

CHROMATOGRAFICKÉ METODY II.

APLIKAČNÍ ROZSAH CHROMATOGRRAFIE

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

PC a TLC



- 1944 – Martin, Synge
PC aminokyselin
(Nobelova cena)
- 1952 – TLC nahrazuje PC

INSTRUMENTACE PC a TLC

CHROMATOGRAFICKÝ PAPÍR

- Nemodifikovaný
- Modifikovaný – ionexy, acylace

f. Whatman (Anglie)

Schleicher-Schüll (Německo)

TLC

- Vlastní příprava - sypané, nalévané
- Komerčně dostupné - Silufol (ČR)
Whatman

PC a TLC - MODY

- rozdělovací
- adsorpční
- ionexová
- hydrofobní – RP a HIC
- gelová permeační

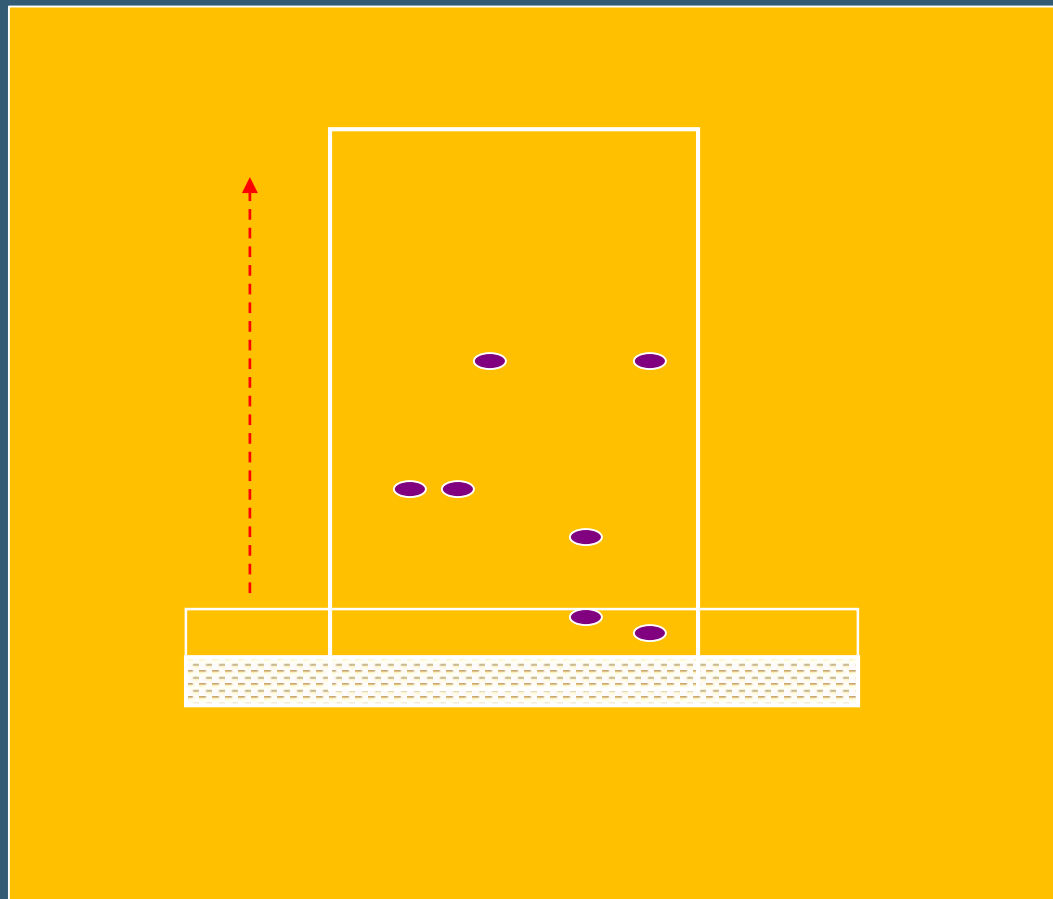
NANÁŠENÍ VZORKU

- Pipety
- Kapiláry

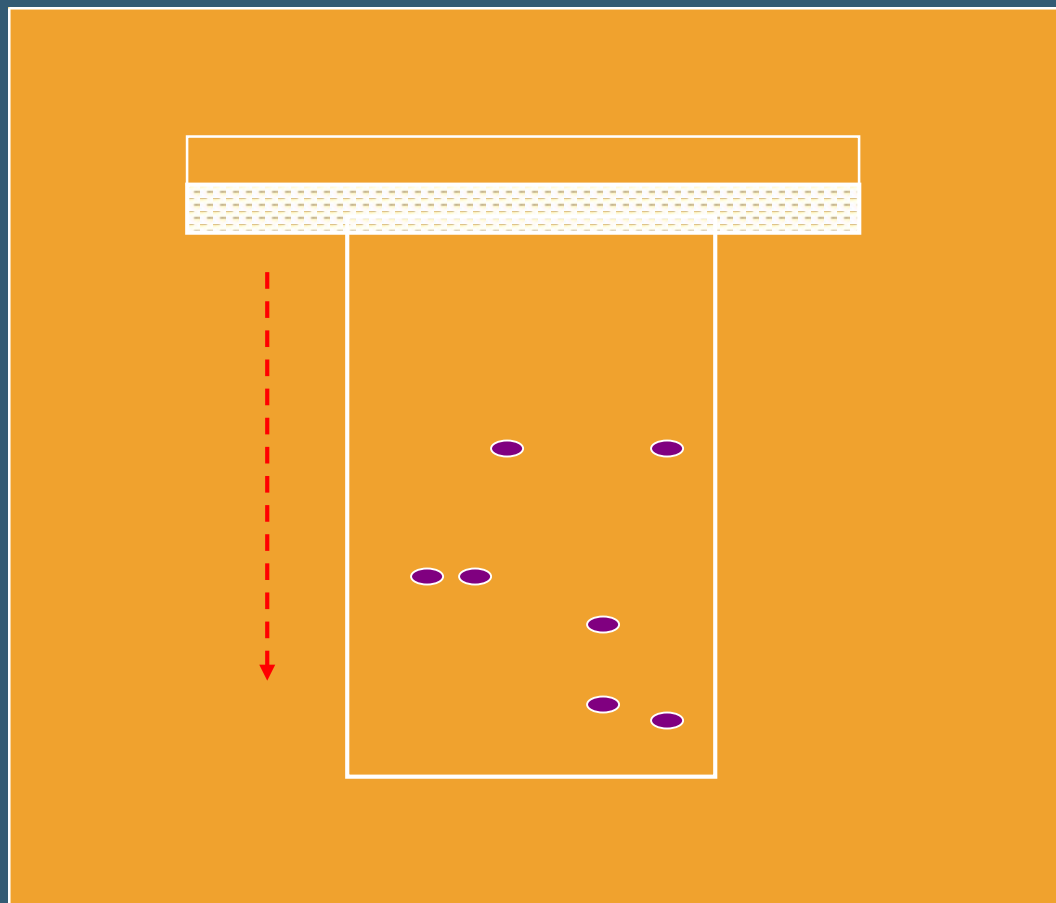
PROVEDENÍ

- Vzestupné
- Sestupné
- Kruhové
- Dvojrozměrné

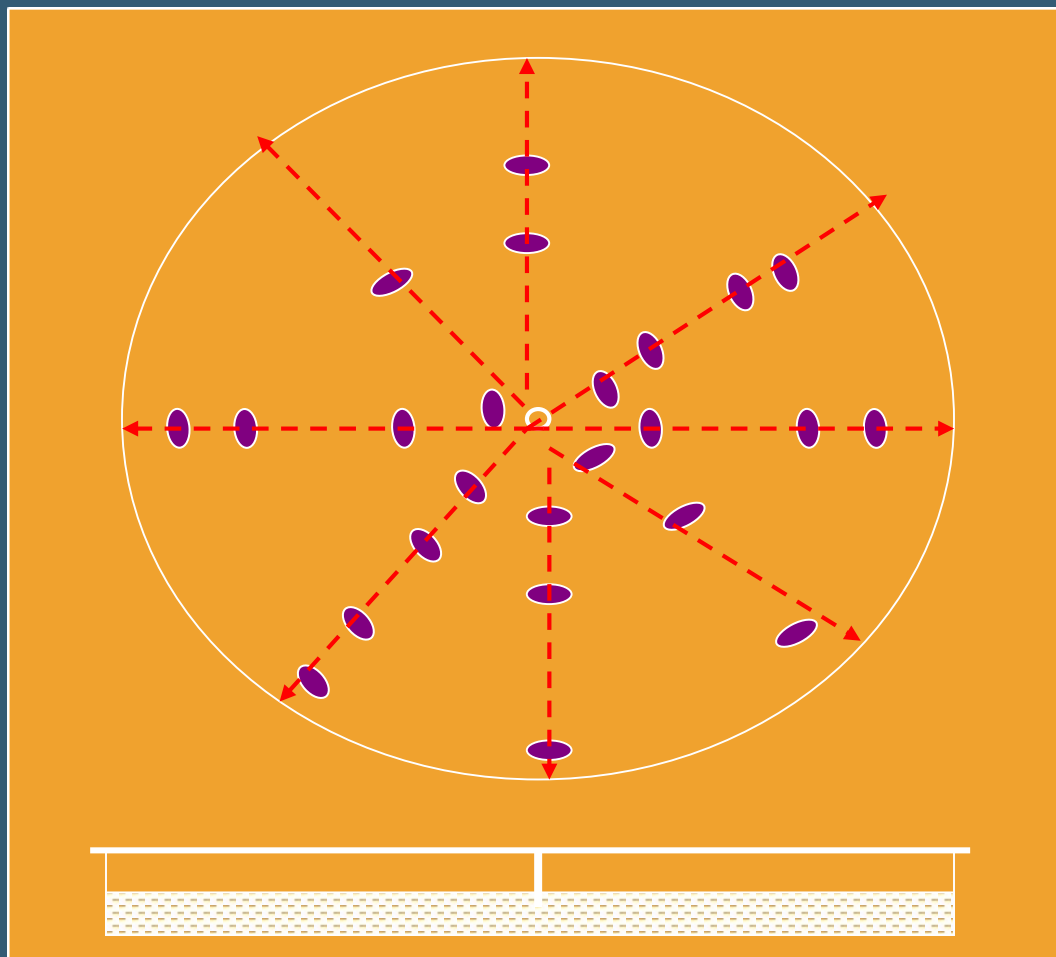
VZESTUPNÉ



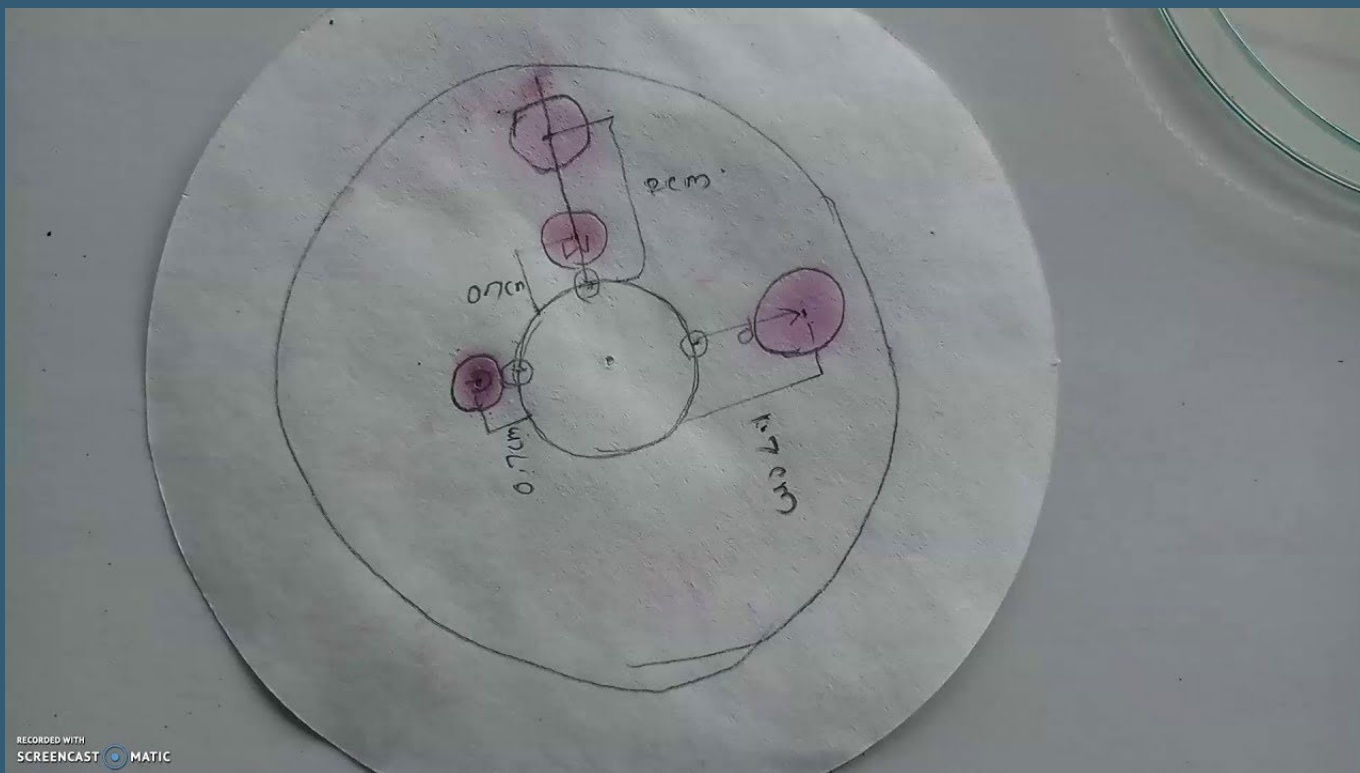
SESTUPNÉ



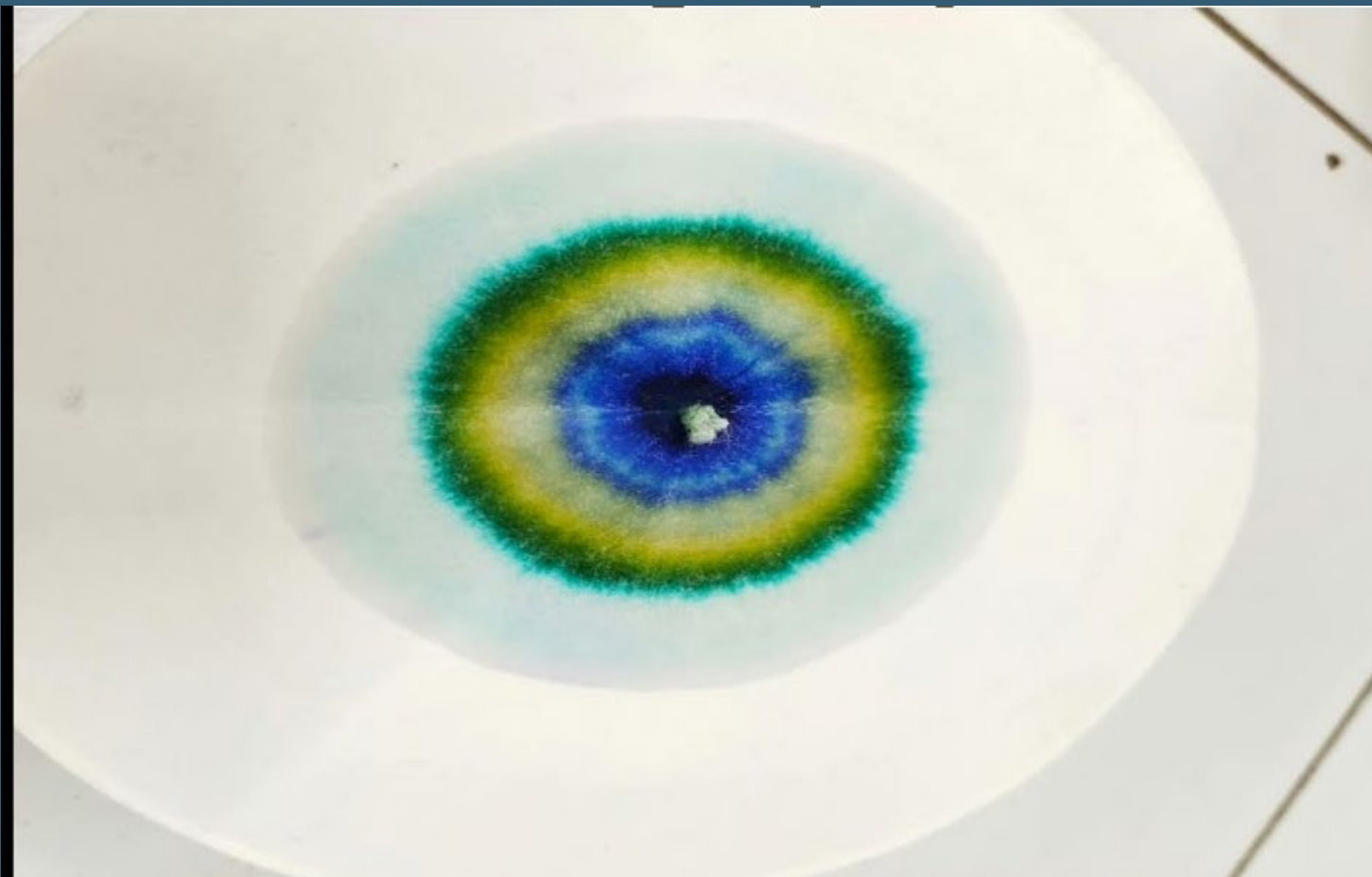
KRUHOVÉ (RADIÁLNÍ)



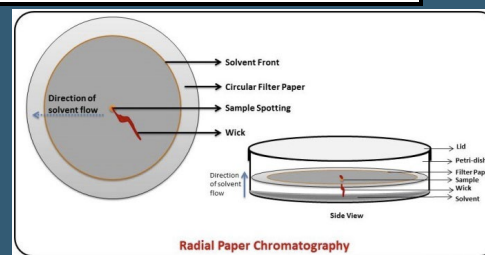
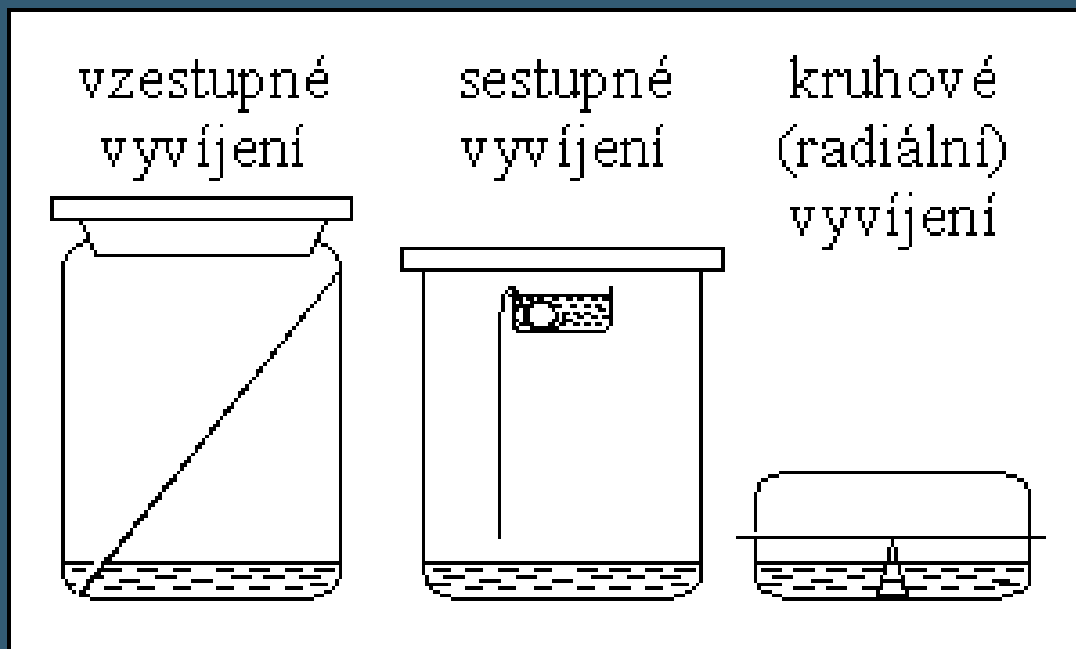
KRUHOVÉ (RADIÁLNÍ)



