

Chromatografické metody II.

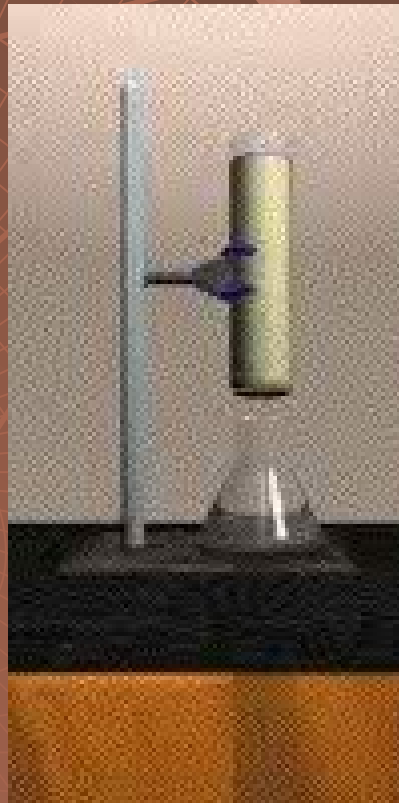


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Chromatografie



Kapalinová chromatografie rozdělení

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

Kapalinová chromatografie využití

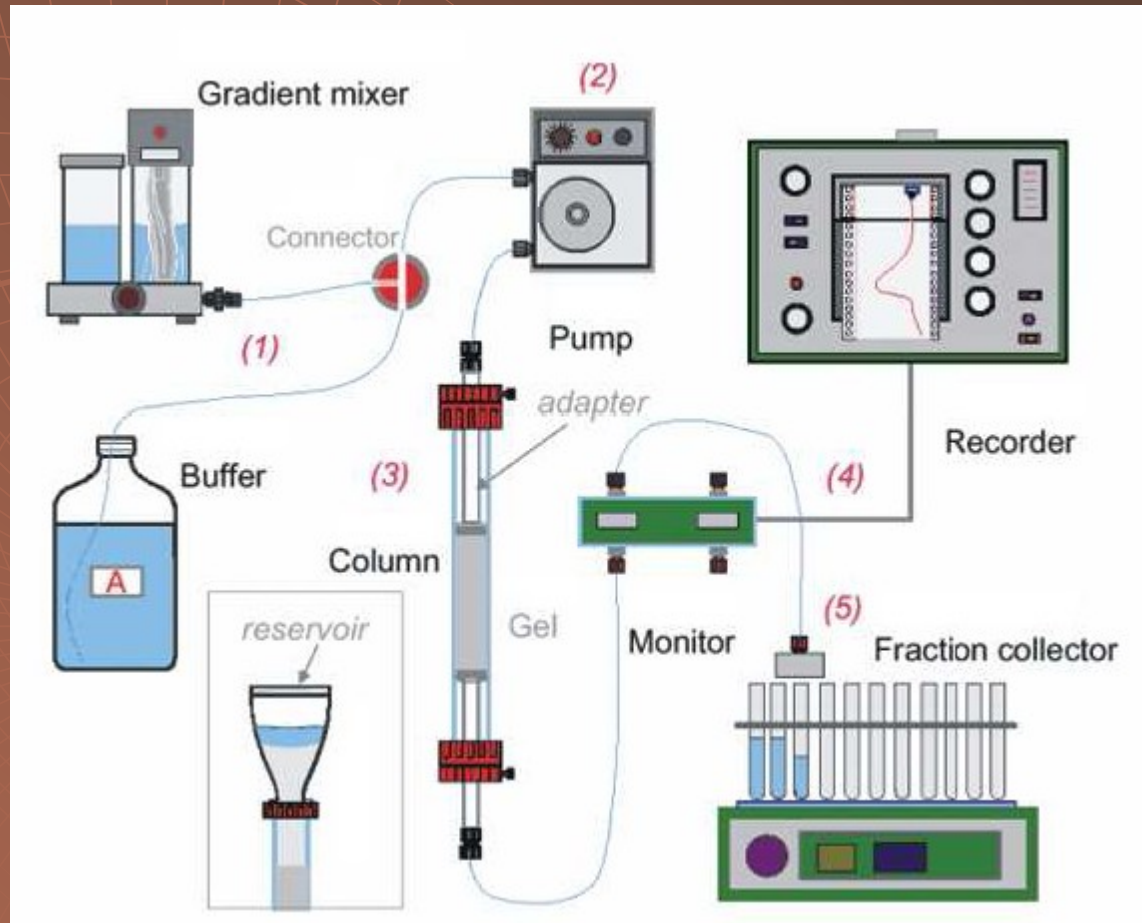
- ◆ LPC – preparativní
- ◆ FPLC – semipreparativní a analytická
- ◆ HPLC – analytická
- ◆ UPLC – analytická

