

RETENČNÍ MECHANISMY

Pokročilá kapalinová
chromatografie



JSOU STEJNÉ?



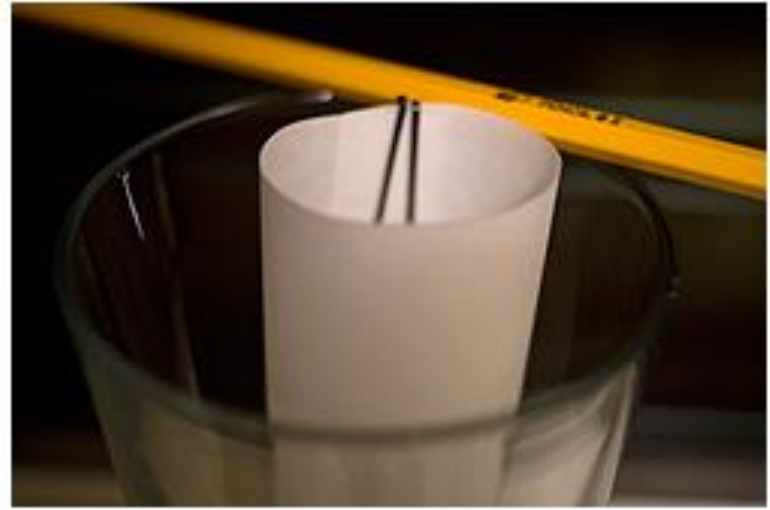
JSOU STEJNÉ?



+



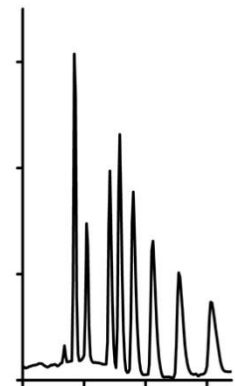
CHROMATOGRAFIE



JSOU STEJNÉ?



KOLONOVÁ CHROMATOGRAFIE



CHROMATOGRAFIE

Michail Semjonovič Cvět

- separace chlorofylových barviv na CaCO_3
- 1901 – 1903 – 1905 – 1906
(pokus – odesláno – publikováno – název)

Chromato-grafie

- z řeckého **chroma** (barva) a **graphein** (psát)
- ЦВЕТ = *barva*



A. Tiselius

Elektroforéza

(Nobelova Cena 1948)

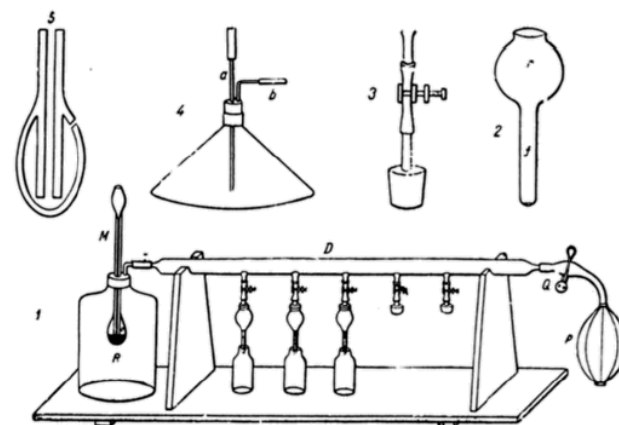


A.J.P. Martin



R. Synge

Rozdělovací chromatografie (Nobelova Cena 1952)



CHROMATOGRAFIE

Michail Semjonovič Cvět

- separace chlorofylových barviv na CaCO_3
- 1901 – 1903 – 1905 – 1906
(pokus – odesláno – publikováno – název)

Chromato-grafie

- z řeckého **chroma** (barva) a **graphein** (psát)
- ЦВЕТ = *barva*



A. Tiselius

Elektroforéza

(Nobelova Cena 1948)



Martin Prince

S03E10

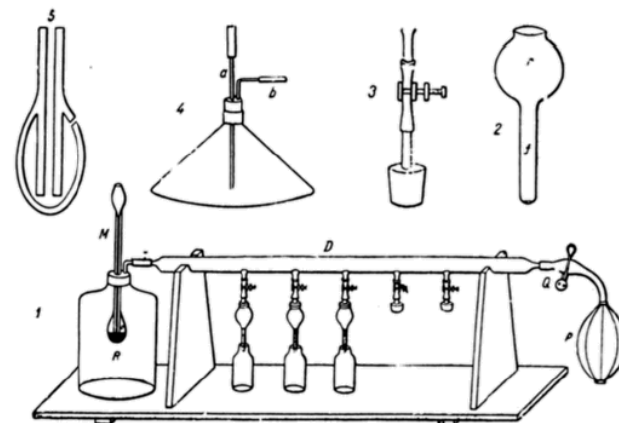


A.J.P. Martin

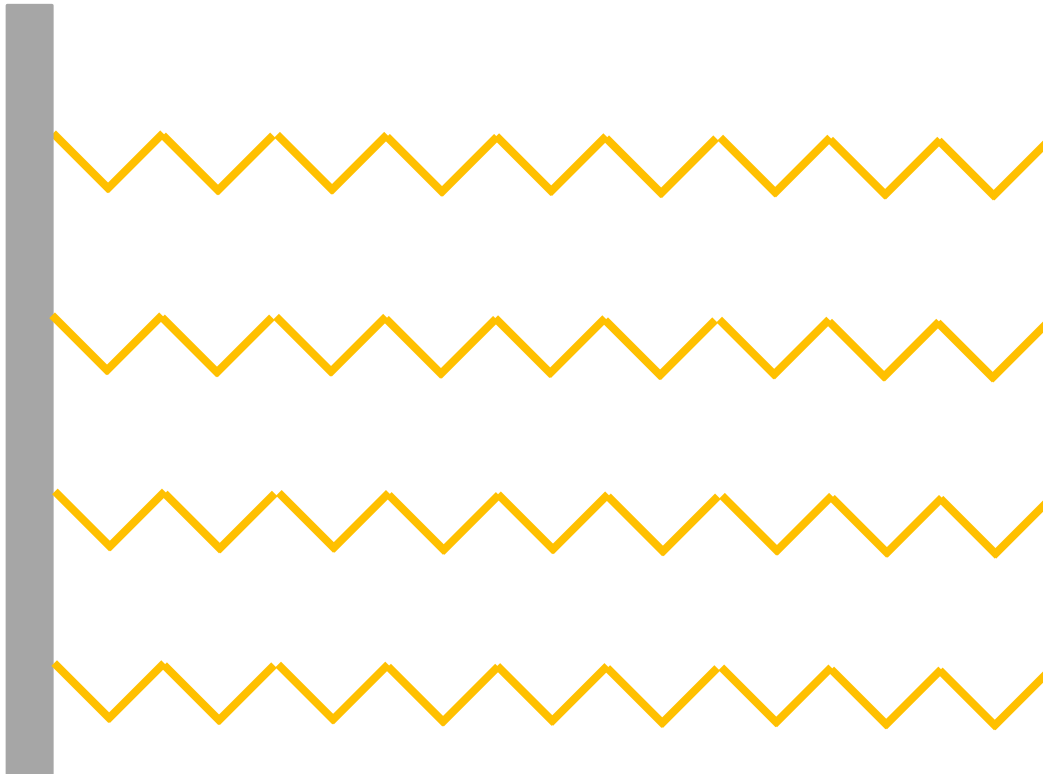


R. Synge

Rozdělovací chromatografie (Nobelova Cena 1952)



KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE



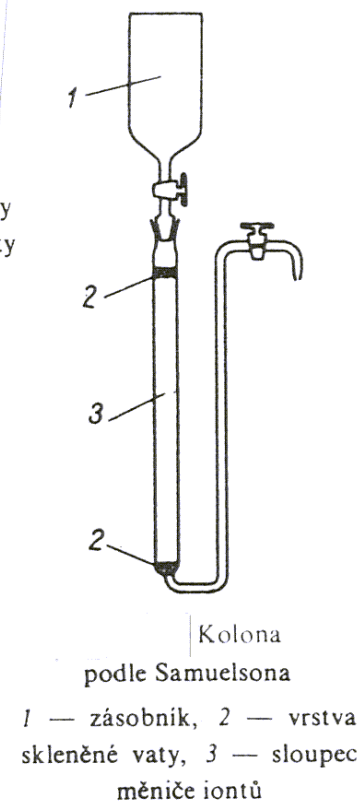
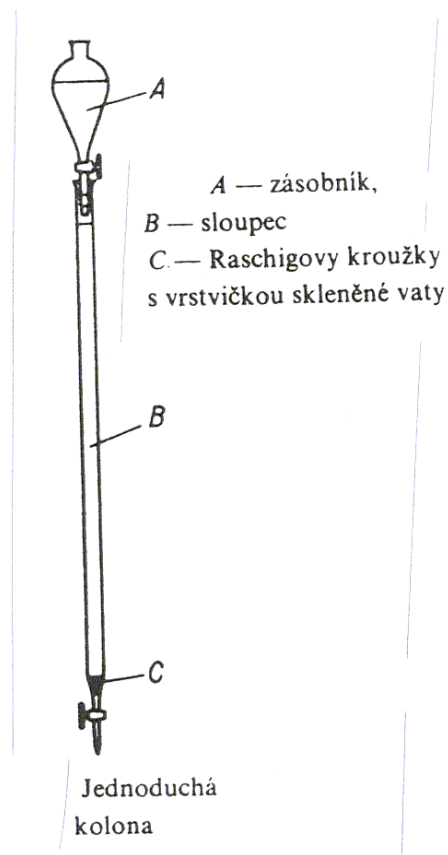
KOLONOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Adsorbent (silikagel, alumina) či ionex

Kolony (50 – 250 mm) sypané za sucha (předem nastavená aktivita adsorbentu)

Vzorek nalit na vrch sloupce, postupná eluce rozpouštědly (odmísení!)

Odběr a analýza **frakcí**



V dnešní době hlavně čištění, preparace.

VYSOKOÚČINNÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography

Automatická metoda od zavedení vzorků po vyhodnocení dat

Krátké kolony (30 - 250 mm)

Sorbent s malými částicemi (μm)

Separace ovlivněna náplní kolony i mobilní fází.

Rychlá (<15-20 min),

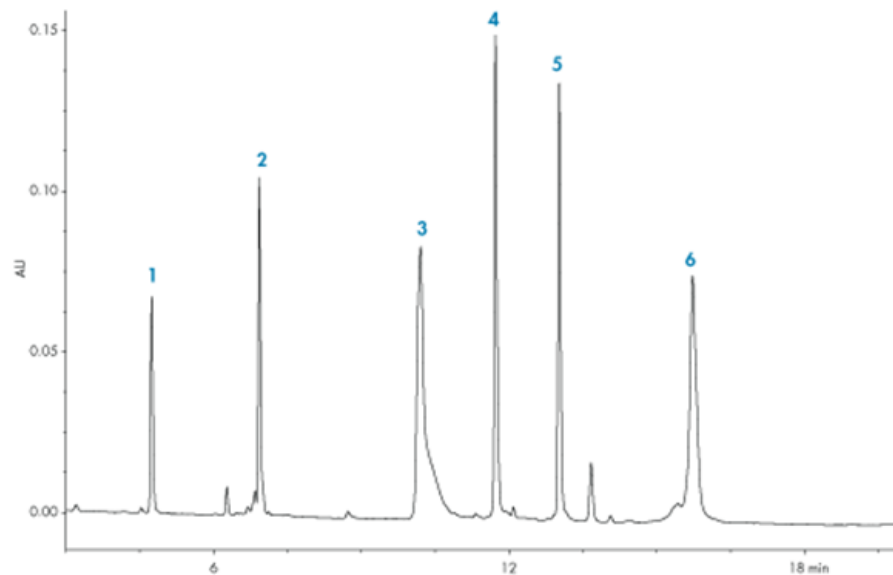
Vysoká účinnost (>40 000 n/m)

Vysoký tlak (5-40 MPa)

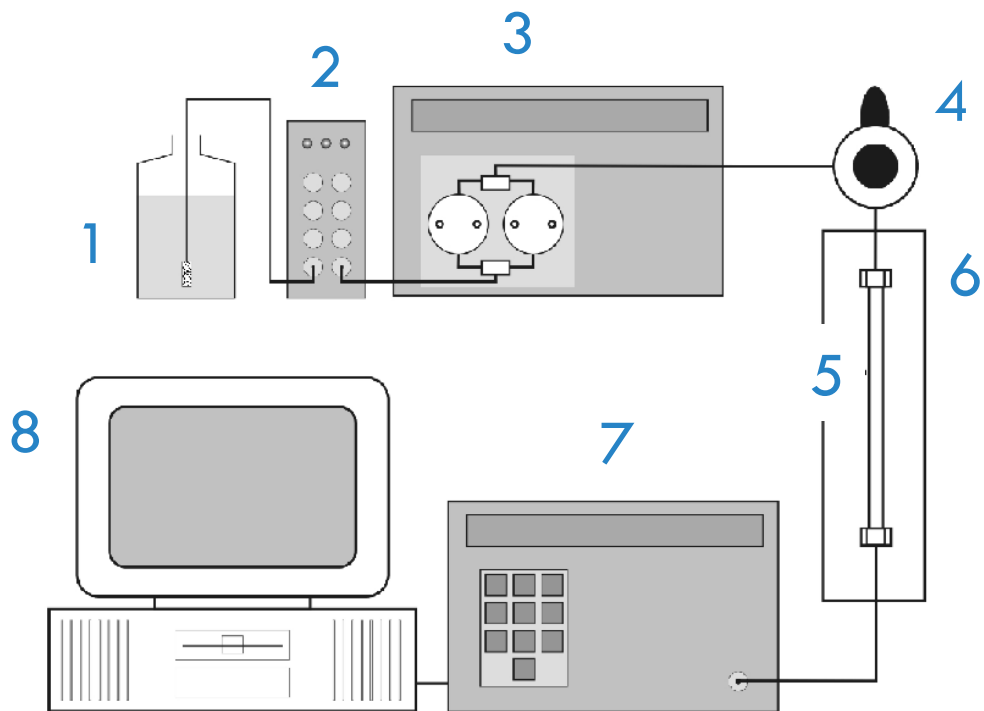
Kontinuální detekce

Column: XBridge BEH300, C₁₈,
3.5 μm , 2.1 \times 50 mm
Mobile Phase A: 0.1% TFA in water
Mobile Phase B: 0.075% TFA in 71.4% Acetonitrile
Flow rate: 0.2 mL/min
Gradient: 28-100% B in 25 min
Column temp: 40 °C
Injection: 5 μL
Detection λ : 220 nm

Sample: 1. Protein Mixture: Ribonuclease A (0.04 mg/mL)
2. Cytochrome C (0.06 mg/mL)
3. Bovine Serum Albumin (0.20 mg/mL)
4. Myoglobin (0.13 mg/mL)
5. Enolase (0.22 mg/mL)
6. Phosphorylase b (0.59 mg/mL)
prepared in 0.1% TFA in 5% Acetonitrile



INSTRUMENTACE



- 1 – zásobník mobilní fáze
- 2 – odplyňovač mobilní fáze
- 3 – vysokotlaké čerpadlo
- 4 – dávkovač

- 5 – separační kolona
- 6 – termostat kolony
- 7 – detektor
- 8 – datová stanice

