

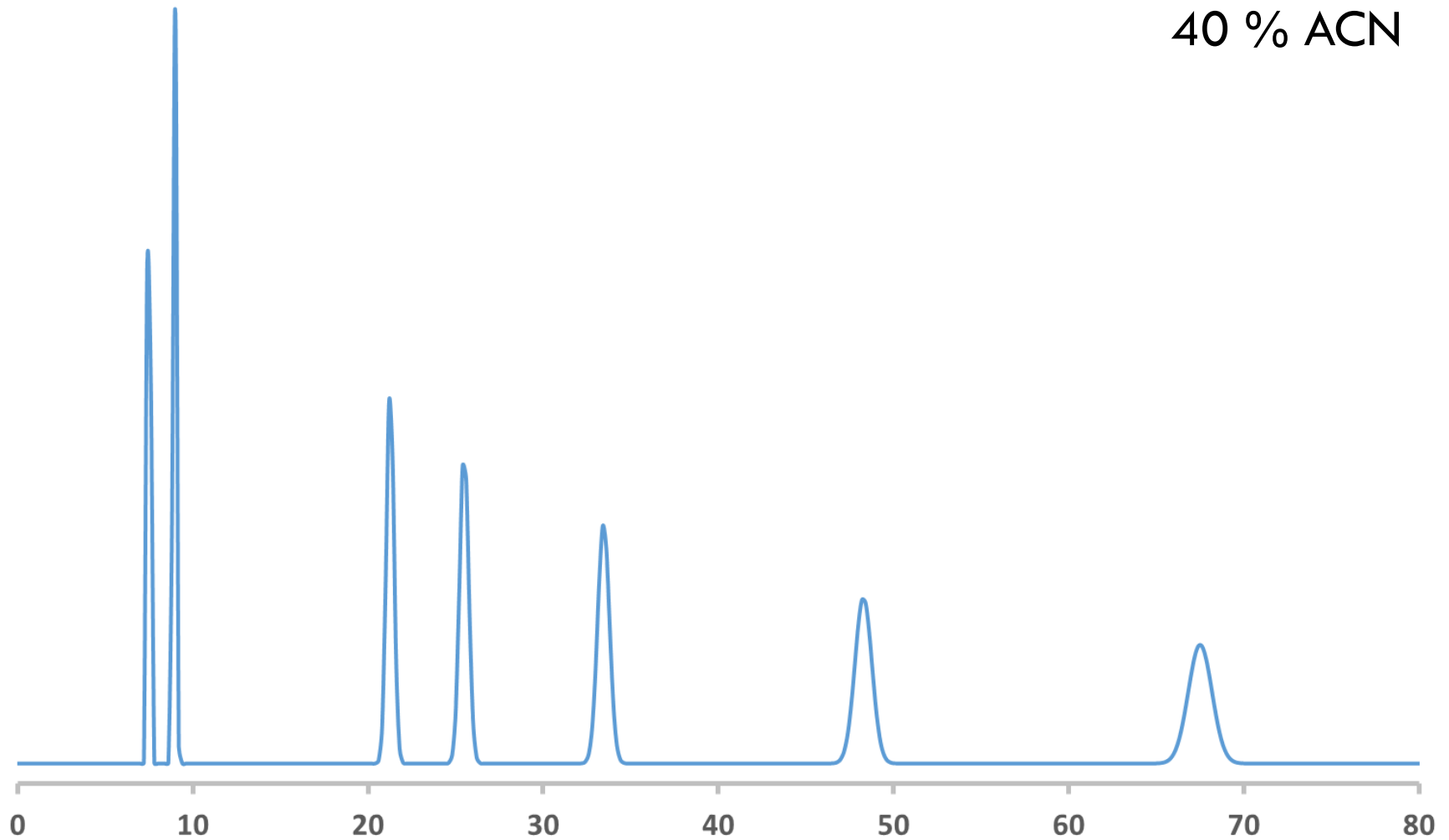
GRADIENTOVÁ ELUCE

Pokročilá kapalinová chromatografie



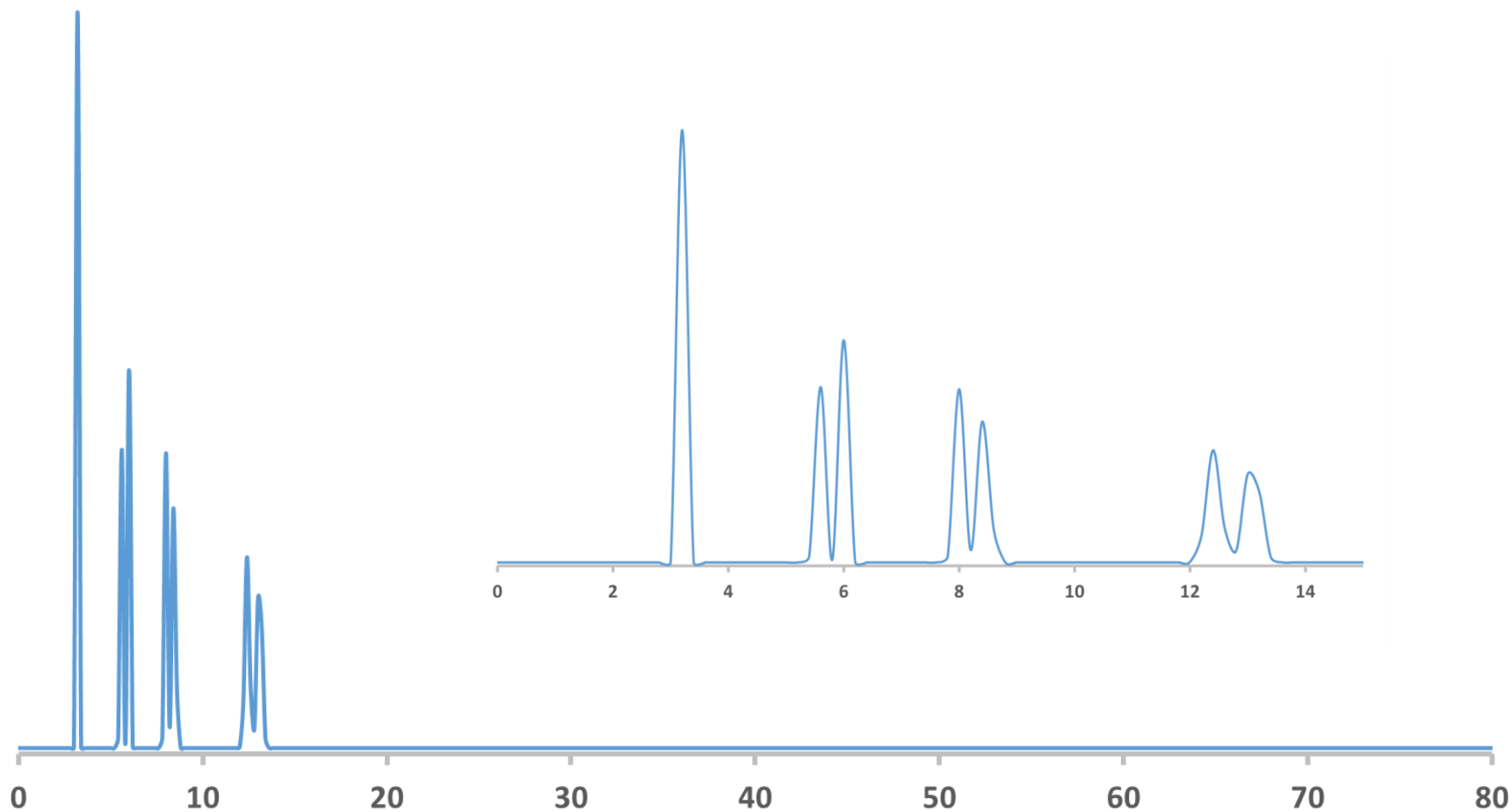
KONSTANTNÍ SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE

40 % ACN



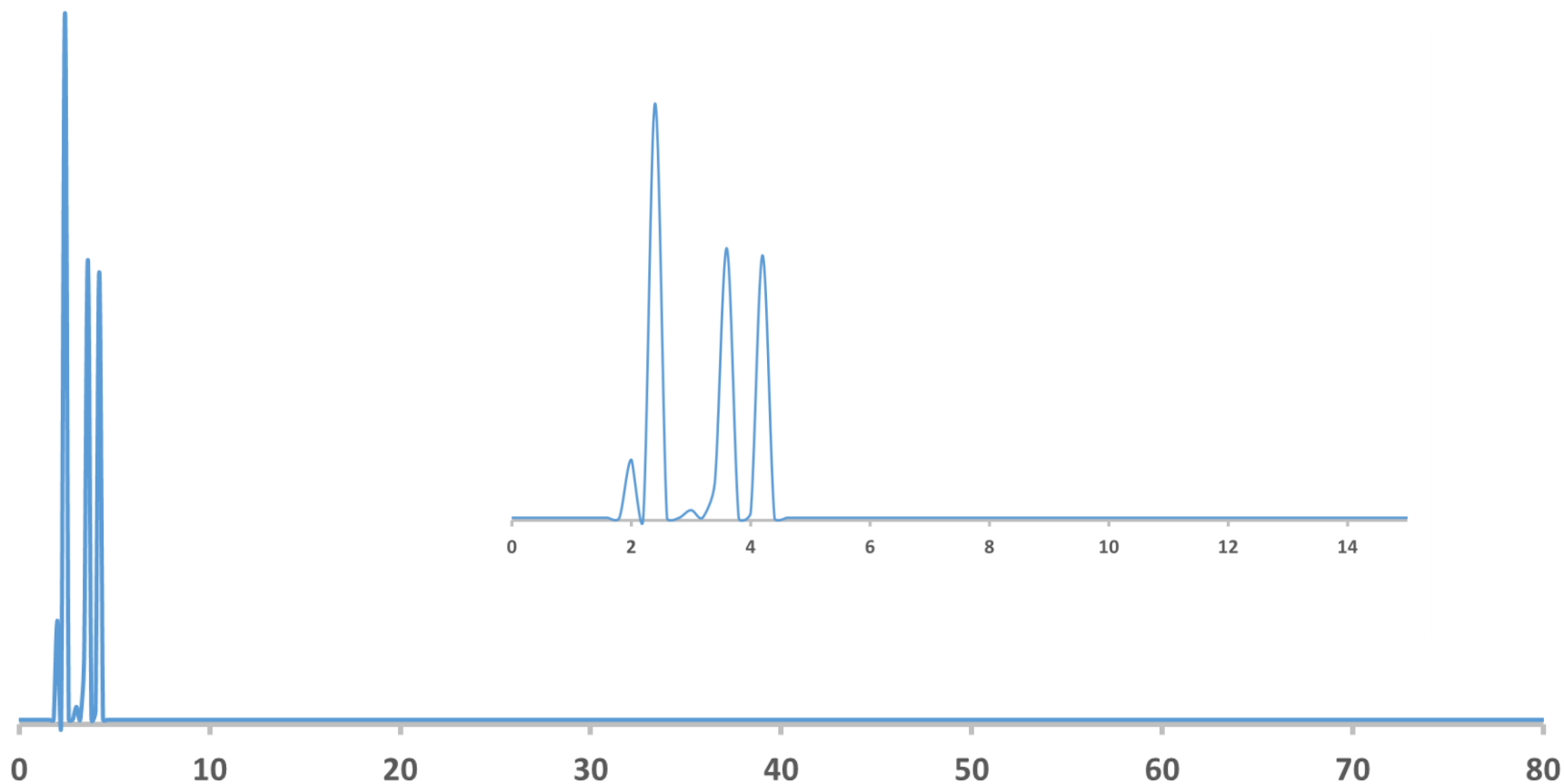
KONSTANTNÍ SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE

60 % ACN



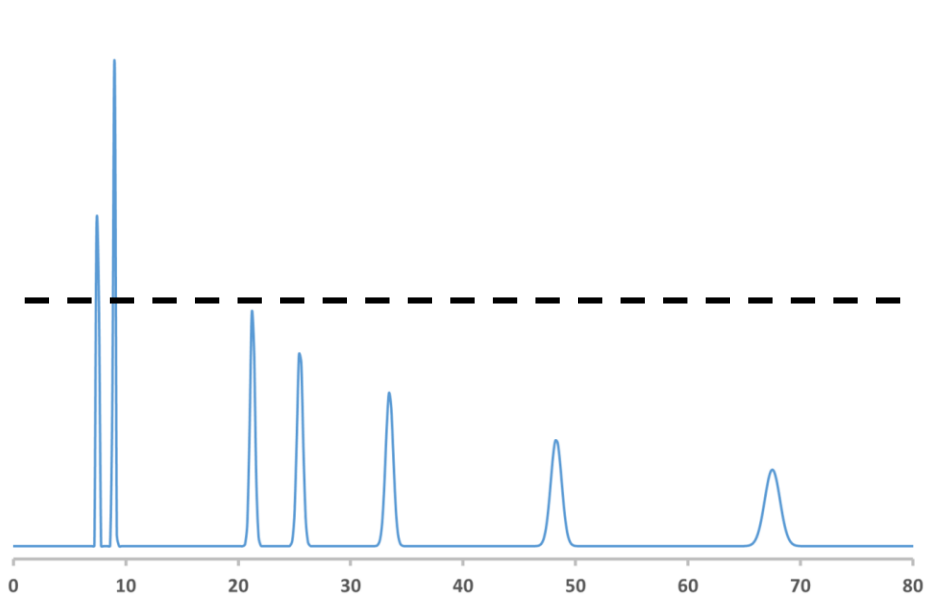
KONSTANTNÍ SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE

80 % ACN



CHROMATOGRAFICKÁ ELUCE

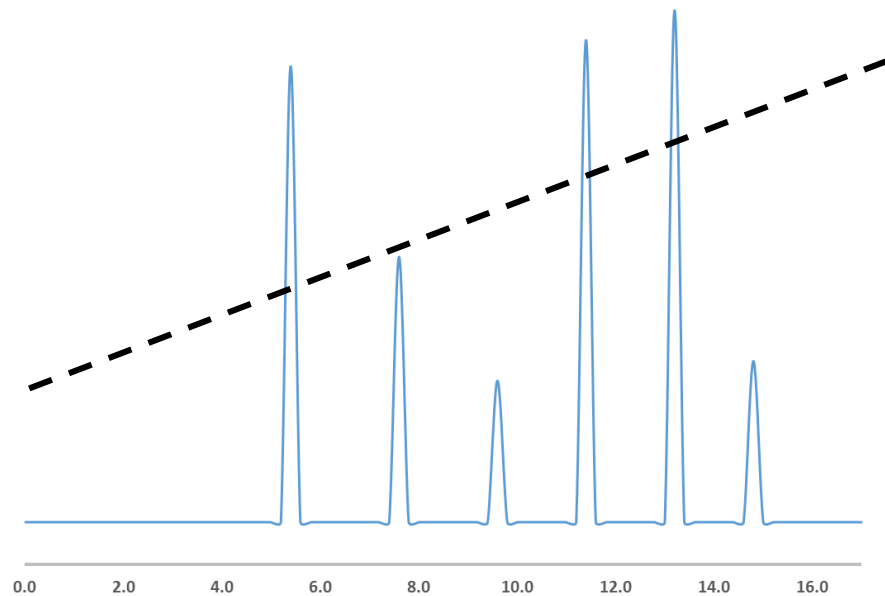
Izokratická eluce



40 % acetonitrilu

70 minut

Gradientová eluce eluce



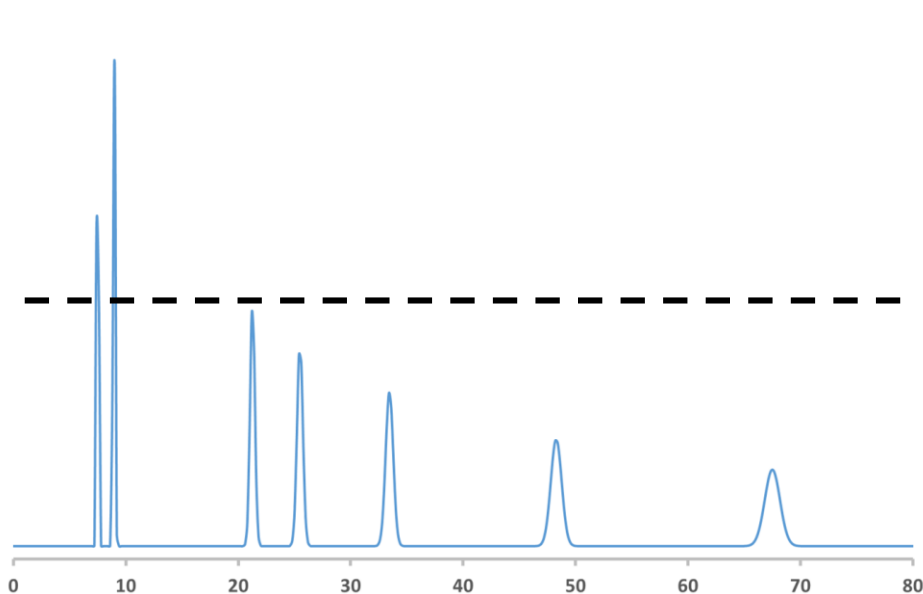
20 – 80 % acetonitrilu ve 20 min

15 minut

Kontinuální změna složení mobilní fáze. Snížení retence více zadržovaných látek

CHROMATOGRAFICKÁ ELUCE

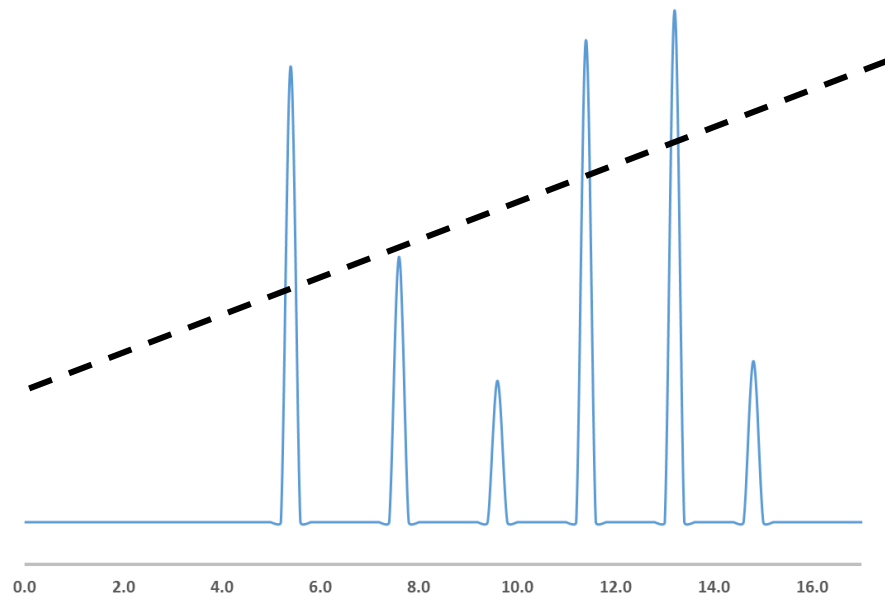
Izokratická eluce



40 % acetonitrilu

70 minut

Gradientová eluce eluce

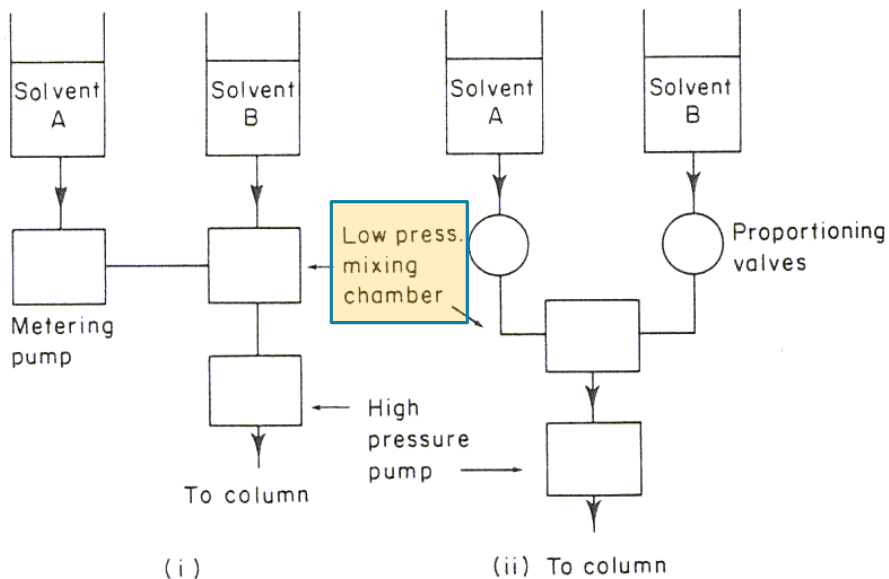


20 – 80 % acetonitrilu ve 20 min

15 minut

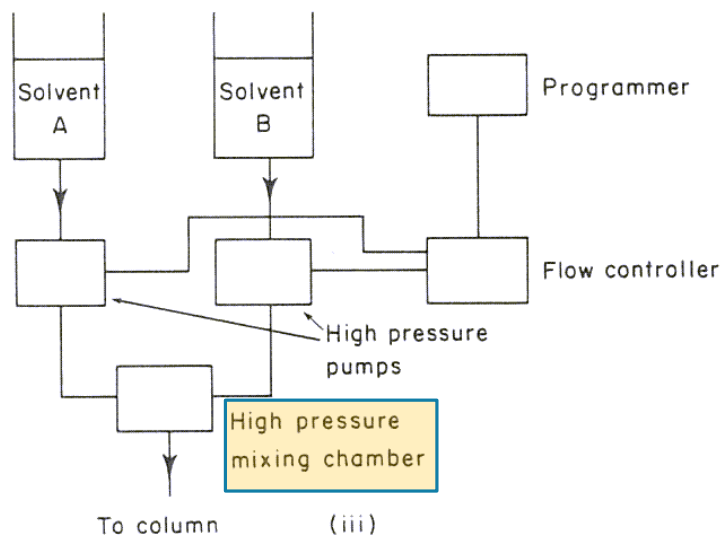
Kontinuální změna složení mobilní fáze. Snížení retence více zadržovaných látek

TVORBA GRADIENTU



Nízkotlaký gradient

- Až čtyři složky mobilní fáze
- Vyšší zpoždění gradientu
- Tvorba gradientu **PŘED** čerpadlem



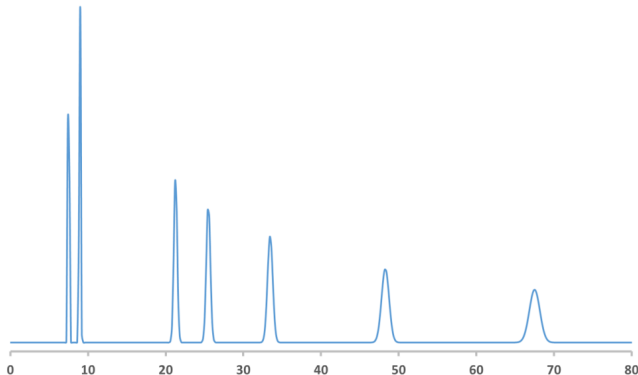
Vysokotlaký gradient

- Vysokotlaká čerpadla
- Menší zpoždění gradientu
- Tvorba gradientu **ZA** čerpadlem

VÝHODY A NEVÝHODY GRADIENTOVÉ ELUCE

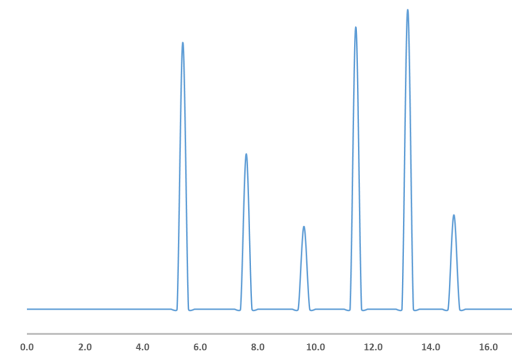
Nevýhody

- Ekvilibrace kolony
- Převod metody
- Čistota rozpouštědel
- Kompatibilita detekce



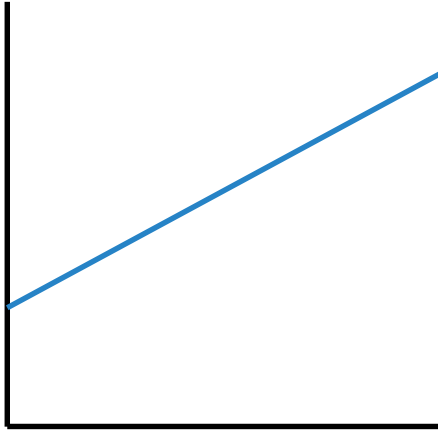
Výhody

- Odstranění nečistot
- Větší rozpětí (retence) látek
- Zvýšení píkové kapacity
- 2D-LC
- Zaostření píků (citlivost detekce)
- Velké molekuly
- MS spojení

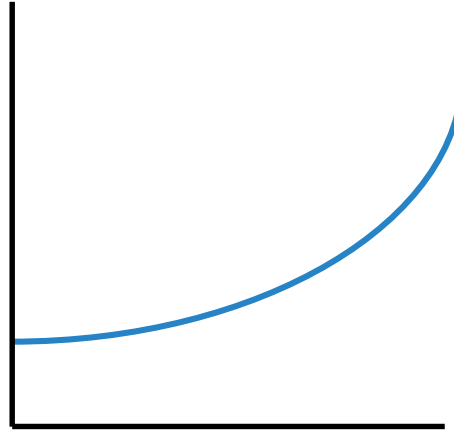


TYPY GRADIENTŮ

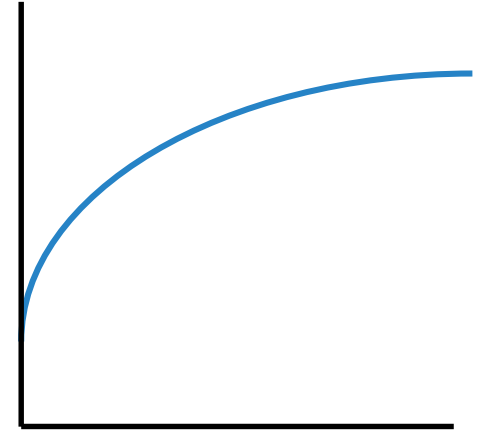
Lineární



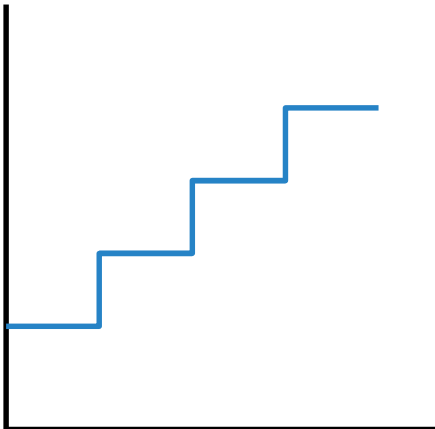
Konvexní



Konkávni



Skokové



Složky

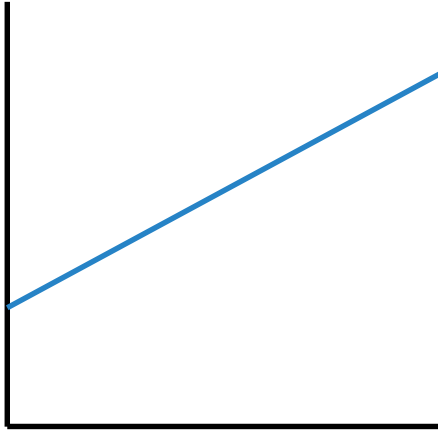
- 2, 3, 4, ...

Mód

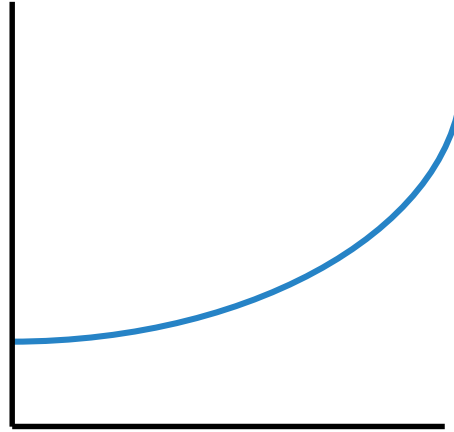
- RP, NARP, Ion pair, pH, IS, IEX, NP, HILIC

TYPY GRADIENTŮ

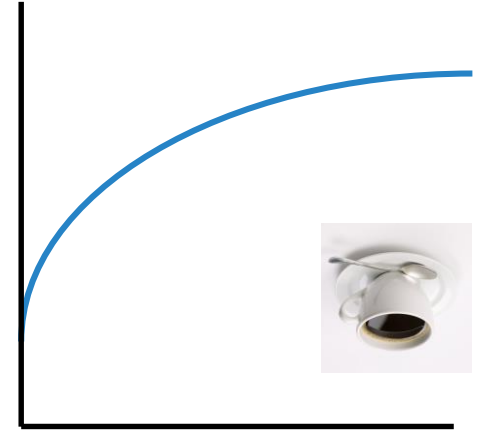
Lineární



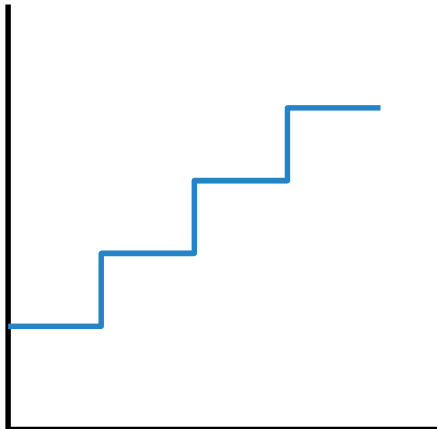
Konvexní



Konkávni



Krokové



Složky

- 2, 3, 4, ...

