

Kapalinová chromatografie

Cíle přednášky

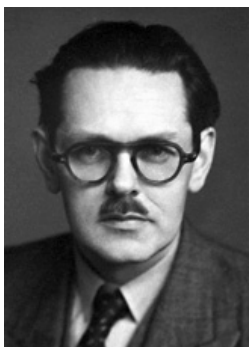
- Experimentální uspořádání
 - Kolonová kapalinová chromatografie
 - Vysokotlaká kapalinová chromatografie: čerpadla, kolony, dávkování vzorků, detektory
 - Aplikace kapalinové chromatografie
-

Doporučená literatura

- Klouda P.: Moderní analytické metody, 2003, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava.
 - Štulík K. a kol.: Analytické separační metody, 2004, Karolinum, Praha.
 - Churáček J. a kol.: Analytická separace látek, 1990, SNTL, Praha.
 - Churáček J. a kol.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, 1993, Academia, Praha.
-

Historie chromatografie

- 40. - 50. léta – chromatografie na papíru a tenké vrstvě (Cramer, Stahl, Macek, Hais)
- 50. léta – Martin & Synge – partiční chromatografie



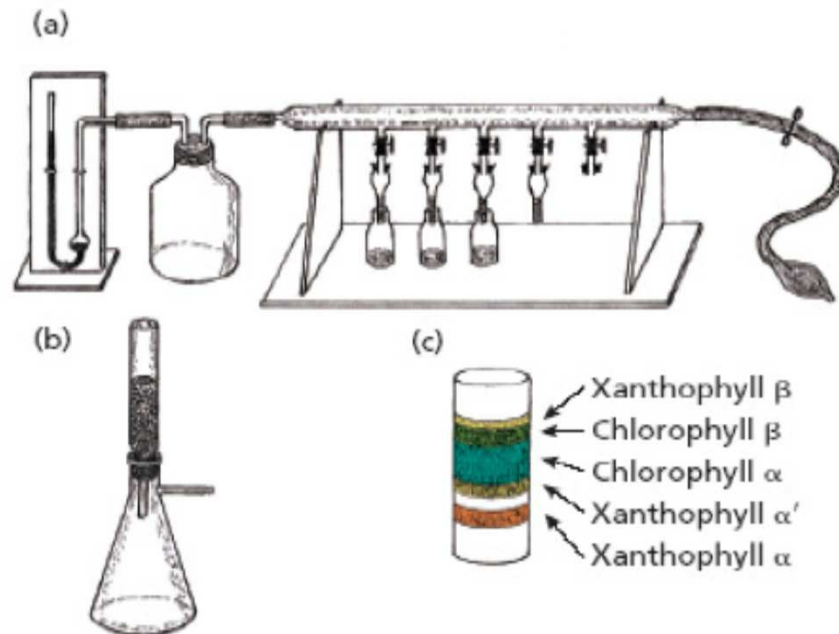
1952 - NOBELOVA CENA



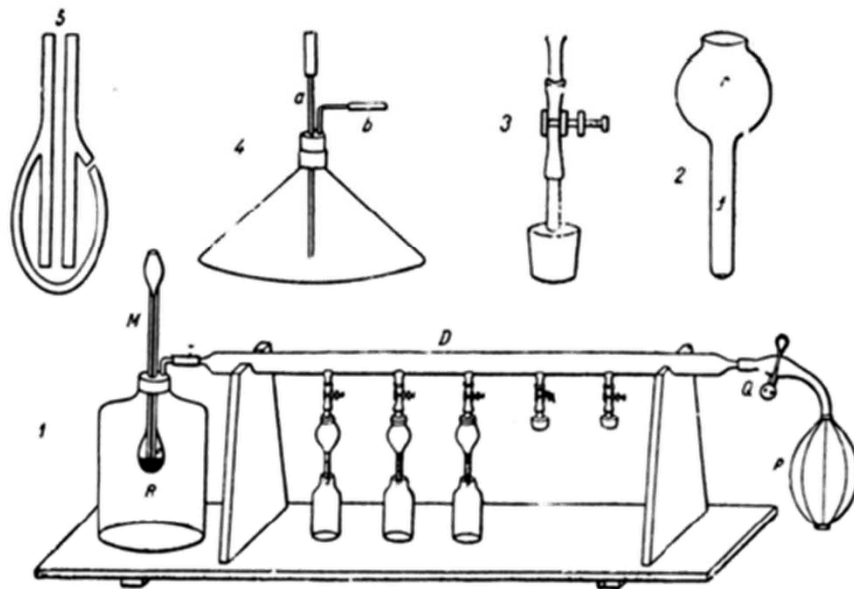
Zdroj: www.nobelprize.org

- Martin & James – plynová chromatografie
 - 60. léta – gelová chromatografie
 - Začátek 70. let – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
 - 90. léta – elektrochromatografie, UHPLC
 - 21. století – mikročipy, UHPLC
-

První chromatografy



M.S. Cvět
Chromatografická
aparatura



Současnost



nanoAcquity, Waters Corporation

<http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=1000235>



1290 Infinity, Agilent Technologies

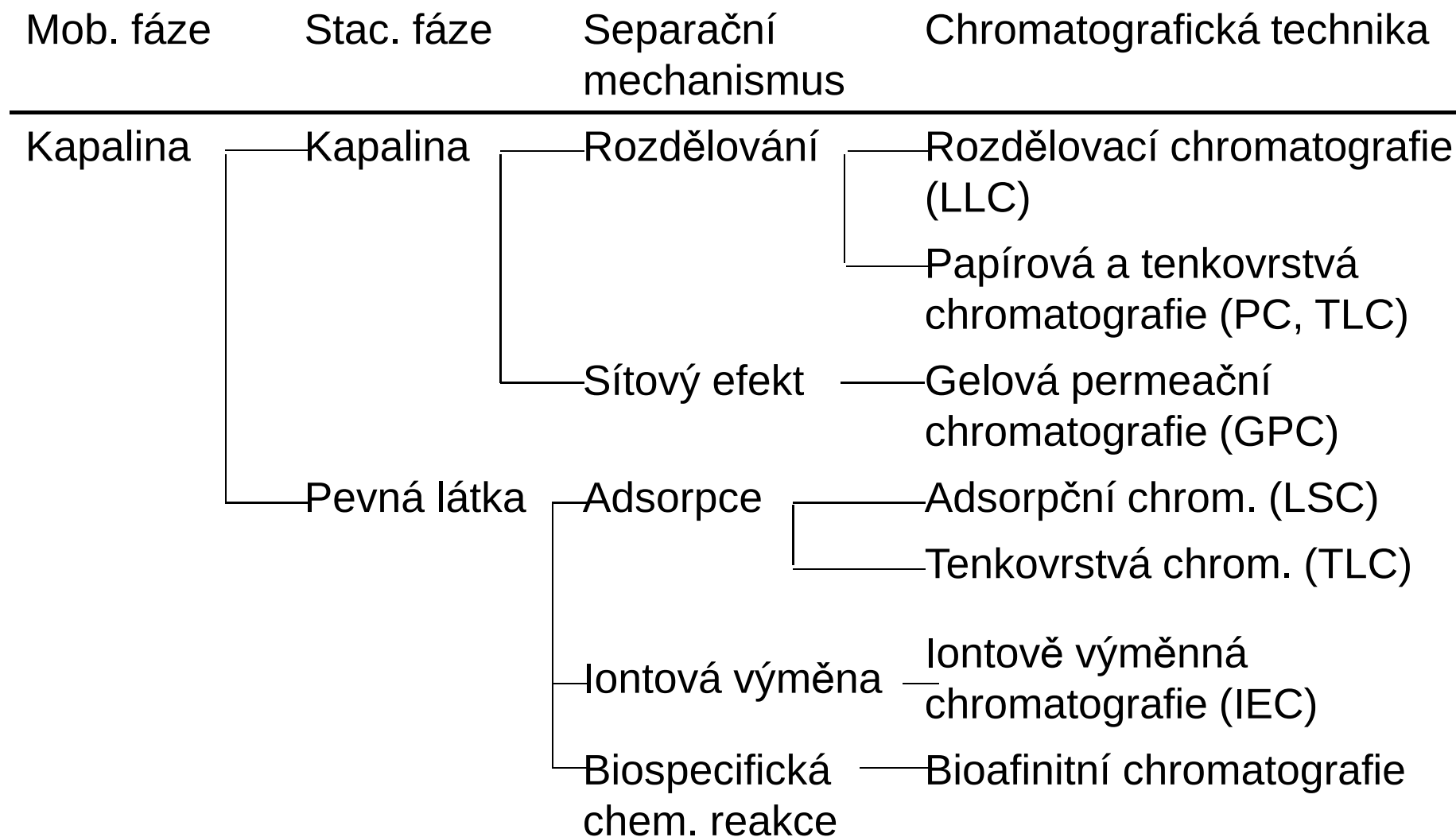
http://www.agilent.com/newsjp/presrel/fy2009/ca08_1290.jpg

