

Chromatografické metody II.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Aplikační rozsah chromatografie

Metoda	Přibližný rozsah M_r analytů	Analyzované látky
GC	1- 400	plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, po derivatizaci i netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární
HPLC	$3 - 10^6$	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
PC, TLC	100 - 2000	ionty, látky polární i nepolární
CE (CZE, CEC, MEKC)	$3 - 10^6$	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery

PC a TLC



PC a TLC

- ◆ 1944 – Martin, Syngge - PC aminokyselín (Nobelova cena)
- ◆ 1952 – TLC nahrazuje PC

The background features a circular grid pattern, similar to a chromatogram or a technical drawing, with a hand holding a pen pointing to a specific spot on the grid. The entire image has a dark brown color scheme.

Instrumentace PC a TLC

Chromatografický papír

- ◆ Nemodifikovaný
- ◆ Modifikovaný – ionexy, acylace

f. Watman (Anglie)

Schleicher-Schüll (Německo)

TLC

- ◆ Vlastní příprava - sypané, nalévané
- ◆ Komerčně dostupné - Silufol (Cz)
Watman

PC a TLC - mody

- ◆ rozdělovací
- ◆ adsorpční
- ◆ ionexová
- ◆ hydrofobní – RP a HIC
- ◆ gelová permeační

Měření vzorku

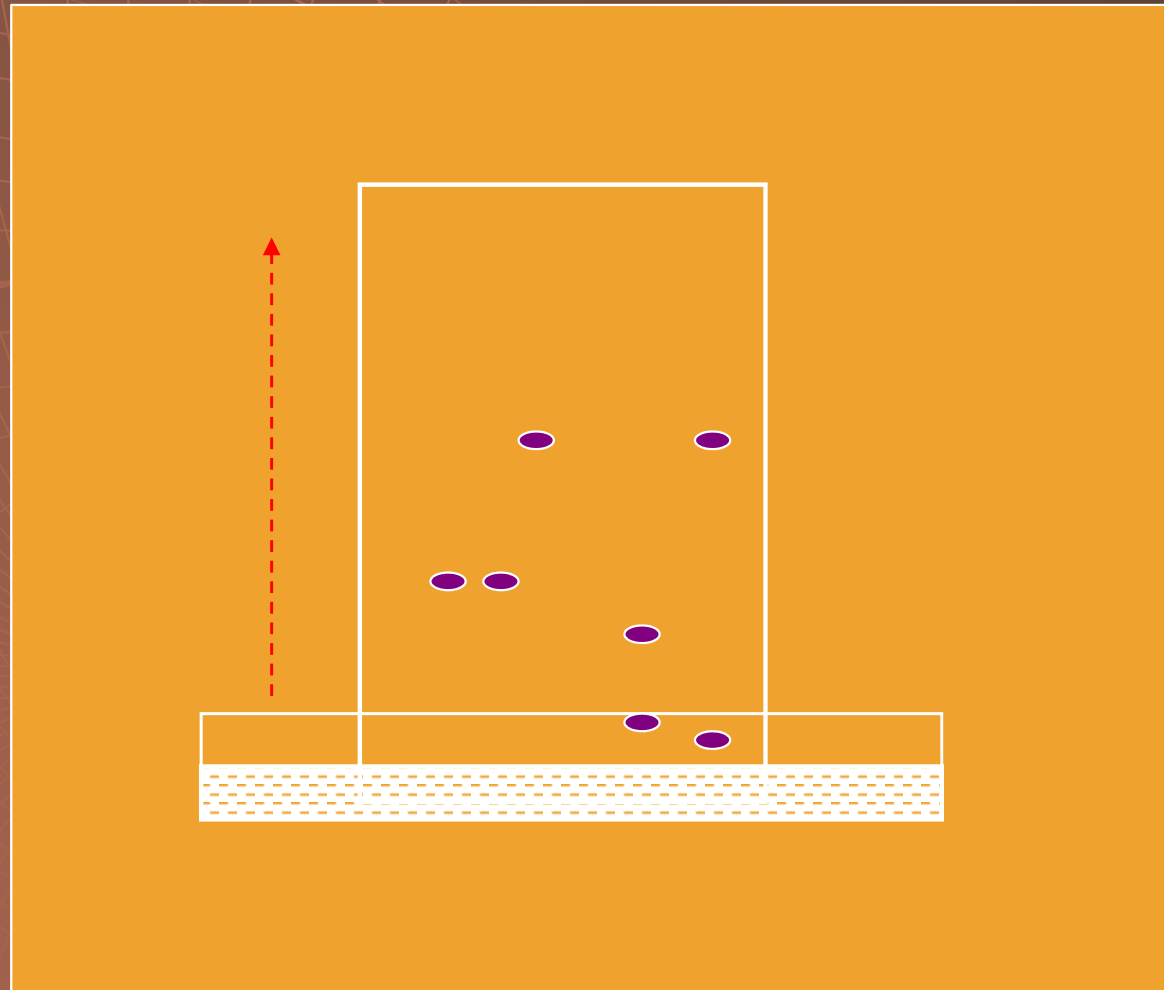
◆ Pipety

◆ Kapiláry

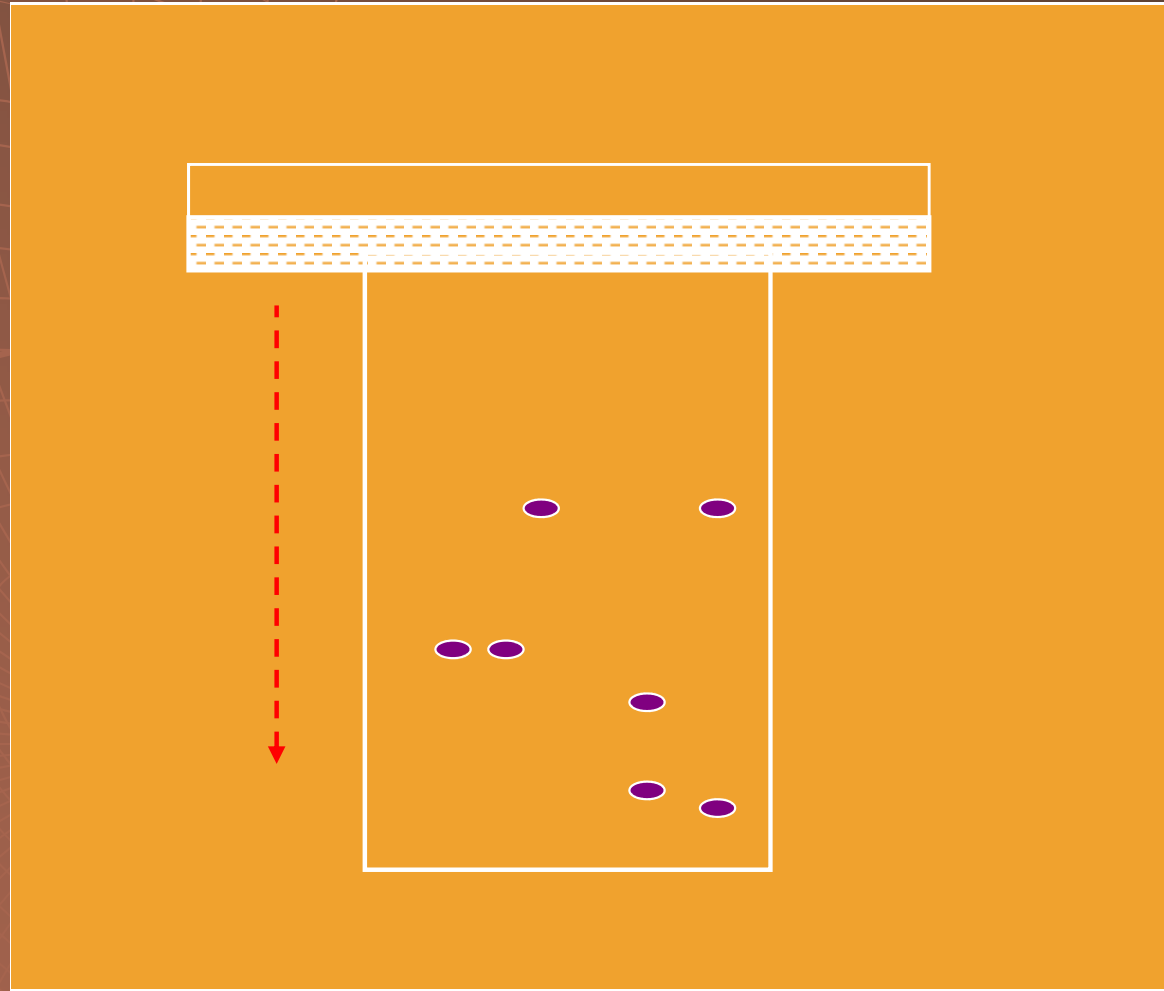
Provedení

- ◆ Vzestupné
- ◆ Sestupné
- ◆ Kruhové
- ◆ Dvojrozměrné

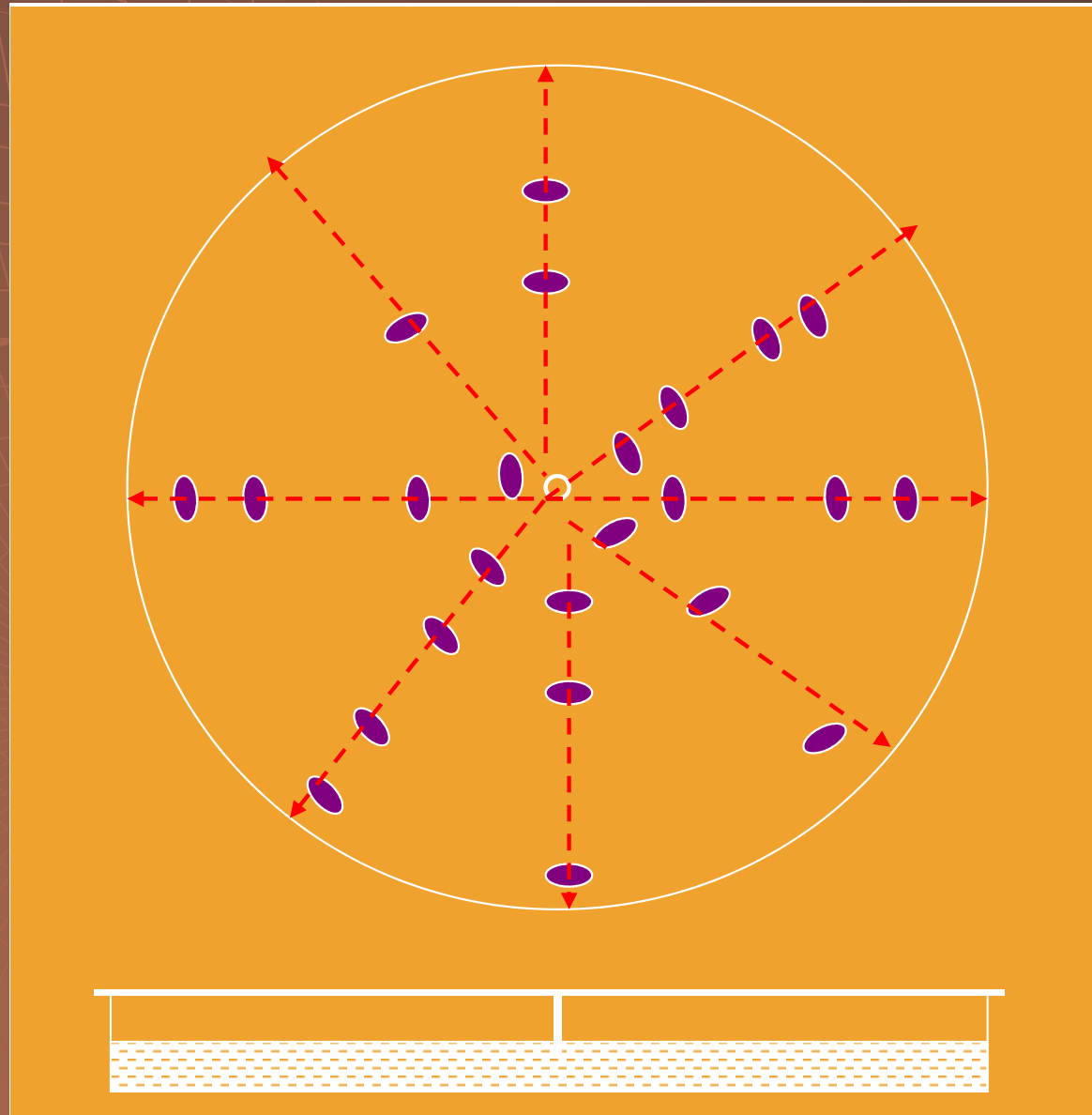
Vzestupné



Sestupné

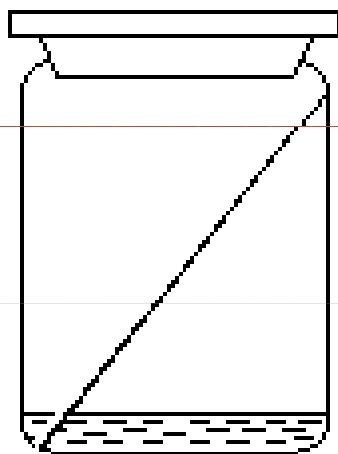


Kruhové

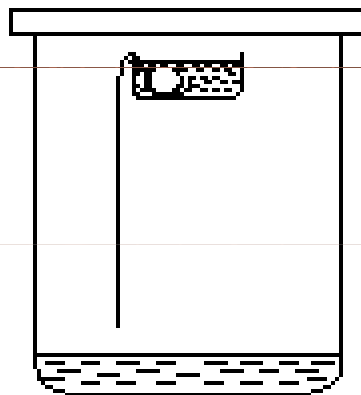


Vyvíjení

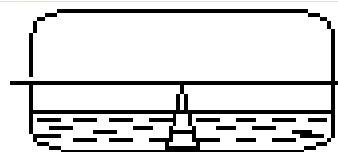
vzestupné
vyvíjení



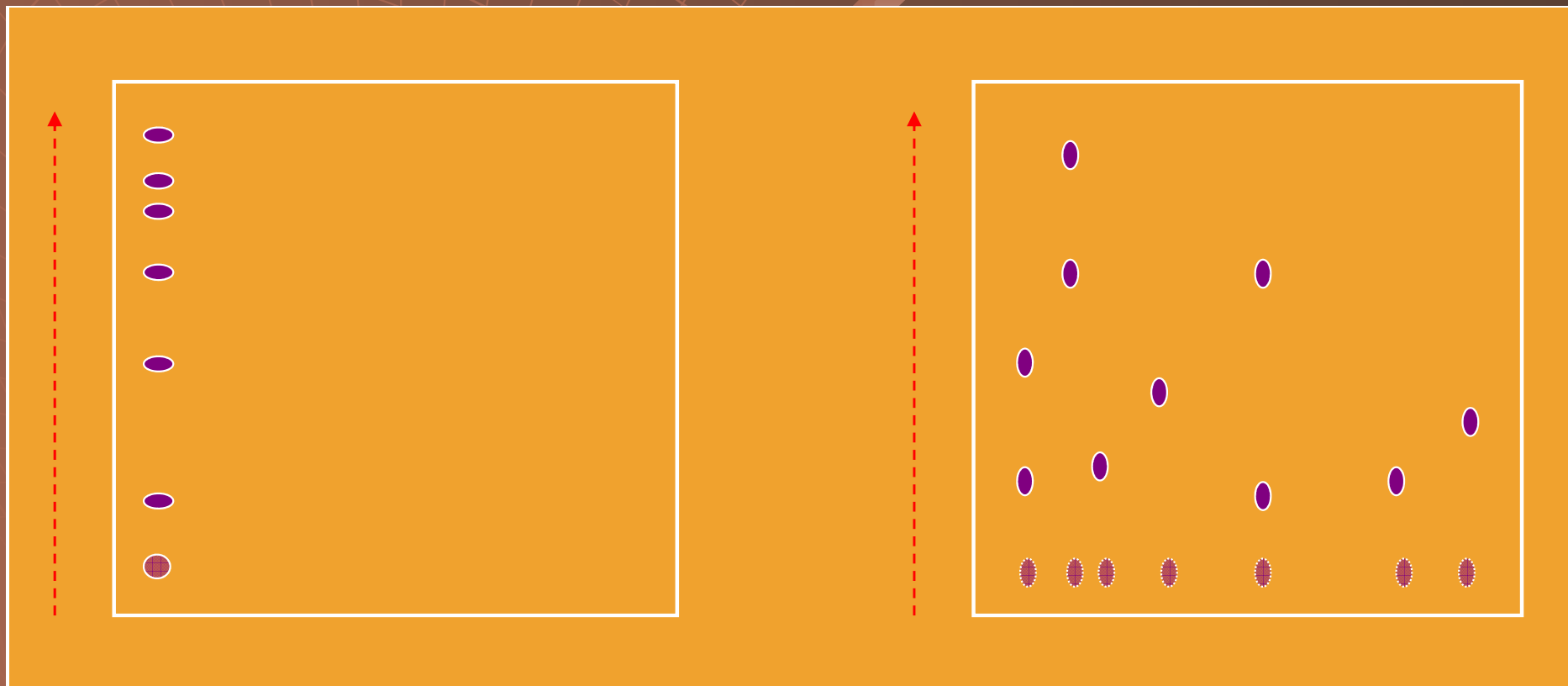
sestupné
vyvíjení



kruhové
(radiální)
vyvíjení



Dvojrozměrné



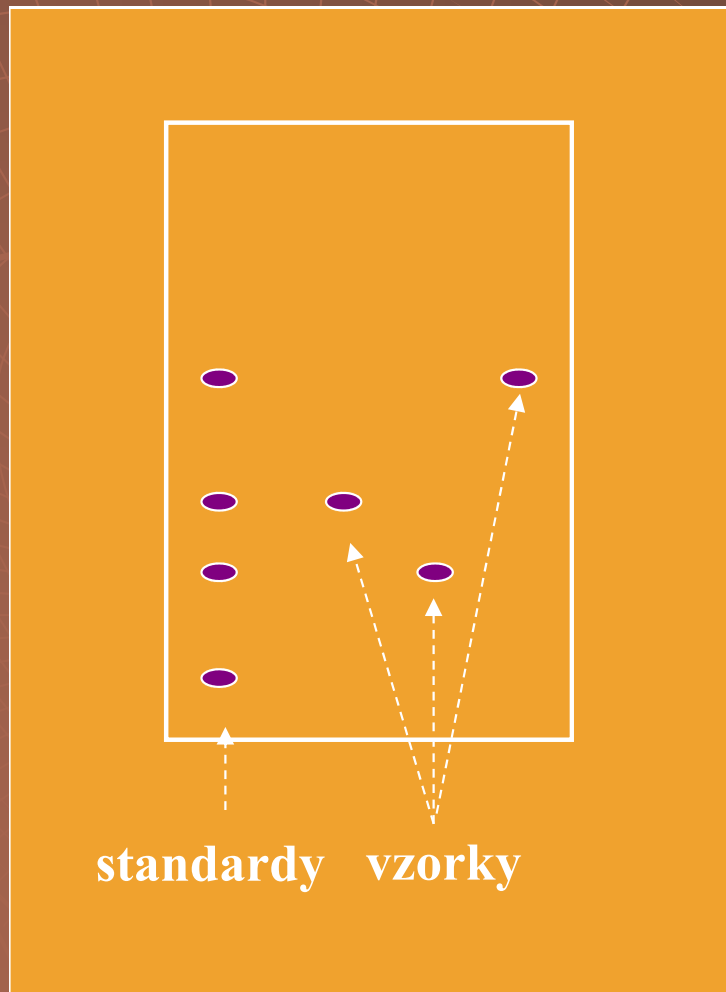
Provedení

- ◆ Analytické
- ◆ Preparativní

Detekce

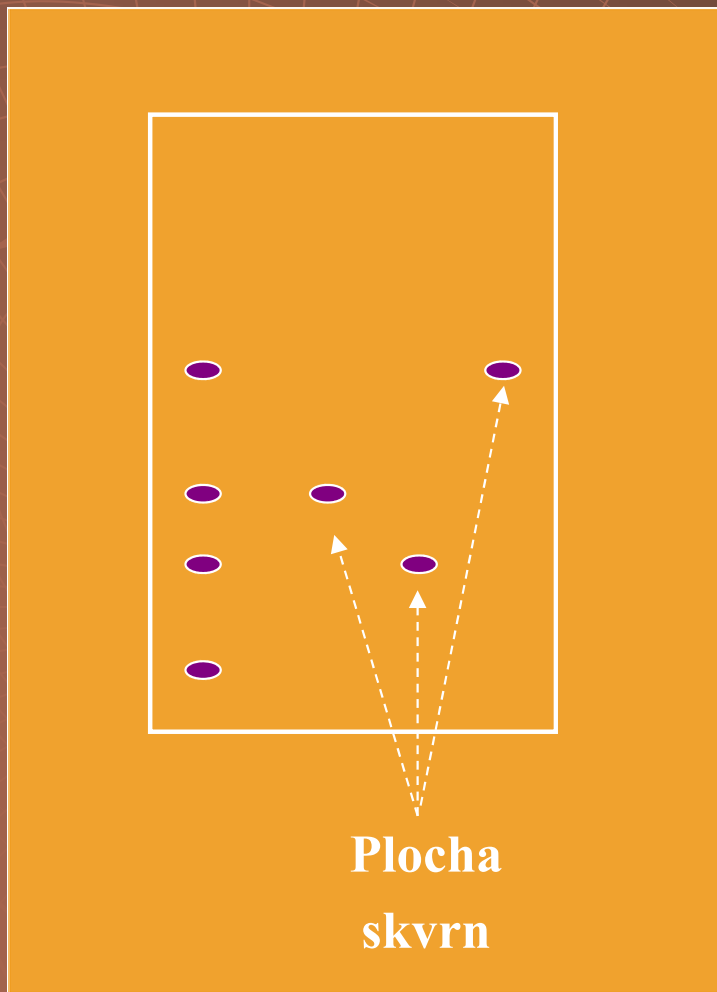
- ◆ Fyzikální
 - UV VIS
 - Fluorescence
- ◆ Chemická – derivatizace
 - Specifická
 - nespecifická
- ◆ Na základě biologické aktivity

Analýza kvalitativní



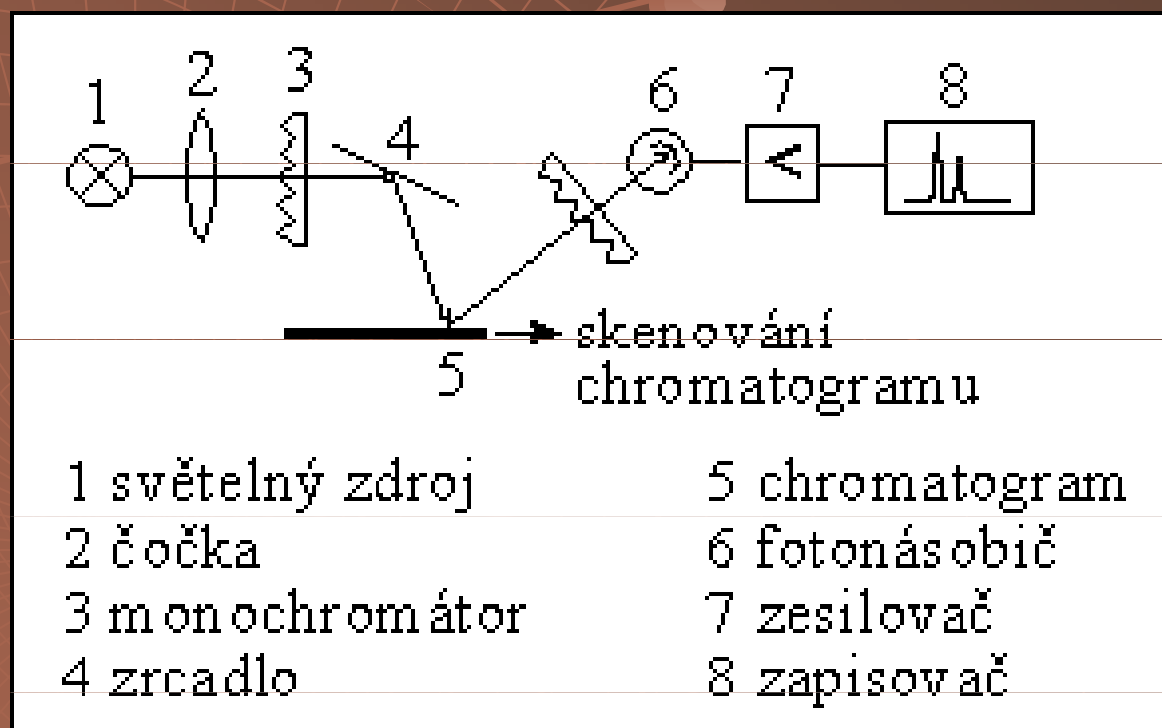
$$R_f = \frac{\textit{střed skvrny}}{\textit{čelo rozpouštědla}}$$

Analýza kvantitativní

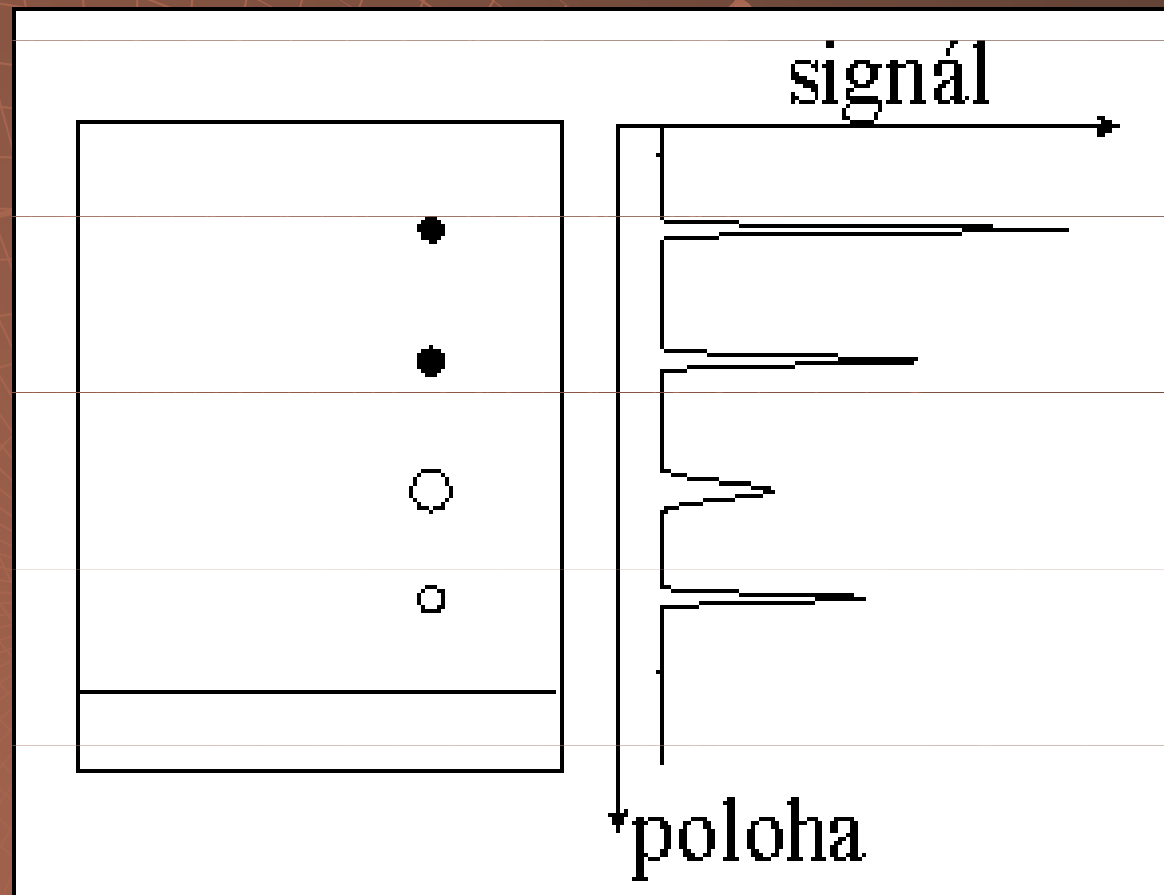


- ◆ Planimetrie
- ◆ Denzitometrie

Denzitometrie



Denzitometrie



Preparace

- ◆ PC – vystřížení a eluce skvrny
- ◆ TLC – vyškrábání a eluce skvrny
 - odsání a eluce skvrny

Kolonačchromatografie



Kapalinoáchromatografie rozdělení

- ◆ Nízkotlaká (atmosferický tlak) – LPC
- ◆ Střednětlaká (4 Mpa) – FPLC
- ◆ Vysokotlaká (40 Mpa) – HPLC
- ◆ Ultravysokotlaká (100 Mpa) – UPLC

Kapalinoáchromatografie využití

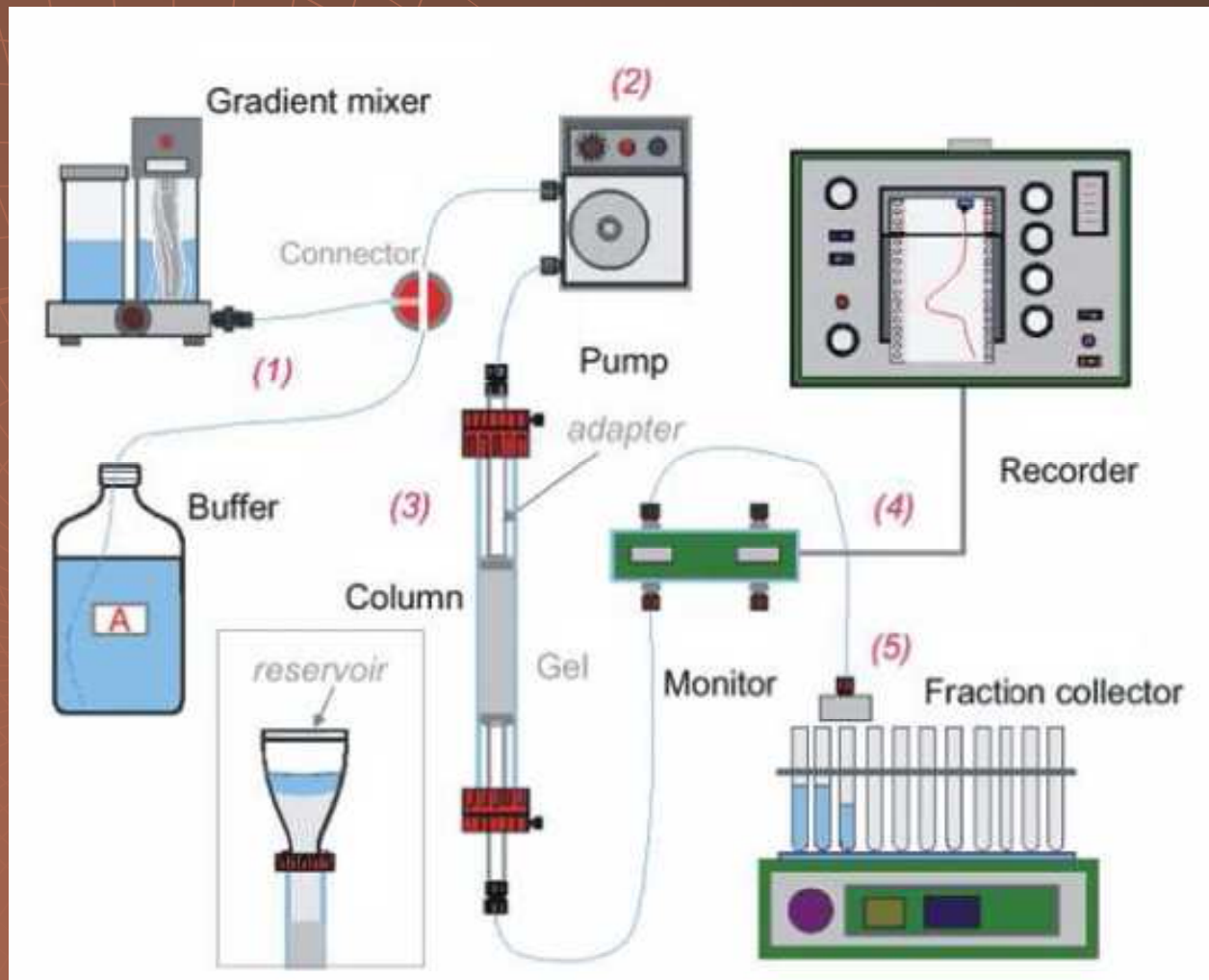
- ◆ LPC – preparativní
- ◆ FPLC – semipreparativní a analytická
- ◆ HPLC – analytická
- ◆ UPLC – analytická

Kapalinoáchromatografie

doba trvání

- ◆ LPC – hodiny
- ◆ FPLC – desítky minut
- ◆ HPLC – minuty
- ◆ UPLC - sekundy

Zařízení pro LPC



Zařízení pro LPC



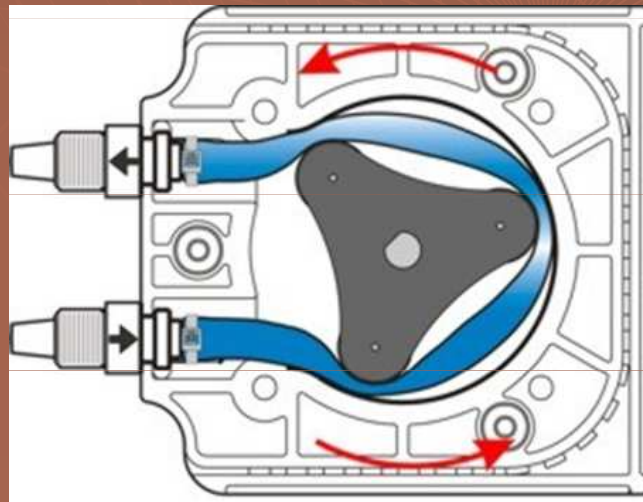
Zařízení pro LPC



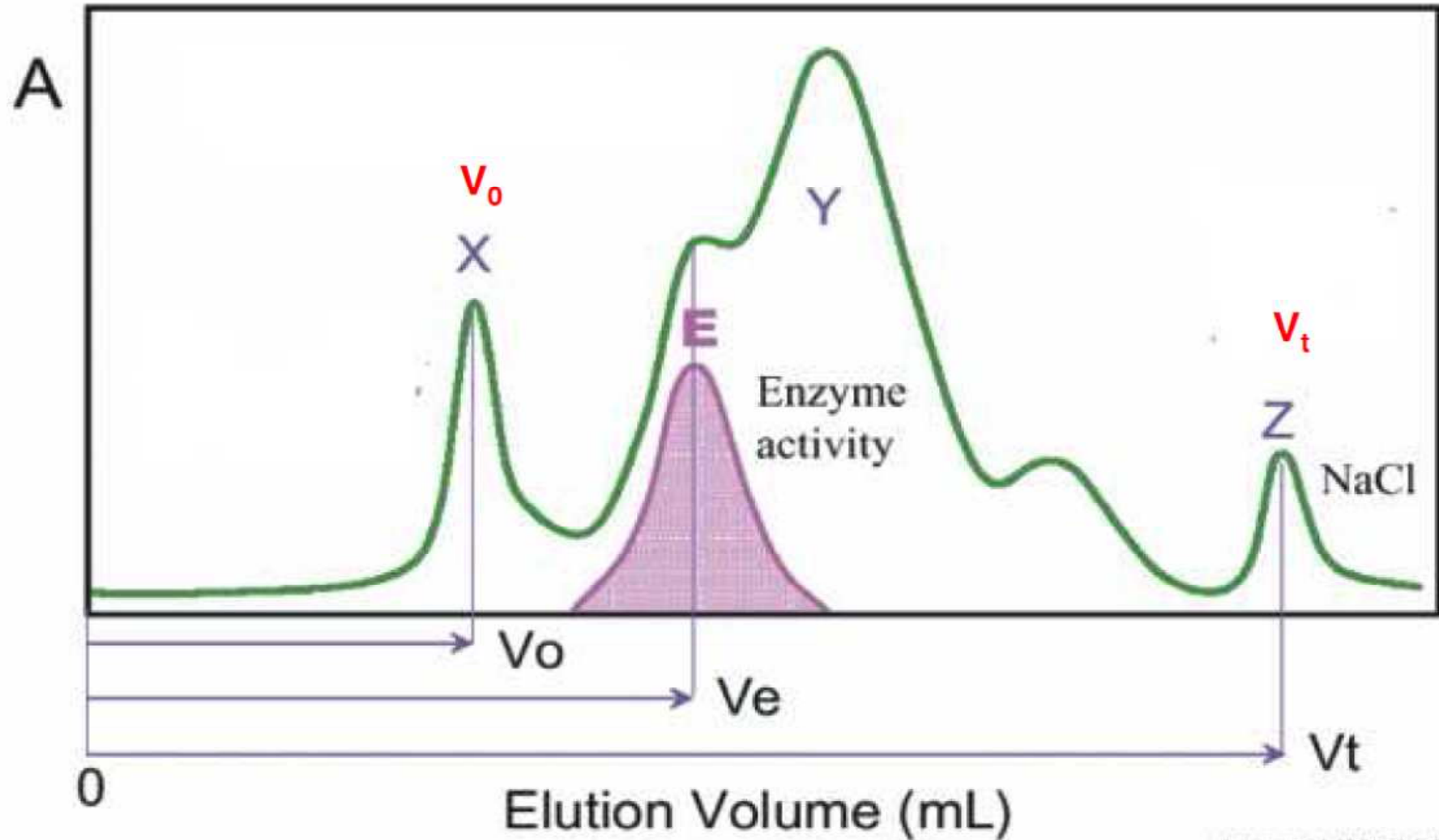
Instrumentace pro LPC

- ◆ Pumpa – peristaltická nebo gravitace
- ◆ Gradient – mísič gradientu
- ◆ Dávkování – přímo pumpou na kolonu
- ◆ Kolony – skleněné
- ◆ Detekce – spektrofotometrická 254, 280 nm
- ◆ Vyhodnocování – zapisovač
- ◆ Sběrač frakcí – programovatelný

Zařízení pro LPC



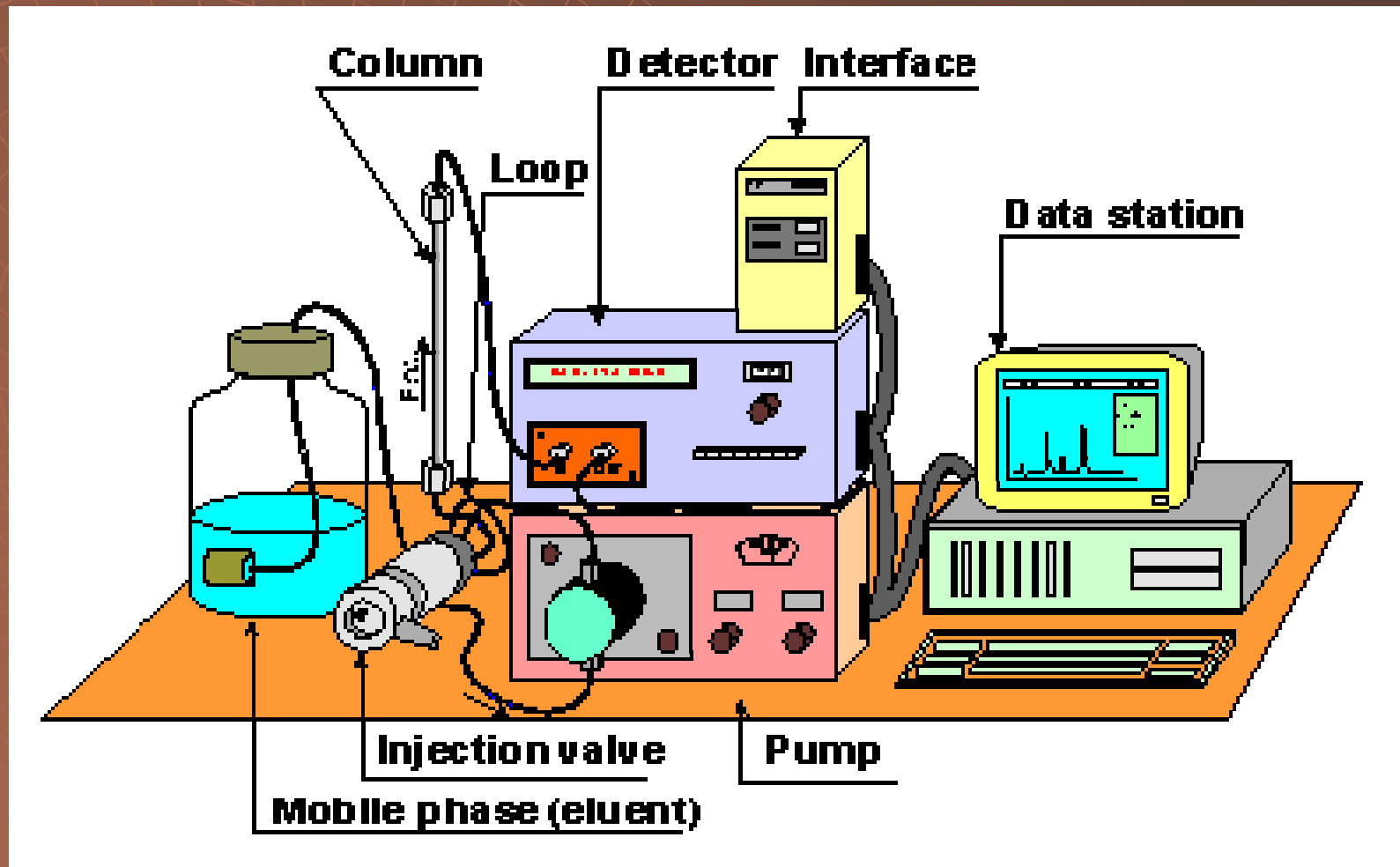
LPC





Instrumentace pro FPLC a HPLC

Zařízení pro FPLC a HPLC



Zařízení pro FPLC



Zařízení pro HPLC



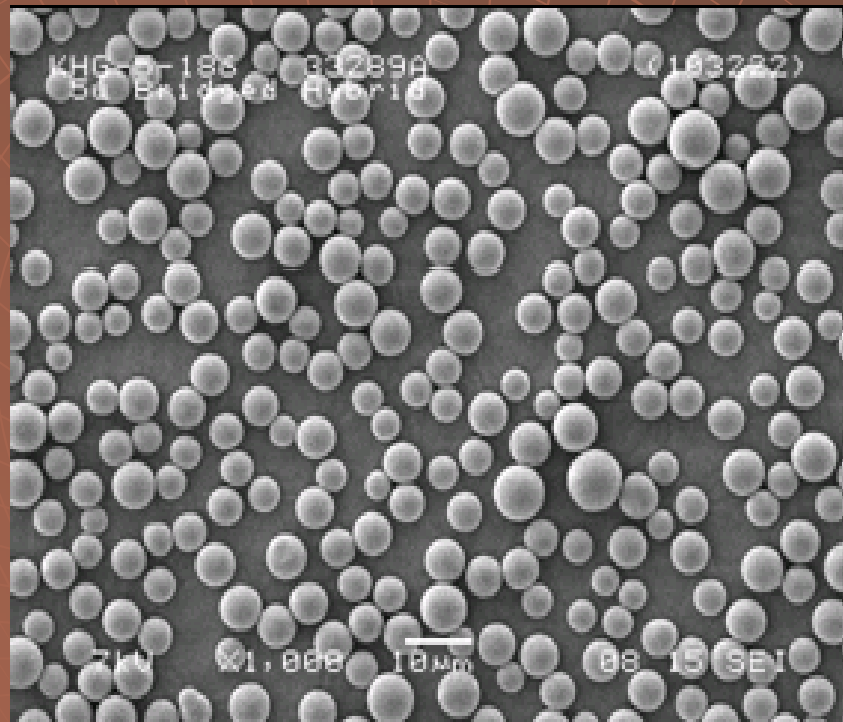
Zařízení pro UPLC



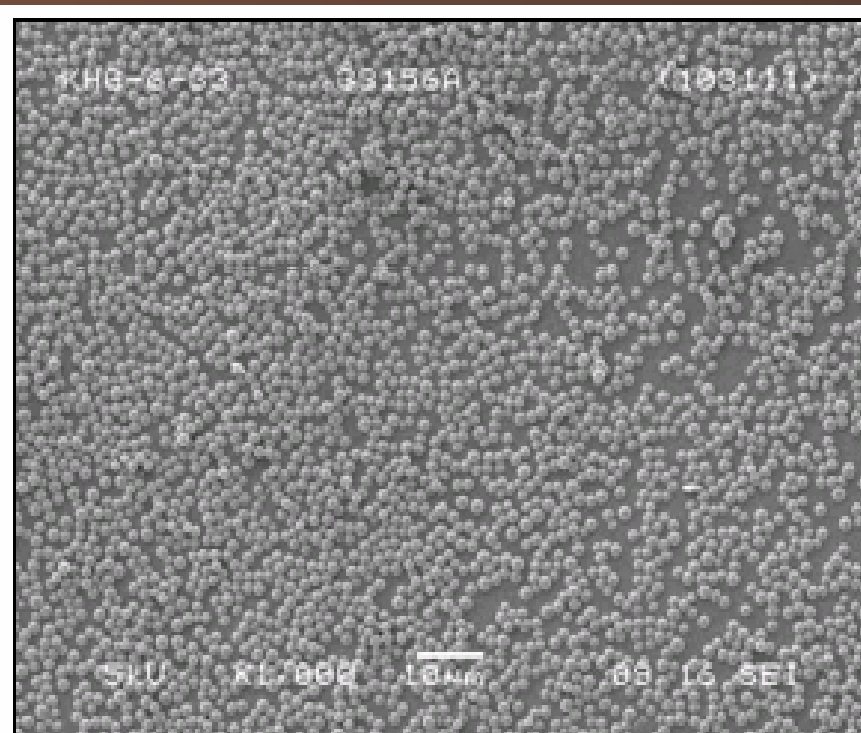
UPLC x HPLC

- kratší doba analýzy = vyšší průchodnost vzorků (vyšší produktivita)
- snížení nákladů = menší spotřeba HPLC rozpouštědel (ekologie)
- zvýšení separační účinnosti
- snížení meze detekce – zvýšení citlivosti
- •více kvalitativních informací

