signálu. Vyhodnocení musíme provést pro přiměřeně dlouhý časový úsek, aby bylo dostatečně spolehlivé. Je samozřejmé, že šum odpovídá určité citlivosti zesilovače a použitým experimentálními podmínkám. Při změně těchto parametrů dochází zpravidla i ke změně šumu.

Označíme-li velikost šumu detektoru  $N$ , potom takové množství složky, které vyvolá odezvu  $R = 2N$ , se podle konvence označuje jako *minimální detegovatelné množství*. S použitím rovn. (4.10) a (4.11) můžeme obdobným způsobem vyjádřit *nejmenší detegovatelnou koncentraci* nebo *nejmenší detegovatelný průtok* složky.

Nejmenší detegovatelná koncentrace nebo hmotnostní průtok charakterizují detektor, ale nejmenší detegovatelné množství v sobě zahrnuje i účinnost chromatografické separace, a není tedy jednoznačně odrazem kvality detektoru.

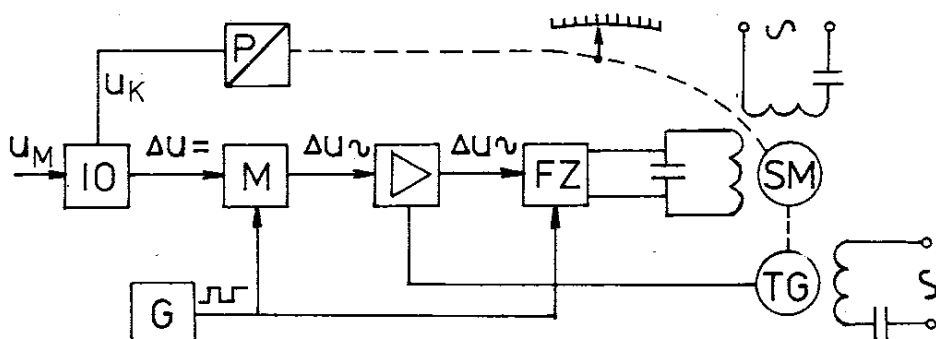
#### 4.1.3 Záznamové a vyhodnocovací zařízení

Eluované látky jsou na výstupu z chromatografické kolony detegovány vhodným detektorem a získaný signál je po příslušné úpravě (lineárním nebo logaritmickém zesílení) zaznamenán graficky. Tím se získá chromatografický záznam, který umožňuje kvalitativní i kvantitativní zhodnocení analyzované směsi. Je-li zápis konečným výstupem, provádí se vyhodnocení chromatogramu manuálně. Pro přesnější a rychlejší vyhodnocení se používá integrátorů, které bývají spojeny s počítačem.

##### Záznamové přístroje

V plynové chromatografii se využívají v převážné míře zapisovače s nepřímým ovládním zapisovacího prvku. Společným znakem těchto přístrojů je, že pracují na kompenzačním principu a kompenzační prvek je přestavován servomechanismem. Základní zapojení se u jednotlivých typů liší provedením vstupních obvodů, zesilovačů, korekčních obvodů apod.

Typický představitel velké skupiny zapisovačů je znázorněn na obvodovém schématu na obr. 34.



Obr. 34. Schéma zapisovače  
P – elektromechanický převodník, M – modulátor,  
G – generátor,  
IO – indikátor odchyly,  
FZ – fázově citlivý zesilovač,  
SM – servomechanismus,  
TG – tachogenerátor

Měřená veličina  $u_M$  se v indikátoru odchyly porovnává s kompenzační veličinou  $u_K$ . Zjištěný rozdíl (regulační odchylna) se vede po zesílení na polohový servomechanismus SM, který přestavuje ve vhodném smyslu hodnotu kompenzačního signálu pomocí polohového převodníku tak dlouho, až je regulační odchylna nulová. Indikátor je odvozen od Poggendorfovy potenciometrické metody. Měřicí potenciometr je zpravidla řešen jako výměnná jednotka, umožňující snadnou změnu rozsahu, v některých případech se rozsah mění zabudovanou rozsahovou jednotkou ve zpětné vazbě. Napájecí napětí potenciometru je stabilizováno kaskádou Zenerových diod, jejichž napětí je periodicky vyrovnáváno pomocí Westonova článku ručně nebo automaticky.

Protože přímé zesílení malých stejnosměrných napětí je poměrně obtížné, převádí se toto napětí pomocí modulace na střídavé. Střídavý signál se po zesílení vede na

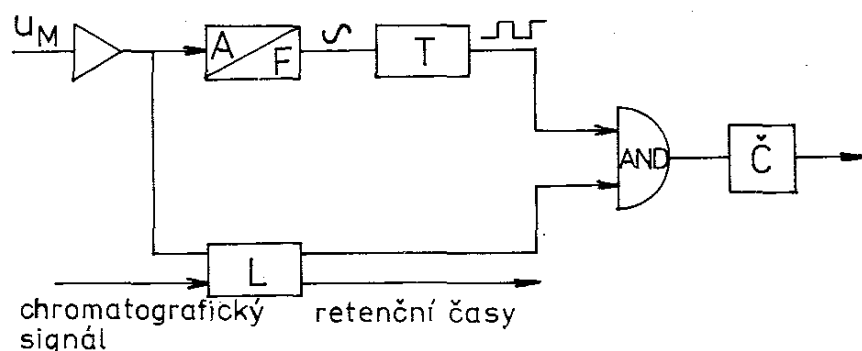
fázově citlivý koncový stupeň zesilovače, jehož výstupní napětí napájí vinutí servomotoru. Podle polaritý odchyłky se mění fáze střídavého napětí a směr točivého magnetického pole v motorku, a tím také smysl otáčení. Rychlost ustálení lze u kvalitnějších zapisovačů přestavovat změnou tachometrického signálu potenciometrem ve zpětné vazbě. Tím se zavádí derivační zpětná vazba, která je úměrná rychlosti pohybu zapisovacího prvku.

Důležitými technickými parametry jsou měřicí rozsahy, třída přesnosti, doba přestavení zapisovacího prvku a vstupní odpor. Měřicí rozsahy jsou od  $100\ \mu\text{V}$  do  $1\ \text{V}$ , třída přesnosti od 0,1 do 0,5, doba přestavení zapisovacího prvku od 0,5 do 2 s. Vstupní odpor u kontaktních modulátorů dosahuje hodnot  $10^7\ \Omega$  a u tranzistorových modulátorů s tranzistorem typu MOS-FET  $10^{10}\ \Omega$ .

Pro chromatografické přístroje, které mohou pracovat současně s dvěma rozdílnými detektory, je výhodné použít dvojitého zapisovače, kde se na jeden papír provádí současně dva záznamy. V tomto případě je nulová linie na jedné straně a záznamy jsou od sebe posunuty o několik mm tak, aby si pera zapisovače nepřekážela.

## Integrátory

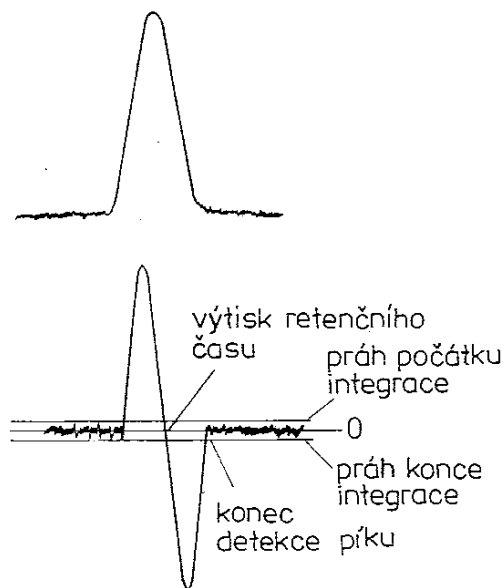
Integrátory pracují na principu převodu vstupního analogového signálu na číslicový. Vstupní signál detektoru chromatografu se nejdříve zesílí a převede se pomocí napěťového řízeného multivibrátoru na frekvenci. Vlastní integraci provádí čítač řízený obvodem logiky. K zajištění správné funkce musí být nejdříve výstupní frekvence multivibrátoru normována na signál pravoúhlého průběhu pomocí tvarovače (obr. 35).



Obr. 35. Schéma číslicového integrátoru  
 $u_M$  – měřené napětí,  
 A/F – převodník napětí na frekvenci, T – tvarovač pravoúhlých kmitů,  
 L – výpočetní blok logiky,  
 AND – logické hradlo,  
 Č – čítač

Výstupní informace z čítače se může uchovat v paměti nebo zaznamenat pomocí tiskárny. Čítače se u jednotlivých zařízení příliš neliší principem, pouze stupněm provedení integrovaných logických obvodů. Podstatně se však liší úroveň bloku logiky. Nejjednodušší integrátory mají alespoň dva výstupní signály z bloku logiky pro blokování a nulování čítače; další signály mohou dávat povel k záznamu retenčních časů, odpojení převodníku při úrovních signálů menších, než je nastavené pásmo necitlivosti apod. Většina elektronických integrátorů deteguje píky na základě první derivace eluční křivky (píku) (obr. 36). Překročili-li hodnota první derivace píku zvolenou hladinu citlivosti strmosti, je prováděna integrace píku, procházeli-li první derivace kladnou hodnotou. Jestliže první derivace přechází z kladné hodnoty přes nulu do negativní hodnoty, je zaznamenán retenční čas píku. Jakmile se negativní

hodnota sníží k hladině citlivosti strmosti, je skončena integrace píku, která je buď vytištěna, nebo uchována v paměti a výtisk je proveden po skončené analýze. U dnešních přístrojů je blok logiky nahrazen mikroprocesorem, který řídí řadu dalších operací zcela automaticky. Mezi řízené parametry je možno zařadit nastavení pracovních teplot, automatický výběr detektorů, kontrolu průtoků plynů, automatické nastavení



Obr. 36. Indikace píku pomocí první derivace eluční křivky

integračních podmínek, korekci základní linie chromatogramu, korekce driftujících a chvostujících píků a konečně automatický výpočet koncentrace stanovovaných komponent pomocí čtyř vyhodnocovacích způsobů (vnitřní normalizací bez použití a s použitím korekčních faktorů, metodou vnitřního a vnějšího standardu – viz odd. 4.3).

## 4.2 KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Úvodem k této problematice je nutno podtrhnout, že chromatografie je metoda separační a sama o sobě má dosti omezené možnosti kvalitativní analýzy. Často se setkáváme s tím, že jako důkaz přítomnosti určité složky se vydává shodnost jejího retenčního času s retenčním časem určitého standardu. I když měření byla provedena za zcela stejných podmínek, nelze prostou shodu retenčních časů měřených na jedné koloně přijmout jako důkaz identity složky. Hodnověrnější jsou ty údaje, kdy shodnost retenčních časů složky a standardu byla prokázána na dvou kolonách o rozdílné polaritě, ale i v takovém případě je lépe hovořit o pravděpodobnosti než o důkazu. Přitom je vždy třeba zohlednit množství dalších faktorů, jako jsou účinnost použitých kolon, počet existujících izomerů stanovované složky, rozdíly jejich bodů varu apod.

Mnohem obecnější je případ, kdy nemáme k dispozici odpovídající standardy a musíme použít jiné postupy. Zhruba lze tento problém řešit třemi cestami:

- a) s využitím retenčních dat,
- b) chromatograficky pomocí chemických reakcí (derivatizací složek),
- c) spojením chromatografu s některým spektrálním přístrojem.

V tomto oddíle se budeme zabývat pouze využitím retenčních dat, metody uvedené pod b) a c) budou probrány v dalších kapitolách.

Chromatografická retenční data mohou být pro účely kvalitativní analýzy vyjádřena několika způsoby.

*Retenční poměry*  $r_{i,s}$  se získají, když je společně se vzorkem nastříkována vhodná složka  $s$ , vybraná jako standard. Retenční poměr libovolné složky  $i$  vzhledem ke standardu je dán vztahem:

$$r_{i,s} = \frac{k_i}{k_s} = \frac{t'_{R,i}}{t'_{R,s}} = \frac{d'_{R,i}}{d'_{R,s}} \quad (4.12)$$

kde  $k$  je kapacitní poměr,  $t'_R$  – redukovaný retenční čas,  $d'_R$  – redukovaná retenční vzdálenost (rozdíl retenční vzdálenosti složky a retenční vzdálenosti nezadržované složky). Je samozřejmé, že při vyhodnocení z chromatogramů se používá redukovaných retenčních vzdáleností. V praxi se často postupuje tak, že jedna ze složek analyzovaného vzorku se označí jako standard a její retenční poměr je potom roven jedné. Je však problematické vybrat takový standard, který by byl vhodný pro větší okruh separací, a tak chromatografická data, uváděná jako retenční poměry, mají omezenou platnost.

*Specifické retenční objemy*  $V_g$  byly zavedeny jako teoreticky exaktní hodnoty v plynové chromatografii. Jde o redukovaný retenční objem vztažený na 1 g stacionární fáze a teplotu 273,15 K. Stlačitelnost plynu v koloně je korigována zavedením korekčního faktoru  $j$ . Pro  $V_g$  pak platí:

$$V_g = \frac{V'_{R(T)}j}{m_L} \quad (4.13)$$

kde  $V'_{R(T)}$  je redukovaný retenční objem korigovaný na teplotu 273,15 K,  $m_L$  – hmotnost stacionární fáze v koloně. Korekční faktor se vypočítá z tlaků na vstupu do kolony  $p_v$  a na jejím výstupu  $p_o$  podle vzorce:

$$j = \frac{3(p_v/p_o)^2 - 1}{2(p_v/p_o)^3 - 1} \quad (4.14)$$

Jisté potíže činí někdy v plynové chromatografii výpočet redukovaného retenčního objemu. Zpravidla máme k dispozici redukovaný retenční čas  $t'_R$  a objemovou rychlost (průtok) na výstupu kolony  $F_m$  měřenou bublinkovým průtokoměrem. Pro přesné výpočty je třeba znát teplotu plynu v průtokoměru  $T_a$  (v K) a tlak vodní páry  $p_{H_2O}$  (v kPa) při teplotě  $T_a$ . Redukovaný retenční objem korigovaný na 273,15 K se vypočítá:

$$V'_{R(T)} = F_m t'_R \frac{(p_o - p_{H_2O}) 273,15}{101,3 T_a} \quad (4.15)$$

Specifický retenční objem charakterizuje analyzovanou složku objemem nosného plynu potřebného k eluci z kolony bez tlakového spádu a mrtvého objemu, která obsahuje 1 g stacionární fáze. V praxi tyto údaje nenašly velké uplatnění, protože

existující rozdíly v kvalitě stejných stacionárních fází i změny stacionární fáze během jejího používání v koloně jsou příčinou značných rozdílů v hodnotách  $V_g$ .

Retenční indexy, zavedené v plynové chromatografii Kovatsem, odstraňují většinu dříve zmíněných nedostatků.

Retenční index vyjadřuje retenční chování sledované látky v jednotné stupnici, kdy za pevné body základní stupnice byly zvoleny retenční hodnoty nerozvětvených alkanů. Retenční index  $I_x$  libovolné složky  $x$  se vypočte podle následující definice:

$$I_x = 100 \frac{\log V_{N_x} - \log V_{N_z}}{\log V_{N(z+1)} - \log V_{N_z}} + 100z \quad (4.16)$$

kde  $V_N$  je čistý retenční objem (součin redukováného retenčního objemu  $V'_R$  a korekčního faktoru  $j$ ),  $z$  – nerozvětvený alkan se  $z$  uhlíkovými atomy,  $(z + 1)$  – alkan se  $z + 1$  uhlíkovými atomy, přičemž se zvolí  $V_{N_z} < V_{N_x} < V_{N(z+1)}$ . V praxi se většinou vystačí při výpočtu s redukovánými retenčními vzdálenostmi.

Retenční index nerozvětvených alkanů je roven stonásobku počtu uhlíkových atomů v molekule, tedy např. pro ethan a butan budou indexy rovny 200 a 400. Logaritmická stupnice je použita proto, že logaritmus redukováného retenčního objemu (nebo času) alkanů roste lineárně s délkou řetězce. V praxi se postupuje tak, že se směs alkanů analyzuje za stejných podmínek jako vzorek. Eluované složky tak mohou být registrovány popisnou formou. Je-li  $I_x$  nějaké složky např. 610, objevuje se složka bezprostředně za hexanem (mezi hexanem a heptanem).

Při použití programované teploty mohou být indexy přibližně vypočteny nahrazením logaritmu čistého retenčního objemu naměřenými hodnotami elučních teplot:

$$I_x = 100 \frac{T_x - T_z}{T_{(z+1)} - T_z} + 100z \quad (4.17)$$

kde  $T_x$ ,  $T_z$  a  $T_{(z+1)}$  jsou eluční teploty příslušné složky a referenčních alkanů.

Na principu podobném Kovatsovým indexům byl vytvořen systém retenčních indexů i v kapalinové chromatografii. Namísto řady nerozvětvených alkanů byla, s ohledem na snadnost detekce v kapalinové chromatografii, použita řada aromatických uhlovodíků jako standardů: benzen (počet jader  $z = 1$ ), naftalen ( $z = 2$ ), fenanthren ( $z = 3$ ), benz[a]anthracen ( $z = 4$ ) a benzo[b]chrysen ( $z = 5$ ). Retenční index libovolné složky je pak určen vztahem:

$$\log I_x = z + \frac{\log V'_{R_x} - \log V'_{R_z}}{\log V'_{R(z+1)} - \log V'_{R_z}} \quad (4.18)$$

kde jsou redukováné retenční objemy standardů.  $V'_{R(z+1)}$ ,  $V'_{R_z}$  a libovolné složky  $V'_{R_x}$  ve vztahu  $V'_{R_z} < V'_{R_x} < V'_{R(z+1)}$ .

Všechny retenční údaje, ať již retenční poměry, specifické retenční objemy, nebo retenční indexy, musí být doprovázeny dvěma základními informacemi, a to:

1. jaká byla použita stacionární fáze,
2. jaká byla teplota kolony.

V kapalinové chromatografii, kde je tabulace dat podstatně méně rozšířena než v chromatografii plynové, je nutné doplnit údaje o mobilní fázi. Často se však v kapalinové chromatografii vynechává informace o teplotě, neboť se většinou pracuje při teplotě místnosti. Význam údaje o stacionární fázi nemá smysl zdůrazňovat a bude podrobně rozveden v dalších kapitolách. Teplota má prvořadý význam u retenčních poměrů, neboť v těch případech, kdy standard a měřená látka jsou sloučeniny strukturně odlišné, může dojít k obrácení pořadí, v jakém složky eluují, a tím i ke značné změně retenčního poměru. Ke každému specifickému retenčnímu objemu (pro danou složku a stacionární fázi) přísluší jediná teplota kolony, neboť hodnoty  $V_g$  se stoupající teplotou klesají. Také retenční indexy se s teplotou mění, čehož se v praxi využívá při analýze složitých, strukturně podobných směsí látek. V analýze uhlovodíků i dalších látek se často zjišťuje *inkrement retenčního indexu*  $dI/dT$  vyvolaný zvýšením teploty kolony. U nerozvětvených alkanů je podle definice inkrement nulový. U isoalkanů a isoalkenů jsou inkrementy malé, např. 0,5 na 10 K, ale u polycykloalkanů dosahují až 15 indexových jednotek na 10 K. Přitom jsou inkrementy všeobecně větší na polárních stacionárních fázích v porovnání s nepolárními.

### 4.3 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Podobně jako kvalitativní analýza, tak i kvantitativní analýza v chromatografii vychází z chromatogramu. Na základě jeho vyhodnocení se potom snažíme určit obsah jedné nebo více složek analyzované směsi. Přitom musíme řešit tyto problémy: změřit plochu pod eluční křivkou, zjistit vztah mezi plochou píku a množstvím složky ve vzorku a konečně získané výsledky vyhodnotit z hlediska přesnosti a správnosti.

#### 4.3.1 Měření plochy píku

V některých případech, kdy se nevyžaduje velká přesnost analýzy a podmínky jsou dostatečně reprodukovatelné, se měření plochy nahrazuje měřením výšky. Měření ploch je však méně závislé na provozních podmínkách chromatografu než u vyhodnocování výšky vlny, a proto se mu dává přednost. Může se provádět těmito postupy:

##### a) *Planimetrováním*

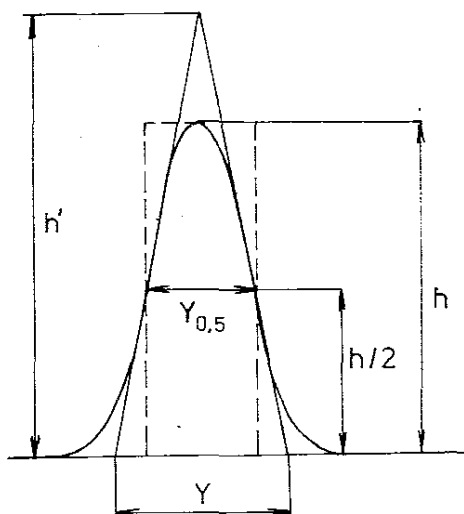
Při tomto způsobu se plocha odměří polárním planimetrem. Práce s tímto zařízením je poměrně namáhavá a časově náročná.

##### b) *Kvadraturou*

Tato metoda vyhodnocení vychází z předpokladu, že lze plochu vlny aproximovat plochou obdélníka (obr. 37). Výpočet se provede násobením výšky vlny  $h$  šířkou vlny  $Y_{0,5}$  naměřenou v poloviční výšce  $h/2$ . Tato metoda je poměrně přesná a přitom rychlá a jednoduchá. Lze ji použít pro symetrické vlny.

### c) *Triangulací*

Výška  $h'$  je měřena od základní linie do průsečíku dvou tangent (obr. 37). Jako šířka se užívá úsečka mezi průsečíky obou tangent se základní linií  $Y$ . Plocha se vypočítá podle vzorce  $A = Yh'/2$ . Tato metoda dává opět dostatečně přesné výsledky a není příliš náročná časově. Podmínkou je, aby vlna měla tvar Gaussovy křivky.



Obr. 37. Kvadratura a triangulace píku

### d) *Vystřiháním a zvážením*

Při této metodě se jednotlivé vlny vystřihají a zváží. Výhodou této metody je použití i pro nesymetrické vlny. Použitý registrační papír musí mít stejnou hustotu, tloušťku a konstantní vlhkost. Tato metoda, i když je pracná, dává velmi přesné výsledky, chromatogram se však znehodnotí.

### e) *Integrátorem*

Dnešní přístroje jsou nejčastěji vybavovány digitálními integrátory, které mohou být připojeny k různým typům chromatografů. V zapojení off-line integrátor zajišťuje běžné zpracování výsledků z chromatografické analýzy: registruje chromatogram s automatickou korekcí nulové linie, tiskne retenční časy složek a integruje plochy pod elučními křivkami. Na závěr analýzy vytiskne integrátor zprávu, kde jsou zpravidla plochy píků normalizovány, popř. vynásobeny korekčními faktory (např. na rozdílnou odezvu detektoru pro různé složky), které jsou vloženy v paměti integrátoru. Je nesporné, že tato metoda měření ploch píků je nejrychlejší a nejpresnější (relativní směrodatná odchylka je menší než 0,5 %).

## 4.3.2 Určení obsahu složky v analyzovaném vzorku

Po změření ploch píků můžeme přistoupit k určení obsahu složek ve vzorku. K tomu účelu se používá několik metod.



## Metoda vnitřní normalizace

### a) *Bez použití korekčních faktorů*

V tomto případě jde o výpočet procentového složení směsi na základě změřených ploch všech píků  $A_1$  až  $A_n$ . Podíl plochy píku  $A_i$  na celkové ploše (v %) se získá ze vzorce:

$$\{A_i\}_\% = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \cdot 100 \quad (4.19)$$

Tyto hodnoty, které mají spíše orientační charakter, jsou zpravidla automaticky vytištěny integrátorem. Tato metoda předpokládá celkovou eluci všech komponent z kolony a současně také stejnou odezvu detektoru na všechny přítomné složky.

### b) *S použitím korekčních faktorů*

Tato metoda má obecnější použití za stejného předpokladu celkové eluce a detegovatelnosti všech komponent. Liší se od předchozího použití korekčních faktorů pro příslušné komponenty. Procentový obsah složky  $i$  se získá jako

$$w_i = \frac{k_i A_i}{\sum_{i=1}^n A_i k_i} \quad (4.20)$$

kde  $w_i$  je hmotnostní zlomek složky  $i$  [s ohledem na rovn. (4.21)],  $k_i$  – korekční faktor složky  $i$ . Pro přesnou práci je vhodné stanovit korekční faktory  $k_i$  pomocí standardních směsí, méně přesné je použití tabelovaných dat. Výpočet korekčního faktoru složky  $i$  vzhledem k referenční látce  $r$  se provede podle rovnice:

$$k_i = \frac{m_i A_r}{m_r A_i} \quad (4.21)$$

kde  $A$  je plocha píku,  $m$  – hmotnost dávkované složky.

Za použití integrátoru je postup následující: Dávkuje se kalibrační směs o známém složení a přibližně stejné koncentraci jednotlivých komponent. Po analýze se obdrží retenční časy a integrované plochy. Integrátor se převede do kalibračního modu a k retenčním časům se pomocí klávesnice zapíše příslušné koncentrace. Integrátor si vypočítá korekční faktory, kterými jsou vynásobeny plochy píků při analýze. Hlavní předností metody vnitřní normalizace je, že není závislá na přesném dávkování vzorku, protože součet poměrných hmotností složek musí dávat 100 %.

## Metoda absolutní kalibrace

Tato metoda je také označována jako metoda vnějšího standardu a spočívá v dávkování známých množství analyzovaného vzorku a standardu za identických podmínek. Vyhodnocování se provede na základě porovnání naměřených ploch. Je možné pracovat dvěma způsoby: metodou kalibrační křivky nebo metodou přímého srovnání.

### a) *Metoda kalibrační křivky*

Pro všechny komponenty analyzované směsi se sestrojí kalibrační křivka, a to buď různým dávkováním směsi o jediné koncentraci, nebo dávkováním stejného množství různě koncentrovaných směsí.

V tomto případě dávkujeme známou hmotnost standardu:

$$m_s = \rho_s V_s \quad (4.22)$$

kde  $\rho_s$  je hmotnostní koncentrace standardu v kalibrační směsi,  $V_s$  – dávkovaný objem kalibrační směsi.

Získáme odpovídající plochu píku  $A_s$ . Tento krok provedeme několikrát pro různé koncentrace a z naměřených dat sestrojíme kalibrační graf vynesáním hodnot  $m_s$  proti  $A_s$ . Při analýze dávkujeme známý objem vzorku  $V_i$ , hmotnost analyzované komponenty  $m_i$  odečteme z kalibračního grafu na základě změřené plochy píku  $A_i$  a vypočítáme hmotnostní koncentraci:

$$\rho_i = \frac{m_i}{V_i} \quad (4.23)$$

### b) *Metoda přímého srovnání*

Je co do principu totožná s první. Vychází z oprávněného předpokladu lineární odezvy v daném koncentračním rozsahu. Nesestavuje se křivka, ale stanoví se pouze jeden bod (druhým bodem je počátek).

Do chromatografu se dávkuje definovaný objem analyzovaného vzorku  $V_i$  a stanoví se plocha píku  $A_i$ . Za zcela stejných podmínek se dávkuje definovaný objem standardu  $V_s$  o známé koncentraci  $\rho_s$  a získá se plocha píku standardu  $A_s$ . Výpočet hmotnostní koncentrace  $\rho_i$  látky  $i$  v analyzovaném vzorku je dán vztahem:

$$\rho_i = \frac{k_i A_i V_s \rho_s}{k_s A_s V_i} \quad (4.24)$$

kde  $k_i, k_s$  jsou specifické korekční faktory analyzované látky a standardu. Jsou-li analyzovaná látka a standard totožné, odpadají ze vzorce korekční faktory a výpočet je dán vztahem:

$$\rho_i = \frac{A_i V_s \rho_s}{A_s V_i} \quad (4.25)$$

V tomto případě se nepřepočítává složení na celkový obsah 100 %, takže může být analyzována případně jen určitá část vzorku.

### Metoda vnitřního standardu

Tato metoda je také známá jako relativní nebo nepřímá metoda. Je založena na přidání známého množství jedné nové látky, která neinterferuje s ostatními vlnami vzorku. Výhodou této metody je, že není třeba přesně znát dávkované množství do chromatografu, ale pouze relativní odezvu detektoru. Tato metoda má opět dvě varianty: metodu přímého srovnání a metodu kalibrační křivky.

### a) Metoda přímého srovnání

Při této metodě přidáme k analyzovanému vzorku o známém objemu  $V_i$  a hledané koncentraci určované složky  $\rho_i$  známý objem  $V_s$  standardního roztoku o hmotnostní koncentraci standardní látky  $\rho_s$ . Chromatografickou analýzou získáme plochy píků  $A_i$  a  $A_s$ . Koncentrace analyzované látky se vypočte ze vztahu:

$$\rho_i = \frac{k_i A_i V_s \rho_s}{k_s A_s V_i} \quad (4.26)$$

### b) Metoda kalibrační křivky

Při této variantě se připraví roztoky o různé koncentraci určované složky a roztoky látky, která bude použita jako vnitřní standard. Smícháním těchto roztoků získáme kalibrační směsi, které dávkujeme do chromatografu. Z naměřených ploch sestavíme graf relativního poměru ploch proti poměru hmotností vždy vzhledem k vnitřnímu standardu.

Dávkujeme vzorek, jehož koncentraci chceme stanovit a který obsahuje známé množství vnitřního standardu. Na základě velikosti poměru ploch odečteme z kalibračního grafu odpovídající koncentraci. U této metody není třeba znát odezvu složek, protože jsou vyjádřeny směrnici kalibrační přímky.

### Metoda standardního přídatku

Princip této metody spočívá v přidání definovaného množství standardu ke známému množství vzorku. Do kolony se dávkuje objem  $V_i$  analyzovaného vzorku o neznámé hmotnostní koncentraci  $\rho_i$  stanovované složky  $i$  a z chromatogramu se stanoví plocha  $A_i$ . K určitému objemu původního analyzovaného vzorku  $V_1$  se přidá definovaný objem standardního vzorku  $V_2$  o hmotnostní koncentraci  $\rho_s$ . Do chromatografu se dávkuje objem  $V_{is}$  vzniklé směsi a změří se plocha  $A_{is}$ . Hledaná koncentrace  $\rho_i$  se vypočte ze vztahu:

$$\rho_i = \frac{A_i V_{is} \rho_s V_2}{A_{is} V_i (V_1 + V_2) - A_i V_{is} V_1}$$

### 4.3.3 Přesnost a správnost analýz

V souvislosti s kvantitativní analýzou se používají dvě základní charakteristiky měření: přesnost a správnost. V důsledku nahodilých chyb jsou při opakovaném měření získané výsledky rozmístěny okolo nejpravděpodobnější hodnoty. Jestliže se celková chyba skládá ze značného počtu malých „elementárních“ chyb, je možno naměřené hodnoty charakterizovat Gaussovým (normálním) rozdělením pravděpodobnosti. Toto rozdělení je určeno nejpravděpodobnější (střední) hodnotou a směrodatnou odchylkou. Máme-li k dispozici  $n$  analýz, které poskytly hodnoty  $x_i$  ( $i = 1, \dots, n$ ), můžeme oba tyto údaje odhadnout. Odhadem nejpravděpodobnější hodnoty je *aritmetický průměr*  $\bar{x}$ :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (4.28)$$

Odhad směrodatné odchytky  $s$  lze vypočítat podle vztahu

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (4.29)$$

Odhad směrodatné odchytky průměru  $s_{\bar{x}}$  je dán vztahem

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (4.30)$$

Pravděpodobnost, se kterou leží správná hodnota veličiny  $x$  uvnitř tzv. intervalu spolehlivosti  $(\bar{x} - E, \bar{x} + E)$ , se nazývá *hladina významnosti*. Pro danou hladinu významnosti je hodnota  $E$  dána vztahem

$$E = t_k \frac{s}{\sqrt{n}} = t_k s_{\bar{x}} \quad (4.31)$$

kde  $t_k$  je kritická hodnota Studentova rozdělení. Hodnoty  $t_k$  lze pro zvolenou hladinu významnosti a pro dané  $n$  nalézt v tabulkách.

V důsledku soustavných chyb se očekávaná nejpravděpodobnější hodnota liší od skutečné hodnoty. Čím je tato odchylka větší, tím horší je správnost metody. O správnosti metody se můžeme přesvědčit analýzou vzorku o známé koncentraci stanovované látky (standardní referenční vzorky), vyhodnocením intervalu spolehlivosti a porovnáním tohoto intervalu s tabelovanou hodnotou koncentrace. U nové metody kontrolujeme soustavné chyby porovnáním s uznanou a dosud používanou metodou.

#### 4.4 DERIVATIZACE, REAKČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Mez detekce, udávaná nejmenším detegovatelným množstvím, její citlivost a selektivitu lze do značné míry ovlivnit chemickou strukturou analyzované látky. Její *derivatizaci*, tj. zavedením vhodných atomů či funkčních skupin do molekuly původní látky (převedením původní látky na látku jinou, s odlišnými vlastnostmi), zlepšíme, usnadníme či umožníme vůbec její stanovení či důkaz.

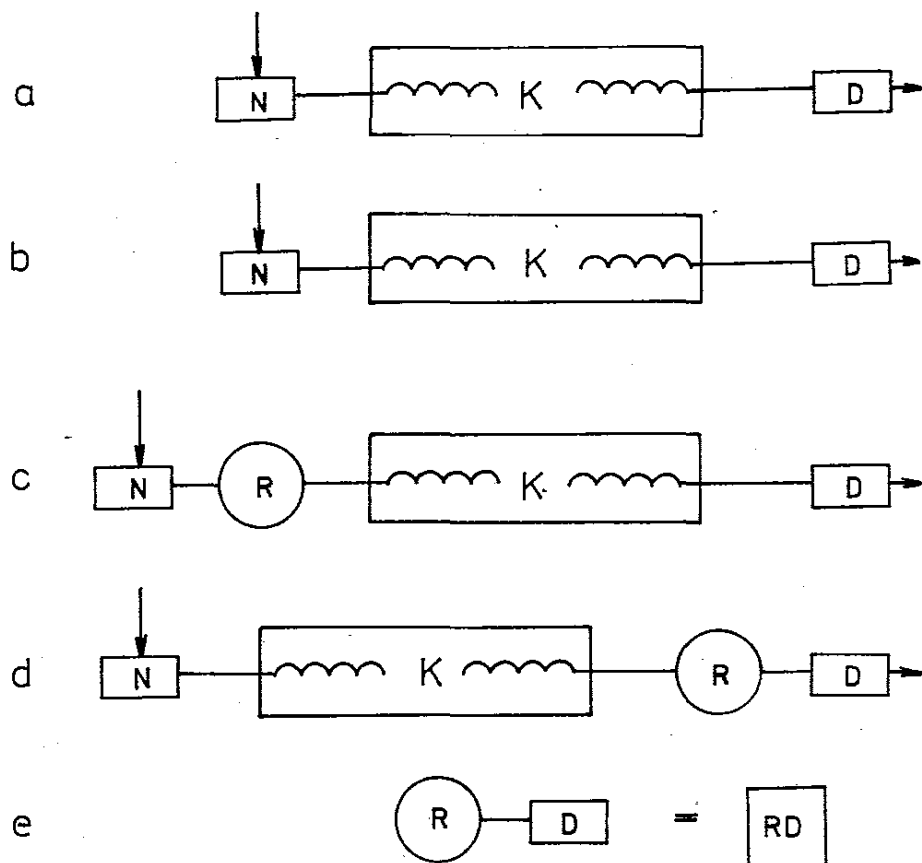
V reakční chromatografii se do separačního systému zapojuje další prvek v sestavě nástřík–kolona–detektor. V určitém místě je zařazen ještě reaktor, v němž dochází k reakci, a tím i k chemické přeměně původních látek (obr. 38).

V zásadě mohou nastat tři případy:

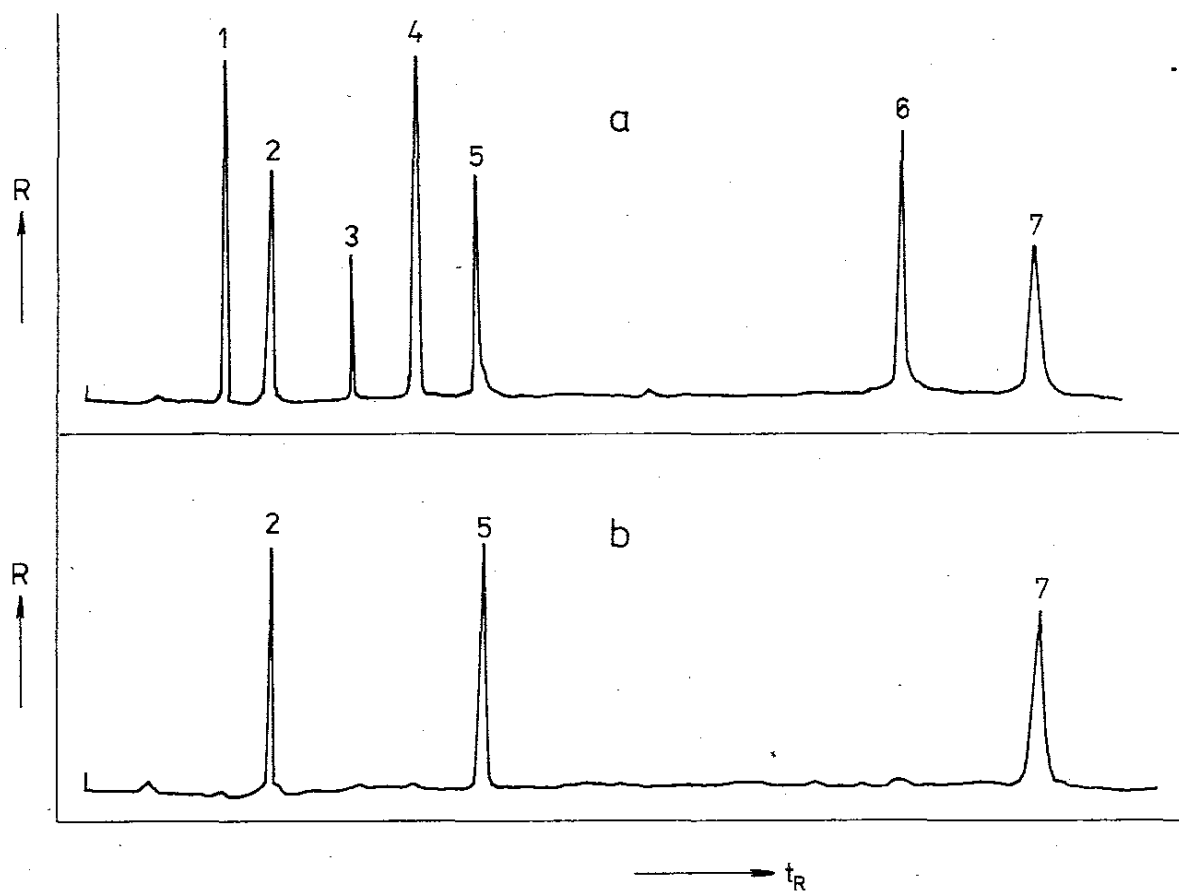
1. K reakci dojde před vstupem vzorku na chromatografickou kolonu, a to mimo chromatografický systém, např. při předkolonových derivatizacích prováděných v samostatných zařízeních (obr. 38b).

2. Reakce probíhá přímo v chromatografické koloně nebo v reaktoru umístěném těsně před chromatografickou kolonou (obr. 38c). Jde hlavně o případy předkolonové derivatizace v mikroreaktorech a o eliminační techniky na reakčních náplních

umísťovaných buď do zvláštního reaktoru, nebo do nástřikového zařízení, anebo přímo do chromatografické kolony.



Obr. 38. Schematické znázornění principů reakční kolonové chromatografie  
 a – normální chromatografický systém,  
 b, c – předkolonová reakce,  
 d – postkolonová reakce,  
 e – vznik reakčního detektoru; N – nástřik, K – kolona, D – detektor, R – reaktor, RD – reakční detektor



Obr. 39. Využití eliminační techniky při analýze komplikovanějších směsí látek (esterů, alkoholů, ketonů a aldehydů)

a – původní chromatografická analýza, b – chromatogram původního vzorku s použitím eliminačního reaktoru naplněného nosičem impregnovaným 2,4-dinitrofenylhydrazinem (píky 1, 3, 4 a 6 odpovídají aldehydům a ketonům, píky 2, 5 a 7 odpovídají alkoholům a esterům)

3. Reakce „post“ kolonová, k níž dochází po rozdělení látek, avšak ještě před vstupem do detektoru. V poslední době se takováto uspořádání označují pojmem reakční detektor (obr. 38d, e).

Do první skupiny patří derivatizační techniky používané jak v plynové, tak v kapalinové chromatografii, dále tzv. pyrolytická plynová chromatografie, kdy se chromatograficky analyzují pyrolytické produkty vzniklé definovaným termickým rozkladem látek, převážně makromolekulárních.

Druhou skupinu tvoří opět derivatizační reakce všeho druhu, kdy se vzniklé deriváty chromatograficky separují, ale také i tzv. eliminační techniky, při nichž v důsledku chemické reakce (derivatizace) vzniká např. netěkavý derivát, který v podmínkách plynové chromatografie nedá v detektoru signál, tzn. že látka, jež poskytla derivát, je eliminována. Obrázek 39 ukazuje na výhody této techniky při identifikaci látek v komplikovanějších směsích.

Třetí skupinu tvoří metody tzv. post-kolonové derivatizace, o nichž je pojednáno v samostatném oddíle.

#### 4.4.1 Derivatizační techniky

Jak již bylo poznamenáno, představují derivatizační techniky nejrozšířenější a také nejvýznamnější část reakční chromatografie.

Derivatizační techniky se zahrnují do kategorie reakční chromatografie proto, že využitím specifických reakcí buď před chromatografickou separací, anebo až po rozdělení látek před vstupem do detektoru docílujeme kvalitativně nových vlastností separovaných látek. Ty umožní předseparaci či separaci vůbec, zvýší citlivost a selektivitu detekce, usnadní jejich identifikaci apod.

Příprava derivátů v klasické podobě, kdy se látky identifikovaly na základě porovnávání fyzikálně chemických konstant připravených derivátů, pozbyla s nástupem především spektrální instrumentace svůj význam. Její těžiště se přeneslo do tří nově vzniklých oblastí.

Je to oblast tzv. *předseparačních technik* umožňujících izolaci určitých skupin látek z komplikovaných směsí, oblast *průtokové injekční analýzy* (FIA – flow injection analysis) a oblast *chromatografické analýzy*, která je nejrozsáhlejší a i významově zaujímá přední místo. Ve všech třech případech zůstává základní princip zachován. Analyzované látky se působením různých činidel převedou chemickou reakcí na deriváty, tj. na látky nové, s odlišnými chemickými a fyzikálně chemickými vlastnostmi.

#### 4.4.2 Derivatizace v plynové chromatografii

Důvodů vedoucích k derivatizaci v plynové chromatografii je více, ale nejvýznamnější jsou tyto:

1. *Zvýšení těkavosti analyzovaných látek.* Velmi mnoho organických látek není totiž možno chromatografovat v plynné fázi proto, že je nelze převést do plynného stavu anebo se při pokusu o zplynění rozkládají.

2. *Zamezení nežádoucí sorpce.* Toho se využívá všude tam, kde přítomná funkční skupina vytváří silné interakce se stacionární fází, jako tomu je např. u hydroxylové skupiny na aromatickém skeletu.

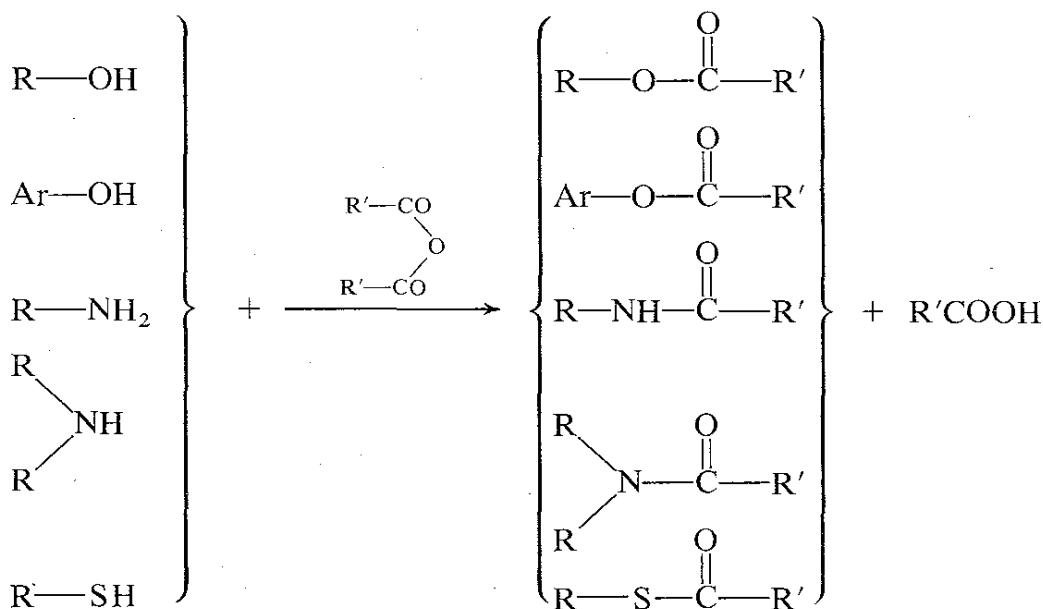
3. *Zlepšení selektivity, zvýšení citlivosti a snížení meze detekce.* Jde především o to, že do molekuly separované látky se zavádějí při derivatizačním pochodu takové elementy, které vykazují selektivitu při určitém způsobu detekce. Jsou to např. halogeny při použití detektoru elektronového záchytu (ECD). Při současném zapojení dvou typů detektorů FID a ECD je možno látky ve směsi i identifikovat či alespoň zařadit do určitých tříd. Jelikož odezva EC-detektoru závisí nejen na druhu halogenů, ale i na jejich počtu, jsou velmi často využívány polyhalogenované deriváty. Pro derivatizaci alkoholů a fenolů se proto používají trifluoracetáty, heptafluorbutyráty, pentafluorbenzoáty a další.

Nitroskupiny či jiné dusíkaté funkční skupiny v molekule derivátu zase umožní detekci plamenovým ionizačním detektorem s alkalickým kovem (AFID), jenž je selektivní na dusíkaté a organofosforečné sloučeniny. Polybromované (obecně polyhalogenované) deriváty lze stanovovat ve velmi nízkých koncentracích (10 až 50 pg ml<sup>-1</sup>) pomocí techniky GC/MS s negativní chemickou ionizací.

#### 4.4.2.1 Významnější derivatizační reakce využívané při plynově chromatografické analýze

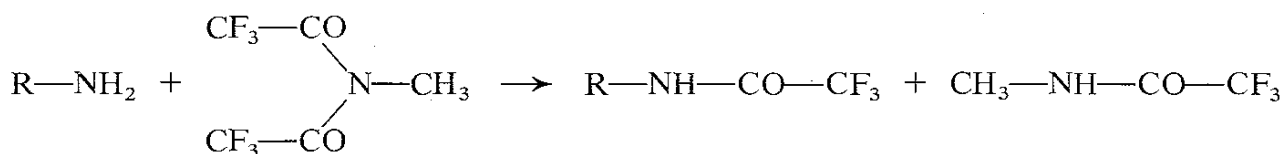
##### Acylderiváty

Acylačních reakcí se využívá při přípravě derivátů alkoholů, fenolů, aminů a thiolů. Vzniklé deriváty vykazují zpravidla nižší polaritu než původní látky a mají výhodnější chromatografické vlastnosti. Blokováním protonu nemůže docházet k jeho interakcím s okolními molekulami. Zamezí se tak disociačním a dimeračním reakcím a tvorbě vodíkových můstků. Schematicky lze znázornit acylaci těmito rovnicemi (Ar = aryl):



Ztráta možnosti tvorby vodíkové vazby vede dále ke zvýšení těkavosti derivátů ve srovnání s původními nederivatizovanými látkami. Do molekuly acylačního činidla se může zavést požadovaná funkční skupina vykazující např. selektivitu při detekci.

Velmi významné je zavádění halogenů do molekuly derivátu. K tomu slouží anhydrid trifluoroctové kyseliny a N-methyl-bis(trifluoracetamid). Anhydrid trifluoroctové kyseliny poskytne reakcí s hydroxylovou skupinou trifluoracetyléster jako derivát a volnou trifluoroctovou kyselinu. Aby reakce proběhla rychle a s dobrým výtěžkem, přidává se do reakční směsi hexamethylendiamin (při 70 °C je výtěžek kolem 70 %) anebo bezvodý amoniak. V tomto případě probíhá reakce kvantitativně. N-Methyl-bis(trifluoracetamid) je výhodnější při derivatizaci aminů a thiolů. Reakce probíhá podle schématu:



Vedlejším produktem reakce je trifluoracetyl-N-methylamid, který je v podstatě nejnižším homologem derivátů aminů, tudíž při eluci vychází z kolony jako první a nemůže rušit separaci žádného z dalších homologů.

## Estery

Esterifikace je nejčastější derivatizační reakce, mající zásadní význam pro analýzu karboxylových kyselin plynovou chromatografií. Estery jsou podstatně těkavější než jim odpovídající kyseliny. Estery nemohou vytvářet vazby vodíkovými můstky, nemohou dimerovat a ani disociovat, takže patří mezi látky s dobrými chromatografickými vlastnostmi. Vyšší mastné kyseliny a polykarboxylové alifatické i aromatické kyseliny není možno vůbec bez předchozí derivatizace analyzovat v plynné fázi. Z esterů se nejčastěji připravují methylestery. Proti vyšším esterům mají řadu výhod, z nichž nejvýznamnější jsou největší těkavost ze všech esterů, velká reakční rychlost a vysoké výtěžky. K přípravě methylesteru se využívá celá řada činidel. Nejčastěji se provádí esterifikace diazomethanem, methanolem za katalytického působení silnými Lewisovými kyselinami, fluoridem či chloridem boritým, koncentrovanou kyselinou sírovou a chlorovodíkovou. Méně běžný způsob je esterifikace termickým rozkladem tetramethylamoniových solí a methyljodidem.

## Silylderiváty

Silylačních reakcí se využívá v chromatografii velmi často. Kromě derivatizace se silylačních činidel používá ještě k deaktivaci nosičů a k přípravě chemicky vázaných fází na silikagelové matrici.

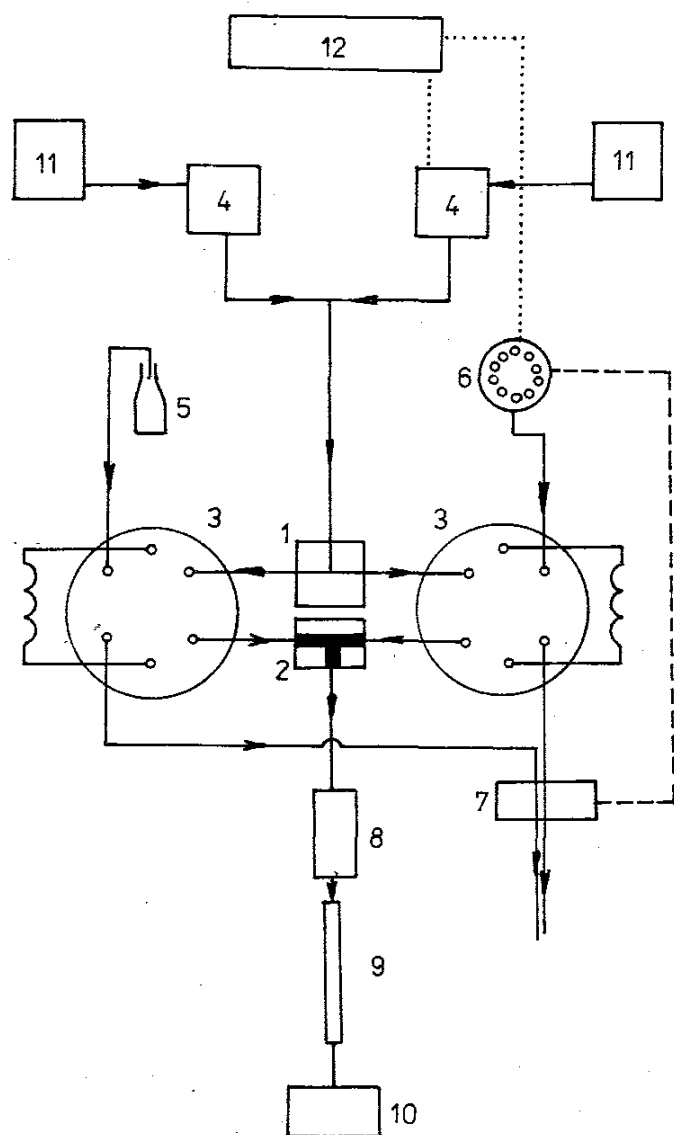
Principem silylačních reakcí je působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující různé polární funkční skupiny s aktivním vodíkem, který je schopen reakce,





(post-column derivatization); derivatizace se provádí v mikroreaktorech, zařazených mezi kolonu a vlastní detektor. Mnohdy je funkce reaktoru a detektoru spojena v jediné zařízení, potom mluvíme o *reakčních detektorech*.

Zatím co „předkolonová“ derivatizace nevyžaduje v klasické podobě speciální instrumentaci (vystačí se zpravidla se zařízením pro mikropreparační techniku a deriváty jsou připravovány mimo chromatograf), „post-kolonová“ derivatizace má značné nároky na speciální zařízení, mikroreaktory, v nichž je možno současně provádět řadu operací (zahřívání, míchání apod.). „Post-kolonová“ derivatizace vyžaduje dále takové reakce či činidla, s nimiž reakce probíhá rychle a pokud možno i kvantitativně.

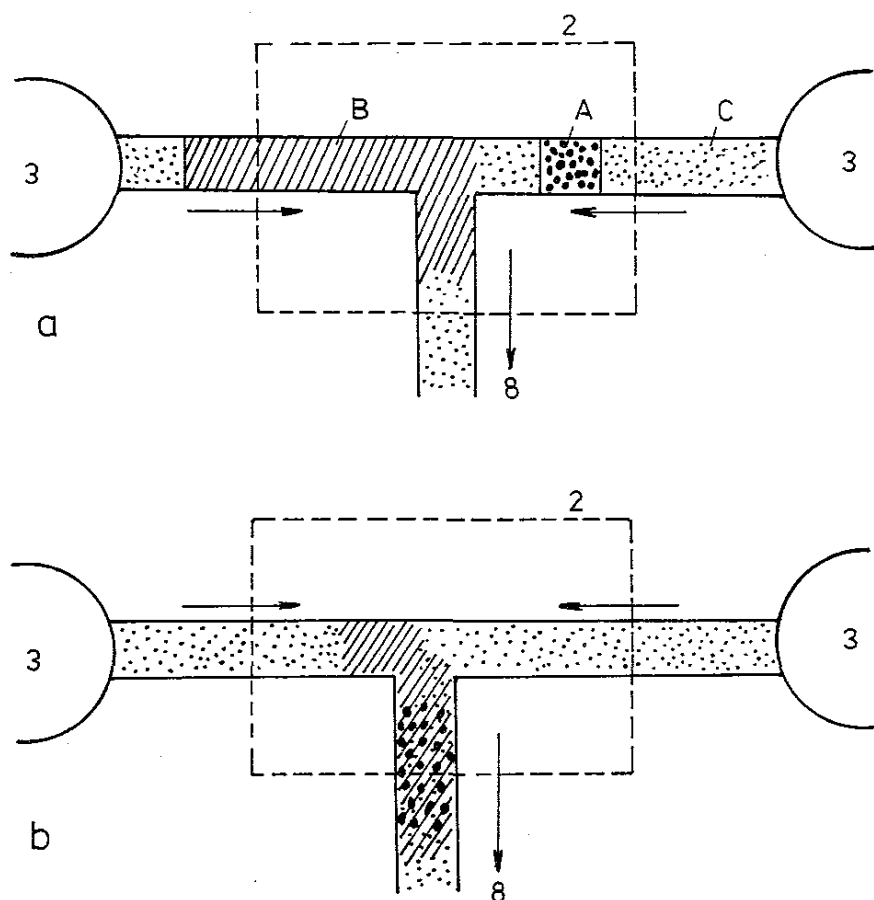


Obr. 40. Zařízení k automatické předkolonové derivatizaci s ovládací mikroprocesorovou jednotkou

- 1 – dělič, 2 – směšovací kus tvaru T,
- 3 – šestice ventily opatřené dávkovací smyčkou, 4 – čerpadla mobilní fáze umožňující gradientovou eluci, 5 – zásobník derivatizačního činidla, 6 – zásobník vzorků k analýze,
- 7 – peristaltické čerpadlo, 8 – reaktor plněný skleněnými kuličkami, 9 – chromatografická kolona, 10 – fluorimetrický detektor,
- 11 – zásobníky mobilní fáze,
- 12 – mikroprocesorová ovládací jednotka;
- tok kapaliny, - - - - elektrické a pneumatické propojení automatických dávkovačů

V dnešní době však i předkolonová derivatizace proniká do automatizačních prvků při konstrukci tzv. analytických robotů. S jedním z nich, sloužícím k automatické analýze aminokyselin, je možno se seznámit na obr. 40. Jde o ukázkou jednoho ze směrů vývoje analytické instrumentace v budoucích letech. Zařízení k automatické předkolonové derivaci aminokyselin využívá jako derivatizačního činidla *o*-ftalaldehydu, který poskytuje s aminokyselinami kondenzační produkty vyznačující se vysoce intenzívní fluorescencí. Mez detekce se pohybuje v rozmezí desetin až jednotek nanogramů. Zařízení pracuje tak, že mobilní fáze přichází ze

zásobníků (11) do vysokotlakých čerpadel (4) umožňujících gradientovou eluci a odtud jde přes dělič (1) a šesticestné kohouty (3) do směšovacího kusu T (2), kde se mísí vzorek s činidlem. Šesticestné kohouty (3) jsou opatřeny smyčkou (v prvním případě o objemu 10  $\mu\text{l}$ ), která je spojena s automatickým dávkovačem vzorků



Obr. 41. Vzorek aminokyselin a činidla směšovaný v kusu tvaru T (číselné označení jako u obr. 40)  
 a – stav před smíšením,  
 b – stav po smíšení;  
 A – segment o objemu 10  $\mu\text{l}$  dávkovaného vzorku aminokyselin,  
 B – segment o objemu 50  $\mu\text{l}$  dávkovaného derivatizačního činidla, C – mobilní fáze

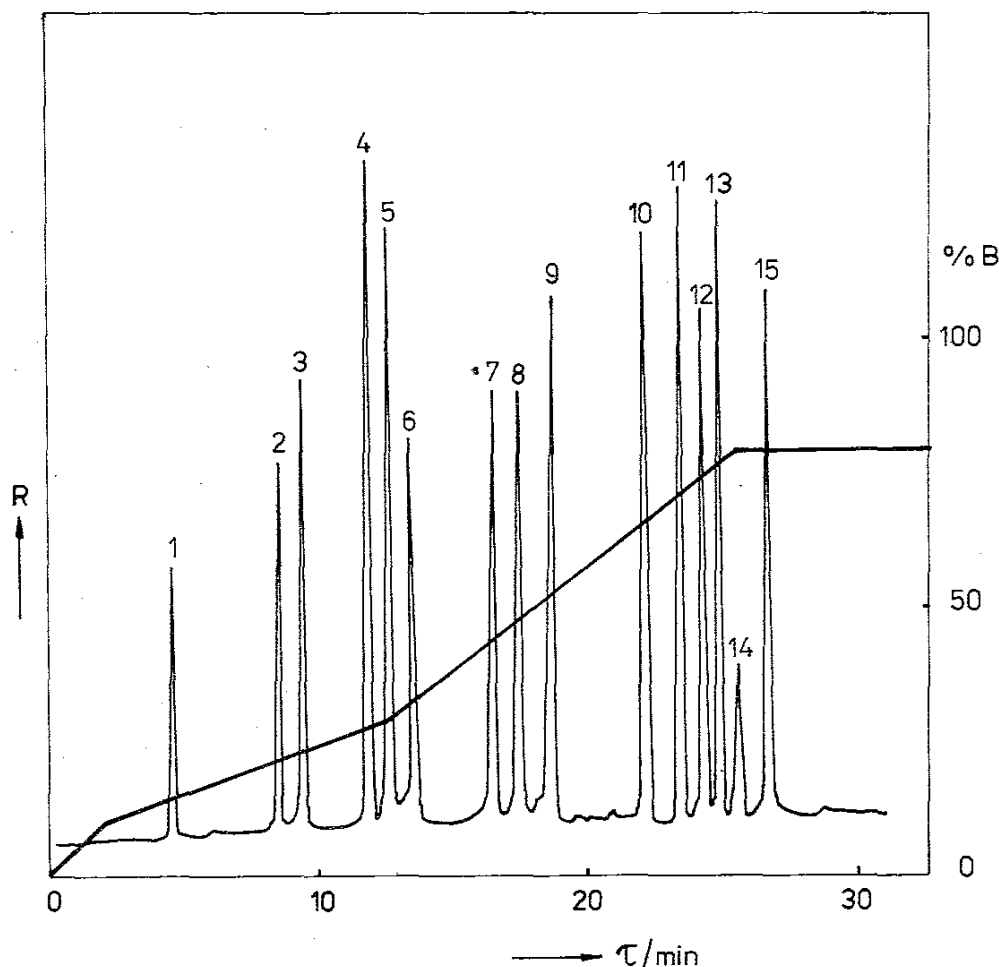
(6) (ve druhém případě o objemu 50  $\mu\text{l}$ ), jež je spojena se zásobníkem roztoku derivatizačního činidla (5). Na začátku analýzy se naplní obě dávkovací smyčky, a to jak vzorkem, tak i derivatizačním činidlem. Po přepnutí kohoutů se segment vzorku unášený mobilní fází smísí v kusu T se segmentem roztoku činidla, jak je schematicky znázorněno na obr. 41, a je dále unášen mobilní fází do reaktoru (8), v němž dojde k reakci. Mikroreaktor je naplněn skleněnými kuličkami, jejichž velikost přímo závisí na reakčním čase. Reakční čas, tj. čas potřebný ke zreagování činidla s analyzovanými látkami, je dále ovlivňován i rozměry mikroreaktoru a průtokem mobilní fáze. V okamžiku, kdy reakční směs dosáhne chromatografickou kolonu, reakce se zastaví vlivem separace zúčastněných komponent. Vzniklé deriváty jsou separovány gradientovou elucí a jsou zaznamenány fluorimetrickým (fluorescenčním) detektorem.

Chromatogram pořízený tímto zařízením je dokladem optimálního řešení konstrukce celého přístroje (obr. 42). Derivatizace proběhla za laboratorní teploty a tvar píků ukazuje na optimální volbu všech dimenzí reaktoru i spojů včetně zvoleného gradientu.

Výhody „post-kolonové“ derivatizace lze spatřovat v tom, že

a) veškeré manuální operace jsou eliminovány;

- b) vedlejší reakce, které při derivatizaci probíhají, a tím i vznik artefaktů dávajících či nedávajících signál detektoru, nejsou na závadu;
- c) derivatizační reakce nemusí proběhnout zcela kvantitativně;
- d) reakce může být neselektivní, činidlo může reagovat s několika skupinami látek, jako je tomu např. u substituovaného benzoylchloridu, který reaguje jak s alkoholy, tak i s fenoly, aminy a thioly;
- e) není třeba hledat nové způsoby podmínek separací, protože se vzorek chromatografuje v nezměněné podobě.



Obr. 42. Chromatogram separace aminokyselin pořízený na automatickém analyzátoru s použitím předkolumnové derivatizace s *o*-ftalaldehydem a merkaptoethanolem  
 reaktor: 25 cm × 4,6 mm, plněný skleněnými kuličkami o průměru 0,28 mm; kolona: 22 cm × 4,6 mm, plněná RP-8 (5 μm); průtok mobilní fáze 1,4 ml min<sup>-1</sup> se stupňovitým gradientem od 100 % fáze A do 75 % fáze B ve 26 minutách; fáze A: fosfátový tlumivý roztok (0,05 mol l<sup>-1</sup>, pH = 7,0); tetrahydrofuran (99 : 1 obj. dílů); fáze B: methanol; detekce: fluorimetrická;  
 1 – Asp, 2 – Asn, 3 – Ser, 4 – Glu, 5 – Gly, 6 – Thr, 7 – Ala, 8 – Arg, 9 – Tyr, 10 – Val, 11 – Phe, 12 – Ile, 13 – Leu, 14 – nečistota, 15 – Lys

Na druhé straně je však třeba podrobněji se seznámit i s určitými nevýhodami, které odpadají přípravou derivátů před vlastní chromatografií. Je to v první řadě problém nezreagovaného přebytečného činidla, které je zpravidla vždy přítomné. Pokud deriváty vzniklé jeho reakcí mají jiné hodnoty měřené veličiny (zbarvení, fluorescenčního záření, vodivosti, půlvolného potenciálu apod.), není třeba se obávat komplikací.

Dalším problémem je rozmývání zóny zapříčiněné průchodem mobilní fáze mikroreaktorem. To má za následek ztrátu účinnosti, která se projeví zejména ve zhoršení rozlišovací schopnosti.

Při volbě a konstrukci derivatizačního mikroreaktoru rozhoduje především druh, chemická povaha derivatizačního činidla a rychlost derivatizační reakce. Rychlé derivatizační reakce, které poskytují derivát během několika minut či dokonce sekund, jsou nejvyhledávanější. Proto také byla v poslední době věnována taková pozornost novým derivatizačním činidlům. Toto úsilí je motivováno ohromným vzrůstem produktivity práce v těch laboratořích, např. zdravotnických, kde jsou denně zpracovávány stovky či tisíce vzorků.

#### 4.4.3.1 Teorie toku mobilní fáze derivatizačním mikroreaktorem

Tok kapaliny trubkovým reaktorem se má co nejvíce přiblížit pístovému toku bez axiálního promíchávání. Mohou být proto použity různé varianty reaktoru – buď prázdné, nebo plněné tuhými neporézními částicemi, většinou skleněnými kuličkami. Od nich je také odvozen často užívaný název kuličkové reaktory. U kapilárních reaktorů uvažujeme ještě kontinuální tok reakčního média a diskontinuální tok, kdy je do proudu mobilní fáze dávkován po určitých intervalech inertní plyn, který oddělí určité malé objemy protékajícího média od sebe. Mluvíme pak o tzv. segmentovém toku, který je vhodný pro pomalé reakce, kdy doba zdržení, označovaná jako  $t_r$ , je větší než 30 sekund. Je-li doba zdržení menší ( $t_r < 30$  s), používá se kapilární reaktor s nesegmentovaným tokem. Trubkový náplňový reaktor plněný neporézním materiálem, např. skleněnými kuličkami, je vhodný pro hodnoty  $t_r$  od 30 s do 50 min. Rozšiřování elučních zón, které přicházejí do reaktoru z kolony a procházejí jím za současné tvorby derivátu, je uvnitř reaktoru způsobováno axiální disperzí, která se vyjadřuje zpravidla rozptylem  $\sigma^2$ , resp. směrodatnou odchylkou  $\sigma$  ( $\sigma$  v časových jednotkách). Jestliže sérii různě za sebou pospojovaných nádob prochází dostatečně úzká zóna určité značkovací látky, je celkový rozptyl této zóny dán součtem všech nezávislých příspěvků:

$$\sigma_{t,\text{celk}}^2 = \sum \sigma_{t,i}^2 \quad (4.32)$$

což znamená, že každá část daného systému přispívá k celkovému rozmývání zóny svou měrou:

$$\sigma_t^2 = \sigma_{tc} + \sigma_{tr}$$

kde c je příspěvek kolony, r – příspěvek reaktoru.

#### Trubkový náplňový reaktor

Jde v podstatě o trubici, zpravidla stočenou do spirály, naplněnou neporézním materiálem. Bylo dokázáno, že axiální disperze v tomto typu reaktoru je srovnatelná s disperzí v kapilárním reaktoru pouze za podmínky, že náplň trubkového reaktoru je tvořena skleněnými kuličkami velmi malého průměru ( $d_p = 10 \mu\text{m}$ ). Promývání

zóny je potom způsobováno převážně turbulentním promícháváním a zčásti při malých průtocích i molekulární difúzí. Molekulární difúze, tak jak je uvažována při aplikacích van Deemterovy rovnice, má v podmínkách kapalinové chromatografie podřadný význam vzhledem k tomu, že difúzní koeficienty v kapalně fázi jsou až o tři řády nižší, než je tomu ve fázi plynné. Rozhodujícím faktorem, který největší měrou ovlivňuje rozmytí zóny, je vlastní náplň reaktoru. Pravidelného uspořádání lože se docíluje technikou plnění reaktoru analogickou, jako tomu je u plnění kolon pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

Pomocí empirických rovnic lze korelovat tzv. redukovanou výšku teoretického patra  $h$  s redukovanou rychlostí toku kapalně fáze  $v$ . Jak rovn. (4.33),

$$h = \frac{2\gamma}{v} + \frac{\lambda_1(1 + \lambda_2)}{v^{0,5}} \quad (4.33)$$

kde  $\gamma$  je koeficient vyjadřující vlastnosti lože, jeho tortuozitu (stáčivost, obloukovitost), např. při stočení do spirály,  $\lambda_1$  a  $\lambda_2$  – empirické konstanty dané geometrií lože, tak i rovn. (4.34),

$$h = \frac{2\gamma}{v} + Av^{0,33} \quad (4.34)$$

kde  $A$  je rovněž empirická konstanta daná geometrií lože, je možno použít k odhadu hodnoty rozptylu  $\sigma_{tr}^2$  na parametrech reaktoru. Pro rozptyl platí, že

$$\sigma_{tr}^2 = h \frac{d_p t_r^2}{L} \quad (4.35)$$

a platí tedy i

$$\sigma_{tr}^2 = \frac{2\gamma}{v} + Av^{0,33} \frac{d_p t_r^2}{L} \quad (4.36)$$

kde  $d_p$  je velikost (průměr) částicek umístěných v loži,  $t_r$  – doba zdržení,  $L$  – délka náplně reaktoru. Redukovaná rychlost toku  $v$  je definována jako bezrozměrný simplex  $u(d_p/D_m)$ , kde  $u$  je lineární rychlost toku a  $D_m$  je difúzní koeficient složky v kapalně fázi.

Rovnice (4.35) a (4.36) je možno převést použitím hodnot difúzních koeficientů  $D_m$  a hodnoty  $\bar{t}$  (označující dobu strávenou v reaktoru, když  $t = 0$  je v místě vstupu látky do reaktoru) na rovn. (4.37), která je vhodná pro výpočet příspěvků k rozšiřování zóny v plněném reaktoru při použití stopovací látky:

$$\sigma_{tr} = \sqrt{\left( \frac{28 D_m \bar{t}^3}{L^2} + \frac{A \bar{t}^{1,67} d_p^{1,33}}{L^{0,67} D_m^{0,33}} \right)} \quad (4.37)$$

Nejmenších hodnot  $\sigma_{tr}$  se dosahuje použitím dlouhého reaktoru plněného malými částicemi. Tlakový spád  $\Delta p$  na plněném reaktoru je vypočítán na základě Darcyho zákona.

Délku reaktoru  $L$  je možno vypočítat podle vztahu:

$$L = \frac{4 \bar{t} F_m}{\pi \varepsilon_T d_r^2} \quad (4.38)$$

kde  $d_r$  je vnitřní průměr reaktoru,  $\varepsilon_T$  – celková pórovitost náplně.

Velmi často je používán i průtokový kapilární reaktor, který bývá stočen do spirály. Toto stočení má však značný vliv na axiální disperzi. Rozšiřování elučnicích pásů je ovlivňováno řadou faktorů, které uvádí v závislost rovn. (4.39), kde pro směrodatnou odchylku  $\sigma_{tr}$  platí:

$$\sigma_{tr} = \frac{K d_r^2 \bar{t}}{96 D_m} \quad (4.39)$$

Tato rovnice vyhovuje podmínce, že  $\sigma_{tr} < \bar{t}$  pro dlouhé úzké kapiláry.

V poslední době byla soustředěna pozornost na vývoj reakčních detektorů vhodných pro úzké náplňové mikrokolonky, a to jak pro systém kapalina–tuhá fáze, tak i pro systém kapalina–kapalina, umožňující i extrakci vzniklých komponent.

Reakční detektory budou stále více využívány i v průtokové analýze (FIA) a jsou důležitým stupněm v celkové robotizaci analytických systémů.

Zavádění reakčních detektorů a derivatizace „on line pre column“ do výzkumné i průmyslové praxe v posledních letech značně stoupá. Derivatizace ve spojení s vysokou účinnou kapalinovou chromatografií skýtá řadu výhod, jež umožňují nasazení této techniky k velkosériovým analýzám na plně robotizovaných analytických pracovištích vybavených i příslušnou výpočetní technikou.

#### 4.4.3.2 Významnější derivatizační činidla a reakce využívané v kapalinové chromatografii

Z derivatizačních reakcí vhodných k přípravě derivátů pro kapalinovou chromatografií se využívají především ty, jež vedou k tvorbě derivátů s vysokou citlivostí detekce umožňující i stopovou analýzu.

V podstatě jde o deriváty vykazující silnou fluorescenci nebo absorpci v ultrafialové a viditelné oblasti spektra nebo o deriváty obsahující značené elementy umožňující radiometrickou detekci. Méně početné jsou deriváty, většinou koordinační sloučeniny, umožňující detekci pomocí atomové absorpční spektrometrie.

Nejpočetnější a i významově nejdůležitější jsou reakce poskytující fluorescenční deriváty. Při derivatizačních reakcích tohoto typu je snahou zavést do molekuly derivátu takové skupiny nebo i celá atomová seskupení, u nichž lze vyvolat působením ultrafialového záření intenzivní fluorescenci. Tyto deriváty je možno detegovat jak na tenké vrstvě, tak i speciálně konstruovaným fluorimetrickým detektorem v podmínkách kolonové kapalinové chromatografie, a to v koncentracích o jeden až dva řády nižších, než dovoluje běžná detekce v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Vývoj nových fluorescenčních činidel probíhá dodnes. Byly popsány desítky činidel k detekci nejrůznějších typů látek, převážně však látek biochemicky významných,

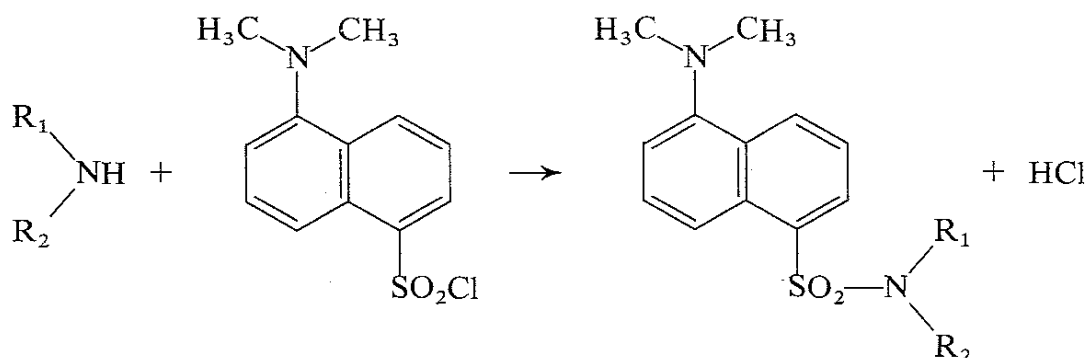
jako jsou aminy, aminokyseliny, aminocukry, alkaloidy, kyseliny, steroidy a fenolické látky.

Pro identifikaci a velkosériové stanovení se stále využívá vysoké separační účinnosti chromatografie na tenké vrstvě, a to jak v klasické, tak i vysokoúčinné modifikaci. Chromatogramy se buď prohlížejí v ultrafialovém záření, nebo se pro účely kvantitativní analýzy využívá skanovacích fluorimetrů, jež dovolují vyhodnotit stovky vzorků za hodinu metodou „in situ“.

Nové typy fluorimetrických detektorů používané v kolonové kapalinové chromatografii umožňují nejen zvýšení citlivosti detekce, ale současně i zvýšení její selektivity. Běžná mez detekce u fluorimetrického detektoru se pohybuje v koncentracích pikogramů v jednom mililitru roztoku.

### Reakce s dansylchloridem

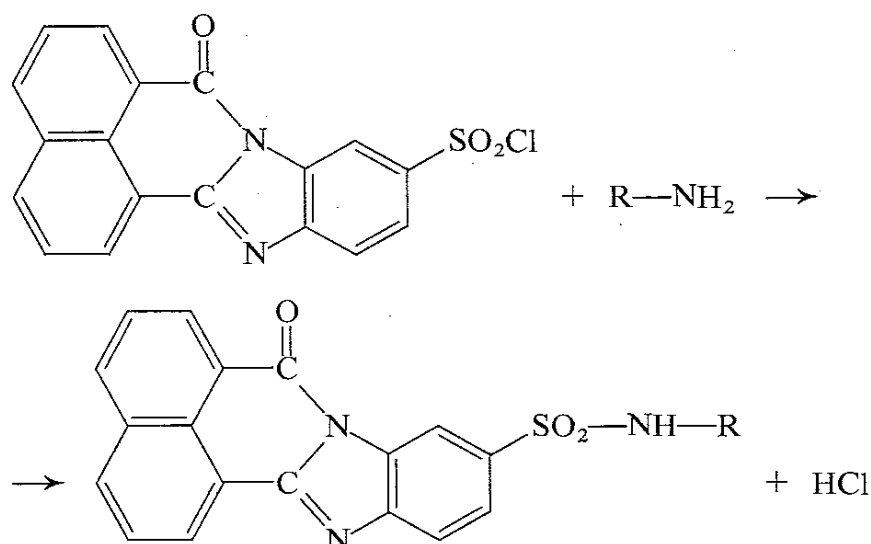
Dansylchlorid (5-dimethylaminonaftalen-1-sulfochlorid) je jedním z nejstarších a současně nejrozšířenějších derivatizačních činidel pro aminy, aminokyseliny, peptidy a i některé fenoly. Reakce probíhá podle schématu:



Excitační maxima se pohybují v rozmezí 350 až 370 nm a emisní maxima v rozmezí 490 až 530 nm.

### Reakce s 1,2-naftoylenbenzimidazol-6-sulfochloridem

Toto činidlo poskytuje deriváty s primárními i sekundárními aminy s vysokým fluorescenčním výtěžkem. Reakční schéma je možno znázornit touto rovnicí:

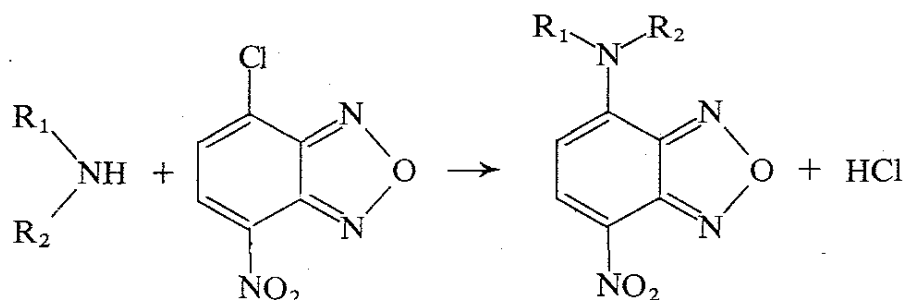




Reakce probíhá v acetonitrilu za přítomnosti roztoku uhličitanu draselného s kvantitativním výtěžkem. Mez detekce je kolem  $10^{-10}$  molu aminu ve skvrně při tenkovrstvé chromatografii a  $5 \cdot 10^{-14}$  molu aminu v objemu 10  $\mu$ l dávkovaném do kapalinového chromatografu.

#### Reakce s 4-chlor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazolem

Aktivovaný chlor v molekule tohoto činidla, označovaného často zkratkou NBD-chlorid, reaguje s primárními i sekundárními aminy podle reakce:

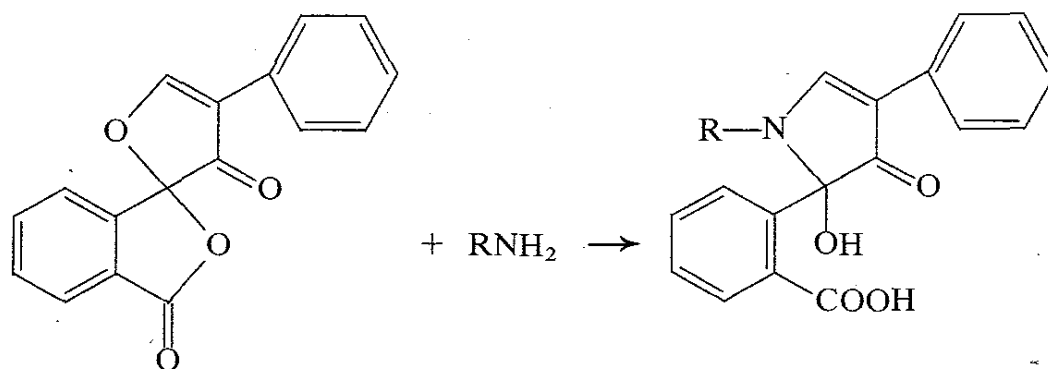


Excitační maxima jsou poněkud vyšší, až při 480 nm, přičemž emisní maxima jsou při 530 nm.

#### Reakce s fluorescaminem

(4-fenylspiro[furan-2(3H),1'(3'H)-isobenzofuran]-3,3'-dionem)

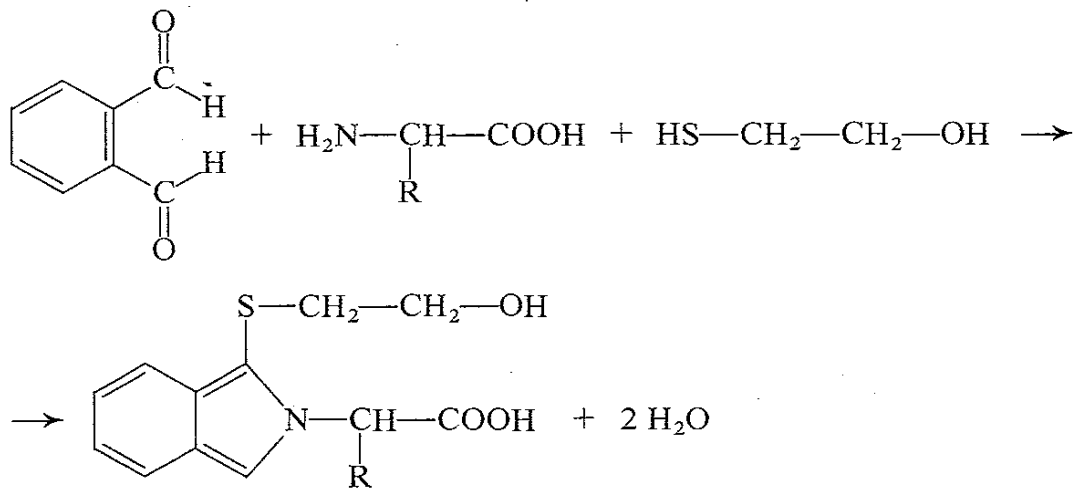
Fluorescamin sám o sobě nefluoreskuje, avšak reakcí s primárními aminy dává intenzivně fluoreskující deriváty. Reakce probíhá podle schématu:



Reakce s fluorescaminem je ve srovnání s dansylchloridem a NBD-chloridem selektivnější. Stálost derivátů je však mnohem nižší. Derivatizaci je třeba provádět bezprostředně před chromatografickou separací. Excitační maxima jsou kolem 390 nm a emisní maxima při 475 nm.

#### Reakce s *o*-ftalaldehydem

Aminy, polyaminy, biogenní aminy, aminokyseliny a peptidy poskytují s *o*-ftalaldehydem za přítomnosti merkptoethanolu deriváty s dobrými vlastnostmi. Reakce se více aplikuje v „post-kolonové“ derivatizaci a probíhá podle schématu:



Deriváty nejsou rovněž dostatečně stabilní, může u nich docházet k různým přesmykům. To je také hlavní důvod jejich použití v „post-kolonové“ derivatizaci, kdy vedlejší produkty reakce vlastní detekci neruší.

Kromě uvedených typů derivatizačních činidel jsou používány i desítky dalších k derivatizaci kyselin, fenolů, aldehydů, alkoholů, thiolů, aminů, aminokyselin a peptidů.

## 5 Optimalizace podmínek pro chromatografickou analýzu

### 5.1 CÍLE OPTIMALIZACE A ZPŮSOBY HLEDÁNÍ OPTIMÁLNÍCH PARAMETRŮ

Optimalizaci chromatografického procesu lze v nejširším smyslu chápat jako racionální volbu pracovních podmínek, aby bylo co nejefektivněji dosaženo požadovaného cíle separace. Cílem optimalizace může být:

1. Dosažení požadovaného rozdělení pro účely kvalitativní či kvantitativní analýzy pokud možno při co nejmenší spotřebě času a mobilní fáze a u kapalinové chromatografie při co nejnižším pracovním tlaku.
2. Dosažení co největší citlivosti stanovení a co nejnižších mezí detekce pro stopovou analýzu.
3. Dosažení separace co největšího množství látek pro preparativní účely.
4. Získání co největšího množství informací z chromatografických dat a z údajů detektoru pro účely identifikace látky.
5. Co nejrychlejší nastavení optimálních pracovních podmínek.

Při optimalizaci separace je třeba mít na zřeteli, že ze tří nejdůležitějších hledisek separace, tj. rozšíření, rychlosti separace a množství separovaných látek, většinou zlepšujeme jedno na úkor ostatních. Lepšího rozlišení dosáhneme při pomalejší analýze anebo s menším množstvím analyzovaného vzorku. Rychlejší analýzy uskutečníme při menších požadavcích na rozlišení a s menším množstvím analyzovaného vzorku. Při analýze většího množství vzorku se zhorší rozlišení jeho složek, popř. musíme ke kompenzaci tohoto vlivu nastavit podmínky, které vedou k prodloužení analýzy.

K optimalizaci lze využít nastavení řady experimentálních parametrů: náplně kolony (stacionární fáze) a jejich rozměrů, velikosti částic náplně, složení mobilní fáze, průtoku mobilní fáze v kolonové chromatografii, způsobu detekce, typu a citlivosti detektoru, eventuální přeběžné úpravy vzorku, rozpouštědla a dávkovaného objemu vzorku, pracovní teploty, popř. derivatizace či volby časového programu teploty, průtoku nebo složení mobilní fáze (gradientové eluce), event. kombinace metod (dvourozměrné techniky při práci v plošném uspořádání, kombinace kolon a jejich přepojování, kombinace různých metod detekce, event. kombinace chromatografických a spektrálních metod.

Výběr experimentálních parametrů, které budeme optimalizovat, závisí na povaze vzorku, na zařízení, které máme k dispozici, a na efektu, který požadujeme od chromatografické separace. Můžeme optimalizovat buď pouze jeden z experimentálních

parametrů, nebo několik parametrů postupně, nezávisle na sobě a je možno použít i současné optimalizace několika parametrů.

Ve většině případů neexistuje jediné optimální řešení daného separačního problému – např. určité směsi látek lze rozdělit ve srovnatelném čase vyhovujícím způsobem jak plynovou, tak i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, na různých stacionárních fázích v plynové chromatografii nebo v kapalinové chromatografii, s využitím různých systémů normálních či obrácených fází.

V praxi má největší význam optimalizace celkového rozdělení složek vzorku (rozlišení) s ohledem na dobu separace, pracovní tlak, citlivost detekce apod. Způsoby optimalizace separace jednotlivých složek vzorku lze zhruba rozdělit do tří skupin:

1. *Empirické postupy pracují metodou pokusu a omylu.* Podmínky separace se obměňují zkusmo, až dosáhneme přijatelné kvality separace látek ve směsi. Úspěch a rychlost tohoto způsobu optimalizace, jehož se dosud převážně používá, závisí na složitosti vzorku, na předchozích informacích o jeho složení, na zkušenostech experimentátora a na tom, zda je možno využít dříve publikovaných informací o chromatografické separaci stejného nebo podobného typu látek. Někdy lze využít i předběžných informací o vhodných separačních podmínkách získaných za použití příbuzné separační metody, např. z experimentů na tenké vrstvě pro volbu podmínek při vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

2. *Postupná optimalizace jedné či více pracovních podmínek separace, využívající statistických postupů,* které nevyžadují předběžné znalosti o zákonitostech separačních procesů, je založena na tzv. filozofii černé schránky (black box).

3. *Metody, které využívají matematických vztahů* k popisu závislosti retence (elučních objemů, kapacitních poměrů) nebo rozlišení na optimalizovaných parametrech k optimalizaci buď jednoho experimentálního parametru, nebo k postupné optimalizaci více experimentálních parametrů, které jsou považovány za vzájemně nezávislé, či k současné optimalizaci dvou či více pracovních podmínek separace.

## 5.2 KRITÉRIA SEPARACE

Aby bylo možno použít racionálních statistických či teoretických postupů optimalizace, je třeba úroveň separace vhodně charakterizovat jednou či více exaktně definovanými veličinami, které lze z chromatogramů snadno vyhodnotit. Tyto veličiny označujeme jako *kritéria separace* a čím větší číselné hodnoty dosáhneme, tím je celková separace lepší. Lze je dělit do dvou skupin:

1. Kritéria, která charakterizují *vzájemnou separaci jedné dvojice látek*. Nejčastěji používanými kritérii tohoto typu jsou:

- rozlišení  $R_{ij}$  [definiční rovnice (3.73) a (3.79)];
- eluční poměr (selektivitní koeficient):

$$r_{ij} = \frac{k_j}{k_i} = \frac{V_{R,j}}{V_{R,i}} \quad (5.1)$$

kde  $k_j$  a  $k_i$  jsou kapacitní poměry;

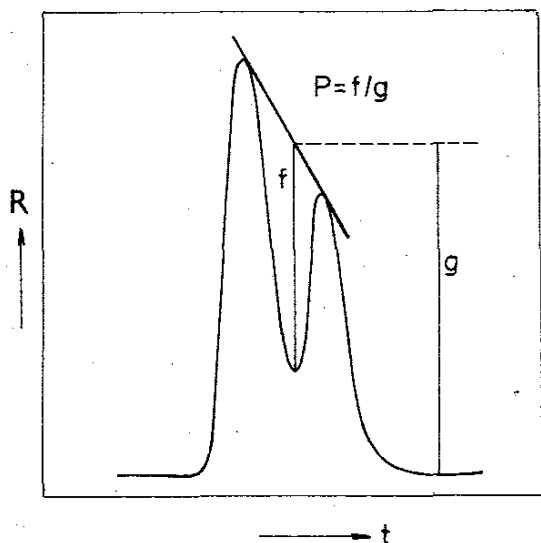
c) separační poměr:

$$S = \frac{V_{R,j} - V_{R,i}}{V_{R,j} + V_{R,i}} = \frac{k_j - k_i}{k_j + k_i + 2} = \frac{2R_{ij}}{\sqrt{n}} \approx \frac{1}{2} \frac{r_{ij} - 1}{r_{ij}} \frac{k_j}{k_j + 1} \quad (5.2)$$

d) faktor separace píků  $P$  (podle Kaisera, obr. 43)

$$P = \frac{f}{g} \quad (5.3)$$

Nejjednodušší způsob použití těchto kritérií spočívá v optimalizaci jejich hodnoty pro tzv. kritický pár látek, jejichž separace činí největší potíže. Tento způsob však může selhat tehdy, když při změně podmínek separace poklesne rozlišení jedné či více jiných dvojic látek na nižší hodnotu než rozlišení původně zvoleného kritického



Obr. 43. Kaiserovo kritérium separace píků

páru. Správnější postup spočívá ve zjištění kritérií separace pro všechny dvojice látek v separované směsi; tímto způsobem neztrácíme informaci o úrovni separace jednotlivých složek vzorku při obměňovaných experimentálních podmínkách.

2. Kritéria charakterizující *jedinou hodnotou úroveň separace všech složek vzorku*, např.

a) funkce chromatografické odezvy (CRF)

$$CRF = \sum_i \ln \frac{P_i}{P_0} + \alpha(t_{R,max} - t_{R,x}) \quad (5.4)$$

b) chromatografická optimalizační funkce (COF), kterou lze definovat různým způsobem, např.:

$$COF = \sum_i \alpha \ln \frac{R_i}{R_0} + \beta(t_{R,max} - t_{R,x}) \quad (5.5)$$

nebo

$$COF = \sum_i R_i + N^\alpha + \beta(t_{R,max} - t_{R,x}) + \gamma(t_{R,1} - t_{R,0}) \quad (5.6)$$

c) celkový relativní produkt rozlišení  $PR$ :

$$PR = \frac{\prod_i R_i}{\binom{\sum R_i}{n-1}^{(n-1)}} \quad (5.7)$$

a další.

V těchto vztazích jsou  $P_i$ ,  $R_i$  hodnoty  $P$  a  $R_{ij}$  pro jednotlivé dvojice látek se sousedními píky,  $P_0$ ,  $R_0$  – minimální akceptovatelné hodnoty  $P_i$  a  $R_i$ ,  $N$  – celkový počet píků na chromatogramu,  $t_{R,1}$  a  $t_{R,x}$  – retenční časy první a poslední ( $x$ -té) eluované látky dělené směsí,  $t_{R,0}$  a  $t_{R,max}$  – předem zvolené hodnoty minimálního a maximálního přípustného retenčního času a  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  – volitelné váhové faktory, které můžeme libovolně měnit podle toho, kterému aspektu separace přikládáme větší důležitost.

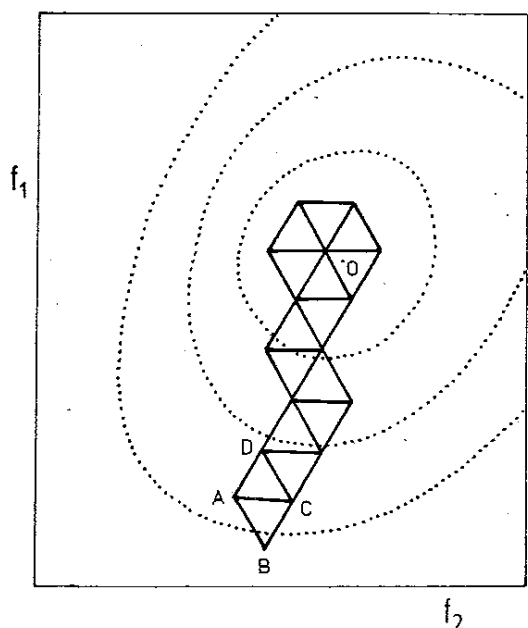
Tato kritéria značně usnadňují optimalizační postupy vzhledem k soustředění informace v jediné hodnotě, což však současně vede k nežádoucí ztrátě informace o separaci jednotlivých sousedních dvojic píků. Nadměrnému prodlužování doby analýzy má zabránit člen  $(t_{R,max} - t_{R,x})$ , popř. jmenovatel u  $PR$ . Člen  $(t_{R,1} - t_{R,0})$  se zavádí se zřetelem na pravidelnější rozložení píků na celém chromatogramu. Při separaci směsí, u nichž neznáme celkový počet složek, má zavedení členu s  $N$  v rovn. (5.6) zaručit výraznou preferenci separace poskytující větší počet píků. Jednotlivá kritéria separace mohou v závislosti na volitelných váhových faktorech víceméně dobře popsat celkovou úroveň separace dělené směsí, u složitějších směsí, kde se mohou píky různých látek vzájemně zcela překrývat a s měnícími se experimentálními podmínkami může docházet i ke změně pořadí eluce, může maximální hodnota kritéria separace odpovídat i vedlejšímu maximu a nemusí vždy jednoznačně vymezit podmínky optimálního rozdělení separované směsi.

## 5.3 NEJDŮLEŽITĚJŠÍ OPTIMALIZAČNÍ POSTUPY

### 5.3.1 Postupná optimalizace podmínek separace simplexovou metodou

Strategie této metody je založena na postupném obměňování podmínek separace, přičemž se dosažená hodnota kritéria separace porovnává s hodnotami dosaženými v předchozích experimentech tak dlouho, až se další obměnou podmínek již nedosáhne jeho významného zlepšení. Použití simplexové metody ilustruje obr. 44. Jako simplex se označuje geometrický obrazec popsáný vždy počtem bodů o jednotku vyšším, než je počet optimalizovaných proměnných. Tak např. při optimalizaci tříložkové mobilní či stacionární fáze, kde jsou koncentrace dvou složek nezávisle proměnné, je simplexem trojúhelník, jehož každý vrchol odpovídá určité kombinaci experimentálních parametrů, poskytující určitou hodnotu kritéria separace. Při postupném vyhledávání optimálních podmínek separace se vrchol

trojúhelníku, odpovídající podmínkám, při nichž bylo dosaženo nejnižších hodnot kritéria separace (bod B na obr. 44), nahradí vrcholem D, zrcadlově překlopeným na opačnou stranu, čímž se vytvoří nový trojúhelník. Tento postup se opakuje, až se dosáhne okolí optima O. U modifikované simplexové metody se postup urychluje

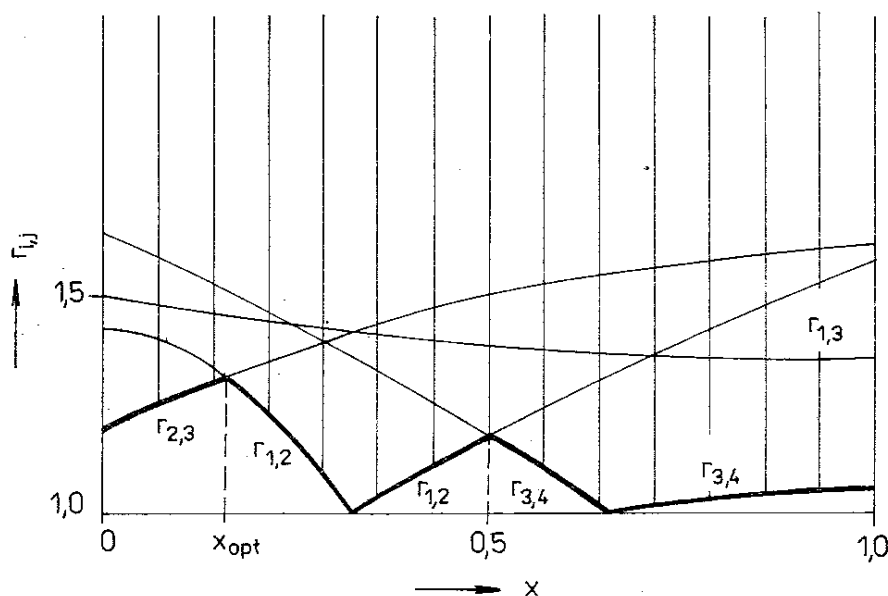


Obr. 44. Optimalizace dvou proměnných simplexovou metodou  
Vrstevnice odpovídající stejné hodnotě kritéria separace jsou vytečkovány. ABC – původní simplex, ACD – nový simplex získaný překlopením bodu B s nejhorší hodnotou kritéria separace. O je optimální hodnota,  $f_1, f_2$  – experimentální podmínky.

tím, že podle relativní změny nově získané odezvy – hodnoty kritéria separace – se strany simplexu prodlužují či zkracují. Celý postup lze automatizovat použitím počítače spojeného s řídicím mikroprocesorem, který po vyhodnocení kritéria separace automaticky nastavuje nové experimentální parametry přístroje. Nevýhodou tohoto postupu je poměrně veliký počet potřebných experimentů a pravděpodobnost „sklouznutí“ do oblastí s lokálními maximy kritéria separace.

### 5.3.2 Metoda okénkových diagramů

Tato metoda byla původně zavedena Laubem a Purnellem pro optimalizaci složení stacionárních fází v plynové chromatografii, později byla využita i k optimalizaci teploty a složení mobilních fází v kapalinové chromatografii a dalších podmínek



Obr. 45. Ukázka okénkového diagramu pro separaci čtyřsložkové směsi  
 $r_{ij}$  – eluční poměry dvojic látek 1 až 4,  $x$  – pracovní parametr,  $x_{opt}$  – optimální hodnota  $x$ .

separace. Okénkový diagram (obr. 45) představuje závislost hodnot kritérií separace pro jednotlivé dvojice látek ve vzorku (např. rozlišení nebo eluční poměr) v závislosti na optimalizovaném pracovním parametru ( $x$ ). Volné (nešrafované) oblasti vymezené pod křivkami těchto závislostí jsou tzv. okénka, která odpovídají pracovním podmínkám, při nichž lze dosáhnout nenulové hodnoty kritéria separace pro všechny dvojice látek. Maximální hodnota kritéria separace dosažitelná v těchto okénkách, která odpovídá optimálním podmínkám separace, je z okénkového diagramu zřejmá na první pohled ( $x_{opt}$ ). Pokud nelze odvodit přímý vztah mezi dobou separace a pracovní podmínkou  $x$ , nepodává metoda okénkových diagramů informaci o době potřebné k analýze. Doporučuje se otestovat i podmínky odpovídající vedlejším maximům (např. pro  $x = 0,5$  na obr. 45), které mohou někdy poskytnout lepší celkovou separaci vzorku než hlavní maximum. K aplikaci této metody je třeba předem proměřit takový počet retenčních dat pro všechny látky separované směsi, aby bylo možno zkonstruovat okénkový diagram s dostačující přesností. Křivky v okénkových diagramech lze konstruovat buď jako empirické závislosti, nebo lze využít teoretického tvaru závislosti kritéria separace na optimalizovaném pracovním parametru. Nelze současně optimalizovat více než jeden pracovní parametr.

### 5.3.3 Současná optimalizace většího počtu experimentálních parametrů

Při tomto způsobu optimalizace je důležité vědět, zda optimalizované experimentální parametry působí na separaci vzájemně nezávisle, nebo zda se navzájem ovlivňují, což lze zjistit např. faktorovou analýzou. V prvním případě je možné jednotlivé parametry optimalizovat postupně některou z dříve uvedených metod, jinak je třeba tyto parametry optimalizovat současně.

K současné optimalizaci většího počtu pracovních podmínek lze použít simplexové metody, s rostoucím počtem parametrů se však zvyšuje pravděpodobnost, že výsledkem bude místo globálního maxima (optima) kritéria separace pouze maximum lokální, odpovídající méně výhodným pracovním podmínkám.

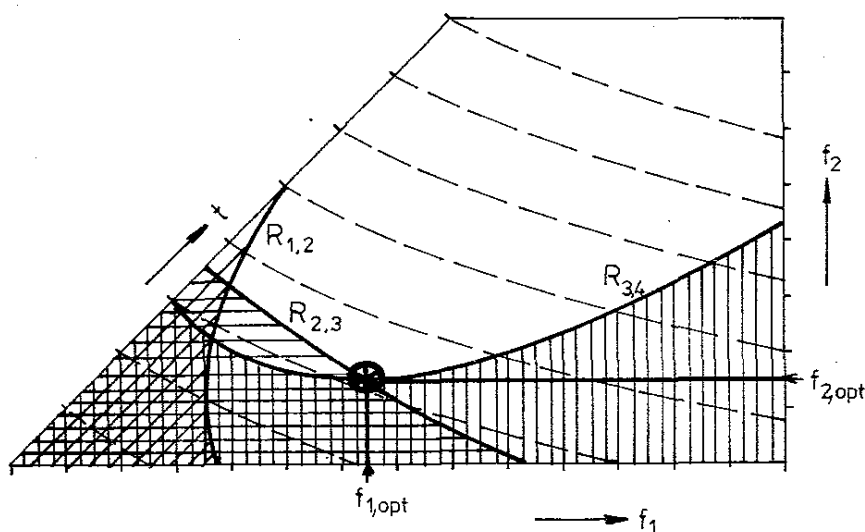
Jiné metody současné optimalizace vyžadují znalost závislosti kritéria separace na optimalizovaných pracovních podmínkách ve tvaru matematické funkce, který je buď znám z teorie chromatografického procesu, nebo jej musíme zjistit experimentálně řadou předběžných experimentů, kdy souborem experimentálních dat prokládáme lineární, kvadratické či kubické funkce tak, aby byl průběh experimentálních závislostí co nejlépe popsán. Tvar těchto funkcí je definován zcela obecně, bez ohledu na chromatografickou teorii, např. ve tvaru (podle Snee):

$$Y = b_1 f_1 + b_2 f_2 + b_3 f_3 + b_{12} f_1 f_2 + b_{13} f_1 f_3 + b_{23} f_2 f_3 (+ b_{123} f_1 f_2 f_3) \quad (5.8)$$

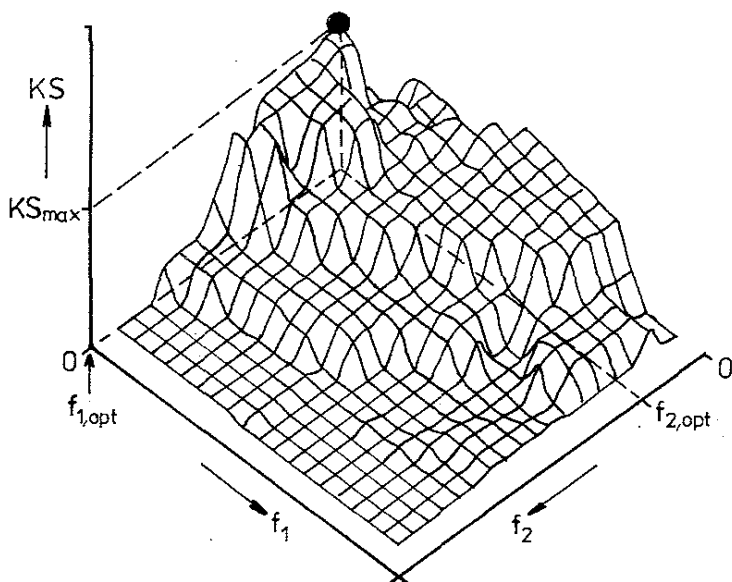
kde  $f_1, f_2, f_3$  jsou optimalizované experimentální podmínky,  $Y$  – odezva, kterou může být buď retenční objem, kapacitní poměr nebo jeho logaritmus, nebo eluční



poměr, rozlišení či jiné kritérium separace, a  $b_1, b_2, b_3, b_{12}, b_{23}, b_{13}, b_{123}$  – parametry, jež zjišťujeme regresní analýzou. [Poslední člen na pravé straně rovn. (5.8) – v závorce – lze v určitých případech zanedbat.] Těchto parametrů potom použijeme k výpočtu hodnot kritéria separace v celé oblasti (prostoru) optimalizovaných pracovních podmínek. Optimální jsou takové experimentální podmínky, odpovídající maximu v tomto prostoru, tj. největší hodnotě kritéria separace.



Obr. 46. Ukázka diagramu oblastí překryvů rozlišení  $R_{ij}$  pro separaci čtyřsložkové směsi v závislosti na hodnotách experimentálních podmínek ( $f_1, f_2$ ). Plné křivky odpovídají hodnotám  $R_{ij} = 1,5$  pro jednotlivé dvojice látek, oblasti s menším rozlišením jsou šrafovány. Přerušované křivky znázorňují různé doby analýzy  $t$ . Optimálního rozdělení všech složek v nekratším čase se dosáhne v bodě označeném kroužkem při podmínkách  $f_{1,opt}, f_{2,opt}$ .



Obr. 47. Ukázka diagramu povrchu kritéria separace ( $KS$ ) v závislosti na dvou optimalizovaných experimentálních podmínkách ( $f_1, f_2$ ). Optimálním podmínkám odpovídá maximální hodnota  $KS_{max}$  (označeno kroužkem) při optimalizovaných podmínkách  $f_{1,opt}, f_{2,opt}$ .

Při grafickém znázornění lze např. zkonstruovat diagram závislosti rozlišení  $R_{ij}$  na optimalizovaných experimentálních podmínkách pro všechny dvojice látek z dělené směsi tak, aby byla zřejmá oblast, kde je rozlišení všech dvojic látek vyšší než minimální požadovaná hodnota (obr. 46). Do takového diagramu lze vynést i dobu separace a jako optimální zvolit takové pracovní podmínky, v nichž je separace nejrychlejší (bod vyznačený hvězdičkou na obr. 46). Jinou možností grafického znázornění představuje diagram, v němž jsou vyneseny hodnoty kritéria separace

v závislosti na optimalizovaných experimentálních podmínkách, a předpokládá se, že maximální hodnota tohoto kritéria v diagramu odpovídá optimálním podmínkám separace (obr. 47).

Určitá nevýhoda této metody optimalizace spočívá v tom, že pro předběžné experimenty je třeba použít čistých standardů, abychom předešli možné záměně píků, dochází-li s měnicími se experimentálními podmínkami ke změně pořadí eluce látek. Čisté standardy nejsou vždy k dispozici, proto bylo navrženo využít k identifikaci látek ploch píků nebo odezvy vícekanálových detektorů (spektrálního „diode-array“ nebo hmotnostně spektrometrického).

