

“Když chemik neví, co s tím, tak to zahřeje.”

Neznámý autor

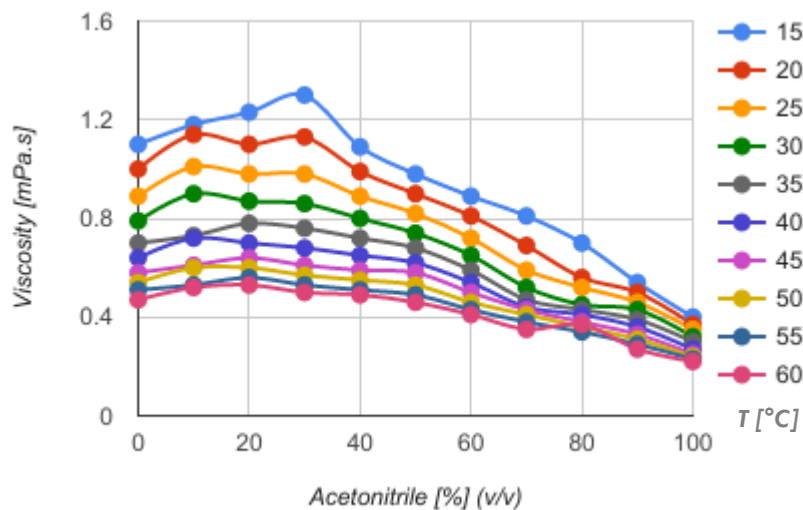
CHROMATOGRRAFIE PŘI VYSOKÝCH TEPLOTÁCH

Pokročilá kapalinová
chromatografie

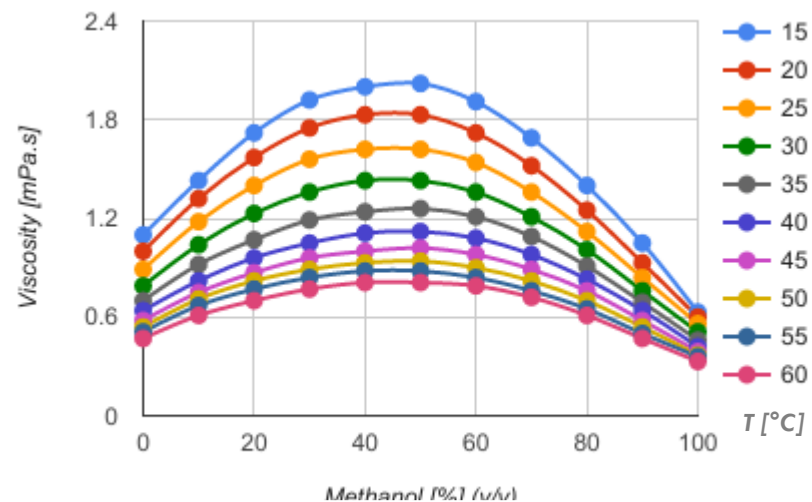


VISKOZITA MOBILNÍ FÁZE A PERMEABILITA

Acetonitril



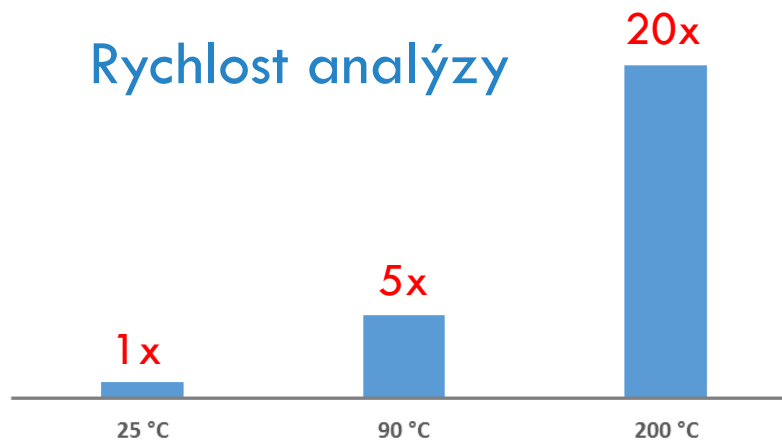
Metanol



$$\eta = 10^{a + \frac{b}{T+c}}$$

a, b, c – konstanty rozpouštědla
 T – teplota v K

Rychlost analýzy



ÚČINNOST

Difúzní koeficient

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

Wilke-Changova rovnice

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

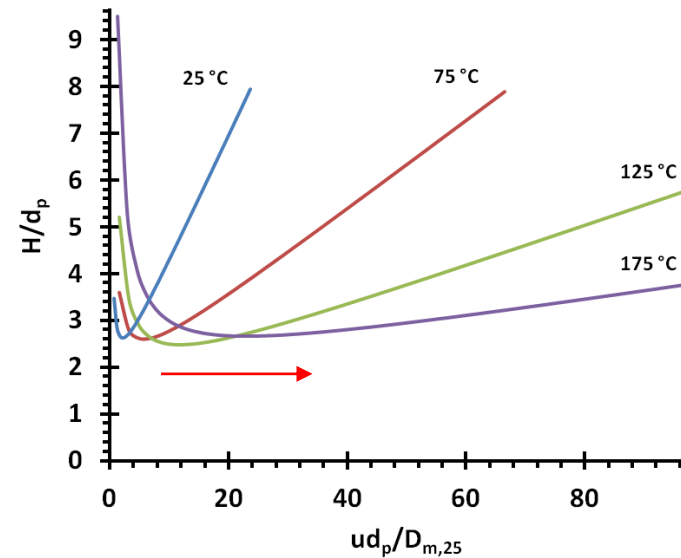
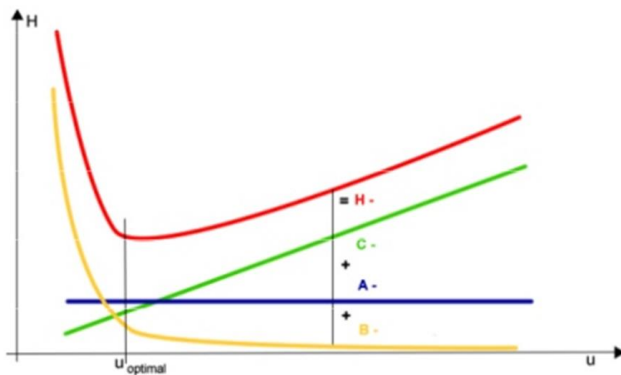
$$B \sim D_m \sim \frac{T}{\eta} \quad C \sim \frac{1}{D_m} \sim \frac{\eta}{T}$$

A – turbulentní difúze

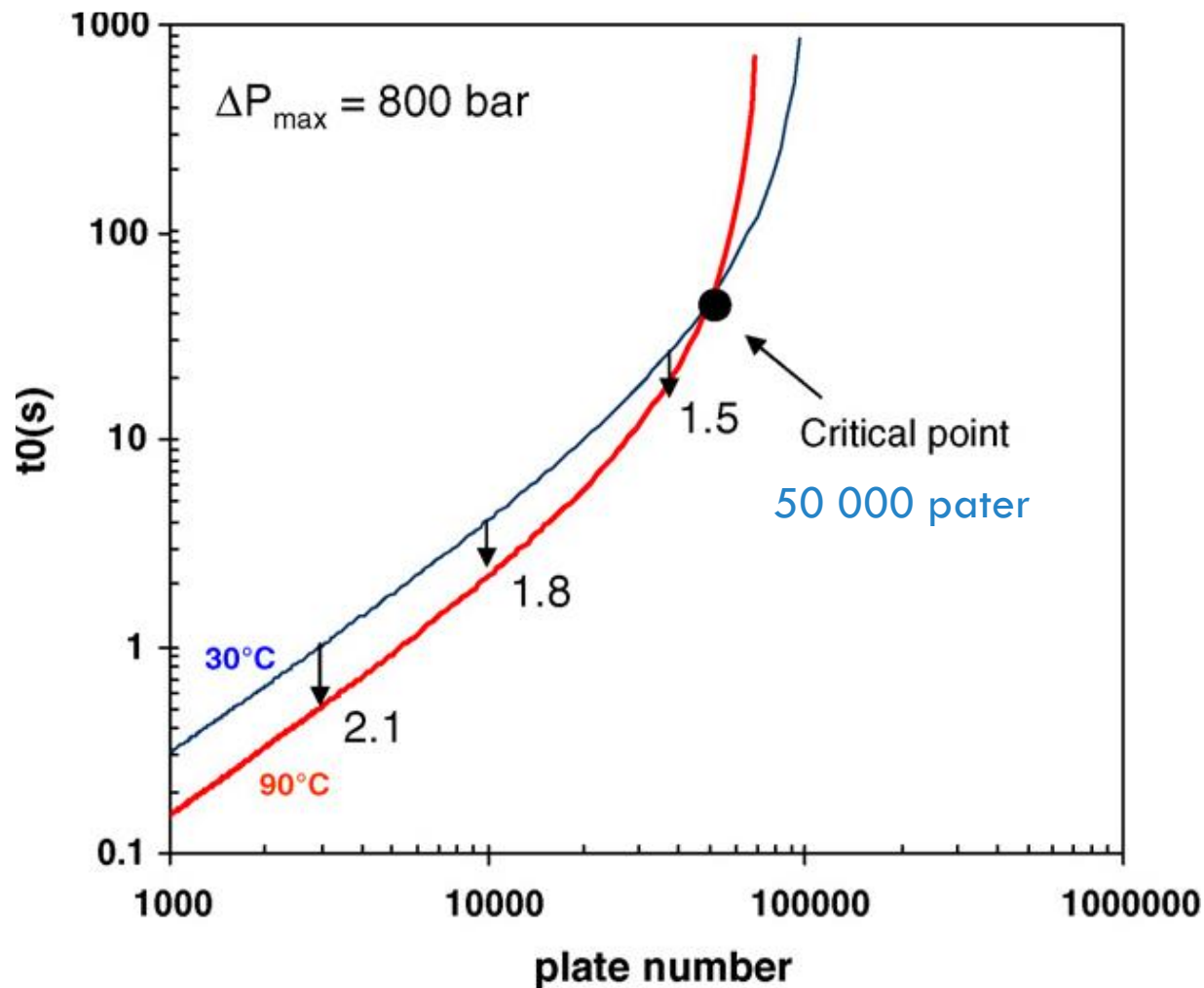
B – molekulová difúze

C – odpor proti převodu hmoty

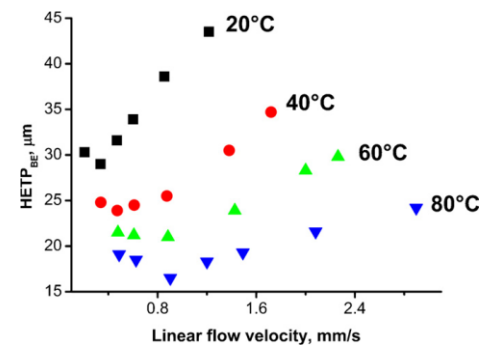
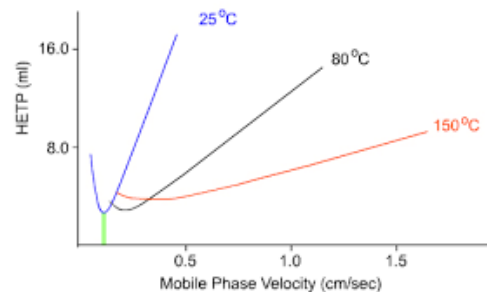
$$\uparrow T \sim \uparrow B \sim \downarrow C$$



VLIV TEPLoty NA ÚČINNOST



Pozor na vysokoúčinné
separace
a na experimentální
uspořádání



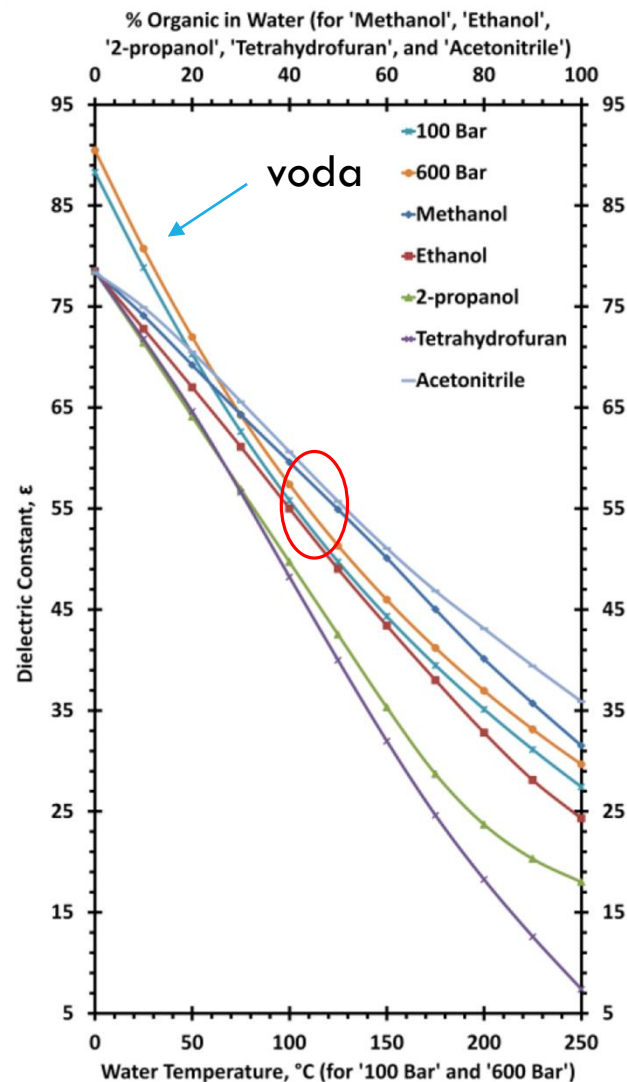
MĚNĚ ORGANICKÉ FÁZE („GREEN CHEMISTRY“)

Při vyšší teplotě dochází ke změně dielektrické konstanty vody, což ovlivňuje její polaritu a rozpustnost látek. Voda se stává víc „organickou“.

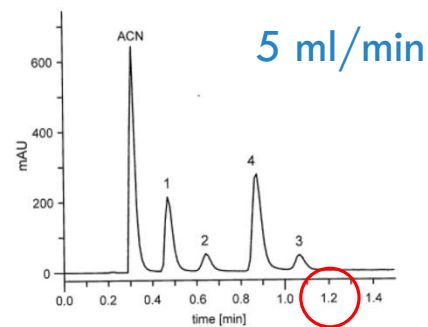
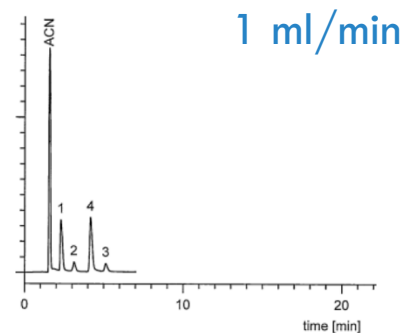
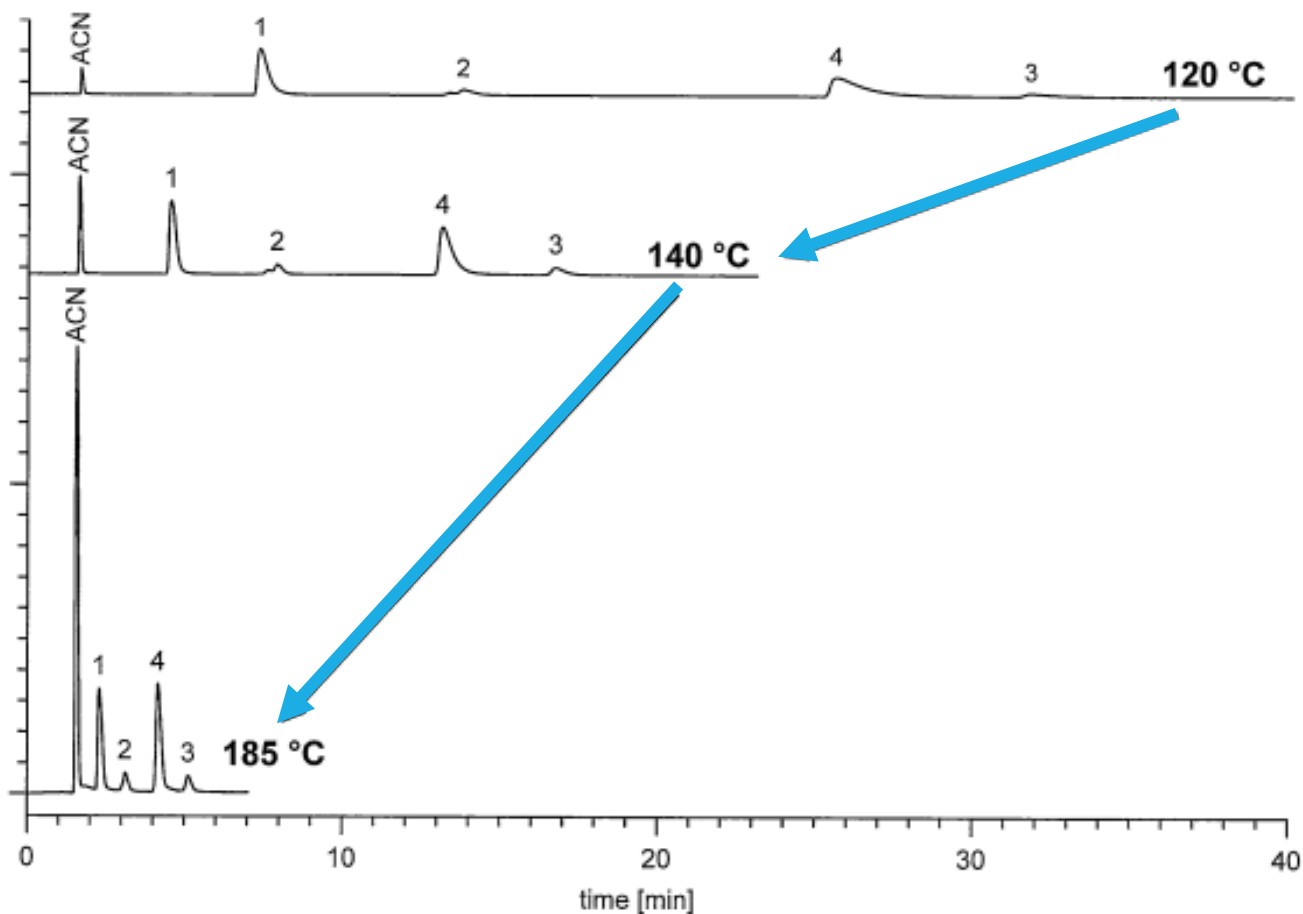
- ΔT 3.75 °C ~ $\Delta \varphi$ 1 % metanolu
- ΔT 5.00 °C ~ $\Delta \varphi$ 1 % acetonitrilu

60% metanol
=
100 % H₂O při 130 °C

Při teplotách nad 100 °C je nutné použít za detektorem restriktor (snížení bodu varu v koloně)

