

Aplikovaná plynová a kapalinová chromatografie

Základní typy chromatografie

(Klasifikace podle skupenství fází)

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Typ chromatografie
plynná	pevná	plynová chromatografie (gas-solid chromatography, GSC)
plynná	kapalná	plynová chromatografie (gas-liquid chromatography, GLC)
kapalná	pevná	kapalinová chromatografie (liquid-solid chromatography, LSC)
kapalná	kapalná	kapalinová chromatografie (liquid-liquid chromatography, LLC)

Nejvýznamnější kategorie:
plynová chromatografie (GC)
kapalinová chromatografie (LC)

Základní typy chromatografie

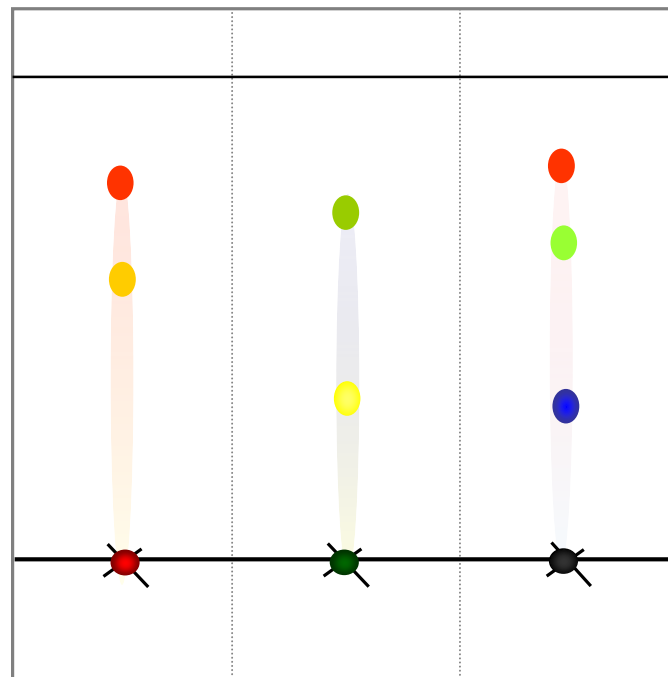
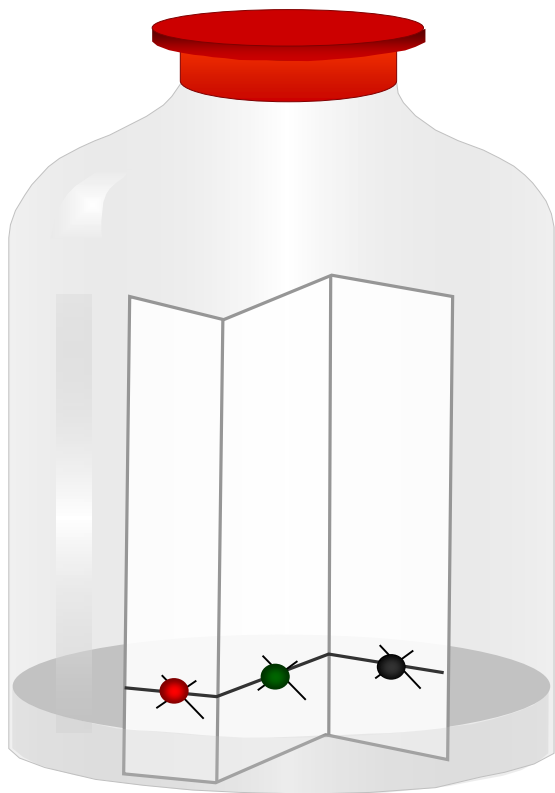
Klasifikace podle způsobu provedení

- kolonová chromatografie (column chromatography - CC)
- chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography - TLC)
- chromatografie na papíře (paper chromatography - PC)

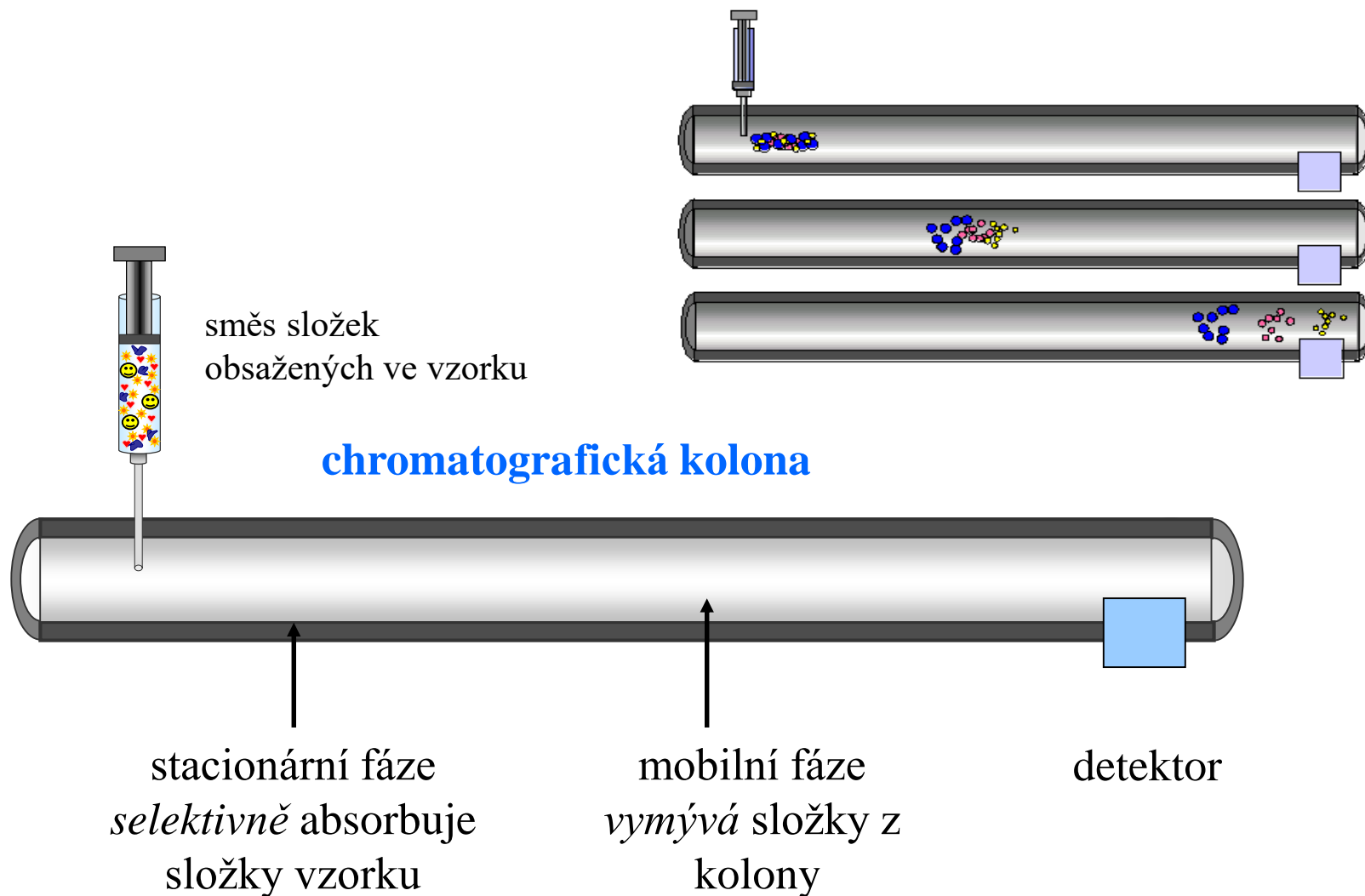
Klasifikace podle podmínek separace

- izokratická chromatografie (konstantní podmínky)
- gradientová chromatografie (mění se teplota, pH, složení mobilní fáze)

Papírová chromatografie



Chromatografická separace

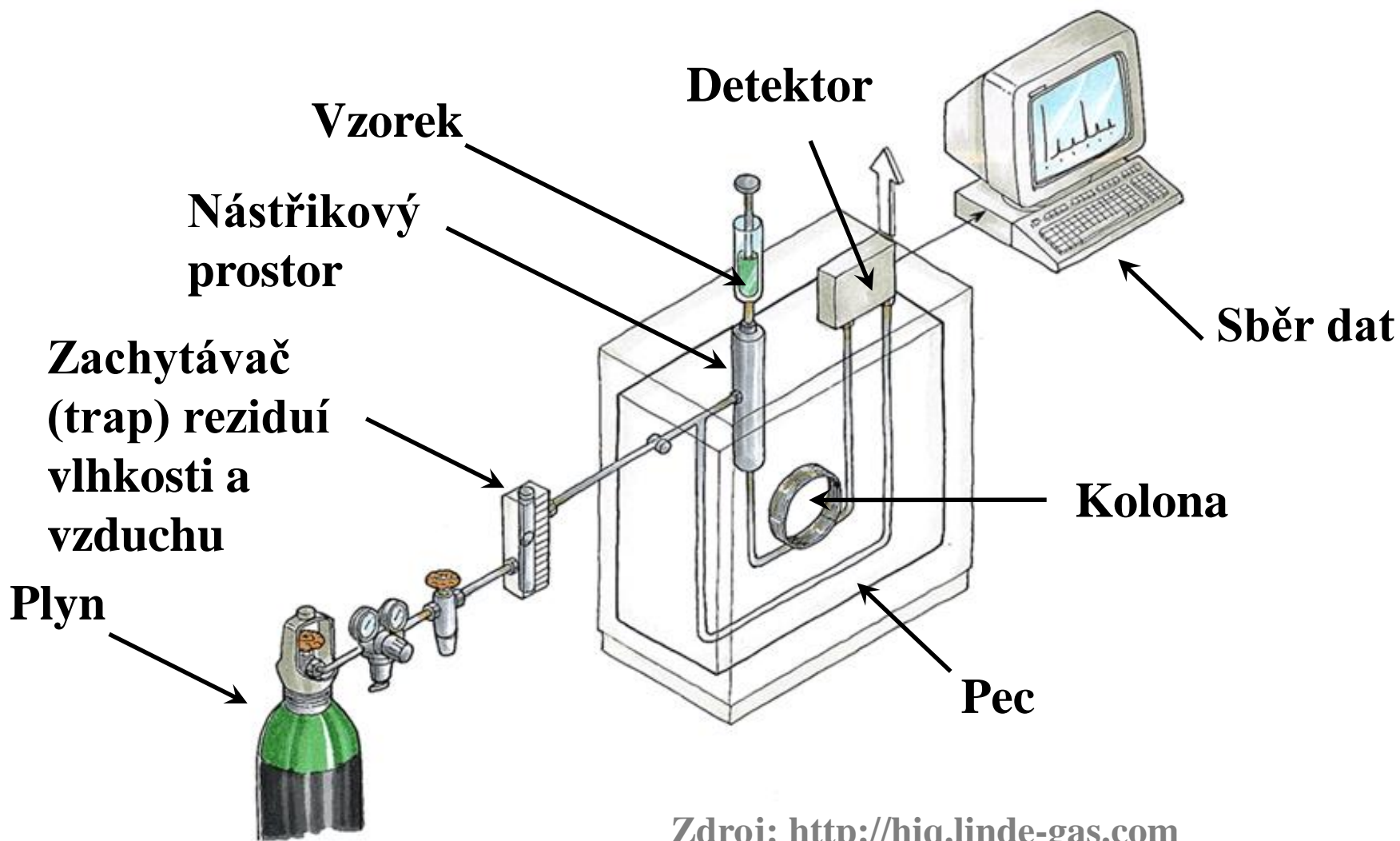


Plynová chromatografie

- **Separace látek v koloně, která obsahuje:**
 - Stacionární (nepohyblivou) fázi (sorbent nebo vysokovroucí kapalina)
 - Mobilní (pohyblivou) fázi (nosný plyn)
- **Dělení látek na základě rozdílů v těkavosti a struktuře**
- **Vhodná pro:**
 - Látky s přijatelnou těkavostí (teplota b.v.)
 - Látky termostabilní



PLYNOVÝ CHROMATOGRAF



Zdroj: <http://hiq.linde-gas.com>

STANOVENÍ POMOCÍ GC – jednotlivé kroky



Nástrik

- Split/splitless, on-column, PTV, DSI/DMI



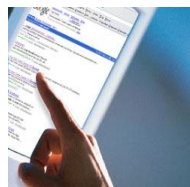
Separace

- Konvenční 1D-GC, rychlá GC, multidimensionální GC



Detekce

- Konvenční a hmotnostně-spektrometrické detektory



Kvantifikace

- Matriční efekty

NÁSTŘIKOVÉ TECHNIKY V GC

- **Výběr optimální nástřikové techniky závisí na:**
 - Koncentračním rozmezí cílových analytů (se speciálními požadavky v (ultra)stopové analýze)
 - Fyzikálně-chemických vlastnostech analytů
 - Přítomnosti matričních koextraktů přítomných ve vzorku

NÁSTŘIKOVÉ TECHNIKY V GC

- **Split**
- **Splitless, pulzní splitless**
- **On-column**
- **Teplotně programovaný nástřik (PTV)**
- **Direct sample introduction (DSI)**
- **Difficult matrix introduction (DMI)**

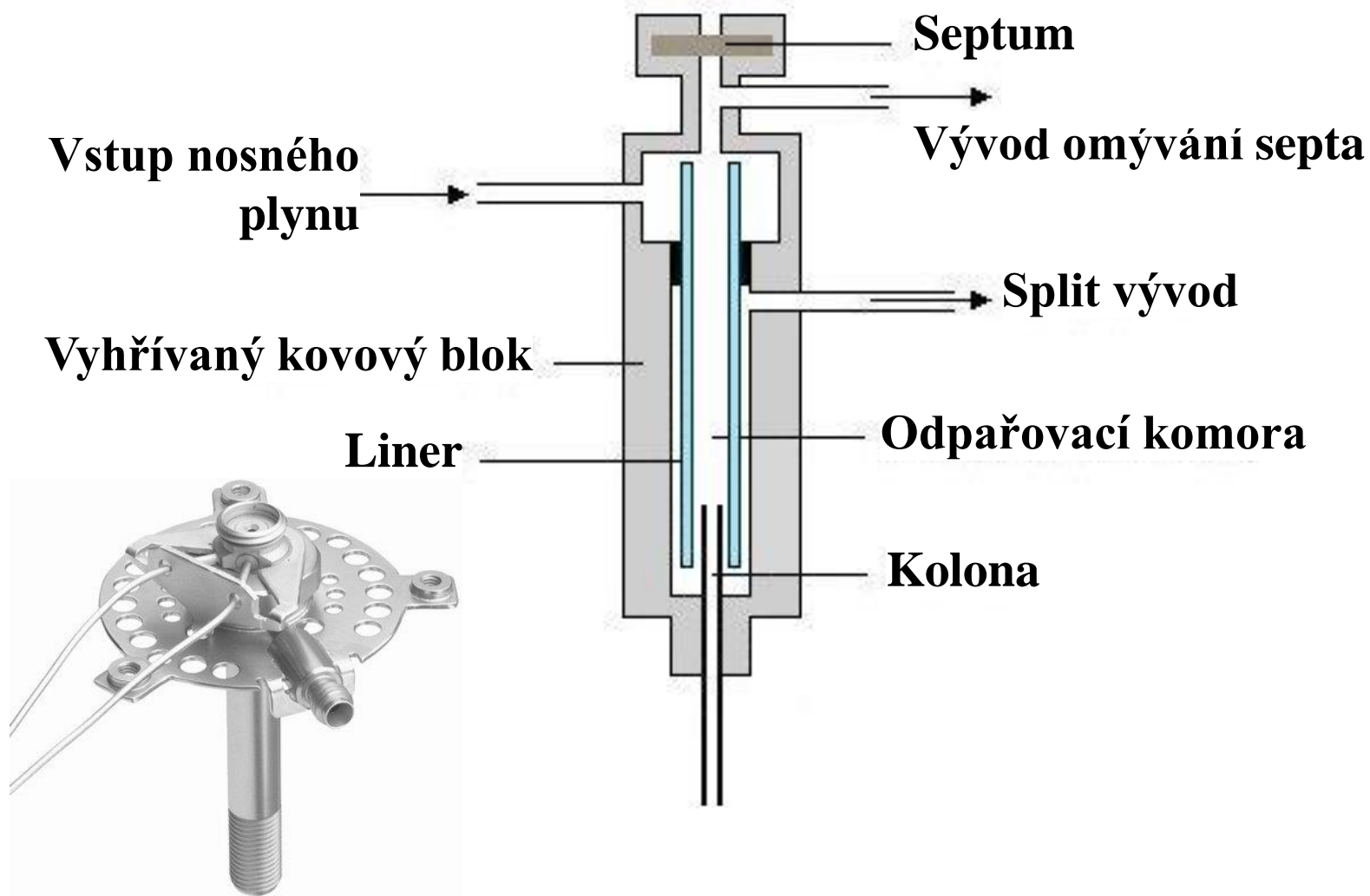


SPLIT NÁSTŘÍK

- **Malý objem vzorku (0,1–2 μL) je rychle nastříknut do vyhřátého lineru**
- **Větší část odfouknuta — menší část je přenesena na kolonu (split poměr)**
- **Hlavní faktory: vnitřní průměr kolony a koncentrace vzorku**
- **Split poměr \neq poměr rozdělení vzorku**



