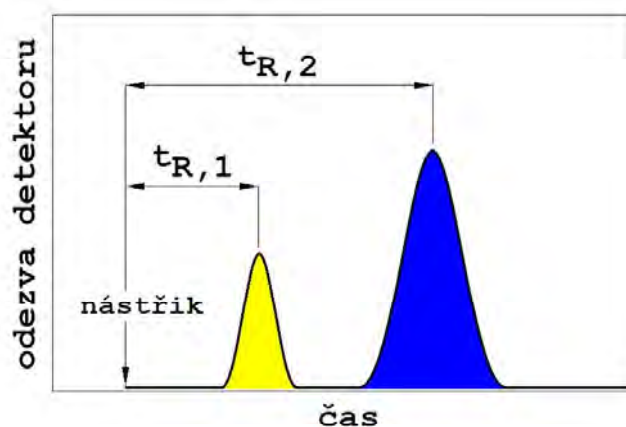
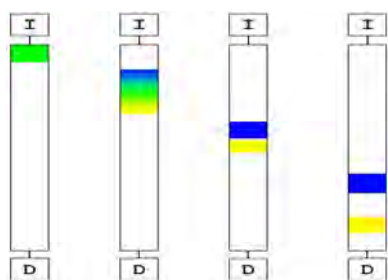


Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Josef Cvačka, 3.11.2011

1

Základy chromatografického procesu



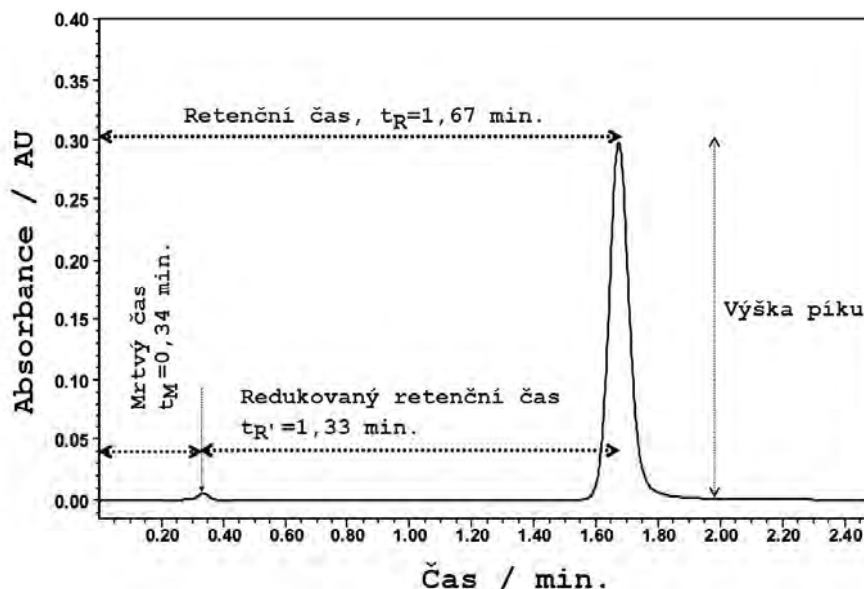
K dělení dochází v separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (**sorbent**) a mobilní fázi (**eluent**).

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

2

Retenční veličiny

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



Retenční čas t_R je celkový čas od nástřiku vzorku do zaznamenání píku detektorem.

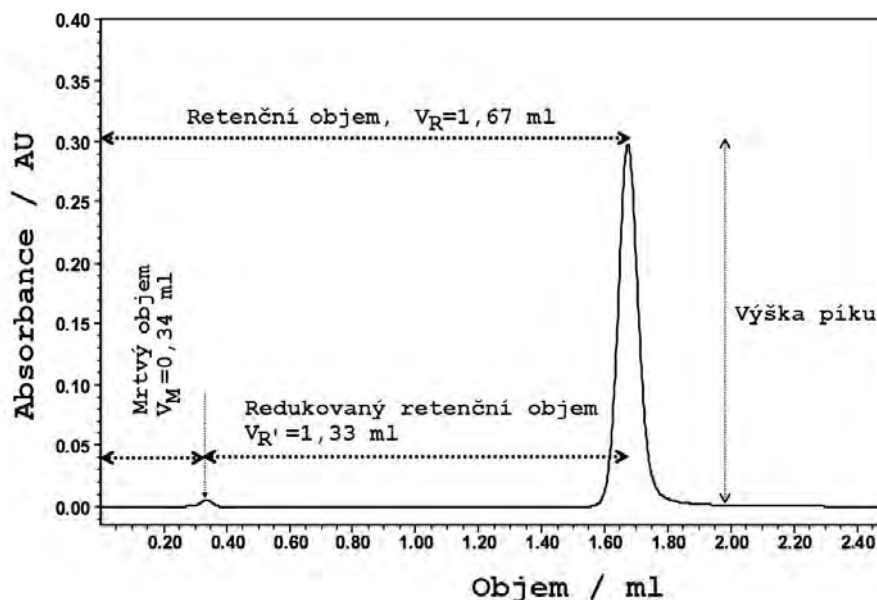
Mrtvý čas t_M je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas - mrtvý čas kolony.

Redukovaný retenční čas t'_R je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi.

3

Retenční veličiny

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

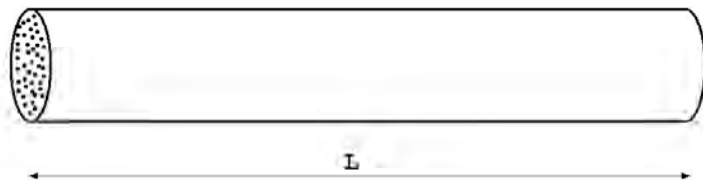


Retenční objem V_R je celkový objem mobilní fáze, která proteče systémem od nástřiku vzorku do zaznamenání píku detektorem.