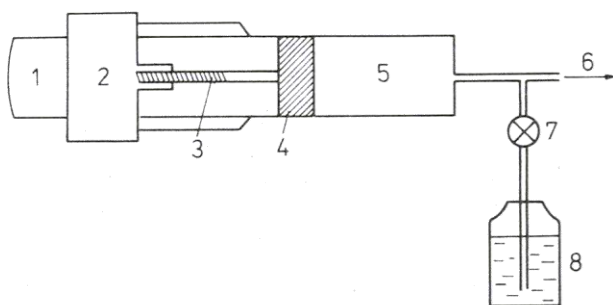


VYSOKOTLAKÁ ČERPADLA

30 – 50 MPa, odolnost vůči korozi, stabilní a reprodukovatelný průtok < 0,5 – 1%

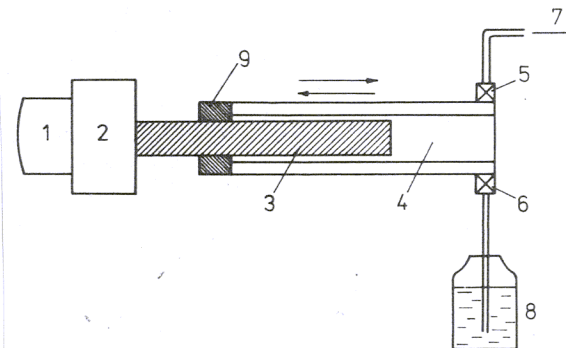
Aplikace	Průměr kolony	Průtok
Konvenční LC	4,6 mm	0,5 – 1,0 ml/min
Mikrokolonová LC	1 mm – 500 μm	40 μl/min – 20 μl/min
Kapilární LC	500 μm – 100 μm	20 μl/min – 300 nl/min
Nano LC	100 μm – 75 μm – 50 μm	300 nl/min – 180 nl/min – 80 nl/min

Velkoobjemová stříkačka

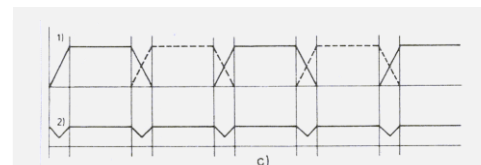


Čerpadlo na principu velkoobjemové injekční stříkačky
 1 – elektromotor s krokovým chodem, 2 – převodovka, 3 – závit na táhle pístu, 4 – píst, 5 – válec naplněný mobilní fází, 6 – směr toku mobilní fáze ke koloně, 7 – jednosměrný ventil umožňující plnění čerpadla mobilní fází, 8 – zásobník mobilní fáze

Pístové čerpadlo



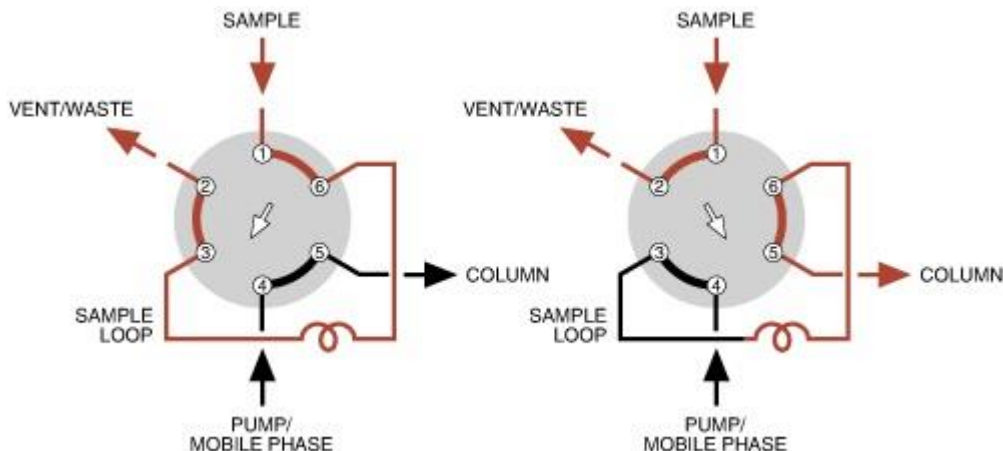
Jednočinné pístové čerpadlo s malým objemem činné části
 1 – elektromotor,
 2 – převodový mechanismus,
 3 – píst, 4 – pracovní prostor válce, 5 – výtlačný ventil, 6 – nasávací ventil, 7 – připojení ke koloně, 8 – zásobník mobilní fáze, 9 – těsnění pístu



Průtokové profily v závislosti na čase a na poloze pístu u čerpadel s jednou a dvěma hlavami

DÁVKOVÁNÍ VZORKŮ

Vnější smyčka

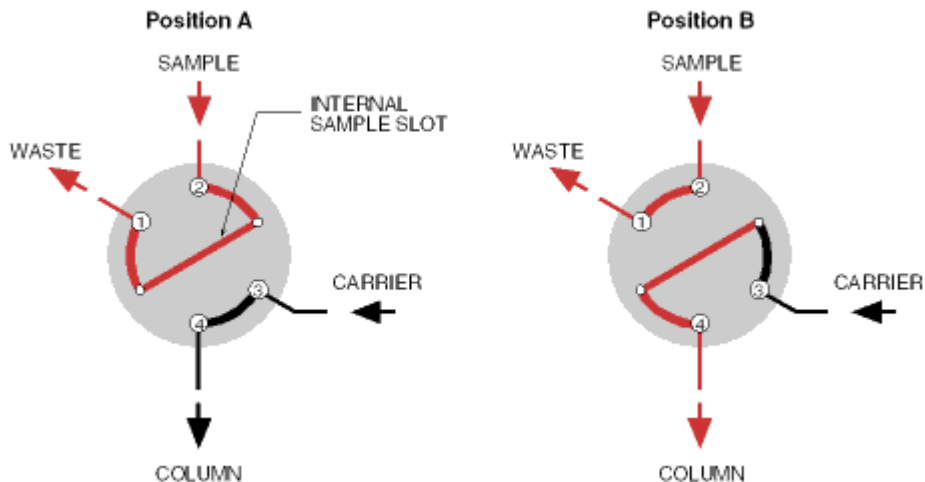


Nutno překonat protitlak mobilní fáze

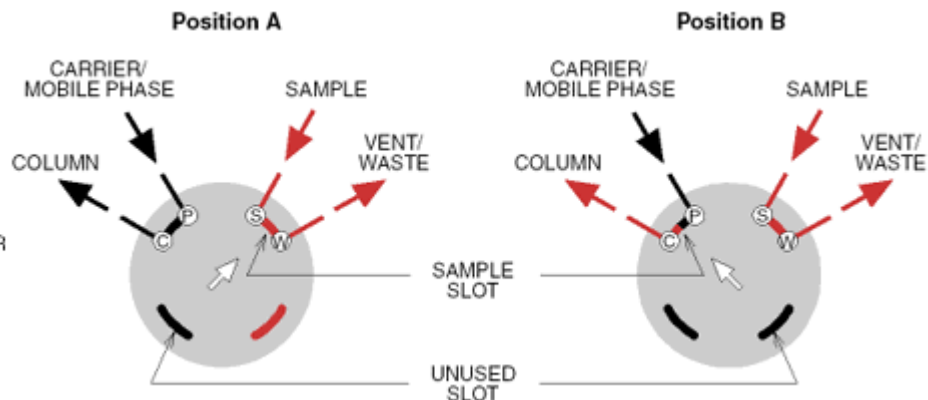
Automatické dávkovače (úprava vzorku, deprivatizace,...)

Nezapomenout, že **objem vzorku** ovlivňuje kvalitu separace!

Vnitřní smyčka



Velmi malé objemy (nl)



KOLONA

Aplikace	Průměr kolony	Průtok
Konvenční LC	4,6 mm	0,5 – 1,0 ml/min
Mikrokolonová LC	1 mm – 500 μm	40 μl/min – 20 μl/min
Kapilární LC	500 μm – 100 μm	20 μl/min – 300 nl/min
Nano LC	100 μm – 75 μm – 50 μm	300 nl/min – 180 nl/min – 80 nl/min

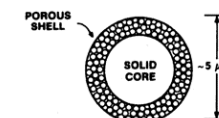
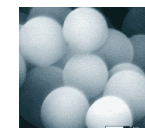
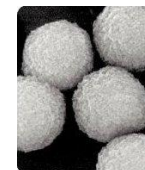
Délka konvenční kolony: 100 – 250 mm
„high speed“ kolony < 50 mm

Průměr 3 – 4 mm (analytické), 1 – 2 mm (mikrokolony), < 1 mm (kapilární), > 4 mm (preparativní)

Částice

LC > 20 μm (plněné za sucha)
HPLC > 10 > 5 > 3 > 1.5 μm (suspenní technika), kulové, pórovité, povrchově pórovité, neporézní, nejčastěji **silikagel**

Optimalizace mimokolonových objemů
Výběr instrumentace na základě kolony



POŽADAVKY NA HPLC KOLONY

- **Retence, selektivita a účinnost separace** různých šarží daného typu kolon – reprodukovatelné a dlouhodobě stabilní v co nejširším rozsahu polarit a pH mobilních fází a pracovních teplot.
- Vysoká účinnost a **symetrie píků** i pro separaci polárních, kyselých, bazických či vysokomolekulárních látek (peptidy, proteiny, syntetické polymery).



www.emdmillipore.com



www.hamiltoncompany.com

- **Mechanická stabilita** kolon při pracovních tlacích do 30 – 40 MPa, co nejvyšší **permeabilita** (malý tlakový odpor) a počet teoretických pater i při vysokých průtocích mobilních fází – rychlé separace.
- **Kompatibilita s technikou HPLC-MS.**

DETEKČNÍ TECHNIKY

Selektivní – odezva pouze na koncentraci analyzované látky

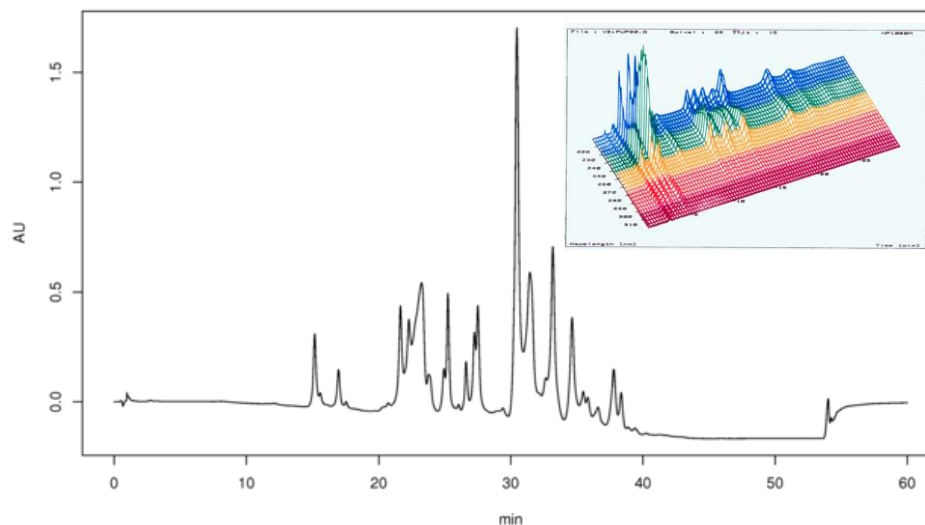
Univerzální – odezva úměrná celkové vlastnosti eluátu

Ideální detektor

- citlivý
- malý šum
- okamžitá odezva
- lineární v širokém koncentračním rozsahu
- minimální příspěvek k rozšiřování píků
- málo citlivý ke změnám tlaku, teploty a průtoku
- možnost práce s gradientem – kompromis

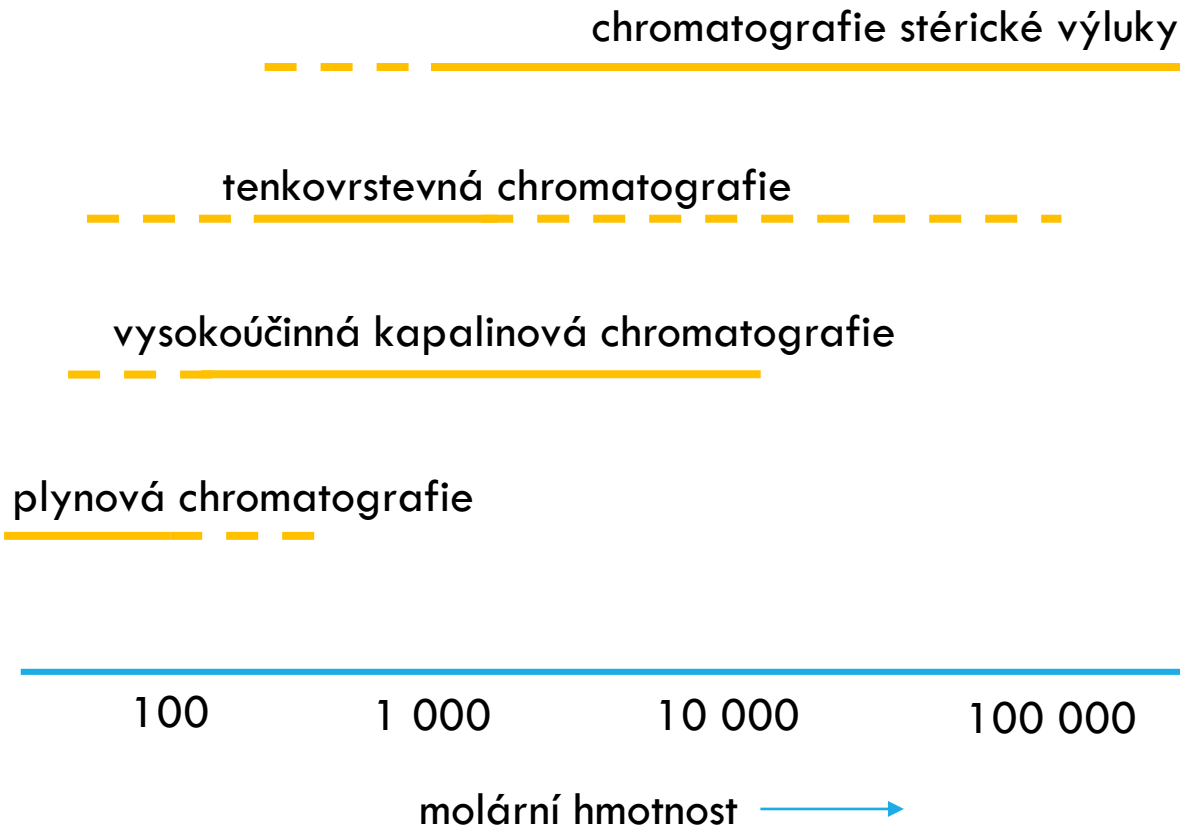
Nejpoužívanější

- hmotnostní (HPLC/MS)
- spektrofotometrický UV – VIS
- fluorimetrický
- elektrochemický
- vodivostní
- rozptyl světla



