

# Chromatografické metody II.

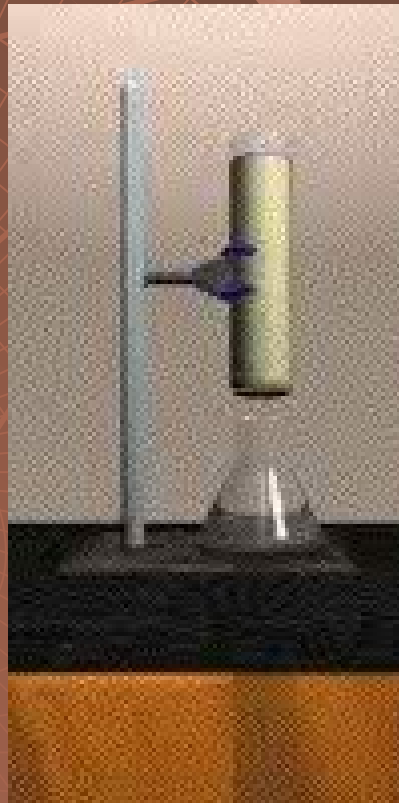


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# 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 <sup>6</sup>	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
PC, TLC	100 - 2000	ionty, látky polární i nepolární
CE (CZE, CEC, MEKC)	3 -10 <sup>6</sup>	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

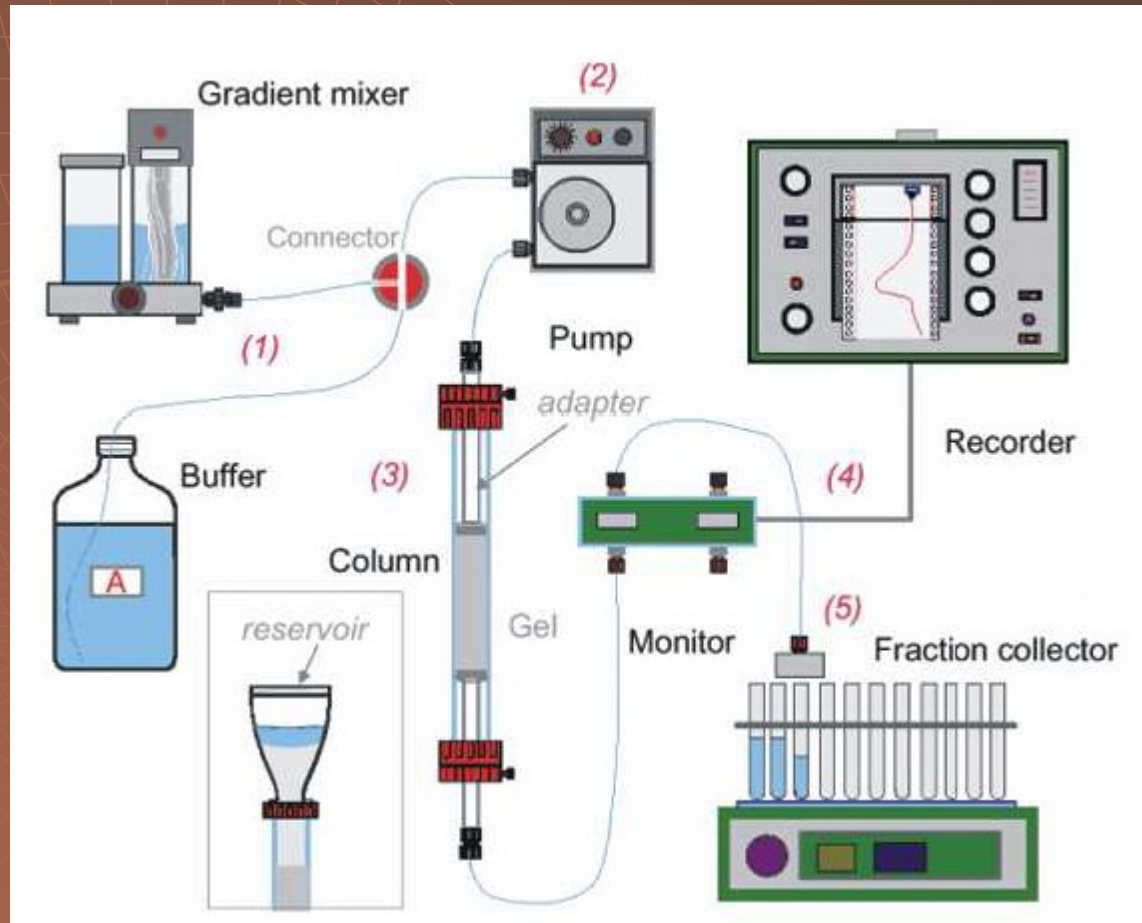


# Kapalinová chromatografie

## doba trvání

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

# Zařízení pro LPC

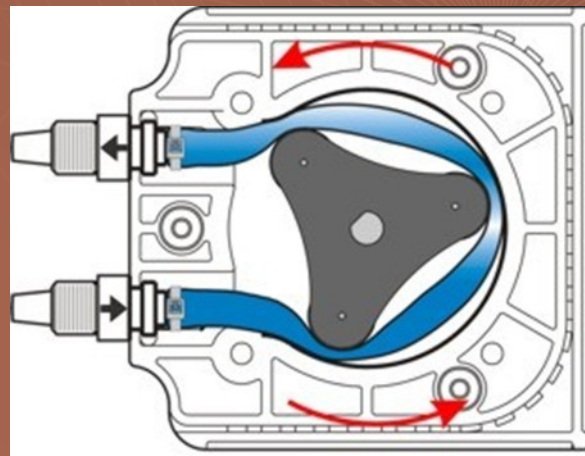


# Zařízení pro LPC





# Zařízení pro LPC



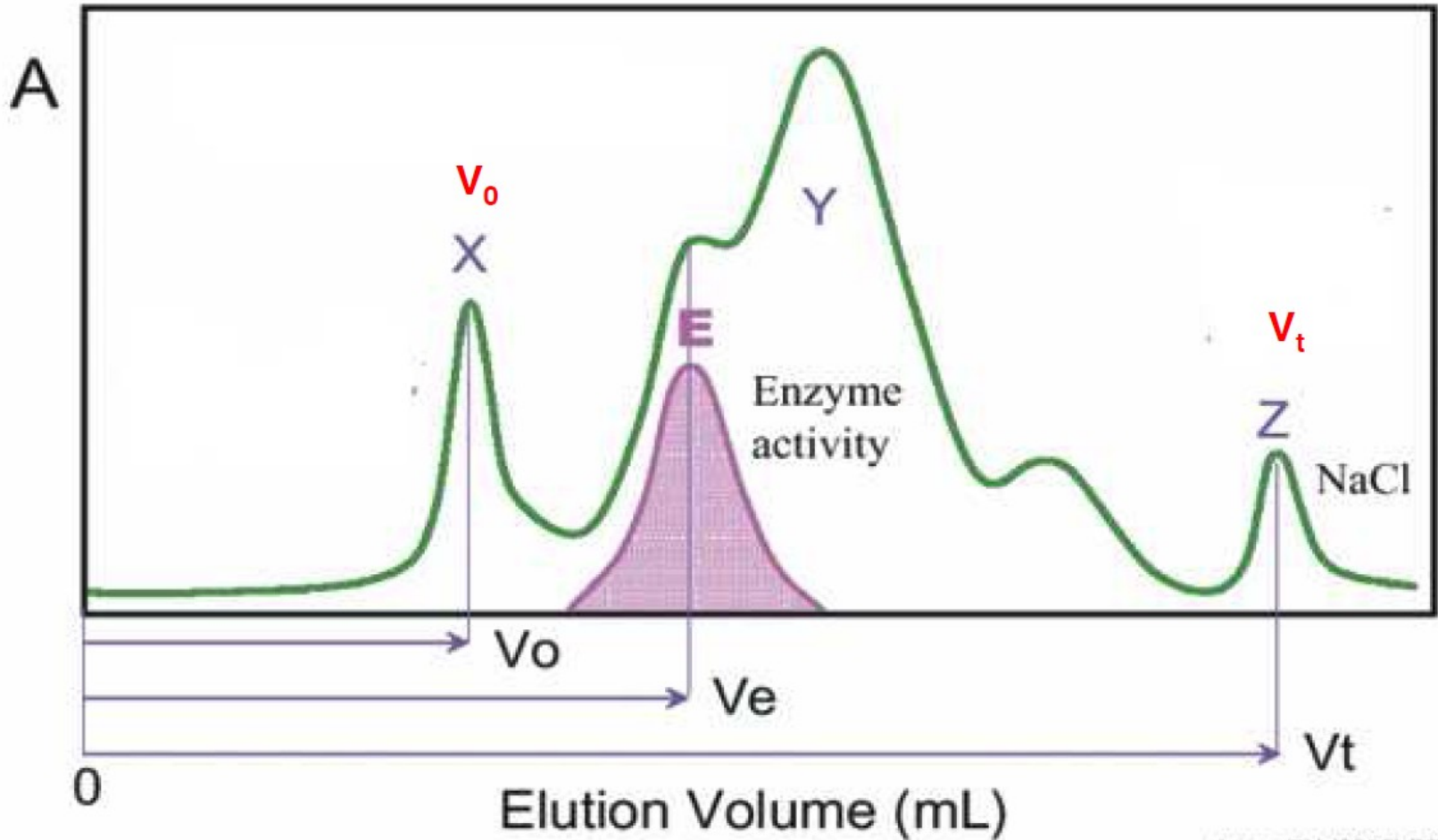
# Zařízení pro LPC



# 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



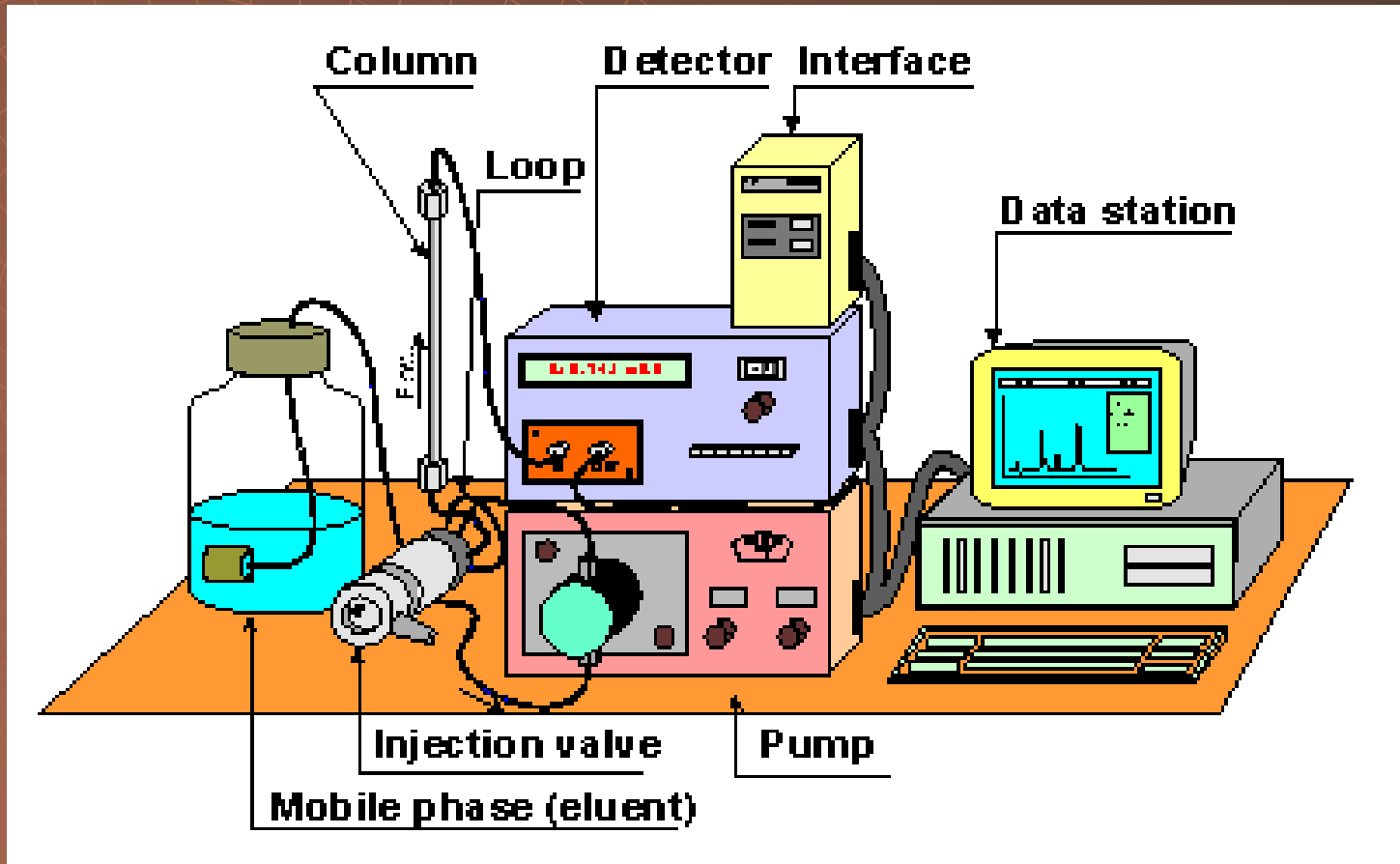




# Instrumentace pro FPLC a HPLC



# Zařízení pro FPLC a HPLC



# Zařízení pro FPLC



# Zařízení pro HPLC



# Zařízení pro UPLC

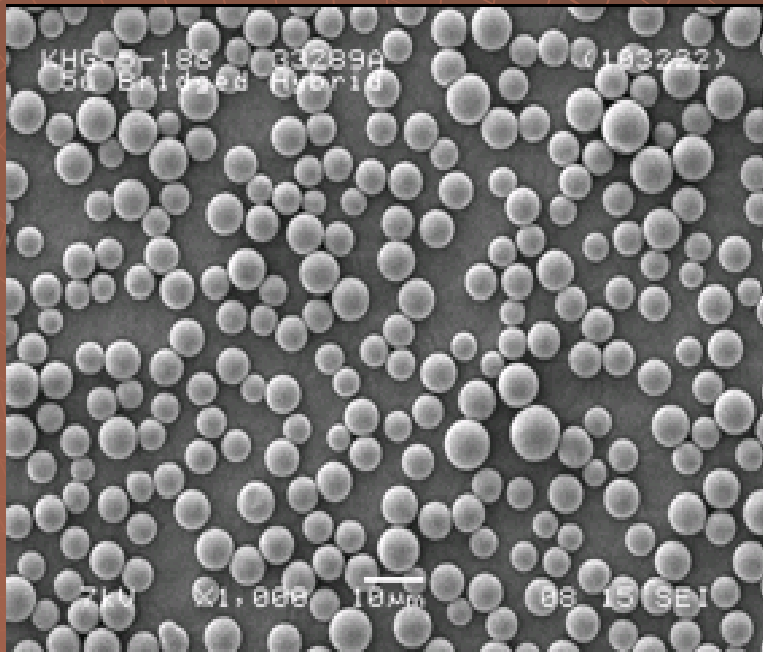


# UPLC x HPLC

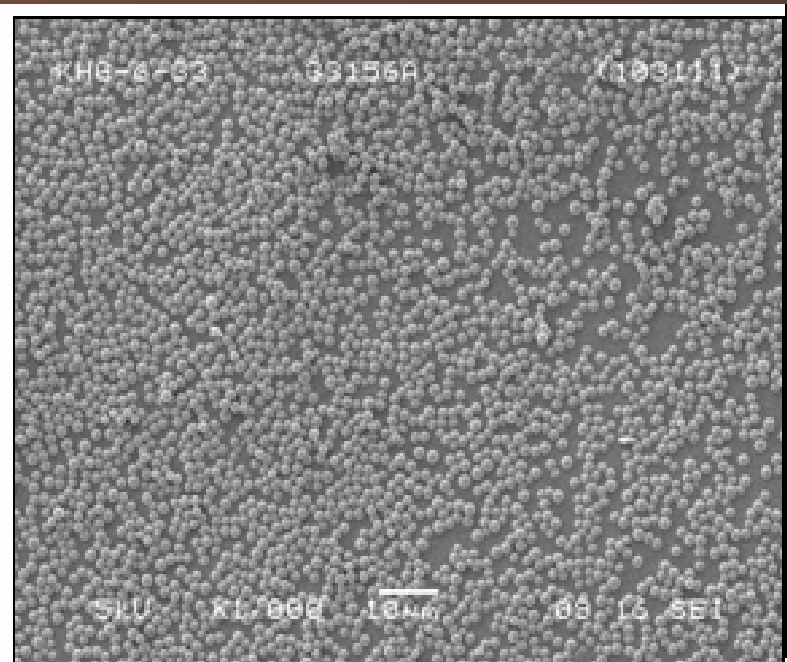
- kratší doba analýzy = vyšší průchodnost vzorků (vyšší produktivita)
- snížení nákladů = menší spotřeba HPLC rozpouštědel (ekologie)
- zvýšení separační účinnosti
- snížení meze detekce – zvýšení citlivosti
- •více kvalitativních informací



