



Analytická chémia v priemyselnej praxi (8)

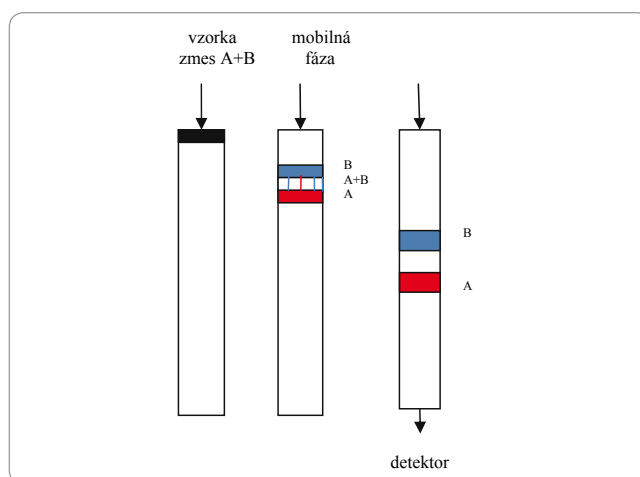
V predchádzajúcej časti článku sme sa venovali polarimetrii, nefelometrii, turbidimetrii a uviedli sme aj základné informácie k vybraným separačným metódam. V ôsmom pokračovaní sa budeme venovať princípu a záznamu chromatografickej separácie a plynovej chromatografii.

Princíp chromatografickej separácie

Separácia vzorky sa dosahuje tým, že jednotlivé zložky sa pohybujú chromatografickým systémom rôznymi rýchlosťami, ktoré závisia od interakcie zložiek s mobilnou a stacionárnou fázou. Prienik zložiek chromatografickým systémom sprostredkúva mobilná fáza. Zložka, ktorej interakcie so stacionárnou fázou sú najsilnejšie, sa bude najdlhšie zdržiavať v stacionárnej fáze, a preto sa bude v chromatografickom systéme pohybovať pomalšie ako ostatné zložky, ktoré sa prednostne zdržiavajú v mobilnej fáze.

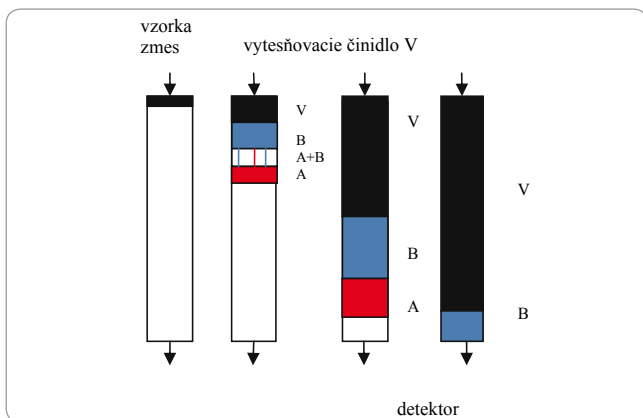
Tento princíp si opíšeme na konkrétnom príklade:

Máme kolónu naplnenú sorbentom (stacionárnou fázou). Cez kolónu sa určitou rýchlosťou pohybuje mobilná fáza (rozpúšťadlo). Na začiatok kolóny naniesieme vzorku, ktorá obsahuje zložky A a B. Mobilná fáza unáša vzorku na koniec kolóny, pričom obe zložky postupujú pomalšie ako mobilná fáza. Zložka B postupuje ešte pomalšie ako zložka A. Hovoríme, že obe zložky sú retardované a zložka B je retardovanejšia ako zložka A oproti mobilnej fáze. Pri postupe vzorky kolónou prechádzajú molekuly zložiek do mobilnej fázy, pričom sa pohybujú rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza, alebo sú zadržované sorbentom a vtedy sa nepohybujú. Počas pohybu vzorky kolónou prejdú molekuly zložiek mnohokrát z prúdu mobilnej fázy na sorben a späť. Doba týchto interakcií molekúl zložky so sorbentom sa nazýva elučný (retenčný) čas t_R . Čím väčšie (intenzívnejšie) sú interakcie, tým väčší je elučný čas a tým neskorší bude výstup zložky z chromatografického systému (kolóny). Na výstupe z kolóny vychádzajú zložky vzorky oddelene, jedna skôr a druhá neskôr. Množstvo mobilnej fázy (rozpúšťadla), ktoré je potrebné na vylúčenie jednej zložky z kolóny, sa nazýva elučný (retenčný) objem V_R .