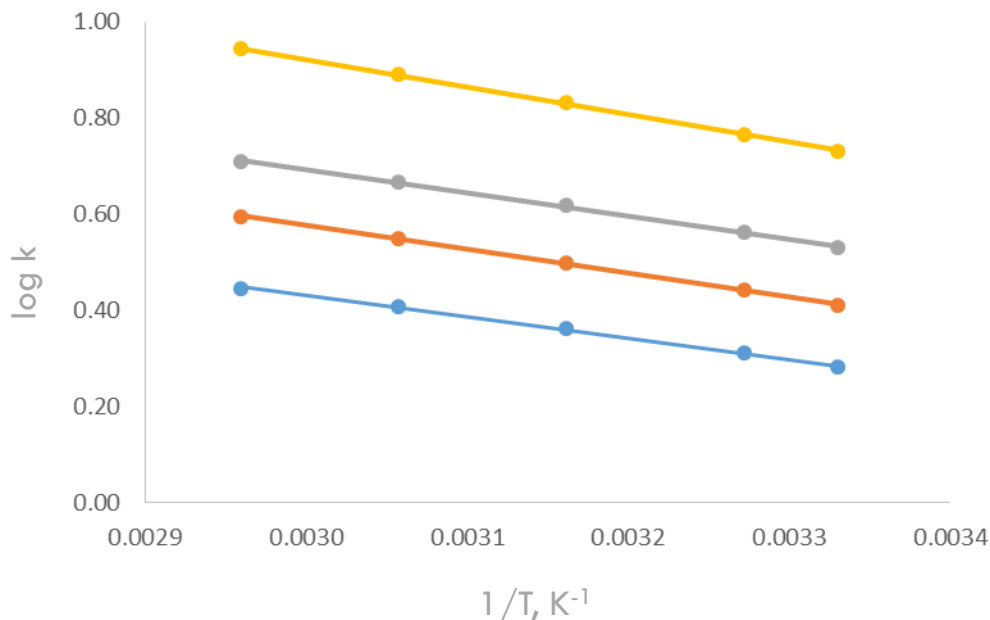
Mód

- RP, NARP, Ion pair, pH, IS, IEX, NP, HILIC

GRADIENTY TEPLoty

van't Hoffova rovnice

$$\log k = A + \frac{B}{T}$$



Menší citlivost na změnu

- ΔT 4 – 5°C ~ $\Delta\phi$ 1 % ACN

Tepelná stabilita kolon (60°C)

- bidentátové kolony, ZrO₂ (100°C)

Pomalejší odezva

- nanoLC a μ LC

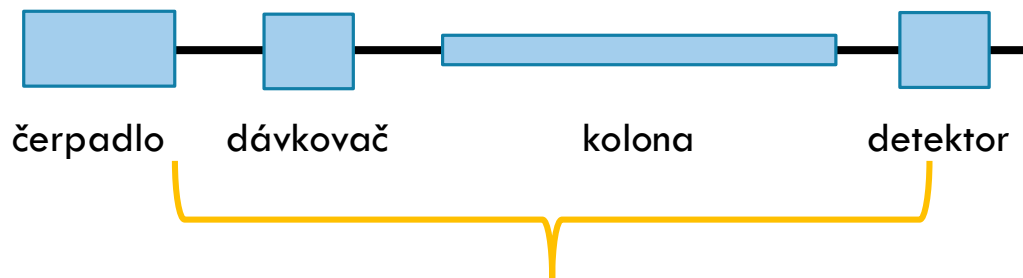
Instrumentace

- Peltierův termostat

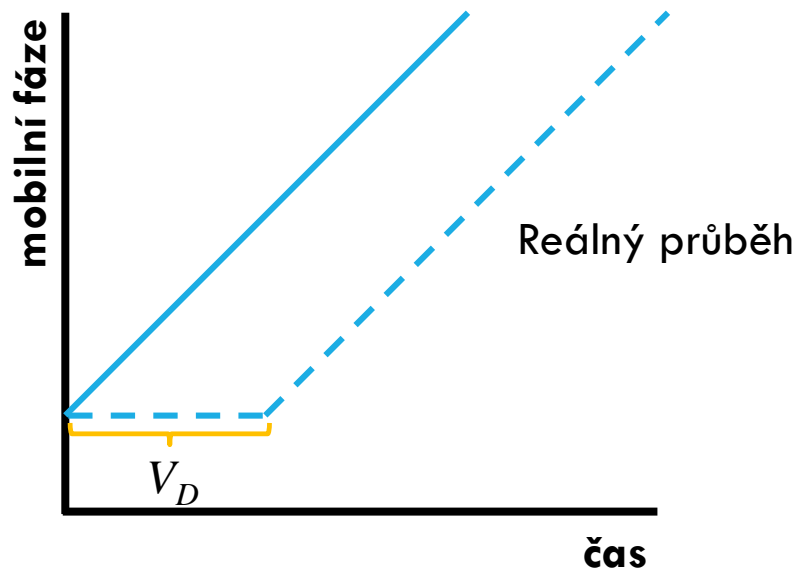
Spíš doplňkově
nebo ve specifických případech

ZPOŽDĚNÍ GRADIENTU

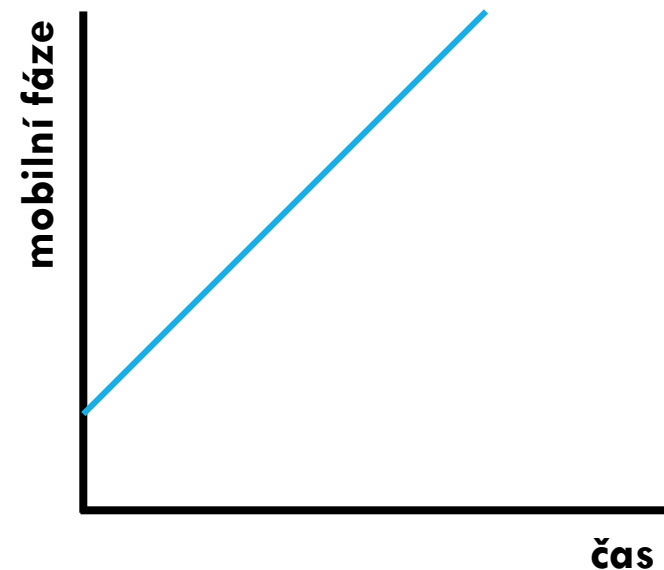
V_D



Zpoždění gradientu
(objem mobilní fáze)



Teoretický průběh

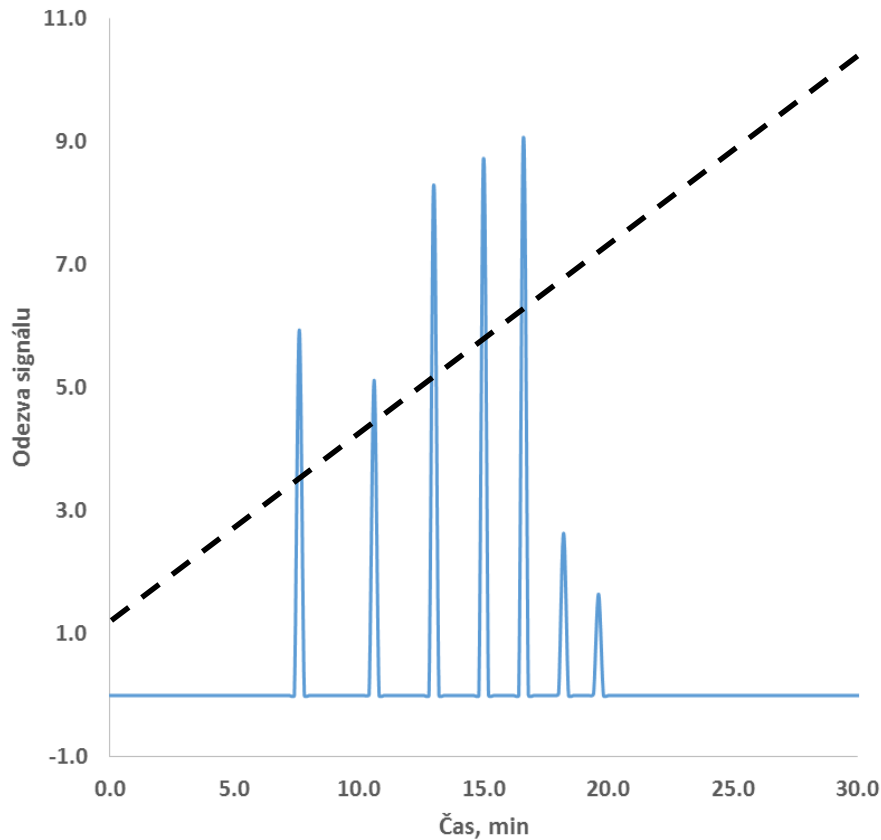


- 1% aceton jako mobilní fáze B
- Silně ovlivněno instrumentací
- Nutno zahrnout do optimalizace