# UPLC x HPLC



**5 µm Particles**



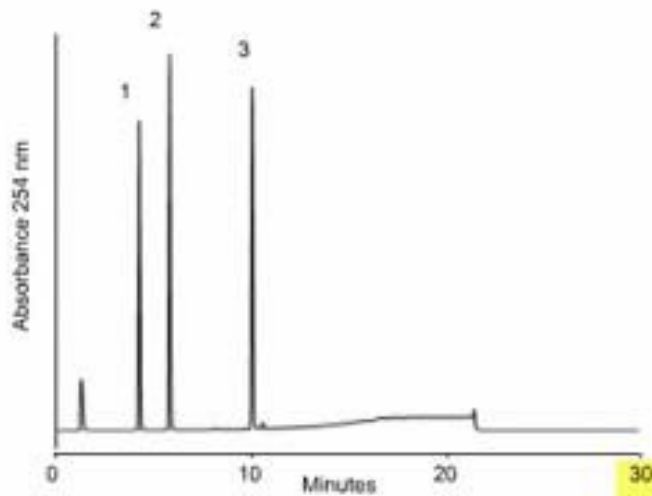
**1.7 µm UPLC Particles**

# UPLC x HPLC

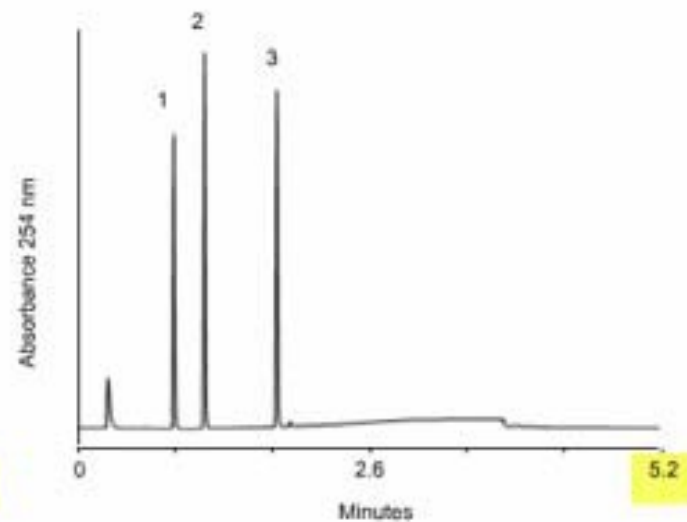
Waters

HPLC Converted to UPLC™

©2005 Waters Corporation

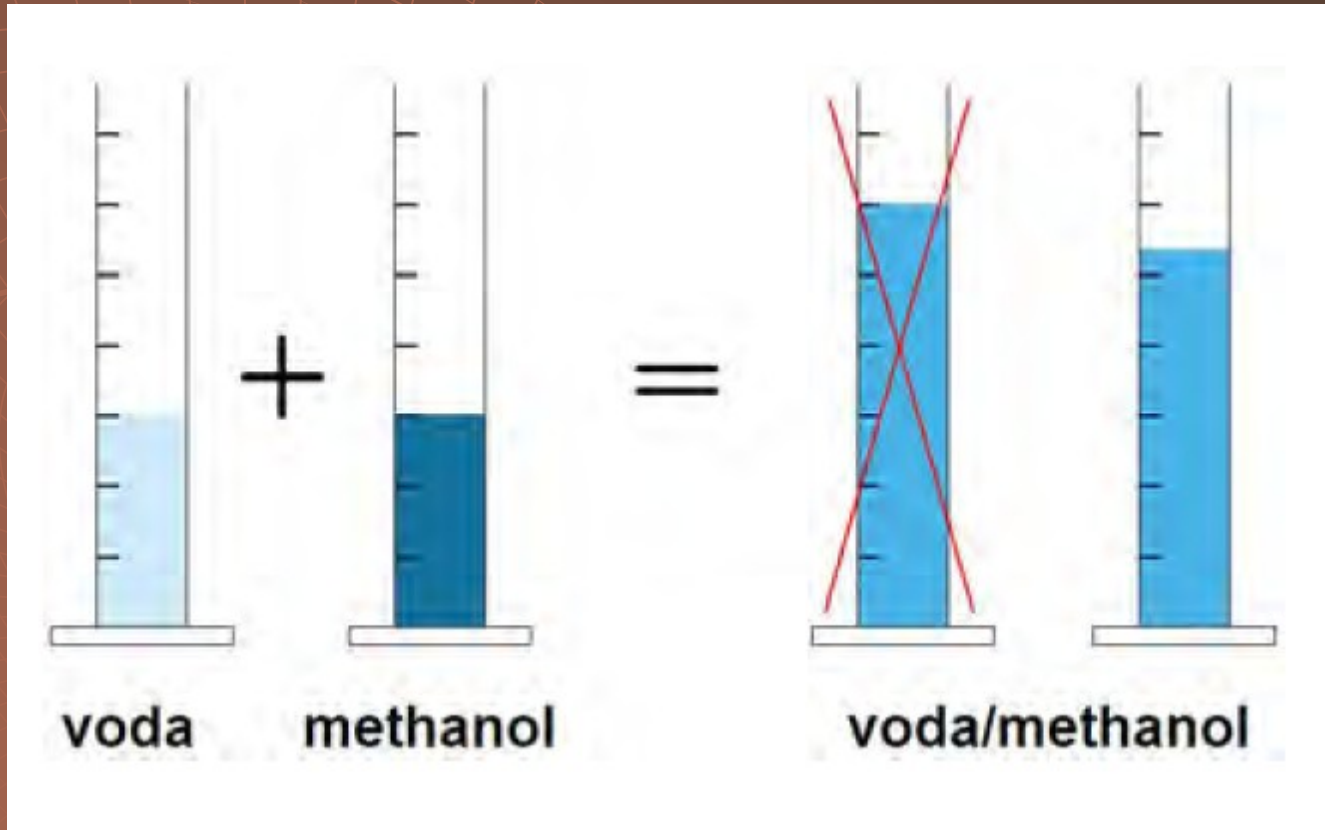


Original 30 minute HPLC



Converted 5.2 minute UPLC™

# Příprava mobilní fáze



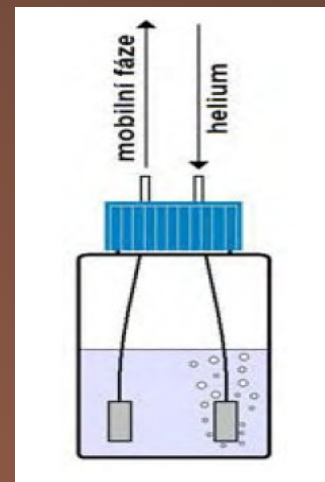
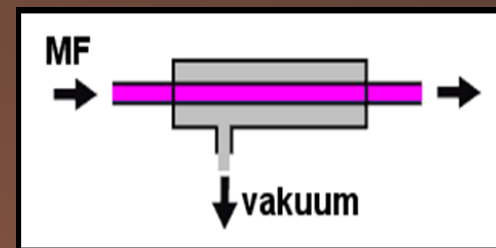
# Příprava mobilní fáze

- filtrace



# Odplynění mobilní fáze

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





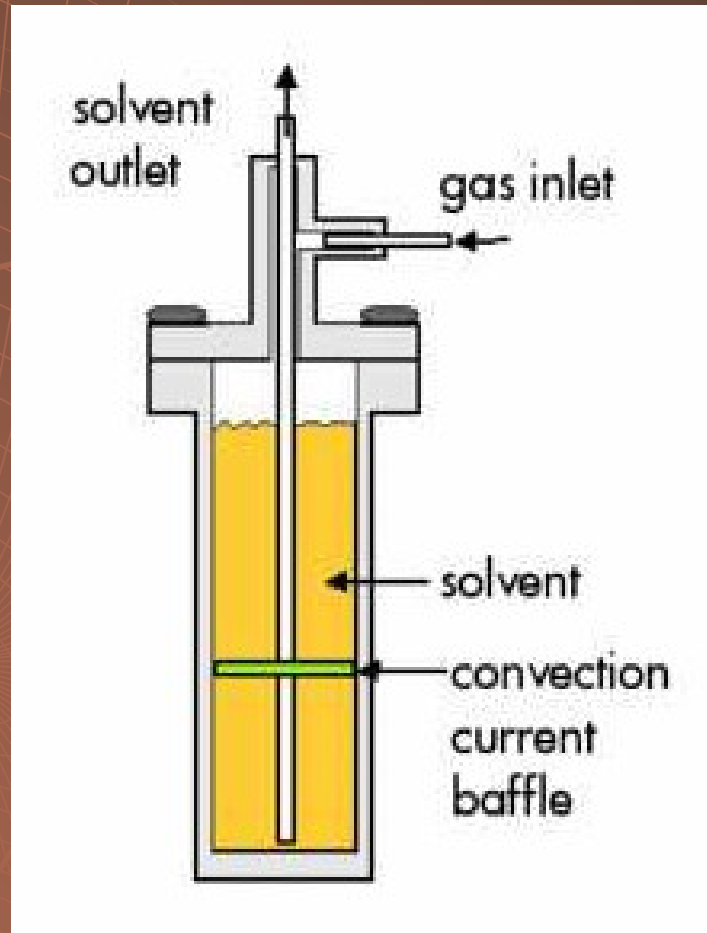


Pumpy



# Pumpy pracující za konstantního tlaku

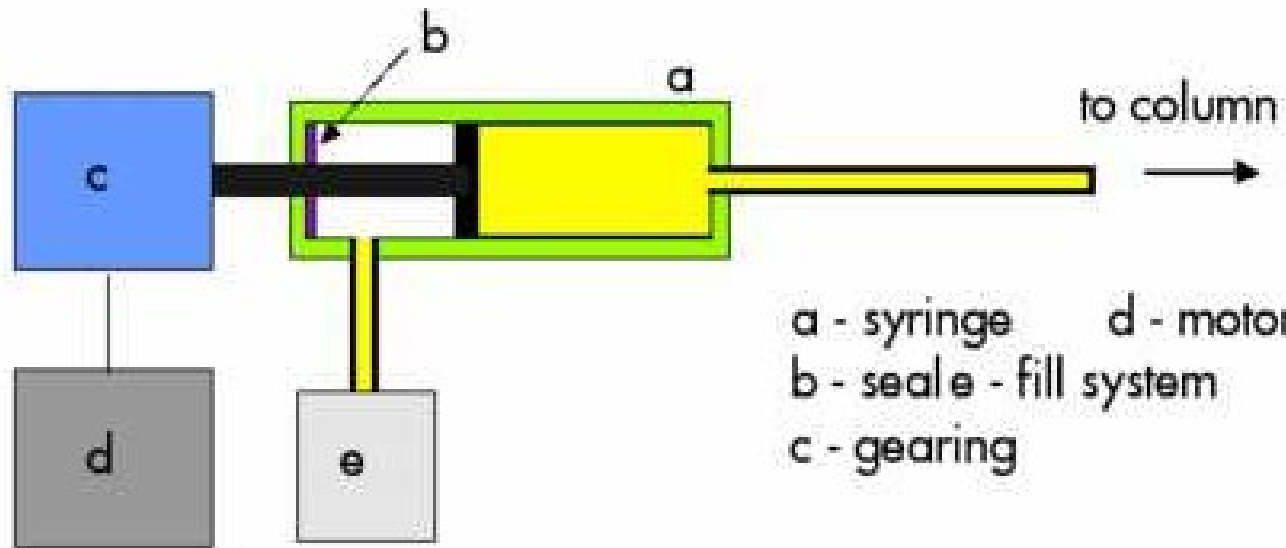
# Tlaková pumpa



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

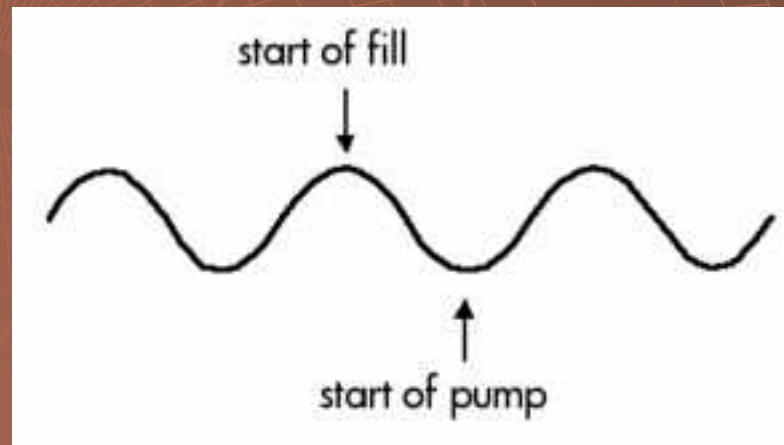
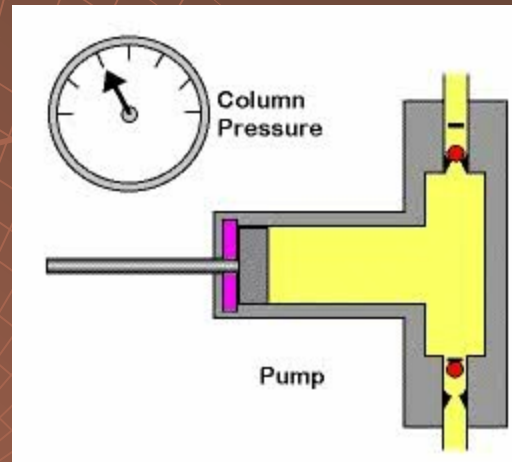
# Pumpy pracující za konstantního průtoku

# Lineární dávkovače

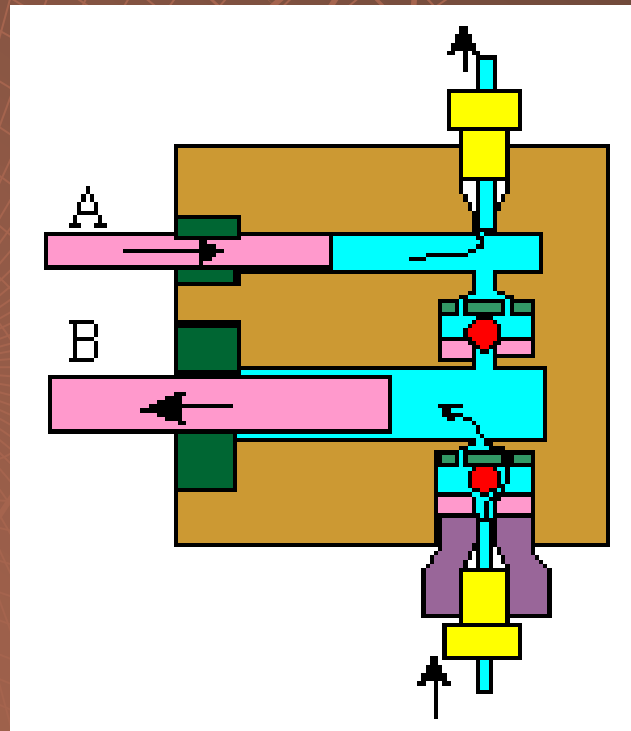
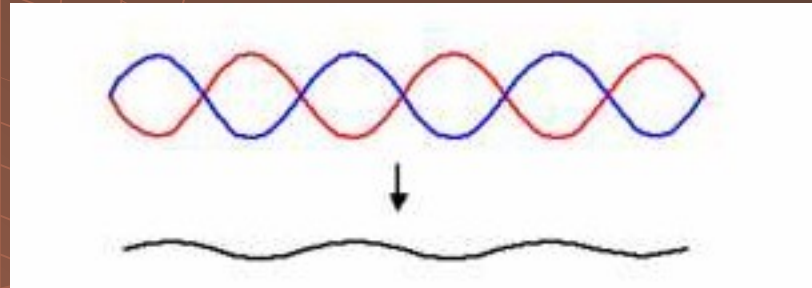




