

Chromatografické metody II.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Aplikační rozsah chromatografie

| Metoda | Přibližný rozsah M_r analytů | Analyzované látky |
|---------------------|--------------------------------|---|
| GC | 1- 400 | plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, po derivatizaci i netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární |
| HPLC | $3 - 10^6$ | ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery |
| PC, TLC | 100 - 2000 | ionty, látky polární i nepolární |
| CE (CZE, CEC, MEKC) | $3 - 10^6$ | ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery |

PC a TLC



PC a TLC

- ◆ 1944 – Martin, Syngge - PC aminokyselín (Nobelova cena)
- ◆ 1952 – TLC nahrazuje PC

The background features a circular grid pattern, similar to a polar coordinate system or a circular graph, rendered in a light brown color. A hand-drawn line in a slightly darker shade of brown starts from the center of the grid and extends towards the right, ending with a small pushpin icon. The overall background is a solid, dark brown color.

Instrumentace PC a TLC

Chromatografický papír

- ◆ Nemodifikovaný
- ◆ Modifikovaný – ionexy, acylace

f. Watman (Anglie)

Schleicher-Schüll (Německo)

TLC

- ◆ Vlastní příprava - sypané, nalévané
- ◆ Komerčně dostupné - Silufol (Cz)
Watman

PC a TLC - mody

- ◆ rozdělovací
- ◆ adsorpční
- ◆ ionexová
- ◆ hydrofobní – RP a HIC
- ◆ gelová permeační

Nanášení vzorku

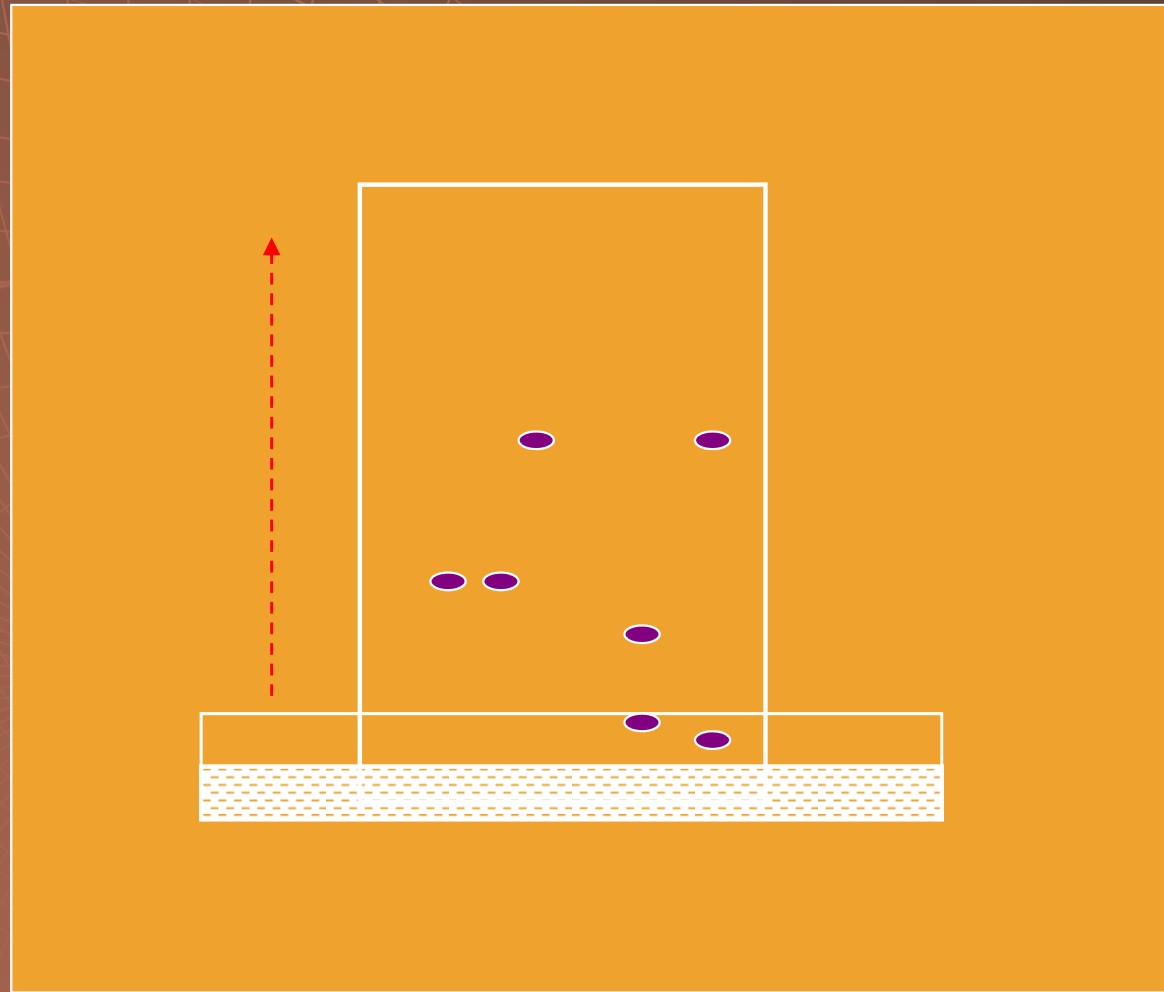
- ◆ Pipety

- ◆ Kapiláry

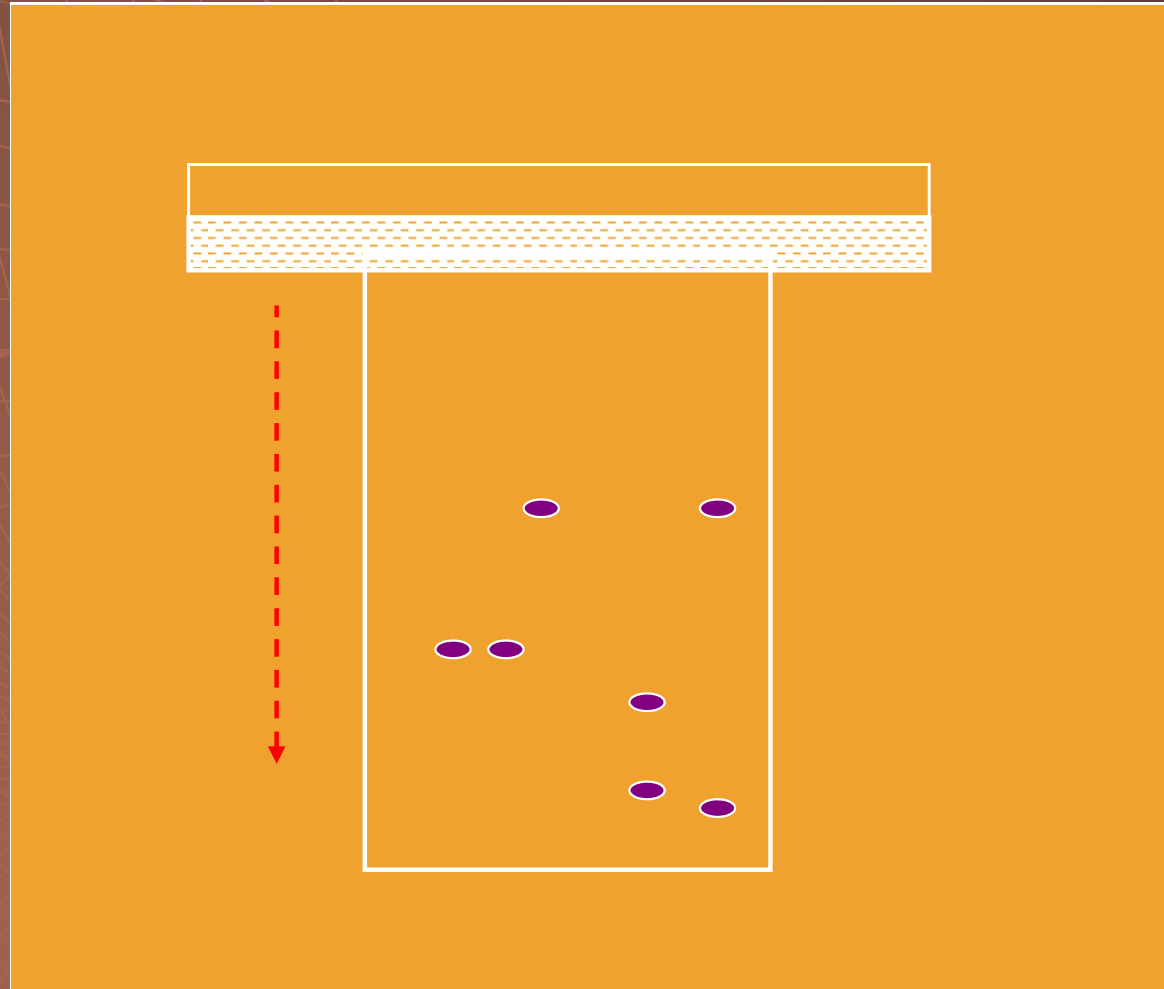
Provedení

- ◆ Vzestupné
- ◆ Sestupné
- ◆ Kruhové
- ◆ Dvojrozměrné

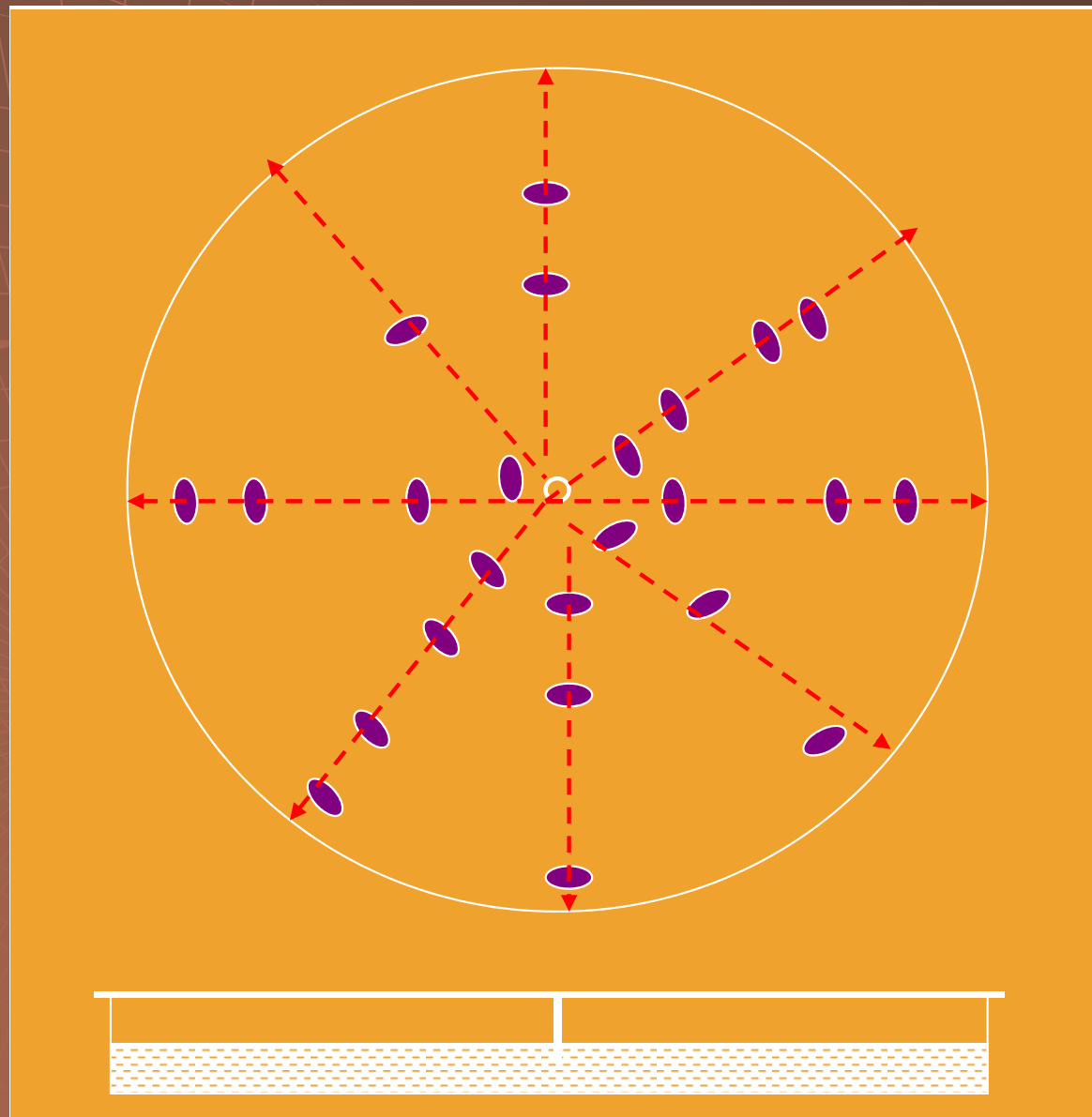
Vzestupné



Sestupné

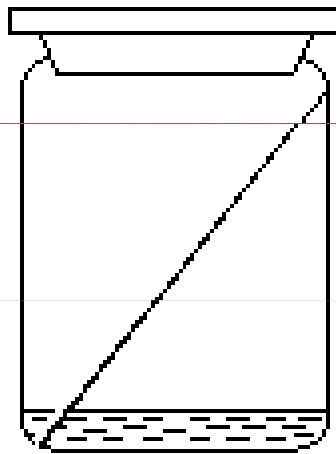


Kruhové

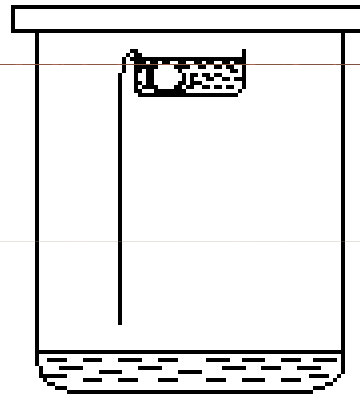


Vyvíjení

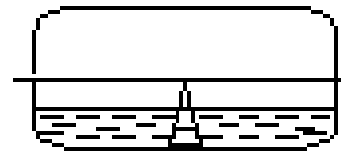
vzestupné
vyvíjení



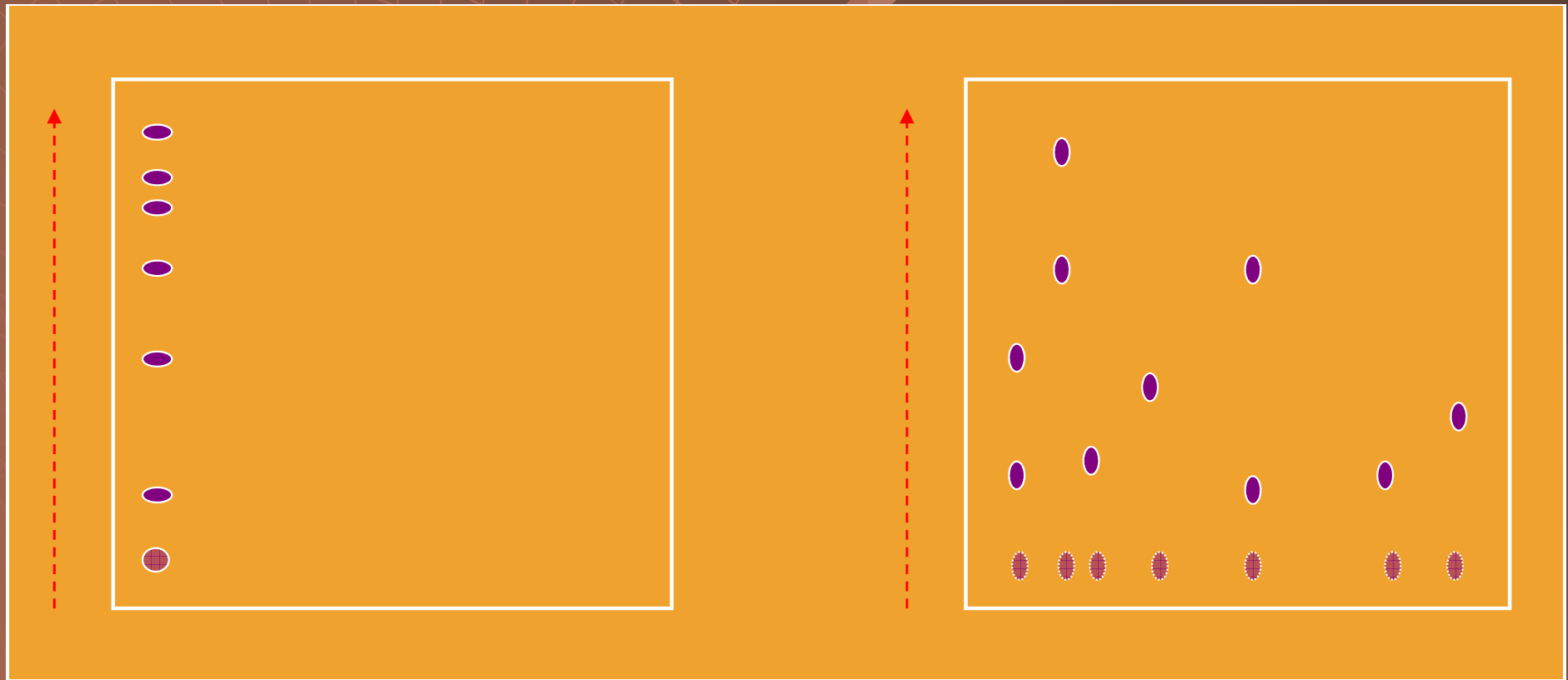
sestupné
vyvíjení



kruhové
(radiální)
vyvíjení



Dvojměrné



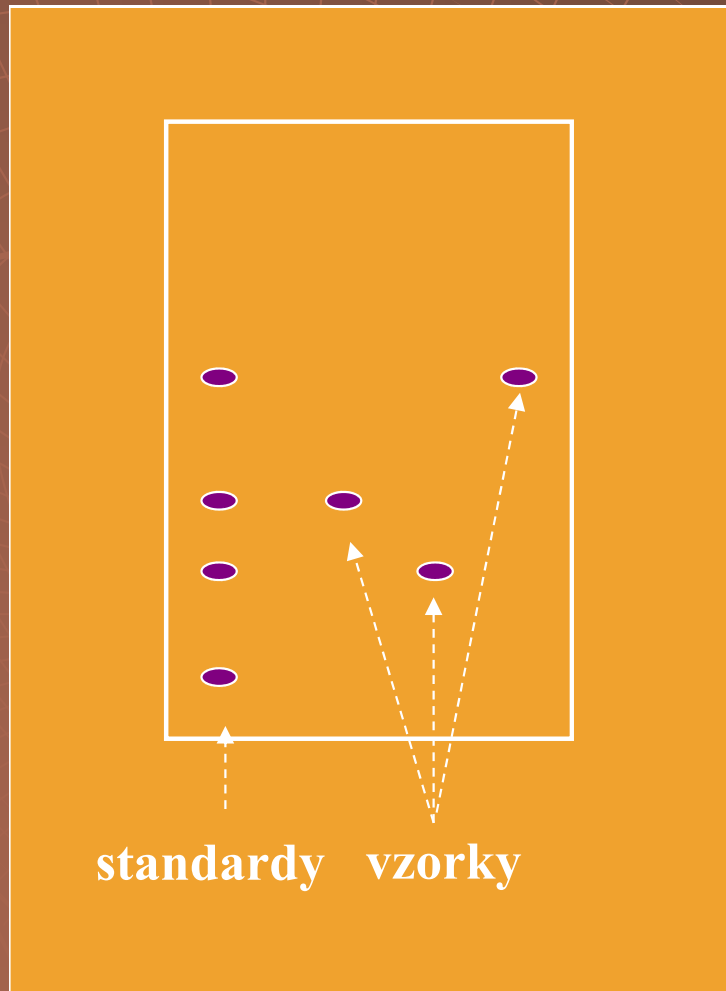
Provedení

- ◆ Analytické
- ◆ Preparativní

Detekce

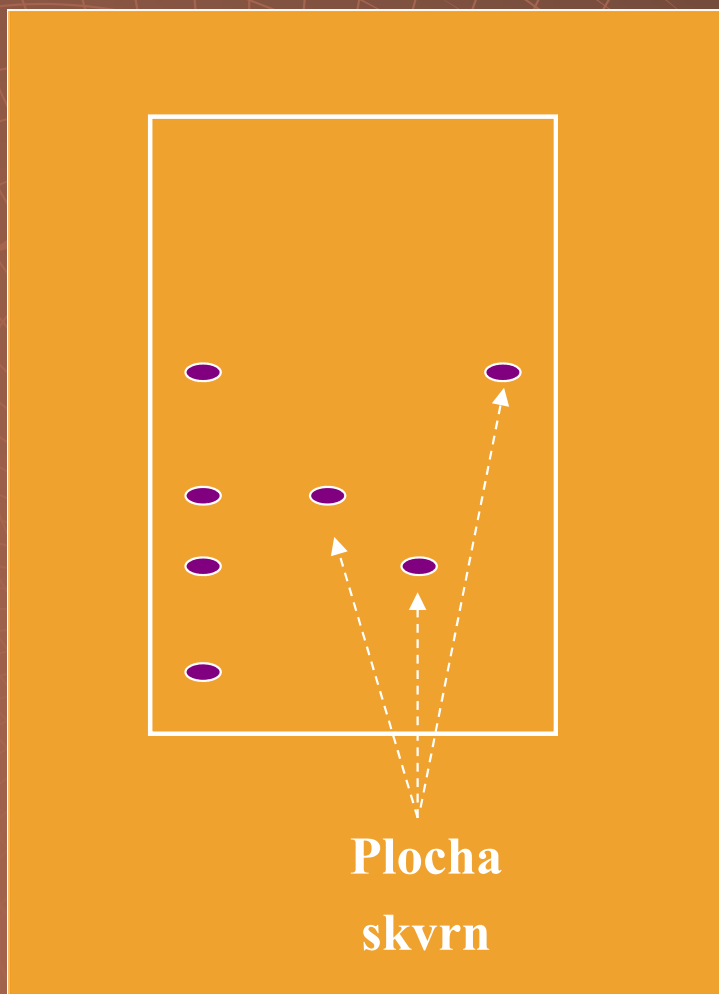
- ◆ Fyzikální
 - UV VIS
 - Fluorescence
- ◆ Chemická – derivatizace
 - Specifická
 - nespecifická
- ◆ Na základě biologické aktivity

Analýza kvalitativní



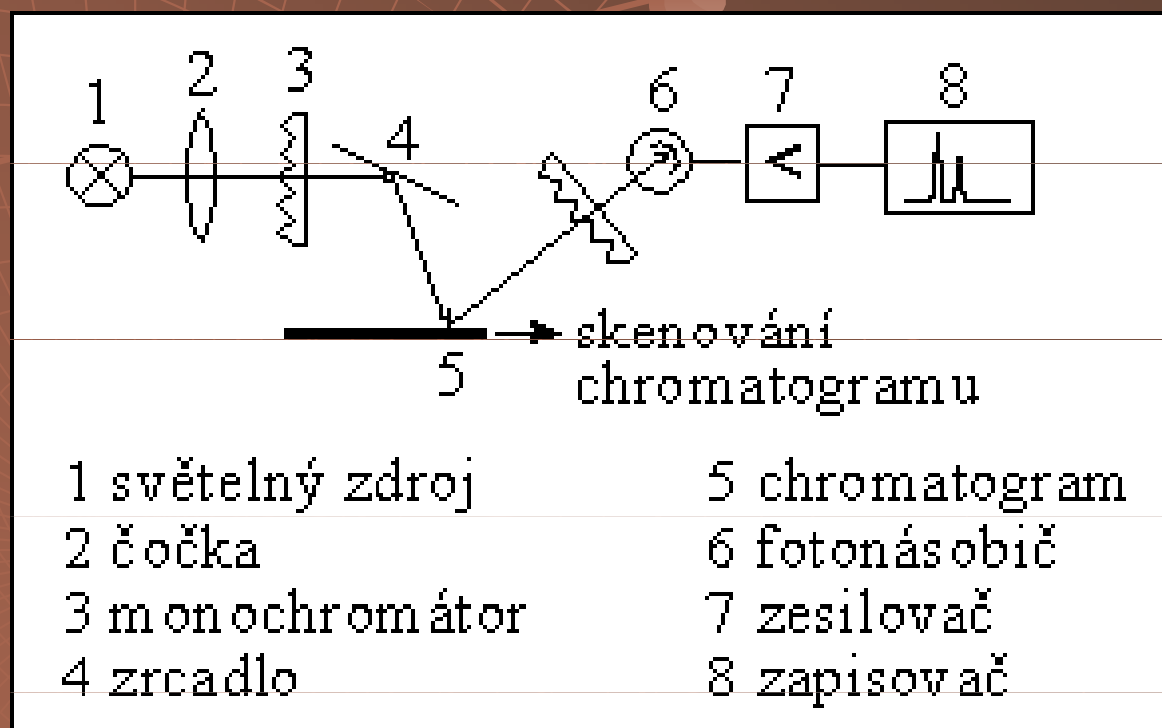
$$R_f = \frac{\textit{střed skvrny}}{\textit{čelo rozpouštědla}}$$

Analýza kvantitativní

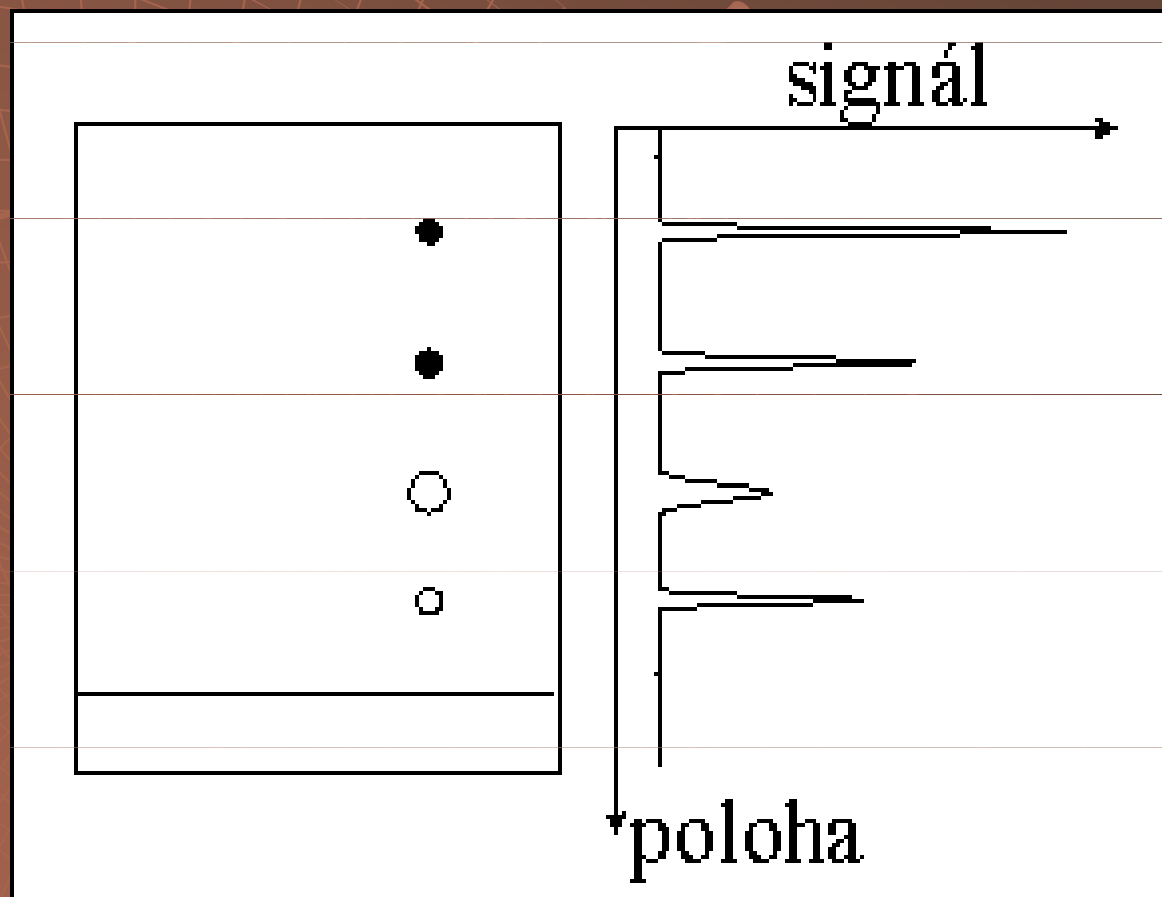


- ◆ Planimetrie
- ◆ Densitometrie

Denzitometrie



Denzitometrie



Preparace

- ◆ PC – vystřížení a eluce skvrny
- ◆ TLC – vyškrábání a eluce skvrny
 - odsání a eluce skvrny

Chromatografie



Kapalinová chromatografie rozdělení

- ◆ Nízkotlaká (atmosferický tlak) – LPC
- ◆ Střednětlaká (4 Mpa) – FPLC
- ◆ Vysokotlaká (40 Mpa) – HPLC
- ◆ Ultravysokotlaká (100 Mpa) – UPLC

Kapalinová chromatografie využití

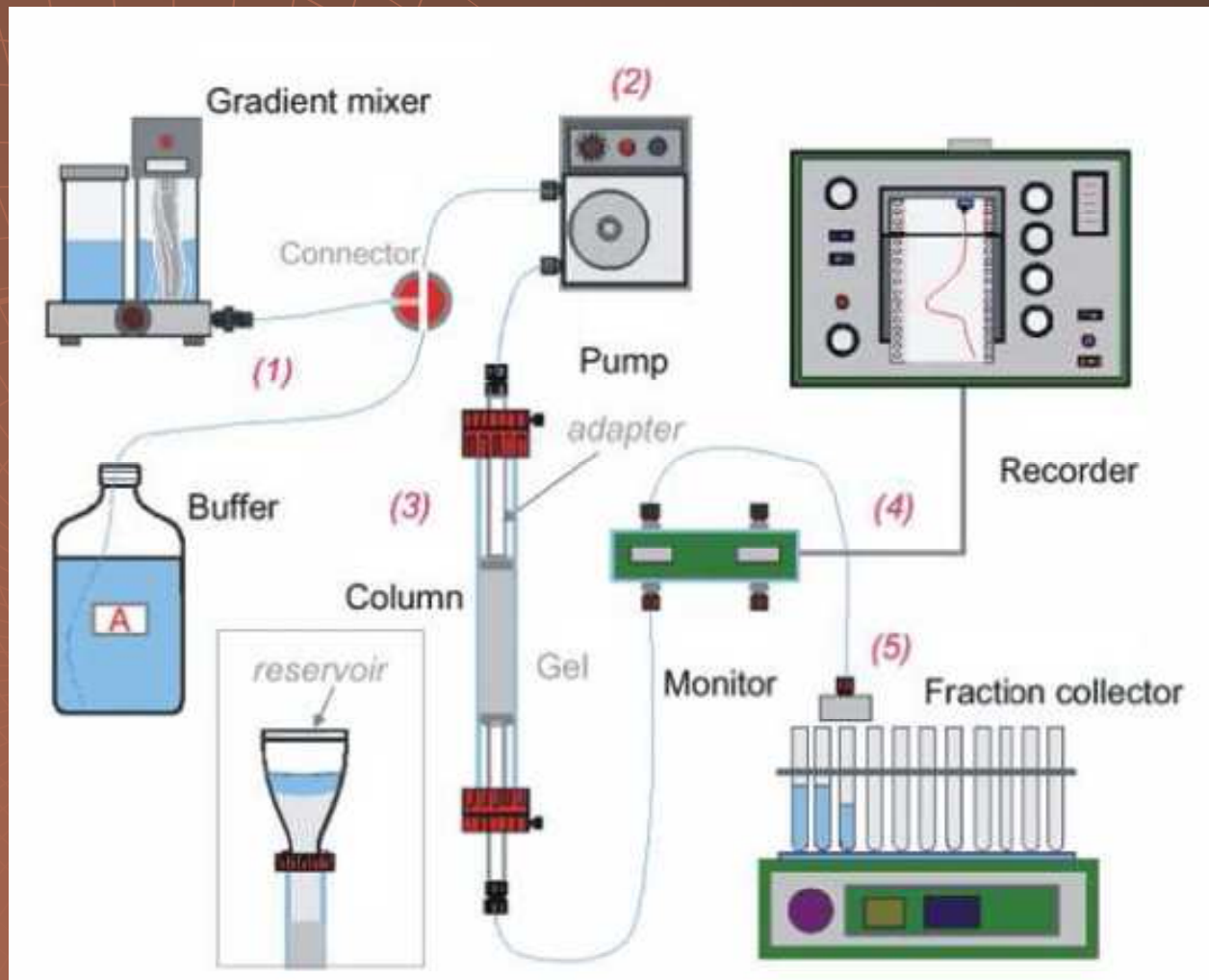
- ◆ LPC – preparativní
- ◆ FPLC – semipreparativní a analytická
- ◆ HPLC – analytická
- ◆ UPLC – analytická

Kapalinová chromatografie

doba trvání

- ◆ LPC – hodiny
- ◆ FPLC – desítky minut
- ◆ HPLC – minuty
- ◆ UPLC - sekundy

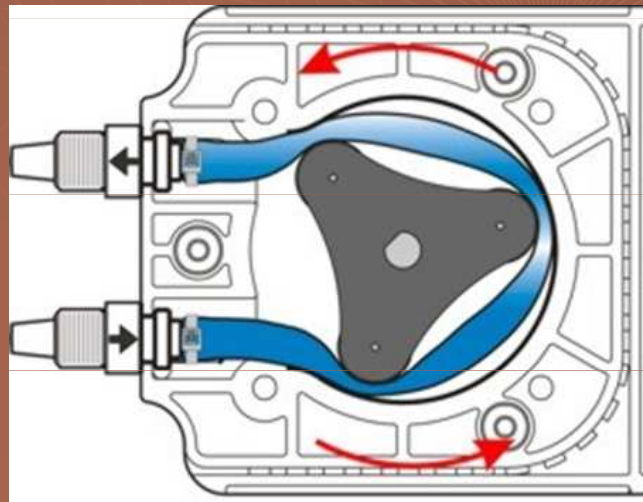
Zařízení pro LPC



Zařízení pro LPC



Zařízení pro LPC



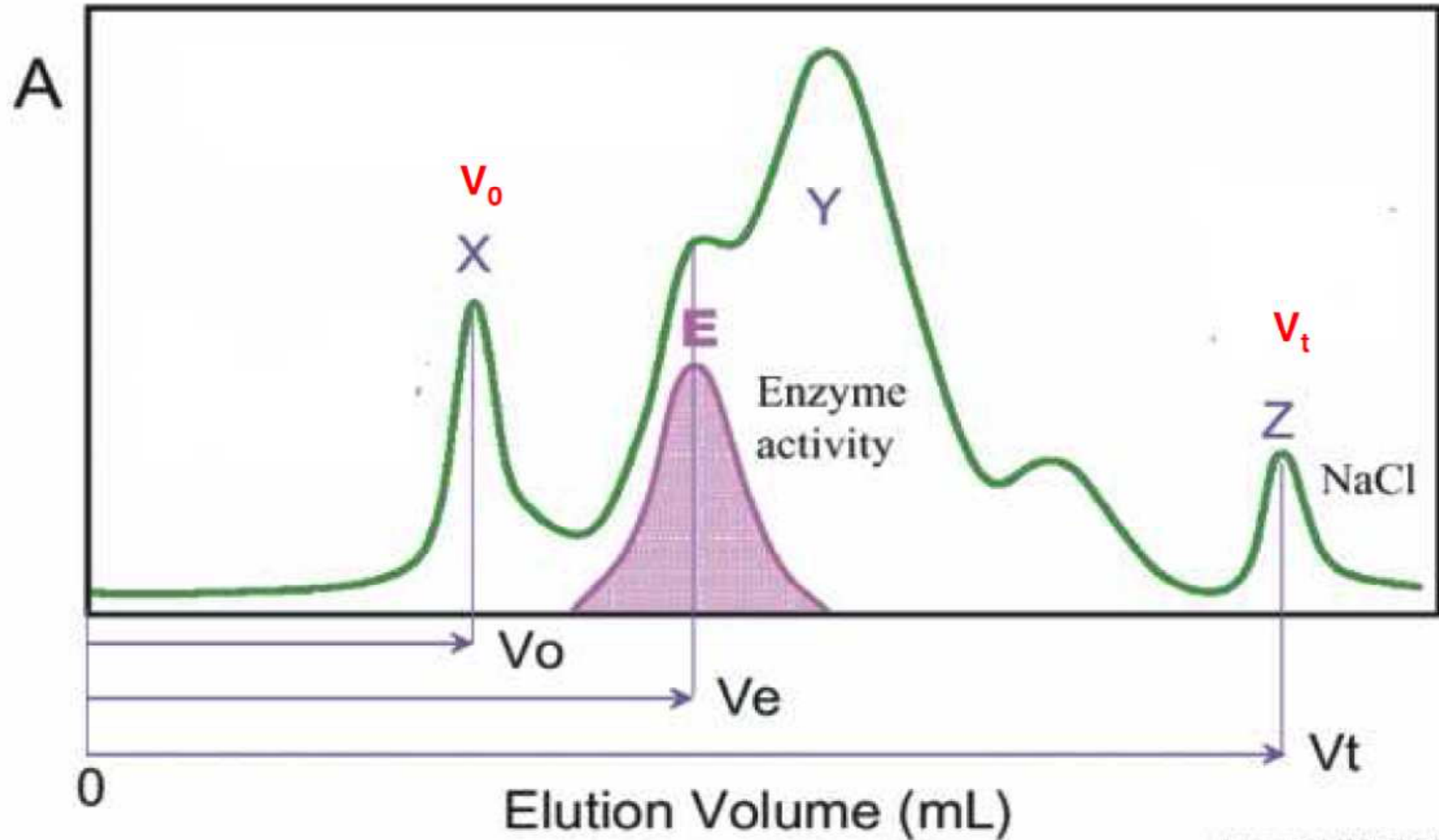
Zařízení pro LPC



Instrumentace pro LPC

- ◆ Pumpa – peristaltická nebo gravitace
- ◆ Gradient – mísič gradientu
- ◆ Dávkování – přímo pumpou na kolonu
- ◆ Kolony – skleněné
- ◆ Detekce – spektrofotometrická 254, 280 nm
- ◆ Vyhodnocování – zapisovač
- ◆ Sběrač frakcí – programovatelný