Nexera, Shimadzu

http://www.chromatographytoday.com/assets/file_store/pr_files/9150/images/shimadzu_nexera_souti2_kopie.jpg



Rozdělení podle mechanismu separace



Účinnost separace

Základní faktory ovlivňující rozšiřování zón v kapalinové chromatografii

- turbulentní difúze v mobilní fázi
- molekulární difúze v mobilní fázi
- odpor vůči převodu hmoty na fázovém rozhraní

Všechny tyto faktory zahrnuty ve **van Deemterově rovnici pro výšku teoretického patra**

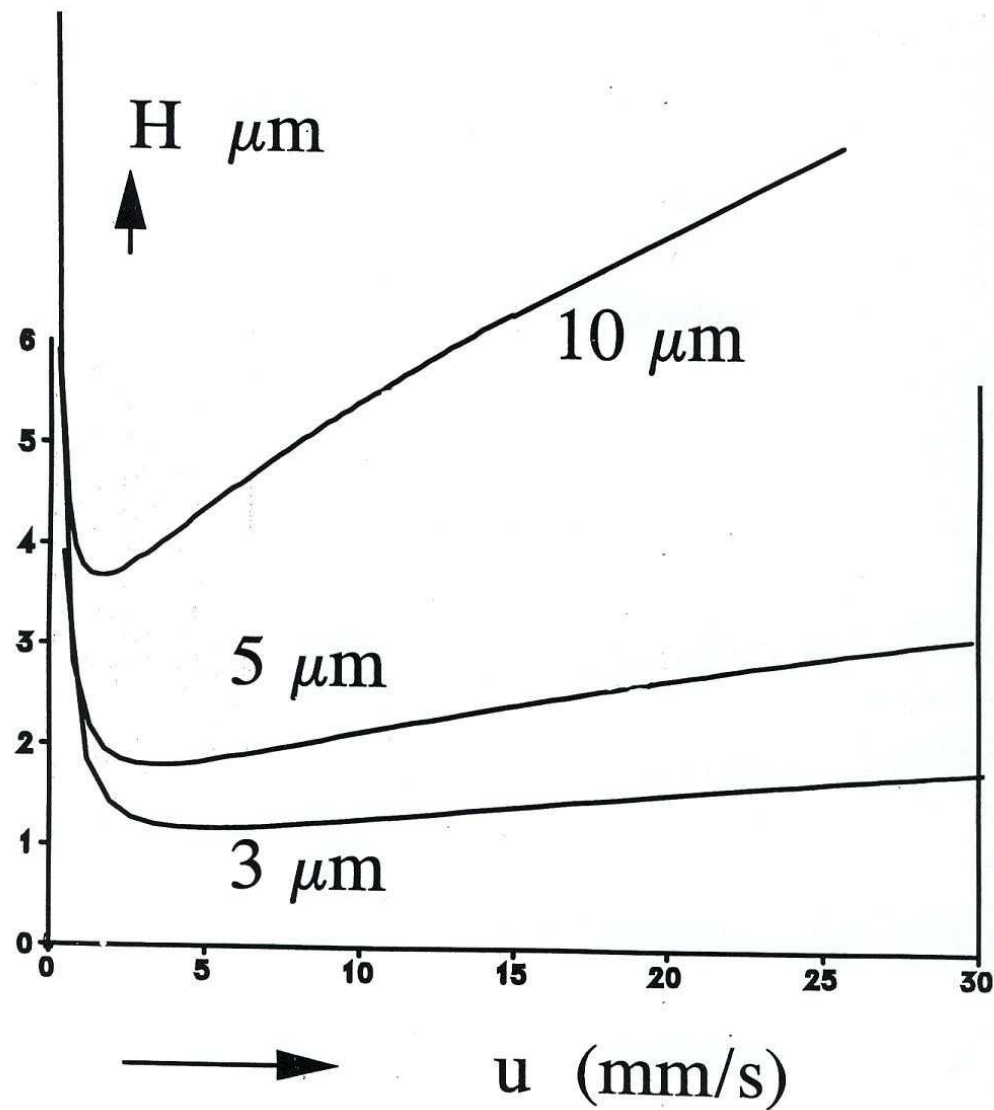
$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

