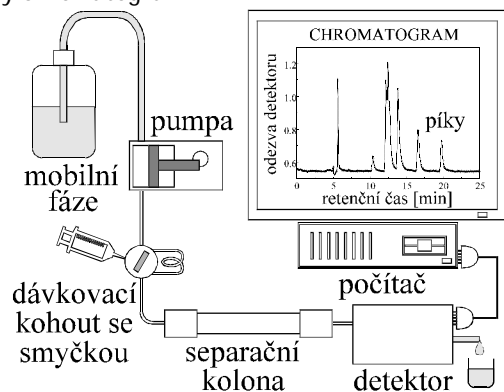


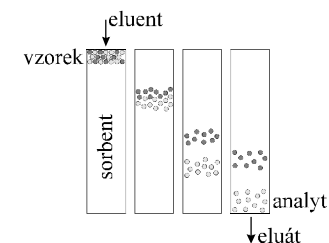
## VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

kapalinový chromatograf



## SEPARACE (DĚLENÍ) V HPLC

- 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).



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

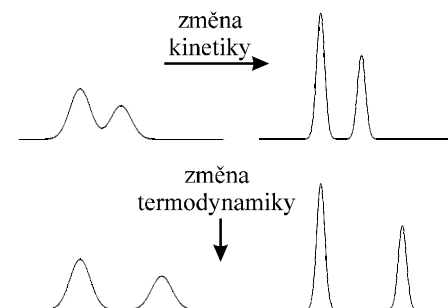
- velikost interakce mezi sorbentem a analytem
- zadržování (retenci) a zpoždování (retardaci) analytů
- rychlost migrace analytů kolonou
- rozdíl v retenčních časech analytů
- dělení analytů od sebe navzájem

Kinetika separace se zabývá vlivy, které ovlivňují

- rozšiřování (rozmyívání) zón analytů během postupu kolonou
- šířku 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 rozlišení sousedních píků v chromatogramu.



## TERMODYNAMIKA SEPARACE

- n objem stacionární fáze  $V_s$  [ml]
- n objem mobilní fáze  $V_m$  [ml]
- n objemový průtok mobilní fáze  $F_m$  [ml/min]
- n lineární rychlost mobilní fáze  $u$  [cm/min]
- n retenční objem i-tého analytu  $V_{R,i}$  [ml]
- n retenční čas i-tého analytu  $t_{R,i}$  [min]
- n mrtvý objem kolony  $V_M$  [ml]
- n mrtvý čas kolony  $t_M$  [min]
- n redukovaný retenční objem  $V'_{R,i}$  [ml]
- n redukovaný retenční čas  $t'_{R,i}$  [min]

$$V_M = F_m \cdot t_M = V_m \quad V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$$

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

$$u = \frac{L}{t_M} \quad V'_{R,i} = F_m \cdot t'_{R,i}$$

- n **Retenční objem** je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.
- n **Retenční čas** je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně.
- n **Mrtvý objem kolony** je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.
- n **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.
- n **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)

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

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

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

## ZÁKLADNÍ ROVNICE CHROMATOGRFIE

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

- n platí především pro rozdělovací chromatografii

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

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

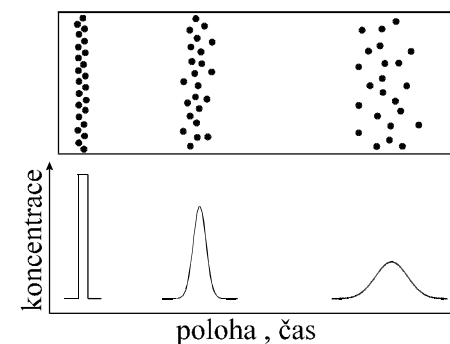
$$t'_{R,i} = \frac{V'_{R,i}}{F_m} = \frac{K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$$

## SEPARAČNÍ MECHANISMY u HPLC

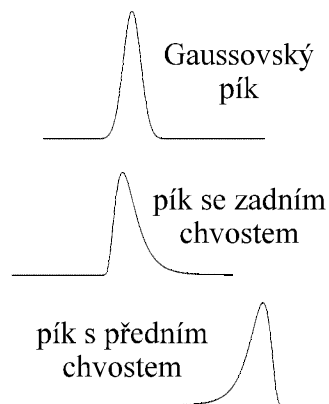
- n příčiny zadržování a dělení separovaných látek
- n Gelová permeační chromatografie (GPC)  
využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.
- n Rozdělovací chromatografie (LLC)  
využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.
- n Adsorpční chromatografie (LSC)  
využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.
- n Ionově výměnná chromatografie (IEC)  
využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

## KINETIKA SEPARACE

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



## TVARY PÍKU



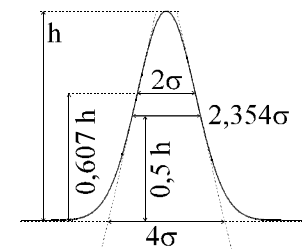
## ŠÍŘKA PÍKU

- n 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].