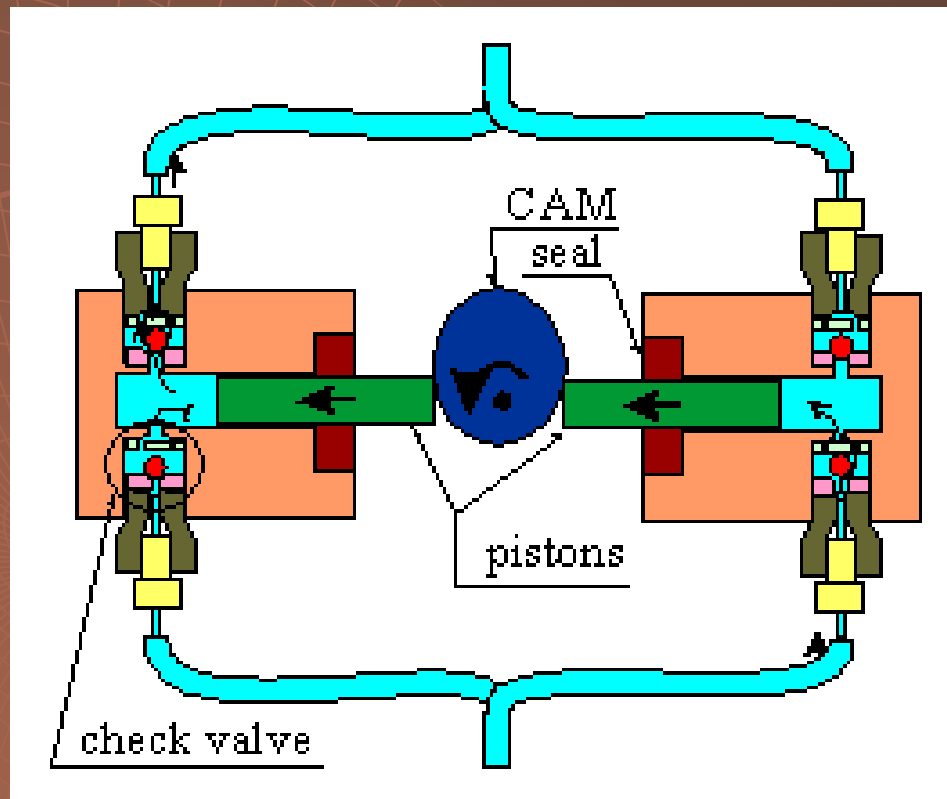
# Pumpa jednopístová



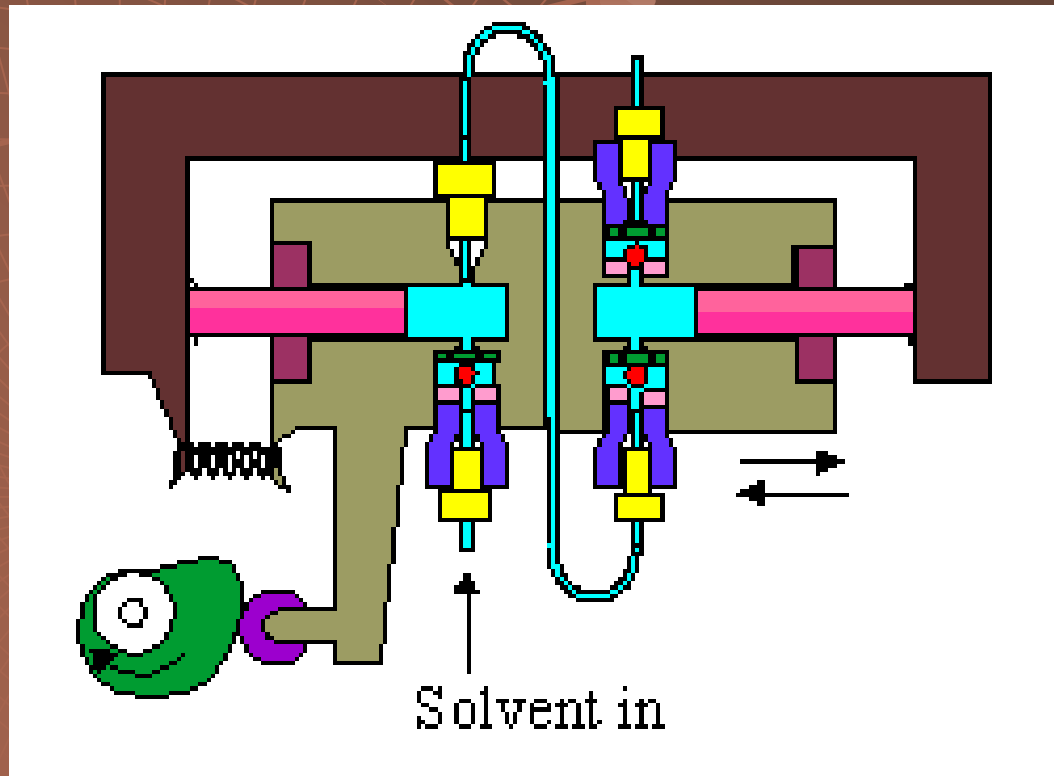
# Pumpa dvoupístová



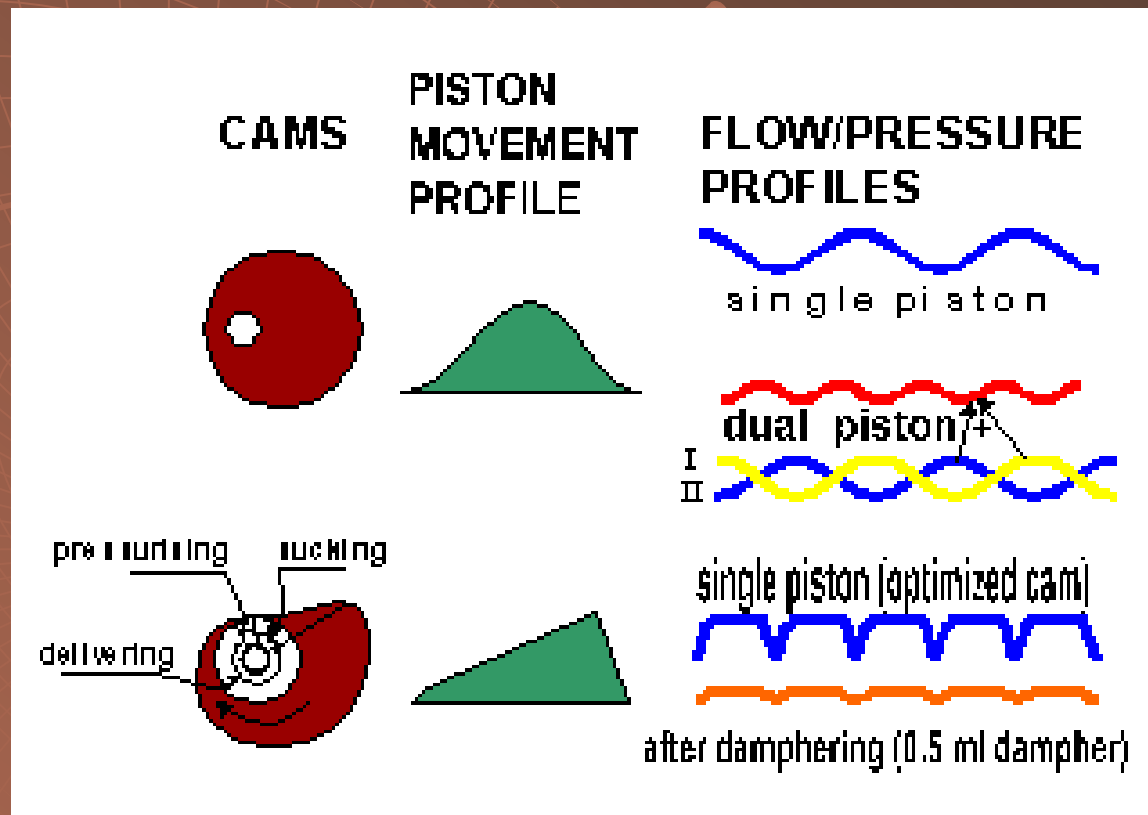
# Pumpa dvoupístová



# Pumpa dvoupístová

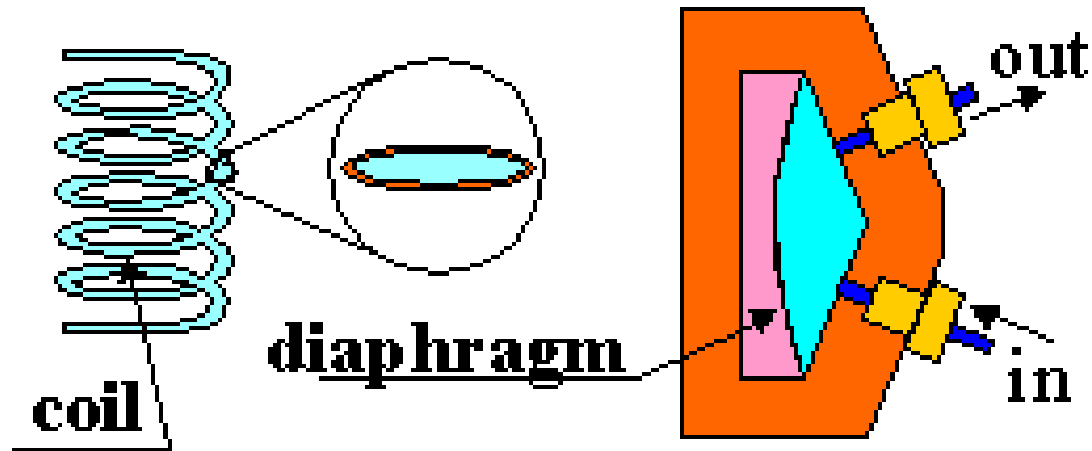


# Tlumení pulsů

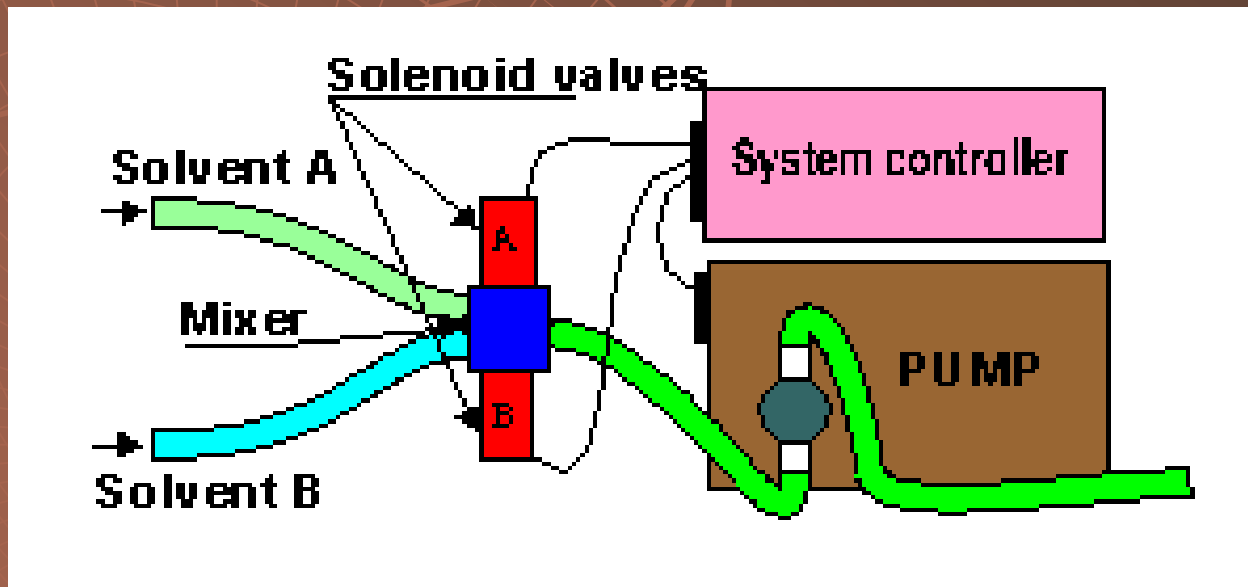




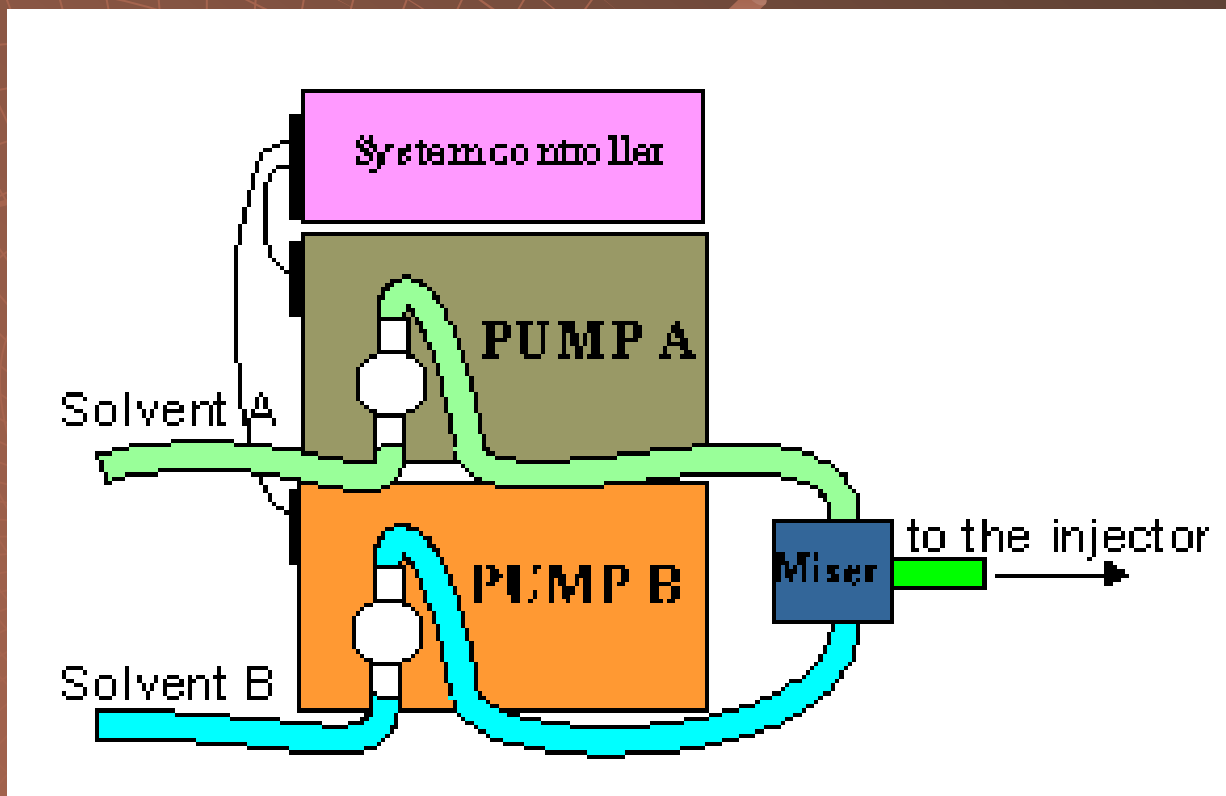
# Tlumení pulsů



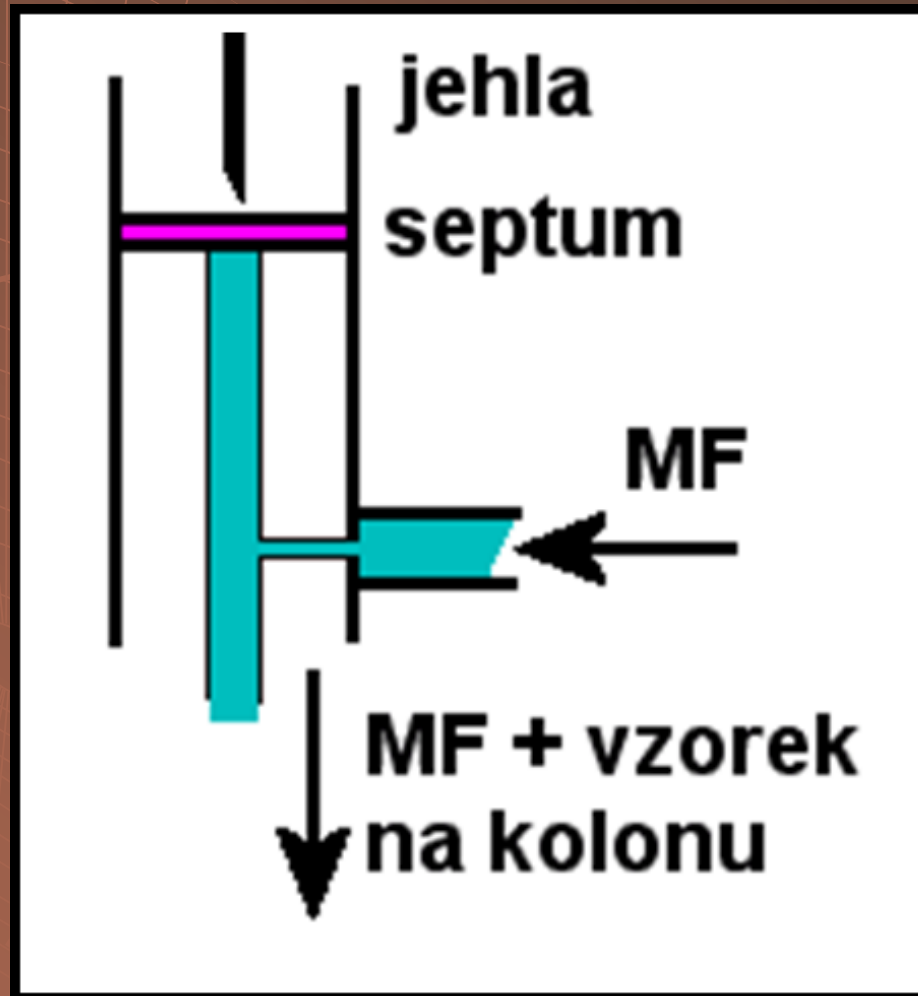
# Gradient nízkotlaký



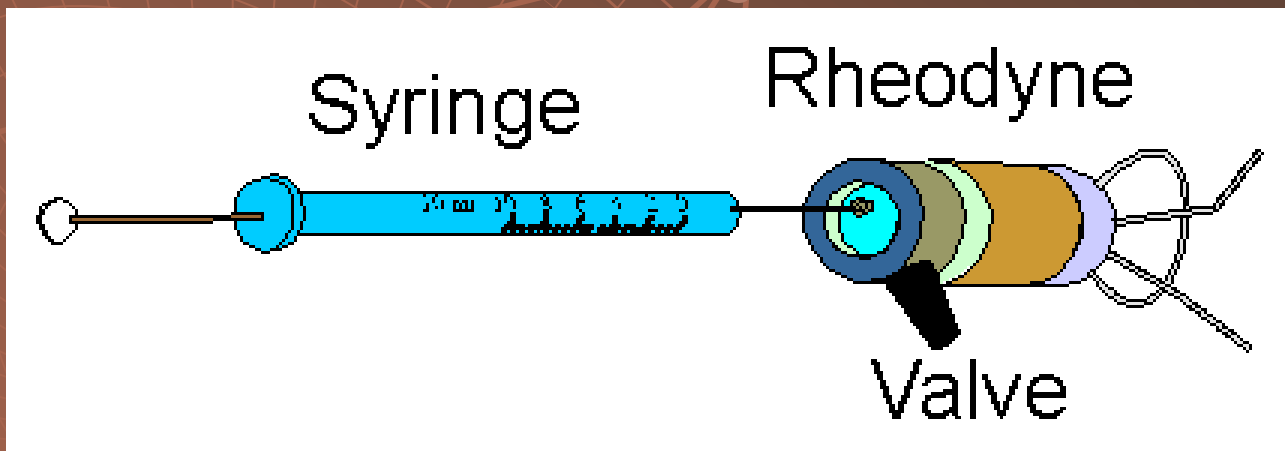
# Gradient vysokotlaký



# Dávkování – septum

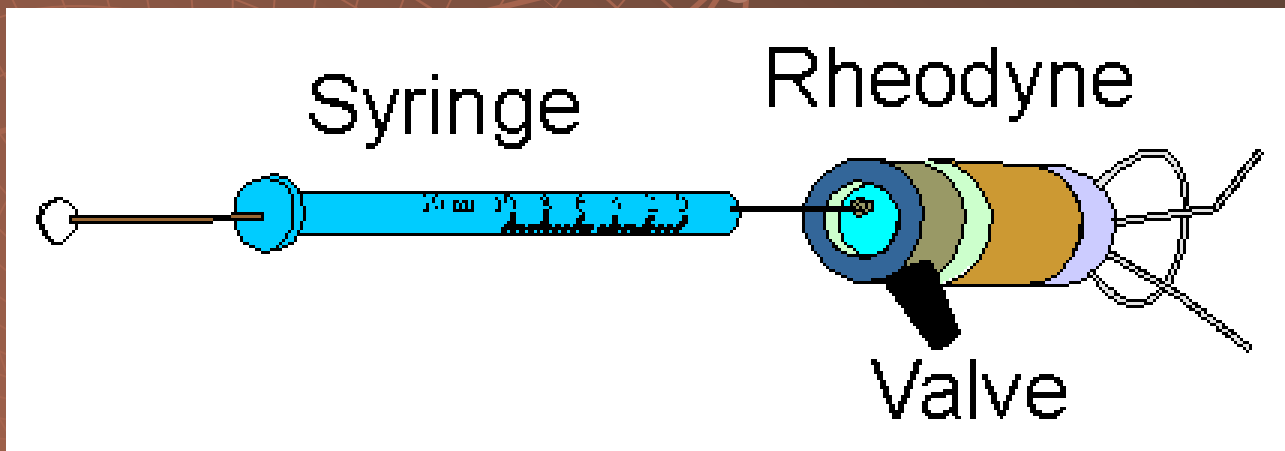


# Dávkování – dávkovací ventil

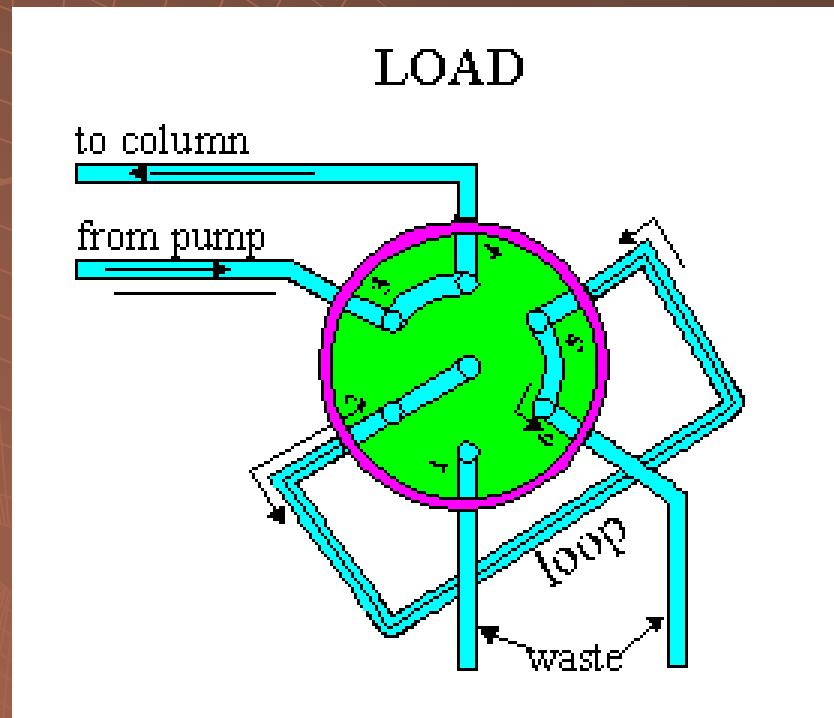




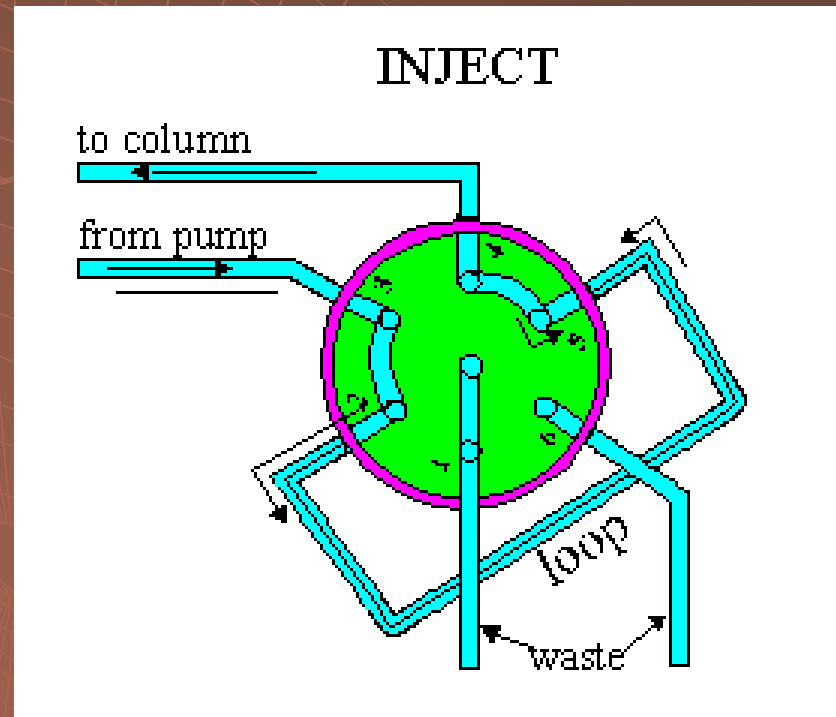
# Dávkování – dávkovací ventil



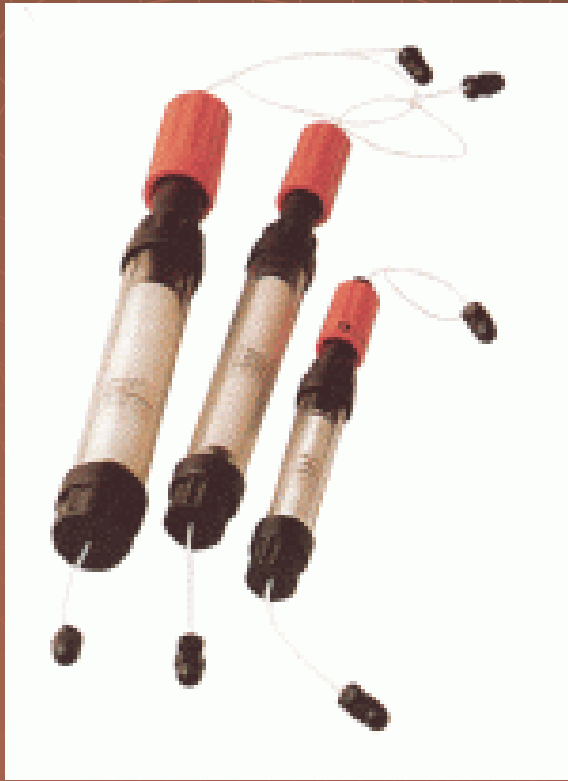
# Dávkovací ventil – „Load“



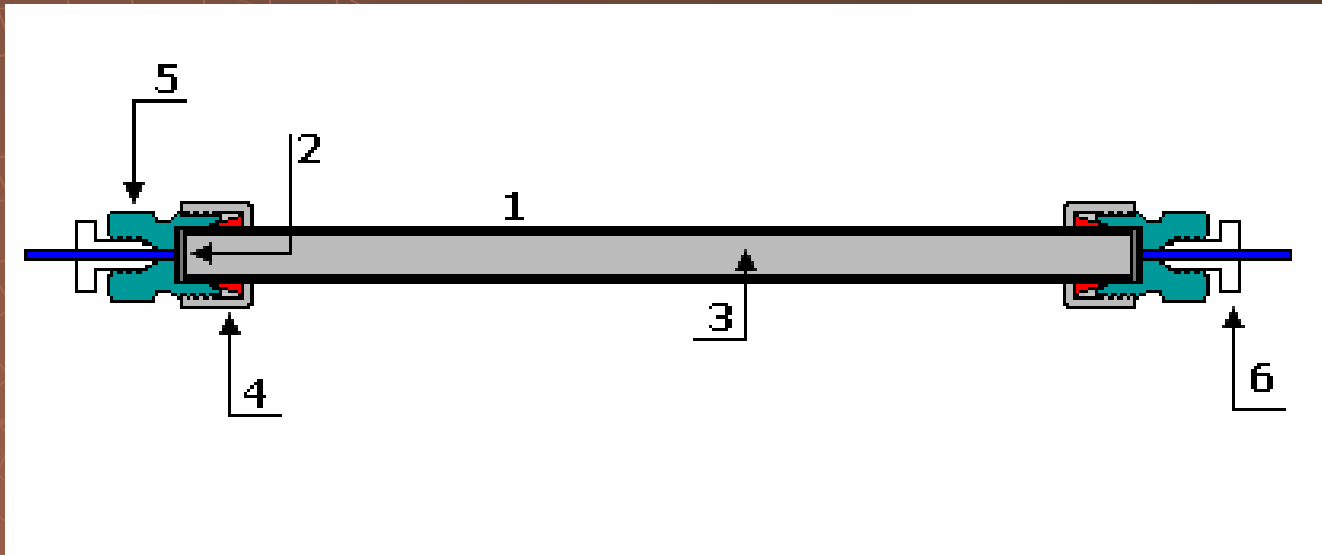
# Dávkovací ventil – „Inject“



# Kolony pro FPLC



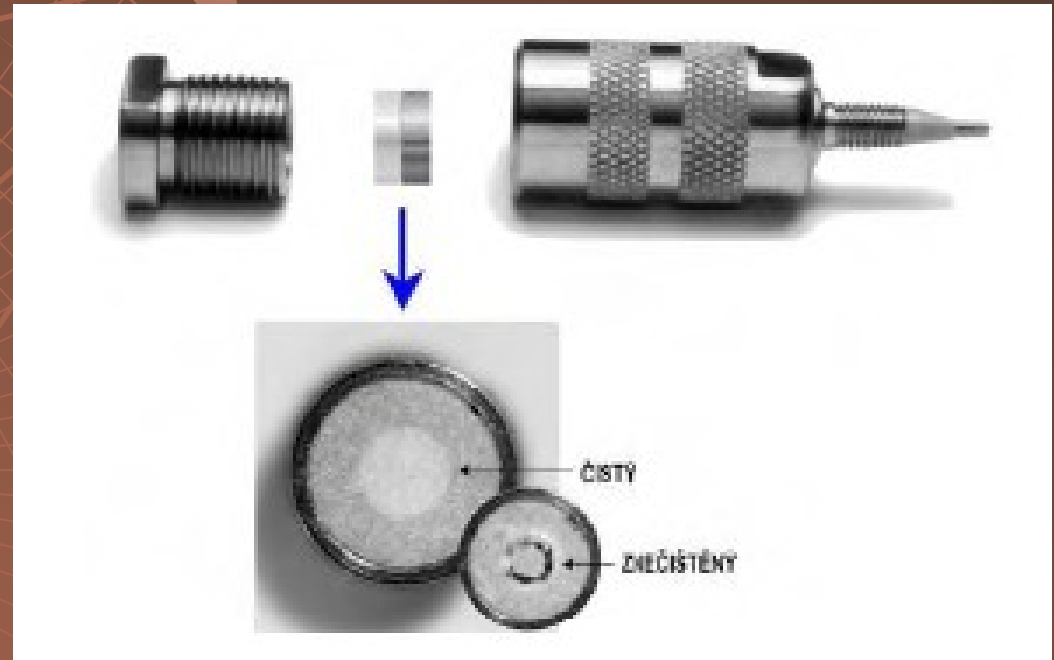
# Kolona



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