### 5.3.4 Teoretické (deterministické) metody

Tyto způsoby optimalizace využívají matematických vztahů, vyplývajících z teorie chromatografického procesu, pro popis závislosti retenčních dat, doby separace, rozlišení a dalších kritérií separace na různých pracovních podmínkách. Tvar rovnice je předem determinován a jejich parametry je v současné době třeba zjišťovat regresní analýzou experimentálních dat získaných v předběžných pokusech při různě nastavených pracovních podmínkách. Většinou vystačíme s menším počtem předběžných experimentů než při způsobech optimalizace, které nevyužívají výsledků chromatografické teorie. Rozvíjí se i výzkum možností předpovědi parametrů těchto rovnic ze struktury látek a vlastností chromatografických systémů.

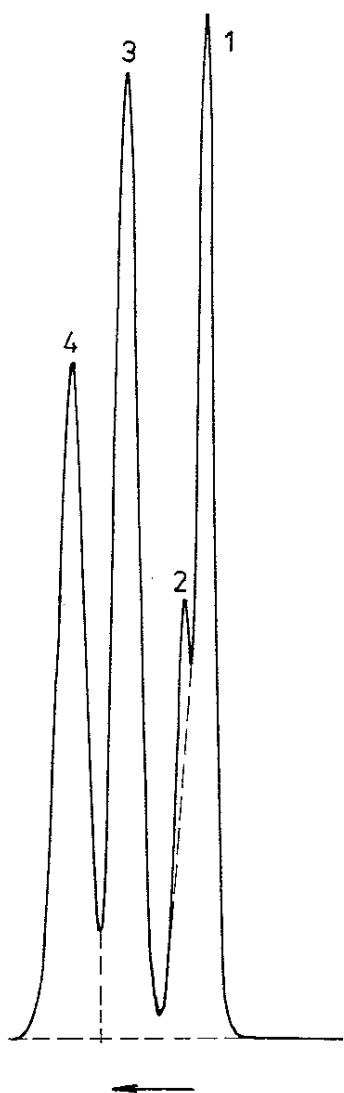
Vlastní optimalizace je založena na matematickém řešení vztahů mezi optimalizovanými podmínkami a použitým kritériem separace. Například počítáme pracovní podmínky, které poskytnou maximální rozlišení pro všechny dvojice látek v předem omezené době separace, nebo naopak podmínky, které odpovídají minimální době separace při předem dané hodnotě rozlišení pro nejhůře se dělicí, kritický pár látek. Z matematického hlediska jde většinou o vyhledání extrému určité funkce, vázaného vedlejší podmínkou.

## 5.4 MATEMATICKÉ ROZLIŠENÍ VZÁJEMNĚ SE PŘEKRÝVAJÍCÍCH PÍKŮ

Většina dříve uvedených optimalizačních postupů je založena na snaze o dosažení úplné separace všech látek ve směsi. Matematické postupy s využitím moderních počítačů však umožňují vyhodnotit kvantitativně plochu a určit maxima i takových píků, které se vzájemně značně překrývají. Tyto metody představují určitou alternativu k optimalizaci experimentálních podmínek separace a lze je rovněž řadit mezi optimalizační techniky.

Plochy píků látek s poměrně malým vzájemným překryvem lze vyhodnotit pomocí jednoduchých geometrických metod rozlišení píků, čehož se používá u řady komerčně dostupných integrátorů. Tyto metody rozdělují píky např. spuštěním kolmice v minimum mezi oběma píky či tangentskou metodou (obr. 48), jsou však tím méně přesné, čím více se píky vzájemně překrývají a čím více se vzájemně liší jejich plochy.

Matematické řešení poskytuje přesnější výsledky než geometrické metody. Při prvním způsobu řešení se experimentální eluční křivkou zahrnující píky překrývajících se látek prokládá křivka teoretické závislosti celkové odezvy detektoru  $R_T$  na čase, přičemž musí být tvar píků obou látek přesně popsán rovnicí v určitém



Obr. 48. Dělení částečně se překrývajících píků tangentovou metodou (1 a 2) a spuštěním kolmice v minimu mezi píky (3 a 4)

tvaru. V nejjednodušším případě, pokud uvažujeme gaussovský tvar elučních křivek [rovn. (3.50)], lze pro každý časový okamžik  $t_i$  vyjádřit odezvu  $R_{T,i}$  jako sumu odezvy detektoru na obě látky v eluátu  $R_{1,i}$  a  $R_{2,i}$ :

$$R_{T,i} = R_{1,i} + R_{2,i} = A_1 e^{-\frac{(t_i - t_{R,1})^2}{2 Y_1^2}} + A_2 e^{-\frac{(t_i - t_{R,2})^2}{2 Y_2^2}} \quad (5.9)$$

kde  $A_1$ ,  $A_2$  jsou amplitudy,  $Y_1$ ,  $Y_2$  – šířky píků,  $t_{R,1}$ ,  $t_{R,2}$  – retenční časy píků, které by látky 1 a 2 vykazovaly bez vzájemného překrytí. V praxi je ovšem třeba uvažovat funkce, které lépe vystihují skutečný tvar píku (Poissonovu, exponenciálně modifikovanou Gaussovou apod.). Při řešení se použije některého chemometrického postupu prokládání křivek, jímž se zjistí koeficienty pravé strany rovn. (5.9) či obdobných rovnic, s jejichž použitím lze určit retenční časy a plochy píků obou látek.

Druhý způsob vyhodnocení překrývajících se píků nevyžaduje přesnou znalost matematické funkce popisující tvar píku, ale musí být k dispozici čisté standardy obou látek. Po proměření chromatogramů několika standardních vzorků každé

látky v koncentracích  $x_j$  a  $y_j$  se vyhodnotí odezvy obou látek  $R_{1..j}$ ,  $R_{2..j}$  v řadě bodů každé z elučních křivek, tedy pro různé časy, resp. objemy eluátu  $i$ . Pro každý objem eluátu se metodou nejmenších čtverců určí koeficienty kalibračních křivek závislosti odezvy  $R_{1..ij}$  na koncentraci  $x_j$  a odezvy  $R_{2..ij}$  na koncentraci  $y_j$ , které lze vyjádřit např. polynomem 2. stupně:

$$\begin{aligned} R_{1..ij} &= a_i x_j^2 + b_i x_j \\ R_{2..ij} &= c_i y_j^2 + d_i y_j \end{aligned} \quad (5.10)$$

Pro celkovou odezvu  $R_{1..}$  v každém bodě eluční křivky odpovídající překrývajícím se pikům platí:

$$R_{T..i} = a_i x^2 + b_i x + c_i y^2 + d_i y \quad (5.11)$$

Koncentrace látek 1 a 2 ve směsi ( $x$  a  $y$ ) lze zjistit proložením závislosti (5.11) s koeficienty  $a_i$ ,  $b_i$ ,  $c_i$  a  $d_i$ , zjištěnými předcházející kalibrací, experimentální eluční křivkou tak, aby čtverce odchylek  $s = \sum (R_{1..} - a_i x^2 - b_i x - c_i y^2 - d_i y)^2$  byly minimální, čehož se dosáhne řešením dvou nelineárních rovnic  $\partial s / \partial x = 0$  a  $\partial s / \partial y = 0$  např. Newtonovou metodou.

Plynová chromatografie je separační metoda, která k separaci plynů a par využívá dvě heterogenní fáze. Mobilní fází je zpravidla inertní plyn. Stacionární fází je nejčastěji kapalina zakotvená na inertním nosiči, méně často povrchově aktivní adsorbent.

Plynová chromatografie prošla od roku 1952, kdy James a Martin publikovali separaci mastných kyselin použitím plynu jako mobilní a kapaliny jako stacionární fáze, rychlým rozvojem a stala se jednou z nejvýznamnějších metod instrumentální analytické chemie. V současnosti je účinným nástrojem poznání v organické chemii, biochemii a chemické technologii. Kromě toho je významnou analytickou metodou v petrochemickém, chemickém a potravinářském průmyslu i při analýze nečistot v jednotlivých složkách životního prostředí. Značné množství výzkumných úkolů, které se řeší v ústavech ČSAV, na vysokých školách, státních a resortních výzkumných ústavech, využívá plynovou chromatografii jako hlavní analytickou metodu. Výjimečná rozlišovací schopnost plynové chromatografie se využívá při analýze mnohasložkových vzorků v kombinaci s jinými fyzikálně chemickými metodami, zejména s infračervenou a hmotnostní spektrometrií. Plynovou chromatografii je možno dále využít k měření některých fyzikálně chemických veličin, jako jsou tlaky par, body varu, latentní tepla, rozpouštěcí tepla, směšovací tepla a aktivní koeficienty.

Značnou výhodou plynové chromatografie vůči ostatním chromatografickým metodám je použití plynu jako mobilní fáze. Nosný plyn je málo viskózní a je stlačitelný. Difúzní koeficienty složek v plynech jsou mnohem větší než v kapalinách a interakce molekul v plynné fázi jsou ve většině případů podstatně menší než v kapalně fázi.

### 6.1 TEORETICKÉ ZÁKLADY PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE

Jak jsme ukázali v kap. 3, rychlost migrace složky kolonou závisí na podmínkách dynamické rovnováhy a na rychlosti toku nosného plynu, zatímco rozšiřování chromatografické zóny závisí na podmínkách toku v koloně, podélné difúzi a rychlosti přenosu látky. Protože proudění plynu a kapaliny chromatografickou kolonou se díky stlačitelnosti plynů podstatně odlišují, uvedeme zde základní vztahy, kterými je možno charakterizovat tok plynné fáze chromatografickou kolonou.

## 6.1.1 Proudění plynu chromatografickou kolonou

Přenos separovaných látek chromatografickou kolonou se v plynové chromatografii realizuje nosným plynem. Proudění nosného plynu se zabezpečuje tlakovým spádem v chromatografické koloně. Protože výsledek analýzy vzorků plynovou chromatografií závisí do značné míry na toku mobilní fáze kolonou, věnuje se značná pozornost zvláště otázkám souvisejícím s reprodukovatelností nastavení a regulace toku plynu kolonou.

### 6.1.1.1 Tok plynu kapilární kolonou

Tok plynu kapilární kolonou je možno charakterizovat Reynoldsovým číslem ( $Re$ ):

$$Re = \frac{\bar{u} d \rho}{\eta} \quad (6.1)$$

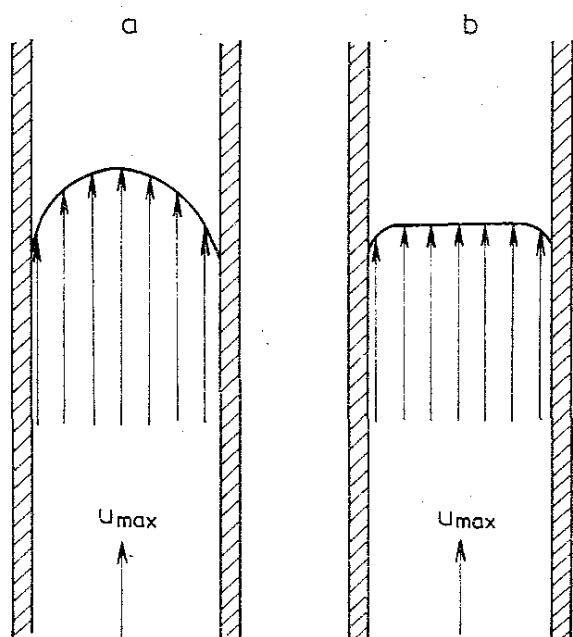
kde  $d$  je vnitřní průměr kapiláry,  $\bar{u}$  – střední lineární rychlost toku plynu ( $\text{v m s}^{-1}$ ),  $\rho$  – hustota plynu ( $\text{v kg m}^{-3}$ ),  $\eta$  – dynamická viskozita ( $\text{v Pa s}$ ).

V závislosti na Reynoldsově čísle rozeznáváme dva toky:

- laminární ( $Re < 2\,000$ ),
- turbulentní ( $Re > 10\,000$ ).

Oblast mezi Reynoldsovými čísly 2 000 až 10 000 je přechodová. Laminární tok je charakterizovaný vytvořením proudnic s různými rychlostmi. Rychlost je nejmenší v okolí stěn (na stěnách je  $u = 0$ ) a největší je uprostřed kapiláry. Proudění charakterizuje paraboloid, jehož podélným řezem je parabola (obr. 49a).

Zvýšením rychlosti proudění se plyn začne míchat, dochází k vyrovnávání rychlostí a vytvoření turbulentního toku (obr. 49b). V kapilární plynové chromatografii se stacionární fázi zachycenou na stěnách kapiláry se používají relativně malé rychlosti toku, a proto můžeme tok plynu kolonou charakterizovat jako laminární (tab. 6.1).



Obr. 49. Proudění plynu v trubici  
a – laminární tok, b – turbulentní tok

Tabulka 6.1. Některé údaje charakterizující tok vodíku a dusíku v kapilární koloně a v koloně naplněné pórovitou náplní

	Kapilární kolony		Kolony s náplní	
	H <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
vnitřní průměr/mm	0,3	0,3	3	3
viskozita <sup>1)</sup> /Pa s	0,008 4	0,016 6	0,008 4	0,016 6
rychlost toku/cm s <sup>-1</sup>	30	10	60	30
Reynoldsovo číslo	0,001	0,002	0,02	0,07
průměr částic/mm	—	—	0,2	0,2
hustota plynu <sup>2)</sup> /kg m <sup>-3</sup>	0,089 9	1,250	0,089 9	1,250

<sup>1)</sup> viskozita při 0 °C

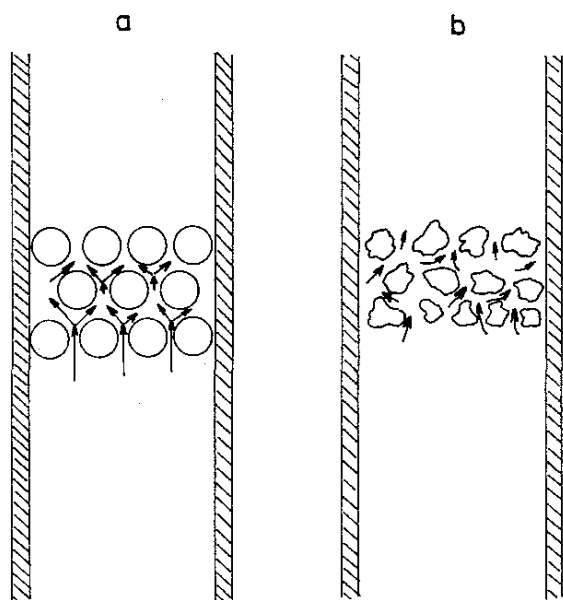
<sup>2)</sup> hustota při 101,3 kPa a 0 °C

### 6.1.1.2 Tok plynu v kolonách s pórovitou náplní

Mezi tokem plynu v kapilárních kolonách a v kolonách s náplní je značný rozdíl. V plynové chromatografii je poměr zrnitosti pórovité náplně ( $d_p$ ) a průměru kolony ( $d_c$ ) velmi malý ( $d_p/d_c < 0,2$ ) a nepravidelně uspořádané kanálky mezi částicemi způsobují smíchání proudu plynu, jak je zřejmé z obr. 50. Proudění v kolonách s pórovitou náplní lze charakterizovat modifikovaným Reynoldsovým číslem:

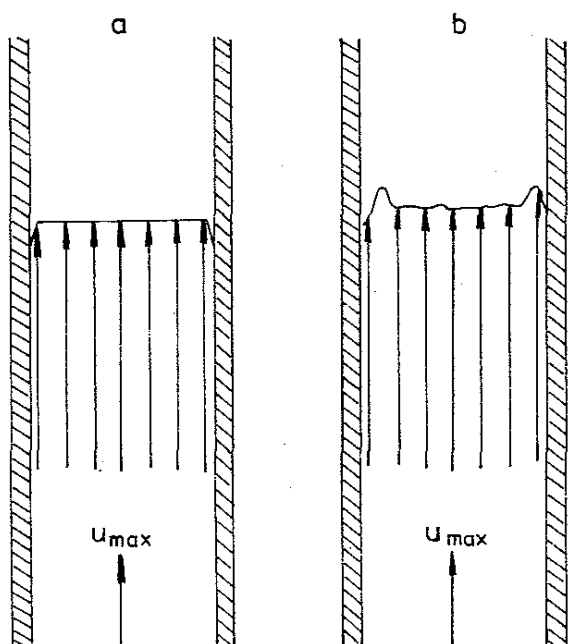
$$Re_m = \frac{d_p \bar{u} \rho}{\eta} \quad (6.2)$$

V oblasti laminárních toků  $Re_m < 10$ , v přechodové oblasti leží  $Re_m$  v intervalu 10 až 100 a pro turbulentní tok  $Re_m > 100$ . Při analýze vzorků plynovou chromatografií v plněných kolonách se pracuje v laminární oblasti toků (tab. 6.1). Zkoumáním podmínek proudění v kolonách s pórovitou náplní se zjistilo, že v každém kanálku jsou proudnice s různými rychlostmi a rychlost na povrchu částic je nulová. Vý-



Obr. 50. Tok plynu trubicí naplněnou kulovými (a) a pórovitými nepravidelnými (b) částicemi

sledkem zbrždování pohybu nosného plynu v koloně povrchem částic náplně je neparabolický profil toku i při laminárním proudění. Profil toku je podobný profilu toku s pístem, jak je zřejmé z obr. 51. Rychlost toku plynu v koloně s náplní závisí mimo jiné i na pórovitosti náplně.



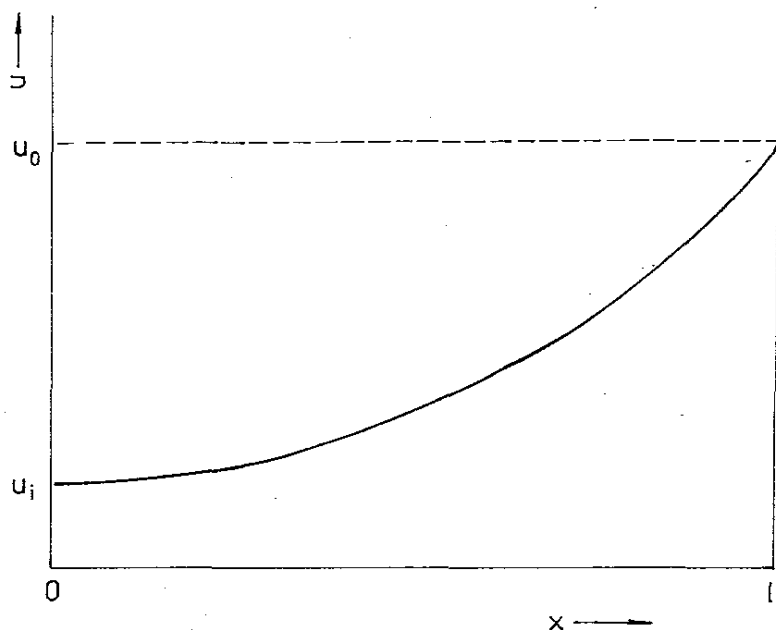
Obr. 51. Proudění plynu v trubici  
a – pístový tok, b – tok v trubici s náplní

### 6.1.1.3 Základní vztahy pro tok plynu chromatografickou kolonou při izotermické analýze

Protože plyn je stlačitelný, rychlost toku nosného plynu v koloně vlivem dekomprese plynu podél kolony roste a na konci kolony je maximální (obr. 52).

Rychlost toku nosného plynu se nejčastěji měří na výstupu z chromatografické kolony a v prázdné kapiláře je možno ji vypočítat z rovnice:

$$u_o = \frac{F_m}{\pi r_c^2} \quad (6.3)$$



Obr. 52. Závislost lineární rychlosti toku plynu ( $u$ ) na vzdálenosti v koloně ( $x$ )  
 $u_i$  – rychlost na vstupu.  
 $u_o$  – rychlost na výstupu



kde  $r_c$  je poloměr kapiláry,  $F_m$  – průtok (objemová rychlost) plynu měřený na výstupu z kolony. V plněných kolonách lze  $u_o$  vypočítat z rovnice:

$$u_o = \frac{F_m}{\pi r_c^2 \varepsilon_T} \quad (6.4)$$

kde  $\varepsilon_T$  je celková pórovitost náplně.

Rychlost toku nosného plynu v libovolné části kolony za izotermických podmínek je možno vypočítat z Boylova zákona:

$$pV = p_o V_o \quad (6.5)$$

kde  $p$  je tlak,  $V$  – objem,  $o$  – index označující výstup z kolony. Jestliže je volný průřez v celé koloně konstantní, lze rovn. (6.5) upravit do tvaru:

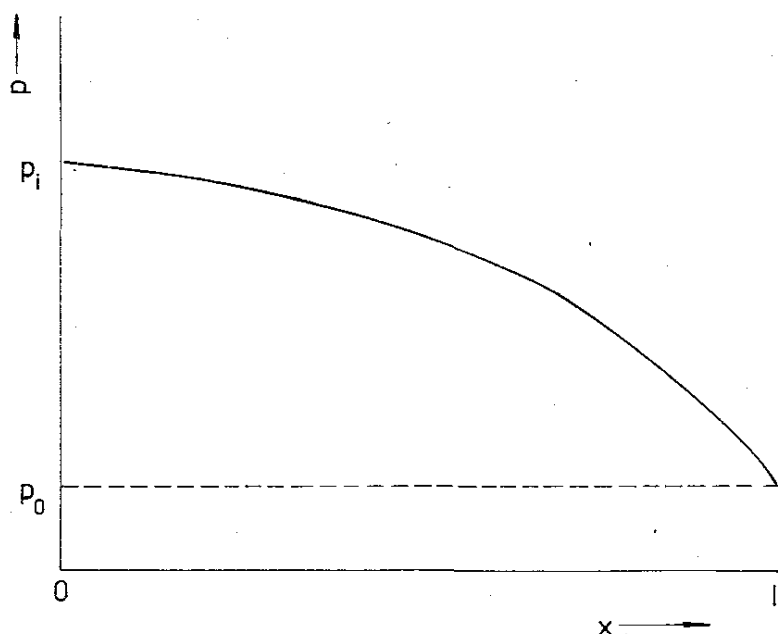
$$pu = p_o u_o \quad (6.6)$$

z které je možno vypočítat lineární rychlost toku nosného plynu na výstupu z chromatografické kolony.

Rychlost toku nosného plynu v každém místě kolony je možno zjistit z Darcyho zákona:

$$u = - \frac{B}{\varepsilon_T \eta} \frac{dp}{dl} \quad (6.7)$$

kde  $B$  je specifická permeabilita kolony,  $\varepsilon_T$  – celková pórovitost náplně,  $\eta$  – dynamická viskozita nosného plynu,  $dp/dl$  – tlakový spád v koloně ve směru toku.



Obr. 53. Závislost tlaku plynu ( $p$ ) na vzdálenosti v koloně ( $x$ )  
 $p_i$  – vstupní tlak,  
 $p_o$  – výstupní tlak,  
 $l$  – délka kolony

Protože plyn je stlačitelný, tlak v koloně klesá podél kolony nelineárně (obr. 53). Rychlost toku nosného plynu na výstupu z kolony lze vypočítat z rovnice:

$$u_o = - \frac{B}{\varepsilon_T \eta} \frac{p}{p_o} \frac{dp}{dl} \quad (6.8)$$

která vznikla kombinací rovnic (6.6) a (6.7). Integrací rovn. (6.8) se pro  $u_o$  získá rovnice:

$$u_o = \frac{B}{\varepsilon_T \eta L} \frac{p_v^2 - p_o^2}{2p_o} \quad (6.9)$$

z které lze úpravou získat:

$$u_o = \frac{B}{\varepsilon_T \eta L} \frac{\bar{p}}{p_o} (p_v - p_o) \quad (6.10)$$

protože pro malé tlakové spády je střední tlak v koloně aritmetickým průměrem  $[\bar{p} \approx (p_v - p_o)/2]$ . Index  $v$  označuje vstup do kolony.

Pro větší tlakové spády je možno střední tlak v koloně zjistit z rovnice:

$$\bar{p} = \frac{\int p \, dl}{\int dl} \quad (6.11)$$

Kombinací rovn. (6.8) a (6.11) se získá:

$$\bar{p} = \frac{\int p^2 \, dp}{\int p \, dp} \quad (6.12)$$

Integrací rovn. (6.12) v hranicích  $p_o$  až  $p_v$  dostaneme vztah pro střední tlak:

$$\bar{p} = \frac{2 p_v^3 - p_o^3}{3 p_v^2 - p_o^2} \quad (6.13)$$

Úpravou rovn. (6.13) se získá vztah mezi středním tlakem ( $\bar{p}$ ) a výstupním tlakem ( $p_o$ ):

$$\bar{p} = \frac{p_o}{j} \quad (6.14)$$

kde  $j$  je kompresibilitní faktor [rovn. (4.14) v odd. 4.2]. Z Boylova zákona a rovn. (6.14) vyplývá vztah pro střední lineární rychlost toku nosného plynu kolonou:

$$\bar{u} = u_o j \quad (6.15)$$

Zjistilo se, že střed chromatografické zóny nesorbované složky se v koloně pohybuje střední rychlostí toku nosného plynu, kterou je možno vypočítat z rovnice:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} \quad (6.16)$$

kde  $L$  je délka kolony a  $t_M$  – mrtvý eluční čas.

Specifická permeabilita kapiláry vzrůstá se čtvercem vnitřního poloměru ( $r_c$ ):

$$B = \frac{r_c^2}{8} \quad (6.17)$$

Rychlost toku nosného plynu na výstupu z kapiláry lze vypočítat z rovn. (6.9) a (6.17):

$$u_o = \frac{r_c^2}{8 \eta L} \frac{p_v^2 - p_o^2}{2 p_o} \quad (6.18)$$

Objemovou rychlost nosného plynu na výstupu z kapiláry je možno vypočítat z rovn. (6.3), (6.14) a (6.18):

$$F_m = \frac{1}{j} \frac{\pi r_c^4}{8\eta L} (p_v - p_o) \quad (6.19)$$

Je zřejmé, že rovn. (6.19) je Poiseuillovou rovnicí pro plyny proudící kapilárou.

Specifická permeabilita plněných kolon závisí na velikosti částic náplně ( $d_p$ ) a jejich pórovitosti ( $\varepsilon_o$ ) a lze ji vypočítat z Kozenyho-Carmanovy rovnice:

$$B = \frac{d_p^2 \varepsilon_o^3}{180 (1 - \varepsilon_o)^2} \quad (6.20)$$

Rychlost toku nosného plynu na výstupu z plněné kolony je možno vypočítat z rovn. (6.9) a (6.20). Objemovou rychlost nosného plynu plněnou kolonou lze vypočítat kombinací rovn. (6.4), (6.9), (6.14) a (6.24).

#### 6.1.1.4 Základní vztahy pro tok plynu chromatografickou kolonou při programované teplotě s lineárním gradientem

Za izotermických podmínek lze rychlost toku plynu kolonou vypočítat z rovn. (6.8). Úpravou této rovnice je možno získat závislost rychlosti toku plynu na výstupu z kolony na teplotě při izotermické analýze:

$$u_o(T) = - \frac{B}{\varepsilon_T \eta(T)} \frac{p \, dp}{p_o \, dl} \quad (6.21)$$

Mění-li se teplota izotermické analýzy při konstantním tlaku plynu na vstupu do kolony ( $p_v = \text{konst}$ ), je možno integrováním rovn. (6.21) získat rovnici:

$$u_o(T) = \frac{B}{\varepsilon_T \eta(T) L} \frac{p_v^2 - p_o^2}{2p_o} \quad (6.22)$$

jak to vyplývá z rovn. (6.9).

Viskozita plynu  $\eta$  se zvyšováním teploty sice roste nelineárně, avšak pro nevelké teplotní rozdíly ji lze vypočítat z lineární závislosti:

$$\eta(T) = a + bT \quad (6.23)$$

Kombinací rovn. (6.22) a (6.23) je možno získat vztah:

$$u_o(T) = \frac{B}{\varepsilon_T (a + bT) L} \frac{p_v^2 - p_o^2}{2p_o} \quad (6.24)$$

z kterého vyplývá, že při konstantním vstupním tlaku rychlost toku plynu na výstupu z chromatografické kolony klesá s rostoucí teplotou izotermické analýzy.

Když se teplota kolony při konstantním tlaku mění plynule (např. vzrůstá s lineárním gradientem), rychlost plynu na výstupu z kolony se mění s teplotou podle vztahu, který je možno získat derivováním rovn. (6.24) podle teploty.

Když se plynule zvyšuje teplota v přístroji s konstantní objemovou rychlostí ( $F_m = \text{konst}$ ), zvyšuje se vstupní tlak a rychlost na výstupu z kolony je konstantní:

$$u_o(\text{prog}) = \frac{F_m}{A_m} \quad (6.25)$$

kde  $A_m$  je volný průřez kolonou.

### 6.1.2 Látková bilance solutu v chromatografické koloně

Jedním z úkolů chromatografické teorie je hledání transportní funkce, tj. vztahu popisujícího závislost koncentrace látky v chromatografické zóně na místě a času. Při hledání transportní funkce je třeba zvolit pro chromatografický děj takový model, který je možné matematicky popsat. Hlavním problémem teoretického zpracování chromatografického děje je, že mikroskopickou stavbu pórovitého systému, který představuje náplň v chromatografické koloně, není možno znázornit vhodným modelem. Skutečný systém se proto nahrazuje zjednodušeným makroskopickým modelem a při popisu děje v koloně se nejčastěji vychází z látkové bilance solutu. Modelem, kterým je možno charakterizovat procesy spojené s migrací solutu v plynové chromatografii, je model lineární neideální chromatografie, při kterém se předpokládá, že separační funkce je lineární, rovnováha se ustaluje okamžitě a při migraci se uplatňuje difúze. Zóny se difúzí rozšiřují a rozdělení molekul solutu v zóně je podobné Gaussovu rozdělení chyb. Pro model lineární neideální chromatografie byla odvozena rovn. (3.51), která charakterizuje koncentraci látky na výstupu z chromatografické kolony ( $c_{i,o}$ ) a v plynové chromatografii se uvádí ve tvaru:

$$c_{i,o} = \frac{n_i}{A_m u_o \sigma_t \sqrt{2\pi}} \exp - \left[ \frac{(t - t_R)^2}{2\sigma_t^2} \right] \quad (6.26)$$

kde  $n_i$  je látkové množství solutu v zóně,  $A_m$  – volný průřez kolony,  $u_o$  – lineární rychlost toku plynu na výstupu z kolony,  $\sigma_t$  – směrodatná odchylka zóny v časových jednotkách,  $t$  – čas a  $t_R$  – eluční čas.

V praxi se rovn. (6.26) udává ve tvaru:

$$c_{i,o} = c_{i,\max} \exp - \left[ \frac{(t - t_R)^2}{2\sigma_t^2} \right] \quad (6.27)$$

kde  $c_{i,\max}$  je maximální koncentrace solutu v zóně.

Z odd. 3.3 vyplývá, že rovn. (6.26) a (6.27) popisují chromatografický pík a obsahují údaje, které je možno využít při kvalitativní analýze ( $t_R$ ), kvantitativní analýze ( $c_{\max}$ ) a hodnocení separační účinnosti chromatografické kolony ( $\sigma^2$ ).

### 6.1.3 Eluční charakteristiky

Základní eluční charakteristiky v kolonové chromatografii jsou uvedeny v kap. 3. Při elučních charakteristikách v plynové chromatografii je třeba mimo faktorů uvedených v této kapitole navíc uvažovat stlačitelnost plynu. Podle realizace

experimentu je vhodné je rozdělit na eluční charakteristiky naměřené za izotermických podmínek a s programovaně se měnící teplotou.

### 6.1.3.1 Eluční charakteristiky naměřené za izotermických podmínek

Základní eluční charakteristikou v plynové chromatografii je eluční čas. Základní rovnici pro eluční čas lze odvodit z rovn. (3.8):

$$t_R = t_M(1 + k) \quad (6.28)$$

kde  $k$  je kapacitní poměr (faktor).

Protože rychlost toku nosného plynu se nejčastěji měří na výstupu z chromatografické kolony ( $u_o$ ), uvádí se rovn. (6.28) též ve tvaru:

$$t_R = \frac{L}{\bar{u}}(1 + k) = \frac{L(1 + k)}{ju_o} \quad (6.29)$$

kde  $t_M = L/\bar{u}$ ,  $j$  – kompresibilitní faktor.

Rovnice (3.10) se v plynové chromatografii uvádí ve tvaru:

$$V_R = V_M + K_D V_F$$

kde  $K_D$  je distribuční (rozdělovací) konstanta,  $V_F$  – objem stacionární kapaliny.

Jestliže se při separaci látek uplatňuje v rozdělovacím mechanismu i adsorpce na povrchu stacionární kapaliny (adsorpce na pohyblivém rozhraní) a adsorpce na povrchu nosiče stacionární kapaliny (adsorpce na tuhém povrchu), rovnice pro eluční objem zahrnuje i členy vyjadřující tuto adsorpci:

$$V_R = V_M + K_D V_F + K_I A_I + K_A A_S \quad (6.30)$$

kde  $K_I$  je adsorpční koeficient na povrchu kapaliny s povrchem  $A_I$ ,  $K_A$  – adsorpční koeficient na povrchu nosiče stacionární kapaliny s povrchem  $A_S$ .

Za předpokladu, že se při chromatografii uplatňuje jen rozdělovací separační funkce (chromatografie plyn–kapalina), je čistý eluční objem úměrný rozdělovací konstantě:

$$V_N = V_R' = jK_D V_F \quad (6.31)$$

kde  $V_R' = V_R - V_M$ . Když se z rovn. (6.31) počítá rozdělovací konstanta ( $K_D$ ), je třeba eluční objemy udávat při teplotě kolony. Retenci složky je výhodné vyjádřit i specifickým elučním objemem [rovn. (4.13)].

Jestliže se při separaci uplatňuje jen adsorpce na tuhé fázi (chromatografie plyn–adsorbent) a adsorpční izoterma je lineární, je čistý eluční objem úměrný adsorpčnímu koeficientu ( $K_A$ ):

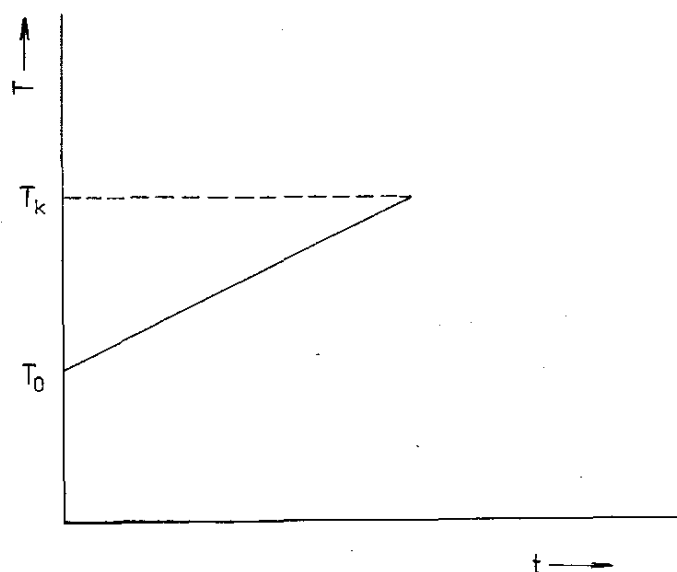
$$V_N = V_R' = K_A A_S \quad (6.32)$$

Eluční čas a eluční objem a z nich odvozené eluční charakteristiky závisí na značném počtu experimentálních podmínek a v praxi je lze jen těžko reprodukovat. Podstatně reprodukovatelněji je možno měřit relativní eluční charakteristiky, jako jsou eluční poměry ( $r_{i,s}$ ) a Kovatsovy eluční indexy ( $I$ ) (viz odd. 4.2).

### 6.1.3.2 Eluční charakteristiky při programované teplotě

Jestliže se v průběhu separace mění programovaně teplota, v koloně se změnou teploty mění hydrodynamické podmínky. Změna elučního času s teplotou závisí nejen na změně separační funkce s teplotou, ale i na způsobu, jak se v přístroji reguluje tok nosného plynu. Udrží-li se v přístroji konstantní vstupní tlak, zvyšováním teploty vzrůstá viskozita nosného plynu a v důsledku toho klesá průtok nosného plynu chromatografickou kolonou. Jestliže se v průběhu analýzy udržuje konstantní průtok plynu kolonou, změna elučního času s teplotou závisí na změně separační funkce s teplotou. Závislost elučního času na teplotě je možno odvodit z rovn. (6.29):

$$t_R(T) = t_M(T) [1 + k(T)] = \frac{L}{\bar{u}(T)} [1 + k(T)] \quad (6.33)$$



Obr. 54. Závislost teploty kolony ( $T$ ) na čase ( $t$ ) při programované teplotě s lineárním gradientem (LTPGC)  
 $T_0$  – počáteční teplota,  $T_k$  – konečná teplota

V nejjednodušším případě se teplota analýzy mění s lineárním gradientem (obr. 54), takže nárůst teploty v koloně lze vyjádřit rovnicí:

$$T = T_0 + rt \quad (6.34)$$

kde  $T_0$  je počáteční teplota,  $r$  – rychlost zvyšování teploty (gradient teploty),  $t$  – čas.

Protože se střední rychlost toku nosného plynu s teplotou mění, je možné rovnici pro výpočet elučního času při programovaně se měnící teplotě s lineárním gradientem zjistit diferenciací a integrací rovn. (6.33):

$$t_R(\text{prog}) = \int_0^L \frac{[1 + k(T)] dl}{\bar{u}(T)} \quad (6.35)$$

kde  $k(T)$  je závislost kapacitního poměru a  $\bar{u}(T)$  – závislost střední rychlosti toku na teplotě při izotermickém režimu.

Při programované změně teploty se retence solutu v chromatografické koloně často se vyjadřuje eluční teplotou ( $T_R$ ), což je teplota kolony, při které z kolony eluuje maximální koncentrace solutu, a při programování teploty s lineárním gradientem ji lze zjistit z rovnice:

$$T_R = T_0 + rt_R(\text{prog}) \quad (6.36)$$

Aby se při měření elučních charakteristik s programovanou změnou teploty zmenšil vliv fluktuace experimentálních podmínek na minimum, vyjadřuje se retence solutu v koloně relativně k retenci nerozvětvených alkanů systémem elučních indexů, které je možno vypočítat z rovn. (4.17). Z rovnic (6.36) a (4.17) je zřejmé, že na výpočet elučních indexů je možné mimo elučních teplot použít i eluční časy.

#### 6.1.4 Termodynamické základy plynové chromatografie

V předcházejících oddílech jsme uvedli vztahy mezi elučními charakteristikami a rozdělovací konstantou. V tomto oddíle uvedeme hlavní faktory ovlivňující rozdělovací, resp. distribuční konstantu. Protože plynová chromatografie se v praxi realizuje zvláště v systému plyn–kapalina, bude hlavní část tohoto oddílu věnována popisu tohoto systému. Jestliže zóna solutu proniká chromatografickou kolonou, pro jeho molekuly neplatí termodynamické vztahy odvozené pro statické systémy. V přední části zóny převládá sorpce molekul solutu do stacionární fáze, zatímco v zadní části zóny pronikání molekul solutu ze stacionární do mobilní fáze. Stav molekul solutu ve středu symetrické zóny je možné charakterizovat vztahy zjištěnými při rozdělení molekul solutu do kapalné a plyné fáze za statických podmínek.

##### 6.1.4.1 Chromatografie plyn–kapalina

Chemický potenciál solutu v plyné fázi lze vyjádřit rovnicí:

$$\mu_i(\text{g}) = \mu_i^\circ(\text{g}, T) + RT \ln a_i(\text{g}) \quad (6.37)$$

kde  $\mu_i^\circ(\text{g}, T)$  je standardní chemický potenciál solutu, jehož hodnota závisí nejen na vlastnostech solutu a nosného plynu, ale i na volbě standardního stavu,  $a_i(\text{g})$  – aktivita solutu v plyné fázi (g).

Aktivita solutu v plyné fázi je definována poměrem:

$$a_i(\text{g}) = \frac{f_i(\text{g})}{f_i^\circ(\text{g})} \quad (6.38)$$

kde  $f_i(\text{g})$  je fugacita solutu v plyné fázi,  $f_i^\circ(\text{g})$  – fugacita solutu v standardním stavu.

Pro plyny je výhodné udávat jako standardní stav čistý plyn, který se chová stavově ideálně při teplotě soustavy, v které se nachází, a při zvoleném tlaku (nejčastěji se

volí tlak 101,325 kPa). Za těchto podmínek a za předpokladu, že i roztok solutu v nosném plynu se chová stavově ideálně ( $f_i = p_i$ ), závisí standardní potenciál  $\mu^\circ(\text{g})$  jen na teplotě a v rovn. (6.38) je možné místo fugacit použít tlaky par solutu:

$$a_i(\text{g}) = \frac{p_i}{p_i^\circ} \quad (6.39)$$

kde  $p_i^\circ$  je tlak par solutu v standardním stavu.

Kombinací rovn. (6.37) a (6.39) se získá pro chemický potenciál rovnice:

$$\mu_i(\text{g}) = \mu_i^\circ(\text{g}, T) + RT \ln \frac{p_i}{p_i^\circ} \quad (6.40)$$

Když se solut v plynné fázi nechová stavově ideálně, je třeba do výpočtu zahrnout i aktivitní koeficient  $\gamma_i(\text{g})$ .

Chemický potenciál solutu rozpuštěného v stacionární kapalině lze charakterizovat rovnicí:

$$\mu_i(\text{l}) = \mu_i^\circ(\text{l}, T, p) + RT \ln a_i(\text{l}) \quad (6.41)$$

kde  $\mu_i^\circ(\text{l}, T, p)$  je standardní chemický potenciál solutu v roztoku, jehož hodnota závisí na solutu, rozpouštědle a volbě standardního stavu,  $a_i(\text{l})$  – aktivita solutu v roztoku (l). Aktivita solutu v roztoku je dána poměrem fugacit:

$$a_i(\text{l}) = \frac{f_i(\text{l})}{f_i^\circ(\text{l})} \quad (6.42)$$

kde  $f_i(\text{l})$  je fugacita solutu v roztoku,  $f_i^\circ(\text{l})$  – standardní fugacita solutu v roztoku.

Protože roztoky solutu v stacionární kapalině jsou velmi zředěné, je výhodné volit následující standardní stav: solut je v standardním stavu, je-li kapalný, o teplotě a tlaku soustavy a chová-li se jako v nekonečně zředěném roztoku v daném rozpouštědle. Nejsou-li roztoky nekonečně zředěné, je třeba počítat aktivitu solutu ze vztahu:

$$a_i(\text{l}) = x_i(\text{l}) \gamma_i(\text{l}) \quad (6.43)$$

kde  $x_i(\text{l})$  je látkový zlomek solutu v roztoku,  $\gamma_i(\text{l})$  – jeho aktivitní koeficient v daném roztoku.

Kombinací rovn. (6.41) a (6.43) se získá vztah pro chemický potenciál solutu v roztoku:

$$\mu_i(\text{l}) = \mu_i^\circ(\text{l}, T, p) + RT \ln x_i(\text{l}) \gamma_i(\text{l}) \quad (6.44)$$

Protože za rovnováhy jsou chemické potenciály pro solut v plynné a kapalně fázi stejné, lze z rovn. (6.40) a (6.44) odvodit rovnici:

$$\frac{p_i}{p_i^\circ x_i(\text{l}) \gamma_i(\text{l})} = \exp \left[ \frac{\mu_i^\circ(\text{l}, T, p) - \mu_i^\circ(\text{g}, T)}{RT} \right] \quad (6.45)$$



což je v podstatě Henryho zákon [rovn. (3.20)]:

$$p_i = H_i x_i \gamma_i$$

kde  $H_i$  je Henryho konstanta.

Za rovnováhy je možno z rovn. (6.37) a (6.41) odvodit vztah pro distribuční konstantu ( $K_D$ ):

$$K_D = \frac{a_i(l)}{a_i(g)} = \exp \left[ - \frac{\mu_i^\circ(l, T, p) - \mu_i^\circ(g, T)}{RT} \right] \quad (6.46)$$

V plynové chromatografii se pro výpočet distribuční konstanty používá rovnice, v které se rovnovážné koncentrace solutu v zóně nahrazují středními koncentracemi solutu v koloně:

$$K_D = \frac{\bar{c}_i(l)}{\bar{c}_i(g)} = \frac{n_i(l)V_1}{V_g n_i(g)} \quad (6.47)$$

kde  $n_i$  je látkové množství solutu,  $V$  – objem fáze v chromatografické koloně. Je zřejmé, že rovn. (6.47) platí jen tehdy, je-li v obou fázích možno nahradit aktivity koncentracemi.

Látkové množství solutu v stacionární kapalině lze vypočítat z látkového zlomku solutu:

$$x_i(l) = \frac{n_i(l)}{n_i(l) + n_1} \approx \frac{n_i(l)}{n_1} \quad (6.48)$$

kde  $n_1$  je látkové množství stacionární kapaliny v koloně, pro které platí:

$$n_1 = \frac{m_1}{M_1} = \frac{\rho_1 V_1}{M_1} \quad (6.49)$$

kde  $m_1$  je hmotnost kapalné fáze,  $\rho_1$  – její hustota,  $M_1$  – molární hmotnost. Kombinací rovn. (3.19), (6.48) a (6.49) se pro látkové množství solutu v stacionární kapalině získá vztah:

$$n_i(l) = \frac{\rho_1 V_1}{M_1} \frac{p_i}{p_i^\circ \gamma_i(l)} \quad (6.50)$$

Látkové množství solutu v plyné fázi je možno vypočítat ze stavové rovnice:

$$n_i(g) = \frac{p_i V_g}{RT} \quad (6.51)$$

Když se vztahy (6.50) a (6.51) dosadí do rovn. (6.47), získá se pro distribuční konstantu solutu rovnice:

$$K_{D,i} = \frac{RT \rho_1}{\gamma_i(l) M_1 p_i^\circ} \quad (6.52)$$

z které vyplývá, že distribuční konstanta solutu závisí na teplotě, molární hmotnosti stacionární kapaliny, tlaku nasycených par solutu a jeho aktivitním koeficientu v stacionární kapalině. Změnou polaritý stacionární kapaliny lze významně měnit aktivitní koeficienty solutu, což umožňuje separovat i takové složky, které mají za daných podmínek stejné tlaky nasycených par. Z rovnice (6.52) je možno s ohledem na definici specifického (měrného) elučního objemu ( $V_g$ ) (viz odd. 4.2) odvodit rovnici:

$$V_g = \frac{K_D \cdot 273,16}{\rho_l T} \quad (6.53)$$

Tlak nasycených par solutu ( $p_i^\circ$ ) a aktivitní koeficient solutu v kapalně fázi [ $\gamma_i(l)$ ] (v dalším textu se bude uvádět zjednodušený symbol  $\gamma_i$ ) závisí na teplotě, což umožňuje změnou teploty rozdělit látky, které při dané teplotě eluují současně.

Závislost nasyceného tlaku par na teplotě vyplývá z Clausiovy–Clapeyronovy rovnice:

$$\frac{d \ln p^\circ}{dT} = \frac{\Delta \mathcal{H}_v}{RT^2} \quad (6.54)$$

kde  $\Delta \mathcal{H}_v$  je molární výparná entalpie solutu.

Rovnici (6.54) lze integrovat za předpokladu, že  $d(\Delta \mathcal{H}_v/dT) = 0$ :

$$\ln p^\circ = -\frac{\Delta \mathcal{H}_v}{RT} + C \quad (6.55)$$

kde  $C$  je integrační konstanta.

Aktivitní koeficient solutu v roztoku stacionární kapaliny souvisí s molární dodatkovou směšovací Gibbsovou energií ( $\Delta G_{E,i}$ ):

$$\Delta G_{E,i} = RT \ln \gamma_i \quad (6.56)$$

Molární dodatková směšovací Gibbsova energie je dána rozdílem:

$$\Delta G_E = \Delta \mathcal{H}_E - T \Delta \mathcal{S}_E \quad (6.57)$$

ve kterém  $\Delta \mathcal{H}_E$  je molární dodatková směšovací entalpie,  $\Delta \mathcal{S}_E$  – molární dodatková směšovací entropie,  $T$  – teplota.

S ohledem na rovn. (3.23) je možno pro aktivitní koeficient napsat vztah:

$$\gamma_i = \gamma_{T,i} \gamma_{A,i} \quad (6.58)$$

kde  $\gamma_T$  je termický a  $\gamma_A$  – atermický aktivitní koeficient, pro který platí rovn. (3.24) a (3.25).

Termický aktivitní koeficient závisí na tom, jaké jsou energetické rozdíly mezi interakcemi molekul rozpouštědla a solutu. Závisí tedy na intermolekulárních silách a určuje rozdíly v selektivním zbrždění pohybu látek v chromatografické koloně při použití různě polárních stacionárních kapalin.

Atermické aktivní koeficienty nezávisí na intermolekulárních interakcích, ale na velikosti molekul solutu a stacionární kapaliny [viz rovn. (3.26)].

Z rovnic (3.24), (3.25) a (6.58) vyplývá, že

$$\frac{d \ln \gamma_i}{dT} = \frac{\Delta \mathcal{H}_E}{RT} \quad (6.59)$$

Molární výparná entalpie solutu z nekonečně zředěného roztoku ( $\Delta \mathcal{H}_s$ ) je rozdílem molární výparné entalpie čistého solutu ( $\Delta \mathcal{H}_v$ ) a molární směšovací entalpie solutu v roztoku ( $\Delta \mathcal{H}_E$ ):

$$\Delta \mathcal{H}_s = \Delta \mathcal{H}_v - \Delta \mathcal{H}_E \quad (6.60)$$

Kombinací rovnic (6.56), (6.58), (3.24) a (3.25) je možno získat závislost specifického elučního objemu ( $V_g$ ) na teplotě ( $T$ ):

$$\frac{d \ln V_g}{d(1/T)} = \frac{\Delta \mathcal{H}_s}{R} \quad (6.61)$$

jejíž integrací za předpokladu, že  $d(\Delta \mathcal{H}_s/dT) = 0$ , se získá rovnice, která se využívá ke zjištění  $\Delta \mathcal{H}_s$ :

$$\log V_g = \frac{\Delta \mathcal{H}_s}{2,303 RT} + C \quad (6.62)$$

kde  $C$  je integrační konstanta.

Z rovnice (6.62) je zřejmé, že závislost  $\log V_g$  na  $1/T$  je přímková se směrnici  $\Delta \mathcal{H}_s/2,303 R$ .

#### 6.1.4.2 Chromatografie plyn–adsorbent

V chromatografii plyn–adsorbent, pro niž se používá zkratka GSC, je stacionární fází tuhý zrnitý adsorbent. Při adsorpci plynů a par na tuhých adsorbentech lze rozlišovat fyzikální adsorpci a chemisorpci. Fyzikální adsorpce je energeticky méně náročná než chemisorpce. Pro chromatografii plyn–adsorbent se využívá výlučně fyzikální adsorpce. Adsorpční izotermy v reálných soustavách jsou často nelineární, protože povrch adsorbentu není homogenní a jako první se obsazují nejaktivnější centra. O úspěšnosti separace látek rozhoduje adsorpčně-desorpční dynamická rovnováha na povrchu adsorbentu. Statistický charakter adsorpční rovnováhy umožňuje charakterizovat molekuly na povrchu adsorbentu a v mobilní fázi Boltzmannovým zákonem:

$$\frac{N_s}{N_m} = \exp\left(\frac{\Delta E}{k^* T}\right) \quad (6.63)$$

kde  $N_s$  je počet adsorbovaných molekul,  $N_m$  – počet molekul v mobilní fázi,  $\Delta E$  – změna adsorpční energie,  $k^*$  – Boltzmannova konstanta,  $T$  – teplota. Statistický charakter adsorpčně-desorpční dynamické rovnováhy umožňuje rovno-

vážné koncentrace nahradit průměrnými koncentracemi solutu v koloně a Henryho adsorpční konstantu ( $K_s$ ) vyjádřit vztahem:

$$K_s = \frac{\bar{c}_s}{\bar{c}_m} \quad (6.64)$$

kde  $\bar{c}_s$  je střední koncentrace solutu naadsorbovaná v koloně na povrchu adsorbentu, která je dána rovnicí:

$$\bar{c}_s = \frac{n_s}{V_s} \quad (6.65)$$

kde  $n_s$  je látkové množství a  $V_s$  – objem adsorbentu v koloně.

Z rovnice (6.51) je zřejmé, že koncentrace solutu v mobilní fázi je úměrná parciálnímu tlaku ( $p_i$ ), a rovnici (6.64) je možné uvést i ve tvaru:

$$c_{s,i} = k_{s,i}^* p_i \quad (6.66)$$

Rovnice (6.66) platí jen pro adsorbenty s homogenním povrchem a popisuje lineární adsorpční izotermu [srovnej rovn. (6.66) s rovn. (3.1)]. Protože povrchy adsorbentů nejsou homogenní, lineární izoterma platí jen pro velmi malé parciální tlaky solutu v mobilní fázi (viz odd. 3.2.1). Adsorpce je exotermický děj, jehož tepelný efekt lze změřit kalorimetricky nebo ho zjistit z van't Hoffovy rovnice:

$$\frac{d \ln K_A}{dT} = \frac{\Delta \mathcal{H}_a}{RT^2} \quad (6.67)$$

kde  $\Delta \mathcal{H}_a$  je molární adsorpční entalpie,  $K_A$  – adsorpční koeficient charakterizovaný poměrem

$$K_A = \frac{m_a V_m}{A m_m} \quad (6.68)$$

kde  $m_a$  je hmotnost solutu adsorbovaného na povrchu adsorbentu  $A$ ,  $m_m$  – hmotnost solutu v plynné fázi o objemu  $V_m$ .

Při hodnocení adsorpce je důležité uvést, zda se vyjadřuje Henryho adsorpční konstantou nebo adsorpčním koeficientem. V obou případech jsou však těžkosti s definováním standardních stavů.

### 6.1.5 Rozmývání zóny solutu v plynové chromatografii

Teoretické základy, které vysvětlují příčiny rozmývání zóny solutu v chromatografické koloně, jsou shrnuty v odd. 3.3.4. Protože plyn je stlačitelný, rovnice popisující rozmývání zón v plynové a kapalinové chromatografii se liší.

### 6.1.5.1 Rozmývání zón v kolonách s náplní při izotermické analýze

Při zkoumání faktorů způsobujících rozmývání zóny solutu v plynové chromatografii s plněnými kolonami se vychází z rozšířené van Deemterovy rovnice:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_g^\circ}{u_o} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2 \bar{u}}{D_l} + \frac{k^2 d_p^2 u_o}{100 D_g^\circ (1+k)^2} \quad (6.69)$$

kde  $H$  je výškový ekvivalent teoretického patra,  $\lambda$  – koeficient charakterizující homogenost náplně chromatografické kolony,  $d_p$  – průměrná zrnitost náplně,  $\gamma$  – labyrintový (tortuozitní) faktor, který vyjadřuje vliv různé pórovitosti náplně na rychlost difúze,  $D_g^\circ$  – difúzní koeficient solutu v plynné fázi při atmosférickém tlaku,  $k$  – kapacitní faktor,  $d_f$  – tloušťka filmu stacionární kapaliny nanesené na nosiči,  $D_l$  – difúzní koeficient solutu v kapalně fázi,  $u_o$  – rychlost toku plynu na výstupu z chromatografické kolony,  $\bar{u}$  – střední lineární rychlost toku plynu v chromatografické koloně.

Rovnici (6.69) lze uvést ve tvaru:

$$H = A + \frac{B_o}{u_o} + C_1 \bar{u} + C_g^\circ u_o \quad (6.70)$$

kde význam konstant  $A$ ,  $B_o$ ,  $C_1$  a  $C_g^\circ$  je možno zjistit porovnáním rovn. (6.69) a (6.70).

Protože pro vyjádření závislosti výškového ekvivalentu ( $H$ ) na rychlosti toku plynu ( $u$ ) podle rovn. (6.70) je třeba trojrozměrný prostor, je výhodnější rovn. (6.70) uvést ve tvaru:

$$H = A + \frac{B_o j}{\bar{u}} + C_1 \bar{u} + \frac{C_g^\circ \bar{u}}{j} \quad (6.71)$$

kde  $A$  je koeficient vířivé (turbulentní) difúze,  $B_o$  – koeficient podélné difúze,  $C_1$  a  $C_g^\circ$  – koeficienty odporu proti převodu hmoty v kapalně, resp. plynné fázi. Pro střední lineární rychlost toku nosného plynu ( $\bar{u}$ ) v koloně platí rovn. (6.15).

Rovnice (6.71) je rovnicí hyperboly (obr. 56) s minimem pro výškový ekvivalent teoretického patra,

$$H_{\min} = A + 2\sqrt{B_o(C_1 j + C_g^\circ)} \quad (6.72)$$

kterému patří optimální střední rychlost toku nosného plynu v koloně:

$$\bar{u}_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B_o}{C_1 j + C_g^\circ}} \quad (6.73)$$

Giddings zjistil, že aditivnost příspěvků k výškovému ekvivalentu teoretického patra neplatí, když se použijí větší rychlosti toku nosného plynu. Za těchto podmínek závislost výškového ekvivalentu teoretického patra ( $H$ ) na střední lineární rychlosti toku nosného plynu ( $\bar{u}$ ) lépe vystihuje rovnice:

$$H = \frac{1}{\frac{1}{A} + \frac{j}{C_g^\circ \bar{u}}} + \frac{B_o j}{\bar{u}} + C_1 \bar{u} \quad (6.74)$$

### 6.1.5.2 Rozmývání zón v kapilárních kolonách při izotermické analýze

Kapilární kolony je možno realizovat zachycením stacionární kapaliny, adsorbentu nebo náplně na stěny kapiláry (náplň je stacionární kapalina zakotvená na vhodném nosiči – viz odd. 6.3). Protože kapilární kolony s adsorbentem na stěnách kapiláry jsou v praxi používány zřídka, rozmývání zón v těchto kolonách do tohoto oddílu nezahrneme.

Když se kapalná fáze zakotví na stěny kapiláry s kruhovým průřezem, získá se kapilární kolona, která se v literatuře označuje zkratkou WCOT<sup>1)</sup>. Pro tento typ kolon závisí výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) na střední lineární rychlosti toku nosného plynu ( $\bar{u}$ ) např. podle rovnice, kterou odvodil Golay a kterou je možno uvést ve tvaru:

$$H = 2 \frac{D_g^\circ j}{\bar{u}} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f}{D_1} \bar{u} + \frac{1+6k+11k^2}{24(1+k)^2} \frac{r_c^2}{D_g^\circ j} \bar{u} \quad (6.75)$$

kde  $r_c$  je vnitřní poloměr kapiláry,  $d_f$  – tloušťka filmu kapalně fáze. Význam ostatních symbolů je vysvětlen u rovn. (6.69). Golayovu rovnici lze uvést v zjednodušeném tvaru:

$$H = \frac{B_o j}{\bar{u}} + C_1 \bar{u} + \frac{C_g^\circ \bar{u}}{j} \quad (6.76)$$

Protože v rovn. (6.76) chybí výraz  $A$ , je výškový ekvivalent teoretického patra menší než v plněných kolonách [srovnej rovn. (6.71) a (6.76)].

Když se kapalná fáze zakotví na vhodný nosič a takto získaná náplň se zachytí v tenké vrstvě na vnitřní stěny kapiláry, získá se kapilární kolona, která se v literatuře označuje zkratkou SCOT<sup>2)</sup>. Pro tento typ kolon odvodil Golay vztah mezi  $H$  a  $\bar{u}$ , který lze najít v monografiích o kapilární plynové chromatografii. V tomto vztahu jsou mimo faktorů uvedených v rovn. (6.75) zahrnuty i další konstanty, závislé na pórovitosti náplně, povrchu kapalně fáze a povrchu vnitřních stěn kapiláry.

### 6.1.5.3 Rozmývání zóny solutu při programované teplotě

Při zjišťování závislosti rozmývání zóny na rychlosti zvyšování teploty chromatografické kolony při programované teplotě je výhodné využít závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na teplotě zjištěné za izotermických podmínek. Závislost van Deemterovy rovnice na teplotě při izotermické analýze lze vyjádřit vztahem:

$$H(T) = A(T) + \frac{B_o(T)j(T)}{\bar{u}(T)} + \frac{C_g^\circ(T)\bar{u}(T)}{j(T)} + C_1(T)\bar{u}(T) \quad (6.77)$$

<sup>1)</sup> WCOT – Wall Coated Open Tubular.

<sup>2)</sup> SCOT – Support Coated Open Tubular.

Je zřejmé, že při zjišťování vlivu teploty na výškový ekvivalent teoretického patra je třeba rovn. (6.77) derivovat podle teploty a při programované teplotě s lineárním gradientem integrovat v hranicích  $T_0$  až  $T$ . Protože se analytické řešení takového integrálu dosud nenašlo, zhodnotíme rozšiřování zóny solutu při programované teplotě jen kvalitativně.

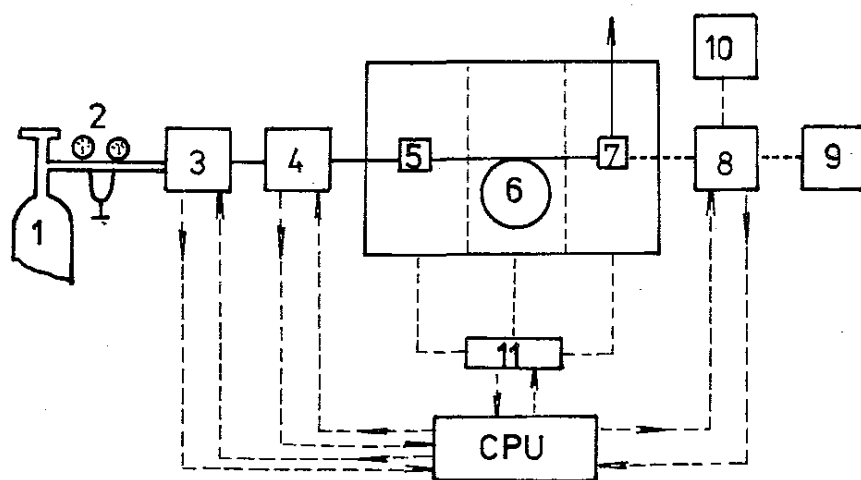
Závislost turbulentní difúze na teplotě je s ohledem na závislost ostatních členů rovn. (6.77) malá a je možné ji zanedbat. Jestliže se pracuje s přístrojem s konstantním vstupním tlakem,  $dj(T)/dt = 0$ , vliv teploty se projeví na koeficientu  $B_0$  (závislost difúzního koeficientu v plynné fázi a distribuční konstanty na teplotě), na koeficientu  $C_1$  (závislost difúzního koeficientu v stacionární fázi a distribuční konstanty na teplotě) a střední rychlosti toku plynu (závislost viskozity nosného plynu na teplotě).

Důsledkem zvyšování teploty kolony při programované teplotě je získání úzkých zón, z čehož lze usoudit, že teplota snižuje výškový ekvivalent teoretického patra. Jednoznačné závěry však nemůžeme získat, protože počet piků, které je možné rozdělit mezi dva nerozvětvené alkany, je při programované teplotě menší než při izotermické analýze (viz odd. 6.9).

## 6.2 ZÁKLADNÍ ČÁSTI PLYNOVÉHO CHROMATOGRAFU

Plynový chromatograf, jehož blokové schéma je na obr. 55, obsahuje tyto hlavní části:

- zásobník plynné fáze,
- zařízení na regulaci tlaku, resp. průtoku plynné fáze,
- dávkovací zařízení,
- chromatografickou kolonu,



Obr. 55. Blokové schéma plynového chromatografu, jehož činnost řídí mikroprocesor

1 – tlaková láhev s nosným plynem, 2 – redukční ventil, 3 – regulátor tlaku, 4 – regulátor průtoku, 5 – dávkovač, 6 – chromatografická kolona, 7 – detektor, 8 – elektroměr, 9 – zapisovač, 10 – integrátor, 11 – regulátor teploty, CPU – mikroprocesor; dávkovač, kolona a detektor jsou v termostatech

- termostat se zařízením pro izotermickou analýzu a pro analýzu s programovou změnou teploty,
- detektor,
- zařízení na zpracování signálu detektoru a jeho záznam,
- zařízení na vyhodnocení analýzy.

Činnost plynového chromatografu můžeme popsat zjednodušeným postupem: Z tlakové láhve (1) přechází nosný plyn redukčním ventilem (2) (ve kterém se zredukuje tlak na méně než 0,5 MPa) do sušicí trubice, regulátoru tlaku (3) (ve kterém se nastaví požadovaný tlak na vstupu do kolony), resp. do regulátoru průtoku (4). Vzorek se dávkuje do proudu nosného plynu v dávkovači (5) a je plynem vnesen do chromatografické kolony (6). V koloně se vzorek rozdělí na složky, které jsou nosným plynem postupně vymývané do detektoru (7), jehož signál se zpracuje elektroměrem (8), zapíše zapisovačem (9), zhodnotí integrátorem nebo zařízením na zpracování údajů (10). Teplotu dávkovače, detektoru a kolony regulují teplotní regulátory (11). V moderních přístrojích se vzorky dávkuje automatickými dávkovači, celý chod přístroje řídí mikroprocesor (CPU) a analýza se vyhodnocuje počítačem. Z výsledku analýzy je možné získat informace o kvalitativním a kvantitativním složení vzorku a o separační účinnosti chromatografického systému.

### 6.2.1 Nosný plyn

Mobilní fází v plynové chromatografii je plyn. Protože se mobilní fáze účastní přenosu látek chromatografickou kolonou, vžil se pro něj název nosný plyn.<sup>1)</sup>

Volbu nosného plynu ovlivňuje více faktorů. Jedním z rozhodujících je typ použitého detektoru. Mezi další patří inertnost, čistota, viskozita, hustota plynu a bezpečnost při práci. Zásobníkem nosného plynu jsou zpravidla tlakové láhve. Jako nosné

Tabulka 6.2. Hustoty a viskozity některých plynů při 0 °C a 101,325 Pa

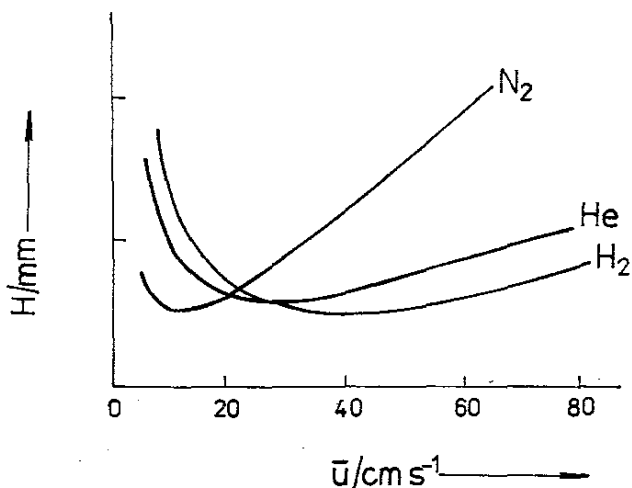
Plyn	Hustota kg m <sup>-3</sup>	Viskozita μPa s
vodík	0,089 9	8,44
dusík	1,250	16,58
kyslík	1,429	19,23
vzduch	1,293	17,07
oxid uhličitý	1,977	13,83
helium	0,178	18,6
neon	0,899	29,8
argon	1,784	21,2

<sup>1)</sup> I když nosný plyn není součástí chromatografu, z formálních důvodů jsme jej zařadili do kapitoly věnované chromatografickému přístroji.



plyny se v praxi nejčastěji používají žárovkový dusík, elektrolytický vodík, helium a argon.

Nosný plyn se suší molekulovými síty. Stopy kyslíku z dusíku je možno odstranit v kolonce naplněné mědí při zvýšené teplotě. Stopy kyslíku z vodíku se odstraní oxidací na Pt-katalyzátoru při laboratorní teplotě. Z fyzikálních vlastností plynů se v plynové chromatografii nejvíce uplatňují hustota a viskozita, protože ovlivňují difúzi a průtok plynu kolonou. V tabulce 6.2 jsou uvedeny hustoty a viskozity plynů, které je možno využít v plynové chromatografii jako mobilní fáze.



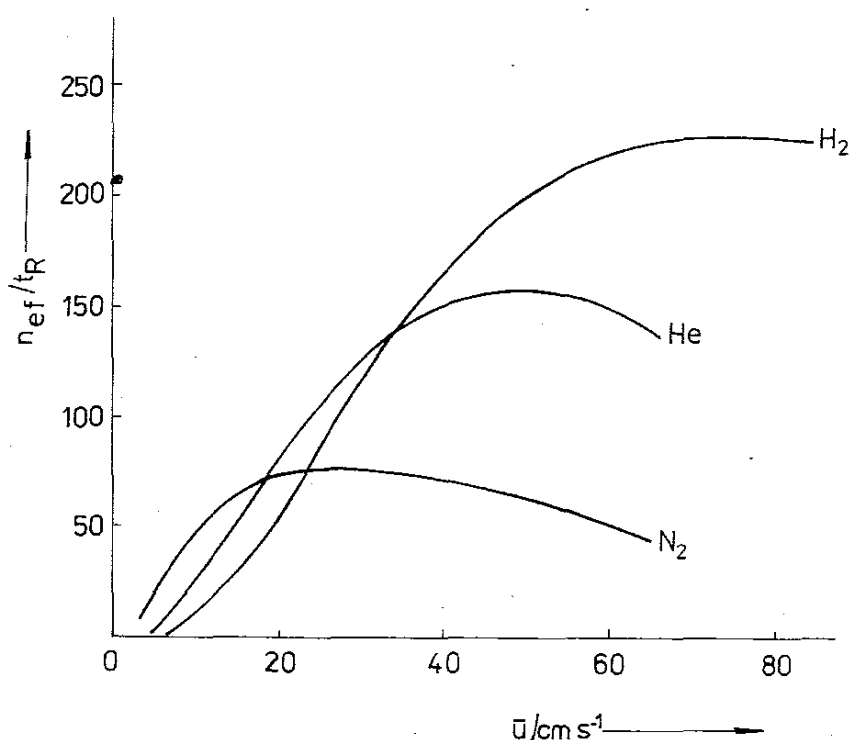
Obr. 56. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra ( $H$ ) na střední lineární rychlosti toku plynu kolonou ( $\bar{u}$ ) zjištěná kapilární plynovou chromatografií pro různé plyny ve stejné koloně pro heptadekan ( $k = 7,95$ ) při  $175\text{ }^\circ\text{C}$

Jak vyplývá z van Deemterovy rovnice, za izotermických podmínek lze podélnou difúzi v plynné fázi snížit zmenšením hodnoty difúzního koeficientu ( $B_0 = 2\gamma D_g^\circ$ ). Jestliže difúzní koeficient klesá s rostoucí hustotou nosného plynu, je možno podélnou difúzi snížit tím, že se jako nosného plynu použije permanentní plyn s větší hustotou (např. dusík nebo argon). Z van Deemterovy rovnice však dále vyplývá, že difúzní koeficient v plynné fázi ovlivňuje i odpor vůči převodu látky v plynné fázi (člen  $C_g^\circ$ ), který s rostoucí hustotou nosného plynu vzrůstá. Z obrázku 56 vyplývá, že má-li se dosáhnout maximální separační účinnosti kolony, je výhodné použít nosný plyn s větší hustotou (argon nebo dusík) a pracovat s malými rychlostmi toku nosného plynu (v blízkosti optima), protože je zřejmé, že v hustších plynech jsou difúzní koeficienty menší než v řidších plynech, a tak menší rychlost toku umožňuje dosažení dynamické rovnováhy i v těchto plynech. Když je však třeba pracovat s většími rychlostmi toku nosného plynu kolonou, je výhodné použít nosný plyn s menší hustotou (vodík nebo helium), u kterého je odpor vůči převodu hmoty v plynné fázi relativně malý (viz obr. 56).

Při optimalizaci analýzy, kterou významně ovlivňuje její trvání, je výhodné jako kritérium výběru nosného plynu použít poměr počtu efektivních pater a elučního času ( $n_{ef}/t_R$ ). Optimální nosný plyn a optimální střední rychlost toku při analýze můžeme zjistit z maxima závislosti  $n_{ef}/t_R$  na  $\bar{u}$ , jak je zřejmé z obr. 57.

Pro takto stanovenou rychlost toku nosného plynu se používá název optimální experimentální rychlost toku. Z obrázku 57 je zřejmé, že výhodným nosným plynem v plynové chromatografii je vodík. Je podstatně levnější než helium a je možno ho získat velmi čistý. Protože vodík tvoří se vzduchem výbušné směsi, jeho používání

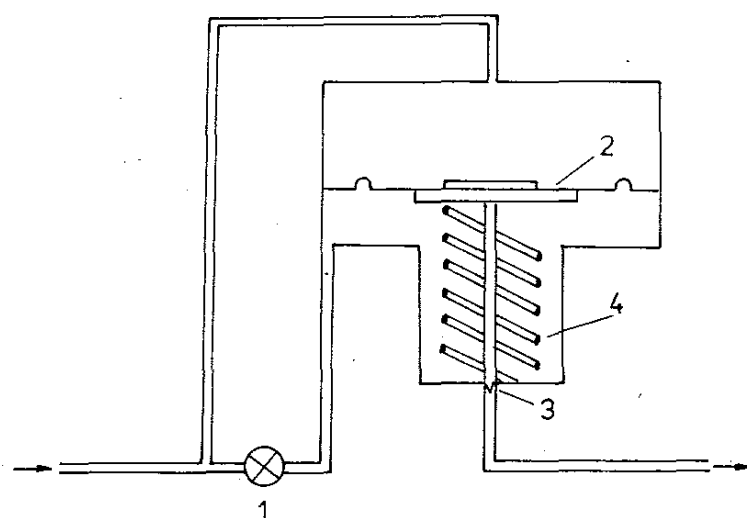
v plynové chromatografii je spojeno se značným rizikem. Doporučuje se umístit tlakové láhve s vodíkem mimo laboratoř, aby nedošlo k výbuchu. V laboratoři se omezujeme jen na rozvod vodíku v kovových trubkách. V chromatografech by se neměly v tomto případě používat skleněné náplňové kolony.



Obr. 57. Závislost poměru  $n_{ef}, t_R$  na  $\bar{u}$  získaná z údajů na obr. 56

## 6.2.2 Regulace tlaku a průtoku nosného plynu

Udržování definovaného průtoku nosného plynu kolonou je důležitou součástí analýzy, protože průtok ovlivňuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu. Při práci s náplňovými kolonami za izotermických podmínek je možno dosáhnout konstantního průtoku regulátory vstupního tlaku nebo průtoku. Nejjednodušším způsobem regulace průtoku je vytvoření velkého tlakového spádu před kolonou, k němuž jsou pak změny tlaku v koloně v průběhu analýzy zanedbatelné. Odpor zařízení před kolonou musí být tedy podstatně větší než změny odporu v koloně v průběhu analýzy a lze ho realizovat kapilárou nebo jehlovým ventilem. Při izotermické analýze se zabezpečí konstantní průtok tak, že membránovým regulátorem



Obr. 58. Schéma membránového regulátoru průtoku

- 1 – jehlový ventil,
- 2 – membrána,
- 3 – škrticí ventil,
- 4 – pružina

tlaku se na redukčním ventilu nastaví přetlak 0,6 až 0,8 MPa, který se jehlovým ventilem zmenší na požadovaný vstupní tlak. Při analýze s teplotním programem se pneumatický odpor kolony mění natolik, že regulace vstupního tlaku nestačí zajistit konstantní průtok nosného plynu kolonou. Jestliže se má i v těchto případech udržet konstantní průtok plynu kolonou, je třeba použít regulátor průtoku. Schéma jednoduchého regulátoru průtoku je na obr. 58. V tomto regulátoru se vytvoří tlakový spád, působící jehlovým ventilem (1) na membránu (2). Konstantní průtok nosného plynu zabezpečuje ventil (3), který je připojen na membránu, ovládanou ocelovou pružinou (4). Regulátor průtoku udrží konstantní průtok (s odchylkou menší než  $\pm 0,4\%$ ) při změně vstupního tlaku dusíku do kolony z hodnoty 0,17 na 0,19 MPa, což odpovídá změně teploty náplňové kolony z 20 °C na 200 °C.

Protože kapilárními kolonami proudí velmi malé průtoky, které se jen velmi těžko regulují, zabezpečuje se konstantní průtok v plynových chromatografích určených pro izotermickou kapilární plynovou chromatografii udržováním konstantního vstupního tlaku a při programovém měnění teploty se počítá se změnou průtoku.

### 6.2.3 Dávkovací systémy

Úlohou dávkovače je rychle a reprodukovatelně dávkovat do kolony plyný, kapalný nebo tuhý vzorek. Separační účinnost kolon a přesnost výsledků závisí na způsobu dávkování a konstrukci dávkovacího systému.

Při dávkování je třeba zajistit, aby:

- a) vzorek v co možná nejkratším čase vnikl do kolony jako píst,
- b) se nezměnily tepelné a tlakové podmínky v koloně.
- c) dávkování bylo reprodukovatelné a aby po dobu dávkování nedocházelo ke změně složení vzorku.

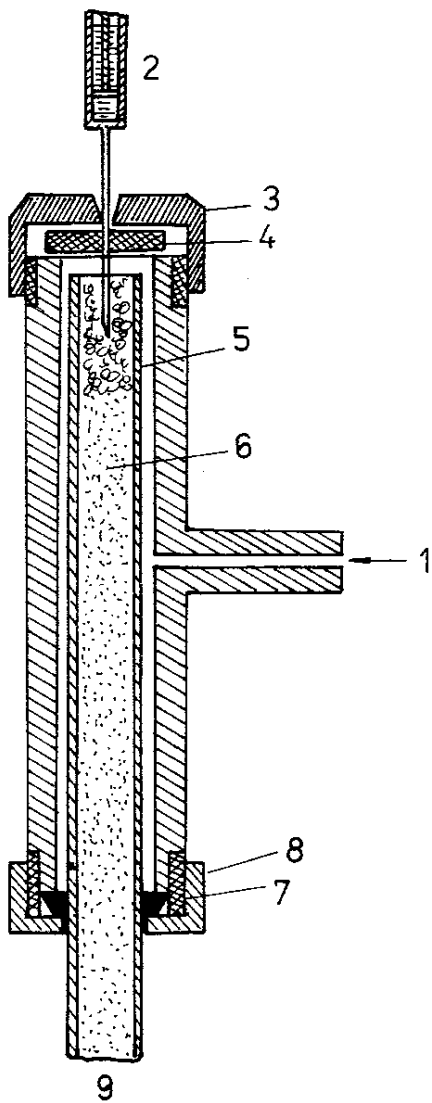
Plyny je možno dávkovat injekčními mikrostríkačkami, obtokovými pipetami nebo dávkovacími kohouty. Kapaliny nebo roztoky se dávkují injekčními stríkačkami propíchnutím silikonové zátky a dávkováním vzorku do vyhřátého dávkovacího prostoru, z kterého se páry nosným plynem přivedou na začátek kolony. K dávkování tuhých vzorků se konstruují zvláštní dávkovače. Nejčastěji se však dávkují jako vzorky v těkavých rozpouštědlech injekčními mikrostríkačkami.

Dávkování vzorků do plněných kolon se podstatně liší od dávkování do kapilárních kolon. Protože v plněných kolonách je dostatečné množství stacionární fáze, kolona se nezahltí ani po dávkování relativně velkého množství vzorku (při analytických aplikacích lze dávkovat až  $10^{-4}$  g vzorku v objemu 1 až 10  $\mu\text{l}$ ). Do kapilárních kolon je nutno dávkovat velmi malá množství a ve velmi malých objemech (zpravidla méně než  $10^{-6}$  g). Pro plněné kolony se v současnosti používají zvláště dávkovací systémy, které umožňují dávkovat vzorek přímo do kolony mikrostríkačkou (2) přes silikonovou zátku (4), jak je zřejmé z obr. 59.

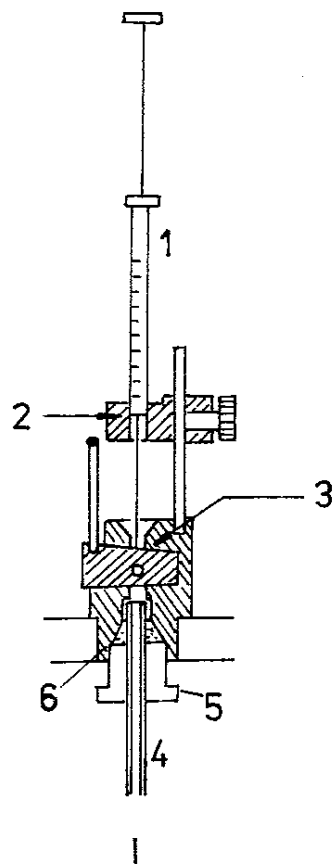
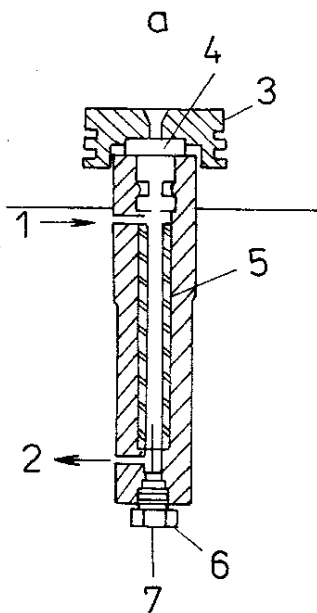
Při dávkování vzorků do kapilárních kolon se zpravidla vzorek po zplynování v dávkovači rozdělí na dvě části. Hlavní část (např. 99 %) se nosným plynem vymyje do ovzduší. Zbytek vzorku se nosným plynem přivede do kapilární kolony (obr. 60a).

Obr. 59. Schéma dávkovacího zařízení pro dávkování do plněných kolon (systém „on-column“)

1 – přívod nosného plynu, 2 – injekční stříkačka, 3, 8 – průvlačné matice, 4 – silikonová membrána, 5 – skleněná vata, 6 – náplň kolony, 7 – těsnění, 9 – kolona



b



Obr. 60. Schéma dávkovacích zařízení pro dávkování do kapilárních kolon

a) dělič vzorku: 1 – přívod nosného plynu, 2 – část vzorku unikajícího do ovzduší, 3, 6 – průvlačné matice, 4 – silikonová zátka, 5 – skleněná trubice, 7 – kapilární kolona; b) přímé dávkování do kapilární kolony (systém „on-column“ podle Groba): I – poloha před dávkováním, II – poloha při dávkování, 1 – injekční stříkačka, 2 – držák injekční stříkačky, 3 – polytetrafluorethylenový ventil, 4 – kapilární kolona, 5 – průvlačná matice, 6 – těsnění

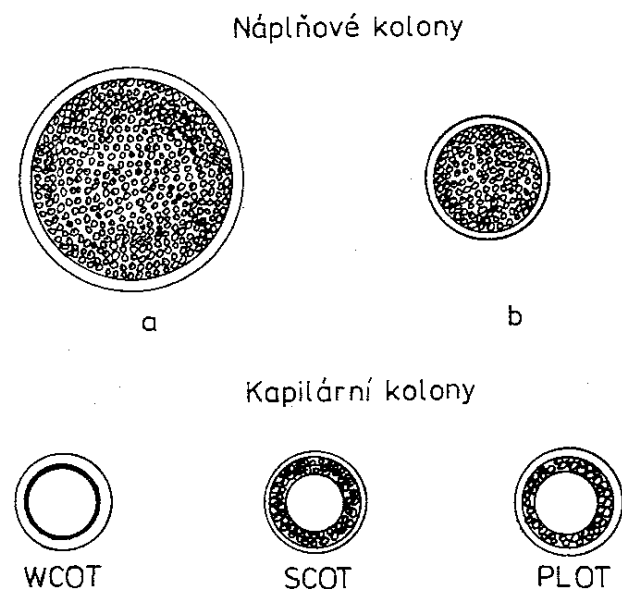
Velkou nevýhodou děliče vzorku je, že ho nelze použít při stopové analýze. V těchto případech je výhodné použít přímé dávkování do kapilárních kolon (on-column) podle Groba (obr. 60b). Při tomto způsobu se vzorky dávkuje do kolony mikrostríkačkou přes otvor v polytetrafluorethylenovém kohoutu. Aby se zabránilo unikání nosného plynu do atmosféry, kohout se otvírá a zavírá jen tehdy, když jehla injekční stříkačky zabraňuje unikání nosného plynu (stříkačka je v držáku dávkovače, obr. 60b).

### 6.3 CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY

Plynová chromatografie je separační metoda, a proto je rozhodující součástí zařízení chromatografická kolona, ve které se vzorek rozděljuje na složky. Chromatografické kolony v plynové chromatografii lze charakterizovat jako:

- kolony plněné chromatografickou náplní (tzv. náplňové kolony),
- kolony kapilární.

Náplňové kolony je možné rozdělit na klasické a mikronáplňové (obr. 61).



Obr. 61. Průřezy nejčastěji používaných náplňových a kapilárních kolon  
 a – náplňová kolona, b – mikronáplňová kolona, WCOT – kapilární kolona s kapalinou zakotvenou na stěnách kapiláry, SCOT – kapilární kolona s kapalinou zakotvenou na nosiči, který je zachycený na stěnách kapiláry, PLOT – kapilární kolona s pórovitým adsorbentem zachyceným na stěnách kapiláry

*Klasické náplňové kolony* se nejčastěji vyrábějí z nerezové oceli, hliníku, Teflonu, polyethylenu a skla. Délka kolony se volí podle toho, jaký problém je třeba řešit, a zpravidla je v rozmezí 30 až 400 cm. Jsou však publikovány případy, v nichž byly použity podstatně delší kolony. Vnitřní průměr analytických kolon je 2 až 4 mm. Na preparativní účely se používají větší průměry.

*Mikronáplňové kolony* se nejčastěji zhotovují ze skla. Délka kolon je zpravidla větší než u klasických náplňových kolon. Vnitřní průměr je asi 1 mm.

Náplní klasických a mikronáplňových kolon může být tuhý zrnitý adsorbent nebo kapalina zakotvená na vhodném nosiči.

*Kapilární kolony* je možno rozdělit do tří skupin (obr. 61):

a) Kolony s kapalinou zakotvenou na vnitřních stěnách kapilární trubice (typ WCOT). Tloušťka kapalného filmu bývá v rozmezí 0,01  $\mu\text{m}$  až 5  $\mu\text{m}$ . Vnitřní průměr tohoto typu kolon se pohybuje obvykle od 50  $\mu\text{m}$  až do 1 mm.

Tabulka 6.3. Některé adsorbenty používané v plynové chromatografii

Název	Charakteristika adsorbentu	Použití
Polymerní adsorbenty		
Chromosorb 101	styren-divinylbenzen	karboxylové kyseliny, glykoly, alkoholy, estery, ketony, aldehydy a ethery
102	styren-divinylbenzen	permanentní plyny, voda, alkoholy, oxidy nekovů
103	zesíťovaný polystyren	aminy, amidy, alkoholy, aldehydy, ketony
104	akrylonitril-divinylbenzen	oxidy síry, sulfan, nitrily, nitroparafiny, amoniak
105	zesíťované polyaromatické živice	formaldehyd, nižší uhlovodíky
106	zesíťovaný polystyren	C <sub>2</sub> – C <sub>5</sub> karboxylové kyseliny a alkoholy
107	zesíťovaný akrylový ester	C <sub>1</sub> – C <sub>4</sub> karboxylové kyseliny, alkoholy, aldehydy, ketony a nitrily
108	zesíťovaný akrylový ester	plyny, voda, alkoholy, aldehydy, ketony, nitrily
Porapak P	styren-divinylbenzen	karboxylové sloučeniny, alkoholy a glykoly
P-S	silanizovaný Porapak P	aldehydy, glykoly
Q	ethylvinylbenzen-divinylbenzen	uhlovodíky, organické látky ve vodě, oxidy dusíku, kyslíkaté organické látky
Q-S	silanizovaný Porapak Q	karboxylové kyseliny, COS, H <sub>2</sub> O, SO <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> SH, SO <sub>2</sub> , (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S
R	polyvinylpyrolidon	voda, HCl, Cl <sub>2</sub> , C <sub>1</sub> – C <sub>6</sub> alkany
S	polyvinylpyridin	alkoholy
N	polyvinylpyrolidon	CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , voda, acetylen, ethylen, ethan
T	ethylenglykol-dimethakrylát	formaldehyd, voda
Tenax	2,6-difenyl- <i>p</i> -fenylenoxid	alkoholy, glykoly, ethanolamin
molekulová síta		
molekulové síto 3A	K <sub>12</sub> (AlO <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> (SiO <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> ·xH <sub>2</sub> O	plyny, CO <sub>2</sub>
4A	Na <sub>12</sub> (AlO <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> (SiO <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> ·xH <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> S, SO <sub>2</sub>
5A	Ca <sub>9</sub> Na <sub>6</sub> (AlO <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> (SiO <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> ·xH <sub>2</sub> O	Cl <sub>2</sub> a HCl
silikagel		
Chromosil 310, 330	čištěný silikagel	permanentní plyny, COS, H <sub>2</sub> S, CS <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , thioly
Porasil	čištěný silikagel	
Spherosil	čištěný silikagel	
uhlík		
Carbosieve B	velmi čistý uhlík	permanentní plyny, voda, uhlovodíky
Carbopack B a C	grafický uhlík	karboxylové kyseliny, aminy, alkoholy
Alumina	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	nižší uhlovodíky

b) Kolony s kapalinou zakotvenou na nosiči, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry (typ SCOT). Tloušťka vrstvy náplně je 1 až 5  $\mu\text{m}$ .

c) Kolony s adsorbentem, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry (typ PLOT<sup>1)</sup>). Tloušťka vrstvy adsorbentu závisí na způsobu výroby a může být v rozmezí 0,01  $\mu\text{m}$  až 10  $\mu\text{m}$ .

Kapilární kolony se nejčastěji zhotovují ze skla, taveného křemene a nerezové oceli. Délka kapilárních kolon se volí podle náročnosti separace z rozmezí 10 až 200 m. K separaci velmi složitých vzorků se používají i delší kolony. Vnitřní průměr kapilárních kolon bývá v rozmezí 50  $\mu\text{m}$  až 1 mm.

### 6.3.1 Adsorbenty

Chromatografie plyn–adsorbent je méně používanou variantou plynné chromatografie. Používá se zvláště k analýze plynů, uhlovodíků a jednoduchých derivátů uhlovodíků. Jako adsorbenty je možno použít různé druhy aktivních adsorbentů: čistý mikropórovitý uhlík, grafitické saze, silikagel, aluminu, molekulové síťky a v dnešní době i některé syntetické makromolekulární adsorbenty. Adsorbenty, které se nejčastěji používají v plynové chromatografii, jsou uvedeny v tabulce 6.3.1. Při klasifikaci adsorbentů lze podobně jako při klasifikaci stacionárních kapalin vycházet z Kovatsových elučních indexů modelových látek (viz odd. 6.3.2). V plynové chromatografii se adsorbenty se v praxi klasifikuje podobně jako v kapalinové chromatografii (kap. 7).

### 6.3.2 Stacionární kapaliny

V chromatografii plyn–kapalina rozhoduje o úspěšnosti separace vlnová rychlost stacionární kapaliny. Průnik jednotlivých složek vzorku chromatografickou kolonou je zbržděn tím více, čím větší jsou jejich distribuční konstanty.

Stacionární kapaliny používané v plynové chromatografii musí vyhovět těmto požadavkům:

1. musí dobře rozpouštět separované látky,
2. rozpustnost složek vzorku v těchto kapalinách má být různá,
3. mají mít nízkou těkavost (1 až 10 Pa při pracovní teplotě),
4. musí být teplotně stálé,
5. nesmí reagovat s analyzovanými látkami,
6. mají mít nízkou viskozitu při pracovní teplotě,
7. musí smáčet nosič.

Použitelnost stacionárních kapalin bývá udávána rozmezím pracovních teplot. Dolní hranicí je zpravidla bod tání, horní hranice je dána těkavostí (tlakem

<sup>1)</sup> Zkratka anglického názvu Porous Layer Open Tubular.

kteřá ruší analýzu. Horní teplota použitelnosti závisí proto na citlivosti použitého detektoru. Tak např. polydimethylsiloxanovou fází (SE-30) lze použít ještě při 350 °C, použije-li se tepelně vodivostní detektor. Při použití plamenového ionizačního detektoru se však doporučují nižší teploty (do 320 °C).

### 6.3.2.1 Klasifikace stacionárních kapalin

V plynové chromatografii se dosud použilo více než 700 různých stacionárních kapalin. Některé z nich jsou v tab. 6.4. Většinu ostatních je možno nalézt ve firemní literatuře.

Tabulka 6.4. Charakteristiky některých kapalných fází používaných v plynové chromatografii jako stacionární kapaliny

Obchodní název	Rozmezí	McReynoldsovy konstanty <sup>1)</sup>					
	teplot °C	X	Y	Z	U	S	P
Apiezon L	50/300	32	22	15	32	42	143
SE-30	50/350	15	53	44	64	41	217
OV-101	0/350	17	57	45	67	43	229
OV-17	0/350	119	158	162	243	202	884
OV-25	0/350	178	204	208	305	280	1 175
OV-210	0/275	146	238	358	468	310	1 520
OV-225	0/275	228	369	338	492	386	1 813
Carbowax 20 M	60/250	322	536	368	572	510	2 308
Carbowax 1 000	40/150	347	607	418	626	589	2 587
BDS	50/225	370	571	440	657	611	2 649
DEGS	20/200	492	733	581	833	791	3 430
Silar 5 CP	50/275	319	495	446	637	531	2 428
Silar 10 C	50/275	523	757	659	942	801	3 682
TCEP	0/175	593	857	752	1 028	915	4 145
OV-275	0/275	629	872	763	1 106	849	4 219

<sup>1)</sup> Základem McReynoldsových konstant jsou Kovatsovy indexy testovacích látek zjištěné se skvalanem jako stacionární kapalinou při 100 °C:  $X = \Delta I_{\text{benzen}} = 653$ ,  $Y = \Delta I_{\text{butanol}} = 590$ ,  $Z = \Delta I_{\text{2-pentanon}} = 627$ ,  $U = \Delta I_{\text{nitropropan}} = 652$ ,  $S = \Delta I_{\text{pyridin}} = 699$ ,  $P = \sum(X, Y, Z, U, S)$ .

Aby se zabránilo úniku stacionárních kapalin z chromatografické kolony, zakotvují se tyto kapaliny na nosič chemickými vazbami. V plynové chromatografii se nejčastěji na nosič chemicky vážou polyethylenglykolové fáze vazbami Si—O—C a silikonové fáze vazbami Si—O—Si, resp. Si—O—C.

Za základ klasifikace stacionárních kapalin lze při chemickém složení zvolit i jejich chromatografické vlastnosti, jako jsou selektivita a polarita.



### 6.3.2.2 Selektivita stacionárních kapalin

Pojmem selektivita se označuje schopnost stacionární fáze rozdělit dvě složky. Selektivitu je možno vyjádřit relativní retencí ( $r_{ji}$ ), která se označuje jako separační faktor ( $\alpha_{ji}$ ):

$$r_{ji} = \alpha_{ji} = \frac{t'_{R,j}}{t'_{R,i}} = \frac{K_{D,j}}{K_{D,i}} = \frac{V_{g,j}}{V_{g,i}} \quad (6.78)$$

Je zřejmé, že selektivita stacionární fáze není všeobecně platným pojmem, ale vztahuje se na separaci určitých látek.

Když se do rovn. (6.78) dosadí za distribuční konstantu  $K_D$  výraz z rovn. (6.52), získá se vztah, jehož úpravou je možno selektivitu stacionární fáze vyjádřit poměrem aktivitních koeficientů ( $\gamma$ ):

$$\log r_{ji} = \log \frac{p_i^\circ}{p_j^\circ} + \log \frac{\gamma_i^\circ}{\gamma_j^\circ} \quad (6.79)$$

Prvý člen pravé strany rovn. (6.79) je úměrný relativní těkavosti separovaných látek a závisí jen na teplotě. Druhý člen je úměrný rozdílu interakcí solutů  $j$  a  $i$  se stacionární fází a lze jím vyjádřit selektivitu stacionární fáze pro tyto soluty. Tento člen je možno měnit změnou teploty a stacionární fáze.

Selektivitu stacionární kapaliny lze vyjádřit i selektivitním koeficientem ( $s_k$ ) pro takové soluty  $j$  a  $i$ , které mají ve standardním stavu stejný tlak nasycených par ( $p_j^\circ = p_i^\circ$ ):

$$s_k = \frac{\gamma_j}{\gamma_i} \quad (6.80)$$

### 6.3.2.3 Polarita stacionárních kapalin

Interakci solutu se stacionární kapalinou lze vyjádřit i pojmem polarita. Je zřejmé, že je složité vyjádřit polaritu stacionární kapaliny v absolutních jednotkách, které by zahrnovaly silové působení všech druhů interakcí solutu se stacionární kapalinou. Proto se polarita stacionárních kapalin nejčastěji vyjadřuje relativně k „nepolární fázi“, v níž převažují disperzní interakce. Nejčastěji se hodnotí systém, jenž zavedli do plynové chromatografie Rohrschneider a McReynolds, kteří použili za základ klasifikace stacionárních kapalin Kovatsovy indexy (viz odd. 4.2). Analyzováním testovacích látek v koloně s danou stacionární kapalinou při izotermickém režimu se zjistí Kovatsovy eluční indexy, od nichž se odečítají Kovatsovy indexy těchto látek naměřené při stejné teplotě se skvalanem jako stacionární kapalinou:

$$\Delta I = I_{sf} - I_{skv} \quad (6.81)$$

Skvalan se při hodnocení polaritativy považuje za nepolární stacionární kapalinou.

Rozdíly Kovatsových indexů ( $\Delta I$ ) pro jednotlivé testovací látky vyjadřují rozdíly v interakcích těchto látek s danou stacionární kapalinou a skvalanem.

Rohrschneider použil jako testovací látky benzen, ethanol, methylethylketon, nitromethan a pyridin. Rohrschneiderovy konstanty, které jsou pro stacionární kapaliny tabelované, se počítají ze vztahu  $\Delta I/100$ . Protože při měření Kovatsových indexů ethanolu, methylethylketonu a nitromethanu je nutno používat těkavé nerozvětvené alkany, což působí experimentální potíže, navrhl McReynolds jako testovací látky benzen, butanol, 2-pentanon, nitropropan a pyridin. McReynoldsovy konstanty vyjadřují tyto interakce solutů se stacionární kapalinou:

$\Delta I_{\text{benzen}}$  – disperzní interakce indukovaných dipólů nenasyčených uhlovodíků se stacionární kapalinou,

$\Delta I_{\text{butanol}}$  – vodíkové vazby alkoholů a kyselin se stacionární fází, v kterých je tato fáze donorem elektronového páru,

$\Delta I_{2\text{-pentanon}}$  – donor-akceptorové interakce elektronového páru aldehydů, etherů, ketonů a esteru se stacionární kapalinou, v kterých je tato kapalina akceptorem elektronového páru, jakož i interakce permanentních dipólů.

$\Delta I_{\text{nitropropan}}$  a  $\Delta I_{\text{pyridin}}$  – interakce nitropropanu se stacionární kapalinou jsou složité a zahrnují všechny předcházející.

Někdy se polarita stacionární kapaliny vyjadřuje součtem jednotlivých příspěvků:

$$P = X + Y + Z + U + S \quad (6.82)$$

kde  $X = \Delta I_{\text{benzen}}$ ,  $Y = \Delta I_{\text{butanol}}$ ,  $Z = \Delta I_{2\text{-pentanon}}$ ,  $U = \Delta I_{\text{nitropropan}}$  a  $S = \Delta I_{\text{pyridin}}$ .

V tabulce 6.4 jsou uvedeny některé stacionární kapaliny používané v plynové chromatografii s teplotním rozmezím jejich použití a McReynoldsovými konstantami zjištěnými při 100 °C v náplňových kolonách a 10 % stacionární kapaliny. Je nutno poznamenat, že Rohrschneiderovy a McReynoldsovy konstanty necharakterizují jen polaritu stacionární kapaliny, ale polaritu náplně chromatografické kolony jako celku. Nosič stacionární kapaliny může často ovlivnit jak selektivitu, tak i polaritu náplně.

Tabulka 6.5. Separační faktory ( $\alpha$ ) a Kovatsovy eluční indexy methylstearátu ( $I_{18:0}$ ) a methyloleátu ( $I_{18:1}$ ) naměřené při 212 °C na náplních s fází Apiezon L

Nosič	$\alpha$	$I_{18:0}$	$I_{18:1}$	Poznámka
Gas Chrom P	0,86	2 071	2 035	a
Chromosorb W AW DMCS	0,86	2 072	2 036	b
Chromaton AW HMDS	0,87	2 073	2 039	c
Gas Chrom Q	0,86	2 074	2 038	b
Chezasorb AW HMDS	0,86	2 073	2 038	c
Chromosorb P AW DMCS	0,87	2 073	2 041	a
Chromosorb W AW	0,87	2 077	2 041	a
Chromosorb G AW	0,87	2 078	2 045	b
kapilární kolona	0,88	2 080	2 047	d

$\alpha = t'_{R,18:0}$ , a – Carlo Erba, Miláno, Itálie, b – Becker, Delft, Holandsko, c – Lachema, s. p., Brno, d – nerezová ocel, Laboratorní přístroje, s. p., Praha

Polarita nosiče pokrytého nepolární stacionární kapalinou přispívá ke zvyšování celkové polarity náplně, jak je zřejmé ze separačních faktorů a Kovatsových indexů methylstearátu a methyloleátu naměřených při 212 °C na náplních se stacionární fází Apiezon L (tab. 6.5). Nejméně polární náplň je pro separaci methylstearátu a methyloleátu nejméně selektivní (nejmenší hodnota  $\alpha$ ) a naměřili se na ní nejmenší hodnoty Kovatsových indexů, z čehož vyplývá, že při separaci uvedeného páru methylesterů karboxylových kyselin zvyšování polarity nosiče zvyšuje jak selektivitu, tak i polaritu náplně. Je zřejmé, že na retenci solutů se v těchto případech zúčastňuje jak rozdělovací mechanismus, tak i adsorpce na aktivních centrech nosiče.

Tabulka 6.6. Separační faktory ( $\alpha$ ) a Kovatsovy indexy methylstearátu ( $I_{18:0}$ ) a methyloleátu ( $I_{18:1}$ ) naměřené při 178 °C na náplních s fází Reoplex 400

Nosič	$\alpha$	$I_{18:0}$	$I_{18:1}$	Poznámka
Gas Chrom P	1,10	2 493	2 521	a
Chromaton N AW HMDS	1,10	2 476	2 486	c
Gas Chrom Q	1,09	2 474	2 498	b
Chromosorb W AW DMCS	1,09	2 472	2 498	a
kapilární kolona	1,10	2 471	2 497	d
Chromosorb P DMCS	1,10	2 463	2 488	a
Chezasorb AW HMDS	1,09	2 459	2 485	c
Chromosorb G AW	1,09	2 456	2 480	b
Celite 545	1,08	2 439	2 459	b
Chromosorb W AW	1,06	2 424	2 438	a
Kieselguhr	1,07	2 417	2 436	b
Chromosorb P AW	1,05	2 352	2 346	a

Vysvětlivky jsou stejné jako u tab. 6.5.

Celková polarita náplně s polární stacionární kapalinou klesá s rostoucí polaritou nosiče v důsledku polárních interakcí aktivních center nosiče s funkčními skupinami stacionární kapaliny (adsorpce stacionární kapaliny na nosiči). Proto náplň s nejméně polárním nosičem pokrytým Reoplexem 400 vykazuje při separaci methyloleátu a methylstearátu největší selektivitu a největší polaritu (tab. 6.6).

### 6.3.3 Nosiče stacionární kapaliny

Stacionární kapalina musí být zachycena (zakotvena) na nosiči, který umožní styk plynné a kapalně fáze na dostatečném povrchu. Jako nosič je možno použít tvrdý pórovitý materiál (náplňové kolony) nebo stěny kapilární trubice (kapilární kolony). Nosič má být inertní (nemá chemicky reagovat se stacionární kapalinou a se separovanými složkami), nemá vykazovat adsorpční vlastnosti, musí být dostatečně tvrdý, aby se při práci nedrobil, má mít určitý specifický povrch, aby umožnil styk plynné a kapalně fáze na dostatečné ploše. Důležité je, aby měl i dostačující

objem dutin. Aby nosiče nevykazovaly adsorpční vlastnosti, používají se takové materiály, které mají relativně malý specifický povrch ( $0,5$  až  $7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) se středními průměry pórů  $0,1$  až  $1,5 \mu\text{m}$  a specifickým vnitřním objemem pórů  $1 \text{ ml g}^{-1}$ .

Významnou charakteristikou nosiče je průměr částic ( $d_p$ ) a distribuce jejich velikosti (viz člen *A* v odd. 6.1.5.1).

Nejčastěji se používají nosiče křemelinového typu. Na povrchu těchto nosičů se vyskytuje značné množství hydroxylových skupin, které vykazují adsorpční vlastnosti, zvláště při analýze polárních látek. Hlavní příčinou této adsorpce je tvorba vodíkových vazeb. Adsorpční aktivitu nosičů je možné snížit:

a) *chemicky*

- promytím nosiče minerálními kyselinami (kysele prané – AW),
- promytím nosiče alkalickými hydroxidy,
- silanizací povrchu nosiče např. dimethyldichlorsilanem (DMCS), hexamethyldisilazanem (HMDS; apod.;

b) *fyzikálně*

- nasycením povrchu solutem před analýzou,
- adsorpcí velmi polární látky,
- vytvořením nepolární mezivrstvy.

Tabulka 6.7. Charakteristiky některých materiálů, které se používají v plynové chromatografii jako nosiče stacionární kapaliny

Obchodní název	Specifický povrch $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$	Poznámky
Chromosorb	A	2,7 měkký nosič, preparativní GC
	P	4,0 tvrdý nosič, růžový
	G	0,5 tvrdý nosič, bílý
	W	1,0 měkký nosič, bílý
	T	7,5 Teflon, max. teplota $250^\circ\text{C}$
	N AW	1,0 nepromytý kyselinou
	AW	1,0 promytý kyselinou
	AW DMCS	1,0 promytý kyselinou a silanizovaný s DMCS
	HP	1,0 s homogenní zrnitostí a velikostí pórů
Gas Chrom	P, Q	1,0 neaktivní nosič na bázi křemeliny
Chromaton	N	1,0 nosič na bázi křemeliny vyráběný v ČSFR
	AW	1,0 promytý kyselinou
	AW DMCS	1,0 promytý kyselinou a silanizovaný s DMCS
	AW HMDS	1,0 promytý kyselinou a silanizovaný s HMDS
Inerton		0,4 až 0,65 tvrdý nosič vyráběný v ČSFR
	AW	0,4 až 0,65 promytý kyselinou
	AW DMCS	0,4 až 0,65 promytý kyselinou a silanizovaný s DMCS
	AW HMDS	0,4 až 0,65 promytý kyselinou a silanizovaný s HMDS
Chromaton	N Super	1,0 velmi inertní nosič k analýze pesticidů a steroidů
Inerton	Super	0,4 až 0,65 nejkvalitnější nosič vyráběný v ČSFR

Nosiče vyráběné na bázi křemeliny jsou bílé. Prodávají se pod různými obchodními názvy (Chromosorb W, Kieselguhr, Gas-Chrom, Chromaton, Inerton, Celite a jiné).

V menší míře se používají jako nosiče materiály z pálených cihel, které jsou růžové až bílohnědé a jsou podstatně tvrdší než nosiče křemelinového typu. Z obchodních preparátů lze mimo jiných uvést Chromosorb P, Diatoport P, Anakrom P, Chezasorb, Rysorb a pórovinu.

Mimo výše uvedené nosiče se ještě používají skleněné, resp. polytetrafluorethylenové kuličky a některé další syntetické polymerní nosiče.

Charakteristiky nejčastěji používaných nosičů kapalné fáze v plynové chromatografii jsou uvedeny v tab. 6.7.

### 6.3.4 Příprava náplňových kolon

Jak jsme uvedli výše, náplní chromatografické kolony může být zrnitý a pórovitý adsorbent nebo kapalina zakotvená na vhodném nosiči. Stacionární kapalina se zakotvuje na nosič z roztoku v těkavém organickém rozpouštědle. Příprava náplní s chemicky vázanými stacionárními fázemi je však podstatně složitější, a proto se náplně získávají komerčně od více výrobců. Náplň se do chromatografické kolony nasype tak, aby byla kolona naplněna rovnoměrně bez vzduchových dutin. Naplněná kolona se před použitím tepelně formuje (kondicionuje) několik hodin při teplotě asi o 20 °C vyšší než nejvyšší pracovní teplota. Jedním z cílů kondicionování je rovnoměrné rozprostření stacionární kapaliny na povrchu nosiče.

