

Teorie chromatografie - I

Veronika R. Meyer – Practical High-Performance Liquid Chromatography, Wiley, 2010

<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470688427>

*Příprava předmětu byla podpořena
projektem OPPA č. CZ.2.17/3.1.00/33253*



Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

Teorie chromatografie

- Chromatografie je separační technika založená na dělení látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní

Přehled chromatografických technik

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Chromatografická technika	Symbol
<i>Plyn</i> Plynová chromatografie	Kapalina	Plynová rozdělovací chromatografie	GLC
	Pevná fáze	Plynová adsorpční chromatografie	GSC
<i>Kapalina</i> Kapalinová chromatografie	Kapalina	Kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
		Gelová permeační chromatografie	GPC, SEC
	Pevná fáze	Kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
		Iontově výměnná chromatografie	IEC
		Iontová chromatografie	IC

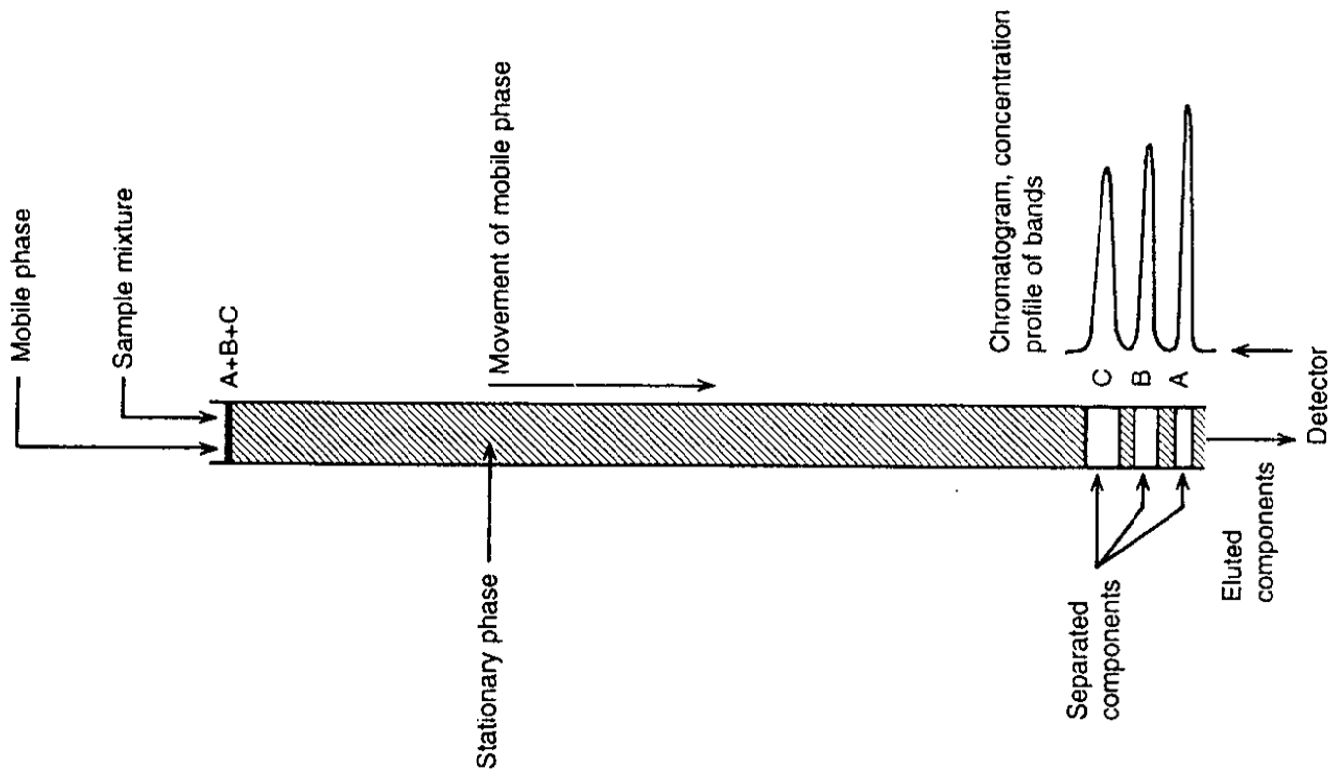
Třídění technik podle formy lože sorbentu:

