

CHARAKTERIZACE KOLON

Pokročilá kapalinová chromatografie



CHROMATOGRAFICKÁ KOLONA



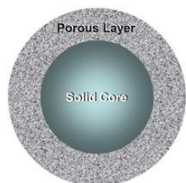
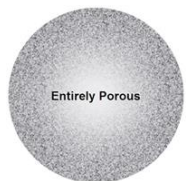
www.prozyme.com

Délka, průměr, velikost částic

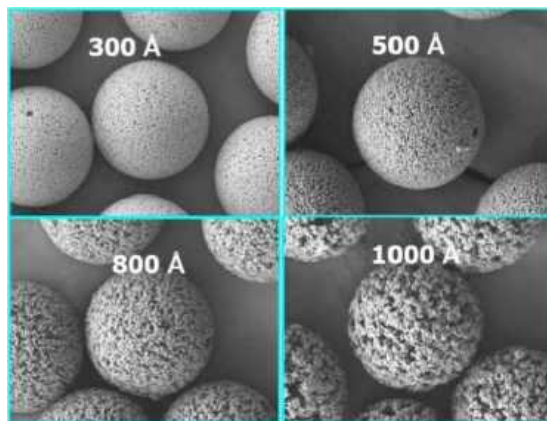
150 x 4.6 mm, 5 μm

Konvenční LC	Mikrokolonová LC	Kapilární LC	Nano LC
4.6 mm	1 mm – 500 μm	500 μm – 100 μm	100 μm – 50 μm

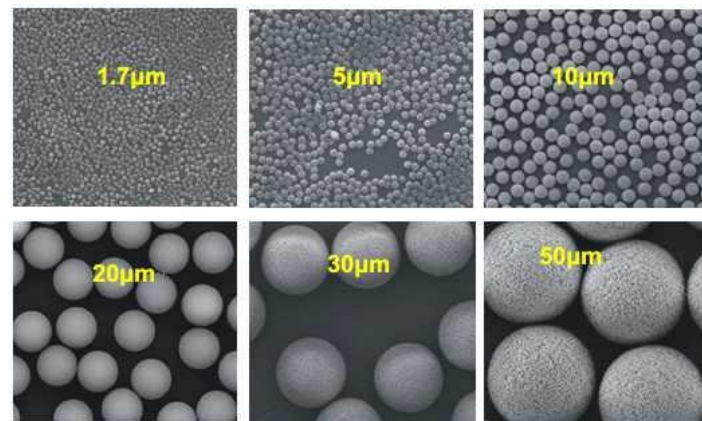
Tvar částic



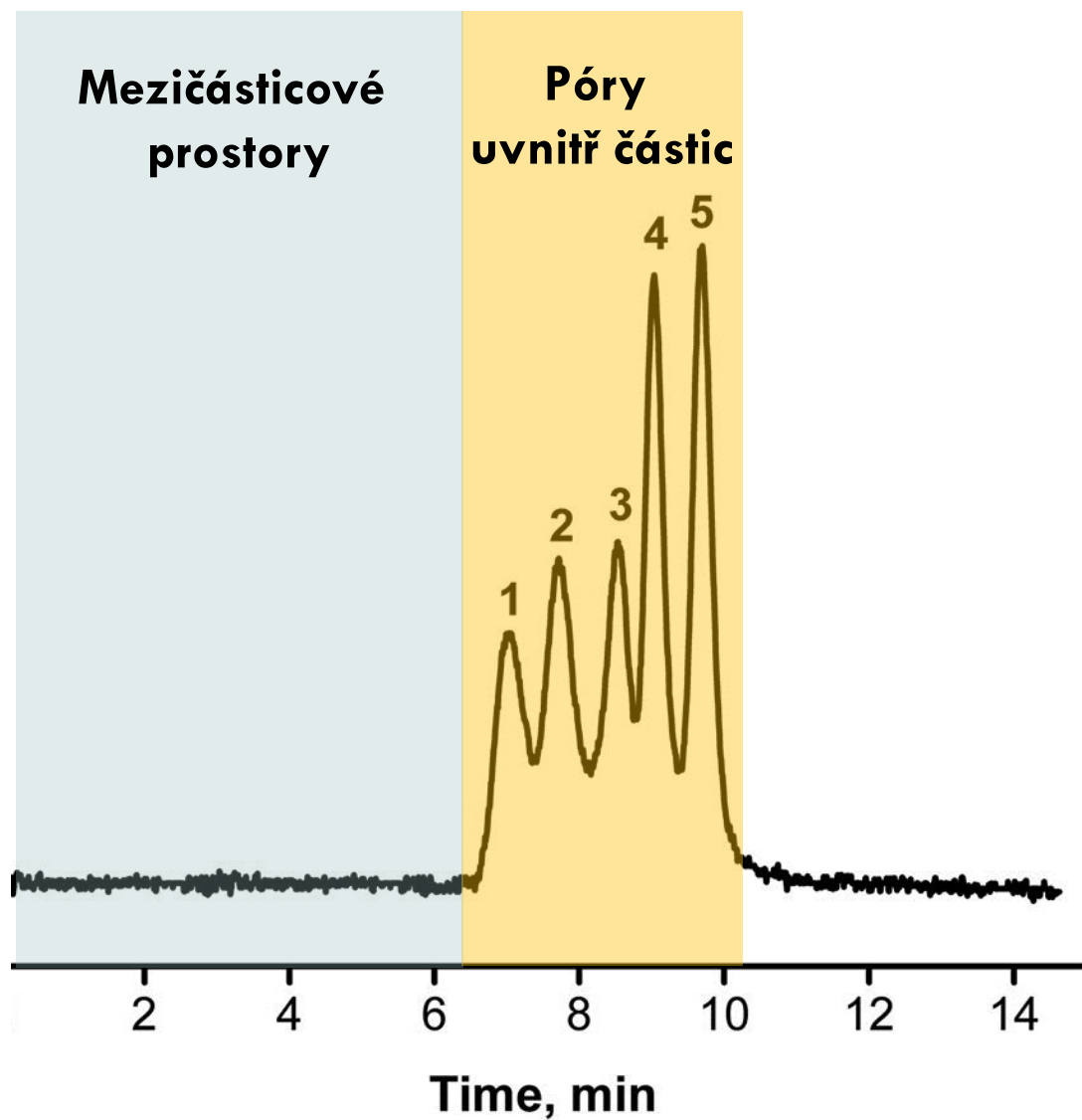
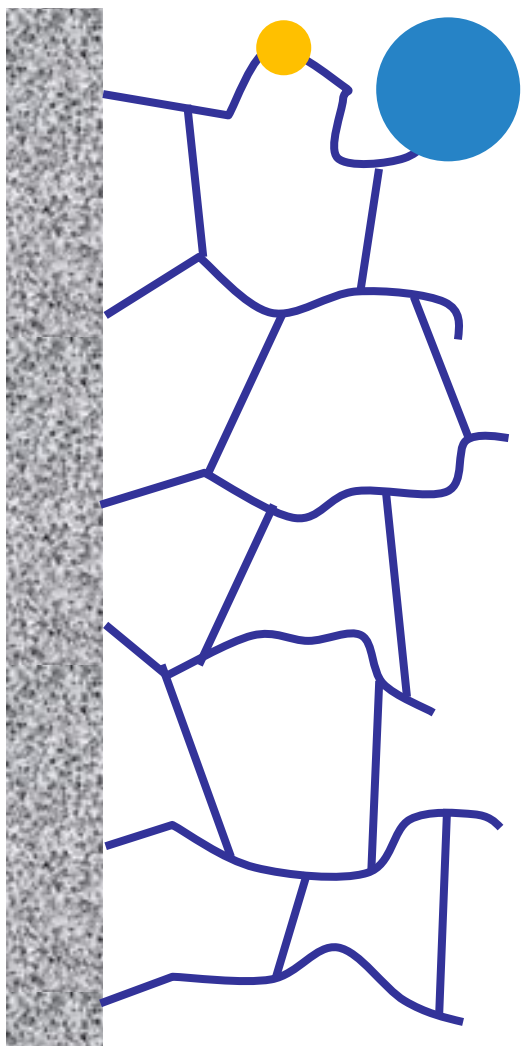
Porozita