Kapalinová chromatografie

doba trvání

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

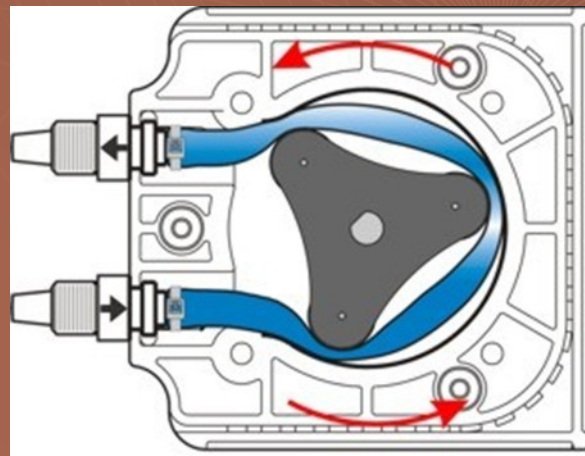
Zařízení pro LPC



Zařízení pro LPC



Zařízení pro LPC



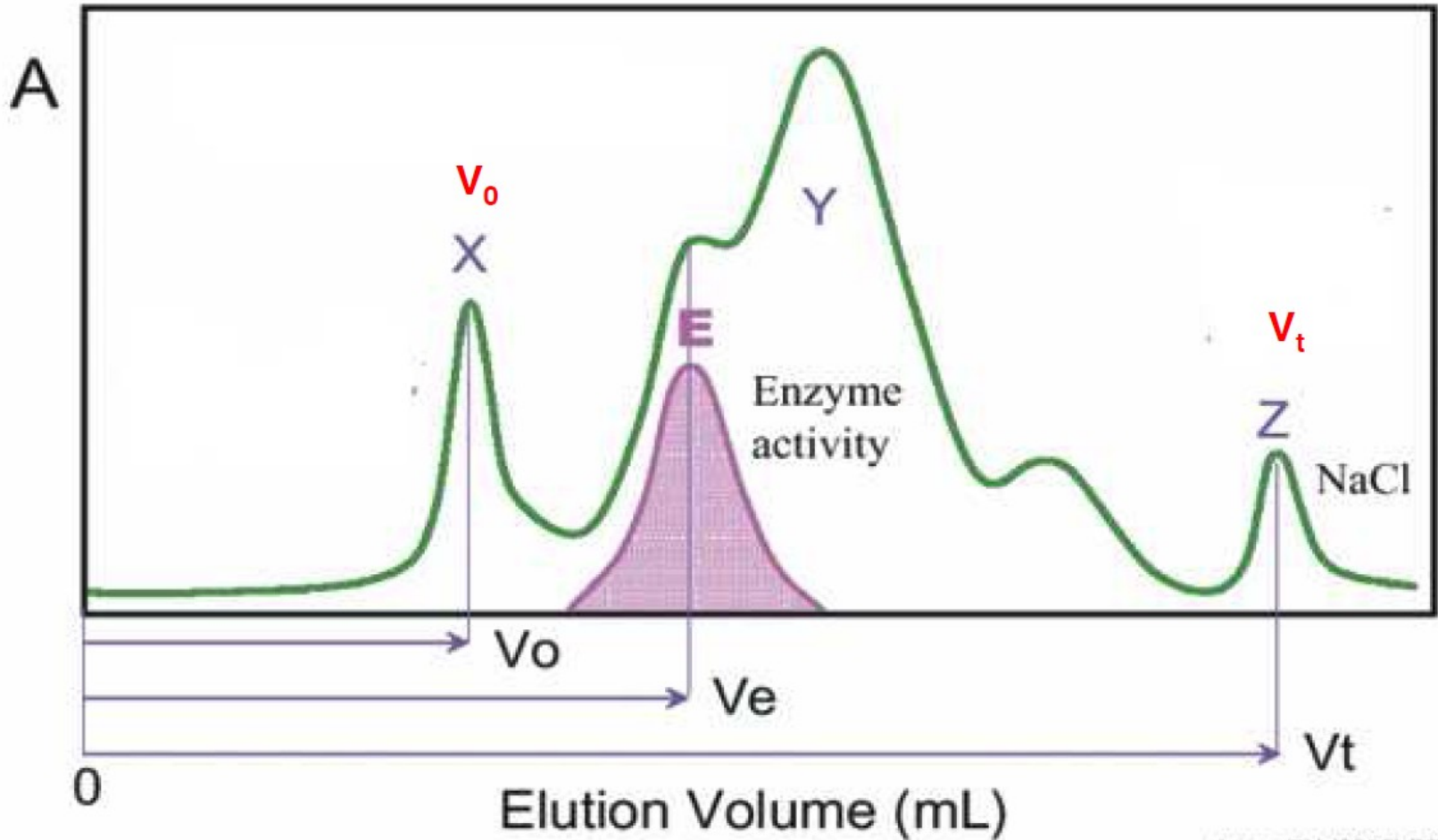
Zařízení pro LPC



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

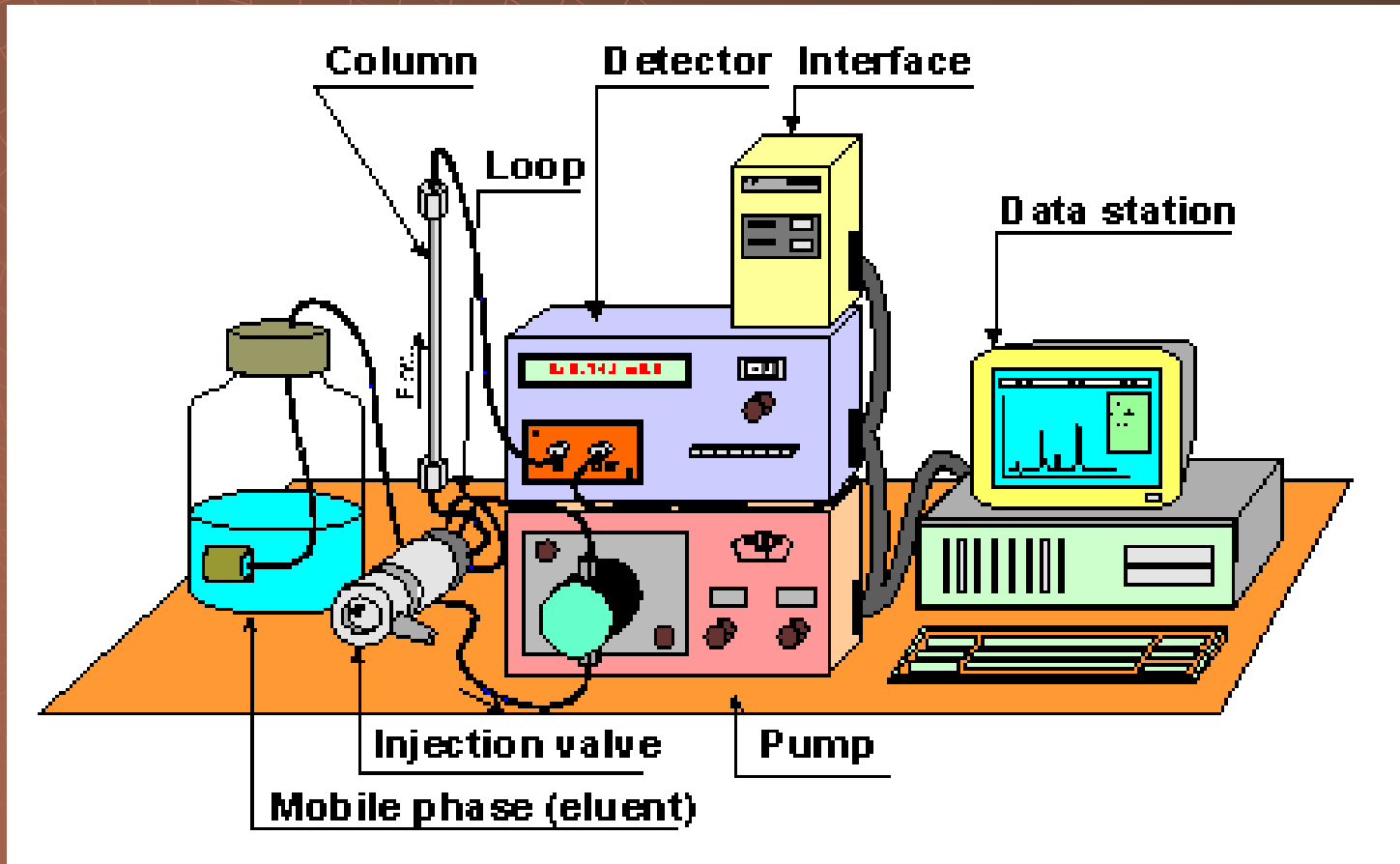
LPC





Instrumentace pro FPLC a HPLC

Zařízení pro FPLC a HPLC



Zařízení pro FPLC



Zařízení pro HPLC



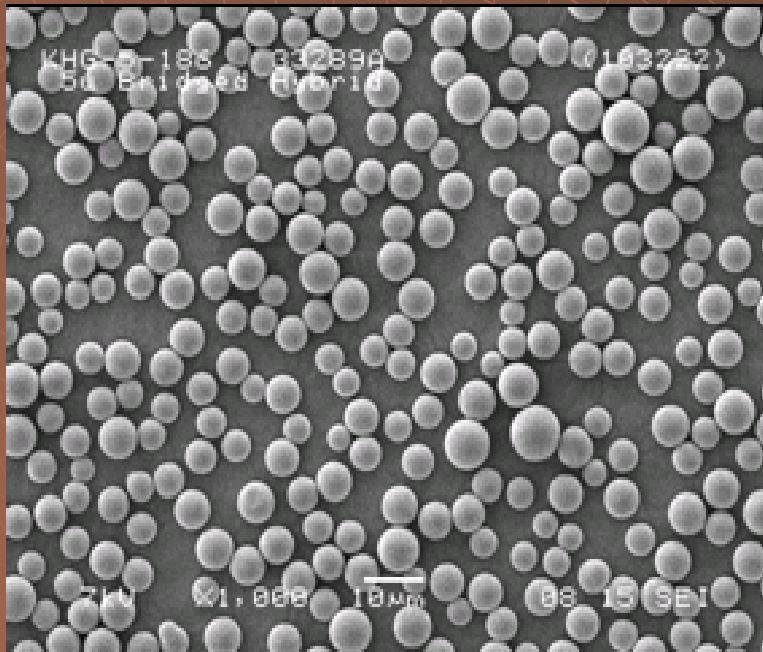
Zařízení pro UPLC



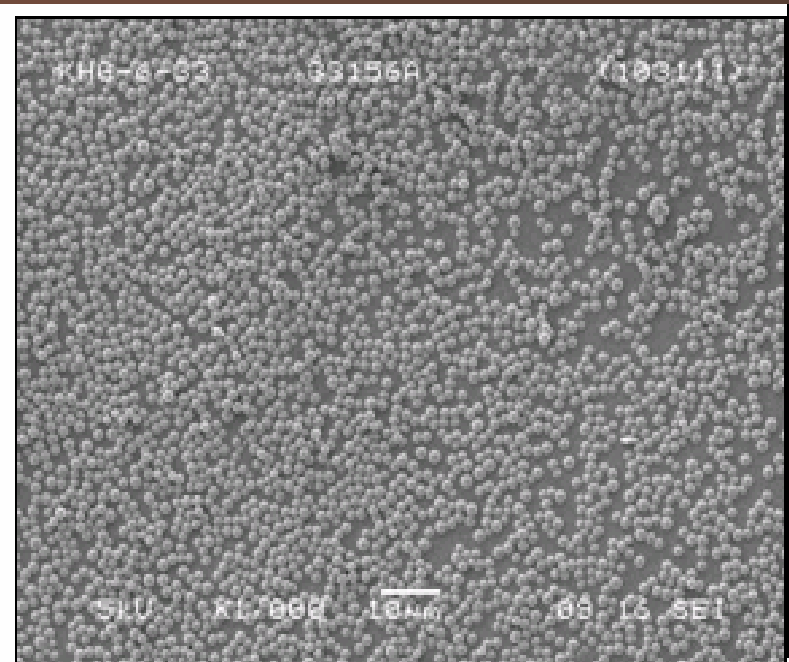
UPLC x HPLC

- 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



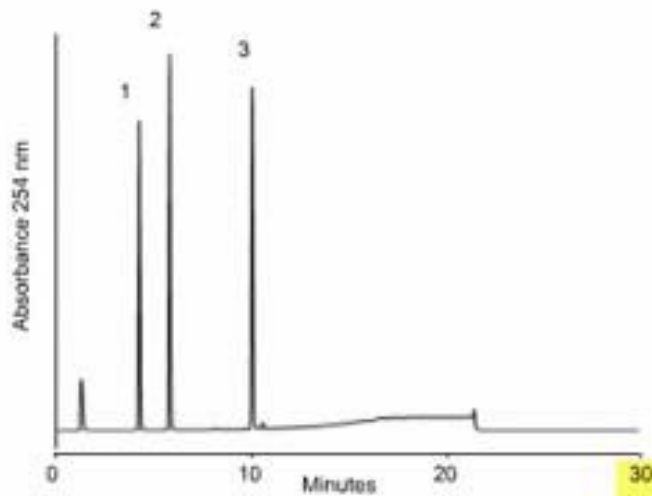
1.7 µm UPLC Particles

UPLC x HPLC

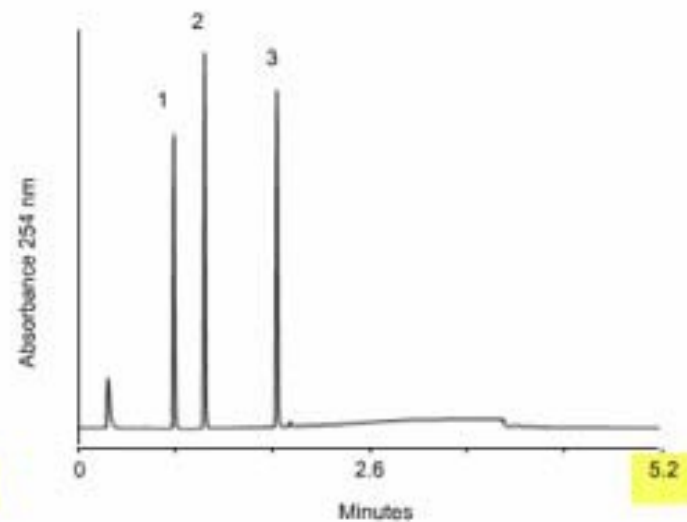
Waters

HPLC Converted to UPLC™

©2005 Waters Corporation

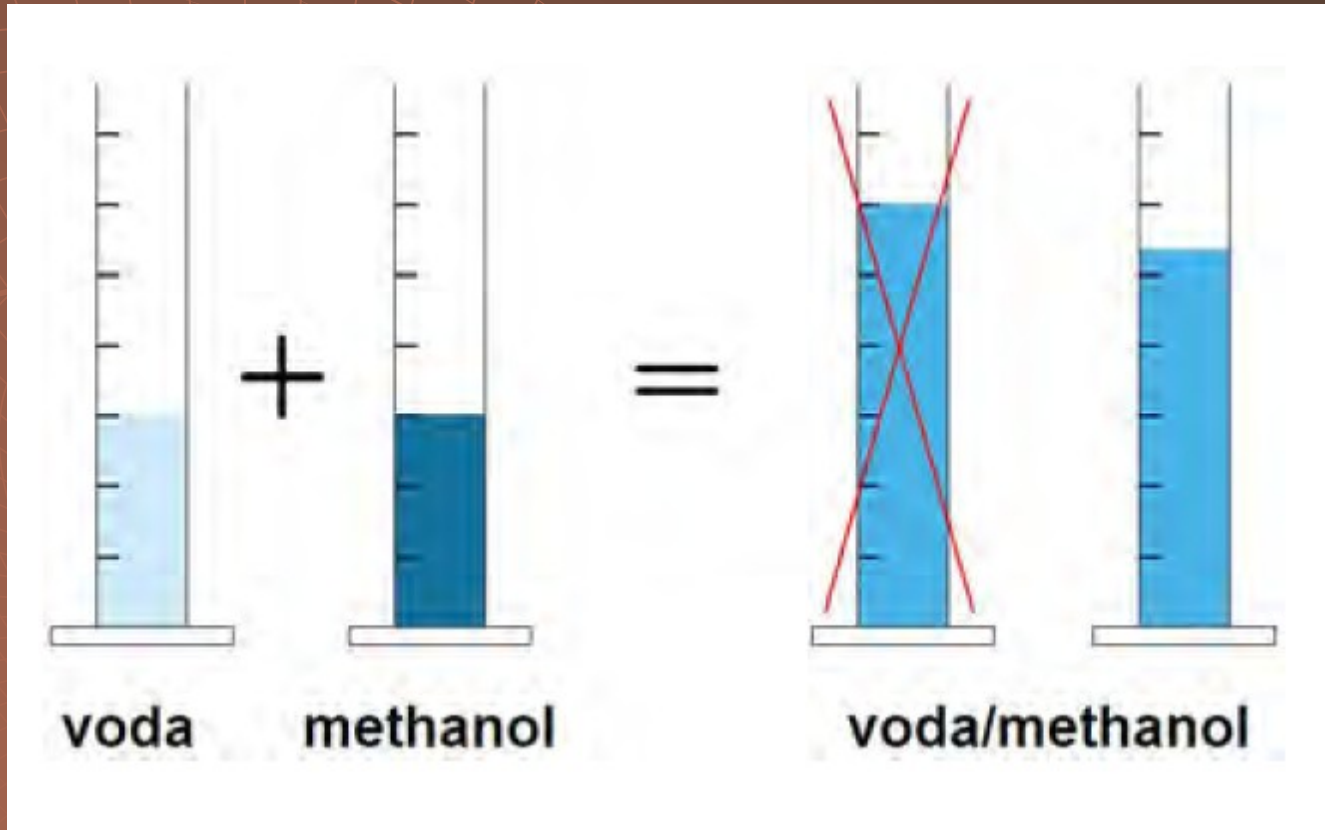


Original 30 minute HPLC



Converted 5.2 minute UPLC™

Příprava mobilní fáze



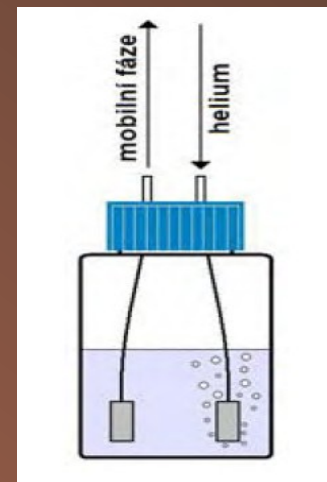
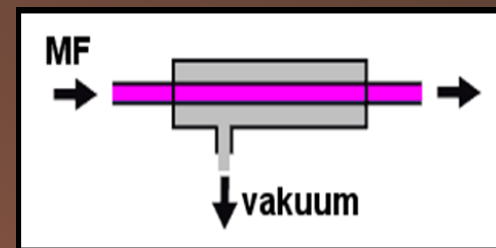
Příprava mobilní fáze

- filtrace



Odplynění mobilní fáze

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



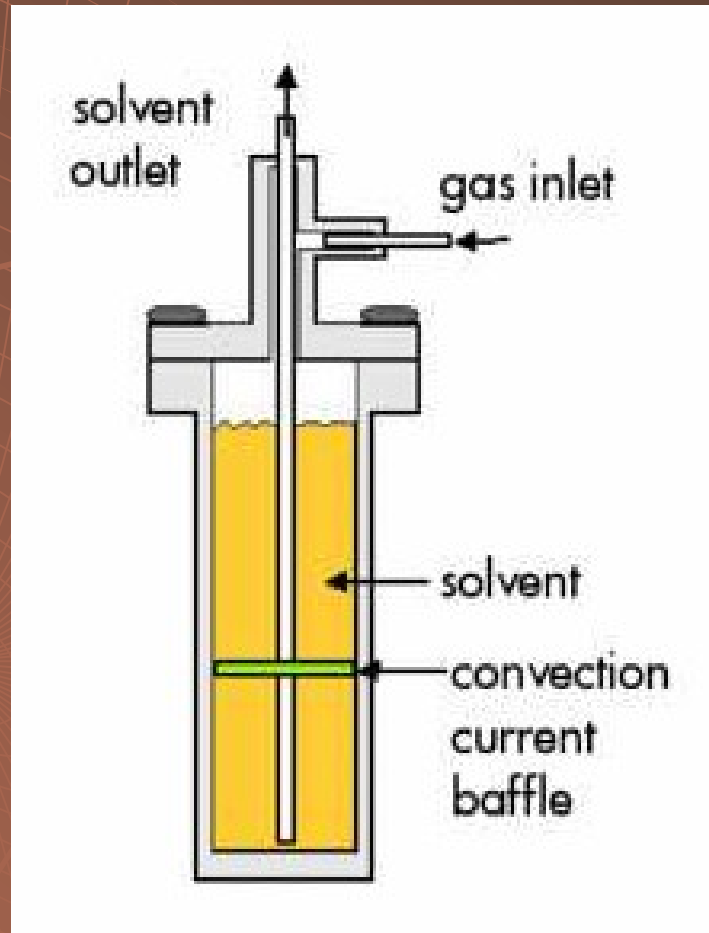
A stylized wireframe globe is centered on the left side of the image. The globe is composed of a grid of lines forming a sphere. A small, light-colored pushpin is stuck into the top of the globe. The word "Pumpy" is written in a white, sans-serif font across the middle of the globe.

Pumpy

The background features a faint, light-colored illustration of a pump impeller. A needle from a pressure gauge is superimposed over the impeller, pointing towards the upper right. The entire scene is set against a dark brown background.

Pumpy pracující za konstantního tlaku

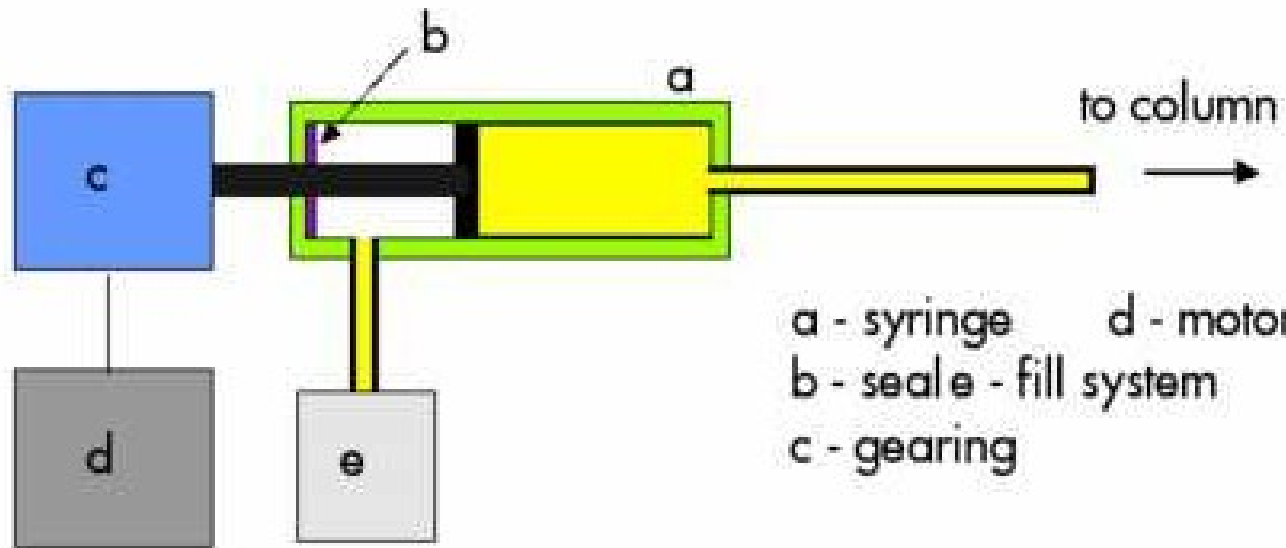
Tlaková pumpa



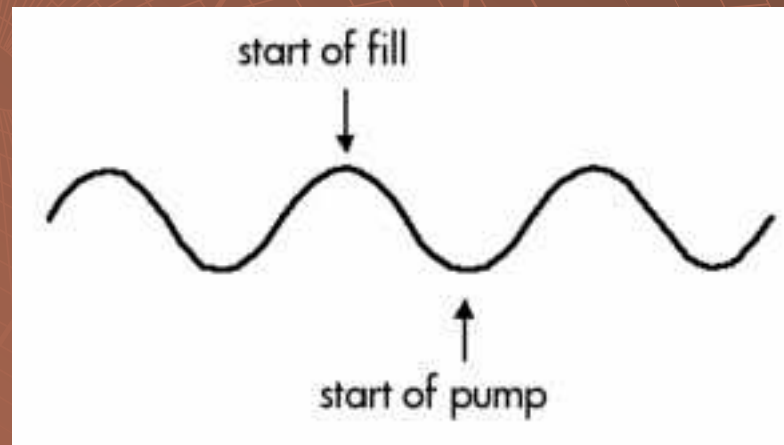
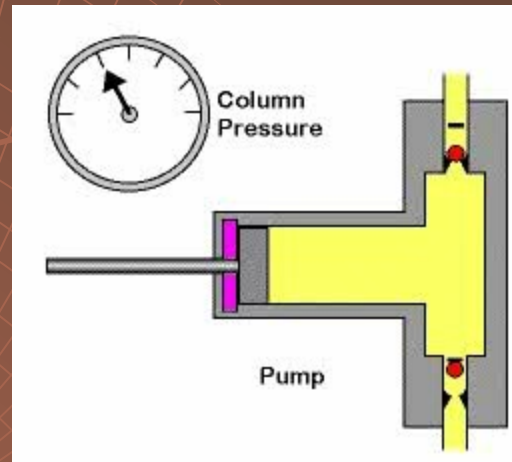


Pumpy pracující za konstantního průtoku

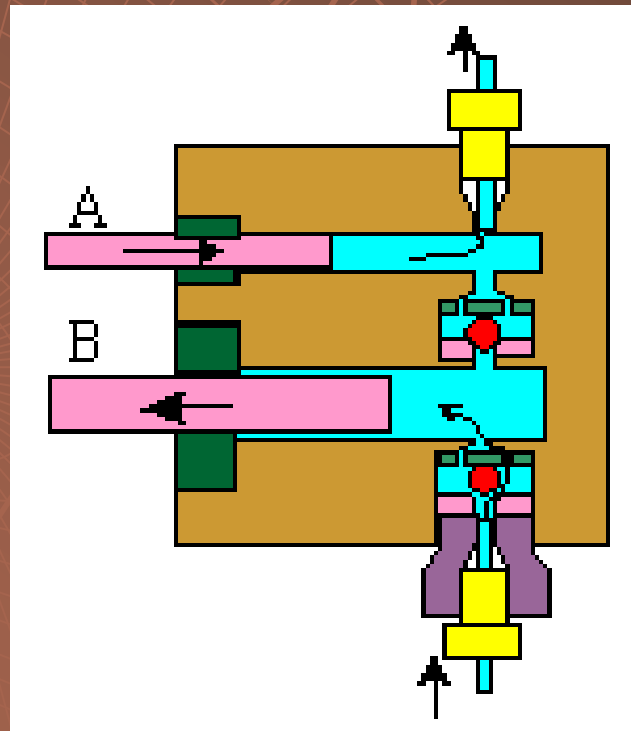
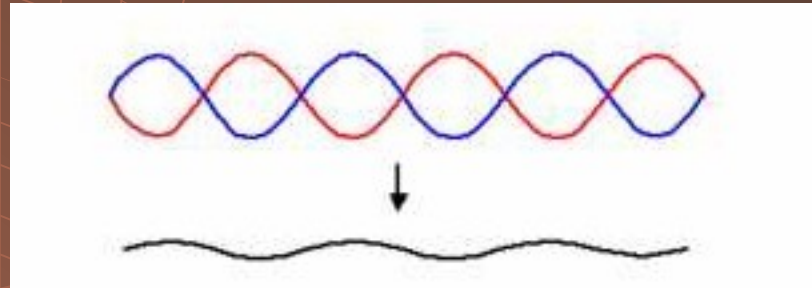
Lineární dávkovače