A – faktor turbulentní difúze

B – faktor molekulární difúze

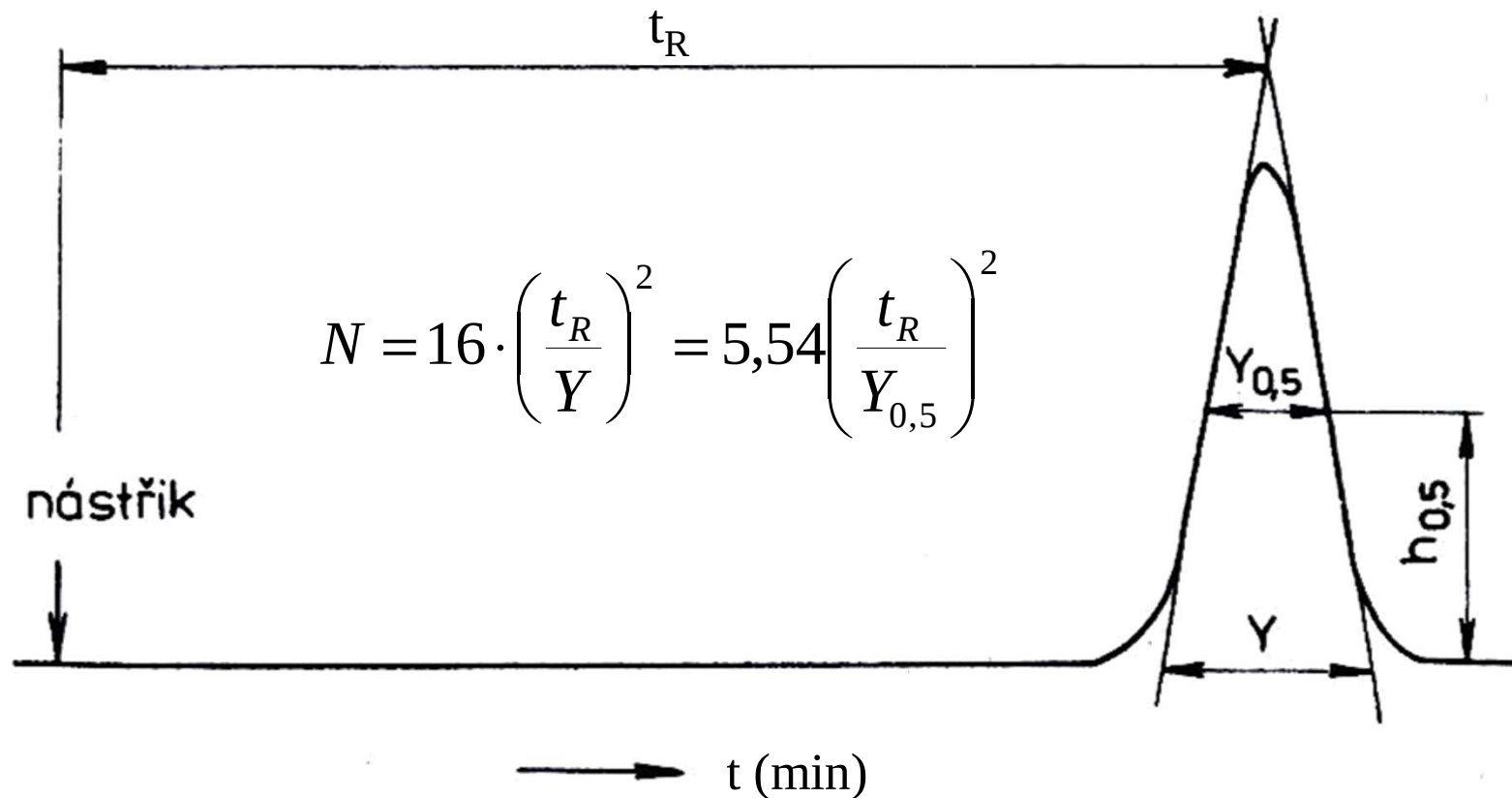
C – faktor odporu proti převodu hmoty

Účinnost separace



H – výškový ekvivalent
teoretického patra
 u – lineární rychlost toku
mobilní fáze kolonou

Výpočet účinnosti z retenčních dat



$N \uparrow \Rightarrow$ menší rozšíření zóny $\Rightarrow$ kolona je účinnější

HPLC

- ❑ Separace látek na základě rozdělování mezi dvě nemísitelné fáze
- ❑ Základní rozdělení podle relativní polariry stacionární a mobilní fáze:
 - Systémy s **normálními fázemi** (polární sorbent, méně polární mobilní fáze)
 - Systémy s **obrácenými fázemi** (nepolární sorbent, polární mobilní fáze)

První systémy s obrácenými fázemi v 50. letech (kapalina – kapalina); dnes naprosto převažují - přes 80% všech aplikací v systémech s chemicky vázanými nepolárními fázemi.

Popis retence

Teoretický popis retence v systémech s obrácenými fázemi

Nejčastěji se vychází z modelu distribuce látky mezi stacionární a mobilní fázi – **retenční faktor**

$$k = \frac{V_S}{V_M} K_D = \frac{V_R}{V_M} - 1$$

V_S – objem stacionární fáze v koloně

V_M – objem mobilní fáze v koloně

V_R – retenční objem látky

K_D – distribuční konstanta látky mezi stacionární a mobilní fázi

Popis retence

Mobilní fáze - (nejčastěji) směs vody a organického rozpouštědla; retenční faktor závisí na jeho koncentraci:

$$\log k = a - m\varphi + d\varphi^2$$

a, m, d – konstanty závislé na typu látky a mobilní fázi

φ - koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi

Často lze kvadratický člen zanedbat (zvl. v mobilních fázích s methanolem).

Gradientová eluce

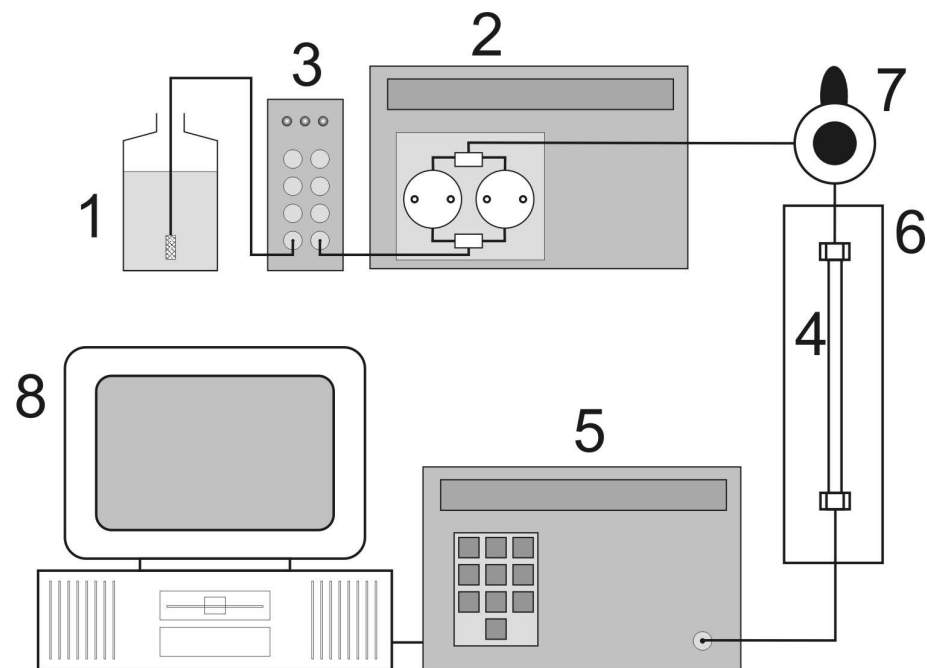
Mění se složení mobilní fáze během analýzy a vzrůstá její eluční síla.

Vysokoúčinná LC - HPLC

- ❑ kontinuální detekce
- ❑ automatická od zavedení vzorků po vyhodnocení dat
- ❑ krátké kolony (3-25 cm), vnitřní průměr 0,5-6 mm
- ❑ náplně s malými částicemi (1-10 μm) a úzkou distribucí
- ❑ vysoká účinnost ($> 40\,000$ pater)
- ❑ rychlost ($< 15-20$ min)
- ❑ vysoké tlaky (5-40 MPa)
- ❑ separace ovlivněna náplní kolony i mobilní fází
→ mechanismus separace

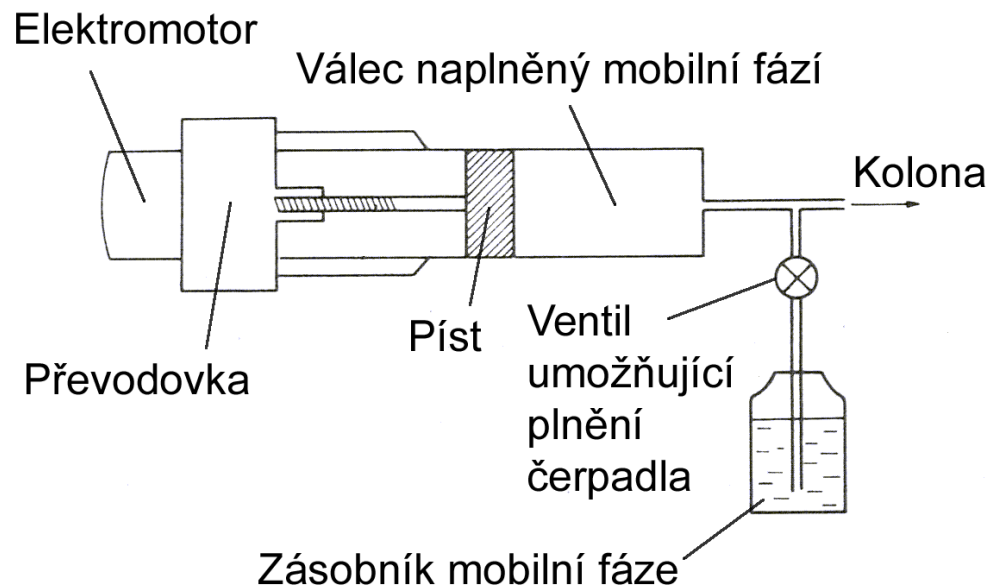
Schéma kapalinového chromatografu

1–zásobník mobilní fáze, 2–čerpadlo,
3–odplyňovač mobilní fáze, 4–kolona,
5–detektor, 6–termostat, 7–dávkový ventil,
8–počítač