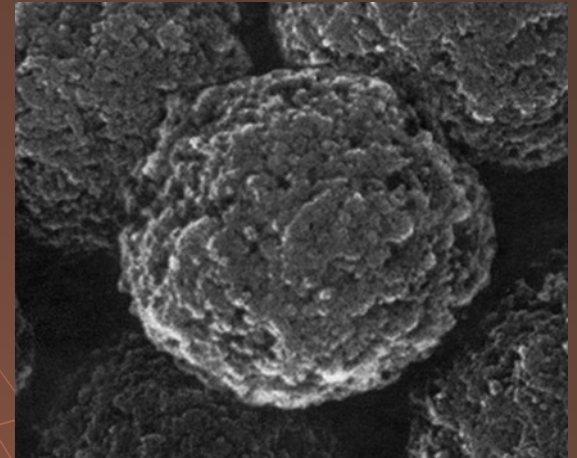
# Částicový sorbent

**tvar:** sférický (bez povrchových vad)

**rozměr pro kolony:**

*analytické* 1 – 8  $\mu\text{m}$

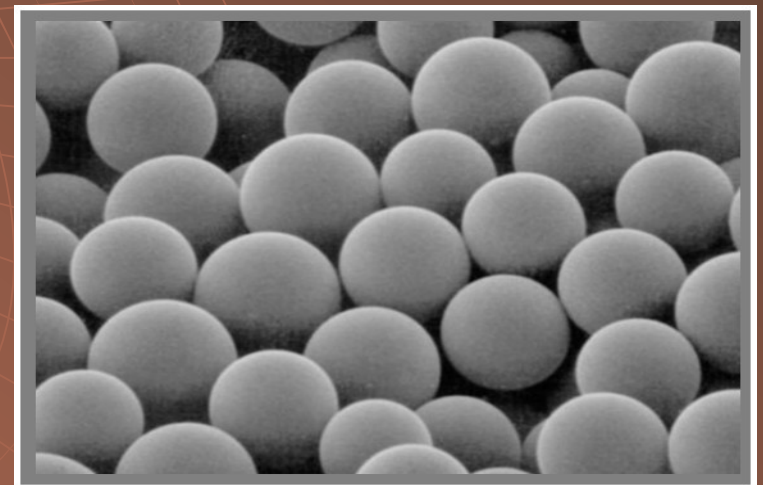
*preparativní* > 10  $\mu\text{m}$



**povrchové rozrůznění**

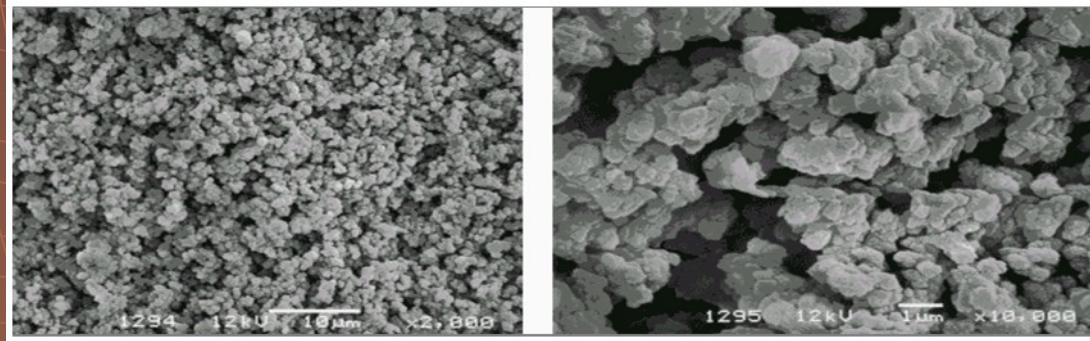
**póry**

**polymerní částice**





# Monolitický sorbent



makropóry:  $\sim 1500$  nm; mezopóry:  $< 50$  nm,  
mikropóry  $< 2$  nm

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

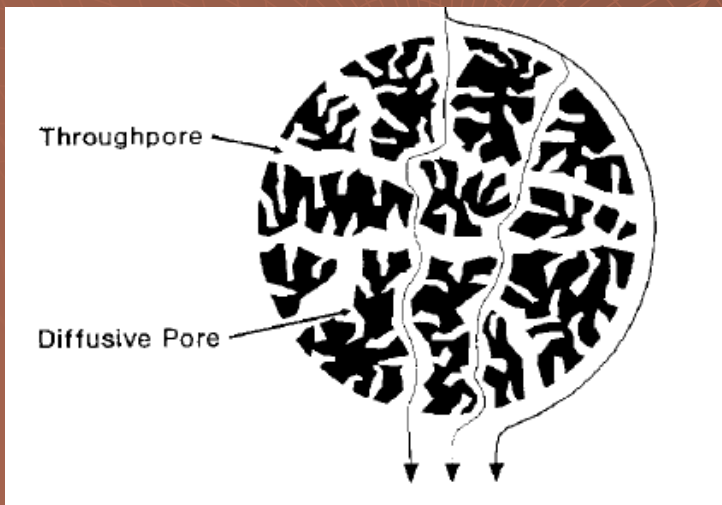
**vysoké průtoky za nízkých tlaků;**  
velká efektivní plocha  $\Rightarrow$  rychlá separace:  
*vysoké* rozlišení a *vysoká* kapacita



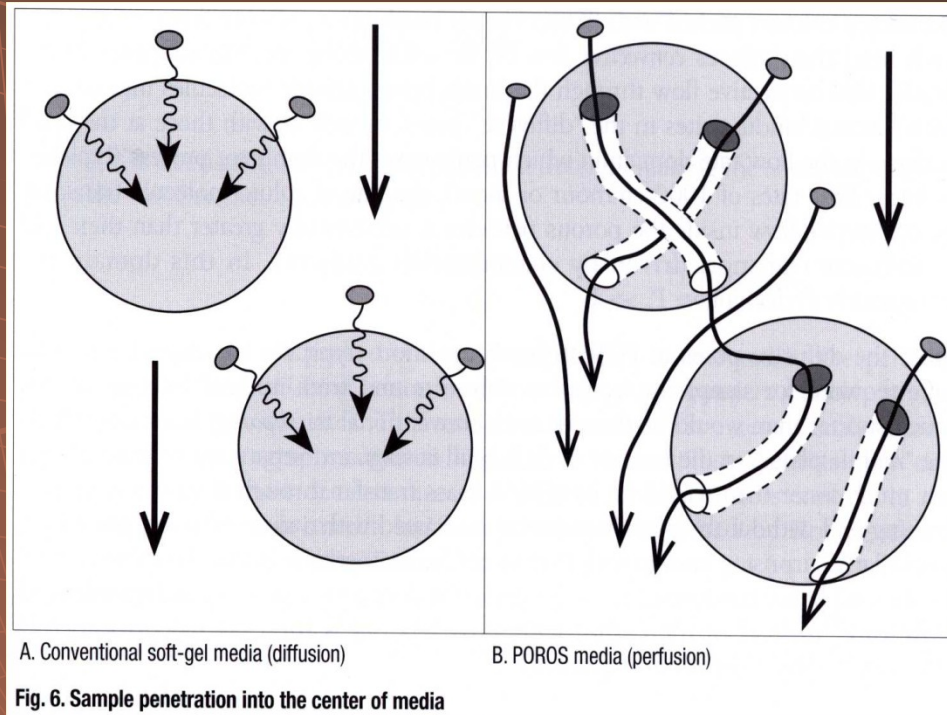


# Perfúzní chromatografie

- ◆ Využívá médií - **POROS média**, jejichž částice (10, 20, 50  $\mu\text{m}$ ) 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<sup>-1</sup>).

- ◆ 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

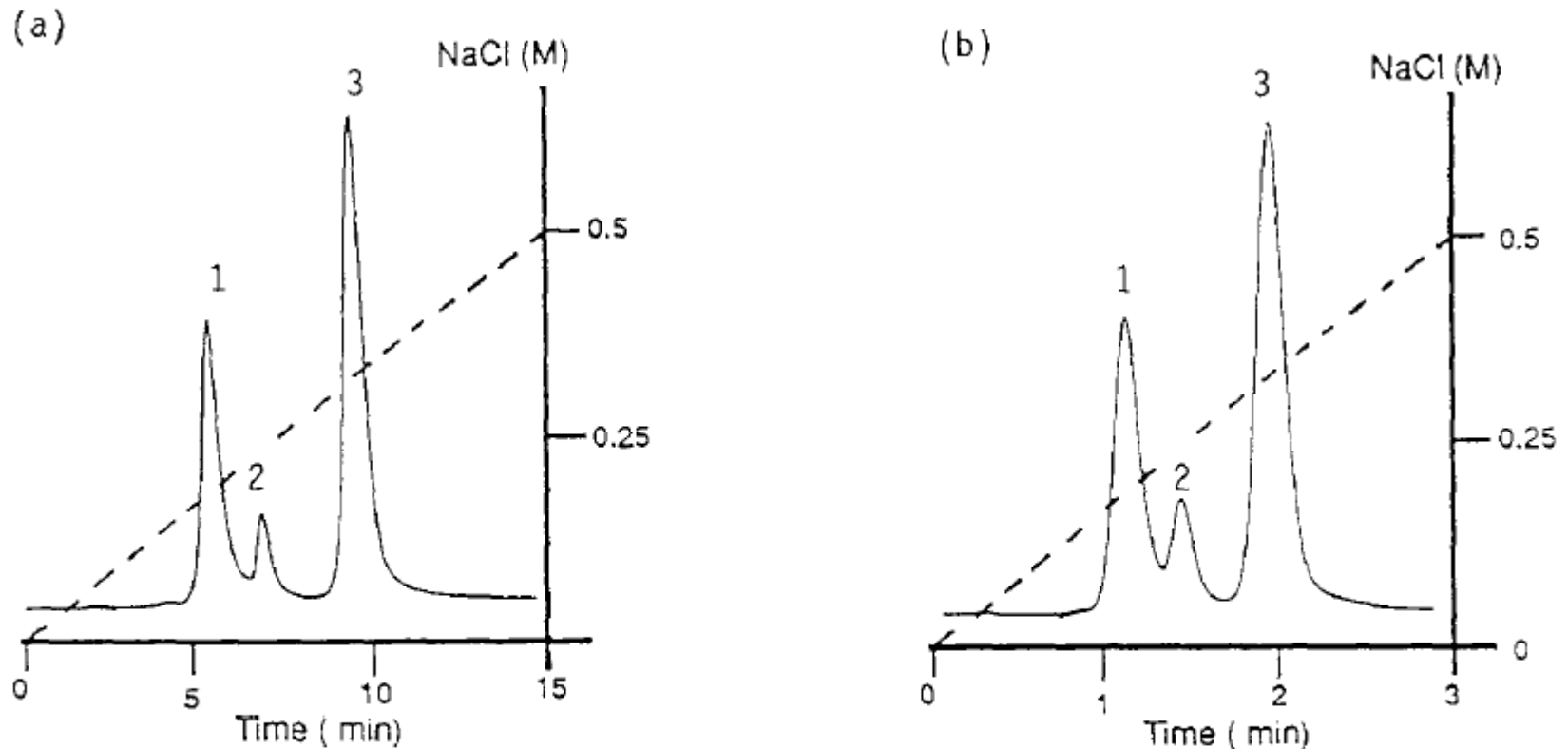
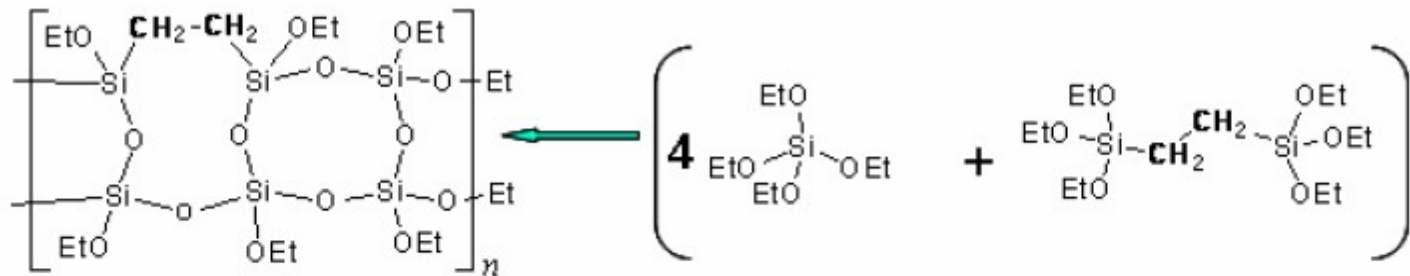