Mrtvý objem V_M je retenční objem analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Je to objem kolonové trubice mínus objem náplně.

Redukovaný retenční objem V'_R je dán rozdílem retenčního a mrtvého objemu.

Průtok mobilní fáze



Lineární rychlost mobilní fáze u [cm/min]

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

L – délka kolony

Objemová průtoková rychlost mobilní fáze F_m [ml/min]

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

V_m – objem mobilní fáze v koloně

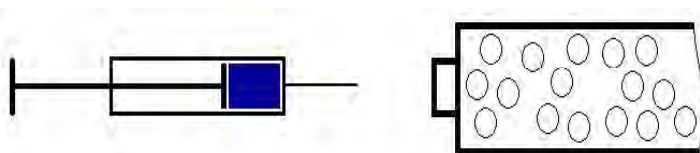
$$V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$$

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

5

Distribuční konstanta

Distribuční konstanta K_D je poměr rovnovážné koncentrace analytu ve stacionární a mobilní fázi



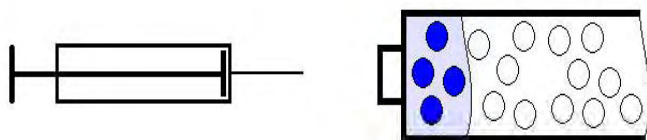
$$K_D = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} = \frac{(n_i)_s \cdot V_m}{(n_i)_m \cdot V_s}$$

$(c_i)_s$ – koncentrace analytu ve stacionární fázi

$(c_i)_m$ – koncentrace analytu v mobilní fázi

V_m – objem mobilní fáze

V_s – objem stacionární fáze



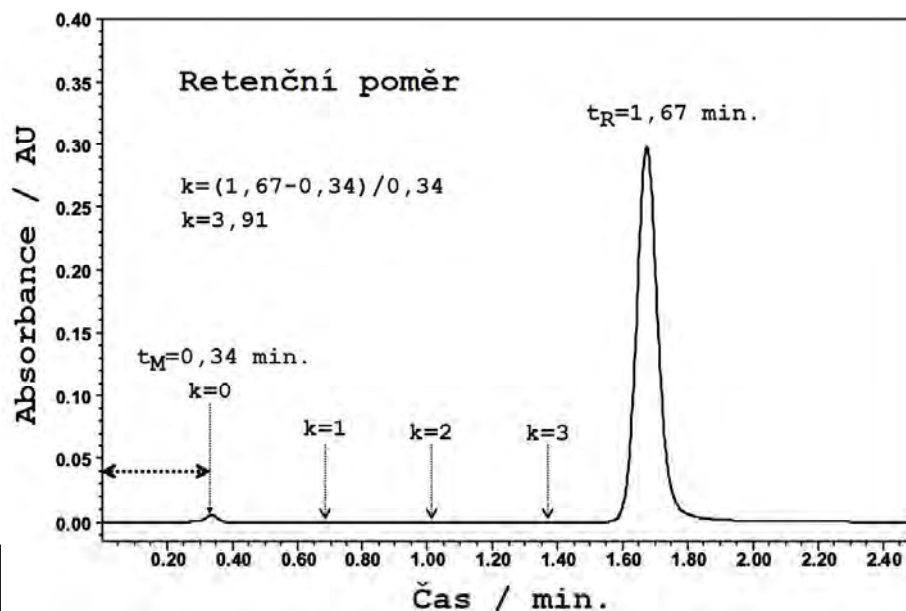
6

Retenční poměr

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

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

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

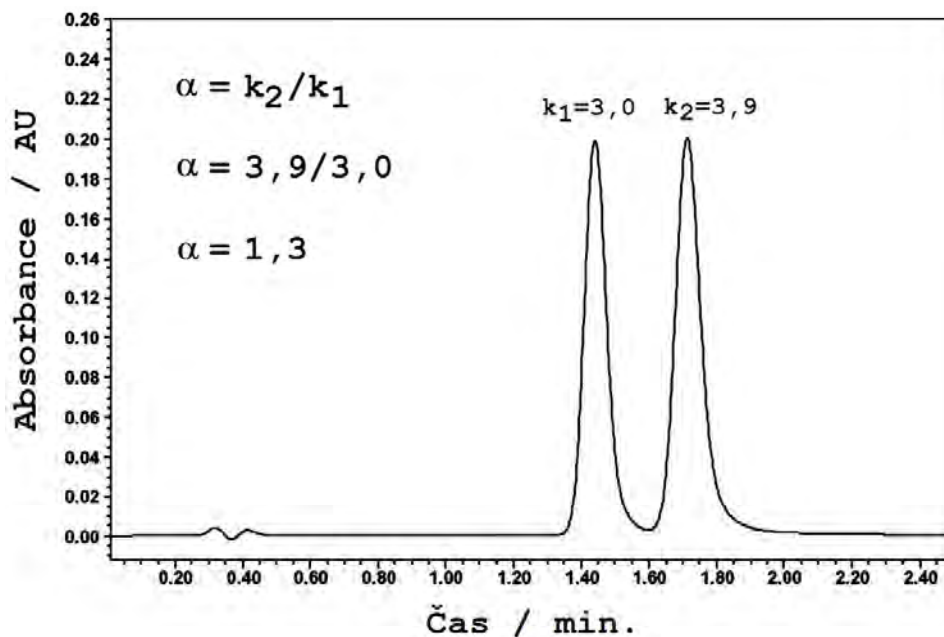


Retenční poměr k – jedna z nejužívanějších retenčních veličin. Udává kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi než ve fázi mobilní, tj. v kolikanásobku mrtvého času (objemu) analyt eluuje. Je to i poměr látkových množství analytu ve stacionární a mobilní fázi za rovnovážných podmínek.