SPLIT NÁSTŘIK



SPLIT NÁSTŘÍK

- **Split poměr ovlivňuje**
 - těkavost vzorku
 - nastříkovaný objem
 - rozpouštědlo
 - technika nástřiku stříkačkou
 - teplota nástřiku
 - teplota kolony (rekondenzace vzorku – zóna snížení tlaku – nasátí dalších par vzorku)
 - objem a tvar nástřikové komory

SPLITLESS NÁSTŘÍK

- **Veškerý nastříknutý vzorek je přenesen na GC kolonu**
- **Splitless perioda – její délka závisí na:**
 - vlastnostech rozpouštědla
 - vlastnostech analytů
 - objemu nástřikového prostoru
 - nástřikovaném objemu
 - nástřikové rychlosti
 - rychlosti nosného plynu

SPLITLESS NÁSTŘIK

- Délka splitless periody (t_s , min)

$$t_s = 2 \cdot \frac{V_l}{F}$$

V_l ...objem lineru (mL)

F ...průtok nosného plynu (mL/min)

Příklad:

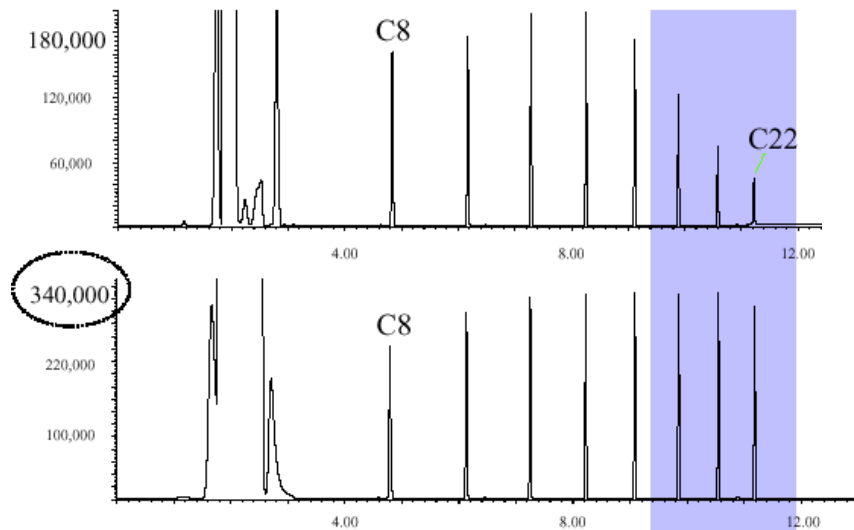
$$V_l = 800 - 990 \mu\text{L}$$

$$F = 1 \text{ mL/min}$$

$$t_s = \mathbf{1,6 - 2 \text{ min}}$$

SPLITLESS NÁSTŘÍK

- Veškerý nastříknutý vzorek (1–5 μL) je přenesen na GC kolonu
- Doba nanášení vzorku: splitless perioda



Splitless perioda: 10 s

Splitless perioda: 60 s

Zdroj: SGE, www.sge.com

SPLITLESS NÁSTŘIK

1.200 μL *Voda* \Rightarrow 1.190 μL

Expanze rozpouštědla
↓
RIZIKO BACKFLASH

800 μL

600 μL

Bezpečný limit (75%)

Acetonitril \Rightarrow 409 μL

Aceton \Rightarrow 293 μL

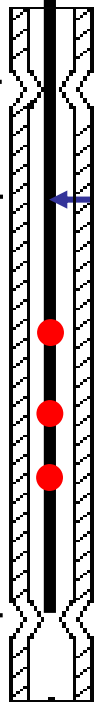
Ethyl-acetát \Rightarrow 220 μL

Toluen \Rightarrow 203 μL

Teplota: 250 °C

Tlak: 101 kPa (14,6 psi)

0 μL



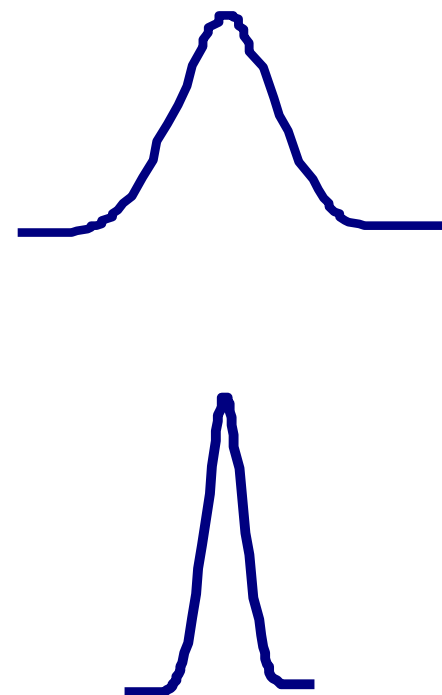
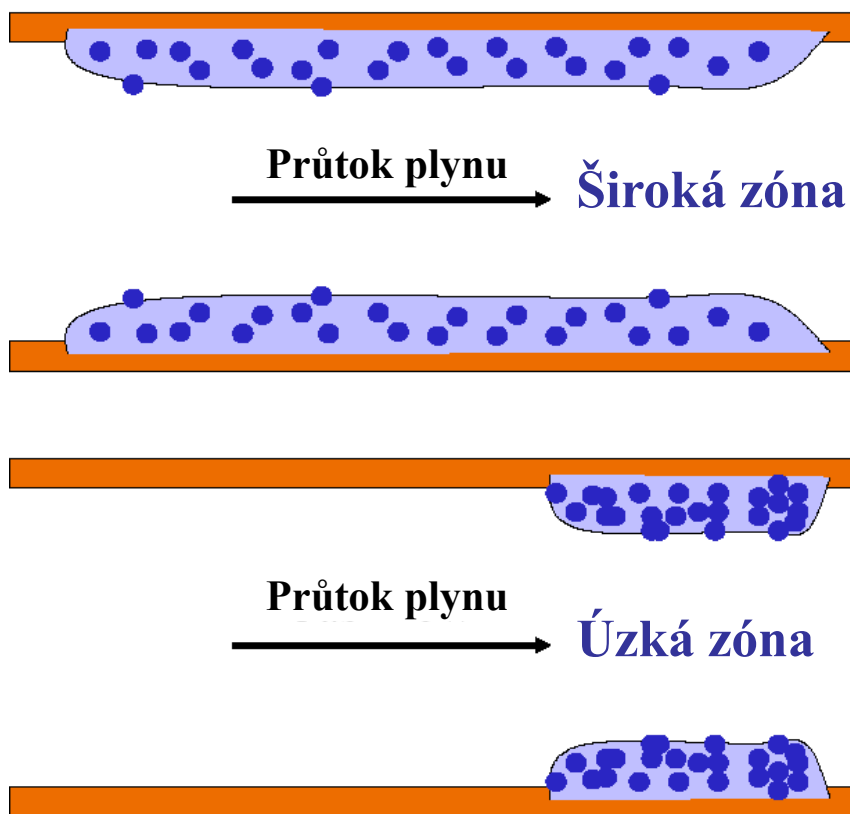
Software: Hewlett-Packard FlowCalc 2.0

SPLITLESS NÁSTŘIK

- **Zaostření nanášené zóny — rozpouštědlem**
 - Teplota kolony 20–30 °C pod borem varu rozpouštědla (kondenzace)
 - Záchyt analytů (s těkavostí podobnou rozpouštědлу) v úzkém pásu
 - Programování teploty – postupné odpaření
- **Příklad:** Analýza reziduí pesticidů — extrakt v toluenu (b.v. 110,6 °C), počáteční teplota kolony: 90 °C

SPLITLESS NÁSTŘIK

- **Zaostření nanášené zóny — rozpouštědlem**



Zdroj: SGE, www.sge.com

SPLITLESS NÁSTŘIK

- **Zaostření nanášené zóny — teplotní zaostření**

- Teplota kolony min. 150 °C pod bodem varu nejtěkavějšího analytu

- Analyty kondenzují na hlavě kolony

- Programování teploty – postupné odpaření

- **Příklad:** Analýza bromovaných retarderů hoření (b.v. > 300 °C) — extrakt v isooktanu (b.v. 99,3 °C); počáteční teplota kolony: 110 °C → nedochází ke kondenzaci rozpouštědla; uplatňuje se pouze teplotní zaostření

SPLITLESS NÁSTŘIK

- **Zaostření nanášené zóny — retenční gap**
 - Kolona bez stacionární fáze – minimální retence
 - Zachycuje zkondenzovaný vzorek
 - Redukuje délku pásu (odpařování rozpouštědla)
 - Na hlavně kolony zaostření rozpouštědlem (těkavější analyty) a stacionární fází (výševroucí analyty)
 - Ochrana kolony před netěkavými složkami vzorku

TEPLOTNĚ PROGRAMOVANÝ NÁSTŘÍK

- **Programmable Temperature Vaporisation (PTV) Injection**
 - **PTV solvent vent nástřik**
 - Vzorek (1–1000 μL) nastříknut při teplotě značně pod bodem varu rozpouštědla (např. 0–30 $^{\circ}\text{C}$)
 - Odvod par rozpouštědla přes split kapiláru
 - Po odfoukání rozpouštědla rychlé vyhřátí injektoru, přenos analytů na kolonu
 - Pro nástřik větších objemů je součástí lineru sorbent pro zabránění zahlcení kolony rozpouštědlem

TEPLOTNĚ PROGRAMOVANÝ NÁSTŘÍK

▪ **Výhody**

- Snížení diskriminace méně těkavých složek
- Šetrnost s termolabilním analytům
- Možnost nástřiku větších objemů (LVI)

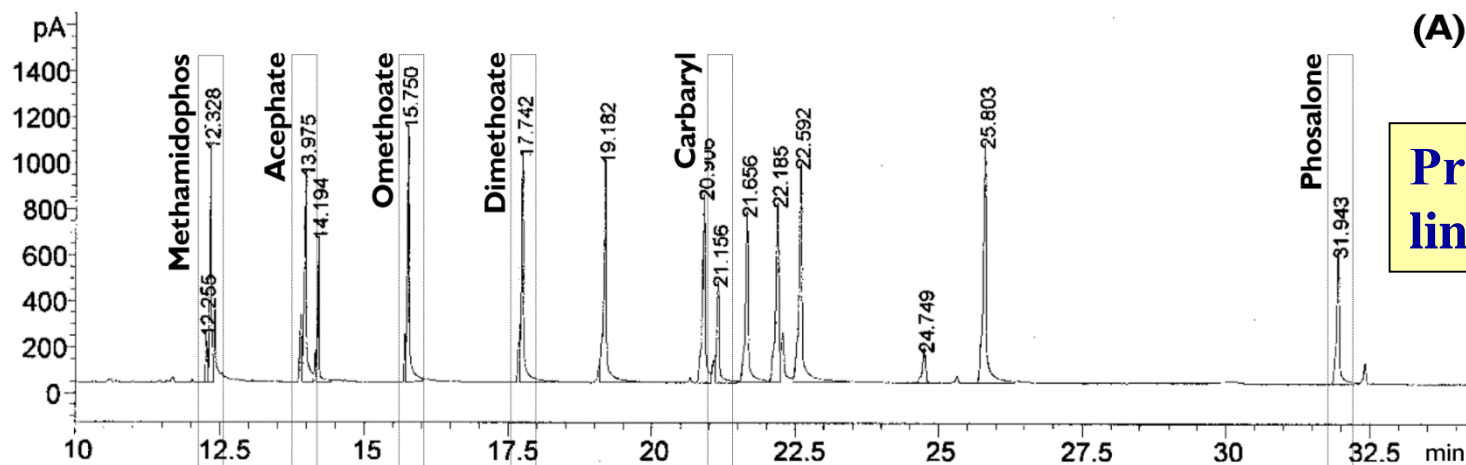
▪ **Nevýhody**

- Důkladná (časově náročná) optimalizace operačních podmínek

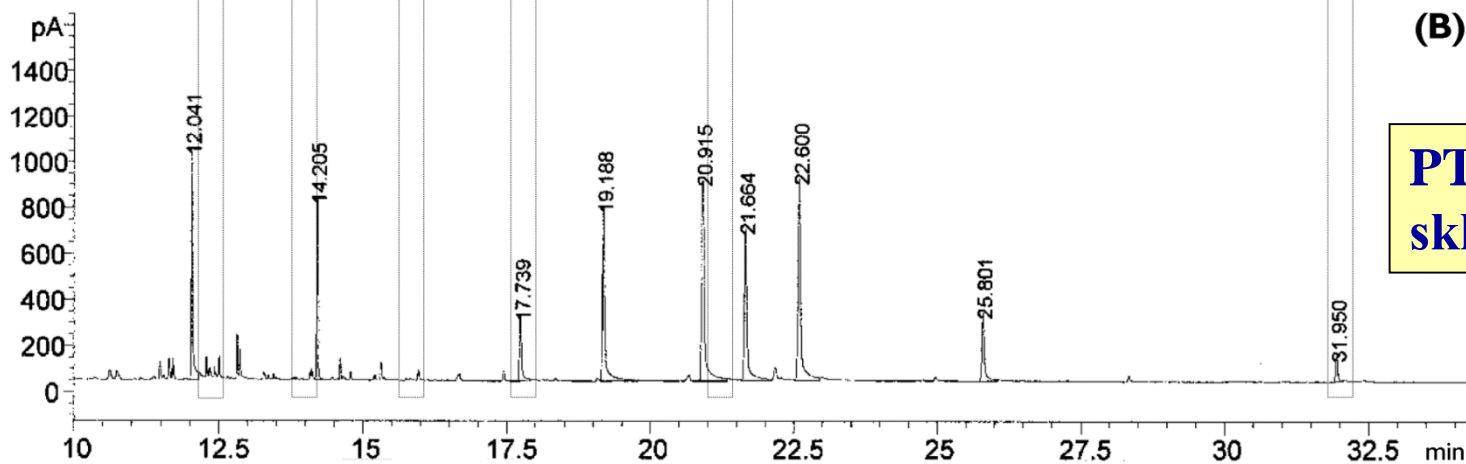
TEPLOTNĚ PROGRAMOVANÝ NÁSTŘÍK

- **Pro nástřík větších objemů je součástí lineru sorbent (Tennax, polyimid, Chromosorb, skleněná vata, PTFE) pro zabránění zahlcení kolony rozpouštědlem**
 - Některé labilní sloučeniny mohou být v přítomnosti daného sorbentu citlivé na degradaci / přeskupování z důvodu katalytických efektů sorbentu, popř. silná vazba analytu na daný materiál

TEPLOTNĚ PROGRAMOVANÝ NÁSTŘÍK



Prázdný PTV liner

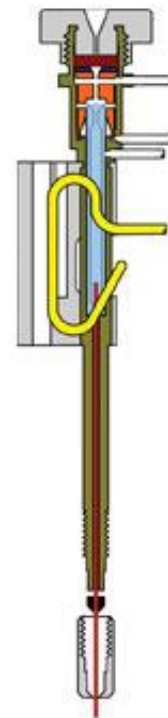


PTV liner se skleněnou vatou

Zdroj: M. Godula, J. Hajšlová, K. Maštovská, J. Křivánková, J. Sep. Sci., 24 (2001) 355–366

