

Vstup pro syntézu oligonukleotidů a kontrola čistoty

Úloha do laboratorního cvičení – Speciální metody

pro 4. ročník odborné chemie, jarní semestr 2007/2008

1. Historie kapalinové chromatografie

1903 - Botanik **Cvet** dělí na sloupci sorbentu listová barviva

1952 - Nobelova cena **Martin, Synge** v oboru chromatografie

V té době se používají kolony s rozměrem částic $d_p = 100 - 200 \mu\text{m}$, tok vlivem gravitační síly, odebrání frakcí eluátu a stanovení obsahu dělených látek ve frakcích se děje nejčastěji kolorimetricky

Nevýhody - pracnost, zdlouhavost a malá účinnost

V té době se také rozvíjí plynová chromatografie (GC), jak v technice tak i v teorii.

Převzetí poznatků z plynové chromatografie a uplatnění současného stavu přístrojové techniky znamenaly revoluční změnu, jejíž počátek se klade do konce let šedesátých a začátku sedmdesátých:

- účinnost **kolon** se zvyšuje zmenšením částic až po nejčastěji i dnes užívané 7 - 10 μm , současný trend jde až na 1.5 μm , rozměry se úměrně zmenšují na nejobvyklejší 4mm x 150 - 250 mm pro konvenční chromatografii, 0,5mm x 60 mm pro pikochromatografii.

- vývojem prošla **čerpadla** na dopravu mobilní fáze pod tlakem skrze kolony, naplněné malými částicemi s rostoucím odporem proti toku mobilní fáze

- konstrukce **detektorů** umožňuje citlivé sledování změn fyzikálních vlastností v toku mobilní fáze, vyvolaných přítomností eluovaných látek

(např. *spektrofotometrický UV-VIS detektor* pro konvenční chromatografii s objemem optické cely 4 μl měří absorpci světla, v moderním provedení s diodovým mostem (PDA) umožňuje analyzovat spektrofotometricky právě eluovanou látku,

elektrochemické detektory zaznamenávají elektrochemickou redukovatelnost roztoku nebo změnu vodivosti prostředí, mají zabudovaná čidla přímo v kapiláře, kterou proudí mobilní fáze.)

V současné době se bez kapalinové kolonové chromatografie provozované pod tlakem (HPLC, jinak též *vysokoučinné kapalinové chromatografie*) neobejde žádná laboratoř. HPLC si stále udržuje svůj význam – umožňuje analyzovat prakticky veškeré organické látky v množstvích od desítek procent do 0,00001 % a v rozpětí relativních molekulových hmotností od stovek u iontů až po několik set tisíc u makromolekul až částic.

2. Základní schéma kapalinového chromatografu

Požadavky na chromatografické zařízení:

a) umožnit pravidelný a konstantní *tok mobilní* fáze stacionární fází
 b) zajistit kvantitativní a časově co nejkratší *nadávkování* analyzované směsi na stacionární fází

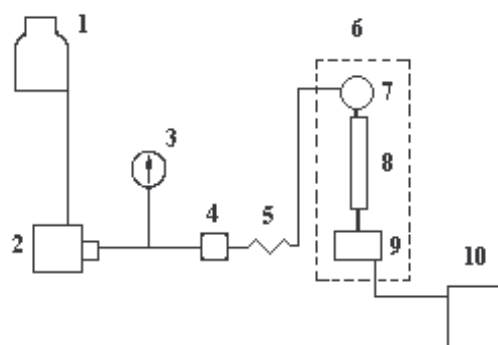
c) vytvořit podmínky k co největšímu počtu *opakování sorpčních a desorpčních procesů* jako výsledku vzájemných vztahů mezi stacionární fází, molekulami složek mobilní fáze a molekulami solutů v analyzované směsi.

d) uskutečnit *průběžné měření* a zaznamenávání změn určitých vlastností tekoucí mobilní fáze, které jsou výsledkem přítomnosti separovaných látek

e) být schopné selektivně uvedené *změny analyzovat* a kvantifikovat

Na splnění těchto požadavků jsou konstruovány nebo operátorem voleny jednotlivé části chromatografického zařízení.

- 1) zásobník mobilní fáze a čerpadlo,
- 2) čerpadlo,
- 3) měřič tlaku a přetlakový regulátor,
- 4) předkolona,
- 5) spojka,
- 6) píčka (možnost termostatování kolonového prostoru),
- 7) dávkovací kohout se smyčkou,
- 8) kolona,
- 9) detektor (UV-VIS, PDA, elektrochemický),
- 10) zařízení pro záznam a zpracování dat,



3.3 Příprava chromatografu

3.3.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze musí být čirá, bez zákalu a mechanických nečistot.