7

Separační faktor

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{D,2}}{K_{D,1}}$$



Separační faktor (selektivita) α – parametr charakterizující vzájemnou retenci dvou analytů.

8

Teorie chromatografického patra

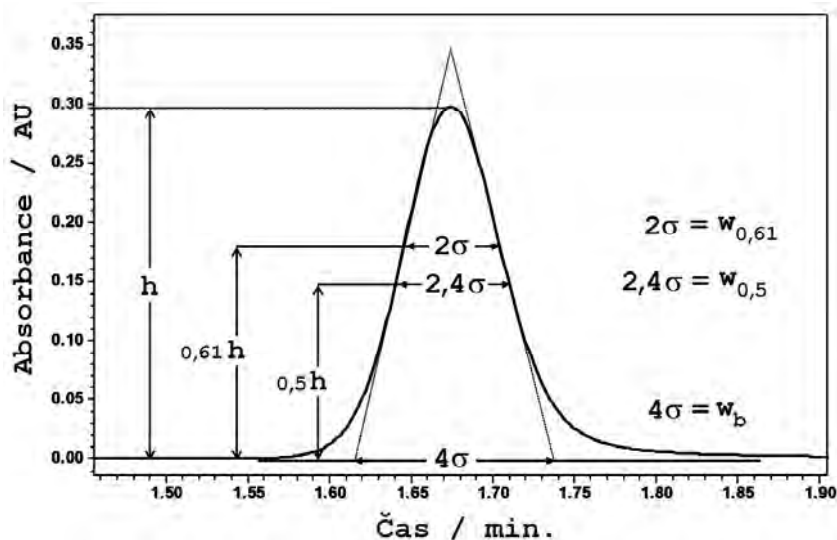
Kolonu lze hypoteticky rozdělit na množství tzv. pater, na kterém dochází k okamžitému ustavení rovnováhy.

Tvar eluční křivky – z teorie chromatografického patra vyplývá, že eluční křivka má tvar Poissonova rozdělení, které lze pro vysoký počet pater lze nahradit Gaussovou křivkou.

$$C = C_{\max} \cdot \exp \frac{-(t - t_{R,i})^2}{2\sigma_t^2}$$

w_b – šířka píku při základně

$w_{0,5}$ – šířka píku v polovině výšky



Teorie chromatografického patra

Počet teoretických pater n – bezrozměrná veličina pro vyjádření účinnosti chromatografické kolony. Vypočítá se z šířky píku v chromatogramu

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_b} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_{0,5}} \right)^2$$

Výškový ekvivalent teoretického patra H – délka kolony připadající na jedno teoretické patro

$$H = \frac{L}{n}$$

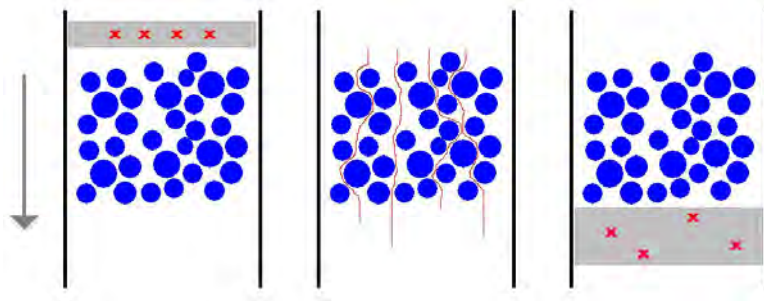
Van Deemterova rovnice

$$H = H_F + H_L + H_M + H_S$$

K celkovému **výškovému ekvivalentu teoretického patra** přispívá:

- vířivá (turbulentní) difúze v mobilní fázi H_F
- axiální difúze v mobilní fázi H_L
- odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi H_M
- odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi H_S

Vířivá difúze – nepravidelnosti ve stacionární fázi způsobují, že některými kanálky proudí mobilní fáze s analytem rychleji než jinými



$$H_F = 2\lambda d_p$$

λ – geometrický faktor

d_p – velikost částic₁₁

Van Deemterova rovnice

Axiální difúze – koncentrační gradienty po stranách zóny způsobují pohyb analytu do oblasti s nižší koncentrací



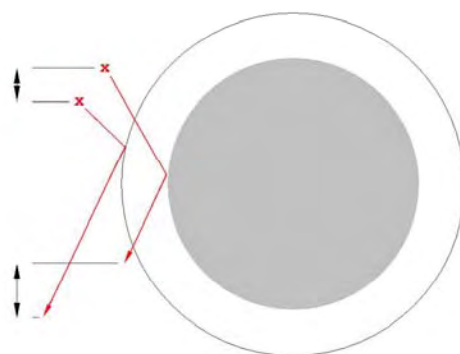
$$H_L = \frac{2D_m}{u}$$

D_m – difúzní koeficient analytu v mobilní fázi

u – lineární rychlost mobilní fáze

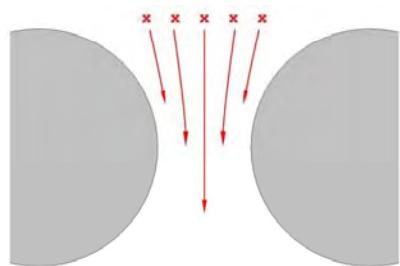
Odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi – některé molekuly analytu proniknou hlouběji do stacionární fáze než jiné

