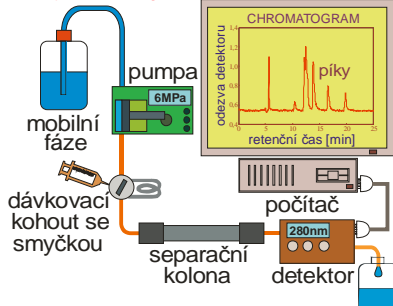


## Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Kapalinový chromatograf

HPLC



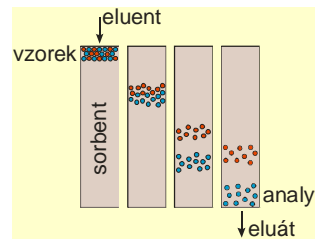
Separací metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

## Separace (dělení)

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



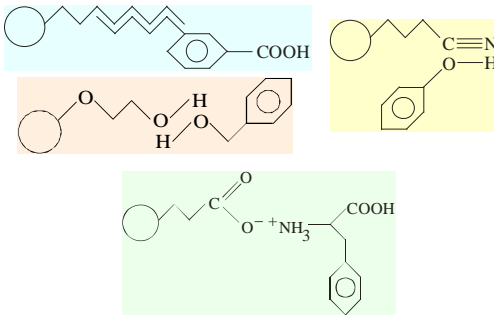
Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou **afinitu** ke stacionární fázi. Různé analyty podléhají různé **distribuci** (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fází. Rozdílné analyty jsou rozdílně **zadržovány** a rozdílně **zpoždovány** (retardovány).

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

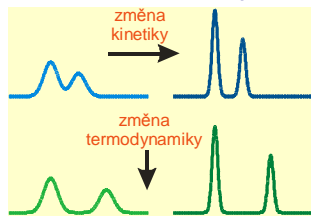
Separací metody

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]

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]

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

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

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

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

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

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

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 tuhé fáze s aktivními centry.

**Iontově výměnná chromatografie (IEC)**

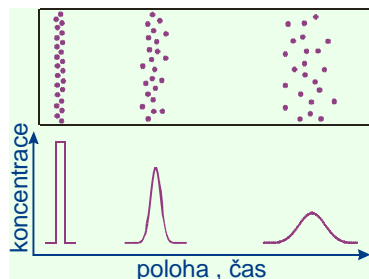
využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

## Kinetika separace



Zóny dělených látek (analytů) se během postupu kolonou **rozšiřují**.

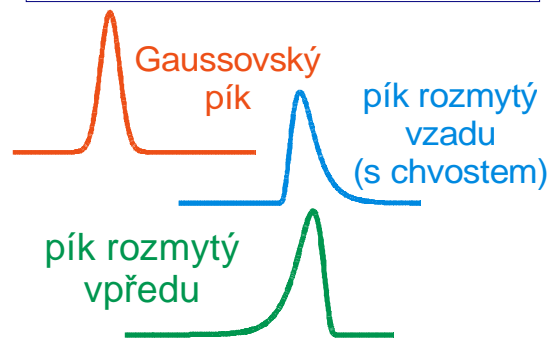
Zóně analytu v chromatogramu odpovídá **pík** neboli **eluční křivka**, která charakterizuje **koncentrační profil** analytu v zóně.

