

M U N I
S C I

Kapalinová chromatografie

Jiří Urban

Nebát se a zeptat se

Kancelář: A14/334

Kamenice 753/5

625 00 Brno

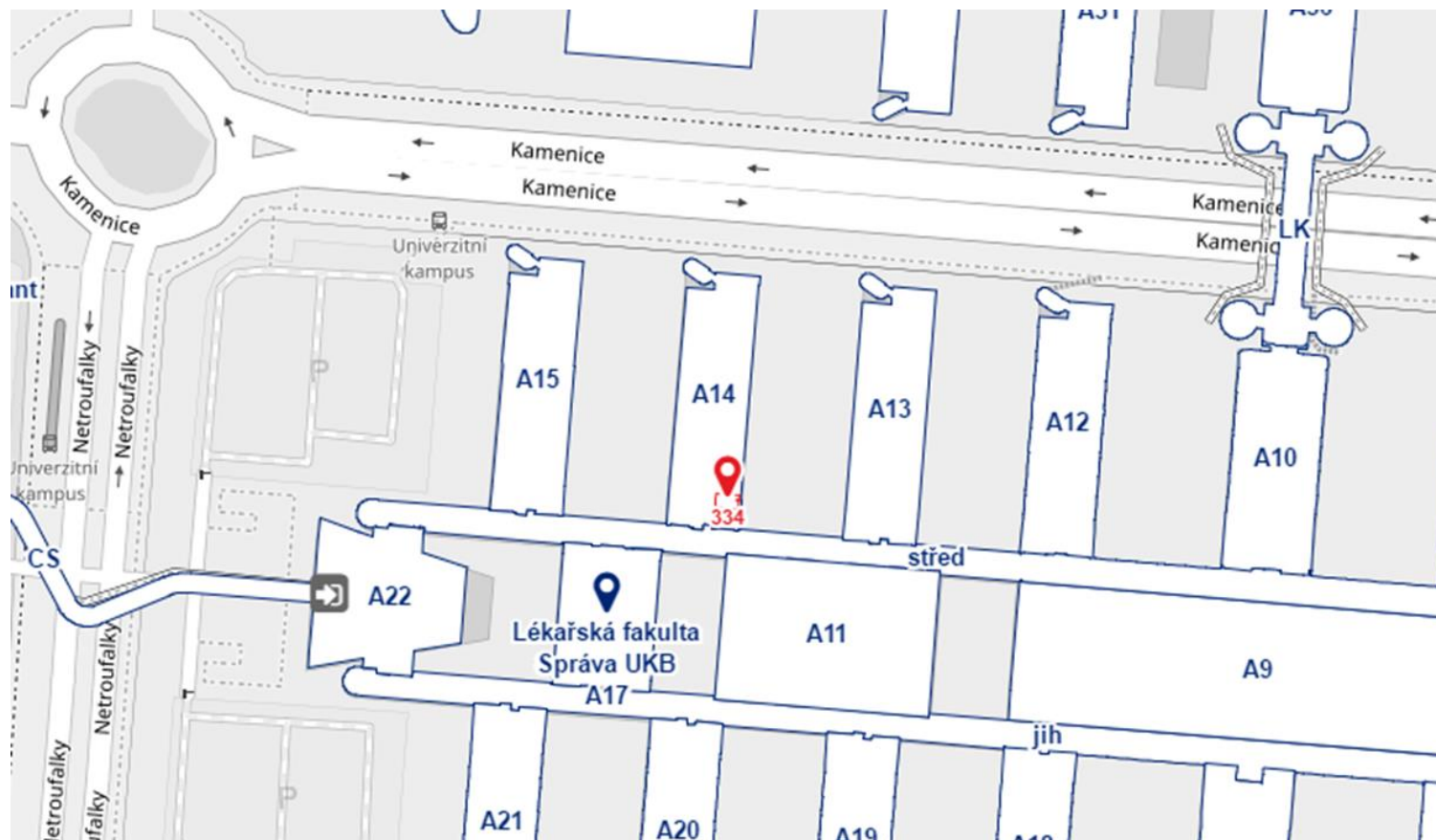
E-mail: urban@chemi.muni.cz

Web: <http://urban.chemi.muni.cz>

Telefon: 549 49 8579

*„Neexistují hloupé odpovědi,
pouze chytré otázky.“*

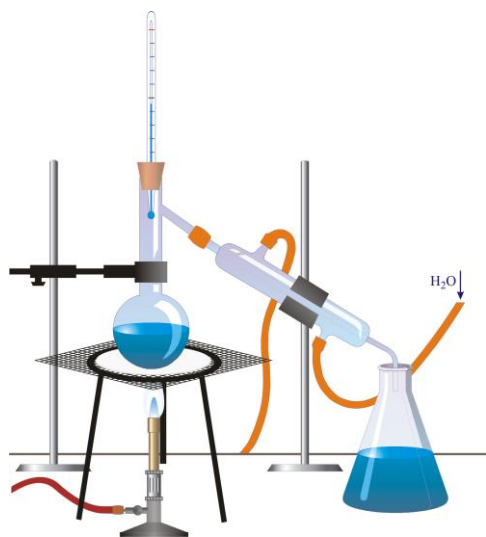
Aristoteles



Separáční techniky

Separáční techniky

Destilace



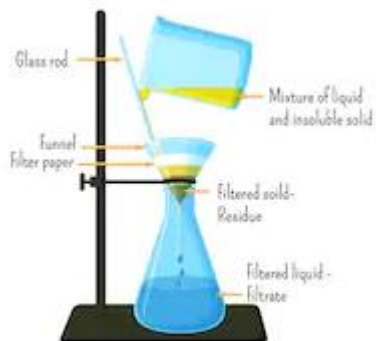
<https://glossary.periodni.com>

Extrakce



<https://chemed.chem.purdue.edu>

Filtrace



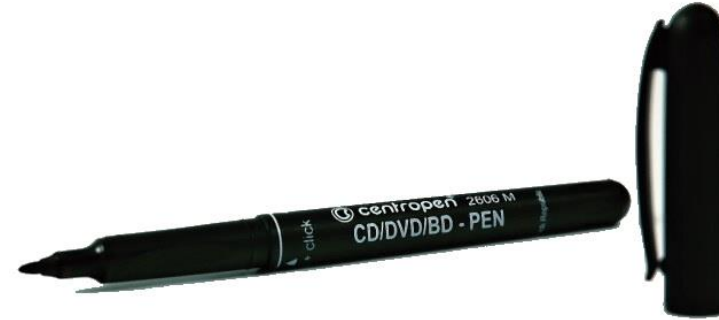
<https://shutterstock.com>

Sublimace

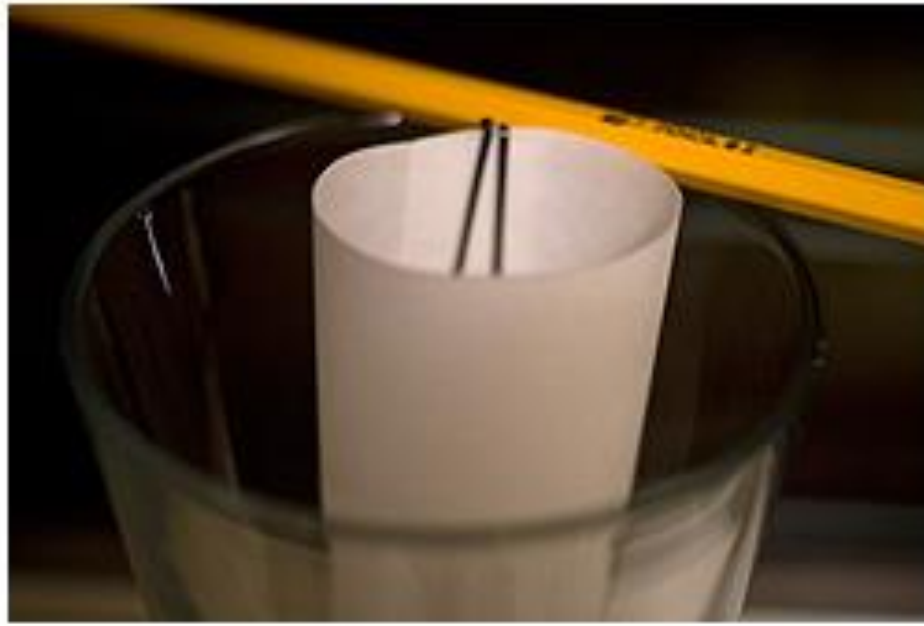


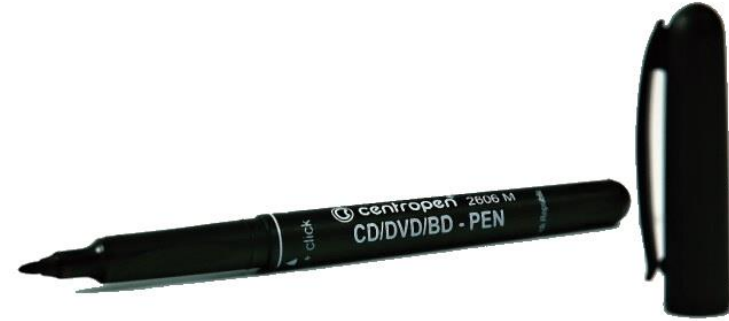
<https://education.seattlepi.com>



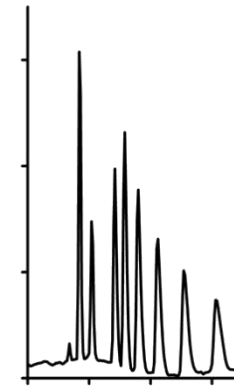


MUNI
SCI





Kolonová chromatografie



Chromatografie

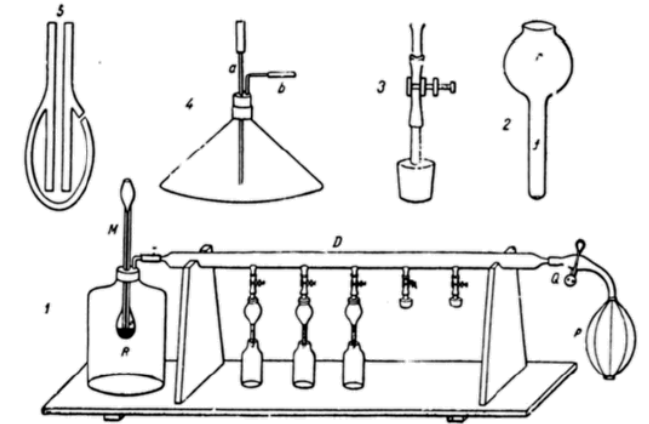
Michail Semjonovič Cvět

- separace chlorofylových barviv na CaCO_3
- 1901 – 1903 – 1905 – 1906

(pokus – odesláno – publikováno – název)

Chromato-grafie

- z řeckého **chroma** (barva) a **graphein** (psát)
- ЦВЕТ = *barva*



www.wikipedia.org



A. Tiselius

Elektroforéza

(Nobelova Cena 1948)



A.J.P. Martin



R. Synge

Rozdělovací chromatografie (Nobelova Cena 1952)

Chromatografie

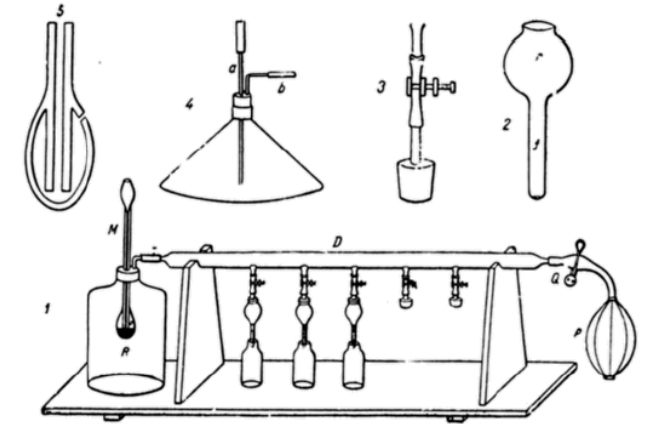
Michail Semjonovič Cvět

- separace chlorofylových barviv na CaCO_3
- 1901 – 1903 – 1905 – 1906

(pokus – odesláno – publikováno – název)

Chromato-grafie

- z řeckého **chroma** (barva) a **graphein** (psát)
- ЦВЕТ = *barva*



www.wikipedia.org



A. Tiselius

Elektroforéza

(Nobelova Cena 1948)



A.J.P. Martin



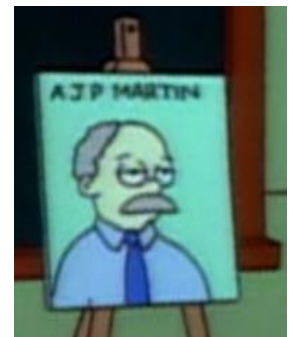
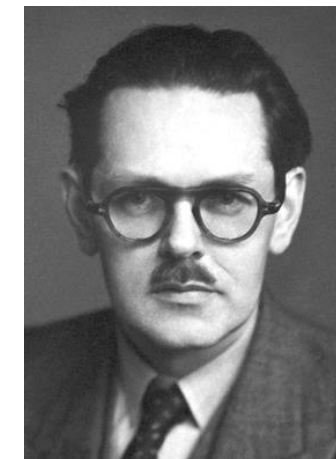
R. Synge

Rozdělovací chromatografie (Nobelova Cena 1952)



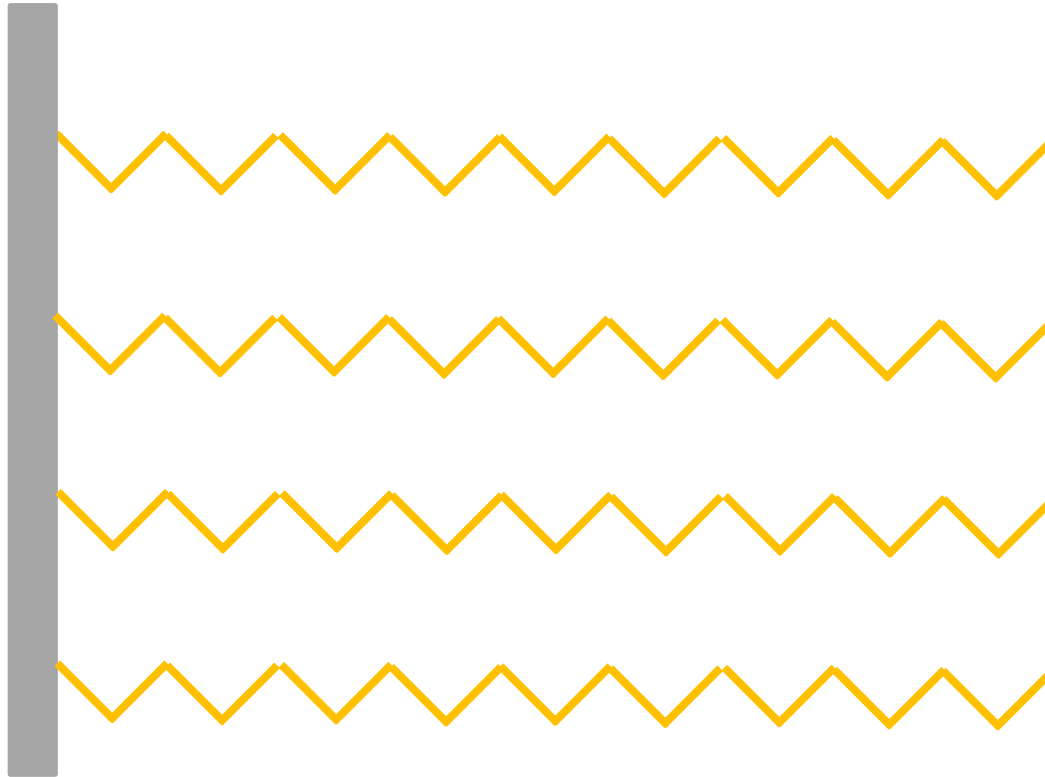
Martin Prince

S03E10

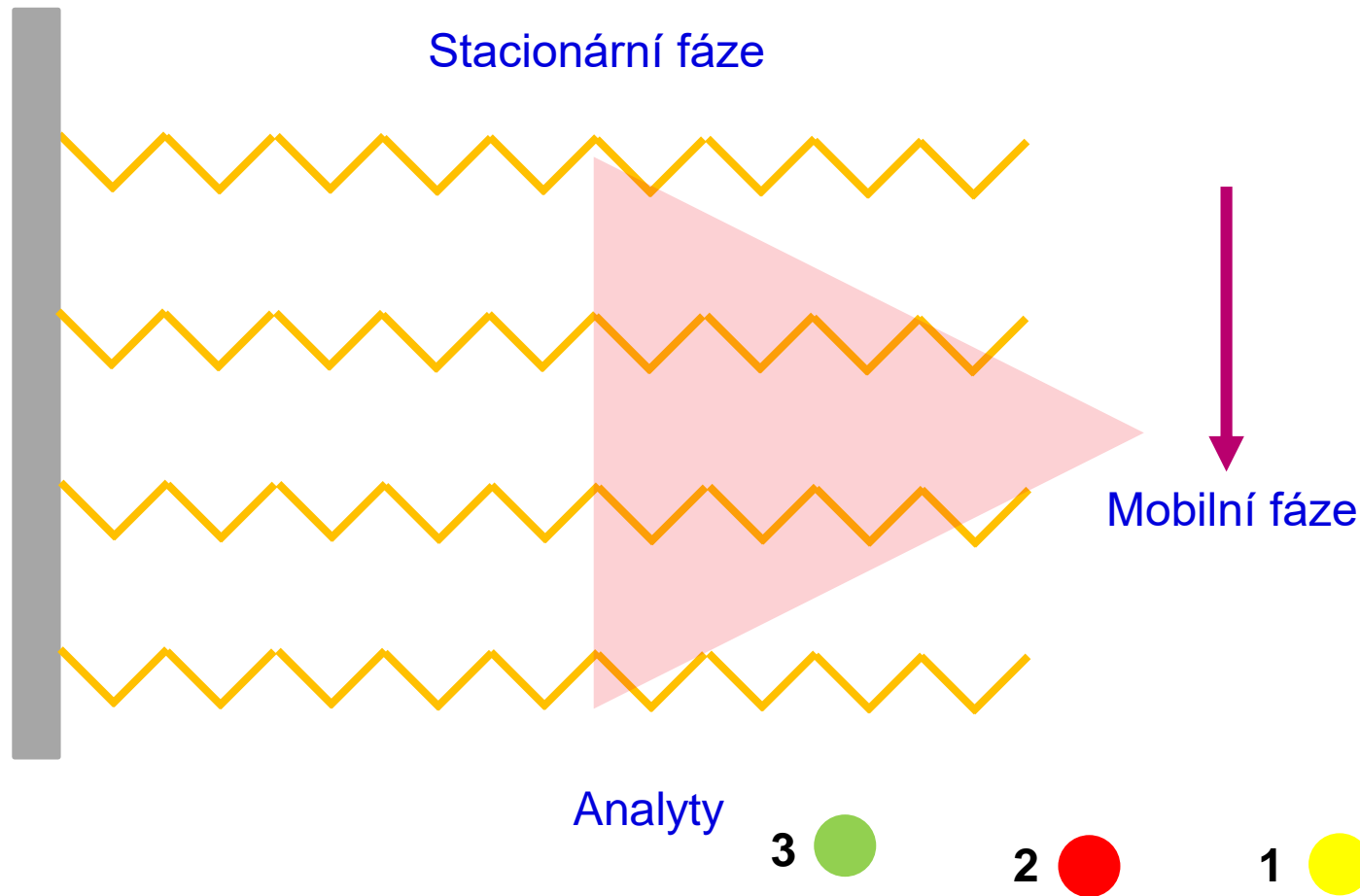


MUNI
SCI

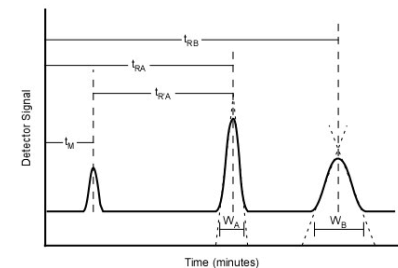
Kapalinová chromatografie



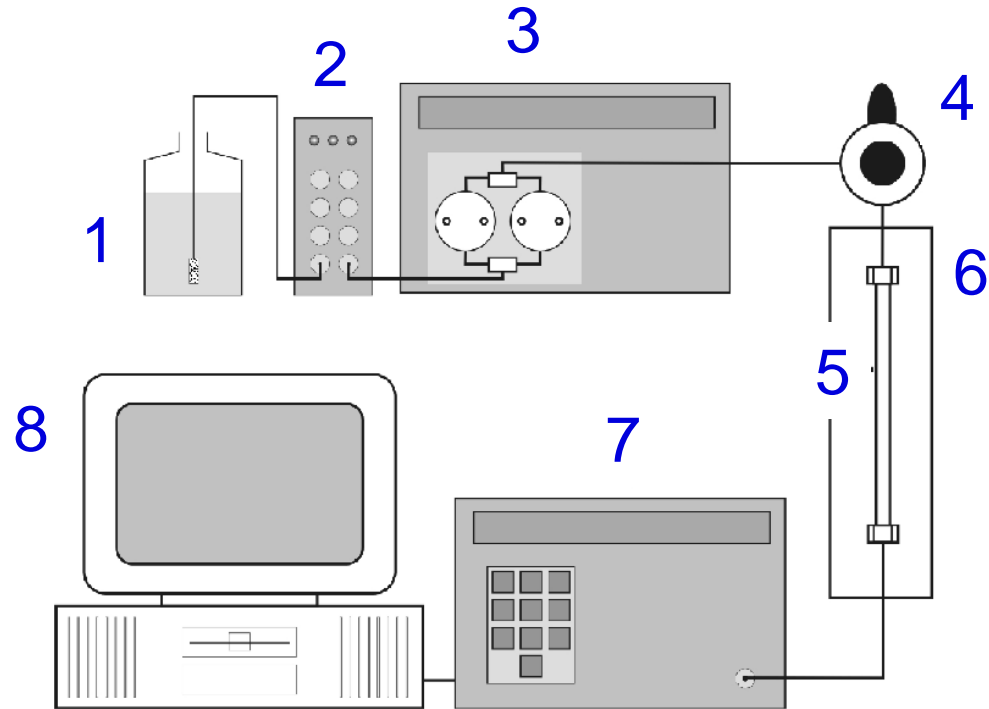
Kapalinová chromatografie



Neustálé
ustalování
rovnovážného
rozdělení
složek vzorku
mezi fázemi.



Instrumentace



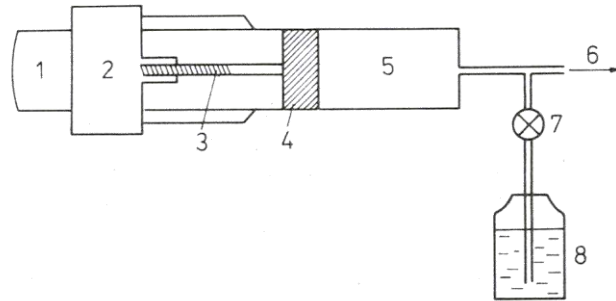
1 – zásobník mobilní fáze
2 – odplyňovač mobilní fáze
3 – vysokotlaké čerpadlo
4 – dávkovač

5 – separační kolona
6 – termostat kolony
7 – detektor
8 – datová stanice



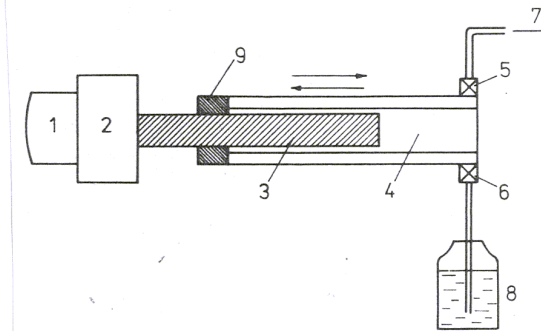
Vysokotlaká čerpadla

Velkoobjemová stříkačka

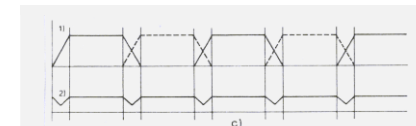


Čerpadlo na principu velkoobjemové injekční stříkačky
 1 – elektromotor s krokovým chodem, 2 – převodovka, 3 – závit na táhle pístu, 4 – píst, 5 – válec naplněný mobilní fází, 6 – směr toku mobilní fáze ke koloně, 7 – jednosměrný ventil umožňující plnění čerpadla mobilní fází, 8 – zásobník mobilní fáze

Pístové čerpadlo



Jednočinné pístové čerpadlo s malým objemem činné části
 1 – elektromotor, 2 – převodový mechanismus, 3 – píst, 4 – pracovní prostor válce, 5 – výtlačný ventil, 6 – nasávací ventil, 7 – připojení ke koloně, 8 – zásobník mobilní fáze, 9 – těsnění pístu



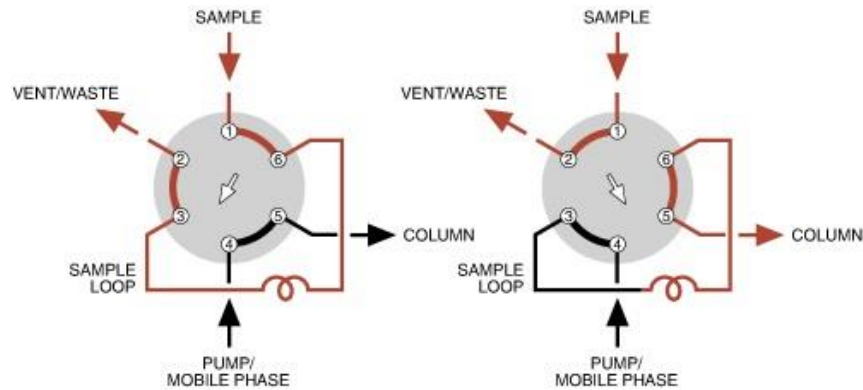
Průtokové profily v závislosti na čase a na poloze pístu u čerpadel s jednou a dvěma hlavami

30 – 50 – 100 MPa, odolnost vůči korozi, stabilní a reprodukovatelný průtok < 0,5 – 1%

Aplikace	Průměr kolony	Průtok
Konvenční LC	4,6 mm	0,5 – 1,0 ml/min
Mikrokolonová LC	1 mm – 500 μm	40 μl/min – 20 μl/min
Kapilární LC	500 μm – 100 μm	20 μl/min – 300 nl/min
Nano LC	100 μm – 75 μm – 50 μm	300 nl/min – 180 nl/min – 80 nl/min

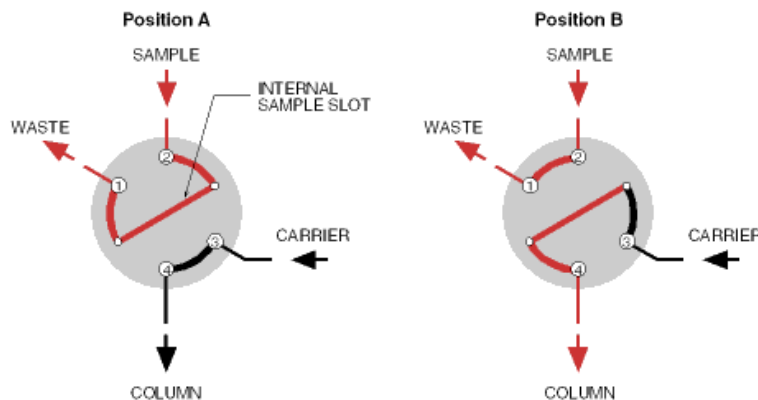
Dávkování vzorků

Vnější smyčka

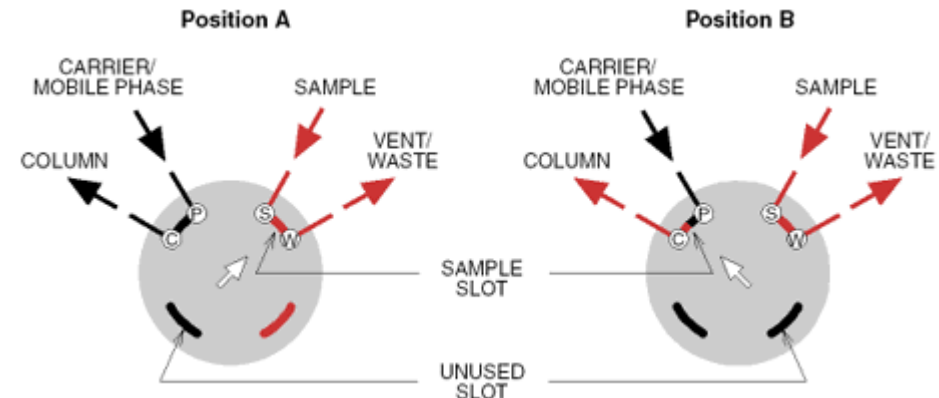


- Nutno překonat protitlak mobilní fáze
- Automatické dávkovače (úprava vzorku, derivatizace,...)
- Nezapomenout, že **objem vzorku** ovlivňuje kvalitu separace!

Vnitřní smyčka



Velmi malé objemy (nl)



Detekční techniky

- **Selektivní** – odezva pouze na koncentraci analyzované látky
- **Univerzální** – odezva úměrná celkové vlastnosti eluátu

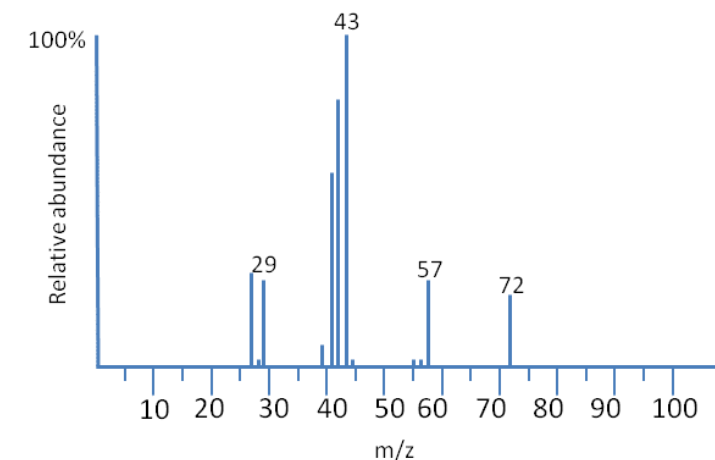
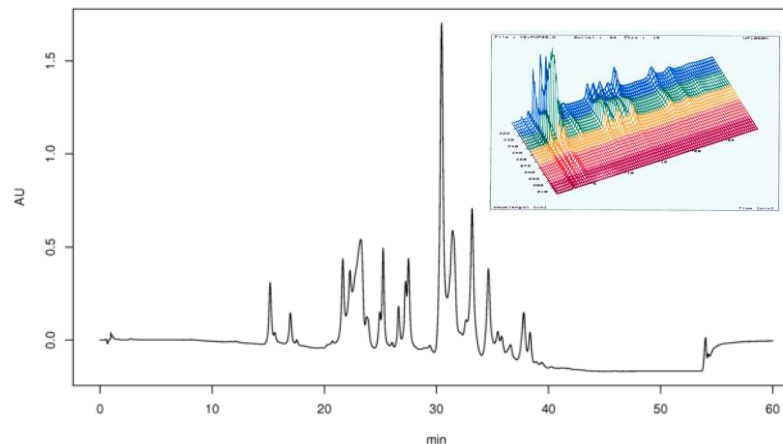
Ideální detektor

- citlivý
- malý šum
- okamžitá odezva
- lineární v širokém koncentračním rozsahu
- odezva úměrná celkové vlastnosti eluátu
- minimální příspěvek k rozšiřování píků
- málo citlivý ke změnám tlaku, teploty a průtoku
- možnost práce s gradientem

– **kompromis**

Nejpoužívanější

- **hmotnostní (HPLC/MS)**
- spektrofotometrický UV – VIS
- fluorimetrický
- elektrochemický
- vodivostní
- rozptyl světla

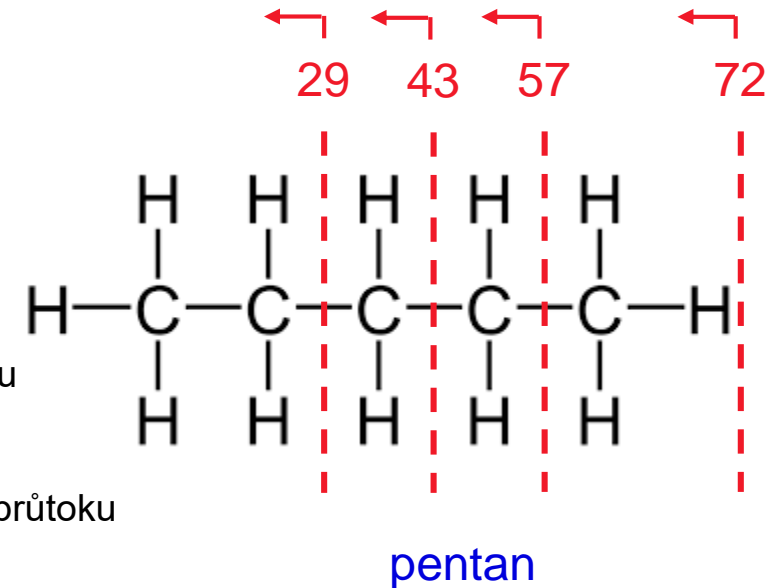


Detekční techniky

- **Selektivní** – odezva pouze na koncentraci analyzované látky
- **Univerzální** – odezva úměrná celkové vlastnosti eluátu

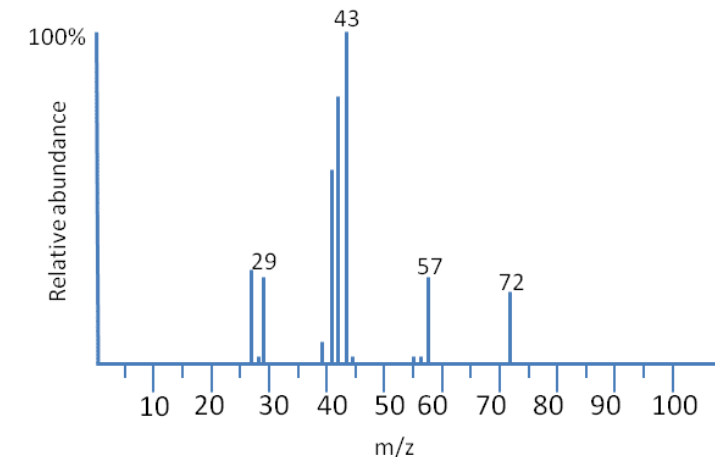
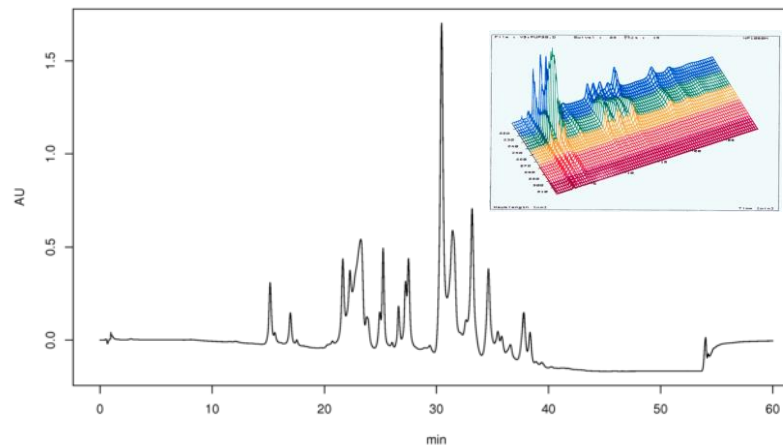
Ideální detektor

- citlivý
- malý šum
- okamžitá odezva
- lineární v širokém koncentračním rozsahu
- odezva úměrná celkové vlastnosti eluátu
- minimální příspěvek k rozšiřování píků
- málo citlivý ke změnám tlaku, teploty a průtoku
- možnost práce s gradientem



Nejpoužívanější

- **hmotnostní (HPLC/MS)**
- spektrofotometrický UV – VIS
- fluorimetrický
- elektrochemický
- vodivostní
- rozptyl světla



Chromatografická kolona



Aplikace	Průměr kolony	Průtok
Konvenční LC	4,6 mm	0,5 – 1,0 ml/min
Mikrokolonová LC	1 mm – 500 μ m	40 μ l/min – 20 μ l/min
Kapilární LC	500 μ m – 100 μ m	20 μ l/min – 300 nl/min
Nano LC	100 μ m – 75 μ m – 50 μ m	300 nl/min – 180 nl/min – 80 nl/min

Délka konvenční kolony: 100 – 250 mm
 „high speed“ kolony < 50 mm

Průměr 3 – 4 mm (analytické),
 1 – 2 mm (mikrokolony), < 1 mm (kapilární),
 > 4 mm (preparativní)

Částice

LC > 20 μ m (plněné za sucha)
 HPLC > 10 > 5 > 3 > 1.5 μ m (suspenní
 technika), kulové, pórovité, povrchově pórovité,
 neporézní, nejčastěji **silikagel**

Optimalizace mimokolonových objemů
 Výběr instrumentace na základě kolony



Stacionární fáze

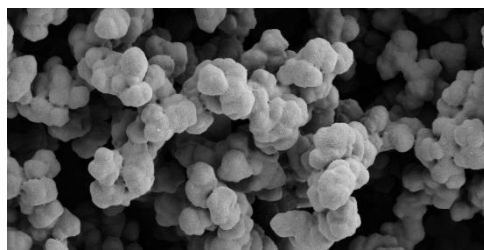
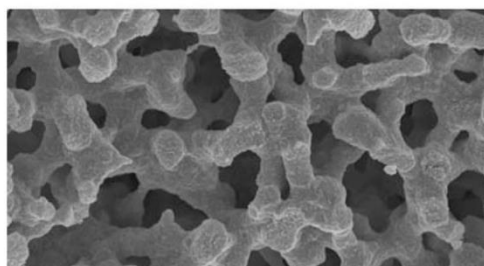


www.prozyme.com

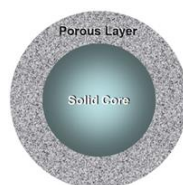
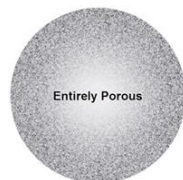
Délka, průměr, velikost částic

150 x 4.6 mm, 5 μ m
L x ID x d_p

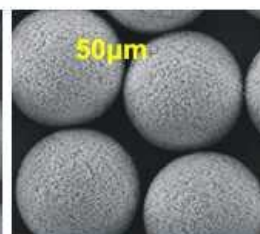
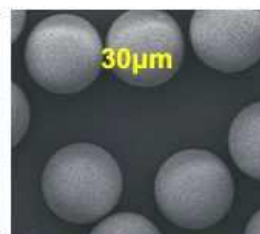
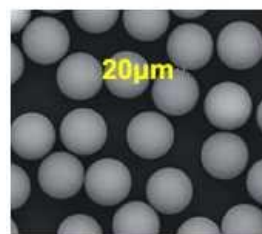
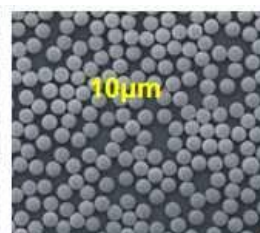
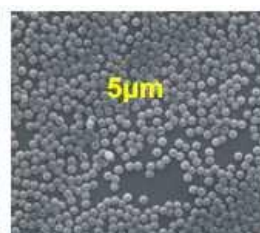
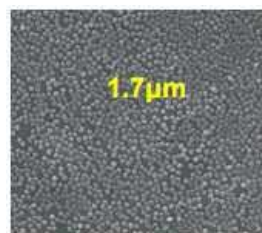
Stacionární fáze



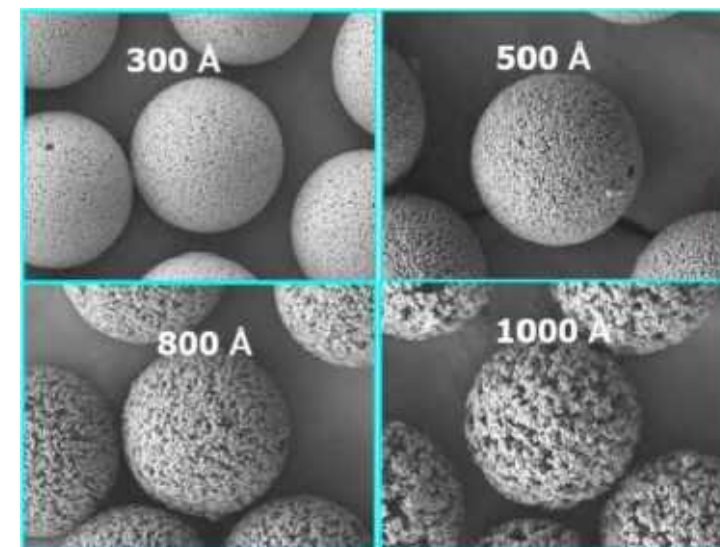
Tvar částic



Velikost částic



Porozita



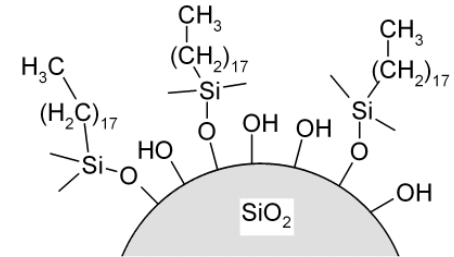
Stacionární fáze



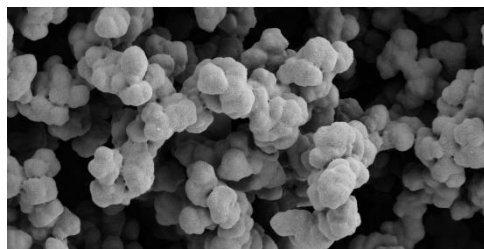
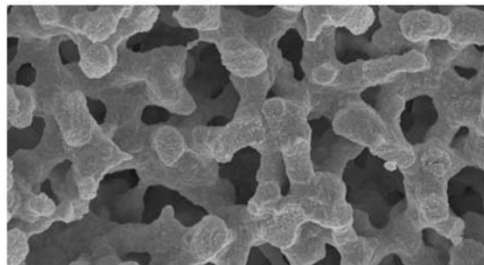
www.prozyme.com

Délka, průměr, velikost částic

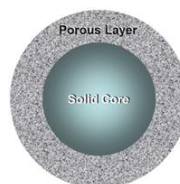
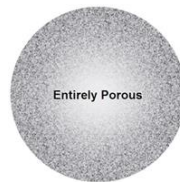
150 x 4.6 mm, 5 μ m
L x ID x d_p



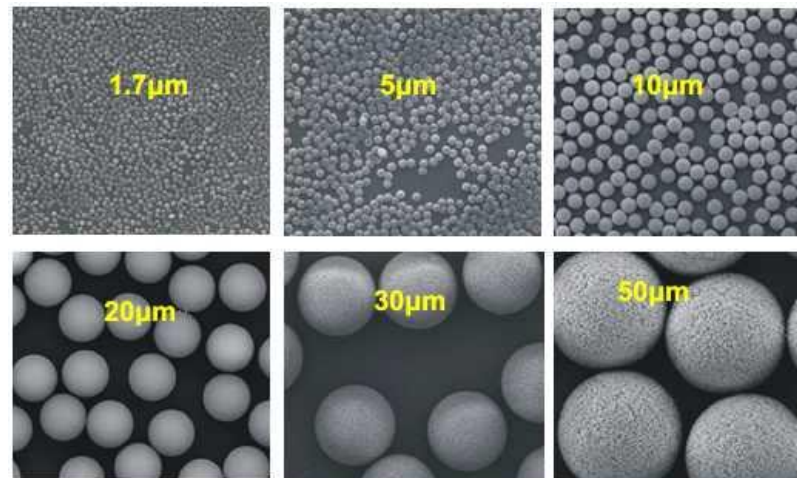
Stacionární fáze



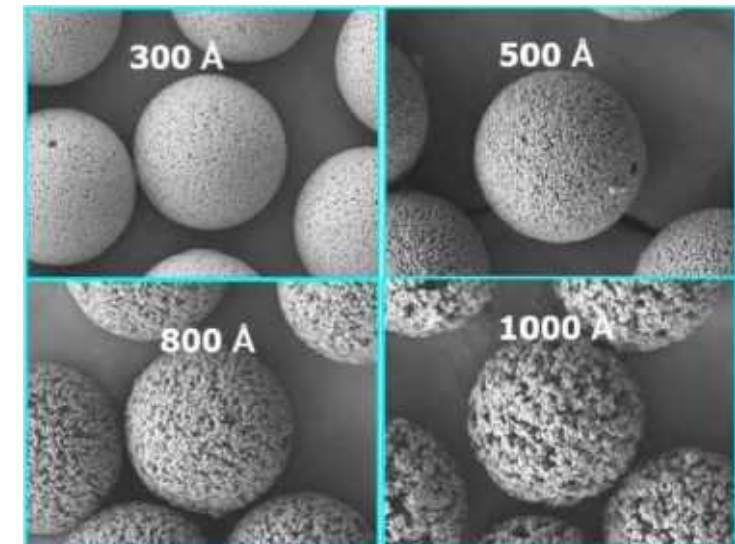
Tvar částic



Velikost částic



Porozita



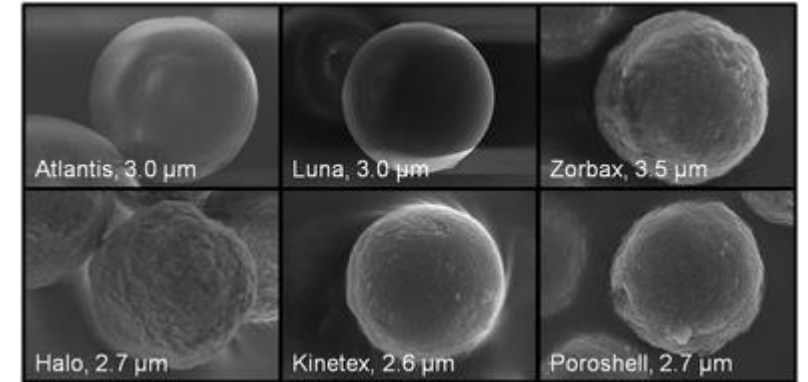
Stacionární fáze

Plně porézní

Částice < 2 μm : Krátké kolony, technika UHPLC, speciální instrumentace, nejvyšší tlak na koloně, 100 – 150 MPa

Povrchově-porézní

Kolony s částicemi s tenkou povrchovou pórovitou vrstvou na pevném jádře, menší tlak, vyšší permeabilita, vyšší průtoky, lepší rozlišení



Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, 16, 6583-6592.