- n 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**.

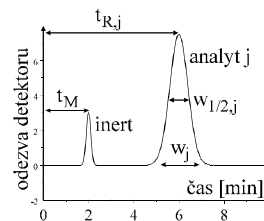
Mírou účinnosti chromatografické kolony je:

a) počet teoretických pater dané kolony

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

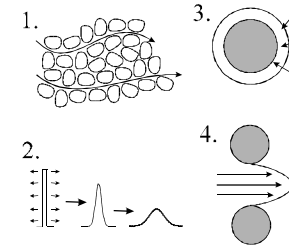
b) výškový ekvivalent teoretického patra (porovnávání kolon různé délky)

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



## PŘÍČINY ROZŠÍŘOVÁNÍ ZÓN

1. **Viřivá difúze** - různé molekuly musí urazit různé vzdálenosti
2. **Podélná molekulární difúze** - molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci
3. **Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi** - různé molekuly difundují různě hluboko do stacionární fáze
4. **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 ( $u$ ).

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

1. Viřivá difúze  $H_V = A$

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  $H_M = C_M \cdot u$

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

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

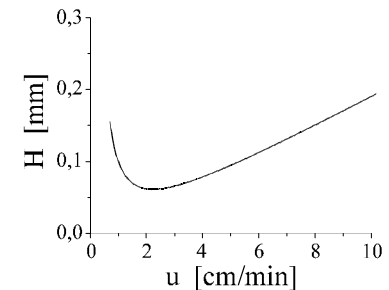
## VLIV RYCHLOSTI MOBILNÍ FÁZE NA ÚČINNOST KOLONY

$n$  van Deemterova rovnice

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

$n$  van Deemterova křivka

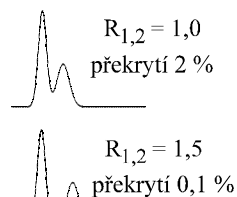
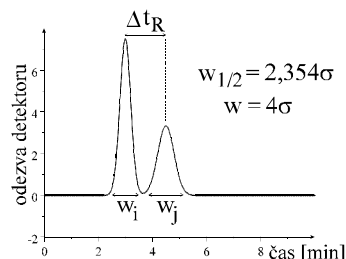
Minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které daná kolona vykazuje největší účinnost a tedy minimálně rozšiřuje zóny analytů.



## ROZLIŠENÍ PÍKU

- n Rozdělení dvou sousedních analytů může být dokonalé nebo nedokonalé.
- n 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

$$R_{i,j} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{\alpha_{j,i} - 1}{\alpha_{j,i}} \cdot \frac{k_j}{1 + k_j} \quad \alpha_{j,i} = \frac{k_j}{k_i} = \frac{t'_{R,j}}{t'_{R,i}} = \frac{K_{D,j}}{K_{D,i}}$$

separační faktor  $\alpha$

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

## ANALYTICKÁ INFORMACE Z CHROMATOGRAMU

### RESULTS

Peak	RT(min)	Height	Area	W0,5
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

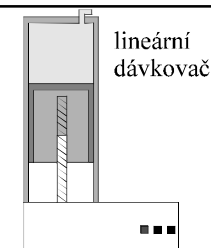
a) metoda kalibrační přímky

b) metoda vnitřního standardu

c) metoda standardního přídatku

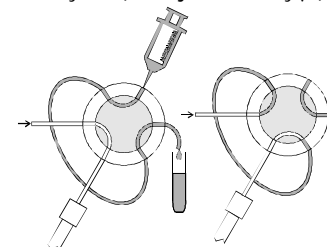
## PUMPY

- n tlak mobilní fáze až do 40 MPa
- n čerpadla nebo lineární dávkovače



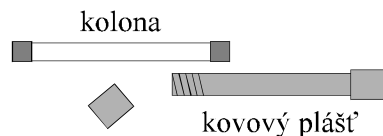
## DÁVKOVACÍ KOHOUTY

- n mají dávkovací smyčku (dávkují se desítky μl)



### KOLONY

- n Rovné skleněné nebo nerezové 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  $\mu\text{m}$ , který je držen v kolně 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

- n stacionární fáze mechanicky nanesené na inertním nosiči (ethylenglykol nebo skvalan na silikagelu)
- n stacionární fáze chemicky vázané (zakotvené) na inertním nosiči (tj. silikagelu)
 

$\equiv\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$	$-\text{C}_6\text{H}_{17}$	$-(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$	nepolární
$-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$		polární
$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$			polární

