

# Analytická chémia v priemyselnej praxi (9)

V predchádzajúcej časti článku sme sa venovali princípu a záznamu chromatografickej separácie a plynovej chromatografii. V záverečnej časti seriálu bude opísaná kvapalinová chromatografia, chromatografia na tenkej vrstve, elektromigračné separačné metódy, ako aj hmotnostná spektrometria.

## Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia je charakterizovaná použitím kvapaliny ako mobilnej fázy. Najrozšírenejšia je kvapalinová rozdeľovacia chromatografia (LLC), o niečo menej rozšírená je kvapalinová adsorpčná chromatografia (LSC). Na rozdiel od plynovej chromatografie nemusíme v kvapalinovej chromatografii uvažovať o kompresibilite kvapalnej mobilnej fázy, pretože pri bežnej práci môžeme veľmi malú stlačiteľnosť kvapalín zanedbať. Na druhej strane však zohráva kvapalná mobilná fáza aktívnu úlohu v separačnom procese.

Podstatou kvapalinovej rozdeľovacej chromatografie (LLC) je distribúcia zložiek medzi kvapalnou mobilnou a kvapalnou stacionárnou fázou ukotvenou na nosiči. Aby mohla distribúcia prebiehať, musia byť obe kvapaliny nemiešateľné. V praxi takéto kvapaliny neexistujú, a preto bola dlho technika LLC sprevádzaná rôznymi ťažkosťami. Problémy boli odstránené zavedením chemicky viazaných stacionárných fáz.

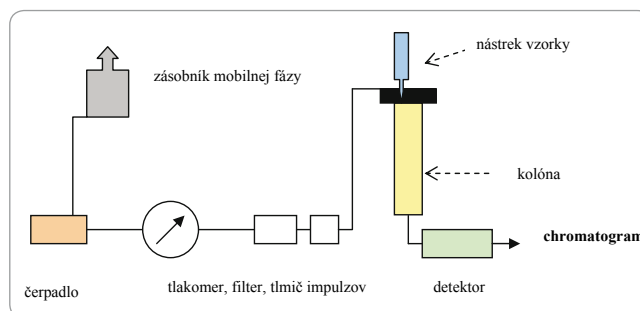


Ak má mať stanovovaná zložka dostatočnú elučnú schopnosť, je potrebné, aby bola rozpustnosť zložky v stacionárnej fáze podstatne väčšia ako vo fáze mobilnej. To sa nedá dosiahnuť, pokiaľ majú obe fázy separačného systému približne rovnakú polaritu. Podstatnou podmienkou separácie v LLC je teda rozdielna polarita oboch fáz. Chemicky viazané stacionárne fázy sú väčšinou nepolárne, čo znamená, že mobilné fázy používané v LLC musia byť polárne.

Kvapalinová adsorpčná chromatografia (LSC) využíva interakciu medzi zložkami vzorky a tuhú fázou – adsorbentom v prostredí mobilnej kvapalnej fázy – eluentu. Na začiatok kolóny sa naniesie vzorka a pri premývaní kolóny eluentom sa zložky vzorky pohybujú v smere eluentu tým rýchlejšie, čím menej sú adsorbované. Zložky obsiahnuté vo vzorke sa pohybujú kolónou rôznou rýchlosťou podľa toho, ako sa líšia ich adsorpčné distribučné konštanty.

Mechанизmus adsorpcie v kvapalnej fáze sa vysvetľuje nasledujúco. Malé guľovité častice adsorbentu sú na začiatku v styku iba s mobilnou fázou – eluentom. Molekuly eluentu obsadia celý povrch adsorbentu a sú na tomto povrchu pripútané silou, ktorá zodpovedá ich adsorpčnej energii. Keď sa v mobilnej fáze objaví analyt, ktorého adsorpčná energia je väčšia ako adsorpčná energia eluentu, analyt sa naadsorbuje na povrch adsorbentu, pričom zodpovedajúci počet molekúl eluentu vytlačí späť do mobilnej fázy. Ak by adsorpčná energia analytu bola menšia ako adsorpčná energia eluentu, zložka by prešla kolónou bez zdržania.

