

Kapalinová chromatografie

Interaktivní návod

doc. Ing. J. Fischer, CSc.

Ing. P. Česla, Ph.D.



Kapalinová chromatografie (LC, HPLC)

Interaktivní návod

1. Princip separace

Fázové systémy, popis retence, typy detekce

2. Základy instrumentace pro HPLC

Schéma a popis přístroje, dávkování vzorků, kolona

3. Dávkování do kapalinového chromatografu

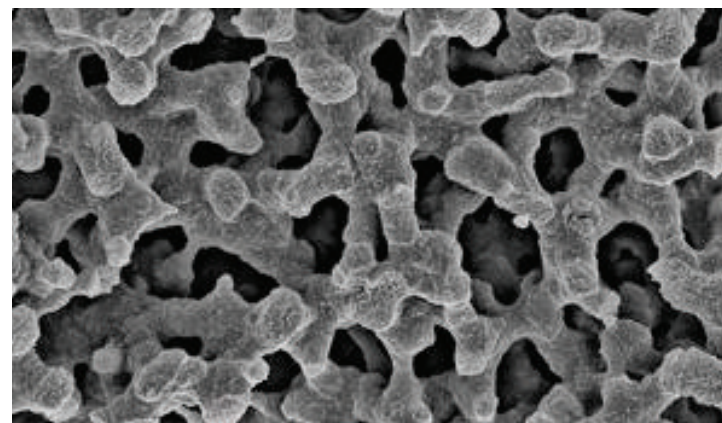
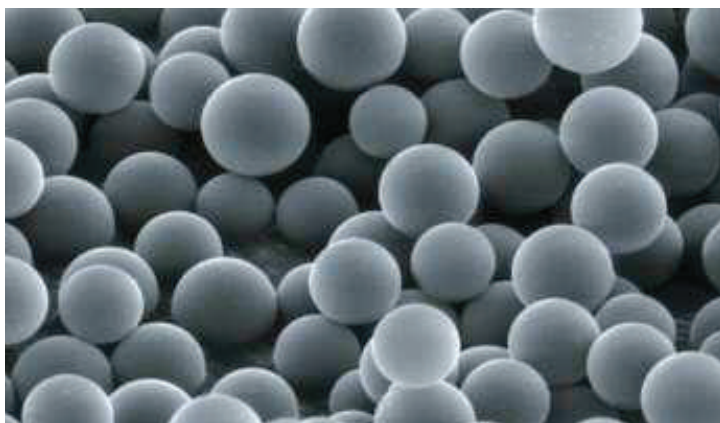
Práce s dávkovacím ventilem s vnější smyčkou

4. Laboratorní návody – literatura v IS STAG

Stanovení ftalátů v lihovinách, stopová analýza HPLC

Princip separace

- Opakovaná distribuce látek mezi kapalnou mobilní a tuhou stacionární fází → látky migrují systémem různou rychlostí ve směru toku mobilní fáze, [separace](#)
- [Vysokoúčinná kapalinová chromatografie \(HPLC\)](#) = kolona 50-300 mm x 2 – 6 mm vnitřní průměr, stacionární fáze 3 – 10 μm , objemový průtok 0.5 – 5 ml/min, pracovní tlaky 30 – 60 Mpa
- Kolony pro HPLC plněné diskrétními částicemi x monolitické stacionární fáze



[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Fázové systémy v 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)
 - **Stacionární fáze:** silikagel, alumina, aminopropyl silikagel, diolová stacionární fáze
 - **Mobilní fáze:** hexan, heptan, dichlormethan ve směsi s nízkým alkoholem
 - Systémy s **obrácenými fázemi** (nepolární sorbent, polární mobilní fáze)
 - **Stacionární fáze:** nepolární typ – oktadecyl silikagel, oktyl silikagel, pentafluorfenyl silikagel, fenyl-hexyl silikagel
 - **Mobilní fáze:** voda ve směsi s acetonitrilem, methanolem, ethanolem atd., bezvodé fáze – 2-propanol ve směsi s hexanem
- ❑ Některé další (méně běžné) fázové systémy:
 - Chromatografie sterické vyluky
 - Iontově výměnná a iontová chromatografie

[Další snímek](#)