Neporézní

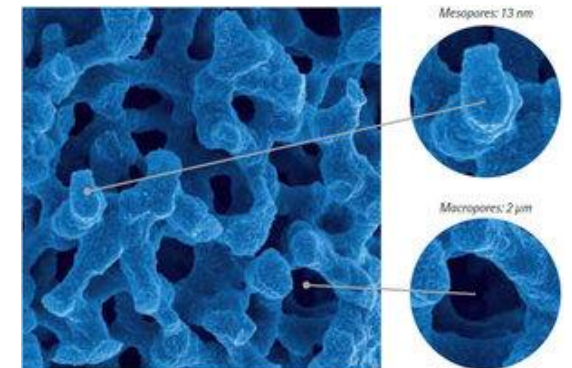
Omezení difúze látek do pórů > eliminace pórů. Snadné přetížení kolony, malé dávkované koncentrace (objemy).



www.crawfordscientific.com

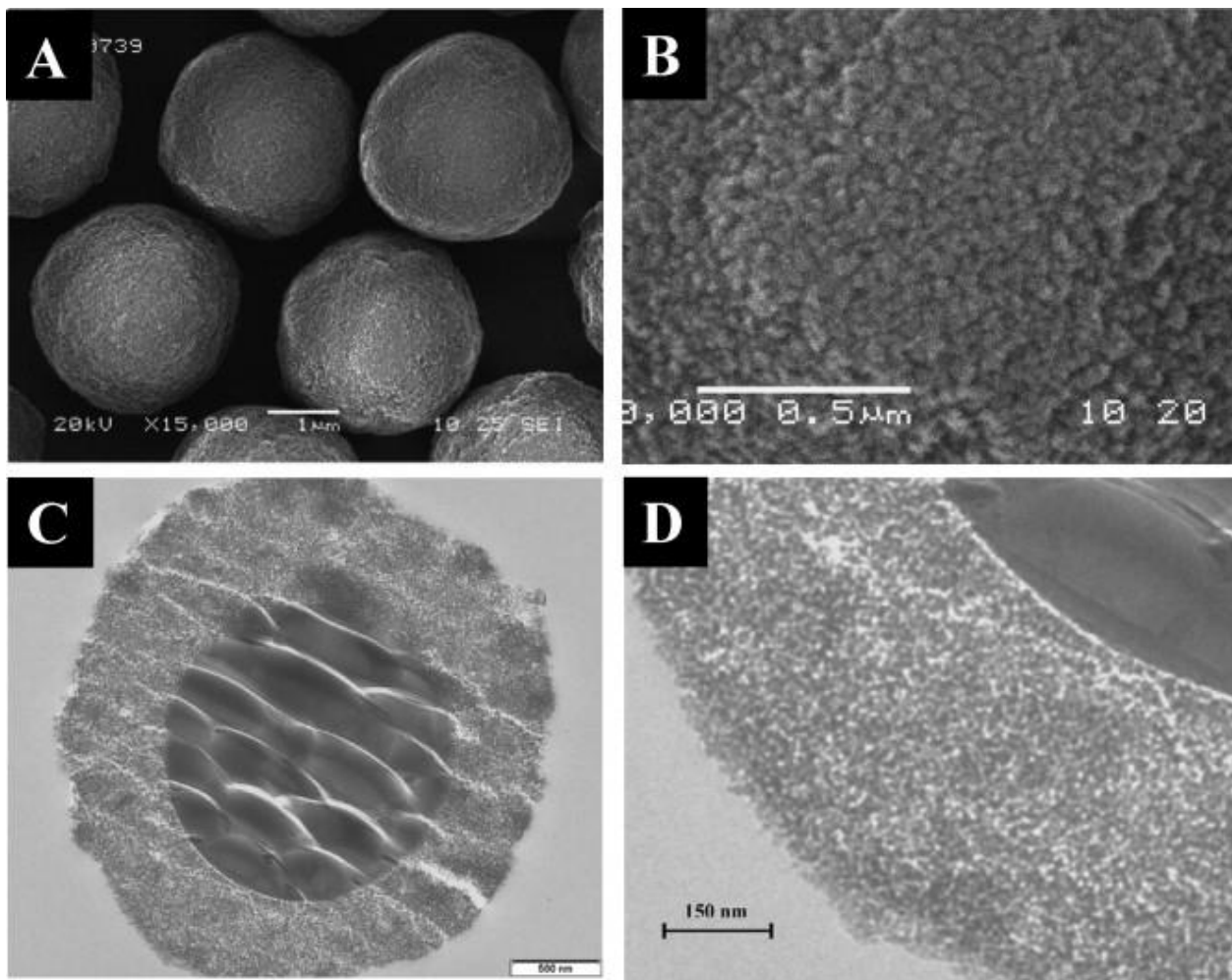
Monolitické

Tlak na monolitické koloně 3-4x menší – vyšší permeabilita, zvyšování průtoku mobilní fáze - zhoršení účinnosti a rozlišení, větší naředění vzorku

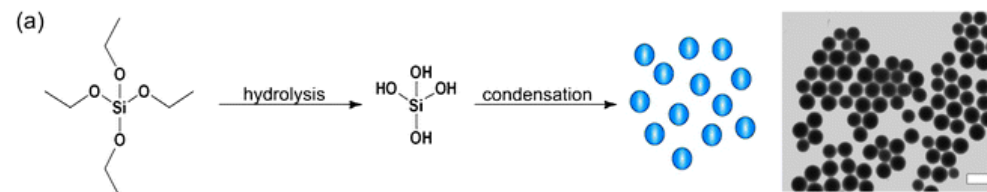


www.merckmillipore.com

Povrchově porézní částice

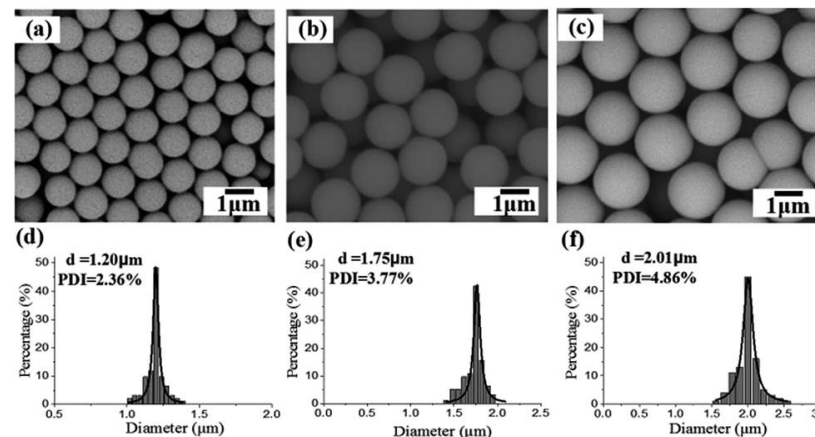


Monodispersní křemenné mikro částice (sub-2-3- μm)
připravené pomocí Stöberovy metody (1968)

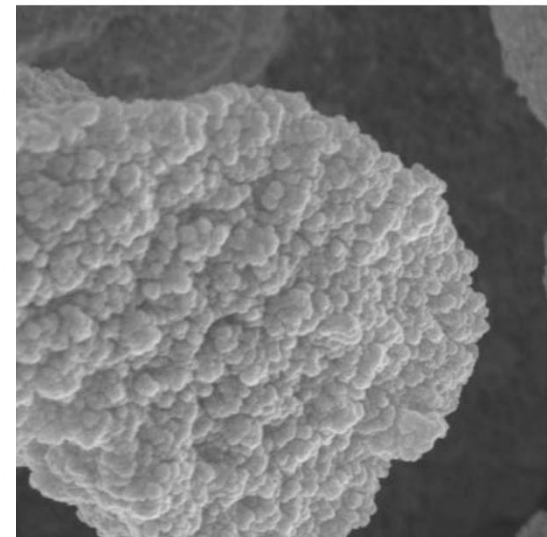
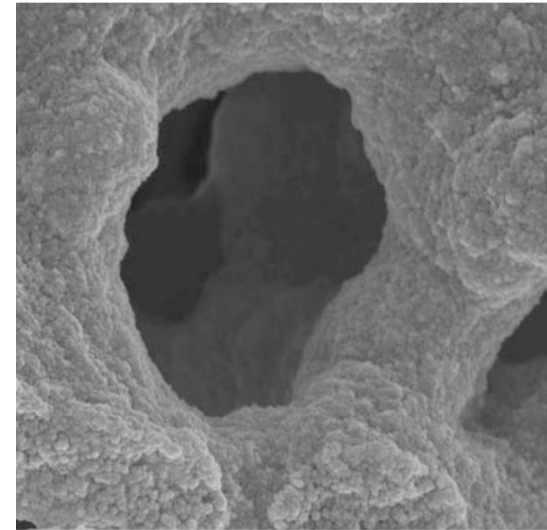
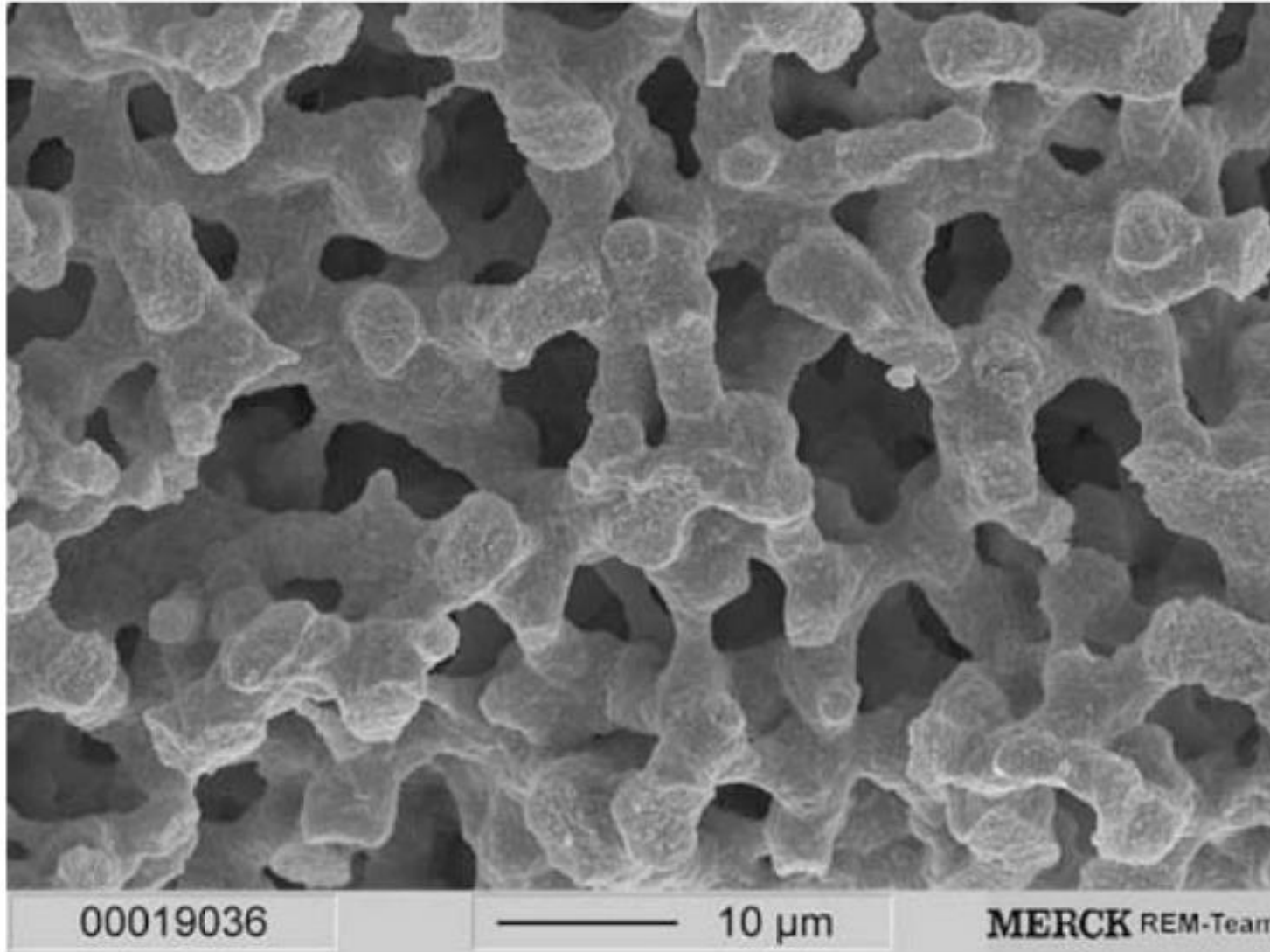


Chem. Commun., 2010, 46, 5832-5849

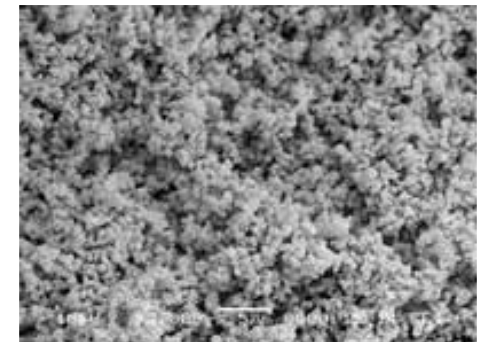
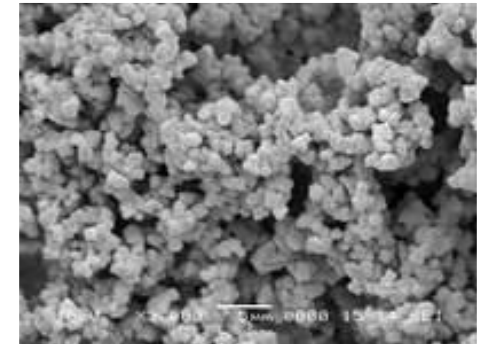
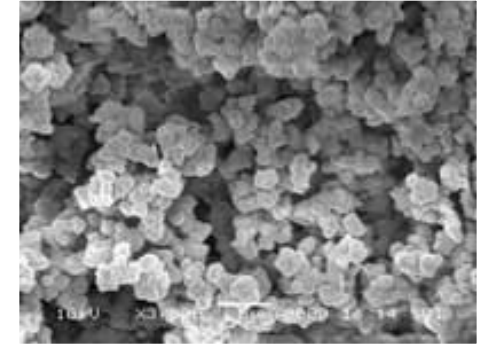
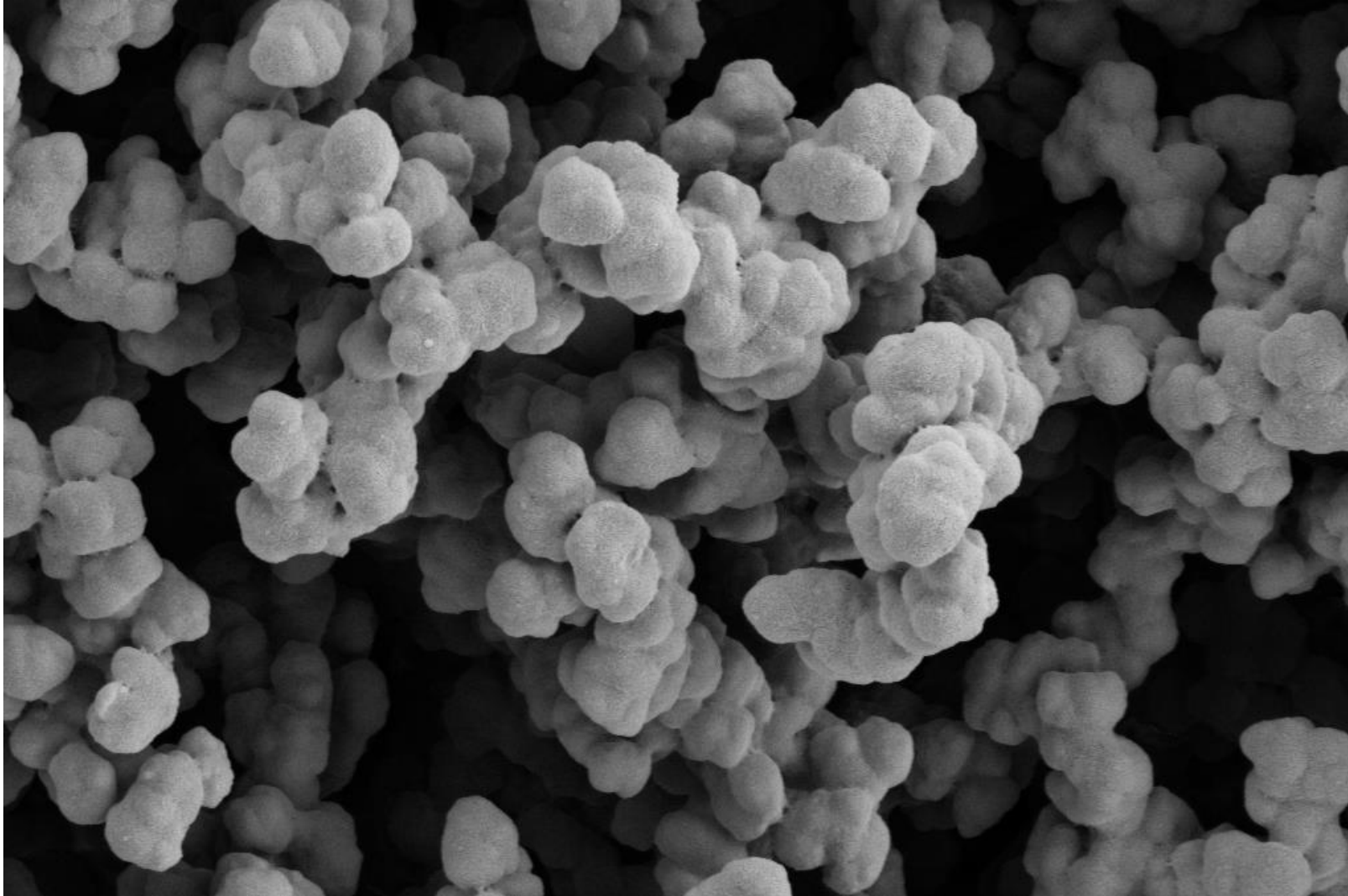
Hydrolyza a polykondenzace tetraetyl-ortosilikátu
probíhá v systému etanol/voda.



Monolitické stacionární fáze – silikagel

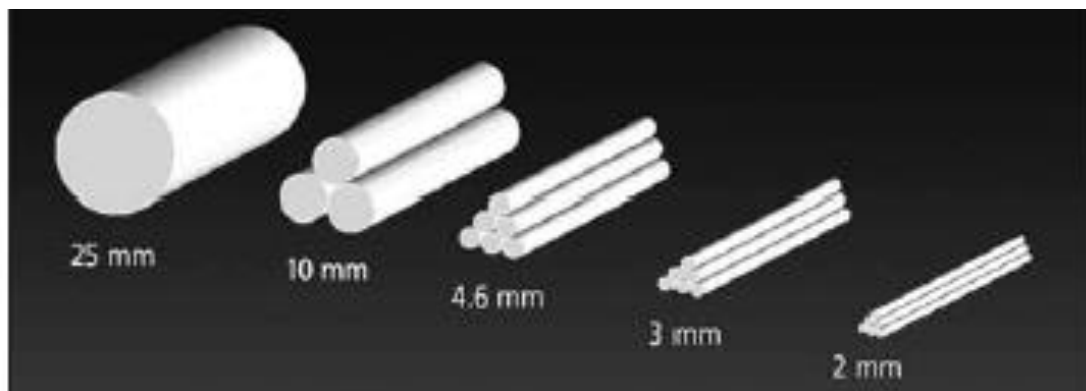
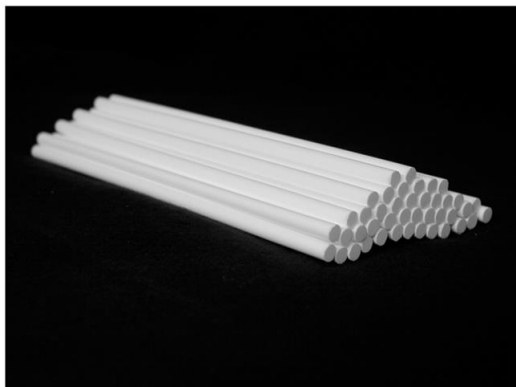


Monolitické stacionární fáze – polymer



Monolitické stacionární fáze

Silikagel



Polymer

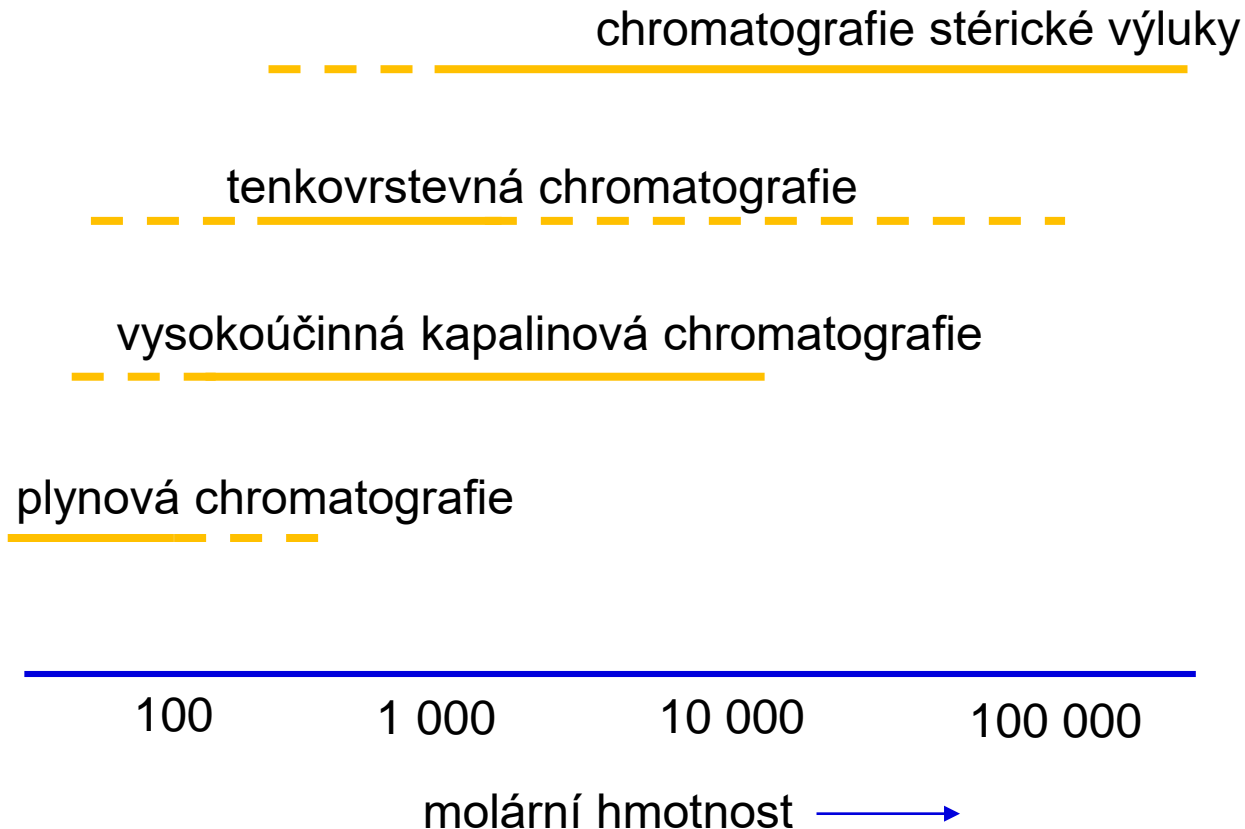


MUNI
SCI

Retenční mechanismy

Rozdělení separačních metod

Vliv velikosti látek

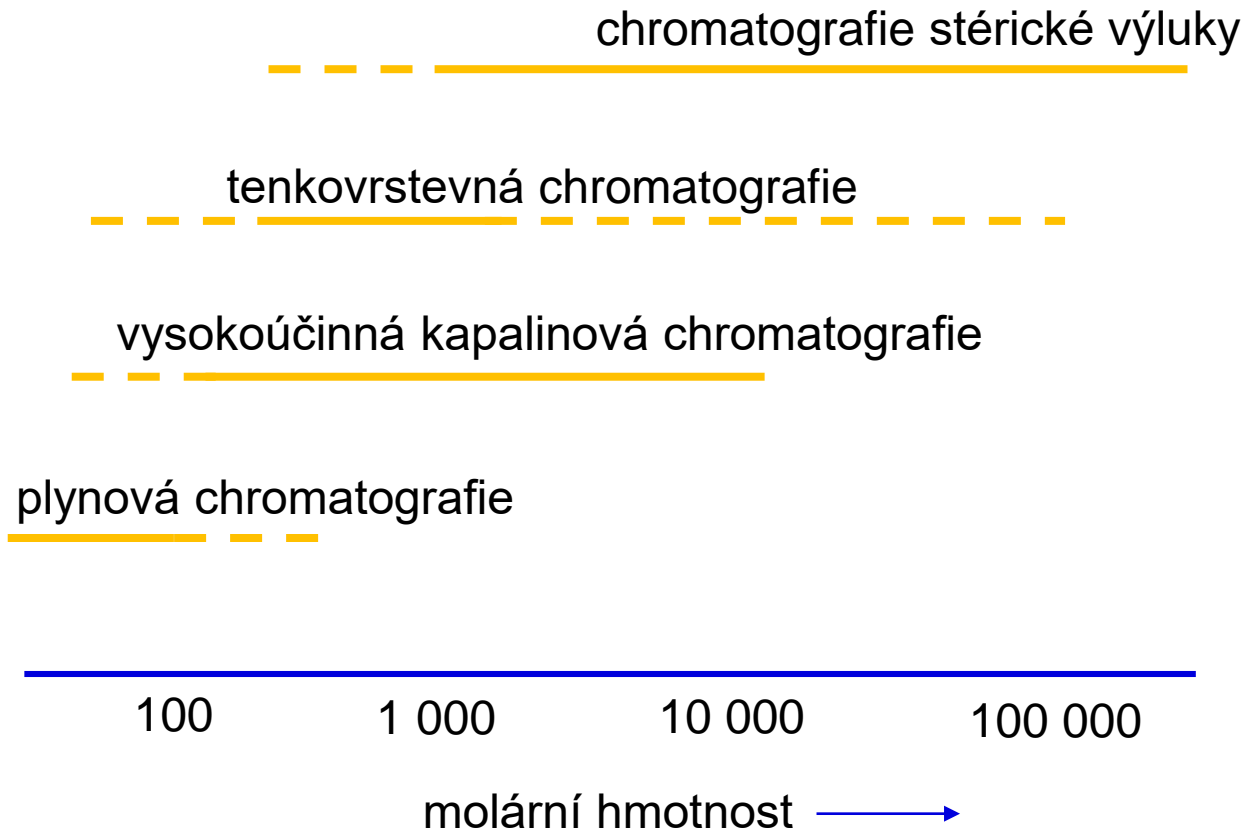


Mechanismy

- Adsorpce
- Rozdělování
- Chemická reakce
 - Výměna iontů
 - Srážení
- Síťový efekt

Rozdělení separačních metod

Vliv velikosti látek

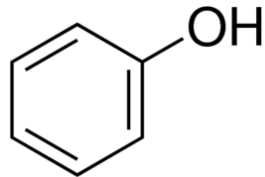


Mechanismy

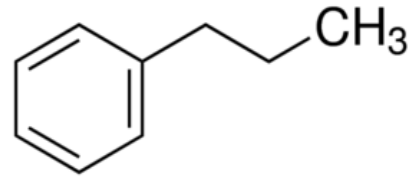
- Adsorpce
- Rozdělování
- Chemická reakce
 - Výměna iontů
 - Srážení
- Síťový efekt

(Téměř) vše lze rozdělit...

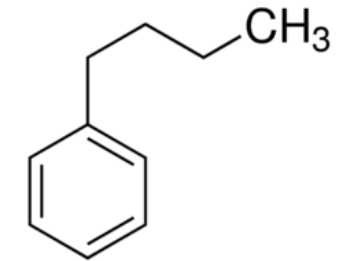
Seřad'te podle polarity



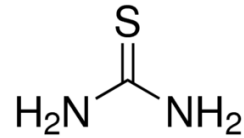
Fenol



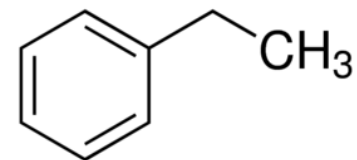
Propylbenzen



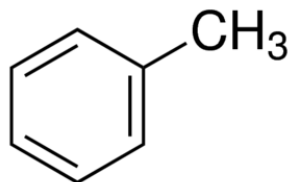
Butylbenzen



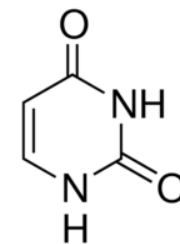
Thiomočovina



Ethylbenzen

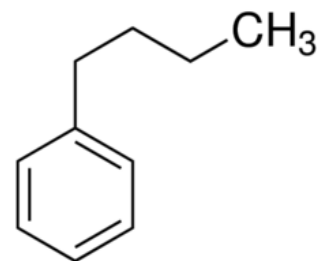


Toluen

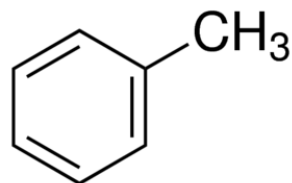


Uracil

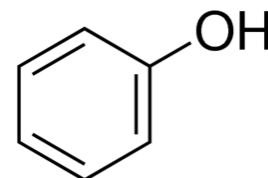
Seřad'te podle polarity



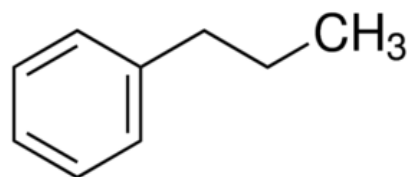
Butylbenzen



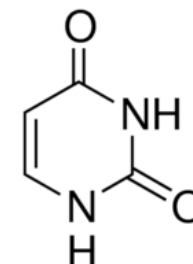
Toluen



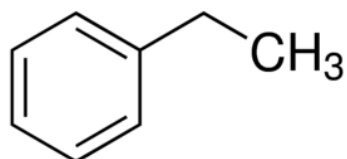
Fenol



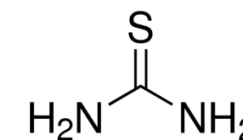
Propylbenzen



Uracil



Ethylbenzen



Thiomočovina

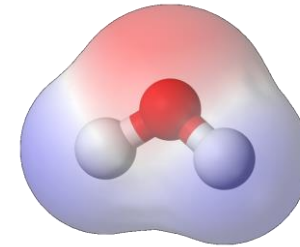
NEPOLÁRNÍ



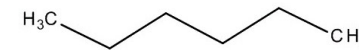
POLÁRNÍ

Polarita

„Polární molekuly jsou molekuly, které mají stálý a nenulový dipólový moment, protože elektrický náboj je v nich rozložen nesymetricky.“



voda



hexan

hydrogen 1 H 1.0079																	helium 2 He 4.0026	
lithium 3 Li 6.941	beryllium 4 Be 9.0122											boron 5 B 10.811	carbon 6 C 12.011	nitrogen 7 N 14.007	oxygen 8 O 15.999	fluorine 9 F 18.998	neon 10 Ne 20.180	
sodium 11 Na 22.990	magnesium 12 Mg 24.305											aluminum 13 Al 26.982	silicon 14 Si 28.086	phosphorus 15 P 30.974	sulfur 16 S 32.065	chlorine 17 Cl 35.453	argon 18 Ar 39.948	
potassium 19 K 39.098	calcium 20 Ca 40.078	scandium 21 Sc 44.956	titanium 22 Ti 47.867	vanadium 23 V 50.942	chromium 24 Cr 51.996	manganese 25 Mn 54.938	iron 26 Fe 55.845	cobalt 27 Co 58.933	nickel 28 Ni 58.693	copper 29 Cu 63.546	zinc 30 Zn 65.39	gallium 31 Ga 69.723	germanium 32 Ge 72.61	arsenic 33 As 74.922	selenium 34 Se 78.96	bromine 35 Br 79.904	krypton 36 Kr 83.80	
rubidium 37 Rb 85.468	strontium 38 Sr 87.62	yttrium 39 Y 88.906	zirconium 40 Zr 91.224	niobium 41 Nb 92.906	molybdenum 42 Mo 95.94	technetium 43 Tc [99]	ruthenium 44 Ru 101.07	rhodium 45 Rh 102.91	palladium 46 Pd 106.42	silver 47 Ag 107.87	cadmium 48 Cd 112.41	indium 49 In 114.82	tin 50 Sn 118.71	antimony 51 Sb 121.76	tellurium 52 Te 127.60	iodine 53 I 126.90	xenon 54 Xe 131.29	
cesium 55 Cs 132.91	barium 56 Ba 137.33	* 57-70	lutetium 71 Lu 174.97	hafnium 72 Hf 178.49	tantalum 73 Ta 180.95	wolfram 74 W 183.84	reinerium 75 Re 186.21	osmium 76 Os 190.23	iridium 77 Ir 192.22	platinum 78 Pt 195.08	gold 79 Au 196.97	mercury 80 Hg 200.59	thallium 81 Tl 204.38	lead 82 Pb 207.2	bismuth 83 Bi 208.98	polonium 84 Po [209]	astatine 85 At [210]	radon 86 Rn [222]
francium 87 Fr [223]	radium 88 Ra [226]	** 89-102	lawrencium 103 Lr [262]	rutherfordium 104 Rf [261]	dubnium 105 Db [262]	seaborgium 106 Sg [266]	bohrium 107 Bh [264]	hassium 108 Hs [269]	meitnerium 109 Mt [269]	unnilium 110 Uu [271]	ununium 111 Uuu [272]	unbibium 112 Uub [277]	untrium 113 Uuq [283]					

* Lanthanide series

lanthanum 57 La 138.91	cerium 58 Ce 140.12	praseodymium 59 Pr 140.91	neodymium 60 Nd 144.24	promethium 61 Pm [145]	samarium 62 Sm 150.36	europium 63 Eu 151.96	gadolinium 64 Gd 157.25	terbium 65 Tb 158.93	dysprosium 66 Dy 162.50	holmium 67 Ho 164.93	erbium 68 Er 167.26	thulium 69 Tm 168.93	ytterbium 70 Yb 173.04
actinium 89 Ac [227]	thorium 90 Th 232.04	protactinium 91 Pa 231.04	uranium 92 U 238.03	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]

** Actinide series

Rozdíl elektronegativit

Mechanismy retence

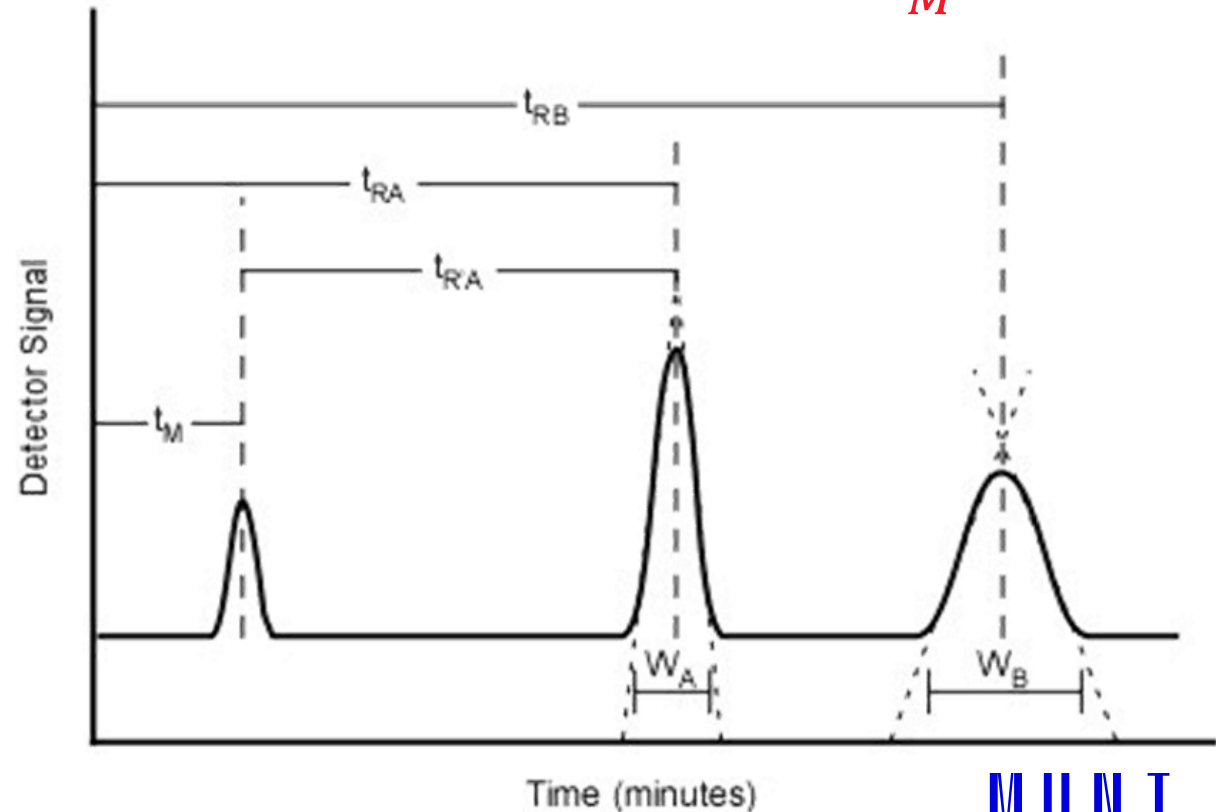
- Normální fáze
- Obrácené fáze
- Hydrofilní interakce
- Iontová výměna
- Iontová chromatografie
- Chromatografie stérické vyluky

Mechanismy retence

- Normální fáze
- Obrácené fáze
- Hydrofilní interakce
- Iontová výměna
- Iontová chromatografie
- Chromatografie stérické vyluky

Teoretická vsuvka

Retenční faktor $k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$

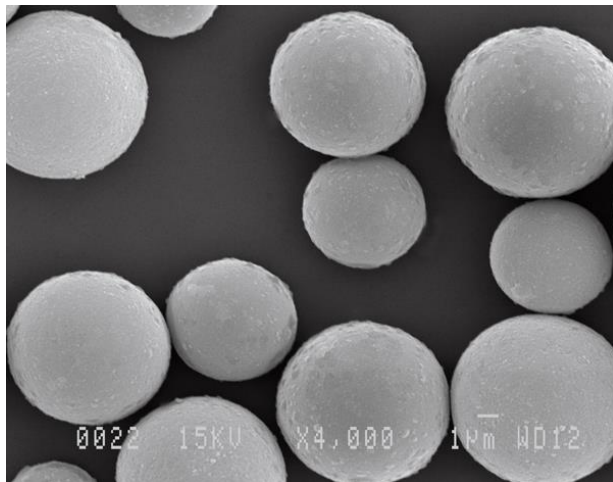


Normální fáze (NP)

Stacionární fáze

Polární

Silikagel, Al_2O_3 , polární gely



www.silicycle.com



www.agc.com

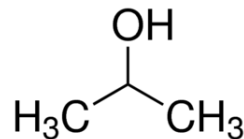
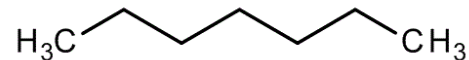


wiseGEEK

Mobilní fáze

Nepolární

hexan, heptan
s přidavkem
izopropanolu,
chloroformu
nebo octanu ethylnatého



Pořadí eluce

Nepolární > Polární

Uhlovodíky < halogen sloučeniny < ethery < nitrily < nitro sloučeniny
< ketony < aldehydy < alkoholy < kyseliny

Mechanismus

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

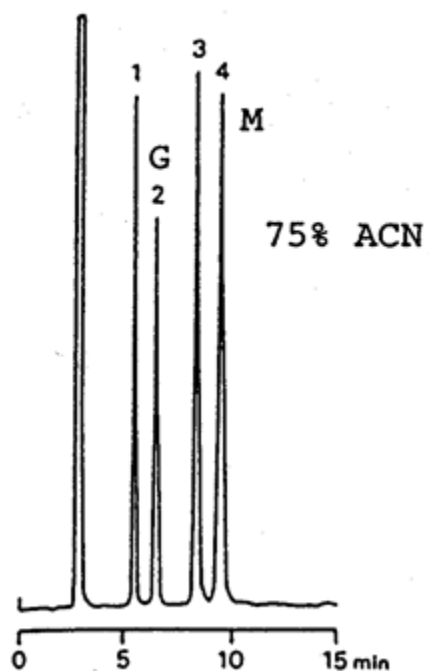
k – retenční faktor
 φ – koncentrace polárního
rozpouštědla
 a, m – konstanty

Aplikace

- Izomery
- Vysoce hydrofobní látky
- Hydrofilní látky (ANP, cukry)
- Nepoužívá se gradient

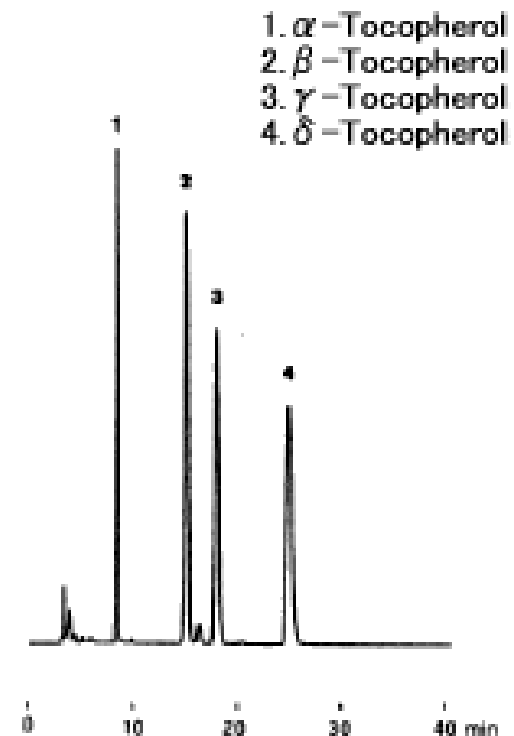
Aplikace – Normální fáze

Cukry



Amino kolona, Acetonitril/voda (75:25)
1 – fruktóza, 2 – glukóza, 3 – sukróza, 4 – maltóza.

Izomery Vitamínu E

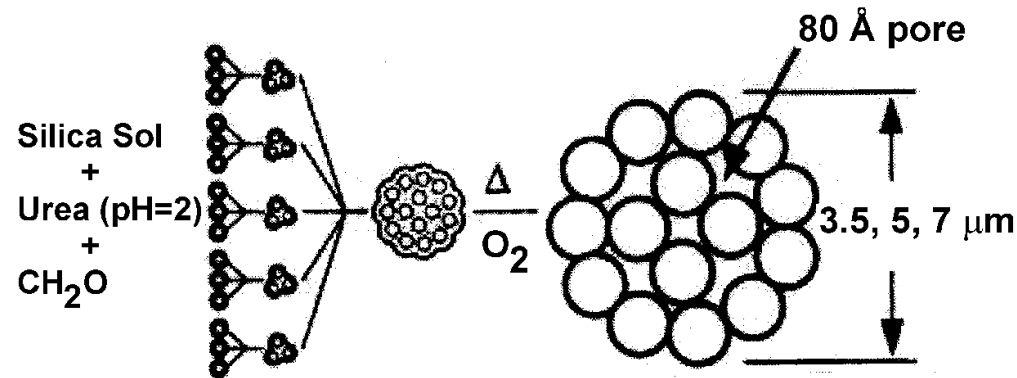


YMC-Pack Polyamine II 250 x 4.6mm I.D.,
n-hexan/octan etylnatý (70/30)

Silikagel

Porézní forma oxidu křemičitého (SiO_2) vyráběná synteticky z křemičitanu sodného.

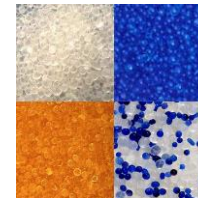
Vysoký aktivní povrch ($800 \text{ m}^2/\text{g}$) a snadná absorpce vody (zahřátím na 150°C lze regenerovat).



Sil – gel, typ A (méně čistý) - neionizovatelné látky, póry 2.5 nm

Sil – sol, typ B rozklad organosilanů, shlukování plynné fáze, čistý, stabilnější i při vyšším pH – i ionizovatelné látky, póry $4.5 - 7 \text{ nm}$

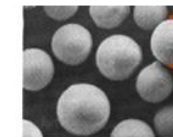
Desikant



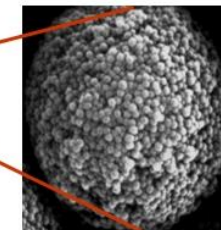
Stelivo



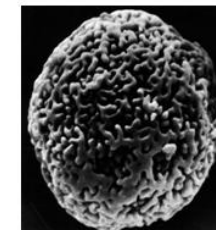
Stacionární fáze



www.team-cag.com



Silica sol



Silica gel

- Povrch je slabě kyselý, což způsobuje chvostování bazických látek.
- Chemicky stabilní do pH 8

Reverzní fáze (RP)

Stacionární fáze

Mobilní fáze

Mechanismus

Nepolární

Polární

Chemicky vázané fáze

Acetonitril

-C4, -C8, -C18

Metanol

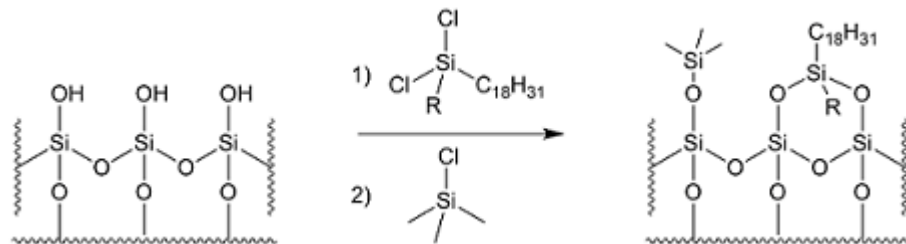
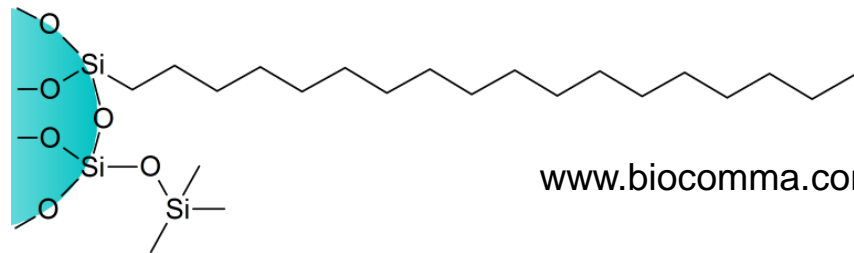
silikagel, uhlík, polymery

Tetrahydrofuran

Voda

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

k – retenční faktor
 φ – koncentrace organického rozpouštědla
 a, m – konstanty



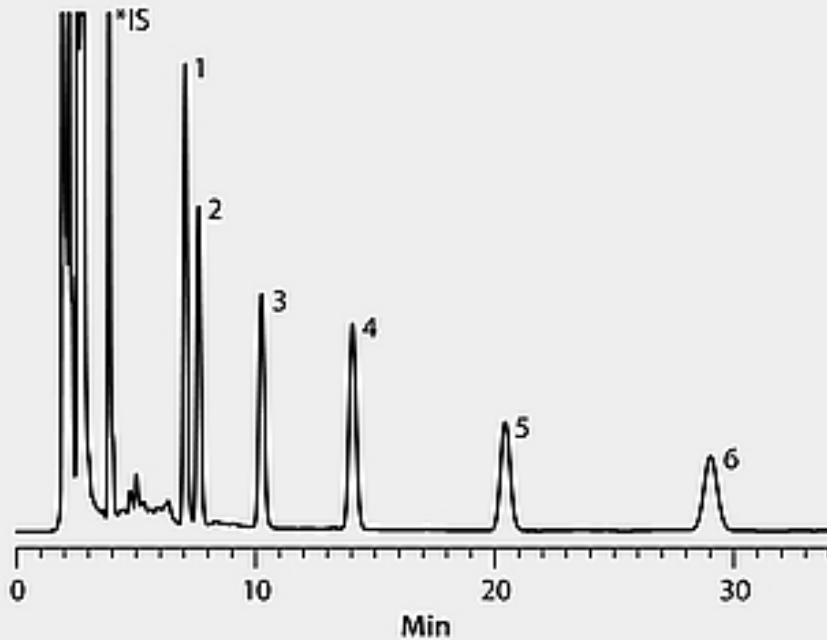
Aplikace

- Biologické vědy
- Životní prostředí
- Průmysl
- Gradient mobilní fáze

80 – 90 % všech aplikací

Pořadí eluce Polární > Nepolární

Aplikace – Barbituráty



Barbiturates from serum using 500 mg/3 mL Discovery DSC-18Lt SPE tubes and Zymark's RapidTrace SPE Workstation.