### 6.3.5 Příprava kapilárních kolon

#### 6.3.5.1 Příprava kapilárních kolon typu WCOT

Jestliže se na přípravu kapilárních kolon použijí kovové kapiláry, je nutné z nich pečlivě vymýt všechny konzervační látky a zbytky nečistot z výroby. Kovové kapiláry se nejčastěji čistí protlačením rozpouštědel kapilárou účinkem stlačeného plynu. Vyčištěné kapiláry se vysuší permanentním plynem při zvýšené teplotě.

Skleněné kapilární trubice jsou zpravidla dostatečně čisté, avšak jejich povrch je velmi hladký a stacionární kapaliny tyto povrchy nesmáčejí (na povrchu se nevytváří rovnoměrný film, ale kapky). Smáčecí vlastnosti skleněných povrchů se zlepšují jejich zdrsňením. Mezi nejčastější způsoby patří úprava povrchu účinkem plynného HCl, HF a methyltrifluorchlorethyletheru nebo účinkem zředěného vodného roztoku HCl při zvýšené teplotě. Vnitřní povrch kapilár z taveného křemene se zdrsňuje účinkem zředěného vodného roztoku HCl při zvýšené teplotě. Na venkovním povrchu křemenných kapilár je polyimidový povlak, který zabraňuje korozi SiO<sub>2</sub> a způsobuje, že tyto kapiláry jsou pružné a při manipulaci téměř nerozbitné. Vnitřní povrch skleněných a křemenných kapilár se před zakotvením stacionární fáze často upravuje silanizací.

Stacionární kapalina se na vnitřní povrch kapilár zakotvuje staticky nebo dynamicky.

Při statickém způsobu se kapilára naplní zředěným roztokem stacionární kapaliny v těkavém rozpouštědle. Jeden konec kapiláry se uzavře (zalepí) a druhým koncem se rozpouštědlo nechá odpařit (při zvýšené teplotě nebo při laboratorní teplotě za sníženého tlaku). Statický způsob zakotvení stacionární kapaliny vyžaduje značnou experimentální zručnost a je velmi zdlouhavý. Jeho předností je definovatelnost tloušťky filmu stacionární kapaliny ( $d_f$ ), která závisí jen na obsahu stacionární kapaliny ve smáčecím roztoku ( $c_1$ ) a na poloměru kapiláry ( $r_c$ ):

$$d_f = \frac{r_c c_1}{200} \quad (6.83)$$

kde  $c_1$  je obsah stacionární kapaliny ve smáčecím roztoku v procentech<sup>1)</sup>.

Při dynamickém způsobu se roztok stacionární kapaliny v těkavém rozpouštědle protlačí kapilárou účinkem permanentního plynu. Rychlost toku smáčecí kapaliny kapilárou musí být konstantní ( $u_1$ ) a volí se v rozsahu 0,5 až 10 cm s<sup>-1</sup>. Objem roztoku stacionární kapaliny, který se protlačí kapilárou, je zpravidla podstatně menší, než je objem kapiláry (např. 10 %). Po protlačení celého roztoku kolonou zůstane na vnitřních stěnách část roztoku, jehož tloušťka ( $d_r$ ) závisí na střední rychlosti toku ( $\bar{u}$ ), kterou se roztok protlačí kapilárou, na viskozitě tohoto roztoku ( $\gamma_r$ ), jeho povrchovém napětí ( $\eta_r$ ) a poloměru kapiláry ( $r_c$ ) a lze ji vypočítat z empirické rovnice:

$$d_r = \frac{r_c}{2} \left( \frac{\bar{u} \eta_r}{\gamma_r} \right)^{1/2} \quad (6.84)$$

Rozpouštědlo z roztoku zachyceného na vnitřních stěnách kapiláry se odstraní profoukáním kapiláry permanentním plynem při laboratorní teplotě.

Dynamická metoda je podstatně rychlejší než statická. Zjištěním tloušťky filmu stacionární kapaliny na stěnách kapiláry při dynamické metodě je však zatíženo podstatně většími chybami než při statické metodě. Homogenost rozprostření stacionární kapaliny na stěnách kapiláry není možné zjistit. Lze však předpokládat, že při statickém způsobu je film homogennější.

### 6.3.5.2 Příprava kapilárních kolon s pórovitou vrstvou

Vrstvu pórovitého materiálu je možné na vnitřní stěny kapiláry zakotvit

- chemicky,
- usazením ze suspenze či koloidního roztoku ve vhodném rozpouštědle.

Chemický způsob spočívá v působení leptacích činidel na povrch skla. Vytvoří-li se takto částice o rozměrech až 10  $\mu\text{m}$ , lze takovéto kapiláry využít v chromatografii

<sup>1)</sup> Rovnice (6.83) platí v případech, když  $r_c \gg d_f$ , což pro klasické kapilární kolony vyhovuje.

plyn–adsorbent (GSC) nebo po smočení částic stacionární kapalinou v chromatografii plyn–kapalina (GLC).

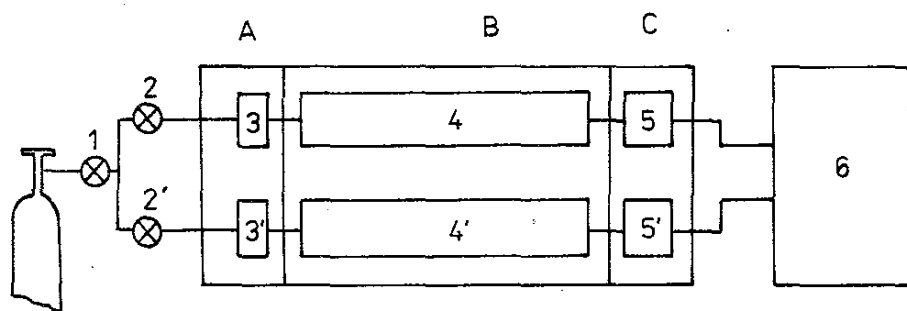
Zakotvení pórovité vrstvy na vnitřních stěnách kapiláry usazením adsorbentu ze stabilní suspenze nebo nosiče z vhodného rozpouštědla je podstatně univerzálnější způsob než chemický. Při zakotvení se používá statický nebo dynamický způsob podobně jako při přípravě kolon typu WCOT. Experimentálně je však náročnější, protože při zakotvování tuhých částic se vyskytují problémy se stabilitou suspenze po dobu pracovního postupu.

S ohledem na značné experimentální těžkosti se kapilární kolony typu SCOT a PLOT v běžných laboratořích nevyrábějí. Lze je však zakoupit od více výrobců. K přednostem kolon SCOT v porovnání se WCOT patří jejich dobrá tepelná stabilita a delší životnost. Přesto se však v chromatografických laboratořích používají ojedinele.

## 6.4 TERMOSTATY

Aby bylo možné reprodukovatelně měřit eluční charakteristiky, je nutno kolonu termostatovat. Společným rysem všech termostatů je regulovaný příkon tepla do okolí chromatografických kolon. Teplo se ke kolonám přivádí vyhřívacím médiem (plynem, kapalinou nebo tuhou látkou) nebo je odporový drát navinutý přímo na koloně. V dnešní době se v plynové chromatografii používají zvláště teplovzdušné termostaty. Vzduch je po zahřátí vyhřívacími tělisky vháněn ventilátorem do prostoru, v kterém jsou umístěny kolony. Elektrický příkon se reguluje zařízením, jehož signál závisí na teplotě v termostatu. Vhodným uspořádáním elektrického příkonu, citlivosti regulátoru a konstrukce termostatu se může zvolený teplotní režim ustálit relativně rychle. O kvalitě termostatů rozhodují zvláště faktory, které ovlivňují časovou konstantu termostatu:

- minimální tepelná kapacita všech vyhřívacích částí termostatu,
- minimální tepelná vodivost vnitřních částí termostatu,
- minimální tepelná vodivost izolace termostatu,
- minimální dopravní zpoždění mezi zdrojem tepelné energie a součástmi termostatu.



Obr. 62. Blokové schéma chromatografu se dvěma kolonami

1 – regulátor tlaku, 2 – regulátor průtoku, 3 – dávkovač, 4 – chromatografická kolona, 5 – detektor, 6 – zpracování signálu detektoru a jeho záznam v čase,

A – termostat pro dávkovače, B – termostat pro kolony, C – termostat pro detektory; čárkou je označena porovnávací větev.

Při programování teploty se od termostatů navíc vyžaduje, aby:

- tepelná kapacita umožnila rychlé a reprodukovatelné ohřívání a chlazení,
- v termostatu byly dvě chromatografické kolony s dvěma detektory (obr. 62) nebo jedna kolona s jedním detektorem a vhodné zařízení ke kompenzaci nuly (např. integrátor nebo počítač).

Při programovaném zvyšování teploty vzrůstá nulový signál detektoru (zvyšováním teploty kolony vzrůstá těkavost stacionární kapaliny), a proto se kompenzuje signálem porovnávacího detektoru. Aby se nulová linie při změně teploty neměnila, je třeba, aby obě kolony byly naplněny stejnou náplní, průtok nosného plynu v obou kolonách byl stejný a signály detektorů se odečítaly. Při jednokolonovém uspořádání se počítačem nebo integrátorem zaznamenaná signál detektoru při analýze bez vzorku, který se odečte od signálu při analýze vzorku.

## 6.5 DETEKTORY

Detektory jsou zařízení, jejichž úkolem je detegovat v nosném plynu složky, které opouštějí chromatografickou kolonu. Od detektoru se vyžaduje rychlá odezva, velká citlivost a stabilita základního (nulového) signálu. Vztahy mezi odezvou detektoru a množstvím složky (hmotnostní detektory), resp. jeho koncentrací (koncentrační detektory) jsou uvedeny v kap. 4.

Podle dějů, které probíhají při detekci, je možno detektory rozdělit na nedestrukční a destruktivní. V nedestrukčních detektorech látka prochází detektorem bez toho, aby se chemicky změnila. Mezi tento typ detektorů patří tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záhytu, argonový a heliový detektor, infračervený spektrometr a některé další. V destruktivních detektorech se látka při detekci ireverzibilně změní. Do této skupiny patří plamenový ionizační a termoionizační detektor a hmotnostní spektrometr.

### 6.5.1 Tepelně vodivostní detektor (TCD)

Principem detekce je odvod tepla z rozžhaveného odporového vlákna plynem vytékajícím z kolony. Ochlazení vlákna vyjádřené jako hustota tepelného toku  $\psi$  závisí na tepelné vodivosti prostředí ( $\lambda$ ) a teplotním gradientu ( $dT/dx$ ):

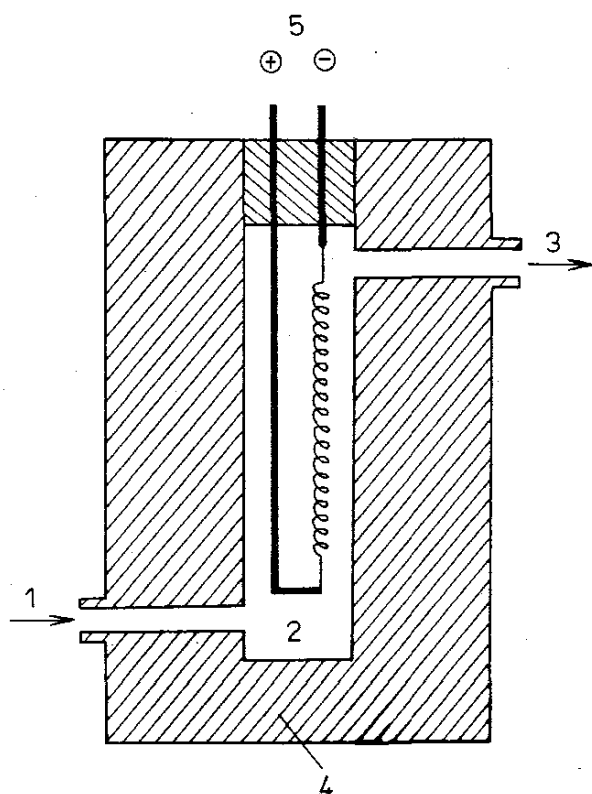
$$\psi = \lambda \frac{dT}{dx} \quad (6.85)$$

Tepelná vodivost prostředí ( $\lambda$ ) je úměrná teplu, které protéká jednotkovou plochou při jednotkovém teplotním gradientu a má rozměr  $\text{J m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

Změnou teploty vlákna se mění elektrický odpor. Odporové vlákno je součástí Wheatstonova můstku, v kterém změna odporu poruší rovnováhu. Porušení rovnováhy je možno kompenzovat měnitelným odporem nebo zaznamenat měřicím zařízením.

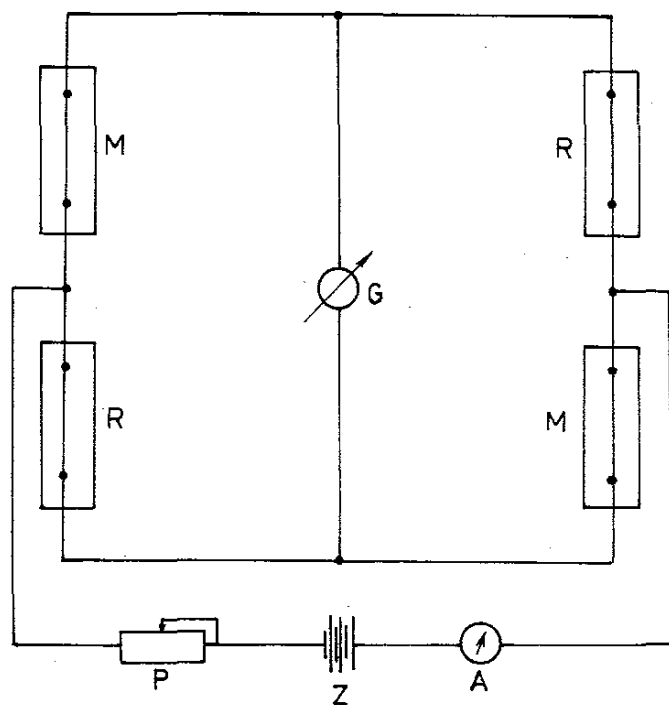


Tepelně vodivostní detektor (obr. 63) se skládá ze spirály (odporového vlákna) umístěné ve válcové dutině kovového bloku. Odporovým vláknem prochází elektrický proud, který vlákno zahřeje na určitou teplotu. Když proudí okolo vlákna nosný plyn, ztráty tepla odvodem jsou konstantní. Konstantní je i teplota vlákna a proud,



Obr. 63. Schéma tepelně vodivostního detektoru s průtokovou celou

1 – plyn proudící z kolony, 2 – spirála z odporového vlákna, 3 – plyn unikající do ovzduší, 4 – kovový blok, 5 – přívod napětí



Obr. 64. Schéma zapojení tepelně vodivostních detektorů ve Wheatstonově můstku

Z – zdroj stejnosměrného napětí, P – potenciometr, A – ampérmetr, G – galvanometr, M – měřicí a R – referenční cely detektoru

který při konstantním napětí prochází vláknem. Když však z kolony eluuje s nosným plynem i složka, změní se jeho tepelná vodivost, což má za následek změnu odvodu tepla z vlákna. Tepelná vodivost plynů je aditivní veličinou, a proto pro binární směs plynů A a B lze napsat rovnici:

$$\lambda_{AB} = \lambda_A x_A + \lambda_B x_B \quad (6.86)$$

kde  $x$  je látkový zlomek.

Odporová vlákna se zhotovují z kovů, které se vyznačují velkým tepelným koeficientem odporu a jsou odolné vůči korozi. Nejčastěji se používá platina, wolfram a jeho slitiny a nikl. V některých detektorech se místo odporových vláken používají termistory.

Na kompenzaci fluktuace průtoku nosného plynu a žhavicího napětí se používají dvě měřicí a dvě referenční tepelně vodivostní čidla, zapojená do Wheatstonova můstku (obr. 64). Aby se zmenšil vliv teploty okolí na teplotu vlákna, čidla jsou termostatována v kovovém bloku s velkou tepelnou kapacitou.

Citlivost teplotně vodivostního detektoru pracujícího při konstantním napětí lze zvýšit:

1. *Zvětšením žhavicího proudu.* Velmi vysoký žhavicí proud je však zdrojem velkého šumu a navíc zkracuje životnost vlákna. Pracovní hodnoty žhavicího proudu závisí na nosném plynu. Pro dusík se při napětí 6 V volí proudy do 150 mA a pro vodík do 300 mA.

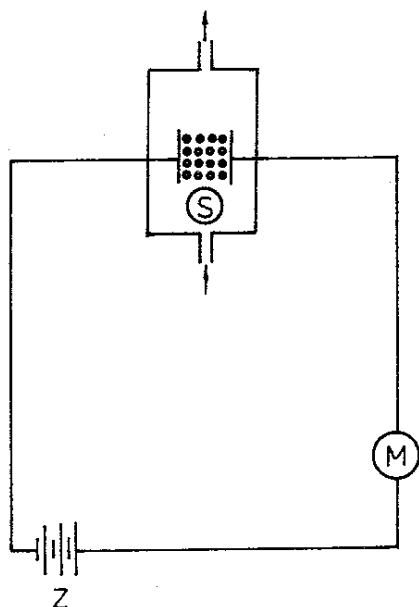
Tabulka 6.8. Tepelné vodivosti některých plynů při 0 °C

Plyn	$\lambda$
	$\text{J m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{K}^{-1}$
vodík	175,0
dusík	23,86
kyslík	24,62
vzduch	24,12
oxid uhličitý	14,32
helium	143,6
neon	45,64
argon	16,75

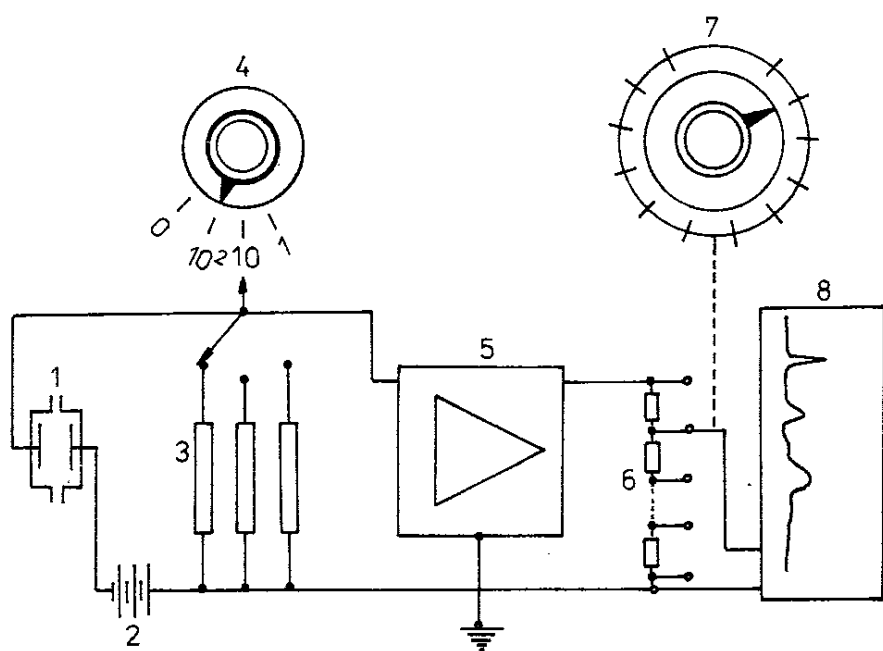
2. *Použitím nosného plynu s velkou tepelnou vodivostí.* Z tabulky 6.8 vyplývá, že nejvyšší tepelnou vodivost má vodík, a proto je nejvhodnějším nosným plynem. S ohledem na bezpečnost při práci se však více doporučuje helium.

## 6.5.2 Ionizační detektory

Ionizační detektory jsou nejpoužívanější detektory v plynové chromatografii. Principem detekce je měření elektrické vodivosti v plynech. Plyny jsou za normálních podmínek elektricky nevodivé. Vodivost se však značně zvýší, jsou-li v plynech přítomny volné elektrony nebo elektricky nabitě částice. Vodivost plynu je úměrná elektrickému proudu, který prochází mezi dvěma elektrodami, na něž je vloženo napětí. Na obrázku 65 je základní schéma ionizačních detektorů. Plyn, který proudí mezi dvěma elektrodami, je ionizován účinkem energie z ionizačního zdroje (S). Při ionizaci vznikají kladné ionty a sekundární elektrony, jejichž pohyb se ve vnějším (mezielektrodovém) elektrickém poli usměrní k příslušným elektrodám. Takovýto přenos náboje se označuje jako ionizační proud. Ten se zpracuje elektroměrem a registruje. Protože jsou ionizační proudy velmi malé ( $10^{-14}$  až  $10^{-6}$  A), je třeba je zesílit zesilovačem s vysokým vstupním odporem. Schéma zařízení na zpracování a registraci ionizačního proudu je na obr. 66. Zesílení je možné regulovat dvěma přepínači. Vstupní impedanci zesilovače lze nastavit v desítkové soustavě (přepínač 4). Výstupní signál ze zesilovače je možné redukovat v dvojkové soustavě (přepínač 7).



Obr. 65. Blokové schéma ionizačního detektoru  
S – ionizační zdroj,  
Z – zdroj stejnosměrného napětí, M – elektroměr



Obr. 66. Schéma zpracování signálu ionizačního detektoru  
1 – ionizační detektor, 2 – zdroj napětí, 3 – vstupní odpory,  
4 – přepínač rozsahu, 5 – zesilovač, 6 – reduktor citlivosti,  
7 – přepínač reduktoru citlivosti, 8 – zapisovač

Nositeli ionizační energie jsou nejčastěji:

- kyslíkovodíkový plamen v plamenovém ionizačním detektoru,
- radioaktivní záření v argonovém a heliovém detektoru a v detektoru elektronového záhytu.

Jak jsme uvedli výše, elektrony a elektricky nabitě částice se účinkem vnějšího elektrického pole pohybují k příslušným elektrodám. Jejich rychlost závisí na intenzitě elektrického pole ( $V\text{ cm}^{-1}$ ), hmotnosti částic a na volné dráze mezi částicemi, která je nepřímo úměrná tlaku v detektoru.

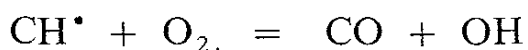
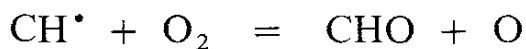
### 6.5.2.1 Plamenový ionizační detektor (FID)

FID<sup>1)</sup> je nejpoužívanějším detektorem v plynové chromatografii. K ionizaci molekul vymývaných z kolony dochází v plazmě vodíkového plamene, který hoří mezi dvěma elektrodami. V čistém kyslíkovodíkovém plameni je jen velmi málo iontů (asi  $10^7$  iontů v  $1\text{ cm}^3$ ). Obsah iontů však velmi vzrůstá již za přítomnosti stopových množství uhlovodíků. Mechanismus ionizace je velmi složitý. Tepelnou energii, která se uvolňuje při hoření, se štěpí chemické vazby organických látek za vzniku radikálů, které reagují s vodíkem v redukční zóně plamene za vzniku radikálů  $\text{CH}^\bullet$ . V oxidační zóně plamene se tyto radikály oxidují za vzniku iontů  $\text{CHO}^+$  a elektronů:

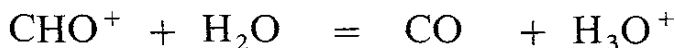
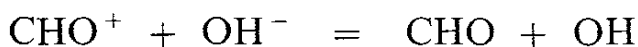


<sup>1)</sup> FID – Flame Ionization Detector

Kromě této reakce probíhají v plameni i reakce, při kterých vznikají neutrální částice:



nebo ionty zanikají rekombinací:



Mimo tyto reakce se při rekombinaci iontů mohou účastnit i heteroatomy (halogeny, fosfor, dusík, síra a jiné).

Plamenový ionizační detektor není citlivý na sloučeniny, které termickým štěpením neposkytují radikály  $\text{CH}^\bullet$ . Jeho odezva závisí tedy na počtu uhlíkových atomů v molekule určované látky, které za podmínek detekce poskytují ionty  $\text{CHO}^+$  (na tzv. počtu efektivních uhlíkových atomů). Heteroatomy v molekulách organických látek se uplatňují specifickými interakcemi, které zpravidla snižují odezvu detekce (tab. 6.9).

Relativní molární odezvu ( $RMR$ ) (viz odd. 6.8) lze považovat za aditivní veličinu a vypočítat ji z inkrementů (přírůstků) funkčních skupin:

$$RMR = a \Delta RMR_A + b \Delta RMR_B + \dots \quad (6.87)$$

kde  $\Delta RMR$  jsou inkrementy,  $a$  – počet funkčních skupin A,  $b$  – počet funkčních skupin B.

Inkrementy hodnot  $RMR$  pro plamenový ionizační detektor některých funkčních skupin jsou zahrnuty v tab. 6.10. Za základ hodnot  $RMR$  se navrhly číselné hodnoty

Tabulka 6.9. Vliv některých typů chemických vazeb a heteroatomů na počet efektivních uhlíkových atomů

Atom	Typ vazby	Počet efektivních uhlíkových atomů
C	jednoduchá vazba v alifatických uhlovodících	1,0
C	násobná vazba v aromatických uhlovodících	1,0
C	násobná vazba v alkenech	0,95
C	násobná vazba v alkinech	1,30
C	vazba $\text{C}=\text{O}$	0,0
C	vazba $\text{—C}\equiv\text{N}$	0,3
O	etherická vazba $\text{C—O—C}$	−1,0
O	vazba $\text{C—OH}$ v primárních alkoholech	−0,6
O	vazba $\text{C—OH}$ v sekundárních alkoholech	−0,75
O	vazba $\text{C—OH}$ v terciárních alkoholech	−0,25
Cl	vazba $\text{C—Cl}$ v alifatických uhlovodících	−0,12
Cl	vazba $\text{C—Cl}$ v alkanech	0,05

Kovatsových indexů nerozvětvených alkanů (viz odd. 4.2) a inkrement pro skupinu  $-\text{CH}_2-$  ( $RMR_{\text{CH}_2} = 100$ ). Výpočet hodnot  $RMR$  a inkrementů je však jen přibližný, protože síla vazeb ve funkčních skupinách, která určuje koncentraci iontů v detektoru, závisí i na sousedních substituentech.

Tabulka 6.10. Inkrementy  $RMR$  zjištěné FID pro některé funkční skupiny

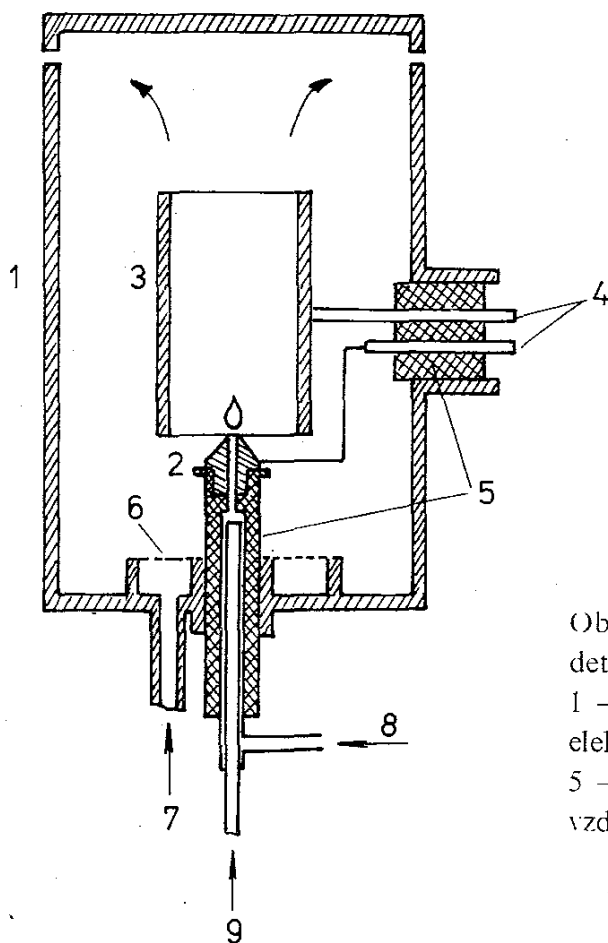
Funkční skupina	Inkrement hodnot $RMR$
$-\text{CH}_2\text{OH}$	55
$\begin{array}{l} \diagdown \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \diagup \end{array}$	35
$-\text{CO}-\text{CH}_3$	100
$\begin{array}{l} \diagdown \\ \text{CO} \\ \diagup \end{array}$	0
$-\text{CH}_2-\text{CO}-$	135
$-\text{CH}=\text{O}$	0
$-\text{CO}-\text{CO}-$	90
$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CO}-$	170
$-\text{O}-\text{CH}_2-$	0
$\begin{array}{l} \diagdown \\ \text{C}=\text{CH}_2 \\ \diagup \end{array}$	178
primární $-\text{OH}$	-45
sekundární $-\text{OH}$	-65

Vedle typu analyzované sloučeniny závisí citlivost plamenového ionizačního detektoru rovněž na:

- konstrukci detektoru,
- ionizačním napětí,
- toku nosného plynu,
- poměru toku nosného plynu, vzduchu a vodíku v detektoru.

Schéma plamenového ionizačního detektoru je na obr. 67. Detektor se skládá z difúzního vodíkového hořáku. Vodík hoří mezi dvěma elektrodami, na které se vkládá napětí lišící se o 100 až 300 V. Efluent z kolony se před vstupem do hořáku mísí s vodíkem, jehož tok je regulovatelný. Vzduch, který je nutný k hoření vodíku, se přivádí přes vzduchový filtr na dně detektoru. Konstrukce trysky ovlivňuje šum detektoru. Je výhodné, když je tryska z nerezové oceli a je jednou z elektrod. Druhou elektrodou (tzv. sběrnou) je nejčastěji dutý váleček z nerezové oceli. Protože ionizační účinnost detektoru je velmi nízká, je důležité, aby rychlost přívodu solutu do detektoru byla dostatečně pomalá. Citlivost a šum detektoru závisí i na poměru průtoků nosného plynu a vodíku. Pro náplňové kolony se nejčastěji používají průtoky v rozsahu  $15$  až  $50 \text{ ml min}^{-1}$  jak pro nosný plyn, tak i pro vodík, přičemž je snaha dodržet

stejné průtoky obou plynů. Pro kapilární kolony se používá průtok vodíku asi  $30 \text{ ml min}^{-1}$ . Průtok vzduchu je asi  $500 \text{ ml min}^{-1}$ . Když je třeba pracovat s maximální citlivostí detektoru, určí se optimální průtoky nosného plynu, vodíku a vzduchu některým z optimalizačních postupů (např. simplexovou sekvenční metodou).



Obr. 67. Schéma plamenového ionizačního detektoru

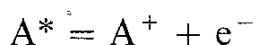
1 – tělo detektoru, 2 – tryska, 3 – sběrná elektroda, 4 – přívod ionizačního napětí, 5 – izolátory, 6 – vzduchový filtr, 7 – vstup vzduchu, 8 – vodík, 9 – nosný plyn z kolony

### 6.5.2.2 Termoionizační detektor (TID, AFID)

Principem detekce TID a AFID<sup>1)</sup> je měření koncentrace iontů alkalického kovu v efektivním prostoru detektoru. Koncentrace iontů je úměrná proudu, který prochází mezi polarizovanými elektrodami. Když se mezi trysku hořáku a sběrnou elektrodu plamenového ionizačního detektoru vloží halogenid alkalického kovu, rozpadne se tato sůl účinkem tepelné energie podle schématu:



Excitovaný atom alkalického kovu ( $A^*$ ) může vyzářit foton nebo se může ionizovat:



Je zřejmé, že koncentrace iontů  $A^+$  v detektoru je tím větší, čím menší je ionizační

<sup>1)</sup> TID – Thermoionic Detector

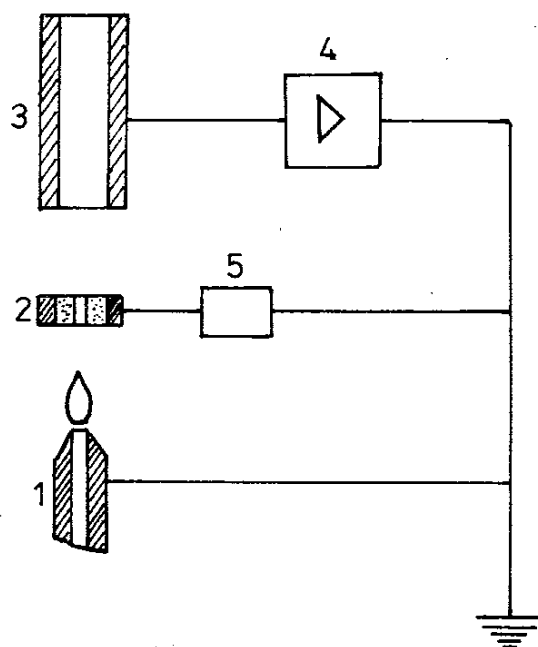
AFID – Alkali-Flame Ionization Detector

potenciál alkalického kovu. V TID se nejčastěji používá CsBr, protože cesium má z alkalických kovů nejnižší ionizační potenciál (tab. 6.11).

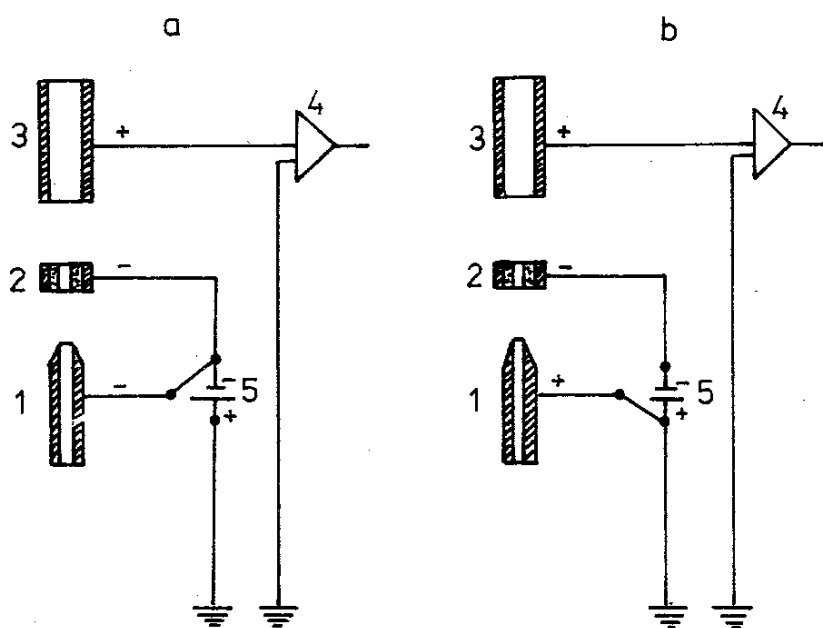
Tabulka 6.11. Ionizační potenciály alkalických kovů

Prvek	<u>Ionizační potenciál</u> eV
sodík	5,14
draslík	4,39
rubidium	4,17
cesium	3,89

Když z kolony eluují látky obsahující heteroatomy (N, P, S, Cl), tvoří podobně jako u FID ionty a oxidační zplodiny v plameni, které reagují specifickými reakcemi s ionty  $A^+$  (snižují nebo zvyšují ionizační proud). Ve většině komerčních TID



Obr. 68. Blokové schéma zapojení termoionizačního detektoru  
1 – tryska hořáku, 2 – zásobník soli, 3 – sběrná elektroda, 4 – zesilovač, 5 – přidavné napětí



Obr. 69. Schéma zapojení TID se selektivní odezvou pro látky obsahující atomy dusíku (a) a atomy fosforu (b)  
1 – tryska hořáku, 2 – zásobník soli, 3 – sběrná elektroda, 4 – zesilovač, 5 – zdroj napětí

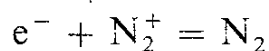
se používá trojelektrodové zapojení, jak je zřejmé z obr. 68. Rozdíl napětí na elektrodách je obdobně jako u FID 150 až 300 V. Odezva TID významně závisí na průtoku nosného plynu, průtoku vzduchu, vzdálenosti zásobníku halogenidu alkalického kovu od plamene a sběrné elektrodě. Protože i za ustálených podmínek se odezva detektoru mění s časem, je třeba vzdálenost zásobníku halogenidu od plamene a sběrné elektrody poměrně často adjustovat. Odezva detektoru závisí na povaze heteroatomu a klesá v pořadí  $P(110) > N(10) > S(5) \geq Cl(5) > As(1) \geq Bi(1)$ , kde čísla v závorkách označují relativní citlivost. Protože odezva detektoru je největší pro látky obsahující atomy fosforu a dusíku, používá se detektor zvláště pro stanovení látek obsahujících tyto atomy a označuje se pak jako detektor NP. Selektivitu detektoru lze ovlivnit změnou polaritý elektrod (obr. 69). Detektor je selektivní k látkám, obsahujícím atomy dusíku, jsou-li tryska a zásobník halogenidu zápornými elektrodami. Je-li tryska kladnou elektrodou, zásobník zápornou elektrodou a sběrná elektroda je kladná, detektor je selektivní k látkám obsahujícím fosfor.

### 6.5.2.3 Detektor elektronového záchytu (ECD)

Principem detekce ECD<sup>1)</sup> je zachycování elektronů elektronegativními atomy, funkčními skupinami nebo molekulami. Jestliže se zachycování elektronů realizuje v elektrickém poli, změní se v něm přenos náboje a zvýší se pravděpodobnost rekombinace iontů, což se projeví poklesem ionizačního proudu. V detektoru se účinkem radioaktivního zářiče  $\beta$  ( $^3H$ ,  $^{63}Ni$ ) ionizuje nosný plyn (např. dusík), přičemž vznikají z nosného plynu kationty a pomalé elektrony:



Je-li v detektoru jen nosný plyn, přenáší se migrací nabitých částic mezi elektrodami elektrický náboj úměrný proudu. Tento základní elektrický proud je velmi malý ( $10^{-9}$  až  $10^{-8}$  A), protože napětí na elektrodách je velmi malé (2 až 100 V) a hodně elektronů zaniká rekombinací:



Když se nosným plynem vymyje do detektoru i solut s elektronegativními vlastnostmi, pomalé elektrony se zachytí za vzniku aniontů:



jejichž hmotnost je podstatně větší než hmotnost elektronů. Důsledkem toho je zbrzdění přenosu náboje a pokles elektrického proudu. Pokles proudu v detektoru je úměrný koncentraci solutu ( $c$ ) podle rovnice:

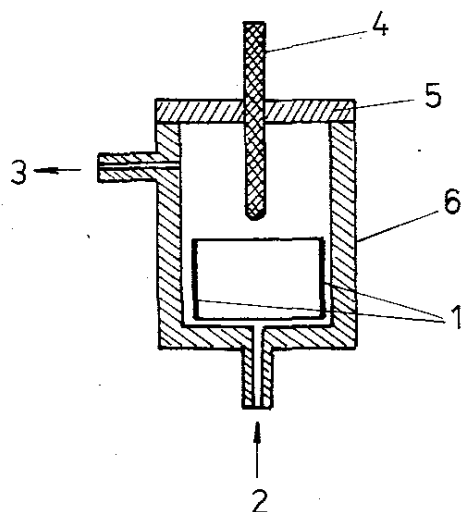
$$\frac{I_0 - I_c}{I_c} = K_{ez}c \quad (6.88)$$

<sup>1)</sup> ECD – Electron Capture Detector.



kde  $I_0$  je základní proud detektoru,  $I_c$  – proud, který protéká detektorem, je-li v něm koncentrace solutu  $c$ ,  $K_{ez}$  – konstanta elektronového záchytu, která závisí na teplotě a elektronegativních vlastnostech solutu.

Detektor elektronového záchytu tvoří průtoková ionizační komůrka (obr. 70). Zdrojem primárních elektronů je zdroj měkkého záření  $\beta$ , který je zachycený na katodě. Anodou je sběrná elektroda ve formě válečku. Jako radioaktivní zářič se používá  $^3\text{H}$  zachycený na vhodný nosič (pro teploty do  $200\text{ }^\circ\text{C}$ ) nebo  $^{63}\text{Ni}$  (pro teploty do  $400\text{ }^\circ\text{C}$ ). Na elektrody je možno přivádět konstantní stejnosměrné napětí (2 až 100 V), nebo napěťové pravoúhlé pulsy.



Obr. 70. Schéma detektoru elektronového záchytu

1 – radioaktivní zdroj záření, 2 – efluent z kolony, 3 – efluent unikající do ovzduší, 4 – sběrná elektroda (anoda), 5 – izolátor, 6 – tělo detektoru (katoda)

Při práci s konstantním napětím se volí takové napětí, které právě stačí k zachycení všech elektronů uvolněných v komůrce detektoru. Jestliže se polarizují elektrody napěťovými pulsy, zvýší se citlivost ECD a jeho lineární dynamický rozsah. Zatímco při práci s konstantním napětím je lineární dynamický rozsah asi  $10^2$ , při práci s napěťovými pulsy se tato hodnota zvýší na  $10^4$  až  $10^5$ .

Mimo dusík je možno použít jako nosný plyn argon s přídavkem methanu, který potlačuje průběh nežádoucích reakcí v detektoru.

Tabulka 6.12. Reaktivní citlivost ECD pro některé sloučeniny

Skupina látek	Sloučenina	Relativní citlivost
alkany	hexan	1,0
aromatické uhlovodíky	naftalen	10
	anthracen	$10^2$
chlorované alkany	chlorbutan	$10^2$
	tetrachlormethan	$10^6$
chlorované aromatické uhlovodíky	chlorbenzen	$10^2$
	benzylchlorid	$3 \cdot 10^4$
aromatické nitrosločeniny	nitrobenzen	$10^5$
	dinitrobenzen	$10^6$
estery dikarboxylových kyselin	diethyloxalát	$10^5$
	diethylfumarát	

ECD je velmi selektivní zvláště k sloučeninám obsahujícím atomy halogenů, fosforu, síry, olova, kyslíku, k nitrosloučeninám a aromatickým uhlovodíkům. Jeho citlivost závisí na elektronegativitě atomu a funkční skupině a na jejich procentovém zastoupení v molekule. V tabulce 6.12 jsou pro názornost uvedeny relativní citlivosti některých vybraných látek.

#### 6.5.2.4 Heliový a argonový detektor (HeD, ArD)

Do skupiny ionizačních detektorů patří i heliový a argonový detektor, v kterých se jako nosných plynů používá velmi čisté helium nebo argon. Atomy helia, resp. argonu se účinkem intenzivního (tvrdého) záření  $\beta$  dostanou do vzbuzeného stavu a jsou schopny ionizovat všechny sloučeniny s nižšími ionizačními potenciály. Ionizace se uskutečňuje v elektrickém poli o velké intenzitě (do  $4\,000\text{ V cm}^{-1}$  pro heliový detektor a  $9\,000\text{ V cm}^{-1}$  pro argonový detektor) a lze ji popsat rovnicemi (ORG – organická látka):



Mimo tuto ionizaci může v detektoru probíhat i ionizace primárními elektrony z  $\beta$ -záření:



Na ionizaci se mohou dále účastnit i tyto sekundární elektrony. Heliový a argonový detektor se konstrukčně podobají ECD. Jako zdroj záření  $\beta$  se používá  $^3\text{H}$ ,  $^{63}\text{Ni}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  a  $^{85}\text{Kr}$ .

#### 6.5.3 Selektivní detektory

Mezi selektivní detektory používané v plynové chromatografii můžeme mj. zahrnout detektor elektronového záchytu (viz odd. 6.5.2.3), coulometrický detektor a plamenový fotometrický detektor.

Tabulka 6.13. Vlnové délky charakteristického záření pro FPD

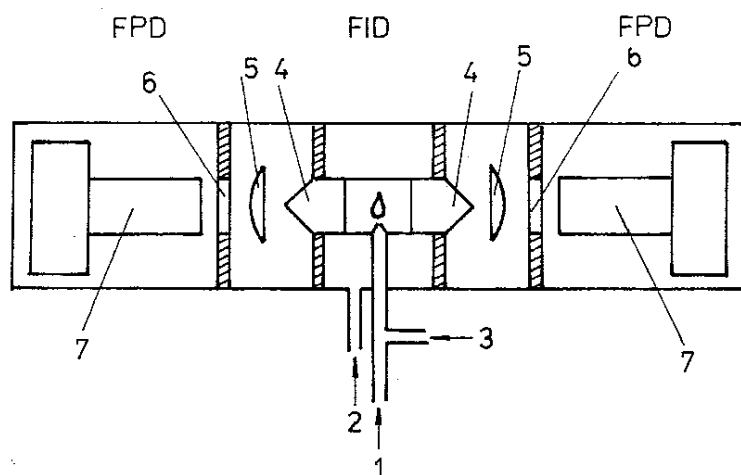
Atom	Emitující skupina	Vlnová délka nm
P	HPO	526, 565
S	S <sub>2</sub>	394, 384
	CS	257,6
C	C—C	512,9, 516,5, 654,1, 436,4
	C—H	390, 431,4
N	CN	388,3
As	AsO	500

Principem coulometrického detektoru je automatická coulometrická titrace roztoku, který vznikne spálením eluátu z kolony a jeho absorpcí v absorbéru. Coulometrickým detektorem se nejčastěji stanovují látky, které obsahují síru (v oxidačních zplodinách se coulometricky stanovuje  $\text{SO}_2$ ) a chlor (stanovuje se  $\text{Cl}_2$ ). K indikaci ekvivalentního bodu u coulometrického detektoru se nejčastěji používá potenciometrický princip.

Principem plamenového fotometrického detektoru (FPD<sup>1)</sup>) je měření emise plamene při charakteristické vlnové délce. Na charakteristickém záření se podílejí heteroatomy organických molekul (tab. 6.13). Základní děje probíhající při plamenově fotometrické detekci organických látek obsahujících atomy fosforu lze popsat rovnicemi:



Při přechodu skupiny HPO ze vzbuzeného do základního stavu se vyzáří charakteristické záření vlnových délek 526 a 565 nm.



Obr. 71. Schéma dvojitého plamenového fotometrického detektoru spojeného s FID

- 1 – efluent z kolony,
- 2 – vzduch, 3 – vodík,
- 4 – světlovod, 5 – čočka,
- 6 – filtr,
- 7 – fotoelektrický násobič

K základním částem plamenového fotometrického detektoru patří hořák, optické součásti (4, 5, 6) a fotonásobič (7) (obr. 71). Aby se k detekci využila větší část zářivého toku, detektor obsahuje dvě větve.

Jak je zřejmé z tab. 6.13, je možno využít plamenový fotometrický detektor pro analýzu látek obsahujících atomy P, S, N a As, a to zvláště ke stanovení agrochemikálií obsahujících fosfor a ke stanovení sirných sloučenin v ovzduší.

## 6.6 ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLU DETEKTORU

Změna složení eluátu vytékajícího z kolony se v detektoru převede na změnu elektrické veličiny, kterou je možno po úpravě zaznamenat nejčastěji zapisovačem v závislosti na čase jako chromatogram. Vyhodnocování záznamů získaných analyzováním mnohasložkových vzorků (obsahujících desítky až stovky složek) je velmi

<sup>1)</sup> FPD – Flame Photometric Detector.

zdlouhavé. Proto se v současnosti k vyhodnocení analýzy používají digitální integrátory a počítače (viz odd. 4.1.3).

K hlavním úkolům digitálního integrátoru patří:

- zaznamenat závislost signálu detektoru na čase,
- transformovat analogový signál detektoru do digitální formy,
- ve výpisu z integrátoru uvést eluční časy a plochy, resp. výšky píků.

Novější integrátory mají rozšířenou paměť, výpočtovou kapacitu a možnost programování výpočtů v jazyce BASIC. Ve výpisu z těchto integrátorů bývají výsledky složení vzorku se statistickým zpracováním a charakteristika složek vzorku z banky údajů. Integrátor navíc umožňuje v externí paměťové jednotce (na magnetické páse nebo pružném disku) uchovávat chromatogramy, reprodukovat je s úpravou podmínek (odčítání nulové linie při analýze s teplotním programem, změny podmínek integrace při kvantitativní analýze apod.) a přes vhodný mezičlánek posílat údaje ke zpracování do centrálního počítače.

Je-li součástí zařízení i mikropočítač, lze získat systém, který pracuje automaticky. Mimo výpočtů a zpracování údajů může mikroprocesor počítače řídit činnost plynového chromatografu. Operátor zasahuje do analýzy a zpracování výsledků klávesnicí mikropočítače. Při zpracovávání velkého souboru údajů je výhodné připojit chromatografy přes integrátor nebo mikropočítač prostřednictvím mezičlátku k výkonnému počítači, což umožňuje automatizovat celé laboratoře pro plynovou chromatografii. Z chromatogramu, který se získá zapisovačem, integrátorem nebo počítačem, můžeme získat informace pro kvalitativní a kvantitativní analýzu a pro hodnocení účinnosti separačního systému.

## 6.7 KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Jedním z požadavků na analýzu vzorků plynovou chromatografií je kvalitativní analýza. Základní poznatky o kvalitativní analýze vzorků prováděné chromatografickými metodami jsou uvedeny v odd. 4.2. Cílem kvalitativní analýzy je nejčastěji identifikace složek vzorku, méně často charakteristika skupin látek ve vzorku. Při kvalitativní analýze vzorků plynovou chromatografií lze:

- vycházet z elučních údajů,
- využít selektivní detektory,
- kombinovat plynovou chromatografii s jinými fyzikálně chemickými nebo chemickými metodami.

### 6.7.1 Využití elučních dat k identifikaci složek ve vzorku

Tato metoda se v praxi používá nejčastěji. Základem identifikace je porovnání naměřených elučních údajů s elučními údaji referenčních látek nebo publikovanými elučními údaji. Při porovnávání se zvolí rozmezí elučních údajů (okno), v kterém se údaje považují za totožné. Určitost, s kterou je možno solut v píku identifikovat, závisí na přesnosti měření elučních charakteristik, počtu předpokládaných složek

ve vzorku ( $n_p$ ) a rozlišovací schopnosti kolony ( $R_{ji}$ ). Při statisticky náhodném rozdělení píků na chromatogramu lze z Poissonova rozdělení vypočítat pravděpodobnost ( $p_n$ ) výskytu  $n$ -solutů v píkách eluujících v časovém rozmezí  $t_R - t_M$ :

$$p_n = \frac{e^{-\varrho} \varrho^n}{n!} \quad (6.89)$$

kde  $\varrho$  je hustota píků eluujících na chromatogramu za čas  $t_R$  a je možno ji vypočítat ze vztahu:

$$\varrho = \frac{n_p \Delta t_R}{t_R - t_M} \quad (6.90)$$

kde  $n_p$  je předpokládaný počet složek, které by měly eluovat z kolony v čase  $t_R - t_M$ ,  $t_M$  – mrtvý eluční čas,  $\Delta t_R$  – nejmenší rozdíl elučních časů složek  $j$  a  $i$ , které je možno v dané koloně ještě spolehlivě rozlišit s rozlišením  $R_{ji}$  [viz rovn. (3.73)]:

$$R_{ji} = \frac{2\Delta t_R}{Y_j + Y_i} \approx \frac{\Delta t_R}{Y_j} \quad (6.91)$$

kde  $Y$  je šířka píku při základně.

Kombinací rovn. (6.90) a (6.91) a úpravou je možno získat pro hustotu píků ( $\varrho$ ) vztah:

$$\varrho = \frac{4n_p}{t_R - t_M} \frac{R_{ji} t_{R,j}}{\sqrt{n_j}} \quad (6.92)$$

protože

$$Y_j = \frac{4t_{R,j}}{\sqrt{n_j}}$$

Jestliže se při analýze vyžaduje rozlišení  $R_{ji} = 1,00$ , složka  $j$  eluuje jako poslední a analýza je dostatečně dlouhá ( $t_R - t_M \approx t_R$ ), lze pro hustotu píků odvodit vztah:

$$\varrho = \frac{4n_p}{\sqrt{n_j}} \quad (6.93)$$

z něhož vyplývá, že hustota píků na chromatogramu vzrůstá s rostoucím počtem složek ve vzorku a klesá s rostoucím počtem teoretických pater kolony.

Z rovnice (6.89) lze vypočítat pravděpodobnost, s jakou v daném časovém intervalu ( $\Delta t_R$ ) eluuje maximálně jeden solut (tj. žádný nebo jeden):

$$p_0 + p_1 = e^{-\varrho} (1 + \varrho) \quad (6.94)$$

jakož i pravděpodobnost, že v intervalu  $\Delta t_R$  budou eluovat dva nebo více solutů:

$$p_{se} = 1 - e^{-\varrho} (1 + \varrho) \quad (6.95)$$

V tab. 6.14 jsou z rovn. (6.93) a (6.95) vypočítány hodnoty  $p_{se}$  a  $\varrho$  pro různé počty složek ve vzorku ( $n_p$ ) v závislosti na počtu teoretických pater kolony ( $n_j$ ). Z tab. 6.14

je zřejmé, že pravděpodobnost správné identifikace (pokles hodnot  $p_{se}$ ) vzrůstá s rostoucím počtem teoretických pater.

Tabulka 6.14. Závislost počtu složek  $n_p$  na hustotě píků na chromatografu ( $\varrho$ ) a počtu teoretických pater ( $n_j$ ) na pravděpodobnosti, že v intervalu  $\Delta t_R$  eluuje více solutů ( $p_{se}$ )

$p_{se}$	$\varrho$	$n_j = 10^3$	$n_j = 10^4$	$n_j = 10^5$	$n_j = 10^6$
0,1	0,53	4	13	42	132
0,05	0,36	3	9	28	90
0,01	0,15	1	4	12	37

Když se vzorek analyzuje ve dvou kolonách o různé polaritě ( $A$ ,  $B$ ), je pravděpodobnost, že dva nebo více píků eluuji současně, podstatně menší než při analýze vzorku v jedné koloně, jak vyplývá z rovnice:

$$p_{se}(A + B) = p_{se}(A) p_{se}(B) \quad (6.96)$$

Protože platí, že  $[p_{se}(A), p_{se}(B)] < 1$ , musí platit, že  $p_{se}(A + B) < [p_{se}(A), p_{se}(B)]$ .

#### 6.7.1.1 Izotermická analýza

Kromě elučních časů se při identifikaci složek ve vzorku separovaných za izotermických podmínek používají redukované eluční časy ( $t'_R$ ), eluční objemy ( $V_R$ ,  $V'_R$ ,  $V_N$  a  $V'_N$ ), eluční poměry ( $r_{ji}$ ) a Kovatsovy eluční indexy ( $I$ ) (viz odd. 4.2).

Je-li třeba identifikovat složky vzorku porovnáním naměřených a publikovaných elučních časů a objemů a z nich odvozených redukovaných údajů, reprodukovatelnost měření zpravidla nesplňuje požadavky kladené na identifikaci. Podstatně lepší shodu naměřených a publikovaných údajů je možno získat při izotermické analýze porovnáním elučních poměrů ( $r_{ji}$ ). Publikované eluční poměry však lze využít při identifikaci jen v tom případě, když se použije stejný standard. Protože vybrat standard, který by vyhovoval všem experimentálním podmínkám, je téměř nemožné, volí se více standardů. Kovats zjistil, že nejvýhodnější standardy představuje homologická řada nerozvětvených alkanů. Když se při izotermické analýze porovnají eluční údaje látek s elučními údaji těchto alkanů v semilogaritmické škále, získá se systém Kovatsových elučních indexů (viz odd. 4.2). Identifikace složek vzorku porovnáním naměřených a publikovaných elučních indexů souvisí s reprodukovatelností měření elučních indexů a rozlišovací schopností chromatografické kolony. Nejmenší rozdíl Kovatsových indexů dvou solutů ( $j, i$ ), které je možno v dané koloně rozlišit s faktorem  $R_{ji}$ , závisí na separační účinnosti chromatografické kolony (počtu efektivních pater  $n_{ef}$ ) a elučním poměru alkanů ( $r_{z+1,z}$ ):

$$\Delta I = I_j - I_i = \frac{400 R_{ji}}{\sqrt{n_{ef} \ln r_{z+1,z}}} \quad (6.97)$$

kde počet efektivních pater ( $n_{ef}$ ) závisí na počtu teoretických pater ( $n$ ) a kapacitním poměru podle rovn. (3.53).

Standardizací pracovních podmínek lze dosáhnout reprodukovatelnost měření Kovatsových indexů, která umožňuje využít k identifikaci látky separované plynovou chromatografií publikované Kovatsovy indexy.

K identifikaci složek vzorku analyzovaného izotermicky lze vedle Kovatsových indexů využít i z nich odvozené teplotní koeficienty ( $dI/dT$ ), rozdíly indexů na dvou fázích o různé polaritě ( $\Delta I$ ) a inkrementy skupin, z kterých se skládá molekula složky tzv. homomorfní faktory).

Tabulka 6.15. Kovatsovy indexy ( $I$ ), strukturální inkrementy indexů pro skupinu  $\text{CH}_3\text{COO}-$  ( $\delta I$ ) a teplotní koeficienty ( $\Delta I/20^\circ\text{C}$ ) zjištěné pro octany sekundárních tetradekanolů ve skleněné kapilární koloně typu WCOT se stacionární kapalinou Carbowax 1500 při  $155^\circ\text{C}$

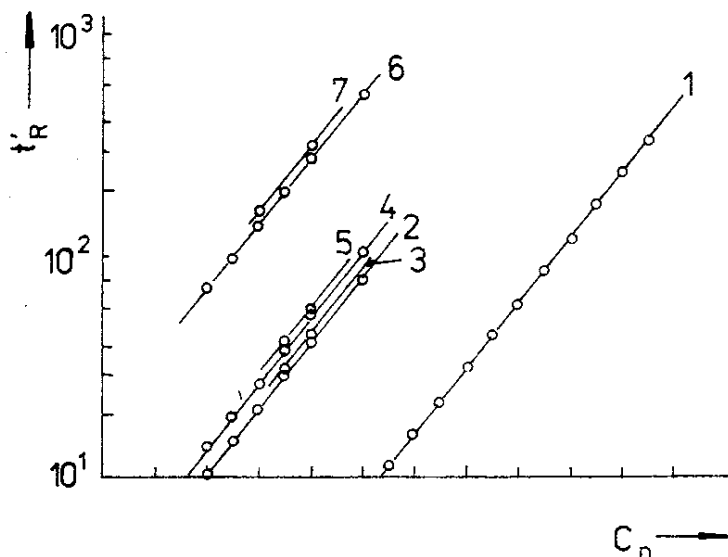
Polohový izomer	$I$	$\delta I$	$\Delta I/20^\circ\text{C}$	$\Delta I$
tetradekan-2-ol	1 919,3	519,3	21,5	202,4
-3-ol	1 890,0	490,0	20,2	191,0
-4-ol	1 864,5	464,5	17,5	183,7
-5-ol	1 851,0	451,0	16,5	178,8
-6-ol	1 843,3	443,3	15,3	175,5
-7-ol	1 841,2	441,2	14,2	175,5

V tabulce 6.15 jsou pro ilustraci uvedeny Kovatsovy indexy ( $I$ ), z nich odvozené teplotní koeficienty ( $\Delta I/20^\circ\text{C}$ ) a inkrementy indexů pro skupinu  $\text{CH}_3\text{COO}-$  ( $\delta I$ ) naměřené separací octanů sekundárních tetradekanolů v kapilární koloně typu WCOT se stacionární fází polyethylenglykol 1 500 (Carbowax 1 500), jakož i rozdíly Kovatsových indexů ( $\Delta I$ ) na polární (Carbowax 20 M) a nepolární (OV-101) fází.

Z tabulky 6.15 je možno zjistit, že k identifikaci všech sekundárních tetradekanol-acetátů Kovatsovými indexy stačí volit rozmezí (okno)  $\pm 1$  indexové jednotky, z čehož plyne, že pro 95%ní pravděpodobnost správné identifikace je třeba, aby směrodatná odchylka měření indexů byla  $\pm 0,25$  a kolona byla schopna rozlišit látky s rozdílnými indexy  $\Delta I_{ji} = 1,00$ . Protože v koloně s fází Carbowax 1 500 je při  $155^\circ\text{C}$  eluční poměr sousedních alkanů  $r_{z+1,z} \approx 1,5$ , lze z rovn. (6.97) vypočítat, že za daných podmínek se rozliší složky  $j$  a  $i$  ( $\Delta I_{ji} = 1,00$  a rozlišení  $R_{ji} = 1,00$ ) jen v kolonách s extrémně vysokou separační účinností ( $n_{ef} \approx 10^6$ ).

Nejsou-li při analýze k dispozici referenční materiály ani publikované Kovatsovy indexy, lze k identifikaci využít korelaci mezi elučními údaji a strukturou analyzovaných látek (jejich chemickým složením, resp. některou fyzikální konstantou). Mezi nejjednodušší korelace patří semilogaritmická závislost mezi redukovanými elučními časy a počtem uhlíkových atomů, která je pro vyšší členy homologických řad přímková (obr. 72). Směrnice přímek charakterizují homologickou řadu, stacionární kapalinu a teplotu. Pro vyšší členy homologických řad je možno získat přímky i ze

semilogaritmických závislostí redukovaných elučních časů na bodu varu a tlaku nasycených par, resp. z logaritmické závislosti redukovaných elučních časů naměřených na dvou stacionárních fázích o různé polaritě. Podobné závislosti se získají, když se místo redukovaných elučních časů použijí čisté nebo specifické eluční objemy a eluční poměry. Když se do korelací zahrnou i nižší členy homologických řad, uvedené závislosti jsou nelineární. Identifikace členů homologických řad využitím uvedených závislostí se nejčastěji realizuje interpolací, méně často extrapolací.



Obr. 72. Semilogaritmická závislost  $\log t'_R$  na počtu uhlíkových atomů ( $C_n$ ) zjištěná analyzováním alkanů (1), methylesterů nasycených (2) a mononenasycených (3) karboxylových kyselin, octanů nasycených (4) a mononenasycených (5) alkoholů, nasycených (6) a mononenasycených (7) karboxylových kyselin. Náplňová kolona (délka 2 m, vnitřní průměr 3 mm) naplněná 15%ním diethylglykolsukcinátem (DES) s přidavkem 4%ního  $H_3PO_4$  na Chromosorbu W o zrnitosti 0,12 až 0,15 mm při 183 °C.

K identifikaci členů homologické řady lze dále využít závislosti Kovatsových indexů na počtu uhlíkových atomů, bodech varu, molární hmotnosti, tlaku par apod. Tyto závislosti jsou všeobecně nelineární, avšak pro vyšší členy homologických řad je lze považovat za lineární. Z lineární závislosti Kovatsových indexů na počtu uhlíkových atomů pro jednotlivé homologické řady se odvodily aditivní vlastnosti Kovatsových indexů, které se využívají k předpovědi indexů. Pro ilustraci je možné uvést výpočet indexu tridekan-3-oleacetátu z údajů v tab. 6.15:

$$I = \delta I(\text{tridekan}) + \delta I(\text{CH}_3\text{COO— v poloze 3})$$

což po dosazení hodnoty z tab. 6.15 dává:

$$I = 1\,300 + 490,0 = 1\,790,0$$

(Kovatsov index tridekanu  $I = 1\,300$ ).

Porovnáním vypočteného indexu s naměřeným (1 794,1) lze usoudit, že vypočítanou hodnotu indexu je možno využít k identifikaci tridekan-3-acetátu ve vzorku jen v tom případě, kdy jsou o vzorku k dispozici další údaje (např., že jde o octany



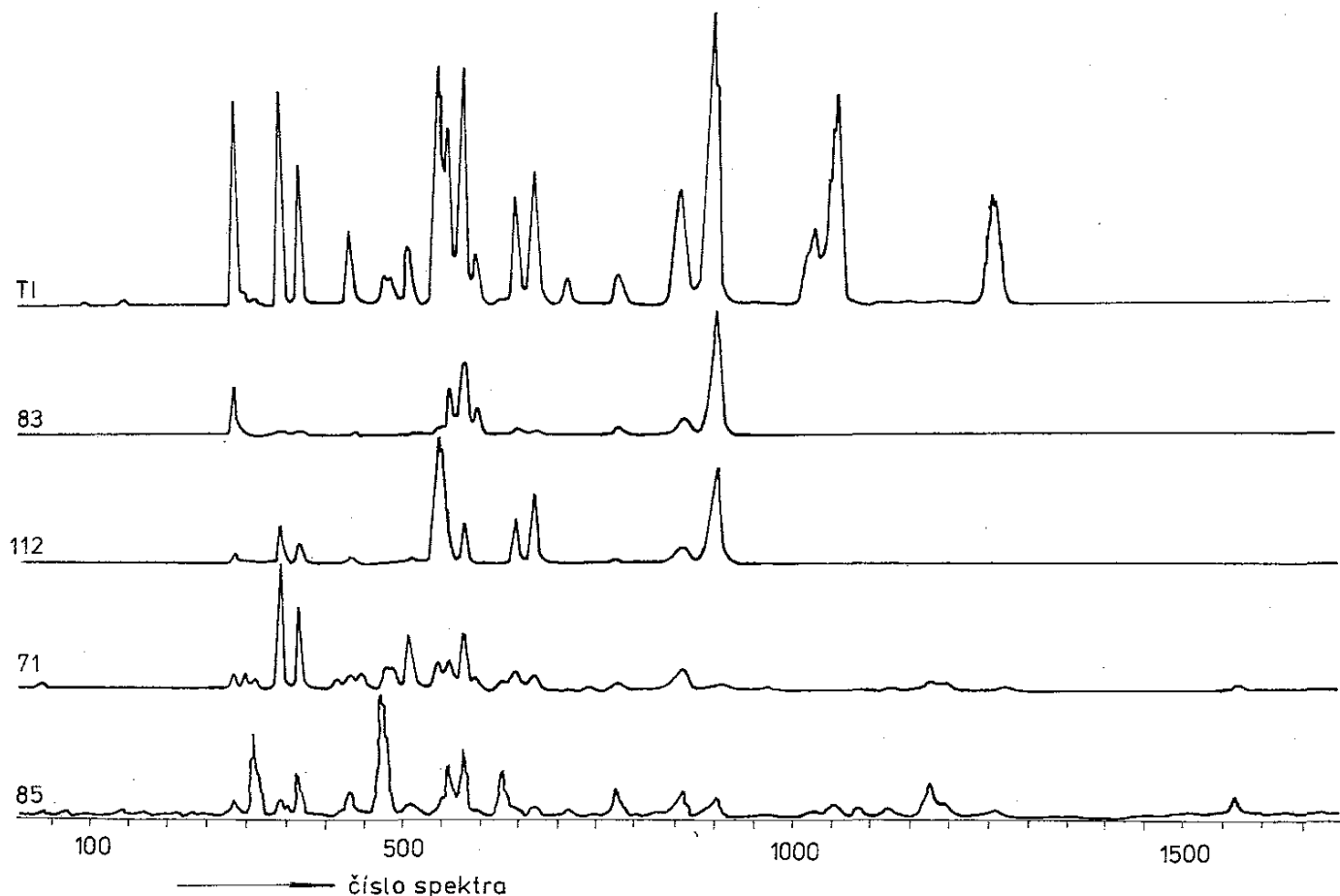
sekundárních alkoholů). Shoda vypočítaných a naměřených elučních indexů je podstatně lepší pro měření na nepolárních stacionárních kapalinách, výborná je v případech, kdy se analyzují na těchto nepolárních kapalinách nepolární soluty.

### 6.7.1.2. Analýza s programovanou teplotou

Při identifikaci složek vzorku analyzovaného plynovou chromatografií s programovanou teplotou s lineárním gradientem (LTPGC) se nejčastěji používají retenční indexy, které se liší od Kovatsových [srovnej rovn. (4.16) a (4.17)]. Indexy při LTPGC závisí kromě jiných experimentálních podmínek i na povaze nosného plynu a jeho toku v koloně. Při identifikaci složek vzorku porovnáním naměřených a publikovaných elučních indexů je nutno standardizovat podstatně víc podmínek než při izotermických analýzách.

### 6.7.2 Charakteristika složek ve vzorku selektivními detektory

Selektivní detekcí lze ve vzorku dokázat přítomnost určitých látek, i když se všechny složky vzorku nerozdělí nebo jsou přítomny ve vzorku ve velmi nízkých koncentracích. K selektivní detekci se v plynové chromatografii nejčastěji používají detektor elektronového záchytu (ECD), plamenový fotometrický detektor (FPD) a termoionizační detektor (TID) (viz odd. 6.5).



Obr. 73. Chromatogram získaný analyzováním cyklických a aromatických uhlovodíků s počtem uhlíkových atomů 8 kapilární plynovou chromatografií na skvalanové fázi kombinací GC/MS  
TI – celkový iontový tok, 71, 83, 85, 112 – charakteristické ionty cyklických uhlovodíků

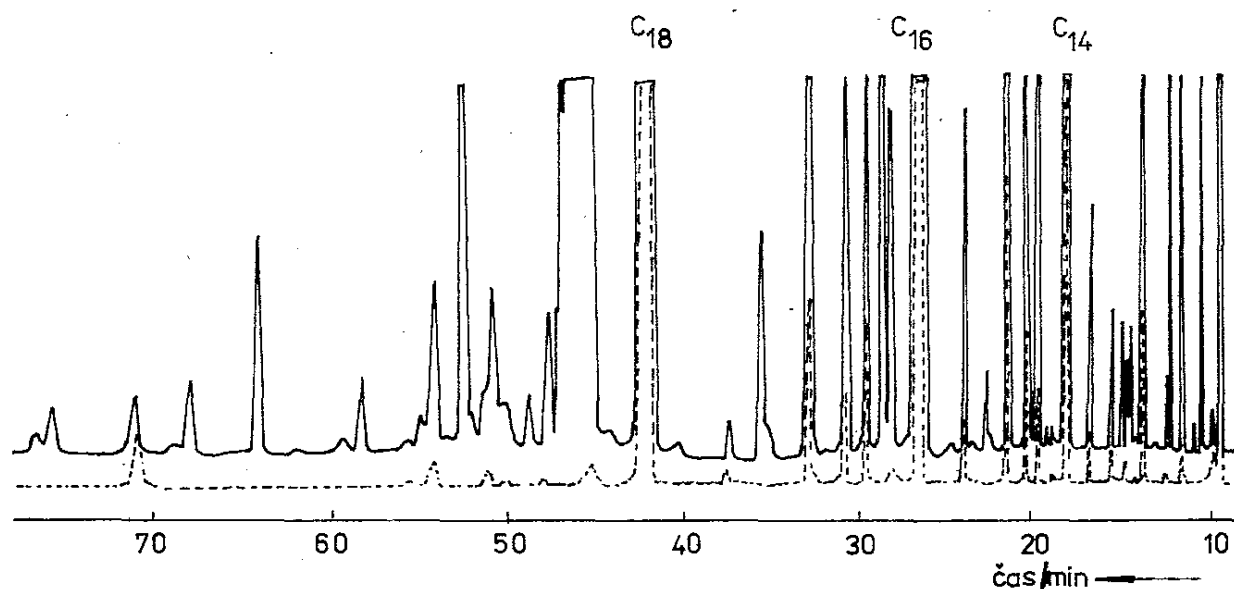
Kromě těchto detektorů sem patří i hmotnostní spektrometr, který deteguje v eluentu jen jeden ion (SIM<sup>1</sup>) a absorpční spektrální detektory (UV, IR), jestliže pracují při jedné vlnové délce. Odezva selektivních detektorů se používá k získání informací o charakteru složek, zvláště když tyto přístroje pracují paralelně s neselektivním detektorem (např. FID). Na obrázku 73 je chromatogram získaný analyzováním cyklických a aromatických uhlovodíků s počtem uhlíkových atomů 8 kapilární plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem a hmotnostním spektrometrem, který snímal jen jeden ion. Při identifikaci složek ve vzorku je výhodné kombinovat odezvu selektivních detektorů s elučními charakteristikami. Mezi nejčastější kombinace univerzálních a selektivních detektorů v plynové chromatografii patří FID-ECD a FID-TID (FID-AFID).

Jestliže se v plynové chromatografii použije k detekci infračervený nebo hmotnostní spektrometr, který umožňuje snímat celá spektra, získají se kombinace GC/IR<sup>2</sup>, resp. GC/MS<sup>3</sup>, jež jsou nejvhodnějšími metodami pro identifikaci složek ve vzorku (viz kap. 8).

### 6.7.3 Charakteristika složek ve vzorku kombinací plynové chromatografie s metodami klasické organické analýzy

Při charakteristice funkčních skupin ve složkách vzorku je možno využít chemických reakcí, které se používají k důkazu těchto skupin v klasické organické analýze.

Nechá-li se vzorek reagovat s činidlem před analýzou, získáme charakteristiku



Obr. 74. Separace methylesterů karboxylových kyselin izolovaných z másla kapilární plynovou chromatografií s fází BDS (90 m dlouhá kolona z nerezové oceli s vnitřním průměrem 0,25 mm) při 180 °C

Plnou čarou je znázorněn chromatogram původního vzorku, čárkovaně vzorky po hydrogenaci.

<sup>1</sup>) SIM – Single Ion Monitoring.

<sup>2</sup>) GC/IR – Gas Chromatography-Infra Red

<sup>3</sup>) GC/MS – Gas Chromatography-Mass Spectrometry

složek ve vzorku porovnáním chromatogramu původního vzorku s chromatogramem vzorku, v kterém proběhla chemická reakce. Jako příklad důkazu přítomnosti nenasyčených vazeb v methylesterech karboxylových kyselin může sloužit obr. 74. Protože se katalytickou hydrogenací nenasyčených vazeb methylestery nenasyčených kyselin ze vzorku eliminovaly, nazýváme tyto reakce před analýzou eliminační. Při eliminaci nejčastěji probíhají reakce spojené s hydrogenací, dehydrogenací, ozonolýzou a přípravou různých derivátů (podrobněji viz odd. 4.4). Katalytickou hydrogenací je možno za určitých podmínek eliminovat funkční skupiny a analyzovat jen uhlovodíkový zbytek (tato metoda byla zavedena do plynové chromatografie pod názvem chromatografie uhlovodíkového skeletu z anglického termínu Carbon Skeleton Chromatography).

#### 6.7.4 Identifikace složek vzorku spojením dvou nebo více chromatografických kolon

Z odd. 6.7.1 vyplývá, že správnost identifikace složek vzorku využitím elučních charakteristik je možno zvýšit:

- snížením hustoty píků na chromatogramu [viz rovn. (6.95)],
- separací vzorku ve dvou kolonách o různé polaritě [viz rovn. (6.96)].

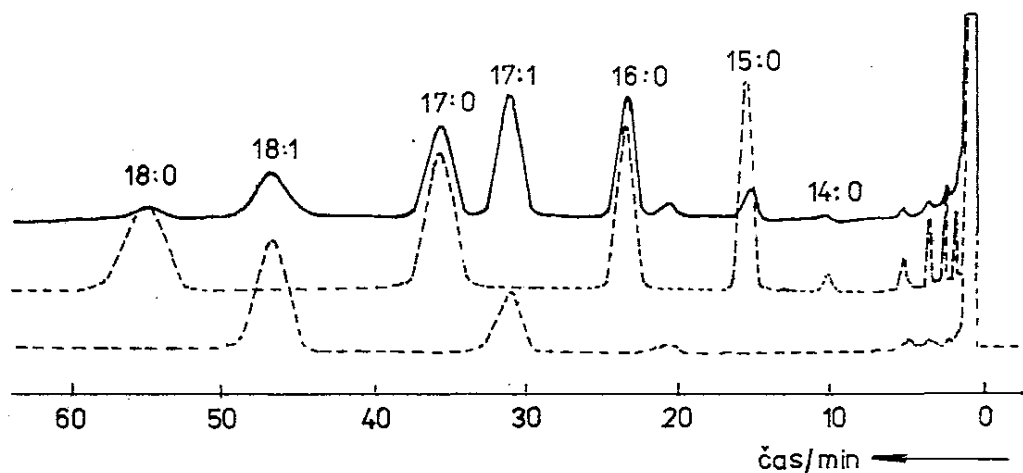
Do tohoto oddílu by bylo možné zahrnout i identifikaci složek vzorku v kolonách se směsnými stacionárními kapalinami, které jsou uvedeny v kap. 5.

K analýze uhlovodíkových vzorků, kde je třeba analyzovat velmi velké počty vzorků s velkým množstvím složek, se používají dvou a vícekolonové systémy, u nichž lze měnit směr toku plynu v koloně a měnit pořadí kolon (tzv. přepínání kolon). Analýza může probíhat automaticky a je většinou určena ke zjištění skupinového složení.

#### 6.7.5 Identifikace složek vzorku kombinací plynové chromatografie s jinými chromatografickými technikami

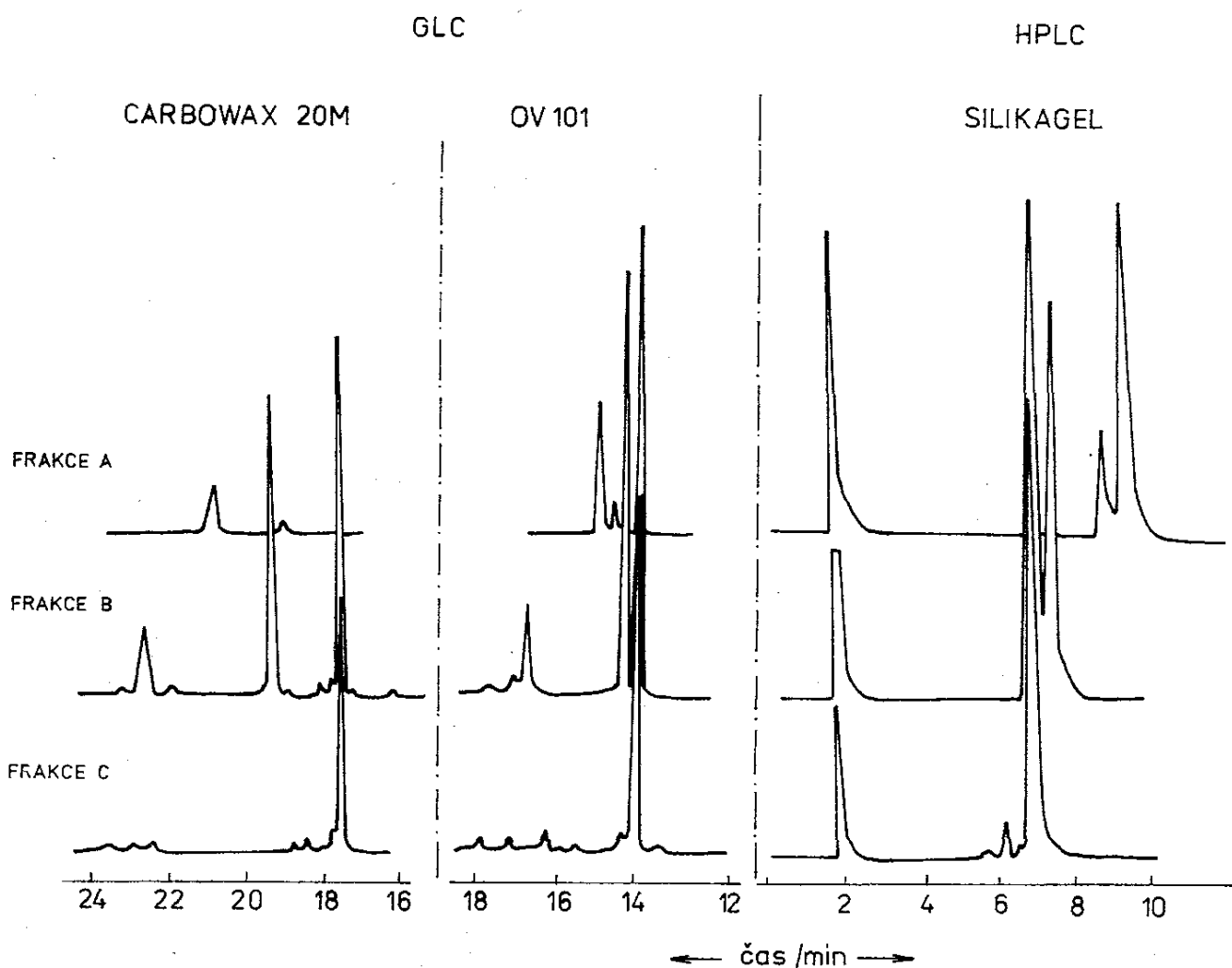
Pravděpodobnost identifikace složek vzorku je možno zvýšit kombinací plynové chromatografie s kapalinovou chromatografií a chromatografií na tenkých vrstvách. Při analýze se zpravidla kombinují dva separační principy (LSC a GLC). Metody lze kombinovat přímo (on-line) a nepřímo (off-line). Při přímém spojení metod zkondenzují složky vymývané z nedestrukčního detektoru na startovní linii tenké vrstvy, jejíž pohyb zabezpečuje elektromotor. Po skončení analýzy plynovou chromatografií se tenkovrstvý chromatogram vyvíjí vhodnou mobilní fází a složky se identifikují vhodným činidlem. Protože identifikace „on-line“ systémem vyžaduje relativně složité zařízení, v praxi se používá jen zřídka. Při identifikaci složek vzorku kombinací TLC a GLC systémem „off-line“ se nejprve vzorek analyzuje kapalinovou chromatografií a vypreparované frakce se rozdělí plynovou chromatografií. Pro ilustraci je na obr. 75 zobrazen chromatogram získaný analyzováním methylesterů karboxylových kyselin v původním vzorku (horní záznam) a frakcí methyl-

esterů nasycených (střední záznam) a nenasyčených kyselin s jednou dvojnou vazbou (spodní záznam) plynovou chromatografií v náplňové koloně s nepolární stacionární fází (Apiezonem L). Frakce methylesterů nasycených a nenasyčených kyselin se



Obr. 75. Chromatogram získaný analyzováním methylesterů karboxylových kyselin plynovou chromatografií v 2 m dlouhé skleněné koloně o vnitřním průměru 3 mm naplněné 10 % Apiezonu L na Chromosorbu W o zrnitosti 0,12 až 0,15 mm při 200 °C

Přerušovaně jsou zakresleny frakce methylesterů nasycených kyselin (střední záznam) a methylesterů *cis*-mononenasyčených kyselin (spodní záznam) získané analyzováním původního vzorku na tenkých vrstvách silikagelu impregnovaného 10%ním AgNO<sub>3</sub>. První číslo označuje počet uhlíkových atomů v kyselině, druhé číslo počet dvojných vazeb.



Obr. 76. Analýza destilační frakce PCB kombinací preparativní LC, HPLC a kapilární GLC ve dvou kolonách s různou polaritou

získaly analyzováním původního vzorku tenkovrstvou chromatografií na silikagelu impregnovaném 10 %  $\text{AgNO}_3$ .

Optimální kombinací chromatografických metod při identifikaci mnohasložkových vzorků je kombinace HPLC s kapilární GLC. Jako příklad je možno uvést analýzu chlorovaných bifenyliů (obr. 76).

## 6.8 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Při zjišťování obsahu složek ve vzorku se vychází z ploch nebo výšek píků na chromatogramu. Protože závislost plochy nebo výšky píku na koncentraci nebo hmotnosti složky ve vzorku není známa, zjišťuje se kalibrací. Při zjišťování obsahu složky ve vzorku se vychází z vlastností použitého detektoru (viz kap. 4 a odd. 6.5) a způsobu, kterým se kalibruje vztah mezi jeho odezvou a koncentrací, resp. hmotností analyzované složky (odd. 4.3). Mimo korekčních faktorů se při kalibraci v plynové chromatografii využívají ještě molární odezvové faktory ( $MR$ ), kterými se normalizuje odezva na jednotkové látkové množství. Jestliže se při kvantitativní analýze vychází z plochy píku ( $A_i$ ), molární odezvu hmotnostních detektorů můžeme vypočítat ze vztahu:

$$MR = \frac{A_i M_i}{m_i} \quad (6.98)$$

kde  $M_i$  je molární hmotnost složky  $i$ ,  $m_i$  – hmotnost detegované složky. Chyby při dávkování lze eliminovat zavedením relativních molárních odezev.

K hlavním zdrojům chyb, které mohou ovlivnit výsledky stanovení složek vzorku plynovou chromatografií, patří:

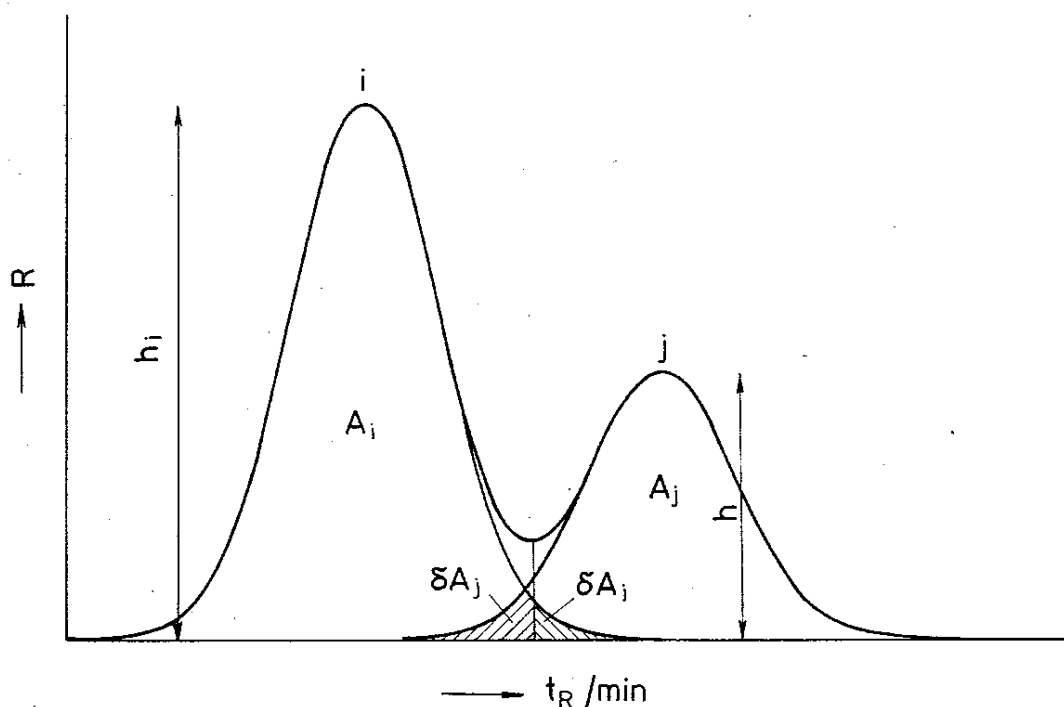
- odběr vzorku a jeho dávkování do kolony,
- ztráty v průběhu separace,
- překrytí píků.

1. *Odběr vzorku a jeho dávkování do kolony.* Požadavky na odběr vzorku jsou zpravidla součástí analytických postupů a jsou normalizovány. Při odběru vzorků z kontinuální výroby se zohledňuje i frekvence odběru a doba, po kterou se vzorek odebírá. Zhomogenizovaný vzorek je třeba dávkovat do chromatografického přístroje tak, aby se dostal do kolony beze změny. Způsob dávkování ovlivňuje zvláště analýzu termolabilních látek a vzorků, které obsahují složky s velmi odlišnými body varu. Zvlášť náročný je odběr plyných vzorků, jejich skladování a dávkování do chromatografického přístroje. Když se vzorky dávkují injekčními stříkačkami, relativní chyba dávkování je zpravidla větší než  $\pm 5\%$ .

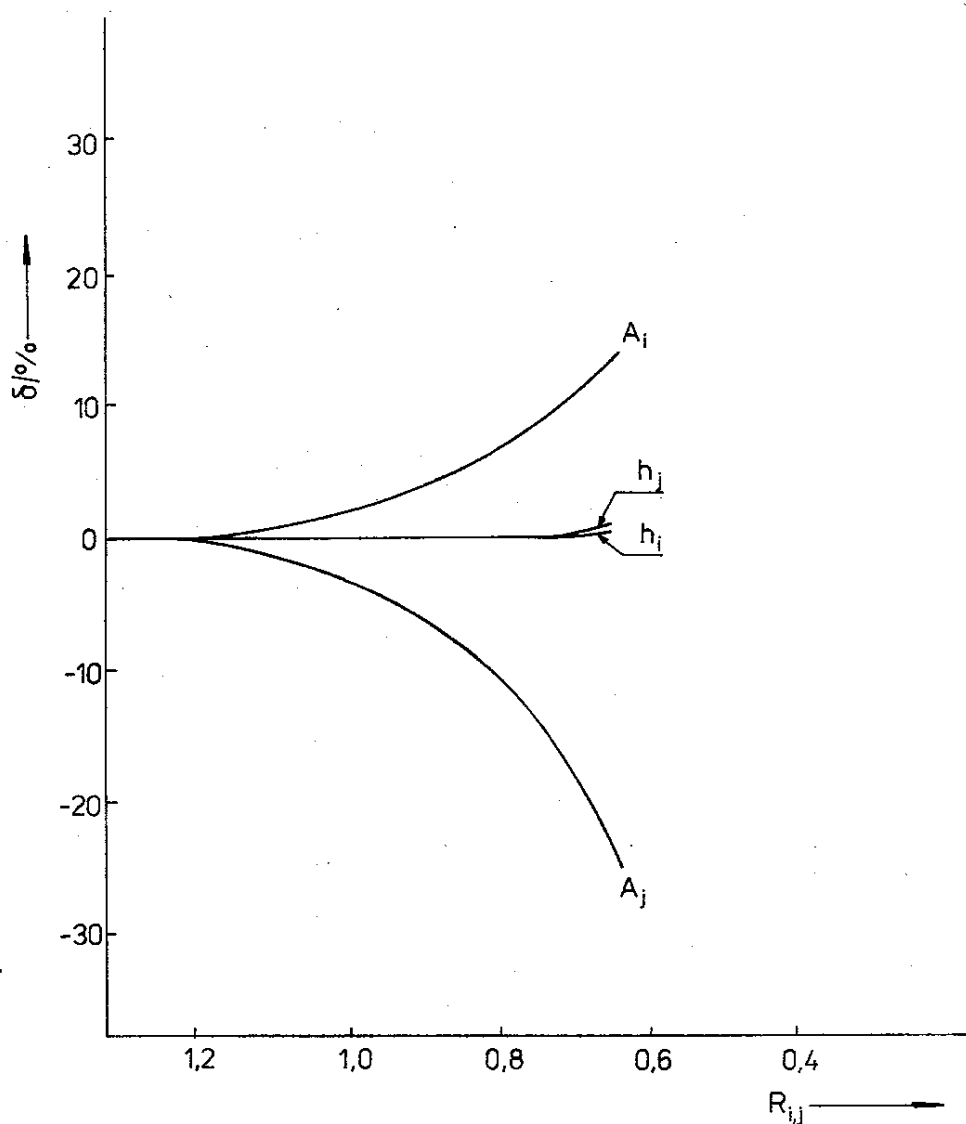
2. *Ztráty v průběhu separace.* V chromatografické koloně se na ztrátách mohou podílet:

- chemické reakce,
- adsorpce na aktivních centrech nosiče,
- tepelný rozklad termolabilních látek.

Ztráty složky v průběhu separace závisejí na koncentraci a velmi často vzrůstají s klesající koncentrací. Postup stanovení nízkých koncentrací je proto třeba otestovat analyzováním modelového vzorku v kolonách s různými náplněmi, které jsou umístěny v různých přístrojích. Nejsou-li k dispozici referenční látky, metoda se otestuje analyzováním vzorku ve více laboratořích (tzv. kruhovými testy).



Obr. 77. Zjištění ploch nerozlišených píků integratorem



Obr. 78. Závislost chyby měření ( $\delta$  v %) na rozlišení ( $R_{ij}$ ) pro plochy ( $A$ ) a výšky ( $h$ ) píků složek  $i$  a  $j$  při poměru koncentrací  $c_i/c_j = 2,0$

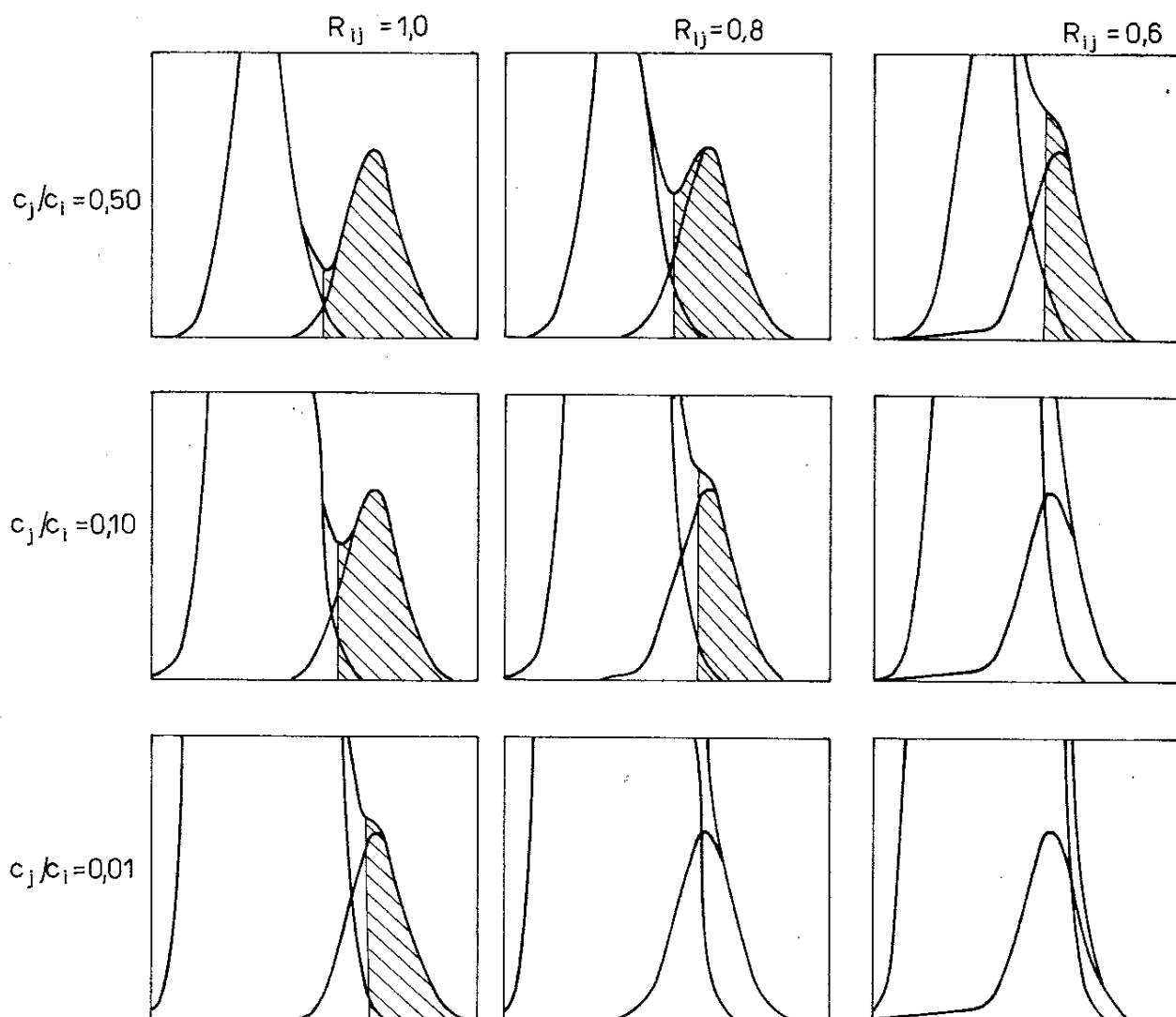
3. *Překrytí píků.* Zdrojem značných chyb je určení správné plochy píků takových složek, které eluují nedostatečně rozlišené. Chyba při stanovení ploch nerozlišených píků závisí na rozlišení ( $R_{ji}$ ), poměru koncentrací ( $c_i/c_j$ ) a tvaru chromatografických píků. Pro symetrické píky je chyba stanovení ploch dvou nerozlišených píků zobrazena na obr. 77. Integrátor měří plochy  $A_i$  a  $A_j$  tak, že je v minimu křivky rozdělí na dvě části. Protože koncentrace píků nejsou stejné, nejsou stejné ani příspěvky ploch  $\delta A_i$  a  $\delta A_j$ .

Z obrázku 77 je zřejmé, že chyba stanovení plochy  $A_j$  vzrůstá s klesajícím poměrem koncentrací ( $c_i/c_j$ ) a se zmenšováním rozlišení ( $R_{ji}$ ) a pro dané podmínky ji lze vypočítat ze vztahu:

$$\delta_j = \frac{\delta A_i - \delta A_j}{A_j} \cdot 100 \quad (6.99)$$

Z obrázku 78 vyplývá, že při nedostatečném rozložení píků je výhodnější použít ke kvantitativní analýze výšek píků než ploch, protože výšky píků závisejí v podstatně menší míře na překrytí píků než plochy.

Z obrázků 79 lze zjistit, že už při poměru  $c_j/c_i = 0,5$  roste velmi významně chyba stanovení plochy  $A_j$  s klesajícím rozlišením a při rozlišení  $R_{ji} = 0,6$  je větší



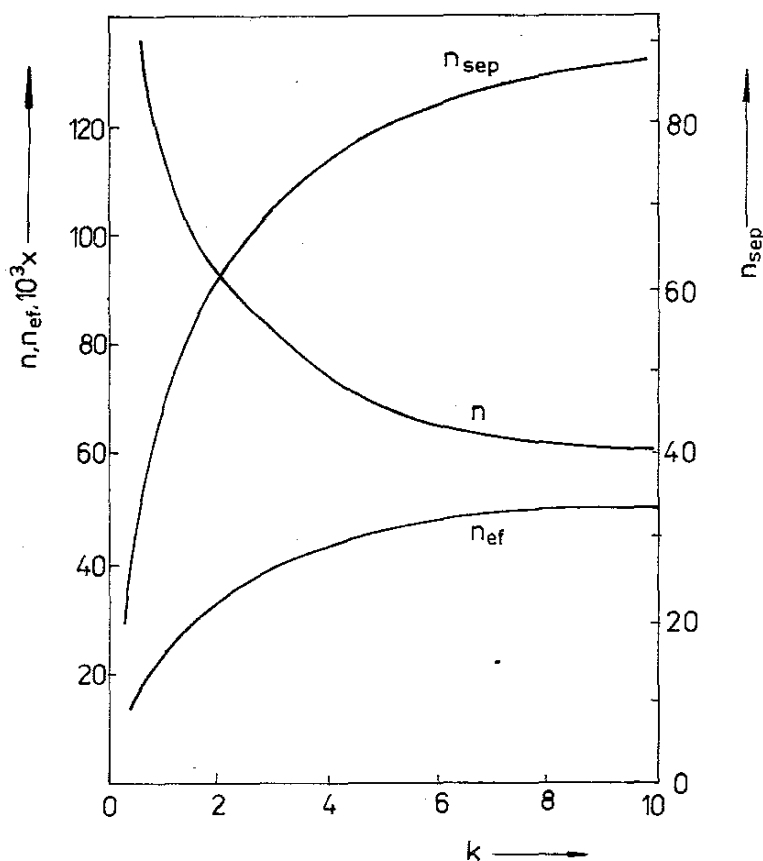
Obr. 79. Závislost určení ploch píků  $i$  a  $j$  integrátorem na rozlišení ( $R_{ij}$ ) a poměru koncentrací ( $c_j/c_i$ )  
Šrafovaná plocha patří složce  $j$  tak, jak ji určil integrátor.

než 20 %, zatímco výšky píků se za těchto podmínek liší jen velmi málo. Z obr. 79 tedy vyplývá, že při stanovení složek, které jsou nedostatečně rozlišeny, je nutno používat místo ploch výšek píků. Je-li součástí vyhodnocovacího zařízení i počítač, je možno správně zjistit plochy píků matematickým rozkladem obvodové křivky píků.

## 6.9 HODNOCENÍ SEPARAČNÍ ÚČINNOSTI CHROMATOGRAFICKÝCH KOLON

### 6.9.1 Izotermická analýza

Separační účinnost chromatografické kolony při izotermické analýze lze mj. charakterizovat počtem teoretických ( $n$ ) a efektivních ( $n_{ef}$ ) pater (viz odd. 3.3.3). V kapilární plynové chromatografii se často analyzují látky, které eluují z chromatografické kolony při velmi malých kapacitních poměrech ( $k$ ). Zjistilo se, že počty



Obr. 80. Závislost počtu teoretických pater ( $n$ ), efektivních pater ( $n_{ef}$ ) a separačního čísla ( $n_{sep}$ ) na kapacitním poměru ( $k$ ) zjištěná analyzováním nerozvětvených alkanů v 200 m dlouhé skleněné kapilární koloně s vnitřním průměrem 0,3 mm smočené fází OV-101 při 60 °C

teoretických a efektivních pater nejsou pro kapilární kolony konstantní, ale významně se mění s kapacitním poměrem (obr. 80). Z obrázku 80 je zřejmé, že pro maximální využití efektivní separační účinnosti chromatografické kolony je třeba upravit pracovní podmínky tak, aby složky vzorku eluovaly s kapacitními poměry většími než 2,5. Z rovnic (3.53) a (3.79) je možno pro rozlišení ( $R_{ji}$ ) odvodit rovnici:

$$R_{ji} = \frac{\sqrt{n_{ef,j}}}{4} \cdot \frac{r_{ji} - 1}{r_{ji}} \quad (6.100)$$



ze které s ohledem na obr. 80 vyplývá, že i rozlišovací schopnost kolony roste s rostoucím kapacitním poměrem analogicky jako efektivní separační účinnost.

Separální účinnost kapilárních kolon se často hodnotí počtem složek, které je možno rozdělit s daným rozlišením ( $R_{ji}$ ) mezi dvěma nerozvětvenými alkany, tzv. separačním číslem ( $n_{sep}$ ). Toto číslo je možno vypočítat ze vzorce:

$$n_{sep} = \frac{t_{R,z+1} - t_{R,z}}{Y_{h/2,z+1} + Y_{h/2,z}} - 1 \quad (6.101)$$

kde  $t_R$  jsou eluční časy,  $Y_{h/2}$  – šířky píků v poloviční výšce,  $z$  – počet uhlíkových atomů v nerozvětvených alkanech.

Z obr. 80 vyplývá, že separační číslo stejně jako počet efektivních pater rostou s rostoucím kapacitním poměrem ( $k$ ).

Účinnost smáčení stěn kapilární kolony stacionární kapalinou se hodnotí kritériem  $CE$ , které je poměrem teoretického a experimentálního výškového ekvivalentu teoretického patra:

$$CE = \left( \frac{H_{teor}}{H_{exp}} \right)_{min} \cdot 100 \quad (6.102)$$

kde se výškové ekvivalenty zjišťují při optimální rychlosti toku nosného plynu.

Separální účinnost kolon v plynové chromatografii je výhodné hodnotit píkovou kapacitou ( $PC$ ), tj. počtem píků, které je možno na chromatogramu rozlišit s daným rozlišením. Píkovou kapacitu lze odvodit z počtu píků ( $PC$ ) eluujících z chromatografické kolony v čase  $t$  z rovnice:

$$d(PC) = \frac{dt}{Y} = \frac{dt}{4\sigma} \quad (6.103)$$

protože pro šířku piku při základně platí, že  $Y = 4\sigma$ . Integrací rovn. (6.103) se získá počet píků eluujících mezi  $t_M$  a  $t_R$ :

$$\int_1^{PC} d PC = \int_{t_M}^{t_R} \frac{dt}{Y} \quad (6.104)$$

Po dosazení za směrodatnou odchylku ( $\sigma$ ) z rovn. (3.52) se získá:

$$PC = 1 + \int_{t_M}^{t_R} \frac{\bar{n}^{1/2} dt}{4 t} \quad (6.105)$$

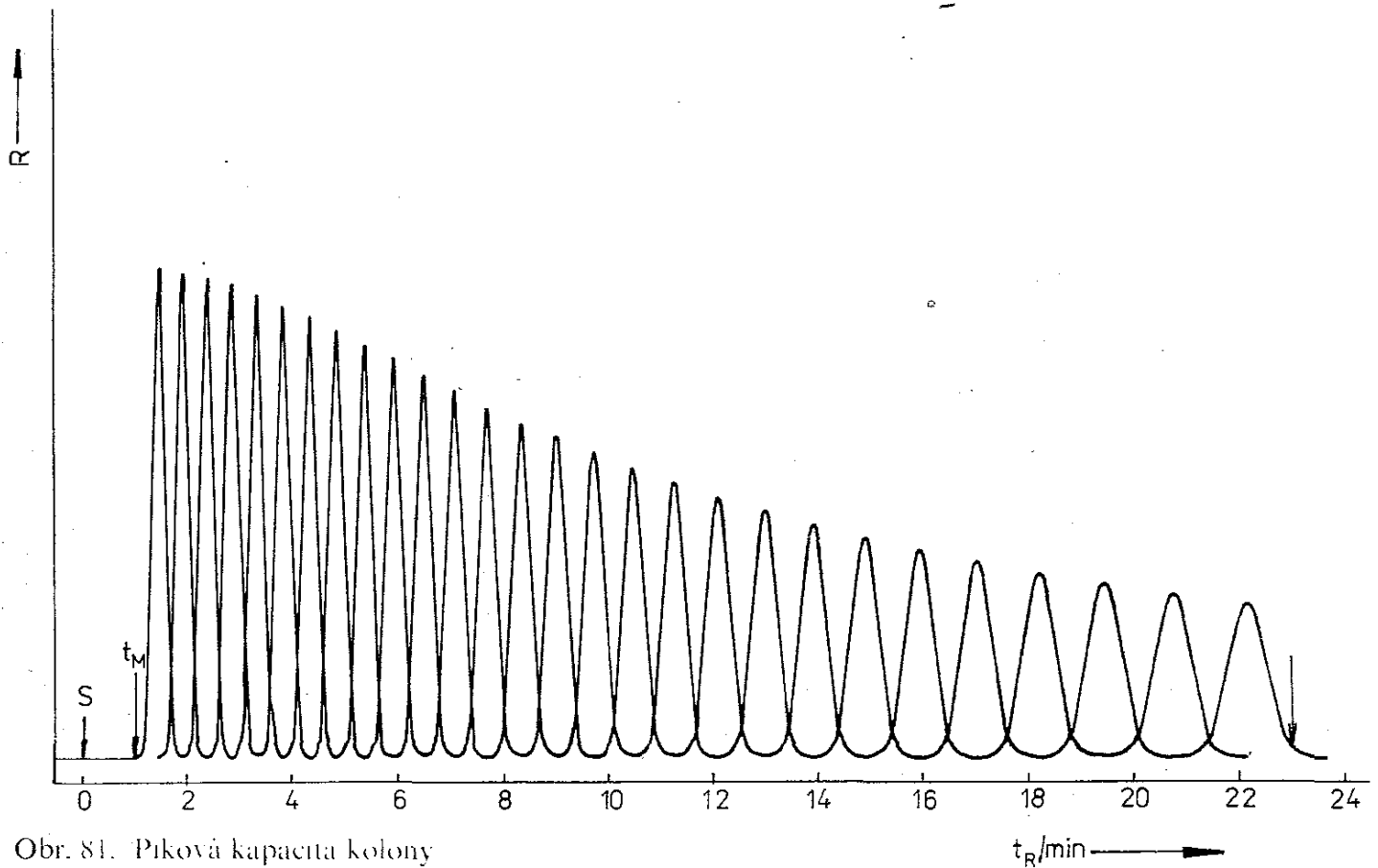
Integrací rovn. (6.105) se získá:

$$PC = 1 + \frac{\bar{n}^{1/2}}{4} \ln \frac{t_R}{t_M} \quad (6.106)$$

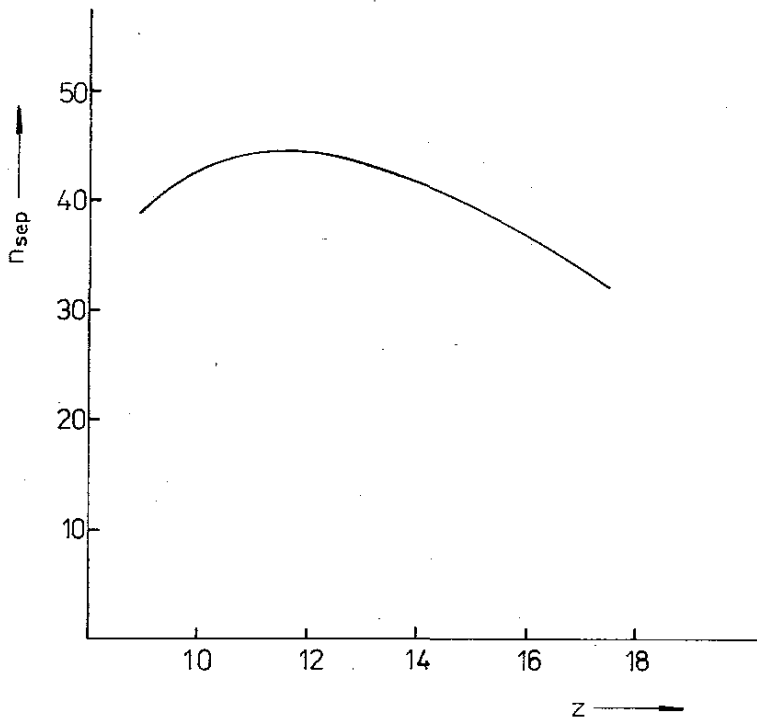
kde  $\bar{n}$  je průměrný počet teoretických pater.