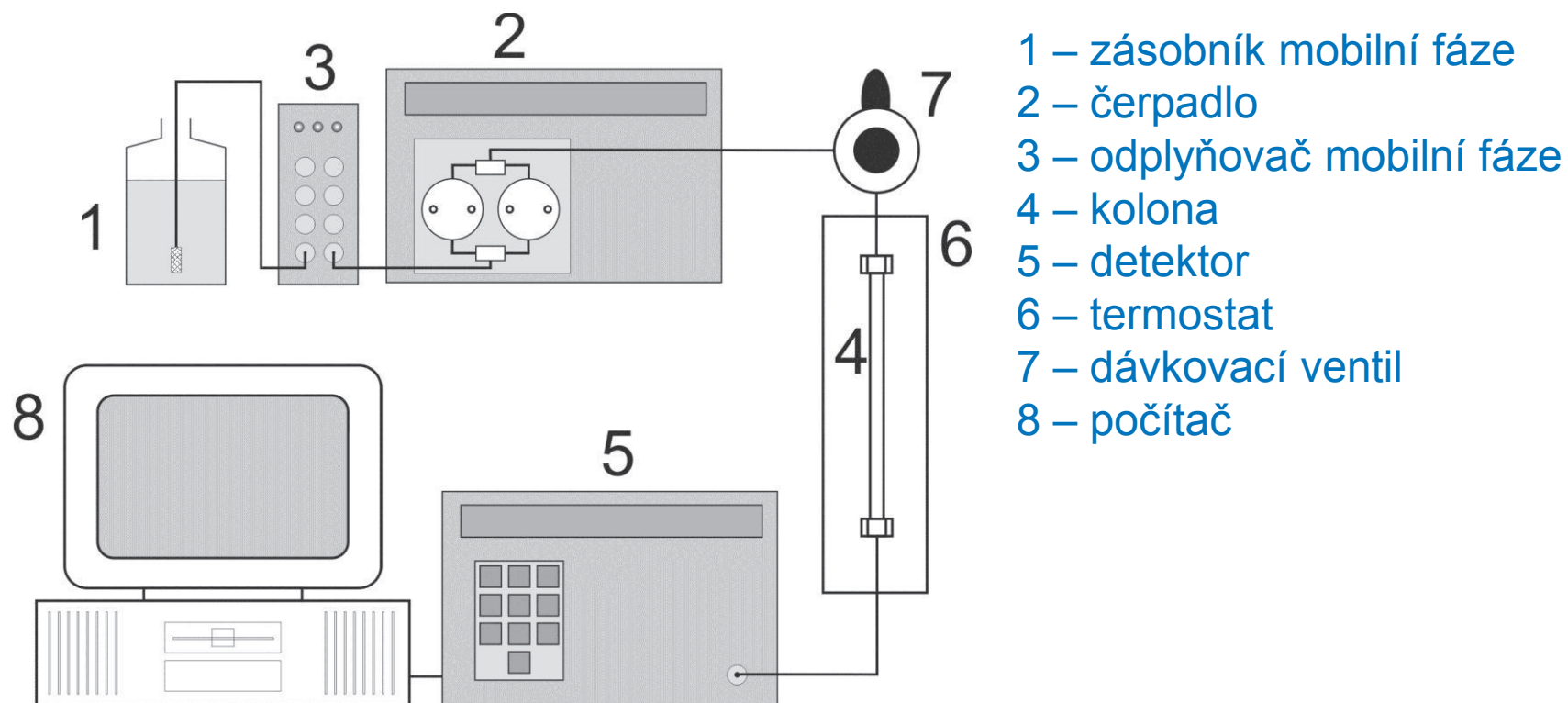
[Návrat do menu](#)

