

# PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE (GC)

*Dělení látek mezi stacionární a mobilní fází*

*– na základě rozdílů v těkavosti a struktuře*

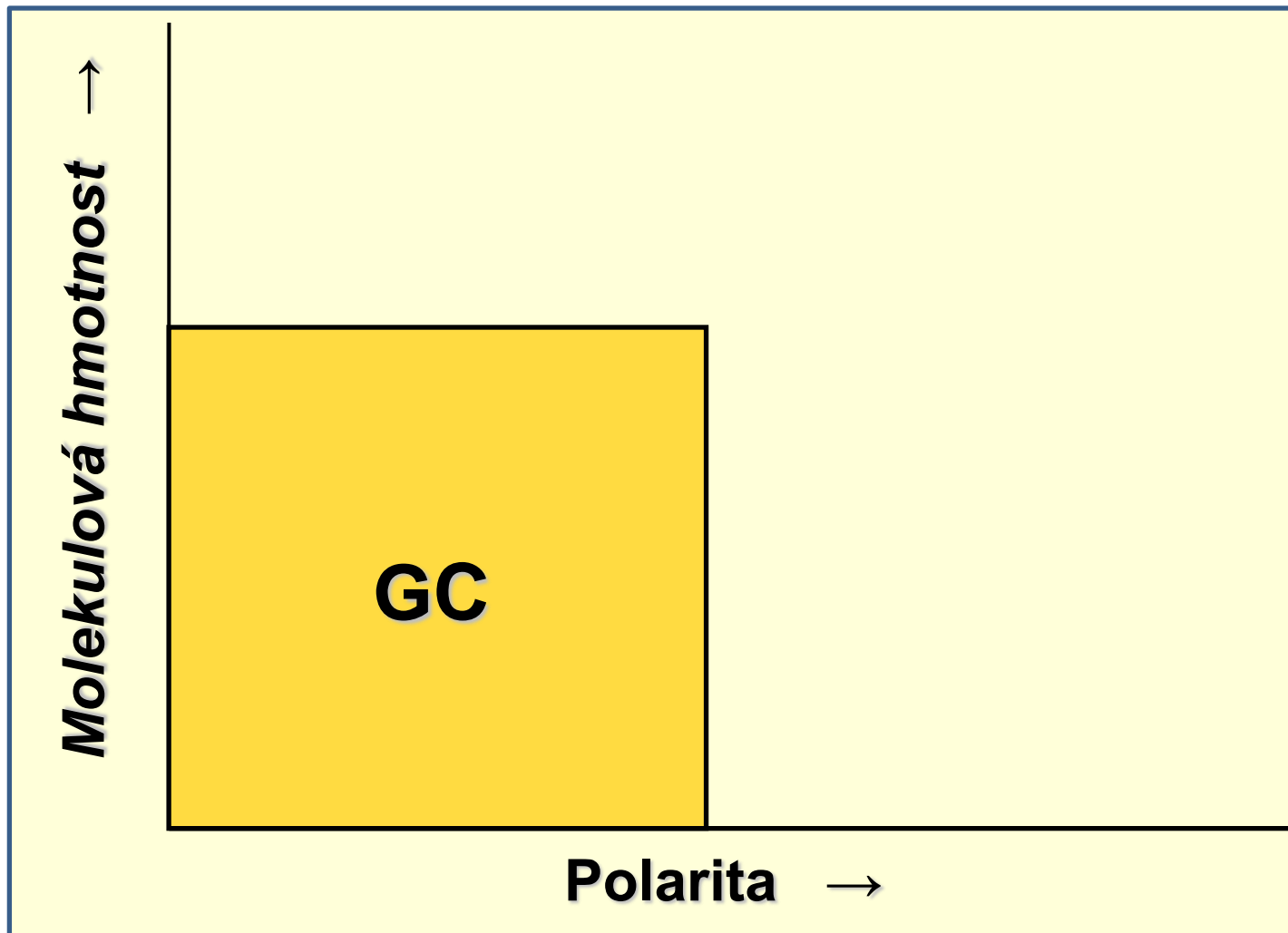
*(separované látky vykazují rozdílnou chromatografickou afinitu)*