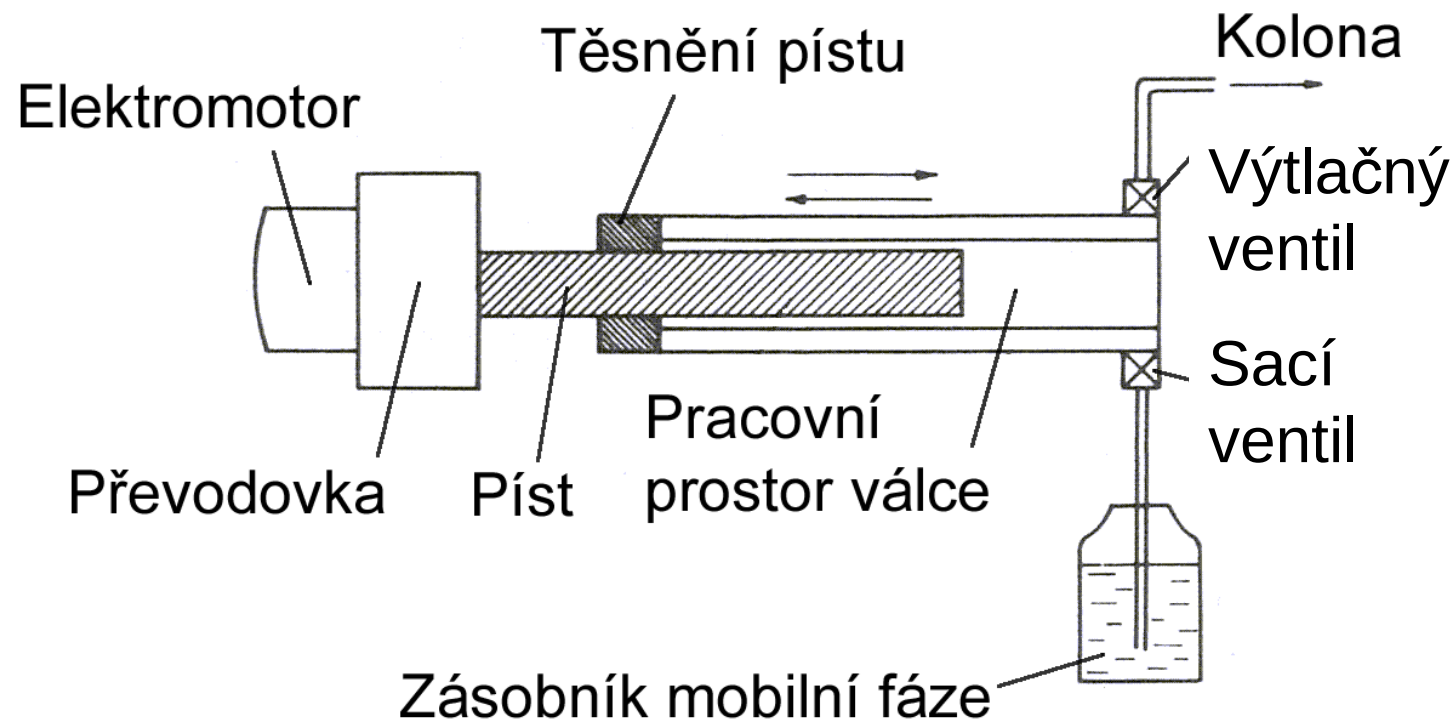
Čerpadla mobilní fáze

- ❑ průtoky 0.5 – 5 ml/min, nutná reprodukovatelnost okolo 1%, přesnost okolo 1% a co nejmenší kolísání průtoku
- ❑ konstrukce čerpadla musí být schopna poskytovat zvolený průtok až do tlaků 40 – 60 MPa (100 MPa)
- ❑ gradientová eluce



Čerpadlo na principu velkoobjemové injekční stříkačky

Čerpadla mobilní fáze



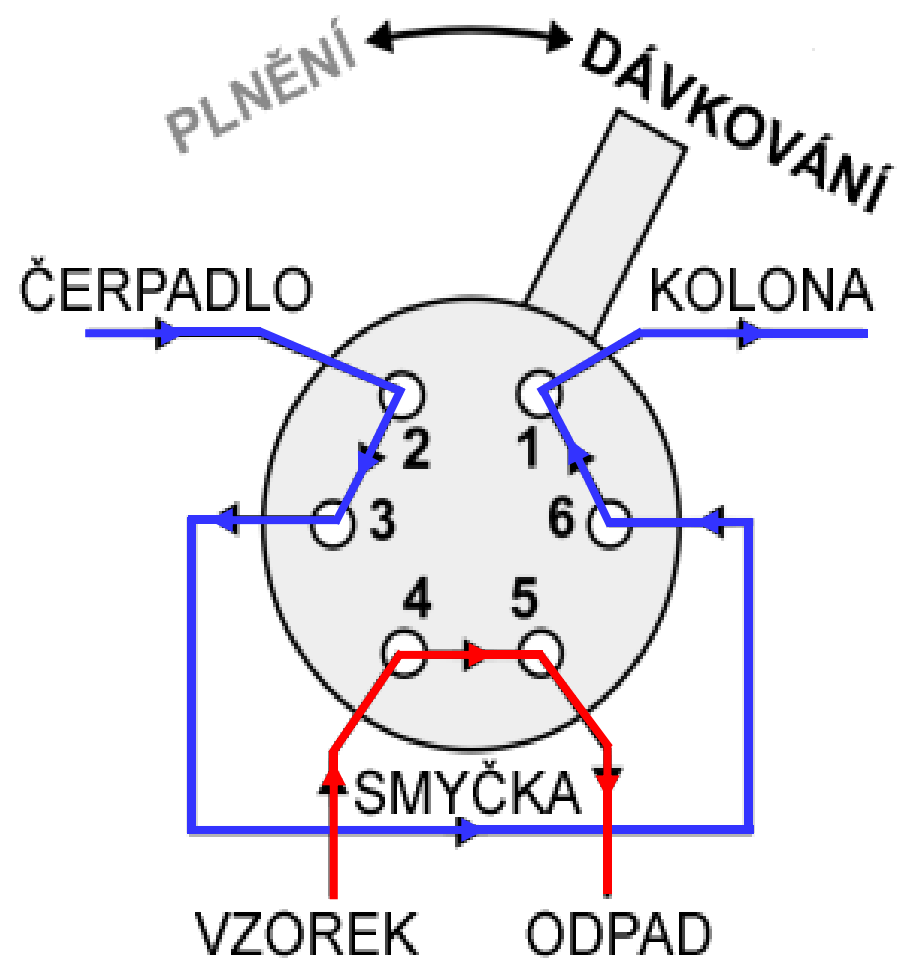
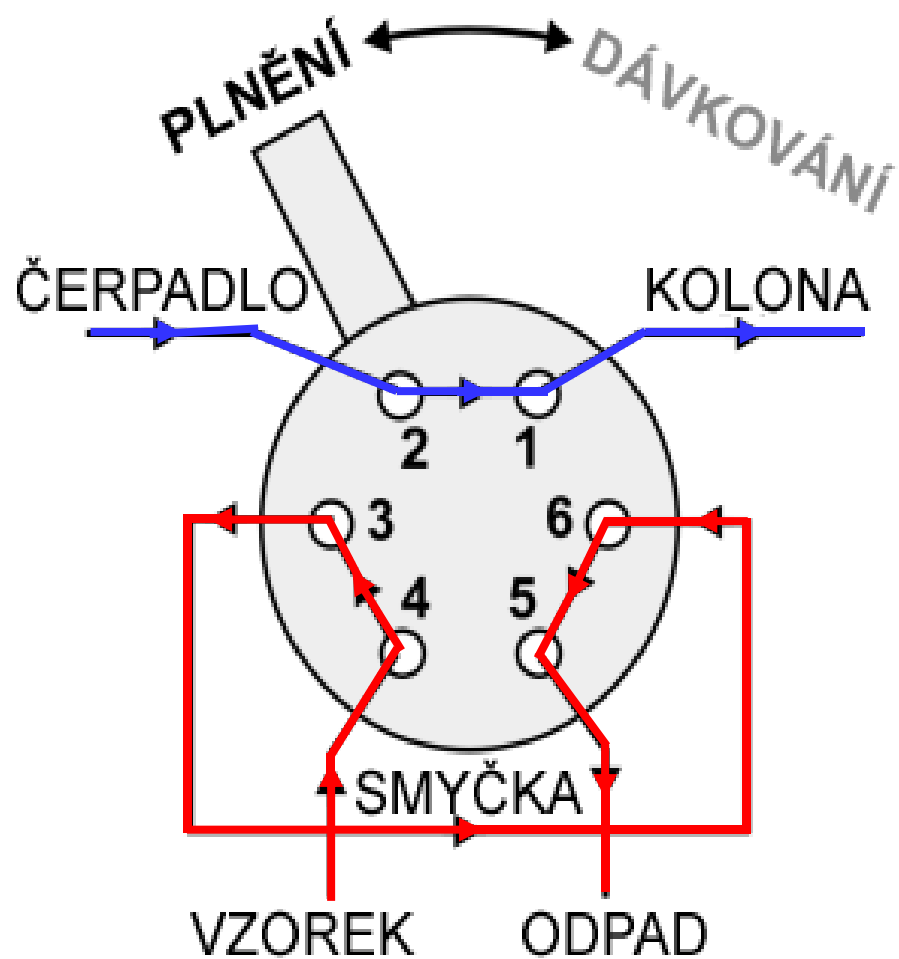
Jednočinné pístové čerpadlo s malým objemem činné části

