

SEPARAČNÍ METODY

Přehled nejdůležitějších separačních metod

Separací (dělicí) metody patří k základním typům operací prováděných v chemické laboratoři. Tyto operace se uplatňují při izolaci jednotlivých složek ze směsí, při čištění látek, předchází některým analytickým důkazům a stanovením a často se samy požívají jako metody kvalitativní i kvantitativní analýzy.

Směsi se dělí metodami

- chemickými – jednotlivé složky převádíme na jiné chemické sloučeniny, které se oddělí (např. tvorba sraženiny, plynné sloučeniny apod.)
- fyzikálními – látky se chemicky nemění.

K *nejznámějším separačním metodám* patří *filtrace, dekantace a odstředování*.

FILTRACE – je způsob dělení heterogenních směsí – nejčastěji pevné fáze od fáze kapalné nebo plynné. Dvě různé fáze dělíme pomocí propustného materiálu. Filtračním materiálem může být filtrační papír (jsou různé druhy podle propustnosti a velikosti pórů), porcelánový filtrační kelímek a skleněné porézní kelímky, zv. frity nebo skleněné porézní nálevky, zv. nuče. Oba typy jsou číslovány podle velikosti pórů písm. S nebo G s číslem 0 - 5 (nejhustší). Filtraci lze provádět buď jako *filtraci za normálního tlaku* /viz obr. 1/, *za zvýšeného tlaku* nebo *filtraci za sníženého tlaku* (používáme Büchnerovou nálevku) /viz obr. 2/. Poslední dva typy filtrace urychlují a zkracují průběh filtrace.

Kromě toho lze provádět také *filtraci za studena* nebo *za horka* (tehdy, jsou-li látky při laboratorní teplotě v pevném stavu a při vyšší teplotě kapalné).

Je-li směs tvořena pevnou a kapalnou fází, pak kapalným zbytkem po přefiltrování se nazývá *filtrát*.

DEKANTACE – je dělení pevné a kapalné fáze a spočívá v opatrném odlití nebo odsátí kapaliny od usazené vrstvy pevné látky /viz obr. 4/.

ODSTŘEDĚNÍ – způsob oddělování pevné a kapalné fáze nebo dvou kapalin na základě rozdílné hustoty.

KRYSTALIZACE – je vylučování pevné látky z roztoku ve formě krystalů. Ty se vylučují z nasycených roztoků, když nasycený roztok ochladíme nebo rozpouštědlo z roztoku odpaříme. Krystalizace ochlazením je založena na změně rozpustnosti látek vlivem teploty. Rozpustnost většiny látek s teplotou stoupá. Podle rychlosti chlazení roztoků rozlišujeme krystalizaci

- volnou* – roztok necháme volně stát, po delší době, v závislosti na koncentraci roztoku a teplotě okolí se začnou tvořit krystalky, které jsou pěkně rostlé, tvarované, avšak méně čisté. Zvýšené čistoty krystalů můžeme dosáhnout opakovanou krystalizací, zv. rekrystalizace.
- rušenou* – roztok zahřejeme až do stavu nasycení (na skleněné tyčince se tvoří po ochlazení krystaly) a pak prudce ochladíme (pod tekoucí studenou vodou nebo v ledové vodě). Po chvíli se začnou vylučovat jemné a drobné krystalky, které jsou velmi čisté. Krystalizaci lze urychlit třením skleněné tyčinky o stěnu kádinky.

Od matečného roztoku lze krystaly oddělit filtrací nebo dekantací, zbývající filtrát se po zahuštění může podrobit opakované krystalizaci, zv. rekrystalizace.

Na *změně skupenství* jsou založeny další separační metody – destilace, sublimace, vymrazování a tavení.

DESTILACE – používá se k čištění kapalin a dělení kapalných směsí. Dělení je založeno na rozdílných bodech varu jednotlivých složek směsi. Ze směsi se oddělí (destiluje) nejdříve těkavější látka, tj. ta, která vře při nižší teplotě (má nižší bod varu). Látky destilují postupně podle zvyšujícího se bodu varu. Jejich páry se v chladiči postupně kondenzují (sráží) a odkapávají do jímadla /viz obr. 3/. Aby při jednorázové, tzv. jednoduché destilaci došlo k úplnému oddělení dvou látek ze směsi, musí být jedna buď úplně netěkavá, nebo se musí lišit teplotou varu alespoň o 150 °C.

Některé kapaliny při určité koncentraci tvoří tzv. azeotropní směsi, tj. směsi, které mají konstantní bod varu, destilují spolu a jednoduchou destilací se nedají od sebe oddělit. Např. směs ethanol – voda tvoří tuto směs při poměru 96% lihu a 4 % vody (přesně 95,57 % ethanolu) a bod varu je 78,15 °C.

SUBLIMACE – je pochod, při které se pevná látka zahříváním převádí v páry, které na chladném místě opět kondenzují na pevnou látku, aniž by procházely stadiem kapaliny. Používá se k oddělování sublimujících látek od netěkavých nebo k čištění látek. Sublimují např. naftalen, kys. salicylová, kys. šťavelová a další).

VYMRAZOVÁNÍ – používá se v praxi k čištění a sušení plynů. Je to jednoduchá a účinná dělicí metoda pro směsi látek, z nichž některé snížením teploty kondenzují a jiné nekondenzují. Používají se teploty kapalného vzduchu – asi – 185 °C nebo směsi pevného CO₂ a těkavých organických kapalin (ethanolu, ethyletheru nebo acetonu).

TAVENÍ – se uplatňuje nejčastěji v průmyslovém měřítku jako tzv. zonální tavení; jen ojediněle v laboratoři. Někdy se provádí oddělování nečistot krystalizací látky z taveniny, podobně jako při krystalizaci z roztoku.

Mezi *separační metody založené na rozdělení látek mezi dvě fáze* patří extrakce (vyluhování) a zejména chromatografie

EXTRAKCE (vyluhování) – je dělicí metoda, při které převádíme ze směsi do roztoku pouze jednu látku (ostatní zůstávají nerozpuštěné) na základě větší rozpustnosti ve vhodném rozpouštědle. Extrakce se provádí za chladu, proto se často používá pro biologické materiály. Např. tukové látky se dají extrahovat z krevního séra etherem.