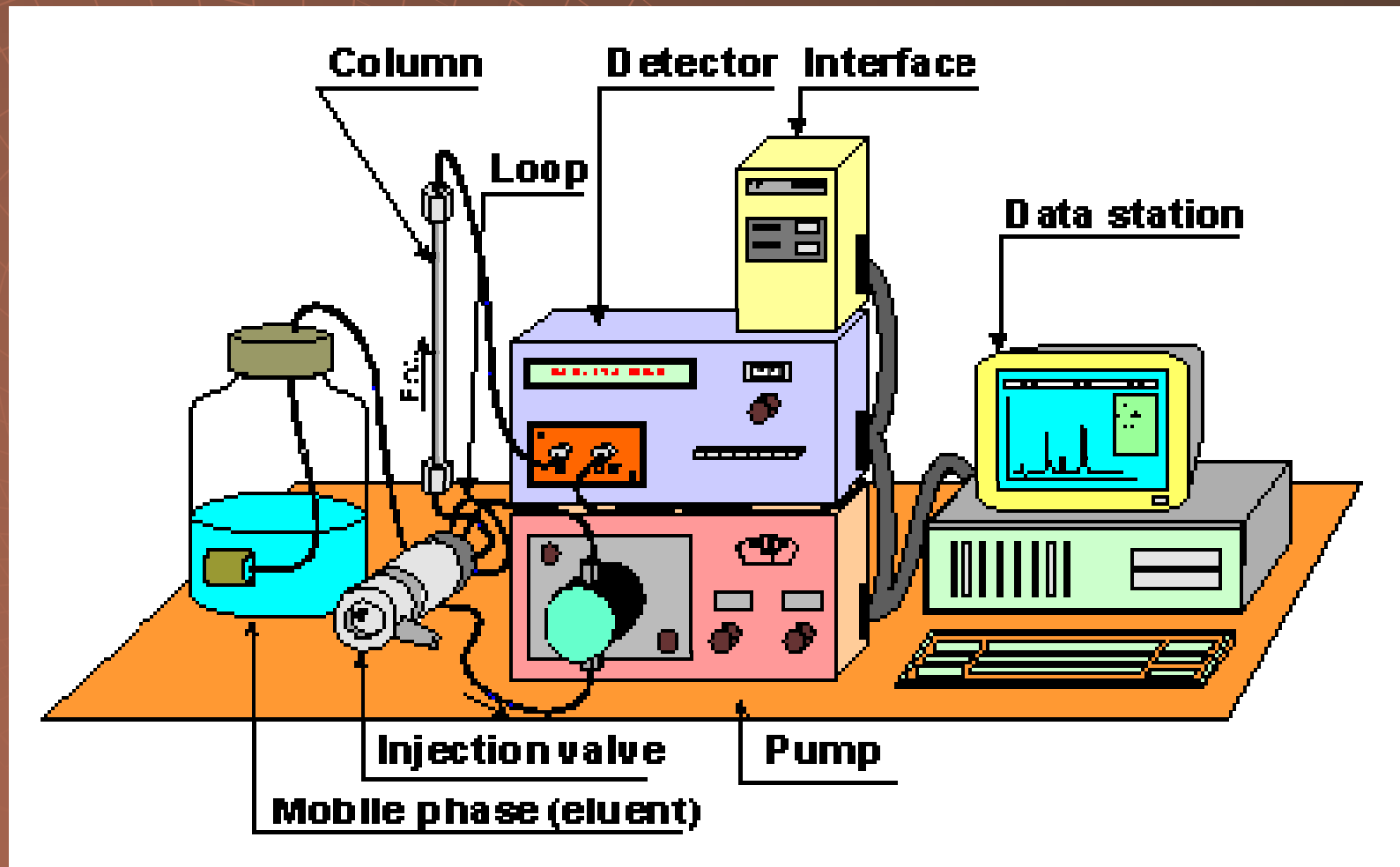
LPC





Instrumentace pro FPLC a HPLC

Zařízení pro FPLC a HPLC



Zařízení pro FPLC



Zařízení pro HPLC



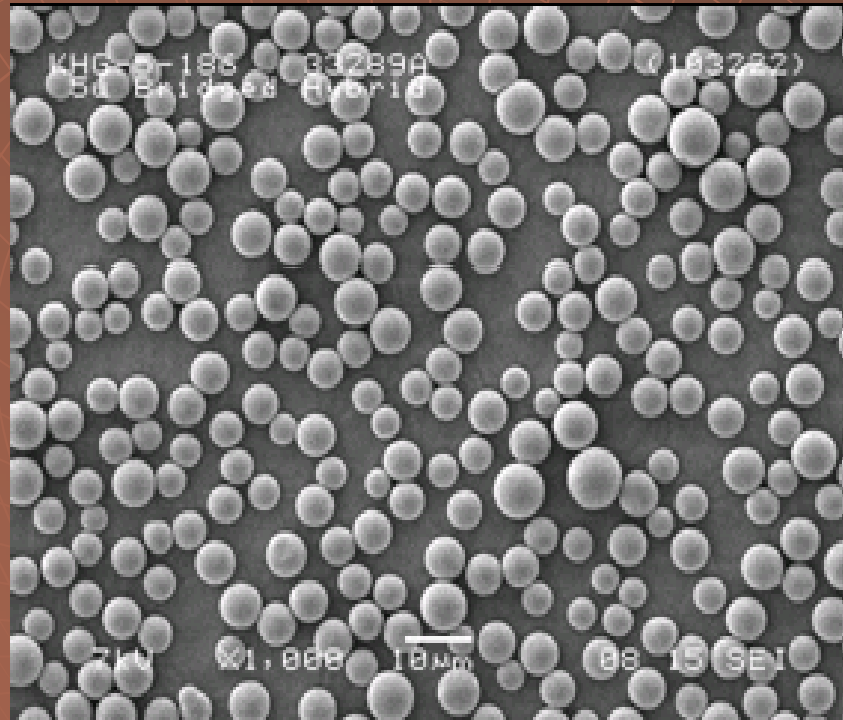
Zařízení pro UPLC



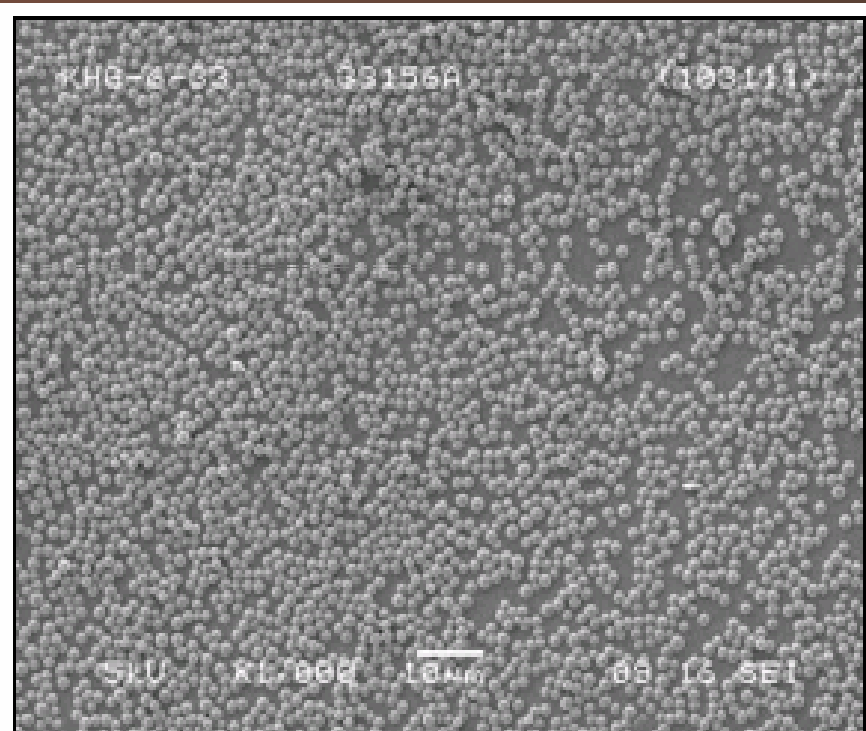
UPLC x HPLC

- kratší doba analýzy = vyšší průchodnost vzorků (vyšší produktivita)
- snížení nákladů = menší spotřeba HPLC rozpouštědel (ekologie)
- zvýšení separační účinnosti
- snížení meze detekce – zvýšení citlivosti
- •více kvalitativních informací

UPLC x HPLC



5 µm Particles



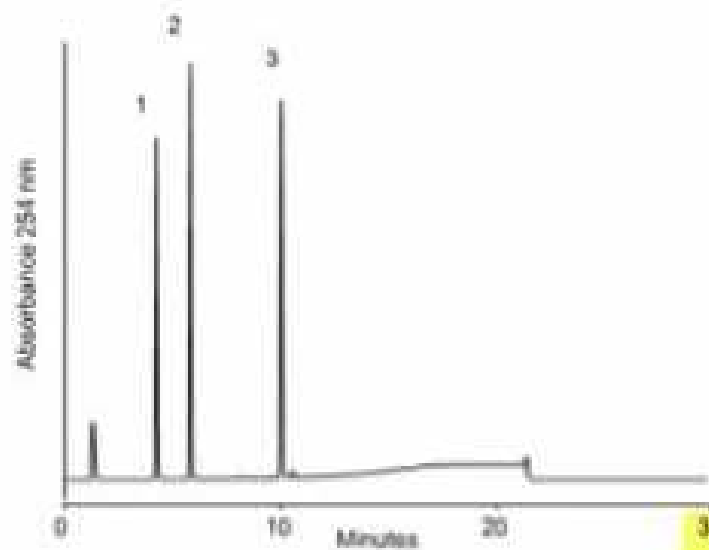
1.7 µm UPLC Particles

UPLC x HPLC

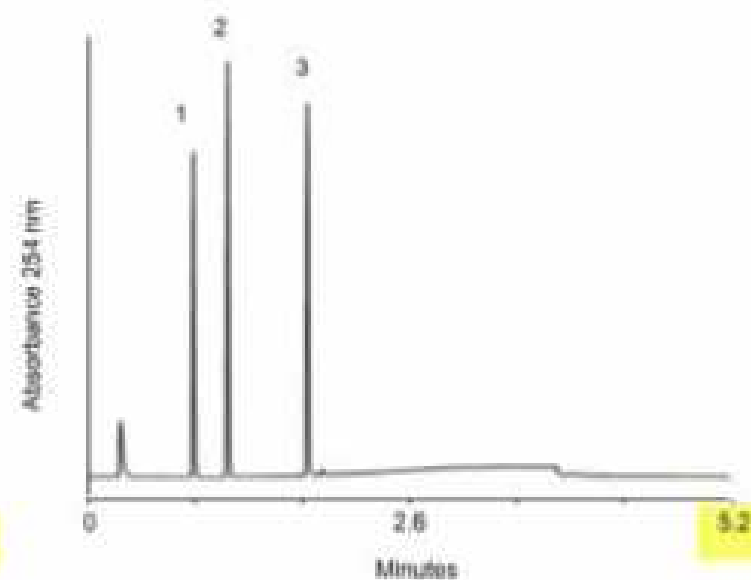
Waters

HPLC Converted to UPLC™

©2005 Waters Corporation

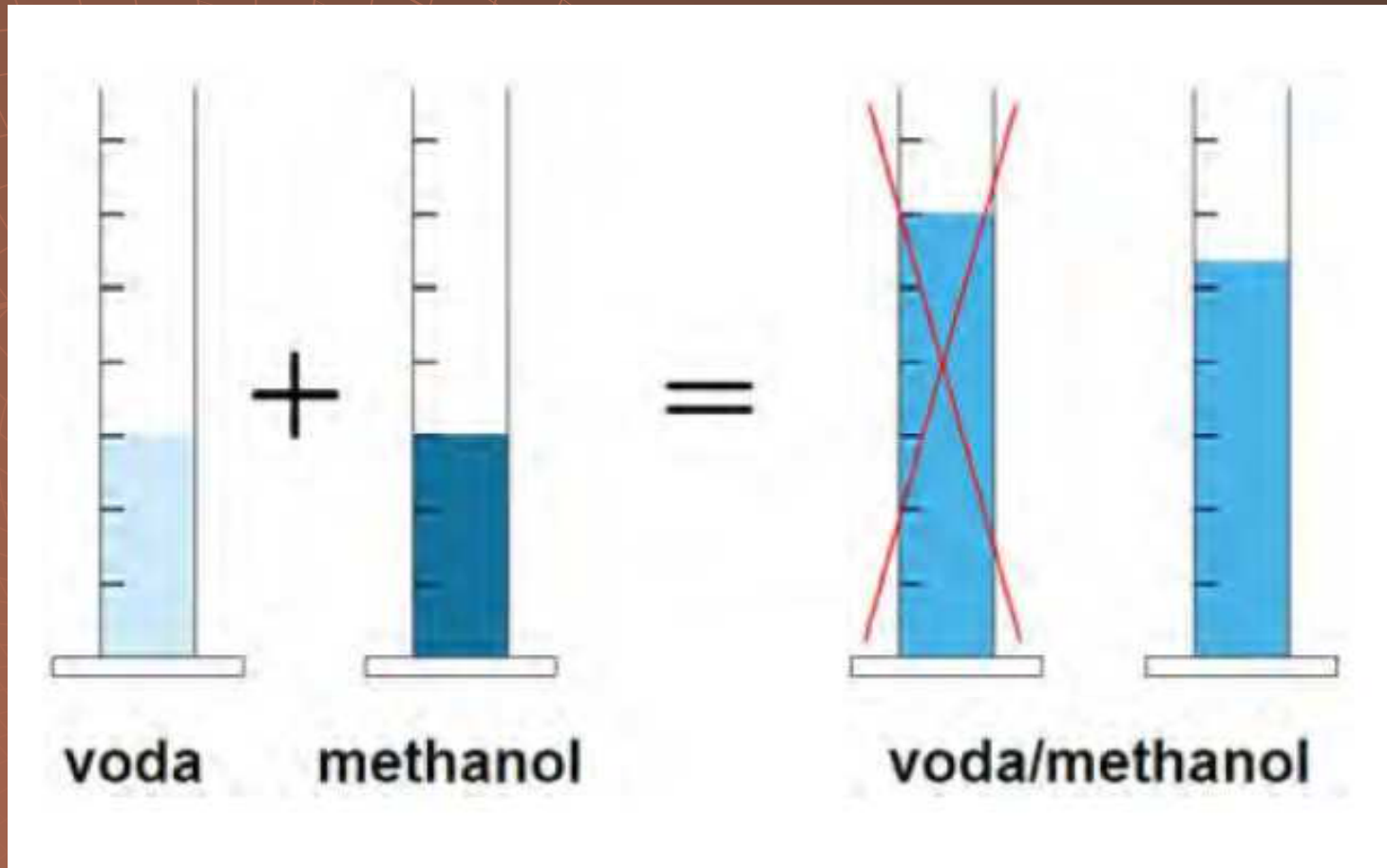


Original 30 minute HPLC



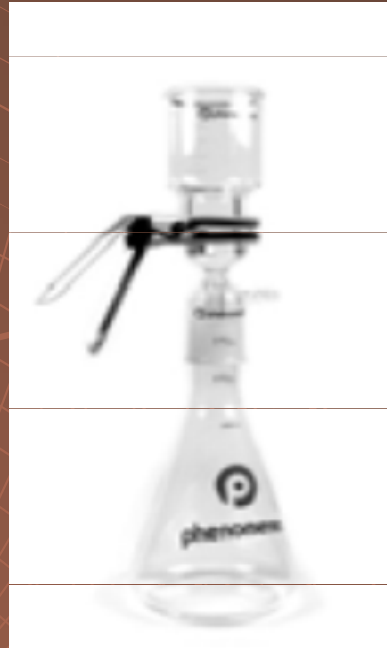
Converted 5.2 minute UPLC™

Příprava mobilní fáze



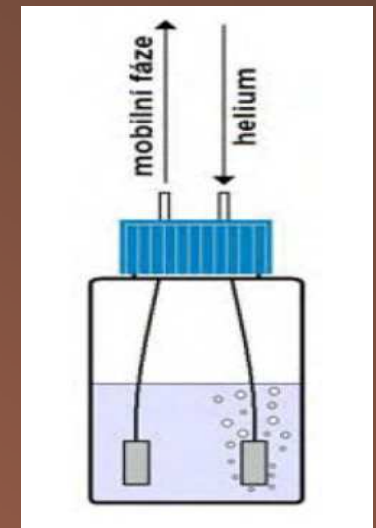
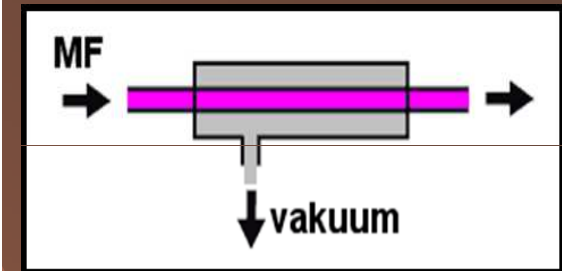
Příprava mobilní fáze

- filtrace



Odplynění mobilní fáze

- přechod varem za nízkého tlaku
- ozvučení ultrazvukem
- vakuová filtrace
- in-line membránové odplynění
- probublávání inertním plynem



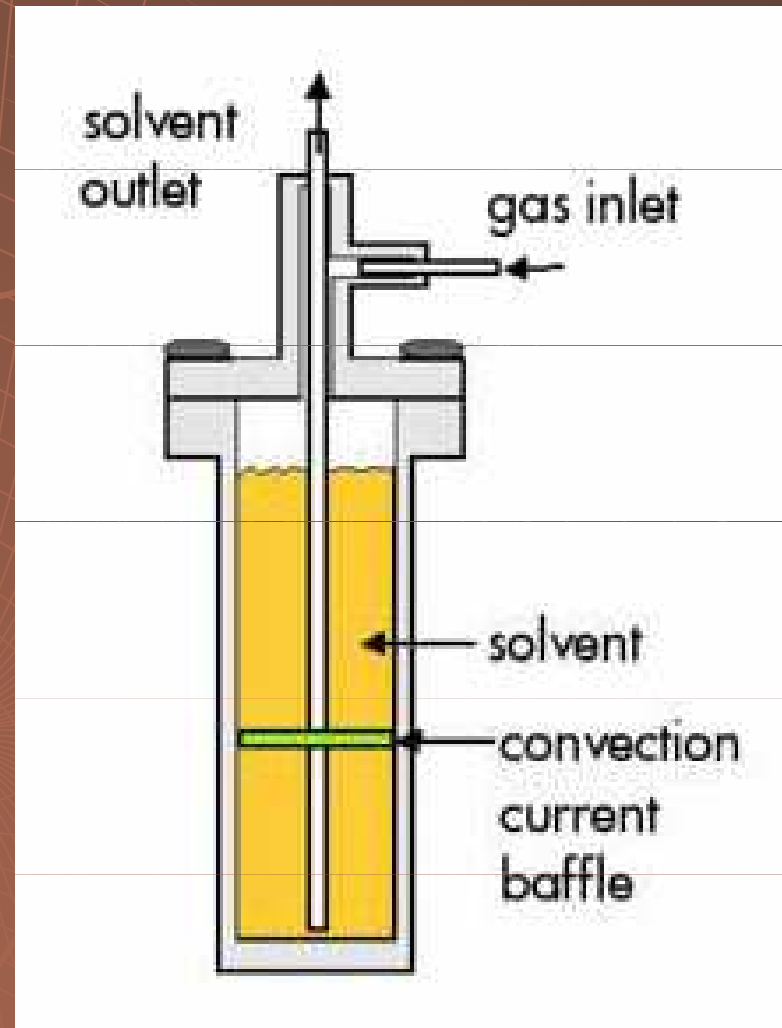


Pumpy



Pumpy pracující za konstantního tlaku

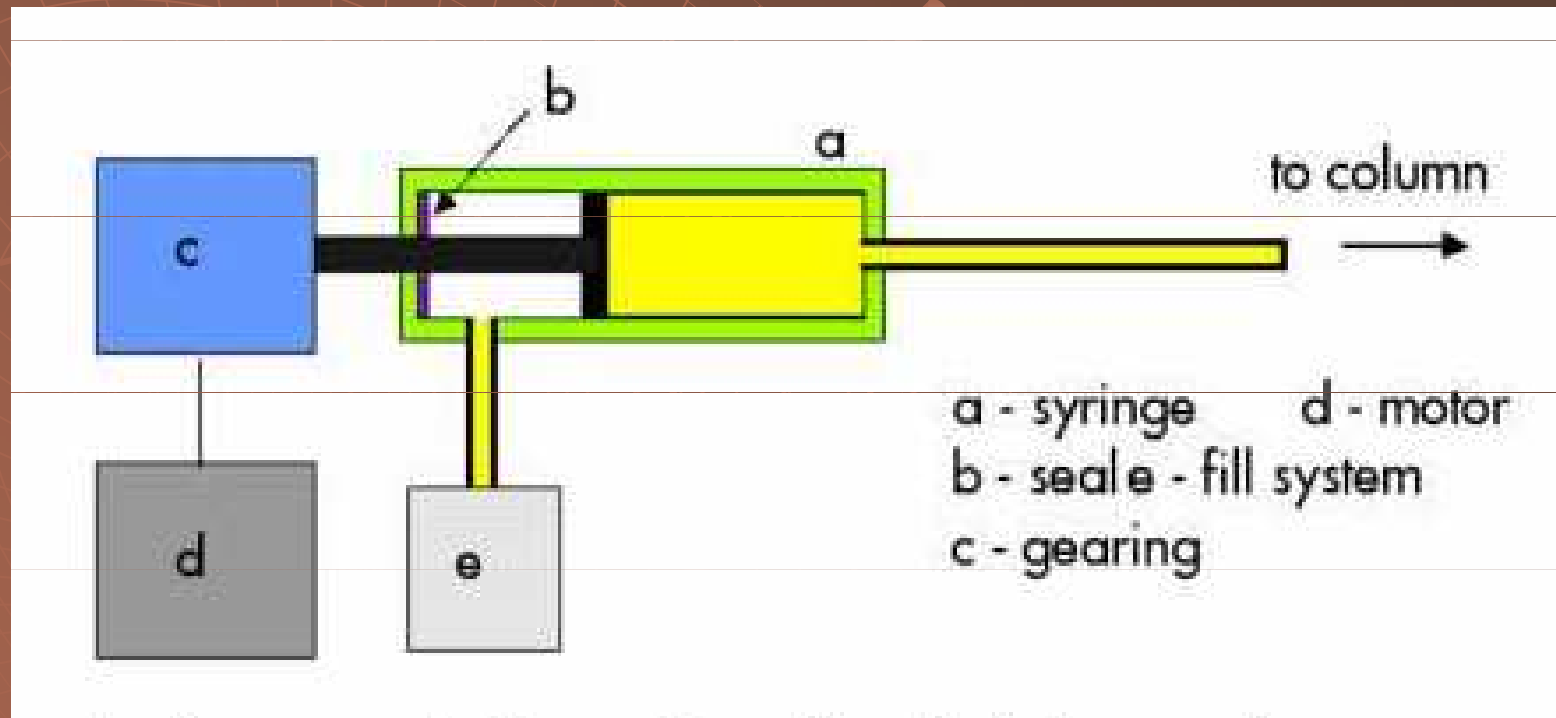
Tlaková pumpa



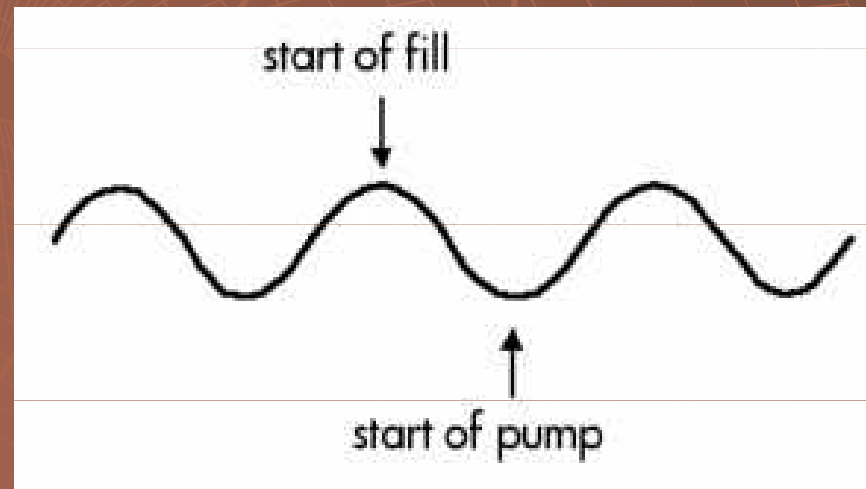
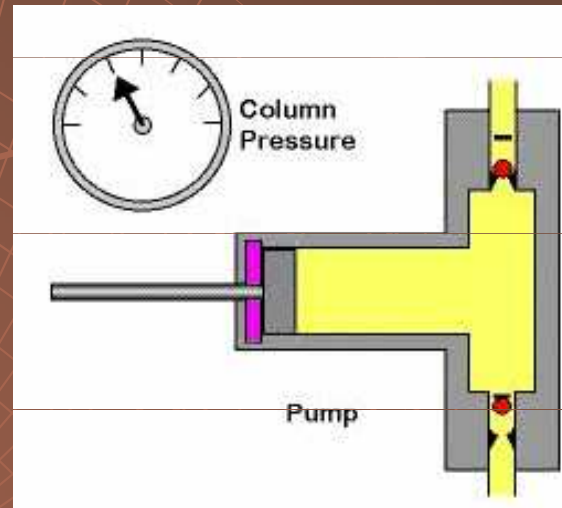
The background features a faint, light-colored grid pattern overlaid on a dark brown background. The grid consists of concentric circles and radial lines, resembling the structure of a pump impeller. A small, stylized pump component is visible at the center of the grid.

Pumpy pracující za konstantního průtoku

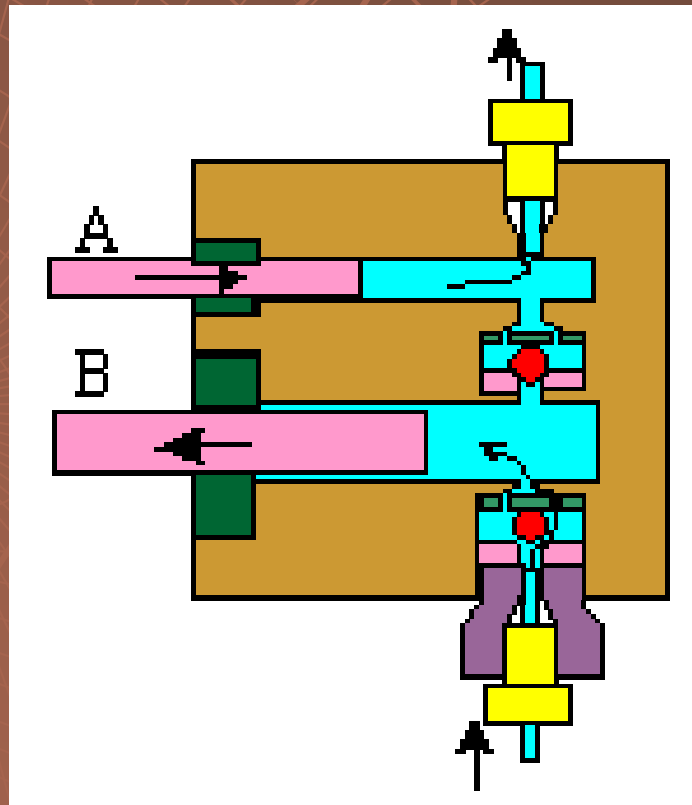
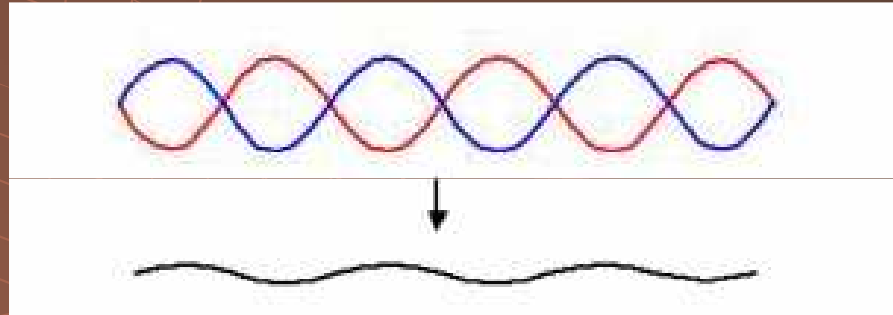
Lineární dávkovače