*IS = Barbitol (internal standard).

Sample Info: 0.5 mL porcine serum spike with 0.5 µg/mL or 1.0 µg/mL each analyte then diluted with 0.5 mL water.

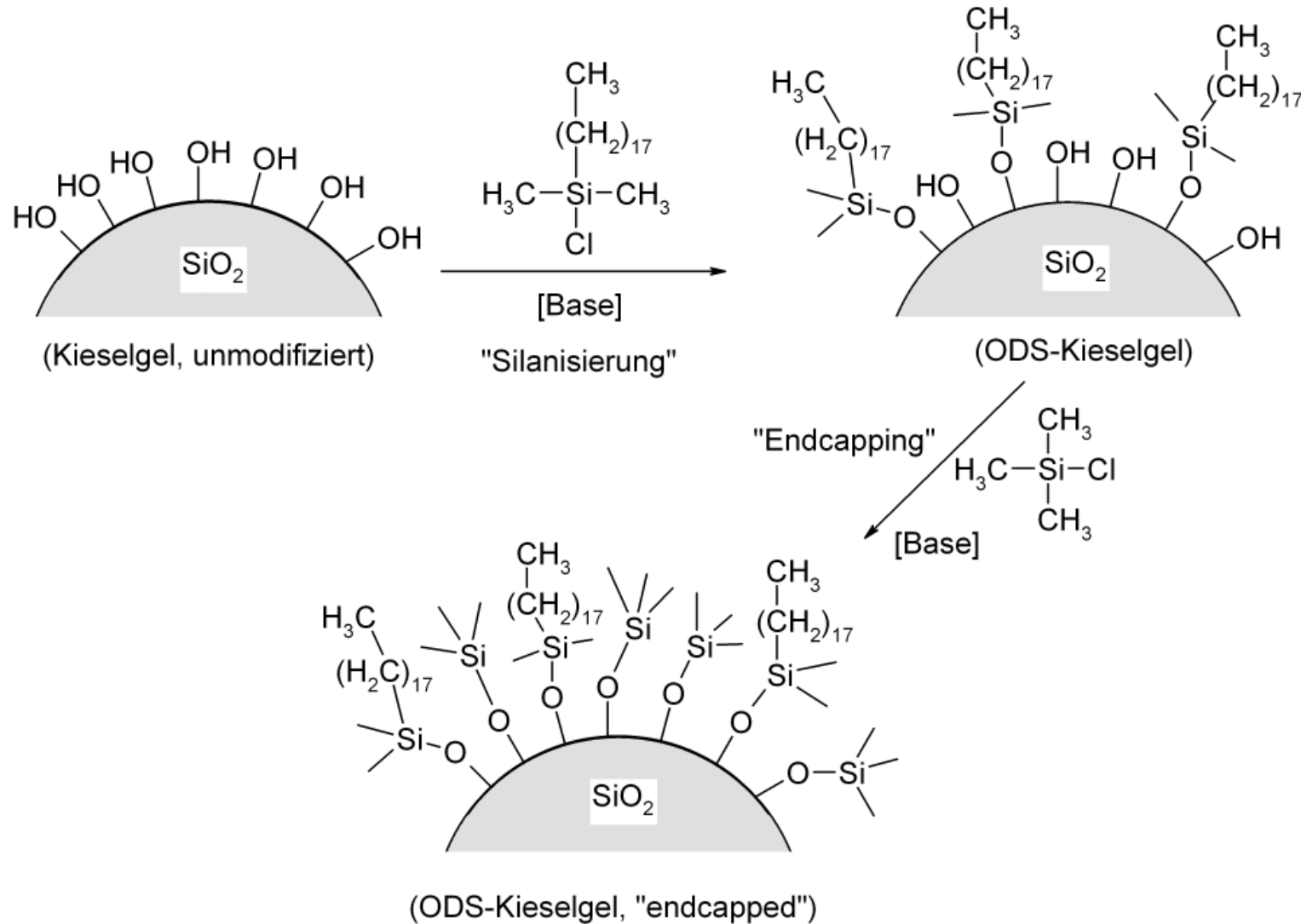
Efficiency of Recovery

Compound	Concentration (µg/mL)	%Recovery	%RSD (n=6)
1. Phenobarbital	0.5	96.2	±1.6
	1.0	94.9	±1.7
2. Aprobarbital	0.5	98.5	±2.1
	1.0	100.8	±0.8
3. Butobarbital	0.5	97.2	±1.9
	1.0	98.7	±1.8
4. Mephobarbital	0.5	99.7	±2.4
	1.0	101.0	±2.0
5. Pentobarbital	0.5	96.4	±1.7
	1.0	96.4	±1.9
6. Secobarbital	0.5	98.2	±1.7
	1.0	97.7	±1.8

SPE Method For RapidTrace SPE Workstation Application

1. Condition & equilibrate each tube/well with 2 mL MeOH & 2 mL DI Water
2. Load sample
3. Wash each tube/well with 2 mL 5% MeOH
4. Vacuum or air dry for 5–10 min
*This removes any excess water from the sorbent.
The presence of water in the final eluent may prolong eluent evaporation.*
5. Elute with 1–2 mL MeOH
6. Dry eluate with nitrogen purge (40 °C; 15–20 min)
7. Reconstitute with 200 µL mobile phase
8. Quantify against internal or external standards via HPLC analyses

Chemicky vázané stacionární fáze



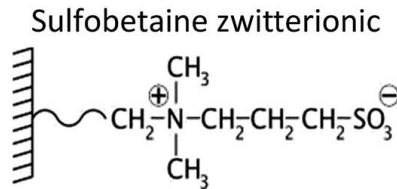
Hydrofilní interakce (HILIC)

Stacionární fáze

Polární

Silikagel

Polární funkční skupiny



Mobilní fáze

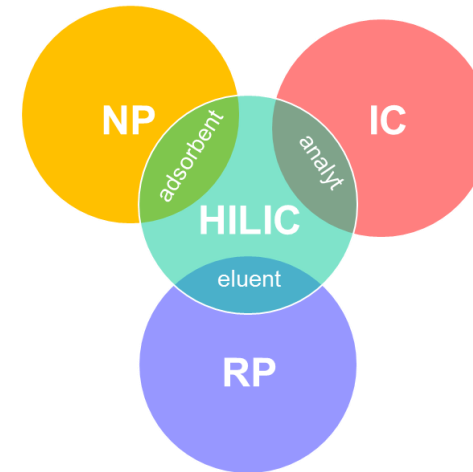
Polární

Acetonitril

Metanol

Vody/Pufr

(nízké koncentrace)



Mechanismus

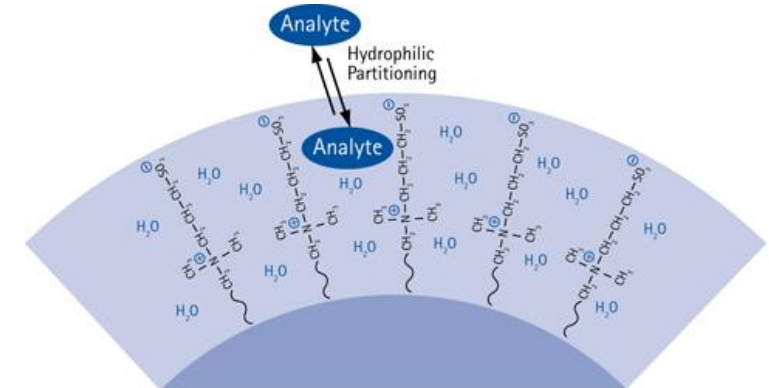
Rozhodující role v mechanismu separace



Snadná volba podmínek pro daný separační problém.



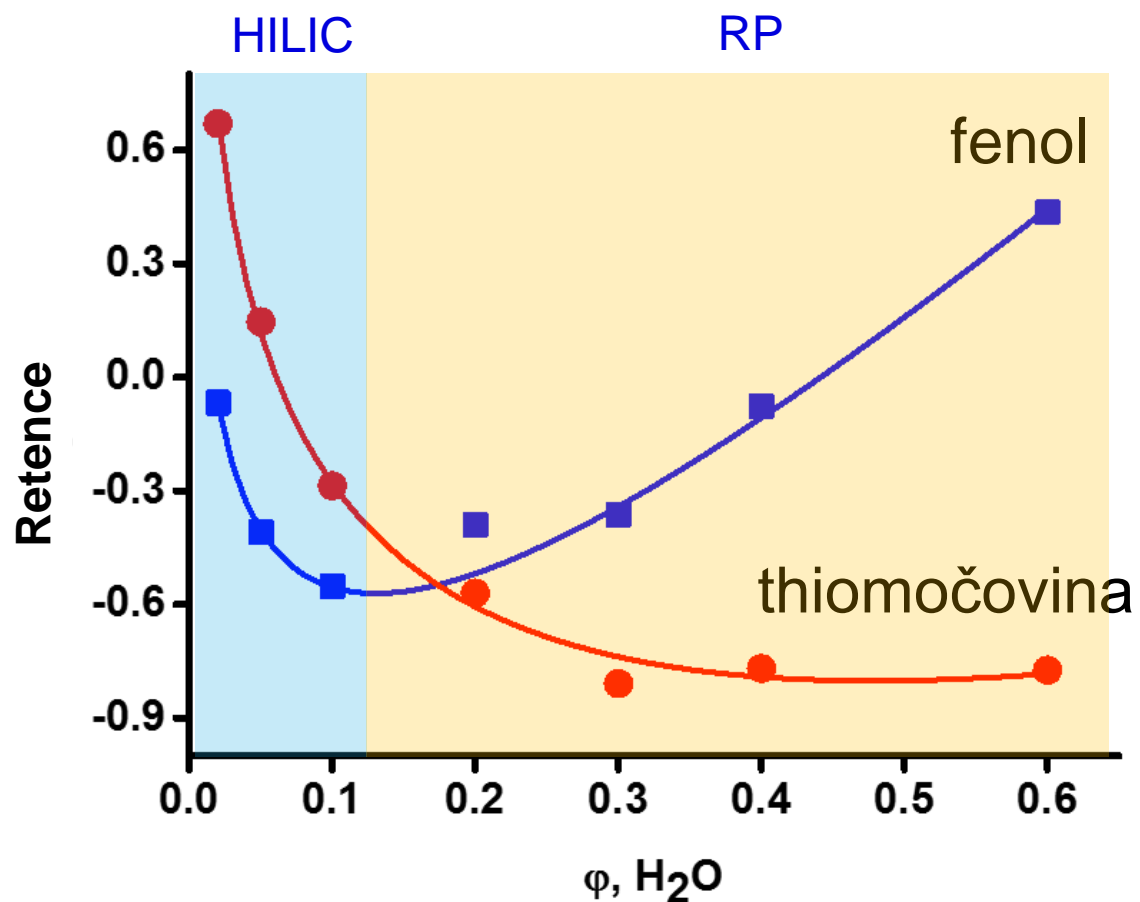
Andrew J. Alpert



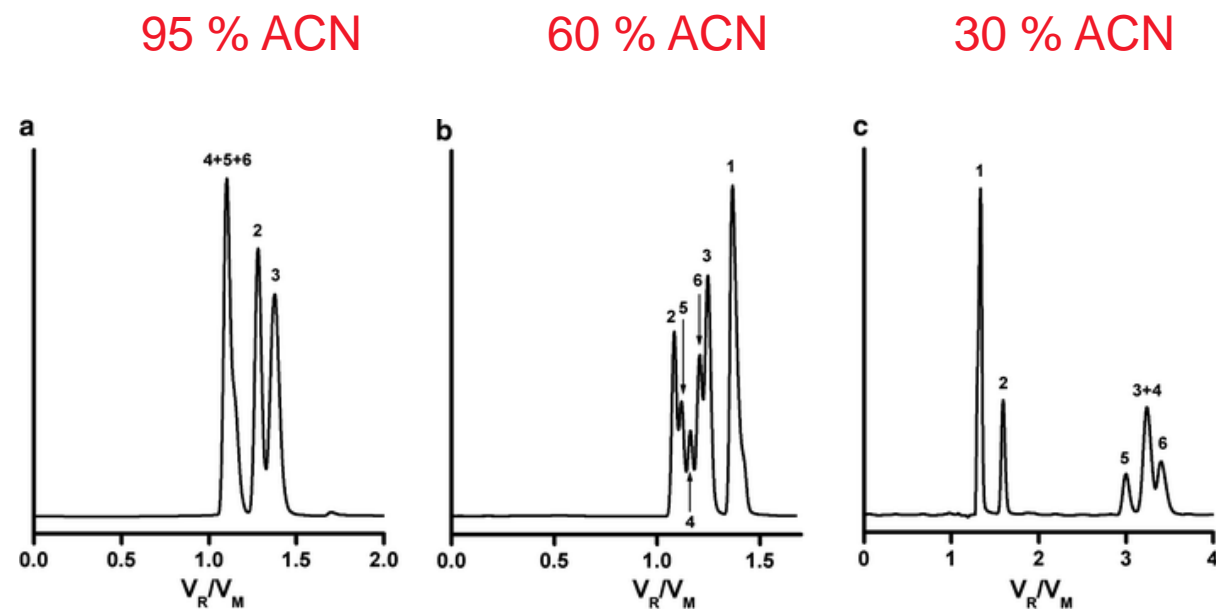
Interakce ve vodné vrstvě

www.merckmillipore.com

Duální retenční mechanismus

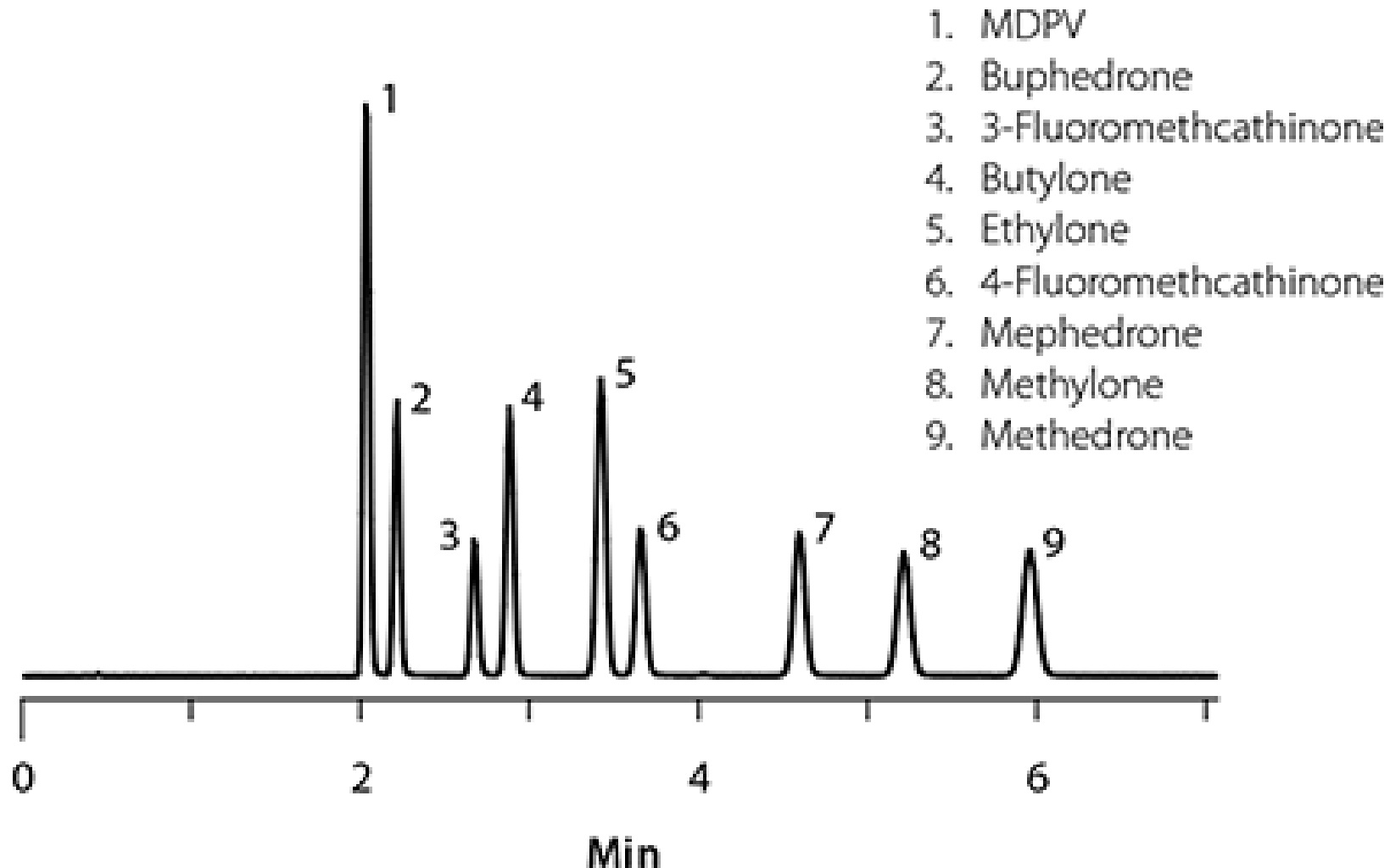


Retence ovlivněná složením mobilní fáze



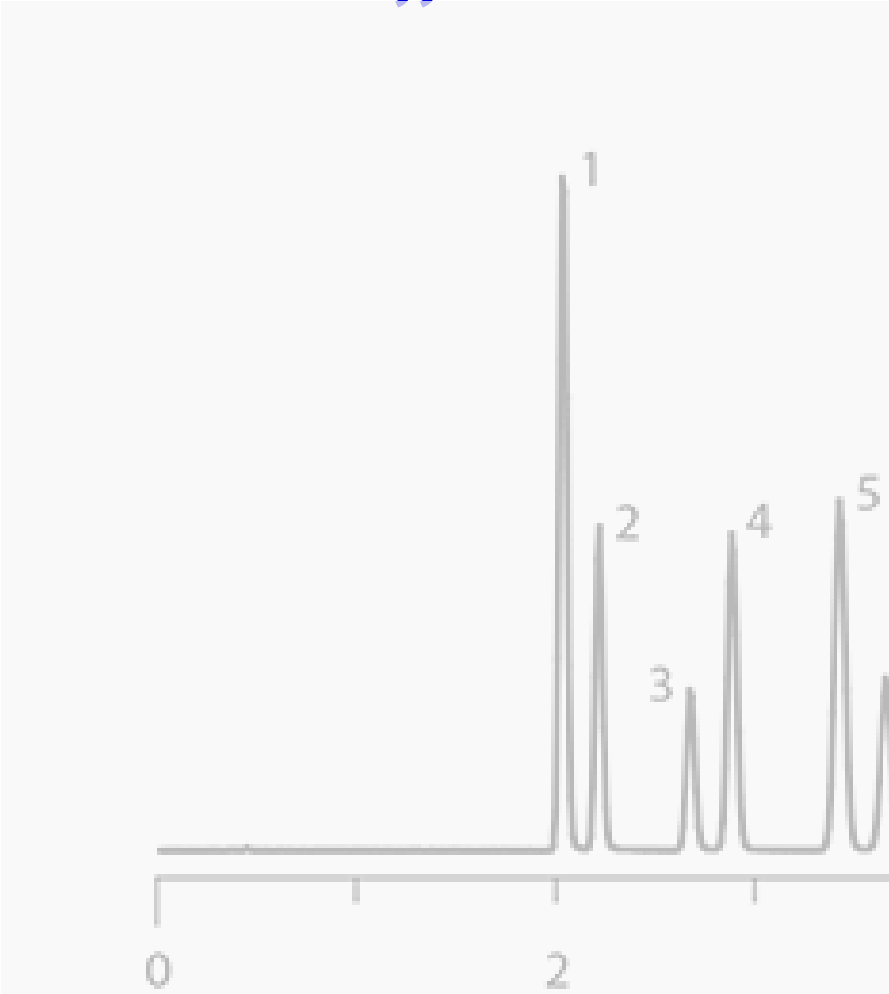
Barbituráty, monolitická kapilární kolona.

Aplikace – „Bath Salts“

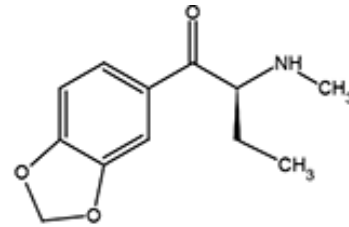


Ascentis Express HILIC (Si), 10 cm x 2.1 mm, 2.7 μ m, mobile phase: (A) 5 mM ammonium formate acetonitrile; (B) 5 mM ammonium formate water; (98:2, A:B); flow rate: 0.6 mL/min

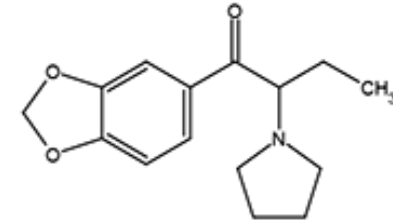
Aplikace – „Bath Salts“



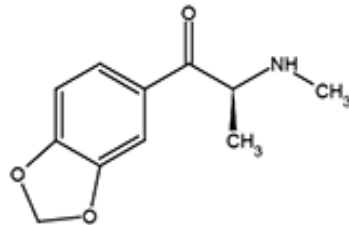
Ascentis Express HILIC (Si), 10 cm x 2.1 mm
 formate acetonitrile; (B) 5 mM ammonium for



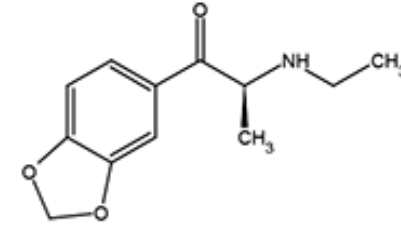
Butylone



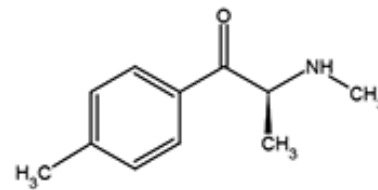
3,4-Methylenedioxypropylone
(MDPV)



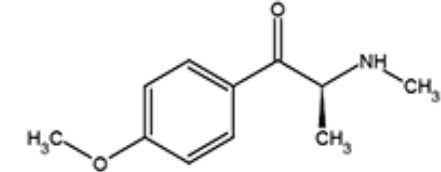
Methylone



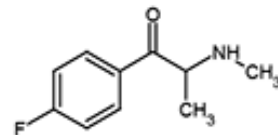
Ethylone



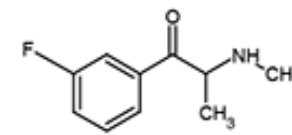
Mephedrone



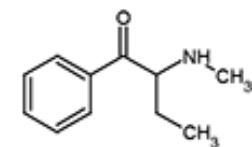
Methedrone



4-Fluoromethcathinone



3-Fluoromethcathinone



Buphedrone

Shrnutí NP x RP x HILIC

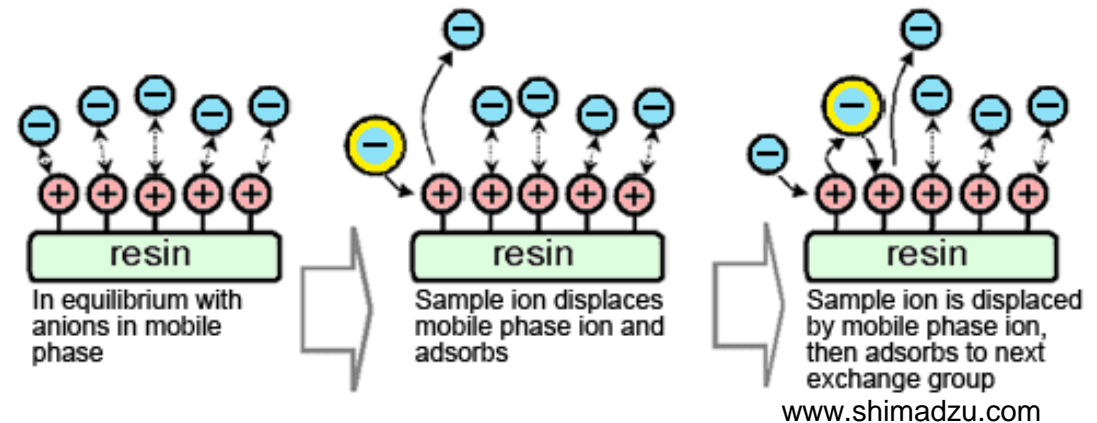
	NP	RP	HILIC
Stacionární fáze	Polární	Nepolární	Polární
Mobilní fáze	Nepolární	Polární	Polární
Vzorky	Méně polární	Ne/Polární	Polární

Retenci a selektivitu ovlivňuje
polarita vzorku a mobilní a stacionární fáze.

Iontově-výměnná chromatografie (IEX)

Stacionární fáze

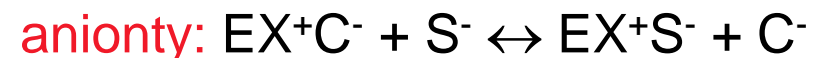
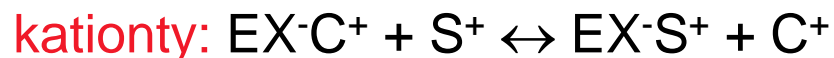
- **Katexy** s anionickými sulfonovými nebo karboxylovými iontově-výměnnými skupinami
- **Anexy** s kvarterními nebo terciárními aminovými skupinami



Organické polymerní sorbenty, silikagel s chemicky vázanými iontově-výměnnými skupinami.

Mobilní fáze

Roztoky elektrolytů (pufry, soli, slabé kyseliny či báze), protiionty C soutěží s ionty vzorku S:



$$k = \frac{V_S}{V_M} \frac{(S)}{[S]} = \frac{V_S}{V_M} \frac{K_S^c Q^c}{c^c} = k_0 \phi^{-m}$$

Q - iontově-výměnná kapacita,
m = s/c je poměr nábojů vyměňovaných iontů

Iontová chromatografie (IC)

Moderní forma iontově-výměnné chromatografie

Pitná voda, zubní pasty (F^-), zelenina (NO_3^-), biologické tekutiny (Na^+ , K^+), speciální analýza (Cr^{3+} , Cr^{6+})

Stacionární fáze

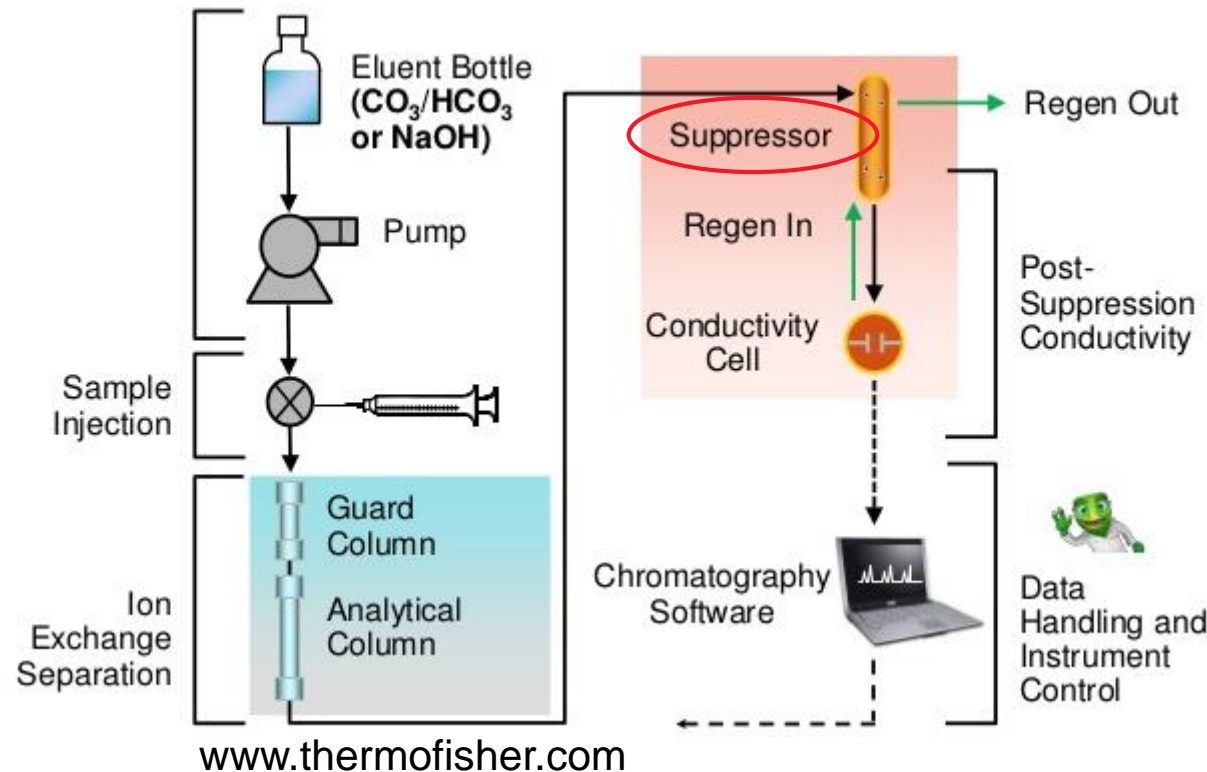
Silný měnič iontů

Mobilní fáze

$NaOH$, Na_2CO_3

Detekce

- Vodivostní (supresor)
- Nepřímá detekce
 - Eluce ftaláty, salicyláty

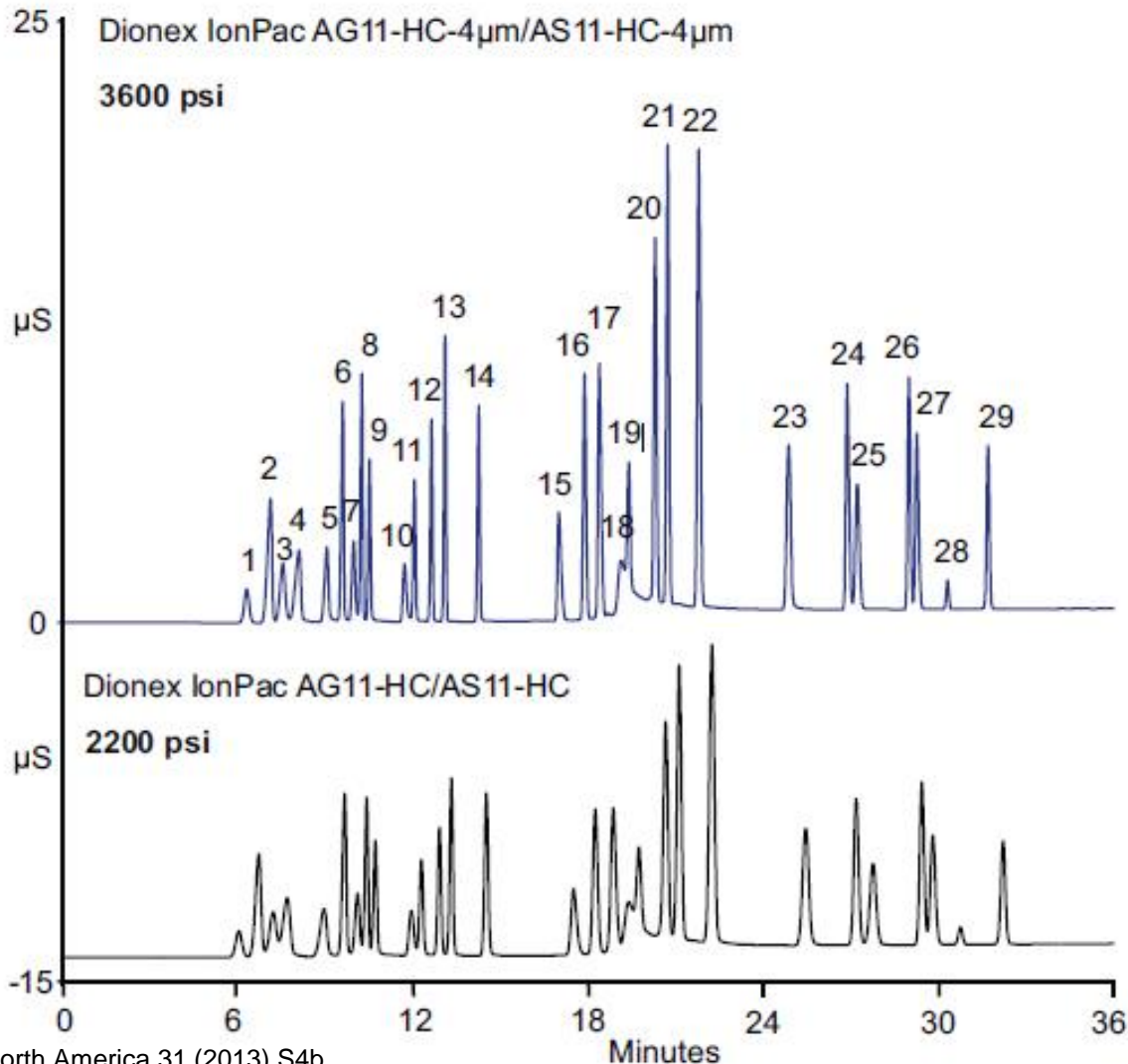


Supresor

Odstranění iontů
mobilní fáze

(silný katex pro anionty)

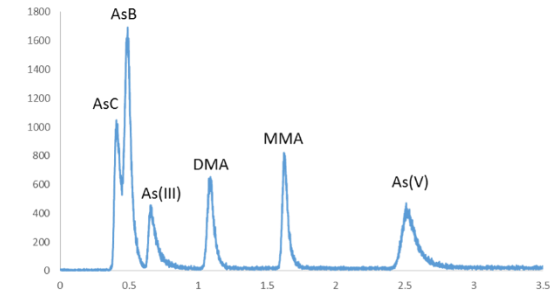
Aplikace (IC)



Peaks:

1. Quinate
2. Fluoride
3. Lactate
4. Acetate
5. Propionate
6. Formate
7. Butyrate
8. Methylsulfonate
9. Pyruvate
10. Valerate
11. Monochloroacetate
12. Bromate
13. Chloride
14. Nitrite
15. Trifluoroacetate
16. Bromide
17. Nitrate
18. Carbonate
19. Malonate
20. Maleate
21. Sulfate
22. Oxalate
23. Tungstate
24. Phosphate
25. Phthalate
26. Citrate
27. Chromate
28. *cis*-Aconitate
29. *trans*-Aconitate

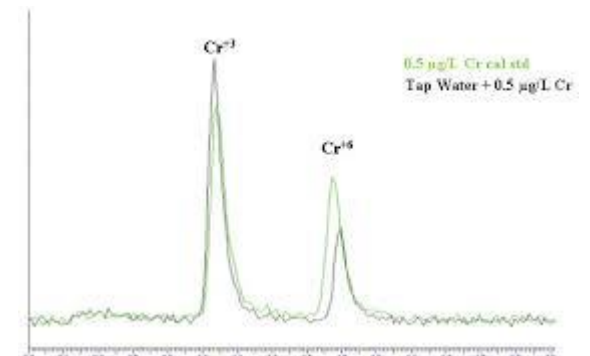
Speciace - Arsen



Gradient separation of six arsenic species at 400 ng/L (ppt) concentration. Gradient conditions are given in Table 2.

J. Anal. At. Spectrom., 2015,30, 1405-1407

Speciace - Chrom



www.perkinelmer.com

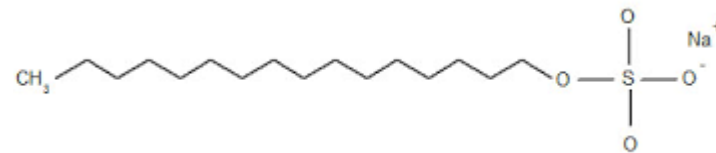
Chromatografie iontových párů

Tvorba iontových párů mezi chromatografovanými disociovanými kyselinami nebo zásadami a opačně nabitými ionty ve vodné fázi.

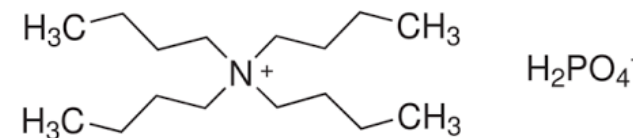
↳ Neutralizovaný náboj, hydrofobní látky > **system obrácených fází**

Protiionty

– Iontové páry **se zásadami** – silné kyseliny (k. chloristá, alkansulfonové kyseliny)



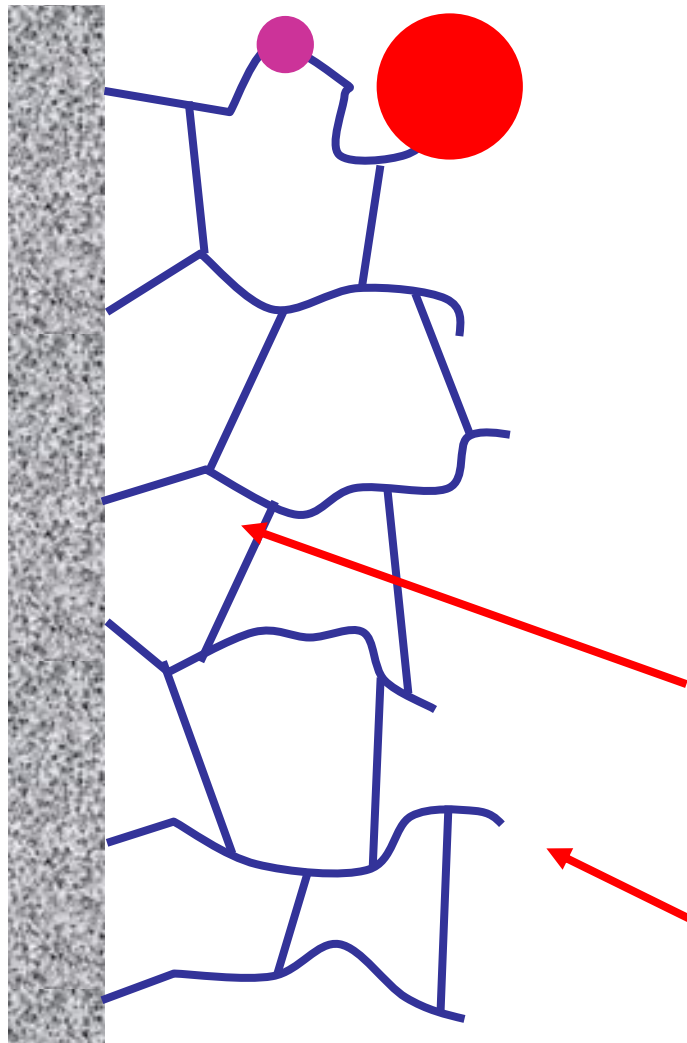
– Iontové páry **s kyselinami** – kvarterní amoniové soli (tetrabutylamoniumfosfát)



Aplikace

Analýza kyselých a bazických látek v barvářských meziproduktech, farmaceutických výrobcích a produktech látkové výměny.