Existují různé způsoby extrakce jako macerace, digesce a perkolace.

Rozšířeným způsobem extrakce je **vytřepávání** – extrakce kapaliny z kapalné směsi přidáním rozpouštědla, v němž je extrahovaná složka velmi dobře rozpustná. Provádí se protřepáváním směsi s vhodným rozpouštědlem. Čím větší je tzv. *rozdělovací koeficient* (r.k.) a větší rozpustnost složky v použitém rozpouštědle, tím lépe se extrahovaná složka oddělí od směsi. Účinnost extrakce se zvýší také opakovaním extrakce.

Poznámka: Rozdělovací koeficient je poměr koncentrací látky rozpuštěné ve dvou různých, navzájem nerozpustných a nemísitelných rozpouštědlech (kapalinách A, B); **r.k. = c_A / c_B** . Rozdělovací koeficient závisí pouze na teplotě a je pro danou látku v daných rozpouštědlech konstantní.

Jako příklad možno uvést vytřepávání bromu nebo jodu z jejich vodných roztoků např. sirouhlíkem, benzínem nebo petroletherem.

CHROMATOGRRAFIE – patří mezi nejdůležitější a nejrozšířenější separační metody. Podle použitých principů a zároveň podle charakteru separační funkce se chromatografie dělí na *ch. adsorpční, rozdělovací, a iontově výměnnou*. Podle povahy mobilní fáze se chromatografie dělí na *plynovou a kapalinovou* (stacionární fáze je pevná nebo kapalná). Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme chromatografii na *sloupcovou* (také kolonovou) a *plošnou*. Sloupcová chromatografie – plynová nebo kapalinová – stacionární fázi tvoří náplň kolony, mobilní fázi je plyn nebo kapalina. U plošné ch. je stacionární fáze ve formě větší plochy (např. papíru, vrstvičky silikagelu apod.

Dnes mají největší použití ch. plynová a kapalinová, které jsou dostatečně citlivé, pracují s malým množstvím vzorku, umožňují současné kvalitativní i kvantitativní stanovení a vyhodnocování výsledků lze dobře automatizovat použitím výpočetní techniky.

Chromatografie má časté a široké využití v oblasti biochemických analýz, v potravinářském průmyslu, při rozborech vody, ovzduší, barviv, léčiv, v petrochemickém průmyslu apod.

JINÉ SEPARAČNÍ METODY

Mezi ostatní známé separační metody patří ještě dialýza, elektroforéza, elektrolýza, dále vysolování a srážení rozpouštědly. Krátce lze tyto metody charakterizovat takto:

DIALÝZA – používá se k dělení směsi látek s rozdílnou velikostí molekul. K dělení slouží polopropustná membrána, která menší molekuly propustí, větší zadrží. Polopropustné blány jsou často živočišného původu (celofán, želatina, pergamen, kolodiové roztoky), membránové filtry se připravují uměle. Rychlost dialýzy je závislá především na rozdílu koncentrací látky na obou stranách polopropustné blány. Klesne na nulu až se koncentrace vyrovnají.

Dialýzou můžeme snadno oddělit minerální soli, aminokyseliny a peptidy od bílkovin. Nejčastěji používáme dialýzu v případech, kdy chceme zbavit vysokomolekulární látky nízkomolekulárních nečistot. Dialýza je rovněž velmi významným procesem při pronikání a výměně látek (některých iontů a molekul vody) buněčnou blánou.

ELEKTROFORÉZA – separační metoda založená na pohybu elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Dělí se tak především částice (ionty) vysokomolekulárních látek. Podobně lze dělit i nízkomolekulární ionty – to označujeme jako *iontoforézu*. Výsledek dělení závisí mj. na pH prostředí a na velikosti vloženého napětí. Elektroforéza se používá hlavně ke kvalitativním analytickým účelům a k mikroreparaci.

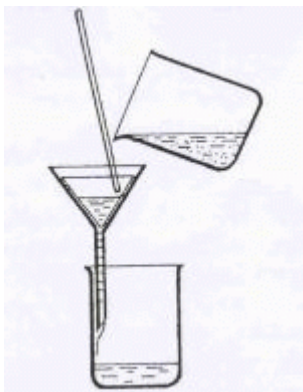
ELEKTROLÝZA – představuje elektrochemické pochody probíhající na elektrodách při průchodu stejnosměrného elektrického proudu elektrolytem. *Elektrolyty* jsou roztoky nebo taveniny látek v disociovaném stavu, které vedou elektrický proud. Elektrody jsou vodiče ponořené do elektrolytu, jimiž zavádíme elektrický proud. Při elektrolýze si částice vyměňují elektrické náboje (elektrony), proto elektrolytické děje jsou děje oxidačně redukční. Na kladné elektrodě – anodě – ionty (aniony) elektrony uvolňují a samy se oxidují. Na záporné elektrodě – katodě – ionty (kationy) elektrony přijímají a samy se redukují.

Rozklad různých elektrolytů probíhá při různém napětí, které se nazývá *rozkladné napětí*. Odpovídající potenciál na elektrodě, při kterém se látka (ion) začne vylučovat na elektrodě, se označuje jako *vylučovací potenciál*, který je pro daný ion charakteristickou veličinou používanou ke *kvalitativnímu* prokazování látek. Proto dostatečně rozdílné vylučovací potenciály různých látek v roztoku umožňují postupné vylučování těchto látek při elektrolýze. Těto vlastnosti lze využít k oddělování (separaci) jednotlivých složek z roztoku. Produkty elektrolýzy lze vážít nebo vypočítat (viz Faradayovy zákony) a využít tak elektrolýzy ke *kvantitativnímu* stanovení.

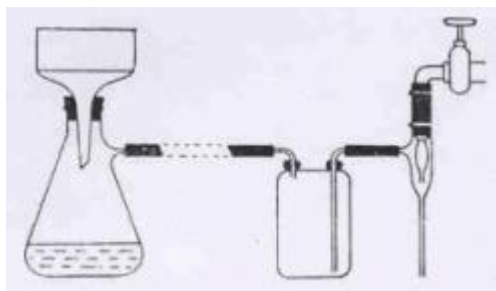
Elektrolýza má význam jako kvantitativní analytická metoda, uplatňuje se dále jako jedna z významných průmyslových metod výroby a rafinace kovů (samotné kovy a pokovování), nekovů (plynů – kyslík, vodík, chlor) a výrobě některých sloučenin (NaOH, chlornany, chlorečnany).