Velikost částic



POROZITA



POROZITA KOLONY

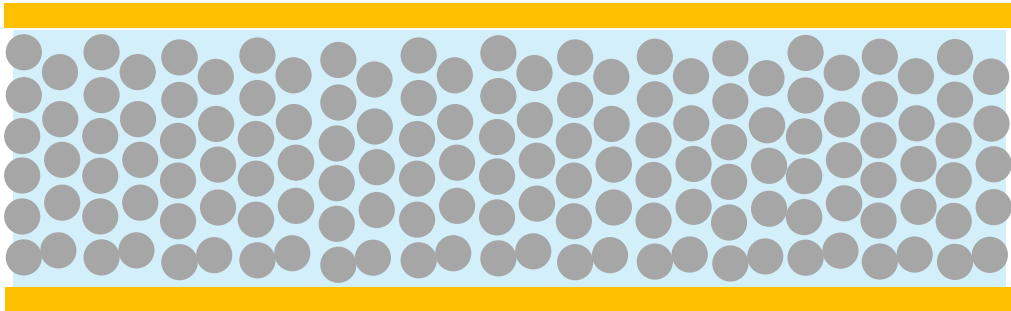


Celková porozita, ε_T

Mrtvý objem, V_M

Geometrický objem, V_C

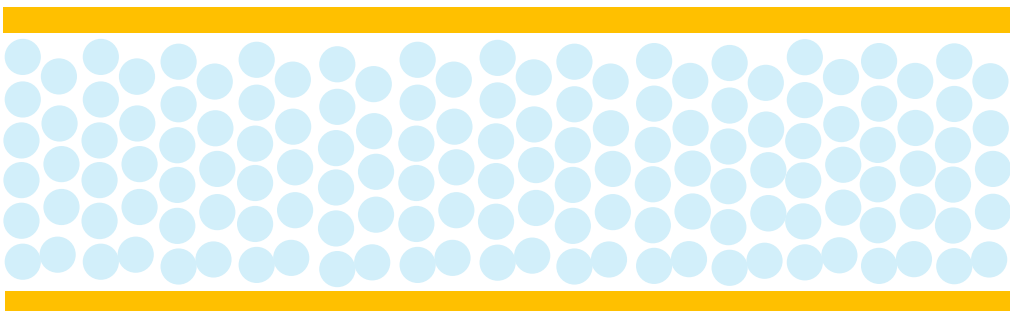
$$\varepsilon_T = \frac{V_M}{V_C}$$



Mezičásticová porozita, ε_0

Mezičásticový objem, V_0

$$\varepsilon_0 = \frac{V_0}{V_C}$$

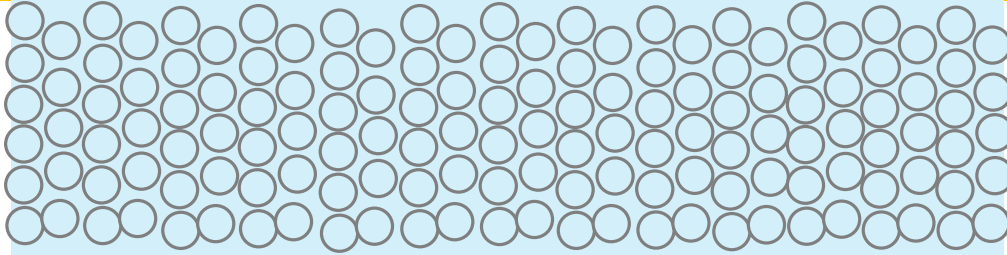


Částicová porozita, ε_i

Objem pórů v částicích, V_i

$$\varepsilon_i = \frac{V_M - V_0}{V_C} = \frac{V_i}{V_C}$$

POROZITA KOLONY

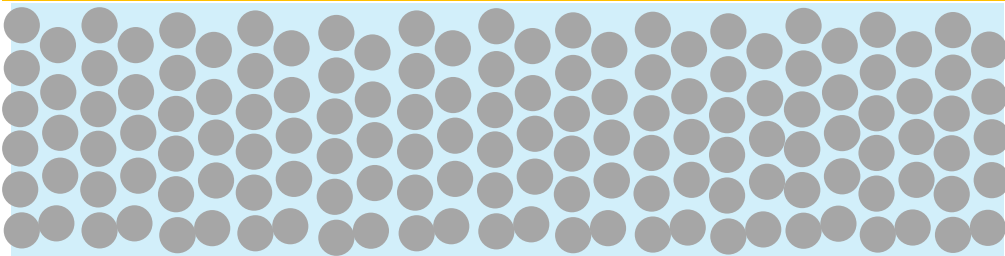


Celková porozita, ε_T

Mrtvý objem, V_M

Geometrický objem, V_C

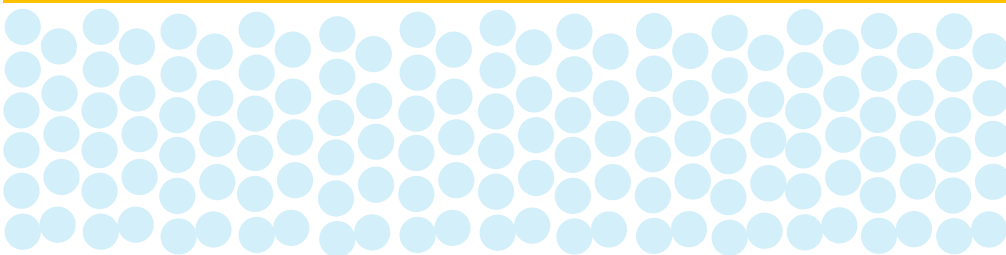
$$\varepsilon_T = \frac{V_M}{V_C}$$



Mezičásticová porozita, ε_0

Mezičásticový objem, V_0

$$\varepsilon_0 = \frac{V_0}{V_C}$$



Částicová porozita, ε_i

Objem pórů v částicích, V_i

$$\varepsilon_i = \frac{V_M - V_0}{V_C} = \frac{V_i}{V_C}$$

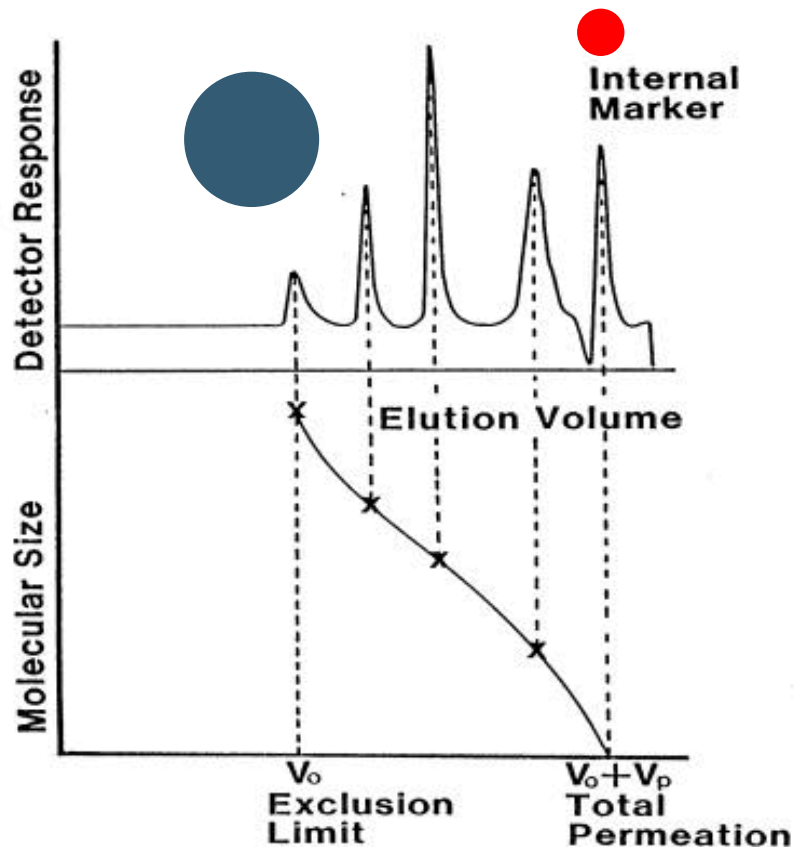
INVERZNÍ CHROMATOGRAFIE STÉRICKÉ VÝLUKY

Separace na základě velikosti molekuly

Hydrodynamický průměr

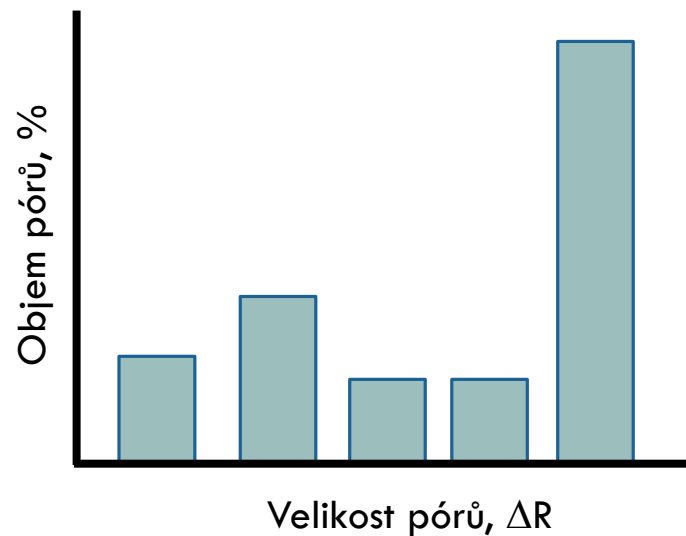
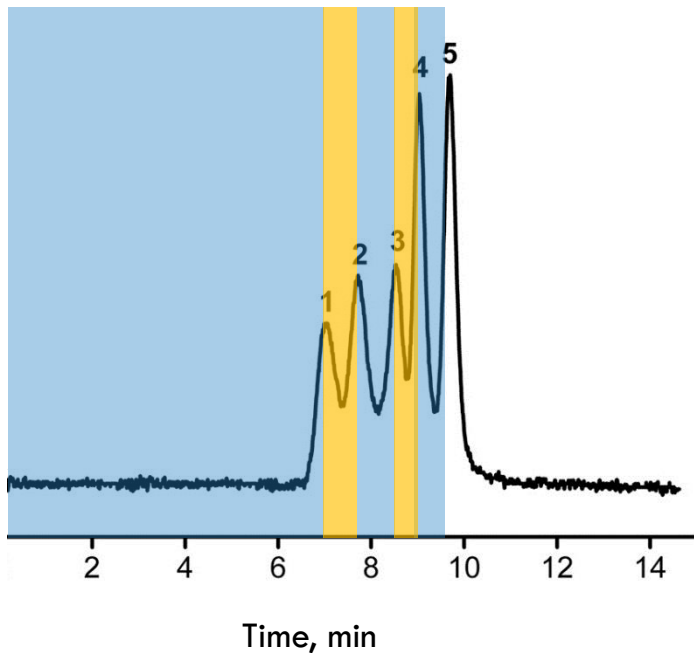
$$R, \text{ nm} = 0.0246 \cdot M^{0.588}$$

pro polystyreny v THF



INVERZNÍ CHROMATOGRRAFIE STÉRICKÉ VÝLUKY

Distribuce velikostí pórů



Přístupný objem pórů

$$\Delta V, \% = (V_2 - V_1) / V_M \cdot 100$$

V_M – eluční objem malé molekuly

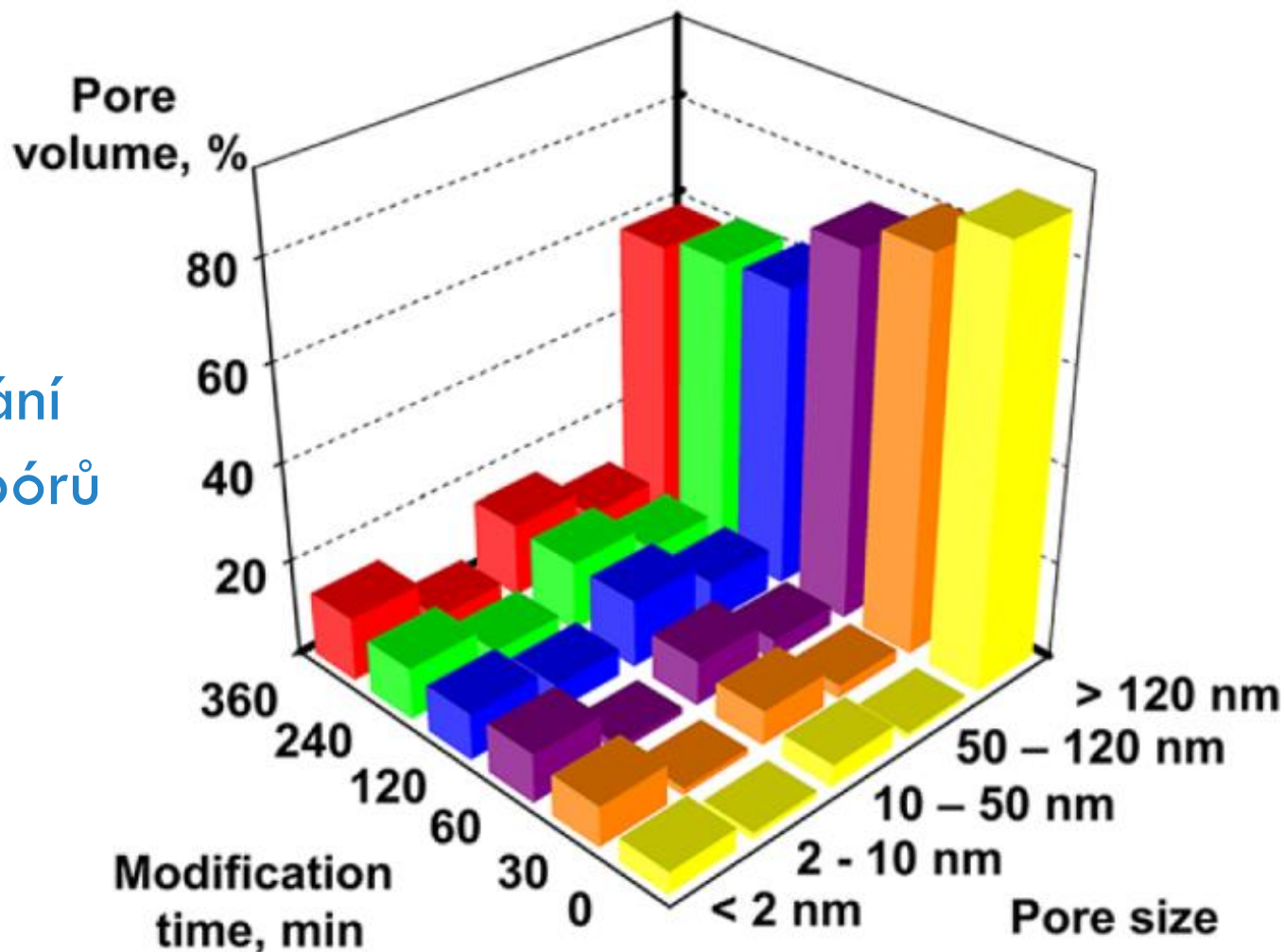
Hydrodynamický průměr

$$R, \text{ nm} = 0.0246 \cdot M^{0.588}$$

pro polystyreny v THF

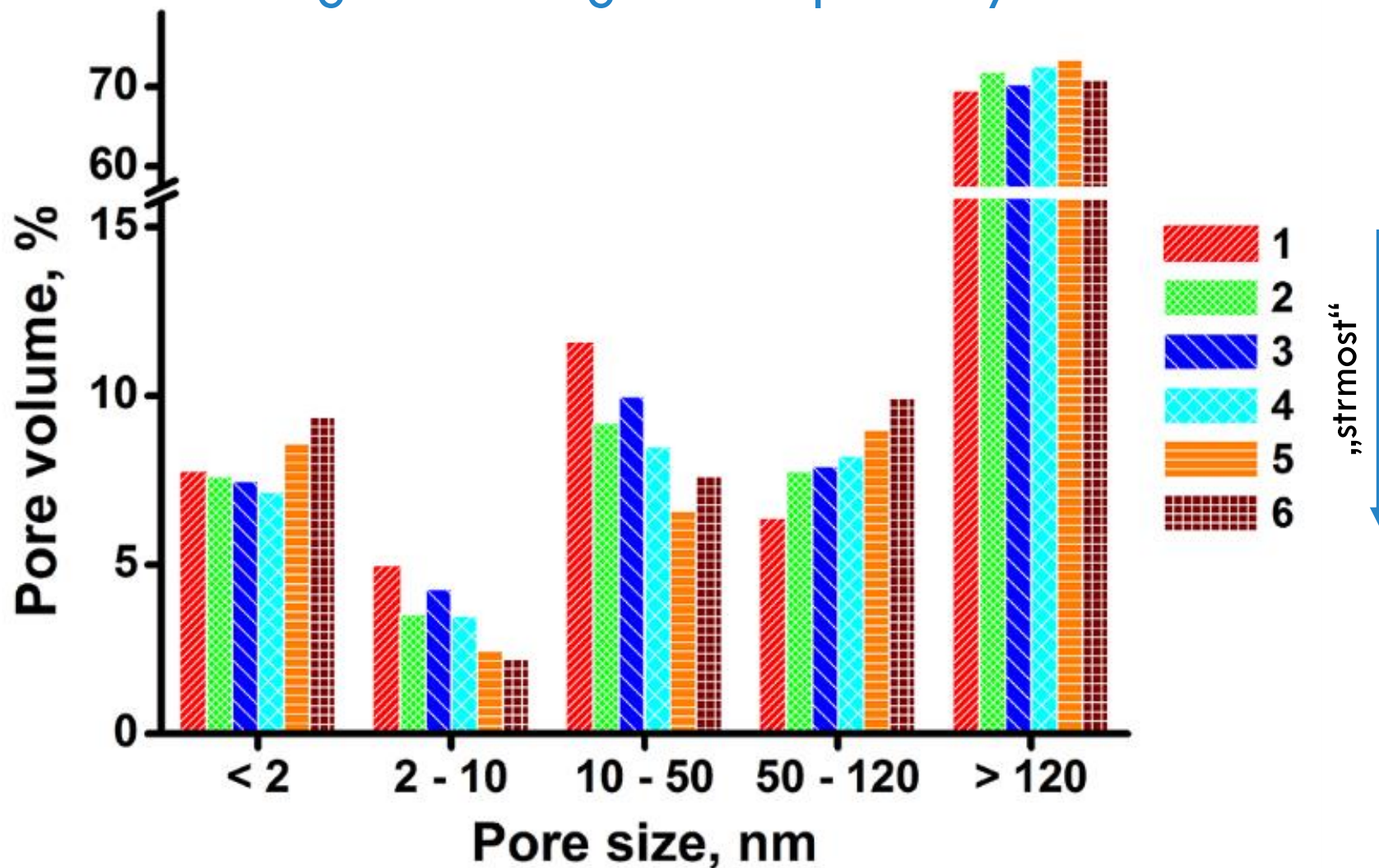
VLIV MODIFIKACE NA DISTRIBUCI PÓRŮ

Formování
malých pórů

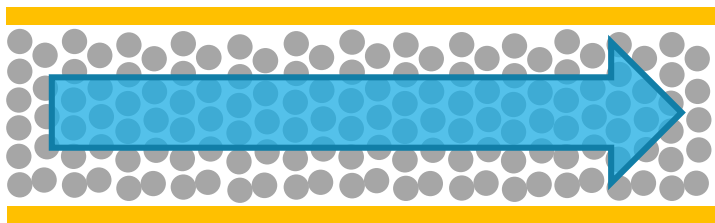


VLIV MODIFIKACE NA DISTRIBUCI PÓRŮ

Longitudinální gradient porozity



PERMEABILITA KOLONY



„Průtočnost“ kolony

Nezávisí na teplotě, rozměrech kolony, tlakovém spádu a na složení mobilní fáze

$$K_F = \frac{F_m \cdot \eta \cdot L}{\Delta p \cdot \pi \cdot r^2}$$

F_m – průtok mobilní fáze kolonou, m^3/s

η – viskozita mobilní fáze Pa·s

L – délka kolony, m

Δp – tlakový spád, Pa

π – 3.14159 26535

r – poloměr kolony, m

ε_0 – mezičásticová porozita

d_p – průměr částic náplně, m

Kozeny-Carman rovnice

Vztah mezi permeabilitou a velikostí částic

$$d_p = (1 - \varepsilon_0) \sqrt{\frac{180 \cdot K_F}{\varepsilon_0^3}}$$

$$d_p = \sqrt{1000 \cdot K_F} \quad (\varepsilon_0 \approx 0.4)$$

VISKOZITA MOBILNÍ FÁZE



η [éta]

SI jednotky

Pa·s

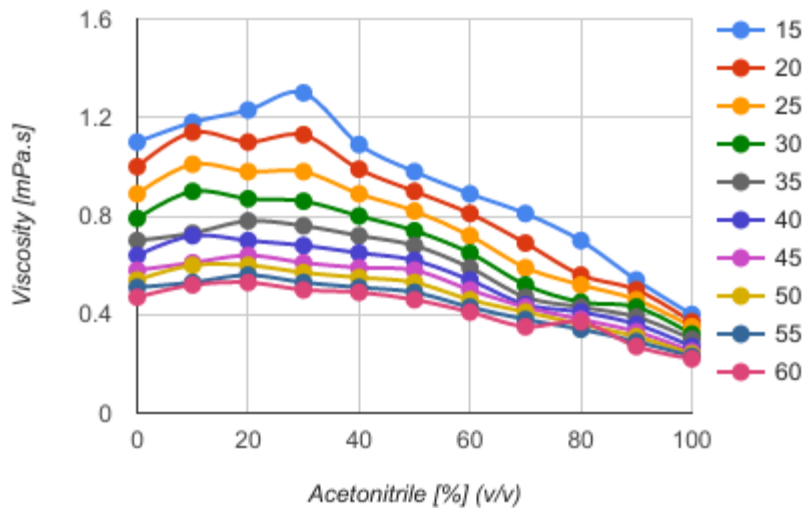
Alternativně

Poise (P)