### MOBILNÍ FÁZE pro LLC

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

### STACIONÁRNÍ FÁZE pro IEC

- n měniče iontů s nabitými funkčními skupinami  
 $-\text{COO}^-$   $-\text{SO}_3^-$   $-\text{NH}_3^+$   $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$   
 $-\text{SO}_3\text{H}^+ + \text{Na}^+ \rightleftharpoons -\text{SO}_3^-\text{Na}^+ + \text{H}^+$   
 $-\text{NH}_3^+\text{OH}^+ + \text{NO}_3^- \rightleftharpoons -\text{NH}_3^+\text{NO}_3^- + \text{OH}^-$

### MOBILNÍ FÁZE pro IEC

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

### STACIONÁRNÍ FÁZE pro GPC, GF, SEC

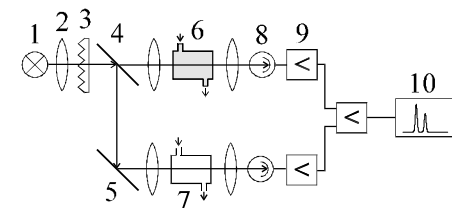
- n polystyren zesíťovaný divinylbenzenem a silikagel o určité velikosti pórů

### MOBILNÍ FÁZE pro GPC, GF, SEC

- n vodné pufrý (např. fosforečnanový, TRI S), acetonitril a kys. trifluoroctová (TFA)

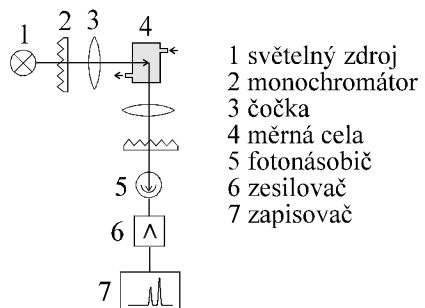
### DETEKTORY v HPLC

#### 1) absorpční fotometrický detektor

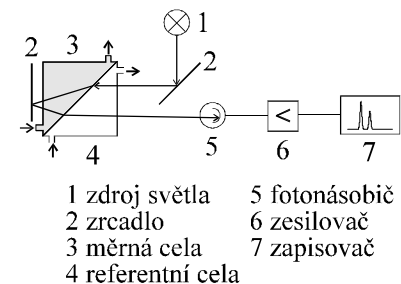


- |                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| 1 světelný zdroj        | 6 měrná cela      |
| 2 čočka                 | 7 referentní cela |
| 3 monochromátor         | 8 fotonásobič     |
| 4 polopropustné zrcadlo | 9 zesilovač       |
| 5 zrcadlo               | 10 zapisovač      |

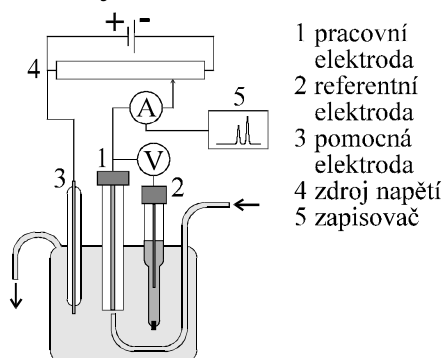
## 2) fluorimetrický detektor (fluorescenční detektor)



## 3) refraktometrický detektor



## 4) amperometrický detektor



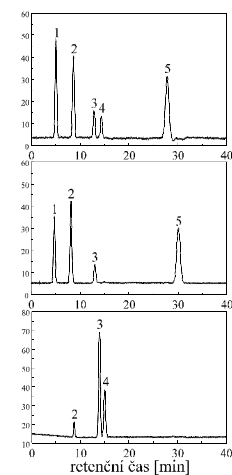
5) vodivostní detektor

6) detektor s diodovým polem (DAD)

7) hmotnostní spektrometr jako detektor

## HPLC FUNGICIDŮ

- n fungicidy extrahované dichlormetanem z ovoce
- n stac. fáze: Nucleosil 7 C18
- n eluent: kys. mravenčí + NaOH (pH 7,5), 40 % se 60 % methanolu
- n píky: 1. thiabendazol;  
2. o-fenylfenol; 3. difenylamin;  
4. ethoxychin; 5. bifenylyl