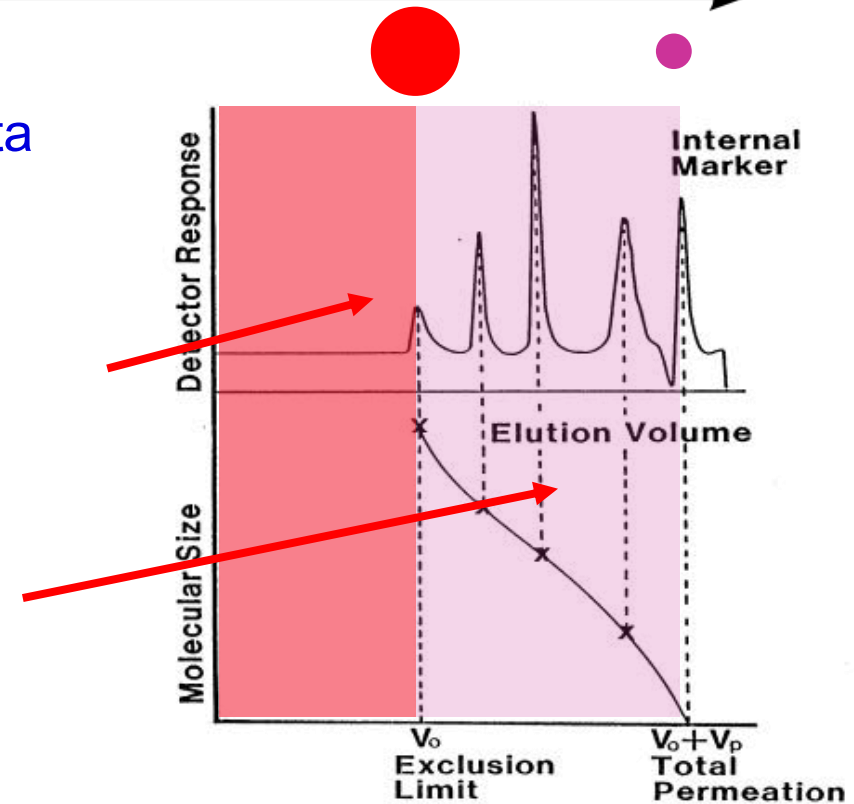
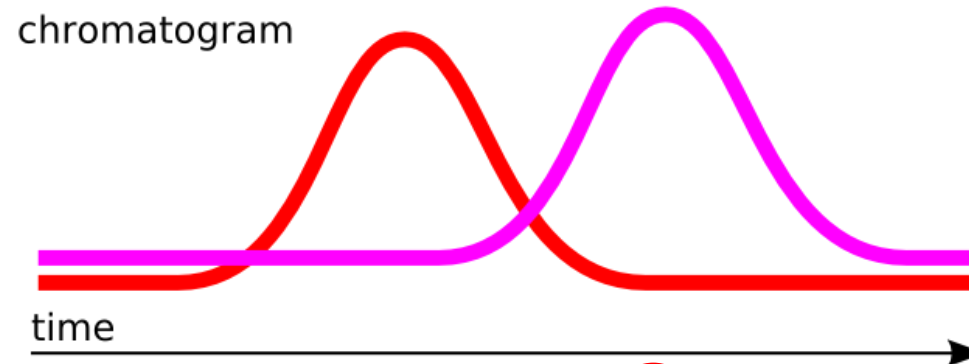
Chromatografie stérické výluky (SEC)



Celková porozita

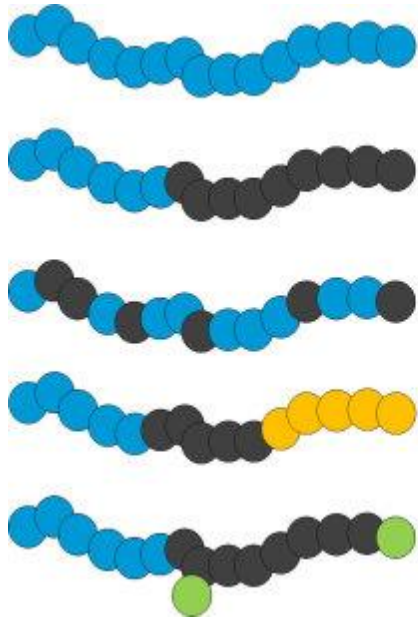
Mezičásticový prostor

Póry v částici



Chromatografie stérické vyluky (SEC)

Polymery



Homopolymer

Block Copolymer

Statistical Copolymer

ABC Triblock Terpolymers

Polymers with Functional Groups

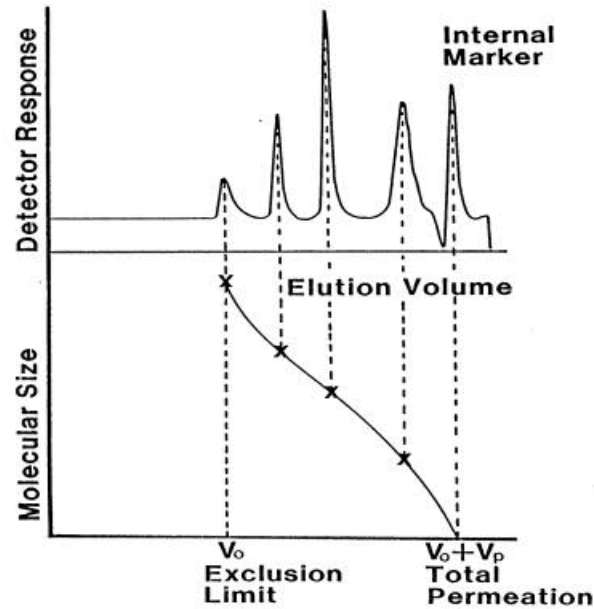
www.hzg.de

Stacionární fáze

Gely, polymery

Mobilní fáze

THF, H₂O



Kalibrace

$$\log M = A - B \cdot V_e$$

polystyreny

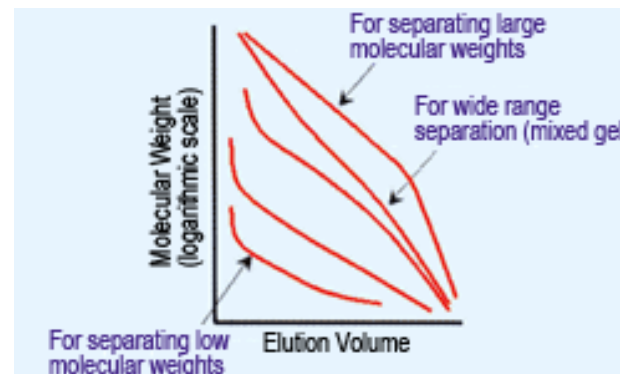
Mark-Houwinkova rovnice

(kalibrace pro jiný polymer)

$$[\eta] = KM^a$$

Vodná SEC

Standardy dextranů
Biopolymery



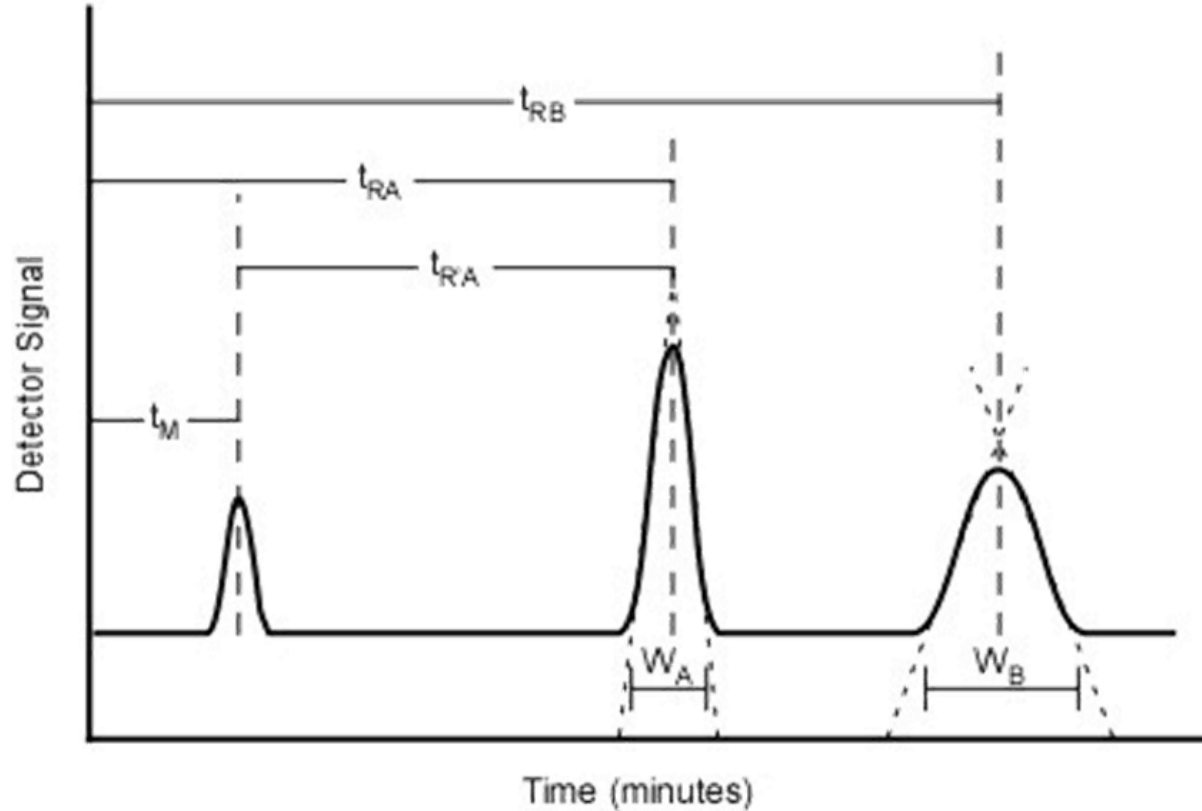
www.shimadzu.com

MUNI
SCI

Retenční charakteristiky

Retenční faktor

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



© Dunnivant & Ginsbach

– Eluční čas a objem

t_M – mrtvý čas

$t_{R,A}$ – retenční čas látky A

$t_{R,B}$ – retenční čas látky B

F_m – průtok mobilní fáze

$$V_R = t_R \cdot F_m$$

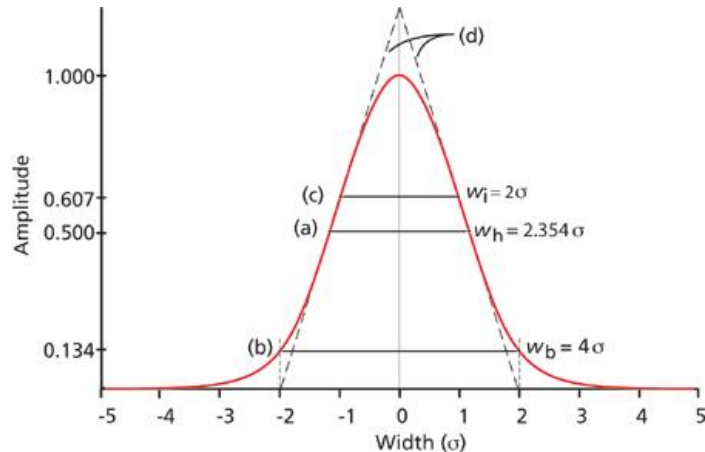
– Retenční faktor

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

V_S – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze

Účinnost separace

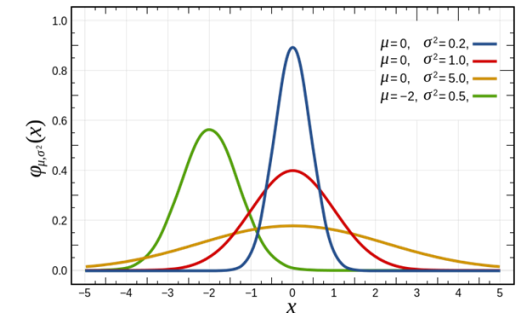


Gaussova funkce

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

σ – směrodatná odchylka

μ – střední hodnota náhodné veličiny (t_R)



www.wikipedia.org

– Počet teoretických pater, N

$$N = 5.545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{0.5}}\right)^2 \quad N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{4\sigma}}\right)^2$$

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

– Výškový ekvivalent

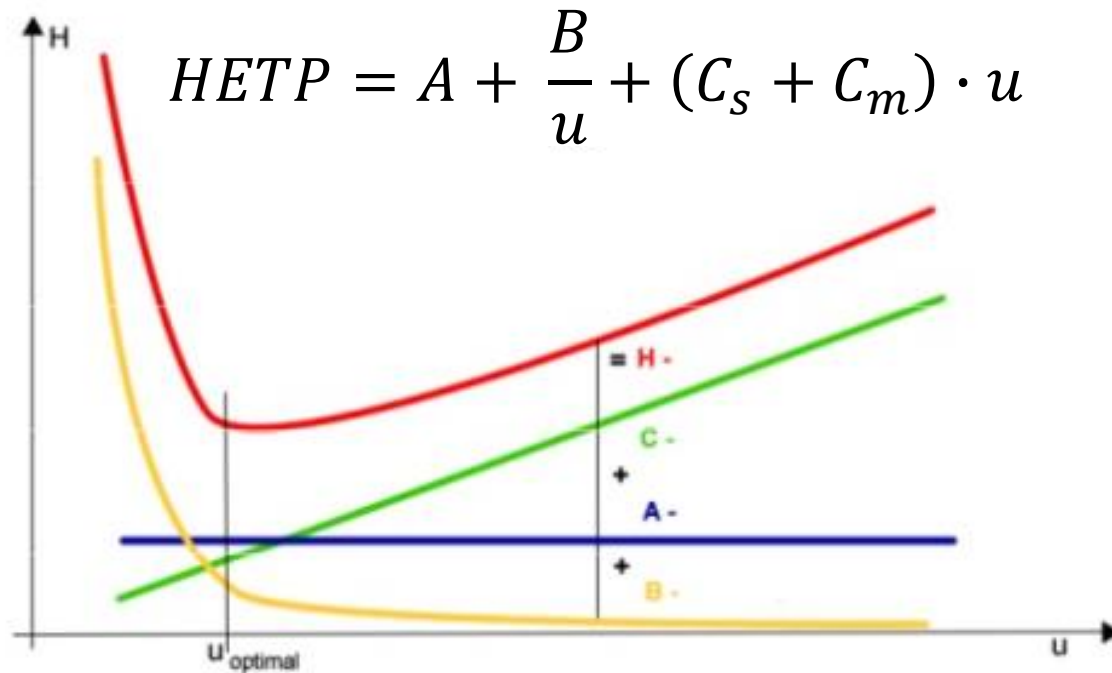
teoretického patra, $HETP$

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

– Lineární rychlost, u

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

Van Deemterova rovnice



www.thermofisher.com

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

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

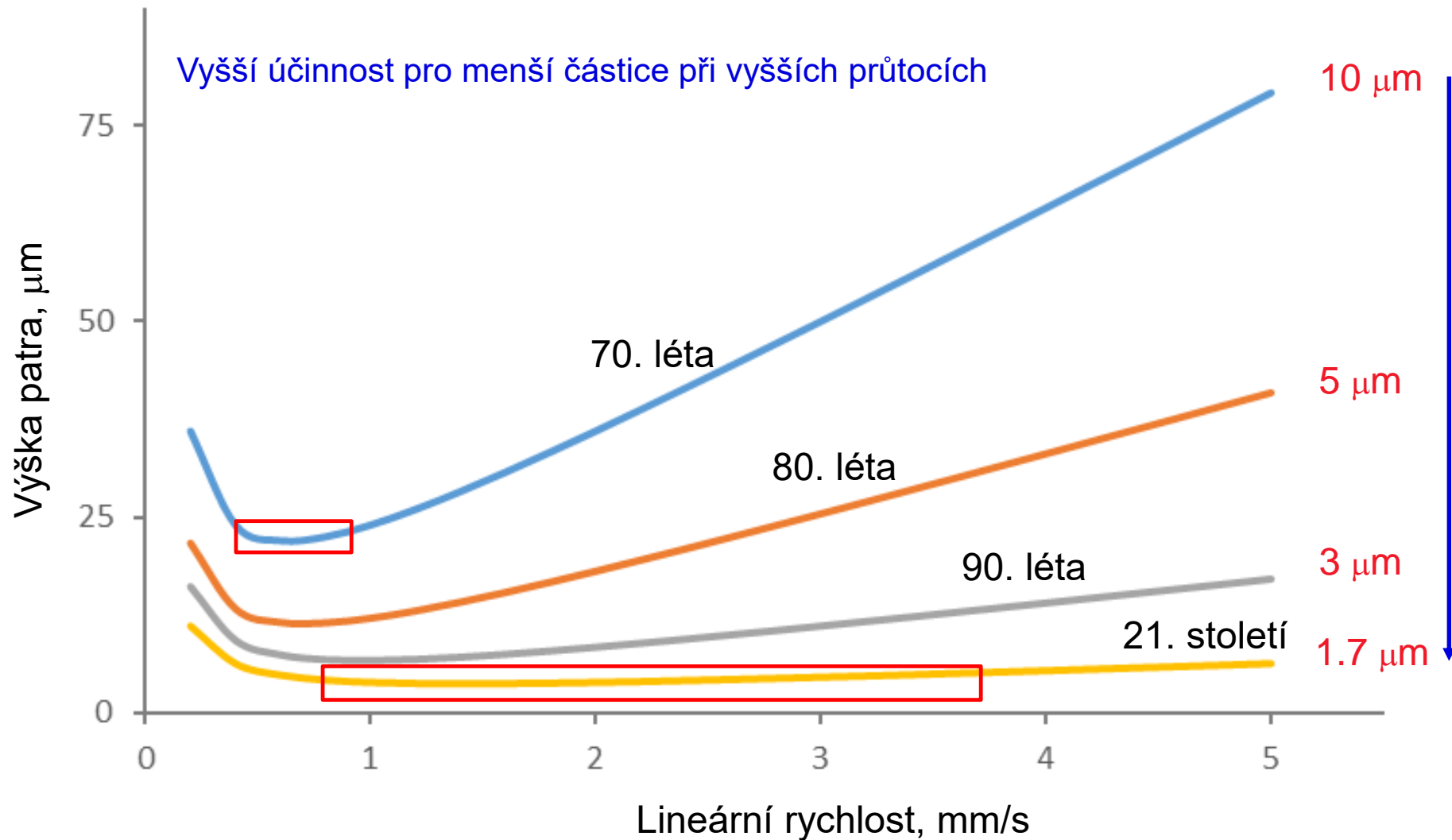
$$h = \frac{H}{d_p}$$

$$v = \frac{u \cdot d_p}{D_m}$$

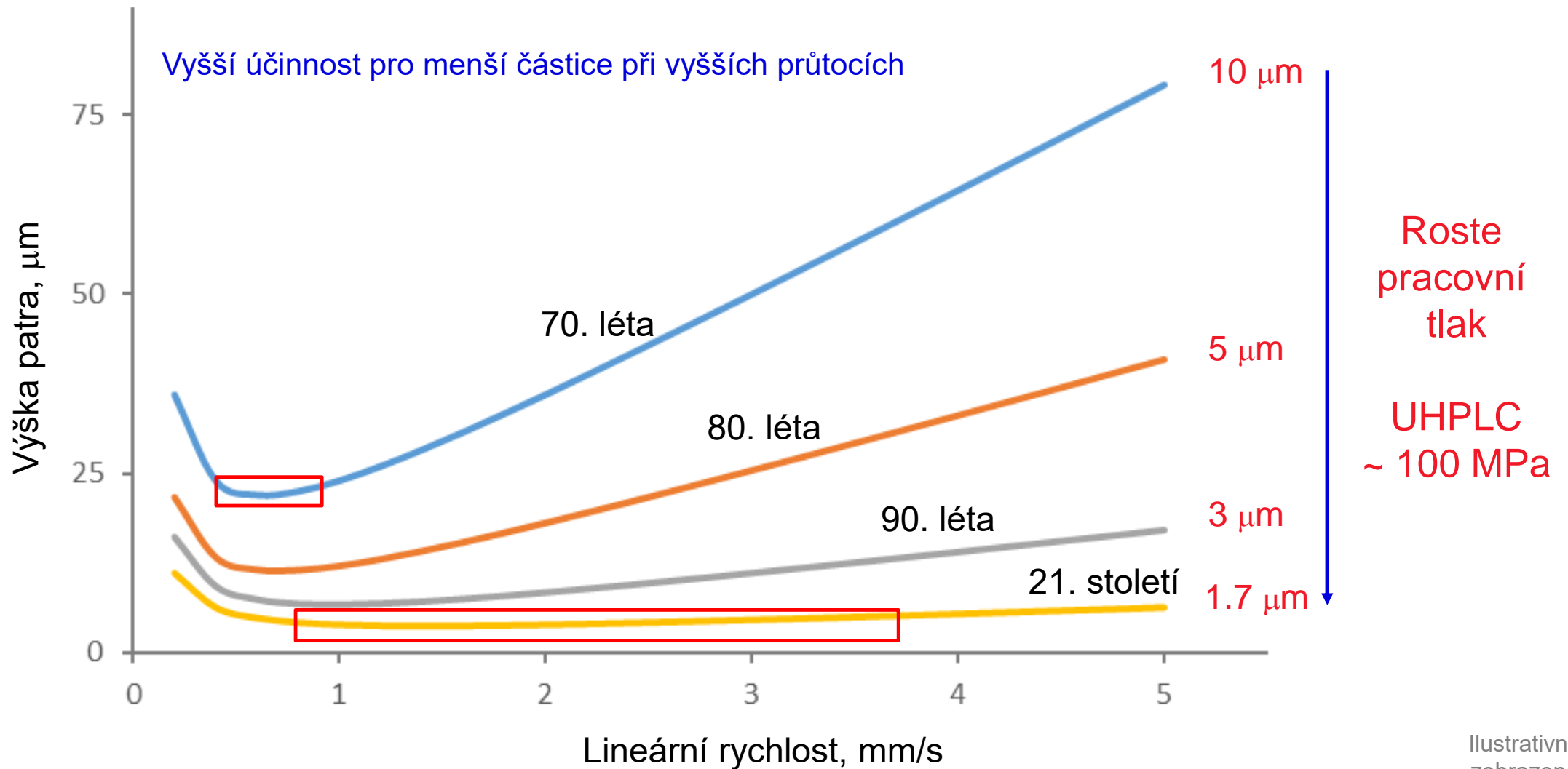
d_p – velikost částic

D_m – difúzní koeficient

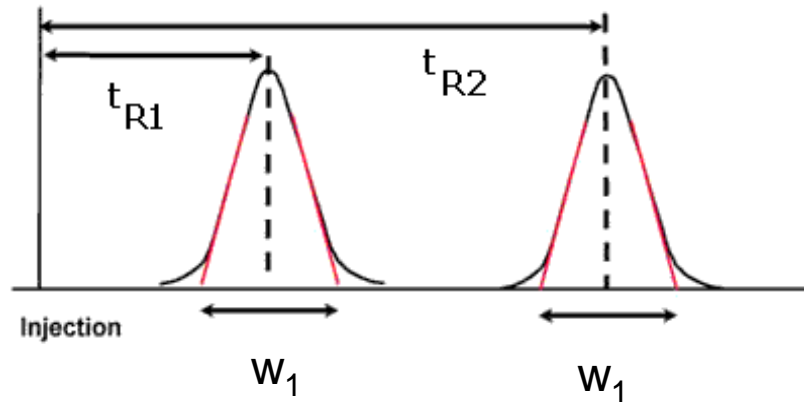
Velikost částic a účinnost



Velikost částic a účinnost



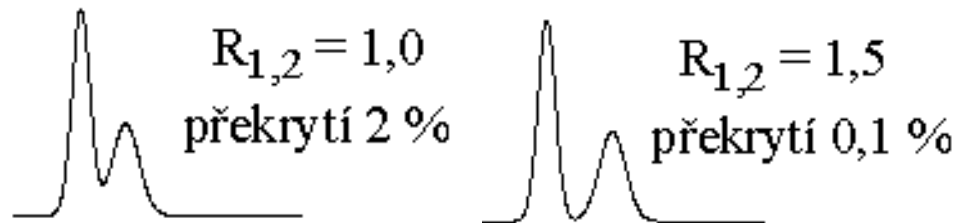
Rozlišení



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

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

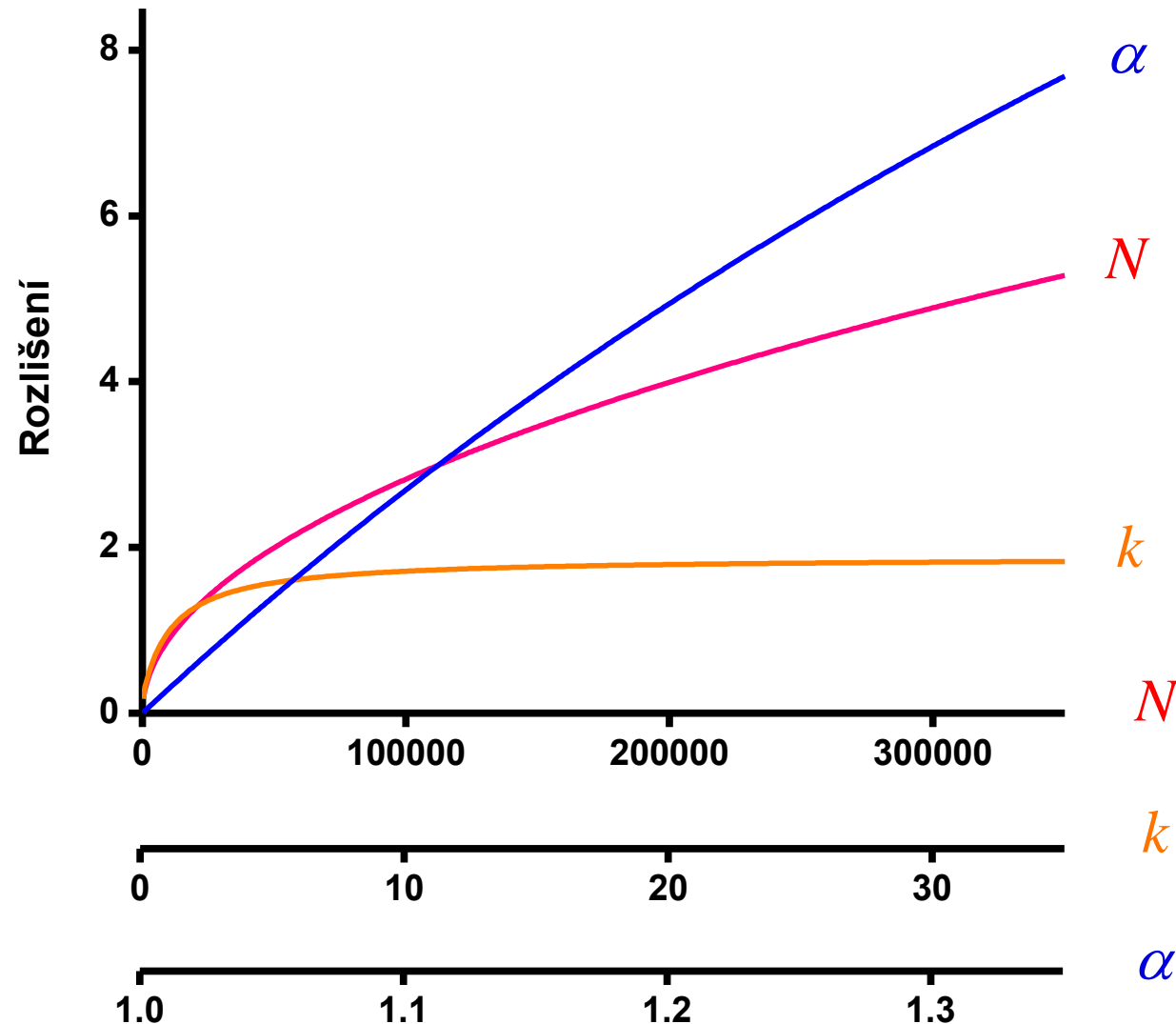
účinnost selektivita retence



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)

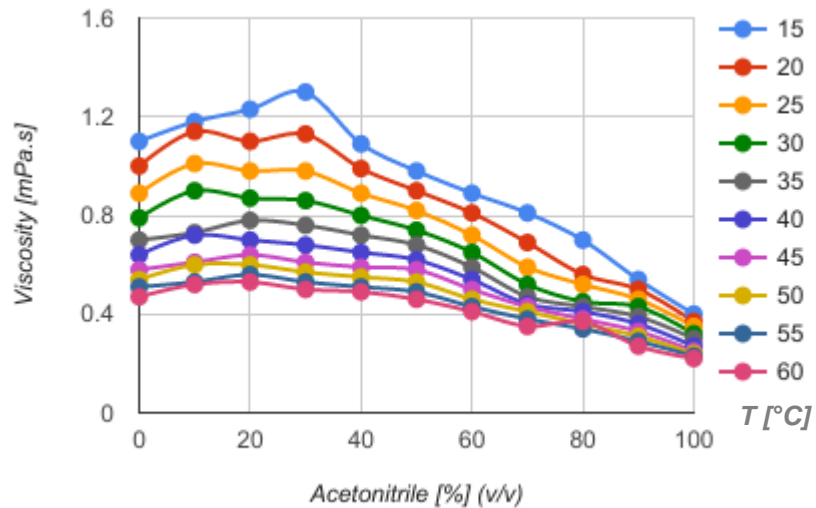
$N = 25\,000$, $k = 3$, $\alpha = 1.05$

MUNI
SCI

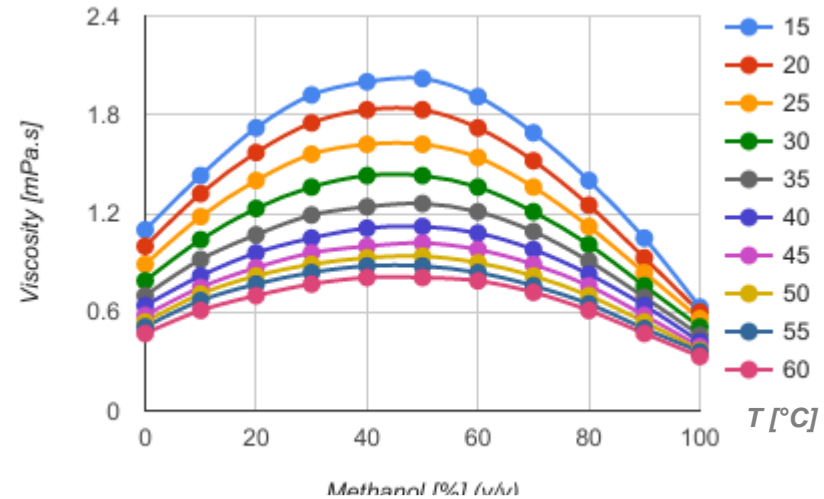
Vliv teploty

Viskozita mobilní fáze a permeabilita

Acetonitril



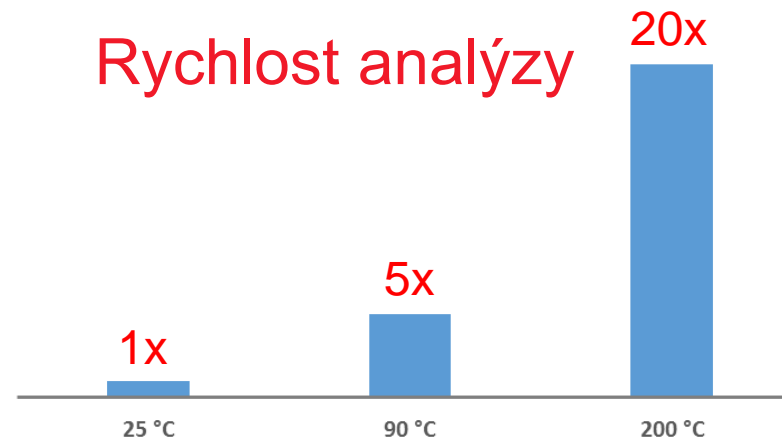
Metanol



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

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

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

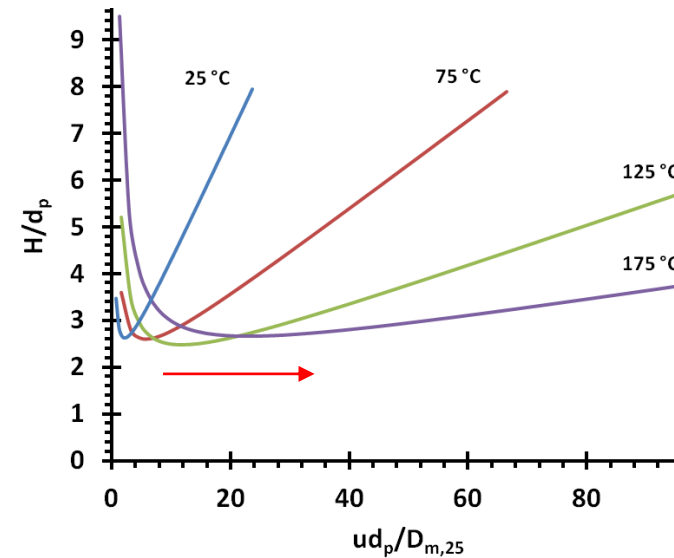
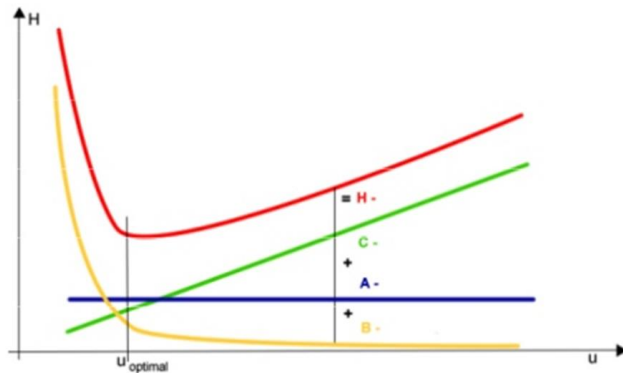
$$B \sim D_m \sim \frac{T}{\eta} \quad C \sim \frac{1}{D_m} \sim \frac{\eta}{T}$$

A – turbulentní difúze

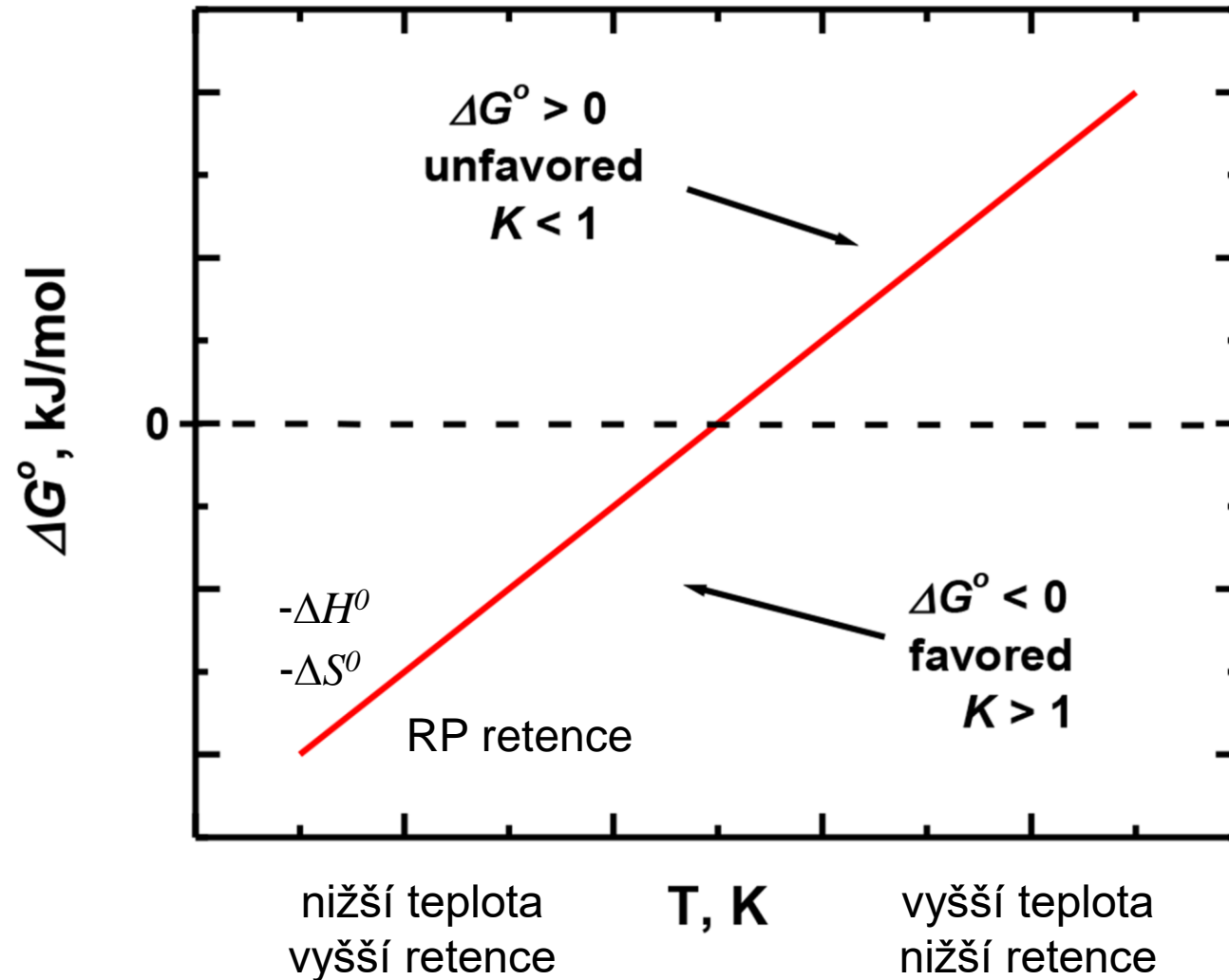
B – molekulová difúze

C – odpor proti převodu hmoty

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



Gibbsova energie

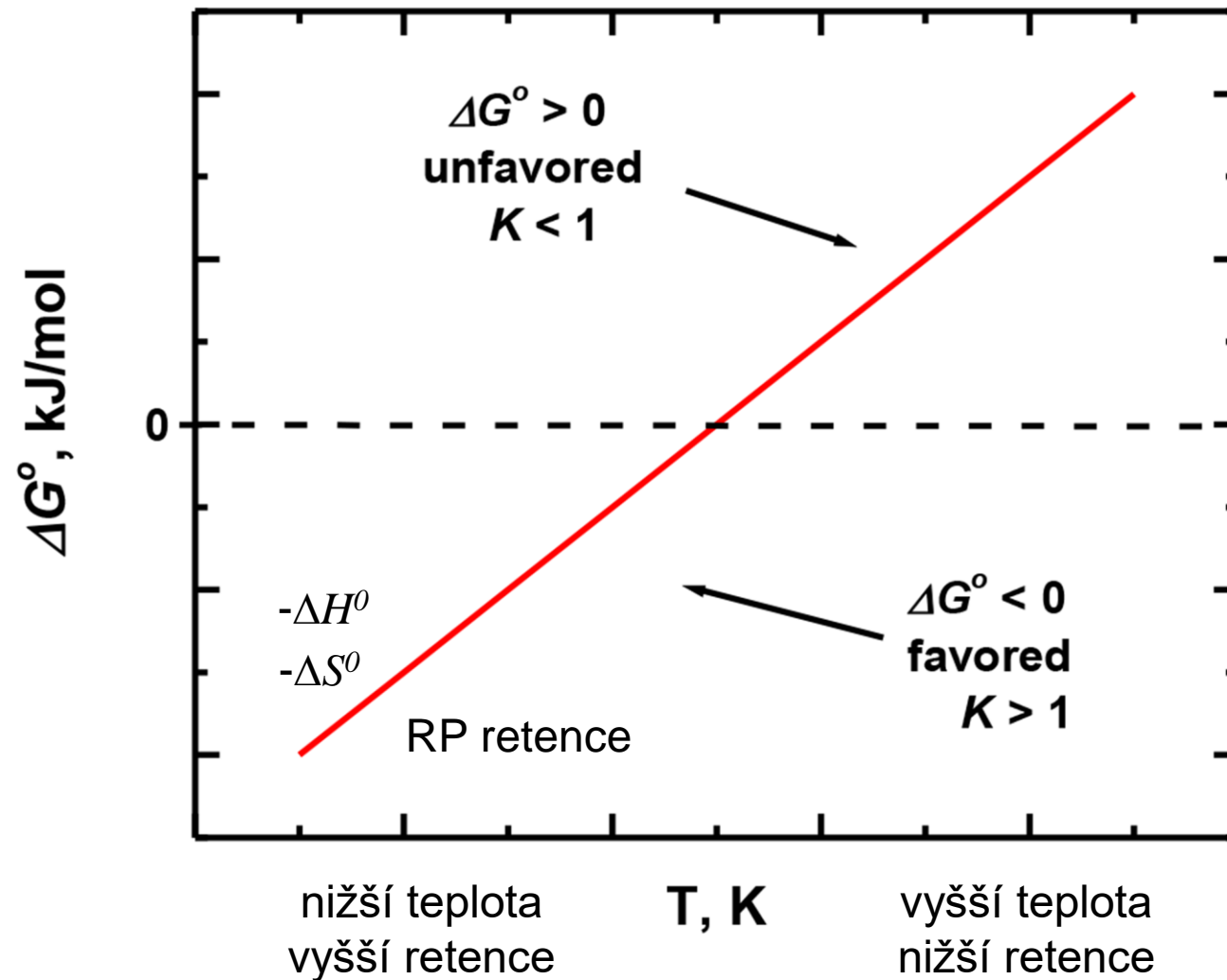


Gibbsova volná energie

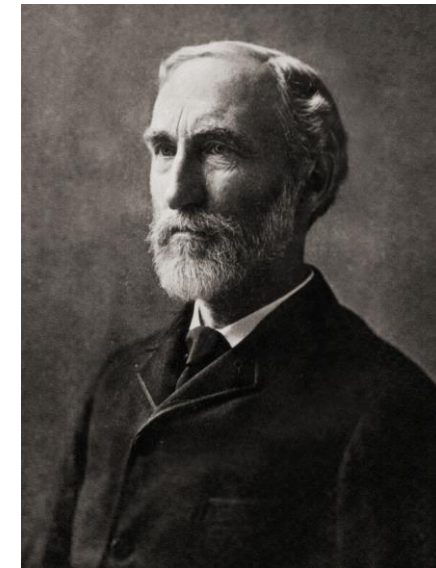
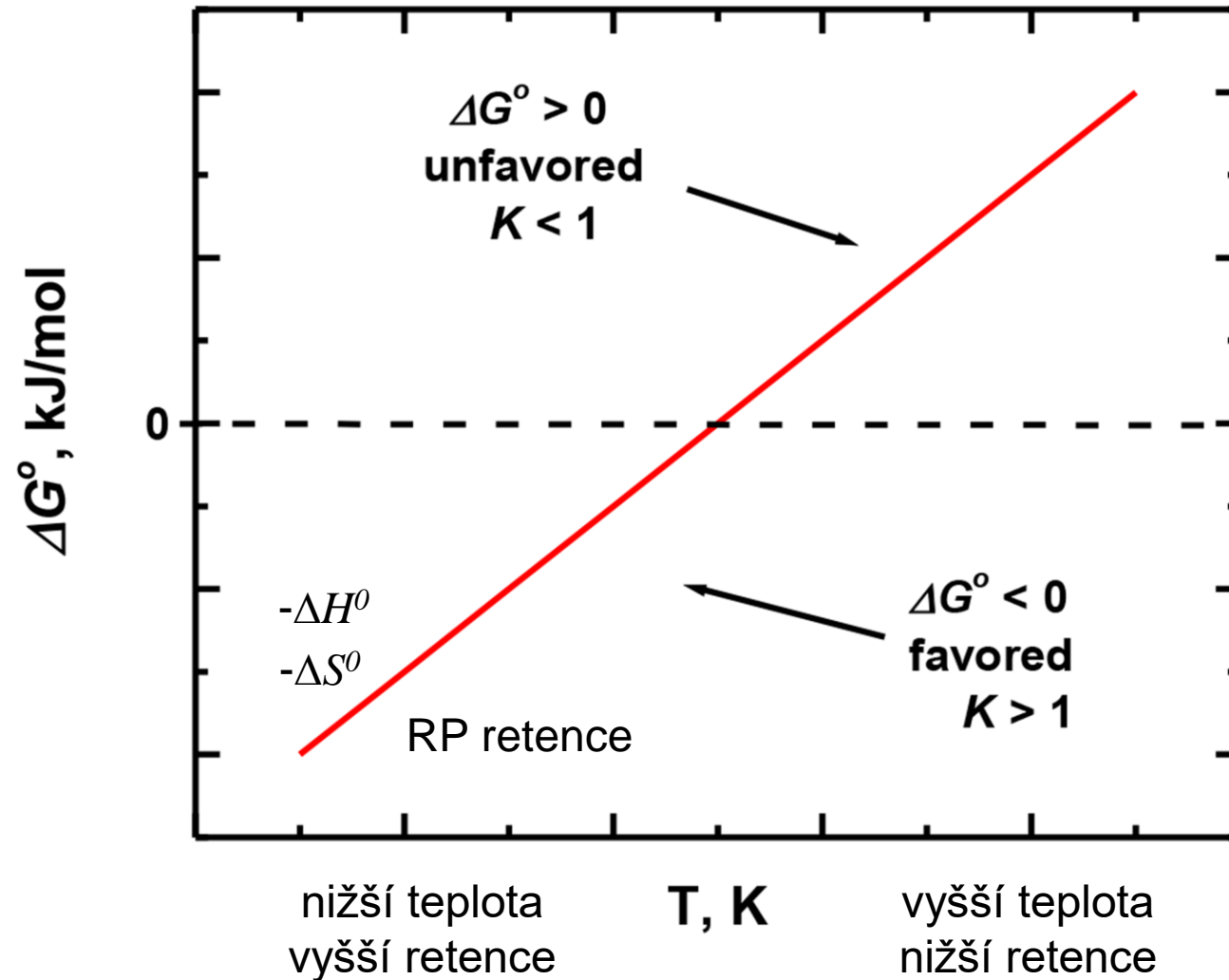
$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K$$

Distribuční koeficient

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

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \beta \quad \Phi = \frac{1}{\beta} = \frac{V_S}{V_M}$$

Standardní molární entalpie

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

převodu látky mezi stacionární a mobilní fází

Standardní molární entropie

Van't Hoffova rovnice

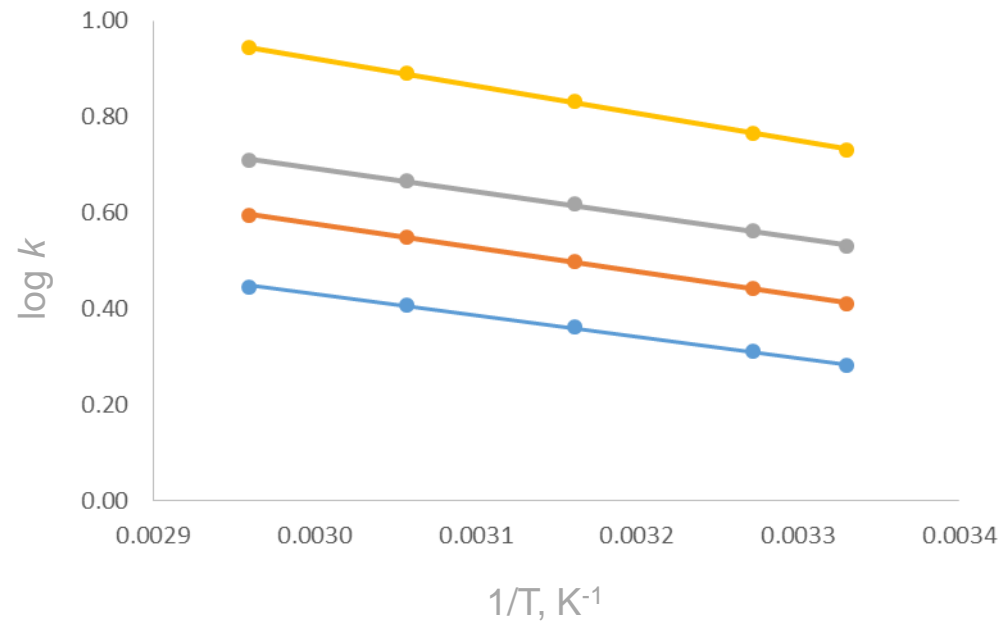
$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M}$$

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R}\right) \quad \ln K = \ln k\beta \quad \beta = \frac{V_{Mobilní}}{V_{Stacionární}}$$

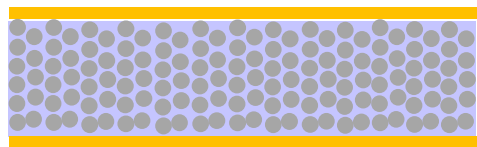
Fázový poměr

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

van't Hoffova rovnice



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



Konstantní při různých teplotách (?)