Možnosti detekce v HPLC

- 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

Základy instrumentace pro HPLC

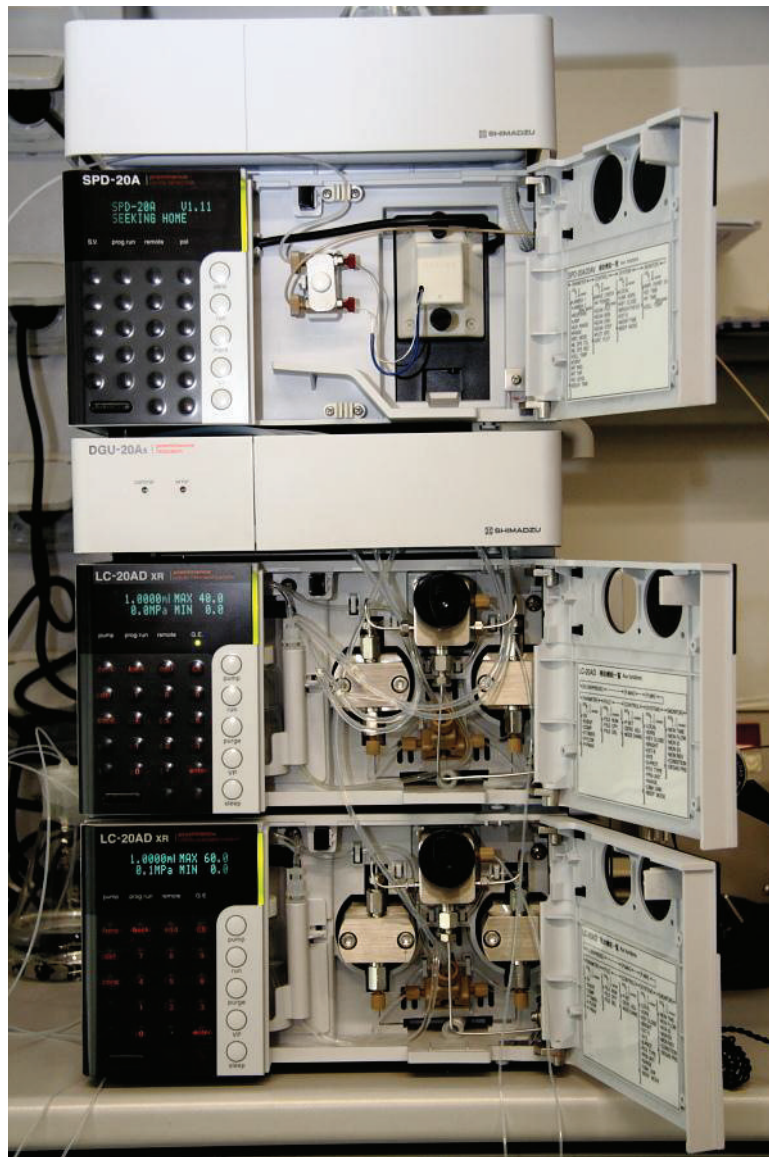
- Schéma přístroje pro kapalinovou chromatografii



[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Příklad přístroje pro HPLC



- Celkový pohled na sestavu kapalinového chromatografu Shimadzu v uspořádání pro vysokotlaký gradient.