UPLC x HPLC



5 µm Particles



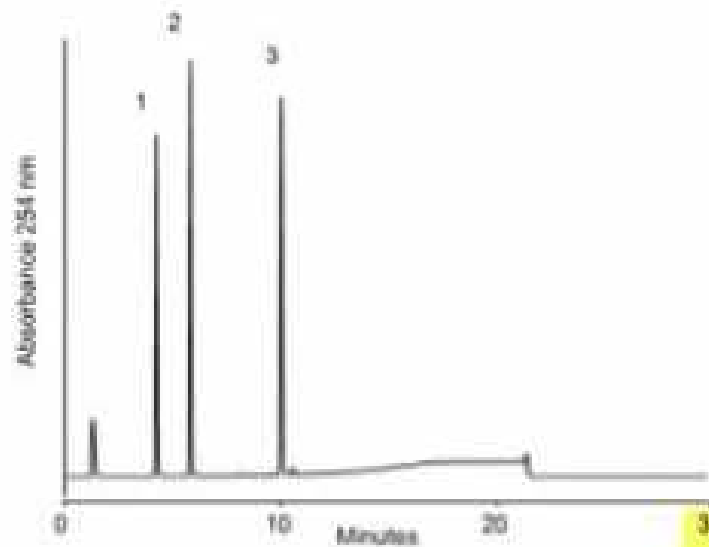
1.7 µm UPLC Particles

UPLC x HPLC

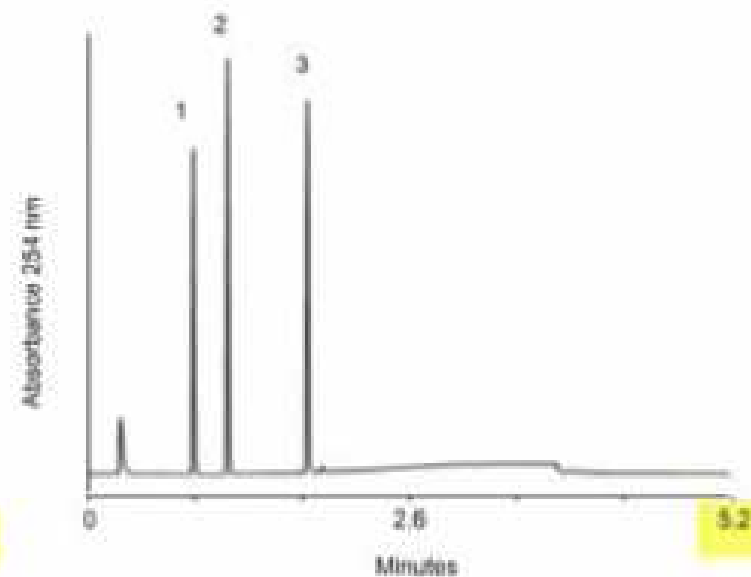
Waters

HPLC Converted to UPLC™

©2005 Waters Corporation

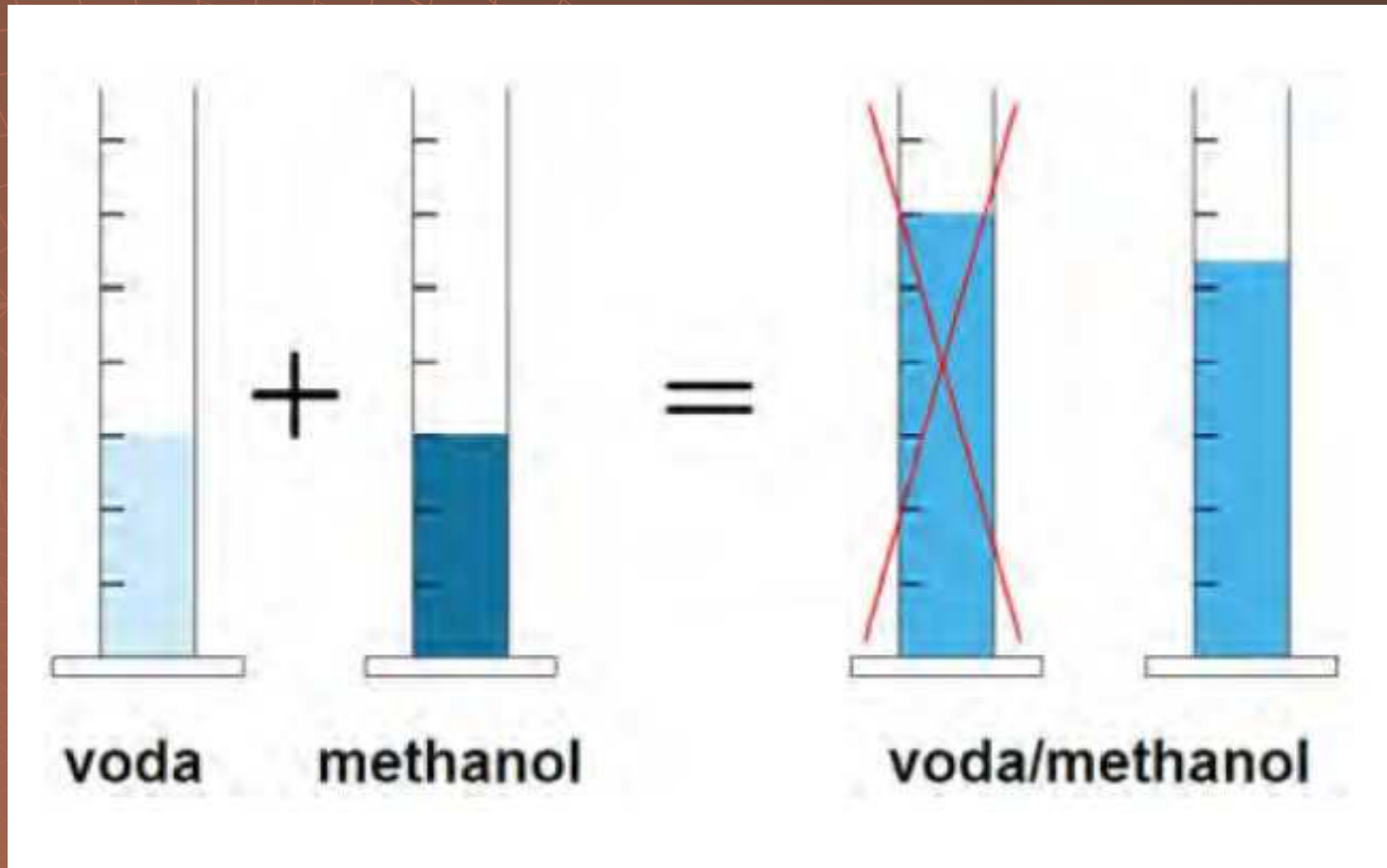


Original 30 minute HPLC



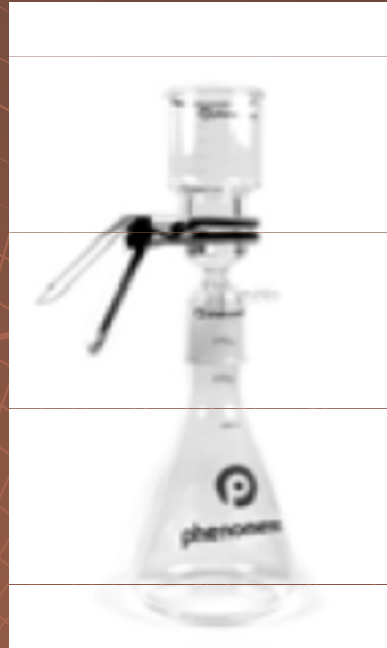
Converted 5.2 minute UPLC™

Příprava mobilní fáze



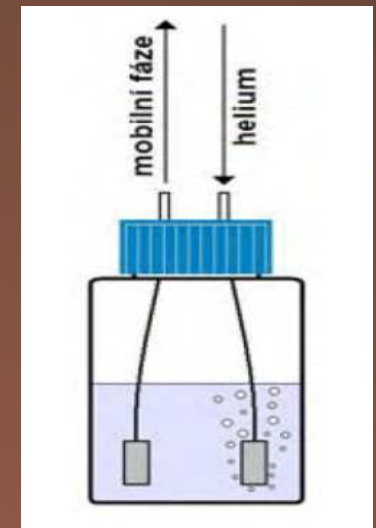
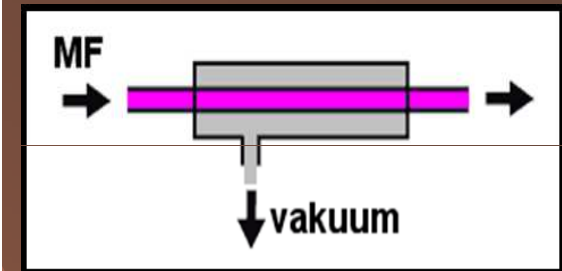
Příprava mobilní fáze

- filtrace



Odplynění mobilní fáze

- přechod varem za nízkého tlaku
- ozvučení ultrazvukem
- vakuová filtrace
- in-line membránové odplynění
- probublávání inertním plynem



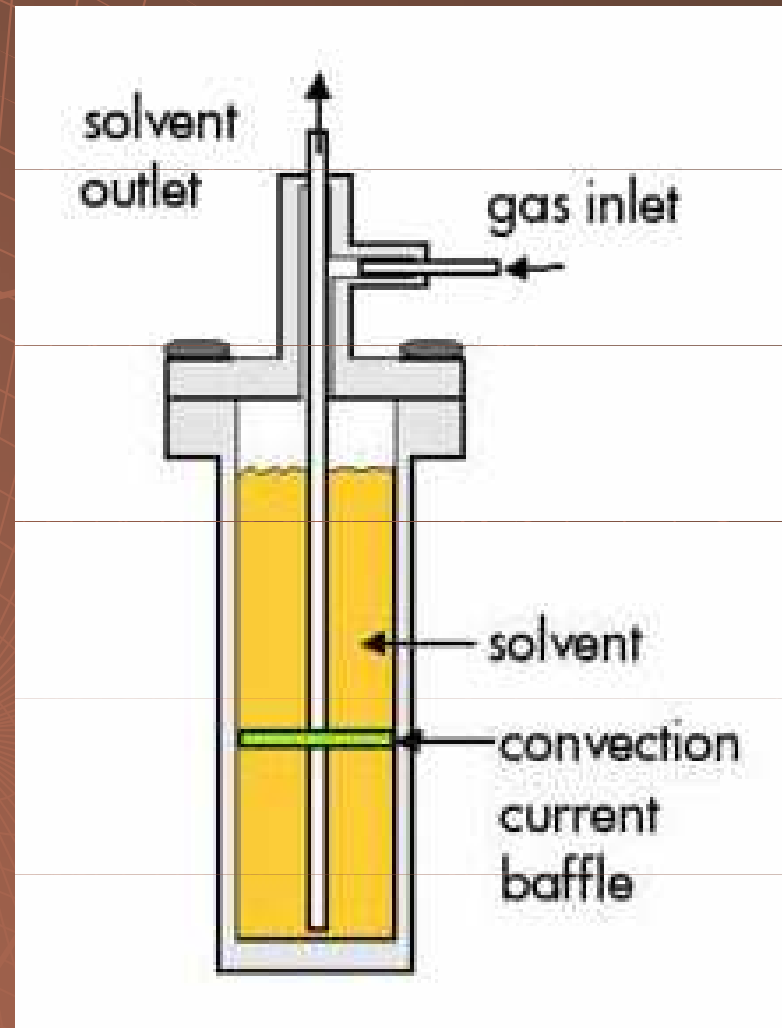


Pumpy

The background features a faint, light-colored grid pattern overlaid on a dark brown background. The grid consists of concentric circles and radial lines, resembling the structure of a pump impeller. A small, light-colored object, possibly a pump component, is visible near the center of the grid.

Pumpy pracující za konstantního tlaku

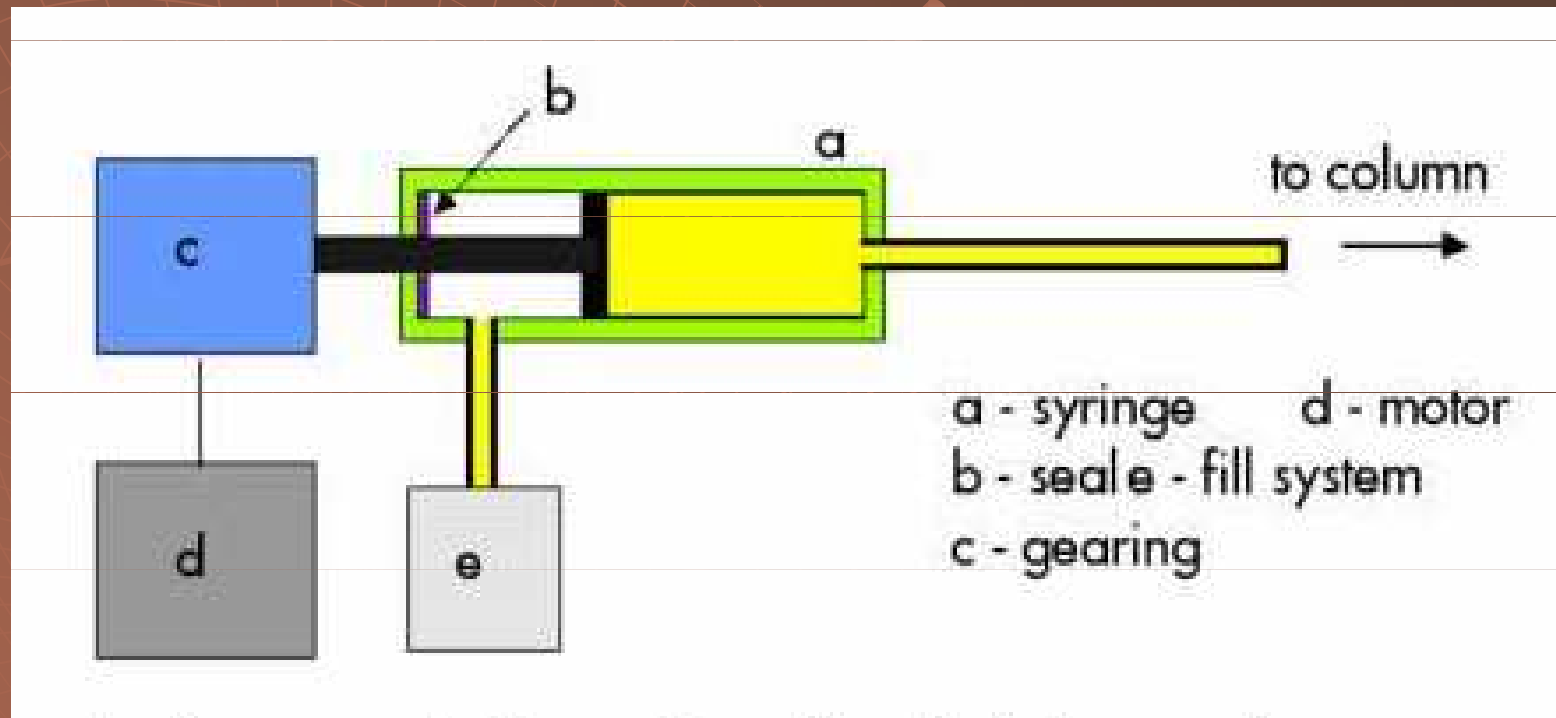
Τλακοάρpυμπα



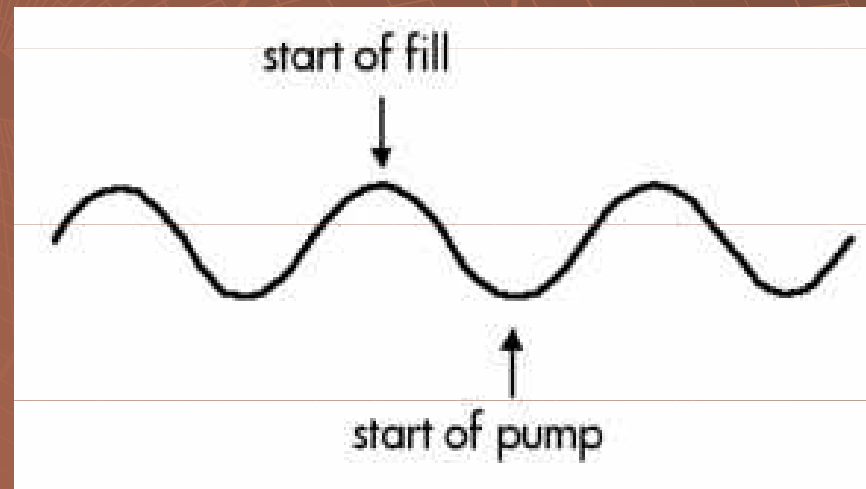
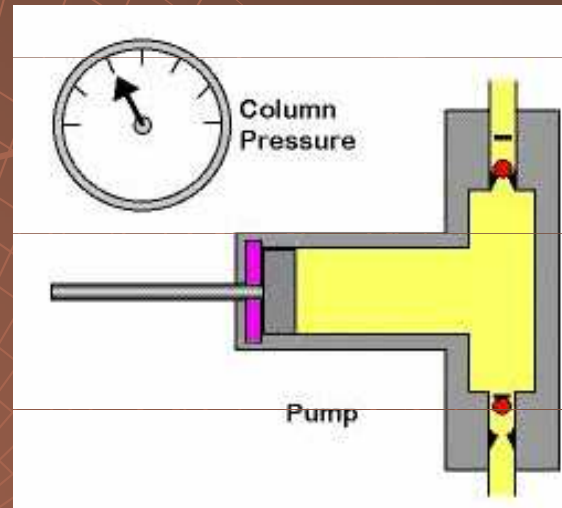
The background features a faint, light-colored grid pattern overlaid on a dark brown background. The grid consists of concentric circles and radial lines, resembling the structure of a pump impeller. A small, stylized pump component is visible at the center of the grid.

Pumpy pracující za konstantního průtoku

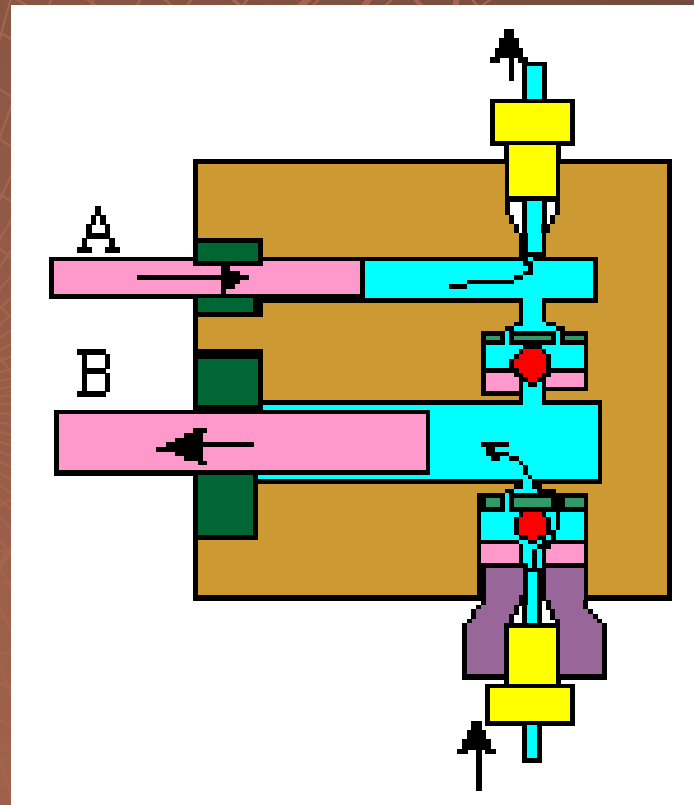
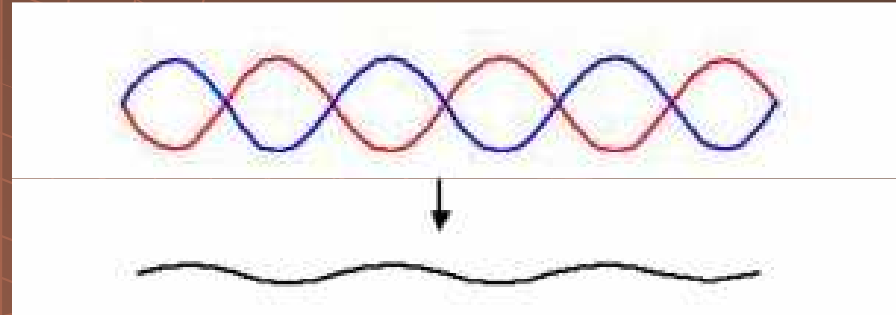
Lineární dákováče