Základné technické vybavenie kvapalinového chromatografu zahŕňa čerpadlo, zariadenie na dávkovanie vzorky, kolónu, detektor a vyhodnocovacie zariadenie.



Obr. 18 Schéma kvapalinového chromatografu

Čerpadlo musí zabezpečovať konštantný prietok mobilnej fázy, ktorý má byť plynule regulovateľný. Najčastejšie sa používajú piestové čerpadlá. Pri každom pohybe vpred dochádza k vytlačeniu malého objemu mobilnej fázy do chromatografického systému a pri pohybe späť sa komora naplní.

V kvapalinovej chromatografii sa používajú iba náplňové kolóny zhotovené zvyčajne ako rovné trubice z nehrdzavejúcej ocele alebo tvrdeného skla dlhé 10 až 50 cm. Vnútrotný priemer kolóny je 1 až 5 mm a bežný prietok eluentu 1 až 2 ml za minútu. Pre vysokoúčinné kolóny je dôležité, aby ich vnútrotný priemer bol čo najmenší (1 – 2 mm), po celej dĺžke rovnaký a aby bol vnútrotný povrch hladký. Takéto kolóny spotrebujú aj málo eluentu (10 – 100  $\mu$ l za minútu).

Detektory sú veľmi dôležitým prvkom v modernej kvapalinovej chromatografii. Univerzálne detektory sa používajú v prípade, že potrebujeme registrovať piky všetkých rozdeľovaných zložiek. V kvapalinovej chromatografii však častejšie využívame špecifické (selektívne) detektory založené na niektorej z inštrumentálnych metód. K najbežnejším patria fotometrické detektory, ktorými sa meria absorbancia eluentu vytekajúceho z kolóny pri určitej vlnovej dĺžke. Refraktometrickým detektorom sa meria rozdiel indexu lomu eluátu a čistej mobilnej fázy. Prítomnosť zložky v eluáte sa prejaví zmenou indexu lomu. Fluorescenčné detektory sú založené na schopnosti látok absorbovať a vysielať elektromagnetické žiarenie, elektrochemické detektory vodivostné a voltamperometrické sa používajú v prípadoch, keď sú v skúmanom roztoku ióny, prípadne oxidovateľné alebo redukovateľné zložky. Čoraz častejšie sa využívajú aj detektory umožňujúce identifikáciu separovaných zložiek pomocou ich hmotnostných spektier.

## Gélová permeačná chromatografia (GPC)

Je predstaviteľkou najjednoduchšieho separačného princípu, mechanickej separácie na základe rozdielnych veľkostí molekúl delených zložiek. Stacionárna fáza je tuhá látka – gél, ktorý je nasýtený (napučaný) mobilnou fázou. Podstatou metódy je rozdielne prenikanie separovaných molekúl (na základe ich rozmerov) do kvapalnej fázy uzavretej v dutinách gélu. Pri tejto separácii sa uplatňuje „sitový efekt“, pri ktorom molekuly menších rozmerov, ako je veľkosť dutín gélu, budú difundovať do mobilnej fázy v dutinách gélu a tým sa budú v nich zachytávať a systémom prenikať pomalšie. Molekuly väčšie, ktoré do dutín gélu nezapadnú, prejdú systémom rýchlejšie spolu s mobilnou fázou.

## Ionexová (iónovovýmenná) chromatografia (IEC)

Je určená na separáciu iónov a ďalších nabitých častíc. Častice bez náboja prechádzajú kolónou bez zdržania. Separácia sa uskutočňuje na iónomeničoch, ktoré majú na svojom povrchu chemicky viazané iónové skupiny a na nich sú elektrostatickými silami viazané