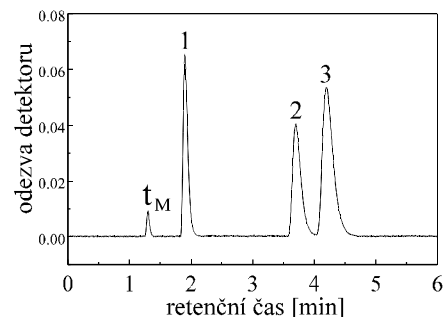
UV  
fotometrická  
detekce  
při 246 nm

fluorimetrická  
detekce  
excitace / emise  
275 nm / 320 nm

amperometrická  
detekce  
při +800 mV

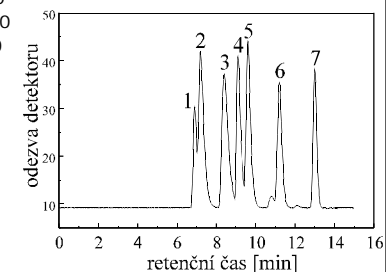
### HPLC DERIVÁTŮ PURINU

- n kolona: 30 cm x 4 mm
- n stac. fáze: Nucleosil 50-5
- n eluent: methanol / voda / dichlormethan 47/17/936 (v/v/v)
- n průtok eluentu: 0,8 ml/min při tlaku 100 bar
- n detekce: UV fotometrická při 280 nm
- n píky: 1. kofein; 2. theofyllin; 3. theobromin



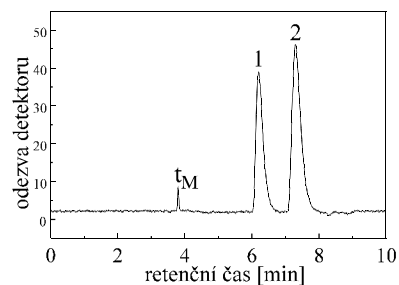
### HPLC BÍLKOVIN

- n kolona: 25 cm x 9,4 mm
- n stac. fáze: Zorbax GF-250
- n eluent: 130 mM NaCl + 20 mM KCl + 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 7,0)
- n průtok eluentu: 1 ml/min
- n detekce: UV fotometrická při 210 nm
- n píky:
  1. myší IgM, M<sub>h</sub> = 900 000
  2. hovězí thyroglobulin, M<sub>h</sub> = 669 000
  3. β-amylasa z brambor, M<sub>h</sub> = 200 000
  4. hovězí serum albumin, M<sub>h</sub> = 66 000
  5. kuřecí albumin, M<sub>h</sub> = 45 500
  6. hovězí RNAasa, M<sub>h</sub> = 13 700
  7. azid (t<sub>M</sub>), M<sub>h</sub> = 65



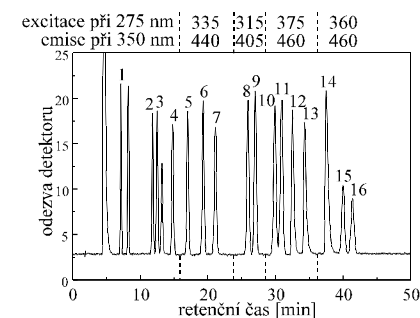
### HPLC D,L ALANINU chirální separace optických izomerů

- n kolona: 25 cm x 4 mm
- n stac. fáze: Nucleosil Chiral-1
- n eluent: 1 mM vodný roztok (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu (pH = 5,6)
- n průtok eluentu : 1,2 ml/min při tlaku 75 bar
- n teplota: 60 °C
- n detekce: UV fotometrická při 240 nm
- n píky: 1. D-alanin; 2. L-alanin



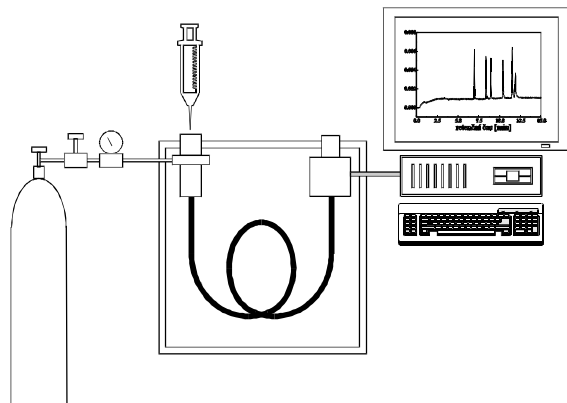
### HPLC POLYAROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ

- n kolona: 15 cm x 4 mm
- n stac. fáze: Nucleosil 5 C18 PAH
- n průtok eluentu: 0,9 ml/min při tlaku 100 bar
- n eluent: acetonitril/voda; 5 min 60% ACN, isokraticky; 60% → 90% ACN za 15 min, lineární gradient; 90% → 100% ACN za 20 min, lineární gradient; 20 min 100% ACN, isokraticky
- n detekce: fluorimetrická
- n píky:
  1. naftalen, 2. acenaften,
  3. fluoren, 4. fenanthren,
  5. anthracen, 6. fluoranthren,
  7. pyren, 8. benz[a]antracen,
  9. chrysen, 10. benzo[e]pyren,
  11. benzo[b]fluoranthren,
  12. benzo[k]fluoranthren,
  13. benzo[a]pyren,
  14. dibenzo[ah]anthracen,
  15. benzo[ghi]perylene,
  16. indeno[1,2,3-cd]pyren