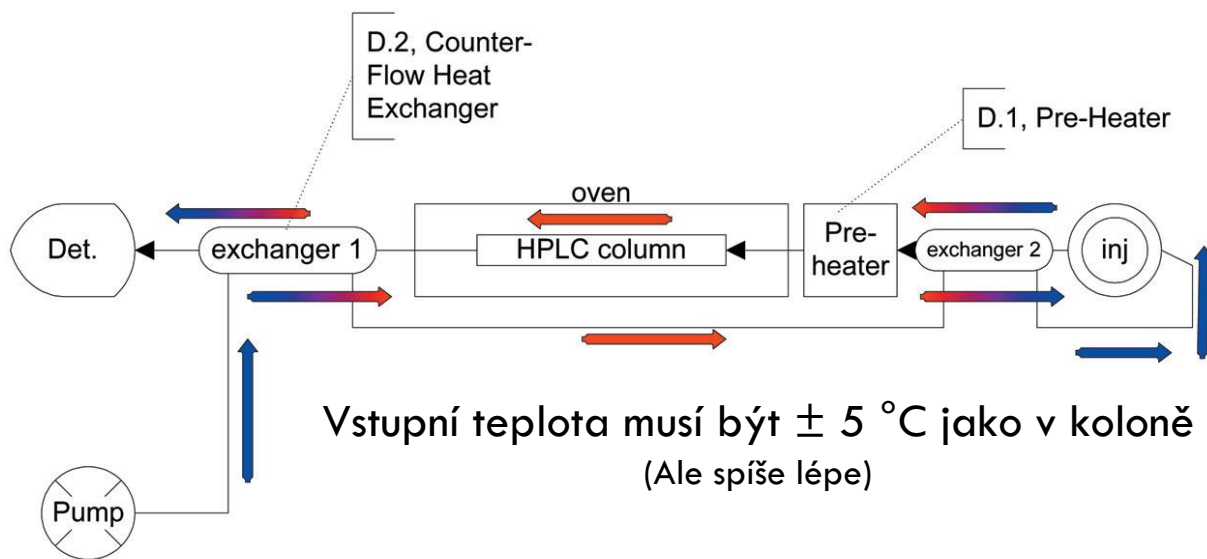
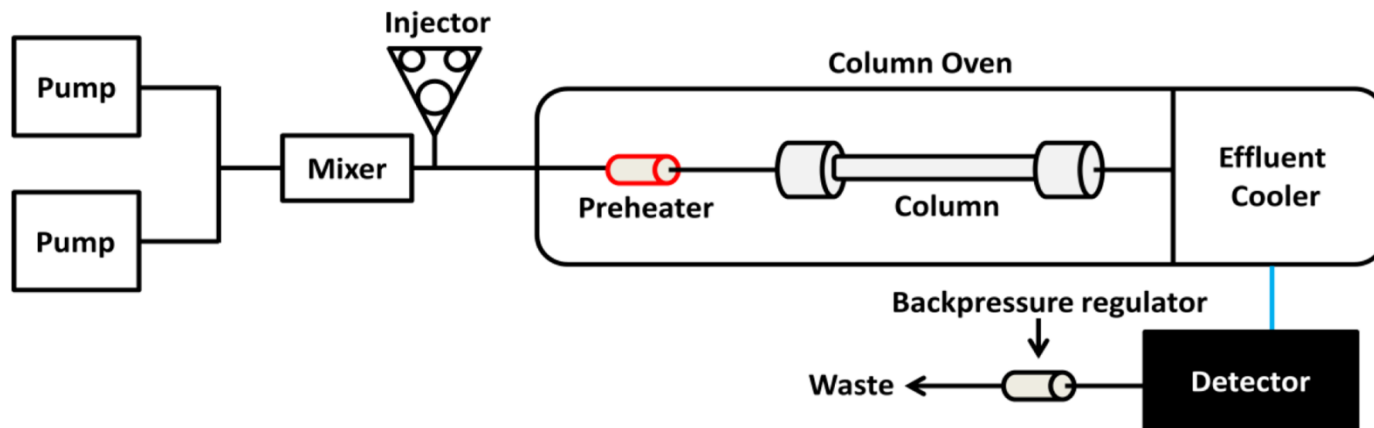


VLIV TEPLOTY NA SEPARACI



Steroidy na ZrO_2 částicích pokrytých polybutadienem. Mobilní fáze 100 % H_2O

INSTRUMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ

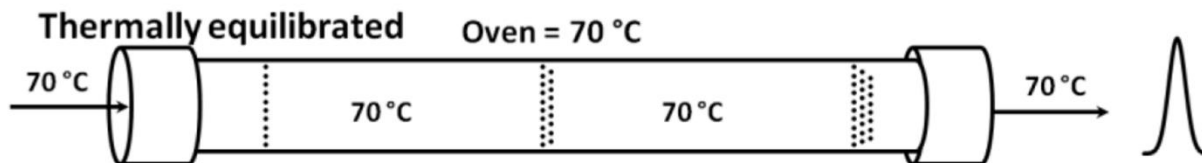


$$\ln \left(\frac{T_{in} - T_B}{T_{out} - T_B} \right) = \frac{2\pi L}{\dot{m}C_p R'_{th}}$$

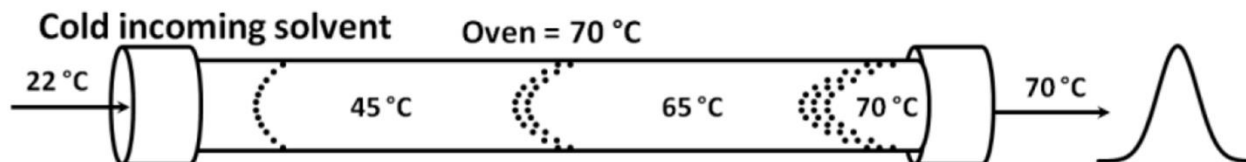
Pozor na „domácí“ instrumentaci

VLIV TEPLoty NA ÚČINNOST

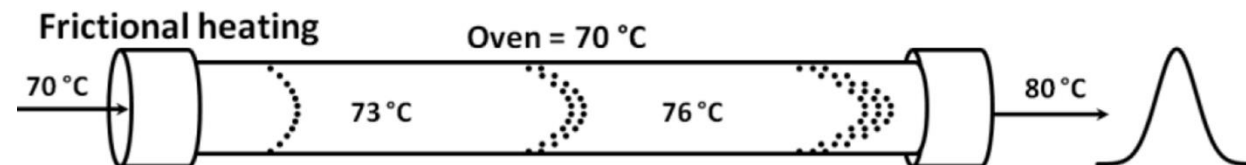
Ideální stav



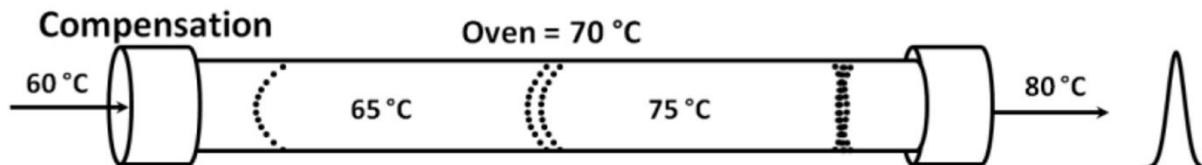
Studená mobilní fáze



Teplota tření

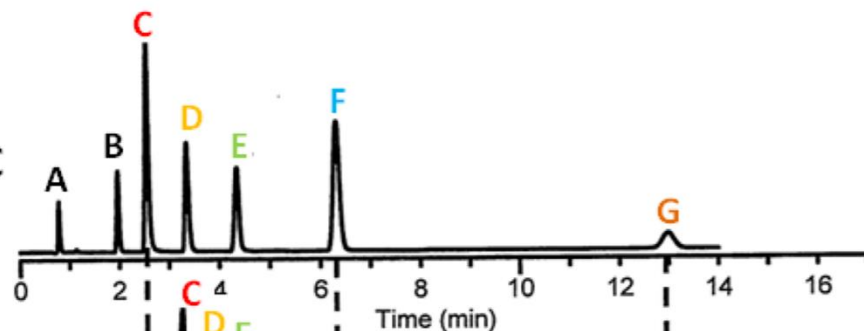


Kompenzace

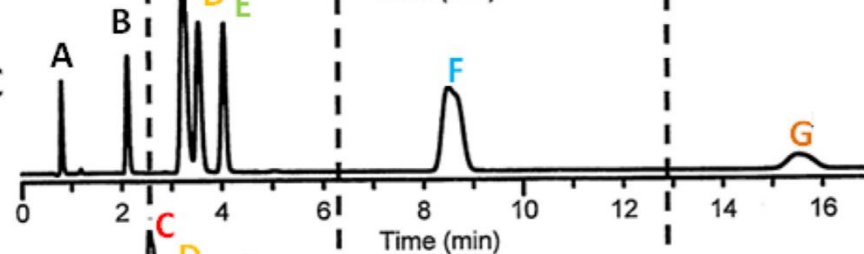


VLIV TEPLoty NA SEPARACI

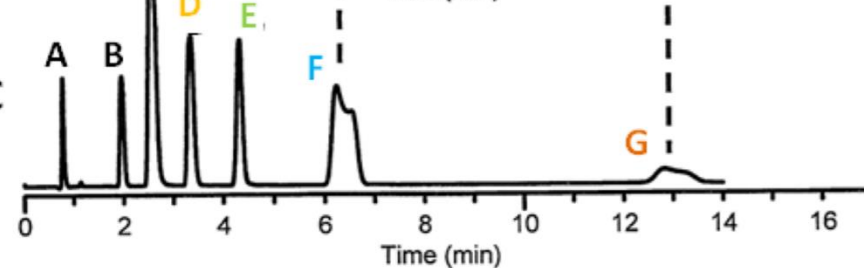
(a) Incoming mobile phase $T = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$
Oven $T = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$



(b) Incoming mobile phase $T = 39\text{ }^{\circ}\text{C}$
Oven $T = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$

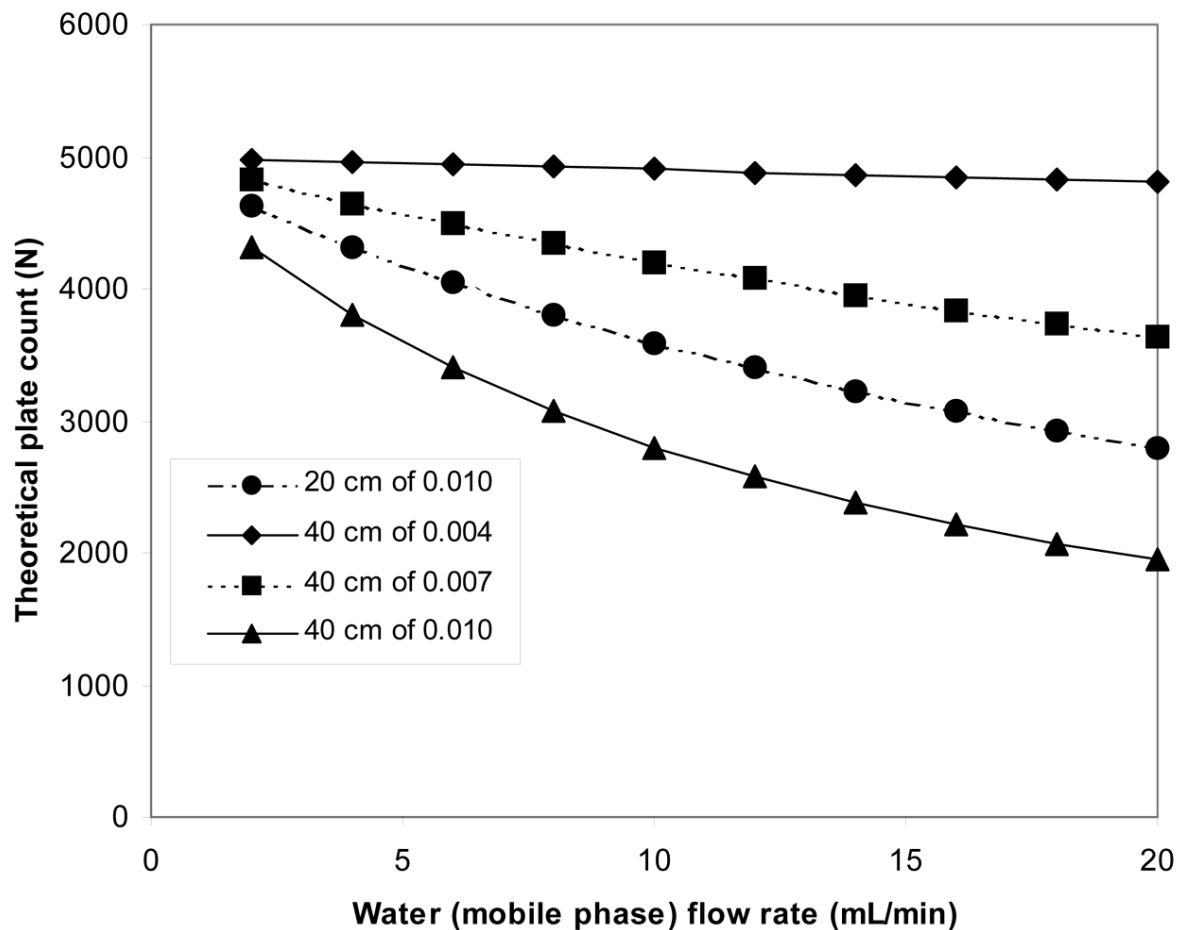


(c) Incoming mobile phase $T = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$
Oven $T = 77\text{ }^{\circ}\text{C}$

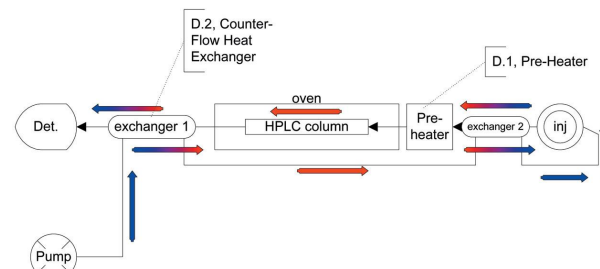


CHLAZENÍ MOBILNÍ FÁZE (DETEKCE)

Délka a průměr mimokolonových kapilár



Protiproudý chladič



$200 > 70-80 \text{ } ^\circ\text{C}$

Alternativně ledová lázeň

TERMODYNAMIKA RETENCE

Gibbsova volná energie



$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K$$

Distribuční koeficient



Standardní molární entalpie



$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$



převodu látky mezi
stacionární a mobilní fází

Standardní molární entropie

Gibbsova volná energie

Obecný popis pravděpodobnosti průběhu (chemické) reakce (ΔG^0)

- $-\Delta G^0$ – proběhne
- ΔG^0 – neproběhne

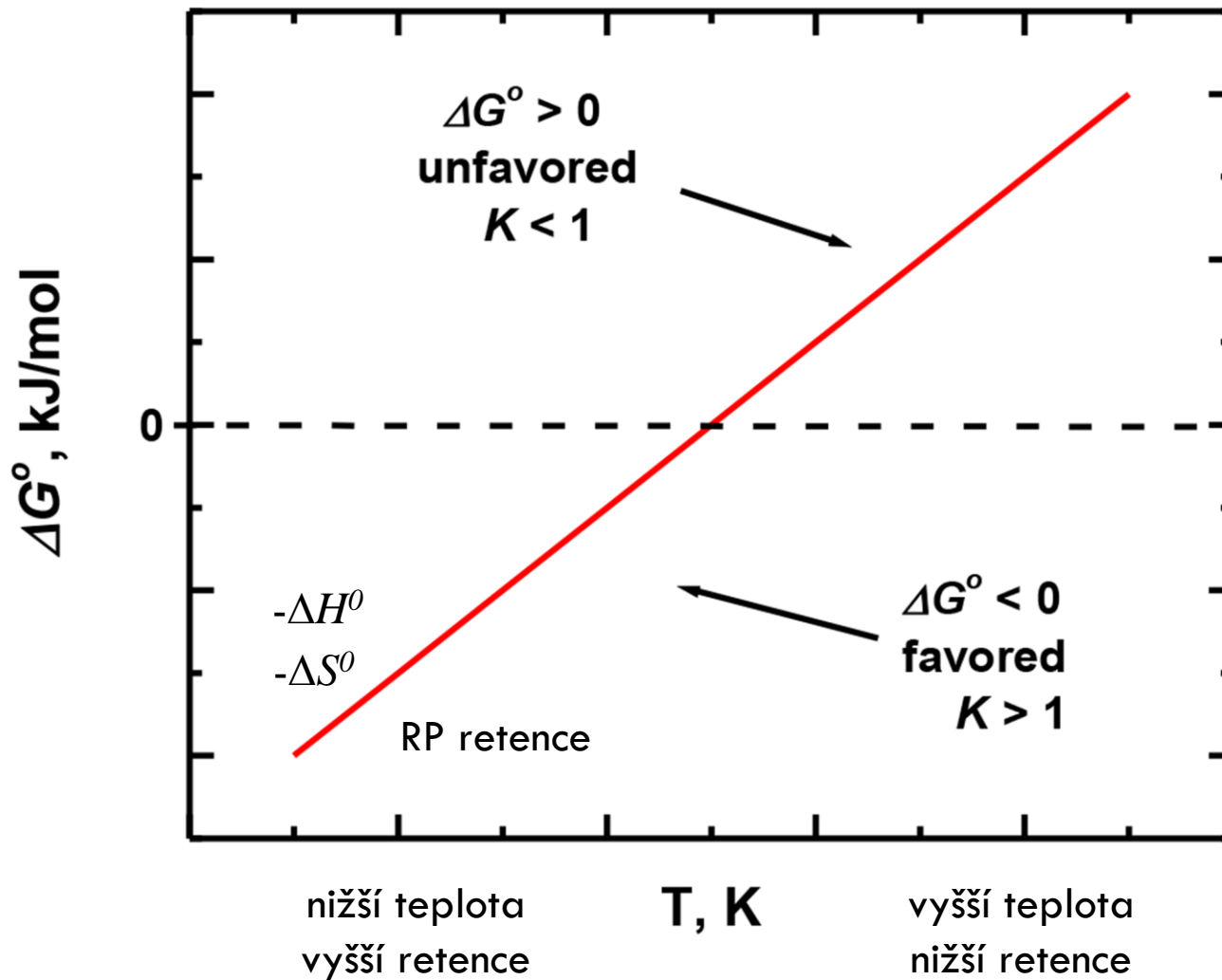
Entalpie

Změna energie při přestupu z mobilní do stacionární fáze. Odpovídá rozdílu interakcí mezi stacionární a mobilní fází. Přejed mobilní > stacionární fáze je preferován (retence), což odpovídá **záporným hodnotám entalpie**, $-\Delta H^0$, které upřednostňujeme.