VYSOLOVÁNÍ – je jeden z možných způsobů vysrážení látek z roztoku. Používá se nejčastěji k vysrážení některých organických látek (např. aminokyselin, bílkovin) z roztoků. K vysolování jsou nejvhodnější sírany, chloridy, fosforečnany, příp. citráty kovů alkalických (Na, K), amonné, vápenaté a hořečnaté. Při počátečním přidávání se rozpustnost vysolovaných látek (aminokyselin, bílkovin) nejdříve zvyšuje. Teprve dalším přidáním soli se uvedené látky začnou vylučovat. Při dostatečné koncentraci soli je vyloučená (vysolená) látka prakticky nerozpustná.

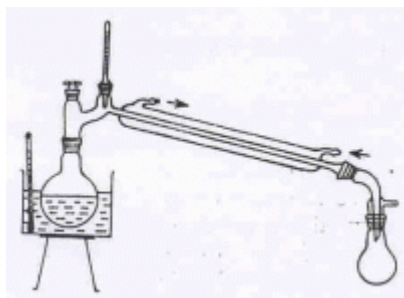
Poznámka: Pokud se následným zředěním sraženina (u bílkoviny) rozpustí a opětovným přidáním soli vysráží, hovoříme o tzv. *reversibilním* čili *vrátném rozpouštění* nebo *srážení bílkovin*. Pokud tomu tak není a sraženina se zředěním nerozpustí, hovoříme o *ireversibilním* čili *nevrátném srážení bílkovin* (při použití solí těžkých kovů).



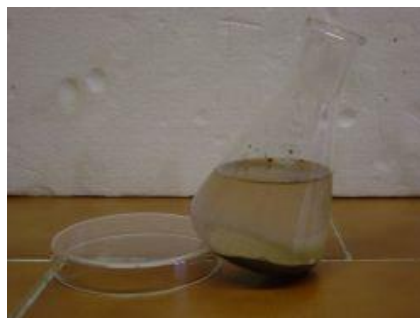
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3.



Laboratorní úlohy z tématu Separční metody

Úlohy na základní separační metody (filtrace, sublimace, krystalizace, destilace) byly provedeny v rámci laboratorních cvičení z chemie v 1. ročníku, proto nebudou znova opakovány.

Úloha č.1. *Stanovení rozdělovacího koeficientu kyseliny salicylové mezi chloroform a vodu.*

/úloha se vztahuje k extrakci/

Princip: Rozpustnost látek je mj. závislá i na povaze rozpouštědla. Rozdílnou rozpustnost dané látky ve dvou různých rozpouštědlech udává tzv. rozdělovací koeficient K_r . Vyjadřuje kolikrát je daná látka lépe rozpustná v jednom rozpouštědle než ve druhém. Vyjadřuje se číslem větším než 1, $K_r > 1$.

Pomůcky: kyselina salicylová, chloroform, odměrný roztok 0,1 M NaOH, fenolftalein, byreta, dělicí nálevka.

Postup: Do dělicí nálevky nalijeme 50 ml destilované vody a 50 ml chloroformu, přidáme asi 0,5 g kys. salicylové. Dělicí nálevku uzavřeme zátkou a směs několikrát dobře protřepeme až se kyselina rozpustí. Vytvořené vrstvy oddělíme (dvě vrstvy – vrstva chloroformu je u dna) do dvou samostatných kádinek. Postupně odpipetujeme z každé kádinky přesně 20,00 ml roztoku a titrujeme roztokem NaOH na fenolftalein do trvalého fialového zbarvení. Každou titraci provedeme dvakrát. Ze zjištěných hodnot určíme průměrnou spotřebu pro každý roztok. Rozdělovací koeficient K_r je dán poměrem spotřeb roztoku NaOH

$$K_r = \frac{V_{\text{chloroform}}}{V_{\text{voda}}}$$

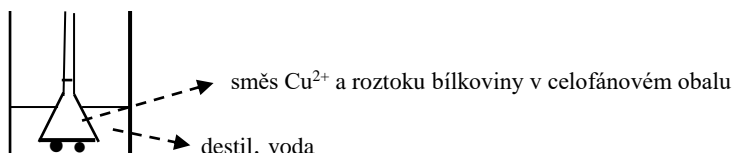
- Úkol:** 1. Uveďte naměřené spotřeby roztoku NaOH a hodnoty průměrné,
2. Vypočítejte hodnotu rozdělovacího koeficientu.

Úloha č.2. *Dělení směsí pomocí dialýzy - oddělení Cu^{2+} iontů ze směsi CuSO_4 a bílkoviny*

Princip: viz výše

Pomůcky: roztok modré skalice o konc. asi 0,1 M, zř. roztok amoniaku, celofán, vaječný bílek (koloidní roztok ve vodě), široká kádinka, nálevka, provázek, zápalky nebo špejle.

Postup: Polopropustnou blánu – celofán – namočíme asi na 20 minut do vody v kádince. Po změknutí celofán přetáhneme přes nálevku a na stopce zavážeme provázkem. Směsí roztoku vaječného bílku a modré skalice naplníme nálevku (pipetou) a poté položíme opatrně do čisté kádinky s vodou podložíme zápalkami nebo kousky špejli. - viz nákres.



Od okamžiku ponoření odečítáme čas. Po 2, 7, 17, 37 minutách (je možné volit jiné, dostatečně dlouhé časové intervaly) od ponoření odpipetujeme vždy 2 cm³ kapaliny z kádinky do zkumavky a přikápneme roztok amoniaku. Podle intenzity zbarvení v jednotlivých zkumavkách můžeme usuzovat na stupeň průběhu dialýzy.

Úkol: Formulujte slovy závěr – výsledek pozorování, závislost kvantitativního průběhu dialýzy na čase.

Chromatografie

patří mezi analytické metody, založené na dělení směsí (separační metody). Principiálně je založena na rozdělování jednotlivých složek směsí mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze - *stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá)* - které jsou relativně vůči sobě v pohybu. Čím větší je rozdělovací schopnost složek a doba dělení, příp. počet dělení, tím lépe se jednotlivé složky oddělí.