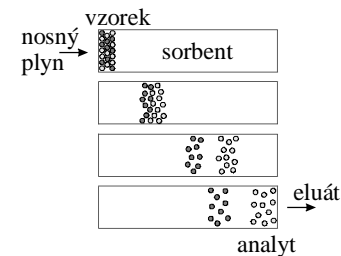


## PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE (GAS CHROMATOGRAPHY, GC)



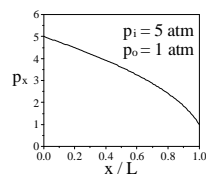
## SEPARACE V GC

- probíhá v kapilární nebo náplňové koloně, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi (sorbent) a mobilní (pohyblivou) fázi (nosný plyn, inertní plyn či eluent).
- Rozdílné analyty mají rozdílnou afinitu k sorbentu.
- Různé analyty vykazují různou distribuci mezi sorbentem a eluentem nebo adsorpci na sorbentu.
- Rozdílné analyty jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpždovány (retardovány).

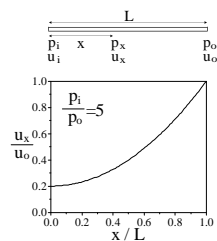


## LINEÁRNÍ RYCHLOST NOSNÉHO PLYNU

stlačitelnost plynů



nárůst lineární rychlosti  
nosného plynu při průchodu  
kolonou



## Kompresibilitní faktor

$$j = \frac{3}{2} \cdot \frac{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^2 - 1}{\left(\frac{p_i}{p_o}\right)^3 - 1}$$

$p_i$  tlak na vstupu do kolony  
 $p_o$  tlak na výstupu z kolony

průměrná lineární rychlost mobilní fáze

$$\bar{u} = \frac{B_o \cdot \Delta p}{\eta \cdot \varepsilon \cdot L} = \frac{B_o \cdot (p_i - p_o)}{\eta \cdot \varepsilon \cdot L}$$

$$\bar{u} = j \cdot u_o$$

- $B_o$  specifická permeabilita kolony [m<sup>2</sup>]
- $\Delta p$  tlakový spád [Pa]
- $h$  dynamická viskozita [Pa s]
- $e$  vnitřní porozita sorbentu
- $L$  délka kolony [m]

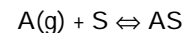
## RETENČNÍ OBJEMY V GC

- n mrtvý retenční objem  $V_M = t_M \cdot F_m$
- n retenční objem  $V_{R,i} = t_{R,i} \cdot F_m$
- n redukovaný retenční objem  $V'_{R,i} = t'_{R,i} \cdot F_m = V_{R,i} - V_M$
- n **čistý retenční objem** je redukovaný retenční objem korigovaný na stlačitelnost nosného plynu  

$$V_N = t'_{R,i} \cdot F_m \cdot j = V'_{R,i} \cdot j$$
- n **specifický retenční objem** je čistý retenční objem vztažený na 1 g nebo 1 m<sup>2</sup> stacionární fáze a vztažený na 0 °C (tj. 273,15 K)

$$V_g = \frac{273,15 \cdot V_N}{w_L \cdot T_c} \quad V_s = \frac{273,15 \cdot V_N}{S \cdot T_c}$$

## ADSORPCE



$$K_{D,A} = \frac{(a_A)_{AS}}{(a_A)_g} = \frac{(c_A)_{AS} \cdot (\gamma_A)_{AS}}{(c_A)_g \cdot (\gamma_A)_g}$$

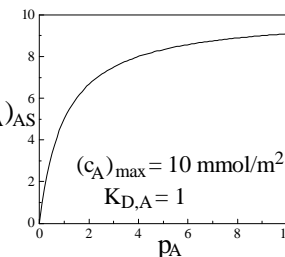
$$(c_A)_{AS} = \frac{K_{D,A}}{R \cdot T} \cdot p_A$$

Henryho adsorpční izoterma

$$(c_A)_{AS} = konst \cdot p_A$$

Langmuirova adsorpční izoterma  $(c_A)_{AS}$

$$(c_A)_{AS} = (c_A)_{\max} \cdot \frac{K_{D,A} \cdot p_A}{1 + K_{D,A} \cdot p_A}$$



## ROZPOUŠTĚNÍ (ABSORPCE)

Raoultův zákon

$$p_B = p_B^0 \cdot x_B \quad \begin{array}{l} p_B \text{ parciální tlak složky B nad směsí kapalin} \\ p_B^0 \text{ tlak (tenze) nasycených par složky B} \\ x_B \text{ molární zlomek složky B v kapalně směsi} \end{array}$$