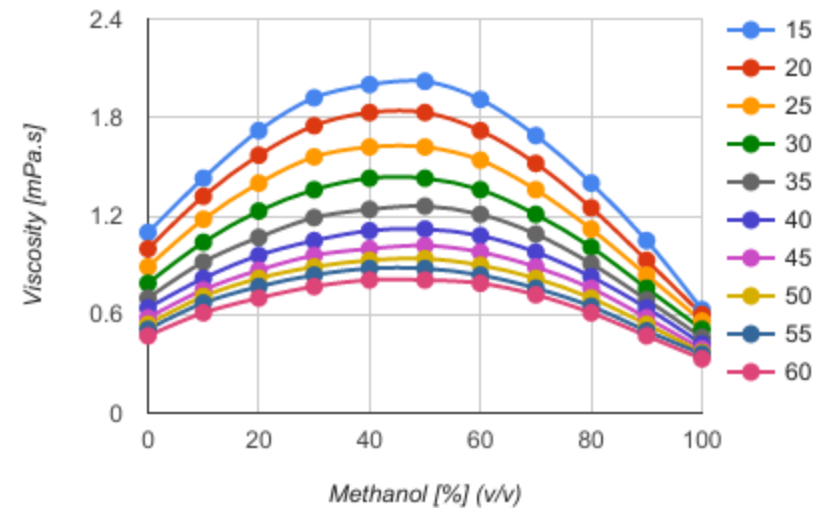
www.jakcvicit.com www.kilogramy.cz

1 cP = 0.001 Pa·s

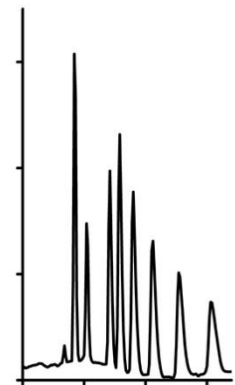
Acetonitril



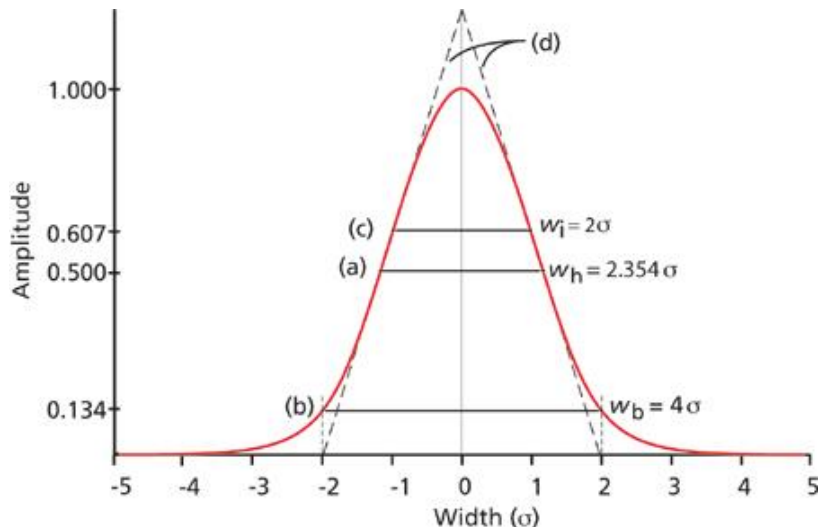
Metanol



CHROMATOGRAFICKÁ SEPARACE



CHROMATOGRAFICKÝ ZÁZNAM



www.chromatographyonline.com

Gaussova funkce

$$f_n(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

σ – směrodatná odchylka

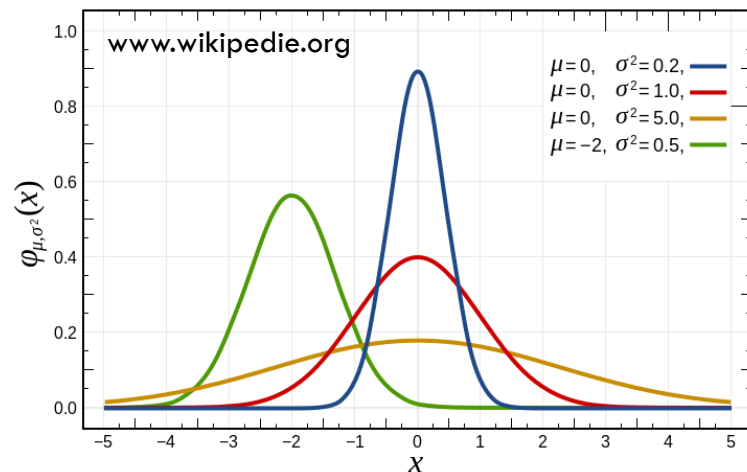
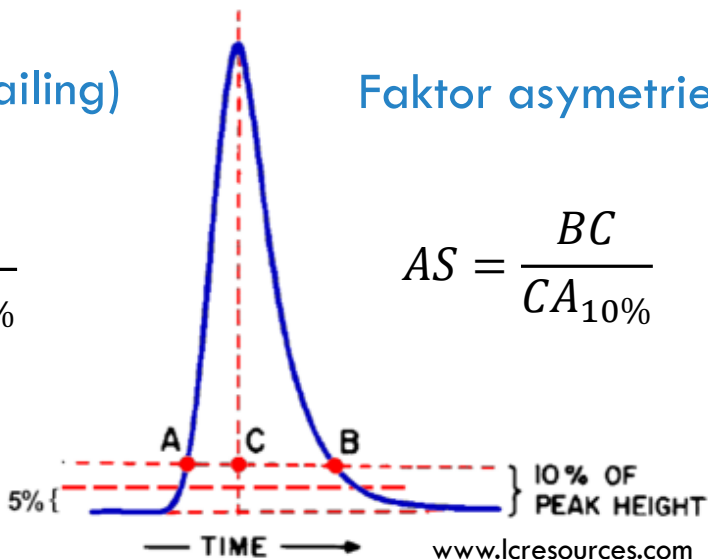
μ – střední hodnota náhodné veličiny (t_R)

Chvostování (tailing)

$$TF = \frac{AB}{2AC_{5\%}}$$

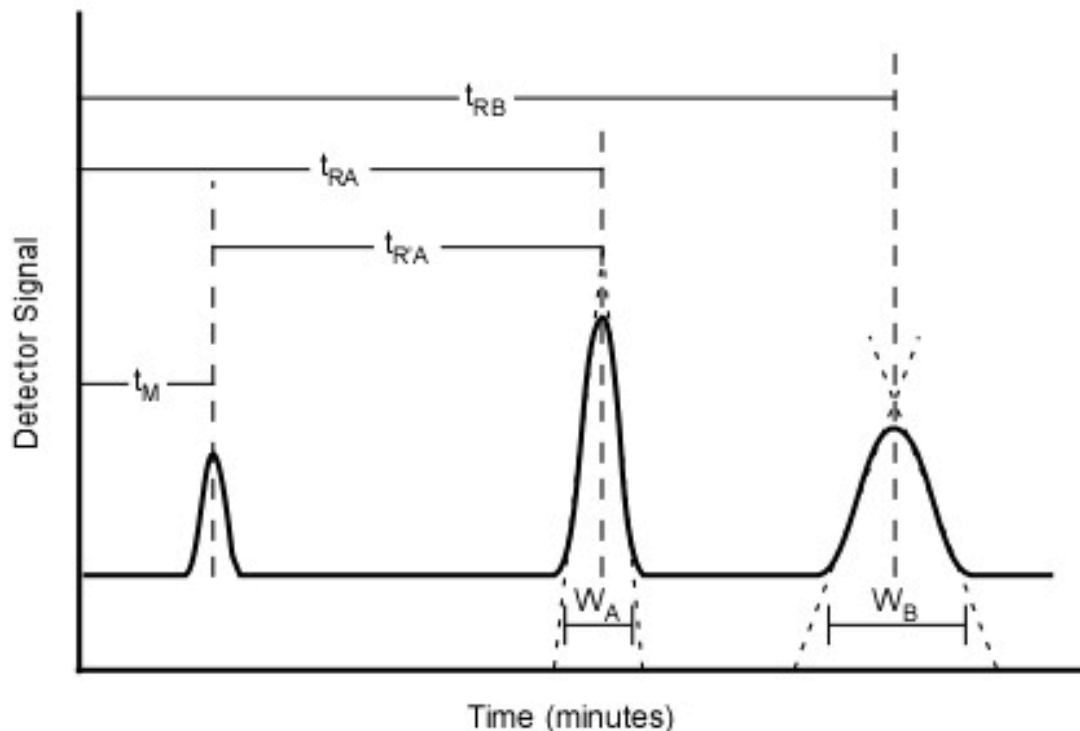
Faktor asymetrie

$$AS = \frac{BC}{CA_{10\%}}$$



RETENČNÍ FAKTOR

Eluční čas a objem



© Dunnivant & Ginsbach

t_M – mrtvý čas

$t_{R,A}$ – retenční čas látky A

$t_{R,B}$ – retenční čas látky B

F_m – průtok mobilní fáze

$$V_R = t_R \cdot F_m$$

Retenční faktor

$$k = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

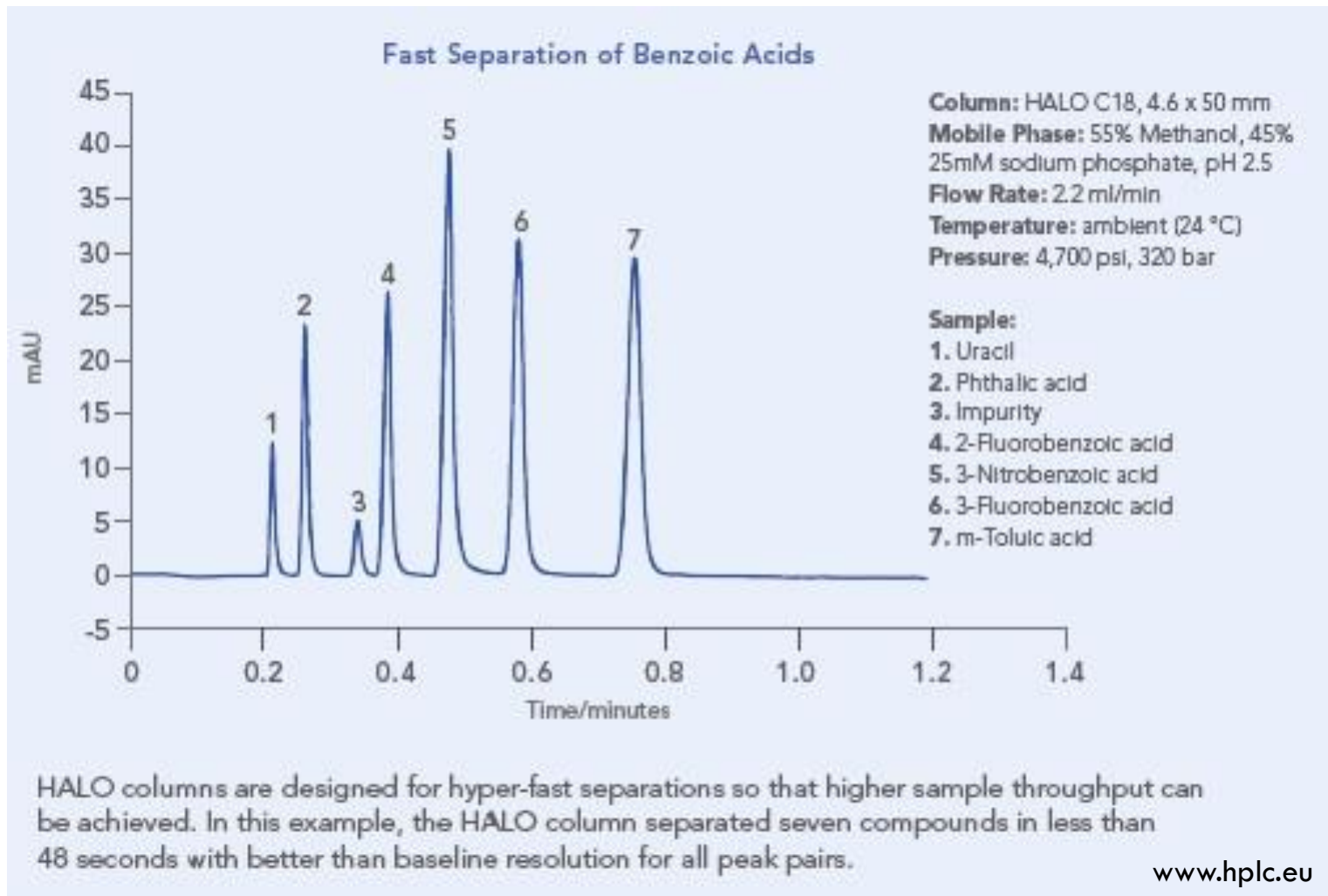
V_S – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Kolikrát je eluční objem/čas větší,
než mrtvý objem/čas kolony

UKÁZKA RYCHLÉ A ÚČINNÉ SEPARACE



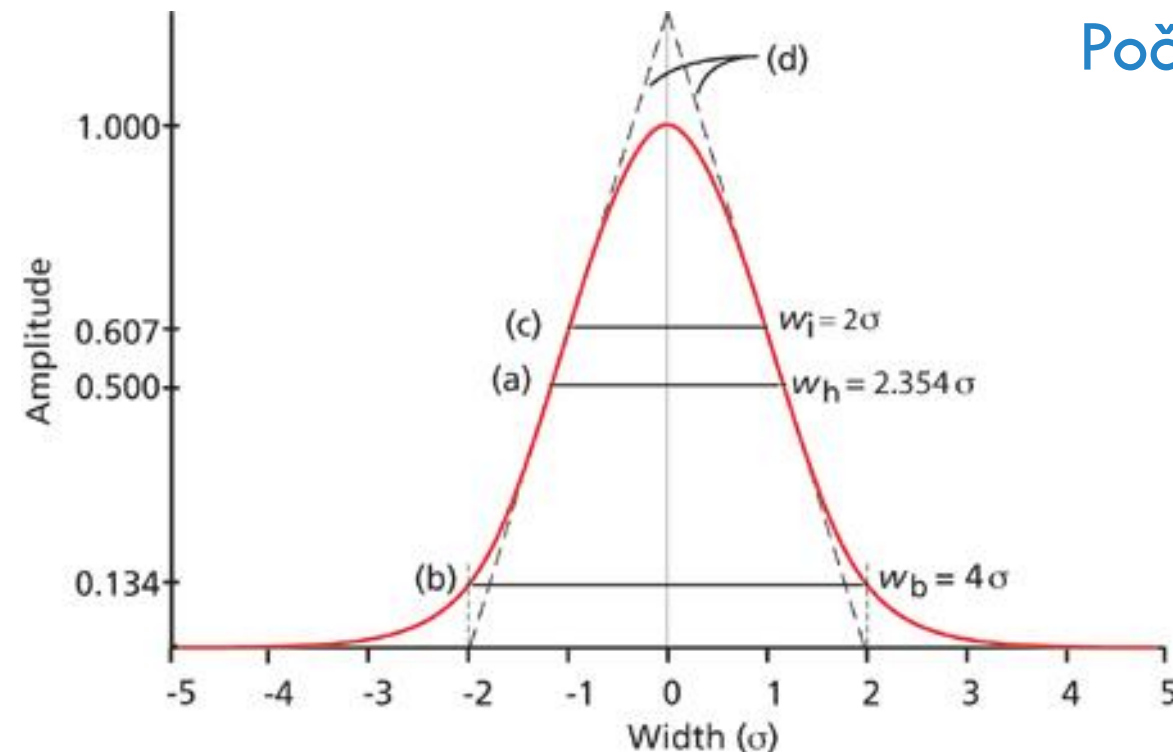
ÚČINNOST SEPARACE (IZOKRATICKÁ ELUCE)

Počet teoretických pater, N

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2}$$

$$N = 5.545 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2$$

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{4\sigma}} \right)^2$$



Pozor na vliv mimokolonových objemů

$$N_{cor} = \frac{(t_R - t_{syst})^2}{(\sigma_t^2 - \sigma_{t,syst}^2)}$$

Lze (také) extrapolovat z retenčních charakteristik homologické řady (alkylbenzeny) J. Sep. Sci. 2003, 26, 1005.