Rozdělení chromatografických metod

1) podle povahy mobilní fáze

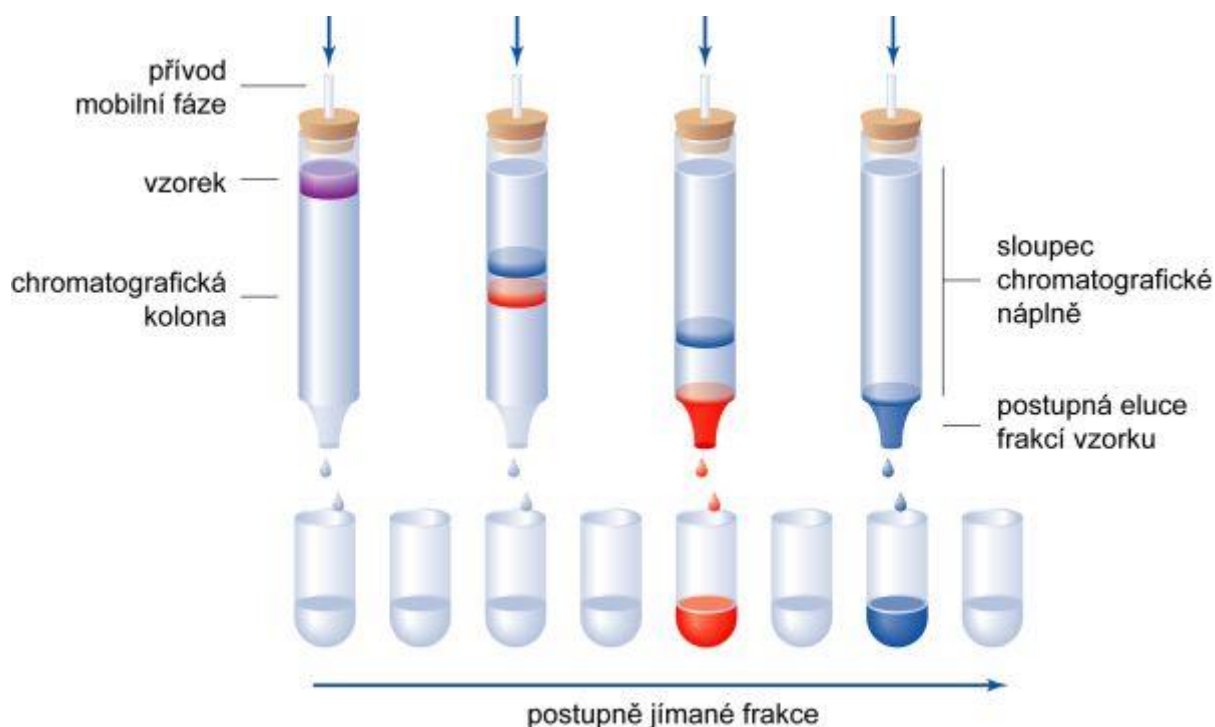
- a) kapalinová chromatografie – mobilní fáze je kapalina,
- b) plynová chromatografie – mobilní fáze je plyn.

2) podle uspořádání stacionární fáze

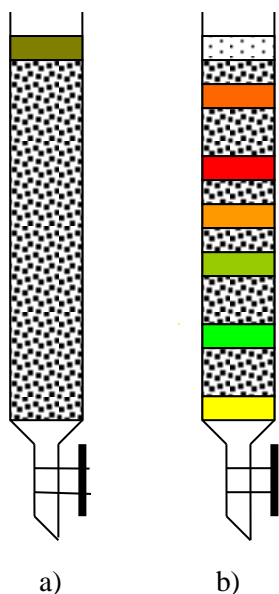
- a) kolonová (sloupcová) chromatografie – stacionární fáze je v trubici čili koloně a tvoří sloupec) (viz obr. č.1),
- b) plošné uspořádání
 - papírová chromatografie – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - chromatografie na tenké vrstvě – stacionární fáze je umístěna na Al folii, skleněné destičce nebo jiném plošném podkladu (Obr. 2)

3) podle povahy dělení (separace)

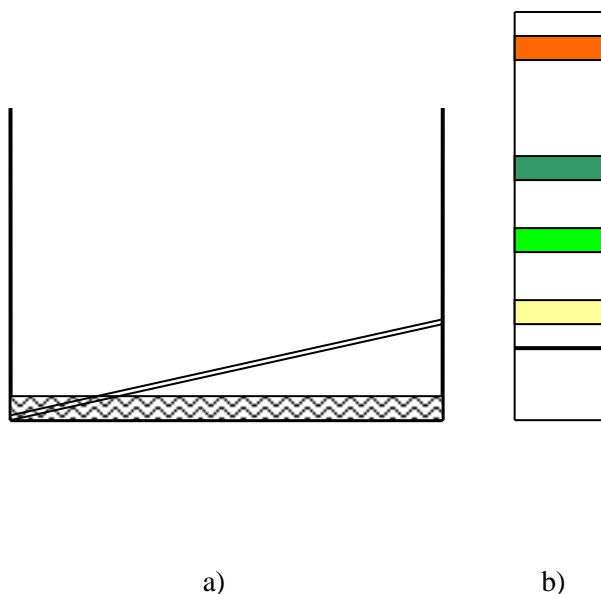
- a) rozdělovací chromatografie – o dělení rozhoduje rozdílná rozpustnost složek vzorku v mobilní (kapalina, plyn) a stacionární fázi (kapalina),
- b) adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje různá schopnost složek vzorku poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka),
- c) iontově-výměnná (iontoměničová) chromatografie – stacionární fázi je iontoměnič, který je umístěn v koloně; o separaci rozhoduje rozdílná velikost přitažlivých sil složek vzorku mezi nimi a funkčními skupinami iontoměniče,
- d) gelová chromatografie – stacionární složkou je gel, složky se dělí podle soudržných sil mezi molekulami gelu a jednotlivými složkami mobilní fáze,
- e) afinitní chromatografie – dělení je založeno na selektivní afinitě (schopnosti se vázat) některých složek vzorku vzhledem k stacionární fázi.