## Metoda vhodná pro látky:

- **termostabilní a nereaktivní s ostatními látkami**
- **s přijatelnou těkavostí - při 350 °C musí být alespoň částečně v plynném stavu (horní hranice těkavosti, možnost derivatizace)**
- **není vhodná pro většinu anorganických sloučenin (lze použít pro H<sub>2</sub>O, plyny apod.)**



# Odhad vhodnosti sloučeniny pro GC:



# TECHNICKÁ REALIZACE PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

## Nástřik - Injektor

Split/splitless, on-column, pulzní techniky

Nástřik velkých objemů (PTV, on-column-SVE)

Desorpční techniky

## Separace - kolona

Náplňové a kapilární kolony

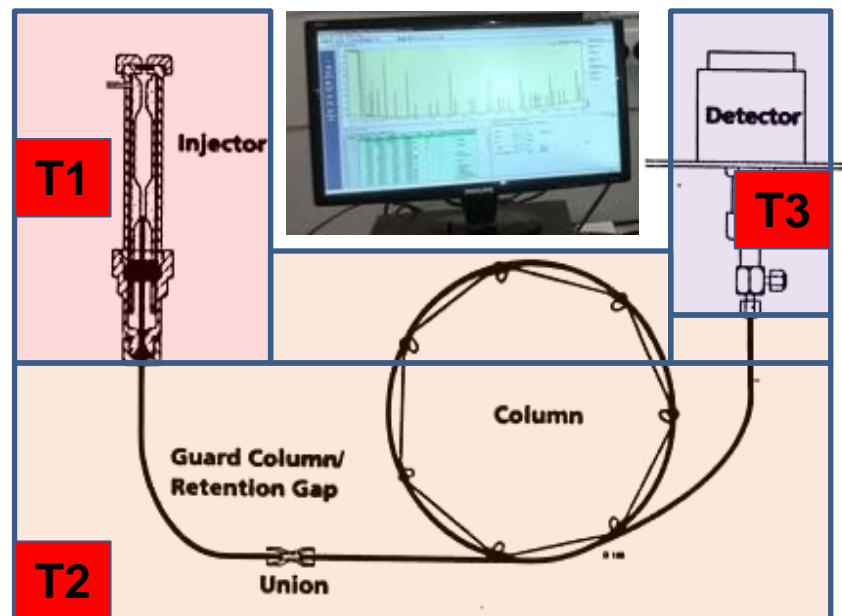
Paralelní a vícerozměrná GC

## Detekce - detektor

Retenční čas, spektrum

## Kvantifikace - software

Odezva detektoru - plocha nebo výška píku

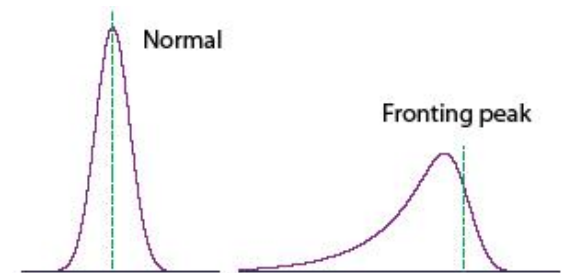


# GC SEPARACE - teorie I

Po **vstupu do kolony** dochází k **rozdělování** molekul analytů mezi **stacionární (SF) a mobilní fází (MF)**, systém se blíží rovnovážné distribuci mezi SF a MF, což lze popsat pomocí distribuční konstanty  $K_D$

**K pohybu molekul kolonou dochází pouze prostřednictvím mobilní fáze** - všechny molekuly projdou stejnou dráhou v odlišných časech podle rozdílné velikosti afinity ke stacionární fázi.

**Každá molekula může vstoupit do stacionární fáze a zase z ní vystoupit.** Pokud je pozice obsazena, molekula putuje dále až najde volné místo. Na uvolněné místo může vstoupit další molekula. Při velkém množství molekul (přesycení systému) může dojít k rozšiřování eluční zóny a snížení zádrže (retence) - tzv. peak fronting.