Fig. 14. Separation of model proteins on POROS S/M; 75  $\mu$ g load of a protein mixture containing chymotrypsin (1), cytochrome *c* (2), and lysozyme (3); detection at 280 nm; column, 100  $\times$  4.6 mm I.D.; 20 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid buffer, pH 6.0; detection at 280 nm. (a) 1 ml/min,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

# UPLC stacionární fáze Waters

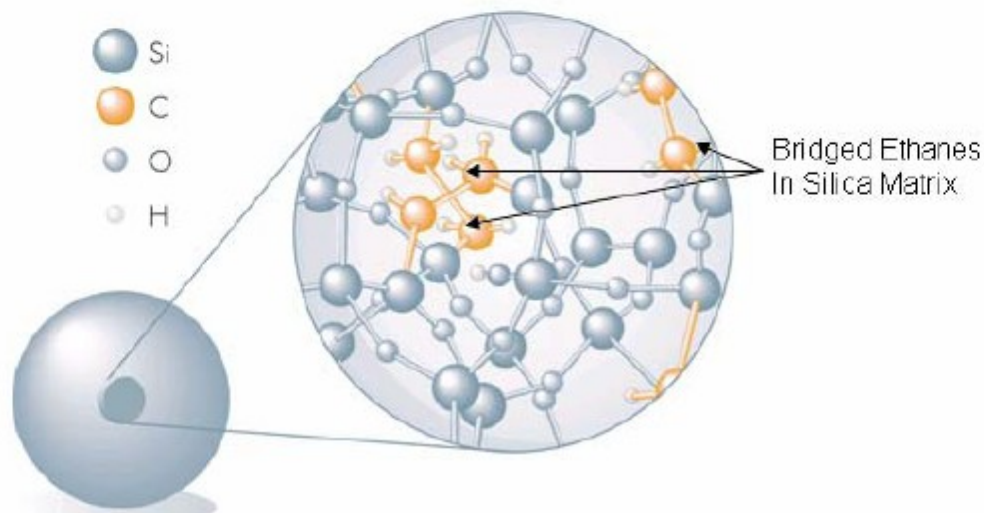
technologie "Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology"



Polyethoxysilane (BPEOS)

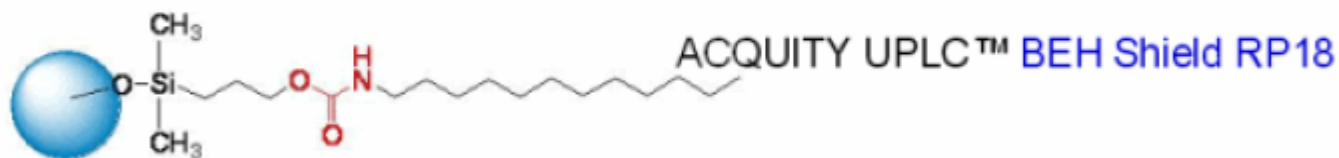
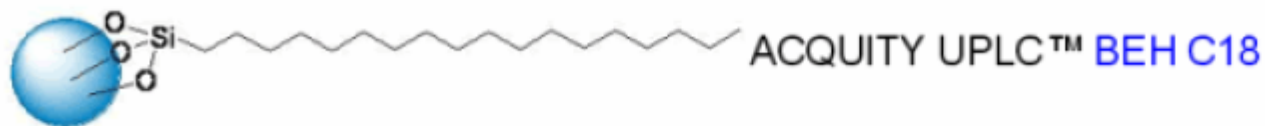
Tetraethoxysilane (TEOS)

Bis(triethoxysilyl)ethane (BTEE)



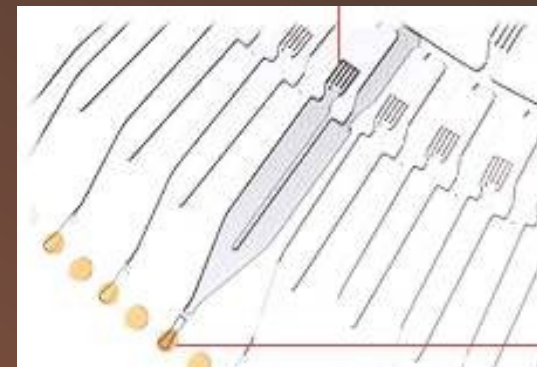
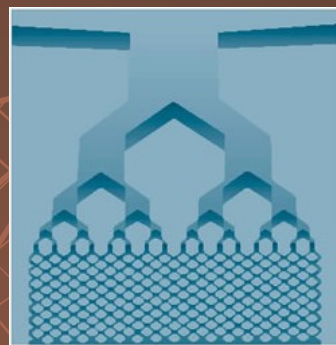
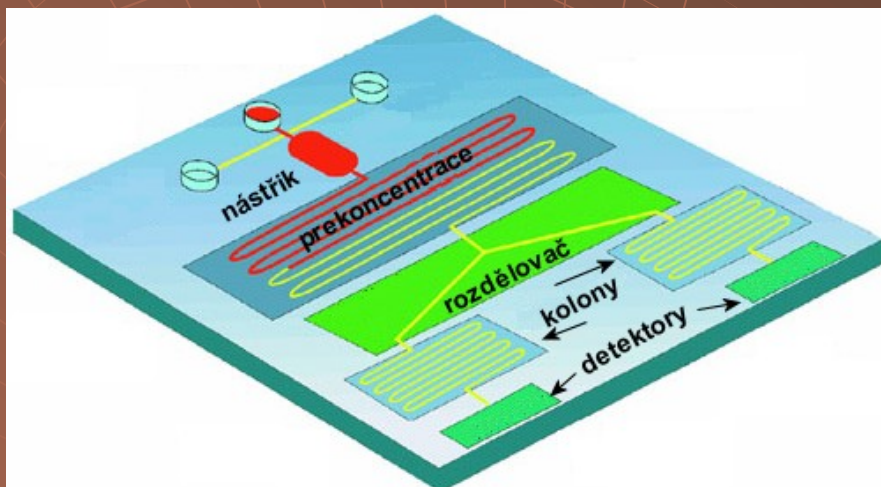


# UPLC stacionární fáze Waters



# Chipová chromatografie

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

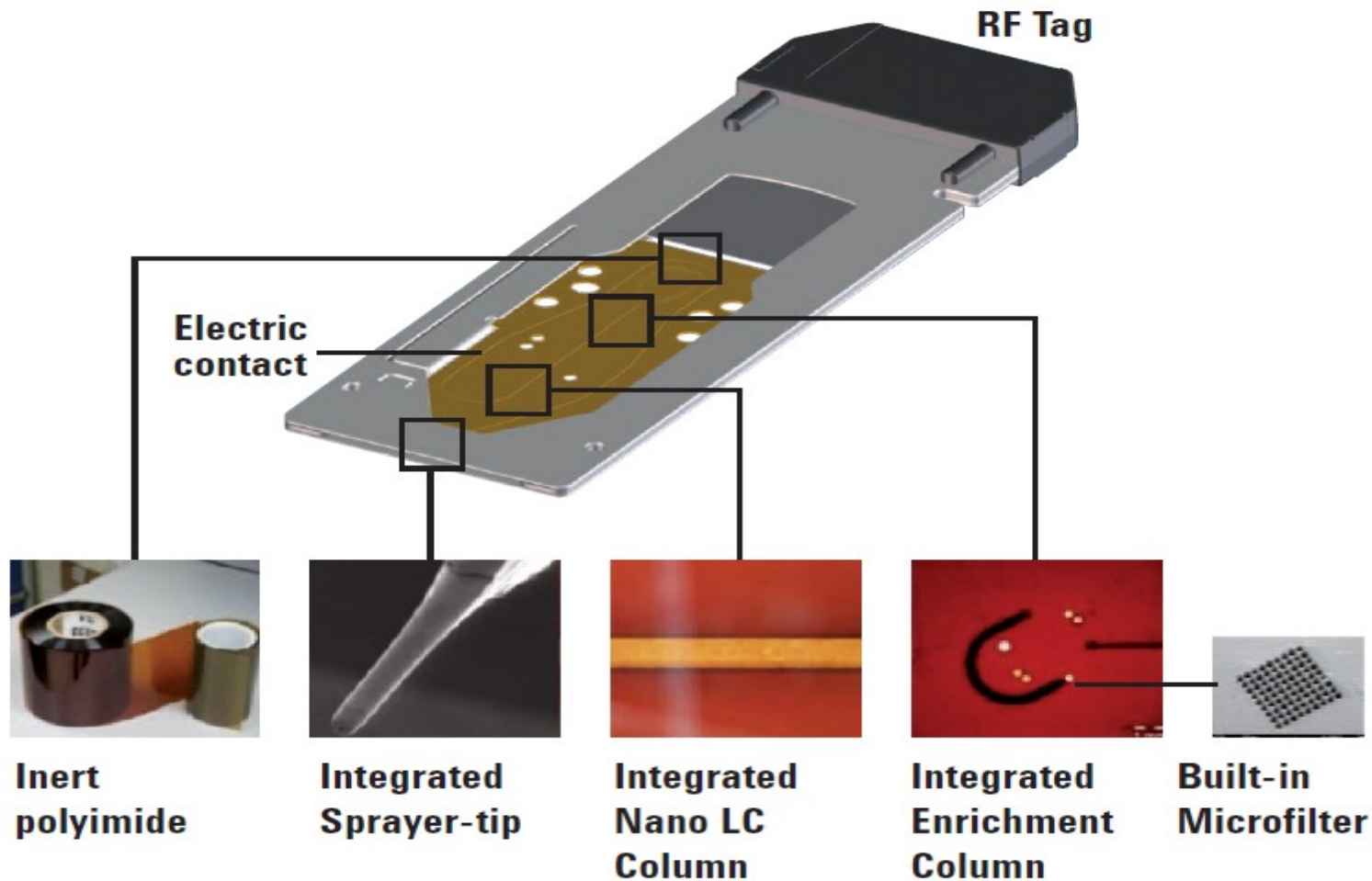


doprava MF: pumpa, odstředivá síla, el. staticky

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

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

# Chipová chromatografie Agilent



**Inert polyimide**

**Integrated Sprayer-tip**

**Integrated Nano LC Column**

**Integrated Enrichment Column**

**Built-in Microfilter**



# 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 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>
závislost odezvy na průtoku	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ano
teplotní závislost	vysoká (10 <sup>-4</sup> jed. ind. lomu)	nížká	nížká	nížká	vysoká (1,5%)	vysoká (2,0%)	nížká	vysoká
gradientová eluce	ne	ano	ne	ano	ne	ano	ano	ano (částečně)