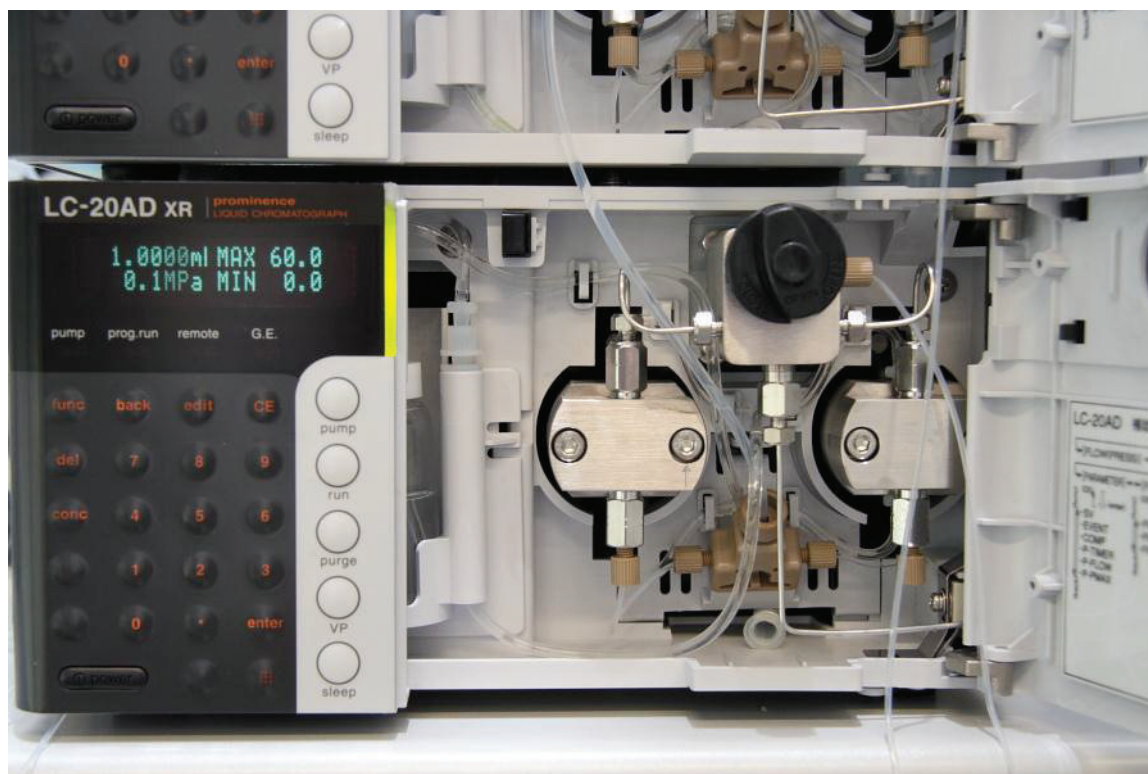
Dole dvě vysokotlaká čerpadla LC 20 AD, **uprostřed** degaser k odplyňování složek mobilní fáze, **nad ním** spektrofotometrický detektor SPD 20A, **zcela nahoře** prostor pro zásobní láhve se složkami mobilní fáze.

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Příklad čerpadla pro HPLC

- Detailní pohled na vysokotlaké čerpadlo LC 20 AD.



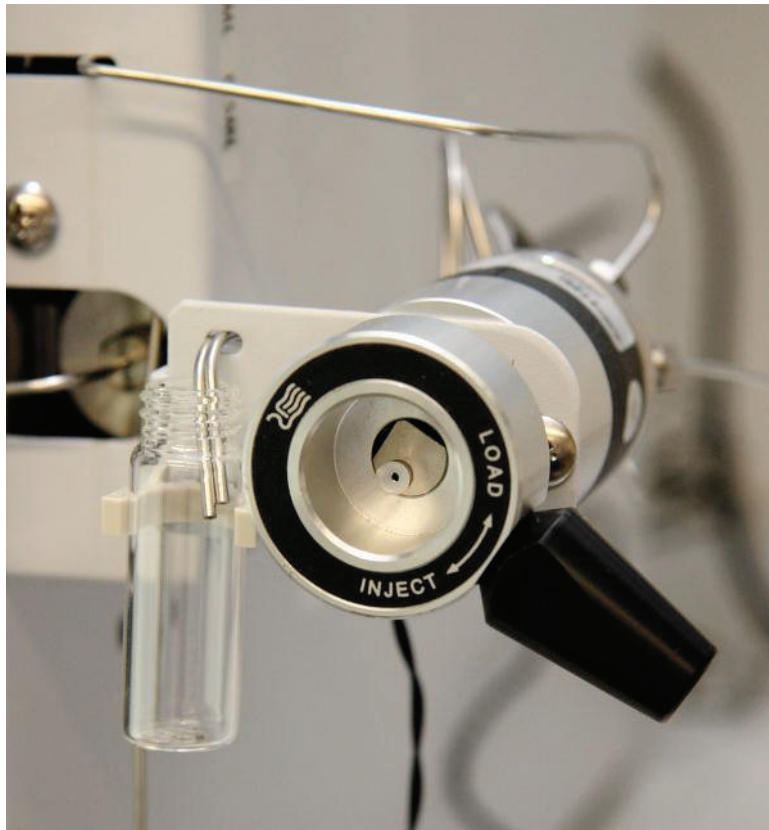
Napravo od klávesnice pro řízení a programování čerpadla jsou vidět dvě čerpací hlavy v paralelním zapojení, **uprostřed** je ventil pro rychlé promytí čerpadla mobilní fází.

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Dávkování vzorků do HPLC kolony

- Dávkované objemy řádově v μl do mobilní fáze pod stálým tlakem
→ obtokové dávkovací ventily



Čelní pohled na šesticestný dávkovací ventil Rheodyne.