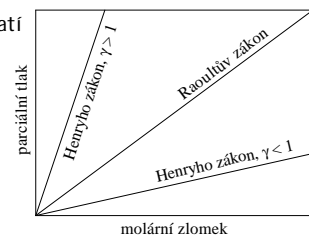
$$p_B = p_B^0 \cdot \gamma_B \cdot x_B$$

$$\gamma_B = \gamma_B(x_B)$$

pokud  $x_B \ll 1$ , pak  $\gamma_B$  je konstantní a platí

Henryho zákon

$$p_B = H_B \cdot x_B$$

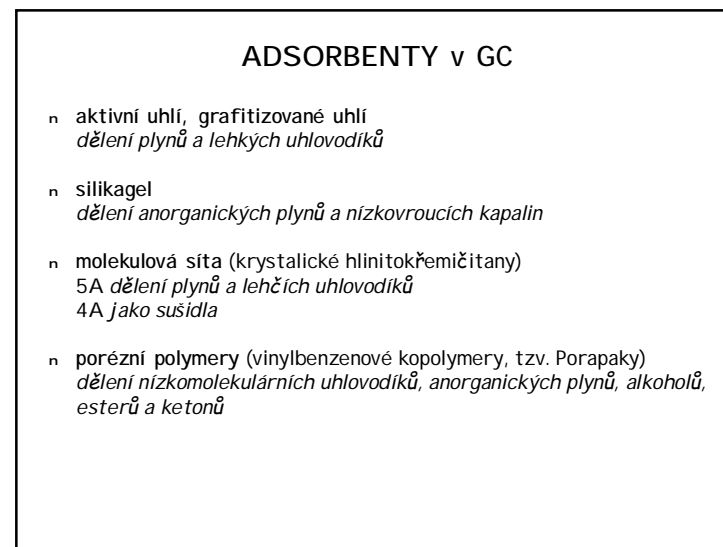
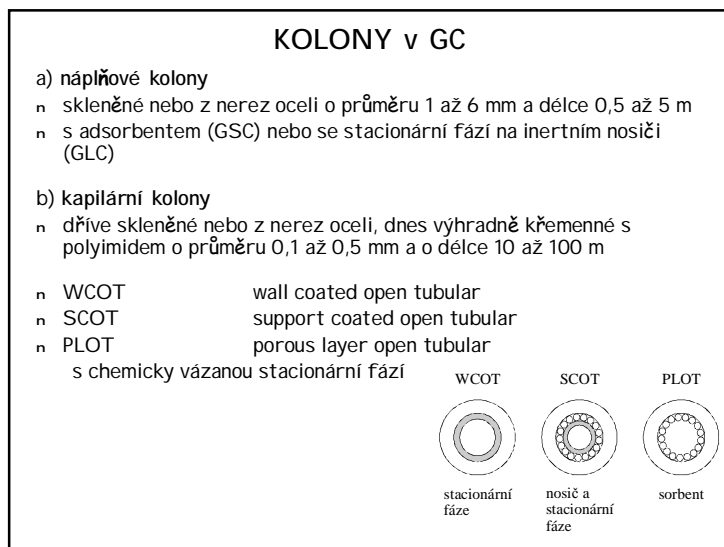
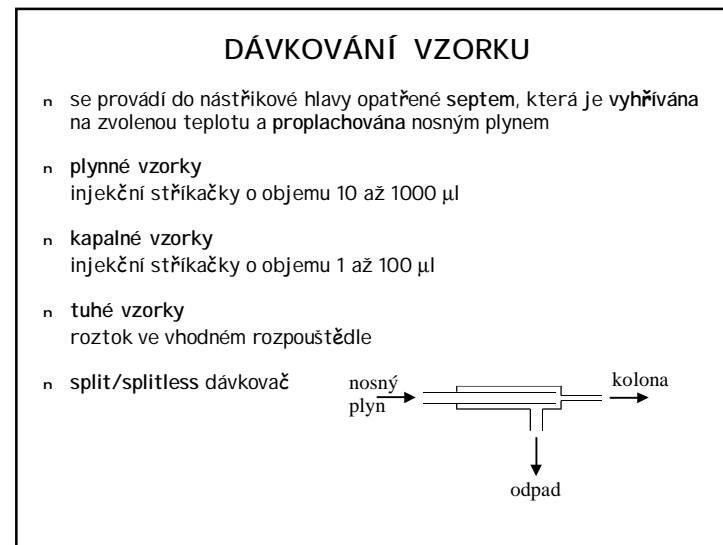
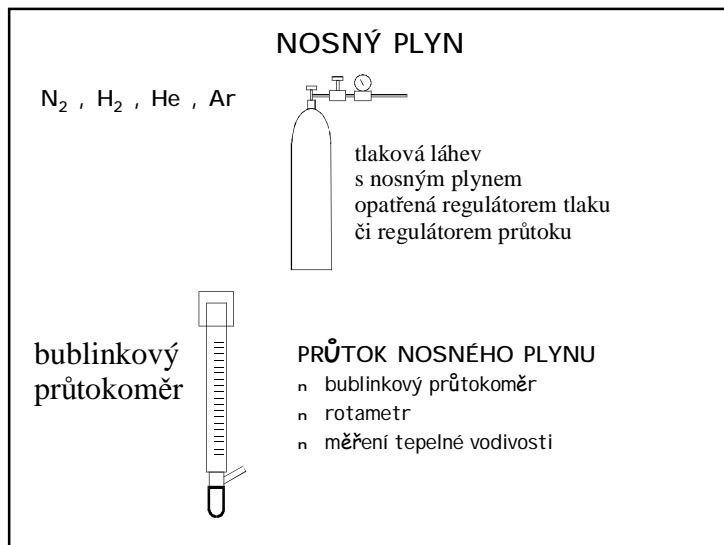