ROZDĚLENÍ SEPARAČNÍCH METOD

Vliv velikosti látek

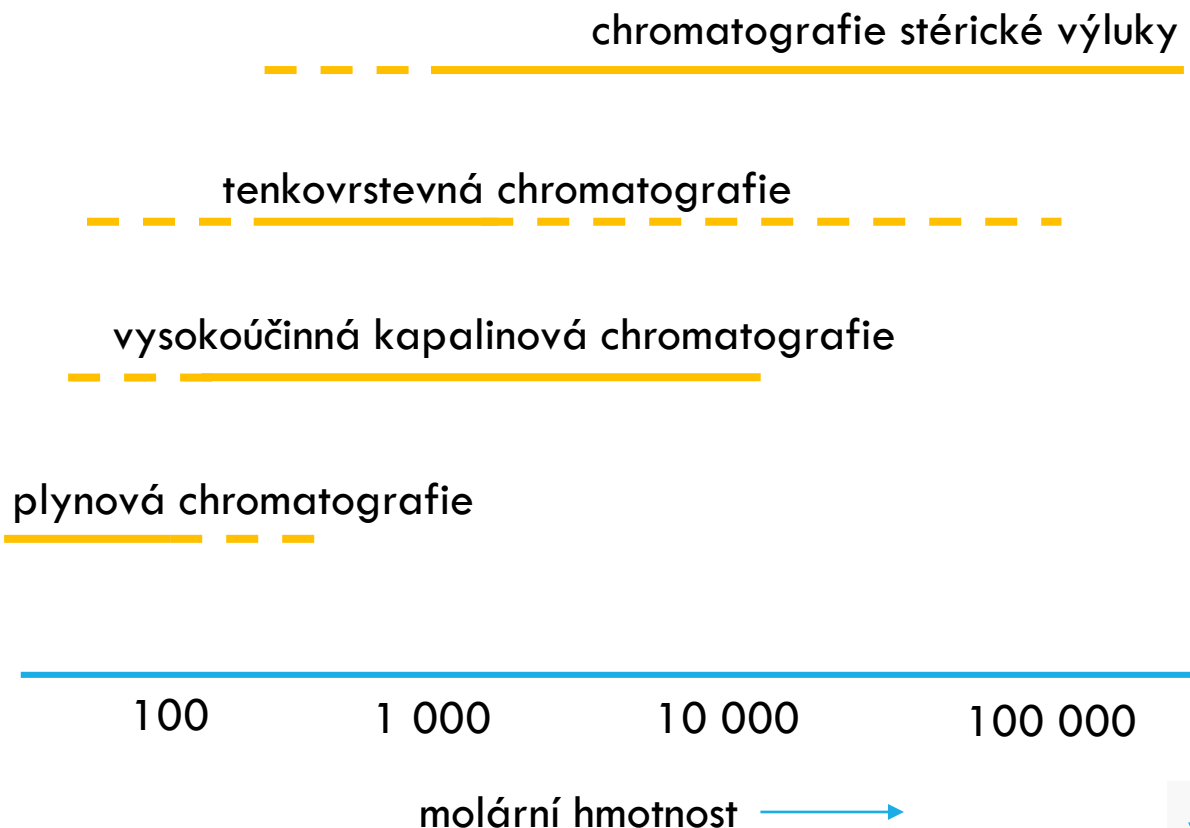


Mechanismy

- Adsorpce
- Rozdělování
- Chemická reakce
 - Výměna iontů
 - Srážení
- Síťový efekt

ROZDĚLENÍ SEPARAČNÍCH METOD

Vliv velikosti látek



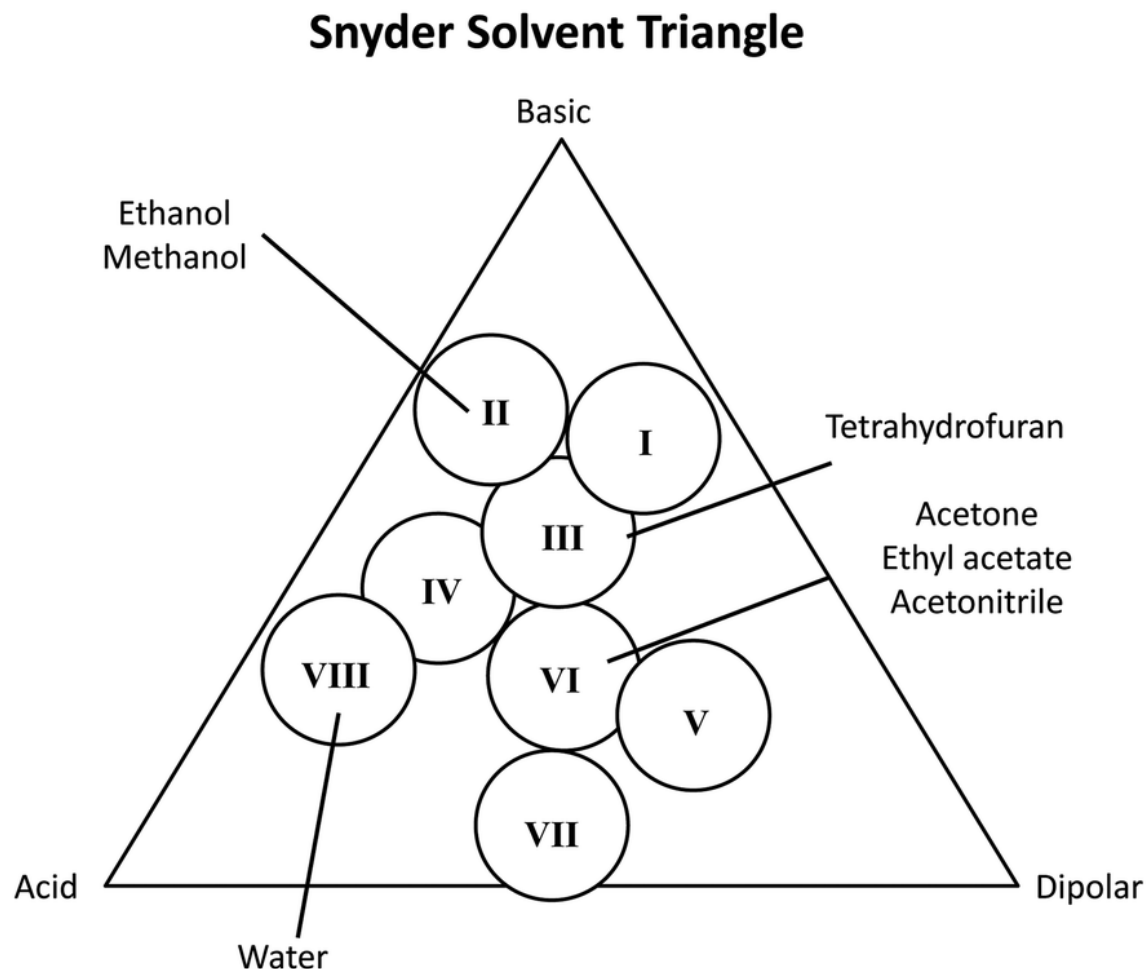
Mechanismy

- Adsorpce
- Rozdělování
- Chemická reakce
 - Výměna iontů
 - Srážení
- Síťový efekt

Vše lze rozdělit!

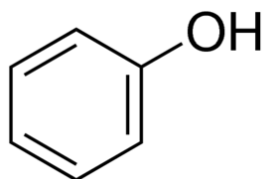
ROZPOUŠTĚDLA / MOBILNÍ FÁZE

I	Alifatické ethery, trialkylaminy
II	Alifatické alkoholy
III	Pyridiny, tetrahydrofuran, amidy (bez formamidu)
IV	Glykoly, glykoethery, benzylalkohol, formamid, HAc
V	Dichlormethan, dichlorethan, trikresylfosfát
VIa	Alkylhalogenidy, ketony, estery, nitrily, sulfoxidy, sulfony, anilin, dioxan
VIb	Nitrosloučeniny, fenyalkylethery, aromatické uhlovodíky
VII	Aromatické halogensloučeniny, difenyether
VIII	Fluoralkanoly, m-kresol, chloroform, voda

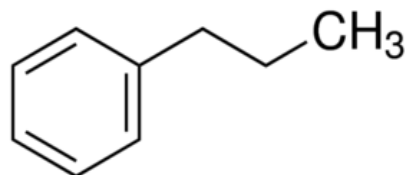


Mísitelnost!

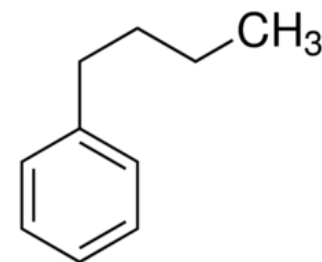
SEŘAĎTE PODLE POLARITY



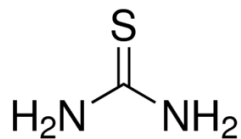
Fenol



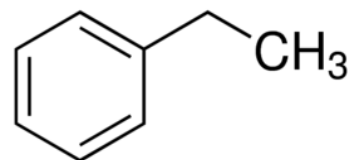
Propylbenzen



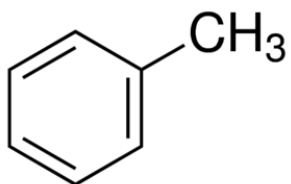
Butylbenzen



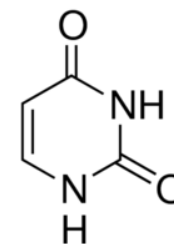
Thiomočovina



Ethylbenzen

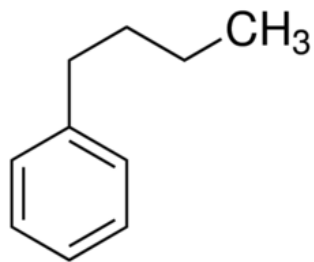


Toluen

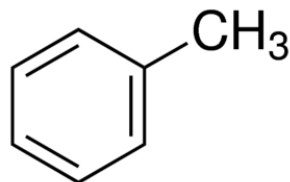


Uracil

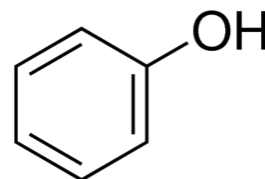
SEŘAĎTE PODLE POLARITY



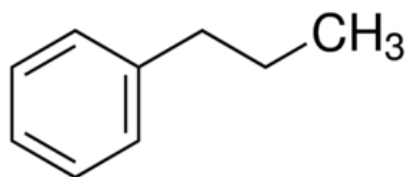
Butylbenzen



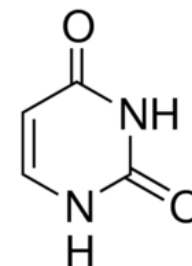
Toluen



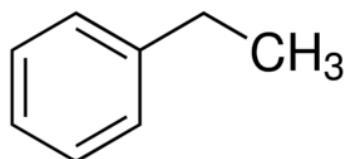
Fenol



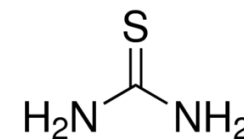
Propylbenzen



Uracil



Ethylbenzen



Thiomočovina

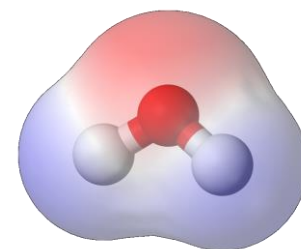
NEPOLÁRNÍ



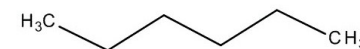
POLÁRNÍ

POLARITA

„Polární molekuly jsou molekuly, které mají stálý a nenulový dipólový moment, protože elektrický náboj je v nich rozložen nesymetricky.“



voda



hexan

hydrogen 1 H 1.0079																	helium 2 He 4.0026	
lithium 3 Li 6.941	beryllium 4 Be 9.0122											boron 5 B 10.811	carbon 6 C 12.011	nitrogen 7 N 14.007	oxygen 8 O 15.999	fluorine 9 F 18.998	neon 10 Ne 20.180	
sodium 11 Na 22.990	magnesium 12 Mg 24.305											aluminum 13 Al 26.982	silicon 14 Si 28.086	phosphorus 15 P 30.974	sulfur 16 S 32.065	chlorine 17 Cl 35.453	argon 18 Ar 39.948	
potassium 19 K 39.098	calcium 20 Ca 40.078	scandium 21 Sc 44.956	titanium 22 Ti 47.867	vanadium 23 V 50.942	chromium 24 Cr 51.996	manganese 25 Mn 54.938	iron 26 Fe 55.845	cobalt 27 Co 58.933	nickel 28 Ni 58.693	copper 29 Cu 63.546	zinc 30 Zn 65.39	gallium 31 Ga 69.723	germanium 32 Ge 72.61	arsenic 33 As 74.922	selenium 34 Se 78.96	bromine 35 Br 79.904	krypton 36 Kr 83.80	
rubidium 37 Rb 85.468	strontium 38 Sr 87.62	yttrium 39 Y 88.906	zirconium 40 Zr 91.224	niobium 41 Nb 92.906	niobium 42 Mo 95.94	technetium 43 Tc [99]	ruthenium 44 Ru 101.07	rhodium 45 Rh 102.91	palladium 46 Pd 106.42	silver 47 Ag 107.87	cadmium 48 Cd 112.41	indium 49 In 114.82	tin 50 Sn 118.71	antimony 51 Sb 121.76	tellurium 52 Te 127.60	iodine 53 I 126.90	xenon 54 Xe 131.29	
cesium 55 Cs 132.91	barium 56 Ba 137.33	* 57-70 Lu	lutetium 71 Lu 174.97	hafnium 72 Hf 178.49	tantalum 73 Ta 180.95	tungsten 74 W 183.84	rhenium 75 Re 186.21	osmium 76 Os 190.23	iridium 77 Ir 192.22	platinum 78 Pt 195.08	gold 79 Au 196.97	mercury 80 Hg 200.59	thallium 81 Tl 204.38	lead 82 Pb 207.2	bismuth 83 Bi 208.98	polonium 84 Po [209]	astatine 85 At [210]	radon 86 Rn [222]
francium 87 Fr [223]	radium 88 Ra [226]	* * 89-102 Lr	lawrencium 103 Lr [262]	rutherfordium 104 Rf [261]	dubnium 105 Db [262]	seaborgium 106 Sg [266]	bohrium 107 Bh [264]	hassium 108 Hs [269]	meitnerium 109 Mt [269]	ununnium 110 Uun [271]	ununium 111 Uuu [273]	unbinium 112 Uub [277]	unquadrium 114 Uuq [289]					

* Lanthanide series

lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04
--	-------------------------------------	---	--	--	---------------------------------------	---------------------------------------	---	--------------------------------------	---	--------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------	--

** Actinide series

actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]
--------------------------------------	--------------------------------------	---	-------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	------------------------------------	---------------------------------------	---	---	--------------------------------------	--	---------------------------------------

Rozdíl elektronegativit

MECHANISMY RETENCE

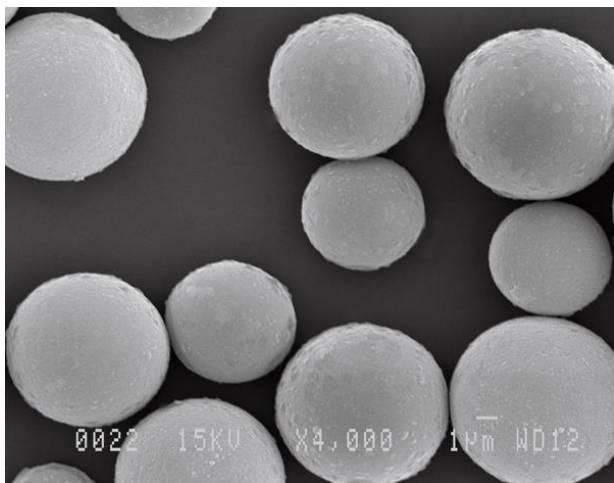
- Normální fáze
- Obrácené fáze
- Hydrofilní interakce
- Iontová výměna
- Iontová chromatografie
- Chromatografie stérické vyluky
- Imunoafinitní chromatografie
- Chromatografie za kritických podmínek

NORMÁLNÍ FÁZE (NP)

Stacionární fáze

Polární

Silikagel, Al_2O_3 , polární gely



www.silicycle.com



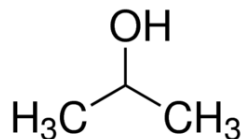
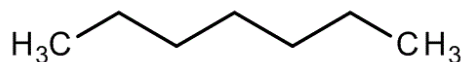
www.agc.com



Mobilní fáze

Nepolární

hexan, heptan
s přísávkem
izopropanolu,
chloroformu
nebo octanu ethylnatého



Pořadí eluce

Uhlovodíky < halogen sloučeniny < ethery < nitrily < nitro sloučeniny < ketony
< aldehydy < alkoholy < kyseliny