- Chromatografie sloupcová
- Chromatografie na tenké vrstvě

1. Princip chromatografické separace

Pojmy: Stacionární fáze, mobilní fáze, sorbent, vzorek, složky,
retardace složek

Srovnání šířky zón, jejich postupné rozšiřování - nástřik,
složka A, složka B



Uspořádání chromatografie

1. Frontální chromatografie:

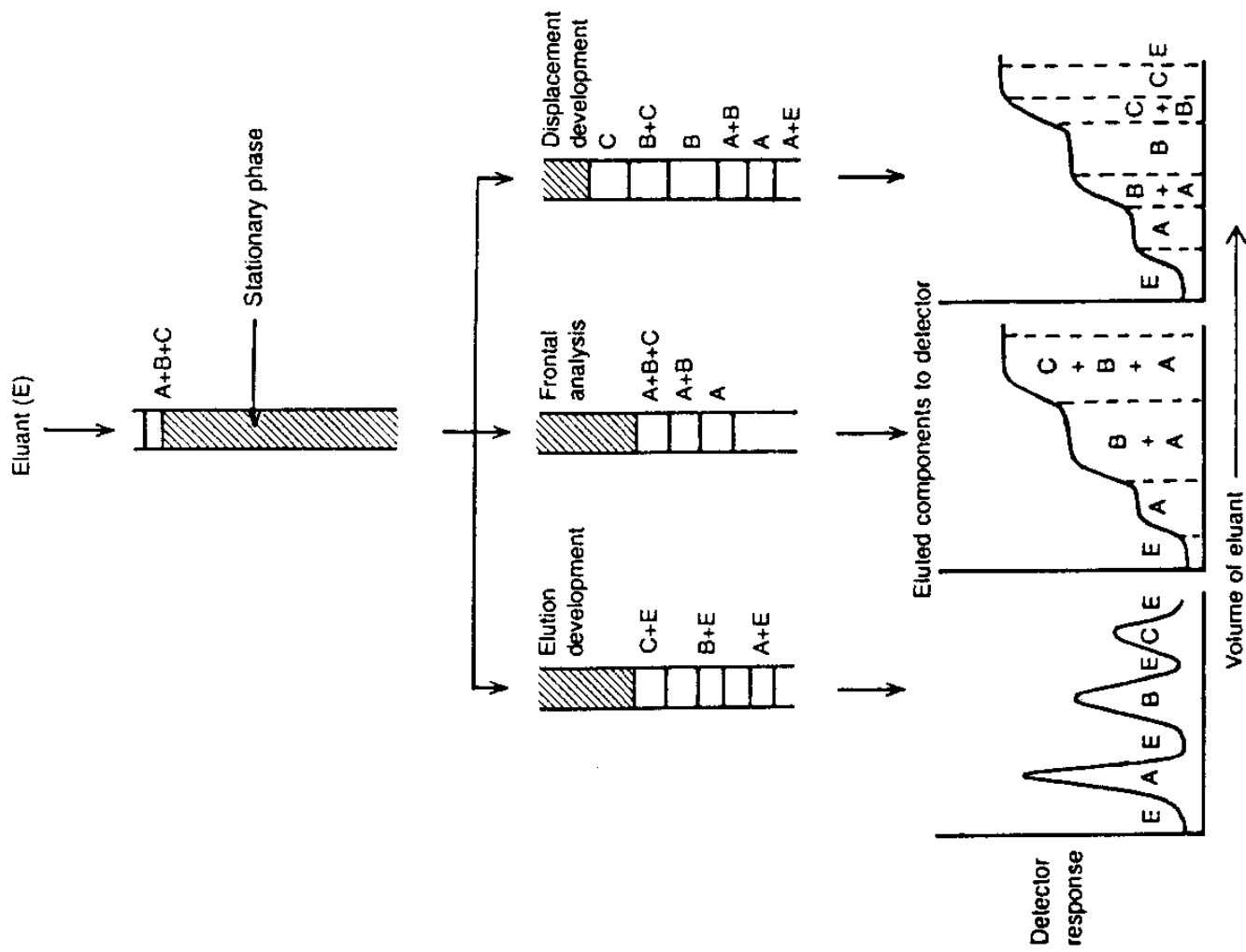
- Na kolonu je kontinuálně vnášen roztok vzorku, ten slouží současně jako mobilní fáze. Na koloně dojde k dělení složek vzorku, ale pouze nejméně zadržovaná složka je získána v čisté podobě. Druhá eluovaná složka je ve směsi s první, třetí s první a druhou složkou atp.