TEPLOTNĚ PROGRAMOVANÝ NÁSTŘÍK

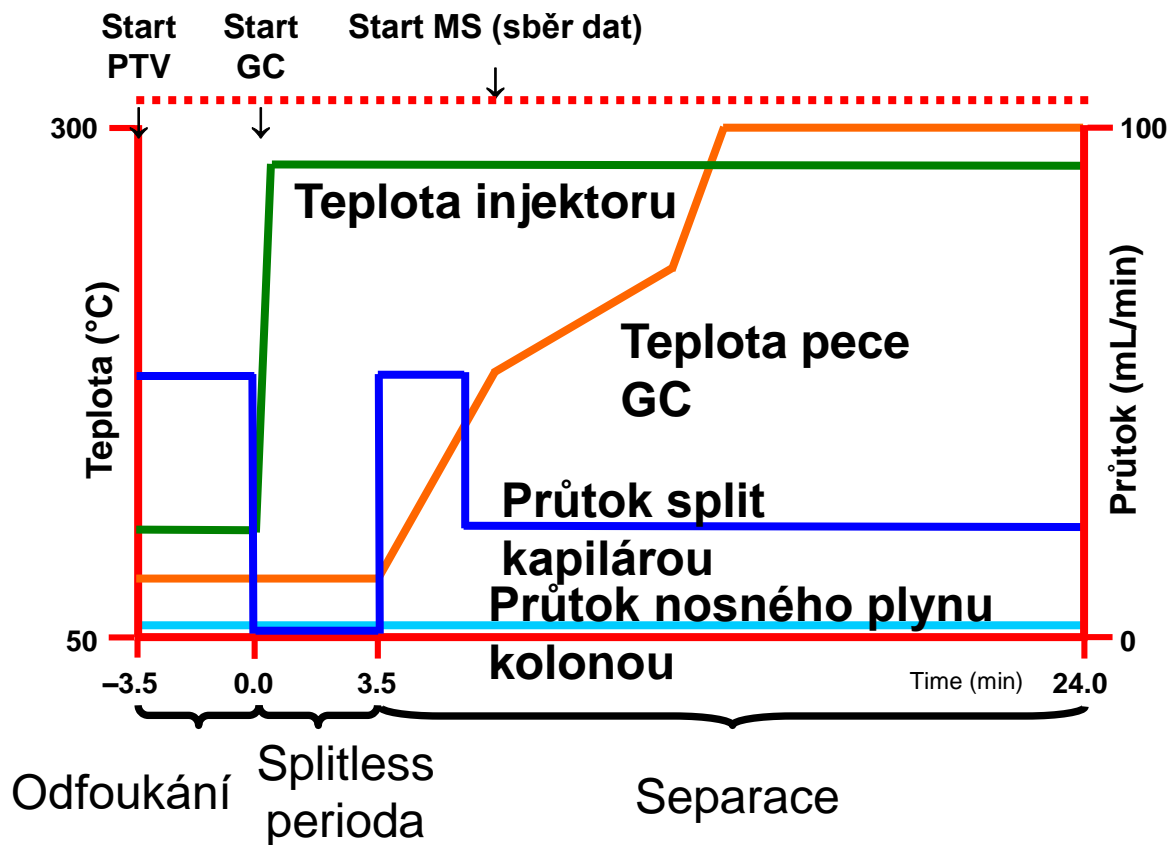
- Ve srovnání s klasickým splitless nástřikem PTV vyžaduje časově zdlouhavější optimalizaci parametrů
 - Počáteční a koncová teplota injektoru
 - Rychlost vyhřívání injektoru
 - Doba odfoukávání (*vent time*)
 - Průtok a tlak
 - Doba přenosu analytů na GC kolonu
 - Objem nástřiku
 - Typ lineru



Zdroj: Varian, www.varianinc.com

TEPLOTNĚ PROGRAMOVANÝ NÁSTŘÍK

▪ Ukázka PTV–GC–MS programu

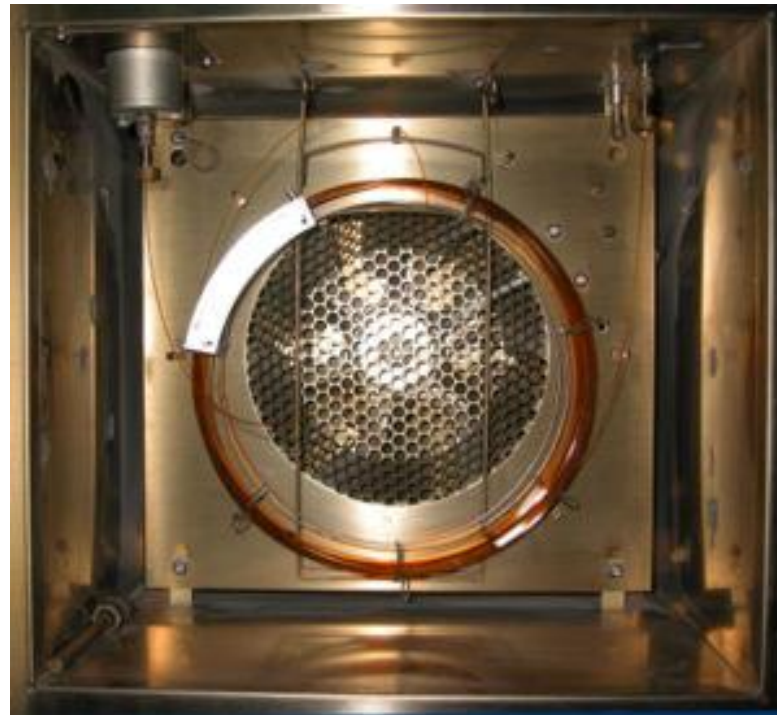


ROZDĚLENÍ GC KOLON

Náplňové



Kapilární

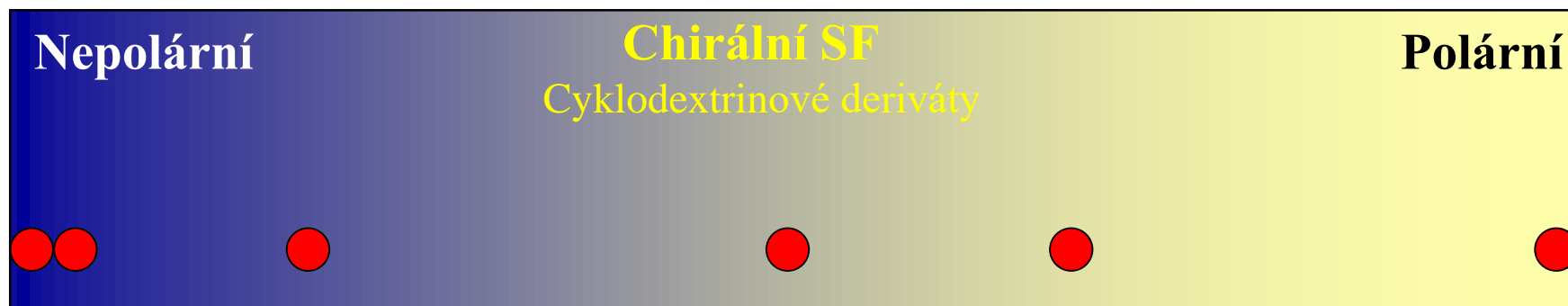


KLASIFIKACE KAPILÁRNÍCH KOLON

Kategorie	Vnitřní průměr průměry kolon [mm]	Komerčně dostupné
Megabore	$\geq 0,5$	0,53
Wide bore	$\geq 0,3 - < 0,5$	0,32; 0,45
Narrow bore	$\geq 0,2 - < 0,3$	0,20; 0,25; 0,28
Microbore	$\geq 0,2 - < 0,3$	0,10; 0,15; 0,18
Sub-microbore	$< 0,1$	různé

Zdroj: K. Maštovká, S.J. Lehotay (2003) J. Chromatogr. A 1000, 153–180

STACIONÁRNÍ FÁZE V GC



POLY- 100 % dimethylsiloxan (PDMS)

(5 %-fenyl)methylsiloxan

(50 %-fenyl)methylsiloxan

(70 %-kyanopropylfenyl)methylsiloxan

(100 %-kyanopropylfenyl)methylsiloxan

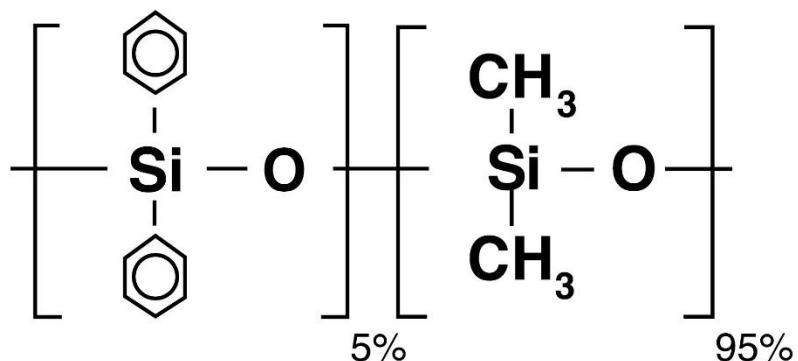
Polyethylenglykol (PEG)



Zdroj: <http://phenomenex.com>

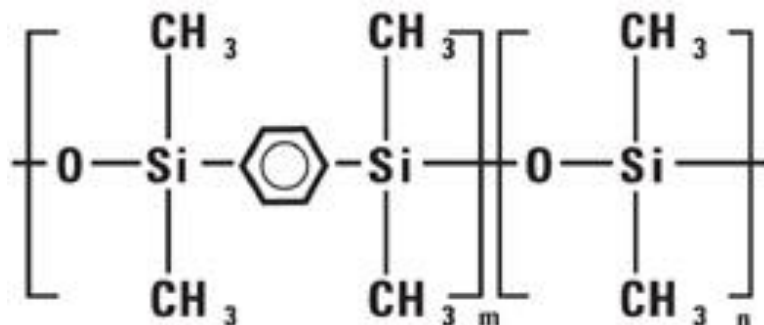
Stacionární fáze:

Poly(5 %-fenyl)methylsiloxan



Poly(5 %-fenyl)silfenylensiloxan

[poly 1,4-bis(dimethylsiloxy)fenylen dimethyl siloxan]



POLARITA STACIONÁRNÍCH FÁZÍ

▪ **Nepolární fáze**

- Dělení látek na základě bodu varu (dle těkavosti)
- Větší teplotní rozsah (obvykle až do 350–380 °C)
- Menší pozadí (bleed)
- **Příklady: DB-1, DB-5, DB-5ms, BPX-1, BPX-5**

▪ **Středně polární fáze**

- Separační účinnost se mění s teplotou
- Nízká teplota: jako nepolární fáze
- Vysoká teplota: jako polární fáze
- **Příklady: DB-17ms, BPX-50**

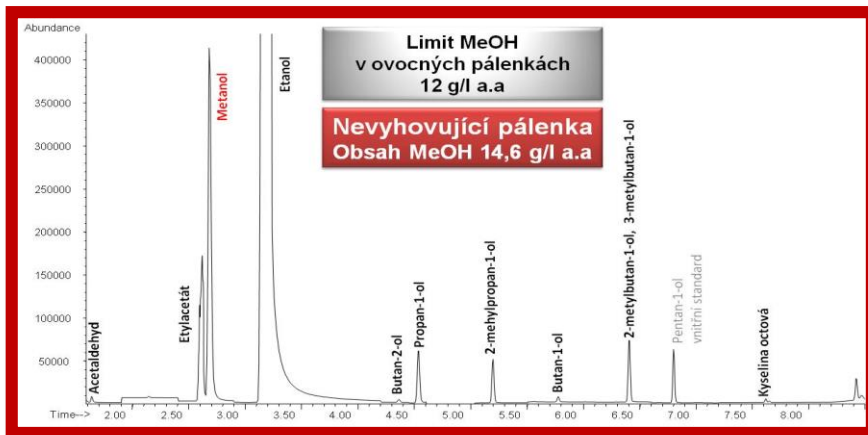
▪ **Polární fáze**

- Dělení látek na základě specifických interakcí
- Menší teplotní rozsah (obvykle do 220–280 °C)
- Vyšší pozadí (bleed)
- **Příklady: HP-Innowax, SolGelWax**

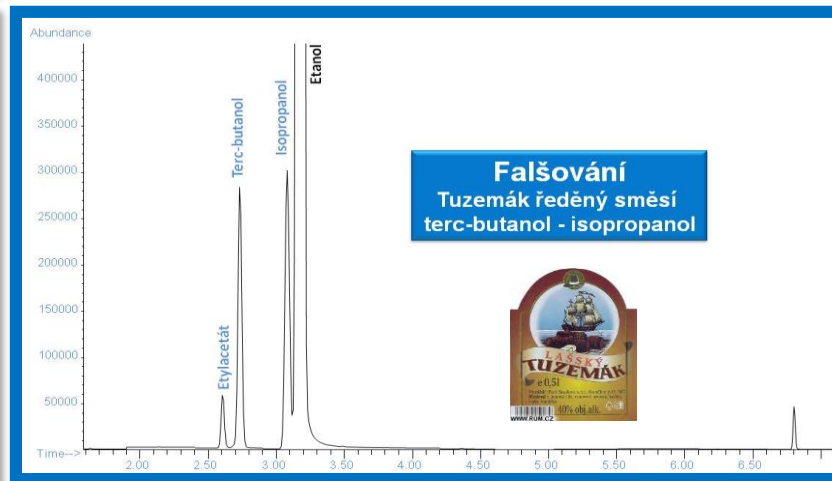
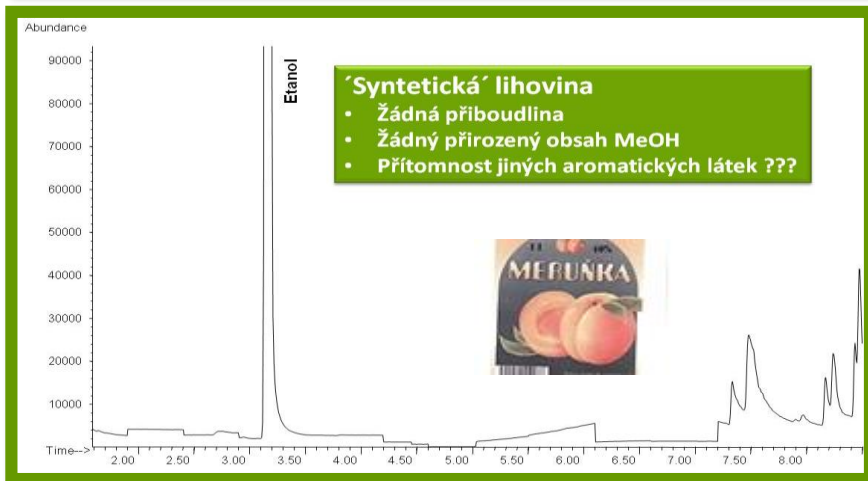
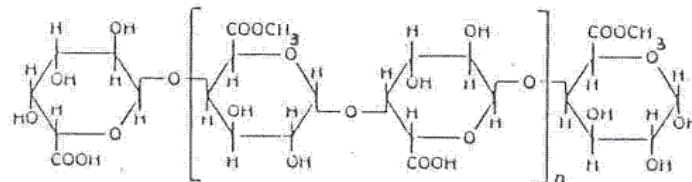


Kauza METHANOL

akreditovaná metoda VŠCHT: GC-MS



Přirozený zdroj methanolu: pektin



KLASIFIKACE GC DLE TYPU ANALÝZY

Typ GC analýzy	Doba separace	$w_{1/2}$ píku
Konvenční	>10 min	>1 s
Rychlá	1–10 min	200–1000 ms
Velmi rychlá	0,1–1 min	30–200 ms
Ultra-rychlá	< 0,1 min	5–30 ms

Zdroj: K. Maštovká, S.J. Lehotay (2003) J. Chromatogr. A 1000, 153–180

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE



$$t_R = \frac{L}{\bar{u}} (k+1)$$



- (A) Zkrácení délky kolony ($\downarrow L$)
- (B) Snížení retenčního faktoru ($\downarrow k$)
- (C) Zvýšení průtoku nosného plynu ($\uparrow u$)

Zdroj: K. Maštovká, S.J. Lehotay (2003) J. Chromatogr. A 1000, 153–180

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

- **Snížení retenčního faktoru ($\downarrow k$)**
 - **Zvýšení isothermní teploty**
 - **Rychle programování teploty**
 - **Změna stacionární fáze pro zlepšení selektivity**
 - **Tenčí film stacionární fáze**

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

- **Zvýšení průtoku nosného plynu ($\uparrow u$)**
 - **Vyšší než optimální průtok nosného plynu**
 - **Zvýšení optima průtoku nosného plynu**
 - Použití vodíku jako nosného plynu
 - Operace s vyústěním kolony do vakua (nízkotlaká GC)

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

- **Zkrácení délky kolony ($\downarrow L$)**
 - Nejjednodušší možnost pro snížení délky GC analýzy
 - Většina rychlých GC analýz prováděna na krátkých kolonách (≤ 10 m) v kombinaci s další možností
 - Zkrácení délky kolony vede ke snížení rozlišení ($R \sim \sqrt{L}$)
 - Možnost kompenzace R pomocí hmotnostní spektrometrie