# Refraktometrický detektor

index lomu

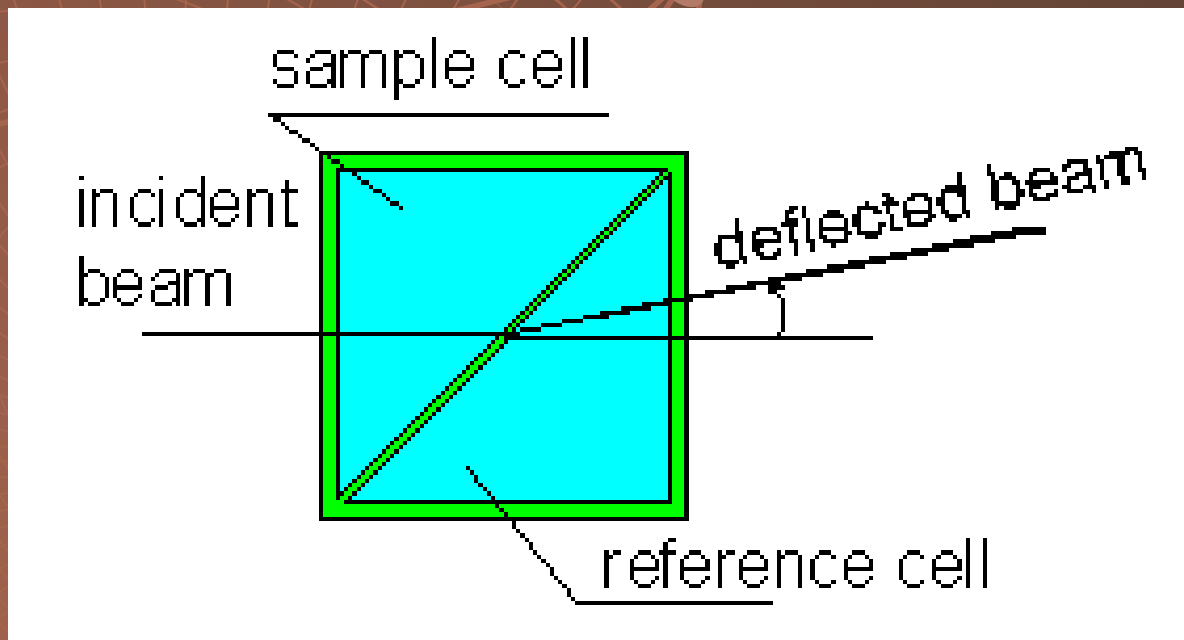
**šum**  $10^{-7}$

**dyn. rozsah**  $10^4$

**citlivost**  $10^{-7}$  g/ml

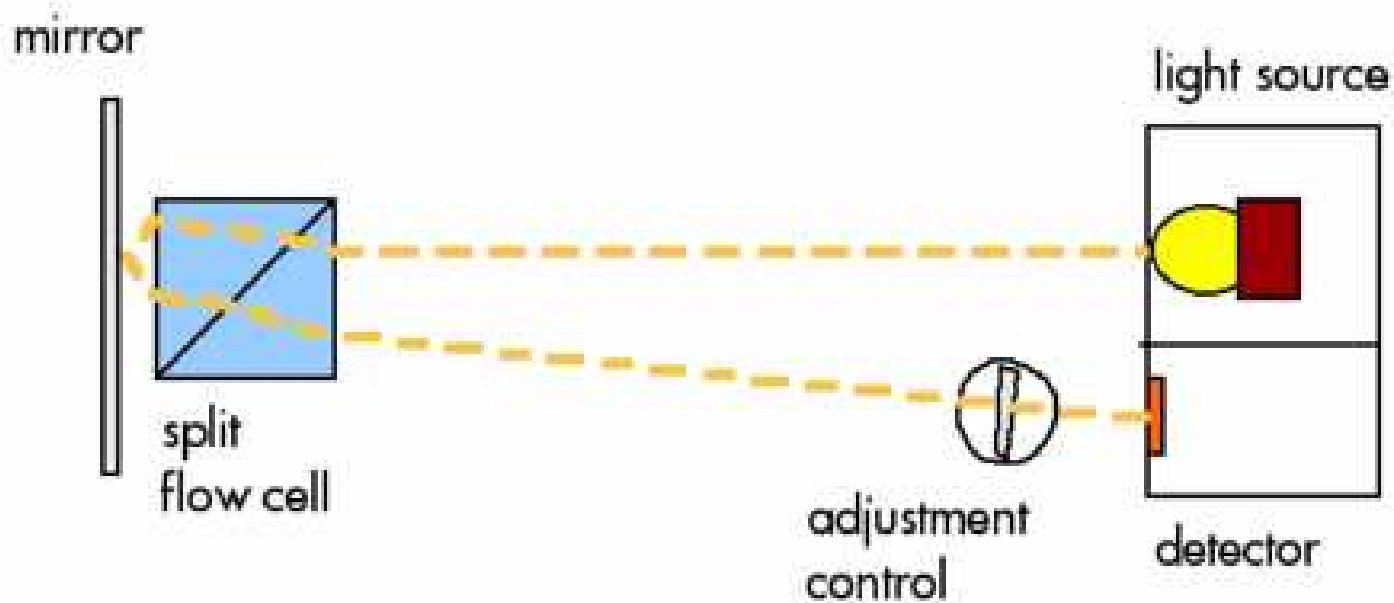


# Refraktometrický detektor



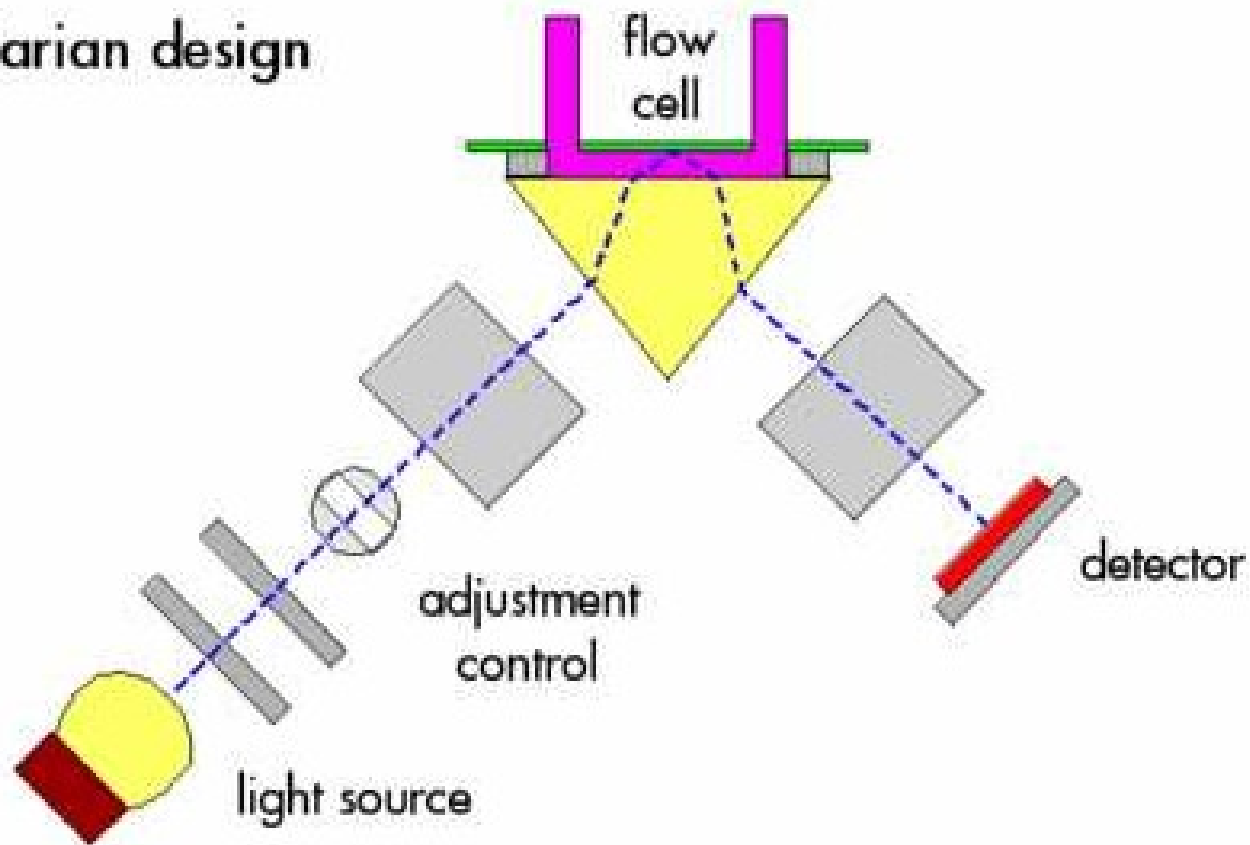
# Refraktometrický detektor

Waters design



# Refraktometrický detektor

Varian design



# „Light scattering“ detektor

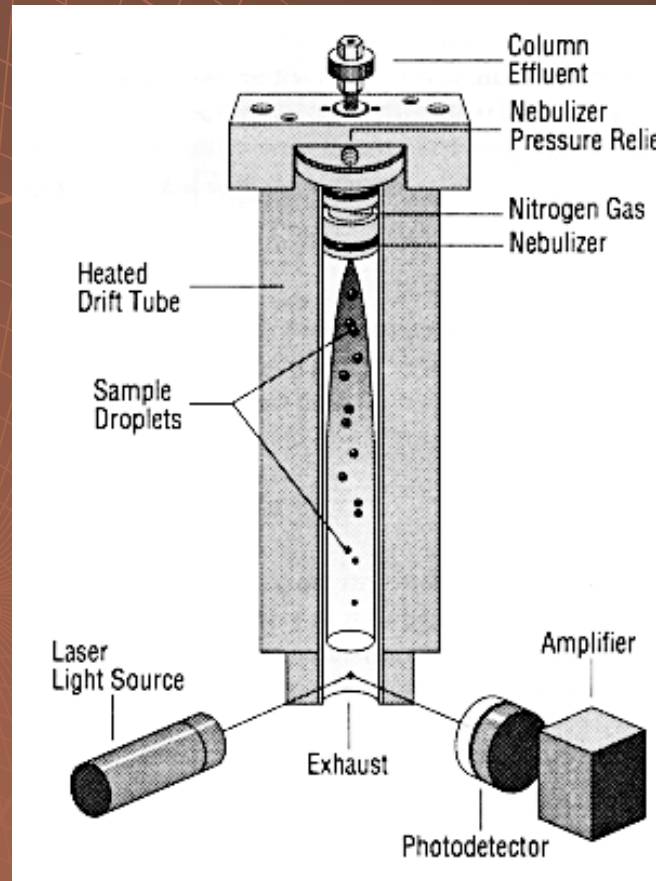
Rozptyl

**šum**  $10^{-8}$

**dyn. rozsah**  $10^4$

**citlivost**  $10^{-9}$  g/ml

# „Light scattering“ detektor



# UV – VIS detektor detekční cela

Absorbance

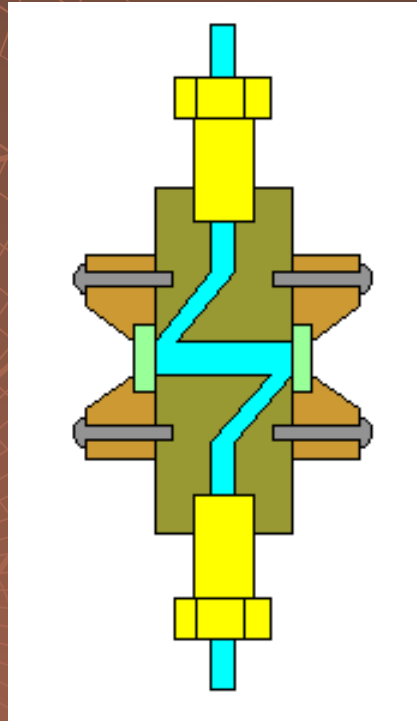
**šum**  $10^{-4}$

**dyn. rozsah**  $10^4$

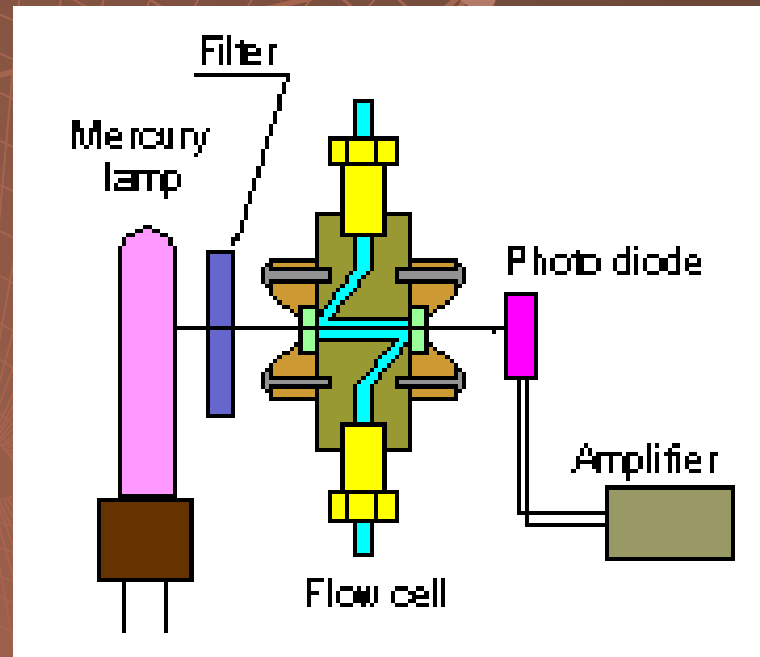
**citlivost**  $10^{-10}$  g/ml



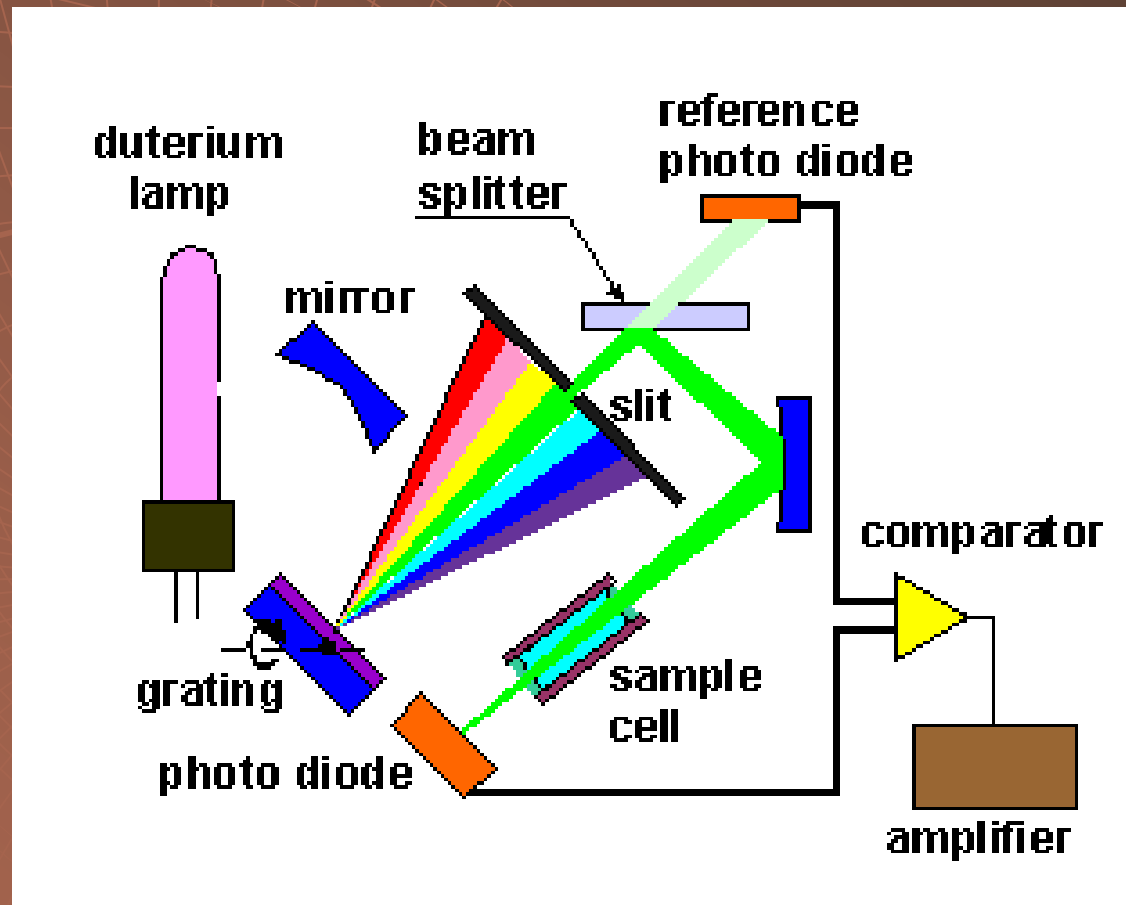
# UV – VIS detektor detekční cela



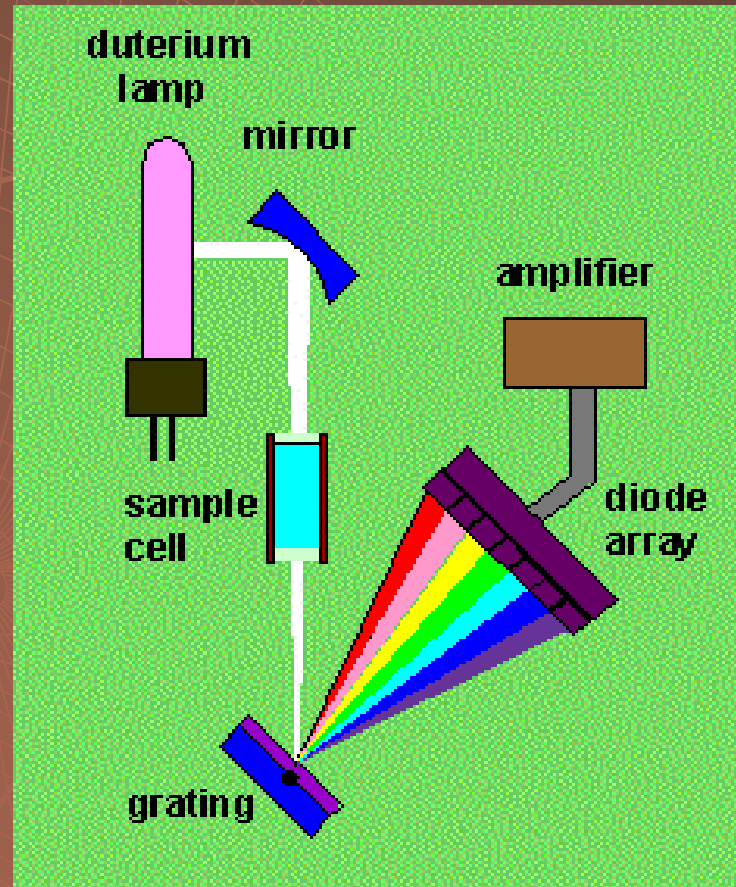
# UV – VIS detektor s fixní vlnovou délkou