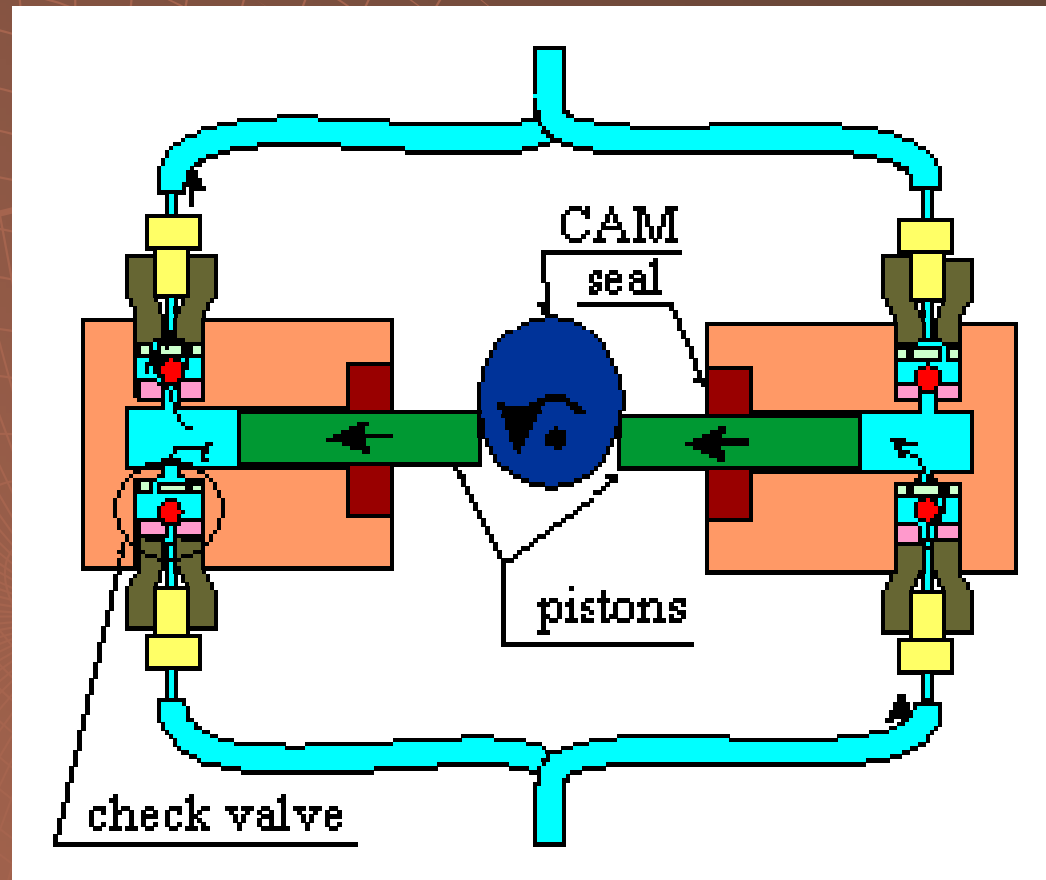
Pumpa jednopístová



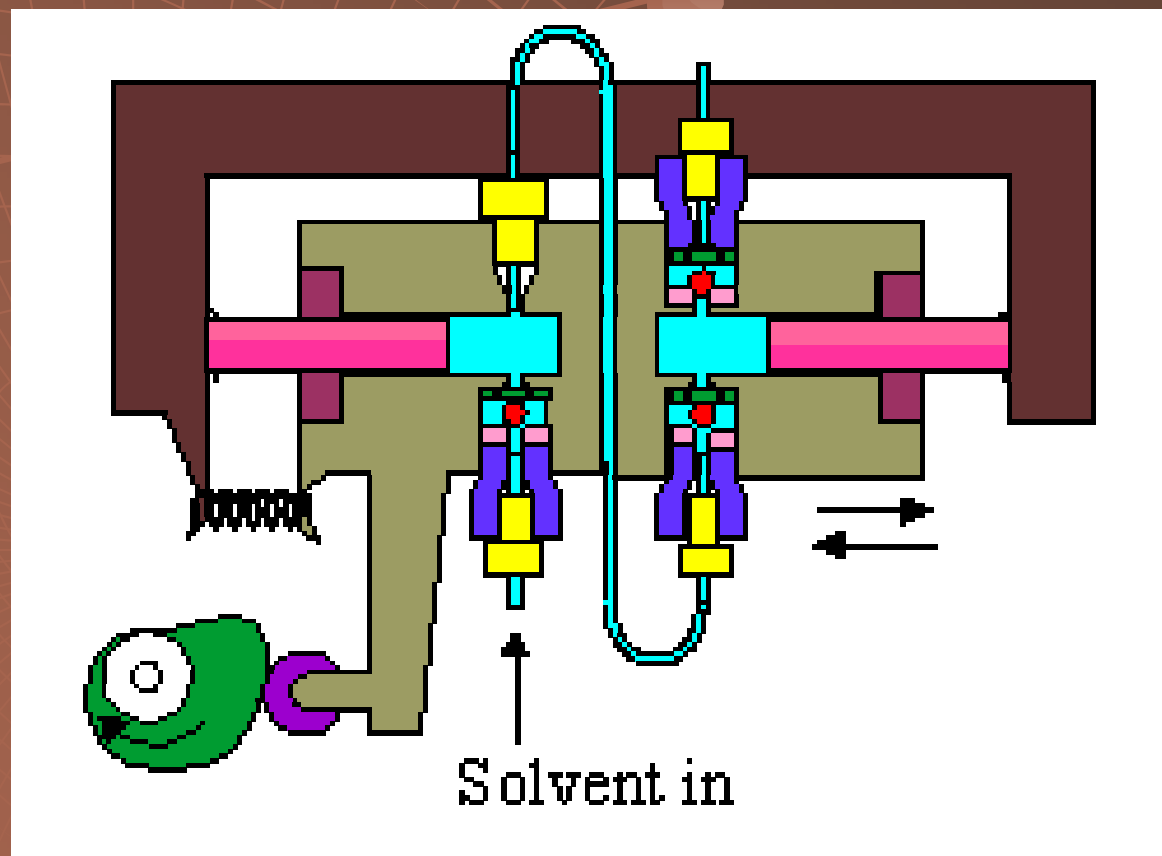
Pumpa dvoupístová



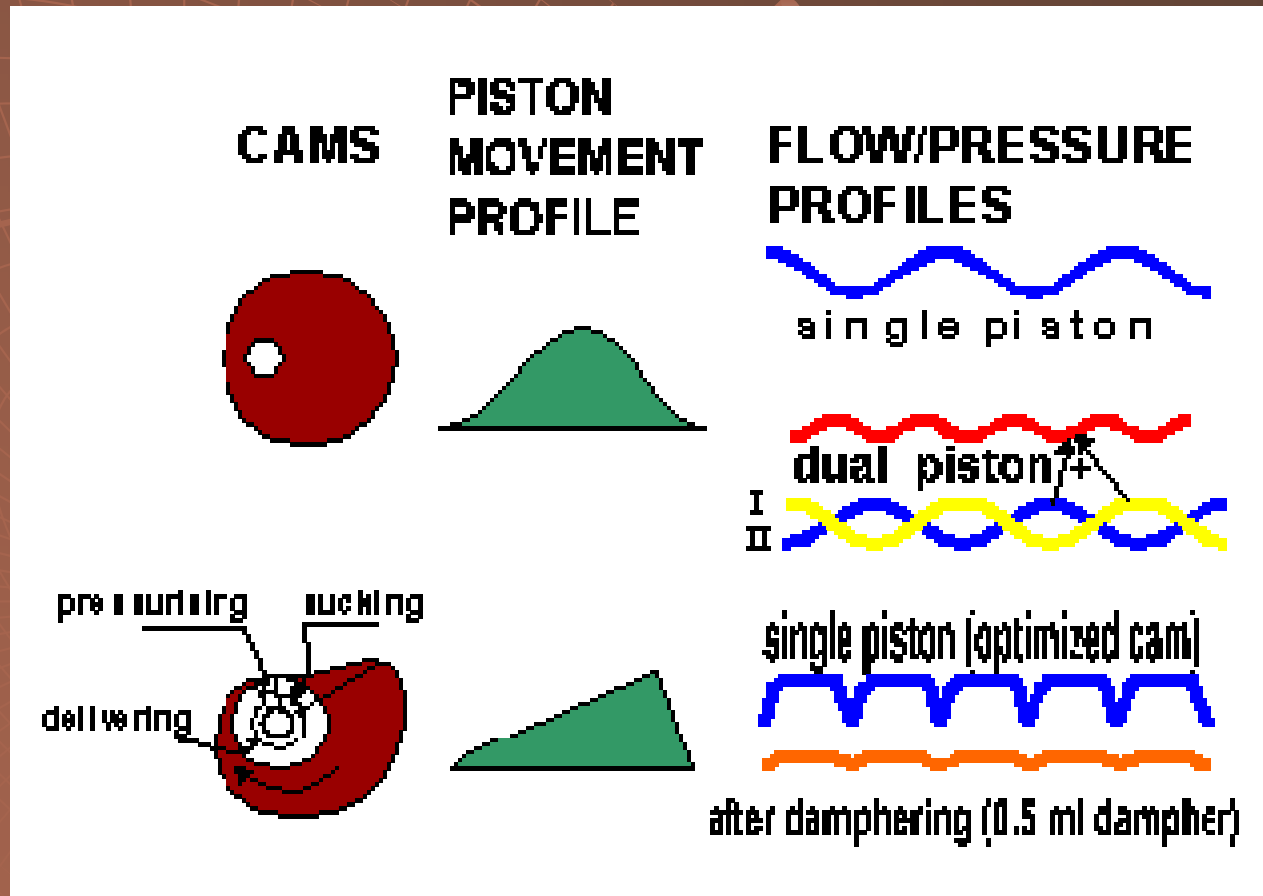
Pumpa dvoupístová



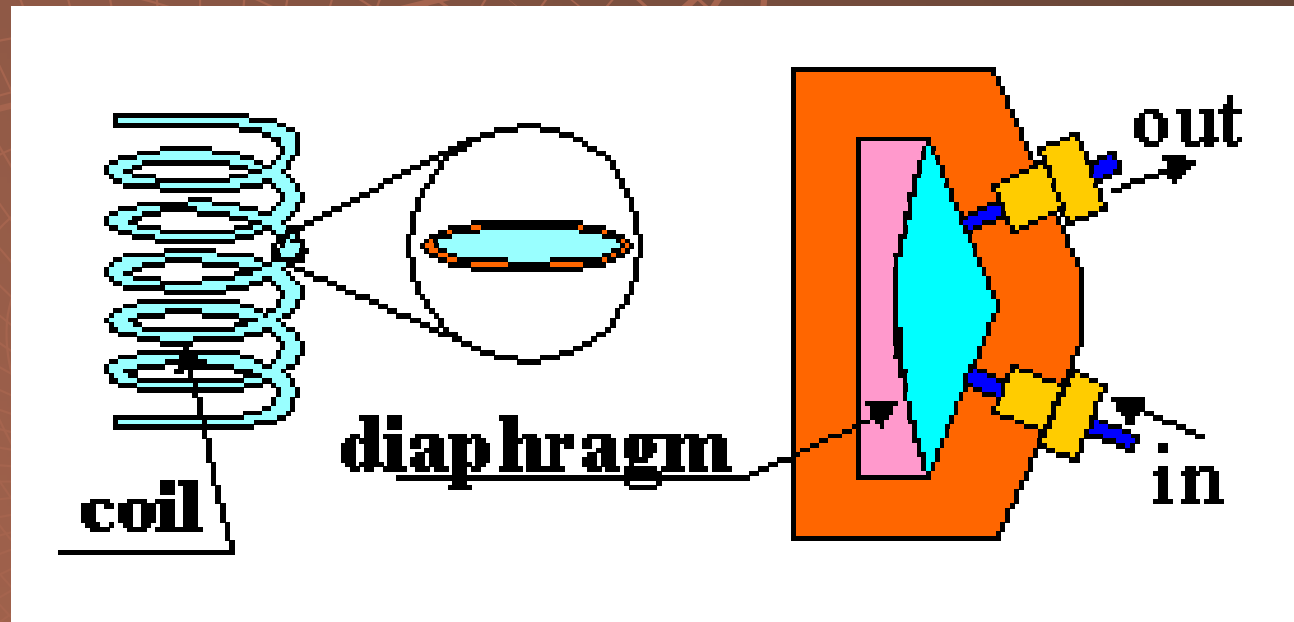
Pumpa dvoupístová



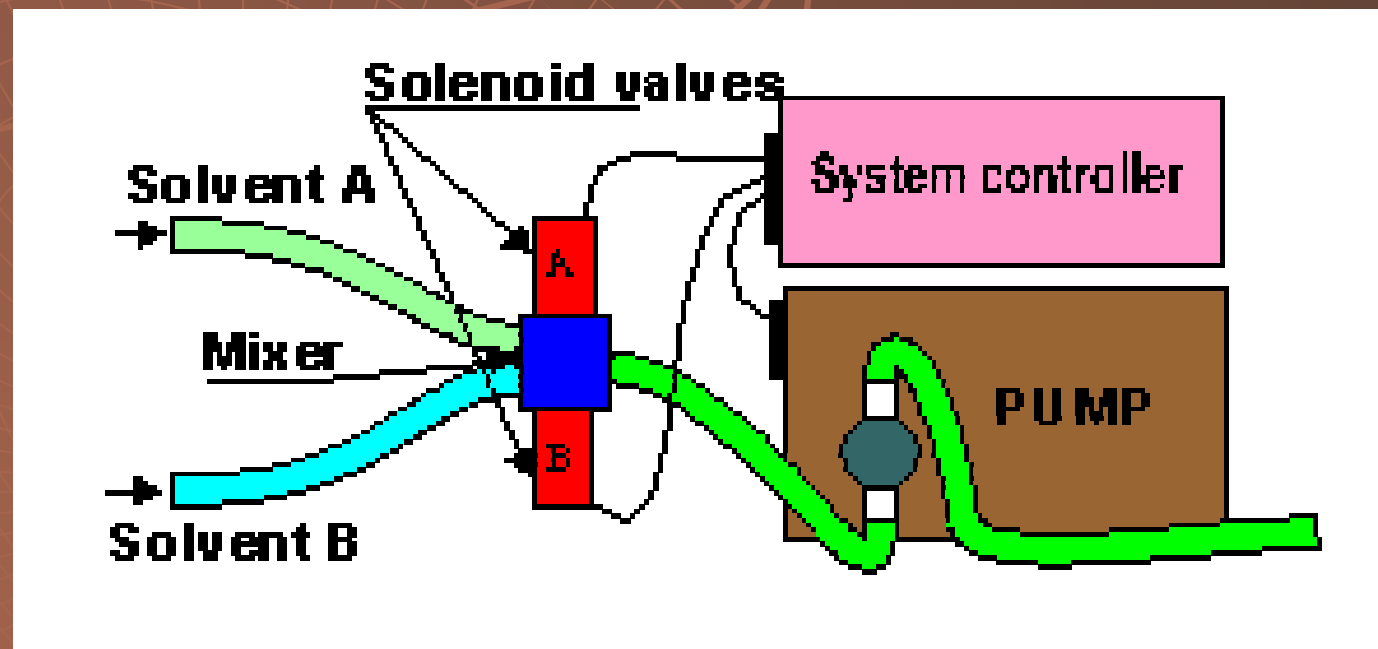
Tlumení pulsů



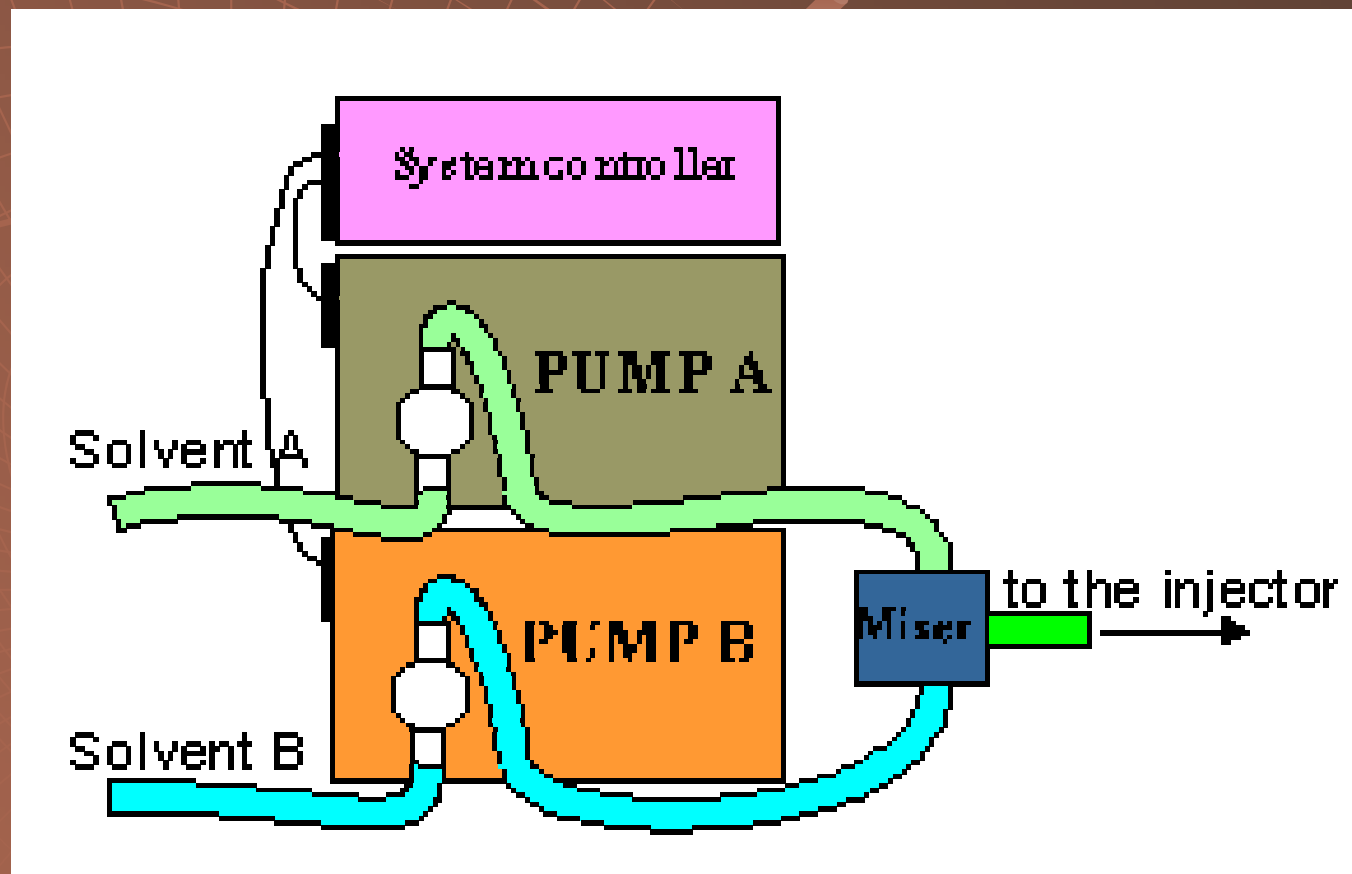
Tlumení pulsů



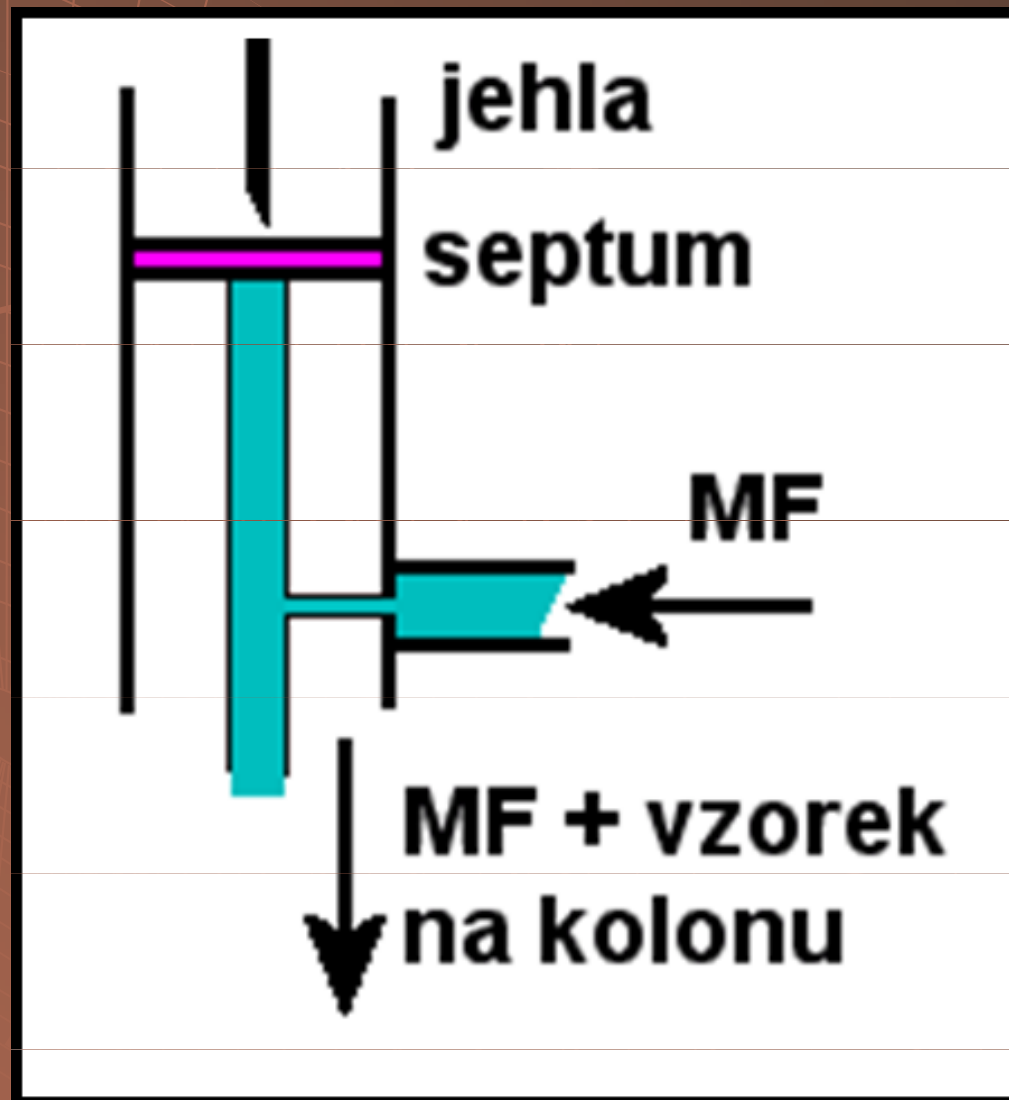
Gradient nízkotlaký



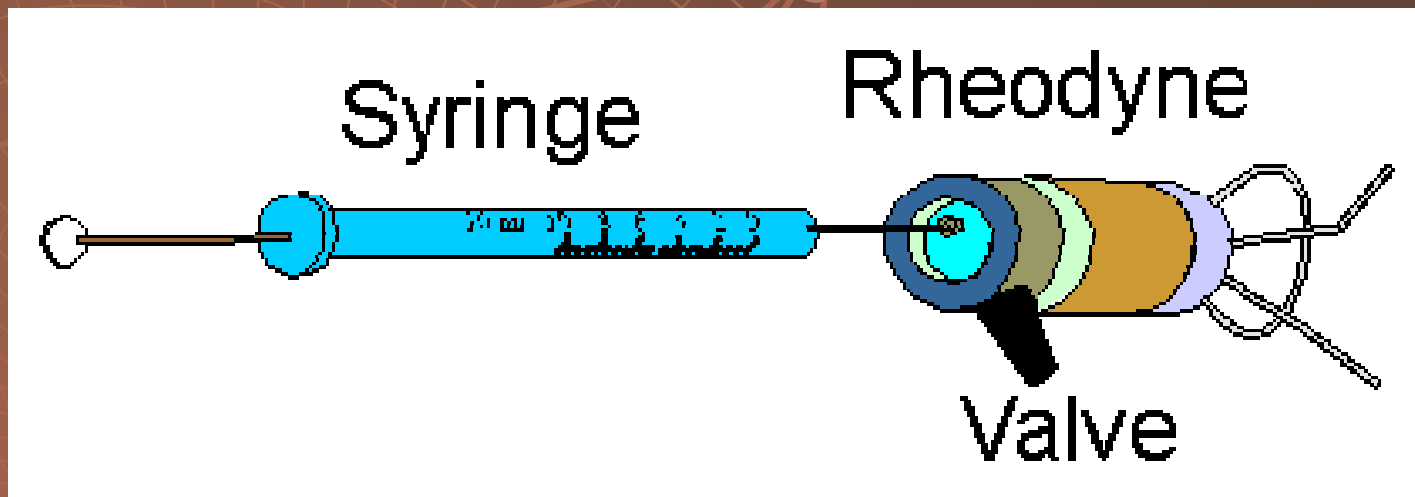
Gradient vysokotlaký



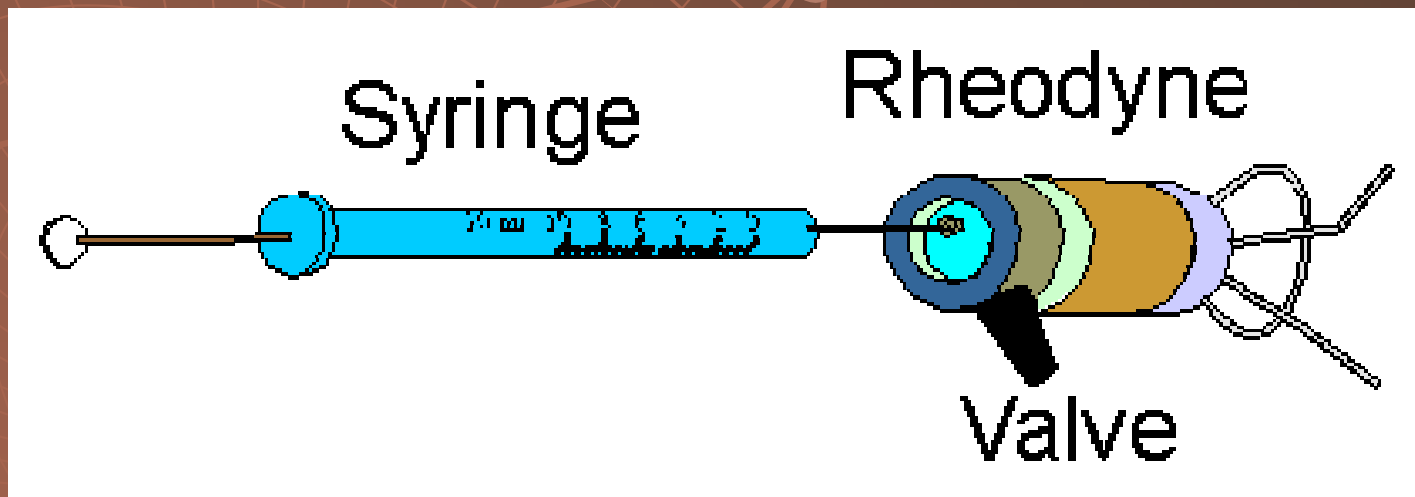
Dákování – septum



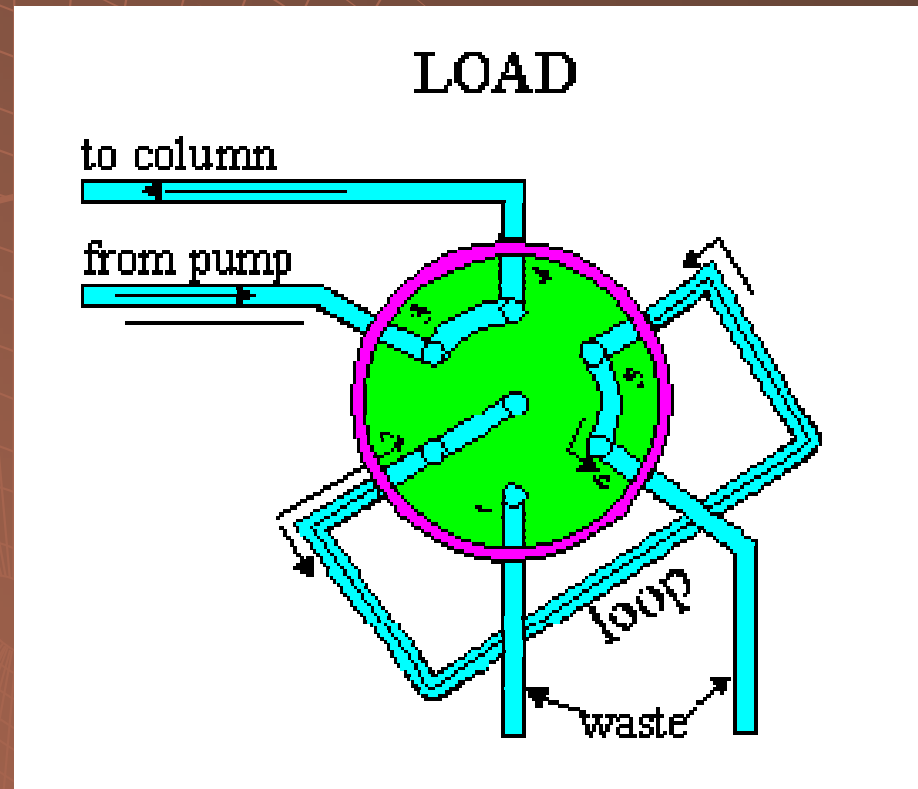
Dákování – dákovací ventil



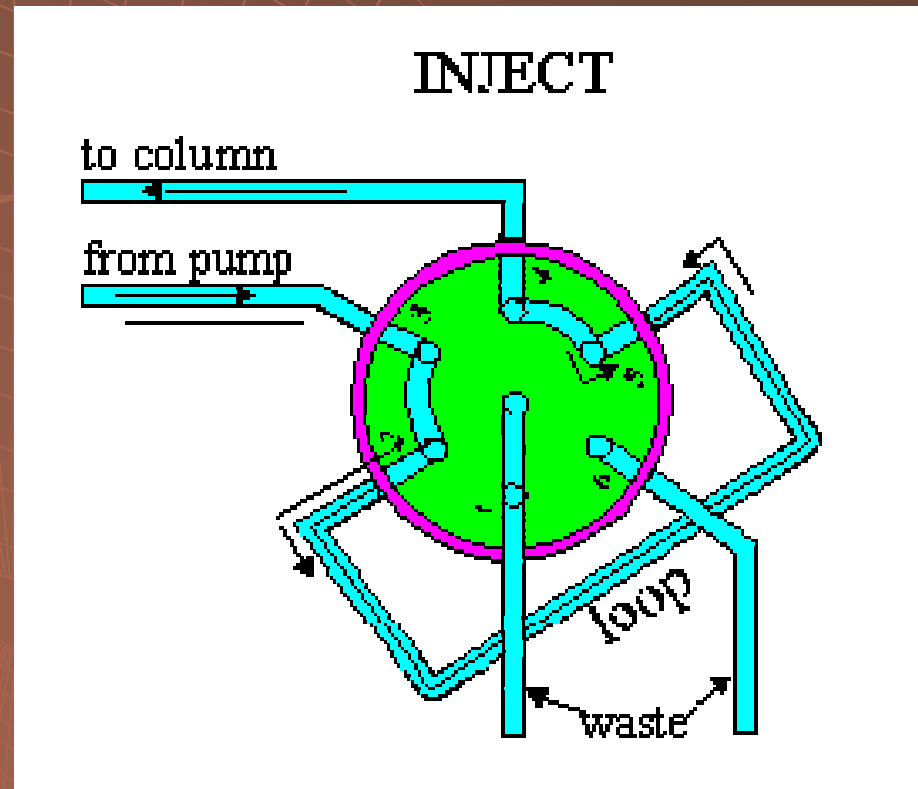
Dákování – dákovací ventil



Dákovací ventil – „Load“



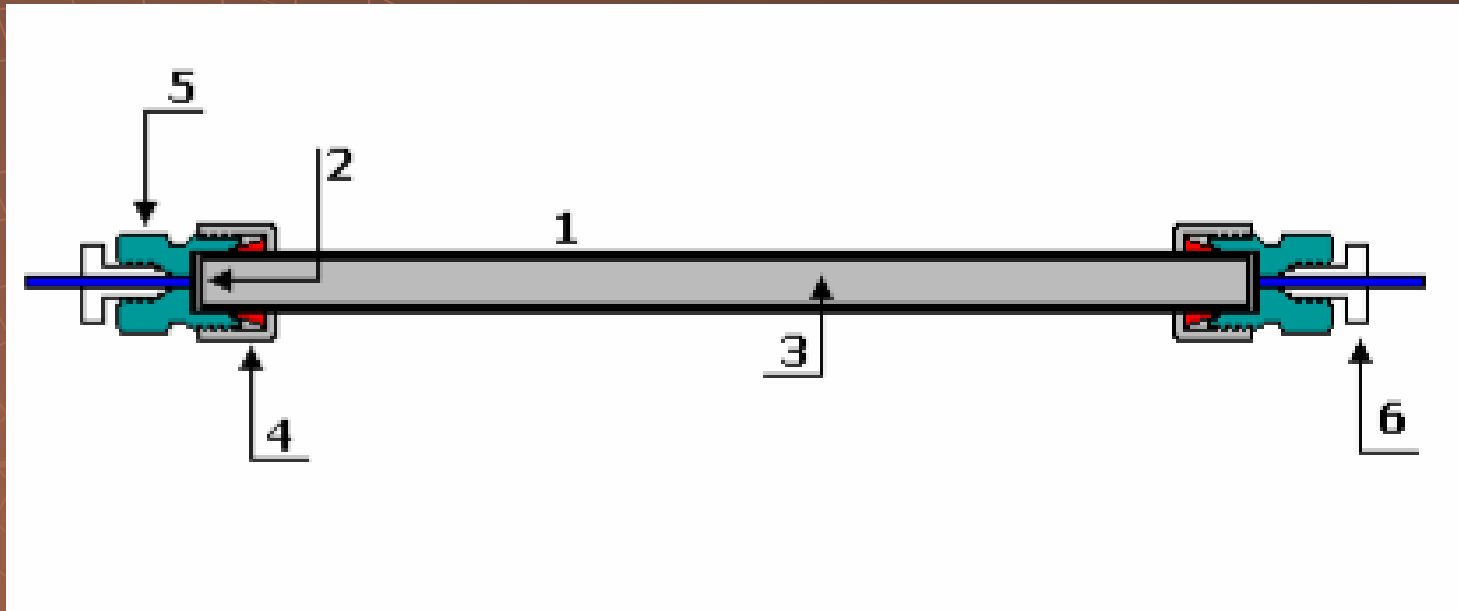
Dákovací ventil – „Inject“



Kolony pro FPLC

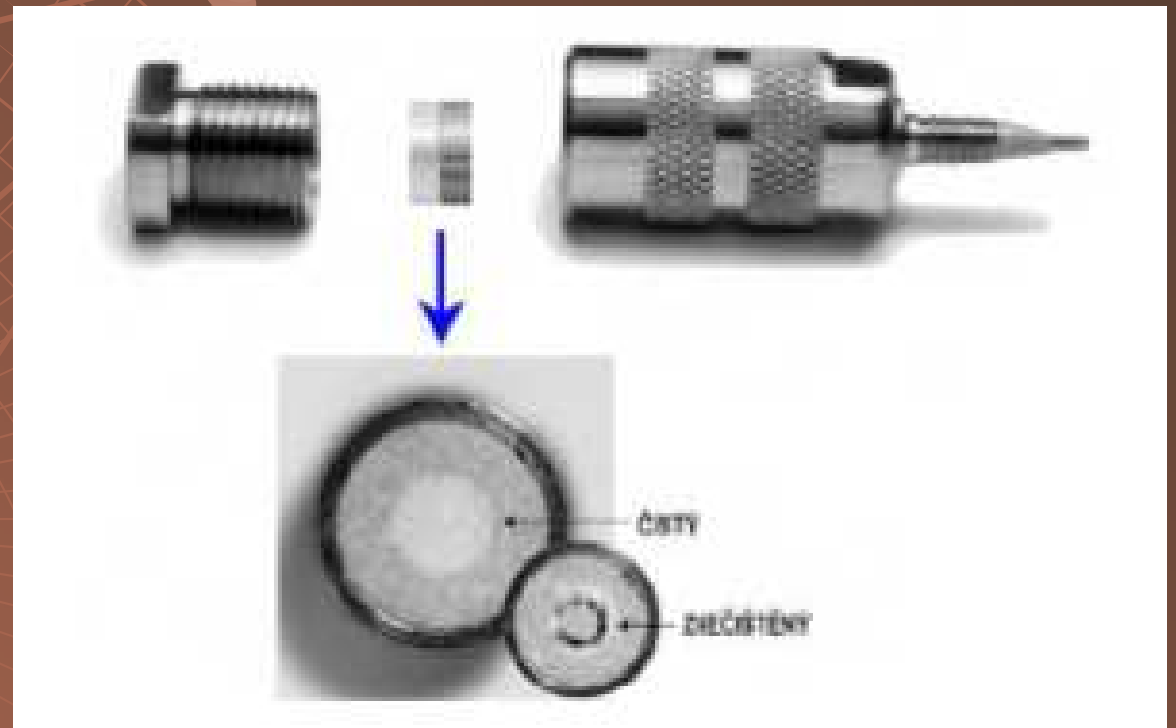


Kolona



1. kovový plášť
2. Porézní kovová frit
3. Stacionární fáze
4. Převlečný ochranný kroužek
5. Koncová hlavice
6. vstup pro kapiláru se šroubem

Předkolona



Kolony pro HPLC a UPLC



Kolony pro nano- a kapiální HPLC



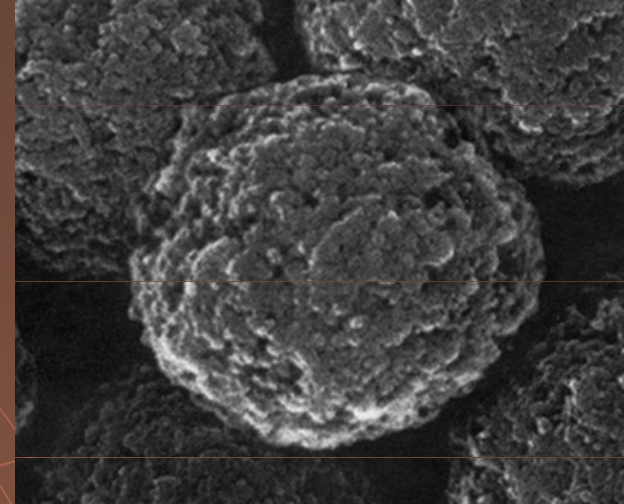
Částicový sorbent

tvar: sférický (bez povrchových vad)

rozměr pro kolony:

analytické 1 – 8 μm

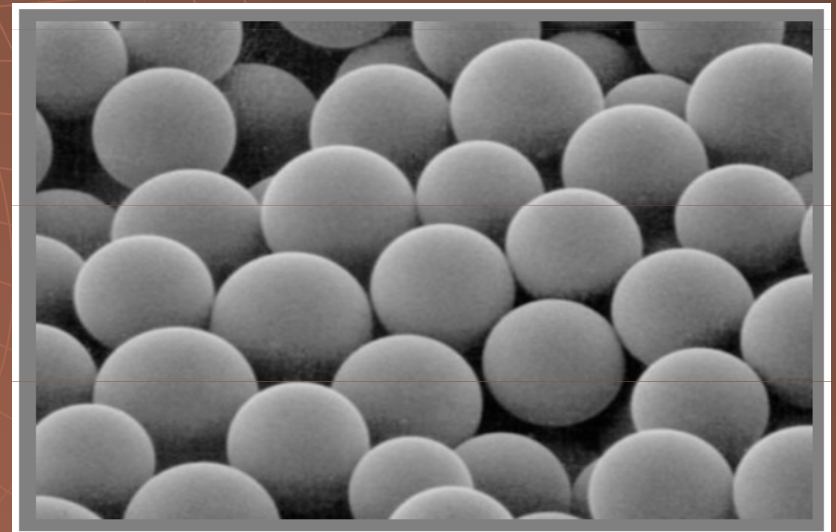
preparativní > 10 μm



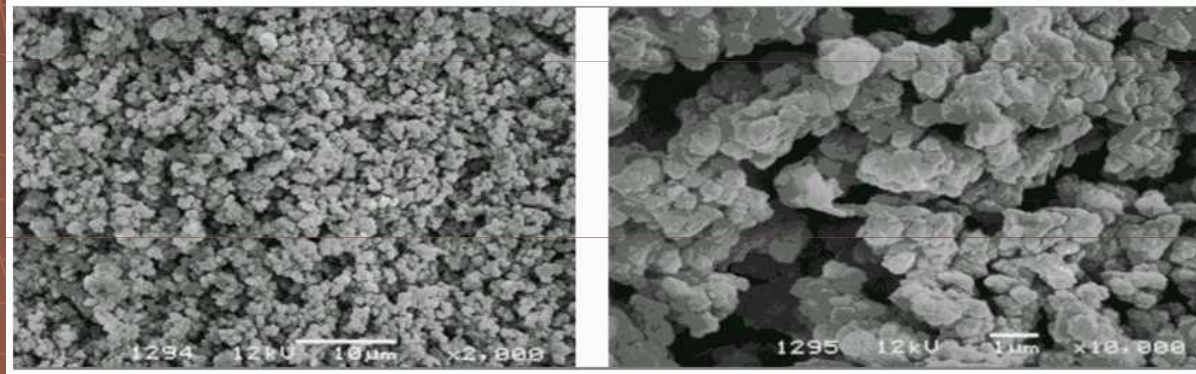
povrchové rozrůznění

póry

polymerní částice



Monolitický sorbent



makropóry: ~ 1500 nm; mezopóry: < 50 nm,
mikropóry < 2 nm

pórovitost monolitické stacionární fáze až 85 %;
oproti částicové s pórovitostí *max* 60 %

vysoké průtoky za nízkých tlaků;
velká efektivní plocha \Rightarrow rychlá separace:
vysoké rozlišení a vysoká kapacita

monomer + polymerační činidlo + porogen

ML-SF na bázi siliky

tetramethoxysilan (TMOS)

tetraethoxysilan (TEOS) + kyselina octová + polyethylenglykol (PEG)

ML-SF na bázi organických materiálů

styren-divinylbenzen (S-DVB)

metakryláty

vinyl-deriváty (vinylpyrrolidon, vinylacetát)

izooktan

tetrahydrofuran

dekanol

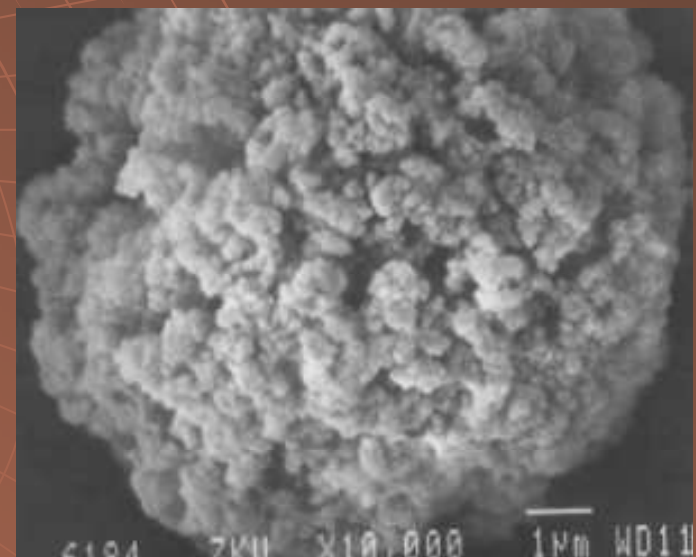
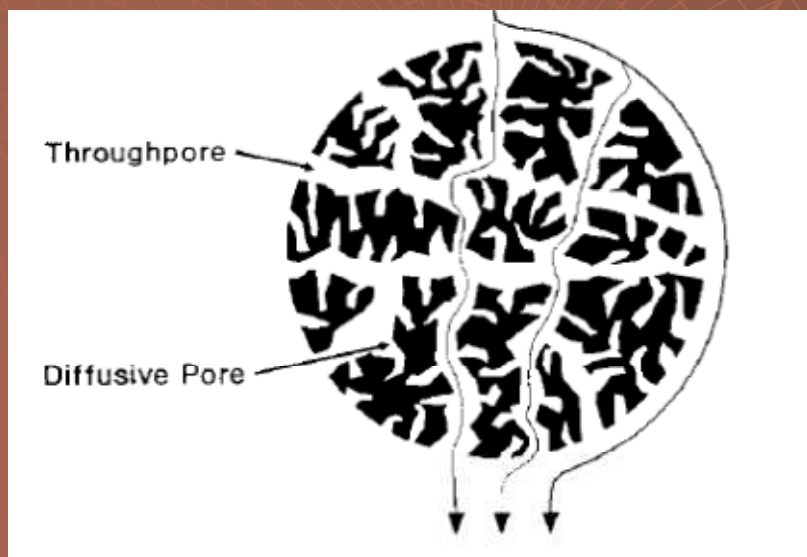
nevýhoda: obtížná výroba

provedení: disk, trubička, plněná kapilára

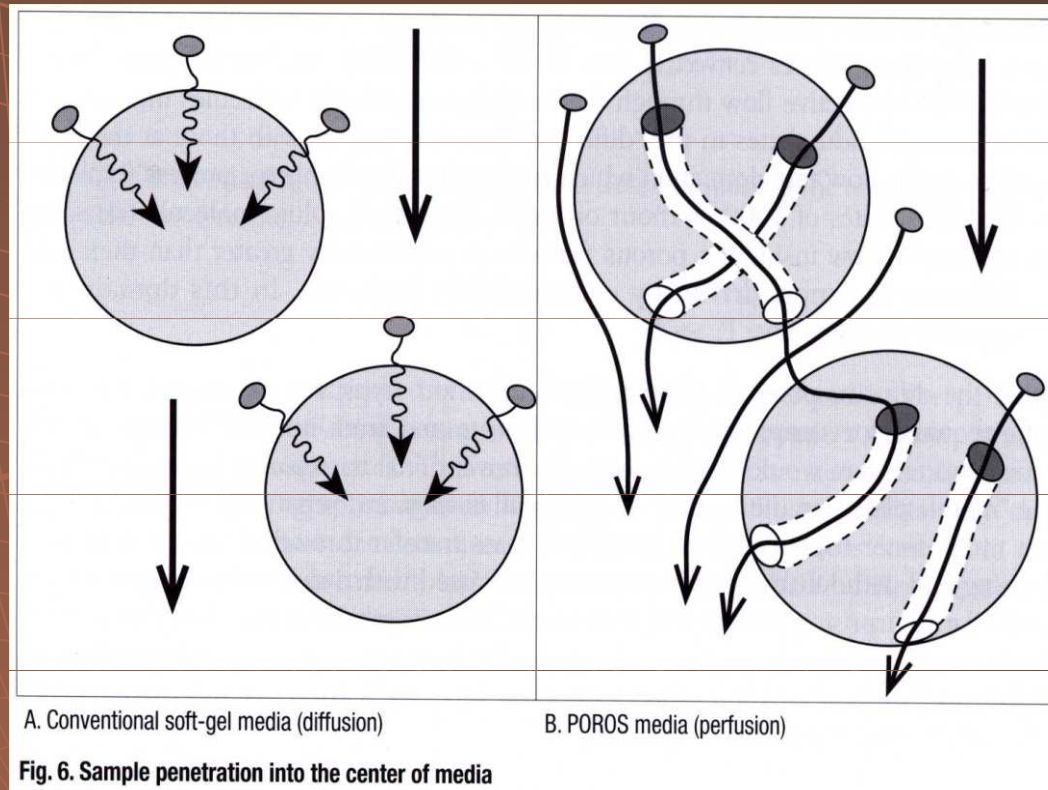


Perfúzní chromatografie

- ◆ Využívá médií - **POROS média**, jejichž částice (10, 20, 50 μm) mají velké příčné póry - 600 - 800 nm. Molekuly biopolymerů unášené **konvektivním prouděním** mobilní fáze se těmito póry lehce dostávají do nitra částic. Příčné póry jsou navíc vzájemně propojeny krátkými “difuzními” póry - 50 – 150 nm. Vytváří se tak síťová struktura s rozsáhlým vnitřním prostorem pro interakci nosiče s biopolymerem.



Perfúzní chromatografie - princip



Průtokem mobilní fáze vytváří napříč každou částicí média rozdíl tlaku, který indukuje **konvektivní tok příčnými póry (perfúze)**. Biomakromolekuly ve vzorku se tak dostávají do kontaktu jak s povrchem částic, tak i s vazebnými místy v jejich nitru.

Perfúzní chromatografie

K efektu perfúze dochází jen při určité průtokové rychlosti. Moderní HPLC a FPLC systémy mohou zajistit podmínky perfúze pouze u malých analytických POROS kolon (4.6 x 100 mm, objem 1.7 ml, při průtokové rychlosti kolem 10 ml.min⁻¹).

- ◆ Výhody ve srovnání s chromatografií konvenční:
 - Kapacita je vysoká, nezávisí na průtokové rychlosti.
 - Rozlišení je vysoké, nezávisí na průtokové rychlosti.
 - Rychlost separace je obvykle 10 - 100x větší než u konvenčních médií, řádově se pohybuje v minutách.

Perfúzní chromatografie - princip

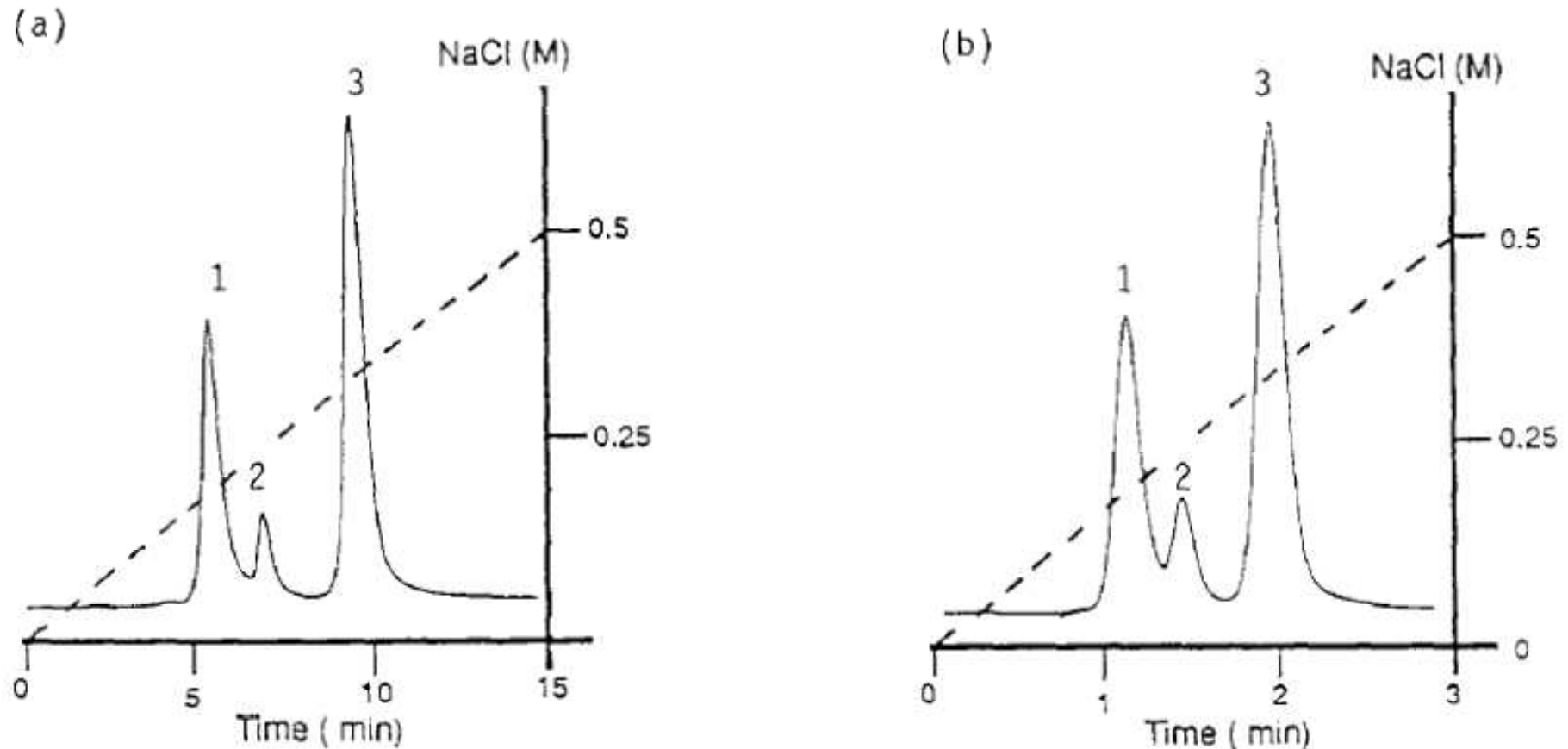
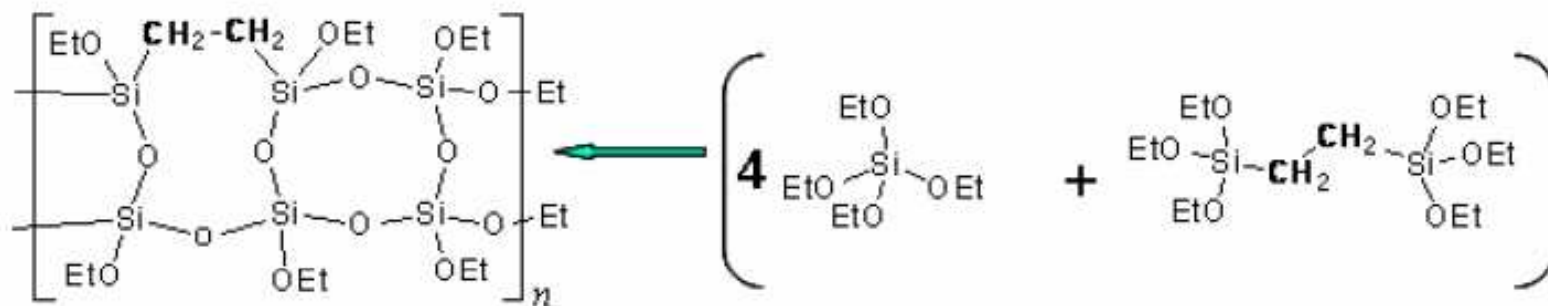


Fig. 14. Separation of model proteins on POROS S/M; 75 μg load of a protein mixture containing chymotrypsin (1), cytochrome *c* (2), and lysozyme (3); detection at 280 nm; column, 100 \times 4.6 mm I.D.; 20 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid buffer, pH 6.0; detection at 280 nm. (a) 1 ml/min, 15-min gradient to 0.5 M NaCl; (b) 5 ml/min; 3-min gradient to 0.5 M NaCl.

UPLC stacionární fáze Waters

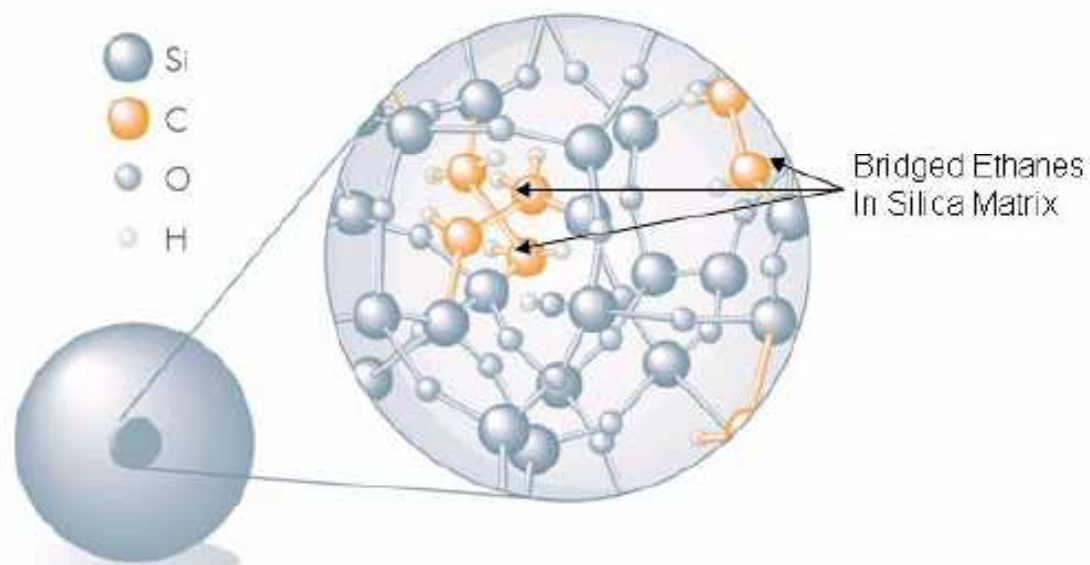
technologie "Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology"



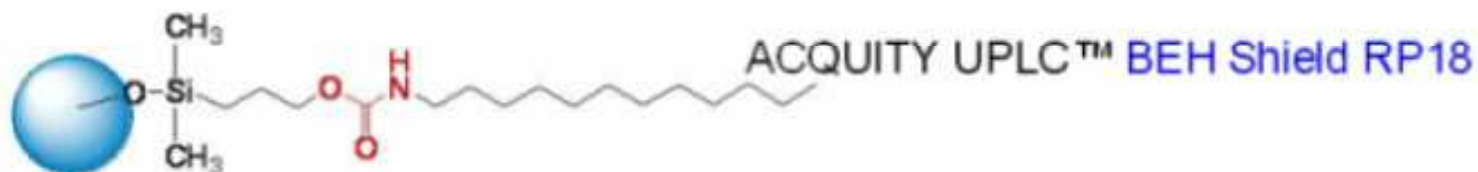
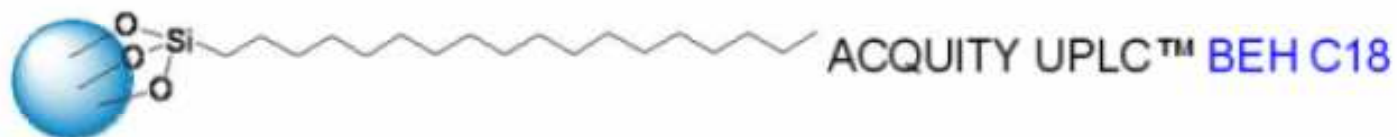
Polyethoxysilane (BPEOS)

Tetraethoxysilane (TEOS)

Bis(triethoxysilyl)ethane (BTEE)

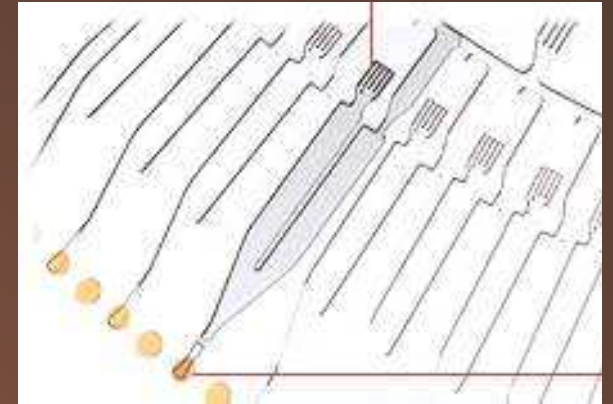
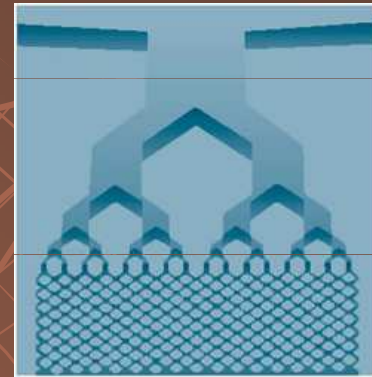
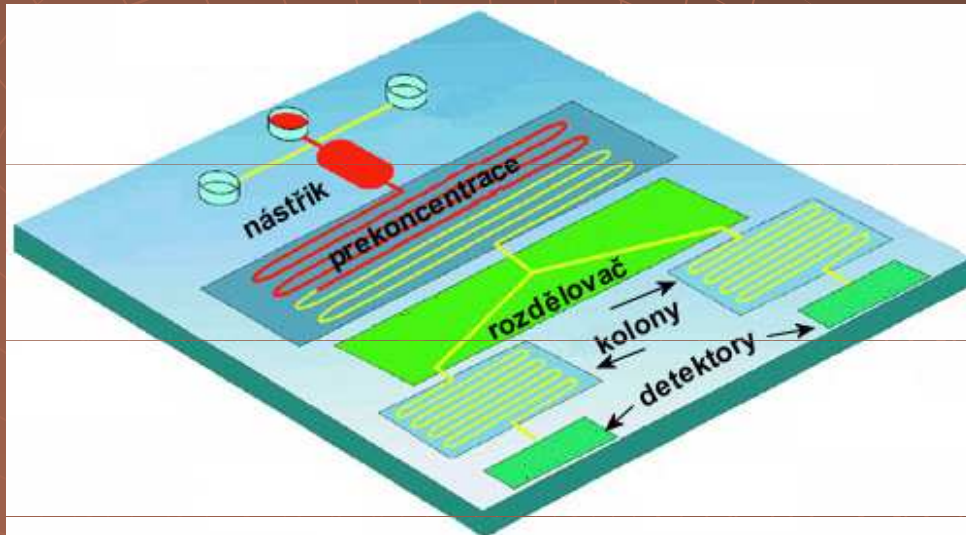


UPLC stacionární fáze Waters



Chipová chromatografie

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

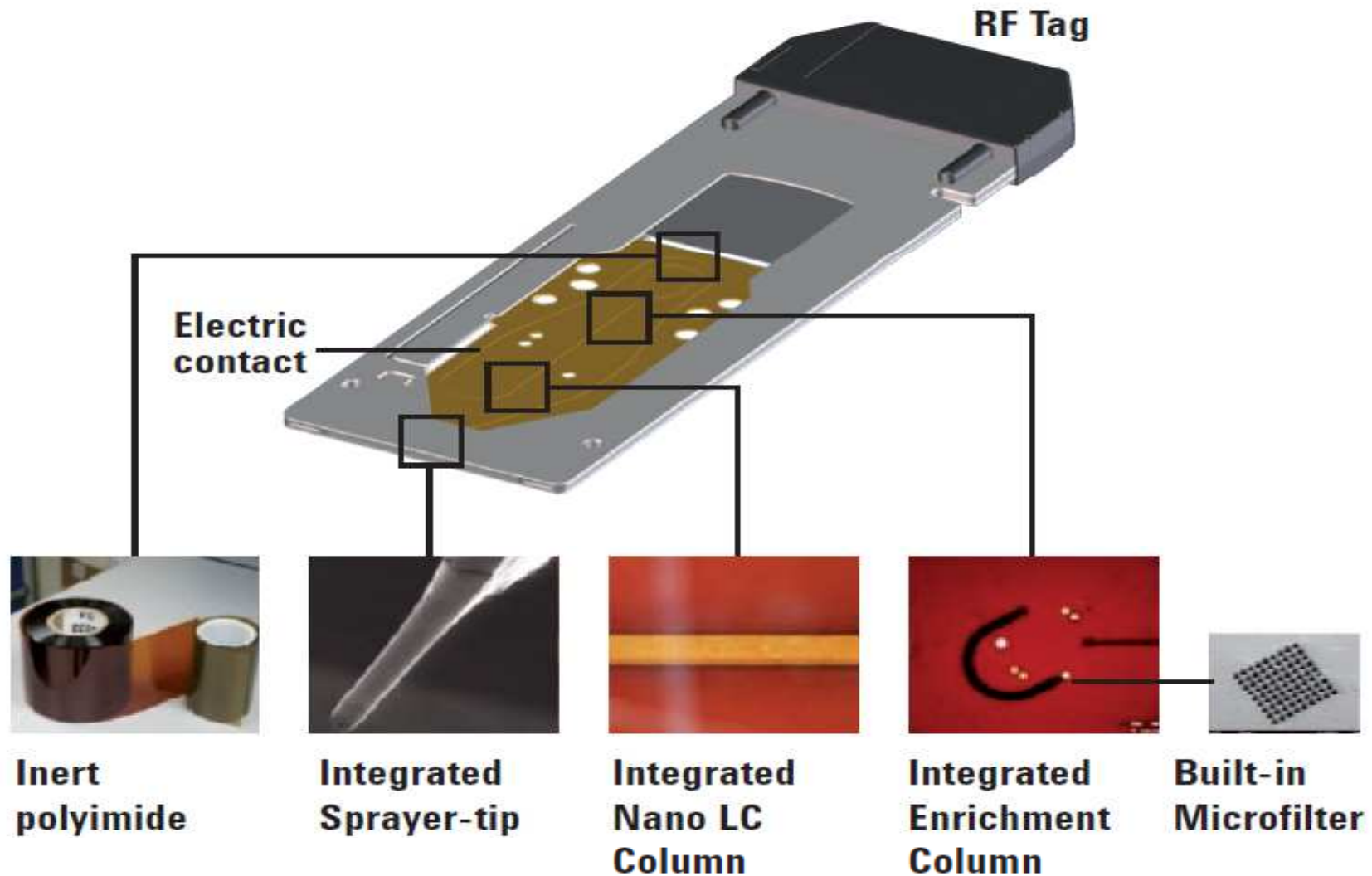


doprava MF: pumpa, odstředivá síla, el. staticky

výhody: rychlost analýzy, velikost,
malá spotřeba vzorku (< nl !)