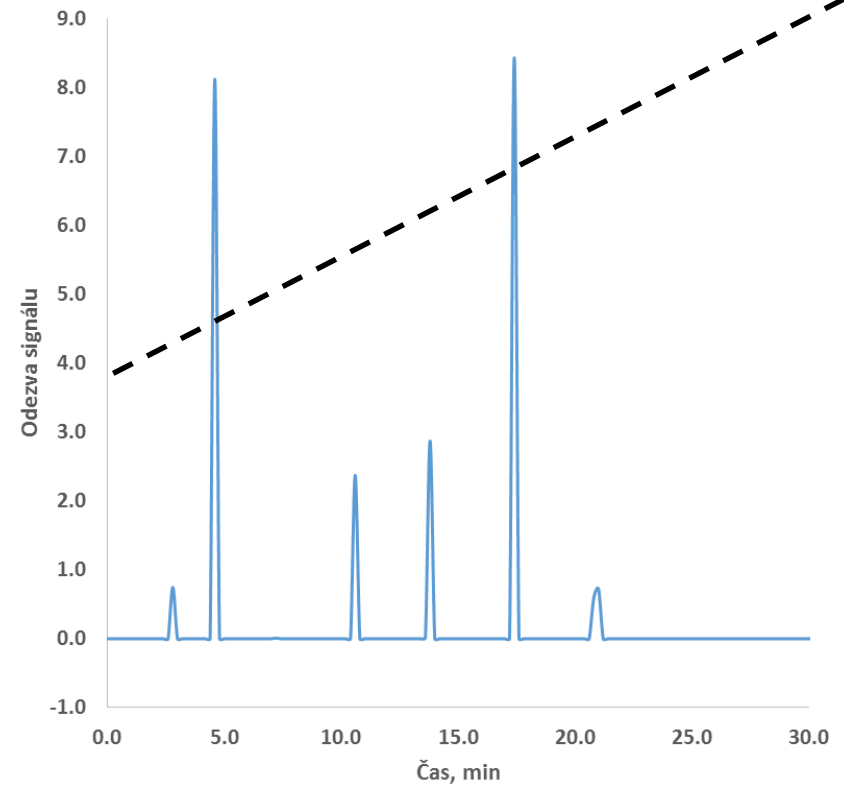
POČÁTEČNÍ KONCENTRACE

A

5 – 80 % za 30 minut



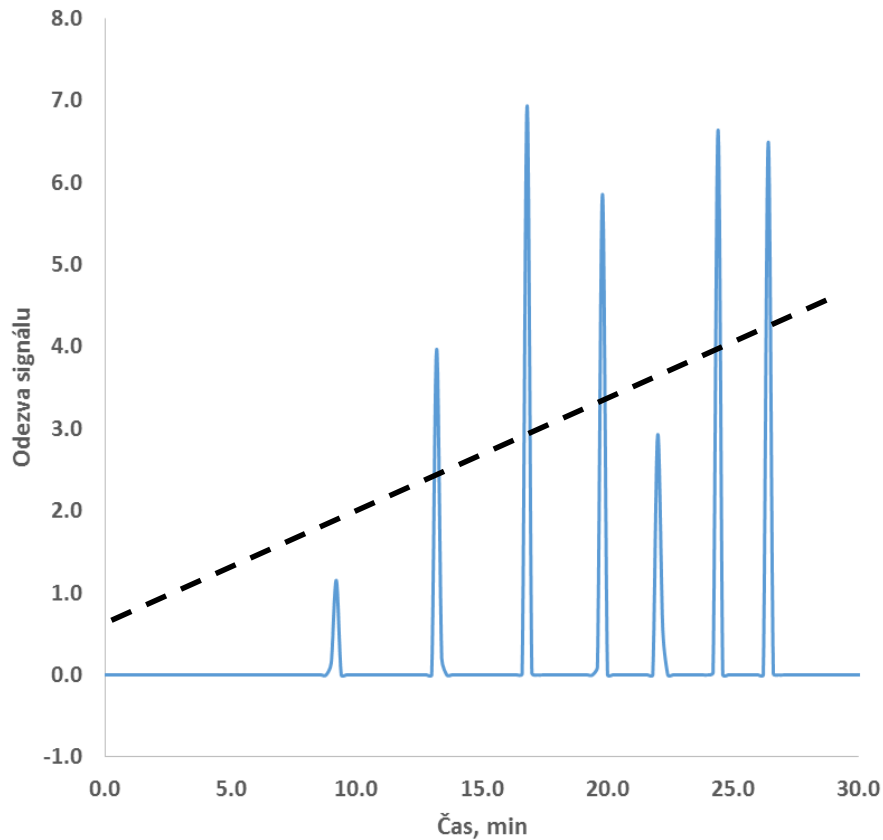
25 – 80 za 30 min



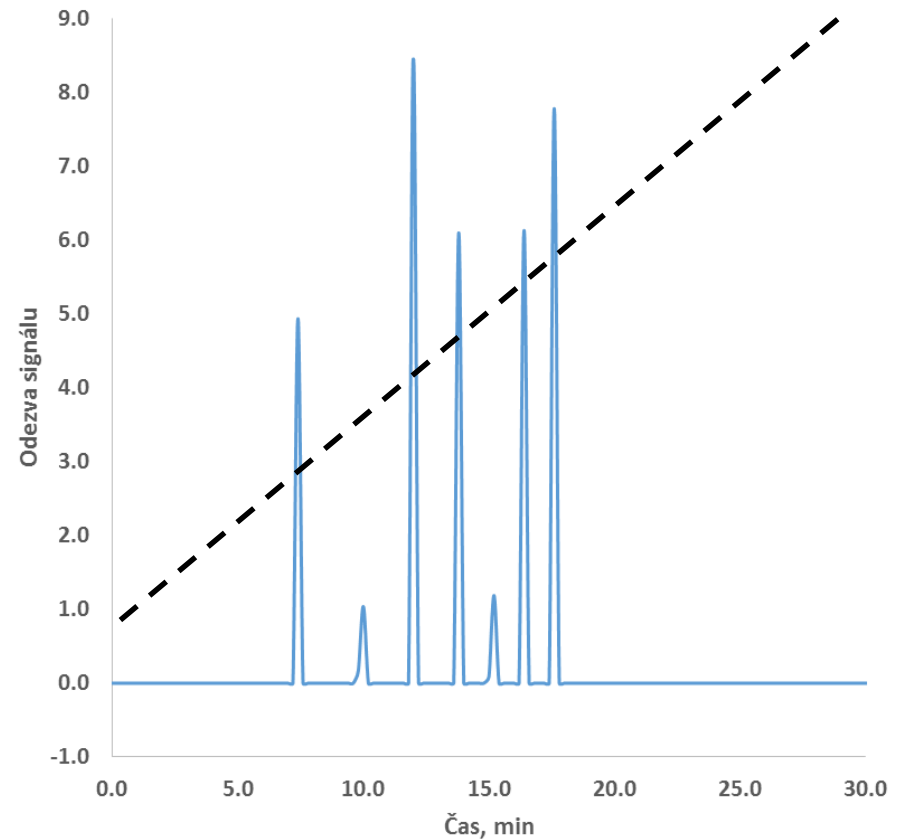
Čím vyšší, tím rychlejší eluce málo zadržovaných látek

