



STACIONÁRNÍ FÁZE

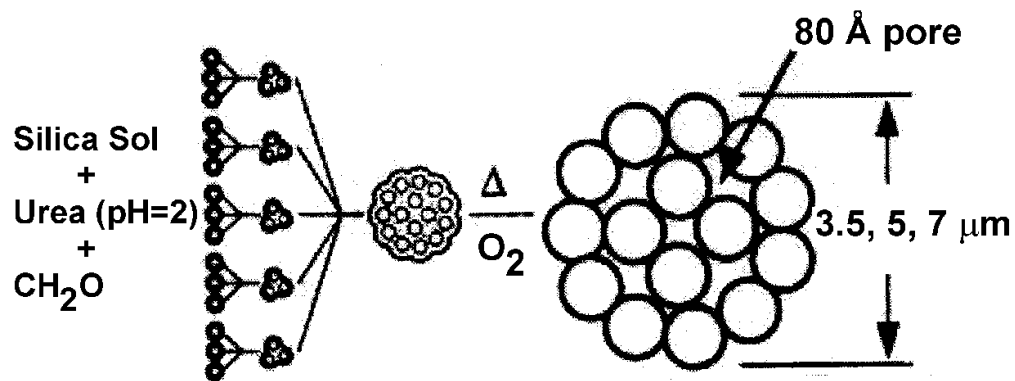
Pokročilá kapalinová chromatografie



SILIKAGEL

Porézní forma oxidu křemičitého (SiO_2) vyráběná synteticky z křemičitanu sodného.

Vysoký aktivní povrch ($800 \text{ m}^2/\text{g}$) a snadná absorpce vody (zahřátím na 150°C lze regenerovat).



Sil – gel, typ A (méně čistý) - neionizovatelné látky, póry 2.5 nm

Sil – sol, typ B rozklad organosilanů, shlukování plynné fáze, čistý, stabilnější i při vyšším pH – i ionizovatelné látky, póry 4.5 – 7 nm

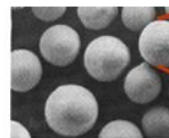
Desikant



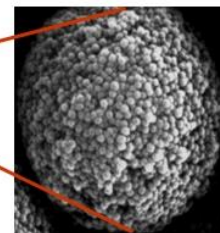
Stelivo



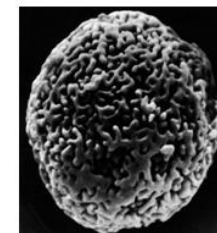
Stacionární fáze



www.team-cag.com



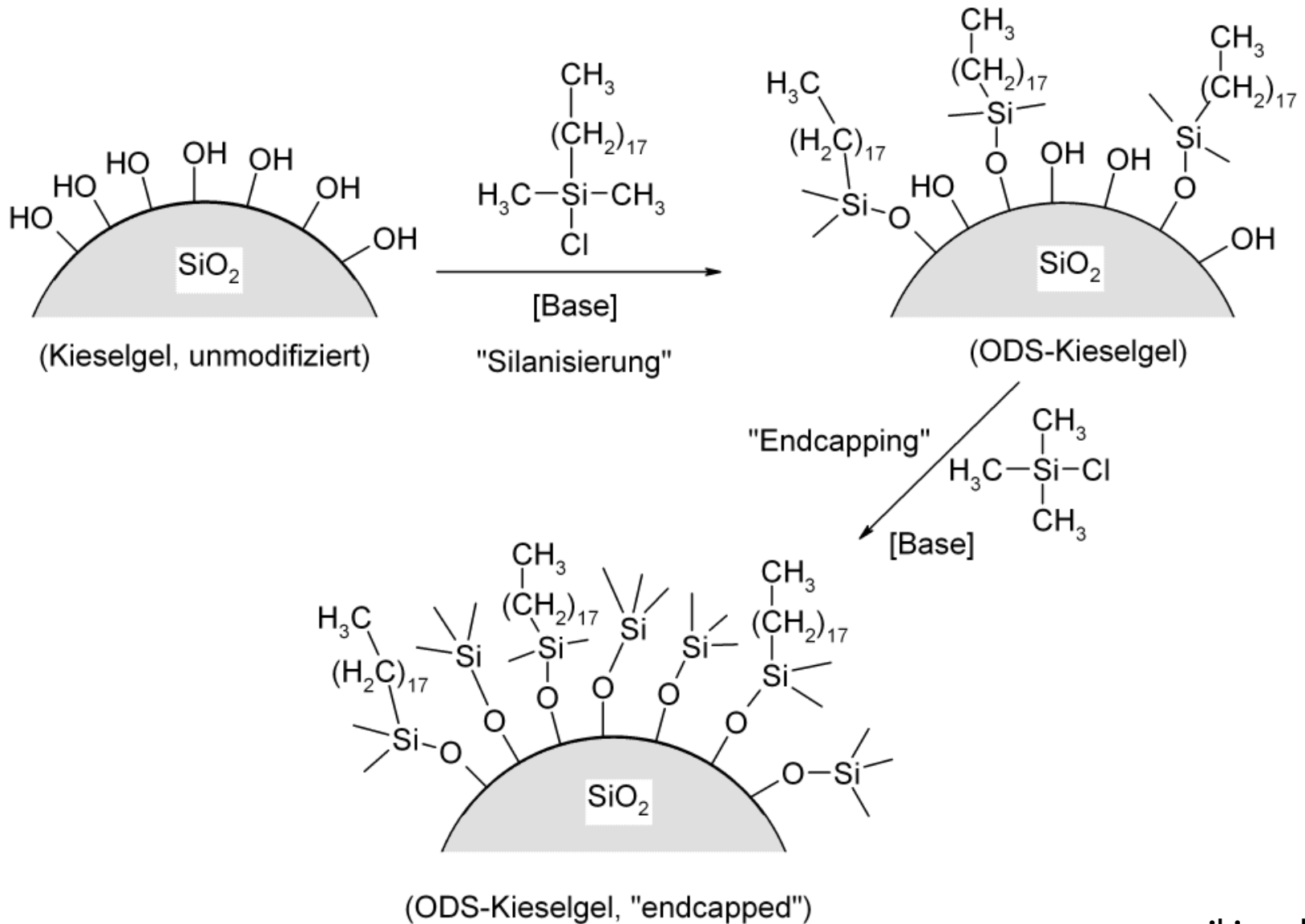
Silica sol



Silica gel

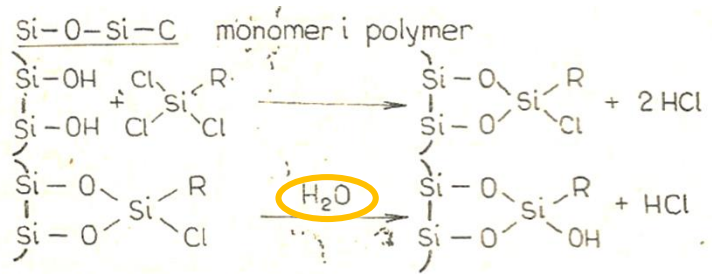
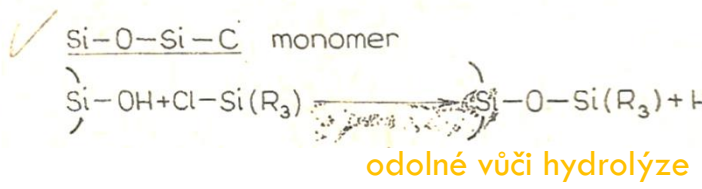
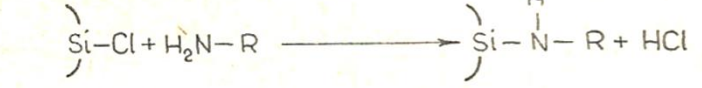
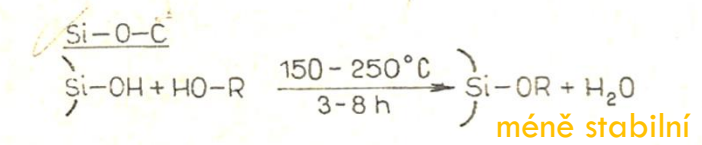
- Povrch je slabě kyselý, což způsobuje chvostování bazických látek.
- Chemicky stabilní do pH 8

CHEMICKY VÁZANÉ STACIONÁRNÍ FÁZE

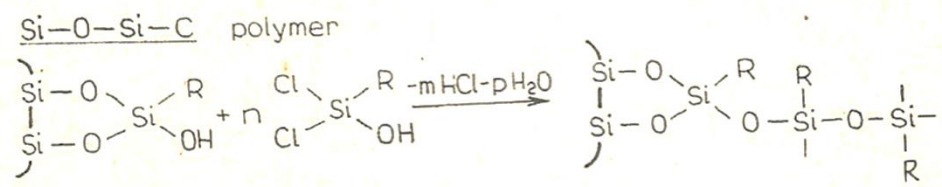
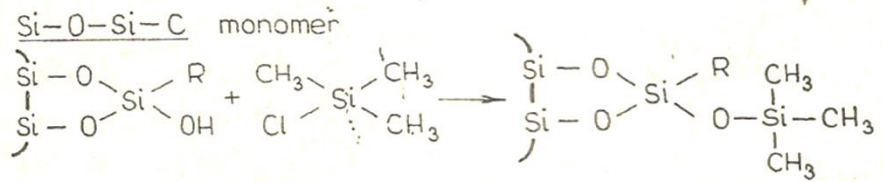


CHEMICKY VÁZANÉ STACIONÁRNÍ FÁZE

Zavádění reaktivních funkčních skupin



účinnost ↓

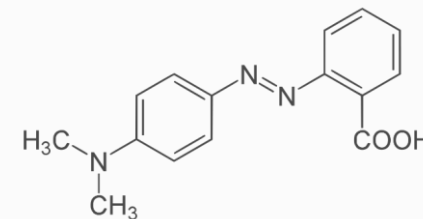


Omezená stabilita – hydrolyza při pH < 3, rozp. při pH > 8.5, zbylé Si-OH skupiny adsorbují látky (basické) a způsobují nesymetrické píky, proto dosilanizace ve 2. stupni Cl-Si(CH₃)₃ nebo (CH₃)₃N-Si-N(CH₃)₃, činidla s rozvětvenými alkyly.

PŘÍTOMNOST SILANOLOVÝCH SKUPIN?

Protřepat náplň s benzenovým roztokem metylové červeně a promýt čistým benzenem.

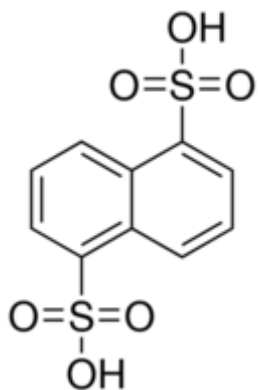
Červenofialová náplň? Nezreagované hydroxylové skupiny



Chromatografický test

Testovací sloučeniny

Naftalendisulfonové kyseliny



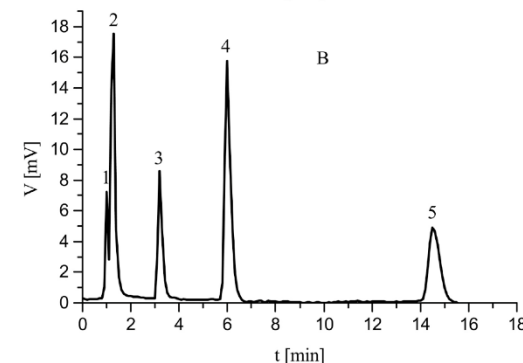
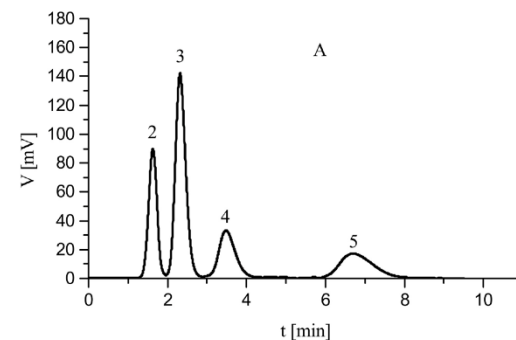
1,5-NDSA

Volné
silanolové skupiny?



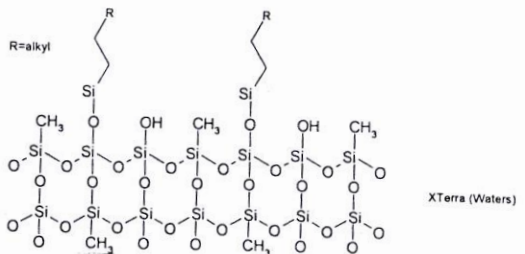
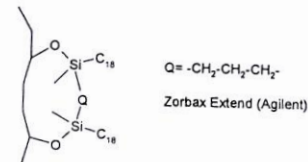
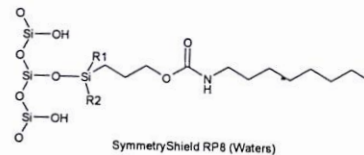
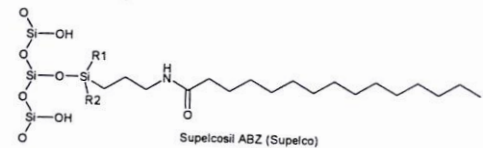
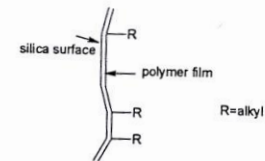
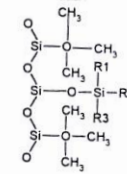
Retence

Mobilní fáze 0.4 M Na₂SO₄



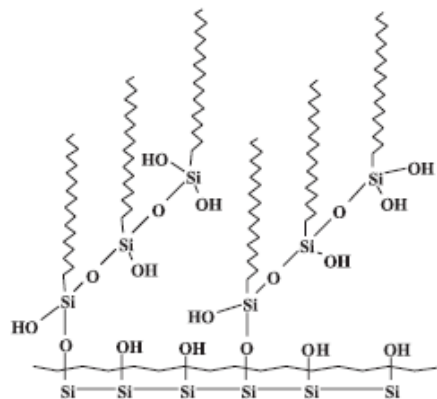
VOLNÉ SILANOLOVÉ SKUPINY

1. **Endcapping** – silanizace ve 2.stupni s TMCS (pro kyseliny), s HMDS (pro báze)
2. **Encapsulation** – obalení povrchu silikagelu tenkou vrstvou silikonového polymeru před modifikací (Stálé do pH 10, zbytkové Si-OH skupiny)
3. **Zavedení polárních skupin** – stíní povrch, jiná selektivita, brání zhroucení alkylů v mobil. fázích s vysokým obsahem vody
4. **Bidentátové stacionární fáze** – stabilita při vysokém pH
5. **Modifikace celého povrchu** – zavedení CH₃ skupin do povrchové vrstvy, poměr alkyl : SiOH ≈ 1 : 1 se změní na alkyl : CH₃ : SiOH ≈ 1 : 1 : 1

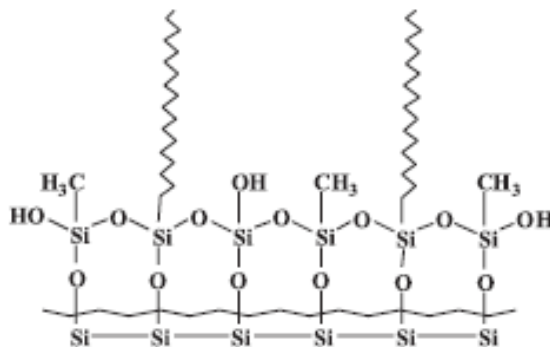


VOLNÉ SILANOLOVÉ SKUPINY

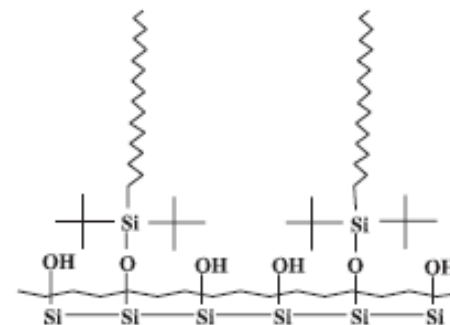
Vertikálně
polymerizované fáze



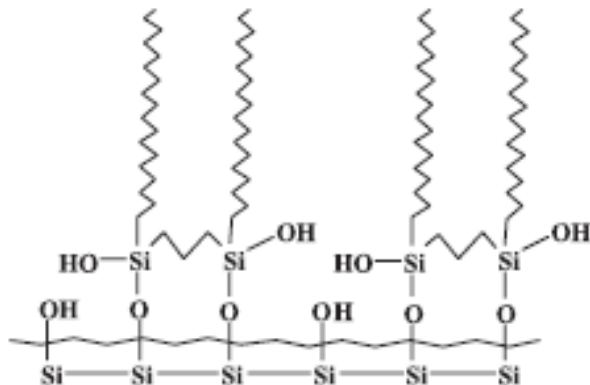
Horizontálně
polymerizované fáze



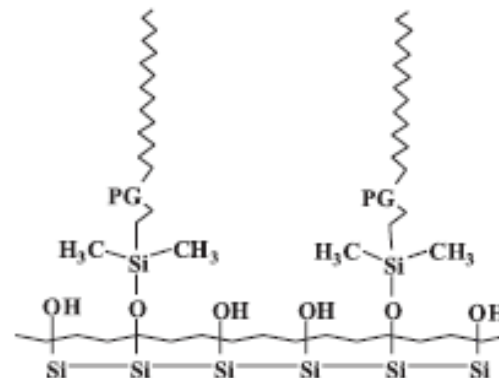
Stérická ochrana



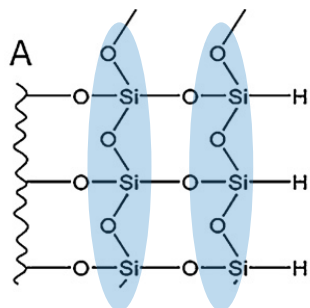
Bidentátové fáze



Stacionární fáze
s polárními skupinami

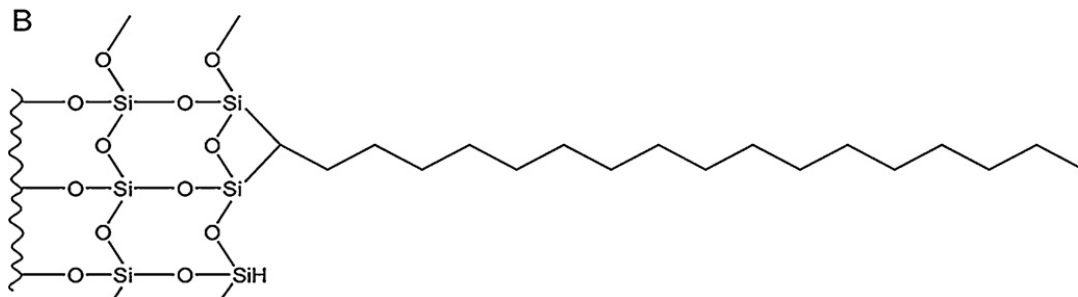


HYDROSILOVANÝ SILIKAGEL

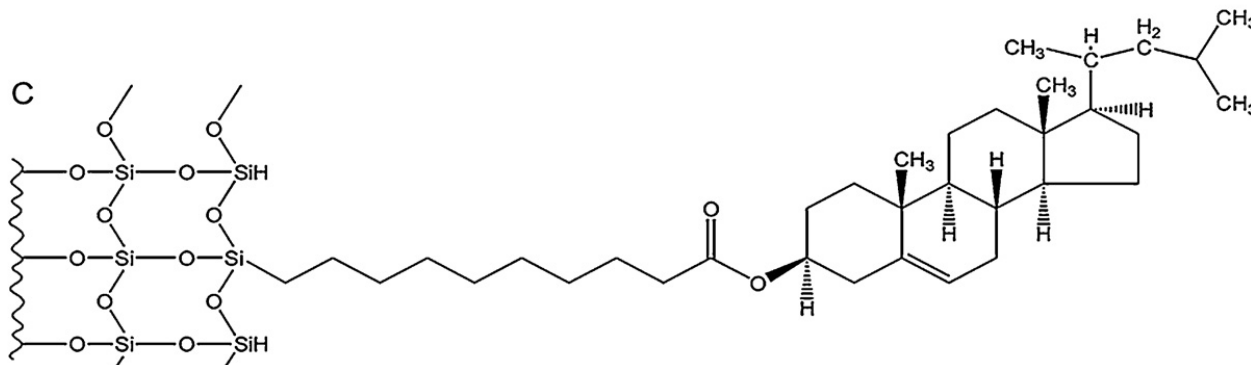


Odstraněno 90-95% Si-OH skupin, menší polarita povrchu, vyšší teplotní stabilita. HILIC aplikace pro polární látky.