2. Vytěšňovací chromatografie:

- Mobilní fáze se velmi silně adsorbuje na sorbentu, silněji než kterákoli složka vzorku. Mobilní fáze je vytěšňovacím činidlem. Složky naneseného vzorku na kolonu jsou tlačeny před zónou mobilní fáze a nemusí být plně rozděleny

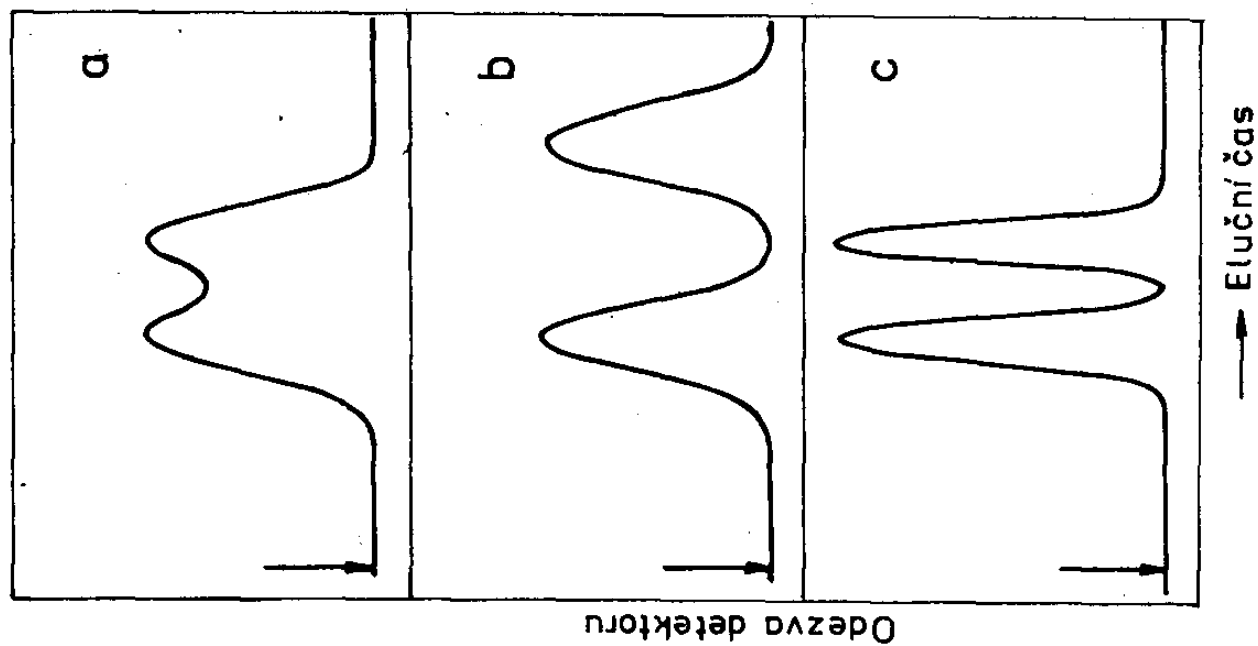
3. Eluční chromatografie:

- Nejrozšířenější forma chromatografie
- Vzorek je nanesen do proudu mobilní fáze. Na koloně dochází k dělení složek podle síly interakce mezi složkami a sorbentem. Složky mohou být rozděleny do vzájemně zcela oddělených zón a jsou zředěny mobilní fází



Separaci dvou složek lze ovlivnit dvěma způsoby:

1. Podmínky separace upravíme tak, aby rozdíl v retenčních časech složek byl co největší. Toho dosáhneme změnou velikosti interakce jednotlivých složek se stacionární fází, tj. ovlivnění dělení složek termodynamickým aspektem separace
2. Podmínky separace změníme tak, aby šířka píků byla menší. Zúžením šířky píků, lze dosáhnout úplnějšího dělení, tzn. menšího překryvu píků, dokonce i při sníženém rozdílu retenčních časů složek
V tomto případě jde o uplatnění kinetického aspektu separace



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

2. Interakce mezi fázemi a mezi molekulami

Interakce složky v separačním systému mohou být posuzovány ze dvou hledisek:

- a) v makroměřítku – rovnováha mezi dvěma fázemi
- b) v mikroměřítku – intermolekulové síly

2.1 Interakce mezi fázemi

Gelová permeační chromatografie GPC/vylučovací chromatografie (SEC)

- Jednoduchý chromatografický princip
- Dělení podle rozdílů hydrodynamických objemů analytů
- Nedochozí k interakci se sorbentem

Plynová rozdělovací chromatografie GLC

- Založena na rozdělovacím procesu složek mezi plynnou mobilní a kapalnou stacionární fází
- Rovnováhu je možno popsat distribuční konstantou K_D :

$$K_{D(A)} = \frac{(c_A)_S}{(c_A)_m} = \frac{(n_A)_S V_m}{(n_A)_m V_S} \quad (1)$$

$(c_A)_S$ a $(c_A)_m$ jsou koncentrace složky A ve stacionární (kapalně) a mobilní (plynně) fázi, $(n_A)_S$ a $(n_A)_m$ jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi, V_m a V_S jsou objemy mobilní a stacionární fáze

- Na nepolárních stacionárních fázích rozhoduje o retenci nepolárních analytů především jejich těkavost, na polárních fázích při interakcích s polárními analyty je situace složitější

Kapalinová rozdělovací chromatografie LLC

- Technika je založena na rozdělovacím procesu složky mezi dvě zcela nemísitelné kapaliny
- Hnací silou procesu je zase rozdíl koncentrací složky v jedné a druhé fázi
- Systém projevuje snahu dostat se do rovnováhy, v rovnováze musí být splněna termodynamická podmínka:

$$(\Delta G)_{T,p} = 0 \quad (2)$$

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

Pokud je složka A distribuována mezi dvě nemísitelné kapaliny, lze dosažení rovnováhy popsat pomocí chemických potenciálů, protože chemický potenciál je roven parciální molární entalpii, v rovnováze tedy platí:

$$(\mu_A)_S = (\mu_A)_m \quad (3)$$

$(\mu_A)_S$ a $(\mu_A)_m$ jsou chemické potenciály složky A ve stacionární a mobilní fázi

Hodnotu chemického potenciálu složky A v kterékoli fázi lze vyjádřit:

$$\mu_A = \mu_A^0 + RT \ln a_A \quad (4)$$

kde μ_A^0 je chemický potenciál složky A ve standardním stavu
a a_A je aktivita složky A