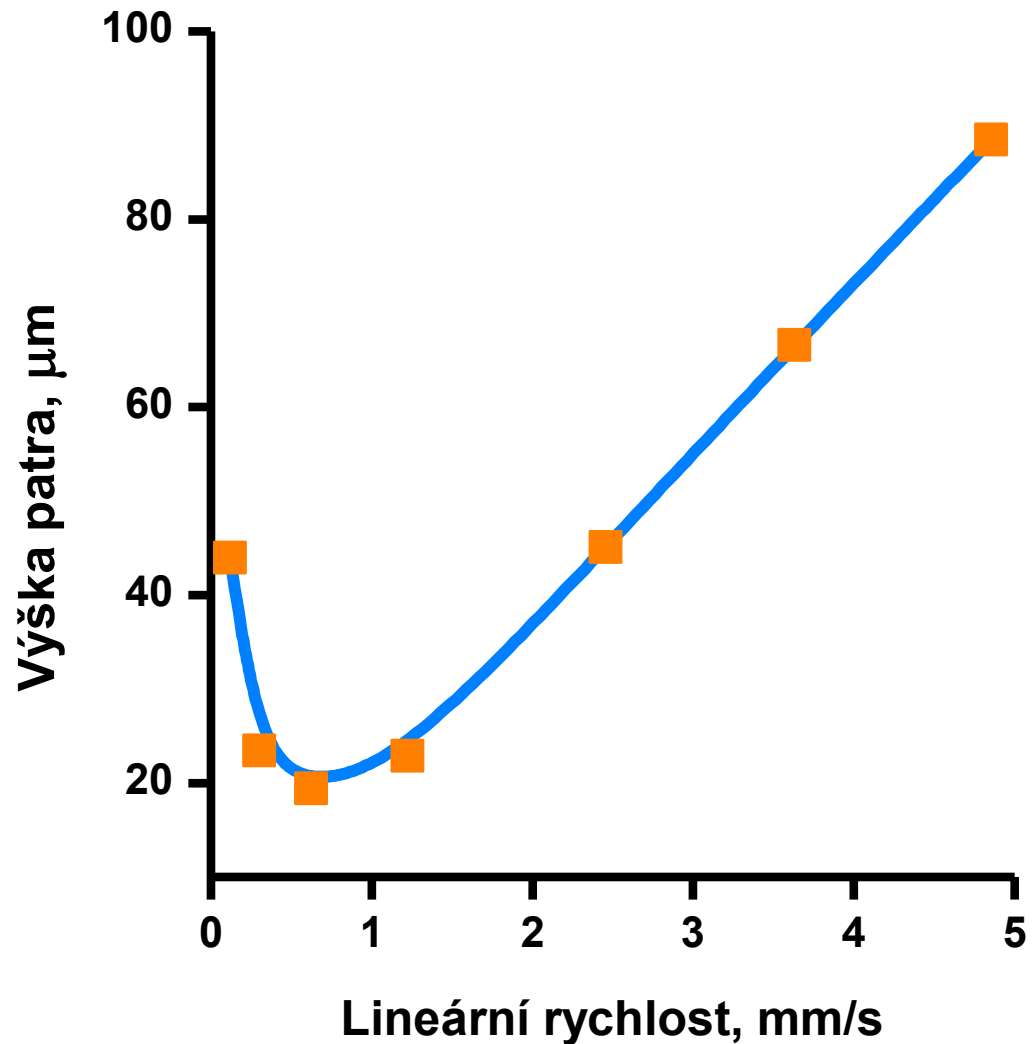
VAN DEEMTEROVA ROVNICE

Výškový ekvivalent
teoretického patra
(H , $HETP$)

$$H = \frac{L}{N}$$

Lineární rychlost
toku mobilní fáze
(u)

$$u = \frac{L}{t_m}$$



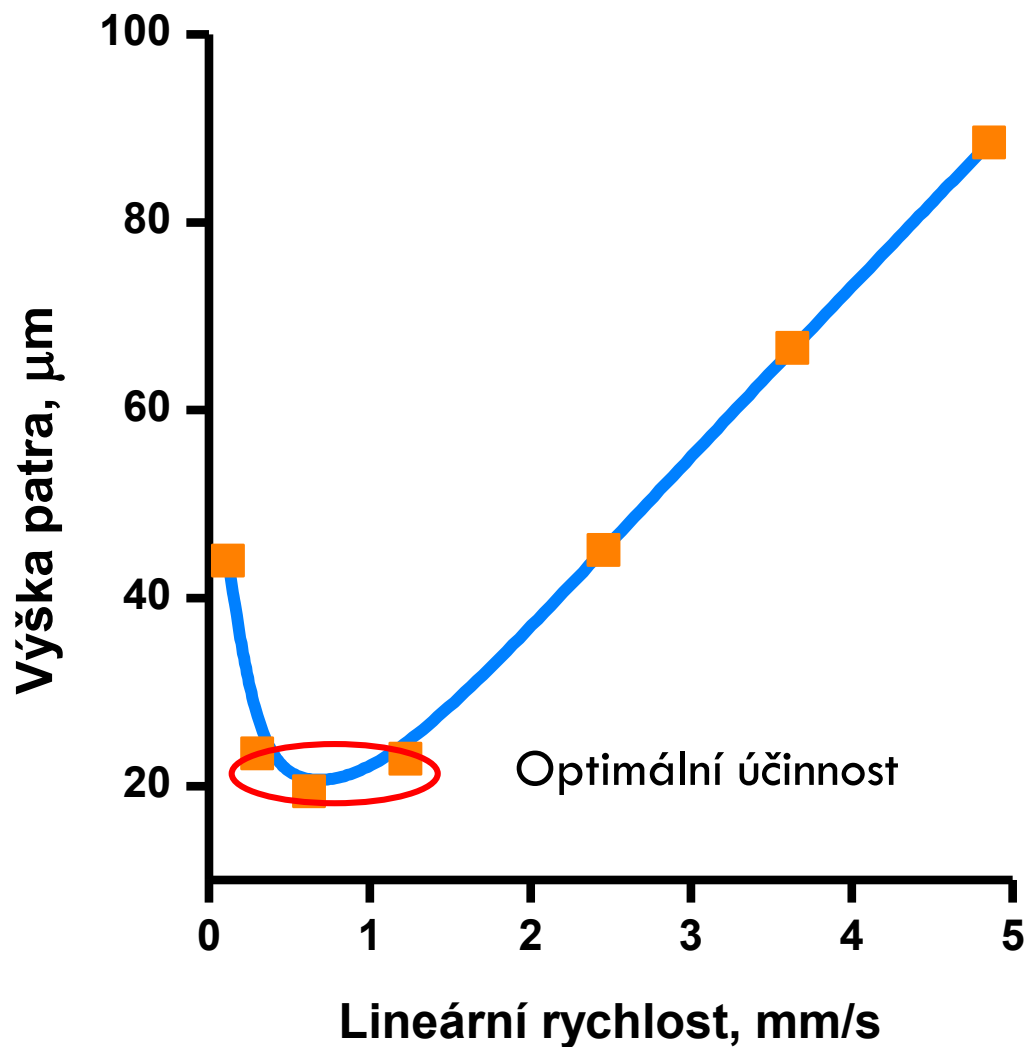
VAN DEEMTEROVA ROVNICE

Výškový ekvivalent
teoretického patra
(H , $HETP$)

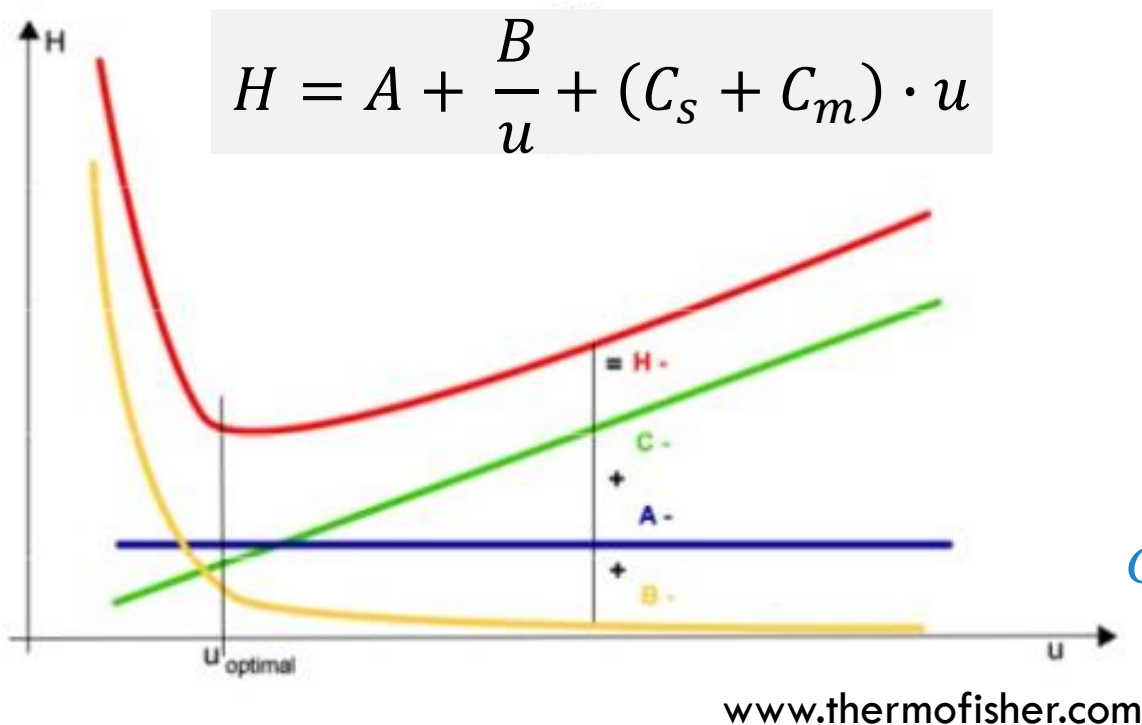
$$H = \frac{L}{N}$$

Lineární rychlost
toku mobilní fáze
(u)

$$u = \frac{L}{t_m}$$



VAN DEEMTEROVA ROVNICE



$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m) \cdot u$$

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

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

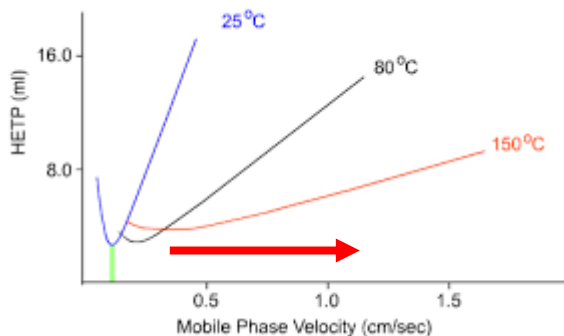
$$D_m = \frac{7.4 \cdot 10^{-8} T \sqrt{\phi_{sv} \cdot M_{sv}}}{\eta_{sv} \cdot V_A^{0.6}}$$

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

VLIV EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK

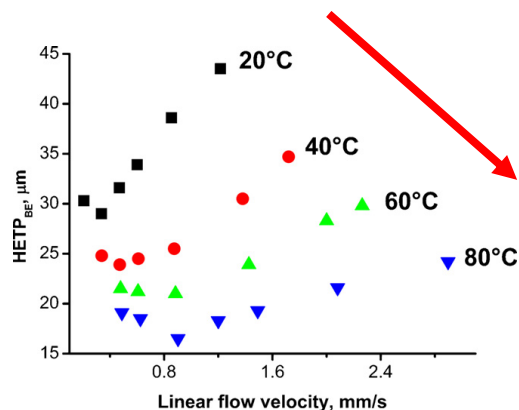
Pracovní teplota

Plněné kolony



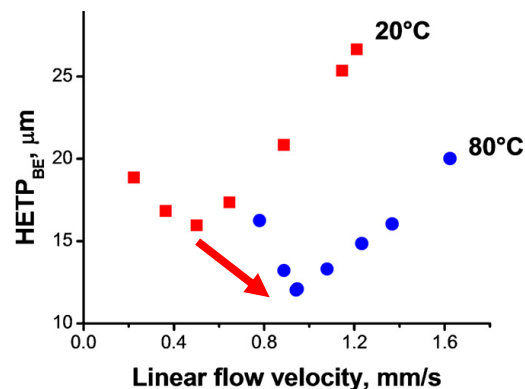
www.chromacademy.com

Polymerní monolity

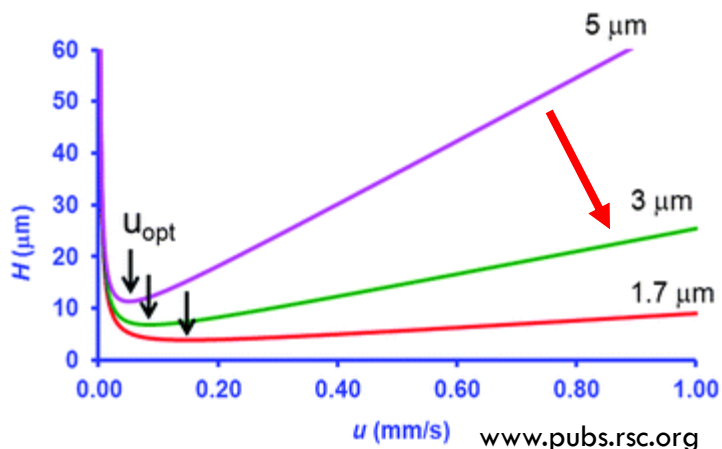


J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8212.