Navázání bidentátových C18 nebo cholesterolových skupin - dvojitý mechanismus: HILIC – RP.



Bidentátová C18 skupina

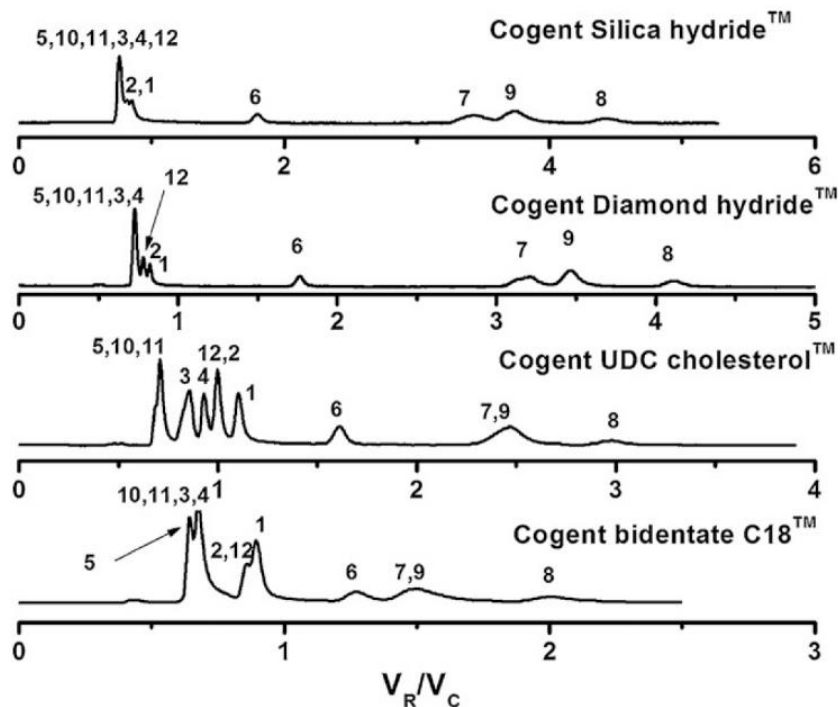


Cholesterol

DUÁLNÍ RETENČNÍ MECHANISMUS

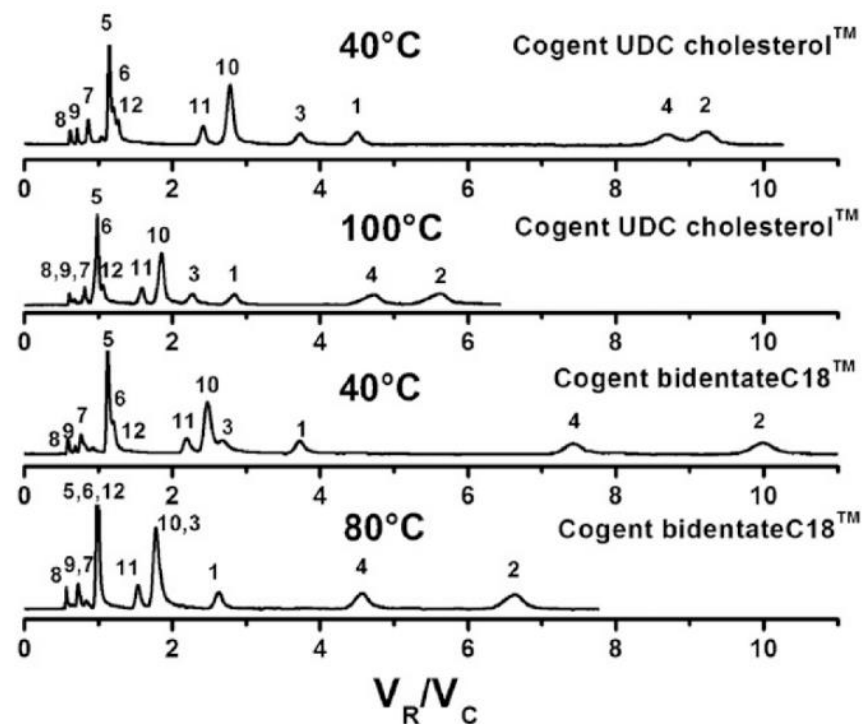
Hydrofilní interakce

Flavony v 10 mmol/L octanu amonném
(6:94 voda : acetonitril)



Reverzní fáze

Flavony v 10 mmol/L octanu amonném
(65:35 voda : acetonitril)



NEJEN SILIKAGEL

Property	SiO ₂	Ti O ₂	Al ₂ O ₃	ZrO ₂
Monodispersity	++	++	++	++
<i>Spherical micron sized particles available for all the oxides</i>				
Pore structure	++	?	?	++
<i>Silica and zirconia have well connected pores, not much has been published on the porosity of spherical titania and alumina .</i>				
Surface area/pore diameter	++++	++	+++	++
<i>Wider range available for silica</i>				
Controllable surface chemistry	++++	?	++	++
<i>Silica by silane chemistry, metal oxides by polymer deposition, zirconia - carbon deposition, not much is known on titania's surface chemistry</i>				
Mechanical strength	++	?	?	+++
<i>Silica and zirconia can tolerate >10,000 psi</i>				
Chemical stability	-	++ (?)	+++	++++
<i>Silica: 2<pH<8 (some to pH 11.5 0, no phosphates), alumina 3<pH<13, zirconia 1<pH<14, no stability studies are available for titania</i>				
Thermal stability	-	?	?	+++
<i>Silica: not higher than 60-70 °C, zirconia up to 200 °C, lack of temperature stability of alumina and titania</i>				
Column efficiency	+++	?	++	+++
<i>Silica and zirconia comparable, alumina slightly lower, no studies on titania</i>				
Energetic homogeneity	++	+	+	+
<i>Silica has better homogeneity of the surface (from an HPLC point of view) than metal oxides, all metal oxides have comparable surface chemistry.</i>				

CHROMATOGRAFICKÉ ČÁSTICE

Plně porézní

Částice $< 2 \mu\text{m}$: Krátké kolony, technika UHPLC, speciální instrumentace, nejvyšší tlak na koloně, 100 – 150 MPa

Povrchově-porézní

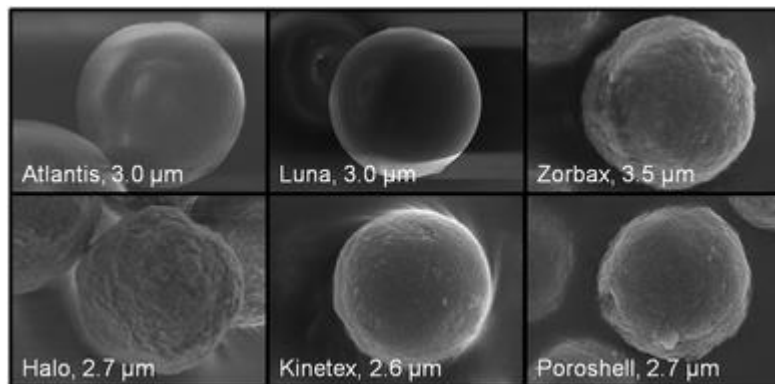
Kolony s částicemi s tenkou povrchovou pórovitou vrstvou na pevném jádře
menší tlak, vyšší permeabilita, vyšší průtoky, lepší rozlišení

Neporézní

Omezení difúze látek do pórů $>$ eliminace pórů. Snadné přetížení kolony, malé dávkované koncentrace (objemy).

Monolitické

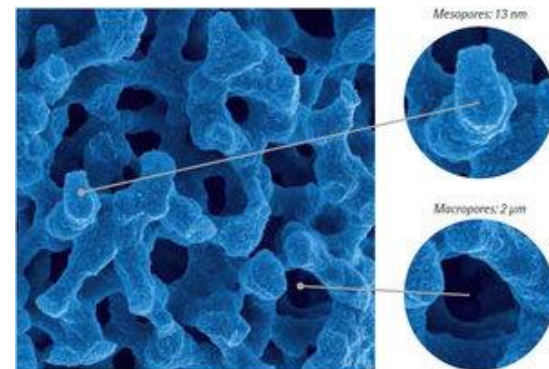
Tlak na monolitické koloně 3-4x menší – vyšší permeabilita, zvyšování průtoku mobilní fáze - zhoršení účinnosti a rozlišení, větší naředění vzorku



Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, 16, 6583-6592.

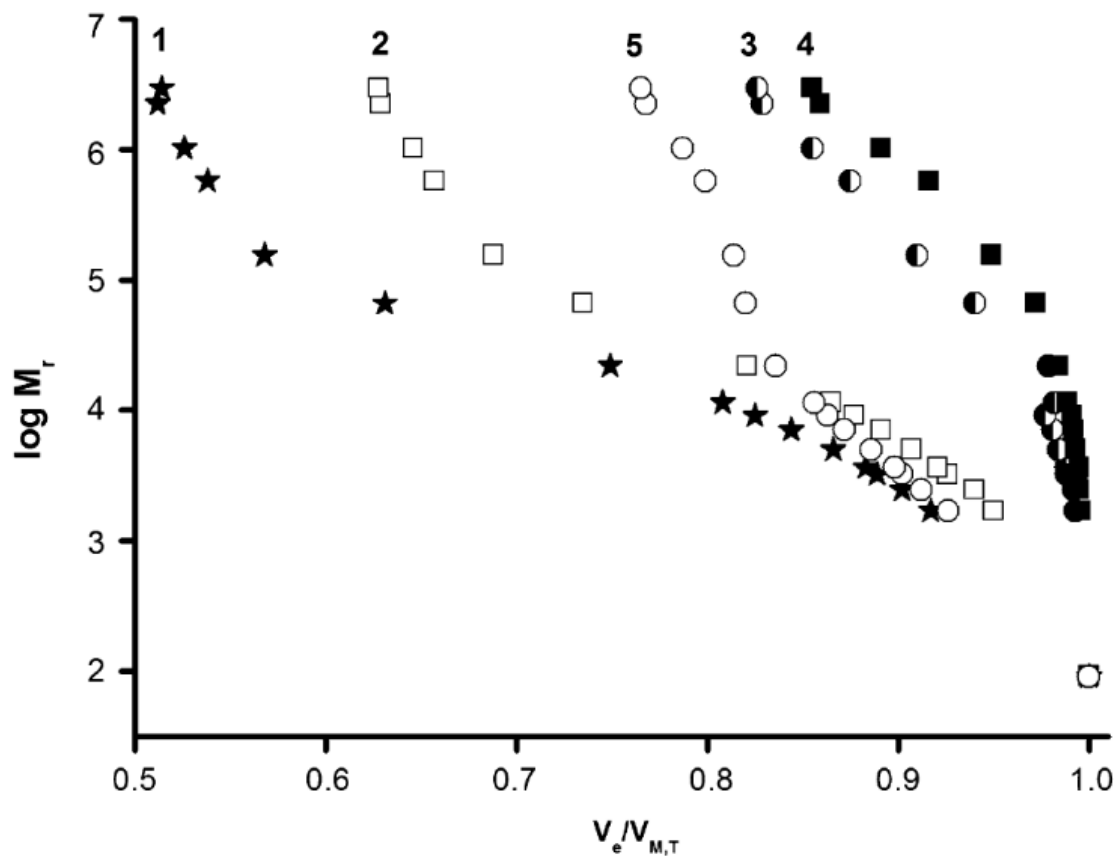


www.crawfordscientific.com



www.merckmillipore.com

VNITŘNÍ STRUKTURA ČÁSTIC



Objem vnitřních pórů

Celoporézní

1) Prontosil

75 x 3 mm, 3 μm

2) Zorbax

75 x 2.1 mm, 5 μm

Povrchově porézní

3) Poroshell

75 x 2.1 mm, 5 μm

Neporézní

4) NPS Micra

100 x 4.6 mm, 3 μm

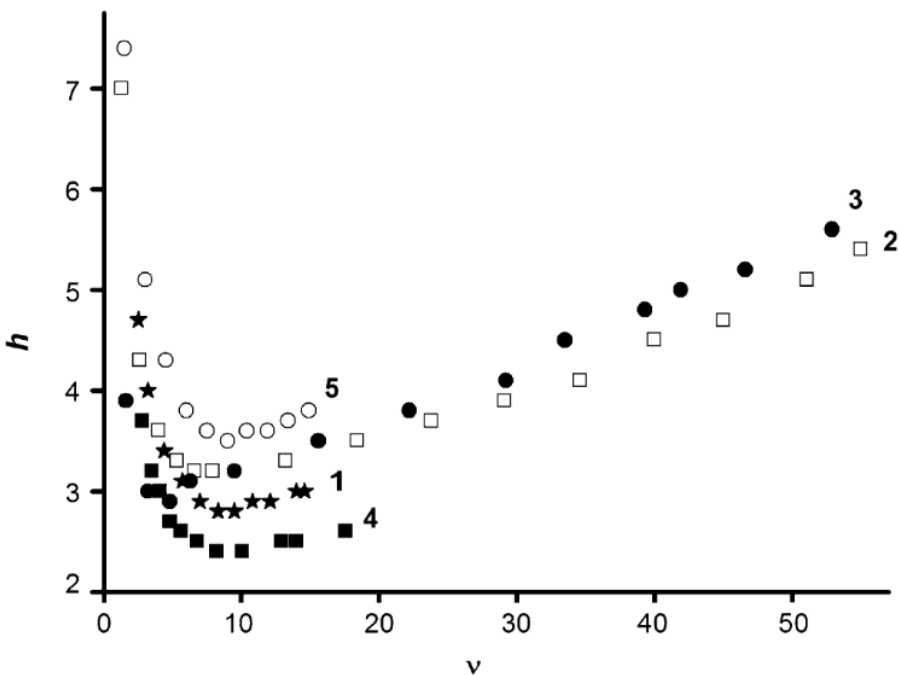
Monolitická

5) Chromolith

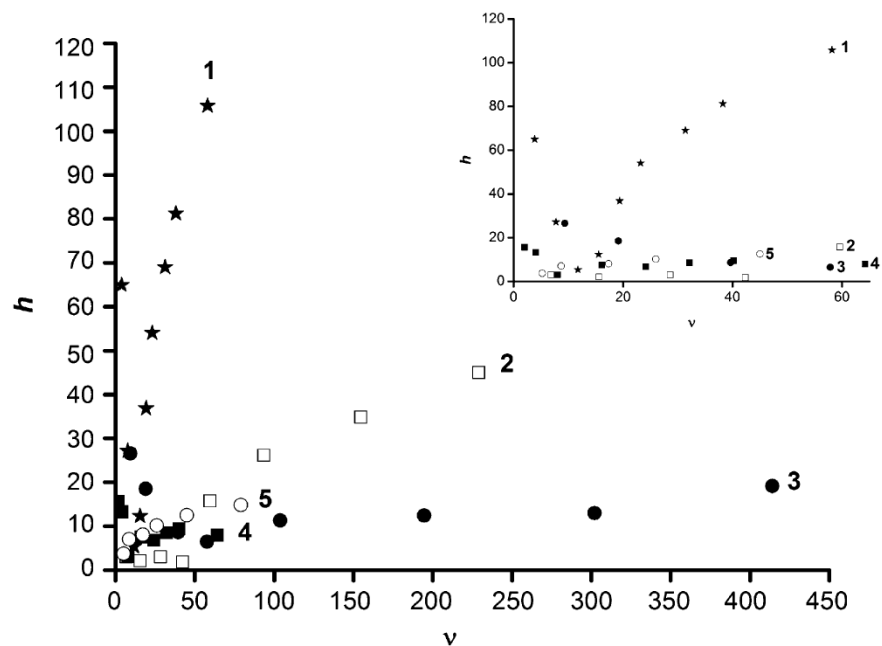
100 x 4.6 mm

ÚČINNOST

Etylbenzen

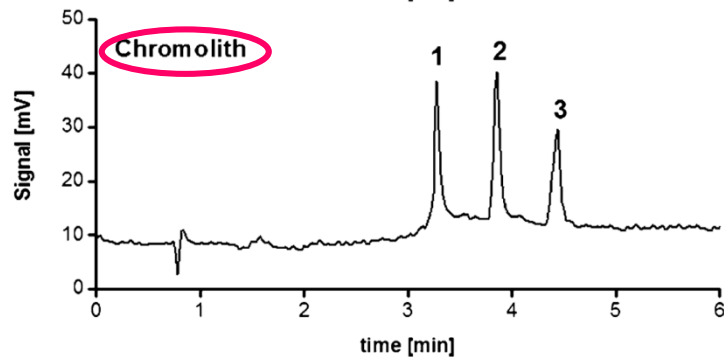
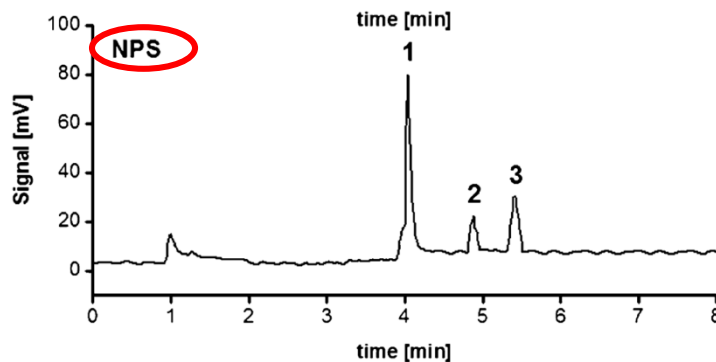
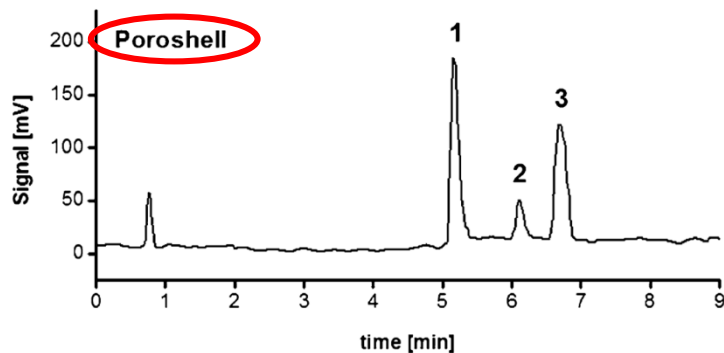
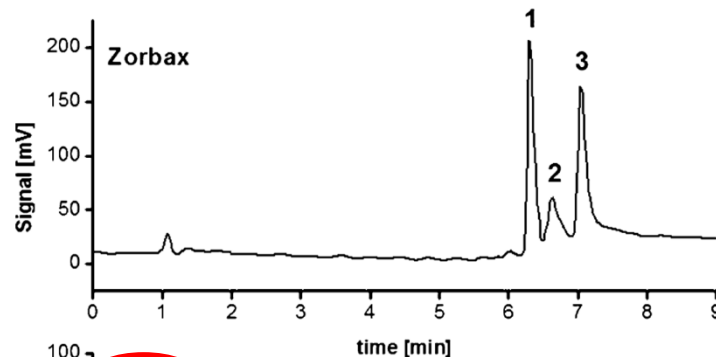
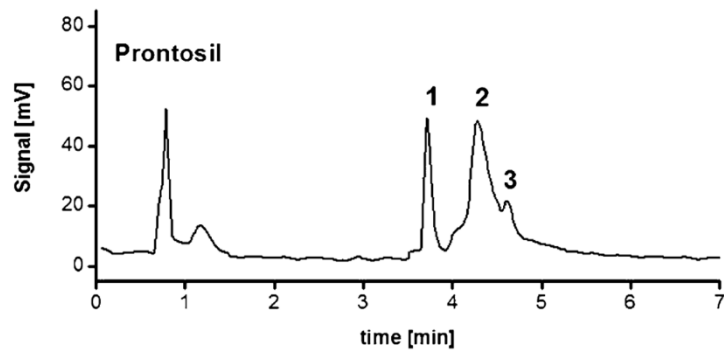