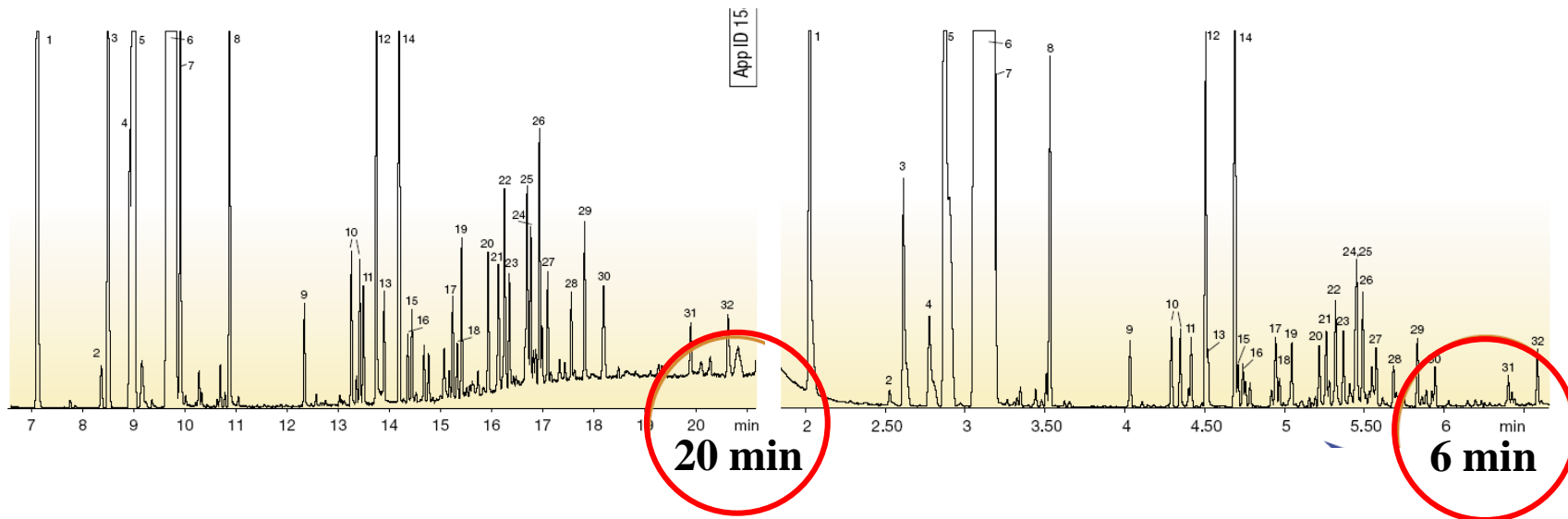
MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

- Zkrácení délky kolony

Analýza těkavých látek (stacionární fáze: PEG)

60 m × 0,25 mm × 0,25 μm

10 m × 0,10 mm × 0,10 μm



Zdroj: Phenomenex, www.phenomenex.com

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

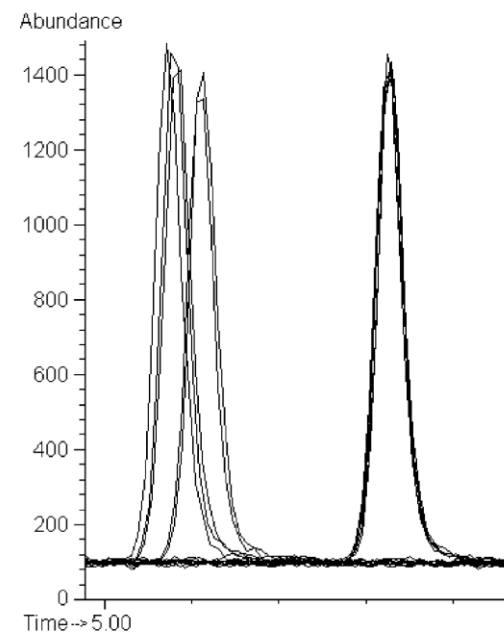
- **Použití kolony s malým vnitřním průměrem**
 - Microbore kolony; nižší kapacita
- **Použití kolony s tenkým filmem stacionární fáze**
 - Pokles kapacitního faktoru (retence)
→ rychlejší GC analýza

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

- Rychlé teplotní programování
 - Konvenční ohřev pomocí pece GC

Teplotní rozmezí	Max. teplotní rampa
50–70 °C	120 °C/min
70–115 °C	95 °C/min
115–175 °C	65 °C/min
175–300 °C	45 °C/min

Max. teplotní rampa je závislá na typu GC, napětí (110 V/60 Hz vs. 230 V/50 Hz), typu insertu

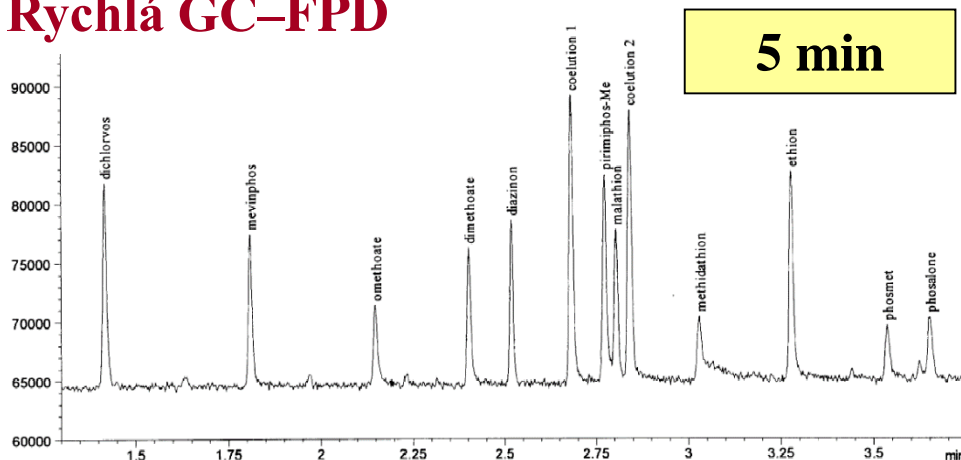


MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

- **Rychlé teplotní programování**
 - **Odporový ohřev GC kolony**
 - Elektrický proud pro zahřátí vodivého materiálu (kov) umístěného v těsné blízkosti
 - Rychlý ohřev a také rychlé zchlazení
 - Teploty ohřevu až **30 °C/s (= 1800 °C/min)**

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

Rychlá GC–FPD

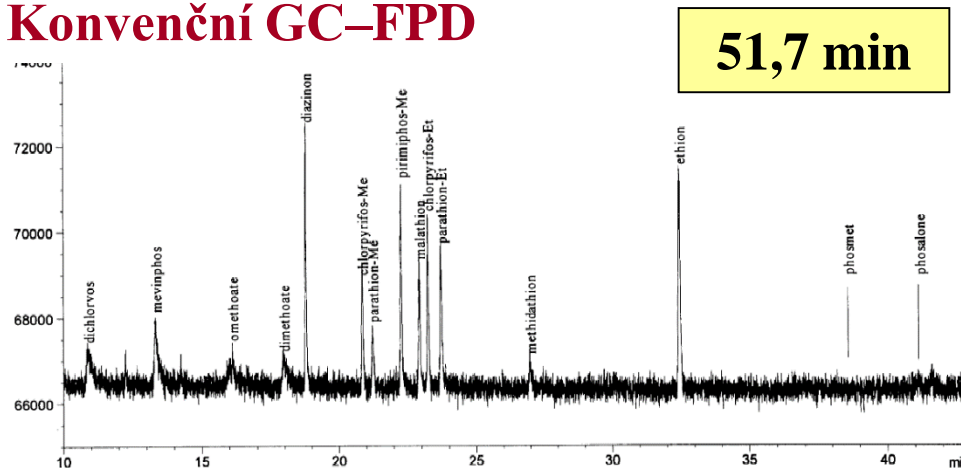


5 min

Teplotní program

60 °C (0,5 min),
 360 °C/min do 90 °C,
 63,5 °C/min do 180 °C,
 82,9 °C/min do 325 °C (1,25 min)

Konvenční GC–FPD



51,7 min

Teplotní program

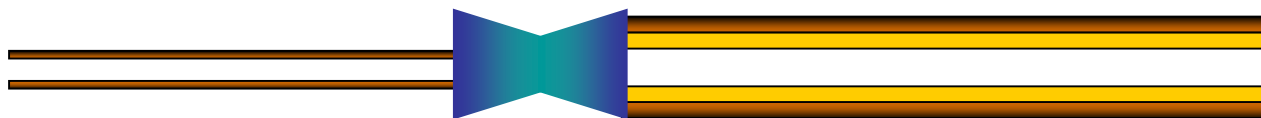
60 °C (2 min),
 10 °C/min do 180 °C,
 2 °C/min do 240 °C,
 15 °C/min do 325 °C (2 min)

Zdroj: K. Maštovská, J. Hajšlová, M. Godula, J. Křivánková, V. Kocourek, J. Chromatogr. A 907 (2001) 235–245

MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

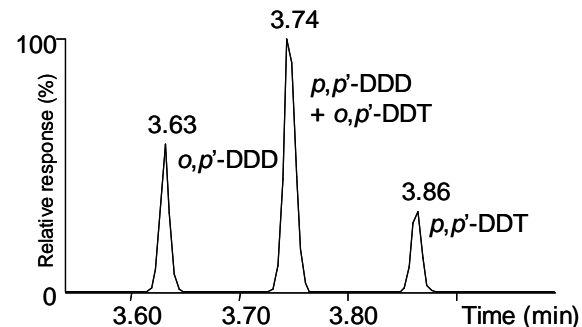
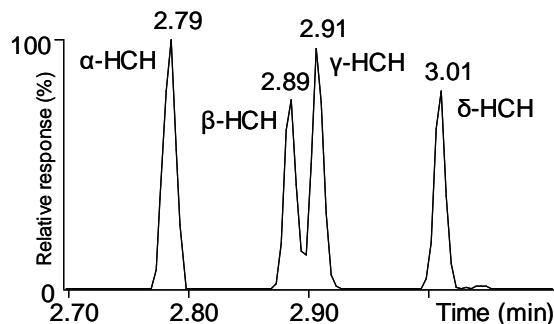
▪ Nízkotlaká GC

- **Nižší tlak v koloně vede k větší difuzivitě látek v plynné fázi → rychlejší GC separace**
- **Spojení megabore kolony s krátkou restriční kolonou ve vstupní části kolony pomocí konektoru**
 - *Restriční kapilára*: 2–5 m, vnitřní průměr 0,15–0,18 mm, bez stacionární fáze
 - *Megabore kolona*: 10 m délka, 0,53 mm vnitřní průměr, 0,25–1 μm tloušťka fáze

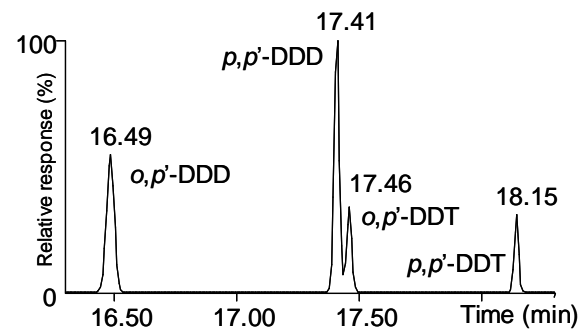
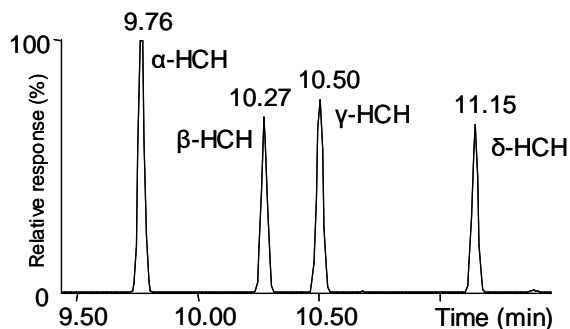


MOŽNOSTI ZRYCHLENÍ GC SEPARACE

- **LPGC–TOFMS** Kolona: 10 m × 0,53 mm × 0,50 μm; Gradient: 60 °C/min



- **GC–TOFMS** Kolona: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm; Gradient: 5–25 °C/min



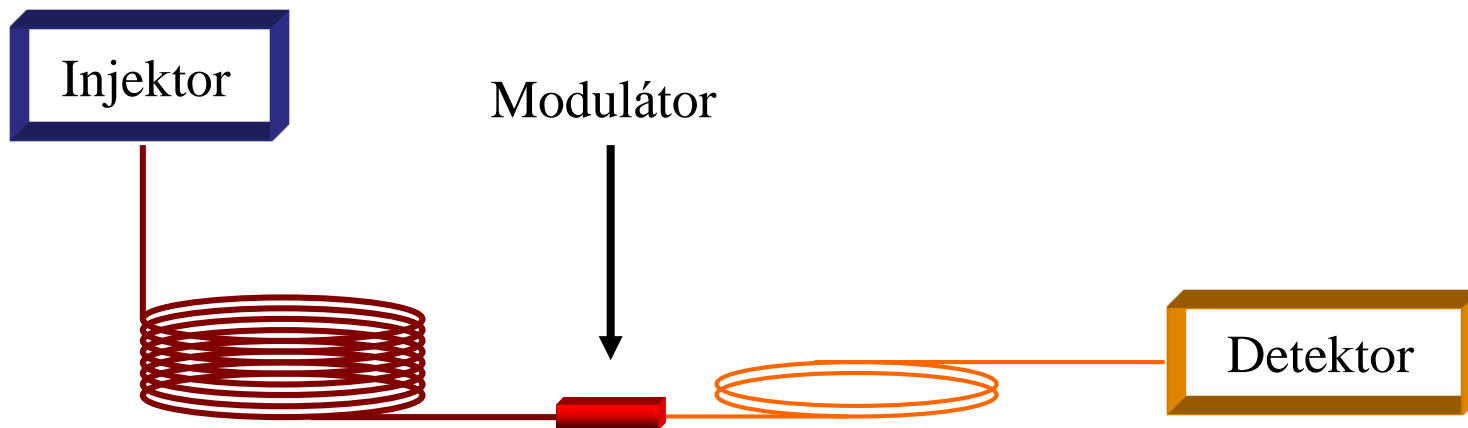
Zdroj: T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovska, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281–294

LIMITACE 1D-GC

- **Nedostatečná separace/citlivost při stanovení analytů u komplexních vzorků...**
 - Složky aroma (např. aroma kávy: cca 600 sloučenin)
 - Kontaminanty (PCB: 209 kongenerů, pesticidy)
- **Chybná / nemožná identifikace analytů**
- **Nadhodnocení / podhodnocení výsledků**

KOMPLETNÍ DVOUROZMĚRNÁ GC (GC×GC)

- Dvě kolony s odlišnou selektivitou spojeny modulátorem



Primární kolona

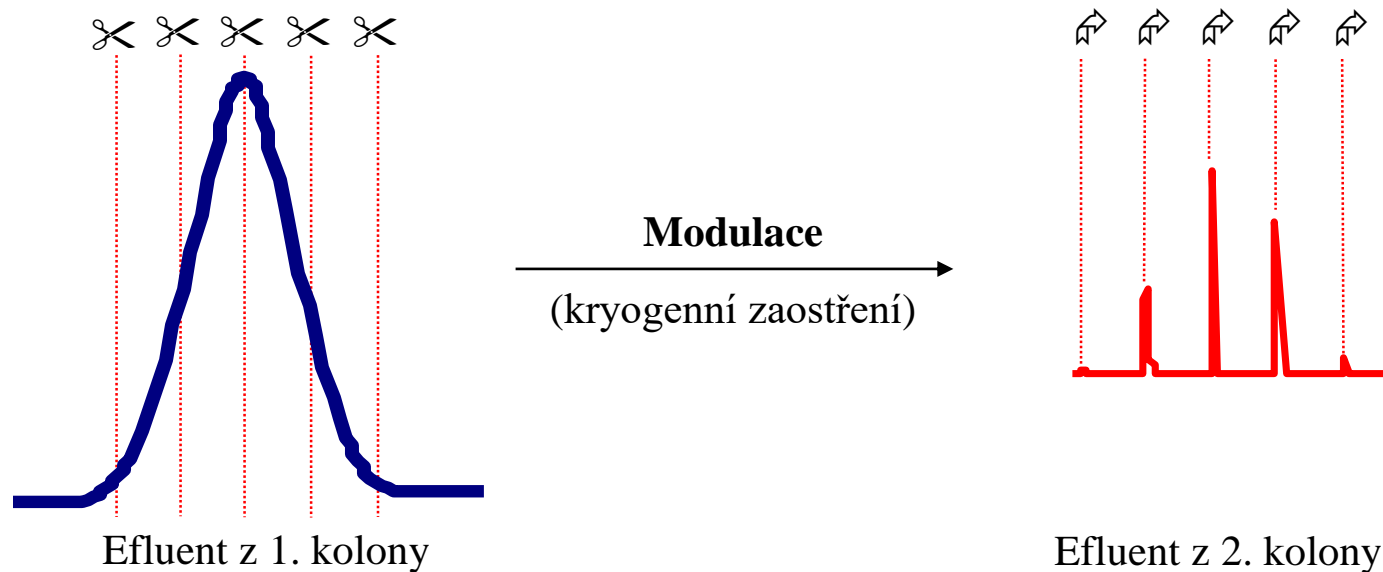
Obvykle narrow bore (nepolární) kolona
(30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)