Obr. č. 1 Schéma uspořádání a průběhu (postupné eluce) kolonové (sloupcové) chromatografie



Obr. 1a. Chromatografická kolona pro sloupcovou chromatografii
a) s náplní před dělením, b) po rozdělení



Obr. 2 Chromatografie na tenké vrstvě
a) uložení tenké vrstvy, b) chromatogram po vyvolání

Poznámka: **adsorpce*** - zachycování, koncentrování plynných nebo kapalných složek z roztoků na povrchu pevných (tuhých) látek, tzv. **adsorbentů**. Velikost adsorpce **a** je závislá na koncentraci látky **c** podle vztahu $a = k \cdot c$, kde **k** je tzv. adsorpční konstanta, závislá na kvalitě adsorbentu, rozpouštědla i rozpuštěné látky.

Mezi nejstarší a nejznámější typy adsorpční chromatografie patří z hlediska provedení **ch. sloupcová**. Provádí se ve skleněných trubiciích – kolonách (viz obr. 1). Jako adsorbenty (pevná fáze) se používají polární látky (oxid hlinitý, silikagel, celulóza, škrob a jiné) nebo látky nepolární (různé druhy aktivního uhlí), kterými je naplněna trubice. Mobilní fázi tvoří rozpouštědlo, ve kterém je dělená směs rozpustná (např. voda, benzín, benzen, chloroform, ethanol, methanol a další). Jednotlivé složky při průchodu vrstvou adsorbentu postupují různou rychlostí, která je úměrná velikosti adsorpce těchto složek k adsorbentu. Čím je adsorpce složky k pevné fázi větší, tím je rychlost postupu menší. Jednotlivé složky je proto možno jímát odděleně. Proces „vymývání a odkapávání“ jednotlivých složek z kolony se označuje jako *eluace*. Jejich množství lze po eluci stanovit titračně, fotometricky nebo některou z dalších odměrných či optických metod.

Jiným typem adsorpční chromatografie je **ch. na tenkých vrstvách**. Tenká vrstva adsorbentu (často silikagel, oxid hlinitý, oxid, vápenatý, uhličitán vápenatý a jiné) na tenké kovové nebo skleněné desce tvoří pevnou fázi. Mobilní fázi je vhodné rozpouštědlo, do něhož je tenká vrstva ponořena. Do nádoby s rozpouštědlem se vkládá šikmo pod úhlem asi 20°. Vzorek směsi se nanáší na pevnou vrstvu adsorbentu tak, aby nebyl ponořen do roztoku rozpouštědla. Vztlínáním rozpouštědla nahoru se směs dělí. Jednotlivé složky postupují podle velikosti adsorpce. Pro kvalitativní hodnocení směsi vypočítáváme hodnoty R_F (viz papírová chromatografie), pro kvantitativní účely určujeme plochu skvrny nebo po eluci skvrny stanovíme obsah některou z analytických metod uvedených výše (viz sloupcová chromatografie)

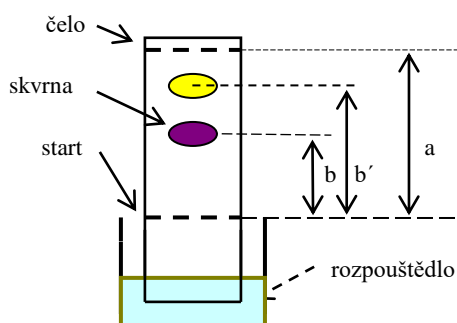
Nejstarším typem plošné rozdělovací chromatografie je **chromatografie papírová**. Stacionární fázi tvoří voda (kapalná fáze), která je zakotvená na pevném nosiči (celulóza jako filtrační papír). Používá speciální, chromatografický papír (odtud *ch. papírová*), na který se nanáší zkoumaný vzorek a papír je ponořen do mobilní fáze (voda, kys. mravenčí, methanol, kys. octová, ethanol, aceton a jiná organická rozpouštědla). Jsou-li složky bezbarvé je nutné je po rozdělení vybarvit chemickým postříkem. Jsou-li složky barevné, není třeba je zviditelňovat.

Ch. papírová se provádí buď jako tzv. *ch. vzestupná* – mobilní fáze vzlíná (stoupá) nahoru, a *ch. sestupná* – mobilní fáze sestupuje zhora dolů. Někdy se používá papír ve tvaru kruhu a vzorek zkoumané směsi se nanáší do středu nebo po obvodu kružnice nedaleko středu. Papírový kruh je

umístěn vodorovně a je spojen s mobilní fází knotem nebo bavlněnou nití. Toto uspořádání se nazývá *ch. kruhová* nebo *horizontální*.

Vlastní chromatografii provádíme tak, že vzorek směsi nanese na start a papír ponoříme do rozpouštědla tak, aby linie startu byla nad hladinou rozpouštědla. Mobilní fáze (rozpouštědlo) je nasáváno kapilárními silami a vymývá jednotlivé složky dělené směsi na základě jejich rozdílného rozdělovacího koeficientu mezi stacionární a mobilní fází. Jednotlivé látky se zviditelní formou skvrn v různých vzdálenostech od startu. Látka lépe rozpustná ve stacionární (zakotvené) fázi je blíže u startu než látka lépe rozpustná v mobilní fázi (je vzdálenější). Vzniklý chromatogram vysušíme a vyhodnotíme určením hodnoty R_F (pro vzestupnou a sestupnou ch.) nebo R_R (pro horizontální ch.).