Inzulin



1) Prontosil / 2) Zorbax / 3) Poroshell / 4) NPS / 5) Chromolith

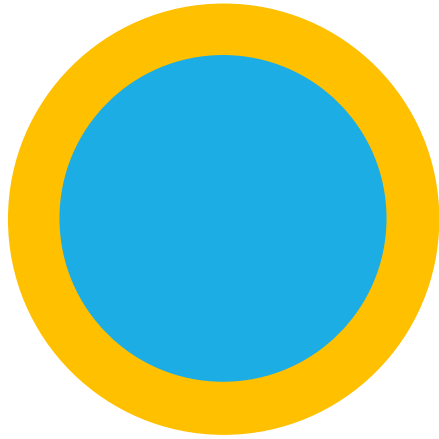
GRADIENTOVÁ ELUCE PROTEINŮ



- 1 – Insulin
- 2 – Trypsin
- 3 – BSA

Zlepšená separace
při minimalizaci vnitřních pórů

POVRCHOVĚ PORÉZNÍ ČÁSTICE (CORE-SHELL)



Neprostupné jádro

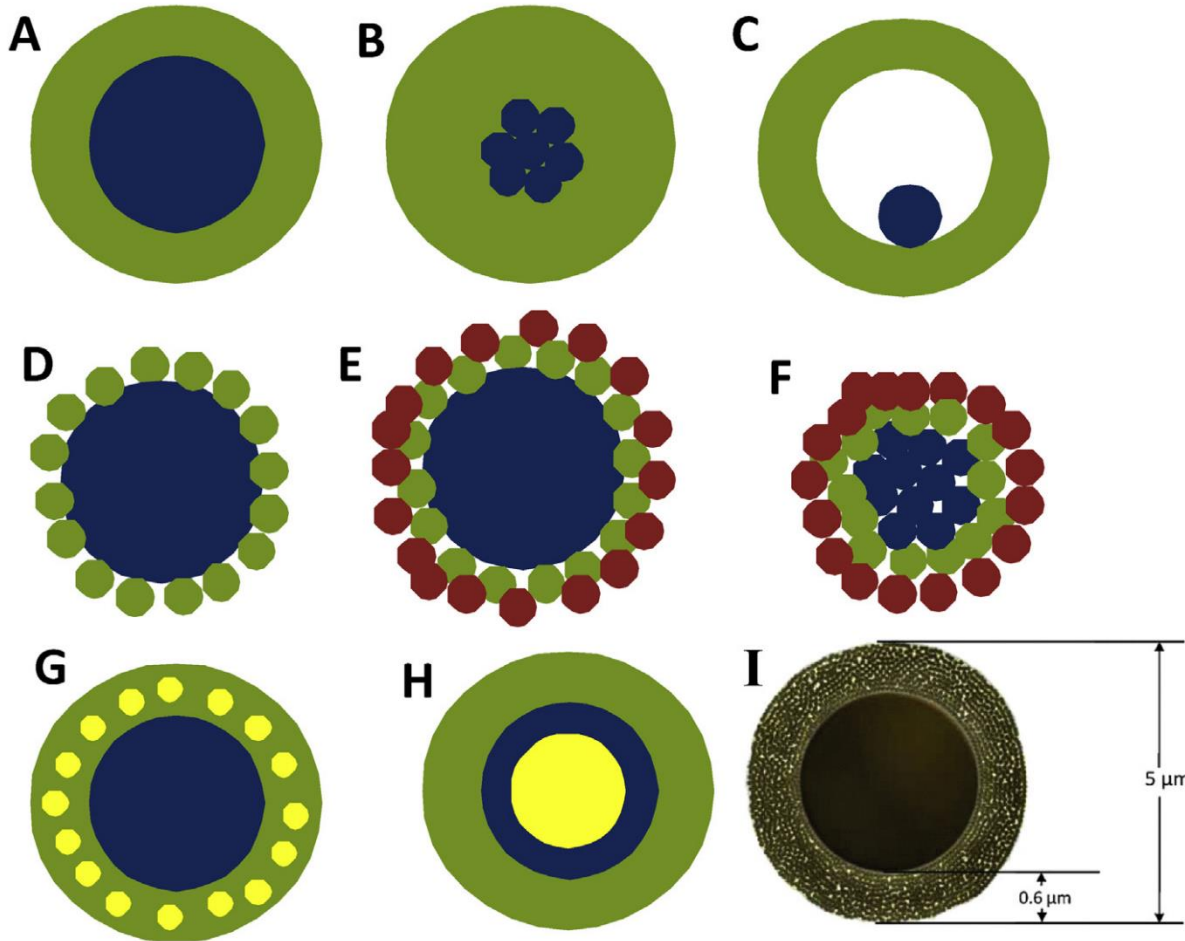
Povrchová porézní vrstva

Umožňují rychlejší a účinnější separace.

Objevily se již na konci 60. let 20. století. Byly ale zastíněny možností připravit celoporézní částice s menším průměrem (C. Horváth, J. Kirkland)

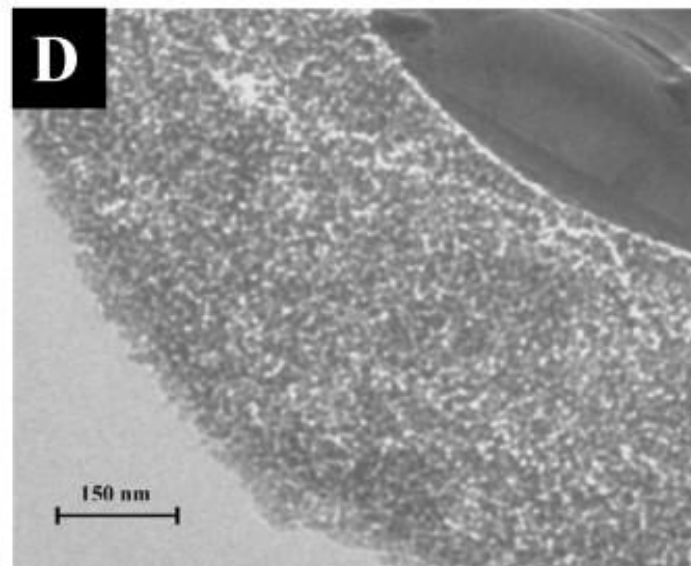
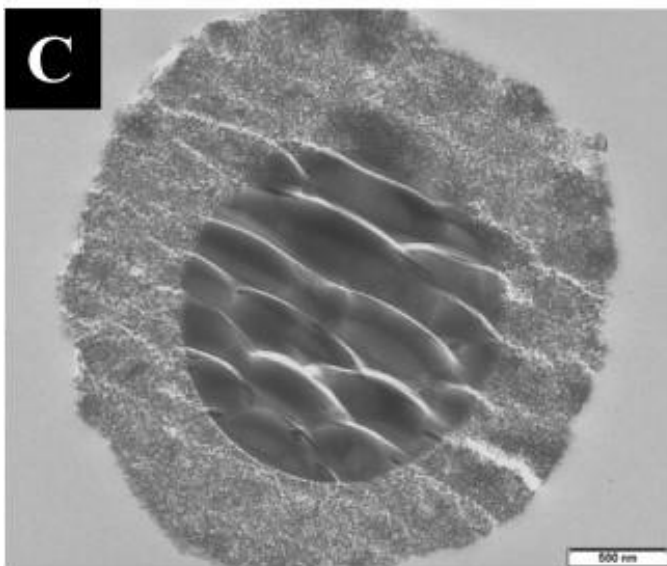
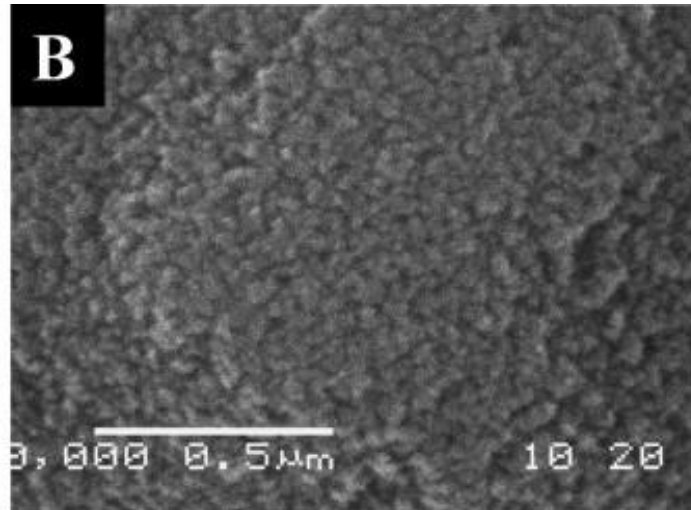
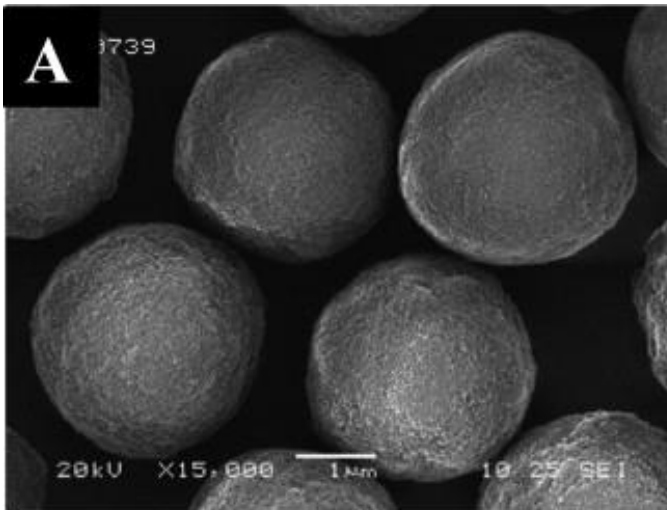
LLC (liquid-liquid chromatography) – porézní vrstva napuštěná nemísitelným rozpouštědlem (problém s rozpustností vzorku)

CORE-SHELL ČÁSTICE



- A) Jedna částice
- B) Shluk částic
- C) „Skořápka“, „chrastítko“
- D) Malé částice na jedné
- E) Více vrstev
- F) Agregované částice
- G) Integrace částic do vrstvy
- H) Několik různých vrstev
- I) Chromatografie

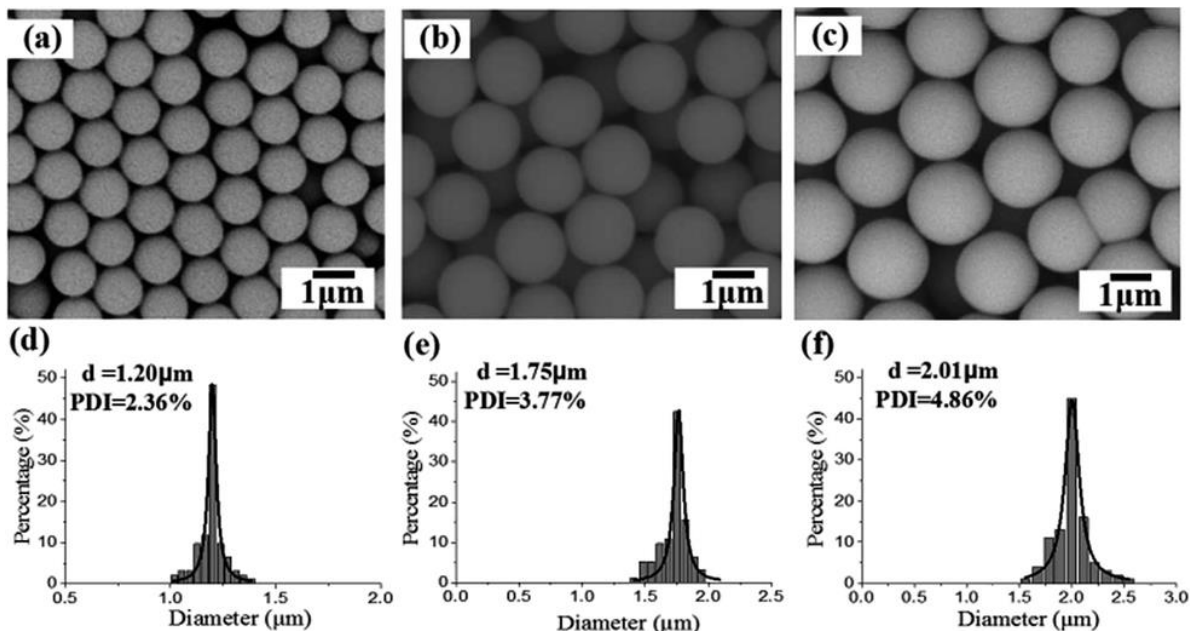
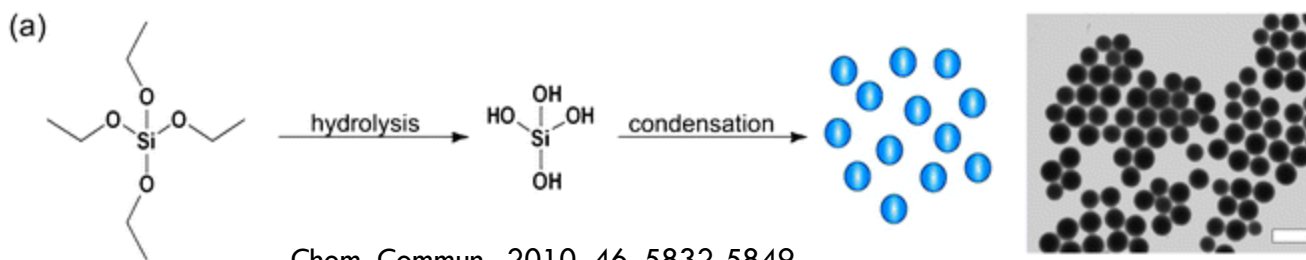
MORFOLOGIE CORE-SHELL ČÁSTIC



PŘÍPRAVA CORE-SHELL ČÁSTIC

Jádro

Monodispersní křemenné mikro částice (sub-2-3- μm) připravené pomocí Stöberovy metody (1968)

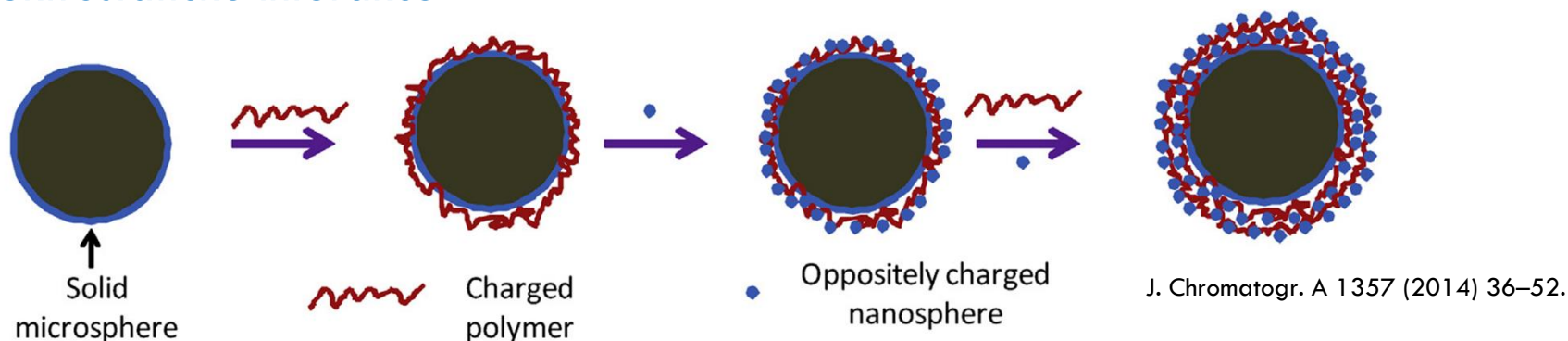


Hydrolýza a polykondenzace tetraethylortosilikátu probíhá v systému etanol/voda.

PŘÍPRAVA CORE-SHELL ČÁSTIC

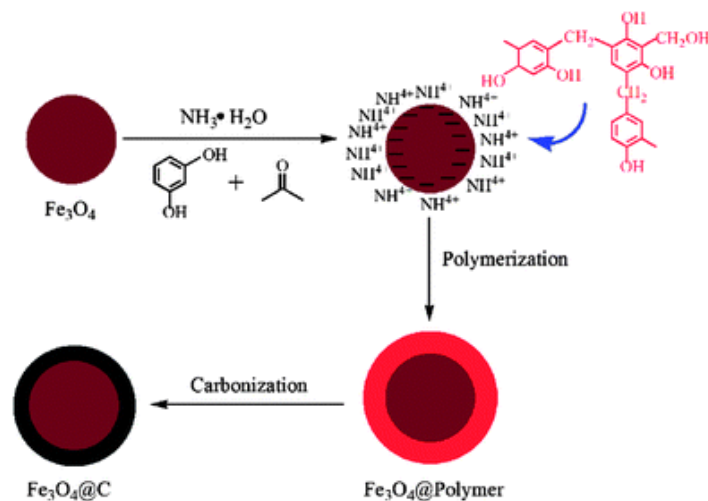
Porézní vrstva

Elektrostatické interakce



Syntéza vrstvy na vytvořených částicích

- Polymerizace podporovaná silikagelem
- Precipitační polymerace
- Silica-metal-organic frameworks (MOFs)
- Magnetické core-shell částice

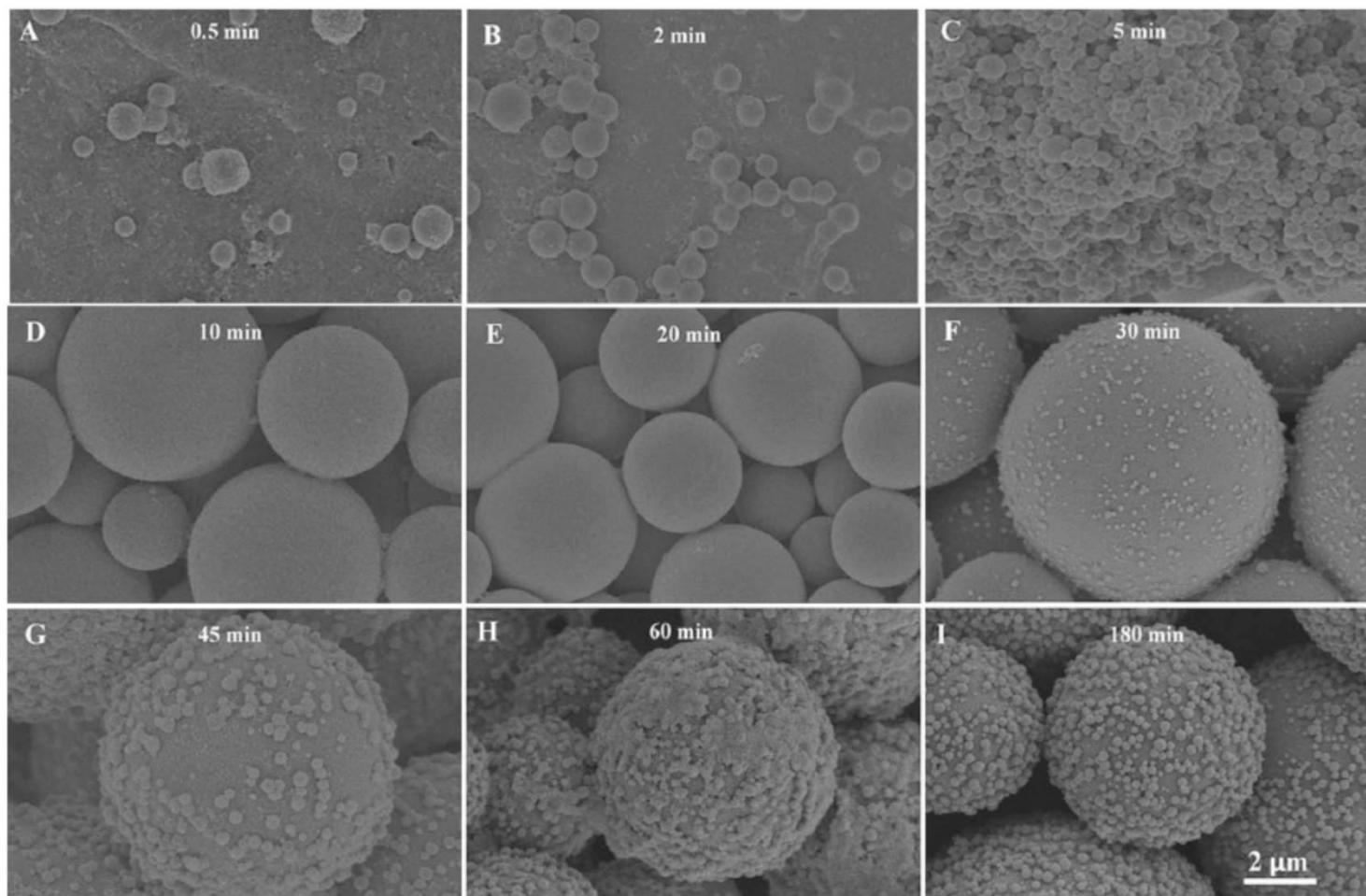


PŘÍPRAVA CORE-SHELL ČÁSTIC

Porézní vrstva

Spheres-on-spheres

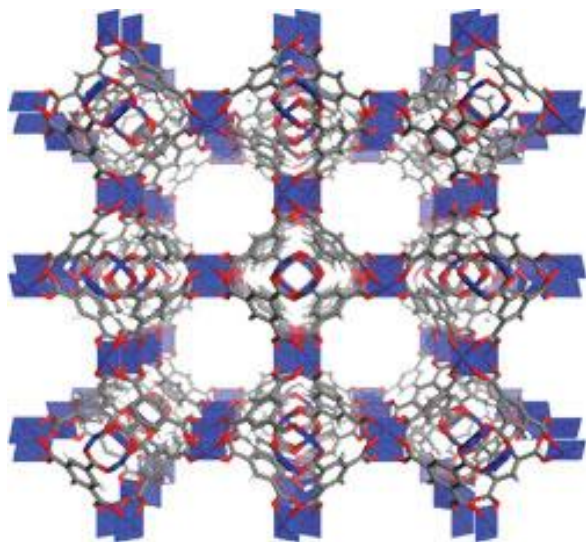
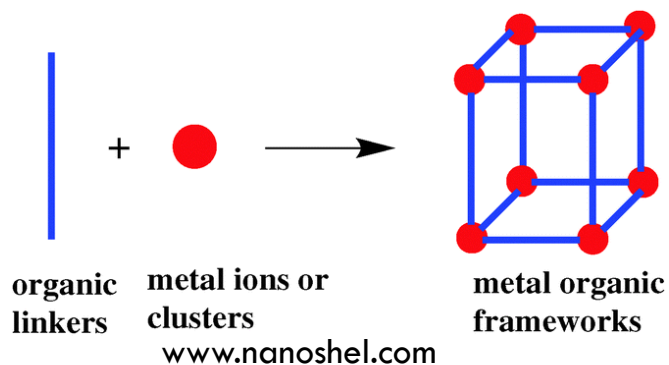
Prekurzor 3-mercaptopropyltrimethoxysilan