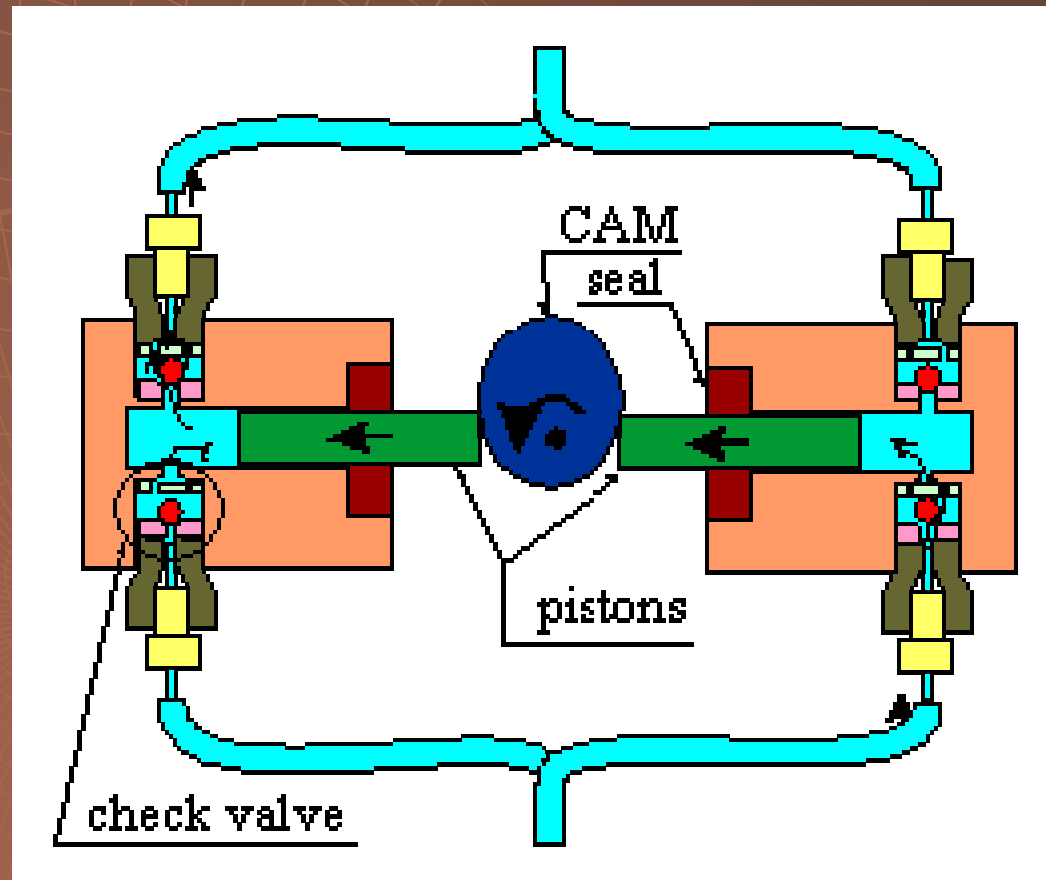
Pumpa jednopístová



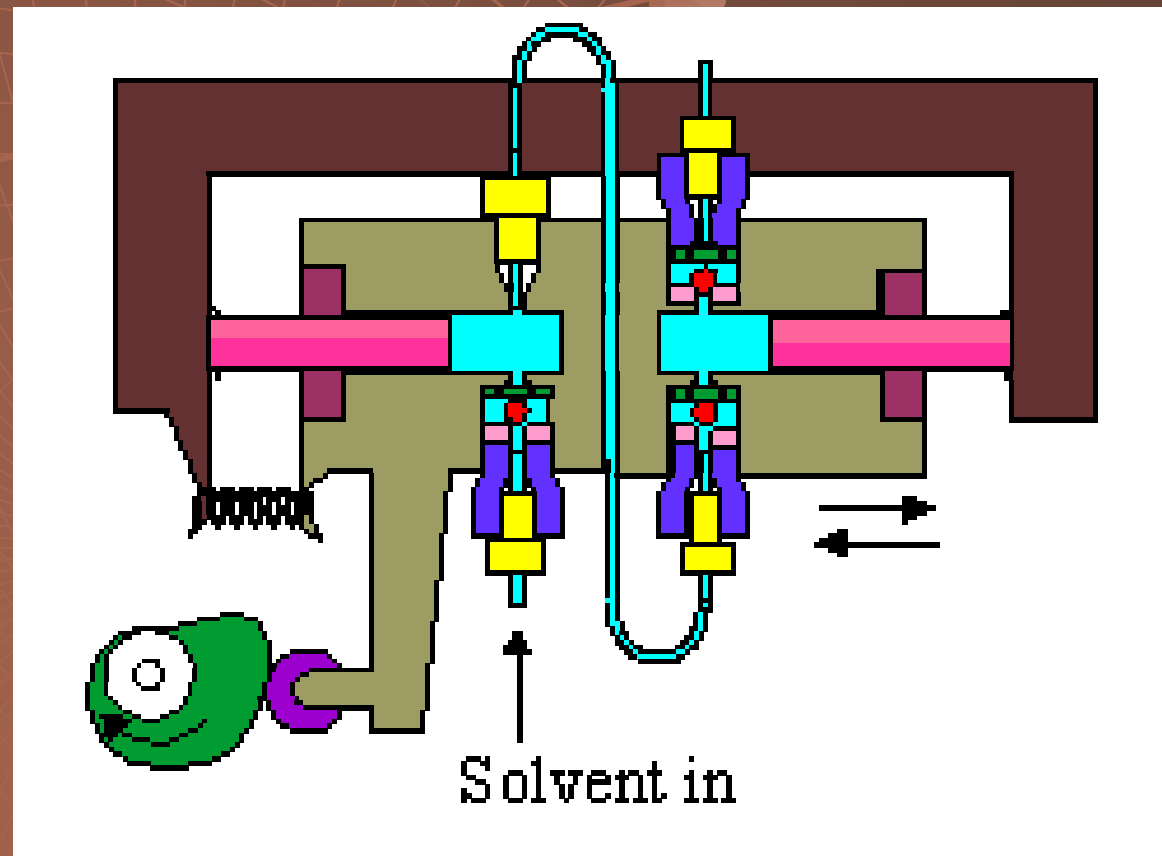
Pumpa dvoupístová



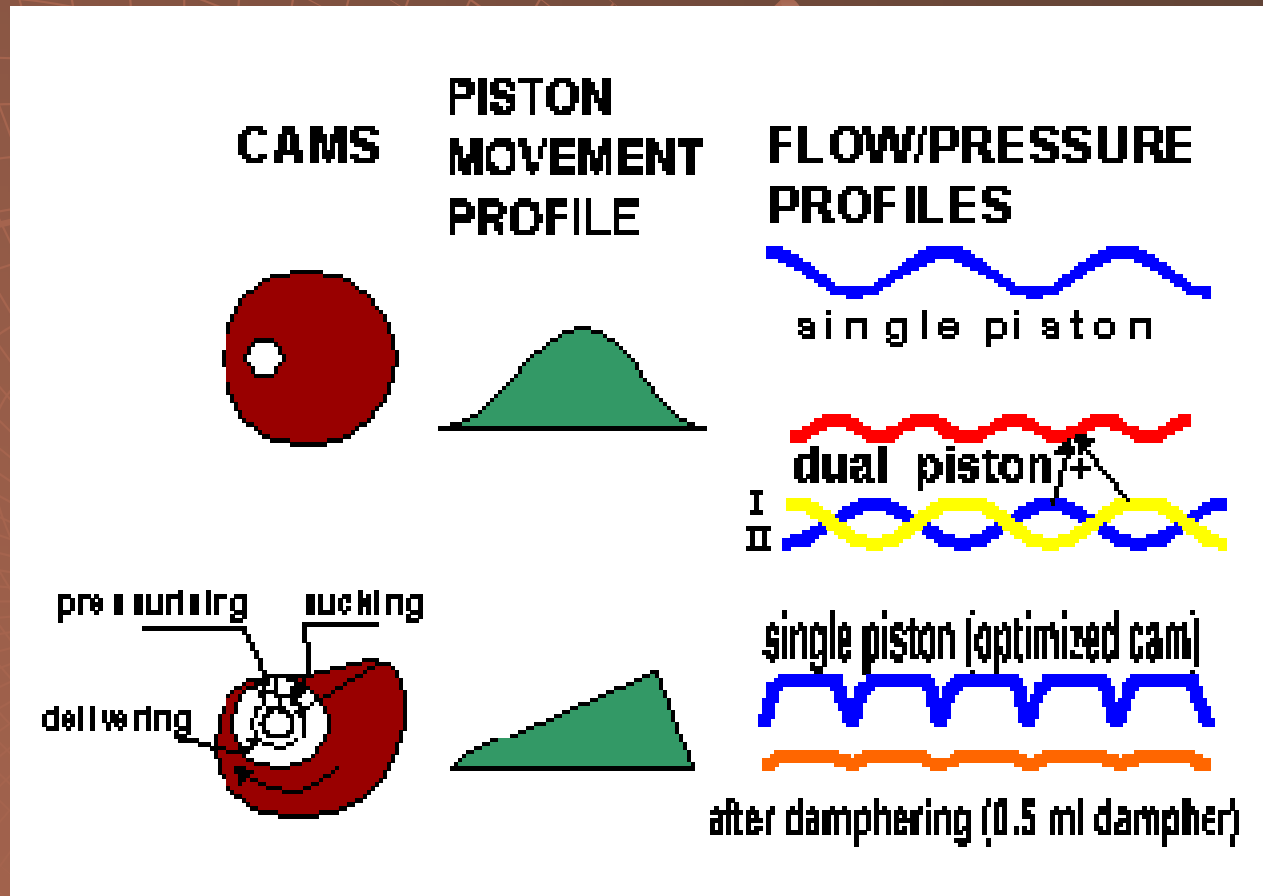
Pumpa dvoupístová



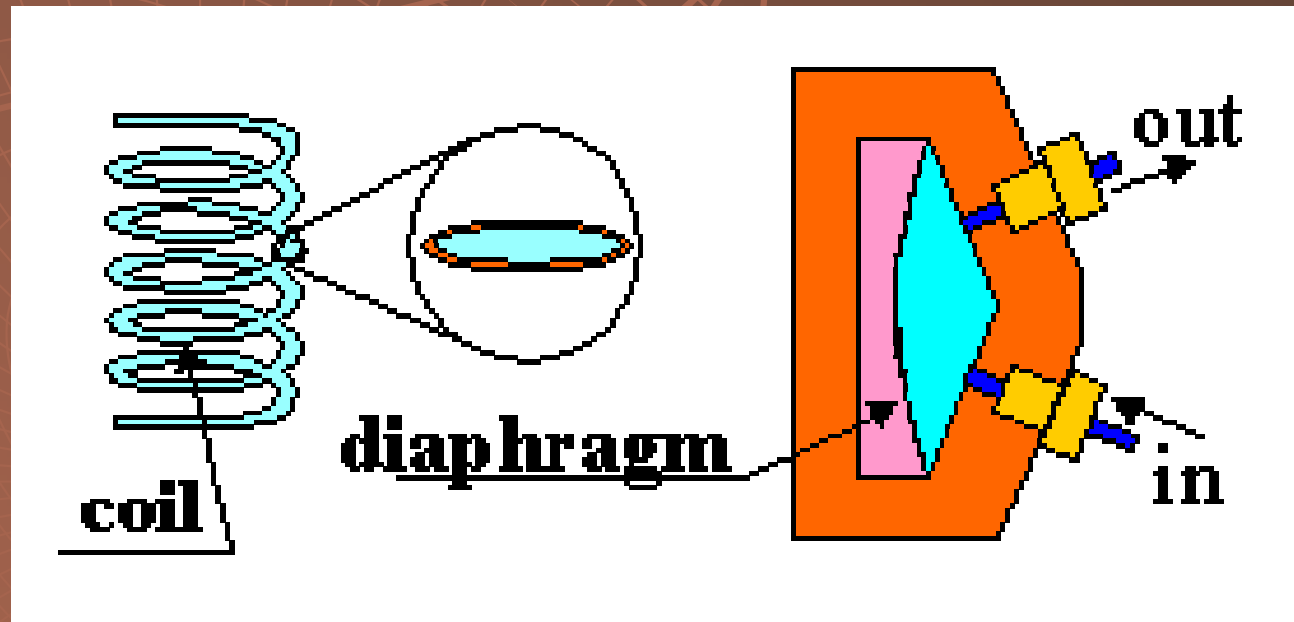
Pumpa dvoupístová



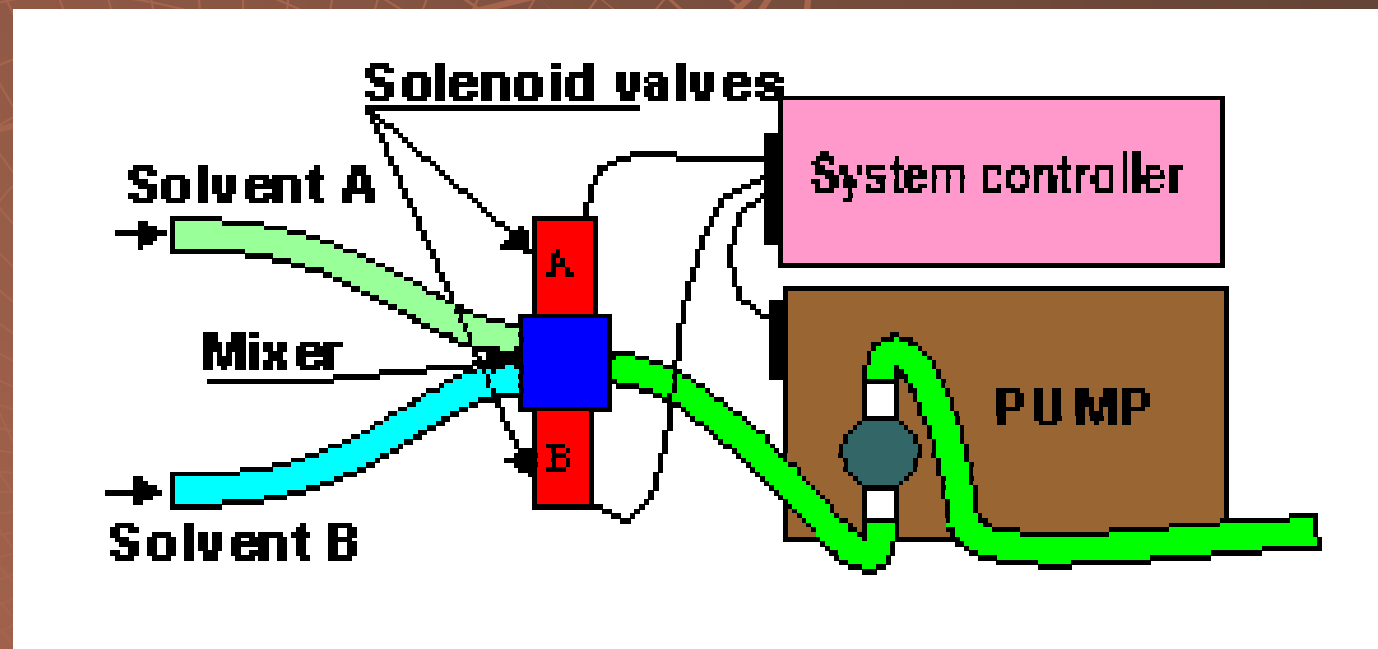
Tlumení pulsů



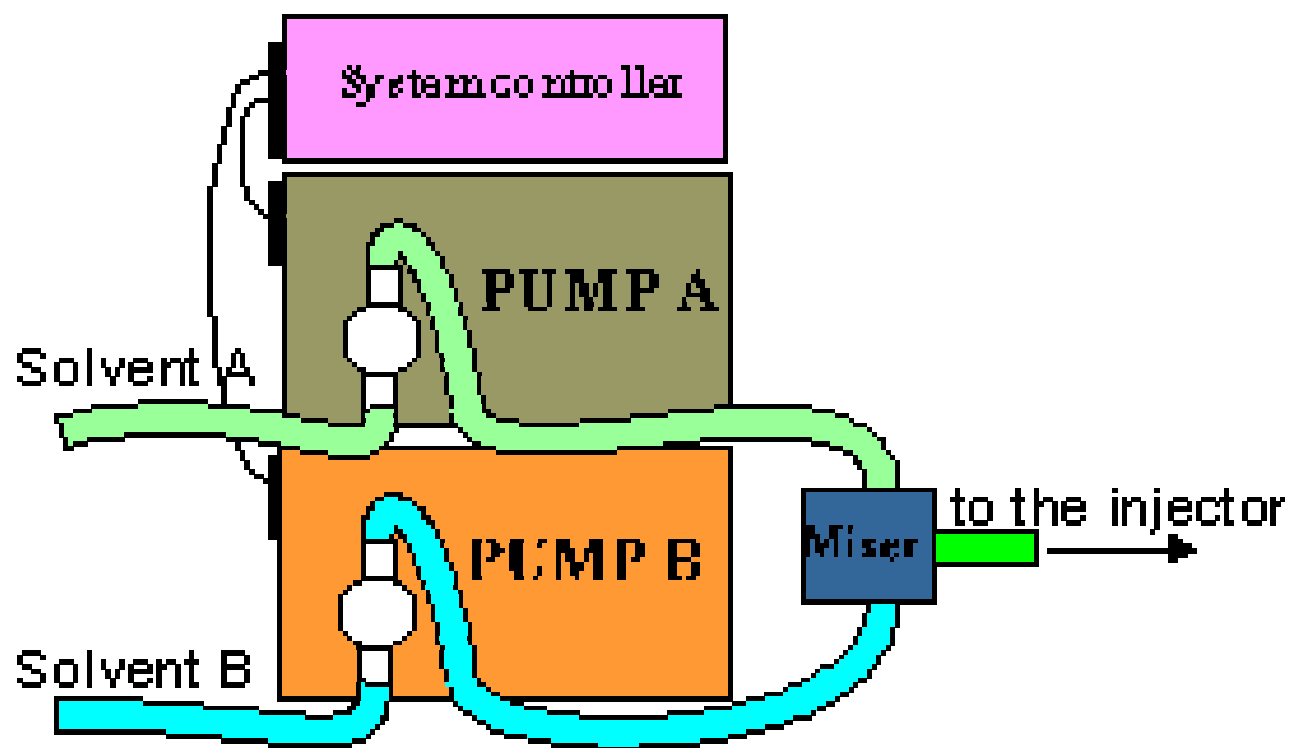
Tlumení pulsů



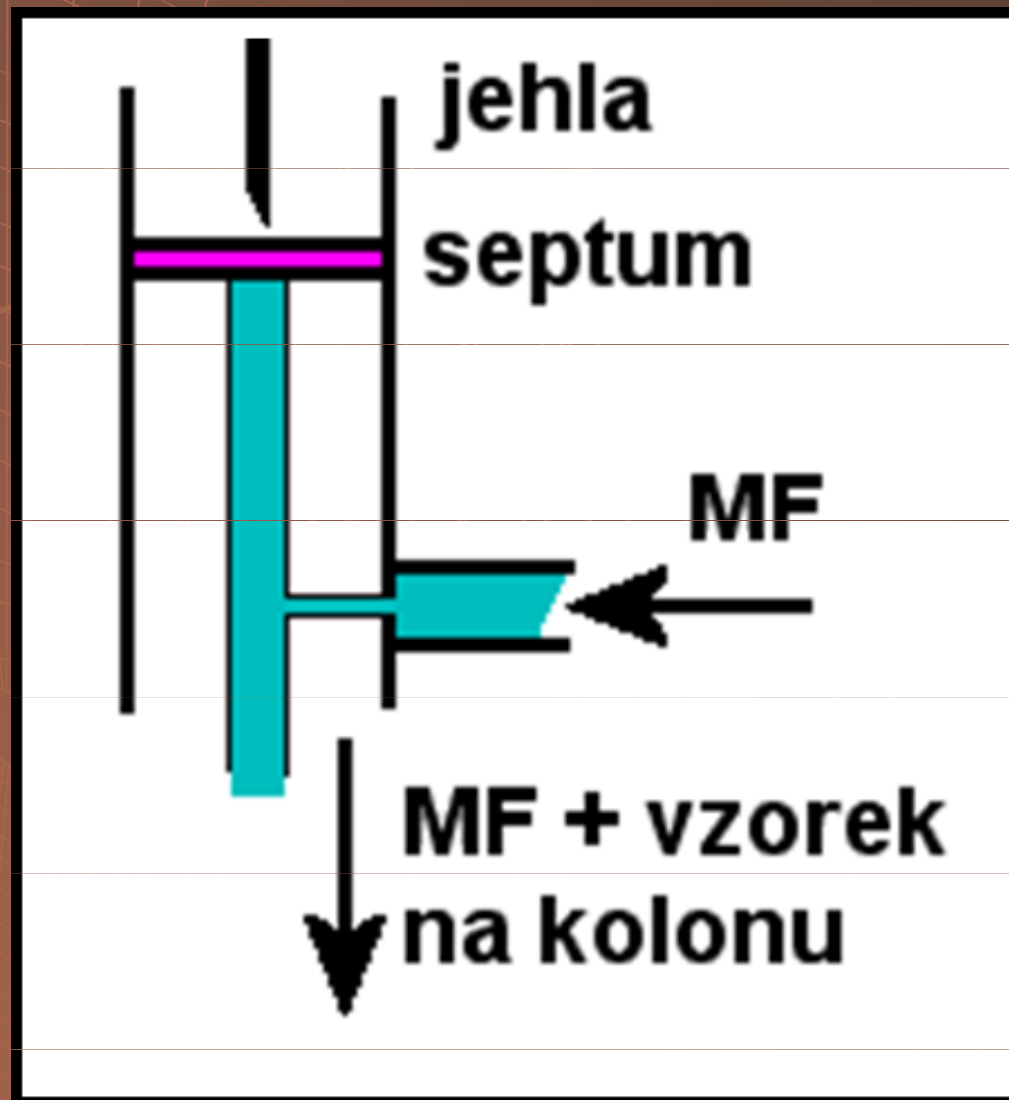
Gradient nízkotlaký



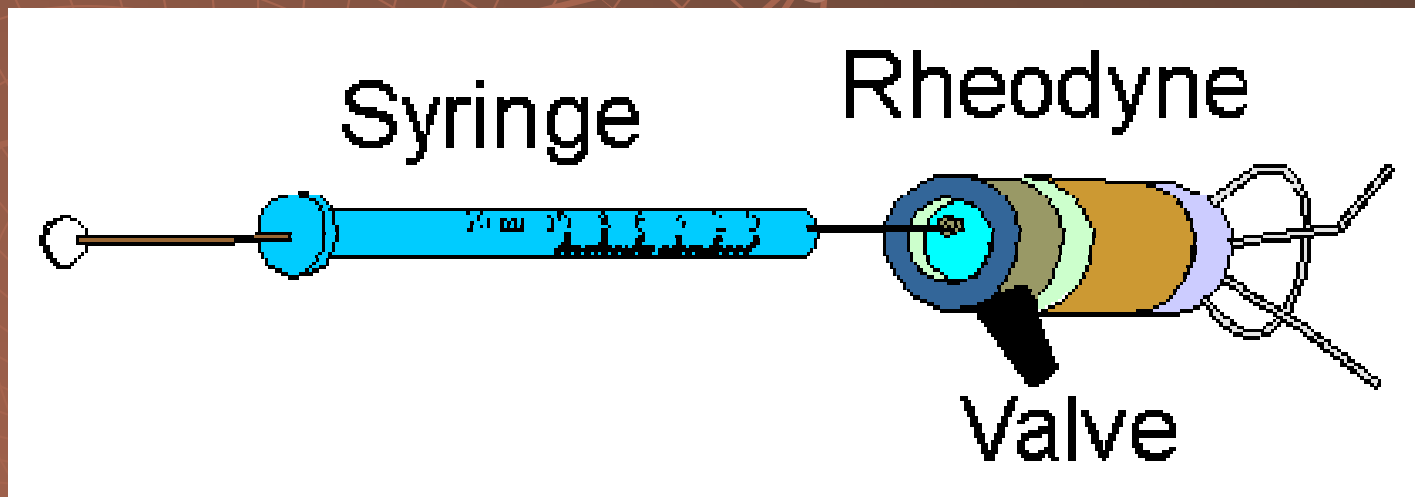
Gradient vysokotlaký



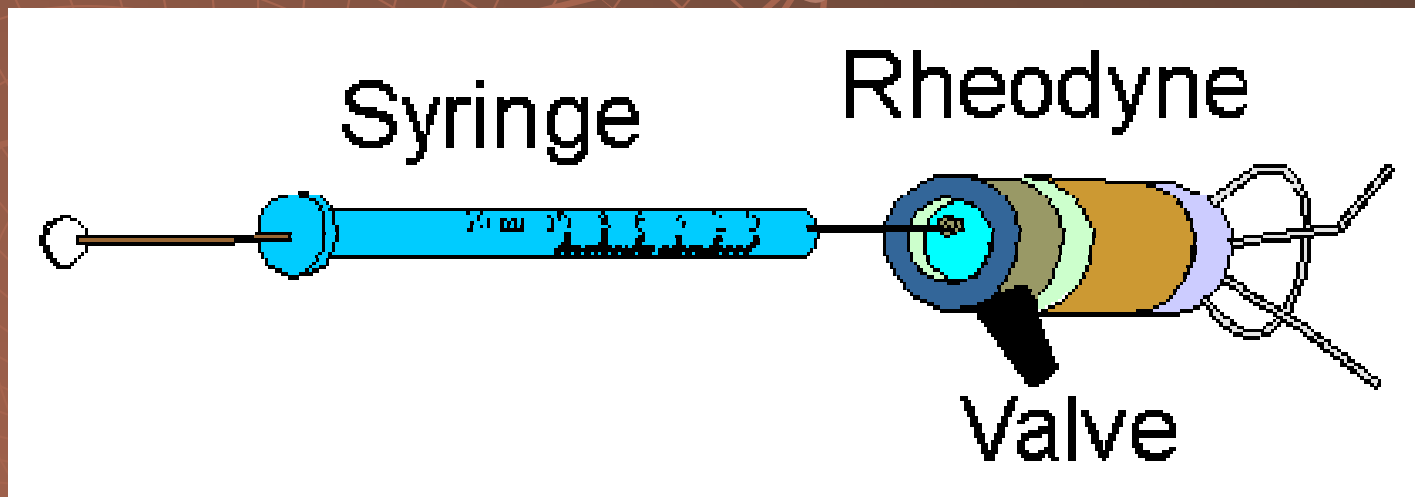
Dávkování – septum



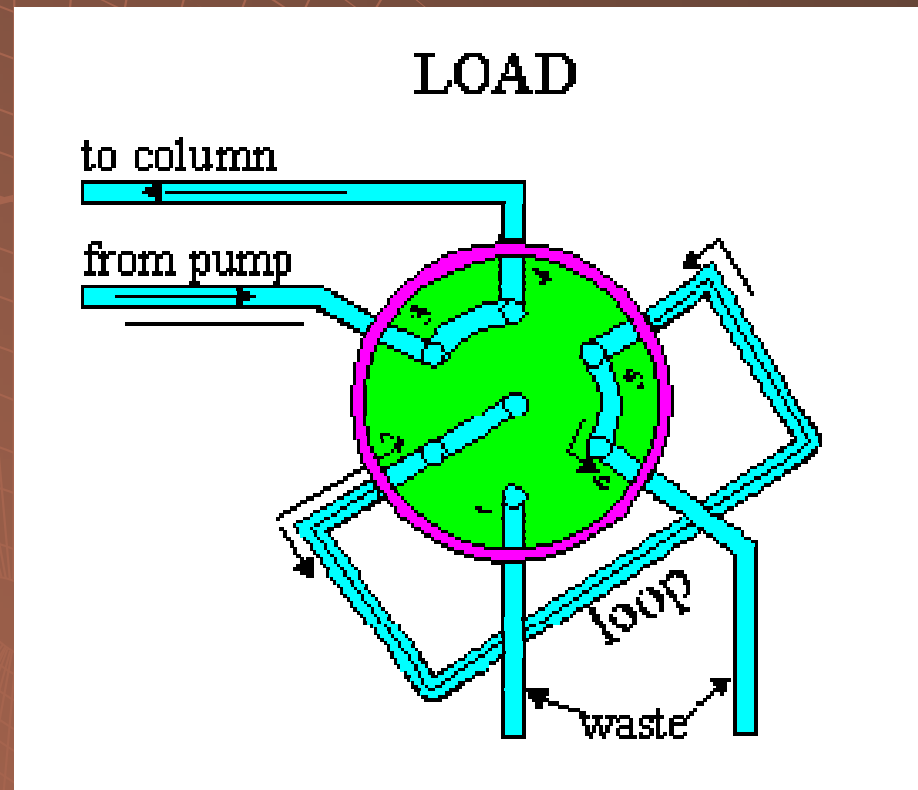
Dávkování – dávkovací ventil



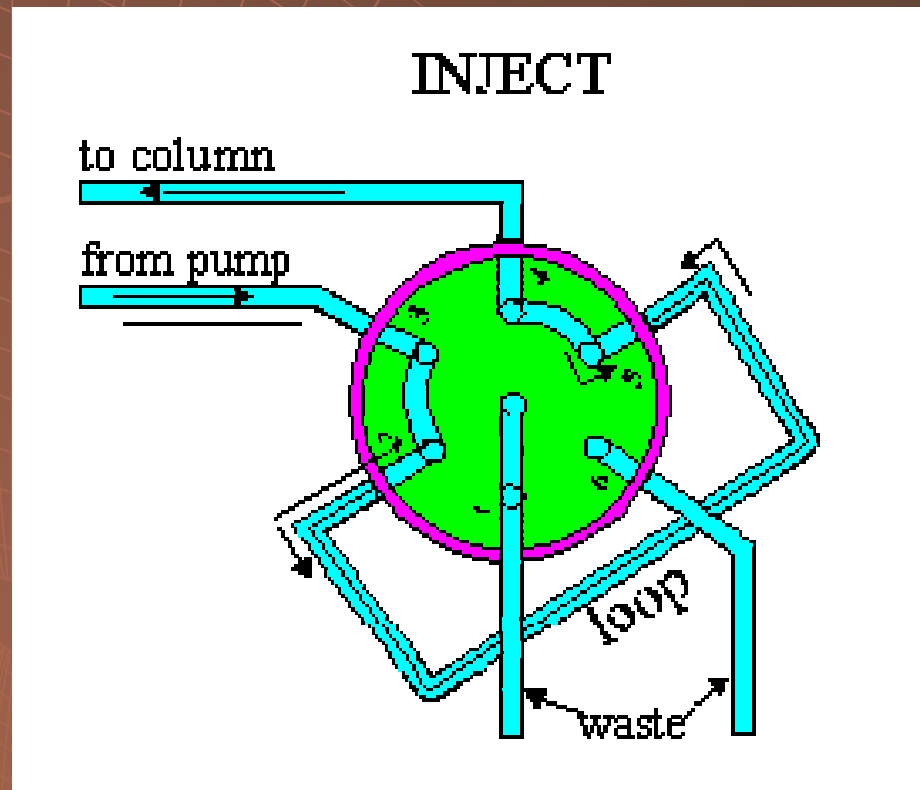
Dávkování – dávkovací ventil



Dávkovací ventil – „Load“



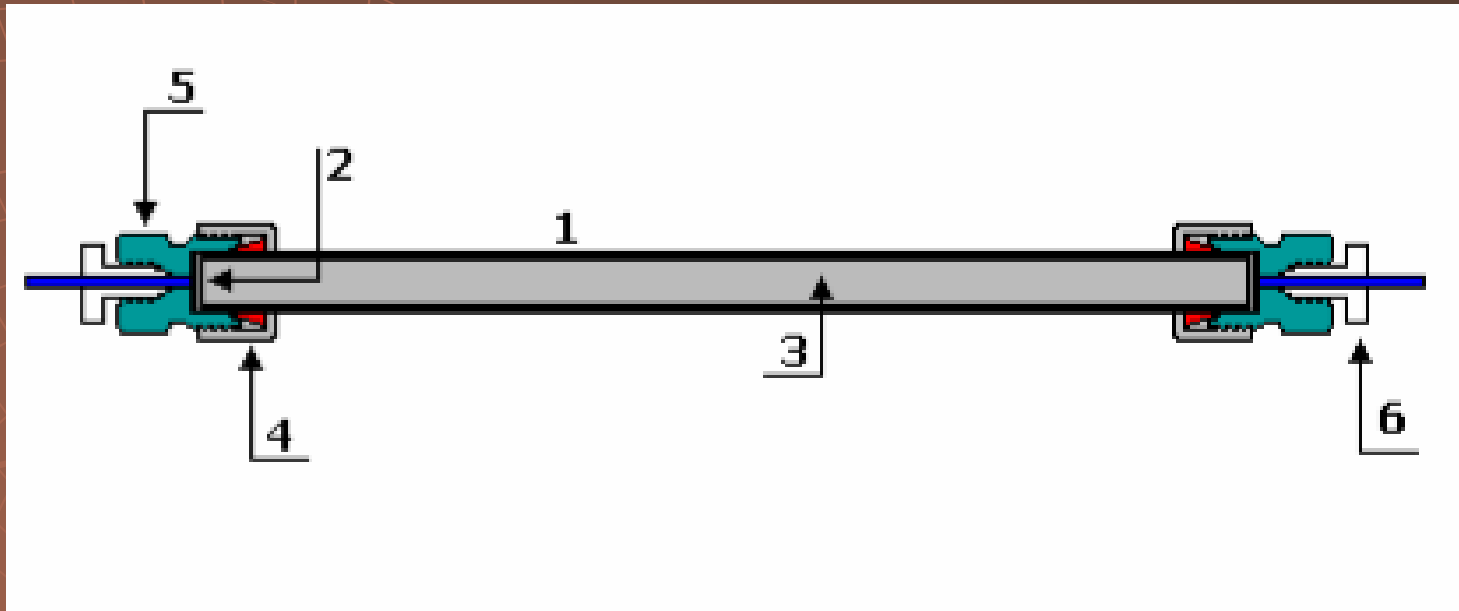
Dávkovací ventil – „Inject“



Kolony pro FPLC

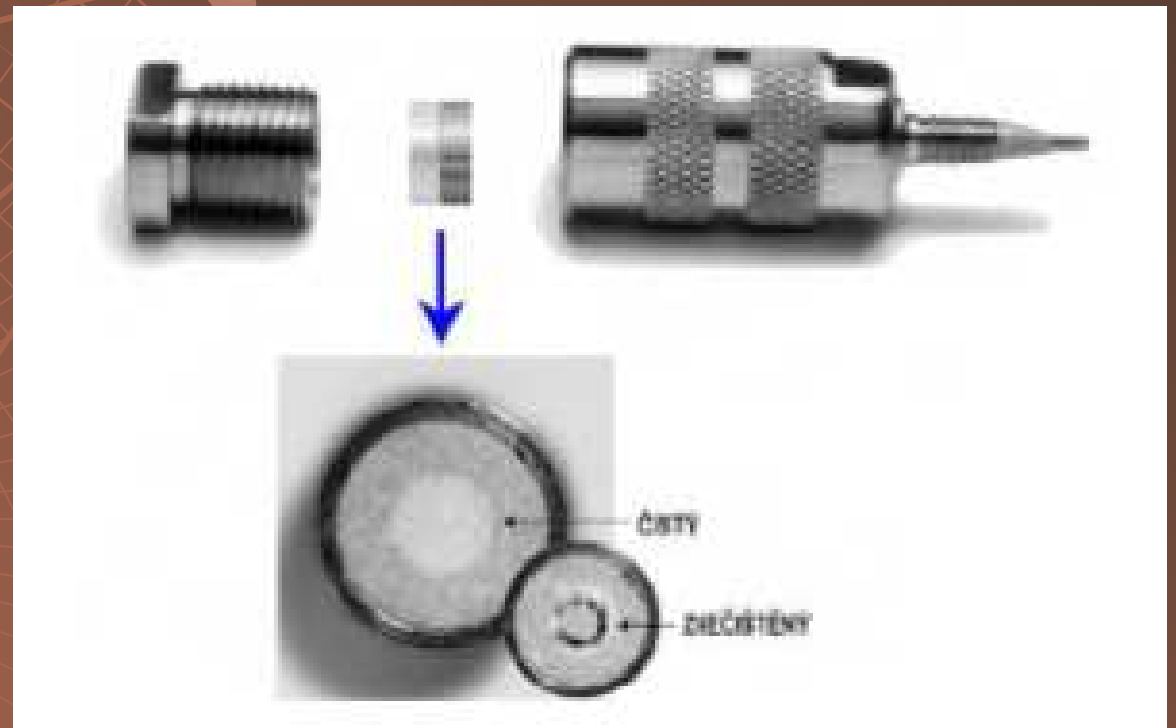


Kolona



1. kovový plášť
2. Porézní kovová fritá
3. Stacionární fáze
4. Převlečný ochranný kroužek
5. Koncová hlavice
6. vstup pro kapiláru se šroubem

Předkolona



Kolony pro HPLC a UPLC



Kolony pro nano- a kapilární HPLC



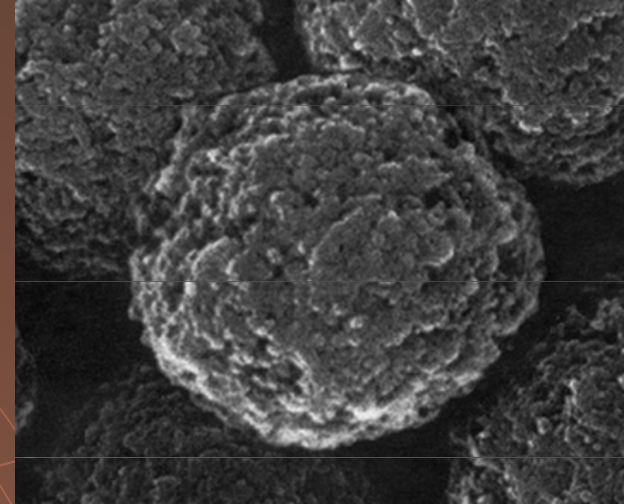
Částicový sorbent

tvar: sférický (bez povrchových vad)

rozměr pro kolony:

analytické 1 – 8 μm

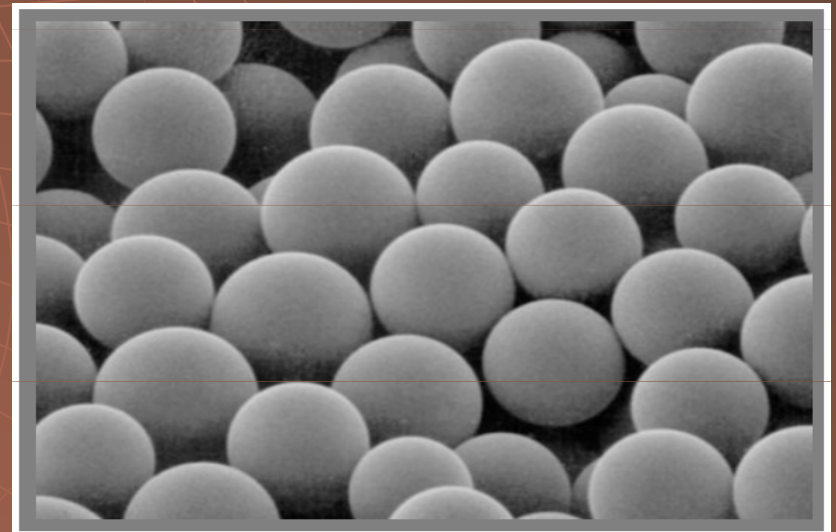
preparativní > 10 μm



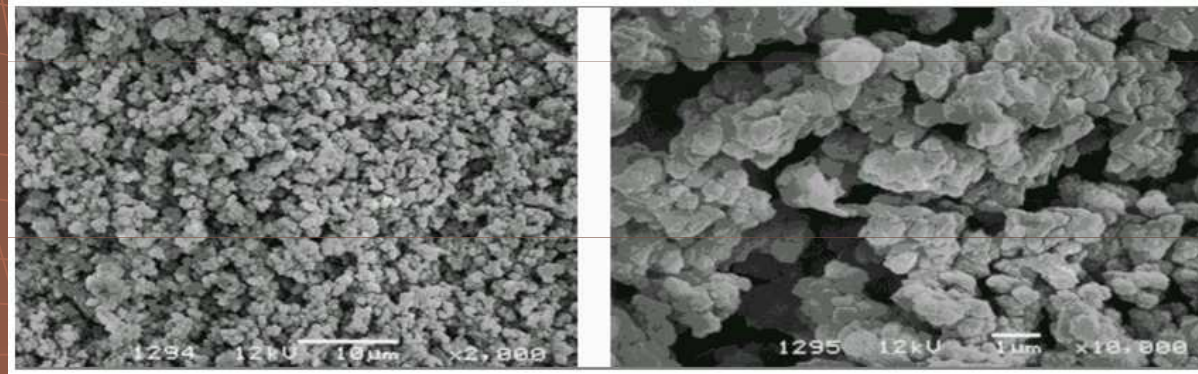
povrchové rozrůznění

póry

polymerní částice



Monolitický sorbent



makropóry: ~ 1500 nm; mezopóry: < 50 nm,
mikropóry < 2 nm

pórovitost monolitické stacionární fáze až 85 %;
oproti částicové s pórovitostí *max* 60 %

vysoké průtoky za nízkých tlaků;
velká efektivní plocha \Rightarrow rychlá separace:
vysoké rozlišení a vysoká kapacita

monomer + polymerační činidlo + porogen

ML-SF na bázi siliky

tetramethoxysilan (TMOS)

tetraethoxysilan (TEOS) + kyselina octová + polyethylenglykol (PEG)

ML-SF na bázi organických materiálů

styren-divinylbenzen (S-DVB)

metakryláty

vinyl-deriváty (vinylpyrrolidon, vinylacetát)

izooktan

tetrahydrofuran

dekanol

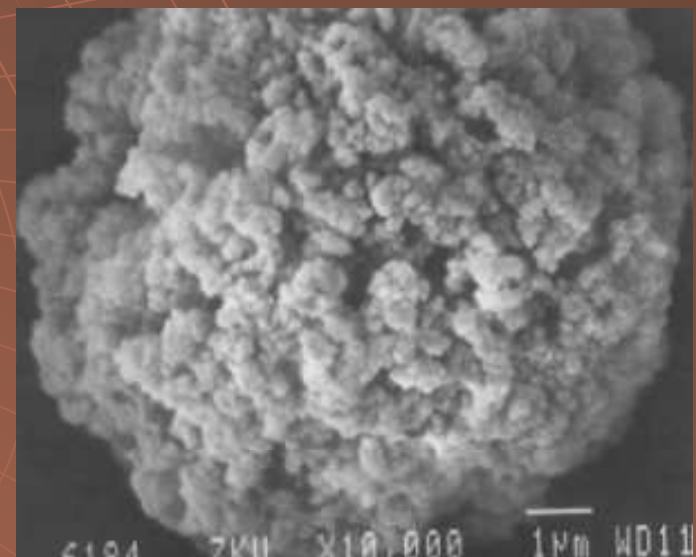
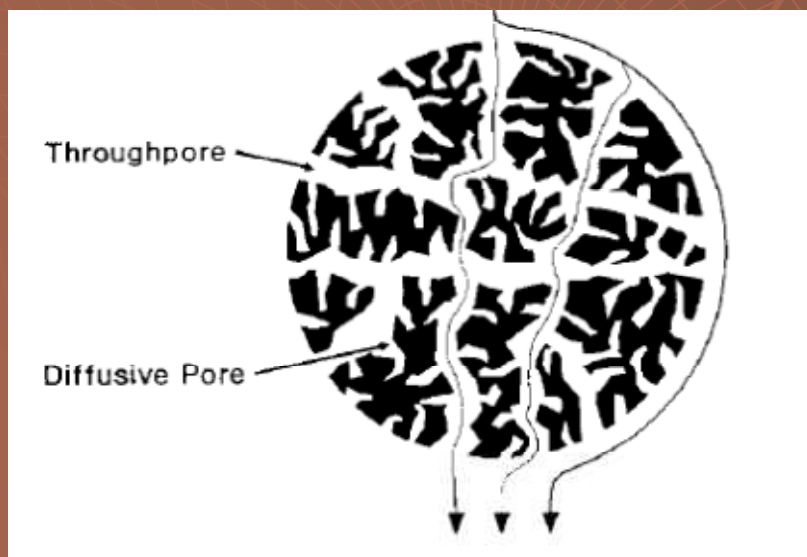
nevýhoda: obtížná výroba

provedení: disk, trubička, plněná kapilára

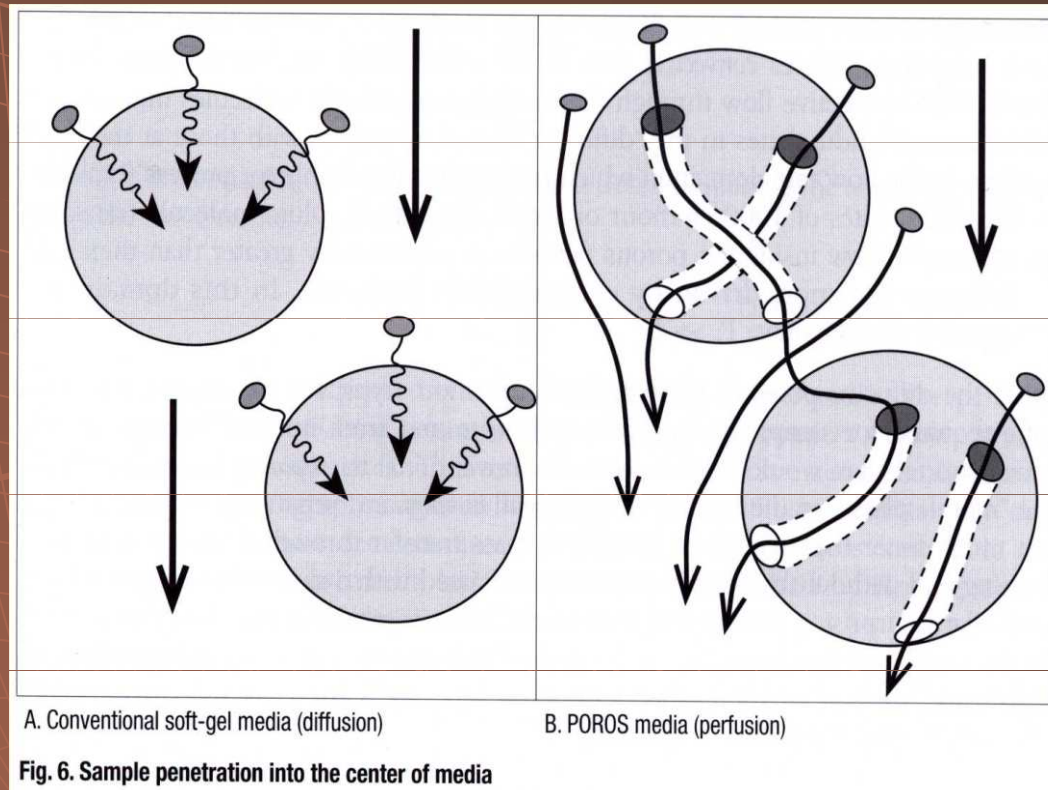


Perfúzní chromatografie

- ◆ Využívá médií - **POROS média**, jejichž částice (10, 20, 50 μm) mají velké příčné póry - 600 - 800 nm. Molekuly biopolymerů unášené **konvektivním prouděním** mobilní fáze se těmito póry lehce dostávají do nitra částic. Příčné póry jsou navíc vzájemně propojeny krátkými “difuzními” póry - 50 – 150 nm. Vytváří se tak síťová struktura s rozsáhlým vnitřním prostorem pro interakci nosiče s biopolymerem.



Perfúzní chromatografie - princip



Průtokem mobilní fáze vytváří napříč každou částicí média rozdíl tlaku, který indukuje **konvektivní tok příčnými póry (perfúze)**. Biomakromolekuly ve vzorku se tak dostávají do kontaktu jak s povrchem částic, tak i s vazebnými místy v jejich nitru.

Perfúzní chromatografie

K efektu perfúze dochází jen při určité průtokové rychlosti. Moderní HPLC a FPLC systémy mohou zajistit podmínky perfúze pouze u malých analytických POROS kolon (4.6 x 100 mm, objem 1.7 ml, při průtokové rychlosti kolem 10 ml.min⁻¹).

- ◆ Výhody ve srovnání s chromatografií konvenční:
 - Kapacita je vysoká, nezávisí na průtokové rychlosti.
 - Rozlišení je vysoké, nezávisí na průtokové rychlosti.
 - Rychlost separace je obvykle 10 - 100x větší než u konvenčních médií, řádově se pohybuje v minutách.

Perfúzní chromatografie - princip

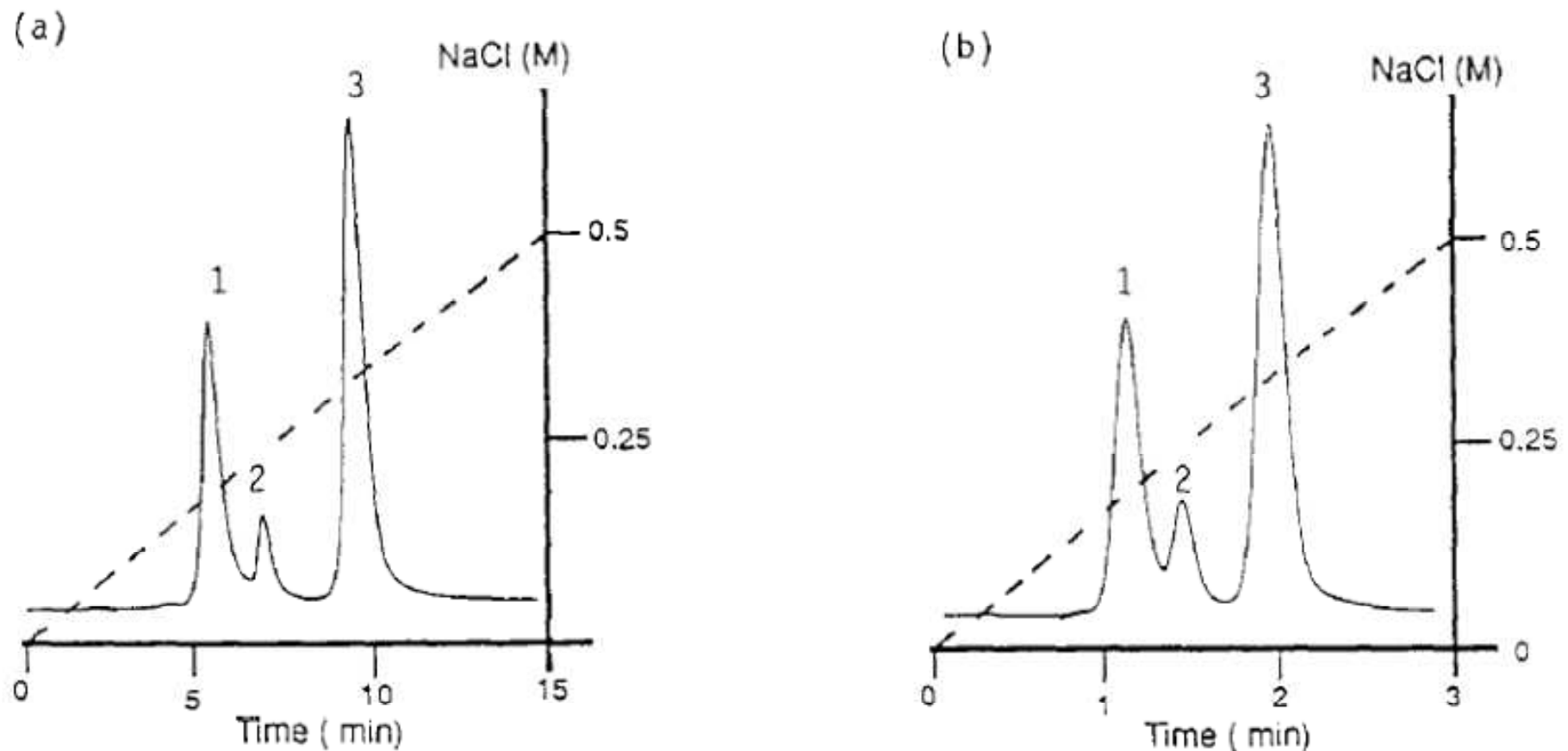
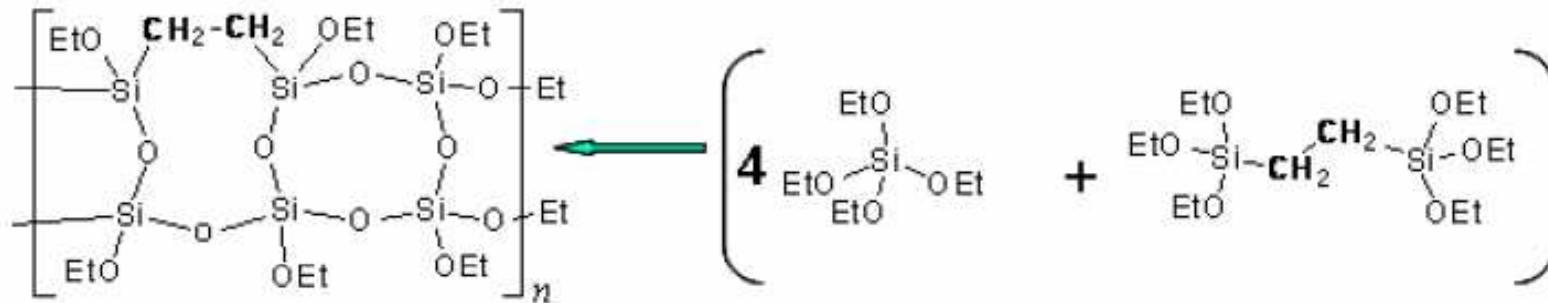


Fig. 14. Separation of model proteins on POROS S/M; 75 μg load of a protein mixture containing chymotrypsin (1), cytochrome *c* (2), and lysozyme (3); detection at 280 nm; column, 100 \times 4.6 mm I.D.; 20 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid buffer, pH 6.0; detection at 280 nm. (a) 1 ml/min, 15-min gradient to 0.5 M NaCl; (b) 5 ml/min; 3-min gradient to 0.5 M NaCl.