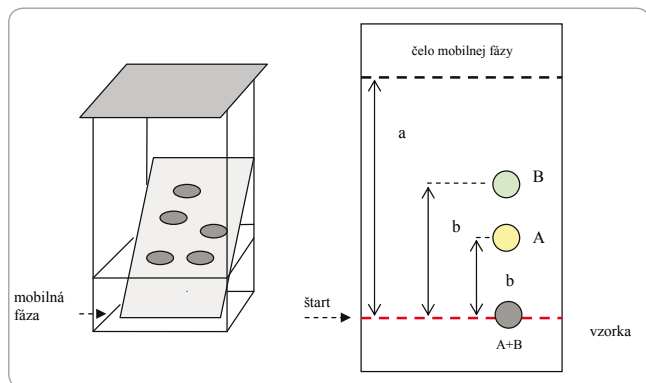
opačne nabitých protiiónov. Tieto protiióny sú zhodné s jedným z iónov, ktoré tvoria mobilnú fázu. Protiión je pri separácii dočasne vymenený rovnako nabitým iónom separovanej zložky. Prebytok iónov v mobilnej fáze spôsobí, že ión zložky je z tohto miesta vytesnený a unášaný mobilnou fázou k ďalšej častici sorbentu, kde sa celý proces zopakuje. Doba zotrvania iónu zložky na povrchu sorbentu závisí od koncentrácie rovnako nabitých iónov v mobilnej fáze a od ich afinity k fixovanému iónovému miestu. Takmer všetky iónové výmeny prebiehajú vo vodných roztokoch. Separované, a teda aj vymieňané môžu byť kladne aj záporne nabité ióny a podľa toho nazývame iónomeniče katexami alebo anexami.

## Chromatografia na tenkej vrstve (TLC)

Technika tenkovrstvovej chromatografie v planárnom usporiadaní využíva bežné princípy kvapalinovej chromatografie. Odlišuje sa iba usporiadaním stacionárnej fázy do tenkej vrstvy namiesto kolóny. Mobilná fáza nie je čerpaná, ale nasávaná kapilárnymi silami tenkej vrstvy. TLC je veľmi vhodná ako orientačná metóda na analýzy veľkého počtu podobných vzoriek (tzv. screening). Je to metóda veľmi rýchla a lacná.

Hlavným prvkom TLC je chromatografická platňa – sklená, hliníková alebo z plastu, na ktorej je nanesená vrstvička sorbentu s hrúbkou 0,1 až 0,5 mm. Najbežnejšie používaný sorbent je silikagél, ale aj oxid hlinitý, celulóza a polyamid. Platne sa často upravujú s prímiesou fluorescenčného indikátora, ktorý uľahčuje detekciu škvrn.

Pred použitím sa platne zvyknú aktivovať zahriatím v sušiarňi a potom sa na označený štart nanesie mikropipetou niekoľko mikrolitrov roztoku vzorky. Platňa sa vyvíja v uzavretej komore, ktorej atmosféra je nasýtená parami mobilnej fázy. Pri vzostupnom vyvíjaní sa platňa ponorí do malej vrstvičky rozpúšťadla (mobilnej fázy). Rozpúšťadlo vzlína kapilárnymi silami a súčasne unáša jednotlivé zložky vzorky rôznou rýchlosťou. Potom sa platňa vysuší a jednotlivé zložky (škvrny) sa lokalizujú. Často sa používa postrek vhodným reagentom, prípadne fluoreskujúce zložky môžeme lokalizovať pomocou UV lampy.



Obr. 19 Princíp tenkovrstvovej chromatografie

Pri vyhodnocovaní chromatogramu sa meria vzdialenosť stredy škvrny  $b$  od štartu (vzdialenosť, ktorú dosiahla zložka počas separácie) a vzdialenosť  $a$ , ktorú prešla mobilná fáza od štartu. Tieto dve hodnoty umožňujú výpočet retardačných faktorov  $RF$  separovaných zložiek, ktoré sa vypočítajú zo vzťahu:

$$RF = a/b$$

Jednotlivé zložky skúmanej vzorky identifikujeme porovnaním vypočítanej hodnoty retardačného faktora a hodnoty  $RF$  štandardu.

Možnosti kvantitatívnej analýzy sú pri tenkovrstvovej a papierovej chromatografii obmedzené. Koncentráciu zložiek vo vzorke môžeme približne odhadnúť na základe porovnania intenzity sfarbenia škvrny zložky a štandardu, ktorého koncentráciu poznáme. V praxi sa tiež používa postup, pri ktorom sa škvrna príslušnej zložky vystrihne alebo sa zoškriabe sorbent so škvrnou do vhodného rozpúšťadla. Vyextrahovaná zložka sa stanoví niektorou inou analytickou metódou.