- Při dosažení rovnováhy platí:

$$(\mu_A^0)_S + RT \ln (a_A)_S = (\mu_A^0)_m + RT \ln (a_A)_m \quad (5)$$

$$RT \ln \frac{(a_A)_S}{(a_A)_m} = (\mu_A^0)_m - (\mu_A^0)_S \quad (6)$$

kde $(a_A)_S$ a $(a_A)_m$ jsou aktivity složky A ve stacionární a mobilní fázi

- Poměr aktivity složky A ve stacionární fázi k aktivitě v mobilní fázi je znám jako termodynamická distribuční konstanta K_D^0 , platí:

$$RT \ln K_D^0 = -\Delta\mu_A^0 \quad (7)$$

Rovnice (7) je Nernstův distribuční zákon, dává do souvislosti termodynamickou distribuční funkci a rozdíl standardních chemických potenciálů

- Při experimentálních měřeních jsou aktivity obtížně dostupné, proto se často užívá tzv. distribuční konstanta K_D , která je s termodynamickou distribuční konstantou spojena pomocí vztahu:

$$K_D = \frac{(c_A)_S}{(c_A)_m} = \frac{(\gamma_A)_m}{(\gamma_A)_S} K_D^0 \quad (8)$$

kde $(\gamma_A)_m$ a $(\gamma_A)_S$ jsou aktivní koeficienty složky A v mobilní a stacionární fázi, $(c_A)_m$ a $(c_A)_S$ jsou rovnovážné molární koncentrace složky A v obou fázích

- Spojením rovnic (7) a (8) lze dostat vztah pro distribuční konstantu:

$$K_D = \frac{(\gamma_A)_m}{(\gamma_A)_s} \exp\left(-\frac{\Delta\mu_A^0}{RT}\right) \quad (9)$$

Pokud se pracuje při malých koncentracích složky A, je volen jako standardní stav složka A při nekonečném zředění. Pak se aktivitní koeficienty blíží 1 a distribuční konstanta je závislá jen na rozdílu standardních chemických potenciálů a teplotě

Plynová a kapalinová adsorpční chromatografie GSC, LSC

- Ve srovnání s GLC a LLC, kde dochází k dělení mezi fázemi, které zaujímají jistý objem, probíhá separace složek v případě GSC a LSC odlišně. V tomto případě se ustavuje rovnováha mezi jednou fází zaujímající určitý objem a povrchem adsorbentu
- Při **adsorpci** molekul na pevný sorbent se předpokládá, že tyto molekuly jsou zachycovány v silovém poli na povrchu sorbentu, a že setrvávají na tomto povrchu
- Pokud molekuly pronikají přes rozhraní pevné fáze a difundují do jejího objemu, jedná se o **absorpci**
- Někdy dochází k oběma procesům současně
- Kromě toho se dále rozlišuje fyzikální adsorpce a chemisorpce

Fyzikální adsorpce

- Je založena na van der Waalsových silách působících mezi adsorbátem a adsorbentem. Energie těchto interakcí jsou většinou malé, ale rychlost fyzikální adsorpce velká. Při adsorpci z roztoků vytváří složka na povrchu adsorbentu většinou monomolekulární vrstvu, protože složka musí při sorpci nejprve vytěsnit už adsorbovanou mobilní fázi. Při sorpci plynů na pevných sorbentech může dojít k interakci mezi první sorbovanou vrstvou a molekulami vzorku v plynné fázi

Chemisorpce

- Dochází ke vzniku kovalentní nebo iontové vazby a energie řádově odpovídá vzniku vazby při chemické reakci. Kapacita povrchu je podstatně nižší než při fyzikální adsorpci, protože složka reaguje jen na aktivních centrech adsorbentu. Rychlost chemisorpce je menší a zrychluje se s teplotou exponenciálně

Skutečné chromatografické separace se zpravidla dějí mezi těmito dvěma extrémy. Obvykle nedochází ke vzniku vazby, i když v některých případech jsou interakce spojeny s velkými energetickými změnami