Opominutí tohoto kroku způsobí, že pod tlakem pístu v čerpadle se vzduch uvolní a bubliny naruší kontinuitu toku mobilní fáze. Pozorujte proto bedlivě, zda ve výtokové kapiláře z detektoru nejdou bubliny. Pokud jsou přítomny je záznam detektoru bezcenný.

Mobilní fáze se předem filtruje na speciálním zařízení přes filtr definovaných dimenzí pórů.

K odvzdušnění mobilní fáze slouží odplyňovač. Obsahuje-li mobilní fáze vysoký podíl takových organických rozpouštědel, která snadno rozpouštějí vzduch (např. metanol), je třeba mobilní fázi předem odvzdušnit v ultrazvukové lázni.

Zásadou postupu před napojením toku mobilní fáze na kolonu je zbavit vedení v kapiláře vzduchu.

Na panelu čerpadla, nebo softwarově, se nastaví *průtok mobilní fáze* přes kolonu na hodnotu 0,20 ml/min.

3.3.2 Ekvilibrace kolony

Spustí se čerpadlo stiskem příslušné ikony ovládacího softwaru nebo tlačítka „PUMP“ na čerpadle, asi po 10 min ekvilibrace kolony se průtok přepne na hodnotu 0,50 ml/min. Dávkování vzorku a měření je možno zahájit po ustálení tlaku, zpravidla asi za půl hodiny.

3.3.3 Sběr dat

Sběr dat se provede dle návodu vedoucího cvičení.

3.3.4 Dávkování vzorku dávkovacím kohoutem

Před zahájením vlastního měření se doporučuje několikrát nastříknout do dávkovacího kohoutu destilovanou vodu nebo mobilní fázi.

Vzorek dávkovaný na kolonu musí být čirý, částice nebo zákal mohou nevratně znehodnotit kolonu.

Vzorky obsahující rozpuštěné plyny (např. metanolicke roztoky) je třeba před nástřikem důkladně odvzdušnit v ultrazvukové lázni.

Naplnění smyčky dávkovače

Při plnění dávkovací smyčky o objemu 20 μ l se páčka dávkovače přepne do pohotovostní *horní* polohy, do dávkovacího otvoru se jemně zasune jehla injekční stříkačky (nezasouvat násilím na doraz) a tlakem na píst injekční stříkačky se naplní dávkovací smyčka dávkovače (na konci odpadní kapiláry odkápne 3–5 kapek).

Nástřik vzorku na kolonu

Jehla se vytáhne a páčka se přepne do pravé spodní polohy. Tím se uvnitř dávkovače přepne směr toku mobilní fáze tak, že prochází smyčkou.

3.4 Provedení analýzy

3.4.1 Stanovení mrtvého objemu kolony

Nastříknutím látky, která není zadržovaná sorbentem, se stanoví tzv. mrtvý čas t_M , tj. doba, za kterou kolonou projde látka zcela inertní vůči sorbentu. Při znalosti průtokové

objemové rychlosti (F , ml/min), lze vypočítat V_M mrtvý objem kolony. Odečteme čas t_M a s použitím údaje F se vypočte mrtvý objem kolony V_M

3.4.2 Testování kolony

Před použitím kolony pro chromatografickou analýzu, ať v rutinní analytice v průmyslu nebo i ve vědeckém výzkumu, se doporučuje testování kolony.

Při *testování* se nezajímáme o schopnost kolony separovat a rozlišit určitou směs solutů, ani o to, proč píky některých solutů se více rozmývají než jiné. Toto hodnocení vychází z *termodynamického aspektu* separačního procesu a tyto parametry lze ovlivnit změnou buď složení jen mobilní nebo jen stacionární fáze nebo obou najednou.

Od testování kolony očekáváme její charakteristiku z hlediska transportní funkce, z hledisek *kinetiky distribučního procesu* mezi stacionární a mobilní fází. Postup testování má být univerzální, parametry kolony se mají porovnávat s určitým standardem, který má být volen tak, aby bylo možné ho použít na kolony, aniž by byl ovlivněn jejich rozměrem, druhem solutu a použitou mobilní fází.

Pro testování se volí standardní vzorek – testovací *směs* - jejíž složky se chovají ideálně z hledisek termodynamiky procesu, mají symetrické píky. Jsou to směsi jednoduchých organických látek - ve cvičení bude analyzována testovací směs **aceton, benzen, toluen**.