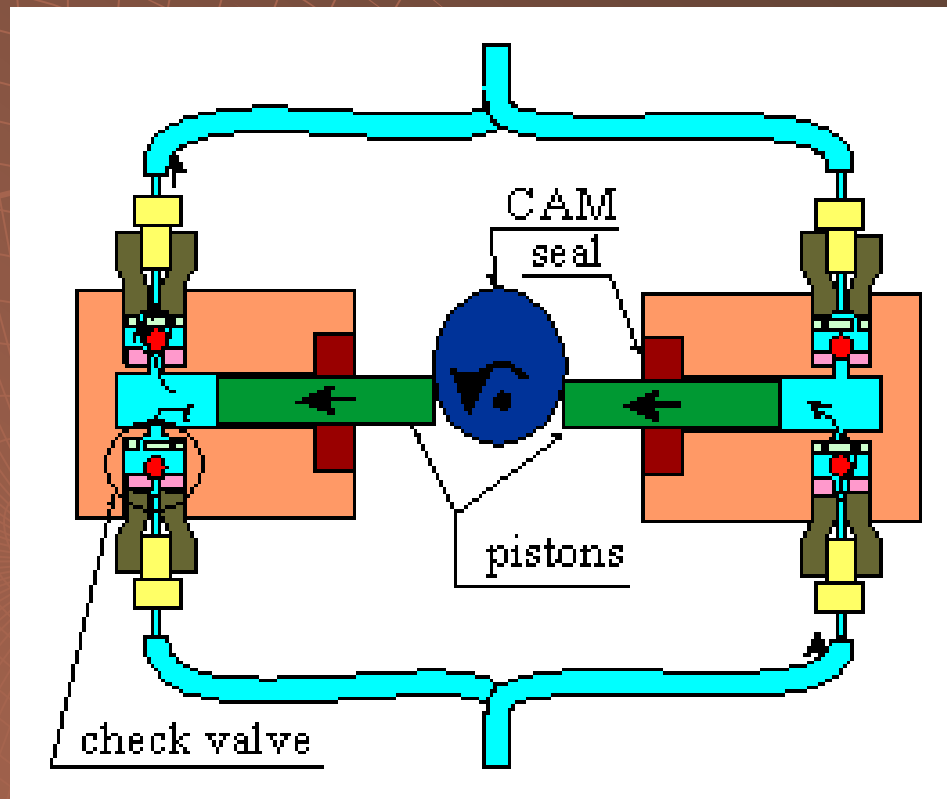
Pumpa jednopístová



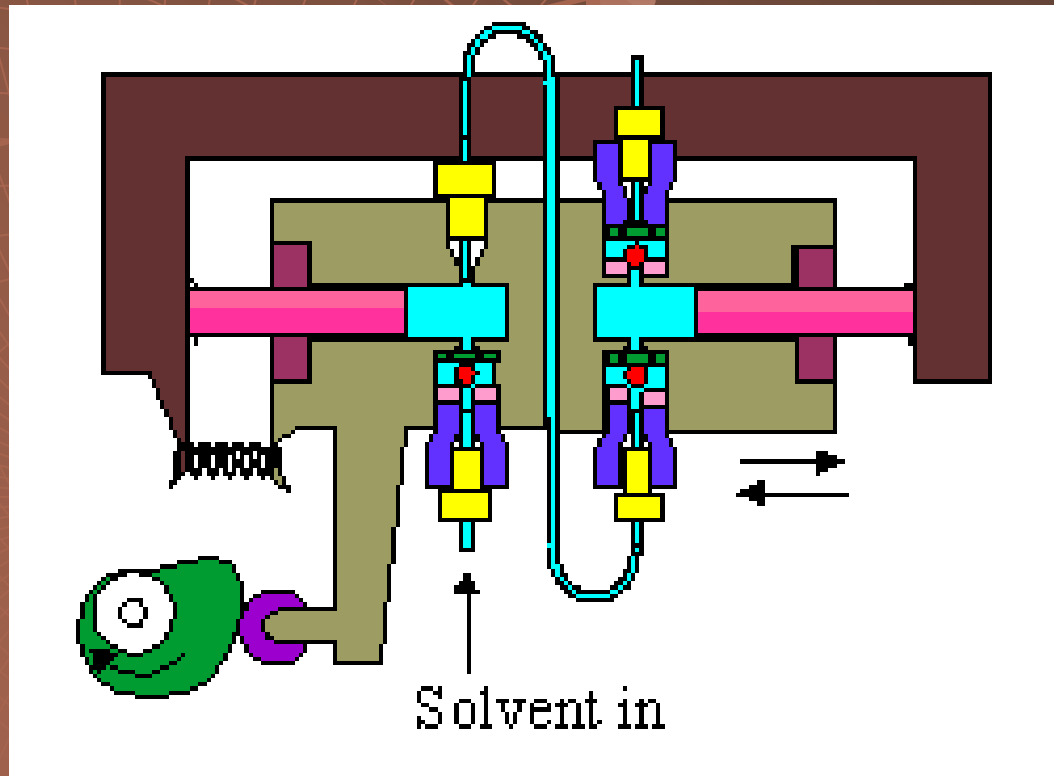
Pumpa dvoupístová



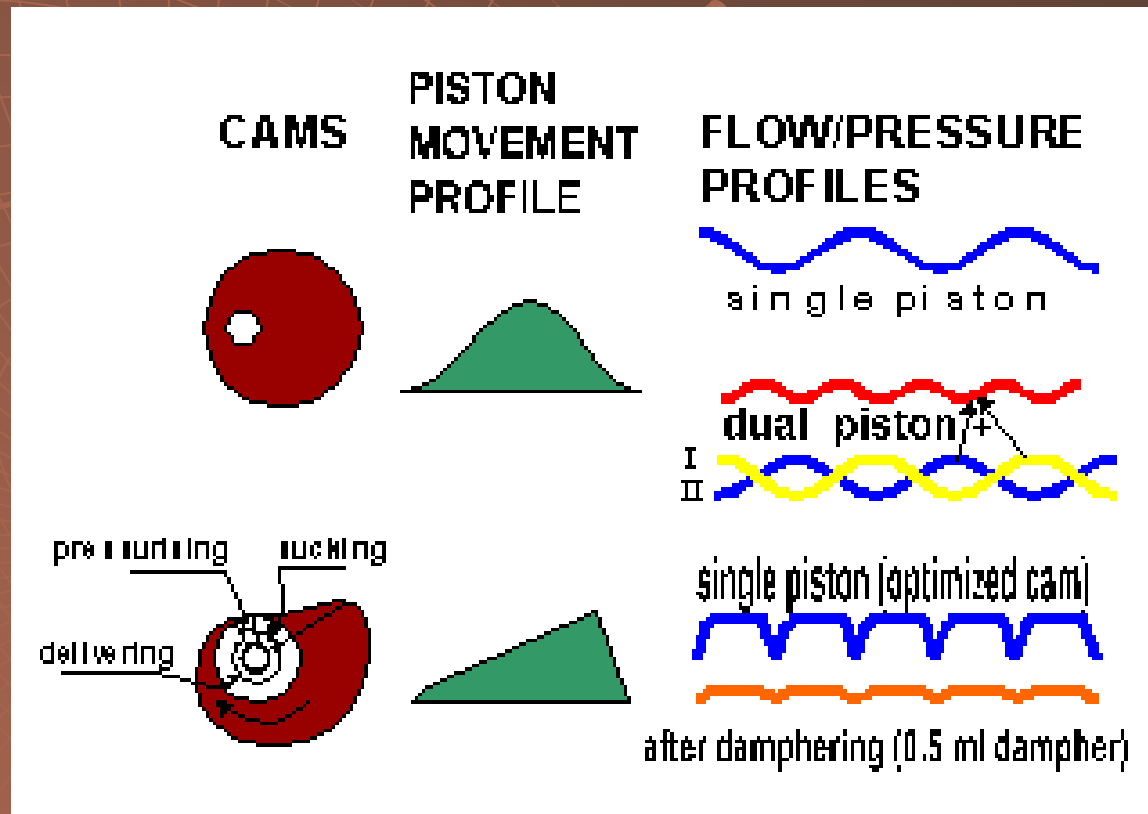
Pumpa dvoupístová



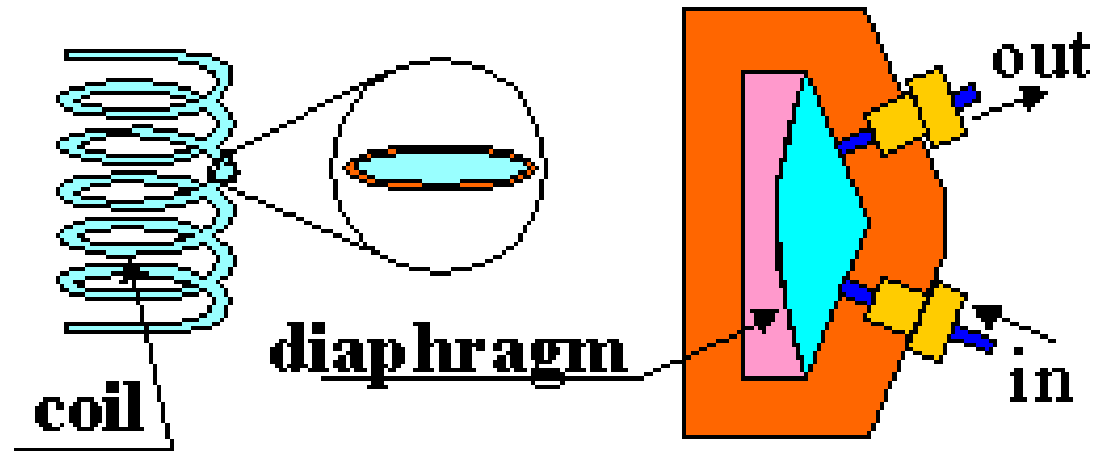
Pumpa dvoupístová



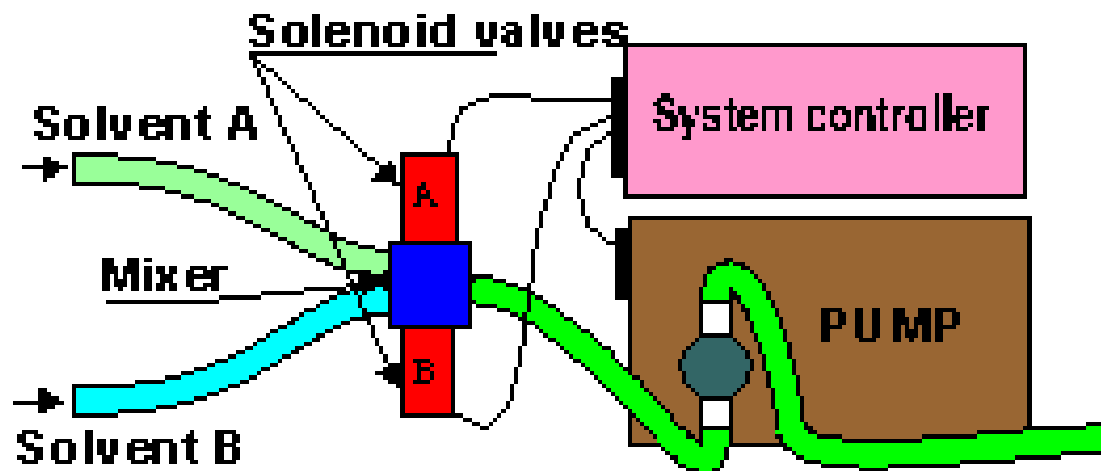
Tlumení pulsů



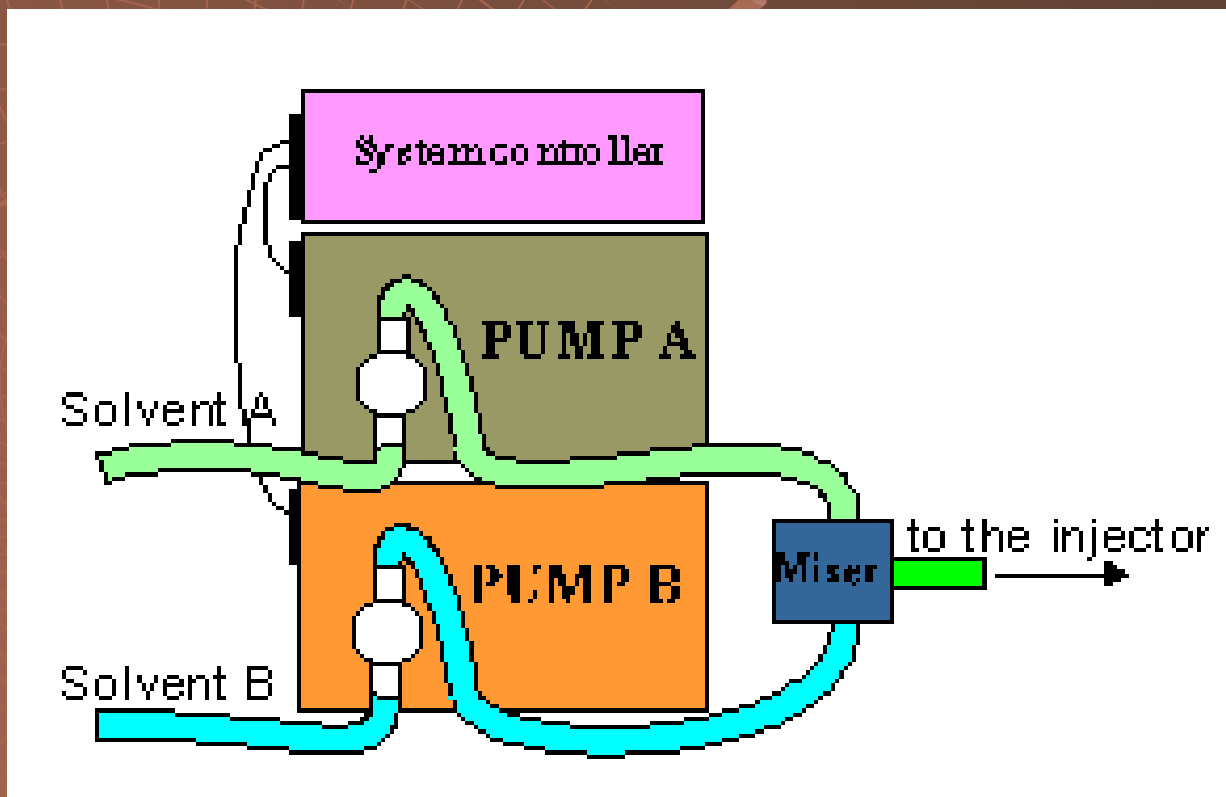
Tlumení pulsů



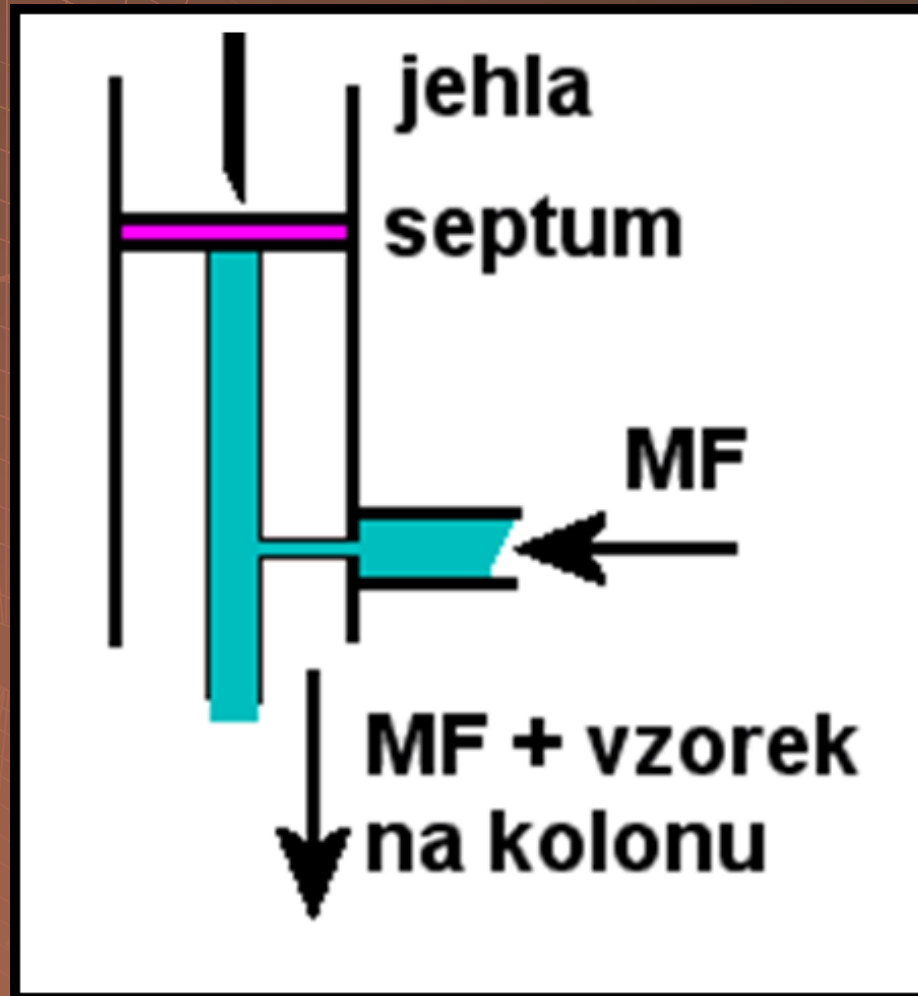
Gradient nízkotlaký



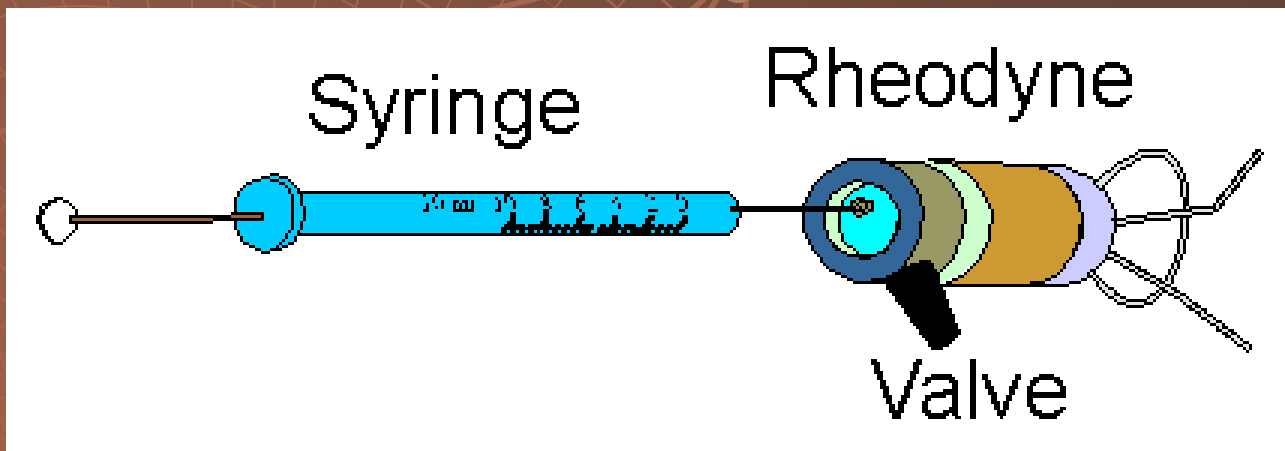
Gradient vysokotlaký



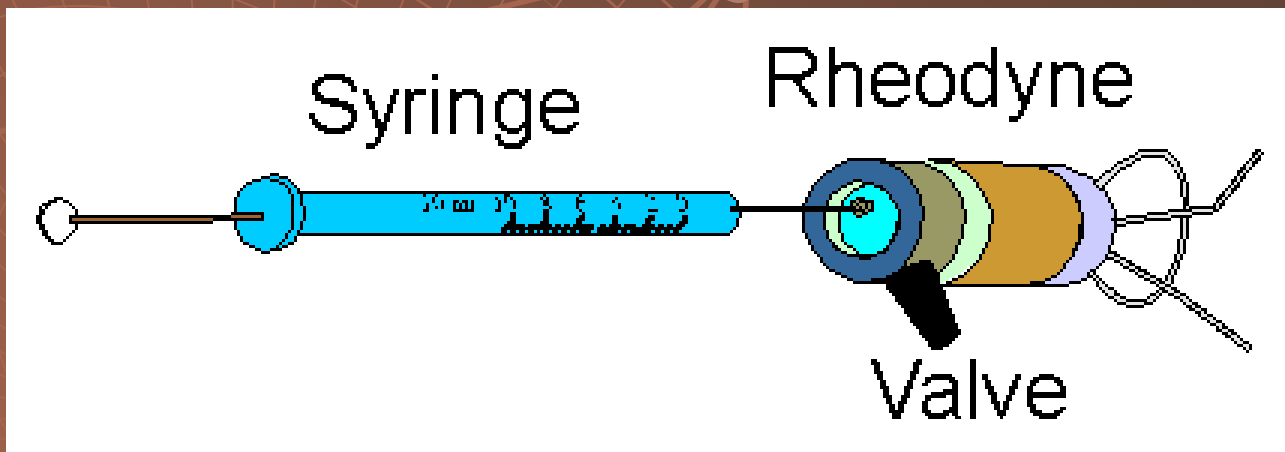
Dávkování – septum



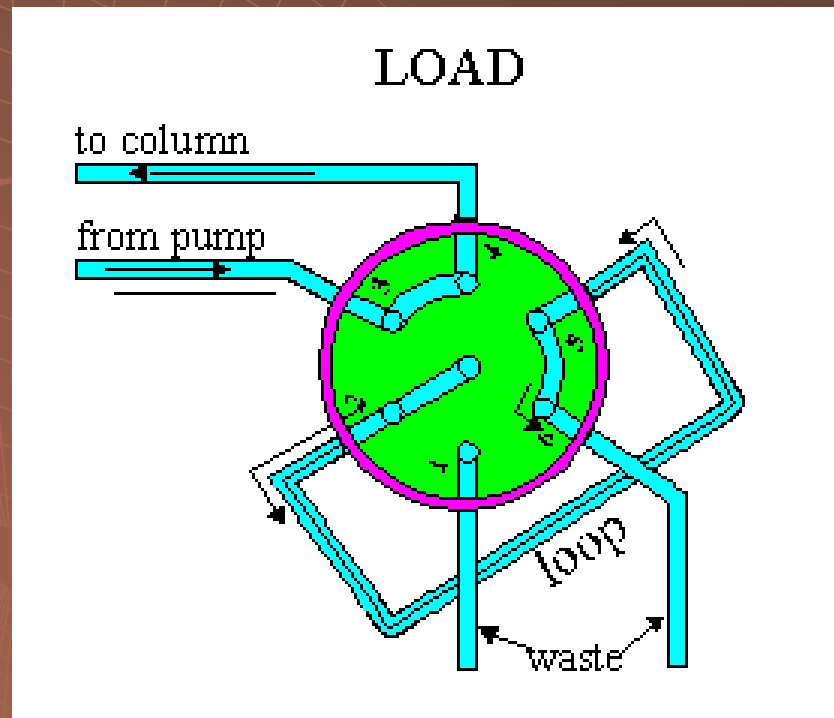
Dávkování – dávkovací ventil



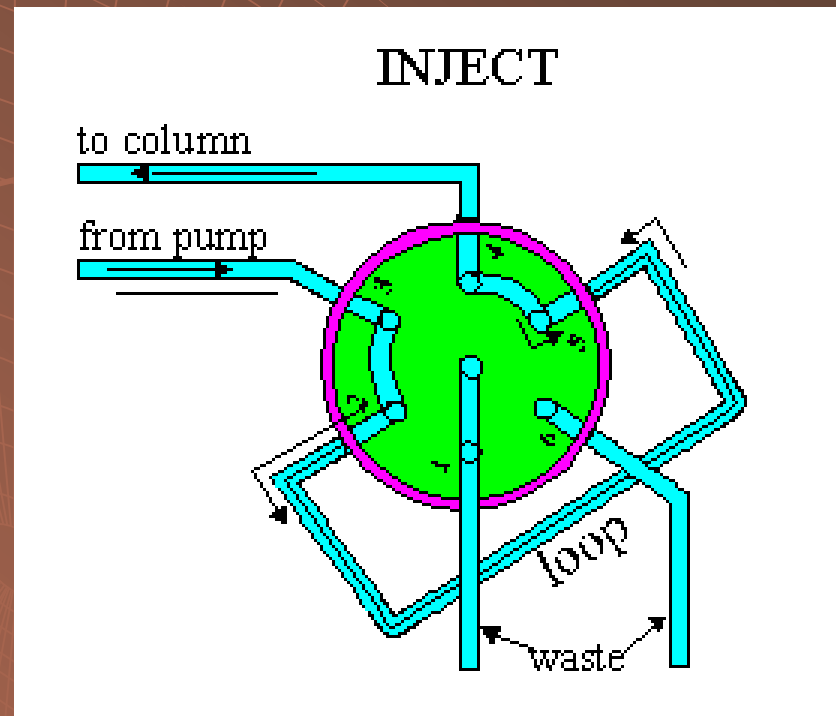
Dávkování – dávkovací ventil



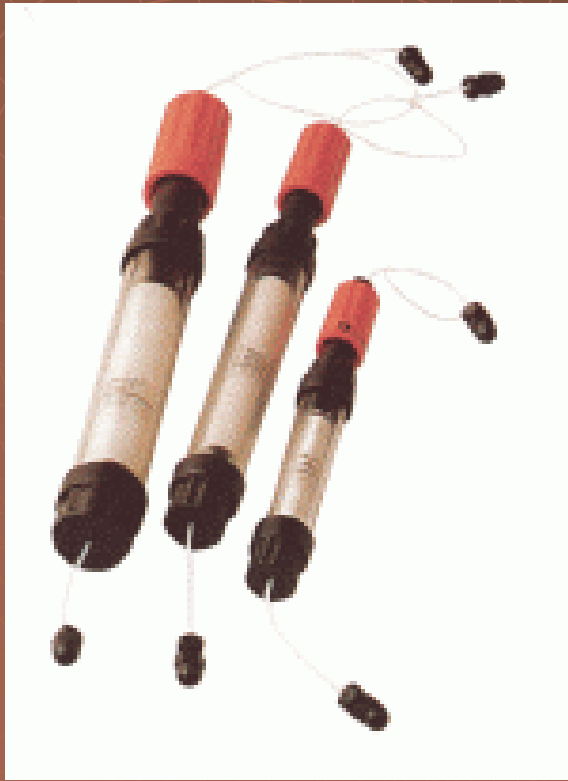
Dávkovací ventil – „Load“



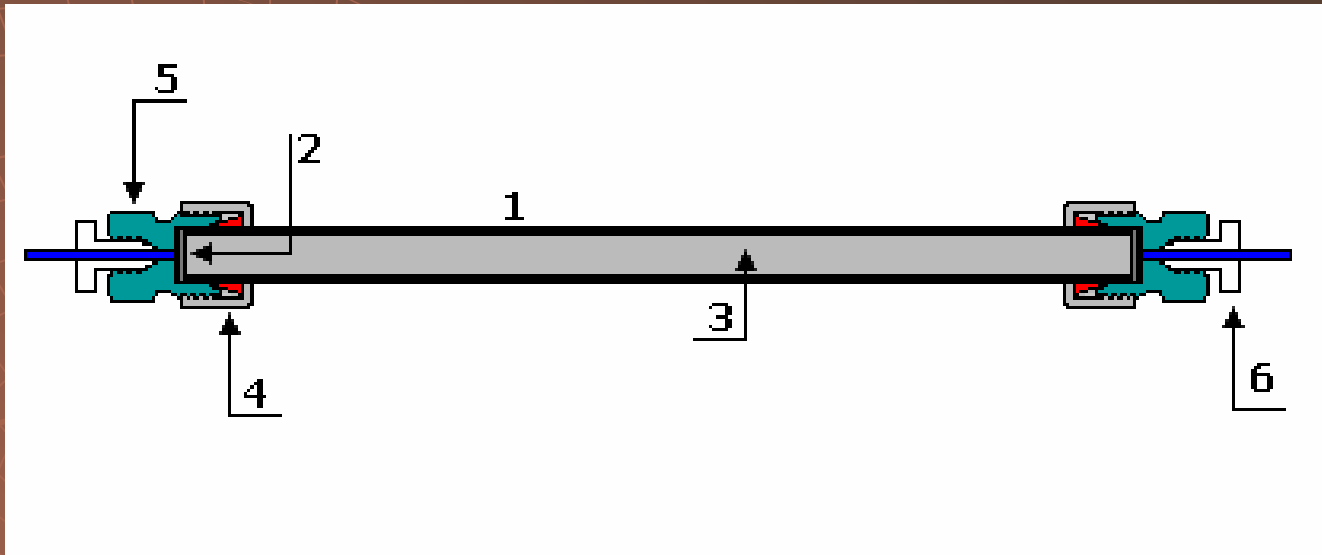
Dávkovací ventil – „Inject“



Kolony pro FPLC

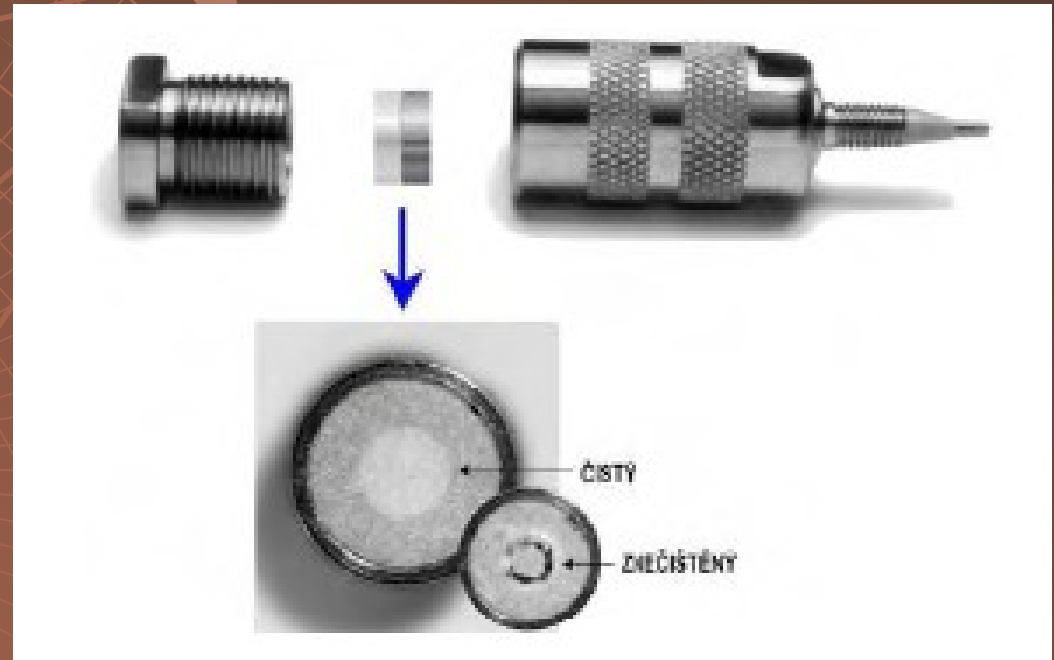


Kolona



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 kapilární HPLC



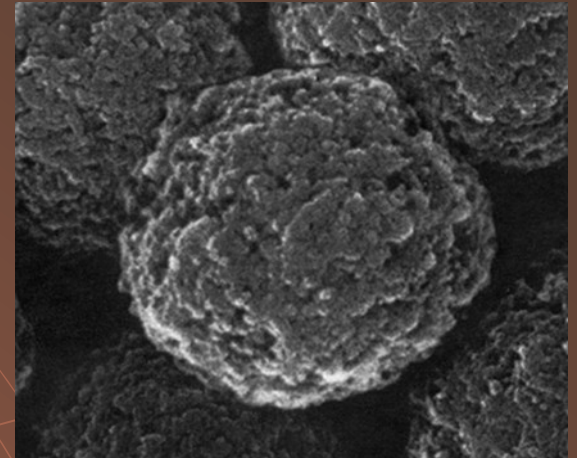
Částicový sorbent

tvar: sférický (bez povrchových vad)

rozměr pro kolony:

analytické 1 – 8 μm

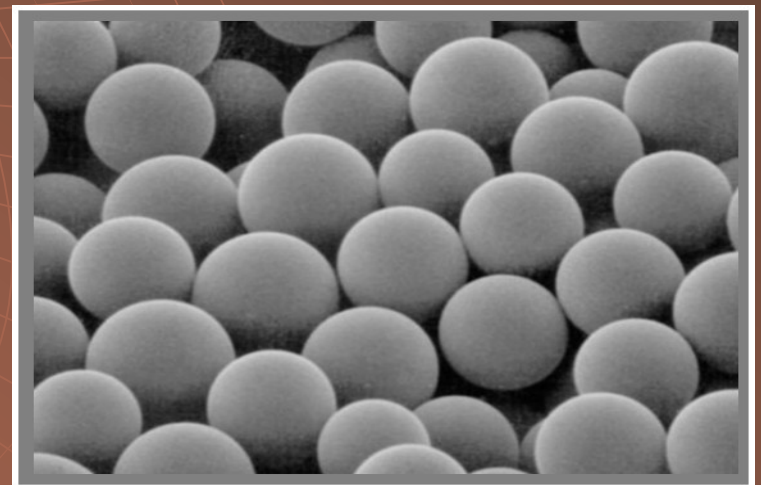
preparativní > 10 μm



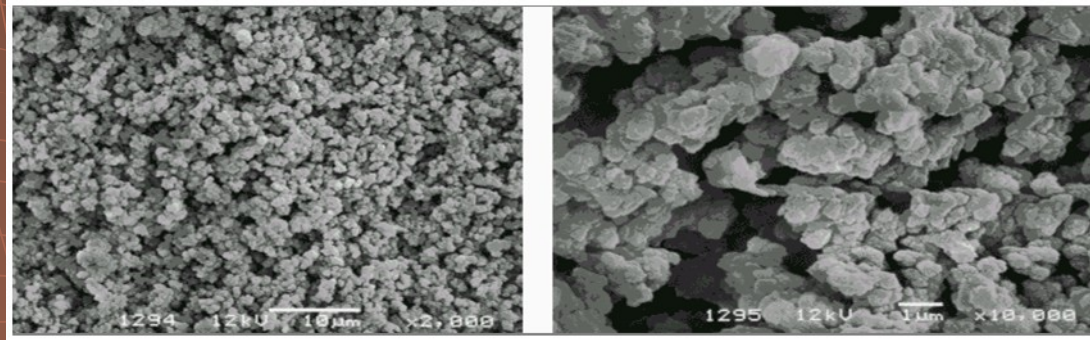
povrchové rozrůznění

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)
(PEG)

+

kyselina octová

+

polyethylenglykol

ML-SF na bázi organických materiálů

styren-divinylbenzen (S-DVB)

metakryláty

vinyl-deriváty (vinylpyrrolidon, vinylacetát)

izooktan

tetrahydrofuran

dekanol

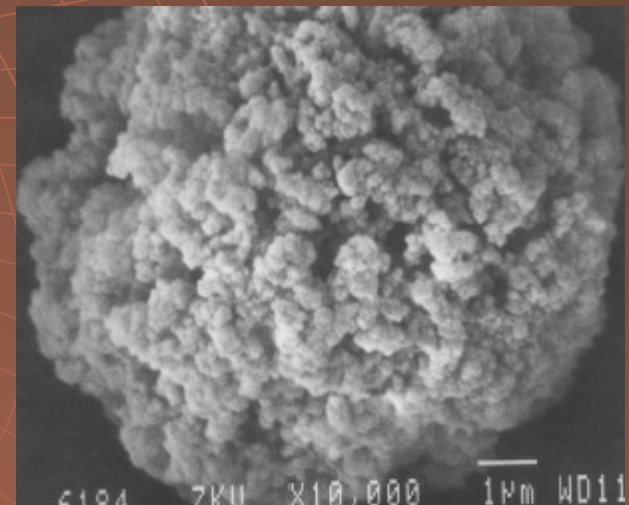
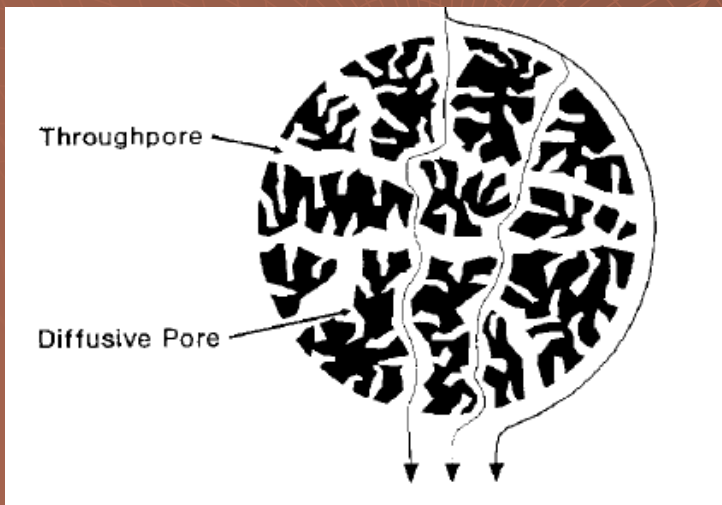
nevýhoda: obtížná výroba

provedení: disk, trubička, plněná kapilára

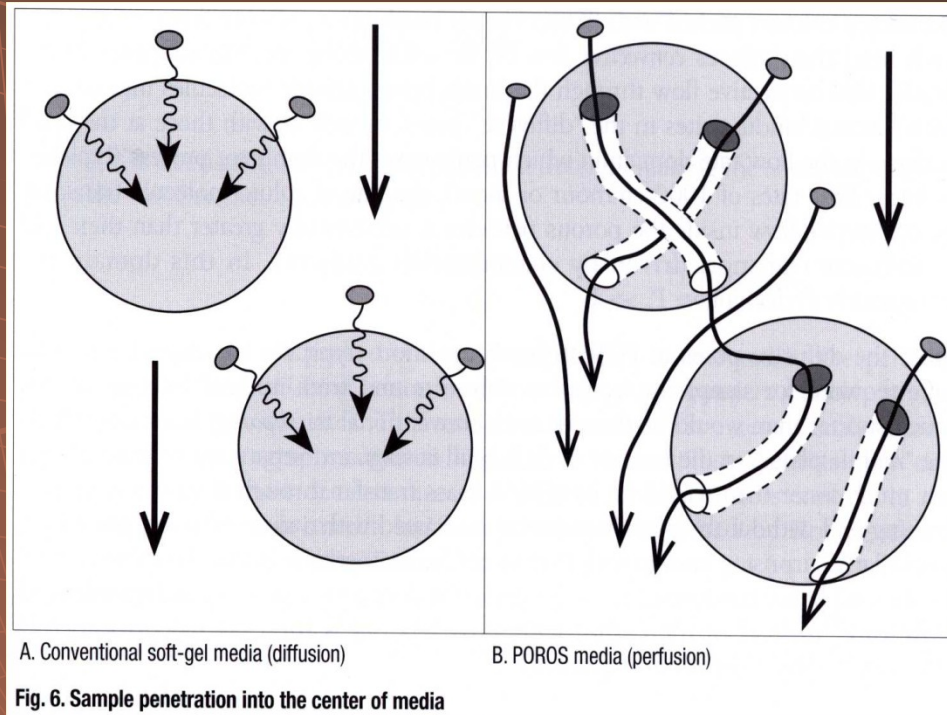


Perfúzní chromatografie

- ◆ 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

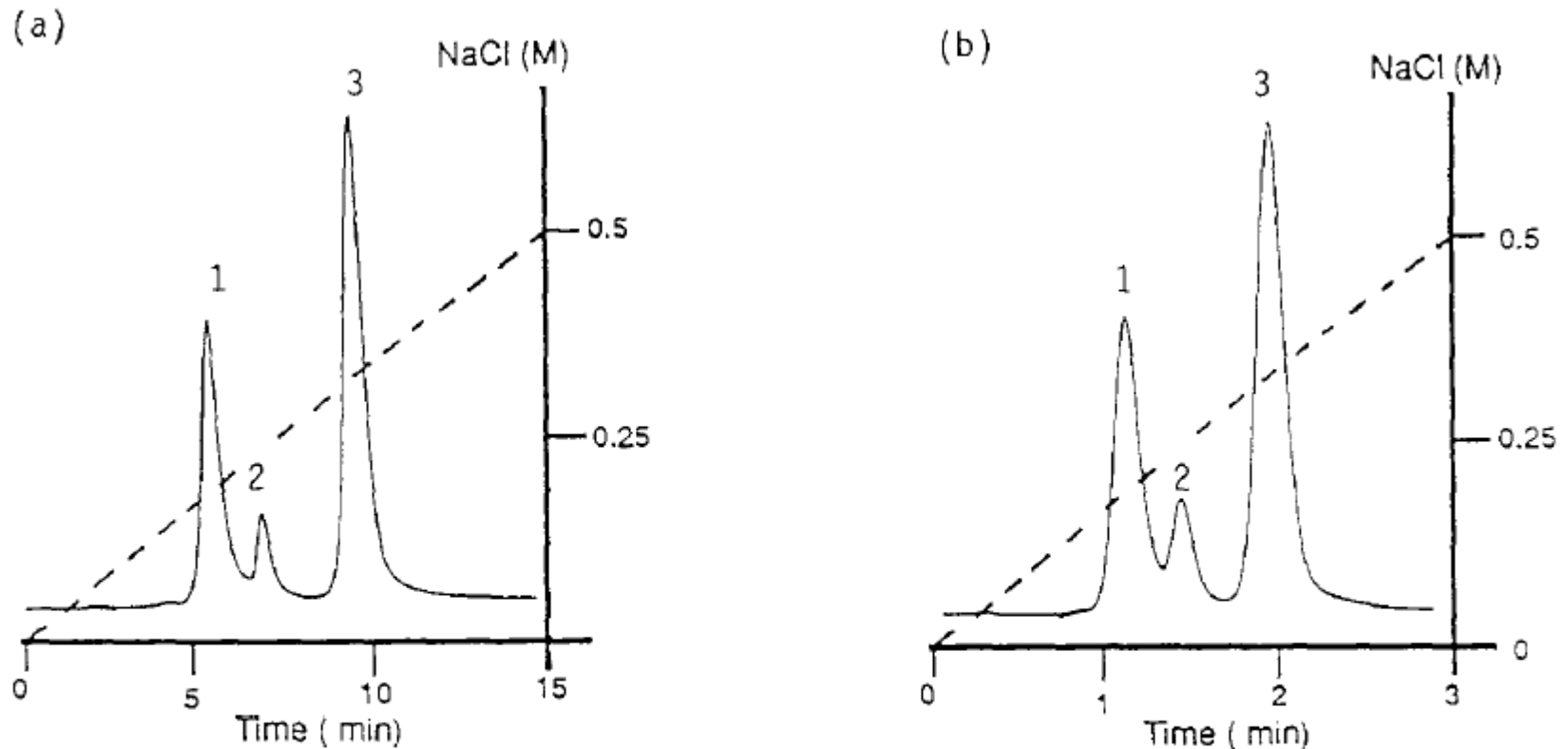


Fig. 14. Separation of model proteins on POROS S/M; 75 μg load of a protein mixture containing chymotrypsin (1), cytochrome *c* (2), and lysozyme (3); detection at 280 nm; column, 100 \times 4.6 mm I.D.; 20 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid buffer, pH 6.0; detection at 280 nm. (a) 1 ml/min, 15-min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