# GC SEPARACE - teorie II

*Separace 2 látek nastává, pokud je distribuce jejich molekul mezi SF a MF rozdílná.*

## Možnosti zvýšení separace:

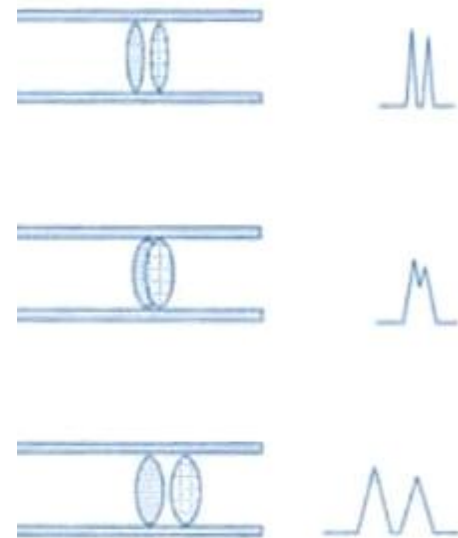
### 1. Zvýšením rozdílů retenčních časů

(*termodynamický aspekt*) - ovlivnění interakcí mezi analytem a SF změnou  $K_D$  a teploty

### 2. Zúžením píků (kinetický aspekt)

- rozměry kolony, rychlost MF, parametry SF apod.

⇒ úzké eluční zóny potřebují pro separaci menší rozdíl retenčních časů



# GC SEPARACE - teorie III

## HLAVNÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ SEPARACI:

- **stacionární fáze** - větší rozpustnost (afinita) analytu pro danou SF = větší retence
- **struktura analytu** - 1. analyt rozpustnější (s vyšší afinitou) pro danou SF než 2. analyt
- **teplota** - ovlivňuje distribuci molekul mezi SF a MF  
 $\uparrow$  teplota  $\Rightarrow \uparrow$  molekul v MF  $\Rightarrow \downarrow t_R$   
 $\Rightarrow$  užší eluční zóny s nižšími retenčními časy

Další faktory: **rozměry kolony, nosný plyn a jeho rychlost**



# GC SEPARACE - kapacitní faktor - k

Závisí na: typu kolony - SF a rozměry, teplotě, lineární rychlosti MF

*Molekuly jakéhokoliv analytu projdou stejnou délkou (objemem) kolony, což je tzv. **mrtvý (eluční) objem** vyjádřený jako retenční čas analytu procházejícího systémem bez zádrže v čase  $t_M$*

⇒ **redukovaný retenční čas ( $t_R'$ )** vyjadřující dobu strávenou v SF je pro daný analyt získán jako retenční čas ( $t_R$ ) zmenšený o mrtvý retenční čas:

$t_R' = t_R - t_M$ , retenční časy analytů se tedy liší o rozdíl časů strávených ve SF

## Kapacitní faktor (retenční faktor) – k:

- poměr doby strávené analytem v SF ( $t_R'$ ) a v MF ( $t_M$ )

$$k = t_R' / t_M = (t_R - t_M) / t_M$$

Měřítka zádrže jedné sloučeniny v SF v porovnání s druhou  
( $k = 0$  bez zádrže,  $k = 1$  slabá zádrž,  $k = 10$  silná zádrž)

- charakterizace GC separace z hlediska rychlosti



# GC SEPARACE - distribuční konstanta $K_D$ - I

## Distribuční konstanta – $K_D$ :

- poměr molární koncentrace analytu v SF ( $c_S$ ) a v MF ( $c_M$ )
- vyjadřuje distribuci analytu mezi SF a MF
- konstantní pro daný analyt, SF a teplotu

Analyty se rozdělí mezi SF a MF v závislosti na **teplotě kolony, své struktuře a charakteru SF (chromatografické afinitě)**

$$K_D = c_S / c_M = k \beta = (t_R' / t_M) (r / 2 d_f),$$

kde  $\beta = r / 2 d_f = V_M / V_S$  je fázový poměr.