Vedle van der Waalsových sil, které jsou podstatou interakcí mezi nepolárními složkami a nepolárními sorbenty, se někdy na adsorpci podílí také intermolekulární vodíkové můstky a přenos elektronů mezi adsorbátem a adsorbentem

- K popisu adsorpční rovnováhy se užívají adsorpční izotermy
- Principiálně se tyto izotermy neliší, ať jde o adsorpci z plynu nebo z kapaliny
- Ideální chování lze popsat rovnicí (10):

$$K_D = \frac{(c_A)_S}{(c_A)_m} \Rightarrow (c_A)_S = K_D (c_A)_m \quad (10)$$

kde $(c_A)_S$ je rovnovážná koncentrace sorbované složky A v pevné fázi a $(c_A)_m$ je rovnovážná koncentrace sorbované složky v mobilní fázi

- V případě popisu rovnováhy plyn-pevná fáze se někdy užívá vztah:

$$\frac{m_A}{w_S} = K_D p_A \quad (11)$$

m_A je hmotnost sorbované složky, w_S je hmotnost adsorbentu, p_A je parciální tlak složky v mobilní fázi

- Rovnice (10, 11) popisují **lineární adsorpční izotermu**
- Pro reálné systémy tato lineární závislost platí jen zcela výjimečně, většinou jen pro malé koncentrace

- Reálné izotermy v adsorpční chromatografii mají nejčastěji tvar popsaný **Langmuirovou** rovnicí:

$$(c_A)_s = \frac{k_1 k_2 (c_A)_m}{1 + k_2 (c_A)_m} \quad (12)$$

kde k_1 a k_2 jsou konstanty

- Izoterma vychází z předpokladu, že adsorbát tvoří na povrchu monomolekulární vrstvu
- Pokud je koncentrace složky nízká, je možno zanedbat ve jmenovateli součin $k_2(c_A)_m$ a vztah (12) odpovídá lineární závislosti
- Pokud je koncentrace vysoká blíží se koncentrace složky A ve stacionární fázi limitní hodnotě

- Obdobný průběh závislosti koncentrace složky ve stacionární fázi-koncentrace složky v mobilní fázi má empirická **Freundlichova** izoterma:

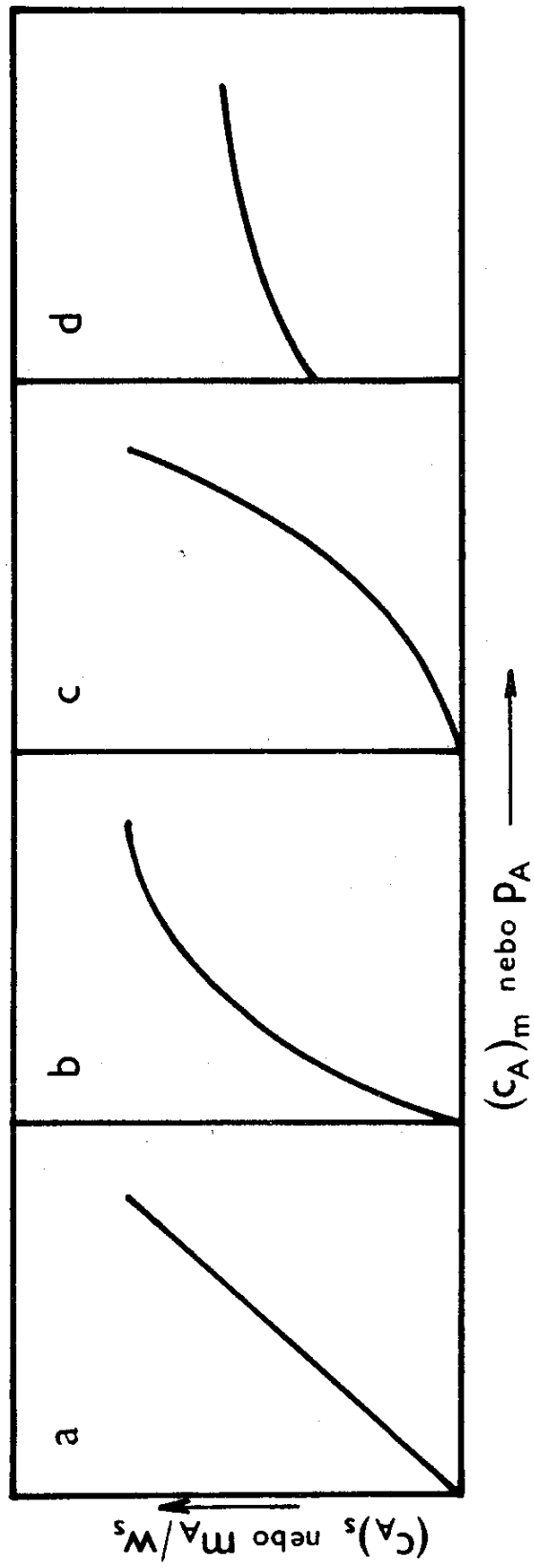
$$(c_A)_S = k_3 (c_A)_m^{\frac{1}{n}} \quad (13)$$