Dávkované množství

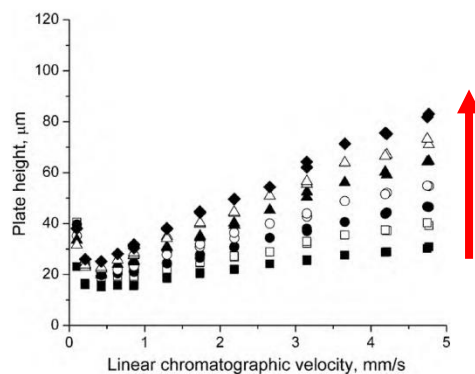


Velikost částic

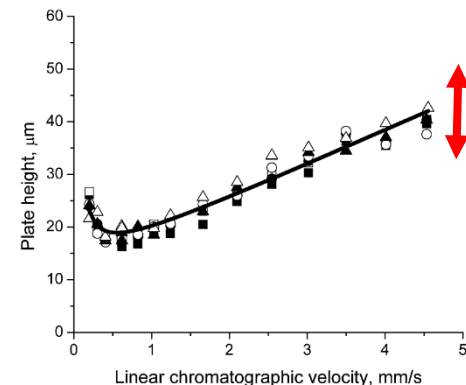


www.pubs.rsc.org

Retence

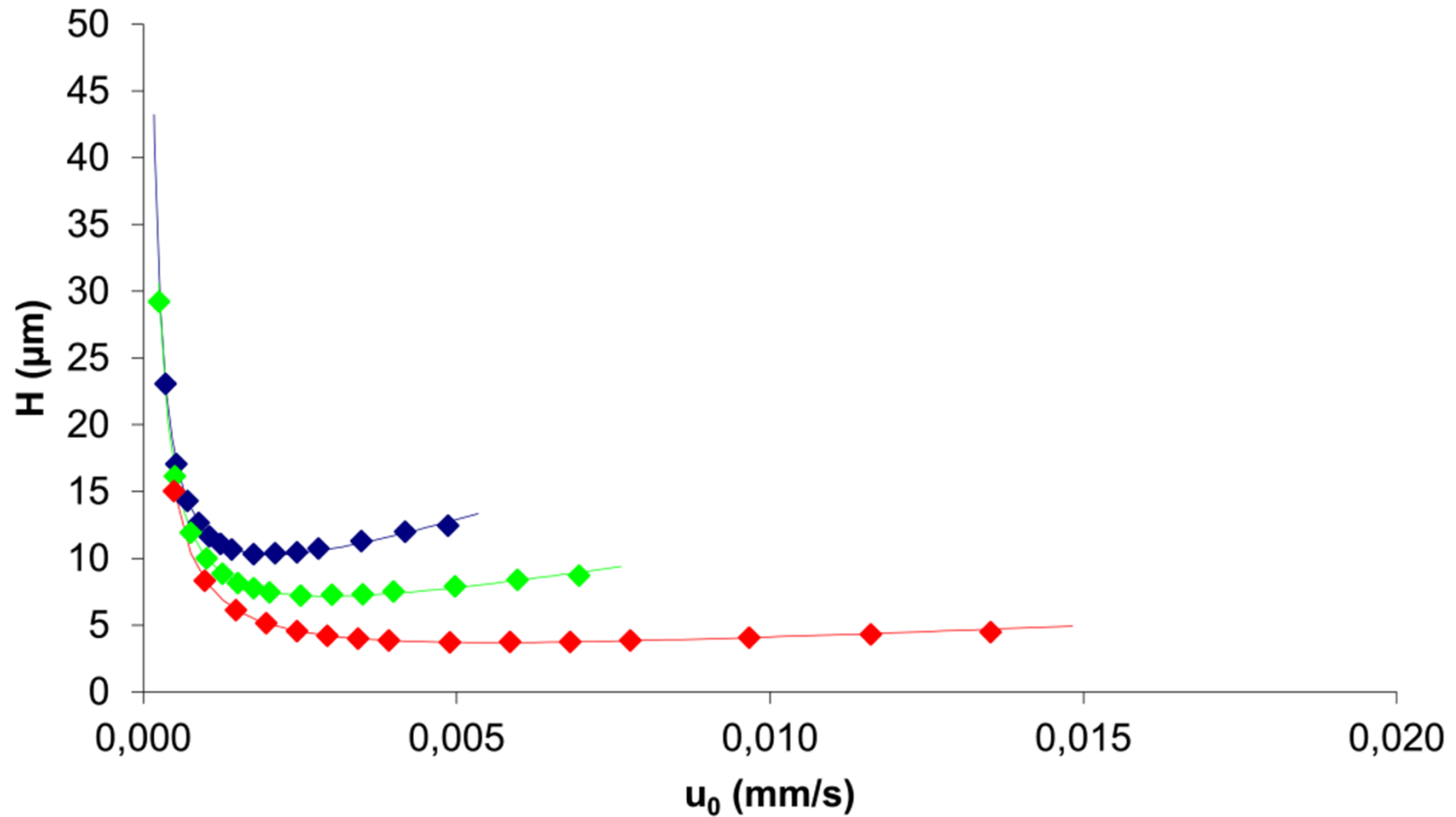


J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5389.

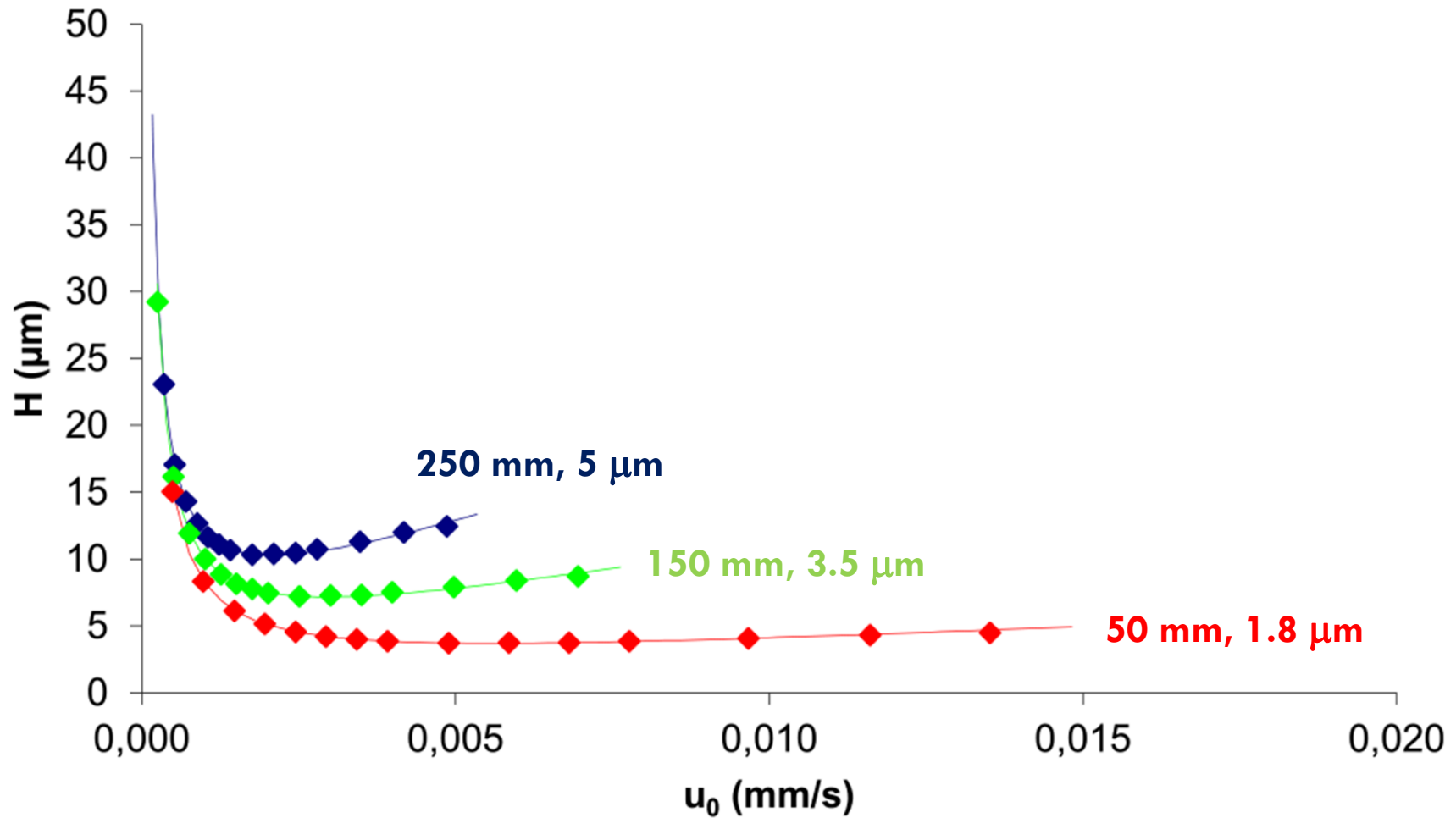


J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7514.