$$H_S = \frac{d_p^2 \cdot u}{30D_m} \cdot \frac{k}{(k+1)^2}$$



Van Deemterova rovnice

Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi – při průchodu mobilní fáze kanálkem mají částice uprostřed mnohem větší rychlost než u stěny



$$H_M = \frac{\omega \cdot d_p^2 \cdot u}{D_m}$$

ω – faktor závislý na typu náplně

$$H = H_F + H_L + H_M + H_S$$

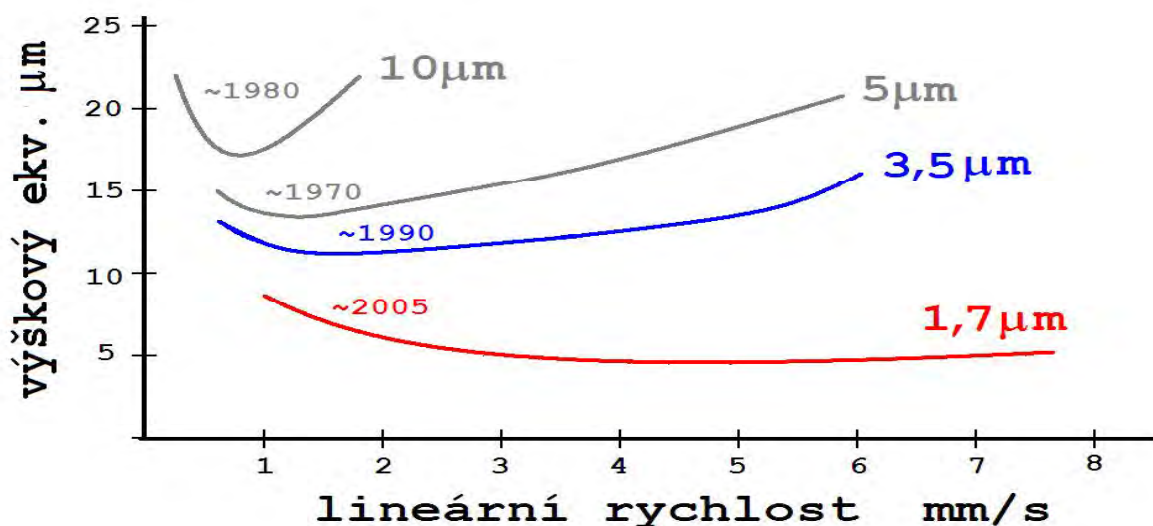
V praxi se používá zkrácený zápis Van Deemterovy rovnice – **závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti mobilní fáze**

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

A,B,C – konstanty pro daný chromatografický systém

13

Van Deemterova rovnice



Účinnost separace roste se snižující se velikostí částic náplně ($H \sim 2,5d_p$).

Minimum křivky udává průtokové rychlosti, při které kolona vykazuje největší účinnost. Minimum je pro malé částice ploché, tj. je možno pracovat v širším rozsahu průtoků bez ztráty účinnosti.

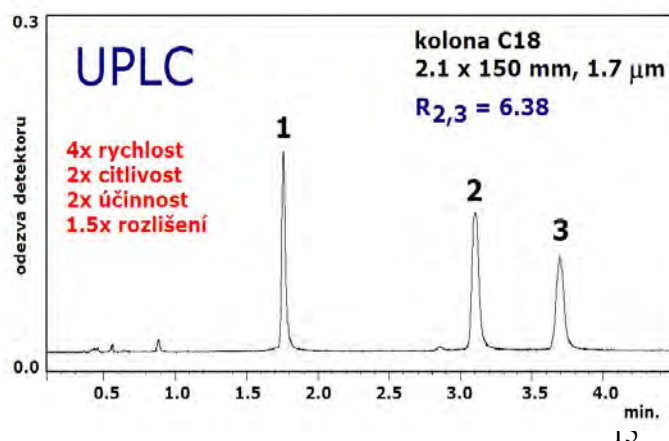
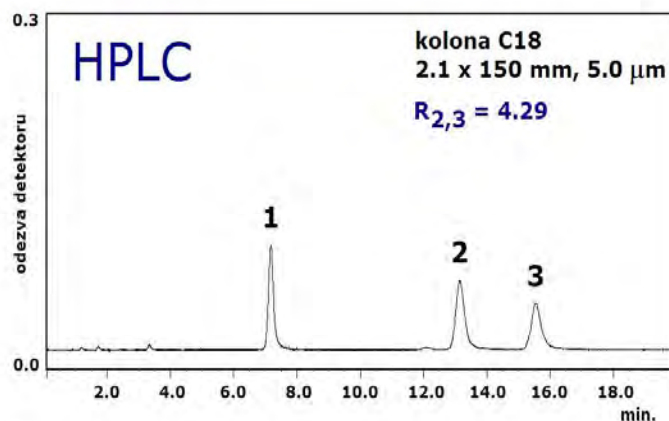
14

HPLC a UHPLC (UPLC)

UHPLC = Ultra High Performance Liquid Chromatography

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s částicemi menšími než 2 μm a velmi vysokým provozním tlakem (do ~ 1000 bar).

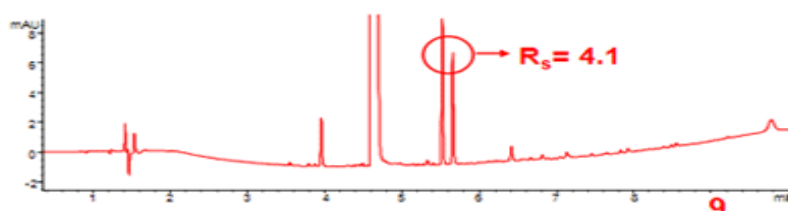
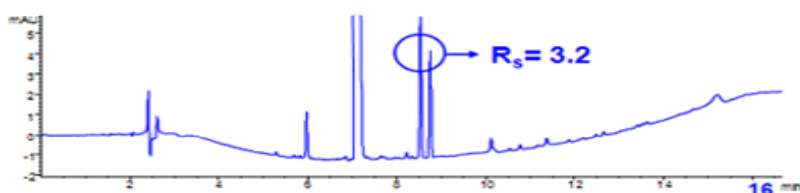
Dosahuje se vyšších účinností separace a velmi krátkých retenčních časů.