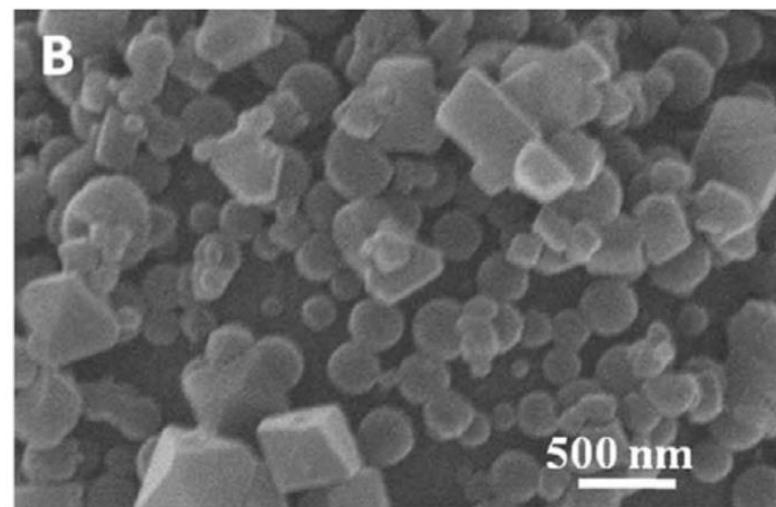
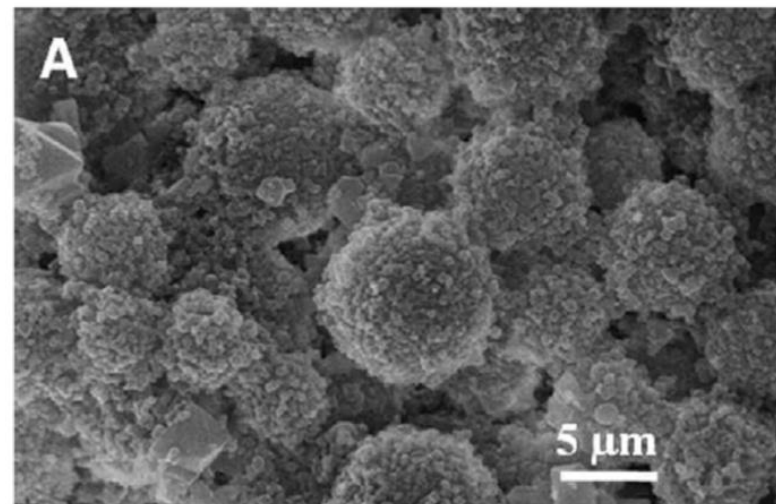
PŘÍPRAVA CORE-SHELL ČÁSTIC

Porézní vrstva

Metal-organic frameworks (MOFs)



www.sigmaaldrich.com

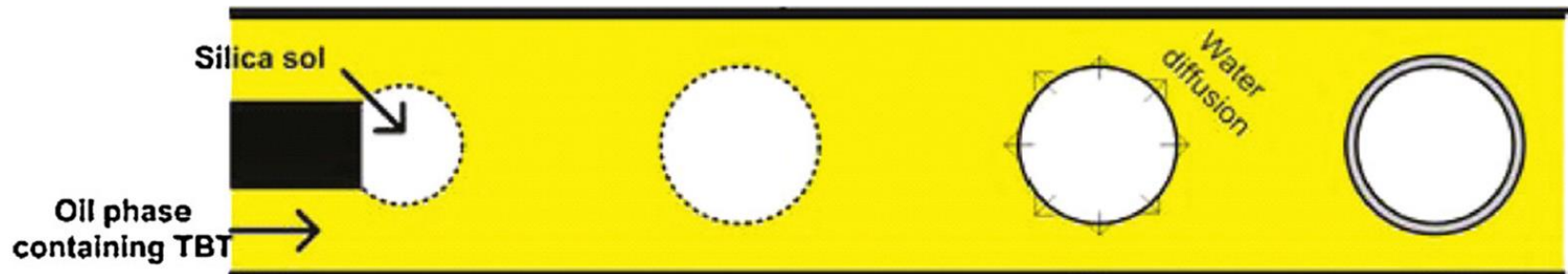


J. Mater.Chem. A 1 (2013) 3276.

PŘÍPRAVA CORE-SHELL ČÁSTIC

Porézní vrstva

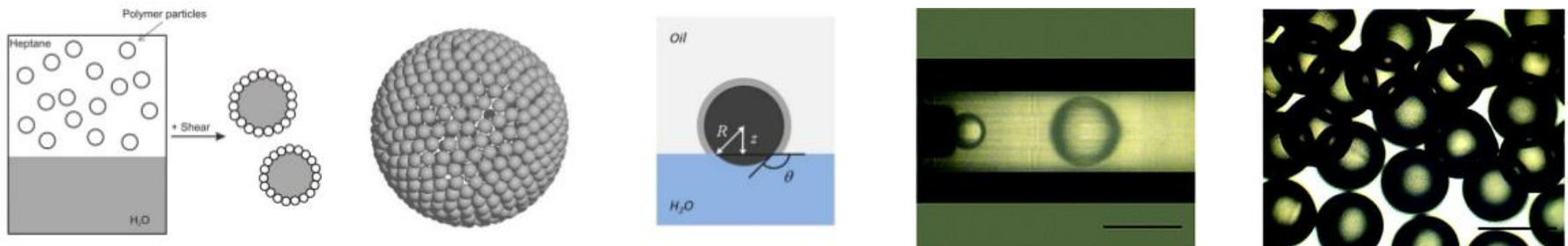
Kapková emulzní technika



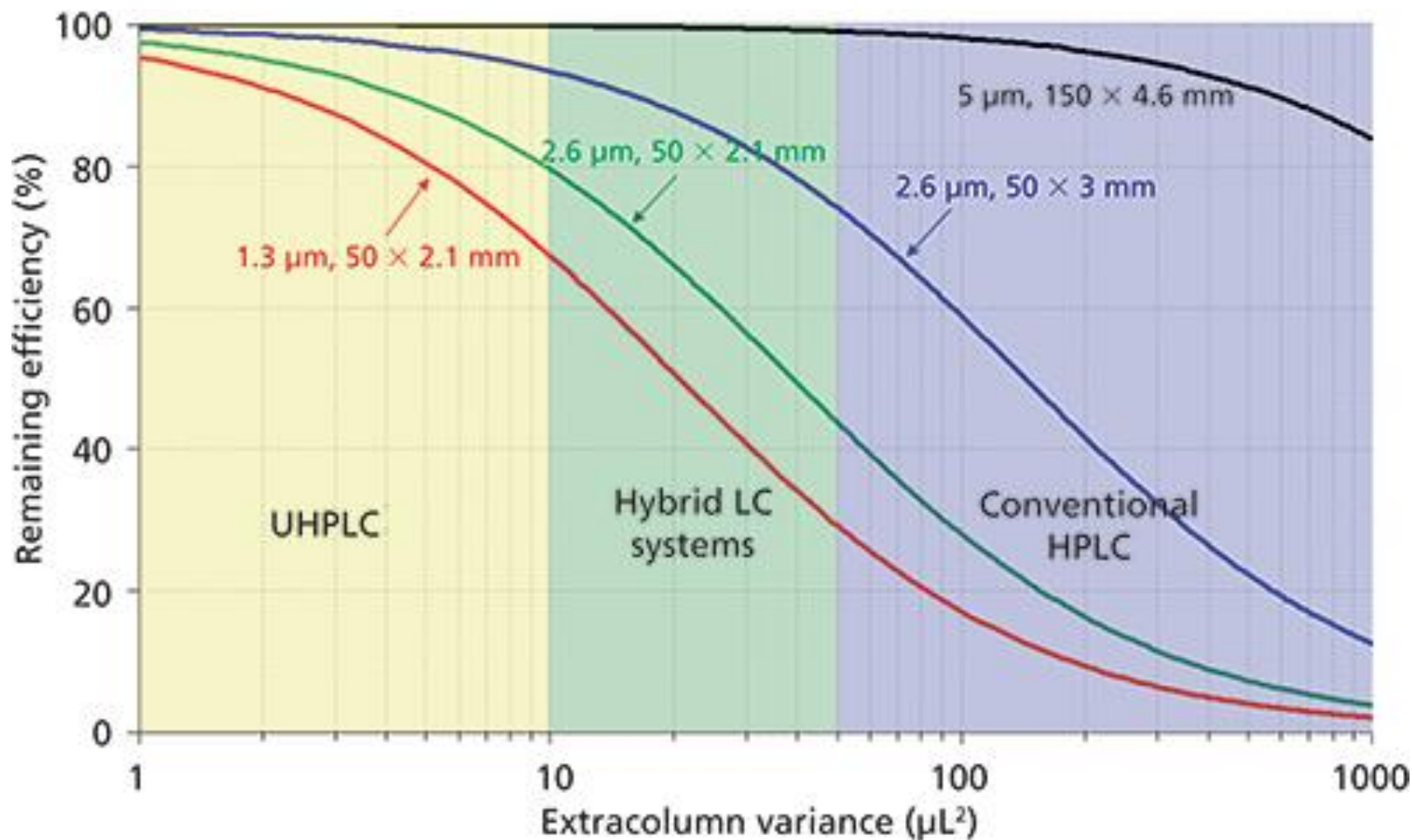
Langmuir 27 (2011) 13242.

Pickering emulsion

Emulze stabilizovaná pevnými částicemi (koloidní silikagel), které se absorbují na rozhraní dvou fází

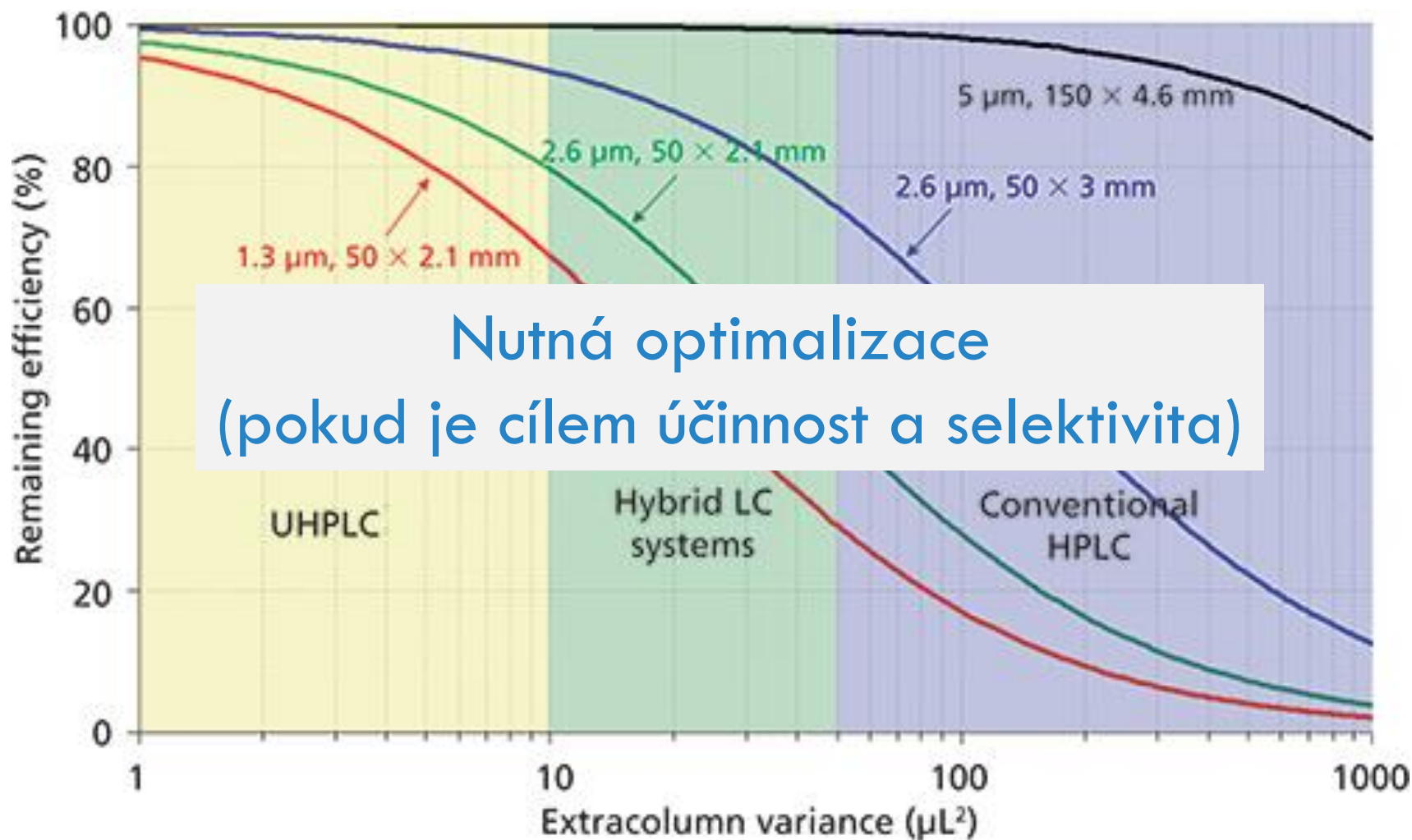


VLIV MIMOKOLONOVÝCH OBJEMŮ



$$k = 5$$

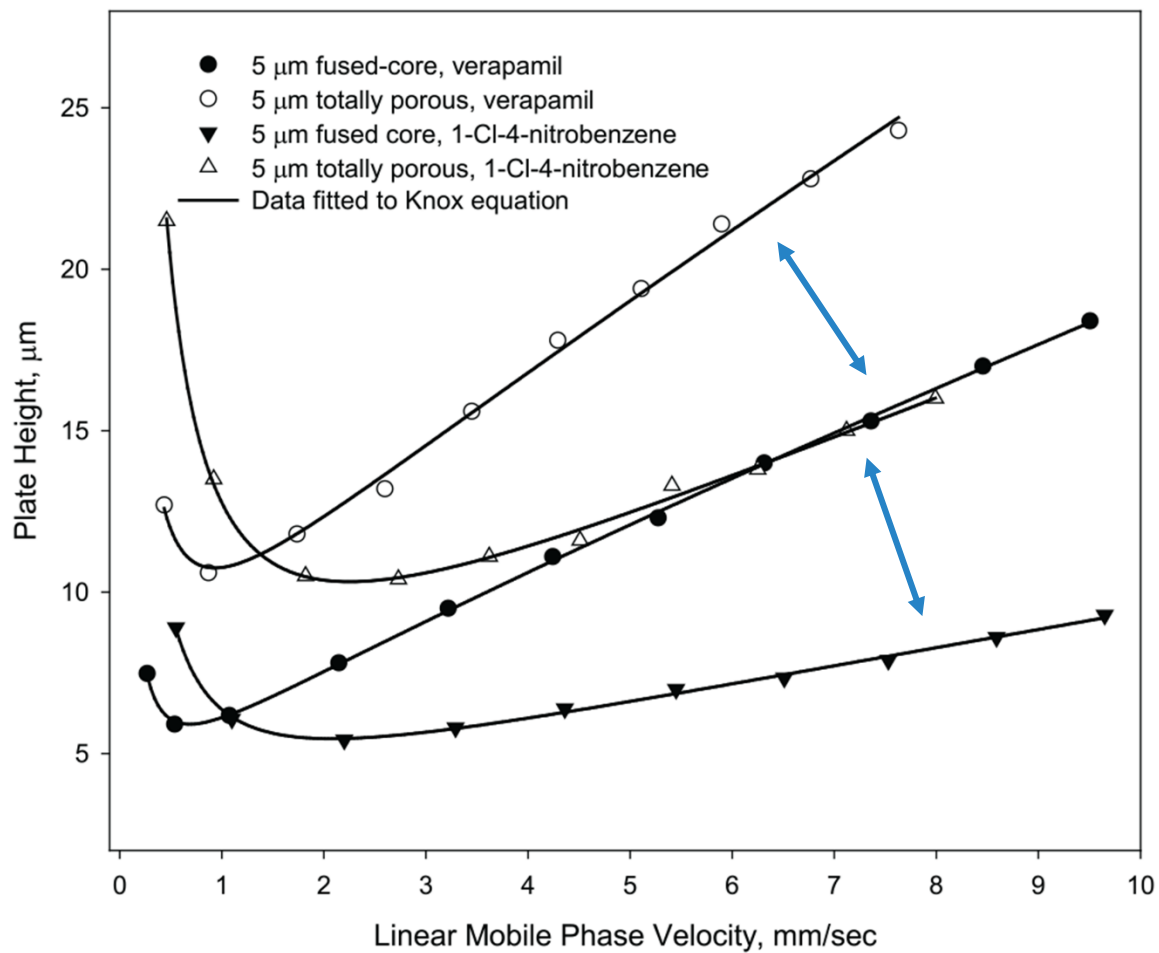
VLIV MIMOKOLONOVÝCH OBJEMŮ



Nutná optimalizace
(pokud je cílem účinnost a selektivita)