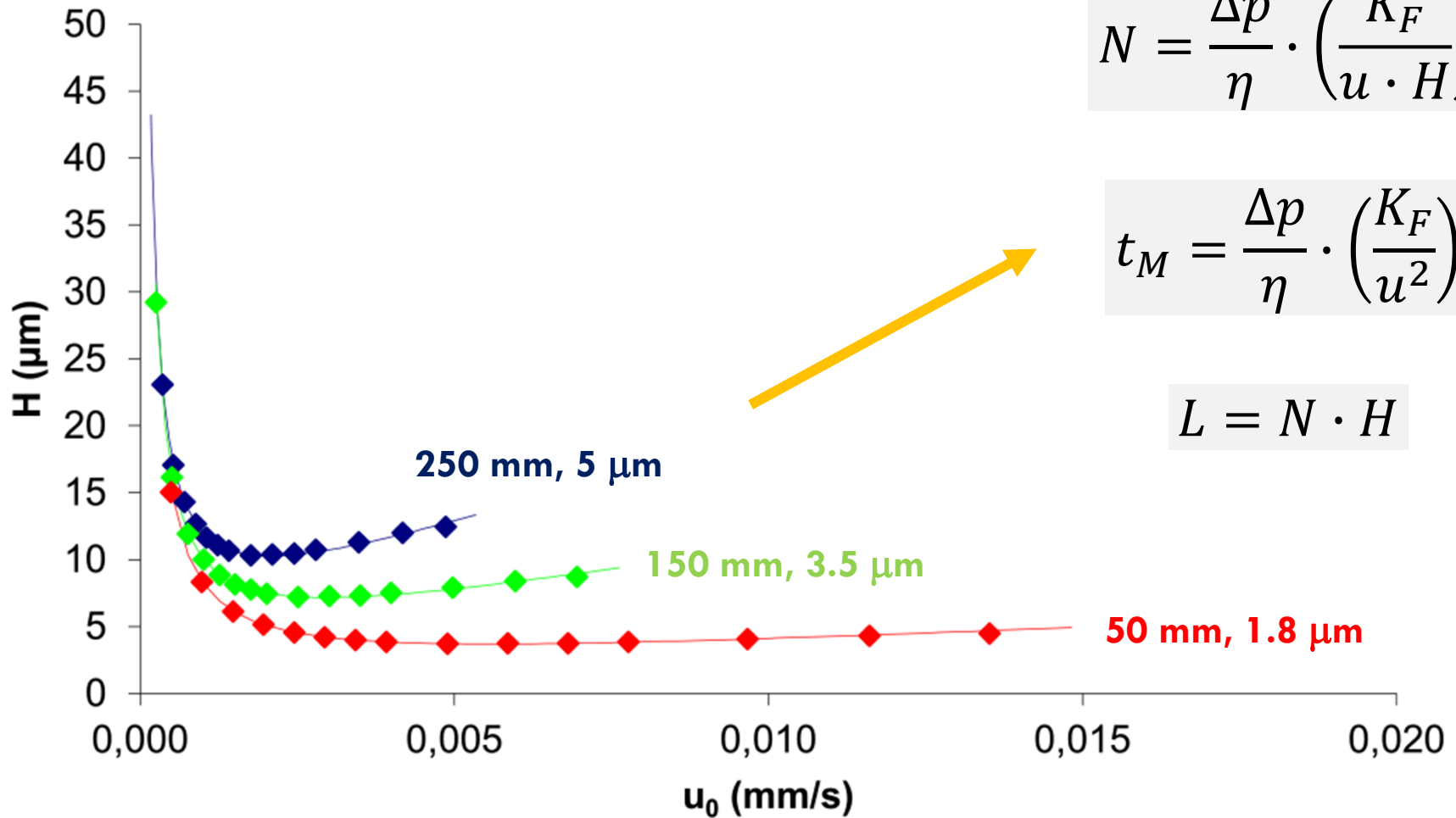
KINETICKÁ ANALÝZA



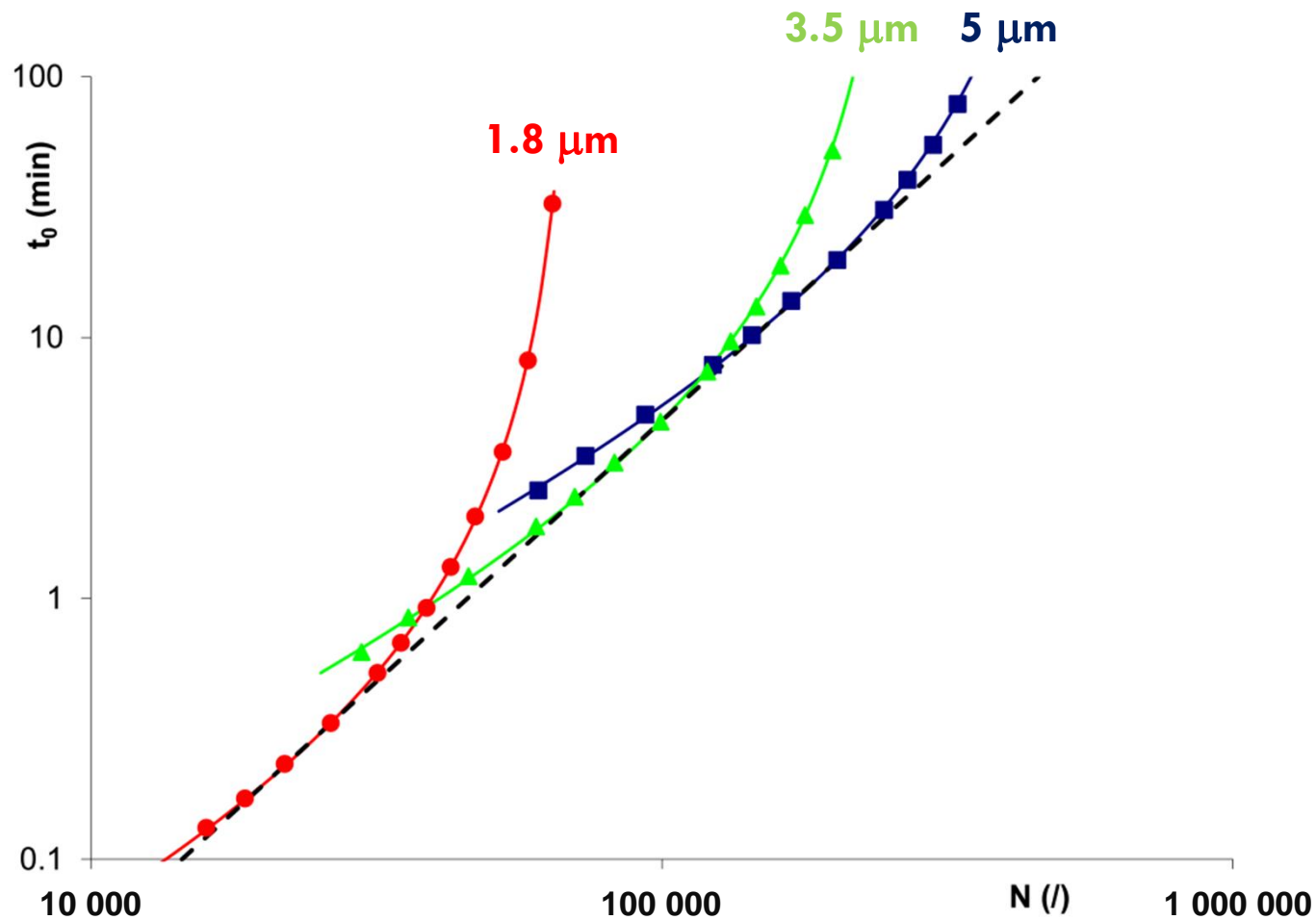
KINETICKÁ ANALÝZA



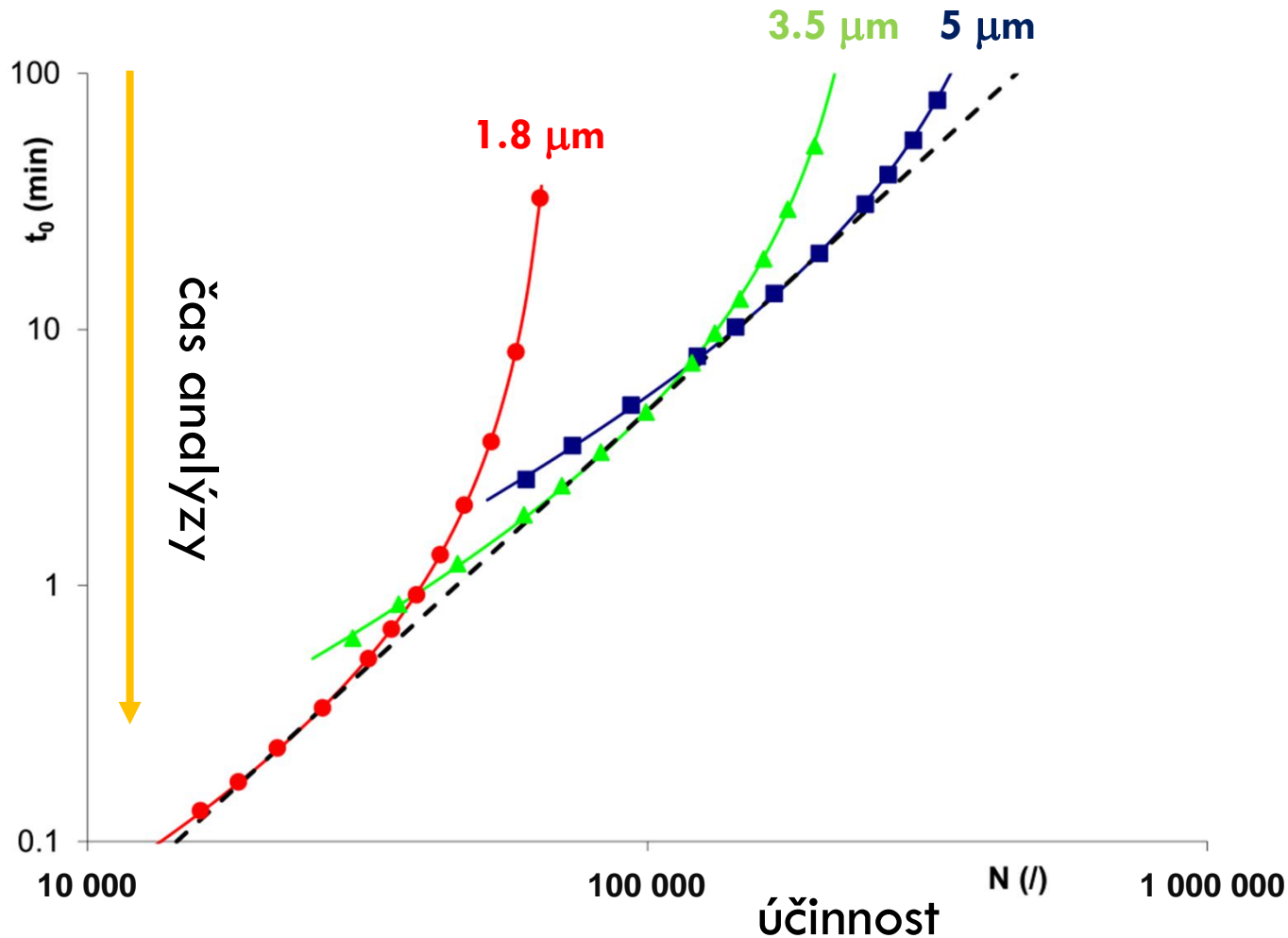
KINETICKÁ ANALÝZA



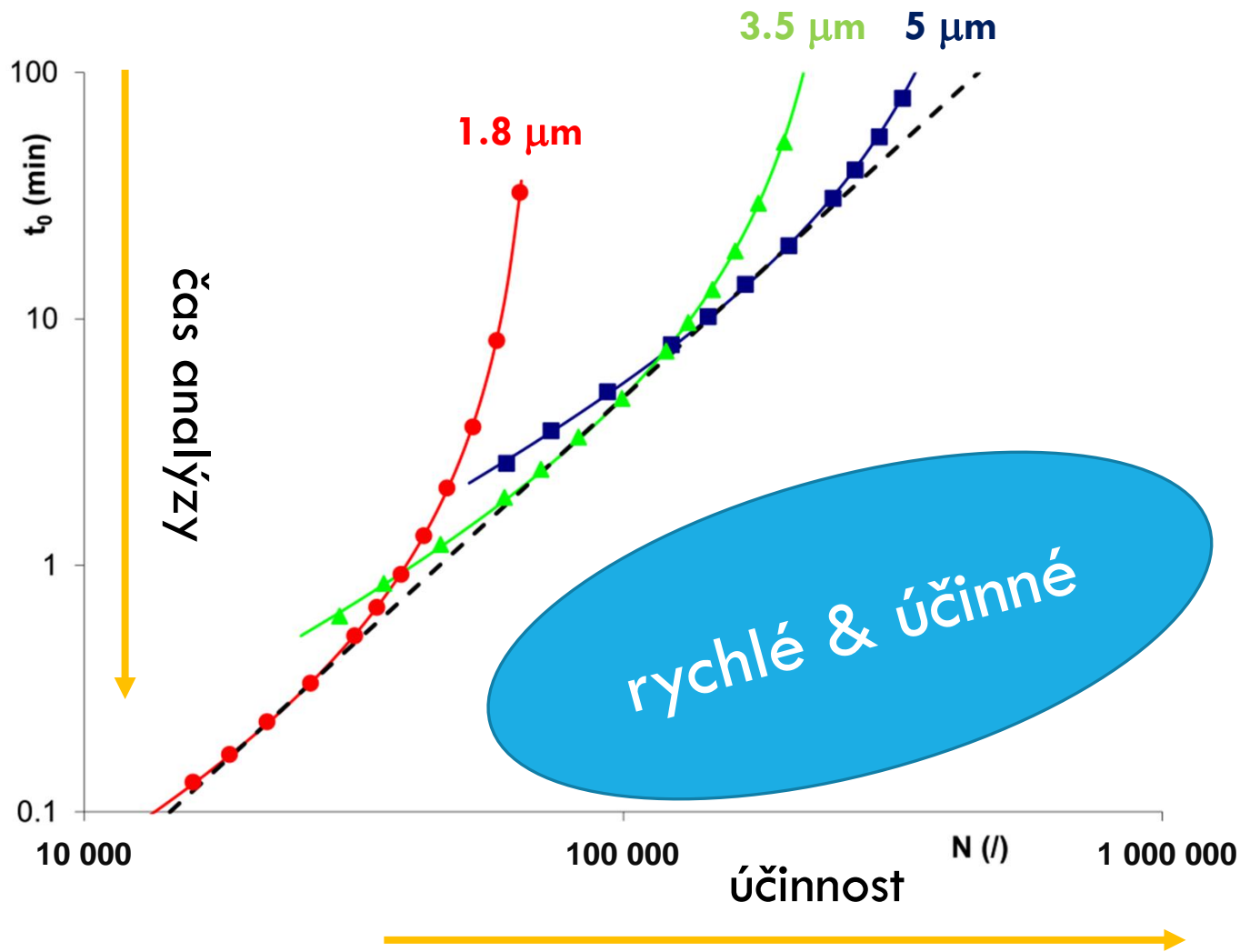
KINETICKÁ ANALÝZA (KINETIC PLOT)



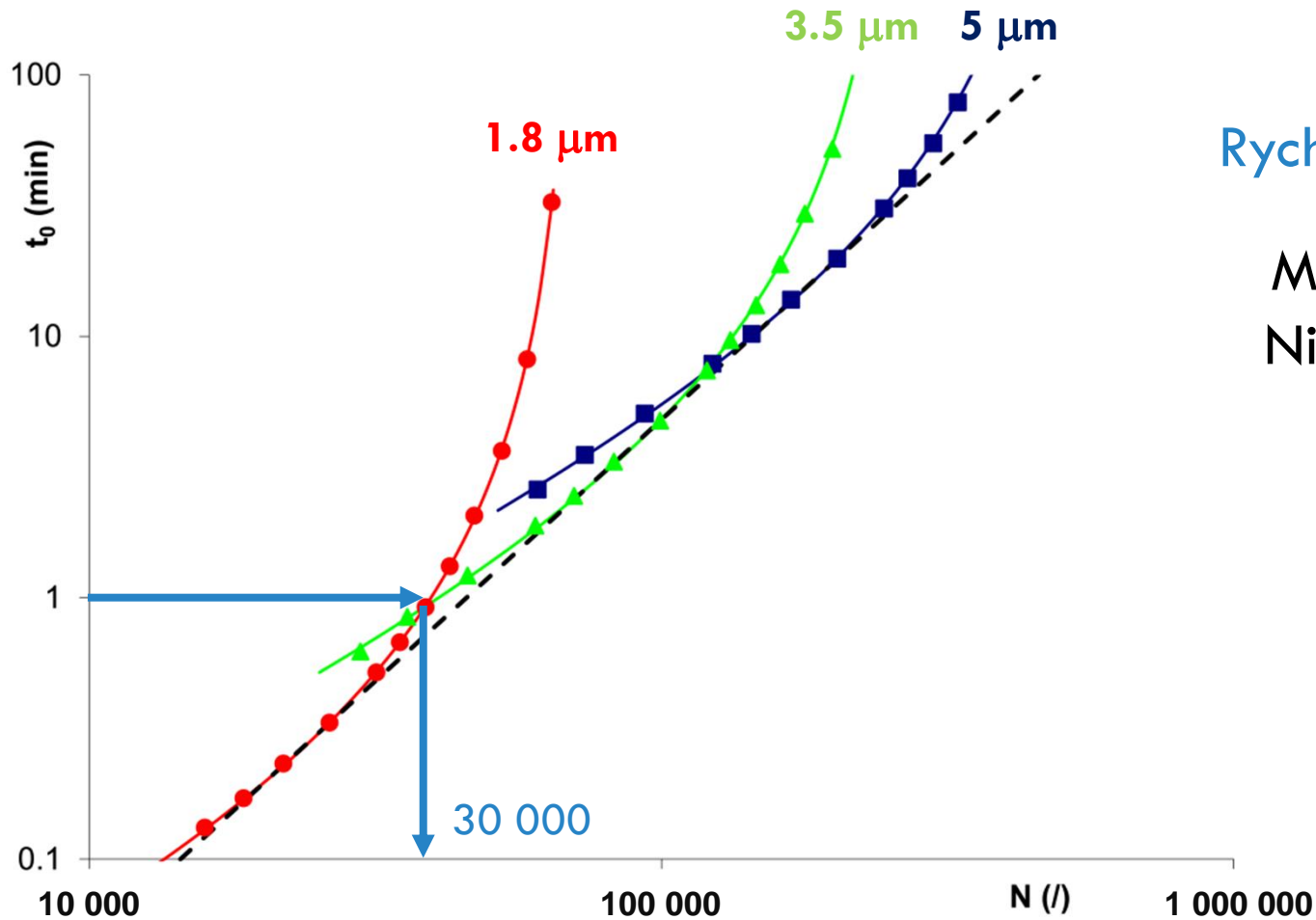
KINETICKÁ ANALÝZA (KINETIC PLOT)



KINETICKÁ ANALÝZA (KINETIC PLOT)