kde k_3 je konstanta, n je konstanta > 1

- Freundlichova izoterma na rozdíl od Langmuirovy nelimituje k určité hodnotě pro koncentraci složky ve stacionární fázi při zvyšování koncentrace složky v mobilní fázi
- V praxi je známa také izoterma **anti-Langmuirova**
Vyskytuje se v případech, kdy první vrstva sorbovaných molekul usnadňuje adsorpci dalších molekul analytu
- V případě **chemisorpce** je energie interakce velká a látka bývá i zcela ireverzibilně zadržena na adsorbentu
Chemisorpce je nejčastěji spojena se vznikem silných vodíkových můstků, acidobazickou interakcí mezi složkou a povrchem adsorbentu, nebo přenosem elektronů
- V rovnicích (12, 13) lze nahradit $(c_A)_S$ a $(c_A)_m$ výrazy m_A/w_S a p_A podobně jako v rovnici (11). V této formě jsou častěji uváděny v GSC

Typ adsorpční izotermy je obvykle spojen s tvarem chromatografického píku

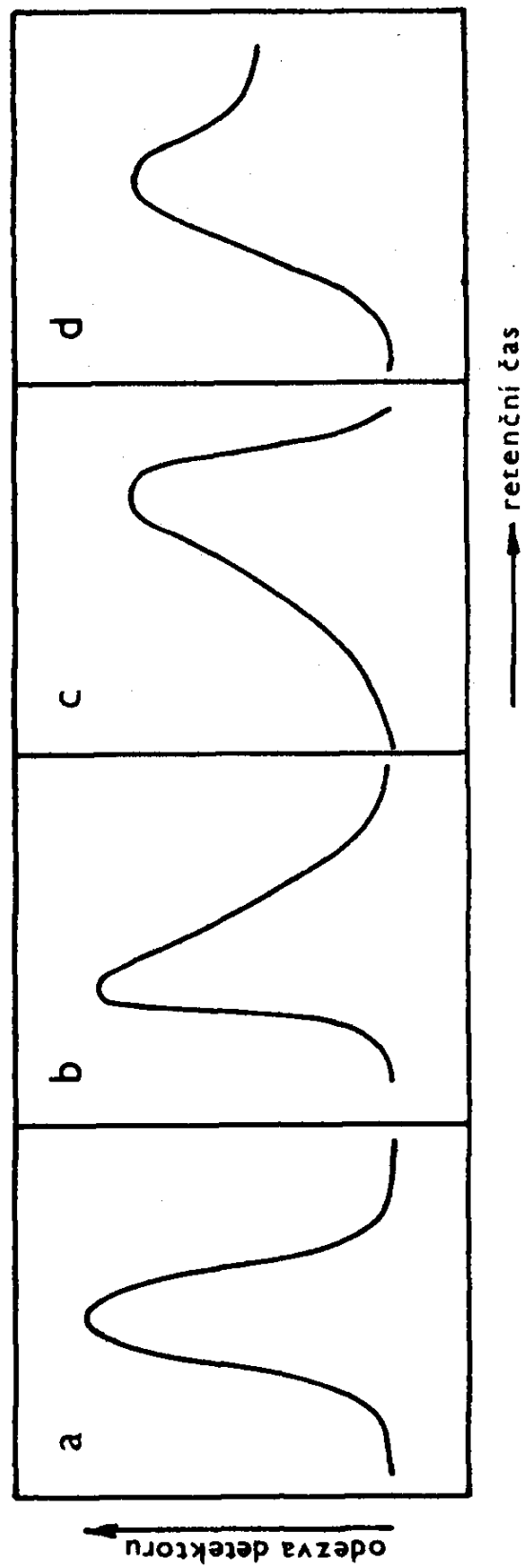
- Pokud separace probíhá za koncentrací popsaných lineární izotermou, jsou píky symetrické
- V případě vysokých koncentrací složky, tj. v oblasti nelineární, je často zjištěna asymetrie, chvostování píků (tailing) pro složky řídící se Langmuirovu izotermou. Maximum píku se zvětšeným nástřikem posunuje ke kratším retenčním časům/objemům. Tento tvar píku je poměrně častý především v LSC
- Pokud je chování složky popsáno anti-Langmuirovu izotermu, je zjištěno posunutí maxima píku k větším retenčním časům, objemům. Pík je nesymetrický, projevuje se náběhem (fronting). Tento tvar je méně častý, lze se s ním setkat v LLC, kdy větší množství složky ve stacionární fázi zvýší afinitu této fáze k dané složce