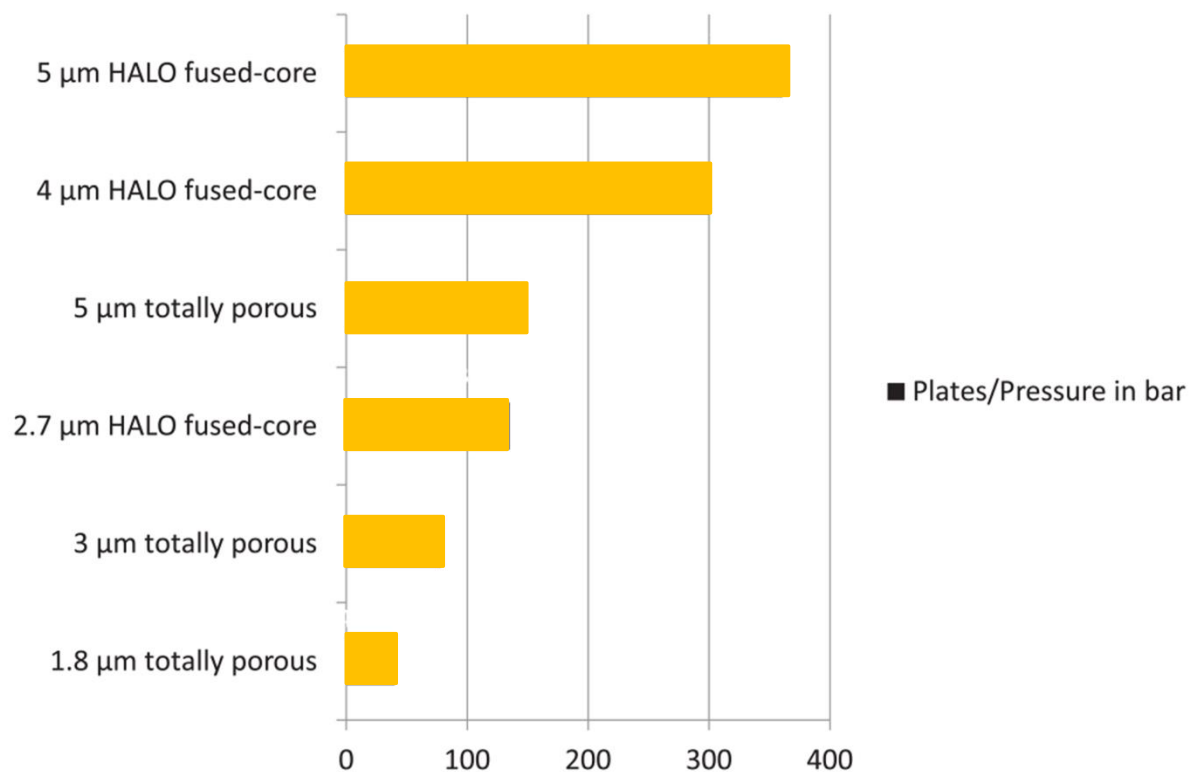
$$k = 5$$

VYŠŠÍ ÚČINNOST

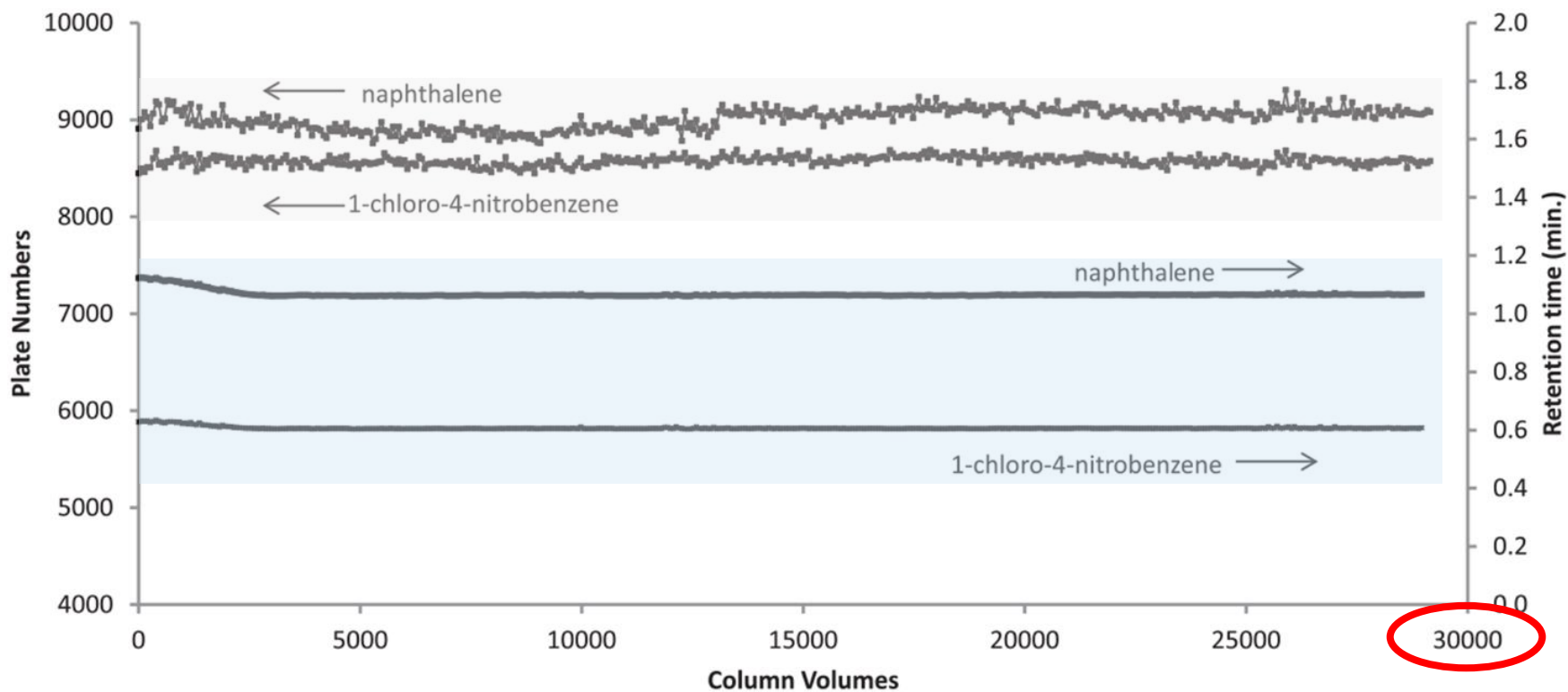


SROVNÁNÍ KOLON

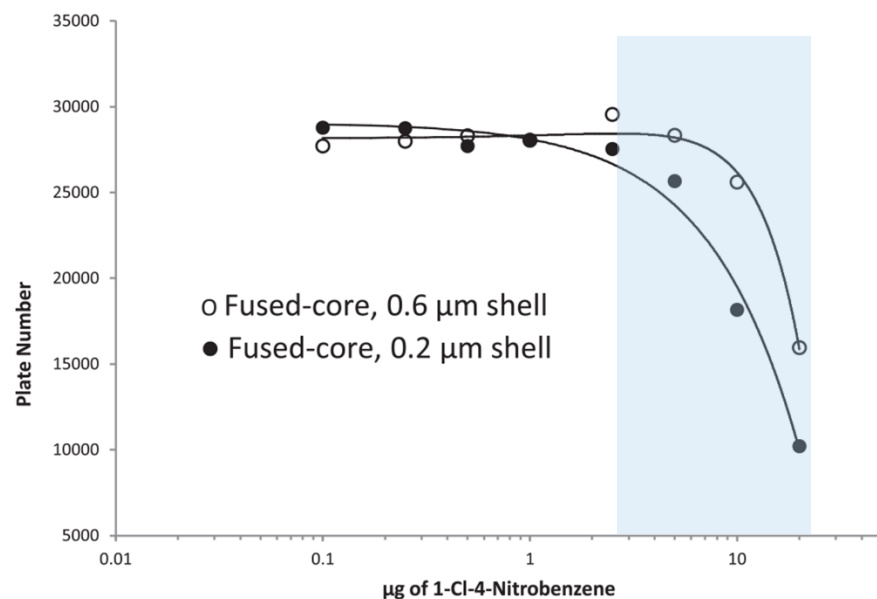
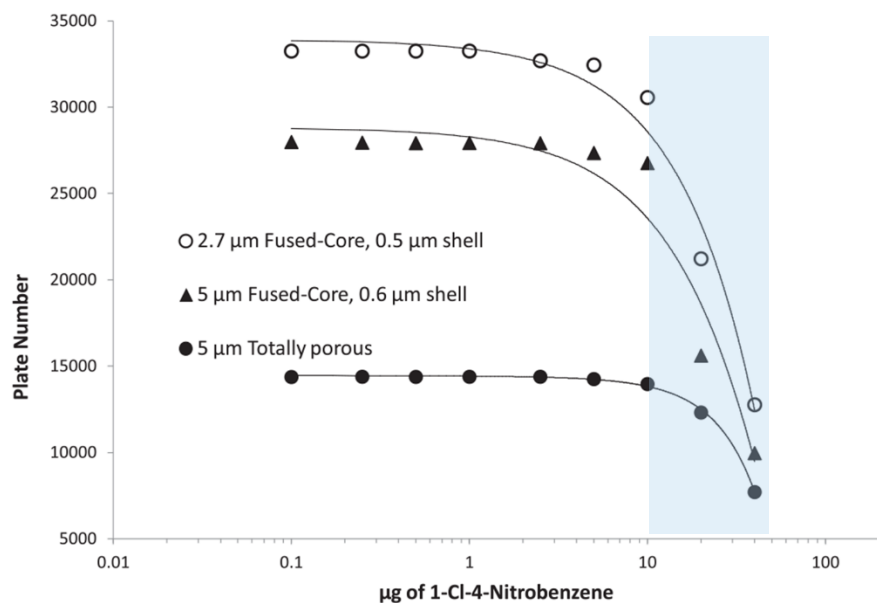
Počet pater / pracovní tlak (bar)



STABILITA



VLIV KONCENTRACE VZORKU

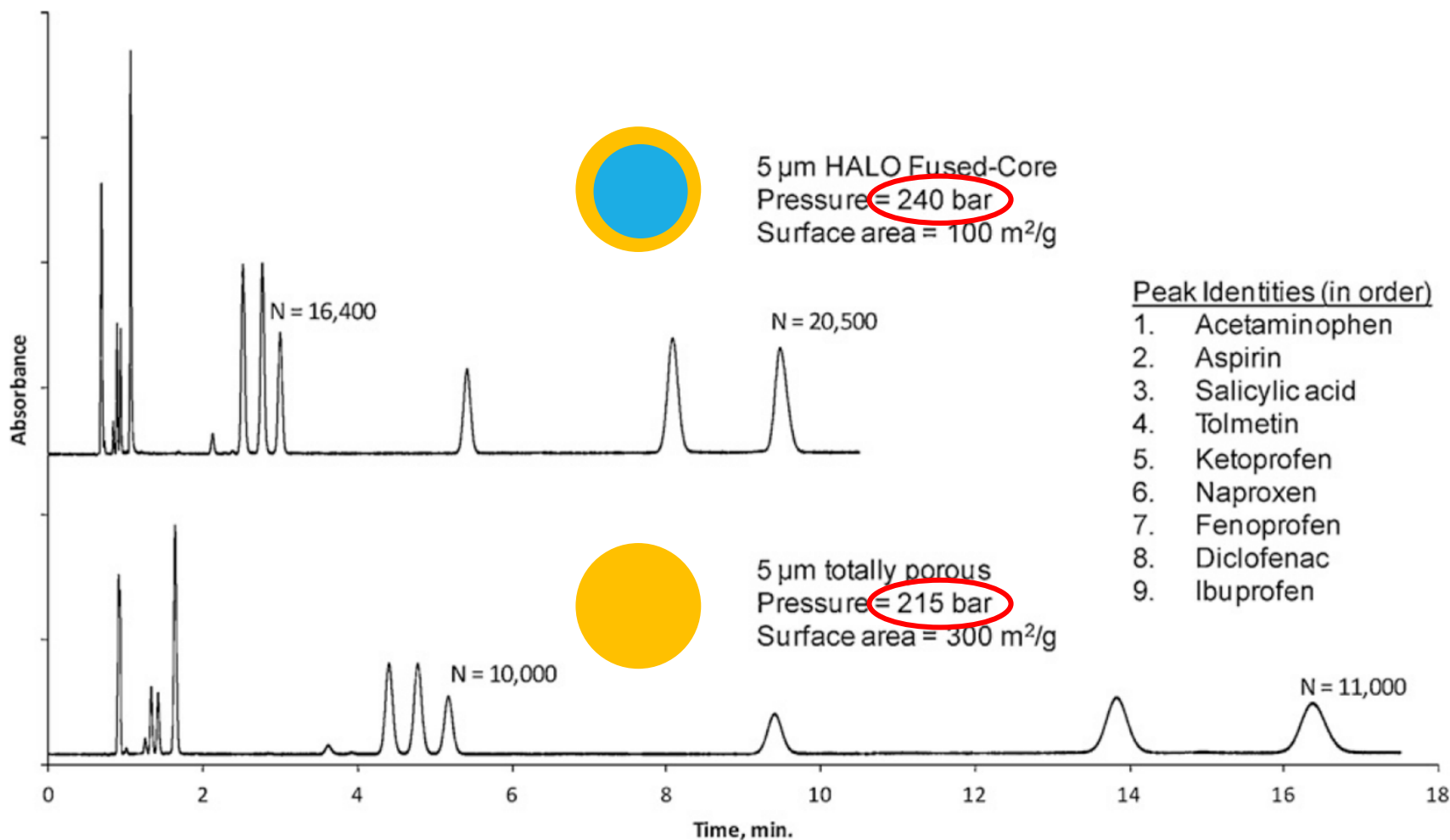


Srovnatelný vliv zvýšené koncentrace vzorku, ale dramatičtější pokles účinnosti.

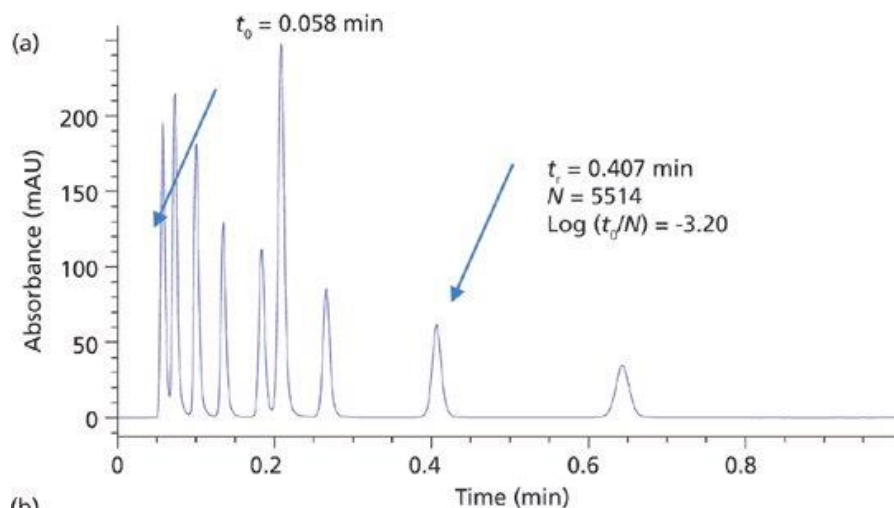
Tloušťka porézní vrstvy snižuje vliv koncentrace vzorku na účinnost kolony.

2.7 µm částice s 0.5 µm vrstvou, 75% objemu porézní
> vyšší koncentrace vzorku

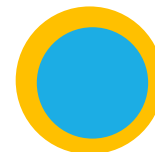
CORE-SHELL vs. PLNĚ PORÉZNÍ



CORE-SHELL vs. UHPLC

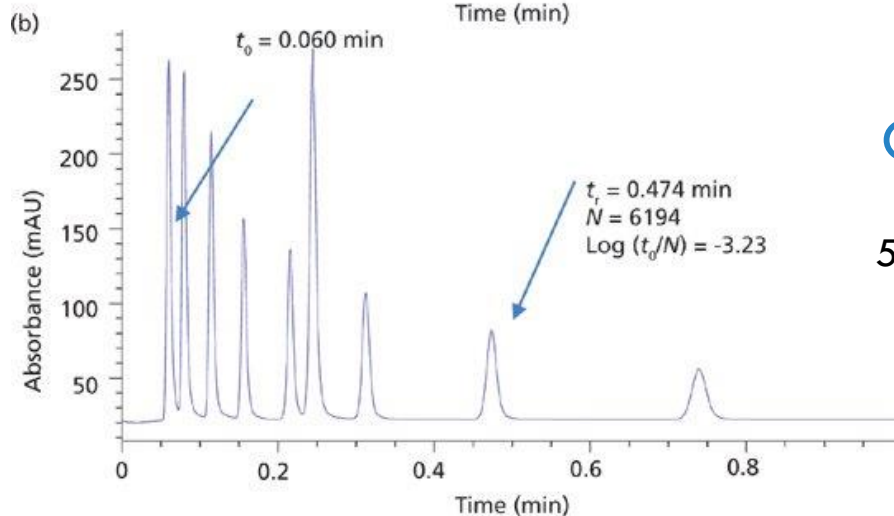


Core-shell



54.9 MPa

50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm Poroshell 120 EC-C18



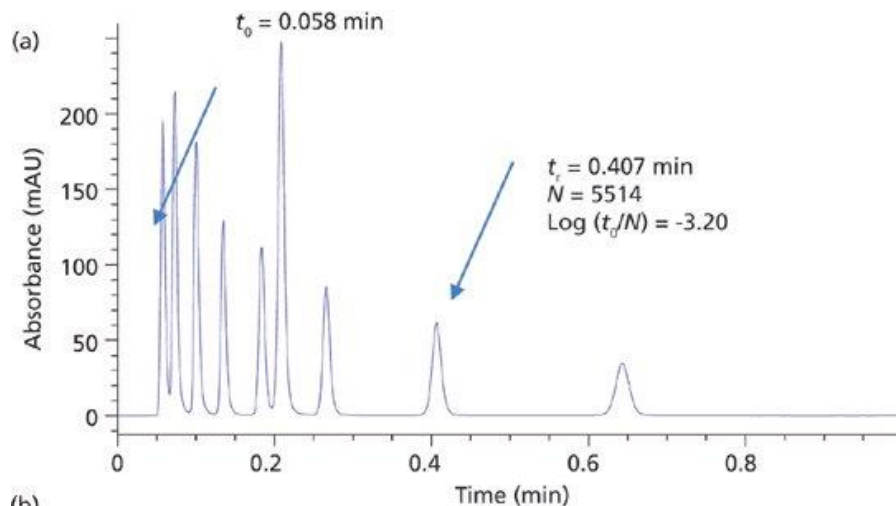
Celoporézní



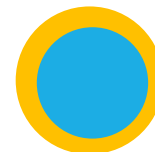
100.3 MPa

50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm Zorbax RRHD Eclipse Plus C18