Velikost částic a tlak v systému

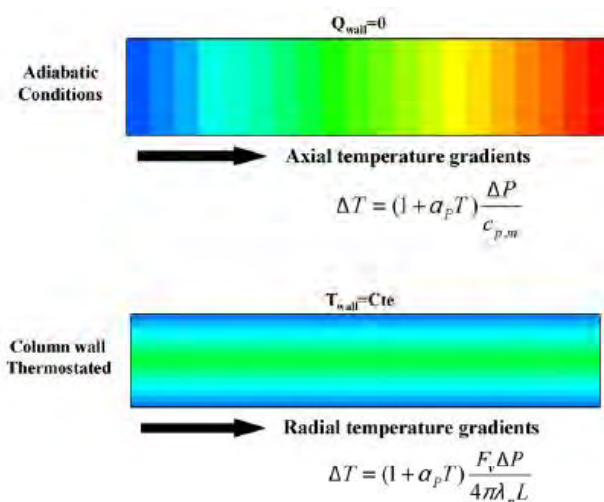
Tlak v HPLC systému je přímo úměrný průtoku, viskozitě mobilní fáze a délce kolony a nepřímo úměrný druhé mocnině velikosti částic a průměru kolony.

$$\Delta P \sim \frac{F_m \cdot \eta \cdot L}{d_p^2 \cdot d_c^2}$$



Teplota a její vliv na účinnost

Temperature gradients have negative impact on the column efficiency due to heterogeneous distribution of the mobile phase linear velocity, viscosity and density throughout the column, which affect the equilibrium constant of a compound distribution between mobile and stationary phases (decreases with increasing temperature), and retention factors of the analytes. The difference between the temperatures at the inlet and the outlet of the column can be as much as 20K, and the difference between the temperatures of the center and the column wall can reach up to 6K, if the column is operated under regular convection conditions. The radial temperature gradient increases slowly along the column [17].



Semi-quantitative and schematic representation of the temperature gradients in a chromatographic column when its wall is under strict adiabatic conditions (top, longitudinal gradient) and is kept at uniform, constant temperature (bottom, fully developed radial gradient). T , average temperature; α_p , thermal expansion coefficient of the eluent (< 0); ΔP , pressure drop along the column; $c_{p,m}$, specific heat of the eluent; F_v , mobile phase flow rate; λ_p , heat conductivity of the packed bed (packing material + eluent); L , column length. In actual columns operated under realistic conditions, both gradients coexist.

17

Mimokolonové příspěvky k rozšiřování zón

K celkové šířce píku přispívá nejen kolona, ale i ostatní části HPLC systému:

$$\sigma_{celkový}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{kolona}^2 + \sigma_{spoj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{el}^2$$

σ_{inj}^2 – **příspěvek injektoru**. Objem vzorku by měl být co nejmenší (< 1 teor. patro), nastříknutá zóna by měla být pravoúhlá.

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{V_{inj}^2}{K^2}$$

K – faktor závislý na konstrukci injektoru

σ_{spoj}^2 – **příspěvek spojovacích trubic**. Spojovací trubice musí mít malý vnitřní průměr a musí být co nejkratší

$$\sigma_{spoj}^2 = \frac{\pi \cdot R^4 \cdot l \cdot F_m}{24D_m}$$

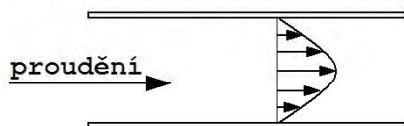
R, l – vnitřní poloměr a délka trubice

18

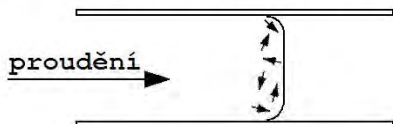
Mimokolonové příspěvky k rozšiřování zón

Profily rychlostí v trubici:

laminární proudění



turbulentní proudění



Laminární proudění – vzniká při běžných rychlostech mobilní fáze v HPLC. Kapalinu lze považovat za soubor vrstev, mezi nimiž působí viskózní síly.

Turbulentní proudění – vzniká při velmi vysokých rychlostech (~100ml/min.), uspořádaná distribuce rychlostí je narušena, pohyb mobilní fáze je chaotický, dochází k intenzivnímu promíchávání.