Testování provádí i výrobci kolon a atest je ke koloně přiložen, obsahuje údaje: typ kolony, výrobní šarže, složení testovací směsi, objem dávkovaného vzorku, složení mobilní fáze, objemová průtoková rychlost mobilní fáze ml/min, způsob detekce (λ a rozsah měření AU) a vzorový chromatogram.

Provedení pokusu

Připravíme testovací směs, obsahující 4 ml acetonu, 1 ml benzenu a 1 ml toluenu v 44 ml methanolu

Na kolonu nadávkujeme 10 μ l testovací směsi a zaznamenáme chromatogram, analýzu poté zopakujeme.

Z chromatogramů vyhodnotíme údaje (pro každý pík) - d_R a $Y_{0.5}$. Srovnáme hodnotu n (počet teoretických pater), H (výšku ekvivalentu teoretického patra) a redukované veličiny ($h = H/dp$) vypočtenou na základě těchto hodnot a hodnoty vypočtené softwarem.

3.4.3 Stanovení retenčních časů pro analyzované soluty

- připravíme pracovní roztoky měřených standardů izomerů guanosinmonofosfátu,
- provedeme *dva* nástřiky *každého* z těchto roztoků na kolonu.

3.4.4 Analýza směsi izomerů guanosinmonofosfátu

- nastříkneme vzorek směsi a provedeme analýzu, nástřik opakujeme dvakrát.

3.4.5 Stanovení obsahu nečistoty ve vzorku 5'GMT

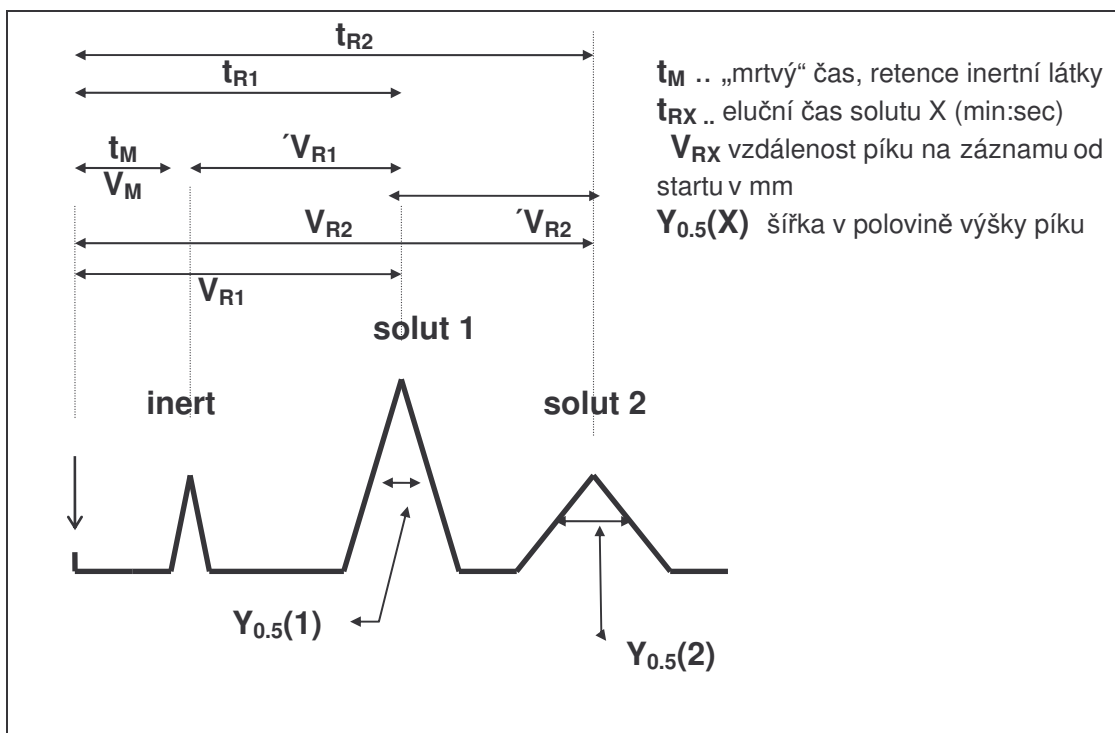
- připravíme si pracovní roztok vzorku guanosin 5'-monofosfátu dle pokynu vedoucího cvičení,
- tento pracovní roztok nastříkneme a zanalyzujeme,
- k pracovnímu roztoku přidáme dvakrát standardní přídatek identifikované nečistoty a proměříme,

d) každou analýzu provedeme 2x.