nevýhody: práce s malými objemy
(povr. napětí, elektrostatické interakce)

Chipová chromatografie Agilent





Detektory

Detektory

	RI	UV-VIS	IR	FLD	ECD	CONDUCT	CORONA	ELSD
typ detektoru	nedeštruktivní	nedeštruktivní	nedeštruktivní	nedeštruktivní	deštruktivní	nedeštruktivní	deštruktivní	deštruktivní
odezva	univerzální	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	selektivní	univerzální
měřená veličina	index lomu	absorbance	absorbance	intenzita fluorescence	elektrický proud	vodivost	elektrický proud	rozptyl světla
typická citlivost (hmotnost/ml)	μg	ng	μg	pg	pg	ng	ng	μg
lineární rozsah	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ²
závislost odezvy na průtoku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotní závislost	vysoká (10 ⁻⁴ jed. ind. lomu)	nížká	nížká	nížká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	nížká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano (částečně)

Refraktometrický detektor

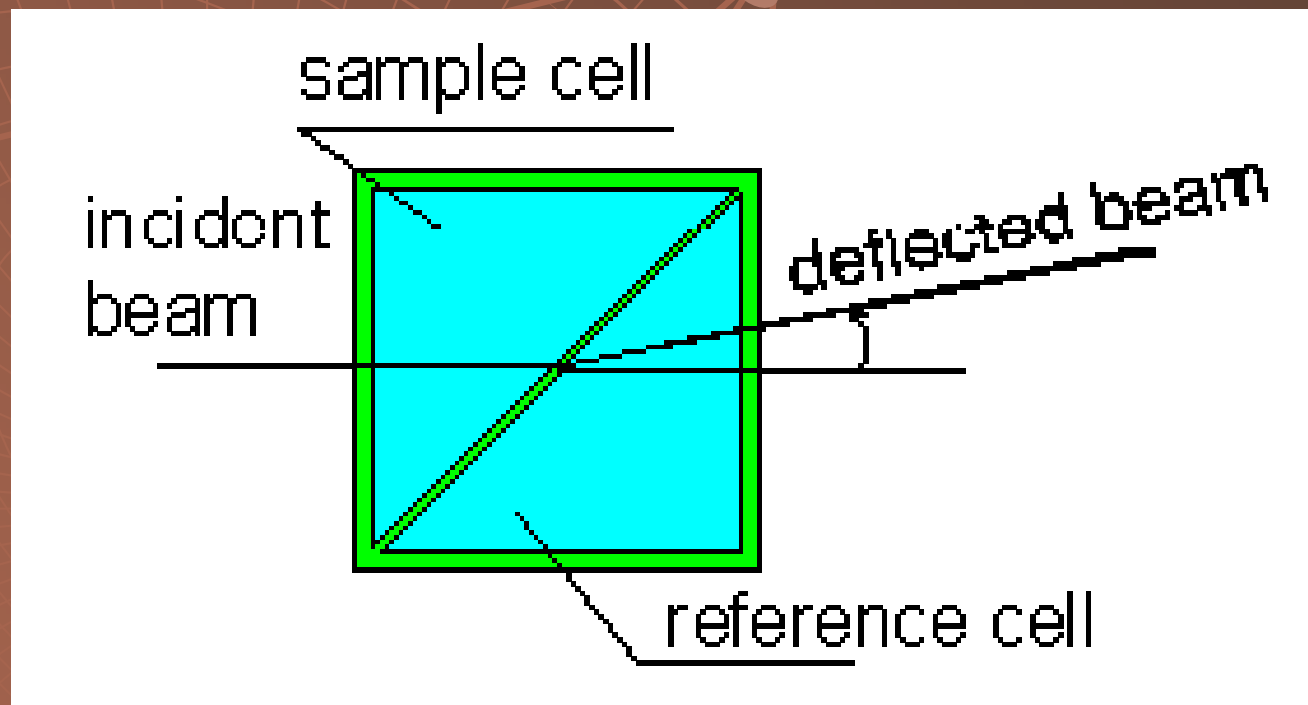
index lomu

šum 10^{-7}

dyn. rozsah 10^4

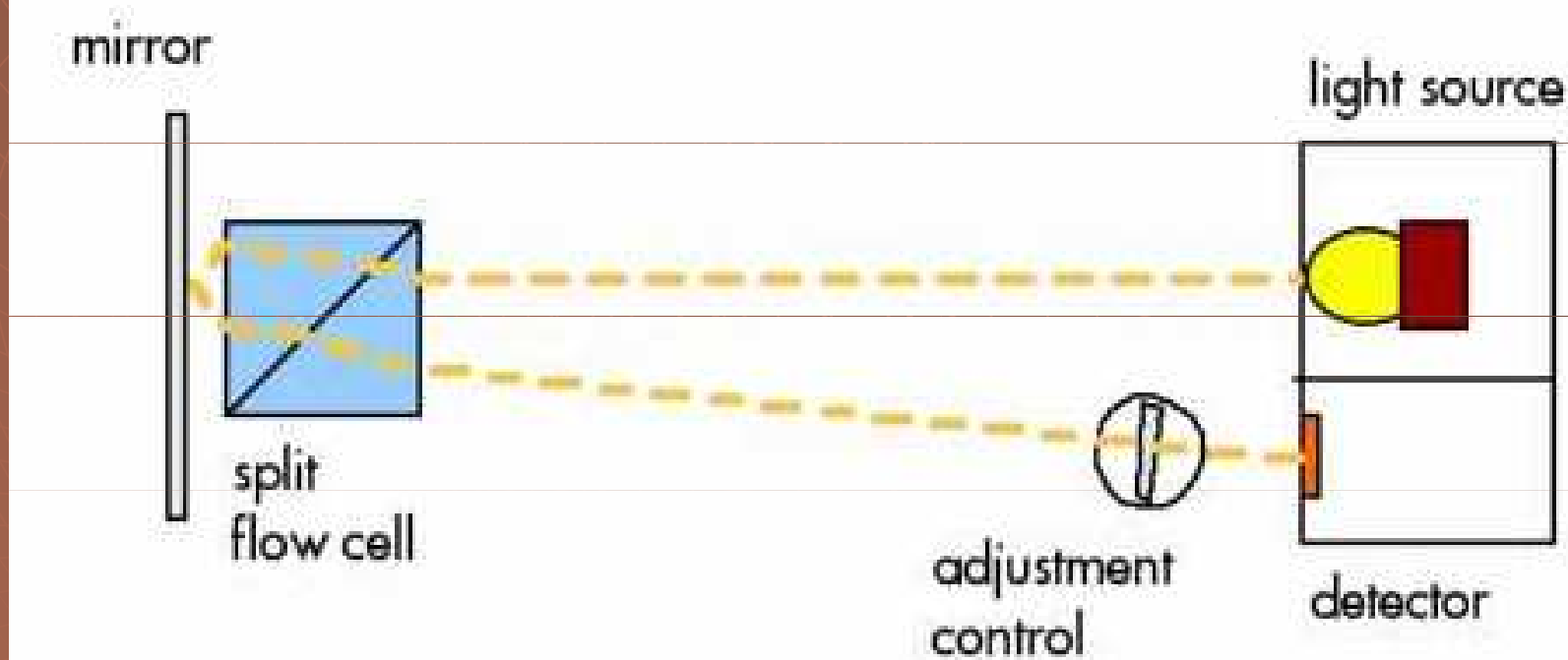
citlivost 10^{-7} g/ml

Refraktometrický detektor



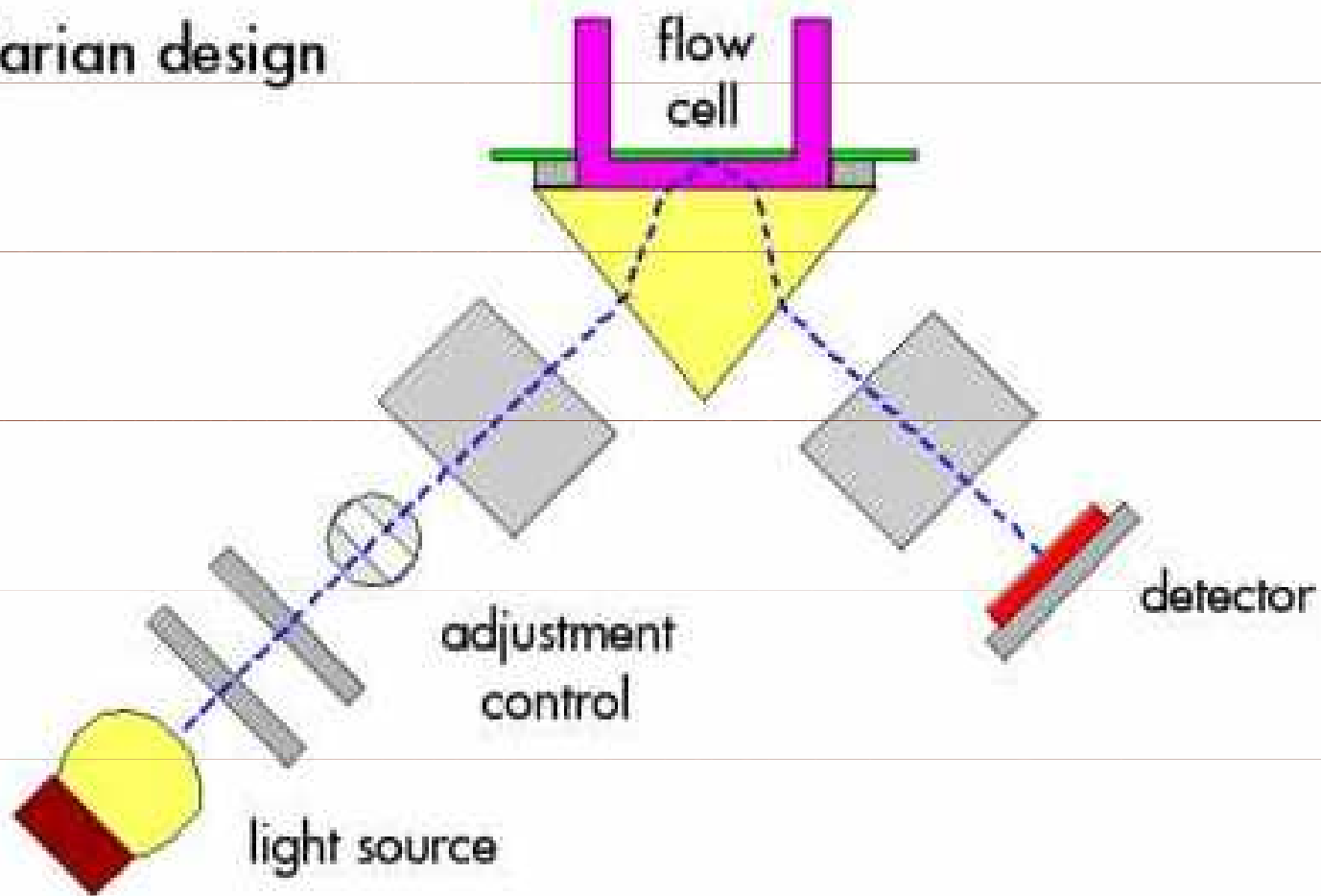
Refraktometrický detektor

Waters design



Refraktometrický detektor

Varian design



„Light scattering“ detektor

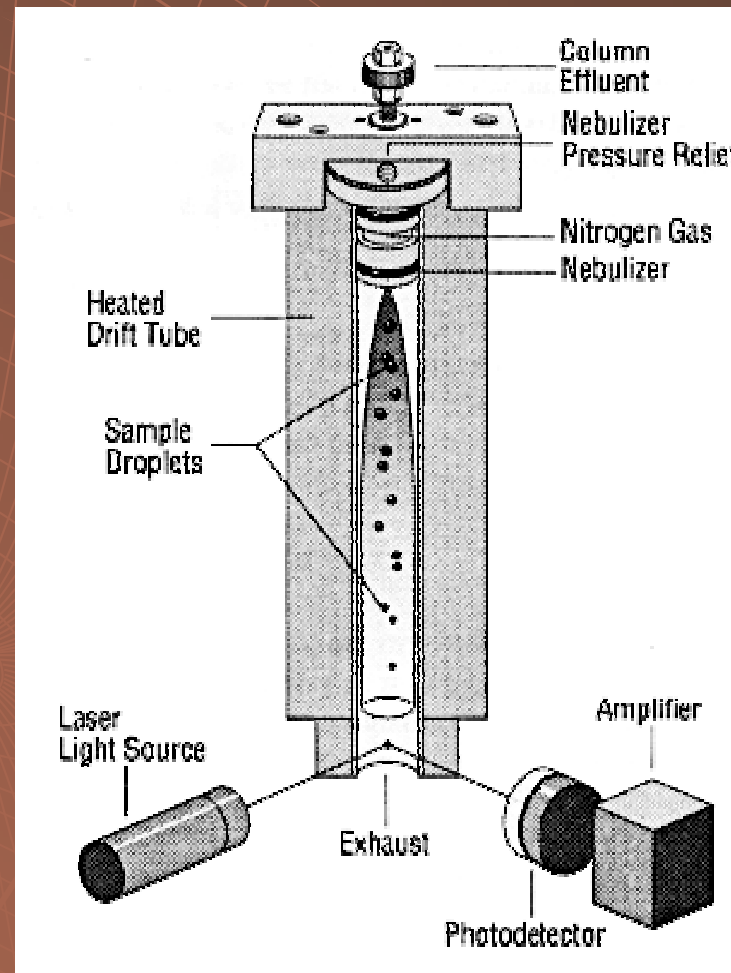
Rozptyl

šum 10^{-8}

dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-9} g/ml

„Light scattering“ detektor



UV – VIS detektor detekční cela

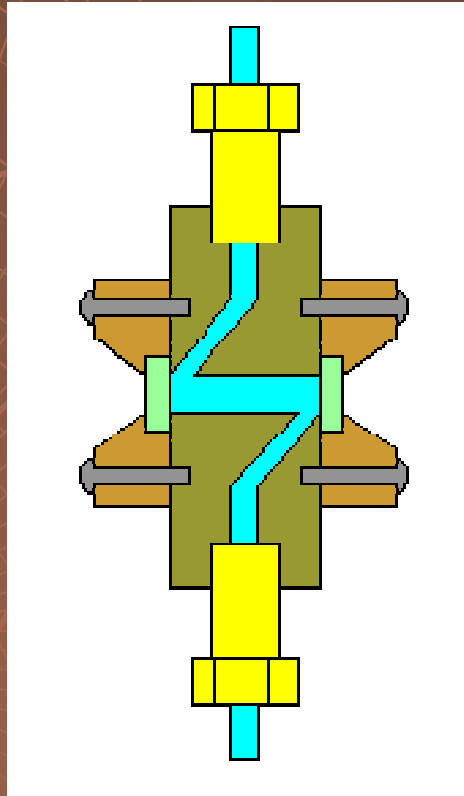
Absorbance

šum 10^{-4}

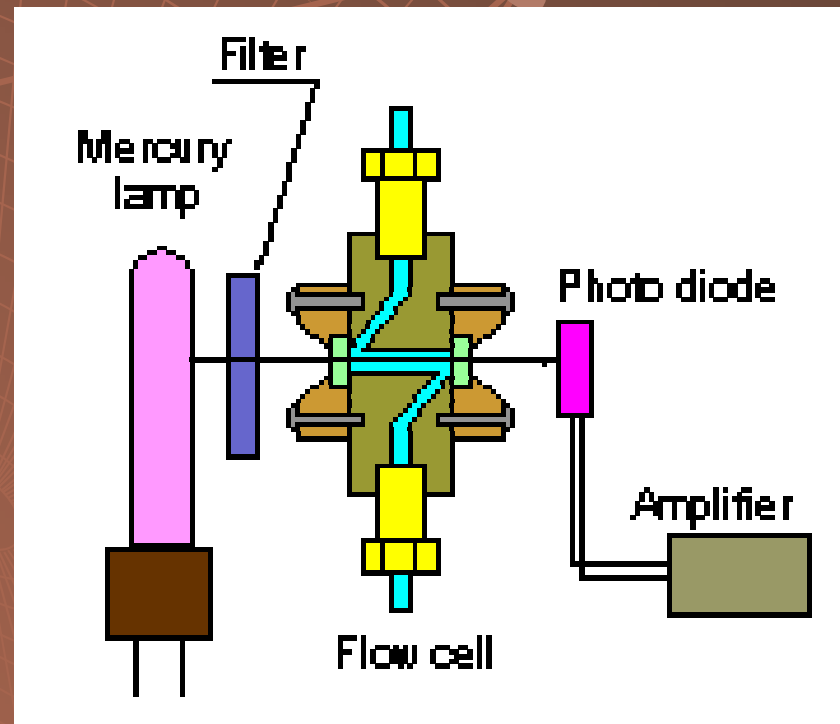
dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-10} g/ml

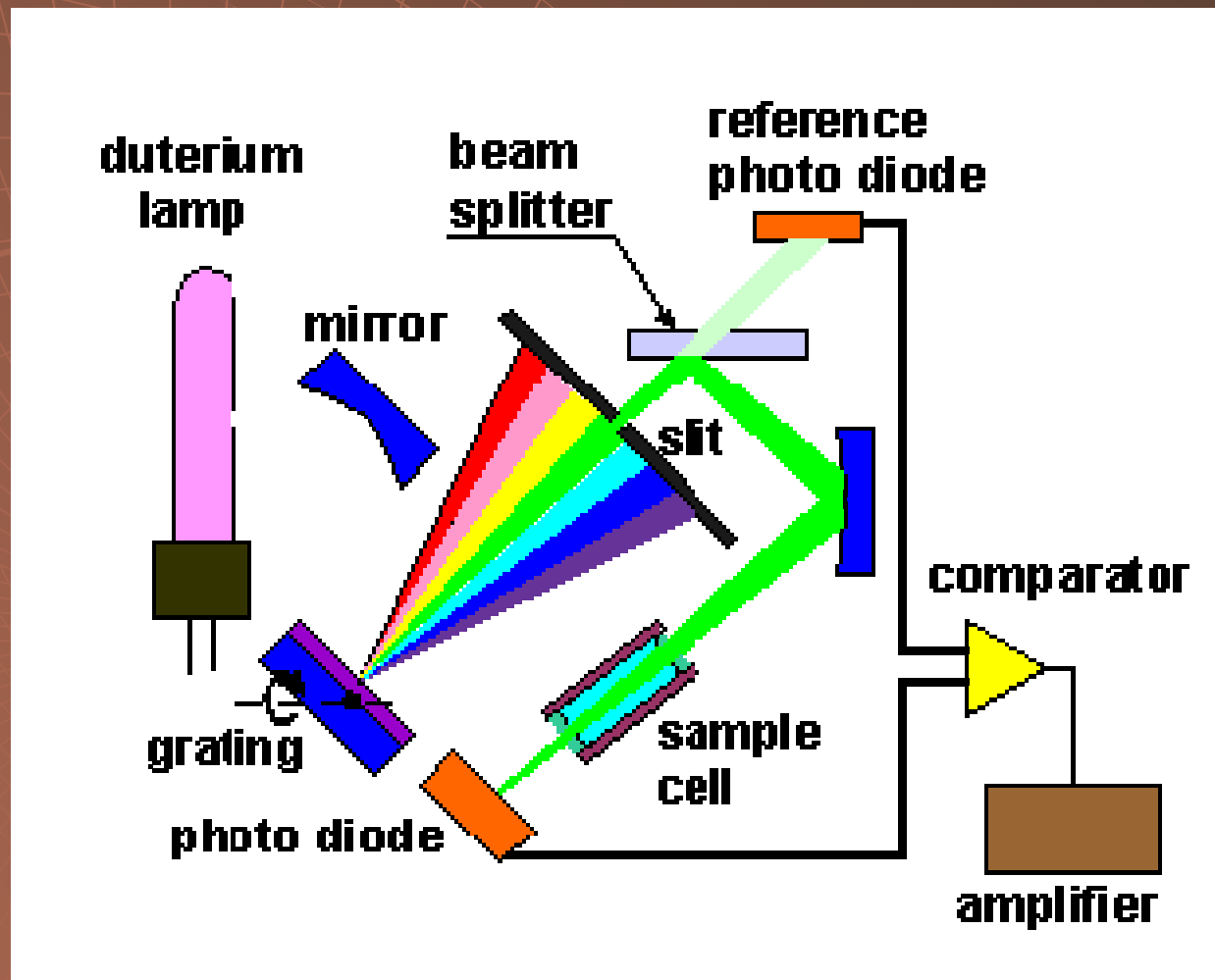
UV – VIS detektor detekční cela



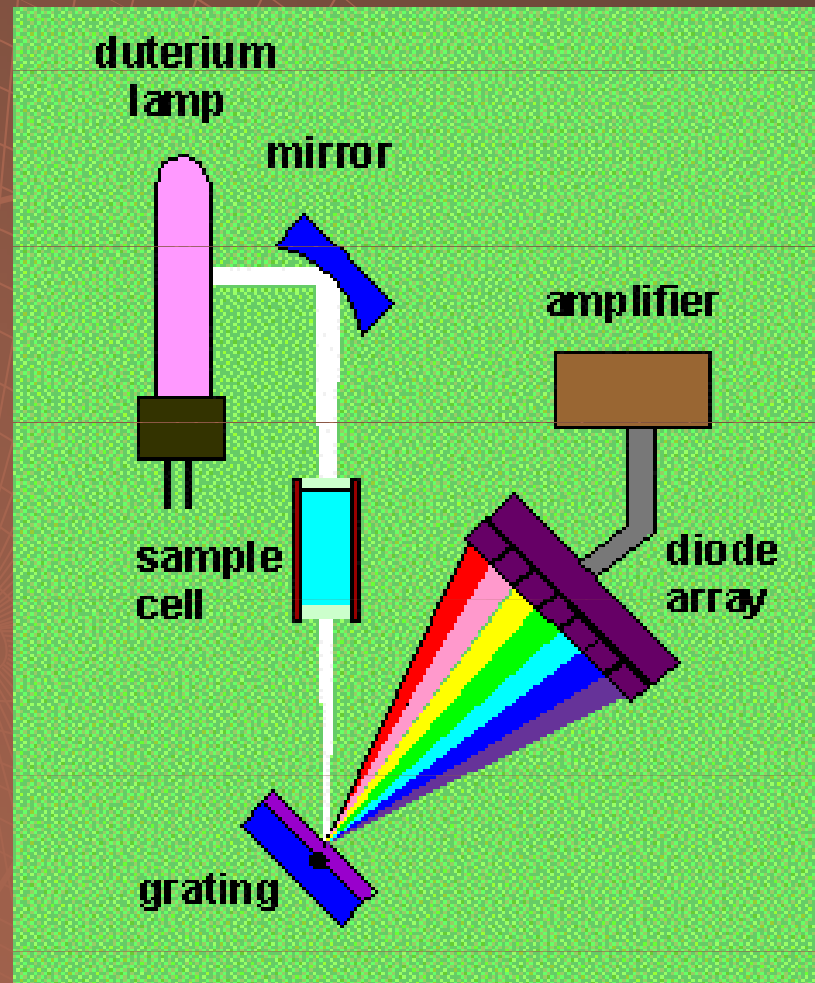
UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



UV – VIS detektor s diodovým polem

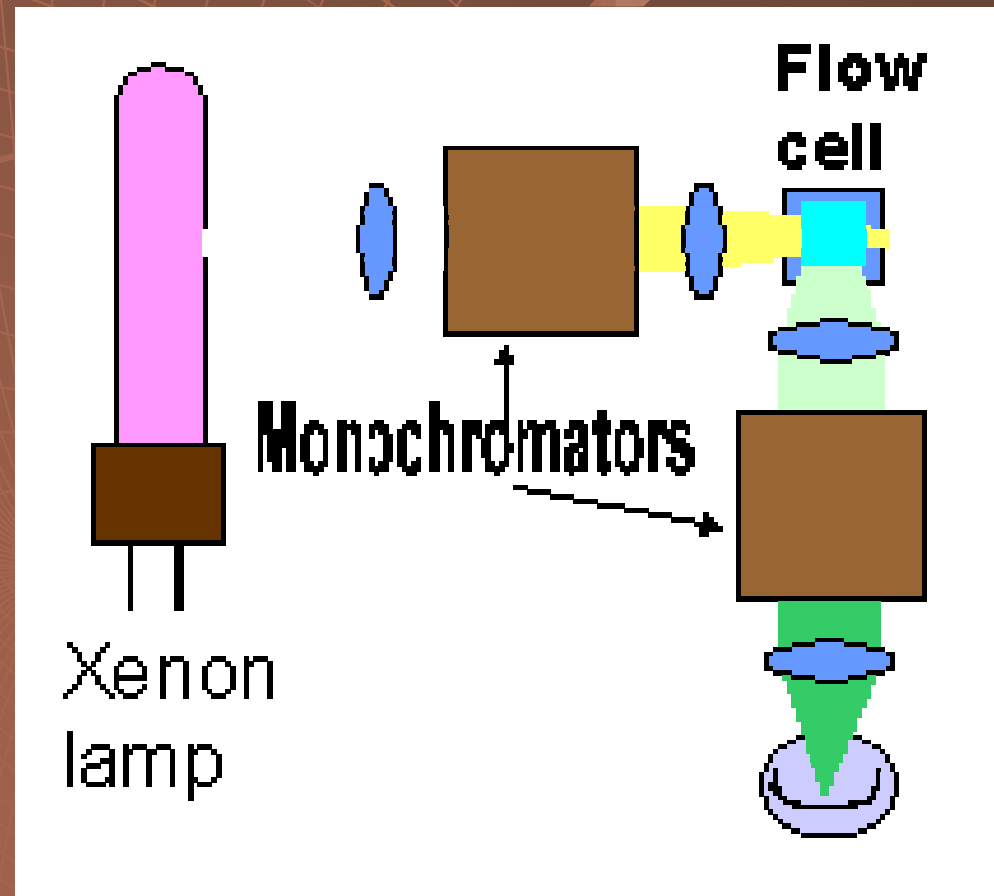


Fluorescenční detektor

Fluorescence

citlivost 10^{-9} g/ml

Fluorescenční detektor

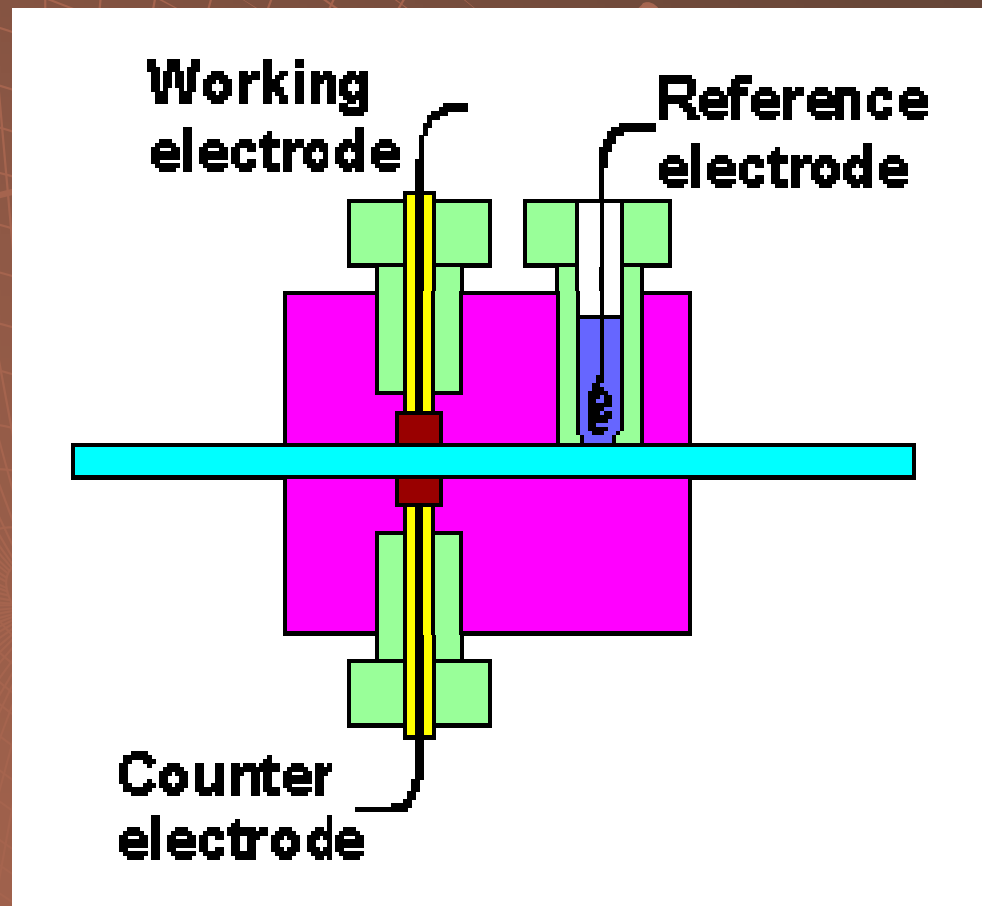


Elektrochemický detektor

elektrický proud

citlivost 10^{-9} g/ml

Elektrochemický detektor



Konduktometrický detektor

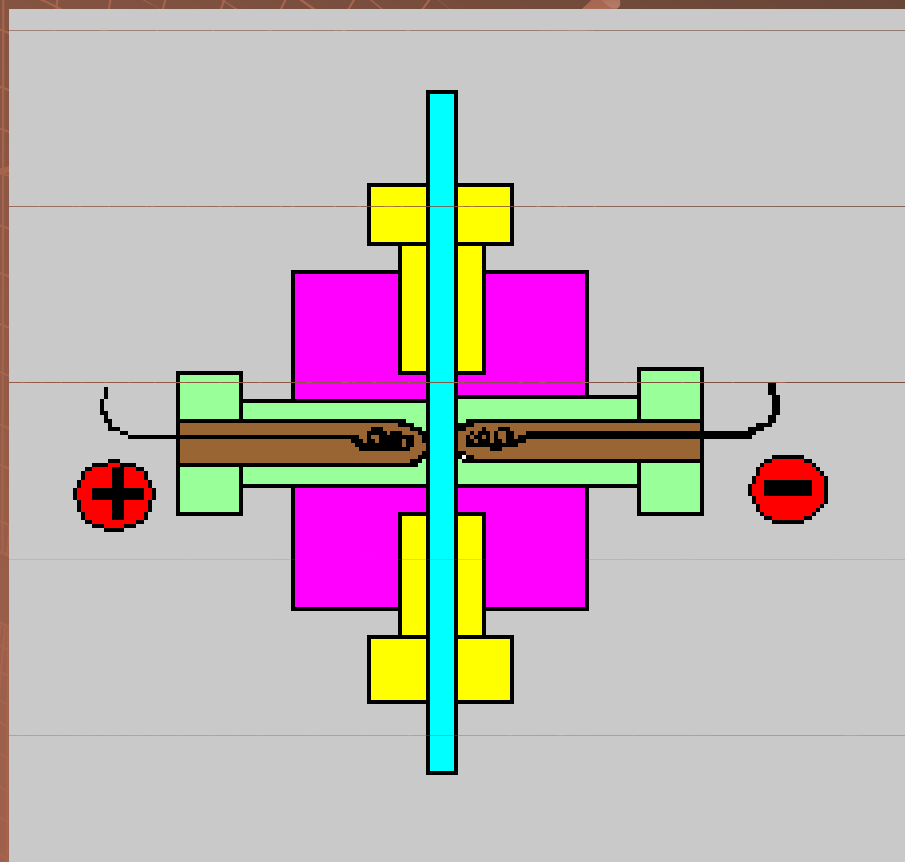
Vodivost

šum 10^{-3}

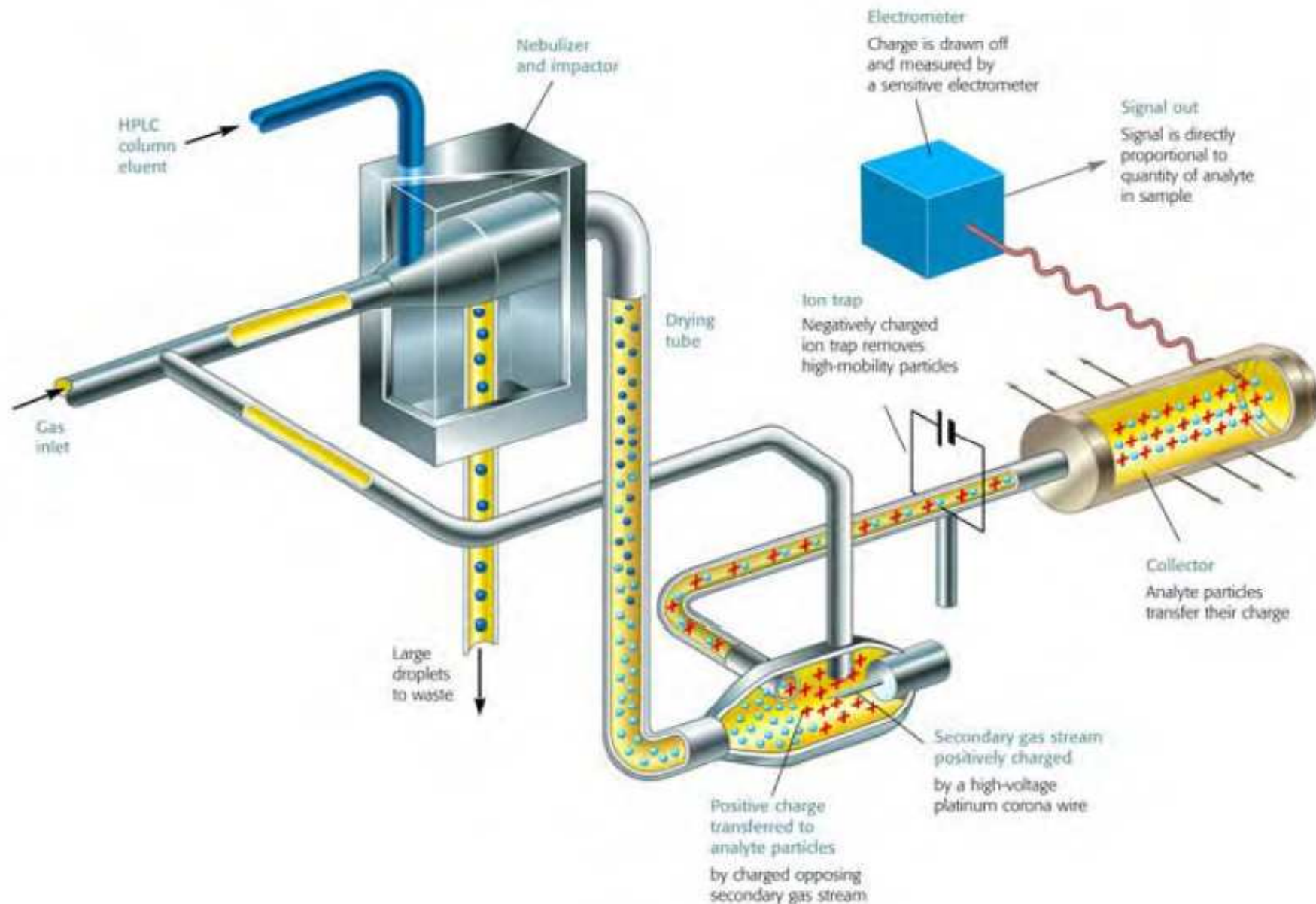
dyn. rozsah 10^6

citlivost 10^{-8} g/ml

Konduktometrický detektor



Aerosolový detektor nabitých částic

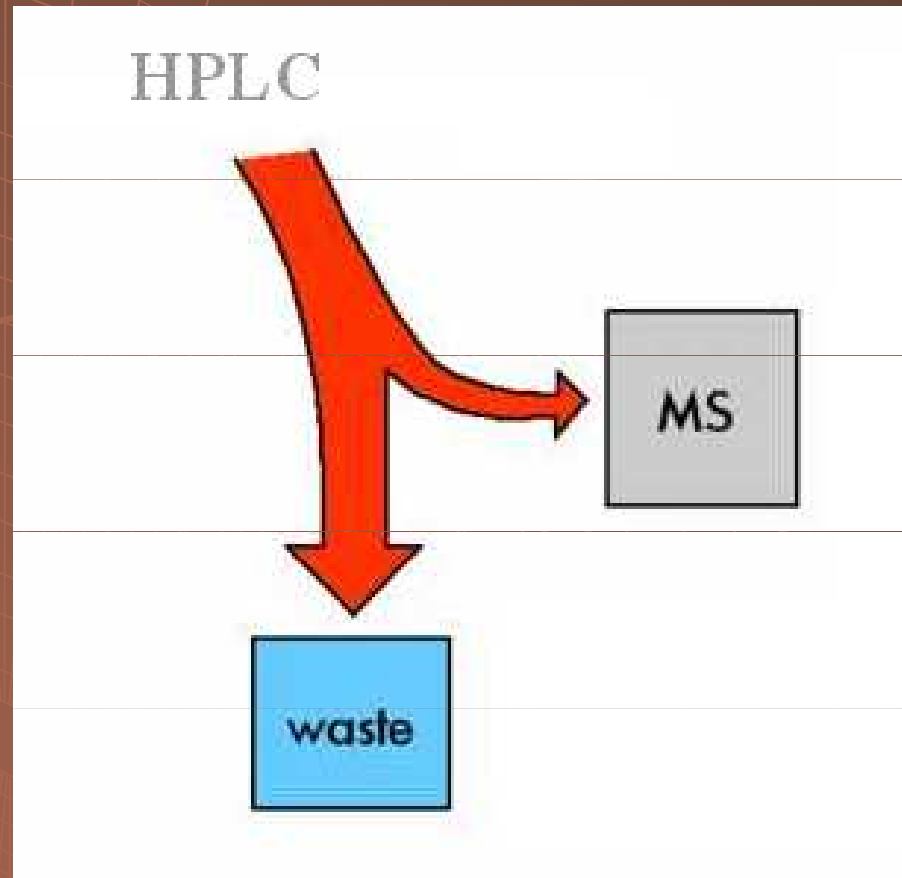


LC-MS

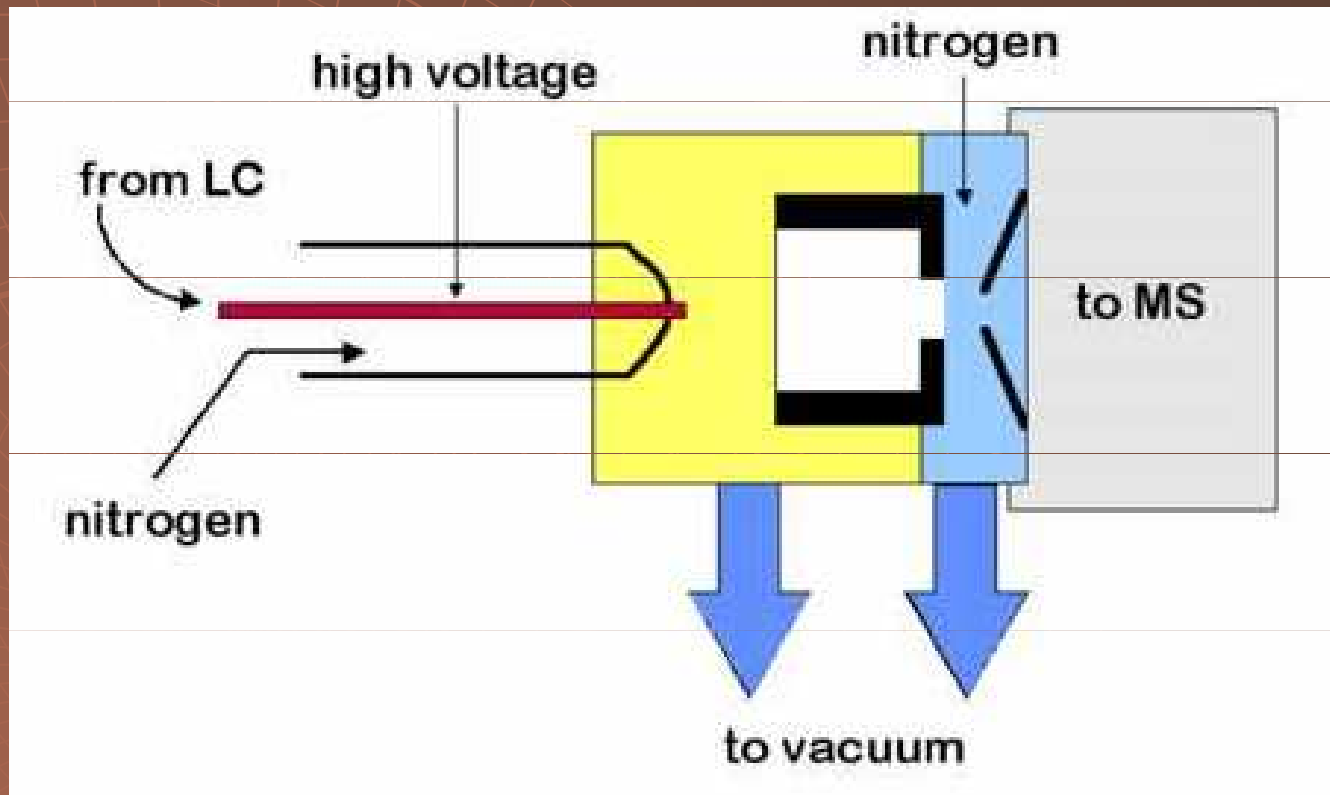
počet iontů

citlivost 10^{-13} g/ml

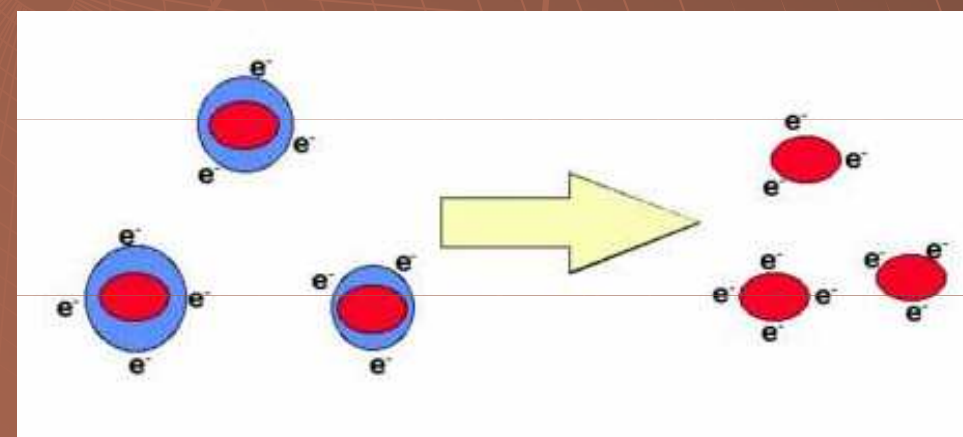
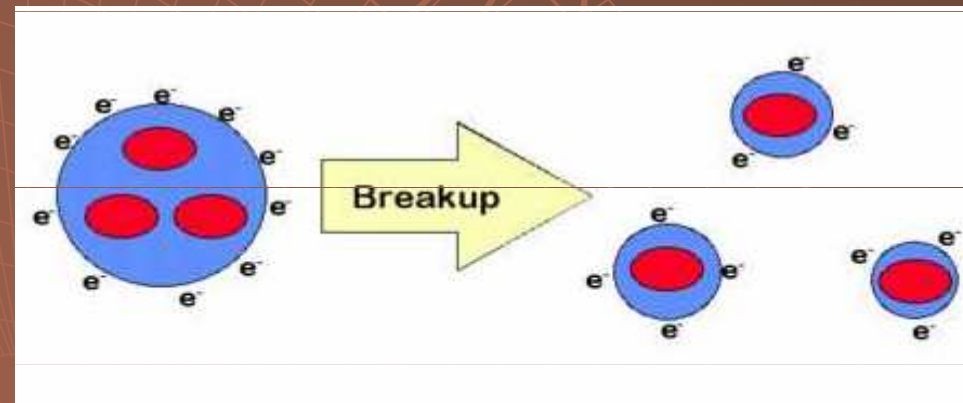
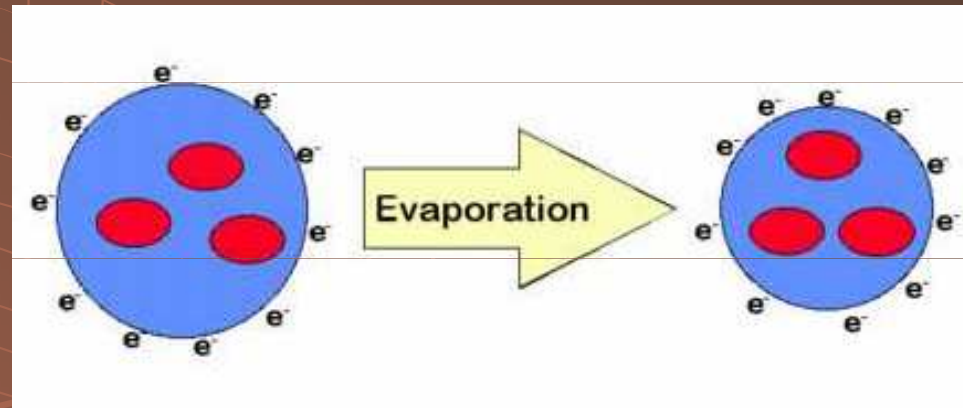
LC-MS