KONCOVÁ KONCENTRACE

5 – 60 % za 30 minut



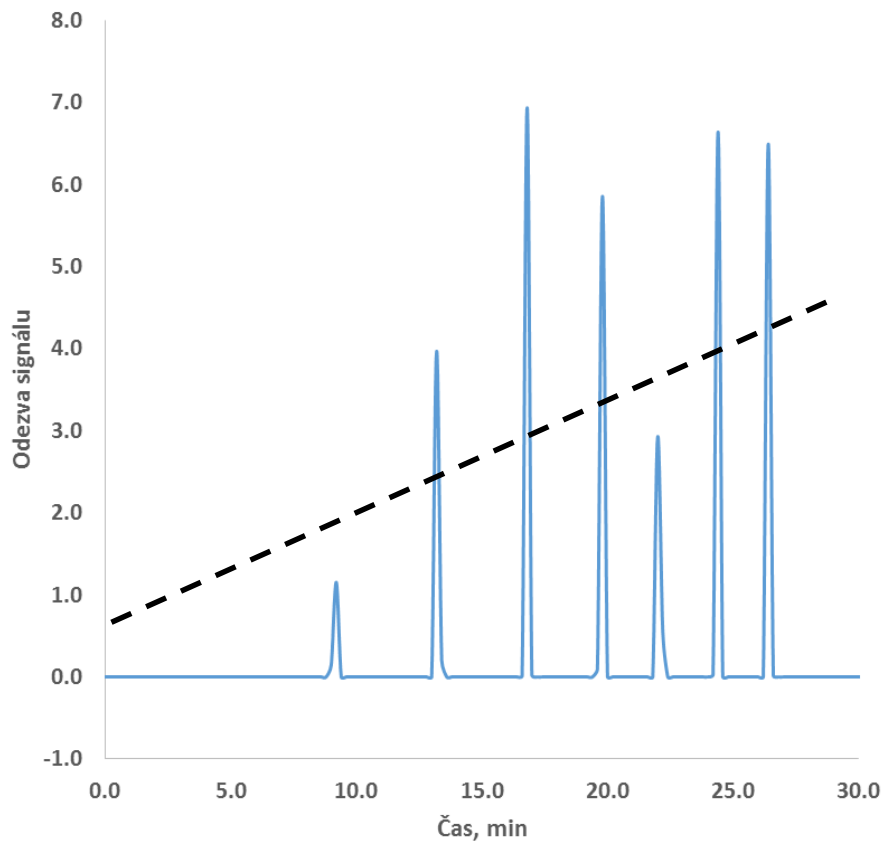
5 – 90 za 30 min



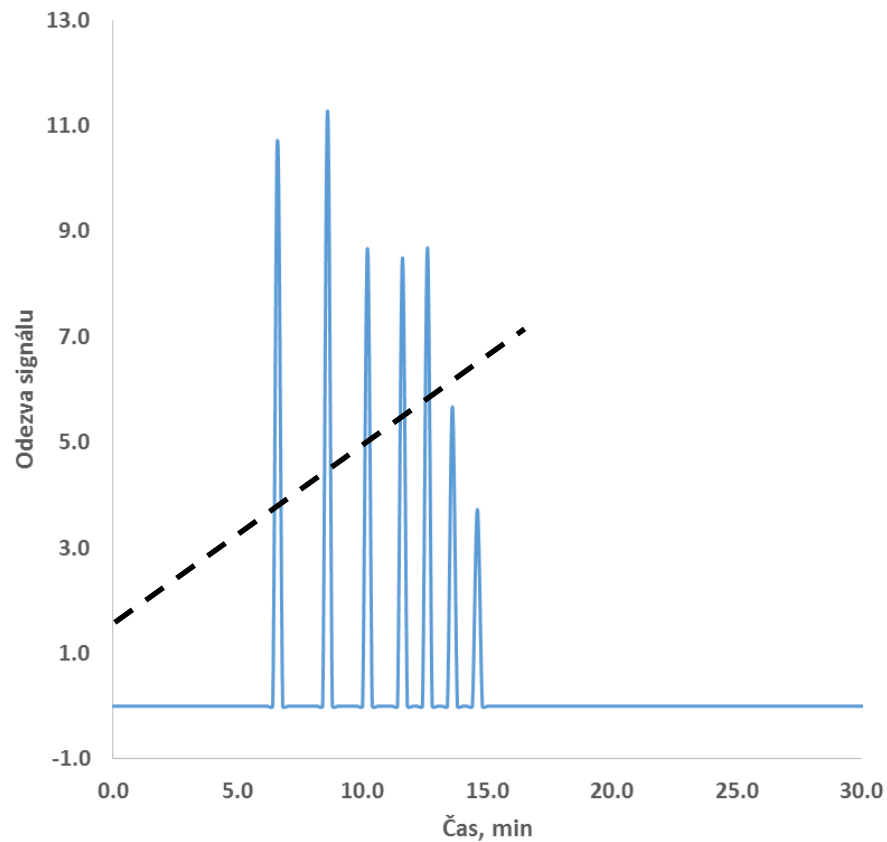
Čím vyšší, tím rychlejší eluce více zadržovaných látek

