

OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PROCESŮ – P8

Zjistěte optimální počáteční a konečnou koncentraci acetonitrilu při gradientu dvousložkové mobilní fáze, tak, aby bylo dosaženo separace všech látek ve směsi, s rozlišením R_s alespoň 1,5 ($R_s \geq 1,5$) v průběhu gradientu. Předpokládejte celkovou dobu gradientu 2 min. Parametry a a m potřebné pro optimalizaci získáte lineární regresní analýzou isokratických dat s využitím modelu $\log k - \varphi$. K řešení připojte grafy isokratických závislostí, hodnoty korelačních koeficientů a získáte parametry a a m , které následně použijete pro výpočet elučních objemů látek při gradientové eluci. K optimalizaci použijte metodu okénkových diagramů (závislosti rozlišení sousedních dvojic látek na počáteční koncentraci při gradientu, A), s využitím editoru Excel. Připojte grafy okénkových diagramů s vyznačením optimálních parametrů gradientu. Za předpokladu gausovského tvaru elučních křivek všech látek vypočtete tvar chromatogramu pro optimální podmínky separace. Obrázek optimalizovaného chromatogramu připojte k řešení.

Vstupní data

- použitá kolona: Kinetex XB-C18, 50×3.0 mm, 2.6 μm
- mobilní fáze: 10 mM octan amonný + acetonitril
- průtok mobilní fáze: 2 ml/min
- požadovaný čas gradientu: $t_G = \text{min}$
- počáteční koncentrace acetonitrilu: $A = \% \text{ acetonitrilu}$
- konečná koncentrace acetonitrilu: $\varphi_G = \% \text{ acetonitrilu}$
- mrtvý objem kolony: $V_M = 0.218 \text{ ml}$
- účinnost kolony: $N = 9500 \text{ pater}$
- zpoždění gradientu: $V_D = 0.94 \text{ ml}$
- tabulka naměřených elučních objemů látek za isokratických podmínek:

látka	mobilní fáze (% acetonitrilu)			
	15 %	20 %	25 %	30 %
	$V_R \text{ (ml)}$	$V_R \text{ (ml)}$	$V_R \text{ (ml)}$	$V_R \text{ (ml)}$
(-)-epikatechin	0.49	0.34	0.29	0.26
rutin	0.96	0.44	0.30	0.26
naringin	2.02	0.72	0.40	0.30
morin	3.40	1.39	0.74	0.47
kvercetin	5.63	2.14	1.03	0.57
hesperetin	12.58	4.59	2.08	1.14
biochanin A	61.43	21.61	8.70	4.06

Rovnice lineárního isokratického modelu: $\log k = -m \cdot \varphi + a$

Rovnice pro výpočet elučních objemů při gradientu: $V_R = \frac{1}{m \cdot B} \log[2.31mB \cdot V_M \cdot 10^{a-m \cdot A} - V_D + 1] + V_M + V_D$

kde a a m jsou parametry jednotlivých látek vypočítané z lineárních závislostí za isokratických podmínek, V_M je mrtvý objem kolony, V_D zpoždění gradientu, A počáteční koncentrace acetonitrilu v gradientu a B strmost gradientu ($\varphi = A + B \cdot V$). Strmost gradientu se vypočítá podle vztahu:

$$B = (\varphi_G - A) / V_G,$$

φ_G je konečná koncentrace acetonitrilu v gradientu (při výpočtu předpokládejte 100% acetonitrilu), V_G je objem mobilní fáze, který projde kolonou od počátku do konce gradientu.