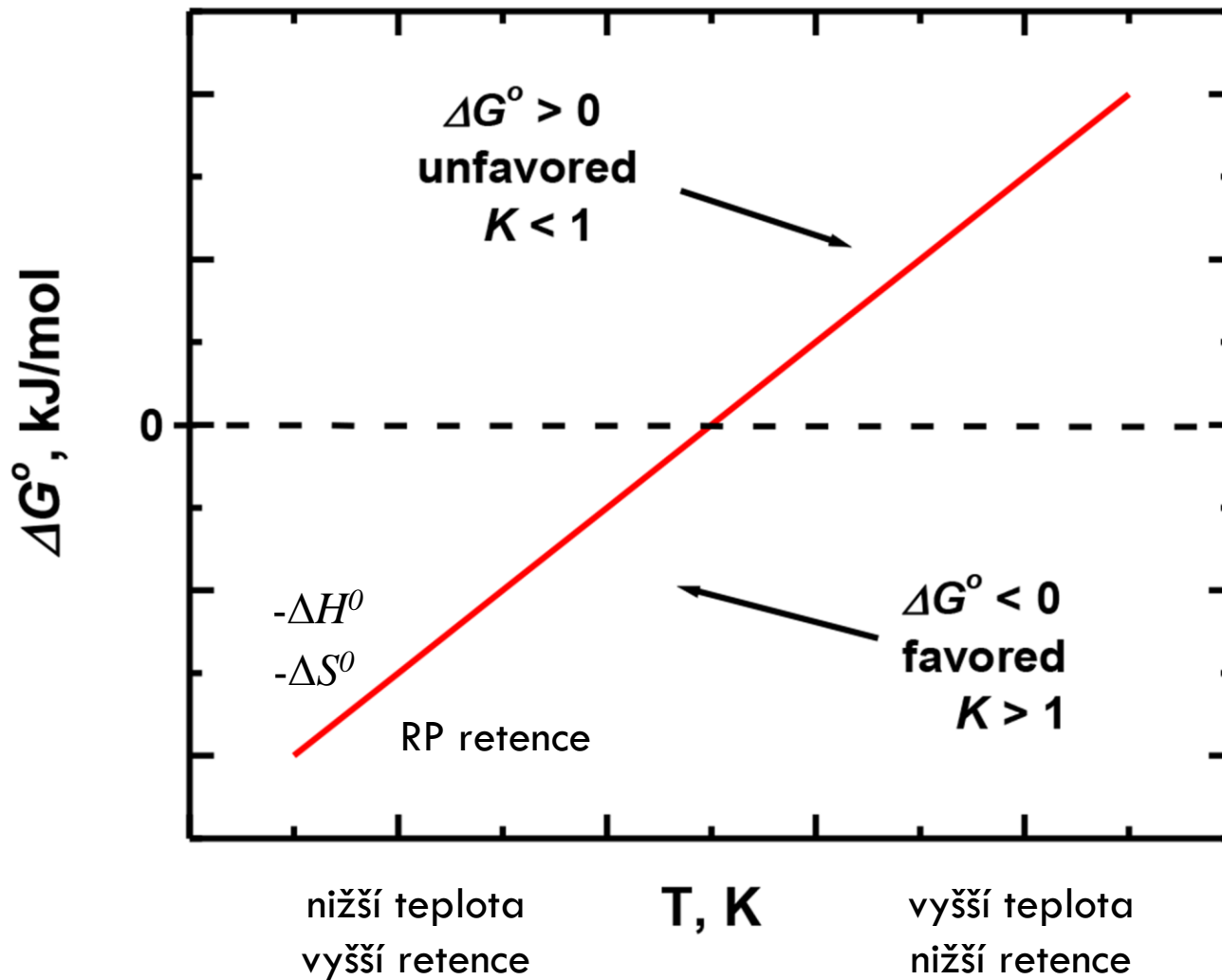
Entropie

Odpovídá změně entropie (míře neuspořádanosti) při přechodu z mobilní do stacionární fáze. Neuspořádanost je v prostoru stacionární fáze omezena, což se projeví negativními hodnotami ΔS^0 . Proto upřednostňuje **pozitivní hodnoty změny entropie**.

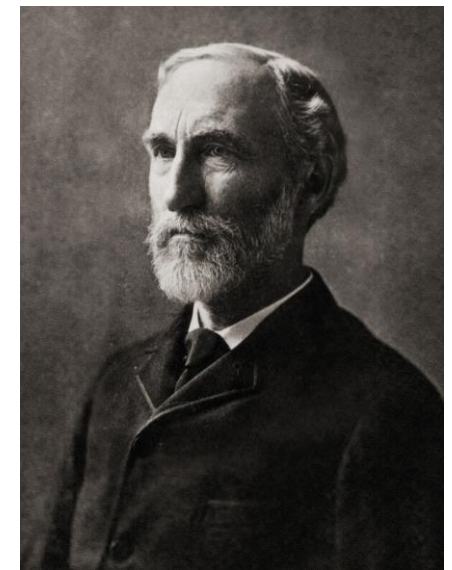
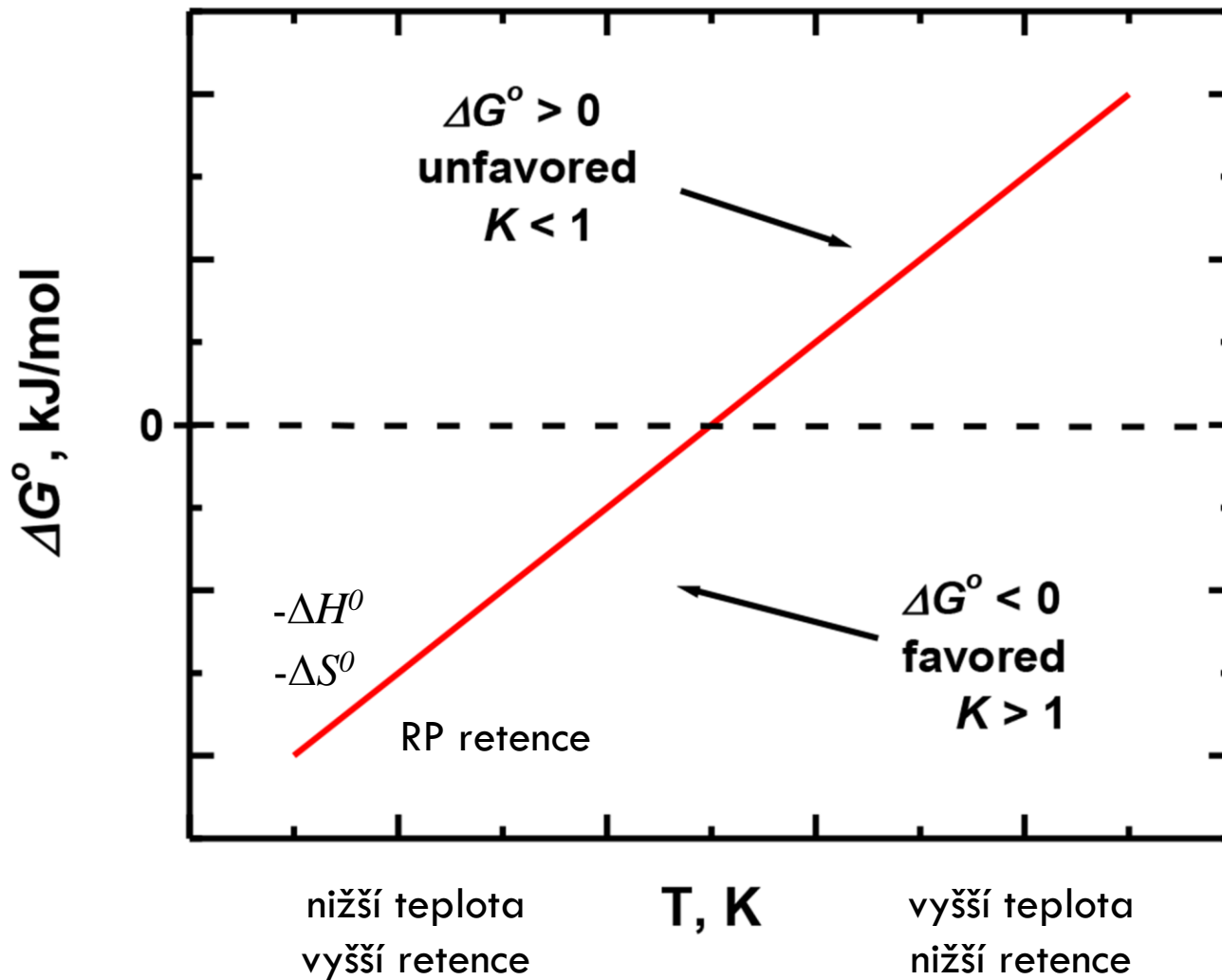
GIBBSOVA ENERGIE



GIBBSOVA ENERGIE



GIBBSOVA ENERGIE



Josiah Willard Gibbs

(1839 – 1903)

VAN'T HOFFOVA ROVNICE

Gibbsova volná energie



$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K$$

Distribuční koeficient



$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \beta$$

Standardní molární entalpie



$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

převodu látky mezi
stacionární a mobilní fází



Standardní molární entropie

$$\Phi = \frac{1}{\beta} = \frac{V_S}{V_M}$$

Van't Hoffova rovnice

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R}\right)$$

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M}$$

$$\ln K = \ln k\beta$$

$$\beta = \frac{V_{Mobilní}}{V_{Stacionární}}$$

Fázový poměr

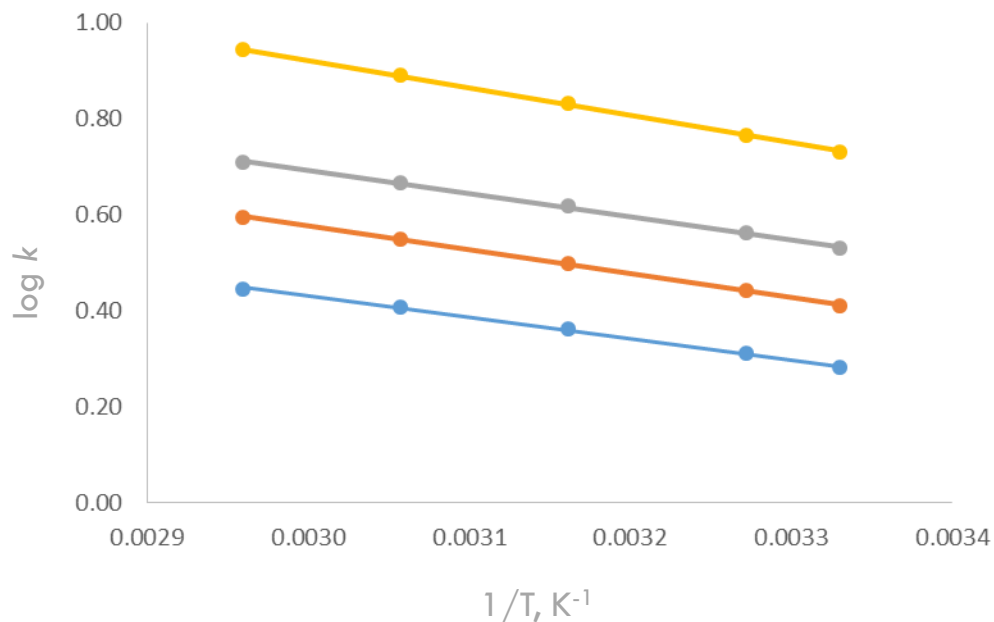
$$\log k = A + \frac{B}{T}$$

www.chromatographyonline.com/elevated-temperatures-liquid-chromatography-part-iii-closer-look-van-t-hoff-equation

www.chromatography-online.org/Retention/Thermodynamics/rs_1_15.php

R – plynová konstanta, $8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$, T – termodynamická teplota, K , k – retenční faktor

VAN 'T HOFFOVA ROVNICE



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

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

$$\ln k = - \frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M}$$

směrnice

úsek

entalpický
příspěvek

entropický
příspěvek

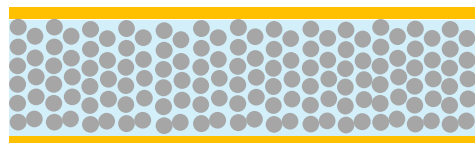
ΔH^0

ΔS^0

Poměr fází

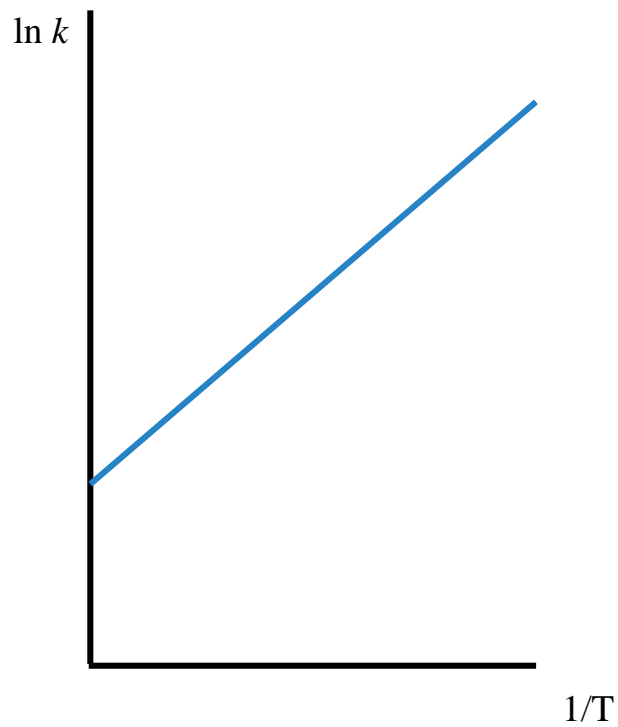
$$\frac{V_S}{V_M} = \frac{V_C - V_M}{V_M} = \frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T}$$

Konstantní při různých teplotách (?)