V súčasnosti sa používa aj vysokoúčinná tenkovrstvová chromatografia (HPTLC), ktorá na rozdiel od TLC využíva jemnejšie zrnité sorbenty, platne s menšími rozmermi platní a nanesené škvrny s menším priemerom.

## Elektromigračné separačné metódy

Podstatou týchto metód je pohyb nabitej častice vplyvom jednosmerného elektrického poľa. K deleniu dochádza v kvapalnej fáze, prevažne vo vodnom prostredí. Ak je častica nesúca náboj  $Q$  vystavená vplyvu jednosmerného elektrického poľa s intenzitou  $E$ , pôsobí na túto časticu sila  $F_1$ , ktorá časticu uvádza do pohybu. Pohyb častice je však brzdený odporom prostredia daným silou  $F_2$ , priamo úmernou rýchlosti častice  $v$ .

Ak je na začiatku rýchlosť častice nulová, pôsobením sily  $F_1$  ju uvedieme do pohybu. Zvyšovaním rýchlosti pohybu častice sa bude zvyšovať aj odpor prostredia (sila  $F_2$ ) až do okamihu, keď sa obe sily vyrovnajú. Nastane ustálený stav, v ktorom sa nabitá častica pohybuje stálou rýchlosťou. V ustálenom stave sú obidve sily v rovnováhe a platia vzťahy:

$$F_1 = F_2 \quad Q E = k v$$

Z predchádzajúceho vzťahu môžeme určiť rýchlosť častice:

$$v = (Q/k) \cdot E$$

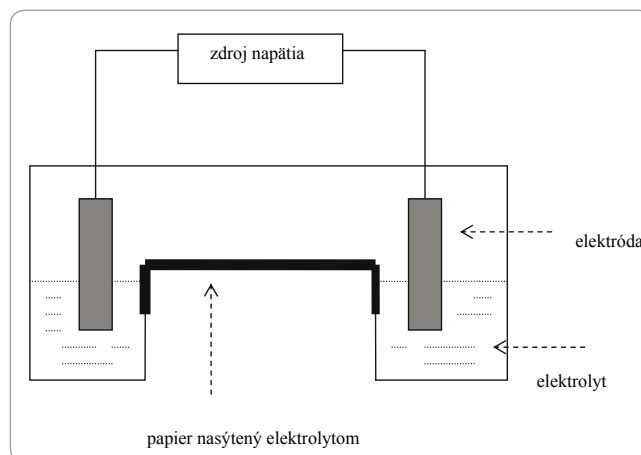
kde  $u$  je pohyblivosť častice. Tá je daná rozmerom, tvarom a nábojom častice a viskozitou roztoku. K separácii v elektrickom poli dochádza na základe pohyblivosti častíc, ktorá je pre nabitú časticu rôznych zložiek v danom prostredí rozdielna. Z predchádzajúcej rovnice vyplýva, že existujú dva spôsoby, ako oddeliť ióny s rozdielnou pohyblivosťou:

1. pracovať pri konštantnom elektrickom poli ( $E = \text{konšt}$ ) a separovať častice na základe ich rozdielnej rýchlosti v (elektroforéza),
2. pracovať pri konštantnej rýchlosti častíc ( $v = \text{konšt.}$ ), ktorá sa dosahuje pri rozdielnych hodnotách  $E$  pre rôzne častice (izotachoforéza).

## Elektroforéza

Podstatou elektroforézy je migrácia elektricky nabitých častíc v konštantnom jednosmernom elektrickom poli, pričom kationy migrujú k zápornému pólu, anióny ku kladnému a neutrálne molekuly resp. častice sa nepohybujú. V dôsledku odlišnej pohyblivosti iónov jednotlivých zložiek vo vzorke možno separovať pohyblivejší ión od menej pohyblivého.