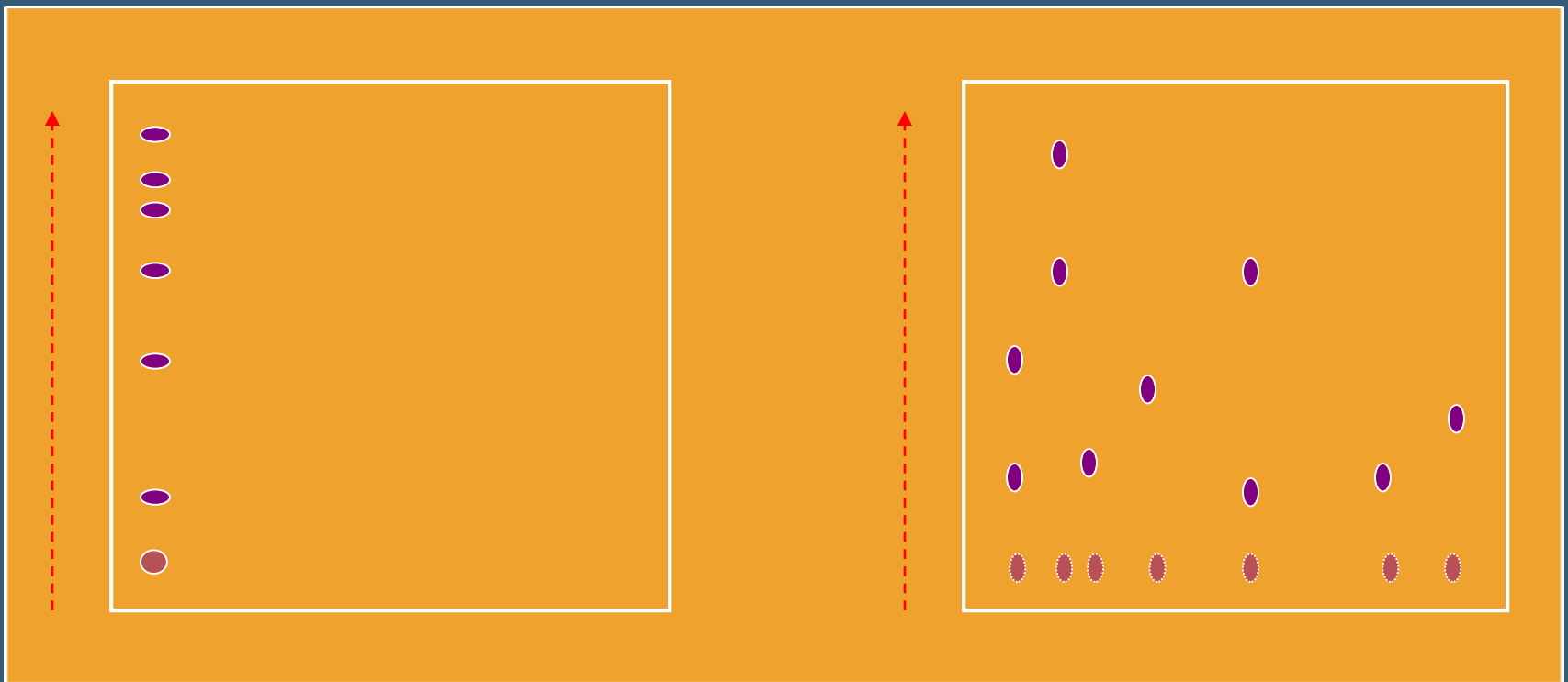
KRUHOVÉ (RADIÁLNÍ)



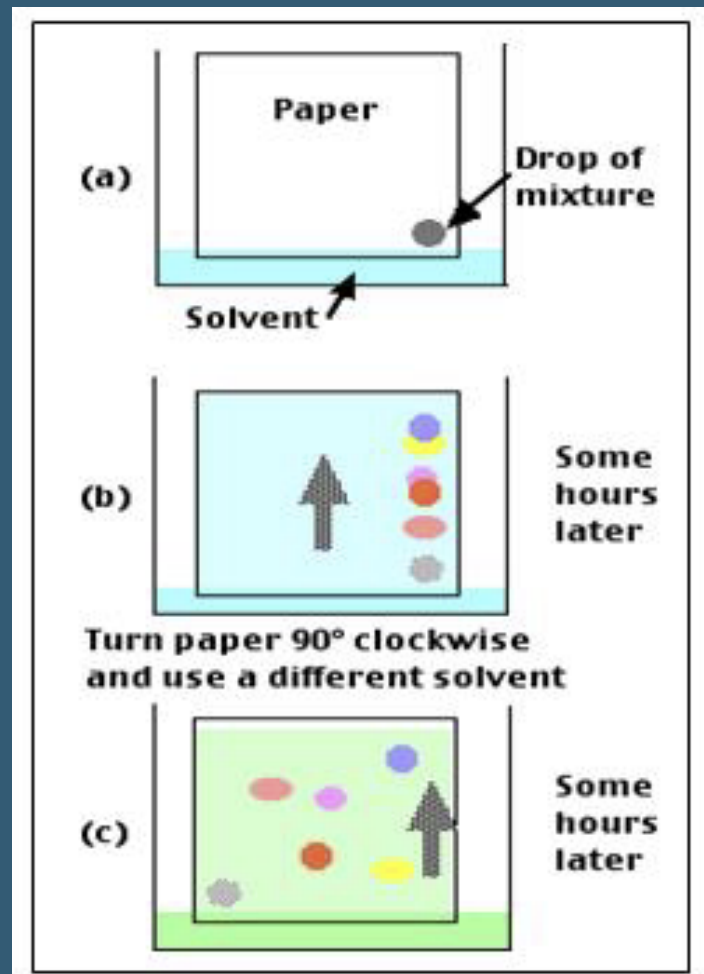
VYVÍJENÍ (V UZAVŘENÉ NÁDOBĚ)



DVOJROZMĚRNÉ

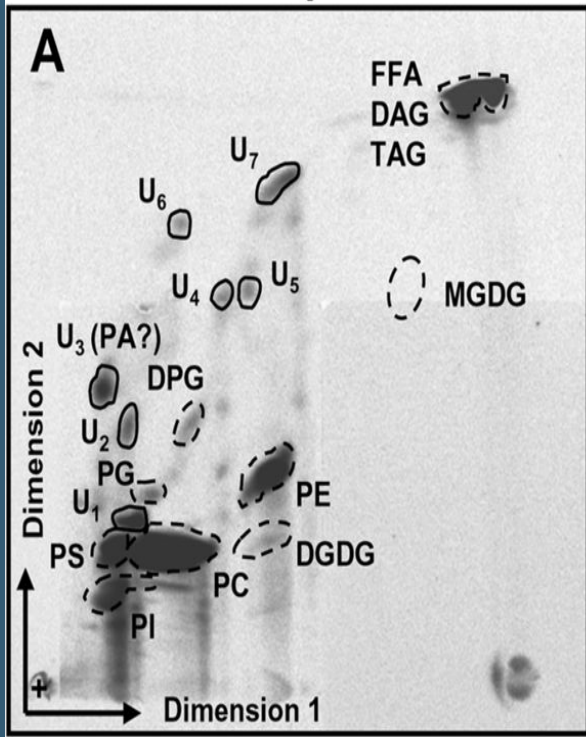


DVOJROZMĚRNÉ

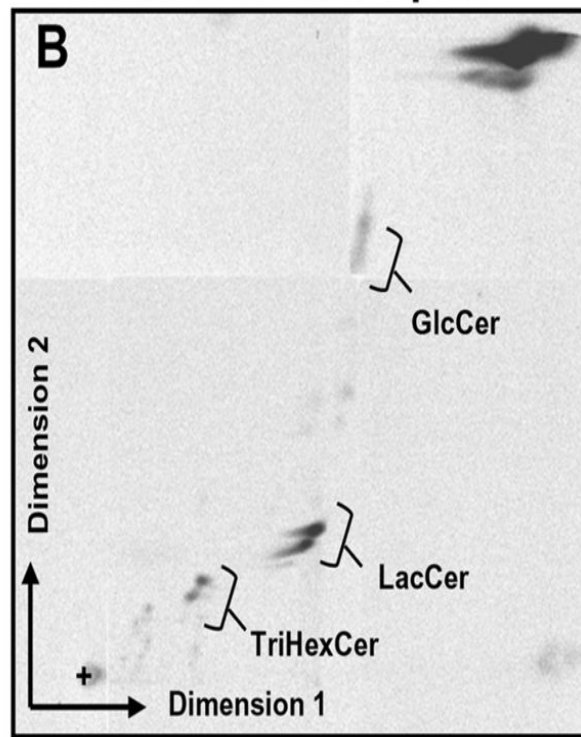


DVOJROZMĚRNÉ

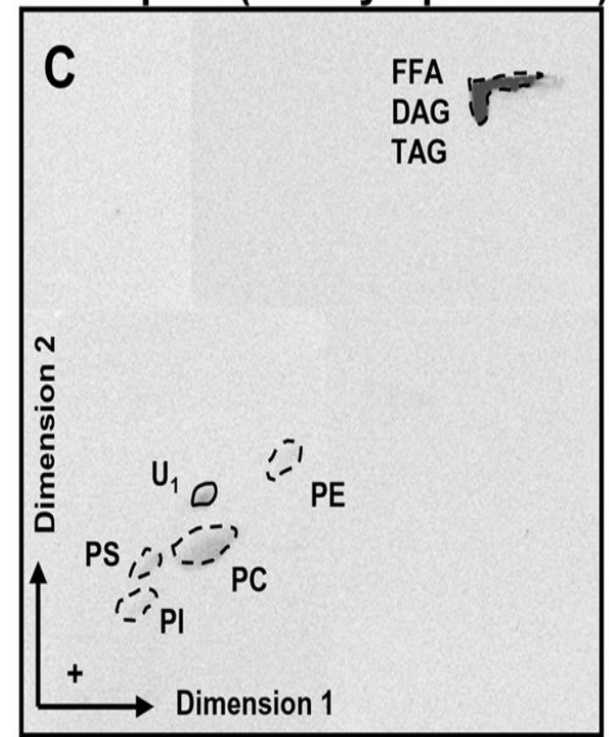
Total lipids



Alkali resistant lipids



Total lipids (haloxyfop treated)



PROVEDENÍ

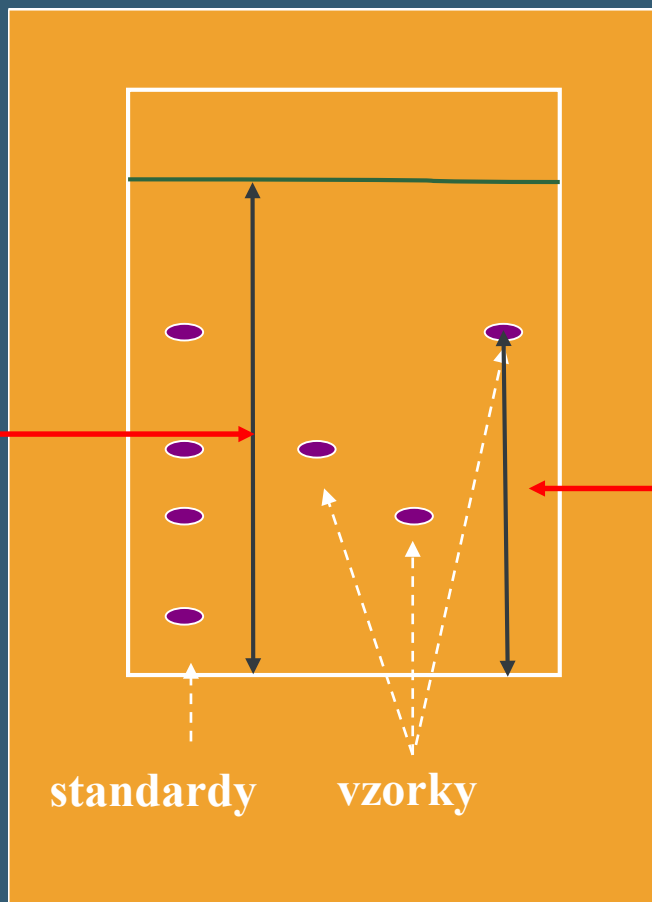
- Analytické
- Preparativní

DETEKCE

- Fyzikální
 - UV VIS
 - Fluorescence
- Chemická – derivatizace
 - Specifická
 - Nespecifická
- Na základě biologické aktivity

ANALÝZA KVALITATIVNÍ

vzdálenost čela
mobilní fáze od
startu



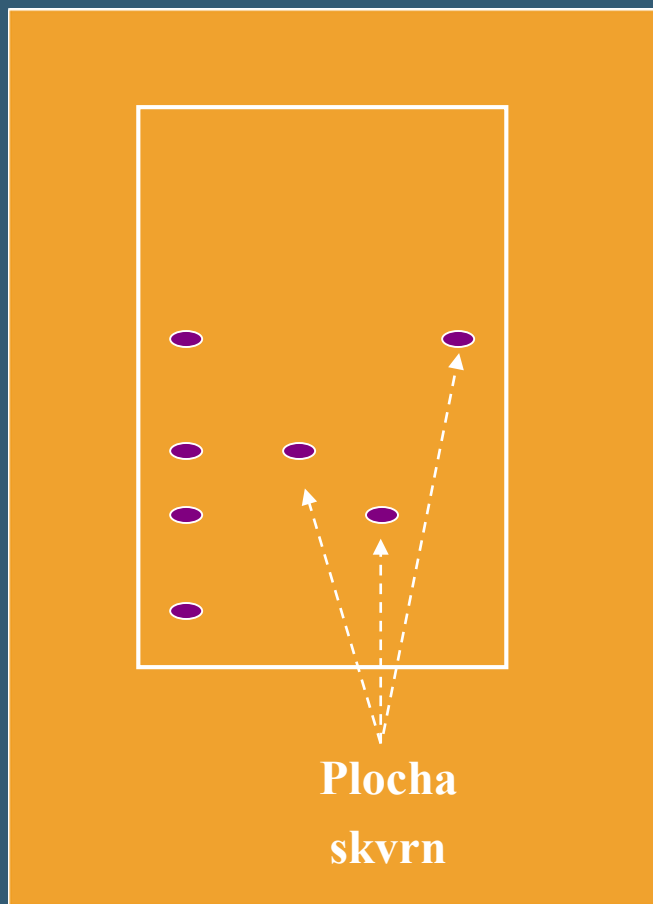
standardy

vzorky

$$R_f = \frac{\textit{střed skvrny}}{\textit{čelo rozpouštědla}}$$

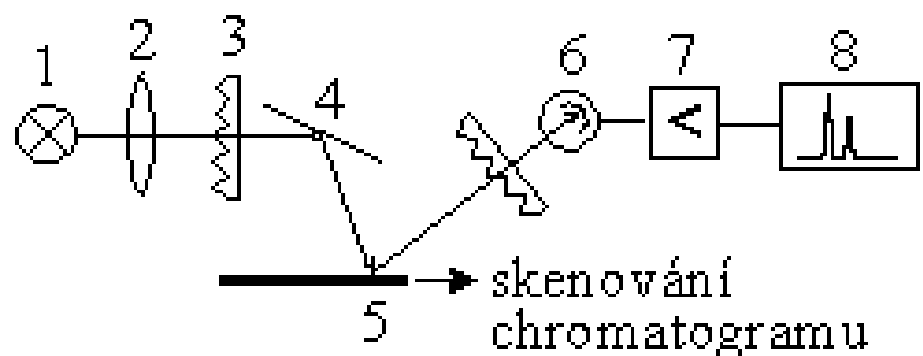
vzdálenost **středu skvrny**
i-tého analytu od startu

ANALÝZA KVANTITATIVNÍ



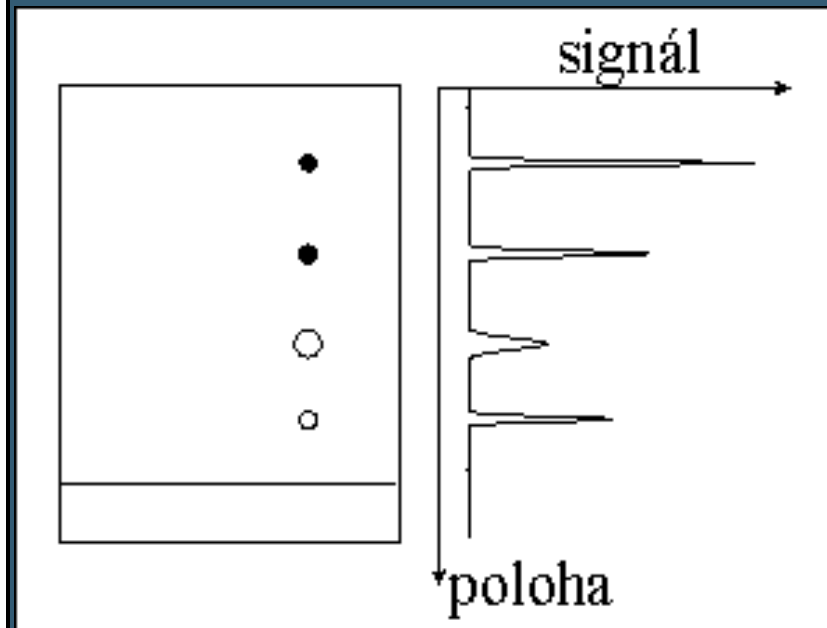
- Planimetrie
- Denzitometrie

DENZITOMETRIE



1 světelný zdroj
2 čočka
3 monochromátor
4 zrcadlo

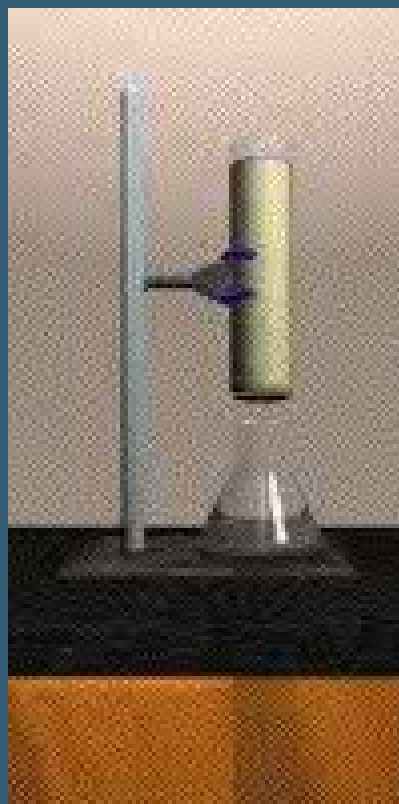
5 chromatogram
6 fotonásobič
7 zesilovač
8 zapisovač



PREPARACE

- PC – vystřížení a eluce
skvrny
- TLC – vyškrábání a eluce
skvrny
– odsání a eluce
skvrny

KOLONOVÁ CHROMATOGRRAFIE



KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

ROZDĚLENÍ

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

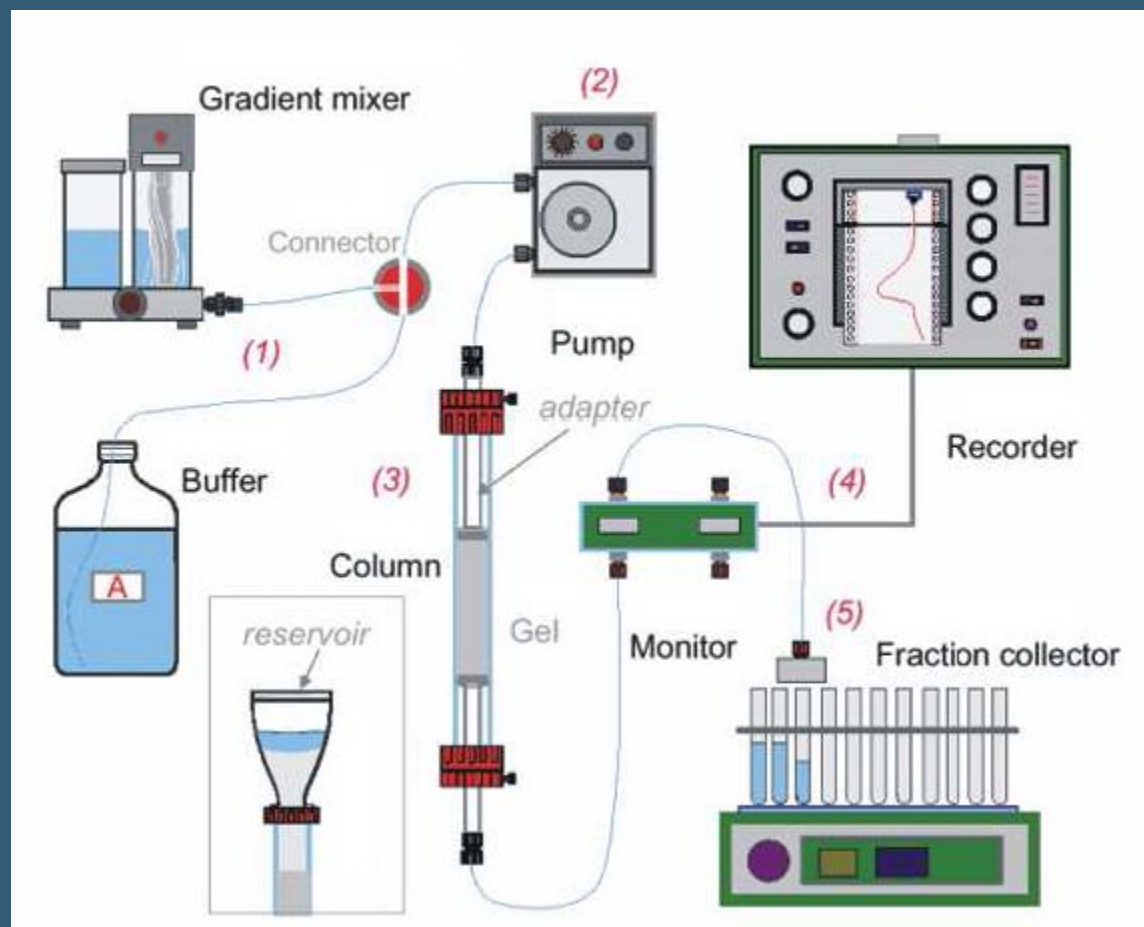
KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

