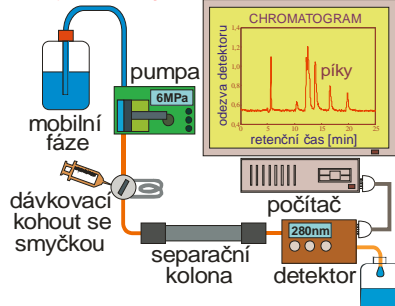


Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinový chromatograf

HPLC



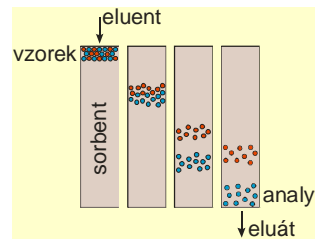
Separací metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Separace (dělení)

probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (sorbent) a mobilní fázi (eluent).



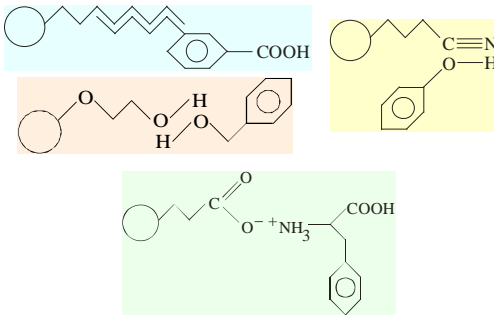
Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou **afinitu** ke stacionární fázi. Různé analyty podléhají různé **distribuci** (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fází. Rozdílné analyty jsou rozdílně **zadržovány** a rozdílně **zpoždovány** (retardovány).

Separací metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Druhy interakcí



Separací metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Separace a disperse

Při postupu vzorku kolonou

se jednotlivé složky vzorku (analyty) **dělí** (dospějí do detektoru v různých retenčních časech) se zóny analytů **rozšiřují**

Termodynamika separace se zabývá vlivy, které ovlivňují velikost **interakce** mezi sorbentem a analytem **zadržování (retenci)** a **zpoždování (retardaci)** analytů **rychlost pohybu (unášení)** analytů kolonou **rozdíl v retenčních časech** analytů **dělení** analytů od sebe navzájem

Kinetika separace se zabývá vlivy, které ovlivňují **rozšiřování (rozmyvání) zón** analytů během postupu kolonou **šířky píků** v chromatogramu

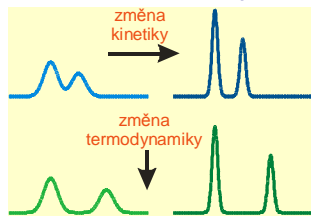
Separací metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Termodynamika a kinetika separace

spolu úzce souvisejí a obě dvě určují, jak moc se sousední píky v chromatogramu **překrývají**; tj. jak dokonale nebo nedokonalé jsou **zóny sousedních analytů vzájemně odděleny**. Termodynamika i kinetika separace ovlivňují **rozlišení** sousedních píků v chromatogramu.



Separací metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Termodynamika separace

objem stacionární fáze V_s [mL]

objem mobilní fáze V_m [mL]

objemový průtok mobilní fáze F_m [mL/min]

lineární rychlost mobilní fáze u [cm/min]

retenční objem i-tého analytu $V_{R,i}$ [mL]

retenční čas i-tého analytu $t_{R,i}$ [min] $V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$

mrtvý objem kolony V_M [mL]

mrtvý čas kolony t_M [min] $V_M = F_m \cdot t_M = V_m$

redukovaný retenční objem $V'_{R,i}$ [mL]

redukovaný retenční čas $t'_{R,i}$ [min] $V'_{R,i} = F_m \cdot t'_{R,i}$

$$u = \frac{L}{t_M}$$

$$V'_{R,i} = V_{R,i} - V_M$$

$$t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M$$

Separací metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Retenční veličiny

Retenční objem je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.

Retenční čas je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně.

Mrtvý objem kolony je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Mrtvý čas kolony je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. **Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas - mrtvý čas kolony.**

Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi.

Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Distribuce a retence

Distribuční konstanta (rozdělovací konstanta)

$$K_{D,i} = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

Retenční faktor (kapacitní faktor, kapacitní poměr)

$$k_i = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R,i}}{t_M} \quad k_i = \frac{V_{R,i} - V_M}{V_M} = \frac{V'_{R,i}}{V_M}$$

$K_{D,i}$ a k_i charakterizují **selektivitu**, tj. jak moc se analyty na koloně **zadržují** a **zpožďují**.

Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Základní rovnice chromatografie

$$V_{R,i} = V_M + K_{D,i} \cdot V_s$$

platí především pro
rozdělovací chromatografii

$$V'_{R,i} = K_{D,i} \cdot V_s$$

$$t_{R,i} = \frac{V_{R,i}}{F_m} = \frac{V_M + K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$$

$$t'_{R,i} = \frac{V'_{R,i}}{F_m} = \frac{K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$$

Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Separční mechanismy u HPLC

příčiny zadržování a dělení separovaných látek

Gelová permeační chromatografie (GPC)

využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.

Rozdělovací chromatografie (LLC)

využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.

Adsorpční chromatografie (LSC)

využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu pevné fáze s aktivními centry.

Iontově výměnná chromatografie (IEC)

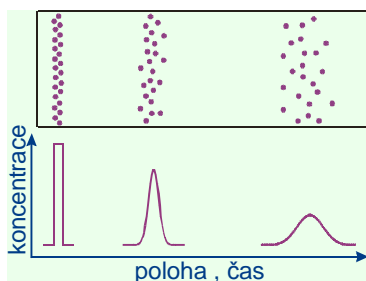
využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

Kinetika separace



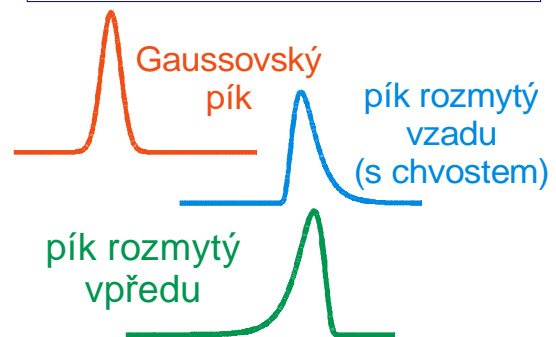
Zóny dělených látek (analytů) se během postupu kolonou **rozšiřují**.
Zóně analytu v chromatogramu odpovídá **pík** neboli **eluční křivka**, která charakterizuje **koncentrační profil** analytu v zóně.

Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

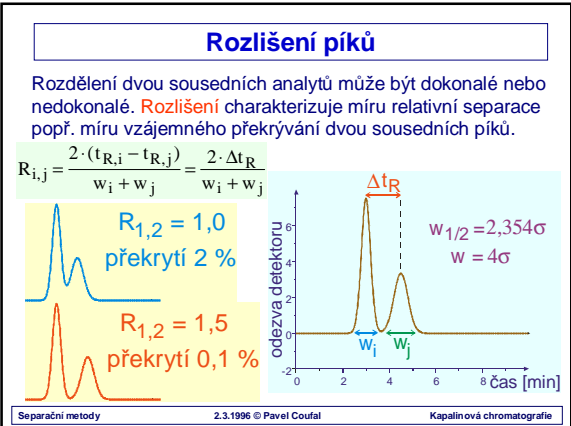
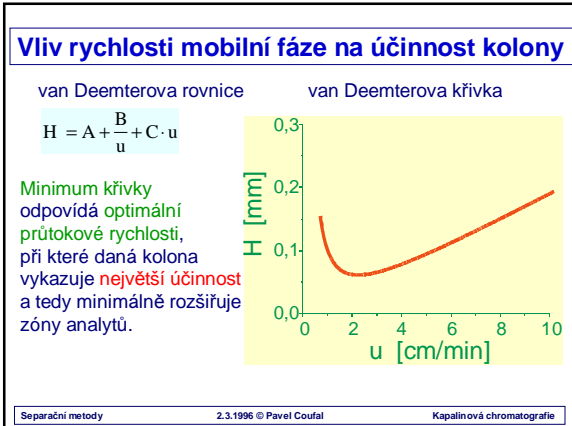
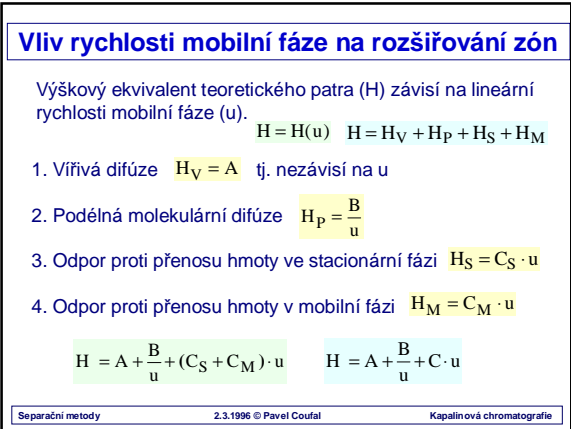
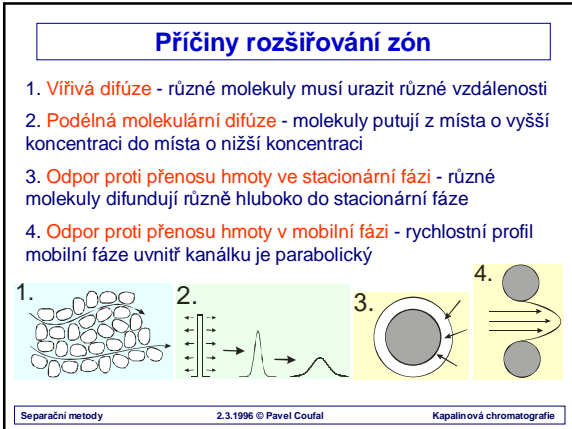
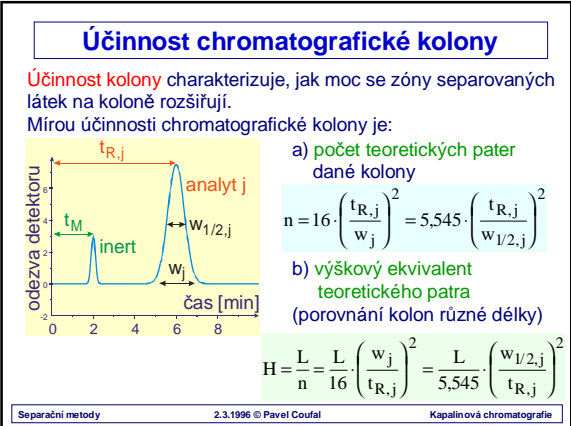
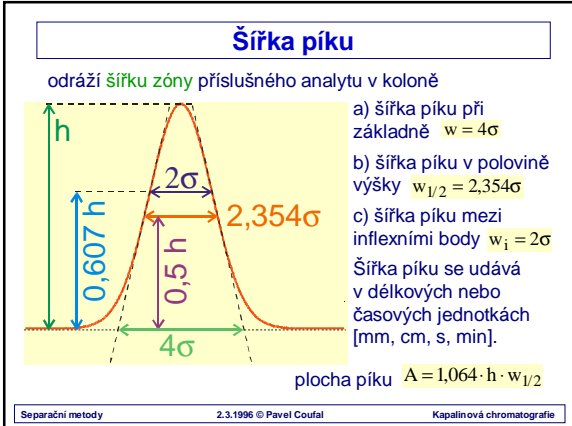
Tvar píku



Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie



Faktory ovlivňující rozlišení

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

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**
- a) rychlost toku mobilní fáze
 - b) délka kolony
 - c) průměr zrna, teplota, viskozita
- faktor selektivity**
(velmi důležitý)
- a) změna stacionární fáze
 - b) změna mobilní fáze
 - c) rychlost toku mobilní fáze
- faktor kapacity**
($k \approx 3$ až 10)
- a) množství stacionární fáze v koloně
 - b) změna stacionární nebo mobilní fáze
 - c) teplota (v LC malý vliv)