Hodnota R_F je poměr vzdálenosti středu skvrny ke vzdálenosti čela rozpouštědla od startu (viz obr. obr. 3.)



a ...vzdálenost čela rozpouštědla od startu,

b...vzdálenost středu skvrny od startu

$$R_F = b / a$$

Obr. 3. Schéma chromatogramu vzniklého technikou plošného uspořádání

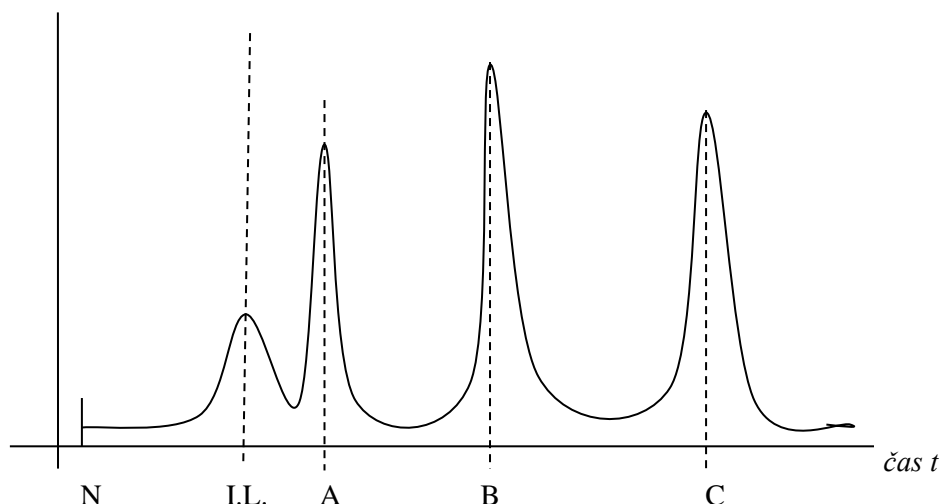
Hodnota R_F má být v rozmezí 0,16 až 0,86. Je pro určitou látku a systém rozpouštědel stálá a charakteristická pro kvalitu látky. Z chromatogramu lze určit rovněž i kvantitativní obsah složek.

Rozdělovací papírovou chromatografií s výhodou používáme při dělení a stanovení aminokyselin, cukrů, alkaloidů, steroidů alkoholů a jiných látek. Je vhodná při běžné analytické kontrole. Dílčí nevýhodou je poměrně malá přesnost a časová náročnost při vyvíjení chromatogramů.

Kromě speciálního filtračního papíru se dnes používá tenká vrstva jemného a homogenního silikagelu na tenké hliníkové folii (užívá se pod obch. názvem Silufol).

Nejpoužívanějším typem chromatografie je **plynová chromatografie**. U adsorpční plynové chromatografie jsou nosnou, mobilní fází některé inertní plyny (tzv. nosné plyny) jako CO_2 , helium, argon, dusík nebo vodík. Stacionární (pevnou) fází jsou např. silikagel, oxid hlinitý, hliníkokřemičitany nebo jiné speciálně vyvinuté adsorbenty. V praxi se používá méně často.

U rozdělovací plynové chromatografie, která se používá v praxi častěji, je stacionární fáze tvořená kapalinou, která je zakotvená na porézní látku, zv. nosič. Jako zakotvené fáze (kapaliny) se používají silikony, vyšší alifatické uhlovodíky, vyšší alkoholy, estery a další organické sloučeniny. Stacionární fáze je umístěna v tenké trubičce spirálovitého tvaru zvané *kolona*, kterou trvale proudí netečné nosné plyny – mobilní fáze (CO_2 , helium, argon, dusík nebo vodík). Nosný plyn unáší dělenou látku v podobě pár chromatografickou kolonou a v množství daném rozdělovacím koeficientem se dělená látka rozpouští v zakotvené fázi. Rozdělovací koeficient udává poměr koncentrace látky v kapalně (zakotvené) a mobilní fázi (nosný plyn). Po průchodu složek *detektorem*, který jednotlivé složky zaznamená po kvalitativní i kvantitativní stránce jsou složky vyhodnoceny záznamovým zařízením formou grafického zápisu tzv. *chromatogramu* (viz obr. č. 4, obr. č. 5). Je to soustava po sobě následujících *píků*, jejichž umístění – pořadí od začátku (startu) souvisí s kvalitou složky, výška a šířka píku udává množství složky (kvantitativní údaj). Přístroj pro tento typ analýzy se jmenuje *plynový chromatograf*.



Obr. 4 Chromatografická křivka (chromatogram)

N.....nástřík, I.L.inertní látka, A, B, C.....jednotlivé složky směsi

V současné době se získané výsledky zaznamenávají graficky na obrazovce a ještě dále zpracovávají digitálně připojenou výpočetní technikou..

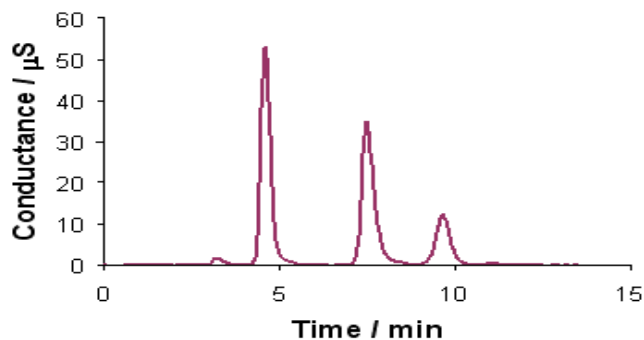
Plynová chromatografie je velmi citlivá metoda a pracuje s velmi malými kvanty vzorku. Je vhodná pouze pro látky plynné nebo kapalné, které lze snadno převést do plynného stavu. Metodami plynové chromatografie můžeme oddělovat a kvantitativně stanovovat organické látky s bodem varu do 400°C. Uplatňuje se zejména při dělení, určování a stanovení uhlovodíků a jejich izomerů. Pro plynovou chromatografii je charakteristická vysoká separační účinnost. Jedinou analýzou můžeme stanovit 5 až 20 složek vedle sebe.

Jiným, velmi často používaným typem chromatografie je **chromatografie kapalinová**. Podobně jako plynová ch. tak i kapalinová ch. může být podle separační podstaty *adsorpční kapalinová ch.* nebo *rozdělovací kapalinová ch.*

Mobilní fázi při *adsorpční kapalinové ch.* je kapalina (organická látka – hexan, cyklohexan, tetrachlormethan, toluen, benzen, ethylacetát, aceton, ethanol, methanol a jiné). Nejčastěji používaným pevným adsorbentem je opět silikagel nebo oxid hlinitý, dále křemičitany, škrob, polyakrylamid, ale také aktivní uhlí (nepolární adsorbent pro chromatografování směsí nepolárních látek)

Při *rozdělovací kapalinové chromatografii* je stacionární fázi kapalina zachycená v tenké vrstvě na povrchu inertního pevného nosiče (křemelina, kuličky z porézního skla a polymerů, silikagel apod.). Jsou to speciální kapaliny o velké molekulové hmotnosti. Mobilní fázi tvoří různá rozpouštědla – voda, kyselina mravenčí, methanol, kyselina octová, ethanol aceton a další).