VYUŽITÍ

DOBA TRVÁNÍ

- | | |
|--|---------------|
| ▪ LPC – preparativní | hodiny |
| ▪ FPLC – semipreparativní a analytická | desítky minut |
| ▪ HPLC – analytická | minuty |
| ▪ UPLC – analytická | sekundy |

ZAŘÍZENÍ PRO LPC



ZAŘÍZENÍ PRO LPC



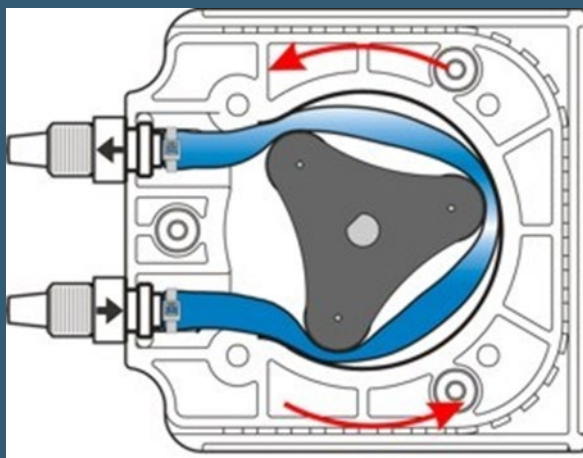
ZAŘÍZENÍ PRO LPC



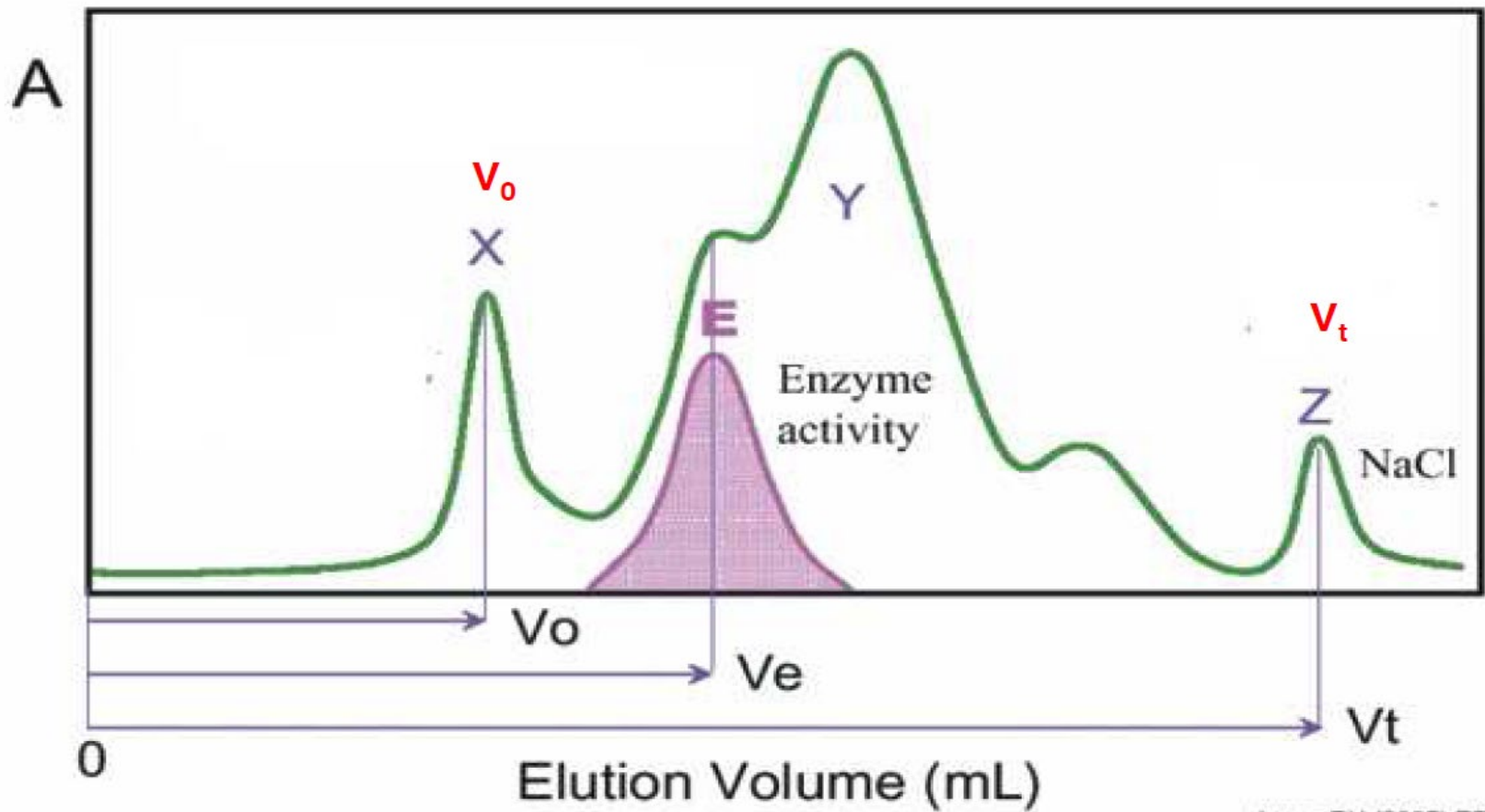
INSTRUMENTACE PRO LPC

- Pumpa – peristaltická nebo gravitace
- Gradient – mísič gradientu
- Dávkování – přímo pumpou na kolonu
- Kolony – skleněné
- Detekce – spektrofotometrická 254, 280 nm
- Vyhodnocování – zapisovač
- Sběrač frakcí – programovatelný