- Pokud nastane ireverzibilní sorpce na adsorbentu je zjištěn velmi pomalý pokles odezvy detektoru, po velmi značné době se pík téměř nedostane na základní linii. Jev chemisorpce je většinou nežádoucí



Obr. 2.3

Základní typy adsorpčních izoterm

a - lineární, b - Langmuirova, c - anti-Langmuirova, d - chemisorpce



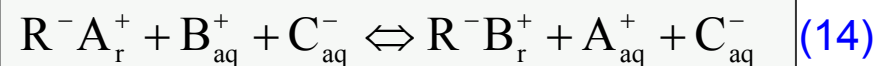
Obr. 2.4

Tvary píků odpovídající izotermám

a - lineární, b - Langmuirově, c - anti-Langmuirově, d - chemisorpci

Iontově výměnná chromatografie IEC

- Lze charakterizovat jako výměnnou adsorpci
- Sorbent zachycuje určitý iont a místo něj uvolňuje do roztoku jiný iont
- Většinou se provádí ve vodných roztocích
- Iontová interakce lze popsat následovně:



R^- je fixované místo na iontoměniči, A_r^+ je zaměnitelný protiiont a B_{aq}^+ a C_{aq}^- jsou zcela disociované ionty složky BC

- Ionty A^+ , B^+ , C^- jsou pohyblivé v systému. Iont R^- je vázán na iontoměniči permanentně
- Výměnná reakce je popsána distribuční konstantou následovně:

$$K_D = \frac{[\text{B}^+]_r [\text{A}^+]_{\text{aq}}}{[\text{B}^+]_{\text{aq}} [\text{A}^+]_r} \quad (15)$$

$[\text{A}^+]_{\text{aq}}$ a $[\text{A}^+]_r$ jsou rovnovážné látkové koncentrace iontu A^+ v mobilní a stacionární fázi, obdobně pro iont B^+
Náboje obou iontů jsou pozitivní jednomocné