Sekundární kolona

Obvykle microbore (polární) kolona
(1 m × 0,10 mm × 0,10 μm)

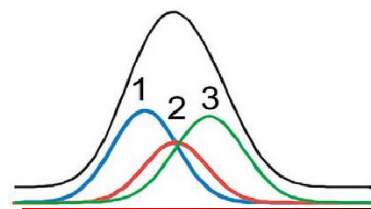
KOMPLETNÍ DVOUROZMĚRNÁ GC

- Modulátor přenáší v pravidelném intervalu část efluentu z 1. kolony
- Kryogenicky zaostřené části jsou přeneseny na 2. kolonu
- Rychlá separace na 2. koloně

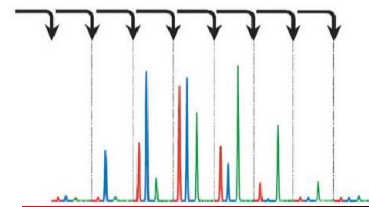


TVORBA GC×GC CHROMATOGRAMU

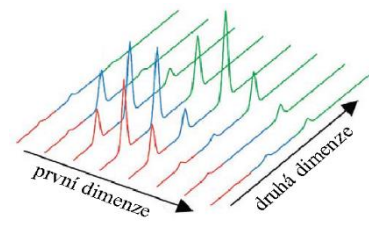
- 1D chromatogram
(výstup z první kolony)
- Základní 2D chromatogram
(výstup z druhé kolony)
- 2D chromatogramy skládané
vedle sebe
- Vrstevnicový půdorys 2D
chromatogramu



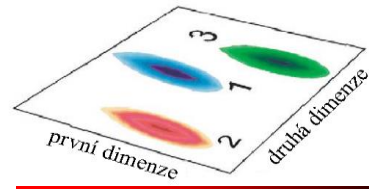
MODULACE



TRANSFORMACE



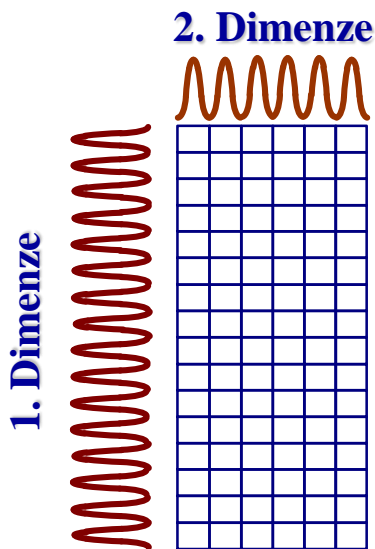
VIZUALIZACE



VÝHODY GC×GC vs. 1D-GC

- **Zvýšení kapacity píků (n_c)**
 - Maximální počet chromatografických píků, které je možné uspořádat za sebou do separačního prostoru (chromatogramu) → zvýšení separační účinnosti

$$n_c(\text{celk}) = n_c(\text{kolona 1}) \times n_c(\text{kolona 2})$$



Konvenční kapilární kolona

→ $n = 1\ 000$

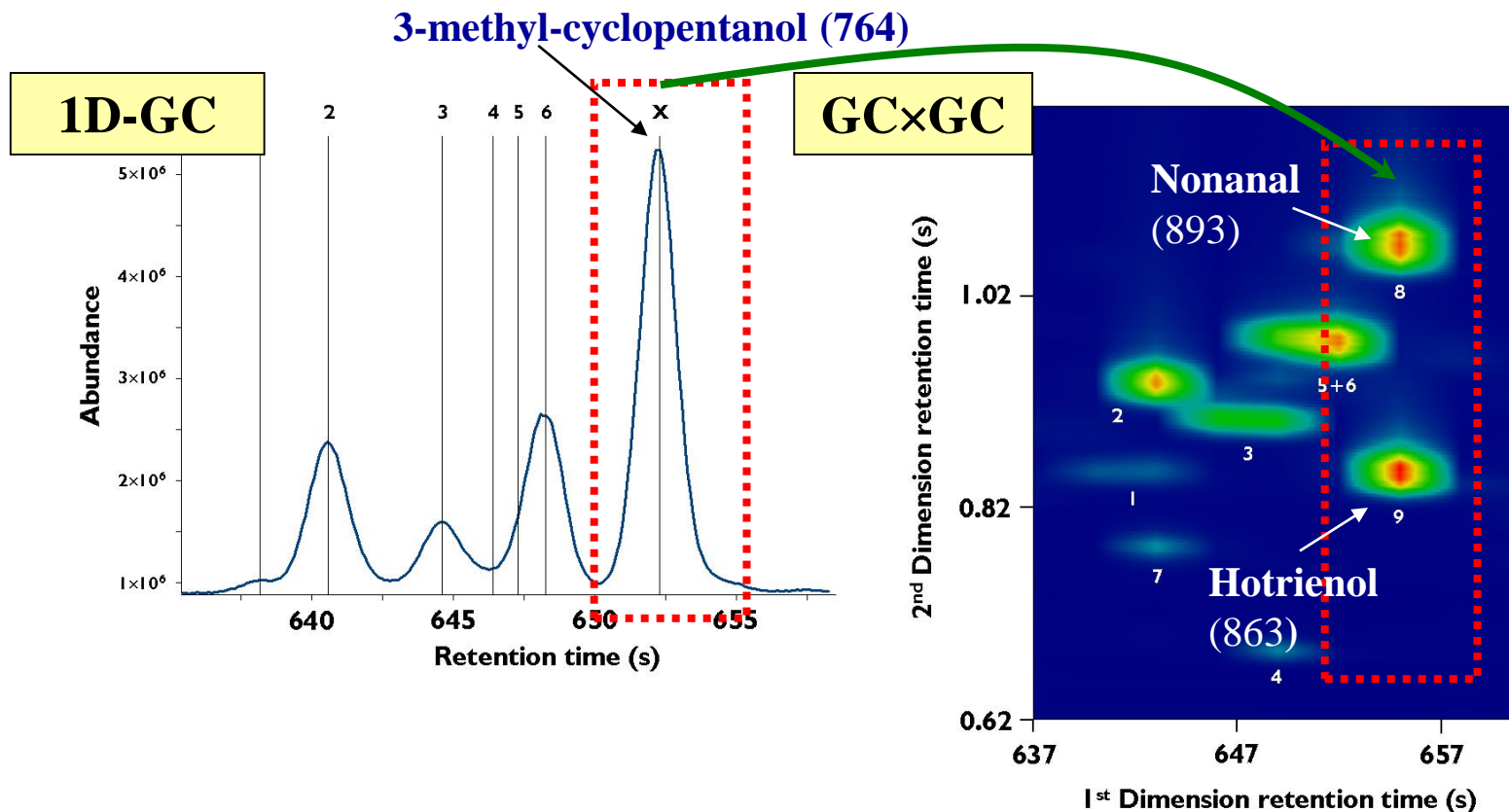
GC×GC

(kolona druhé dimenze: $n = 25$)

→ $n = 1\ 000 \times 25 = 25\ 000$

VÝHODY GC×GC vs. 1D-GC

- Zvýšení kapacity píků

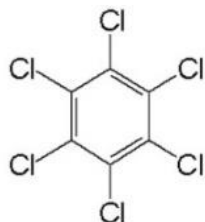
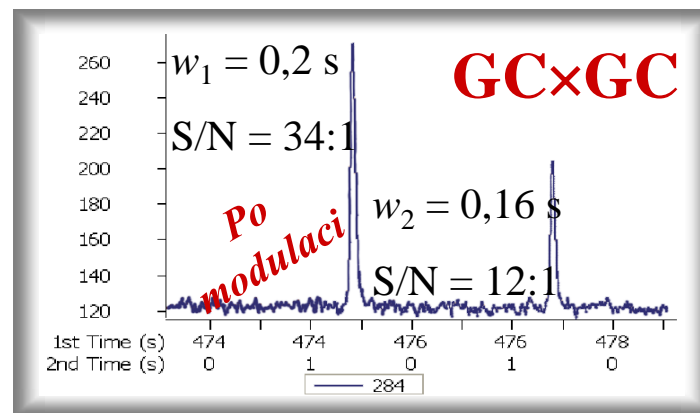
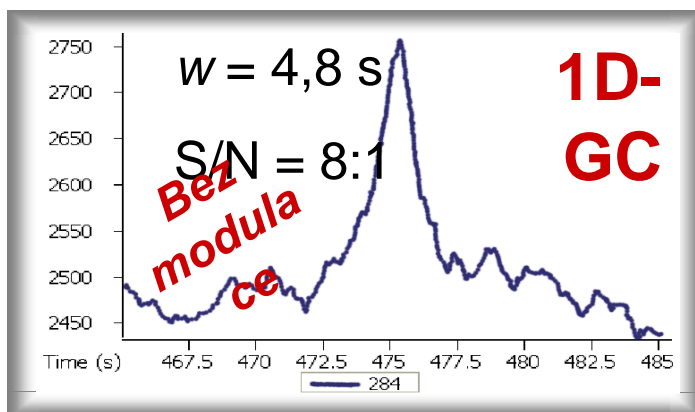


Těkavé látky medu izolované pomocí HS-SPME

VÝHODY GC×GC vs. 1D-GC

▪ Zlepšení detekce

- Užší píky generované GC×GC (zaostření píku na vstupu kolony druhé dimenze)
- Zvýšení poměru signálu k šumu (S/N) (lepší separace analytů od ostatních částí vzorku)



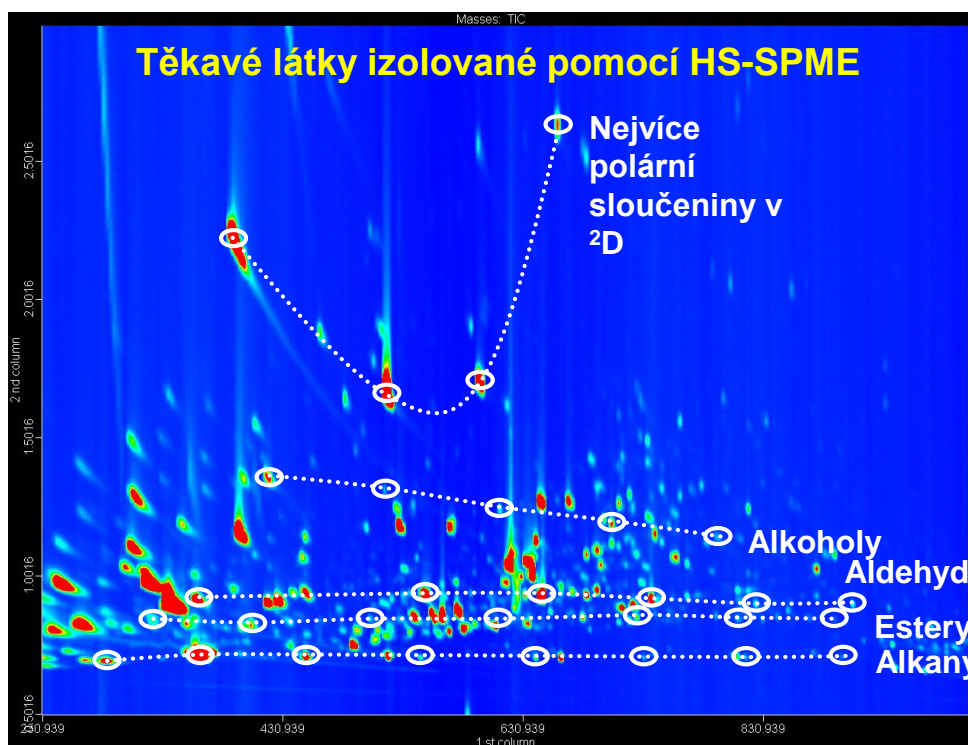
Hexachlorbenzen

2 pg v nástřiku

VÝHODY GC×GC vs. 1D-GC

- Tvorba strukturovaných chromatogramů
 - Doplnující se separační mechanismy na obou kolonách

2D- Supelcowax 10
(polyethylenglycol)



1D - DB-5ms [(5 %-fenyl)methylpolysiloxan]

DETEKTORY VE SPOJENÍ S GC

Konvenční detektory



Plamenově ionizační detektor (FID)

Tepelně vodivostní detektor (TCD)

Detektor elektronového záchytu (ECD)

Dusíko-fosforový detektor (NPD)

Halogen-specifický detektor (XSD)

Fotoionizační detektor (PID)

Plamenově-fotometrický detektor (FPD)

Pulzní plamenově-fotometrický detektor (PFPD)

Atomový emisní detektor (AED)

Elektrolytický vodivostní detektor (ELCD)

Hmotnostně selektivní detektory



Kvadrupól (Q)

Iontová past (IT)

S měřením času průletu (TOF)

Sektor (S)

DETEKTORY VE SPOJENÍ S GC

Detektor	Selektivita	Linearita
Plamenově-ionizační (FID)	Ne	10^7
Tepelně vodivostní detektor (TCD)	Ne	10^4 – 10^6
Detektor elektronového záchytu (ECD)	Halogeny	10^4
Dusíko-fosforový detektor (NPD)	N, P	10^4 – 10^5
Halogen-specifický detektor (XSD)	Halogeny	10^4
Fotoionizační detektor (PID)	Aromatické sl.	10^6
Plamenově-fotometrický detektor (FPD)	S, P	S*: 10^3 ; P: 10^5
Pulzní plamenově-fotometrický detektor	Až 28 prvků	S*, P: 10^3
Atomový emisní detektor (AED)	Jakýkoliv prvek	10^3 – 10^4
Elektrolytický vodivostní detektor (ELCD)	S, N, halogeny	10^6
Hmotnostně selektivní detektor (MSD)	Ano	10^3 – 10^7

DETEKTORY VE SPOJENÍ S GC

- **Konvenční detektory vs. hmotnostně selektivní detektory**
 - **Výhodou MS** ve srovnání s konvenčními detektory je, kromě **selektivní detekce** analytu eluujícího se za daného retenčního času, možnost získání **strukturních informací**, což umožňuje **konfirmasi identity** cílového analytu nebo **identifikaci** „neznámých“ sloučenin

Kapalinová chromatografie

- **Separace látek v koloně, která obsahuje:**
 - Stacionární (nepohyblivou) fázi (sorbent)
 - Mobilní (pohyblivou) fázi (kapalina, eluent)
- **Vhodná pro:**
 - Malé ale i velké (makro)molekuly, iontové sloučeniny
 - Termostabilní i termolabilní sloučeniny
 - Limitace: rozpustnost v mobilní fázi