ČAS GRADIENTU

5 – 60 % za 30 minut



5 – 60 % za 15 min



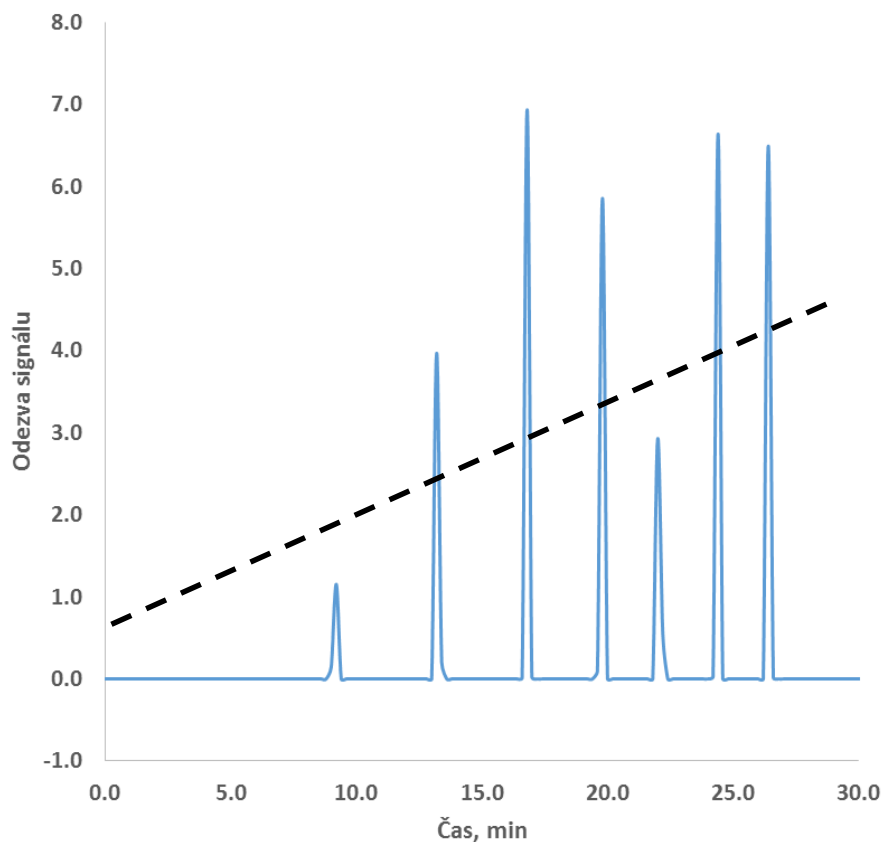
Čím vyšší, tím rychlejší eluce látek

STRMOST GRADIENTU

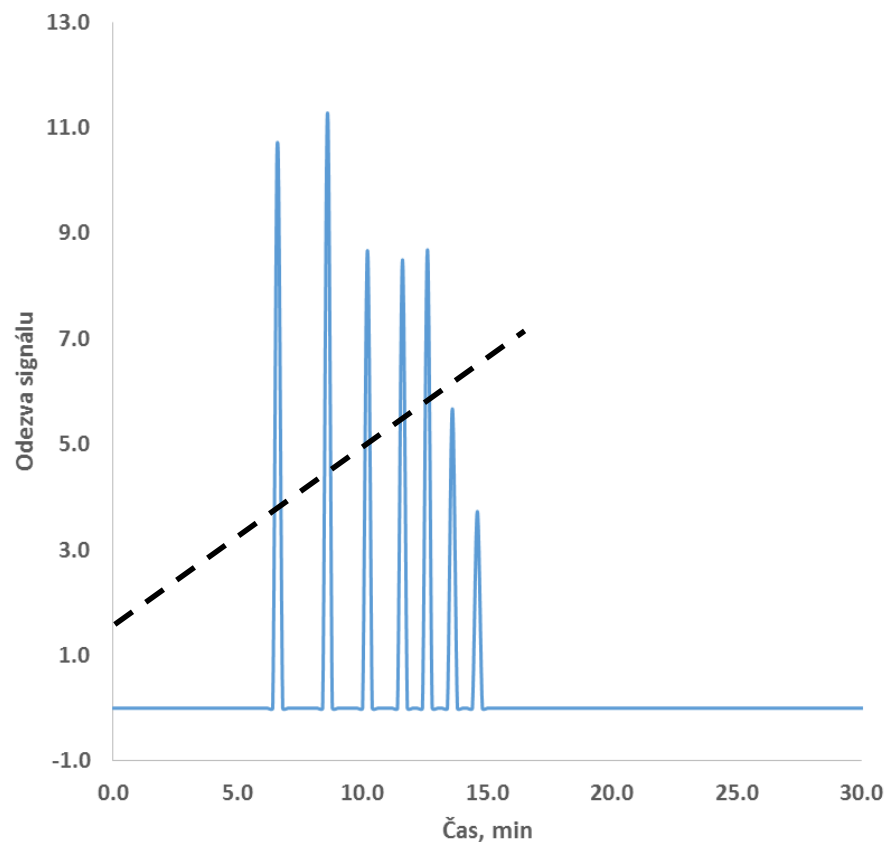
$$B = \frac{\varphi_K - A}{t_G}$$

B

5 – 60 % za 30 minut



5 – 60 % za 15 min



Čím vyšší, tím rychlejší eluce látek

RETENČNÍ FAKTOR, ŠÍŘKA PÍKU A ROZLIŠENÍ

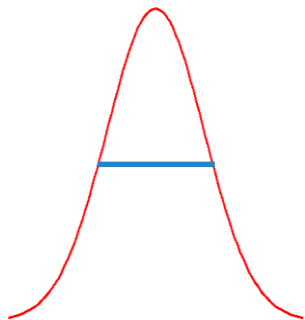


Eluční faktor v polovině kolony

$$k^* = \frac{1}{1.15B + \left(\frac{1}{a}\right)}$$

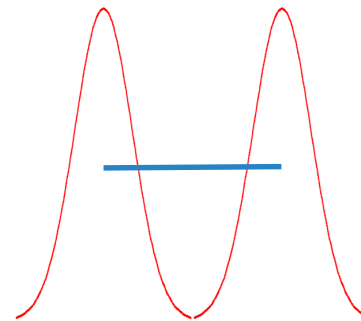
Eluční faktor v době eluce

$$k_e = \left[2.31m \frac{\Delta\varphi}{V_G} V_M + 10^{(mA-a)} \right]^{-1}$$



Šířka píku

$$w_g = \frac{4V_M(1 + k_e)}{\sqrt{N}}$$



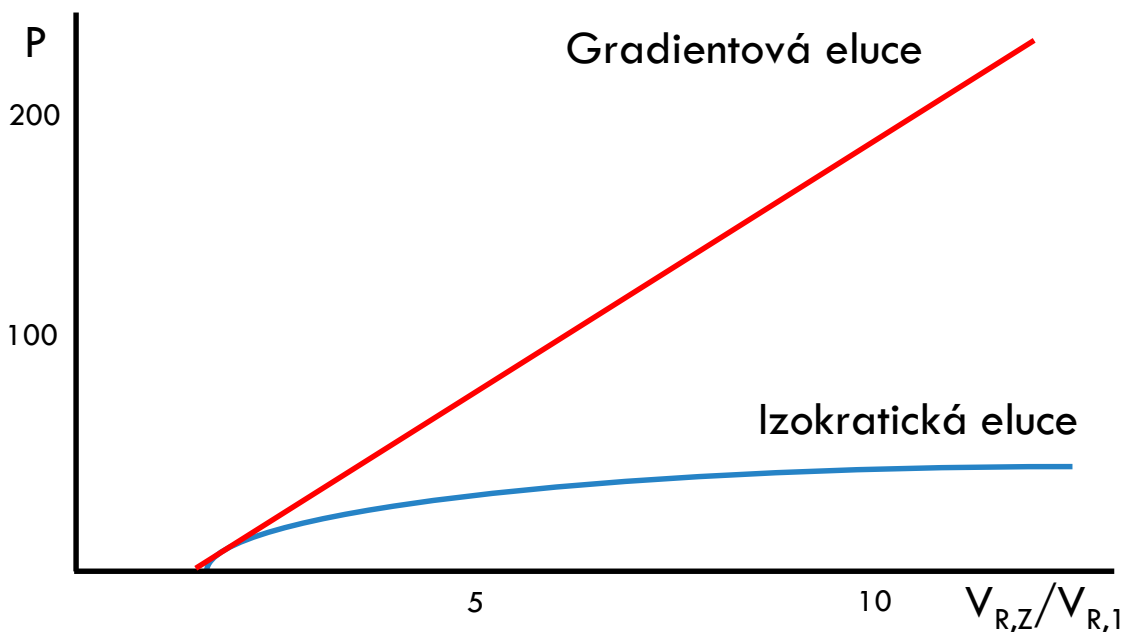
Rozlišení píků

$$R_s = \frac{V_{R(2)} - V_{R(1)}}{w_g}$$

Předpoklad konstantní šířky píku v gradientové eluci

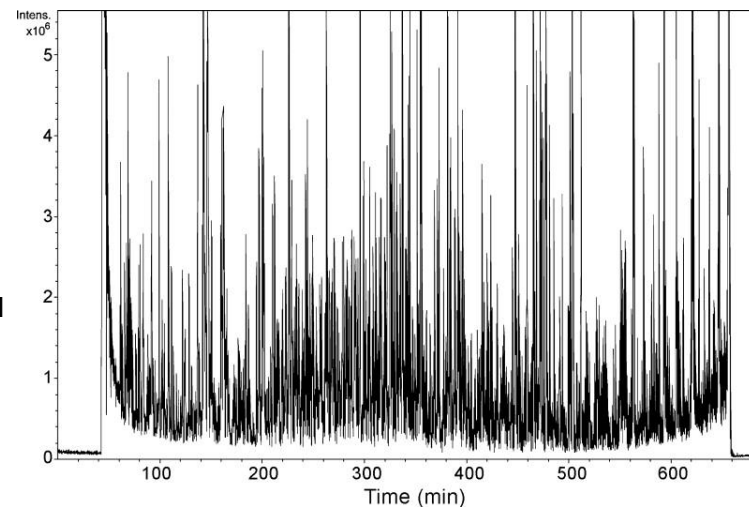
PÍKOVÁ KAPACITA

Maximální počet píků, které lze rozdělit v rámci jedné analýzy



$$P = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{t_{R,Z}}{t_{R,1}} - 1 \right) + 1$$

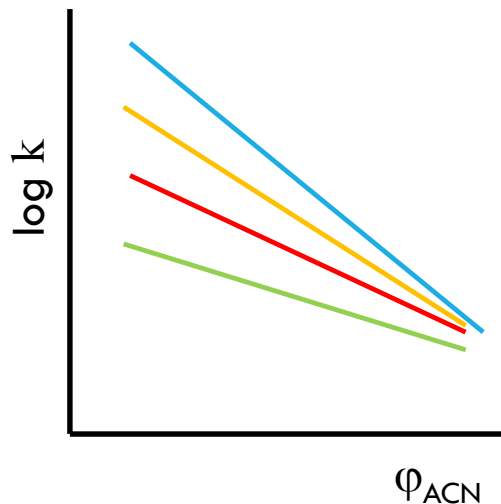
$$P = 1 + \frac{t_G - t_m}{w_g} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{t_G}{t_m} - 1 \right) \frac{1}{(1 + k_e)}$$



$$P = 1 + \sqrt{\frac{N}{4}} \frac{t_G}{t_m} \frac{1}{1 + [10^{(mA-a)} + 2.31m(\Delta\varphi/t_G)V_m]^{-1}}$$

RETENCE V GRADIENTOVÉ ELUCI

Retence vs. složení mobilní fáze



$$\log k = \log k_0 - m \cdot \varphi = a - m \cdot \varphi$$

Retenční faktor
v čisté vodě

Koncentrace
(acetonitrilu)

Konstanta odpovídající
síle mobilní fáze

$$\log k = a - S\varphi$$

Llyod R. Snyder

Teorie lineární síly rozpouštědla (Linear Solvent Strength theory, LSS)

Směrnice gradientu

$$b_s = \frac{t_0 S \Delta \varphi}{t_G} = \frac{V_m S \Delta \varphi}{t_G F_m}$$

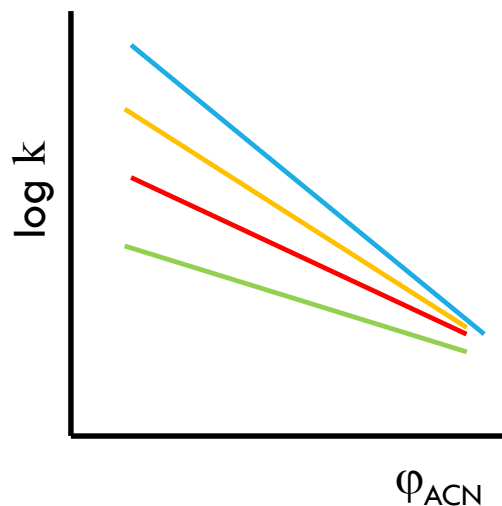
Eluční faktor v polovině kolony
ekvivalent k

$$k^* = \frac{1}{1.15 b_s} = \frac{t_G}{1.15 t_0 S \Delta \varphi}$$

PREDIKCE RETENCE V GRADIENTOVÉ ELUCI

Retence vs. složení mobilní fáze

Pavel Jandera



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

lineární
regrese

Konstanty a a m

Několik gradientů (6)

nelineární
regrese

Reverzní fáze

$$V_R = \frac{1}{m \cdot B} \log \{ 2.31 m B [V_M 10^{(a-mA)} - V_D] + 1 \} + V_M + V_D$$

PREDIKCE RETENCE V GRADIENTOVÉ ELUCI

Normální fáze

- Nižší viskozita mobilní fáze (nižší tlak)
- Chemicky vázané stacionární fáze jsou stabilnější v čisté organice
- Lepší rozpustnost látek v organické mobilní fázi
- Analýza vysoce hydrofobních látek (neúměrně zadržovaných v RP systému)
- Separace pozičních izomerů a stereoizomerů
- Bezproblémová extrakce do nepolárních rozpouštědel (problém v RP)
- Separace syntetických polymerů nerozpustných ve vodě

$$k = k_0 \varphi^{-m} \quad V_R = \frac{1}{B} [(m+1)B(k_0 V_m - V_D A^m) + A^{(m+1)}]^{1/(m+1)} - \frac{A}{B} + V_m + V_D$$

Chromatografie iontové výměny

Separace malých anorganických iontů nebo oligonukleotidů, nukleových kyselin, peptidů a proteinů.

φ odpovídá molární koncentraci elektrolytu v mobilní fázi a parametr m stechiometrickému koeficientu výměny.

Stacionární fáze

silikagel, polární skupiny

Mobilní fáze

A: hexane, heptan

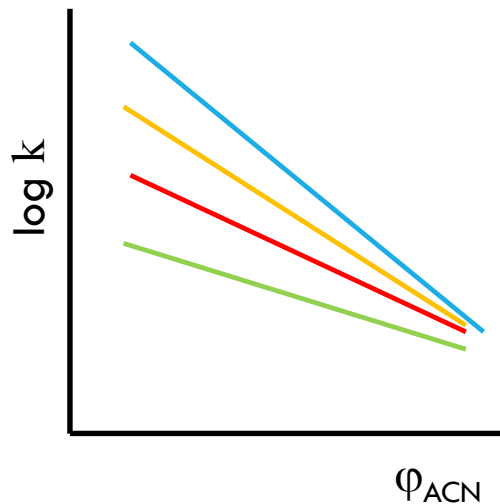
B: dichlormethan, metyl tert-butyl ether, alkoholy, estery, nitrily

$$k_e = k_0 \left[(m+1) \frac{\Delta\varphi}{V_G} V_m k_0 + 10^{(m+1)} \right]^{-(m/m+1)}$$

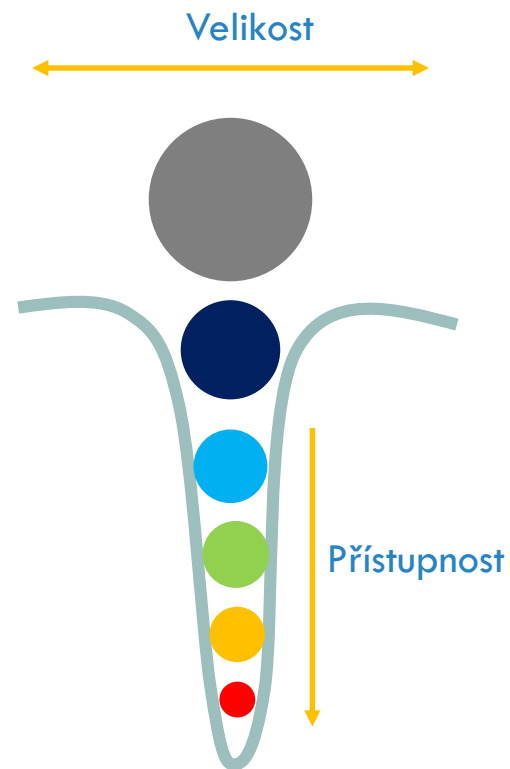
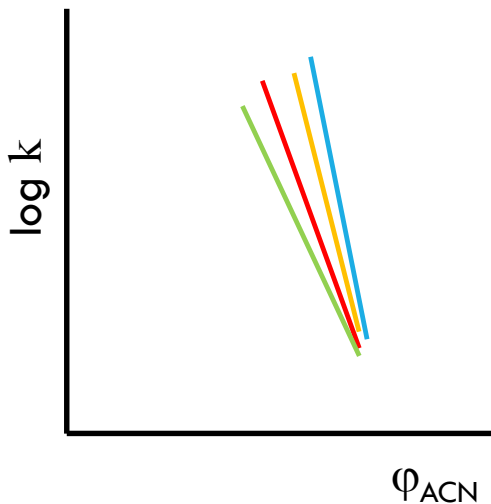
Formálně podobné NP systému

VYSOKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY

Malé molekuly



Vysokomolekulární látky



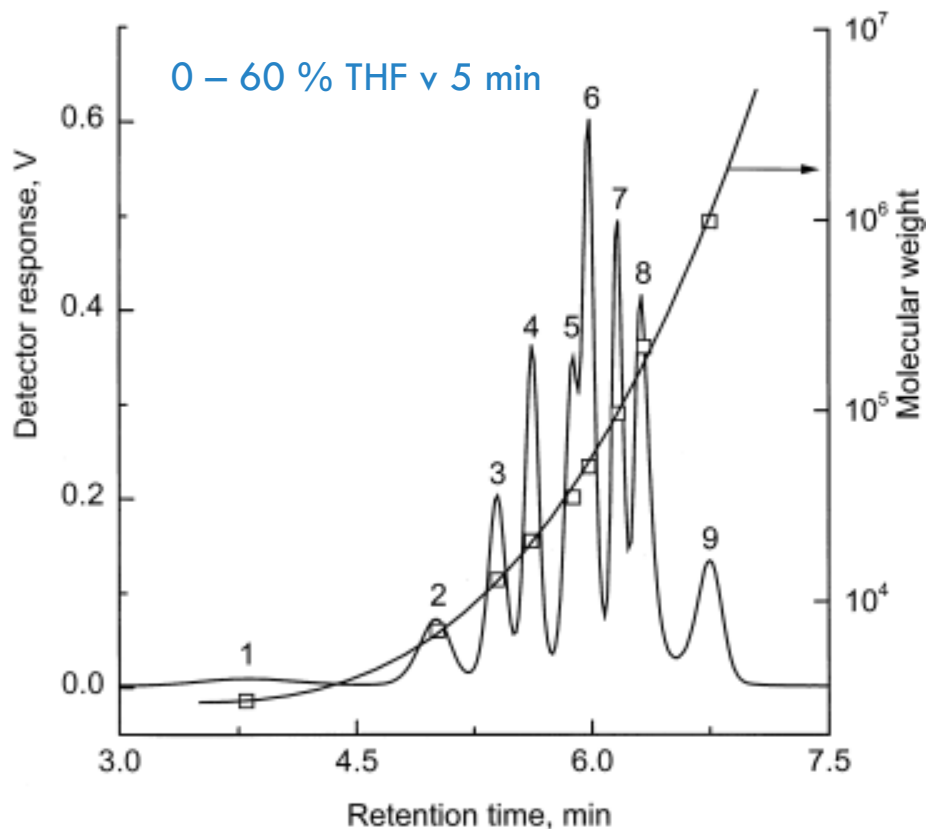
- Pomalá difúze
- On/off efekt
- Nižší dynamický rozsah eluce
- Gradientová eluce

$$m = 0.48M^{0.44}$$

$$V_R = \frac{1}{m \cdot B} \log \{ 2.31mB [V_M 10^{(a-mA)} - V_D] + 1 \} + V_M + V_D$$

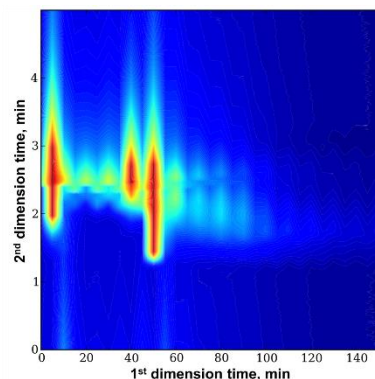
VYSOKOMOLEKULÁRNÍ LÁTKY

„Srážecí-rozpouštěcí“ chromatografie (GPEC)



Nadávkování směsi polymerů do „srážecí“ mobilní fáze (metanol). Postupné zvyšování koncentrace „rozpouštěcí“ mobilní fáze (THF). Eluce podle rozpustnosti/molární hmotnosti.

Lze použít k určení parametrů velikosti a distribuce polymerů.



GPEC eluce v první dimenzi separace polymerů.

VÝVOJ METODY GRADIENTOVÉ ELUCE

Matematická optimalizace více parametrů

(pozor na lokální maxima a minima!)

Jednoparametrová optimalizace

- Několik iniciačních analýz (větší rozsah koncentrací a časů)
- Získání konstant a, m
- Vhodné kritérium optimalizace (Rozlišení, R_S) a jeho závislost na vybraném parametru (strmost gradientu, počáteční koncentrace, ...)
- Nalezení optimálních podmínek

Dvouparametrová optimalizace

- Synergický efekt (t_G, T nebo t_G, A)
- Hledání optimálních podmínek

$$B = \frac{\varphi_K - A}{t_G}$$

$$V_R = \frac{1}{m \cdot B} \log\{2.31mB[V_M 10^{(a-mA)} - V_D] + 1\} + V_M + V_D$$



Zdeněk Uhlíř

VÝVOJ METODY GRADIENTOVÉ ELUCE

Matematická optimalizace více parametrů

(pozor na lokální maxima a minima!)

Jednoparametrová optimalizace

- Několik iniciačních analýz (větší rozsah koncentrací a časů)
- Získání konstant a, m
- Vhodné kritérium optimalizace (Rozlišení, R_S) a jeho závislost na vybraném parametru (strmost gradientu, počáteční koncentrace, ...)
- Nalezení optimálních podmínek

Dvouparametrová optimalizace

- Synergický efekt (t_G, T nebo t_G, A)
- Hledání optimálních podmínek

$$B = \frac{\varphi_K - A}{t_G}$$

$$V_R = \frac{1}{m \cdot B} \log \{ 2.31 m B [V_M 10^{(a-mA)} - V_D] + 1 \} + V_M + V_D$$



Zdeněk Uhlíř



www.pametnik.cz

PŘEVOD METODY

Základní předpoklad

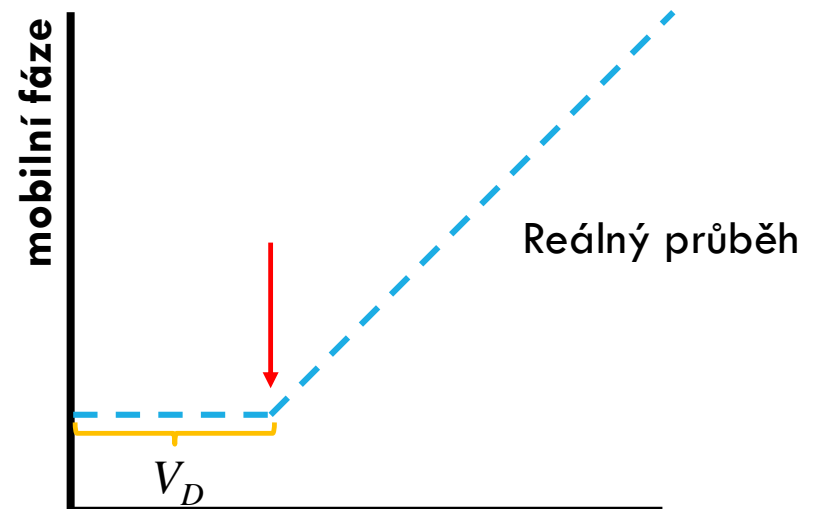
$$\frac{V_M}{V_G} = \frac{V_M}{t_G F_m} = \frac{d_c^2 L}{t_G F_m} = \textit{konstanta}$$

Průměr
a délka kolony

Pozor na zpoždění gradientu

- Použít „dlouhé“ rovnice
- Dávkovat do „začátku“ gradientu (ne každý systém to dovoluje)

Složitější optimalizace než v izokratické eluci



PŘEVOD METODY

System 1



$$\frac{V_M}{V_G} = \frac{V_M}{t_G F_m} = \frac{d_c^2 L}{t_G F_m} = \textit{konstanta}$$

System 2



- L – délka kolony
 d_c – průměr kolony
 d_p – velikost částic
 V_i – dávkovaný objem
 F – Průtok mobilní fáze
 p – Pracovní tlak
 N – účinnost
 t_g – čas (v) gradientu

PŘEVOD METODY

System 1



Průtok mobilní fáze

$$F_2 = F_1 \cdot \left(\frac{d_c^{(2)}}{d_c^{(1)}} \right) \cdot \left(\frac{d_p^{(1)}}{d_p^{(2)}} \right)$$

Profil gradientu

$$t_{g(2)} = t_{g(1)} \cdot \left(\frac{V_{M(2)}}{V_{M(1)}} \right) \cdot \left(\frac{F_1}{F_2} \right)$$

Pracovní tlak

$$p_2 = p_1 \cdot \left(\frac{L_2 \cdot F_2}{L_1 \cdot F_1} \right) \cdot \left(\frac{d_p^{(1)} \cdot d_c^{(1)}}{d_p^{(2)} \cdot d_c^{(2)}} \right)^2$$

Dávkovaný objem

$$V_{i(2)} = V_{i(1)} \cdot \left(\frac{d_c^{(2)} \cdot L_2}{d_c^{(1)} \cdot L_1} \right)$$

Účinnost

$$N_2 = N_1 \cdot \left(\frac{d_p^{(1)}}{d_p^{(2)}} \right) \cdot \left(\frac{L_2}{L_1} \right)$$

System 2





“The ignorance of the world often makes people believe that life should be black and white – that you must choose sides – and so the world of colorful gradients goes unadmired.”

A.J. Darkholme

Rise of the Morningstar