# GC SEPARACE - distribuční konstanta II

$K_D = c_S / c_M = k \beta = (t_R' / t_M) (r / 2 d_f)$ ,  $\beta = r / 2 d_f = V_M / V_S$  je fázový poměr,

$$\Rightarrow k = K_D / \beta = K_D 2 d_f / r$$

- užitečné pro **odhad vlivu změn parametrů kolony** při optimalizaci metody **na retenci a účinnost kolony**

- pro zvýšení **k** je nutné buď  $\uparrow K_D$  nebo  $\downarrow \beta$  a naopak  $\uparrow \beta \Rightarrow \downarrow k$  (při  $K_D$  konst.)

$\beta = r / 2 d_f$   $\Rightarrow \uparrow \beta \approx \uparrow r$  (tedy  $\uparrow$  poloměr kolony) nebo  $\approx \downarrow d_f$  (tedy  $\downarrow$  tloušťka SF)

Vztah obsahující délku kolony a MF (nosný plyn - typ a průtok)

$$t_R' = t_M (2 c_S d_f) / (c_M r) ; t_M = L / u$$

$$\Rightarrow t_R' = (2 c_S d_f L) / (c_M r u) = \underbrace{(c_S / c_M)}_{K_D} \underbrace{(2 d_f / r)}_{1/\beta} \underbrace{(L/u)}_{t_M}$$

$K_D$

$1/\beta$

$t_M$



# GC SEPARACE - distribuční konstanta III

## Vliv teploty na $K_D$

$\uparrow$ teplota  $\Rightarrow \downarrow K_D \Rightarrow \downarrow$ retence

- malá změna teploty = velká změna retence (při  $\beta$  konst.)

$\uparrow K_D \Rightarrow$  silnější spojení se SF =  $\uparrow t_R$

- vícekrát přenos hmoty = delší analýza = více analytu ve SF, kde se nepohybuje  $\Rightarrow$  analyt vnášen do detektoru dlouho v rozmyté zóně

= široké píky

$\downarrow K_D \Rightarrow$  více analytu v MF =  $\downarrow t_R$

- rychlý přenos do detektoru = úzké píky

$K_D$  se nemění pro všechny analyty stejně - vhodné programování teploty:

- na začátku analýzy  $\uparrow K_D$  (nižší teplota) - zlepšuje separaci

- na konci analýzy  $\downarrow K_D$  (vyšší teplota) = užší píky



# GC SEPARACE - separační faktor, selektivita - $\alpha$

## Schopnost SF separovat 2 sloučeniny - $\alpha$

- poměr retencí dvou píků - vzdálenost mezi vrcholy dvou píků
- *žádná informace o kvalitě rozdělení,*
- *stejně pro široké (slité) i úzké píky*

$$\alpha = k_2 / k_1 = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M)$$

- *určena funkčními skupinami, závisí na specifických interakcích analytů se SF*
- *pokud  $> 1$ , lze sloučeniny rozdělit (někdy pouze částečně)*
- *je-li  $= 1$ , pak v daném systému nelze sloučeniny rozdělit*



# GC SEPARACE - účinnost (výkonnost) - I

Účinnost (efficiency  $\approx$  výkonnost) = počet teoretických pater -  $n$

$\uparrow$  účinnost  $\Rightarrow$   $\downarrow$  šířka eluční zóny  $\Rightarrow$   $\uparrow$  separační potenciál

*užší eluční zóny = vyšší kapacita píků*

- bezrozměrná veličina spočítaná pro 1 analyt
- vztah mezi retenčním časem a šířkou píku

$$n = 16 (t_R/w_b)^2 = 5,545 (t_R/w_h)^2$$

$w_b$  - šířka píku na základně,  $w_h$  - šířka píku v polovině výšky



# GC SEPARACE - účinnost (výkonnost) - II

**Účinnost = počet teoretických pater -  $n$**

- *$n$  je dáno výběrem sloučeniny - píku použitého k výpočtu: je vyšší pro dříve se eluující sloučeniny a s rostoucím retenčním časem klesá (eluční zóny = píky se rozšiřují)*
- *správná charakterizaci kolony - pík s  $k > 5$  (lineární závislost  $n$  a  $k$ )*
- *porovnání účinnosti kolon - použité píky identické  $k$*
- *vypočtené  $n$  ve skutečnosti popisuje účinnost celého analytického systému (injektor, průtok nos. plynu, teplota kolony, ...)*
- *zúžení píků programováním teploty - zásadní vliv na hodnotu  $n$*