UPLC stacionární fáze Waters

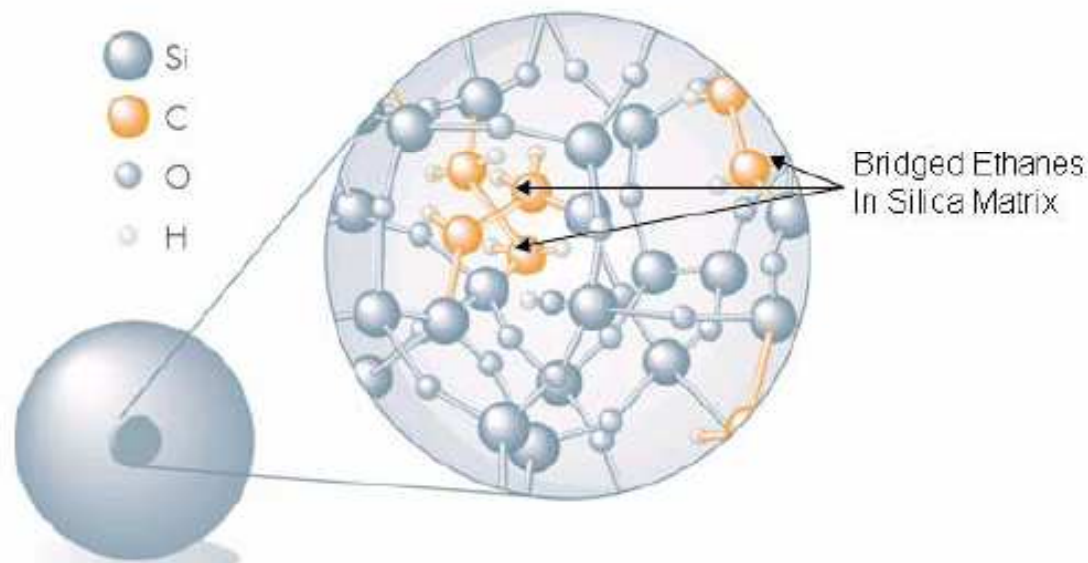
technologie "Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology"



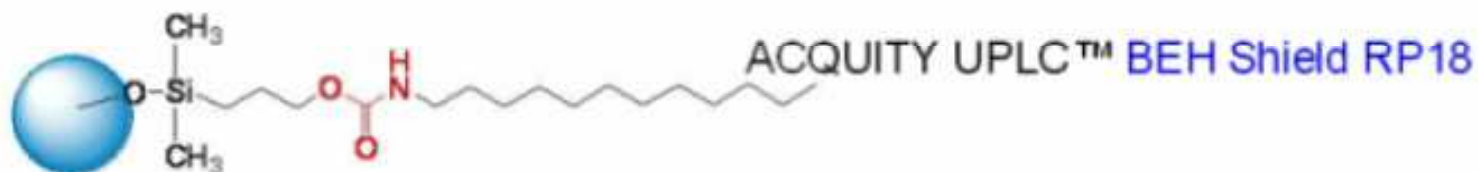
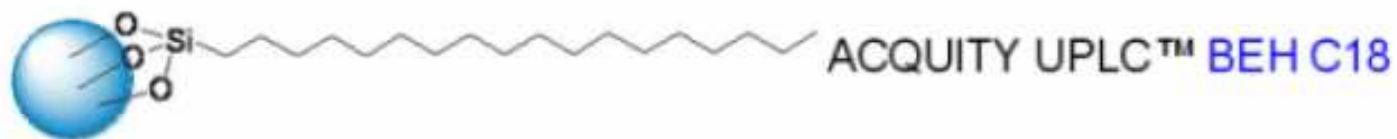
Polyethoxysilane (BPEOS)

Tetraethoxysilane (TEOS)

Bis(triethoxysilyl)ethane (BTEE)

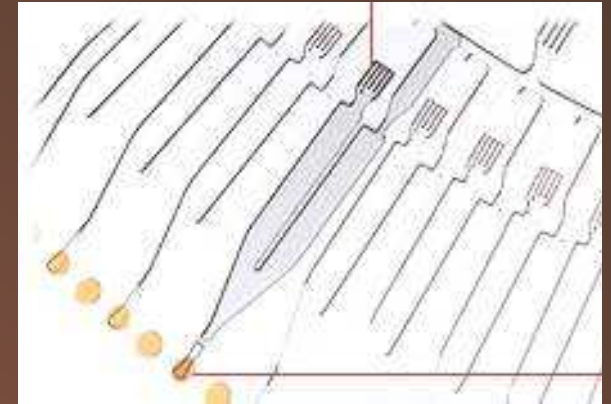
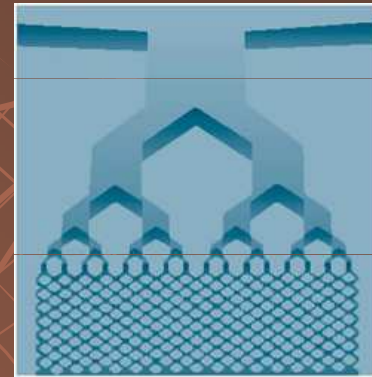
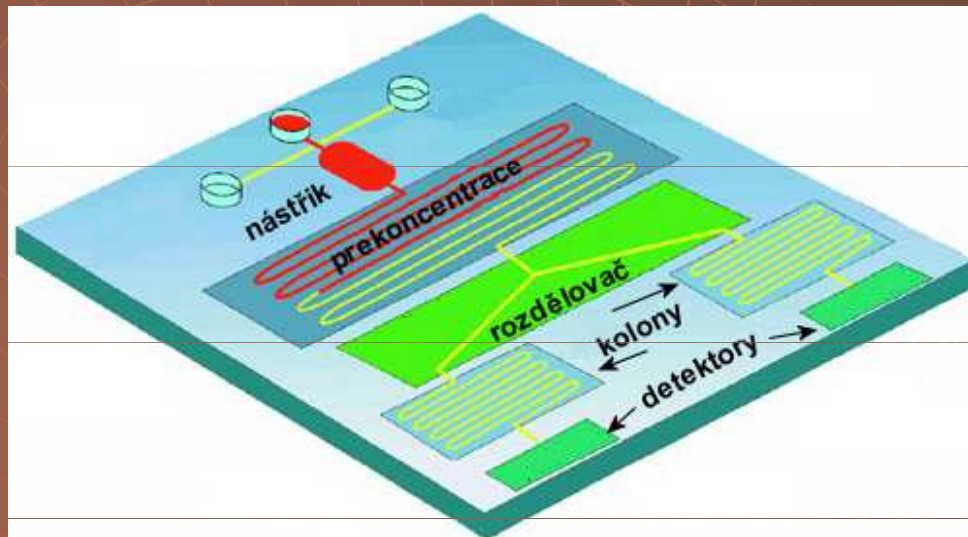


UPLC stacionární fáze Waters



Chipová chromatografie

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

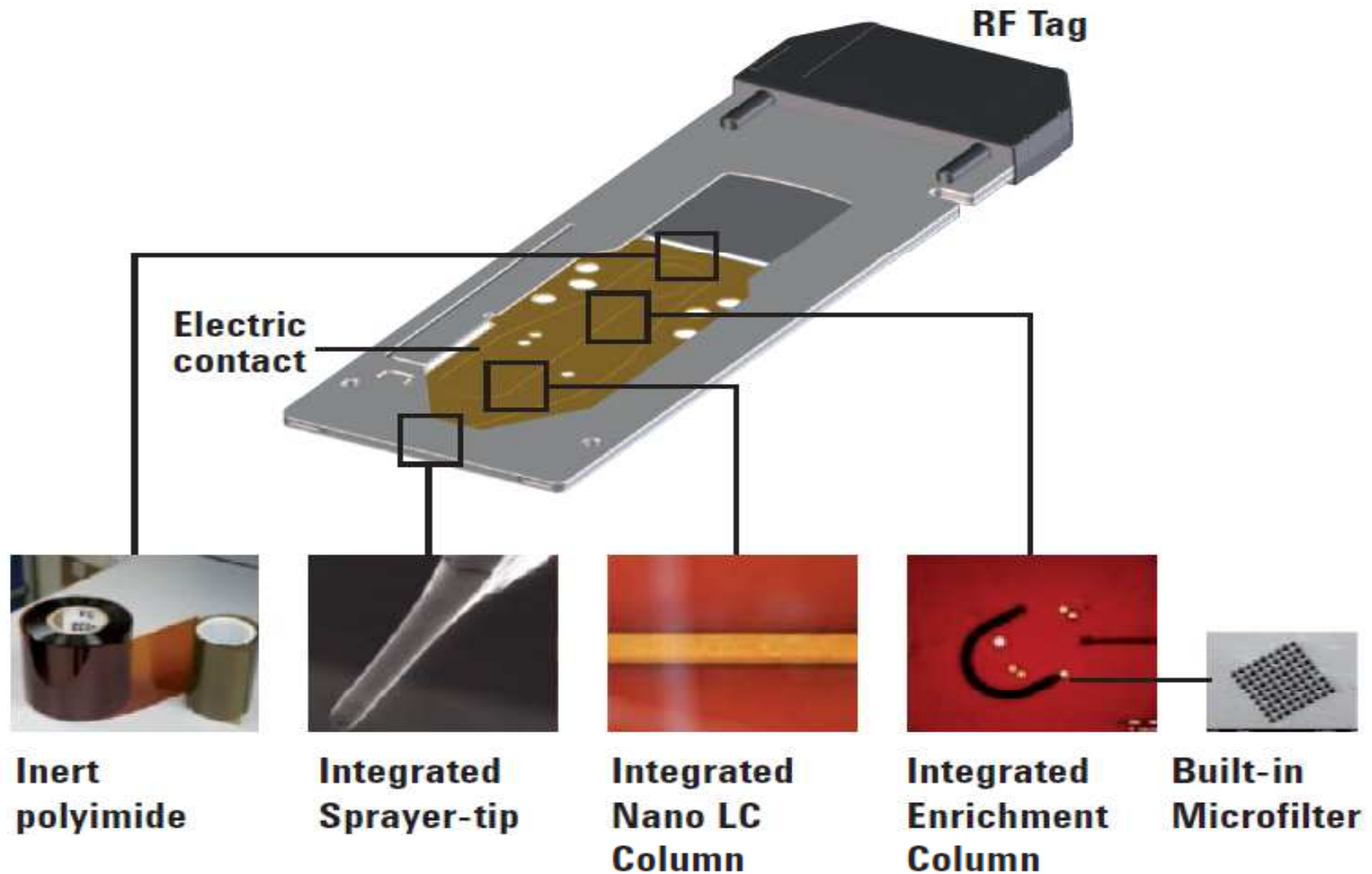


doprava MF: pumpa, odstředivá síla, el. staticky

výhody: rychlost analýzy, velikost,
malá spotřeba vzorku (< nl !)

nevýhody: práce s malými objemy
(povr. napětí, elektrostatické interakce)

Chipová chromatografie Agilent





Detektory

Detektory

| | RI | UV-VIS | IR | FLD | ECD | CONDUCT | CORONA | ELSD |
|---------------------------------|--|-----------------|-----------------|------------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| typ detektoru | nedeštruktivní | nedeštruktivní | nedeštruktivní | nedeštruktivní | deštruktivní | nedeštruktivní | deštruktivní | deštruktivní |
| odezva | univerzální | selektivní | selektivní | selektivní | selektivní | selektivní | selektivní | univerzální |
| měřená veličina | index lomu | absorbance | absorbance | intenzita fluorescence | elektrický proud | vodivost | elektrický proud | rozptyl světla |
| typická citlivost (hmotnost/ml) | μg | ng | μg | pg | pg | ng | ng | μg |
| lineární rozsah | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ² |
| závislost odezvy na průtoku | ano | ne | ne | ne | ano | ano | ano | ano |
| teplotní závislost | vysoká (10 ⁻⁴ jed. ind. lomu) | nížká | nížká | nížká | vysoká (1,5%) | vysoká (2,0%) | nížká | vysoká |
| gradientová eluce | ne | ano | ne | ano | ne | ano | ano | ano (částečně) |

Refraktometrický detektor

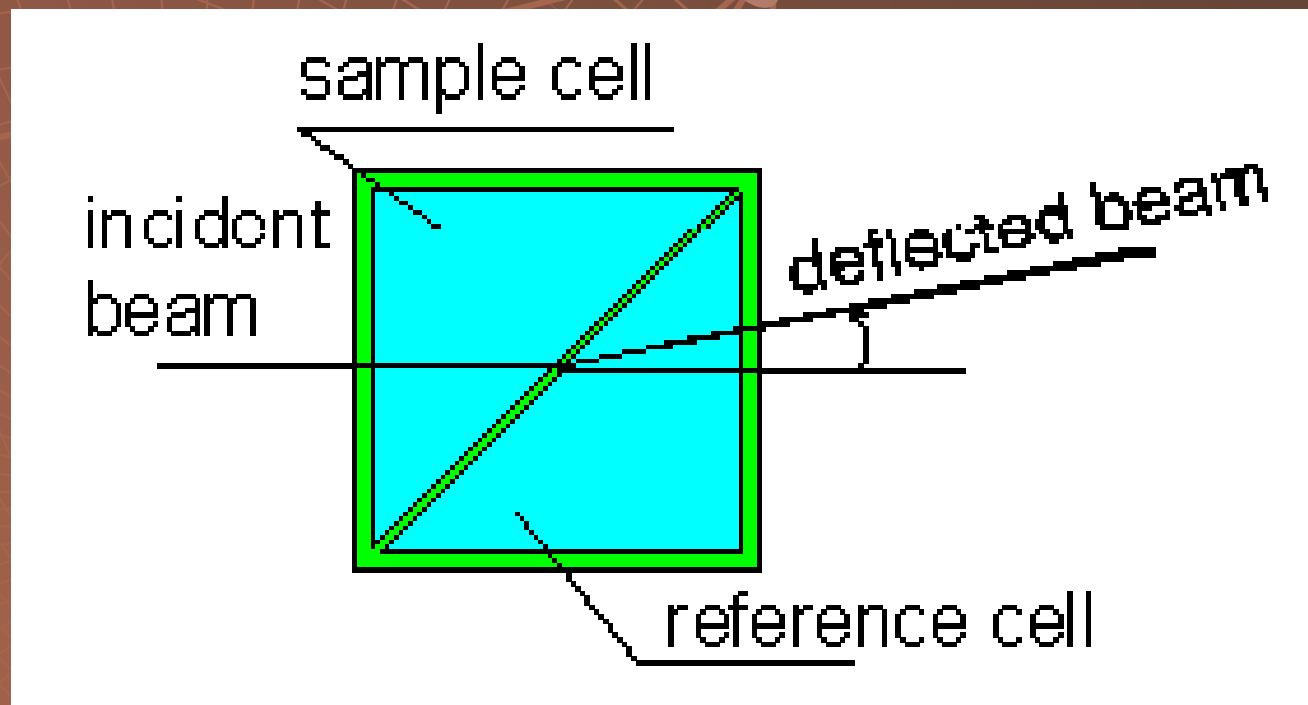
index lomu

šum 10^{-7}

dyn. rozsah 10^4

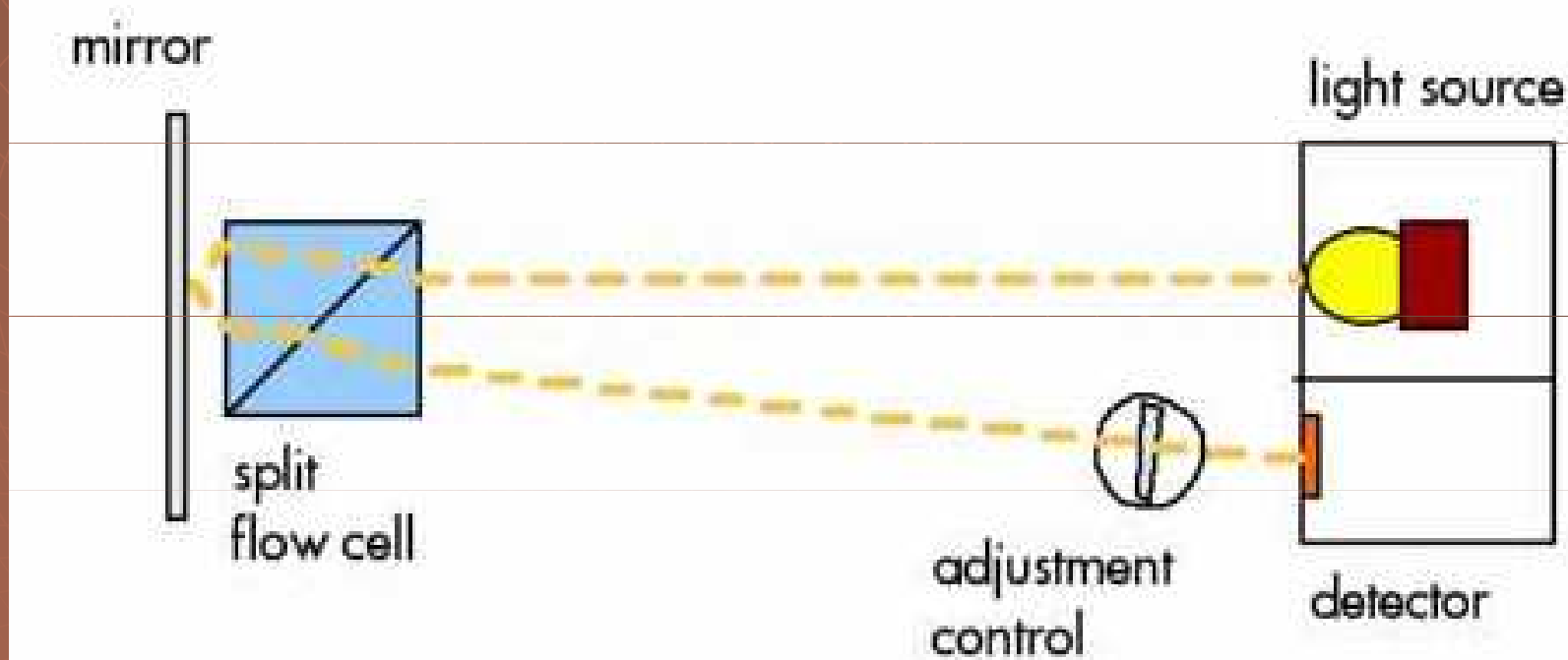
citlivost 10^{-7} g/ml

Refraktometrický detektor



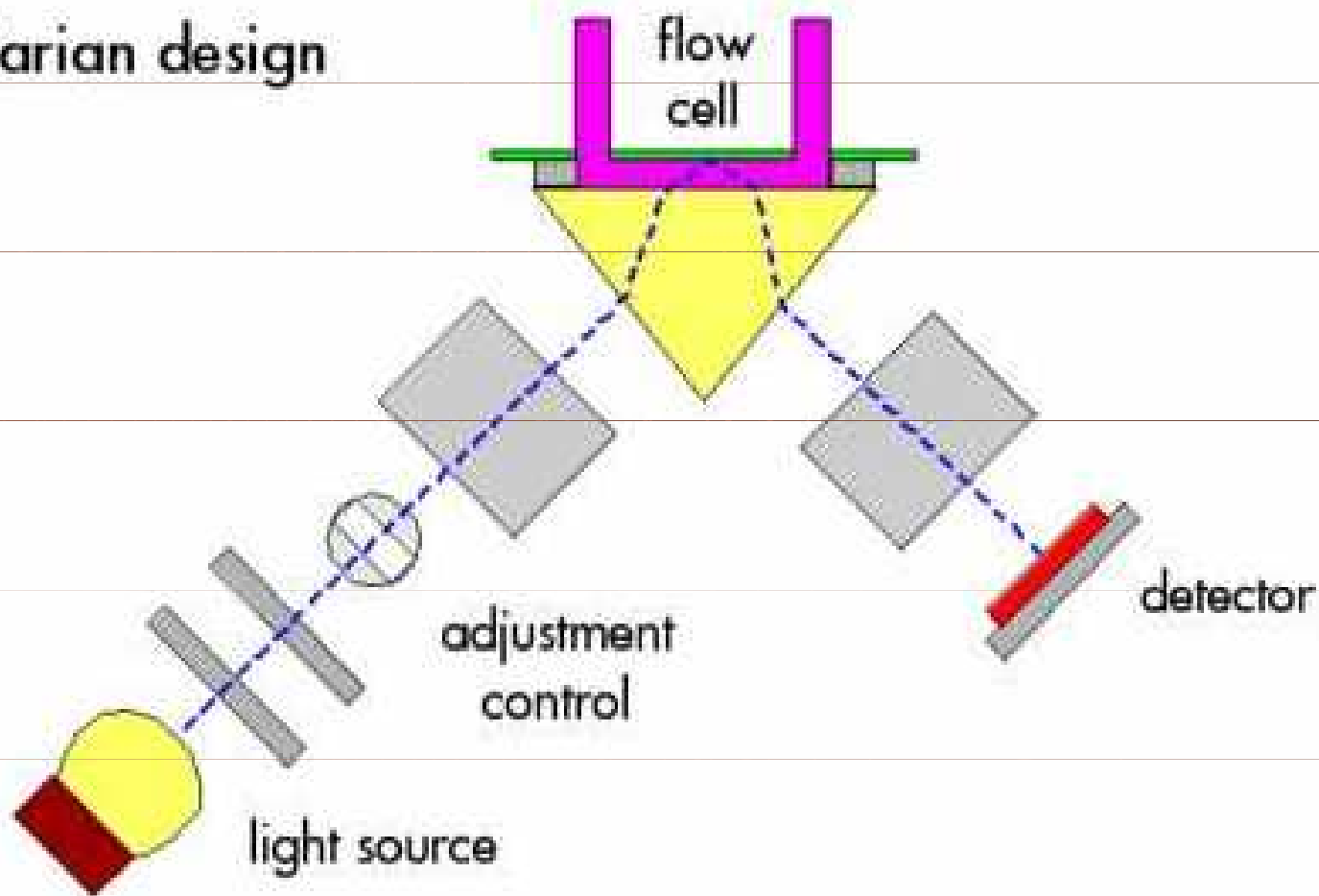
Refraktometrický detektor

Waters design



Refraktometrický detektor

Varian design



„Light scattering“ detektor

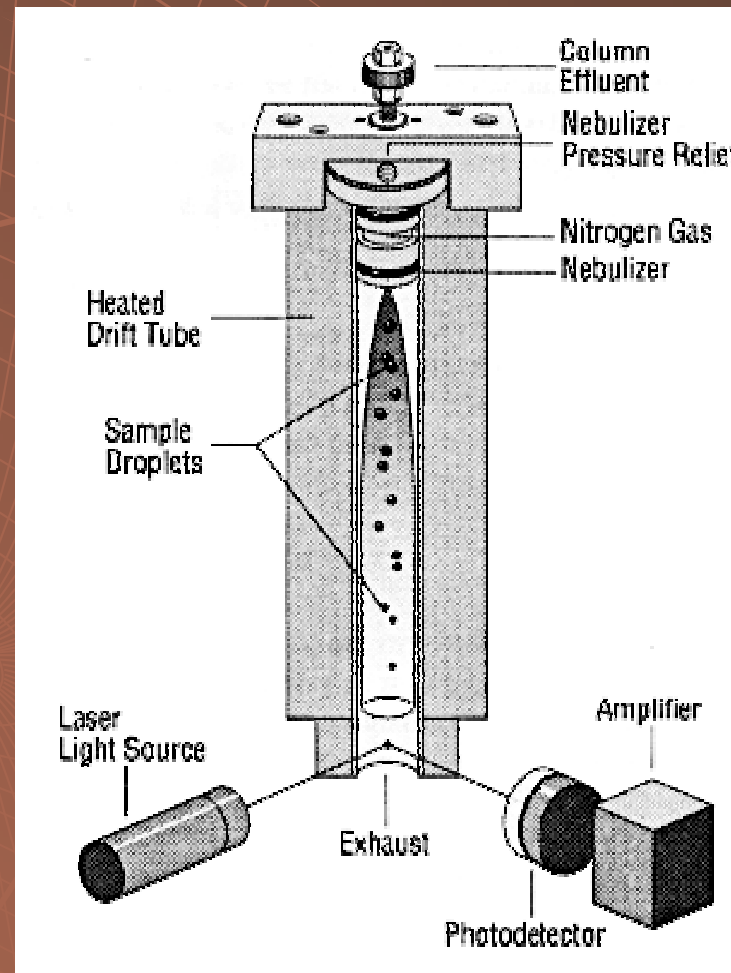
Rozptyl

šum 10^{-8}

dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-9} g/ml

„Light scattering“ detektor



UV – VIS detektor detekční cela

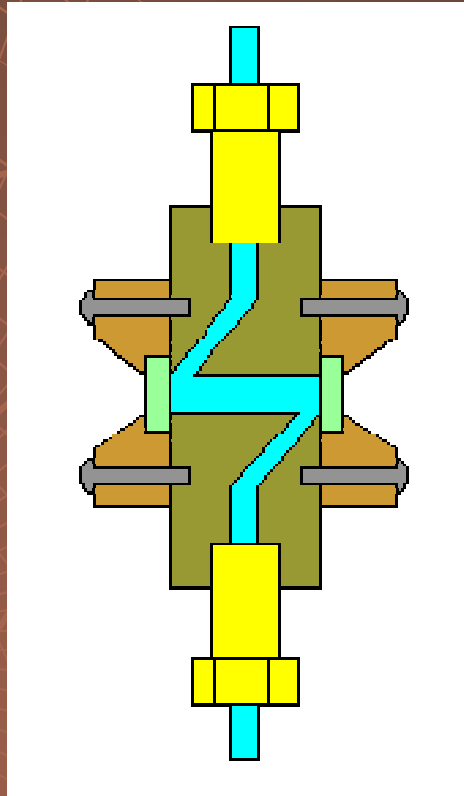
Absorbance

šum 10^{-4}

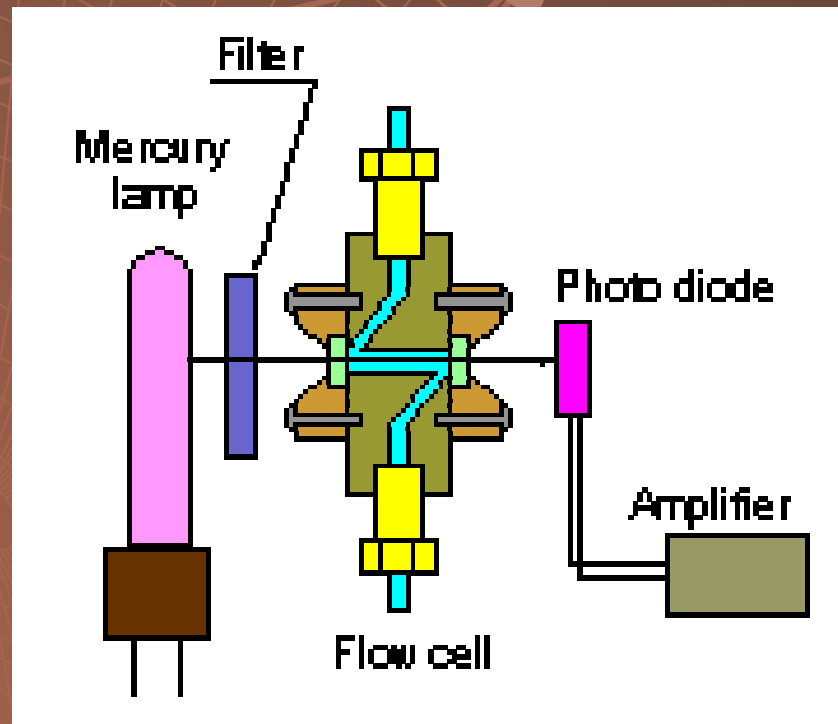
dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-10} g/ml

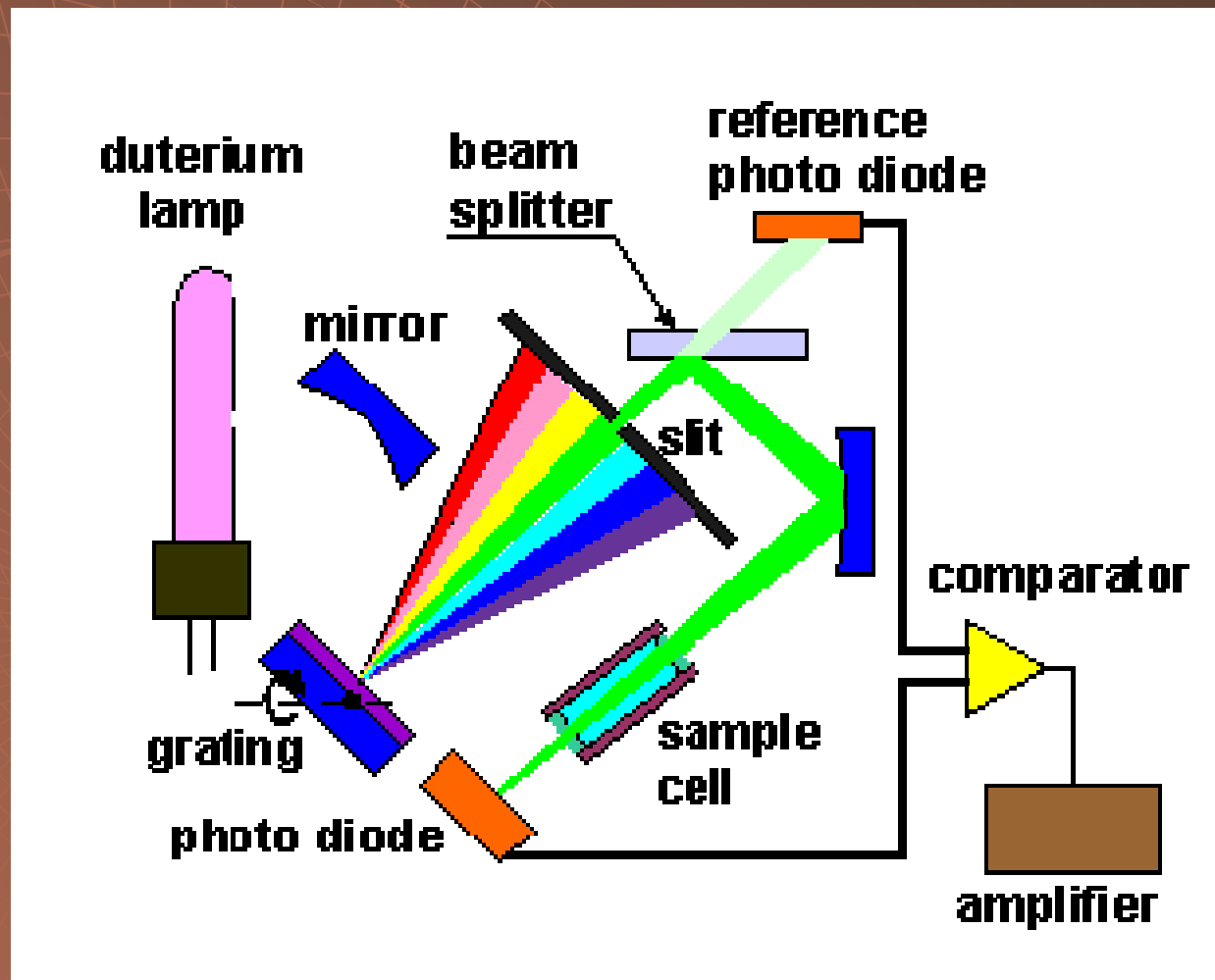
UV – VIS detektor detekční cela



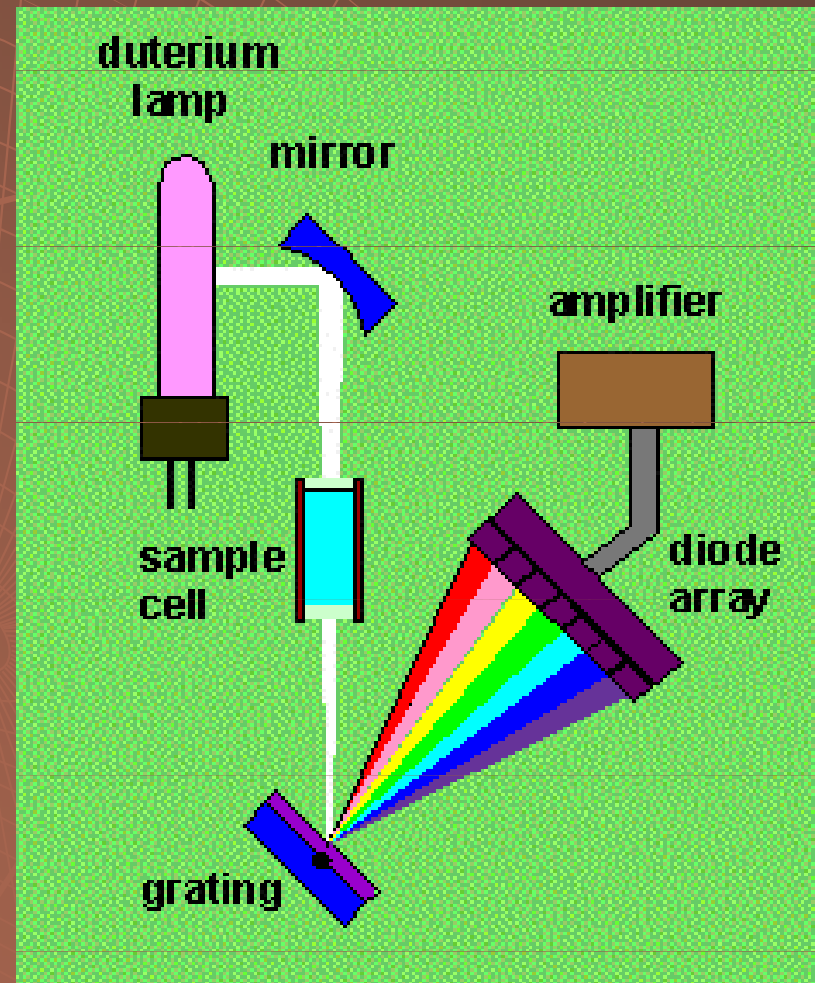
UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