3.5 Vyhodnocení:

- a) vypočítáme mrtvý objem kolony V_M
- b) pro všechny píky v testovací směsi stanovíme jejich šířku $Y_{0.5}$ v polovině výšky v mm , z hodnot jejich t_R a $Y_{0.5}$ vypočítáme počet pater N , přepočteme na výšku teoretického patra a získáme údaj pro hodnocení účinnosti kolony
- c) stanovíme retenční objemy separovaných standardů izomerů guanosinmonofosfátu
- d) stanovíme kapacitní poměry k separovaných látek jako retenční charakteristiku, sloužící k porovnávání chromatogramů při změně experimentálních podmínek (změna složení mobilní fáze aj.)
- e) dle měření standardů (retenční časy, spektra) provedeme identifikaci látek v analyzované směsi izomerů guanosinmonofosfátu.
- f) identifikujeme nečistotu ve vzorku guanosin 5'-monofosfátu.
- g) pro píky v chromatogramu směsi izomerů stanovíme chromatografické rozlišení.
- h) ze sady chromatogramů měření standardního přídatku určíme obsah nečistoty ve vzorku guanosin 5'-monofosfátu.

Vyhodnocení chromatografického záznamu



Charakteristickou veličinou pro každou chromatografovanou látku je eluční (retenční objem) V_R . Existuje vztah mezi eluční dobou t_R , která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a elučním (retenčním) objemem, tj. objemem mobilní fáze, který za tu dobu proteče =>

$$V_R = t_R \times F_M$$

kde F_M je objem mobilní fáze, proteklé kolonou za jednotku času (objemová rychlost toku ml/min).

Eluční čas t_M odečteme na vytištěném chromatogramu, eventuálně jej lze získat ze záznamu zapisovače přepočtem z hodnot vzdálenosti d_R maxima píku od linie nástřiku (v mm) s použitím údaje o posunu papíru s (v mm/min). Hodnota elučního času je v minutách.

$$t_R = \frac{d_R}{s}$$

Eluční objem V_R je součtem dvou objemových veličin

$$V_R = V_M + V'_R$$

kde V_M je mrtvý objem a V'_R je redukováný eluční objem.

Pro hodnocení rozdílů v retencích látek se často používá pojmu retenční poměr $r_{1,2}$. Jeho hodnota se počítá z poměru redukováných retenčních objemů

$$r_{1,2} = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}}$$

V literatuře se retence látek, zvláště při optimalizaci podmínek a hodnocení trendů změn retence, často vyjadřují pojmem *kapacitní poměr k*.

Ten je definován

$$k_1 = \frac{V_{R1} - V_M}{V_M}$$

Je vyjadřován jako poměr celkového množství separované látky ve stacionární fázi k jejímu celkovému množství ve fázi mobilní

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

K_D je distribuční konstanta, V_S objem stacionární fáze, V_M mrtvý objem.

Základním údajem o rozmývání složek vzorku při transportu kolonou (které se projevuje šířkou píku) je *počet teoretických pater kolony n*. Tento údaj slouží k hodnocení účinnosti kolony podobně jako odvozená veličina *výškový ekvivalent teoretického patra H*. Počet teoretických pater se zjistí experimentálně dosazením naměřených parametrů do vztahu

$$n = 5,545 \times \left(\frac{d_R}{Y_{0.5}} \right)^2 = 5,545 \times \left(\frac{t_R}{Y_{s0.5}} \right)^2$$

kde $Y_{0.5}$ je šířka píku v polovině výšky v mm, d_R vzdálenost maxima píku od linie nástřiku v mm, t_R je eluční čas v sekundách a $Y_{s0.5}$ je šířka píku v polovině výšky vyjádřená také v časových jednotkách (sekundy).

Výškový ekvivalent výškového patra H (v mm) se vypočítá z délky kolony (v pokusu 150mm) a vypočteného počtu pater n

$$H = \frac{L}{n}$$

Pro hodnocení, jak jsou píky od sebe odděleny, se používá veličiny *rozlišení*. Rozlišení $R_{1,2}$ se vypočítá z rozdílu elučních objemů separovaných látek 1 a 2, a hodnot šířek obou elučních křivek v poloviční výšce

$$R_{1,2} = \frac{1,177(V_{R2} - V_{R1})}{Y_{0.5(1)} + Y_{0.5(2)}}$$

Z hodnoty $R_{1,2}$ lze odhadnout míru překrývání sousedících píků, při hodnotě $R=1$ jsou píky překryty z 2% plochy, dokonale odděleny jsou při hodnotě $\geq 1,5$

Doporučená literatura:

J. Churáček, P. Jandera: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. SNTL, Praha 1984.