# GC SEPARACE - účinnost (výkonnost) - III

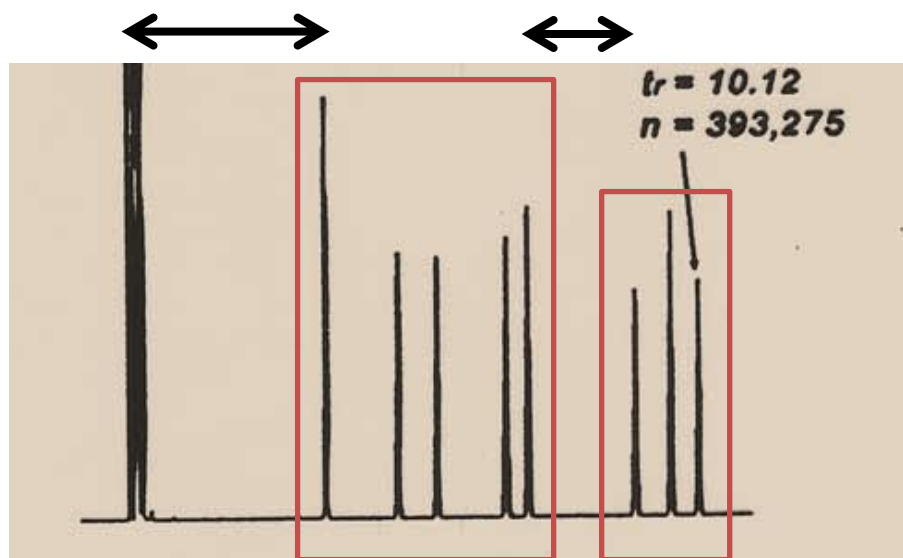
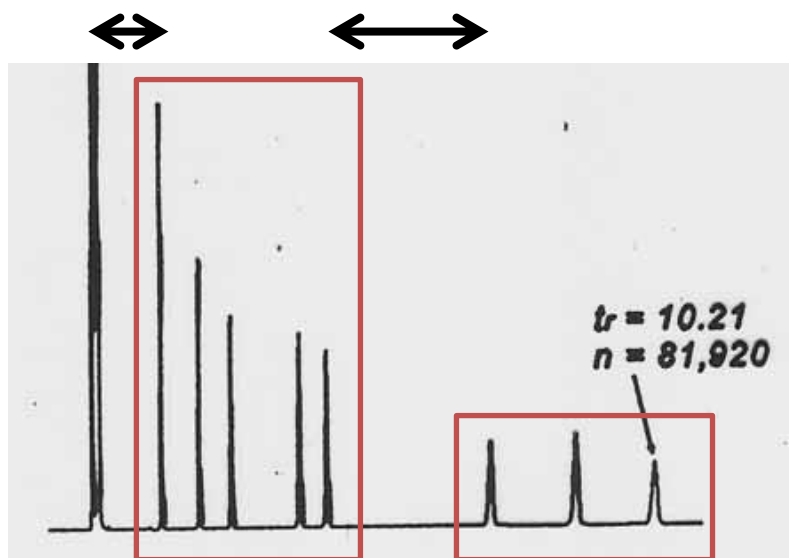
Účinnost = počet teoretických pater - vliv teploty

↑ účinnost ⇒ ↓ šířka eluční zóny

izotermní

X

programovaná teplota



# GC SEPARACE - účinnost (výkonnost) - IV

## Výška ekvivalentní teoretickému patru (h, HETP)

$$\downarrow h \Rightarrow \uparrow n \Rightarrow \uparrow \text{účinnost}$$

- část kolony, ve které dojde jednou k ustavení rovnováhy
- počet teoretických pater - celkový nebo na metr délky kolony

$$h \text{ (HETP)} = L / n$$

- změna počtu teoretických pater v čase  $\Rightarrow$  kontrola po definovaném počtu analýz = úředně uznatelný důkaz změny vlastností kolony - např. při akreditovaných analýzách  $\Rightarrow$  zkrácení X výměna kolony