## VLIV TEPLOTY NA SEPARACI

- n teplota nástřikové hlavy,  $T_{inj}$
- n teplota termostatu kolony,  $T_c$   $T_c > T_{var}$  ;  $T_{inj} \approx T_c$  ;  $T_d > T_c$
- n teplota detektoru,  $T_d$
- n Vyšší teplota kolony vede k rychlejší analýze.
- n Vyšší teplota kolony vyžaduje vyšší tlak nosného plynu na vstupu do kolony pro zachování jeho lineární rychlosti kolonou.
- n izotermická analýza,  $T_c = konst.$
- n analýza s teplotním gradientem,  $T_{c,1} \rightarrow T_{c,2}$

## DERIVATIZACE ANALYTU

- n vede ke snížení jeho bodu varu ( $T_{var}$ )  
 kyselina benzoová (249 °C), anilin (184 °C) → benzanilid (117 °C)
- n derivatizace aminokyselin  
 aminokyselina + isopropylalkohol → isopropylester  
 + trifluoracetanhydrid → trifluoracetamid

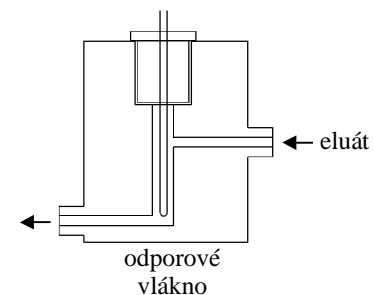


## KAPALNÉ STACIONÁRNÍ FÁZE V GC

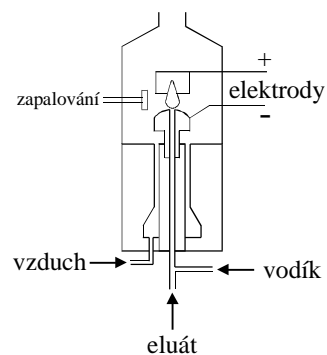
- n Carbowaxy (polyethylenglykoly) ; Ucony (polypropylenglykoly)  
*polární stacionární fáze; s rostoucí Mr klesá polarita*
- n Polyestery (např. polyethylenglykol- a polypropylenglykoladipáty, polyethylenglykolsukcináty)  
*polární stacionární fáze*
- n Silikonové stacionární fáze (polysiloxany)  
(např. methylpolysiloxan SE-30, fenylmethylpolysiloxan OV-17, fenylpolysiloxan SE-54, kyanopropylpolysiloxan SP-2340)  
*často používané  
široký rozsah polarity*

## DETEKTORY

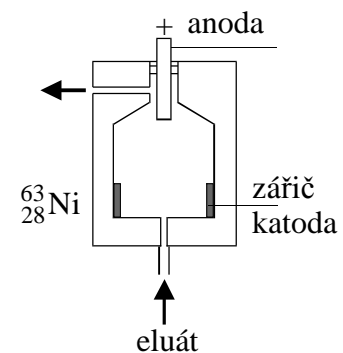
1. tepelně vodivostní detektor, TCD  
*univerzální, nedestruktivní, středně citlivý*



2. plamenový ionizační detektor, FID  
*selektivní, destruktivní, velmi citlivý*



3. detektor elektronového záchytu, ECD  
*selektivní, nedestruktivní, středně citlivý*