UPLC stacionární fáze Waters

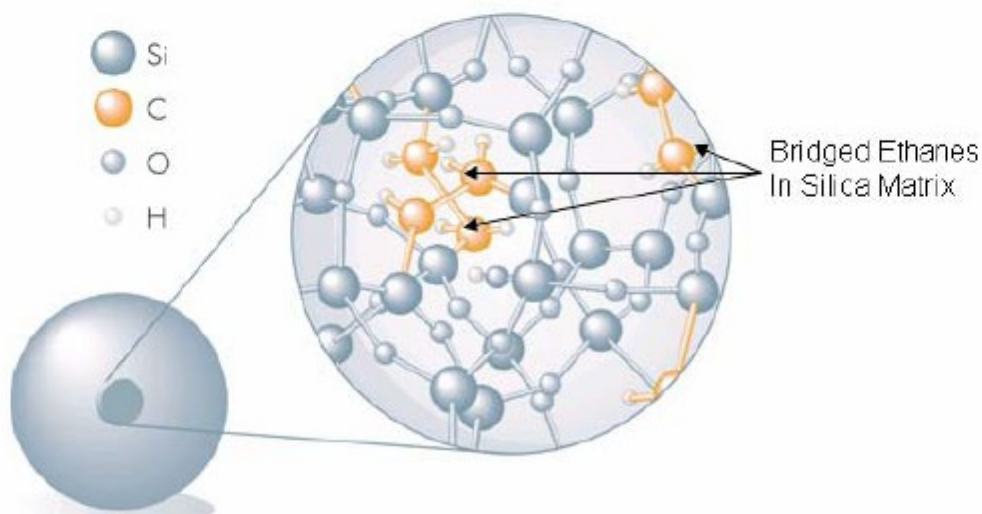
technologie "Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology"



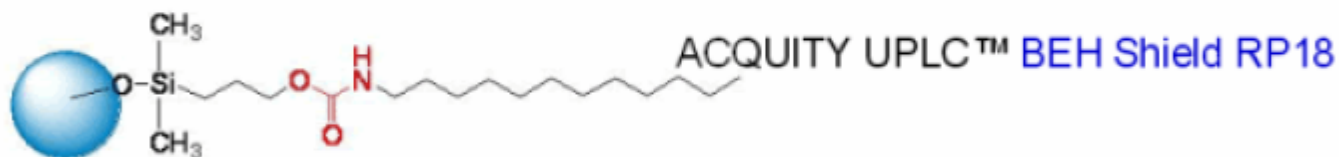
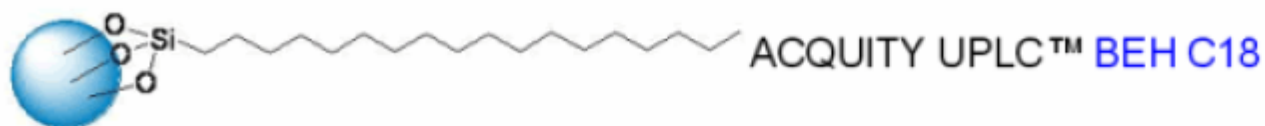
Polyethoxysilane (BPEOS)

Tetraethoxysilane (TEOS)

Bis(triethoxysilyl)ethane (BTEE)

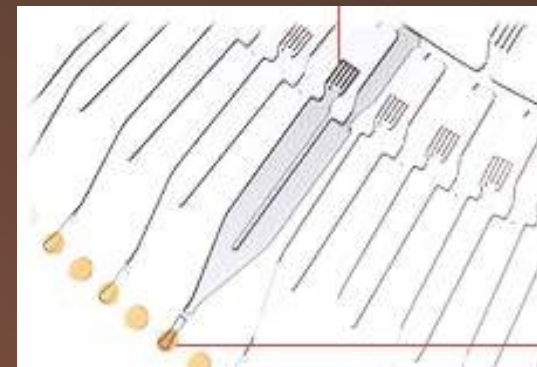
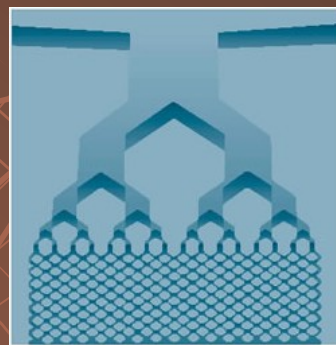
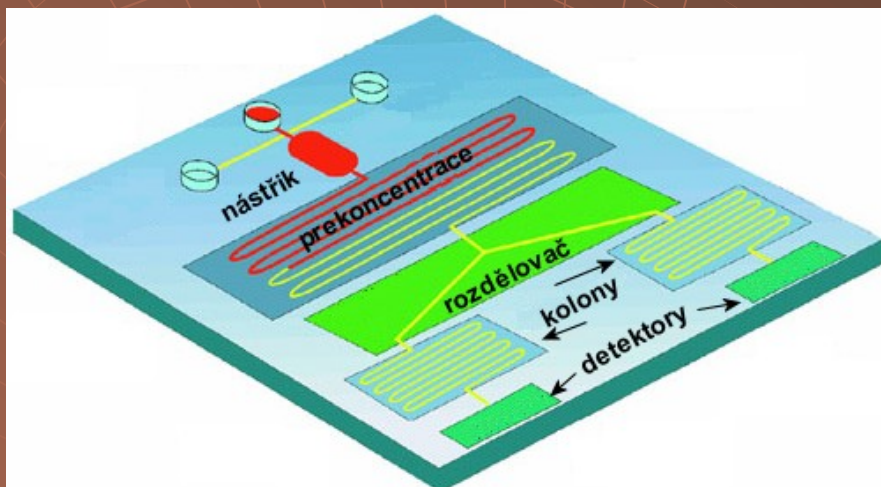


UPLC stacionární fáze Waters



Chipová chromatografie

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

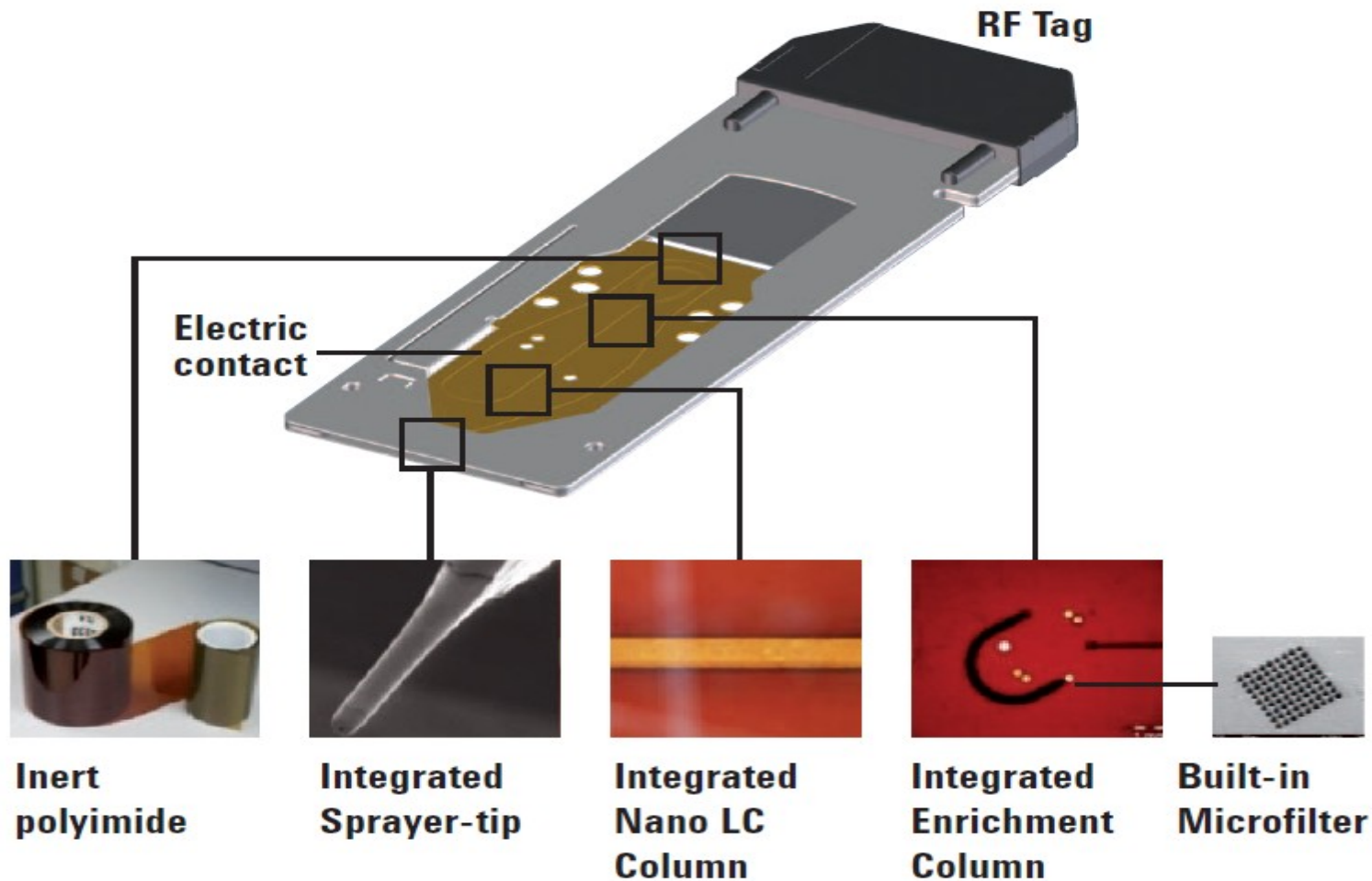


doprava MF: pumpa, odstředivá síla, el. staticky

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)	nízká	nízká	nízká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	nízká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano (částečně)