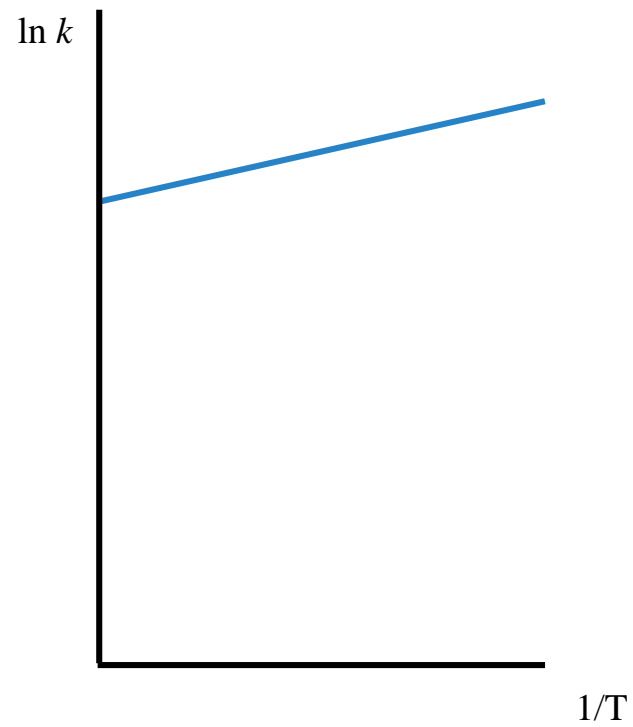


ENTALPIE vs. ENTROPIE

System A

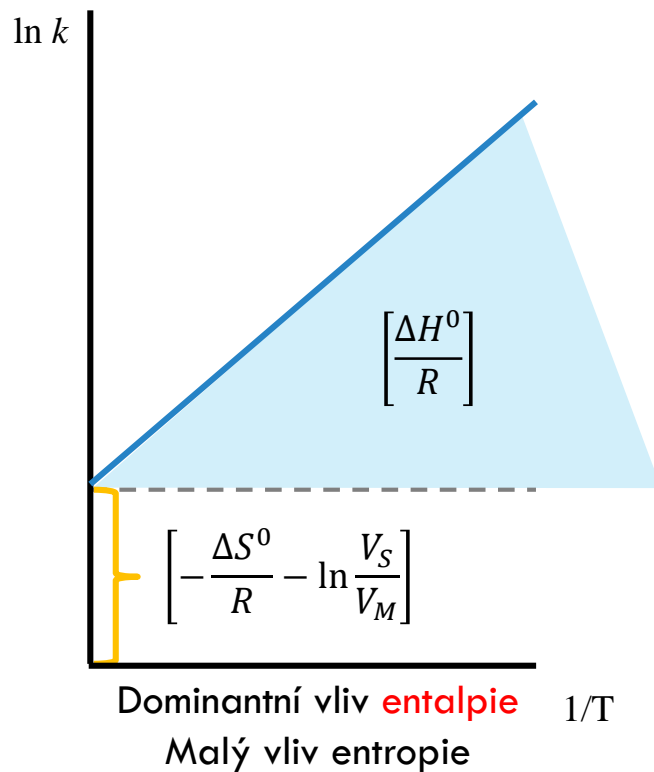


System B

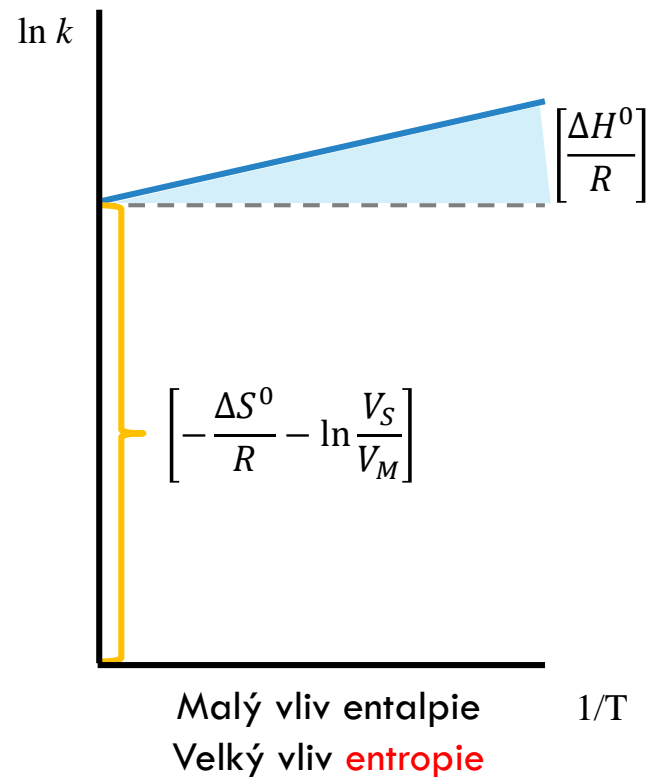


ENTALPIE vs. ENTROPIE

System A

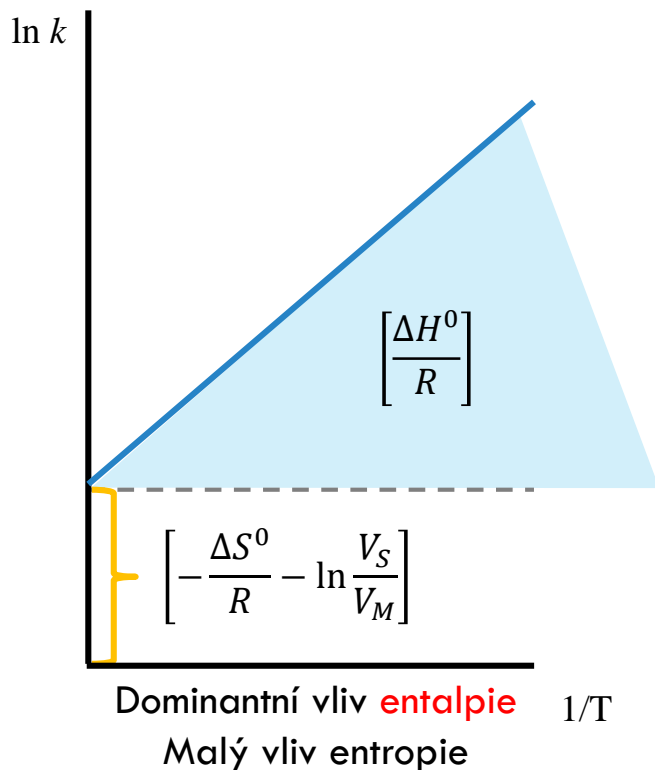


System B



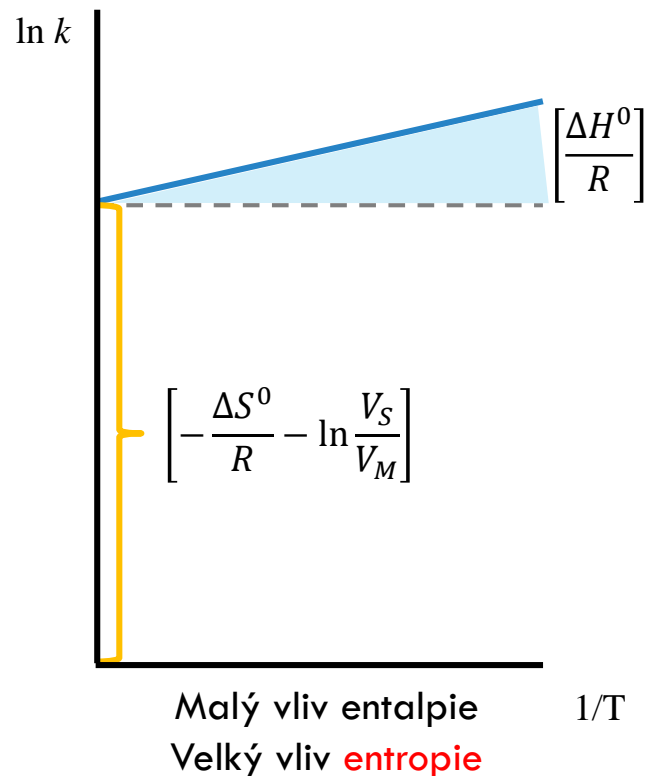
ENTALPIE vs. ENTROPIE

System A



Rozdělení kontrolují molekulární síly, interakce vzorku se stacionární fází

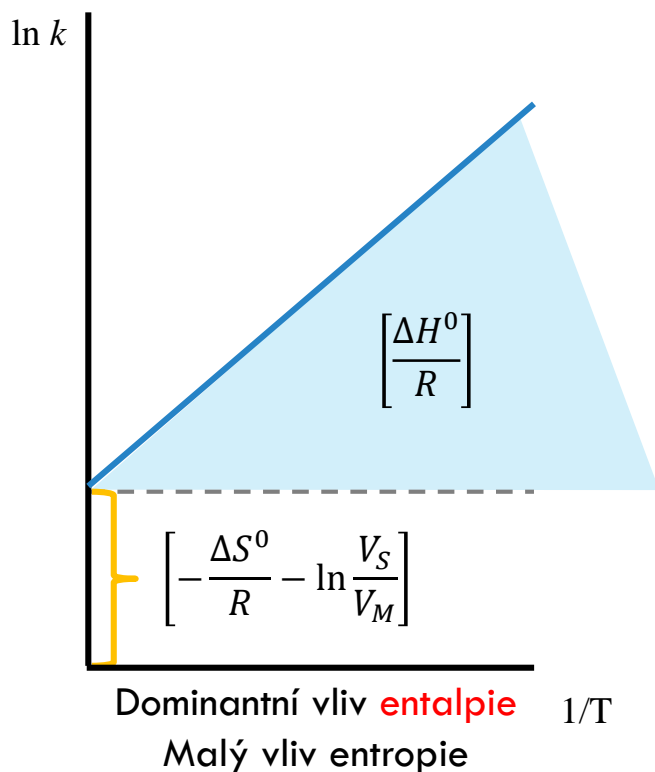
System B



Rozdělení kontrolované (náhodnou) entropií. Žádné interakce. Větší záporná entropie – větší retence (menší chaos).

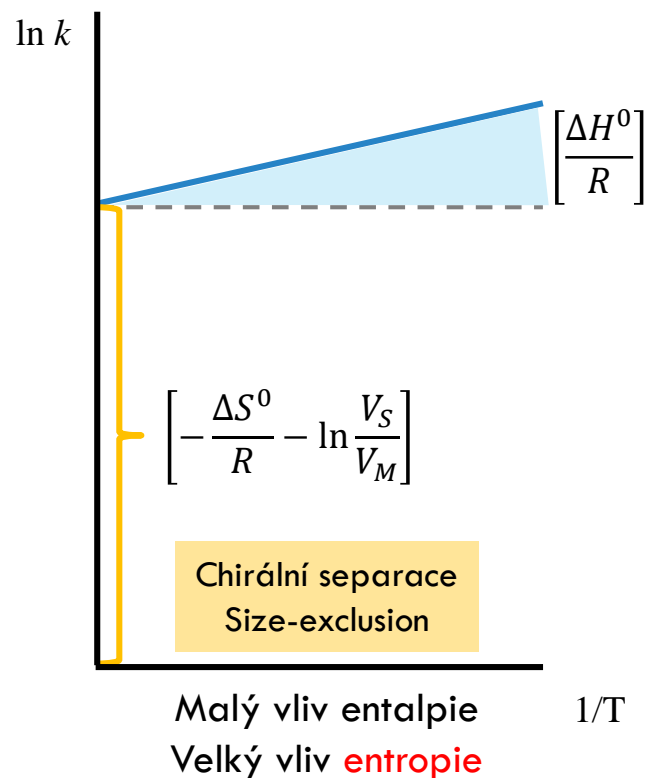
ENTALPIE vs. ENTROPIE

System A



Rozdělení kontrolují molekulární síly, interakce vzorku se stacionární fází

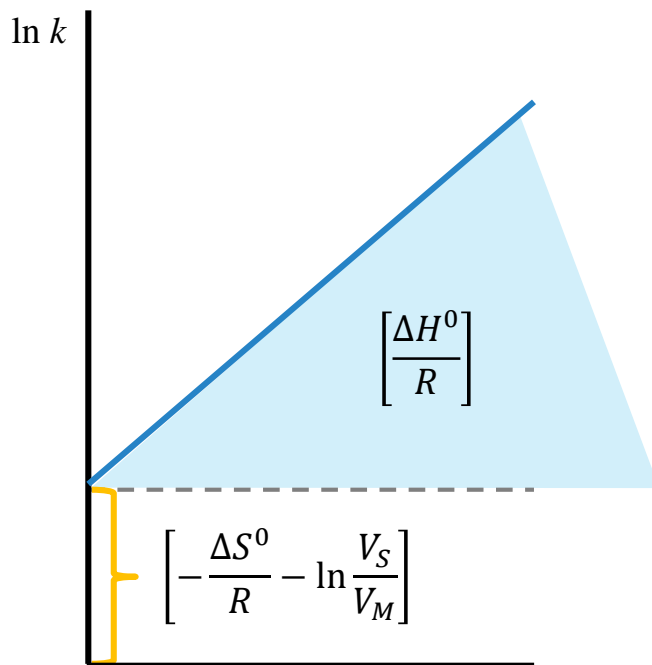
System B



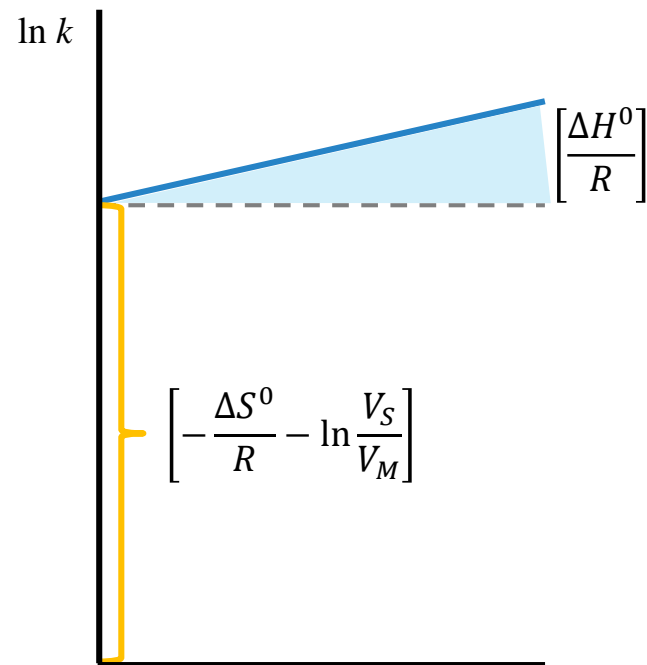
Rozdělení kontrolované (náhodnou) entropií. Žádné interakce. Větší záporná entropie – větší retence (menší chaos).

TERMODYNAMICKÝ POPIS RETENCE

System A



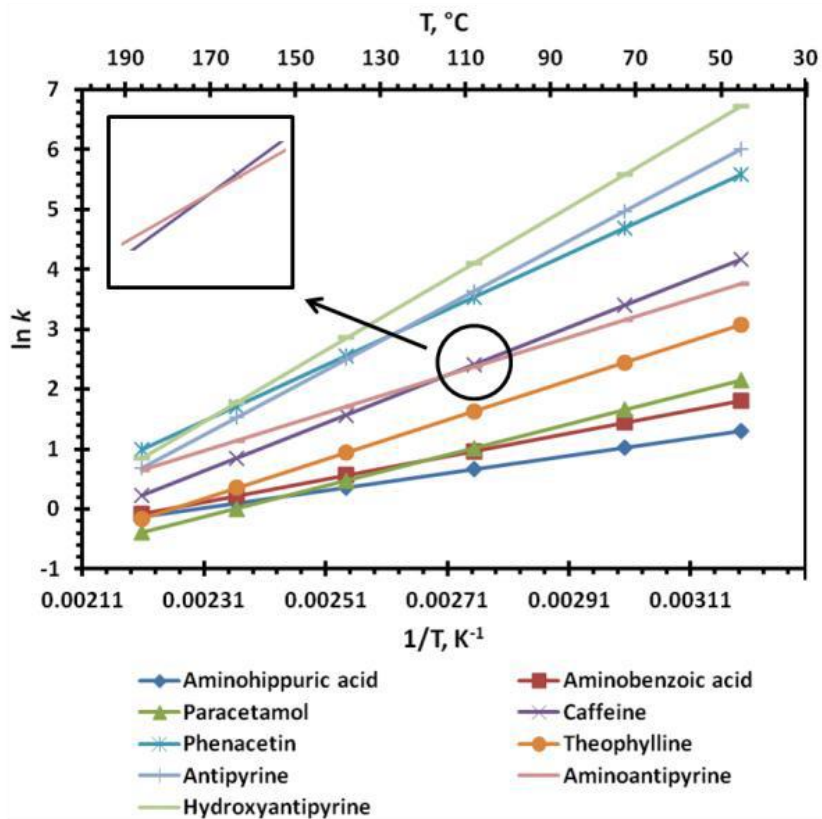
System B



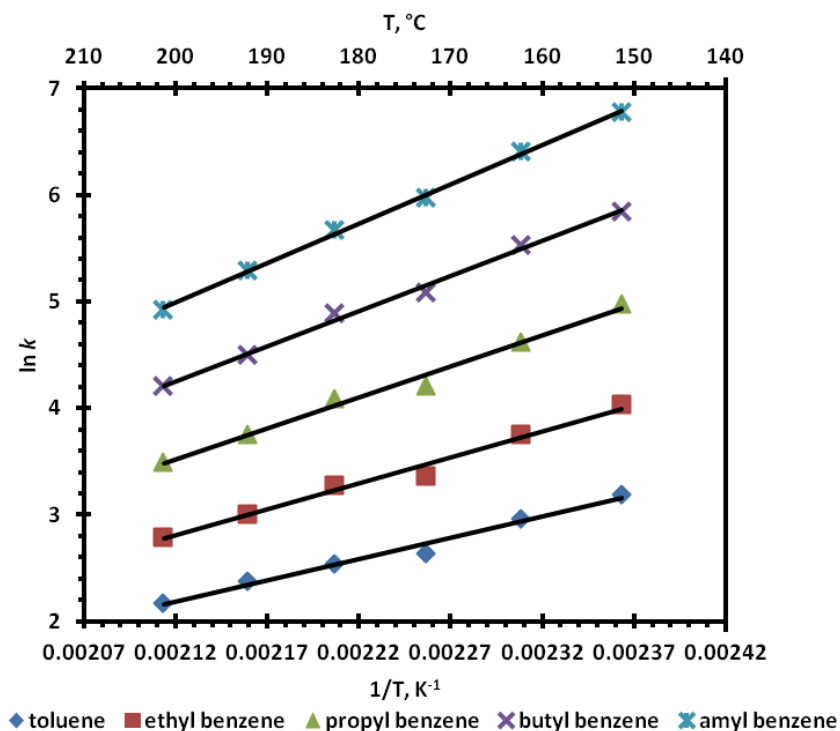
Termodynamika retence popisuje, že existují dva hlavní mechanismy. Nelze ale přímo odvodit, jak lze takto retenci kontrolovat. To se musí dít/studovat skrze rozdělovací koeficient (K) ovlivněný **molekulárními interakcemi** a poměr objemů stacionární a mobilní fáze (V_S/V_M), tedy **geometrií stacionární fáze**.