#### 4. hmotnostní spektrometr, MS

*vysoce specifický, destruktivní, velmi citlivý*

TCD: všechny látky lišící se tepelnou vodivostí od nosného plynu

FID: uhlovodíky

ECD: halogenderiváty (pesticidy) a nitroderiváty

#### CHARAKTERIZACE DETEKTORŮ

n základní linie, šum a drift, píky

n odezva detektoru (signál detektoru), R  
*diferenciální veličina (výška píku)*

citlivost detektoru, S  $R = S \cdot c$  nebo  $R = S \cdot \frac{dm}{dt}$

n plocha pod eluční křivkou, A  
*integrální veličina (plocha píku)*

$$A = \int_{t_1}^{t_2} R dt = \frac{S}{F_m} \cdot m \quad \text{nebo} \quad A = \int_{t_1}^{t_2} R dt = S \cdot m$$

n lineární dynamický rozsah  $A = b \cdot c$

n detekční limit, LOD 3s

n limit stanovení, LOQ 10s

#### ANALYTICKÁ INFORMACE Z CHROMATOGRAMU

##### RESULTS

<u>Peak</u>	<u>RT(min)</u>	<u>Height</u>	<u>Area</u>	<u>W0.5</u>
1	5.723	1.957	8.872	0.023
2	12.561	5.457	96.121	0.048
3	15.887	2.827	73.266	0.073
4	22.975	0.773	6.001	0.102

kvalitativní informace :

poloha píku - retenční čas

→ retenční faktor - druh látky (metoda standardů nebo MS detekce)

$$k = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

kvantitativní informace :

plocha píku → množství, koncentrace látky

a) metoda vnitřní normalizace

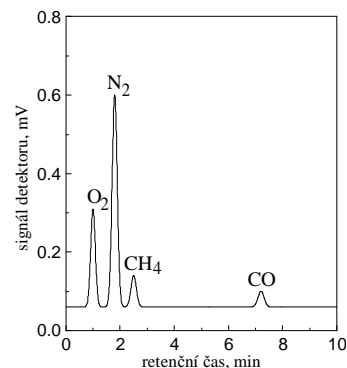
b) metoda absolutní kalibrace (kalibrační přímky)

c) metoda vnitřního standardu

d) metoda standardního přídatku

## GC PLYNŮ ze VZDUCHU

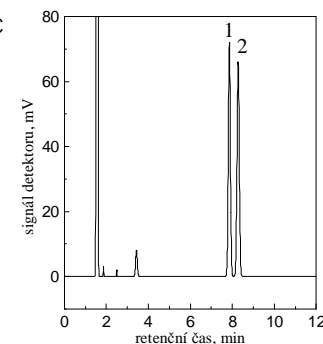
- n kolona: náplňová, z nerezové oceli  
6' x 1/8" (183 cm x 3,2 mm)
- n stacionární fáze: molekulové síto 5A
- n nosný plyn: 30 ml/min He
- n dávkování: 100  $\mu$ l (35 °C)
- n teplota termostatu kolony: 35 °C
- n detekce: TCD (140 °C)



## GC isopropylesteru FENYLALANINU

- n kolona: křemenná kapilární, 25 m x 0,250 mm
- n stacionární fáze: PERMABOND® L-CHI RASIL-VAL
- n nosný plyn: 1,2 ml/min H<sub>2</sub> (0,6 bar)
- n dávkování: 0,5  $\mu$ l (1% roztok v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)
- n splitter (dělič): 1:50
- n teplota termostatu kolony: 150 °C
- n detekce: FID (260 °C)

1. D-fenylalanin, 2. L-fenylalanin



## GC polychlorovaných bifenyľů (PCB)

- n kolona: FS-SE-54-DF-0,35; 50 m x 0,25 mm ID
- n stacionární fáze: SE-54 (*fenylpolysiloxan*)
- n nosný plyn: N<sub>2</sub> (1,2 bar)
- n dávkování: 1  $\mu$ l (200 - 800 pg/ $\mu$ l v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)
- n splitter (dělič): 1:70
- n teplota kolony: 80 °C → 280 °C, 8 °C/min
- n detekce: ECD (260 °C)

1. 2-chlorbifenyľ, 2. 4-chlorbifenyľ,
3. 2,2'-dichlorbifenyľ,
4. 2,4-dichlorbifenyľ, 5. 4,4'-dichlorbifenyľ,
6. 3,5,3'-trichlorbifenyľ,
7. 2,4,4'-trichlorbifenyľ,
8. 2,5,2',5'-tetrachlorbifenyľ,
9. 2,4,6,4'-tetrachlorbifenyľ,
10. 3,4,4'-trichlorbifenyľ,
11. 2,3,4,6,2'-pentachlorbifenyľ,
12. 2,3,4,4'-tetrachlorbifenyľ,
13. 2,3,4,5,2'-pentachlorbifenyľ,
14. 2,4,5,2',4',5'-hexachlorbifenyľ,
15. 2,3,4,2',4',5'-hexachlorbifenyľ,
16. 2,3,4,5,2',3'-hexachlorbifenyľ