Refraktometrický detektor

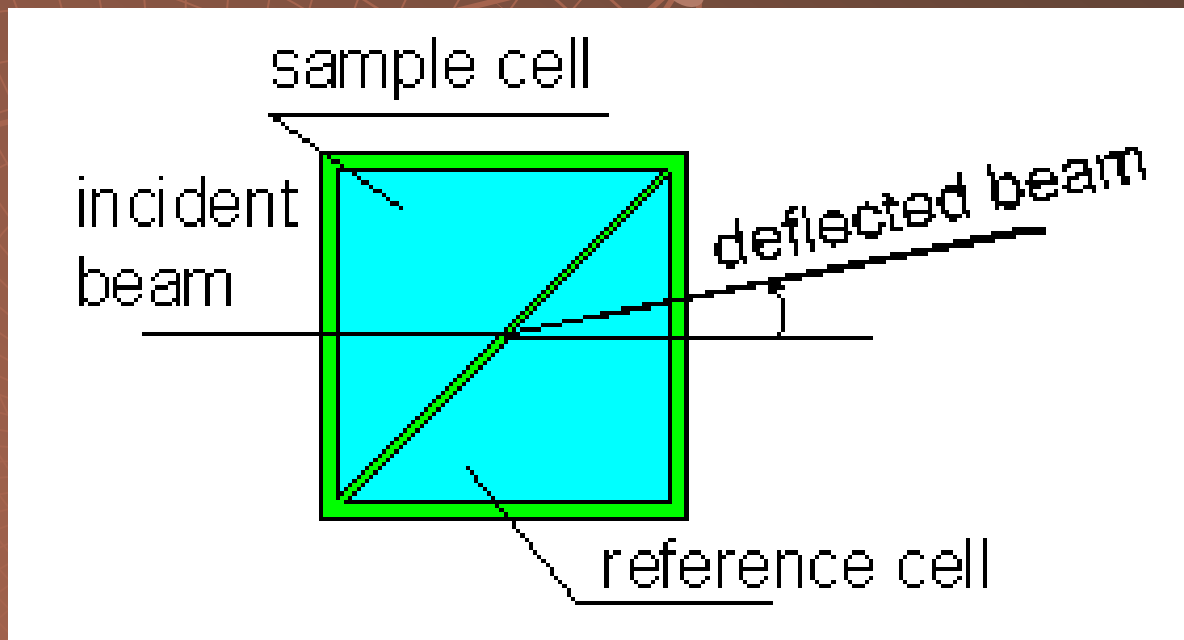
index lomu

šum 10^{-7}

dyn. rozsah 10^4

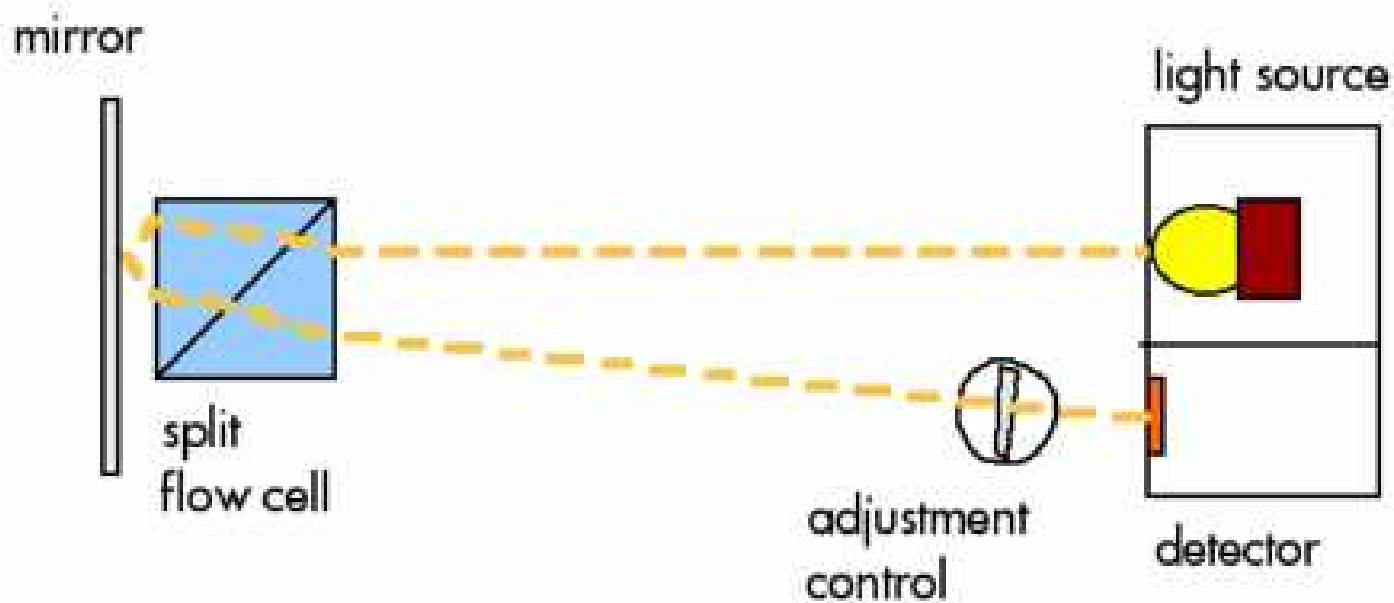
citlivost 10^{-7} g/ml

Refraktometrický detektor



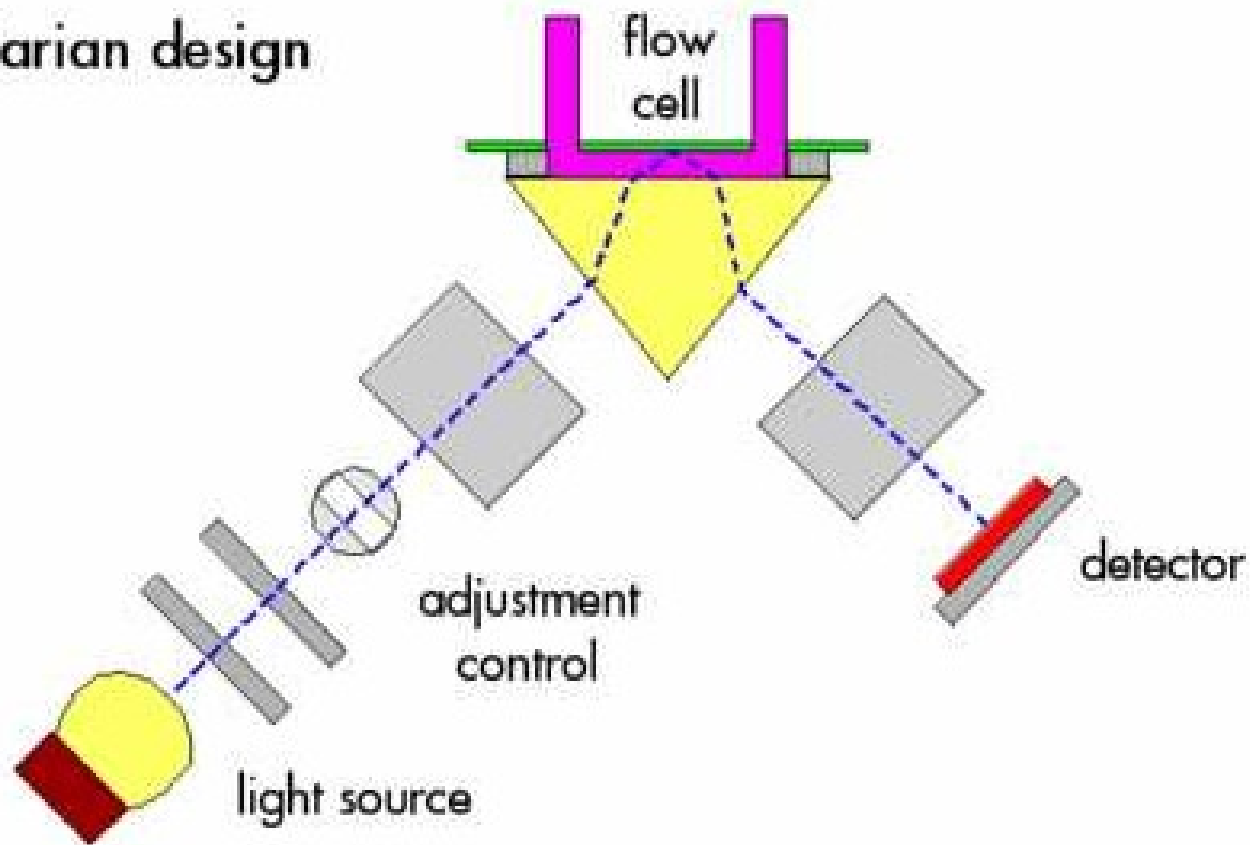
Refraktometrický detektor

Waters design



Refraktometrický detektor

Varian design



„Light scattering“ detektor

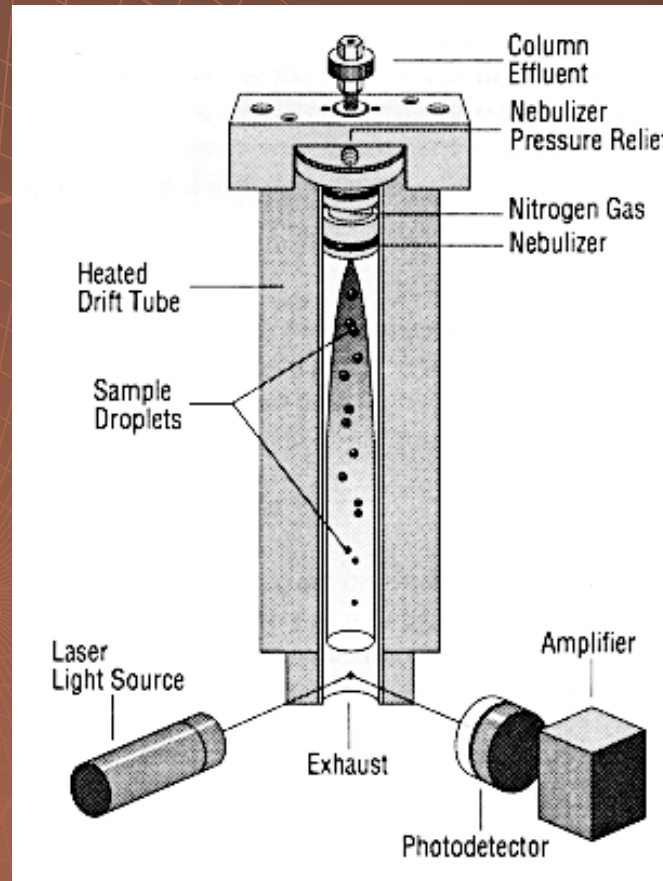
Rozptyl

šum 10^{-8}

dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-9} g/ml

„Light scattering“ detektor



UV – VIS detektor detekční cela

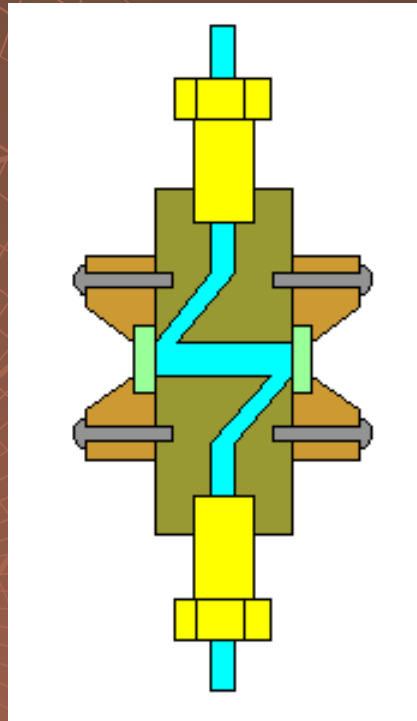
Absorbance

šum 10^{-4}

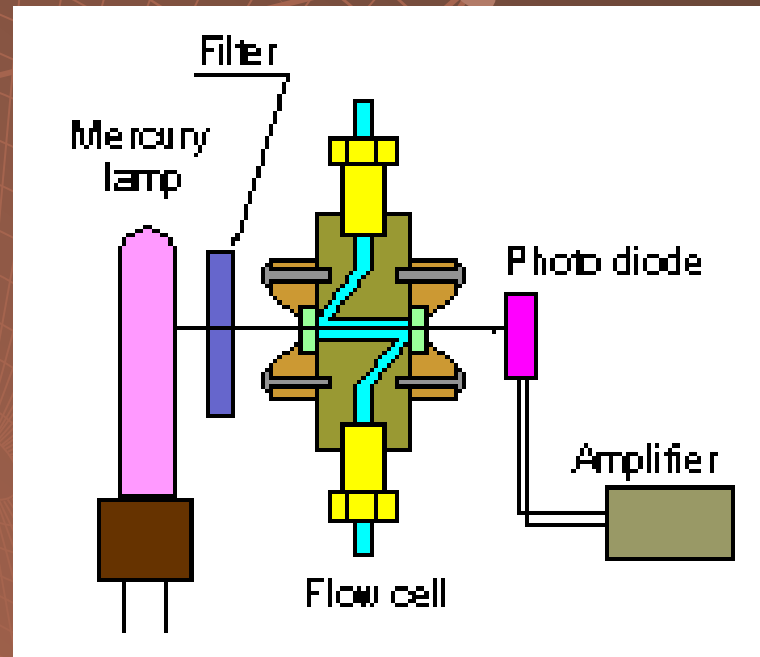
dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-10} g/ml

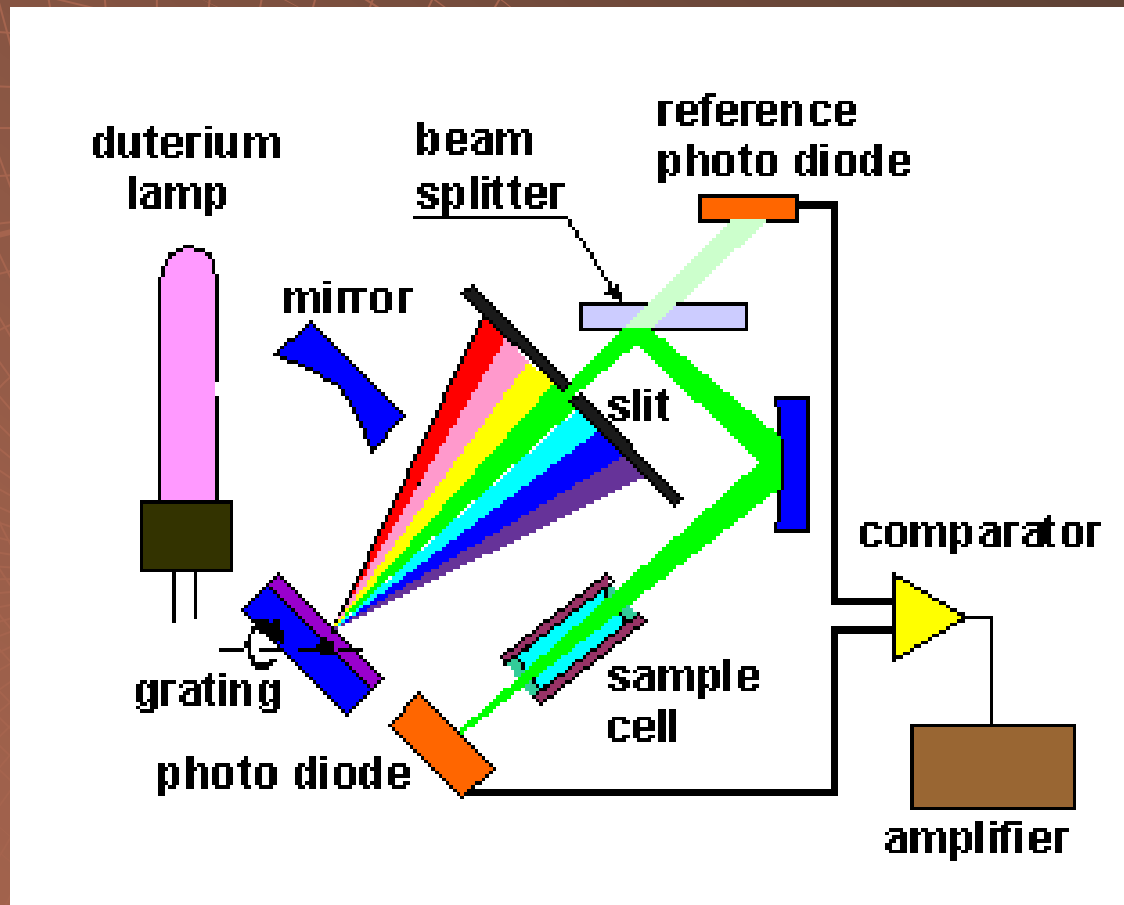
UV – VIS detektor detekční cela



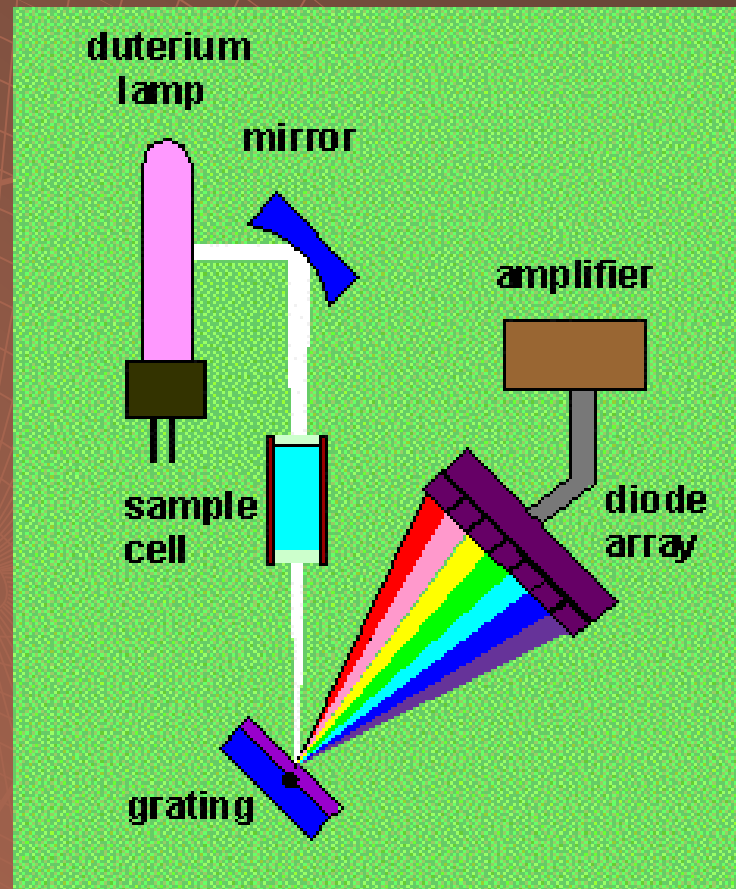
UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



