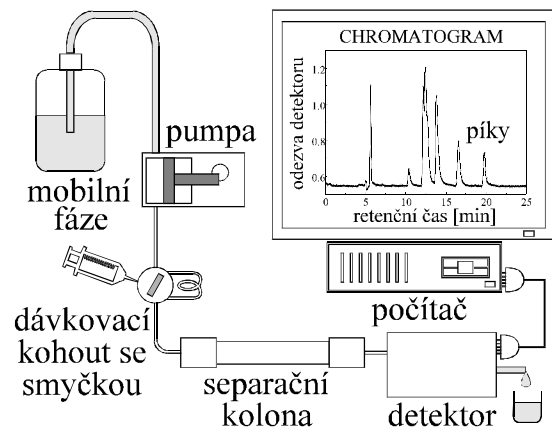
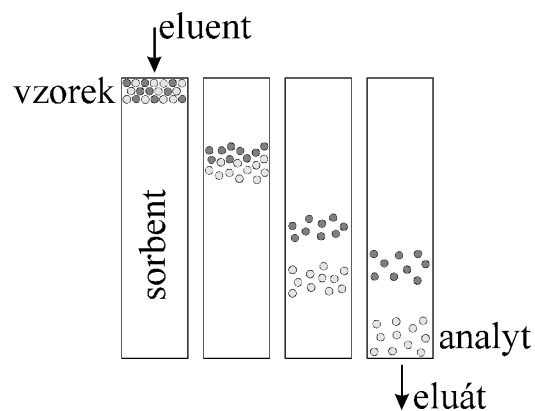


VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE
Kapalinový CHROMATOGRAF HPLC



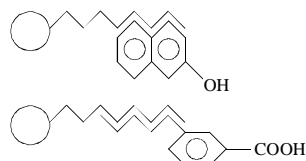
SEPARACE (DĚLENÍ)

probíhá v separační koloně, která obsahuje **stacionární** (nepohyblivou) **fázi** = sorbent a **mobilní** (pohyblivou) **fázi** = eluent.
Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou **afinitu** ke stacionární fázi.
Různé analyty podléhají různé **distribuci** (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fázi.
Rozdílné analyty jsou rozdílně **zadržovány** a rozdílně **zpoždovány** (retardovány).

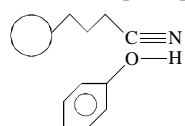


DRUHY INTERAKCÍ

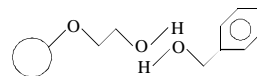
hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly)



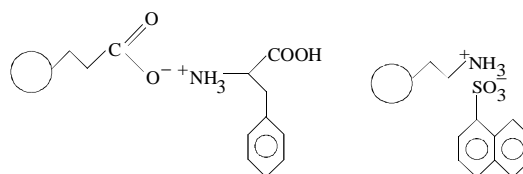
interakce dipól-dipól



vodíková vazba



elektrostatická interakce



Při postupu vzorku kolonou :

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

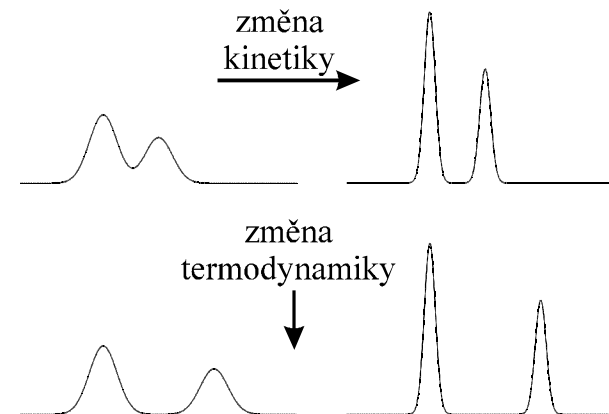
Termodynamika separace se zabývá vlivy, které ovlivňují

- velikost interakce mezi sorbentem a analytem
- zadržování (retenci) a zpoždování (retardaci) analytů
- rychlost migrace analytů kolonou
- rozdíl v retenčních časech analytů
- dělení analytů od sebe navzájem

Kinetika separace se zabývá vlivy, které ovlivňují

- rozšiřování (rozmyívání) zón analytů během postupu kolonou
- šířky píků v chromatogramu

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



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]
mrtvý objem kolony V_M [ml]
mrtvý čas kolony t_M [min]
redukovaný retenční objem $V'_{R,i}$ [ml]
redukovaný retenční čas $t'_{R,i}$ [min]

$$V_M = F_m \cdot t_M = V_m$$

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

$$V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$$

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

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

$$V'_{R,i} = F_m \cdot t'_{R,i}$$

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.

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)

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

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

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

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

ZÁKLADNÍ ROVNICE CHROMATOGRRAFIE

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

platí především pro rozdělovací chromatografii

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

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

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

SEPARAČNÍ 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 tuhé fáze s aktivními centry.

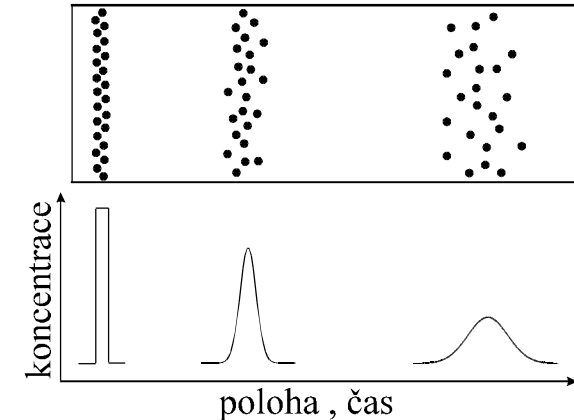
Iontově výměnná chromatografie (IEC)

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

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.



TVARY PÍKU