# GC SEPARACE - rozlišení R

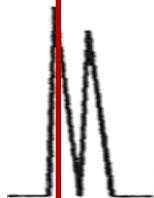
Míra separace mezi dvěma píky s ohledem na šířku píků  
- měřítko kvality rozdělení sloučenin

**R je dáno účinností ( $n \approx$  tvar píku), selektivitou stacionární fáze ( $\alpha$ )  
a retenčním časem ( $k$ )**

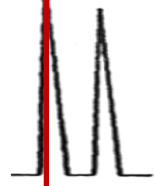
$$R = 1/4 n^{1/2} ((\alpha-1)/\alpha) (k/(k+1)) \text{ nebo } R = 1,18 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{h1} + W_{h2})$$



$R < 1,5$  (částečný) překryv píků; nižší  $n$  a  $\alpha$



$R = 1,5$  píky rozdělené bez baseline mezi sebou



$R > 1,5$  píky rozdělené s odstupem; vyšší  $n$  a  $\alpha$



# GC SEPARACE - van Deemterova teorie - I

**Vlivy na eluční zóny (tvar píků) - rozšiřování a jiné deformace**  
Teorie vytvořená pro náplňové kolony (následně zjednodušená pro kapilární kolony)

## **1. VÍŘIVÁ (turbulentní) DIFUZE v MF - $H_F$**

Rozdílné proudění MF mezi částicemi sorbentu z důvodu rozdílných vzdáleností mezi nimi (tvoří se různé kanálky)  $\Rightarrow$  molekuly analytů postupují v MF různě rychle

## **2. MOLEKULÁRNÍ (axiální nebo longitudinální) DIFUZE v MF - $H_L$**

Analyt je na začátku kolony v úzké zóně o vysoké koncentraci  
 $\Rightarrow$  při postupu kolonou na obou koncích zóny koncentrační gradient  
 $\Rightarrow$  difuze molekul z místa o vyšší konc. do místa o nižší konc. (Fick. z.)  
- projevuje se méně s  $\uparrow u$



# GC SEPARACE - van Deemterova teorie - II

## 3. ODPOR PROTI PŘENOSU HMOTY VE SF - $H_S$

Molekuly difundují z MF do SF a zpět a různě hluboko  $\Rightarrow$  rozdílná zadrž  
Molekuly v MF “předběhnou” molekuly ve SF (SF je obsazena)  $\Rightarrow$   
rozšíření eluční zóny

## 4. ODPOR PROTI PŘENOSU HMOTY V MF - $H_M$

Proud MF v koloně (v kanálcích mezi částicemi) nejednotný  
– u stěny (povrchu sorbentu) minimální  $X$  ve středu toku maximální  
 $\Rightarrow$  molekuly postupují různou rychlostí. Difuzní přestup molekul mezi  
proudy – vyrovnání rozdílů.  
- projevuje se více s  $\uparrow u$

$$H = H_F + H_L + H_S + H_M = A + B/u + (C_S + C_M) u$$

$$H = A + B/u + C u$$



# GC SEPARACE

## Volba parametrů k dosažení požadovaného rozlišení

1. Programování teploty, programování tlaku, různé délky a průměry kolony, různé tloušťky SF
  - vliv na šířku píků, retenční čas (může dojít ke změně elučního pořadí), kapacitu píků, rozložení píků na chromatogramu
2. Volba stacionární fáze - rozdílnost charakteru a velikosti retence, rozdílnost selektivity - dochází ke změně elučního pořadí, rozdílný vliv na rozdílné analyty - aplikace paralelní chromatografie na dvou různých SF
3. Volba mobilní fáze - různé nosné plyny - rozdíly v rychlosti průtoku



# GC SEPARACE

## Rozměry kolony - účinnost a rozlišení

$$R = 1/4 n^{1/2} ((\alpha-1)/\alpha) (k/(k+1))$$

$$t_R' = (2 c_S d_f L) / (c_M r u) = (c_S / c_M) (2d_f / r) (L / u)$$

$$n = L / h; \quad n = 16 (t_R / w_b)^2$$

Délka kolony:

$\uparrow L \Rightarrow \uparrow n$      $2x \uparrow L \Rightarrow \uparrow R$  ale jen o 25 - 35 %