UV – VIS detektor s diodovým polem

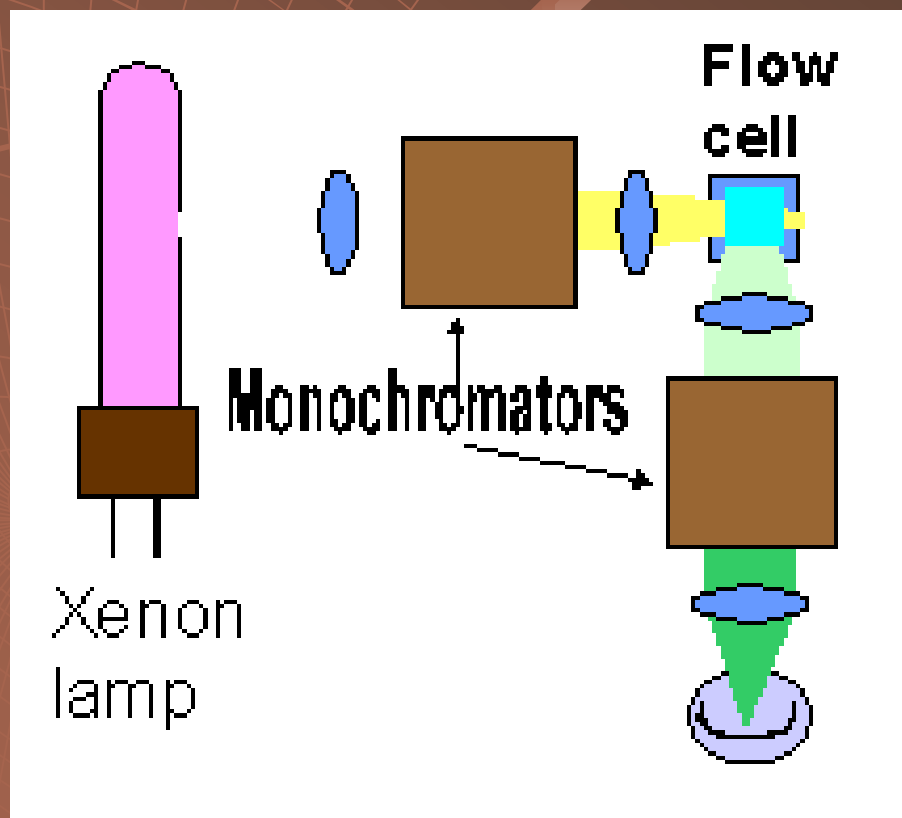


Fluorescenční detektor

Fluorescence

citlivost 10^{-9} g/ml

Fluorescenční detektor

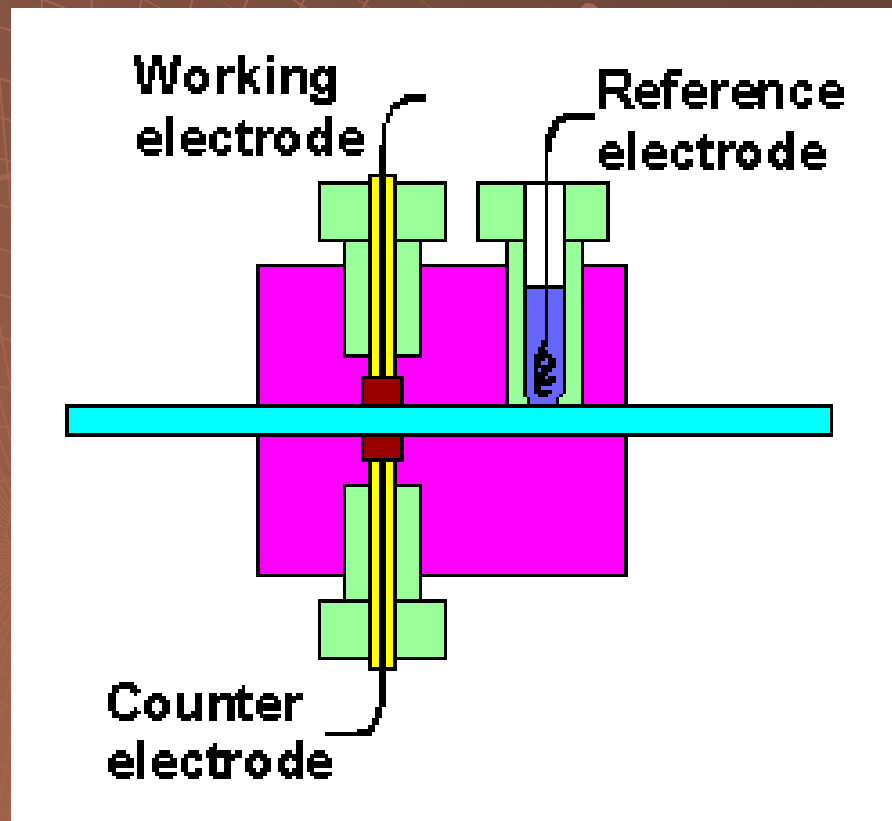


Elektrochemický detektor

elektrický proud

citlivost 10^{-9} g/ml

Elektrochemický detektor



Konduktometrický detektor

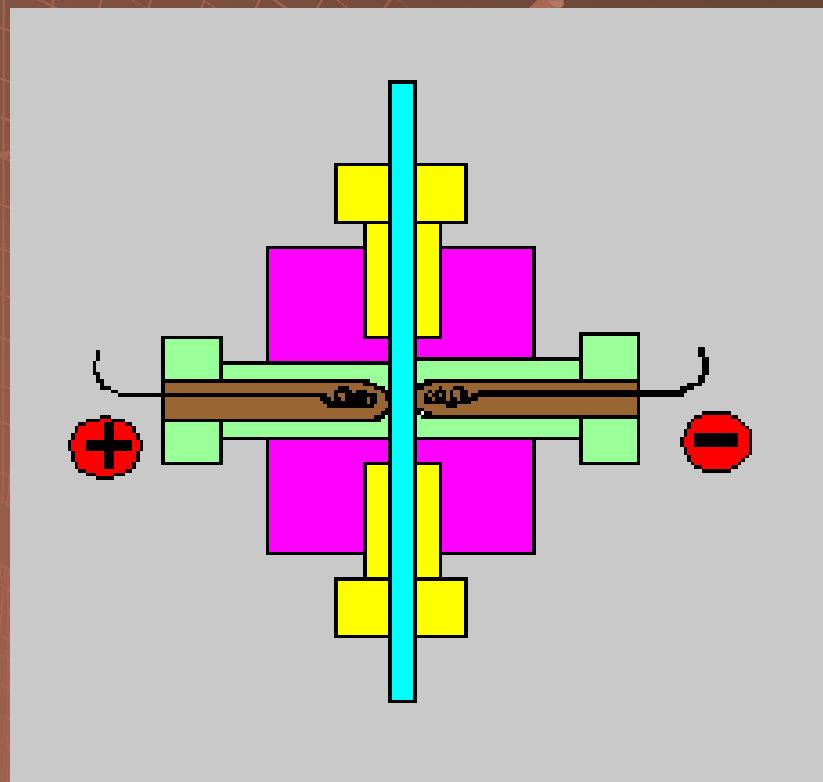
Vodivost

šum 10^{-3}

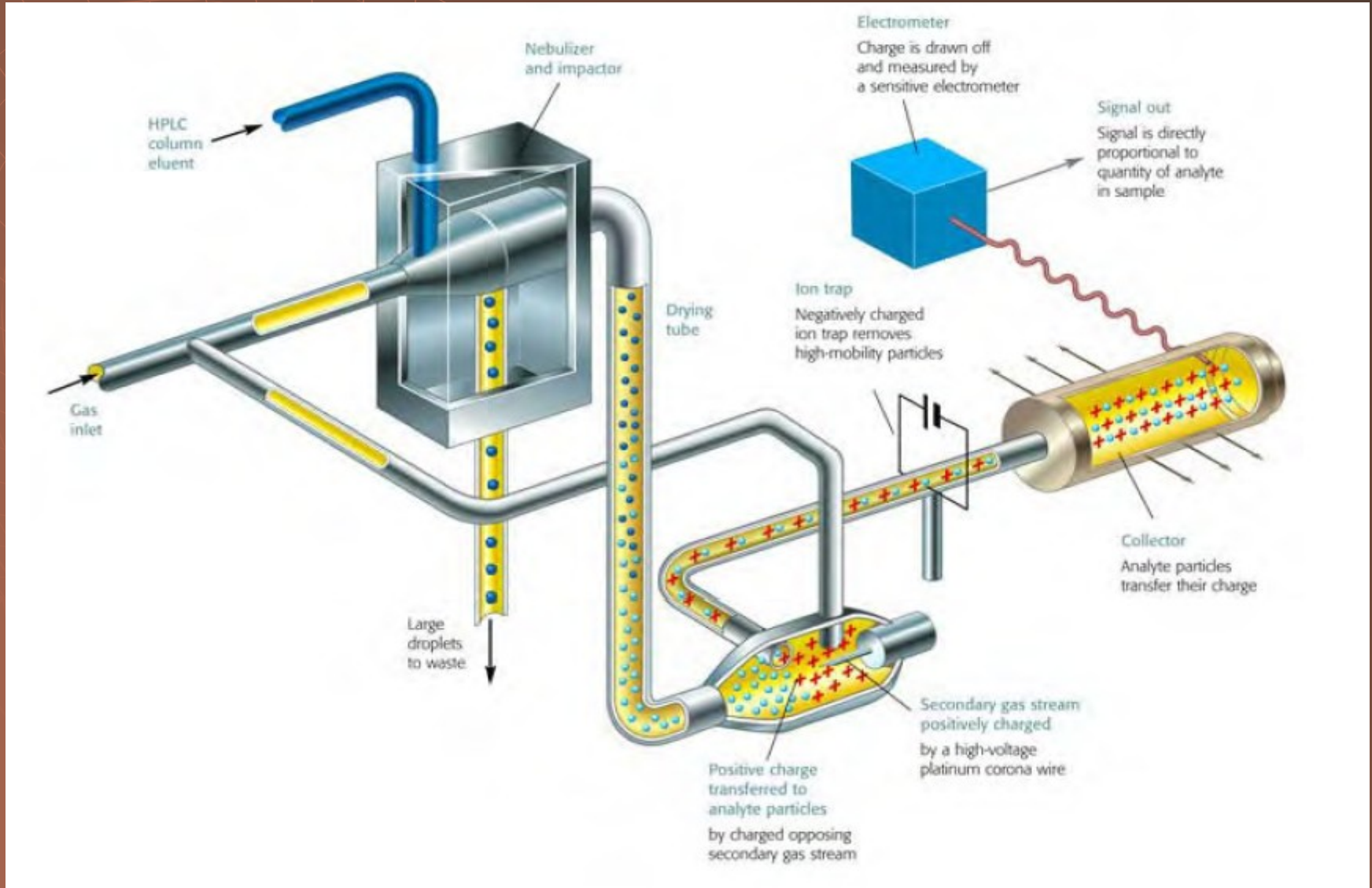
dyn. rozsah 10^6

citlivost 10^{-8} g/ml

Konduktometrický detektor



Aerosolový detektor nabitých částic

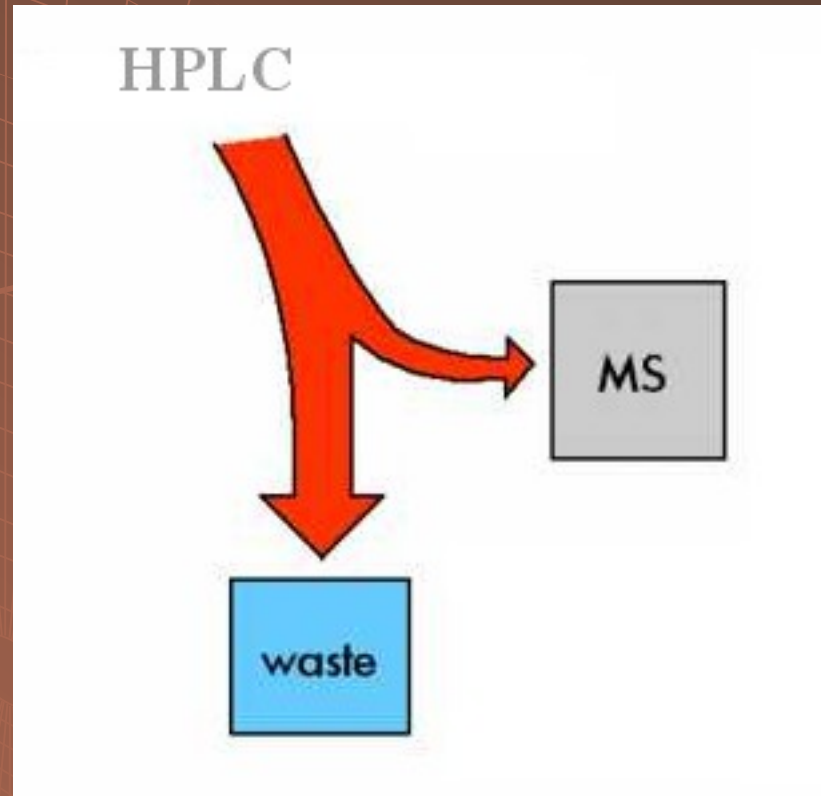


LC-MS

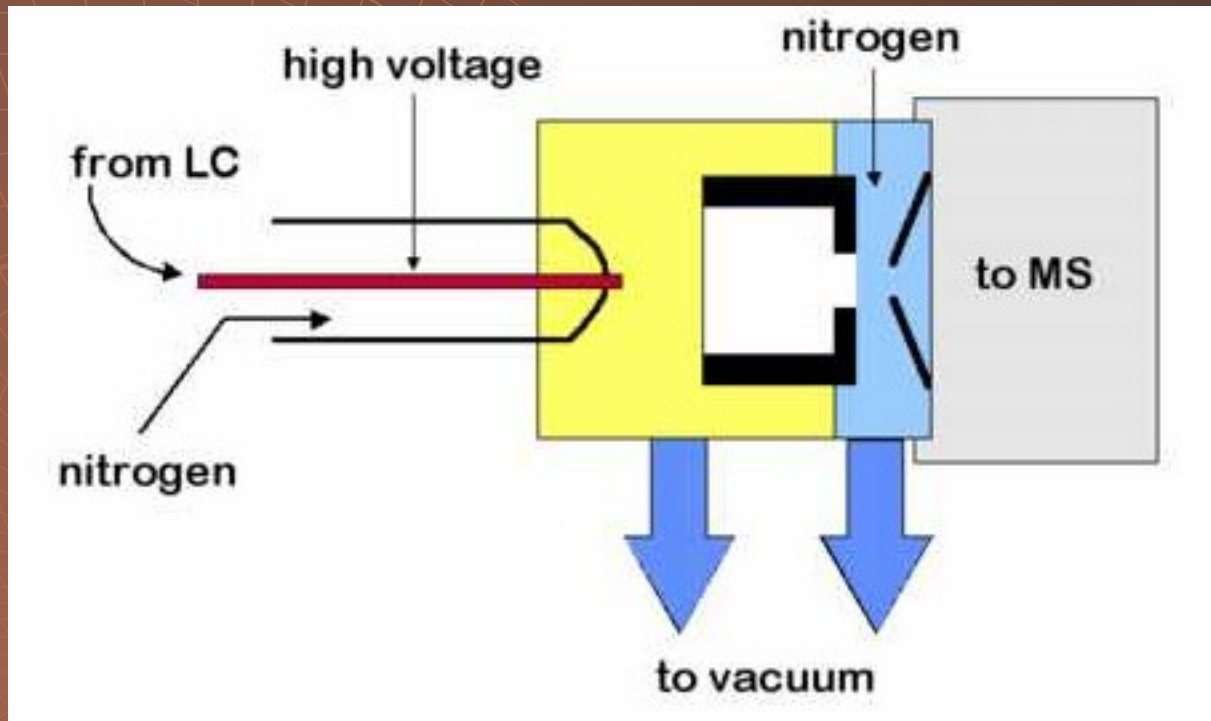
počet iontů

citlivost 10^{-13} g/ml

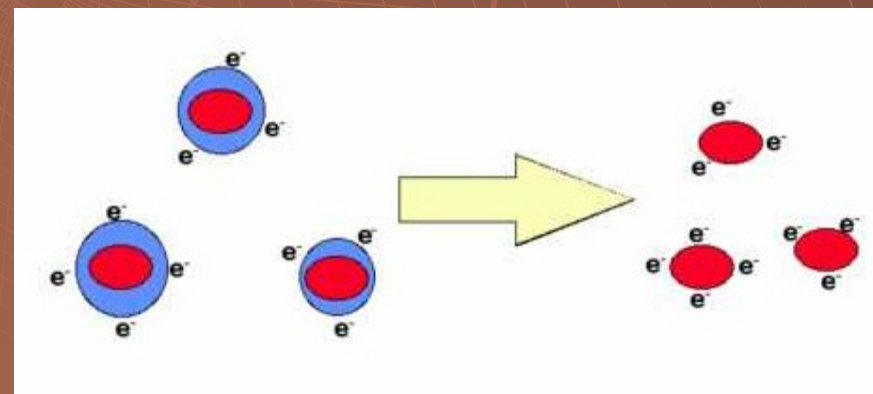
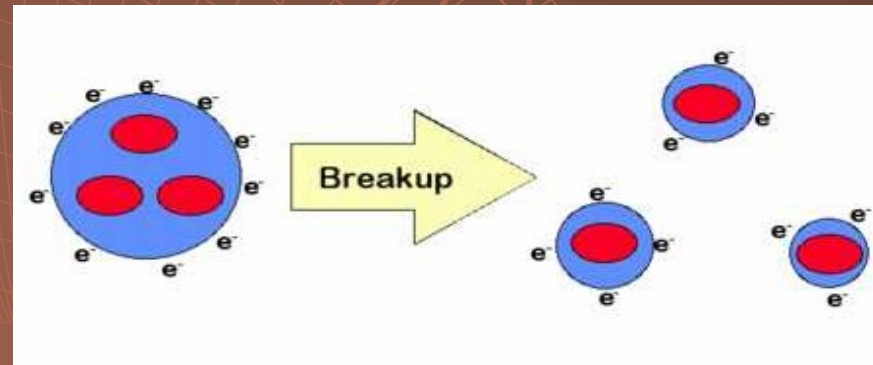
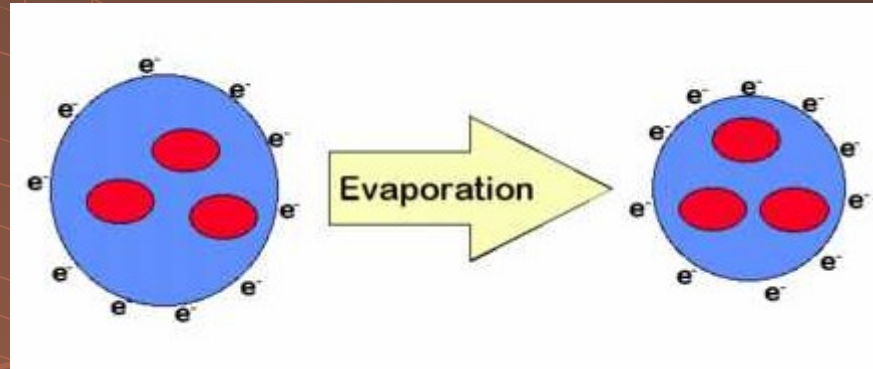
LC-MS