σ_{det}^2 – **příspěvek detektoru**. Závisí na objemu a geometrii detekční cely

$$\sigma_{det}^2 \approx \frac{V_{det}^2}{K^2}$$

σ_{el}^2 – **příspěvek elektroniky**. Závisí na časových konstantách elektronických obvodů (zesilovačů).

$$\sigma_{el}^2 = konst \cdot F_m^2 \quad |_{19}$$

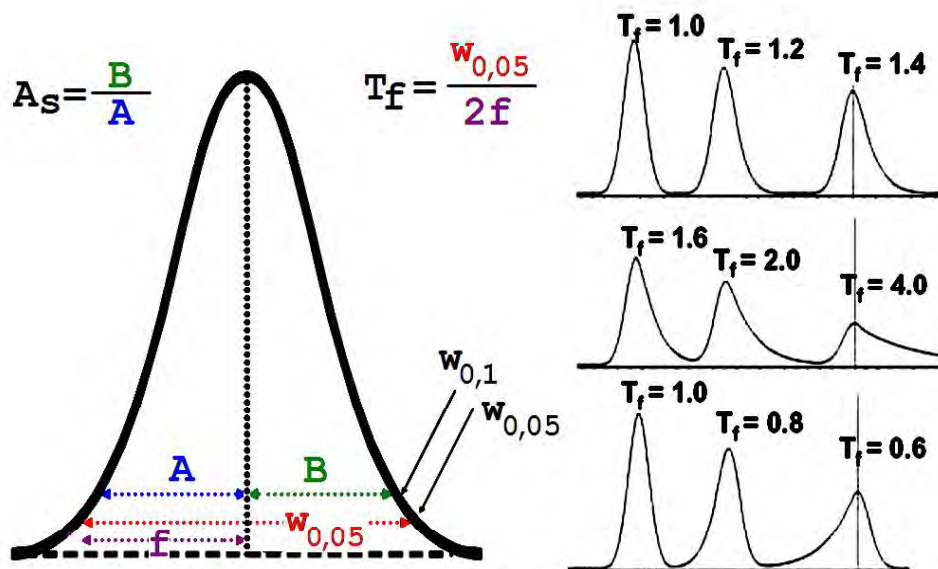
Symetrie píku

$$A_s = \frac{B}{A}$$

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

$$A_s = \frac{B}{A}$$

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}$$



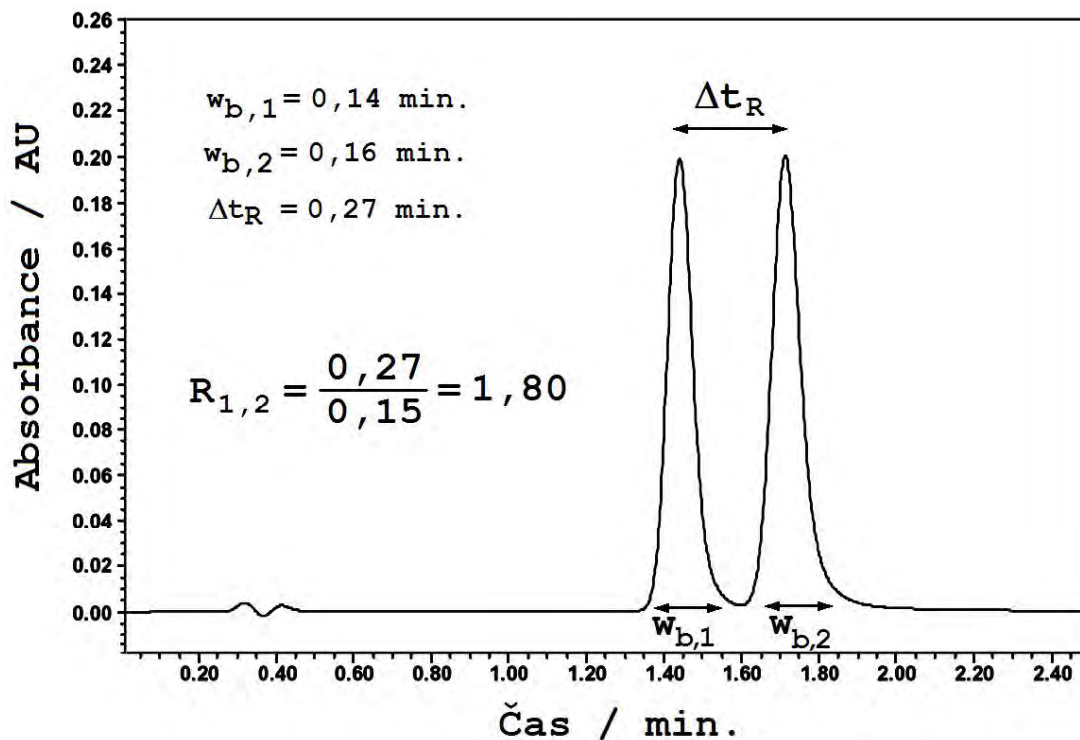
Faktor asymetrie A_s – míra souměrnosti chromatografického píku, určuje se v 10% výšce.

Tailing faktor T_f – obdobná veličina jako faktor asymetrie používaná ve farmaceutické analýze. Určuje se v 5% výšce píku.

$T_f > 1$ pro píky asymetrické v sestupné části ("tailing" píky)

$T_f < 1$ pro píky asymetrické ve vzestupné části ("fronting" píky)