Pro ilustraci je na obr. 81 zakreslena píková kapacita pro kolonu s průměrným počtem teoretických pater  $\bar{n} = 3\,300$  a rozlišením sousedních složek  $R_{ji} = 1,00$ .

Separáčnı́ účinnost kolony je možno dále hodnotit i separáčnı́ rychlostı́, která udává pı́kovou kapacitu za časovou jednotku ( $PC/\Delta t$ ). Z obr. 81 je možno zjistit, že separáčnı́ rychlost s časem klesá.



Obr. 81. Pı́ková kapacita kolony



Obr. 82. Závı́slost separáčnı́ho čı́sla ( $n_{sep}$ ) na počtu uhlı́kových atomů v nerozvětvených alkanech ( $z$ ) při LTPGC

Skleněná kapilární kolona o délce 50 m s vnitřním průměrem 0,3 mm, se silikonovou fází OV-101 ( $d_f = 0,2 \mu\text{m}$ ). Teplotní program od 60 do 280 °C s gradientem  $1,2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Nosný plyn vodík se střední lineární rychlostı́ toku  $\bar{u} = 35 \text{ cm s}^{-1}$  při 60 °C.

## 6.9.2 Analýza s programovanou teplotou

Jestliže se teplota kolony v průběhu analýzy programovaně mění, není možno hodnotit separáčnı́ účinnost počtem teoretických a efektivních pater. Při

LTPGC se separační účinnost nejčastěji hodnotí separačním číslem a píkovou kapacitou. Separační číslo však není ani při LTPGC konstantní a za daných podmínek závisí na počtu uhlíkových atomů v nerozvětvených alkanech (obr. 82).

## 6.10 VYUŽITÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE V PRAXI

Plynová chromatografie se v praxi nejčastěji používá jako analytická metoda ke stanovení složek v plynných, kapalných a tuhých vzorcích. Velká rozlišovací schopnost plynové chromatografie umožňuje analyzovat mnohasložkové vzorky, jejichž složky se jen málo liší fyzikálně chemickými vlastnostmi. Když vzorek nemá při pracovní teplotě dostačující těkavost, je možné použít pyrolýzní plynovou chromatografii nebo nadkritickou parní chromatografii.

Plynová chromatografie se dále používá jako preparativní metoda k izolaci, resp. výrobě čistých látek. Lze ji využít i k měření některých fyzikálně chemických veličin. Značnou výhodou měření těchto veličin je, že není třeba čistých látek.

Plynový chromatograf je relativně jednoduchý přístroj, jehož činnost je možné lehce mechanizovat a automatizovat. Plynové chromatografy zapojené ve výrobním procesu „on-line“ (procesní chromatografy) pracují automaticky a výsledky analýzy slouží k řízení výroby.

### 6.10.1 Analytická plynová chromatografie

Plynová chromatografie se nejčastěji používá ke kvalitativní a kvantitativní analýze plynných, kapalných a tuhých vzorků, obsahujících desítky až stovky složek. Vzorky je možné analyzovat přímo tehdy, když se při pracovní teplotě nerozkládají a vykazují dostačující těkavost (tlaky nasycených par jsou větší než 1 kPa). Je-li třeba analyzovat látky, jejichž těkavost je velmi malá anebo se při teplotě kolony rozkládají, lze složky vzorku analyzovat po jejich přeměně na těkavější a stálejší deriváty (viz odd. 4.4).

Vzorky plynů (permanентní plyny, oxidy, sulfidy a uhlovodíky) se nejčastěji analyzují chromatografií plyn–adsorbent, kapaliny nebo roztoky tuhých látek chromatografií plyn–kapalina.

Izotermická analýza se používá k analýze vzorků, jejichž složky se velmi neliší body varu (do 150 °C). Jednoduché vzorky se analyzují v náplňových kolonách. Mnohasložkové vzorky (desítky až stovky složek) se analyzují v kapilárních kolonách, nejčastěji typu WCOT. Za izotermických podmínek je možno analýzu urychlit programovaným zvyšováním průtoku nosného plynu. Zařízení na programování průtoku nosného plynu je jednoduché a analýzu s programovaným průtokem (FPGC) je výhodné realizovat v kapilárních kolonách, které vykazují relativně malou závislost  $H$  na  $\bar{u}$ , takže změnou rychlosti toku nosného plynu se velmi nezmění separační účinnost kolony. Složitě vzorky se analyzují kombinací programovaného průtoku s programovaně se měnící teplotou. Analýza s programovanou teplotou (TPGC) se nejčastěji používá k analýze vzorků, jejichž složky se velmi odlišují body

varu. Téměř všechny moderní plynové chromatografy umožňují analyzovat vzorky za podmínek TPGC. U většiny vzorků stačí měnit teplotu s lineárním gradientem. Rychlost zvyšování teploty lze volit v rozmezí 0,1 až 50 °C za 1 min. V praxi se nejčastěji používají změny teploty 5 až 10 °C za 1 min pro náplňové kolony a 0,1 až 5 °C za 1 min pro kapilární kolony.

K analýze látek přítomných ve vzorku ve velmi nízkých koncentracích je možno použít:

1. *Přímé metody*, jimiž lze určovat stopové koncentrace přímo. U přímých metod je nutné použít citlivé detektory. Mez stanovení lze snížit mimo jiné zvýšením separační účinnosti (složky budou eluovat v úzkých zónách), optimalizací pracovních podmínek detektoru a využitím počítačů (statistickým zpracováním signálu detektoru se zvýší poměr signálu k šumu).

2. *Obohacovací metody*, u kterých je třeba zpracovávat velké objemy vzorků (ml až litry kapalin a sta až tisíce litrů plynů). Obohacovací metody je výhodné realizovat v předkoloně, v níž se stopové složky zachytí (adsorpcí na vhodném adsorbentu nebo vymrazením). Po zkoncentrování se obohacovací kolona připojí k analytické koloně. Rychlým zvýšením teploty obohacovací kolony se složky vzorku desorbují a nosným plynem se vnesou do analytické kolony. Kromě tohoto postupu se při spojení obohacovací a analytické kolony používají ještě přepínače toku nosného plynu a zpětný výplach (podrobněji v odd. 10.2).

K charakteristice tuhých látek s velmi malým tlakem par je možno využít pyrolýzu a analýzu pyrolýzních produktů plynovou chromatografií. Vzorky se zpravidla pyrolyzují těsně před chromatografickou kolonou a získané chromatogramy (pyrogramy) jsou pro danou látku charakteristické. Standardizací podmínek v pyrolyzátoru je možné dosáhnout značnou reprodukovatelnost rozkladu vzorku a pyrogramy využít k charakteristice vysokomolekulárních látek (např. polymerů) a nízkomolekulárních látek s malým tlakem par. Pyrolýzní plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií se získávají podklady o štěpení organických molekul nízkovroucích látek pro výrobní účely zvláště v petrochemii.

### 6.10.2 Preparativní plynová chromatografie

Preparativní plynová chromatografie se používá k izolaci složek ze vzorku a od analytické plynové chromatografie se liší zvláště tím, že se separují větší množství vzorku a rozdělené složky se vymrazují ve zvláštních nádobách. Preparativní plynovou chromatografií je možno realizovat:

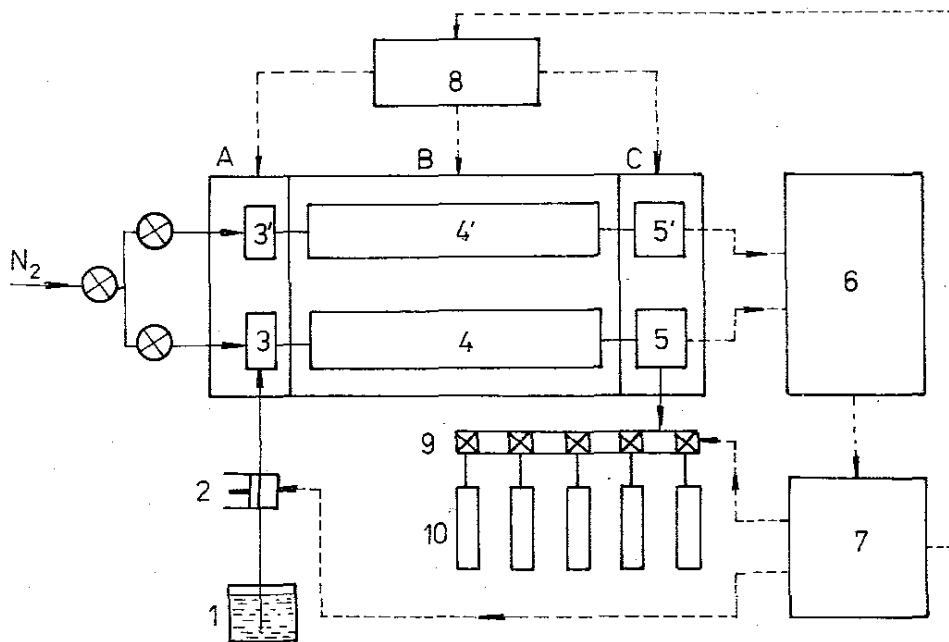
- v mikroměřítku,
- v laboratorním měřítku,
- v průmyslu při výrobě čistých látek.

K separaci velmi malého množství (nanogramů až miligramů) je možno použít analytickou kolonu. K získání větších množství je nutno separaci mnohonásobně opakovat.

Preparativní plynová chromatografie uplatněná v laboratorním měřítku se realizuje v kolonách s vnitřním průměrem 10 až 100 mm, v nichž je možno separovat až desítky gramů vzorku.

K výrobě čistých látek se používají kolony s průměry většími než 100 mm, v kterých je možno separovat gramové až kilogramové vzorky.

K úspěšné aplikaci preparativní plynové chromatografie v laboratorním měřítku je nutno splnit některé základní požadavky. Problémy spojené s využitím preparativní plynové chromatografie při výrobě čistých látek jsou často specifické a jejich popis překračuje rámec tohoto oddílu.



Obr. 83. Blokové schéma preparativního plynového chromatografu  
 1 – zásobník vzorku, 2 – pístové čerpadlo, 3 – dávkovač (vypařovač), 4 – chromatografická kolona, 5 – detektor, 6 – zpracování signálu detektoru a jeho záznam, 7 – programovací jednotka, 8 – regulátor teploty, 9 – ventily pro zachycování frakcí, 10 – vymrazovací nádoby, A – termostat pro dávkovač, B – termostat pro kolonu, C – termostat pro detektor

K izolaci miligramových až gramových množství složek ze vzorku je možno využít analytické plynové chromatografie. K izolaci větších množství vzorku se používají preparativní plynové chromatografy s automatickým provozem. Blokové schéma takového zařízení je na obr. 83. Vzorek se dávkovačem (2) automaticky dávkuje v cyklech do vyhřátého dávkovacího prostoru (vypařovače 3). Páry vzorku jsou nosným plynem vneseny do chromatografické kolony. Složky v efluentu z kolony procházejí nedestrukčním detektorem (5) do vymrazovacích nádob (10). Tok efluentu do vymrazovacích nádob ovládají ventily (9). Při separaci vzorků je možno použít izotermický režim nebo programovaně se měnící teplotu. Celý cyklus analýzy se automaticky opakuje tak dlouho, až se získají potřebná množství složek.

Dávkovací prostory (vypařovače) preparativních plynových chromatografů musí být konstruované z materiálu s dostatečnou tepelnou kapacitou na rychlé vypaření

vzorku tak, aby nedocházelo k zahlcení kolony. Zjistilo se, že objem par vzorku ( $V_F$ ) při teplotě kolony by neměl být větší, než vyplývá ze vzorce:

$$V_F = \frac{V_R}{2\sqrt{n}} \quad (6.107)$$

kde  $V_R$  je eluční objem,  $n$  – počet teoretických pater.

Jako nosný plyn se používá nejčastěji dusík, helium a argon. Nedoporučuje se používat vodík pro velmi velké průtoky.

K separaci vzorků preparativní plynovou chromatografií je potřebná kolona s dostatečným objemem náplně. Objem kolony se nejčastěji zvětšuje rozšířením vnitřního průměru, méně často prodloužením kolony. Při plnění kolon s průměry většími než 10 mm se však mohou vyskytovat problémy s nerovnoměrným naplněním, a proto se tyto kolony plní jinak než analytické (např. fluidační technikou) nebo se na přípravu kolon používají trubice se zvláštní geometrií (kolony s clonami na vyrovnání toku mobilní fáze apod.).

Jako chromatografickou náplň je možno použít všechny náplně, které se používají v analytické plynové chromatografii. Nosič stacionární kapaliny má být dostatečně tvrdý, aby se nedrobnil. K preparativním účelům se používají náplně s vyššími obsahy stacionární kapaliny než při analytických aplikacích, které umožňují dávkování většího množství vzorku. Výškový ekvivalent teoretického patra závisí na experimentálních podmínkách podle rovnice:

$$H = A + \frac{B_0}{\bar{u}} + C_1\bar{u} + C_2\bar{u}^2 + H_p \quad (6.108)$$

kde příspěvek  $H_p$  se začíná uplatňovat v kolonách s průměry většími než 5 mm a v kolonách s průměry většími než 50 mm je rozhodujícím činitelem. Předpokládá se, že hlavní příčinou rozmývání zóny v kolonách s většími průměry je profil toku nosného plynu, který je v těchto kolonách neregulární, a navíc se mění podél kolony. Příspěvek  $H_p$  můžeme vypočítat z rovnice:

$$H_p = \frac{0,5 kd^2\bar{u}}{\gamma D_g + \alpha d_p\bar{u}} \quad (6.109)$$

kde  $k$  je faktor charakterizující rychlostní profil toku nosného plynu,  $d$  – vnitřní průměr kolony,  $\alpha$  – konstanta charakterizující geometrii náplně. Ostatní symboly v rovn. (6.108) a (6.109) jsou shodné se symboly v rovn. (6.69) a (6.71).

Při preparativní plynové chromatografii se však často získávají nesymetrické píky i v případech, kdy není kolona zahlcena velkým vzorkem. Příčinou této nesymetrie může být radiální teplotní gradient v koloně s velkými průměry a tzv. entalpičké předávkování, které souvisí se sorpčně-desorpčním teplem v zóně, které se nestačí termostatovat, protože náplň kolony je slabým vodičem tepla. Symetričnost zón můžeme zvětšit zvýšením pracovní teploty. Limitujícím faktorem zvyšování teploty je však znečišťování složek těkáním stacionární kapaliny. Mění-li se programově teplota, je nutné ji zvyšovat pomalu.

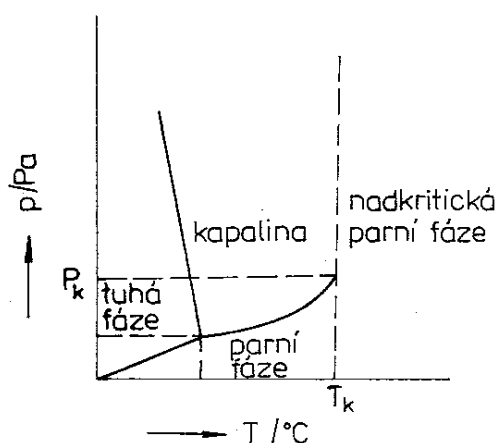
K detekci složek eluujících z chromatografické kolony se v preparativní plynové chromatografii nejčastěji používá nedestrukční tepelně vodivostní detektor. Použije-li se plamenový ionizační detektor, je třeba využít k detekci jen velmi malou část effluentu z kolony (např. 0,1 %) a hlavní část vpustit do vymrazovacího systému. K hlavním úkolům vymrazovacího systému patří:

- kondenzace složky z plynné fáze,
- ochrana rozdělených složek před znečištěním.

K zachycování složek se používají různé typy nádobek. Tok nosného plynu do jednotlivých nádobek se ovládá automaticky pneumatickými nebo magnetickými ventily.

### 6.10.3 Nadkritická parní chromatografie (SFC)

Nadkritická parní chromatografie, pro kterou se používá též název superkritická fluidní chromatografie (SFC<sup>1</sup>), je metoda, jež k separaci látek využívá jako mobilní fázi páru nad kritickou teplotou. Stacionární fází může být kapalina nebo



Obr. 84. Fázový diagram CO<sub>2</sub>

Tabulka 6.16. Průměrné fyzikální vlastnosti kapalin a par při normálních podmínkách a par při nadkritických podmínkách

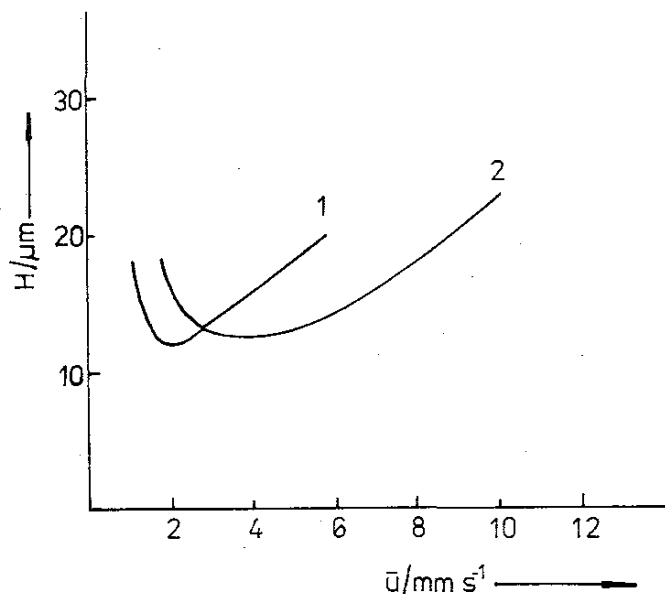
Konstanta	Pára	Nadkritická pára	Kapalina
hustota $\rho/\text{g cm}^{-3}$	$10^{-3}$	0,3	1
difúzní koeficient $D/\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	$10^{-1}$	$10^{-3}$	$10^{-5}$
dynamická viskozita $\eta/\text{Pa s}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$ až $10^{-2}$	1

adsorbent. Při teplotách vyšších než kritická teplota nelze páry látky zkapalnit při žádném tlaku (viz obr. 84). Při teplotách a tlacích, které jsou vyšší než kritické, vykazuje parní fáze vlastnosti, které se liší od vlastností par a kapalin za normálních podmínek (tab. 6.16). Změnou tlaku par při teplotách vyšších než teplota kritická se mění v mobilní fázi rozpustnost solutu, jeho difúzní koeficienty, viskozita a hustota:

<sup>1</sup>) SFC – Supercritical Fluid Chromatography

1. Rozpustnost solutu v nadkritické parní fázi roste s tlakem, což umožňuje při SFC tlakem měnit selektivitu separačního systému. Tím se SFC liší od GC a LC.

2. Difúzní koeficienty solutu jsou větší v nadkritické parní fázi než v kapalných roztocích. Minimum závislosti  $H$  na  $\bar{u}$  je proto při HPLC nižší, ale u SFC je možno použít podstatně větší rychlosti toku mobilní fáze, a to bez podstatné ztráty separační účinnosti (obr. 85).



Obr. 85. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra ( $H$ ) na střední lineární rychlosti toku ( $\bar{u}$ )  $\text{CO}_2$  při SFC se směsnou mobilní fází (acetonitril + voda) při HPLC v koloně s chemicky vázanou stacionární fází (oktadecylsilan) zjištěná pro pyren při  $40\text{ }^\circ\text{C}$   
1 – HPLC, 2 – SFC

3. Viskozita nadkritické parní fáze je podstatně menší než viskozita kapalin, což umožňuje použít při SFC podstatně nižší tlaky nebo při stejných vstupních tlacích podstatně delší kolony než při HPLC.

4. Hustotu nadkritické parní fáze je možno měnit tlakem, což umožňuje měnit všechny vlastnosti mobilní fáze, které závisejí na tlaku. Rozdíly mezi SFC, LC a GC lze zjistit z tab. 6.17, ve které jsou uvedeny hlavní parametry, jimiž lze měnit selektivitu separačního systému. Jak v LC, tak v SFC je možno selektivitu separačního systému měnit i mobilní fází. Na rozdíl od LC je v SFC podstatně menší výběr mobilních fází. V tab. 6.18 jsou uvedeny body varu a některé kritické veličiny látek, kterých by bylo možné využít jako mobilní fáze v SFC. Permanentní plyny s velmi nízkými kritickými

Tabulka 6.17. Hlavní parametry, které ovlivňují selektivitu při GC, LC a SFC

Parametr	GC	LC	SFC
teplota separace	++	+	++
stacionární fáze	++	++	++
mobilní fáze	-	++	+
tlakový spád v koloně	-	-	++

++ – parametr významně ovlivňuje selektivitu  
+ – parametr ovlivňuje selektivitu  
- – parametr neovlivňuje selektivitu



Tabulka 6.18. Body varu ( $T_v$ ), kritické teploty ( $T_k$ ), kritické tlaky ( $p_k$ ) a kritické hustoty ( $\rho_k$ ) některých látek, které lze použít jako mobilní fáze v SFC

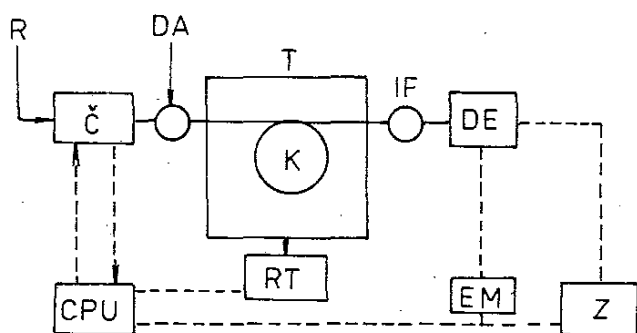
Látka	$T_v$ °C	$T_k$ °C	$p_k$ MPa	$\rho_k$ g cm <sup>-3</sup>
dusík	-195,8	-147,1	3,39	0,311
argon	-185,9	-122,4	4,86	0,531
ethan	-88,5	32,3	4,88	0,203
trifluormethan	-82,2	25,9	4,69	0,516
oxid uhličitý	-78,5	31,0	7,39	0,468
amoniak	-33,4	132,4	11,30	0,235
butan	-0,5	152,0	3,80	0,228
diethylether	34,6	193,6	3,64	0,265
methanol	64,7	239,4	8,10	0,272
tetrahydrofuran	65,5	267,0	5,19	0,322
hexan	68,8	234,2	2,97	0,233
cyklohexan	80,8	280,3	4,07	0,273
isopropylalkohol	82,3	235,2	4,76	0,273

teplotami se téměř nepoužívají. Velmi dobrými mobilními fázemi v SFC jsou nízko-vroucí kapaliny, z nichž se nejčastěji používá CO<sub>2</sub>.

Zvýšením tlaku v koloně roste hustota mobilní fáze, čímž se zvýší rozpustnost solutu v mobilní fázi. S rostoucím tlakem klesá retence solutu v koloně. Tak např. když se změní hustota CO<sub>2</sub> za podmínek SFC z hodnoty 0,1 na 0,8 g cm<sup>-3</sup>, kapacitní poměr solutu se změní asi 10<sup>4</sup>-krát. Z tohoto důvodu je programování tlaku významné při optimalizaci separace vzorků metodou SFC. S rostoucím tlakem však nestoupá jen hustota mobilní fáze, ale i její relativní permitivita.

Výběr mobilní fáze při SFC souvisí mimo jiné i s rozpustností organických látek. Páry nad kritickou teplotou jsou vhodným rozpouštědlem lipofilních látek. Při separaci homologů metodou SFC s CO<sub>2</sub> jako mobilní fází eluují tyto homology z kolony s rostoucím bodem varu. Na rozdíl od plynové chromatografie se zvýšením teploty chromatografické kolony při SFC zvýší retence solutu v koloně.

Blokové schéma přístroje pro kapilární SFC je na obr. 86. K hlavním částem chromatografu patří vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, termostat a detektor. Pro kapilární SFC se vyžaduje čerpadlo s lineárním posunem pístu, která dodává mobilní fázi bez pulsů, protože přes kapiláru proudí velmi malý tok mobilní fáze. Pístová, resp. membránová čerpadla, která dodávají mobilní fázi v cyklech,



Obr. 86. Blokové schéma přístroje na kapilární SFC

R – rozpouštědlo, Č – vysokotlaké čerpadlo, DA – dávkování vzorku, T – termostat, K – kolona, IF – mezičlánek, DE – detektor, CPU – mikroprocesor, RT – regulátor teploty, EM – elektromotor, Z – zapisovač

lze použít v SFC s plněnými kolonami, kde jsou podstatně větší průtoky. Při regulaci a programování vstupního tlaku nebo hustoty mobilní fáze se čerpadlo řídí mikroprocesorem. Tlak se velmi často programuje v rozsahu 5 až 35 MPa. Programovaného zvyšování hustoty mobilní fáze lze dosáhnout zvyšováním vstupního tlaku, teploty a jejich kombinací.

Vzorek se dávkuje do proudu mobilní fáze dávkovacím kohoutem. V případě kapilární SFC se používají děliče vzorku, pracující při laboratorní teplotě. Příprava vzorku k analýze zpravidla sestává z rozpuštění vzorku ve vhodném rozpouštědle, aby se mohl v roztoku dávkovat do dávkovacího kohoutu. Mobilní fáze vnese vzorek do chromatografické kolony, která je v termostatu.

Kolony pro SFC mohou být plněné (náplňové) a kapilární. Do plněných kolon se mohou používat náplně z plynové a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Aby se stacionární kapalina nevymývala z kolony, používají se náplně s chemicky vázanými fázemi. Průměr zrn náplně je zpravidla menší než 0,1 mm. Tlakový spád v kolonách plněných velmi jemně zrnitými náplněmi je však značně velký, což má za následek velký gradient hustoty mobilní fáze podél kolony. V takových případech je nutno pracovat s relativně vysokými tlaky v koloně, při kterých je hustota parní fáze větší a tlakový spád v koloně ji neovlivňuje.

Velkou výhodou kapilárních kolon je jejich malý hydrodynamický odpor, což umožňuje používat velmi dlouhé kolony (do 60 m) s relativně malým tlakovým spádem. Kapilární kolony pro SFC jsou zpravidla z taveného křemene s vnitřním průměrem 50 až 100  $\mu\text{m}$ . Na vnitřních stěnách kapilár je zakotvena stacionární kapalina (nejčastěji chemicky vázaný prostorově zesíťovaný silikonový elastomer). Kolona je termostatována při teplotě, kterou vyžaduje mobilní fáze. Rozdělené složky se detegují v detektorech. Jestliže detektor pracuje při atmosférickém tlaku, je mezi kolonou a detektorem mezičlánek (interface), jehož úlohou je redukovat výstupní tlak z kolony na tlak atmosférický. Může-li detektor pracovat při vyšších tlacích, reduktor tlaku se umísťuje až za detektor. V SFC je možno využít detektory jak z plynové chromatografie (plamenově ionizační, termoionizační, infračervený spektrometr s Fourierovou transformací a hmotnostní spektrometr – MS), tak i z vysokoúčinné kapalinové chromatografie (ultrafialový a fluorimetrický).

Jak jsme uvedli výše, SFC má některé výhody proti GC a HPLC. SFC není omezena těkavostí solutu, jak je tomu v GC, lze jí analyzovat termolabilní látky, protože vhodným výběrem mobilní fáze je možno analyzovat vzorky při relativně nízkých teplotách. Při SFC jsou menší problémy s adsorpcí velmi polárních látek. Na rozdíl od HPLC je možno při SFC bez potíží použít FID, TID, MS, spektrometr FTIR. Kapilární SFC navíc šetří rozpouštědla.

#### 6.10.4 Fyzikálně chemické aplikace plynové chromatografie

Vztahy mezi parametry charakterizujícími chromatografickou zónu (eluční charakteristiky a veličiny ovlivňující šířku zóny) a fyzikálně chemickými údaji solutů a stacionárních fází jsou základem fyzikálně chemických aplikací plynové

chromatografie. Protože plynová chromatografie je dynamická metoda, má v porovnání se statickými metodami měření fyzikálně chemických údajů více kladů a nedostatků. Ke kladům měření plynovou chromatografií patří:

- čas k měření, který je nepoměrně kratší než u statických metod,
- jednoduchost měření,
- možnost měřit konstanty se znečištěnými soluty,
- možnost zjištění veličin pro více látek jedním měřením,
- zjištění konstant v nekonečně zředěných roztocích extrapolováním závislosti elučních charakteristik na dávkovaném množství pro nulový vzorek.

K nevýhodám měření fyzikálně chemických veličin plynovou chromatografií patří:

- problémy se získáním chemicky definovaných stacionárních fází, kterými jsou nejčastěji polymery nebo polykondenzáty se značně rozdílnými molekulovými hmotnostmi,
- těžkosti s měřením elučních charakteristik za definovaných teplot a tlaků,
- omezení ve výběru solutů vlivem těkavosti.

Porovnáním fyzikálně chemických veličin naměřených za statických podmínek a plynovou chromatografií za definovaných podmínek se však v převážné většině případů zjistila velmi dobrá shoda. Měření fyzikálně chemických veličin plynovou chromatografií jsou založena na mechanismu sorpčních procesů, faktorech rozmyvajících chromatografickou zónu, tvorbě komplexních sloučenin a neideálnosti plynné fáze.

Distribuční konstantu ( $K_D$ ) můžeme zjistit plynovou chromatografií z rovn. (6.53):

$$K_D = \frac{V_g \rho_1 T}{273,16}$$

Z tabulky 6.19 je zřejmá velmi dobrá shoda distribučních konstant naměřených staticky a plynovou chromatografií pro některé uhlovodíky na skvalanové kapalinové fázi při 30 °C.

Aktivitní koeficient složky v roztoku lze vypočítat z rovn. (6.52) a (6.53):

$$\gamma_i = \frac{R \cdot 273,16}{V_g p_i^\circ M_1}$$

Tabulka 6.19. Distribuční koeficienty ( $K_D$ ) některých uhlovodíků v systému dusík – skvalan při teplotě 30 °C naměřené staticky a plynovou chromatografií

Uhlovodík	$K_D$ (GLC)	$K_D$ (stat.)
pentan	98,8	98,1
hexan	304,9	305,5
heptan	926,7	927,0
benzen	433,4	434,8

Protože aktivitní koeficienty závisí na koncentraci složek v kapalně fázi, je výhodné extrapolovat jejich hodnoty na nulovém vzorku a udávat je pro nekonečně zředěné roztoky ( $\gamma_i^\circ$ ).

Je-li třeba, aby byly výsledky měření aktivitních koeficientů zatíženy relativními chybami menšími než  $\pm 5\%$ , musíme do výpočtu zahrnout korekci na neideální chování parní fáze. Pro výpočet korigovaných aktivitních koeficientů ( $\gamma_i^\circ$ ) lze použít více empirických rovnic. Jednou z nich je rovnice:

$$\ln \gamma_{f,i}^\circ = \ln \gamma_i^\circ - \frac{p_i^\circ}{RT} (B_{ii}^* - V_i^\circ) + \frac{p_o j_3^4}{RT} (2B_{ij}^* - V_i^\circ) \quad (6.110)$$

kde  $\gamma_f^\circ$  je aktivitní koeficient zohledňující neideální chování plynné fáze,  $p_i^\circ$  – tlak nasycených par solutu při teplotě  $T$ ,  $B_{ii}^*$  – druhý viriální koeficient solutu,  $B_{ij}^*$  – druhý směsný viriální koeficient solut–nosný plyn,  $V_i^\circ$  – molární objem čistého solutu při teplotě  $T$ ,  $p_o j_3^4$  – střední tlak plynu v koloně, který je možno vypočítat z rovnice:

$$\bar{p} = p_o \frac{4(p_v/p_o)^3 - 1}{3(p_v/p_o)^4 - 1} \quad (6.111)$$

kde  $p_v$  je vstupní tlak plynu,  $p_o$  – jeho tlak na výstupu.

Tabulka 6.20. Aktivitní koeficienty některých uhlovodíků v dinonylftalátu zjištěné extrapolováním na nulovém vzorku ( $\gamma_i^\circ$ , GLC) a naměřené staticky ( $\gamma_i^\circ$ , stat.)

Uhlovodík	Teplota °C	$\gamma_i^\circ$ (GLC)	$\gamma_i^\circ$ (stat.)
hexan	25	1,122	1,120
benzen	30	0,564	0,559
cyklohexan	30	0,942	0,931
heptan	30	1,311	1,313

Viriální koeficienty  $B_{ii}^*$  a  $B_{ij}^*$  je možno zjistit staticky nebo z plynově chromatografických měření podle několika empirických vzorců. Ze směrnice závislosti  $\log V_N$  na středním tlaku v koloně lze vypočítat viriální koeficient  $B_{ij}^*$ :

$$\ln V_N = \ln V_N^\circ + \frac{(2B_{ij}^* - V_i^\circ)}{RT} p_o j_3^4 \quad (6.112)$$

Z úseku na ose  $y$  je možno vypočítat koeficient  $B_{ii}^*$  z empirické rovnice:

$$\ln V_N^\circ = \frac{n_1 RT}{\gamma_i^\circ p_i^\circ} - \frac{(B_{ii}^* - V_i^\circ) p_i^\circ}{RT} \quad (6.113)$$

kde  $n_1$  je látkové množství stacionární kapaliny v chromatografické koloně.

Z tab. 6.20 je zřejmá velmi dobrá shoda aktivitních koeficientů ( $\gamma_i^\circ$ ) zjištěných plynovou chromatografií a staticky.

Pro dodatkové termodynamické funkce platí s ohledem na rovn. (6.56) a (6.57) a volbu standardního stavu pro složku v stacionární kapalině (viz odd. 6.1.4) rovnice:

$$\Delta G_{E,i} = \Delta \mathcal{H}_E - T\Delta \mathcal{S}_E = RT \ln \gamma_i^\circ \quad (6.114)$$

ze které je možné derivací podle teploty zjistit molární směšovací entalpii solutu ve stacionární kapalině ( $\Delta \mathcal{H}_E$ ):

$$\frac{d \ln \gamma_i^\circ}{d(1/T)} = \frac{\Delta \mathcal{H}_E}{R} \quad (6.115)$$

Molární výparnou entalpii solutu z nekonečně zředěného roztoku ( $\Delta \mathcal{H}_s$ ) lze vypočítat z rovn. (6.61):

$$\frac{d \ln V_g}{d(1/T)} = \frac{\Delta \mathcal{H}_s}{R}$$

Molární výparnou entalpii čistého solutu ( $\Delta \mathcal{H}_v$ ) je možno vypočítat z rovn. (6.60):

$$\Delta \mathcal{H}_v = \Delta \mathcal{H}_s + \Delta \mathcal{H}_E$$

Kombinací rovn. (6.60), (6.61) a (6.115) se získá pro  $\Delta \mathcal{H}_v$  rovnice:

$$\Delta \mathcal{H}_v = R \frac{d \ln V_g}{d(1/T)} + R \frac{d \ln \gamma_i^\circ}{d(1/T)} \quad (6.116)$$

Hodnoty  $\Delta \mathcal{H}_v$  vypočítané z rovn. (6.116) jsou ve velmi dobré shodě s hodnotami naměřenými jinými technikami.

Plynovou chromatografií lze využít i k měření některých dalších fyzikálně chemických veličin solutu, které nevyplývají z interakcí v chromatografické koloně, jako jsou body varu a tlaky nasycených par. Tyto veličiny se zjišťují nejčastěji interpolací ze závislostí elučních charakteristik na bodu varu nebo tlaku nasycených par referenčních látek.

Tabulka 6.21. Difúzní koeficienty ( $D_g^\circ$ ) některých plynů v dusíku při atmosférickém tlaku (101 325 Pa) a 51 °C

Plyn	$D_g^\circ$ z rovn. (6.117) cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	$D_g^\circ$ – publikované údaje cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub>	0,892 ± 0,016	0,909
O <sub>2</sub>	0,263 ± 0,003	0,244
CO <sub>2</sub>	0,188 ± 0,003	0,194

Když se ve stacionární kapalině rozpustí látka, se kterou solut vytváří komplexy, je možno plynovou chromatografií měřit konstanty stability těchto komplexů. K získání adsorpční izotermy lze v GSC využít jak frontální, tak i eluční techniku. Ze šířky chromatografické zóny lze zjistit difúzní koeficient solutu v plynné fázi.

Výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) solutu v prázdné kapiláře ( $k = 0$ ) je možno zjistit z Golayovy rovnice [rovn. (6.75)]:

$$H = \frac{2 D_g^\circ}{\bar{u}} j + \frac{r_c^2 \bar{u}}{24 D_g^\circ j} \quad (6.117)$$

ze které lze vypočítat difúzní koeficient  $D_g^\circ$ .

Porovnáním difúzních koeficientů vypočítaných z rovn. (6.117) s publikovanými údaji se zjistila dobrá shoda (tab. 6.21).

## 6.11 OPTIMALIZACE PRACOVNÍCH PODMÍNEK V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII

Jedním z cílů plynově chromatografické analýzy je rozdělení složek vzorku v co nejkratším čase. Na splnění tohoto cíle se při separaci hledají optimální pracovní podmínky. Separaci složek v plynové chromatografii ovlivňuje zvláště:

1. teplota separace (izotermická separace, separace při programované teplotě a jejich kombinace),
2. selektivita stacionární fáze (při chromatografii plyn–kapalina zvláště selektivita stacionární kapaliny).
3. separační účinnost chromatografické kolony (počet teoretických pater, počet efektivních pater, separační číslo, píková kapacita apod.).

Kromě těchto hlavních faktorů může separaci ovlivňovat i druh nosného plynu, nosič stacionární kapaliny, teplota dávkovače, konstrukce chromatografu (dávkovač, spojky, detektor) a některé další faktory. Při optimalizaci hlavních faktorů se tyto vedlejší faktory zpravidla nemění. Separovat složky vzorku znamená rozeznat (rozlišit) jimi poskytované signály. Jak je zřejmé z kap. 3, je výhodné použít jako míru rozlišení dvojice solutů rozlišení [ $R_{ji}$  v rovn. (3.73) a (3.79)], resp. faktor separace píků [ $P$  v rovn. (5.3)]. Míra rozlišení je základem kritérií, kterými se hodnotí výběr nejvhodnějších (optimálních) pracovních podmínek, a to jak při separaci kritického páru ve vzorku, tak i při separaci vzorku, který obsahuje více kritických párů. Výběr optimalizačního kritéria proto rozhoduje o úspěchu optimalizace.

Protože v míře rozlišení nejsou zahrnuty některé z faktorů, které mohou ovlivnit výsledek analýzy (čas analýzy, koncentrace solutů a jejich poměr ve vzorku), zahrnují se do optimalizačních kritérií i složky, které nevyplývají z míry rozlišení [viz např. rovn. (5.5) a (5.6) v kap. 5].

Při optimalizaci pracovních podmínek v plynové chromatografii se nejčastěji používá jako optimalizačního kritéria funkce chromatografické odezvy [CRF v rovn. (5.4)]. Vztah mezi hodnotou CRF a pracovními podmínkami se zjišťuje empiricky postupy uvedenými v odd. 5.3.3. Koeficienty v rovn. (5.8) se zjišťují regresní analýzou z měření, při kterých se měnily pracovní podmínky, např. simplexovou sekvenční analýzou, čímž se zamezí hledání lokálních optim.

Optimální parametry se určí z minima rovn. (5.8). Rovnice se tedy použije na hledání optimálních pracovních podmínek v oblasti globálního optima, kde simplexová

vý optimalizační postup může selhat (geometrický obrazec se překlápí v kruhu) nebo je optimalizační postup při zkrácení ramen simplexového obrazce velmi zdlouhavý. Kombinace uvedených metod se použila např. k optimalizaci počáteční teploty ( $T_0$ ) a rychlosti zvyšování teploty ( $r$ ) při separaci vzorku s teplotním programem.

Protože simplexový postup hledání optimálních pracovních podmínek může být zdlouhavý, jsou snahy využít k optimalizaci deterministické metody (odd. 5.3.4), při kterých se k hledání optimálních parametrů využívají zvláště závislosti elučních údajů na pracovních podmínkách, jež je možno odvodit z chromatografické teorie. Je nutno poznamenat, že při optimalizaci pracovních podmínek těmito metodami se předpokládá konstantní separační účinnost chromatografického systému, což však při většině optimalizačních postupů zpravidla neplatí. Tak např. jednou z rovnic, které se často používají k optimalizaci pracovních podmínek při separaci kritického páru solutů, je rovnice:

$$R_{ji} = \frac{\sqrt{n_j} k_j r_{ji} - 1}{4(1 + k_j r_{ji})}$$

kde  $R_{ji}$  je rozlišení,  $n_j$  – počet teoretických pater,  $k_j$  – kapacitní faktor,  $r_{ji}$  – eluční poměr,  $j$  – symbol pro později eluující složku.

Z kap. 3 vyplývá, že při odvození této rovnice se předpokládala konstantní separační účinnost kolony, tj., že  $t_R/\sigma = \text{konst}$ , což při optimalizaci podmínek v GLC neplatí, protože separační účinnost kolony v GLC závisí jak na kapacitním poměru, tak i na polaritě stacionární kapaliny.

Při hledání vhodné optimalizační procedury se zpravidla vychází z cíle analýzy. Když je cílem kvantitativní analýza složek a při analýze se použije integrátor, je třeba zjistit podmínky, při kterých integrátor složky, jejichž obsah hledáme, rozliší a poskytne jejich plochy. Protože je velmi obtížné matematicky popsat závislost odezvy integrátoru pro neúplně rozlišené soluty na optimalizovaných parametrech, využívá se k optimalizaci pracovních podmínek empirický přístup, např. metoda pokusu a omylu. Touto metodou se zjistí optimální teplotní režim analýzy vícesložkového vzorku kapilární plynovou chromatografií. Výsledkem postupu je takový teplotní režim, při kterém integrátor ve vzorku rozliší za nejkratší čas nejvíce složek (vícenásobná kombinace izotermických úseků s úseky, při nichž se zvyšuje teplota s lineárním gradientem). Metoda pokusu a omylu je sice zdlouhavá (vyžaduje mnohonásobné opakování analýzy); pro rutinní analýzu je však výhodná, protože optimalizační kritérium (maximální počet složek rozlišených integrátorem) nejvíce vyhovuje všeobecným požadavkům rutinní analýzy.

## 7.1 ÚVOD, ROZDĚLENÍ METOD KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

Pro všechny metody kapalinové chromatografie platí, že mobilní fázi tvoří kapalina. Stacionární fáze představuje sorbent, který může být umístěn plošně (ve vrstvě) anebo v uzavřené trubici (koloně, sloupci). Z tohoto hlediska se také vyvinuly i názvy jednotlivých metod kapalinové chromatografie. V plošném uspořádání to jsou metody *papírové* a *tenkovrstvé chromatografie*, v kolonové chromatografii mluvíme o dnes již *klasické sloupcové chromatografii*, využívané převážně k preparativním účelům, k čištění a izolaci látek, a o *vysokoúčinné kapalinové chromatografii* (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), k jejímuž rozvoji došlo v posledních letech.

Jestliže lze plynovou chromatografií s ohledem na těkavost a tepelnou stálost analyzovat zhruba 20 % dnes známých sloučenin, připadá na kapalinovou chromatografii celých 80 % všech ostatních sloučenin převážně organického charakteru. V podmínkách iontové kapalinové chromatografie se analyzují i velmi komplikované směsi anorganických kationtu a aniontu i s ionty organickými.

Volba techniky kapalinové chromatografie k separaci daného vzorku vyplývá z jeho charakteru a z požadavků na vlastní analýzu ať již kvalitativní (identifikaci složek), nebo kvantitativní.

Pro rychlé orientační nebo pro velkosériové analýzy se použije některá z metod plošného uspořádání, např. vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie – HPTLC, která mj. vyniká vysokou produktivitou práce; vždyť na jedné vrstvě lze chromatografovat až 20 vzorků najednou. Pro účely mikropreparační, kdy požadujeme čistou substanci v miligramových či gramových množstvích, využijeme klasickou sloupcovou chromatografii. Pro výzkumné účely a pro přesnou kvantitativní analýzu, kdy lze metodu plně automatizovat včetně vyhodnocení výsledků, se běžně používá vysokoúčinná kapalinová kolonová chromatografie (HPLC). Tyto metody mají své modifikace, založené na použité stacionární či mobilní fázi charakteristických vlastností, které umožňují separaci na základě zvoleného mechanismu. Pak mluvíme o adsorpční, chemisorpční, gelové, iontové a afinitní chromatografii nebo o chirálních fázích schopných separovat optické izomery.

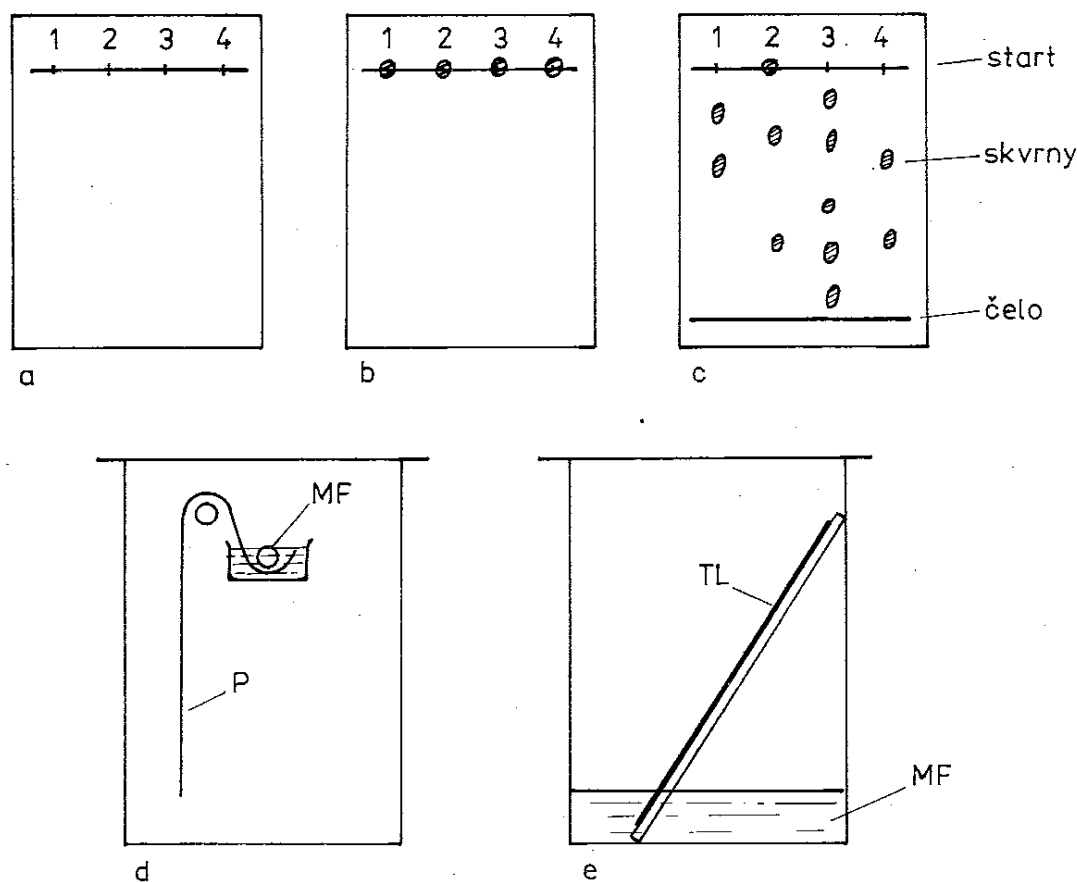


## 7.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE V PLOŠNÉM USPOŘÁDÁNÍ

Technika kapalinové chromatografie v plošném uspořádání spočívá v tom, že sorbent má podobu tenké vrstvy. Při papírové chromatografii to je vlastní chromatografický papír, při tenkovrstvé chromatografii je sorbent rozprostřen ve vrstvě různé tloušťky, umístěné na tuhé podložce.

Papírová chromatografie představuje jednu z nejstarších chromatografických technik využívajících k separaci rozdělovacího mechanismu. Na svém začátku ve čtyřicátých letech dala základ velkému rozmachu biochemie. Byly to především práce z oblasti analýzy aminokyselin a peptidů, které umožnily budoucí objevy v biologii a biochemii.

Princip papírové a tenkovrstvé chromatografie spočívá v tom, že při průchodu rozpouštědla papírem či vrstvou sorbentu dochází k separaci látek. V praxi se postupuje tak, že se na chromatografický papír či tenkou vrstvu vyznačí ve vhodné vzdálenosti od okraje startovní linie s body pro nanesení analyzovaných vzorků. Na označená místa se nanesou roztoky příslušných vzorků a po odpaření rozpouštědla se chromatogram umístí do chromatografické komory, jež je nasycena párami stacionární i mobilní fáze. Stacionární fáze je zafixována v papíru či ve vrstvě, mobilní



Obr. 87. Schéma uspořádání při papírové a tenkovrstvé chromatografii  
a – chromatografický papír (vrstva) s vyznačeným startem, b – chromatografický papír (vrstva) s nanesenými vzorky, c – vyvinutý a zdetegovaný chromatogram s viditelnými skvrnami rozdělených látek, d – sestupné vyvíjení, e – vzestupné vyvíjení, MF – mobilní fáze, P – chromatografický papír, TL – tenká vrstva sorbentu

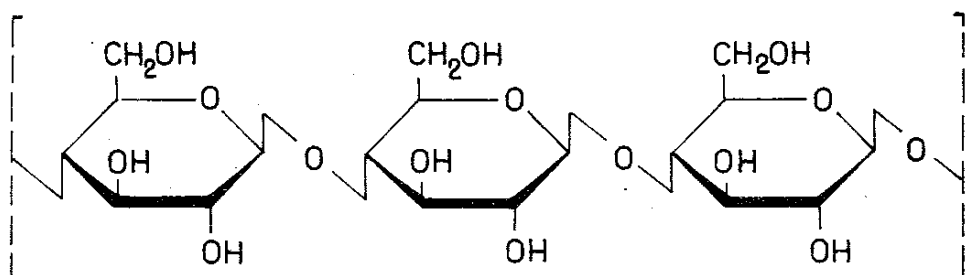
fáze protéká papírem či vrstvou vlivem kapilárních sil. V řadě případů, např. jde-li o adsorpční či chemisorpční mechanismus separace, je stacionární fází sorbent. Vyvíjení se provádí buď vzestupnou, nebo sestupnou technikou. Při papírové chromatografii volíme častěji sestupnou techniku, při tenkovrstvé vzestupnou. Schematicky je postup znázorněn na obr. 87.

Ve většině případů si mechanismus separace v papírové chromatografii představujeme jako rozdělování mezi dvě fáze, i když se mohou uplatňovat jiné mechanismy. Papír funguje jako nosič zakotvené (stacionární) fáze. U neupravených papírů je stacionární fází voda přítomná v papíře, často se tímto termínem označuje komplex celuloza–voda. Upraví-li se papír impregnací, mohou se na něm zakotvit i jiná rozpouštědla, např. polární formamid a dimethylformamid nebo nepolární parafinový či silikonový olej apod. Ke zvolené zakotvené fázi se potom musí najít vhodná fáze protékající (mobilní). K rozdělování mezi tyto fáze dochází na základě rozdělovacího (distribučního) zákona a rozdělení je dáno hodnotou distribuční konstanty. Můžeme si tedy představit, že látka nanesená na chromatogram (v místě startu) je rozpuštěná ve stacionární, tj. zakotvené fázi. Jakmile se mobilní fáze při průtoku papírem či vrstvou dostane ke startovní linii, část látky se rozpustí – ustaví se rovnováha – a přenesse se na papíru nebo vrstvě o kousek dál, kde se opět ustaví rozdělovací rovnováha mezi mobilní a stacionární fází. Vlivem různě velkých hodnot distribučních konstant pro různé látky dojde i k jejich rozdílné migraci na chromatogramu, a tudíž k jejich rozdělení. Látky více rozpustné ve stacionární fázi budou migrovat pomaleji (menší hodnota  $R_F$ ), látky s vyšší rozpustností v mobilní fázi budou blíže čelu – vyšší hodnoty  $R_F$ . Bude-li mít dvojice látek v daném rozpouštědlovém systému stejnou hodnotu distribuční konstanty, nerozdělí se. Bude třeba hledat takový rozpouštědlový systém, v němž se budou jejich distribuční konstanty lišit.

### 7.2.1 Instrumentace a materiály užívané v papírové a tenkovrstvé chromatografii

#### Chromatografický papír

Ve většině případů lze k chromatografii použít kvalitní filtrační papír vyrobený na bázi čisté celulosy. Celulosové zbytky tvoří v papíru vlákna různé délky daná různým počtem anhydrocelulosových jednotek. Běžné jsou řetězce s asi 2 000 jednotkami. Struktura celulosových řetězců je patrna z obr. 88. Znázorněný polymerní řetězec může interagovat prostřednictvím vodíkových vazeb s řadou polárních



Obr. 88. Struktura celulosových molekul

látek, např. s vodou, a vytvářet tenký modifikovaný film stacionární fáze. Celulosevé papír vykazuje silnou afinitu k vodě a je schopen sorbovat 5 až 20 hmotn.% vody.

Chromatografické papíry se vyrábějí z bavlněných zbytků, tzv. linters. Linters obsahují nejčistší celulosová vlákna a vyrobený papír je dosti odolný proti chemickým reaktivním činidlům, neboť má poměrně vysoký obsah krystalického podílu celulosy. Celulosa a papír vyrobený z dřevní hmoty má naopak velký podíl amorfni celulosy a je současně doprovázen řadou balastních, nesnadno odstranitelných doprovodných komponent. Dnes vyráběné kvalitní chromatografické papíry v podstatě neobsahují nečistoty doprovázející celulosovou surovinu, jako jsou např. třísloviny, pryskyřice, slizy, tuky, vosky, aminokyseliny a soli těžkých kovů.

Chromatografický papír tvoří 95 až 99 %  $\alpha$ -celulosy (tj. podíl celulosy nerozpustné při 20 °C v 17,5%ním NaOH). Mikroskopicky bylo zjištěno, že tloušťka vlákn se pohybuje kolem 0,015 až 0,04 mm, zatímco jeho délka závisí na zpracování suroviny. Při mletí celulosy, kdy se vlákna krátí, dochází k jejich drcení. Krácení vláken velmi ovlivňuje výsledné vlastnosti chromatografického papíru, rozhodující při jeho výběru, jako jsou rychlost toku rozpouštědla, savost a hustota papíru. Bavlněná celulosová vlákna z linters jsou spirálové útvary, jejichž středem probíhá široký kanálek. Pro získání optimálních tokových vlastností chromatografického papíru je důležité, aby nedocházelo k poškozování těchto snopců během technologického zpracování. V tabulce 7.1 jsou uvedeny některé charakteristické parametry nejběžnějších chromatografických papírů. V praxi jsou nejvíce využívány papíry Whatman č. 1 a Schleicher-Schüll 2043b (MG1). Z tabulky je také patrné, že chromatografovaná směs bude nejrychleji protékat papíry W 31 ET, W 4, SS 598G a SS 2040a. Pro preparativní účely se využívají papíry o větší plošné hmotnosti a vyšší kapacitě. Kapacita papíru vyjadřuje množství látky v mg, které pojme 1 dm<sup>2</sup> papíru, aniž by došlo k rušivým vlivům při separaci.

Tabulka 7.1. Přehled nejběžnějších typů chromatografických papírů

Papír	Tloušťka mm	Plošná hmotnost g m <sup>-2</sup>	Kapacita mg	Savost <sup>1)</sup>
Whatman				
W 1	0,16	85 až 90	10 až 15	140 až 220
W 2	0,18	95 až 100	10 až 15	200 až 300
W 3	0,36	185	20 až 25	150 až 250
W 4	0,19	90 až 95	10 až 15	70 až 100
W 31 ET	0,50	190	40 až 60	60 až 120
Schleicher – Schüll				
SS 598 G	0,25	140 až 150	15 až 20	60 až 80
SS 2040a	0,19	90 až 95	10 až 15	90 až 140
SS 2043a	0,18	90 až 95	10 až 15	230 až 270
SS 2043b (MG1)	0,23	120 až 130	15 až 20	220 až 260

<sup>1)</sup> Udává se jako čas (v min), za který kapalina dosáhne na svisle upevněném papíru výšky 30 cm.

Na trhu jsou však i modifikované papíry, upravované pro speciální účely. Jsou to např. papíry acetylované nebo etherifikované k dělení látek lipofilního charakteru nebo papíry s úpravou pro iontovou výměnu, jež obsahují značné množství volných karboxylových skupin vázaných na celulosové řetězce. Kromě karboxylovými skupinami je však možno papíry modifikovat i bazickými skupinami.

### Sorbenty pro tenkovrstvou chromatografii

Při separaci látek na principu adsorpčního mechanismu se nejčastěji využívají běžné adsorbenty, jako je silikagel, oxid hlinitý, křemelina, celit, škrob, práškový polyamid a další. Velikost zrn např. u silikagelu se pro běžnou separaci pohybuje v rozmezí 30 až 50  $\mu\text{m}$ . Menší částice se využívají při přípravě tzv. vysokoúčinných tenkých vrstev, kdy je tloušťka vrstvy asi 150  $\mu\text{m}$  a velikost zrn asi 15  $\mu\text{m}$ . Bližší údaje o vlastnostech sorbentů budou podrobně popsány v oddíle o vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografii (str. 217).

V dnešní době se dodávají na trh hotové fólie s nanesenou vrstvou sorbentu, která je pro snazší manipulaci zpevněna vhodným pojivem (škrobem, sádrou). Z československých výrobků to jsou hotové fólie označované jako Silufol (sorbentem je silikagel), Alufol (s oxidem hlinitým), Lucefol (s celulosovým práškem). Tloušťka zafixované vrstvy sorbentu se pohybuje v rozmezí 0,1 až 0,25 mm. Kromě klasických sorbentů se používají i modifikované sorbenty na bázi silikagelu, na němž jsou chemicky vázané polární i nepolární funkční skupiny vykazující selektivitu k určitým typům látek.

### Vyvíjecí komory

Pro vyvíjení papírových chromatogramů se osvědčily komory pro sestupné vyvíjení, v nichž se v horní části umístí žlábek s mobilní fází (obr. 87d). Pro vzestupné vyvíjení lze využít jakoukoli nádobu s dobře těsnícím víkem. Mobilní fáze se umístí

Tabulka 7.2. Srovnání parametrů klasické (TLC) a vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC)

Sorbent silikagel	TLC		HPTLC
zrnění / $\mu\text{m}$	10	až 40	10
velikost pórů / nm	8	až 50	6
specifický povrch / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	—		500
formát vrstvy / $\text{cm} \times \text{cm}$	20 $\times$ 20		5 $\times$ 5, 10 $\times$ 10
výškový ekvivalent teoretického patra / $\mu\text{m}$	25	až 40	15
průměr nanesených skvrn / mm	2	až 6	0,2 až 1,5
průměr rozdělených skvrn / mm	5	až 15	0,5 až 2
doba potřebná k separaci / min	10	až 200	2 až 15
množství látky ve skvrně / $\mu\text{g}$	0,05	až 10	0,005 až 1
mez detekce / ng	1	až 3	1 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> při měření fluorescence

na dně nádoby a rozpouštědlo vzlíná vzhůru. Pro vyvíjení tenkých vrstev je možno užít stejných komor (obr. 87e), avšak často se využívají komory sendvičového typu, u nichž je jen velmi nepatrný prostor mezi vrstvou a stěnou komory. Tyto komory se vyznačují dobrou reprodukovatelností hodnot  $R_F$ , neboť u nich dochází k rychlému a stabilnímu nasycení atmosféry v komoře párami rozpouštědlového systému.

Stupeň nasycení komory značně ovlivňuje kvalitu dělení, tvar skvrn a zejména pak reprodukovatelnost výsledků.

Vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě

Charakteristickým rysem metody HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography) je miniaturizace zařízení, zmenšení množství nanášených látek a výrazné snížení množství používaných rozpouštědel jako mobilních fází a dále pak podstatné zvýšení produktivity práce při sériových analýzách. Zlepšení dělicích vlastností se dosahuje použitím vysoce kvalitního, dobře vytríděného mikropórovitého silikagelu. Na jednu fólii je možno nanést pět až desetkrát více vzorků. Průměr skvrny nemá být větší než 1 mm. Porovnání klasické techniky a techniky HPTLC se silikagelem jako adsorbentem udává tab. 7.2.

## 7.2.2 Volba stacionární a mobilní fáze v papírové a tenkovrstvé chromatografii

Volba rozpouštědlového systému hraje v chromatografii významnou roli. V obou technikách plošného uspořádání je selektivita systému dána stacionární a mobilní fází, jež je rozhodujícím činitelem ovlivňujícím kvalitu separace vyjadřovanou rozlišením [viz rovn. (3.78)]. V papírové a tenkovrstvé chromatografii není v podstatě možné ovlivňovat účinnost ani faktor kapacity změnou rychlosti toku mobilní fáze. Faktor selektivity je tedy jediným faktorem, který rozhoduje o kvalitě rozdělení látek na chromatogramu.

V papírové i tenkovrstvé chromatografii se ve většině případů využívají dva základní mechanismy separace. V papírové chromatografii je to výlučně rozdělovací mechanismus, v tenkovrstvé chromatografii ve větší míře adsorpční mechanismus, v menší míře mechanismus rozdělovací a chemisorpční. V některých případech separací polymerních látek se využívá i mechanismus silového efektu (pole).

### 7.2.2.1 Volba rozpouštědlového systému v papírové chromatografii

Z hlediska rozdělovacího mechanismu můžeme běžně užívané soustavy rozdělit do tří skupin:

1. *Soustavy s vodou jako stacionární zakotvenou fází.* U nich se předpokládá, že voda je pevně fixována vazbou vodíkových můstků na celulosu a vytváří objemné hydratované molekuly celulosy gelového charakteru. Mobilní fází tvoří organické rozpouštědlo (nižší alkoholy) ve směsi s vodou. I když v rozdělovací chromatografii platí zásada, že stacionární fáze nesmí být mísitelná s fází mobilní (aby nedocházelo

k vymývání stacionární fáze), v tomto případě voda tvořící stacionární fázi je pevně vázána na celulosu, má charakter gelu a není vymývána z papíru mobilní fází.

Tento typ soustav se velmi dobře hodí pro separaci hydrofilních polárních látek neutrální povahy, jako jsou např. cukry, polyoly, ale i silné kyseliny (sulfokyseliny). Zmenšení obsahu vody v mobilní fázi či použití mírně polárního organického rozpouštědla vede ke snížení hodnoty  $R_F$ , zatímco zvýšení obsahu vody nebo použití organického rozpouštědla o vyšší polaritě působí naopak vyšší pohyblivost dělených látek, která vede ke vzrůstu hodnot  $R_F$ .

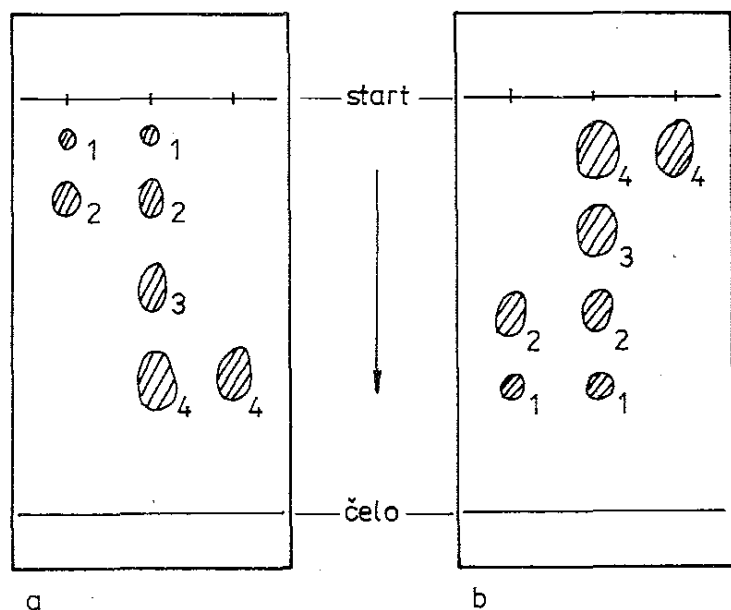
Při chromatografii slabých kyselin a bází nebo jejich solí rozpustných ve vodě je třeba do mobilní fáze přidat silnější kyselinu nebo bázi za účelem potlačení nebo podpoření disociace. Jinak totiž dochází k tvorbě pruhů nebo jinak deformovaných skvrn. Změny v hodnotách  $R_F$  lze opět dosáhnout změnou polaritý mobilní fáze. Pro separaci nižších mastných kyselin se např. osvědčuje soustava 2-propanol–amoniak–voda (v poměru 9 : 1 : 2). Přítomný amoniak nebo i jiná báze (ethylamin) jednak podpoří disociaci separovaných kyselin, jednak zamezí jejich těkání z papíru utvořením příslušné soli. Pro separaci bází (volných aminů) se naopak do mobilní fáze přidává octová kyselina.

2. *Soustavy s polárními organickými rozpouštědly jako stacionární fází.* Zvolenou polární zakotvenou fází se chromatografický papír naimpregnuje a po vytěkání rozpouštědla, v němž byla stacionární fáze rozpuštěna, se přistupuje k nanášení vzorků na start. Z těchto typů stacionárních fází se nejčastěji používají formamid, dimethylformamid, ethylenglykolmonoacetát a jiné. Při impregnaci se nejprve připraví 5, 10, 20 až 50%ní roztok stacionární fáze v methanolu a teprve potom se jím papír impregnuje např. protažením ve žlábků. Mobilní fáze musí splňovat podmínku nerozpustnosti s fází stacionární, a proto se nejčastěji používají směsi uhlovodíků, jako hexanu, cyklohexanu, benzenu, toluenu, dále tetrachlormethanu, chloroformu, ethylacetátu a dalších. V případě, že by mohlo dojít k rozpuštění i malého množství stacionární fáze ve fázi mobilní, doporučuje se nasytit mobilní fázi před vyvíjením chromatogramu fází zakotvenou (tj. formamidem, dimethylformamidem).

Se stoupající polaritou fáze se budou hodnoty  $R_F$  zvyšovat. Stejně tak se budou zvyšovat s klesající koncentrací fáze v impregnačním roztoku. Je-li v literatuře uvedeno, že bylo použito soustavy 30%ní DMF/cyklohexan, benzen (5 : 1), znamená to, že jako impregnačního roztoku bylo použito 30%ního roztoku dimethylformamidu v methanolu a jako mobilní fáze směs cyklohexanu a benzenu v udaných objemových dílech.

3. *Soustavy s nepolárními organickými zakotvenými fázemi.* Říká se jim též soustavy s obrácenou fází (RP – Reverse Phase). Jde o zakotvení nepolárního rozpouštědla, kterým bývá nejčastěji parafinový olej, silikonové oleje různých typů, laurylalkohol, 1-bromnaftalen a další. Mobilní fází, která opět musí splňovat podmínku vzájemné nerozpustnosti, bývá směs polárních organických rozpouštědel (methanolu, ethanolu, acetonu, octové kyseliny, acetonitrilu, formamidu a dimethylformamidu) vždy v určitém poměru s vodou.

Přídavek organického rozpouštědla do mobilní fáze vždy zvyšuje hodnoty  $R_F$  právě tak jako snižování koncentrace impregnačního roztoku zakotvené fáze. I v tomto systému se doporučuje nasytit před použitím mobilní fázi rozpouštědlem zvoleným za stacionární fázi.



Obr. 89. Rozmístění homologické řady 3,5-dinitrobenzoátů alkoholů na papíře s normální (a) a obrácenou (b) zakotvenou fází 1 až 4 – počet uhlíků v molekule alkoholu, a – papír W 1 impregnovaný 50%ním dimethylformamidem, mobilní fáze: cyklohexan, benzen (10 : 1), b – papír W 1 impregnovaný 5%ním parafinovým olejem, mobilní fáze: methanol, dimethylformamid, voda

Pojem obrácená fáze je odvozen z toho, že pořadí separovaných složek se v tomto systému skutečně obrací. Nejmenší hodnoty  $R_F$  mají ty látky, které jsou nejméně polární (hydrofobní s delšími alkylovými řetězci), a tudíž jsou více rozpustné v zakotvené nepolární hydrofobní fázi. Tato závislost je patrná z obr. 89.

#### 7.2.2.2 Volba sorbentu a rozpouštědlového systému v tenkovrstvé chromatografii

Při použití tenké vrstvy sorbentu jako nosiče zakotvené fáze se postupuje podle zásad uvedených u papírové chromatografie, pouze s tím rozdílem, že impregnační roztok o určité koncentraci stacionární fáze se nechá při impregnaci vrstvy vzlínat celou vrstvou. Potom se těkavé rozpouštědlo, v němž byla stacionární fáze rozpuštěna, odstraní a vrstva je připravena k nanášení vzorků.

Při volbě sorbentu i mobilní fáze se vychází vždy z povahy separovaných látek. *Látky rozpustné v organických rozpouštědlech.* Pro nepolární látky volíme buď adsorpční chromatografii, nebo rozdělovací chromatografii na obrácených fázích. Středně polární látky chromatografujeme na principu adsorpčním, přičemž silikagel použijeme pro látky neutrální a kyselé a oxid hlinitý pro mírně polární látky neutrální a bazické.

Látky rozpustné ve vodě. K separaci neiontového charakteru využíváme rozdělovacího principu s vodnými mobilními fázemi. Sorbentem je prášková celulóza (Lucefol). Pro látky iontové povahy můžeme použít vrstev s iontově výměnnými vlastnostmi.

Při adsorpční chromatografii volíme v podstatě mezi dvěma adsorbenty, silikagelem a oxidem hlinitým. Hlavní rozdíl mezi nimi spočívá v tom, že hliník má větší koordinační schopnost než křemík. Proto je oxid hlinitý vhodnějším adsorbentem pro středně polární a málo polární látky se stericky rozdílným tvarem molekuly. Deaktivovaný oxid hlinitý lze však použít i pro látky polárnějšího charakteru. Látky schopné vytvářet intermolekulární vodíkové můstky (alkoholy, kyseliny, fenoly, aminy aj.) se na oxidu hlinitém zadržují pevněji než na silikagelu, protože dochází k donor-akceptorové interakci aktivního vodíku s kovovým atomem za tvorby vodíkové vazby typu chelátu.

Seřadíme-li jednotlivé funkční skupiny podle klesající adsorptivity na polárním adsorbentu, dostaneme řadu s klesající polaritou:  $R-SO_3H$ ,  $R-COOH$ ,  $R-CONH_2$ ,  $R-OH$ ,  $R-NH_2$ ,  $R-COOCH_3$ ,  $R-NH-R$ ,  $R-NO_2$ ,  $R-O-CH_3$ ,  $R-Cl$ ,  $R-H$ . Určitý vliv na adsorptivitu má také polarizovatelnost molekuly a velikost dipólového momentu, která se zvláště uplatňuje při dělení izomerních látek.

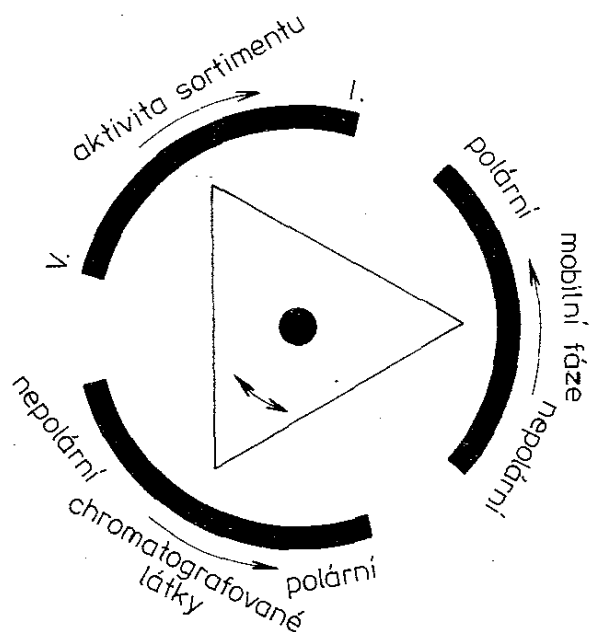
Tabulka 7.3. Zkrácená eluotropní řada rozpouštědel

parafinový olej	↑ ↓	nepolární lipofilní rozpouštědla
hexan		
cyklohexan		
tetrachlormethan		
benzen		
dichlormethan		
chloroform		
diethylether		polární (hydrofilní) rozpouštědla
1-butanol		
pyridin		
aceton		
propanol		
octanová kyselina		
methanol		
formamid		
voda		

Rozpouštědlo použité při adsorpční chromatografii jako mobilní fáze je samo adsorbováno, přičemž dochází k soutěži mezi chromatografovanou látkou a rozpouštědlem. Čím je chromatografovaná látka ve vztahu k rozpouštědлу tvořícímu mobilní fázi polárnější, tím je více zadržována adsorbentem a hodnoty  $R_F$  se snižují. Chceme-li naopak zvýšit pohyblivost chromatografovaných látek, tj. dosáhnout vyšších hodnot  $R_F$ , použijeme polárnější rozpouštědlo, neboť molekuly polárnějšího rozpouštědla budou vytěsňovat molekuly chromatografované látky a ty bude možné mobilní fází vymýt z prostoru, kde byly sorbovány. Podle polarity lze sestavit běžně používaná rozpouštědla do tzv. eluotropní řady (tab. 7.3).



Pro první orientaci při volbě systému byla navržena pomůcka, jejíž náčrt je na obr. 90. Při nastavení jednoho z vrcholů trojúhelníka na odhadovanou polaritu chromatografovaných látek ukazují zbývající dva vrcholy vhodnou aktivitu adsorbentu a polaritu mobilní fáze.



Obr. 90. Pomůcka pro orientaci při volbě sorbentu a mobilní fáze

### 7.2.3 Detekční systémy v papírové a tenkovrstvé chromatografii

Detekce sloučenin je důležitým krokem vlastní chromatografie, poněvadž nám umožní zjistit místa na chromatogramu, kde se vyskytují rozdělené látky.

*Fyzikální způsoby detekce* spočívají ve využití záření (viditelného, ultrafialového a infračerveného) dopadajícího na chromatogram. Řada látek absorbuje záření o určité vlnové délce a toho lze využít při prohlížení chromatogramu. Některé látky se projevují jako fluoreskující skvrny, jiné naopak absorbují ultrafialové záření a projeví se jako tmavé skvrny na svítícím pozadí. Toho se zvláště využívá, impregnujeme-li vrstvu např. fluorescenčním indikátorem. Vrstva pod ultrafialovým zářením silně září, zatímco látky rozdělené na chromatogramu se jeví jako tmavé skvrny. Ve všech těchto případech se skvrny zakreslí na chromatogramu. Při papírové chromatografii sulfokyselin se chromatogram zahřeje (v sušárně, pod infračervenou lampou) a papír v místech, kde jsou přítomny rozdělené sulfokyseliny, ztmavne; dojde k jeho mineralizaci.

*Chemické způsoby detekce* spočívají v tom, že se chromatogram postříká vhodným detekčním činidlem, jež vyvolá barevnou reakci s rozdělenými látkami. Pro detekci látek na tenkých vrstvách se používá řady univerzálních detekčních činidel, zpravidla agresivních, nelze je proto využít v papírové chromatografii. Z agresivních univerzálních činidel to jsou koncentrovaná kyselina dusičná, kyselina sírová, roztok dichromanu sodného, manganistanu draselného, kyselina sírová ve směsi s aldehydy apod. Vedle univerzální detekce je vhodné mít k dispozici i selektivní způsoby, jež umožňují detegovat pouze určitou skupinu látek. Tak např. acidobazické indikátory odhalí na chromatogramu kyseliny a báze, Ehrlichovo činidlo (2-dimethylaminobenz-

aldehyd) reaguje pouze s aminy, Gibbsovo činidlo (3,5-dibromchinonchlorimin) reaguje s fenoly s volnou *p*-polohou, ninhydrin a isatin reaguje s aminokyselinami a s některými aminy, ethylát sodný v acetonu reaguje s *m*-dinitrosloučeninami apod. Ke zvýšení citlivosti detekce a mnohdy i k umožnění citlivé detekce vůbec se často provádí derivatizace. Látky ještě před vlastní chromatografií převedeme na vhodné deriváty a ty potom chromatografujeme. Tak je možno převést alkoholy na 3,5-dinitrobenzoáty, kyseliny na 2,4-dinitrobezylestery, aminy na N,N-dimethyl-*p*-amino-benzenazobenzoáty, které jsou přímo barevné.

*Ostatní způsoby detekce* využívají různých vlastností separovaných látek, které lze tímto způsobem na chromatogramu odhalit. Například biologický způsob využívá biologických vlastností látky např. k zastavení růstu mikroorganismů.

Podle citlivosti jednotlivých způsobů detekce lze dokázat a stanovit ve skvrně až desetiny mikrogramů látek ( $10^{-7}$  g).

#### 7.2.4 Využití chromatografie v plošném uspořádání v technické praxi

Papírová, ale zejména tenkovrstvá chromatografie neztratí nikdy svůj význam v široké technické praxi hlavně pro svoji jednoduchost, vysokou separační účinnost, velkou rychlost a minimální ekonomickou nákladnost. Tenkovrstvá chromatografie je nezbytným doplňkem organických syntéz, umožňujících rychlou a jednoduchou kontrolu průběhu reakcí. Velkosériové kvantitativní analýzy v běžném i vysokoúčinném uspořádání zvyšují mnohonásobně produktivitu práce např. v klinickém screeningu při vyšetřovacích metodách. Dále lze papírovou a tenkovrstvou chromatografií úspěšně využít ke zjišťování nečistot v různých materiálech, surovinách i finálních výrobcích, k identifikaci těchto látek a také k čištění a mikro-preparaci některých látek. Zvláštní pozornost si zaslouží kvantitativní analýza, kdy k vyhodnocení chromatogramů slouží různě upravené spektrofotometry, umožňující proměřování skvrn v prošlém i odraženém záření při různých vlnových délkách. Automatický záznam intenzity skvrny nám poskytuje shodný výsledek s plynovou a kapalinovou kolonovou chromatografií, avšak ve srovnání s těmito technikami je docilována mnohonásobně vyšší produktivita práce, významná zejména při velkosériových analýzách.

### 7.3 KAPALINOVÁ KOLONOVÁ CHROMATOGRRAFIE V KLASICKÉM USPOŘÁDÁNÍ

V dnešní terminologii se klasická kolonová nebo též zvaná sloupcová chromatografie nazývá kapalinovou kolonovou chromatografií v uzavřeném systému.

Její princip spočívá v tom, že v koloně je umístěno lože sorbentu a kolona je nahoře opatřena zásobníkem mobilní fáze (eluentu) a dole jímačem eluátu. Vzorek se vnáší přímo na lože sorbentu a průtok mobilní fáze se reguluje pouze hydrostatickým tla-

kem, tj. výškou rezervoáru mobilní fáze nad kolonou. Detekce se zpravidla provádí v jednotlivých frakcích refraktometricky nebo spektrofotometricky.

Vnitřní průměr kolon se pohybuje v rozmezí 0,6 až 5 cm a délka v rozmezí 20 až 150 cm. Zrnění sorbentů je velmi hrubé (120 až 200  $\mu\text{m}$ ), a to zejména proto, aby bylo dosaženo optimální rychlosti průtoku mobilní fáze. Rozměry kolony se volí podle množství vzorku, jež se má podrobit chromatografické separaci. Větší rozměry kolony a hrubší zrnění sorbentu zhoršují rozlišení a účinnost separace.

Tohoto způsobu se dnes nevyužívá k analytickým separacím, ale k chromatografickému čištění preparátů a k jejich mikropreparaci a izolaci. Chromatografická kolona může být plněna buď adsorbenty (silikagelem, oxidem hlinitým), nebo měničemi iontů s výměnnou kapacitou od 4 do 10 mmol  $\text{H}^+$  nebo  $\text{OH}^-$  na 1 gram výměnné pryskyřice v suchém stavu.

O výběru sorbentu a použitých mobilních fází je pojednáno detailně v odd. 7.4.4.

## 7.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ KOLONOVÁ CHROMATOGRAFIE

### 7.4.1 Úvod

I když byla kapalinová kolonová chromatografie vlastně první chromatografickou metodou, objevenou Cvětem na počátku tohoto století, ustupovala dlouho do pozadí za ostatní chromatografické techniky. Teprve koncem šedesátých let došlo k renesanci této techniky v moderní, vysokoúčinné formě. Vysoké účinnosti a rychlosti se u této metody dosahuje použitím kolon plněných náplněmi s velmi jemnými částicemi o velikosti 3 až 15  $\mu\text{m}$  a poměrně velkých průtoků mobilní fáze, což však vyžaduje použití vysokotlakých čerpadel a takové konstrukce celého přístroje, která odolává tlakům do 30 až 60 MPa. Byly vyvinuty průtokové detektory, umožňující citlivou kontinuální detekci, dávkovací systémy, umožňující dávkování vzorku bez přerušování toku mobilní fáze kolonou a dokonce i automatické dávkování sady vzorků podle předem zvoleného programu. K automatizaci celé analýzy přispívá i použití integrátorů a počítačových systémů pro zpracování dat a vybavení přístroje řídicími mikroprocesory, které umožňují předem zvolit pracovní podmínky a jejich změny pro celé série analýz. V poslední době jsme svědky zavádění laboratorních robotů pro předběžné úpravy vzorků před dávkováním do chromatografu.

Vedle technického pokroku umožnily rozvoj vysokoúčinné kapalinové chromatografie i poznatky z teorie plynové chromatografie, které objasnily podstatu pochodů v koloně a jejich souvislost s účinností chromatografického procesu. Velice významným průlomem bylo i zavedení náplní kolon s chemicky vázanými fázemi, umožňujícími vysoce selektivní separace s dobrou reprodukovatelností. V posledních letech se zkoumají souvislosti mezi strukturou látek a vzájemnými interakcemi mezi dělenými látkami a stacionární a mobilní fází za účelem předpovědi retenčních dat a plánování podmínek eluce i vývoje nových selektivních sorbentů. Pokračuje i vývoj selektivních detektorů na nových fyzikálně chemických principech a zavádění

spektrálních detektorů, které by umožnily přímou identifikaci rozdělených složek (využití ultrafialové a hmotnostní spektrometrie, ale i NMR a infračervené spektrometrie). O bouřlivém rozvoji této metody svědčí jednak počet publikací z tohoto oboru, jednak i prodej kapalinových chromatografů, který v posledních letech dosáhl na světových trzích největšího objemu ze všech analytických přístrojů.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie zahrnuje soubor metod, založených na různém mechanismu separace, jejichž společným pojátkem je použití kapalné mobilní fáze, vysokotlaké techniky a účinných kolon pro rychlou analýzu. Tyto metody lze dále členit na

- chromatografii v systému kapalina–kapalina (využívá kapalnou stacionární fázi zakotvenou na vhodném nosiči v koloně), která se v dnešní době používá již jen v omezené míře,

- chromatografii v systému kapalina–tuhá fáze.

Chromatografii v systému kapalina–tuhá fáze lze dále dělit na

- chromatografii na polárních adsorbentech,
- chromatografii na nepolárních a na středně polárních chemicky vázaných fázích,

- iontově výměnnou chromatografii (resp. iontovou chromatografii),

- gelovou permeační chromatografii využívající sterické vyluky látek,

- afinitní chromatografii.

Speciální techniky využívají tzv. chromatografie iontových párů k separaci iontových látek, chromatografická separace optických izomerů s využitím stacionárních a mobilních chirálních fází, popř. komplexotvorných rovnováh ve stacionární a mobilní fázi. Tyto jednotlivé metody budou postupně probrány v odd. 7.4.4, pojednávajícím o chromatografických systémech.

## 7.4.2 Teorie toku mobilní fáze kolonou

Objem kolony  $V_c$  rovnoměrně naplněné náplní (sorbentem) lze rozdělit na tři části: na objem mobilní fáze mezi částicemi náplně  $V_o$ , na objem mobilní fáze uvnitř pórů částic náplně (tato kapalina se označuje jako „stagnující mobilní fáze“)  $V_i$  a objem skeletu (matrice) náplně  $V_{sk}$ :

$$V_c = V_o + V_i + V_{sk} = V_M + V_{sk} \quad (7.1)$$

kde  $V_M$  je celkový objem mobilní fáze v koloně, tj. objem mezi póry i v pórech náplně.

Poměr objemu mobilní fáze mezi částicemi a uvnitř částic a celkového objemu mobilní fáze k celkovému objemu kolony určuje trojí druh pórovitosti naplněné kolony, tj. pórovitost mezi zrny náplně  $\varepsilon_o$ , pórovitost uvnitř zrn  $\varepsilon_i$  a celkovou pórovitost  $\varepsilon_T$ :

$$\varepsilon_o = \frac{V_o}{V_c} \quad (7.2)$$

$$\varepsilon_i = \frac{V_i}{V_c} \quad (7.3)$$

$$\varepsilon_T = \frac{V_o + V_i}{V_c} = \frac{V_M}{V_c} = \varepsilon_o + \varepsilon_i \quad (7.4)$$

U pravidelně a rovnoměrně naplněných kolon o průměru větším, než je desetinásobek středního průměru částice náplně, je  $\varepsilon_o \approx 0,40$  až  $0,42$ .  $\varepsilon_i$  závisí na charakteru náplně. U dokonale nepórovitých částecek (např. skleněných kuliček) je  $\varepsilon_i = 0$  a u částecek vyplněných póry v celém objemu je  $\varepsilon_i = \varepsilon_o \approx 0,40$  až  $0,42$ . U těchto částecek je celková pórovitost  $\varepsilon_T \approx 0,8$  až  $0,84$  a objem skeletu  $V_{sk}$  tedy činí asi 16 až 20 % objemu kolony.

Celková pórovitost náplně kolony se tedy ve skutečnosti pohybuje mezi oběma krajními hodnotami,  $\varepsilon_T = 0,4$  až  $0,84$ . Póry uvnitř náplně se vyznačují alespoň v určitém rozmezí statistickým rozdělením velikostí (objemů). Pro různě velké molekuly je tedy dostupná pouze určitá část těchto pórů, která se zmenšuje s rostoucí relativní molekulovou hmotností dané látky. Na tom je založeno dělení gelovou permeační chromatografií.

Pokud jsou pórovité částecčky pokryty nanesenou nebo chemicky vázanou fází, dojde k vyplnění části pórů uvnitř částecček a  $\varepsilon_i < 0,40$ . Podobný jev může nastat i v adsorpční chromatografii při částečném zaplnění pórů polárního adsorbentu vodou.

$V_o$  lze zjistit jako retenční objem inertní látky o velké molekulové hmotnosti, která nemůže proniknout ani do nejobjemnějších pórů částecček náplně (např. polystyren o  $M_r = 10^6$  pro silikagel s methylenchloridem jako mobilní fází).  $V_M$  naopak zjišťujeme jako retenční objem inertní látky o malé molekulové hmotnosti, o níž lze předpokládat, že pronikne do všech pórů náplně (např. benzen pro silikagel s methylenchloridem jako mobilní fází). U některých náplní a mobilních fází činí výběr vhodných inertních látek určité potíže a zejména stanovení  $V_M$  může být zatíženo systematickou chybou, která velmi ovlivňuje přesnost zjišťování kapacitních poměrů  $k$ . Při vyhodnocování  $V_M$  (popř.  $V_o$ ) z chromatogramů inertních látek si musíme uvědomit, že z polohy elučního maxima na chromatogramu se zjistí celkový mrtvý objem systému, tj. objem mobilní fáze v koloně, zvětšený o mimokolonové příspěvky: objem dávkovacího zařízení, průtokové cely detektoru a spojovacího potrubí. U dobře konstruovaných přístrojů by tento příspěvek měl být menší než asi 30 až 50  $\mu\text{l}$ , což lze v praxi často zanedbat. U kolon o průměru 2 až 3 mm a délce menší než 300 mm se však již tímto zanedbáním můžeme dopustit relativní chyby větší než 5 %, která s klesajícím objemem kolony  $V_c$  dále roste.

Průtok mobilní fáze kolonou lze charakterizovat buď objemovou rychlostí  $F_m$  (v  $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$ ), nebo lineární rychlostí  $u$  (v  $\text{cm s}^{-1}$ ) – rovn. (3.3). Tyto rychlosti jsou ve vztahu:

$$u = \frac{F_m}{A_m} = \frac{F_m}{\pi r^2 \varepsilon_T} \quad (7.5)$$

kde  $r$  je vnitřní poloměr kolony,  $A_m$  — její volný průřez, tj. pouze ta část průřezu kolony, která je volná pro tok mobilní fáze.

Lineární rychlost toku mobilní fáze kolonou je podle Darcyho zákona přímo úměrná tlakovému spádu v koloně  $\Delta p$  a nepřímo úměrná délce kolony  $L$  a viskozitě mobilní fáze  $\eta$ :

$$B = \frac{u\eta L \varepsilon_T}{\Delta p} = \frac{L^2 \eta \varepsilon_T}{\Delta p t_M} = \frac{F_m \eta L}{\Delta p \pi r^2} \quad (7.6)$$

kde konstanta úměrnosti  $B$  se nazývá permeabilita kolony. Tato konstanta nezávisí na teplotě, rozměrech kolony, tlakovém spádu a na složení mobilní fáze, takže hodnotu stanovenou v jedné mobilní fázi lze používat i pro jiné eluenty. Po dosazení  $\varepsilon_0 \approx 0,4$  do empirické Kozenyho–Carmanovy rovnice

$$B = \frac{d_p^2 \varepsilon_0^3}{180 (1 - \varepsilon_0)^2} \quad (7.7)$$

se získá přibližně platný empirický vztah pro permeabilitu kolony v závislosti na průměru částic náplně:

$$B = \frac{d_p^2}{1\,000} \quad (7.8)$$

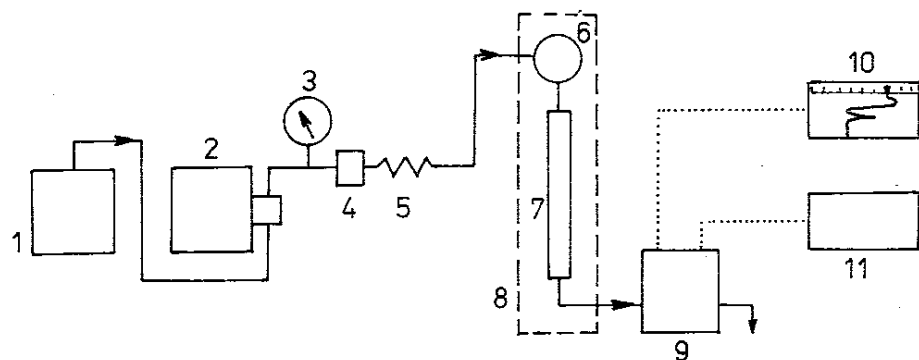
Z rovnic (7.6) a (7.7) plyne dále velmi důležitý závěr: při konstantní objemové rychlosti toku mobilní fáze je tlakový spád na koloně přímo úměrný délce kolony a viskozitě mobilní fáze a nepřímo úměrný čtverci průměru částic náplně a čtverci vnitřního průměru kolony. Opačné závislosti platí pro vliv uvedených parametrů na objemovou rychlost toku při konstantním tlakovém spádu na koloně. Protože u řady přístrojů jsme omezeni určitou maximální hodnotou pracovního tlaku, lze uvedené vztahy použít k výpočtu rozměrů kolony a její náplně, které nám umožní pracovat při požadované rychlosti toku mobilní fáze, abychom dosáhli rychlých analýz při optimálním využití přístroje.

Uvedených vztahů lze použít k hodnocení kvality naplnění kolony. Permeabilita vypočtená z experimentálních parametrů  $F_m$ ,  $L$ ,  $\eta$ ,  $r$ ,  $\Delta p$  by se neměla výrazně lišit od hodnoty vypočtené z velikosti částic náplně — rovn. (7.8), popř. lze po dosazení experimentálně zjištěné permeability do vztahu (7.8) vypočítat tzv. hydrodynamický průměr částic náplně a porovnat jej s hodnotou deklarovanou výrobcem.

V praxi se ukázalo, že hydrodynamický průměr se shoduje se skutečným středním průměrem částic pouze u kolon plněných za mokra. Po dosazení permeability z rovn. (7.8) do vztahu (7.6) lze vypočítat očekávaný tlakový spád na koloně plněné náplní se známou velikostí částic. Liší-li se tato hodnota o více než 20 % od skutečně naměřeného tlakového spádu, lze usuzovat buď na špatné naplnění kolony, nebo na netěsnost či nadměrný odpor v přístroji.

## 7.4.3.1 Sestava kapalinového chromatografu

Moderní kapalinový chromatograf se značně liší od poměrně jednoduchého zařízení používaného v klasické kapalinové kolonové chromatografii. Jak ukazuje schéma přístroje v základním provedení na obr. 91, kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze (1 až 5), dávkování vzorku



Obr. 91. Blokové schéma jednoduchého kapalinového chromatografu

1 – zásobník mobilní fáze, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 – čidlo pro měření pracovního tlaku, 4 – filtr, 5 – průtočný tlumič pulsů, 6 – zařízení pro dávkování vzorku, 7 – chromatografická kolona, 8 – termostátová skříň, 9 – detektor, 10 – zapisovač, 11 – zařízení pro zpracování dat, např. integrátor

(6), separaci látek (7) a jejich detekci (9), záznam (10) a zpracování dat (11). Mobilní fáze z vhodného zásobníku (1) je dávkována vysokotlakým čerpadlem (2) vybaveným čidlem k měření tlaku (3) přes filtr tuhých částic (4) a průtočný tlumič pulsů (5) a přes zařízení pro dávkování vzorků (6) do chromatografické kolony (7) a detektoru (9). Za detektor je eventuálně možno zařadit jímač frakcí. Signál z detektoru je registrován zapisovačem (10) a vyhodnocován integrátorem, popř. mikro počítačem či větším počítačem (11), je-li požadováno složitější zpracování dat. Pro lepší reprodukovatelnost výsledků se doporučuje temperovat kolonu na konstantní teplotu; u některých přístrojů lze i teplotu kolonové skříně (8) programovat s časem. Dokonalejší přístroje jsou vybaveny zařízením pro tvorbu gradientu mobilní fáze umožňujícím eluci s časově programovaným složením mobilní fáze připravované mísením 2 až 4 složek. Dále je možno použít řady užitečných doplňkových zařízení, jako jsou ochranné filtry a předkolony, zařízení pro odplynování mobilní fáze, ventily pro přepojování několika chromatografických kolon v průběhu separace, a je možno používat i dvou či více detektorů řazených za sebou. Většina moderních přístrojů je řízena mikroprocesory a účelovými počítači, které umožňují předem programovat separační metody, včetně pracovních podmínek (složení a průtoku mobilní fáze, teploty) a jejich časových změn, sekvenci vzorků a použitých chromatografických kolon, automatickou obměnu pracovních podmínek za účelem optimalizace separační metody atp.

Kapalinové chromatografy jsou koncipovány buď jako stavebnicové (modulární)

systémy, kde lze snadno a pohodlně jednotlivé části obměňovat pro požadovaný účel, nebo jako kompaktní jednotky. Zařízení prvního typu se lépe hodí pro výzkumnou činnost a vyvíjení nových pracovních metod, přístroje druhého typu mají jednodušší obsluhu a umožňují zpracovávat větší množství vzorků, jsou proto zvláště vhodné pro rutinní práci. Univerzální přístroje v určité účelové sestavě nahrazují čím dále v širší míře jednoúčelové specializované kapalinové chromatografy určené pro analýzu aminokyselin, cukrů apod. Preparativní a gelová permeační, jakož i mikrokolonová kapalinová chromatografie většinou vyžadují speciální přístroje.

Všechny moderní kapalinové chromatografy by měly splňovat řadu požadavků, aby bylo možno dosáhnout účinné chromatografické separace, reprodukovatelných retenčních dat a přesných kvantitativních výsledků. Tyto požadavky zaručuje pouze použití kvalitní kolony v kvalitním přístroji. Aby bylo možno analyzovat řadu různých typů vzorků, je třeba mít k dispozici řadu detektorů a kolon s různými typy náplní. Rychlost analýzy zaručuje použití relativně vysokých průtoků mobilních fází dávkovaných čerpadly při vysokých tlacích, detektory a zapisovače s rychlou odezvou a automatické zpracování dat. Dobré reprodukovatelnosti výsledků lze dosáhnout přesnou kontrolou složení a průtoku mobilní fáze, teploty kolony a pracovního režimu detektoru, účinné separace a vysoké citlivosti použitím účinných kolon, spojovacího potrubí a cel detektorů s minimálním objemem a konstrukce detektoru, zaručující stabilní signál a vysoký poměr odezvy k šumu i při vysokých citlivostech detektoru. Zejména je třeba dbát na to, aby veškerá spojovací potrubí mezi dávkovacím zařízením, kolonou a detektorem byla co nejkratší a měla malý vnitřní průměr (ca 0,12 až 0,25 mm).

U nás vyrábí a dodává kapalinové chromatografy v různých sestavách s.p. Laboratorní přístroje, Praha.

#### 7.4.3.2 Čerpadla mobilní fáze

Požadavky kladené na čerpadla pro moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografy jsou značně náročné:

1. Čerpadla musí být konstruována z materiálů odolných vůči korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází (jako jsou tlumivé roztoky, slabě kyselé a bazické roztoky, organická rozpouštědla), k čemuž se hodí nerezová ocel, titan či některé keramické materiály. Těsnění se většinou vyrábějí z plněného Teflonu, kuličky a sedélka ventilů (a někdy i písty) ze safíru. Občas se používají i čerpadla zkonstruovaná pouze ze skla a Teflonu, kde lze použít i agresivnějších mobilních fází, jejich funkce je však omezena tlakem do 3 až 10 MPa.

2. Čerpadla mají být schopna dávkovat plynule kapaliny bez kolísání (pulsů) průtoku do tlaků 30 až 50 MPa, a to při průtocích od 0,1 do 5 nebo 10 ml min<sup>-1</sup> pro analytické aplikace (pro mikrokolonovou chromatografii požadujeme průtoky podstatně nižší, od 0,005 nebo 0,01 ml min<sup>-1</sup>, a naopak pro preparativní chromatografii průtoky až 50 ml min<sup>-1</sup>). Nastavení průtoku by mělo být přesné a reprodukovatelné se směrodatnou odchylkou nižší než 0,5 až 1 %.

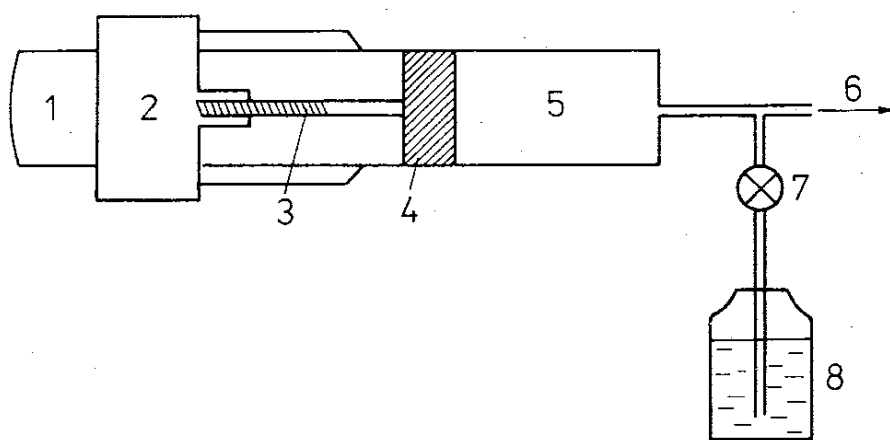


3. Vnitřní objem čerpadel má být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze, eventuálně práci s gradientem tvořeným v nízkotlaké části přístroje.

Čerpadla lze dělit do dvou skupin podle toho, zda jsou schopna vytvářet konstantní tlak nebo konstantní průtok čerpané kapaliny. Pro analytickou kapalinovou chromatografii se v dnešní době používají čerpadla druhého typu, protože u čerpadel prvního typu závisí skutečný průtok kapaliny na hydraulickém odporu v systému, který může kolísat a podléhá také dlouhodobým časovým změnám.

K čerpadlům pracujícím s konstantním tlakem počítáme především:

1. *Čerpadla pneumatická*, kde je zdrojem hnací síly stlačený plyn, který se zavádí buď přímo nad hladinu stlačované kapaliny, nebo nepřímo přes píst s různým poměrem ploch v plynové a kapalinové části čerpadla, jehož velikostí určuje zesílení tlaku. Tato čerpadla jsou poměrně levná a používají se spíše v preparativní kapalinové chromatografii nebo při plnění kolon.



Obr. 92. Čerpadlo na principu velkoobjemové injekční stříkačky

1 – elektromotor s krokovým chodem, 2 – převodovka, 3 – závit na táhle pístu, 4 – píst, 5 – válec naplněný mobilní fází, 6 – směr toku mobilní fáze ke koloně, 7 – jednosměrný ventil umožňující plnění čerpadla mobilní fází, 8 – zásobník mobilní fáze

2. *Čerpadla s mechanickým pohonem*, která se používají především pro analytickou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Zde jsou zdrojem hnací síly elektromotory, které přes mechanický převod vytlačují kapalinu pístem nebo membránou. Tato čerpadla lze dělit podle objemu pístní komory na čerpadla:

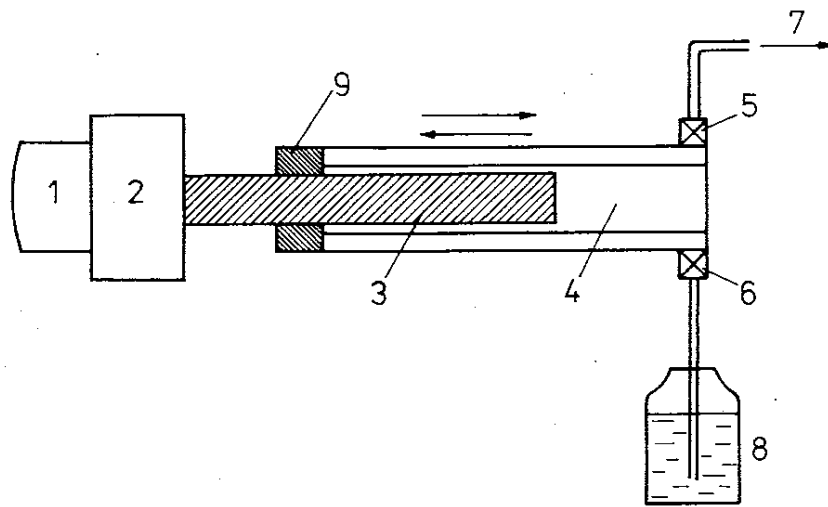
a) typu *velkoobjemové injekční stříkačky*, kde je píst tlačěn táhlem se závitem, jehož pohon je zajišťován krokovým elektromotorem přes šnekový převod a vytlačuje kapalinu z pístní komory (válece) o objemu 100 až 500 ml (obr. 92). Průtoková rychlost se nastavuje otáčkami elektromotoru. Výhodou tohoto typu čerpadel je zcela hladký bezpulsní průtok dávkované kapaliny. Dnes se od jejich používání upouští (s výjimkou aplikací při mikrokolonové kapalinové chromatografii) pro tyto nevýhody:

– po vyčerpání kapaliny v pracovním válci je třeba přerušit tok mobilní fáze kolonou na dobu několika minut, kdy se při rychlém zpětném chodu pístu pracovní válec doplní mobilní fází ze zásobníku,

– výměna mobilní fáze v čerpadle je zdoluhavá a obvykle vyžaduje značné množství mobilní fáze k promytí pracovního válce,

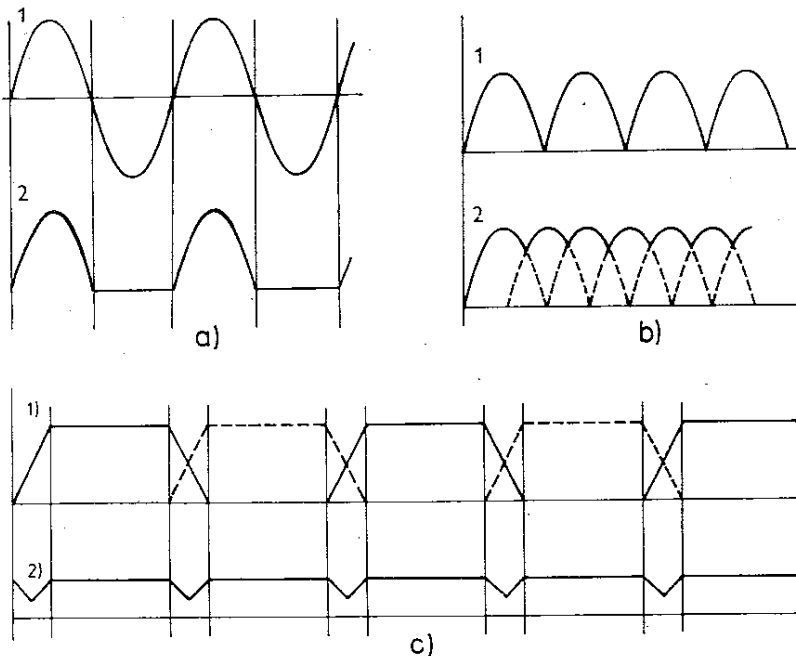
– v důsledku stlačitelnosti kapalin je třeba počítat s časem až několika desítek minut do ustavení konstantního průtoku.

b) s malým objemem činné části (obr. 93), která využívají rychlé frekvence střídání fází, v nichž se kapalina z malé pístní komory (o objemu 20 až 400  $\mu\text{l}$ ) vytlačuje a nasává přes dva zpětné ventily, z nichž sací je spojen se zásobníkem mobilní fáze



Obr. 93. Jednočinné pístové čerpadlo s malým objemem činné části

- 1 – elektromotor,
- 2 – převodový mechanismus,
- 3 – píst, 4 – pracovní prostor válce, 5 – výtlačný ventil, 6 – nasávací ventil,
- 7 – připojení ke koloně,
- 8 – zásobník mobilní fáze,
- 9 – těsnění pístu



Obr. 94. Průtokové profily v závislosti na čase a na poloze pístu u čerpadel s jednou a dvěma hlavami (popis v textu)

a výtlačný s kolonou. Průtok mobilní fáze se nastavuje buď volbou otáček elektromotoru, nebo velikostí zdvihu pístu. Čerpadla tohoto typu lze dále dělit na pístní, která k vytlačování a nasávání kapaliny používají pístu (jsou častější), nebo na membránová, která využívají kovové membrány. Výhoda tohoto typu čerpadel spočívá především v tom, že mobilní fázi lze dávkovat bez přerušování neomezeně dlouho a že v důsledku relativně malého vnitřního objemu lze mobilní fázi v čerpadle rychle a snadno vyměňovat. Nevýhodou je kolísání průtoku mobilní fáze s časem v důsledku střídání výtlačné a sací fáze. Průtokový profil těchto čerpadel ukazuje obr. 94. U jednočinných čerpadel (s jednou pístní hlavou) lze závislost polohy pístu na čase znázornit sinusovkou (obr. 94a, křivka 1), přičemž k výtlačku kapaliny jsou využity pouze části nad osou (křivka 2 na obr. 94a). Výsledné pulsy se potlačují zařazením tlumiče pulsů nebo lépe zařazením další pístní hlavy, pracující v opačné

fázi (profil průtoku znázorňuje křivka 1 na obr. 94b), popř. se využívá tři pístních hlav pracujících s fázovým posunem o  $120^\circ$  (profil průtoku znázorňuje křivka 2 na obr. 94b). Ještě dokonalejšího vyrovnání průtoku (křivka 2 na obr. 94c) lze dosáhnout při použití dvoučinných čerpadel se speciálně tvarovanými vačkami, která poskytují lichoběžníkové profily průtoku u obou hlav pracujících v opačné fázi (křivka 1 na obr. 94c). Zbývající malé kolísání průtoku se vyrovnává v nízkoobjemových průtočných tlumičích pulsů, využívajících stlačitelnosti pružných stěn či obtékaného jádra tlumiče. Pístová čerpadla se dvěma či třemi hlavami se v dnešní době používají nejčastěji.