UV – VIS detektor s diodovým polem

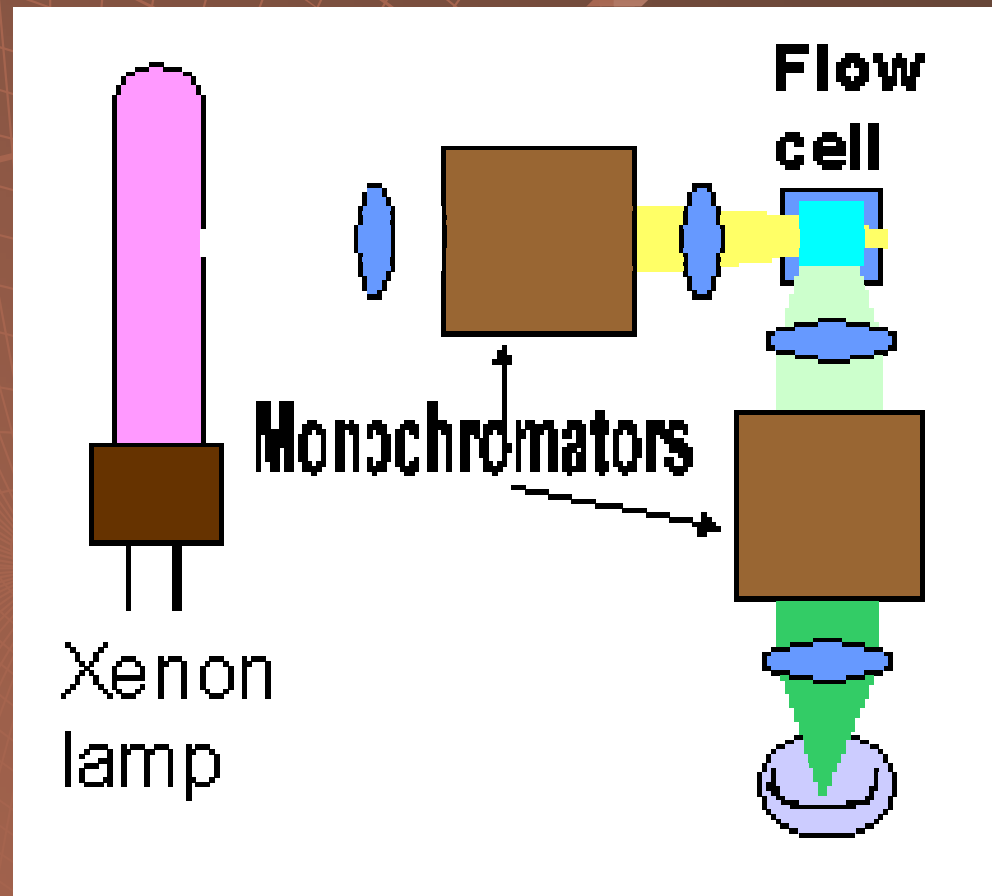


Fluorescenční detektor

Fluorescence

citlivost 10^{-9} g/ml

Fluorescenční detektor

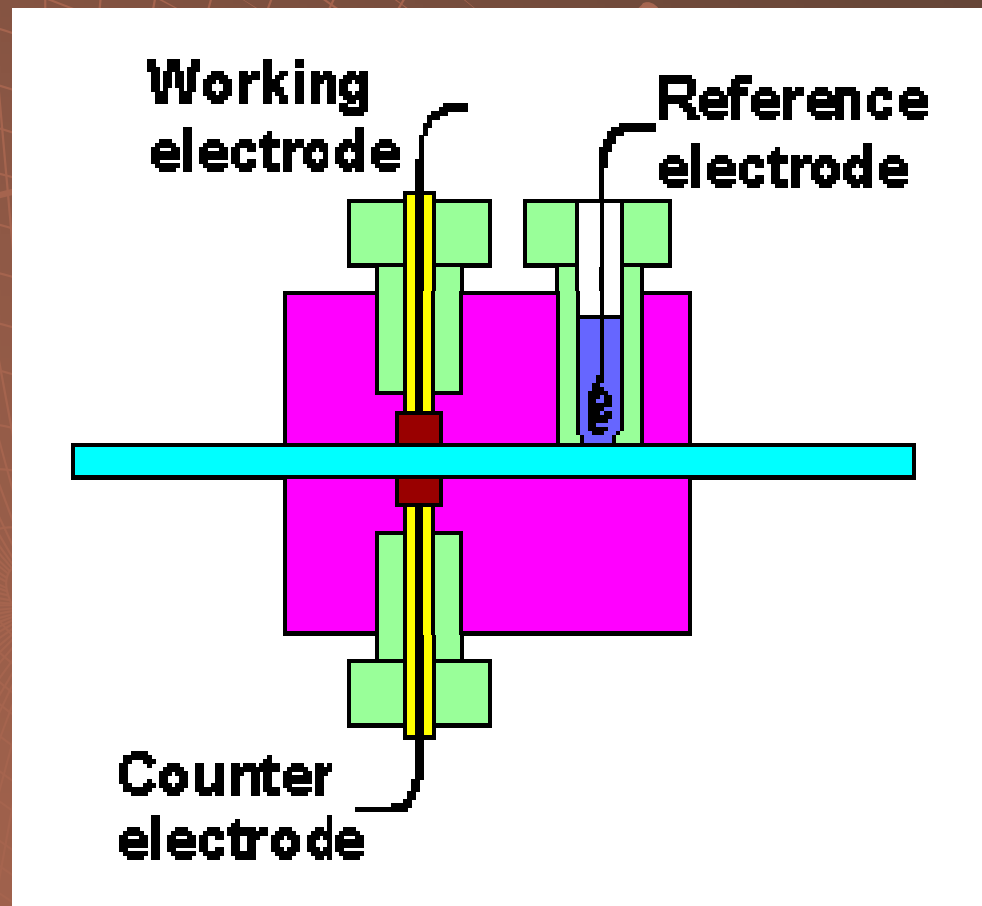


Elektrochemický detektor

elektrický proud

citlivost 10^{-9} g/ml

Elektrochemický detektor



Konduktometrický detektor

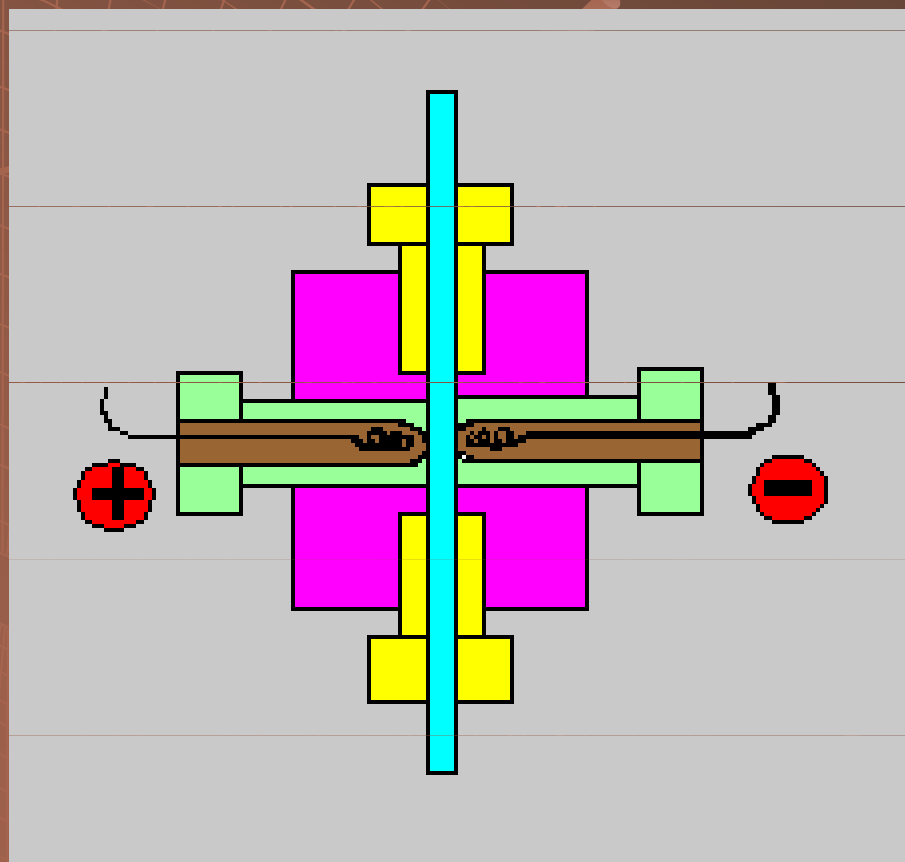
Vodivost

šum 10^{-3}

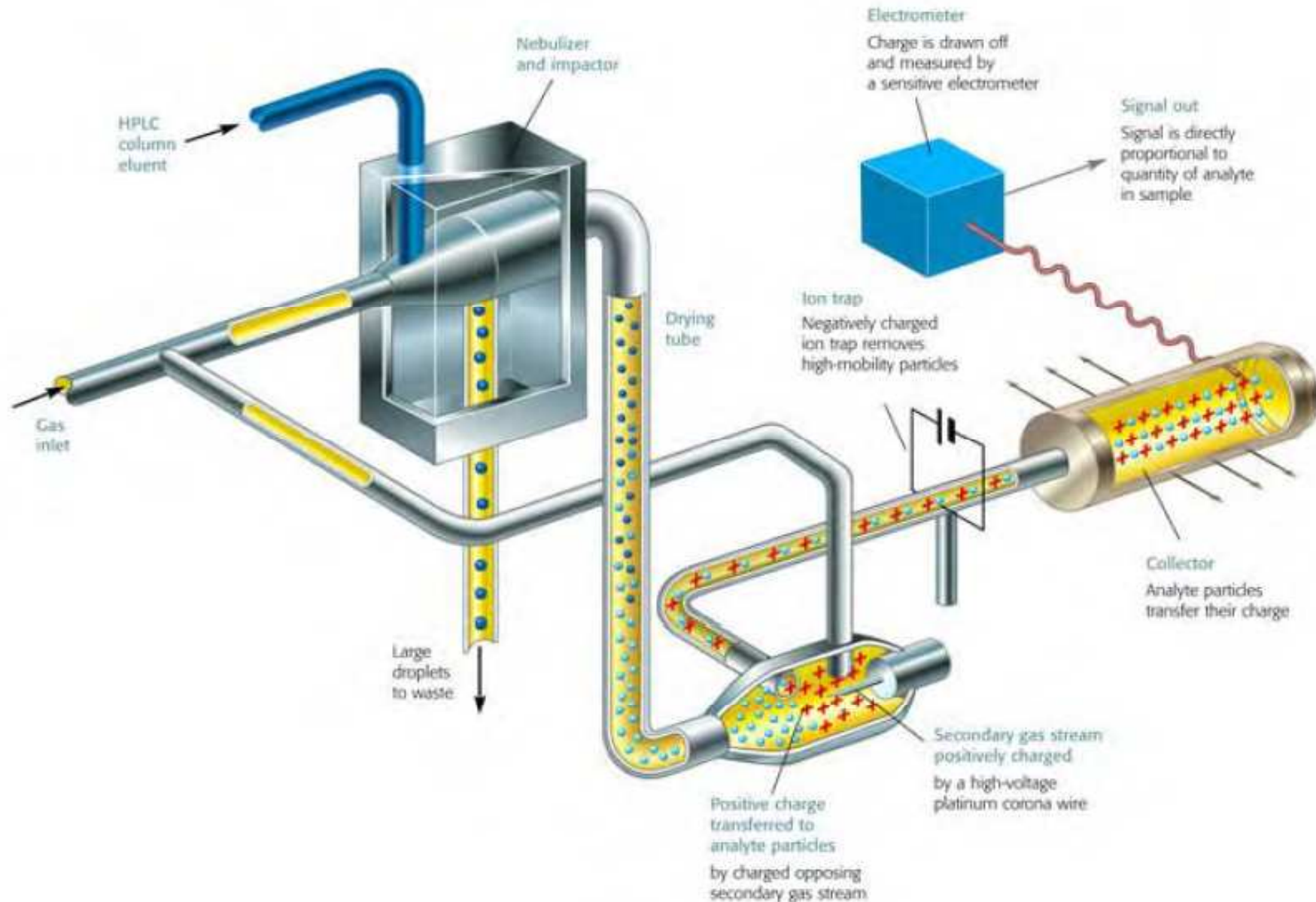
dyn. rozsah 10^6

citlivost 10^{-8} g/ml

Konduktometrický detektor



Aerosolový detektor nabitých částic

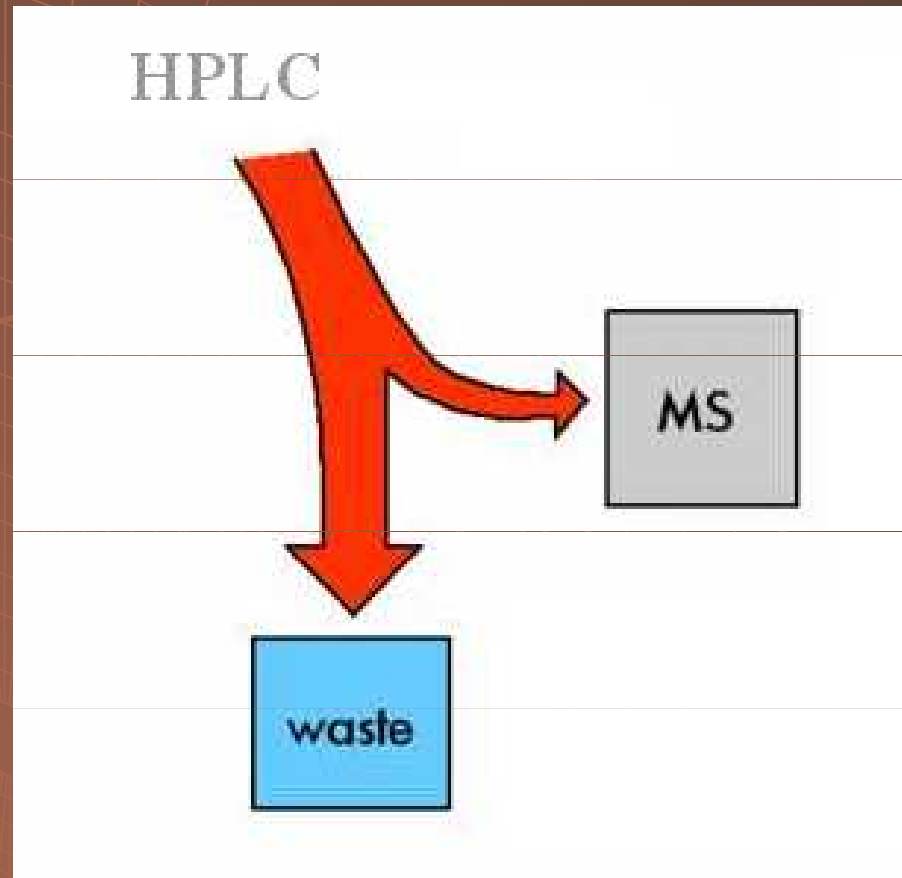


LC-MS

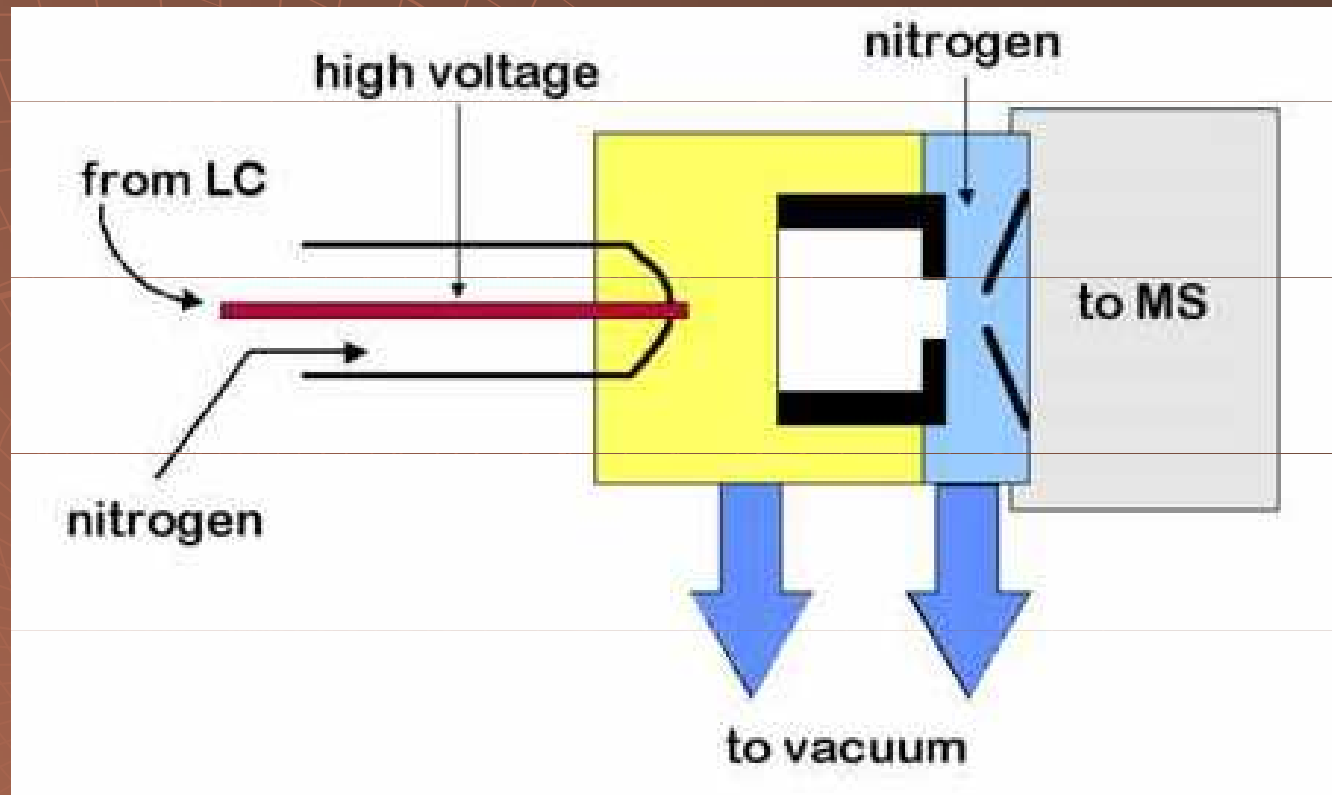
počet iontů

citlivost 10^{-13} g/ml

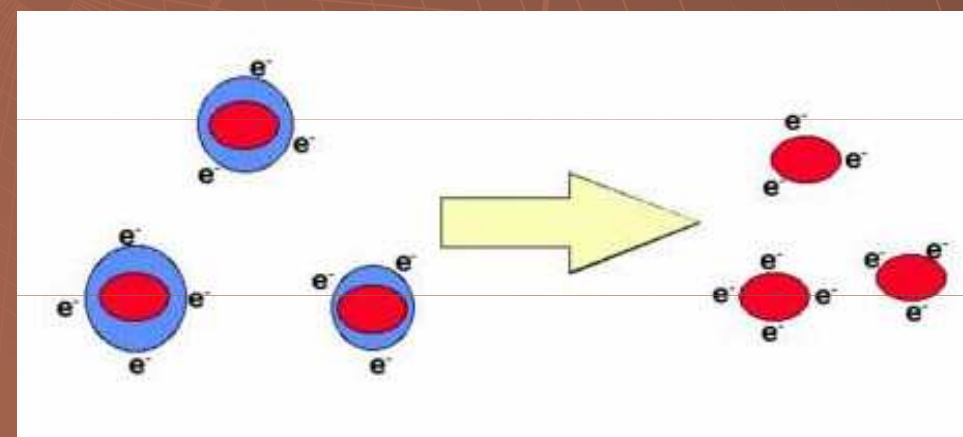
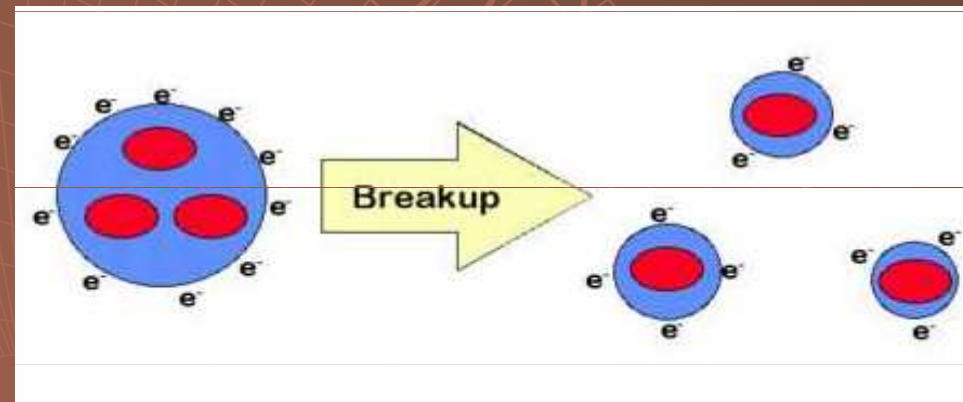
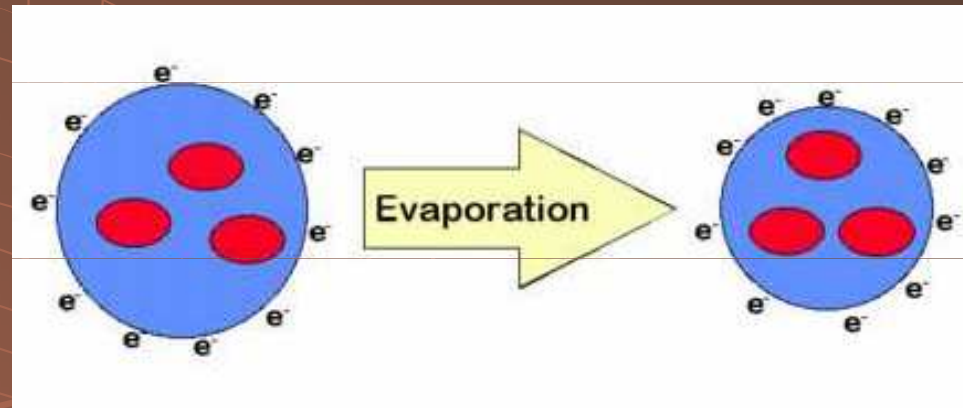
LC-MS



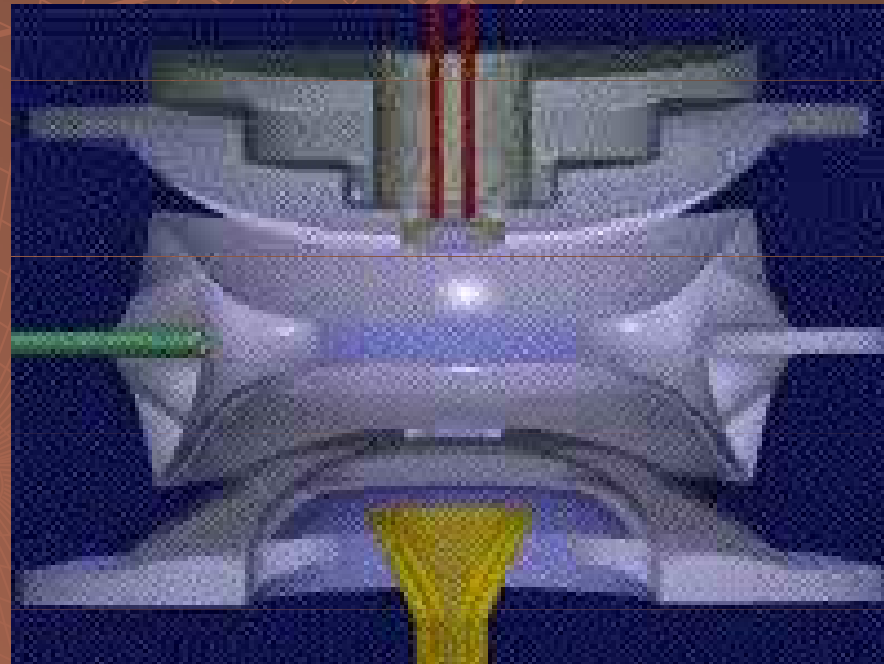
„Electrospray“



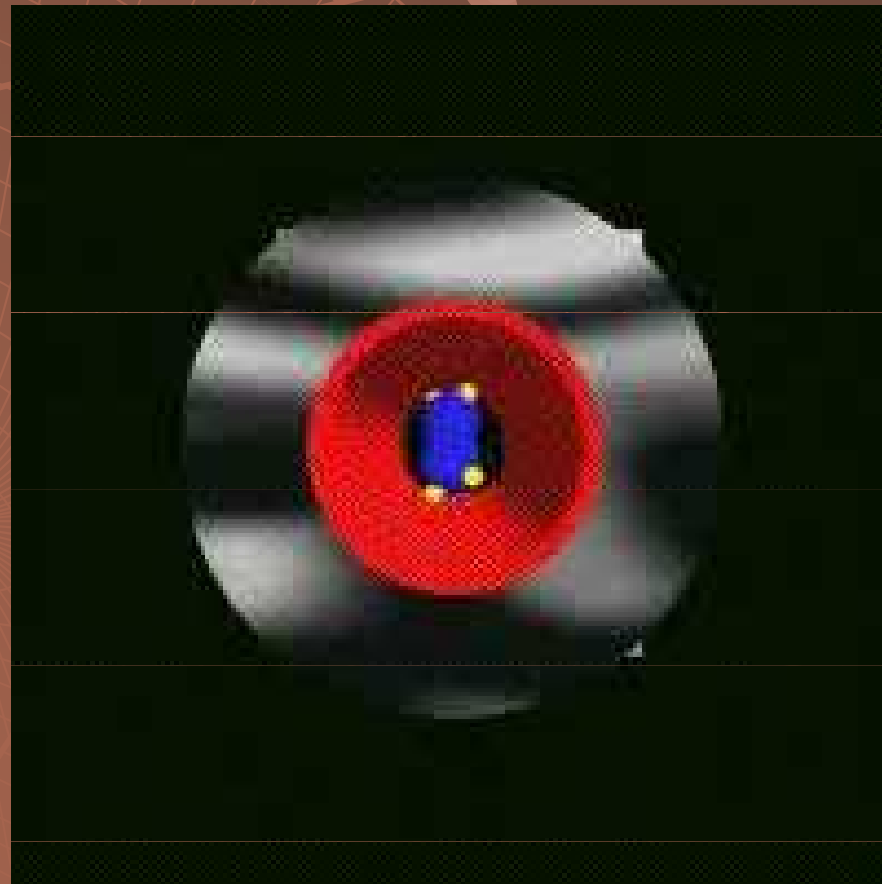
Ionizace



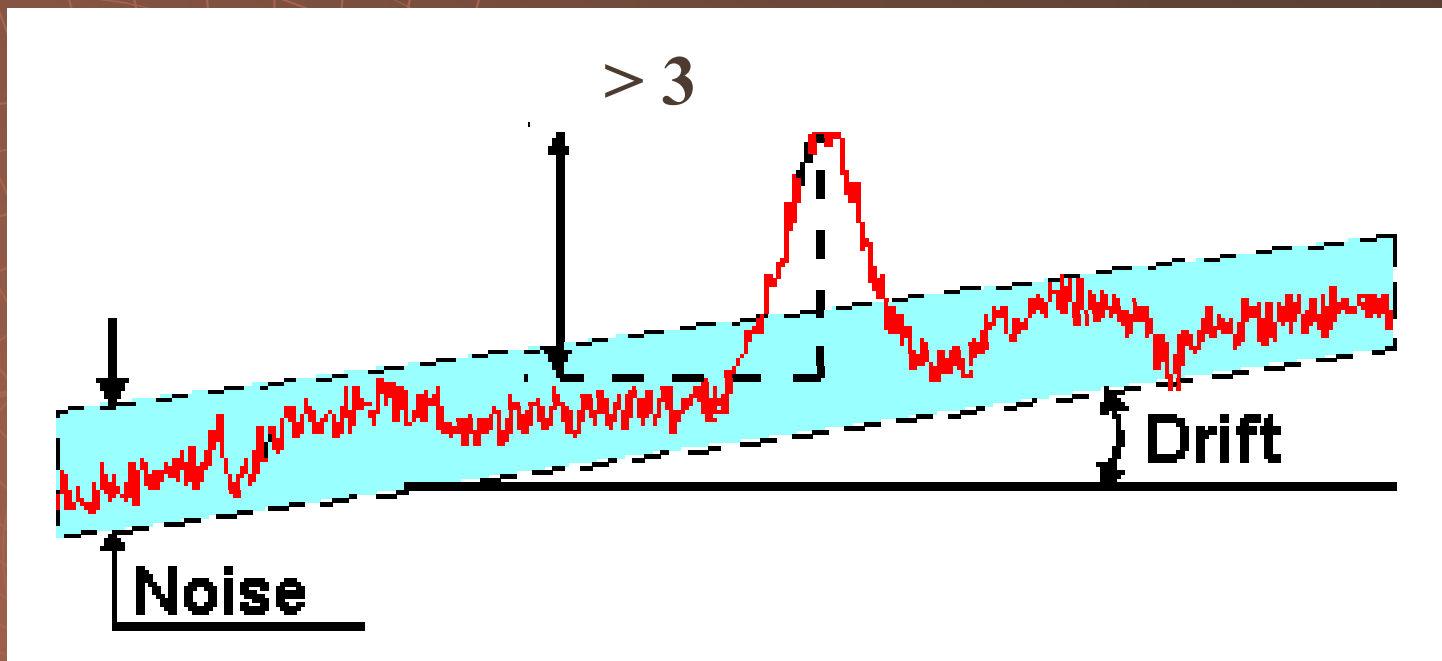
Ion Trap



Kvadrupol



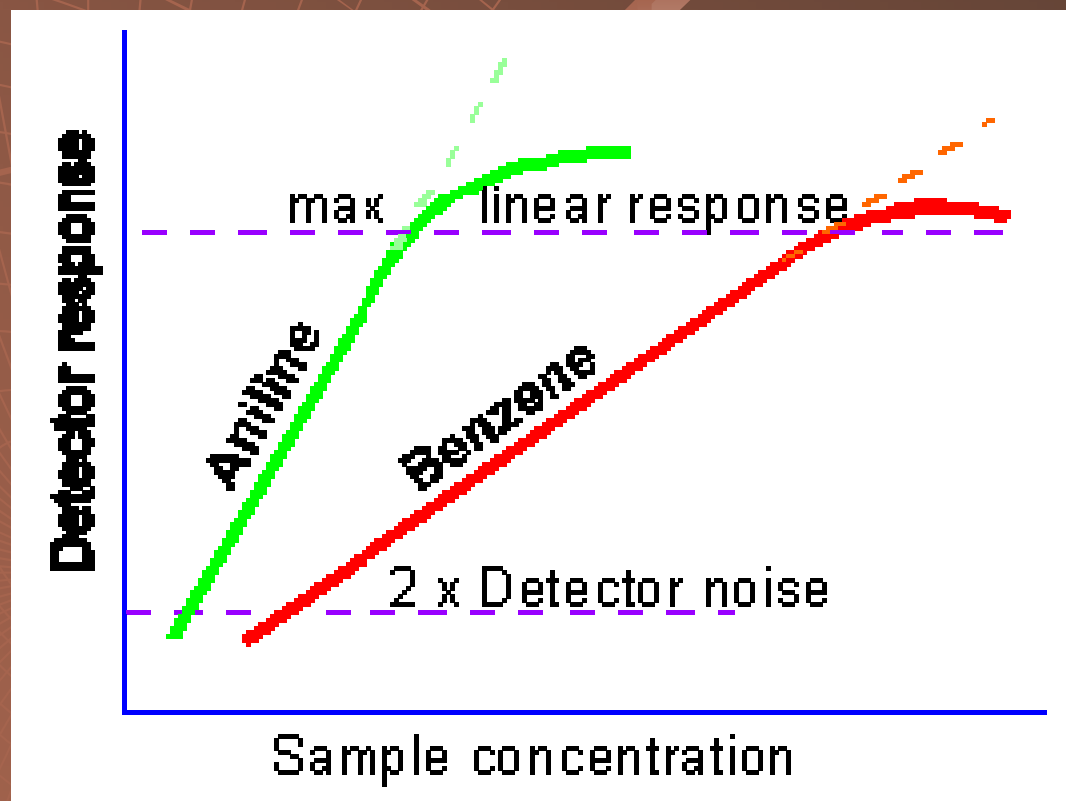
Šum a drift detektoru



Mez detekce $S/N > 3$

Mez stanovitelnosti $S/N > 10$

Lineární rozsah detektoru



Derivatizace

- ◆ zvýšení citlivosti nebo umožnění detekce vůbec
- ◆ zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec
- ◆ zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně

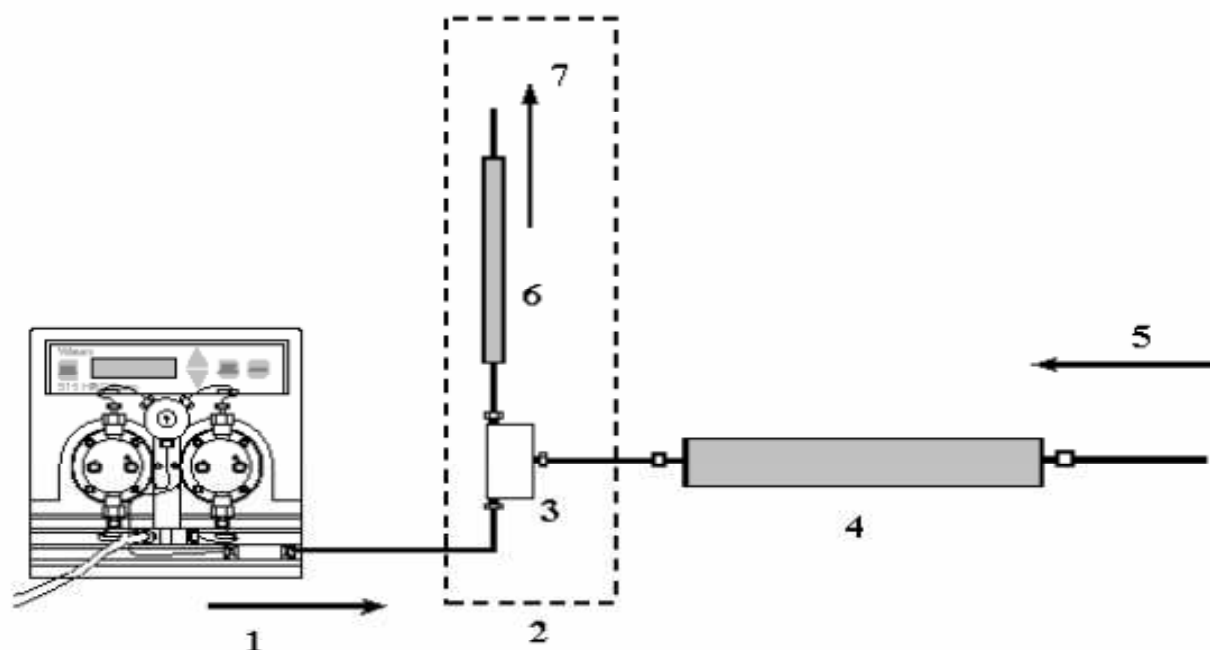
Požadavky na deriváty

- ◆ chemické individuum
- ◆ stabilní
- ◆ reakce kvantitativní, rychlá, selektivní bez vedlejších produktů za mírných reakčních podmínek (pH, teplota)
- ◆ činidlo musí být dobře separovatelné od svých produktů na koloně jiné fyzikálně-chemické vlastnosti

Derivatizace

- ◆ „pre-column“ - před vlastní analýzou
- ◆ „post-column“ – za kolonou po analýze

Derivatizace



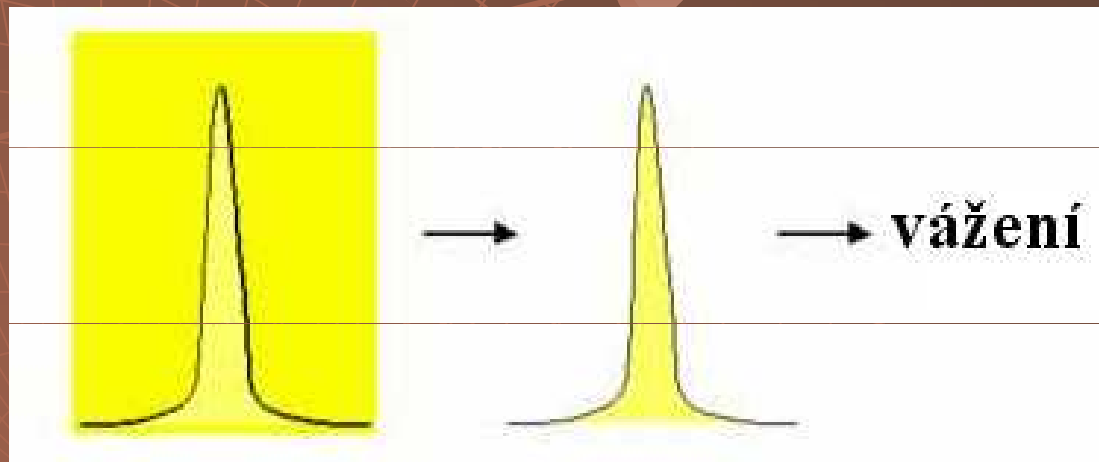
- 1 - derivatizační pumpa derivatizačního reagentu
- 2 - postkolonový systém
- 3 - směšovací komůrka (mixér)
- 4 - chromatografická kolona
- 5 - směr toku mobilní fáze
- 6 - derivatizační reaktor (smyčka)
- 7 - směr toku činidla (efluentu) k detektoru

Jednostupňová postkoloná derivatizace

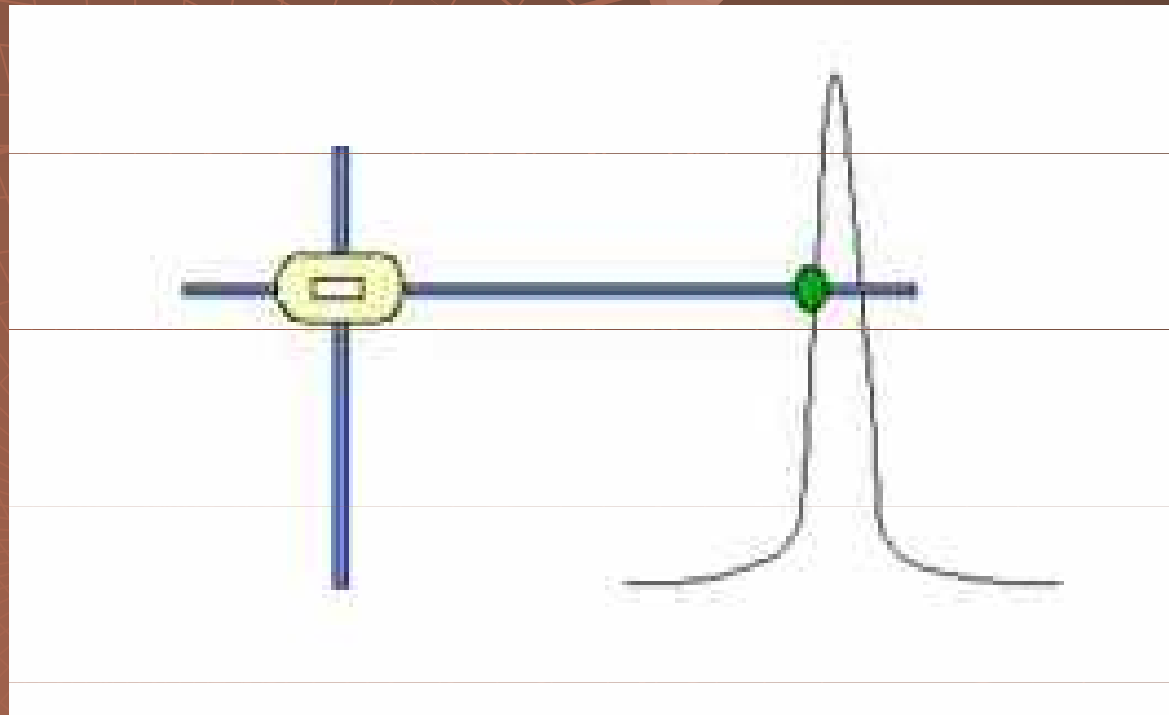
Vyhodnocení

- ◆ Zapisovače
- ◆ Integratory
- ◆ Integrační software + PC

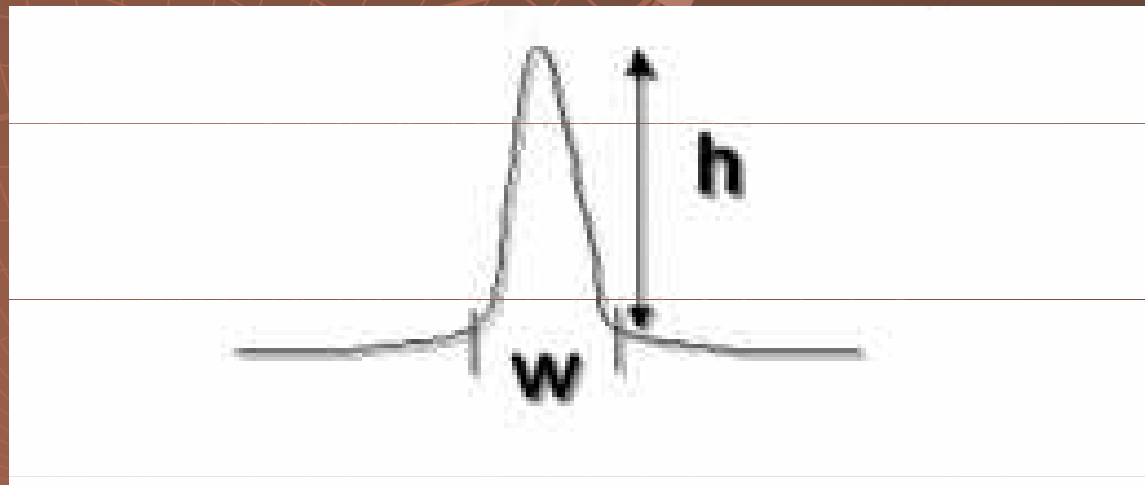
Zjištění plochy píků u zapisovačů vážením



Zjištění plochy píků u zapisovačů planimetrem

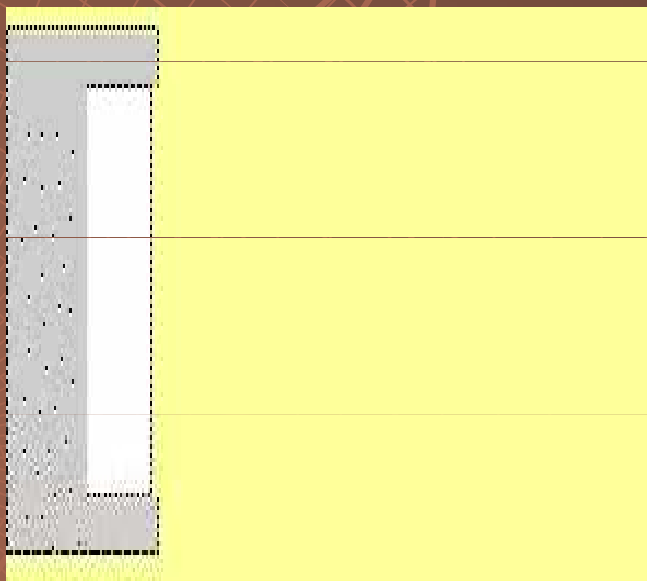


Zjištění plochy píků u zapisovačů výpočtem



plocha = základna x výška

Integrator



Provedení

- ◆ Analytické
 - ◆ Preparativní
-

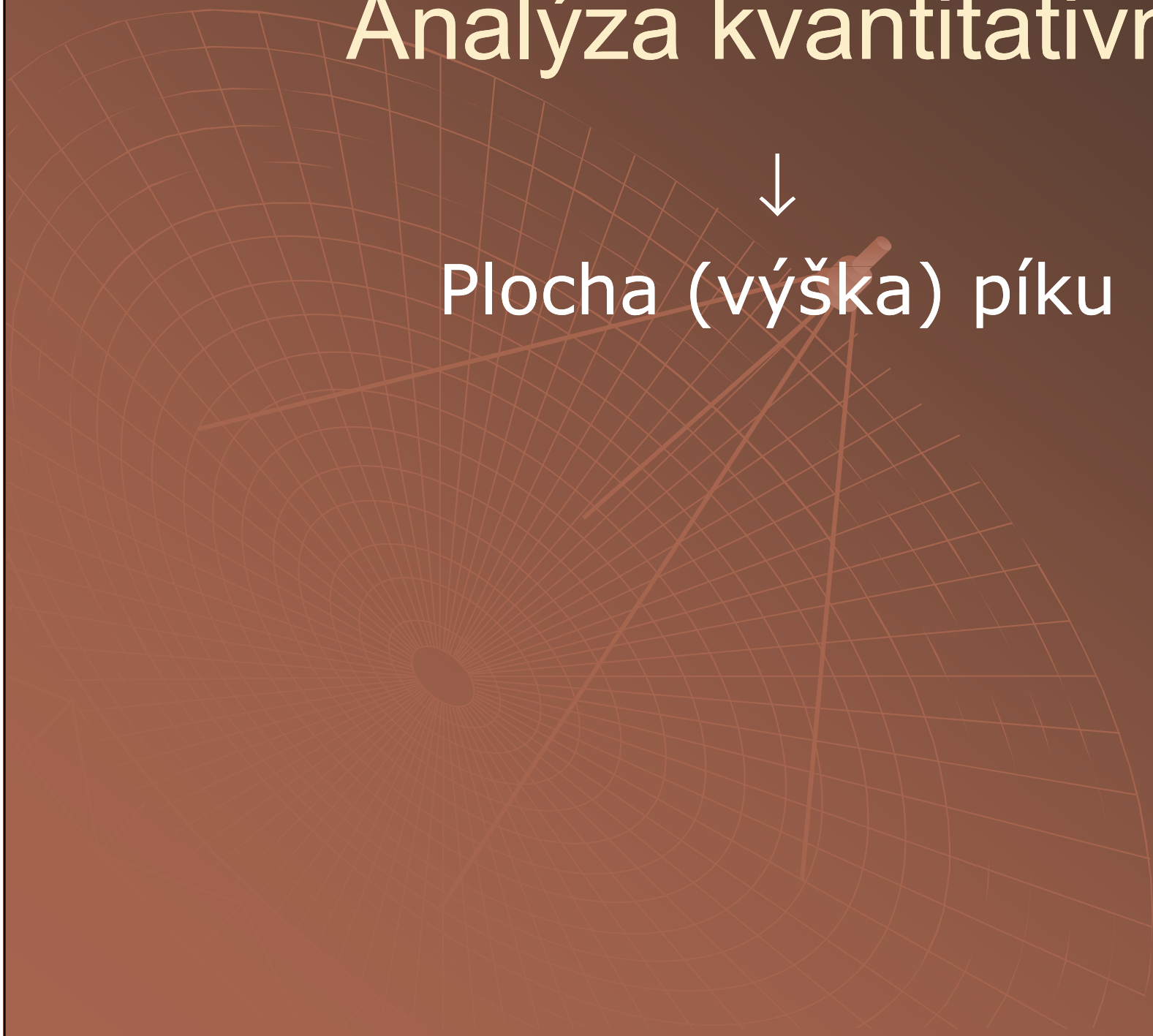
Analýza kvalitativní

- ◆ Srovnání retenčních časů (objemů) píků u vzorku a standardů
- ◆ „spiking“ – přidání standardu do vzoru → nárůst výšky píků
- ◆ Specifická detekce – UV-VIS, fluorescence, elektrochemická
- ◆ MS

Analýza kvantitativní



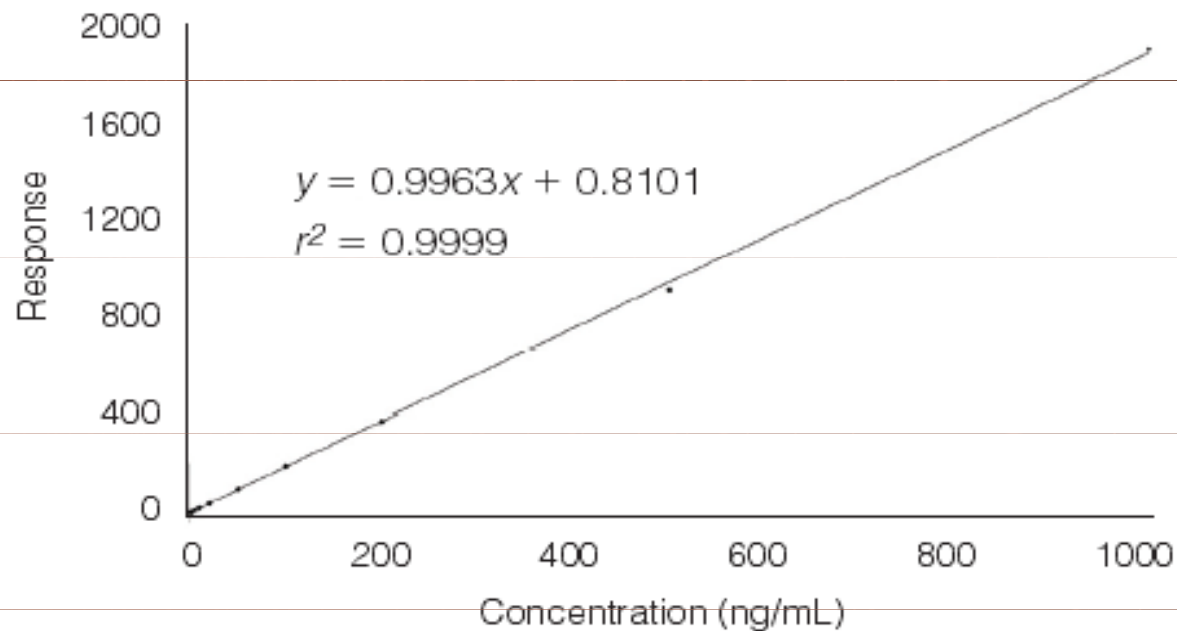
Plocha (výška) píku



Analýza kvantitativní

◆ Metoda externího standardu

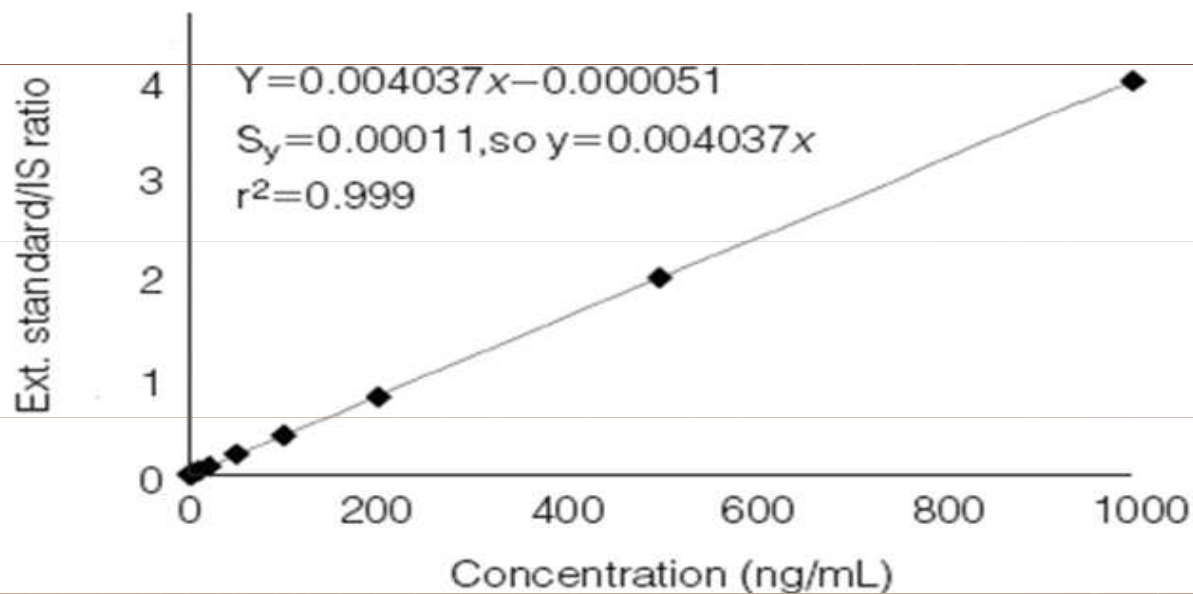
Figure 1: Calibration plot of response versus concentration.



Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda vnitřního standardu

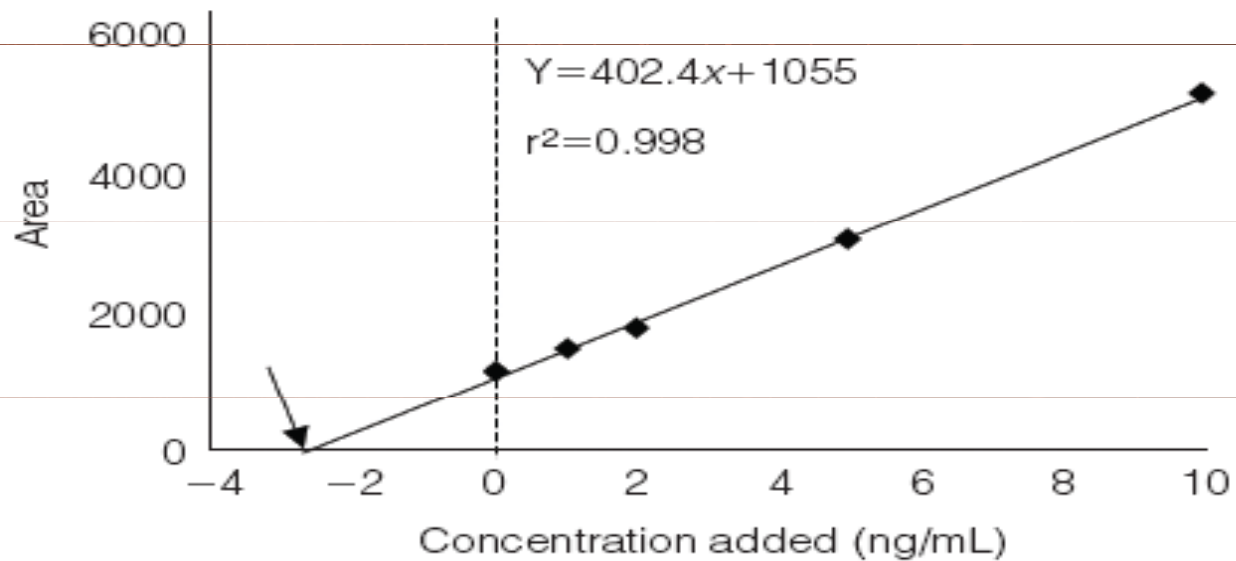
Figure 2: Internal standard calibration plot from data in Table 1.



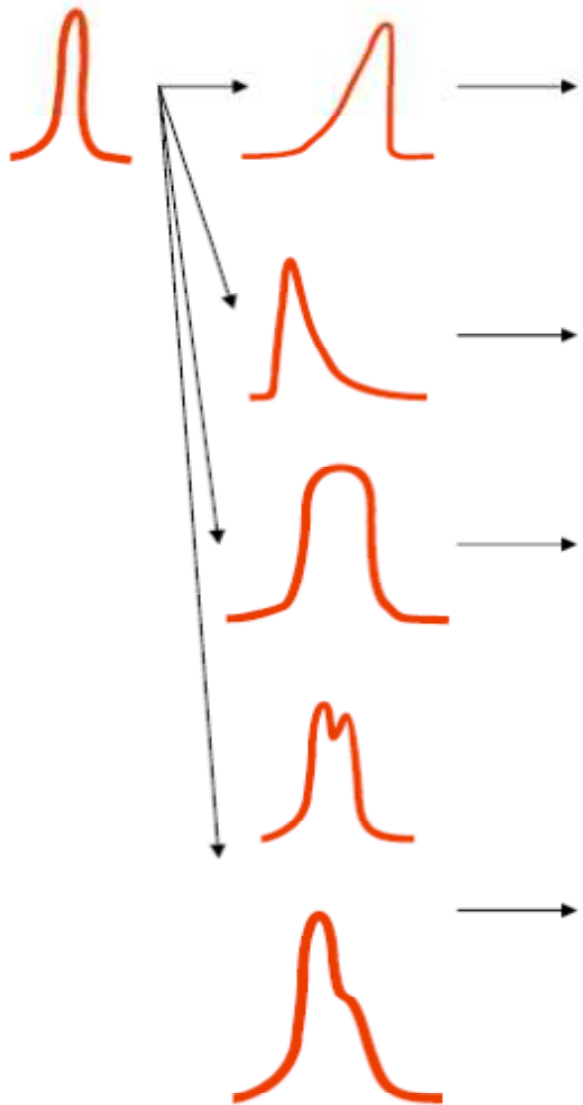
Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda standardního přídatku

Figure 3: Standard additions calibration plot from data in Table 1.



Problémy při LC analýze



•vzorek je rozpuštěn v prostředí o vyšší iontové síle než mobilní fáze

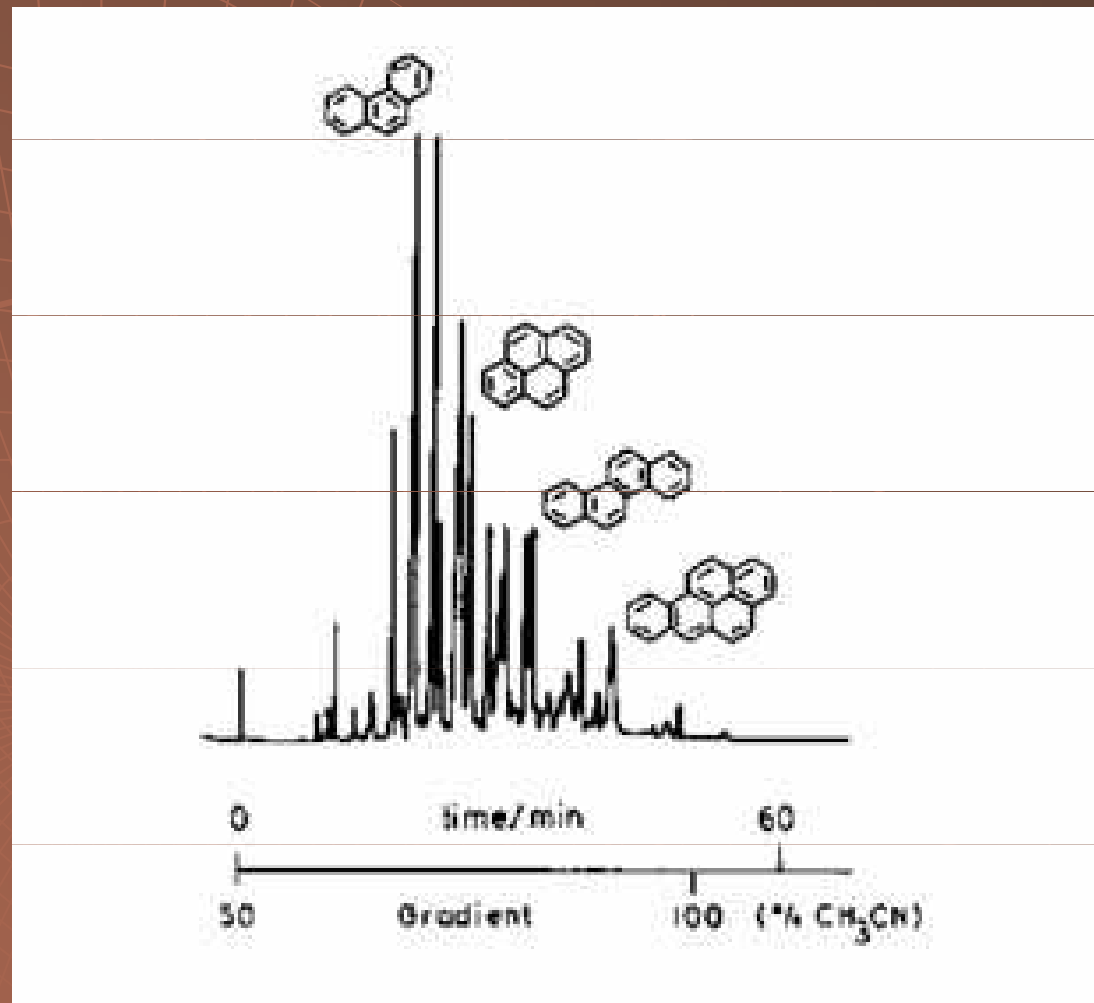
- špatná rozpustnost v mobilní fázi
- kanálky ve stacionární fázi

- sedlá náplň kolony
- nespecifické interakce
- silná retence vzorku
- přetížení kolony

- snížit nástřik
- poškozená kolona
- nečistoty v koloně

- nerozdělené píky
- kanálky v koloně
- nečistoty na koloně
- nástřik ve dvou podílech

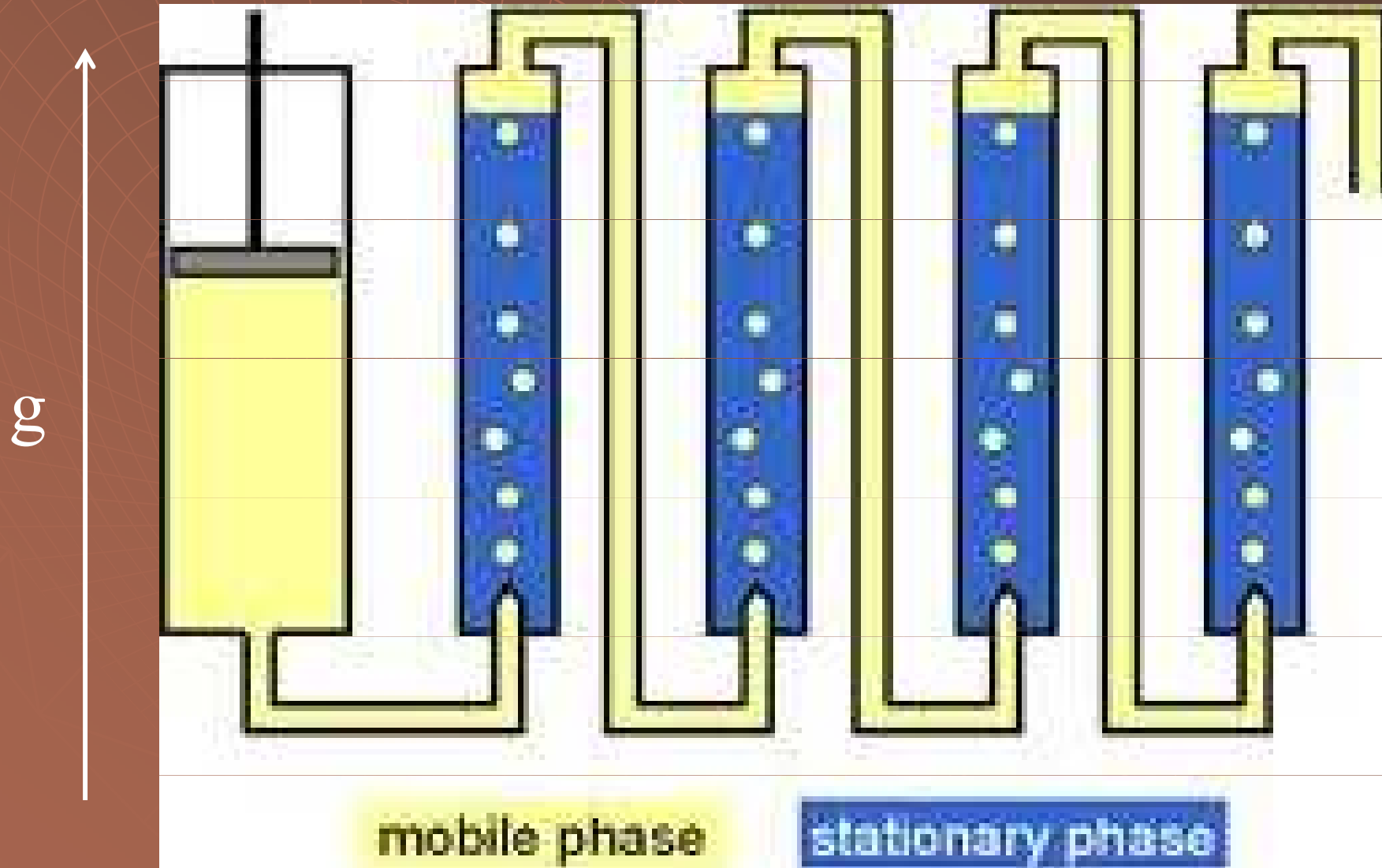
LC analýza



Countercurrent Chromatography

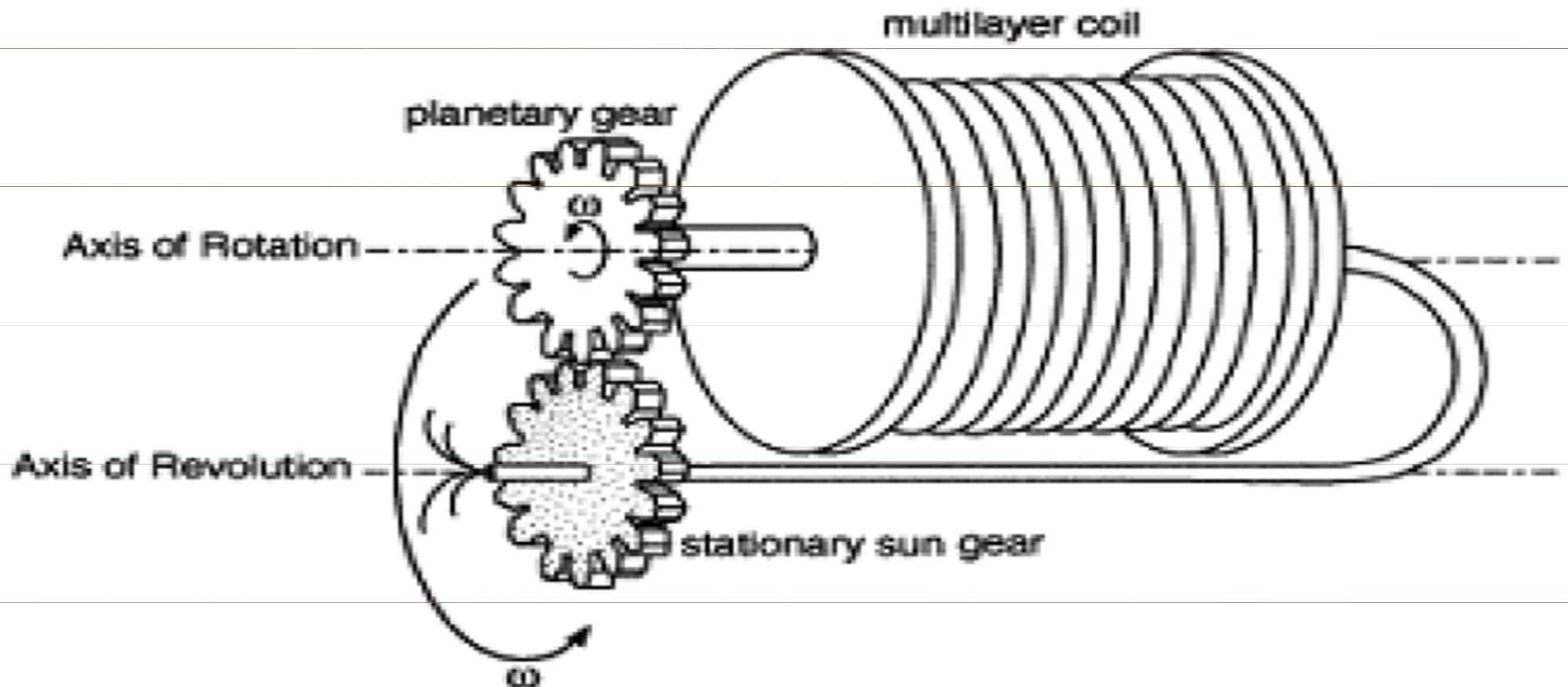
- ◆ Mobilní fáze - kapalina
- ◆ Stacionární fáze - kapalina

Countercurrent Chromatography „kapičková“ CCC



Countercurrent Chromatography rotační CCC

Type-J Synchronous Planetary Motion

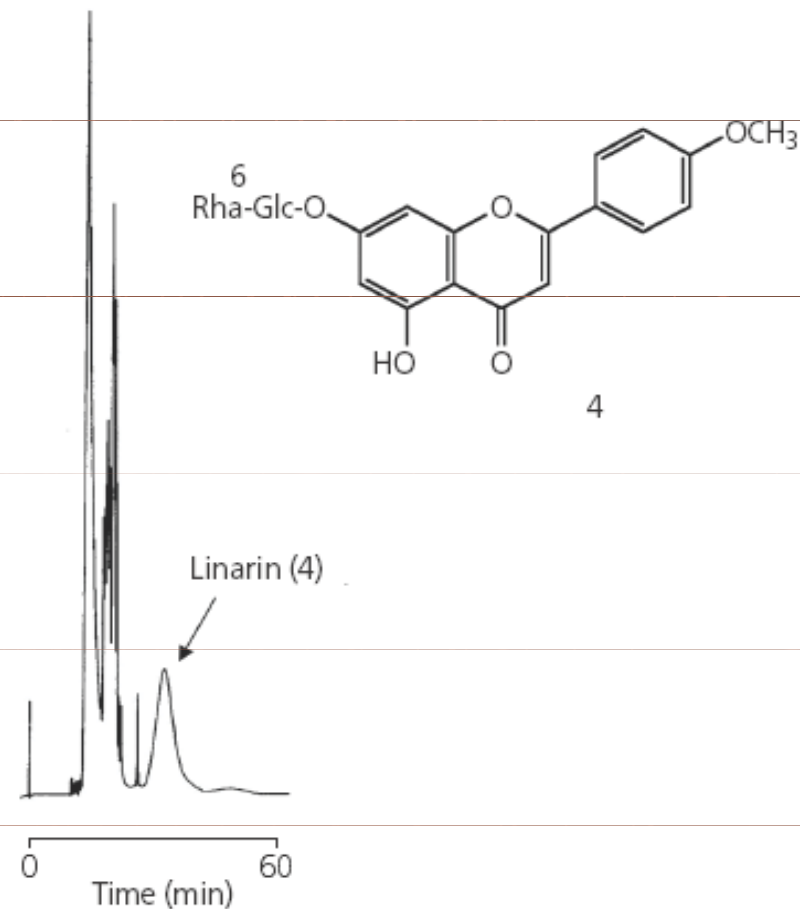


Countercurrent Chromatography



Countercurrent Chromatography

Figure 3: CCC of a methanol extract of *Buddleja davidii* (Buddlejaceae) leaves on a DE instrument with 17 mL coil; rotation speed: 2000 rpm; solvent system: CHCl_3 -MeOH- H_2O 45:33:22 (mobile phase = lower phase) at a flow-rate of 1 mL/min; sample 20 mg; detection 254 nm.



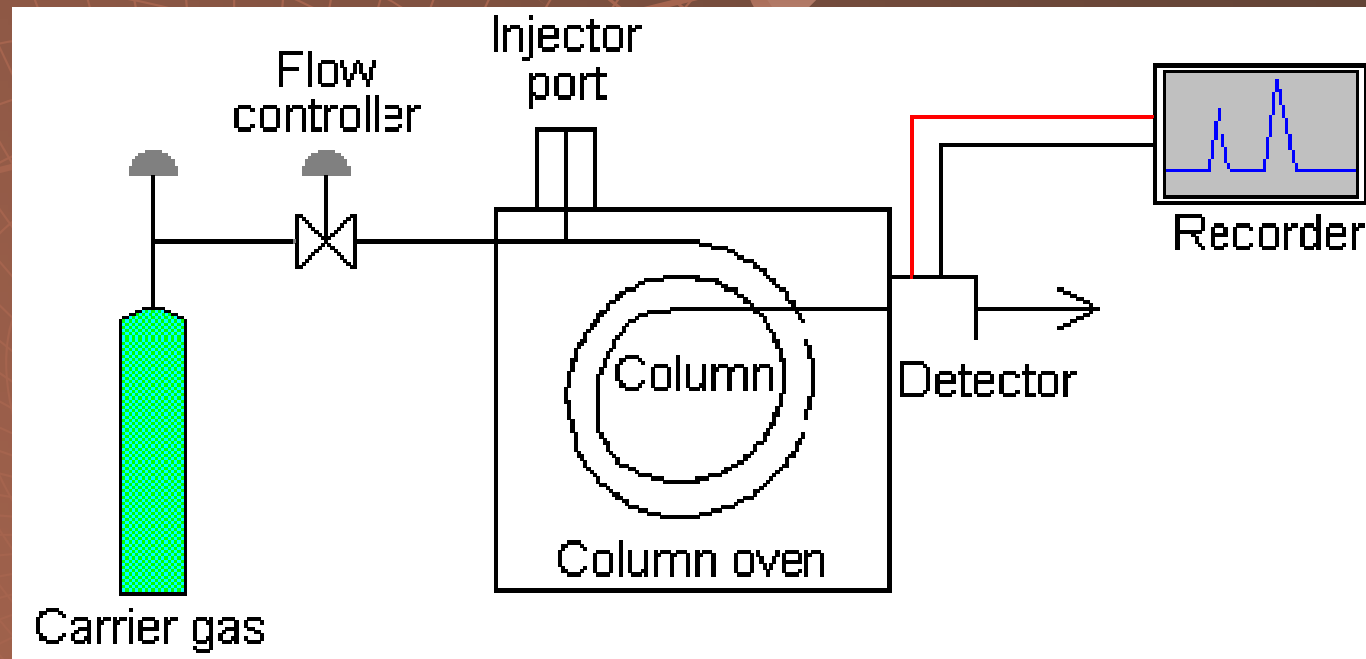
Plynová chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - plyn
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze,
kapalina

Výhody

- ◆ Nižší viskozita mobilní fáze
- ◆ Rychlejší difuze

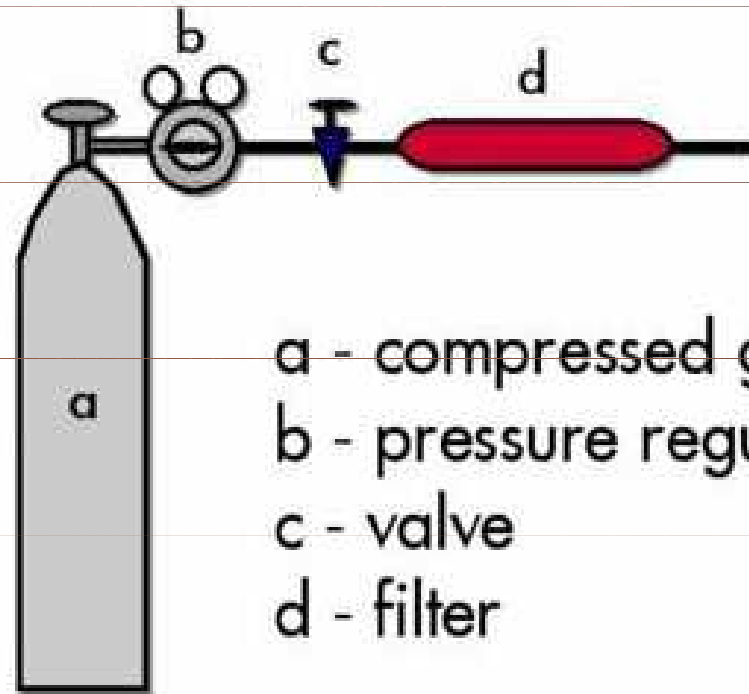
Schéma plynového chromatografu



Plynový chromatograf

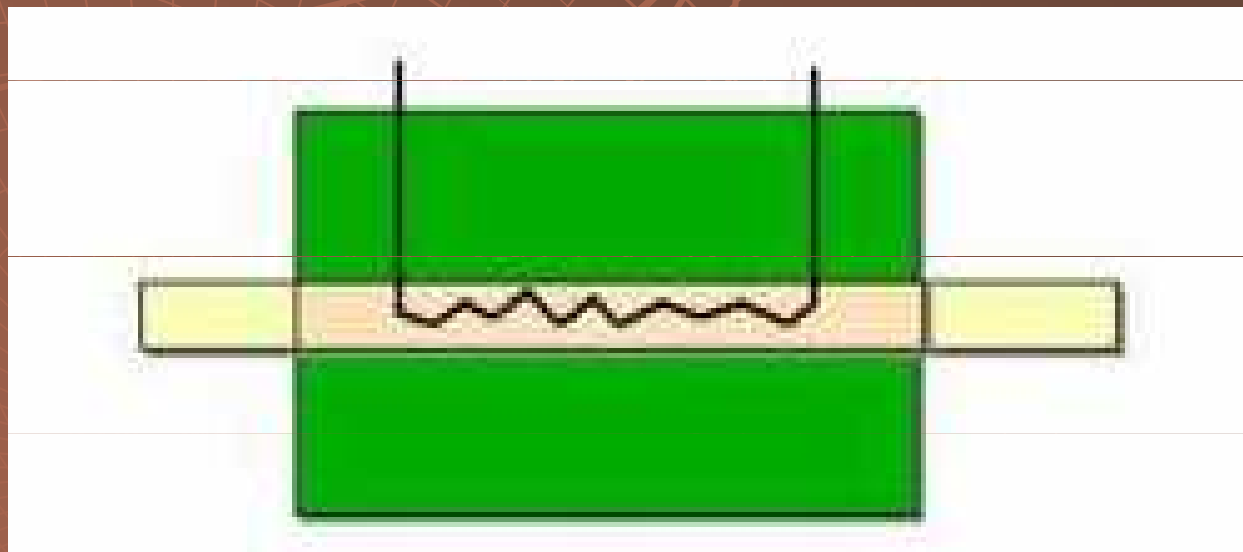


Zdroj nosného plynu



- a - compressed gas cylinder
- b - pressure regulator
- c - valve
- d - filter

Elektrické měření průtoku



Nosné plyny

| Plyn | Výhody | Nevýhody |
|-------|----------------------------|---------------------------|
| N_2 | levný, bezpečná práce | nízká tepelná vodivost |
| H_2 | vysoká tepelná vodivost | explosivní |
| He | inertní | drahý |
| Ar | inertní | drahý |

Příprava vzorků pro GC

- ◆ Plyny, kapaliny - přímo
- ◆ Pevné látky - po derivatizaci

Objemy dávkovaných vzorků

◆ Plyny - 0.5 – 5 ml

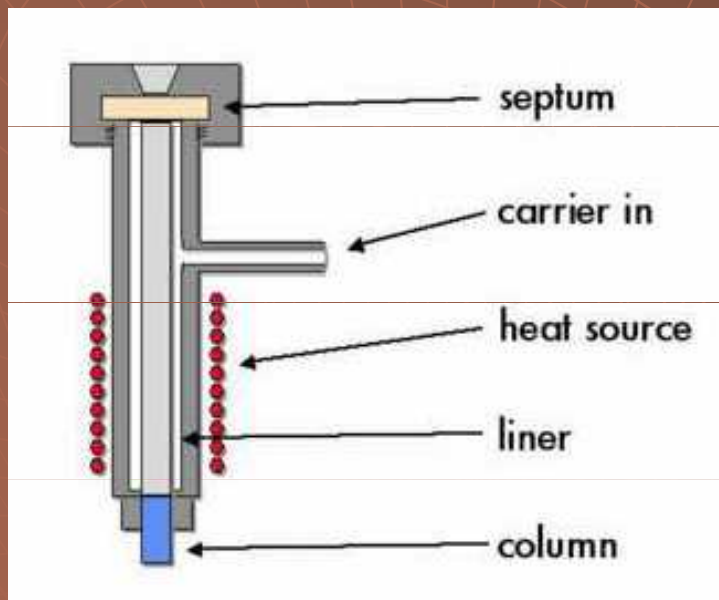
◆ Kapaliny - 0.1 – 10 μ l

Způsoby dávkování vzorků

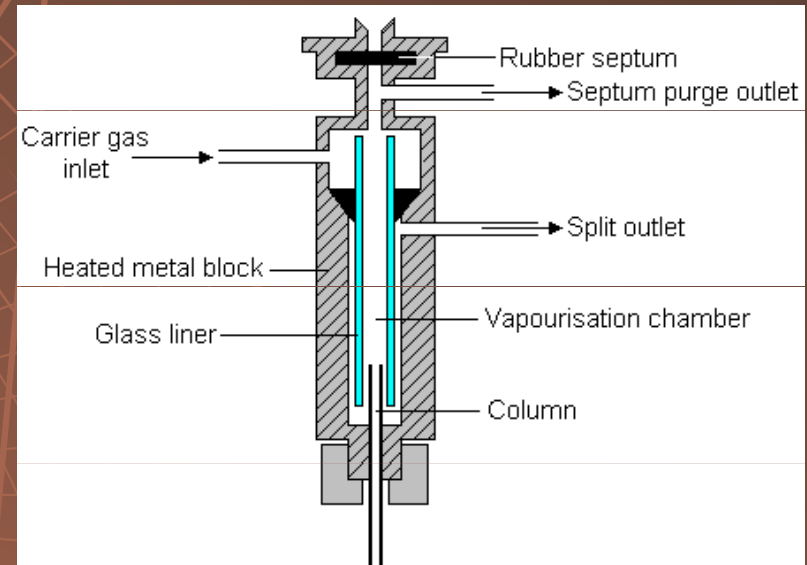
- ◆ Přes septum
- ◆ Ventilem
- ◆ Termální desorpcí

Stříkačkou

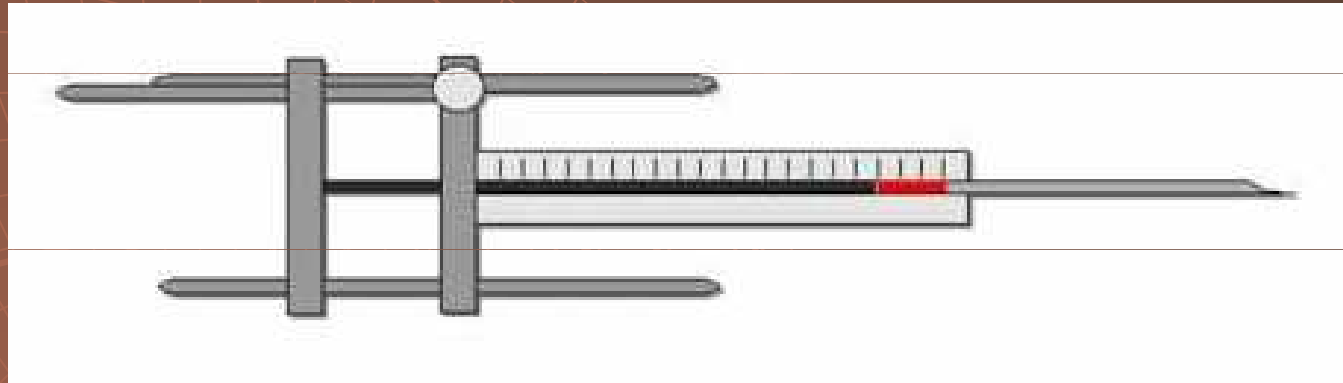
„splitless“



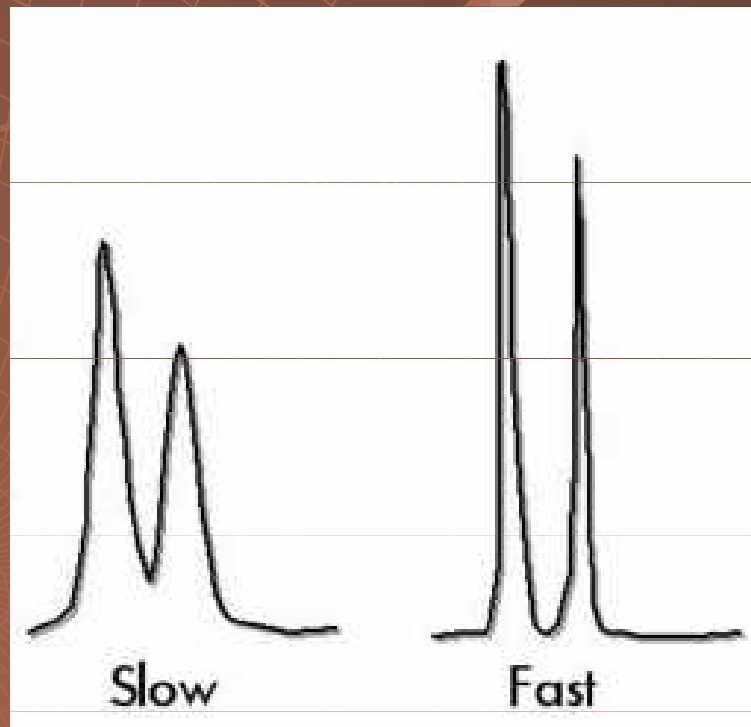
„split“



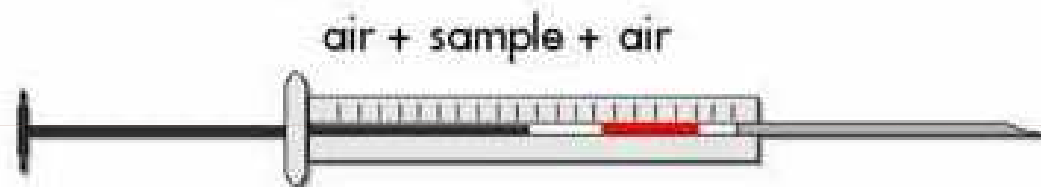
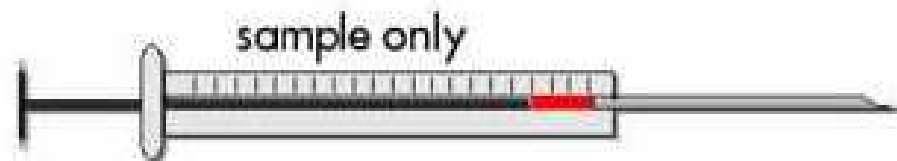
Dávkovací stříkačka