ZAŘÍZENÍ PRO LPC

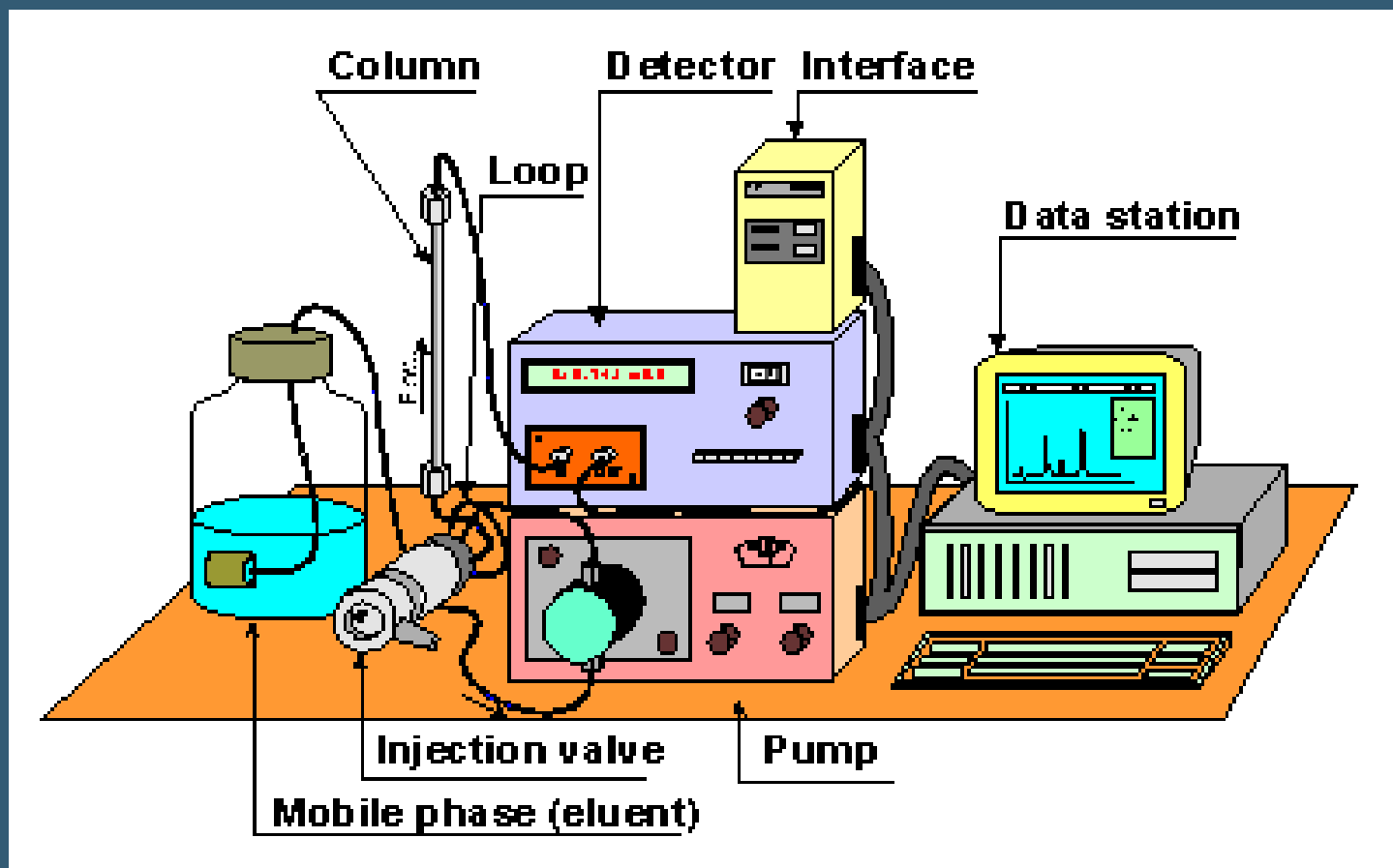


LPC



INSTRUMENTACE PRO FPLC A HPLC

ZAŘÍZENÍ PRO FPLC A HPLC



ZAŘÍZENÍ PRO FPLC

FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY



ZAŘÍZENÍ PRO HPLC



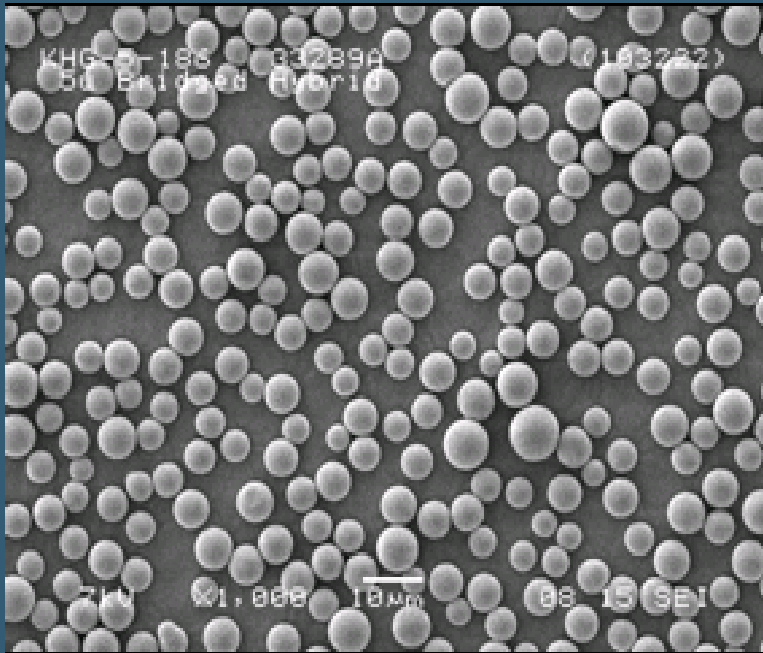
ZAŘÍZENÍ PRO UPLC



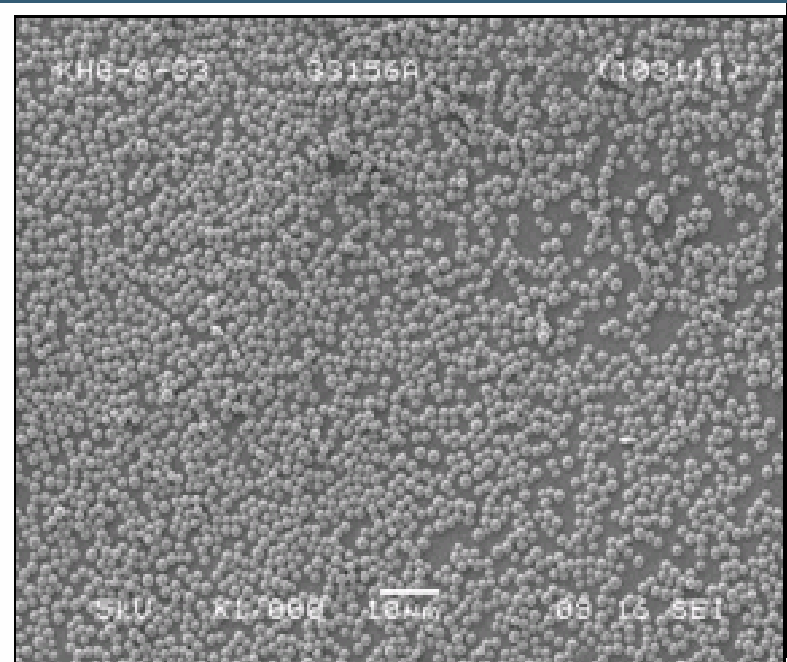
UPLC X HPLC

- 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

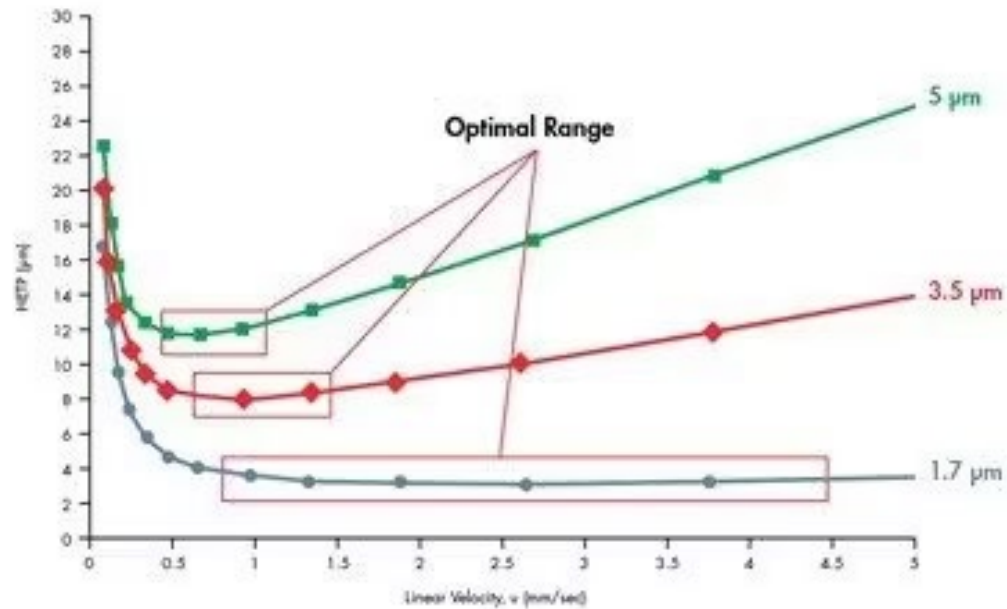


5 µm Particles



1.7 µm UPLC Particles

UPLC X HPLC

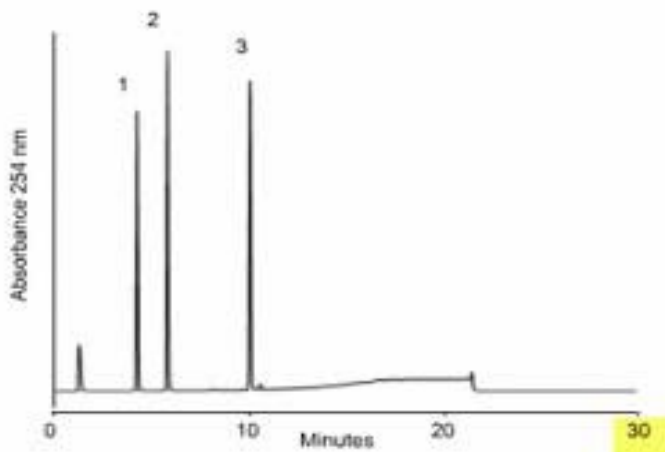


UPLC X HPLC

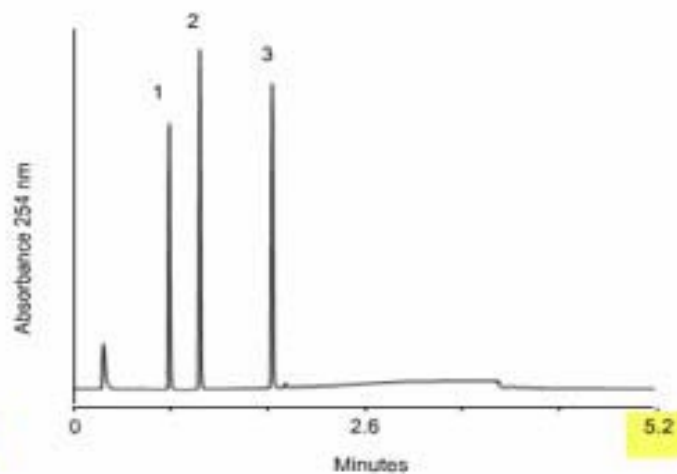
Waters

©2005 Waters Corporation

HPLC Converted to UPLC™

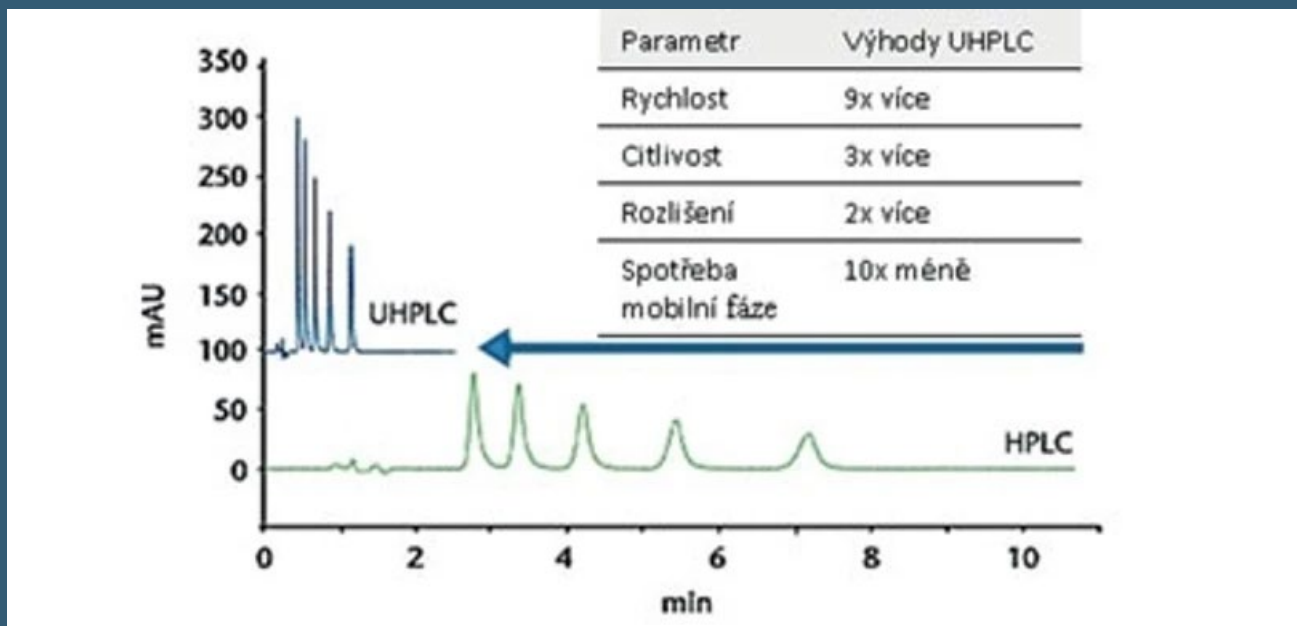


Original 30 minute HPLC

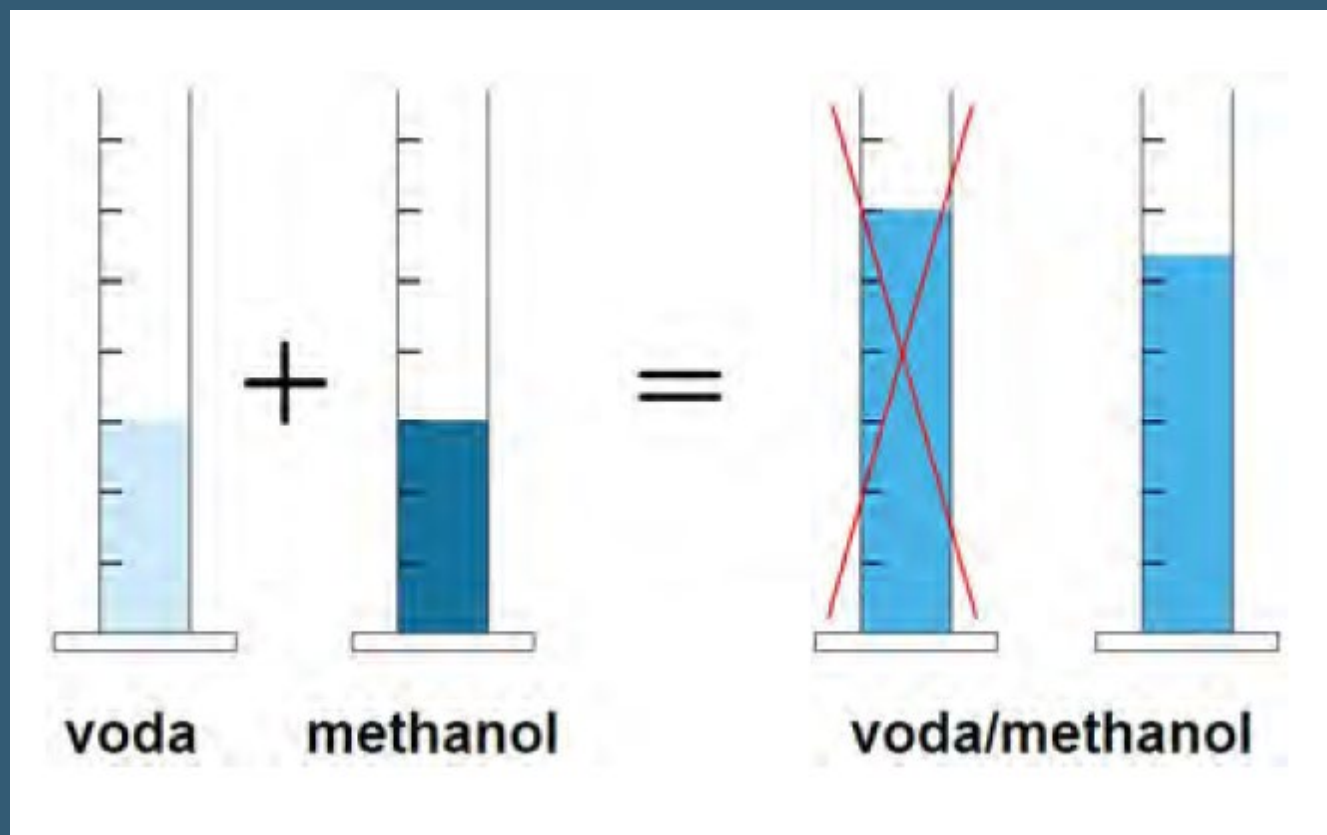


Converted 5.2 minute UPLC™

HPLC VERSUS UHPLC



PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE



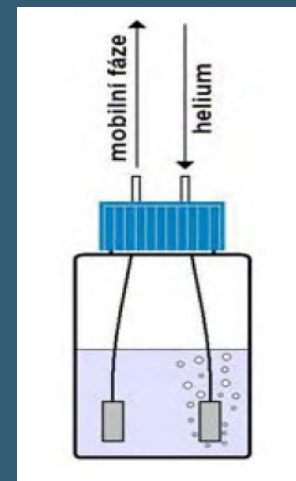
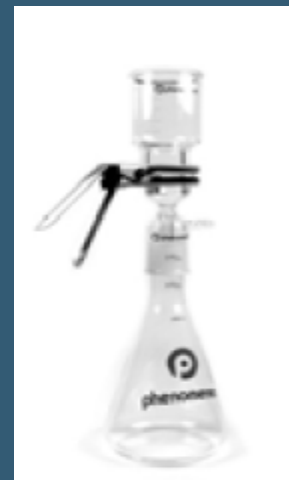
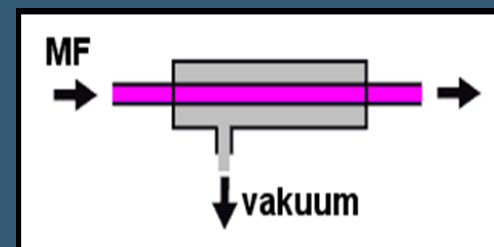
PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE

- filtrace



ODPLYNĚNÍ MOBILNÍ FÁZE

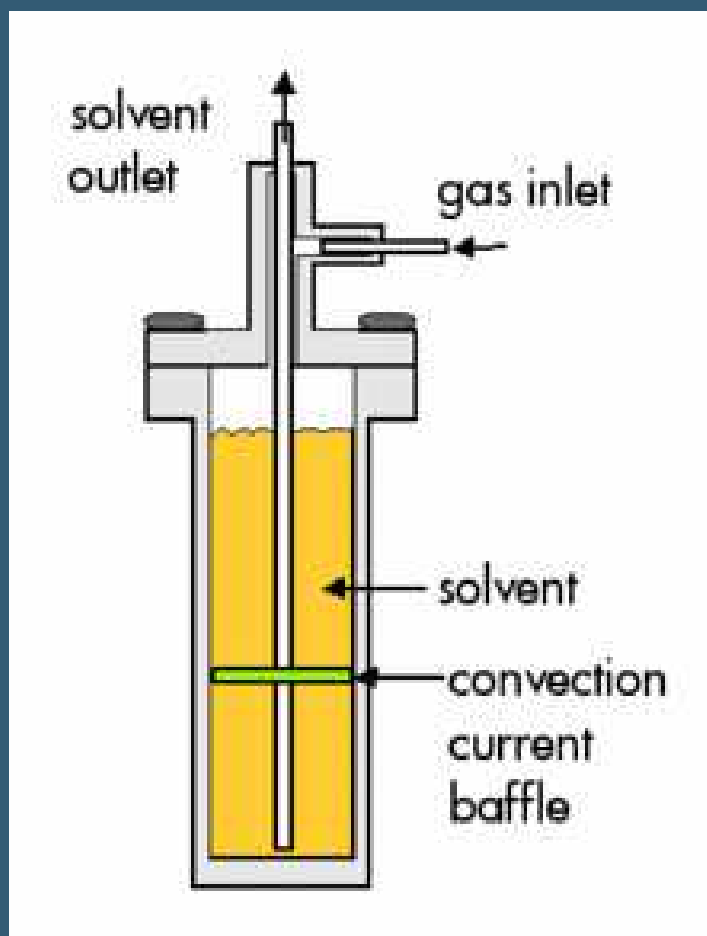
- přechod varem za nízkého tlaku
- ozvučení ultrazvukem
- vakuová filtrace
- in-line membránové odplynění
- probublávání inertním plynem



PUMPY

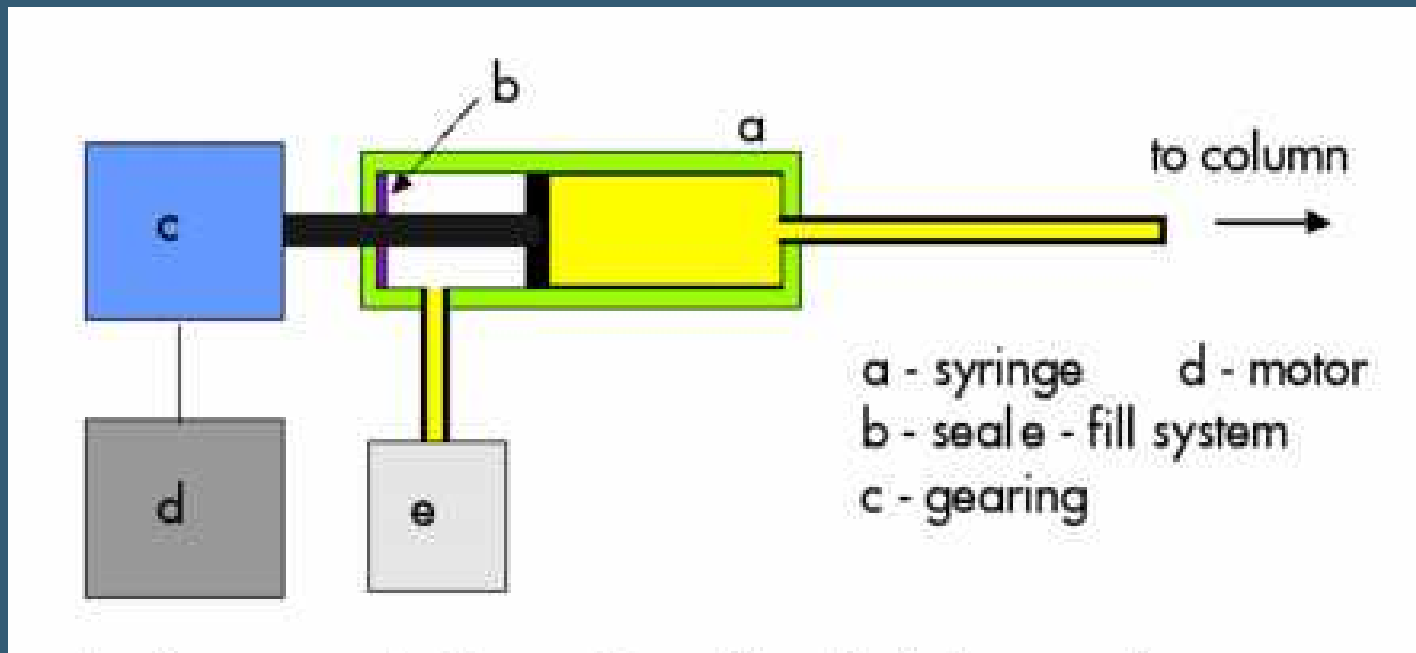
PUMPY PRACUJÍCÍ ZA KONSTANTNÍHO TLAKU

TLAKOVÁ PUMPA

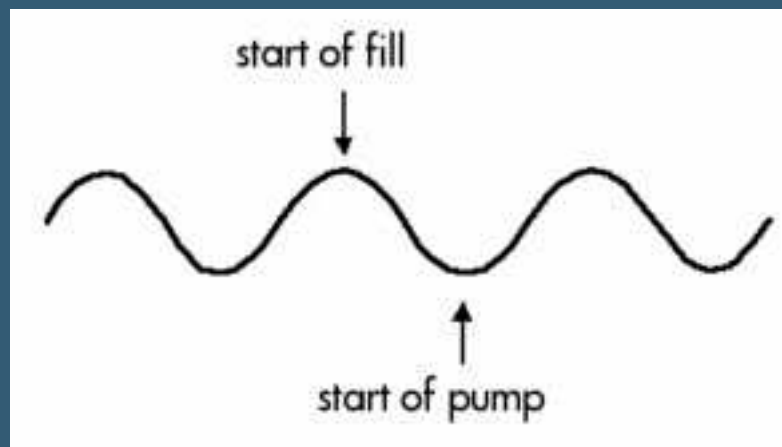
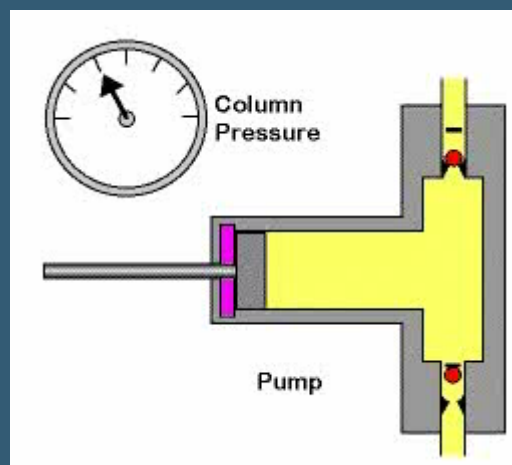


PUMPY PRACUJÍCÍ ZA KONSTANTNÍHO PRŮTOKU

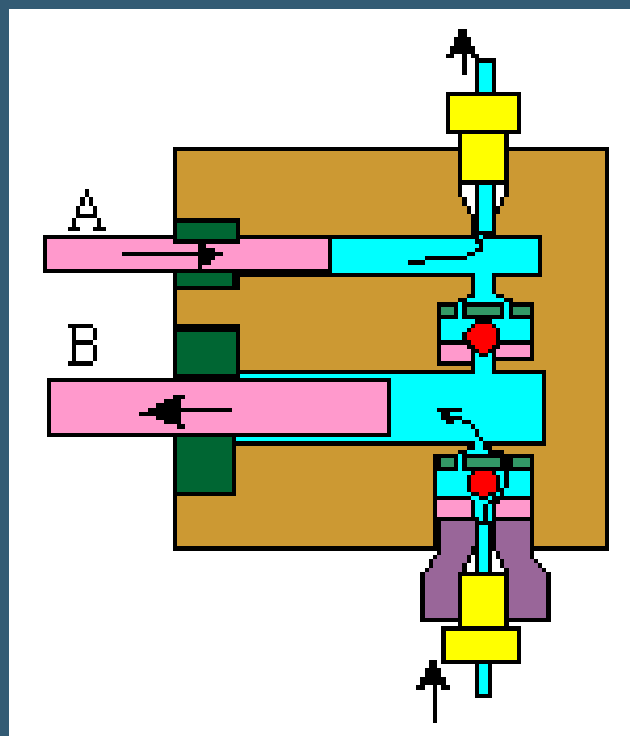
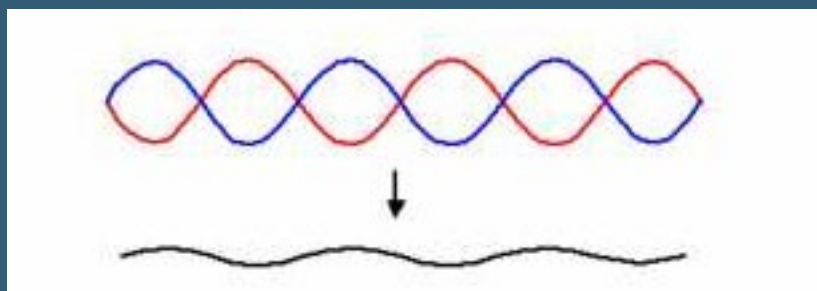
LINEÁRNÍ DÁVKOVAČE