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

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

směrnice

úsek

entalpický
příspěvek

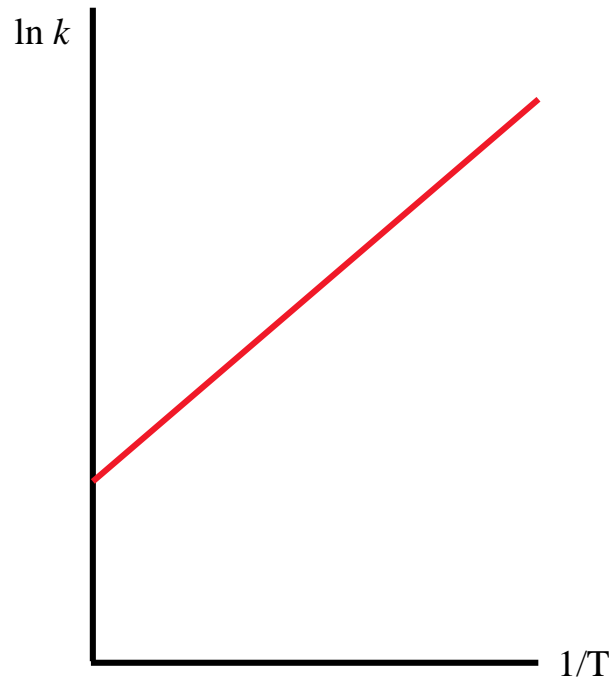
entropický
příspěvek

ΔH^0

ΔS^0

Entalpie vs. Entropie

System A

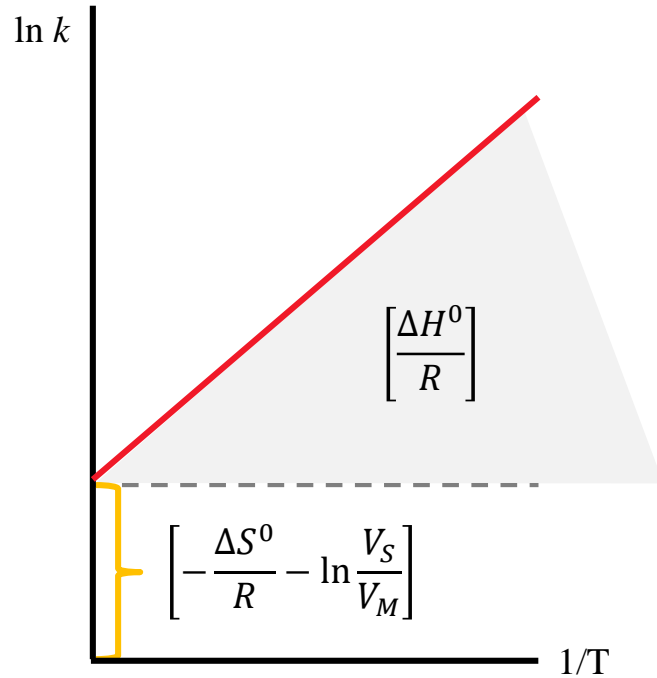


System B



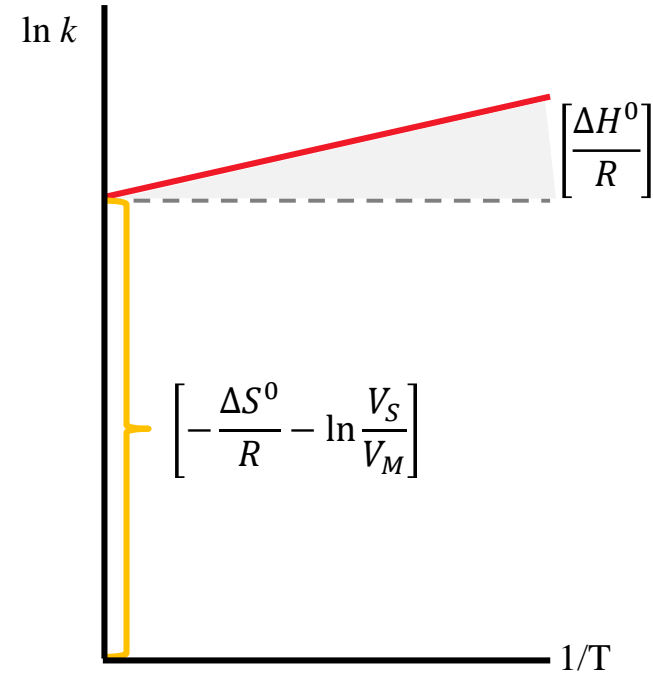
Entalpie vs. Entropie

System A



Dominantní vliv **entalpie**
Malý vliv entropie

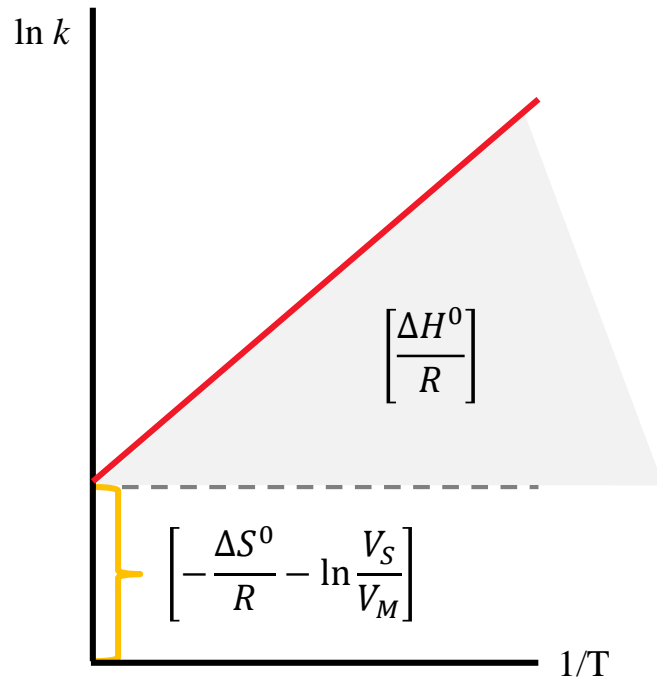
System B



Malý vliv entalpie
Velký vliv **entropie**

Entalpie vs. Entropie

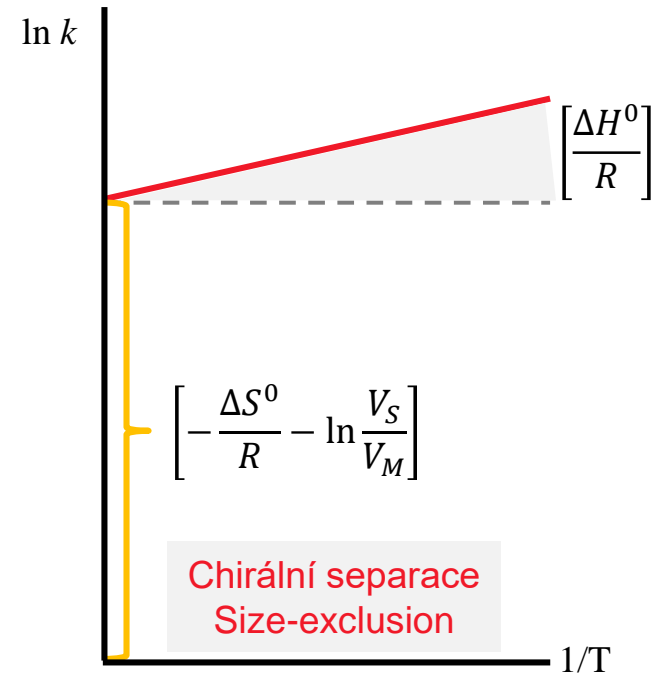
System A



Dominantní vliv **entalpie**
Malý vliv entropie

Rozdělení **kontrolují** molekulární síly,
interakce vzorku se stacionární fází

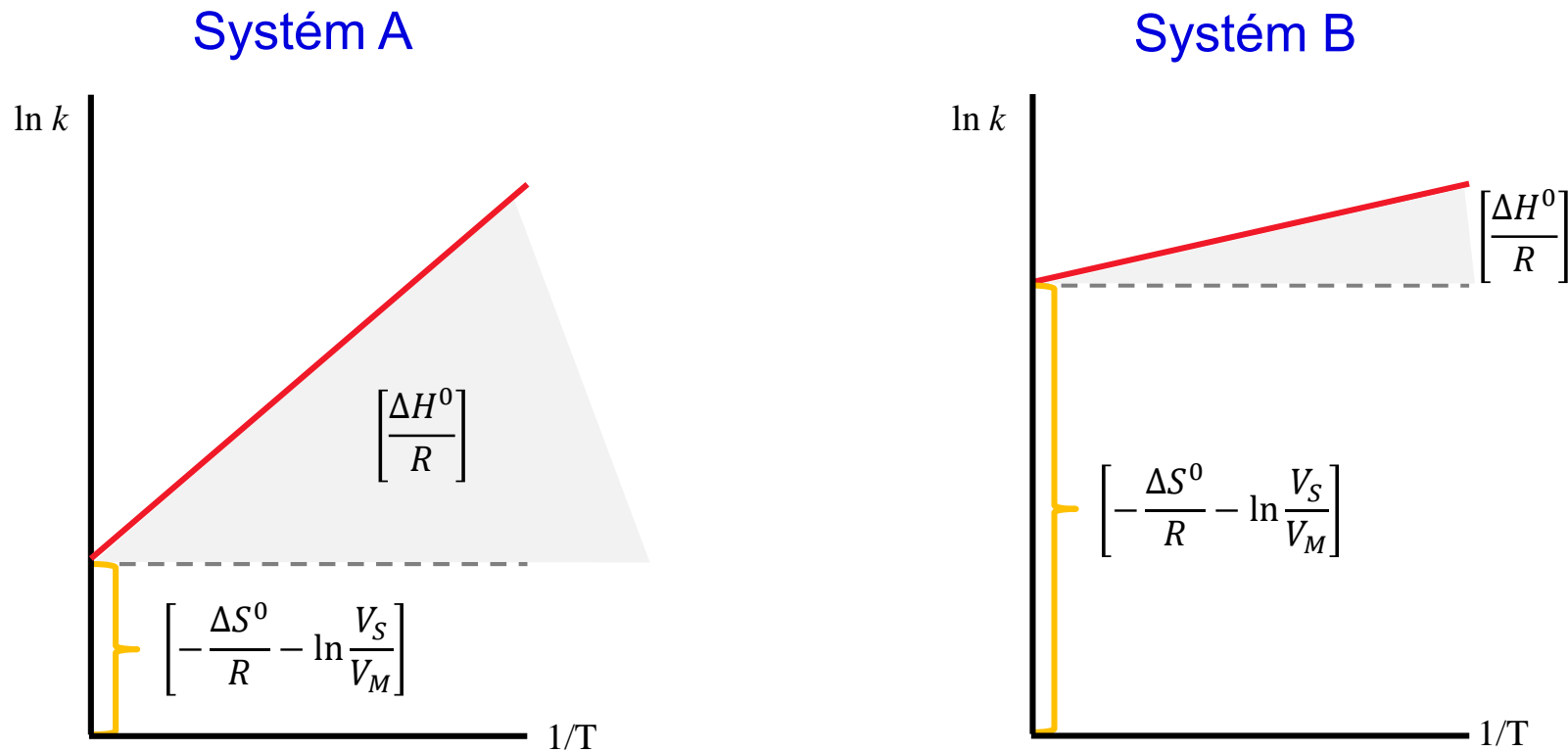
System B



Malý vliv entalpie
Velký vliv **entropie**

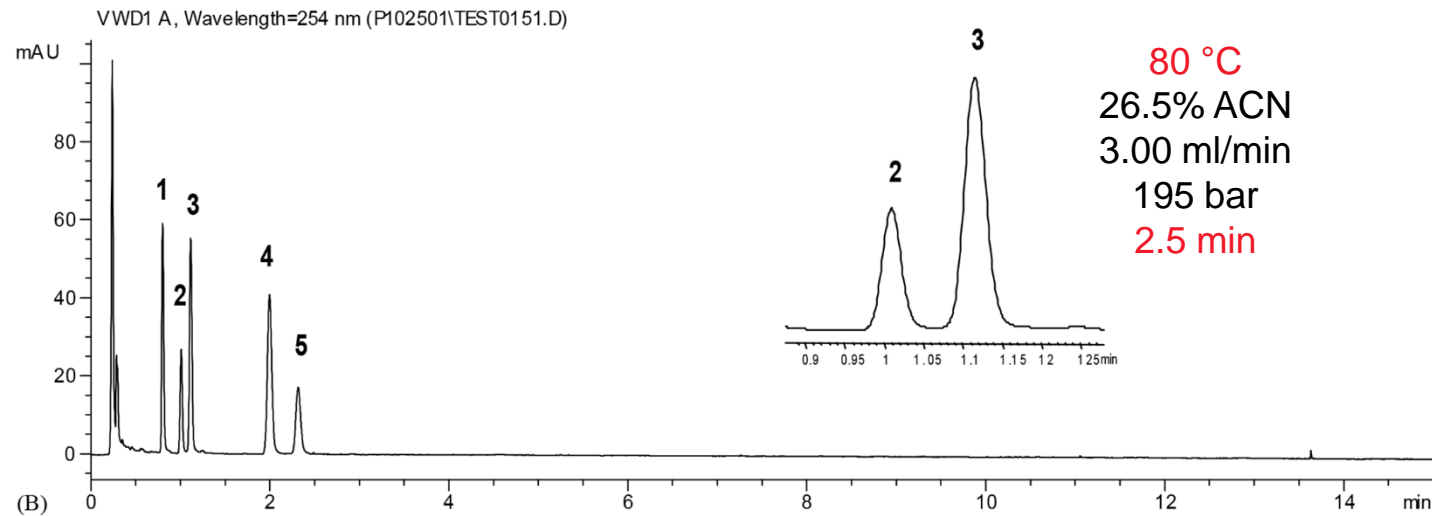
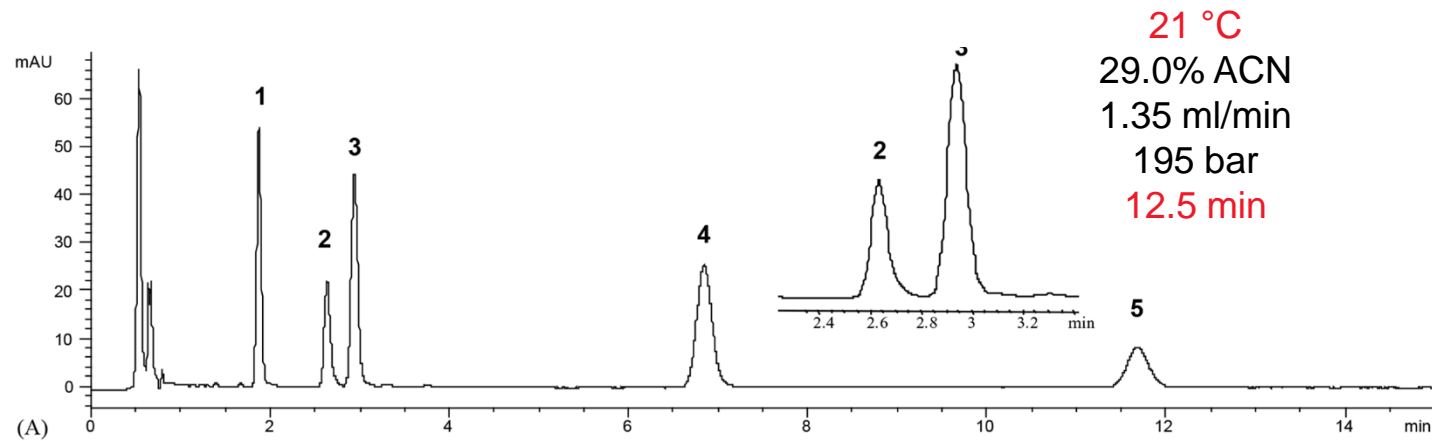
Rozdělení **kontrované** (náhodnou)
entropií. **Žádné interakce**. Větší záporná
entropie – větší retence (menší chaos).

Termodynamický popis retence

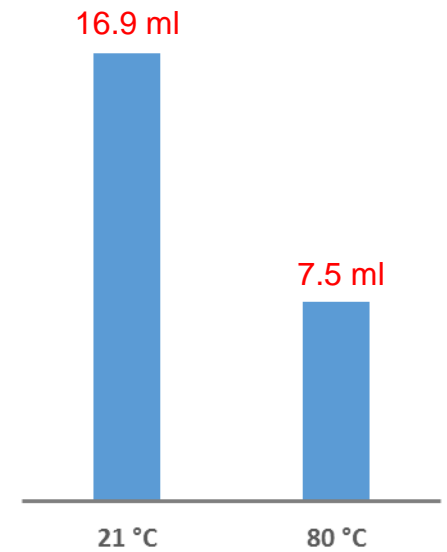


Termodynamika retence popisuje, že existují dva hlavní mechanismy. **Nelze** ale přímo **odvodit**, jak lze takto **retenci kontrolovat**. To se musí dít/studovat skrze rozdělovací koeficient (K) ovlivněný molekulárními interakcemi a poměr objemů stacionární a mobilní fáze (V_S/V_M), tedy geometrií stacionární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

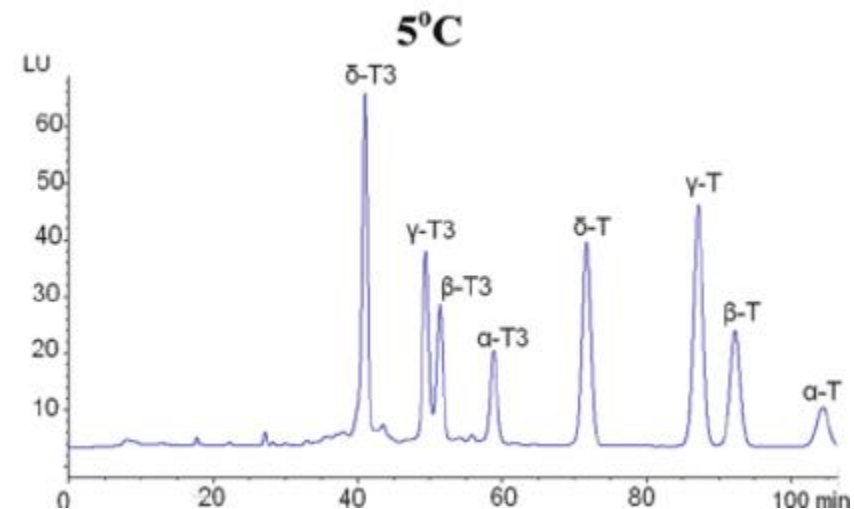
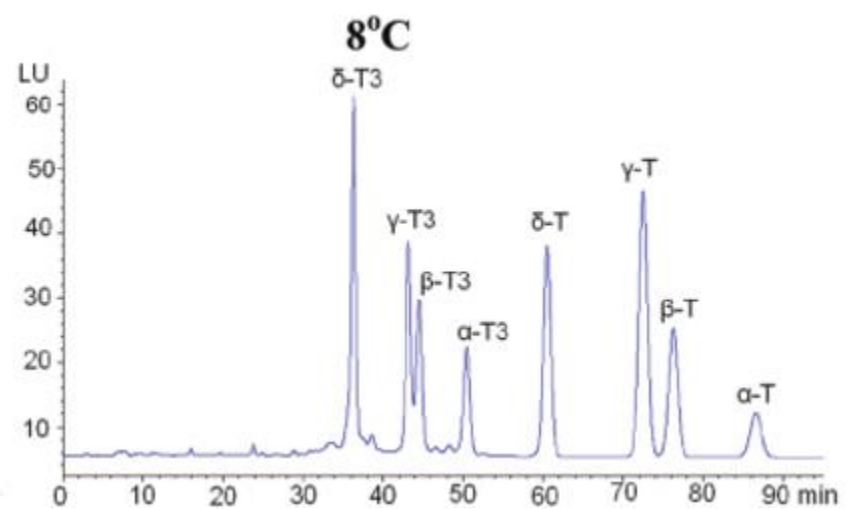
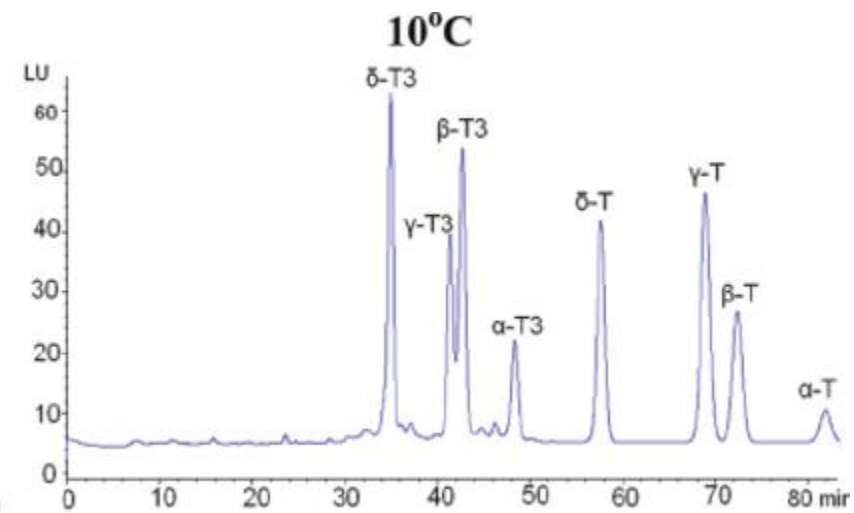
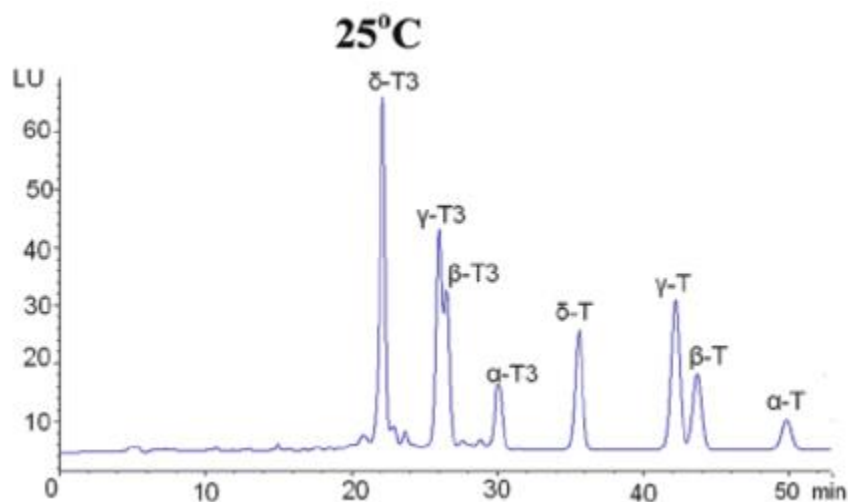
Antihistaminika