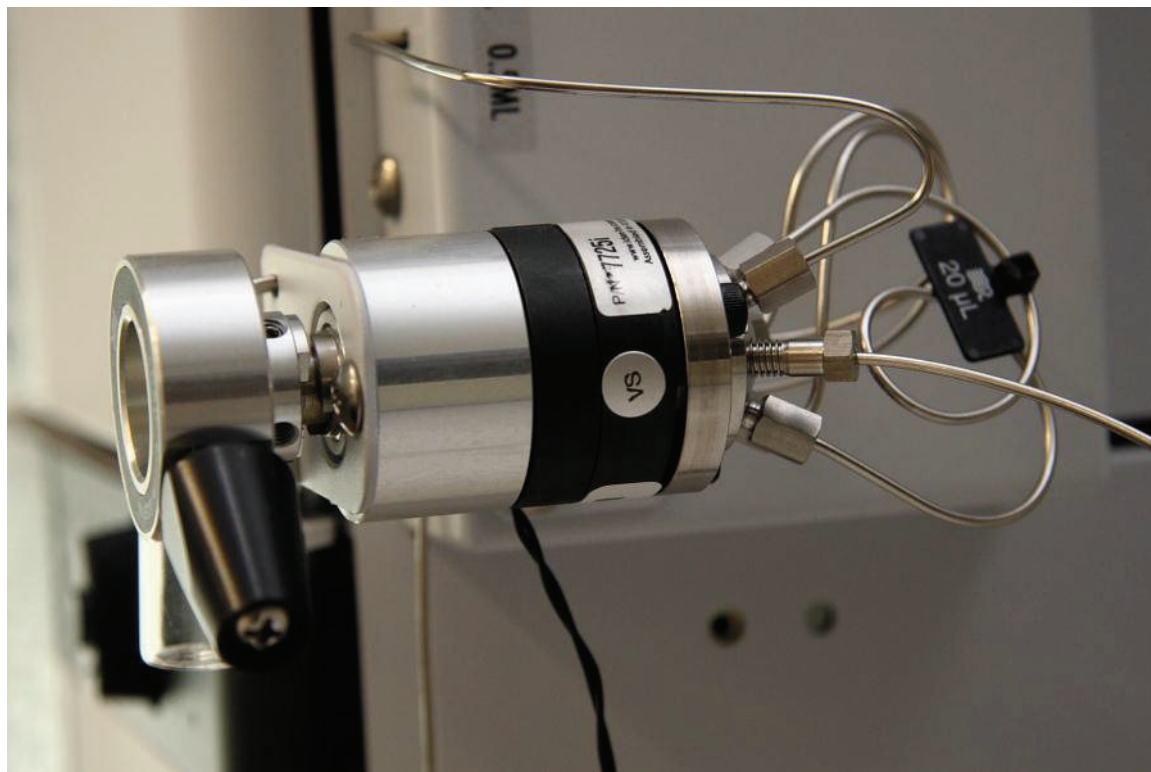
Napravo přepínací páka s polohami „dávkování“ a „plnění“, **uprostřed** port pro zavedení jehly stříkačky se vzorkem, **vlevo** na držáku odpadní nádobka pro přebytečný vzorek

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Dávkování vzorků do HPLC kolony

- Dávkovací ventil Rheodyne z bočního pohledu.



Nahoře je viditelná kapilára pro přívod mobilní fáze od čerpadla, **uprostřed** je zapojena kapilára spojující dávkovací ventil a separační kolonu. **Za nimi** je vidět připojení dávkovací smyčka (objem 20 μ l).

[Další snímek](#)

[Návrat do menu](#)

Separační kolona v termostatu

- Detail separační kolony pro kapalinovou chromatografii umístěné v termostatu (s odklopeným víkem).



Dávkování do kapalinového chromatografu

- Dávkování s použitím dávkovacího ventilu Rheodyne s vnější smyčkou



*Klikni na
video pro
přehrání*



1. Promytí a naplnění stříkačky vzorkem
2. Promytí a plnění vnější smyčky, ventil v poloze LOAD
3. Nadávkování do toku mobilní fáze bez poklesu tlaku, otočení ventilu do polohy INJECT, start analýzy