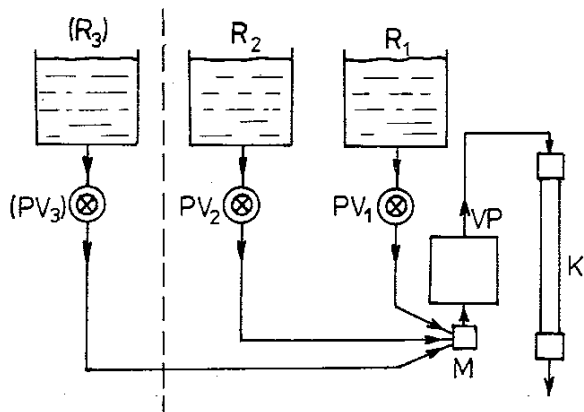
Čerpadla jsou většinou vybavena čidlem pro snímání tlaku a průtočnými filtry před a za zpětnými ventily. Zásobníky mobilní fáze se zhotovují většinou ze skla a musí být dobře uzavřeny, ne však zcela těsně, aby z nich kapalina mohla dobře odtékat a přitom její páry neunikaly do okolní atmosféry. Rozpuštěné plyny, které rušivě ovlivňují jak funkci čerpadel, tak i signál některých detektorů, je třeba z mobilní fáze odstranit.

#### 7.4.3.3 Tvorba gradientu mobilní fáze

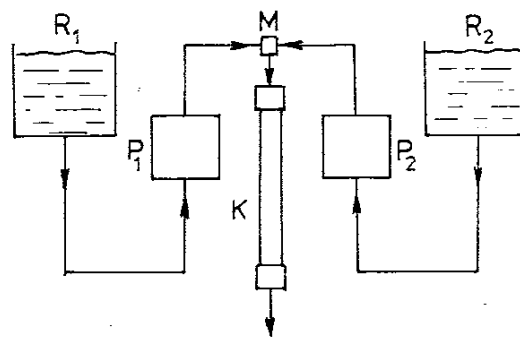
Gradientové eluce se používá k dělení směsí, jejichž složky se značně liší retencí při eluci s konstantním složením mobilní fáze. Její princip spočívá v použití mobilních fází, jejichž složení se mění s časem. Toho se docílí mícháním několika složek (většinou dvou až tří) v poměru, který se řídí předem zvoleným časovým programem. Zařízení pro tvorbu gradientu složení mobilní fáze lze principiálně dělit do dvou skupin:

1. Složky mobilní fáze se mísí za atmosférického tlaku před vstupem do vysokotlakého čerpadla v malé směšovací komůrce, přičemž poměr směšovaných složek se řídí otvíráním a zavíráním časově programovatelných solenoidních ventilů na vstupu směšovací komůrky nebo průtokem 2 až 3 pomocných podávacích nízko-tlakých mikročerpadel (obr. 95). Tento způsob tvorby gradientu se vyznačuje vysokou přesností, ale vyžaduje sladění pracovní periody pracovních cyklů ventilů a vysokotlakého čerpadla a dokonalé odvzdušnění složek mobilní fáze v zásobnících. Lze jej použít pouze ve spojení s vysokotlakými čerpadly s malým objemem činné části.

2. Každá složka mobilní fáze je dávkována vlastním vysokotlakým čerpadlem do malé směšovací komůrky před kolonou, tedy ve vysokotlaké části přístroje (obr. 96). K tomuto účelu lze použít jak čerpadel s malým objemem činné části, tak i čerpadel na principu velkoobjemové injekční stříkačky. Vzhledem k ceně čerpadel se tohoto způsobu používá v podstatě pouze k tvorbě dvousložkových gradientů. Průtoky dávkované oběma čerpadly jsou časově programovány tak, že se jejich poměr mění s časem, ale celkový průtok obou složek je konstantní. Toto zařízení se proti dříve uvedenému typu vyznačuje menším zpožděním gradientu (které je dáno vnitřním objemem zařízení od směšovací komůrky ke koloně), ale přesnost tvorby gradientu je většinou poněkud nižší vlivem různé stlačitelnosti kapalin a objemových změn (kontrakcí) při jejich směšování.



Obr. 95. Zařízení pro tvorbu gradientu v nízkotlaké části před vysokotlakým čerpadlem VP  
 $R_1, R_2, (R_3)$  – zásobníky 2 až 3 složek mobilní fáze,  $PV_1, PV_2, (PV_3)$  – solenoidové ventily nebo podávací nízkotlaká mikročerpadla, M – směšovací komůrka, K – kolona

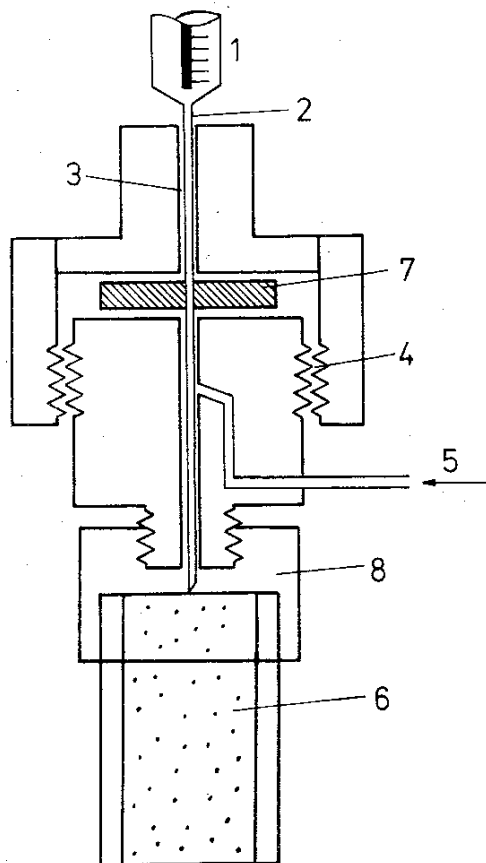


Obr. 96. Zařízení pro tvorbu gradientu ve vysokotlaké části s použitím 2 vysokotlakých čerpadel  $P_1$  a  $P_2$   
 $R_1, R_2$  – zásobníky se složkami mobilní fáze, M – směšovací komůrka, K – kolona

K programování gradientu se u většiny moderních přístrojů používá buď elektronického programátoru, nebo řídicího minipočítače, ovládajícího otáčky elektromotorů čerpadel či cyklus otvírání a zavírání solenoidových ventilů podle časového programu umožňujícího volbu gradientu buď s několika předvolitelnými tvary a různou strmostí, nebo jako řadu na sebe navazujících lineárních úseků.

#### 7.4.3.4 Zařízení pro dávkování vzorků

Konstrukce zařízení pro dávkování vzorku na chromatografickou kolonu může významně ovlivnit účinnost separace, při nedokonalém dávkování může

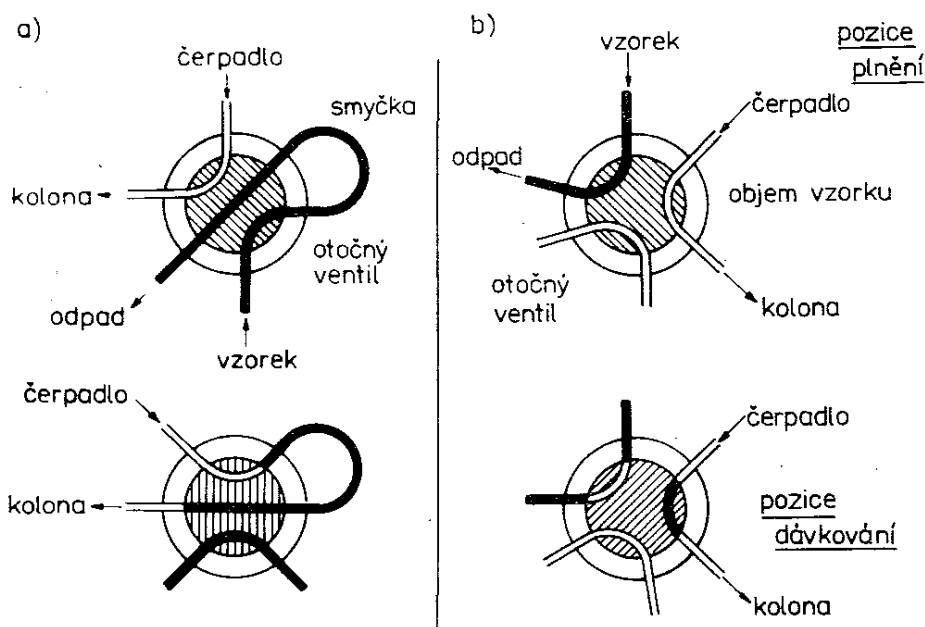


Obr. 97. Nástřikové zařízení pro dávkování vzorku injekční stříkačkou  
1 – stříkačka, 2 – jehla stříkačky, 3 – vedení jehly, 4 – šroubení k dotažení septa, 5 – přívod mobilní fáze, 6 – kolona, 7 – septum, 8 – spojení kolony s dávkovacím zařízením

docházet k významnému rozšiřování elučních zón vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení, zejména při použití vysoce účinných kolon. Byly zavedeny tři odlišné způsoby dávkování vzorků:

1. Přímý nástřik vzorku injekční stříkačkou na vrstvu sorbentu v koloně buď přes vhodné septum (průpichové pryžové těsnění) bez zastavení průtoku mobilní fáze (obr. 97), které lze použít maximálně do tlaků přibližně 10 MPa, nebo bez použití septa, což však vyžaduje přerušování toku mobilní fáze kolonou (dávkovače stop-flow) např. odšroubováním uzávěru na hlavě kolony při zastavení chodu čerpadla mobilní fáze. Obě tyto metody se vyznačují poměrně špatnou reprodukovatelností dávkovaných objemů vzorků, a nejsou tedy příliš vhodné pro kvantitativní analýzu.

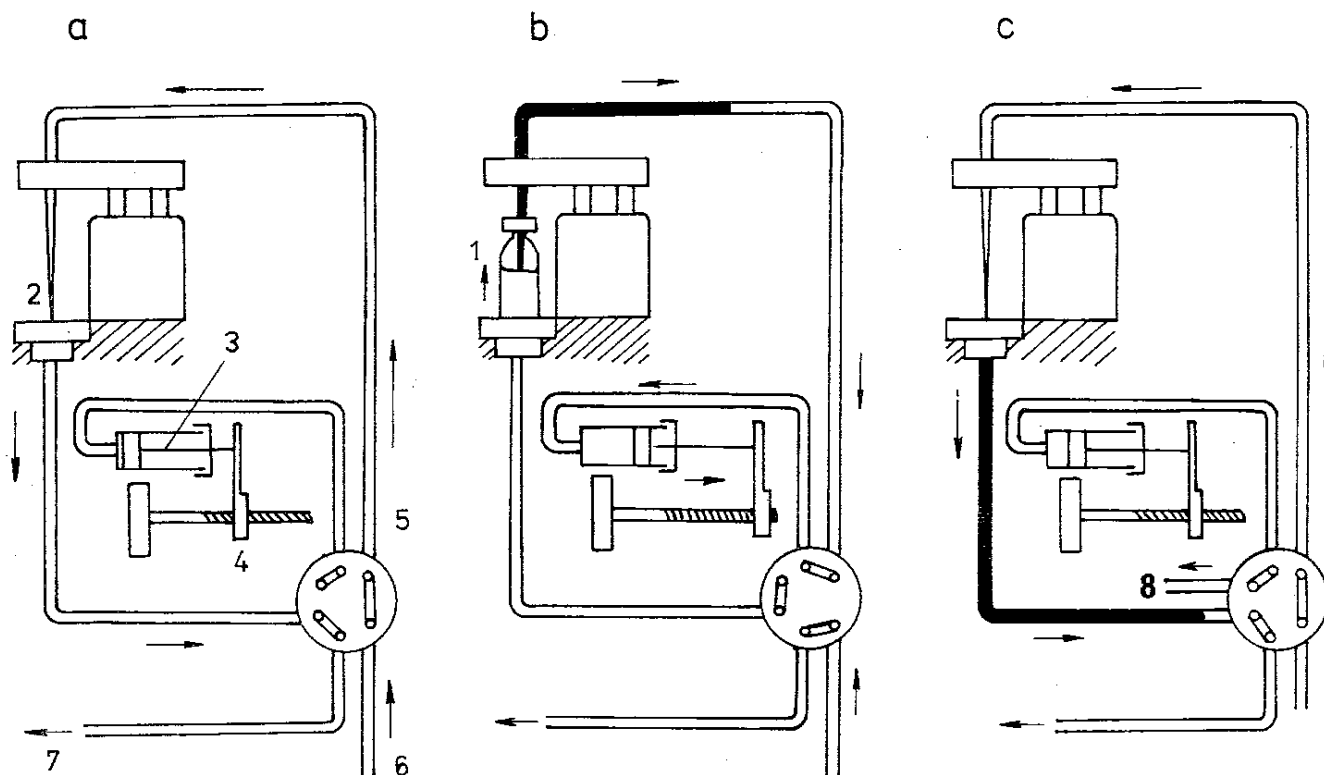
2. Dávkování vzorku dávkovacím ventilem se smyčkou (např. zařízení na obr. 98) bez přerušování toku mobilní fáze, kdy lze dávkovat buď pouze objem daný vnitřním objemem smyčky dávkovače, nebo lze u dávkovačů se speciální konstrukcí plnit jen část dávkovací smyčky injekční stříkačkou, a měnit tak dávkovaný objem. Smyčkové dávkovače jsou dvoupolohové a jejich funkce je zřejmá z obrázku. Komerčně jsou dostupné i dávkovače s poněkud odlišným konstrukčním provedením.



Obr. 98. Schéma dávkovacích vysokotlakých ventilů  
a – s využitím smyčky,  
b – s využitím vnitřní dutiny ventilu.

3. Dávkování vzorků automatickými dávkovači, které na rozdíl od předchozích manuálních způsobů umožňují dávkovat automaticky řadu vzorků po sobě bez zásahu obsluhy přístroje. To je výhodné zejména pro sériové rutinní analýzy řady vzorků, zejména pokud lze dávkovač ovládat řídicím počítačem, který současně kontroluje zpracování dat. Dávkovač sestává ze zásobníku s malými nádobkami se vzorky, které se před každým nástřikem posunou pod injekční stříkačku dávkovače. Ta vzorek z nádobky nasaje do dávkovací smyčky, po přepnutí ventilu se vytlačí vzorek ze smyčky do chromatografické kolony. Většinou se využívá pneumatického ovládání systému stlačeným vzduchem. Příklad takového zařízení ukazuje obr. 99.

U dávkovaných vzorků je třeba dbát na to, aby byly dokonale rozpuštěny, nejlépe v rozpouštědle o stejném složení jako mobilní fáze, popř. aby přítomné tuhé částičky byly ze vzorku odfiltrovány.



Obr. 99. Automatický dávkovač vzorků (firmy Hewlett-Packard)

1 – nádobka se vzorkem, 2 – jehla dávkovače, 3 – injekční stříkačka ovládaná krokovým motorem 4, 5 – rotační přepínací ventil, 6 – přívod mobilní fáze od čerpadla, 7 – spojovací kapilára ke koloně, 8 – kapilára k odpadu;

a – normální provoz, mobilní fáze prochází jehlou na kolonu, b – plnění jehly vzorkem ze zásobníku bez přerušení toku mobilní fáze po přepnutí rotačního ventilu, c – nástřik vzorku z jehly po opětovném přepnutí rotačního ventilu do původní polohy se současným vyprázdněním injekční stříkačky

#### 7.4.3.5 Chromatografické kolony a jejich náplně

Volba vhodné kolony má ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii rozhodující význam, neboť výsledek chromatografické analýzy je především určován kvalitou kolony a její náplně. Na druhé straně však optimálního využití vlastností dobré chromatografické kolony dosáhneme pouze v přístroji, kde jsou i ostatní části (především detektory, dávkovací zařízení a spojovací kapiláry, ale i čerpadla mobilní fáze) konstruovány s ohledem na použitou chromatografickou kolonu.

Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem, zhotovené z materiálu, který musí odolávat jak relativně vysokým pracovním tlakům (až 60 MPa), tak i chemickému působení mobilních fází a separovaných látek, na něž rovněž nemá působit katalyticky, aby nedošlo k rozkladu vzorku v průběhu analýzy. Jako materiálu pro chromatografické kolony se většinou používá bezešvých trubíc z kvalitní antikorozi oceli s leštěným vnitřním povrchem nebo tlustostěnných trubíc z borosilikátového skla speciálně tvrzeného, které mají lepší chemickou odolnost, ale nižší mechanickou odolnost, takže se doporučuje používat skleněných kolon maximálně do tlaků 10 až 20 MPa. Výhody obou typů kolon spojují kolony zhotovené z kovu, jejichž vnitřní povrch je potažen tenkou vrstvou skla. Jejich širšímu použití však zatím brání poměrně

Tabulka 7.4. Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii

Označení kolon	Použití	Vnitřní průměr		Délka	Velikost		Množství vzorku pro 1 separaci
		mm	mm		částecek náplně	$\mu\text{m}$ g	
preparativní (technologické)	technologické aplikace – malotonážní výroba (v kg) vzácných chemikálií	>50	500 až 2 000	500 až 2 000	10 až 100	10 <sup>2</sup>	až 10 <sup>4</sup>
preparativní, semipreparativní	separace látek (v g) pro další analýzu, výroba velmi vzácných chemikálií	10 až 50 8 až 10	250 až 1 000 150 až 500	250 až 1 000 150 až 500	10 až 100 5 až 40	10 <sup>-2</sup> 10 <sup>-3</sup>	až 10 <sup>1</sup> až 10 <sup>-1</sup>
klasické, GPC a iontové výměnné	gelová permeační chromatografie, analyzátory aminokyselin apod.	6 až 10	150 až 1 000	150 až 1 000	15 až 100	10 <sup>-6</sup>	až 10 <sup>-1</sup>
analytické	většina analytických aplikací	2 až 6	50 až 300	50 až 300	3 až 10	10 <sup>-10</sup>	až 10 <sup>-4</sup>
mikrokolony	analytické aplikace	0,5 až 2	50 až 1 000	50 až 1 000	3 až 10	10 <sup>-12</sup>	až 10 <sup>-5</sup>
kapilární, plněné	analytické aplikace	≤0,3	100 až 1 000	100 až 1 000	3 až 10	10 <sup>-14</sup>	(?) až 10 <sup>-6</sup>
kapilární, prázdné, se stěnami s chemicky vázanými fázemi	tento typ kolon je ve stadiu teoretického výzkumu a vývoje	0,005 až 0,060	1 000 až 10 000	1 000 až 10 000	—	<10 <sup>-8</sup>	(?)

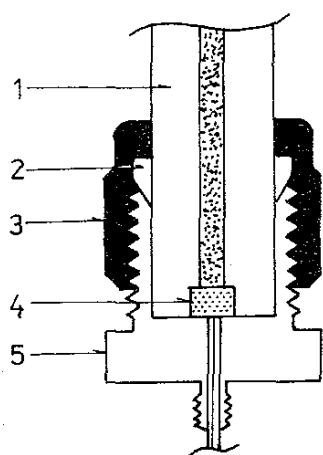
vysoká cena. Lze použít i trubic z vysoce inertních plastů, umístěných ve speciálních kovových pouzdrech, kde působí vysoký tlak na jejich vnější stěny, a brání tak jejich poškození při pracovním tlaku (tzv. systému radiální komprese).

Rozměry kolon závisí jednak na účelu, k němuž jsou použity, jednak na velikosti částic náplně. Orientační přehled vnitřních průměrů a délek kolon pro různé aplikace je uveden v tab. 7.4. Tloušťka stěny kolon závisí na vnitřním průměru kolony a na materiálu, z něhož je kolona zhotovena. Pro kolony z nerezové oceli má být poměr vnitřního průměru a tloušťky stěny nejvýše 1:0,25, u skleněných kolon většinou tloušťka stěny převyšuje vnitřní průměr.

V dnešní době se pro analytické aplikace používá převážně kolon plněných pórovitými náplněmi s částicemi o průměru 3 až 10  $\mu\text{m}$ . Délka těchto kolon se pohybuje mezi 5 až 30 cm a vnitřní průměr nejčastěji mezi 2 až 4 mm. Při volbě rozměrů kolony a velikosti náplně je třeba mít na paměti, že množství vzorku, které je možno podrobit separaci, roste se čtvercem vnitřního průměru kolony, zatímco u dobře naplněných kolon účinnost separace ani doba analýzy na průměru kolony nezávisí. S rostoucí délkou kolony se úměrně zvyšuje účinnost separace (počet pater), ale i doba analýzy a pracovní tlak. Účinnost separace a pracovní tlak naopak klesají s rostoucím čtvercem průměru částic náplně. Citlivost analýzy je nepřímo úměrná rozmytí eluční zóny a roste s klesající délkou a průměrem kolony a s klesajícím průměrem částic náplně. Tohoto principu využívá tzv. nízkodisperzní kapalinová chromatografie, tj. chromatografie s malým rozmytím elučních zón, při níž se pracuje:

1. s krátkými kolonami,
2. s kolonami o malém vnitřním průměru.

Při práci s krátkými kolonami (ca 5 až 6 cm) lze dosáhnout značného urychlení analýzy a snížení spotřeby mobilní fáze při dobré účinnosti separace, pokud jsou kolony plněny náplněmi s malým průměrem částic (3  $\mu\text{m}$ , popř. i menší). Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm (mikrokolonami) mluvíme o tzv. mikrokolonové kapalinové chromatografii, jejíž výhodou je zejména snížení spotřeby mobilní fáze a vzorku a zvýšení citlivosti detekce. O této metodě pojednává podrobněji odd. 7.4.6.1. Při nízkodisperzní kapalinové chromatografii je třeba co nejvíce omezit rozmývání elučních zón v důsledku mimokolonových příspěvků [rovn. (3.72)], takže je třeba omezit na minimum vnitřní objem spojovacích kapilár (pod 1  $\mu\text{l}$ ), dávkovacího zařízení (pod 1  $\mu\text{l}$ ) a celý detektoru (1 až 5  $\mu\text{l}$ ). Velkou pozornost



Obr. 100. Příklad koncevky kolony bez mrtvého objemu  
1 – chromatografická kolona, 2 – kónické těsnění, 3 – převlečná matka, 4 – porézní fritka nebo sítko (2  $\mu\text{m}$ ), 5 – šroubení s kapilárou k připojení kolony k detektoru; všechny části jsou zhotovené z nerezové oceli



je třeba věnovat i koncovkám kolon, které nemají mít žádný mrtvý prostor (obr. 100).

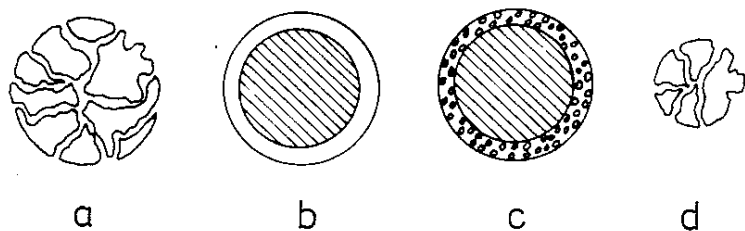
Delších kolon s průměrem řádově v centimetrech se používá v preparativní chromatografii, kde je cílem izolace rozdělených látek po předchozí separaci a kde se snažíme o to, aby bylo možno zpracovat co největší množství vzorku (další podrobnosti jsou uvedeny v odd. 7.4.6.2).

Aby se dosáhlo vysoké účinnosti kolon v kapalinové chromatografii, je třeba volit takové typy náplní a takové způsoby plnění kolon, které umožní co nejvíce potlačit rozšiřování elučních zón látek v koloně. Je tedy třeba omezit jednotlivé příspěvky k výškovému ekvivalentu teoretického patra. Příspěvek turbulentní difúze lze potlačit homogenním a rovnoměrným naplněním kolony malými částicemi a vliv odporu proti převodu hmoty v mobilní fázi se omezí při použití malých částic náplně, čímž se zmenší velikost prostoru mezi částicemi. K potlačení vlivu odporu proti převodu hmoty ve stagnující mobilní fázi lze přistupovat dvojím způsobem:

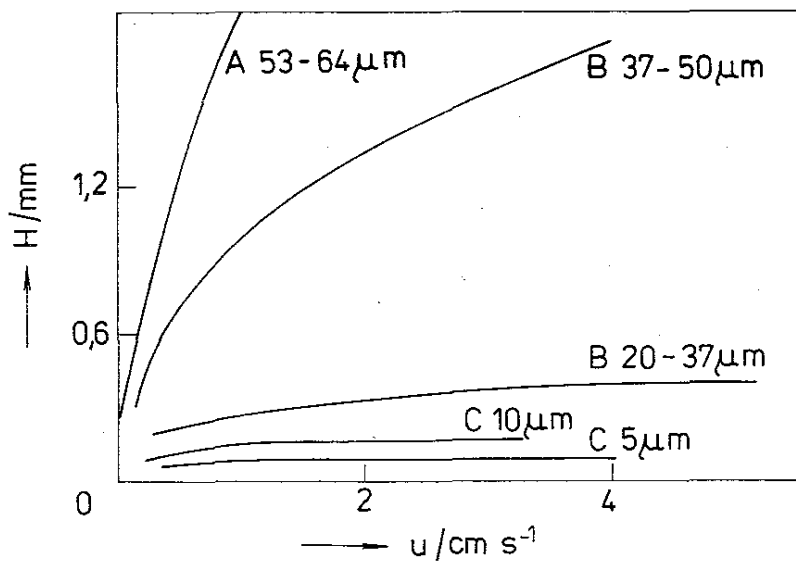
a) zmenšováním průměru částic náplně,

b) použitím tzv. povrchově pórovitých náplní, u nichž je tenká aktivní vrstva sorbentu (stacionární fáze) nanášena na nepropustném jádru, většinou na malých skleněných kuličkách.

Oběma těmito způsoby se zmenší objem pórů se stagnující mobilní fází uvnitř částic náplně, jimiž musí molekuly látek difundovat, aby dosáhly povrchu stacionární fáze.



Obr. 101. Řez částicemi různých typů náplní (popis v textu)



Obr. 102. Účinnost pórovitých a povrchově pórovitých náplní kolon s různými rozměry částic  
 A – pórovitý silikagel,  
 B – povrchově pórovitý silikagel,  
 C – mikroparticulární pórovitý silikagel  
 H – výškový ekvivalent teoretického patra,  
 u – lineární rychlost toku mobilní fáze

Na obrázku 101 jsou uvedeny různé typy náplní, které se užívají v kapalinové chromatografii: klasický typ pórovité náplně s částicemi o průměru 25 až 80  $\mu\text{m}$  (a), tzv. pelikulární náplň s filmem polymerní stacionární fáze nanášeným na nepropustném anorganickém nosiči kulového tvaru (b), náplň s tzv. kontrolovanou

povrchovou pórovitostí, kterou tvoří pórovité anorganické částice, jež mohou být pokryté nanesenou nebo chemicky vázanou stacionární fází nebo sintrované na anorganickém kulovém nosiči (c) (průměr částic pod písmenem b a c je 25 až 50  $\mu\text{m}$ , tloušťka filmu či povrchově pórovité vrstvy je 1 až 3  $\mu\text{m}$ ) a tzv. mikropartikulární pórovité náplně stejné struktury jako (a), ale s částicemi o průměru 3 až 20  $\mu\text{m}$  (d).

Porovnání účinnosti pórovitých a povrchově pórovitých náplní kolony ukazuje obr. 102. Výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  klesá a účinnost separace se zlepšuje s klesajícím průměrem pórovitých částic. Nahrazení pórovité částice stejně velikou povrchově pórovitou částičkou má obdobný vliv jako zmenšení průměru částic. Výhody lepší účinnosti povrchově pórovitých náplní se projevují zejména při větším průměru částic náplně; s klesajícím průměrem částic je i relativní zlepšení účinnosti u povrchově pórovitých náplní menší. Největší účinnosti se dosáhne u mikropartikulárních pórovitých náplní při rozměru částic asi 3 až 10  $\mu\text{m}$ . Po vyřešení technických problémů spojených s přípravou kolon plněných

Tabulka 7.5. Porovnání vlastností různých typů náplní

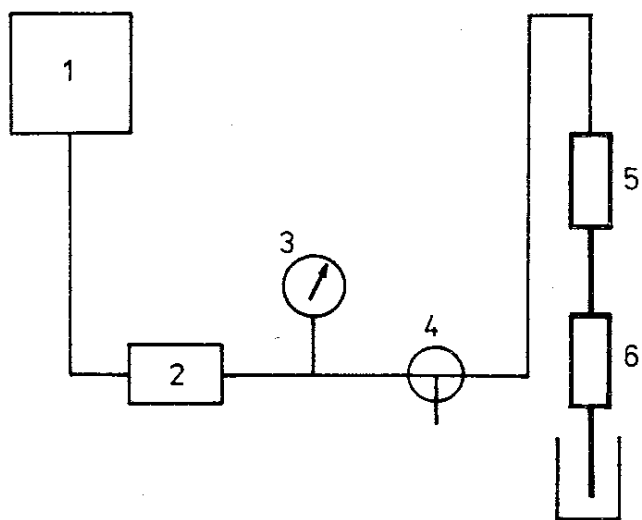
Vlastnost	Typ náplně		
	klasická pórovitá	povrchově pórovitá a pelikulární	pórovitá mikro-partikulární
střední průměr částic / $\mu\text{m}$	20 až 200	25 až 80	3 až 15
typická délka kolon / cm	50 až 200	50 až 100	5 až 30
typický průměr kolon / mm	10 až 100	2 až 3	0,5 až 6
specifický povrch náplně / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	60 až 600	1 až 15	60 až 600
tvar částic	nepravidelný	kulový	kulový nebo nepravidelný
kapacita	velká	malá	velká
tlakový spád na koloně	velmi malý	malý	velký
účinnost	velmi malá	střední až dobrá	velmi dobrá
snadnost plnění	velmi snadné, za sucha	snadné, za sucha	za mokra, vysokotlakou suspenzní technikou
cena	nízká	vysoká	vysoká
<i>Možnost použití:</i>			
vývoj analytických metod	ne	ne	ano
rutinní analýza	ne	částečně	ano
stopová analýza	ne	ne	ano
preparativní dělení	ano	ne	ano
ochranné předkolony	ano	ano	částečně
čištění rozpouštědel	ano	ne	ne
předkolony pro obohacování vzorků	ano	ne	částečně

mikropartikulárními částicemi značně poklesl praktický význam náplní s kontrolovanou povrchovou pórovitostí. Vlastnosti různých typů náplní jsou porovnány v tab. 7.5.

V moderní analytické praxi zcela převažuje použití kolon plněných mikropartikulárními pórovitými náplněmi s částicemi o průměru 3 až 10  $\mu\text{m}$  vzhledem k lepší účinnosti separace a kapacitě (možnosti zatížení kolony vzorkem). Povrchově pórovité a pelikulární náplně mohou být užitečné pro relativně jednoduché rutinní separace, pokud rozhodují malé nároky na pracovní tlak a přípravu kolon. Klasické pórovité náplně s částicemi o průměru větším než 20  $\mu\text{m}$  se v dnešní době používají pro preparativní separace (hlavně pro nižší cenu) a pro některé aplikace gelové permeační a iontově výměnné chromatografie, i když i v těchto oblastech se stále více prosazují kolony plněné účinnějšími mikropartikulárními náplněmi. Další možnosti využití jsou přehledně uvedeny v tab. 7.5.

Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matici (na silikagelu, popř. na oxidu hlinitém nebo pórovitém sklu), na níž mohou být chemicky vázané nebo zakotvené různé stacionární fáze. Částičky mohou mít nepravidelný nebo kulový tvar. Méně často se používá i organických gelů různé struktury, popř. s chemicky modifikovaným povrchem. Částice těchto náplní mají vesměs kulový tvar. Charakter stacionární fáze, pórovitost a specifický povrch částiček náplně závisí na chromatografickém systému a je podrobněji probrán v odd. 7.4.4.

Plnění kolon částičkami o průměru větším než 30  $\mu\text{m}$  (klasickými pórovitými a povrchově pórovitými náplněmi) je snadno uskutečnitelné za sucha podobnou technikou jako plnění plynově chromatografických kolon. Kolony s reprodukovatelnou účinností v rozmezí 20 % lze připravit tak, že se postupně přidává vždy jen malé množství náplně (maximálně k zaplnění 2 až 3 mm délky kolony) a po každém přidavku se kolonou poklepává o podložku a současně jemně ze strany ve výši hladiny náplně v koloně.



Obr. 103. Zařízení pro plnění kolon za vyšších tlaků

1 – zásobník plnicí kapaliny, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 – manometr, 4 – trojcestný kohout, 5 – zásobník suspenze, 6 – kolona

Plnění za sucha selhává u náplní s částičkami o průměru menším než 20  $\mu\text{m}$ , hlavně vlivem elektrostatického náboje, který působí shlukování částiček náplně při plnění. Výsledkem je nejednotná struktura náplně v koloně. Pro přípravu účinn-

ných rovnoměrně naplněných kolon byla vyvinuta technika rychlého plnění kolon suspenzí náplně ve vhodné kapalině při vysokých tlacích, aby se zabránilo shlukování částic a jejich rozdělení podle velikosti v průběhu plnění. Jako suspenzních kapalin se používá různých směsí polárních a středně polárních rozpouštědel o vysoké viskozitě nebo hustotě. K plnění lze např. použít zařízení, jehož schéma ukazuje obr. 103. Vysokotlaká čerpadla jsou buď speciálně upravena pro tento účel, nebo lze použít i čerpadla kapalinového chromatografu.

#### 7.4.3.6 Detektory ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Obecné vlastnosti detektorů a požadavky na ně kladené jsou uvedeny v kap. 4. V podstatě všechny typy detektorů používané v dnešní době v kapalinové chromatografii jsou koncentrační, tj. poskytují signál (odezvu) úměrný koncentraci látek v eluátu. Lze je dělit do dvou skupin na:

a) *selektivní detektory*, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky (solutu) v eluátu,

b) *univerzální (nespecifické) detektory*, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku, tj. solutu a mobilní fáze.

Ideální detektor pro kapalinovou chromatografii by měl umožňovat detekci všech typů látek, měl by poskytovat okamžitou a lineární koncentrační odezvu v co nejširším rozmezí koncentrací solutu, měl by mít vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu, neměl by být citlivý ke změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty, měl by mít minimální příspěvek k rozšiřování elučních zón látek a měl by umožňovat použití gradientové eluce či jiných technik s programovanou změnou pracovních podmínek. Takový detektor pro kapalinovou chromatografii v praxi neexistuje a různé detektory se jednotlivým požadavkům do různé míry přibližují. Jednotlivé nejčastěji používané typy detektorů pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a jejich důležité vlastnosti uvádí tab. 7.6.

#### Spektrofotometrické detektory (ultrafialová–viditelná oblast)

Tyto detektory jsou v moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografii nejrozšířenější a ačkoliv jsou selektivní, používají se v 70 až 80 % aplikací. Detegované látky musí absorbovat záření vlnové délky použité k detekci. Podle toho, které vlnové délky se používají k měření, lze rozeznávat čtyři konstrukční typy:

a) Detektory, které pracují s jednou pevně nastavenou vlnovou délkou (nejčastěji 253,7 nm), většinou využívají jako zdroje záření nízkotlakou rtuťovou výbojku opatřenou na výstupu záření interferenčním filtrem. Pro detekci látek s absorpčními maximy u nižších vlnových délek se někdy používají jako zdroje monochromatického záření i nízkotlaká zinková výbojka (spektrální emisní čára při 212 nm) a nízkotlaká kadmiová výbojka (emisní čára při 225 nm). Detektory se konstruuji jako dvoupaprskové a měří rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou, v níž může být buď vzduch, nebo mobilní fáze. Schéma tohoto typu detektorů ukazuje obr. 104.

Tabulka 7.6. Některé typy detektorů pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a jejich typické vlastnosti

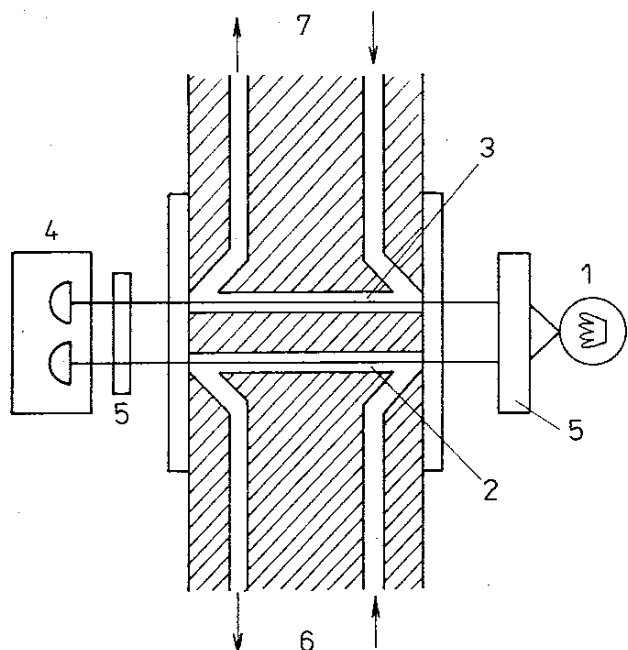
## Typ detektoru

měřená fyzikální veličina	spektrofotometrický UV-VIS		fluorimetrický		elektrochemický		refraktometrický		vodivostní		radiometrický	
	absorbance	absorbance	absorbance	absorbance	fluorescenční tok elektrický proud mezi elektrodami	index lomu	vodivost	radioaktivita				
úpořitebnost	velmi velká	malá	velká	velká	velká	velká	menší	malá				
spojení s gradientovou elucí	ano	obtížné	ano	obtížné	ne	ne	ano, pokud se nemění	ano				
závislost odezvy na průtoku <sup>1)</sup>	ne	ne	ne	ano	ano	ne	ano	ne				
teplotní závislost odezvy	nízká	nízká	nízká	nízká	značná	značná	značná	zanedbatelná				
rozsah linearity	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^6$	$10^6$	$10^4$	$10^3$ až $10^4$	velký				
horní mez lineární odezvy	1 jednotka absorbance	1 jednotka absorbance	závisí na typu látky	$10^{-5}$ A	$10^{-3}$ jednotek indexu lomu	1 mS	—					
minimální <sup>2)</sup> detegovatelná koncentrace / $\text{g ml}^{-1}$	$10^{-10}$	$10^{-6}$	$10^{-12}$	$10^{-12}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	—					
klasifikace detektoru	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	nespecifický	nespecifický	nespecifický	selektivní				

<sup>1)</sup> v důsledku teplotní závislosti (rychlosti odvodu tepla) některé typy detektorů, klasifikované zde jako nezávislé na průtoku, projevují určitou závislost na průtoku

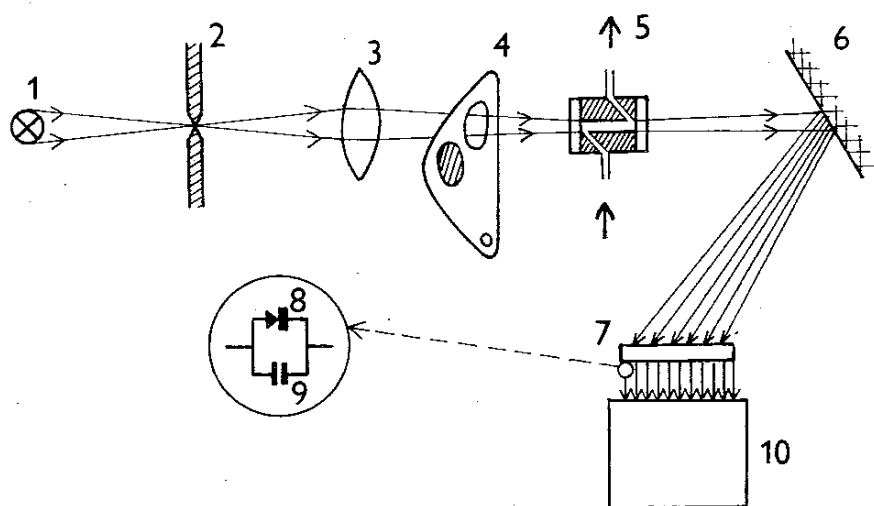
<sup>2)</sup> orientační hodnoty, závisí na typu látky a někdy i na použité mobilní fázi

b) Detektory, u nichž lze volit mezi několika předem danými vlnovými délkami (např. 254, 280, 313, 340, 365, 405, 436 a 546 nm), jsou založeny na stejném principu jako předchozí typ a vlnovou délku volíme výměnou interferenčního filtru.



Obr. 104. Schéma dvoupráskového spektrofotometrického detektoru (UV-viditelná oblast)

1 – zdroj ultrafialového, popř. viditelného záření,  
2 – měrná cela detektoru, 3 – referenční cela detektoru, 4 – fotoelektrické články zaznamenávající prošlé záření, 5 – optický systém detektoru, 6 – přítok a odtok mobilní fáze z kolony, 7 – přítok a odtok čisté mobilní fáze



Obr. 105. Schéma spektrofotometrického „diode-array“ detektoru s rychlým záznamem spektra

1 – deuteriová výbojka, 2 – štěrbinu, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – průtoková cela, 6 – holografická disperzní mřížka, 7 – souprava plošných fotodiod, 8 – fotodioda, 9 – kondenzátor, 10 – stolní počítač

c) Spektrofotometrické detektory opatřené monochromátorem, u nichž lze vlnovou délku nastavovat (většinou v rozmezí od 190 do 400 nm), konstrukčně odpovídají miniaturizovaným spektrofotometrům vybaveným průtočnými mikro-celami. Výhodou je jednoduchá možnost volby libovolné vlnové délky nastavením monochromátoru, nevýhoda spočívá v poněkud nižší citlivosti ve srovnání s detektory s pevně nastavenou vlnovou délkou. Některé detektory tohoto typu umožňují snímat spektra látky v měrné cele detektoru při zastaveném průtoku mobilní fáze.

d) Spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušování chromatografické separace na koloně pracují s velkým počtem plošných fotodiod (více než 200), umístěných na destičce o délce asi 1 cm („photodiode-array“ detektory). Jak ukazuje schéma na obr. 105, záření ze zdroje (deuteriové výbojky) po průchodu měrnou průtokovou celou se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený

absorpcí v cele detektoru. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, předem nabitým na určitou hodnotu, a fotoelektrický proud vznikající po dopadu záření na fotodiodu vybije kondenzátor úměrně velikosti intenzity dopadajícího zářivého toku. V následující fázi se kondenzátor dobije a měří se proud spotřebovaný na dobití, jehož velikost se pro každou fotodiodu ukládá do paměti řídicího počítače. Periody ozáření a dobíjení kondenzátorů se velmi rychle střídají (s frekvencí několika milisekund), takže pro zpracování signálů počítačem jsou k dispozici v každém okamžiku údaje o absorpenci při každé vlnové délce registrované jednotlivými fotodiodami. Tyto detektory umožňují jednak současnou detekci a integraci při několika vlnových délkách (1 až 8), jednak i současné získávání spekter a chromatogramů, např. ve formě prostorových diagramů. Lze i sčítat signály při několika různých vlnových délkách, a tím zvýšit citlivost detekce.

### Fluorimetrický detektor

Tento detektor je vysoce selektivní a citlivý a poskytuje odezvu pro látky vykazující fluorescenci. Detegovaná látka v cele detektoru absorbuje ultrafialové budicí (excitační) záření, jehož pohlcená energie se zčásti vyzáří (emituje) ve formě fluorescenčního záření o nižší energii (vyšší vlnové délce), než má záření excitační. Emitované záření dopadá na fotoelektrický násobič, který poskytuje proud úměrný toku emitovaného fluorescenčního záření a koncentraci detegované látky v cele detektoru. Předpokladem dobré funkce detektoru je dokonalé oddělení emitovaného záření od záření budicího, čehož se dosáhne umístěním fotoelektrického násobiče kolmo na směr průchodu budicího záření celou a zařazením vhodných filtrů.

Nejjednodušší detektory používají rtuťové výbojky a filtru jako zdroje monochromatického excitačního záření a detegují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách. Na druhé straně nejdražší přístroje jsou vybaveny monochromátory umožňujícími zvolit libovolnou vlnovou délku jak budicího, tak i emitovaného záření, programovat vlnové délky v průběhu eluce pro dosažení maximální citlivosti detekce různých separovaných látek, eventuálně i snímat excitační a emisní spektra látek v cele detektoru za účelem jejich identifikace.

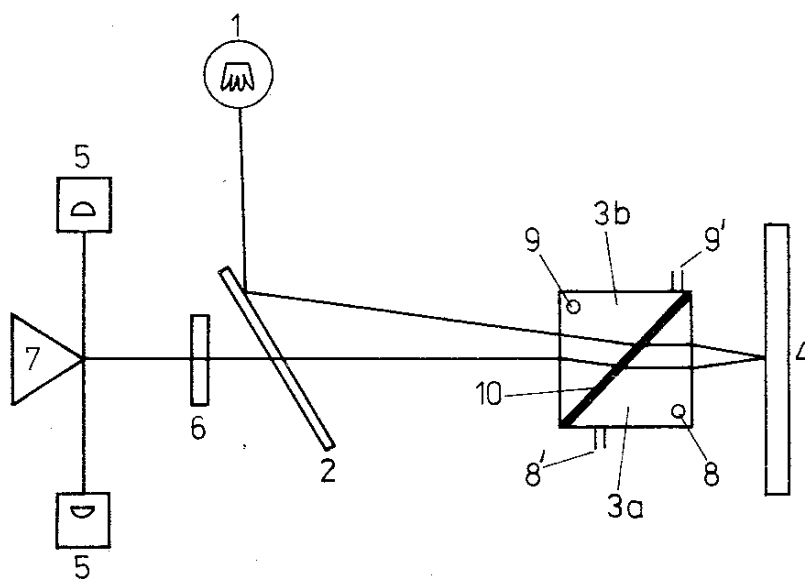
### Refraktometrický detektor

Tento detektor sice umožňuje detekci v podstatě všech látek (je univerzální, nespecifický), vyznačuje se však nižší citlivostí a vyššími mezemi detekce než spektrofotometrické, fluorimetrické či elektrochemické detektory. Jeho odezva značně závisí na teplotě. Nelze jej použít při gradientové eluci. Tento detektor poskytuje odezvu úměrnou rozdílu indexů lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (kterou by měla být vždy čistá mobilní fáze) v cele srovnávací. Citlivost detektoru tedy je tím větší, čím větší je rozdíl indexu lomu látky a indexu lomu mobilní fáze. Stabilní odezva detektoru vyžaduje, aby teplota cel detektoru byla konstantní. Proto jsou cely refraktometrického detektoru zasazeny do masivního kovového bloku s velkou tepelnou kapacitou; většinou je možno tento blok temperovat pomocí

termostatu s vnějším oběhem temperační kapaliny. K měření rozdílu indexů lomu se používá

- a) výhylkové metody,
- b) Fresnelovy metody,
- c) Christiansenova efektu.

Výhylkový refraktometr, jehož princip znázorňuje obr. 106, používá paprsku světla, který postupně prochází měrnou a srovnávací celou, dopadá na zrcadlo, od něhož se odrazí, znovu projde oběma celami a po průchodu polopropustným zrcadlem dopadá na hranu zrcadlového hranolu, od něhož se odráží na dvojici spárovaných čidel. Skleněnou destičkou se nastaví optická nula tak, aby dopadal na obě čidla stejný světelný tok, pokud je v obou celách mobilní fáze. Při průchodu detegované látky měrnou celou působí změna indexu lomu v této cele výhylku paprsku, takže na obě čidla dopadá různý světelný tok, který v nich vyvolá různé hodnoty elektrického proudu. Proudový rozdíl po zesílení představuje signál detektoru.



Obr. 106. Schéma výhylkového refraktometrického detektoru

1 – zdroj záření, 2 – polopropustné zrcadlo, 3 – cely refraktometru, a – měrná, b – referentní, 4 – zrcadlo, 5 – detektory záření (fotoelektrické články), 6 – skleněná destička k nastavení optické nuly, 7 – zrcadlový hranol, 8, 8' – přívod a odvod mobilní fáze z měrné cely, 9, 9' – přívod a odvod mobilní fáze z referentní cely, 10 – přepážka z křemenného skla

Detektory konstruované na principu využití Fresnelova zákona měří intenzitu světla odraženého z fázového rozhraní mezi kapalinou a skleněným hranolem, která závisí na indexech lomu obou prostředí. I u těchto detektorů se využívá jako signálu rozdíl toku světla vycházejícího z měrné cely, již protéká eluát z kolony, a toku světla ze srovnávací cely s čistou mobilní fází. Tento typ detektoru je poněkud méně citlivý než výhylkové refraktometrické detektory.

Detektor využívající Christiansenova efektu měří intenzitu světla rozptýleného při průchodu eluátu celou plněnou částčkami o stejném indexu lomu, jaký má mobilní fáze. Podíl rozptýleného záření prudce vzroste, je-li index lomu eluátu odlišný od indexu lomu náplně cely. Nevýhodou je, že pro každou mobilní fázi musí být použita cela s náplní o jiném indexu lomu.



Tyto detektory měří proud vyvolaný při průchodu redukovatelné či oxidovatelné látky měrnou celou, ve které jsou umístěny elektrody, na něž je vloženo pracovní napětí nezbytné k průběhu elektrochemické reakce. Většinou se používá tříelektrodového systému (elektrody měrné, srovnávací a pomocné). Jako materiálu měrné elektrody, na níž probíhá elektrochemická oxidace či redukce detegované látky, se používá skelného uhlíku, grafitové pasty, uhlíkových (grafitových) vláken, platiny, zlata, mědi, niklu či drátů a disků potažených různými amalgámy rtuti. Nevýhodou tuhých měrných elektrod je zanášení a postupná deaktivace jejich povrchu produkty oxidace a redukce či nečistotami z mobilní fáze, což vyžaduje častou recalibraci detektoru při kvantitativní analýze. Občas je třeba měrnou celou demontovat a elektrodu mechanicky očistit (obrousit) a tím obnovit její povrch. Polarografické detektory pracují se rtuťovou kapkovou elektrodou, u níž se na rozdíl od ostatních detektorů pravidelně obnovuje povrch. Nevýhodou této elektrody je omezený anodický potenciálový rozsah a omezená možnost miniaturizace měrné cely.

Měrné cely jsou válcové (tubulární), kde eluát z trysky přímo omývá měrnou elektrodu (tzv. wall-jet detektory), nebo kapilární, kde se do středu matky, již prochází kapilára, našroubuje držák s elektrodou (eluát z cely prochází prostorem mezi matkou a držákem), nebo s tenkou vrstvou roztoku vymezenou výřezem ve fólii z plástu (Teflonu). Při miniaturizaci měrných cel bylo dosaženo vnitřních objemů menších než 1 nl, což činí tyto detektory zvláště vhodné pro práci s mikrokolonami a s kapilárními kolonami.

Elektrochemické detektory jsou selektivní a umožňují dosáhnout velmi vysoké citlivosti detekce (tab. 7.6), jejich výhodou je i poměrně nízká cena. Hlavními nevýhodami jsou jednak zanášení povrchu tuhých elektrod, jednak vysoké nároky na čistotu mobilní fáze, má-li být dosaženo stabilní nulové linie a reprodukovatelných výsledků. Zvláště musí být z mobilní fáze odstraněn veškerý rozpuštěný kyslík i stopy kovových iontů. Mobilní fáze musí být vodivá, takže elektrochemické detektory nelze použít při chromatografii s normálními fázemi, a na závadu je i vysoký obsah organických rozpouštědel ve vodně-organických mobilních fázích (snížená vodivost mobilní fáze).

### Vodivostní detektor

Vodivostní detektor je po detektoru refraktometrickém druhý nejčastěji používaný nescifický (univerzální) detektor. Měří elektrickou vodivost eluátu vytékajícího z kolony mezi dvěma elektrodami (z nerezové oceli, zlata nebo platiny) v průtokové cele obvykle válcového tvaru, jejíž objem lze snadno miniaturizovat (až pod 0,1  $\mu$ l). Obě elektrody však musí být vzájemně dobře izolovány. Aby se zabránilo jejich polarizaci, je na ně vkládáno střídavé napětí. Vodivostní detektor se hodí pouze pro detekci iontů, které zprostředkovávají vedení proudu v roztocích. Mobilní fáze by měla být pokud možno nevodivá, tj. voda bez přídavku elektrolytů, popř. vodné roztoky organických rozpouštědel. Takovéto mobilní fáze jsou však pro separaci

většiny iontů nevhodné. Přesto vodivostní detektory doznávají zvláště v poslední době stále širšího použití v iontové výměnné (či iontové) chromatografii (odd. 7.4.4.5). Je však třeba používat pouze přísady málo koncentrovaných slabě vodivých solí do mobilních fází. Buď se před vlastní detekcí většina vodivých iontů z mobilní fáze odstraní na tzv. potlačovací (supresorové) koloně, nebo je třeba pracovat s vodivostními detektory konstruovanými tak, aby umožňovaly citlivě registrovat i nepatrné změny vodivosti při poměrně vysokých hodnotách vodivosti, daných přítomností základního elektrolytu v mobilní fázi.

Citlivost vodivostního detektoru není příliš vysoká v důsledku přítomnosti stopových iontových nečistot ve vodných mobilních fázích (zvláště je na závadu přítomnost rozpuštěného  $\text{CO}_2$ ); detektor je dosti citlivý na kolísání teploty v průběhu měření.

### Ostatní typy detektorů

*Spektrofotometrické detektory pracující v infračervené oblasti spektra* mají značně omezené využití vzhledem k relativně nízké citlivosti a ke značným omezením volby mobilní fáze, protože velká většina rozpouštědel vykazuje v infračervené oblasti řadu intenzivních absorpčních pásů. Tyto detektory se používají převážně ve spojení s gelovou permeační chromatografií, kde se zpravidla analyzují vzorky ve větších koncentracích. O možnostech spojení kapalinové chromatografie se snímáním infračervených spekter bude pojednáno v kap. 8.

*Permitivitní (kapacitní) detektor* měří permitivitu eluátu vztaženou k permitivitě čisté mobilní fáze. Má tedy měrnou a srovnávací celu, které jsou konstruovány jako miniaturní průtočné kondenzátory. V každé cele je dvojice izolovaných kovových elektrod většinou válcového tvaru, které jsou součástí vyváženého elektrického můstku. Přítomnost látky v eluátu změní permitivitu v měrné cele, čímž se poruší rovnováha na můstku. To se projeví elektrickým signálem detektoru, který je tím větší, čím větší je koncentrace látky v eluátu a rozdíl mezi permitivitou látky a mobilní fáze. Citlivost tohoto detektoru, teplotní závislost a další vlastnosti jsou zhruba srovnatelné s refraktometrickým detektorem.

*Radiometrických detektorů* lze použít pouze k detekci látek s přirozenou radioaktivitou nebo látek značených radioaktivními izotopy. K detekci se využívá scintilátorů, které jsou v přímém styku s mobilní fází.

Vedle těchto detektorů byla popsána i celá řada dalších, využívajících nejrůznějších fyzikálně chemických principů, které však zatím buď nejsou komerčně dostupné, nebo se prozatím používají jen v omezené míře. O reakčních detektorech pojednává odd. 4.4.

#### 7.4.3.7 Pomocná zařízení

Mezi pomocná zařízení používaná ve většině přístrojů patří průtoková čidla pro měření pracovního tlaku, zařízení k nastavení horní (popř. i dolní) tlakové meze při práci, termostatovaná kolonová skříň, umožňující pracovat při předem

Tabulka 7.7. Charakterizace chromatografických systémů

Systém	Vhodný pro dělení látek	Stacionární fáze	Eluent	Zvýšení retence
kapalina — polární adsorbent	nepolární a středně polární, rozpustné v nepolárních rozpouštědlech	silikagel, oxid hlinitý	nepolární a středně polární rozpouštědla a jejich směsi	rostoucí polarita vzorku, klesající polarita eluentu
kapalina — tuhá středně polární fáze	středně polární až silně polární, rozpustné ve středně až silně polárních rozpouštědlech	silikagel s chemicky vázanými skupinami —NH <sub>2</sub> , —OH, —C≡N, —NO <sub>2</sub>	a) směsi nepolárních a středně polárních rozpouštědel v systému s normálními fázemi  b) voda s přísadami polárního organického rozpouštědla v systému s obrácenými fázemi	a) rostoucí polarita a specifické interakce vzorku, klesající polarita eluentu  b) klesající polarita vzorku, rostoucí specifické interakce, rostoucí polarita eluentu
kapalina — tuhá nepolární fáze	málo polární až silně polární, rozpustné ve vodě a v alkoholech	silikagel s chemicky vázanými alkyly (C <sub>18</sub> , C <sub>8</sub> ) nebo fenyle	voda s přísadou nižších alkoholů, acetonitrilu apod., vodně organické roztoky solí	klesající polarita vzorku, rostoucí molekulová hmotnost a uhlvodíková část molekuly, rostoucí polarita eluentu, potlačení disociace kyselin či bází

kapalina — kapalina	nepolární až silně polární	nosič (křemelina, silanizovaný silikagel) se zakotvenou polární nebo nepolární kapalinou	rozpouštědlo opačné polaritý než stacionární fáze, s menším přídávkem jiného, popř. ternární rozpouštědlové směsi	rostoucí rozpustnost vzorku ve stacionární fázi, klesající rozpustnost vzorku v eluentu
chromatografie na měničích iontů	iontové — soli, kyseliny, báze, amfolyty	organické měniče iontů, chemicky vázané měniče na silikagelu	voda s přísadou kyselin, zásad, solí; roztoky tlumivé, event. s přísadou organického rozpouštědla	zvýšení náboje chromatografovaného iontu, snížení iontové síly eluentu, zvýšení disociace kyselin a bází
chromatografie iontových párů	iontové — soli, kyseliny, báze, amfolyty	a) nosič s vodnou fází obsahující protiion s organickým alkylem b) chemicky vázaná nepolární fáze	a) nepolární organické rozpouštědlo b) vodně organický roztok obsahující protiion	a) zvýšení náboje chromatografovaného iontu b) snížení koncentrace organického rozpouštědla v eluentu, zvýšení koncentrace protiionu
gelová permeační chromatografie	vysokomolekulární látky a látky o rozdílné molekulové hmotnosti	pórovité náplně a gely s definovaným rozdělením velikosti pórů, hydrofilní anebo organofilní či univerzální	volíme takový, aby dobře rozpouštěl vzorek a potlačila se adsorpce na náplni	snížování molekulové hmotnosti (velikosti molekul) složek vzorku

zvolené konstantní teplotě, a jímače frakcí, které automaticky v určitých časových intervalech vyměňují nádoby, do nichž vytéká eluát z detektoru. Velmi užitečné jsou i průtočné minifiltry a malé ochranné předkolony plněné sorbentem stejného nebo podobného typu, jako je náplň analytické kolony, které se umísťují mezi čerpadlo a dávkovací zařízení, popř. i mezi dávkovací zařízení a kolonu a slouží k odstranění (sorpci) tuhých i rozpuštěných rušivých kontaminantů z mobilní fáze nebo ze vzorku. Tyto kontaminanty by se jinak sorbovaly či usazovaly na analytické koloně a snižovaly by její životnost.

U většiny přístrojů je velmi důležité dokonalé odplynění mobilní fáze před vstupem do čerpadla, aby nedocházelo k uvolnění bublinek rozpuštěných plynů v detektoru, v koloně nebo v samotném čerpadle, což by se projevilo narušením funkce přístroje – snížením a kolísáním průtoku mobilní fáze, kmitáním odezvy detektoru a nevýhodnotitelným chromatografickým záznamem apod. Proto se mobilní fáze předem odplyňuje, např. v ultrazvukové lázni. Dokonalejší je průběžné odplyňování přímo v přístroji. K tomuto účelu se nejčastěji používá odstranění (stripování) rozpuštěných plynů z mobilní fáze probubláváním vysoce čistým heliem. Komerčně dostupné jsou i průtokové odplyňovače, kde mobilní fáze prochází před vstupem do čerpadla trubicí z plastové membrány v evakuovaném prostoru, do něhož proniká rozpuštěný plyn stěnami trubic, molekuly mobilní fáze však membránou proniknout nemohou.

Pro práci s přepojováním sprážených kolon (odd. 7.4.5.3) je nutno použít přístroje vybaveného příslušnými přepínacími ventily, ovládanými buď ručně, nebo pneumaticky, s možností předem programovat dobu přepnutí kolon.

#### 7.4.4 Chromatografické systémy, popis retence a mechanismus separace

Základní principy separace, působící v nejčastěji používaných chromatografických systémech, byly objasněny v odd. 3.2. V této části bude pojednáno poněkud podrobněji o jednotlivých systémech, používaných v dnešní době ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

##### 7.4.4.1 Chromatografie v systému kapalina–kapalina

Při chromatografii, založené na rozdělení chromatografovaných látek mezi dvě kapalně fáze, se používá stacionární kapalná fáze zakotvená na vhodném nosiči. Při dělení látek se pak využívá rozdílů v jejich distribuci mezi obě kapaliny, která by v ideálním případě měla být stejná jako rovnovážná distribuce látky definovaná distribuční konstantou určenou klasickým způsobem (jako pro měření extrakčních rovnováh). Obě kapaliny přitom nesmějí být vzájemně mísitelné.

Nosič stacionární fáze nemá ovlivňovat rozdělovací rovnováhu, tzn., že nesmí mít adsorpční vlastnosti. Má sloužit pouze k rovnoměrnému rozdělení stacionární fáze na velkém povrchu, aby se mohla rychle ustavit rovnováha mezi oběma kapalinami. Ve skutečnosti není znám zcela inertní nosič a musí se počítat s konkurenčním vlivem adsorpce.

Tabulka 7.8. Vhodnost systémů kapalinové chromatografie pro dělení látek ve směsi podle různých strukturálních parametrů (orientační údaje)

Strukturální parametr	Chromatografický systém					
	LSC (polární adsorbenty)	LSC (obrácené fáze)	LLC (chemicky vázané středně polární fáze)	chromatografie na měničích iontů	chromatografie iontových párů	gelová permeační chromatografie
velikost molekul	++	++	++	++	+	+++
izomerie:						
a) cyklická – acyklická	++	++	++	+	+	++
b) rozvětvené řetězce	++	++	+	+	+	+
c) sterická ( <i>cis-trans</i> )	+++	++	++	+	+	-
d) počet násobných vazeb	+++	++	++	+	+	-
e) poloha násobných vazeb	++	++	++	+	+	-
homologické řady	++	+++	+++	+	++	++
počet a poloha substituentů:						
a) slabě polární (alkyl, aryl, halogen)	+++	+++	+++	+	+	+
b) středně polární (nitro, karbonyl, estery)	+++	++	+++	+	+	+
c) polární (amidy, aminy, alkoholy, fenoly)	++	++	+++	++	++	+
d) silně polární a iontové, různě disociované kyseliny a báze	+	++	+++	+++	+++	+

Pozn.: +++ velká pravděpodobnost úspěšné separace

++ střední pravděpodobnost úspěšné separace

+ menší pravděpodobnost úspěšné separace

- velmi malá nebo nulová pravděpodobnost úspěšné separace

Tabulka 7.9. Některé náplně kolon a mobilní fáze vhodné pro jednotlivé chromatografické metody

Chromatografická metoda	Náplň kolony	Složení eluentu pro první pokusy
kapalina — tuhá fáze, polární adsorbenty	pórovitá mikroparticulární, 3 až 15 $\mu\text{m}$  silikagel, 6 až 10 nm (Lichrosorb Si 60; Si 100; Lichrospher Si 100; $\mu$ -Porasil, Spherisorb S; Zorbax SIL; Spherosil; MicroPak Si; Nucleosil 100, Sil X-I; Partisil, Separon SGX; Silasorb)  oxid hlinitý (Lichrosorb Alox T; Spherisorb A 10 W; Micro Pak Al; Alusorb)	povrchově pórovitá, 30 až 50 $\mu\text{m}$  silikagel (Corasil II; Pellosil; Perisorb A; Vydac; Sil X-II)  alkan (heptan, hexan, pentan), popř. s přísadou 1 až 10 % propanolu nebo isopropylalkoholu, resp. s kontrolovanou vlhkostí, methylenchlorid
kapalina — tuhá fáze; chemicky vázané nepolární fáze	uhlovodík $\text{C}_{18}$ chemicky vázaný na silikagel (Lichrosorb RP 18; $\mu$ -Bondapak C 18; Spherisorb ODS; Zorbax ODS, MicroPak C—H; Nucleosil C 18; ODS-SIL-X-1; Partisil ODS; Vydac TP Reverse Phase; Hypersil ODS; Separon SGX C 18; Silasorb C 18)	methanol (nebo acetonitril) s přísadou 10 až 40 % vody
	nižší nasycené uhlovodíky chemicky vázané na silikagel (Lichrosorb RP 2; RP 8; Silasorb C 8)	
	aromatické fáze chemicky vázané na silikagel (Phenyl SIL-X-1; Alkylphenyl SIL-X-1; Silasorb Fenyl)	
	uhlík vyloučený na porézním nosiči; organické nepolární polymerní gely	

kapalina — chemicky vázané málo a středně polární fáze	nitřilová stacionární fáze ( $\mu$ -Bondapak CN; MicroPak-CN; Nucleosil CN; Cyano-SIL-X-1; Partisil PAC; Vydac TP Polar; SIL 60-CN; Silasorb Nitřil; Separon SGX CN)	(CO:PELL PAC; Vydac 501 PP)	uhlovodík (heptan) s přísadou propanolu nebo chloroformu pro normální systém; voda s přísadou methanolu (acetonitrilu) pro systém RP
	(Fluoräther SIL-X-1)		
	etherická stacionární fáze		
	stacionární fáze s nitroskupinami		
	(SIL 60-NO <sub>2</sub> ; Nucleosil NO <sub>2</sub> )		
	stacionární fáze s aminoskupinami — slabý měnič aniontů		
	(Lichrosorb NH <sub>2</sub> ; $\mu$ -Bondapak NH <sub>2</sub> ; Nucleosil NH <sub>2</sub> , N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; Amino SIL-X-1; SIL-60-NH <sub>2</sub> ; Silasorb NH <sub>2</sub> ; Separon SGX NH <sub>2</sub> )		
	stacionární fáze s hydroxyskupinami		
	(Lichrosorb DIOL)		
kapalina—kapalina	nosič zakotvené fáze: silikagel (Chromosorb LC)	různé typy, navíc (Zipax)	kapalina nemísitelná se zakotvenou fází; popř. směs uhlovodík — ethanol — voda
chromatografie na měničích iontů	silně kyselý měnič kationtů s organickou maticí, 5 až 20 $\mu$ m (Aminex A 4; A 5; A 6; A 7; Beckmann AA 15; PA 28; PA 35; Durum DC-1 A; 2 A; 4 A; 6 A; Hamilton HP AN 90; B 80; H 70; Dowex AG 50 W; Ostion LGKS; Spheron S)		tlumivé roztoky (fosfátové, citrátové, borátové), 0,1 až 1 mol l <sup>-1</sup> pro pórovitě měniče, 0,01 až 0,1 mol l <sup>-1</sup> pro povrchově pórovitě měniče; pH od 0 do 12 pro organické měniče a od 3 do 7,5 pro měniče na anorganickém nosiči, nejlépe v blízkosti pK kyselin nebo zásad ve vzorku; zvýšená teplota nebo přísada organického rozpouštědla (alkoholy), ne pro Zipax!
	silně kyselý měnič kationtů na anorganickém nosiči		
	(Lichrosorb KAT; Nucleosil SA; Partisil 10 SCX; Vydac TP Cation; Silasorb S)	(Bondapak CX-Corasil; Perisorb KAT; Vydac 401 SA; Zipax SCX)	



Tabulka 7.9. — pokračování

Chromatografická metoda	Náplň kolony	Složení eluentu pro první pokusy
pórovitá mikropartikulární, 3 až 15 $\mu\text{m}$	povrchově pórovitá, 30 až 50 $\mu\text{m}$	
chromatografie na měničích	<p>silně bazický měnič aniontů s organickou maticí, 5 až 20 <math>\mu\text{m}</math> (Aminex A 25; A 27; A 28; Durrum DA <math>\times</math> 8; <math>\times</math> 8 A; <math>\times</math> 4; Hamilton 7800; Dowex AG 1; Ostion LG ATP; Spheron DEAE)</p> <p>silně bazický měnič aniontů na anorganickém nosiči (Partisil 10 SAX; Lichrosorb AN; Nucleosil SB; Vydac TP Anion; Silasorb DEA)</p>	
chromatografie iontových párů	náplň s chemicky vázanou nepolární fází (jako u chromatografie kapalina — tuhá fáze)	20%ní až 80%ní methanol ve vodě s přísadou 0,001 až 0,01 $\text{mol l}^{-1}$ tetraalkylamoniumfosfátu, $\text{pH} \approx 7,5$ pro kyseliny; 0,001 až 0,01 $\text{mol l}^{-1}$ alkansulfonové kyseliny, $\text{pH} \approx 3,5$ pro báze
gelová permeační chromatografie	<p>organofilní gely, série s různou distribuční porů (<math>\mu</math>-Styragel)</p> <p>hydrofilní gely, série s různou distribuční porů (Spheron, Sephadex, Separon HEMA)</p> <p>anorganické materiály s různou distribuční porů (Bio-Glas; CPG-10; <math>\mu</math>-Porasil; Lichrospher)</p>	volba takového rozpouštědla, aby byl vzorek dobře rozpustný; potlačení sorpce na náplni kolon; popř. zvýšená teplota

Nosiče mají mít poměrně velký objem pórů (1 až 3 ml na 1 g), aby mohly pojmout značné množství stacionární fáze (až 1 g na 1 g nosiče). Průměr pórů se má pohybovat mezi 10 až 50 nm; u menších pórů roste odpor náplně proti převodu hmoty, což snižuje separační účinnost; u pórů s větším průměrem naopak dochází ke značnému vymývání stacionární kapalné fáze erozí.

Jako nosič stacionární fáze se nejčastěji volí silikagel nebo křemelina, která má slabší adsorpční schopnost než silikagel. Oba materiály se mohou pro další snížení adsorpční aktivity podrobit silanizaci (zejména mají-li sloužit jako nosiče nepolárních fází). Lze použít jak pórovité, tak i povrchově pórovité nosiče stacionárních fází, v druhém případě se však musí počítat s příslušně menší kapacitou a menším přípustným zatížením kolony.

Jako zakotvené kapalné stacionární fáze lze použít polární či středně polární kapaliny, např. 3,3'-oxydipropionitrilu, 1,2,3-tris(2-kyanoethoxy)propanu, trimethylenglykolu, polyethylenglykolu atp., popř. propanolu, ethanolu či vody s přísadou tlumivých roztoků, solí, kyselin nebo bází. Aby nedošlo k rozpouštění stacionární fáze v eluentu, lze jako mobilních fází použít alifatických uhlovodíků s přísadou nejvýše 10 % chloroformu, tetrahydrofuranu nebo diethyletheru. V takovýchto systémech je možnost ovlivnění retence obměnou složení mobilní fáze dosti omezena.

Proto navrhl Huber použití ternárních rozpouštědlových směsí. Dvě z rozpouštědel se vzájemně nemísí a tvoří základ stacionární a mobilní fáze. Třetí rozpouštědlo se volí tak, aby se rozpouštělo v obou ostatních, přičemž však musí ještě zůstat zachována vzájemná nemísitelnost obou fází. Hlavním účelem třetího rozpouštědla je snížení rozdílu polarit mezi oběma fázemi. Volbou množství tohoto rozpouštědla lze modifikovat retenci, popř. selektivitu separace podstatně lépe než u binárních soustav. Tak např. v ternárním systému voda–ethanol–alifatický uhlovodík (popř. dichlormethan) závisí distribuční konstanta  $K_D$  jednak na parametrech  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  charakteristických pro chromatografovanou látku, jednak na parametrech  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  daných charakterem a poměrem složek ternárního chromatografického systému:

$$\log K_D = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 \quad (7.9)$$

Chromatografie v systému kapalina–kapalina má značné praktické nevýhody:

1. Poměrně komplikované zakotvení stacionární fáze v koloně naplněné nosičem o jemném zrnění, které spočívá v zavádění roztoku stacionární fáze ve vhodném rozpouštědle do kolony s následným vypláchnutím přebytku rozpouštědla dusíkem.

2. Nezbytnost práce s eluentem předem nasyceným stacionární fází, čehož se dosahuje zařazením tzv. saturační předkolony plněné nosičem se stejnou stacionární fází, přičemž tato předkolona i analytická kolona musí být temperovány na stejnou teplotu.

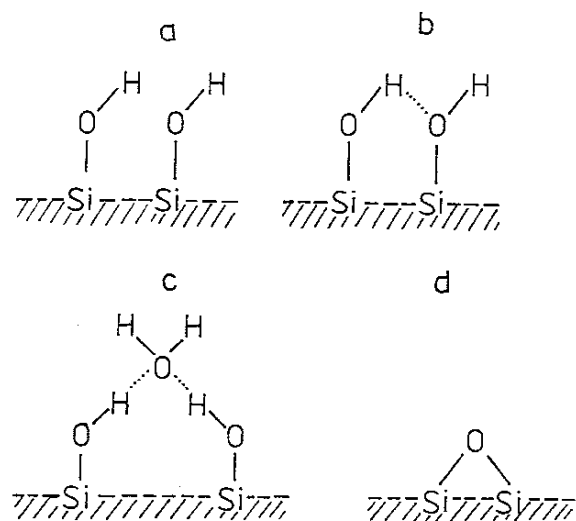
3. Omezení průtoku mobilní fáze kolonou.

4. Nemožnost pracovat s programovaným složením mobilní fáze (gradientovou elucí) či s programovanou teplotou. Tato omezení jsou vynucena požadavkem, aby nedocházelo k vymývání stacionární fáze z kolony v průběhu chromatografického procesu, což by vedlo k nereprodukovatelným výsledkům.

Z těchto důvodů se v dnešní době chromatografie v systému kapalina–kapalina používá jen zřídka a tato technika byla téměř vytlačena používáním kolon s různými chemicky vázanými stacionárními fázemi, u nichž všechna výše uvedená omezení odpadají.

#### 7.4.4.2 Chromatografie na polárních adsorbentech

Z polárních adsorbentů se v dnešní době pro účely vysokoúčinné kapalinové chromatografie používá téměř výlučně silikagel, dále ve velmi omezené míře oxid hlinitý.



Obr. 107. Struktura povrchu silikagelu  
 a – volné hydroxylové (silanolové) skupiny,  
 b – vicinální hydroxylové (silanolové) skupiny,  
 c – hydroxylové (silanolové) skupiny poutající vodu vodíkovými vazbami, d – siloxanové skupiny vznikající při vysokých teplotách

*Silikagel*,  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , je xerogel kyseliny křemičité, má amorfni strukturu a pórovité částice. Připravuje se hydrolyzou alkalických křemičitanů, tetrachlorosilanu nebo tetraalkoxysilanů s následující polykondenzací a zráním gelu, který se nakonec promyje a vysuší. Odstranění mikropórů a zvětšení rozměrů pórů se dosáhne zahříváním volné suspenze silikagelu v autoklávu. Pro účely adsorpční kapalinové chromatografie vyhovují materiály s poměrně velkým specifickým povrchem ( $200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  a více), velkým specifickým objemem pórů (více než  $0,7 \text{ ml g}^{-1}$ ) a průměrem pórů 6 až 15 nm. Strukturu povrchu silikagelu znázorňuje schematicky obr. 107.

Hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu (silanolové skupiny) jsou buď izolované, nebo jsou při vhodné poloze sousední skupiny vzájemně vázány vodíkovými vazbami. Na silanolové skupiny se adsorbuje voda rovněž vodíkovou vazbou. Tuto adsorbovanou vodu lze odstranit zahřátím na  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , a tím silikagel aktivovat. Při teplotách nad  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  dochází k ireverzibilním změnám povrchu silikagelu a za teploty mezi  $300$  až  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  kondenzují sousední hydroxylové skupiny na siloxanové skupiny, které již nelze při normální teplotě znovu hydratovat. Při ještě vyšších teplotách dochází k odštěpení volných hydroxylových skupin z povrchu silikagelu, který tak nabývá hydrofobních vlastností a je pak již k chromatografii polárních látek zcela nevhodný.

Povrch silikagelu je slabě kyselý, takže více zadržuje bazické látky než látky kyselé

a neutrální, a může tak působit chvostování jejich píků při chromatografické eluci; tomu lze většinou zabránit přidávkem slabé báze k mobilní fázi. Silikagel je však chemicky stabilní pouze při  $\text{pH} < 8$ . V praxi se nejčastěji používá silikagel Si 100 a Si 60 (číselné hodnoty udávají desetinásobek velikosti pórů v nm) s částicemi nepravidelného nebo kulového tvaru.

Oxid hlinitý (*alumina*) vhodný pro kapalinovou chromatografii je krystalický, se specifickým povrchem 100 až 200  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ , specifickým objemem pórů 0,2 až 0,3  $\text{ml g}^{-1}$  a průměrem pórů 10 až 20 nm. Hydroxylové skupiny na povrchu lze aktivovat (zbavit adsorbované vody) zahříváním na 200 °C; při zahřívání nad 900 °C ztrácí oxid hlinitý ireverzibilně svou aktivitu.

Vedle hydroxylových skupin jsou na povrchu oxidu hlinitého centra s elektron-akceptorovými vlastnostmi, která mohou vstupovat do interakce s molekulami bohatými na elektrony (Lewisovými bázemi). Tyto interakce jsou příčinou určitých rozdílů v selektivitě oxidu hlinitého ve srovnání se silikagelem, kterých lze výhodně využít při chromatografii látek, lišících se od sebe rozložením elektronů. Například dělení polykondenzovaných aromátů s rozsáhlým systémem elektronů  $\pi$  je selektivnější na oxidu hlinitém než na silikagelu. Jinak má oxid hlinitý velmi podobné adsorpční vlastnosti jako silikagel, je však méně používán, protože na jeho povrchu dochází častěji ke katalytickému působení a rozkladu nebo ireverzibilní adsorpci chromatografovaných látek. Pro chromatografii se nejlépe hodí tzv. neutrální oxid hlinitý, který byl po vyrobení pečlivě neutralizován kyselinou. Takzvaný bazický oxid hlinitý vykazuje vlastnosti měniče aniontů a tzv. kyselý oxid hlinitý, získaný po úpravě bazického oxidu přebytkem kyseliny, působí částečně jako měnič kationtů, což může vyvolávat při adsorpční chromatografii nepříjemné komplikace.

Při chromatografii na polárních adsorbentech je sorpce látky důsledkem rozdílných polárních sil působících mezi povrchem adsorbentu a chromatografovanou látkou a polárních sil působících mezi povrchem adsorbentu a mobilní fází. Proti systému kapalina–kapalina s polární stacionární fází je zde hlavní rozdíl v tom, že interakcí se účastní povrch adsorbentu, na němž jsou v určitých neměnných (v prvním přiblížení) vzájemných vzdálenostech rozložena aktivní centra adsorpce. Mezi centry adsorpce nemůže buď vůbec docházet ke vzájemným interakcím, anebo u center ležících v těsné blízkosti došlo vzájemným působením k trvalému oslabení jejich adsorpční aktivity.

Adsorpční proces v tomto poněkud zjednodušeném modelu je potom charakterizován

a) vzájemným soutěžením molekul vzorku a mobilní fáze o aktivní centra na povrchu adsorbentu,

b) možností interakcí s větším počtem aktivních center u molekul se dvěma nebo více polárními skupinami. Potom adsorpce jedné molekuly vzorku X z mobilní fáze se uskuteční na úkor adsorpce  $n$  molekul mobilní fáze M z adsorbované fáze:



Indexy a, m se zde vztahují k adsorbované a mobilní fázi.

Tabulka 7.10. Přehled chromatograficky významných vlastností rozpouštědel používaných jako mobilní fáze

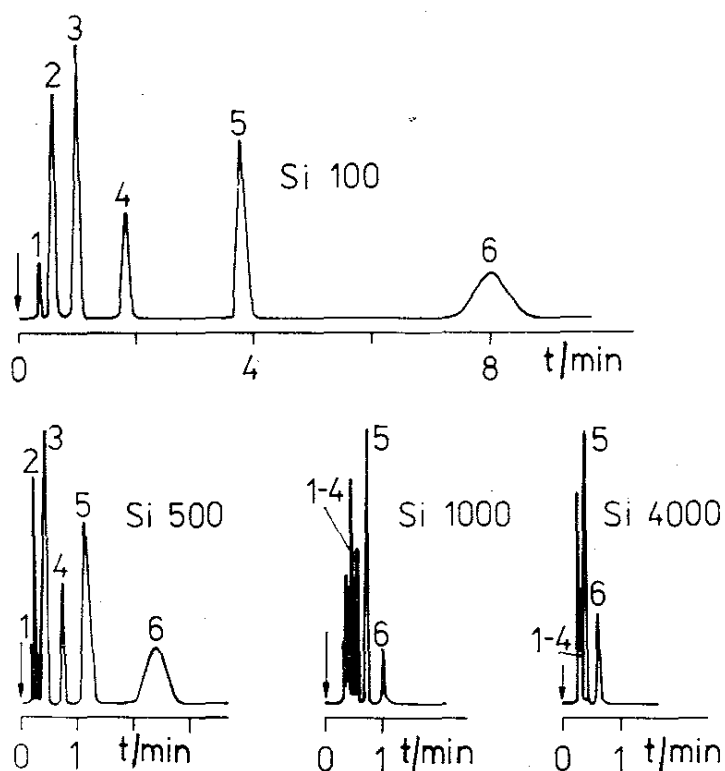
Rozpouštědlo	Skupina <sup>1)</sup>	$P$	$x_e$	$x_d$	$x_n$	$\epsilon$ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )	Bod varu °C	Viskozita při 20 °C mPa s	Index lomu $n_D^{20}$	Mez absorpce v oblasti UV nm
skvalan	—	—0,8	—	—	—	—	99	0,50	1,391	200
isooktan	—	—0,4	—	—	—	0,01	174	0,92	1,412	200
dekan	—	—0,3	—	—	—	0,04	98	0,42	1,388	200
heptan	—	0	—	—	—	0,01	81	0,98	1,426	210
cyklohexan	—	0	—	—	—	0,04	69	0,33	1,375	200
hexan	—	0	—	—	—	0,01	36	0,23	1,358	200
pentan	—	0	—	—	—	0,00	47	0,37	1,630	380
siruhlík	VIb	1,0	—	—	—	0,15	76	0,97	1,466	265
tetrachlormethan	VIb	1,7	0,30	0,38	0,32	0,18	143	—	1,400	—
dibutylether	I	1,7	0,53	0,08	0,39	—	89	—	1,400	—
triethylamin	I	1,8	0,61	0,07	0,32	—	67,8	0,37	1,368	220
diisopropylether	I	2,2	0,54	0,11	0,35	0,28	111	0,59	1,496	285
toluen	VIb	2,3	0,32	0,24	0,44	0,29	139	0,62	1,500	290
<i>p</i> -xylen	VIb	2,4	0,32	0,24	0,44	0,26	132	0,80	1,525	280
chlorbenzen	VII	2,7	0,24	0,34	0,42	0,30	156	—	1,560	—
brombenzen	VII	2,7	0,24	0,34	0,42	—	188	—	1,620	—
jodbenzen	VII	2,7	0,24	0,36	0,40	—	258	—	1,581	—
difenylether	VII	2,8	0,25	0,33	0,42	—	172	—	1,508	—
ethoxybenzen	VIb	2,9	0,27	0,29	0,44	—	35	0,23	1,353	202
diethylether	I	2,9	0,55	0,11	0,34	0,38	80	0,65	1,501	280
benzen	VIb	3,0	0,29	0,28	0,43	0,32	38	0,39	—	—
trikresylfosfát	V	3,1	0,35	0,18	0,47	—	195	—	—	—
bromethan	VIa	3,1	0,32	0,28	0,40	0,37	85	—	—	—
1-oktanol	II	3,2	0,61	0,14	0,25	—	298	—	—	—
fluorbenzen	VII	3,3	0,24	0,33	0,43	—	40	0,44	1,424	233
dibenzylether	VIb	3,3	0,27	0,27	0,46	—	154	—	1,522	—
dichlormethan	V	3,4	0,34	0,17	0,49	0,42	84	4,10	1,410	210
methoxybenzen	VIb	3,5	0,28	0,31	0,41	—	—	0,79	—	—
2-pentanol	II	3,6	0,58	0,17	0,25	0,61	—	—	—	—
1,2-dichlorethan	V	3,7	0,36	0,19	0,45	0,49	—	—	—	—



Pro uvedený mechanismus adsorpce bylo vypracováno několik modelů; nejdokonalejší teorii adsorpční chromatografie vyvinul Snyder. Podle této teorie je distribuční konstanta při adsorpční chromatografii dána vztahem

$$\log K_D = \log V_a + \alpha(S - A_s \varepsilon) \quad (7.11)$$

kde  $\alpha$  kvantitativně vyjadřuje aktivitu adsorbentu,  $A_s$  je plocha, kterou zaujímá molekula adsorbované látky na povrchu adsorbentu,  $V_a$  – povrchový objem adsorbentu (objem monomolekulární vrstvy rozpouštědla adsorbovaného hmotnostní jednotkou adsorbentu),  $S$  – volná energie adsorpce látky z pentanu jako rozpouštědla na adsorbent standardní aktivity ( $\alpha = 1$ ) a  $\varepsilon$  – parametr síly rozpouštědla, který popisuje vliv rozpouštědla na adsorpci látky a nezávisí na vlastnostech adsorbentu či chromatografovaných látek (tab. 7.10).



Obr. 108. Separace oligofenylenů 1 až 6 v závislosti na specifickém povrchu silikagelu  
 Si 100, 250 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>;  
 Si 500, 50 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>;  
 Si 1 000, 20 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>;  
 Si 4 000, 6 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>

Velikost adsorpce tedy roste s rostoucí aktivitou a specifickým povrchem adsorbentu a klesá s rostoucí silou (polaritou) mobilní fáze  $\varepsilon$  a s rostoucí plochou adsorbentu, které je zapotřebí k adsorpci jedné molekuly chromatografované látky. Vliv specifického povrchu adsorbentu (silikagelu) na separaci ilustruje příklad na obr. 108.

Protože rozmístění adsorpčních center na povrchu adsorbentu je neměnné, závisí interakce funkčních skupin v molekulách chromatografovaných látek s adsorbentem na geometrickém rozmístění funkčních skupin v těchto molekulách. Nejsilnější jsou, jestliže rozmístění funkčních skupin přesně odpovídá poloze adsorpčních center. Výsledkem jsou značné rozdíly adsorpčních energií různých izomerů, a proto chromatografie v systému kapalina–tuhá fáze většinou poskytuje lepší selektivitu pro dělení izomerů než chromatografie v systému kapalina–kapalina.

Síla polárních interakcí s adsorbentem a velikost retence v dané mobilní fázi je

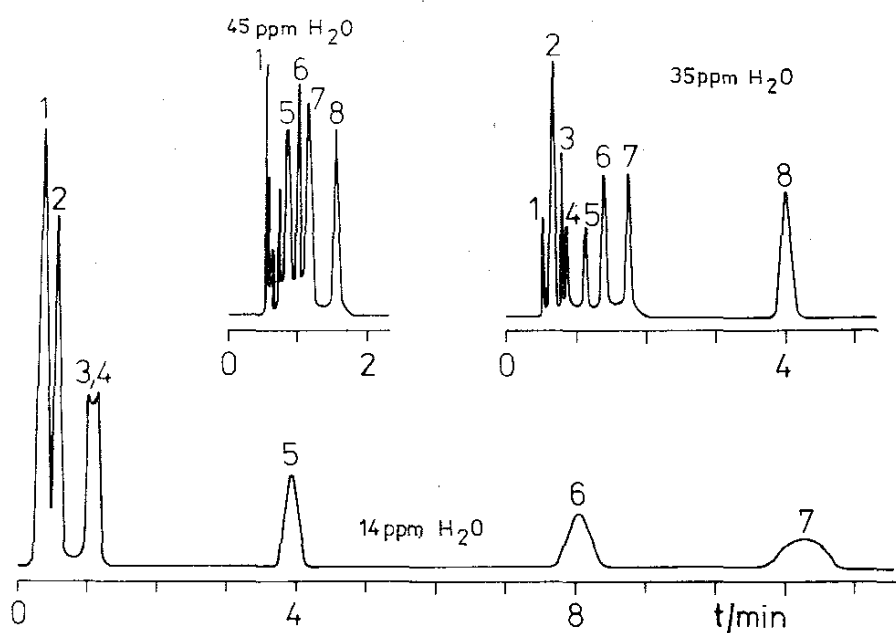
určována počtem a charakterem (polaritou) funkčních skupin v molekulách chromatografovaných látek. Podle rostoucí polaritativy funkčních skupin roste retence látek na polárních adsorbentech v pořadí: alifatické uhlovodíky < aromatické uhlovodíky < halogensloučeniny < ethery < terciární aminy < nitrily < nitrosoučeniny < estery karboxylových kyselin < ketony < aldehydy < primární aminy < amidy karboxylových kyselin < alkoholy < fenoly < karboxylové kyseliny < sulfokyseliny.

Toto přibližné pořadí se může poněkud měnit podle druhu převládajících selektivních interakcí v použité mobilní fázi. Pořadí eluce alifatických sloučenin se poněkud liší od pořadí, v jakém jsou eluovány aromatické látky, kde je polarita ovlivňována i mezomerními, konjugačními či indukčními efekty mezi funkční skupinou a aromatickým jádrem. Tyto efekty se samozřejmě uplatňují i při vzájemném působení dvou nebo více funkčních skupin přítomných v molekule chromatografované látky a ovlivňují výslednou polaritu (dipólový moment) molekuly.

Energie adsorpce nasycených uhlovodíků, popř. alkylových skupin v molekulách chromatografovaných látek, je malá, takže látky na povrchu adsorbentu budou adsorbovány svými polárními funkčními skupinami a uhlovodíkové části molekul budou směřovat kolmo od povrchu adsorbentu do mobilní fáze.

K plnému uplatnění polárních sil mezi povrchem adsorbentu a funkčními skupinami v molekulách chromatografovaných látek je třeba, aby funkční skupiny měly volný přístup k aktivním centřům adsorbentu. Každé omezení přístupu funkční skupiny, ať již sousedstvím s nepolární nebo málo polární skupinou, popř. i interakcí s polární skupinou v sousedství, vede ke snížení retence látky. Proto u alkylovaných polárních derivátů benzenu bude retence nejvíce snížena u izomerů s alkylem v poloze *ortho* k funkční skupině. Tak např. z izomerních nitrofenolů se nejdříve eluuje *o*-nitrofenol vlivem snížení polaritativy intramolekulární vodíkovou vazbou, mezomerní efekt naopak zvyšuje kyselost a retenci *p*-nitrofenolu.

Ke kontrole retence dělených látek na koloně plněné daným adsorbentem lze použít buď nastavení aktivity adsorbentu, nebo kontroly složení mobilní fáze.

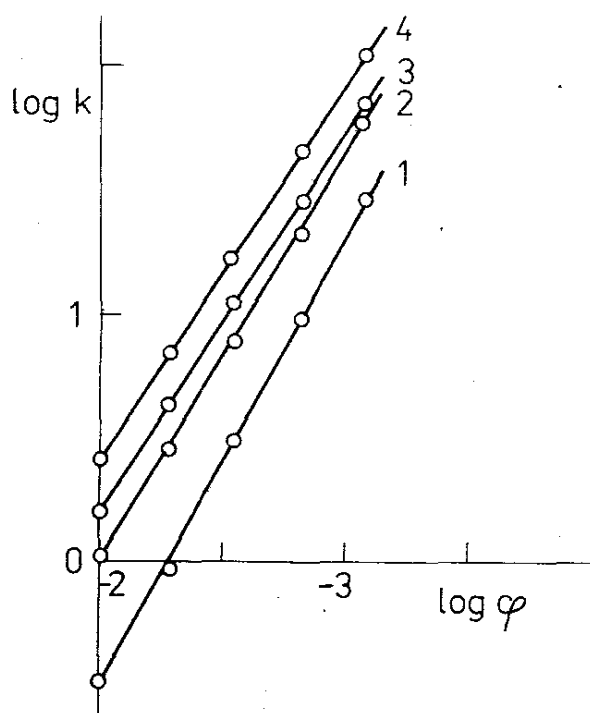


Obr. 109. Separace aromatických uhlovodíků na koloně plněné oxidem hlinitým (Alumina Woelm, 5  $\mu$ m, 15 cm  $\times$  4,1 mm, 25  $^{\circ}$ C) o různé aktivitě, kontrolované obsahem vody v heptanu jako mobilní fázi  
 1 – tetrachlorethylen,  
 2 – benzen, 3 – naftalen,  
 4 – bifenyl, 5 – anthracen,  
 6 – pyren, 7 – fluoranthracen,  
 8 – 1,2-benzanthracen



Aktivita adsorbentu klesá s rostoucím množstvím vody adsorbovaným na jeho povrchu a lze ji nastavovat změnou obsahu vody (v rozmezí jednotek až desítek ppm) v organickém rozpouštědle použitým jako mobilní fáze. Ustavení rovnovážného obsahu vody mezi adsorbentem a mobilní fází je značně zdlouhavé a může trvat řadu hodin. Rovnováha závisí na teplotě a vlhkosti vzduchu, který je ve styku s mobilní fází, proto může kolísat s časem, což vede ke změnám aktivity adsorbentu s časem a špatné reprodukovatelnosti retenčních dat. K úspěšné aplikaci kontroly retence je proto třeba použít uzavřený systém, kde mobilní fáze prochází stále uzavřeným cyklem zásobník mobilní fáze–čerpadlo–kolona–detektor–velká kolona plněná adsorbentem o určité aktivitě–zásobník mobilní fáze. Obrázek 109 ukazuje příklad vlivu aktivity adsorbentu na separaci.

Retenci při chromatografii na polárních adsorbentech lze do jisté míry kontrolovat použitím různých čistých rozpouštědel o různé polaritě. Charakter použitého rozpouštědla do značné míry ovlivňuje i selektivitu dělení vlivem různého uplatnění selektivních interakcí rozpouštědla s dělenými látkami (další podrobnosti jsou uvedeny v odd. 7.4.5.2). Polarita mobilní fáze je vždy menší než polarita použitého adsorbentu, takže pracujeme v tzv. systému s normálními fázemi.



Obr. 110. Závislost kapacitních poměrů ( $k$ ) na obsahu propanolu ( $\varphi$ ) v mobilní fázi propanol–heptan na koloně plněné oxidem hlinitým Lichrosorb Alox T pro:

1 – lumisterol, 2 – tachysterol, 3 – kalciferol,  
4 – ergosterol,  $\varphi$  – objemový zlomek

Plného využití možností chromatografie na polárních adsorbentech a jemného nastavení požadované polaritě mobilní fáze se dosáhne pouze při používání směsí rozpouštědel. V praxi se většinou vystačí s binárními směsmi dvou rozpouštědel s odlišnou polaritou. Směsi rozpouštědel umožní ovlivňovat do jisté míry nezávisle velikost retence (kapacitní poměry) a selektivitu dělení. Lze namíchat směsi různých rozpouštědel o stejné celkové eluční síle ( $\epsilon$ ), ale s rozdílnými selektivními interakcemi, takže je možné očekávat stejnou retenci silněji zadržovaných látek, ale nestejnou selektivitu, a tedy i nestejně rozlišení chromatografovaných látek.

Rostoucí objemový zlomek  $\varphi$  polárního rozpouštědla v mobilní fázi vede ke snížení retence na polárních adsorbentech. Závislost kapacitních poměrů ( $k$ ) na  $\varphi$  lze

v prakticky používaném oboru koncentrací ( $\varphi \geq 0,02$  až  $0,05$ ) popsat přibližně vztahem:

$$k = a\varphi^{-m} \quad (7.12)$$

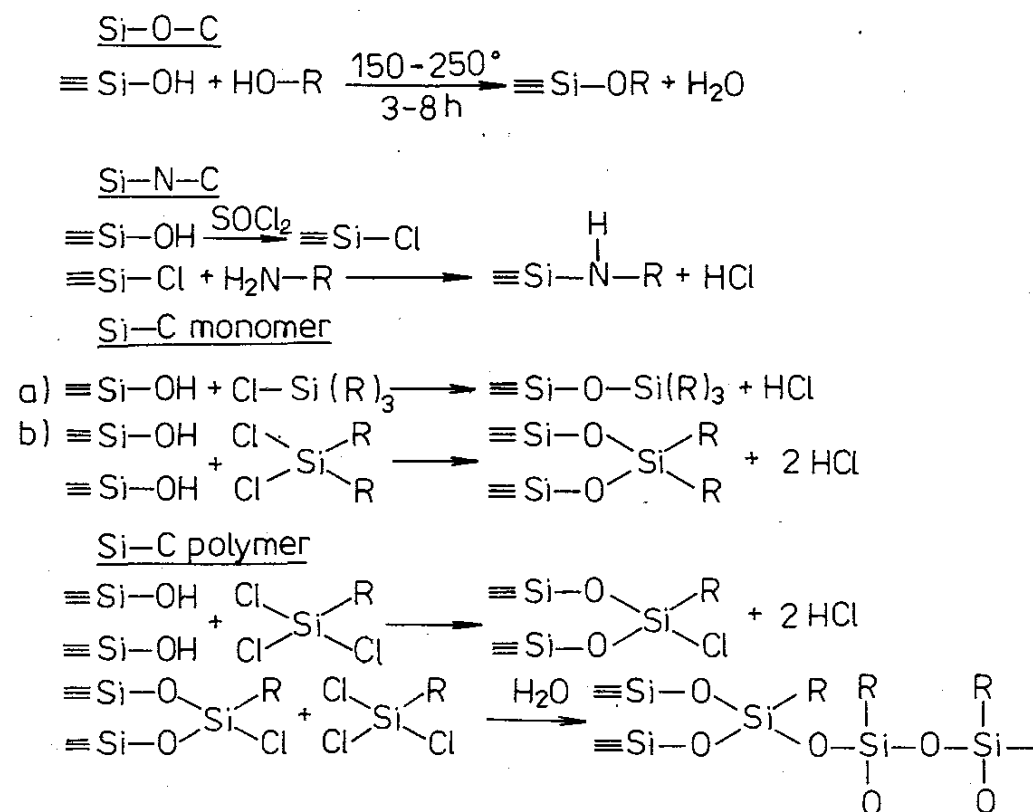
kde  $a, m$  jsou konstanty závislé na charakteru chromatografované látky, adsorbentu a polární složky mobilní fáze,  $k$  – kapacitní poměr při použití čistého polárního rozpouštědla jako mobilní fáze. Platnost vztahu (7.12) ilustruje praktický příklad na obr. 110. Pro některé slabě zadržované látky lze při nízkých  $\varphi$  pozorovat určité odchylky (většinou negativní) experimentálních kapacitních poměrů od závislosti (7.12).

Jako nepolární složku mobilní fáze lze použít nasycený uhlovodík, např. heptan nebo hexan, a jako složku polární např. propanol, acetonitril, methyl-terc.butylether nebo dichlormethan.

#### 7.4.4.3 Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi

Systémy s obrácenými fázemi se v dnešní době ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii používají nejčastěji, odhaduje se, že asi v 80 až 90 % všech aplikací. V těchto systémech se používají nepolární stacionární fáze a polární fáze mobilní. Jako náplně kolon se převážně používají chemicky vázané nepolární fáze na silikagelu jako nosiči, méně často i uhlík nebo organické polymery.

Stacionární fáze chemicky vázané na nosiči mají velmi významné praktické výhody ve srovnání s kapalnými fázemi fyzikálně zakotvenými, neboť nedochází k jejich vymývání z kolony ani vlivem rozpouštění v mobilní fázi, ani vlivem eroze



Obr. 111. Reakční schémata přípravy vázaných fází chemickou modifikací silikagelu

při velkém průtoku eluentu a lze snadno použít pracovních technik s časově programovanou změnou teploty nebo složení mobilní fáze (gradientové eluce). Rovněž nemusíme mobilní fázi předem sytit fází stacionární a používat temperovaných předkolumn obsahujících nosič se stacionární fází.

Na obrázku 111 jsou uvedena reakční schémata nejčastěji používaných způsobů přípravy chemicky vázaných fází na silikagelu jako nosiči.

Působením alkoholů na *silikagel* byly připraveny stacionární fáze vázané kovalentně na povrch silikagelu vazbami  $\text{Si—O—C}$ , které však nejsou stabilní vůči hydrolyze a vylučují použití vody a nižších alkoholů v mobilních fázích. Tyto náplně jsou komerčně dostupné pod názvem Durapak. Stabilnější vůči hydrolyze (v rozmezí pH 4 až 7,5) jsou fáze, vázané k povrchu silikagelu kovalentní vazbou  $\text{Si—N—C}$ , připravované reakcí chlorovaného silikagelu s aminy.

Zcela odolné proti hydrolyze jsou náplně vázané na povrch silikagelu kovalentní vazbou  $\text{Si—O—Si—C}$ , které se připravují reakcí silanolových skupin na povrchu silikagelu s alkylchlorsilany (viz obr. 111), popř. alkylalkoxysilany. V prvním případě je třeba vázat kyselinu chlorovodíkovou, která reakcí vzniká, přídavkem bezvodé báze (triethylaminu nebo pyridinu) do reakční směsi, v druhém případě se vznikající alkohol oddestilovává z reakční směsi. Podle způsobu vedení reakce a podle použitých činidel lze získat buď monomerní, nebo polymerní chemicky vázané fáze, přičemž se zpravidla dává přednost prvnímu typu vzhledem k lepší separační účinnosti. Při chromatografii v systému s obrácenými fázemi se používají chemicky vázané fáze s kovalentní vazbou  $\text{Si—O—Si—C}$  s navázanými alkylovými řetězci různé délky (nejčastěji  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  a  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ ) či s fenylovými a bifenylovými skupinami, které mají poněkud zvýšenou polaritu a vykazují selektivní afinitu zejména k fenolům a aminům. Dynamické vlastnosti těchto náplní (účinnost a permeabilita kolony) jsou určovány především vlastnostmi nosiče (silikagelu), tj. jeho strukturou a velikostí částic, zatímco termodynamické chování (retence a selektivita chromatografovaných látek) jsou dány chemicky navázanou fází.

*Uhlík*, připravovaný tepelným zpracováním (grafitizací) sazí jako adsorbent pro chromatografii s obrácenými fázemi, je komerčně dostupný pod názvem Carbo-pack B. Většinou poskytuje asymetrické píky a má příliš malou mechanickou odolnost. Lepšími vlastnostmi v tomto směru se vyznačuje tzv. pórovitý skelný uhlík, získaný impregnací silikagelu směsí fenolu a urotropinu, polymerací této směsi a pyrolýzou pryskyřice vzniklé v pórech silikagelu, rozpuštěním silikagelu a tepelným zpracováním zbylého pórovitého uhlíku při teplotách nad 200 °C. Výhodou tohoto materiálu proti chemicky vázaným nepolárním fázím je stabilita v širším rozmezí pH, zejména v alkalické oblasti, což umožňuje lépe separovat aminy a další bazické látky. Podobnými výhodami se vyznačují i *polymerní náplně*. Zesítěné polystyrenové náplně připravované kopolymerací styrenu a divinylbenzenu mají vlastnosti podobné chemicky vázaným fenylovým fázím. Sníženou polaritou a menšími selektivními interakcemi se vyznačují náplně s oktadecylovými řetězci vázanými na povrch polymeru, většinou typu akrylátového polymeru či kopolymeru. Náplně polymerního typu vykazují podstatně nižší separační účinnost než náplně s chemicky vázanými

nepolárními fázemi. Účinnost lze poněkud zvýšit prací při zvýšených teplotách. U nás jsou náplně tohoto typu komerčně dostupné pod názvem Separon HEMA nebo HEMA S (Tessek, Praha) a Spheron OD (s. p. Lachema, Brno).

V systémech s obrácenými fázemi lze separovat jak málo polární látky (např. aromatické uhlovodíky), tak i látky středně a silně polární (fenoly, aminy, cukry), a dokonce i látky iontové povahy (karboxylové a sulfonové kyseliny, dusíkaté báze).

Při chromatografii v systémech s obrácenými fázemi se používají silně polární mobilní fáze, tvořené vodou s přídavkem polárních organických rozpouštědel – nižších alkoholů, acetonitrilu, tetrahydrofuranu nebo dioxanu, popř. s přídavkem tlumivého roztoku, soli nebo kyseliny. Na nepolárních náplních se v ideálním případě nevyskytují aktivní adsorpční centra. Ve skutečnosti se tato centra vyskytují u uhlíkových náplní a představují je do jisté míry i aromatická jádra u fenylových vázaných fází a polymerních náplní, u fází s vázanými alkyly je rovněž většinou přítomen určitý podíl nezreagovaných silanolových skupin schopných adsorbovat polární látky. Mechanismus retence v těchto systémech není dosud zcela jednoznačně vyřešen, předpokládá se však, že nejvýrazněji se uplatňuje tzv. solvofobní efekt. Mezi nepolární stacionární fází na jedné straně a chromatografovanými látkami či složkami mobilní fáze na straně druhé se uplatňují pouze disperzní interakce, které však také působí mezi složkami mobilní fáze a chromatografovanými látkami ve fázi mobilní, takže působení těchto interakcí v obou fázích se vzájemně do značné míry kompenzuje. Převažující hnací silou retence látek jsou polární interakce mezi molekulami mobilní fáze, zejména vody, které jsou silnější než polární interakce mezi molekulami dělených látek a složkami mobilní fáze. Důsledkem je vytěsňování chromatografovaných látek z mobilní fáze do fáze stacionární a látky jsou tím více zadržovány, čím nižší je jejich polarita, resp. čím větší je uhlovodíková část jejich molekuly a čím polárnější je mobilní fáze. Retence látek rovněž roste s prodlužující se délkou a počtem alkylů stacionární fáze chemicky vázané na nosiče. K retenci zřejmě poněkud přispívá i kapalná fáze v bezprostředním okolí nepolárních vázaných řetězců, která obsahuje vyšší koncentrace organického rozpouštědla než fáze mobilní a má tedy také větší afinitu k slabě či středně polárním látkám.

V systémech s obrácenými fázemi se zvětšuje retence látek s rostoucí nepolární částí v jejich molekulách. V homologických řadách pozorujeme lineární závislost logaritmů kapacitních poměrů na počtu atomů uhlíku v molekulách látek, proto se chromatografie v systému s obrácenými fázemi výborně hodí k separaci homologů, většinou je však méně selektivní pro separaci polohových izomerů než chromatografie na polárních adsorbentech. Rovněž počet aromatických jader a atomů halogenů v molekulách látek zvyšuje jejich retenci, naopak přítomnost silně polárních a iontových skupin snižuje retenci tím více, čím jsou skupiny polárnější ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ). Je-li v molekule přítomno více funkčních skupin, závisí celková polarita molekuly a retence na interakcích mezi nimi (projevují se mezomerní, konjugační a indukční efekty). Rozvětvení uhlovodíkového řetězce a přítomnost násobné vazby v molekule ve srovnání s nerozvětvenými a nasycenými látkami retenci snižuje.

Pokud je v molekule přítomno více polárních skupin a uhlovodíková část molekuly je malá (např. u cukrů nebo nukleosidů či u některých bází nukleových kyselin) nebo jsou-li v molekule přítomny ionizované funkční skupiny (např. u karboxylových kyselin nebo u sulfokyselin), může převažovat afinita těchto látek k vodě jako mobilní fázi nad hydrofobními interakcemi působícími vylučování organických látek z vodné fáze (látky jsou dobře rozpustné ve vodě). Tyto látky mají eluční objem blízký  $V_M$  nebo i menší. Pro silně polární a iontové látky se zřejmě stane určitá část objemu pórů uvnitř náplně nepřístupná, protože přiblížení silně polárních molekul k nepolárnímu povrchu stacionární fáze by způsobilo energeticky nevýhodné snížení jejich solvatace. Někdy lze uvedený jev kompenzovat a retenci silně polárních organických látek zvýšit potlačením jejich disociace (úpravou pH) nebo zvýšením iontové síly mobilní fáze (přídavkem elektrolytu do mobilní fáze dojde k vysolení organické látky do nepolární stacionární fáze).

Selektivitu při chromatografii v systému s obrácenými fázemi lze ovlivňovat volbou organické složky mobilní fáze a využitím jejich selektivních interakcí s chromatografovanými látkami.

Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla, tedy v obráceném pořadí než při chromatografii na polárních adsorbentech. Některá používaná organická rozpouštědla lze přibližně seřadit podle rostoucí eluční síly takto: methanol < acetonitril  $\approx$  ethanol < isopropylalkohol  $\approx$  1-propanol < dioxan < tetrahydrofuran.

Při chromatografii v systému s obrácenými fázemi je voda složkou o velmi malé eluční síle. Pro vliv koncentrace organického rozpouštědla (lze ji rovněž výhodně vyjádřit jako objemový zlomek  $\varphi$ ) v mobilní fázi na kapacitní poměry chromatografovaných látek ( $k$ ) byla experimentálně prokázána přibližná platnost rovnice:

$$\log k = a - m\varphi \quad (7.13)$$

kde  $a, m$  jsou konstanty nezávislé na koncentraci organického rozpouštědla v mobilní fázi,  $k$  – kapacitní poměr v čisté vodě jako eluentu, získaný extrapolací experimentálních údajů.