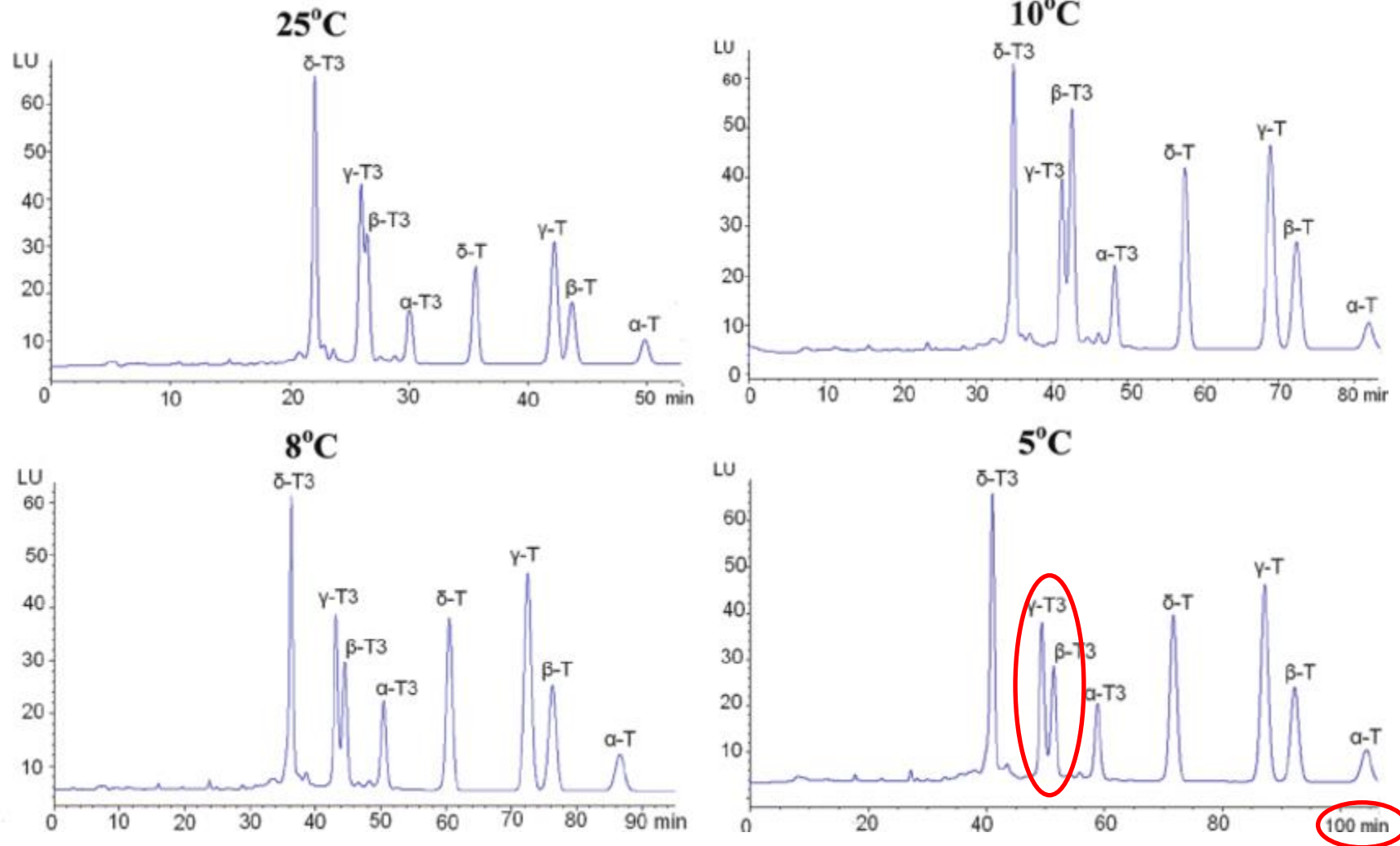
Spotřeba
mobilní fáze



Tokoferoly a tokotrienoly



Tokoferoly a tokotrienoly

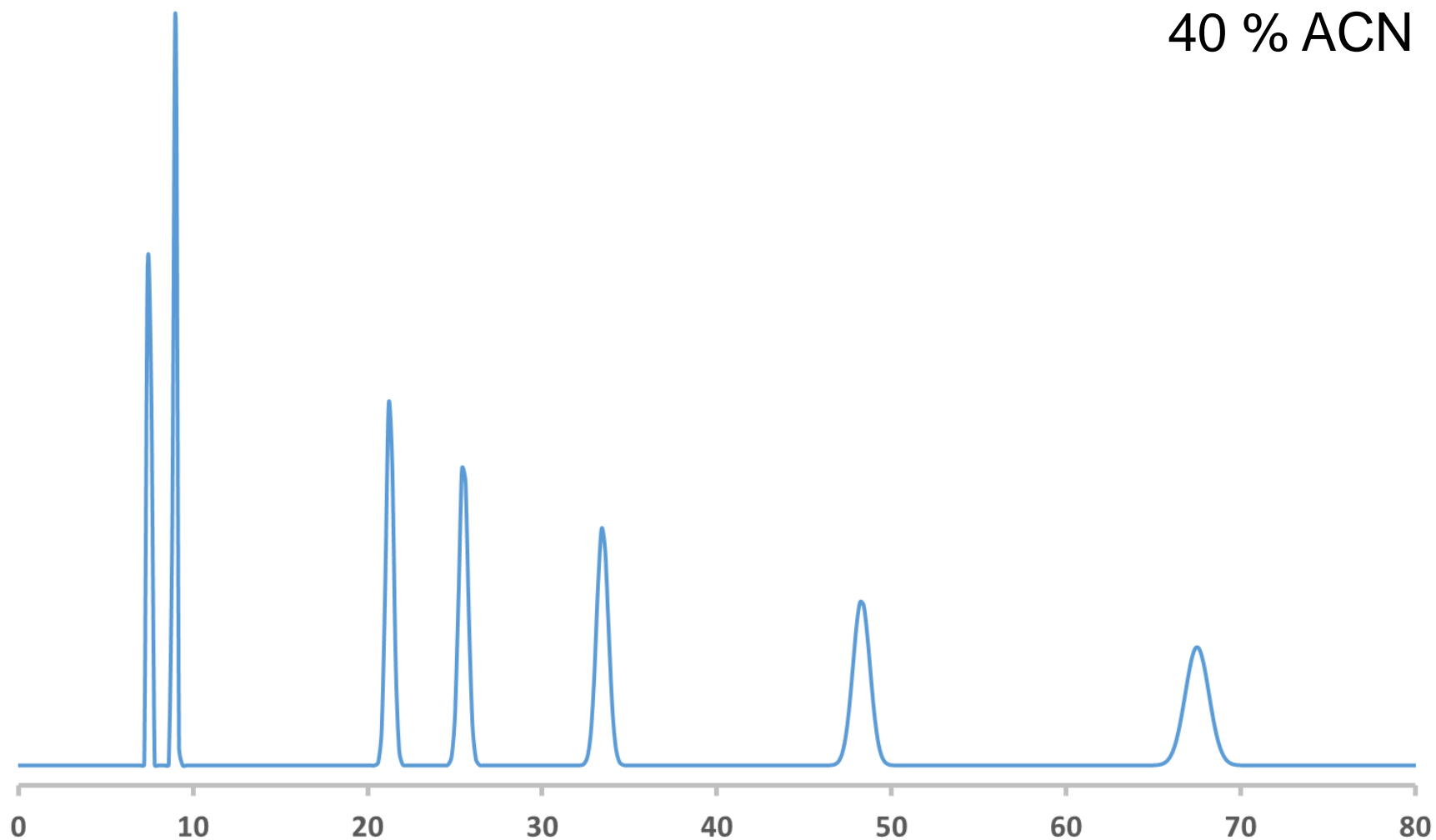


M U N I
S C I

Gradientová eluce

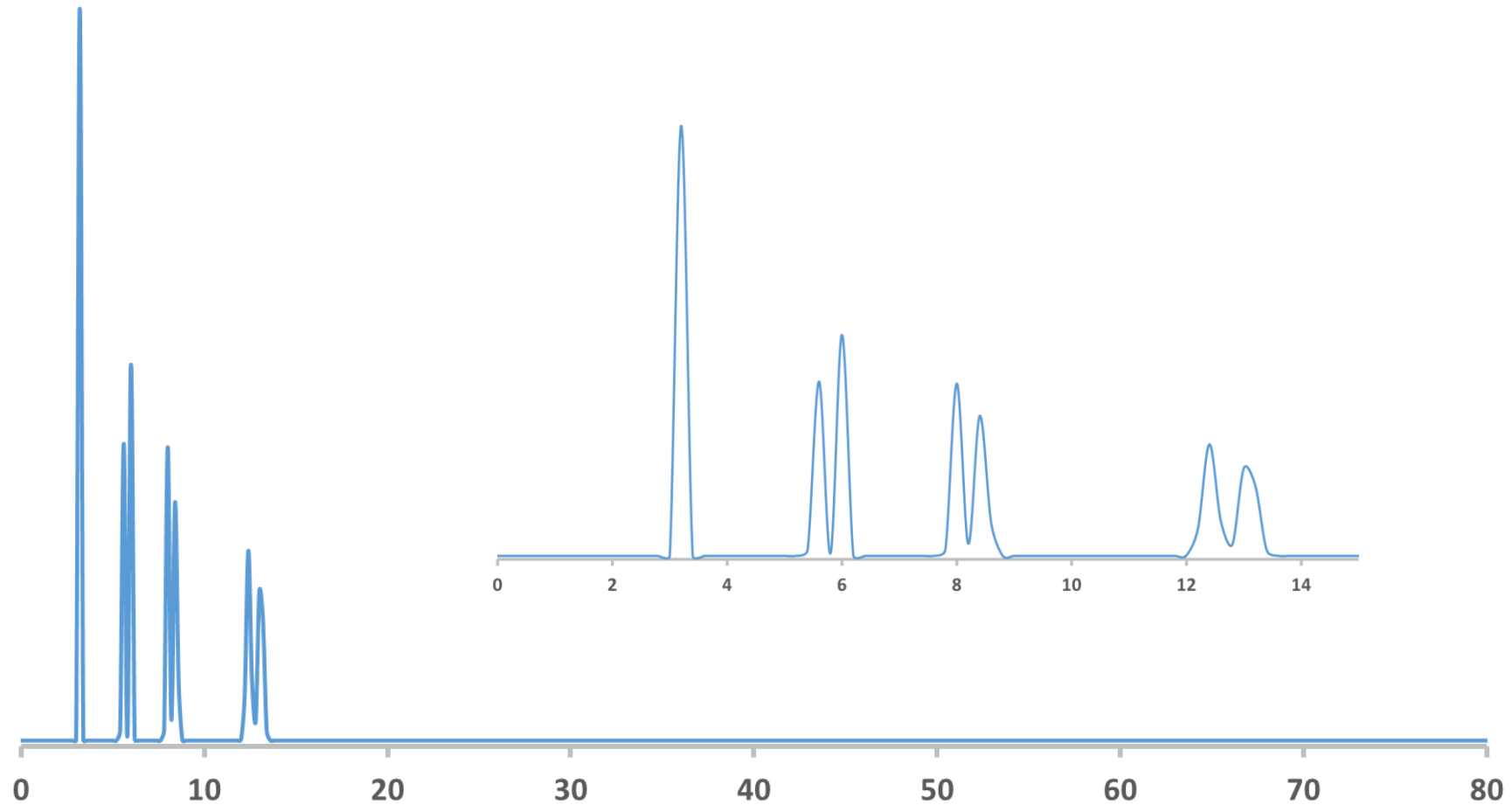
Konstantní složení mobilní fáze

40 % ACN



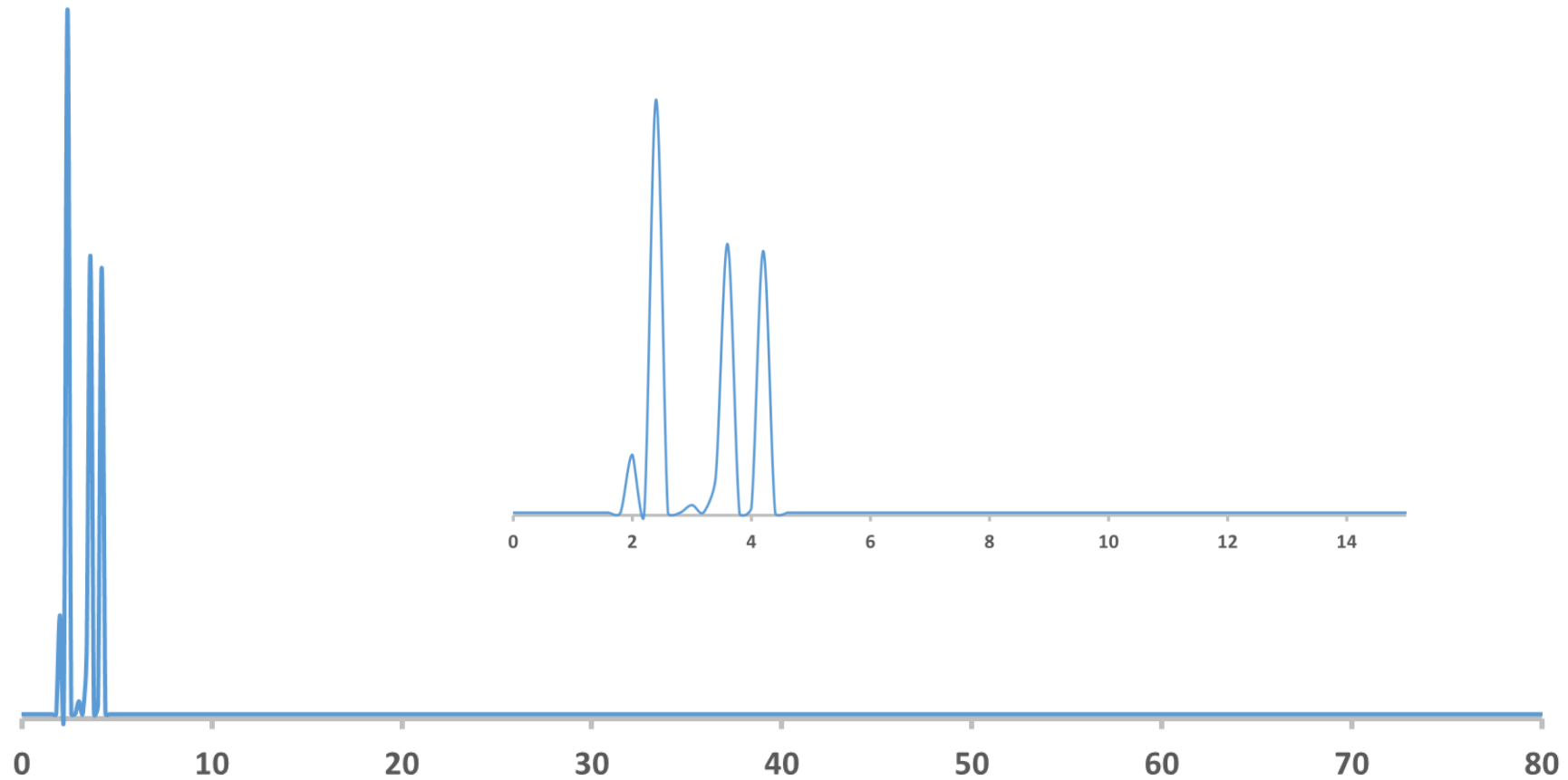
Konstantní složení mobilní fáze

60 % ACN



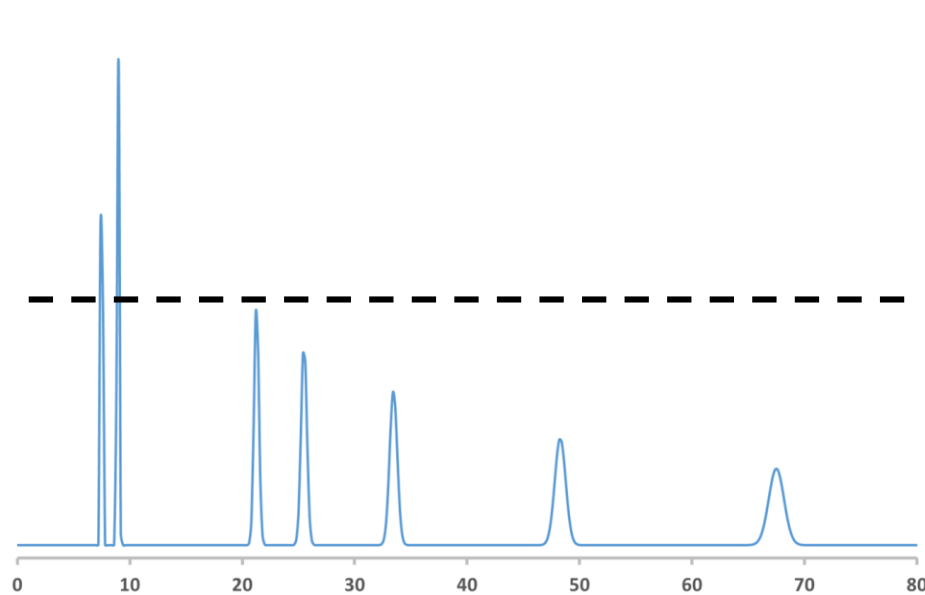
Konstantní složení mobilní fáze

80 % ACN



Chromatografická eluce

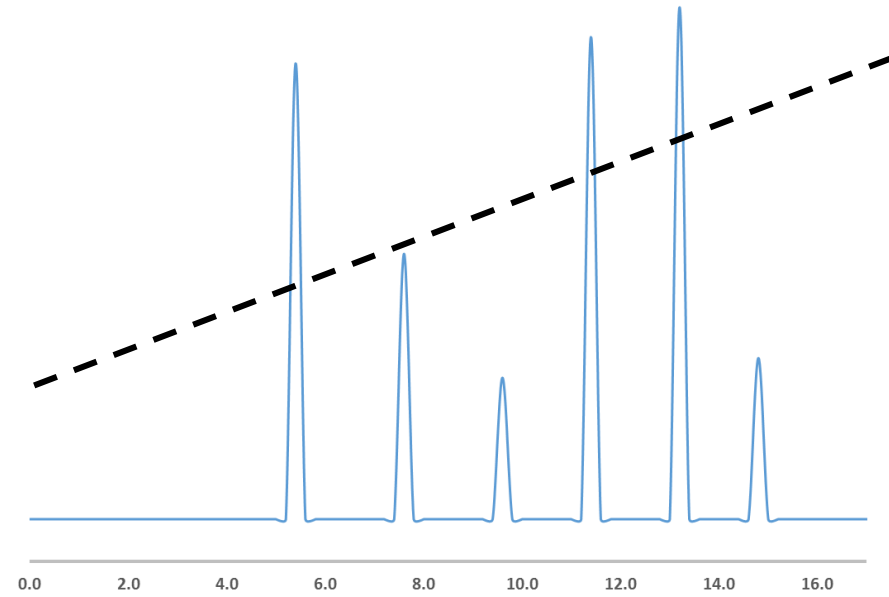
Izokratická eluce



40 % acetonitrilu

70 minut

Gradientová eluce



20 – 80 % acetonitrilu ve 20 min

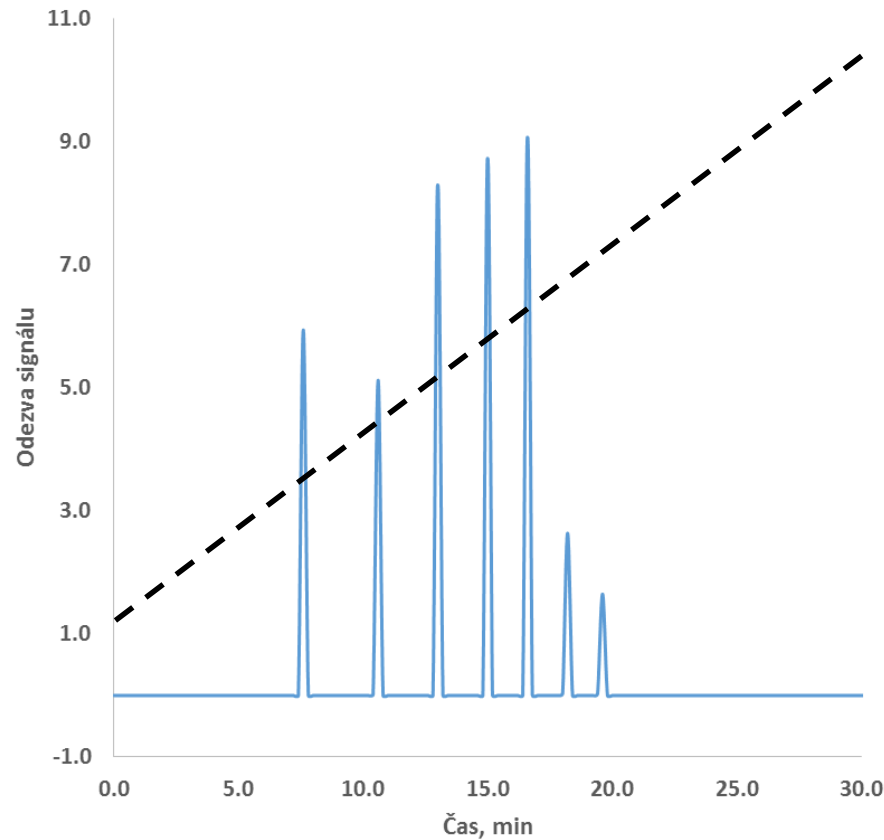
15 minut

Kontinuální změna složení mobilní fáze. Snížení retence více zadržovaných látek

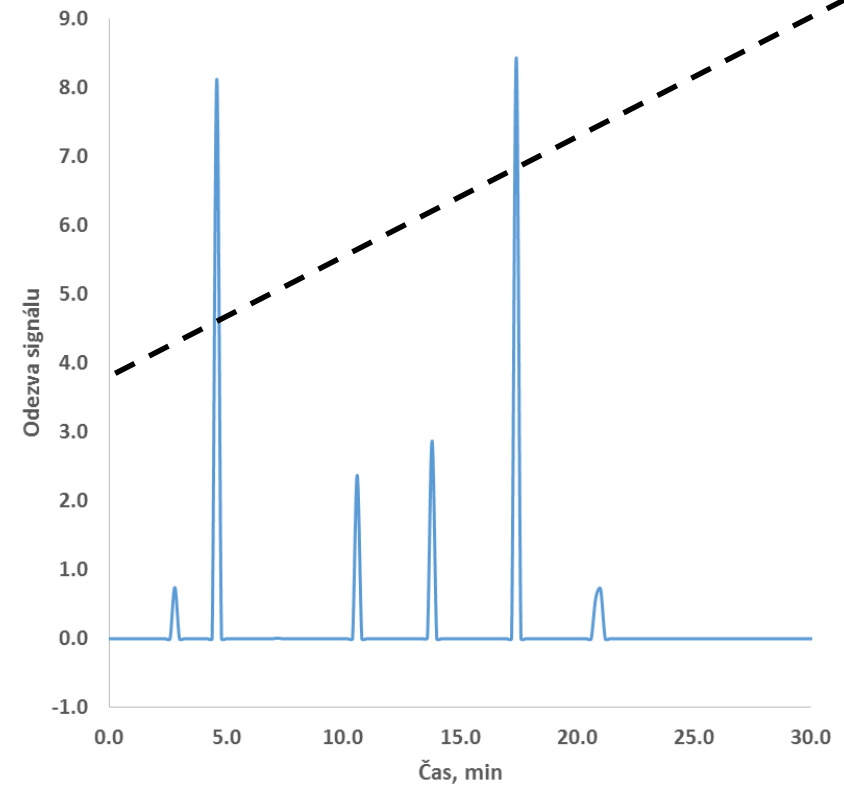
Počáteční koncentrace

A

5 – 80 % za 30 minut



25 – 80 za 30 min

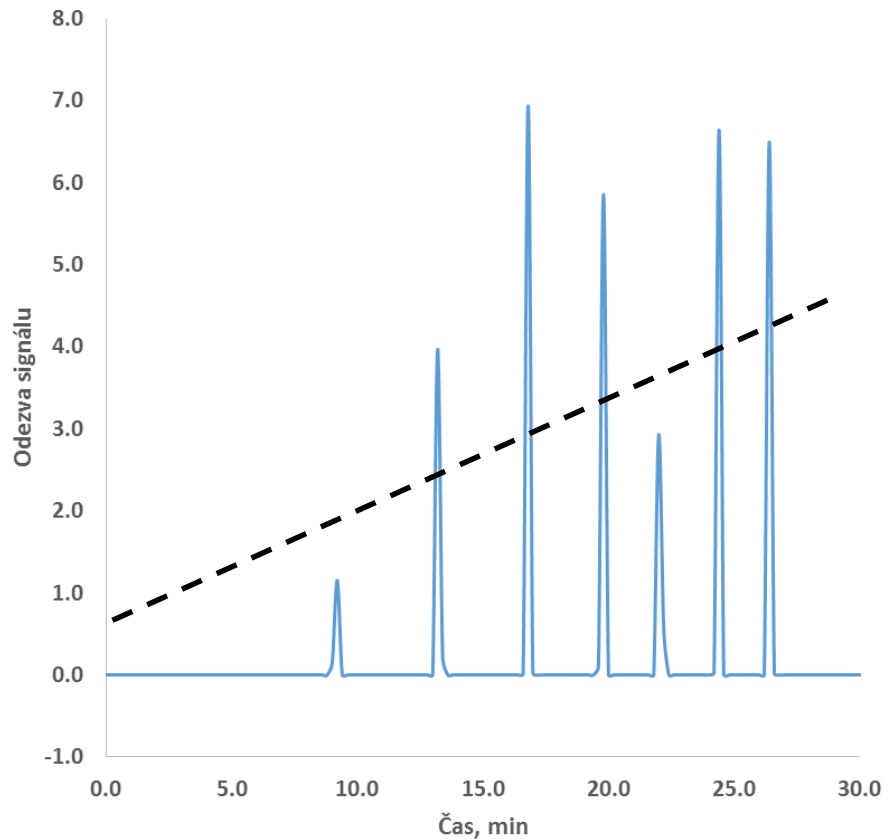


Čím vyšší, tím rychlejší eluce málo zadržovaných látek

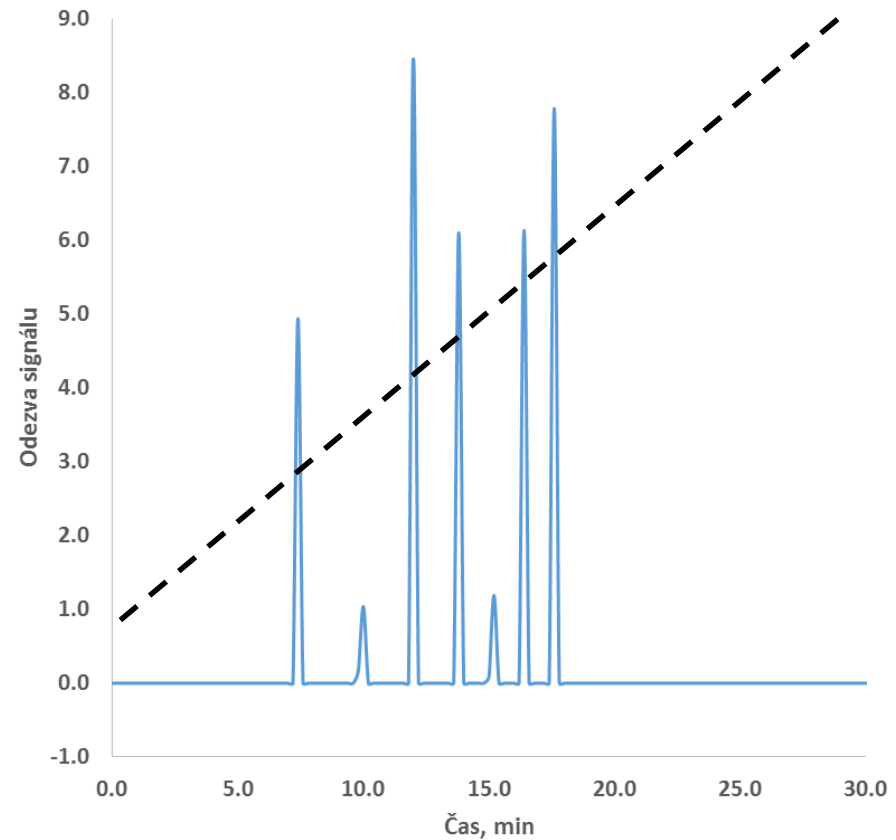
Koncová koncentrace



5 – 60 % za 30 minut



5 – 90 za 30 min

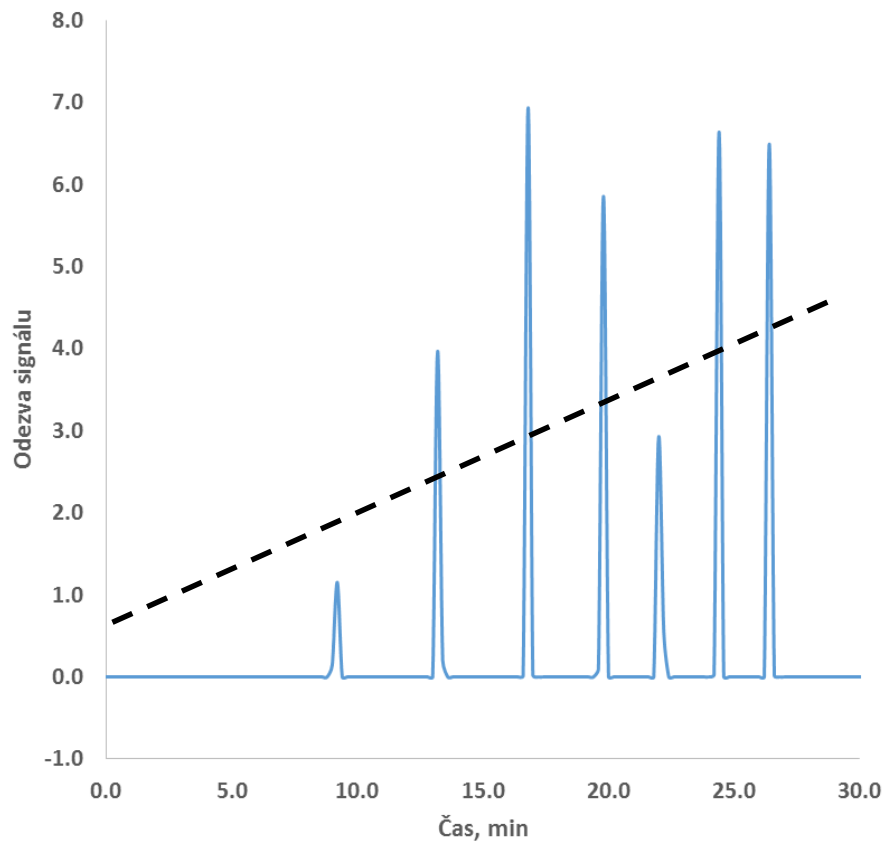


Čím vyšší, tím rychlejší eluce více zadržovaných látek

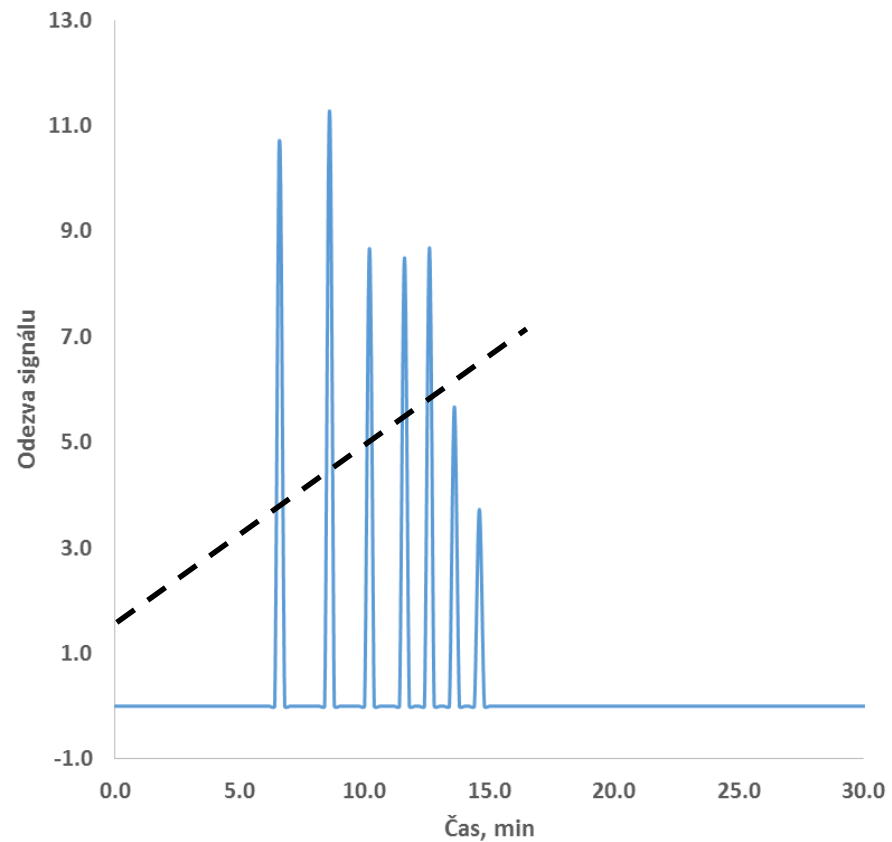
Čas gradientu

t_G

5 – 60 % za 30 minut



5 – 60 % za 15 min



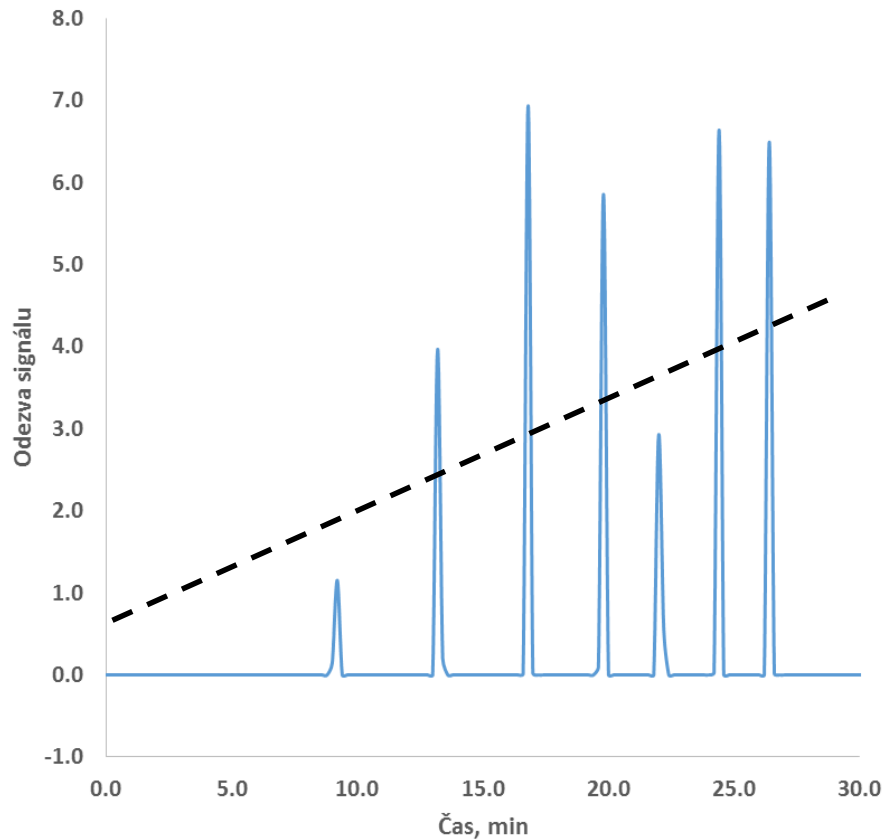
Čím vyšší, tím rychlejší eluce látek

Strmost gradientu

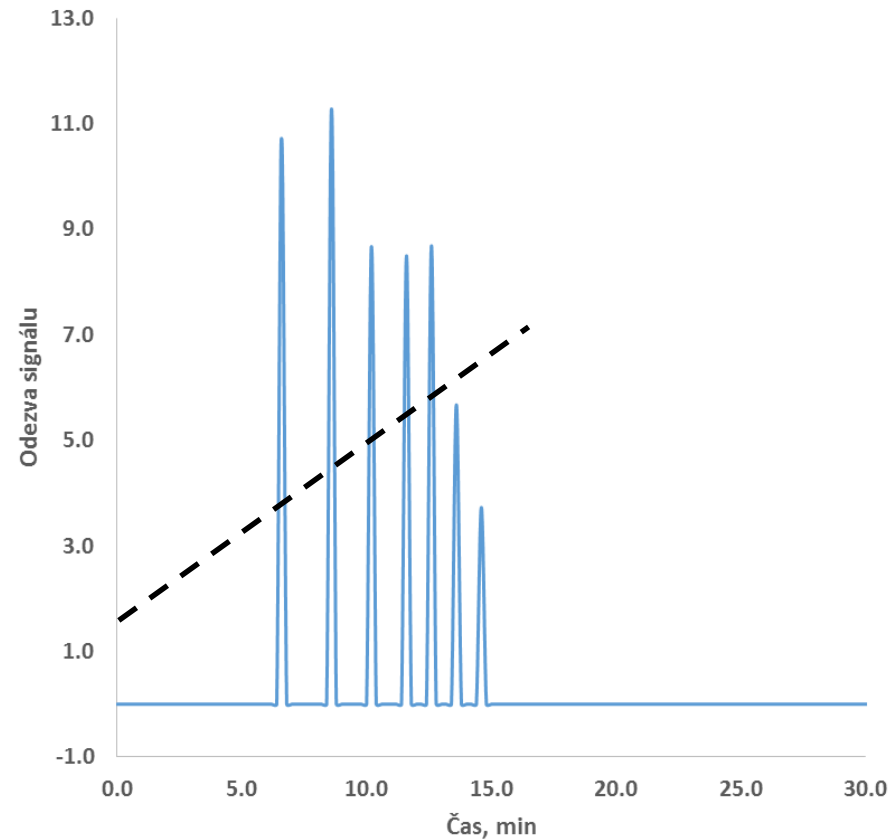
$$B = \frac{\varphi_K - A}{t_G}$$

B

5 – 60 % za 30 minut



5 – 60 % za 15 min



Čím vyšší, tím rychlejší eluce látek

Převod metody

Základní předpoklad

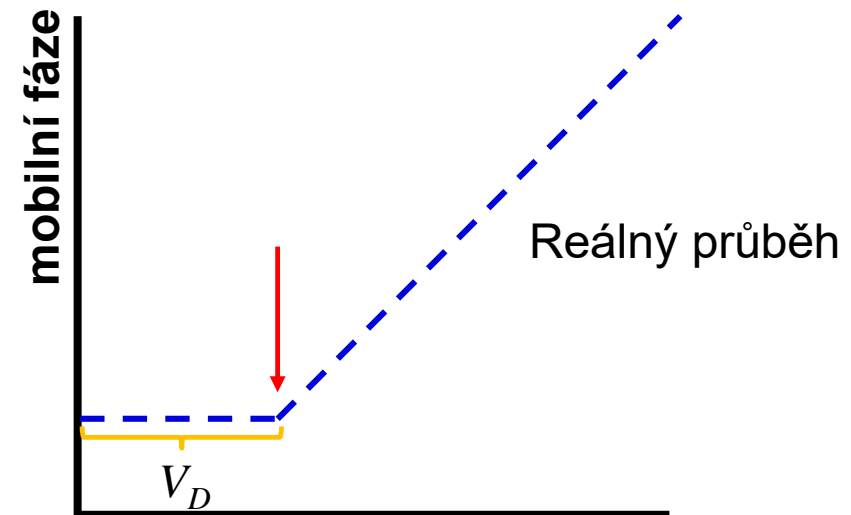
$$\frac{V_M}{V_G} = \frac{V_M}{t_G F_m} = \frac{d_c^2 L}{t_G F_m} = \textit{konstanta}$$

Průměr
a délka kolony

Pozor na zpoždění gradientu

- Použít v rovnicích popisujících retenci
- 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

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

Dávkovaný objem

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

Profil gradientu

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

Účinnost

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

Pracovní tlak

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

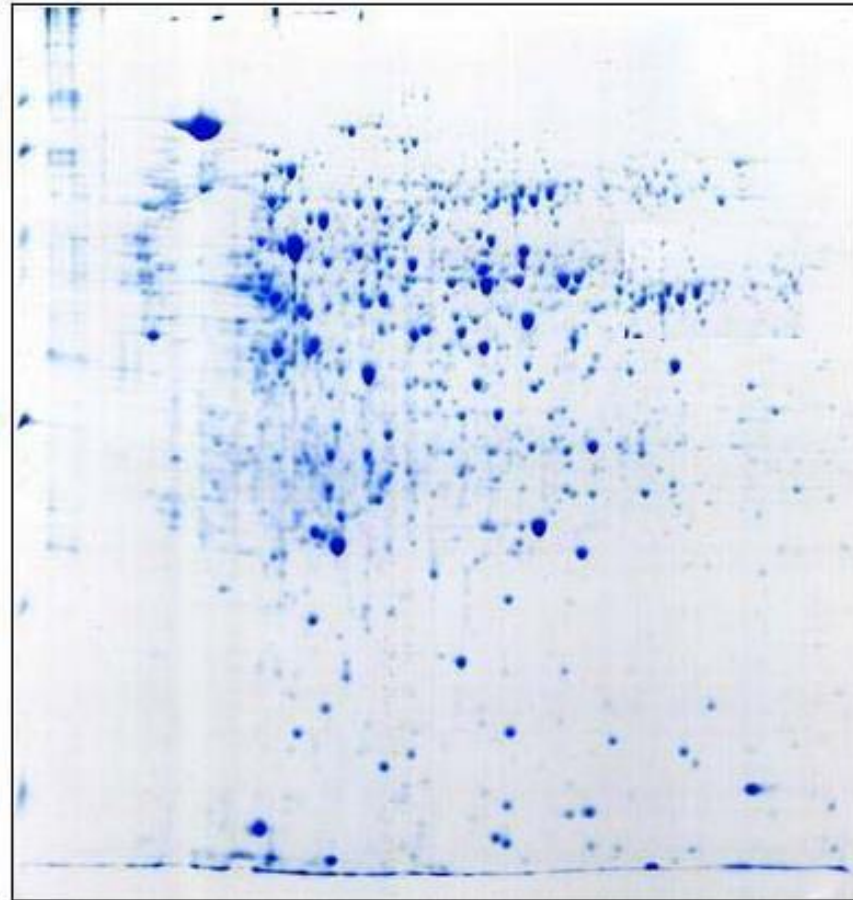
System 2



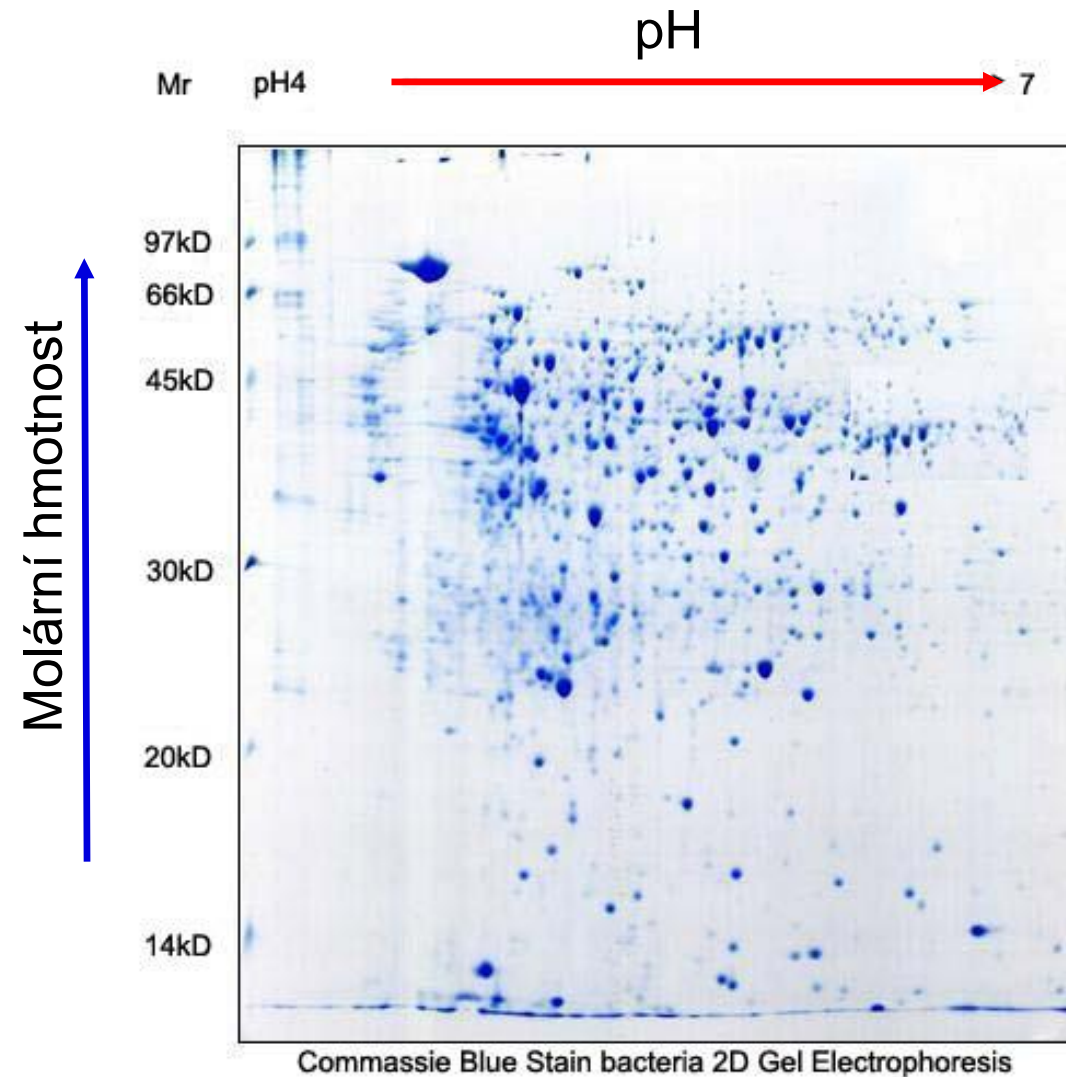
M U N I
S C I

Vícerozměrné separace

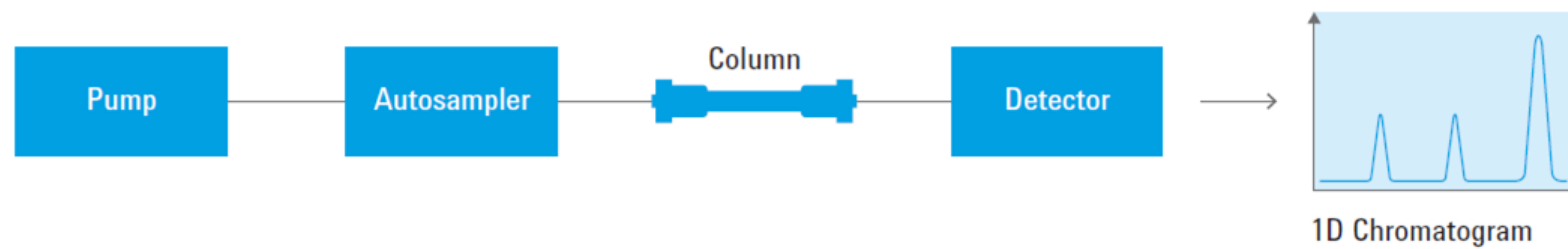
Moderní umění (?)



(2D) gelová elektroforéza

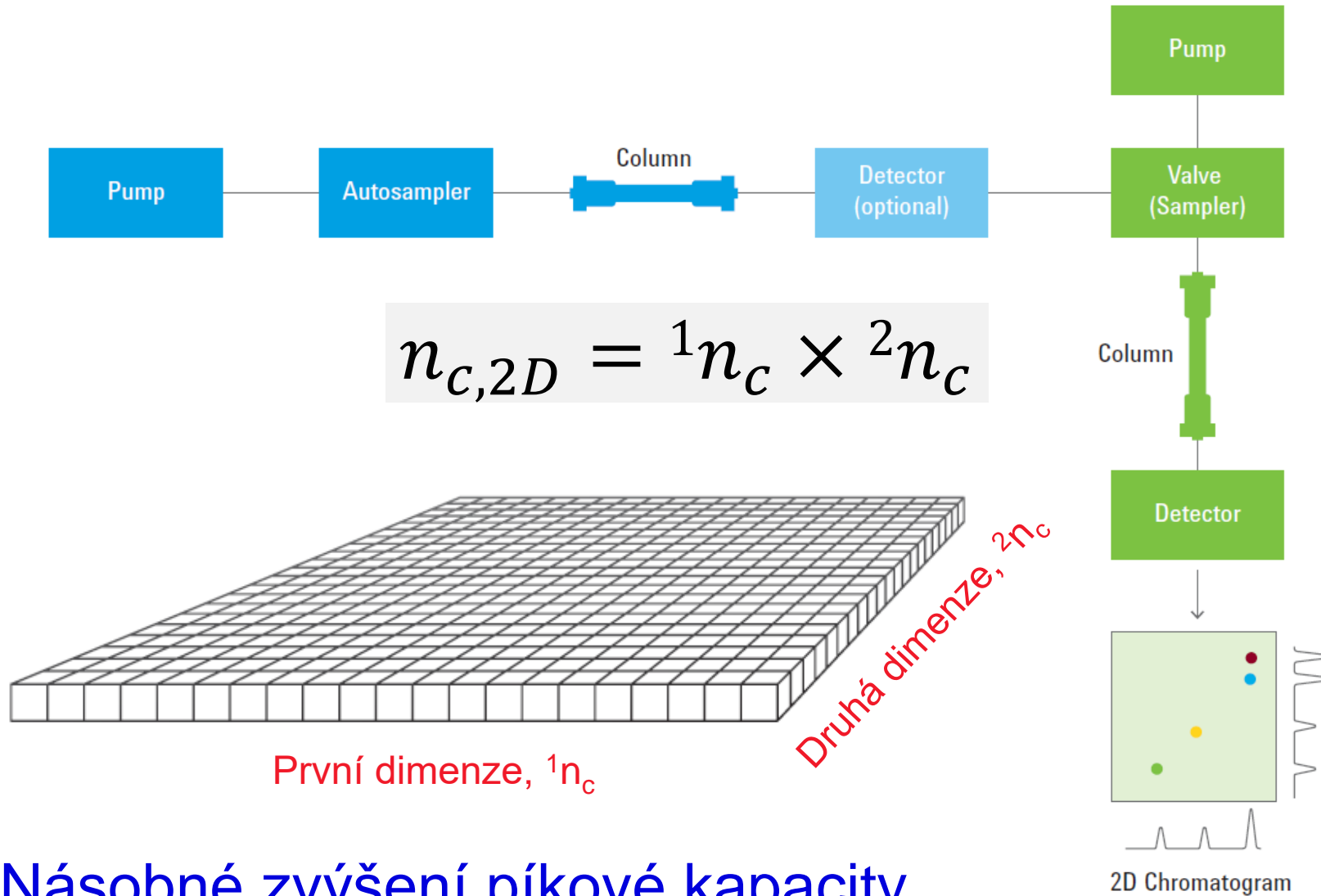


1D HPLC



První dimenze, 1n_c

2D HPLC



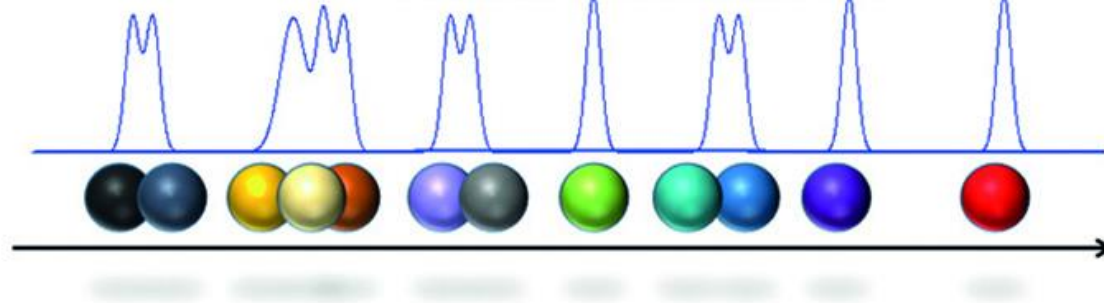
Násobné zvýšení píkovej kapacity

Comprehensive 2D-LC

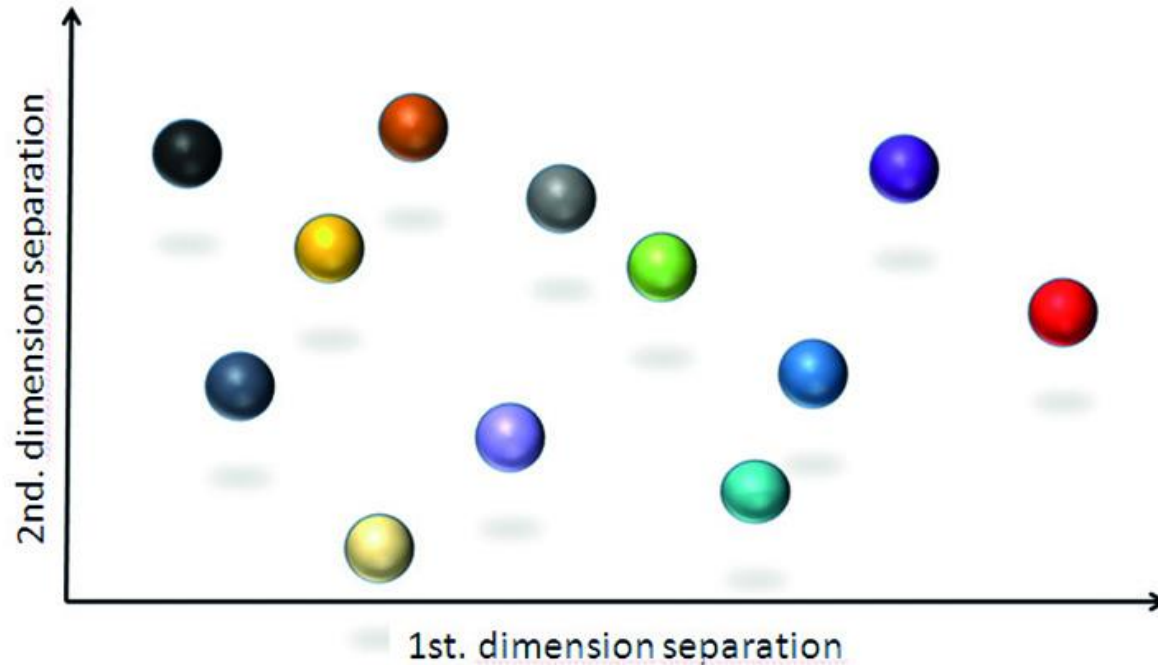
Complex sample



One-Dimensional Separation

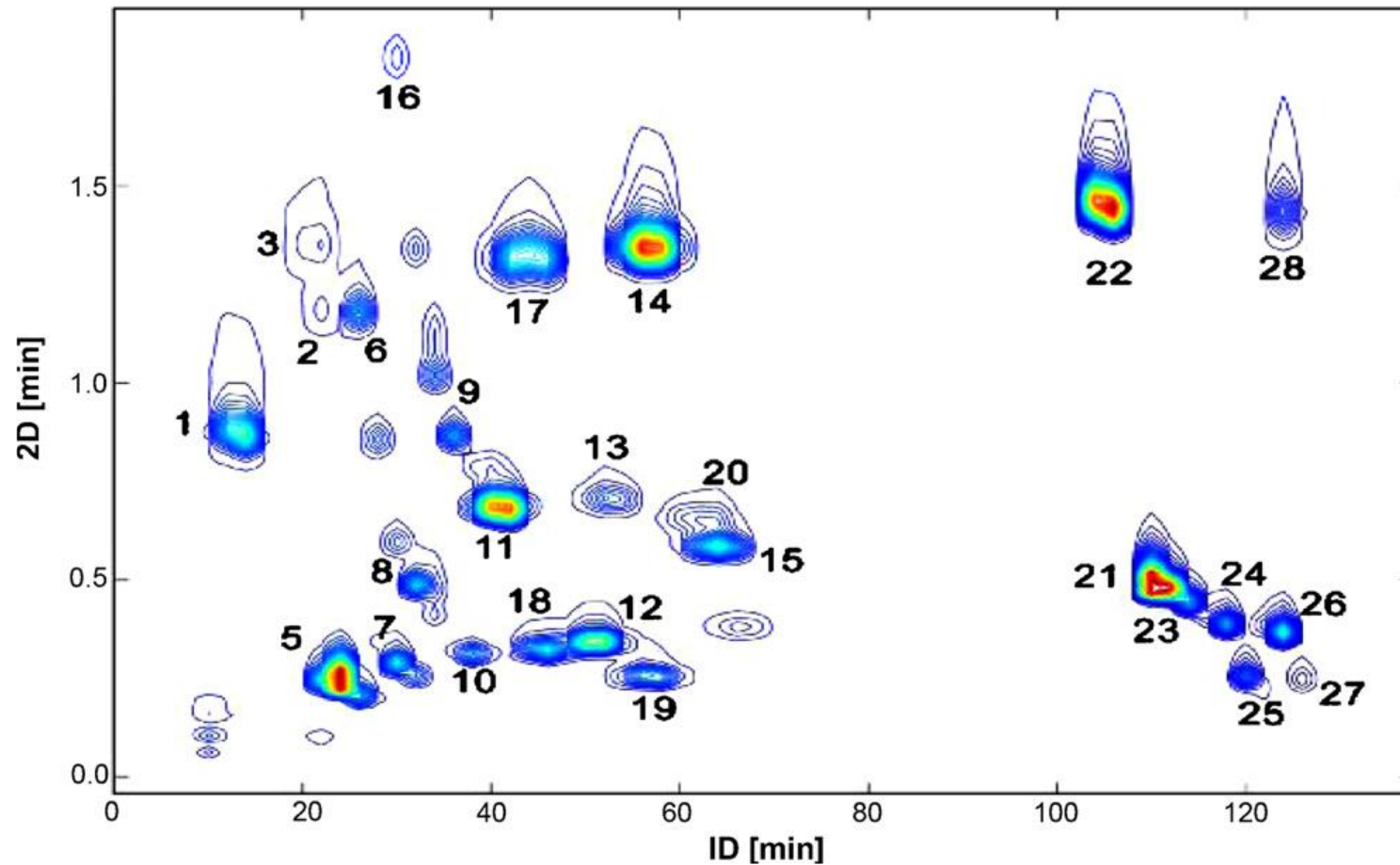


Two-Dimensional Separation

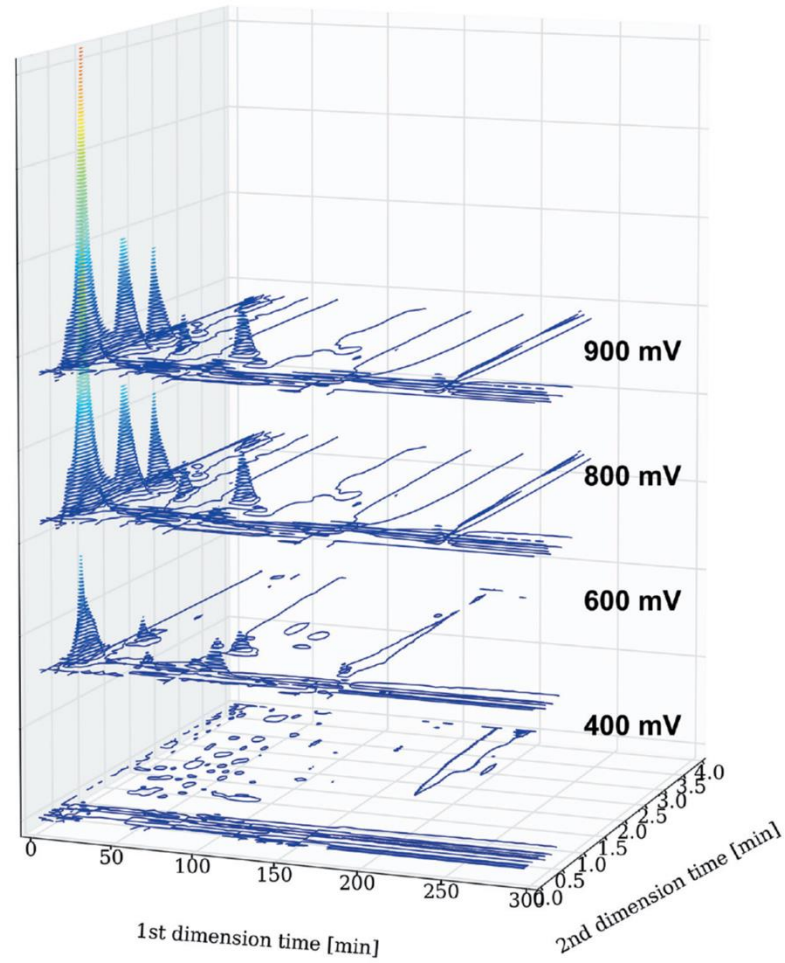
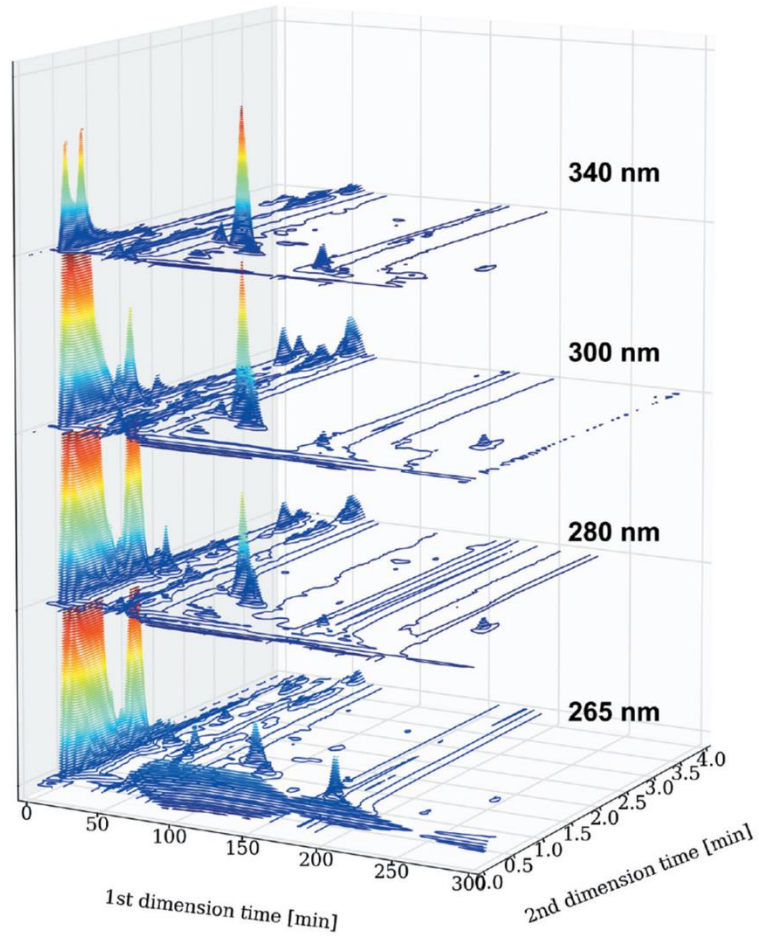


Dvourozměrná chromatografie

Fenolické látky a flavony



Pilsner Urquell

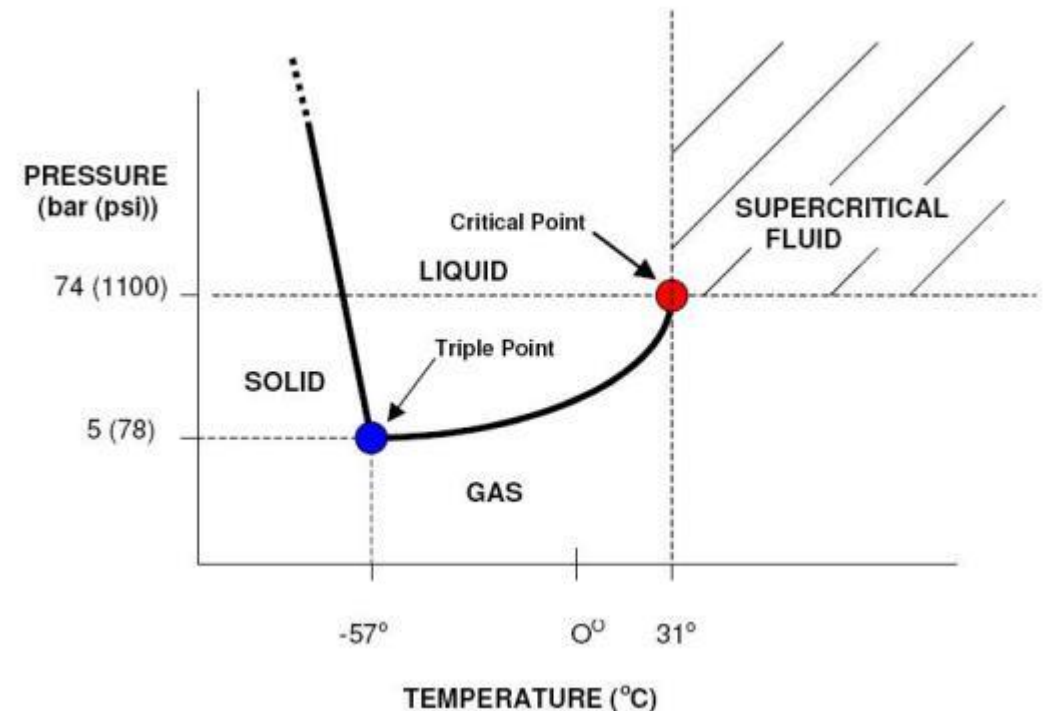


M U N I
S C I

SFC

Superkritická fluidní chromatografie (SFC)

- Mobilní fází je stlačený CO₂ (80 bar)
- Eluce jako v normálních fází
- Organický modifikátor
 - > 5 % metanol, ethanol, isopropanol
 - gradient
- Polární látky: silikagel, kyano-, diol-, amino- stacionární fáze
- Nepochární látky: RP stacionární fáze (C4, C8, C18)
- Chirální separace



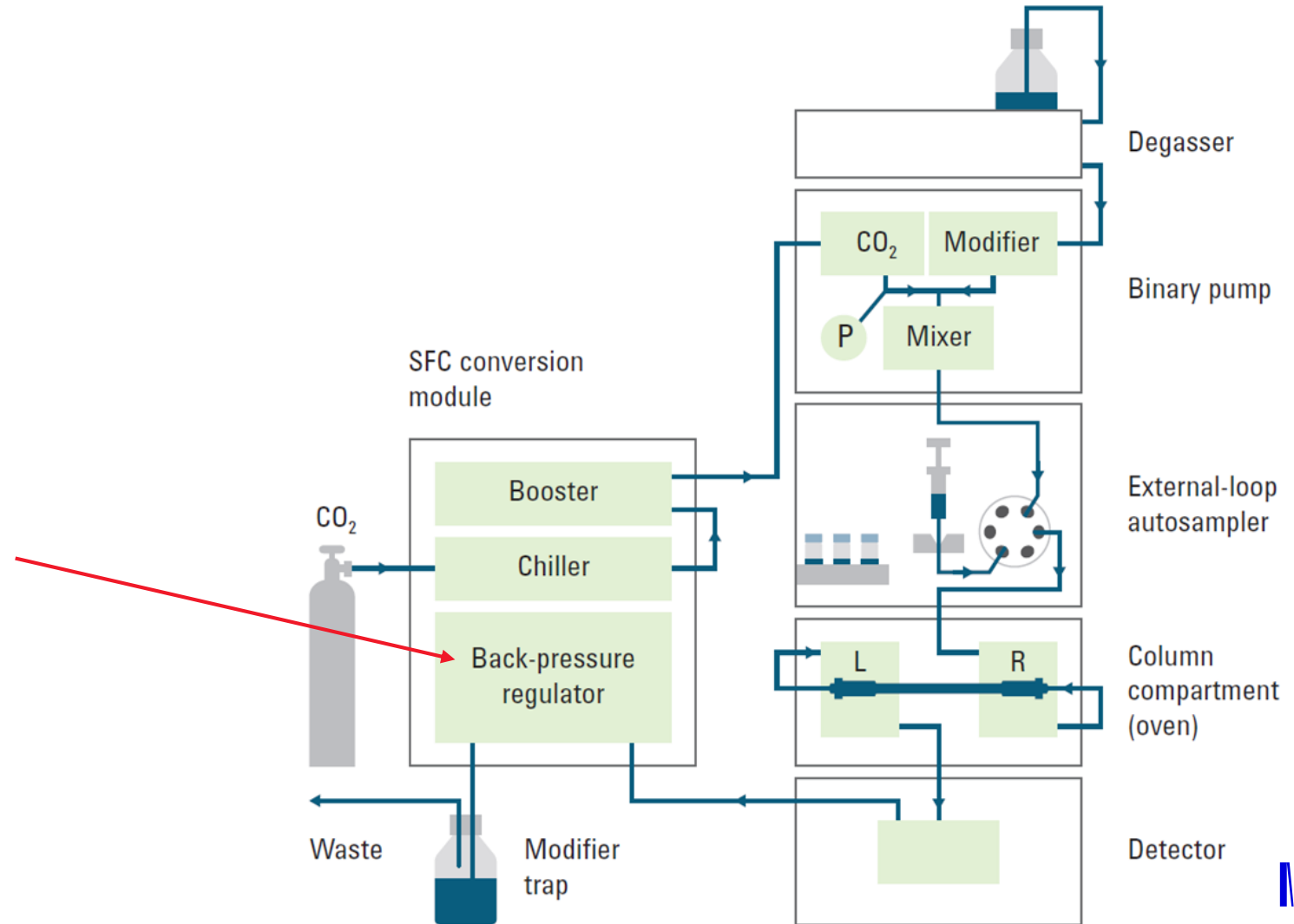
<https://www.southampton.ac.uk/~gjl/Research/sfc.htm>

(pod)kritické podmínky

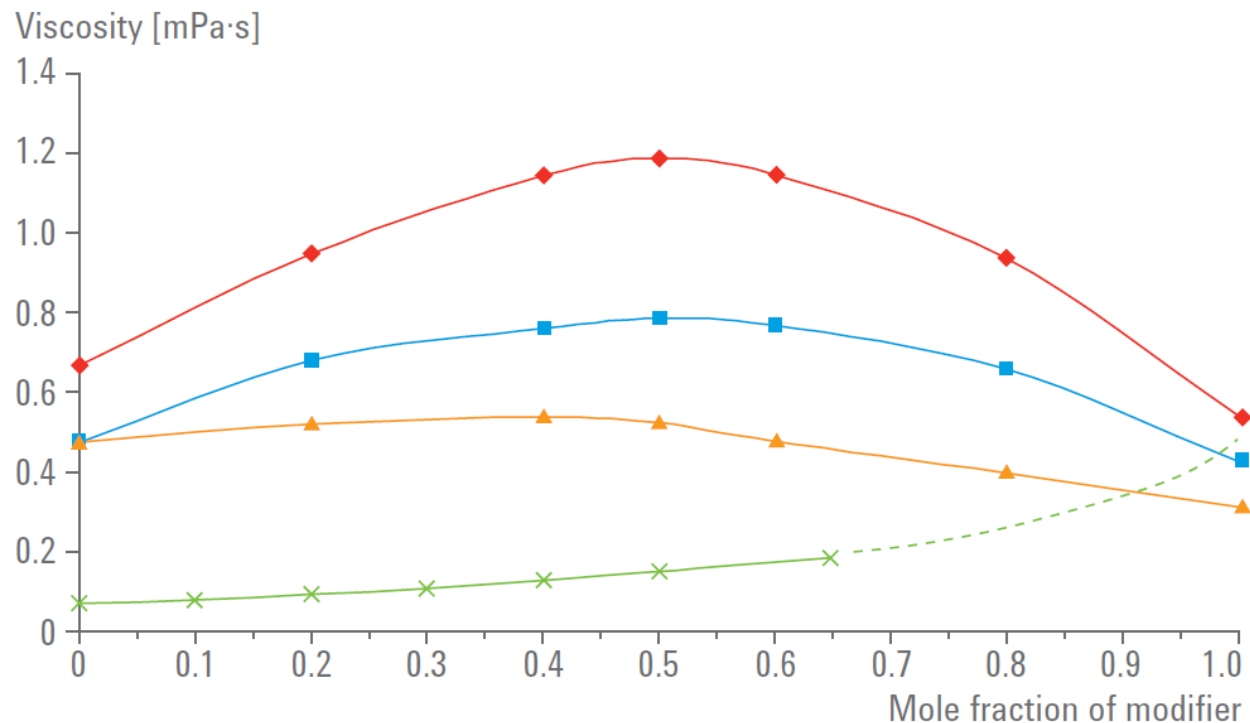
MUNI
SCI

Instrumentace

Regulátor tlaku
(stlačený plyn)