# UV – VIS detektor s proměnlivou vlnovou délkou



# UV – VIS detektor s diodovým polem



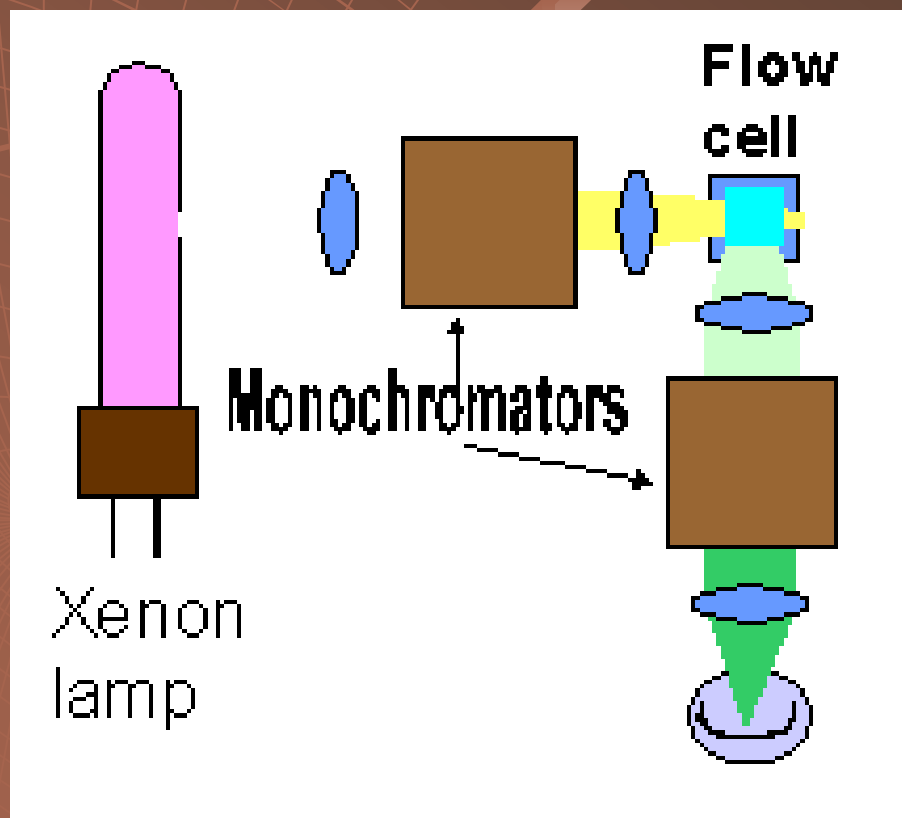
# Fluorescenční detektor

Fluorescence

**citlivost**  $10^{-9}$  g/ml



# Fluorescenční detektor

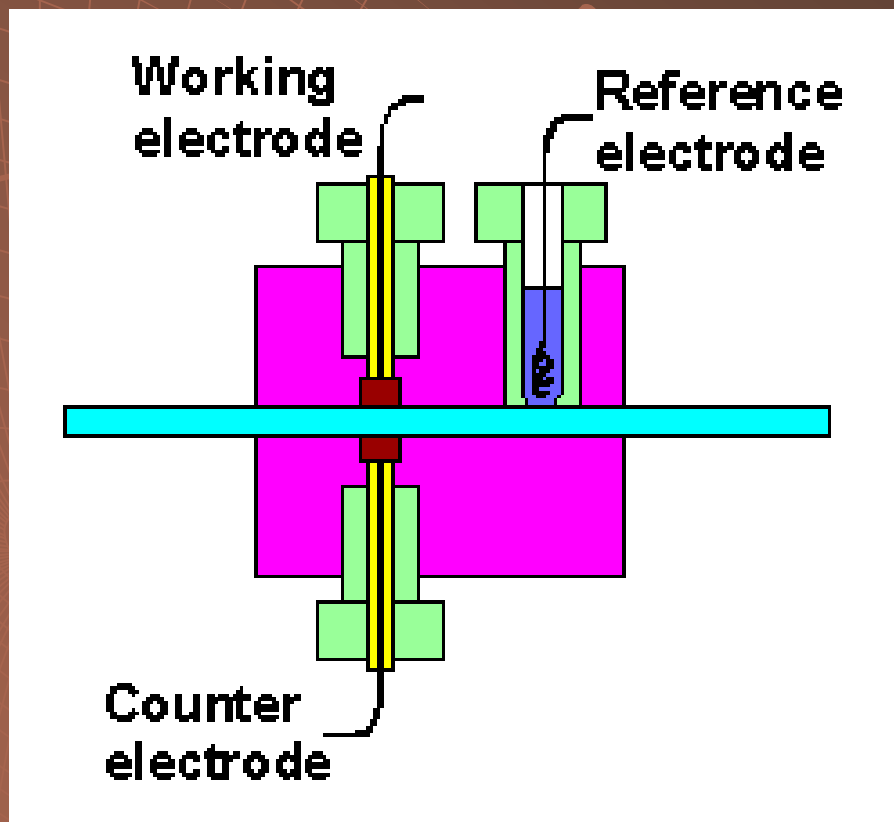


# Elektrochemický detektor

elektrický proud

**citlivost**  $10^{-9}$  g/ml

# Elektrochemický detektor



# Konduktometrický detektor

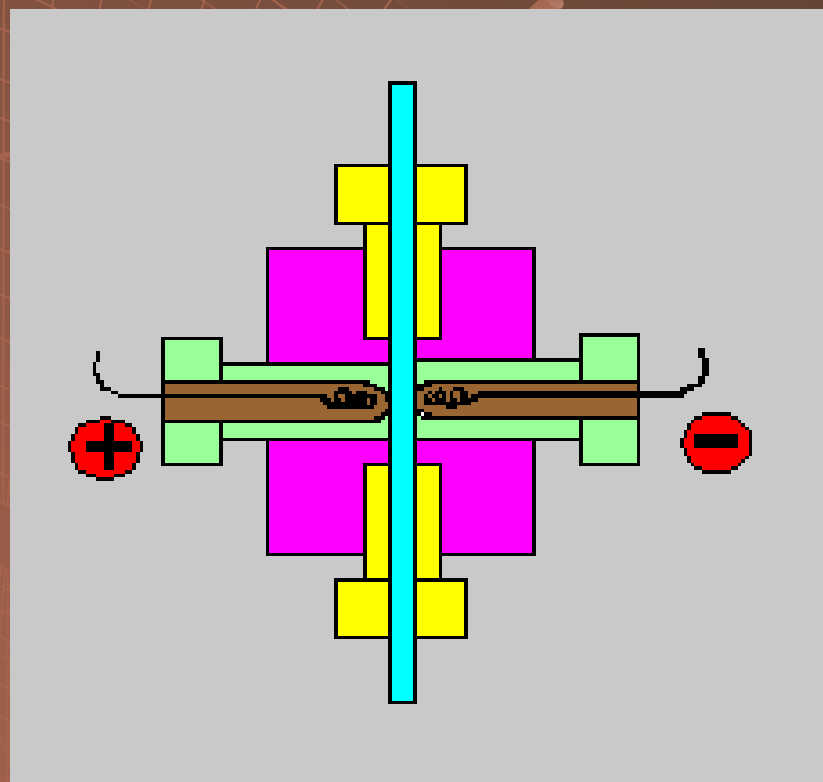
Vodivost

**šum**  $10^{-3}$

**dyn. rozsah**  $10^6$

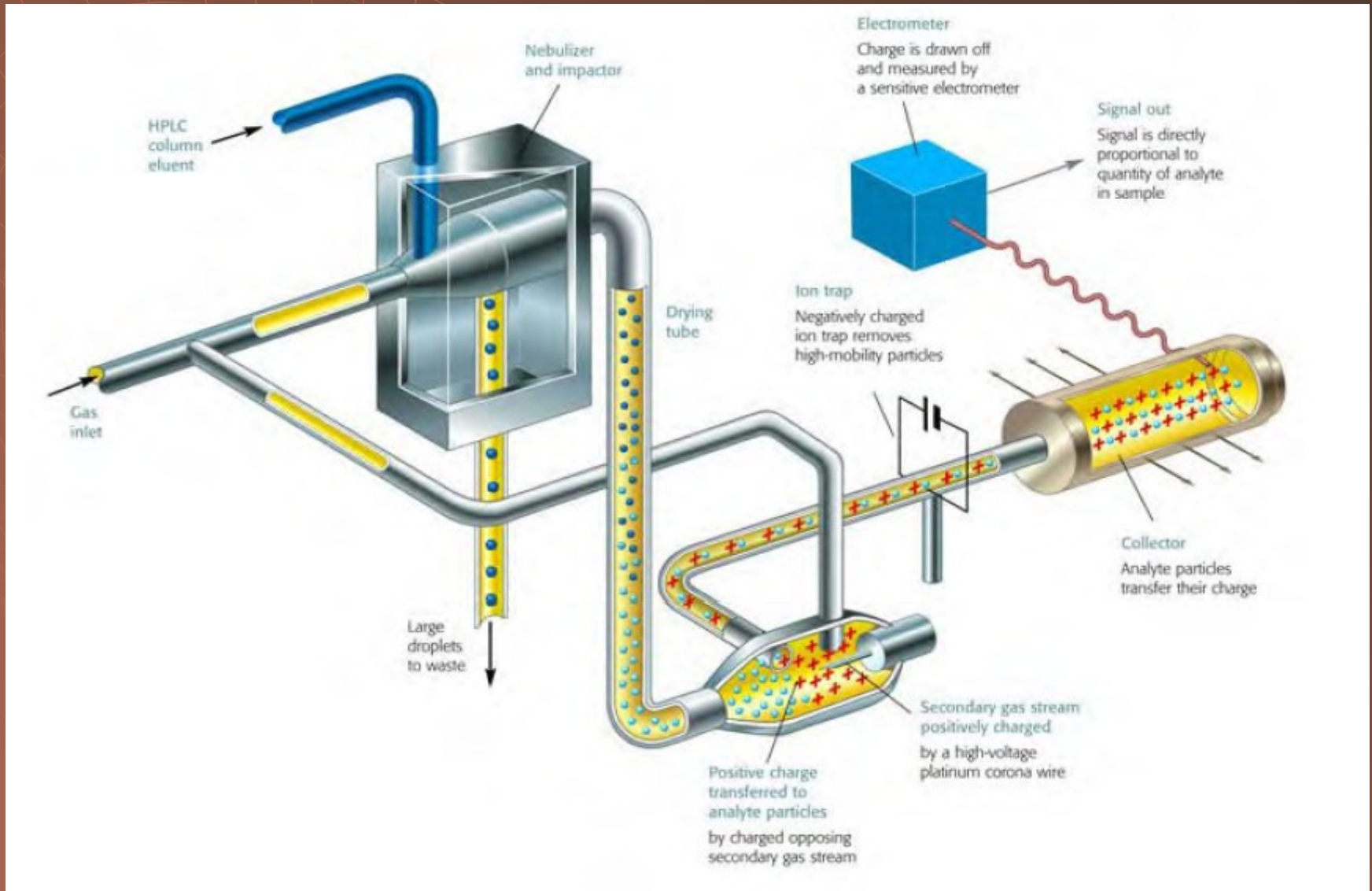
**citlivost**  $10^{-8}$  g/ml

# Konduktometrický detektor





# Aerosolový detektor nabitých částic

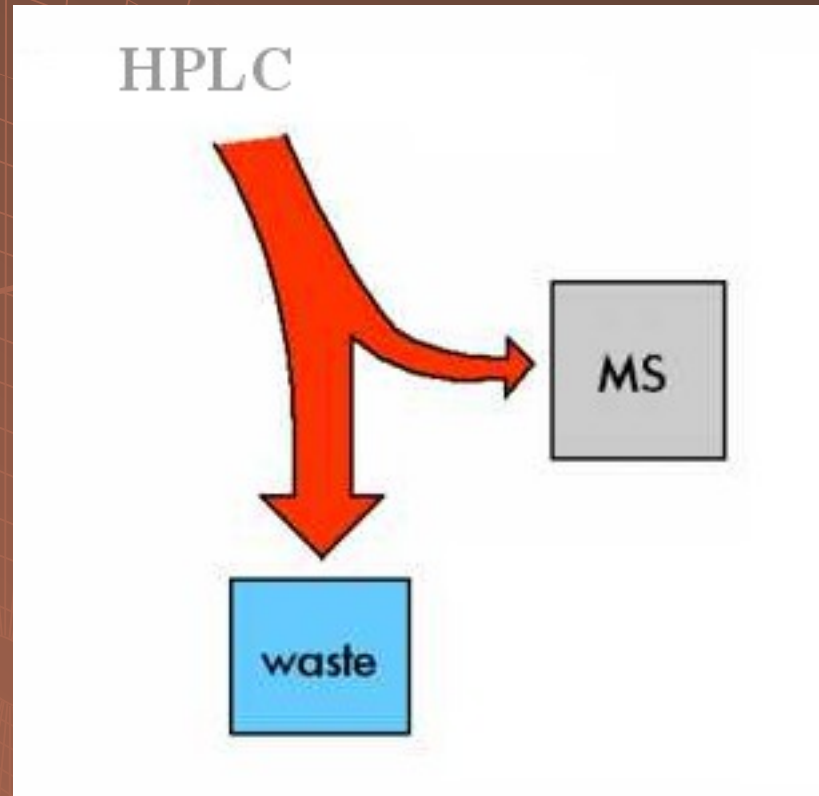


# LC-MS

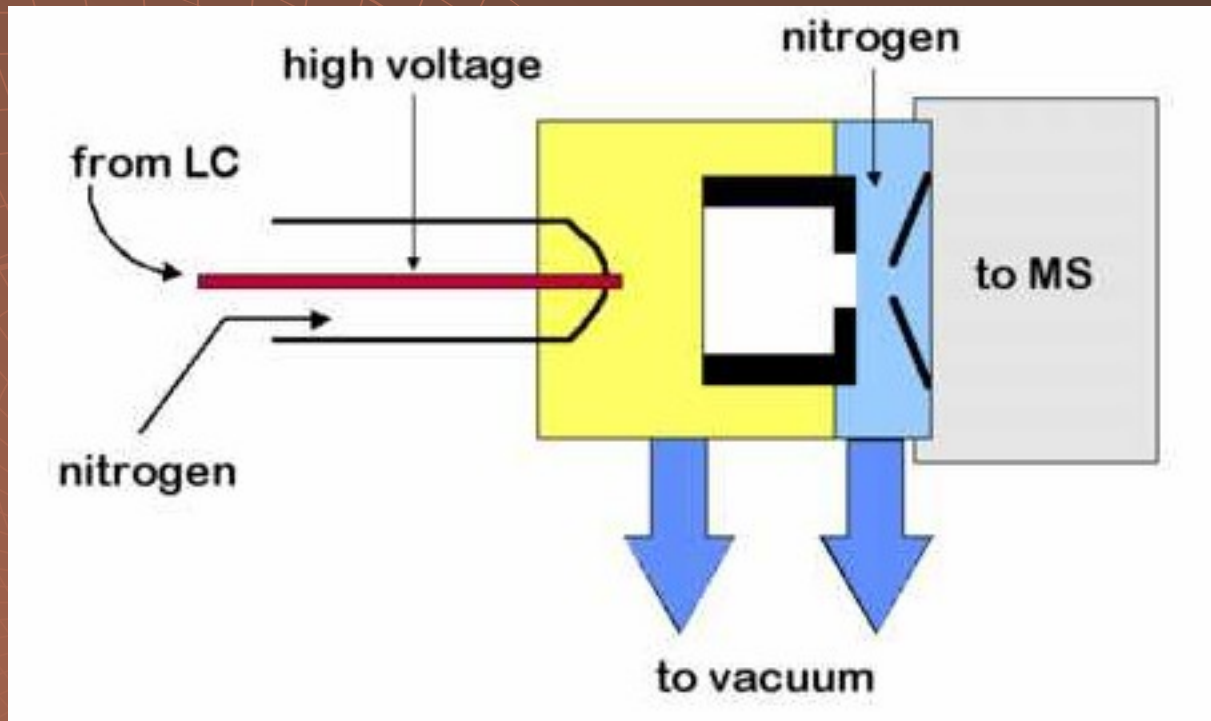
počet iontů

**citlivost**  $10^{-13}$  g/ml

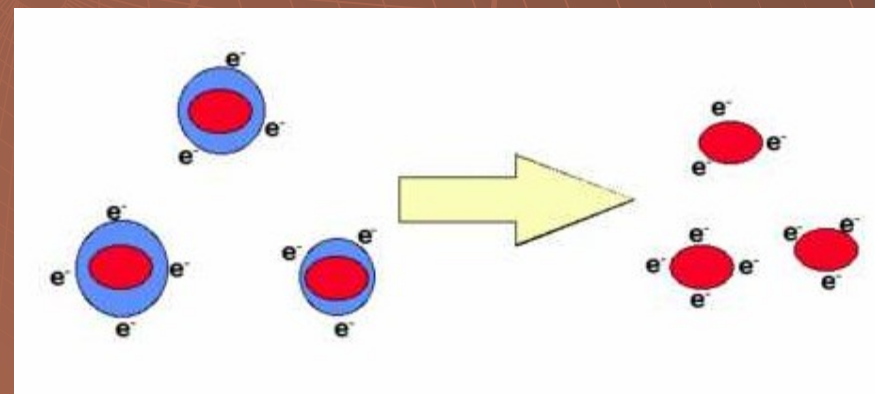
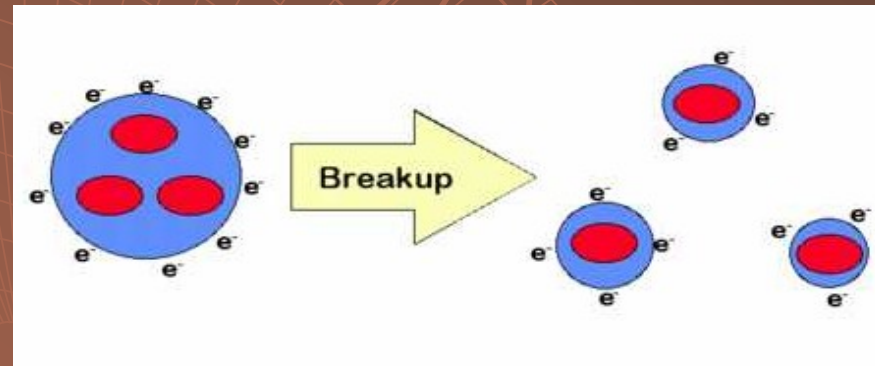
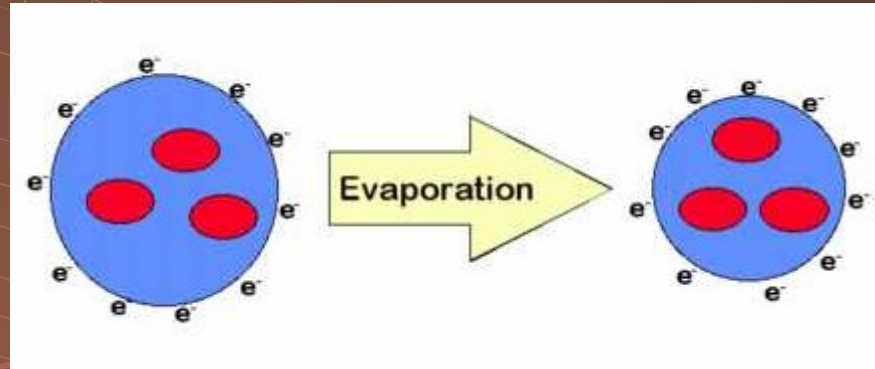
# LC-MS



