

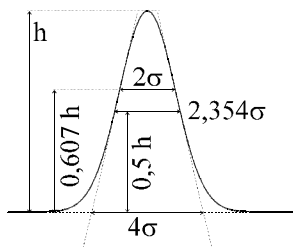
## ŠÍŘKA PÍKU

odráží šířku zóny příslušného analytu v koloně

- šířka píku při základně  $w = 4\sigma$
- šířka píku v polovině výšky  $w_{1/2} = 2,354\sigma$
- šířka píku mezi inflexními body  $w_i = 2\sigma$

Šířka píku se udává v délkových nebo časových jednotkách [mm, cm, s, min].

plocha píku :  $A = 1,064 \cdot h \cdot w_{1/2}$



## ÚČINNOST CHROMATOGRAFICKÉ KOLONY

Účinnost kolony charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek na koloně **rozšiřují**.

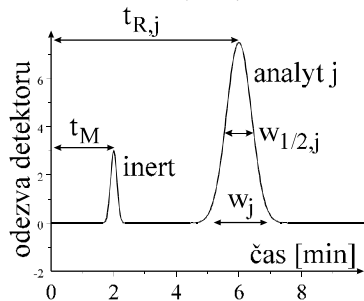
Mírou účinnosti chromatografické kolony je:

a) **počet teoretických pater** dané kolony

$$n = 16 \cdot \left( \frac{t_{R,j}}{w_j} \right)^2 = 5,545 \cdot \left( \frac{t_{R,j}}{w_{1/2,j}} \right)^2$$

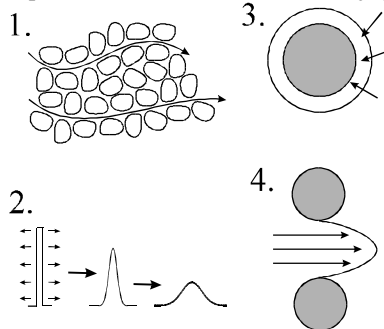
b) **výškový ekvivalent teoretického patra** (porovnávání kolon různé délky)

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{16} \cdot \left( \frac{w_j}{t_{R,j}} \right)^2 = \frac{L}{5,545} \cdot \left( \frac{w_{1/2,j}}{t_{R,j}} \right)^2$$



## PŘÍČINY ROZŠÍŘOVÁNÍ ZÓN

- Vířivá difúze** - různé molekuly musí urazit různé vzdálenosti
- Podélná molekulární difúze** - molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci
- Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi** - různé molekuly difundují různě hluboko do stacionární fáze
- Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi** - rychlostní profil mobilní fáze uvnitř kanálku je parabolický



## VLIV RYCHLOSTI MOBILNÍ FÁZE NA ROZŠÍŘOVÁNÍ ZÓN

Výškový ekvivalent teoretického patra (H) závisí na lineární rychlosti mobilní fáze (u).

$$H = H(u) \quad , \quad H = H_V + H_P + H_S + H_M$$

1. Vířivá difúze

$$H_V = A \quad ; \text{ tj. nezávisí na } u$$

2. Podélná molekulární difúze

$$H_P = \frac{B}{u}$$

3. Odpor proti přenosu hmoty ve stac. fázi

$$H_S = C_S \cdot u$$

4. Odpor proti přenosu hmoty v mob. fázi

$$H_M = C_M \cdot u$$

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M) \cdot u$$

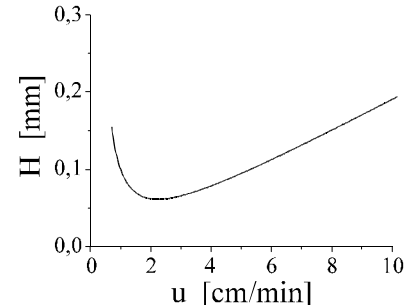
$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

## VLIV RYCHLOSTI MOBILNÍ FÁZE NA ÚČINNOST KOLONY

van Deemterova rovnice

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

van Deemterova křivka



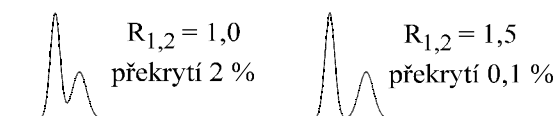
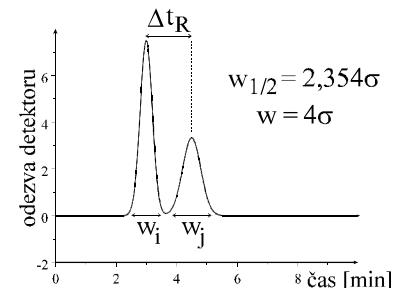
Minimum křivky odpovídá **optimální průtokové rychlosti**, při které daná kolona vykazuje **největší účinnost** a tedy minimálně rozšiřuje zóny analytů.

## ROZLIŠENÍ PÍKU

Rozdělení dvou sousedních analytů může být dokonalé nebo nedokonalé.