Kapalinovou chromatografii můžeme separovat mnohem větší počet látek než chromatografii plynovou díky větším možnostem výběru různých fází. Můžeme tak dělit přírodní látky jako bílkoviny, tuky, polysacharidy a jejich hydrolyzáty a mnoho dalších organických i anorganických látek.



Obr. 5. Typický obrázek chromatogramu

Chromatografické metody mají velký význam při dělení a identifikaci biologického materiálu. Používá se jich také k dělení, identifikaci a stanovení jednotlivých látek v tělních tekutinách. Chromatografické metody jsou dnes plně automatizovány a jsou neodmyslitelnou součástí moderních klinických vyšetřovacích metod např. komplexní vyšetření krve).

Laboratorní úlohy pro chromatografii

Úloha č. 1. Dělení směsi barviv papírovou kruhovou chromatografií.

Pomůcky: pro úlohu 1.a) Směs barviv č. 1 - methylenová modř, eozín a brilantní zeleň, rozpustit v metanolu + voda (1 : 1), mobilní fáze (metanol + voda 7 : 3), Petriho misky (menší, větší), kapilární pipetka, porcelánová nebo skleněná mistička, knot, chromatografický nebo filtrační papír.

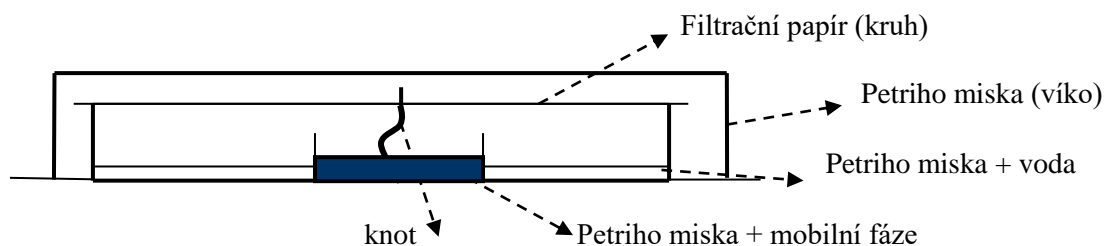
pro úlohu 1.b) Směs barviv č. 2. – 10% roztoky FeCl_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; vyvíjecí rozpouštědlo (mobilní fáze) - 9 dílů acetonu a 1 díl kys. chlorovodíkové (1 : 1), amoniak, chromatografický nebo filtrační papír, Petriho misky o průměru 9 až 10 cm, kapilární pipetka.

Postup: 1.a) Přesně do středu kruhového výřezu jemného filtračního papíru o průměru 10 cm nanese pipetou několik kapek směsi roztoku methylenové modři, eozínu a brilantní zeleně. Po vysušení protáhneme středem bavlněnou nit (knůtek) asi 4 cm dlouhou, aby zasahovala do misky s mobilní fází.

Do Petriho misky o průměru poněkud menším než je průměr kruhového výřezu filtračního papíru nalijte trochu vody a do středu misky umístěte malou porcelánovou nebo skleněnou mističku. Potom Petriho misku přikryjte výřezem filtračního papíru tak, aby bavlněný knůtek dosahoval na dno porcelánové mističky. Vše přiklopte větší Petřino miskou.

Po 15 minutách víko sejměte, nadzvedněte filtrační papír a do mističky nalijte směs methanolu a vody (mobilní fáze), filtrační papír se vzorkem položte na Petřino misku tak, aby knůtek zasahoval do směsi v mističce s mobilní fází. Vše opět přikryjte víkem.

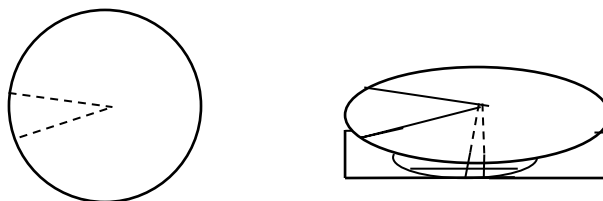
Za 30 minut se na papíře vytvoří 3 soustředné barevné kruhy – nejbližze středu je modrý kruh methylenové modře, následuje červeně zbarvený kruh eozínu a nakonec zelený kruh brilantní zeleně. Aparaturu sestavíme dle obrázku 1.



Obr. 1

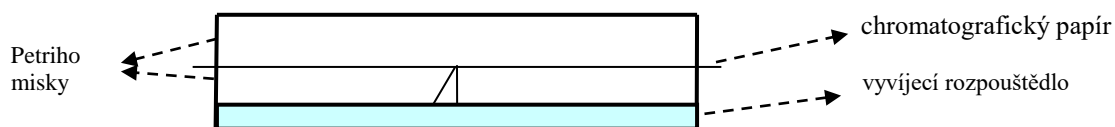
Poznámka: viz Buchar, Halbých, Borovička: Praktická cvičení z organické chemie (pro pedagogické fakulty), SPN Praha, 1970.

Postup 1. b) Vystříhnete kolečko chromatografického papíru o málo větší, než je průměr Petriho misky. Nastříhnete kruhovou výseč tak, aby po přehnutí a zkrácení sahala na dno misky a sloužila k nasávání vyvíjecího roztoku



Obr. 2b Sestava pro kruhovou chromatografií.

Kolem středu papíru naneste pipetkou roztoky soli železité, měďnaté a nikelnaté. Roztoky nanášejte na sebe ve formě kruhového proužku o průměru asi 1,5 cm a šířce max. 4 mm čistou pipetkou vymytou destilovanou vodou. Nastřížený proužek papíru bude bez vzorku. Po každém nanesení papír usušte, aby se dalším roztokem proužek nerozpíjel do šířky. I před vyvíjením musí být chromatogram suchý. Do Petriho misky dejte asi 10 cm³ vyvíjecího rozpouštědla. Na misku položte připravený papír se vzorky, nastřížený a zkrácený proužek přehněte dolů do kapaliny a přikryjte druhou miskou (obr 2).