Elektroforéza v plošnom usporiadaní predstavuje systém dvoch elektród ponorených do elektrolytu. Voľba elektrolytu závisí od charakteru separovanej látky. Konštantné elektrické pole v celom systéme je zabezpečené vodivým spojením medzi katódou a anódou. Vodivé spojenie elektród je realizované prostredníctvom porézneho materiálu alebo hydrofilného polymérneho gélu napusteného elektrolytom.



Obr. 20 Princíp elektroforézy

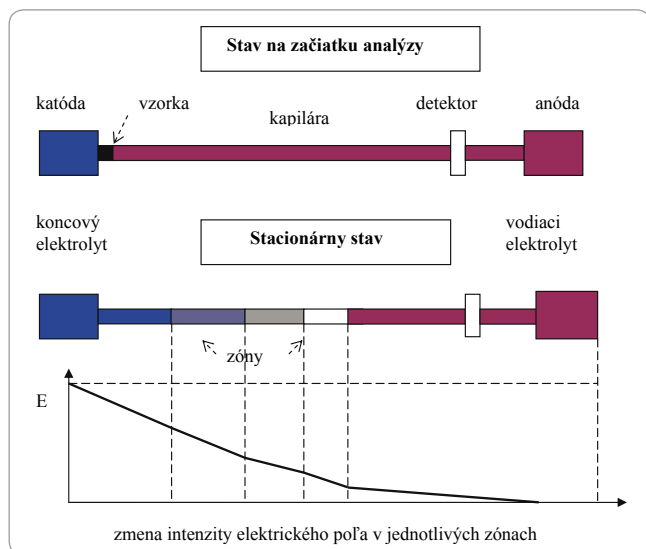
V najjednoduchšom usporiadaní sa ako vodivý spoj používa filtračný papier, ktorého konce siahajú do elektrolytu umiestneného v dvoch žliabkoch katódového a anódového priestoru. Používajú sa platinové alebo grafitové elektródy, pričom intenzita jednosmerného elektrického napätia je 5 až 10 V cm<sup>-1</sup>. Separácia pri týchto podmienkach trvá niekoľko hodín. Na papier sa nanesie vzorka ako bodka alebo prúžok kolmý na smer pohybu iónov. Rôzne ióny sa pohybujú rôznou rýchlosťou a rozdelia sa na viac alebo menej oddelené škvrny alebo pásy, podľa toho, ako bola vzorka nanosená na papier. Detekcia škvrn sa robí podobne ako pri tenkovrstvovej chromatografii.

Kapilárna elektroforéza využíva namiesto plošného vodivého spojenia kremennú kapiláru naplnenú vhodným pufrom. Uplatňuje sa hlavne pri separácii peptidov, proteínov, nukleových kyselín a ďalších biopolymérov. Používa sa aj na separáciu anorganických katiónov a aniónov.

Elektroforéza má široké uplatnenie hlavne v biochémií, používa sa na delenie vzoriek biologického pôvodu, napr. bielkovín, nukleových kyselín, tkanivových extraktov, ale aj buniek, baktérií a pod.

## Izotachoforéza

Izotachoforéza používa dva rôzne elektrolyty s rozdielnou pohyblivosťou iónov. Keď delíme napr. anióny, obsahuje anódový priestor a celý spoj (kapilára) medzi oboma elektródami taký elektrolyt, ktorého anióny majú väčšiu pohyblivosť ako anióny vo vzorke. Katódový priestor je naplnený elektrolytom, ktorého anióny majú menšiu pohyblivosť ako anióny vo vzorke. Elektrolyt s väčšou pohyblivosťou aniónov sa nazýva vedúci elektrolyt. Elektrolyt s menšou pohyblivosťou aniónov sa nazýva koncový elektrolyt. Vzorka sa nanáša na rozhranie medzi tieto dva elektrolyty. Po pripojení jednosmerného napätia sa vzorka začne deliť podľa pohyblivosti jednotlivých aniónov. Po dostatočne dlhom čase sa dosiahne stacionárny stav, keď jednotlivé zložky vytvoria zóny tesne za sebou podľa klesajúcej pohyblivosti aniónov. Tieto ióny sa všetky pohybujú rovnakou rýchlosťou smerom k anóde – znamená to, že intenzita elektrického poľa  $E$  sa bude v jednotlivých zónach rôzne pohyblivých iónov meniť. Podobné závery platia, samozrejme, aj pre separáciu katiónov.