TEPLOTNÍ KONTROLA SELEKTIVITY

Ovlivnění selektivity



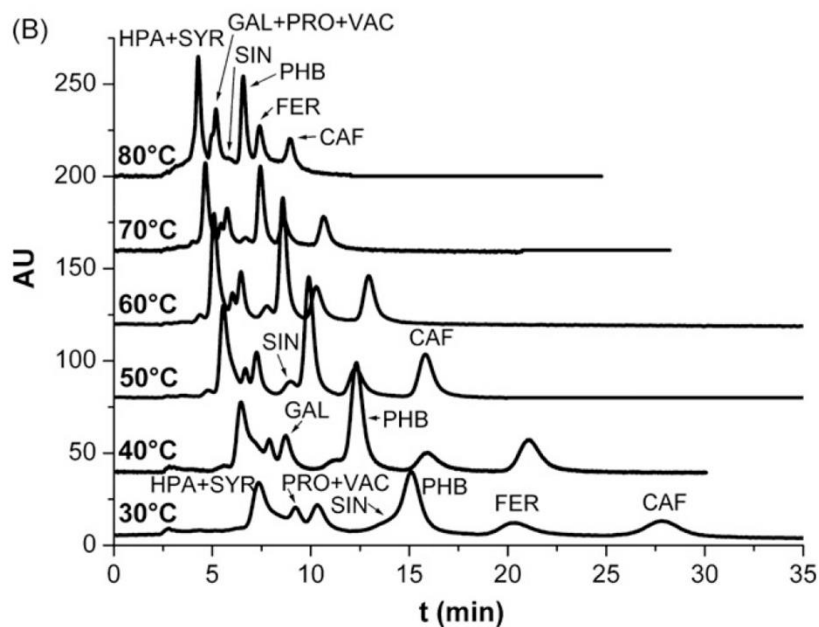
Homologická řada



Charakterizace kolon: $\Delta H^0, \Delta S^0$

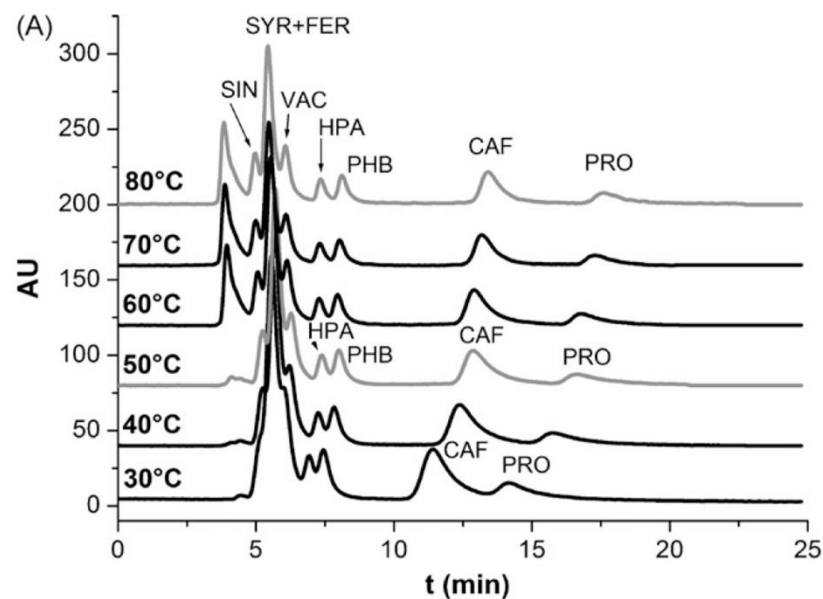
RETENČNÍ MECHANISMY

Reverzní fáze



15% acetonitril, 30 – 80 °C

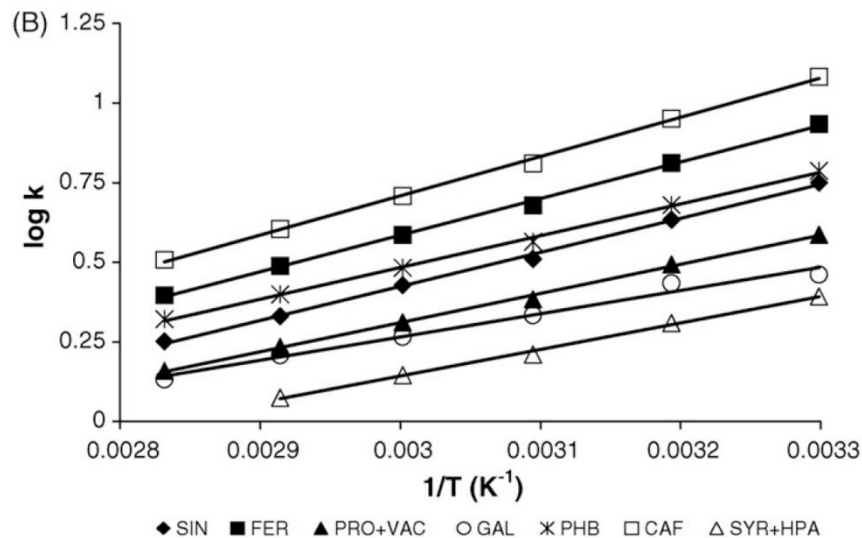
Hydrofilní interakce



90% acetonitril, 30 – 80 °C

RETENČNÍ MECHANISMY

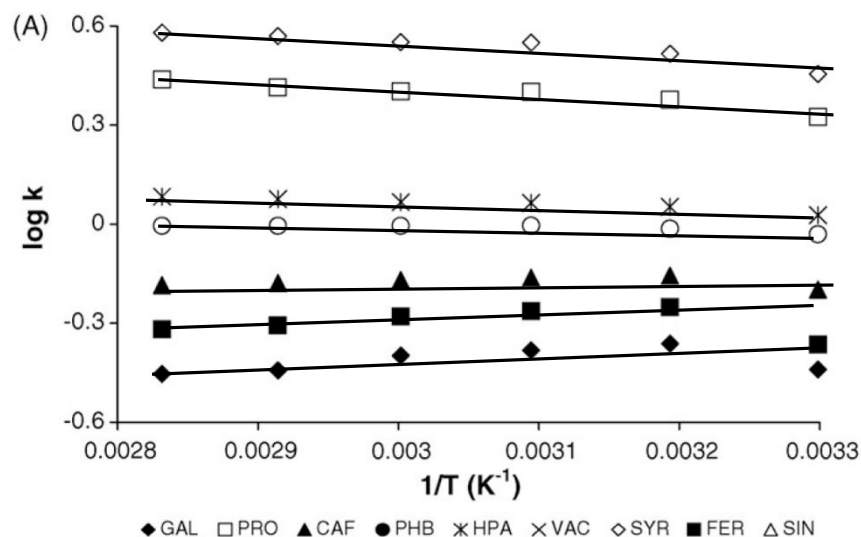
Reverzní fáze



15% acetonitril, 30 – 80 °C

Typický průběh pro reverzní fáze,
vliv entalpie

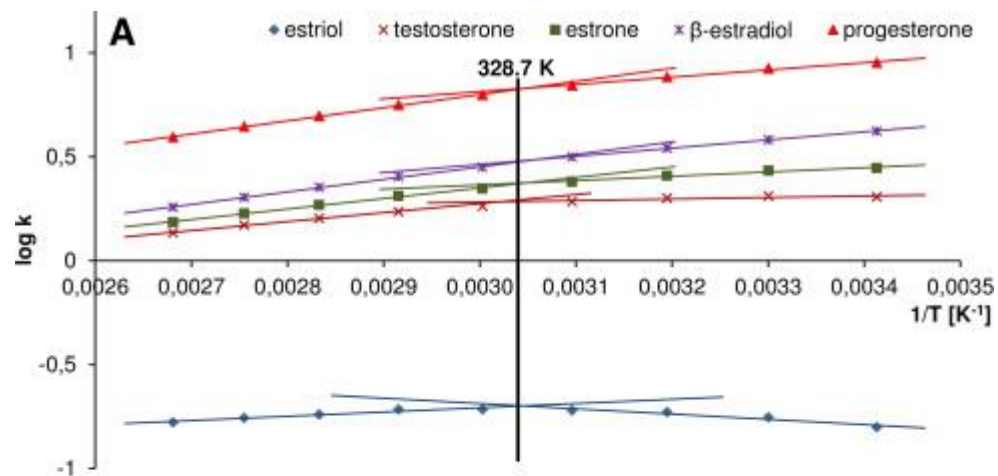
Hydrofilní interakce



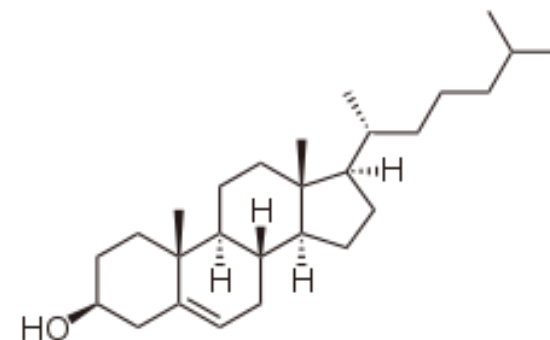
90% acetonitril, 30 – 80 °C

Retence téměř nezávislá na teplotě,
vliv entropie

NELINEARITA TEPLOTNÍ ZÁVISLOSTI

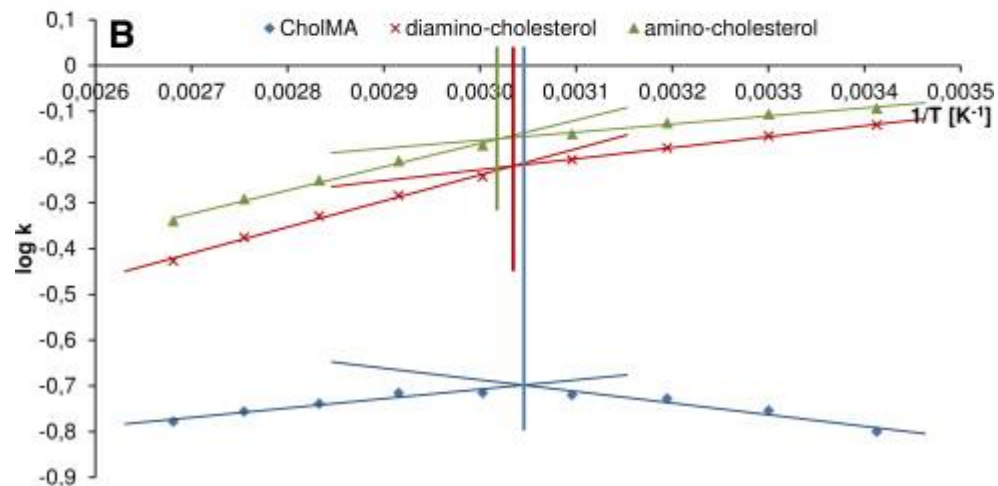


Cholesterolem modifikované
stacionární fáze



Kapalný krystal cholesterolu
(změna teplotní závislosti)

Dominantnější pro kolony
s větším pokrytím cholesterolem.

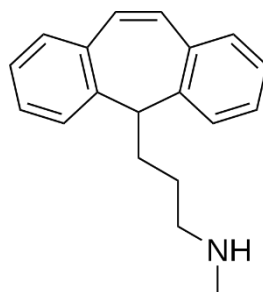
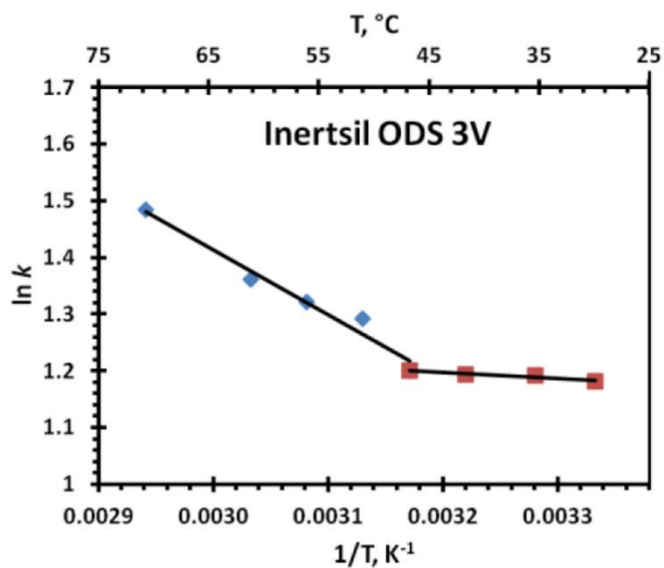


VLIV pH

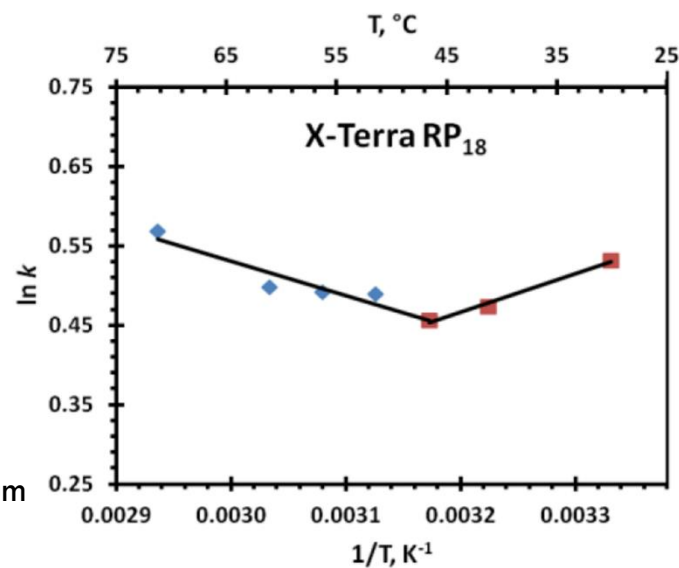
Změna ionizace molekul vlivem teploty a pH prostředí (zejména při $\text{pH} \sim \text{pK}_a$)

$$\Delta \text{pK}_a = -0.03 / ^\circ\text{C}$$

Zvýšení retence se zvyšující se teplotou



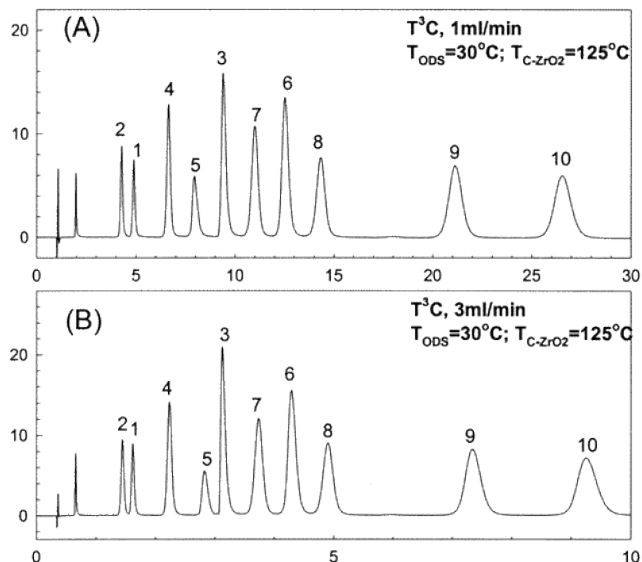
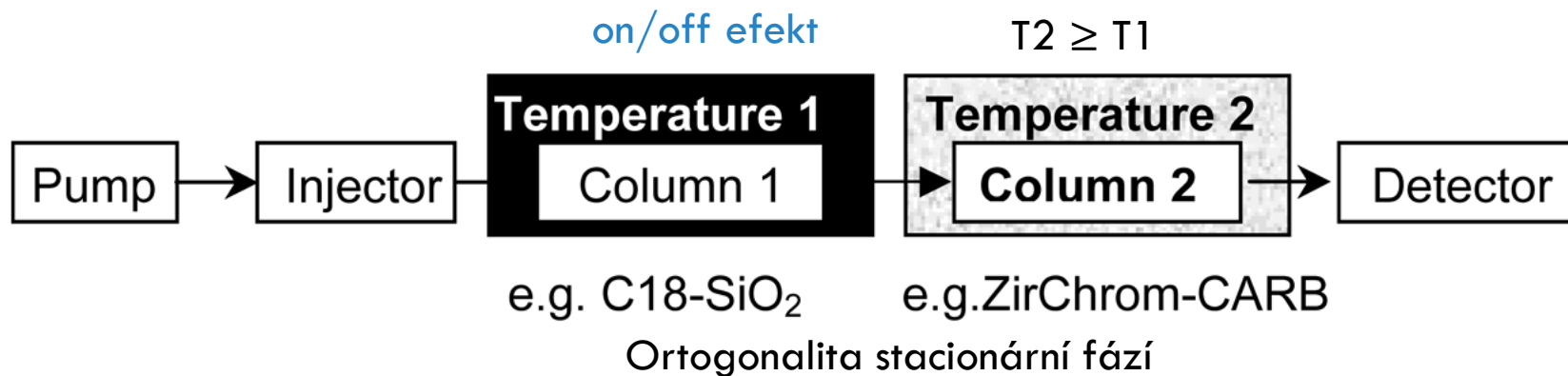
Protriptylin
Tricyklické antidepresivum



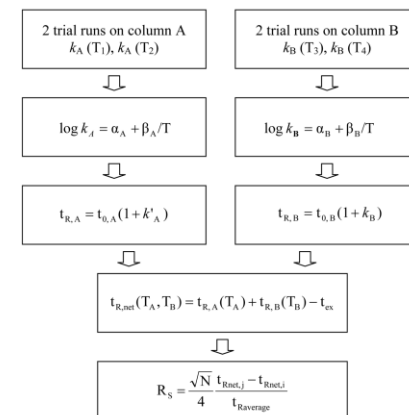
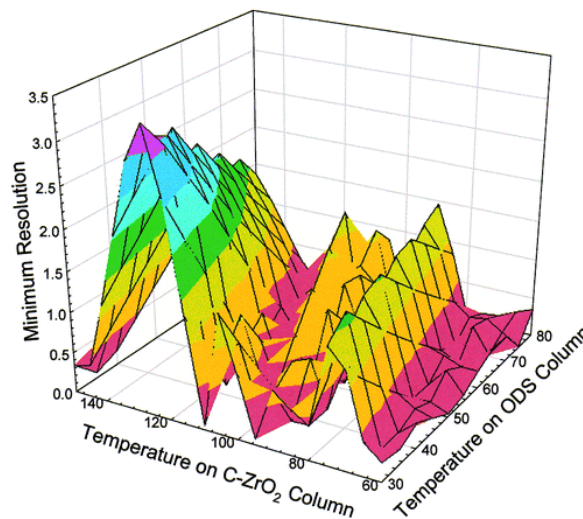
← Teplota

← Teplota

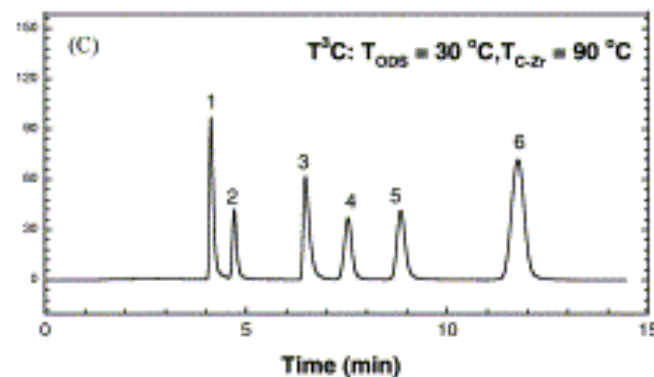
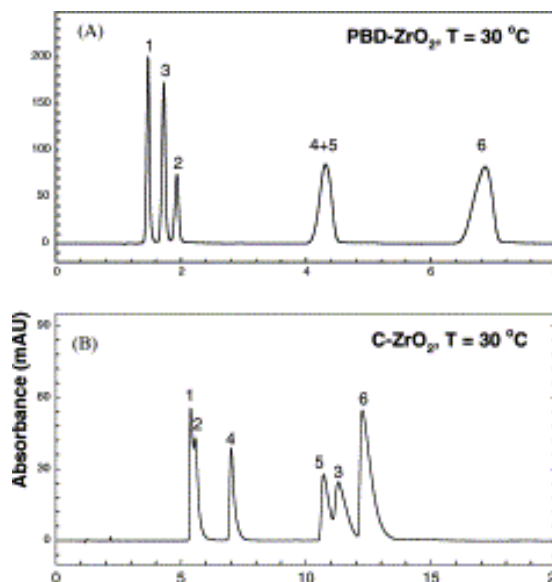
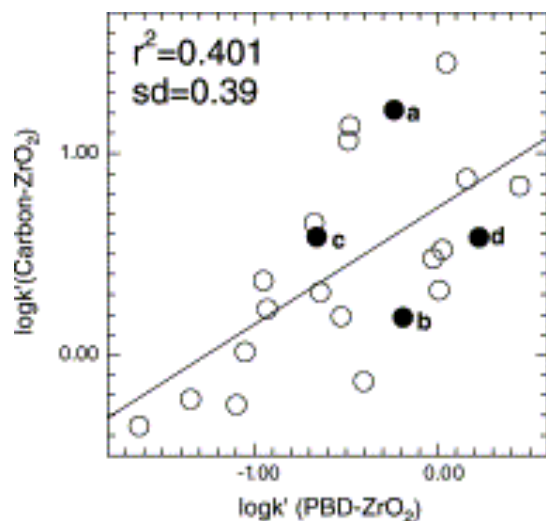
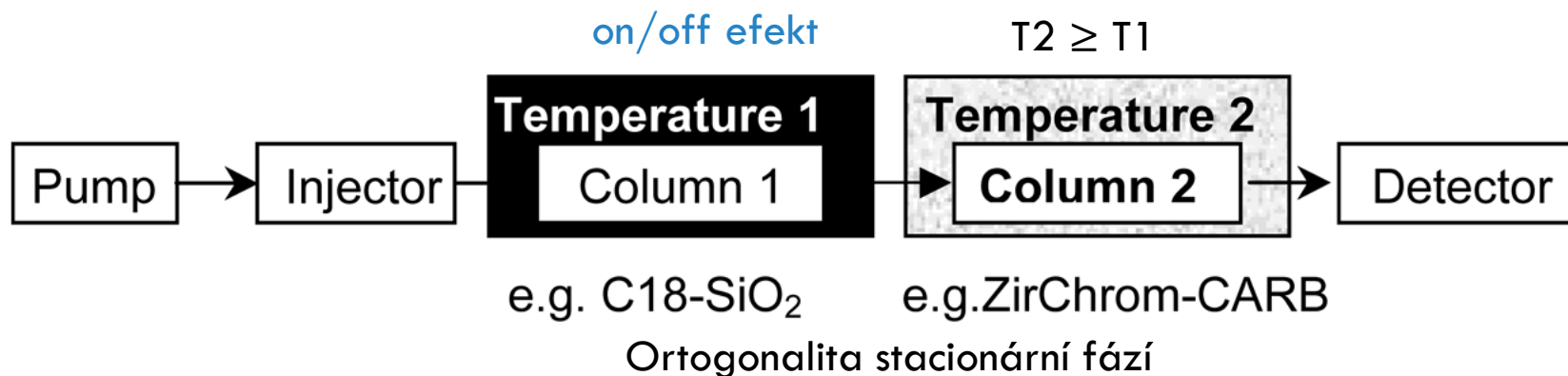
TEPLOTNÍ KONTROLA SELEKTIVITY



Okénkový diagram



TEPLOTNÍ KONTROLA SELEKTIVITY



STACIONÁRNÍ FÁZE

1. Zavedení methylových skupin

poměr alkyl : CH₃ : SiOH ~ 1 : 1 : 1

nověji - ethylenové můstky

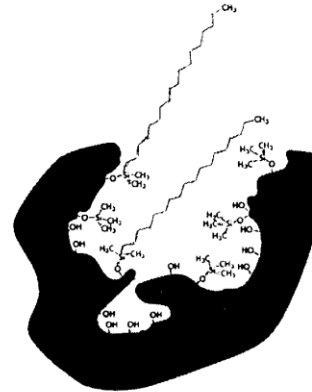
2. Nesilikagelové nosiče

- Organické polymerní částice
- Uhlík
- Oxid hlinitý
- Modifikovaný oxid zirkoničitý

- uhlíkem
- C18, C18 a uhlíkem
- polystyrenem
- polybutadienem

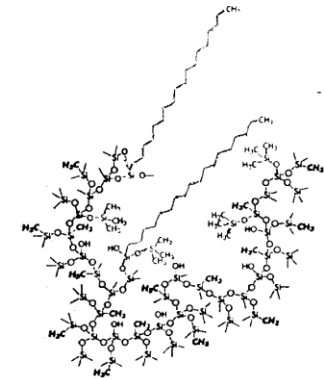
3. Hybridní materiály, matrice

polymer – silikagel, ZrO₂ - silikagel



Silica C18 Materials

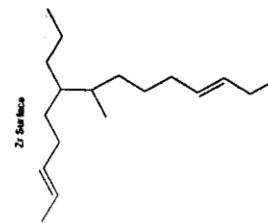
1/2 Max C18/Endcap
1/2 Free Silanols



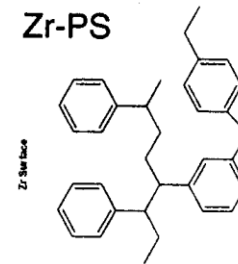
Hybrid Particle C18

1/3 Incorporated Methyls
1/3 Max C18/Endcap
1/3 Free Silanols

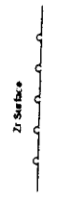
Zr-PBD



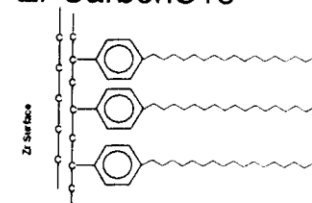
Zr-PS



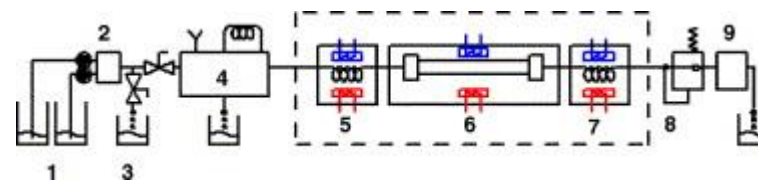
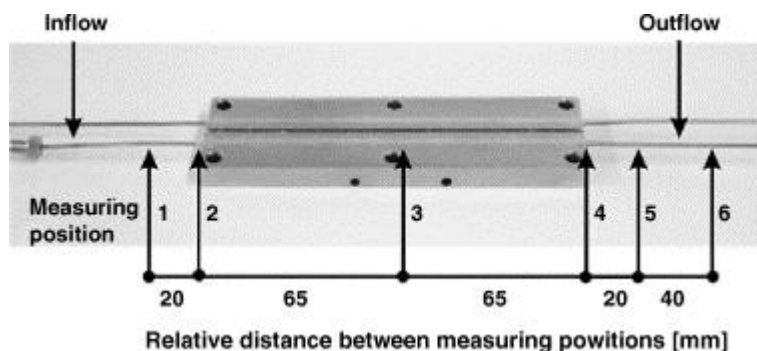
Zr-Carbon