Dávkování vzorků

Nutnost zavádět vzorek do systému **proti vysokému tlaku** uvnitř systému (desítky MPa)!

- ❑ septový (průpichový) dávkovač (historický)
 - ❑ smyčkový dávkovač – dávkování bez tlaku běžnou inj. stříkačkou, nevýhodou fixní dávkovaný objem
-

Dávkování vzorků



Kolony používané v HPLC

Velikost a tvar částic

- ❑ Nepravidelné
- ❑ Sférické – vyšší účinnost, rovnoměrné plnění

Velikost částic moderních sorbentů $< 10 \mu\text{m}$, plně pórovité částice, čím menší tím vyšší účinnost, ale rostou problémy s plněním a vysokými pracovními tlaky.

Nejnovější mikronáplně s velikostí částic pod $3 \mu\text{m}$ a s velmi vysokou účinností a velkou rychlostí separace.

Kolony používané v HPLC

Klasifikace **podle průměru, délky a průtoku mobilní fáze:**

- ❑ **Preparativní kolony:** $d > 10$ mm, délka v desítkách cm, průtok m.f. desítky – stovky ml/min
- ❑ **Analytické kolony:** $d = 2-8$ mm, délka 5-30 cm, průtok m.f. 0,5-3 ml/min
- ❑ **Mikrokolony:** $d = 0,5-1$ mm, délka 5-30 cm, průtok m.f. 0,05-0,2 ml/min
- ❑ **Kapilární kolony:** $d = 100-500$ μm , délka 10-30 cm, průtok m.f. 1-20 $\mu\text{l/min}$

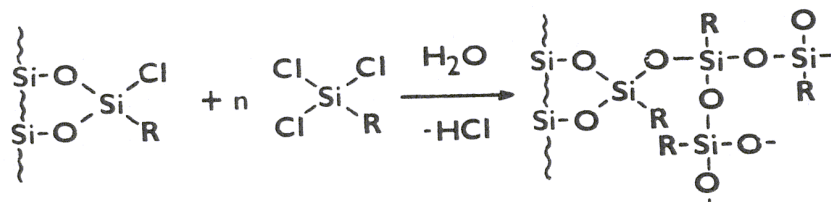
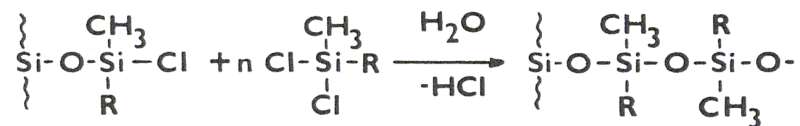
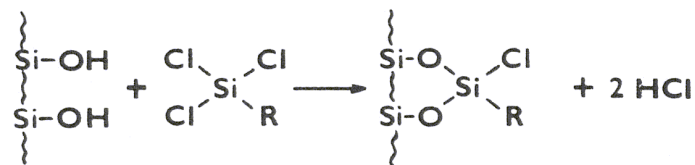
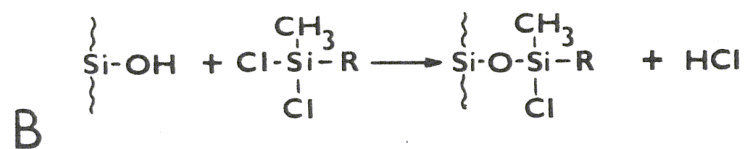
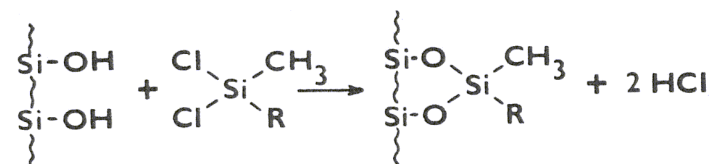
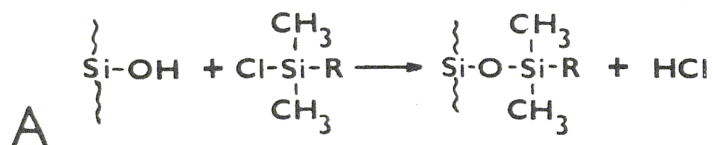
Podle **povahy lože stacionární fáze:**

- ❑ Kolony plněné diskretními částicemi sorbentu
 - ❑ Monolitické kolony se stacionární fází připravenou „in situ“ ve formě jednoho kusu
-

Náplně kolon používané v HPLC

- ❑ převážně náplně s **chemicky vázanými stacionárními fázemi**, různá polarita stacionární fáze podle navázané funkční skupiny
 - polární ($-\text{NH}_2$, diolová)
 - středně polární ($-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$)
 - nepolární ($-\text{C}_8$, $-\text{C}_{18}$, -fenyl)
- ❑ méně často stacionární fáze z nemodifikovaného silikagelu, aluminy a typu organických polymerů (styren-divinylbenzen, polyethylenglykolmetakrylát), u org. polymerů vyšší stabilita náplně v bazických mobilních fázích.