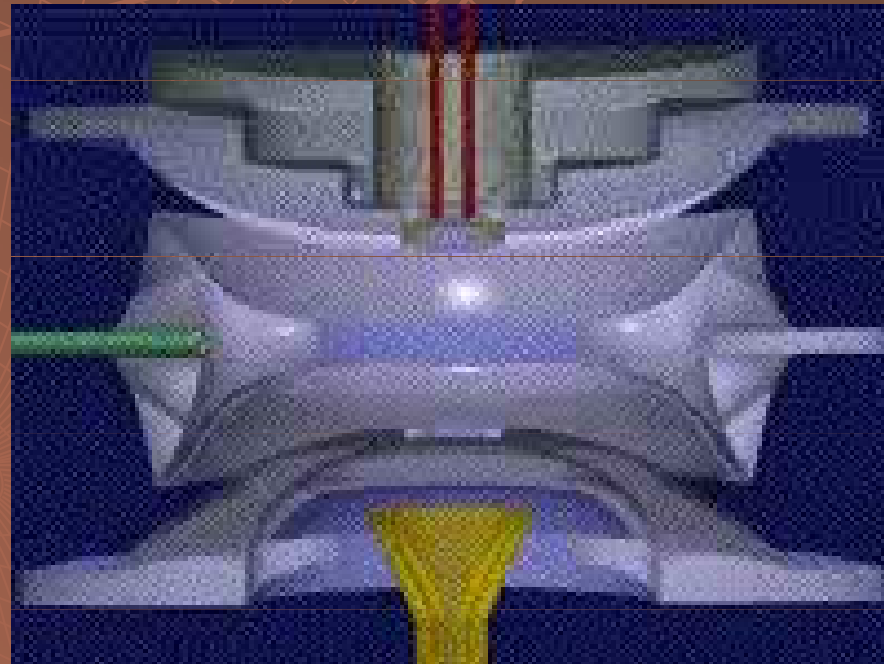
„Electrospray“



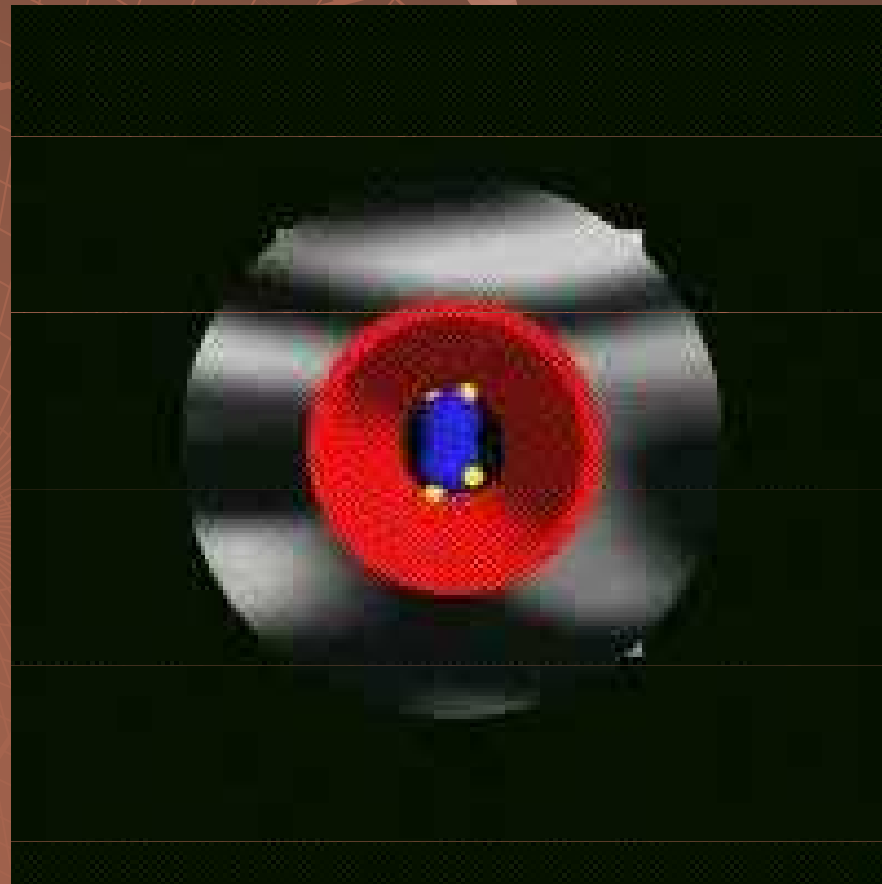
Ionizace



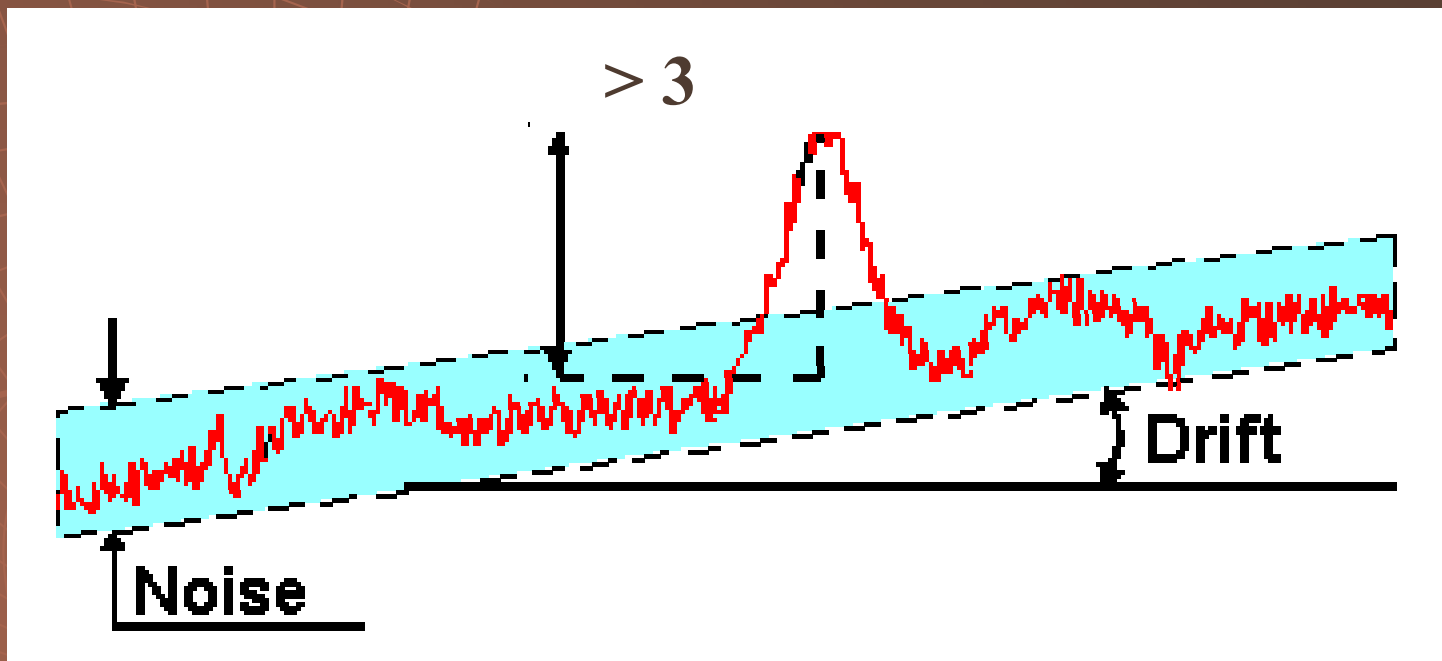
Ion Trap



Kvadrupol



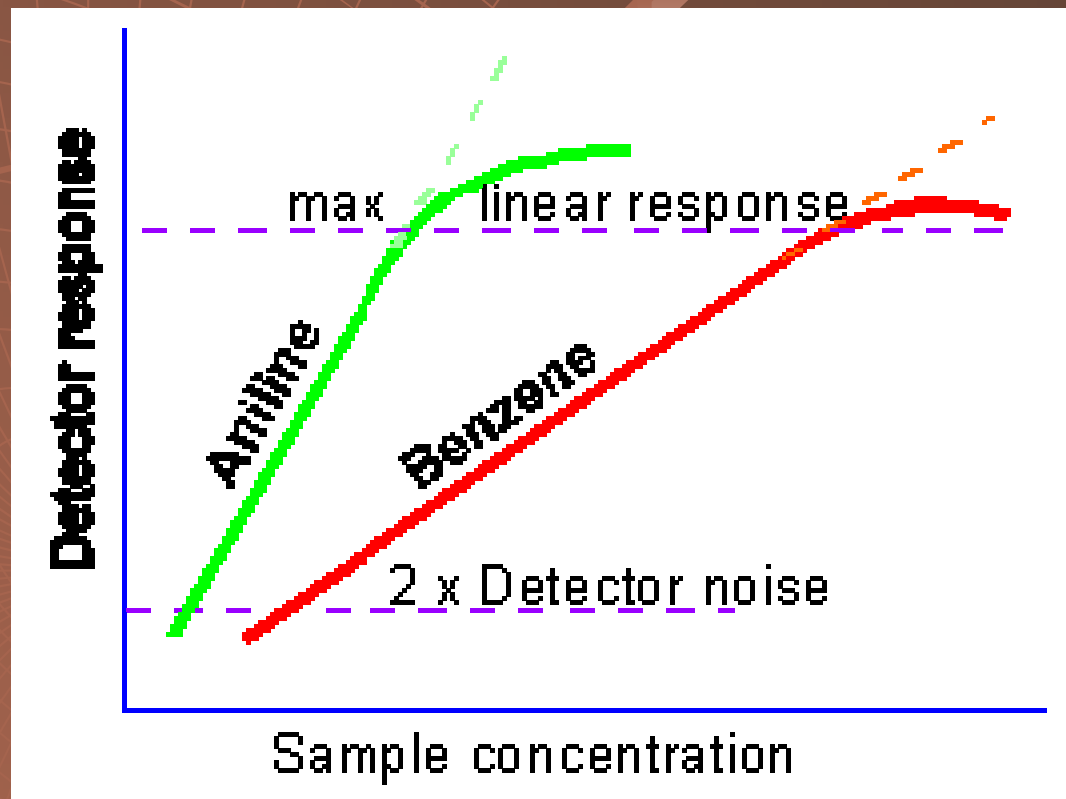
Šum a drift detektoru



Mez detekce $S/N > 3$

Mez stanovitelnosti $S/N > 10$

Lineární rozsah detektoru



Derivatizace

- ◆ zvýšení citlivosti nebo umožnění detekce vůbec
- ◆ zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec
- ◆ zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně

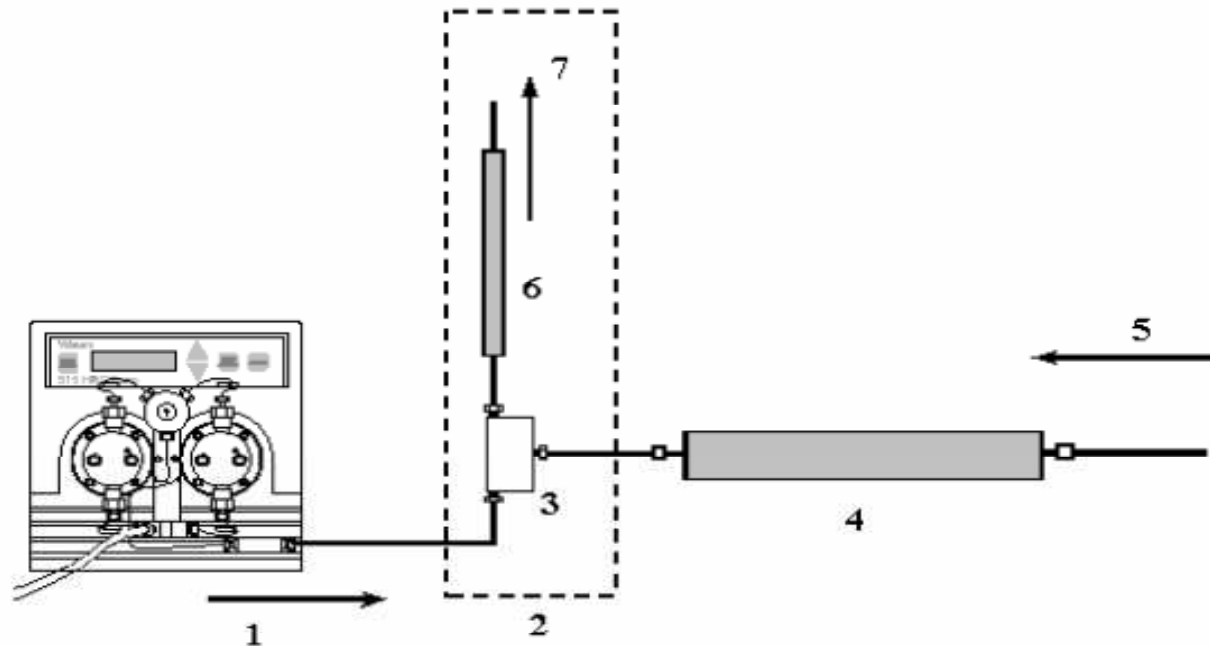
Požadavky na deriváty

- ◆ chemické individuum
- ◆ stabilní
- ◆ reakce kvantitativní, rychlá, selektivní bez vedlejších produktů za mírných reakčních podmínek (pH, teplota)
- ◆ činidlo musí být dobře separovatelné od svých produktů na koloně jiné fyzikálně-chemické vlastnosti

Derivatizace

- ◆ „pre-column“ - před vlastní analýzou
- ◆ „post-column“ – za kolonou po analýze

Derivatizace



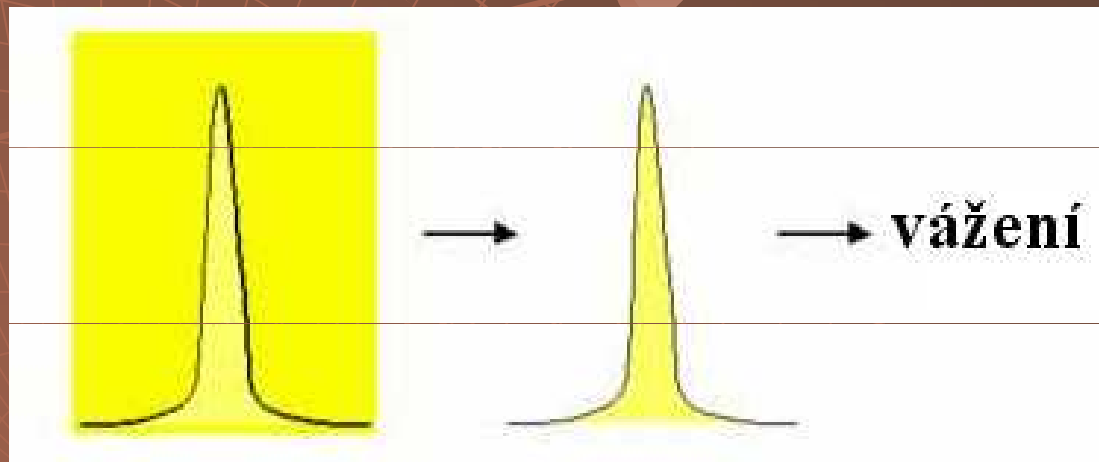
- 1 - derivatizační pumpa derivatizačního reagentu
- 2 - postkolonový systém
- 3 - směšovací komůrka (mixér)
- 4 - chromatografická kolona
- 5 - směr toku mobilní fáze
- 6 - derivatizační reaktor (smyčka)
- 7 - směr toku činidla (efluentu) k detektoru

Jednostupňová postkoloná derivatizace

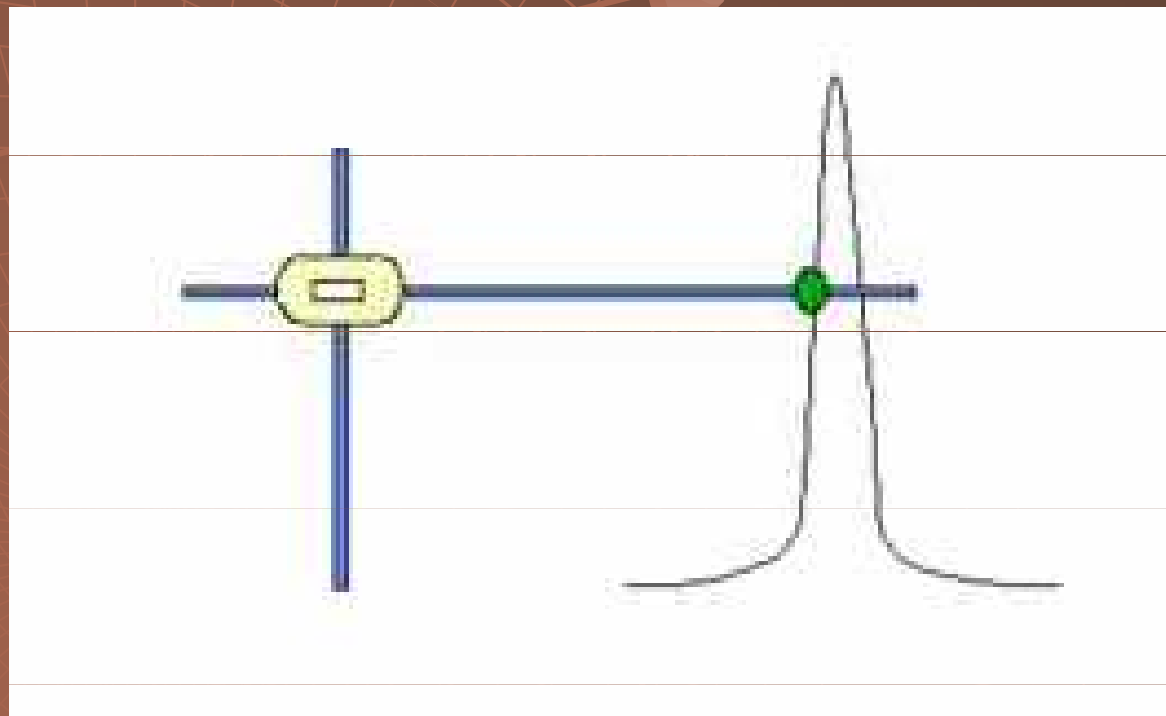
Vyhodnocení

- ◆ Zapisovače
- ◆ Integratory
- ◆ Integrační software + PC

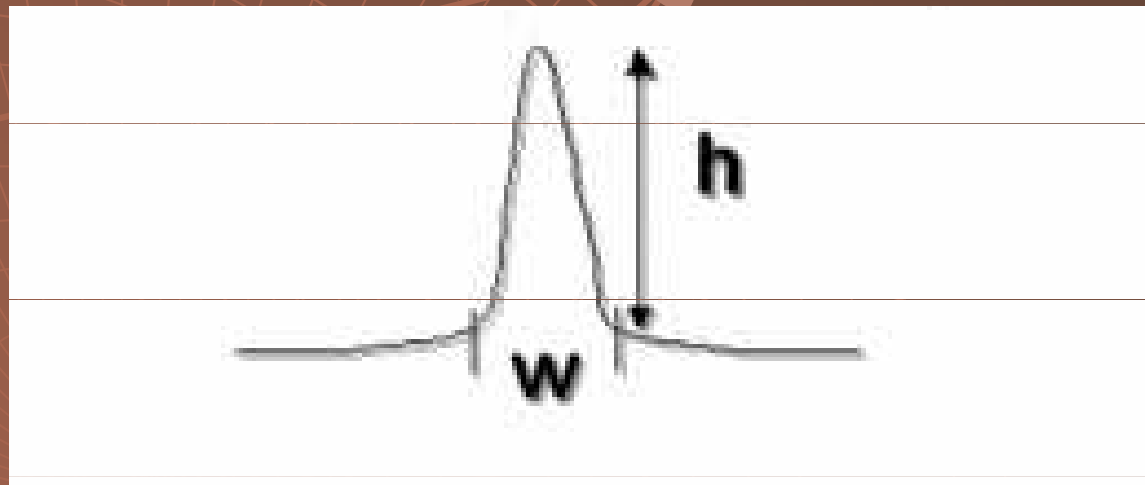
Zjištění plochy píků u zapisovačů vážením



Zjištění plochy píků u zapisovačů planimetrem

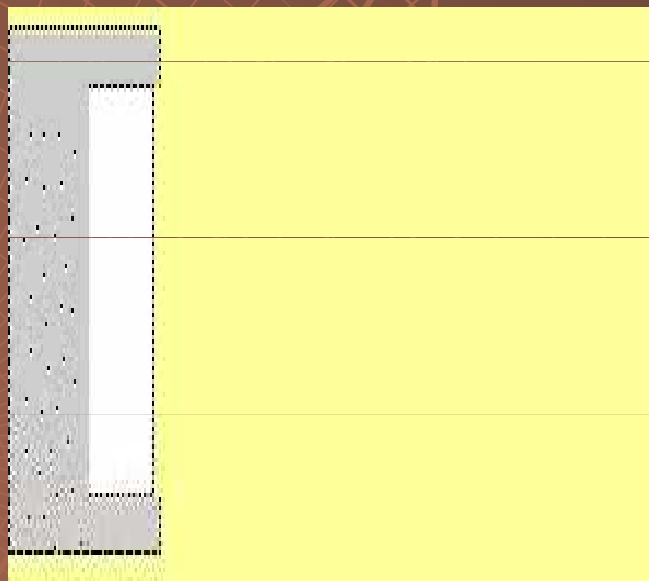


Zjištění plochy píků u zapisovačů výpočtem



plocha = základna x výška

Integrator



Provedení

- ◆ Analytické
 - ◆ Preparativní
- 

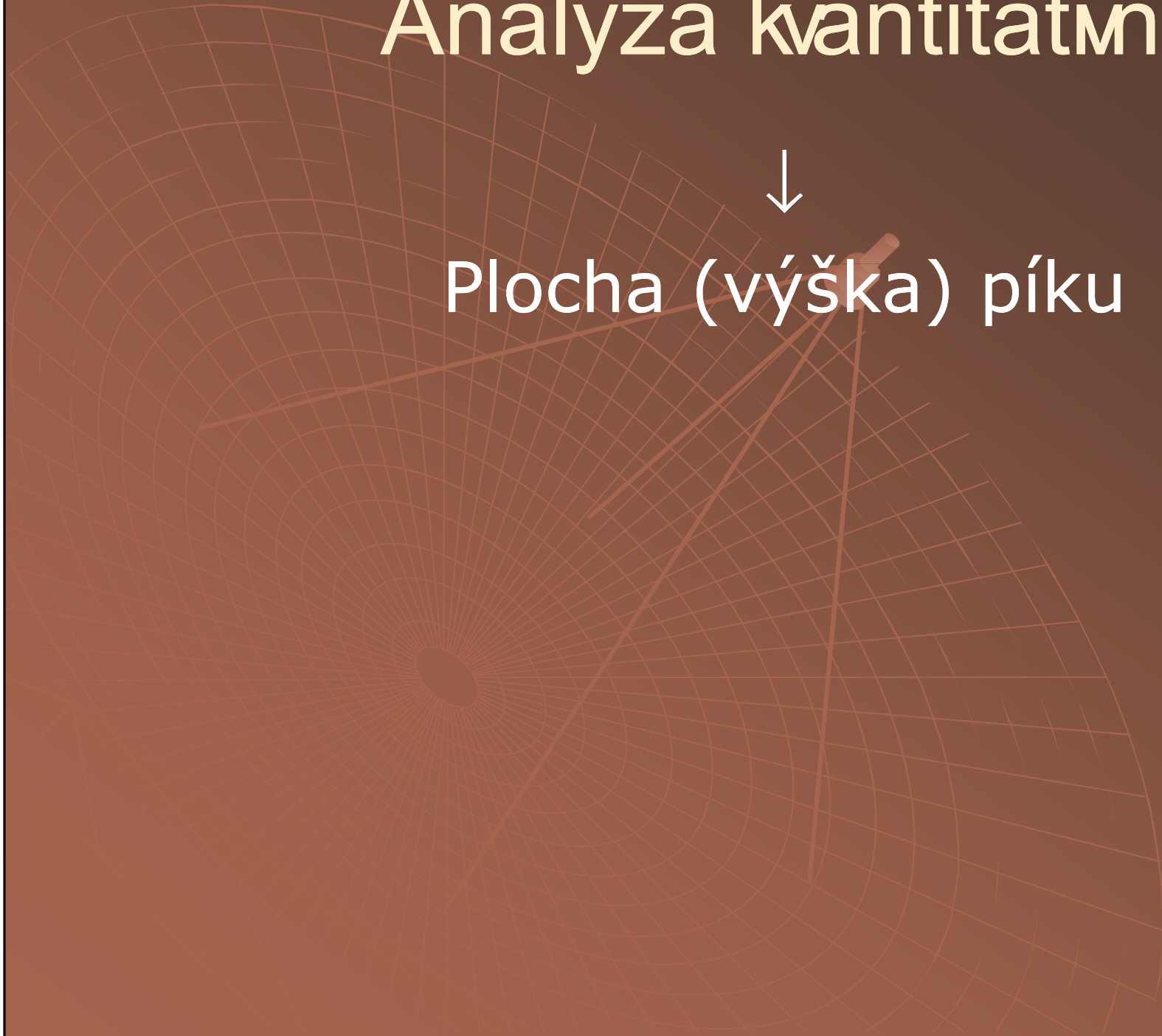
Analýza kvalitativní

- ◆ Srovnání retenčních časů (objemů) píků u vzorku a standardů
- ◆ „spiking“ – přidání standardu do vzoru → nárůst výšky píků
- ◆ Specifická detekce – UV-VIS, fluorescence, elektrochemická
- ◆ MS

Analýza kvantitativní



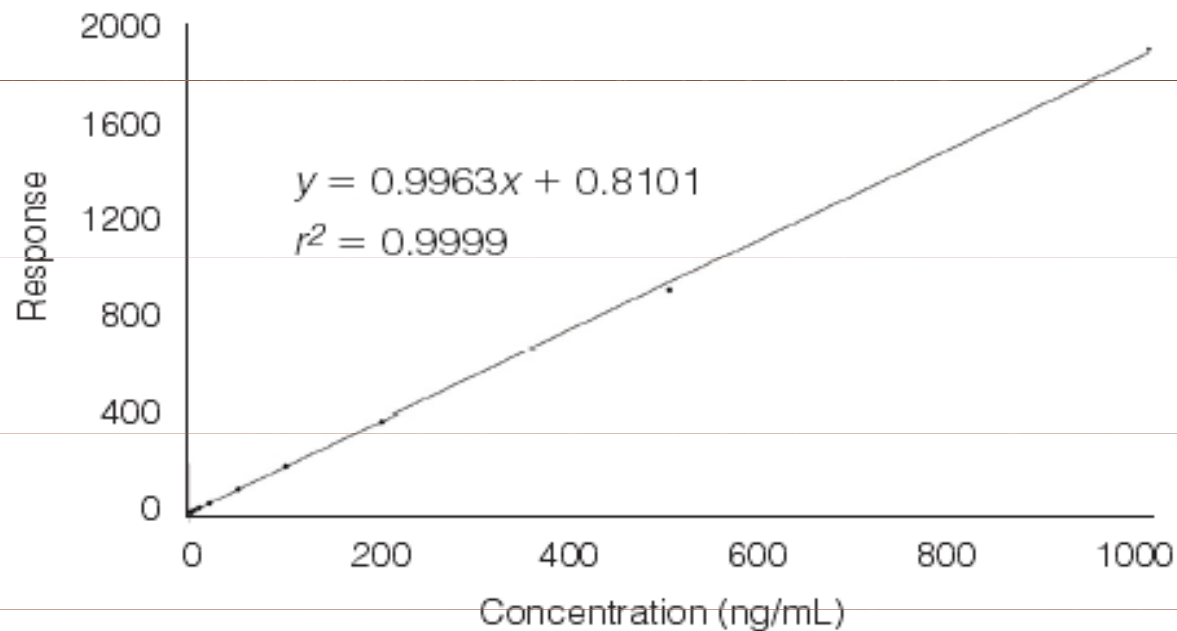
Plocha (výška) píku



Analýza kvantitativní

◆ Metoda externího standardu

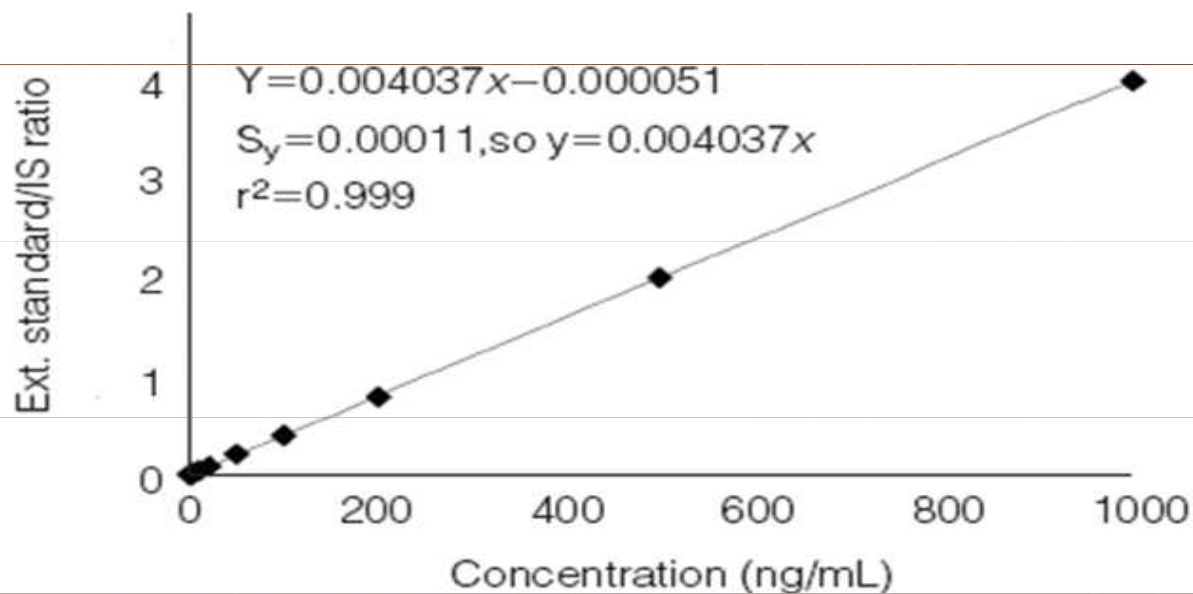
Figure 1: Calibration plot of response versus concentration.



Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda vnitřního standardu

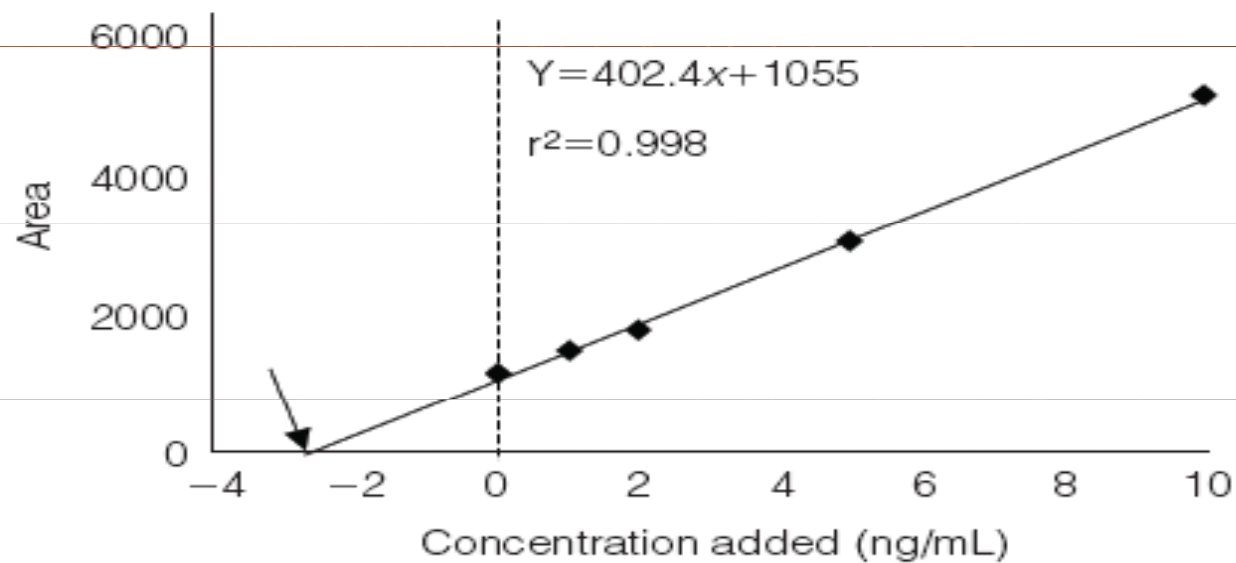
Figure 2: Internal standard calibration plot from data in Table 1.



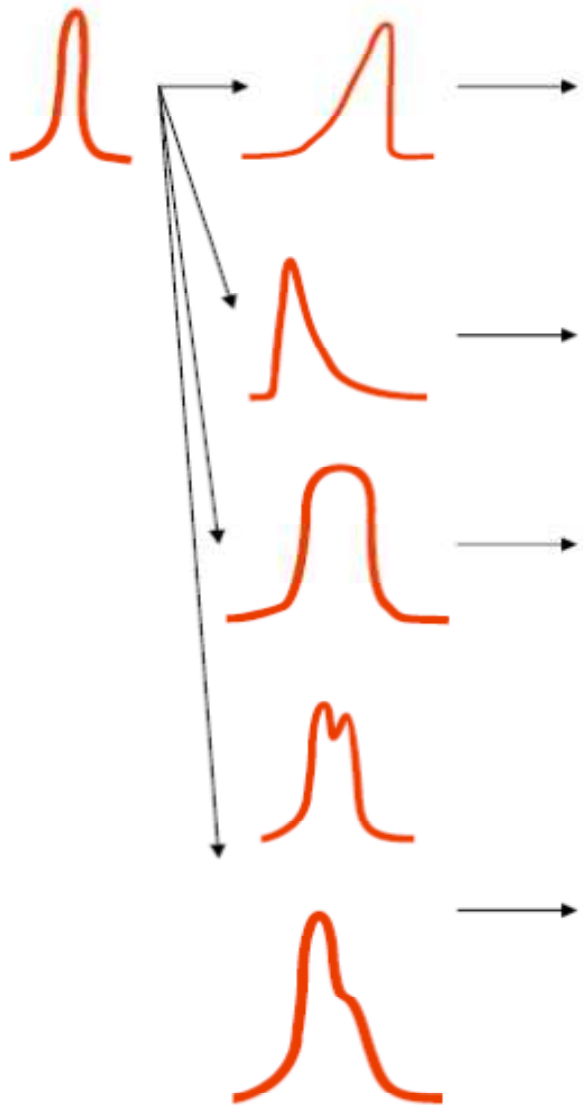
Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda standardního přídávku

Figure 3: Standard additions calibration plot from data in Table 1.