CORE-SHELL vs. UHPLC

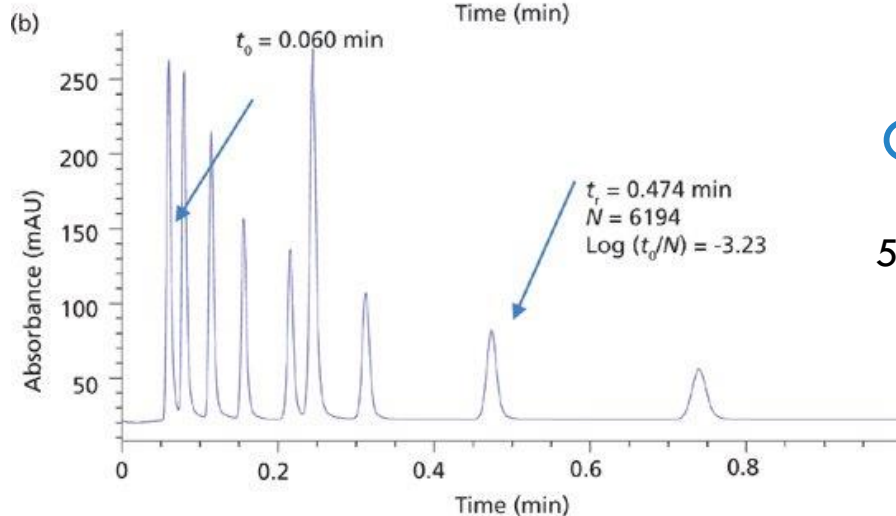


Core-shell



54.9 MPa

50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm Poroshell 120 EC-C18



Celoporézní

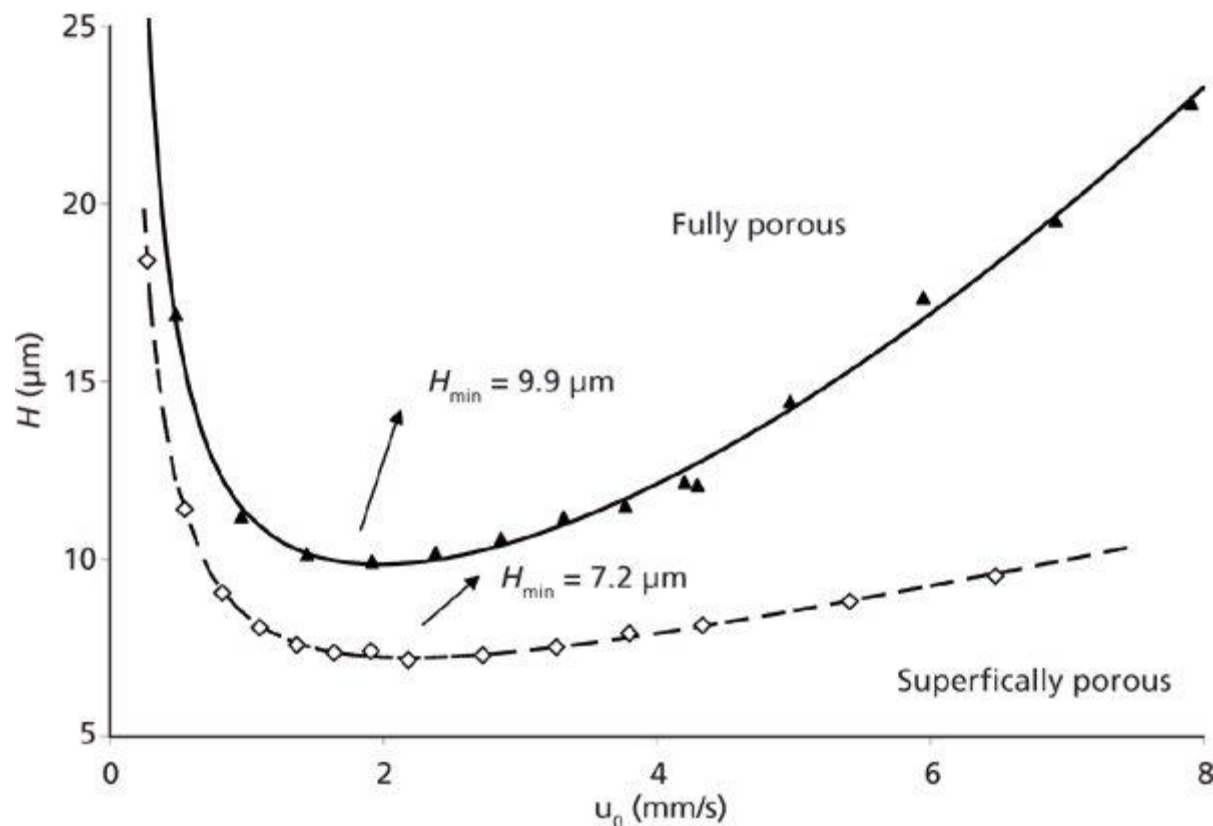


UHPLC

100.3 MPa

50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm Zorbax RRHD Eclipse Plus C18

CORE SHELL vs. PORÉZNÍ ČÁSTICE

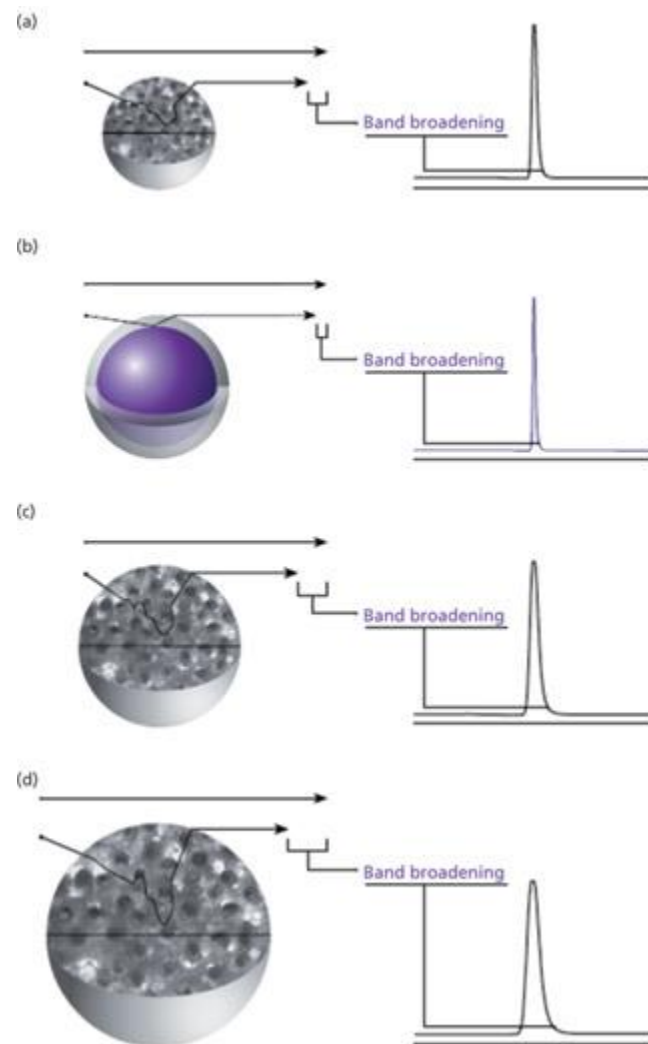


Efficiency comparison between fully porous and superficially porous 5- μm particles. Column dimensions: 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm ; mobile phase: acetonitrile–water; test compound: benzophenone; $k' = 6.2$ (isoelutropic conditions). (Data courtesy of Dr. Ken Broeckhoven, Vrije Universiteit Brussel.)

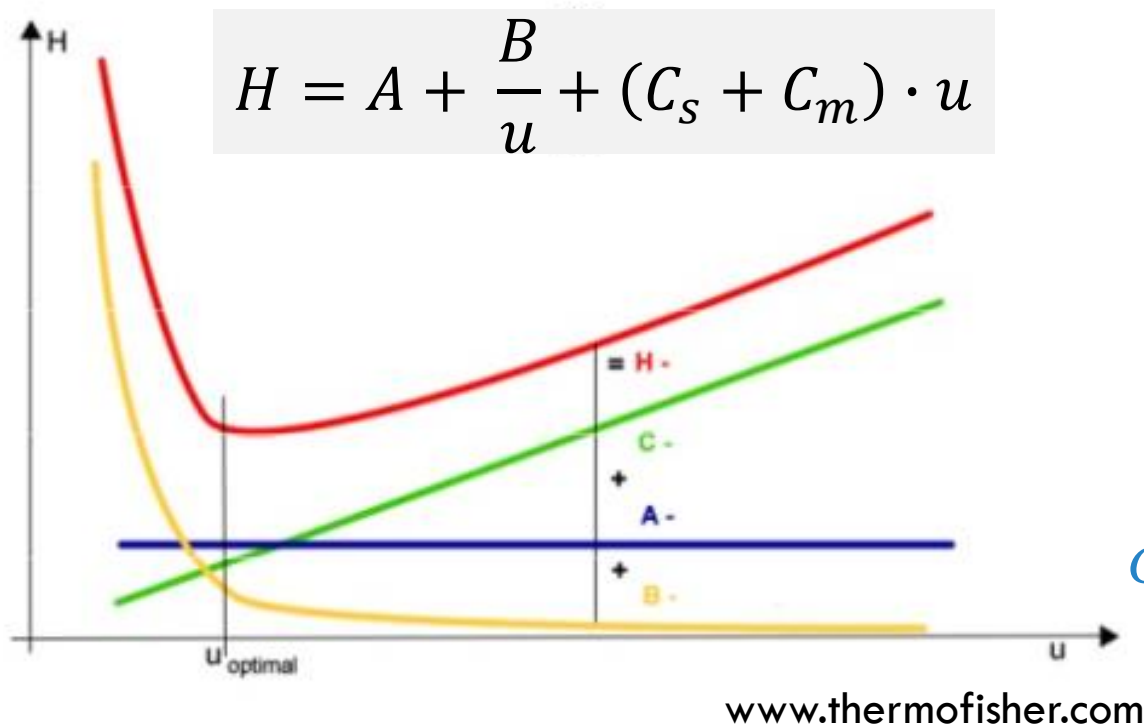
LEGENDY

Core-shell částice jsou tak dobré, protože:

- 1) Mají malý příspěvek axiální (longitudinální) difúze k účinnosti (parametr B)
- 2) Umožňují rychlý převod hmoty mezi mobilní a stacionární fází (parametr C)
- 3) Vířivá difúze je nezávislá na průtoku mobilní fáze (parametr A)
- 4) Mají velmi úzkou distribuci velikosti částic



VAN DEEMTEROVA ROVNICE



$$H = H_A + H_B + H_{C_s} + H_{C_m}$$

A – turbulentní difúze

kvalita a rovnoměrnost
náplně

B – molekulová difúze

Difúzní koeficienty látek
(malé vs. velké molekuly)

C – odpor proti převodu hmoty

Difúze ve stacionární fázi,
tvar a velikosti náplně,
„hloubka“ difúze

Redukované veličiny

$$h = \frac{H}{d_p} \quad v = \frac{u \cdot d_p}{D_m}$$

Difúzní koeficient

Wilke-Changova rovnice

$$D_m = \frac{7.4 \cdot 10^{-8} T \sqrt{\phi_{sv} \cdot M_{sv}}}{\eta_{sv} \cdot V_A^{0.6}}$$

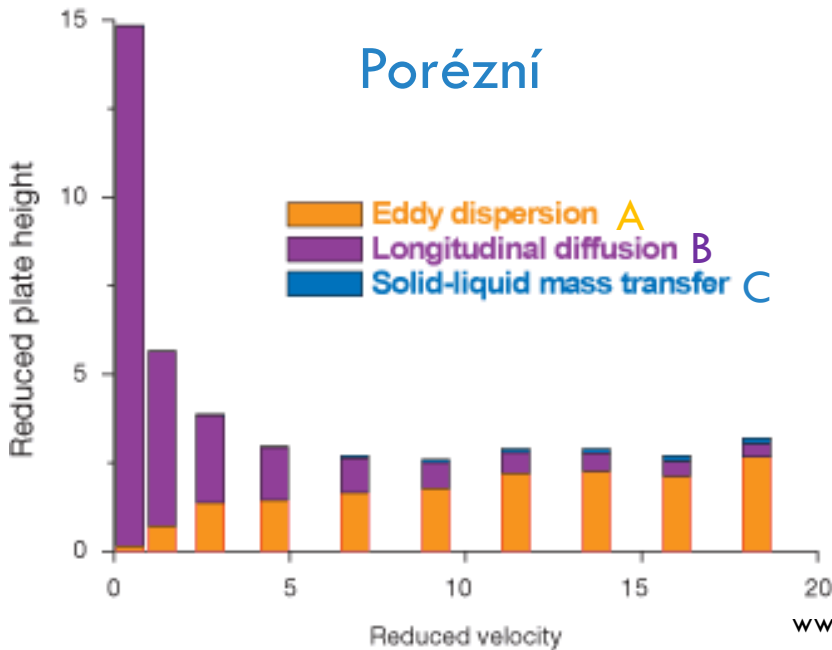
ϕ – asociační faktor: voda 2.6,
metanol 1.9, etanol 1.5, ACN 1.37,
ostatní 1

LEGENDY ÚČINNOSTI CORE-SHELL ČÁSTIC

4.6 x 100 mm Luna-C18 (2)

Porézní

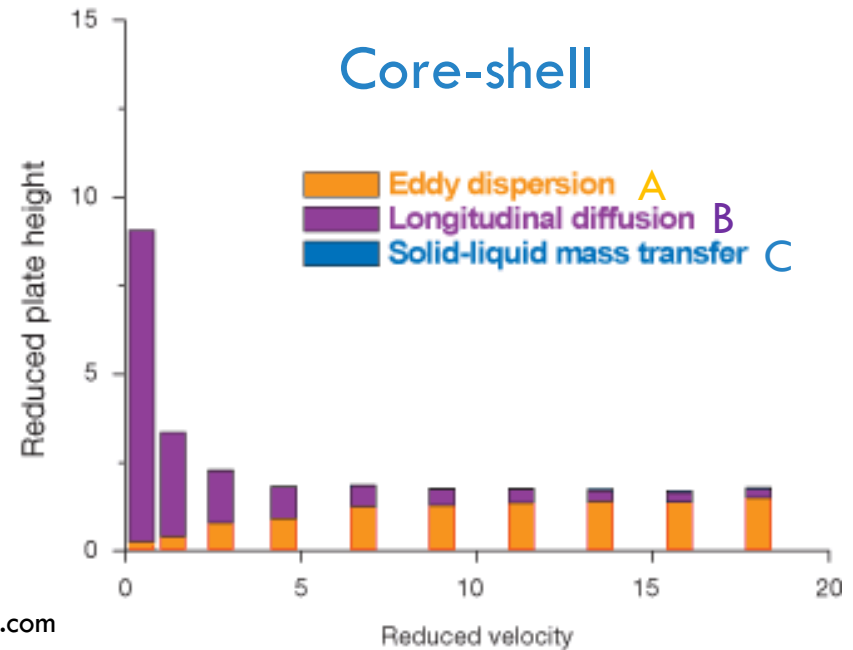
- Eddy dispersion A
- Longitudinal diffusion B
- Solid-liquid mass transfer C



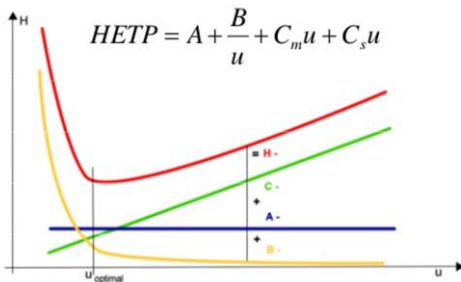
4.6 x 100 mm Kinetex C18

Core-shell

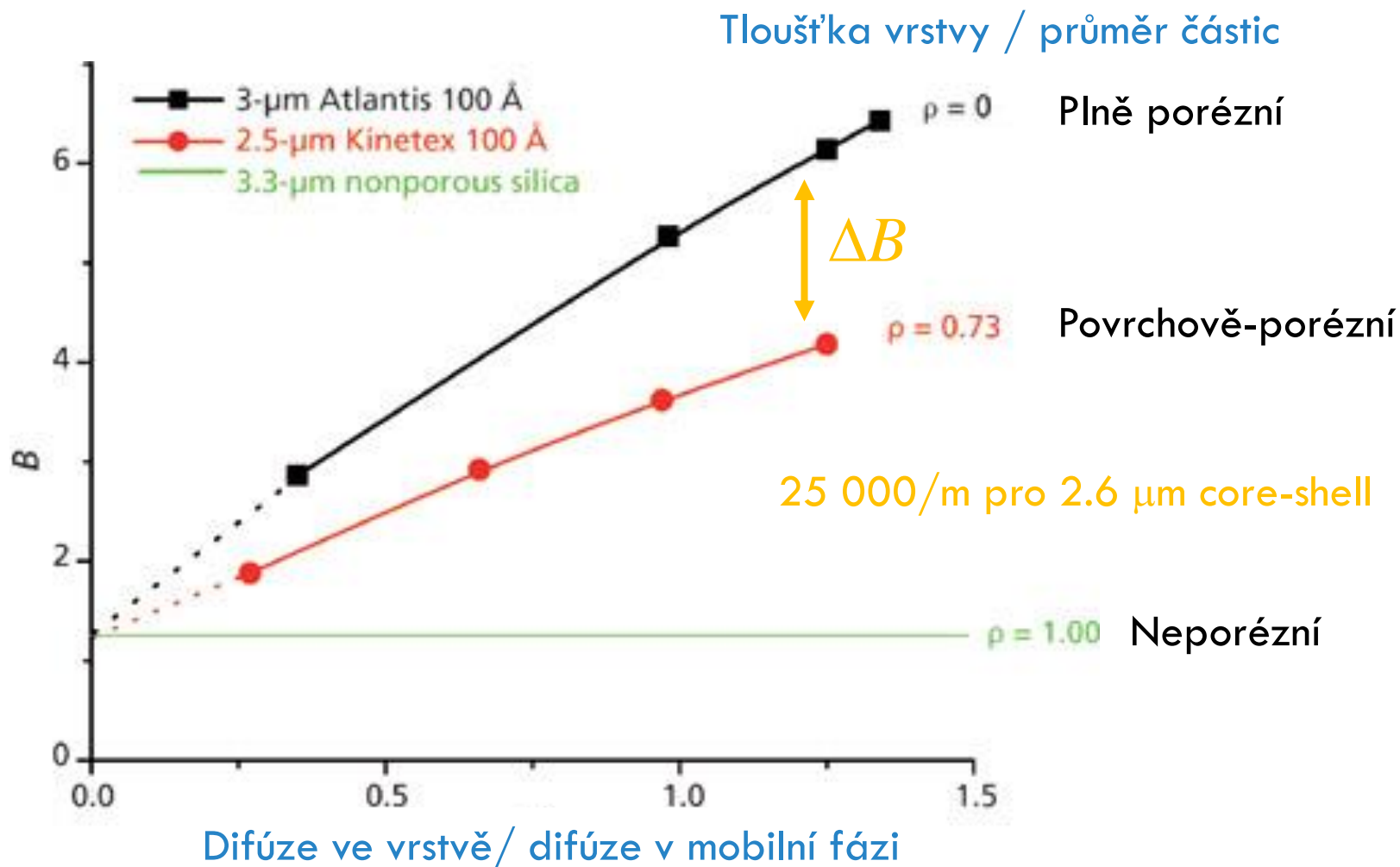
- Eddy dispersion A
- Longitudinal diffusion B
- Solid-liquid mass transfer C