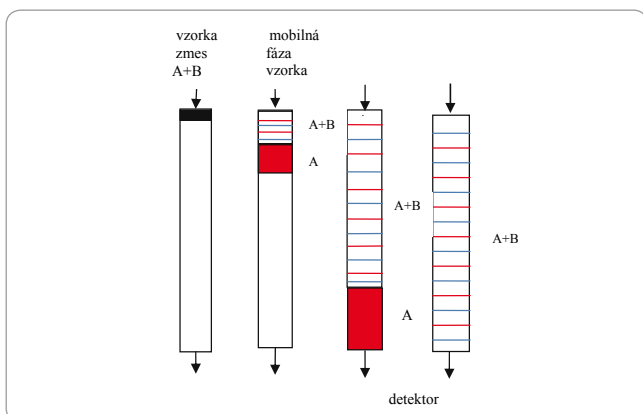
Obr. 14 Princíp elučnej chromatografie

Opísaný spôsob usporiadania chromatografického delenia vzorky na jednotlivé zložky sa nazýva elučná chromatografia. Pri tomto spôsobe sa jednorazovo nadávkuje vzorka do chromatografického systému a jednotlivé zložky sa „vymývajú“ (eluujú) inertnou mobilnou fázou (rozpúšťadlom). Mobilná fáza sa v tomto prípade nazýva eluent a oddelené zložky vychádzajúce zo systému sú eluáty. Vzhľadom na to, že jednotlivé eluáty vychádzajú z chromatografického systému samostatne, nezmiešané, navzájom oddelené čistým rozpúšťadlom, je táto separácia z analytického hľadiska najlepšia, a preto aj najpoužívanejšia. Jej nevýhodou je menšia kapacita a vyššia spotreba rozpúšťadla.



Obr. 15 Princíp vytesňovacej chromatografie

Pri vytesňovacej (vytláčacej) chromatografii mobilná fáza funguje ako vytláčacie (vytesňovacie) činidlo, ktoré tlačí vzorku pred sebou. Vzorka sa opäť jednorazovo nadávkuje na začiatok chromatografického systému a potom sa privedie vytláčacie činidlo (rozpúšťadlo), ktoré má väčšiu afinitu k sorbentu ako jednotlivé zložky. Toto činidlo pôsobí na zložky ako piest, ktorý ich tlačí pred sebou smerom k výstupu, pričom aj medzi jednotlivými zložkami dochádza k vzájomnému vytláčaniu v dôsledku rôznej afinity k sorbentu. Pri vytesňovacej technike sa jednotlivé zložky usporiadajú v poradí od najmenej sa sorbujúcej až po rozpúšťadlo a v tomto poradí aj opúšťajú chromatografický systém. Táto technika sa používa hlavne v adsorpčnej a ionexovej chromatografii.



Obr. 16 Princíp frontálnej chromatografie

Najmenej používanou technikou je frontálna chromatografia, ktorá vyžaduje po každej analýze regeneráciu chromatografického systému. Pri tomto spôsobe slúži vzorka súčasne aj ako mobilná fáza, a preto sa kontinuálne privádza do systému. Ako prvá začne zo systému vychádzať najmenej sorbovaná zložka, neskôr sa v eluáte objaví aj ďalšia zložka, ktorá má väčšiu afinitu k sorbentu, po čase zložka s ešte väčšou afinitou k sorbentu až nakoniec vyteká zo systému eluát s obsahom všetkých zložiek. Teda vytekajúci eluát sa zložením vyrovná pritekajúcej vzorke, chromatografický systém je nasýtený, ďalšia separácia zložiek nie je možná. Systém treba regenerovať, prípadne obnoviť. Táto chromatografická technika sa využíva na kontrolu technických procesov a pri výskume sorpčných procesov.

Záznam chromatografickej separácie

Grafický záznam chromatografickej separácie sa nazýva chromatogram (obr. 17). Krivky znázorňujúce poradie separovaných zložiek opúšťajúcich chromatografickú kolónu sa nazývajú chromatografické vlny, elučné krivky alebo najčastejšie píky.