Separční metody

2.3.1996 © Pavel Coufal

Kapalinová chromatografie

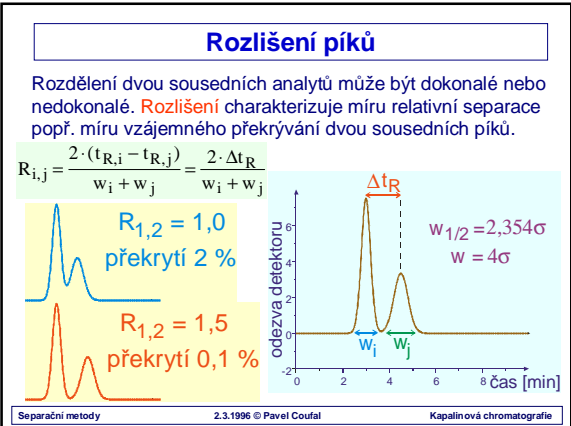
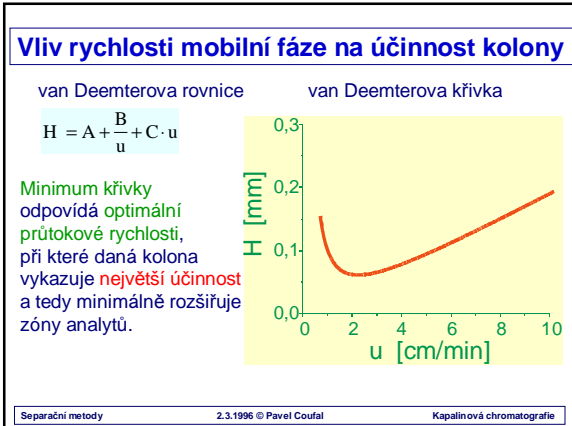
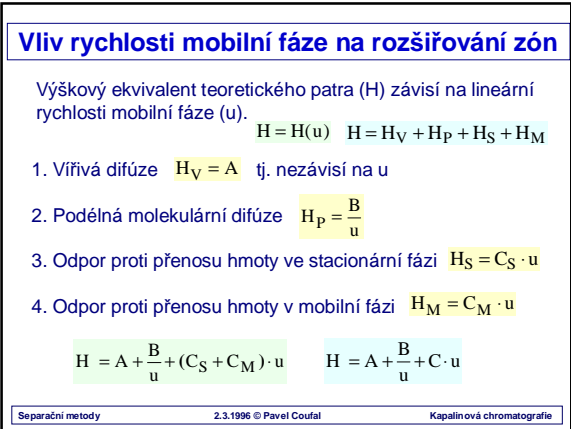
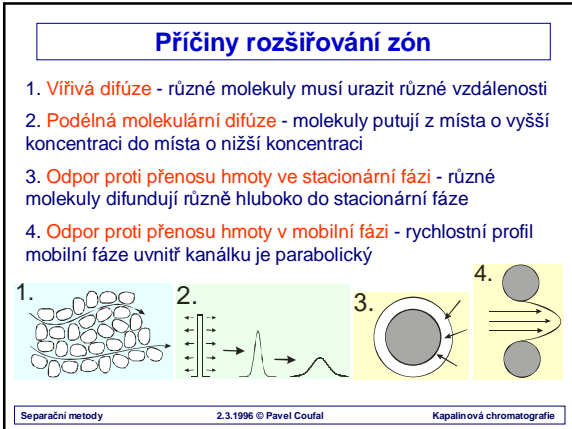
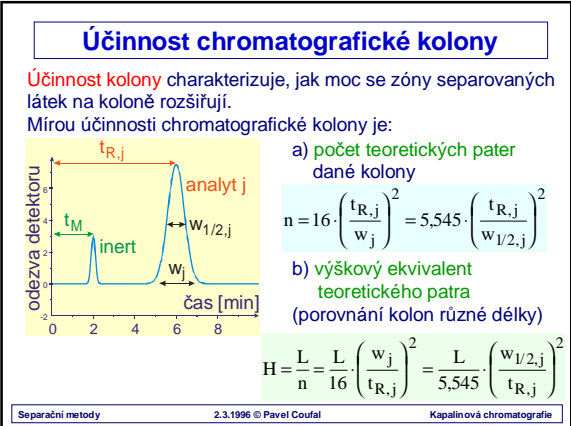
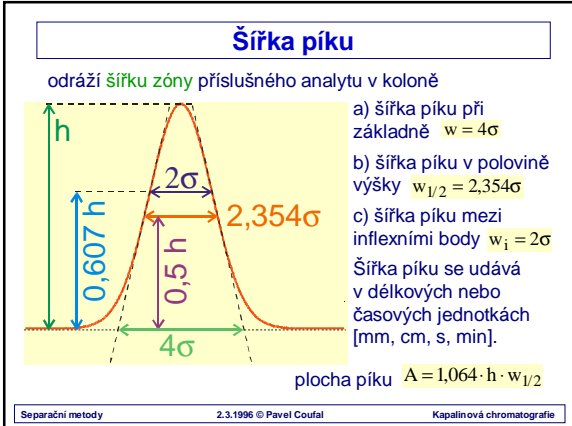
## Tvar píku



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)