Náplně kolon používané v HPLC

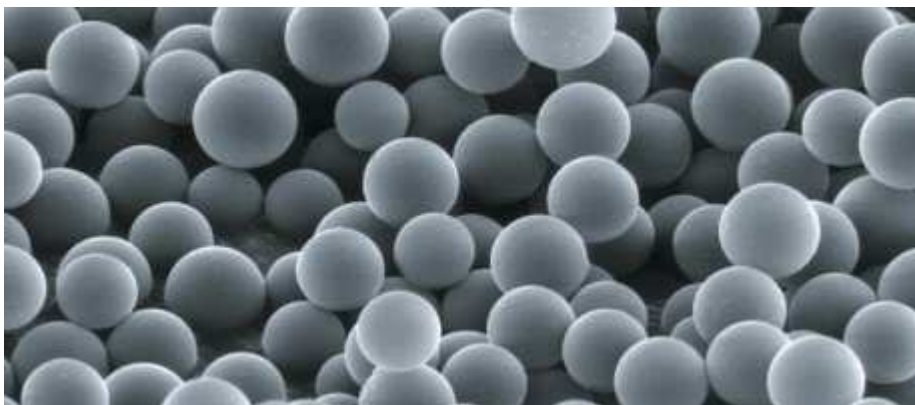


A – monomerní

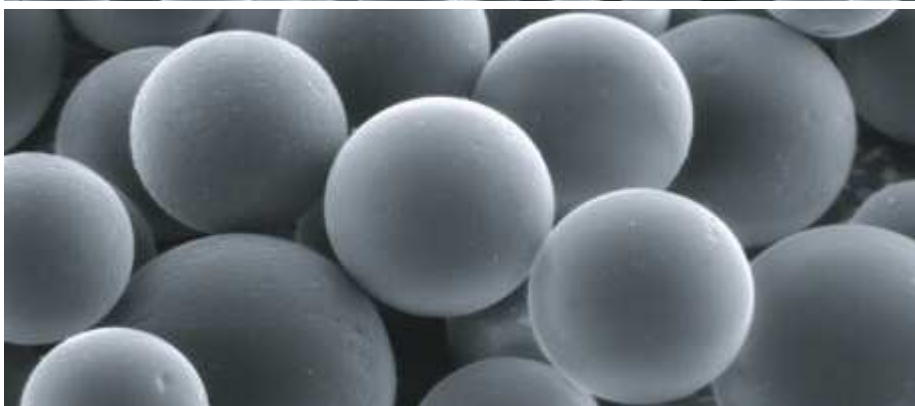
B – polymerní

chemicky vázané
fáze

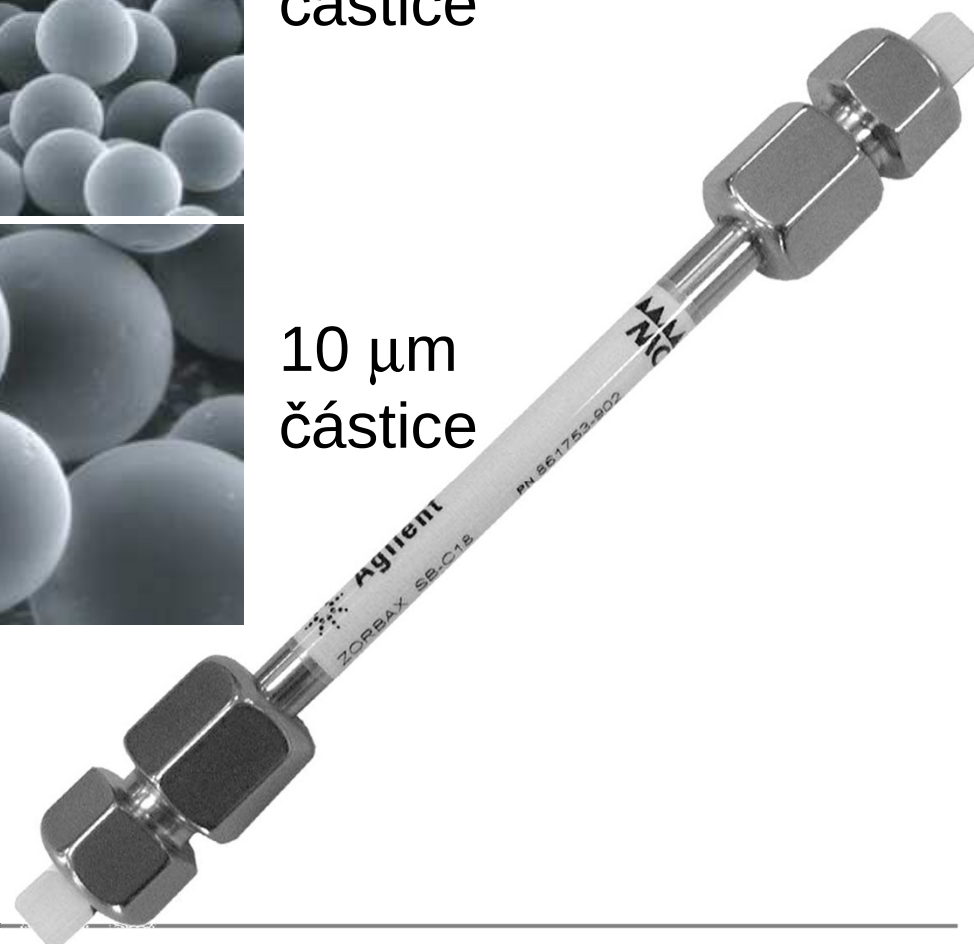
Kolony používané v HPLC



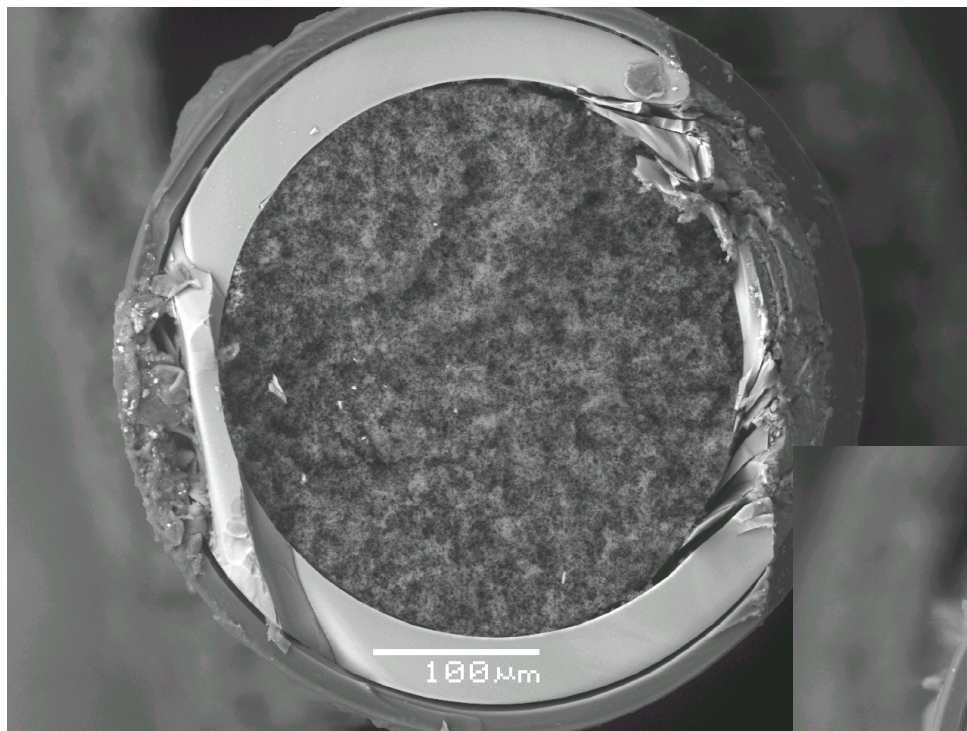
3,5 µm
částice



10 µm
částice



Kolony používané v HPLC



Detektory v kapalinové chromatografii

Speciální nároky kladené na detektory:

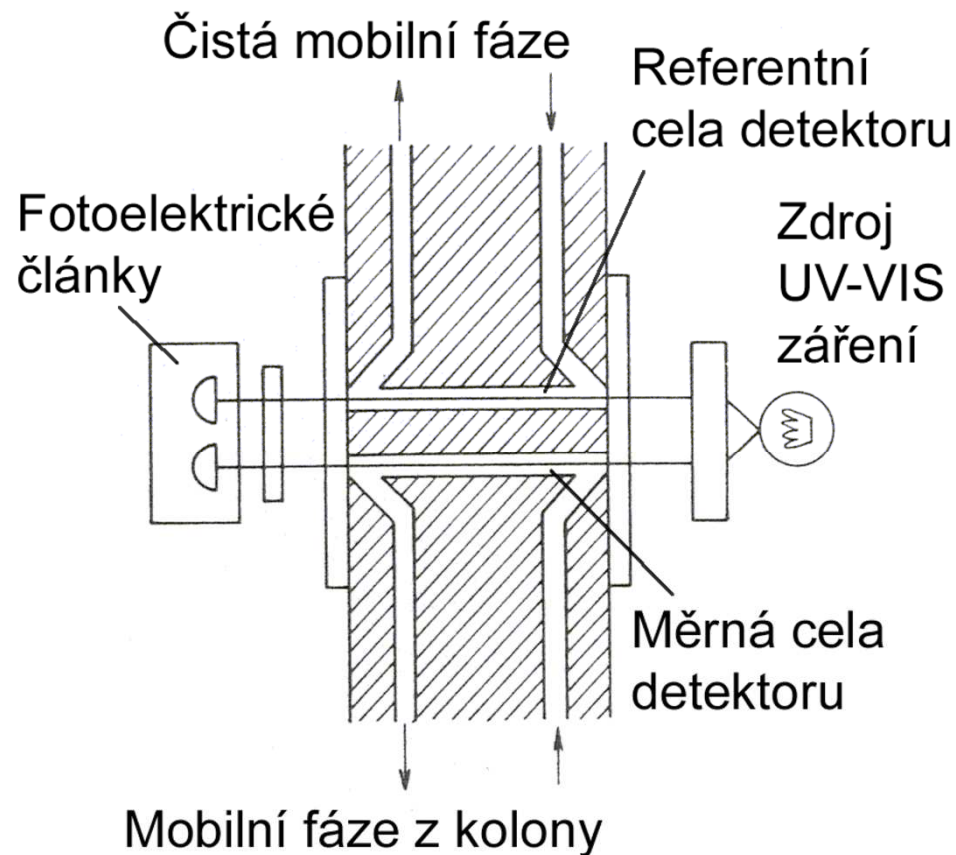
- ☐ Vysoká citlivost
- ☐ Nízký šum a drift nulové linie
- ☐ Univerzálnost
- ☐ Malý objem detekční cely (řádově jednotky μl)
- ☐ Příznivá cena

Nutnost kompromisů, neexistuje zcela univerzální detektor!