Rychlost dávkování



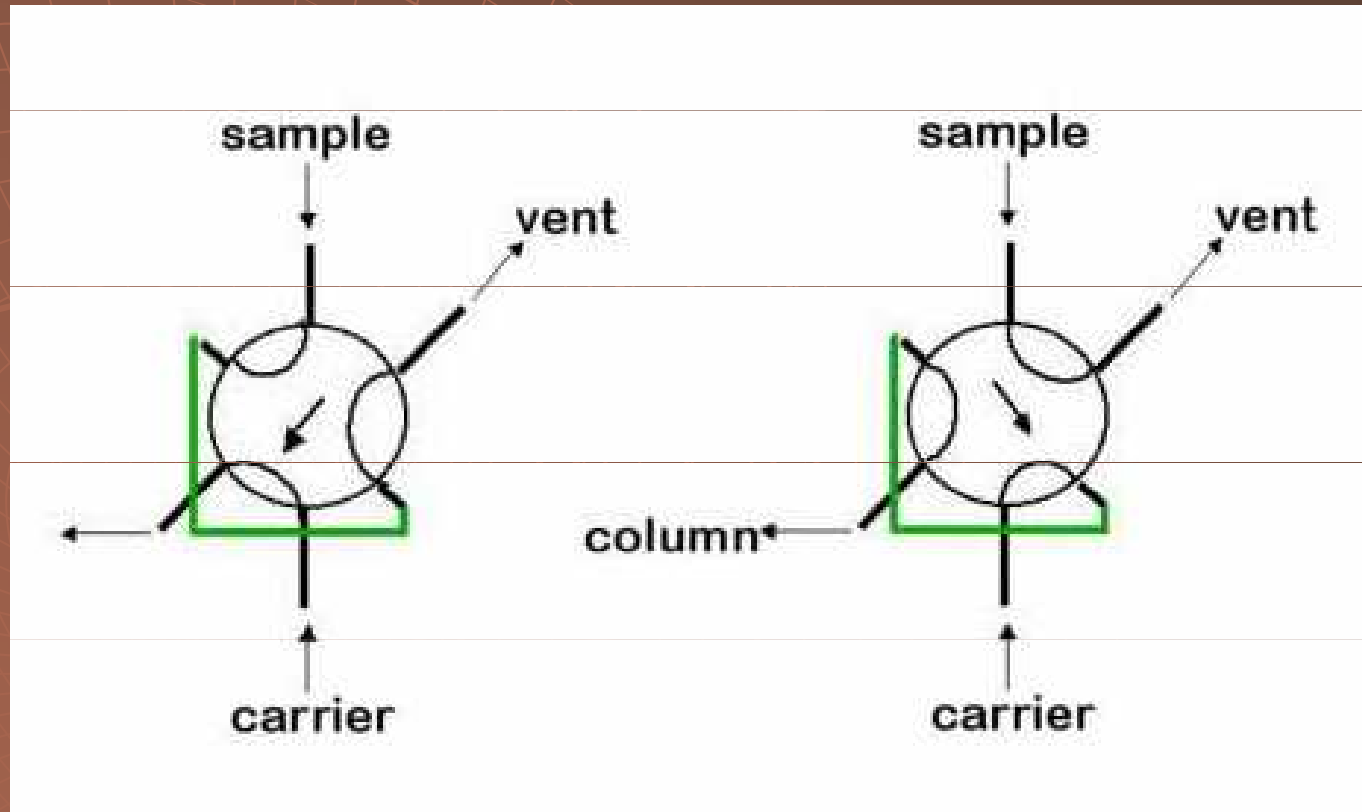
Způsob dávkování



Automatické dávkovače



Ventilem



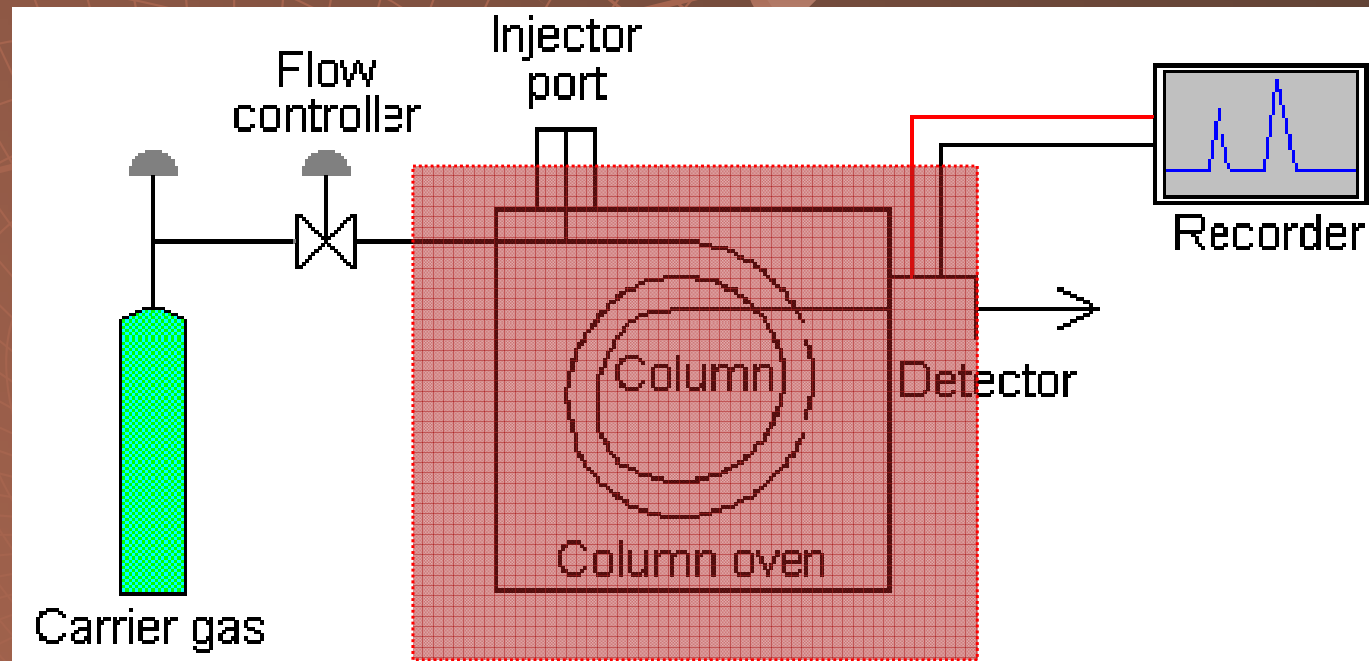
Ventil



Dávkování termální desorpcí



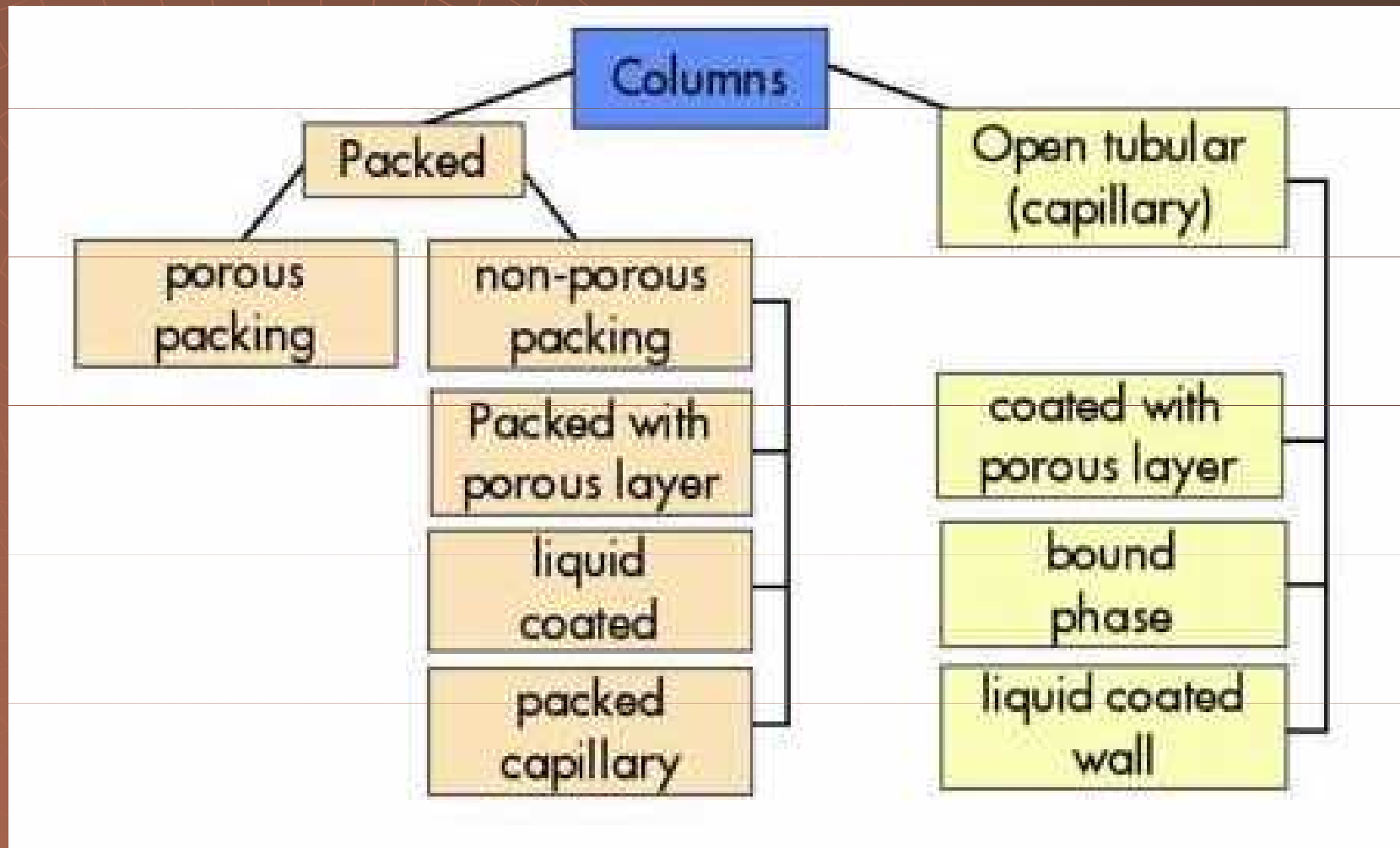
Termostatování



Kolony

- ◆ Náplňové – ¼" OD – ocel, sklo
délka 1m
- ◆ Kapilární – 0.1 – 0.5 mm ID –
křemen, ocel, sklo
délka – 10 - 100 metrů

Kolony



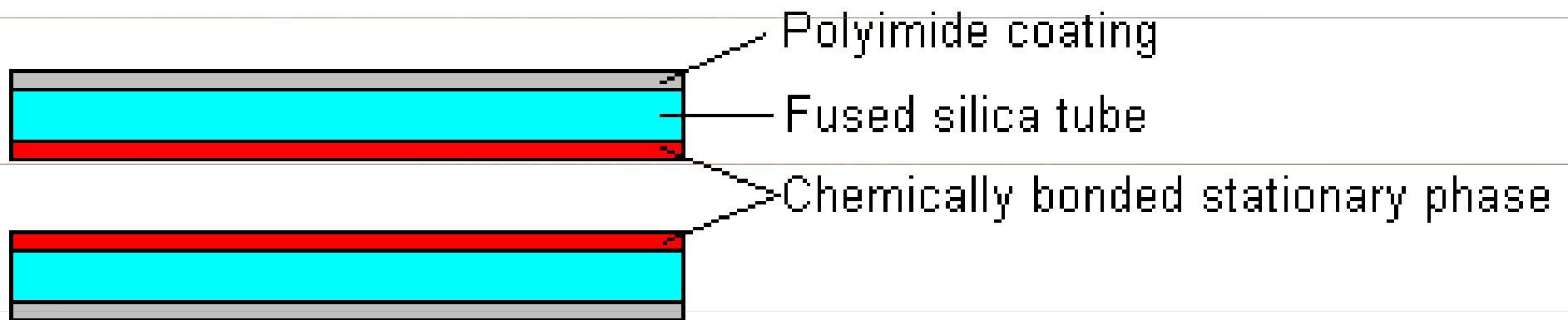
Náplňová kolona



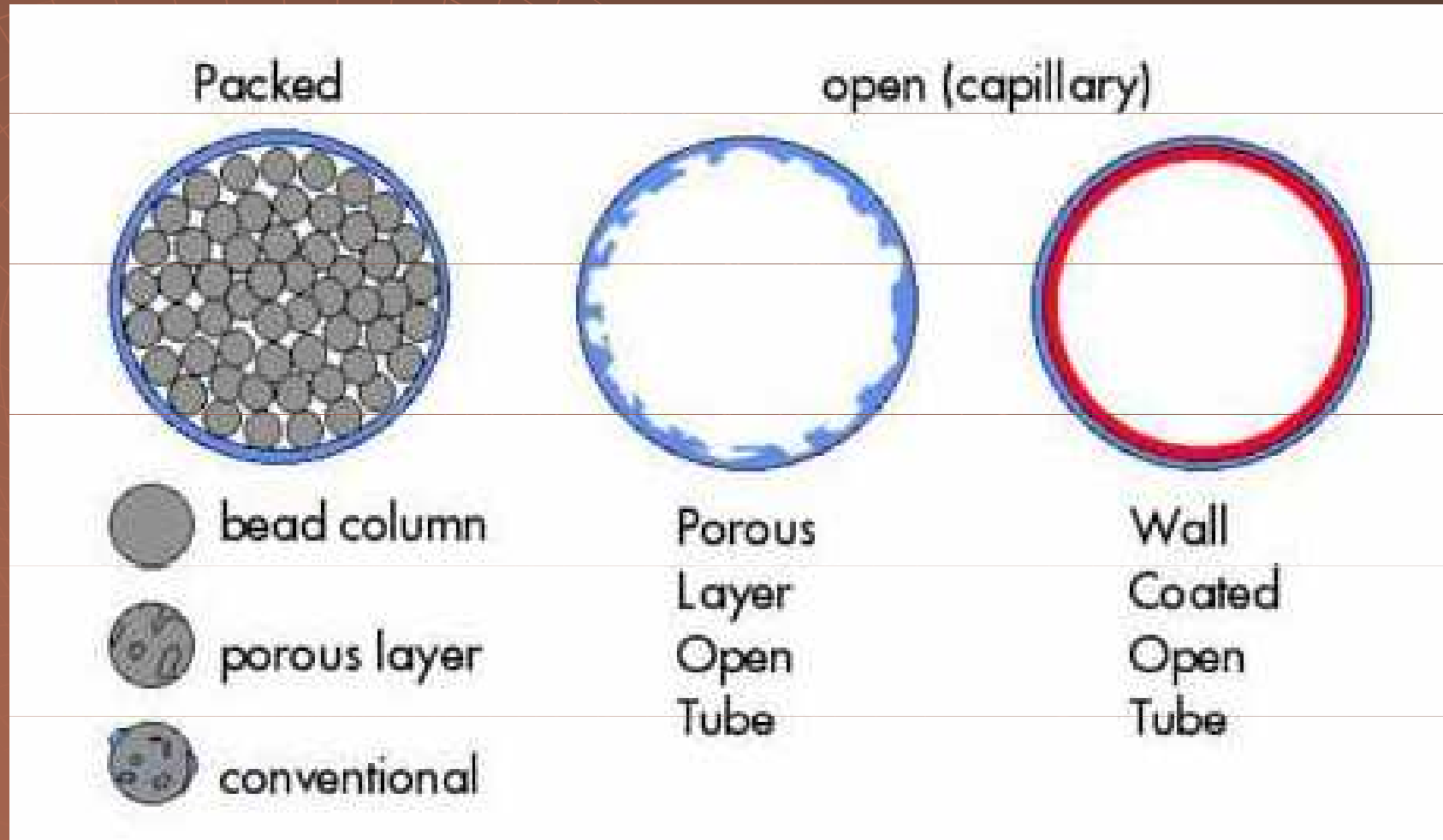
Kapilární kolona



Kapilární kolona



Kolony



Pevné stacionární fáze

Aktivní uhlí, grafitizované uhlí
- dělení plynů a lehkých uhlovodíků

Silikagel

- dělení anorganických plynů a nízkovroucích kapalin

Molekulová síta (krystalické hlinitokřemičitany)

- dělení plynů a lehčích uhlovodíků

Porézní polymery (vinylbenzenové kopolymery)

- dělení nízkomolekulárních uhlovodíků, anorganických plynů, alkoholů, esterů a ketonů

Kapalné stacionární fáze

Carbowaxy (polyethylenglykoly)

Ucony (polypropylenglykoly)

- polární stacionární fáze, s rostoucí M_r klesá polarita

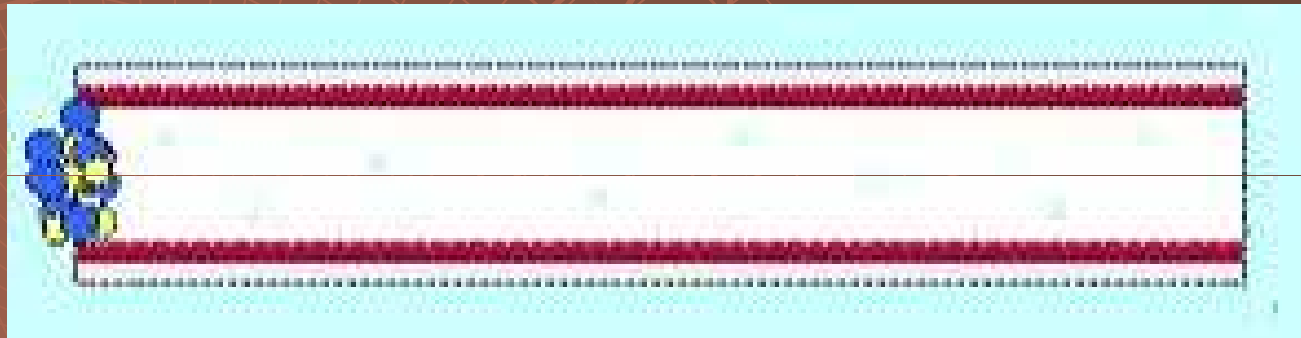
Polyestery (např. polyethylenglykoladipáty)

- polární stacionární fáze

Silikonové stacionární fáze (polysiloxany)

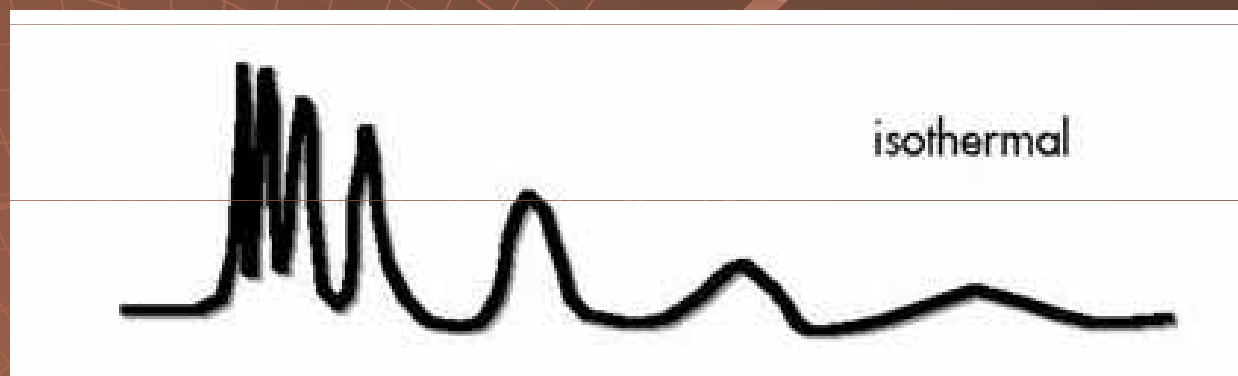
- často používané, široký rozsah polarity

Eluce



Eluce

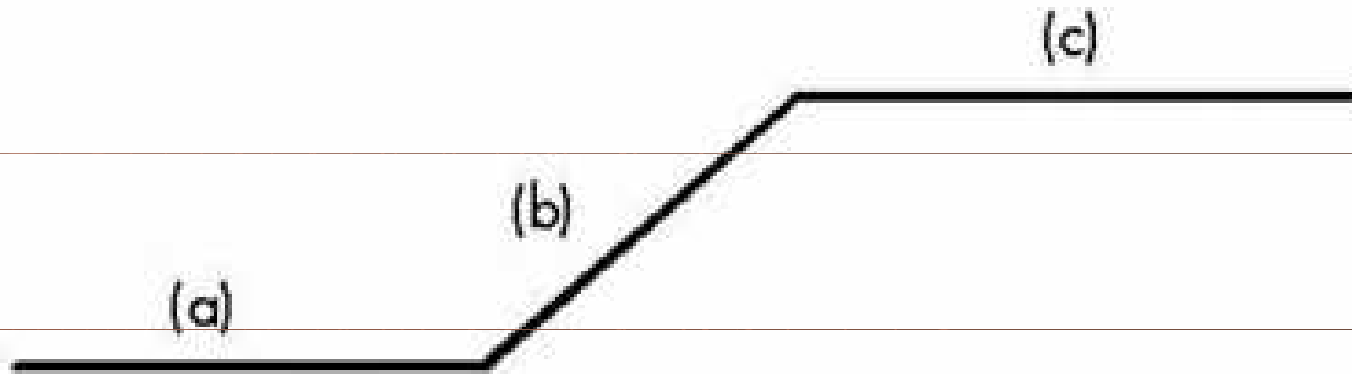
- ◆ Izotermální



- ◆ Gradientová – zvyšování teploty – 400 °C



Eluce



a - initial temperature and time

b - ramp ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

c - final hold time and temperature

Detektory

Destruktivní x

Nedestruktivní

Universální x

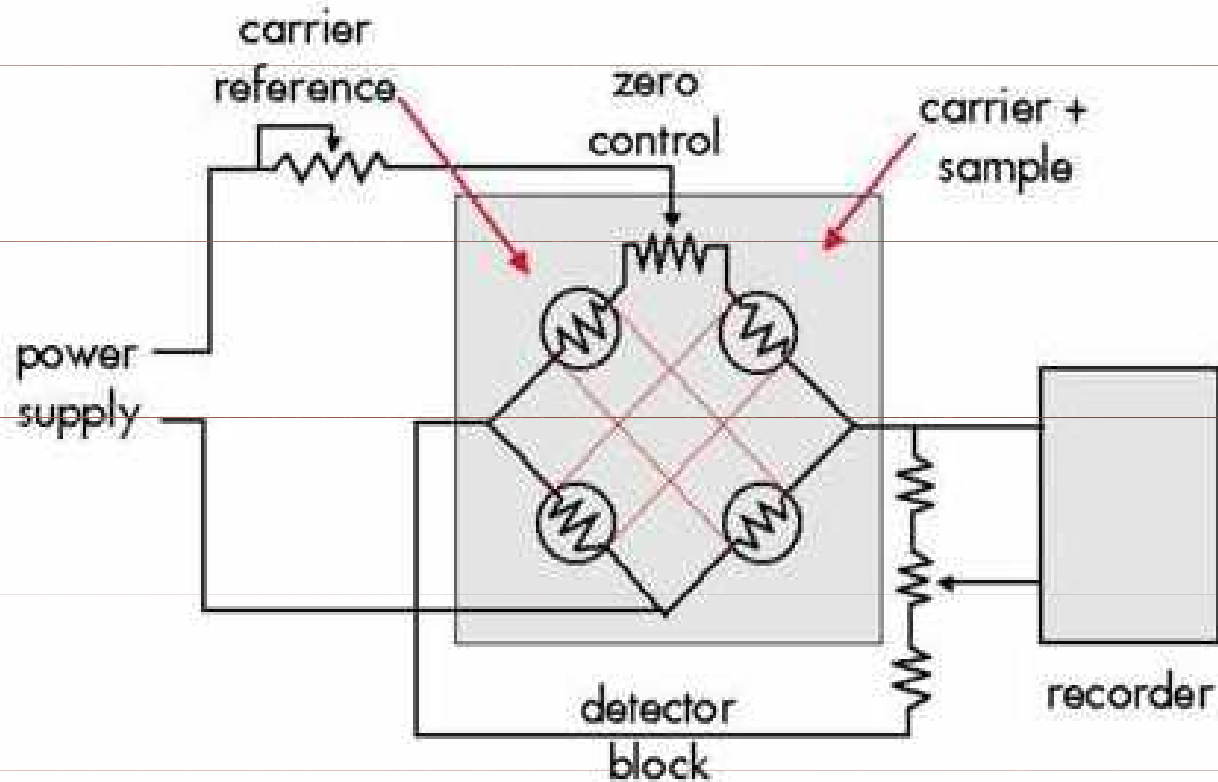
Selektivní



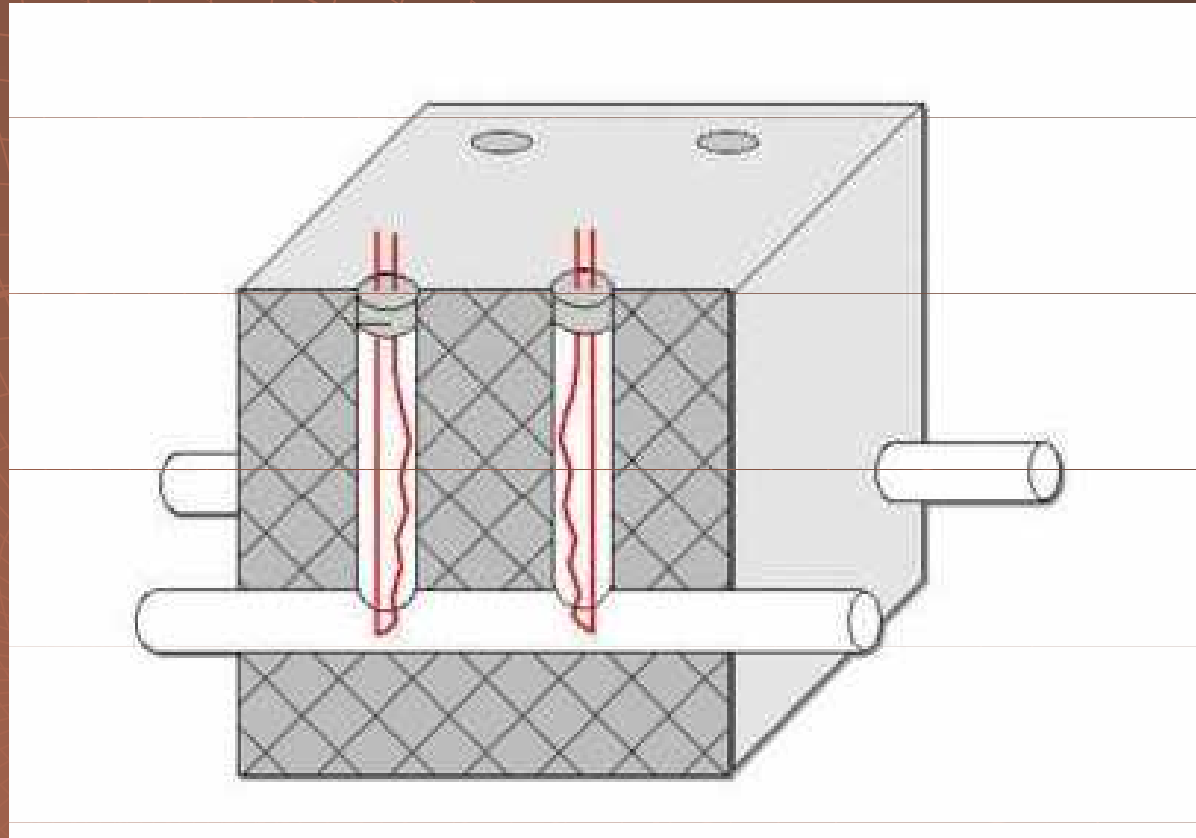
Teplotně vodivostní detektor TCD

- ◆ Universální detektor
- ◆ Nedestruktivní detektor
- ◆ Lineární rozsah – 10^6
- ◆ Princip – změna tepelné vodivosti eluentu

Teplotně vodivostní detektor TCD



Teplotně vodivostní detektor TCD

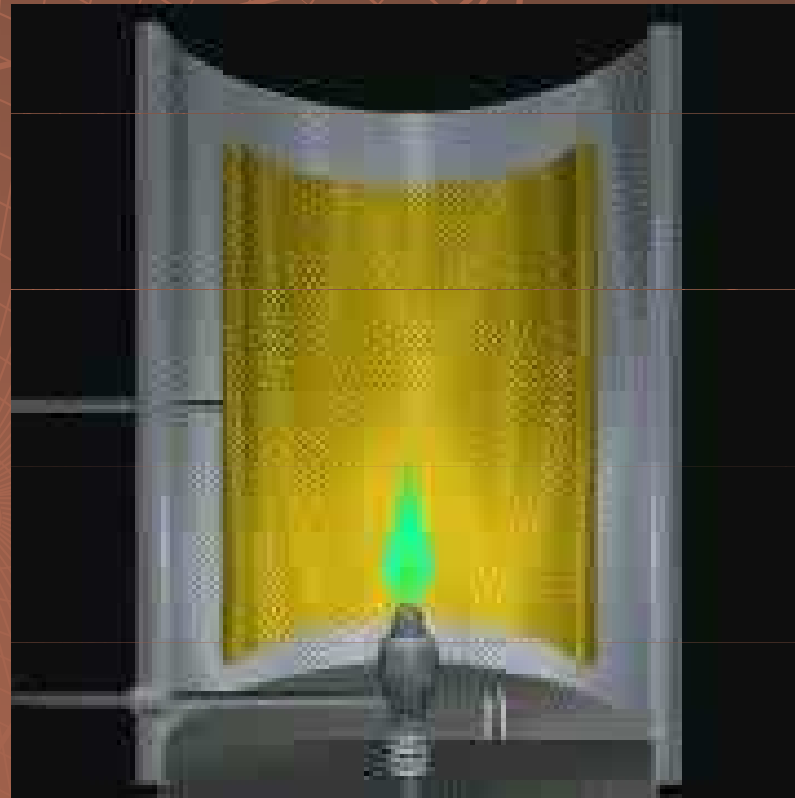


Plamenově ionizační detektor FID

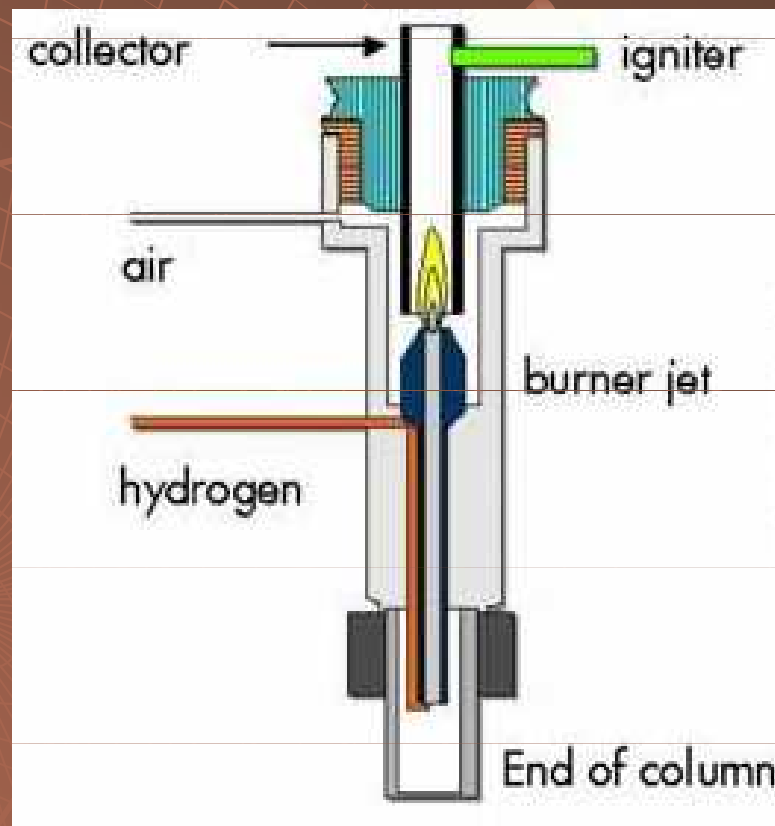
- ◆ Specifický
- ◆ Destruktivní
- ◆ Lineární rozsah – 10^7

- ◆ Princip – ionty vznikající spalováním vzorku vyvolávají nárůst proudu

Plamenově ionizační detektor FID



Plamenově ionizační detektor FID

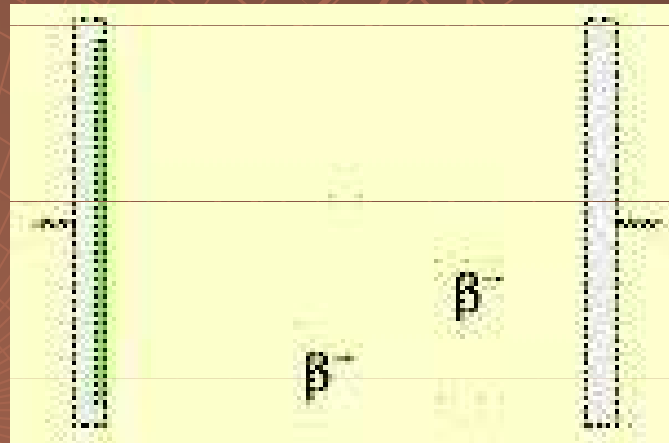


Detektor elektronového záchytu ECD

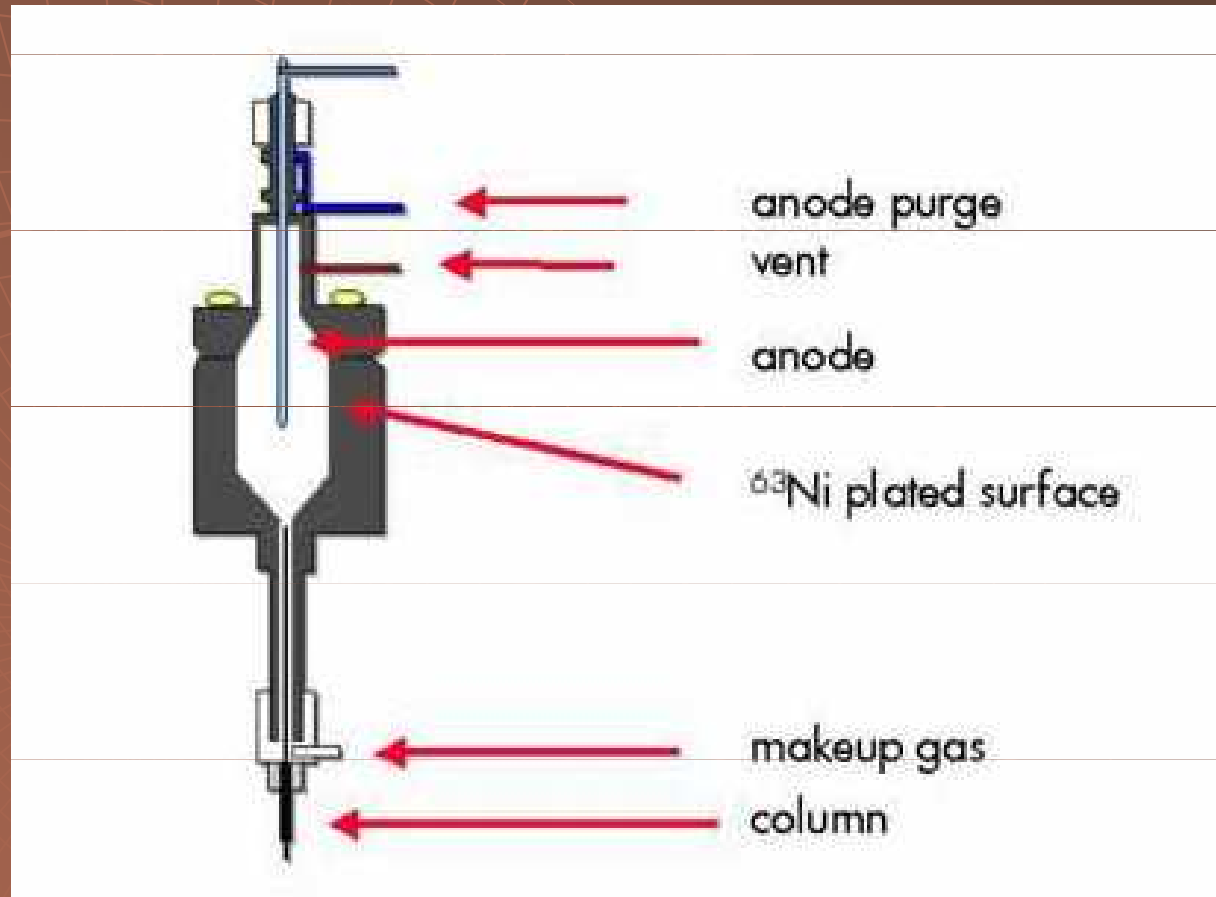
- ◆ Specifický
- ◆ Nedestruktivní
- ◆ Lineární rozsah – 10^4
- ◆ Princip – interakce β^- částic se vzorkem vyvolává pokles proudu

Detektor elektronového záchytu ECD

$\beta^- - {}_{63}\text{Ni}$

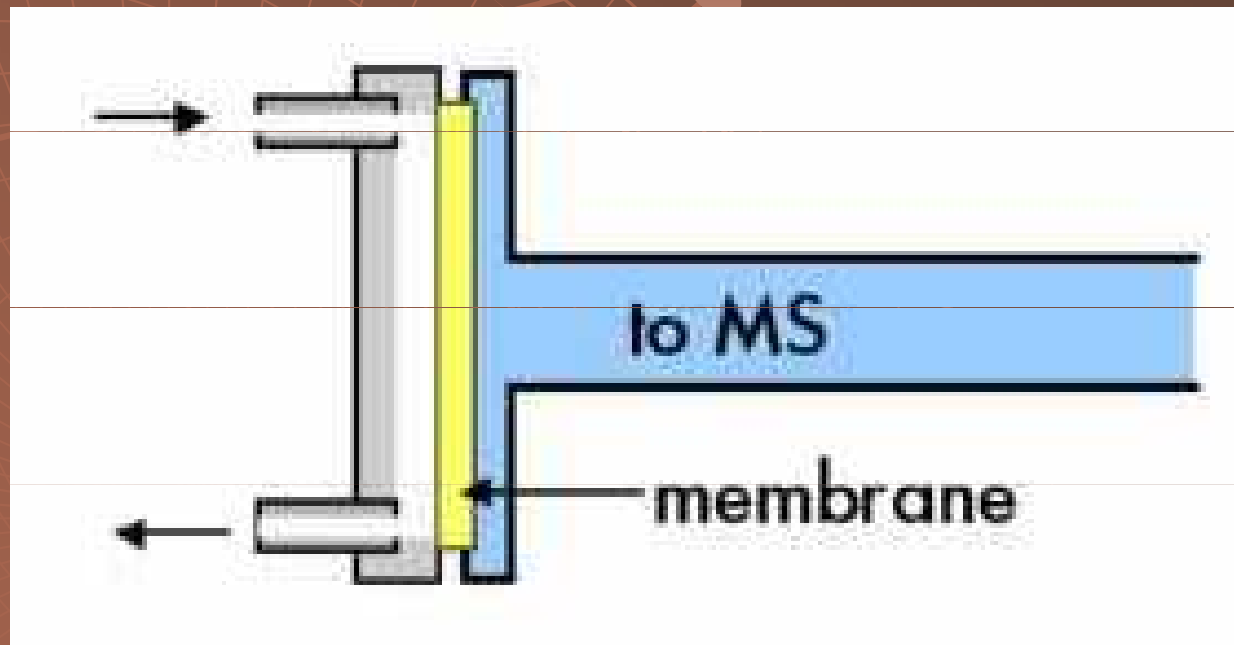


Detektor elektronového záchytu ECD



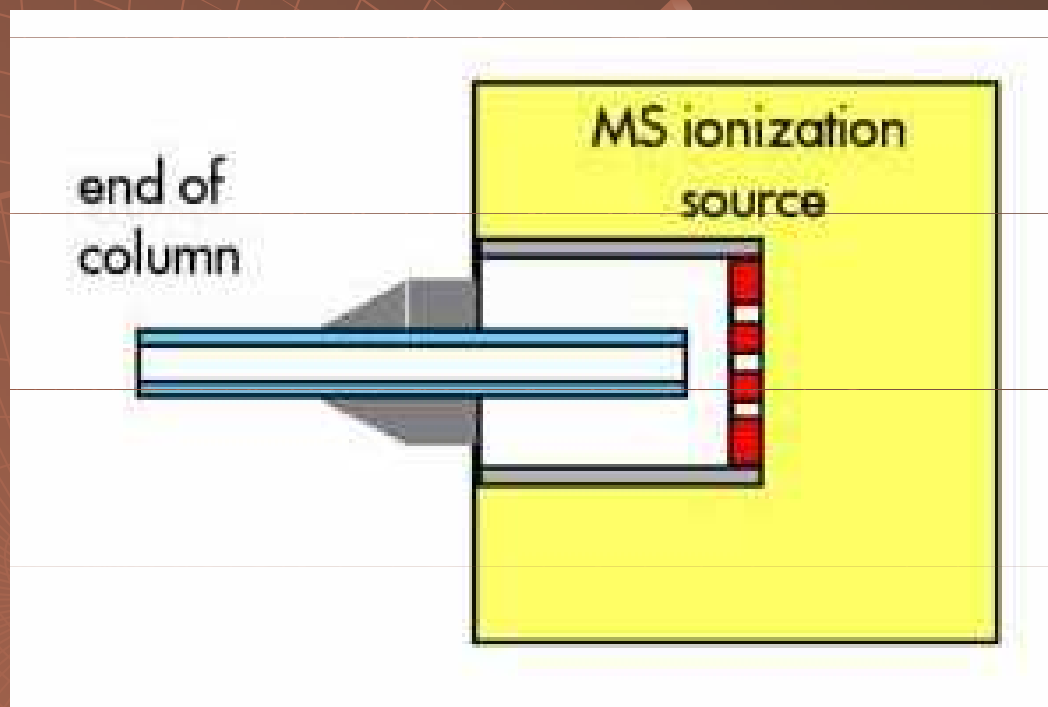
GC MS

permeační interface

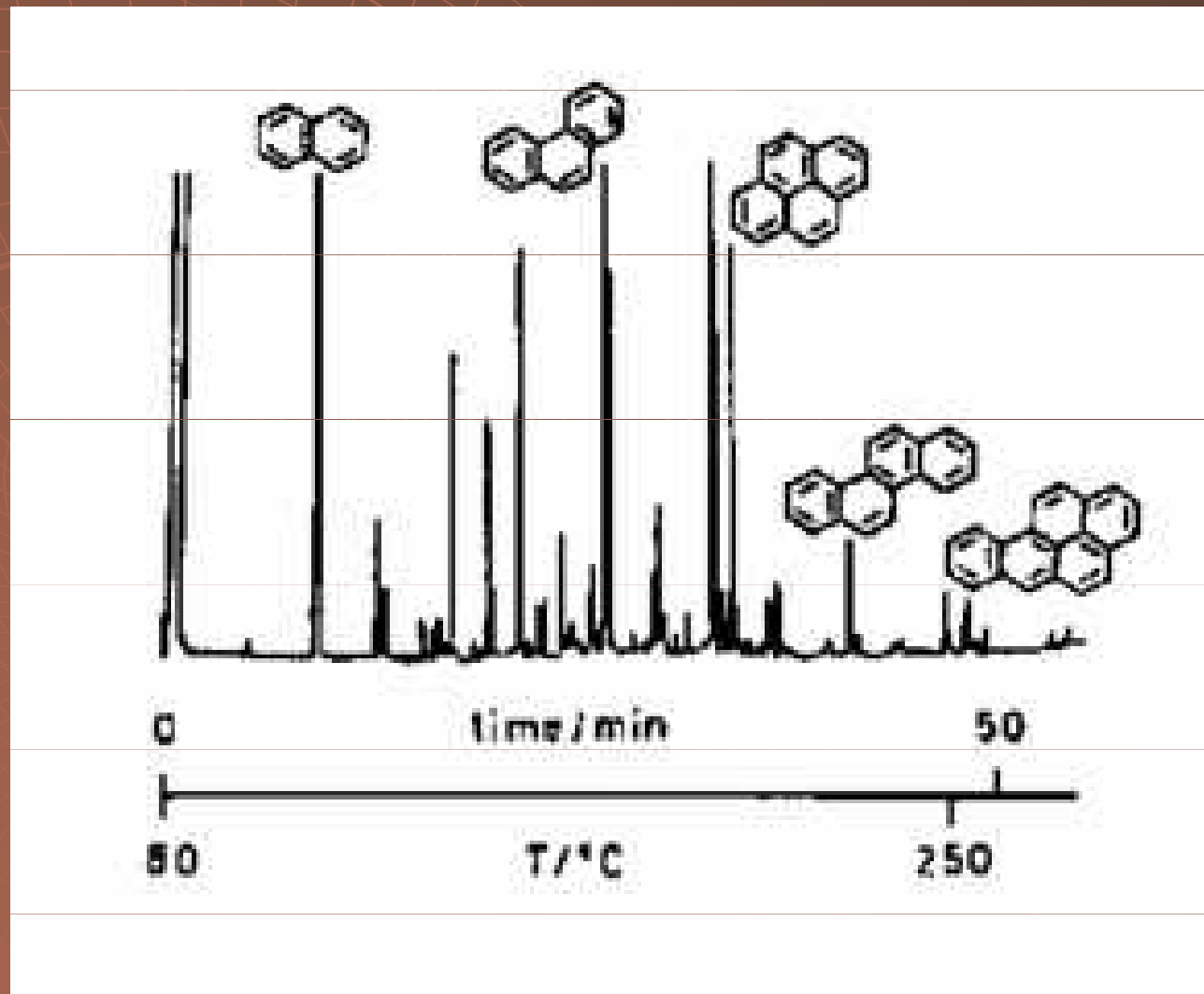


GC MS

přímé spojení



GC analysa



Superkritická fluidní chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - superkritická kapalina
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze, kapalina