Mechanismus

$$\log k = a - m \cdot \log \varphi$$

k – retenční faktor

φ – koncentrace polárního
rozpuštědla

a, m – konstanty

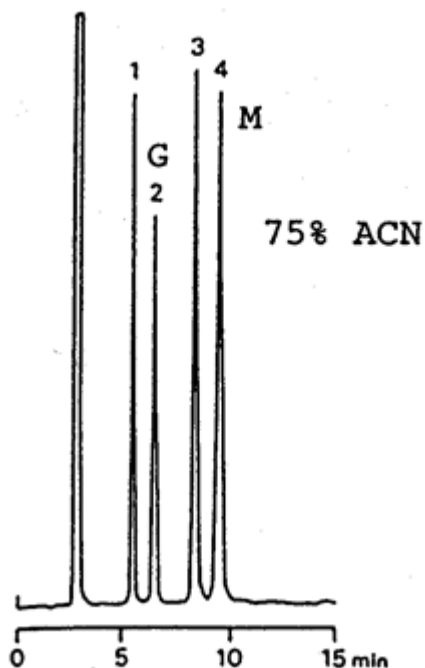
Aplikace

- Izomery
- Vysoce hydrofobní látky
- Hydrofilní látky (ANP, cukry)
- Nepoužívá se gradient

Nepolární > Polární

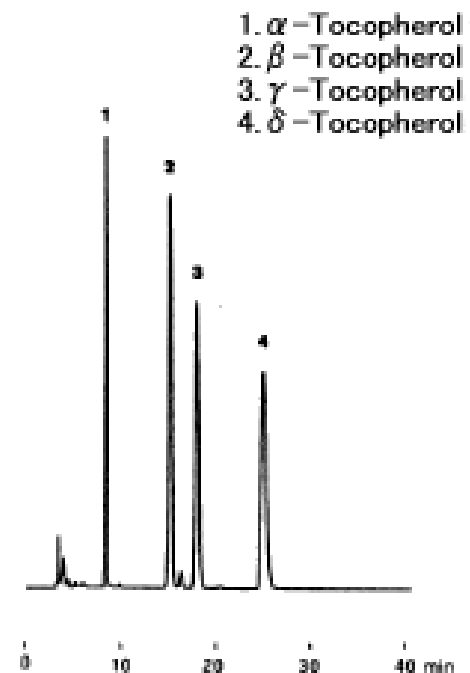
APLIKACE – NORMÁLNÍ FÁZE

Cukry



Amino kolona, Acetonitril/voda (75:25)
1 – fruktóza, 2 – glukóza, 3 – sukróza, 4 – maltóza).

Izomery Vitamínu E



YMC-Pack Polyamine II 250 x 4.6mmI.D.,
n-hexan/octan etylnatý (70/30)

REVERZNÍ FÁZE (RP)

Stacionární fáze

Nepolární

Chemicky vázané fáze

-C4, -C8, -C18

silikagel, uhlík, polymery

Mobilní fáze

Polární

Acetonitril

Metanol

Tetrahydrofuran

Voda

Mechanismus

$$\log k = a - m \cdot \varphi$$

k – retenční faktor

φ – koncentrace organického rozpouštědla

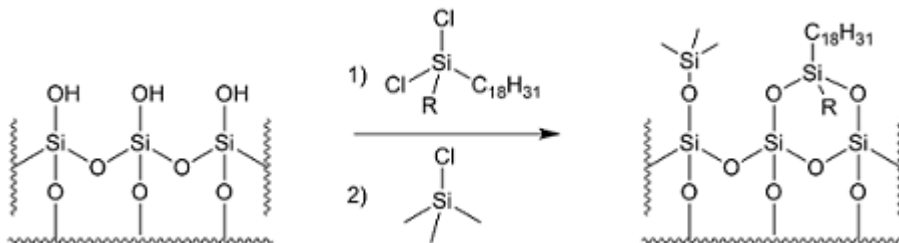
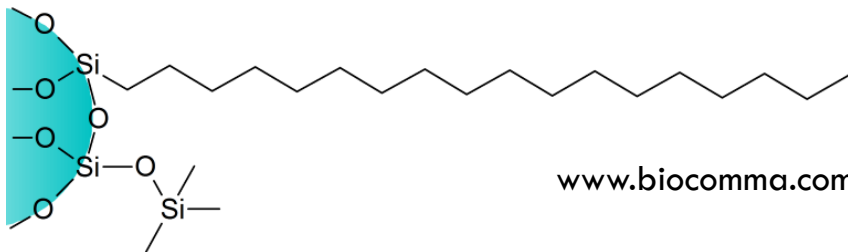
a, m – konstanty

Aplikace

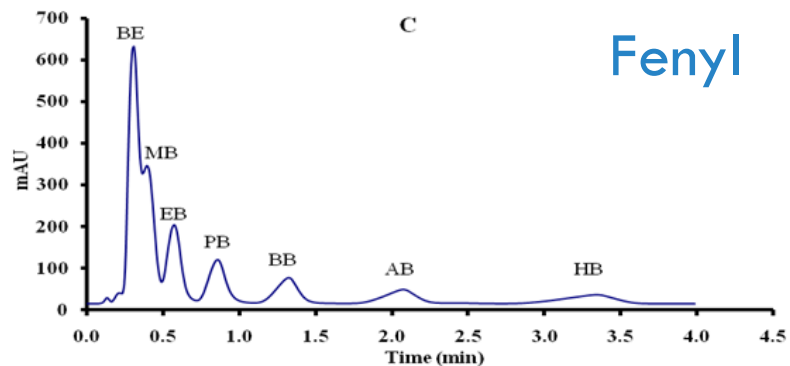
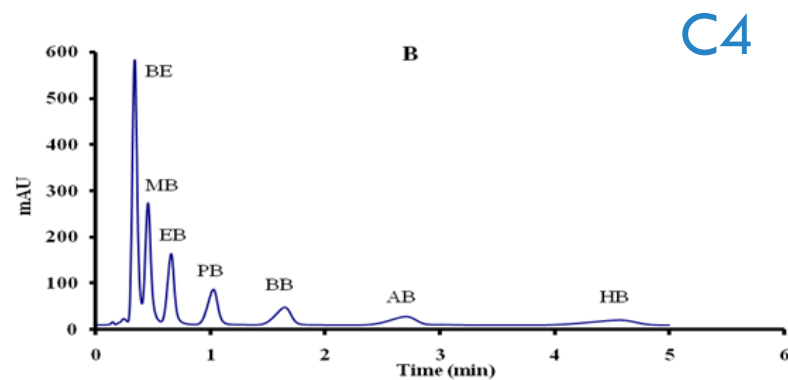
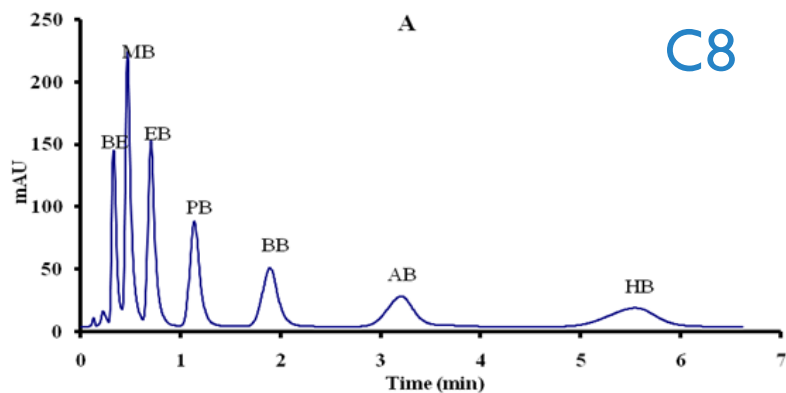
- Biologické vědy
- Životní prostředí
- Průmysl
- Gradient mobilní fáze

80 – 90 % všech aplikací

Pořadí eluce Polární > Nepolární



SELEKTIVITA SEPARACE



Polarita

Stacionární fáze

C18

C8

C4

Nitril

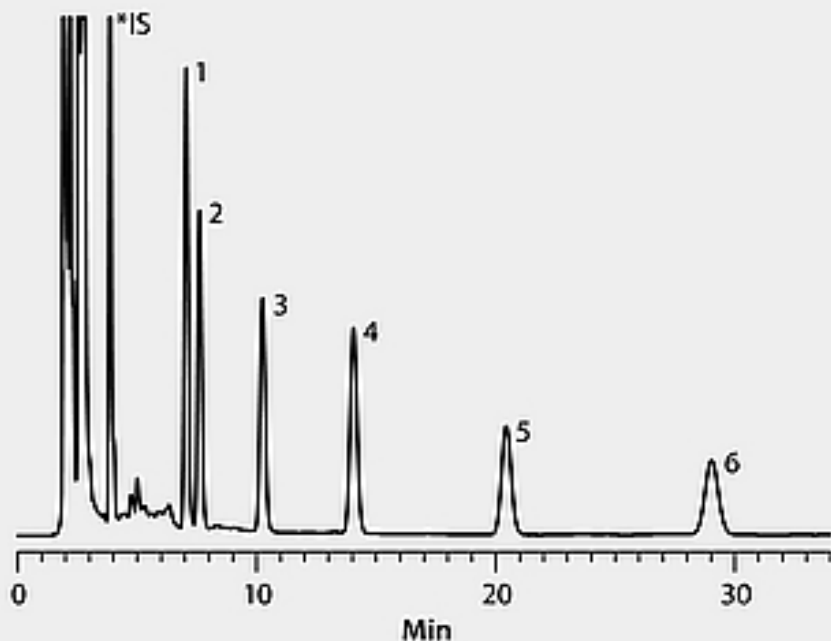
Fenyl

Amin

Retence

Alkylbenzeny, 35% acetonitril

APLIKACE – BARBITURÁTY



Barbiturates from serum using 500 mg/3 mL Discovery DSC-18Lt SPE tubes and Zymark's RapidTrace SPE Workstation.

*IS = Barbitol (internal standard).

Sample Info: 0.5 mL porcine serum spike with 0.5 µg/mL or 1.0 µg/mL each analyte then diluted with 0.5 mL water.

Efficiency of Recovery

Compound	Concentration (µg/mL)	%Recovery	%RSD (n=6)
1. Phenobarbital	0.5	96.2	±1.6
	1.0	94.9	±1.7
2. Aprobarbital	0.5	98.5	±2.1
	1.0	100.8	±0.8
3. Butobarbital	0.5	97.2	±1.9
	1.0	98.7	±1.8
4. Mephobarbital	0.5	99.7	±2.4
	1.0	101.0	±2.0
5. Pentobarbital	0.5	96.4	±1.7
	1.0	96.4	±1.9
6. Secobarbital	0.5	98.2	±1.7
	1.0	97.7	±1.8

SPE Method For RapidTrace SPE Workstation Application

1. Condition & equilibrate each tube/well with 2 mL MeOH & 2 mL DI Water
2. Load sample
3. Wash each tube/well with 2 mL 5% MeOH
4. Vacuum or air dry for 5–10 min
*This removes any excess water from the sorbent.
The presence of water in the final eluent may prolong eluent evaporation.*
5. Elute with 1–2 mL MeOH
6. Dry eluate with nitrogen purge (40 °C; 15–20 min)
7. Reconstitute with 200 µL mobile phase
8. Quantify against internal or external standards via HPLC analyses

HYDROFILNÍ INTERAKCE (HILIC)

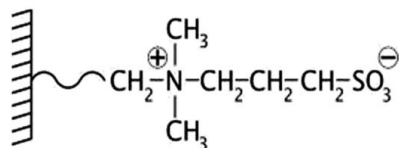
Stacionární fáze

Polární

Silikagel

Polární funkční skupiny

Sulfobetaine zwitterionic



Mobilní fáze

Polární

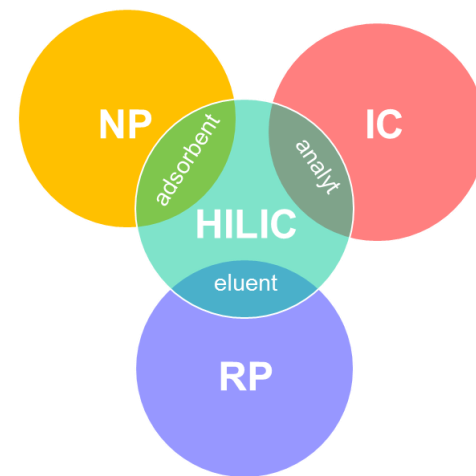
Acetonitril

Metanol

Vody/Pufř

(nízké koncentrace)

Mechanismus



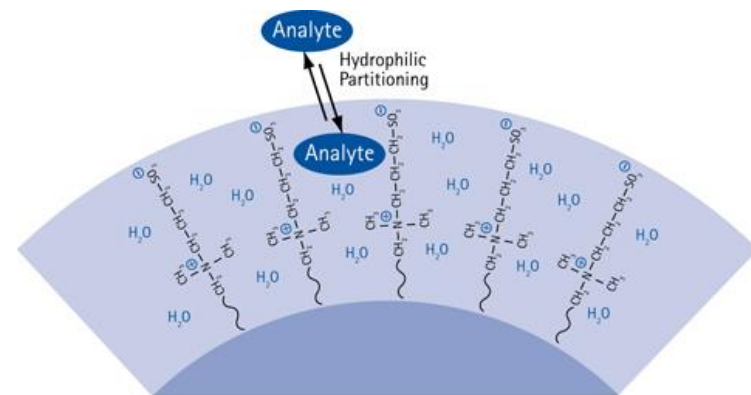
Rozhodující role v mechanismu separace



Snadná volba podmínek pro daný separační problém.