Rozlišení

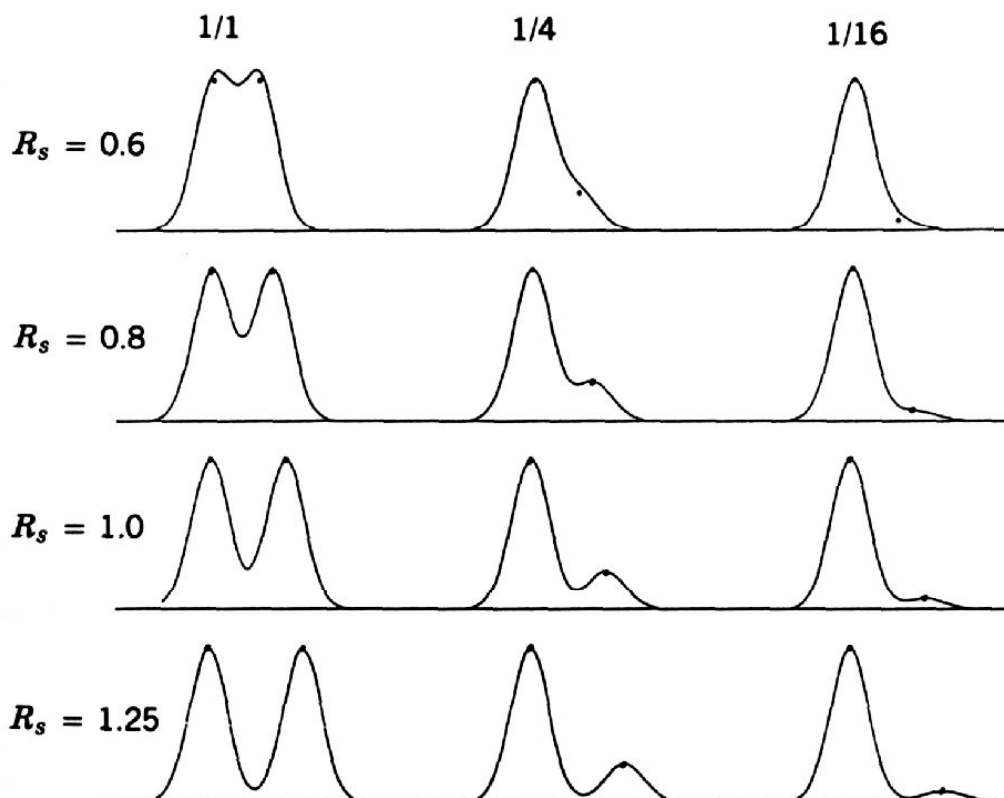


Rozlišení – veličina kvantifikující schopnost chromatografického systému vzájemně oddělit dva analyty.

$$R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \cdot (w_{b,2} + w_{b,1})}$$

21

Rozlišení



Dva píky jsou rozděleny “na základní linii” pokud je $R > 1.5$

22

Rozlišení

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot (\alpha_{2,1} - 1) \cdot \left(\frac{k_1}{1+k_1} \right)$$

účinnost

selektivita

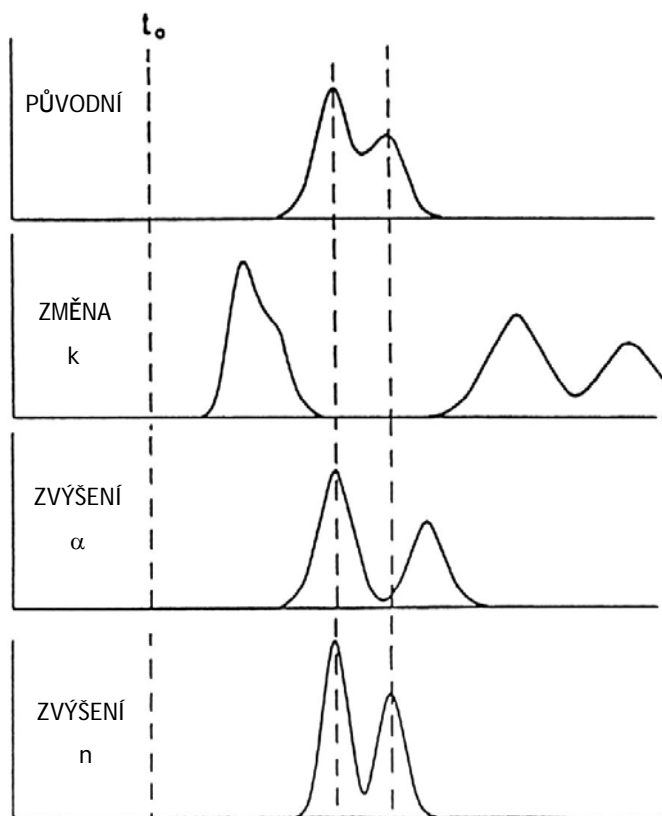
retence

Ovlivnění selektivity a retence

Volba mobilní fáze, volba stacionární fáze, teplota.

Ovlivnění účinnosti

Délka kolony, velikost částic, průtok.



23

Rozlišení

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot (\alpha_{2,1} - 1) \cdot \left(\frac{k_1}{1+k_1} \right)$$

α

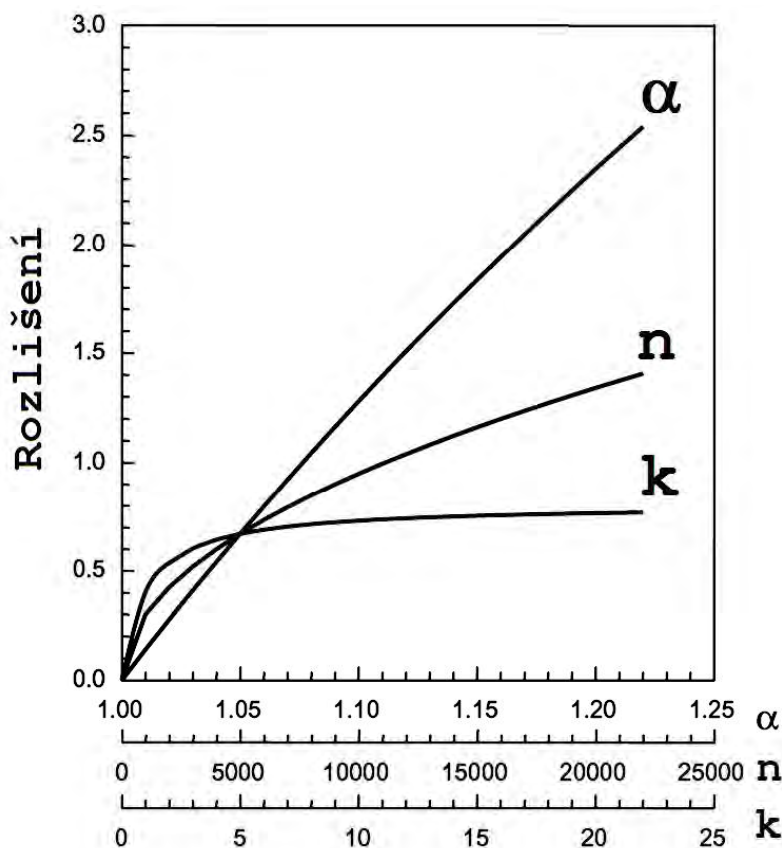
Největší vliv na rozlišení – zvýšení lze dosáhnout optimalizací stacionární i mobilní fáze.