Nejčastěji používané detektory v kapalinové chromatografii:

- ☐ Spektrofotometrický UV-Vis, hmotnostní spektrometr, fluorimetrický, elektrochemický, refraktometrický, vodivostní, infračervený
-

Spektrofotometrický detektor

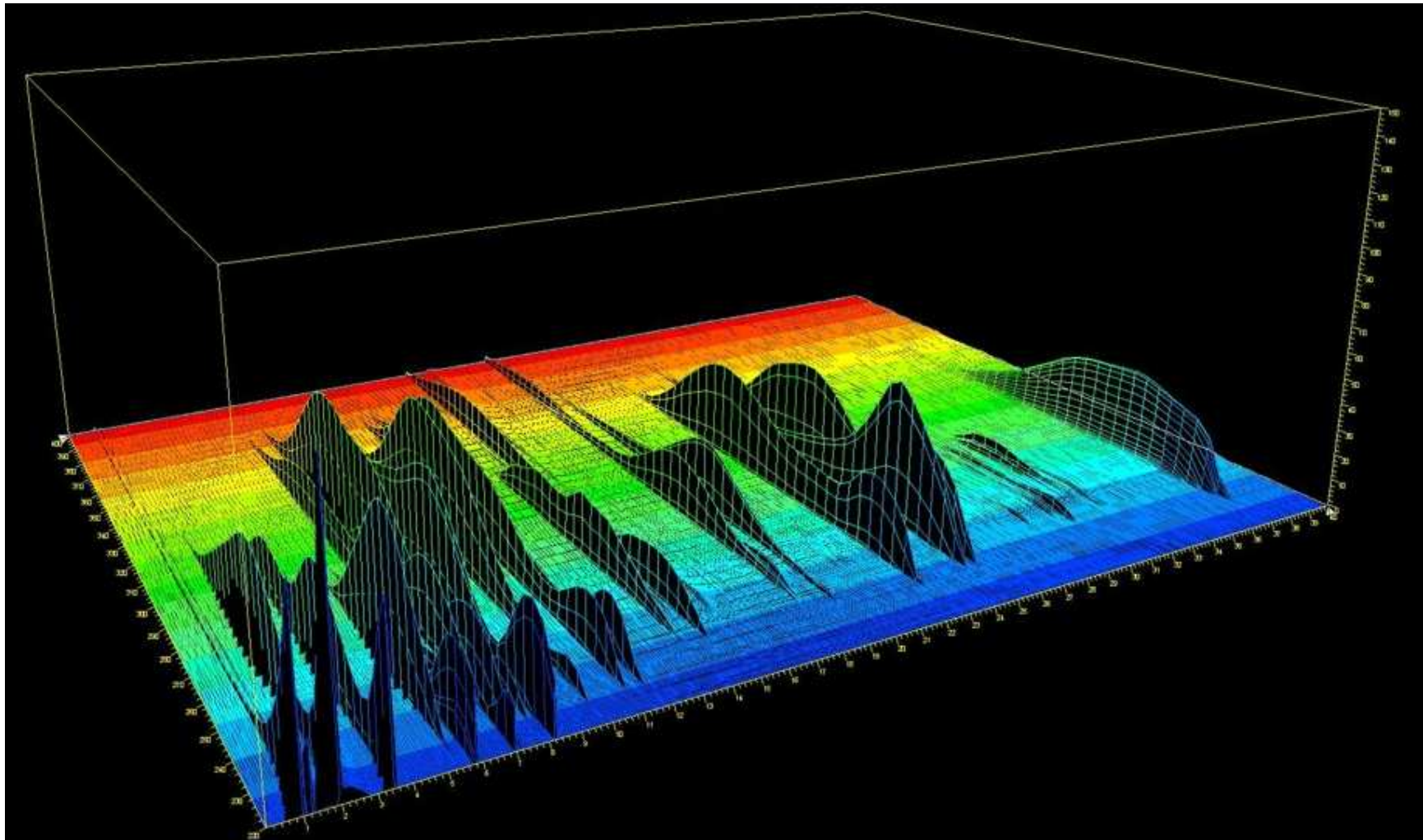


Vlastnosti:

- ☐ nejběžnější
- ☐ stálá nebo proměnná vlnová délka
- ☐ detektor s fotodiodovým polem – velký počet plošných fotodiod
- ☐ meze detekce cca 10^{-10} g/ml

Detektor s diodovým polem

- ❑ rekonstrukce spektra/chromatogramu při zvolené vlnové délce nebo čase
- ❑ identifikace z knihovny, spektrální čistota píku



Moderní trendy v LC

- Mikrofluidika, lab-on-chip
- Detekční systémy, LC/MS, LC/MS/MS, LC/NMR



Agilent Technologies

http://www.agilent.com/about/newsroom/lscs/imagegallery/images/lscs_118_HPLC-ChipII.jpg