Nástrek označuje moment, keď je vzorka vnesená do kolóny (chromatografického systému). Na osi x sú dĺžkové jednotky a na osi y je reakcia detektora, ktorá je funkciou koncentrácie eluovanej zložky v mobilnej fáze. Vzdialenosti d_R sa dajú jednoduchým spôsobom

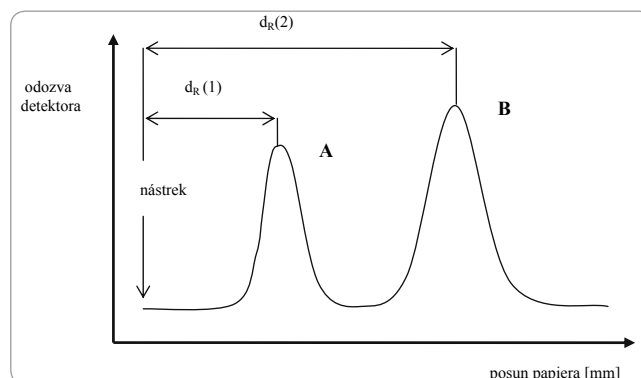
prepočítať na elučné časy t_R alebo elučné objemy V_R . Na výpočet elučného času stačí poznať rýchlosť posunu papiera zapisovača v $[\text{mm min}^{-1}]$:

$$t_R = d_R / v$$

Na výpočet elučného objemu V_R potrebujeme poznať objemovú rýchlosť mobilnej fázy F_m v $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

$$V_R = t_R F_m$$

Prístroj, na ktorom sa chromatografická separácia uskutočňuje, sa nazýva chromatograf.



Obr. 17 Chromatogram dvojzložkovej zmesi

Plynová chromatografia

Princípom tejto separačnej metódy je rovnovážna distribúcia zložiek medzi dve fázy: plynnú – mobilnú a kvapalnú alebo tuhú – stacionárnu. Zložky sú vždy separované v plynnej fáze. Ak vzorku chceme analyzovať metódou plynovej chromatografie, musia byť všetky zložky vzorky vyparené definovaným spôsobom. V praxi to znamená, že GC je vhodná hlavne pre organické látky s teplotou varu asi do 400 °C. Podmienkou je, aby sa látky pri vyparovaní nerozkladali. Teplota 400 °C je horný teplotný limit pre väčšinu bežných plynových chromatografů. Plynová chromatografia je vhodná aj pre anorganické látky, ale iba pre tie, ktoré splňajú podmienku prchavosti. V niektorých prípadoch možno analyzovať aj látky neprchavé, tie sa však musia dať premeniť na prchavé deriváty.

Podľa stacionárnej fázy, ktorú GC používa, sa chromatografia delí na plynovú adsorpčnú chromatografiu (GSC), kde je riadiacim procesom adsorpcia zložky z plynnej fázy na povrch tuhého sorbentu (napr. silikagélu, aktívneho uhlia), a na plynovú rozdeľovaciu chromatografiu (GLC), kde dochádza k distribúcii zložky medzi plynovou – mobilnou a kvapalinovou – stacionárnou fázou. Plynová adsorpčná chromatografia sa využíva pri separácii plynov a niektorých kvapalín s nízkou molekulovou hmotnosťou, pre analytickú prax je menej významná.

V plynovej chromatografii sa mobilná fáza stručne označuje ako nosný plyn. Úlohou nosného plynu je zabezpečiť transport zložiek kolónou, pričom sa sám nesmie zúčastniť separačného procesu. Vzhľadom na to, že ako nosné plyny sa najčastejšie používajú inertné plyny (hélium, dusík, vodík, argón), je zabezpečená ich nerozpustnosť v stacionárnej fáze.

Nosný plyn má však inú vlastnosť, ktorá do určitej miery môže ovplyvniť separačný proces a hlavne výpočty základných parametrov v GC. Je to stlačiteľnosť plynu. Nato, aby plyn prúdil cez kolónu (ktorá predstavuje určitý odpor), je potrebné, aby mal na začiatku kolóny vyšší tlak ako na konci kolóny, kde je obvyčajne atmosférický tlak. Pri vyššom tlaku však dochádza k zmenšeniu objemu plynu. Ak má chromatografická kolóna, cez ktorú prúdi plyn, stále rovnaký priemer, je na začiatku kolóny lineárna rýchlosť plynu menšia ako na mieste výstupu plynu z kolóny. Túto skutočnosť vystihuje modifikovaný Boylov zákon:

$$p_1 u_1 = p_0 u_0$$

kde p_1 a p_0 sú tlaky na vstupe a výstupe chromatografickej kolóny, u_1 a u_0 sú zodpovedajúce lineárne rýchlosti. Vzrast lineárnej rýchlosti má exponenciálny priebeh. Opačný priebeh, teda pokles, má

krivka tlaku, kde dochádza k najrýchlejšiemu poklesu na konci kolóny. Strmosť poklesu je tým väčšia, čím je väčší pomer p_i/p_o (v praxi sa hodnoty tohto pomeru pohybujú v rozmedzí 1,2 – 3).