Problémy při LC analýze



•vzorek je rozpuštěn v prostředí o vyšší iontové síle než mobilní fáze

•špatná rozpustnost v mobilní fázi

•kanálky ve stacionární fázi

•sedlá náplň kolony

•nespecifické interakce

•silná retence vzorku

•přetížení kolony

•snížit nástřik

•poškozená kolona

•nečistoty v koloně

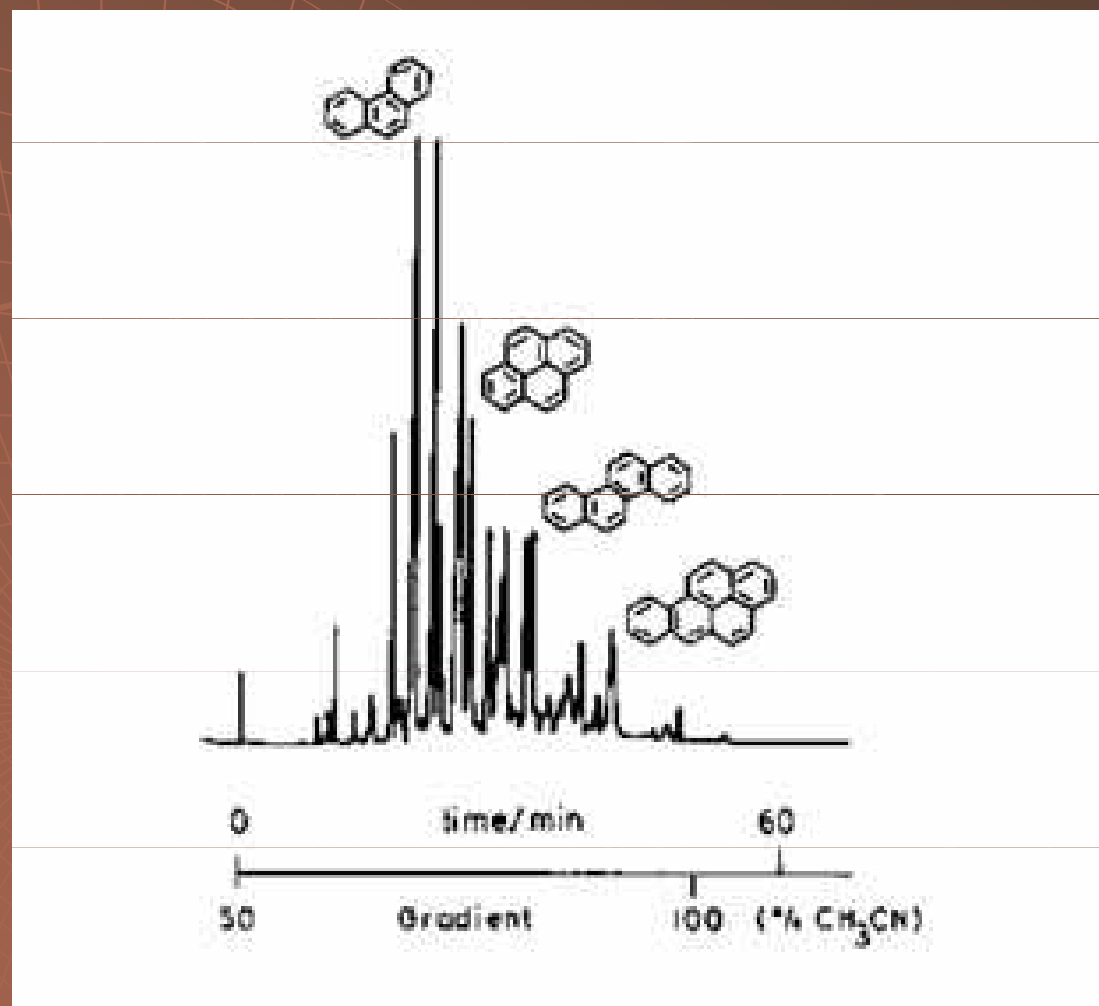
•nerozdělené píky

•kanálky v koloně

•nečistoty na koloně

•nástřik ve dvou podílech

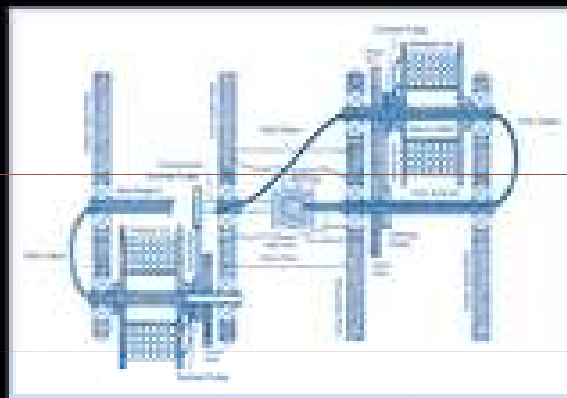
LC analýza



Countercurrent Chromatography

CHROMATOGRAPHIC SCIENCE SERIES VOLUME 62

Countercurrent Chromatography



edited by
Jean-Michel Menet
Didier Thiébaud

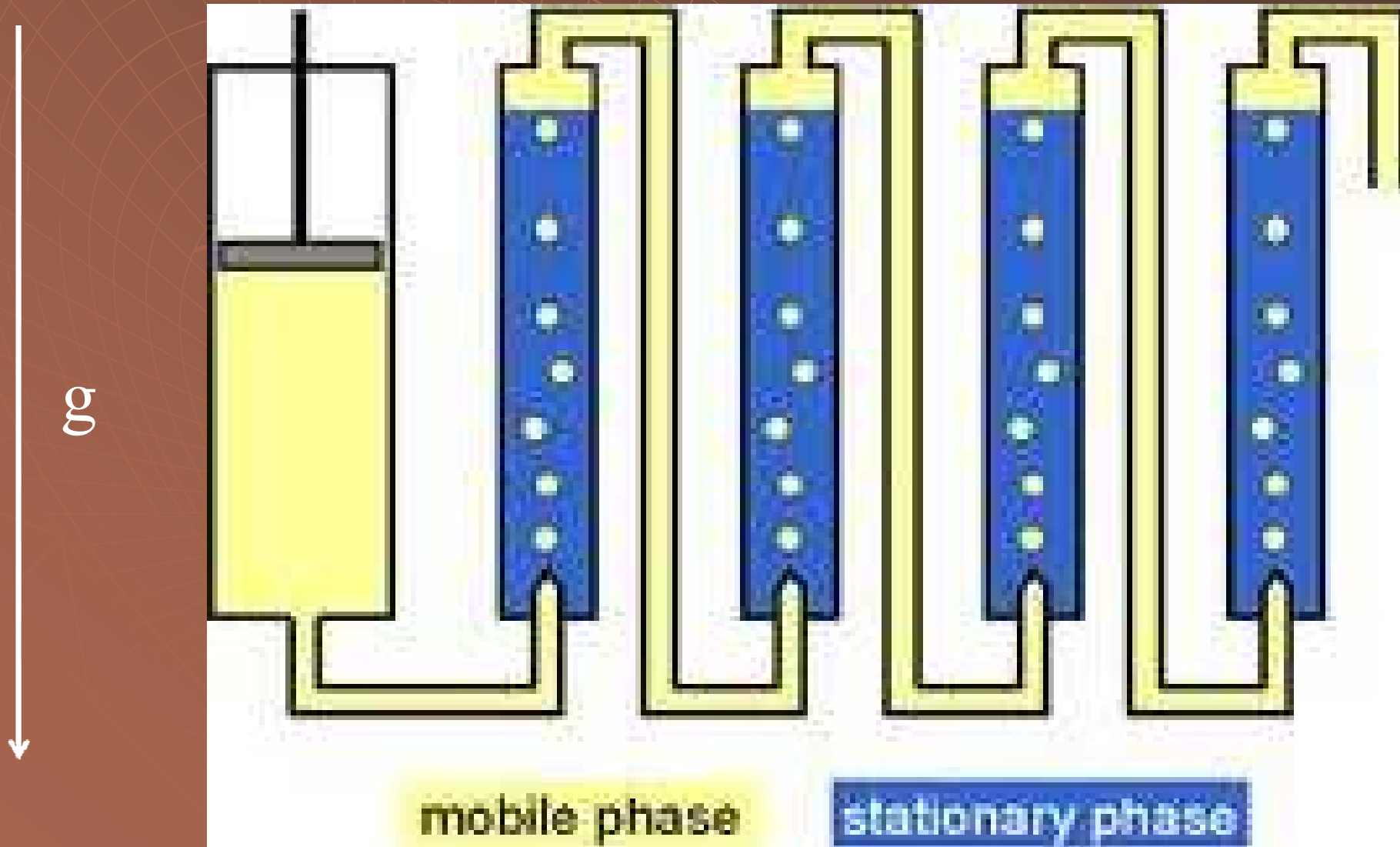
Countercurrent Chromatography

- ◆ Mobilní fáze - kapalina
- ◆ Stacionární fáze - kapalina

Výhody

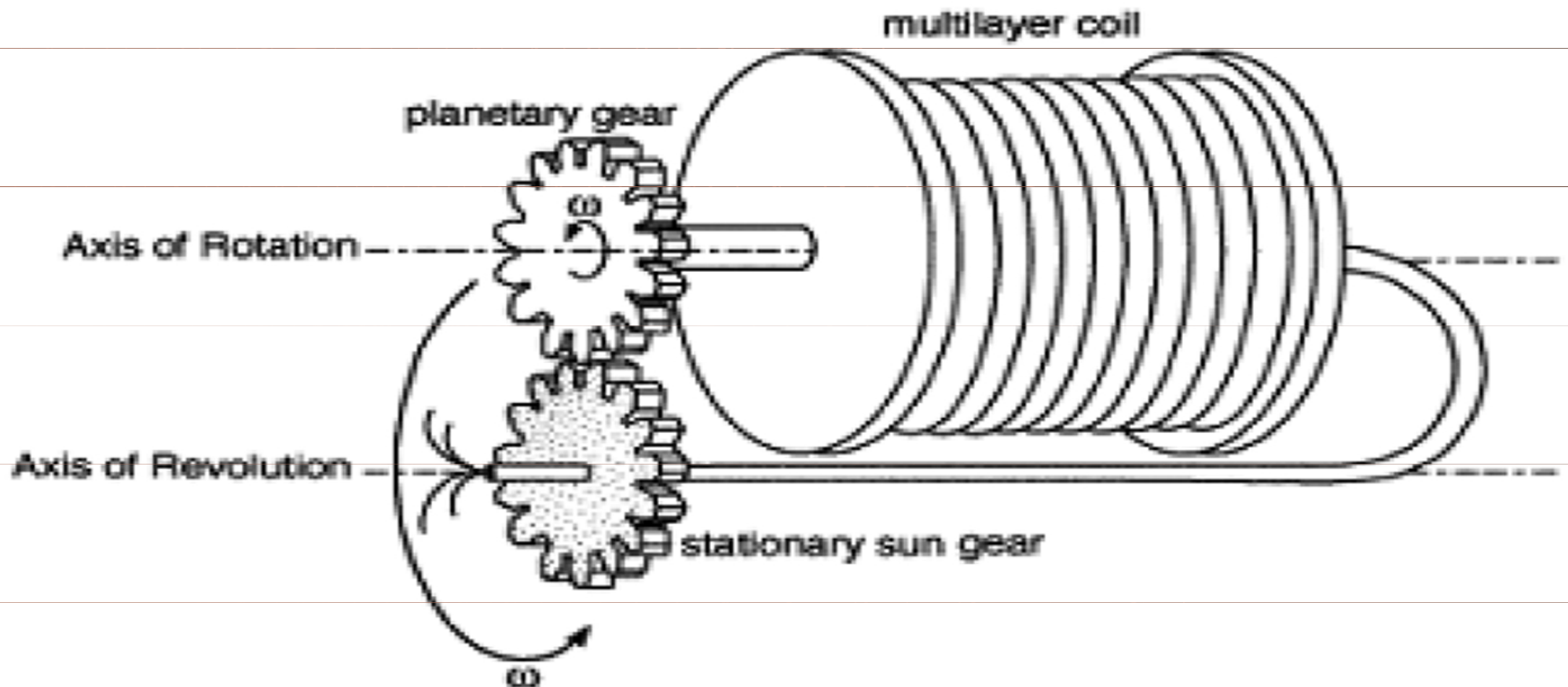
- ◆ Vysoká kapacita
- ◆ Jednoduchý retenční mechanismus
- ◆ Žádné ireverzibilní sorpce
- ◆ Minimální denaturace

Countercurrent Chromatography „kapičková“ CCC

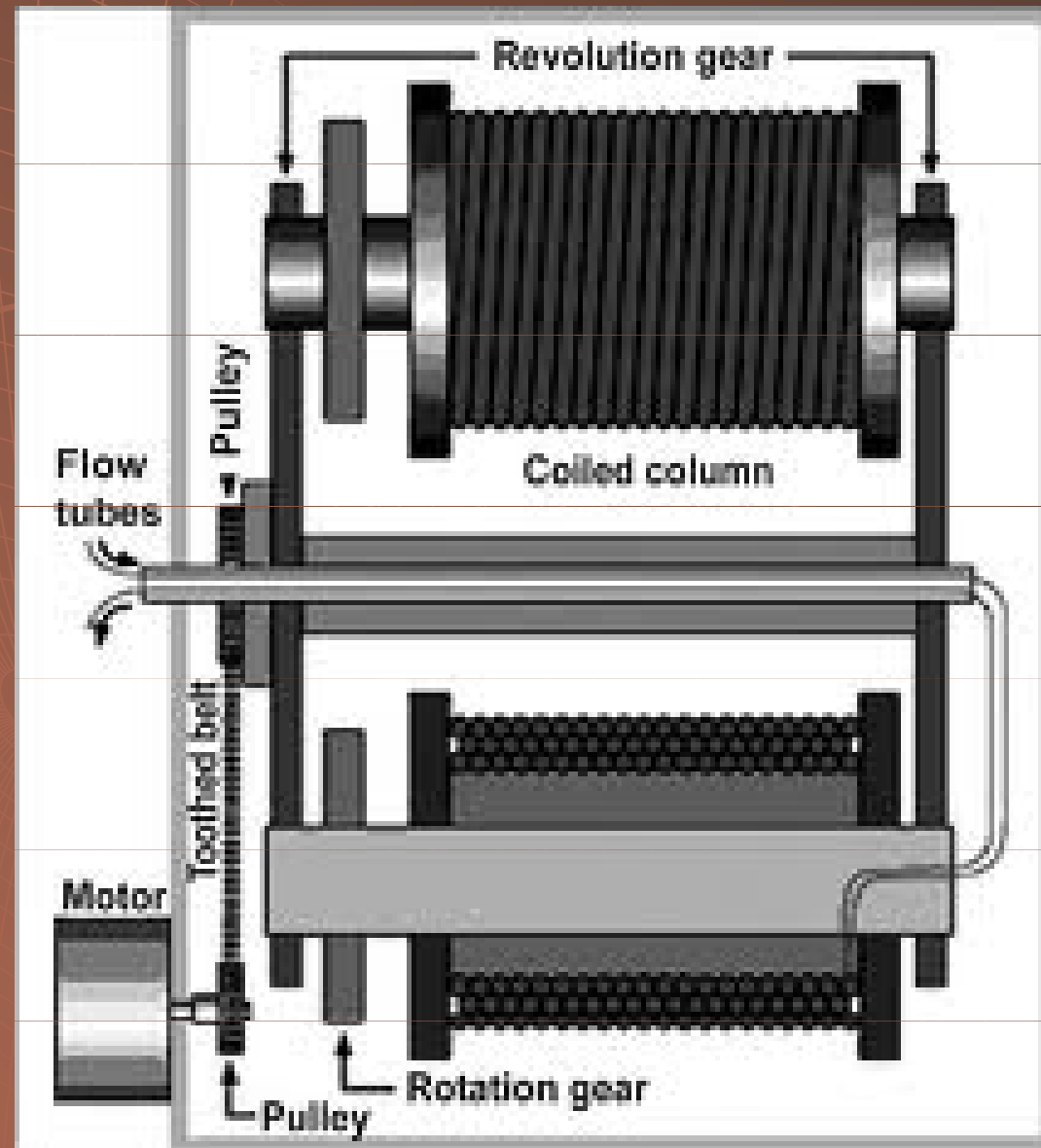


Countercurrent Chromatography rotační CCC

Type-J Synchronous Planetary Motion



Countercurrent Chromatography rotační CCC



Countercurrent Chromatography



Countercurrent Chromatography

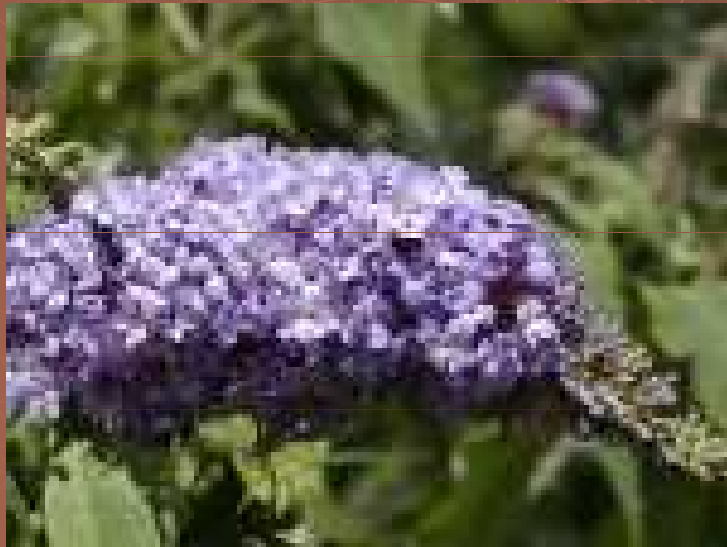
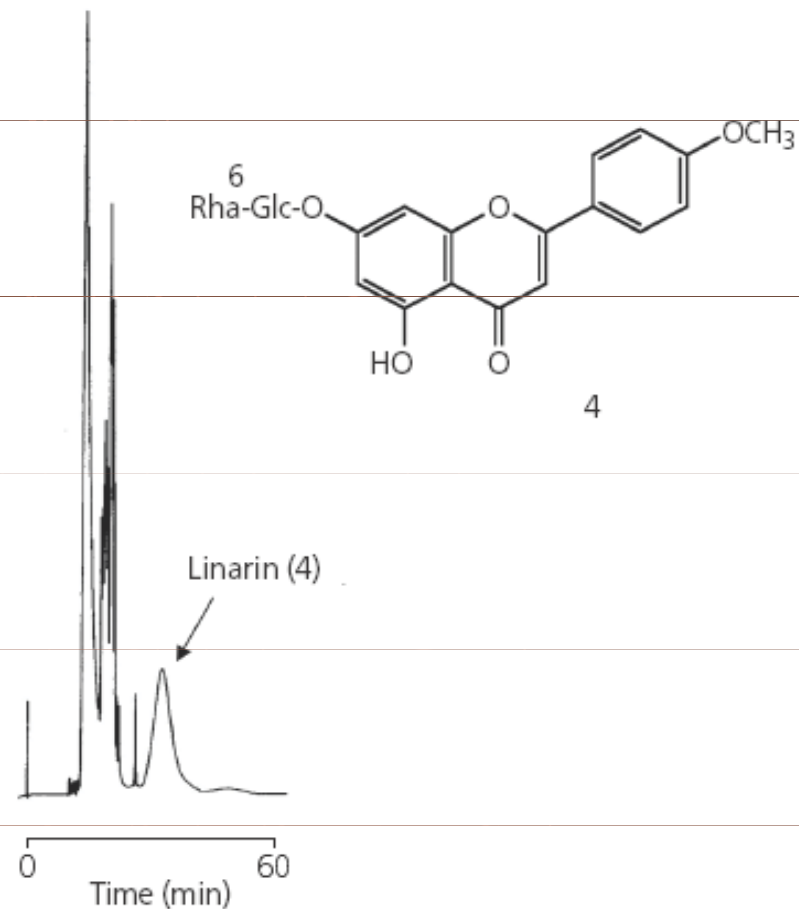
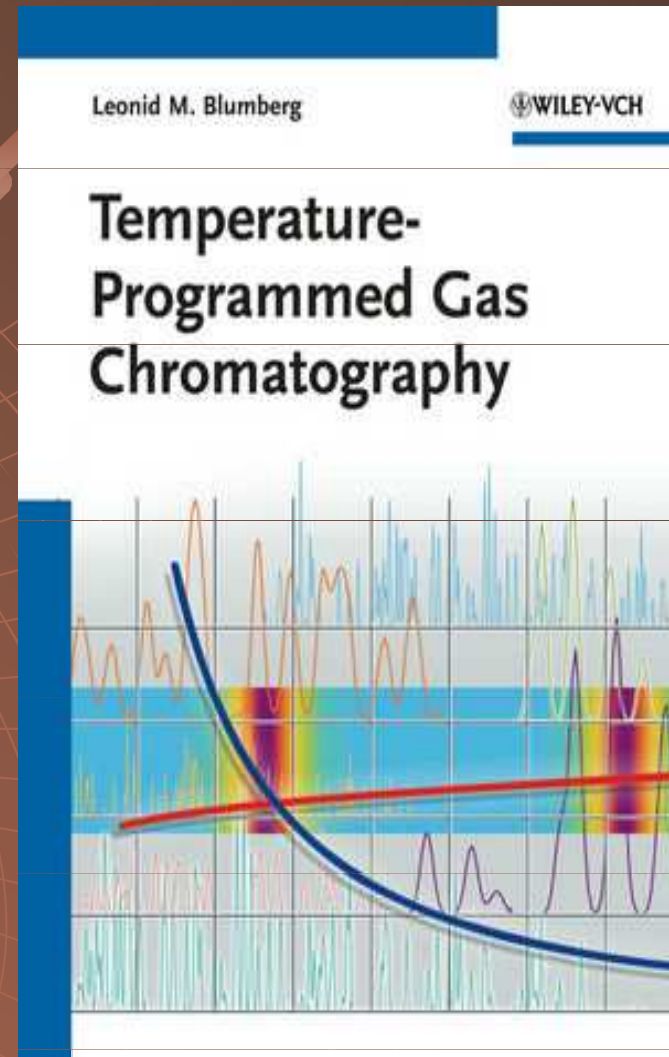
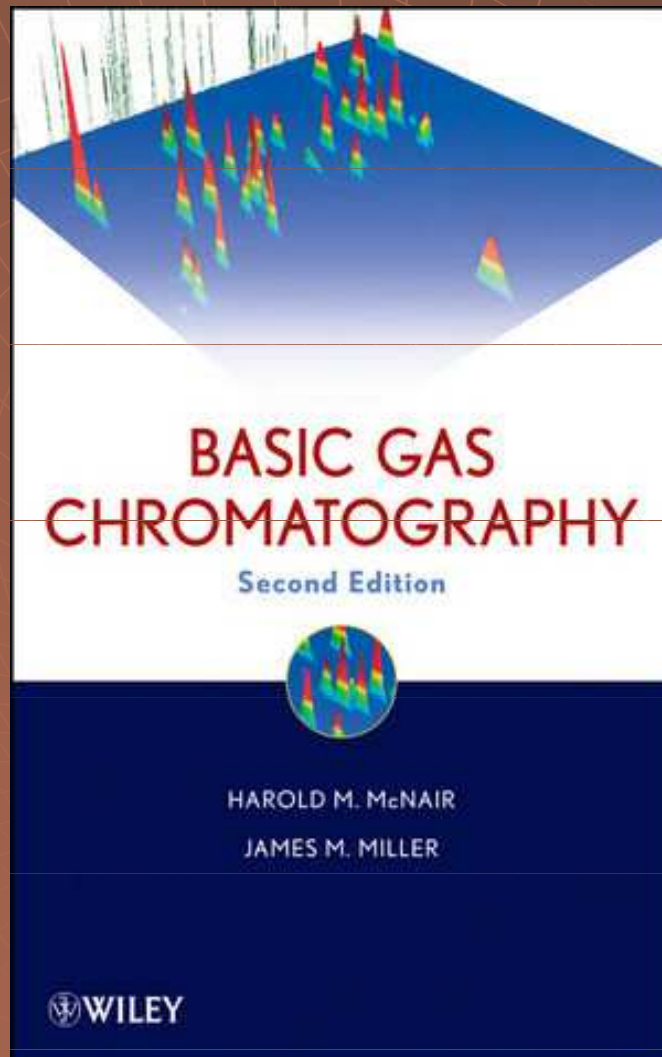


Figure 3: CCC of a methanol extract of *Buddleja davidii* (Buddlejaceae) leaves on a DE instrument with 17 mL coil; rotation speed: 2000 rpm; solvent system: CHCl_3 -MeOH- H_2O 45:33:22 (mobile phase = lower phase) at a flow-rate of 1 mL/min; sample 20 mg; detection 254 nm.



Plynoáchromatografie



Plynová chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - plyn
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze,
kapalina

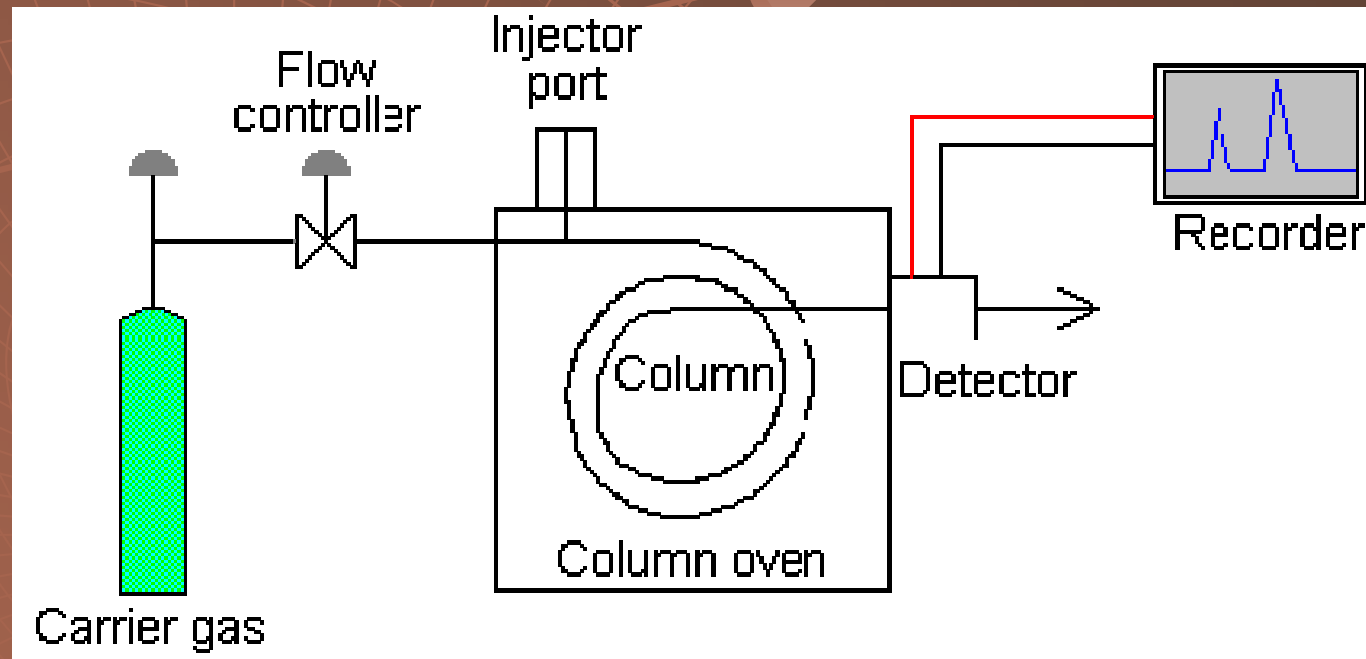
Výhody

- ◆ Nižší viskozita mobilní fáze
- ◆ Rychlejší difuze

Nevýhody

- ◆ Použitelné je pro těkavé látky
- ◆ Látky musí být termostabilní

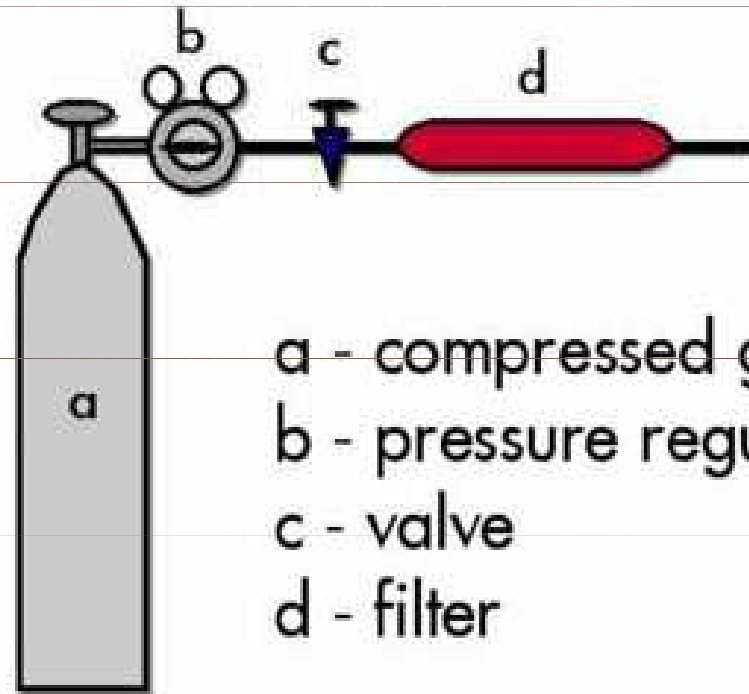
Schéma plynového chromatografu



Plynový chromatograf

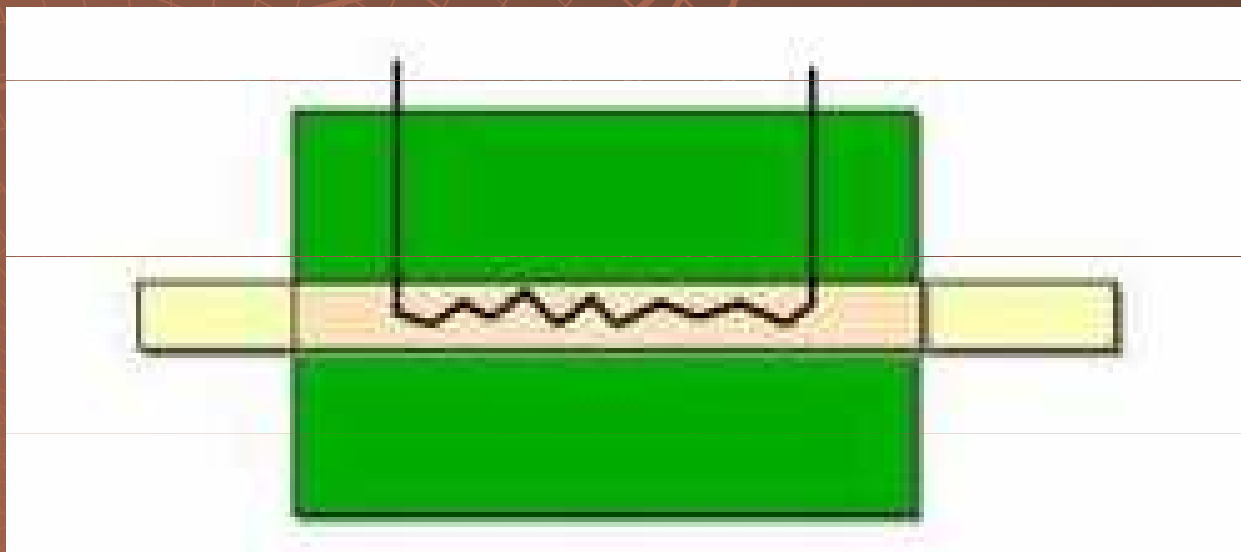


Zdroj nosného plynu



- a - compressed gas cylinder
- b - pressure regulator
- c - valve
- d - filter

Elektrické měření průtoku



Osny plyny

Plyn	Výhody	Nevýhody
N_2	levný, bezpečná práce	nízka tepelná vodivost
H_2	vysoká tepelná vodivost	explosivní
He	inertní	drahý
Ar	inertní	drahý

Příprava vzorků pro GC

- ◆ Plyny, kapaliny - přímo
- ◆ Pevné látky - po derivatizaci

Objemy dávkovaných vzorků

◆ Plyny - 0.5 – 5 ml

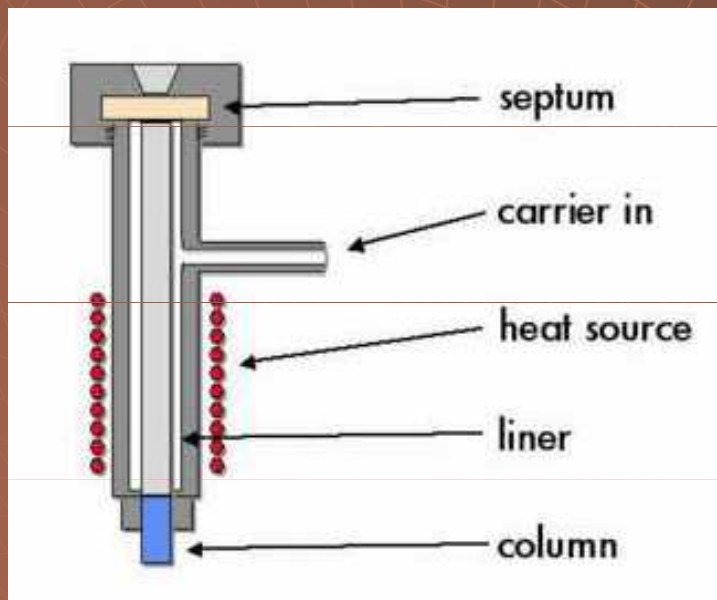
◆ Kapaliny - 0.1 – 10 μ l

Způsoby dákování vzorků

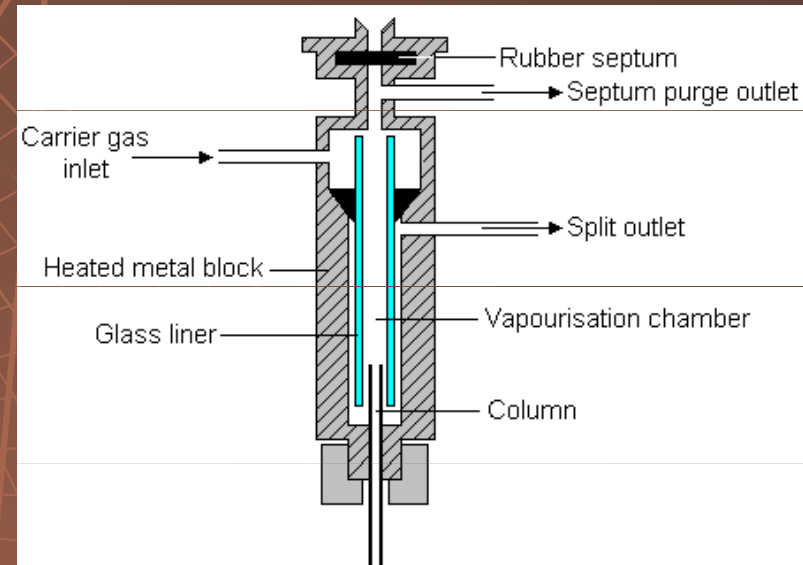
- ◆ Přes septum
- ◆ Ventilem
- ◆ Termální desorpcí

Stříkačkou

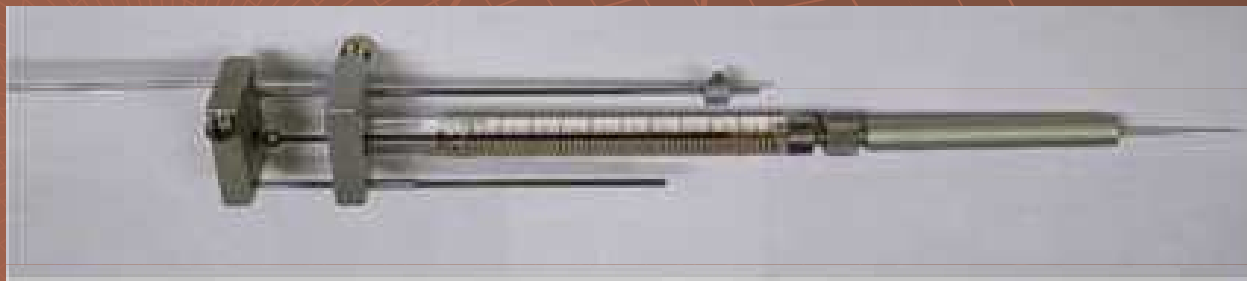
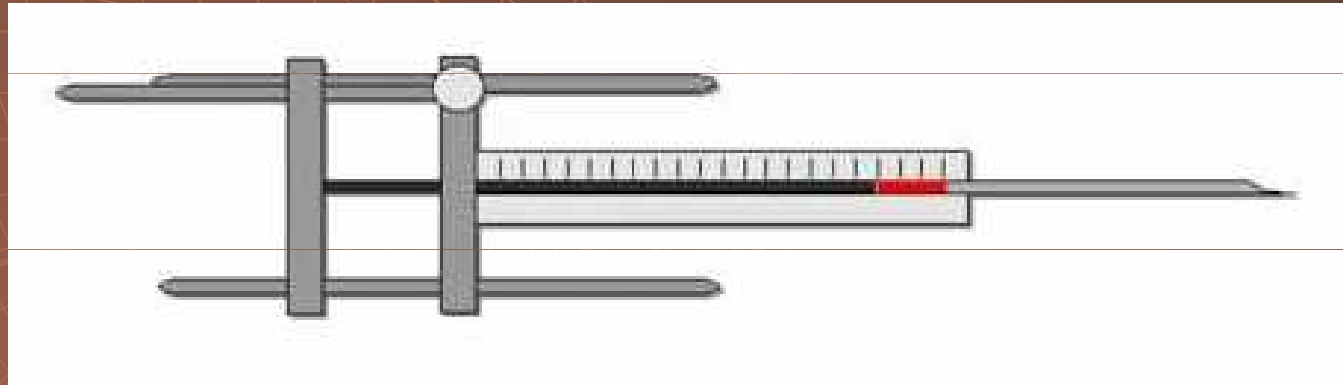
„splitless“



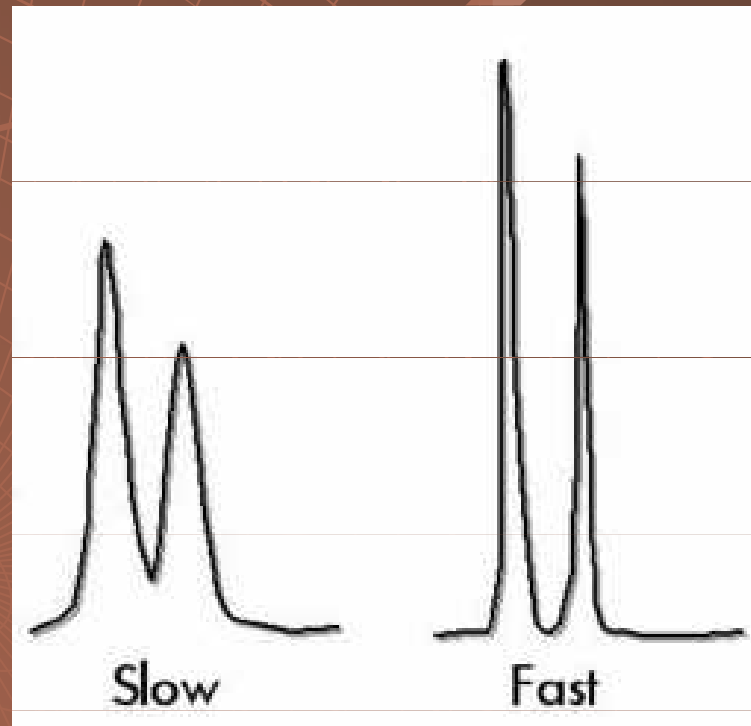
„split“



Dákovací stříkačka



Rychlost d'ákování



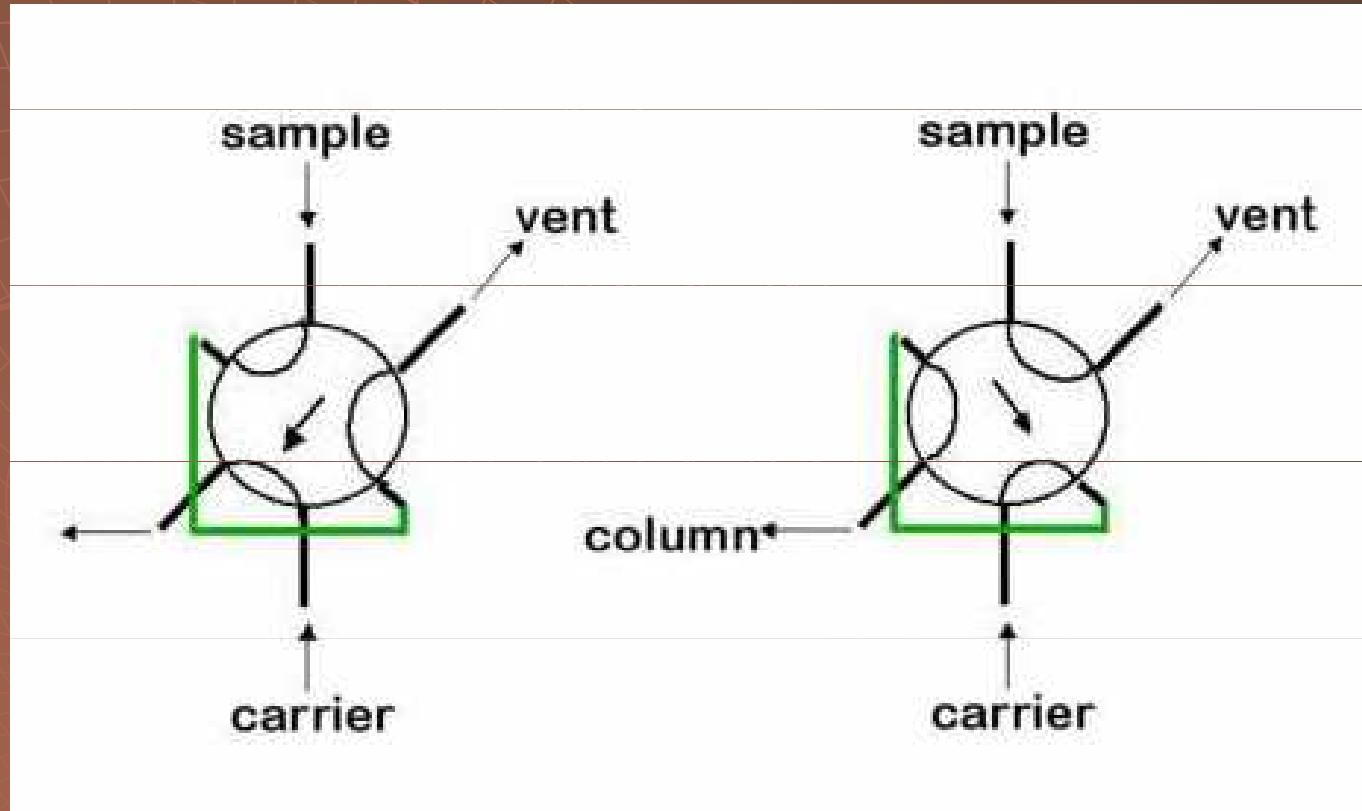
Způsob dákování



Automatické dávkovače



Ventilem



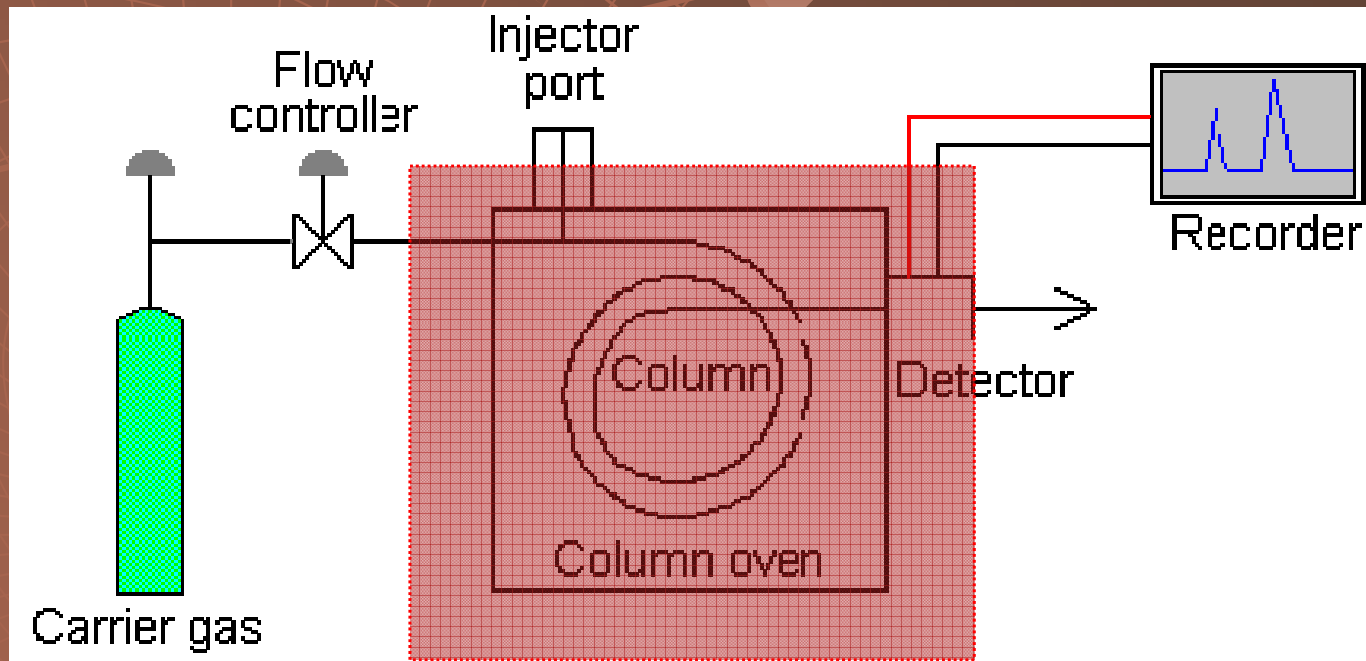
Ventil



Dákování termální desorpcí



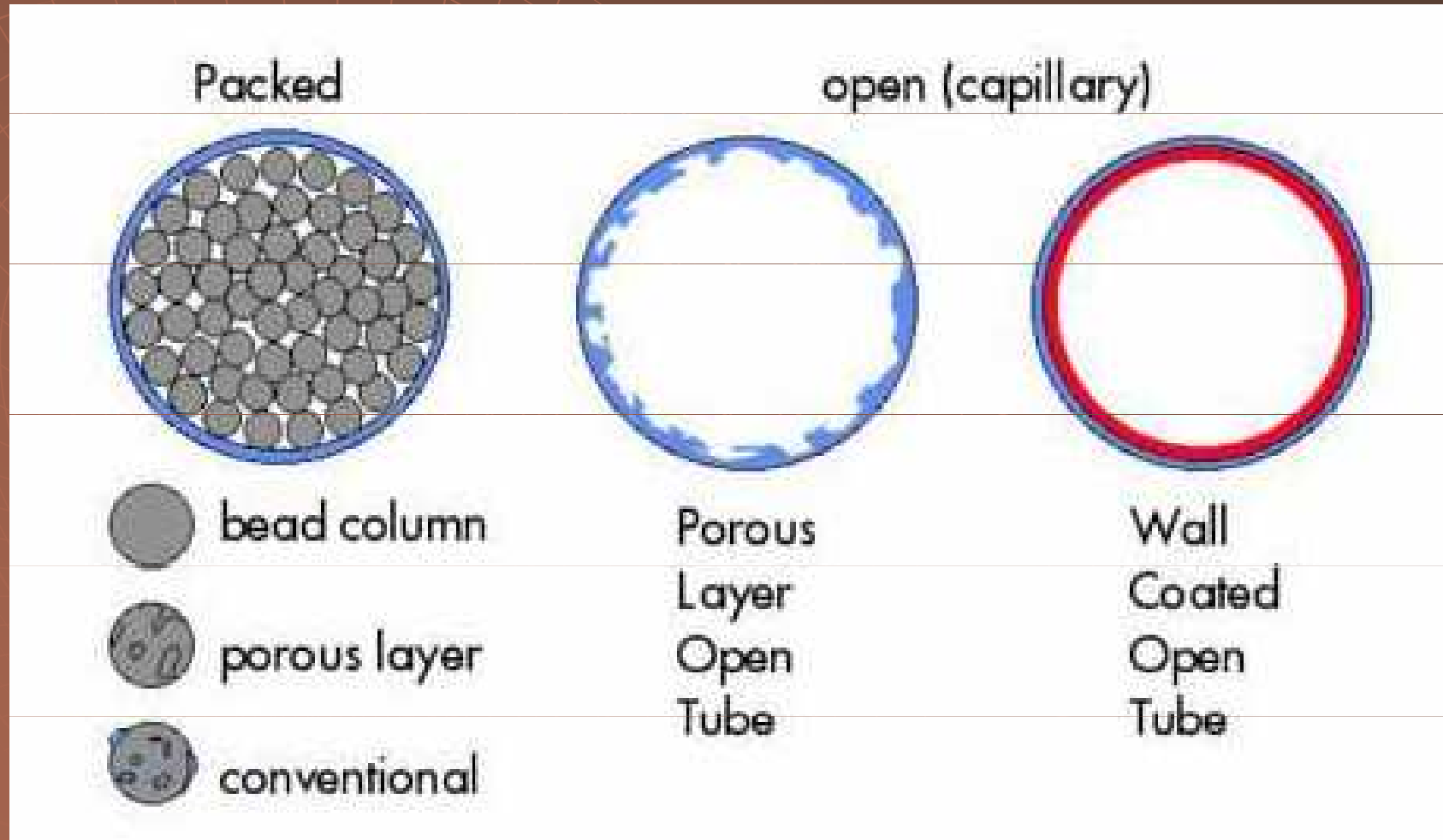
Termostatační



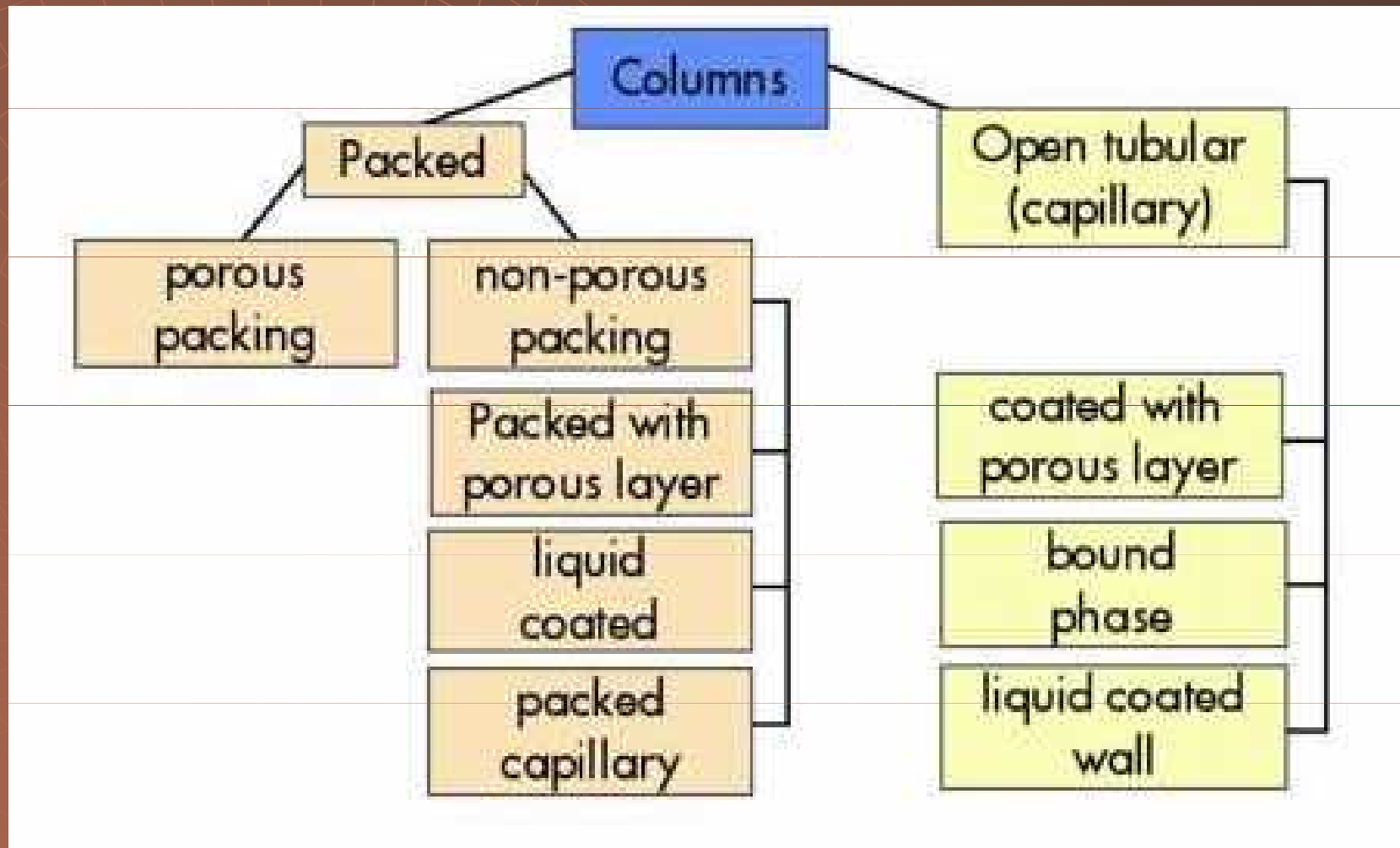
Kolony

- ◆ Náplňové – ¼" OD – ocel, sklo
délka 1m
- ◆ Kapilární – 0.1 – 0.5 mm ID –
křemen, ocel, sklo
délka – 10 - 100 metrů