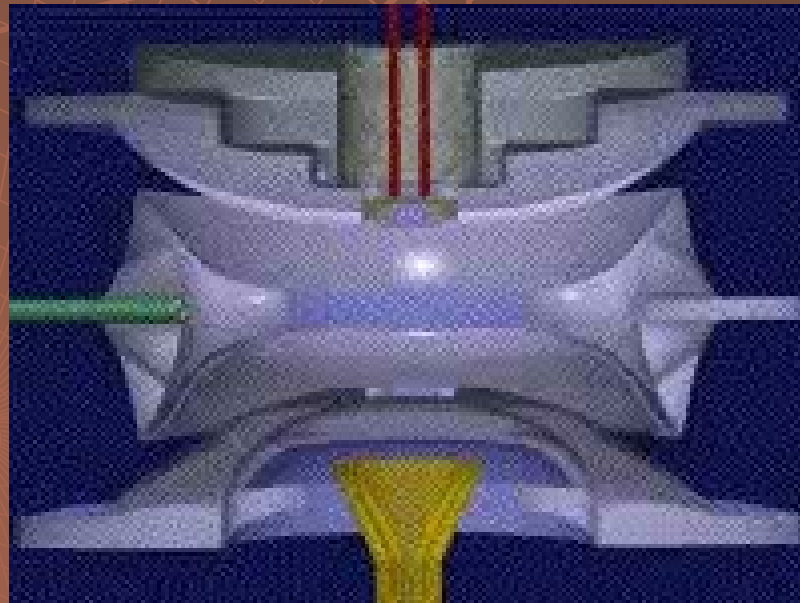
„Electrospray“



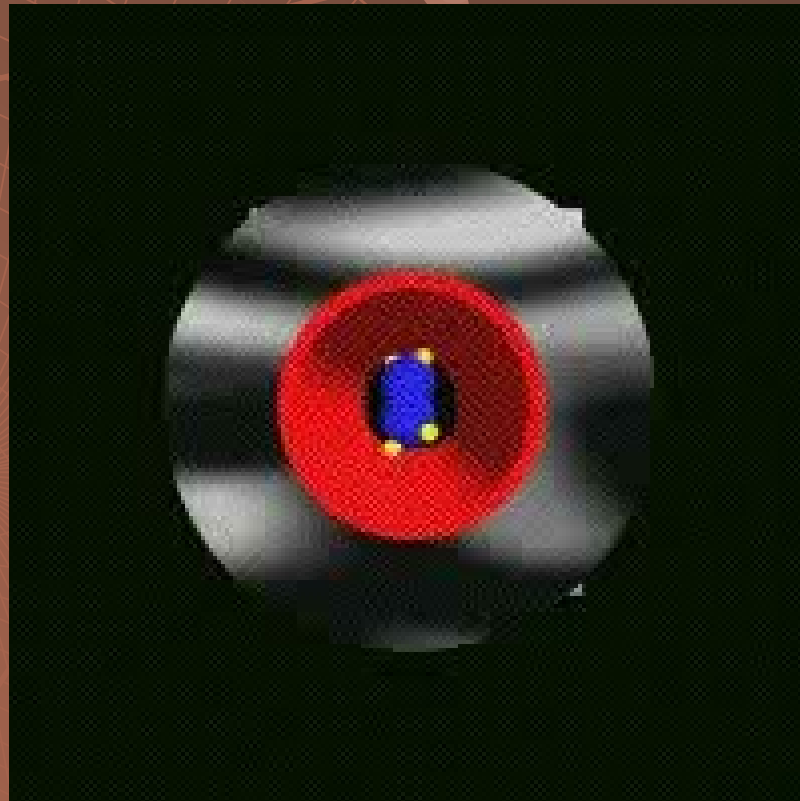
Ionizace



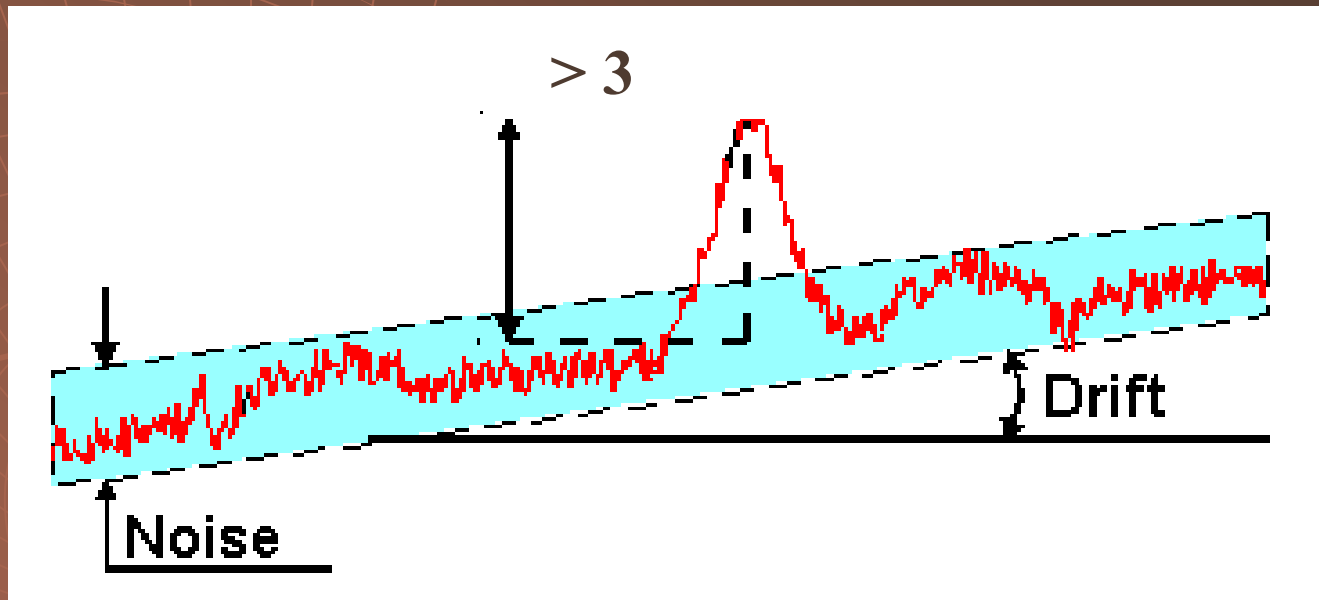
Ion Trap



Kvadrupol



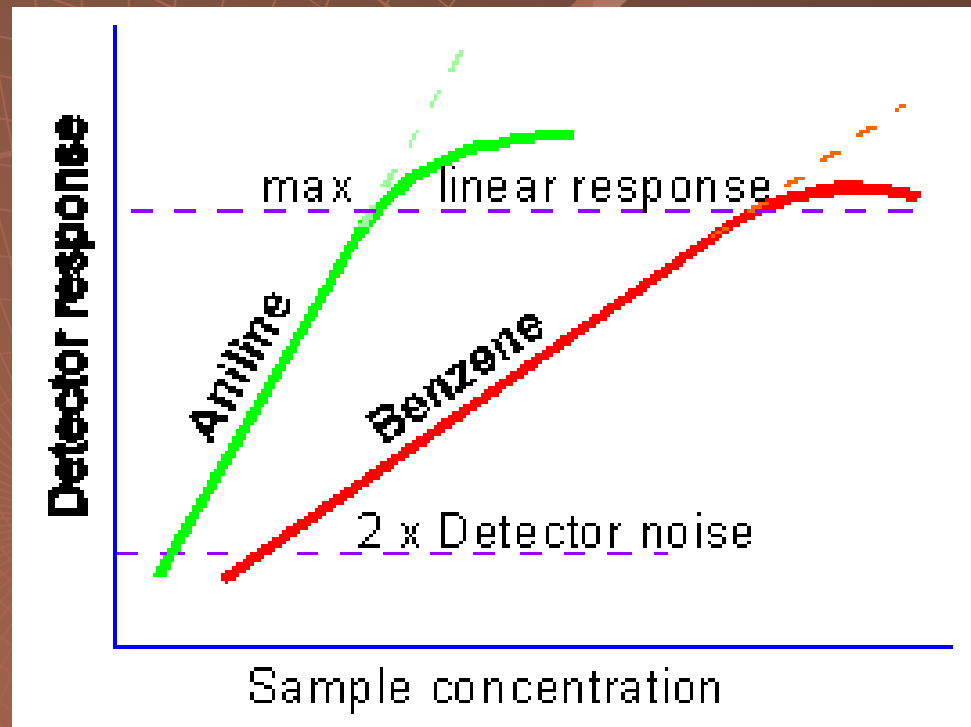
Šum a drift detektoru



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

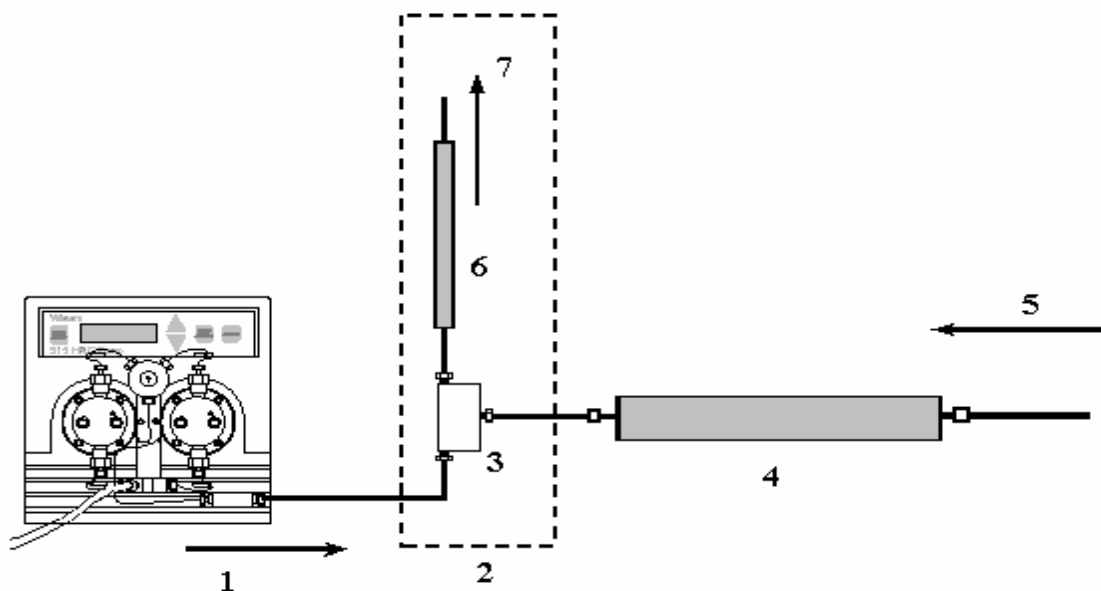
Požadavky na deriváty

- ◆ 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



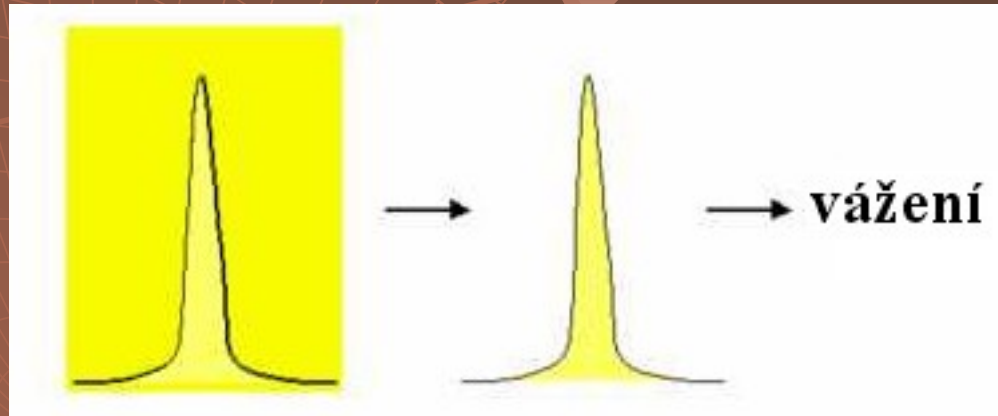
- 1 - derivatizační pumpa derivatizačního reagentu
- 2 - postkolonový systém
- 3 - směšovací komůrka (mixér)
- 4 - chromatografická kolona
- 5 - směr toku mobilní fáze
- 6 - derivatizační reaktor (smyčka)
- 7 - směr toku činidla (efluentu) k detektoru

Jednostupňová postkolonová derivatizace

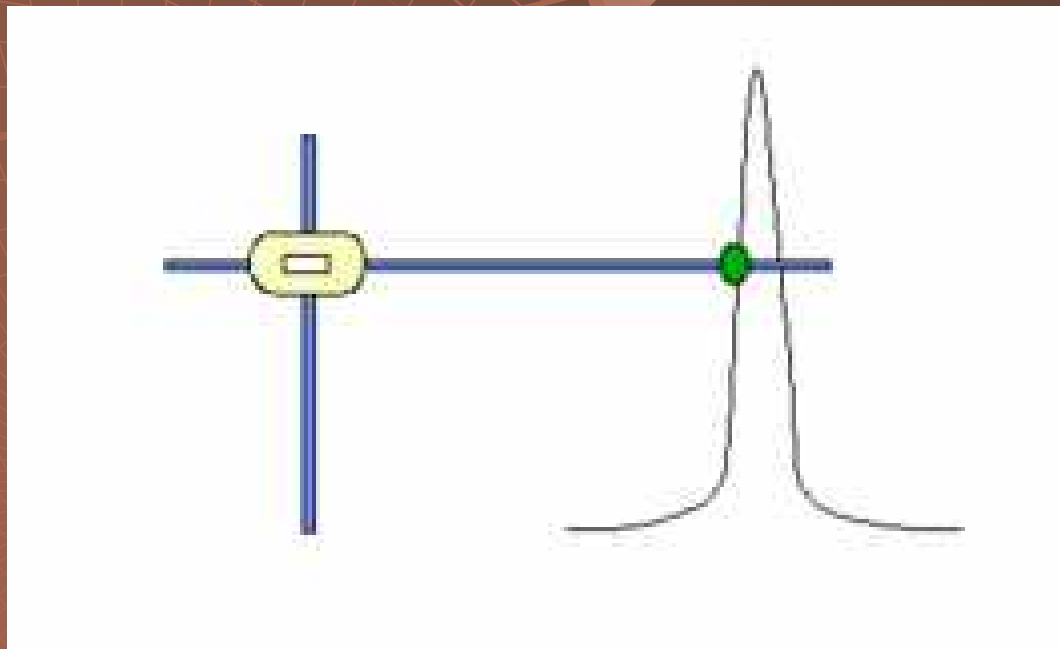
Vyhodnocení

- ◆ Zapisovače
- ◆ Integratory
- ◆ Integrovaný software + PC

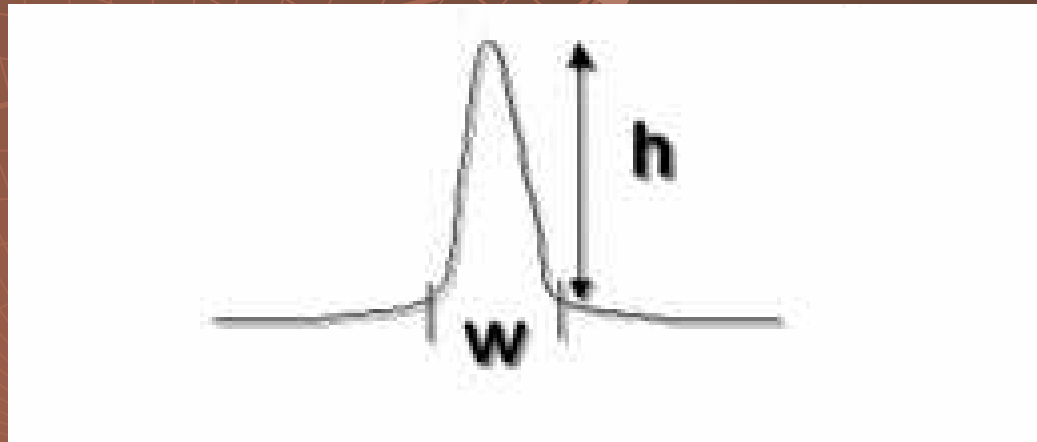
Zjištění plochy píků u zapisovačů vážením



Zjištění plochy píků u zapisovačů planimetrem

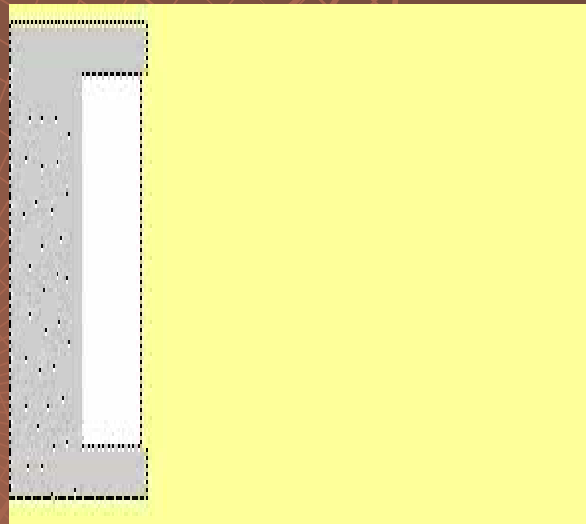


Zjištění plochy píků u zapisovačů výpočtem



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

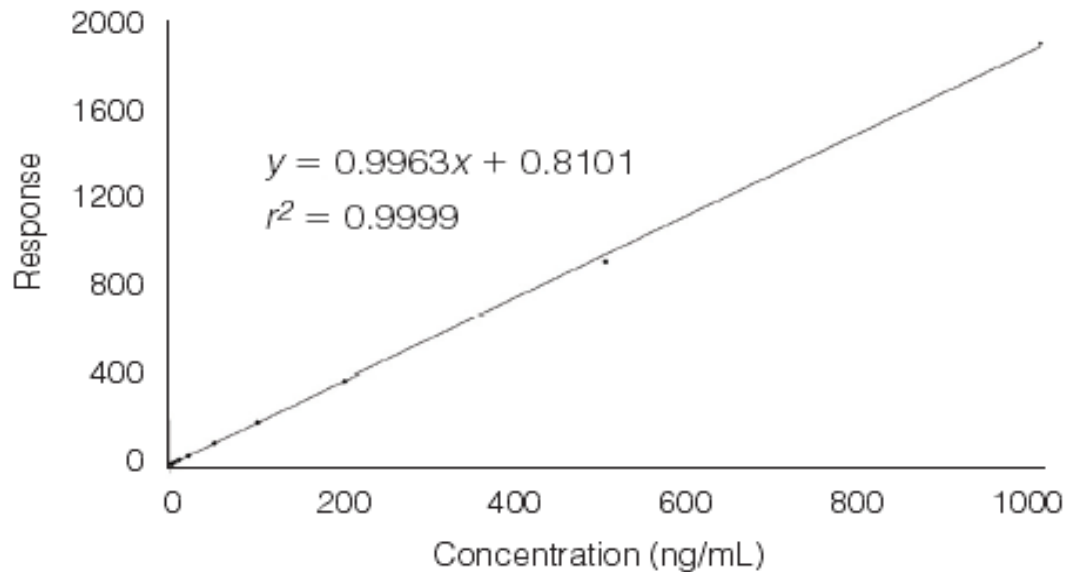


Plocha (výška) píku

Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda externího standardu

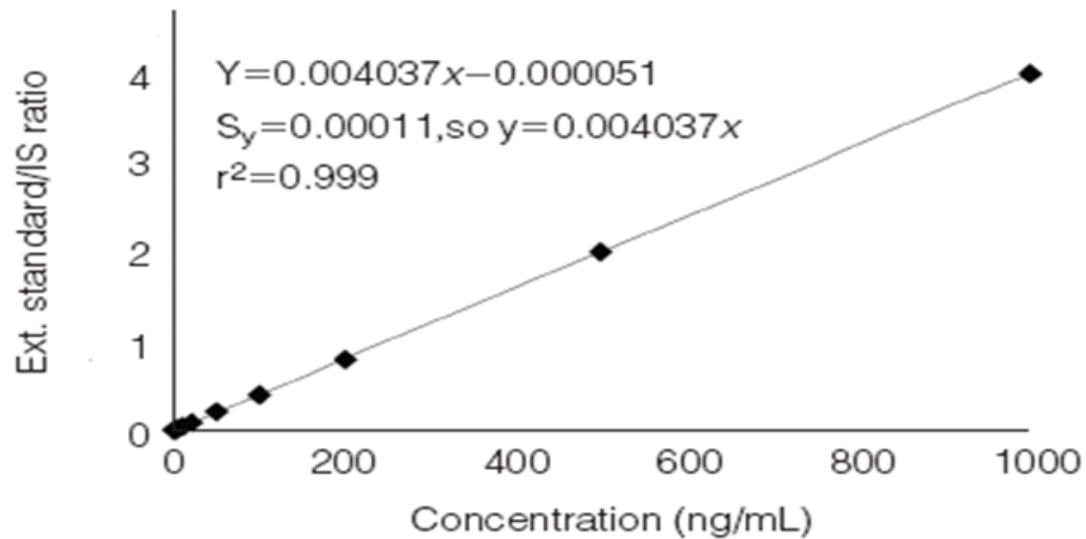
Figure 1: Calibration plot of response versus concentration.



Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda vnitřního standardu

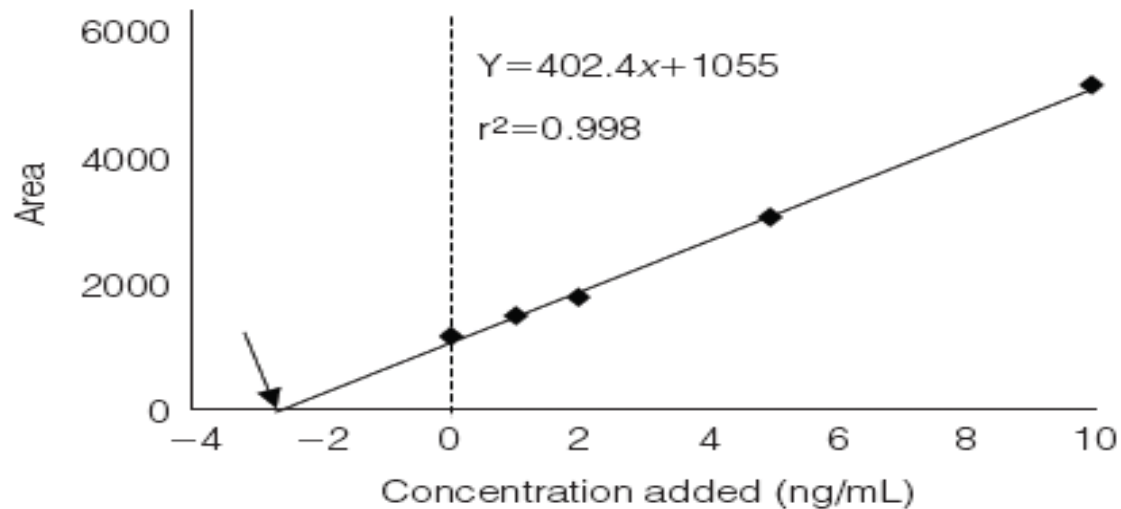
Figure 2: Internal standard calibration plot from data in Table 1.



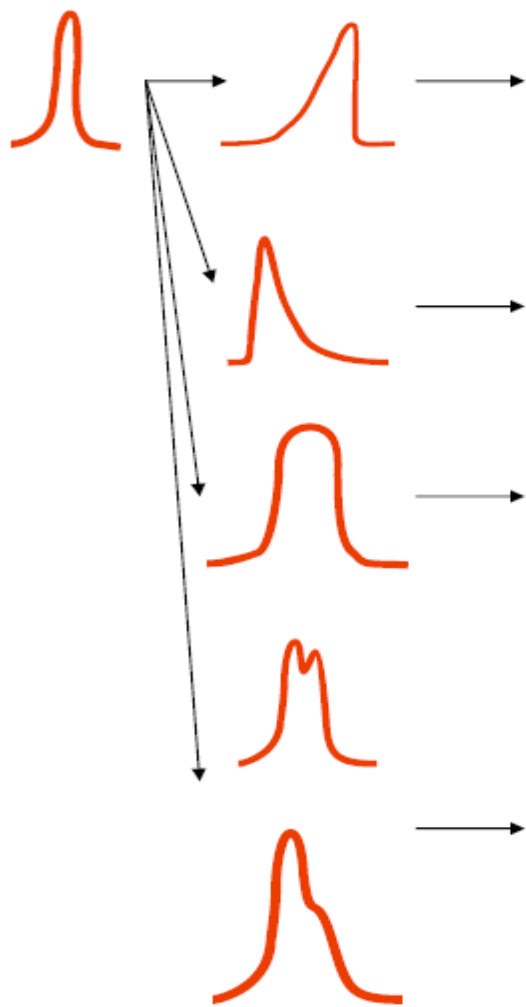
Analýza kvantitativní

- ◆ 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