V širším rozmezí složení mobilních fází vyhovuje lépe pro koncentrační závislost  $\log k$  kvadratická rovnice ve tvaru:

$$\log k = a - m\varphi + d\varphi^2 \quad (7.14)$$

kde  $a, m, d$  jsou experimentální konstanty závislé na chromatografickém systému.

#### 7.4.4.4 Chromatografie na středně polárních chemicky vázaných fázích

Při této metodě se využívá především selektivních interakcí stacionárních fází s určitými typy separovaných látek. Chemicky vázané fáze středně nebo slabě polárního charakteru se získávají modifikací nosiče (silikagelu) podle schématu uvedeného na obr. 111. Při modifikaci se jako silanizační činidla používají alkylchlorsilany nebo alkoxysilany substituované vhodnými funkčními skupinami.

Někdy se funkční skupiny zavádějí i následnými chemickými reakcemi předem připravených chemicky vázaných fází. Z komerčně dostupných náplní tohoto typu lze uvést chemicky vázané fáze s nitrilovými (oxydipropionitrilovými nebo alkyl-nitrilovými) skupinami, se siloxanetherovým charakterem, fluoretherovými skupinami nebo s nitroskupinami, které mají slabě až středně polární charakter. Polárnější jsou fáze s hydroxylovými skupinami (diolové fáze) a fáze s amidickými, primárními, sekundárními či terciárními aminoskupinami, které mohou vytvářet vodíkové vazby s fenoly, cukry, alkoholy a některými dalšími podobnými látkami, k nimž vykazují zvýšenou afinitu. Za určitých podmínek mohou ve vodném prostředí aminové fáze působit i jako slabý měnič aniontů. Intenzívně se zkoumají možnosti přípravy dalších typů chemicky vázaných fází pro speciální aplikace a vyrábějí se např. chemicky vázané opticky aktivní fáze pro separaci optických izomerů a speciální fáze vázané na širokopórním silikagelu pro separaci bílkovin a dalších biopolymerů. K tomuto účelu se užívají i náplně typu Glycophase s chemicky vázanými glycerolovými zbytky, které obsahují etherické a hydroxylové funkční skupiny, popř. i další, získané následnou chemickou modifikací. Jako nosiče těchto fází se používají skla s kontrolovanou povrchovou pórovitostí.

Středně polárních chemicky vázaných fází lze použít jak v systému s normálními fázemi, tak v systému s fázemi obrácenými. V systému s normálními fázemi se podobně jako při chromatografii na polárních adsorbentech používá mobilních fází s nižší polaritou, než má fáze stacionární, tj. nepolárního uhlovodíku, většinou s určitou přísadou polárního organického rozpouštědla. Retence se zvyšuje s rostoucí polaritou chromatografovaných látek a klesá s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fázi. K popisu vlivu mobilní fáze na retenci v omezeném rozmezí složení mobilní fáze lze použít rovn. (7.12), dochází však k četným odchýlkám od platnosti této rovnice. Závislosti  $\log k$  na  $\log \varphi$  jsou často zakřivené a někdy dokonce vykazují minima při určitém  $\varphi$ , kdy dochází ke změně separačního mechanismu.

V systémech s obrácenými fázemi se podobně jako u chemicky vázaných fází alkyl- a arylsilikagelového typu používá mobilních fází o vyšší polaritě, než je polarita středně polárních chemicky vázaných fází, tj. směsí vody s organickými rozpouštědly, jako je methanol, acetonitril či tetrahydrofuran. Retence klesá s rostoucí polaritou chromatografovaných látek i s koncentrací organického rozpouštědla ve vodně-organické fázi ( $\varphi$ ). K popisu vlivu  $\varphi$  na retenci lze použít semilogaritmických rovnic (7.13) nebo (7.14); průběh těchto závislostí je rovněž velmi často zakřivený s občas se vyskytujícími minimy. Zejména při chromatografii silně polárních látek na aminových fázích je třeba často do mobilních fází přidávat tlumivý roztok.

#### 7.4.4.5 Chromatografie na měničích iontů, iontová chromatografie

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se v dnešní době používají měniče iontů, které mají vrstvu měniče chemicky vázanou na pórovitém nebo povrchově pórovitém anorganickém nosiči, většinou silikagelu, a měniče iontů s organickou maticí, nejčastěji na bázi styren-divinylbenzenového kopolymeru,

s rozměrem částic 5 až 20  $\mu\text{m}$ . U některých typů povrchově pórovitých měničů iontů je na nosiči nanasena tenká organická polymerní vrstva s příslušnými iontově výměnnými funkčními skupinami.

Iontově výměnné funkční skupiny jsou velmi podobné u všech typů měničů a zavádějí se do měničů iontů chemickými reakcemi základních organických kopolymerů či chemicky vázaných fází. Podle typů výměnných skupin rozeznáváme silné měniče kationtů se sulfoskupinami, silné měniče aniontů s kvartérními amoniiovými skupinami, slabé měniče kationtů nejčastěji s karboxylovými skupinami a slabé měniče aniontů nejčastěji s terciárními nebo sekundárními aminoskupinami.

Silné měniče se vyznačují úplnou disociací funkčních skupin v širokém rozsahu hodnot pH (1 až 14 pro měniče kationtů, 0 až 12 pro měniče aniontů na bázi organických pryskyřic a 2 až 8 pro měniče na bázi silikagelu) a používají se mnohem častěji než slabé měniče kationtů nebo slabé měniče aniontů. Sílu měniče lze charakterizovat titračními křivkami, které v podstatě odpovídají titračním křivkám silných kyselin či bází nebo titračním křivkám slabých kyselin a bází. Slabé měniče kationtů lze potom použít pouze v alkalické oblasti pH, kde dochází k disociaci slabě kyselých karboxylových funkčních skupin, a slabé měniče aniontů naopak v kyselých roztocích, kde jsou slabě zásadité aminoskupiny protonizovány.

Jednotlivé typy měničů se od sebe liší výměnnou kapacitou, tj. množstvím iontů, které může měnič poutat svými výměnnými skupinami (vyjadřuje se v molech chemických ekvivalentů na 1 g měniče). Nejmenší kapacitu mají povrchově pórovité měniče, asi 10  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ; měniče chemicky vázané na pórovitém silikagelu mají kapacitu asi 0,5  $\text{mmol g}^{-1}$  a největší kapacitou se vyznačují pórovité pryskyřice s organickou maticí (asi 3  $\text{mmol g}^{-1}$ ). Čím větší kapacitu měniče mají, tím větší množství vzorku lze na nich chromatografovat.

Chování měničů s organickou maticí je značně ovlivňováno vlastnostmi této matrice, zejména tzv. stupněm zesílení kopolymeru tvořícího maticí, který určuje velikost pórů. U většiny organických měničů se konečná velikost pórů ustaví až ve styku s kapalinou, neboť při přijímání kapaliny se velikost pórů zvětšuje, měnič bobtná. Bobtnání pryskyřice závisí na složení organické matrice, na jejím zesílení, na iontové formě a na složení kapaliny, s níž je ve styku (mobilní fáze).

Ve srovnání s měniči chemicky vázanými na silikagelu je při použití pryskyřičných měničů účinnost i permeabilita kolony asi pětikrát menší, takže se s nimi pracuje při lineárních rychlostech toku asi pětikrát menších (0,2 až 1  $\text{mm s}^{-1}$ ; u měničů na bázi silikagelu 1 až 5  $\text{mm s}^{-1}$ ) při stejném tlakovém spádu na koloně (asi 3 až 14 MPa). Účinnost dělení na organických měničích se zpravidla zlepšuje za zvýšené teploty.

Selektivita organických měničů iontů na bázi styren-divinylbenzenových pryskyřic pro některé typy dělení nevyhovuje (matrice např. vykazuje velkou afinitu k aromatickým sloučeninám), a proto byly vyvinuty i matrice odlišné struktury. Tak např. měniče na bázi modifikovaného Sephadexu s maticí typu polysacharidu (dextrinu) mají poměrně malou afinitu k nepolárním a aromatickým látkám. Tyto měniče jsou však mechanicky značně nestabilní a lze s nimi pracovat pouze při velmi nízkých

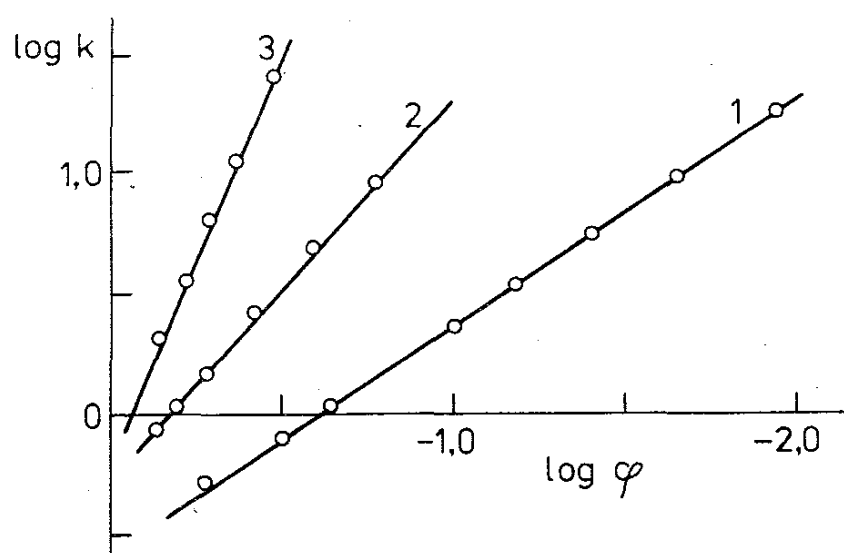
tlacích. Měníče na bázi modifikovaného gelu Spheronu s glykolmethakrylátovou matricí se vyznačují malými objemovými změnami při botnání, dobrou mechanickou stabilitou i při vyšších tlacích a odolností k mikroorganismům.

Při chromatografii zcela ionizovaných organických i anorganických látek se uplatňuje především iontová rovnováha popsaná rovnovážnou konstantou [rovn. (3.41)] pro výměnu iontů s jedním nábojem. Obecnější platnost pro výměnu iontů  $A^{a+}$  a  $B^{b+}$ , resp.  $A^{a-}$  a  $B^{b-}$  má rovnovážná konstanta  $K_A^B$  podle rovn. (7.15), která se rovněž někdy označuje jako selektivní koeficient, neboť charakterizuje selektivní sorpci iontu B vzhledem k iontu A:

$$K_A^B = \frac{([A]_m)^b ([B]_s)^a}{([A]_s)^b ([B]_m)^a} \quad (7.15)$$

kde indexy m se vztahují k rovnovážným koncentracím iontů v mobilní a indexy s k rovnovážným koncentracím iontů ve stacionární (měníčové) fázi; pro jednoduchost nejsou znaménka nábojů vyznačena. Uvažujeme-li výměnu stopových množství chromatografovaného iontu  $B^{b+}$  ( $B^{b-}$ ) za ion  $A^{a+}$  ( $A^{a-}$ ), tato výměna neovlivní významně koncentraci iontu A ani v mobilní fázi  $[A]_m$ , ani ve fázi stacionární, která je dána celkovou výměnnou kapacitou měníče iontů,  $Q = [A]_s$ . Označíme-li pro jednoduchost  $[A]_m = \varphi$  a zavedeme-li do rovn. (7.15) výraz pro distribuční konstantu chromatografované látky  $K_D = [B]_s/[B]_m$ , můžeme získat vztah pro kapacitní poměr  $k$  této látky v závislosti na  $\varphi$ :

$$k = K_D \frac{V_s}{V_M} = \frac{V_s}{V_M} (K_A^B)^{1/a} Q^{b/a} \varphi^{-b/a} \quad (7.16)$$



Obr. 112. Závislost kapacitních poměrů  $k$  nukleotidů na molární koncentraci fosfátového iontu  $\varphi$  v mobilní fázi při chromatografii na měníči aniontů Perisorb AN  
1 – guanosin-5'-monofosfát,  
2 – guanosin-5'-difosfát,  
3 – guanosin-5'-trifosfát

Tento vztah je formálně shodný s rovn. (7.12) popisující závislost  $k$  na  $\varphi$  při chromatografii na polárních adsorbentech. Rostoucí koncentrace iontu A v mobilní fázi tedy snižuje retenci (kapacitní poměry) chromatografovaných látek, přičemž logaritmické závislosti  $k$  na  $\varphi$  jsou lineární a jejich směrnice je určována především poměrem náboje chromatografovaného a elučního iontu (viz příklad na obr. 112).



Afinita iontů k měničům, vyjádřená selektivitním koeficientem, stoupá s rostoucím nábojem a objemem iontů a je ovlivněna i charakterem protiiontu. Selektivitní koeficienty organických iontů závisejí i na interakcích mezi uhlovodíkovou částí iontu a maticí měniče, které jsou velmi podobné silám působícím mezi organickými látkami a náplněmi s nepolárními stacionárními fázemi, a lze jim přiřítat řadu úspěšných dělení organických iontů stejného náboje a přibližně stejné velikosti iontově výměnnou chromatografií.

Uvedená pravidla platí pro mechanismus chromatografie zcela ionizovaných organických látek. V praxi se však velmi často dělí organické kyseliny nebo báze, které v roztocích podléhají acidobazickým rovnováhám. Pracujeme-li při takovém pH, kdy je kyselina či zásada zcela disociována, zůstávají uvedená pravidla v platnosti, změnou pH však dojde ke snížení jejich retence. U částečně disociovaných kyselin anebo zásad již pochopitelně můžeme pozorovat značné odchylky od vztahu (7.16).

Vliv pH na velikost kapacitních poměrů chromatografovaných kyselin či bází je většinou poměrně složitý, zejména proto, že značný počet těchto látek podléhá vícestupňovým acidobazickým rovnováhám, popř. při změně pH může dojít k přeměně kyselých vlastností na bazické a naopak (u aminokyselin a některých heterocyklických sloučenin majících vlastnosti amfolytu). Největší vliv pH na kapacitní poměry můžeme očekávat v oblastech pH blízkých  $pK$  dané kyseliny nebo báze, kde i poměrně velmi malé změny pH výrazně ovlivní disociaci těchto látek.

Organické látky, které nejsou schopné ionizace, anebo ionty nesoucí náboj stejného znaménka jako funkční výměnné skupiny měniče mohou při iontově výměnné chromatografii vstupovat pouze do analogických interakcí jako při chromatografii na nepolárních fázích. Přídavkem organického rozpouštědla k mobilní fázi se tedy urychlí eluce nepolárních látek, zpomalí se naopak přídavkem elektrolytu (soli) k mobilní fázi vysolením nepolární látky z mobilní fáze. Na měničích iontů lze chromatografovat i velmi polární neionizované organické látky ve vodných roztocích polárních organických rozpouštědel (např. ethanolu). V takovém systému se ustaví rovnováha mezi obsahem organického rozpouštědla v eluentu a v kapalině uvnitř pórů měniče s organickou maticí. Kapalina uvnitř pórů má charakter stacionární fáze, která v důsledku hydratace funkčních výměnných skupin měniče obsahuje více vody než fáze mobilní. Měnič má v tomto případě hlavně funkci nosiče stacionární fáze, která je polárnější než eluent. Velmi polární organické látky (glykoly, cukry apod.) mají potom větší afinitu ke stacionární fázi než k fázi mobilní a lze je v daném systému úspěšně chromatograficky dělit. Retenci látek v uvedeném systému lze ovlivňovat obsahem organického rozpouštědla v eluentu; s rostoucí koncentrací ethanolu v mobilní fázi se většinou zvyšují i kapacitní poměry chromatografovaných látek. Touto metodou bylo dosaženo velmi úspěšného dělení cukrů.

Při aplikacích vysokoúčinné chromatografie na měničích iontů činí značné obtíže kontinuální detekce většiny iontů, které neabsorbují v ultrafialové oblasti nebo nevykazují redukční či oxidační vlastnosti, jež by umožnily jejich elektrochemickou detekci. Univerzální (refraktometrické) detektory jsou málo citlivé a poměrně nízkou citlivost má i nepřímá fotometrická detekce, při níž se používá k eluci mobilní fáze

obsahující ionty (např. ftalátové), které výrazně absorbují v UV-oblasti, a eluce iontů s menší absorpcí se projeví negativním signálem detektoru UV. Použití velmi citlivé vodivostní detekce je problematické vzhledem k tomu, že je nezbytné používat vodivých iontů v mobilní fázi. Tyto potíže odstranilo zavedení techniky označované jako *iontová chromatografie*.

Princip této metody spočívá v aplikaci analytických kolon plněných měniči iontů s malou kapacitou, které umožňují použít k separacím mobilní fáze s poměrně nízkým obsahem elektrolytů, řádově v  $\text{mmol l}^{-1}$ . Signál elektrolytů lze při jejich nízké koncentraci potlačit buď elektrickou kompenzací přímo u vodivostních či UV-detektorů, které jsou pro tento účel speciálně uzpůsobeny, nebo odstraněním elektrolytů z mobilní fáze před vodivostní detekcí zachycením na pomocné (potlačovací, supresorové) koloně zařazené mezi analytickou kolonu a detektor. Supresorová kolona je plněná měničem kationtů ve formě  $\text{H}^+$  o poměrně vysoké kapacitě a jako elektrolytu v mobilní fázi se používá uhličitanoého-hydrogenuhličitanoého tlumivého roztoku, který se na supresorové koloně převede na kyselinu uhličitou o nízké vodivosti, takže vodivostní detektor může detegovat vodivější anionty v separované směsi s poměrně vysokou citlivostí. Nevýhoda použití supresorových kolon spočívá v rozšiřování píků eluovaných látek a v potřebě občasné výměny měniče kationtů v této koloně za čerstvý. Tyto nevýhody odstraňuje použití tzv. supresorových vláken, což jsou kapilární trubice o malém vnitřním průměru se stěnami tvořenými měničem kationtů, které jsou plněny inertními skleněnými kuličkami. Eluát z kolony protéká vnitřkem této trubice do vodivostního detektoru, zatímco trubice je zvenčí v protisměru obtékána zředěnou kyselinou sírovou, což zaručuje kontinuální regeneraci iontově výměnných skupin v supresorovém vlákně. Přístroje pro tuto techniku – iontové chromatografy – vyrábí firma Dionex.

I když lze iontové chromatografie použít k analýze kationtů, převažuje analýza anorganických aniontů např. v dešťových, pitných či povrchových vodách, ve velmi čistých chemikáliích, v moči.

#### 7.4.4.6 Chromatografie iontových párů

Při chromatografii iontových párů se využívá tvorby iontových asociátů (iontových párů) mezi dělenými látkami iontové povahy, tedy anionty kyselin nebo kationty bází a opačně nabitými ionty, obsahujícími relativně objemný lipofilní podíl. U vzniklých iontových asociátů je celkový náboj neutralizován, proto jsou podstatně hydrofobnější než původní kyseliny, zásady či soli a vykazují podstatně zvýšenou retenci na nepolárních fázích.

Uvedený mechanismus lze schematicky znázornit takto:



Tomuto ději odpovídá distribuční konstanta  $K_D$ , která je např. pro látku B dána vztahem:

$$K_D = \frac{[\text{A}:\text{B}]_{\text{org}}}{[\text{B}]_{\text{aq}}} = K[\text{A}]_{\text{aq}} \quad (7.18)$$

kde  $K$  označuje rovnovážnou konstantu pro interakci podle rovn. (7.17). Retence vzniklého iontového páru v organické nepolární fázi roste s rostoucí rovnovážnou koncentrací protiiontu  $[A]$  ve vodné fázi a s rostoucí velikostí alkylů v protiiontu i v chromatografovaném iontu.

Jako protiionty pro tvorbu iontových párů se zásadami se v praxi používají silné kyseliny (např. alkansulfonové kyseliny) a jako protiionty pro tvorbu iontových párů s kyselinami slouží většinou kvartérní amoniové soli, např. tetrabutylamonium-fosfát. Při použití silných kyselin a bází jako protiiontů lze totiž nastavovat optimální pH vodné fáze tak, aby se v ní podpořila disociace chromatografované kyseliny či báze, a tím i tvorba iontových párů. V praxi jsme ovšem se zřetelem na stálost aparatury a náplní na bázi silikagelu omezení jen na pH v rozmezí 2 až 8.

K chromatografii iontových párů se často používá systém kapalina–kapalina, přičemž se volí vodná stacionární fáze obsahující příslušný protiion na vhodném, pokud možno inertním nosiči (silanizovaném silikagelu, popř. hydrofobizované celulóse). Organická nepolární fáze slouží jako eluent.

Pohodlněji se pracuje na chemicky vázaných nepolárních stacionárních fázích s mobilní fází obsahující vodný roztok vhodného protiiontu. Při chromatografii v systému obrácených fází lze výhodně ovlivňovat retenci chromatografovaných látek i přidávkem polárního organického rozpouštědla (např. methanolu nebo propanolu) do mobilní fáze. Podobně jako při chromatografii neionogenních látek klesají kapacitní poměry s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla v eluentu.

Chromatografie iontových párů se osvědčila při analýzách kyselých a bazických látek v barvářských meziproduktech, farmaceutických výrobcích a produktech látkové výměny.

#### 7.4.4.7 Využití tvorby komplexů v kapalinové chromatografii

Pro řešení některých speciálních separačních problémů lze využít vedlejších komplexotvorných rovnováh buď ve stacionární, nebo v mobilní fázi. Metoda je založena na odlišné afinitě komplexů a nekomplexních iontů či neiontových látek k jedné či druhé fázi. Při tzv. chromatografii ligandové výměny se používají měniče kationtů v cyklu komplexotvorných kationtů jako stacionární fáze při separaci látek, schopných chovat se k těmto kationtům jako ligandy. Tyto látky se z kolony eluují v pořadí vzrůstajících konstant stability příslušných komplexů a jako eluent se používá roztok jiného ligandu, schopného vstupovat do konkurenčních rovnováh. Jako příklad aplikace lze uvést separaci aminosloučenin na silném měniči kationtů v cyklu  $\text{Cu}^{2+}$  s využitím mobilních fází obsahujících amoniak. V důsledku vysoké stability komplexů separovaných látek s kovovými ionty je však účinnost separace poměrně nízká a píky látek jsou nesymetrické, proto má chromatografie ligandové výměny jen omezené použití.

Při tzv. argentační chromatografii se využívá tvorby „charge-transfer“ komplexů<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Jde o komplexy s přenosem náboje.

iontů  $\text{Ag}^+$  s nenasycenými sloučeninami, přičemž lze buď použít silikagelu s povrchem, na nějž byl nanesen dusičnan stříbrný (interakce ve stacionární fázi), nebo přídavku  $\text{AgNO}_3$  k mobilní fázi při chromatografii v systému s obrácenými fázemi. Touto metodou bylo dosaženo úspěšné separace polohových izomerů, např. *cis*- a *trans*- nenasycených esterů mastných kyselin.

Častěji než komplexotvorných rovnováh ve stacionární fázi se využívá přídavku činidel vytvářejících komplexy s dělenými látkami do mobilní fáze. Tak např. při chromatografii na měničích aniontů bylo použito mobilní fáze obsahující boritanové tlumivé roztoky k separaci polyolů, hydroxykyselin a cukrů, které vytvářejí s boritanovými ionty komplexní anionty. Na měničích aniontů byly úspěšně separovány hydroxykyseliny, vytvářející komplexy s řadou kovových iontů, s použitím mobilních fází obsahujících octany hořečnatý, zinečnatý nebo měďnatý. Naopak řadu kovových iontů, včetně iontů kovů vzácných zemin, bylo možno separovat na měničích kationtů s použitím mobilních fází obsahujících hydroxykyseliny (citronovou, mléčnou nebo hydroxyisomáselnou) nebo kyselinu ethylendiamintetraoctovou. Při chromatografii s obrácenými fázemi bylo popsáno zlepšení selektivity separace sulfonamidů a aminokyselin po přídavku chelátů 4-alkyldiethylentriaminu s ionty  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Ni}^{2+}$ .

#### 7.4.5 Volba pracovních podmínek a optimalizace vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Volba pracovních podmínek a jejich optimalizace zahrnuje obecně několik postupných kroků:

1. volbu chromatografického systému,
2. volbu určité kolony,
3. volbu vhodných pracovních podmínek,
4. eventuální použití programovaných změn podmínek v průběhu eluce a volbu vhodného programu.

Přístup k volbě pracovní metody a podmínek závisí i na povaze separačního problému a možnostech pracovníků. Je třeba brát v úvahu:

- a) složitost vzorku,
- b) cíl separace a požadovanou informaci,
- c) experimentální vybavení,
- d) zkušenosti s jednotlivými metodami,
- e) předběžné znalosti o charakteru vzorku,
- f) ekonomické a hygienické aspekty.

Vzorek se někdy skládá z malého počtu složek; stačí oddělit a stanovit pouze jednu nebo některou ze složek z poměrně složité směsi. V tomto případě je řešení jednodušší, než když požadujeme vzájemné rozdělení všech složek ve složité směsi.

Někdy stačí pro hrubé porovnání kvality vzorku porovnání jeho chromatogramu ve formě tzv. otisku palce (fingerprint) s chromatogramy jiných, standardních směsí;

jindy je třeba prokázat nebo stanovit přítomnost určitých látek nebo identifikovat, popř. izolovat v eluátu pro další analýzu neznámé látky ve vzorku. Pokud jde o analýzy velmi složitých směsí, musíme kombinovat různé analytické metody. V tomto případě lze velmi často použít kapalinové chromatografie pro hrubou předseparaci látek ze směsi do skupin podle relativních molekulových hmotností, polarity atp. V jednotlivých skupinách je potom možné látky analyzovat jinou metodou kapalinové chromatografie, plynovou chromatografií či některou spektrální metodou. Někdy se využívá i přímého spojení různých separačních a spektrálních metod nebo se pracuje s programovanou změnou pracovních podmínek v průběhu dělení (s gradientovou elucí, s kombinací a přepojováním kolon, s programovanou teplotou či průtokem mobilní fáze). Zvláštní požadavky na chromatografii klade stopová analýza či preparativní separace, dělení vysokomolekulárních sloučenin a stanovení distribuce jejich molekulových hmotností, separace biopolymerů, optických izomerů či anorganických iontů, kde se většinou používá speciálních technik kapalinové chromatografie s určitými instrumentálními odlišnostmi. Je třeba mít na paměti i to, že se důsledná optimalizace pracovních podmínek většinou vyplatí při vypracování metody pro rutinní analýzu velkého počtu vzorků, ale ne při řešení jednorázového separačního problému.

Při výběru metody a pracovních podmínek jsme limitováni přístrojem a kolonami, které máme k dispozici, a bereme v úvahu i předchozí zkušenosti s jednotlivými metodami kapalinové chromatografie.

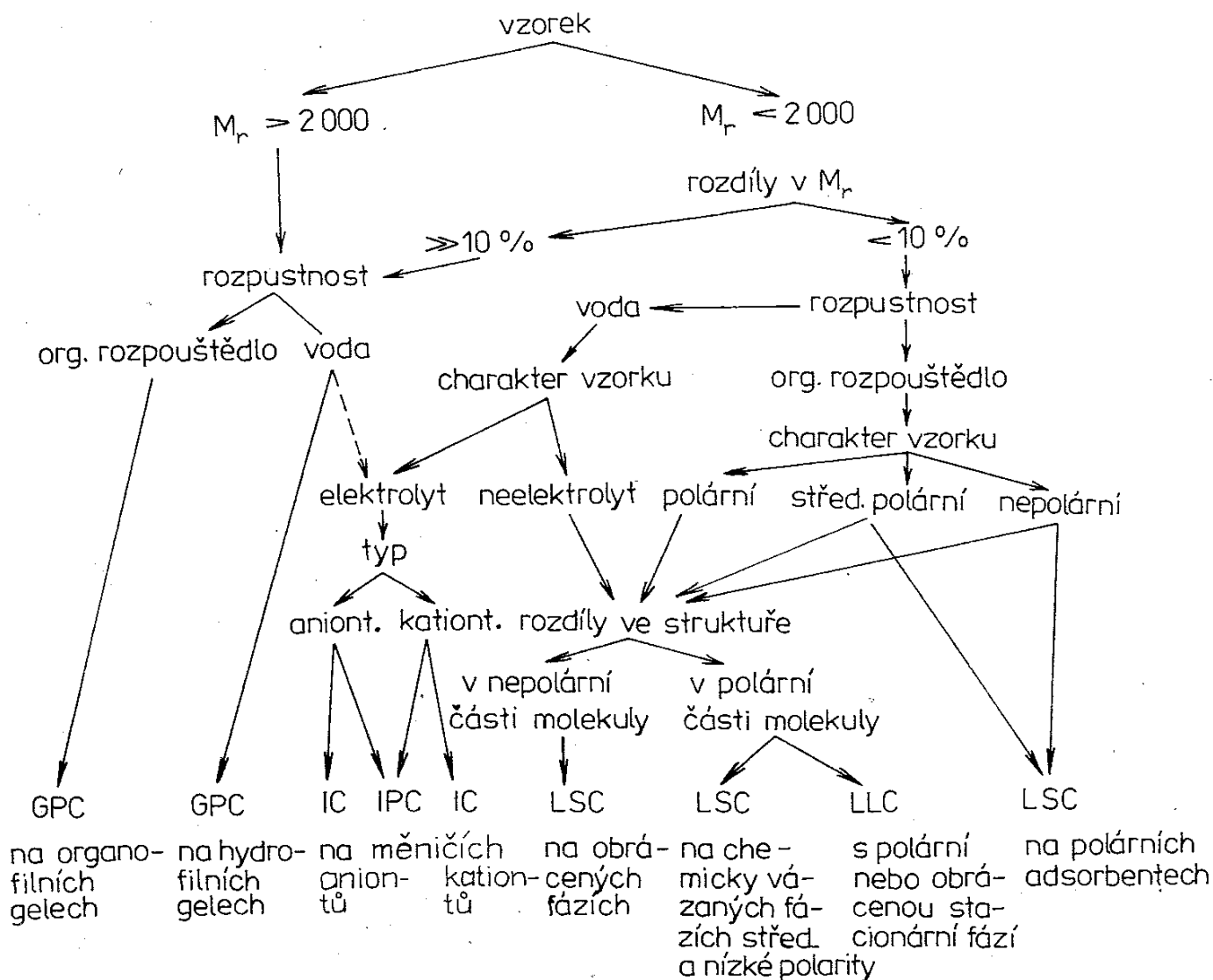
Předběžné znalosti o vzorku nám mohou velmi usnadnit volbu metody a pracovních podmínek. Pokud neznáme přesně strukturu látek očekávaných ve vzorku, jsou velmi cenné i orientační údaje o jejich charakteru, jako je jejich přibližná polarita (látky rozpustné ve vodě nebo v uhlovodících či jiných organických rozpouštědlech), přibližná relativní molekulová hmotnost, povaha látek (jde-li o látky kyselé, bazické nebo neutrální), předběžné údaje z infračervených a ultrafialových spekter nebo informace o pravděpodobných funkčních skupinách. Je třeba také uvážit koncentrace látek ve vzorku a očekávaný poměr obsahu hlavní komponenty a nečistot a podle toho zvolit vhodnou metodu detekce, popř. i předběžné obohacení látek ve vzorku, nebo se uchýlit k přípravě derivátů, které umožní citlivou detekci.

V neposlední řadě je třeba uvážit předpokládanou spotřebu rozpouštědel v mobilních fázích, jejich cenu a toxicitu, cenu kolon a další náklady na provoz přístroje na jedné straně a dobu potřebnou k jedné analýze na straně druhé.

#### 7.4.5.1 Volba chromatografického systému

Při volbě chromatografického systému je třeba vycházet především z charakteru vzorku a z rozdílu ve struktuře jeho složek. Řadu směsí lze separovat s použitím různých metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie a volba systému závisí i na kolonách, které máme k dispozici, a na zkušenostech s jednotlivými metodami. Jako obecného vodítka při volbě chromatografického systému můžeme použít schématu na obr. 113. Základní vlastnosti a obor použití jednotlivých systémů jsou

přehledně uvedeny v tab. 7.7 a v tab. 7.8 je poněkud podrobněji rozvedeno, pro které rozdíly ve struktuře molekul se pravděpodobně uplatní separace v jednotlivých chromatografických systémech.



Obr. 113. Volba chromatografického systému

LSC – chromatografie v systému kapalina–tuhá fáze, LLC – chromatografie v systému kapalina–kapalina, IC – iontově výměnná chromatografie, iontová chromatografie, IPC – chromatografie iontových párů, GPC – gelová permeační chromatografie

Tabulka 7.11 Rozdělení rozpouštědel do skupin selektivity

Skupina	Typ rozpouštědla
I	alifatické ethery, trialkylaminy, tetramethylguanidin
II	alifatické alkoholy
III	pyridiny, tetrahydrofuran, amidy s výjimkou formamidu
IV	glykoly, glykoethery, benzylalkohol, formamid, octová kyselina
V	dichlormethan, dichlorethan, trikresylfosfát
VIa	alkylhalogenidy, ketony, estery, nitrily, sulfoxidy, sulfony, anilin a dioxan
VIb	nitrosloučeniny, fenylalkylethery, aromatické uhlovodíky
VII	aromatické halogensloučeniny, difenylether
VIII	fluoralkanoly, <i>m</i> -kresol, chloroform, voda

Po zvolení chromatografické metody pro daný separační problém musíme vybrat vhodnou náplň kolony a eluent. Pokud lze v literatuře najít údaje o dělení podobného typu sloučenin, můžeme zvolit analogické podmínky a po prvním pokusu o dělení vzorku je podle potřeby poněkud modifikovat.

Nejsou-li takové literární údaje k dispozici, lze k rychlému orientačnímu vyhledání podmínek dělení na polárních adsorbentech někdy využít i výsledků předběžných pokusů na tenkých vrstvách stejného adsorbentu při obměňování charakteru mobilní fáze. Složení eluentu optimální pro chromatografii na tenkých vrstvách však není bez určité obměny použitelné pro dělení stejného vzorku v kapalinové kolonové chromatografii, zejména při práci se směsnými mobilními fázemi.

Pokud nemáme k prvnímu odhadu podmínek dělení použitelné předběžné údaje, můžeme jako pomůcku pro orientaci při první volbě kolony použít údaje shrnuté v tab. 7.9, které lze samozřejmě podle potřeby obměňovat. Zejména doporučené složení mobilní fáze je třeba chápat jen jako nezávazné vodítko. V tabulce jsou uvedeny i některé komerční názvy příslušných typů náplní.

Při rozhodování o použití náplní povrchově pórovitého nebo pórovitého mikroparticulárního charakteru musíme mít na paměti vlastnosti obou typů náplní: Na povrchově pórovitých náplních lze dosáhnout při dobré účinnosti velmi rychlého rozdělení omezeného počtu látek ve vzorku při poměrně malých nárocích na pracovní tlak. Můžeme však dělit jen zcela malá množství vzorku a musíme tedy mít k dispozici citlivé detektory. Na pórovitých mikroparticulárních náplních lze dělit s velmi dobrou účinností i vzorky s větším počtem složek, ovšem za použití vyšších pracovních tlaků a při poměrně delším trvání analýzy než u povrchově pórovitých náplní, pokud není optimalizována délka kolony. Můžeme však dělit podstatně větší množství vzorku, takže nároky na citlivost detektorů nejsou tak velké. V dnešní době při běžných analytických aplikacích naprosto převažují pórovité mikroparticulární náplně.

#### 7.4.5.2 Optimalizace pracovních podmínek (časově stálých)

Při hledání optimálních pracovních podmínek ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se snažíme o dosažení požadovaného rozlišení jednotlivých složek dělené směsi v co nejkratší době, přičemž však musíme brát v úvahu i tlaková omezení daná použitou instrumentací.

Dobu analýzy  $t_A$  lze přibližně ztotožnit s elučním časem poslední eluované látky s kapacitním poměrem  $k_n$ :

$$t_A = \frac{\pi d_c^2 L \varepsilon_T}{4F_m} (1 + k_n) \quad (7.19)$$

kde  $L$  je délka a  $d_c$  – vnitřní průměr kolony,  $\varepsilon_T$  – celková pórovitost kolony,  $F_m$  – objemová rychlost mobilní fáze. Dobu analýzy tedy lze zkrátit zmenšením délky kolony a kapacitního poměru poslední eluované látky, což však současně vede ke snížení separační účinnosti a rozlišení. Snížíme-li ve stejném poměru objemovou

rychlost mobilní fáze a čtverec vnitřního průměru kolony, zůstane zachována lineární rychlost toku mobilní fáze  $u$  a doba analýzy se nezmění. Zvýšíme-li objemovou rychlost mobilní fáze při stejných rozměrech kolony, zkrátí se ve stejném poměru doba analýzy, ale za cenu snížení separační účinnosti a zvýšení tlakového spádu na koloně [(viz Darcyho rovnice (7.6)].

Tlakový spád na koloně je omezen horní hranicí danou použitým instrumentálním zařízením. I v rámci experimentálně dostupných pracovních tlaků však nelze ztráct ze zřetele, že práce při vyšších tlacích většinou vede k rychlejšímu opotřebení základních částí přístroje, zejména čerpadla a zařízení pro dávkování vzorku, a zvyšuje tedy cenu analýzy. Z tohoto hlediska lze optimalizovat pracovní podmínky tak, aby při daném elučním čase byl pracovní tlak minimální. Tohoto požadavku se dosáhne současným zmenšením délky kolony a velikosti částic náplně. Zmenšování velikosti částic náplně je však limitováno potížemi spojenými s plněním kolon velmi malými částicemi, takže spodní hranice velikosti částic náplně je v dnešní době 2 až 3  $\mu\text{m}$ . Podobně zkracování kolon a zmenšování jejich vnitřního průměru je omezeno mimokolonovými příspěvky k rozšiřování elučních zón, což vede k požadavkům na zásadní změny v konstrukci celého přístroje, zejména k miniaturizaci průtokových cel detektorů, spojů a vnitřního objemu dávkovacích zařízení. Metoda, která pracuje s takto optimalizovaným instrumentálním zařízením, se označuje jako *nízkodisperzní chromatografie* či *mikrokolonová chromatografie*.

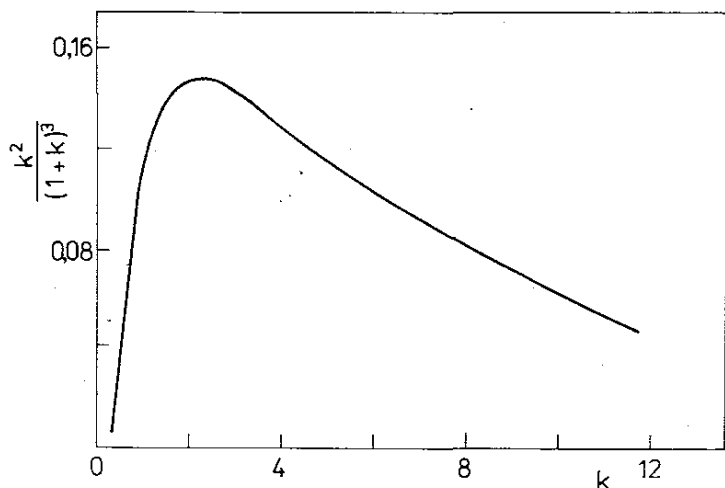
Analyzujeme-li neznámé složité vzorky, je důležitou veličinou počet látek, které lze v průběhu separace na jednom chromatogramu rozlišit, tj. kapacita píků [rovn. (3.84)]. Ta závisí především na separační účinnosti (počtu pater) použité analytické kolony. Optimalizaci separace neznámé směsi lze tedy chápat jako snahu po dosažení co největšího počtu teoretických pater za časovou jednotku, čehož lze dosáhnout při práci s dlouhými kolonami plněnými náplněmi s velmi malými částicemi při velkých objemových rychlostech, ale za cenu velmi vysokého pracovního tlaku. Jak bylo uvedeno výše, úvahy zahrnující tlaková omezení vedou naopak k používání krátkých kolon. Průměr dobře naplněné kolony nemá téměř vliv na separační účinnost. Požadavek maximálního počtu pater za časovou jednotku vymezuje i optimální kapacitní poměr. S použitím vztahu pro efektivní počet pater  $n_{\text{ef}}$  [rovn. (3.53)] a pro kapacitní poměr [rovn. (3.9)] získáme pro počet efektivních pater vztahovaný na eluční čas rovnicí

$$\frac{n_{\text{ef}}}{t_{\text{R}}} = \frac{n}{t_{\text{M}}} \frac{k^2}{(1+k)^3} = \frac{L}{Ht_{\text{M}}} \frac{k^2}{(1+k)^3} = \frac{u}{H} \frac{k^2}{(1+k)^3} \quad (7.20)$$

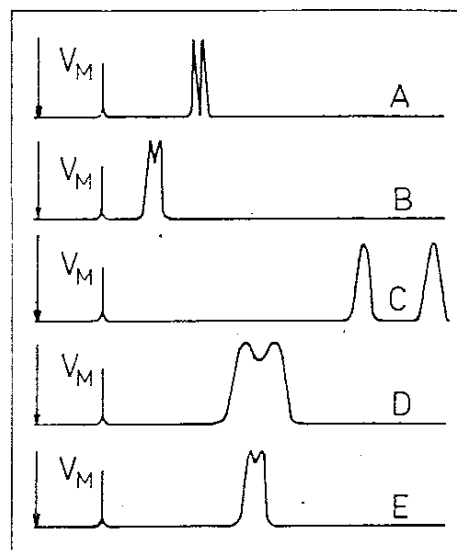
Po derivaci pravé strany této rovnice podle  $k$  zjistíme, že maximálního (optimálního) počtu efektivních pater za sekundu dosáhneme při  $k = 2$ . Graf závislosti  $k^2/(1+k)^3$  na  $k$  ukazuje obr. 114. Jak z obrázku vyplývá, pro rychlé analýzy by měly být kapacitní poměry v rozmezí od 1,5 do 4; při  $k > 10$  se již analýza značně prodlužuje. Při analýze vícesložkových směsí pochopitelně nelze udržet kapacitní poměry všech složek v tomto poměrně úzkém rozmezí, pracuje-li se s konstantním složením mobilní fáze.



Při prvním pokusu o dělení můžeme získat některý z pěti různých typů chromatogramů, který je pro dvě látky schematicky znázorněn na obr. 115. Chromatogram A představuje ideální dělení za podmínek, kdy při vyhovující selektivitě, rozlišení a dobré účinnosti kolony jsou kapacitní poměry látek optimalizovány tak, aby se



Obr. 114. Grafické znázornění vztahu (7.20)



Obr. 115. Schematické znázornění separace dvou látek

dosáhlo co největšího počtu efektivních pater za sekundu. Na chromatogramu B jsou kapacitní poměry obou látek velmi nízké a rozdělení obou látek bude možno dosáhnout zvýšením  $k$  (zmenšením eluční síly mobilní fáze). Na chromatogramu C jsou naopak kapacitní poměry příliš vysoké, rozlišení je nadbytečné a snížením kapacitních poměrů (zvýšením eluční síly mobilní fáze) bude možno dosáhnout podstatného zkrácení doby analýzy. Chromatogram D ukazuje dělení, při němž je stacionární i mobilní fáze celkem vhodně zvolena vzhledem k selektivitě a kapacitním poměrům dělených látek, ale účinnost kolony je malá. Lepšího rozdělení se v tomto případě zřejmě nejúčelněji dosáhne zvětšením počtu pater kolony (prodloužením kolony, zmenšením průměru částecek náplně, zpomalením průtoku mobilní fáze apod.). Na chromatogramu E vyhovují kapacitní poměry obou látek i účinnost kolony, systém je však pro dělení obou látek málo selektivní a rozlišení lze v tomto případě zlepšit pouze změnou stacionární fáze, popř. využitím specifických interakcí ve fázi mobilní.

### Průtok mobilní fáze

Průtok mobilní fáze ovlivňuje pouze účinnost (počet teoretických pater), ale ne selektivitu nebo kapacitní příspěvek k rozlišení [rovnice (3.78)]. Z teorie vyplývá, že závislost výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$  na lineární rychlosti toku mobilní fáze  $u$  prochází minimem. Tohoto minima lze dosáhnout v kapalinové chromatografii pouze při práci s velmi jemnými náplněmi a částicemi o velikosti 3 až 5  $\mu\text{m}$  při malém průtoku (např. u kolony o průměru 4 mm při průtoku menším než  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ ). Proto se téměř vždy používá vyššího průtoku. Jeho snížením

lze většinou dosáhnout mírného zvýšení účinnosti separace, ale za cenu podstatného prodloužení doby analýzy, a proto optimalizace průtoku mobilní fáze ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii nemá velký význam.

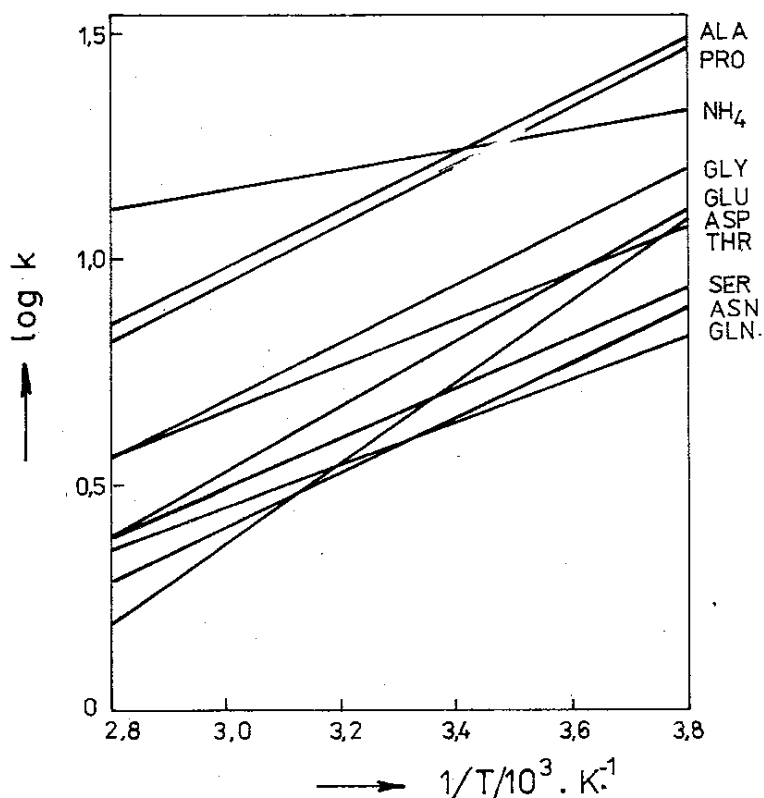
### Pracovní teplota

Teplota ovlivňuje viskozitu mobilní fáze a při vyšších teplotách většinou dochází v důsledku poklesu viskozity a zvýšení difúzních koeficientů k mírnému zvýšení účinnosti separace. Vedle účinnosti má teplota vliv i na retenci. Ze základních termodynamických úvah [rovn. (3.82)] plyne jednoduchá rovnice vyjadřující vliv teploty  $T$  na kapacitní poměry  $k$ :

$$\log k = a + \frac{b}{T} \quad (7.21)$$

kde  $a$ ,  $b$  jsou experimentální konstanty závislé na chromatografickém systému a na vlastnostech separovaných látek.

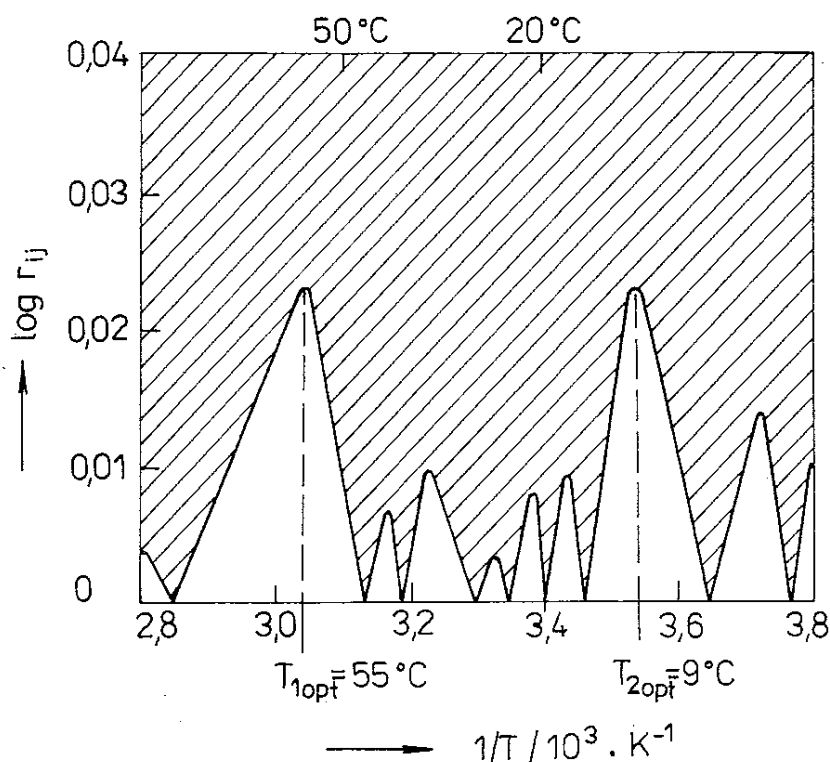
Rovnice (7.21) a parametrů  $a$ ,  $b$ , zjištěných z experimentálních dat, lze využít k optimalizaci teploty např. pomocí okénkových diagramů, kdy spojením rovn. (7.21) s definičními vztahy pro rozlišení nebo pro eluční poměr  $r_{ij}$  získáme vztah mezi těmito kritérii separace a teplotou a z příslušných grafů zjistíme optimální teplotu pro separaci dané směsi (kap. 5).



Obr. 116. Teplotní závislost retence aminokyselin při iontově párové chromatografii v systému s obrácenými fázemi

Použití této metody ilustruje příklad optimalizace teploty při separaci aminokyselin na koloně s chemicky vázanou oktylovou fází při použití mobilní fáze 0,01M-citronan sodný:propanol (49:1) s přidavkem 0,3%ního dodecylsulfonanu sodného. Na obrázku 116 je uveden graf teplotní závislosti kapacitních poměrů jednotlivých aminokyselin a iontů  $\text{NH}_4^+$  a obr. 117 ukazuje výsledný okénkový

diagram závislosti elučních poměrů sousedních dvojic látek na teplotě. Nevyšrafované oblasti odpovídají okénkům a jejich hranice minimálnímu elučnímu poměru  $r_{ij}$  při dané teplotě. Optimálních hodnot  $r_{ij} = 1,05$  lze dosáhnout při teplotě  $55\text{ °C}$  ( $T_{1,\text{opt}}$ ) a  $9\text{ °C}$  ( $T_{2,\text{opt}}$ ), přičemž  $T_{1,\text{opt}}$  je prakticky lépe realizovatelná. K optimalizaci teploty lze využít i jiných způsobů, např. simplexové metody (kap. 5).



Obr. 117. Okénkový diagram pro optimalizaci pracovní teploty zkonstruovaný s použitím dat z obr. 116  $T_{1,\text{opt}}$ ,  $T_{2,\text{opt}}$  – výsledné optimální teploty

### Složení mobilní fáze

Pokud jsme zvolili vhodnou kolonu, má pro úspěšnou separaci ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii největší význam volba a optimalizace složení mobilní fáze. Složení mobilní fáze má určitý vliv na účinnost separace, protože její viskozita ovlivňuje (podobně jako teplota) difúzní koeficienty chromatografovaných látek. Proto je vhodné pracovat s mobilními fázemi s co nejnižší viskozitou.

Podstatně větší význam má však vliv složení mobilní fáze na selektivitu a kapacitní příspěvek k rozlišení. Vliv složení mobilní fáze na separaci se tedy projeví především prostřednictvím kapacitních poměrů. K ovlivňování absolutní (retenční objemy, kapacitní poměry) a relativní (eluční poměr) retence v kapalinové chromatografii se používá binárních (dvousložkových), ternárních (třísložkových) i složitějších mobilních fází, jež jsou složeny z různých rozpouštědel, někdy s přísadou solí, tlumivých roztoků, bází a kyselin. Pro popis retence při chromatografii s binárními mobilními fázemi v systémech s normálními či obrácenými fázemi nebo při chromatografii iontových párů a při chromatografii na měničích iontů lze většinou v prvním přiblížení dobře použít poměrně jednoduchých rovnic [rovn. (7.12) až (7.14) a (7.16) v odd. 7.4.4]. Těchto rovnic lze použít i k optimalizaci složení mobilní fáze; experimentální konstanty  $a$ ,  $m$ , popř.  $d$  je však třeba stanovit v několika experimentech předcházejících vlastní optimalizaci, kdy měříme eluční objemy a kapacitní poměry všech složek dělené směsi pro několik různých složení mobilní fáze. Dosazením rovnic (7.12) až (7.14) do definiční rovnice pro rozlišení získáme vztahy mezi rozlišením

každé dvojice separovaných látek dané směsi a koncentrací (objemovým zlomkem  $\varphi$ ) účinné eluční složky v mobilní fázi, z nichž lze výpočtem nebo za pomoci okénkových diagramů (analogicky jako při optimalizaci teploty) zjistit optimální složení dvou-složkové mobilní fáze pro daný separační problém.

Separované látky vykazují v důsledku strukturních rozdílů v daném chromatografickém systému různé hodnoty konstant  $a$ ,  $m$  a  $d$ , což umožňuje jejich vzájemnou separaci. Tyto rozdíly rovněž vedou k tomu, že u řady látek se s měnícím objemovým zlomkem účinné eluční složky v mobilní fázi ( $\varphi$ ) nemění pouze absolutní retence, ale i retence relativní (eluční poměr). Může dojít i k tomu, že při určitém  $\varphi_0$  se dvě látky vzájemně nedělí, tj. mají stejné kapacitní poměry a při  $\varphi > \varphi_0$  je pořadí jejich eluce opačné než při  $\varphi < \varphi_0$ .

Zatímco rozpouštědlo s nižší eluční silou (nasyčený uhlovodík v systémech s normálními fázemi a voda v systémech s obrácenými fázemi) působí jako zředovadlo, rozpouštědlo s vyšší eluční silou může svým charakterem retenci významně ovlivňovat v důsledku selektivních interakcí s dělenými látkami a se stacionární fází. Selektivní interakce určitého rozpouštědla lze charakterizovat podílem příspěvků proton-akceptorových interakcí ( $x_e$ ), proton-donorových interakcí ( $x_d$ ) a dipól-dipólových interakcí ( $x_n$ ) na celkové polaritě rozpouštědla, přičemž platí:

$$x_e + x_d + x_n = 1 \quad (7.22)$$

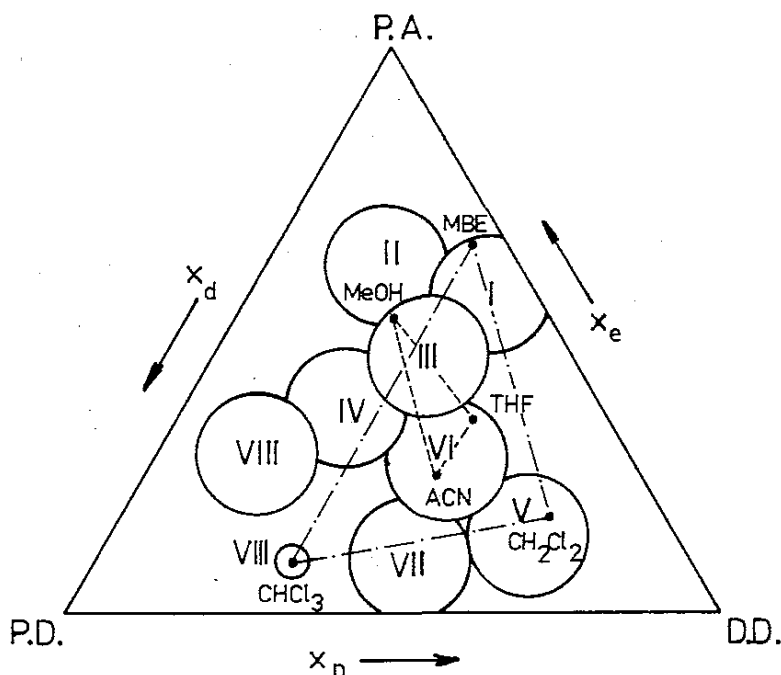
Celkovou polaritu různých rozpouštědel vyjadřuje tzv. parametr polaritě ( $P'$ ), pomocí něhož lze zjistit skutečnou velikost příslušných selektivních interakcí v daném rozpouštědle jako součin  $x_e P'$ ,  $x_d P'$  nebo  $x_n P'$ . Charakterizace polaritě rozpouštědla pomocí parametru polaritě  $P'$  se uplatňuje při chromatografii na chemicky vázaných fázích, popř. i v systému kapalina–kapalina, kdežto při chromatografii na polárních adsorbentech se k tomuto účelu používá tzv. parametru síly rozpouštědla ( $\varepsilon^\circ$ ), jehož hodnoty závisejí na použitém adsorbentu. Hodnoty parametrů  $P'$ ,  $x_e$ ,  $x_d$ ,  $x_n$  a  $\varepsilon^\circ$  pro různá rozpouštědla jsou uvedeny v tab. 7.10 spolu s některými dalšími užitečnými vlastnostmi.

Schopnost selektivních interakcí různých rozpouštědel lze graficky znázornit pomocí Snyderova trojúhelníkového diagramu (obr. 118), kde každý vrchol trojúhelníku odpovídá jedné čisté selektivní interakci a strana trojúhelníku přechodu z jednoho typu interakce na druhý. Každému rozpouštědlu tedy přísluší v trojúhelníku určitý bod o souřadnicích  $x_e$ ,  $x_d$  a  $x_n$ , a to podle převládajícího typu selektivní interakce. Rozpouštědla podobného typu vykazují obdobné selektivní interakce, určené funkčními skupinami v molekule rozpouštědla. Běžně používaná rozpouštědla zaujmají v trojúhelníkovém diagramu na obr. 118 různé oblasti znázorněné kroužky. Podle těchto oblastí lze rozpouštědla rozdělit do osmi různých skupin selektivity. Toto rozřídění a souvislost se strukturou jsou zřejmé z tab. 7.11.

Při práci se směsí rozpouštědel lze pohodlně vypočítat i polaritu této směsi pomocí pravidla o aditivitě parametrů polaritě rozpouštědel:

$$P'_{\text{směsi}} = P'_a(1 - \varphi) + P'_b \quad (7.23)$$

kde  $P'_a$  a  $P'_b$  jsou parametry polaritity pro čistá rozpouštědla a a b,  $\varphi$  – objemový zlomek rozpouštědla b ve směsi. U alifatických nasycených uhlovodíků jsou hodnoty  $P'$  velmi nízké (polární interakce se neuplatňují). Ve směsi polárnějšího rozpouštědla s nasyceným uhlovodíkem se s klesajícím obsahem polárního rozpouštědla pouze



Obr. 118. Snyderův trojúhelníkový diagram selektivity

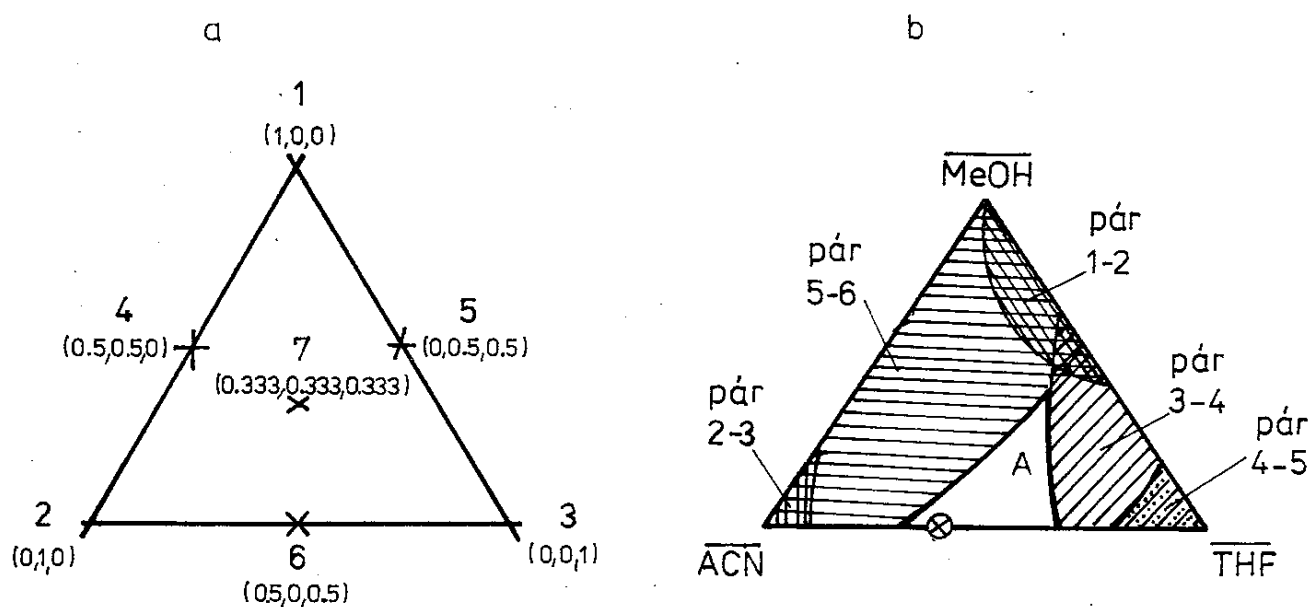
I až VIII – oblasti selektivity různých rozpouštědel (tab. 7.11). Vrcholy trojúhelníku odpovídají čistě proton-donorovým (P.D.), proton-akceptorovým (P.A.) a dipól-dipólovým (D.D.) interakcím, šipkami je znázorněn směr růstu uplatnění příspěvků jednotlivých interakcí  $x_e$ ,  $x_d$ ,  $x_n$  podél stran trojúhelníku. Čárkovaný trojúhelník znázorňuje prakticky používané oblasti selektivity při chromatografii v systémech s obrácenými fázemi, využívající selektivních interakcí methanolu (MeOH), acetonitrilu (ACN) a tetrahydrofuranu (THF), čerchovaný trojúhelník platí pro chromatografii na polárních adsorbentech s využitím selektivních interakcí chloroformu, dichlormethanu a methyl-terc.butyletheru (MBE).

snižuje polarita  $P'$  (a příspěvky  $P'x_e$ ,  $P'x_d$  nebo  $P'x_n$ ), přičemž se relativní příspěvky jednotlivých typů interakcí nemění a selektivita takové rozpouštědlové směsi je v podstatě stejná jako u čistého polárního rozpouštědla. Změnou koncentrace polárního rozpouštědla v takovéto směsi lze nastavit požadovanou polaritu mobilní fáze (a tím i hodnoty kapacitních poměrů) při přibližně konstantní selektivitě v podstatě bez ohledu na druh použitého alifatického uhlovodíku.

Mobilní fáze používané v systémech s obrácenými fázemi jsou tvořeny vodnými roztoky polárních organických rozpouštědel. Při ovlivňování selektivity v těchto systémech se (i když ne zcela správně) voda považuje za zředňovací a uvažují se pouze selektivní interakce dělených látek s organickými rozpouštědly.

Při ovlivňování selektivity dělení volbou typu polárního rozpouštědla vycházíme ze struktury dělených látek a odhadujeme, který typ selektivních interakcí s rozpouštědly bude u jednotlivých látek převažovat, resp. kterým typem interakcí se chromatografované látky budou od sebe nejvíce lišit. Podle souřadnic v diagramu na obr. 118 nebo podle vypočtených součinů  $P'x_e$ ,  $P'x_d$  a  $P'x_n$  z tab. 7.10 zjistíme, která

rozpouštědla nejlépe vyhovují tomuto typu interakcí. Čím silnější bude celková interakce určitého rozpouštědla v mobilní fázi s danou látkou, tím více bude eluce této látky urychlena ve srovnání s dalšími složkami dělené směsi, tím více se tedy sníží eluční poměr této látky vůči ostatním látkám. K optimalizaci lze využít i grafického znázornění pomocí Snyderova trojúhelníku, na němž je založena optimalizační metoda využívající mapování oblasti překryvu rozlišení (metoda ORM – overlapping resolution mapping). Při této metodě se vyberou tři různá rozpouštědla, která jsou od sebe v trojúhelníkovém diagramu selektivity dostatečně vzdálená a představují tak tři různé typy selektivních interakcí. Pro chromatografii na polárních adsorbentech byly navrženy acetonitril (popř. chloroform), methyl-terc.butyl-ether (nebo diethylether) a dichlormethan jako selektivní rozpouštědla a hexan nebo heptan jako zředňovadlo; pro systémy s obrácenými fázemi se jako organických rozpouštědel s rozdílnými selektivními interakcemi používá methanol, acetonitrilu a tetrahydrofuranu a vody jako zředňovadla. Jak je znázorněno na obr. 118, odpovídají polohy tří rozpouštědel s různými selektivními interakcemi vrcholům nového trojúhelníku (vyznačeného na obrázku čárkovaně). Při dalším postupu se použije tohoto nového trojúhelníku k optimalizaci selektivity čtyřsložkových mobilních fází. Místo čistých rozpouštědel se použijí takové směsi těchto rozpouštědel se složkou o velmi nízké eluční síle, které mají přibližně stejnou eluční sílu vůči látkám z dělené směsi (zjistí se většinou v předběžném pokusu s gradientovou elucí), a při optimalizaci se mění pouze vzájemný poměr tří zředěných rozpouštědel s různými selektivními interakcemi (např. při chromatografii v systému s obrácenými fázemi tři směsných rozpouštědel methanol–voda, acetonitril–voda a tetrahydrofuran–voda).



Obr. 119. Ukázka použití metody „ORM“ pro optimalizaci složení čtyřsložkové mobilní fáze methanol (MeOH)–acetonitril (ACN)–tetrahydrofuran (THF)–voda při separaci substituovaných naftalenů v systému s obrácenými fázemi

a – složení mobilních fází při sedmi předběžných experimentech pro získání retenčních dat potřebných k výpočtům rozlišení je označeno křížky; b – oblasti překryvu rozlišení jednotlivých párů separovaných látek pro  $R_s \leq 1,5$  jsou vyšrafovány; A – volná oblast s přijatelným rozlišením všech dvojic látek

Změřením kapacitních poměrů všech dělených látek při sedmi různých poměrech tří rozpouštědel, jak je naznačeno v trojúhelníku selektivity na obr. 119a, získáme experimentální data, jimiž se proloží kvadratické křivky závislosti rozlišení na složení mobilní fáze a zkonstruuje se pro všechny páry separovaných látek diagram oblastí, kde je rozlišení menší než požadovaná hodnota rozlišení (šrafované oblasti na obr. 119b). Tyto oblasti se vzájemně překrývají a volná oblast vymezuje oblast složení čtyřsložkové mobilní fáze poskytující požadované nebo větší rozlišení pro všechny látky v separované směsi, jak ukazuje příklad na obr. 119b. Pro práci zvolíme složení mobilní fáze v blízkosti středu volné oblasti; v uvedeném příkladu lze zvolit místo čtyřsložkové i třísložkovou mobilní fázi acetonitril–tetrahydrofuran–voda, označenou na obrázku křížkem.

Na podobném principu je založena metoda PRISMA, v níž se místo trojúhelníkového diagramu používá prostorového diagramu ve tvaru trojbokého hranolu. V tomto případě se uvažují čistá rozpouštědla se selektivními interakcemi a současně s jejich poměrem optimalizujeme i obsah zředovačla s velmi nízkou eluční silou. K volbě optimálního složení mobilní fáze lze použít i postupné optimalizace, např. simplexové metody.

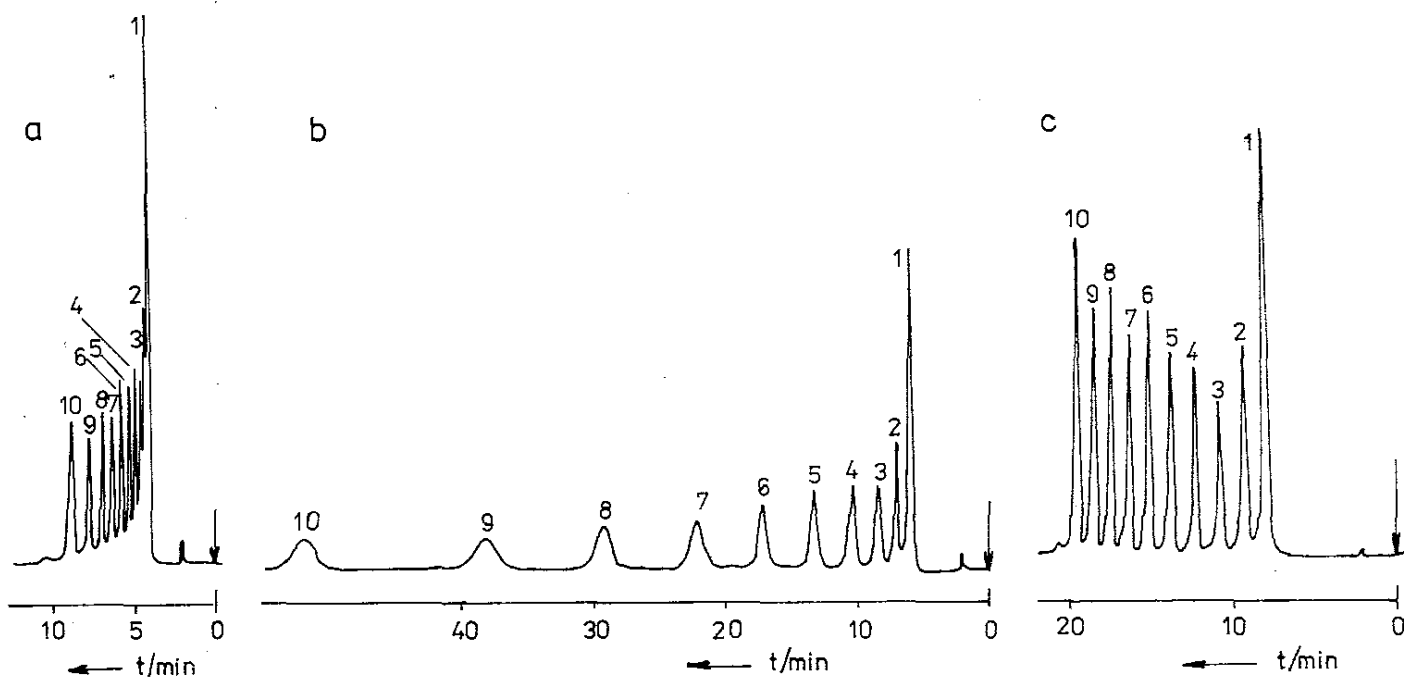
Vzhledem k důležitosti a časové náročnosti správné volby složení mobilní fáze jsou některé moderní kapalinové chromatografy řízené počítačem vybaveny možností automatické optimalizace složení mobilní fáze některou z výše popsaných nebo podobných metod, kdy je počítačem řízeno nastavení podmínek pro předběžné experimenty, vyhodnocení výsledků a na jejich základě i nastavení optimálních pracovních parametrů. U takovýchto přístrojů jde o umělou inteligenci a komerčně jsou dostupné takovéto systémy např. od firem Perkin-Elmer (systém PESOS), Spectra-Physics (systém OPTIM I/II), LDC a Bruker.

#### 7.4.5.3 Programovaná změna pracovních podmínek a optimalizace časového programu

Dosud jsme předpokládali, že pracovní podmínky při chromatografickém dělení (teplota, průtok, složení eluentu) jsou v průběhu eluce konstantní. Při konstantních podmínkách lze dosáhnout dobrého rozdělení pouze u směsí, jejichž složky se příliš neliší velikostí retence. Při větších rozdílech v retenci pro různé složky vzorku vznikají potíže. Jde o tzv. obecný problém eluce. Zvolíme-li podmínky tak, abychom eluovali všechny složky vzorku při  $k < 10$ , nejméně zadržované látky se často jen velmi málo vzájemně dělí i při dobré selektivitě a účinnosti systému (příliš malý příspěvek kapacitního členu  $k$  rozlišení). Za podmínek, které poskytnou uspokojivé rozdělení nejméně zadržovaných látek, se naopak silně zadržované látky ( $k \gg 10$ ) eluují až velmi pozdě a vytvářejí na chromatogramu široké nízké píky. Trvání analýzy se velmi prodlužuje a v důsledku rozšíření elučních zón může být mnohdy koncentrace látek v eluátu snížena až pod mez detekce, takže látku potom na chromatogramu vůbec nezaznamenejeme. Tuto situaci ilustruje příklad separace

homologické řady derivátů primárních alifatických aminů na obr. 120a (mobilní fáze s vysokou eluční silou) a obr. 120b (mobilní fáze s nízkou eluční silou).

Obecný problém eluce se projevuje tím výrazněji, čím složitější směsí je třeba dělit. Aby bylo možno všechny složky takovéto směsi eluovat při dobrém rozdělení a v přijatelném čase, je třeba měnit kapacitní poměry látek s časem, abychom je po větší



Obr. 120. Separace 1,2-naftoylenbenzimidazolsulfonamidů homologické řady alkylaminů  $C_1$  až  $C_{10}$  chromatografií v systému s obrácenými fázemi na koloně plněné náplní LiChrosorb RP C18 fluorimetrická detekce, průtok mobilní fáze  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , mobilní fáze: a – methanol–voda (95 : 5), b – methanol–voda (80 : 20), c – gradientová eluce, lineární gradient od 75 % do 100 % methanolu během 20 minut

část doby migrace kolonou udrželi v přijatelném rozmezí (0,5 až 5). Tohoto cíle lze dosáhnout pouze programovanou změnou pracovních podmínek v průběhu eluce. Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii můžeme časově programovat tyto pracovní podmínky:

1. průtok eluentu,
2. teplotu,
3. kvalitu, popř. aktivitu stacionární fáze,
4. složení eluentu (obr. 120c).

Eluce silněji zadržovaných látek se tedy urychlí zvětšováním průtoku anebo koncentrace účinné eluční složky v eluentu, zvýšením teploty a snížením sorpčních schopností stacionární fáze během eluce. Žádná z těchto změn nevede k rozlišení vyššímu než největší dosažitelné rozlišení za konstantních podmínek eluce, ale jen k urychlení eluce silně zadržovaných látek. Vedle urychlení analýzy se programováním podmínek také potlačí rozmývání elučních zón a zlepší se citlivost analýzy pro silně zadržované látky. Účinnost jednotlivých technik programování roste ve výše uvedeném pořadí od 1 do 4, ve stejném směru se však zvyšuje také instrumentální náročnost příslušné techniky.



## Eluce s programovaným průtokem mobilní fáze

Eluční časy látek jsou při konstantních ostatních podmínkách dělení lineárně závislé na průtoku eluentu. Zkrácení analýzy je tedy přímo úměrné zvýšení průtoku mobilní fáze, přičemž ovšem roste přímo úměrně průtoku eluentu i pracovní tlak. Kontinuálního zvýšení průtoku eluentu v průběhu eluce lze dosáhnout pomocí řídicích jednotek, které u pulsních čerpadel s malým objemem komory kontinuálně mění buď zdvih pístu a objem kapaliny dávkované při jednom pulsu, anebo častěji frekvenci pulsů pístu; u čerpadel pracujících na principu vysokotlaké velkoobjemové injekční stříkačky se mění rychlost pohybu pístu. Lze použít lineární nebo exponenciální programy. Při programování průtoku je důležité, aby strmost křivky  $H-u$  byla co nejmenší, jinak by se zvyšováním průtoku příliš zmenšovala účinnost dělení. Uvedenou techniku lze použít jak při chromatografii v systému kapalina–tuhá fáze a chromatografii na měničích iontů, tak i v systému kapalina–kapalina, kde však při velkých průtocích musíme počítat s mechanickou erozí (vymýváním stacionární kapaliny eluentem).

## Eluce s programovanou teplotou

Zvýšení teploty se většinou projeví zmenšenou sorpcí (zmenšením kapacitních poměrů) chromatografovaných látek a urychlením jejich eluce. Současně se v důsledku zmenšení viskozity eluentu (asi o 50 % při zvýšení teploty o 50 °C) zlepšuje účinnost dělení. K programovanému řízení teploty slouží programované termostaty, přičemž je třeba temperovat jak kolonu, tak eluent před vstupem na ni (postačuje temperace v kapiláře dlouhé asi 1 m o vnitřním průměru 0,5 až 1 mm).

Programování teploty nemůžeme použít při chromatografii v systému kapalina–kapalina, protože se zvýšením teploty vzrůstá vzájemná rozpustnost stacionární a mobilní fáze, což vede k vymývání stacionární fáze z kolony. Tato technika se příliš nehodí ani pro chromatografii na polárních adsorbentech (změna teploty vede ke změně aktivity adsorbentu v průběhu eluce), lze ji však dobře použít při chromatografii na chemicky vázaných fázích nebo na měničích iontů.

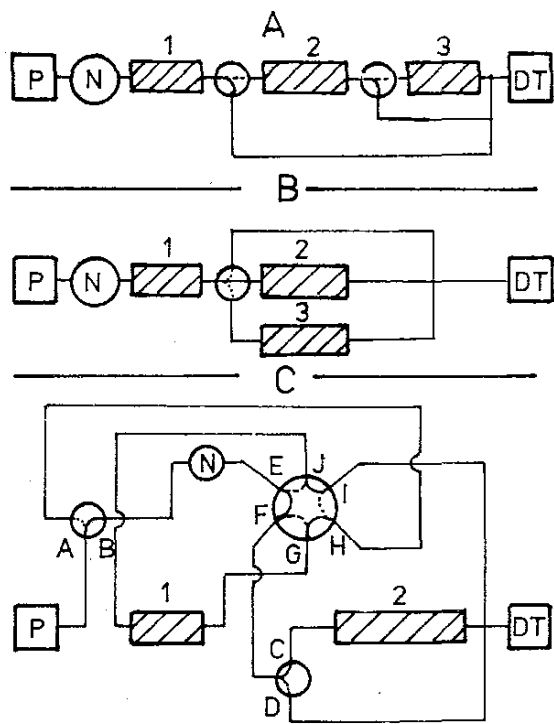
I když lze při programování průtoku mobilní fáze a teploty dosáhnout změny retenčních objemů chromatografovaných látek o 1 až 2 řády, tyto techniky se ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii používají jen zřídka.

## Přepojování spřažených kolon, programování stacionární fáze

Při této technice se používá několika kolon spojených vedle sebe nebo za sebou prostřednictvím několikacestných přepínacích ventilů, takže je možné dělit určité skupiny látek na různých kolonách nebo na různých kombinacích kolon. Kolony mohou být plněny stejnými nebo různými náplněmi. Při vhodném přepínání ventilů je možné separaci programovat tak, aby došlo při dobrém rozlišení složek vzorku k urychlení analýzy ve srovnání se separací na jediné koloně. Příklady uspořádání při této technice ukazují obr. 121.

V uspořádání A jsou tři kolony spojeny v sérii. Na začátku separačního procesu

protéká mobilní fáze všemi kolonami, až jsou složky vzorku rozděleny mezi jednotlivé kolony, ale ještě nejsou eluovány. V koloně 1 jsou nejsilněji zadržované složky, v koloně 2 středně zadržované a v koloně 3 nejslaběji zadržované. V dalším kroku přepneme vývod z první kolony přímo na detektor a eluujeme nejvíce zadržované látky, poté opět přepneme ventily, takže mobilní fáze protéká kolonami 1 a 2 a separujeme středně zadržované látky. Po opětovném přepnutí pracujeme se třemi kolonami v sérii a separujeme nejslaběji zadržované látky v koloně 3.



Obr. 121. Příklady experimentálního uspořádání při programování stacionární fáze přepojováním sprážených kolon  
 1, 2, 3 – chromatografické kolony, P – čerpadlo mobilní fáze, N – zařízení pro dávkování vzorku, DT – detektor, A – sériové zapojení kolon 1, 2, 3, B – paralelní zapojení kolon 2 a 3, C – spojení dvou kolon umožňující převrácení toku mobilní fáze v koloně 1, A až J – vstupy a výstupy přepínacích ventilů

Uspořádání B umožňuje separovat silně zadržované látky pouze na koloně 1 a méně zadržované látky zčásti na koloně 2 a zčásti na koloně 3 (při průtoku mobilní fáze buď kolonami 1 a 2, nebo 1 a 3).

Dvoukolonové uspořádání C s využitím jednoho šesticestného a dvou trojcestných ventilů dovoluje:

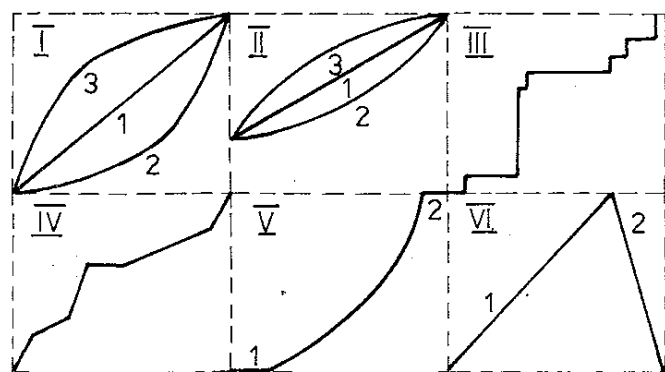
1. ve spojení B-E-J-G-F-C separovat látky na kolonách 1 a 2 v sérii,
2. ve spojení B-E-J-G-F-D separovat látky pouze na koloně 1 a ve spojení B-E-F-C pouze na koloně 2,
3. ve spojení A-H-G-J-I obrátit tok mobilní fáze kolonou 1 a vymýt velmi silně sorbované látky z horní části přímo do detektoru.

V tomto uspořádání (tj. C) je možné složky vzorku rozdělit do dvou skupin a každou z nich separovat na jedné koloně, popř. jednu skupinu na obou kolonách. Dále je možné ze separované směsi vyjmout určitou frakci látek, která nás zajímá, pro analýzu na koloně 2 a zbytek balastních látek vymýt buď přímo, nebo po převrácení toku mobilní fáze do detektoru, což je velmi užitečné při analýze složitých směsí látek. Této techniky lze využít i k čištění a předběžné úpravě vzorků, např. z biologického materiálu.

Předpokladem úspěšné aplikace přepojování sprážených kolon jsou minimální vnitřní objemy použitých přepínacích ventilů a spojovacího potrubí.

Nejpoužívanější a nejúčinnější technikou programování podmínek při eluci je gradientová eluce, při níž pracujeme s mobilní fází, jejíž složení se s časem mění, takže v průběhu eluce se zvyšuje eluční síla mobilní fáze. Většinou se používá eluce s dvousložkovými (binárními) gradienty, přičemž jedna složka mobilní fáze má výrazně vyšší eluční sílu než složka druhá. Časovou změnu koncentrace účinné eluční složky v mobilní fázi označujeme jako *profil gradientu*. Profil gradientu může představovat několik navazujících úseků s konstantním složením mobilní fáze, mezi nimiž se koncentrace účinné eluční složky mění skokem (tzv. stupňovitý gradient), nebo spojitou křivkou (kontinuální gradient), několik spojitých křivek, které na sebe navzájem navazují, či kombinaci skokových změn a úseků spojitých křivek (obr. 122).

Spojitý koncentrační gradient lze charakterizovat pomocí tří na sobě nezávislých parametrů: počáteční koncentrací  $c_0$  účinné eluční složky v mobilní fázi, strmostí gradientu  $b$  (směrnicí udávající průměrnou velikost změny koncentrace účinné eluční složky na jednotku dávkovaného objemu eluentu v průběhu gradientu) a tvarem gradientu. Podle něho lze dělit gradienty na přímkové, konvexní (např. logaritmické) a konkávní (např. exponenciální). V praxi se většinou volí gradienty lineární, někdy též konkávní. Konvexní gradienty většinou nejsou příliš vhodné, protože poskytují větší změnu složení mobilní fáze na začátku gradientu než na jeho konci, zatímco pro dělení většiny směsí potřebujeme strmější změnu koncentrace spíše ke konci gradientu anebo stejnou strmost změny koncentrace v celém průběhu gradientu.



Obr. 122. Různé typy profilů gradientu mobilní fáze

I, II – kontinuální gradient s nulovou a nenulovou počáteční koncentrací:

1 – lineární, 2 – konkávní, 3 – konvexní;

III – stupňovitý gradient; IV – gradient složený z lineárních úseků;

V – konkávní gradient s počátečním zpožděním (1) a prodlevou po ukončení (2); VI – lineární gradient (1)

následovaný obráceným lineárním gradientem (2)

K tvorbě gradientu mobilní fáze se používají zařízení popsaná v odd. 7.4.3.3.

Teorie gradientové eluce umožňuje výpočet elučních objemů a dalších charakteristik této techniky. Z chromatogramů získaných při gradientové eluci nelze přímo vyhodnocovat kapacitní poměry, neboť rovn. (3.9) platí pouze za předpokladu, že distribuční konstanta složky vzorku je v daném chromatografickém systému konstantní, k čemuž je třeba, aby byla udržována konstantní teplota kolony a složení stacionární i mobilní fáze. Při gradientové eluci s měnícím se složením mobilní fáze lze považovat za konstantní kapacitní poměr v určitém místě kolony pouze v průběhu diferenciální změny objemu mobilní fáze proteklé kolonou ( $dV$ ), která působí posun

koncentračního maxima látky kolonou o vzdálenost odpovídající diferenciální části mrtvého objemu kolony  $dV_M$ . Potom lze přepsat rovn. (3.9) do tvaru:

$$dV'_R = d(V_R - V_M) = k dV_M \quad (7.24)$$

a vypočítat retenční objemy při gradientové eluci  $V'_{Rg}$ . Po integraci této základní rovnice v mezích mezi počátečním a konečným redukovaným retenčním objemem a mrtvým objemem dostaneme:

$$\int_0^{V_M} dV_M = \int_0^{V'_{Rg}} \frac{1}{k} dV \quad (7.25)$$

K řešení této rovnice je třeba znát:

- rovnici popisující profil gradientu, tj. závislost koncentrace účinné eluční složky v eluátu ( $\varphi$ ) na objemu mobilní fáze ( $V$ ) proteklém kolonou od začátku eluce,
- závislost kapacitních poměrů ( $k$ ) dělených složek v daném chromatografickém systému na  $\varphi$ .

Kombinací těchto vztahů lze vyjádřit  $k$  jako funkci  $V$  a dosadit do rovn. (7.25).

V dnešní době se nejčastěji používají gradienty rostoucí koncentrace organického rozpouštědla v dvousložkových směsích voda–methanol, voda–acetonitril nebo voda–tetrahydrofuran při chromatografii na alkylsilikagelových kolonách v systémech s obrácenými fázemi. Pro tento případ poskytuje řešení rovn. (7.25) pro lineární gradientovou eluci s počáteční koncentrací organického rozpouštědla  $c_0$  a se strmostí gradientu  $b$  tento vztah:

$$V'_{Rg} = \frac{1}{mb} \log (2,31 mbk'_0 V_M \cdot 10^{-mc_0} + 1) \quad (7.26)$$

kde  $k'_0 = 10^a$  a  $m$  jsou konstanty rovn. (7.13) popisující závislost  $k$  na  $\varphi$  v systémech s obrácenými fázemi. Analogické vztahy lze odvodit i pro chromatografii na polárních adsorbentech, eventuálně i pro práci s tříložkovými (ternárními) gradienty, kde se používá současné změny koncentrace dvou účinných elučních složek v mobilní fázi k lepšímu ovlivňování selektivity separace v průběhu gradientu.

Je třeba zdůraznit, že i separační účinnost je definována pouze pro chromatografické systémy s definovanou konstantní hodnotou distribuční konstanty (tj. kapacitního poměru) a že tedy nelze použít rovn. (3.52) pro výpočet počtu teoretických pater ani rovn. (3.74) pro výpočet rozlišení. Šířka eluční vlny (píku) při práci s konstantní eluční silou mobilní fáze závisí na kapacitním poměru v daném systému:

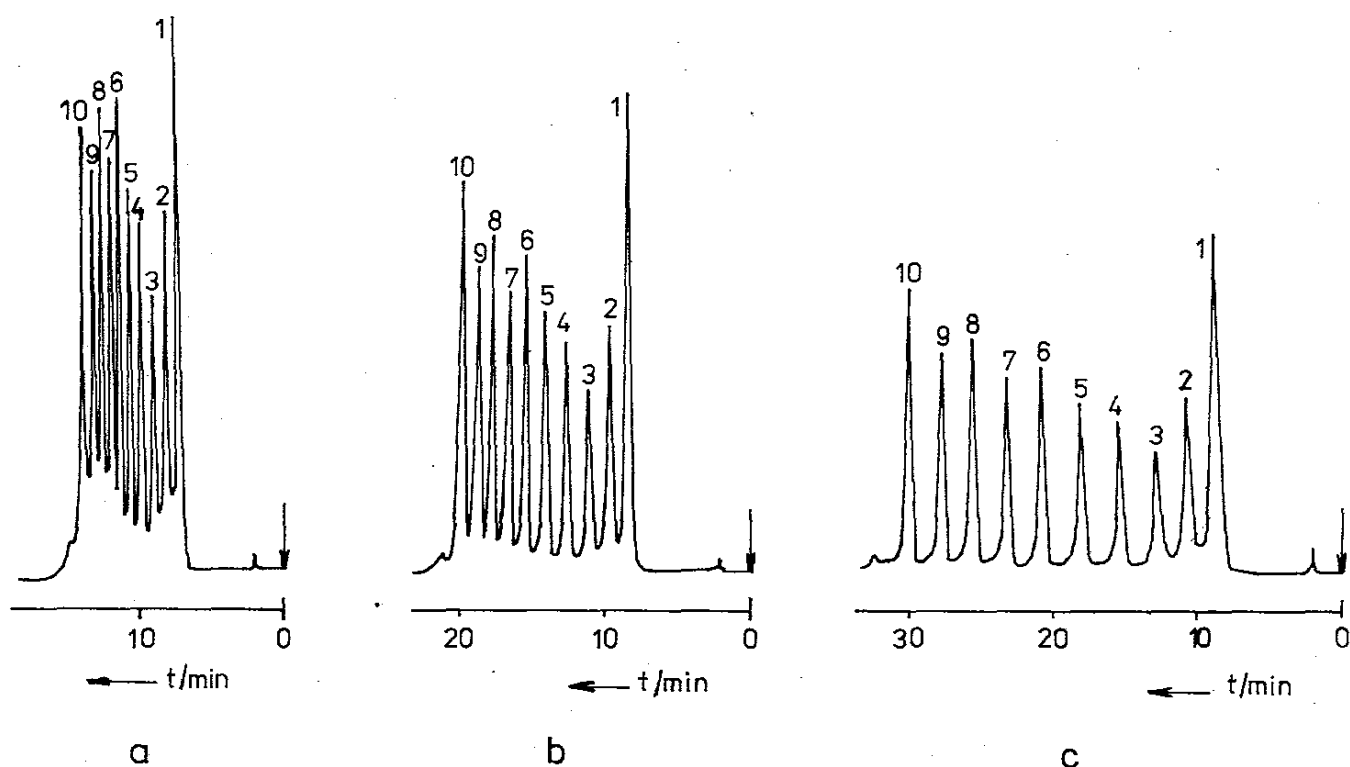
$$Y_V = \frac{4}{\sqrt{n}} V_M (1 + k) \quad (7.27)$$

Při práci s gradientovou elucí, kdy se okamžitý kapacitní poměr látky při průchodu kolonou mění (snižuje) s časem, závisí šířka píku  $Y_{Vg}$  na kapacitním poměru látky v okamžiku eluce ( $k_f$ ):

$$Y_{Vg} = \frac{4}{\sqrt{n}} V_M (1 + k_f) \quad (7.28)$$

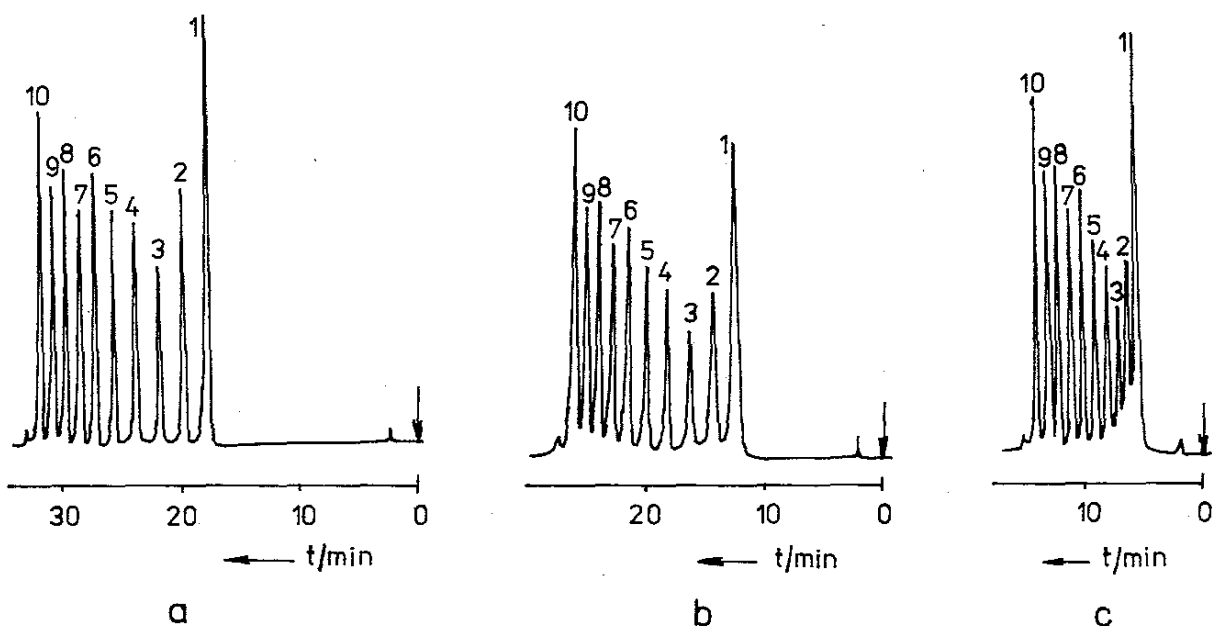
kde  $n$  je počet teoretických pater zjištěný v systému s časově stálým složením mobilní fáze.

Volba vhodného gradientu pro určité dělení je poměrně složitá. Při empirickém postupu optimalizace gradientové eluce lze pro první experiment volit lineární gradient s nulovou počáteční koncentrací účinné eluční složky o celkové době průběhu 20 až 60 min, a to podle složitosti vzorku. Dále lze využít obecných poznatků



Obr. 123. Vliv strmosti gradientu  $b$  na separaci

Látky a pracovní podmínky jako na obr. 120c, lineární gradient od 70 do 100 % methanolu: a – během 10 min, b – během 20 min, c – během 30 min.



Obr. 124. Vliv počáteční koncentrace  $c_0$  při gradientové eluci na separaci

Látky a pracovní podmínky jako na obr. 120c, lineární gradient se stejnou strmostí  $b$  odpovídající přírůstku 10 % methanolu na každých 6 ml mobilní fáze prošlé kolonou, počáteční koncentrace methanolu: a – 50 %, b – 60 %, c – 80 %.

o vlivu parametrů gradientu na separační proces. Vliv počáteční koncentrace účinné eluční složky v mobilní fázi ( $c_0$ ) a strmosti gradientu ( $b$ ) na eluční objemy je do jisté míry analogický vlivu koncentrace účinné eluční složky v mobilní fázi při eluci s časově stálým složením mobilní fáze. Jak ukazují obr. 123 a 124, se vzrůstem těchto parametrů se eluční objemy snižují (eluce se urychlí) a rozlišení se snižuje. Vliv uvedených parametrů na šířky píků eluovaných látek je podstatně menší než vliv složení mobilní fáze při eluci s časově stálým složením mobilní fáze. Je-li rozlišení mezi jednotlivými složkami vzorku příliš nízké nebo příliš vysoké, zvětšíme nebo zmenšíme strmost gradientu; jsou-li první látky eluovány příliš pozdě, lze jejich eluci urychlit zvýšením počáteční koncentrace účinné eluční složky v mobilní fázi. Je-li rozlišení složek vzorku v určitém místě gradientu (většinou na začátku nebo na konci) příliš malé, použijeme nelineární gradient, který má v tomto místě méně strmý průběh než ve zbývající části. Naopak, potřebujeme-li v určité části chromatogramu urychlit eluci složek nadměrně rozdělených, volíme gradient, který je v takovéto části strmější než v jiných částech chromatogramu. K optimalizaci lze použít i některých z metod uvedených v kap. 5. Teoretické (prediktivní) metody jsou založeny na matematických funkčních vztazích mezi rozlišením a parametry gradientu, které lze formulovat po zavedení rovnic analogických vztahům (7.26) a (7.28) do definiční rovnice pro rozlišení [rovn. (3.73)].

Použití gradientové eluce má jistá omezení. Tuto techniku nelze aplikovat v systémech kapalina–kapalina, kde by v průběhu gradientu docházelo k rozpouštění kapalně stacionární fáze v eluentu a k jejímu vymývání z kolony, čímž by docházelo k postupnému snižování sorpční schopnosti kolony. K podobným jevům dochází i při chromatografii na polárních adsorbentech, kde se používá gradientů s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla (propanolu, acetonitrilu, etherů) v poměru k nepolární složce mobilní fáze, kterou je většinou nasycený uhlovodík, jako je hexan nebo heptan. Polární složky mobilní fáze se přednostně sorbují z mobilní fáze, což může vést ke špatné reprodukovatelnosti elučních dat.

S těmito potížemi se nesetkáváme při chromatografii na chemicky vázaných fázích a na měničích iontů. V systémech s obrácenými fázemi se zpravidla používá gradient methanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu nebo kombinace těchto rozpouštědel ve vodě, eventuálně s přísadou tlumivých roztoků či solí při chromatografii polárních látek. V iontové výměnné chromatografii se nejčastěji využívá gradientů iontové síly nebo pH, popř. kombinovaných gradientů iontové síly a pH.

Při gradientové eluci lze použít pouze selektivní detektory, které nejsou citlivé na změnu vlastností eluentu v průběhu separace (ultrafialové detektory, pokud jsou obě složky mobilní fáze dokonale propustné při použité vlnové délce detekce, popř. fluorimetrické detektory), nebo detektory transportní. Diferenciální refraktometry a další univerzální detektory není možno použít. Z tohoto důvodu je třeba, aby používaná rozpouštědla byla dokonale čistá, neboť v opačném případě dochází k velkým změnám nulové linie s časem (k driftu). Opětovné nastavení počátečních podmínek po ukončení gradientové eluce lze nejvýhodněji realizovat rychlým obráceným gradientem.

Při gradientové eluci můžeme dosáhnout největší změny kapacitních poměrů v průběhu eluce ze všech uvedených technik programování podmínek separace, a to až o čtyři či pět řádů.

#### 7.4.5.4 Stopová analýza

Při analýze stopových množství nečistot vyžadujeme co největší citlivost detekce a co nejnižší stanovitelné koncentrace (meze detekce). Tyto hodnoty závisejí na několika faktorech — na citlivosti a šumu vlastního detektoru, na zředění látky v zóně při průchodu kolonou a na úrovni rušivých vlivů daných složkami mobilní fáze či kontaminanty v mobilních fázích nebo v analyzovaném vzorku.

Vyjádříme-li citlivost koncentračního detektoru  $S$  jako faktor odezvy (signálu) na jednotkovou změnu koncentrace látky v eluátu a zkombinujeme-li vztah pro koncentraci látky v maximu gaussovského píku  $c_{mi}$ :

$$c_{mi} = \frac{4n_i}{\pi d_c^2 \varepsilon_T u \sigma_t \sqrt{2\pi}} \quad (7.29)$$

s rovn. (3.3) pro lineární rychlost mobilní fáze  $u$ , rovn. (3.52) pro časovou směrodatnou odchylku píku  $\sigma_t$  a rovn. (3.9) pro vztah mezi elučním časem  $t_R$  a kapacitním poměrem  $k$ , lze odvodit vztah pro výšku píku  $h_i$ :

$$h_i = S c_{mi} = \left(\frac{2}{\pi}\right)^{3,2} S n_i \frac{\sqrt{n}}{L d_c^2 \varepsilon_T (1+k)} \quad (7.30)$$

kde  $n_i$  je látkové množství složky  $i$  vzorku eluované z kolony o délce  $L$ , vnitřním průměru  $d_c$ , celkové pórovitosti  $\varepsilon_T$  a počtu teoretických pater  $n$ . Zlepšení celkové citlivosti detekce je dáno snahou o dosažení co největší výšky píku  $h_i$ , kterou lze především ovlivnit citlivostí použitého detektoru  $S$ .

Detektory používané při vysokoúčinné kapalinové chromatografii jsou méně citlivé než detektory pro chromatografii plynovou a pro stopovou analýzu vyhovují pouze detektory selektivní — ultrafialový, fluorimetrický, elektrochemický, popř. vodivostní. Velmi perspektivní je v tomto ohledu spojení hmotnostní spektrometrie s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, jež je však zatím limitováno vysokou cenou instrumentálního zařízení.

Zvýšení citlivosti a snížení meze detekce se dosáhne zlepšením vlastností detektorů, např. optimalizací použité vlnové délky, prodloužením průtokové cely, potlačení šumu.

Nemáme-li pro určitý typ látek k dispozici citlivou selektivní metodu detekce, nemůžeme se při jejich stopové analýze obejít bez přípravy derivátů vhodných vlastností, např. látek fluoreskujících nebo absorbujících v ultrafialové oblasti. Výšku píku lze při dané citlivosti detektoru zlepšit omezením rozmývání na koloně, tj. zvýšením počtu pater kolony při zachování její délky (použitím náplní s malými rozměry částic), a použitím krátkých kolon, což je jeden ze směrů aplikace tzv. nízkodisperzní chromatografie. Citlivost detekce dále roste úměrně množství

vzorku dávkovanému na kolonu. Objem vzorku lze většinou zvýšit až na 30 % objemu píku vycházejícího z kolony, aniž by došlo k takovému rozšíření píku, které by vedlo k významnému poklesu účinnosti a rozlišení. Toto objemové zatížení kolony tedy klesá s rostoucí účinností kolony a u kolon s asi 5 000 patry představuje asi 5 %  $V_M$ . Významnému rozšiřování elučních zón při větším objemu vzorku lze zabránit tak, že na kolonu dávkujeme látky rozpuštěné v rozpouštědle s velmi nízkou eluční silou, takže se zachytí ve velmi úzké vrstvičce náplně na vrchu kolony i při relativně velkých objemech vzorku a k jejich eluci použijeme v dalším stupni mobilní fáze s vyšší eluční silou. Tímto způsobem dosáhneme na jediné koloně zkoncentrování (obohacení) látek ze vzorku a jejich separace. Této metody lze s výhodou použít k separaci nečistot ve vzorcích vod v systémech s obrácenými fázemi, kdy lze na kolonu dávkovat i několik desítek mililitrů vzorku. Vedle jediné kolony lze použít i sprážené sorpční předkolony s analytickou kolonou, např. v uspořádání podle obr. 121C, a vhodného přepojování toku mobilní fáze při sorpci a při vlastní separaci, kdy lze s výhodou použít i gradientové eluce.

Jak vyplývá ze vztahu (7.30), lze citlivost detekce výrazně zvýšit zmenšením průměru kolony; pokud však zachováme objem vzorku, současně výrazně zvyšujeme zatížení kolony. Nastavujeme-li objem vzorku tak, aby bylo zatížení kolony konstantní, nemá průměr kolony teoreticky vliv na koncentrační citlivost detekce. Použití mikrokolon s malým vnitřním průměrem zvyšuje výrazně hmotnostní citlivost detekce, což má velký význam u takových vzorků, kde máme k dispozici pouze velmi malé objemy.

#### 7.4.5.5 Analýza složitých směsí, úprava vzorků

Při analýze velmi složitých vzorků mnohdy získáme chromatogram s desítkami piků látek i více, jejichž identitu neznáme. Identifikovat tyto látky by bylo možné přímým spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, popř. i s další spektrální technikou. Mnohdy však použití takové náročné a nákladné techniky není třeba, neboť pro účely analýzy zcela postačí informace obsažená v celkovém tvaru chromatogramu jako tzv. otisku prstu. Tohoto způsobu se používá při hodnocení kvality některých složitých technických výrobků (olejů, asphaltů, smol, surfaktantů atp.), kdy se porovnává chromatogram dobré šarže s chromatogramem nově připraveného výrobku. Významné rozdíly mezi chromatogramy indikují i pravděpodobné rozdíly v užitných vlastnostech mezi přípravky.

Podobné techniky se používá v klinické diagnostice při tzv. profilování tělních tekutin (moče, krevního séra), kdy některé nemoci doprovázené poruchami metabolismu se projeví významnými odchylkami v profilu chromatogramu, získaného v systému s obrácenými fázemi nebo při iontové výměnné chromatografii. Analýzu složitých směsí může usnadnit i příprava vhodných derivátů stanovovaných složek.

Pokud jde o předběžnou úpravu vzorků, je jí třeba použít zejména u takových vzorků, které nejsou zcela rozpustné v daném rozpouštědle. V takovémto případě



se uchylujeme k extrakci nejlépe v Soxhletově přístroji, pokud charakter vzorku dovolí použití zvýšených teplot. Velmi složité vzorky, i pokud jsou homogenní a rozpustné ve vhodném rozpouštědle, rovněž často vyžadují předběžné čištění, zejména pokud jde o extrakty z rostlinných nebo živočišných tkání. V tomto případě se používá kombinace následných extrakcí a předčištění na kolonách plněných silikagelem, Florisilem (křemičitanem hořečnatým) nebo oktadecylsilikagelem (podle charakteru vzorku). Osvědčilo se používání minikolonek ve formě malých patron v obalech z plastu (kolonky Sep-Pak firmy Waters), jež lze nasadit přímo na injekční stříkačku se vzorkem, který jednoduše vyčistíme protlačení přes příslušnou minikolonku. Z biologických vzorků je třeba především odstranit proteiny, které by snižovaly životnost kolon. Z téhož důvodu je třeba ze vzorků odfiltrovat i eventuální přítomné tuhé částice.

## 7.4.6 Speciální techniky

### 7.4.6.1 Mikrokolonová kapalinová chromatografie

Jak bylo uvedeno v odd. 7.4.3.5, používá se při mikrokolonové chromatografii jednak plněných mikrokolon s průměrem 0,5 až 2 mm (plněných částicemi s velikostí 3 až 10  $\mu\text{m}$ ), jednak plněných či prázdných kapilárních kolon s průměrem řádově v desítkách  $\mu\text{m}$ . Pro práci s mikrokolonami jsou v dnešní době k dispozici speciálně určené přístroje – mikrokolonové kapalinové chromatografy – nebo lze (s určitým kompromisem) pro práci s mikrokolonami upravit některé z přístrojů určených především k analýzám s běžnými analytickými kolonami. U prázdných kapilárních kolon, které se většinou zhotovují ze skla nebo taveného křemene (podobně jako kapilární kolony v plynové chromatografii, mají však menší průměr), se na vnitřní stěny chemicky vážou vhodné stacionární fáze, jelikož zakotvené stacionární kapalná fáze nejsou dostatečně stabilní. Chromatografie na plněných i prázdných kapilárních kolonách je dosud ve stadiu výzkumu a její praktická užitečnost dosud nebyla plně prokázána, ani nejsou k dispozici komerční kapalinové chromatografy pro práci s kapilárními kolonami.

Základními rysy mikrokolonové kapalinové chromatografie jsou:

1. Používání malých objemových průtoků mobilní fáze. Je zřejmé, že při zachování stejné lineární rychlosti  $u$  je třeba snížit objemový průtok ve srovnání s běžnými analytickými kolonami v poměru zmenšeného průřezu kolony, tj. v poměru čtverců průměru kolony ( $u$  mikrokolony o průměru 0,5 mm 64krát ve srovnání s analytickou kolonou o průměru 4 mm, tj. např. z  $1 \text{ ml min}^{-1}$  na  $16 \mu\text{l min}^{-1}$ ). Z toho vyplývají nároky na změnu konstrukce čerpadel. V mikrokolonové kapalinové chromatografii se dobře uplatňují čerpadla pracující na principu velkoobjemových injekčních stříkaček. Velkou výhodou mikrokolonové kapalinové chromatografie je značná úspora mobilní fáze, takže je možno k separaci použít i netradičních a drahých kapalin jako složek mobilní fáze.