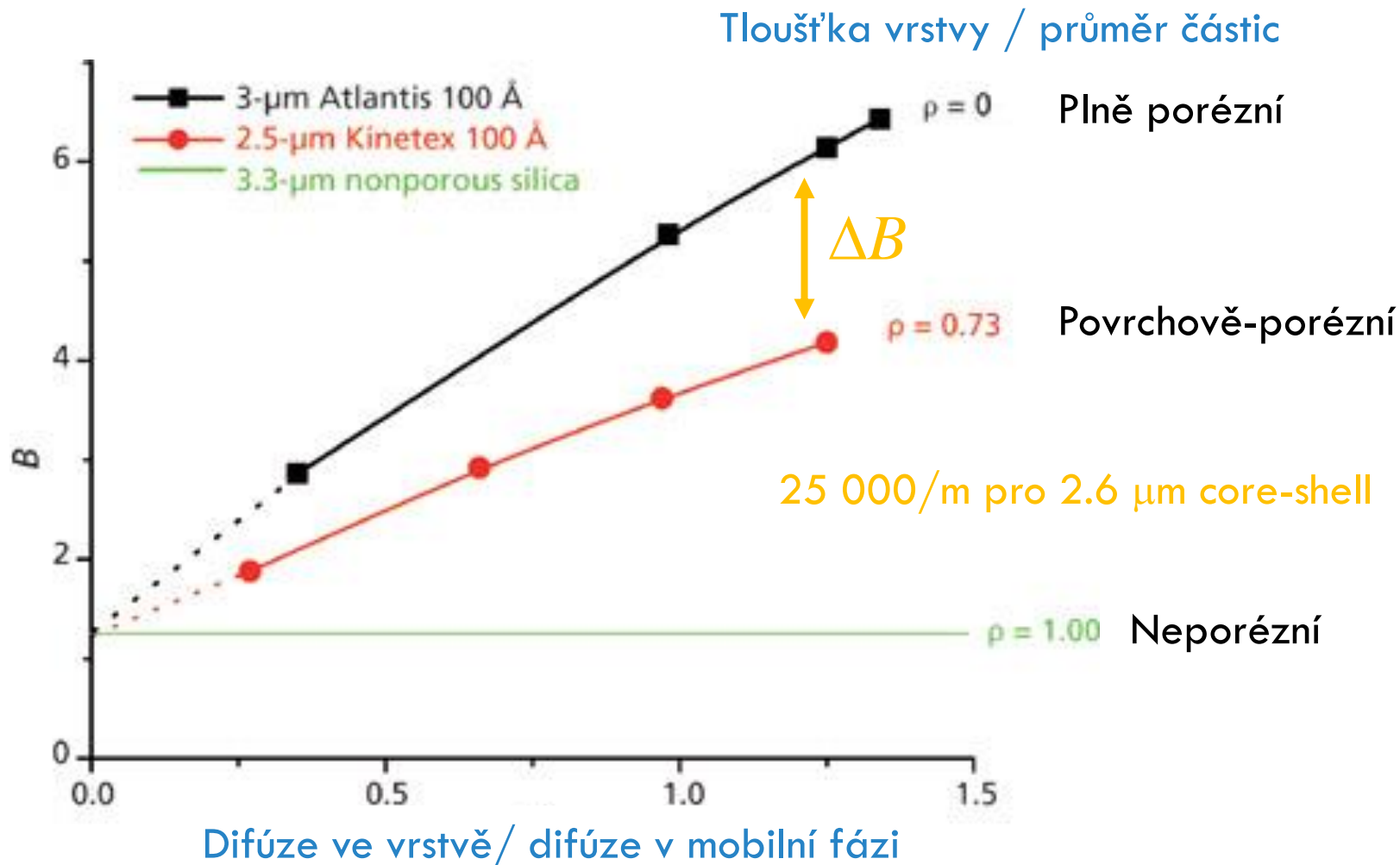
www.phenomenex.com



LEGENDA Č. 1 MALÝ PŘÍSPĚVEK B



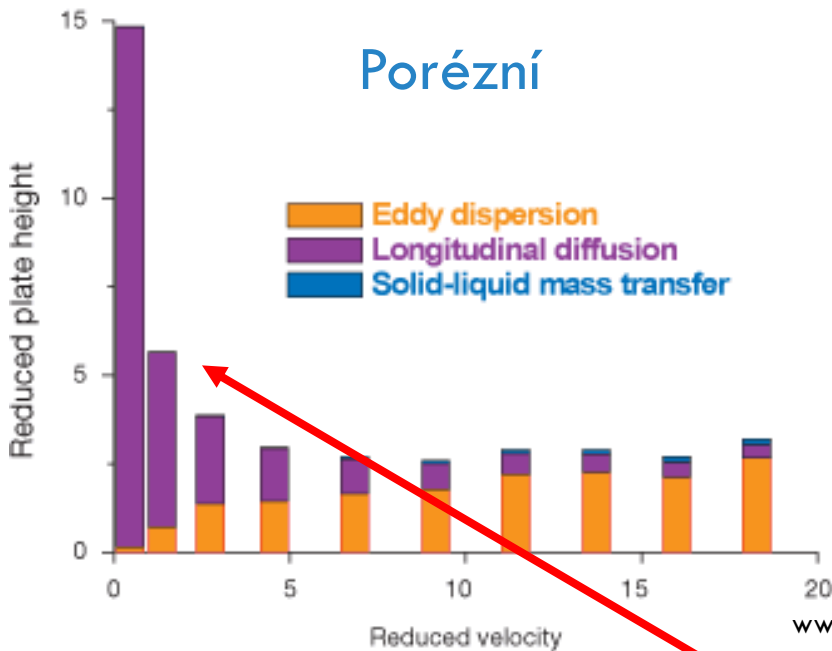
LEGENDA Č. 1 ~~MALÝ~~ PŘÍSPĚVEK B JE VELKÝ



LEGENDA Č. 1 ~~MALÝ~~ PŘÍSPĚVEK B JE VELKÝ

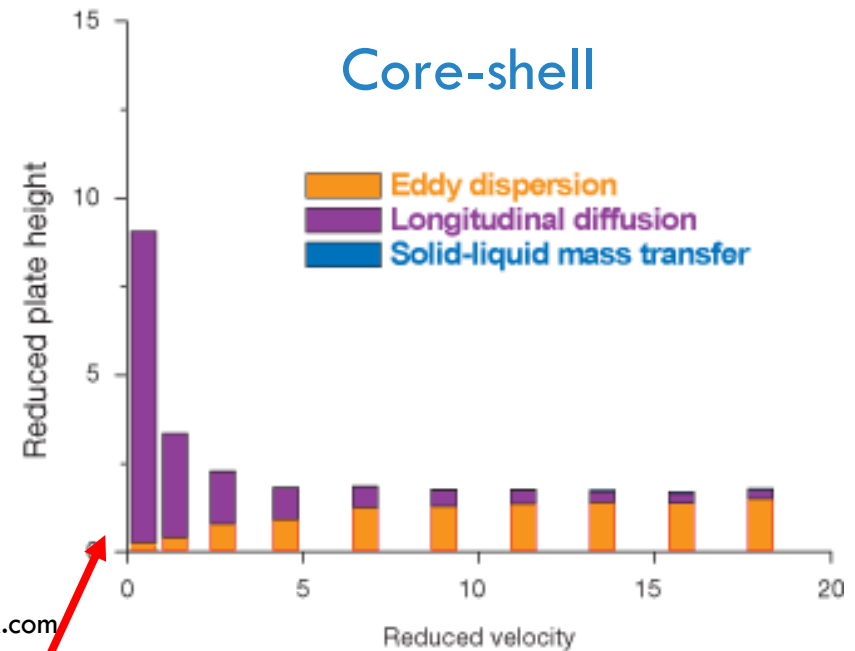
4.6 x 100 mm Luna-C18 (2)

Porézní

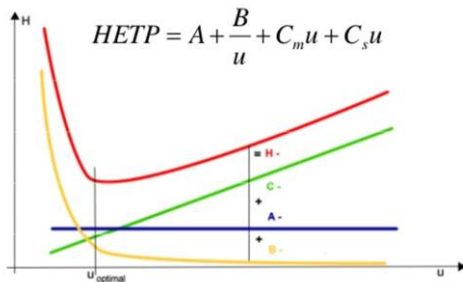


4.6 x 100 mm Kinetex C18

Core-shell



www.phenomenex.com



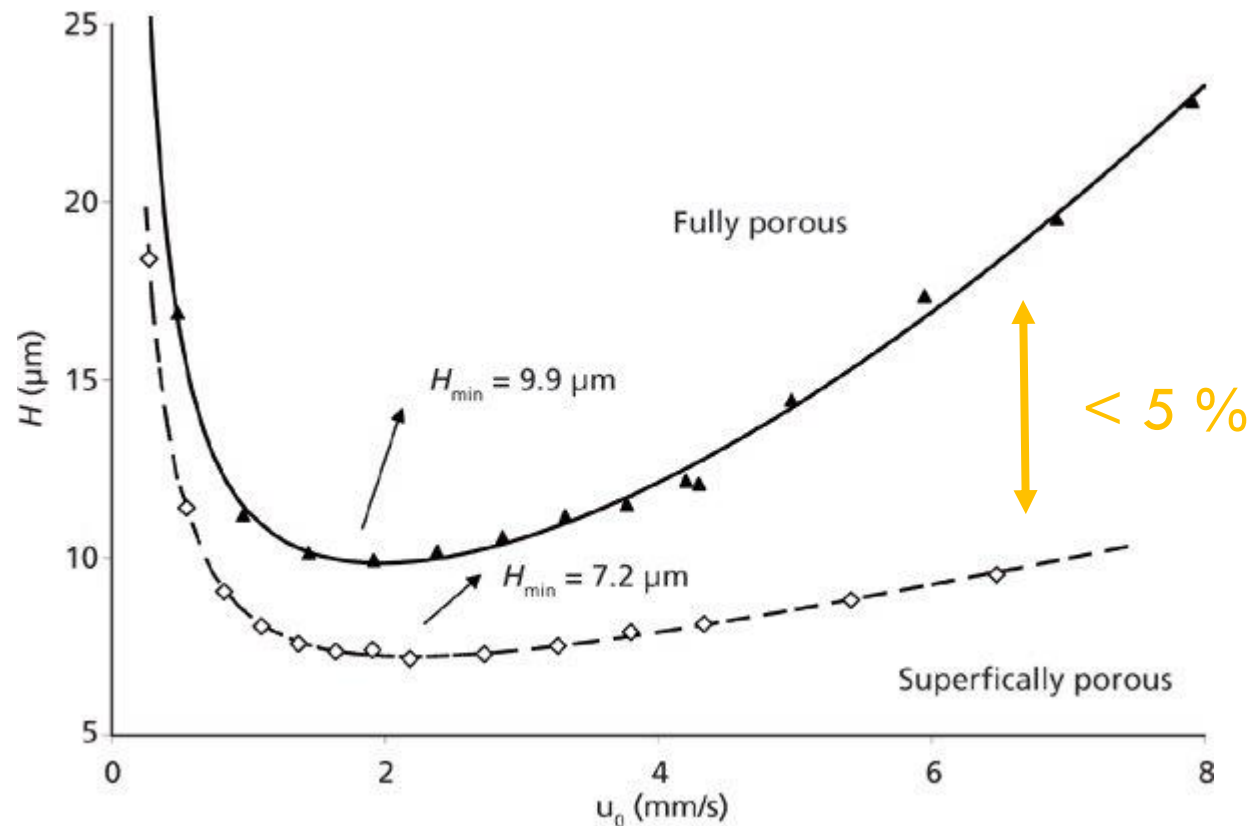
Vliv jádra

Nižší vliv parametru B

Posunuje minimum v vyšším hodnotám

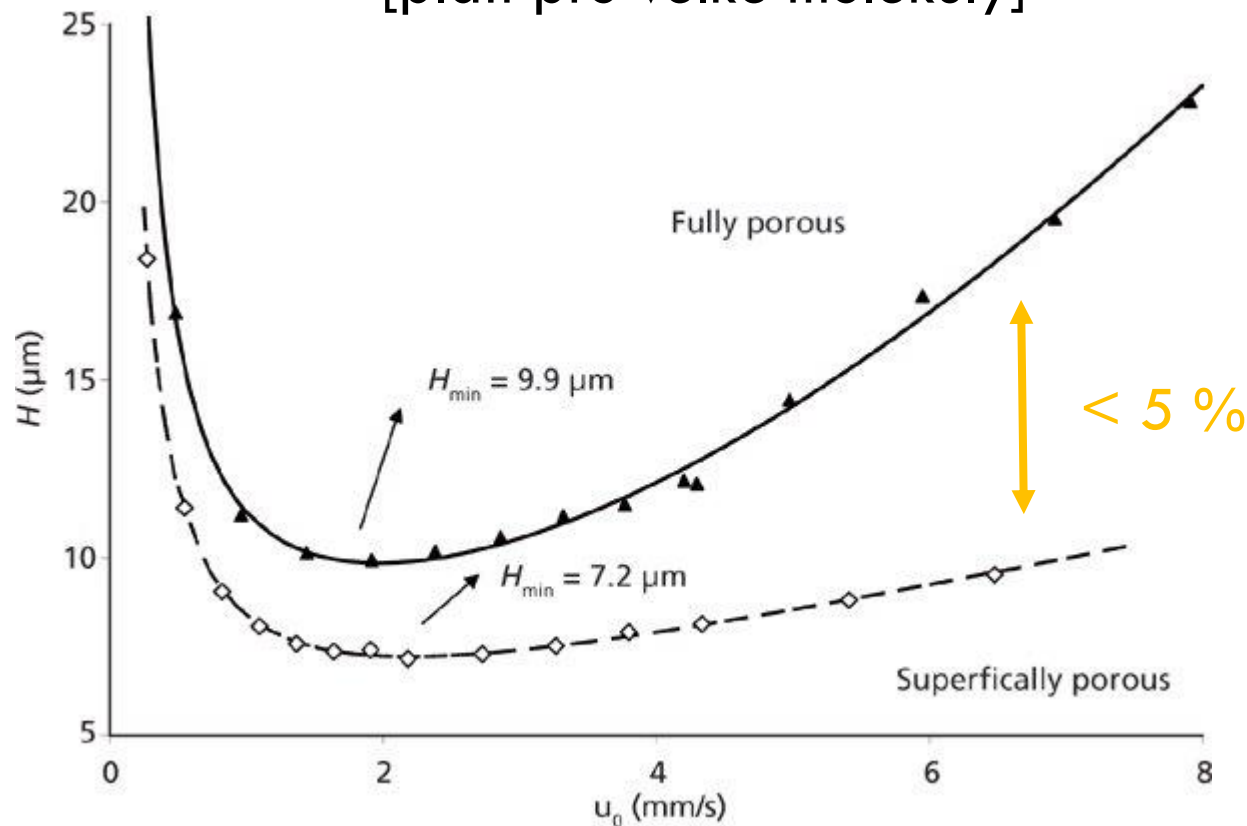
LEGENDA Č. 2 ODPOR PROTI PŘEVODU HMOTY

Minimální vliv parametru C na účinnost (malé molekuly)



LEGENDA Č. 2 ~~ODPOR PROTI PŘEVODU HMOTY~~

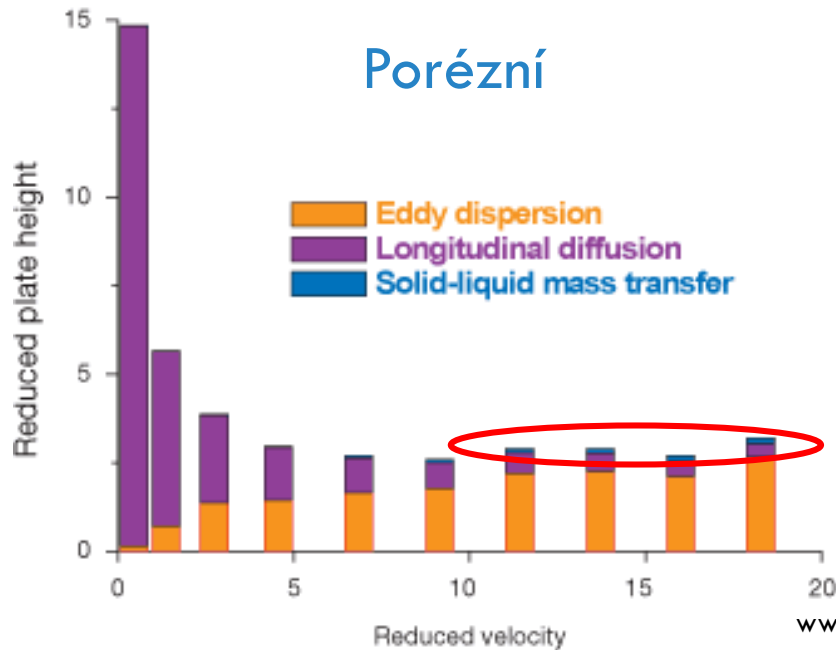
Minimální vliv parametru C na účinnost (malé molekuly)
[platí pro velké molekuly]



LEGENDA Č. 2 ~~ODPOR PROTI PŘEVODU HMOTY~~

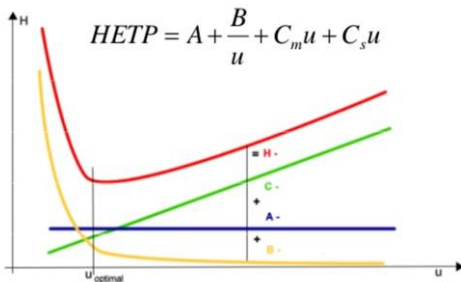
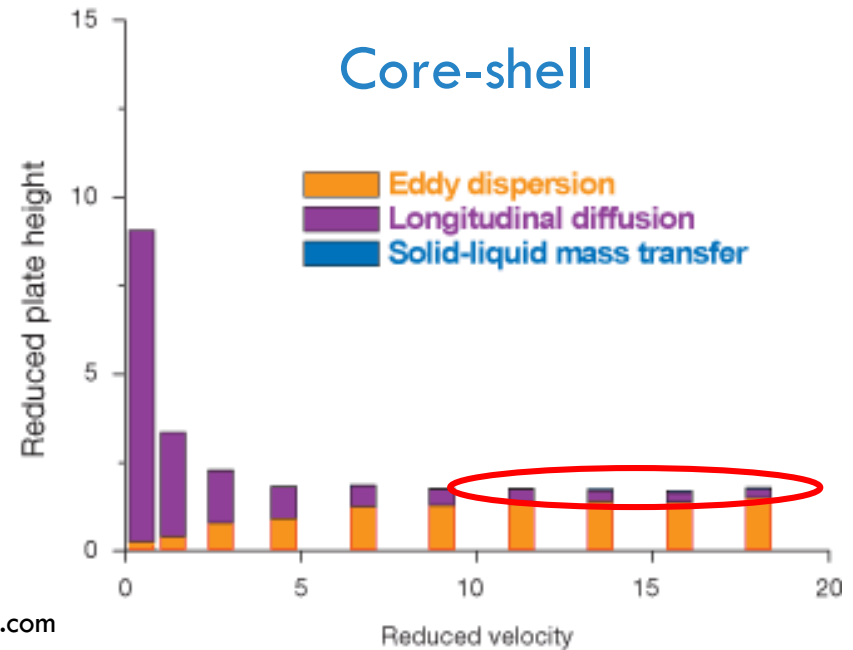
4.6 x 100 mm Luna-C18 (2)

Porézní



4.6 x 100 mm Kinetex C18

Core-shell

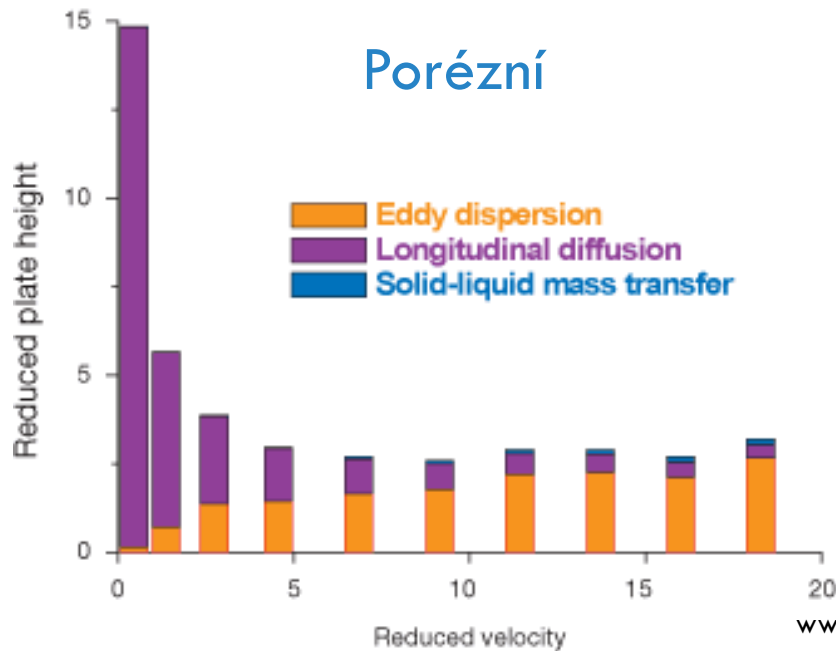


Minimální rozdíl mezi vlivem odporu proti převodu hmoty (parametr C)

LEGENDA Č. 3 KONSTANTNÍ PARAMETR A

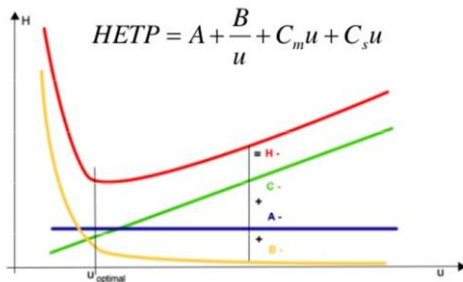
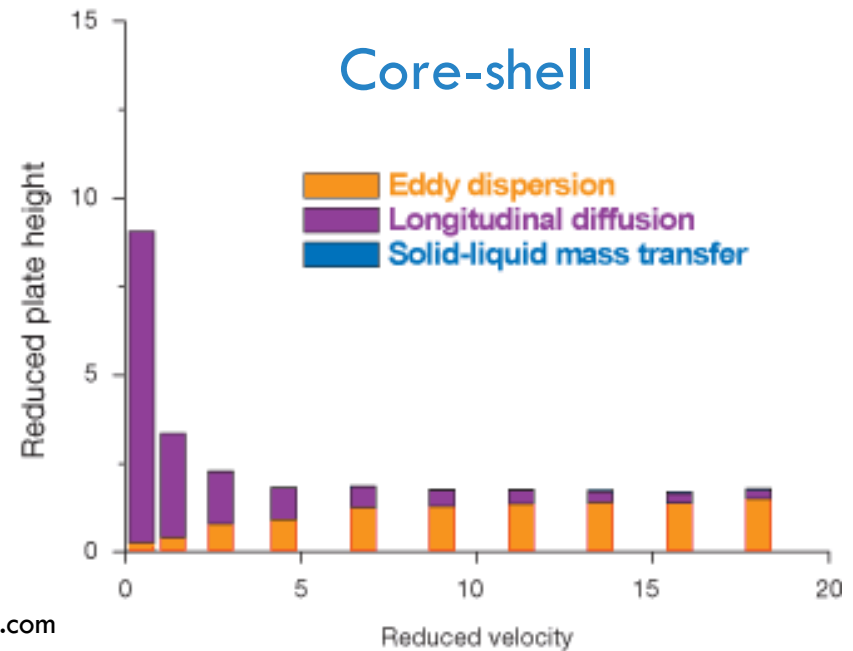
4.6 x 100 mm Luna-C18 (2)