Kolony



Kolony



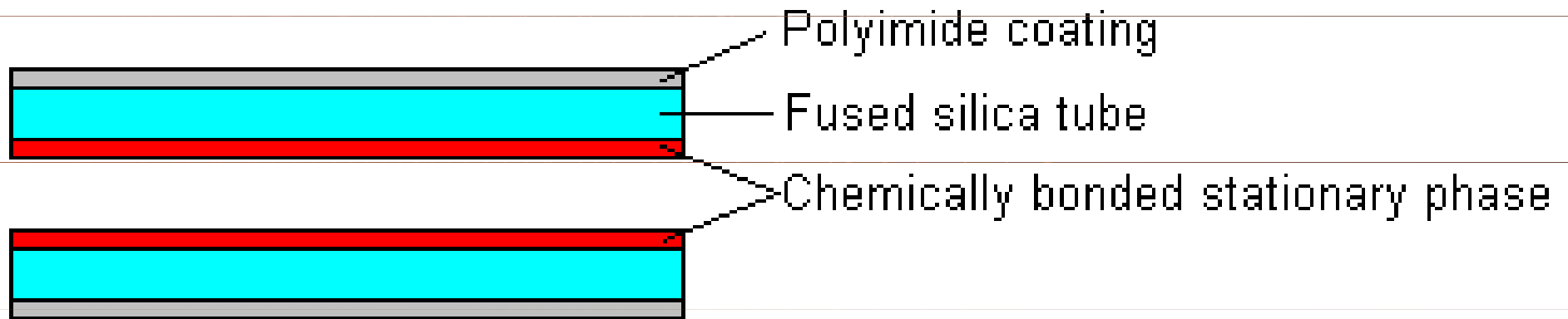
Mřížová kolona



Kapilární kolona



Kapilární kolona



Pevné stacionární fáze

Aktivní uhlí, grafitizované uhlí
- dělení plynů a lehkých uhlovodíků

Silikagel

- dělení anorganických plynů a nízkovroucích kapalin

Molekulová síta (krystalické hlinitokřemičitany)

- dělení plynů a lehčích uhlovodíků

Porézní polymery (vinylbenzenové kopolymery)

- dělení nízkomolekulárních uhlovodíků, anorganických plynů, alkoholů, esterů a ketonů

Kapalné stacionární fáze

Carbowaxy (polyethylenglykoly)

Ucony (polypropylenglykoly)

- polární stacionární fáze, s rostoucí M_r klesá polarita

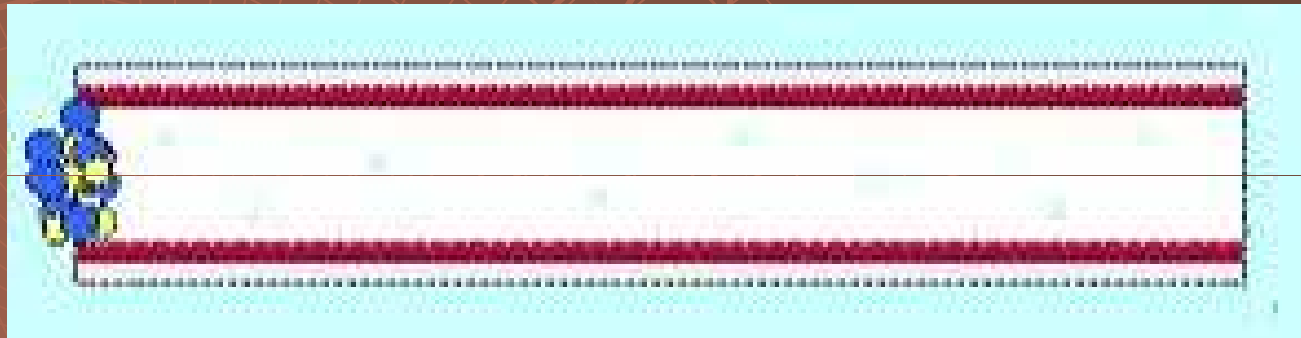
Polyestery (např. polyethylenglykoladipáty)

- polární stacionární fáze

Silikonové stacionární fáze (polysiloxany)

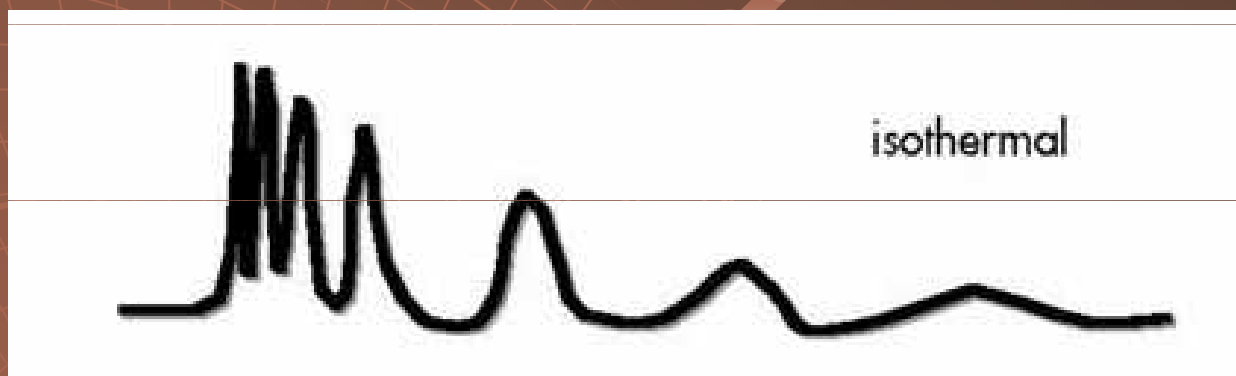
- často používané, široký rozsah polarity

Eluce



Eluce

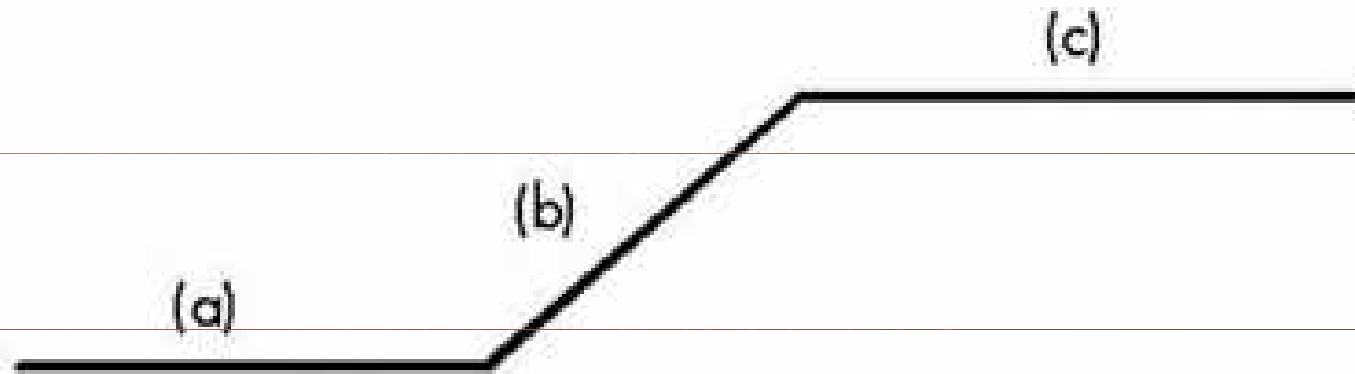
- ◆ Izotermální



- ◆ Gradientová – zvyšování teploty – 400 °C



Eluce



a - initial temperature and time

b - ramp ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

c - final hold time and temperature

Detektory

Destruktivní x

Nedestruktivní

Universální x

Selektivní

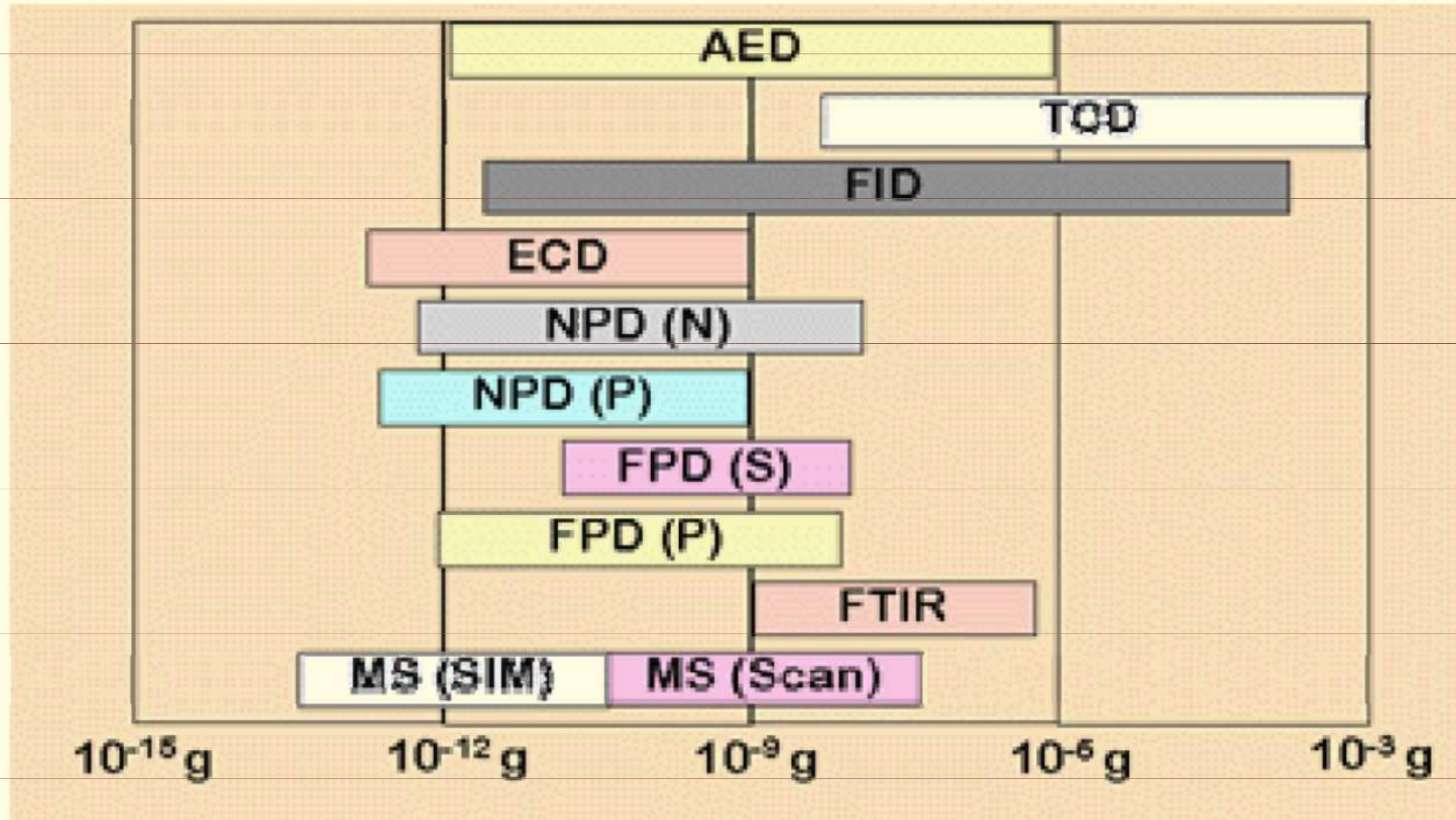


Detektory

Tepelně-vodivostní	Tepelná vodivost
Plamenově-ionizační	Ionizace (uhlovodíky)
Dusíko-fosforový	N,P - určité formy
Elektronového záchytu	Elektronegativní struktury
Atomově-emisní	Emisní záření
Plamenově-fotometrický	P, S - určité formy
Fotoionizační	Absorbce UV
Chemiluminiscenční	Excitace (O₃, F₂)
FTIR	IČ + Fourierova transformace
Hmotnostní	Ionizace

Detektory

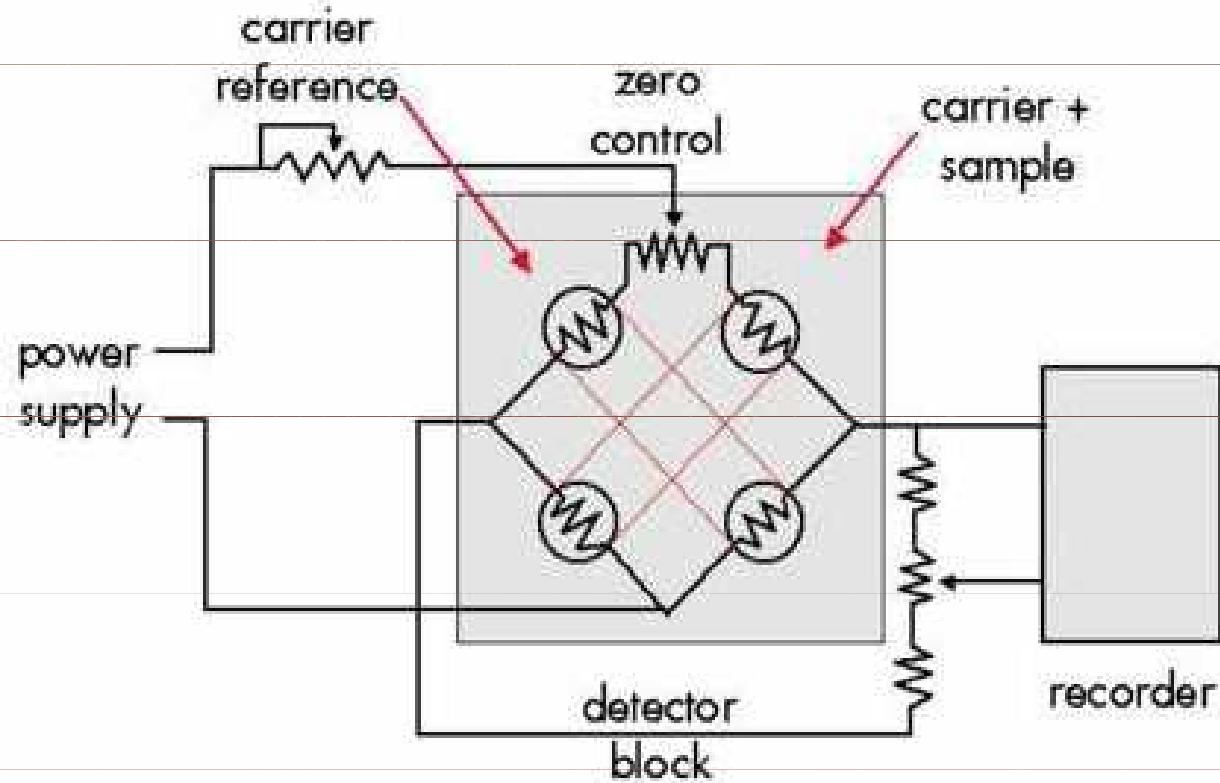
Citlivost a pracovní rozsah GC detektorů



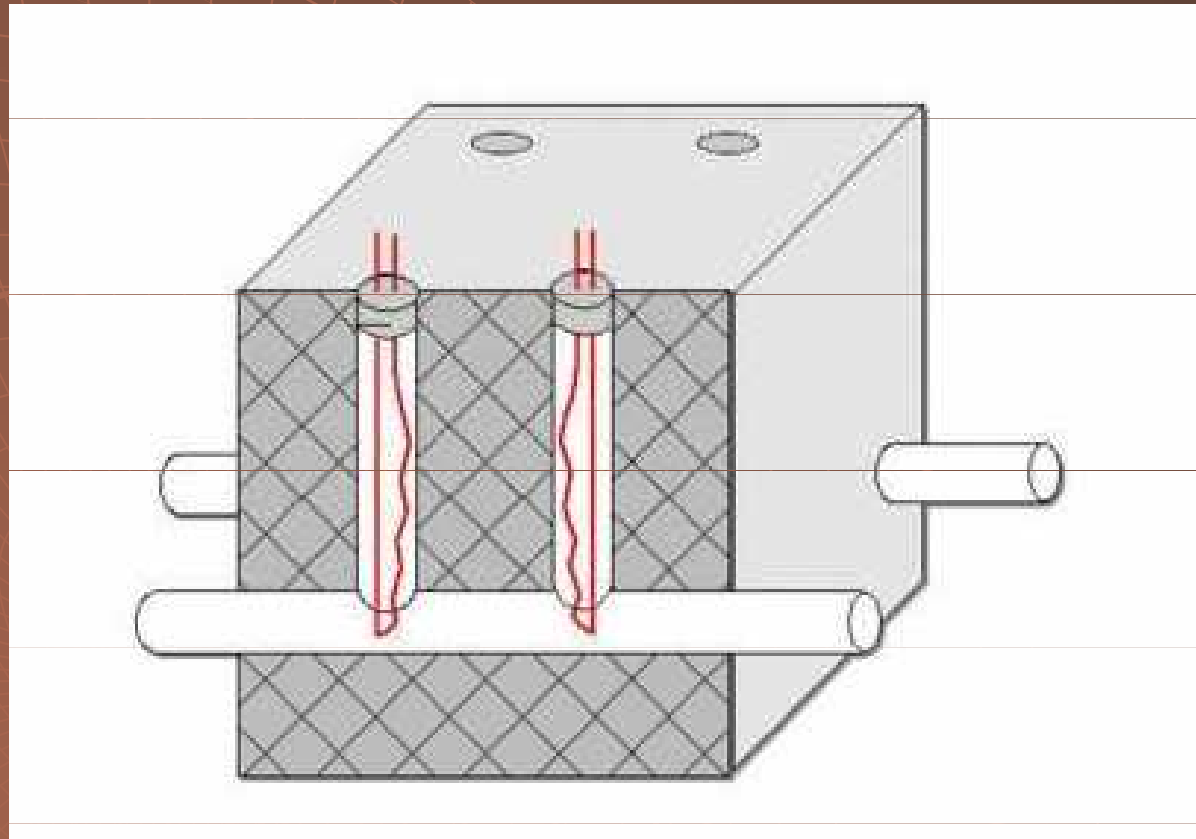
Teplotně vodivostní detektor TCD

- ◆ Universální detektor
- ◆ Nedestruktivní detektor
- ◆ Lineární rozsah – 10^6
- ◆ Princip – změna tepelné vodivosti eluentu

Teplotně vodivostní detektor TCD



Teplotně vodivostní detektor TCD

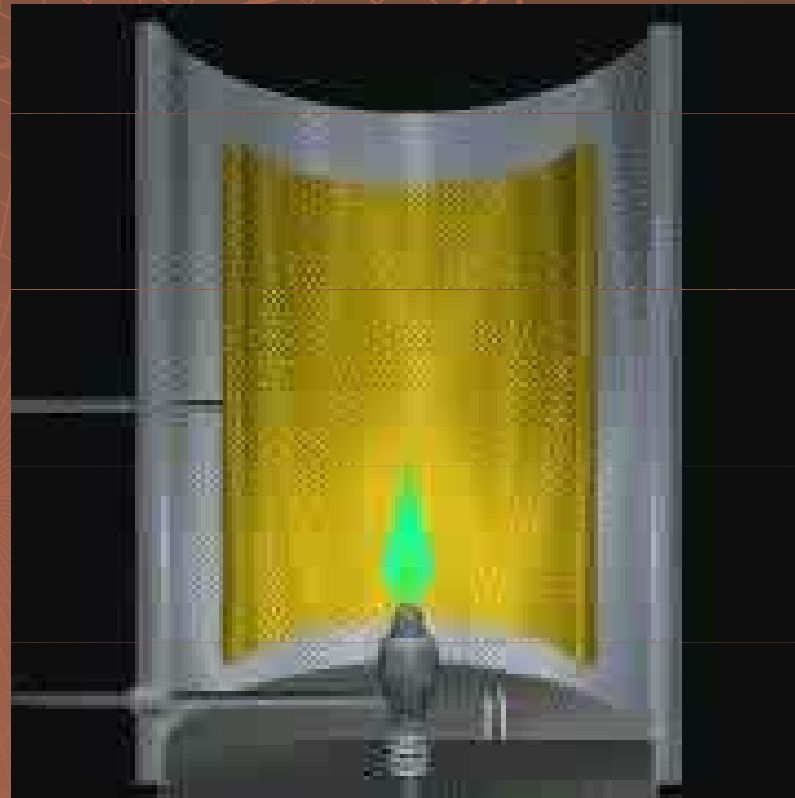


Plamenově ionizační detektor FID

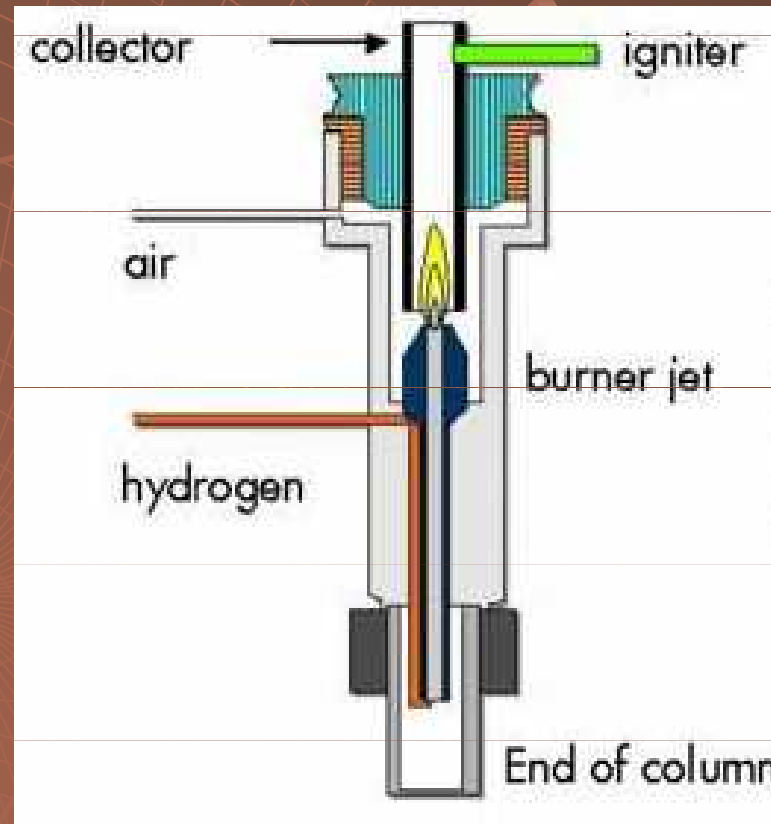
- ◆ Specifický
- ◆ Destruktivní
- ◆ Lineární rozsah – 10^7

- ◆ Princip – ionty vznikající spalováním vzorku vyvolávají nárůst proudu

Plamenově ionizační detektor FID



Plamenově ionizační detektor FID

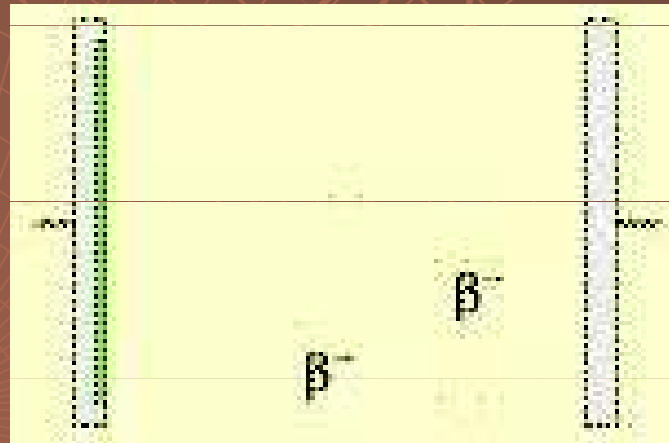


Detektor elektronového záchytu ECD

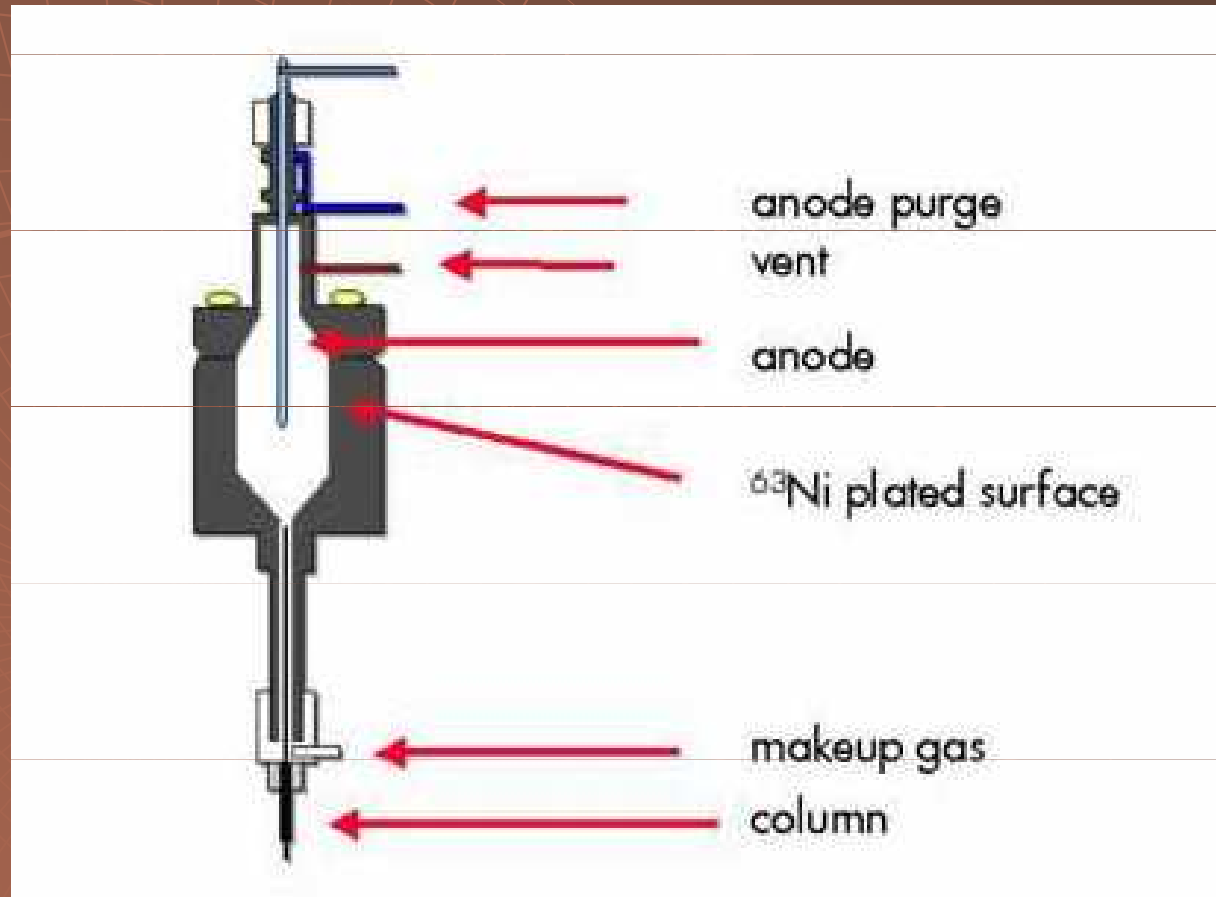
- ◆ Specifický
- ◆ Nedestruktivní
- ◆ Lineární rozsah – 10^4
- ◆ Princip – interakce β^- částic se vzorkem vyvolává pokles proudu

Detektor elektronového záchytu ECD

$\beta^- - {}_{63}\text{Ni}$

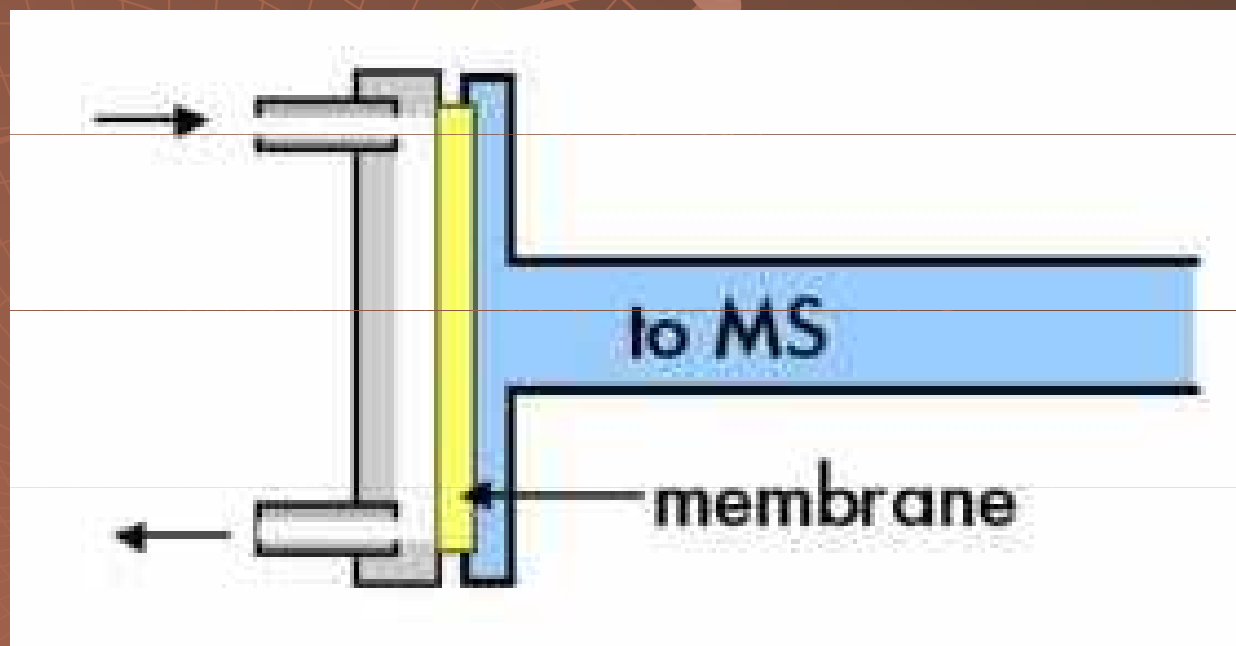


Detektor elektronového záchytu ECD



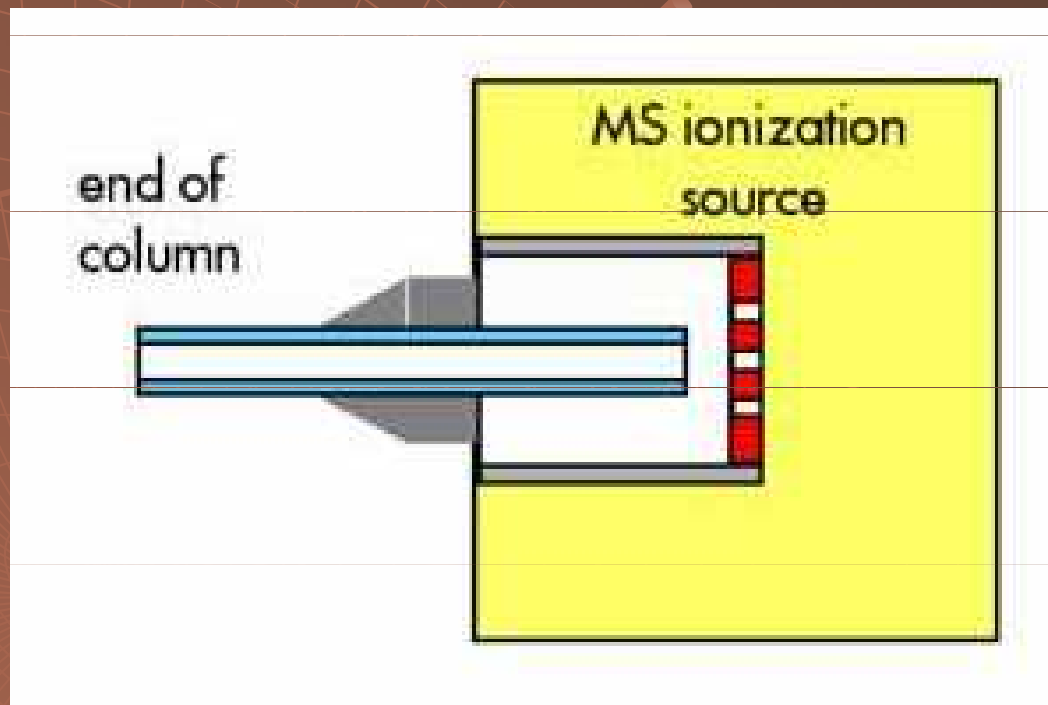
GC MS

permeační interface

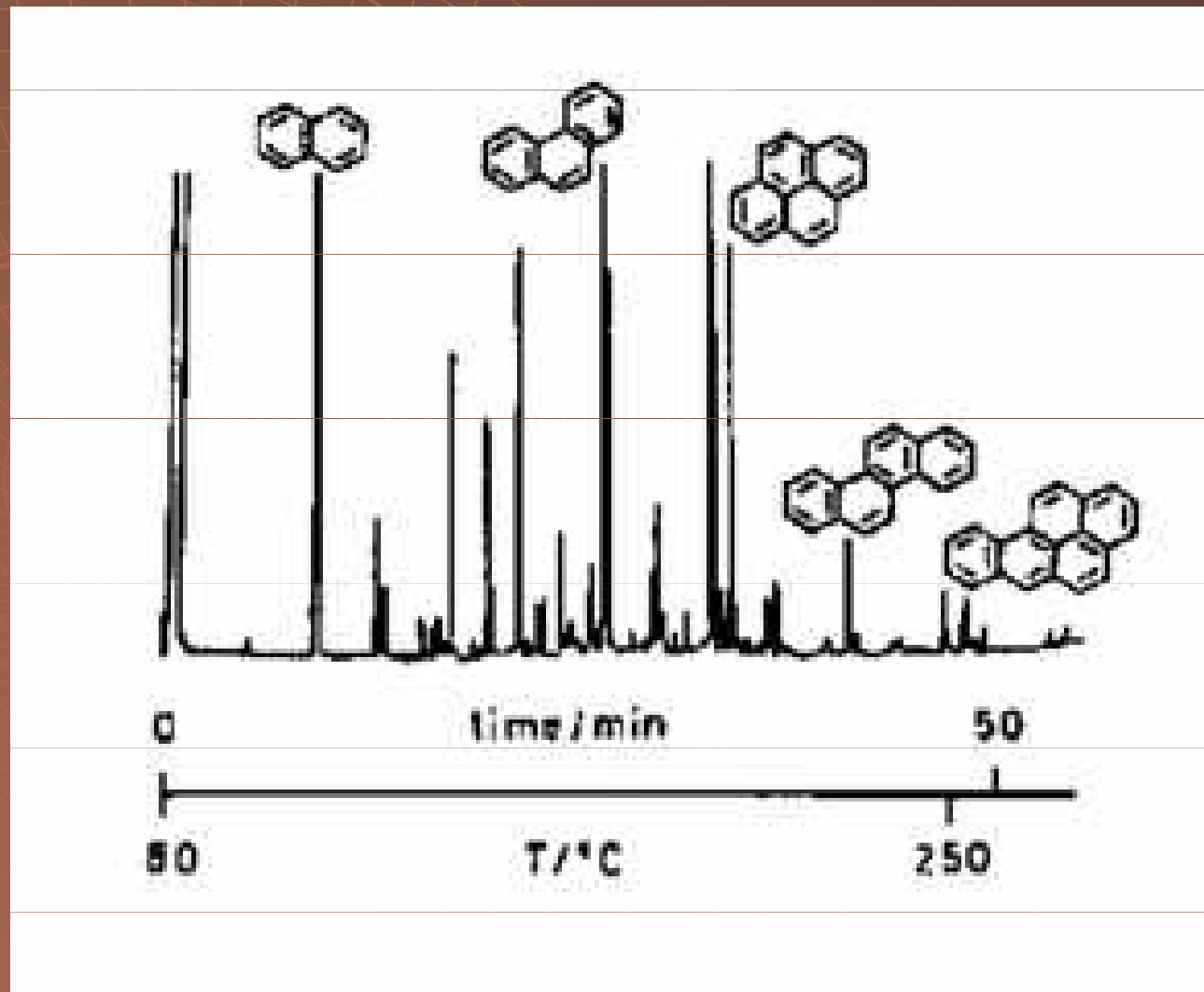


GC MS

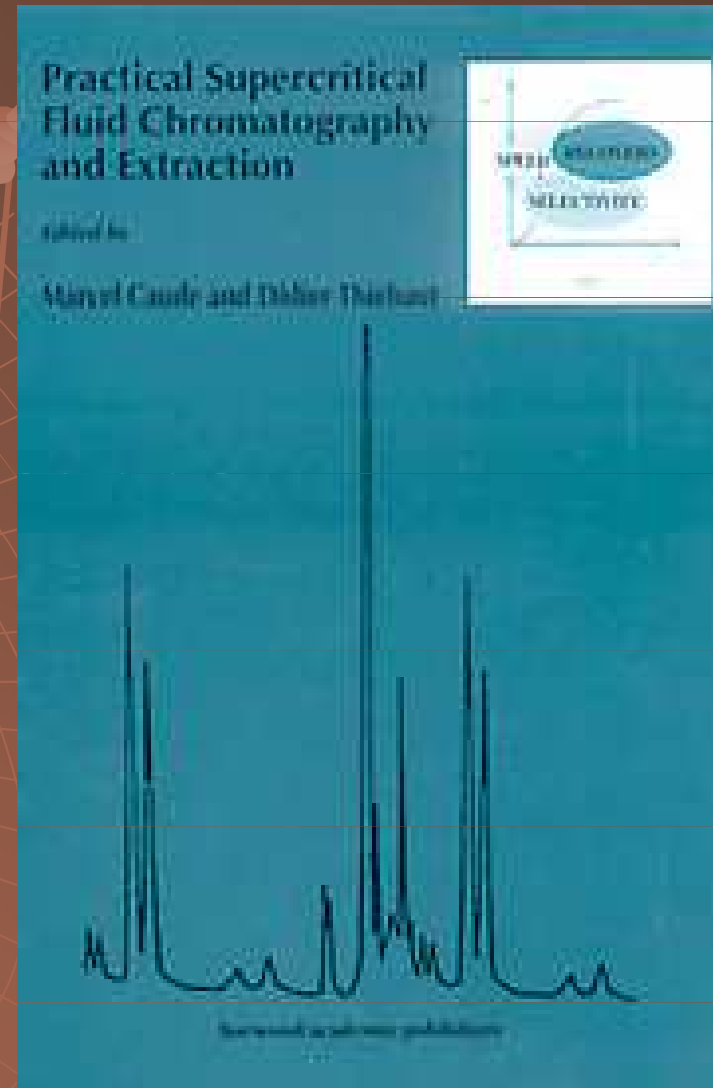
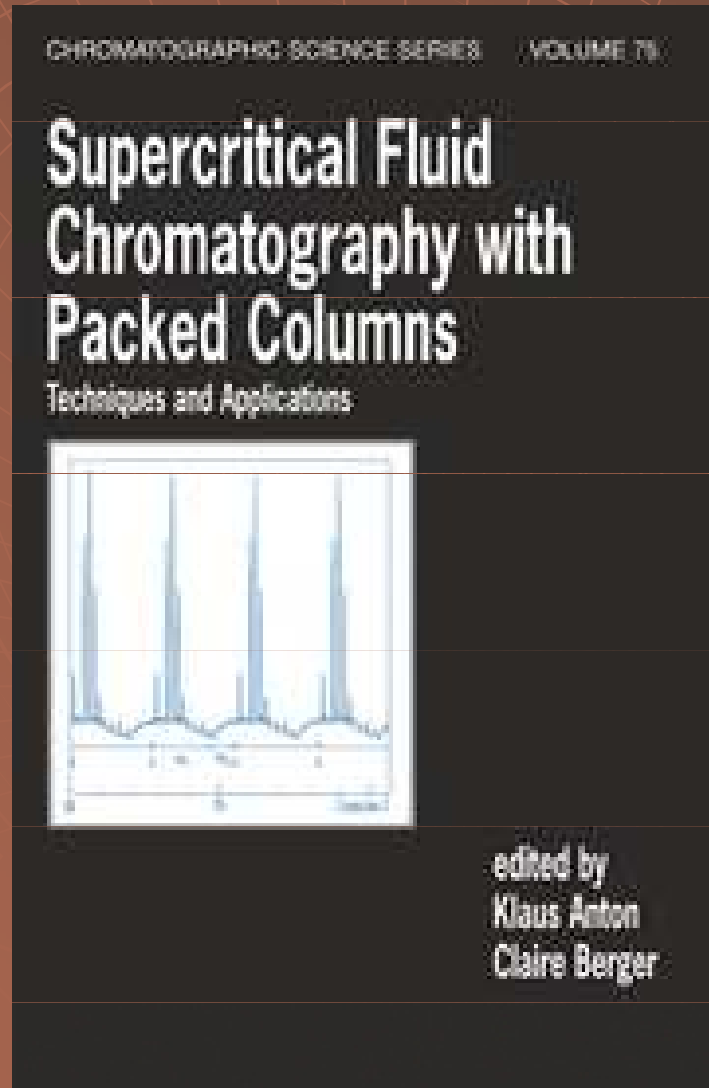
přímé spojení