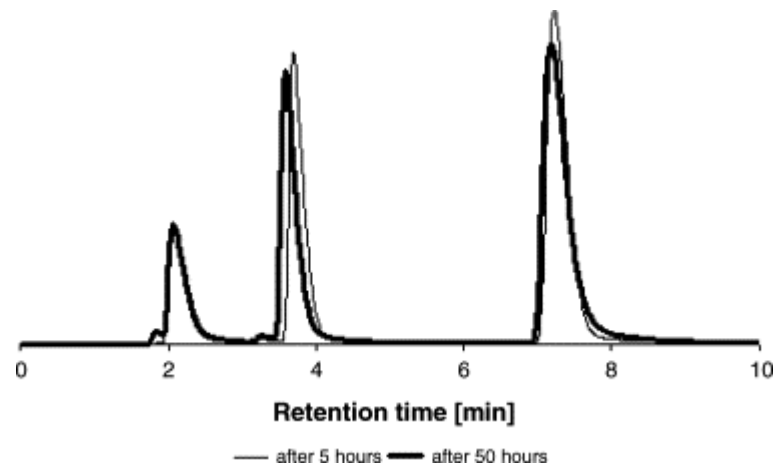
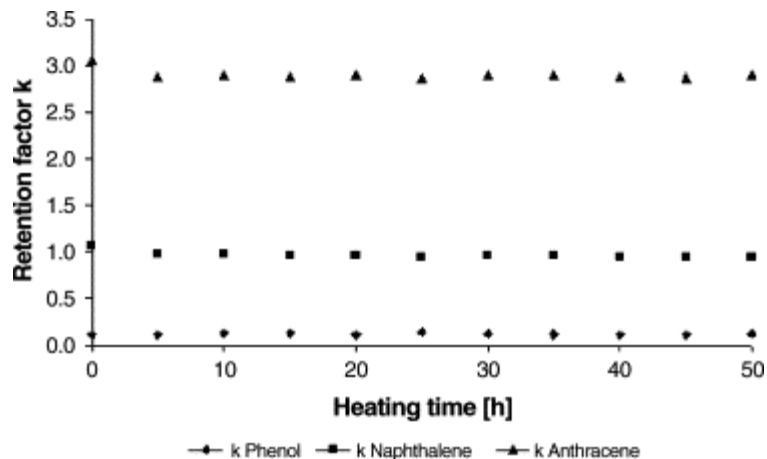
Zr-CarbonC18



TEPLOTNÍ STABILITA KOLON



5 a 50 hodin

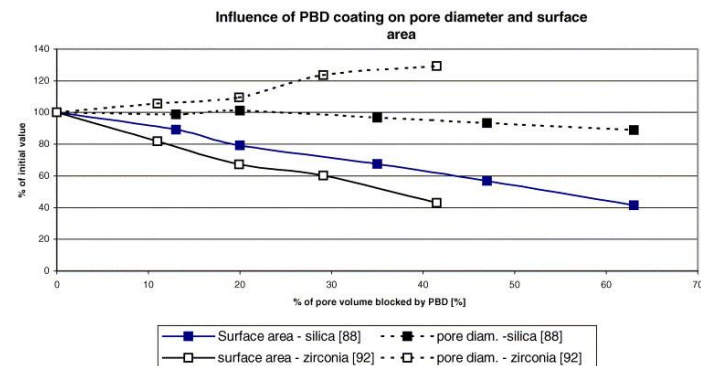
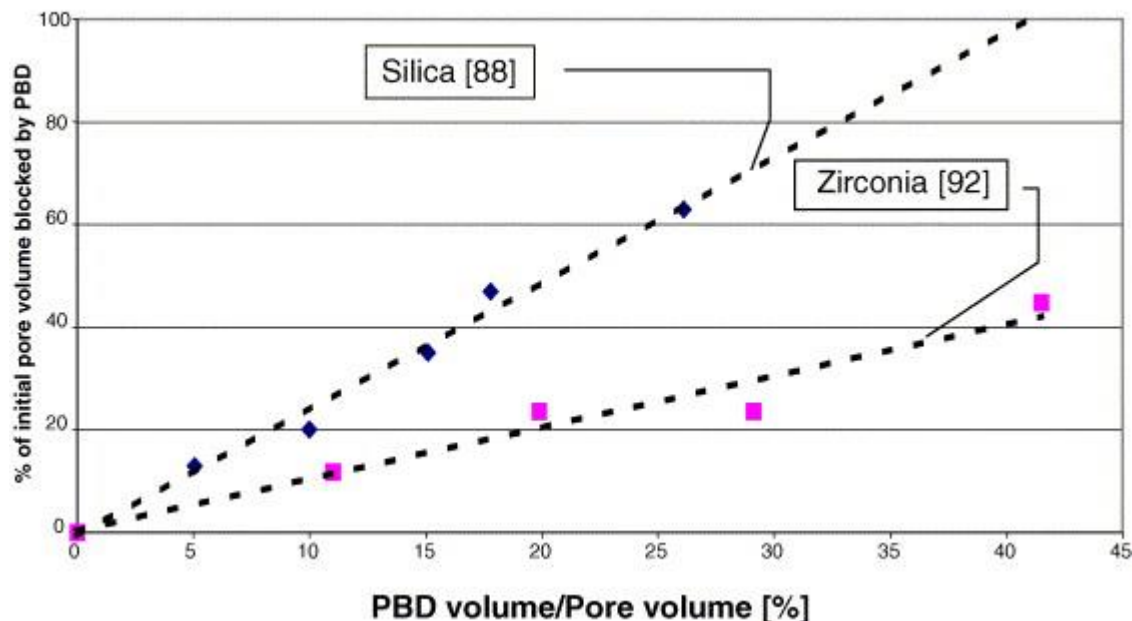


STABILIZACE POVRCHU POLYMEREM

V ideálním případě

- nedochází k blokování pórů
- je částice homogenně pokrytá

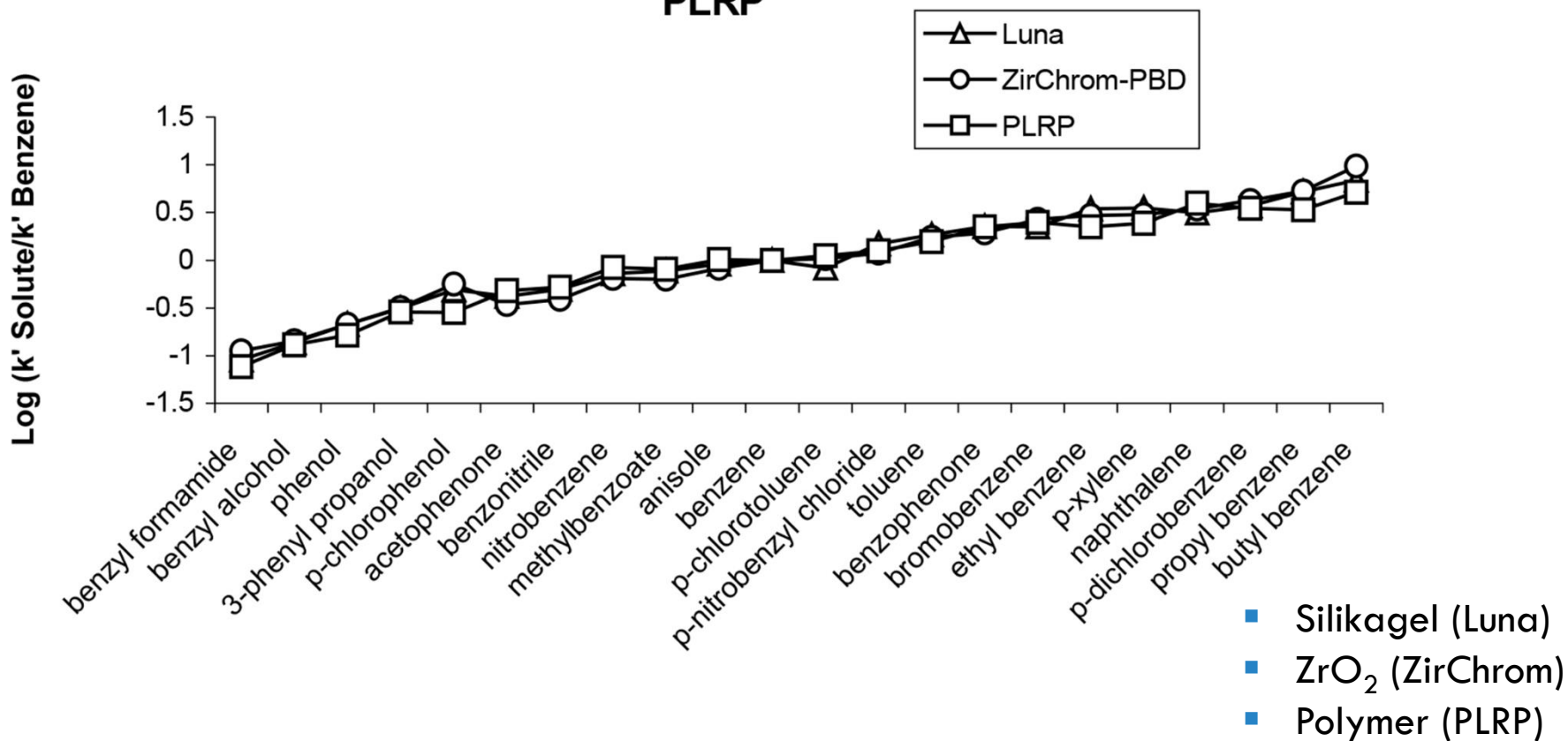
Blokackage of pore volume by PBD



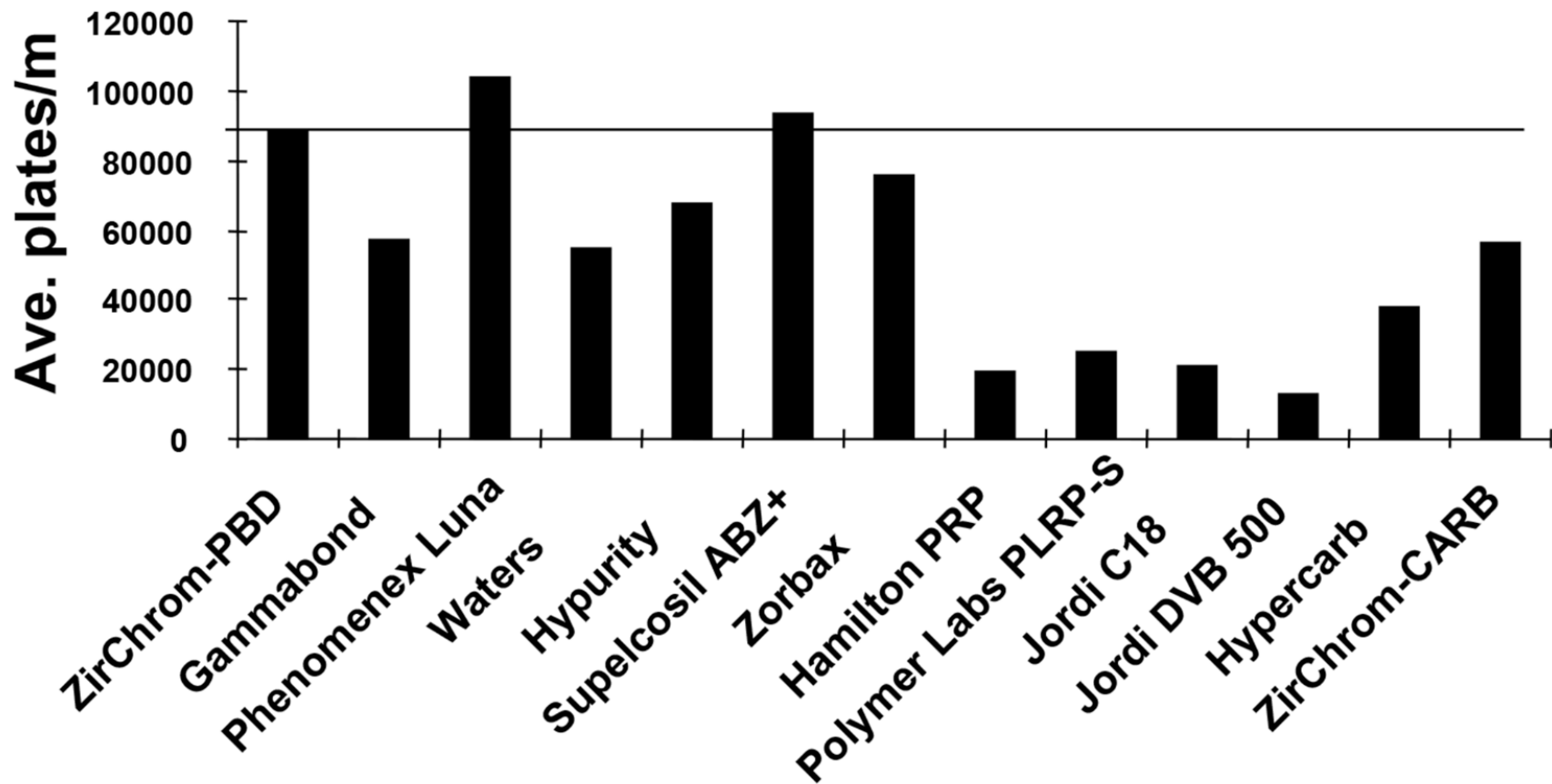
Polymerní pokrytí poskytuje srovnatelnou účinnost jako silikagel (oproti čistě polymerním částicím)

SROVNÁNÍ SELEKTIVITY

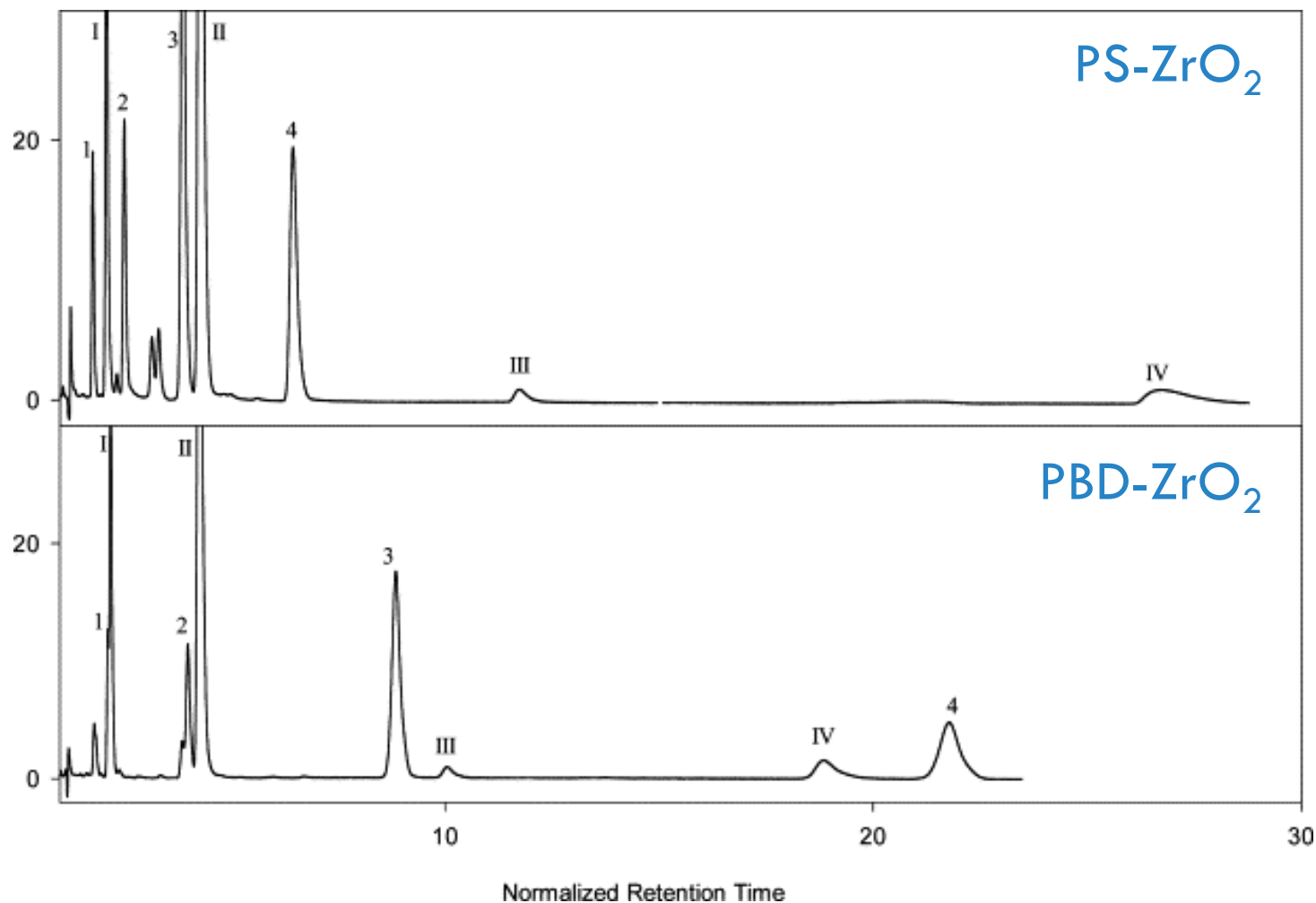
Normalized Selectivity Comparison: Luna, ZirChrom-PBD, PLRP