Vnitřní průměr kolony:

$\downarrow r \Rightarrow \uparrow n$      $4x \downarrow r \Rightarrow 2x \uparrow R$

Tloušťka filmu SF:

$\uparrow d_f \Rightarrow \uparrow \text{retence}$

Velmi těkavé sl. ( $k < 5$ ):  $\uparrow d_f \Rightarrow \uparrow n$

Méně těkavé sl. ( $k > 5$ ):  $\uparrow d_f \Rightarrow \downarrow n$  (eluze za vyšších T  $\Rightarrow$  rozšiřování píků)



# GC SEPARACE

## Teplota - účinnost a rozlišení

↑ **teplota** ⇒ ↓ **retence**

Vliv na rozlišení není jednoznačný, ale je významný - teplota ovlivňuje nejen retenci, ale i šířku píku, tj. účinnost.

Významnou roli hraje programování teploty - buď lineárně nebo v různých rampách a gradientech - lze ovlivnit i pořadí eluce analytů (podle významnosti vlivů - tzv, afinita) a rozlišení.

**DĚLENÍ ČLENŮ HOMOLOGICKÝCH ŘAD:** změna teploty má podobný vliv na retenci všech analytů

**DĚLENÍ SLOUČENIN RŮZNÉHO CHARAKTERU:** změna teploty má zásadní vliv na dělení

**Minimální změna teploty** může mít **významnější vliv** na dělení než změna tloušťky filmu či délky kolony



# GC SEPARACE

## Nosný plyn I - účinnost a rozlišení

**Inertní, neovlivňuje sorpce-desorpce ani selektivitu**

Jeho typ a rychlost průtoku ovlivňují účinnost a dobu analýzy

**Lineární rychlost -  $u$  (cm/s)**

- rychlost nosného plynu při postupu kolonou
- není stejná v celé koloně - používá se průměrná

**Van Deemterova křivka**

- vztah  $u$  a účinnosti vyjádřené jako  $h$  (výška ekvivalentní teor. patru)
- pro  $h_{\min}$  je dosaženo nejvíce teor. pater tedy nejvyšší účinnosti

$$h = A + B / u + C u$$



# GC SEPARACE

## Nosný plyn II - účinnost a rozlišení

**Golayova rovnice pro kapilární kolony - neobsahuje A (sorbent):**

$$h = B / u + C u$$

↓ **u** = malá rychlost analytu v koloně = více přenosů hmoty mezi MF a SF ⇒ velká longitudinální difuze (zóny se smývají)

↑ **u** = minimální longitudinální difuze ⇒ pouze omezený počet přenosů hmoty

### **OPTIMÁLNÍ LINEÁRNÍ RYCHLOST**

**je proto kompromisem pro tyto protichůdně působící jevy.**



# GC SEPARACE

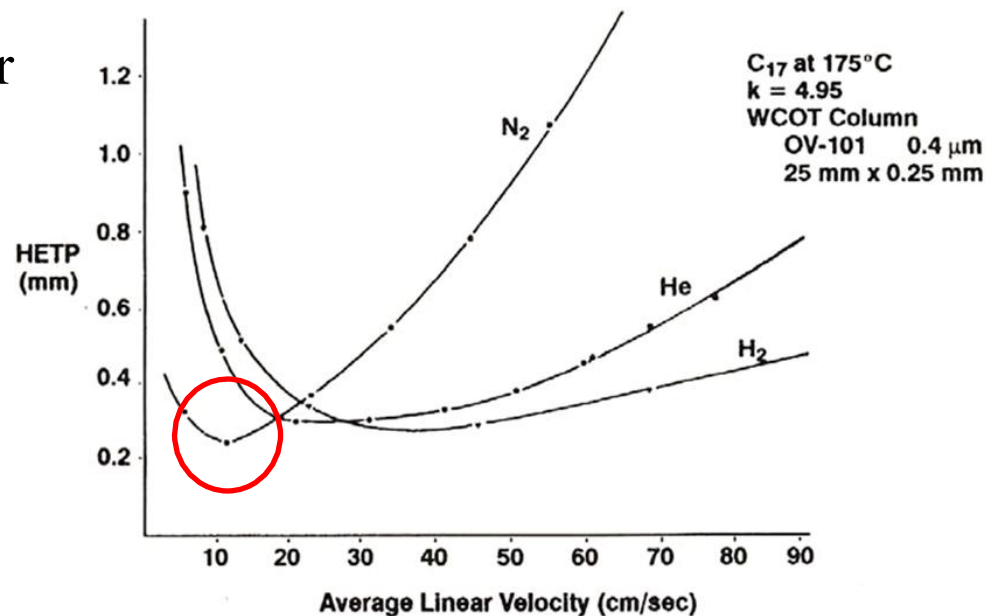
## Dusík jako nosný plyn - N<sub>2</sub>