Obr. 21 Princíp izotachoforézy

Izotachoforéza našla hlavné uplatnenie v biochémií a medicíne. Skoncentrovanie minoritných zložiek počas separácie je vhodné aj na overovanie čistoty chemikálií. Izotachoforéza sa používa aj pri analytických rozboroch zmesí organických a anorganických iónov.

## Hmotnostná spektrometria

Podstatou hmotnostnej spektrometrie je ionizácia molekúl a následná separácia a detekcia vznikajúcich iónov na základe ich hmotnosti a početnosti. Podľa názvu by mohla byť hmotnostná spektrometria zaradená medzi spektrometrické metódy, svojou podstatou

však medzi ne nepatrí. Na základe separácie iónov podľa početnosti a hmotnosti túto metódu zaradujeme medzi separačné analytické metódy.

Na rozdiel od metód IČ, UV-VIS a NMR spektrometrie nemerame pri hmotnostnej spektrometrii fyzikálne vlastnosti molekúl. Jej podstatou je chemická degradácia molekúl vzorky (vznik iónov) nevratným odštiepením valenčných elektrónov. Ide teda o chemický proces, v ktorom rozhodujúcu úlohu zohrávajú atakujúce elektróny.

V hmotnostnom spektrometri účinkom silného prúdu elektrónov dochádza k štiepeniu molekúl, pričom vznikajúce iónové zväzky sú tvorené iónmi s rôznou hmotnosťou. Záznam vznikajúcich iónových zväzkov tvorí hmotnostné spektrum.



Mechanizmus vzniku hmotnostného spektra je nasledujúci. Vzorka, ktorá musí byť v plynnom skupenstve, sa vloží do evakuovanej ionizačnej komory, kde sú jej molekuly atakované elektrónmi uvoľnenými zo žeraveného volfrámového vlákna. Tieto elektróny majú veľkú kinetickú energiu a sú schopné rozštiepiť molekuly vzorky na fragmenty. Vznikajúce fragmenty, ale aj nerozštiepené molekuly sa ionizujú a takto vzniknuté ióny (obvyčajne len kladné) sa po urýchlení a vytvorení úzkeho zväzku privádzajú na analyzátor. V analyzátoze sa jeden iónový zväzok rozdelí na viacero diskretných iónových zväzkov podľa pomeru hmotnosti a náboja ( $m/e$ ) iónov, ktoré sa líšia obsahom energie. Po výstupe z analyzátoru sa iónové zväzky registrujú fotograficky alebo fotoelektricky. Poloha čiar na fotografickom zázname alebo poloha maxim na registračnom zázname určuje rozdelenie iónov podľa ich hmotnosti, kým sčernenie čiar, resp. výška maxim, zodpovedá pomernému zastúpeniu jednotlivých iónov.

Hmotnostná spektrometria umožňuje pomerne jednoduchú identifikáciu zložiek prítomných v zmesiach iba v malých koncentráciách. Možno z nich stanoviť relatívnu molekulovú hmotnosť alebo získať určité informácie o elementárnom zložení a štruktúre látok. Našla preto široké uplatnenie v rôznych oblastiach vedy a výskumu, napr. vo fyzike, v geológii, vo farmácii, v medicíne, kriminalistike, kozmickom výskume či pri riešení problémov v oblasti životného prostredia. Služí na zisťovanie izotopového zloženia prvkov, používa sa pri detekcii a identifikácii stopových množstiev látok, napr. v geológii a geochemii sa ňou stanovuje stopové množstvo prvkov v horninách a mineráloch a určuje sa vek hornín. V biochémií umožňuje sledovanie rôznych biochemických procesov v živých organizmoch.

*Koniec seriálu.*

Ing. Ivona Paveleková, CSc.

Katedra chémie  
PdF Trnavská Univerzita  
ipavelek@truni.sk