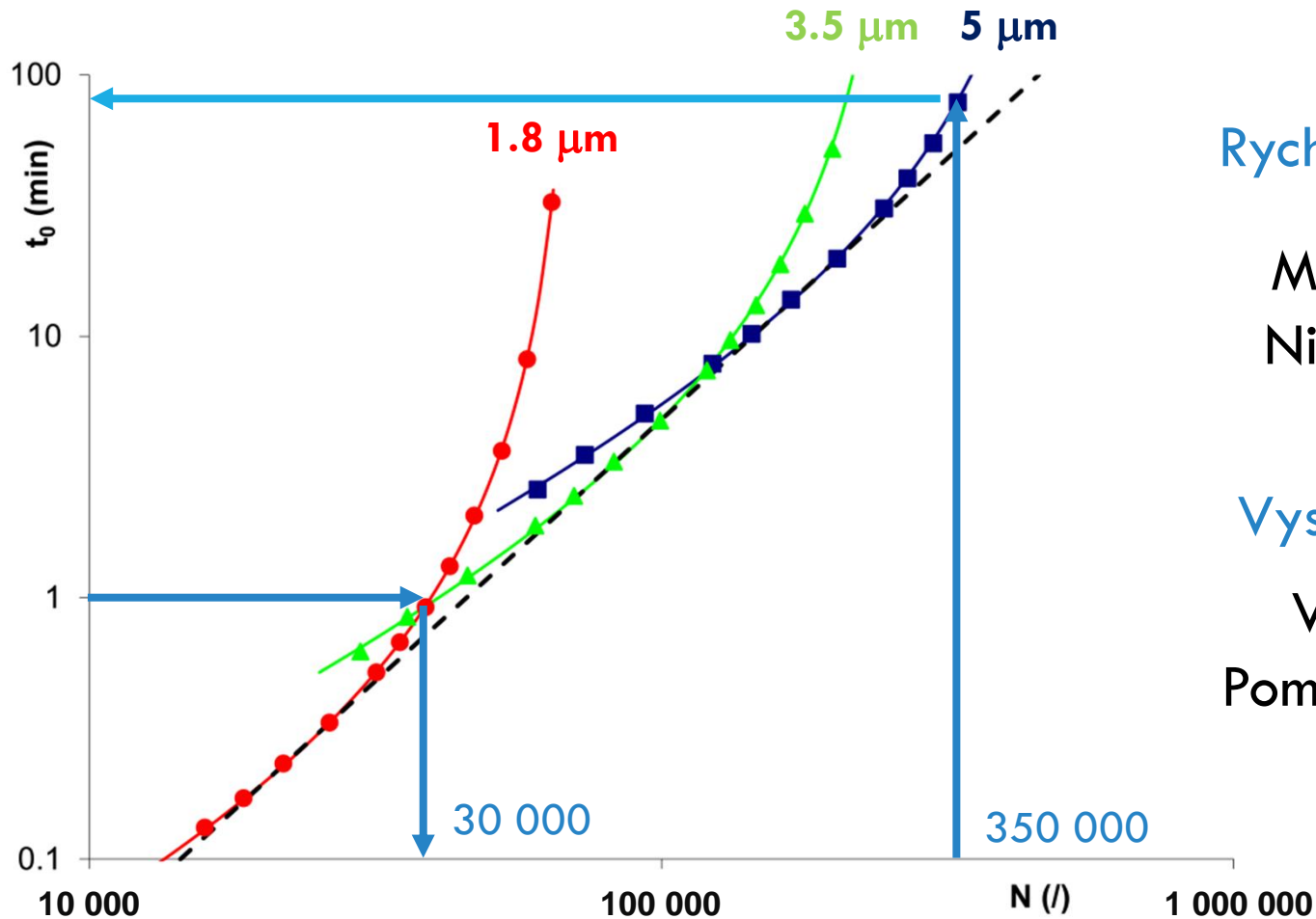
KINETICKÁ ANALÝZA (KINETIC PLOT)



Rychlé analýzy?

Malé částice
Nižší účinnost

KINETICKÁ ANALÝZA (KINETIC PLOT)



Rychlé analýzy?

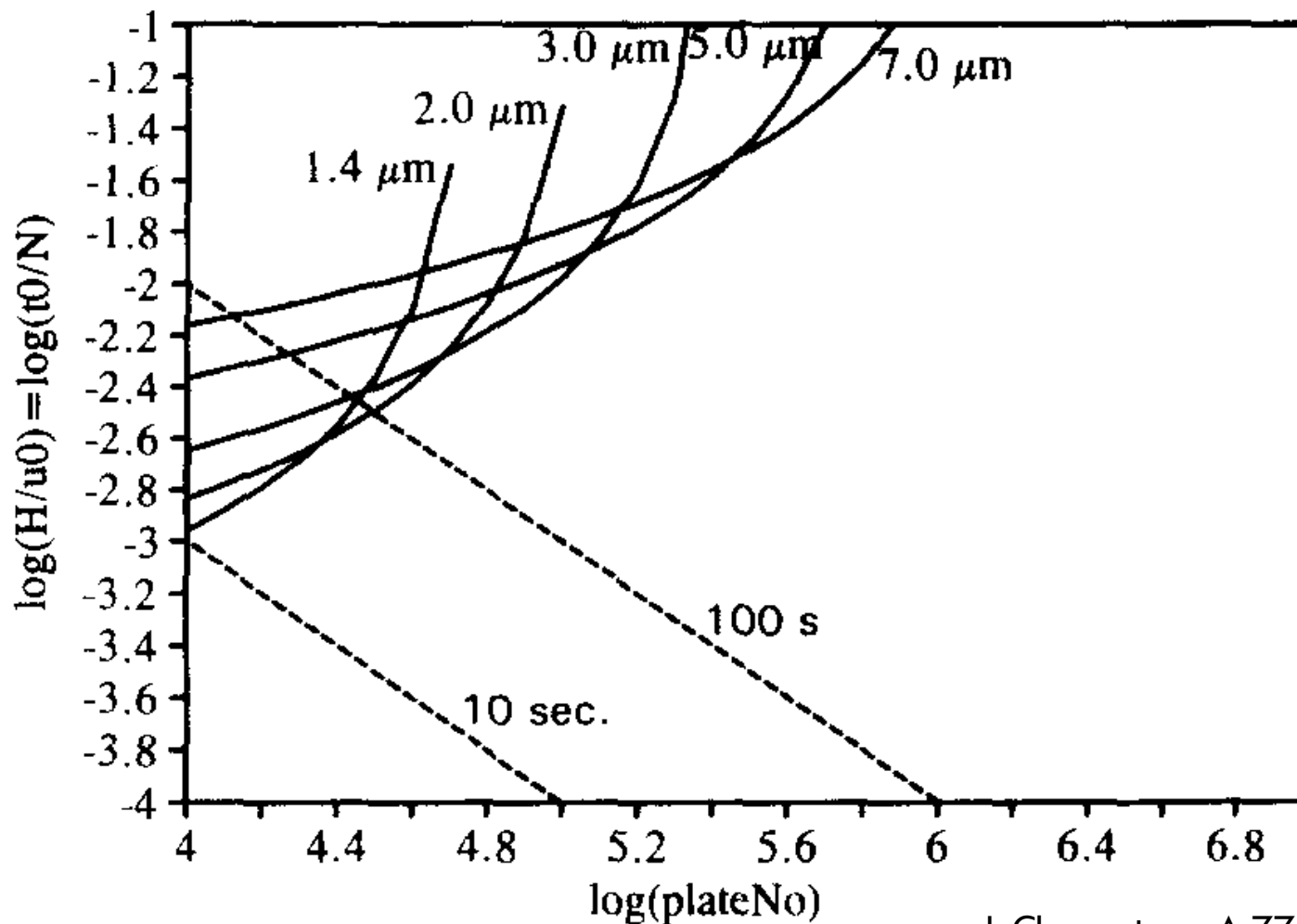
Malé částice
Nižší účinnost

Vysoká účinnost?

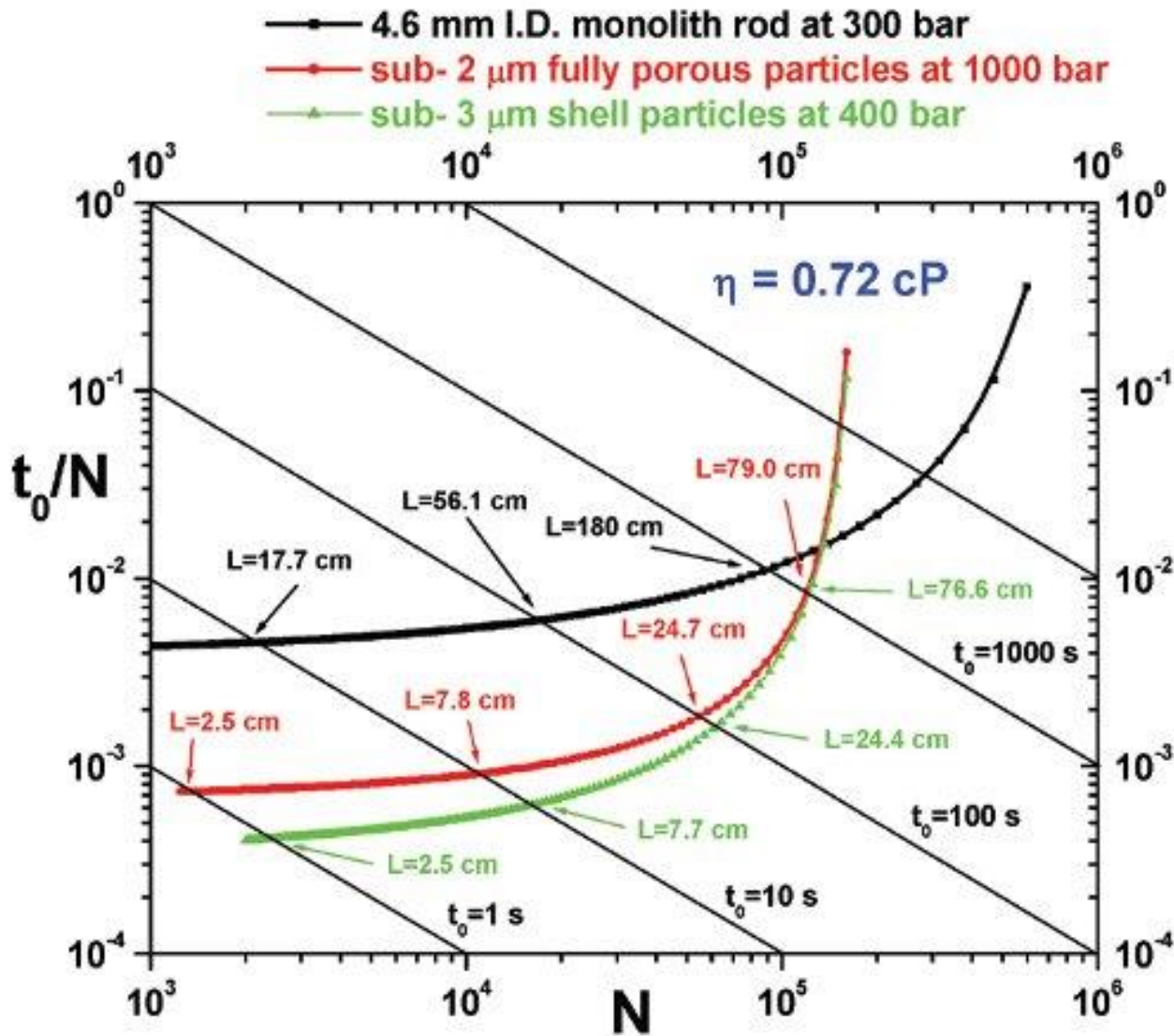
Větší částice
Pomalejší analýzy

POPPEHO GRAFY

Pressure driven PC HPLC



CHARAKTERIZACE KOLON



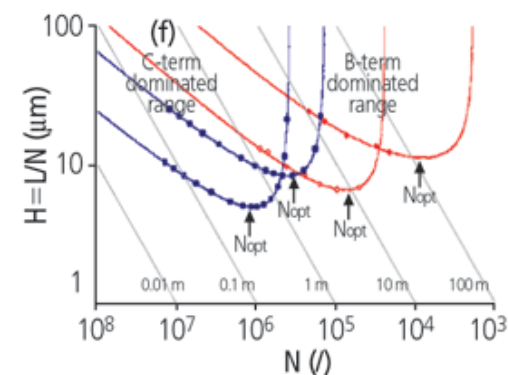
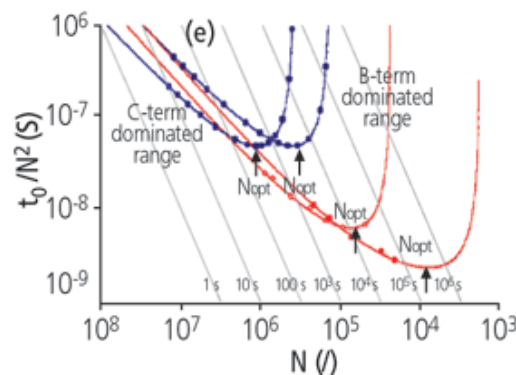
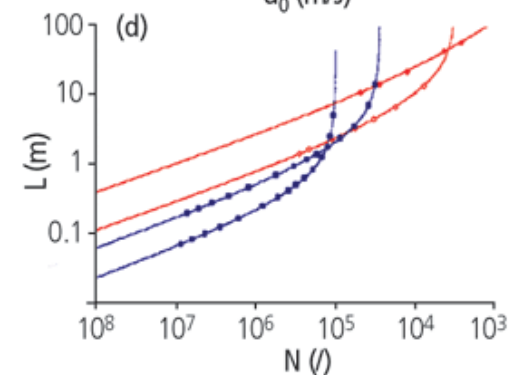
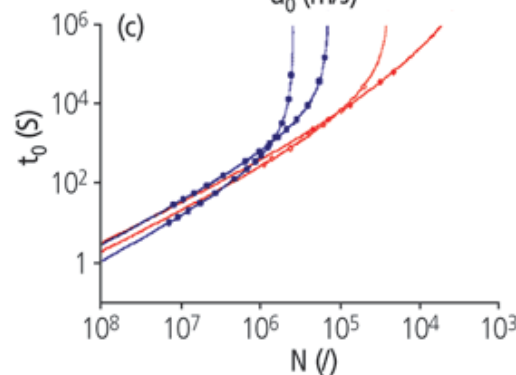
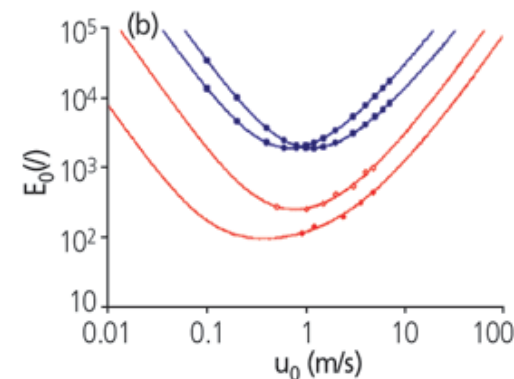
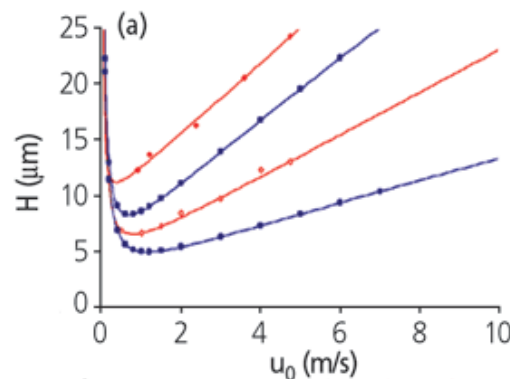
RŮZNÉ POHLEDY

Srovnání kolon z hlediska času analýzy, velikosti částic, účinnosti, pracovního tlaku (UPLC!) apod.