SFC x kompromis mezi GC a HPLC

GC

+ vysoká difuze

- vysoká teplota

+ nízká viskozita

- těkavé látky

HPLC

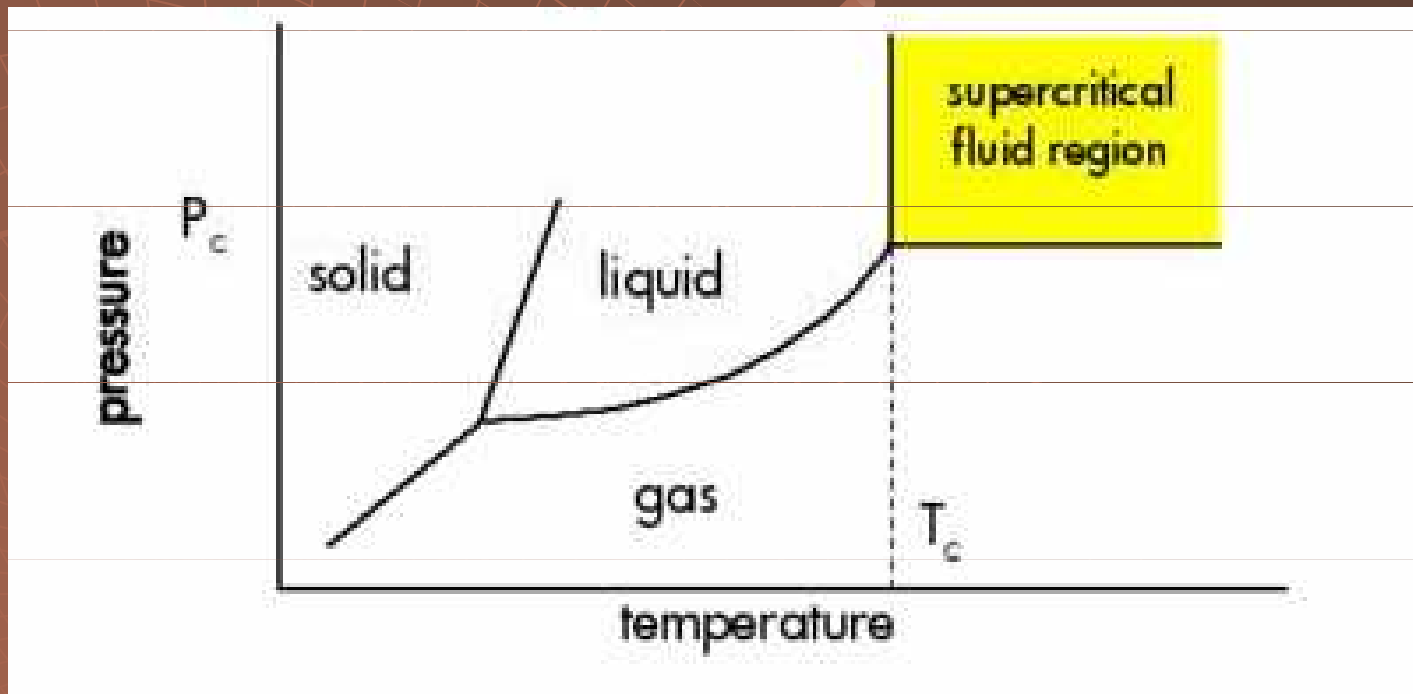
+ nízká teplota

- nízká difuze

+ kapacita

- rychlost analýz

Superkritická kapalina

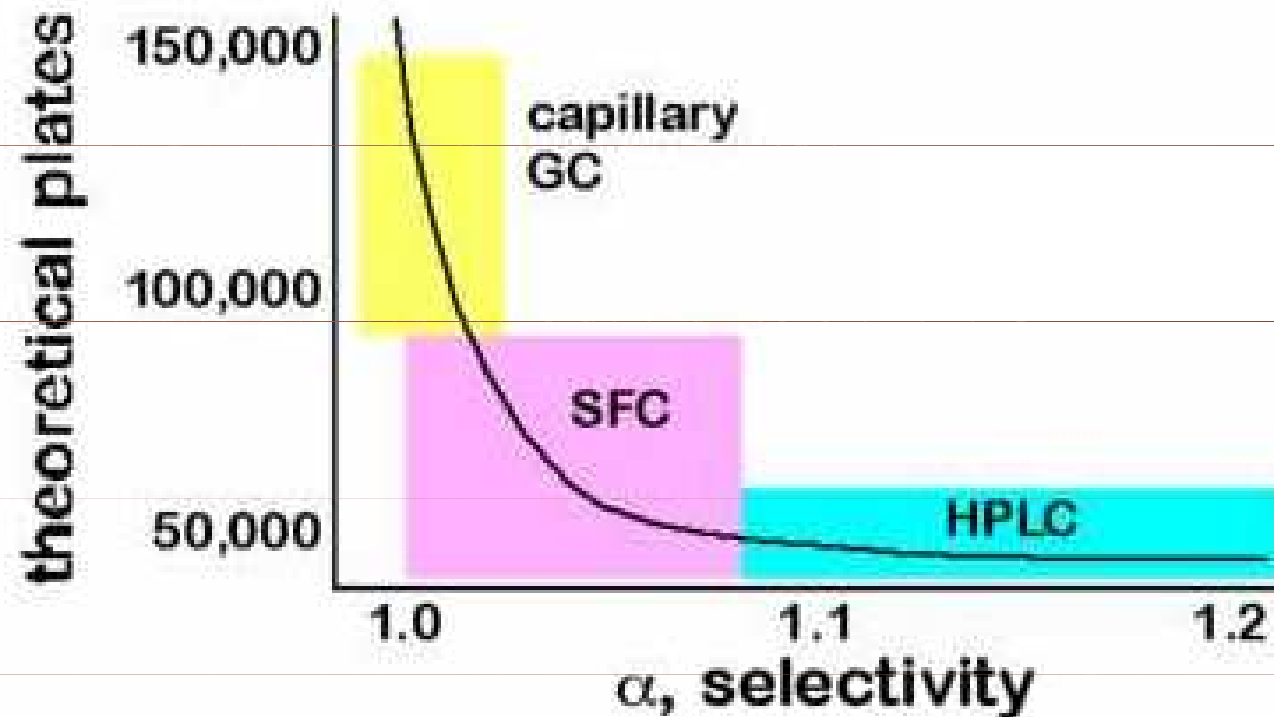


Superkritická kapalina

| Fluid | $T_{c'}$ °C | $P_{c'}$ atm | d' |
|---------------------------------|-------------|--------------|-------|
| CO ₂ | 31.3 | 72.9 | 0.96 |
| N ₂ O | 36.5 | 72.5 | 0.94 |
| NH ₃ | 132.5 | 112.5 | 0.40 |
| n-C ₅ | 196.6 | 33.3 | 0.51 |
| n-C ₄ | 152.0 | 37.5 | 0.50 |
| CCl ₂ F ₂ | 111.8 | 40.7 | 1.12 |
| CHF ₃ | 25.9 | 46.9 | ----- |

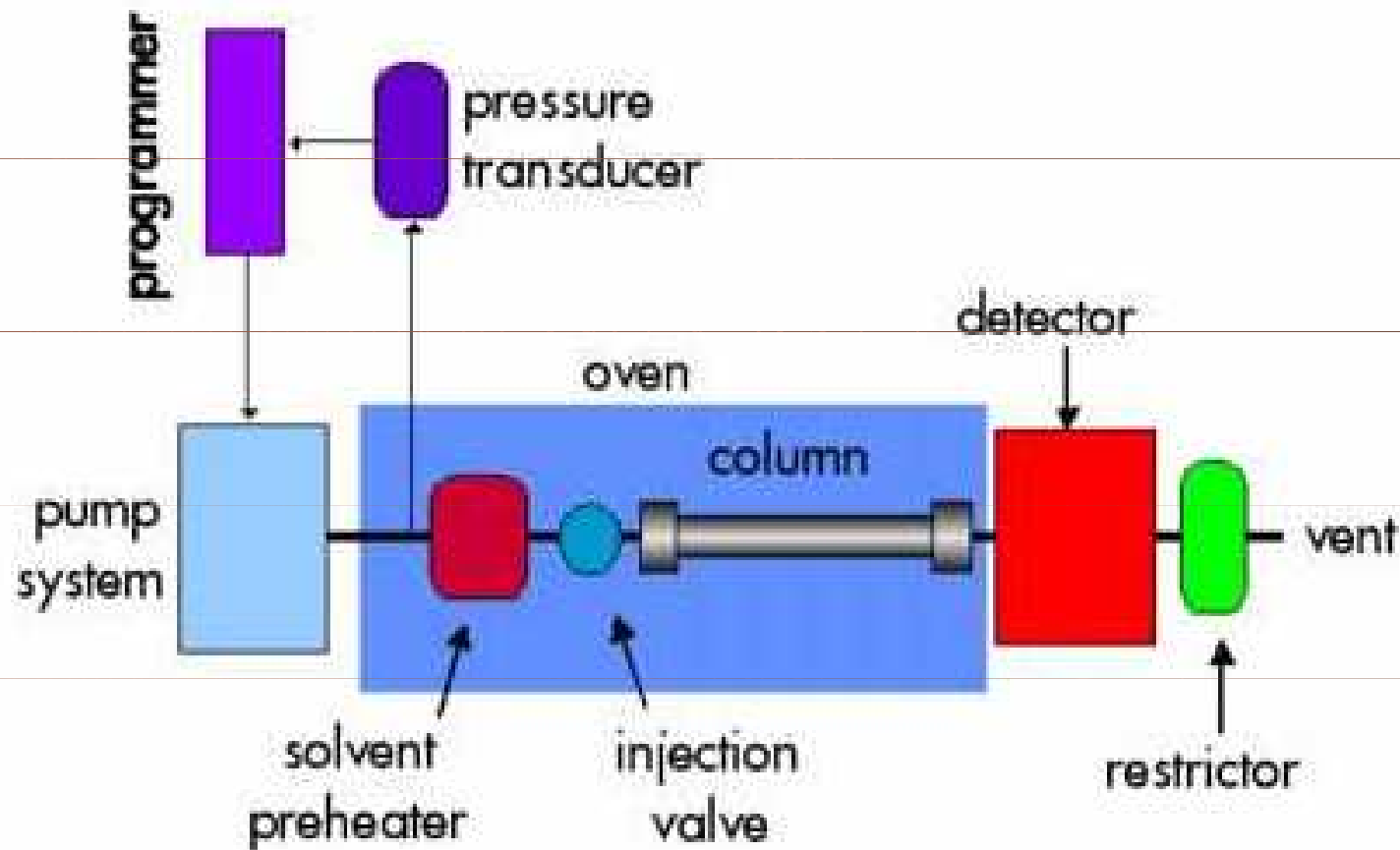
d' density in g/ml at 400 atm

Superkritická fluidní chromatografie

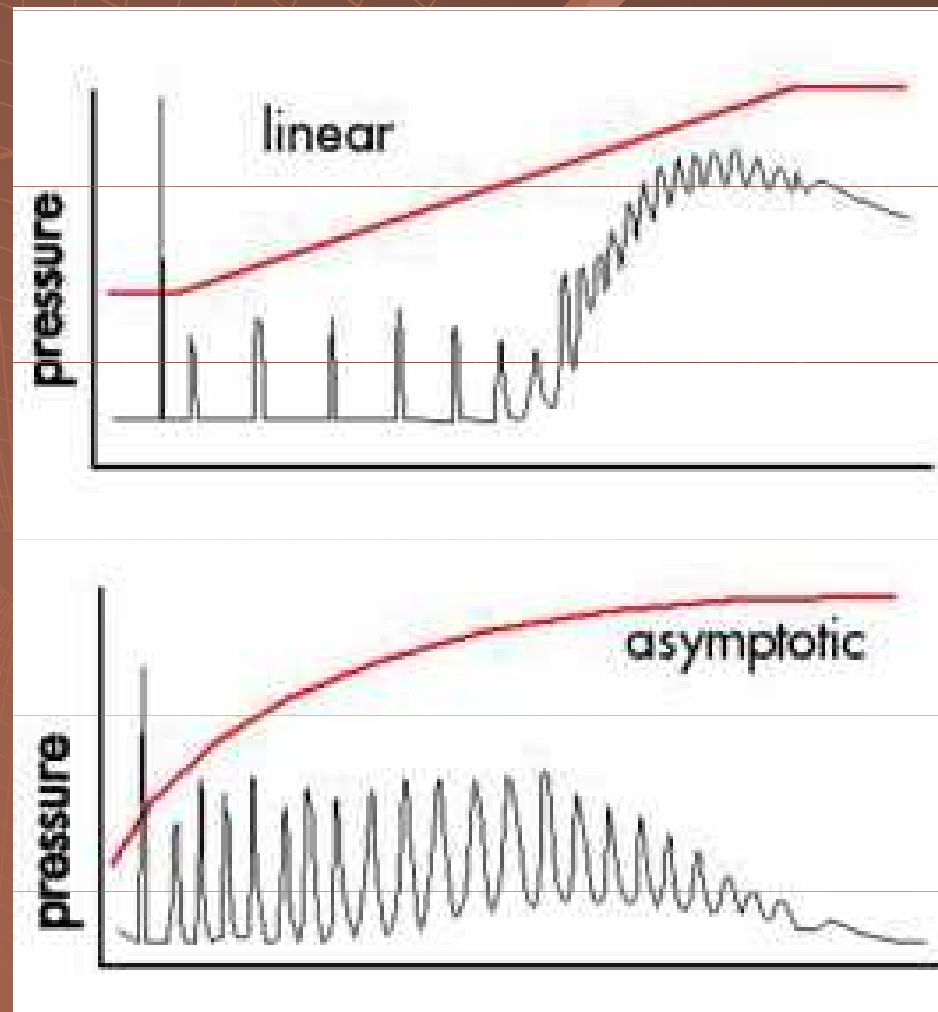


Number of plates required to achieve a separation with $R_s = 1.5$ and $k' = 2$

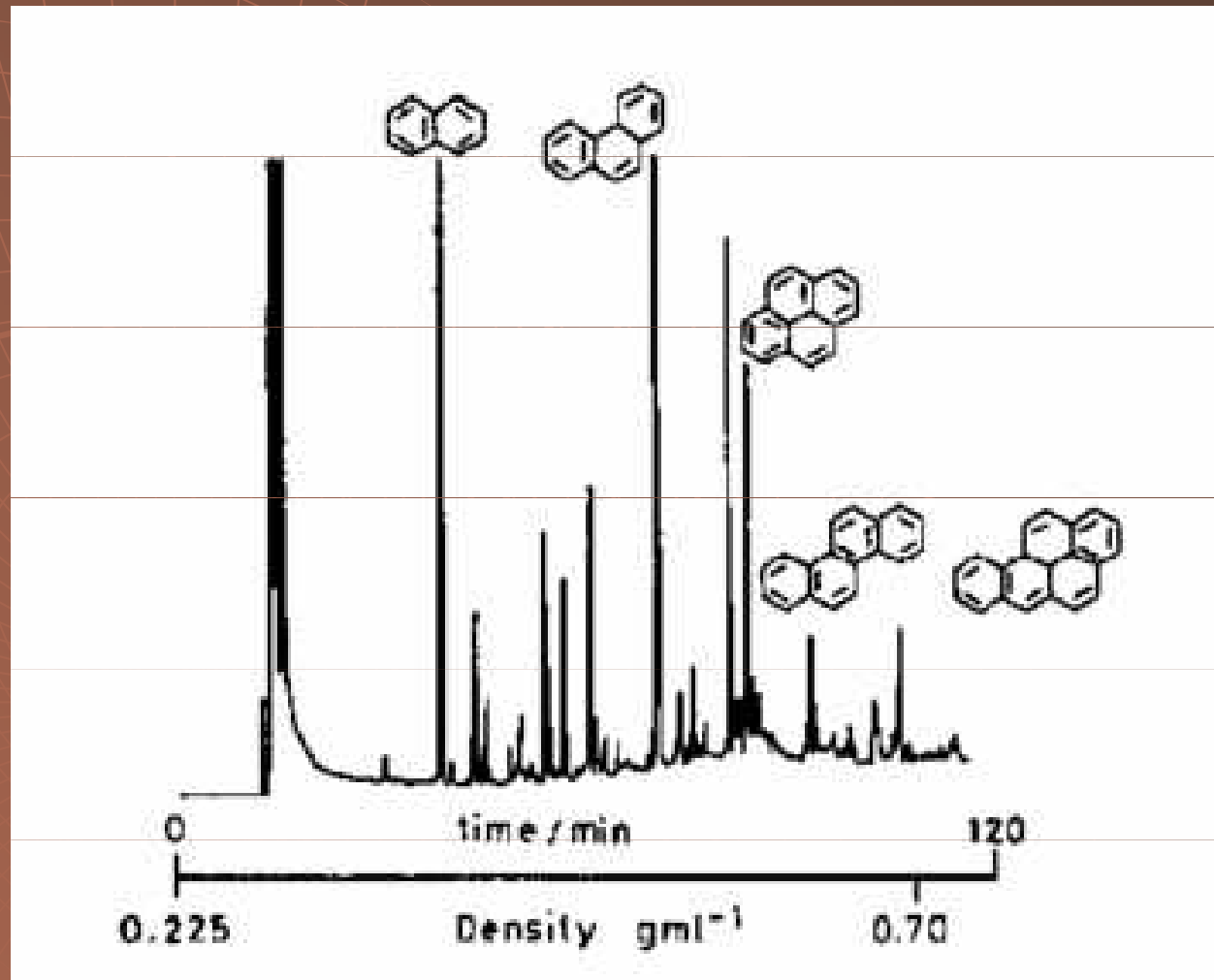
Superkritická fluidní chromatografie



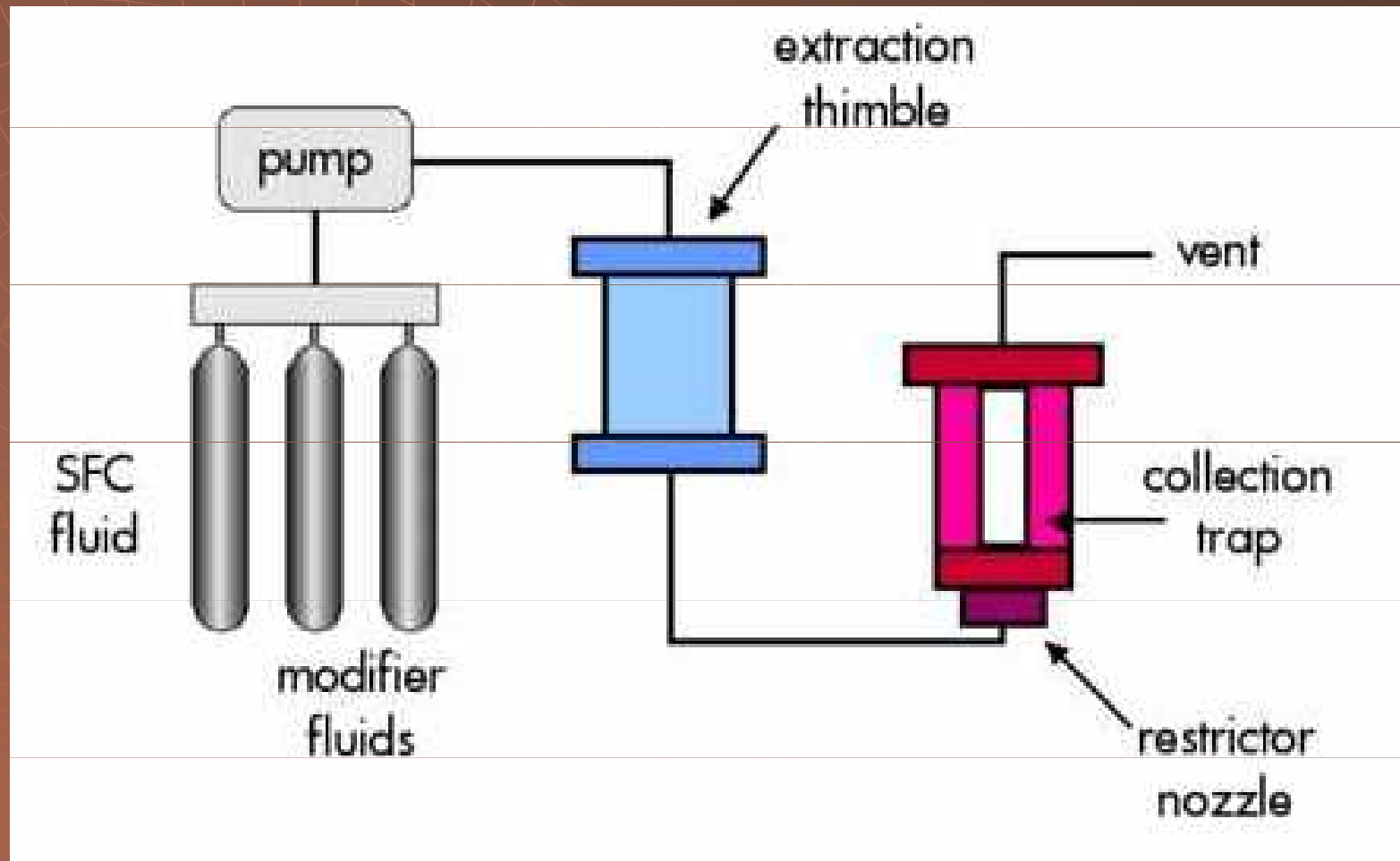
Superkritická fluidní chromatografie



SFC analysa



Superkritická fluidní extrakce



Superkritická fluidní extrakce

- ◆ Používané kapaliny - CO₂
 - levný,
 - netoxický
 - nízká kritická teplota
- ◆ Používané modifikátory
 - HCl – kyselé prostředí
 - NH₃ – bazické prostředí

Superkritická fluidní extrakce

◆ Výhody

- 10-100x rychlejší přestup hmoty
- přímé ovlivnění extrakční síly měněním hustoty (změnou tlaku nebo teploty)
- velká redukce objemů extrahovadel
- některá SF-extrakční činidla jsou za normálních podmínek plyny (CO_2) \Rightarrow jednoduché odpaření

Superkritická fluidní extrakce

◆ Nevýhody

- matricové efekty – neg. vliv matric; interakce se vzorkem i extrakční tekutinou

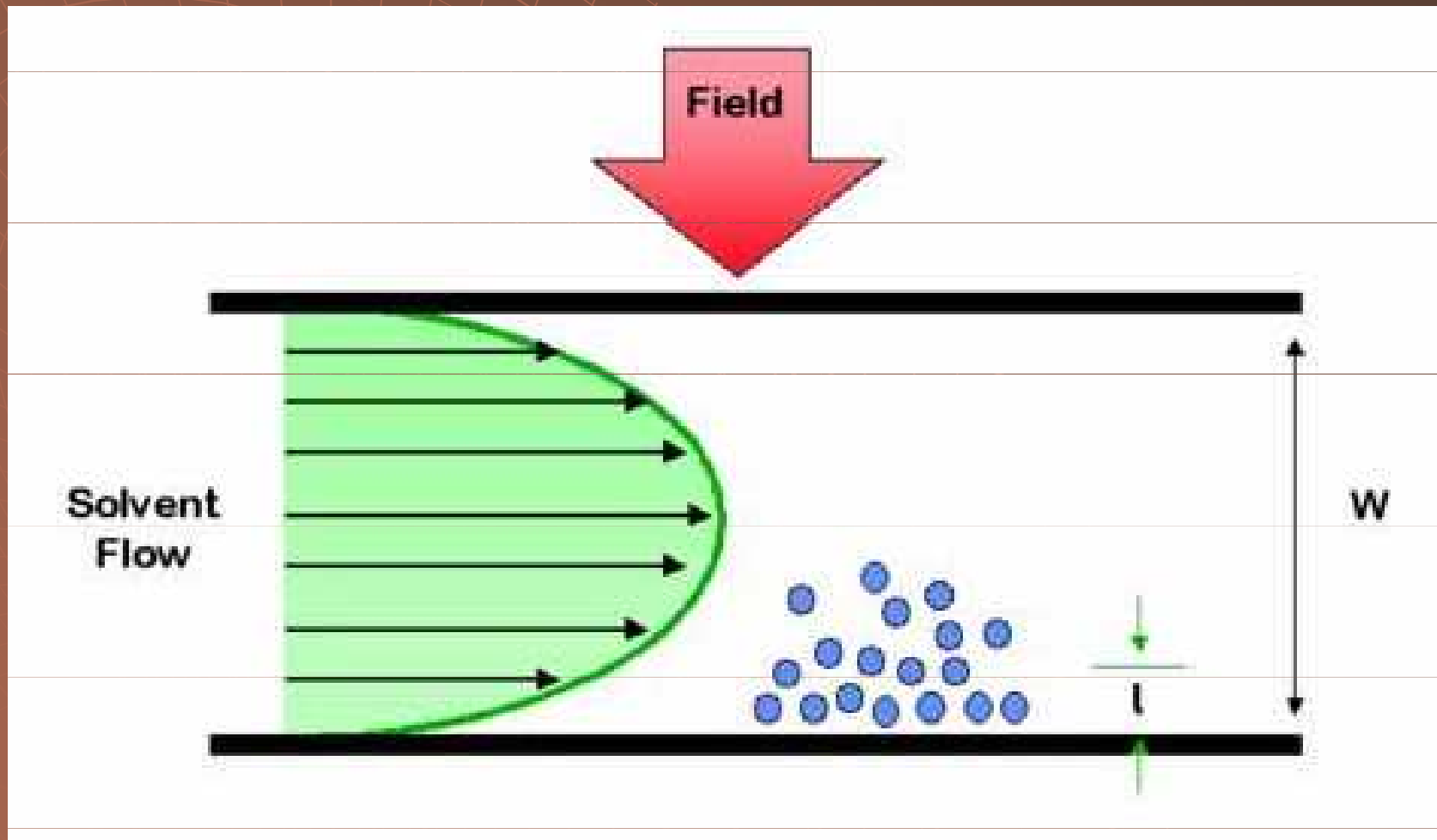
- složitá instrumentace – vysoké teploty a tlaky; práce s plyny (restriktor)

The background features a circular grid pattern on a dark brown background. The grid consists of concentric circles and radial lines. A hand holding a pen is positioned at the top right, with the pen tip pointing towards the center of the grid.

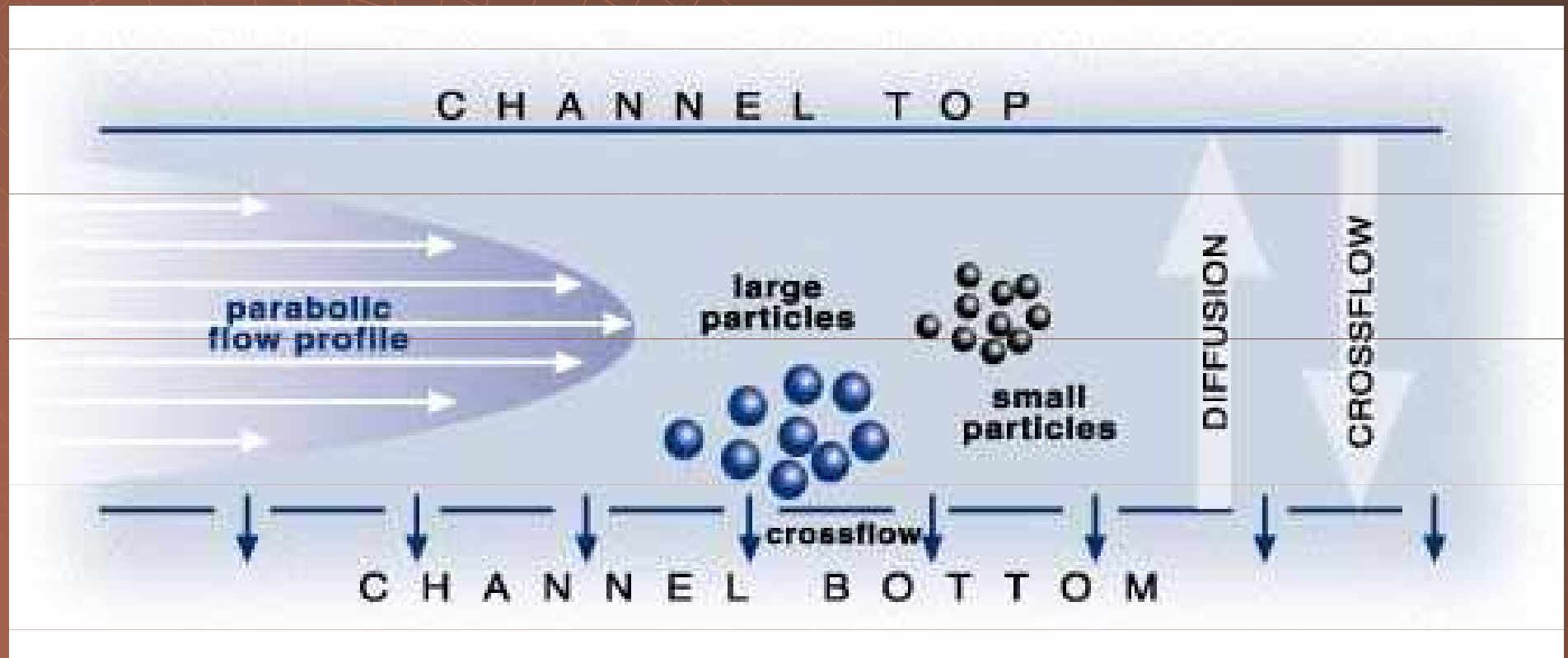
FFF

Field Flow Fractionation

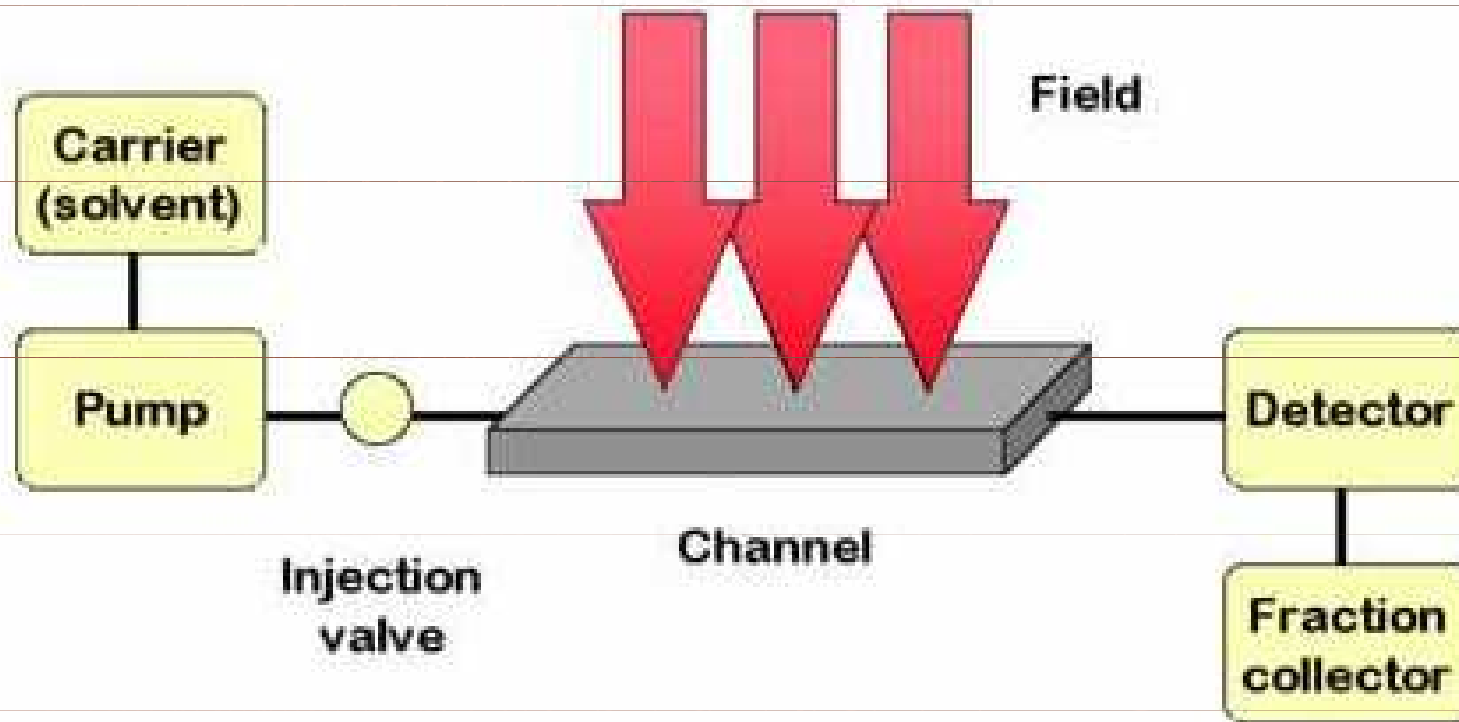
Field Flow Fractionation princip



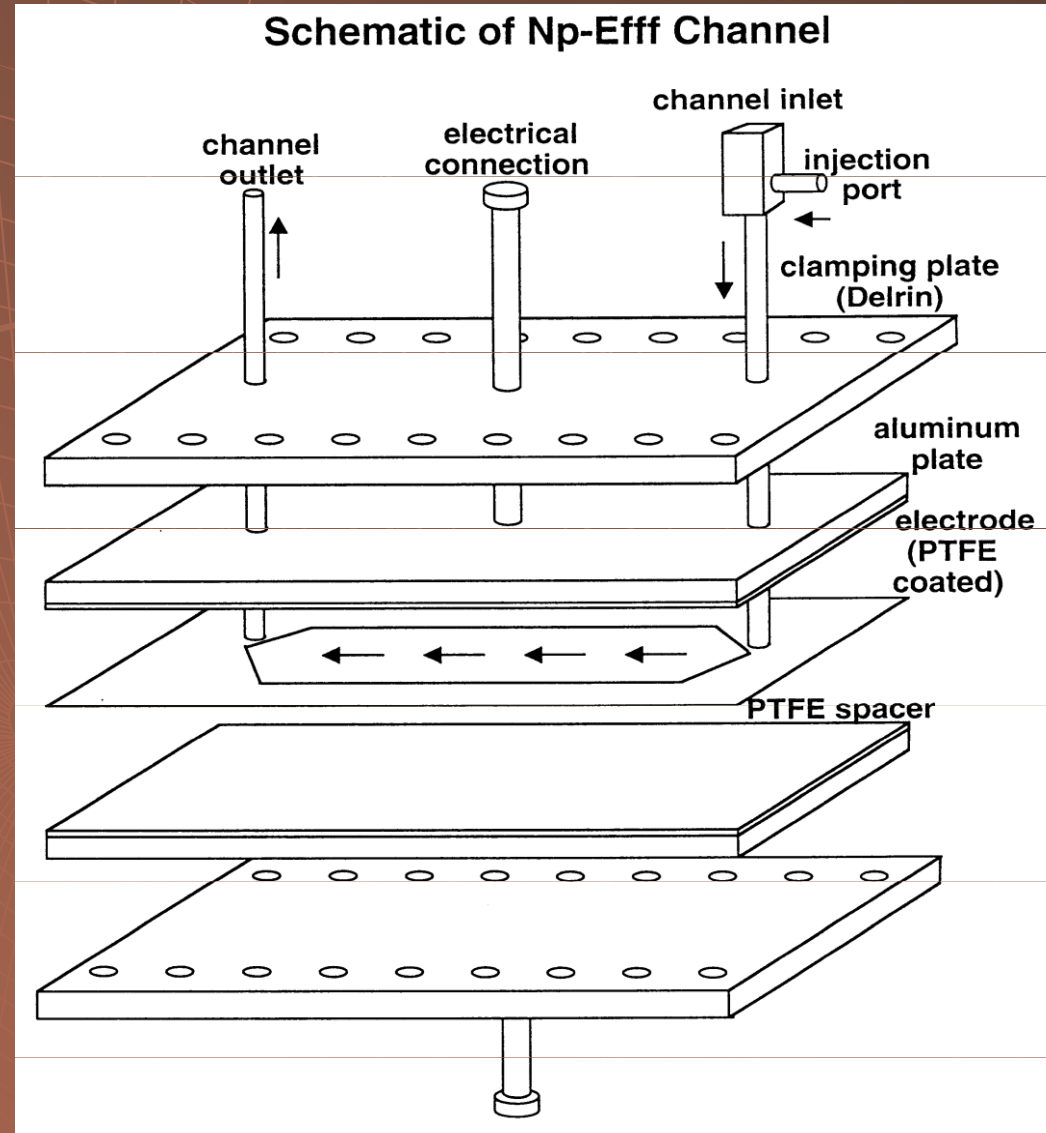
Field Flow Fractionation princip



Field Flow Fractionation instrumentace



Field Flow Fractionation instrumentace



Používaná pole

- ◆ Sedimentační
- ◆ Termální
- ◆ Hydraulické
- ◆ Elektrické

Preparativní FFF