# „Electrospray“

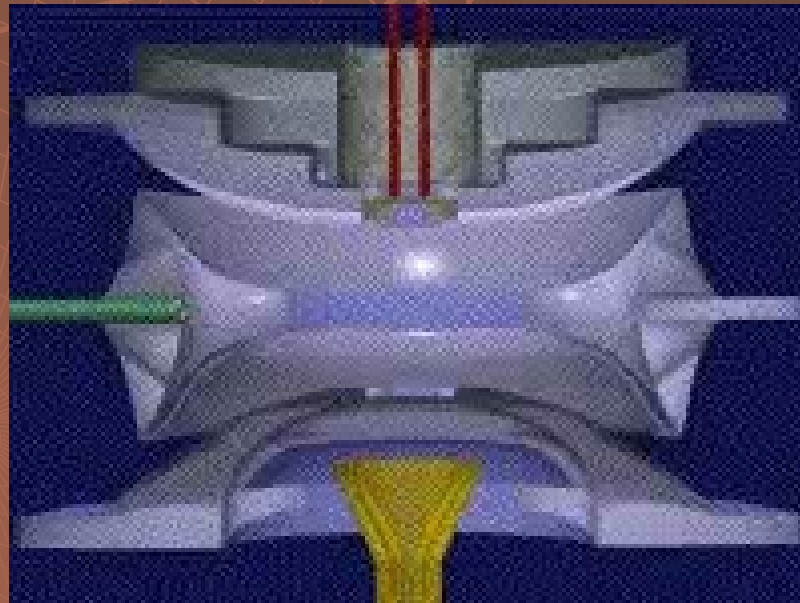


# Ionizace

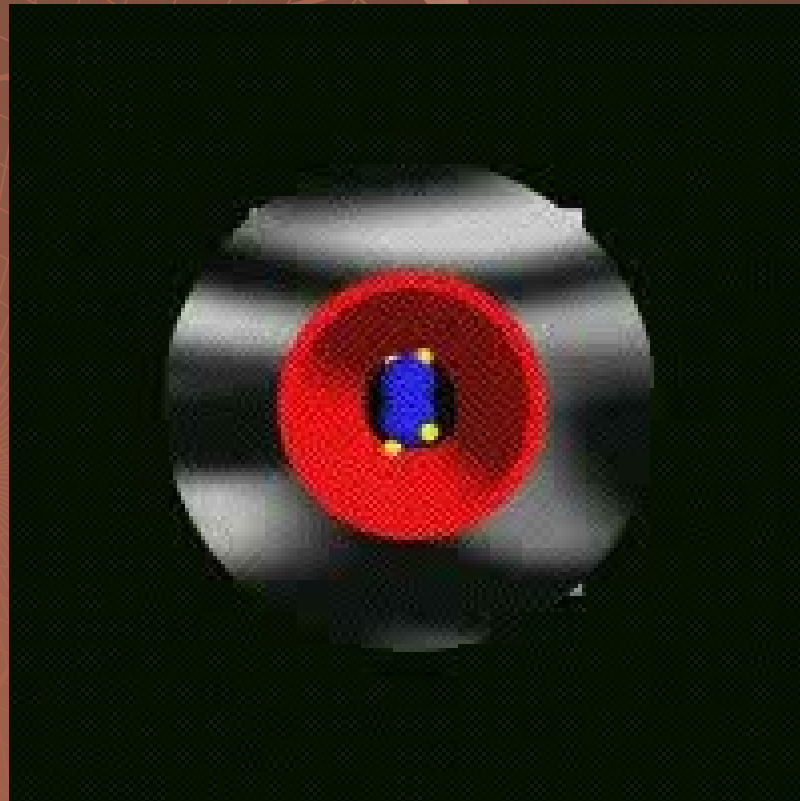




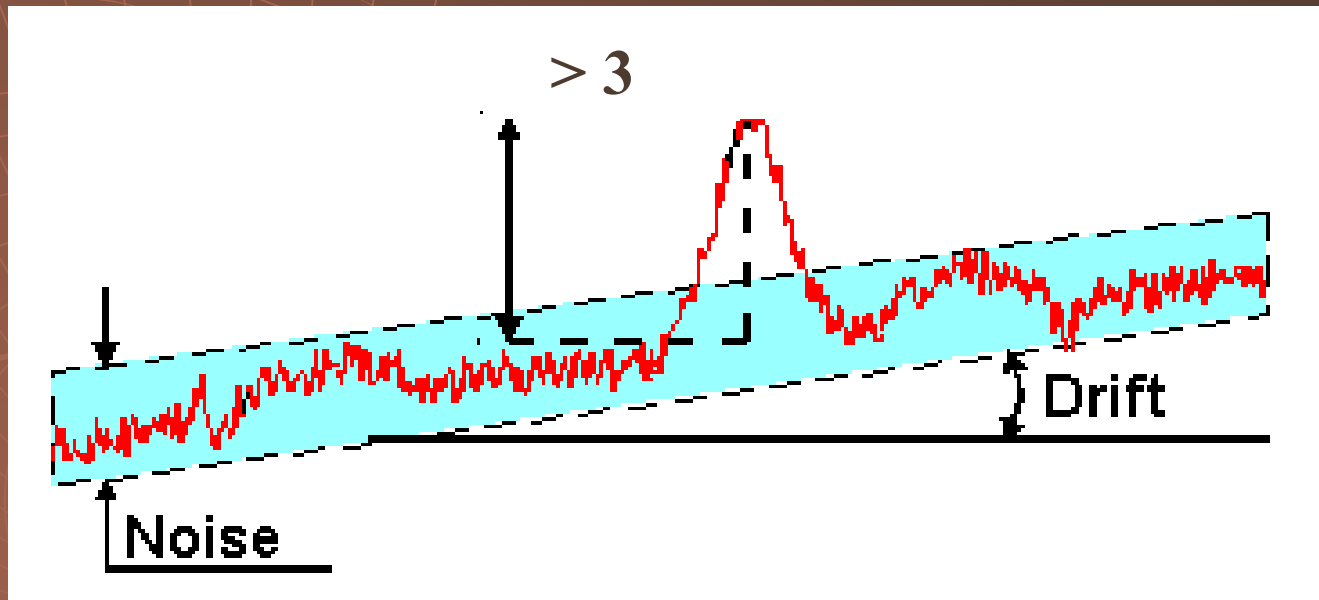
# Ion Trap



# Kvadrupol



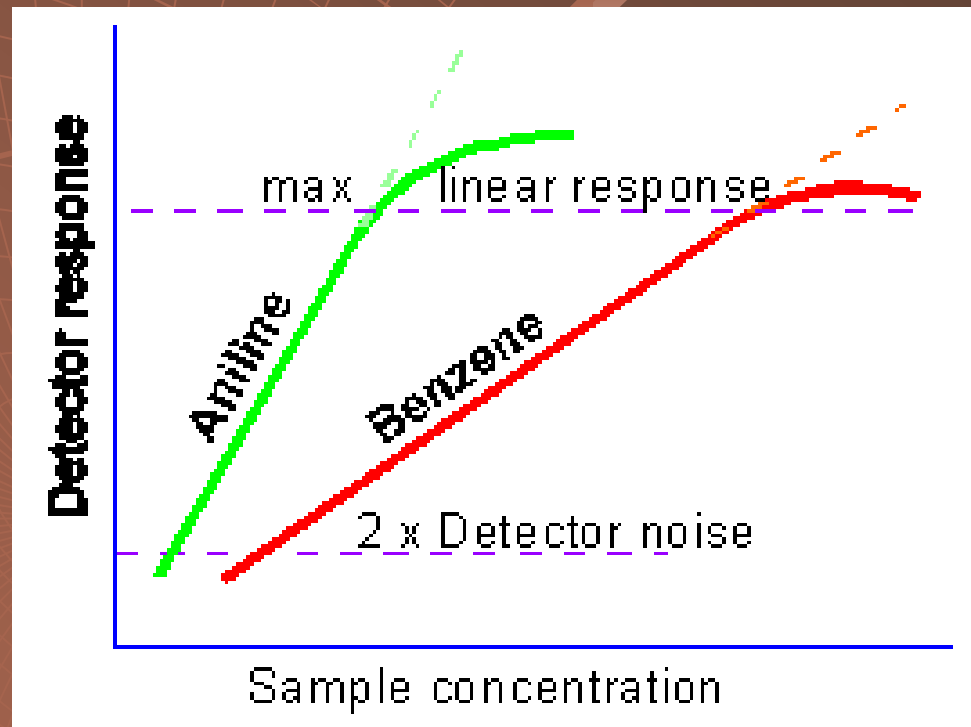
# Šum a drift detektoru



Mez detekce  $S/N > 3$

Mez stanovitelnosti  $S/N > 10$

# Lineární rozsah detektoru



# Derivatizace

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



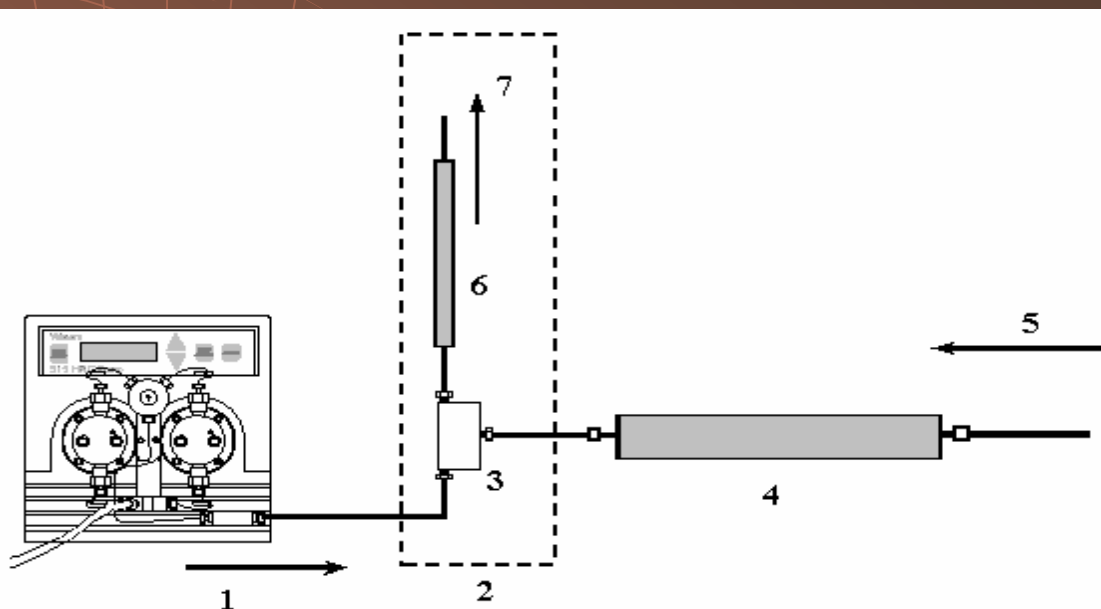
# Požadavky na deriváty

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

# Derivatizace

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

# Derivatizace



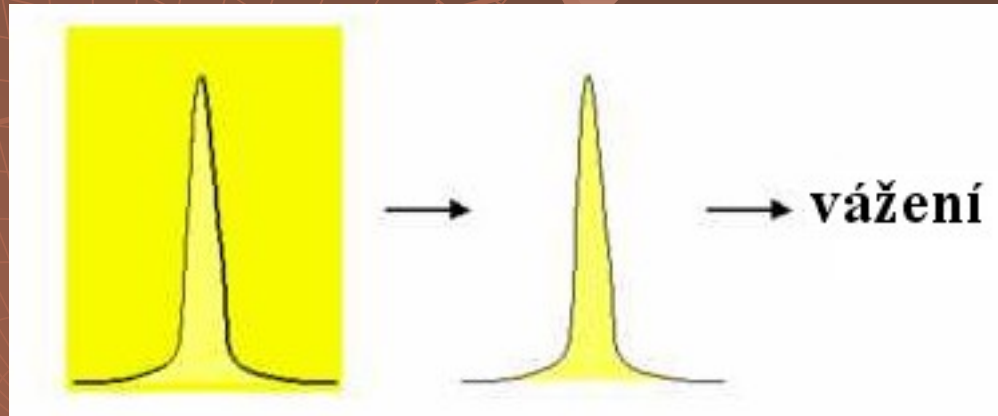
- 1 - derivatizační pumpa derivatizačního reagentu
- 2 - postkolonový systém
- 3 - směšovací komůrka (mixér)
- 4 - chromatografická kolona
- 5 - směr toku mobilní fáze
- 6 - derivatizační reaktor (smyčka)
- 7 - směr toku činidla (efluentu) k detektoru

**Jednostupňová postkolonová derivatizace**

# Vyhodnocení

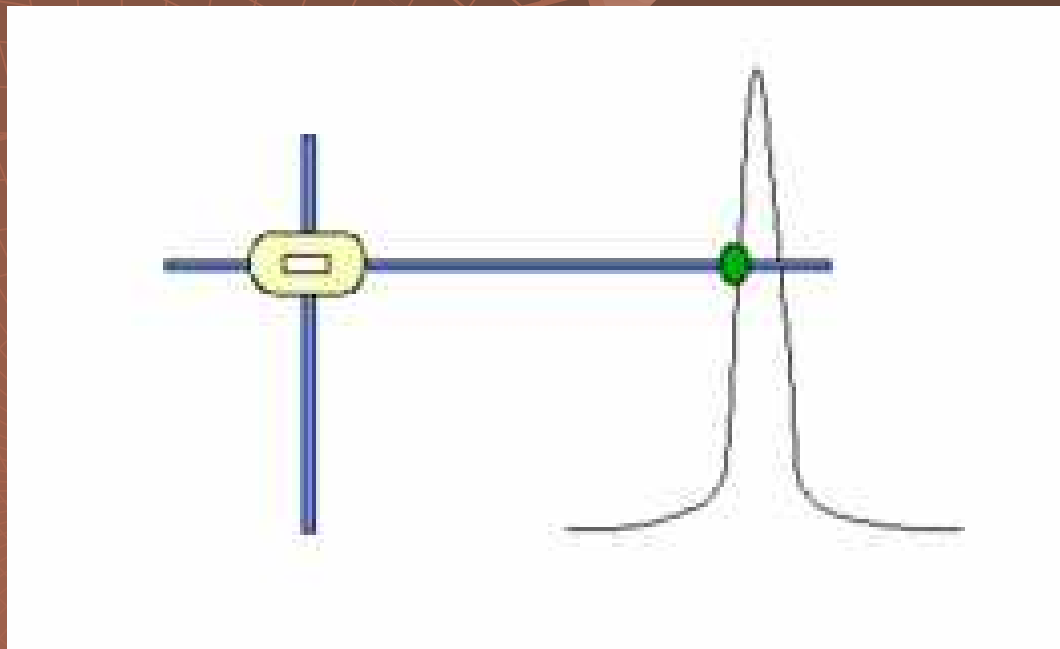
- ◆ Zapisovače
- ◆ Integratory
- ◆ Integrovaný software + PC

# Zjištění plochy píků u zapisovačů vážením

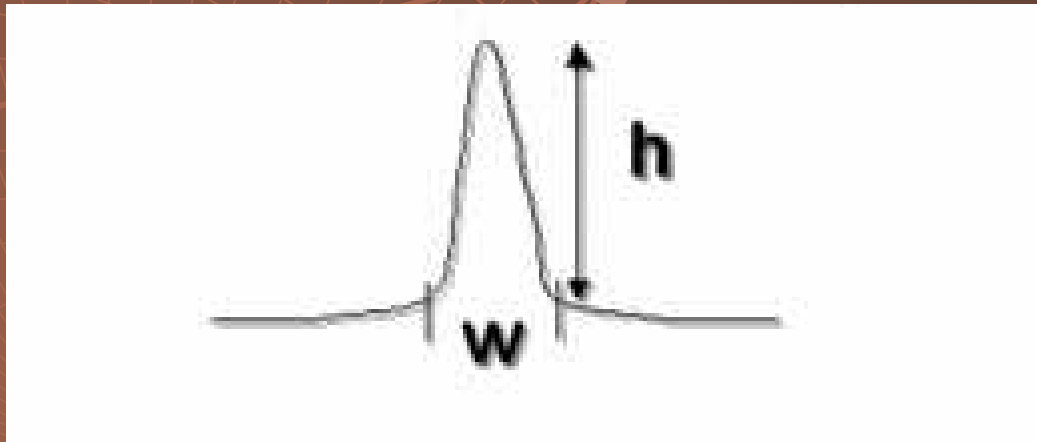




# Zjištění plochy píků u zapisovačů planimetrem

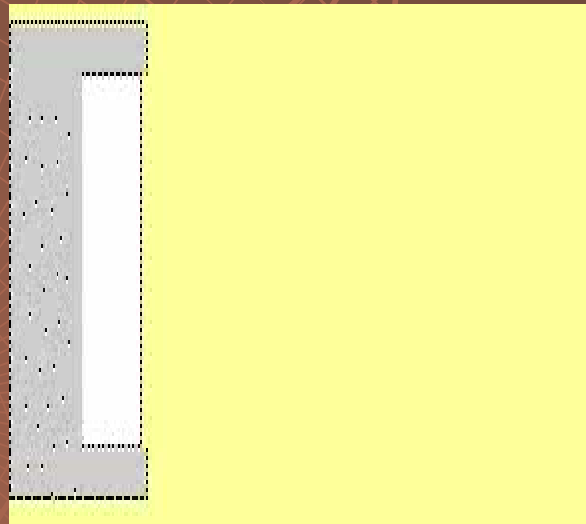


# Zjištění plochy píků u zapisovačů výpočtem



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

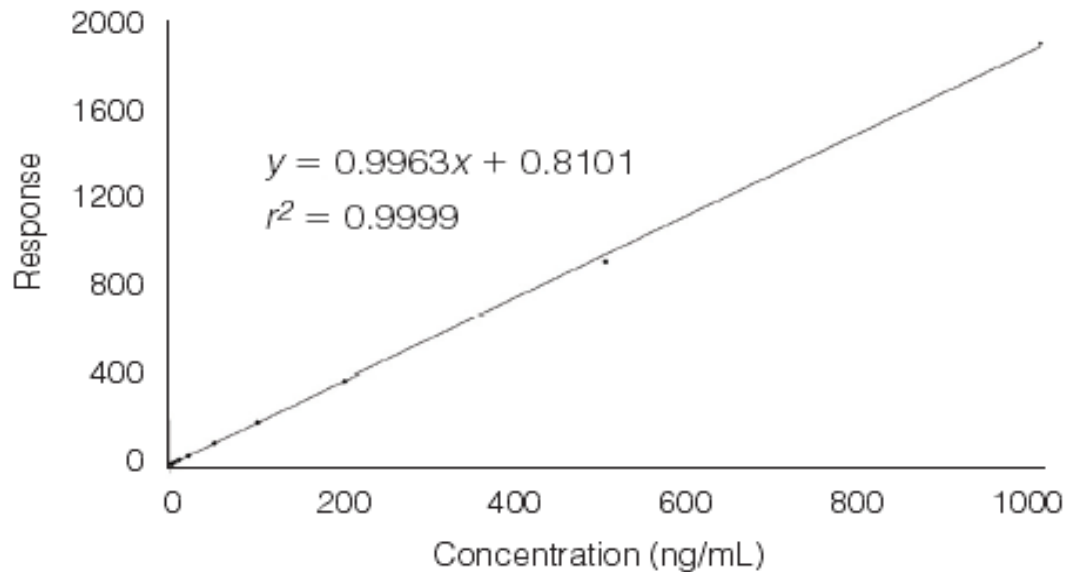


Plocha (výška) píku

# Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda externího standardu

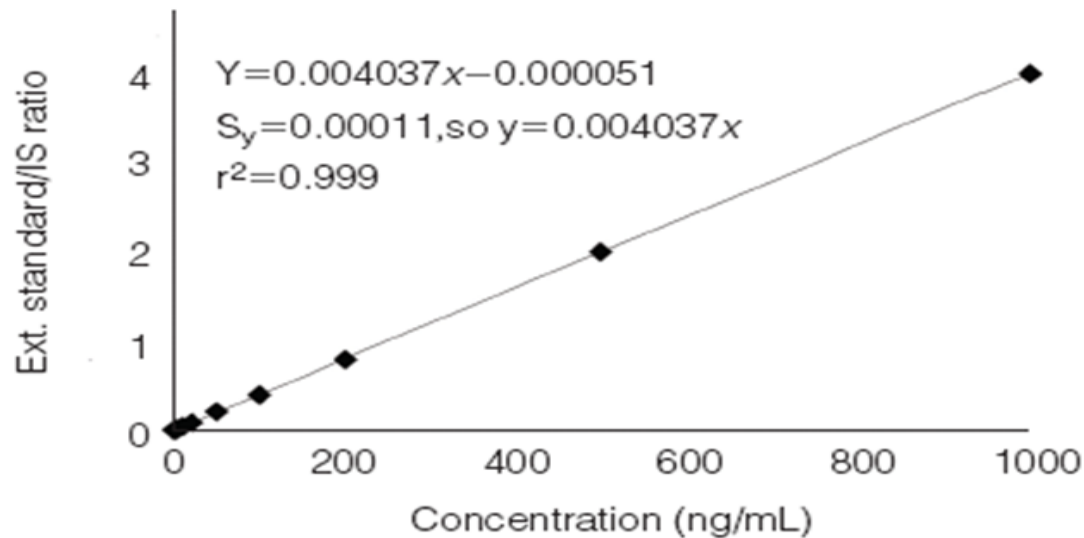
**Figure 1:** Calibration plot of response versus concentration.



# Analýza kvantitativní

- ◆ Metoda vnitřního standardu

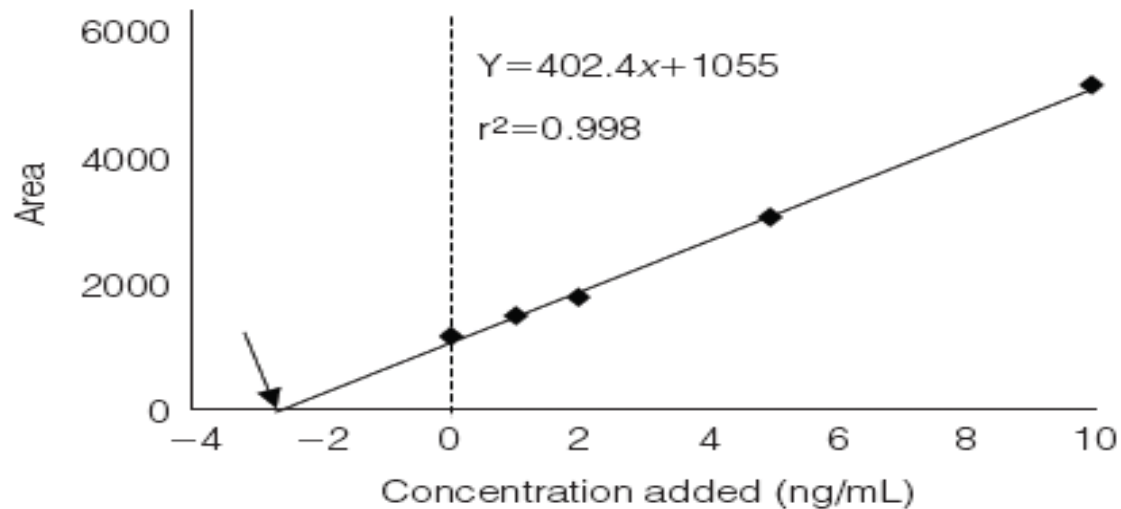
Figure 2: Internal standard calibration plot from data in Table 1.



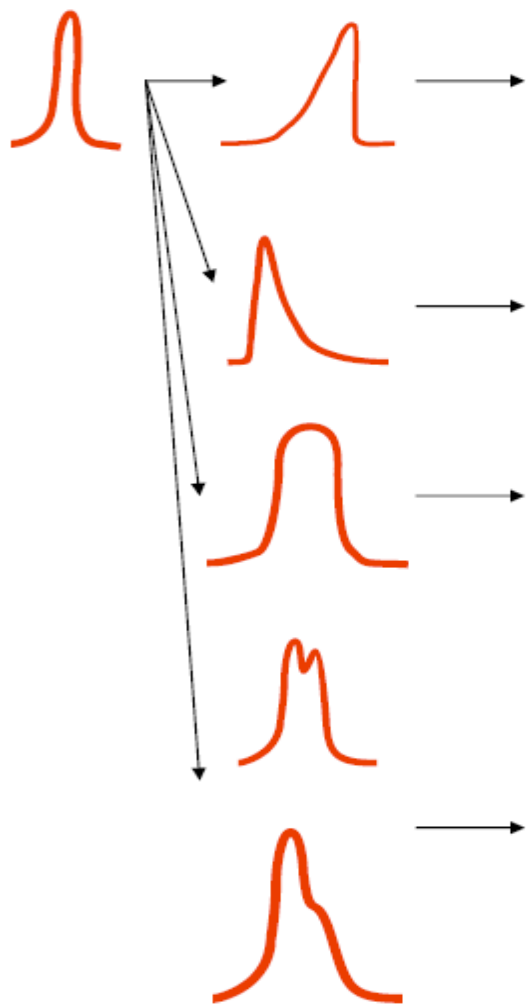
# Analýza kvantitativní

- ◆ 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

