

# HPLC

Oktober 2008

På et plot fra HPLC, vil der måske være en lille spøjs top som det første. Toppen kommer, hvis prøvens opløsningsmiddel er forskellig fra eluenten. Prøvens opløsningsmiddel giver en ændring i refraktiv index ("opløsningsmiddeltop"). Toppen er et mål for dødtiden.

Ex: eluent: MeOH/H<sub>2</sub>O 80/20  
kolonne: 5  $\mu$ m C<sub>18</sub>

I dette tilfælde er eluenten mere polær end stationær fase; det kaldes omvendt fase. Her er det analytternes apolære egenskaber, der er afgørende for adskillelsen.

Ved normal fase er det analytternes polære egenskaber, der er afgørende for adskillelsen.

En analyt har en vis affinitet til den stationære fase.

jo større affinitet til stationær fase, desto længere retentionstid, jo større affinitet til mobil fase, desto kortere retentionstid.

Ekutropstyrke: et udtryk for en eluents evne til at trække analytterne med. Jo mere eluentens polaritet ligner den stationære fases polaritet, desto større elutropstyrke.

## 1 Eksempel på eluentsammensætning

Eluent: MeOH/ H<sub>2</sub>O 80/20, Kolonne: ODS (C<sub>18</sub>). Se figur 1(a).

**Hvad sker der, hvis eluenten ændres til:**

**a.) MeOH/H<sub>2</sub>O 95/5:**

Eluenten bliver mindre polær og kommer altså til at ligne kolonnens polaritet mere. Dvs. analytterne kommer hurtigere ud. Se figur 1(b).

**b.) ACN/H<sub>2</sub>O 80/20:**

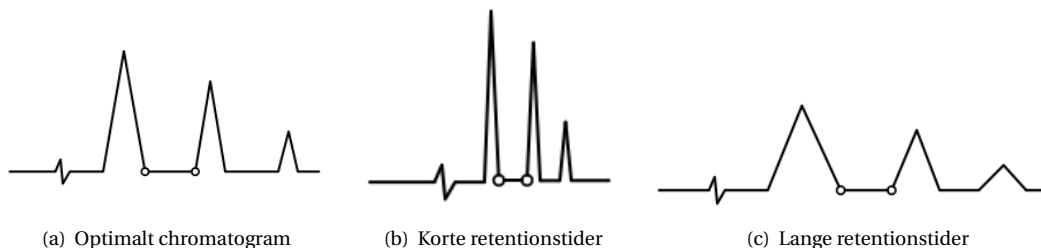
ACN er mindre polær end MeOH, så eluenten vil igen blive mindre polær. Analytterne kommer hurtigere ud. Se figur 1(b).

**c.) MeOH/H<sub>2</sub>O 70/30**

Modsat af a.). Se figur 1(c).

**d.) MeOH/H<sub>2</sub>O 80/20, men kolonnen er udskiftet med C<sub>8</sub>**

Kolonnen er mere polær end før, og ligner altså eluenten mere. Analytterne kommer altså hurtigere ud, og situationen vil ligne den i figur 1(b).



Figur 1: *Chromatogrammer*

## 2 Kolonner

Hvilke faktorer har betydning?

- Hvilken stationær fase, der er i kolonnen (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, ... ,Si)
- Hvilken længde har kolonnen.
- Hvilken diameter har kolonnen.
- Hvilken kornstørrelse har kolonnen (3 til 10 $\mu$ m). Jo lavere kornstørrelse desto mere overflade  $\leftrightarrow$  bedre adskillelse af analytter.

## 3 HPLC-problemer

### 3.1 Toppe ej adskilt

Eluentsammensætningen ændres. Eluenten gøres mere polær ved at øge mængde af vand i eluenten (H<sub>2</sub>O er mere polær end MeOH).