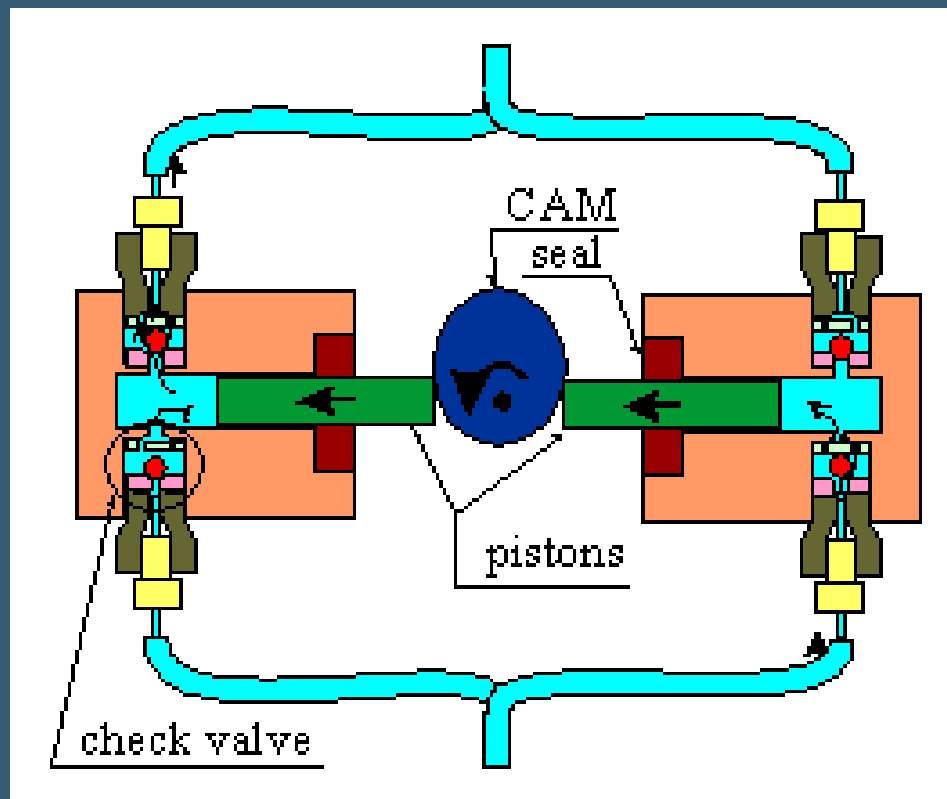
PUMPA JEDNOPISTOVÁ



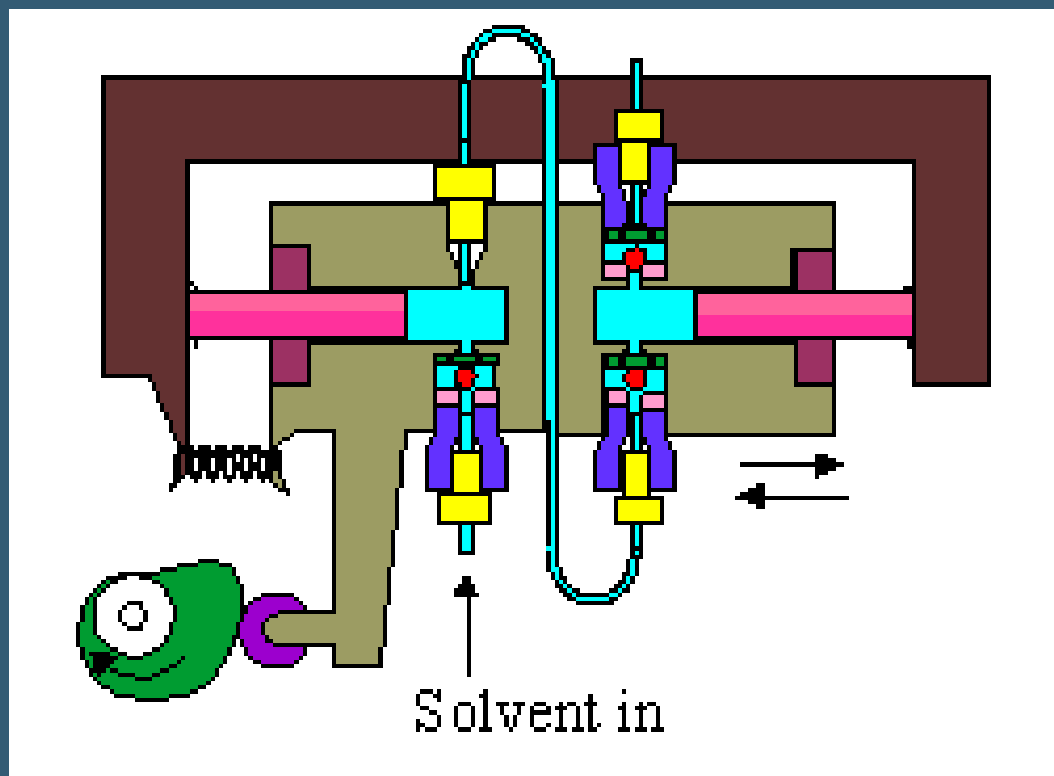
PUMPA DVOUPÍSTOVÁ



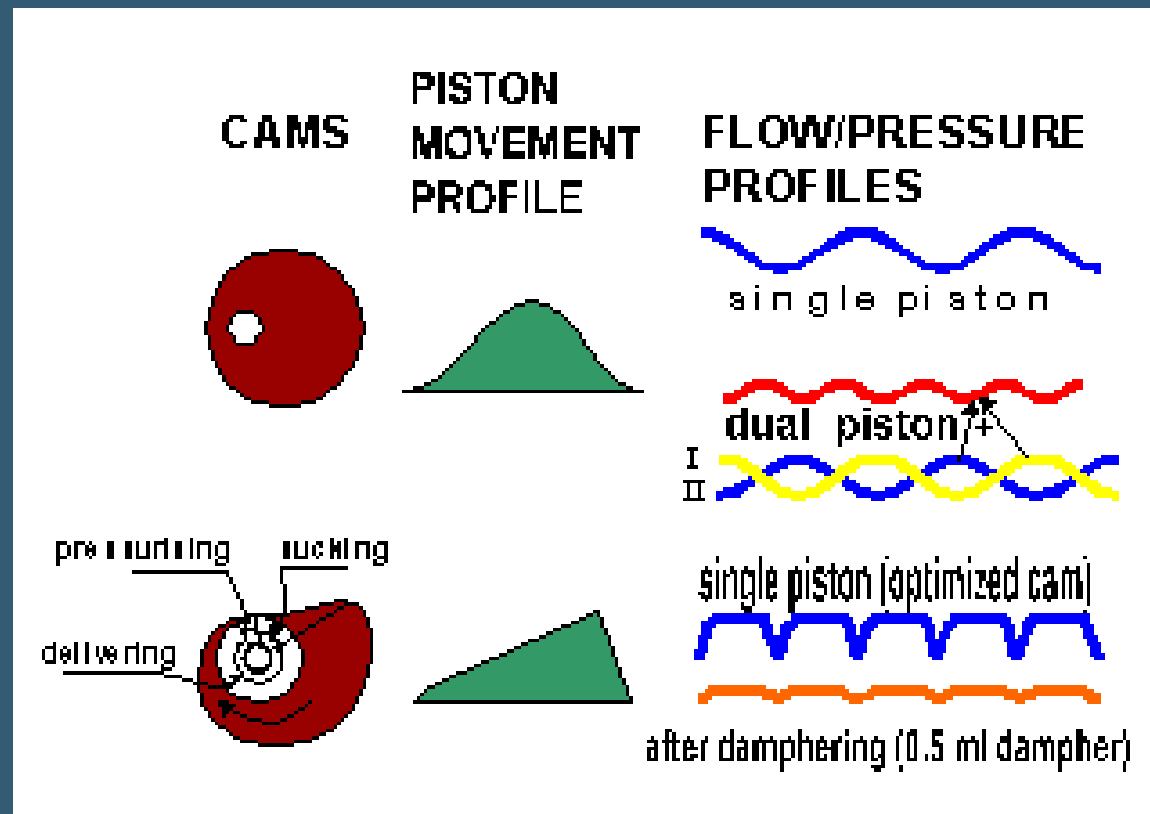
PUMPA DVOUPÍSTOVÁ



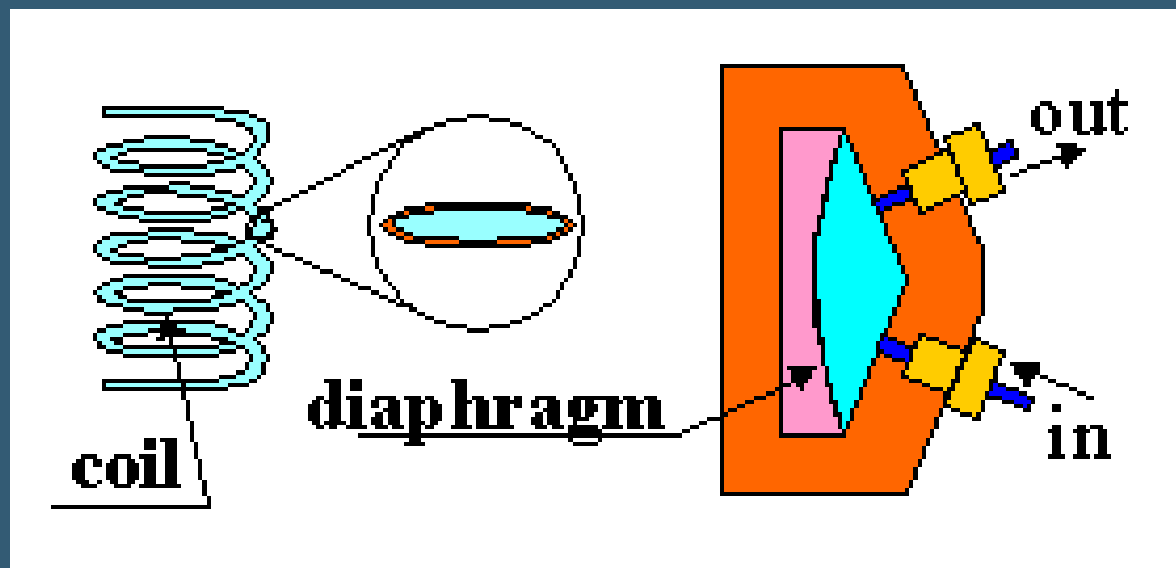
PUMPA DVOUPÍSTOVÁ



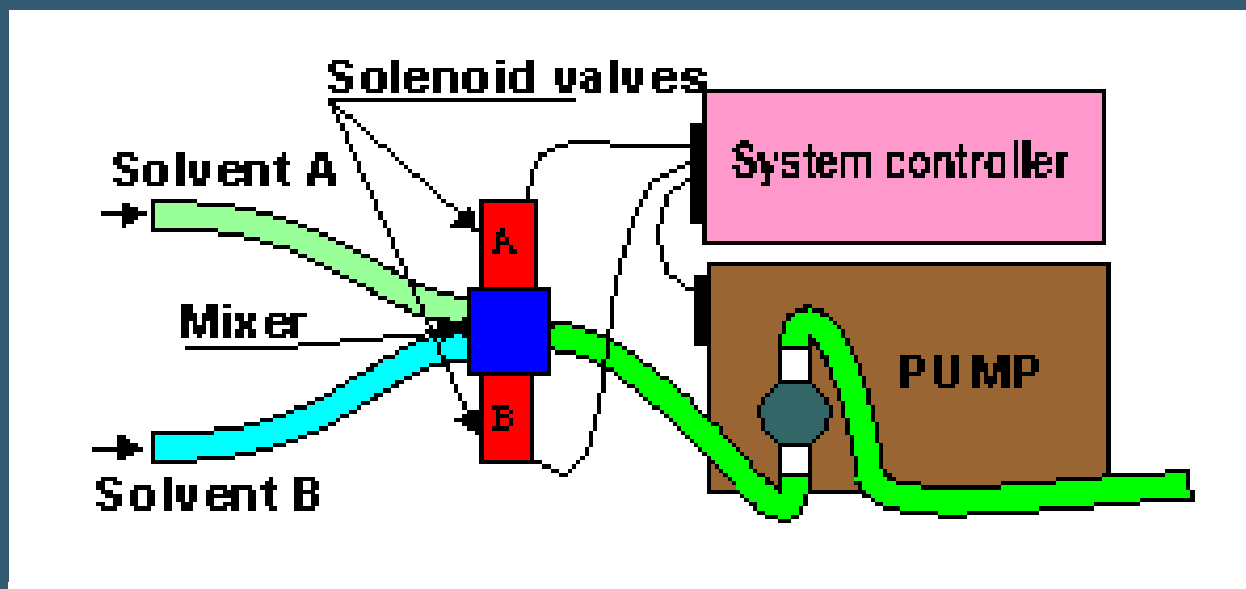
TLUMENÍ PULSŮ



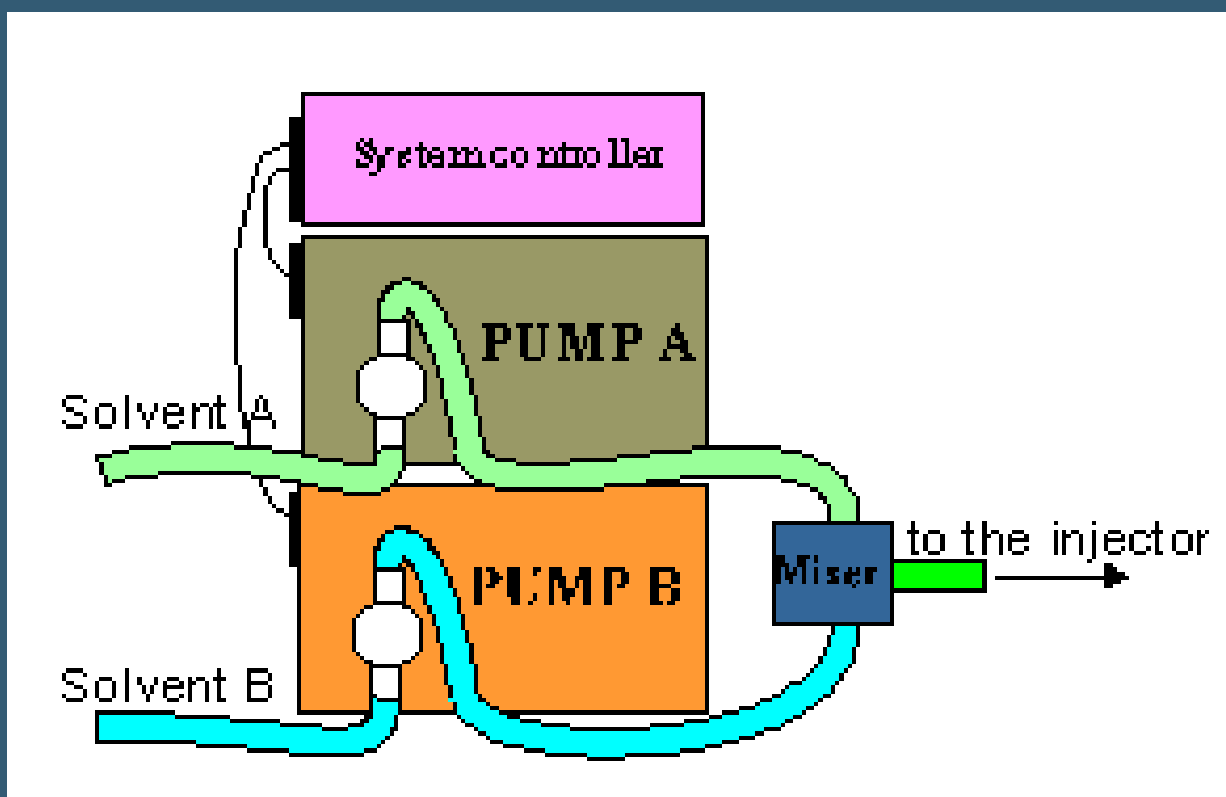
TLUMENÍ PULSŮ



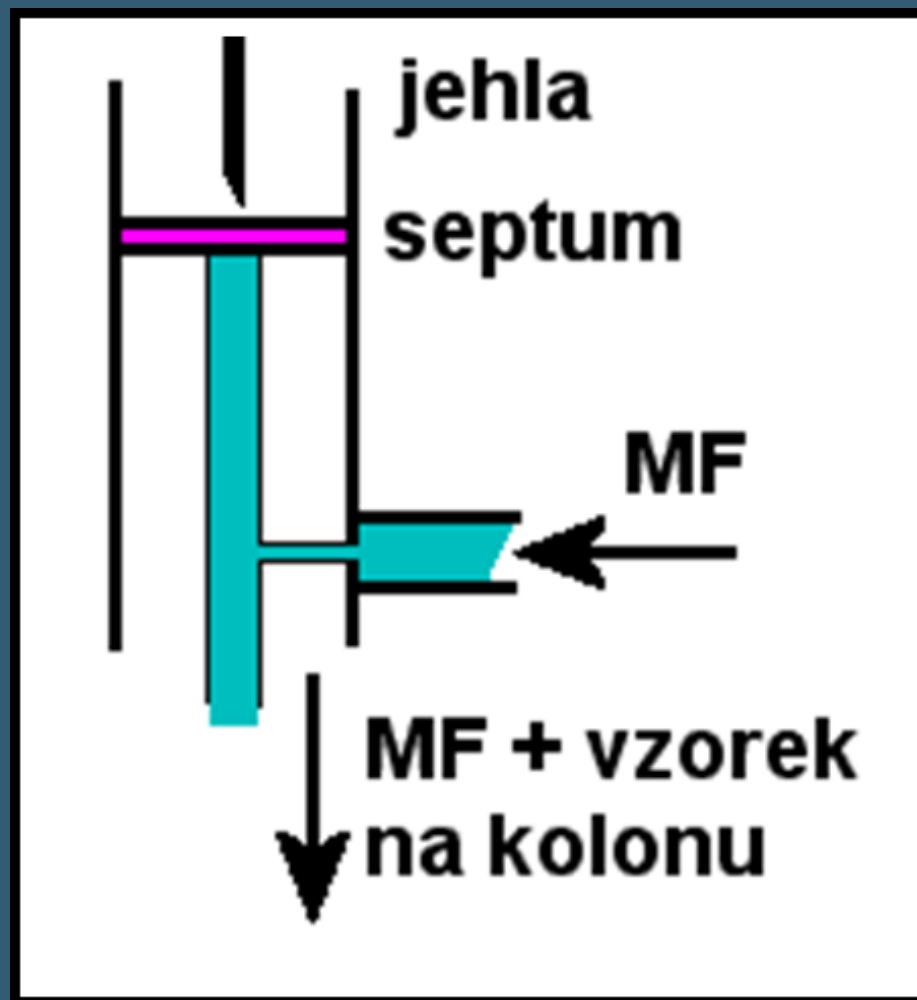
GRADIENT NÍZKOTLAKÝ



GRADIENT VYSOKOTLAKÝ

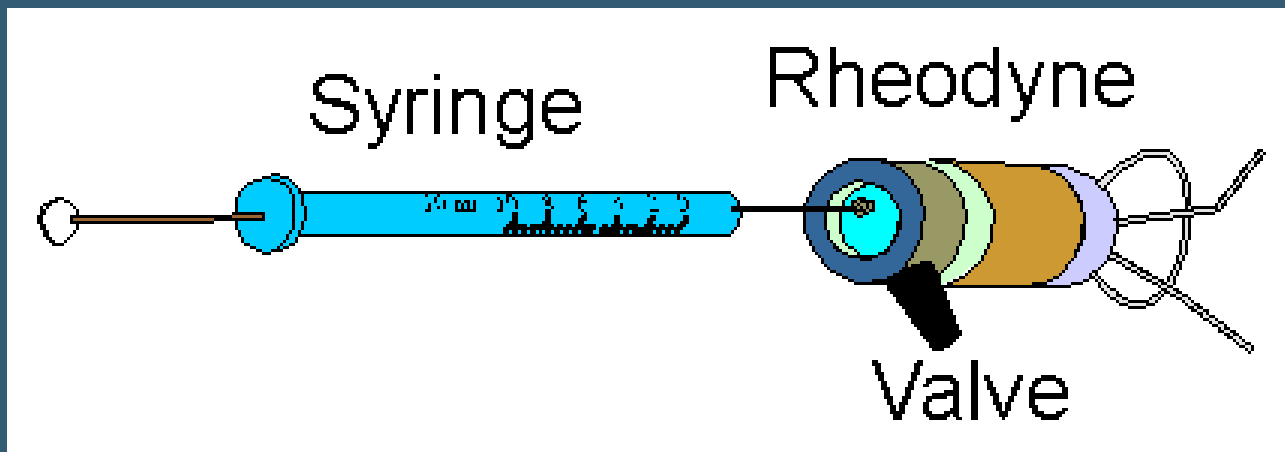


DÁVKOVÁNÍ – SEPTUM

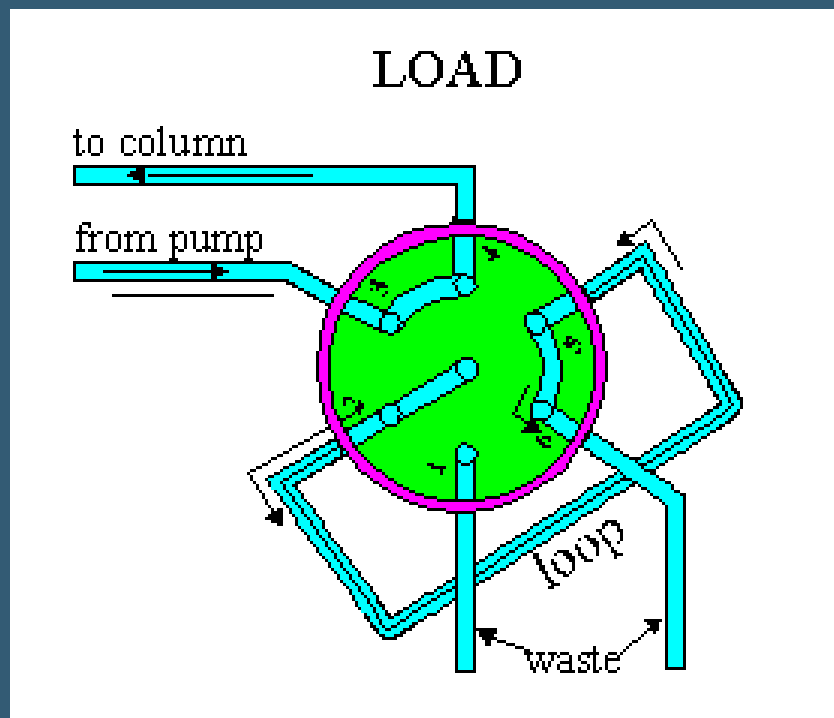


DÁVKOVÁNÍ

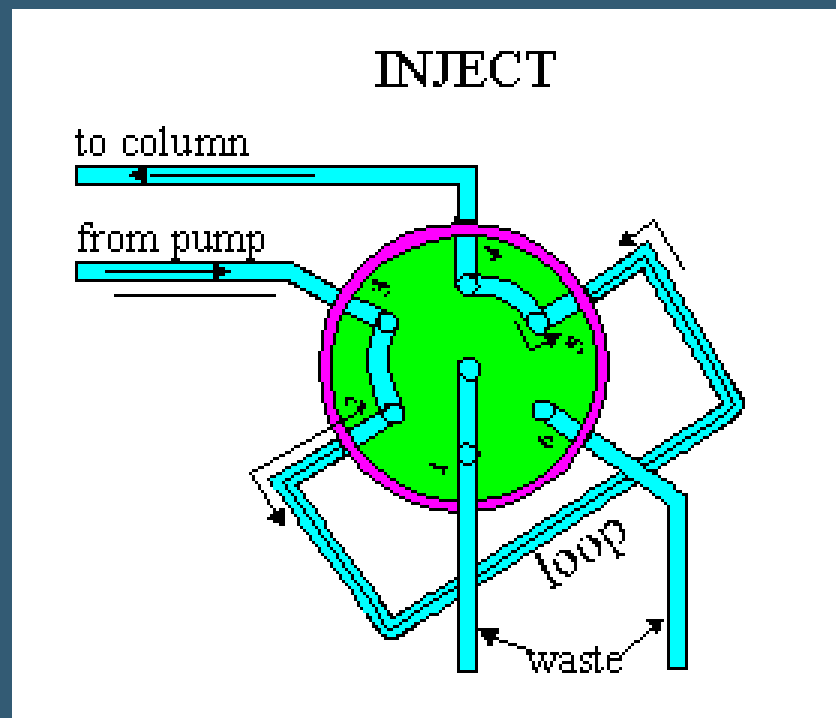
DÁVKOVACÍ VENTIL



DÁVKOVACÍ VENTIL – „LOAD“



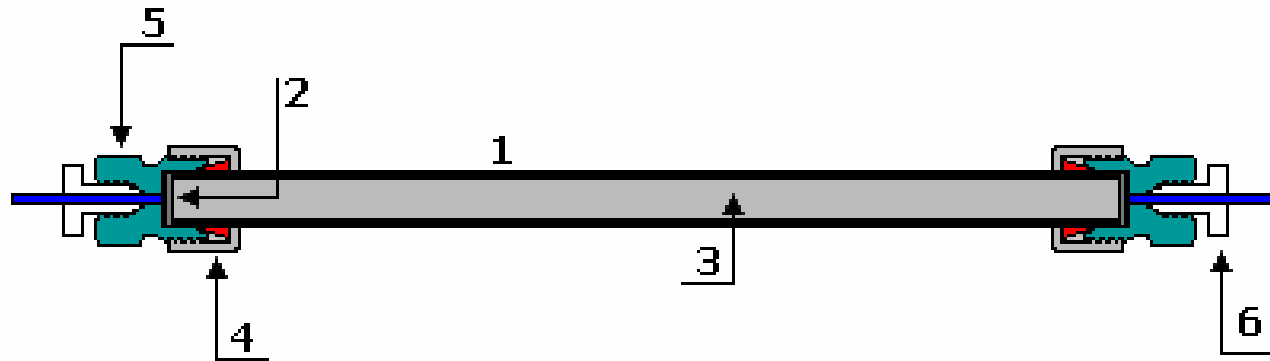
DÁVKOVACÍ VENTIL – „INJECT“



KOLONY PRO FPLC

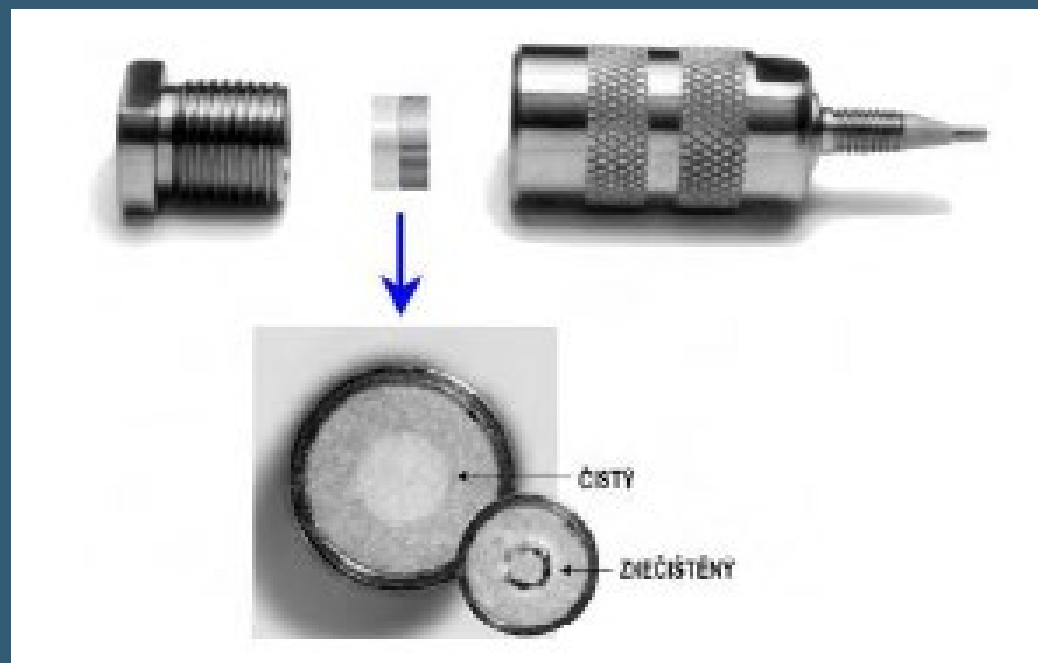


KOLONA



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



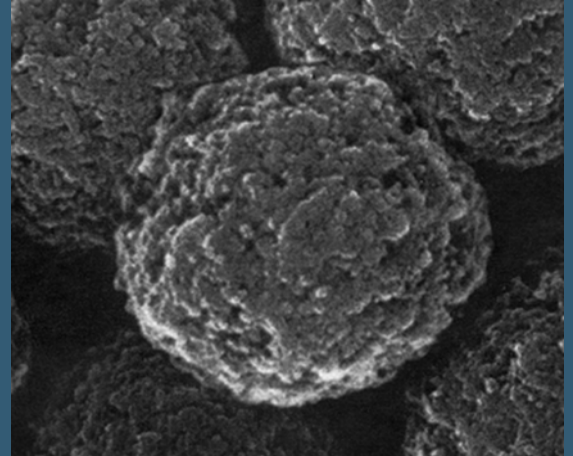
ČÁSTICOVÝ SORBENT

tvar: sférický (bez povrchových vad)