2. Zvýšení hmotnostní citlivosti detekce v důsledku menšího rozmytí elučních zón v koloně. U kolon s menším průměrem se při srovnatelné účinnosti objem píků látek snižuje vzhledem ke kolonám s větším průměrem v poměru čtverců průměrů kolon. To umožňuje pro dosažení stejné citlivosti detekce snížit ve stejném poměru i objem vzorku dávkovaného na kolonu (a tedy i jeho hmotnost), a to při stejné koncentraci analyzovaných látek ve vzorku. Snížení množství vzorku dávkovaného na mikrokolonu je dokonce žádoucí, aby nedošlo k přetížení kolony a k práci mimo oblast lineární izotermy. Úspora množství vzorku potřebného k jedné analýze má značný význam u velmi vzácných vzorků. Koncentrační citlivost zůstává teoreticky stejná u mikrokolony jako u běžné analytické kolony při stejném zatížení obou kolon vzorkem, tj. pokud jsou dávkované objemy vzorku v poměru čtverců průměrů obou kolon. V praxi však často pozorujeme při práci s mikrokolonami i určité zvýšení koncentrační citlivosti detekce.

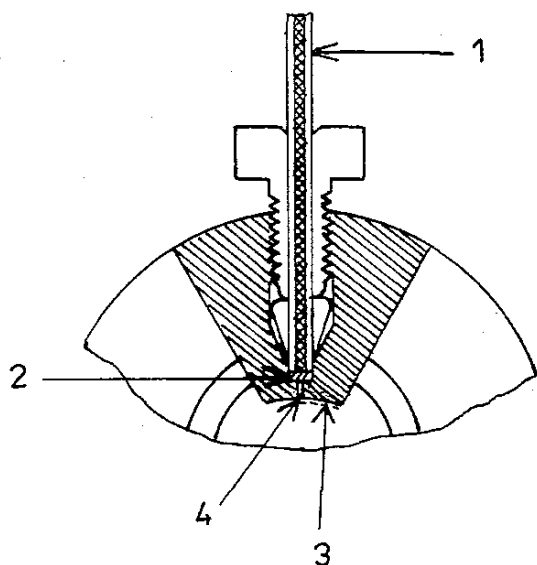
3. Zlepšení možnosti přímého spojení mikrokolonové kapalinové chromatografie s některými spektrálními technikami, především s hmotnostní spektrometrií (LC/MS), vzhledem k menším průtokům mobilní fáze, které vstupují do spektrálního přístroje (viz kap. 8).

4. Značné nároky na konstrukci přístroje, především na miniaturizaci vnitřních objemů cely detektoru, dávkovače vzorků a spojovacích kapilár, aby nedocházelo k významnému rozmytí elučních zón vlivem mimokolonových příspěvků. Podmínkou je, aby směrodatná odchylka rozmytí píku  $\sigma_{V,D}$  způsobená detektorem dosahovala maximálně 10 až 30 % směrodatné odchylky rozmytí píku  $\sigma_{V,K}$  na koloně (obě směrodatné odchylky jsou vyjádřeny v objemových jednotkách). Pro  $\sigma_{V,K}$  získáme z kombinace rov. (3.9) a (3.52) vztah:

$$\sigma_{V,K} = \frac{V_k}{\sqrt{n}} = \frac{V_M}{\sqrt{n}}(1 + k) \quad (7.31)$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že rozmytí eluční zóny na koloně, vyjádřené jako  $\sigma_{V,K}$ , je tím menší, čím je kolona účinnější, čím má kolona menší vnitřní objem (tj. délku, ale zejména vnitřní průměr) a čím méně se látka na koloně zadržuje. Toto rozmytí je tedy obzvláště malé u mikrokolon, které mají malý vnitřní průměr a objem a vysokou účinnost. Na druhé straně je tedy třeba při práci s mikrokolonami používat detektorů s velmi malými vnitřními objemy cel. Pro mikrokolony o průměru 1 mm by měl být menší než 1  $\mu$ l a u kapilárních kolon s vnitřním průměrem pod 0,1 mm by měl být objem cely řádově v nl. Komerčně dostupné spektrofotometrické (UV) a fluorimetrické detektory, označené výrobcí jako detektory pro práci s mikrokolonami, mají většinou cely o objemu 1 až 5  $\mu$ l (minimální objem je 0,5  $\mu$ l), což představuje kompromis mezi rozmýváním píků látek a citlivostí detekce, která u těchto detektorů výrazně klesá se zmenšujícím se objemem cely. Vývoj však v tomto směru není ukončen. Tak např. byl zkonstruován fluorimetrický detektor s laserem jako zdrojem excitačního záření a kapilární křemennou průtokovou celou o objemu ca 10 nl. Mnohem jednodušší je konstrukce miniaturních průtokových cel u elektrochemických detektorů, kde jsou komerčně dostupné přístroje s celami o vnitřním objemu

1 až 10 nl. Podobné nároky jako na detektor jsou kladeny i na dávkovače vzorků, které rovněž přispívají k rozmývání elučních zón. Pro mikrokolony se používají smyčkové dávkovače s vnitřní smyčkou o objemu menším než 1  $\mu\text{l}$ , u kapilárních kolon je třeba dávkovat objemy vzorku menší než 0,1  $\mu\text{l}$ , k čemuž se využívá rozdělovače toku (splitru) mezi dávkovačem vzorků a kolonou. Rovněž je třeba co nejvíce omezit i vnitřní objem spojovacích kapilár, popř. je vůbec odstranit a mikrokolonu připojit přímo k průtokové cele detektoru a do pouzdra dávkovacího ventilu (obr. 125).



Obr. 125. Detail připojení mikrokolony přímo do dávkovacího ventilu

1 – mikrokolona, 2 – fritra na konci mikrokolony, 4 – kapilární spoj mezi mikrokolonou a smyčkou v pouzdře ventilu (světlost 0,1 až 0,2 mm), 3 – vnitřní smyčka přímo v rotoru ventilu

5. Úspora drahých náplní kolon. Proto je snadněji realizovatelné dosažení extrémně vysokých účinností potřebných k separaci velmi složitých směsí. Tak např. spojením 14 jednometrových mikrokolon plněných náplní s průměrem částic 5  $\mu\text{m}$  bylo dosaženo 650 000 teoretických pater. Doba separace na takovýchto kolonách je ovšem velmi dlouhá.

#### 7.4.6.2 Preparativní kapalinová chromatografie

Za preparativní chromatografii můžeme považovat dělení látek v množství 10 mg až několik gramů. K preparativnímu dělení většinou plně postačí (po určitých úpravách) běžné zařízení pro analytickou kapalinovou chromatografii. Bez velkých problémů se mohou používat kolony o průměru 8 až 10 mm při maximálním průtoku mobilní fáze u běžných čerpadel (10 až 15  $\text{ml min}^{-1}$ ). S širšími a delšími kolonami pracují speciální preparativní kapalinové chromatografy, u nichž lze dosahovat podstatně většího průtoku mobilní fáze.

Při plánování podmínek preparativního dělení se vždy musíme snažit o dosažení podstatně většího rozlišení než při analytickém dělení, abychom mohli pracovat při přetížení kolony vzorkem. Zatímco za podmínek rozlišení  $R_{ij} \approx 1,5$  lze na koloně o průměru 2 mm plněné pórovitou náplní analyzovat asi 1 mg látky, na koloně o průměru 8 mm je to asi 20 mg a na koloně o průměru 25 mm asi 100 mg vzorku. Při  $R_{ij} \geq 4$  se může uvedené množství více než desetkrát zvýšit (údaje platí pro kolonu o délce 500 mm a jsou pouze orientační).

Po překročení maximálního zatížení, a tím i lineární kapacity kolony, přechází v ideálním případě gaussovský tvar píku na přibližně obdélníkový. Jelikož se často pracuje v oblasti nelineární izotermy, může dojít k deformaci elučních píků. U asymetrických píků se zvýší jejich vzájemné překrytí, což působí potíže při izolaci čistých látek. V tomto případě se většinou získají čisté pouze krajní (vnější) frakce z obou elučních zón.

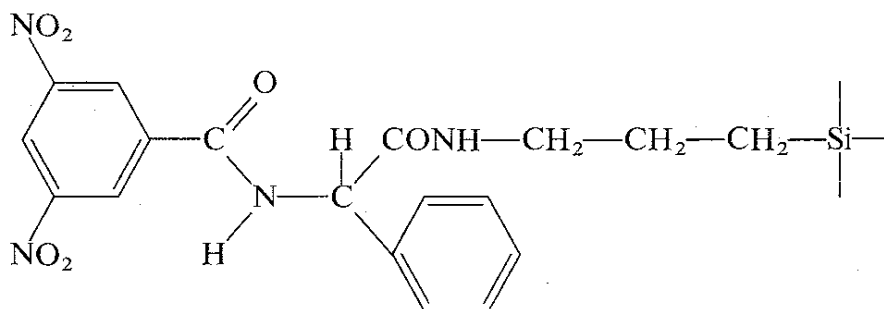
K dávkování poměrně velkých objemů vzorků při preparativní chromatografii se zpravidla používají smyčkové dávkovací ventily. Běžné detektory jsou většinou pro účely preparativní chromatografie příliš citlivé a musí se poněkud upravit, např. použitím průtokové kyvety s kratší optickou dráhou u UV-detektorů, popř. se může pracovat při vlnové délce, při níž mají dělené látky malé molární absorpční koeficienty.

Další způsob preparativní chromatografie umožňují systémy s kolonami o velkém vnitřním průměru (2 až 10 cm), plněné lacinými, poměrně málo účinnými pórovitými náplněmi s částicemi o rozměru 50 až 100  $\mu\text{m}$ . Tyto systémy používají levné zařízení pro dávkování mobilní fáze a umožňují pracovat při průtocích několika desítek mililitrů za minutu. Účinnost dělení je sice horší, ale při dobře zvolené selektivitě umožňují rychlé dělení gramových množství látek. Uvedený typ zařízení je i komerčně dostupný.

#### 7.4.6.3 Chromatografie optických izomerů

Intenzivní výzkum v oblasti přírodních látek, zejména v biochemických aplikacích, vyžaduje dokonalou separaci, identifikaci i stanovení jednotlivých optických izomerů. Na běžných stacionárních fázích je separace těchto látek nedokonalá nebo dokonce selhává. Jeden z možných přístupů, jak chromatograficky analyzovat směsi opticky aktivních izomerních sloučenin, je využití chirálních fází, a to proto, že individuální antipody se liší pouze v chiralitě, nikoli v rozpustnosti, v tlaku par, v ionizačních konstantách apod.

Přítomností opticky aktivní látky ve stacionární nebo mobilní fázi dojde k interakci příslušného optického izomeru obsaženého v chromatografovaném vzorku, a tím i ke zvýšení jeho retence. Určitým problémem zpočátku bylo zafixovat opticky aktivní složku ve stacionární fázi. Jednou z možností je např. modifikovaný silikagel, na nějž se prostřednictvím aminopropylové skupiny naváže opticky aktivní (*R*)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)fenylglycin:



Další z možností je přidavek chirálních sloučenin schopných vazby vodíkovým můstkem do mobilních fází. Pro rozlišení a separaci D- a L-aminokyselin se např. přidává do nevodné mobilní fáze N-acetyl-L-valin. Chirální N-acetyl-L-valin-terc.butylamid je však možno nasorbovat i na silikagel, a vytvořit tak chirální stacionární fázi.

Chirálních fází se nejčastěji využívá v analýze cukrů, aminokyselin, peptidů a celé řady léčiv přírodního i syntetického původu, včetně jejich metabolitů obsažených v tělních tekutinách.

#### 7.4.6.4 Gelová chromatografie

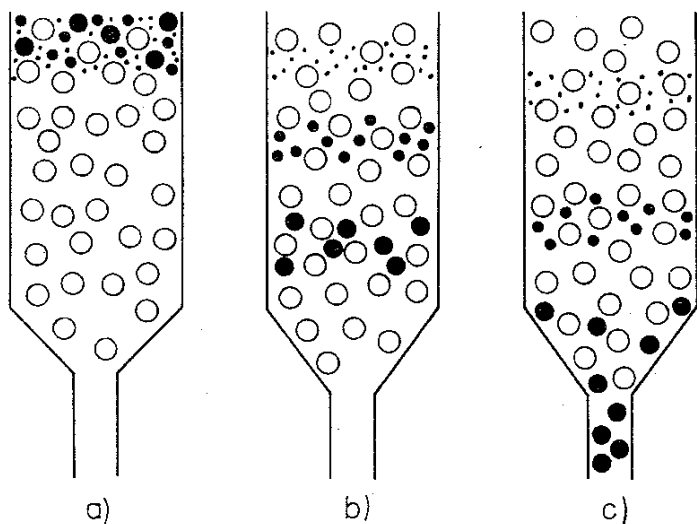
##### Teorie gelové permeační chromatografie (GPC)

Gelová chromatografie je v podstatě speciálním druhem kolonové kapalinové chromatografie a slouží v dnešní době především ke stanovení molekulových hmotností a k analýze směsí oligomerních sloučenin. Na rozdíl od absorpční či rozdělovací chromatografie je separace závislá pouze na velikosti molekul analyzovaných látek a téměř vůbec nezávisí na jejich chemické povaze. Chemické vlastnosti separovaných látek určují pouze systém, v němž bude separace prováděna (volbu hydrofilního či hydrofobního gelu a s tím souvisící volbu elučního činidla).

Pomocí gelové chromatografie je možno separovat jakékoliv molekuly, které se liší svými rozměry, pokud se dobře rozpouštějí v některém rozpouštědle. Velikost molekul nehraje roli, poněvadž moderní gelová chromatografie umožňuje separaci celé řady látek od nízkomolekulárních až po vysokomolekulární, jejichž relativní molekulová hmotnost je v rozmezí  $10^2$  až  $10^7$ .

Největší využití má tato metodika v analýze makromolekulárních látek a v biochemii. Bez zavedení gelové chromatografie do praxe by byl nemyslitelný dnešní vývoj makromolekulární chemie a některých disciplín biochemie.

Pořadí eluce při gelové chromatografii je zcela odlišné od pořadí v kapalinové sorpční chromatografii, a to v tom, že největší molekuly opouštějí sloupec nejdříve a teprve potom odcházejí z kolony molekuly s menší molekulovou hmotností.



Obr. 126. Princip separace látek gelovou chromatografií (vysvětlení v textu)

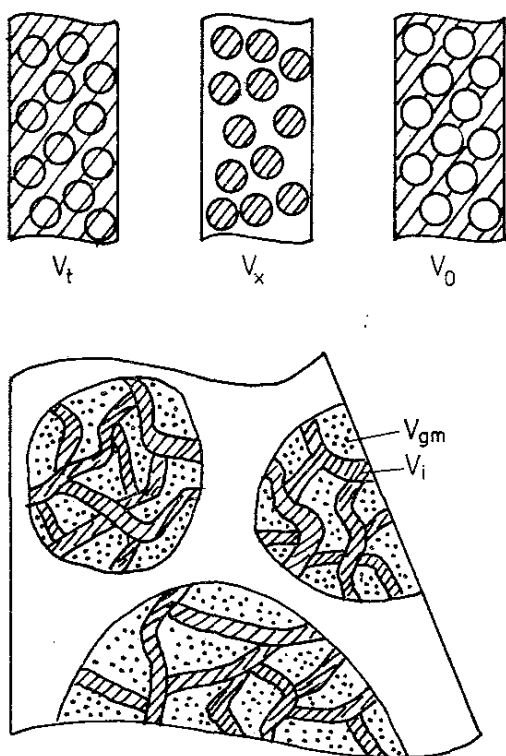
Nejmenší molekuly musí vykonat mnohem delší cestu při průchodu kolonou a mají tudíž nejvyšší hodnoty elučního objemu.

Zjednodušeně lze znázornit tento separační mechanismus ve třech fázích průchodu separovaných složek kolonou (obr. 126).

Dělení tří druhů molekul podle jejich velikosti je nejlépe patrné z obr. 126b, kde jsou již všechny tři typy dobře rozděleny. Nejmenší molekuly mohou difundovat až do vnitřního prostoru gelu, a jsou tudíž nejdéle zadržovány v koloně, zatímco středně velké molekuly se dostanou pouze do větších pórů gelu a nemohou difundovat až do jeho nitra. Molekuly, které mají rozměry větší než jsou rozměry pórů, procházejí kolonou bez zadržení (obr. 126c). Tyto molekuly mají relativní molekulovou hmotnost větší, než je tzv. vylučovací mez  $M_{r,\min}$ .

### Parametry charakterizující gelové lože (kolonu)

V gelové chromatografii se užívají pojmy odlišné od elučních charakteristik uváděných v teorii kapalinové chromatografie v odd. 7.4.2, a to proto, že pojem stacionární fáze je chápán dvojím způsobem. Buď je jím myšlena část volného prostoru uvnitř pórů gelu označovaná  $V_i$ , nebo je myšlen celý objem gelu označovaný  $V_x$ .



Obr. 127. Údaje charakterizující gelové lože (vysvětlení v textu)

Dalšími často uváděnými konstantami jsou eluční objem exkludované látky  $V_0$  a celkový objem označovaný  $V_t$ . V gelové chromatografii uvažujeme tedy volný objem rozpouštědla  $V_0$ , jenž je definován jako objem kapaliny mezi částicemi gelu v koloně, a stacionární objem  $V_i$ , jenž představuje objem rozpouštědla v pórech gelu. Schematické znázornění těchto parametrů je na obr. 127. Odečtením objemu matrice gelu  $V_{gm}$  od celkového objemu gelu  $V_x$  dostaneme hodnotu  $V_i$ :

$$V_i = V_x - V_{gm} \quad (7.32)$$

Vzájemný vztah těchto parametrů je možno popsat těmito rovnicemi:

$$V_t = V_o + V_x \quad (7.33)$$

$$V_x = V_i + V_{gm} \quad (7.34)$$

$$V_t = V_o + V_i + V_{gm} \quad (7.35)$$

přičemž

$$\begin{aligned} V_{gm} &= m_g V_g \\ V_i &= V_x - m_g V_g \end{aligned} \quad (7.36)$$

anebo

$$V_i = m_g S_R \quad (7.37)$$

kde  $V_{gm}$  je objem matrice gelu,  $V_g$  – parciální specifický objem matrice xerogelu,  $m_g$  – hmotnost matrice xerogelu,  $S_R$  – schopnost xerogelu přijímat rozpouštědlo. Pro vodu jako rozpouštědlo se tato konstanta označuje  $W_R$ . Hodnota  $V_t$  se buď vypočte z délky a z průměru sloupce gelu, nebo přesnější je určit ji přímo změřením objemu rozpouštědla v prázdné koloně [přesněji změřením objemu rozpouštědla (vody) v prostoru, který bude zaujímat gelové lože]. Objem  $V_o$  (zvaný též vnější objem) se zjistí experimentálně tak, že se chromatografuje vysokomolekulární látka, která nemůže proniknout do pórů gelu, a určí se její eluční objem. Hodnota  $V_i$  se vypočítává z příslušných rovnic. Hodnota  $S_R$  nebo  $W_R$  je udávána výrobcem.

Distribuční konstanta  $K_D$  není funkcí rozdílu standardních chemických potenciálů látky ve dvou kvalitativně různých fázích, jak je tomu u rozdělovací chromatografie, ale funkcí relace geometrických rozměrů separovaných molekul a pórů daného typu gelu.

Eluční objem  $V_R$  v gelové chromatografii je popsán rovn. (3.35):

$$V_R = V_o + K_D V_i$$

kde konstanta  $K_D$  může nabývat hodnot menších než 1, je nezávislá na délce gelového sloupce a závisí pouze na velikosti a tvaru pórů v gelových částicích.

Vztahy pro distribuční konstantu vycházející z uniformity pórů a respektující skutečnou distribuci pórů jsou uvedeny rovnicemi (3.36) až (3.40).

Pro velké molekuly, které nemohou pronikat do pórů gelu (tj. při exkluzi), je  $K_D = 1$ , a platí tedy:

$$V_R = V_o + V_i \quad (7.38)$$

Z toho je patrné, že eluční objem jakékoliv látky se musí pohybovat v intervalu od  $V_o$  do  $V_o + V_i$  (obr. 128). Je-li  $V_R > V_o + V_i$ , uplatňují se při separaci ještě jiné faktory, především adsorpce.

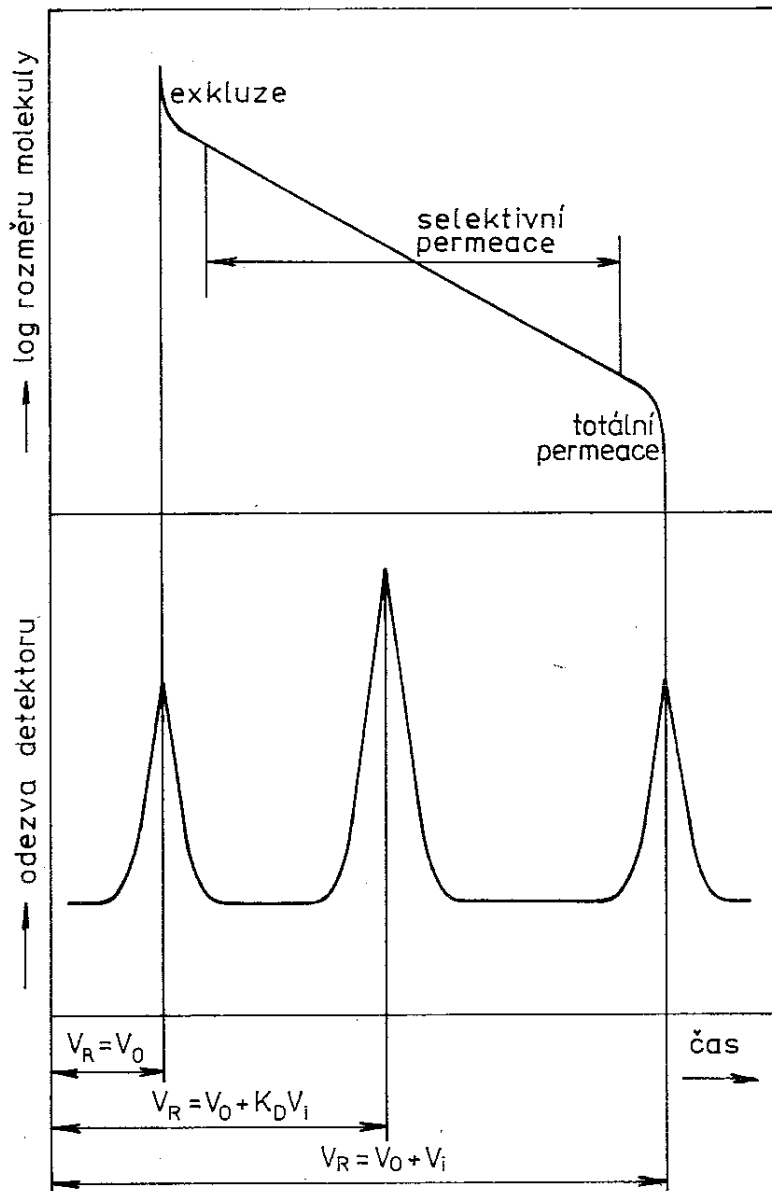
Kromě konstanty  $K_D$  z rovnice, jež vyjadřuje chromatografické chování látky

v gelovém sloupci a jež udává podíl objemu  $V_i$  rozměrově přístupného pro molekuly této látky, je uváděn i vztah, v němž se objevují nové veličiny:

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_i - V_0} \quad (7.39)$$

Použitím  $K_{av}$  dostaneme vztah pro eluční objem:

$$V_R = V_0 + K_{av}(V_i + V_{gm}) \quad (7.40)$$



Obr. 128. Eluce v gelové chromatografii. Závislost elučního objemu na rozměry molekuly, popř. na relativní molekulové hmotnosti

Prostřednictvím distribučních konstant  $K_D$  a  $K_{av}$  lze srovnávat údaje mezi různými publikovanými výsledky. Zásadní rozdíl mezi vyjadřováním  $K_D$  a  $K_{av}$  spočívá v definici stacionární fáze. Předpokládáme-li, že celý objem gelu ( $V_x$ ) je stacionární fází, je distribuční konstanta označována  $K_{av}$ . Je-li jako stacionární fáze myšlena kapalina zaujímající prostor v pórech (objem gelové matrice  $V_{gm}$  se odečte od celkového objemu gelu  $V_x$ ), je distribuční konstanta označována  $K_D$ .

Přestože je princip gelové permeační chromatografie znám již velmi dlouho, neexistuje žádná přijatelná univerzální teorie, jež by umožnila matematický popis separace. Do této úvahy je třeba pojmout jak vlivy hydrodynamické, tak sférické,



difúzní, rovnovážné, adsorpční a event. i další. Ukazuje se, že je možné vyložit vlastní separační mechanismus dvěma způsoby, které uvažují buď *stérickou exkluzi*, nebo *omezenou difúzi*. Dnes je již zřejmé, že za různých podmínek může separaci ovlivňovat kterýkoliv z uvedených mechanismů anebo se mohou uplatňovat oba dva současně.

Mechanismus stérické exkluze je podporován experimentálními výsledky. Základem této teorie je představa o rovnovážném difúzním mechanismu, kdy se předpokládá, že doba, po kterou je rozpustná látka uvnitř pórů gelu, je větší než doba potřebná k difúzi molekul této látky do pórů gelu a zpět. Experimenty ukazují, že při klasické pomalé gelové chromatografii je tento předpoklad splněn. Rovnováha tohoto procesu může být charakterizována distribuční konstantou  $K_D$ .

Již v počátcích gelové chromatografie byly činěny pokusy vyjádřit vztah mezi velikostí molekul analyzované látky a distribuční konstantou. Jak se ukázalo, nezávisí  $K_D$  ani na délce, ani na geometrii kolony, je však ovlivňován vlastnostmi gelu, především velikostí póru a jejich distribucí, tj. rozmístěním na povrchu i uvnitř gelu. Rovnice odvozená Porathem:

$$K_D = A \left[ 1 - B \frac{M_r^{1/2}}{(S_r - \alpha)^{1/3}} \right]^3 \quad (7.41)$$

kde  $S_r$  je objem rozpouštědla v póru,  $\alpha$  – část objemu póru, která není přístupná molekulám dané látky,  $A$  a  $B$  – konstanty, jež se stanoví pro daný typ gelu empiricky,  $M_r$  – relativní molekulová hmotnost, je podpořena experimentálními měřeními, které ukazují, že vynesemím  $K_D$  proti  $M_r^{3/2}$  dostáváme přímku. Tento vztah vede přes kalibraci systému GPC ke stanovení střední hodnoty relativních molekulových hmotností a jejich distribuce. Běžně se však uvádí závislost  $\log M_r$  na  $V_R$ .

Uvedený zjednodušený model, ale i modely složitější jsou založeny na předpokladu ustavení difúzní rovnováhy. Molekuly separovaných látek musí mít dostatek času k rozdělení mezi volný objem gelového sloupce  $V_0$  a objem přístupné části pórů  $K_D V_i$ . Rozšiřování elučních křivek je způsobováno především difúzními pochody vně a uvnitř gelu a souvisí s celkovou účinností kolony.

Určité anomální chování vysokomolekulárních látek, které mají vyšší eluční objemy než  $(V_0 + V_i)$ , je možné vysvětlit tím, že kromě síťového efektu se při separaci uplatňuje i efekt adsorpční. Tyto jevy jsou obecně pozorovány u kolon plněných pórovitými silikagely. Řada experimentálních výsledků získaných při analýzách polymerních sloučenin dokazuje, že stérická exkluze hraje v jejich separaci rozhodující úlohu.

Mechanismus omezené difúze vychází z předpokladu, že nedochází k úplnému ustavení difúzní rovnováhy v jednotlivých částech (patrech) chromatografického sloupce. Hloubka proniknutí molekul separované látky do pórů gelu je závislá na difúzním koeficientu, jenž je úměrný jejich relativní molekulové hmotnosti, a tudíž i hloubce proniknutí molekul analyzované látky do gelu. Doba setrvání makromolekuly ve styku s náplní je srovnatelná s dobou potřebnou k difúzi této látky do pórů gelu a zpět.

Proti teorii omezené difúze se však právem namítá, že v takovém případě by eluční

objemy závisely na lineární rychlosti mobilní fáze. Je pravděpodobné, že omezená difúze bude ovlivňovat mechanismus separace řady látek, zejména objemných biochemicky významných materiálů, avšak nebude mít zcela rozhodující význam.

### Vlastnosti používaných gelů

Pro separaci látek jsou v gelové chromatografii rozhodující charakteristiky pórů použitých gelů, tj. jejich rozměry, tvar, množství a relativní objem. Polarita povrchu gelu se projevuje škodlivými adsorpčními efekty, které komplikují interpretaci naměřených dat, a proto se tento jev snažíme potlačit.

Požadavky na vlastnosti gelů jsou velmi náročné. Matrice gelu musí být vůči chromatografovaným látkám inertní, musí být inertní i vůči mobilní fázi, a to i při použití kyselých i bazických soustav v širším rozsahu pH. Gel musí být odolný i při zvýšené pracovní teplotě, nesmí se během chromatografie rozkládat a uvolňovat produkty rozkladu.

Gely využívané pro chromatografii jsou v zásadě dvojího typu. *Xerogely* jsou tvořeny makromolekulami s póry určité velikosti. V použitém rozpouštědle tyto gely bobtnají na objem, který je mnohonásobně větší než původní. Při změně rozpouštědla může dojít k odbotnání (tj. ke zhroucení původně nabotnalého gelu) a někdy i k znehodnocení gelu. Z komerčně dodávaných xerogelů je možné uvést Sephadex G, Bio-Gel P, Bio-Beads S apod.

*Aerogely* jsou tvořeny maticí s pevnou inertní strukturou, jež obsahuje póry určité velikosti, které jsou v suchém stavu naplněné vzduchem. Aerogely lze použít v kombinaci s jakýmkoli rozpouštědlem, které nebude atakovat jejich skelet. Při naplnění kolony nedochází k objemovým změnám, rozpouštědlo vytěsňuje vzduch z pórů gelu, přičemž vlastní matrice nebobtná. Představitelem tohoto typu gelu jsou různě modifikované silikagely, pórovitá skla apod.

Celá řada dalších často využívaných gelů, jako je např. Styragel nebo československý výrobek Spheron, mají vlastnosti obou základních typů, a to jak xerogelu, tak i aerogelu. Nazýváme je *hybridními gely* nebo též *nehomogenními gely*, neboť tvoří pevnou maticí představovanou hustě zesítěným polymerem s velkým množstvím makro- i mikropórů. Mikropóry jsou schopny solvatace podobně jako u xerogelů, takže dochází i k menšímu nabotnání v solvovaném stavu. Pevná struktura makromolekuly a malé objemové změny při solvataci umožňují práci s těmito gely i při vyšších tlacích. Tyto hybridní gely umožňují i změnu rozpouštědel, aniž by docházelo k poškození makromolekulární matrice.

Dalším kritériem při klasifikaci gelů je jejich afinita k vodě. Z tohoto hlediska rozdělujeme používané gely na *hydrofilní*, jako např. dextranový gel (Sephadex G), různé agarosové gely (Sepharose B, Bio-Gel A), glykolmethakrylátové gely (Spheron), polyakrylamidové gely, které se hodí pro separaci látek rozpustných ve vodě, převážně biochemicky významných, a na *hydrofobní*, které jsou vhodné pro práci v prostředí organických rozpouštědel a používají se k analýzám syntetických makromolekulárních látek. Představitelé tohoto typu náplní jsou styren-divinylbenzenové gely (Styragel, Poragel, Bio-Beads S), zesítěné akrylátové gely a polyvinylacetátové gely.

Existují však i univerzální gely, jež mohou pracovat jak ve vodném prostředí, tak i v prostředí organických rozpouštědel. Jsou to v podstatě pórovité silikagely, označované názvy jako Porasil, Spherosil apod., anebo skleněné pórovité kuličky o definovaných velikostech pórů, dodávané pod názvem Bio-Glass, CPG apod.

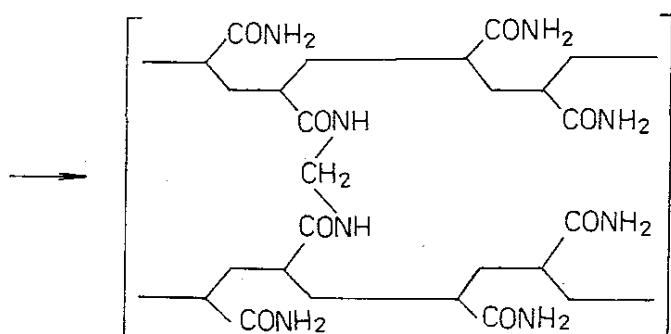
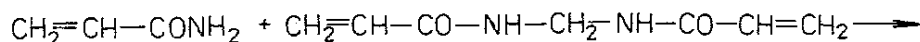
U všech komerčně dodávaných gelů je uváděna tzv. vylučovací mez omezující použitelnost příslušného gelu na základě velikostí jeho pórů. Vylučovací mez limituje nejnížší molekulovou hmotnost molekul, které již nemohou proniknout do pórů gelu.

### Nejčastěji používané gely

*Dextranové gely* označované jako Sephadex jsou vyráběny v širokém sortimentu. Mají velmi širokou distribuci relativních molekulových hmotností ( $M_r = 10^7$  až  $10^8$ ). Jde v podstatě o polysacharidový řetězec s glukosovými zbytky zesítěný epichlorhydrinem. Nerozpustný polymer s příčnými glycerolovými můstky tak získá trojrozměrnou strukturu vykazující dobré hydrofilní vlastnosti. Je schopen přijmout mnohonásobně větší objem vody. Jeho botnavost je závislá na stupni zesílení. Sephadexy označené písmenem G botnají nejen ve vodě, ale i v dalších polárních rozpouštědlech (v dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, formamidu, glykolu apod.). Ve vodných roztocích je Sephadex stálý v rozmezí pH 2,5 až 12. Snese též i koncentrovanější roztoky solí. Výrobek označený LH je hydroxypropylderivát Sephadexu, jehož matrice botná jak v lipofilních, tak v hydrofilních rozpouštědlech. Číselné označení u všech typů Sephadexů označuje po vynásobení číslem 10 hodnotu vylučovací meze  $M_{r, \min}$ .

*Agarosové gely* jsou tvořeny D-galaktosovými a anhydrogalaktosovými zbytky a vytvářejí řetězce s velkým počtem volných hydroxylových skupin. Ty udávají také charakter gelu, v němž je příčné zesílení tvořeno pouze vodíkovými můstky propojenými navzájem. Z toho důvodu jsou agarosové gely méně stálé v kyselých i alkalických roztocích (stálost pH 4 až 9), nesnášejí vyšší koncentraci solí a jsou i tepelně méně stálé (maximální dovolená teplota je 40 °C). Komerčně jsou dodávány pod názvy Sepharose B nebo Bio-Gel A ve vodných suspenzích s malým přídatkem konzervačního činidla, např. azidu sodného.

Gely na bázi syntetické matrice tvoří dnes podstatnou část komerčně využívaných gelů. Z xerogelů to jsou především *polyakrylamidové gely*, vyráběné emulzní kopolymerací akrylamidu s N,N'-metylen-bis(akrylamidem) podle schématu:



Kopolymerační reakci je možno vést tak, že změnou obsahu N,N'-methylen-bis(akrylamidu) dochází k menšímu nebo většímu zesítnění, což má za následek i změnu v porovitosti a ve velikosti pórů.

Označení písmenem P v obchodním označení Bio-Gel značí polyakrylamidový gel a číselné označení udává po vynásobení 1 000 vylučovací mez  $M_{r,\min}$ . Gel je stálý v širokém rozsahu pH (1 až 10). Je často používán i pro separace na tenké vrstvě.

*Hydroxyalkylmethakrylátové gely* patří rovněž k syntetickým gelům. Jsou československým výrobkem a dodávají se pod obchodním označením Separon. Jsou vyráběny suspenzní polymerací hydroxyalkylesterů methakrylové kyseliny s alkylen-bis(methakryláty). Vlastní průběh polymerace je řízený tak, že lze vyrobit tyto gely v širokém sortimentu porovitosti a velikosti vnitřního povrchu. Další jejich výhodou je, že lze do jejich skeletu zabudovat potřebné funkční skupiny ovlivňující jak jejich polaritu, tak i reaktivitu. Modifikované gely Separon jsou proto též využívány jako matrice v afinitní chromatografii a jako měniče iontů (dodává Tessek).

*Polystyrenové gely* jsou styren-divinylbenzenové kopolymery, které patří mezi xerogely. Botnají v organických rozpouštědlech. Jejich zesítnění je příliš velké, takže dochází k vytvoření velmi malých pórů, které limitují vylučovací mez na asi 15 000. Dodávají se pod označením Bio-Gel S nebo Poragel a Styragel. Posledně jmenovaný gel je makropórovitý hybrid typu xerogel–aerogel. Vyznačují se vysokou chemickou i mechanickou odolností.

Pro práci s vodnými roztoky může být zavedena do molekuly tohoto polymeru sulfoskupina, která však má i vedlejší nežádoucí iontově výměnné vlastnosti. Tento gel se dodává pod obchodním názvem Aquapak.

*Anorganické materiály* využívané v gelové chromatografii jsou jednak typu silikagelu, jednak typů pórovitých skel. Hlavní výhoda spočívá v jejich nestlačitelnosti a vysoké mechanické odolnosti. Silikagely speciálně vyvinuté pro kapalinovou a gelovou chromatografii, dodávané pod obchodním označením Fractosil nebo Porasil, mají vylučovací mez velmi vysokou (až  $2 \cdot 10^6$ ). Jsou typickými aerogely a umožňují práci jak ve vodných roztocích, tak i v organických rozpouštědlech. Z pórovitých skel jsou komerčně dodávány aerogely pod názvy Bio-Glass a CPG.

## Volba vhodného typu gelu

Při volbě gelu uvažujeme především systém, v jakém bude separace probíhat. Pro hydrofilní látky volíme vodné či vodně alkoholické soustavy a použijeme hydrofilní gely. Číselné označení gelů, udávající hodnoty vylučovací meze, volíme takové, abychom mohli dosáhnout cíle, pro který gelovou chromatografii využijeme. V zásadě rozeznáváme dva typy separace.

První z nich často nazýváme *skupinovým dělením* nebo *předdělením* a spočívá v tom, že rozdělujeme látky do dvou skupin na principu exkluze či totální permeace. Při exkluzi ( $V_R = V_0$ ; obr. 128) nedochází k průniku molekul látek první skupiny do gelu a látky opustí kolonu bez zpoždění. Druhá skupina látek zůstává v koloně

po určitou dobu nebo se dokonce k jejich eluci musí použít jiný typ rozpouštědla a teprve potom se eluuje jako druhý podíl.

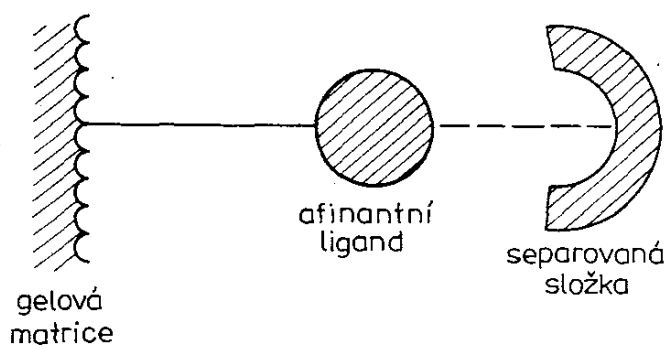
Druhým typem separace je *frakcionace*. Při ní se dělí vícesložkové směsi chemicky si podobných látek na základě jejich různě velké difúze do gelu. Z něho jsou eluovány zpět podle velikosti distribučních konstant. V tomto případě volíme gel, jehož frakcionační rozsah odpovídá průměrné hodnotě relativních molekulových hmotností. Jestliže je látka, kterou chceme izolovat, doprovázena látkami výše- i níže-molekulárními, volíme takový typ gelu, aby tato látka byla uprostřed frakcionačního rozsahu gelu.

Gelová permeační chromatografie dále slouží k charakterizaci polymerních látek, které představují složité směsi oligomerů a polymerů o různých relativních molekulových hmotnostech, kde nelze vzájemně rozdělit chemická individua. Z chromatografického záznamu však získáme celkovou obalovou distribuční křivku, z níž lze vyhodnotit poměrné zastoupení složek polymeru lišících se relativními molekulovými hmotnostmi. Pro volbu gelu platí stejné hledisko jako při jeho použití pro frakcionaci, většinou však nepostačí jedna kolona a je třeba použít řady kolon (6 i více) plněných gely stejného typu, ale s různými vylučovacími mezemi, aby bylo možno postihnout širokou oblast distribuce relativních molekulových hmotností.

Máme-li k dispozici dostatečný počet kolon či kolony s dostatečnou účinností (vyhovujícím počtem teoretických pater), lze použít tzv. recyklační techniky, kde účinnost chromatografické separace zvyšujeme opětovným nástřikem části eluátu na původní kolonu.

#### 7.4.6.5 Afinitní chromatografie

Tento typ chromatografických separací je zaměřen na oblast biochemických analýz, poněvadž umožňuje separaci a izolaci biologicky aktivních látek. Využívá se zde biologických schopností látek specificky a reverzibilně vázat jiné látky. Proto se též někdy tato metoda nazývá jako *bioafinitní* nebo *biospecifická afinitní chromatografie*. Hlavní specificky působící složkou je tzv. biospecifický afinant (afinantní ligand), který se kovalentně váže na pevný nosič. Jde tedy o chemicky vázaný afinant, který při průtoku roztoku kolonou zachytí pouze biologicky aktivní látky, takže ostatní složky volně projdou (obr. 129). Biologicky aktivní sloučeniny budou zadržovány v koloně v poměru svých biospecifických afinit.



Obr. 129. Princip afinitní chromatografie  
nepřerušovaná čára – pevná kovalentní vazba,  
čárkovaně – specifická reverzibilní vazba

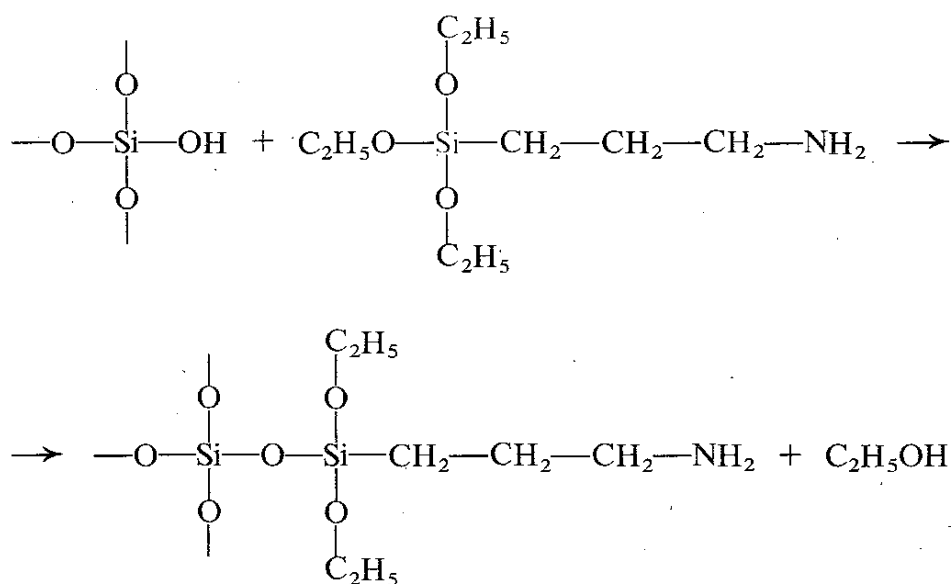
Specificky sorbovaná látka je eluovaná pomocí rozpustného afinantu nebo změnou složení mobilní fáze, např. změnou pH, kdy dojde k disociaci vázaných komponent, a tím i k jejich eluci.

### Volba pevného nosiče a afinantu

Pro přípravu stabilního sorbentu pro afinitní chromatografii je třeba zvolit jak vhodný nosič, tak i požadovaný afinant, a přitom je třeba ještě vyřešit způsob vazby afinantu na nosič. Nosič nesmí interagovat s analyzovanými látkami, aby nedocházelo k nespecifické sorpci, musí však mít dostatečné množství funkčních skupin schopných reakce s afinantem. Struktura nosiče musí být tvořena pórovitou síťovinou, jež umožňuje volný průchod malých i velkých molekul a zaručuje dobré mechanické vlastnosti zrna. Z komerčně dostupných nosičů jsou nejčastěji používány Sepharosa a Bio-Gel. Oba typy představují sférické agarosové gelové částice s volnými hydroxylovými skupinami schopnými chemické reakce potřebné k vazbě afinantu. Další typ nosiče představují syntetické polyakrylamidové a hydroxyalkylmethakrylátové gely, z nich Separon se vyrábí v ČSFR a je v širokém sortimentu na domácím trhu.

Existuje celá řada chemických reakcí vedoucích k pevné vazbě afinantu s nosičem. Často jsou využívány kondenzační reakce, jako je tomu např. u polyakrylamidových gelů, kdy glutaraldehyd přidávaný v nadbytku reaguje jednou ze svých aldehydových skupin s volnou amidoskupinou v gelu a druhá aldehydová skupina reaguje s aminoskupinou afinantu.

Dalším nosičem může být i sklo, na jehož povrch je vázán  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilan:



V další reakci se pomocí vhodných činidel naváže afinant s reaktivní karboxylovou nebo aminovou skupinou.

Jako afinanty se nejčastěji používají různé peptidy, aminokyseliny, enzymy, antigeny a řada různých protilátek. Pro izolaci ribonukleosy se např. zakotví na agarosu jako afinant 5'-(4'-aminofenyl)uridin-2'-fosfát. Pro separaci chymotrypsinu se dodává methylester  $\epsilon$ -aminokaproyl-D-tryptofanu a pro izolaci papainu se váže na agarosu peptid sestávající ze zbytků glycinu, argininu a benzylovaného tyrosinu.

Z enzymů jsou komerčně dodávány celé řady vázaných afinantů, jako např.  $\alpha$ -amylasa, glukosooxidas, peroxidasa, proteasa, ribonukleasa, ureasa a trypsin.

### Sorpce a desorpce látek na koloně

Volba podmínek se řídí specifickými vlastnostmi separovaných látek. Při separaci a izolaci složky s velkou afinitou k sorbentu je třeba téměř vždy eluovat změnou pH tlumivého roztoku, kdežto u látek s malou afinitou k sorbentu se její eluce dosáhne i bez změny pH. V tomto případě však izolujeme látku ve velmi zředěném roztoku. Při izolaci makromolekulárních látek velkých objemů trvá ustavení sorpční rovnováhy delší dobu. Je třeba brát v úvahu kromě srážek mezi molekulami izolované složky s afinantem i vzájemnou orientaci vazebných míst, a proto se průtok mobilní fáze podstatně snižuje ve sloupci sorbentu o rozměrech 0,8 cm  $\times$  5 cm (třeba až na 1 ml min<sup>-1</sup>).

Kromě přímé změny pH je možno eluci urychlit zvýšením teploty anebo změnou iontové síly elujícího tlumivého roztoku.

Afinitní chromatografie má velký význam v oblasti biochemie a biologie. Je nenahraditelným pomocníkem v molekulární biologii a nalezne širší uplatnění v nastupujících biotechnologických procesech i v medicíně a farmakologii.

## 8 Spojení chromatografických a spektrálních metod

Již od samých počátků chromatografie je možno pozorovat snahy o spojení této vynikající separační techniky s některou ze spektrálních metod. Příčinou bylo značné množství informací využitelných k identifikaci složek, které poskytují právě spektrální metody. V prvních fázích vývoje byly rozdělené složky vypreparovány a potom byla změřena jejich spektra, a to absorpční, emisní, fluorescenční nebo jiná. Tato metoda je ve spojení s kapalinovou chromatografií užívána v organické chemii dodnes. Technický rozvoj však směřoval k přímému spojení chromatografického a spektrálního přístroje. První propracovanou a široce používanou byla technika spojující plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem – *technika GC/MS*.

Brzy se však ukázalo, že ohromné množství informací z jediné analýzy složitější směsi nemůže ani kvalifikovaný analytik v přijatelné době zpracovat. Zavedením počítačů pro zpracování analytických dat se otevřely další možnosti k plnému využití všech získaných informací. Současná etapa je charakteristická vznikem přístrojů spojujících nejrůznější chromatografické a spektrální metody. Běžně jsou na trhu přístroje umožňující spojení kapalinové chromatografie s některou z metod molekulové absorpční spektrometrie (UV-VIS, IČ) nebo hmotnostní spektrometrie. Byly vyvinuty speciální detektory pro plynové chromatografy, které umožňují měřit atomová emisní spektra eluujících složek. Lze očekávat, že v blízké budoucnosti bude možné kombinovat chromatografické metody s libovolnou metodou spektrální, i když jistě ne všechny kombinace budou mít takový význam, aby se na trhu objevily odpovídající komerční přístroje.

### 8.1 SPOJENÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (GC/MS)

Hmotnostní spektrometrie je velmi účinná identifikační technika, která se často používá k řešení analytických problémů v organické chemii, biochemii i při analýze anorganických materiálů a povrchů tuhých látek. Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (dále jen GC/MS) přispělo podstatnou měrou k rozvoji hmotnostní spektrometrie a vytvořilo zatím nejefektivnější známou techniku pro analýzu složitých směsí organických látek. Technika GC/MS umožňuje i analýzu organokovových a anorganických směsí s tím omezením, že musí jít o látky, které projdou chromatografickou kolonou.



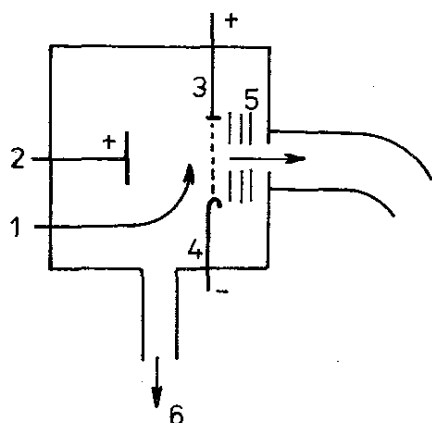
Jak už napovídá název, GC/MS představuje spojení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru, v němž musí být navíc vhodný spojovací článek a u moderních přístrojů i počítač na zpracování dat. Konstrukce plynového chromatografu již byla v této knize popsána, proto zde uvedeme blíže pouze popis hmotnostního spektrometru (uvedené údaje platí i pro techniku LC/MS – odd. 8.6) a popis zařízení pro spojení obou přístrojů – tzv. chromatografický vstup. Dále bude uveden způsob využití počítače v technice GC/MS.

### 8.1.1 Hmotnostní spektrometry

Běžný hmotnostní spektrometr se skládá ze vstupu, iontového zdroje, separátoru, detektoru se zesilovačem a záznamovým zařízením a z vakuového systému.

*Vstup* je místo, kde se zavádí vzorek do hmotnostního spektrometru. Vstup mívá zásobník, kam se vzorek nastříkne. Tvoří jej nádoba o objemu 1 až 2 l. V ní se vzorek vypaří při tlaku několika pascalů a malým otvorem se pak pára pouští do iontového zdroje. Jinou možností je přímý vstup (pro málo těkavé látky), kdy se vzorek zavádí přímo do iontového zdroje. V technice GC/MS přichází do úvahy chromatografický vstup, který bude popsán v odd. 8.1.2.

*Iontový zdroj* je místo, kde z molekul vzorku vznikají nevratným odštěpením valenčních elektronů ionty. V technice GC/MS přicházejí do úvahy tři způsoby ionizace vzorku a z toho vyplývající tři typy iontových zdrojů.



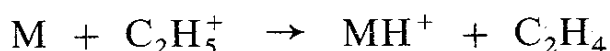
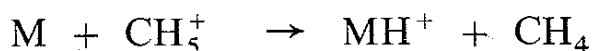
Obr. 130. Iontový zdroj s ionizací nárazem elektronů

- 1 – přívod vzorku, 2 – vytlačovací elektroda,
- 3 – anoda, 4 – žhavená katoda,
- 5 – urychlovací a fokusační elektrody,
- 6 – snížený tlak

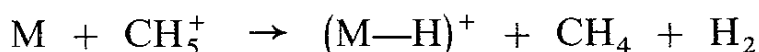
První a nejvýznamnější způsob je ionizace vzorku *nárazem elektronů* (electron impact – EI). Konstrukční uspořádání iontového zdroje využívajícího ionizace nárazem elektronů je na obr. 130. Molekuly vzorku se dostávají do proudu elektronů mezi anodou (3) a žhavenou katodou (4), kde dochází k jejich ionizaci. Vzniklé kladné ionty jsou vytlačovány elektrodou (2) a po urychlení vysokým kladným potenciálem na elektrodách (5) přecházejí do separátoru. Celý proces probíhá za sníženého tlaku asi  $10^{-4}$  až  $10^{-5}$  Pa. Za těchto podmínek nedochází v iontovém zdroji ke srážkám částic a ionty vznikají pouze monomolekulovými rozpady. Přitom vznikají nejen molekulové ionty, ale pokud molekulový ion obsahuje dostatečný přebytek energie, rozpadá se dále na fragmentové ionty a elektroneutrální částice. Stupeň fragmentace

závisí jak na charakteru ionizované látky, přesněji na její ionizační energii, tak i na použité energii ionizujících elektronů. S ohledem na existující katalogy hmotnostních spekter se často používají elektrony o energii 70 eV, i když v některých případech se využívá energie nižší, např. 10 eV. Předností ionizace nárazem elektronů je vysoká citlivost a možnost usuzovat na strukturu látky ze vzniklých fragmentových iontů. Zřetelnou nevýhodou je v řadě případů slabý signál molekulového iontu, což někdy nedovoluje určit relativní molekulovou hmotnost analyzované látky.

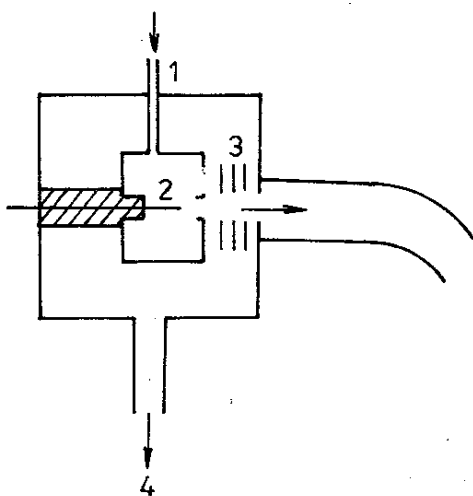
*Chemická ionizace* (CI) je druhý způsob ionizace, který má konstrukční uspořádání iontového zdroje v podstatě shodné se zdrojem pro ionizaci nárazem elektronů (viz obr. 130). Při chemické ionizaci se do iontového zdroje přivádí vedle vzorku ještě pomocný plyn, zpravidla methan nebo isobutan. Tlak tohoto plynu v iontovém zdroji dosahuje 100 Pa, zatímco tlak par vzorku asi  $10^{-4}$  Pa. Za těchto podmínek jsou proudem elektronů ionizovány téměř výlučně molekuly pomocného plynu a např. z methanu vznikají ionty  $\text{CH}_5^+$  a  $\text{C}_2\text{H}_5^+$ . Tyto ionty potom reagují s molekulami vzorku iontově molekulovými reakcemi spojenými s přenosem protonu. Jestliže je molekula vzorku M (alkoholů; aldehydů, esterů atd.) akceptorem protonu, mají reakce tento průběh:



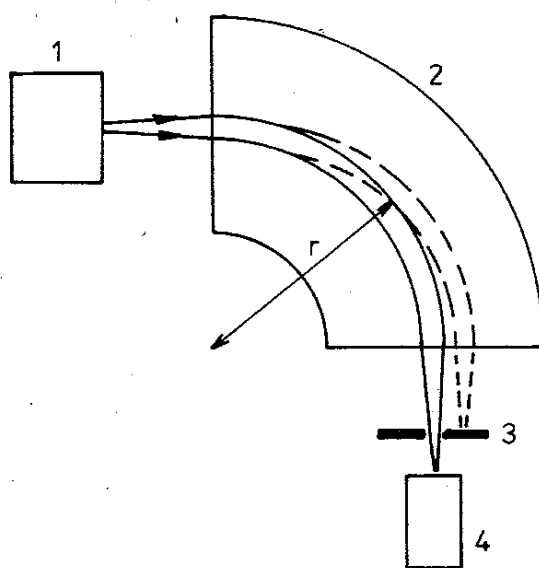
Pokud molekula není dobrým akceptorem protonu, dochází k jinému procesu:



Pokud je chemická ionizace aplikována ve spojení s technikou GC/MS, lze použít jako nosný plyn methan místo helia. Pro chemickou ionizaci je charakteristické, že probíhá při nižší energii a výsledkem je menší fragmentace molekul vzorku než



Obr. 131. Iontový zdroj s ionizací polem  
1 – přívod vzorku, 2 – břit, popř. drátek,  
3 – urychlovací a fokusující elektrody,  
4 – snížený tlak



Obr. 132. Schéma sektorového magnetického separátoru  
1 – iontový zdroj, 2 – magnet, 3 – štěrбина,  
4 – detektor.

při ionizaci nárazem elektronů. Předností chemické ionizace je intenzivní signál kvazimolekulového iontu  $MH^+$  nebo  $(M-H)^+$ , což umožňuje bezpečně stanovit relativní molekulovou hmotnost analyzované látky.

Třetí, relativně nejméně používaný způsob, je ionizace *elektrostatickým polem* (field ionization – FI). Iontový zdroj tohoto typu je na obr. 131. Páry vzorku přicházejí kapilárou (1) do ionizační komůrky, kde je umístěn ostrý břit nebo tenký drátek (2), na který je vložen vysoký kladný potenciál (7 až 10 kV). Molekuly, které se přiblíží k břitu, jsou ionizovány odtržením elektronu, ionty jsou z komůrky rychle vypuzeny a po urychlení na elektrodách vstupují do separátoru. Také v tomto případě je energie, kterou molekula získá, menší než při metodě EI a ve spektru se objeví intenzivní signál molekulového iontu. I v tomto případě probíhá ionizace za značně sníženého tlaku.

Separátory iontů dělí vytvořené ionty podle poměru  $m/ze$ , kde  $m$  je hmotnost iontu a  $ze$  – počet elementárních nábojů  $e$ , které ion nese. Většina iontů nese jeden elementární náboj, proto se běžně říká, že v separátorech jsou ionty děleny podle své hmotnosti. V metodě GC/MS přicházejí do úvahy tři typy separátorů:

- sektorový, dělicí ionty v magnetickém poli,
- kvadrupólový, využívající vysokofrekvenčního pole,
- průletový, měřící dobu letu iontu mezi iontovým zdrojem a detektorem.

a) Sektorový separátor je tvořen elektromagnetem s pólovými nástavci ve tvaru kruhové výseče (obr. 132). Mezi póly magnetu je uložena zakřivená trubice. Kladně nabitě ionty urychlené potenciálem  $\varphi$  vstupují do trubice s kinetickou energií  $ze\varphi$ . Při vstupu do magnetického sektoru na ně kolmo působí homogenní magnetické pole o indukci  $B$ . Na nabitou částici působí dostředivá síla  $\varphi vze$  (kde  $v$  je rychlost částice), která je v rovnováze s odstředivou silou  $mv^2/r$  ( $r$  – poloměr zakřivení dráhy částice). Po eliminaci rychlosti částice dostaneme pro částici nesoucí jednotkový náboj vztah:

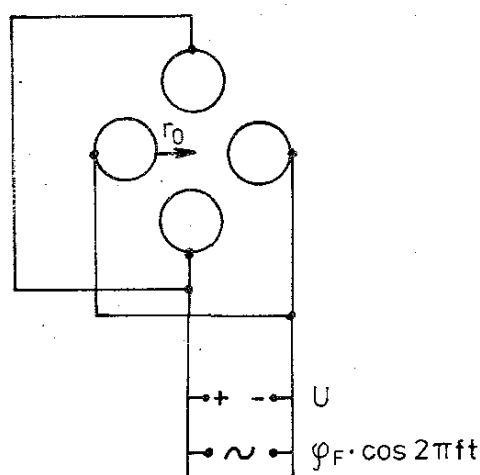
$$\frac{m}{ze} = \frac{B^2 r^2}{2\varphi} \quad (8.1)$$

Z rovnice (8.1) vychází, že určité hmotnosti částice odpovídá určitý poloměr zakřivení dráhy  $r$ , pokud jsou magnetická indukce  $B$  a urychlovací potenciál  $\varphi$  konstantní. Částice, které mají jinou hmotnost, opisují dráhu o poloměru větším nebo menším a jsou zachycovány na štěrbině umístěné před detektorem (viz obr. 132). Plnými čarami jsou naznačeny dráhy iontů o hmotnosti  $m$ , splňující podmínku rovn. (8.1), čárkovaně je naznačena dráha jiného iontu o vyšší hmotnosti. K tomu, aby bylo zaznamenáno hmotnostní spektrum, je třeba postupně splnit podmínku rovn. (8.1) pro všechny přítomné ionty. Je možno buď plynule měnit urychlovací potenciál  $\varphi$ , nebo magnetickou indukci  $B$ . Změna urychlovacího potenciálu je nevýhodná, neboť diskriminuje ionty o vyšší hmotnosti (potenciál pro ně použitý je podstatně nižší), proto se preferuje změna magnetické indukce. Potřebná doba k záznamu hmotnostního spektra bývá 2 až 6 s.

b) Kvadrupólový separátor sestává ze čtyř tyčí kruhového průřezu, které jsou symetricky uspořádány vzhledem k podélné ose. Tyče jsou propojeny tak, že vždy protilehlé dvojice jsou napojeny na společném potenciálu. Ionty se pohybují v elektrickém poli o délce 20 až 30 cm. Pole má dvě složky: statickou a radiofrekvenční (ca 10 MHz). Potenciál jednoho páru tyčí  $\varphi_x$  je dán vztahem:

$$\varphi_x = U + \varphi_F \cos 2\pi f t \quad (8.2)$$

kde  $U$  je stejnosměrné napětí,  $\varphi_F$  – amplituda vysokofrekvenční složky,  $f$  – frekvence a  $t$  – čas. Druhý pár tyčí má potenciál  $\varphi_y = -\varphi_x$ . Schéma zapojení kvadrupólového separátoru je na obr. 133. Ionty vytvořené v iontovém zdroji jsou urychleny malým potenciálem několika desítek voltů a vstupují do osy kvadrupólu, kde oscilují



Obr. 133. Schéma zapojení kvadrupólového separátoru

mezi elektrodami opačné polarity. Při určité hodnotě radiofrekvence dosáhnou ionty o určité hmotnosti stabilních oscilací, zatímco ionty s odlišnou hmotností oscilují s rostoucí amplitudou a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. K měření hmotnostního spektra lze využít dva způsoby, jak ukazuje rovn. (8.3):

$$\frac{m}{ze} = \frac{k\varphi_F}{\omega^2 r_0^2} \quad (8.3)$$

kde  $k$  je konstanta,  $\omega$  – úhlová rychlost ( $\omega = 2\pi f$ ),  $r_0$  – vzdálenost osy kvadrupólu od povrchu tyčí. První způsob spočívá v plynulé změně radiofrekvence, druhý v současné změně  $U$  a  $\varphi_F$  při zachování konstantního poměru  $U/\varphi_F$  (poměr  $U/\varphi_F$  musí být menší než jedna, jinak by všechny kladně nabitě ionty byly zachyceny na záporně nabitých tyčích). Doba potřebná k záznamu spektra je zpravidla 1 až 4 s.

Předností kvadrupólového separátoru je jeho jednoduchá konstrukce a pokud se spektrum získává změnou  $\varphi_F$ , závislost mezi hmotností iontů a časovým průběhem spektra je lineární. Hmotnostní spektrometry s kvadrupólovými separátory v malém kompaktním provedení slouží jako detektory v plynové chromatografii. V porovnání se sektorovými separátory mají kvadrupóly menší rozlišovací schopnost.

c) Průletový separátor je tvořen trubicí o délce asi 1 m. V iontovém zdroji (EI) pracuje vytlačovací elektroda v pulsním režimu. Po dobu asi  $3 \cdot 10^{-9}$  s vytlačuje ionty z komůrky, ionty jsou urychleny potenciálem několika kV a pohybují se

trubkou směrem k detektoru. Ionty s větší hmotností se pohybují pomaleji, ionty s menší hmotností rychleji. Dráhu 1 m urazí ionty podle své hmotnosti za dobu 2 až 30  $\mu\text{s}$ . Pulsy vkládané na vytlačovací elektrodu se opakují s frekvencí 20 kHz.

*Detektor* se zesilovačem a záznamovým zařízením zaznamenává dopadající ionty. Běžně se používá k detekci iontů elektronový (iontový) násobič, což je v podstatě fotoelektrický násobič bez ochranné baňky. Kladný ion po dopadu na první (tzv. konverzní) dynodu uvolní 1 až 2 elektrony, které jsou potenciálovým spádem urychleny k další dynodě atd. Výstup z elektronového násobiče je veden do elektrometrického zesilovače, kde je signálem zesílen natolik, že může být použit buď pro rychlé záznamové zařízení, nebo pro další zpracování počítačem. Běžné zapisovače jsou pro záznam hmotnostního spektra příliš pomalé. Pro tyto účely vyhovuje pouze oscilografický zapisovač, kde se spektrum zaznamenává ultrafialovým paprskem, odraženým od zrcátka galvanometru, na světlocitlivý papír. S rozšířením počítačů se dává přednost záznamu spektra v paměti počítače s následným vytištěním.

*Vakuový systém* musí umožnit dosažení sníženého tlaku  $10^{-5}$  Pa v hmotnostním spektrometru. Pro techniku GC/MS, kdy do hmotnostního spektrometru přitéká 0,5 až 2  $\text{ml min}^{-1}$  plynu, je třeba, aby vakuový systém měl i potřebnou výkonnost. Často se používá tzv. diferenciální čerpání, kdy iontový zdroj a separátor jsou evakuovány odděleně, nezávislými systémy.

## 8.2 CHROMATOGRAFICKÝ VSTUP HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU

Propojení mezi plynovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem, tzv. *chromatografický vstup*, je nový prvek, se kterým se nesetkáváme ani v plynové chromatografii, ani v hmotnostní spektrometrii. Přímé zavedení výstupu z chromatografické kolony do iontové komůrky není zpravidla možné, neboť velké množství nosného plynu by porušilo režim evakuovaného prostoru v hmotnostním spektrometru. To by vedlo k řadě potíží včetně vážného poškození přístroje.

Nejjednodušší spojení představuje dělič umístěný na výstupu z kolony, který dělí proud nosného plynu do dvou větví. Jedna vstupuje do běžného detektoru (např. plamenového ionizačního) a druhá odvádí nosný plyn a eluující složky do iontové komůrky. Pokud pracujeme s náplňovými kolonami, kde průtok nosného plynu bývá 15 až 30  $\text{ml min}^{-1}$ , je třeba, aby podstatná část plynu proudila do detektoru GC. Při dělení v poměru např. 50 : 1 to znamená, že pouze asi 2 % z celkového množství složky se dostanou do hmotnostního spektrometru a navíc je složka silně zředěna nosným plynem. Jiná je situace při práci s kapilárními kolonami. Pro běžně užívané průtoky nosného plynu 1 až 2  $\text{ml min}^{-1}$  postačí, když jsou proudy děleny v poměru 1 : 1, pokud má vakuový systém dostatečnou výkonnost. Poměr lze vhodně upravit průměrem a délkou restriční kapiláry spojující dělič s hmotnostním spektrometrem. Možnost současného chromatografického záznamu a záznamu hmotnostních spekter je výhodná jak pro interpretaci, tak pro kvantitativní vyhodnocení analýzy. Dnes,

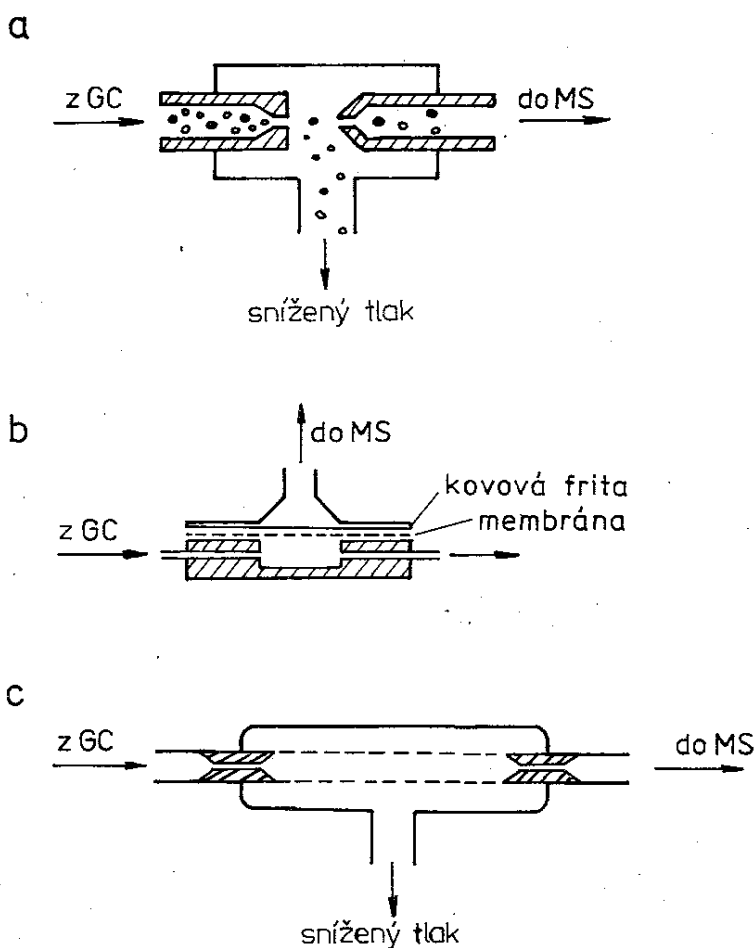
kdy jsou kapilární kolony velmi používány, patří spojení restriční kapilárou mezi nejběžnější. Při práci s náplňovými kolonami se však nevyhneme použití molekulových separátorů.

## 8.2.1 Molekulové separátory

Molekulové separátory mají za úkol oddělit co největší část nosného plynu od eluované složky. Přitom je kladen důraz na to, aby ztráty složky při separaci byly co nejmenší. Výsledkem je podstatné zmenšení objemu nosného plynu a podstatně vyšší koncentrace složky. Existuje celá řada konstrukcí těchto separátorů, ale běžně jsou používány tři typy:

- a) tryskový,
- b) solvatačně difúzní,
- c) efúzní.

a) Tryskový separátor pracuje se dvěma souosými tryskami (obr. 134a). Nosný plyn dosáhne v první trysce velké rychlosti, takže do volného prostoru mezi tryskami difundují pouze molekuly s malou hmotností a jsou odčerpávány. Molekuly s větší hmotností přecházejí setrvačností do druhé trysky. Podmínkou úspěšné práce separátoru je velká rychlost toku v první trysce. Pokud má tryskový separátor pracovat ve spojení s kapilární kolonou, je třeba k výstupu z kolony přidávat určité množství nosného plynu. Běžně se tryskové separátory konstruují jako dvoustupňové.



Obr. 134. Molekulové separátory  
a – tryskový, b – solvatačně difúzní,  
c – efúzní

b) Solvatačně difúzní separátor, někdy také označovaný jako separátor s permeabilní membránou, je na obr. 134b. Výstup z kolony je veden do malé komůrky, která je rozdělena tenkou silikonovou membránou na dvě části. Páry organických látek se přednostně rozpouštějí v silikonu a difundují na druhou stranu membrány, zatímco nosný plyn se rozpouští minimálně. Tento typ separátoru lze užít ve spojení jak s náplňovými, tak i kapilárními kolonami za podmínky, že objem komůrky je dostatečně malý. V opačném případě dochází k nepříjemnému rozšiřování chromatografických píků.

c) Efúzní separátory obsahují zpravidla trubici ze sintrovaného skla nebo kovu umístěnou v evakuovaném obalu (obr. 134c). Porézní přepážkou procházejí podstatně rychleji malé molekuly nosného plynu, zatímco velké molekuly eluovaných složek jsou vedeny dále do hmotnostního spektrometru. Nosný plyn je na vstupu do trubice přiškrben, takže tlak v trubici je asi  $10^2$  Pa. K úspěšné práci separátoru je třeba, aby tlak v obalu byl podstatně nižší, čímž se zabrání zpětné difúzi.

## 8.2.2 Další podmínky pro práci molekulových separátorů

Kromě konstrukčních parametrů závisí úspěšná práce molekulových separátorů na použitém nosném plynu a teplotě. Vedle požadavku běžného v plynové chromatografii, tj. chemické inertnosti, musí mít použitý plyn velmi malou molekulovou hmotnost, aby mohl být v tryskových a efúzních separátorech oddělen od eluované složky. Malá molekulová hmotnost je důležitá i z hlediska hmotnostní spektrometrie, neboť píky odpovídající iontům plynu by rušily při interpretaci spektra. Je též výhodné, má-li plyn vyšší ionizační potenciál, neboť to usnadňuje záznam celkového iontového proudu (viz dále). Ze všech plynů splňuje uvedené podmínky nejlépe helium a jako druhý plyn následuje vodík. V případě, že pracujeme technikou GC/MS s chemickou ionizací, je možné použít jako nosný plyn methan. Většinou se však upřednostňuje helium a methan jako pomocný plyn se přivádí do iontového zdroje zvláštním přívodem.

Také teplota může v rozhodující míře ovlivnit práci molekulových separátorů. Spojení od kolony k molekulovému separátoru, separátor, spojení od separátoru k iontovému zdroji a iontový zdroj je třeba udržovat na teplotě, jakou má kolona. Toho lze dosáhnout buď obalením těchto dílů topnou páskou, nebo jejich uložením v termostatovaném bloku. Při programované teplotě kolony jsou tyto díly zpravidla udržovány na nejvyšší dosažené teplotě.

## 8.3 CHROMATOGRAMY A HMOTNOSTNÍ SPEKTRA V TECHNICE GC/MS

Již v úvodu této kapitoly bylo zdůrazněno, že předností techniky GC/MS je spojení vysoké separační schopnosti plynové chromatografie s identifikačními možnostmi hmotnostní spektrometrie. Z uvedeného vyplývá, že při analýze vzorků

technikou GC/MS musíme získat dva druhy záznamů, a to chromatogram, který nás zhruba informuje o počtu složek přítomných ve vzorku, a hmotnostní spektra jednotlivých píků, z nichž usuzujeme na kvalitu složek, popř. můžeme prokázat současnou eluci více složek v jediném píku. Mimoto existuje ještě zvláštní typ záznamu, který do jisté míry spojuje oba druhy informací.

### 8.3.1 Chromatogramy v technice GC/MS

Nejjednodušší cestou k získání chromatogramu je rozdělení proudu nosného plynu na výstupu z kolony do dvou proudů (viz odd. 8.2). Jeden proud je veden do molekulového separátoru a dále do hmotnostního spektrometru nebo přímo do hmotnostního spektrometru. Druhý proud vstupuje do běžného detektoru plynového chromatografu a umožňuje zaznamenat chromatogram. Lze použít jakéhokoli detektoru, včetně detektorů specifických, ale dává se přednost plamenovému ionizačnímu detektoru.

Jinou možností, jak získat chromatogram, je monitorování celkového iontového proudu. Mezi iontovou komůrkou a sektorovým analyzátozem je umístěna elektroda, na kterou lze fokusovat 0 až 100 % iontového svazku vycházejícího z komůrky. Běžně se fokusuje na elektrodu např. 20 % z celkového iontového proudu, zatímco ostatní ionty vstupují do sektorového separátoru a slouží k získání hmotnostních spekter. Chromatogram pořízený tímto postupem se může do jisté míry lišit od chromatogramu z plamenového ionizačního detektoru. Je to způsobeno jednak tím, že odezva složek je závislá na jejich ionizačním potenciálu, jednak tím, že se v celkovém iontovém proudu uplatní i ionty nosného plynu, ionty těkající mobilní fáze z kolony atd. Při práci s heliem je často výhodné pracovat s energií ionizujících elektronů do 25 eV, kdy nedochází k ionizaci helia.

U moderních přístrojů vybavených počítačem s dostatečnou pamětí se používá jiný postup k záznamu chromatogramu. Během celé analýzy se cyklicky zaznamenávají hmotnostní spektra (jeden cyklus trvá zpravidla 1 až 5 s) a ukládají se do paměti počítače. Počítač porídí součet proudů pro každý záznam, a tak vznikne jeden z bodů, které se vynášejí v závislosti na čase. Na konci analýzy počítač zkonstruuje chromatogram na základě celkového iontového proudu. Přitom je možno ze součtu vyloučit ionty příslušející ionizovanému nosnému plynu, vodě, oxidu uhličitému apod.

### 8.3.2 Hmotnostní spektra v technice GC/MS

I když hmotnostní spektra i v této technice zůstávají svou podstatou stejná (vyjadřují závislost četnosti iontů na jejich hodnotě  $m/ze$ ), jsou tu některé faktory, které není možno přehlédnout. První, patrně nejdůležitější, je faktor časový. Hmotnostní spektra, která lze najít v katalogu, byla měřena tak, že páry analyzované látky ze zásobníku proudily do iontového zdroje, kde byl jejich parciální tlak po dlouhou dobu stálý. Při technice GC/MS máme k dispozici dobu zpravidla 1 až 10 s, po



kteřou eluuje pík, a je jasné, že během této doby se koncentrace látky v nosném plynu mění. Je tedy žádoucí, aby doba záznamu hmotnostního spektra byla co nejkratší. Krátké době záznamu však odporuje požadavek na citlivost, neboť v kratším časovém intervalu dopadne na detektor menší počet iontů. Současně s tím klesá i rozlišovací schopnost hmotnostního spektrometru. Dále je třeba, aby během eluce jediného píku bylo zaznamenáno několik hmotnostních spekter, aby bylo jisté, že nedochází k současné eluci více složek. Z uvedených faktů vychází, že běžně používané doby záznamu 1 až 5 s jsou kompromisním řešením.

Záznam hmotnostních spekter lze řídit diskontinuálně nebo cyklicky. Při diskontinuálním řízení záznamu operátor sleduje chromatogram a v okamžiku, kdy eluuje pík, zaznamenává hmotnostní spektrum. Často se zaznamenává jedno hmotnostní spektrum na začátku eluce píku, druhé ve vrcholu píku a třetí na konci eluce. U složitějších směsí se tímto způsobem získá několik desítek hmotnostních spekter, jejichž další zpracování a interpretace jsou značně časově náročné.

Cyklický záznam hmotnostního spektra spočívá v pravidelném opakovaném snímání hmotnostních spekter. Operátor na začátku zvolí čas potřebný k natočení jediného spektra a k tomuto času přidá i dobu potřebnou k přeladění iontového separátoru do výchozí polohy. V těchto intervalech potom přístroj zaznamenává hmotnostní spektra. Spouštění cyklického záznamu se provádí zpravidla až po eluci rozpouštědla, ve kterém je vzorek rozpuštěn, aby se snížil počet zaznamenaných spekter. I tak je zřejmé, že je-li doba cyklu např. 3 s a chromatografická analýza trvá např. 15 minut, je počet spekter tak velký, že jejich diskontinuální zpracování by bylo neefektivní. Cyklický záznam se proto provádí na přístrojích vybavených počítačem, kde všechna spektra mohou být v digitalizované formě uložena do paměti. Počítač potom může vyloučit ta spektra, kde je pouze pozadí, tj. spektra natáčená v okamžiku, kdy neeluovala žádná složka. Tím se počet spekter i u složitější směsí sníží na 50 až 60. Počítač zkonstruuje na konci analýzy chromatogram na základě celkového iontového proudu a operátor vybere čísla záznamů hmotnostních spekter, která jsou určena k dalšímu zpracování.

### 8.3.3 Fragmentografie a hmotnostní chromatogramy

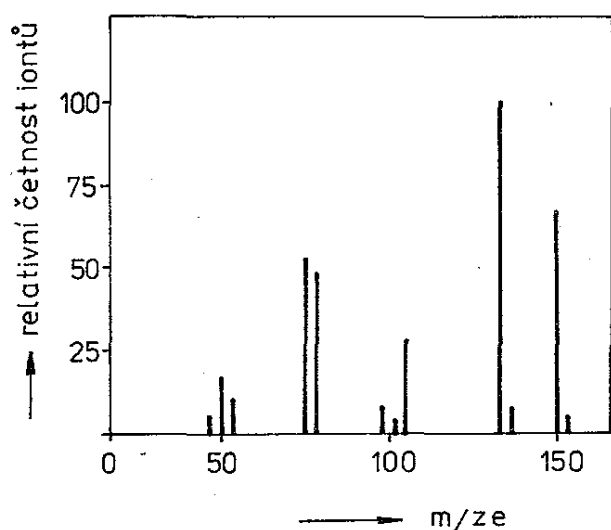
Již u jednoduchých hmotnostních spektrometrů byla využívána možnost fixování iontového separátoru tak, aby propouštěl ionty o určité hodnotě  $m/z$ . Tato metoda, označovaná jako selektivní iontová detekce, se používala tam, kde bylo vhodné sledovat určitou skupinu látek, poskytujících charakteristické ionty v bohaté směsi dalších balastních látek. Hmotnostní spektrometr potom zaznamenával dva chromatogramy – jeden na základě celkového iontového proudu a druhý na základě četnosti vybraného iontu. Prostým porovnáním obou chromatogramů bylo možno určit, které píky obsahují sledované složky.

V novějších přístrojích lze sledovat několik vybraných iontů vícekanálovým záznamem. Tato metoda – *fragmentografie* – vyžaduje rychlé, programově řízené přestavění parametrů iontového separátoru tak, aby byly propuštěny ionty o zvolen-

ných hodnotách  $m/z$ e. Předností fragmentografie je nejen selektivní určení vybraných složek, ale i vyšší citlivost, neboť se nezaznamenává celé spektrum, a tím je možné zaznamenávat vybrané ionty s vyšší časovou konstantou. V přístrojích vybavených počítačem je tato metoda ještě dále rozšířena, protože počítač může zkonstruovat hmotnostní chromatogram pro jakýkoli zvolený ion. Tím odpadá nevýhoda fragmentografie, kde omezený počet registrovaných iontů někdy nedovoloval určit složku s dostatečnou spolehlivostí.

#### 8.4 INTERPRETACE HMOTNOSTNÍCH SPEKTER

Hmotnostní spektrum, tak jak je zaznamená oscilografický zapisovač, představuje hrubou formu, kterou je třeba dále upravit. U starších přístrojů bylo třeba v první řadě provést označení hodnot  $m/z$ e na ose  $x$ . Nové přístroje, které mají tzv. mass-marker, provádějí označení automaticky a každá desítka a stovka hodnoty  $m/z$ e je označena zesílenou čarou. Dále bylo třeba převést spektrum na normalizovanou formu. Nejintenzivnějšímu píku ve spektru byla přisouzena hodnota 100 a ostatní píky potom vyjadřovaly procentové zastoupení složek vztažené k základnímu píku. Operátor musel měřit výšky píku a vypočítávat zastoupení jednotlivých iontů. U moderních přístrojů tato práce odpadá a počítač je schopen vytisknout hmotnostní spektrum v normalizované formě (obr. 135).



Obr. 135. Normalizovaná forma hmotnostního spektra

Další prací analytika bylo porovnání získaného spektra se spektry zaznamenanými v katalogu. Shodnost spekter potom mohla prokázat identitu neznámé složky. Tato práce byla přijatelná, pokud bylo třeba rozhodnout pouze mezi několika možnostmi. Pokud však chyběla jakákoli informace o neznámé složce, bylo vyhledání odpovídajícího spektra v katalogu s např. 10 000 spektry obtížným úkolem. Také tento úkol převzal nyní počítač, který má ve své paměti uloženo několik desítek tisíc hmotnostních spekter. Postupů pro vyhledávání odpovídajícího spektra je několik; jako příklad uvedme porovnávání pěti nebo šesti nejintenzivnějších píků spektra. Počítač potom vybere ne jedno, ale několik spekter, která se spektru neznámé látky nejvíce podobají. To ovšem neznamená, že by odpadly všechny problémy

při interpretaci spekter. Spektra v katalogu byla pořízena na sektorových přístrojích s ionizací nárazem elektronů o energii 70 eV. I když pracujeme se sektorovým přístrojem a používáme stejný způsob ionizace, dostaneme spektrum, ve kterém se intenzity iontů částečně liší od spekter tabelovaných. Důvodem jsou zpravidla menší rozdíly v konstrukci přístroje. Při použití stejné ionizace a kvadrupólového separátoru jsou rozdíly v intenzitách iontů již podstatné a řada firem má ve svých počítačích zabudován program, kterým koriguje naměřené intenzity píků na intenzity tabelované. Použitím jiných způsobů ionizace se mohou získat spektra zcela odlišná od spekter tabelovaných. K pozitivní interpretaci hmotnostního spektra neznámé látky jsou proto vítány jakékoli další informace. U techniky GC/MS jsou to především hodnoty retenčních indexů.

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií slouží především ke kvalitativní analýze. Ke kvantitativní analýze se využívá chromatografických záznamů. Pouze v tom případě, že se dvě složky chromatograficky nedělí, je vhodné hmotnostního spektrometru využít i ke stanovení složek. Podmínkou ovšem je, že jsou k dispozici hmotnostní spektra obou složek a že se tato spektra liší alespoň v jednom charakteristickém údaji. V těch případech, kdy se hmotnostní spektra neliší (např. izomery některých olefinů nebo polycyklických aromátů), je jediným řešením najít takový chromatografický systém, ve kterém se obě složky rozdělí.

## 8.5 APLIKACE TECHNIKY GC/MS

Technika GC/MS se uplatňuje především při analýzách složitých směsí látek, které lze převést do plynného stavu. S použitím kapilární plynové chromatografie lze tyto směsi rozdělit až na několik set složek, přičemž každou složku lze do značné míry s vysokou specifičností charakterizovat hmotnostním spektrem. Na druhé straně vysoká cena tohoto kombinovaného přístroje vybaveného počítačem nesporně vyžaduje, aby byla tato technika aplikována pouze pro řešení velmi náročných a významných analytických problémů a aby bylo předem zajištěno dokonalé využití přístroje. Určitým kompromisem jsou plynové chromatografy vybavené malým kvadrupólovým hmotnostním detektorem, ale i tak cena tohoto přístroje několikanásobně přesahuje cenu běžného plynového chromatografu.

Největší rozšíření zaznamenala technika GC/MS v analýze organických látek. Zcela výjimečných výsledků bylo dosaženo v medicíně a biochemii, kde bylo spojení GC/MS využito při sledování léků, drog a jejich metabolitů v tělních tekutinách. Tato aplikace byla rozšířena i na soudní lékařství, kde v řadě případů umožnila jednoznačné řešení při velmi složitých analýzách.

Nárůst problémů se znečišťováním životního prostředí ve svých důsledcích vedl k růstu investic do oblasti analýzy životního prostředí. Technika GC/MS je nyní široce používána ke stanovení ropného znečištění ve vodách, k určení obsahu chlorovaných pesticidů ve tkáních zvířat apod. Při analýzách materiálů po ekologických katastrofách způsobených chlorovanými dibenzodioxiny a dibenzofurany se významně uplatnila technika GC/MS s negativní chemickou ionizací.

I když se zdá, že vývoj v této oblasti analytiky je v podstatě ukončen, není pochyb o tom, že technika GC/MS najde v budoucnosti ještě daleko širší použití.

## 8.6 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ (LC/MS)

Podobně jako u přímého spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) umožňují hmotnostní spektrometry zapojené přímo za kolonu kapalinového chromatografu snímat hmotnostní spektra separovaných látek v průběhu eluce, což je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Přímé spojení LC/MS však naráží na značné technické potíže, podstatně větší než u spojení GC/MS, a proto dosud není v praxi tak rozšířené. Eluát z kolon v kapalinové chromatografii je kapalný a odstranění eluentu při zavádění do hmotnostního spektrometru pracujícího za sníženého tlaku  $10^{-2}$  až  $10^{-5}$  Pa je mnohem obtížnější než odstranění nosného plynu z eluátu z plynové chromatografické kolony.

Většinu technických problémů spojených s realizací přímého spojení LC/MS se v dnešní době podařilo vyřešit, i když vývoj v tomto směru dosud není ukončen a přístroje s přímým spojením LC/MS jsou dnes komerčně dostupné. Jejich většímu rozšíření v praxi však dosud brání poměrně vysoká cena.

Princip a funkce různých typů hmotnostních spektrometrů byly popsány v odd. 8.1.1, proto bude na tomto místě podán pouze přehled různých v praxi používaných způsobů spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem.

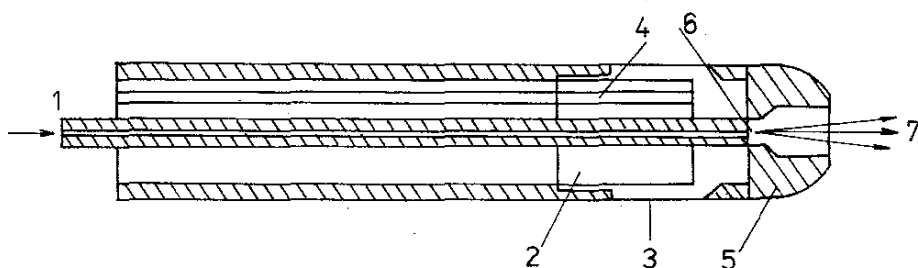
### 8.6.1 Principy přímého spojení LC/MS

Nejjednodušším spojením je přímý přívod eluátu z chromatografické kolony do hmotnostního spektrometru. Tohoto principu využívalo první spojení LC/MS, navržené Mc Laffertym a spolupracovníky. Eluát z chromatografické kolony obtéká diafragmu s otvorem o světlosti několika mikrometrů, jímž část eluátu proniká do iontového zdroje, v němž se odpaří, a páry mobilní fáze slouží jako reakční plyn pro chemickou ionizaci. Citlivost je poměrně nízká, neboť toto zařízení funguje vlastně jako dělič toku eluátu (splitr) a do iontového zdroje pronikne ca 0,3 až 1 % z celkového množství látky. Při použití sektorových přístrojů s elektromagnetickou fokusací je třeba pomocí přídavných vysoce výkonných čerpadel odčerpávat přebytek par rozpouštědla z iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Je zde i poměrně značné nebezpečí elektrického výboje v iontovém zdroji, zvláště při použití vodivějších mobilních fází. Toto nebezpečí je menší při použití hmotnostních spektrometrů s kvadrupólovým hmotnostním filtrem, kde se používá podstatně nižších urychlujících napětí v iontovém zdroji. Z tohoto důvodu a především vzhledem k menším požadavkům na snížení tlaku dnes naprosto převažuje použití kvadrupólových hmotnostních spektrometrů pro spojení LC/MS s přímým přívodem eluátu do iontového zdroje.

Velmi výhodné je použití mikrokolon pro přímé spojení LC/MS, neboť tyto kolony pracují s podstatně menšími průtoky ( $10$  až  $50 \mu\text{l min}^{-1}$ ) než běžné analytické kolony o vnitřním průměru  $3$  až  $5$  mm a lze přivádět celý eluát do iontového zdroje, a tím podstatně zvýšit citlivost detekce. Bylo popsáno i přímé spojení kapilárních kolon s hmotnostním spektrometrem.

Techniky přímého zavádění eluátu z kolony do iontového zdroje byly modifikovány i pro využití jiných principů ionizace. Ionizace při atmosférickém tlaku se uskutečňuje při iontově molekulárních reakcích v iontovém zdroji bez sníženého tlaku. Jako zdroje ionizujícího záření  $\beta$  se používá fólie radioaktivního  $^{63}\text{Ni}$  a vzniklé ionty vstupují do analyzátoru hmotnostního spektrometru otvorem o velikosti  $25$  až  $50 \mu\text{m}$  pomocí urychlujícího elektrického pole vytvořeného systémem záporně nabitých elektrod. Přebytek par eluátu se odčerpává.

Velmi perspektivní je tzv. ionizace tepelným rozprašováním (thermospray ionization), vyvinutá v posledních letech. Při této technice vstupuje eluát z kolony do iontového zdroje nerezovou kapilárou, jejíž konec je elektricky vyhříván. Při průchodu kapilárou dochází k částečnému odpaření eluátu, který tryská z ústí kapiláry jako směs par a aerosolu, jehož drobné kapičky s rozpuštěným solutem mají určitý elektrický náboj. (Je třeba, aby mobilní fáze obsahovala určitý podíl solí.) Tato směs dále prochází vyhřívanou zónou, kde kapičky aerosolu rychlým odpařováním prudce zmenšují svůj objem, přičemž dochází k velmi výraznému vzrůstu povrchové hustoty náboje kapiček, takže vytvořené elektrické pole dostačuje k ionizaci molekul solutu při nárazu kapičky na elektricky vyhřívanou sondu z poniklované mědi. Přebytek par je z iontového zdroje odsáván výkonným vakuovým čerpadlem. Tento způsob ionizace tedy nevyžaduje žhavené vlákno jako ionizace elektronovým nárazem či chemická ionizace, je šetrný a poskytuje vysoký výtěžek molekulových iontů s poměrně malým podílem iontových fragmentů. To má za následek vysokou citlivost (nízké meze detekce) této techniky. Nejdůležitějším parametrem je teplota odpařování, která musí být konstantní (udržuje se termoelektrickým článkem se zpětnou vazbou) a optimalizovaná v závislosti na použité mobilní fázi a průtoku. Metoda je vhodná pro vodné a vodně organické mobilní fáze a přítomnost tlumivých roztoků v mobilní fázi nejenže není na závadu, ale naopak je žádoucí; metoda se

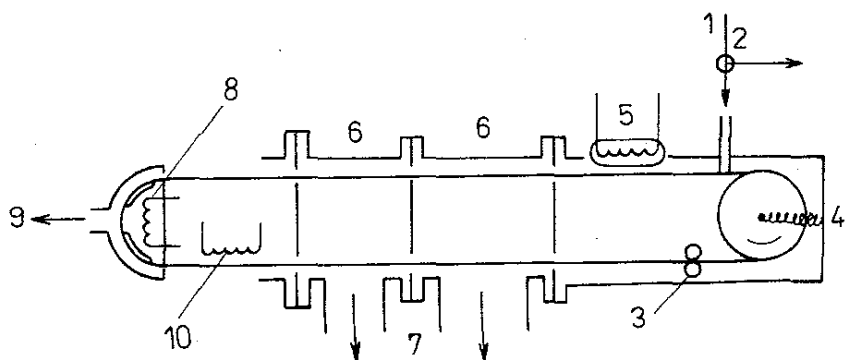


Obr. 136. Dvouúčelové zařízení pro přímé zavádění eluátu z kolony kapalinového chromatografu do iontového zdroje kvadrupólového hmotnostního spektrometru, umožňující jednak ionizaci tepelným rozprašováním, jednak ionizaci žhaveným vláknem

1 – kapilára pro přívod eluátu z kolony, 2 – dvě vyhřívací tělíska, 3 – vyhříváný měděný odpařovač, 4 – termoelektrický článek pro kontrolu teploty odpařování, 5 – vyměnitelná tryska, 6 – nerezová diafragma s miniaturním otvorem v ústí kapiláry, 7 – vstup páry s aerosolem do iontového zdroje

tedy velmi hodí pro chromatografii s obrácenými fázemi. Přístroje pro LC/MS s ionizací tepelným rozprašováním jsou komerčně dostupné a většinou jsou opatřeny i žhaveným vláknem, které lze buď vypnout, nebo zapnout pro podpoření ionizace nárazem elektronů (za účelem zvýšení citlivosti pro fragmentové ionty). Schéma zařízení pro přímý přívod eluátu při ionizaci tepelným rozprašováním ukazuje obr. 136.

Alternativou k přímému zavádění eluátu z kolony do iontového zdroje je použití převodního členu (molekulového separátoru) mezi kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem. Separátory používané při spojení GC/MS (popsané v odd. 8.2.1) se pro spojení LC/MS neosvědčily vzhledem k přítomnosti mnohonásobně vyššího počtu molekul mobilní fáze k eluátu. Proto se používá principiálně stejného systému jako u detektorů s transportem hmoty. Schéma takového zařízení ukazuje obr. 137. Základem tohoto zařízení je pohyblivý dopravníkový pás z nerezové



Obr. 137. Převodní člen s transportním dopravníkem pro zavádění eluátu z kolony kapalinového chromatografu do iontového zdroje kvadrupólového hmotnostního spektrometru

1 – přívod eluátu z kolony, 2 – dělič toku (splitr), 3 – pohon transportního dopravníku, 4 – pružina, 5 – IČ topení pro odpaření mobilní fáze, 6 – evakuované komůrky, 7 – odtah k vakuovému čerpadlu, 8 – topení pro bleskové odpaření solutu, 9 – iontový zdroj, 10 – čistící topení

oceli o šířce 3 mm a tloušťce 0,05 mm, na něž vytéká eluát z kolony kapalinového chromatografu. Pás prochází postupně pod infračervenou lampou, kde se eluát odpaří, dvěma evakuovanými komůrkami, kde se páry eluátu odčerpají vakuovým čerpadlem, k otvoru iontového zdroje, kde se zahřeje na teplotu, při níž dojde k bleskovému odpaření solutu zbylého na pásku (mezi 170 až 320 °C). Tímto způsobem lze převést do iontového zdroje 25 až 40 % z celkového množství solutu z eluátu; předpokladem úspěšné aplikace této metody je však použití těkavých složek mobilní fáze.

Výhodou přímého spojení LC/MS je především vysoká citlivost a možnost rychlého získání hmotnostních spekter a cenných informací o struktuře separovaných látek. V dnešní době poskytuje dostupná instrumentace široké možnosti aplikací této techniky, i když technický vývoj není zdaleka ukončen.

## 8.7 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE SE SPEKTROMETRIÍ NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE (LC/NMR)

Vzhledem k tomu, že nukleární magnetická rezonance (NMR) je nejcennější spektroskopickou technikou pro určení struktury neznámých látek, je spojení LC/NMR potenciálně velmi cenné pro určování struktury neznámých látek ve složitých směsích. Technická realizace tohoto spojení však naráží na ještě větší potíže než spojení LC/MS. Především citlivost spektrometru NMR je podstatně nižší než u spektrofotometrů UV a hmotnostních spektrometrů, a proto vyžaduje relativně značné množství vzorku. Vysoké spektrální rozlišení vyžaduje dokonale homogenní magnetické pole při měření, čehož se dosahuje rotací sondy s kyvetou se vzorkem při vysokých otáčkách. Dosud se však nepodařilo technicky vyřešit průtokovou mikrocelu, schopnou takovéto rotace.

Intenzita signálu NMR značně klesá s rostoucím průtokem v měrné cele spektrometru NMR a většina neperdeuterovaných rozpouštědel (složek mobilní fáze) poskytuje rušivé signály v  $^1\text{H}$ -NMR-spektrech. Přes tyto potíže byly zkonstruovány přístroje umožňující praktickou práci s přímým spojením LC/NMR. Průtokové cely těchto přístrojů měly objem několik desítek až stovek mikrolitrů, což neumožňovalo práci s běžnými analytickými kolonami. Muselo být použito kolon s vnitřním průměrem větším než centimetr (preparativních kolon). Spojení se vyznačovalo poměrně nízkým spektrálním i chromatografickým rozlišením. První úspěšné použití analytické kolony ve spojení LC/NMR popsali r. 1985 Laude a Wilkens, kteří umístili nerezovou komerční analytickou kolonu přímo mezi póly magnetu. Na konec kolony byla připojena skleněná průtočná cela s vnitřním objemem 20  $\mu\text{l}$ , čímž bylo dosaženo značného zlepšení chromatografického rozlišení a spektrální citlivosti. Toto zařízení však stále není vhodné pro rutinní analytické aplikace, do budoucna však lze očekávat další pokrok v konstrukci přístrojů LC/NMR. Prozatím je třeba používat metody „off-line“, tj. zkoncentrování eluované látky ve frakci eluátu následované sejmutím NMR-spektra po rozpuštění látky ve vhodném rozpouštědle.

## 8.8 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S INFRAČERVENOU SPEKTROSKOPIÍ (LC/FTIR)

Zatímco přímé spojení plynové chromatografie s infračervenou spektroskopií (GC/FTIR) je v dnešní době komerčně dostupné, přímé spojení kapalinové chromatografie s infračervenou spektroskopií je spojeno přinejmenším se stejnými obtížemi jako přímé spojení LC/NMR. Infračervená spektroskopie se vyznačuje poměrně nízkou citlivostí a k účelům přímého spojení lze použít pouze přístrojů konstruovaných na principu interferometru, které jsou mnohem citlivější, rychlejší a dražší než běžné dvoupráskové přístroje s optickou či elektrickou kompenzací. U interferometrických infračervených spektrometrů se registruje interferogram vzniklý interferencí dvou paprsků procházejících kyvetou se vzorkem, z nichž jeden

se odráží od pevného a druhý od pohyblivého zrcadla. Získaný interferogram se převádí na běžný tvar absorpčního spektra matematickou cestou pomocí Fourierovy transformace s použitím počítače, jímž je každý přístroj vybaven. Spektrum rozpouštědla se odečítá pomocí počítače od spektra látky. Tato technika se označuje jako infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).

Rozpouštědla používaná jako složky mobilní fáze značně interferují v infračervených spektrech dělených látek, v čemž spočívá druhá hlavní potíž přímého spojení LC/FTIR. Kapalinová chromatografie se nemůže obejít pouze s rozpouštědly běžně používanými při infračervené spektroskopii ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CS}_2$ ) jako s mobilními fázemi. Proto je třeba mobilní fázi z eluátu odstranit ještě před vstupem do infračerveného spektrometru. K tomuto účelu byl navržen kontinuální extrakční membránový separátor spojený s průtokovou celou infračerveného spektrometru. Spojení LC/FTIR na této bázi se vyznačuje poměrně nízkou citlivostí a velmi značnou disperzí píků, nepříjemnou pro moderní vysoce účinné kolony. Alternativní metody používající transportních zařízení na principu dopravníkového pásu nebo automatické diskontinuální techniky měření infračervených spekter se dosud příliš neosvědčily, a tak jsme stále odkázáni na odebírání frakcí eluátu, odpaření rozpouštědla a měření IČ-spekter látky po rozpuštění odparku v některém rozpouštědle běžně používaném v infračervené spektroskopii.

## 8.9 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE SE SPEKTROSKOPIÍ V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI (LC/UV-VIS)

Přímé spojení LC/UV-VIS poskytuje ze všech kombinací (LC/MS, LC/NMR, LC/FTIR) sice nejméně informací o struktuře dělených látek, je však nejcitlivější a setkává se s nejmenšími technickými problémy, které jsou v dnešní době zcela uspokojivě vyřešeny. Dnes je v přijatelné ceně k dispozici řada komerčních systémů LC/UV a pole aplikací této techniky se stále rozrůstá.

Z principiálního hlediska lze rozlišovat dva technické způsoby realizace spojení LC/UV-VIS:

1. pomocí spektrofotometrického detektoru opatřeného monochromátorem, který umožňuje snímat spektrum látky v cele detektoru při zastaveném průtoku mobilní fáze (technika „stop-flow“),

2. pomocí spektrofotometrického detektoru typu „photodiode-array“, který poskytuje okamžité spektrum bez nutnosti zastavit průtok mobilní fáze.

Další podrobnosti o těchto detektorech jsou v odd. 7.4.3.6.

Spektrum získané pomocí „photodiode-array“ detektoru může být u fluoreskujících látek poněkud zkresleno podílem emitovaného fluorescenčního záření vybuzeného v cele detektoru dopadajícím polychromatickým zářením. Přesto však má tento typ detektoru nesporné výhody proti detektoru s monochromátorem:

1. Jeho funkce je spolehlivější, protože se v něm nepoužívají pohyblivé mechanické části, které jsou nejčastějším zdrojem poruch.



2. Spektrum je dostupné okamžitě bez přerušení toku mobilní fáze kolonou a lze jej uložit v paměti počítače. Později jej lze vyvolávat pro každý okamžik v průběhu eluce a porovnávat se sbírkou spekter standardů.

3. Pomocí trojrozměrných diagramů v souřadnicích absorbance–vlnová délka–čas lze volit vlnovou délku zaručující optimální citlivost detekce či porovnávat spektra na různých místech chromatografického píku, a kontrolovat tak jeho čistotu.

Mezi separační analytické metody patří také elektromigrační metody. Jsou založeny na rozdílné pohyblivosti nabitých částic v stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost nabitých částic závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí a síly elektrického pole. Velikost náboje ovlivňuje stupeň ionizace, iontová síla a pH prostředí.

### 9.1 ZÁKLADNÍ PRINCIPY

V elektromigračních metodách je rozhodujícím činitelem elektroforetická pohyblivost nabité částice (iontu)  $u$ . Ta je definována jako rychlost této částice  $v$  při jednotkovém gradientu elektrického pole  $E$ :

$$u = \frac{v}{E} \quad (9.1)$$

Na pohyblivost částic má vliv více faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou:

a) *Fyzikálně chemické vlastnosti samotných částic* – jejich celkový náboj, velikost, tvar, disociovatelnost povrchových skupin, schopnost adsorpce iontů a polárních molekul, tvorba komplexů apod. Většinu z těchto faktorů ovlivňuje prostředí, zvláště pH a přítomnost jiných elektrolytů (iontová síla).

b) *Vlastnosti prostředí*. Elektrolyty, které se v elektromigračních metodách používají, jsou zpravidla tlumivé roztoky o určité koncentraci, iontové síle, pH, vodivosti, teplotě, viskozitě a permitivitě. Pohyblivost nabitých částic mohou ovlivnit i přítomné neelektrolyty (komplexy, asociáty a jiné agregáty). Roztok elektrolytu je vodičem druhé třídy a při průchodu proudů klade určitý odpor. Jeho velikost závisí na druhu, koncentraci a konstrukci elektroforetického zařízení. Při průchodu elektrického proudů elektrolytem se tvoří Joulovo teplo  $Q$ , které lze vypočítat podle vztahu:

$$Q = UIt = \frac{U^2 t}{R} = RI^2 t \quad (9.2)$$

kde  $U$  je napětí (rozdíl potenciálů mezi elektrodami),  $I$  – elektrický proud,  $t$  – čas,  $R$  – odpor prostředí. Vzniklé teplo způsobuje odpařování rozpouštědla, v důsledku čehož roztok vzlíná z prostoru elektrod (jde o tzv. knotový efekt). Účinkem Joulova tepla se zahřívá i nosič se separovanými látkami, které se mohou termicky měnit.

c) *Vlastnosti nosiče*. Při jeho použití je pohyblivost iontů zpravidla menší než při

volné elektroforéze. Migraci ovlivňují další faktory, jako je elektroosmóza, průtokový potenciál, prostorové vlivy nosiče, adsorpce apod. Velikost elektroosmózy závisí na druhu nosiče, potenciálovém spádu, iontové síle elektrolytu a pH. Výsledný pohyb částice je daný součtem elektroforetické a elektroosmotické pohyblivosti. Podmínky, které ovlivňují pohyblivost částic na nosičích, jsou složité a lze je těžko standardizovat. Proto se k identifikaci separovaných složek při elektroforéze na nosičích nepoužívají absolutní pohyblivosti, ale relativní, které se určí pomocí standardů. V elektroforetických technikách se ve funkci nosiče používá speciální chromatografický papír a různé druhy gelů, popř. sorbentů. Nosič nemá klást odpor při migraci a má být chemicky inertní vůči separovaným složkám a ostatním činidlům (rozpuštědlu, detekčnímu činidlu).

d) *Vlastnosti elektrického pole.* Zahrnují jeho sílu, homogenitu, stabilitu, změny pH vlivem elektrických dějů na elektrodách a komplikace s Joulovým teplem. Všechny tyto činitele ovlivňují rychlost migrace, ostrost a rovnoměrnost rozdělených zón.

Podle experimentálního uspořádání lze elektroforetické metody rozdělit do čtyř základních typů na:

- zónovou elektroforézu,
- elektroforézu s pohyblivým rozhraním,
- izoelektrickou fokusaci,
- izotachoforézu.

## 9.2 ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

Zónová elektroforéza je realizována tak, že katodový i anodový prostor a kolona jsou naplněny základním elektrolytem. Vzorek se dávkuje jednorázově do určitého místa kolony (zpravidla do středu). Po zavedení stejnosměrného elektrického proudu nastává účinkem gradientu elektrického pole pohyb částic podle jejich efektivních (relativních) pohyblivostí k příslušné elektrodě. Současně se tedy separují kationty i anionty a vytvářejí v základním elektrolytu samostatné zóny, které jsou neostré a látka je v nich rozložena nerovnoměrně. Po dobu separace vzrůstá šířka zón a klesá v nich maximální koncentrace. Ke stabilizaci zón se používají vhodné nosiče. Interakce vzorku s nosičem však může nepříznivě ovlivnit tvar zóny a přesnost kvantitativního vyhodnocení.

Základní zařízení pro elektroforézu se skládá z elektroforetické komory a zdroje stejnosměrného proudu. Elektroforetická komora (kyveta, válec, trubice tvaru U, kolona) má katodový a anodový prostor, kde jsou příslušné elektrody s elektrolytem a prostor na umístění nosiče. Zdroj stejnosměrného elektrického proudu by měl poskytovat konstantní proud nebo napětí. Podle použitého, resp. dosaženého napětí na konci separace se elektroforéza dělí na:

- nízkonapěťovou (do 300 V),
- středněnapěťovou (do 1 500 V),
- vysokonapěťovou (až do 15 kV).