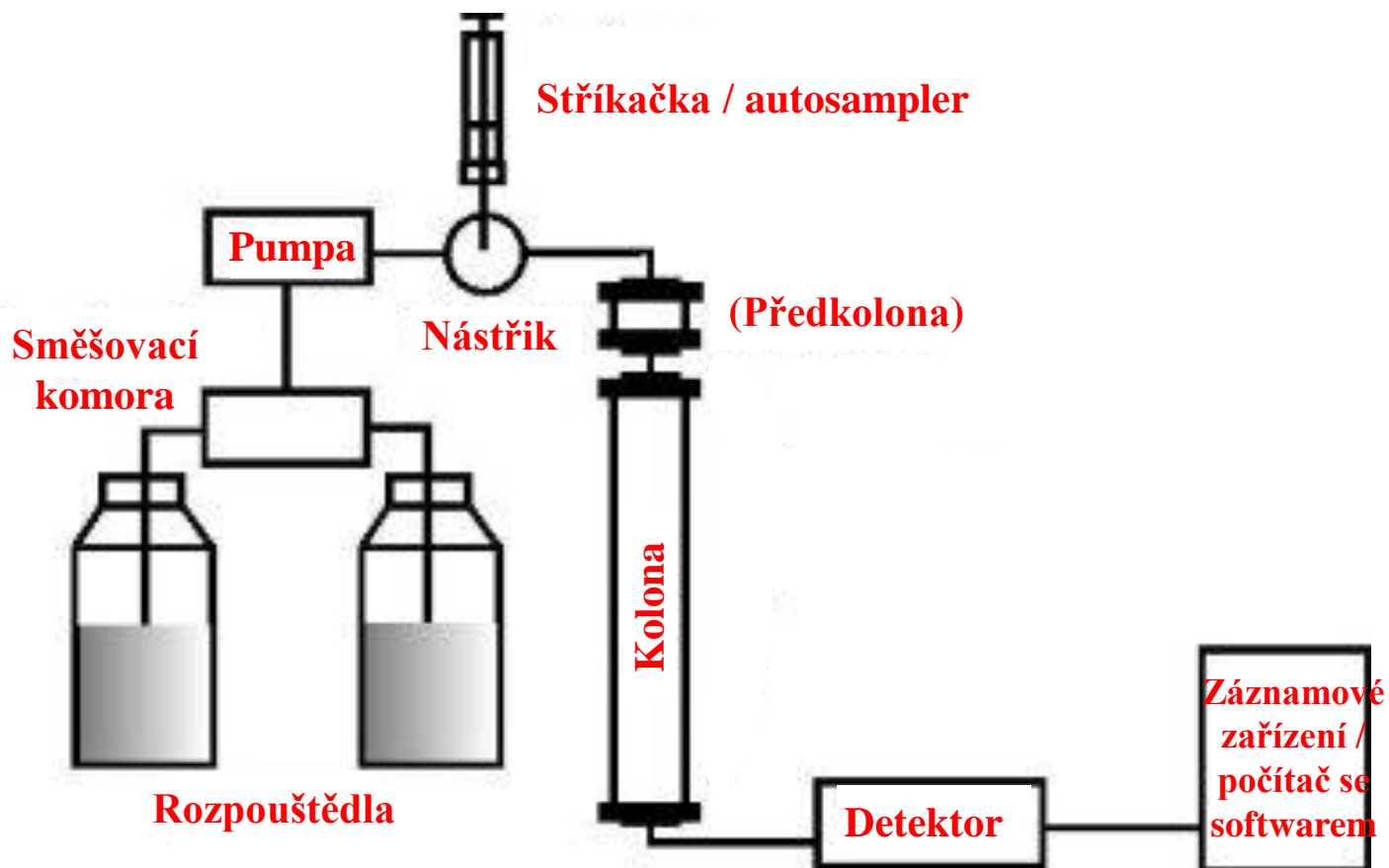


KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

- **Separace látek v koloně, která obsahuje:**
 - Stacionární (nepohyblivou) fází (sorbent)
 - Mobilní (pohyblivou) fází (kapalina, eluent)
- **Vhodná pro:**
 - Malé ale i velké molekuly, iontové sloučeniny
 - Termostabilní i termolabilní sloučeniny
 - Limitace: rozpustnost v mobilní fází



KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF



STANOVENÍ POMOCÍ LC



Nástrjik

- Šesticestný ventil



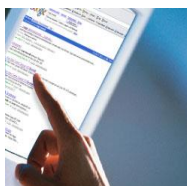
Separace

- HPLC, rychlá LC (UHPLC)



Detekce

- Konvenční a hmotnostně-spektrometrické detektory



Kvantifikace

- Matriční efekty

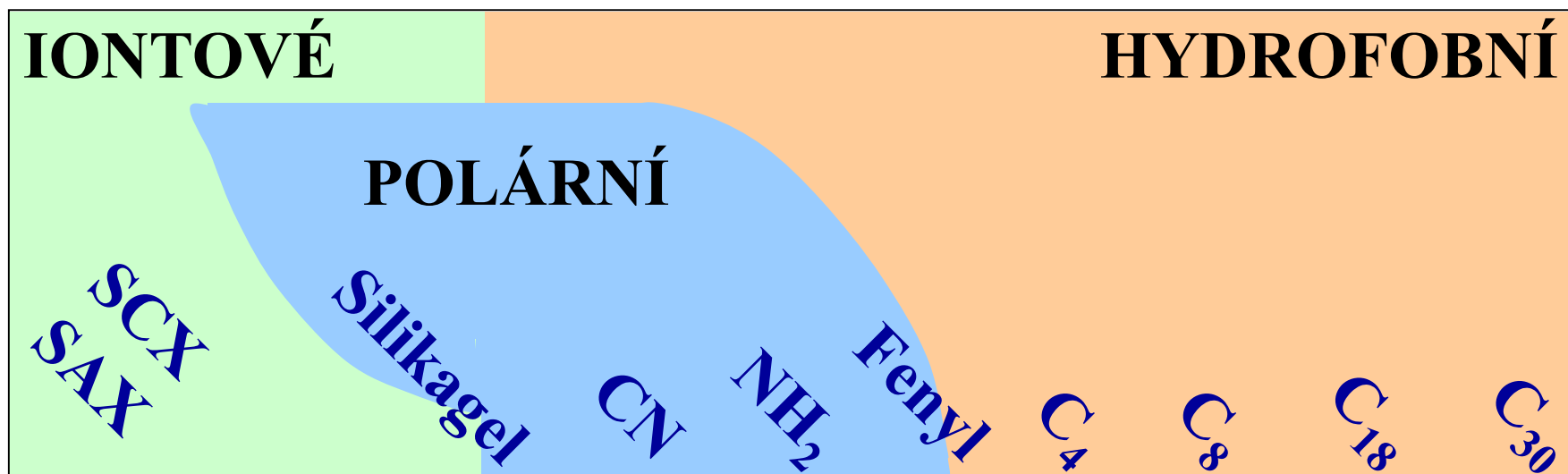
VÝBĚR CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU

- **Výběr chromatografického systému závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu**
 - Rozpustnost analytu
 - Polarita analytu
 - Molekulová hmotnost analytu
- **Pouze přiměřené interakce se stacionární fází jsou žádoucí (analyty musí projít LC kolonou)**

VÝBĚR CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU

	Chromatografie s normální fází	Chromatografie s reverzní fází	HILIC chromatografie	Iontově výměnná chromatografie
Stacionární fáze	Polární (silikagel, alumina, florisil, MgO)	Nepolární modifikovaný silikagel (C ₁₈ , C ₈ , C ₃₀ , fenyl, CN)	Nepolární s polárními interakcemi (modifikovaný silikagel – <i>kvalt.</i> N ⁺ , SO ³⁻)	Iontové (s vázanými iontovými skupinami – <i>kvalt.</i> N ⁺ , SO ³⁻)
Mobilní fáze	Nepolární (hexan, dichlormethan, tetrahydrofuran, ethyl-acetát)	Polární (voda, methanol, acetonitril, tetrahydrofuran)	Polární (voda, methanol, acetonitril)	Voda (až 50 % organika) s pufrům (NaHCO ₃ , NaOH...)
Analyty	Nepolární a ve vodě nerozpustné	Mírně polární a polární	Iontové a neiontové polární, rozpustné ve vodě	Iontové, organické a anorganické báze a kyseliny

STACIONÁRNÍ FÁZE V LC



SCX...strong kation-exchange
SAX...strong anion-exchange

CN...kyanopropylová fáze
NH₂...aminová fáze
Fenyl...fenolová fáze

C₄...butylová fáze
C₈...oktylová fáze
C₁₈...oktadecylová fáze
C₃₀...triacontylová fáze

ISOKRATICKÁ vs. GRADIENTOVÁ ELUCE

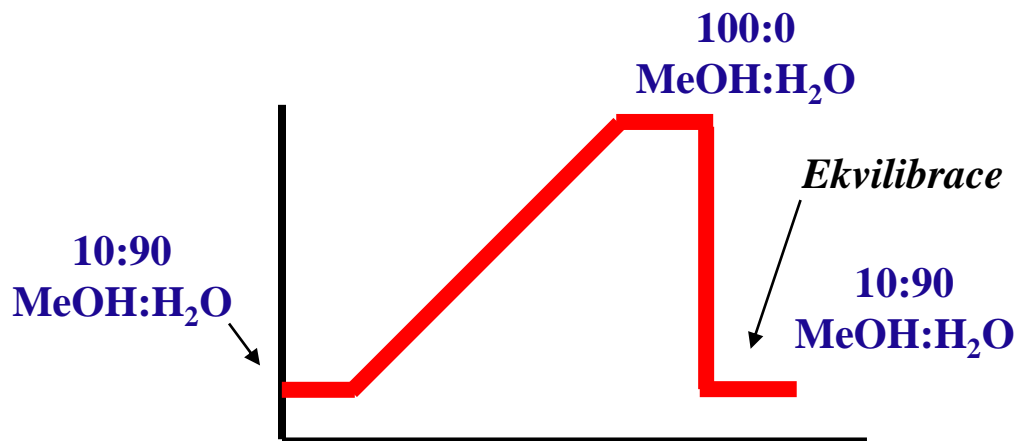
■ Isokratická eluce

- Konstantní složení mobilní fáze během separace

■ Gradientová eluce

- Složení mobilní fáze se mění s časem (→ v průběhu separace dochází ke zvyšování eluční síly MF)

Rozpouštědlo A: H₂O
Rozpouštědlo B: MeOH

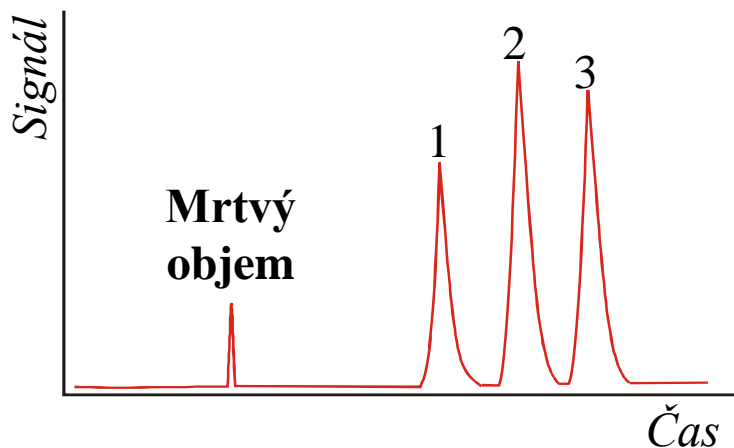


CHROM. S NORMÁLNÍMI FÁZEMI

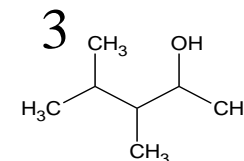
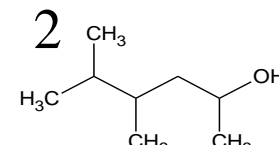
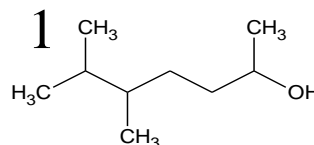
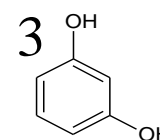
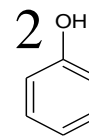
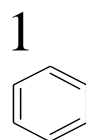
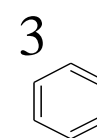
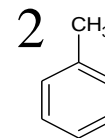
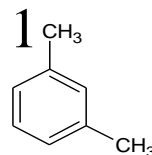
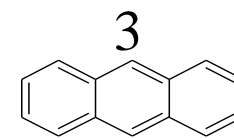
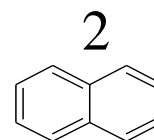
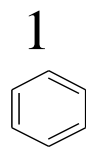
- **Stacionární fáze**
 - Polární (silikagel, alumina, florisil, MgO)
- **Mobilní fáze**
 - Nepolární (hexan, dichlormethan, tetrahydrofuran, ethyl-acetát)
- **Analyty**
 - Nepolární a ve vodě nerozpustné

CHROM. S NORMÁLNÍMI FÁZEMI

Polární analyty se eluují později než nepolární.



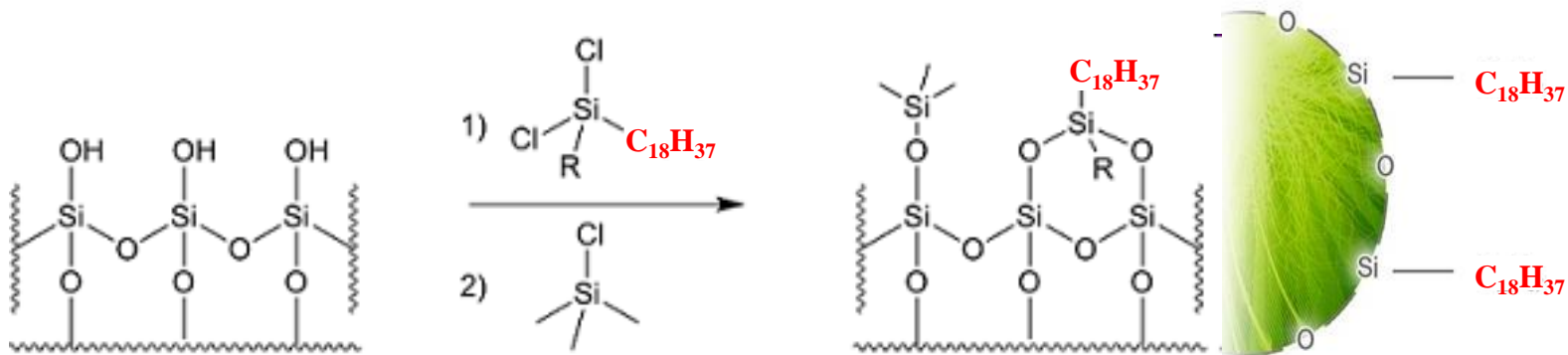
Lipofilita



Polarita

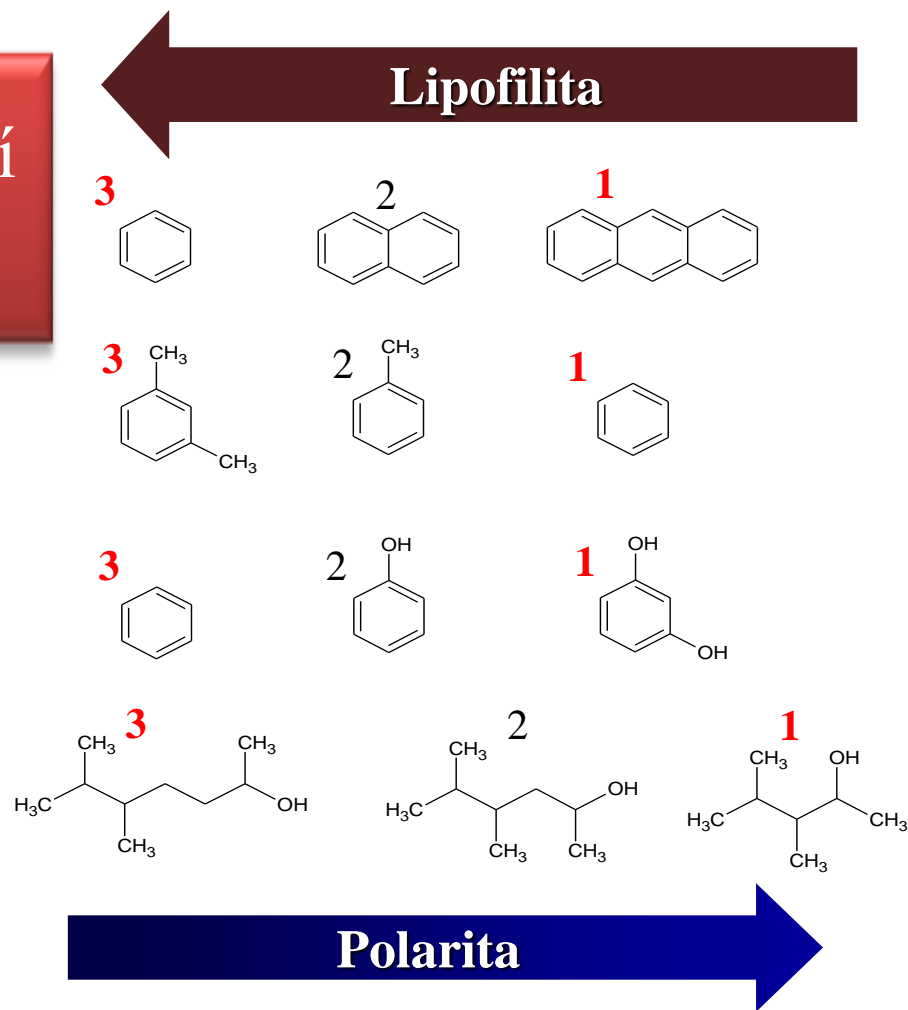
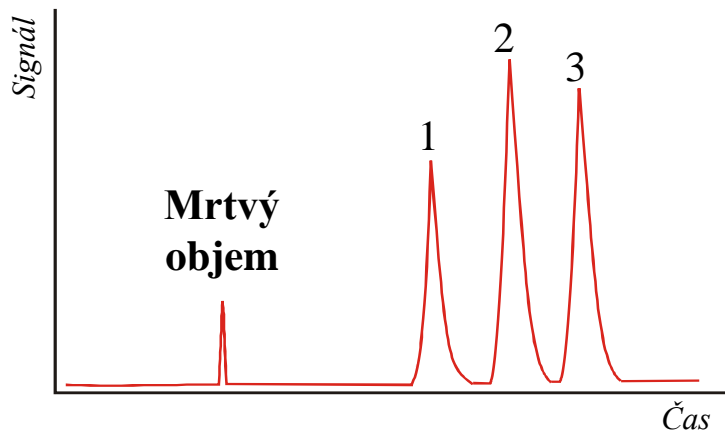
CHROM. S REVEZNÍMI FÁZEMI

- **Stacionární fáze**
 - Nepolární modifikovaný silikagel (C_{18} , C_8 , fenyl, CN)
- **Mobilní fáze**
 - Polární (voda, MeOH, MeCN, tetrahydrofuran)
- **Analyty**
 - Nepolární a polární



CHROM. S REVEZNÍMI FÁZEMI

Polární sloučeniny se eluují **dříve** než nepolární.