rozměr pro kolony:

analytické 1 – 8 μm

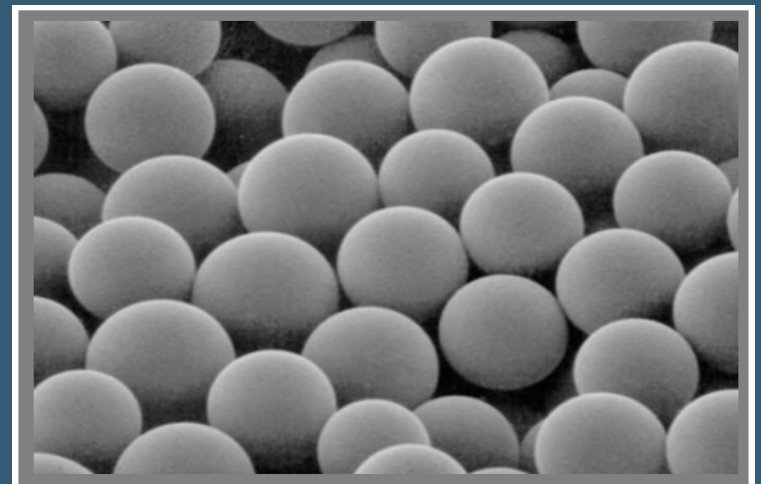
preparativní > 10 μm



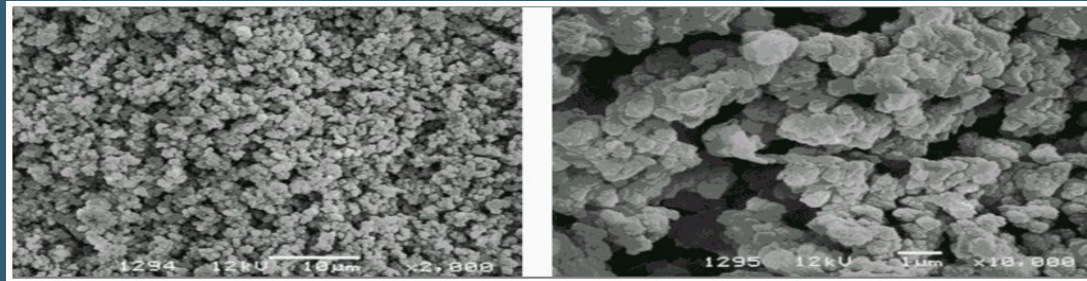
povrchové rozrůznění

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) + kyselina octová + polyethylenglykol (PEG)

ML-SF na bázi organických materiálů

styren-divinylbenzen (S-DVB)

izooktan

metakryláty

tetrahydrofuran

vinyl-deriváty (vinylpyrrolidon, vinylacetát)

dekanol

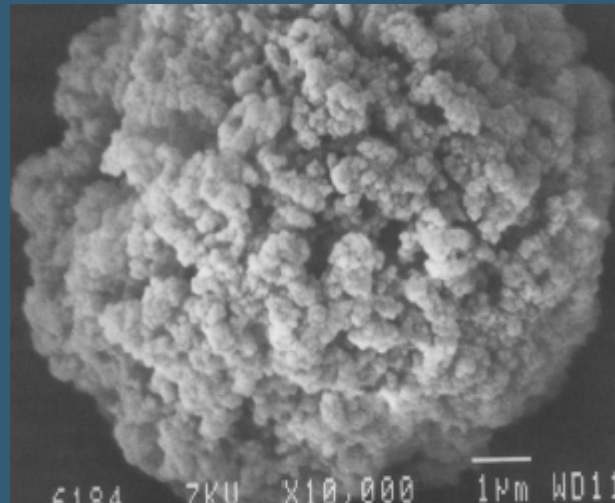
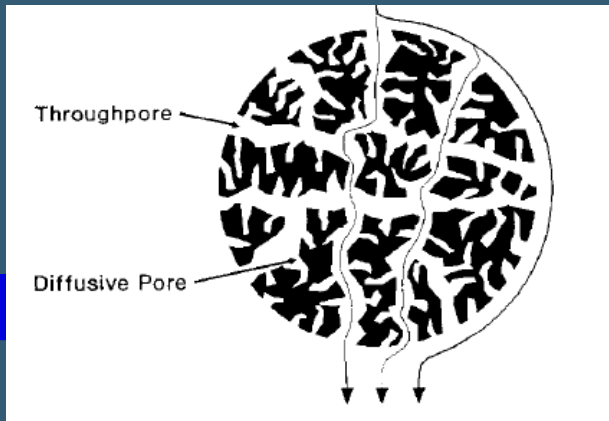
nevýhoda: obtížná výroba

provedení: disk, trubička, plněná kapilára

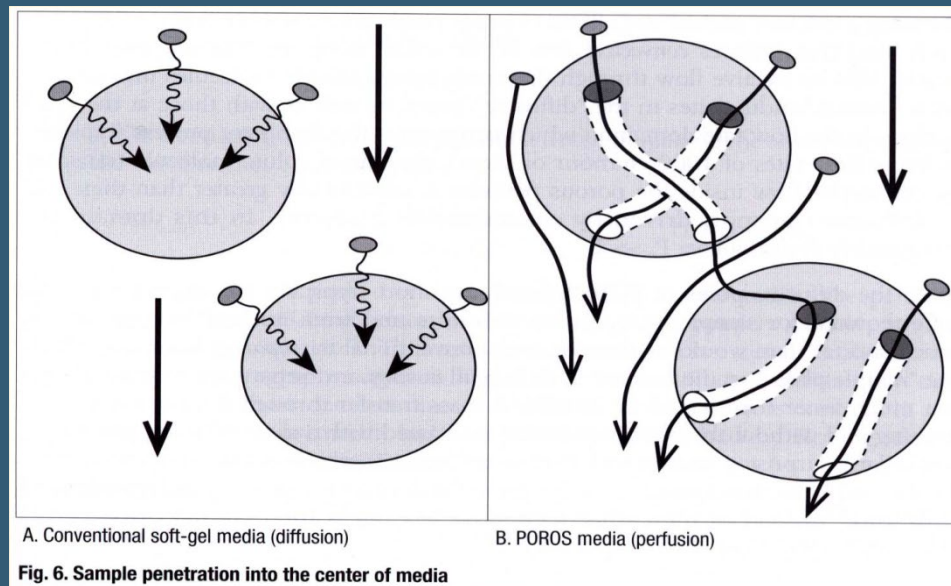


PERFÚZNÍ CHROMATOGRRAFIE

- 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 CHROMATOGRRAFIE

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

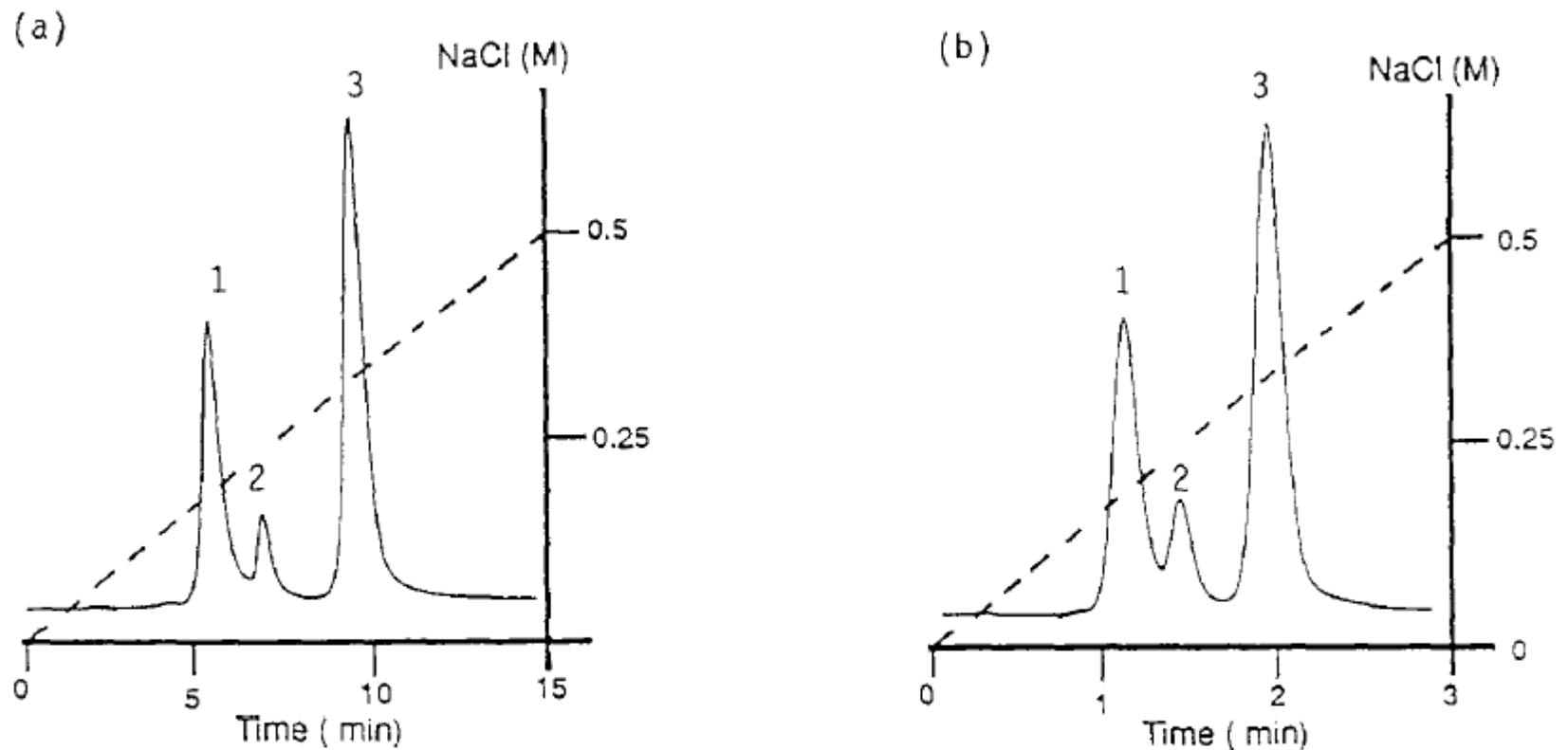


Fig. 14. Separation of model proteins on POROS S/M; 75 μ g load of a protein mixture containing chymotrypsin (1), cytochrome *c* (2), and lysozyme (3); detection at 280 nm; column, 100 \times 4.6 mm I.D.; 20 mM 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid buffer, pH 6.0; detection at 280 nm. (a) 1 ml/min, 15-min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

UPLC stacionární fáze Waters

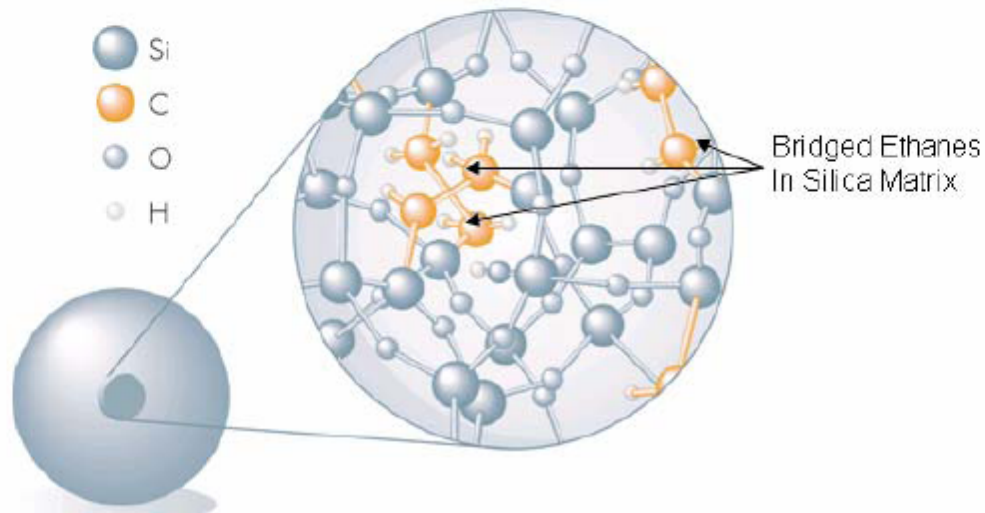
technologie "Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology"



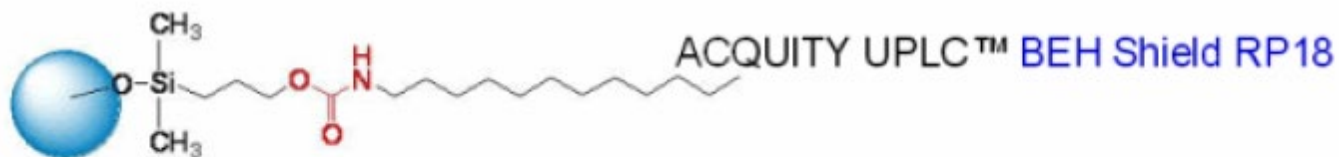
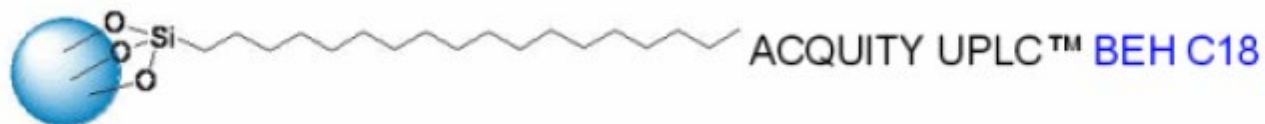
Polyethoxysilane (BPEOS)

Tetraethoxysilane (TEOS)

Bis(triethoxysilyl)ethane (BTEE)

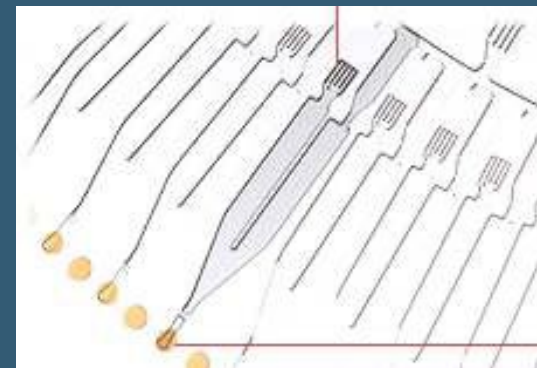
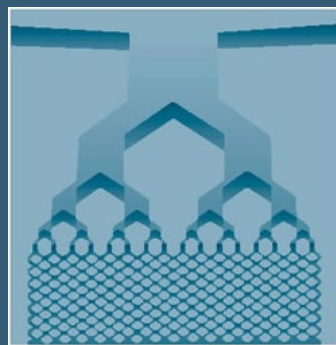
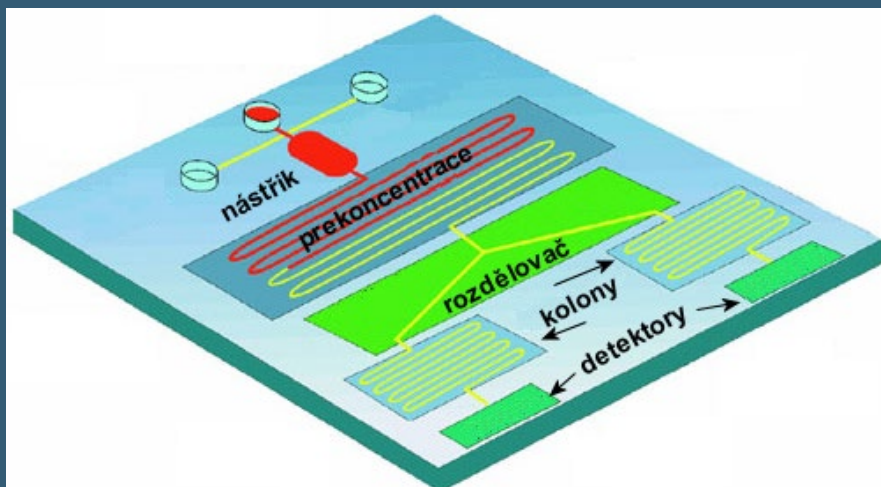