Kvalitativní analýza se provádí na základě rychlosti migrace (efektivní pohyblivosti). Mírou kvantity je celková plocha zóny, která se zjišťuje obdobně jako při chromatografii v plošném uspořádání.

### 9.3 ELEKTROFORÉZA S POHYBLIVÝM ROZHRAŇÍM

Tato technika je realizována tak, že směs separovaných složek smíchaná se základním elektrolytem je rozptýlena v tak velké části separační kolony, že při dané délce kolony nemůže dojít k úplné separaci. Po zavedení stejnosměrného proudu dojde jen k částečné separaci složek. Prvá zóna je směsí základního elektrolytu a nejpohyblivější složky vzorku, potom následuje směsná zóna základního elektrolytu a dvou nejrychlejších složek atd. Na konci kolony se budou shromažďovat nejpomalejší složky. V posledních letech se věnuje zvýšená pozornost této technice v kapilárním uspořádání, ale jinak nenašla širší uplatnění.

### 9.4 IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE

Metoda nachází uplatnění při separaci látek amfoterního charakteru, které se liší hodnotou izoelektrického bodu, tj. velikostí pH, při němž jejich náboj nabývá nulové hodnoty. Na rozdíl od ostatních elektroforetických technik vytváří izoelektrická fokusace takové podmínky prostředí, aby rychlost pohybu separovaných složek byla funkcí jejich polohy v koloně. Základem je přítomnost gradientu pH podél kolony vytvořeného pomocí amfolytů, které účinkem elektrického pole putují do míst svých izoelektrických bodů. Tím se mezi anodou a katodou vytvoří stálý gradient pH. Nejnižší pH je u anody a nejvyšší u katody. Po vložení elektrického pole se začnou amfolyty pohybovat k příslušné elektrodě, dokud se nedostanou do oblasti pH, která se rovná jejich izoelektrickému bodu. Při této hodnotě pH se stanou elektricky neutrálními a zastaví se. Vytvoří tu ostrou zónu bez ohledu na to, kde se nacházely na začátku pokusu.

### 9.5 IZOTACHOFORÉZA

Izotachoforéza patří mezi nejprogresivnější elektromigrační separační metody. Využívá diskontinuálního gradientu elektrického pole vytvářeného v diskontinuálně uspořádaném systému elektrolytů. Separace probíhá na základě rozdílných efektivních pohyblivostí iontových sloučenin vlivem elektrického pole.

Z hlediska analytického využití je nejrozšířenější kapilární izotachoforéza. V tomto případě se separace uskutečňuje v kapiláře spojené se dvěma elektrodovými prostory, které jsou přímo připojeny na stabilizovaný zdroj stejnosměrného proudu. Na rozdíl od jiných elektroforetických technik se v izotachoforéze využívají dva druhy elektrolytů. Jedno elektrodové oddělení a kapilára jsou naplněny vodícím elektrolytem a druhé zakončujícím elektrolytem. Vzorek se dávkuje na rozhraní mezi vodící

a zakončující elektrolyt (terminátor). Jednou analýzou lze separovat jen jeden druh iontů (anionty, resp. kationty). Vodicí elektrolyt se musí zvolit tak, aby měl nejvyšší efektivní pohyblivost ze všech separovaných složek, a zakončující elektrolyt musí být naopak nejméně pohyblivý. Ve vodicím elektrolytu se vždy vyskytuje protiion, který má určitou tlumicí schopnost (je součástí tlumivého roztoku). Po zapnutí zdroje se budou ionty účinkem elektrického pole pohybovat k opačně nabitým elektrodám a začnou se řadit podle svých pohyblivostí. Po určitém čase se dosáhne ustáleného rovnovážného stavu, v kterém se všechny ionty (seřazené v zónách podle klesajících pohyblivostí) pohybují stejnou rychlostí a následují jeden za druhým. Hranice mezi jednotlivými zónami jsou ostré v důsledku uplatňování samozaostřovacího efektu. Protože má v ustáleném stavu každá zóna jinou efektivní pohyblivost, musí se měnit od zóny k zóně i potenciálový gradient. Fyzikální vlastnosti daných iontů v zóně jsou tedy konstantní, avšak na rozhraní zón se mění skokem. Na tomto principu je založena detekce zón pomocí fyzikálních metod.

Při izotachoretické separaci platí tzv. Kohlrauschova regulační funkce, což v praxi znamená, že koncentrace látky ( $c$ ) v dané zóně se vždy upraví na koncentraci látky v předcházející zóně. Například pro ionty A a B v jejich zónách platí:

$$c_{B,2} = c_{A,1} \frac{u_B(u_A + u_Q)}{u_A(u_B + u_Q)} \quad (9.3)$$

kde index 1, 2 vyjadřuje pořadové číslo zóny,  $u$  je pohyblivost iontu a  $u_Q$  – pohyblivost protiiontu. Z této rovnice vyplývá, že koncentrace separované složky v zóně nezávisí na složení analyzovaného vzorku. Toto je též jednou z výhod izotachorezy v porovnání s takovými metodami, při kterých koncentrace velmi zředěného vzorku po dobu analýzy ještě dále klesá.

### 9.5.1 Výběr systému elektrolytů

Separaci iontových látek lze provést různými způsoby:

a) K separaci iontů se mohou využít rozdíly v absolutních iontových pohyblivostech. pH tlumivého systému se volí tak, aby všechny složky analyzované směsi byly v podstatě úplně disociované. Tento druh separace se nazývá separace podle pohyblivosti.

b) K separaci je možno využít rozdíly v hodnotách  $pK$  slabých elektrolytů. pH systému se volí tak, že většina složek analyzovaného vzorku není úplně disociovaná. To je výhodné hlavně tehdy, má-li většina iontových látek přibližně stejnou pohyblivost. Tento způsob se označuje jako separace podle hodnot  $pK$ .

c) Změnou vhodného rozpouštědla lze též dosáhnout úplné separace. Tato technika je vhodná tehdy, když má v jednom rozpouštědle většina složek analyzované směsi přibližně stejné iontové pohyblivosti i hodnoty  $pK$ . Volbou vhodného rozpouštědla, ve kterém jsou složky rozpuštěné, je možné někdy dosáhnout různé hodnoty  $pK$ , resp. rozdílné pohyblivosti.

d) K separaci se mohou využít i jiné jevy, jako např. tvorba komplexů, srážení a jiné interakce.

Dosud neexistuje žádná všeobecná metoda, jak najít vhodný systém elektrolytů. Při jeho volbě je třeba brát v úvahu více faktorů, jako je výběr rozpouštědla, tlumivého protiiontu, pH vodícího elektrolytu, vodícího a zakončujícího elektrolytu.

### Výběr rozpouštědla

V izotachoforéze se jako rozpouštědlo nejčastěji používá voda, protože dobře rozpouští většinu iontových sloučenin. K separaci látek, které jsou nerozpustné nebo jen málo rozpustné ve vodě (např. vyšší mastné kyseliny), je možné použít i jiné rozpouštědlo. Je-li třeba použít nevodné rozpouštědlo, je volba závislá hlavně na vlastnostech vzorku.

Rozpouštědlo vhodné pro izotachoforézu v kapilárním uspořádání musí splňovat tyto požadavky:

1. musí mít co nejmenší vodivost,
2. vzorek se v něm musí dostatečně rozpouštět,
3. vzorek v něm musí tvořit nabitě částice.

Nabitě částice může tvořit molekula disociací. V rozpouštědlech, která mají vysokou permitivitu, a ve velmi zředěných roztocích jsou přítomny jen volné ionty, zatímco v rozpouštědlech s nízkou permitivitou je ionizace menší (je v nich více neionizovaných molekul).

### Výběr tlumivého roztoku

Kromě vodícího iontu má význam i protiion tlumivého roztoku. Při jeho volbě musíme mít na zřeteli hlavně tyto faktory:

a) Nejdůležitější funkcí protiiontu je jeho tlumivá schopnost s dostatečnou tlumivou kapacitou ke stabilizaci a regulaci pH v různých zónách.

b) Funkcí protiiontu je zachování elektroneutality v každé zóně. Protiionty se mohou využít i k tvorbě komplexů se vzorkem. Tím ovlivní vhodným způsobem efektivní pohyblivosti některých separovaných složek.

c) V případě, že se k detekci používá UV-detektor, volí se tlumivé protiionty z hlediska absorpce ultrafialového záření tak, aby měly minimální nebo nulovou absorpci.

### Volba pH vodícího elektrolytu

Zvolit správně pH vodícího elektrolytu je důležité zvláště tehdy, když probíhá separace iontů podle hodnot  $pK$ . Všeobecně se pH volí tak, aby se získaly co největší rozdíly v efektivních pohyblivostech. Určitým omezením je však skutečnost, že když se pH v dané zóně liší více než o dvě jednotky od hodnoty  $pK$  iontů v zóně, potom potenciál vzroste nad maximálně přípustnou hodnotu napětí, kterou může zdroj napětí dodat. Maximální tlumivé kapacity se dosáhne tehdy, když platí  $(pK + 1) > pH_{zóny} > (pK - 1)$ .

## Volba vodicího a zakončujícího elektrolytu

Výběr vodicího a zakončujícího elektrolytu se řídí především skutečností, že vodicí ion musí mít největší a zakončující nejmenší efektivní pohyblivost. Dalším požadavkem je, aby oba elektrolyty byly velmi čisté. Malé množství nečistot v zakončujícím elektrolytu, které mají vyšší pohyblivost než ionty terminátoru, budou migrovat přes přecházející zóny a vytvoří zóny nečistot. Podobně nečistoty ve vodicím elektrolytu budou zůstávat vzadu tehdy, budou-li jejich efektivní pohyblivosti menší než pohyblivost vodicího iontu. Na druhé straně nečistoty v terminátoru s pohyblivostí menší než pohyblivost zakončujícího iontu a nečistoty ve vodicím elektrolytu s vyšší pohyblivostí než pohyblivost vodicího iontu neovlivňují separaci.

### Odchytky vlivem přítomnosti iontů $H^+$ a $OH^-$ v tlumivém systému

Odchytky v tlumivém systému je možno očekávat hlavně při nízkých hodnotách pH při separaci kationtů a v případě vysokých hodnot pH při separaci aniontů. V takových případech jsou ionty  $H^+$ , resp.  $OH^-$  přítomny v tak velkém množství, že mohou vést elektrický proud. Za těchto okolností už neplatí izotachoforetická podmínka a výsledkem je typ zónové elektroforézy.

## 9.5.2 Optimalizace separačního procesu

Optimalizační procesy se řídí především správnou volbou tří parametrů, které na sobě celkem nezávisí. Jsou to:

- elektrický proud,
- společný protiion,
- pH vodicího elektrolytu.

Při hledání optimálních podmínek izotachoforetické separace látek je třeba kromě volby vhodného systému elektrolytů uvažovat ještě další faktory, jako jsou čas potřebný k analýze, separační kapacita a separační účinnost.

a) Čas analýzy je nepřímo úměrný intenzitě použitého elektrického proudu. Kromě této závislosti je čas rozlišení<sup>1)</sup> komplexní funkcí koncentrace a pH vodicího elektrolytu, jakož i injektovaného množství vzorku a iontových pohyblivostí. Pro daný vzorek a daný elektrolytický systém je délka rozlišení<sup>2)</sup> nezávislá na proudové

<sup>1)</sup> Čas rozlišení je daný poměrem délky zóny měřené složky a rozdílu rychlostí pohybu rozhraní. Například jestliže složka A migruje mezi vodicím elektrolytem L a složkou B, je čas rozlišení  $t_r$ :

$$t_r = \frac{l_A}{v_{L/A} - v_{A/A+B}}$$

kde  $l_A$  je délka zóny složky A,  $v_{L/A}$  – rychlost pohybu rozhraní složky A a vodicího elektrolytu L,  $v_{A/A+B}$  – rychlost pohybu rozhraní zóny A mezi složkou A a B.

<sup>2)</sup> Délka rozlišení je dráha potřebná k úplnému rozlišení složky A do zóny délky  $l_A$  za daných separačních podmínek.

hustotě a lze z ní vypočítat kapacitu kolony. Ze závislosti mezi časem potřebným k analýze a elektrickým proudem vyplývá, že je snaha intenzitu elektrického proudu maximalizovat. Je třeba zvolit takovou hodnotu elektrického proudu, aby čas analýzy byl sice minimální, ale aby se současně nezmenšila přesnost analýzy. Intenzita elektrického proudu nemá vliv na separační účinnost ani na kapacitu<sup>1)</sup>.

b) Vlastnosti společného protiproudu, zvláště jeho pohyblivost, ovlivňující především účinnost separačního děje. Správná volba protiproudu se přímo projeví v čase analýzy, separačním čísle a kapacitě. Separační číslo  $S_A$  látky A je definováno vztahem:

$$S_A = \frac{F}{I} \frac{\partial n_A}{\partial t} \quad (9.4)$$

kde  $F$  je Faradayova konstanta,  $I$  – elektrický proud,  $n_A$  – látkové množství složky A,  $t$  – čas. Hodnoty separačního čísla leží v intervalu 0 až 1. Jsou v podstatě nezávislé na množství vzorku a geometrii separační kolony a ukazují efektivnost separačního procesu.

Pro složku B se separační číslo vypočítá ze vztahu:

$$S_B = \frac{c_B}{c_A} S_A \quad (9.5)$$

kde  $c_A$  a  $c_B$  jsou látkové koncentrace složek A a B ve vzorku.

Účinnost separačního procesu určují vlastnosti směsné zóny, které závisejí na vlastnostech vodícího elektrolytu a na separační kapacitě. Všeobecně platí, že hodnoty pH vzorku a pH vodícího elektrolytu by se neměly velmi lišit.

c) Zvýšení separační kapacity v kapilární izotachoforéze dosáhneme prodloužením kapiláry. Tato úprava však prodlužuje čas analýzy. Limitujícím faktorem je zde maximální napětí, které může dodat použitý zdroj napětí. V praxi však existují i další možnosti zvýšení separační kapacity, např.:

1. hydrodynamickým protiproudem, který se realizuje tak, že se do kolony proti směru migrace zavádí tok vodícího elektrolytu, jenž snižuje rychlost migrace, a tak vlastně zvyšuje separační kapacitu kolony. Tento způsob prodlužuje čas analýzy, ale nezvyšuje napětí,

2. spojením dvou kapilár různého průměru (neprodukuje se velmi čas analýzy a nezvyšuje se napětí),

3. koncentrační kaskádou. Dělicí prostor v separační kapiláře je rozdělen na několik částí, které se na začátku experimentu liší koncentrací vodících iontů,

4. spojením kapilár různého průměru s možností oddělení interferujících složek v předseparační koloně. Toto uspořádání je dosud nejefektivnějším způsobem zvýšení separační kapacity.

Úspěch optimalizačních procesů však závisí na fyzikálně chemických vlastnostech separovaných látek stejně jako na kvalitě jednotlivých parametrů samotného izo-

<sup>1)</sup> Separační kapacita vyjadřuje maximální množství ekvimolární směsi dvou vybraných látek, které za daných pracovních podmínek ještě může být odděleno.



tachoforetického zařízení. Malé rozdíly v iontových pohyblivostech a disociačních konstantách komplikují separační proces. K dosažení uspokojivé separační účinnosti je nezbytné použít separačního postupu při různých podmínkách. Pro spolehlivější interpretaci získaných izotachforeogramů se doporučuje pracovat na zařízeních se dvěma rozdílnými detektory.

Při analýzách komplikovaných mnohasložkových vzorků, resp. soustav, v kterých je hledaná složka proti ostatním ve velmi nízké koncentraci, jsou identifikace a stanovení náročná. Ani po optimalizaci se vždy nedosáhnou uspokojivé výsledky. Nejefektivnějším řešením v takovém případě je použít k analýzám dvoukolonový přístroj s možností částečného oddělení složek v předseparační části a následnou separací vybraného, ne zcela odděleného vzorku.

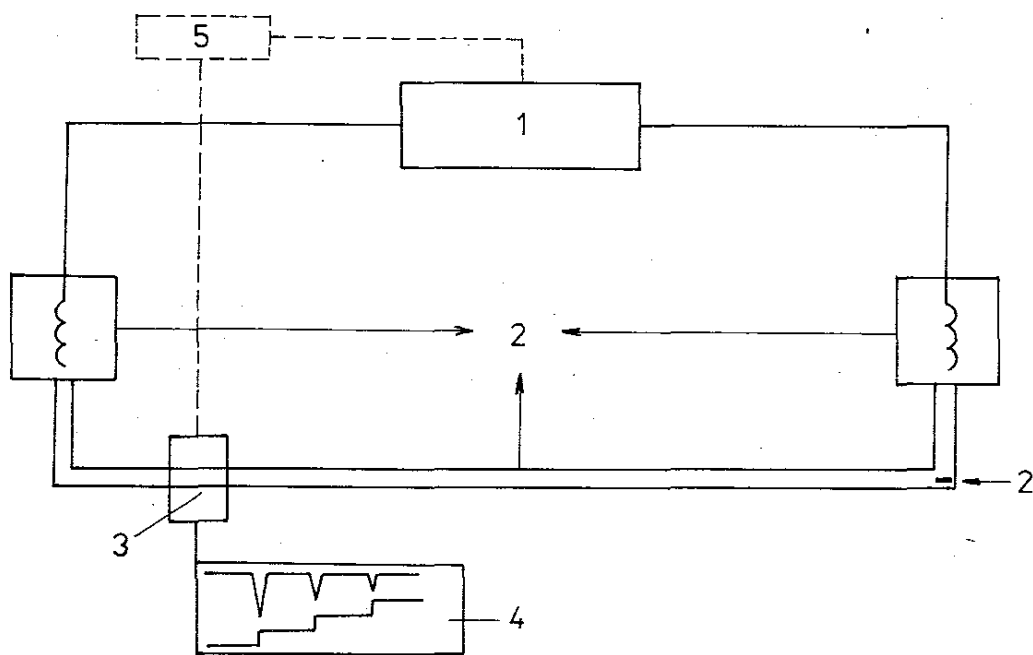
### 9.5.3 Přístrojová technika v kapilární izotachoforéze

Každé zařízení pro izotachoforézu musí obsahovat tyto základní části (obr. 138):

1. Vysokonapěťový zdroj stejnosměrného proudu s možností udržovat jeho konstantní hodnoty. Dnešní zdroje jsou schopné stabilizovat proud do 20 do 500  $\mu\text{A}$  s napětím 16 až 25 kV.

2. Vlastní separační jednotku. Dnes se nejvíce používají polytetrafluorethylenové kapiláry různého vnitřního průměru (0,2 až 1 mm), vhodným způsobem spojené s elektrodovými odděleními a dávkovacím systémem.

3. Detektor, který může být univerzální nebo specifický. Z hlediska vzájemného uspořádání elektrolytu a detektoru může jít o kontaktní nebo bezkontaktní detektory. Do skupiny bezkontaktních detektorů patří teplotní a vysokofrekvenční detektor.



Obr. 138. Blokové schéma uspořádání izotachoretického zařízení

1 – zdroj napětí, 2 – separační jednotka, 2' – dávkování vzorku, 3 – detektor, 4 – registrační zařízení, 5 – řídicí jednotka

Teplotní detektory se pro svou nižší citlivost a rozlišovací schopnost přestaly v izotachoforetických zařízeních používat. Na druhé straně brání širšímu uplatnění vysokofrekvenčních detektorů některé konstrukční problémy. V komerčně vyráběných zařízeních pro kapilární izotachoforézu jsou zabudovány kontaktní detektory (vodivostní, resp. gradientový), popř. kontaktní detektory v kombinaci se specifickým detektorem (UV-detektor, radiochemický, resp. elektrochemický detektor).

4. Registrační zařízení. Používají se různé typy citlivých lineárních kompenzačních zapisovačů, které mohou být spojeny s mikropočítačem pro kvantitativní analýzu.

V některých nejnovějších zařízeních, které mají kromě analytické kolony zabudovanou i předseparační kolonu, je vestavěna ještě řídicí jednotka.

Z konstrukčního hlediska byly vyvinuty dva typy separační jednotky: kompaktní a modulární. Širší uplatnění našel modulární typ separační jednotky. Je variabilnější, protože dovoluje rychlou a jednoduchou zaměnitelnost jednotlivých částí, což je výhodné zvláště při opravách. Na druhé straně má však větší počet spojovacích míst, která mohou být zdrojem nedefinovatelných výtoků roztoků. Těsnost spoju a spolehlivost ventilů dnes nenaráží na vážnější technické problémy. Dávkování vzorků na rozhraní mezi vodící a zakončující elektrolyt je možné uskutečnit pomocí dávkovacích kohoutů nebo mikrostríkačkami. Výhoda dávkovacích kohoutů je v tom, že získané rozhraní mezi elektrolyty a vzorkem je ostré. Na druhé straně je však malá variabilita v dávkovaném objemu. Z tohoto hlediska jsou výhodnější mikrostríkačky, ale při dávkování vzorku tímto způsobem dochází k promíchávání roztoků.

#### 9.5.4 Kvalitativní analýza

Izotachoforetickou analýzou lze získat integrální nebo diferenciální záznam — *izotachoforeogram*. Integrální záznam má stupňový charakter, přičemž výška jednotlivých stupňů je zdrojem kvalitativní informace a je úměrná některé fyzikální veličině, a to podle způsobu detekce. Signál z detektorů při jednotlivých způsobech detekce je úměrný příslušným fyzikálním veličinám:

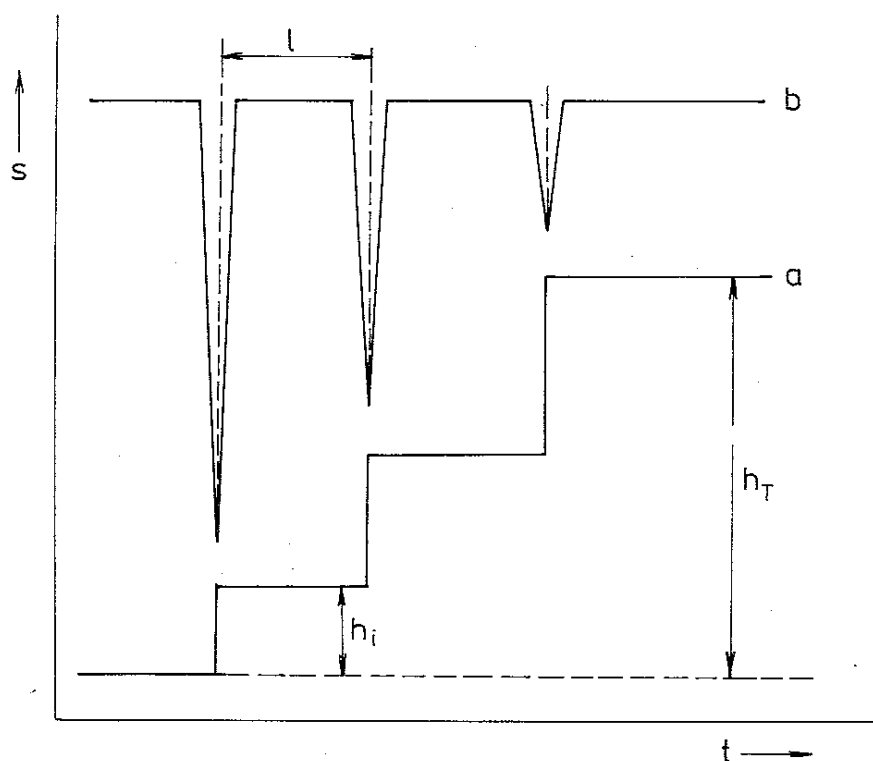
- a) signál z termoelektrického článku je úměrný teplotě v místě měření — zóny;
- b) signál z vodivostního detektoru je úměrný vodivosti elektrolytu v místě měření;
- c) signál z detektoru, kterým se měří potenciálový gradient, je úměrný intenzitě elektrického pole v měřené zóně.

Pro kvalitativní analýzu dosud není vypracován univerzální postup. Významnou roli při identifikaci hraje předběžná informace a znalost o tom, jak v určitých operačních systémech migrují látky, které přicházejí v úvahu. Identifikace zón izotachoforeogramu je ve většině případů založena na porovnávání charakteristických konstant *RSH* (relative step height), získaných analýzou vzorku a standardů při stejných podmínkách. Nesouhlasí-li výška zóny standardní látky s výškou zóny vzorku, je možno říci, že standardní látka není ve vzorku přítomná. Při shodě výšek obou zón může být standardní látka přítomná ve vzorku jen s určitou pravděpodobností. Proto je vhodné provádět kvalitativní analýzu ve více operačních systémech.

K určení charakteristické konstanty  $RSH$  se využívá vztah:

$$RSH = \frac{h_i - h_L}{h_T - h_L} \quad (9.5)$$

kde  $h_i$  je výška zóny měřené složky,  $h_T$  – výška zóny zakončujícího elektrolytu,  $h_L$  – výška zóny vodícího elektrolytu. Způsob jejího určení je vidět z obr. 139.



Obr. 139. Izotachforeogram – závislost měřeného signálu  $S$  na čase  $t$

a – integrální záznam,  
b – diferenciální záznam,  
 $h_i$  – výška zóny měřeného iontu od linie vodícího elektrolytu,  $h_T$  – výška zóny zakončujícího elektrolytu od linie vodícího elektrolytu

### 9.5.5 Kvantitativní analýza

Základem vyhodnocení kvantitativní analýzy je vyjádření látkových množství příslušných stanovovaných složek z délek zón na izotachforeogramu. Z teorie izotachoforézy vyplývá, že mezi délkou zóny a látkovým množstvím složky platí přímá úměrnost. Konstanta úměrnosti se liší pro různé složky a rozdílné pracovní podmínky. Pro jednotlivé případy je třeba tyto konstanty vždy stanovit kalibrací nebo výpočtem. To však znamená, že kalibrační údaje získané za určitých pracovních podmínek není možno použít k interpretaci výsledků získaných při jiných pracovních podmínkách. Dnes se používá několik způsobů kvantitativního vyhodnocování izotachforeogramů:

1. *Metoda kalibrační křivky.* Délka zóny  $l$  (obr. 139) je úměrná látkovému množství dávkované látky a je určena koncentrací vodícího elektrolytu. Kalibrační křivka, která se získá experimentálně, se musí pro každou iontovou látku, přítomnou ve vzorku, změřit zvlášť. Linearita závislosti délky zóny na dávkovaném látkovém množství je zároveň i praktickým kritériem úplného rozdělení a správné funkční odezvy detektoru.

2. *Metoda univerzální kalibrační konstanty.* Tuto metodu do izotachoforézy

zavedl Beckers se spolupracovníky. Je založena na definičním vztahu mezi látkovým množstvím  $n$ , dávkovaným objemem  $V$  a koncentrací  $c$ :

$$n = cV \quad (9.6)$$

Po separaci v kapiláře je látkové množství obsažené v zóně délky  $l$ :

$$n = Alc^* \quad (9.7)$$

kde  $A$  je vnitřní průřez kapiláry,  $c^*$  – koncentrace látky v zóně. Kombinací rovnic (9.6) a (9.7) se získá tvar:

$$A = \frac{Vc}{lc^*}, \text{ resp. } \frac{Vc}{l^*c^*} = \text{konst} = K_{\text{kal}} \quad (9.8)$$

kde  $K_{\text{kal}}$  je kalibrační konstanta,  $l^*$  – délka zóny. Z rovnice (9.8) vyplývá, že je-li známa kalibrační konstanta, je možno vypočítat koncentraci iontové látky v analyzovaném vzorku z délky zóny. Kalibrační konstanta však není konstantou pro všechny systémy. Odchytky některých faktorů, jako je teplota, proud a koncentrace vodícího elektrolytu, způsobují různou délku zóny pro stejná látková množství v různých systémech. Největším problémem při této metodě je určit správnou hodnotu látkové koncentrace iontové látky  $c^*$  v zóně. Pro její výpočet je třeba znát efektivní pohyblivosti iontů a jejich absolutní koncentrace v jednotlivých zónách.

3. *Metoda relativních korekčních faktorů.* Tato metoda vypracovaná Bočkem a spolupracovníky spočívá v tom, že korekční faktory svou podstatou reprezentují relativní kalibrační údaje, pomocí kterých se soubor délek zón z izotachoforeogramu přepočte na látková množství příslušných složek.

Korekční faktor dané složky  $D_{i,r}$  je charakterizován jako délka zóny složky  $l_i$  připadající na 1 mol této složky, která se vztahuje na analogické veličiny vhodně zvolené referenční složky  $r$  analyzované společně se složkou  $i$ :

$$D_{i,r} = \frac{l_i/n_i}{l_r/n_r} \quad (9.9)$$

Takto určený korekční faktor  $D_{i,r}$  je funkcí jen složení vodícího elektrolytu a teploty. Nezávisí na geometrii kolony, velikosti elektrického proudu a hydrodynamickém protiproudu. Zvolí se referenční látka, potom poměr  $l_r/n_r$  představuje vlastně přístrojovou konstantu  $K$  a pro délku zóny  $l_i$  platí:

$$l_i = KD_{i,r}n_i \quad (9.10)$$

Relativní korekční faktor se prakticky určuje tak, že se připraví soustava složek  $i, j, k$  až  $r$  s koncentracemi  $c_i, c_j, c_k$  až  $c_r$ . Po izotachoforetické analýze směsi se vyhodnotí délka jednotlivých zón  $l_i, l_j, l_k$  až  $l_r$  a podle vztahu (9.10) se vypočítají jednotlivé korekční faktory.

Neznámá koncentrace látky ve vzorku se potom určí technikou vnitřního standardu. K definovanému vzorku  $V_x$  obsahujícímu složku  $x$  o koncentraci  $c_x$  se přidá

definovaný objem  $V_s$  vhodného standardu s o koncentrací  $c_s$ . Po smíchání budou koncentrace  $c'_x$  a  $c'_s$  dané vztahem:

$$c'_x = \frac{c_x V_x}{V_x + V_s} \quad (9.11)$$

$$c'_s = \frac{c_s V_s}{V_s + V_x} \quad (9.12)$$

Po dávkování vhodného množství látky získané soustavy se na izotachforeogramu získají délky zón  $l'_x$  a  $l'_s$ . Neznámá koncentrace složky ve vzorku se vypočítá zavedením  $c'_x$  a  $c'_s$  do vztahu (9.9):

$$c_x = \frac{D_{s,r} l'_x V_s}{D_{x,r} l'_s V_x} c_s \quad (9.13)$$

Výhodou této techniky je, že nemusíme znát injektované množství směsi (vzorek + standard). Analyzovaná a standardní látka jsou separované v průběhu jedné analýzy. Jak vyplývá z uvedeného, vnitřním standardem musí být látka, která není přítomná v analyzovaném vzorku.

Správná aplikace analytických separačních metod je velmi důležitá v běžné technické i výzkumné praxi. Vysoké požadavky průmyslové praxe jsou kladeny na analytickou chemii při sledování kvality vyráběných produktů, a to jak při jejich finálním hodnocení, tak i v průběhu výroby při mezioperačních kontrolách. Nečistoty nebo různá aditiva přidávaná do výrobků (stabilizátory, antioxidantiva apod.) jsou přítomny ve velmi nízkých koncentracích, přičemž substrát, v němž se vyskytují a mají být stanoveny, může tvořit plyny, páry, aerosoly, kapaliny, tuhé sypké i tuhé celistvé materiály (plasty apod.).

Další velkou oblastí požadující stopovou analýzu anorganických i organických látek je oblast toxikologie a životního prostředí. Značná část toxikologických analýz a analýz vyžadovaných v souvislosti s kontrolou životního prostředí zjišťuje látky o velmi nízkých koncentracích. I když analytická chemie nemůže sama o sobě přispět ke snižování kontaminace životního prostředí toxickými a jinak závadnými látkami, je východiskem pro posouzení okamžitého stavu a výchozím bodem pro následná rozhodnutí a opatření. Jedině spolehlivé a objektivní analytické výsledky mohou ukázat na stupeň znečištění a dát podklady pro způsoby likvidace. V konečné fázi jsou analytické výsledky nutným předpokladem pro hodnocení účinnosti čisticích procesů. V oblastech toxikologické analýzy jsou výsledky analytických měření rozhodujícími údaji při hodnocení kvality výrobků, ať již průmyslového zboží, či potravinářských a farmaceutických produktů. Všude tam jsou koncentrace sledovaných složek velmi nízké, pohybující se v množstvích tisícín až stotisícín procenta. Výsledky analýz musí být spolehlivé, neboť závažná rozhodnutí učiněná na jejich základě mohou mít značné ekonomické důsledky.

Kromě vlastního analytického zpracování vzorků jsou výsledky značně ovlivňovány i způsobem odběru vzorků a jejich dalším zpracováním před analýzou. I analytická metoda, osvědčená v praxi, poskytující správné a přesné výsledky, nedává ve spojení s nevhodným a nekvalifikovaným odběrem vzorků správné výsledky.

V řadě případů, zvláště pak při stopové analýze, je třeba vzorky před analýzou upravovat. Jde převážně o zkoncentrování hledaných komponent. Například koncentrace složek v imisních vzorcích ovzduší jsou tak nízké, že běžně užívané detektory např. v plynové chromatografii je nezaznamenávají. Bez předchozího obohacení vzorku by nebylo možno analýzu vůbec provést. Přesto však můžeme analyzovat i vzorky, v nichž je koncentrace sledovaných látek  $10^{-8}$  až  $10^{-12}$  mol  $l^{-1}$ , tj. v množstvích pohybujících se v jednotkách ppb. Přepočet jednotek koncentrací uváděných často v odborné literatuře a jejich vzájemný vztah je uveden v tab. 10.1.

Tabulka 10.1 Přepoččet jednotek koncentrací

$\text{g l}^{-1}$ ( $\text{kg m}^{-3}$ )	$\text{g m}^{-3}$	%	ppm	ppb
1 000		100,00	1 000 000	
100		10,00	100 000	
10		1,00	10 000	
1		0,1	1 000	
1,0		0,01	100	
0,01		0,001	10	
0,001	1	0,000 1	1	1 000
0,000 1	0,1	0,000 01	0,1	100
0,000 01	0,01	0,000 001	0,01	10
0,000 001	0,001	0,000 000 1	0,001	1

Poznámka: Při přepočtu procent je třeba rozlišovat hmotnostní a objemová procenta. V případě přepočtu hmotnostních procent z údajů  $\text{g l}^{-1}$ ,  $\text{g m}^{-3}$  apod. se předpokládá jednotková hustota.

Jednotek ppm a ppb se užívá zejména v americké literatuře, a to pro vyjádření objemového ( $V/V$ ) nebo hmotnostního ( $m/m$ ) zlomku dané látky v soustavě. Zkratka ppm (part per million) vyjadřuje počet dílů složky v  $10^6$  dílech celku, zkratka ppb (part per billion) počet dílů složky v  $10^9$  dílech celku. Tak např. ve vzduchu je 5 ppm ( $V/V$ ) helia, ve vodě bývá 50 až 200 ppm ( $m/m$ ) organických látek. V běžném ovzduší bývá přítomna řada škodlivin ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}$ ) v koncentracích 10 až 100 ppb ( $V/V$ ).

Často je výhodnější vyjádřit tyto koncentrace jako hmotnost dané látky v  $1 \text{ m}^3$  vzduchu či  $1 \text{ m}^3$  vody, u vzduchu vždy za normálních podmínek ( $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $101,3 \text{ kPa}$ ). Pro přepoččet údajů v ppm na koncentrace v  $\text{mg l}^{-1}$  (za podmínky jednotkové hustoty) platí

$$\text{ppm } (m/m) = \text{mg l}^{-1} = \text{g m}^{-3} \quad (10.1)$$

Podobně při přepočtu údajů v ppm na koncentrace v  $\mu\text{l l}^{-1}$

$$\text{ppm } (V/V) = \mu\text{l l}^{-1} = \text{ml m}^{-3} \quad (10.2)$$

Pro přepoččet koncentrací plyných složek vyjádřených jako ppm, resp. ppb ( $V/V$ ) za tlaku  $101,3 \text{ kPa}$  platí:

$$c(\text{mg m}^{-3}) = \frac{c(\text{ppm}) \cdot 273,15}{22,41 \cdot T} \cdot M \quad (10.3)$$

$$c(\mu\text{g m}^{-3}) = \frac{c(\text{ppb}) \cdot 273,15}{22,41 \cdot T} \cdot M \quad (10.4)$$

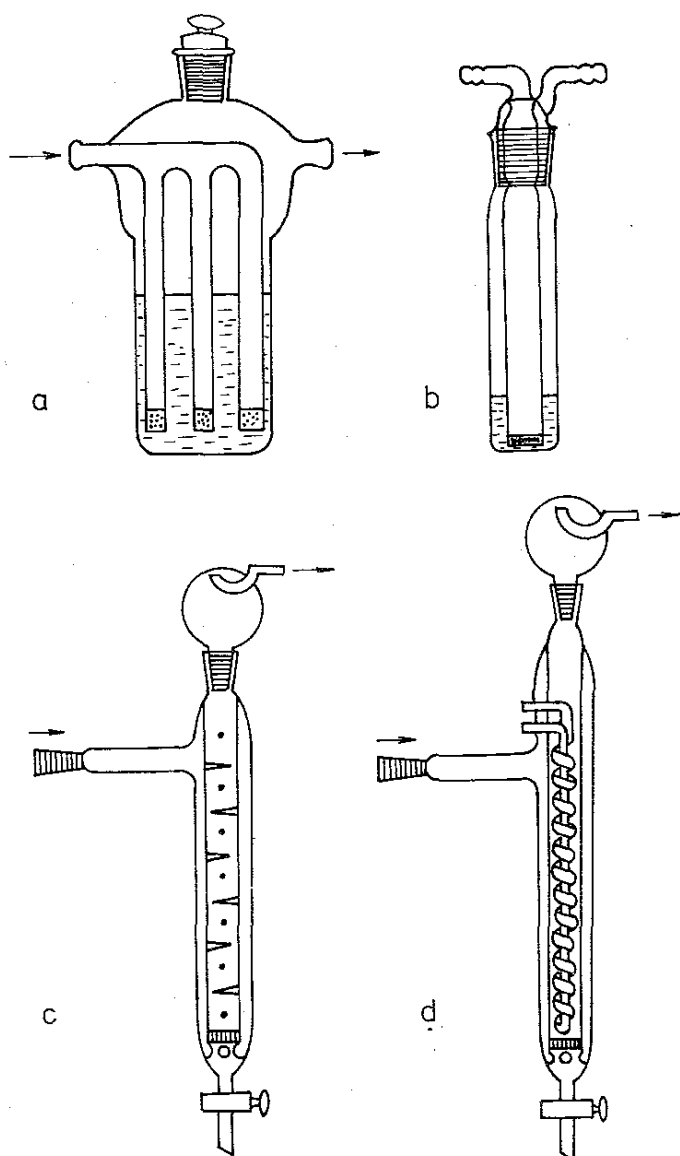
kde  $M$  je molární hmotnost,  $T$  – teplota (v K).

Vzorek je část celku získaná odběrem, která má reprezentovat celek kvalitativně i kvantitativně. Výsledky rozboru každého vzorku jsou přímo závislé na reprezentativnosti vzorku. Velikost vzorku požadovaného k analýze je nepřímo úměrná citlivosti použitých analytických technik a mezi důkazu a stanovitelnosti jednotlivých složek. Je-li systém, který má být analyzován, homogenní, nejsou při odběru vzorků větší problémy. Problematické je odebírání vzorků aerosolů, gelů, pěn, emulzí, koloidních suspenzí i některých biologických materiálů.

Způsob odběru vzorku je dán charakterem systému, ze kterého je vzorek odebírán. Odebrané vzorky mohou v průběhu skladování a přepravy podléhat různým vlivům, které mohou způsobit jak kvalitativní, tak i kvantitativní změny složek. Analýzu je proto třeba provést co nejdříve po odběru.

Největší komplikace nastávají při odběru emisních a imisních vzorků ovzduší. Odebírají se aerosoly, plyny a páry.

1. *Aerosoly*. Jsou to lyofobní koloidní roztoky. Jejich odběr je obtížný, značně komplikovaný a náročný. Aerosoly tvoří dvě základní formy: kouř (tuhé částičky rozptýlené v plynu) a mlhu (kapalina rozptýlená v plynu). Aerosolové částičky mají



Obř. 140. Absorbéry (impingery) pro odběr a zkoncentrování plyných vzorků  
a – impinger pro velké objemy prosávaného vzduchu, b – nejběžnější typ, c – absorpční aparát s fritou a trny, d – absorpční aparát s fritou a temperováním



velikost od 0,01 do 0,1  $\mu\text{m}$ . Při jejich odběru dochází ke značným chybám, které rostou se stoupající rychlostí pohybu částic a jejich velikostí. Pro získání reprezentativního vzorku je nutné odebrat všechny části proudu (např. v potrubí, výduších, komínkách). K odběru se používají impingery různých velikostí a tvarů nebo různé mikrofiltry, vyrobené z esterů celulosy, jež jsou charakteristické tím, že lze při jejich výrobě určit přímo velikost pórů a že lze při zpracování odebraných vzorků snadno rozpustit v organických rozpouštědlech. Při odběru aerosolových vzorků do impingerů je třeba zvolit vhodnou sorpční kapalinu.

2. *Plyny a páry*. Při odběru plynů a par se vyskytuje poměrně velké nebezpečí modifikace odebraného vzorku buď vlivem kvality vzorkovnice (difúze stěnami, okluze apod.), nebo následnou fotochemickou reakcí vzorku přímo ve vzorkovnici. Řada plynů se jímá do odběrových vaků z plastových a kaučukových materiálů. Tyto pružné vzorkovnice umožňují odběry několika desítek litrů vzorku na rozdíl od tuhých, většinou skleněných vzorkovnic, které mají malý objem a vykazují okluzi některých složek na vnitřních stěnách. Při sledování některých par organických látek, např. v ovzduší, lze k odběru použít i absorbérů (impingerů) plněných vhodnou sorpční kapalinou. Některé z typů užívaných v makro- a mikroměřítku jsou znázorněny na obr. 140.

## 10.2 KONCENTRAČNÍ TECHNIKY A ÚPRAVA VZORKŮ

Pro použití obohacovacích postupů existuje řada důvodů. Je-li při daném postupu s přímým dávkováním analyzovaného vzorku a při dané citlivosti analytického přístroje koncentrace sledované látky pod mezí detekce, je nutno sledovanou látku nějakým způsobem nahromadit, zkoncentrovat. Obohacovací techniky se používají i tehdy, je-li koncentrace sledované složky nad mezí detekce, a to proto, že analýza koncentrátu je vždy spolehlivější než analýza původního materiálu. Dalším důvodem je i skutečnost, že stanovovaná látka je doprovázena jinými balastními látkami, které zhoršují nebo znemožňují separaci. Mnohdy se využívá obohacovací techniky při odběru vzorků a jejich transportu do laboratoří, protože se vzorek konzervuje.

Tabulka 10.2. Základní principy obohacovacích postupů

### 1. *Extrakční techniky*

- a) extrakce tuhým látkou (sorbentem)  
zachycení plynného nebo kapalného vzorku v obohacovací trubičce  
desorpce zahřátím nebo rozpouštědlem
- b) extrakce kapalinou (trapping) – odlučovací techniky
- c) extrakce plynem (analýza „head space“)

### 2. *Vymrazovací (kryogenní) techniky*

3. *Metody využívající k zachycení složek chemické reakce*  
– aplikace reakční chromatografie, derivatizační techniky

Obohacování lze charakterizovat efektivním stupněm obohacení ( $\alpha_{ef}$ )

$$\alpha_{ef} = q \frac{c_{i,c}}{c_{i,o}} \quad (10.5)$$

kde  $q$  je poměr objemu koncentráту a původního materiálu,  $c_{i,c}$  – koncentrace stanovované složky  $i$  v koncentráту,  $c_{i,o}$  – koncentrace stanovované složky  $i$  v původním materiálu.

Obohacování složek přítomných v různých vzorcích je možno realizovat v podstatě třemi základními postupy (tab. 10.2):

- extrakcí,
- vymrazením,
- chemickou reakcí.

## 10.2.1 Extrakční techniky

### 10.2.1.1 Extrakce tuhou látkou – sorbentem

Používání tuhých sorbentů má dlouholetou tradici. I když se často při rozbořech plynných vzorků dává přednost absorpci škodlivin ve specifických roztocích v impingerech, spočívá výhoda tuhých sorbentů v rychlém stanovení sorbované složky a v jednoduchém odběru vzorků s jeho snadným uchováním a dopravou do laboratoře. V podstatě jde o extrakční techniku zpracování vzorku (viz dále). Sorbenty se hodnotí podle různých hledisek; mezi základní patří zrnění, specifický povrch, hydrofilní či hydrofobní charakter, polarita, tepelná stabilita a schopnost zpětného uvolnění sorbátu vlivem teploty nebo pomocí rozpouštědel. Tuhé sorbenty se využívají k několika účelům:

- ke zkoncentrování sledovaných látek,
- k jejich přímému stanovení,
- k úpravě vzorku před analýzou.

Sorpční techniky se dají využít jak pro zkoncentrování sledovaných látek z roztoků, tak při zachycování škodlivin z ovzduší.

Techniky využívající nahromadění stopových složek přímo na chromatografické koloně nebo v předkoloně (sorpční trubičce)

Při obohacovacím způsobu přímo na koloně se předpokládá nástřik velkého množství plynného vzorku na kolonu za nízké teploty (teplota se volí tak, aby se plyny tvořící hlavní složku nezachytávaly, ale aby se sledované komponenty, jako jsou páry organických rozpouštědel apod., sorbovaly). Po zachycení sledovaných látek se spustí rychlý teplotní program a analyzuje se zachycený podíl. K dobré separaci na chromatografické koloně plněné adsorbentem přispívá i mechanismus frakční destilace. U této techniky lze rozlišit dvě alternativy:

- a) jednorázový nástřik většího množství vzorku,
- b) kontinuální průchod analyzovaného vzorku ochlazenou kolonou a periodické uvolnění depozitu zahřátím kolony.

U techniky sorpce v předkoloně se využívá principu nahromadění stopových složek, které se po zachycení desorbují buď zahřátím předkolony a vypláchnutím koncentrátu do chromatografické kolony, nebo extrakcí kapalinou a analýzou extraktu v koloně.

Zkoncentrování složek v předkoloně můžeme realizovat dvojím způsobem, a to konzervačním (totálním) záchytem anebo ekvilibrační technikou. Obohacení na předkoloně či v sorpční trubičce je založeno na vysokých hodnotách distribuční konstanty mezi sorbentem a plynnou fází. Při prosávání plynného vzorku obohacovací trubičkou dochází k frontální chromatografii. Oba tyto koncentrační způsoby vyžadují znalost parametrů frontální zóny, rozsah posunu složek a rozsah rozmytí při totálním záchytu pro nejslaběji a při použití ekvilibrační techniky pro nejsilněji sorbovanou složku. Rychlost posuvu frontální zóny je dána hodnotou specifického elučního objemu  $V_g$ . Pro zjištění rozmytí zóny je třeba stanovit tzv. průnikový objem, tj. prosátý objem vzorku, při kterém dorazilo čelo zóny ke konci sorpční náplně obohacovací trubičky.

#### Ekvilibrační způsob odběru vzorků

Při tomto způsobu odběru plynná směs prochází obohacovací trubičkou tak dlouho, dokud čelo frontální zóny nejsilněji sorbované složky neopustí sorpční náplň. Proporce stanovovaných složek v sorbentu jsou úměrné nejen jejich koncentracím v původním vzorku, ale závisejí i na jejich distribučních konstantách v daném systému. K výpočtu není v tomto případě nutné znát množství prosátého plynného vzorku, ale je třeba znát hmotnost sorbentu v obohacovací trubičce a distribuční konstantu, popř. specifický eluční objem stanovované složky v daném systému při teplotě vzorkování.

#### Převedení složek zachycených v obohacovací trubičce do chromatografu

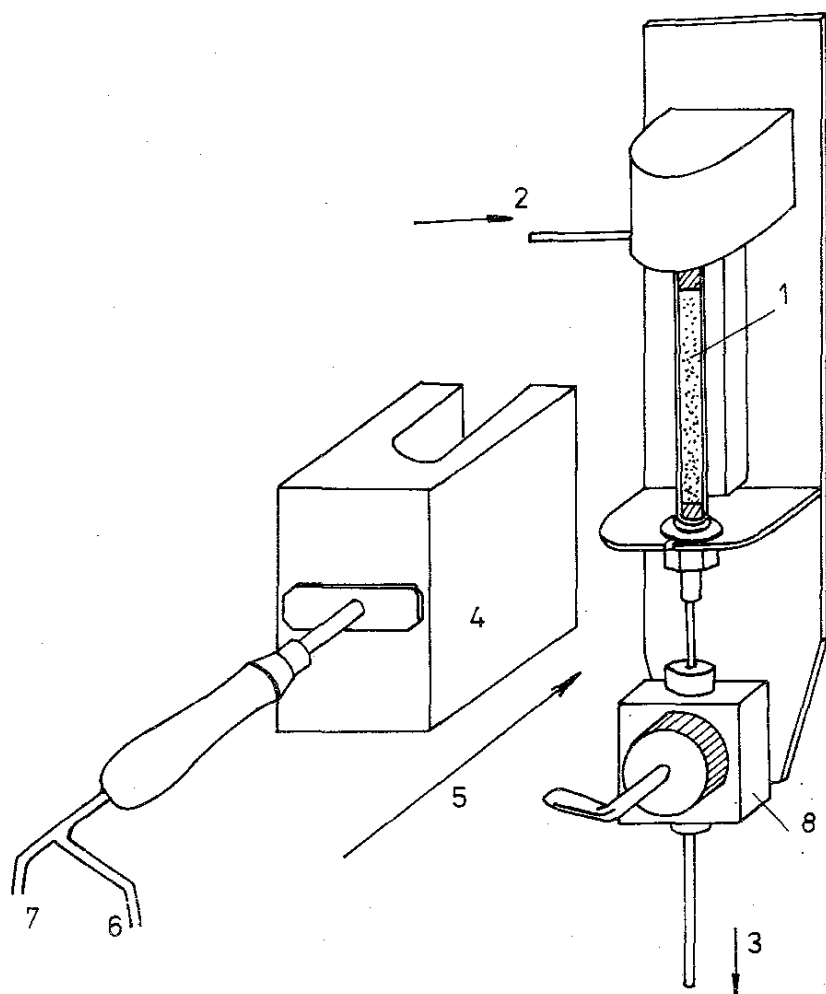
##### *Desorpce teplem*

Obohacovací trubička je ve vhodném zařízení (obr. 141) zahřáta silným teplotním nárazem na teplotu, při níž dochází k desorpci zachycených látek a jejich převedení proudem nosného plynu do chromatografické kolony. Maximální použitelná teplota je dána tepelnou stabilitou sorbentu. Hlavní předností tohoto způsobu je skutečnost, že veškeré zachycené množství je najednou dávkováno do chromatografické kolony.

##### *Desorpce kapalinou*

Jde v podstatě o extrakci sorbovaných složek z obohacovací trubičky vhodným rozpouštědlem. Při tomto způsobu lze pro plynově chromatografickou analýzu vzhledem k dávkovanému objemu využít pouze 0,01 až 0,1 % z celkového množství

desorbovaných složek. Při event. zkoncentrování extraktu odpařením extrakční kapaliny vzniká nebezpečí ztráty složek s nižším bodem varu. Pík rozpouštědla použitého k extrakci může na chromatogramu překrývat i některé menší píky analyzovaných sloučenin. Nástřik extraktu lze na rozdíl od techniky desorpce teplem libovolně opakovat. Hlavní nevýhodou způsobu desorpce kapalinou je to, že dojde ke značnému zředění zachycených složek.



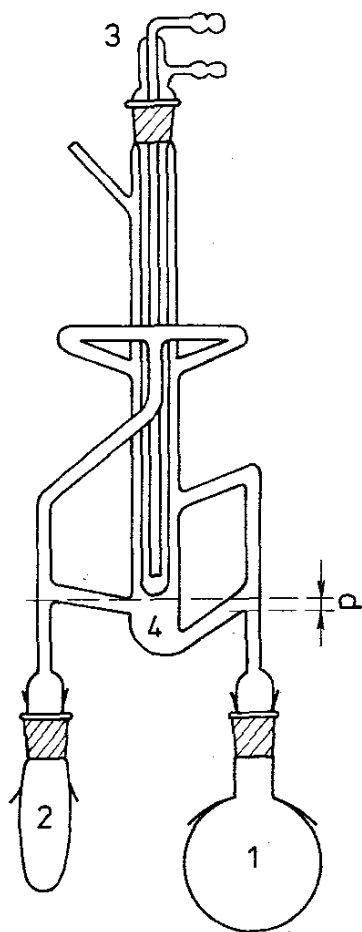
Obr. 141. Zařízení pro desorpci veškerého sorbovaného množství přímo do plynového chromatografu  
 1 – obohacovací trubička,  
 2 – přívod nosného plynu,  
 3 – do chromatograf. kolony,  
 4 – vyhřívaný blok,  
 5 – směr nasunutí bloku,  
 6 – přívod elektrického proudu k topnému tělísku,  
 7 – vývod kabelu od termoelektrického článku,  
 8 – uzavírací ventil

Zajímavou variantou je přímá eluce složek z obohacovací trubičky do kapalinového chromatografu za současného využití změny eluční síly rozpouštědel použitých jako mobilní fáze v průběhu separace.

#### 10.2.1.2 Extrakce kapalinou

Ke zkoncentrování složek jak z plynů, tak i z vodných roztoků lze využít různých rozpouštědel schopných rozpouštět jednotlivé komponenty obsažené v analyzovaném vzorku. V případě analýzy vodných roztoků jde v podstatě o extrakci složek vytřepáváním. V případě plyných vzorků jde o absorpci složek do kapaliny. Tento postup je znám pod pojmem odlučovací (trapping) technika. Zařízením pro odběr vzorků jsou různé absorbéry (impingery) s fritou nebo bez ní, doplněné vhodným čerpadlem a měřicím zařízením (průtokoměrem), pečlivě kalibrovaným. Základní podmínkou je dobrá rozpustnost sledovaných komponent v použitém rozpouštědle a znalost velikosti distribučních konstant v daném systému.

Samostatnou variantou je tzv. extrakčně-destilační způsob obohacení, jenž je využitelný k izolaci a zkoncentrování nepolárních i polárních relativně netěkavých organických látek. Zkoncentrování a izolace spočívá v tom (obr. 142), že vzorek umístěný ve větší destilační baňce (1) destiluje s vodní párou. Páry kondenzují v centrální části aparátů a chladiči, jenž je společný i pro destilující extrakční činidlo.



Obr. 142. Destilačně extrakční aparát (pro extrakční činidla lehčí než voda)  
 1 – baňka se vzorkem (vodný roztok),  
 2 – baňka s extrakčním činidlem lehčím než voda,  
 3 – prstový chladič 4 – centrální část aparátu;  $d$  – diference v rozdílu hladin (1 až 4 mm)

Jak na chladiči, tak v prostoru centrální části aparátů dochází k extrakci. Směsný kondenzát stéká po stěnách chladiče a v dolním prostoru (4) se odděluje těžší vodná fáze od lehčí organické fáze a obě se předem vrací do příslušných destilačních baněk. Účinnost extrakce závisí na výběru extrakčního činidla. Stupeň zkoncentrování (v případě, že se pracuje se vzorkem o objemu 150 až 200 ml a 2 až 4 ml extrakčního činidla) se pohybuje v rozmezí dvou řádů. Použití destilace jako prvního obohacovacího stupně má řadu výhod. Spočívají v tom, že se do extraktu nedostávají extrahovatelné látky, čemuž se při běžném způsobu obohacování extrakcí do koncentrátu nelze vyhnout. Jde např. o vosky, pryskyřice, tuky, detergenty a další. Proto se tento způsob zkoncentrování dobře hodí pro analýzu kontaminantů (pesticidů, fenolů, chlorovaných uhlovodíků). Extrakt se v konečné fázi analyzuje plynovou nebo kapalinovou chromatografií.

### 10.2.1.3 Extrakce plynem – analýza „head space“

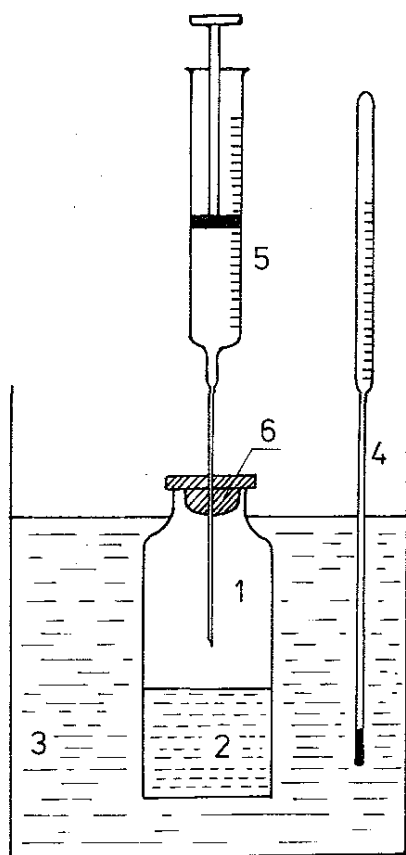
Pro postupy založené na extrakci analyzovaného materiálu plynem s následující chromatografickou analýzou plynného extraktu je užíván název analýza „head space“. Jde v podstatě o plynově chromatografickou analýzu těkavých složek

obsažených v plynné fázi, která je ve styku, zpravidla i v rovnováze, s analyzovanou kondenzovanou fází. Jde o nepřímou metodu analýzy, při níž je obsah dané složky v kondenzované fázi určován podle výsledku analýzy plynné fáze v systému. Při identifikaci složek se neseťkáváme s žádnými problémy, avšak pro kvantitativní analýzu je nutno brát v úvahu vlastnosti analyzovaného systému jako celku, především vlastnosti, které charakterizují systémy plyn–kapalina a plyn–tuhá látka.

Podle způsobu odběru plynné fáze lze rozdělit techniku „head space“ do dvou kategorií:

1. *Statická analýza „head space“*, při níž se analyzuje vzorek plynu odebraný z prostoru nad kondenzovanou fází uzavřeného systému, který je v rovnováze. Při tomto způsobu se koncentrace složek v koexistujících fázích nemění, i když při odběru vzorku plynné fáze dojde k určitému porušení rovnováhy. Stupeň porušení rovnováhy je závislý nejen na způsobu odběru vzorku, ale hlavně na jeho odebraném množství.

2. *Dynamická analýza „head space“*. Při této technice je kondenzovaná fáze kontinuálně extrahována proudem inertního plynu a stanovuje se obsah komponent uvolněných z extrahovaného materiálu. Koncentrace složek však v obou fázích s časem kontinuálně klesá a blíží se asymptoticky nule. I když systém je vlivem stripování (probublávání) plynem neustále vychylován z rovnováhy, předpokládá se, že i za těchto nestacionárních podmínek lze získat kvantitativní výsledky.



Obr. 143. Princip zařízení pro statickou analýzu „head space“

- 1 – prostor plynné fáze nad kapalinou – „head space“,
- 2 – vzorek,
- 3 – termostatovaná lázeň,
- 4 – teploměr,
- 5 – dávkovací stříkačka,
- 6 – pryžové septum

Metodou „head space“ je možno analyzovat jak homogenní kapaliny a tuhé látky, tak i nehomogenní materiály, které mohou být kapalné i tuhé. Tato metoda vznikla a je používána ve spojení s plynovou chromatografií. Schematický náčrt experimentálního uspořádání pro analýzu „head space“ statickým způsobem je na obr. 143.

## Teoretické řešení distribuce složky v systému

Termodynamický popis rovnováhy vychází z rovnosti chemických potenciálů všech složek ve všech fázích. Při teplotě  $T$  a celkovému tlaku  $p$  pro složku  $i$  v systému plyn–analyzovaný materiál (homogenní roztok) platí:

$$(V_i)_p y_i p = \gamma_i (V_i^\circ)_{p_i^\circ} (p_i^\circ)_p x_i \quad (10.6)$$

kde  $(V_i)_p$  je fugacitní koeficient složky  $i$  v plynné fázi při tlaku  $p$ ,  $\gamma_i$  – aktivitní koeficient složky  $i$ ,  $(p_i^\circ)_p$  – tlak nasycených par složky  $i$  při celkovém tlaku  $p$ ,  $(V_i^\circ)_{p_i^\circ}$  – fugacitní koeficient čisté složky  $i$  při tlaku nasycených par  $p_i^\circ$ ,  $y_i$ ,  $x_i$  – látkové zlomky složky  $i$  v plynné a kondenzované fázi. Podle Gibbsovy rovnice platí pro  $(p_i^\circ)_p$ :

$$(p_i^\circ)_p = p_i^\circ \left( \exp \int_{p_i^\circ}^p \frac{V_i^1}{RT} dp \right) \quad (10.7)$$

kde  $p_i^\circ$  je tlak nasycených par složky  $i$ ,  $V_i^1$  – molární objem čisté kapalně složky  $i$ ,  $R$  – plynová konstanta,  $T$  – teplota systému.

Distribuční konstanta složky  $i$  ( $K_i$ ) je dána poměrem látkových zlomků složky v obou fázích při daném tlaku  $p$ :

$$K_i = p \frac{y_i}{x_i} \quad (10.8)$$

Spojením rovn. (10.6) a (10.7) získáme vztah pro termodynamickou distribuční konstantu ( $K_{i,gl}$ ) složky  $i$ :

$$K_{i,gl} = \frac{(V_i)_p}{(V_i^\circ)_{p_i^\circ}} \frac{\exp \left( - \int_{p_i^\circ}^p \frac{V_i^1}{RT} dp \right)}{p_i^\circ \gamma_i} \quad (10.9)$$

Tato distribuční konstanta umožňuje popis distribuce složky mezi plynnou (g) a kondenzovanou (kapalnou, l) fází pomocí termodynamických vlastností systému. Pro látkové zlomky složky  $i$  v obou fázích platí:

$$y_i = \frac{m_{i,g} Z_g RT}{M_i V_g p} \quad (10.10)$$

$$x_i = \frac{m_{i,l} M_1}{M_i V_l \rho_1} \quad (10.11)$$

kde  $M_1$  a  $M_i$  jsou molární hmotnosti kondenzované fáze a složky  $i$ ,  $Z_g$  – kompresibilitní faktor plynné fáze,  $\rho_1$  – hustota kondenzované fáze,  $m_{i,g}$ ,  $m_{i,l}$  – hmotnosti složky  $i$  v plynné a kondenzované fázi,  $V_g$ ,  $V_l$  – objemy fází.

Dosazením vztahů z rovn. (10.10) a (10.11) do rovn. (10.8) získáme vztah vyjadřující závislost distribuční konstanty na vlastnostech reálného systému:

$$K_i = \frac{Z_g \rho_1 RT}{M_1} \frac{m_{i,g} V_l}{m_{i,l} V_g} \quad (10.12)$$

příčemž zlomek  $m_{i,g}V_1/m_{i,l}V_g$  je v podstatě rovněž distribuční konstantou označovanou též jako termodynamická.

Jestliže spojíme rovnice (10.9) a (10.12), získáme pro rovnovážnou konstantu termodynamický rigorózní vztah:

$$K_{i,gl}^* = \frac{(V_i)_p}{(V_i^o)_{p_i}} \frac{Z_g \rho_l RT}{M_l p_i^o \gamma_i} \exp\left(-\int_{p_i}^p \frac{V_i^l}{RT} dp\right) \quad (10.13)$$

Další úpravou tohoto vztahu lze zanedbat vlivy neideálního chování plynné fáze a stlačitelnosti kondenzované fáze a získat vztah používaný k vyjadřování distribuční konstanty složky v chromatografických systémech plyn–kapalina:

$$K_{i,gl} = \frac{\rho_l RT}{M_l p_i^o \gamma_i} \quad (10.14)$$

Z obou posledních vztahů vyplývá, že distribuční konstanta složky  $i$  v systému je funkcí jak teploty a tlaku, tak i složení obou zúčastněných fází. Aplikací Gibbsovy–Duhemovy rovnice je možno tyto závislosti kvantitativně popsat.

Pro rychlost extrakce vyjadřovanou v časové změně hmotnosti složky  $i$  v systému byla odvozena rovnice:

$$\frac{dm_i(t)}{dt} = -m_i(t) \frac{F_m}{V_g + K_{i,gl} V_1} \quad (10.15)$$

jejímž řešením pro počáteční podmínky  $t = 0$ ,  $m_i(t) = m_i$  byl získán výraz:

$$\frac{m_i(t)}{m_i} = \exp\left(-\frac{F_m t}{V_g + K_{i,gl} V_1}\right) \quad (10.16)$$

kde  $m_i(t)$  je okamžitá celková hmotnost složky  $i$  v systému,  $F_m$  – objemová rychlost (průtok) probublávajícího (stripujícího) plynu,  $m_i$  – počáteční hmotnost složky  $i$  v celém systému.

Důležitou hodnotou při extrakci je poločas extrakce  $t_{1/2}$ , který kvalifikuje podmínky extrakce. Lze ho vyjádřit vztahem:

$$t_{1/2} = \ln 2 \frac{V_g + K_{i,gl} V_1}{F_m} \quad (10.17)$$

Všechny uvedené vztahy platí za předpokladu, že koncentrace složky  $i$  v probublávajícím plynu je při výstupu z kondenzované fáze s ní v rovnováze.

Z praktického hlediska je velmi důležité znát vztah mezi celkovým množstvím stanovované složky v systému a její rovnovážnou koncentrací v plynné fázi ( $c_{i,g}$ ), která je vyjádřena poměrem ( $m_{i,g}/V_g$ ):

$$m_i = c_{i,g} (K_{i,gl} V_1 + V_g) \quad (10.18)$$

Pro výpočet počáteční hmotnosti složky  $i$  v celém systému ( $m_i$ ) je tedy třeba určit dva údaje:

1. hodnotu koncentrace této složky v plynné fázi ( $c_{i,g}$ ), která se stanoví plynově chromatografickou analýzou plynné fáze,



2. hodnotu distribuční konstanty ( $K_{i,gl}$ ). Tu však není zpravidla jednoduché určit [viz rovn. (10.13 a 10.14)].

Existuje však několik způsobů, jak  $K_{i,gl}$  eliminovat. Jedním z nich je metoda standardního přídatku, která za předpokladu, že malý přírůstek složky  $i$ , která je v systému již přítomna, významně neovlivní termodynamické vlastnosti zúčastněných fází, eliminuje celý člen  $K_{i,gl}V_1 + V_g$ . Jestliže hodnoty objemu zúčastněných fází  $V_g$  a  $V_1$  zůstanou v podstatě stejné, stačí stanovit hodnotu  $c_{i,g}$  v původním systému a v systému s obohacenou složkou  $i$ .

Druhá z možností eliminace  $K_{i,gl}$  spočívá ve využití referenčního modelového systému. Za předpokladu, že se připraví modelový systém se známým obsahem složky  $i$  a stejným složením matečného materiálu, jaké má analyzovaný vzorek, je možno opět analytickým zjištěním koncentrací stanovené složky  $i$  v plynné fázi ( $c_{i,g}$ ) eliminovat hodnotu distribuční konstanty.

Podobných výsledků se dosáhne pomocí metody dvou odběrů nebo diskontinuální opakovanou extrakcí.

Tabulka 10.3. Porovnání relativních velikostí ploch pík ( $A_{rel}$ ) získaných při analýze vzorků vody s obsahem organických sloučenin 100 ppm ( $m/m$ )

Sloučeniny	Analýza		
	kapalná fáze	plynná fáze	$A_{rel}$ (plynná fáze)
	$A_{rel}$	$A_{rel}$	$A_{rel}$ (kapalná fáze)
aceton	1	1	1
acetaldehyd	0,37	0,5	1,35
methylacetát	0,58	1,8	3,10
ethanol	0,1	0,15	1,5
ethylether	1,42	13,2	9,3
pentan	1,8	3,5	1,9
benzen	2,3	35,5	15,4

Užitečnost a oprávněnost použití analýzy „head space“ jako metody vedoucí ke snížení meze stanovitelnosti je dokumentována v tab. 10.3, která srovnává relativní plochy pík vzorků vody obsahující vždy 100 ppm každé z uvedených sloučenin, a to při dávkování kapalně a plynně fáze, jež je v rovnováze s kapalinou. Ukázalo se, že např. u ethyletheru a benzenu je obohacení v plynné fázi až desetkrát a vícekrát vyšší.

### 10.2.2 Vymrazovací (kryogenní) techniky obohacování

Princip této obohacovací techniky spočívá v kondenzaci plynů a par z odebíraného plynného vzorku v jímačce za nízkých teplot. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu je kondenzace velkého množství vody spolu se sledovanými složkami,

jež má někdy za následek ucpání jímacího zařízení. Výhodou je jednak neselektivní zachycování komponent, jednak konzervace vzorku včetně snadné dopravy a možnost okamžité analýzy bez jeho další úpravy.

Kvalitu separace, tj. zvýšení rozlišení, je možno dosáhnout použitím teplotního gradientu při tepelné desorpci depozitu do chromatografické kolony, což v podstatě představuje frakční destilaci jednotlivých složek.

Tato kondenzační obohacovací technika je jednou z nejspolehlivějších pro plynné vzorky.

### 10.2.3 Metody využívající chemické reakce – aplikace reakční chromatografie

Jestliže se při zachycování komponent využije i chemické reakce, při níž vznikají další látky specifických vlastností s typickými chromatografickými charakteristikami, mluvíme o aplikaci reakční chromatografii či derivatizační technice. Tato technika se realizuje na stejném principu jako extrakce kapalinou. Do absorbéru (promývačky, impingeru) se vloží jako náplň roztok vhodného činidla. Pro zvýšení selektivity může být užito činidlo, které reaguje pouze s určitou skupinou látek ve vzorku. Tyto látky se zachytí, zatímco ostatní složky směsi odcházejí z absorbéru.

# 14 Cizojazyčné ekvivalenty nejfrekventovanějších výrazů

Studium chromatografie staví před zájemce problém znalosti nejen příslušného jazyka, ale především cizích ekvivalentů běžných termínů. V dnešní době je převážná část prací i monografií zabývajících se chromatografií publikována v některém světovém jazyce, a to především v angličtině, ruštině a němčině. Pro první orientaci v nomenklatuře postačí uvedené termíny, které nejsou v běžných technických slovnících významově správně překládány.

čas retenční	retention time	Retentionszeit, Rückhaltezeit	время удерживания
čelo	front (leading edge)	Front	передний край
čínidlo eluční	eluting solvent, eluent, eluting agent	Elutionsmittel, Eluens	элюирующий агент, ра- створитель для элюиро- вания
dávkovací systém	sample introduction system, sample in- jection system	Probeneinführungs- system	приспособление для ввода пробы, дозирующее устройство
detekce	detection	Nachweis, Detektion	детектирование, детекция
detektor argonový	argon- -ray detector, -ionization detector, beta-ray ionization detector	-Strahlen-Ionisations- detektor, Argon- β-Strahlendetektor	аргон детектор с -излуча- телем, ионизационный де- тектор с -излучателем
detektor elektronového záchytu	electron capture detector, electron attachment detector	Elektroneneinfang- detektor	электронно-захватный де- тектор, детектор с захва- том электронов
detektor ionizační	ionization detector	Ionisationsdetektor	ионизационный детектор
detektor plamenový	flame ionization detector	Flammenionisations- detektor	пламенно-ионизационный детектор, ионизационно- пламенный детектор, де- тектор с пламенной иони- зацией
detektor tepelně vodivostní	thermal conductivity cell, katharometer	Wärmeleitfähigkeits- zelle	ячейка по теплопровод- ности, катарометр
distribuce velikosti pórů	pore-size distribution, pore distribution	Porenverteilung, Porenbereich	распределение размеров пор
effluent	effluent, column effluent	abfliessende Flüssigkeit, Ablauf	вытекающая жидкость, эфлюент
ekvilibrovat	equilibrate (chromato- graphic tank)	äquilibrieren, Gleich- gewicht einstellen (Chromatographie- Kammer)	уравновешивать (хрома- тографическая камера)

eluční (retenční) poměr	retention ratio	Retentionsrate	коэффициент удержива- ния
fingerprint	finger print, characteristic pattern	Fingerprintchromato- gramm, charakte- ristisches Chromato- gramm	характерный хроматогра- фический спектр, отпеча- ток пальцев
fólie	foil	Folie	фольга
chromatografie adsorpční	adsorption chromatography	Adsorptionschromato- graphie	адсорбционная хромато- графия
chromatografie eluční	elution chromatography	Elutionschromato- graphie	элюиционная хроматогра- фия, проявительная хр.
chromatografie frontální	frontal chromatography	Frontalchromato- graphie	фронтальная хромато- графия
chromatografie gelová	gel chromatography, gel permeation chromatography	Gelchromatographie, Gelpermeations- Chromatographie	хроматография на геле, хроматография просачи- вания гелей
chromatografie iontově výměnná	ion-exchange chromatography	Ionenaustausch- chromatographie	ионообменная хромато- графия
chromatografie kapalina–kapalina	liquid–liquid chromatography	Flüssig–Flüssig- Chromatographie	жидко-жидкостная хрома- тография
chromatografie kapalina–tuhá látka	liquid–solid chromatography	Flüssig–Fest- Chromatographie	жидкостнотвердая хрома- тография
chromatografie kapalinová	liquid chromatography	Flüssigkeits- chromatographie	жидкостная хромато- графия
chromatografie kontinuální	continuous chromatography	kontinuierliche Chromatographie	непрерывная хромато- графия
chromatografie papírová	paper chromatography	Papier- chromatographie	бумажная хроматогра- фия, хроматография на бумаге
chromatografie plyn–kapalina	gas–liquid chromatography	Gas–Flüssigkeits- Chromatographie	газожидкостная хромато- графия
chromatografie plyn–tuhá látka	gas–solid chromatography	Gas–Feststoff- Chromatographie	газоадсорбционная хроматография
chromatografie plynová	gas chromatography	Gaschromatographie	газовая хроматография
chromatografie s chemickou reakcí (reakční)	reaction chromatography	Reaktions- Chromatographie	реакционная хромато- графия
chromatografie sloupcová (kolonová)	column chromatography	Säulen- chromatographie	колоночная хромато- графия, хр. на колонках
chromatografie s obrácenými fázemi	reversed phase chromatography	Chromatographie mit umgekehrten Phasen, Chromatographie mit Phasenumkehrung	хроматография с обра- щенными фазами, обратнофазная хромато- графия, обращенно- фазная хроматография
chromatografie srážecí	precipitation chromatography	Fällungs- chromatographie	осадочная хроматография
chromatografie tenkovrstvá (na tenkých vrstvách)	thin-layer chromatography	Dünnschicht- chromatographie	тонкослойная хромато- графия

chromatografie vysolovací	salting-out chromatography	Aussalz- chromatographie	высаливающая хромато- графия, высаливательная хроматография
chromatografie vytěšňovací	displacement chromatography	Verdrängungs- chromatographie	вытеснительный хромато- графический анализ, вытеснительная хр.
chromatopack	chromatopack	Chromatopack, Chromatographie- filterpaket	хроматошак, пачка хро- матографической бумаги
chromatopile (sloh)	chromatopile	Chromatopile, Chromatographie- stapelsäule	хроматошайл хроматографический столбец, хроматографи- ческий штабель
chvostování	tail formation, comet formation, trail formation, tailing (PC, TLC)	Schwanzbildung, Schweifbildung (PC, TLC)	образование хвостов (бумажная хроматогра- фия)
index retenční (eluční)	retention index	Retentionsindex	индекс удерживания
intersticiální objem	interstitial volume	Gasraumvolumen	объем газового поме- щения
kapacitní poměr	capacity ratio	Kapazitätsfaktor	коэффициент емкости колонки
kolona	column	Säule	колонка
kolona kapilární	capillary column	Trennkapillare	капиллярная колонка
kolona náplňová	packed column	gefüllte Säule	насадочная колонка заполненная колонка наполненная колонка набивная колонка
kolona náplňová, kapilární	packed capillary column	gepackte Kapillar- säule	заполненная капиллярная колонка
kolona preparativní	preparation column	präparative Säule	препаративная колонка
komora	chamber	Kammer	камера
měníč iontů	ion exchanger	Ionenaustauscher	ионообменник, ионит
molekulové síto	molecular sieve	Molekularsieb	молекулярное сито
nanášení na tečku	spot, apply (sample)	Auftragen (Probe)	нанести (образец)
nosič	carrier, support	Träger, Träger- material	носитель, твердый носитель
objem čistý	net retention volume	Nettoretentions- volumen	эффективный удержи- ваемый объем, эффектив- ный объем удерживания
objem eluční (retenční)	retention volume	Retentionsvolumen, Rückhaltevolumen	удерживаемый объем, объем удерживания
objem korigovaný	corrected retention volume	korrigiertes Retentionsvolumen	исправленный удержи- ваемый объем, исправ- ленный объем удержи- вания
objem mrtvý	dead volume	Totvolumen	мертвый объем
objem redukovaný	adjusted retention volume	reduziertes Retentionsvolumen	приведенный удержи- ваемый объем, приведен- ный объем удерживания

objem specifický	specific retention volume	spezifisches Retentionsvolumen	удельный удерживаемый объем, удельный объем удерживания
odezva detektoru	detector response	Ansprechvermögen des Detektors	реакция детектора, показания детектора, отклик детектора
patro teoretické pík (křivka) plocha pod píkem	theoretical plate peak peak area, area of the peak	theoretischer Boden Berg, Pík, Peak Bergfläche, Peakfläche	теоретическая тарелка пик площадь пика
plyn nosný	carrier gas	Trägergas, Schleppgas	газ-носитель, проявитель
pohyblivost pojídlo recirkulace	mobility binder, binding agent recycling	Beweblichkeit Bindemittel Umlauf	мобильность связывающее средство циклическая хромато- графия
rozdělovací koeficient	partition coefficient distribution coefficient	Verteilungs- koeffizient	коэффициент распреде- ления
rozlišení	resolution, resolving power	Auflösungsvermögen, Auflösung	размещающая способ- ность, разделительная способность
rozprašovač	sprayer	Sprüher	опрыскиватель, распыли- тель, пульверизатор
rychlost toku	flow rate, flow velocity (gas)	Strömungsgeschwin- digkeit (Gas), Gasmengenstrom	объемная скорость потока (газ)
řada eluotropní	eluotropic series, mixotropic series	eluotrope Reihe, mixotrope Reihe	элюотропный ряд
sběrač frakcí skvrna spřažení	fraction collector spot coupling technique	Fraktionssammler Fleck Kopplungstechnik, Kopplungsmethode	коллектор фракций пятно техника совмещения методов разделения
standard	standard, standard substance, reference substance	Bezugssubstanz, Vergleichssubstanz, Standard, Testsubstanz	эталон, метчик
start	start, starting point, origin	Startpunkt, Start	старт
šmouha (tvorba)	trail formation, comet formation, tail formation, tailing (PC, TLC)	Schwanzbildung (PC, TLC)	образование хвостов (PC, TTC)
šum účinnost	noise efficiency	Rauschen Wirkungsgrad	шум, фон, фоновый сигнал эффективность, коэффи- циент полезного действия
vrstva výška píku (křivky) výškový ekvivalent teoretického patra	layer peak height height equivalent to a theoretical plate	Schicht Berghöhe Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens	слой высота пика высота эквивалентная теоретической тарелке, высота теоретической тарелки

vyvíjení	development	Entwicklung	проявление
vyvíjení dvourozměrné	two-dimensional chromatography	zweidimensionale Chromatographie	двухмерная хроматография
vyvíjení kruhové	radial development, circular chromatography	Rundfilterchromatographie, Zirkularchromatographie, Ringchromatographie	круговая хроматография, циркулярная хроматография
vyvíjení na proužku s klínem	wedge-strip technique	Keilstreifentechnik	метод с клиновидными полосками
vyvíjení opakované	wedge-tip technique multiple development	Mehrfachentwicklung, wiederholte Entwicklung	многократное проявление, повторное разделение, повторная хроматография
vyvíjení sestupné	descending technique	absteigende Entwicklung	нисходящая хроматография
vyvíjení vzestupné	ascending technique	aufsteigende Entwicklung	восходящая хроматография
základní linie	base line	Grundlinie, Nulllinie	нулевая линия
zhášení fluorescence	quenching of fluorescence	Löschen der Fluoreszenz	затухание флуоресценции
zóna	band	Streifen, Zone, Bande	полоса, зона
žlábek	trough	Trog	лодочка

Analytická separace látek zaujímá dnes přední místo ve výčtu frekventovaných analytických metod, používaných jak ve výzkumu, tak i v technické praxi.

Hlavní dominantu v analytické separaci látek tvoří metody chromatografické. Spolu s elektromigračními metodami — elektroforézou a izotachoforézou — představují dnes nejrozšířenější a nejužívanější analytické metody.

Základy chromatografie položil nesporně počátkem tohoto století ruský botanik M. S. Cvet, který jako první rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva. Téměř o půl století později se objevily zásadní práce z papírové a v padesátých letech i plynové chromatografie. Prvé práce z elektroforézy se objevily v roce 1937 a teprve v sedmdesátých letech byl Martinem a Everaetsem položen základ izotachoforézy. V roce 1952 obdrželi Martin a Synge za své práce z oboru chromatografie Nobelovu cenu. Bylo to spravedlivé uznání jejich průkopnické práce. Vždyť chromatografie a elektroforéza daly podnět k rozvoji dalších oborů. Urychlily nebývalou měrou zásadní výzkum v biochemii a medicíně, otevřely nové oblasti biologie a umožnily převést organickou syntézu včetně makromolekulární na kvalitativně novou bázi.

I Československo přispělo významnou měrou k rozvoji téměř všech chromatografických a elektroforetických metod. Bylo to především založení laboratoře pro analýzu plynů, později převedené do samostatného Ústavu analytické chemie ČSAV v Brně. Jeho činnost vycházela z průkopnických prací Janákových, který se v 50. letech zabýval analýzou plynů v chromatografickém systému plyn–tuhá látka. K výraznému rozšíření a využití chromatografie nejen u nás, ale i ve světě přispěla rozsáhlá monografie o papírové chromatografii Haise a Macka.

Rozsah působnosti chromatografických, elektroforetických a dalších separačních metod z hlediska aplikace na separaci organických, ale i řady organokovových a anorganických sloučenin je velmi široký a pokrývá látky o různých relativních molekulových hmotnostech od plynů až po živé buňky, jak je znázorněno v tab. 1.2.

Všechny moderní metodiky jsou charakterizovány snahou o rozvoj analytických mikro- až submikrometod a o rozvoj přístrojové techniky zahrnující v sobě i robotizační prvky, jež se týkají automatického dávkování, sběru, zpracování a interpretace dat s využitím přímého spojení přístrojů s počítačem, který vnáší do technické i funkční úrovně novou kvalitu.

Metody analytické separace se uplatňují v oblasti stopové až ultrastopové a strukturní analýzy, analýzy vysokých obsahů a selektivní analýzy mnohasložkových soustav. Ve všech těchto oblastech je pozornost zaměřena na optimalizaci postupů a robotizaci na sebe vzájemně navazujících operací zasahujících od přípravy vzorku k analýze přes jeho další zpracování (extrakci, izolaci, předseparaci atp.) až po vysokoúčinnou chromatografickou techniku spojenou s automatickým vyhodnocením a záznamem.

V současné etapě vědeckotechnického pokroku nabývají výsledky poskytované analytickou chemií rozhodujícího významu, neboť jsou často podkladem zásadních rozhodnutí. Kromě průmyslu — a nejen chemického — je značný tlak na analytickou chemii vyvíjen i z tzv. sekundární sféry, z oblasti státní správy např. Státní technickou inspekcí ochrany ovzduší, hydrometeorologickými ústavy, inspektoráty kontroly



případem je strukturální selektivita, kdy jsou látky děleny podle rozdílů ve tvaru molekuly. Někdy jsou tyto rozdíly malé, např. u *cis*- a *trans*-izomerů nebo u optických izomerů, ale existují separační metody, které jsou schopny tento typ izomerů selektivně dělit.

*Rozsah použitelnosti* charakterizuje schopnost separační metody dělit určitý typ vzorku vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem složek. Z tohoto hlediska můžeme separační techniku označit jako vhodnou pro separaci atomů, molekul nebo makromolekul, popř. vhodnou pro separaci látek těkavých nebo netěkavých.

*Frakcionační kapacita* udává maximální počet složek, který může být rozdělen v jediné operaci. Například jednoduchá extrakce může rozdělit vzorek na dvě části, plynová chromatografie na kapilárních kolónách na několik set píků. V prvním případě je frakcionační kapacita dvě, v druhém několik set.

Separační metody lze dále charakterizovat maximálním množstvím vzorku, které jsou schopny rozdělit v jediné operaci, nebo rychlostí, jakou se separační proces uskuteční. Tyto parametry většinou nejsou nezávislé a úzce souvisí s obtížností dělení, se složitostí vzorku atd.

Separačních metod je značné množství, ale ty nejdůležitější lze zařadit do dvou velkých skupin:

1. metody založené na rozdílech v rovnovážné fázové distribuci složek;

Tabulka 1.3. Separační metody založené na fázových rovnováhách

plyn – kapalina	plyn – tuhá látka	kapalina – kapalina	kapalina – tuhá fáze
destilace	sublimace	extrakce	srážení
pěnové dělení	separace na molekulových sítích	kapalinová rozdělovací (partiční) chromatografie	frakční krystalizace
plynová rozdělovací (partiční) chromatografie	plynová adsorpční chromatografie	gelová permeační chromatografie	separace na molekulových sítích zonální tavení kapalinová adsorpční chromatografie iontově výměnná chromatografie

Tabulka 1.4. Separační metody založené na rozdílech v rychlosti migrace

přes polopropustnou membránu	v silovém poli
ultrafiltrace	elektroforéza
obrácená osmóza	termodifúze
dialýza	ultracentrifugace
elektrodialýza	hmotnostní spektrometrie
	frakcionace tokem (FFF)
	izotachoforéza

v některé fázi, nejčastěji vodné, tvoří extrahovaná částice více forem, vyjadřuje rovnovážný stav tzv. *rozdělovací (distribuční) koncentrační poměr*  $D_c$

$$D_c = \frac{c_{A,org}}{c_{A,aq}} \quad (2.9)$$

Rozdíl mezi  $K_D$  a  $D_c$  můžeme vysvětlit např. na extrakci pyridinu (slabé jednosytné zásady B) z vodné do organické fáze. Zatímco rozdělovací konstanta určuje poměr aktivit (resp. koncentrací) pyridinu (jako báze) v obou fázích

$$K_D = \frac{[B]_{org}}{[B]_{aq}} \quad (2.10)$$

určuje  $D_c$  poměr *celkových* rovnovážných koncentrací pyridinu v obou fázích. Pokud v organické fázi nedochází k žádné vzájemné interakci mezi molekulami B, je  $c_{B,org} = [B]_{org}$ . Ve vodné fázi se však může B protonizovat, takže  $c_{B,aq} = [B]_{aq} + [HB]_{aq}$ . S použitím vztahu (2.10) a vztahu pro protonizační konstantu pyridinu ( $\beta_{H1} = [BH^+]_{aq}/[B]_{aq}[H^+]_{aq}$ ) získáme pro  $D_c$  pyridinu vztah

$$D_c = \frac{[B]_{org}}{[B]_{aq} + [BH^+]_{aq}} = K_D (1 + \beta_{H1}[H^+]_{aq})^{-1} \quad (2.11)$$

Tedy obecně  $K_D \neq D_c$ .

Zde je třeba upozornit, že  $K_D$  je definována pro přechod složky z vodné (polární) do organické (méně polární) fáze. V kapalinové rozdělovací chromatografii (LLC) s normálním poměrem fází (mobilní fáze je méně polární než stacionární fáze) má hodnota  $K_D$  používaná např. ve vztahu pro  $V_R = f(V_m, V_s)$  převrácenou hodnotu rozdělovací konstanty pro extrakci.

## 2.2 EXTRAKCE TUHÉ LÁTKY KAPALINOU

Používá se nejčastěji k izolaci jedné nebo více složek z přírodního materiálu nebo z technických produktů. Extrahuje se obvykle v přístroji, v kterém se jednoduchým způsobem realizuje opakovaná extrakce, aby výtěžek izolace byl co největší. Materiál, z něhož složku extrahujeme, se musí obvykle rozmělnit. Rozpouštědlo volíme tak, aby se v něm co nejselektivněji rozpouštěla složka, kterou chceme izolovat. Je výhodné, má-li použité rozpouštědlo nízký bod varu, aby je bylo možno odstranit destilací od izolované složky, aniž by došlo k jejím ztrátám těkáním. Nejčastěji používaným přístrojem pro extrakci tuhé látky kapalinou je Soxhletův extraktor nebo extraktor podle Twisselmana. Jejich funkce je podobná a lze ji objasnit na příkladu izolace tuku z olejniny (semene).

Vzorek olejniny se rozmělní a naváží se do tvarovaného papírového zásobníku (tzv. patrony), který se uzavře vatou, zbavenou extrahovatelných složek. Zásobník se vzorkem se vloží do střední části extraktoru, která se nasadí na varnou baňku s vhodným rozpouštědlem (např. hexanem, petroletherem). Na střední část se nasadí

kteřá vznikla kombinací rovnic (6.6) a (6.7). Integrací rov. (6.8) se pro  $u_o$  získá rovnice:

$$u_o = \frac{B}{\varepsilon_T \eta L} \frac{p_v^2 - p_o^2}{2p_o} \quad (6.9)$$

z které lze úpravou získat:

$$u_o = \frac{B}{\varepsilon_T \eta L} \frac{\bar{p}}{p_o} (p_v - p_o) \quad (6.10)$$

protože pro malé tlakové spády je střední tlak v koloně aritmetickým průměrem [ $\bar{p} \approx (p_v - p_o)/2$ ]. Index  $v$  označuje vstup do kolony.

Pro větší tlakové spády je možno střední tlak v koloně zjistit z rovnice:

$$\bar{p} = \frac{\int p \, dl}{\int dl} \quad (6.11)$$

Kombinací rov. (6.8) a (6.11) se získá:

$$\bar{p} = \frac{\int p^2 \, dp}{\int p \, dp} \quad (6.12)$$

Integrací rov. (6.12) v hranicích  $p_o$  až  $p_v$  dostaneme vztah pro střední tlak:

$$\bar{p} = \frac{2}{3} \frac{p_v^3 - p_o^3}{p_v^2 - p_o^2} \quad (6.13)$$

Úpravou rov. (6.13) se získá vztah mezi středním tlakem ( $\bar{p}$ ) a výstupním tlakem ( $p_o$ ):

$$\bar{p} = \frac{p_o}{j} \quad (6.14)$$

kde  $j$  je kompresibilitní faktor [rovn. (4.14) v odd. 4.2]. Z Boylova zákona a rov. (6.14) vyplývá vztah pro střední lineární rychlost toku nosného plynu kolonou:

$$\bar{u} = u_o j \quad (6.15)$$

Zjistilo se, že střed chromatografické zóny nesorbované složky se v koloně pohybuje střední rychlostí toku nosného plynu, kterou je možno vypočítat z rovnice:

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} \quad (6.16)$$

kde  $L$  je délka kolony a  $t_M$  — mrtvý eluční čas.

Specifická permeabilita kapiláry vzrůstá se čtvercem vnitřního poloměru ( $r_c$ ):

$$B = \frac{r_c^2}{8} \quad (6.17)$$

Rychlost toku nosného plynu na výstupu z kapiláry lze vypočítat z rov. (6.9) a (6.17):

$$u_o = \frac{r_c^2}{8\eta L} \frac{p_v^2 - p_o^2}{2p_o} \quad (6.18)$$

Když se plynule zvyšuje teplota v přístroji s konstantní objemovou rychlostí ( $F_m = \text{konst}$ ), zvyšuje se vstupní tlak a rychlost na výstupu z kolony je konstantní:

$$u_o(\text{prog}) = \frac{F_m}{A_m} \quad (6.25)$$

kde  $A_m$  je volný průřez kolonou.

### 6.1.2 Látková bilance solutu v chromatografické koloně

Jedním z úkolů chromatografické teorie je hledání transportní funkce, tj. vztahu popisujícího závislost koncentrace látky v chromatografické zóně na místě a času. Při hledání transportní funkce je třeba zvolit pro chromatografický děj takový model, který je možné matematicky popsat. Hlavním problémem teoretického zpracování chromatografického děje je, že mikroskopickou stavbu pórovitého systému, který představuje náplň v chromatografické koloně, není možno znázornit vhodným modelem. Skutečný systém se proto nahrazuje zjednodušeným makroskopickým modelem a při popisu děje v koloně se nejčastěji vychází z látkové bilance solutu. Modelem, kterým je možno charakterizovat procesy spojené s migrací solutu v plynové chromatografii, je model lineární neideální chromatografie, při kterém se předpokládá, že separační funkce je lineární, rovnováha se ustaluje okamžitě a při migraci se uplatňuje difúze. Zóny se difúzí rozšiřují a rozdělení molekul solutu v zóně je podobné Gaussovu rozdělení chyb. Pro model lineární neideální chromatografie byla odvozena rovn. (3.51), která charakterizuje koncentraci látky na výstupu z chromatografické kolony ( $c_{i,o}$ ) a v plynové chromatografii se uvádí ve tvaru:

$$c_{i,o} = \frac{n_i}{A_m u_o \sigma_t \sqrt{2\pi}} \exp - \left[ \frac{(t - t_R)^2}{2\sigma_t^2} \right] \quad (6.26)$$

kde  $n_i$  je látkové množství solutu v zóně,  $A_m$  – volný průřez kolony,  $u_o$  – lineární rychlost toku plynu na výstupu z kolony,  $\sigma_t$  – směrodatná odchylka zóny v časových jednotkách,  $t$  – čas a  $t_R$  – eluční čas.

V praxi se rovn. (6.26) udává ve tvaru:

$$c_{i,o} = c_{i,\text{max}} \exp - \left[ \frac{(t - t_R)^2}{2\sigma_t^2} \right] \quad (6.27)$$

kde  $c_{i,\text{max}}$  je maximální koncentrace solutu v zóně.

Z odd. 3.3 vyplývá, že rovn. (6.26) a (6.27) popisují chromatografický pík a obsahují údaje, které je možno využít při kvalitativní analýze ( $t_R$ ), kvantitativní analýze ( $c_{\text{ma}}$ ) a hodnocení separační účinnosti chromatografické kolony ( $\sigma^2$ ).

### 6.1.3 Eluční charakteristiky

Základní eluční charakteristiky v kolonové chromatografii jsou uvedeny v kap. 3. Při elučních charakteristikách v plynové chromatografii je třeba mimo faktorů uvedených v této kapitole navíc uvažovat stlačitelnost plynu. Podle realizace

volí tlak 101,325 kPa). Za těchto podmínek a za předpokladu, že i roztok solutu v nosném plynu se chová stavově ideálně ( $f_i = p_i$ ), závisí standardní potenciál  $\mu^\circ(\text{g})$  jen na teplotě a v rovn. (6.38) je možné místo fugacit použít tlaky par solutu:

$$a_i(\text{g}) = \frac{p_i}{p_i^\circ} \quad (6.39)$$

kde  $p_i^\circ$  je tlak par solutu v standardním stavu.

Kombinací rovn. (6.37) a (6.39) se získá pro chemický potenciál rovnice:

$$\mu_i(\text{g}) = \mu_i^\circ(\text{g}, T) + RT \ln \frac{p_i}{p_i^\circ} \quad (6.40)$$

Když se solut v plynné fázi nechová stavově ideálně, je třeba do výpočtu zahrnout i aktivitní koeficient  $\gamma_i(\text{g})$ .

Chemický potenciál solutu rozpuštěného v stacionární kapalině lze charakterizovat rovnicí:

$$\mu_i(\text{l}) = \mu_i^\circ(\text{l}, T, p) + RT \ln a_i(\text{l}) \quad (6.41)$$

kde  $\mu_i^\circ(\text{l}, T, p)$  je standardní chemický potenciál solutu v roztoku, jehož hodnota závisí na solutu, rozpouštědle a volbě standardního stavu,  $a_i(\text{l})$  – aktivita solutu v roztoku (l). Aktivita solutu v roztoku je dána poměrem fugacit:

$$a_i(\text{l}) = \frac{f_i(\text{l})}{f_i^\circ(\text{l})} \quad (6.42)$$

kde  $f_i(\text{l})$  je fugacita solutu v roztoku,  $f_i^\circ(\text{l})$  – standardní fugacita solutu v roztoku.

Protože roztoky solutu v stacionární kapalině jsou velmi zředěné, je výhodné volit následující standardní stav: solut je v standardním stavu, je-li kapalný, o teplotě a tlaku soustavy a chová-li se jako v nekonečně zředěném roztoku v daném rozpouštědle. Nejsou-li roztoky nekonečně zředěné, je třeba počítat aktivitu solutu ze vztahu:

$$a_i(\text{l}) = x_i(\text{l}) \gamma_i(\text{l}) \quad (6.43)$$

kde  $x_i(\text{l})$  je látkový zlomek solutu v roztoku,  $\gamma_i(\text{l})$  – jeho aktivitní koeficient v daném roztoku.

Kombinací rovn. (6.41) a (6.43) se získá vztah pro chemický potenciál solutu v roztoku:

$$\mu_i(\text{l}) = \mu_i^\circ(\text{l}, T, p) + RT \ln x_i(\text{l}) \gamma_i(\text{l}) \quad (6.44)$$

Protože za rovnováhy jsou chemické potenciály pro solut v plynné a kapalně fázi stejné, lze z rovn. (6.40) a (6.44) odvodit rovnici:

$$\frac{p_i}{p_i^\circ x_i(\text{l}) \gamma_i(\text{l})} = \exp \left[ \frac{\mu_i^\circ(\text{l}, T, p) - \mu_i^\circ(\text{g}, T)}{RT} \right] \quad (6.45)$$

z které vyplývá, že distribuční konstanta solutu závisí na teplotě, molární hmotnosti stacionární kapaliny, tlaku nasycených par solutu a jeho aktivním koeficientu v stacionární kapalině. Změnou polaritu stacionární kapaliny lze významně měnit aktivní koeficienty solutu, což umožňuje separovat i takové složky, které mají za daných podmínek stejné tlaky nasycených par. Z rovnice (6.52) je možno s ohledem na definici specifického (měrného) elučního objemu ( $V_g$ ) (viz odd. 4.2) odvodit rovnici:

$$V_g = \frac{K_D \cdot 273,16}{\rho_l T} \quad (6.53)$$

Tlak nasycených par solutu ( $p_i^\circ$ ) a aktivní koeficient solutu v kapalně fázi [ $\gamma_i(l)$ ] (v dalším textu se bude uvádět zjednodušený symbol  $\gamma_i$ ) závisí na teplotě, což umožňuje změnou teploty rozdělit látky, které při dané teplotě eluují současně.

Závislost nasyceného tlaku par na teplotě vyplývá z Clausiovy–Clapeyronovy rovnice:

$$\frac{d \ln p^\circ}{dT} = \frac{\Delta \mathcal{H}_v}{RT^2} \quad (6.54)$$

kde  $\Delta \mathcal{H}_v$  je molární výparná entalpie solutu.

Rovnici (6.54) lze integrovat za předpokladu, že  $d(\Delta \mathcal{H}_v/dT) = 0$ :

$$\ln p^\circ = -\frac{\Delta \mathcal{H}_v}{RT} + C \quad (6.55)$$

kde  $C$  je integrační konstanta.

Aktivní koeficient solutu v roztoku stacionární kapaliny souvisí s molární dodatkovou směšovací Gibbsovou energií ( $\Delta G_{E,i}$ ):

$$\Delta G_{E,i} = RT \ln \gamma_i \quad (6.56)$$

Molární dodatková směšovací Gibbsova energie je dána rozdílem:

$$\Delta G_E = \Delta \mathcal{H}_E - T \Delta \mathcal{S}_E \quad (6.57)$$

ve kterém  $\Delta \mathcal{H}_E$  je molární dodatková směšovací entalpie,  $\Delta \mathcal{S}_E$  – molární dodatková směšovací entropie,  $T$  – teplota.

S ohledem na rovn. (3.23) je možno pro aktivní koeficient napsat vztah:

$$\gamma_i = \gamma_{T,i} \gamma_{A,i} \quad (6.58)$$

kde  $\gamma_T$  je termický a  $\gamma_A$  – atermický aktivní koeficient, pro který platí rovn. (3.24) a (3.25).

Termický aktivní koeficient závisí na tom, jaké jsou energetické rozdíly mezi interakcemi molekul rozpouštědla a solutu. Závisí tedy na intermolekulárních silách a určuje rozdíly v selektivním zbrždění pohybu látek v chromatografické koloně při použití různě polárních stacionárních kapalin.

vážné koncentrace nahradit průměrnými koncentracemi solutu v koloně a Henryho adsorpční konstantu ( $K_s$ ) vyjádřit vztahem:

$$K_s = \frac{\bar{c}_s}{\bar{c}_m} \quad (6.64)$$

kde  $\bar{c}_s$  je střední koncentrace solutu naadsorbovaná v koloně na povrchu adsorbentu, která je dána rovnicí:

$$\bar{c}_s = \frac{n_s}{V_s} \quad (6.65)$$

kde  $n_s$  je látkové množství a  $V_s$  – objem adsorbentu v koloně.

Z rovnice (6.51) je zřejmé, že koncentrace solutu v mobilní fázi je úměrná parciálnímu tlaku ( $p_i$ ), a rovnici (6.64) je možné uvést i ve tvaru:

$$c_{s,i} = k_{s,i}^* p_i \quad (6.66)$$

Rovnice (6.66) platí jen pro adsorbenty s homogenním povrchem a popisuje lineární adsorpční izotermu [srovnej rovn. (6.66) s rovn. (3.1)]. Protože povrchy adsorbentů nejsou homogenní, lineární izoterma platí jen pro velmi malé parciální tlaky solutu v mobilní fázi (viz odd. 3.2.1). Adsorpce je exotermický děj, jehož tepelný efekt lze změřit kalorimetricky nebo ho zjistit z van't Hoffovy rovnice:

$$\frac{d \ln K_A}{dT} = \frac{\Delta \mathcal{H}_a}{RT^2} \quad (6.67)$$

kde  $\Delta \mathcal{H}_a$  je molární adsorpční entalpie,  $K_A$  – adsorpční koeficient charakterizovaný poměrem

$$K_A = \frac{m_a V_m}{A m_m} \quad (6.68)$$

kde  $m_a$  je hmotnost solutu adsorbovaného na povrchu adsorbentu  $A$ ,  $m_m$  – hmotnost solutu v plynné fázi o objemu  $V_m$ .

Při hodnocení adsorpce je důležité uvést, zda se vyjadřuje Henryho adsorpční konstantou nebo adsorpčním koeficientem. V obou případech jsou však těžkosti s definováním standardních stavů.

### 6.1.5 Rozmývání zóny solutu v plynové chromatografii

Teoretické základy, které vysvětlují příčiny rozmývání zóny solutu v chromatografické koloně, jsou shrnuty v odd. 3.3.4. Protože plyn je stlačitelný, rovnice popisující rozmývání zón v plynové a kapalinové chromatografii se liší.

### 6.1.5.2 Rozmývání zón v kapilárních kolonách při izotermické analýze

Kapilární kolony je možno realizovat zachycením stacionární kapaliny, adsorbentu nebo náplně na stěny kapiláry (náplň je stacionární kapalina zakotvená na vhodném nosiči – viz odd. 6.3). Protože kapilární kolony s adsorbentem na stěnách kapiláry jsou v praxi používány zřídka, rozmývání zón v těchto kolonách do tohoto oddílu nezahrneme.

Když se kapalná fáze zakotví na stěny kapiláry s kruhovým průřezem, získá se kapilární kolona, která se v literatuře označuje zkratkou WCOT<sup>1</sup>). Pro tento typ kolon závisí výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) na střední lineární rychlosti toku nosného plynu ( $\bar{u}$ ) např. podle rovnice, kterou odvodil Golay a kterou je možno uvést ve tvaru:

$$H = 2 \frac{D_g^\circ j}{\bar{u}} + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f}{D_1} \bar{u} + \frac{1+6k+11k^2}{24(1+k)^2} \frac{r_c^2}{D_g^\circ j} \bar{u} \quad (6.75)$$

kde  $r_c$  je vnitřní poloměr kapiláry,  $d_f$  – tloušťka filmu kapalné fáze. Význam ostatních symbolů je vysvětlen u rovn. (6.69). Golayovu rovnici lze uvést v zjednodušeném tvaru:

$$H = \frac{B_o j}{\bar{u}} + C_1 \bar{u} + \frac{C_g^\circ \bar{u}}{j} \quad (6.76)$$

Protože v rovn. (6.76) chybí výraz  $A$ , je výškový ekvivalent teoretického patra menší než v plněných kolonách [srovnej rovn. (6.71) a (6.76)].

Když se kapalná fáze zakotví na vhodný nosič a takto získaná náplň se zachytí v tenké vrstvě na vnitřní stěny kapiláry, získá se kapilární kolona, která se v literatuře označuje zkratkou SCOT<sup>2</sup>). Pro tento typ kolon odvodil Golay vztah mezi  $H$  a  $\bar{u}$ , který lze najít v monografiích o kapilární plynové chromatografii. V tomto vztahu jsou mimo faktorů uvedených v rovn. (6.75) zahrnuty i další konstanty, závislé na pórovitosti náplně, povrchu kapalné fáze a povrchu vnitřních stěn kapiláry.

### 6.1.5.3 Rozmývání zóny solutu při programované teplotě

Při zjišťování závislosti rozmývání zóny na rychlosti zvyšování teploty chromatografické kolony při programované teplotě je výhodné využít závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na teplotě zjištěné za izotermických podmínek. Závislost van Deemterovy rovnice na teplotě při izotermické analýze lze vyjádřit vztahem:

$$H(T) = A(T) + \frac{B_o(T)j(T)}{\bar{u}(T)} + \frac{C_g^\circ(T)\bar{u}(T)}{j(T)} + C_1(T)\bar{u}(T) \quad (6.77)$$

<sup>1</sup>) WCOT – Wall Coated Open Tubular.

<sup>2</sup>) SCOT – Support Coated Open Tubular.



b) Kolony s kapalinou zakotvenou na nosiči, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry (typ SCOT). Tloušťka vrstvy náplně je 1 až 5  $\mu\text{m}$ .

c) Kolony s adsorbentem, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry (typ PLOT<sup>1)</sup>). Tloušťka vrstvy adsorbentu závisí na způsobu výroby a může být v rozmezí 0,01  $\mu\text{m}$  až 10  $\mu\text{m}$ .

Kapilární kolony se nejčastěji zhotovují ze skla, taveného křemene a nerezové oceli. Délka kapilárních kolon se volí podle náročnosti separace z rozmezí 10 až 200 m. K separaci velmi složitých vzorků se používají i delší kolony. Vnitřní průměr kapilárních kolon bývá v rozmezí 50  $\mu\text{m}$  až 1 mm.

### 6.3.1 Adsorbenty

Chromatografie plyn–adsorbent je méně používanou variantou plynové chromatografie. Používá se zvláště k analýze plynů, uhlovodíků a jednoduchých derivátů uhlovodíků. Jako adsorbenty je možno použít různé druhy aktivního uhlí, čistý mikropórovitý uhlík, grafitické saze, silikagel, aluminu, molekulová síta a v dnešní době i některé syntetické makromolekulární adsorbenty. Adsorbenty, které se nejčastěji používají v plynové chromatografii, jsou uvedeny v tab. 6.3. Při klasifikaci adsorbentů lze podobně jako při klasifikaci stacionárních kapalin vycházet z Kovatsových elučních indexů modelových látek (viz odd. 6.3.2). Většina adsorbentů se v praxi klasifikuje podobně jako v kapalinové chromatografii (viz kap. 7).

### 6.3.2 Stacionární kapaliny

V chromatografii plyn–kapalina rozhoduje o úspěšnosti separace vzorku stacionární kapalina. Průnik jednotlivých složek vzorku chromatografickou kolonou je zbržděvaný tím víc, čím větší jsou jejich distribuční konstanty.

Stacionární kapaliny používané v plynové chromatografii musí vyhovovat těmto požadavkům:

1. musí dobře rozpouštět separované látky,
2. rozpustnost složek vzorku v těchto kapalinách má být různá,
3. mají mít nízkou těkavost (1 až 10 Pa při pracovní teplotě),
4. musí být teplotně stálé,
5. nesmí reagovat s analyzovanými látkami,
6. mají mít nízkou viskozitu při pracovní teplotě,
7. musí smáčet nosič.

Použitelnost stacionárních kapalin bývá udávána rozmezím pracovních teplot. Dolní hranicí je zpravidla bod tání, horní hranice je dána těkavostí (tlakem par),

---

<sup>1)</sup> Zkratka anglického názvu Porous Layer Open Tubular.