Zmeny tlaku v chromatografickej kolóne vedú k tomu, že nemôžeme jednoducho vypočítať objemový prietok a tým ani elučný objem. Môžeme však zmerať elučný čas zložky t_R , objemový prietok na výstupe z kolóny F_m a vstupný tlak p_i . Výstupný tlak p_o je obyčajne totožný s atmosférickým tlakom. Redukovaný elučný objem, bez korekcie na tlak, počítame zo vzťahu:

$$V_R = (t_R - t_M) F_m$$

kde t_M je elučný čas nezadržiavanej zložky. Pri bežných výpočtoch môžeme použiť priemernú lineárnu rýchlosť nosného plynu a jeho priemernú objemovú rýchlosť. Na korekciu použijeme tzv. kompresibilitný faktor j , ktorý zohľadňuje stlačiteľnosť plynov a je vypočítaný zo vstupného a výstupného tlaku podľa vzťahu:

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

Pomocou kompresibilného faktora korigujeme v plynovej chromatografii vplyv tlakového spádu v kolóne a tým aj hodnotu redukovaného elučného objemu. Získavame tak čistý elučný objem V_N , ktorý je vyjadrený vzťahom:

$$V_N = j V_R$$

Základné časti plynového chromatografu sú:

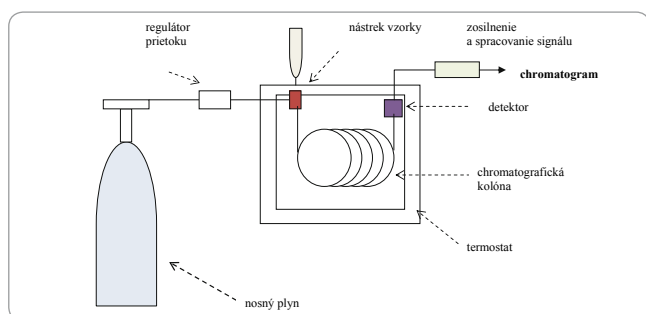
- zdroj nosného plynu,
- zariadenie na meranie a reguláciu prietoku nosného plynu,
- nástreková komôrka,
- chromatografická kolóna,
- termostat,
- detektor a zariadenie na zosilnenie, zaznamenanie a vyhodnotenie signálu detektora.

Zdrojom nosného plynu je zvyčajne tlaková fľaša s regulátorom tlaku. Nosný plyn musí byť čistý, bez vlhkosti a bez obsahu kyslíka. Tlak plynu sa meria manometrom.

Nástreková komôrka je pripojená na vstup chromatografickej kolóny a je vyhrievaná na teplotu, ktorá je vyššia ako teplota varu najmenej prchavej zložky vo vzorke. Pary vzorky prenáša nosný plyn do pripojenej kolóny.

V plynovej chromatografii sa používajú dva typy kolón: náplňové a kapilárne. Náplňové kolóny sú ocelové alebo sklené trubice naplnené sorbentom alebo nosičom pokrytým kvapalnou fázou. Nosičom je najčastejšie oxid kremičitý, na ktorom je kvapalná stacionárna fáza ukotvená, zachytená adsorpciou alebo chemickou väzbou. Vnútorý priemer kolóny je 2 až 3 mm a dĺžka 1 až 3 m.

Vzhľadom na vyššiu účinnosť sa v plynovej chromatografii častejšie využívajú kapilárne kolóny. Sú to kapiláry, pri ktorých funkciu nosiča spĺňajú vnútorné steny kapiláry pokryté ukotvenou kvapalnou stacionárnou fázou. Kapilárne kolóny sa zhotovujú z taveného kremeňa potiahnutého na povrchu vrstvičkou polyimidu. Táto vrstvička odstraňuje krehkosť kremeňa a kolóny sú potom pružné. Kapilárne kolóny sa zhotovujú aj zo skla, ale pre veľkú krehkosť sa používajú zriedkavejšie. Vnútorý priemer kolóny je 0,1 až 0,6 mm a dĺžka 15 až 60 m. Stacionárna fáza v plynovej chromatografii zadržiava jednotlivé zložky v závislosti od ich distribučných konštánt.