UPLC stacionární fáze Waters



CHIPOVÁ CHROMATOGRRAFIE

struktury vyleptané do křemíkové (Si) destičky

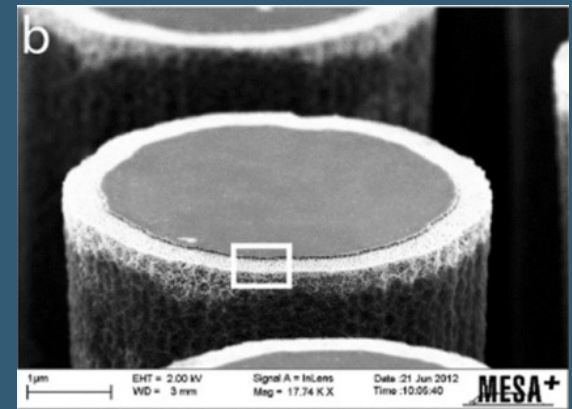
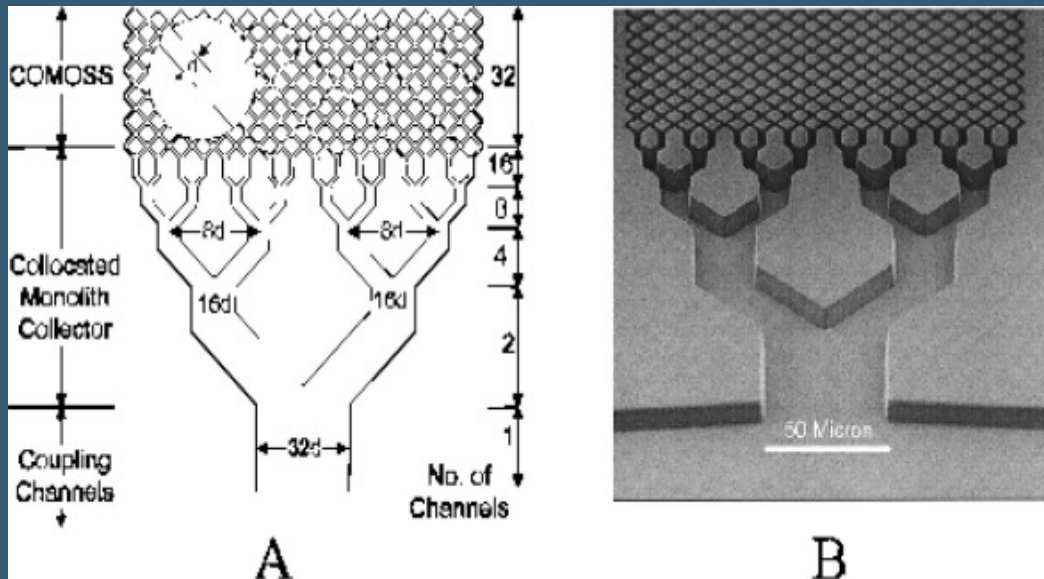


pohyb MF: pumpa, odstředivá síla, elektrostaticky

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

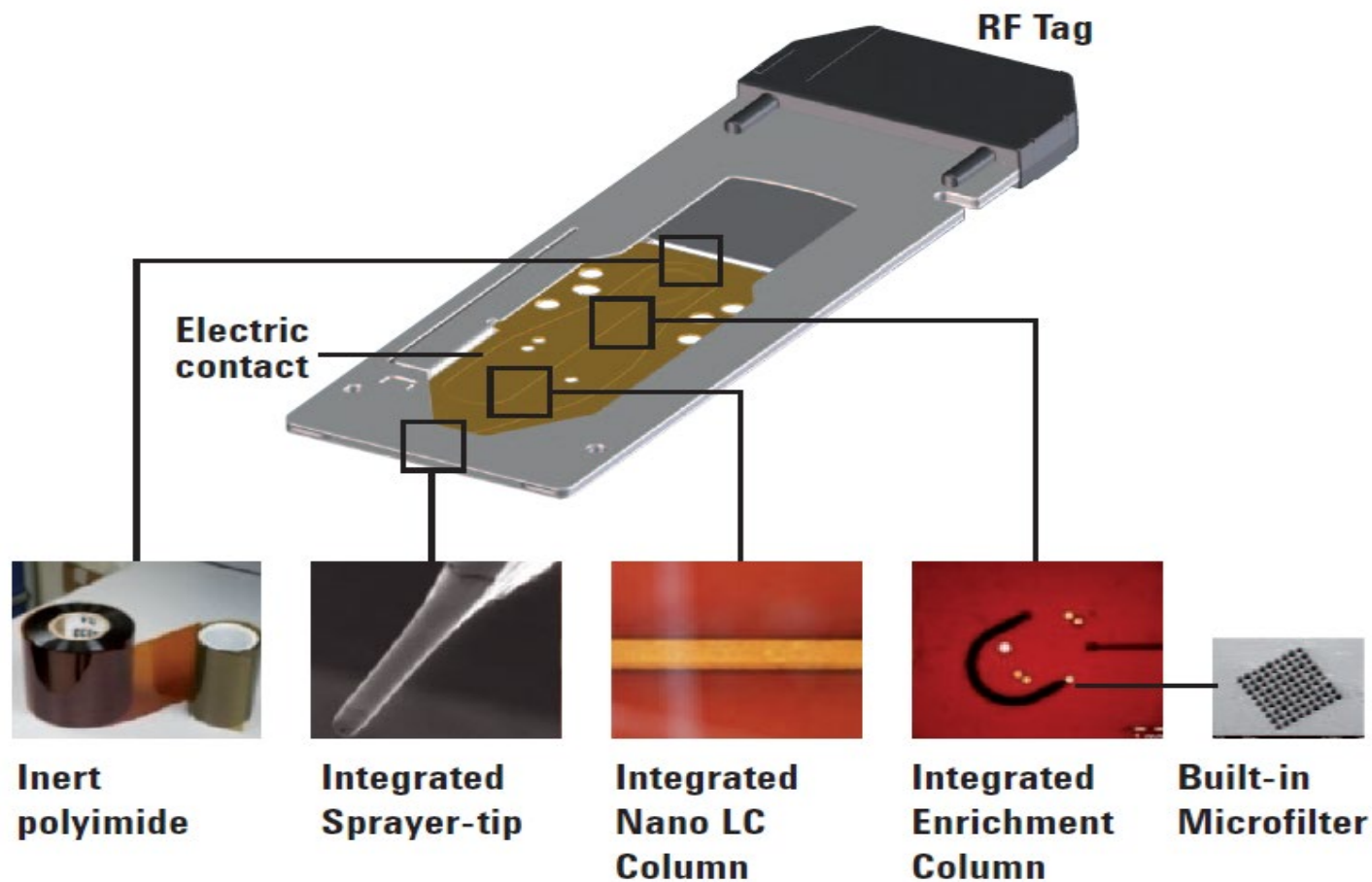
nevýhody: práce s malými objemy
(povr. napětí, elektrostatické interakce)

PILLARS (SLOUPKY)



CHIPOVÁ CHROMATOGRRAFIE

AGILENT



PRŮMYSLOVÉ SYSTÉMY

Chromatography columns OVERVIEW



Micro columns
2 to 25 ml



Mini columns
20 - 1500 ml



MP columns
1 - 60 L



Pilot columns
2 - 50 L



Process columns
30 - 2500 L



Industrial columns
30 - 2500 L

R&D / Process validation

Scale-up

Commercial

Segmented columns

Full radial columns

PRŮMYSLOVÉ SYSTÉMY



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

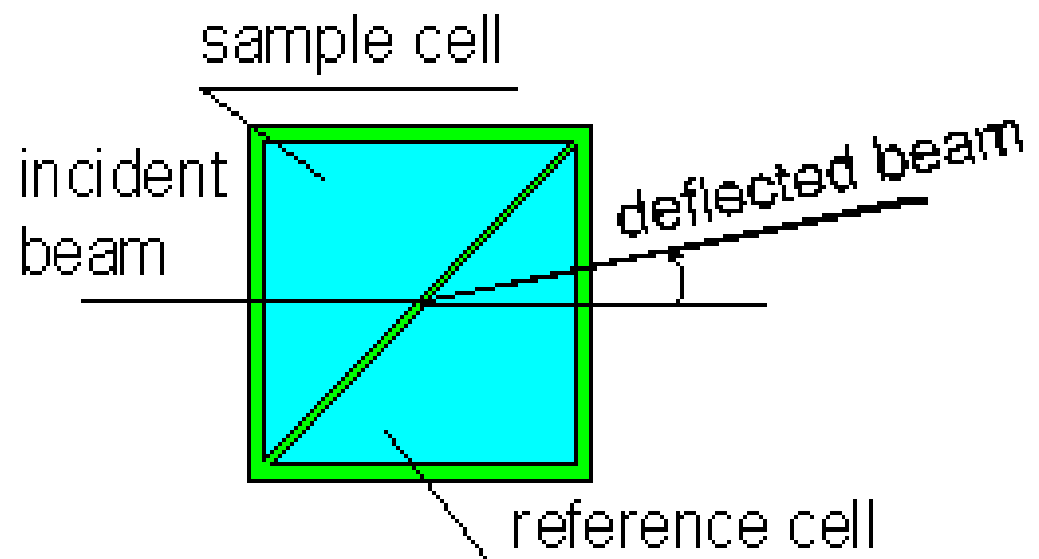
REFRAKTOMETRICKÝ DETEKTOR

index lomu

šum 10^{-7}

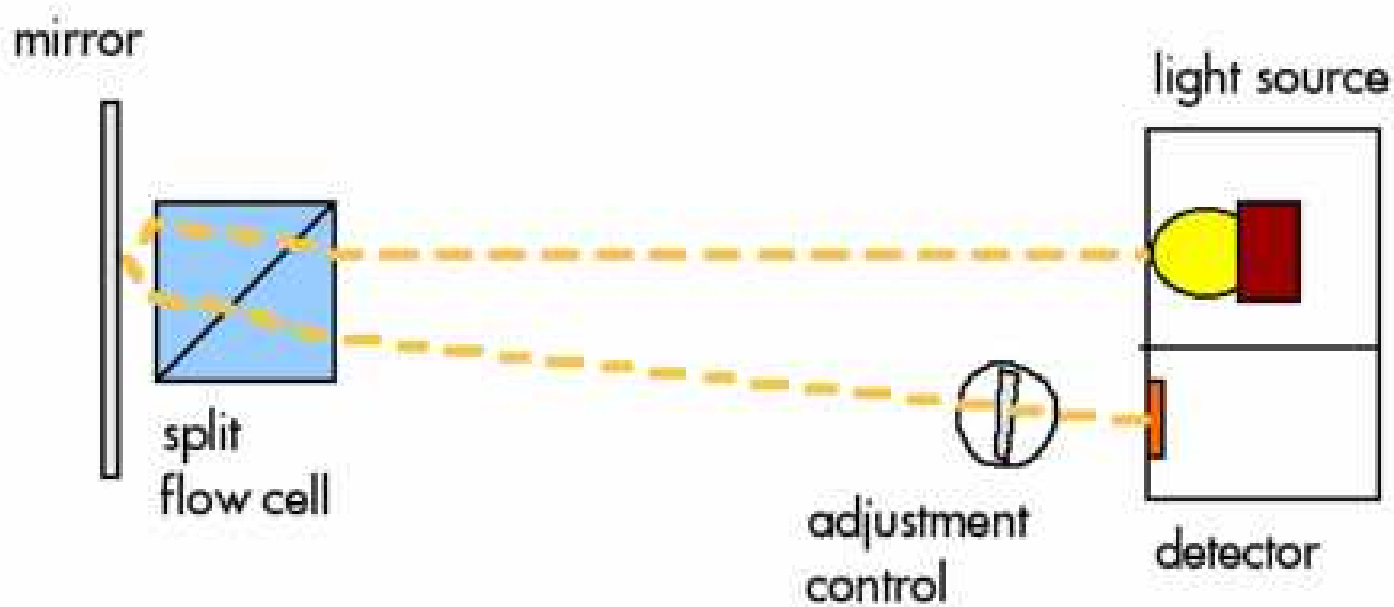
dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-7} g/ml