GC analysa



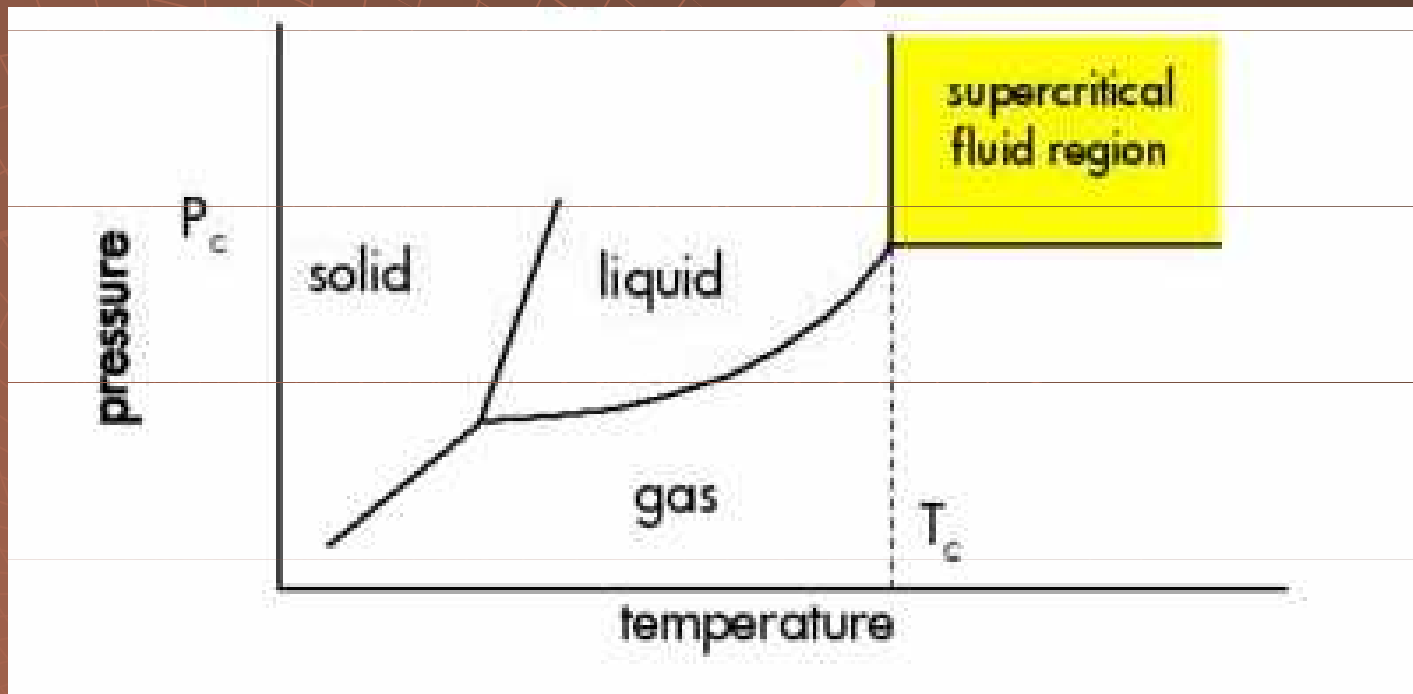
Superkritická fluidní chromatografie



Superkritická fluidní chromatografie

- ◆ Mobilní fáze - superkritická kapalina
- ◆ Stacionární fáze - pevná fáze, kapalina

Superkritická kapalina



Superkritická kapalina

Fluid	$T_{c'}$ °C	$P_{c'}$ atm	d'
CO ₂	31.3	72.9	0.96
N ₂ O	36.5	72.5	0.94
NH ₃	132.5	112.5	0.40
n-C ₅	196.6	33.3	0.51
n-C ₄	152.0	37.5	0.50
CCl ₂ F ₂	111.8	40.7	1.12
CHF ₃	25.9	46.9	-----

d' density in g/ml at 400 atm

SFC x kompromis mezi GC a HPLC

GC

+ vysoká difuze

- vysoká teplota

+ nízká viskozita

- těkavé látky

HPLC

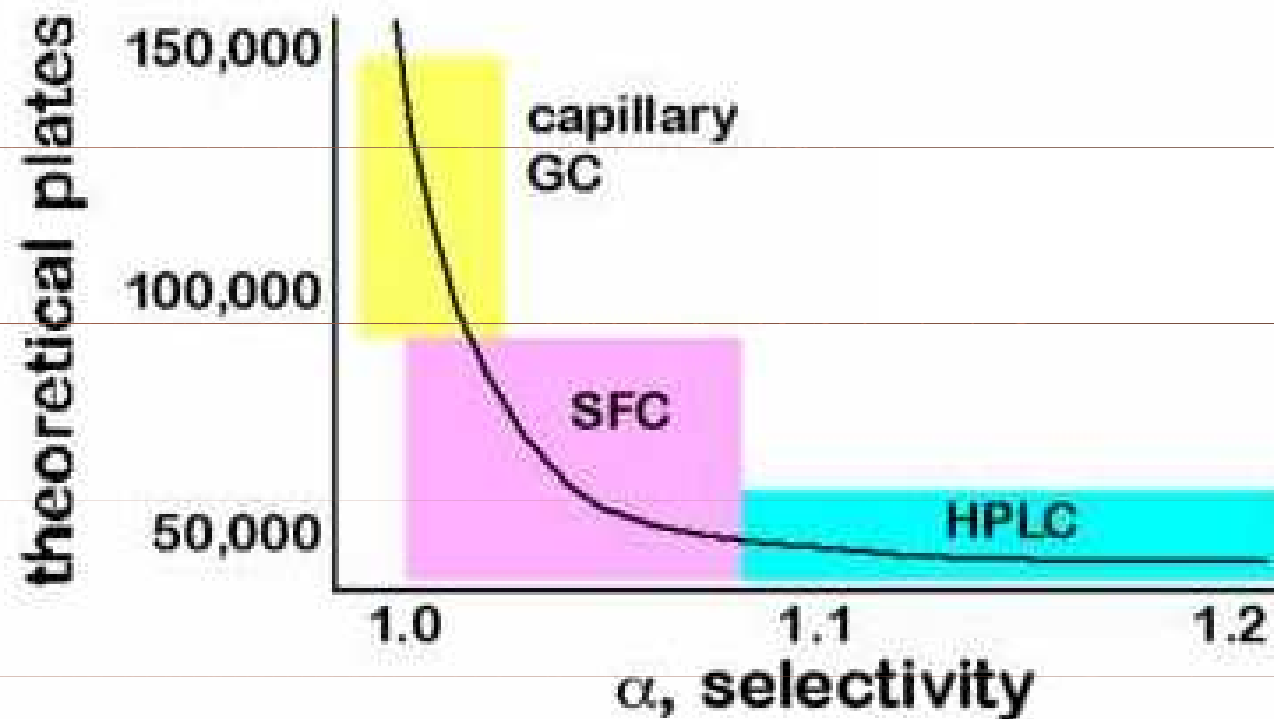
+ nízká teplota

- nízká difuze

+ kapacita

- rychlost analýz

Superkritická fluidní chromatografie



Number of plates required to achieve a separation with $R_s = 1.5$ and $k' = 2$

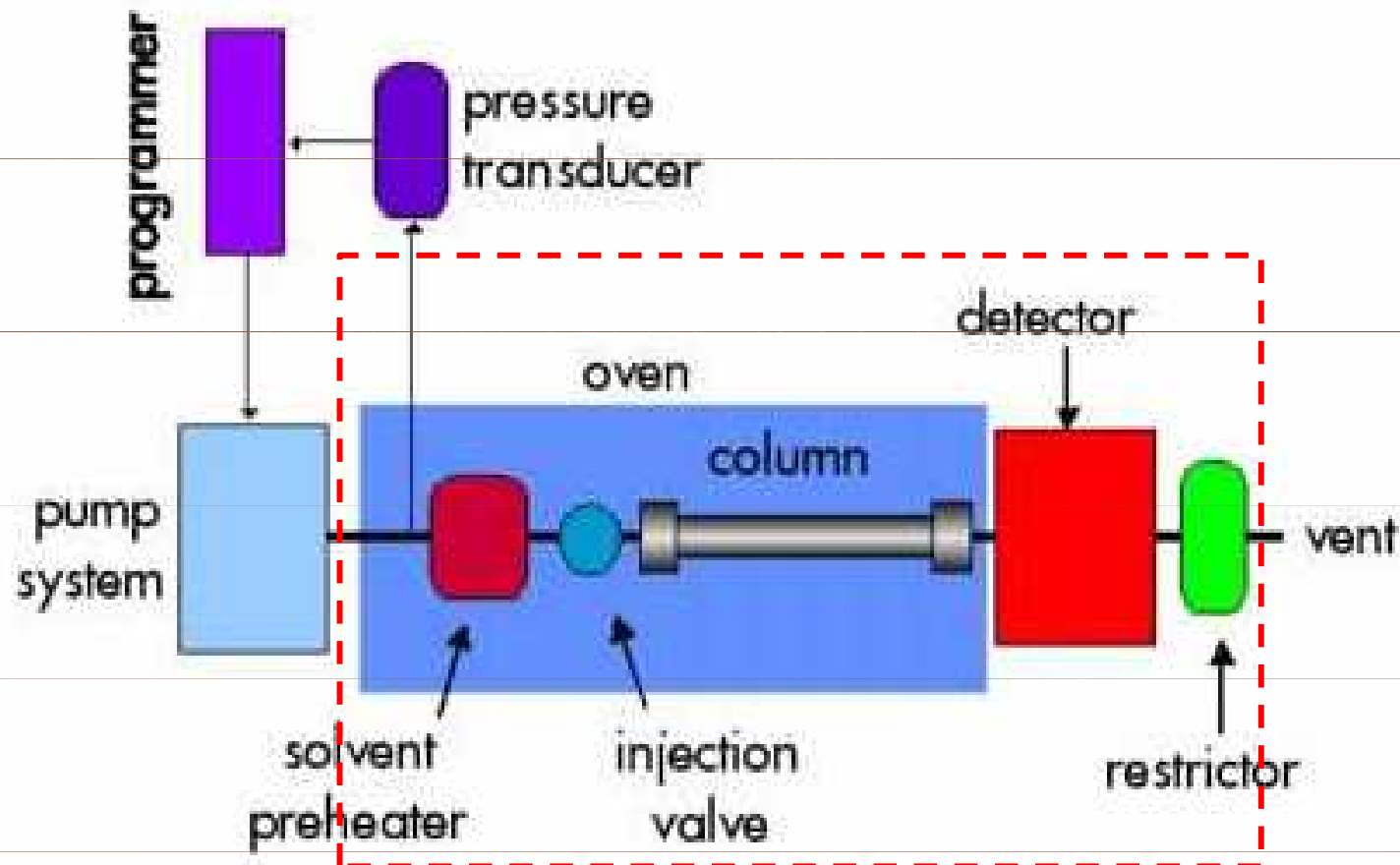
Výhody

- ◆ Superkritická kapalina se viskozitou blíží fázi plynné, hustotou fázi kapalné
- ◆ Účinnosti srovnatelné s GC
- ◆ Rychlost větší než u LC
- ◆ Dobrá rozpouštěcí schopnost MF

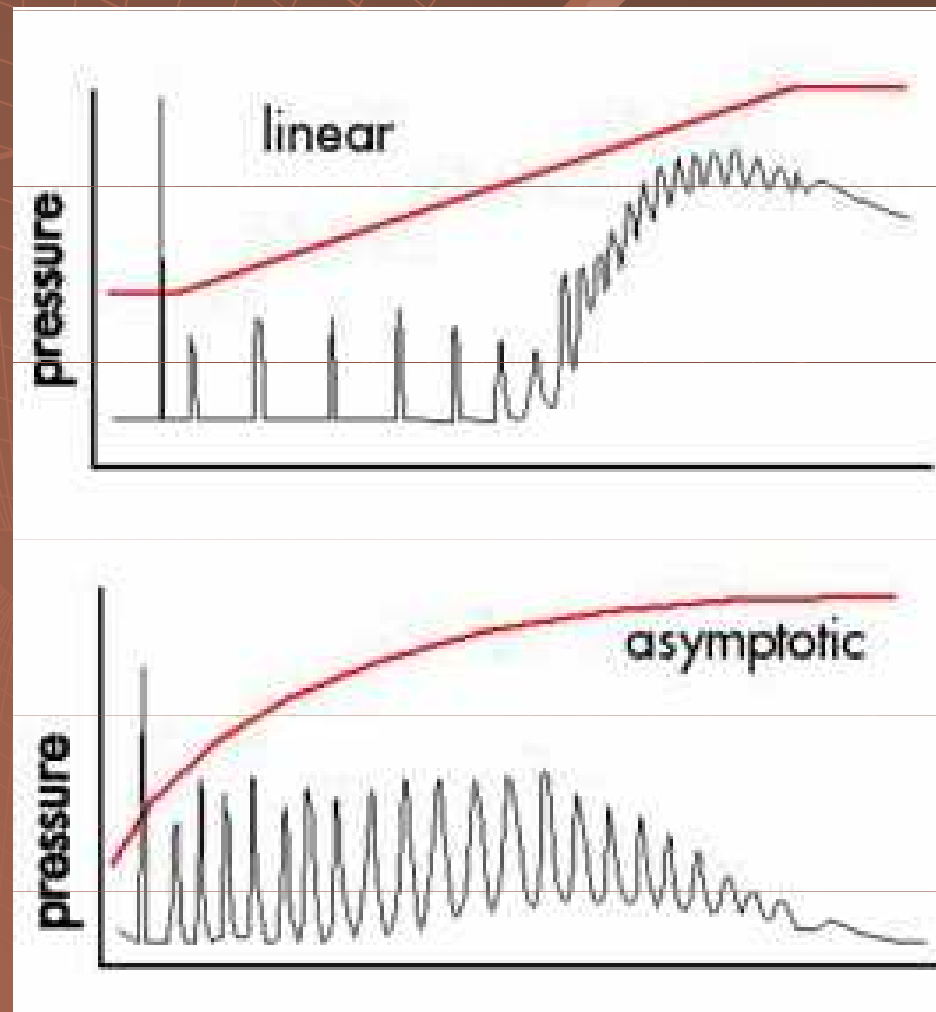
Nevýhody

- ◆ Zařízení musí odolávat větším tlakům
- ◆ Vyšší cenová náročnost při srovnání s GC a LC

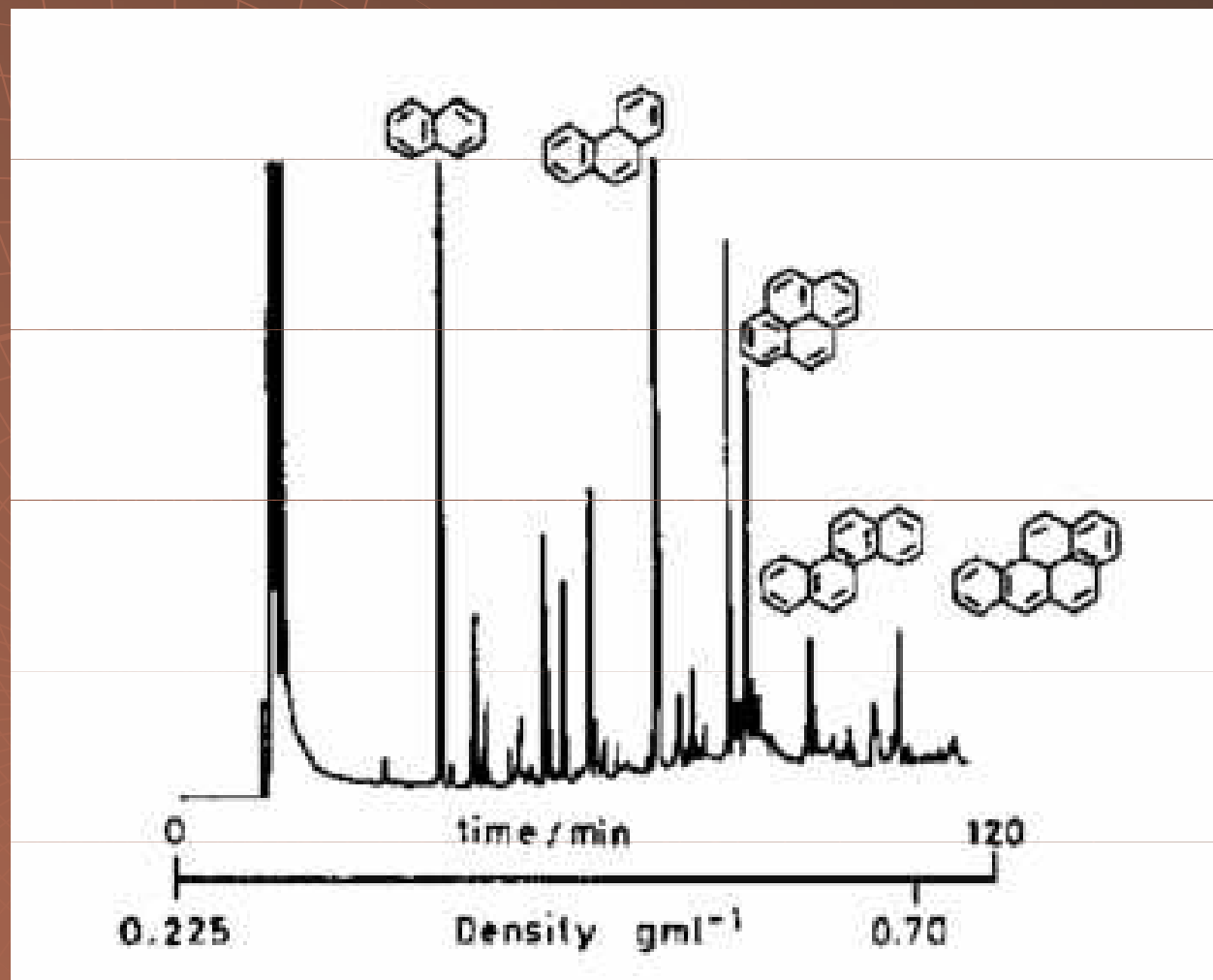
Superkritická fluidní chromatografie



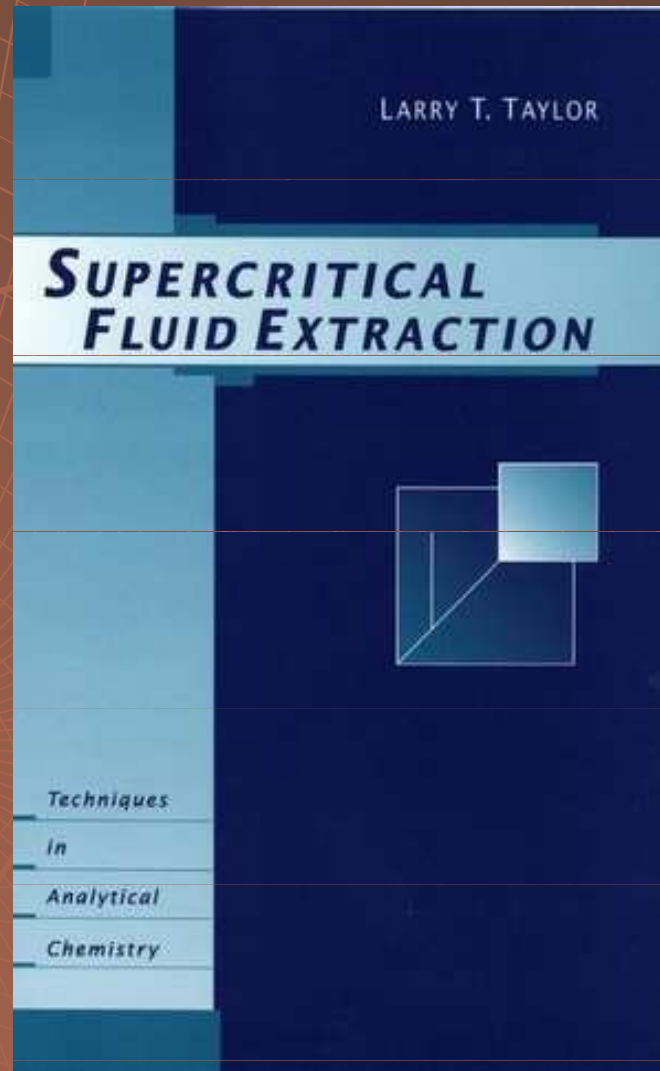
Superkritická fluidní chromatografie



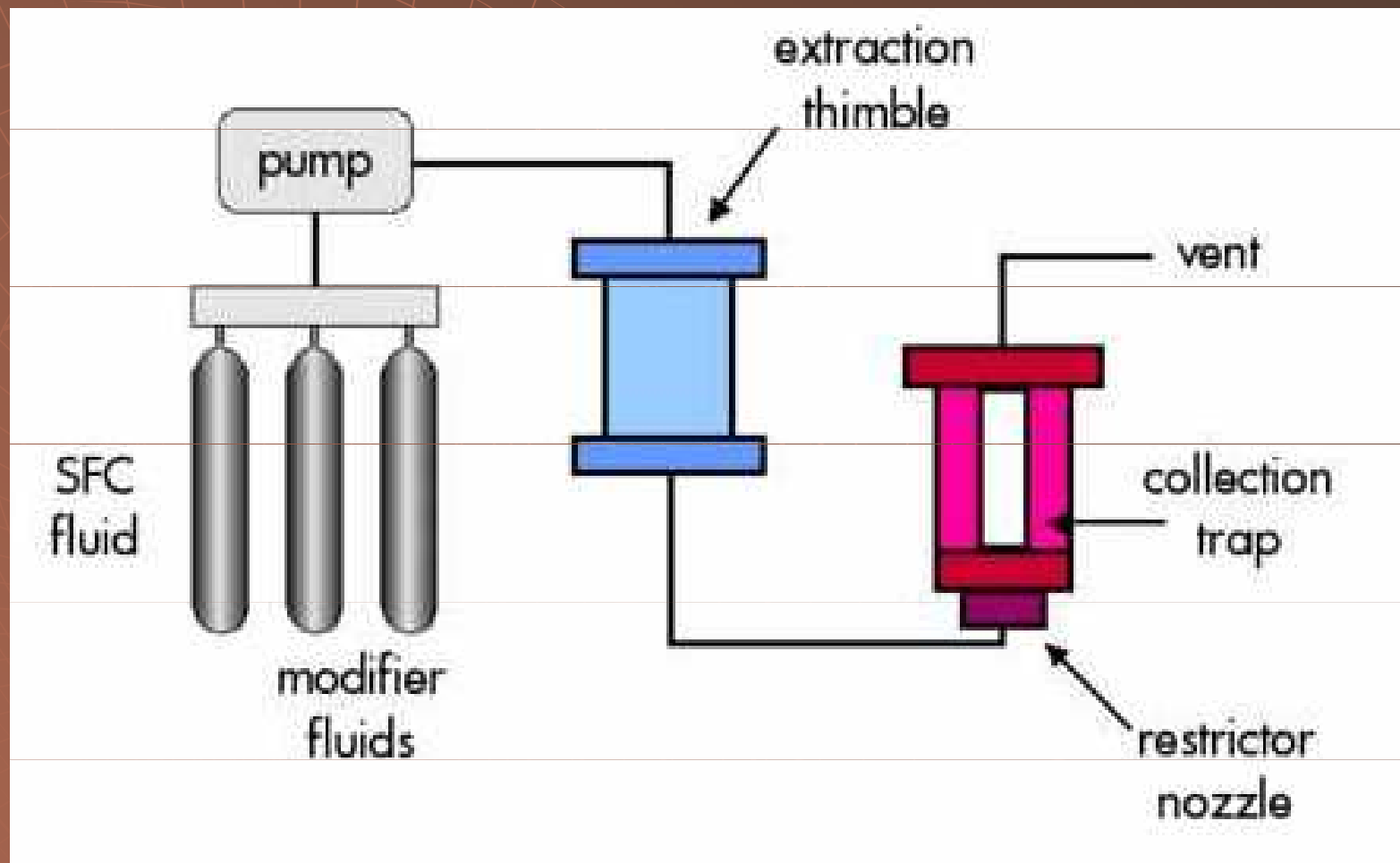
SFC analysa



Superkritická fluidní extrakce



Superkritická fluidní extrakce



Superkritická fluidní extrakce

- ◆ Používané kapaliny - CO_2
 - levný,
 - netoxický
 - nízká kritická teplota
- ◆ Požívané modifikátory
 - HCl – kyselé prostředí
 - NH_3 – bazické prostředí

Superkritická fluidní extrakce

◆ Výhody

- 10-100x rychlejší přestup hmoty
- přímé ovlivnění extrakční síly měněním hustoty (změnou tlaku nebo teploty)
- velká redukce objemů extrahovadel
- některá SF-extrakční činidla jsou za normálních podmínek plyny (CO_2) \Rightarrow jednoduché odpaření

Superkritická fluidní extrakce

◆ Nevýhody

- matricové efekty – neg. vliv matric; interakce se vzorkem i extrakční tekutinou

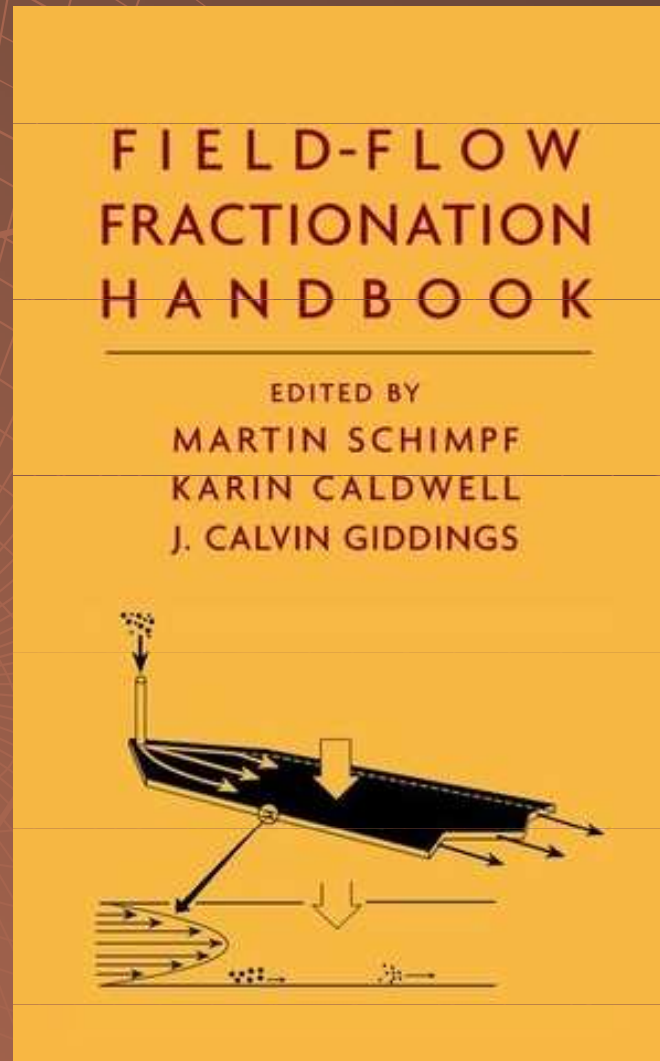
- složitá instrumentace – vysoké teploty a tlaky; práce s plyny (restriktor)



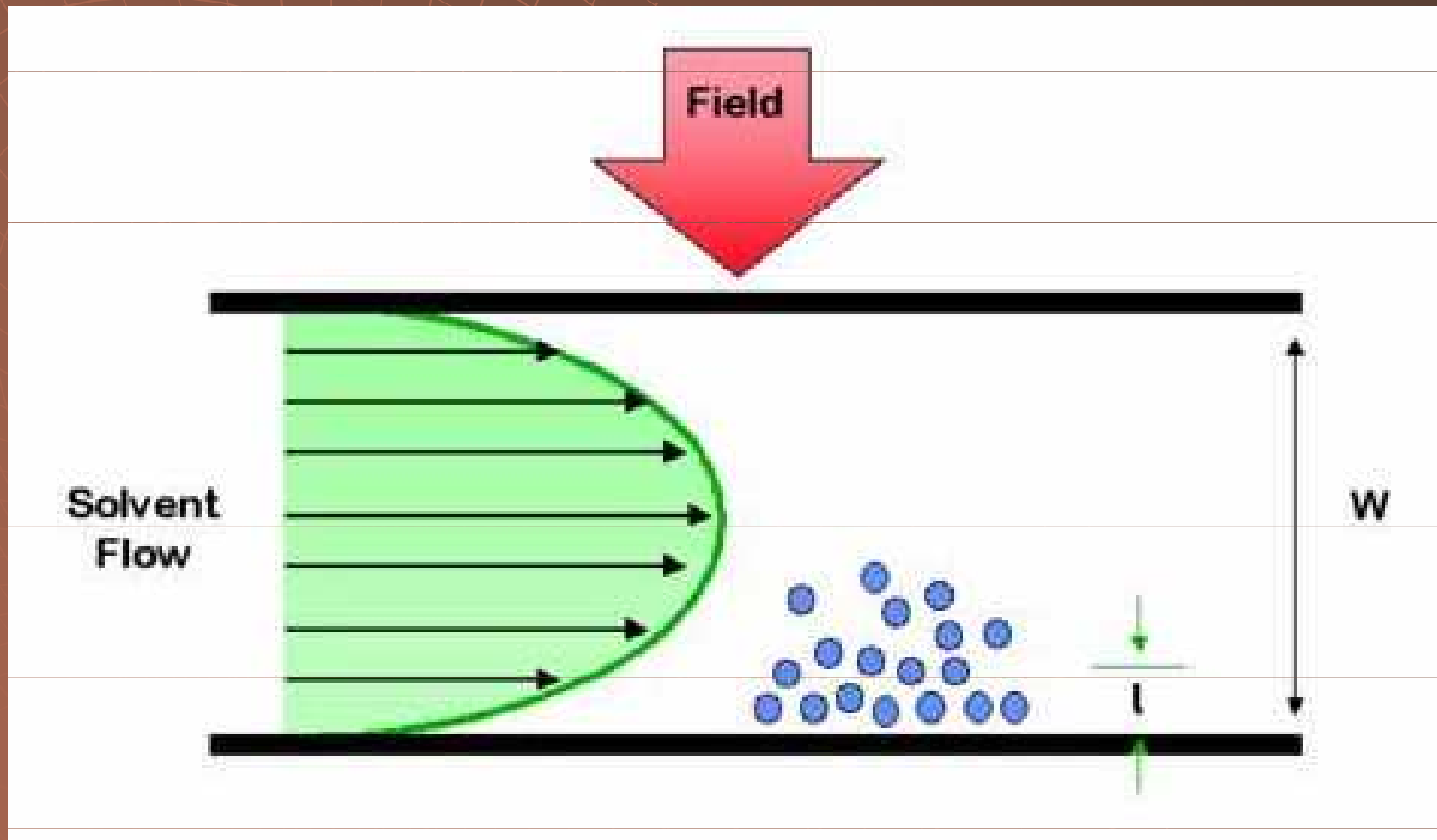
FFF

Field Flow Fractionation

Field Flow Fractionation princip



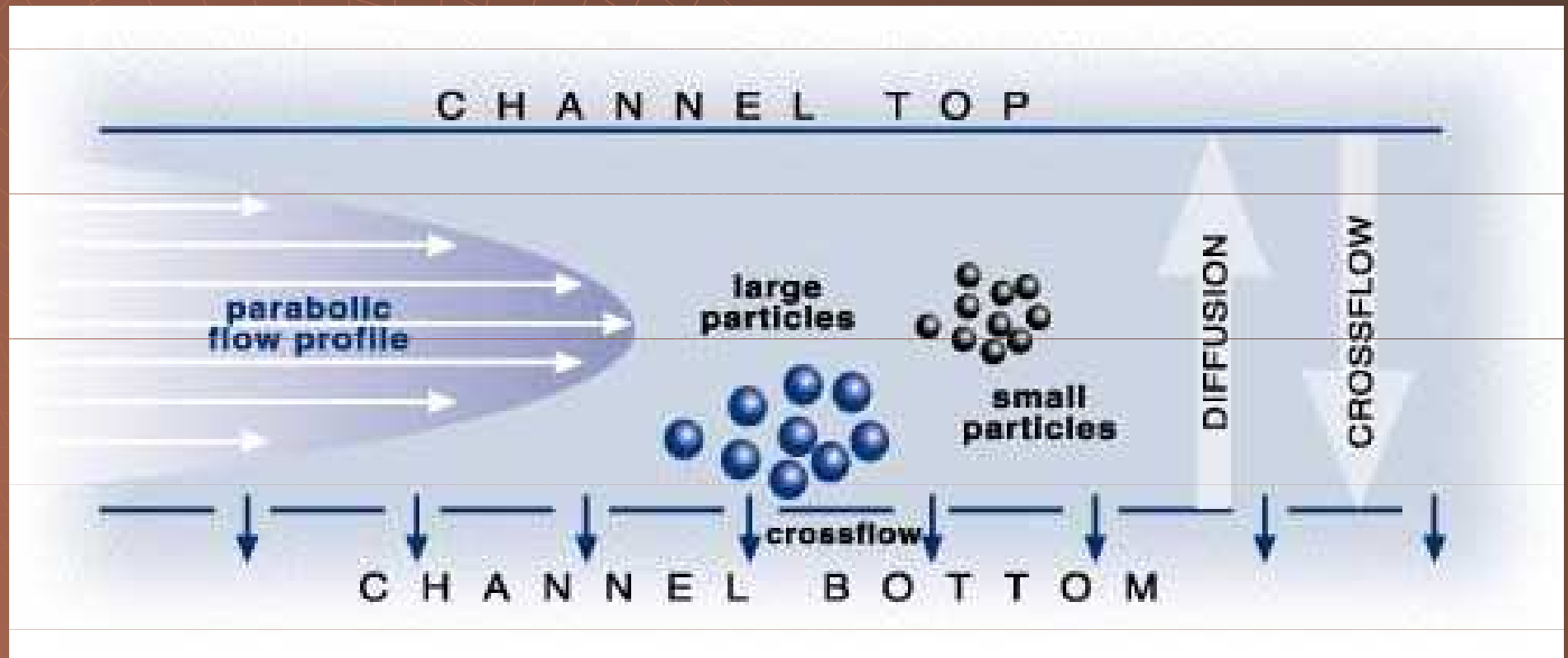
Field Flow Fractionation princip



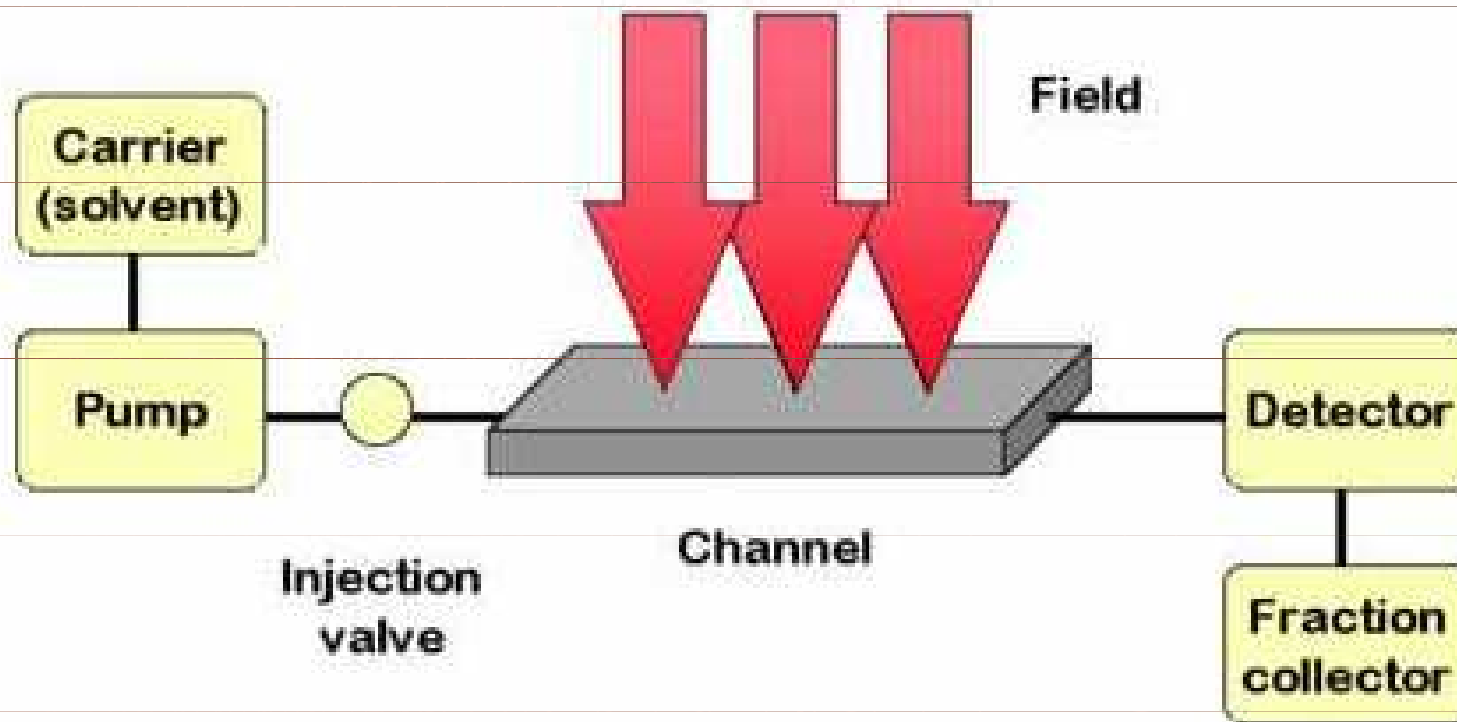
Používaná pole

- ◆ Sedimentační
- ◆ Termální
- ◆ Hydraulické
- ◆ Elektrické

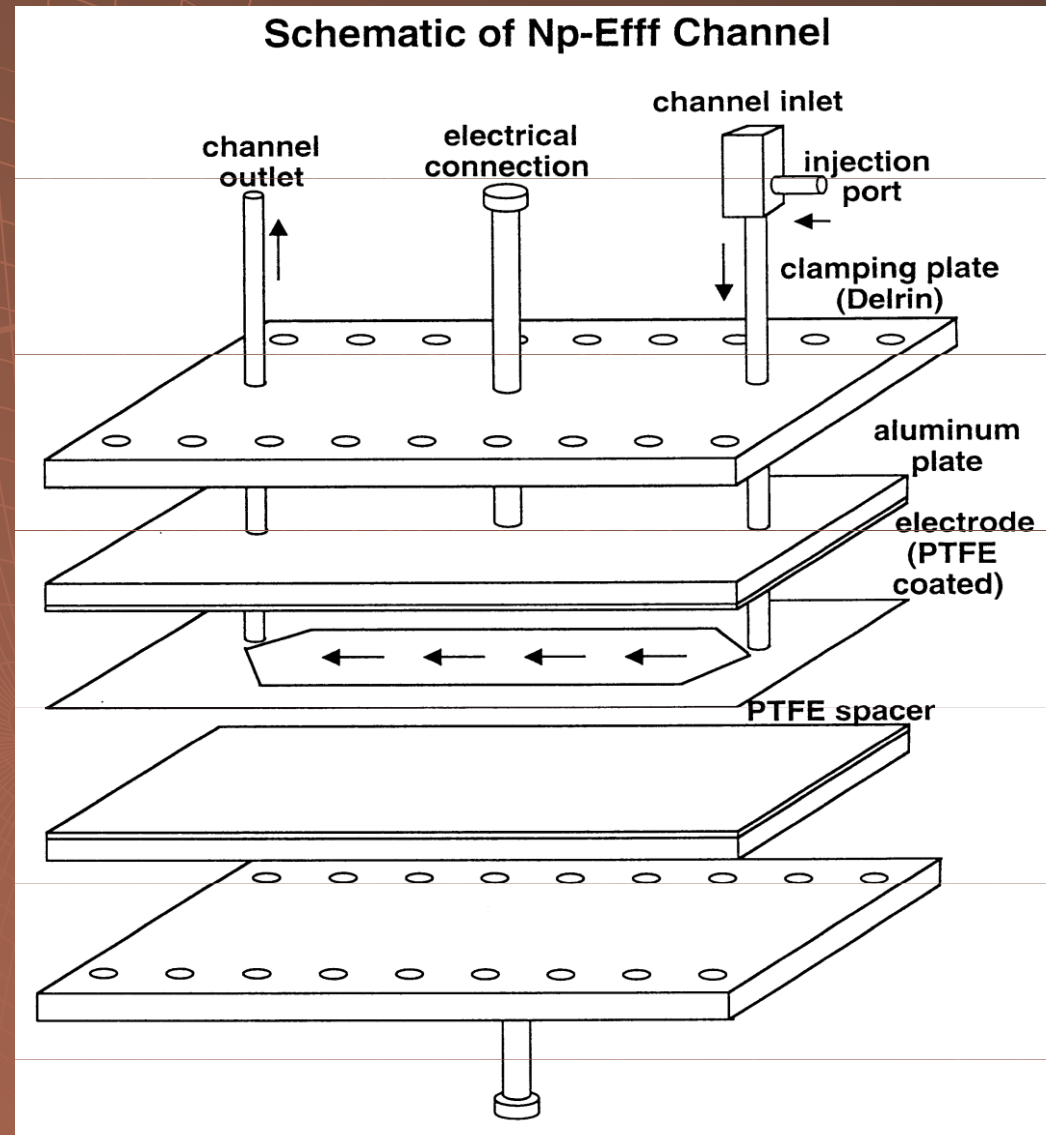
Field Flow Fractionation princip



Field Flow Fractionation instrumentace



Field Flow Fractionation instrumentace



Preparatívni FFF