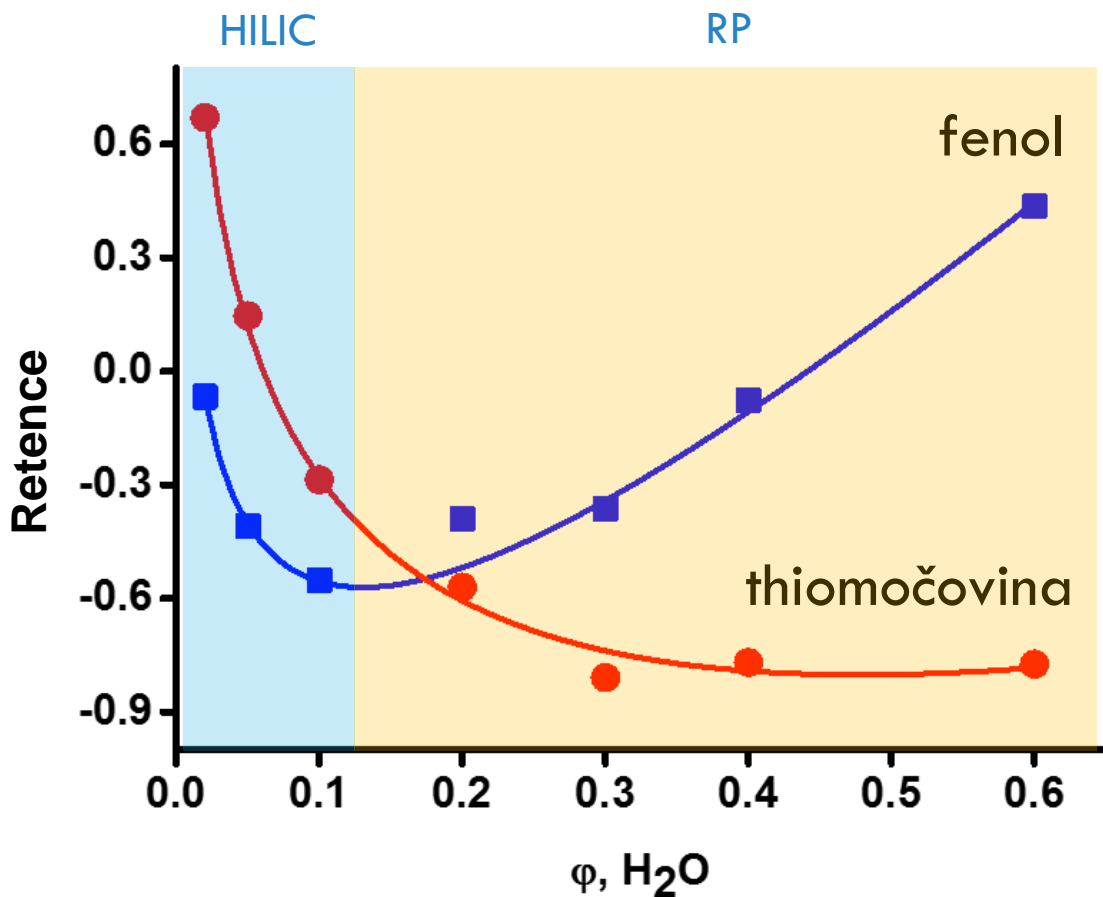
Andrew J. Alpert



Interakce ve vodné vrstvě

www.merckmillipore.com

DUÁLNÍ RETENČNÍ MECHANISMUS



Retence ovlivněná
složením mobilní fáze

Minimum „U-křivky“

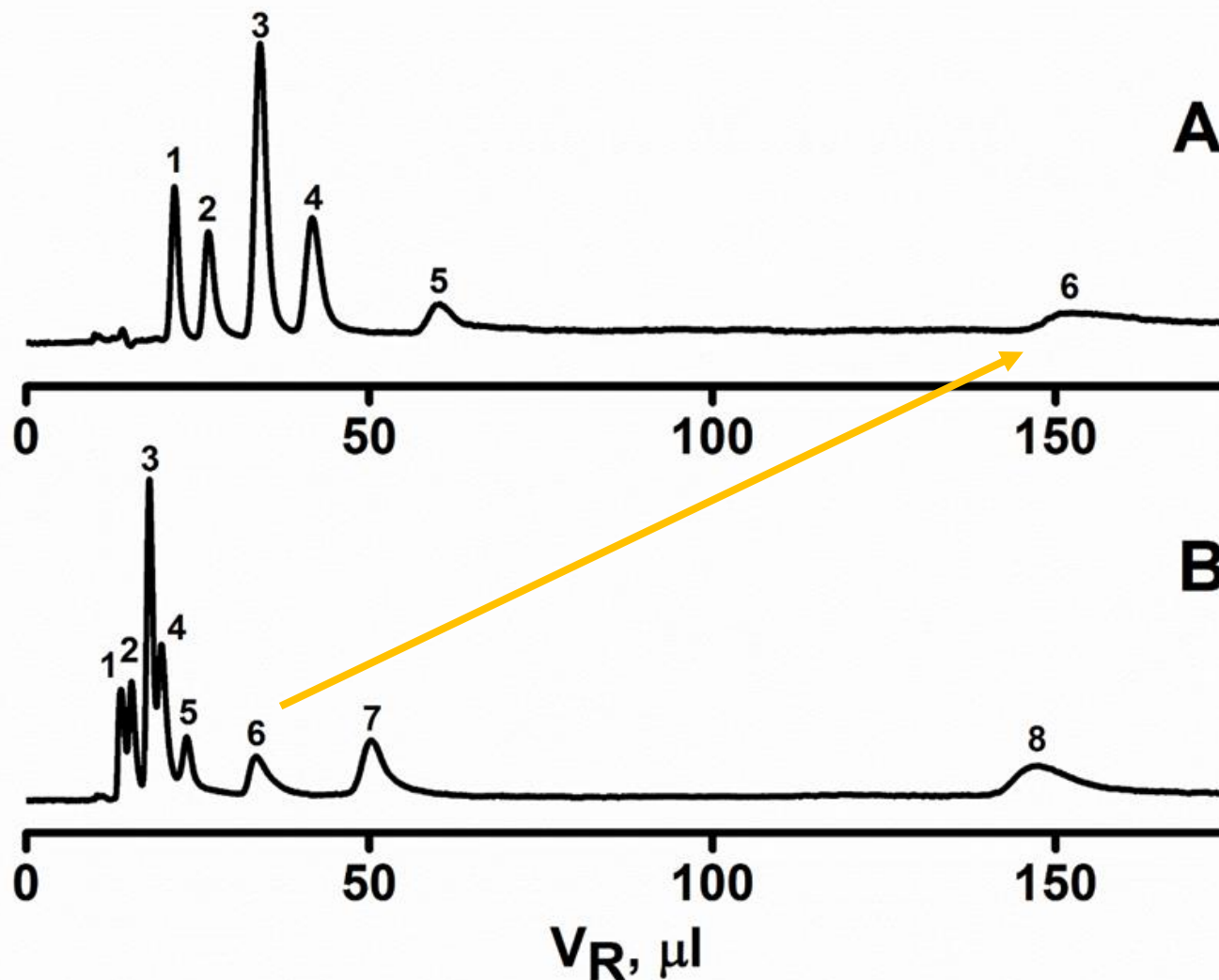
$$\varphi_{min} = \frac{m_{HILIC}}{2.301 \cdot m_{RP}}$$

Charakterizace HILIC kolon
~20 – 30 %

Popis retence

$$\log k = a + m_{RP} \cdot \varphi_{H_2O} - m_{HILIC} \cdot \varphi_{H_2O}$$

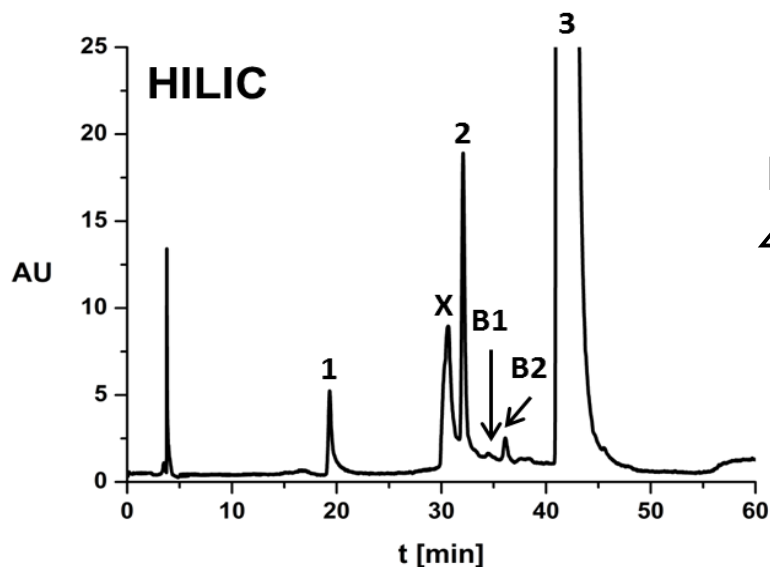
VLIV SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE



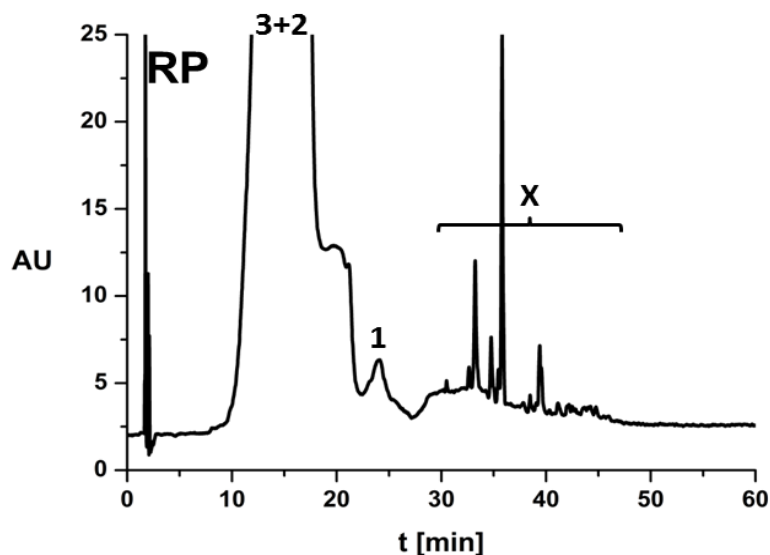
95% ACN

90% ACN

HILIC vs. RP



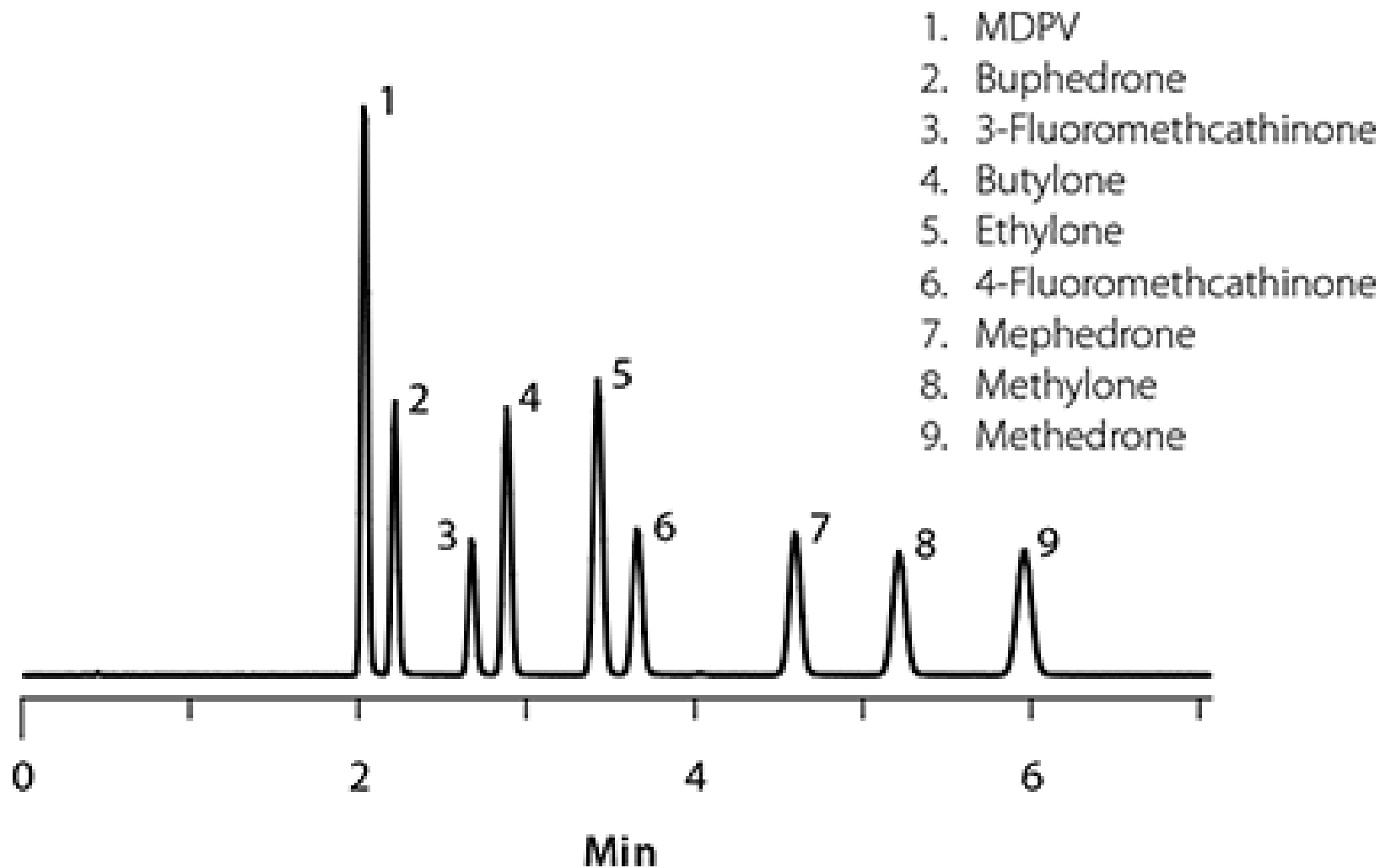
HILIC a RP separace, 4-karboxybenzaldehydu (1), 4-hydroxymethylbenzoové kys. (2), kys. tereftalové (3) a minoritních nečistot B1, B2, X.



Kolona ZIC-HILIC 4.6 x 50 mm; 5 μ m gradient: 100 – 90% acetonitrilu ve vodě / 60 min

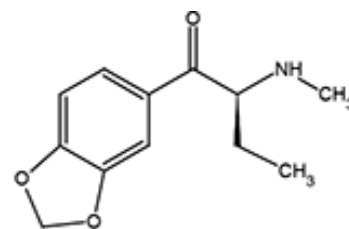
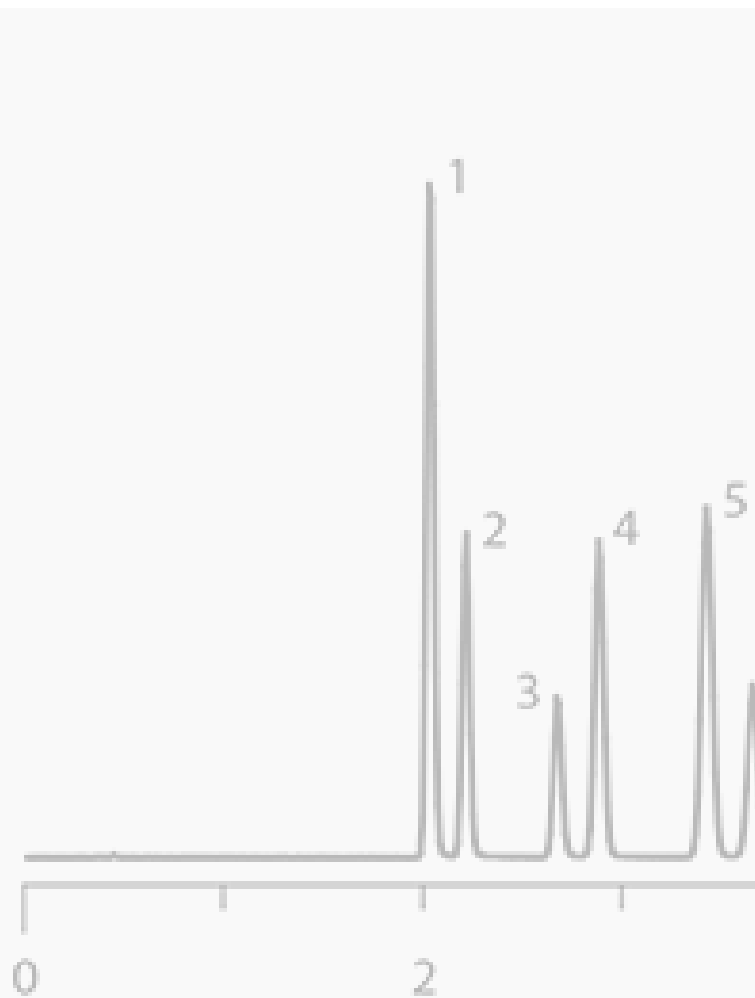
Kolona Aqua C18; 3.0 x 150 mm; 5 μ m (Phenomenex) gradient: 0-80% acetonitrilu ve vodě / 70 min.