Porézní



4.6 x 100 mm Kinetex C18

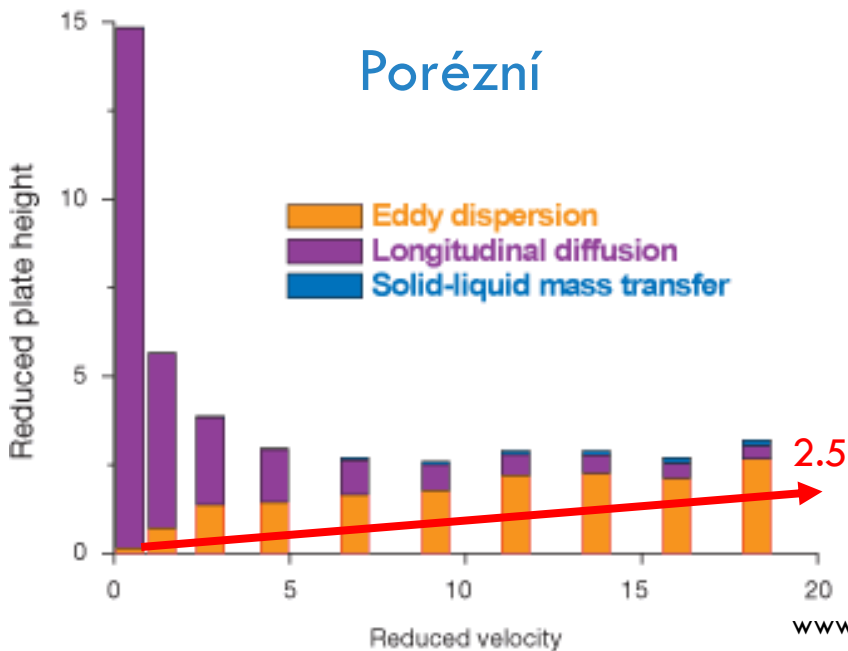
Core-shell



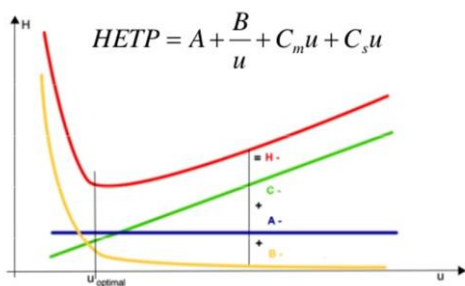
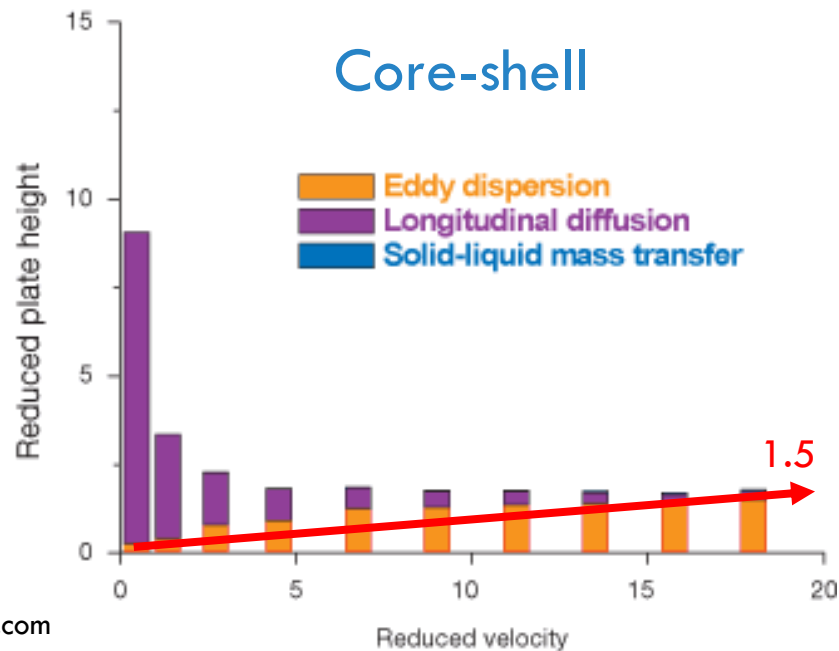
www.phenomenex.com

LEGENDA Č. 3 NEKONSTANTNÍ PARAMETR A

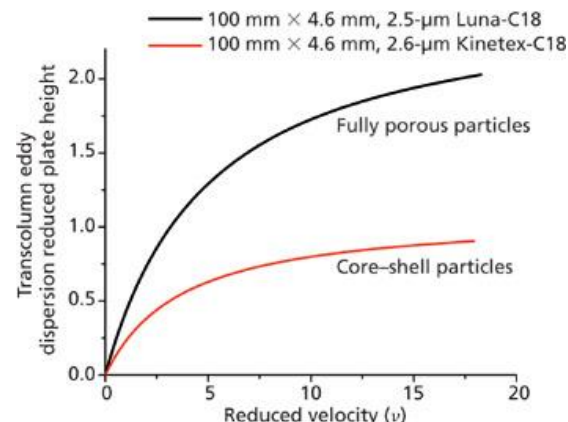
4.6 x 100 mm Luna-C18 (2)



4.6 x 100 mm Kinetex C18

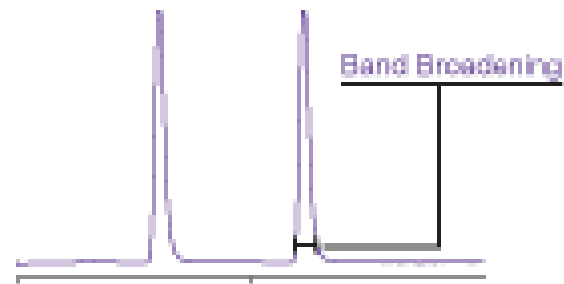
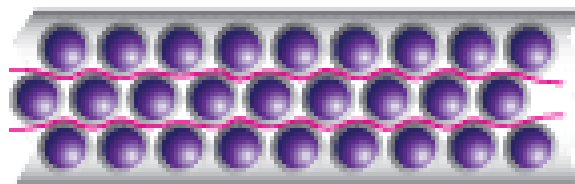


Parametr A
(turbulentní difúze)
roste s průtokem
mobilní fáze



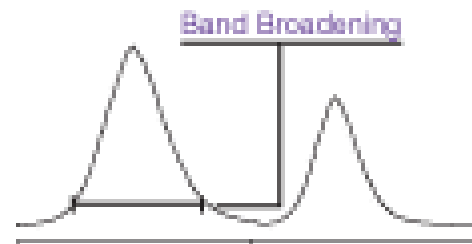
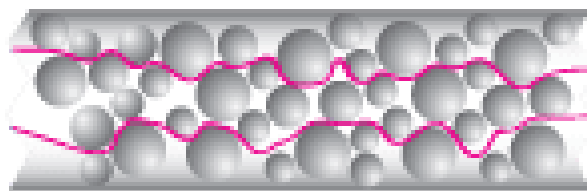
LEGENDA Č. 4 ÚZKÁ DISTRIBUCE ČÁSTIC

Kinetex Core-Shell



PŘEDSTAVA

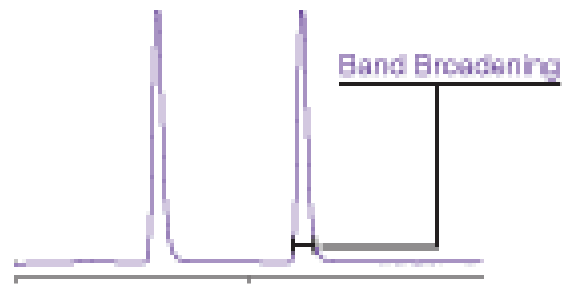
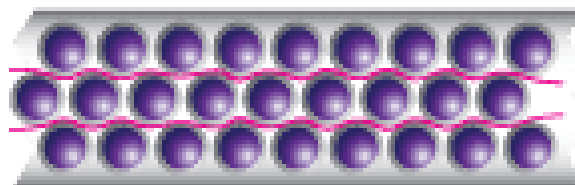
Fully Porous



www.phenomenex.com

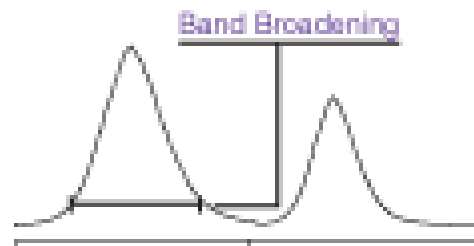
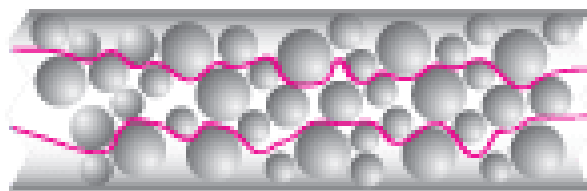
LEGENDA Č. 4 ÚZKÁ DISTRIBUCE ČÁSTIC

Kinetex Core-Shell



PŘEDSTAVA

Fully Porous



www.phenomenex.com

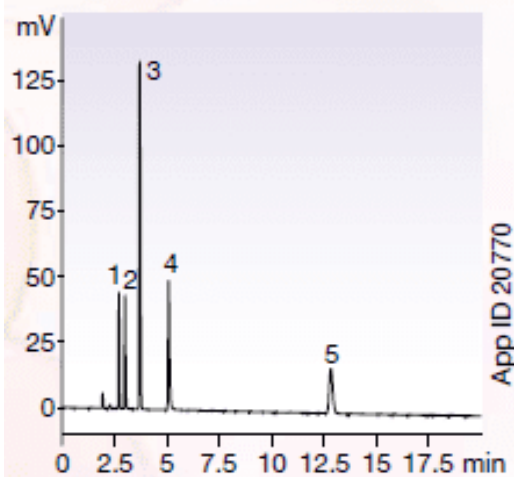
Neplatí, pokud rozptyl v distribuci částic nepřesáhne 50 %

Lepší homogenita náplně (vliv porézní vrstvy?)

Malý vliv turbulentní difúze

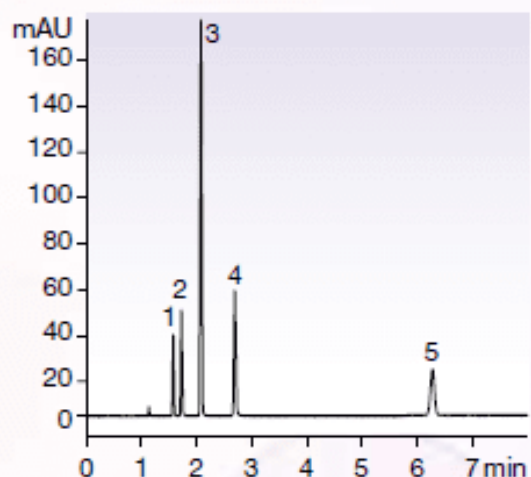
VLIV VELIKOSTI ČÁSTIC

Kinetex 5 μm C18
on Shimadzu[®] LC-20A



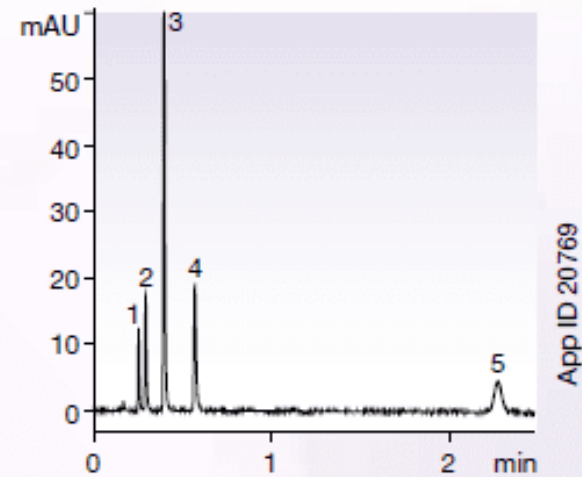
Columns: Kinetex 5 μm C18
Dimension: 250 x 4.6 mm
Part No.: 00G-4601-E0

Kinetex 2.6 μm C18
on Agilent[®] 1100



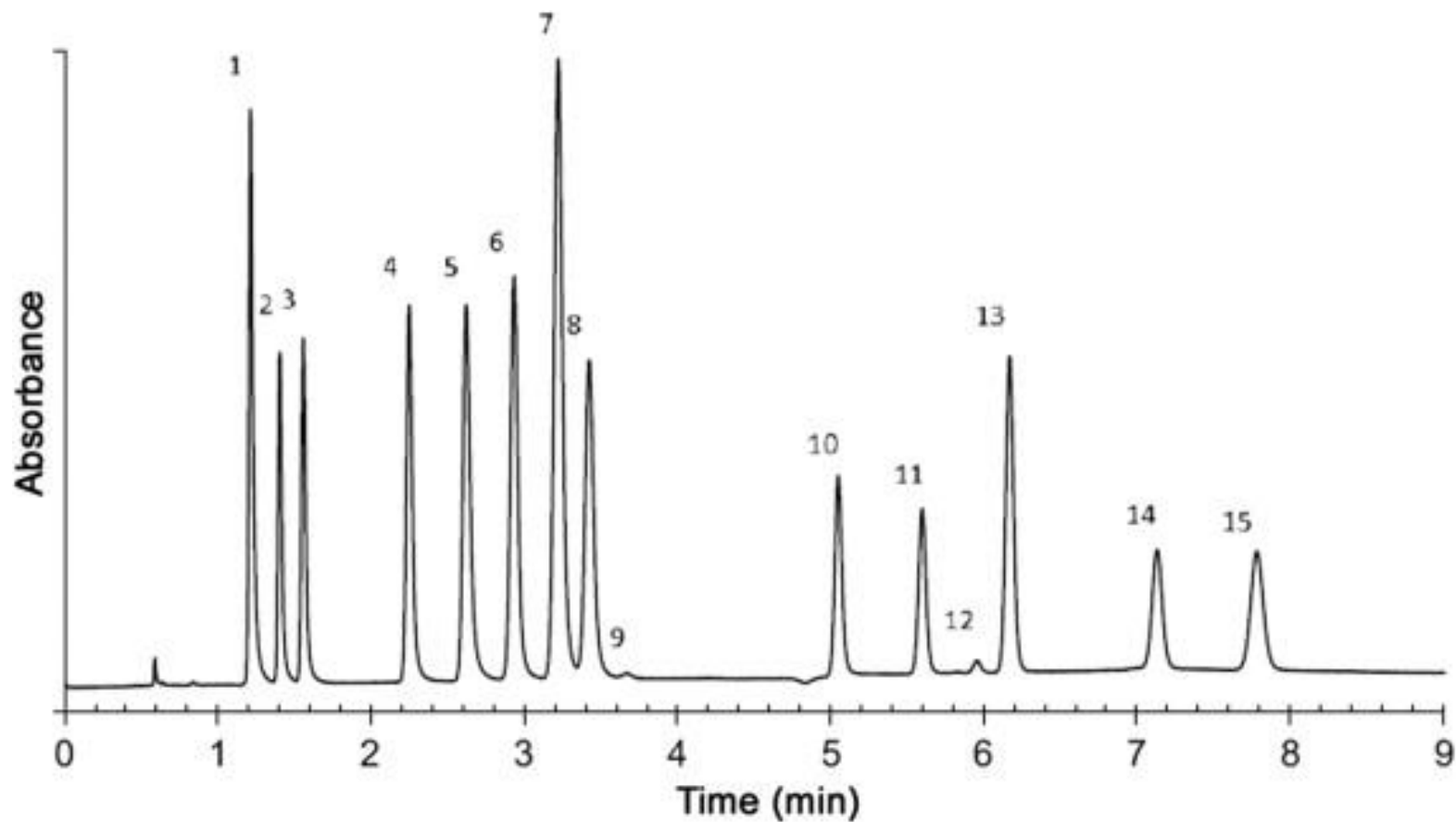
Columns: Kinetex 2.6 μm C18
Dimension: 150 x 4.6 mm
Part No.: 00F-4462-E0

Kinetex 1.7 μm C18
on Agilent 1290

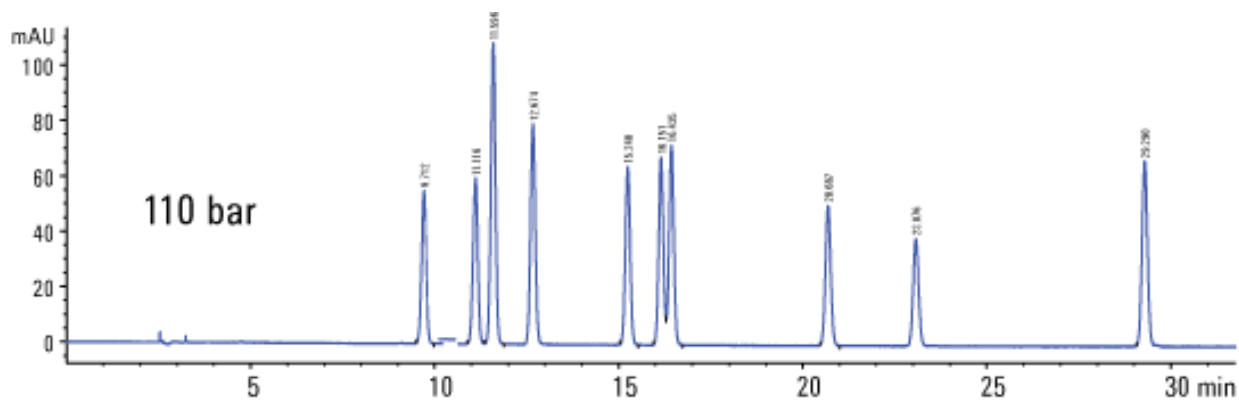


Columns: Kinetex 1.7 μm C18
Dimension: 50 x 3.0 mm
Part No.: 00B-4475-Y0
Mobile Phase: 680:320:2

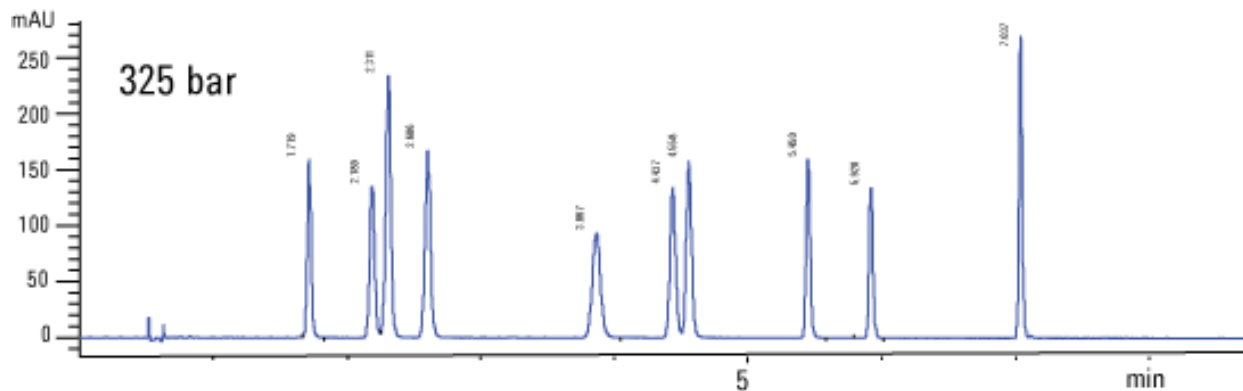
NUKLEOSIDY, HALO PENTA-HILIC, 100 X 4.6MM




SULFONAMIDY



Plně porézní



Core-shell



„Challenges are what make life interesting; overcoming them is what makes life meaningful.“

Joshua J. Marine