Obr. 2b Sestava pro kruhovou chromatografii.

Vyvíjení ukončete, když čelo chromatogramu dospěje téměř k okrajům misek. Látky se rozdělí a vytvoří soustředné kruhy.

Aby se však pruhy vybarvily daleko intenzivněji, vystavte chromatogram působení par amoniaku. Pak se Cu²⁺ proužek zbarví tmavě modře, Ni²⁺ proužek fialově modře a Fe³⁺ sůl zůstane zbarvená hnědě.

Úkol: Zdůvodněte zbarvení jednotlivých proužků, příp. zapište rovnice chemických dějů.

Poznámka: Kozáková, Holada, Maliníková: Laboratorní technika pro 4. ročník gymnázií, STNL Praha 1988.

Úloha č. 2. Dělení listových barviv

a) vzestupnou papírovou chromatografii

b) vzestupnou chromatografii na tenké vrstvě

Pomůcky: extrakt, vyvíjecí soustava - směs aceton-benzen (3 : 7), pipetka, chromatografický papír, silikagelová folie Silufol, skleněný válec, malá Petriho miska.

Příprava extraktu: zelené listy (špenát, kopřiva dvoudomá, břečťan, ibišek, apod.) se rozmačkají v třecí misce s několika mililitry ethanolu nebo acetonu, a kapalina se přefiltruje do kádinky. Vzniklý roztok musí být tmavě zelený.

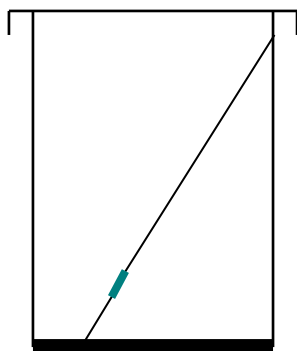
ad a) do kádinky s extraktem ponořte proužek chromatografického, příp. filtračního papíru šířky 20 – 30 mm. Roztok vzlíná do výše a při tom se rozděluje na své složky. Karotenoidy se adsorbují méně a postupují rychleji než chlorofyly (**chlorofyl a a b**), proto prolínají výše a vytvoří nad oběma chlorofyly žlutý pas.

Jiné provedení: na proužek chromatografického, příp. filtračního papíru šířky 20 – 30 mm předem nanese pipetkou kapku nebo proužek extraktu asi 1,5 až 2 cm od spodního okraje (nanášení na stejné místo je možno několikrát zopakovat, vždy po zaschnutí předchozího vzorku, aby se vzorek dále nerozpíjel). Po zaschnutí vložíme proužek do skleněného válečku (vyvíjecí komora), v němž je na dně vyvíjecí soustava. Vzorek na papíře musí být nad hladinou vyvíjecí soustavy (asi 1,5 cm). Skleněný válec přiklopíme malou Petriho miskou.



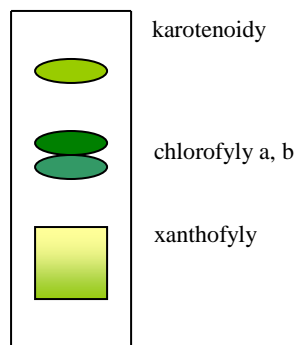
Obr. 3a

Proužek s naneseným vzorkem



Obr. 3b Proužek ve válci

na dně válce je vrstva vyvíjecí směsi

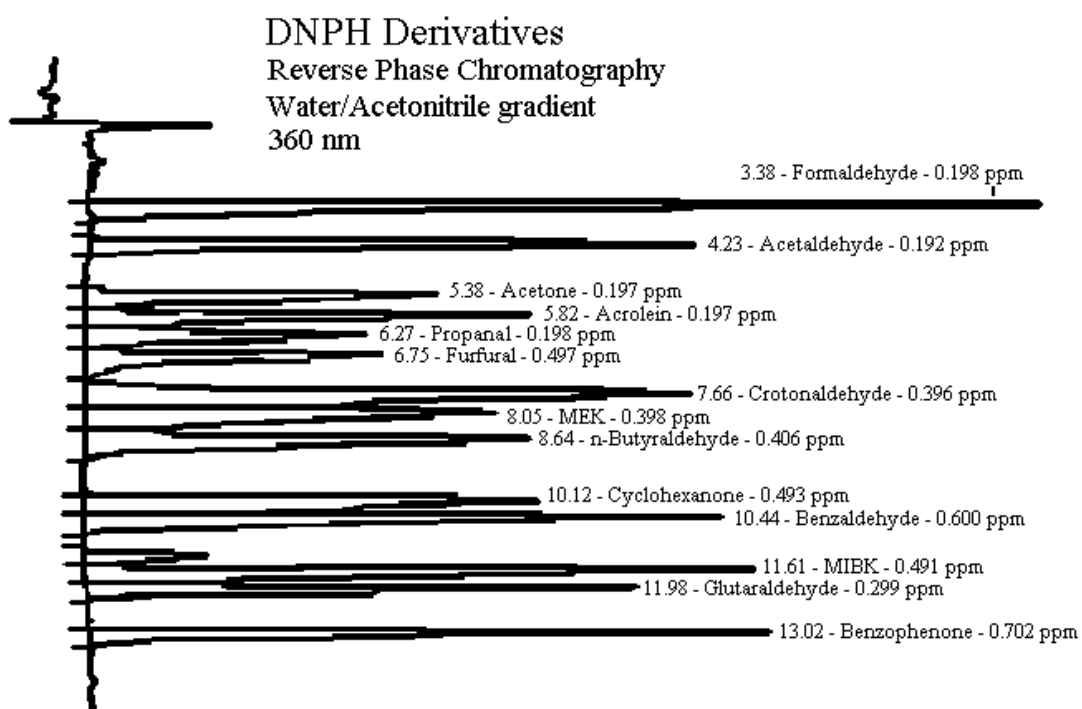


Obr. 3c chromatogram

ad b) postup jako výše (jiné provedení). Místo proužku chromatografického papíru použijeme proužek silikagelové folie Silufol.



Obr. 4. Chromatogram po rozdělení listových barviv



Obr. 5. Chromatogram směsi aldehydů a ketonů