Obr. 18 Schéma plynového chromatografu

Úlohou detektora je poskytnúť rozdielne signály pri prechode čistého nosného plynu a pri prechode nosného plynu obsahujúceho eluovanú zložku. Prvým predpokladom úspešnej detekcie je dobré rozdelenie analyzovanej zmesi. Ak je toto rozdelenie nedostatočné, dobrý výsledok sa nedosiahne ani najkvalitnejším detektorom. Základnými charakteristikami dobrého detektora je stabilita signálu, veľká citlivosť a dostatočne rýchla reakcia na zmenu zloženia prechádzajúceho eluentu.

Identifikácia v chromatografii je založená na porovnávaní elučného času alebo objemu neznámej zložky s elučným časom alebo objemom štandardu za rovnakých chromatografických podmienok delenia. Ak súhlasia elučné údaje niektorej zložky analyzovanej vzorky s elučnými údajmi štandardu, môžeme predpokladať, že látka je totožná so štandardom.

Kvantitatívnej analýze predchádza meranie plochy pík, ktoré sa v súčasnosti uskutočňuje výhradne digitálnymi integrátormi. Po zmeraní plochy pík môžeme pristúpiť k samotnej kvantitatívnej analýze pomocou niektorej z nasledujúcich metód.

Pri metóde vnútornej normalizácie sa percentuálne zloženie zmesi vypočíta na základe zmeranej plochy všetkých pík A_1, \dots, A_n . Percentuálny podiel plochy A_i sa získa delením integrovanej plochy píku A_i plochou všetkých pík a násobením 100:

$$\%(A_i) = \frac{A_i}{\sum A_n} \cdot 100$$

Metóda absolútnej kalibrácie spočíva v dávkovaní známych množstiev analyzovanej vzorky a štandardu za rovnakých podmienok. Vyhodnotenie sa robí porovnávaním nameraných ploch alebo výšok pík. Môže sa pritom postupovať dvoma spôsobmi, metódou kalibračnej krivky alebo metódou priameho porovnania.

Metóda štandardného prídavku spočíva v pridaní definovaného množstva stanovovanej zložky (štandardu) k známemu množstvu vzorky. Do kolóny sa nadávkuje definovaný objem analyzovanej vzorky s neznámou koncentráciou stanovovanej zložky c_i a z chromatogramu sa zistí plocha píku A_i . K definovanému objemu analyzovanej vzorky sa pridá definované množstvo zložky i ako štandardu. Do chromatografu sa nadávkuje rovnaký objem vzniknutej zmesi a opäť sa zmeria zväčšená plocha $A_{i,s}$. Za predpokladu, že pridaný objem roztoku štandardu nespôsobí výraznejšiu zmenu objemu vzorky, môžeme neznámú koncentráciu zložky c_i vypočítať z jednoduchého vzťahu:

$$c_i = \frac{c_s A_i}{A_{i,s} - A_i}$$

kde c_s je koncentrácia pridaného štandardu vo vzorke. Metóda štandardného prídavku sa používa veľmi často, pretože pomáha eliminovať straty, ktoré vznikli počas úpravy a čistenia vzorky.

Plynová chromatografia má v súčasnosti veľmi široké uplatnenie pre jej pomerne ľahkú uskutočniteľnosť a rýchlosť stanovenia. Využíva sa na separáciu, identifikáciu aj stanovenie látok, pri čistení a kontrole čistoty látok a tiež na zisťovanie niektorých fyzikálochemických údajov alebo pri skúmaní štruktúry látok. Táto analytická metóda sa využíva vo výskume aj v priemysle, pri štúdiu a analýzach zložiek životného prostredia, ropných produktov, potravín a kozmetiky. Uplatňuje sa v klinickej a toxikologickej analýze.

V ďalšom pokračovaní seriálu bude opísaná kvapalinová chromatografia a chromatografia na tenkej vrstve.

Ing. Ivona Paveleková, CSc.

Katedra chémie
PdF Trnavská Univerzita
ipavelek@truni.sk