APLIKACE – „BATH SALTS“

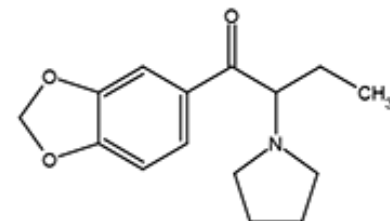


Ascentis Express HILIC (Si), 10 cm x 2.1 mm, 2.7 μ m, mobile phase: (A) 5 mM ammonium formate acetonitrile; (B) 5 mM ammonium formate water; (98:2, A:B); flow rate: 0.6 mL/min

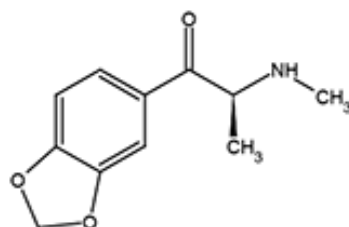
APLIKACE – „BATH SALTS“



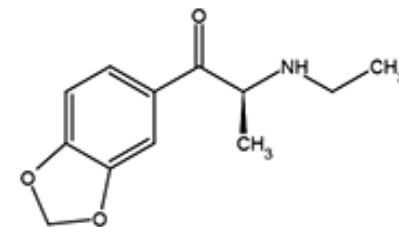
Butylone



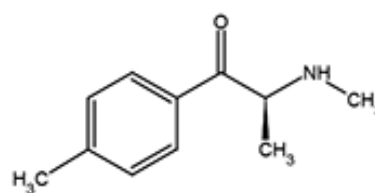
3,4-Methylenedioxypropylone
(MDPV)



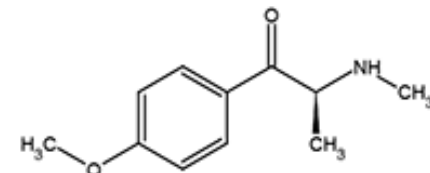
Methylone



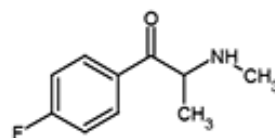
Ethylone



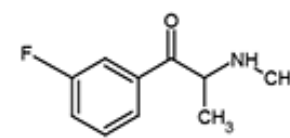
Mephedrone



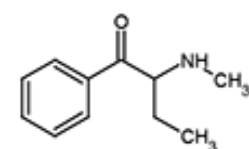
Methedrone



4-Fluoromethcathinone



3-Fluoromethcathinone



Buphedrone

Ascentis Express HILIC (Si), 10 cm x 2.1 mm, 2.7 μm
(B) 5 mM ammonium formate water; (98:2, A:B); flow rate 0.2 mL/min

SHRNUTÍ NP X RP X HILIC

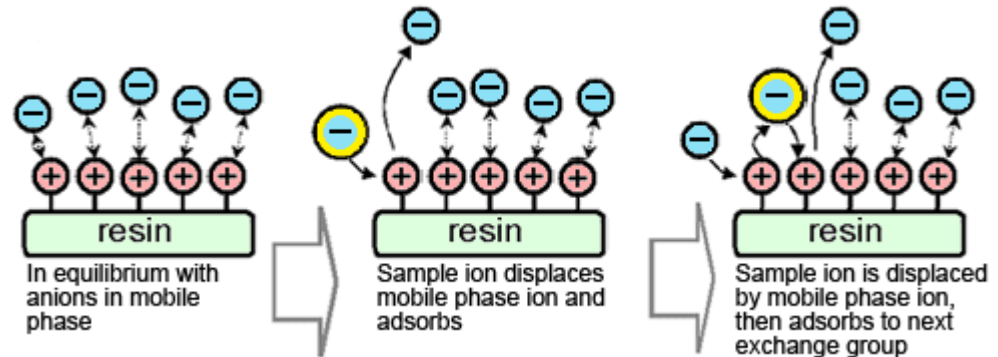
	NP	RP	HILIC
Stacionární fáze	Polární	Nepolární	Polární
Mobilní fáze	Nepolární	Polární	Polární
Vzorky	Méně polární	Ne/Polární	Polární

Retenci a selektivitu ovlivňuje polarita vzorku a mobilní a stacionární fáze.

IONTOVĚ-VÝMĚNNÁ CHROMATOGRRAFIE (IEX)

Stacionární fáze

- **Katexy** s anionickými sulfonovými nebo karboxylovými iontově-výměnnými skupinami
- **Anexy** s kvarterními nebo terciárními aminovými skupinami



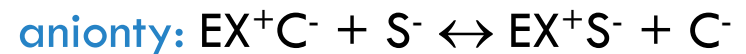
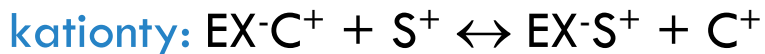
www.shimadzu.com

Organické polymerní sorbenty, silikagel s chemicky vázanými iontově-výměnnými skupinami.

Mobilní fáze

Roztoky elektrolytů (pufry, soli, slabé kyseliny či báze),

Protiionty C soutěží s ionty vzorku S:



$$k = \frac{V_S}{V_M} \frac{(S)}{[S]} = \frac{V_S}{V_M} \frac{K_S^c Q^c}{\frac{s}{c^c}} = k_0 \varphi^{-m}$$

Q - iontově-výměnná kapacita,

m = s/c je poměr nábojů vyměňovaných iontů

IONTOVÁ CHROMATOGRAFIE (IC)

Moderní forma iontově-výměnné chromatografie

Pitná voda, zubní pasty (F^-), zelenina (NO_3^-), biologické tekutiny (Na^+ , K^+),
speciační analýza (Cr^{3+} , Cr^{6+})

Stacionární fáze

Silný měnič iontů

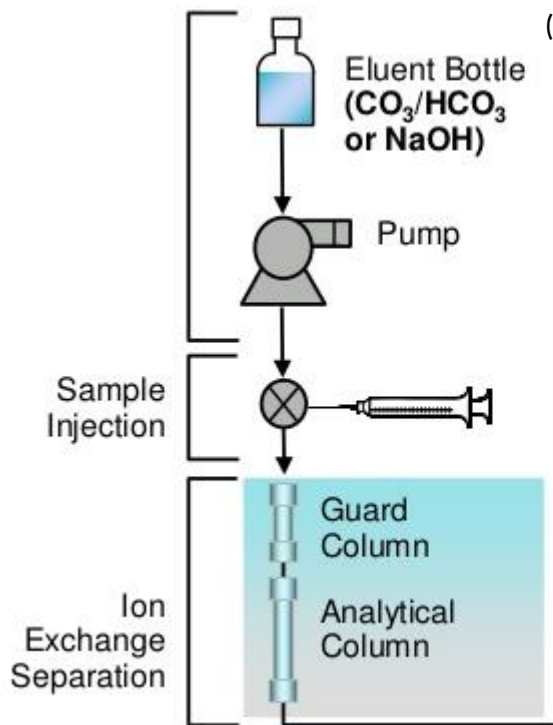
Mobilní fáze

$NaOH$, Na_2CO_3

Detekce

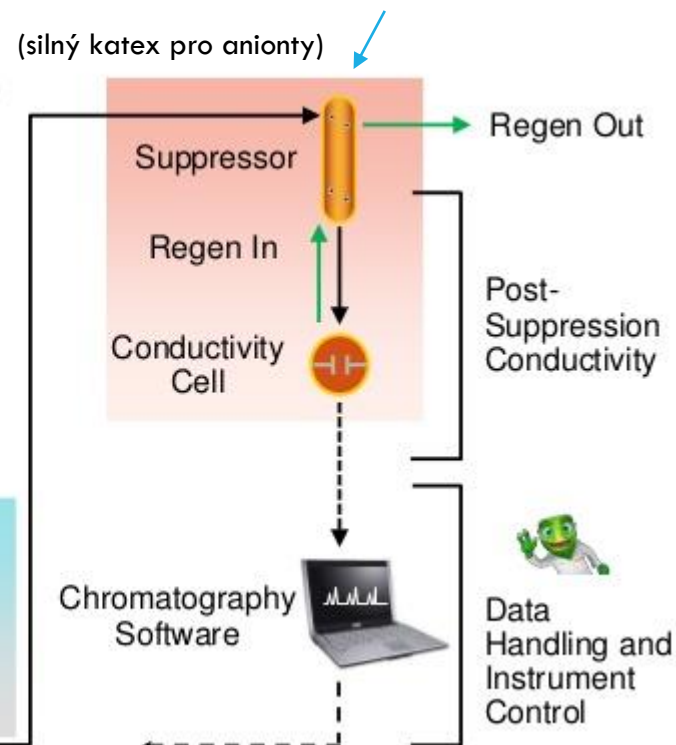
- Vodivostní (supresor)
- Nepřímá detekce
 - Eluce ftaláty, salicyláty

Instrumentace

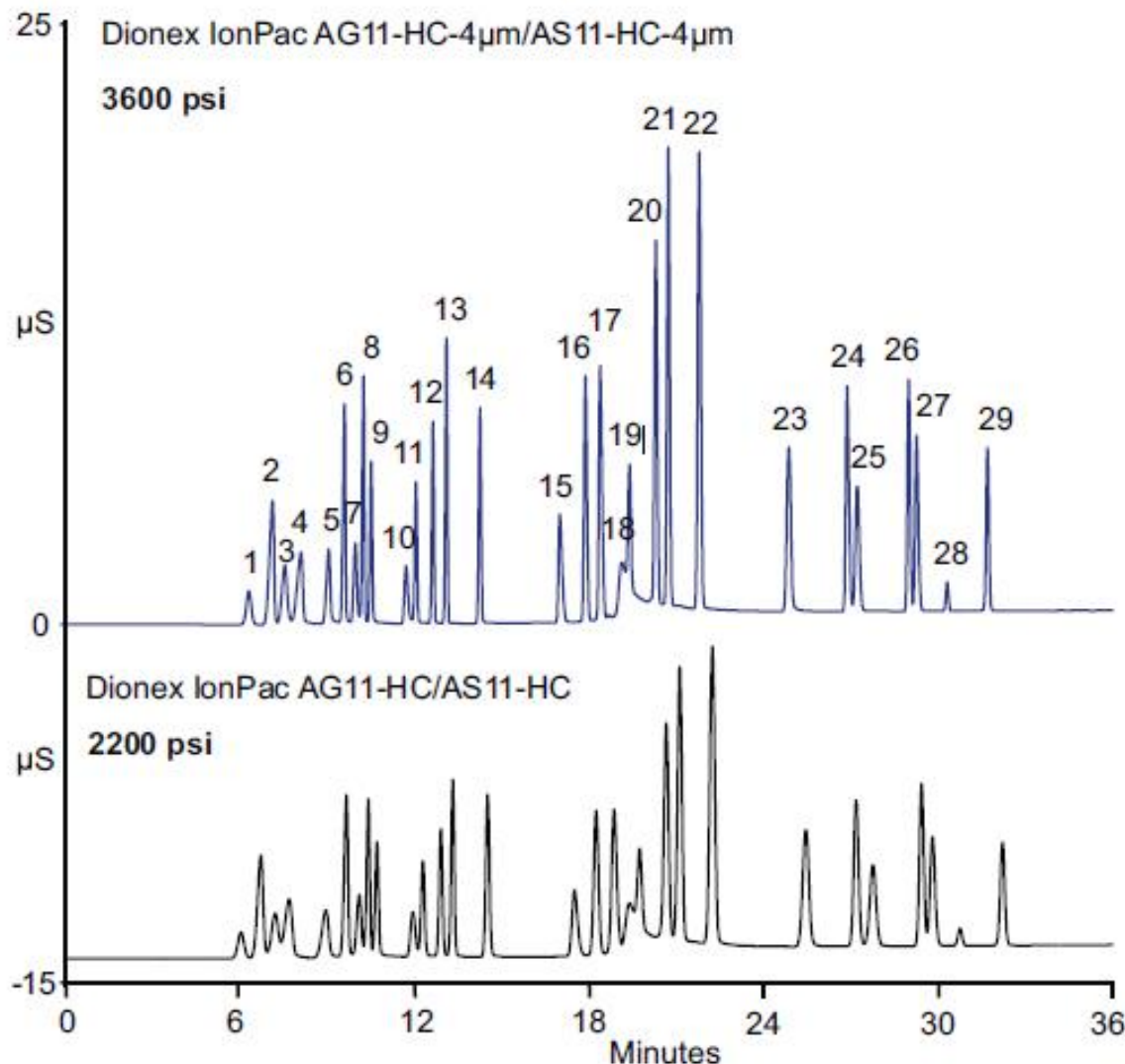


www.thermofisher.com

Odstranění iontů mobilní fáze



APLIKACE (IC)



- Peaks:
1. Quinate
 2. Fluoride
 3. Lactate
 4. Acetate
 5. Propionate
 6. Formate
 7. Butyrate
 8. Methylsulfonate
 9. Pyruvate
 10. Valerate
 11. Monochloroacetate
 12. Bromate
 13. Chloride
 14. Nitrite
 15. Trifluoroacetate
 16. Bromide
 17. Nitrate
 18. Carbonate
 19. Malonate
 20. Maleate
 21. Sulfate
 22. Oxalate
 23. Tungstate
 24. Phosphate
 25. Phthalate
 26. Citrate
 27. Chromate
 28. *cis*-Aconitate
 29. *trans*-Aconitate

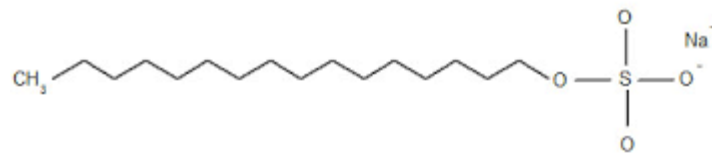
CHROMATOGRAFIE IONTOVÝCH PÁRŮ

Tvorba iontových párů mezi chromatografovanými disociovanými kyselinami nebo zásadami a opačně nabitými ionty ve vodné fázi.

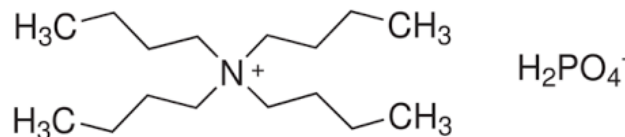
↳ Neutralizovaný náboj, hydrofobní látky > systém obrácených fází

Protiionty

Iontové páry **se zásadami** – silné kyseliny (k. chloristá, alkansulfonové kyseliny)



Iontové páry **s kyselinami** – kvarterní amoniové soli (tetrabutylamoniumfosfát)



Aplikace

Analýza kyselých a bazických látek v barvářských meziproduktech, farmaceutických výrobcích a produktech látkové výměny.

SEPARACE VYUŽÍVAJÍCÍ TVORBU KOMPLEXŮ

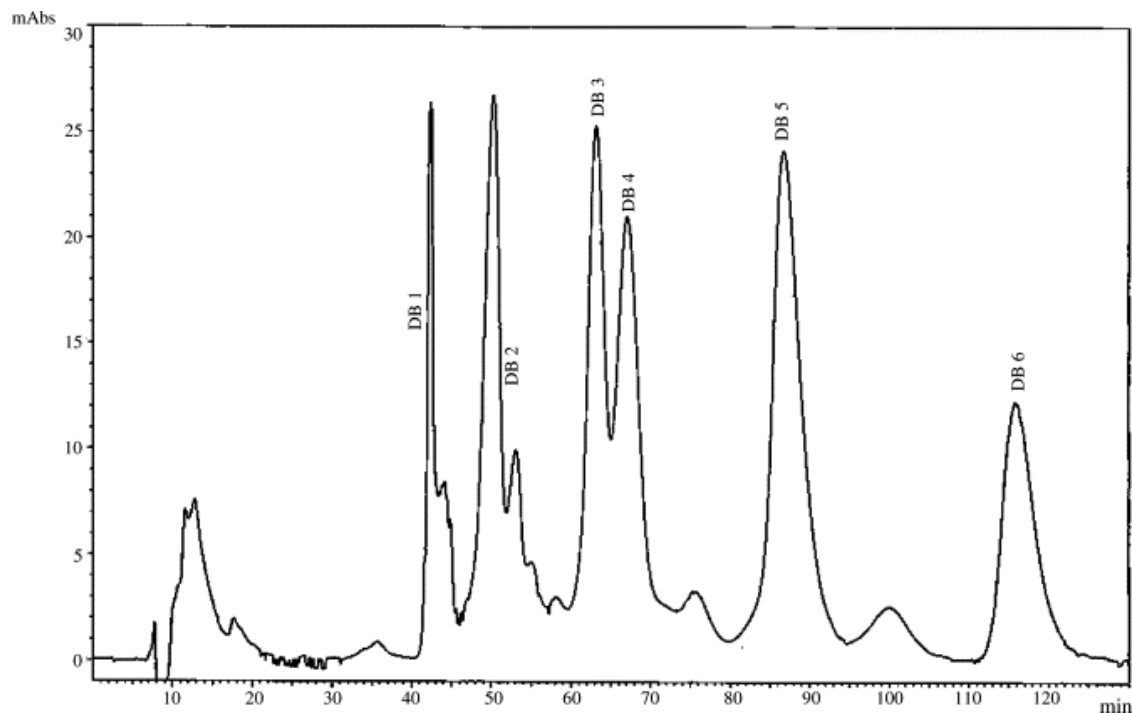
Argentační chromatografie

V tenkovrstevné chromatografii (TLC) je silikagel pokryt AgNO_3 , což umožňuje separaci cis- a trans- izomerů derivátů mastných kyselin.