Chybí vliv experimentálních podmínek na rozmývání píků (účinnost)



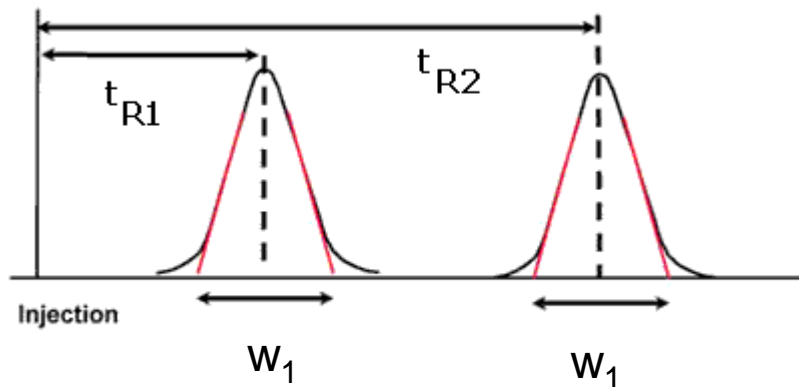
van Deemterova rovnice



(PŘÍPADNÉ) SAMOSTUDIUM

- H. Poppe, Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 3-21.
- A. Andrés, K. Broeckhoven, G. Desmet, Methods for the experimental characterization and analysis of the efficiency and speed of chromatographic columns: A step-by-step Tutorial, *Analytica Chimica Acta* 894 (2015) 20-34.
- G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, Kinetic Plots to Directly Compare the Performance of LC Supports, *LCGC Europe* 18 (2005) 403–408.
- U. D. Neue, Kinetic Plots Made Easy, *LCGC North America* 27 (2009) 974-983.
- <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=curoegDsHonOvmOIIcCdBoB&subNav=kuroegDsHonOvmOIIcCdBoBbC>

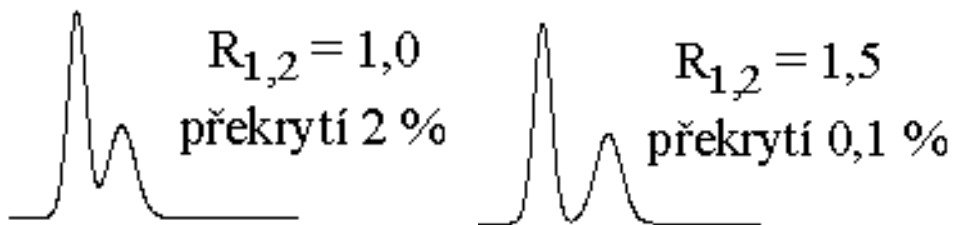
ROZLIŠENÍ



$$R_{1,2} = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2}$$

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{k_2 - k_1}{k_1} \right) \cdot \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right) = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right)$$

účinnost
selektivita
retence



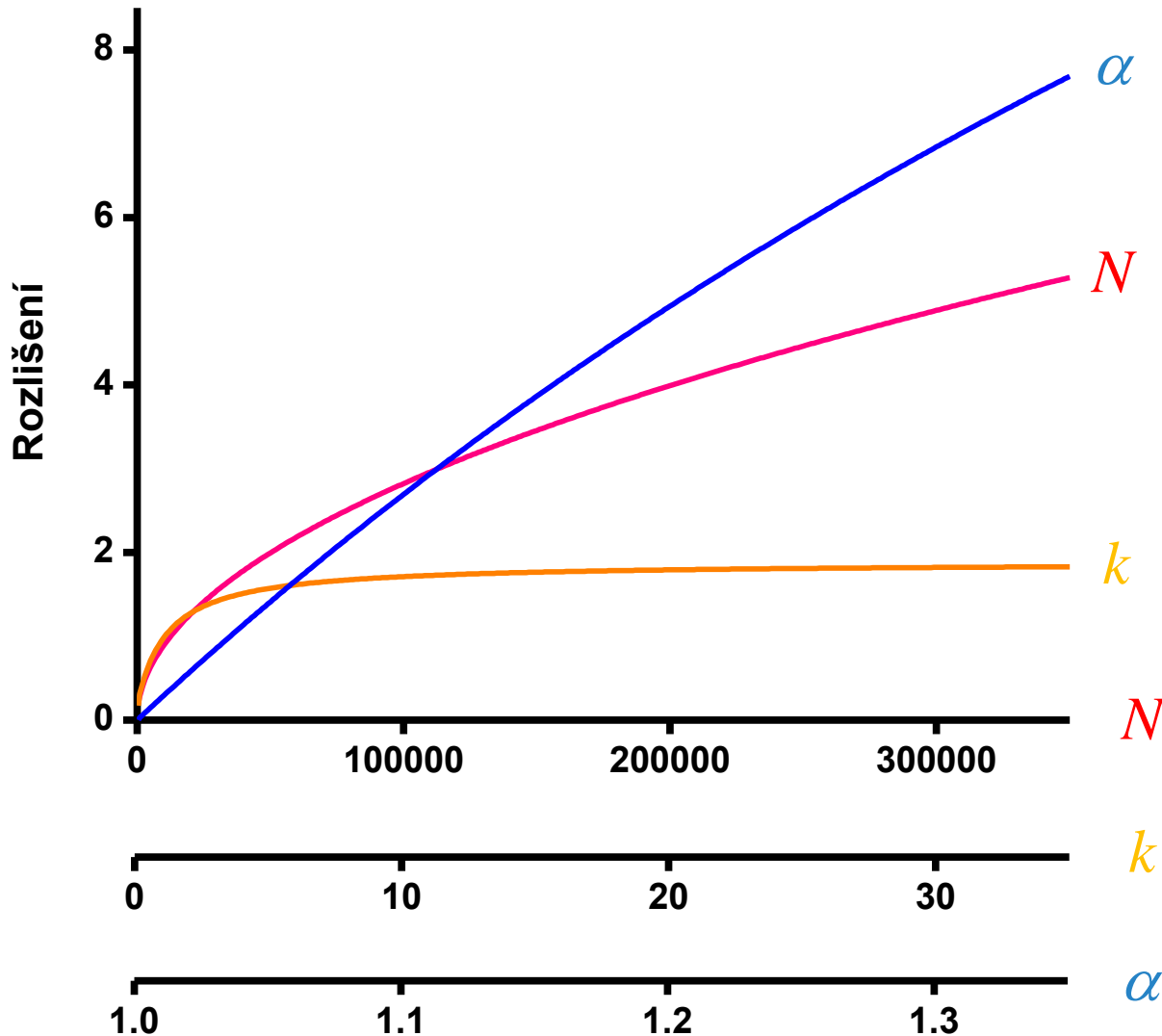
web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html

N – počet pater

k – retenční faktor

α – selektivita $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$

KONTROLA ROZLIŠENÍ



$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_1}{1 + k_1} \right)$$

Rozlišení dvou
látek nejvíce
ovlivňuje
selektivita
separace
(stacionární
a mobilní fáze)

TESTY SELEKTIVITY

Testy hydrofobicity

Engelhardt

$$E = \frac{k_{ethylbenzen}}{k_{toluen}} \quad 55\% \text{ metanol}$$

Tanaka

$$T = \frac{k_{amylbenzen}}{k_{butylbenzen}} \quad 80\% \text{ metanol}$$

Walters

$$W = \frac{k_{antracen}}{k_{benzen}} \quad 65\% \text{ acetonitril}$$

Galushko

$$G = \frac{k_{toluen} + k_{benzen}}{2} \quad 60\% \text{ metanol}$$

Testy silanolové aktivity

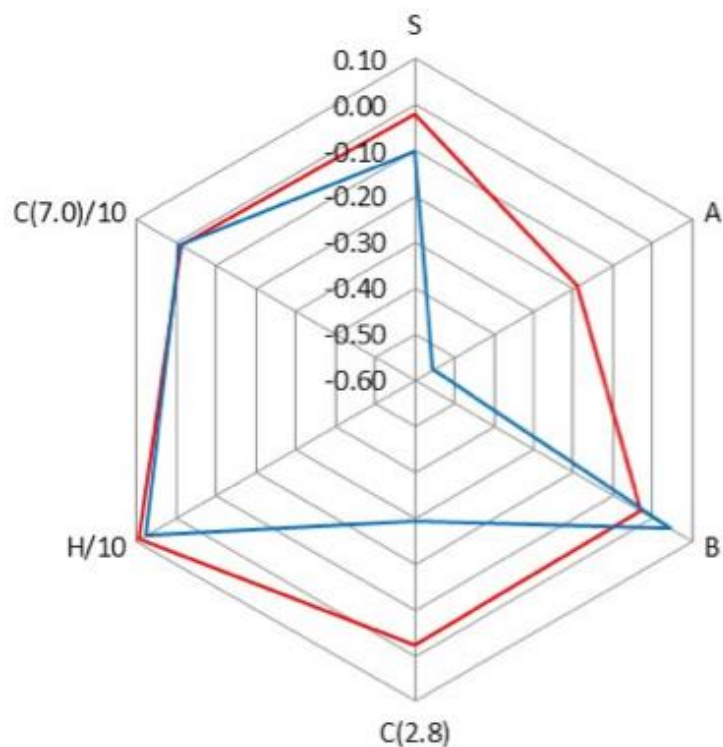
$$E = \frac{k_{anilin}}{k_{fenol}} \quad 55\% \text{ metanol}$$

$$T = \frac{k_{kofein}}{k_{fenol}} \quad 30\% \text{ metanol}$$

$$W = \frac{k_{N,N\text{-diethyltoluamid}}}{k_{antracen}} \quad 100\% \text{ acetonitril}$$

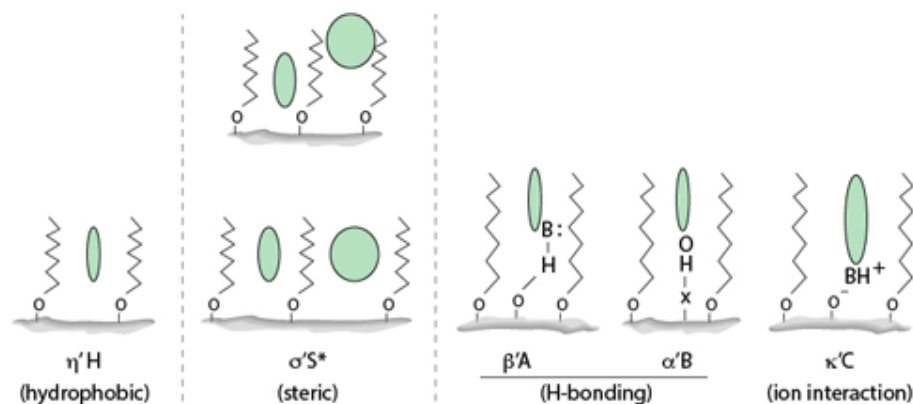
$$G = 1 + 3 \left(\frac{k_{anilin}}{k_{fenol}} - 1 \right) \quad 60\% \text{ metanol}$$

RADAROVÉ GRAFY



Product Quality Research Institute (PQRI)

<http://www.usp.org/app/USPNF/columns.html>



H – hydrofobicita

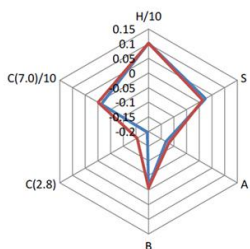
S – stérická selektivita

A – „kyselost“ stacionární fáze

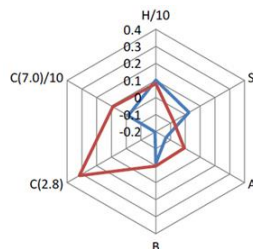
B – „zásaditost“ stacionární fáze

C – ion-exchange kapacita, pH 2.8 a 7

Podobné

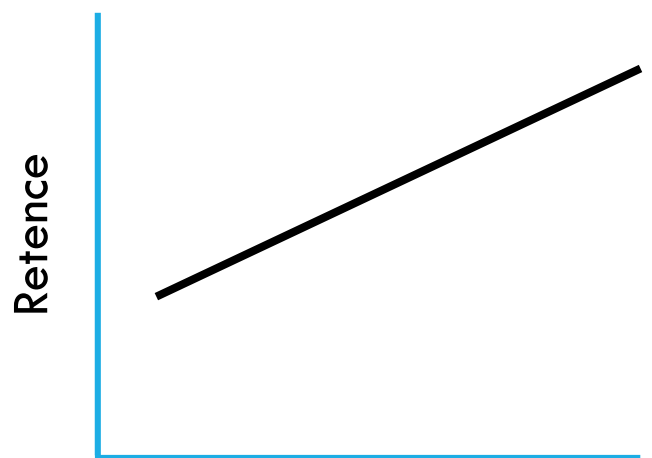


Různé



METYLÉNOVÁ SELEKTIVITA & INDEXY INTERAKCE

Lipofilicita stacionární fáze



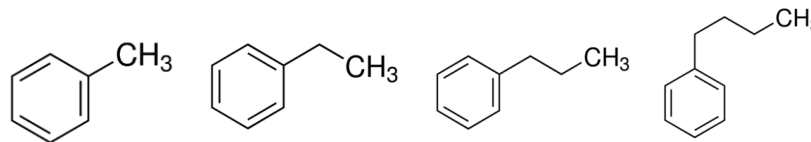
Počet metylenových skupin

nebo

Indexy interakce

Alkylbenzeny

Retence homologické řady



$$\log k = n_c \cdot \log \alpha + \log \beta = n_c \cdot \alpha' + \beta'$$

α' - metylénová selektivita

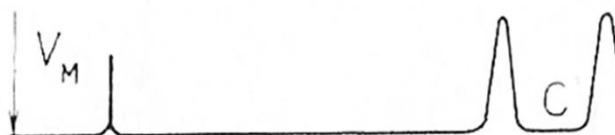
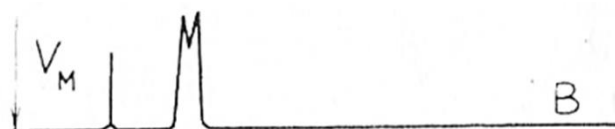
Indexy interakce

I_x – tabelované hodnoty

$$\log k^* = \frac{\log k - \log \frac{V_s}{V_M}}{V_x} = A - B \cdot I_x$$

Charakterizace kolon

ÚČINNOST / RETENCE / SELEKTIVITA





Tim McFarlin / www.pinterest.com

*Nemožné je jen to,
o co jsme se nepokusili.*

Nelson Mandela