CHROM. S REVEZNÍMI FÁZEMI

- **Výběr mobilní fáze v RP-HPLC**
 - Mobilní fáze se obvykle skládá se směsi vody a organického rozpouštědla mísitelného s vodou

H₂O

Methanol

Acetonitril

Ethanol

Isopropanol

Dimethylformamid

Propan-1-ol

Dioxan

Tetrahydrofuran



Pokles polarity

Zvýšení eluční síly

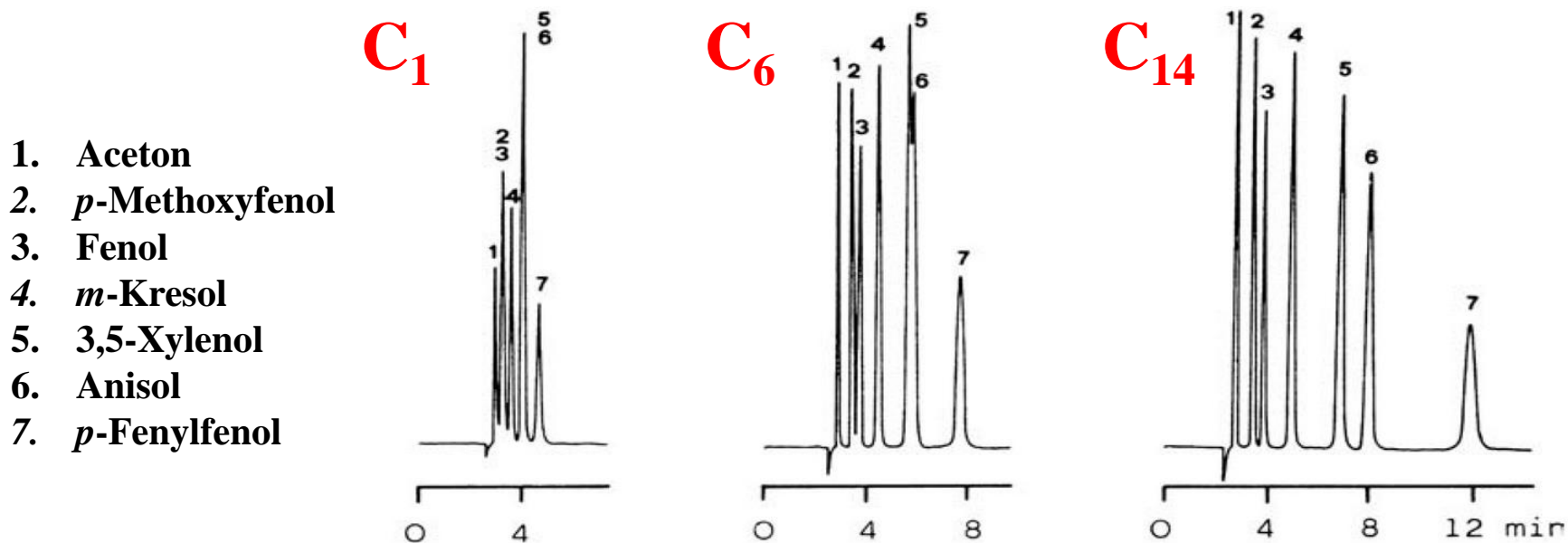
CHROM. S REVEZNÍMI FÁZEMI

- **Stacionární fáze**
 - **C₁₈ modifikovaný silikagel** představuje nejběžnější stacionární fázi; poskytuje **vysokou retenci**
 - Ostatní fáze (**C₈, fenyl, CN, diol, NH₂**) poskytují **nižší retenci** a alternativní selektivitu

CHROM. S REVEZNÍMI FÁZEMI

▪ Stacionární fáze

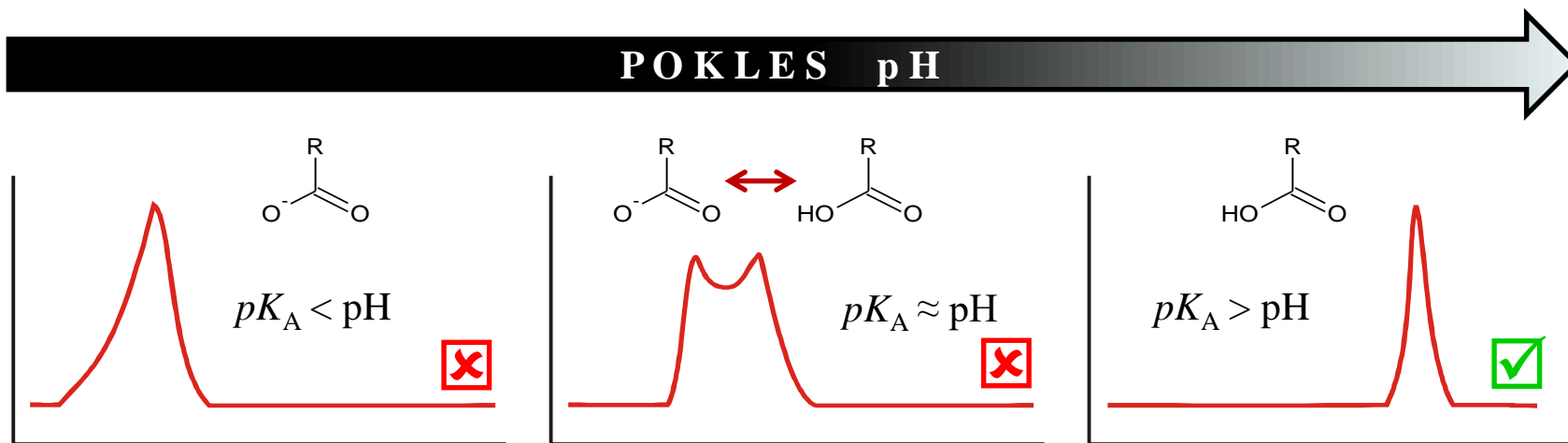
- Vliv délky řetězce na retenci analytů



Delší řetězec v SF vede k větší retenci analytů.

CHROM. S REVEZNÍMI FÁZEMI

▪ Separace iontových sloučenin – KYSELINY



- Disociovaný (polární) analyt poskytuje špatnou retenci a tvar píku

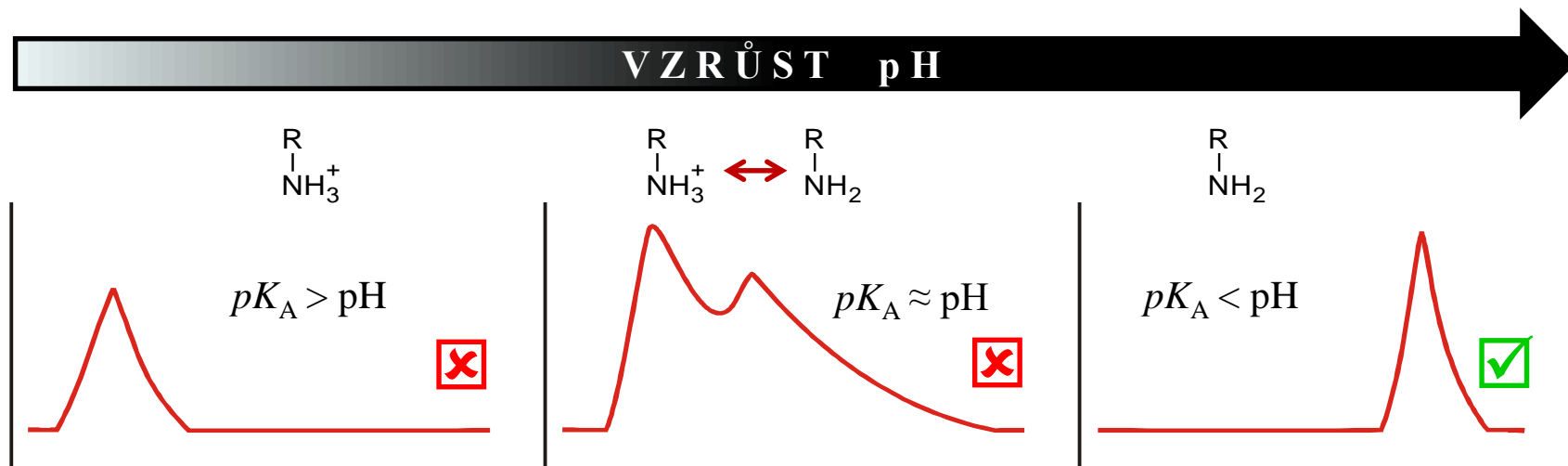
- Při hodnotě pH, která je podobná pK_A analytu, je přítomen analyt v disociované i nedisociované formě. Pík je rozštěpený a široký.

- Nedisociovaný analyt poskytuje lepší retenci a dobrý tvar píku

NEJHORŠÍ SCÉNÁŘ!

CHROM. S REVEZNÍMI FÁZEMI

▪ Separace iontových sloučenin – BÁZE



- Vysoce polární (disociovaný) analyt poskytuje špatnou retenci a tvar píku. ❌
- Při hodnotě pH podobné pK_A analytu, je přítomen analyt v disociované i nedisociované formě; rovněž hrají roli iontové interakce, které způsobují chvostování píku. Pík je rozštěpený a široký. ❌
- Nedisociovaný analyt poskytuje lepší retenci; slabé interakce přesto hrají roli (pík mírně chvostuje). ✅

NEJHORŠÍ SCÉNÁŘ!

HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRRAFIE

- **HILIC – Hydrophilic Interaction Chromatography**
- **HILIC představuje variantu chromatografie s reverzní fází, kdy stacionární fáze je modifikována hydrofilními interakčními skupinami**

HILIC

- **Stacionární fáze**

- Polární modifikace: silikagel s interakčními skupinami –
 N^+ , SO_3^- , $-\text{OH}$

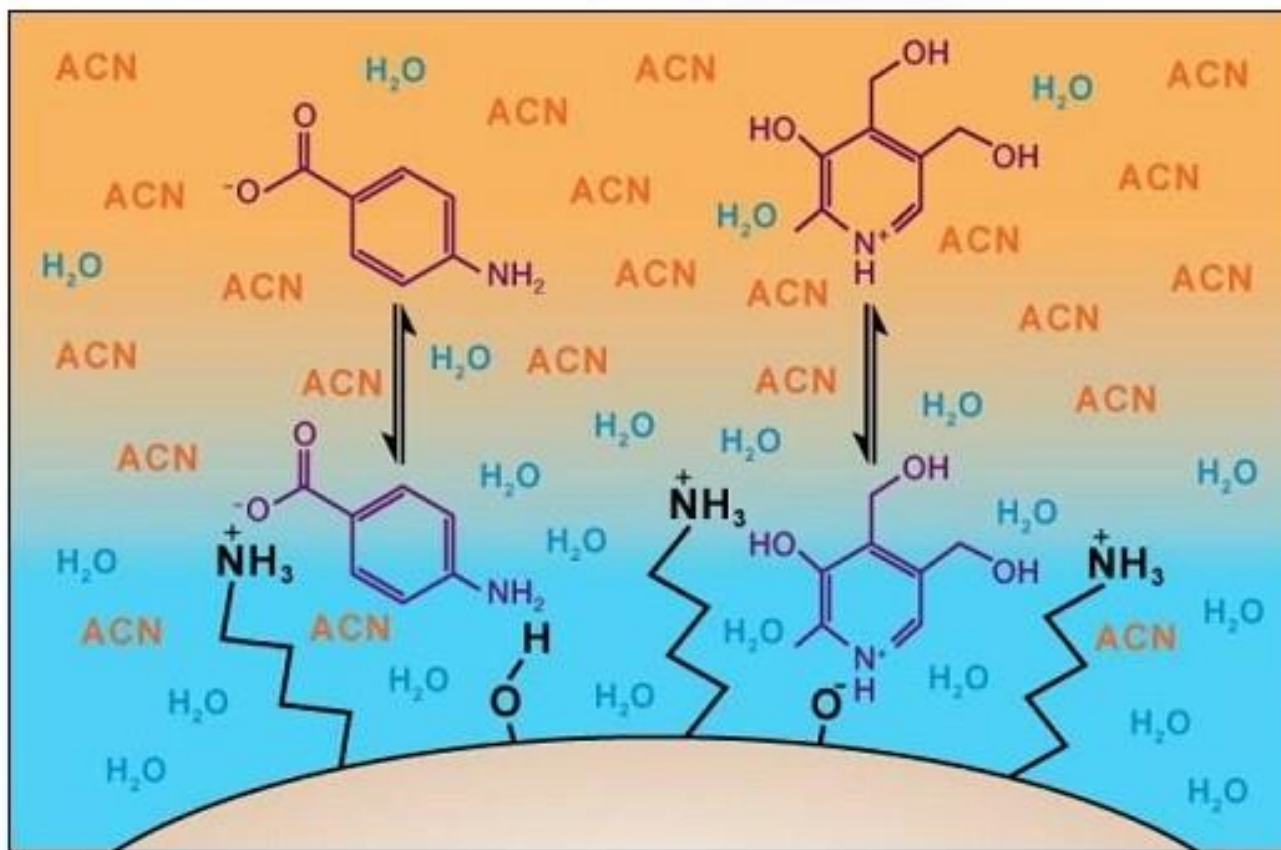
- **Mobilní fáze**

- Vysoký podíl organické složky (>80 %) s malým množstvím vody
 - Voda (nebo polární rozpouštědlo) představuje silné eluční rozpouštědlo

HILIC

▪ Princip retence

- Polární analyt se rozděluje do a z adsorbované vodné vrstvy a zároveň vykazuje polární interakce



HILIC

▪ Výhody

- **Retence velmi polárních analytů**, které nejsou zadržovány reverzní fází
- Komplementární selektivita k reverzní fází
- **Lepší citlivost ve spojení s hmotnostní spektrometrií**
 - Vysoký podíl organické složky MF vede k lepším odezvám v MS
- **Kratší příprava vzorku**
 - odstranění odpařovacího kroku a převod do rozpouštědla s vysokým obsahem vody

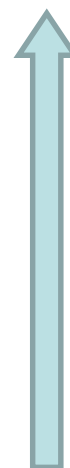
HILIC

▪ Mobilní fáze

- Mravenčan amonný (pH 3); octan amonný (pH 5); 0,2% mravenčí kyselina (pH 2,5); 0,2% kyselina fosforečná (pH 1,8)
- Zvýšení retence analytu je dosaženo výměnou vody za jiné polární rozpouštědlo (methanol, isopropanol)