ÚČINNOST

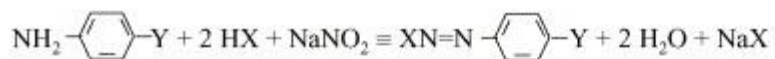


POKRYTÍ POLYSTYRENEM vs. POLYBUTADIENEM



Alkylbenzeny a aromatické uhlovodíky, 50% acetonitril, T = 30 °C

POKRYTÍ UHLÍKEM



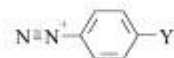
Reaction 1

Where Y = C₁₈H₃₇

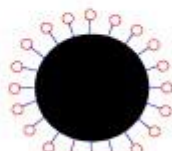


Carbon clad zirconia

+



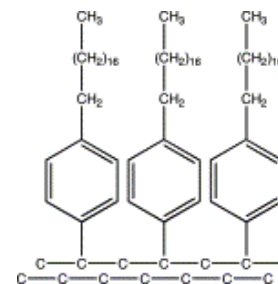
Diazonium Salt



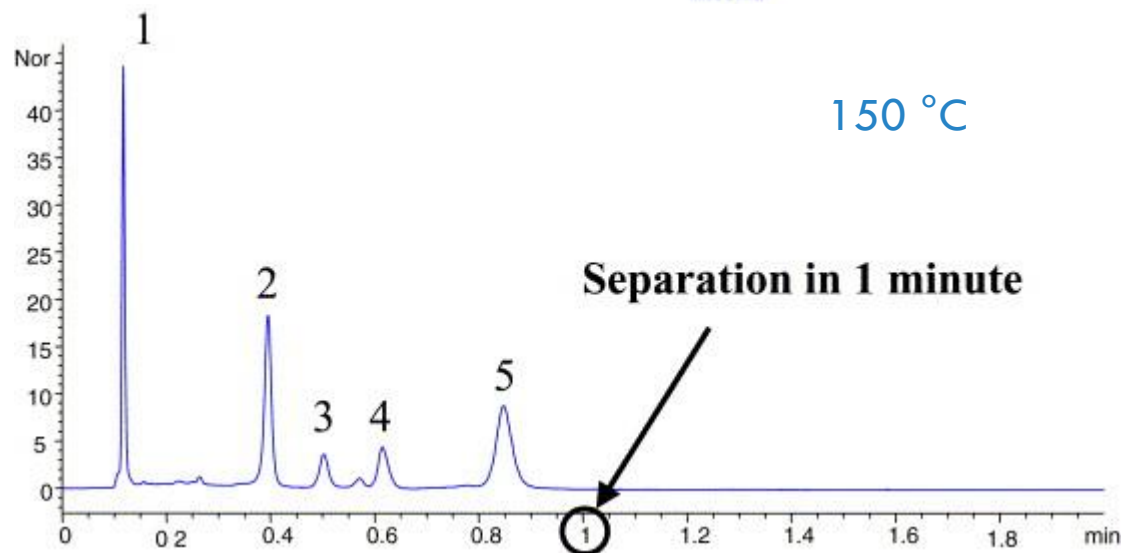
Derivatized Carbon clad zirconia

Reaction 2

DiamondBond C18

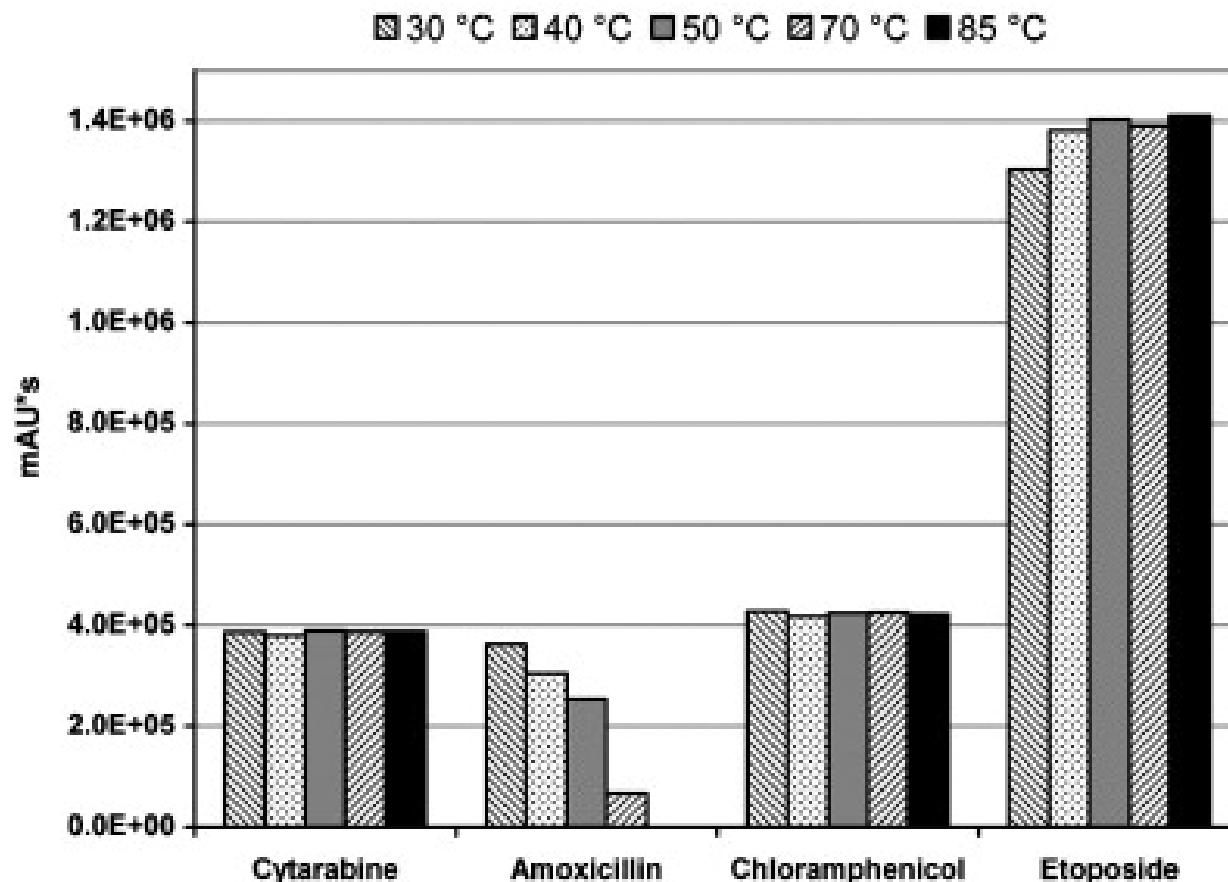


150 °C



1. Acetaminophen
2. Ketoprofen
3. Naproxen
4. Ibuprofen
5. Oxaprofen

STABILITA VZORKU



Stabilita cytostatik a antibiotik při vyšší pracovní teplotě na stacionární fázi tvořené ZrO_2 pokrytým polybutadienem, 15% acetonitril + 0.1% FA

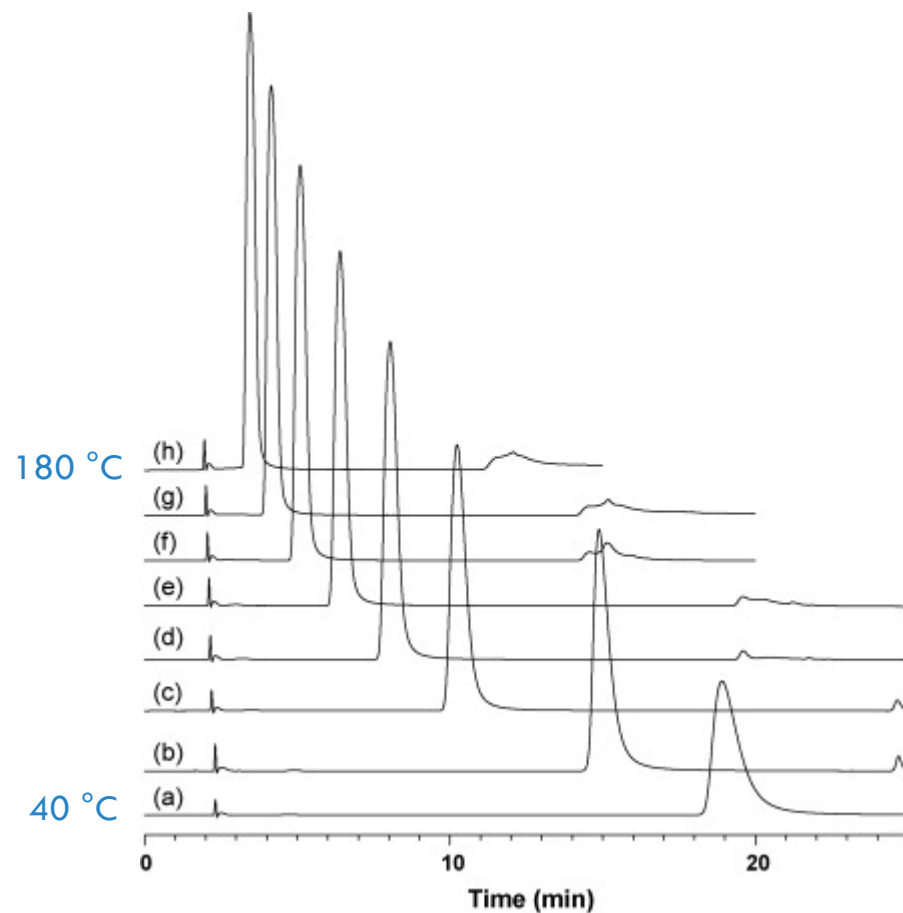
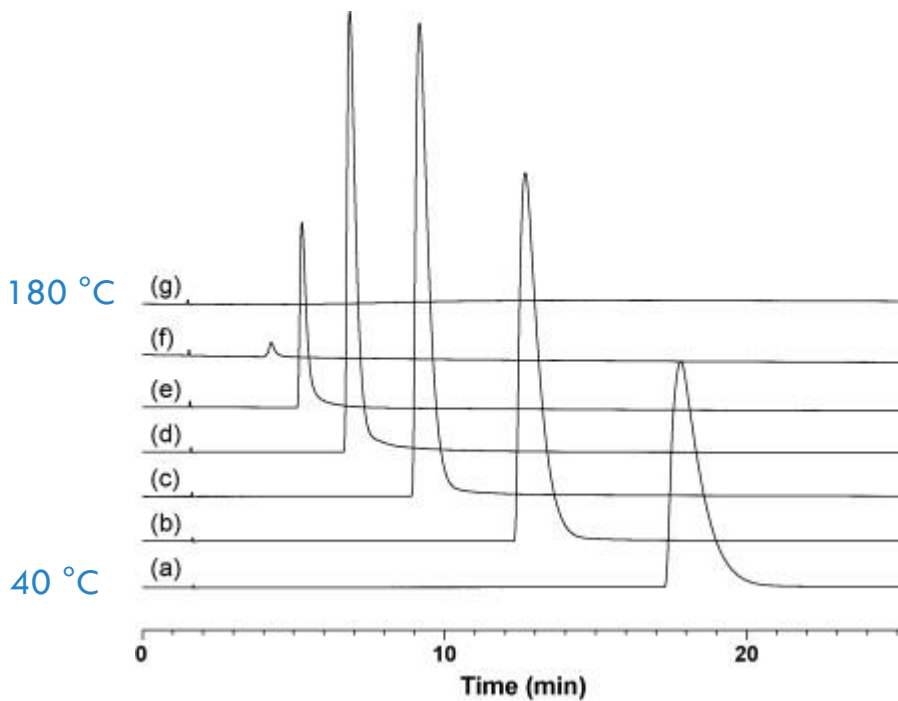
STABILITA VZORKU – VLIV KOLONY

Uhlíkem pokrytý ZrO_2

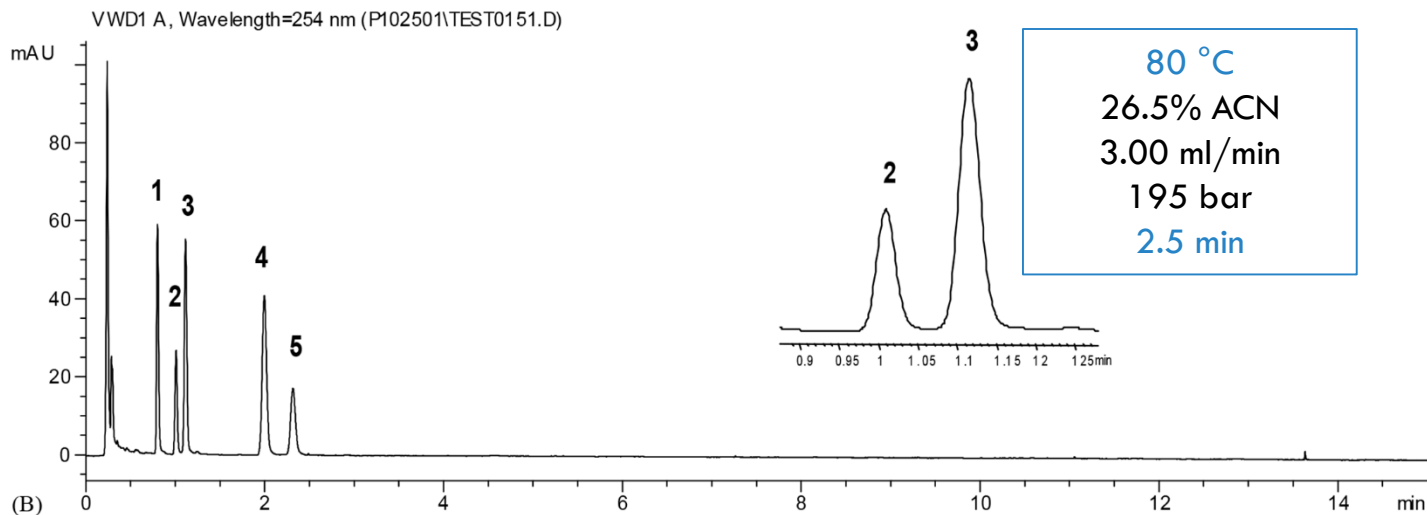
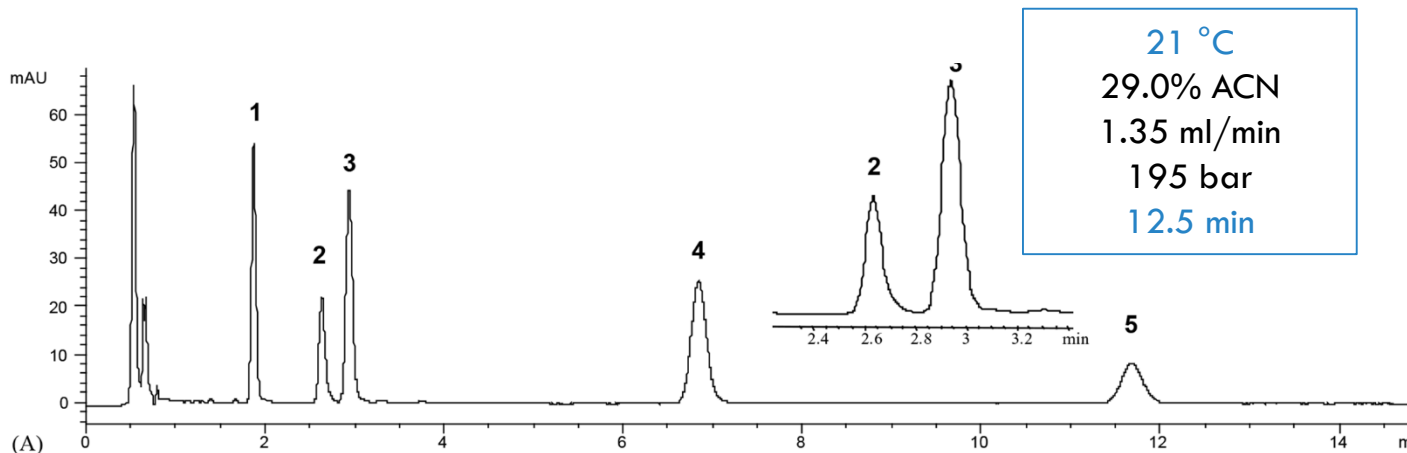
ZirChrom Carb, 150 mm × 4.6 mm, 3 μm

Polystyren-Divinybenzen

PLRP-S, 150 mm × 4.6 mm, 3 μm



ANTI-HISTAMINIKA



Spotřeba
mobilní fáze

16.9 ml

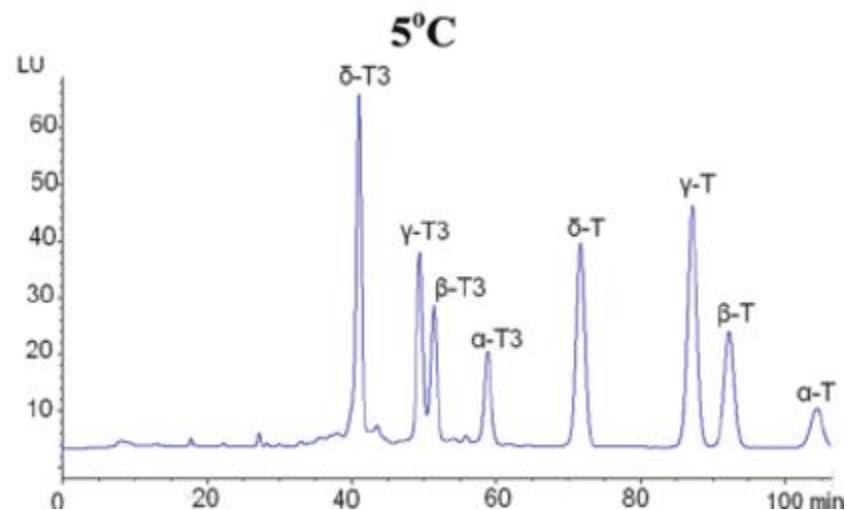
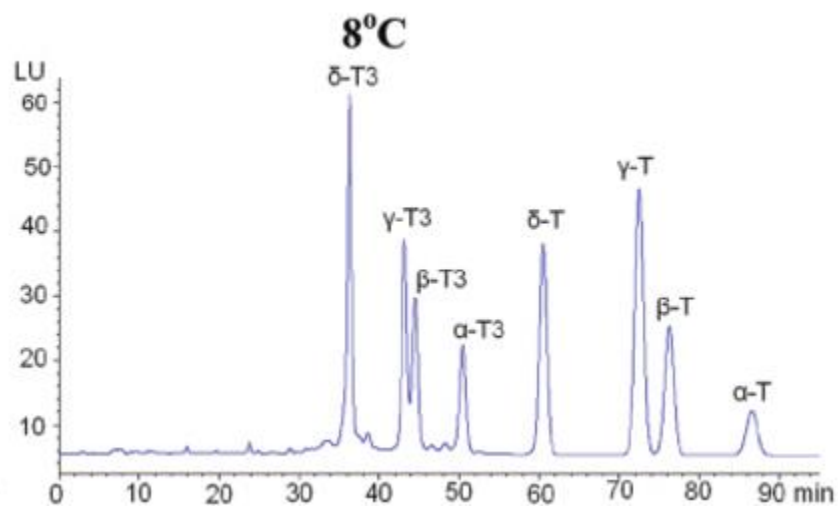
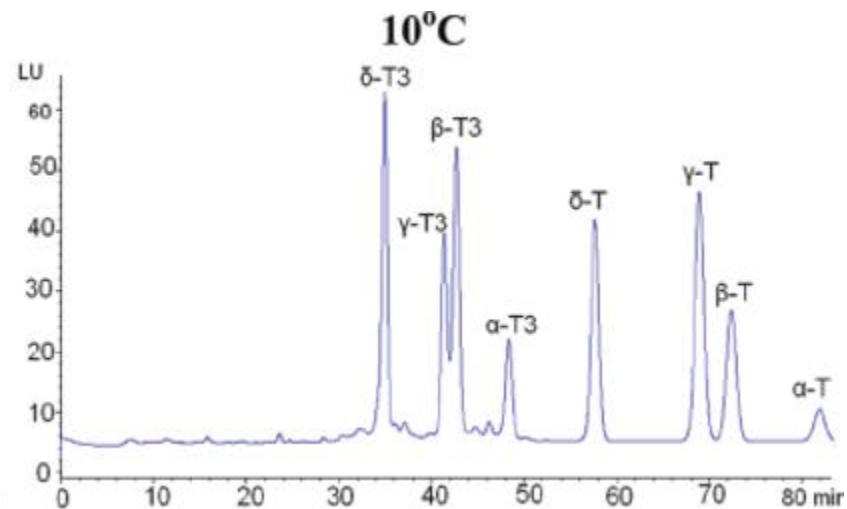
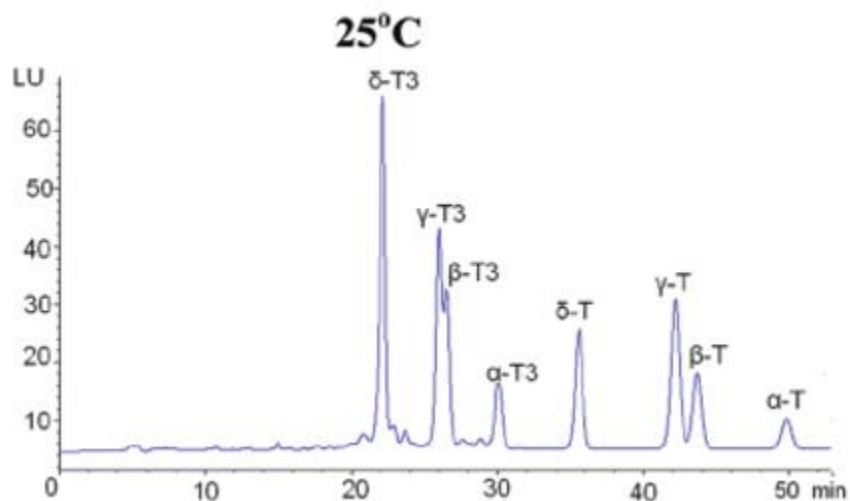