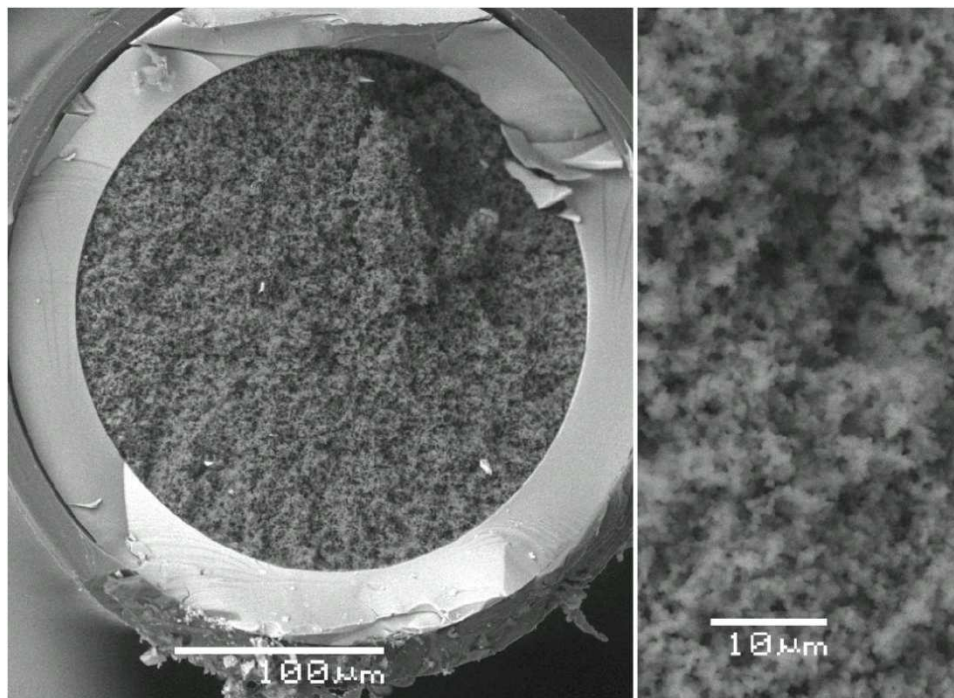


Thermo Fisher Scientific

<http://www.orioninternational.pk/images/products/LTQ%20Orbitrap.png>

Moderní trendy v LC

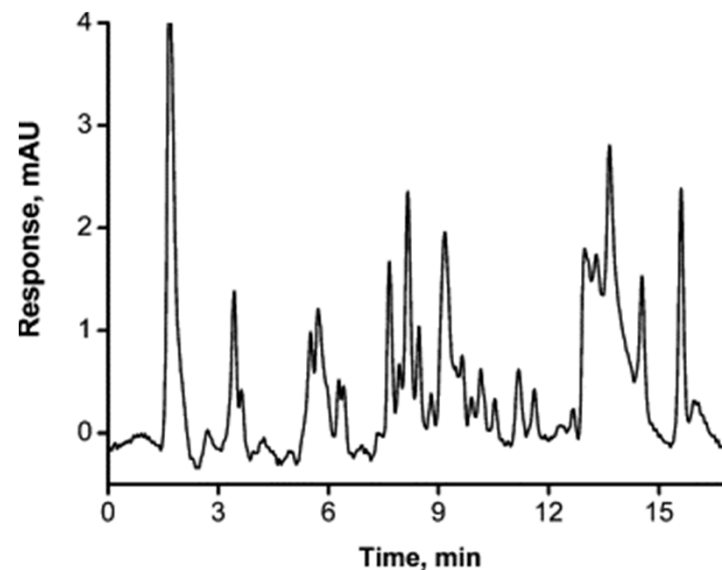
- Monolitické stacionární fáze
- Sub-2 μm částice, povrchově porézní částice



L. Kovaříková:
Mikrokolonová kapalinová chromatografie na monolitických kapilárních kolonách s vázanými cyklodextriny.
Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2011.

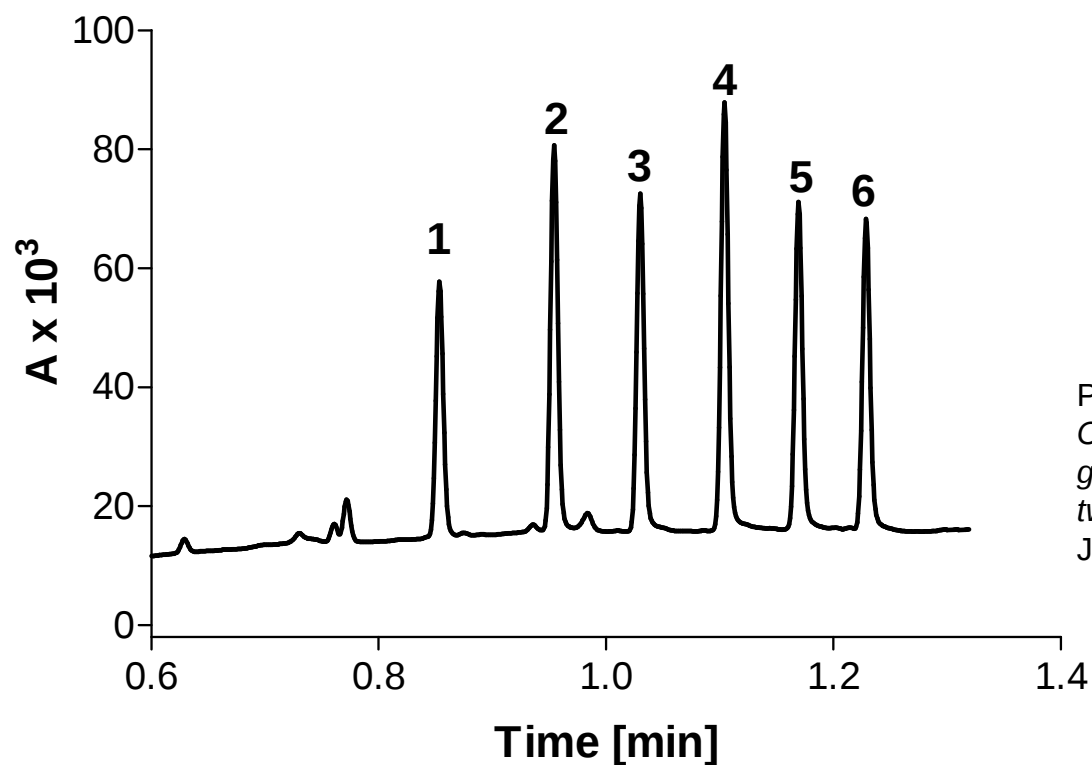
J. Urban:

Hypercrosslinking: New approach to porous polymer monolithic capillary columns with large surface area for the highly efficient separation of small molecules.
Journal of Chromatography A 1217 (2010) 8212.



Moderní trendy v LC

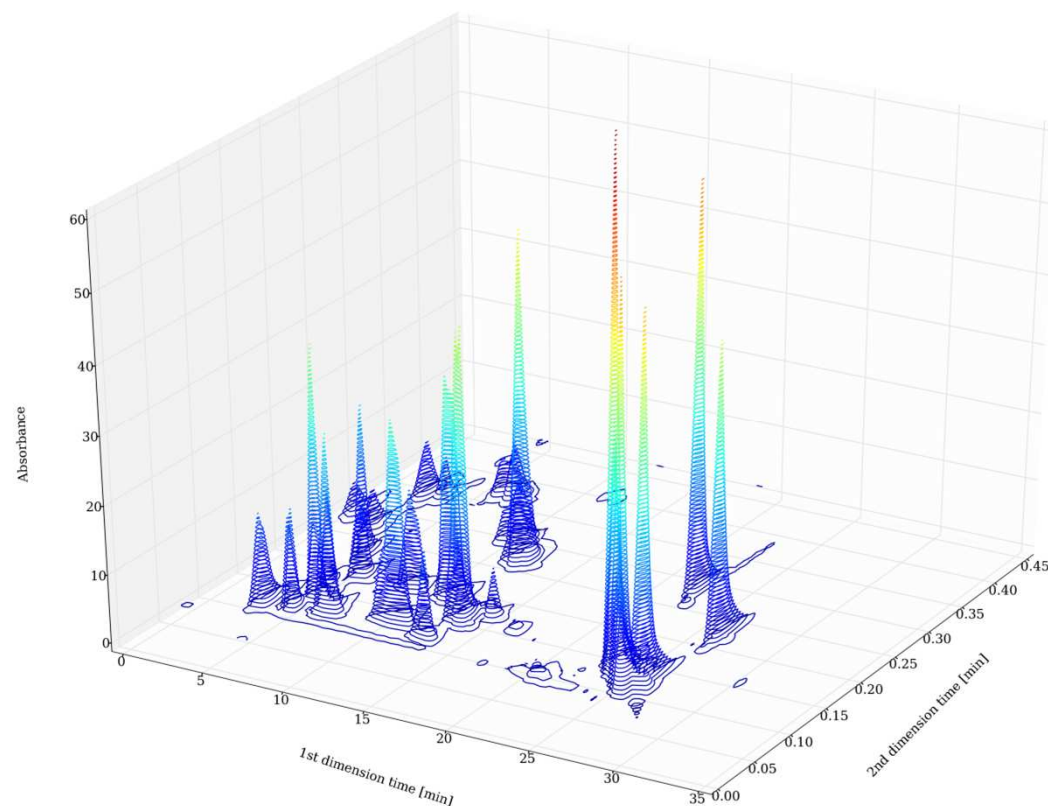
- Rychlé separace v řádu desítek sekund-minuty, RRLC, UHPLC



P. Jandera a kol.:
*Comparison of various second dimension
gradient types in comprehensive
two-dimensional liquid chromatography.*
Journal of Separation Science 33 (2010) 1382.

Moderní trendy v LC

■ Vícerozměrné separační metody



P. Česla a kol.:
*Optimization of two-dimensional gradient liquid
chromatography separations.*
Journal of Chromatography A 1216 (2009) 3443.