Mobilní fáze



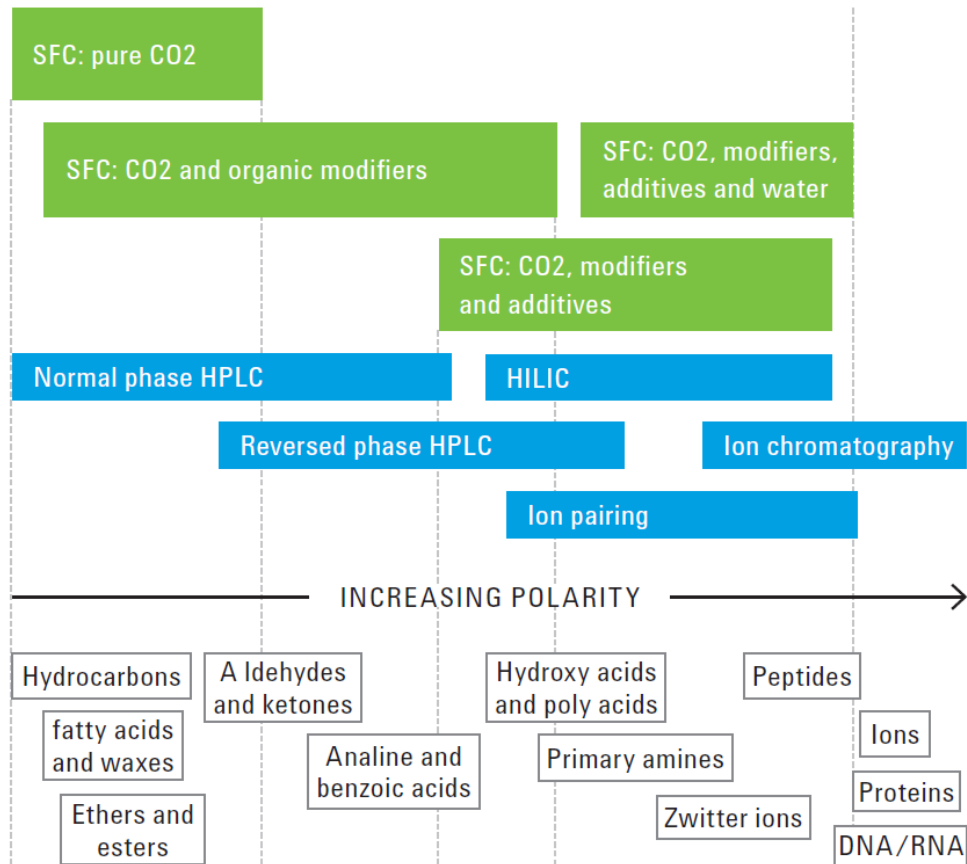
◆ H₂O/MeOH, 40 °C ■ H₂O/MeOH, 60 °C
 ▲ H₂O/ACN, 60 °C × CO₂/MeOH, 50 °C

	Hustota, gcm ⁻³	D _m , cm ² s ⁻¹	Viskozita, gcm ⁻¹ s ⁻¹
Plyn	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻⁴
Superkritická tekutina	10 ⁻¹ - 1 Jako kapalina	10 ⁻⁴ - 10 ⁻³ Jako kapalina	10 ⁻⁴ - 10 ⁻³ Jako plyn
Kapalina	1	< 10 ⁻⁵	10 ⁻²

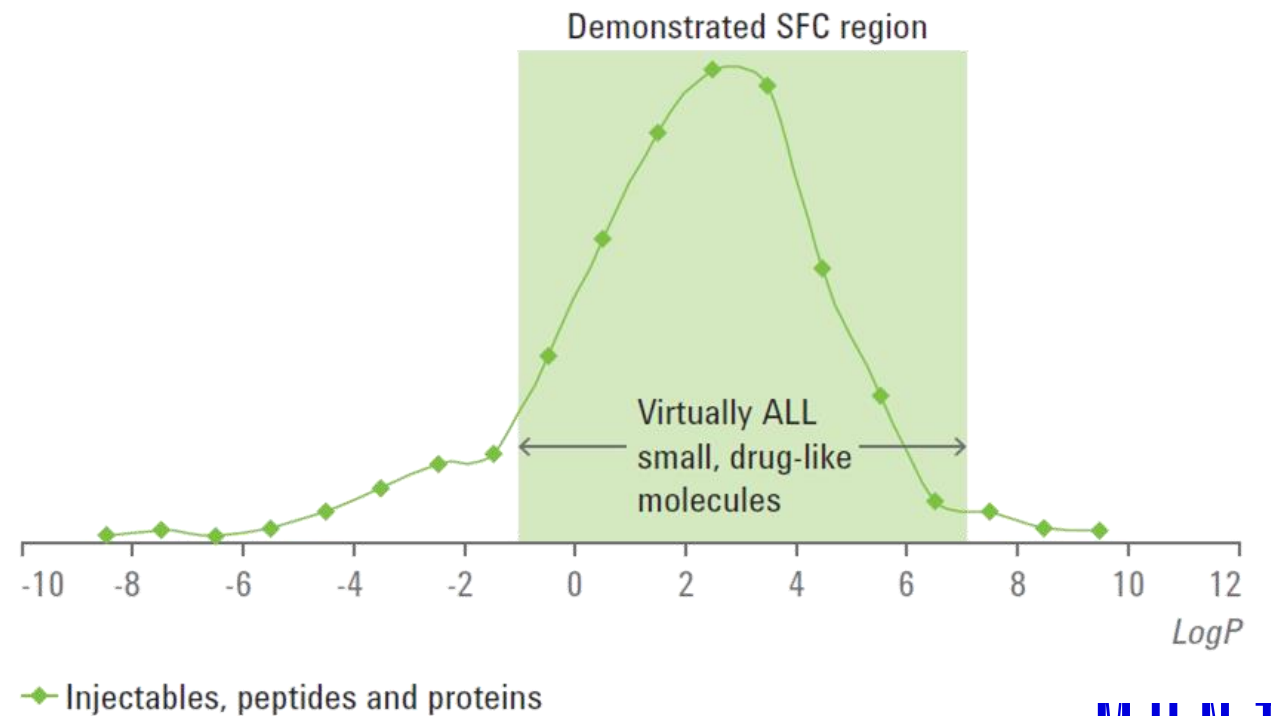
<https://www.southampton.ac.uk/~gjl/Research/sfc.htm>

Tlak je v SFC ve srovnání s HPLC třetinový až pětinnový při třikrát až pětkrát větších průtocích

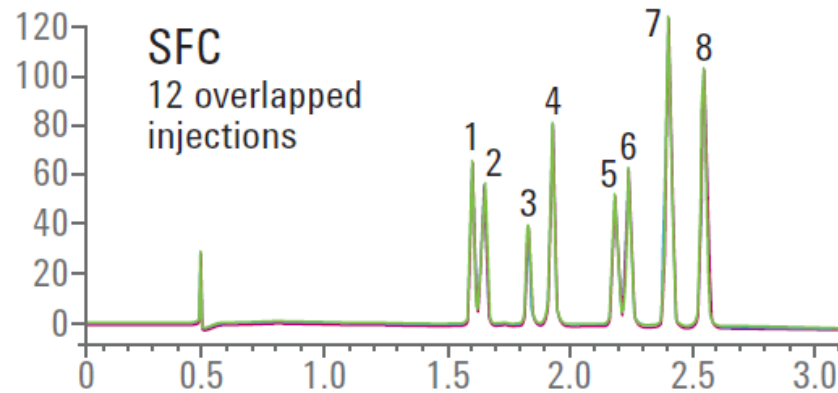
Využití SFC



Farmakologie

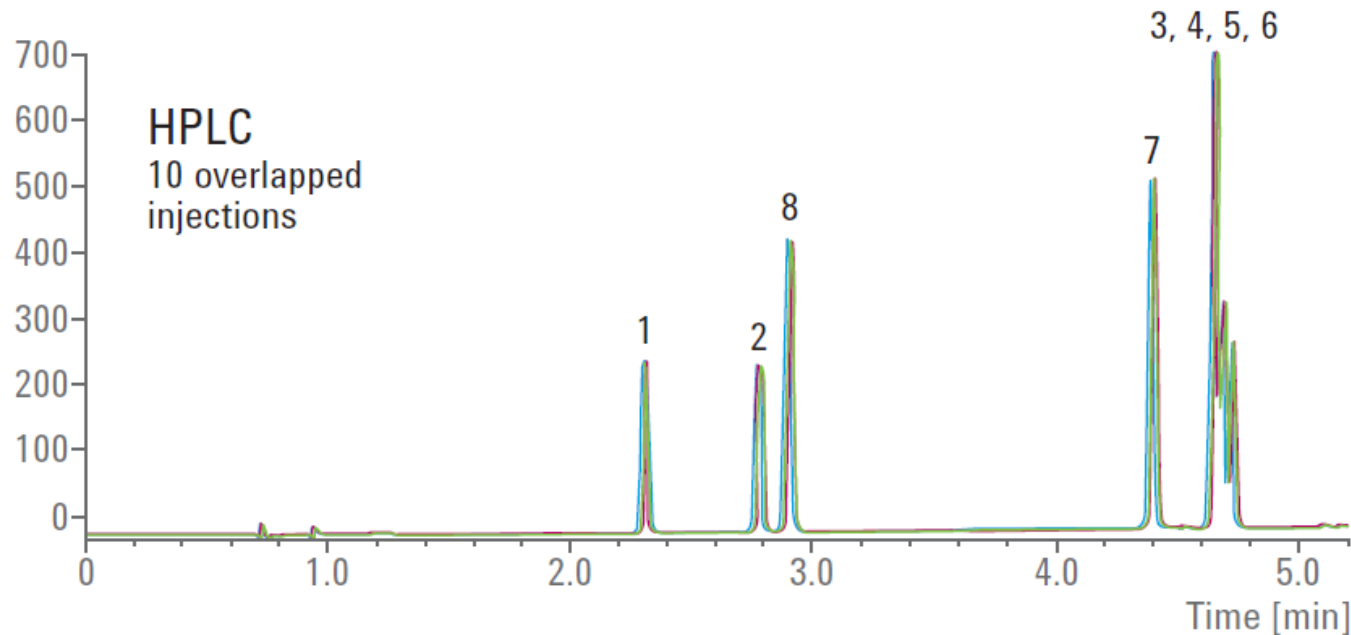


Ortogonalní k reverzním fázím



5 – 25 % MeOH v CO₂ ve 3 minutách

- 1 – kafein,
- 2 – theofylin,
- 3 – kortison,
- 4 – prednisol,
- 5 – hydrokortison,
- 6 – prednisilon,
- 7 – sulfamerazin,
- 8 – sulfachinoxalin



10 – 90 % MeOH ve vodě ve 4.5 minutách

Mobilní fáze

CO₂

- Snadno dostupný
- Levný
- Dosažitelný kritický bod (31 °C, 70 bar)
- Relativně bezpečný
- „Zelený“ (protože byl recyklován)
- Mísitelný s mnoha organickými modifikátory

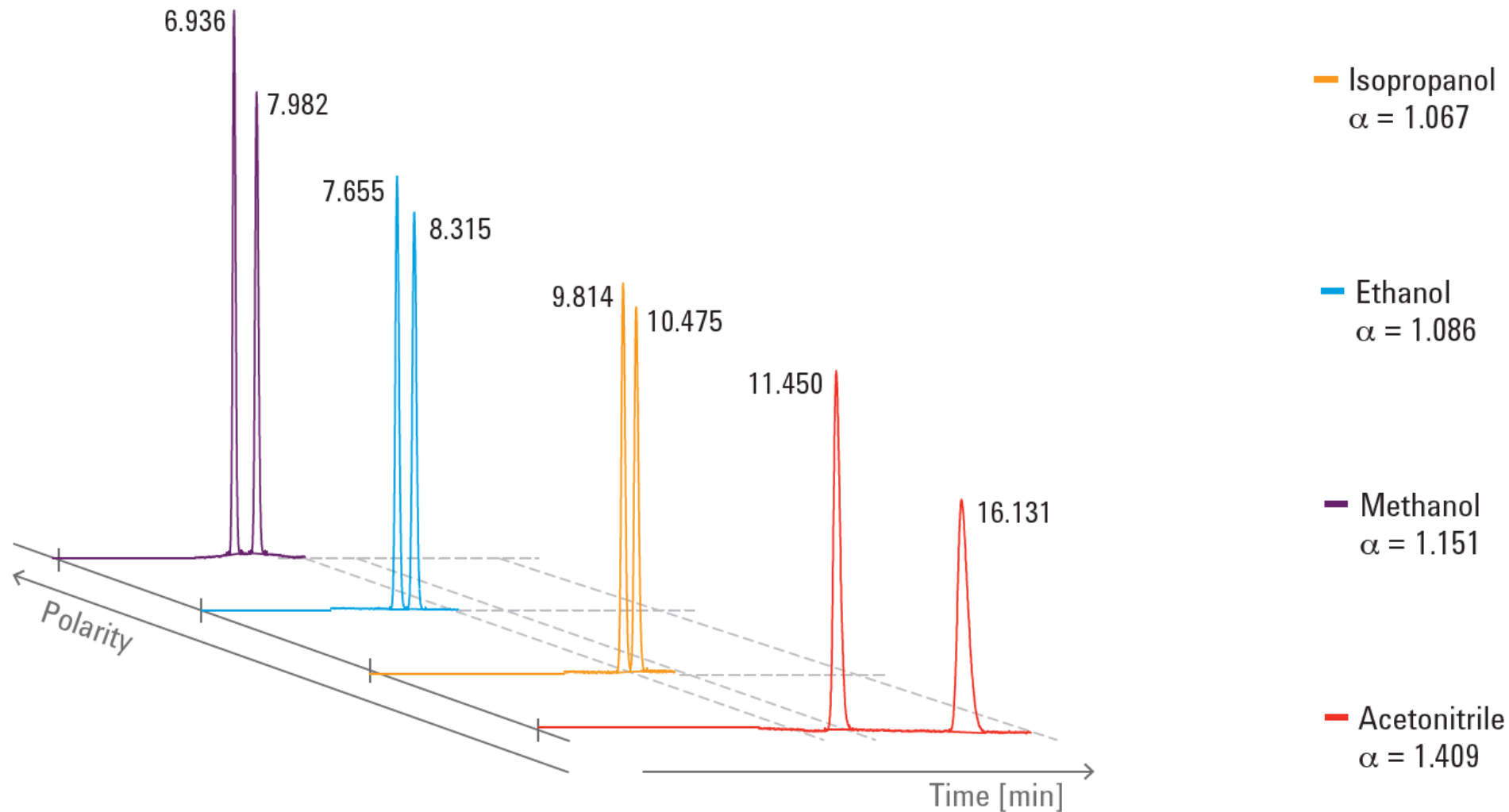
Metanol

- Dostupný
- Levný
- Plně mísitelný s CO₂
- Nízký práh absorpce (~205 nm)
- Relativně nízká toxicita

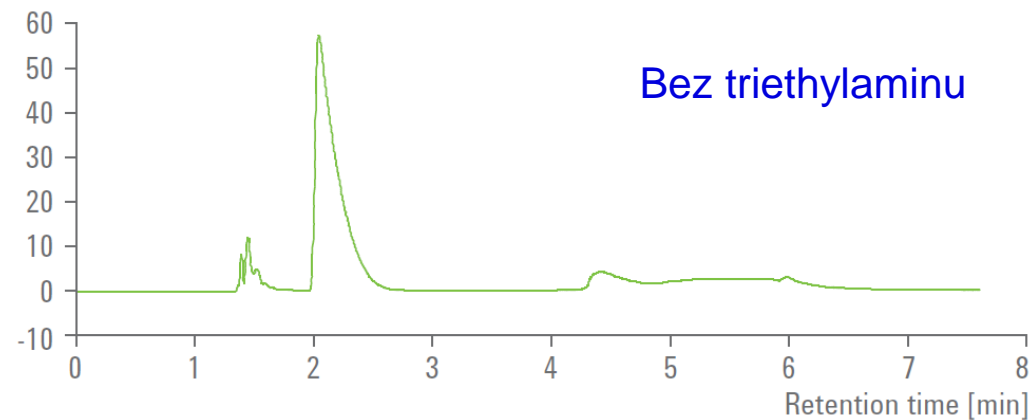
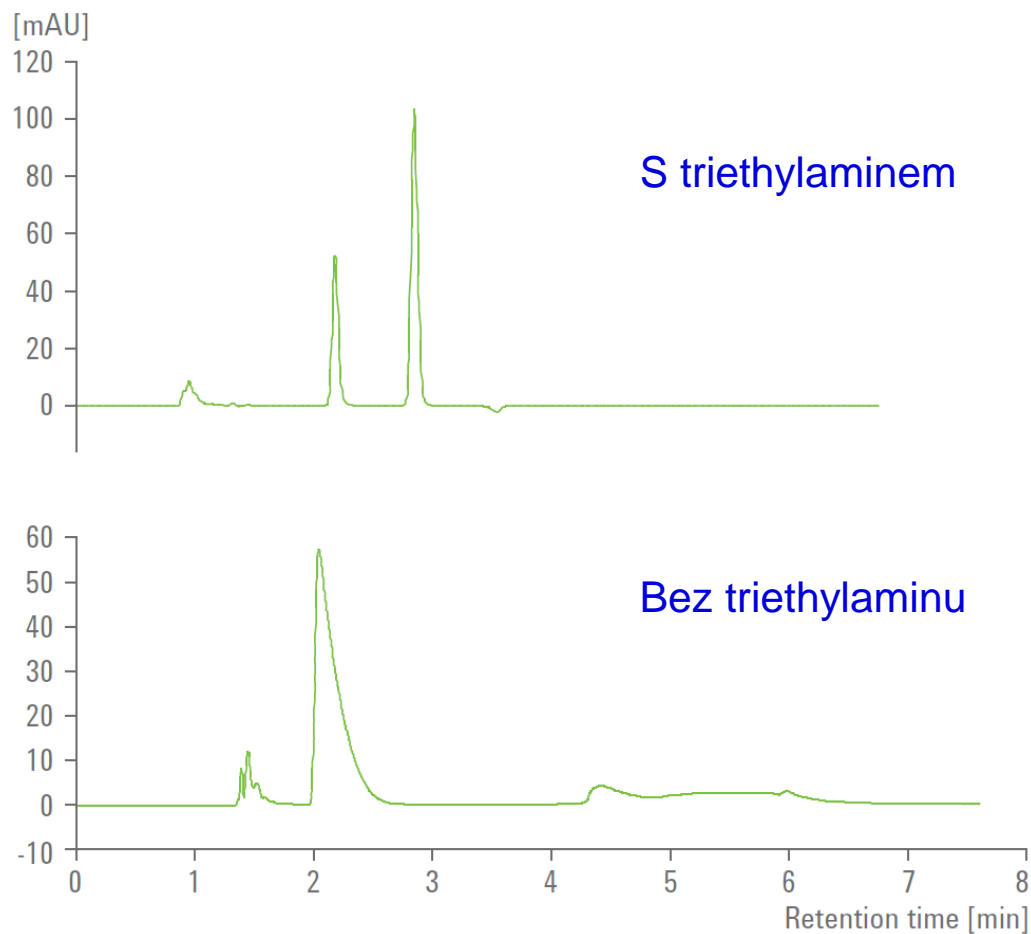
Aditiva

- Vysoce polární látky
- 0.1 – 2 % v modifikátoru
- Potlačení ionizace
- Tvorba iontových párů
- Potlačení aktivních míst S.F.

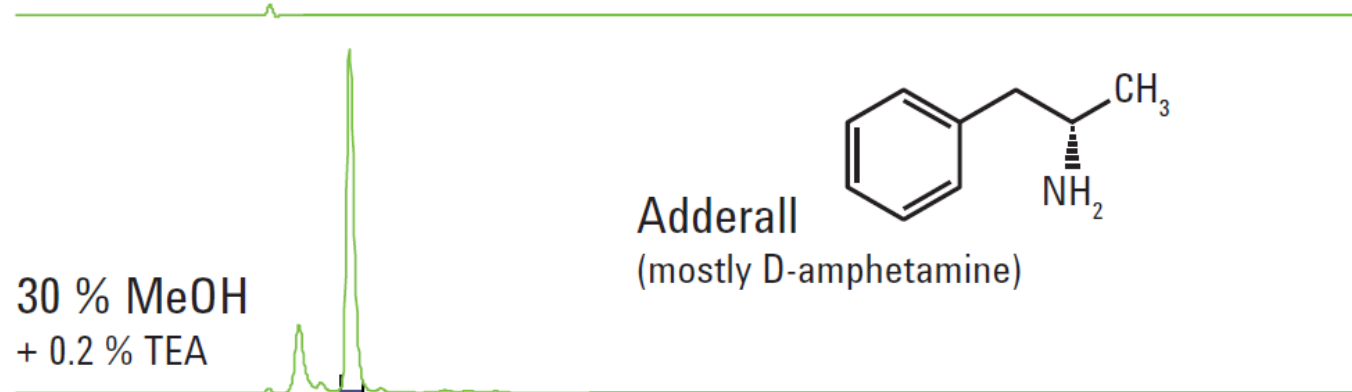
Vliv polarity modifikátoru (chirální separace)



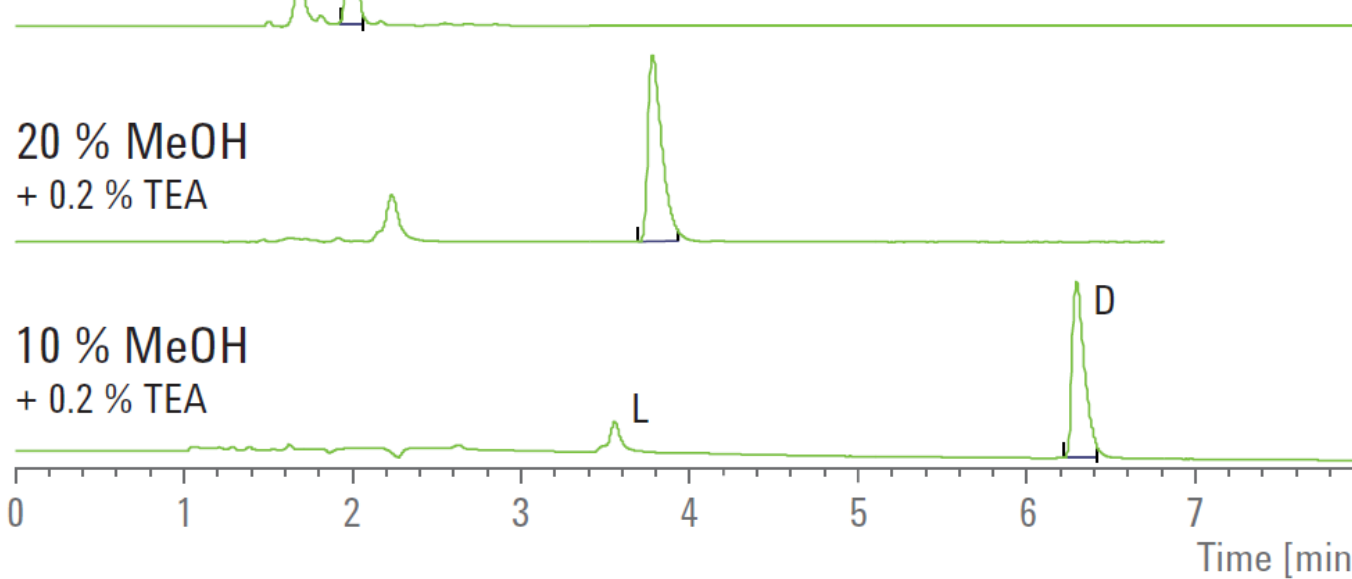
Vliv aditiva – Chirální separace



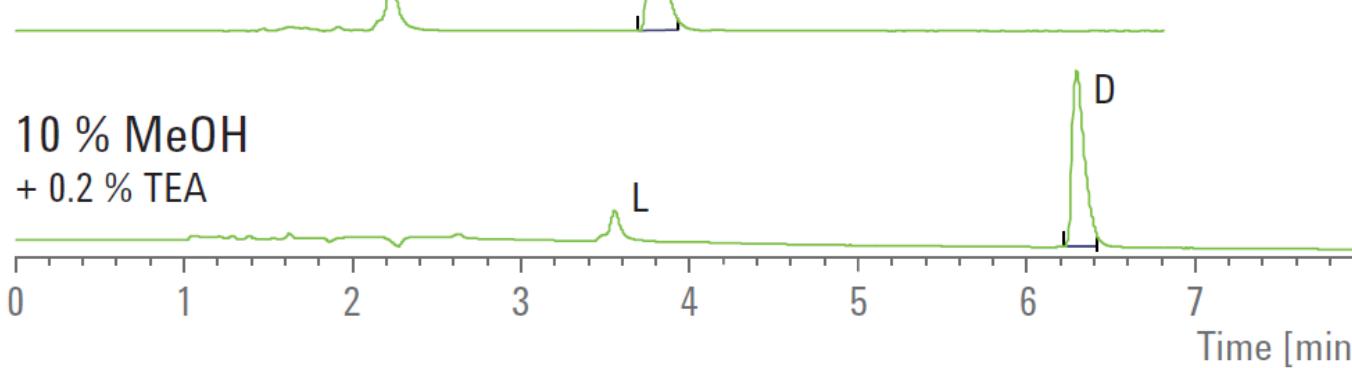
30 % MeOH,
No additive



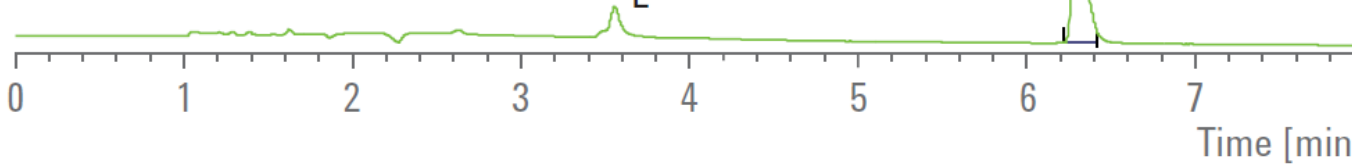
30 % MeOH
+ 0.2 % TEA



20 % MeOH
+ 0.2 % TEA

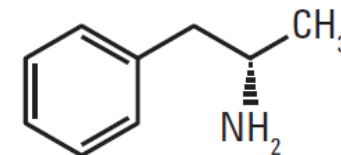


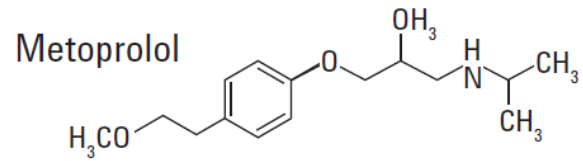
10 % MeOH
+ 0.2 % TEA



Adderall

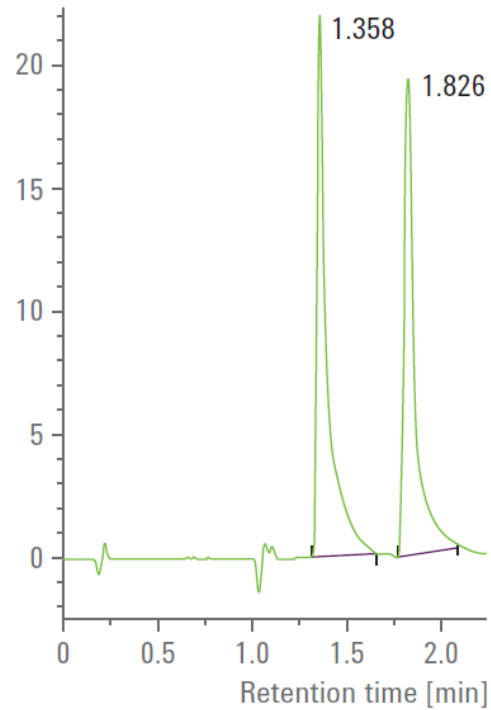
(mostly D-amphetamine)





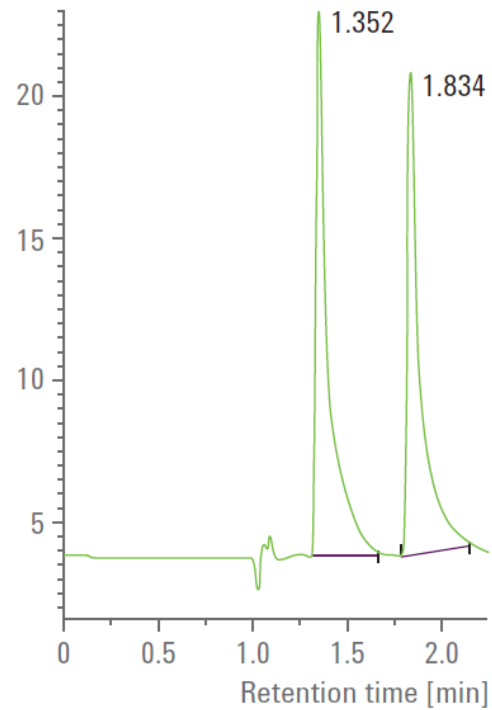
No additive

Absorbance [mAU]



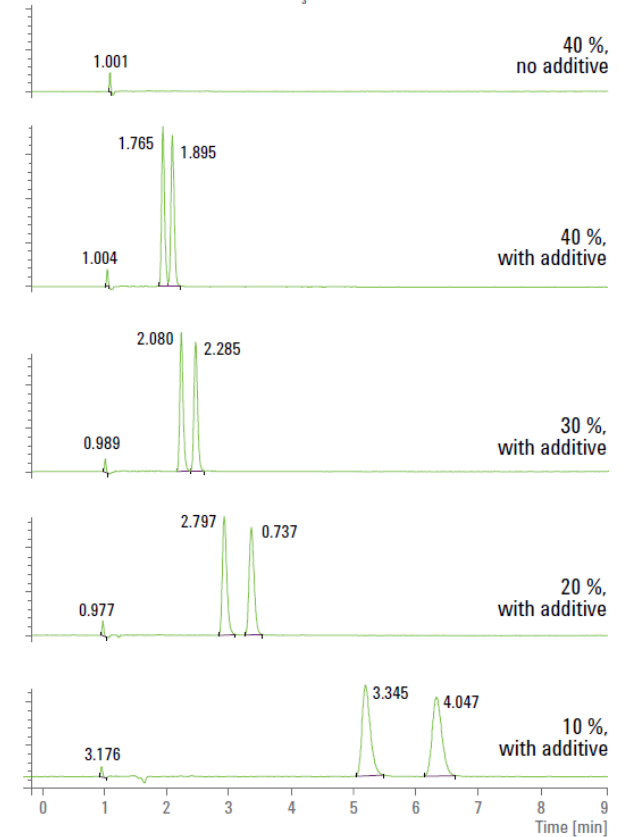
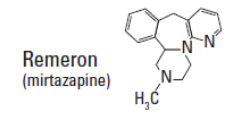
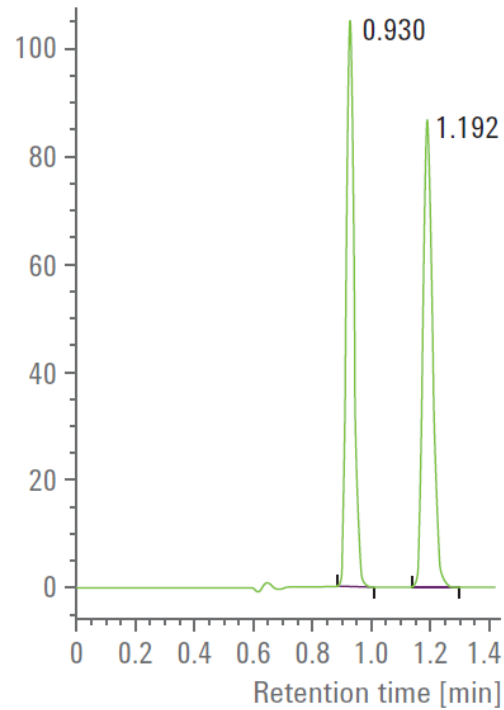
0.1 % Acetic acid

Absorbance [mAU]

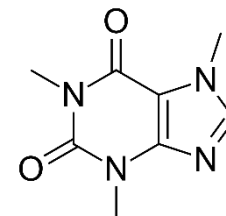
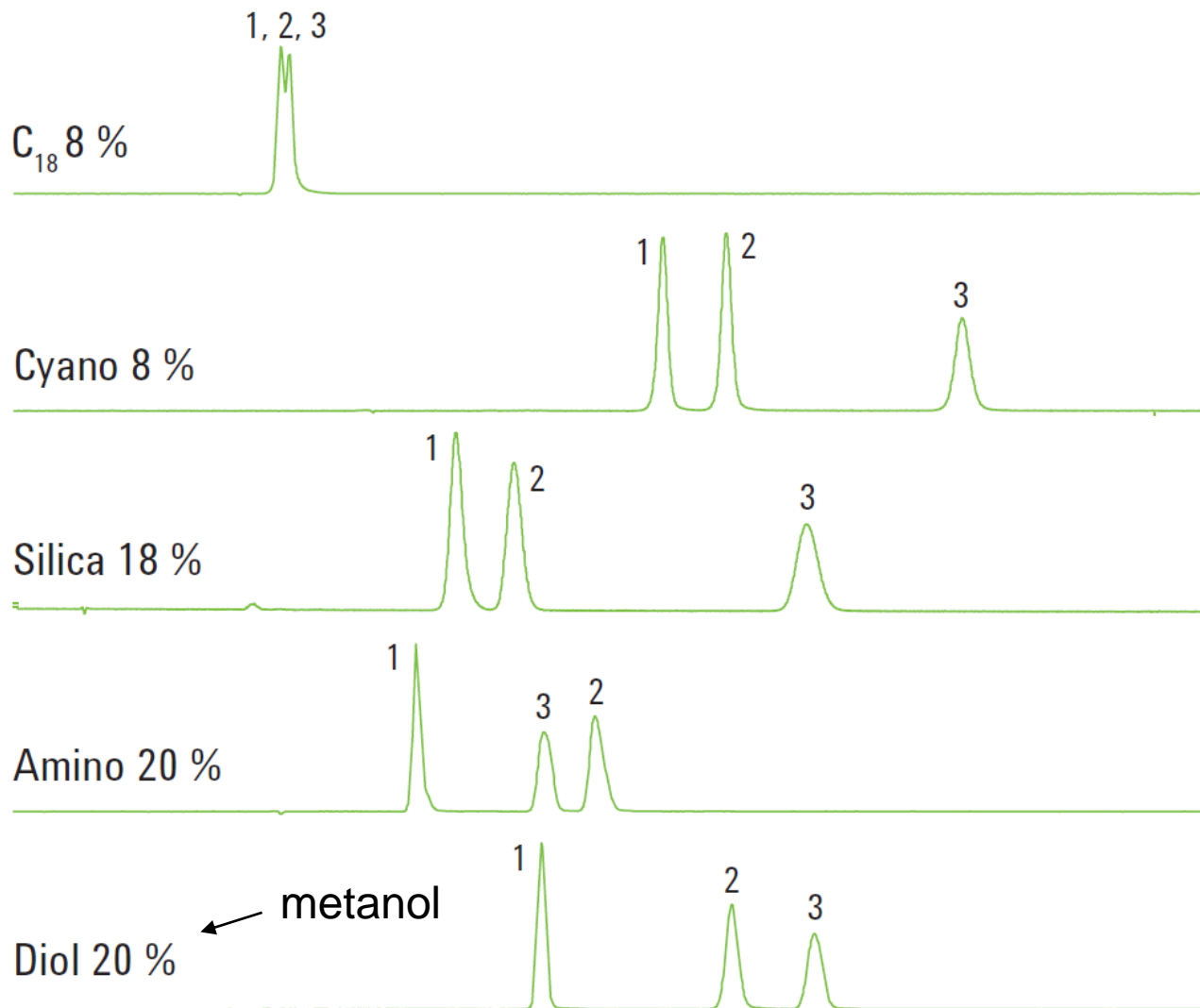


0.1 % TEA

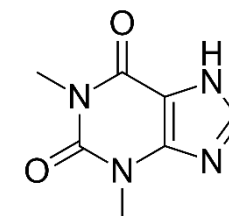
Absorbance [mAU]



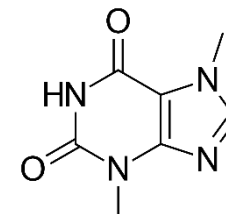
Vliv stacionární fáze



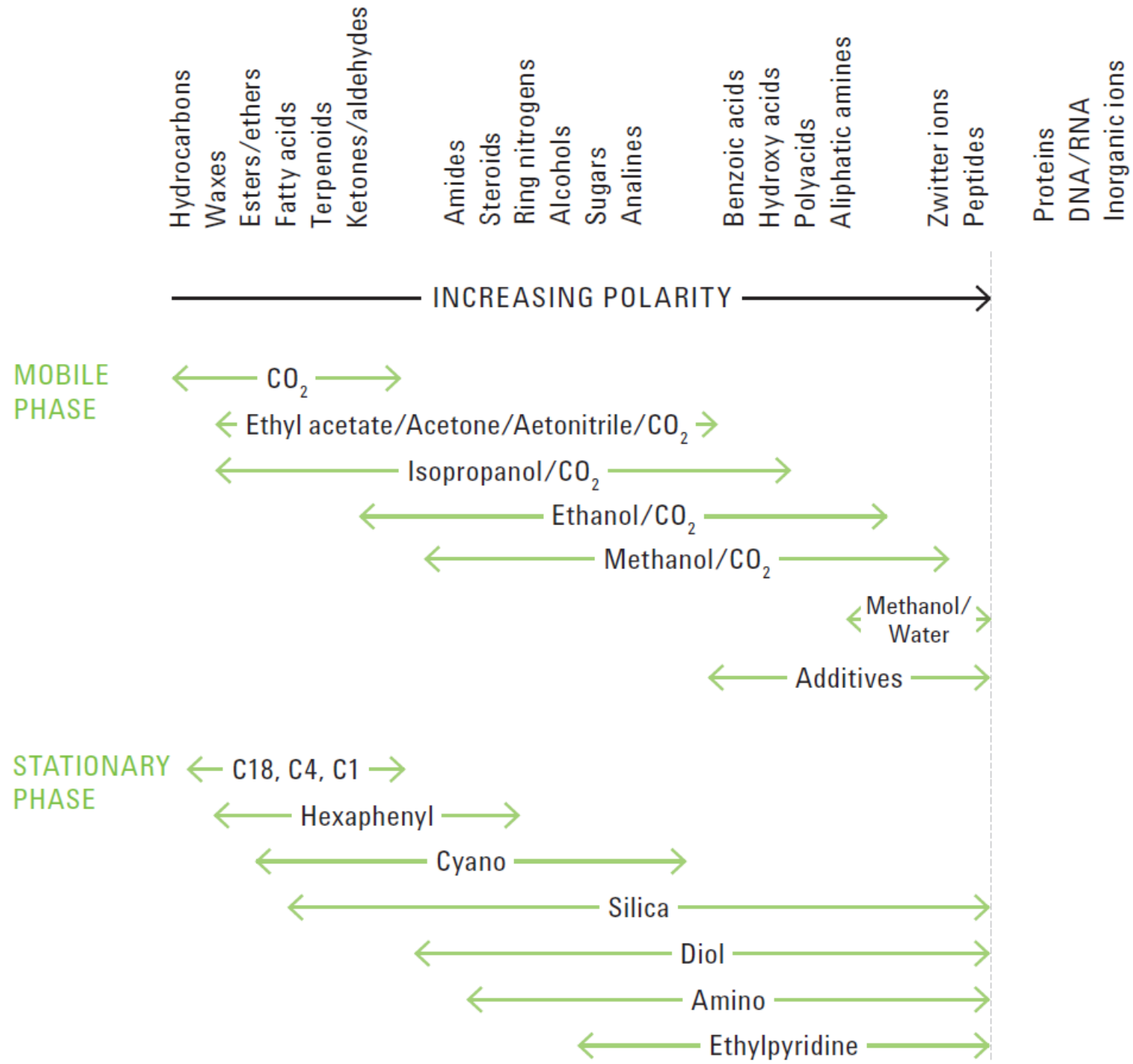
1) Kafein



2) Theofylin

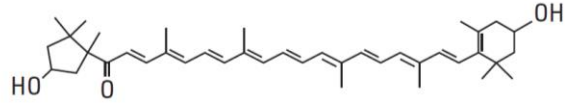


3) Theobromin

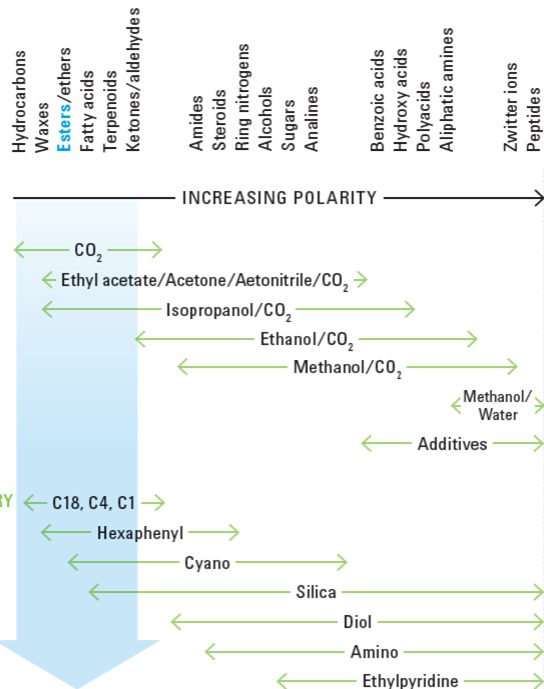
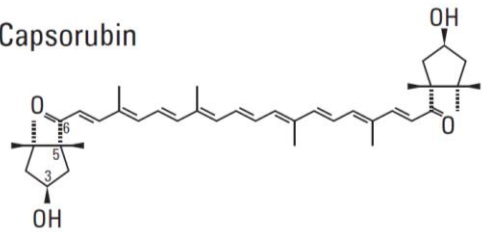


Aplikace – paprikový extrakt

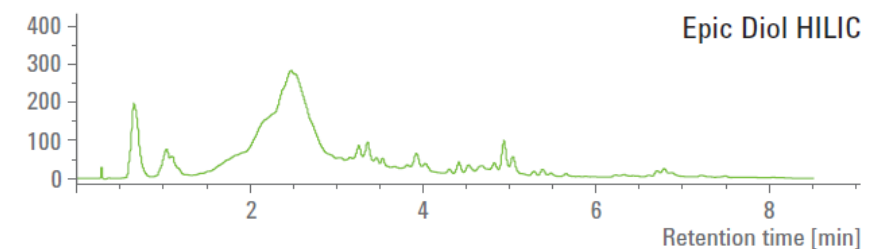
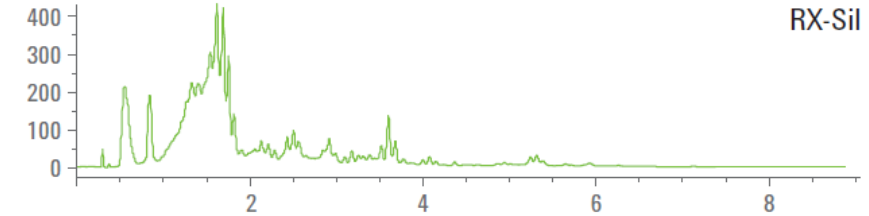
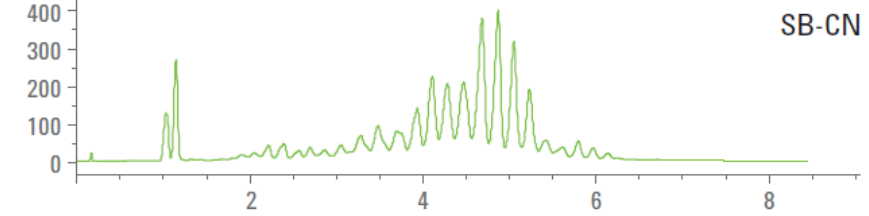
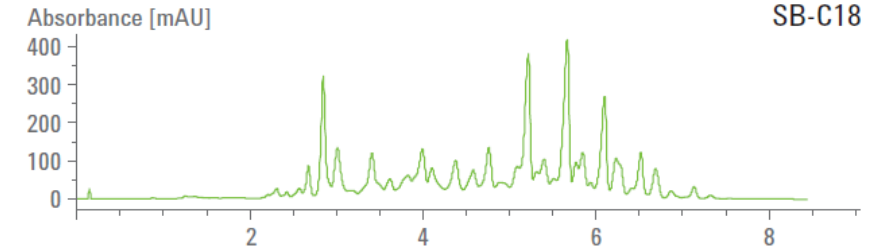
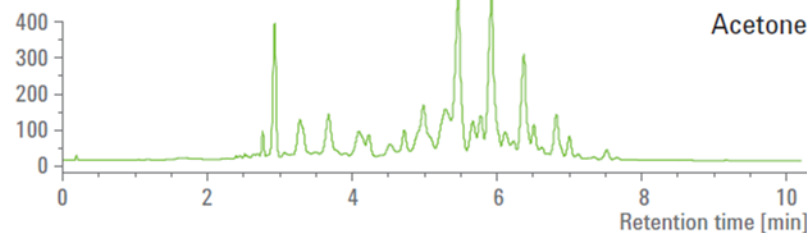
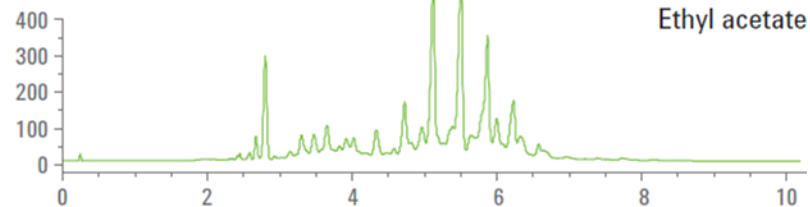
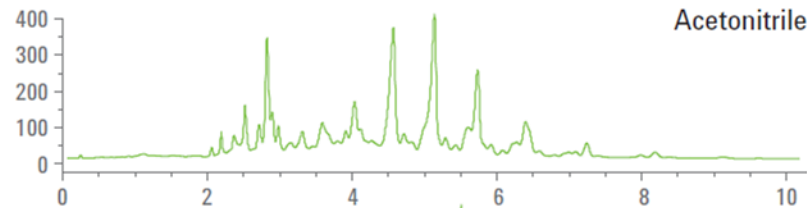
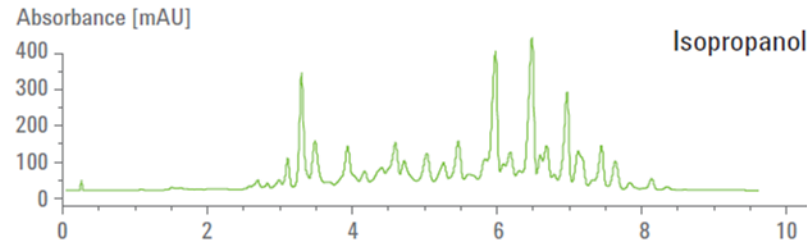
Capsanthin