7.5 ml

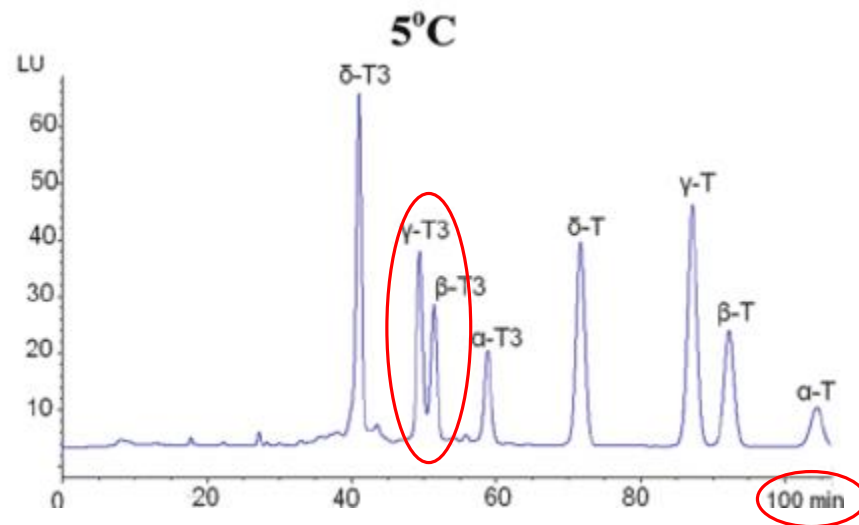
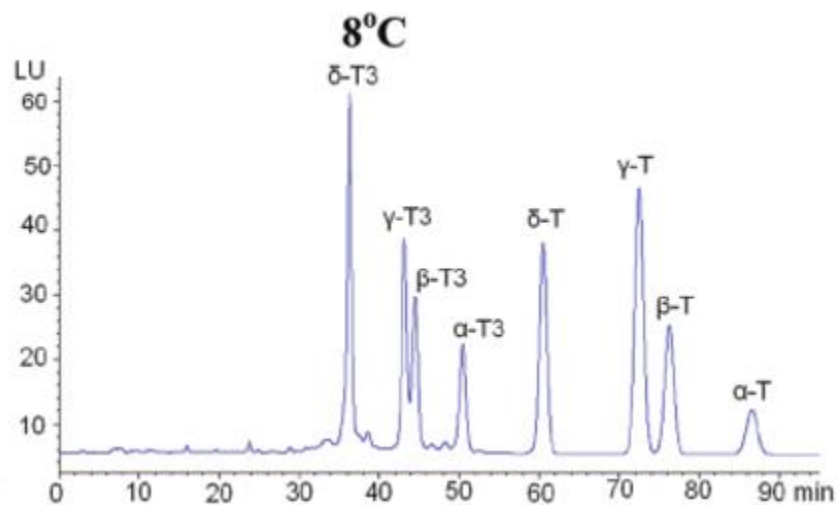
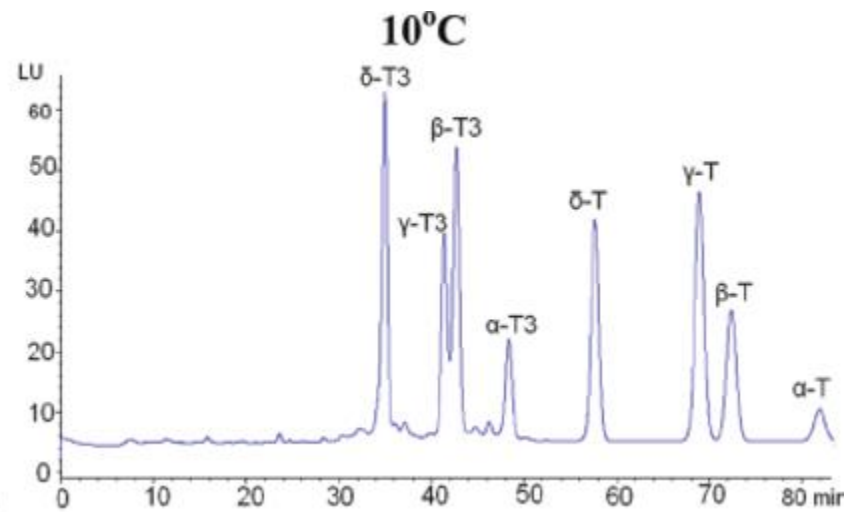
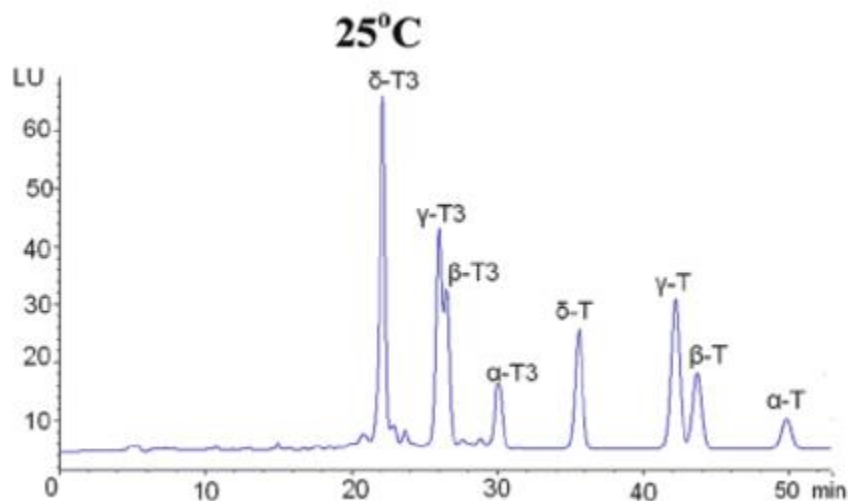
21 °C

80 °C

TOKOFEROLY A TOKOTRIENOLY

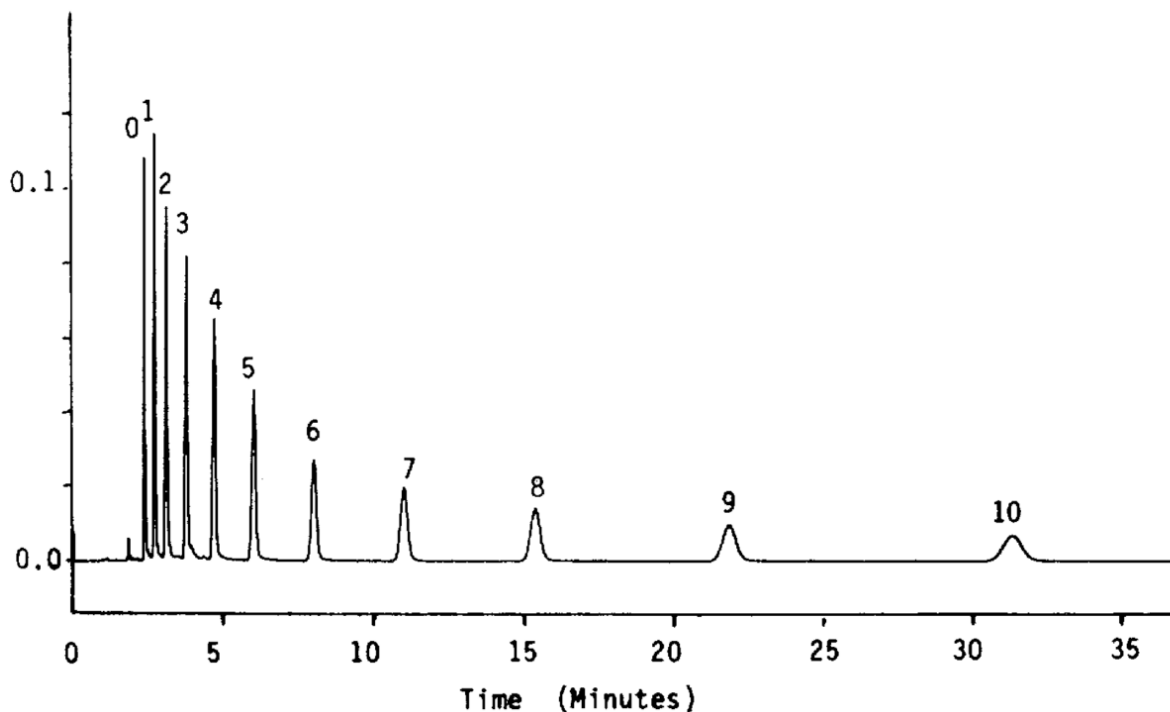


TOKOFEROLY A TOKOTRIENOLY



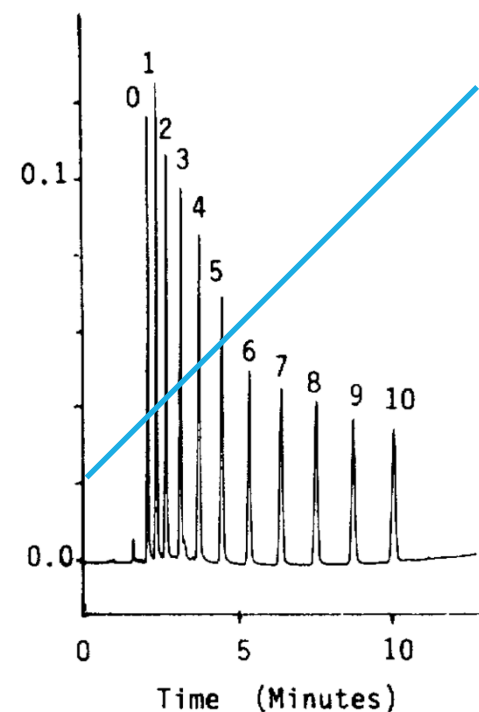
IZOKRATICKÁ ELUCE vs. GRADIENT TEPLoty

Izokratická separace



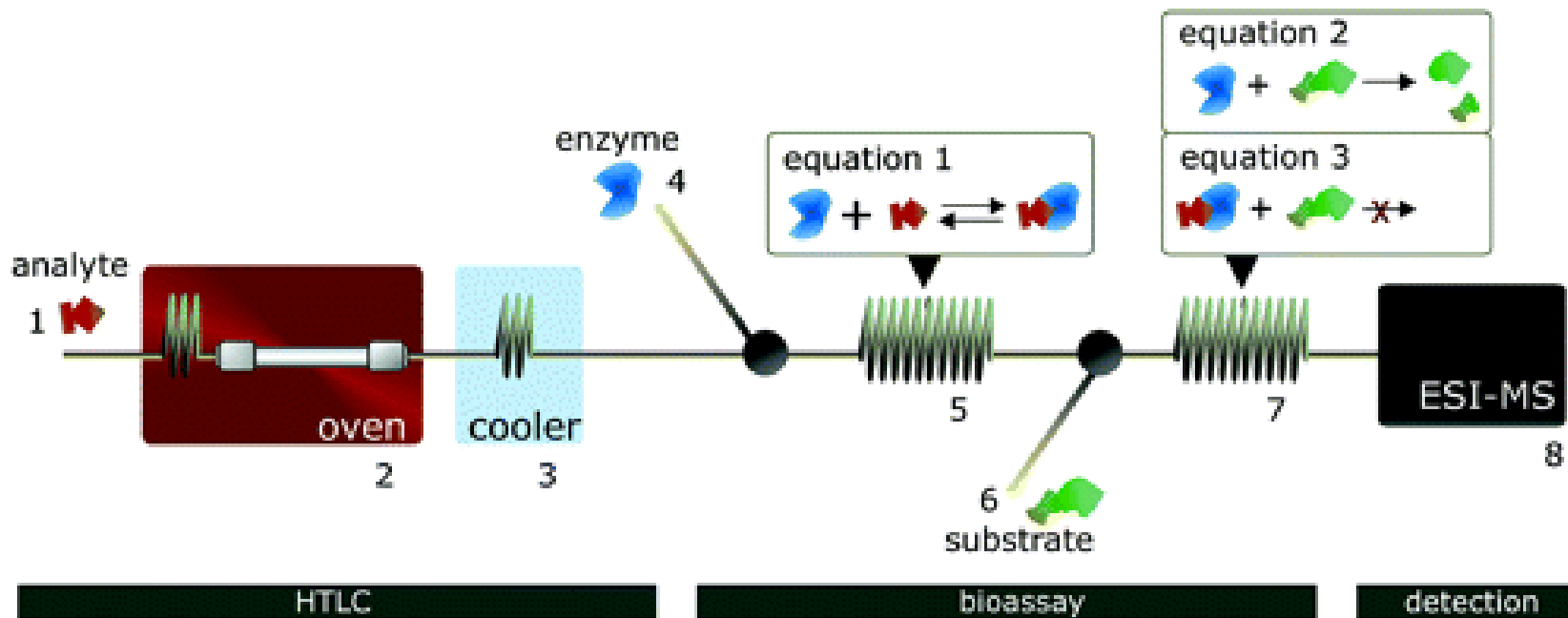
Alkylbenzeny, RP-C18, 50 cm x 1 mm, 7 μ m, 80% acetonitril, 25 $^{\circ}$ C

Teplotní gradient

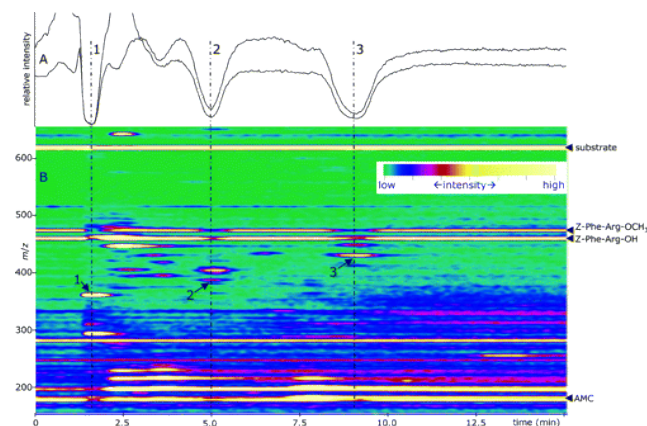


25 - 100 $^{\circ}$ C, 7 $^{\circ}$ C/min

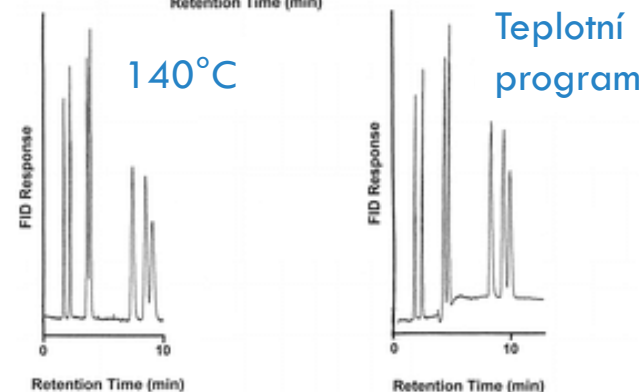
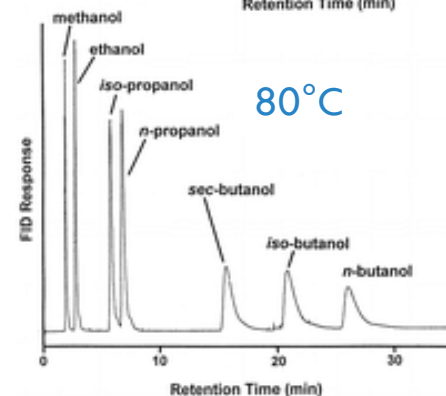
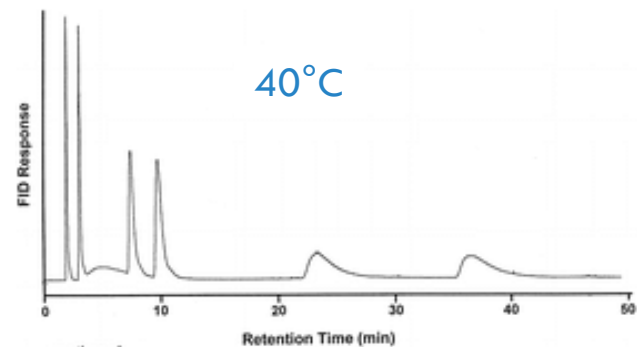
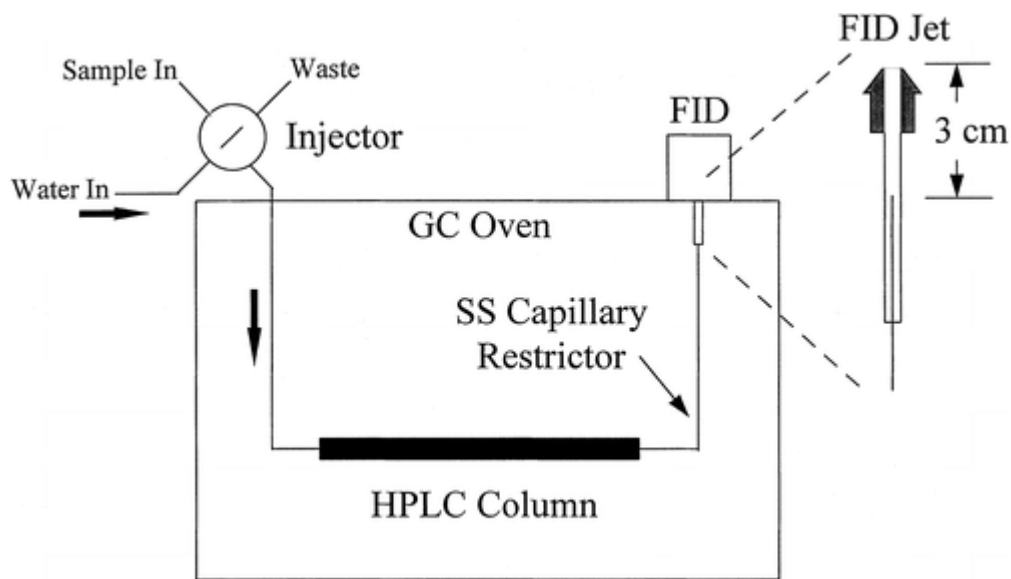
BIOCHEMICKÝ SCREENING



Kombinace vysokotepeľné chromatografie s enzymatickou reakci



VODA JAKO MOBILNÍ FÁZE



Alkohol	Deklarováno, %	Nalezeno, %
Whisky	50.5	49 ± 0.5
Rum	40.0	41 ± 1.0
Červené víno	13.0	13 ± 0.5
Pivo	5.6	5.5 ± 0.1

“I think truth has no temperature.”

Cameron Diaz