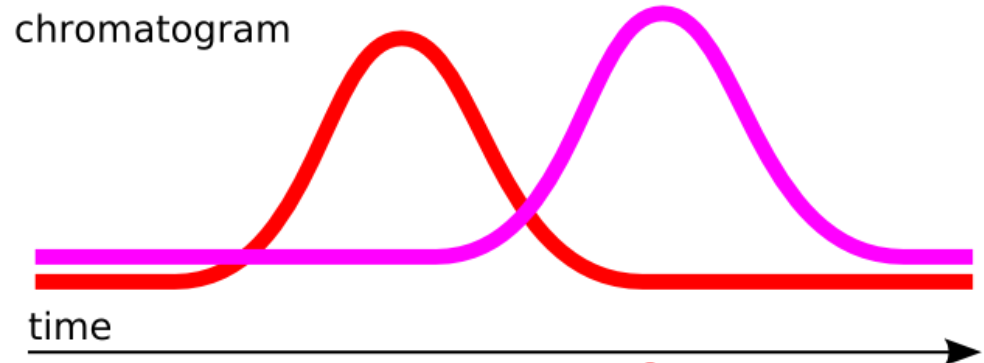
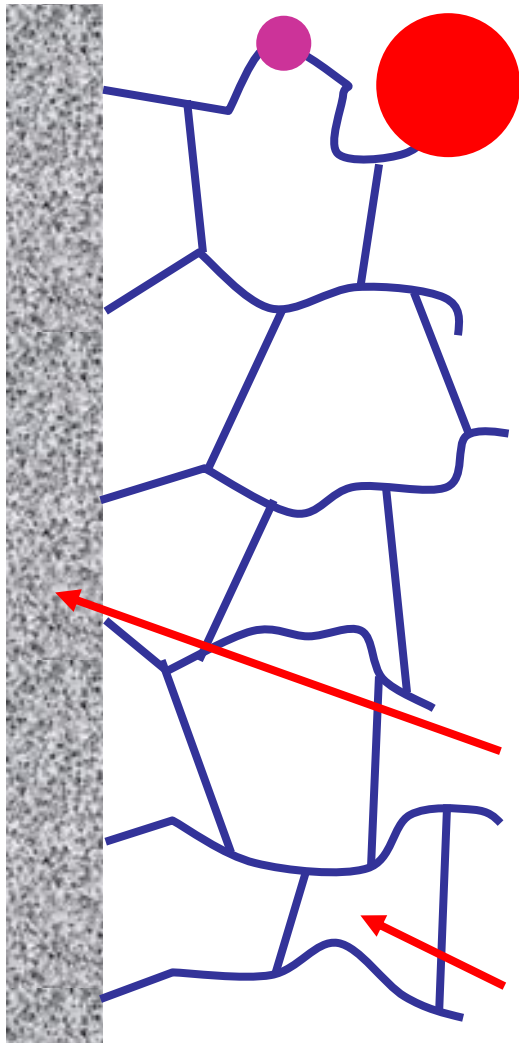
Ag-HPLC separace TAGs v rýžovém oleji.

Silikagelová kolona (Nucleosil)
promyta roztokem 1 M AgNO_3

Ag nanočástice



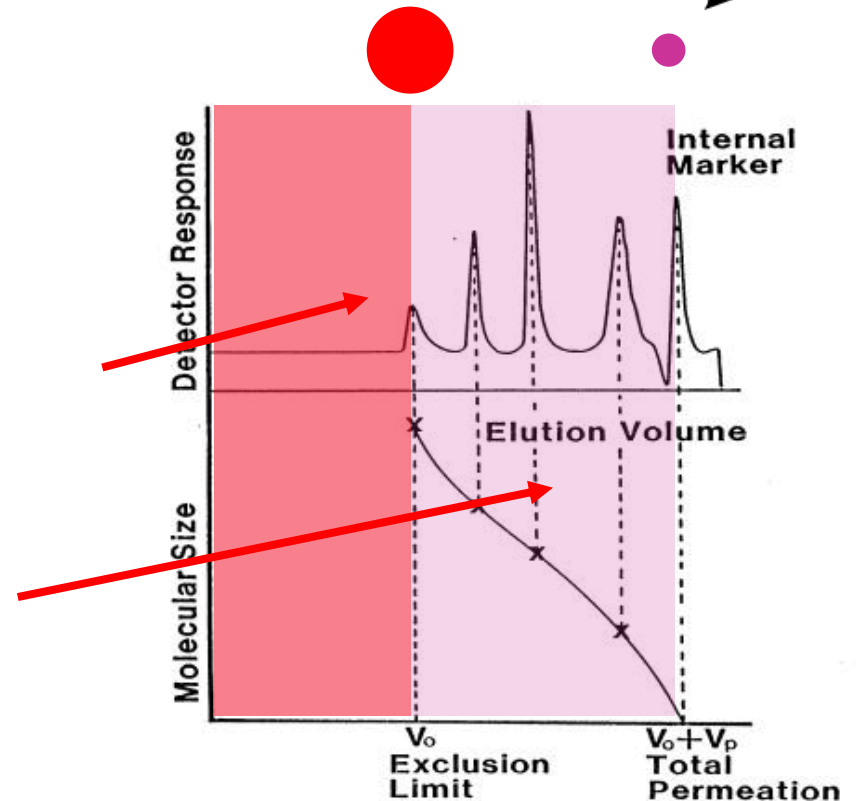
CHROMATOGRRAFIE STÉRICKÉ VÝLUKY (SEC)



Celková porozita

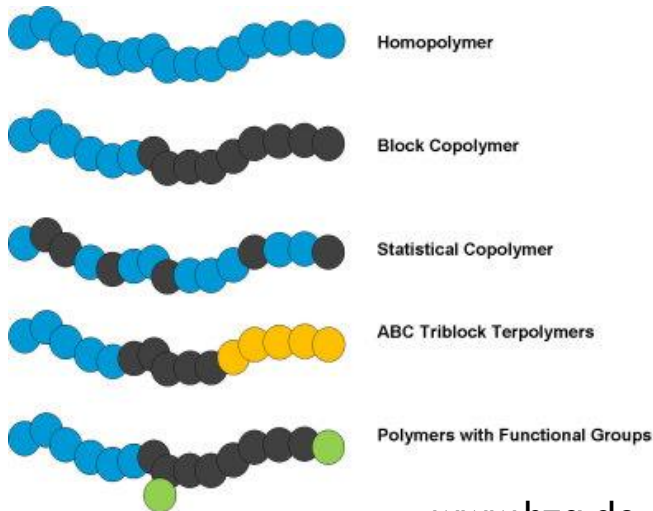
Průtočné póry

Malé póry



CHROMATOGRAFIE STÉRICKÉ VÝLUKY (SEC)

Polymery



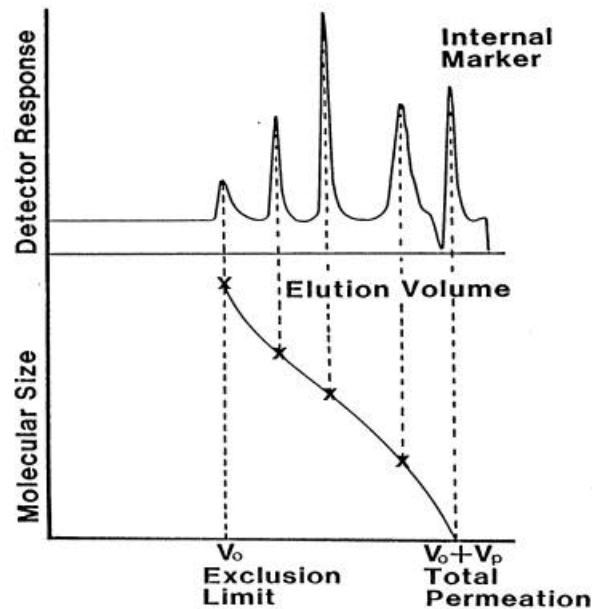
www.hzg.de

Stacionární fáze

Gely, polymery

Mobilní fáze

THF, H₂O



Kalibrace

$$\log M = A - B \cdot V_e$$

polystyreny

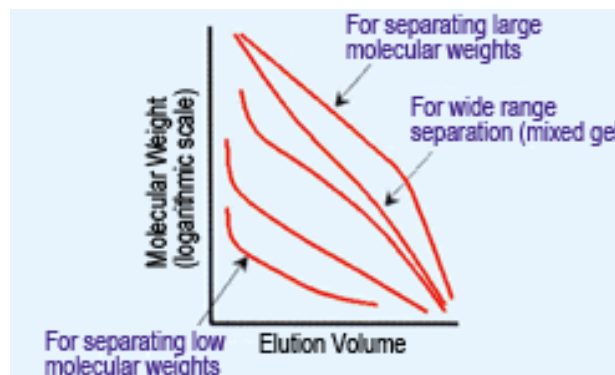
Mark-Houwinkova rovnice

(kalibrace pro jiný polymer)

$$[\eta] = KM^a$$

Vodná SEC

Standardy dextranů
Biopolymery

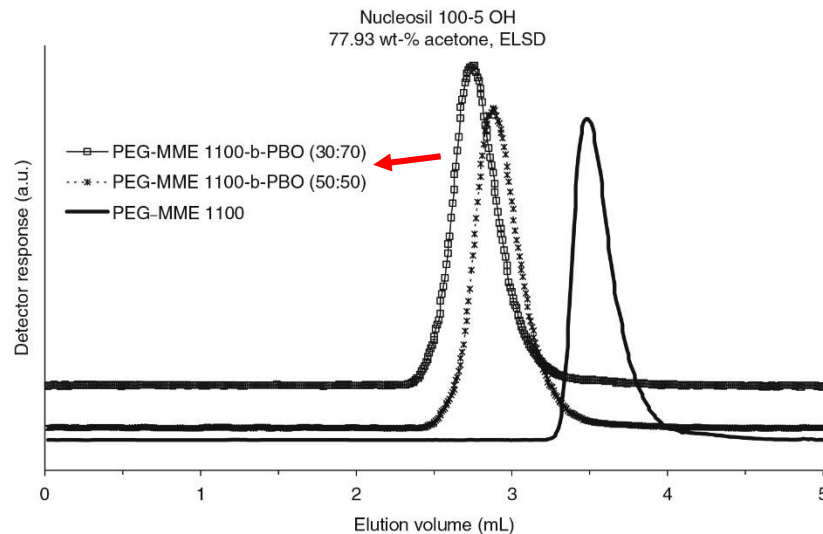
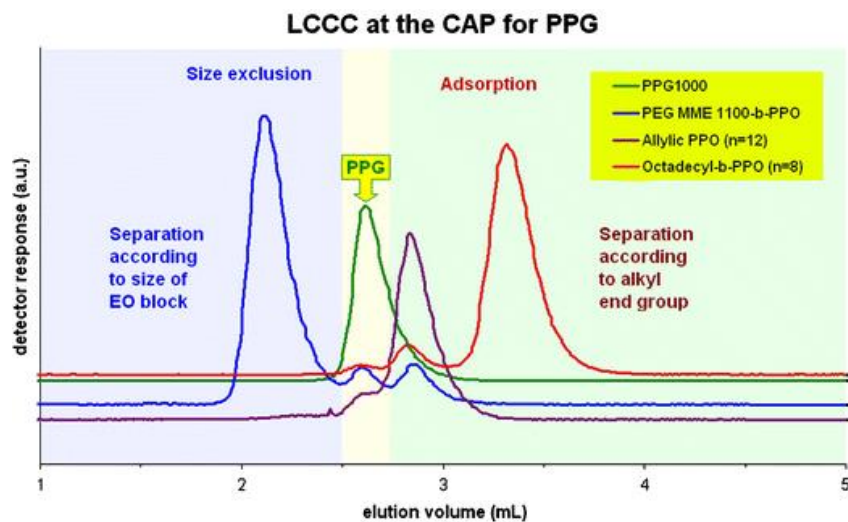
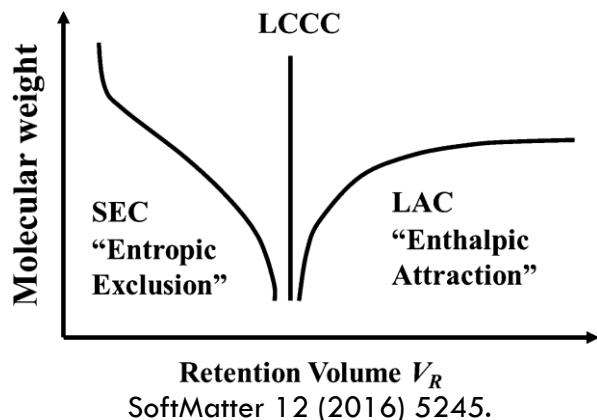


www.shimadzu.com

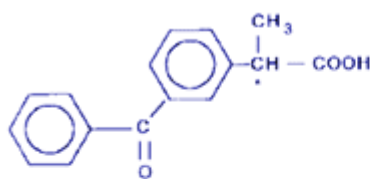
KRITICKÁ CHROMATOGRAFIE (LCCC)

„Rovnováha“ mezi SEC (ΔS) a RP (ΔH)

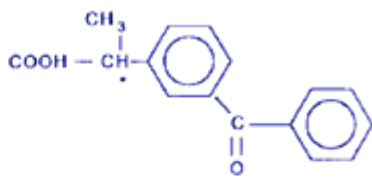
- Velikost molekuly nehraje roli
- Dělení na základě funkčních skupin
- Blokované a graftované polymery, jejich směsi, oligomery
- Nevýhody: rozmývání píků, citlivé na teplotu a složení mobilní fáze (desetiny procent)



CHROMATOGRRAFIE CHIRÁLNÍCH LÁTEK



S - (+) - KETOPROFEN
(analgesic, antiinflammatory)

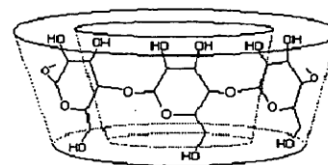
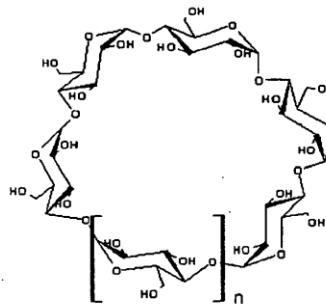


R - (-) - KETOPROFEN
(slows periodontal bone loss)