Nejvyšší účinnost ( $h_{\min}$ )

Hodnota optimální  $u$  - nízká (malé průtoky) a velice úzký rozsah

⇒ vysoké retenční časy

- křivka velmi strmá ⇒ malé zvýšení rychlosti = velká změna účinnosti
- není-li aplikován konst. průtok, dochází k eluci při neoptimální lin. rychl.
- levný a dostupný
- možnost výroby - generátor





# GC SEPARACE

## Helium jako nosný plyn - He

**Přijatelně vysoká účinnost ( $h_{\min}$ ) - nižší než u  $N_2$**

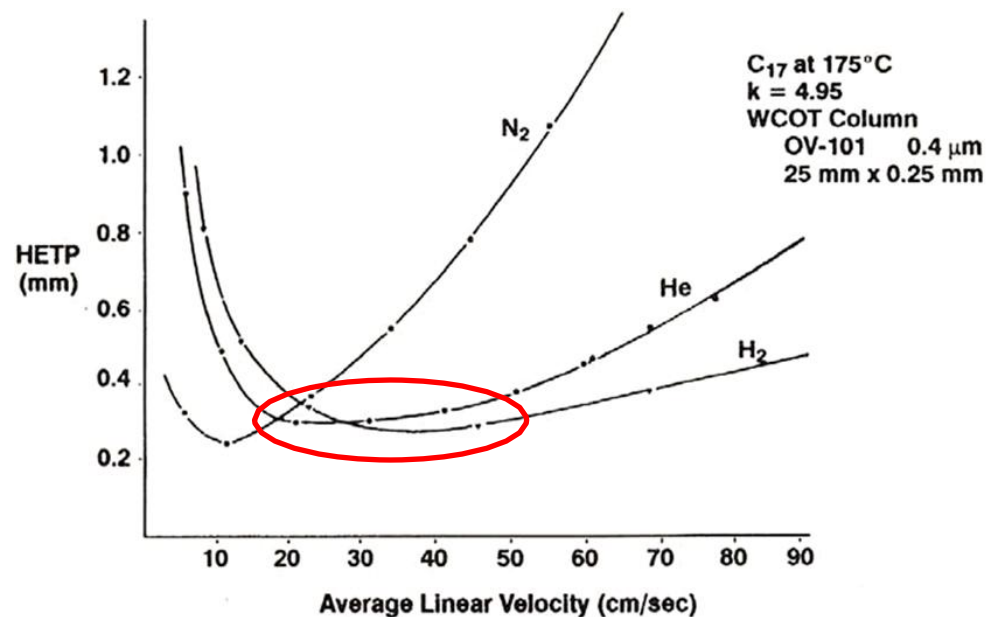
Hodnota optimální  $u$  - dostatečně vysoká a větší rozsah

⇒ nižší retenční časy- křivka není tak strmá

⇒ zvýšení rychlosti = malá změna účinnosti

- drahý a omezeně dostupný

⇒ dochází k nárůstu ceny



# GC SEPARACE

## Vodík jako nosný plyn - H<sub>2</sub>

Vysoká účinnost ( $h_{\min}$ ) - mezi N<sub>2</sub> a He

Hodnota optimální  $u$  - vysoká a velký rozsah

⇒ nižší retenční časy- křivka je plochá

⇒ zvýšení rychlosti = minimální změna účinnosti

- přijatelná cena a dostupnost
- možnost výroby - generátor