Eluční síla rozpouštědla

Nejsilnější

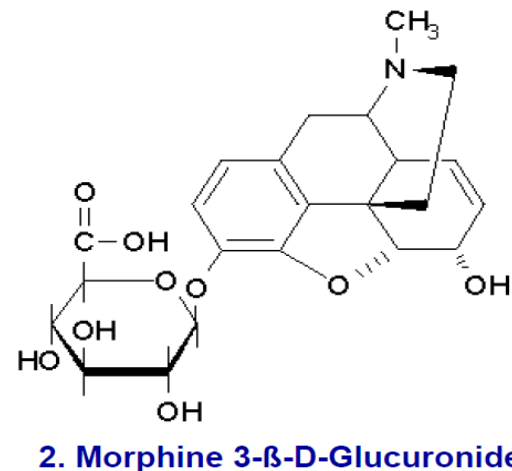
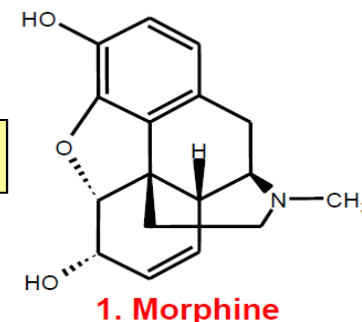
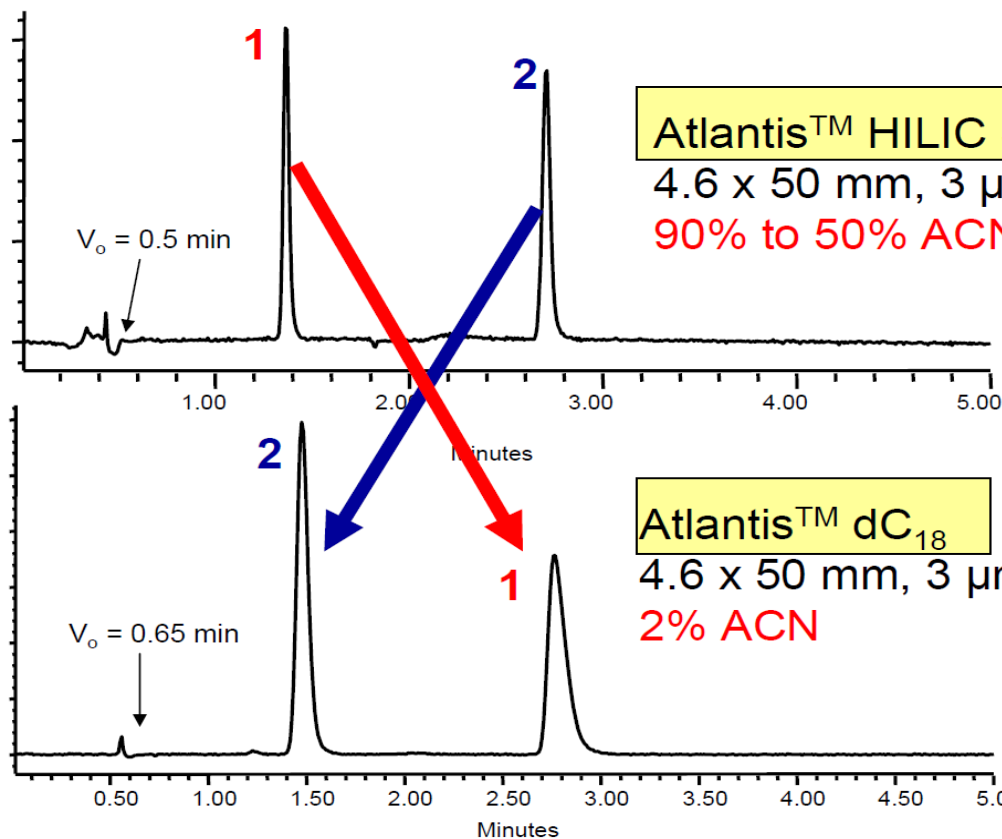


Voda
Methanol
Ethanol
Isopropanol
Acetonitril
Aceton
Tetrahydrofuran

Nejslabší

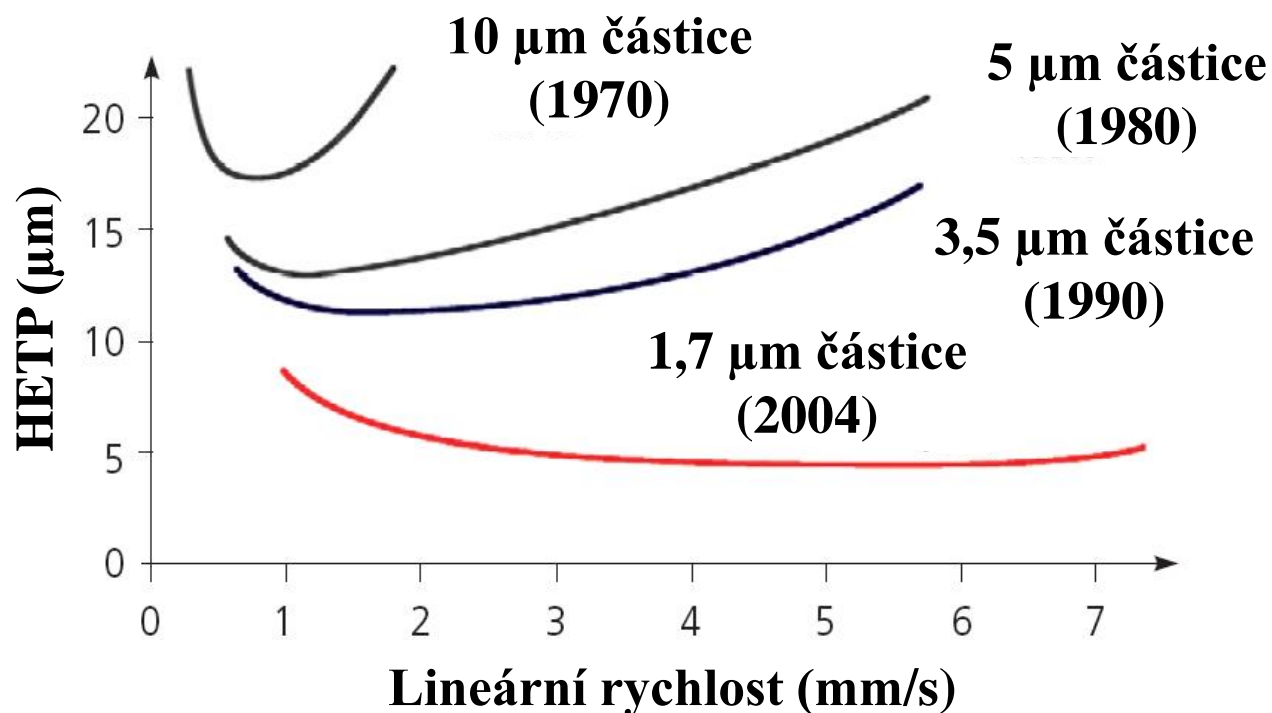
HILIC

▪ Komplementární selektivita k RP-HPLC



KOLONY A STACIONÁRNÍ FÁZE

▪ Velikost částic a separační účinnost



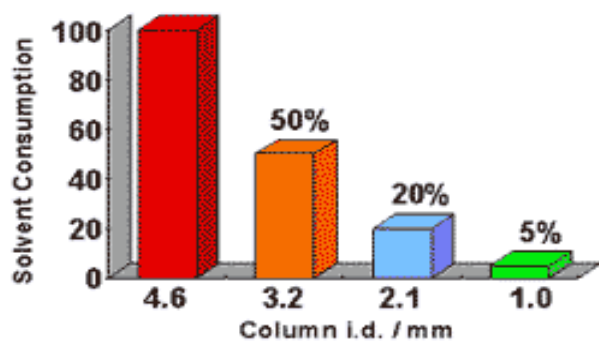
- Průtok MF značně ovlivňuje účinnost kolony a dobu analýzy.
- Kolony s malými částicemi poskytují optimální separaci ve velkém rozmezí průtoků, což dovoluje používat vysoké průtoky MF.

Zdroj: M.P. Balogh, LC GC Europe 18(4) 205-212

KOLONY A STACIONÁRNÍ FÁZE

Spotřeba rozpouštědla

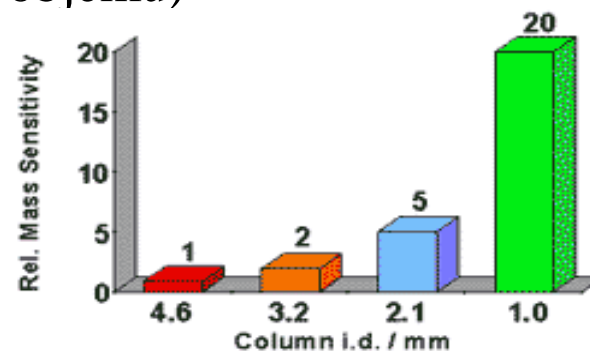
- Použití úzkých kolon vede k podstatné redukci spotřeby MF



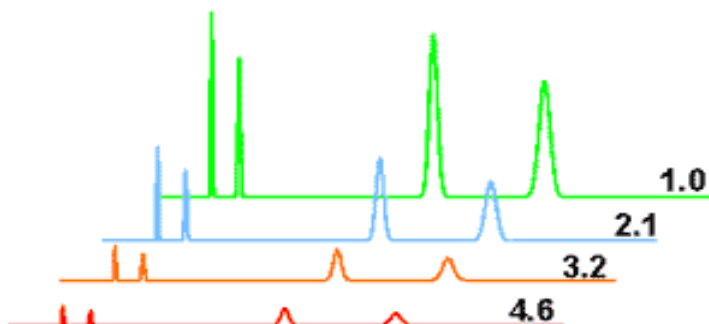
Vnitřní průměr kolony, I.D. (mm)

Citlivost

- Úzké kolony poskytují lepší citlivost (při stejném nastříknutém objemu)



Vnitřní průměr kolony, I.D. (mm)



Nástřik 1 μ l směsi uhlovodíků na kolony s odlišnými průměry

RYCHLÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

- **HPLC (High-performance (High-pressure) LC)**

- Částice: 3–10 μm
- Tlak: do 400 bar (40 MPa)

- **RRLC (Rapid Resolution LC) → Agilent**

- Částice: 1,8 μm (porézní směsné)
- Tlak: do 600 bar (60 MPa)

- **UPLC (Ultra Performance LC) → Waters**

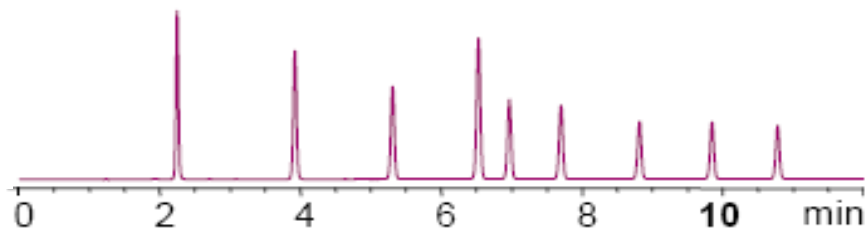
- Částice: 1,7 μm (porézní uniformní)
- Tlak: do 1000 bar (100 MPa)



UHPLC
Ultra high
performance
LC

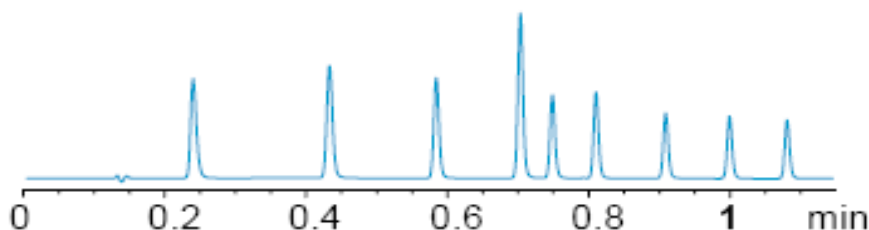
HPLC vs. RRLC

4,6 mm × 150 mm, 5 μm
1,20 mL/min, 40 °C
11 min



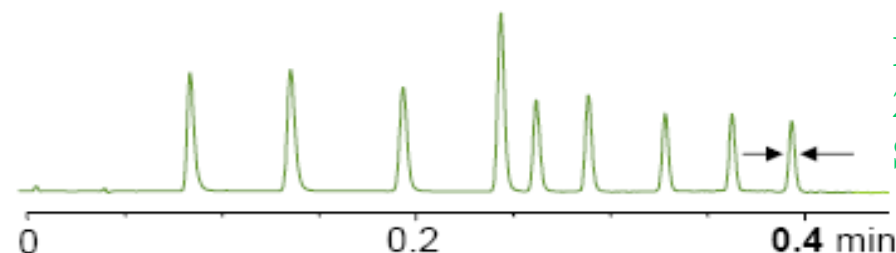
HPLC, 40 °C
Šířka píku: 3,4 s

2,1 mm × 50 mm, 1,8 μm
1,00 mL/min, 40 °C
1,1 min



RRLC, 40 °C
10× rychleji
Šířka píku: 0,5 s

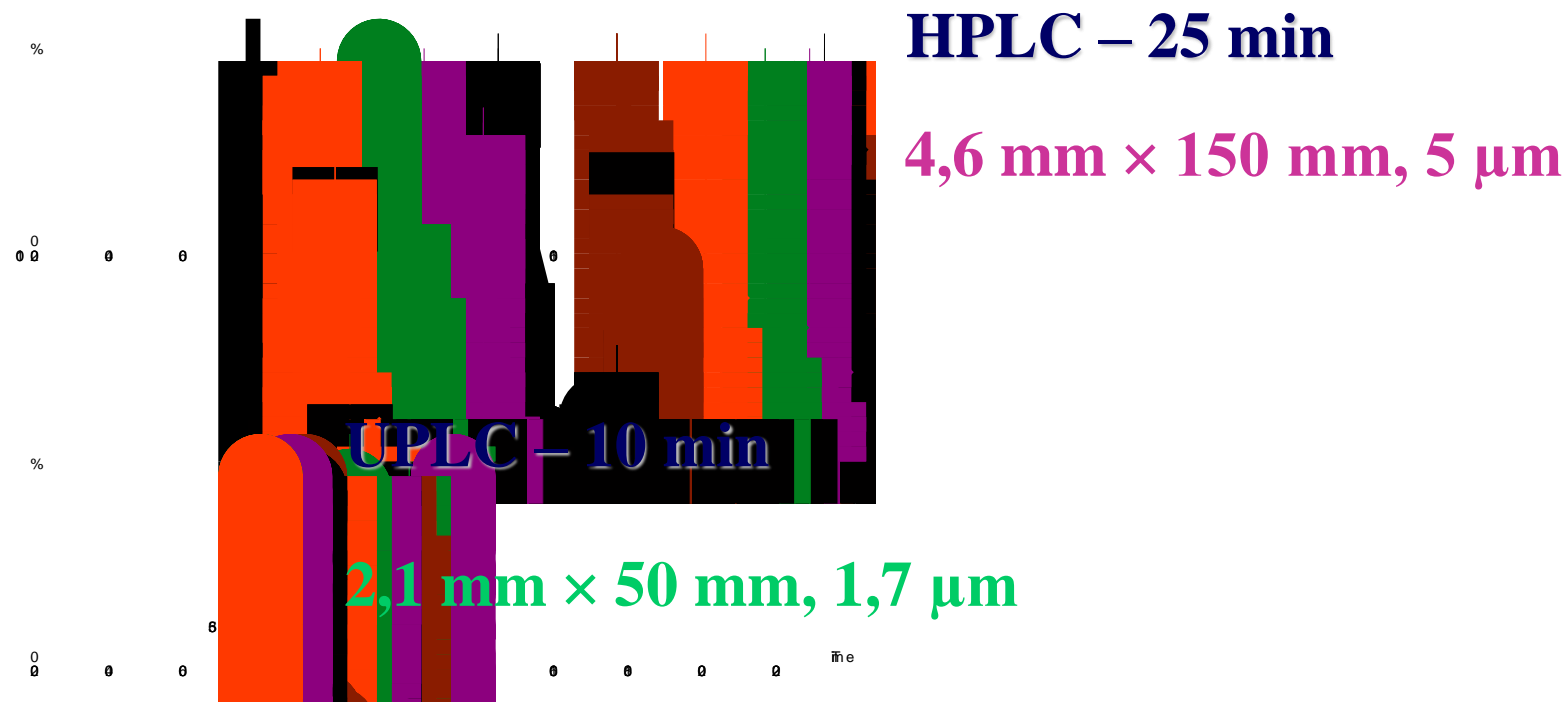
2,1 mm × 50 mm, 1,8 μm
2,40 mL/min, 95 °C
0,4 min



RRLC, 95 °C
27× rychleji
Šířka píku: 197 ms

Zdroj: Agilent, www.agilent.com

LC SEPARACE (pesticidy): HPLC → UHPLC



Průtok MF 0,3 mL/min
(oba systémy)

DETEKTORY V LC

Konvenční detektory



Absorpční fotometrický detektor
Fluorimetrický (fluorescenční) detektor
Refraktometrický detektor
Amperometrický detektor
Vodivostní detektor
Detektor s diodovým polem (DAD)

Hmotnostně selektivní detektory



Iontová past (IT)
Kvadrupól (Q)
TOF
Hybridy: QqQ, TOF/TOF, Q/TOF