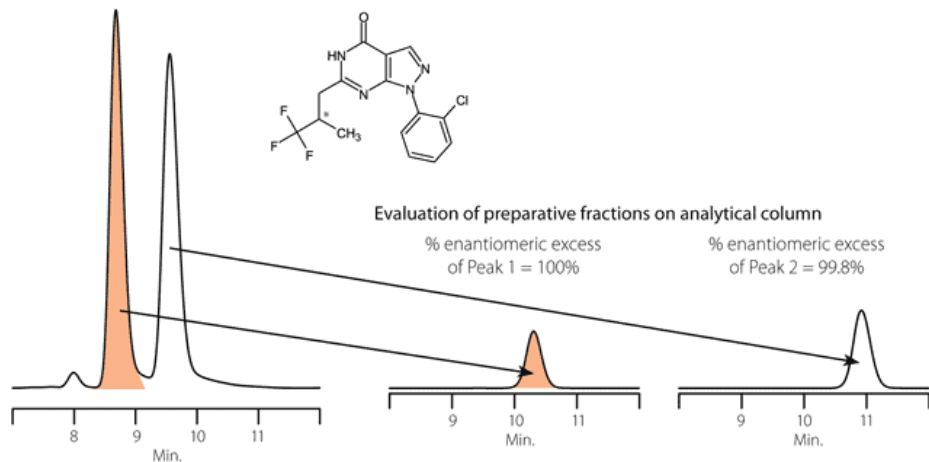


www.phenomenex.com

Cyklodextrin

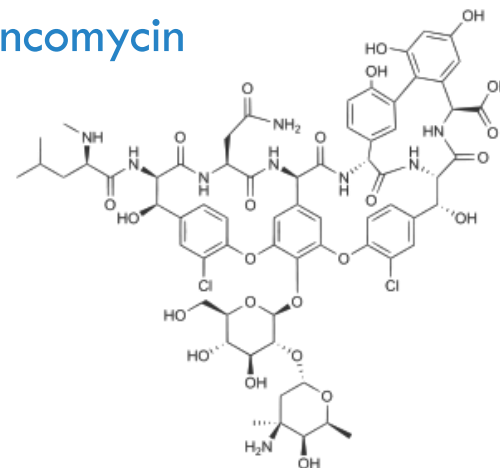


- n = 6 α -cyclodextrin
- n = 7 β -cyclodextrin
- n = 8 γ -cyclodextrin



www.sigmaldrich.com

Vancomycin



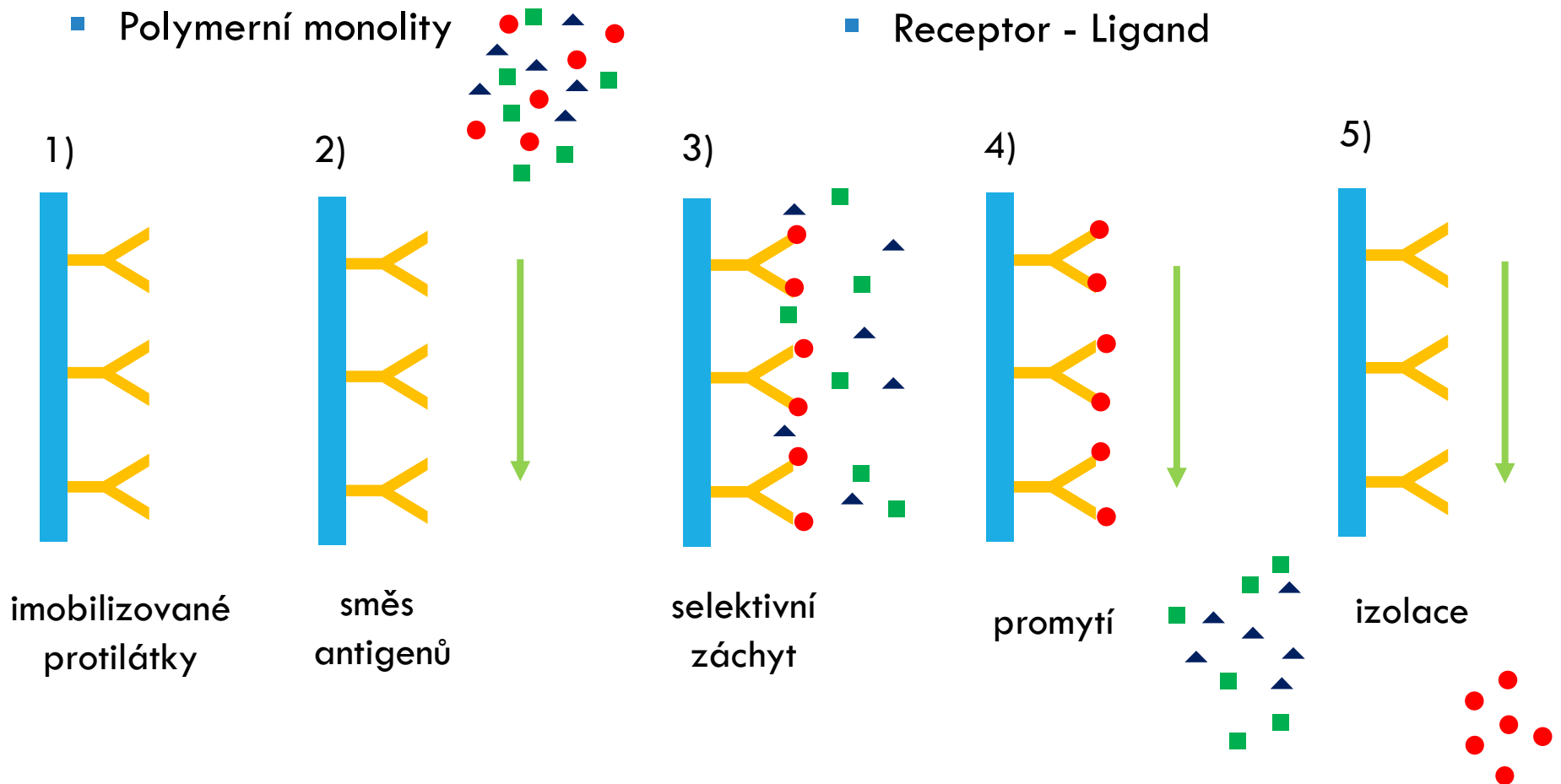
IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE (IMAC)

Čištění a izolace

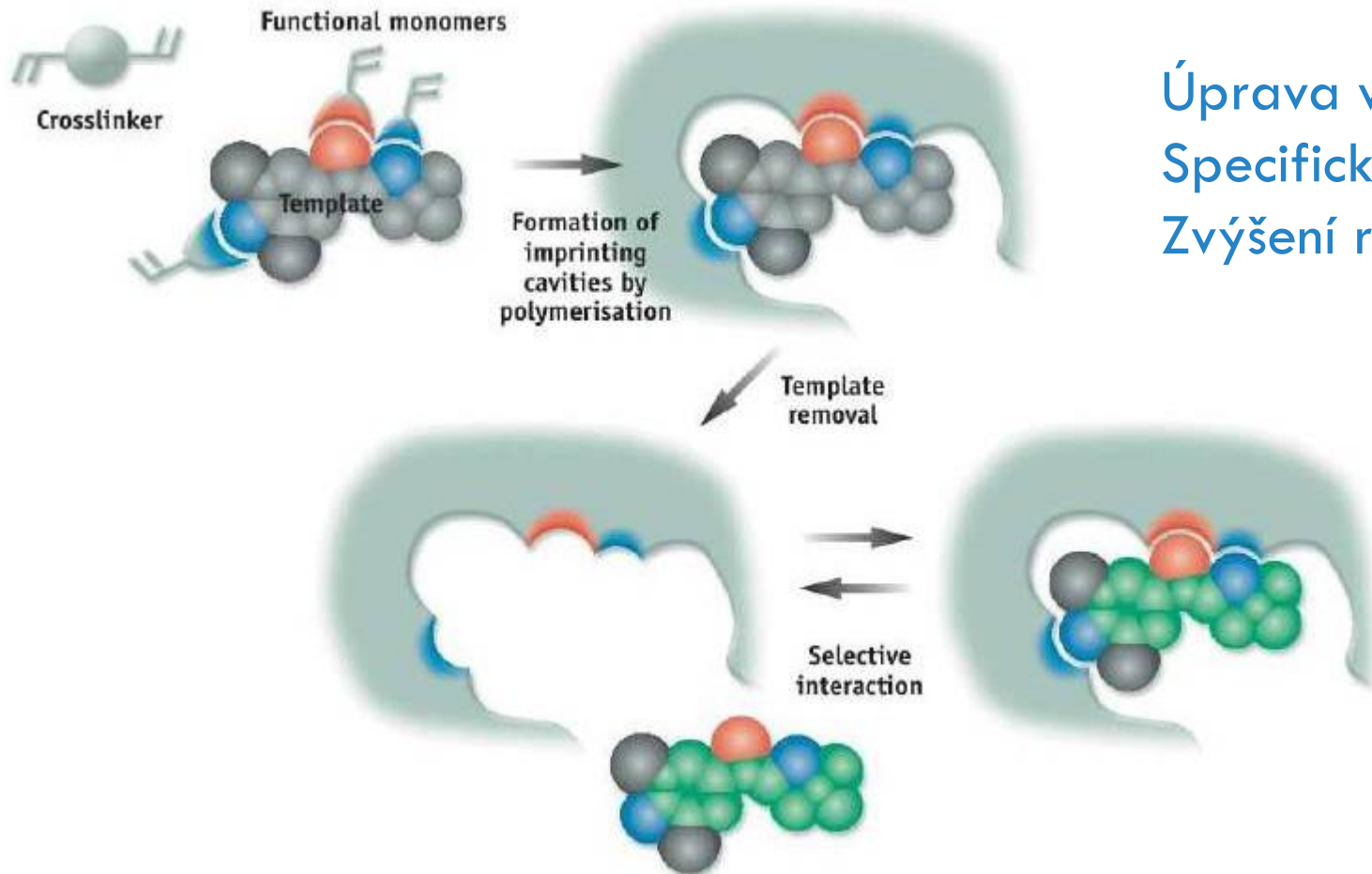
- Gely
- Magnetické částice
- Polymerní monolity

Vysoce specifické reakce

- Protilátka – Antigen
- Enzym – Substrát
- Receptor - Ligand



IMPRINTOVANÉ POLYMERY (MIP)



Úprava vzorku
Specifická extrakce
Zvýšení retence



HPLC 2017 PRAGUE
18–22 June 2017 | CZECH REPUBLIC

A wide-angle photograph of the Prague skyline. In the foreground, the Charles Bridge spans across the Vltava River, featuring several stone arches and statues. The background shows the city's historic architecture, including the prominent spires of St. Vitus Cathedral and other buildings with red-tiled roofs under a clear blue sky.

**45TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM
ON HIGH PERFORMANCE LIQUID PHASE SEPARATIONS
AND RELATED TECHNIQUES**

- 4 parallel tracks, 56 sessions
- Special support for students

WWW.HPLC2017-PRAGUE.ORG

JIŘÍ URBAN

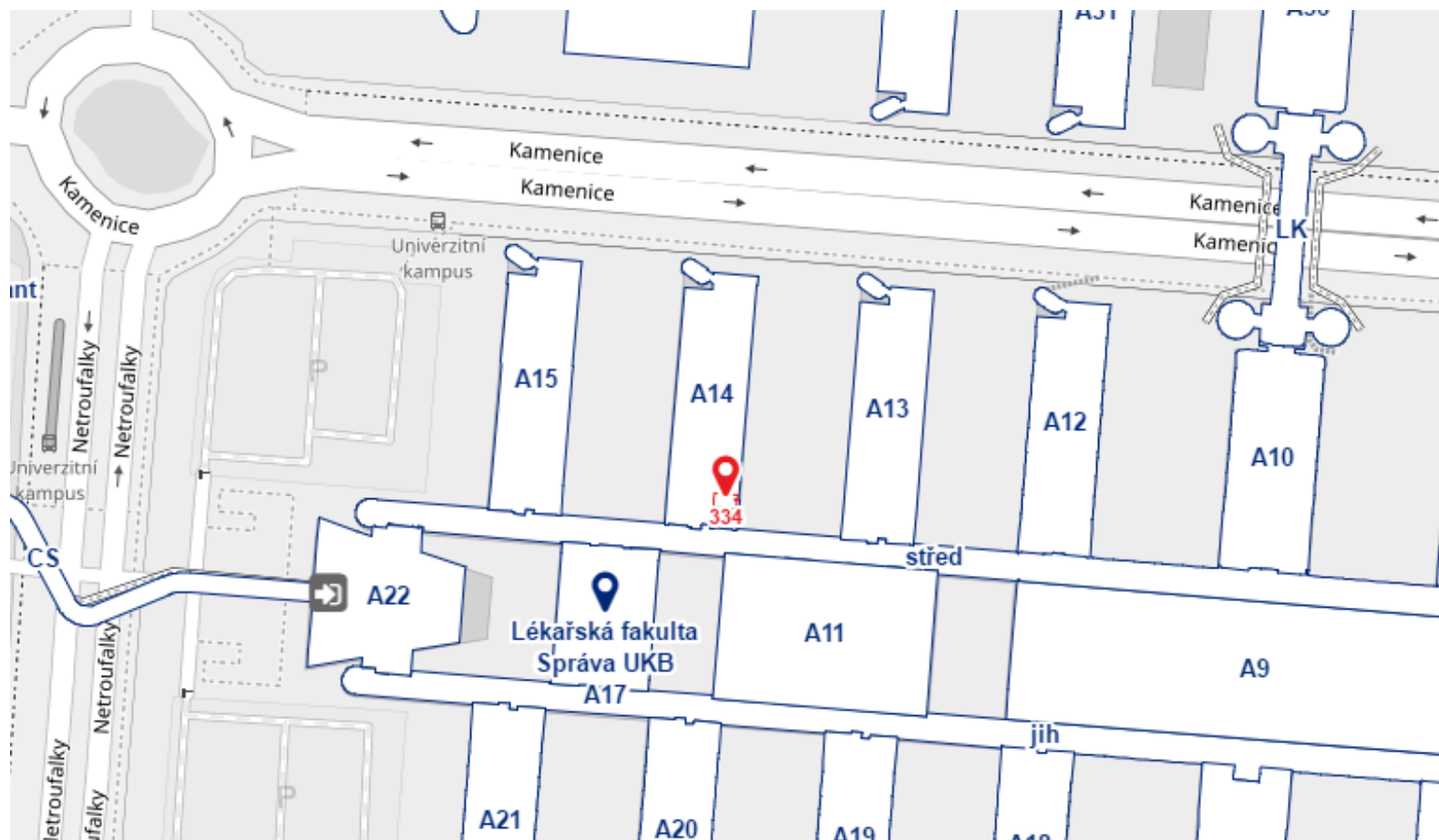
Kancelář: bud. A14/334

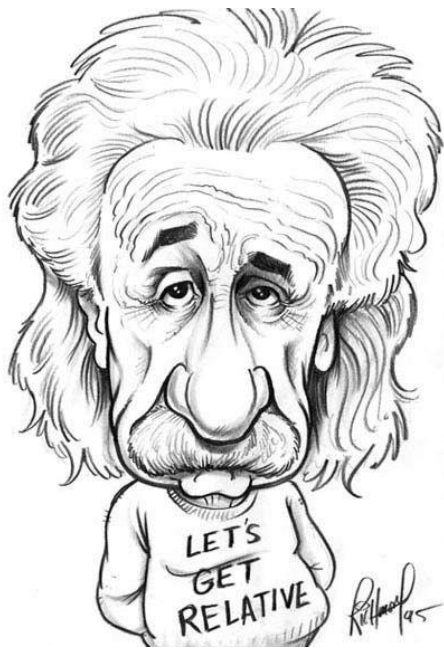
Kamenice 753/5

625 00 Brno

Telefon: 549 49 **8579**

E-mail: urban@chemi.muni.cz





www.tomrichmond.com

*„The important thing
is to never stop questioning“*

Albert Einstein