**Rozlišení** charakterizuje míru relativní separace popř. míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků.

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j}$$



## FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ROZLIŠENÍ

$$R_{i,j} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{\alpha_{j,i} - 1}{\alpha_{j,i}} \cdot \frac{k_j}{1 + k_j}$$

$$\text{separační faktor : } \alpha_{j,i} = \frac{k_j}{k_i} = \frac{t'_{R,j}}{t'_{R,i}} = \frac{K_{D,j}}{K_{D,i}}$$

### faktor účinnosti

- rychlost toku mobilní fáze
- délka kolony
- průměr zrna, teplota, viskozita

### faktor selektivity (velmi důležitý)

- změna stacionární fáze
- změna mobilní fáze
- rychlost toku mobilní fáze

### faktor kapacity ( $k \approx 3$ až 10)

- množství stac. fáze v koloně
- změna stac. nebo mob. fáze
- teplota (v LC malý vliv)

## ANALYTICKÁ INFORMACE Z CHROMATOGRAMU

### RESULTS

Peak	RT(min)	Height	Area	W <sub>0,5</sub>
1	4.328	0.957	7.827	0.123
2	14.256	2.547	69.946	0.448
3	17.973	3.563	127.562	0.573
4	20.127	0.657	26.181	0.672
5	28.006	1.949	112.721	0.945

### kvalitativní informace :

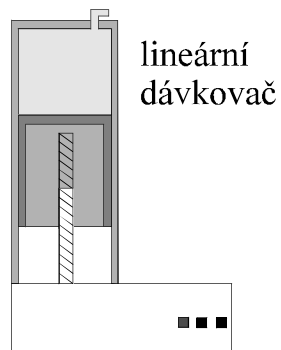
poloha píku - retenční čas  
→ retenční faktor, distribuční konstanta  
- druh látky (metoda standardů)

### kvantitativní informace :

plocha píku → množství, koncentrace látky  
a) metoda kalibrační přímkou  
b) metoda vnitřního standardu  
c) metoda standardního přídatku

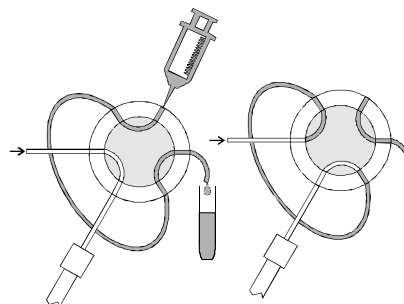
## PUMPY

tlak mobilní fáze až do 40 MPa  
čerpadla nebo lineární dávkovač



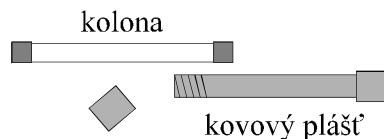
## DÁVKOVACÍ KOHOUBY

mají dávkovací smyčku (dávkují se desítky µl)



## KOLONY

Rovné skleněné trubice o délce 10 až 25 cm a vnitřním průměru 3, 4 nebo 4,6 mm naplněné sorbentem o průměru zrn 3, 5 nebo 10 µm, který je držen v koloně pomocí frit.



## STACIONÁRNÍ FÁZE pro LSC

**silikagel** (oxid křemičitý) - polární, kyselý  
**alumina** (oxid hlinitý) - polární, bazický  
**aktivní uhlí** - téměř nepolární, jen zřídka

## MOBILNÍ FÁZE pro LSC

eluční síla roste → pentan, benzen, chloroform, aceton, acetonitril, ethanol, methanol, voda

## STACIONÁRNÍ FÁZE pro LLC

- stacionární fáze **mechanicky nanesené** na inertním nosiči (ethylenglycol nebo skvalan na silikagelu)
- stacionární fáze **chemicky vázané (zakotvené)** na inertním nosiči (tj. silikagelu)  
≡Si-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> -C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> nepolární  
-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CN -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> polární  
-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH polární

## MOBILNÍ FÁZE pro LLC

- chromatografie s **normálními** fázemi (stac. fáze polární a mob. fáze nepolární) pentan, heptan, chloroform a jejich směsi
- chromatografie s **obrácenými (reverzními)** fázemi (RP-HPLC) (stac. fáze nepolární a mob. fáze polární) methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda a jejich směsi

isokratická a gradientová eluce

## STACIONÁRNÍ FÁZE pro IEC

měníče iontů s nabitými funkčními skupinami  
~COO<sup>-</sup> ~SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ~NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ~CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
~SO<sub>3</sub>H<sup>+</sup> + Na<sup>+</sup> ↔ ~SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup> + H<sup>+</sup>  
~NH<sub>3</sub><sup>+</sup>OH<sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ↔ ~NH<sub>3</sub><sup>+</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + OH<sup>-</sup>

## MOBILNÍ FÁZE pro IEC

roztoky anorganických kyselin a zásad o dané iontové síle a daném pH

## STACIONÁRNÍ FÁZE pro GPC, GF, SEC

polystyren zesíťovaný divinylbenzenem a silikagel o určité velikosti pórů

## MOBILNÍ FÁZE pro GPC, GF, SEC

vodné pufrů (např. fosforečnanový, TRIS), acetonitril a kys. trifluoroctová (TFA)