n

Má význam, ale rozlišení roste “jen” s druhou odmocninou n.

k

Pro vyšší retenční časy se poslední člen blíží k 1 a nemá tedy smysl dále retenci zvyšovat.



24

Isokratická a gradientová eluce

Izokratická eluce: Složení mobilní fáze (její eluční síla) se během analýzy nemění.

Gradientová eluce: Eluční síla mobilní fáze vzrůstá během analýzy.

Výhody gradientové eluce:

Vhodnější pro komplexní vzorky s velkým počtem analytů

Lepší rozlišení pro píky na začátku a konci chromatogramu

Vyšší citivost pro píky na konci chromatogramu

Větší kapacita píků (více se jich vejde do chromatogramu)

Nevýhody gradientové eluce:

Náročnější instrumentace (čerpadla)

Náročnější vývoj metody

Delší doby analýzy vyplývající z nutnosti ekvibrace kolon

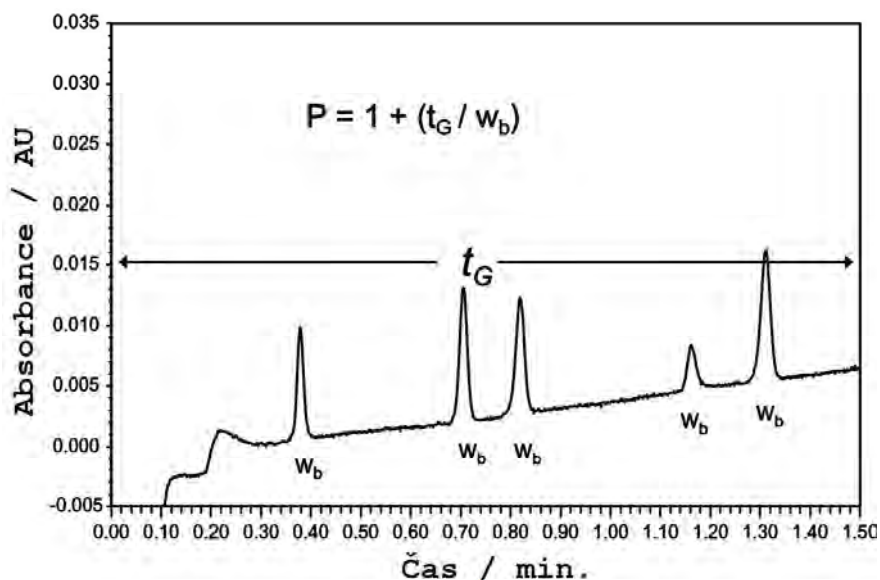
25

Účinnost v gradientové eluci – kapacita píku

Při gradientové eluci se (téměř) nemění šířka píku s časem a **nelze** tedy pro hodnocení účinnosti použít rovnici:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w_b} \right)^2$$

Kapacita píku P: Veličina pro srovnávání účinnosti různých gradientů – podíl celkové doby gradientu a průměrné šířky píku v chromatogramu

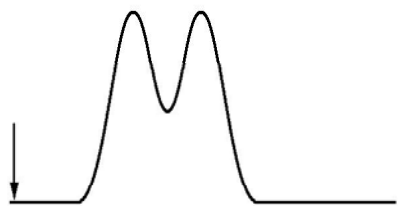


$$P = 1 + \frac{t_g}{(1/n) \sum_1^n w_b}$$

P: 100-200 (gradient)

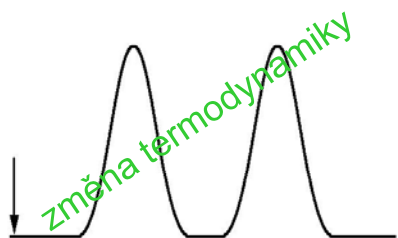
t_g – doba trvání gradientu²⁶

Ovlivnění separačního procesu v HPLC



Separaci lze ovlivnit:

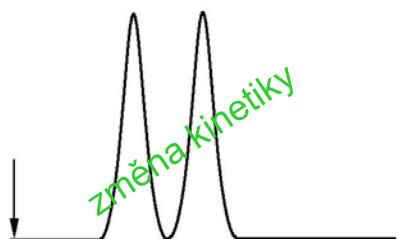
- změnou velikosti interakce mezi analytem, stacionární a mobilní fází – termodynamický aspekt
- ovlivněním šířky zón eluujících složek – kinetický aspekt



Termodynamický aspekt:

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

Ovlivňujeme distribuční konstanty analytů změnami mobilní nebo stacionární fáze. K_D je závislá na teplotě, teplota ovlivňuje separaci.



Kinetický aspekt:

Šířku píků lze ovlivnit všemi parametry vyskytující se v plné verzi Van Deemterovy rovnice, tj. lineární rychlostí mobilní fáze, velikostí částic sorbentu, difúzními koeficienty (lze ovlivnit teplotou!), délkou kolony.