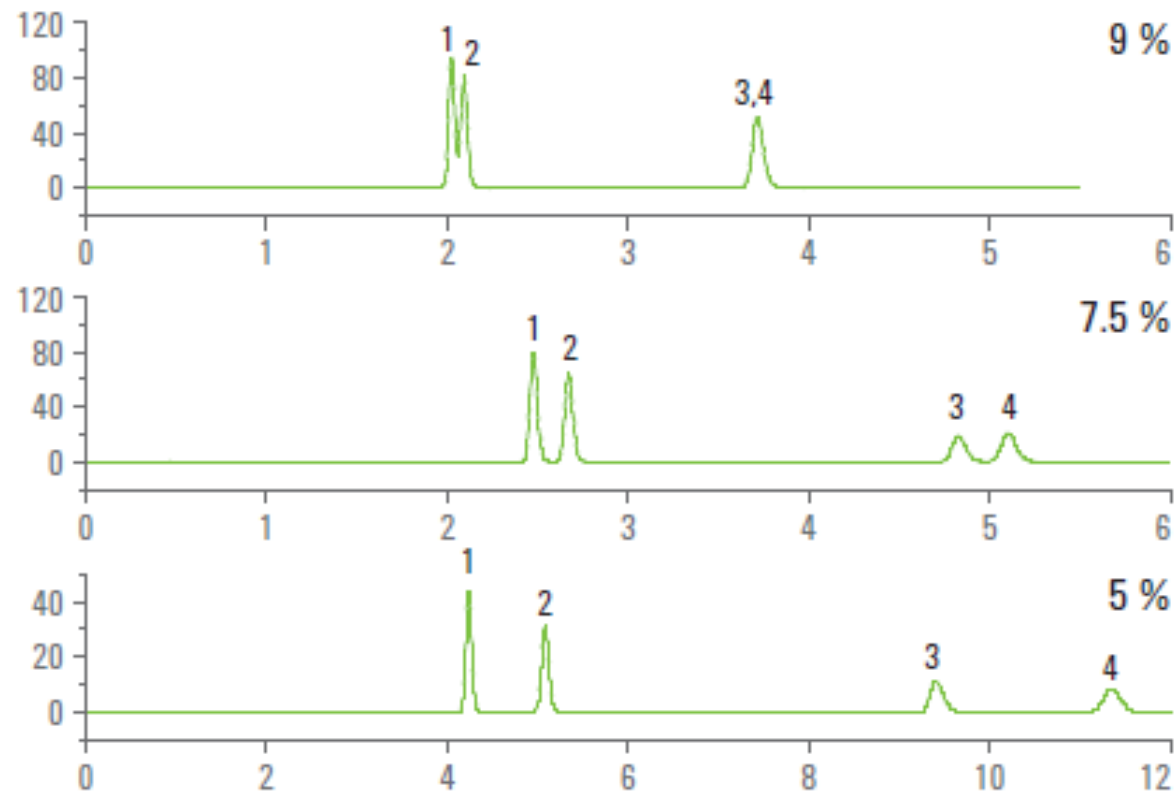
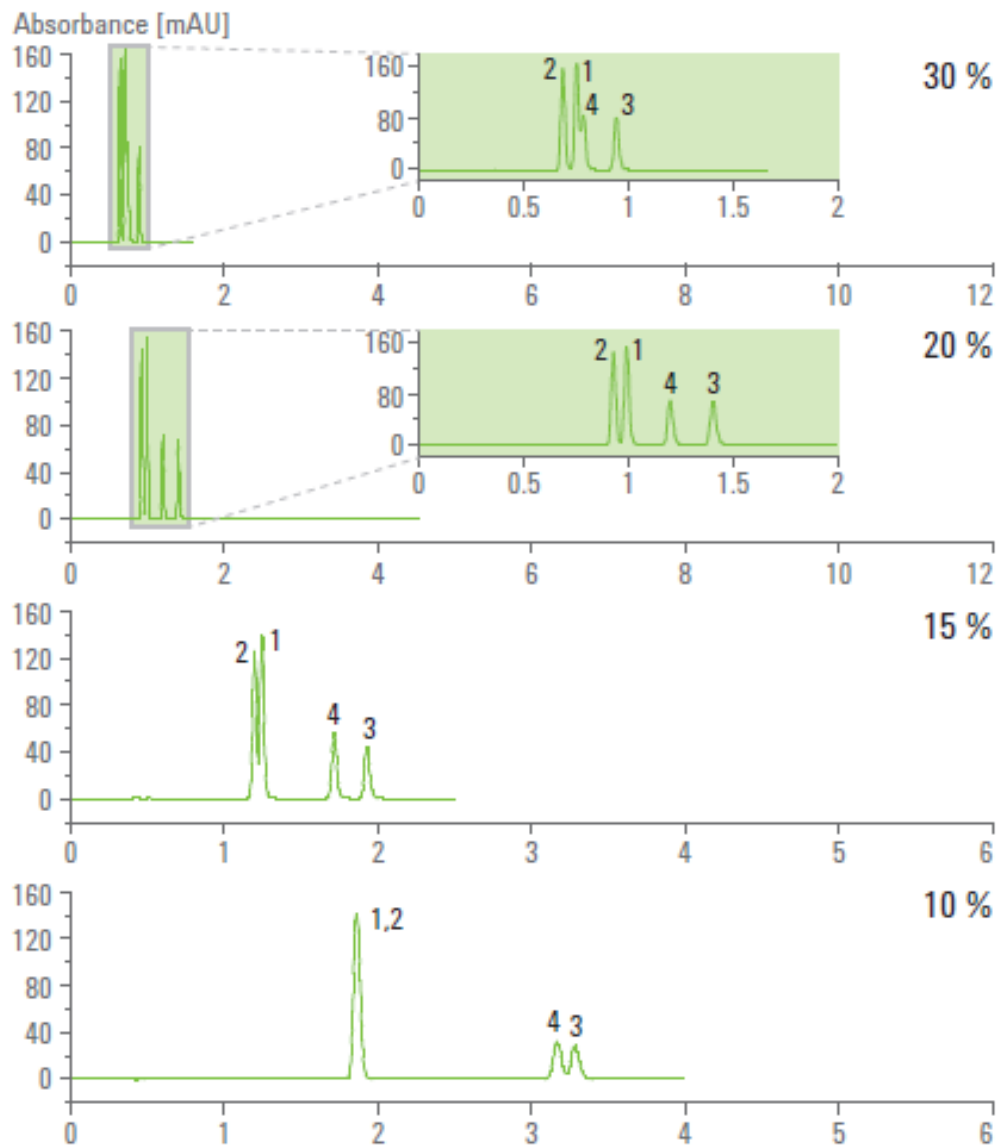
Capsorubin



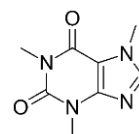
- Hydrocarbons
- Waxes
- Esters/ethers
- Fatty acids
- Terpenoids
- Ketones/aldehydes
- Amides
- Steroids
- Ring nitrogens
- Alcohols
- Sugars
- Anilines
- Benzoic acids
- Hydroxy acids
- Polyacids
- Aliphatic amines
- Zwitter ions
- Peptides
- Proteins
- DNA/RNA
- Inorganic ions



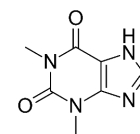
Aplikace – polární látky



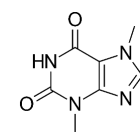
Změna elučního pořadí



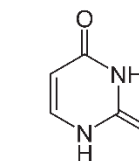
1) Kafein



2) Theofylin



3) Theobromin

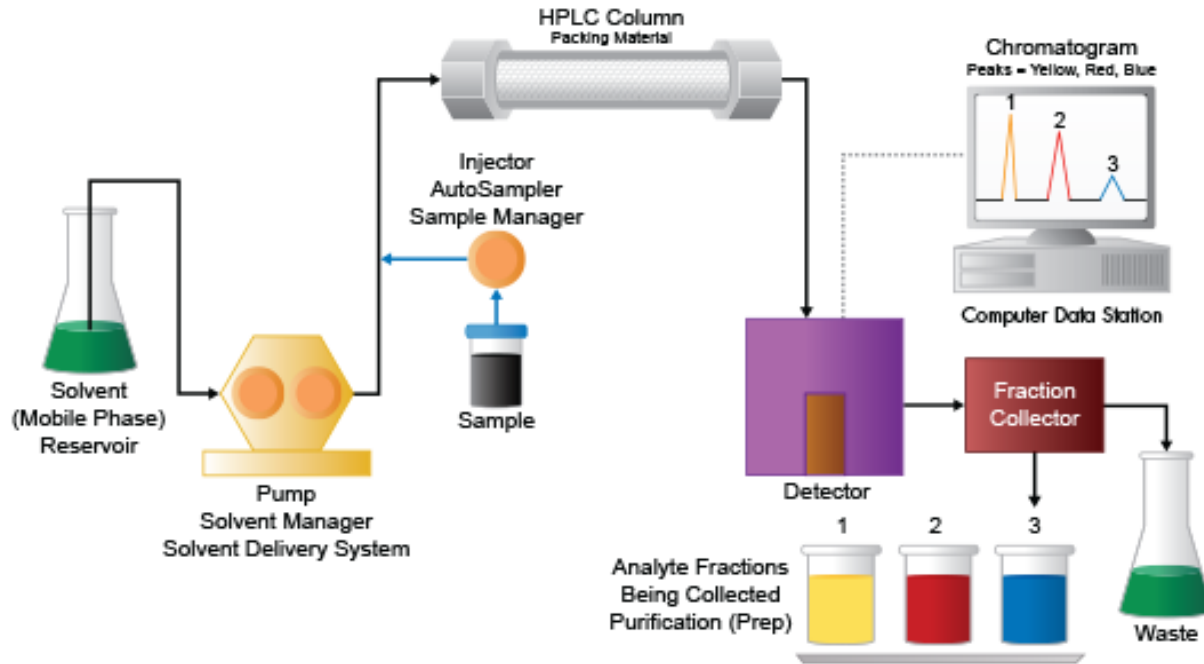


4) Uracil

M U N I
S C I

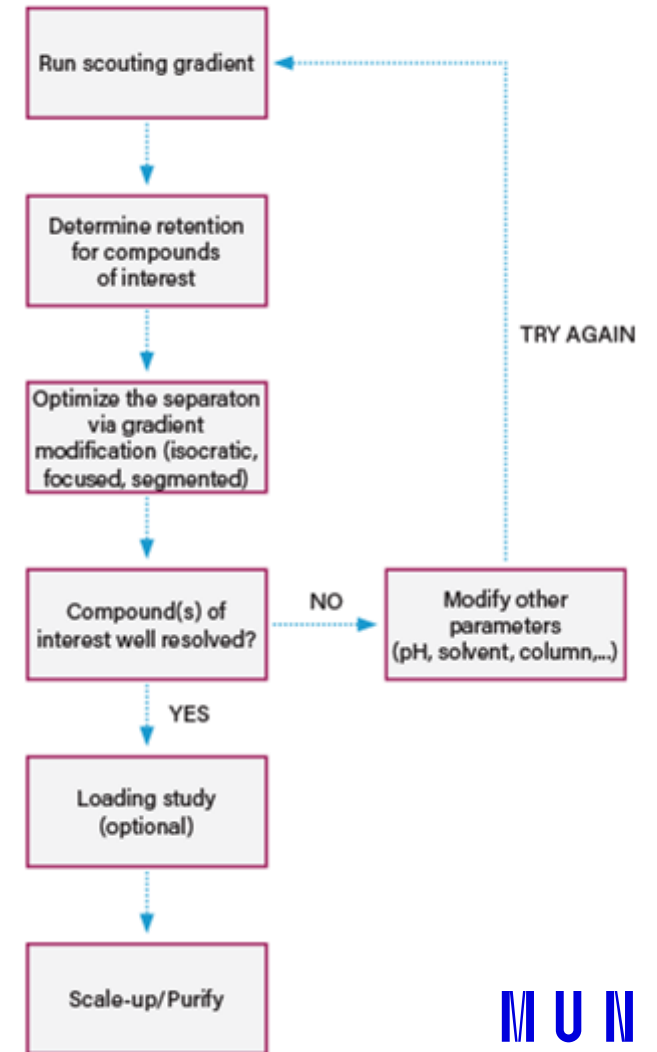
Preparativní chromatografie

Preparativní chromatografie



Slouží k izolaci čistých (nebo alespoň čistějších) složek vzorku, které jsou dále použity (k chemické reakci, další separaci apod.)

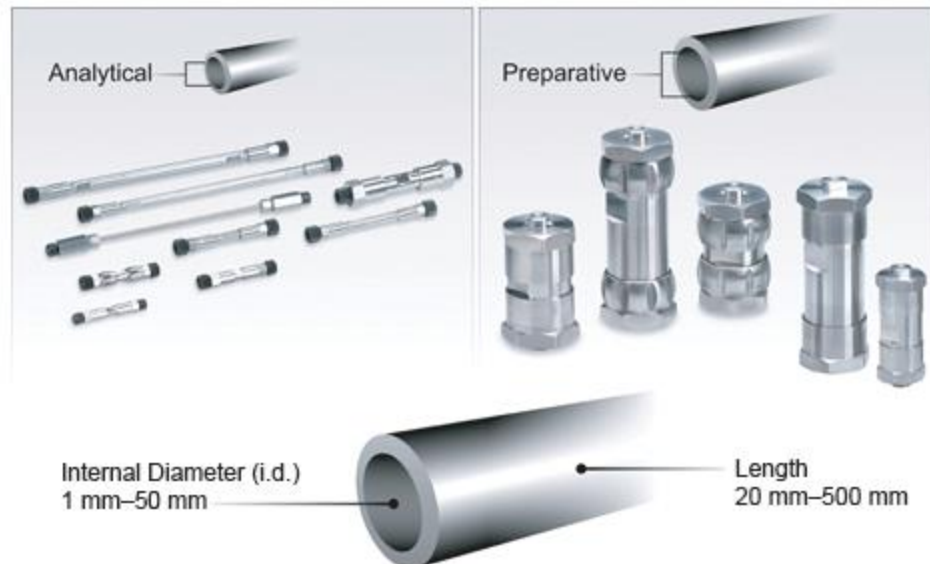
wikipedia.org



Preparativní separace

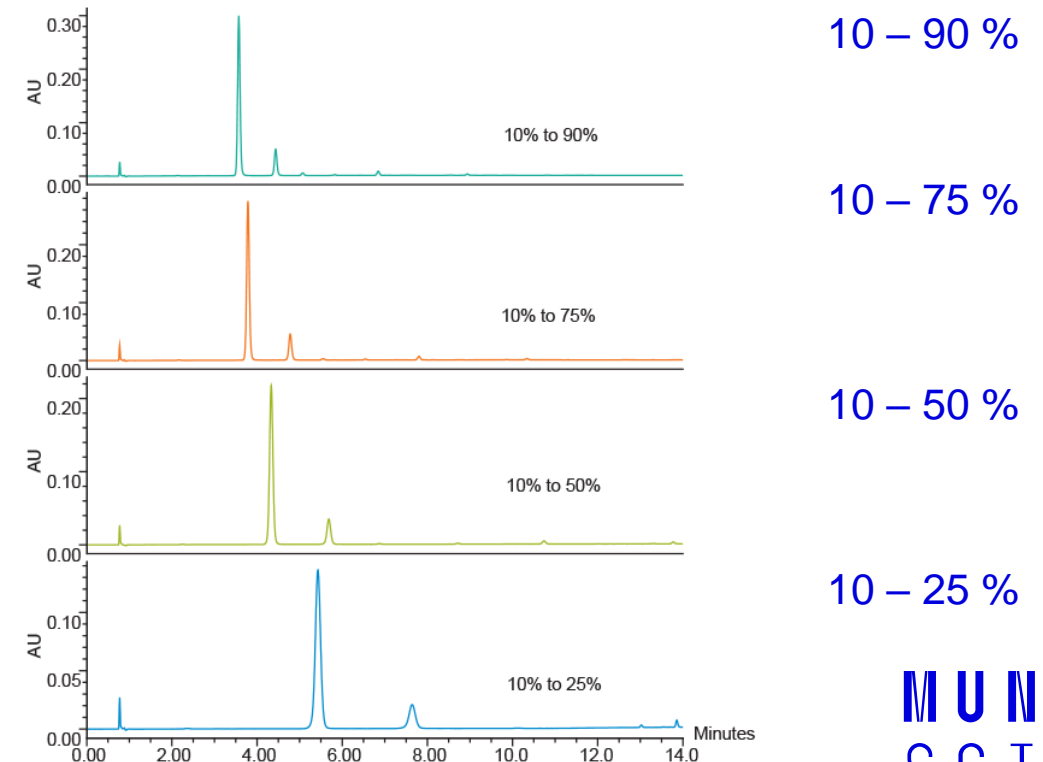
– Kolony

- Kratší, širší
- Rozměry ovlivňují množství vzorku

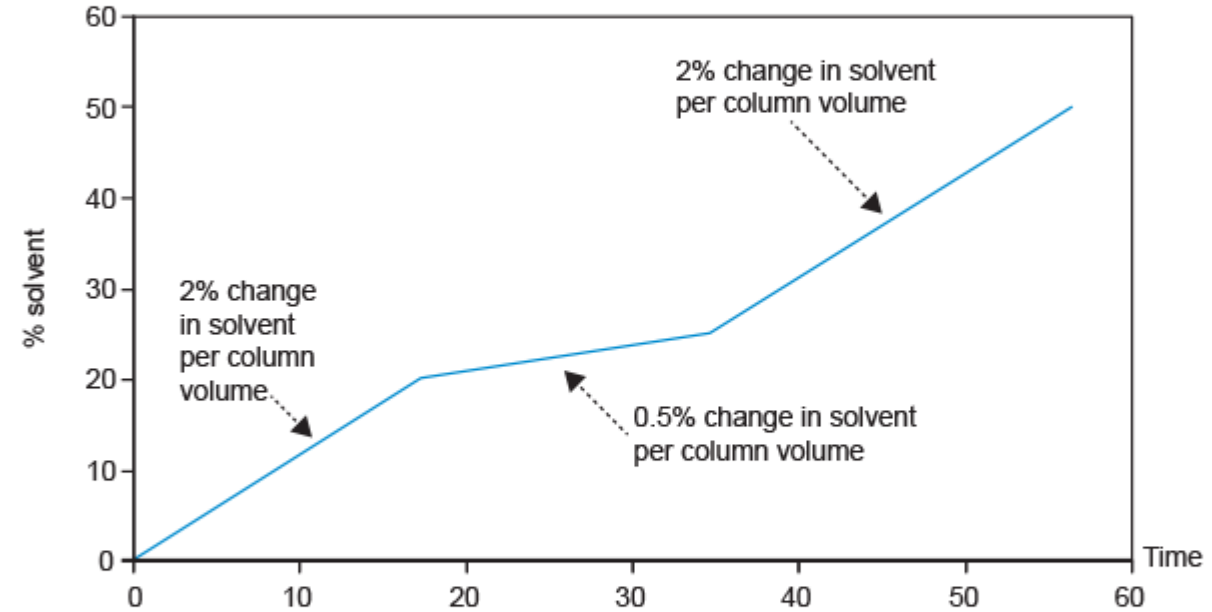
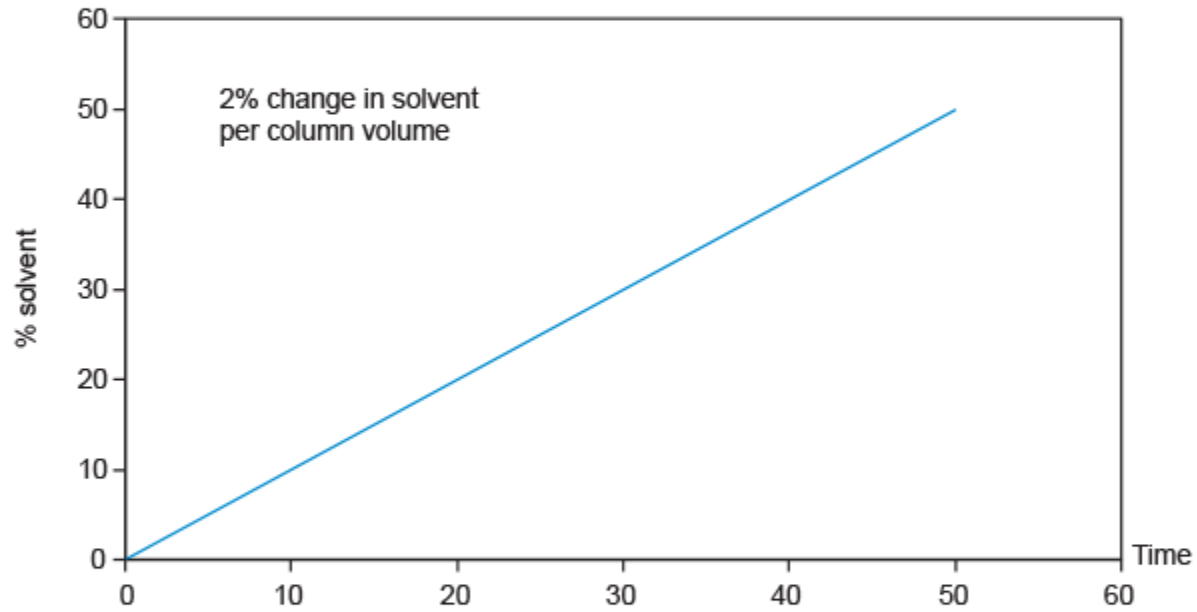


– Vývoj metody

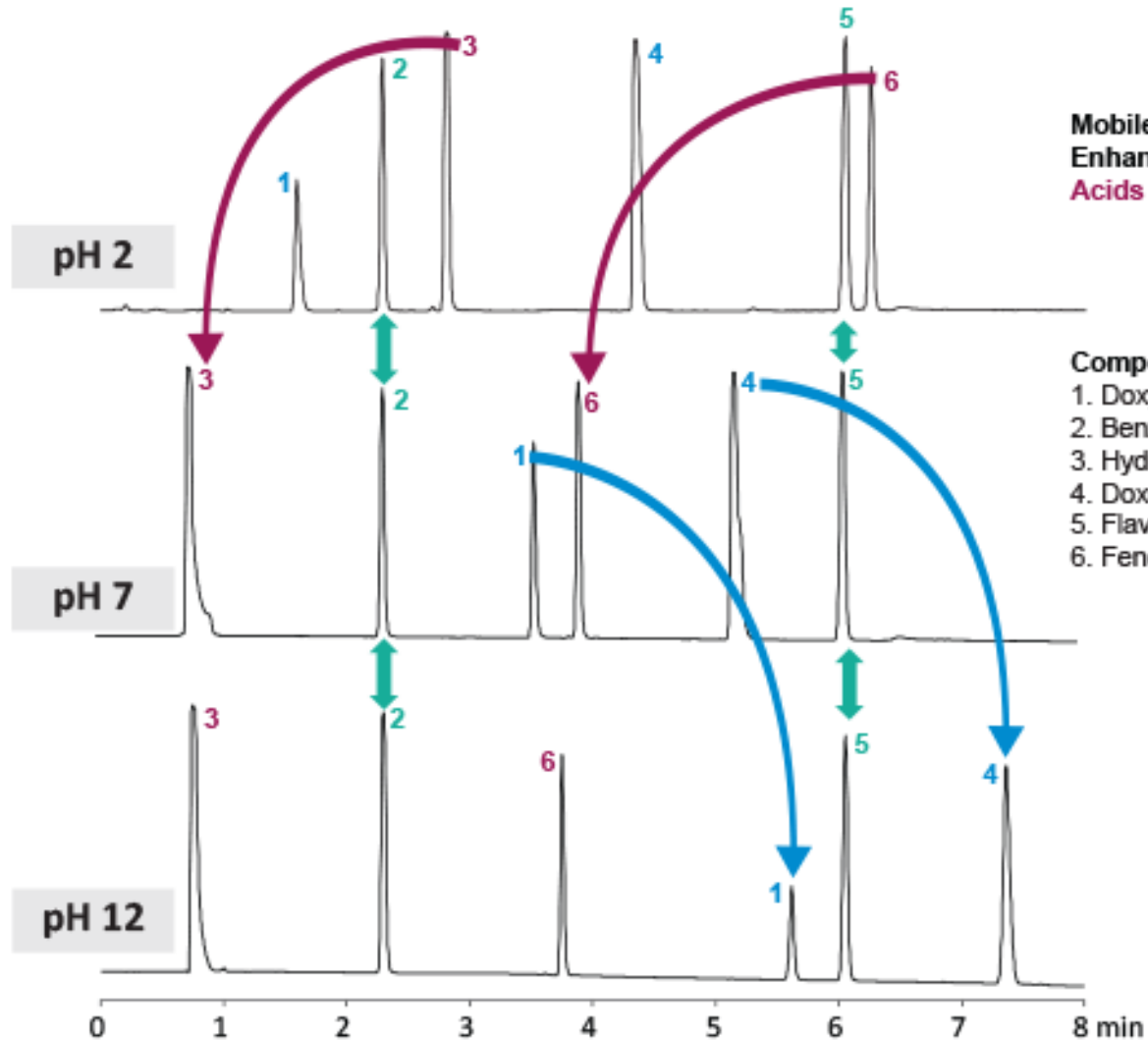
- Gradientová eluce s klesající finální koncentrací



Gradient



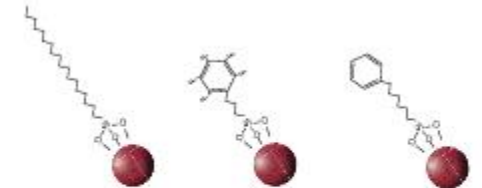
Vliv pH na selektivitu



Mobile Phase pH
Enhances Selectivity for
Acids Bases Neutrals

Compounds:

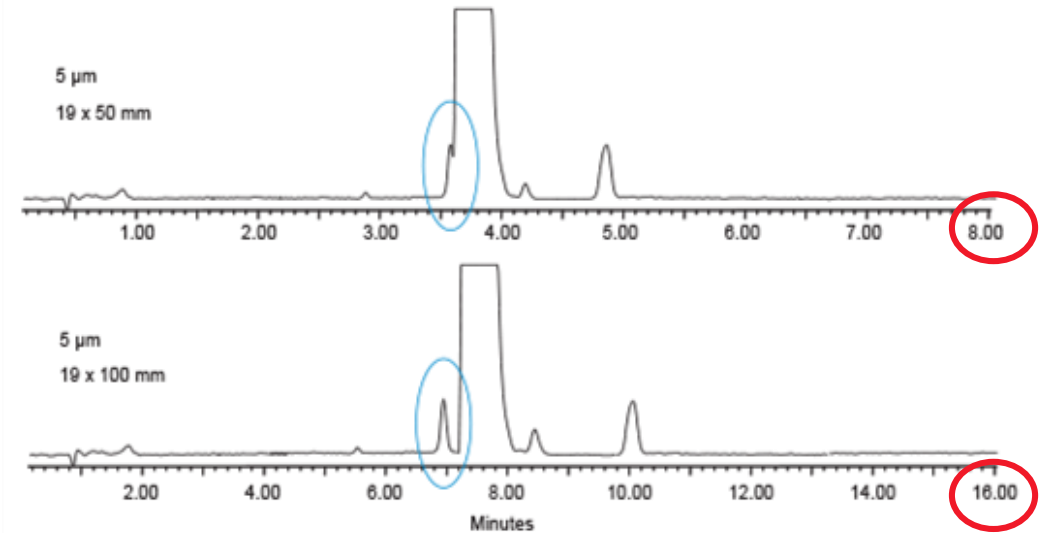
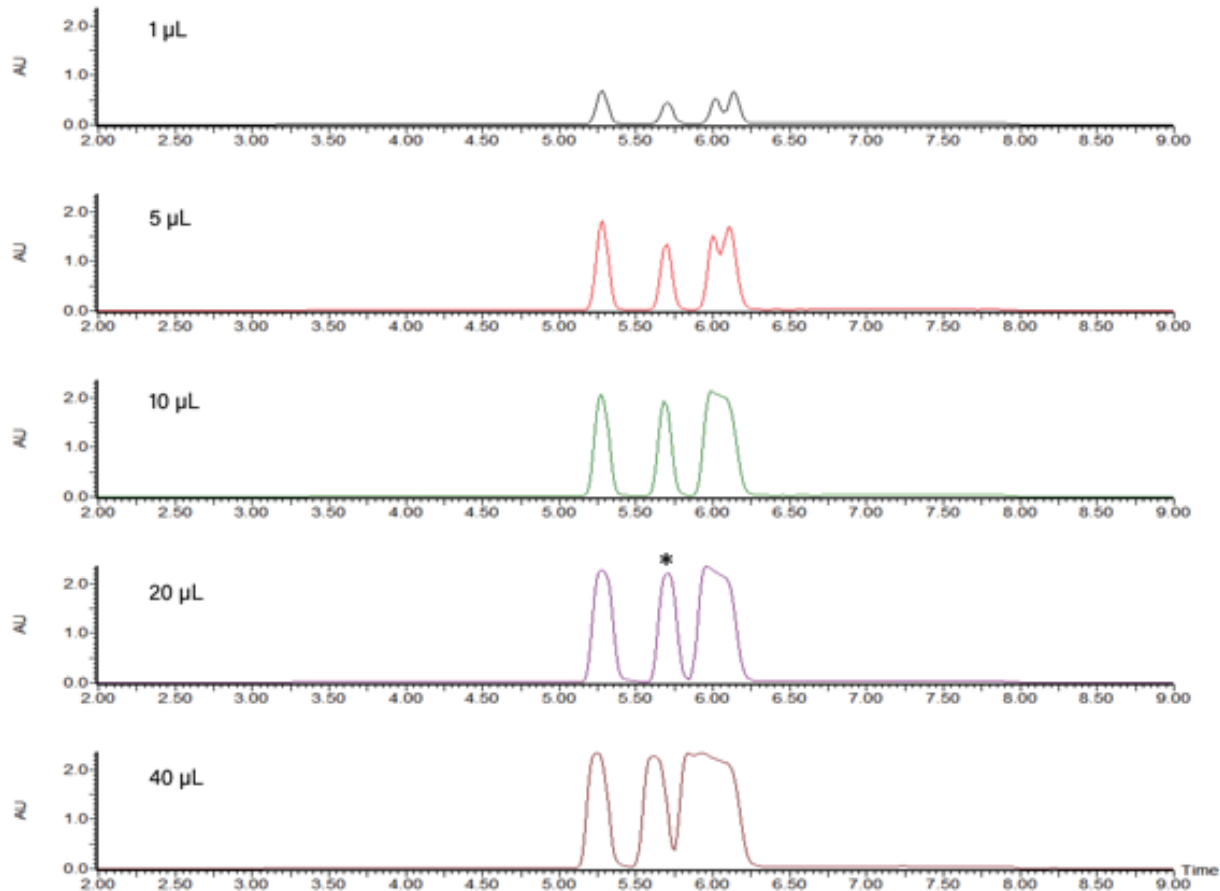
1. Doxylamine (BASIC)
2. Benzamide (NEUTRAL)
3. Hydroxyisophthalic Acid (ACIDIC)
4. Doxepin (BASIC)
5. Flavone (NEUTRAL)
6. Fenopropfen (ACIDIC)



Ligand and Particle Type	CSH C ₁₈	CSH Fluoro-Phenyl	CSH Phenyl-Hexyl
Particle Size	2.5, 3.5, 5 μm	2.5, 3.5, 5 μm	2.5, 3.5, 5 μm
Ligand Density*	2.3 μmol/m ²	2.3 μmol/m ²	2.3 μmol/m ²
Carbon Load*	15%	10%	14%
Endcap Style	Proprietary	None	Proprietary
pH Range	1-11	1-8	1-11
Low pH Temp. Limit	80 °C	60 °C	80 °C
High pH Temp. Limit	45 °C	45 °C	45 °C
Pore Diameter*	130Å	130Å	130Å
Surface Area*	185 m ² /g	185 m ² /g	185 m ² /g

* Expected or approximate value.

Vliv dávkovaného objemu a délky kolony



Kapacita kolony a Aplikace

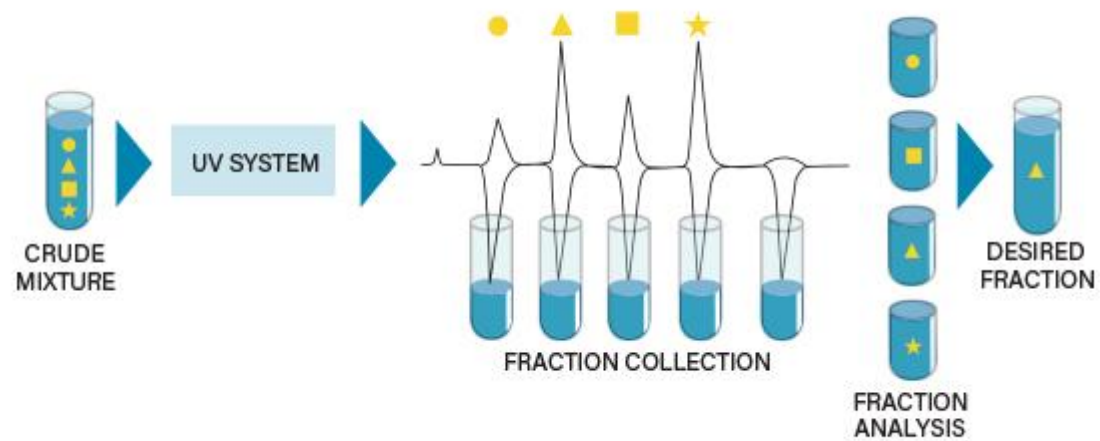
Kapacita kolony (mg)

Aplikace

Délka (mm)	Průměr (mm)					Úroveň (měřítko)	Cílené množství	Typická aplikace
	4.6	10	19	30	50			
50	3	15	45	110	310	Analytická mikropurifikace	µg	Izolace enzymů, případně vývoj bioaktivních sloučenin v malém měřítku
75	—	—	—	165	—			
100	5	25	90	225	620	Semi-Prep	mg	Biologické testování, Určování struktury metabolitů
150	8	40	135	335	930			
250	13	60	225	560	1550	Prep	g	Analytické referenční standardy, Toxikologické studie
Průtok (mL/min)	1.4	6.6	24	60	164	Proces	kg	Výroba chemikálií v průmyslovém měřítku
Dávkovaný objem (µL)	20	100	350	880	2450			

Sběr frakcí

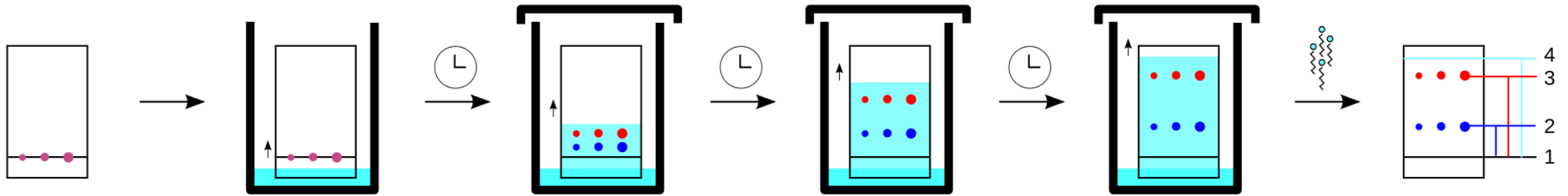
- Na základě informace z detektoru



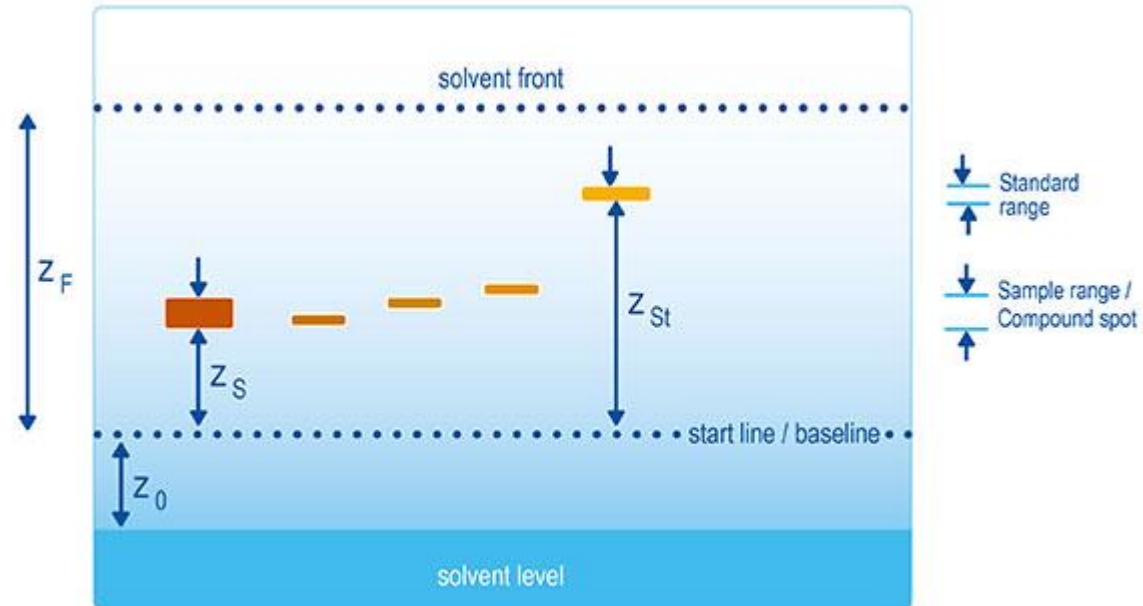
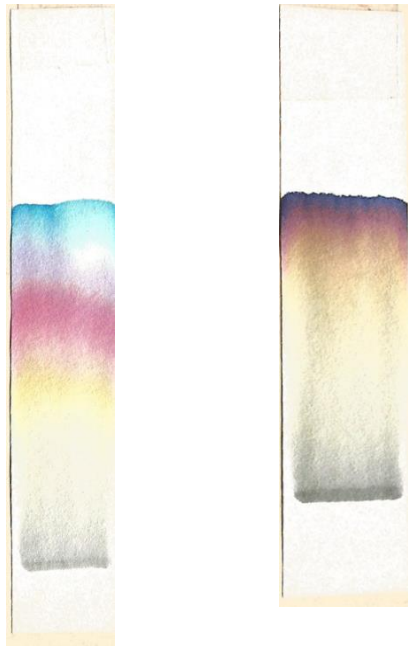
M U N I
S C I

Tenkovrstevná chromatografie

Tenkovrstevná chromatografie



wikipedia.org

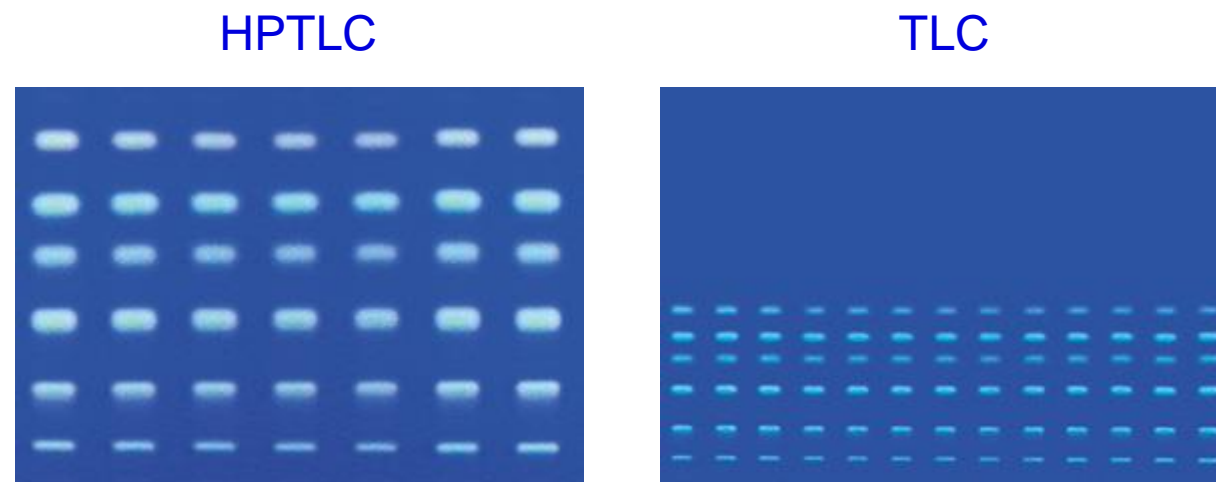


Výběr stacionární fáze

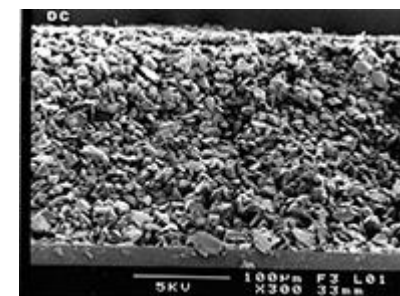
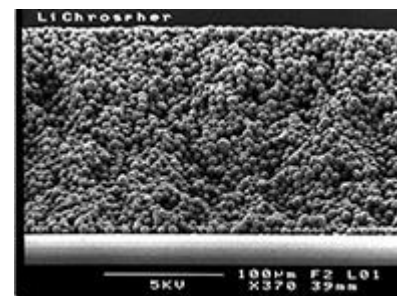
Materiál	Princip	Typická aplikace
Oxid hlinitý	Adsorpční chromatografie (polární interakce)	Alkaloidy, steroidy, terpeny, alifatické, aromatické a bazické sloučeniny
Celulóza	NP/RP, záleží na obsahu acetylu	Antrachinony, antioxidanty, polycyklické aromáty, karboxylové kyseliny, nitrofenoly, sladidla
Křemelina	Impregnovaný materiál pro RP	Aflatoxiny, herbicidy, tetracyklické sloučeniny
Silikagel (SiO₂)		
Standardní silikagel	NP	Nejčastěji využívaný materiál, aflatoxiny
Silikagel G, impregnovaný síranem amonným		Surfaktanty, lipidy Surfactants, lipids (syndrom dechové tísně u dětí, lecitin/sfingomyelin)
Silikagel 60, impregnovaný kafeinem	Přenos náboje komplexu	Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)
Nitrilová skupina (kyano, CN)	NP a RP	Pesticidy, fenoly, konzervanty, steroidy
Diolová skupina		Steroidy, hormony
Amino skupina	Iontová výměna (anionty), NP a RP	Nukleotidy, pesticidy, fenoly, deriváty purinu, steroidy, vitamíny, sulfonové kyseliny, karboxylové kyseliny, xantiny
Obrácené fáze		
RP-2, RP-8, RP-18		Nepolární látky (lipidy, aromatické sloučeniny)
Silanizovaný silikagel 60		Polární látky (bazické a kyselé farmaceutické přísady)
Smáčivý RP-18 W/UV254	NP a RP	Aminofenoly, barbituráty, konzervanty, nukleové báze, PAH, steroidy, tetracyklíny, ftaláty
Sférický silikagel		
LiChrospher® Si 60	NP	Pesticidy, fytofarmaceutika

HPTLC

	HPTLC	TLC
Velikost částic	5 - 6 μm	10 - 12 μm
Distribuce částic	4 - 8 μm	5 - 20 μm
Tloušťka vrstvy	200 μm (100 μm)	250 μm
HETP	12 μm	30 μm
Typická migrační vzdálenost	3 - 6 cm	10 - 15 cm
Čas separace	3 - 20 min	20 - 200 min
Počet vzorků na desce	< 36 (72)	< 10
Objem vzorku	0.1 - 0.5 μl	1 - 5 μl
Detekční limity: absorpce	100 - 500 pg	1 - 5 ng
fluorescence	5 - 10 pg	50 - 100 pg



Identické podmínky separace
aminokyseliny značených dansyl
chloridem



TLC-MS

LESA™
(Liquid Extraction Surface Analysis)

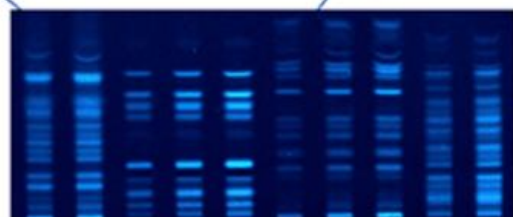


TriVersa®
NanoMate, Advion

TLC-MALDI-MS



TLC MALDI Adapter,
Bruker Daltonics



TLC-DESI-MS

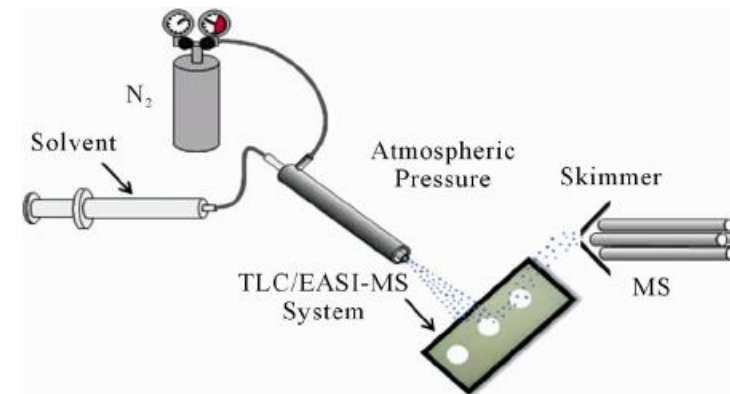


Anal. Bioanal. Chem.
391 (2008) 1627

TLC-DART-MS



Rapid Commun. Mass Spectrom.
2011, 25, 2275 - 2282



DOI: 10.4236/ajac.2011.26075

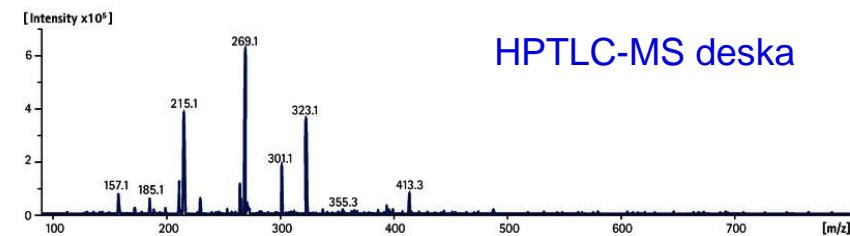
Elution-based TLC-MS



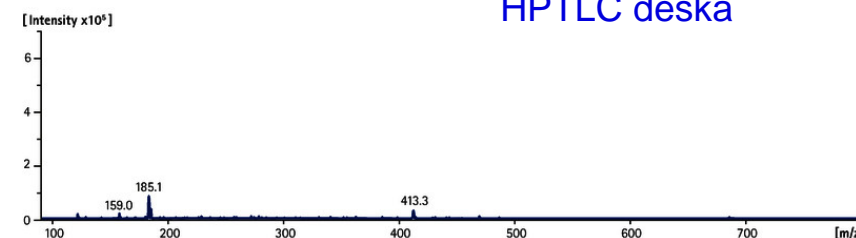
TLC-MS Interface
Camag



Plate Express
Advion



HPTLC-MS deska



HPTLC deska