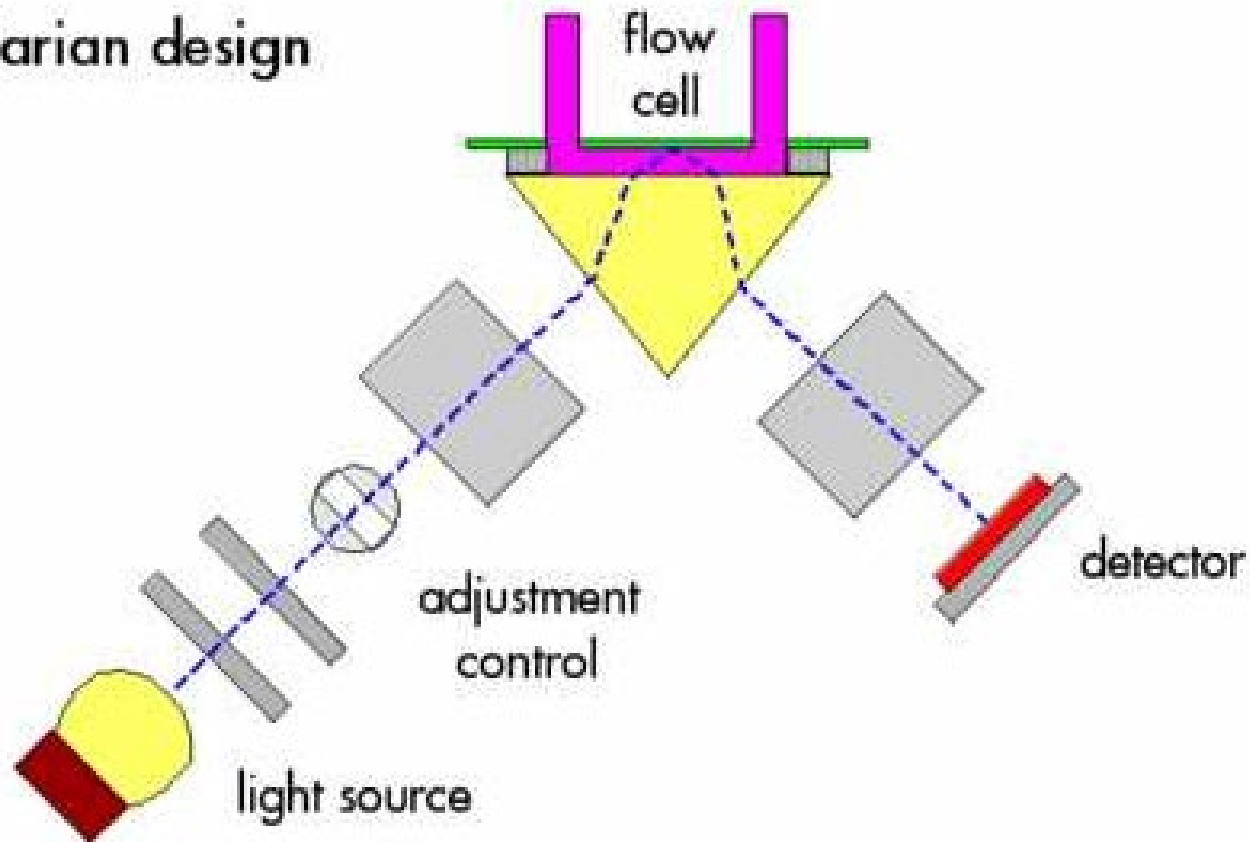
REFRAKTOMETRICKÝ DETEKTOR

Waters design



REFRAKTOMETRICKÝ DETEKTOR

Varian design



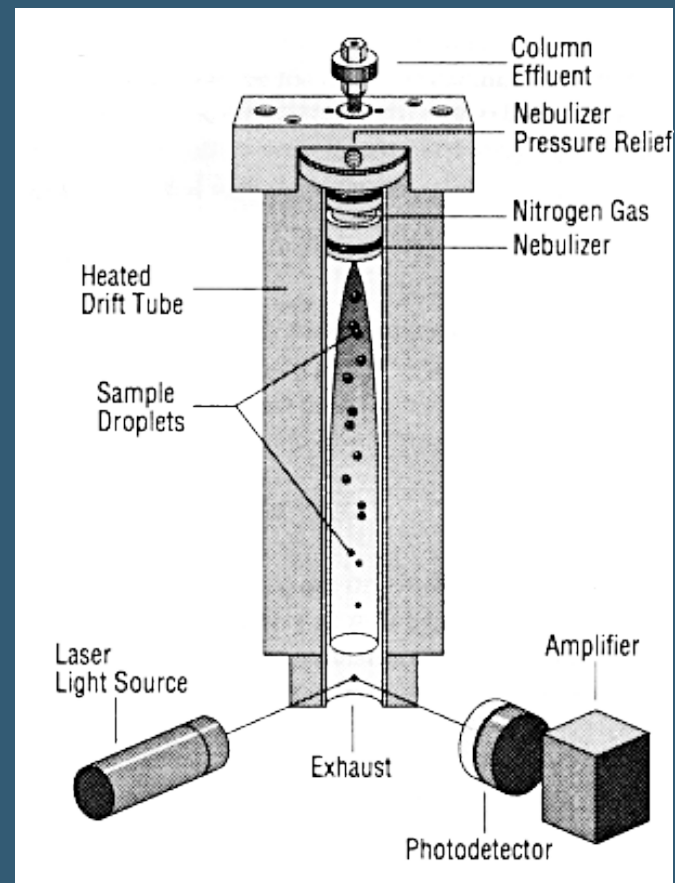
„LIGHT SCATTERING“ DETEKTOR

Rozptyl

šum 10^{-8}

dyn. rozsah 10^4

citlivost 10^{-9} g/ml



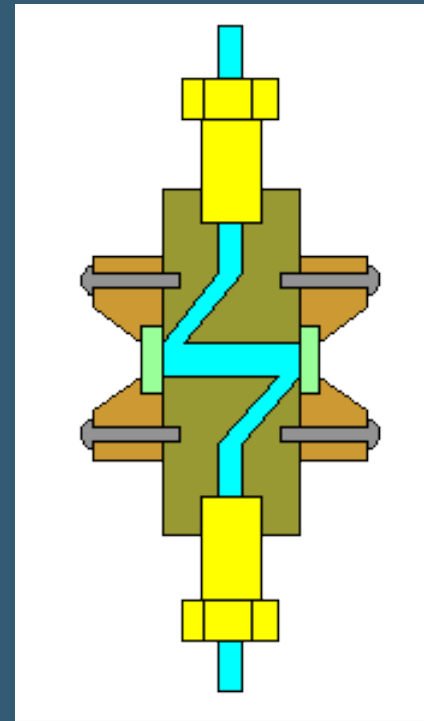
UV – VIS DETEKTOR DETEKČNÍ CELA

Absorbance

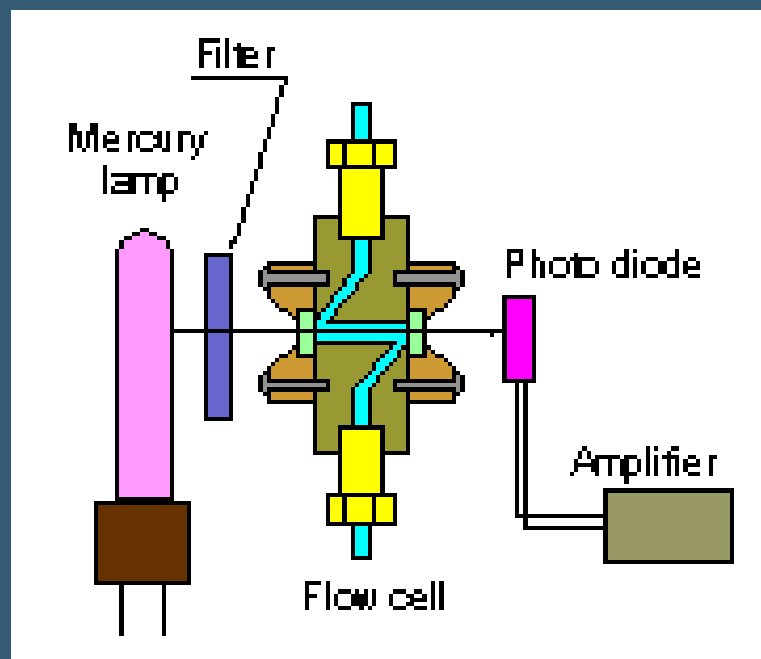
šum 10^{-4}

dyn. rozsah 10^4

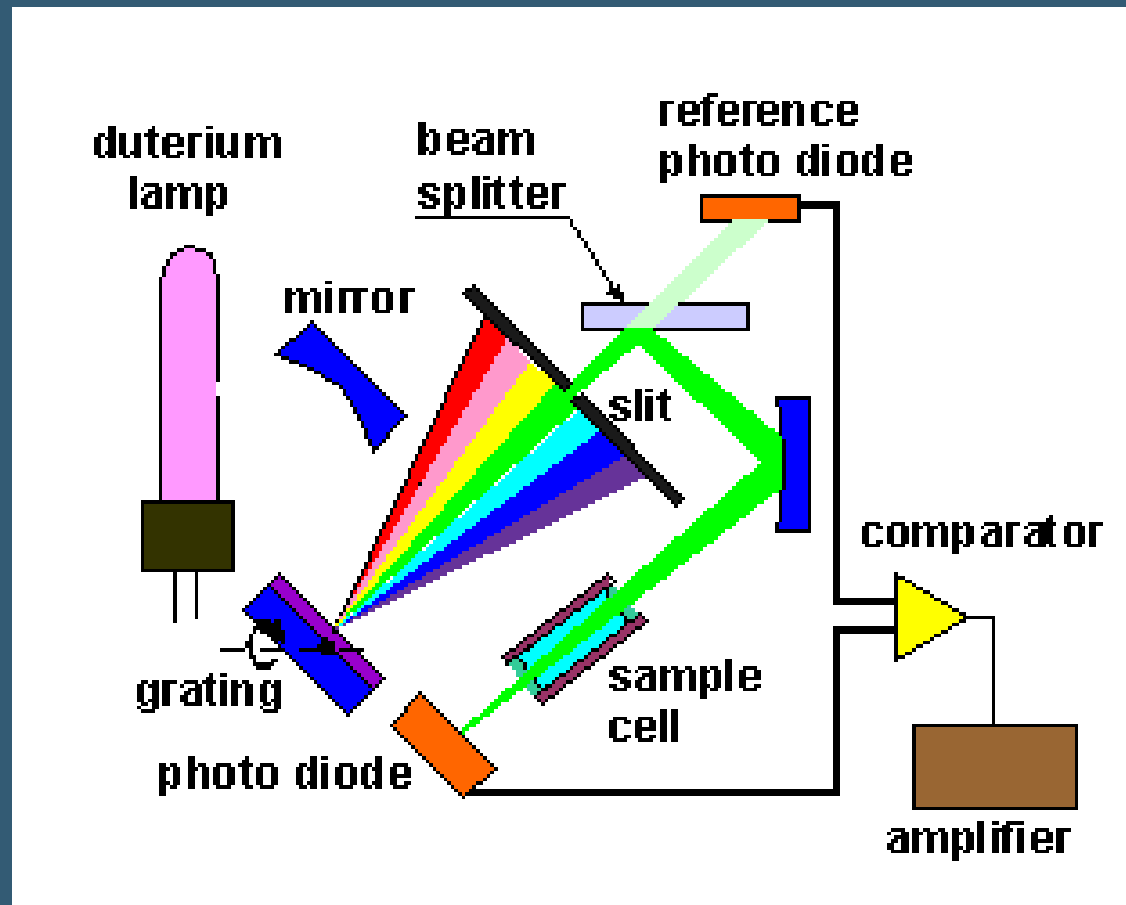
citlivost 10^{-10} g/ml



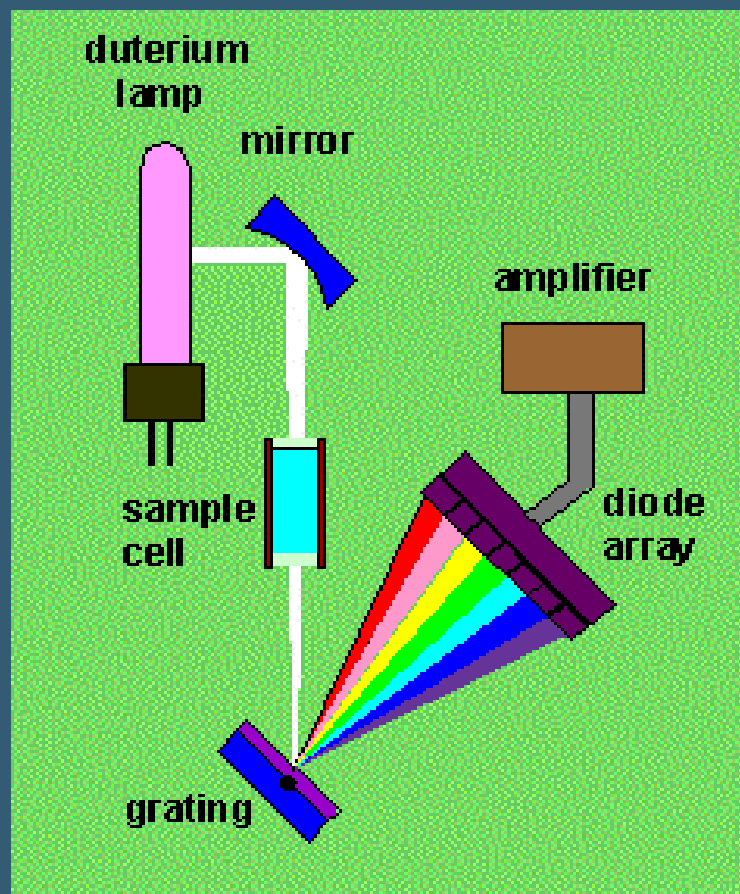
UV – VIS DETEKTOR S FIXNÍ VLNOVOU DĚLKOU



UV – VIS DETEKTOR S PROMĚNLIVOU VLNOVOU DĚLKOU



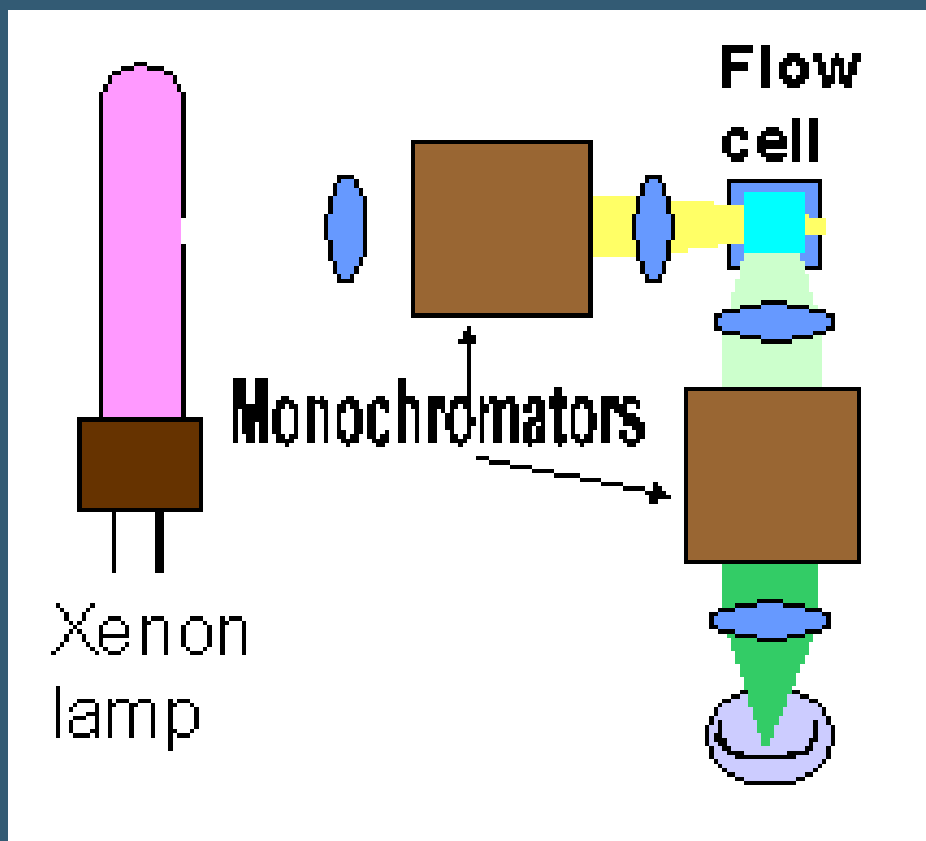
UV – VIS DETEKTOR S DIODOVÝM POLEM



FLUORESCENČNÍ DETEKTOR

Fluorescence

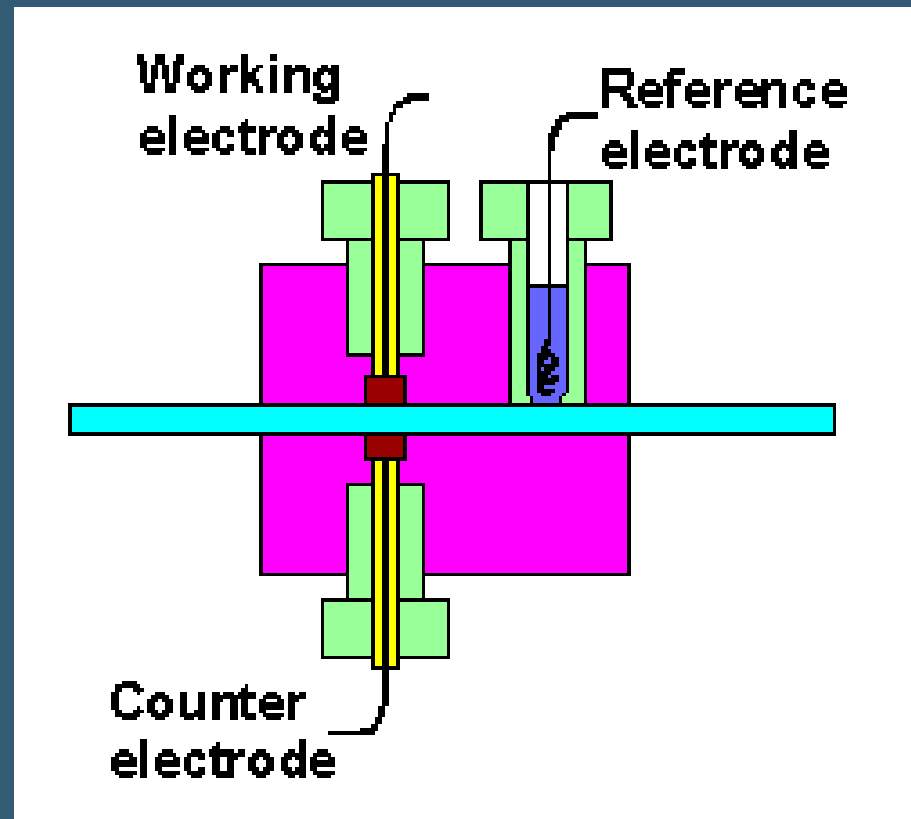
citlivost 10^{-9} g/ml



ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR

elektrický proud

citlivost 10^{-9} g/ml



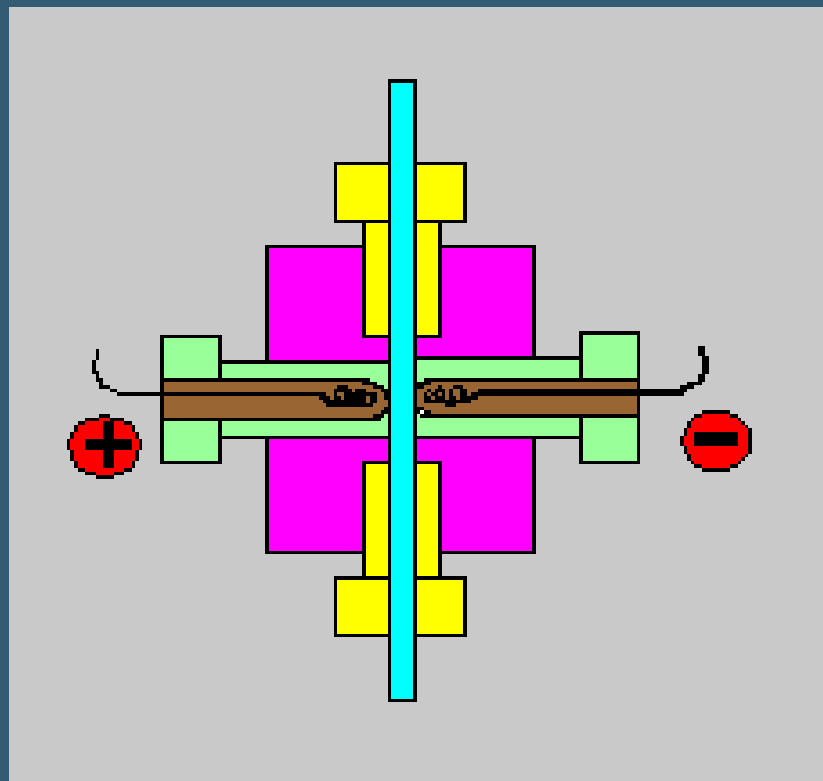
KONDUKTOMETRICKÝ DETEKTOR

Vodivost

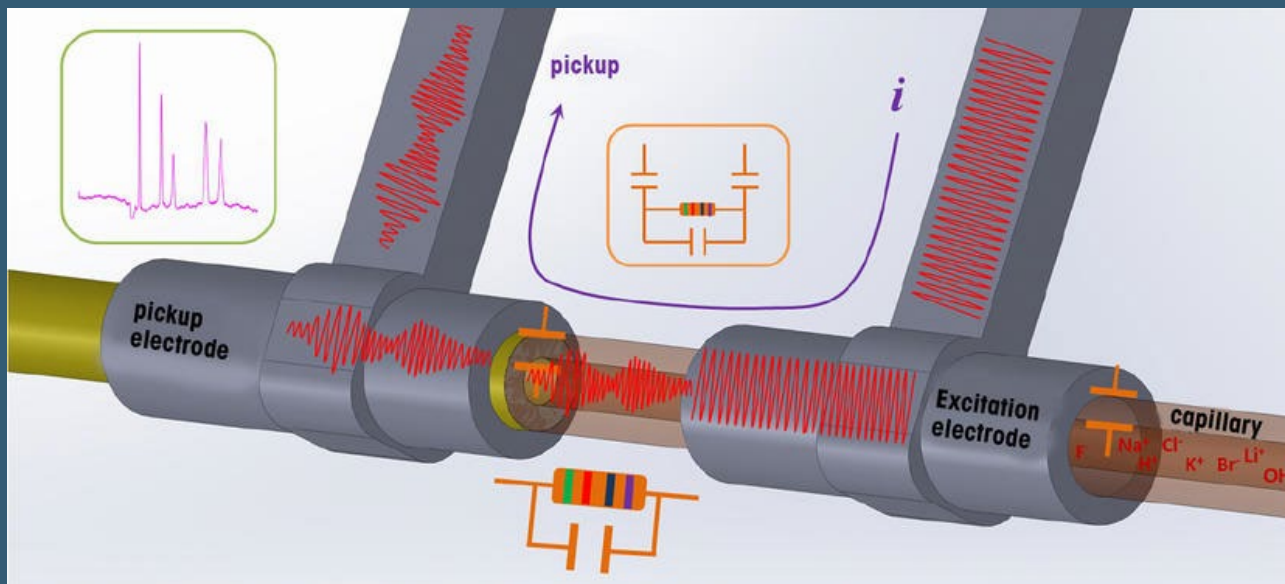
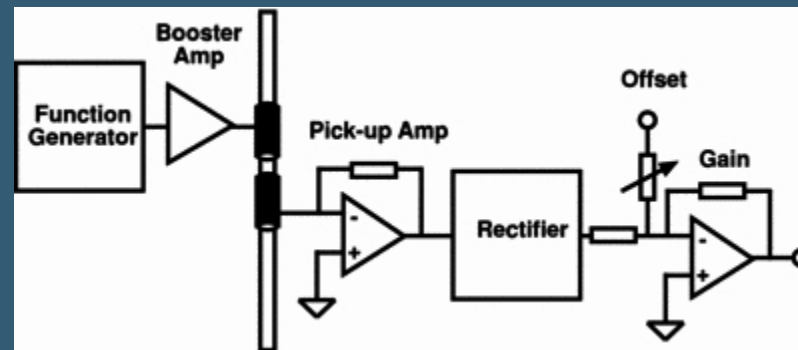
šum 10^{-3}

dyn. rozsah 10^6

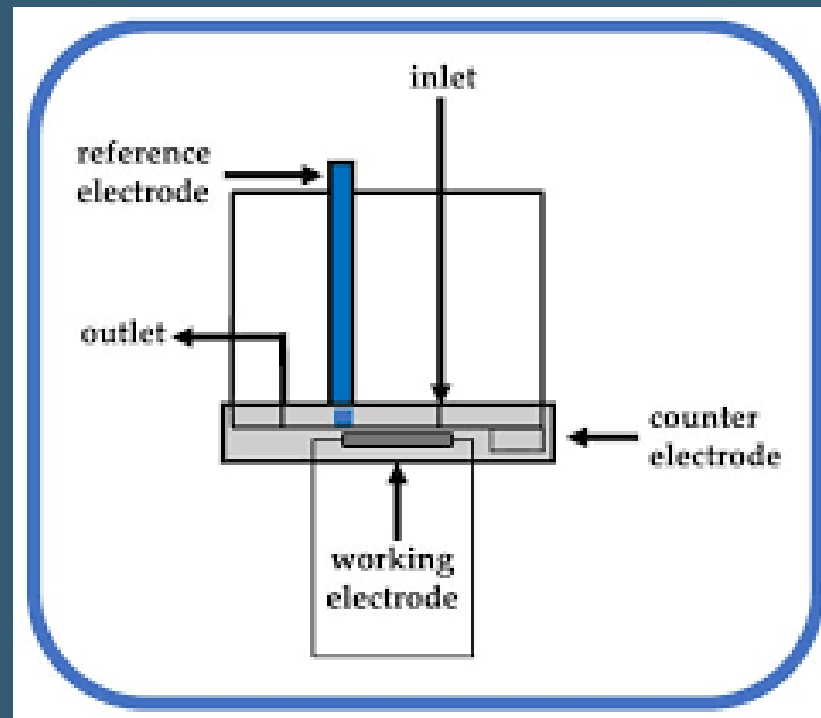
citlivost 10^{-8} g/ml



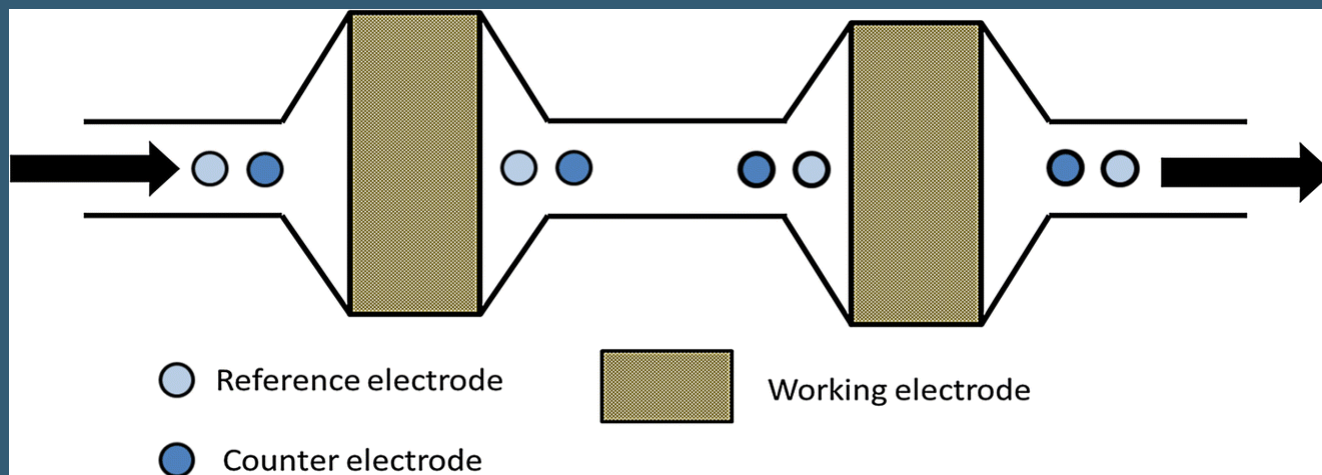
KONDUKTOMETRICKÝ DETEKTOR BEZKONTAKTNÍ



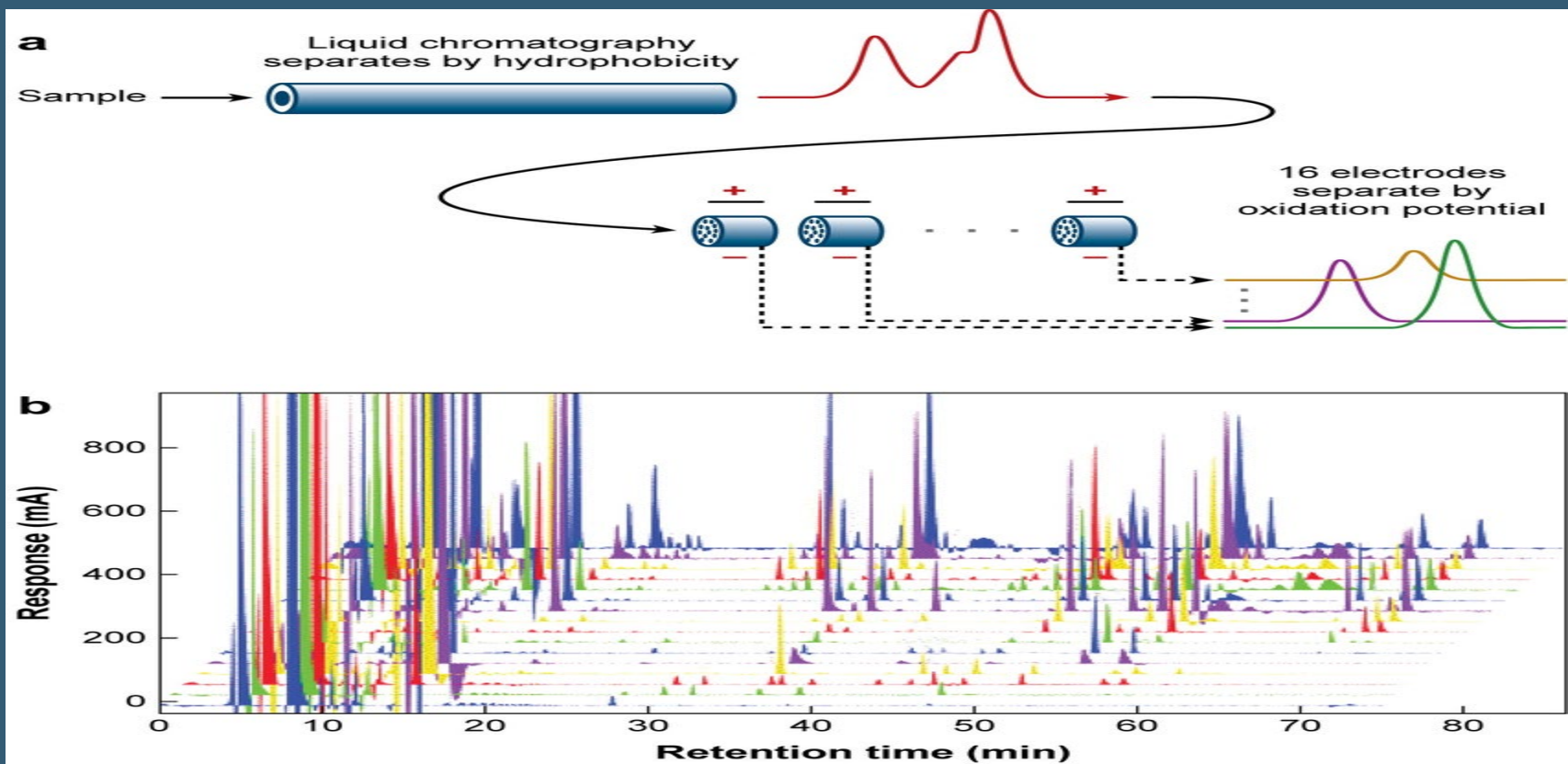
ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR AMPEROMETRICKÝ



ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR COULOMETRICKÝ



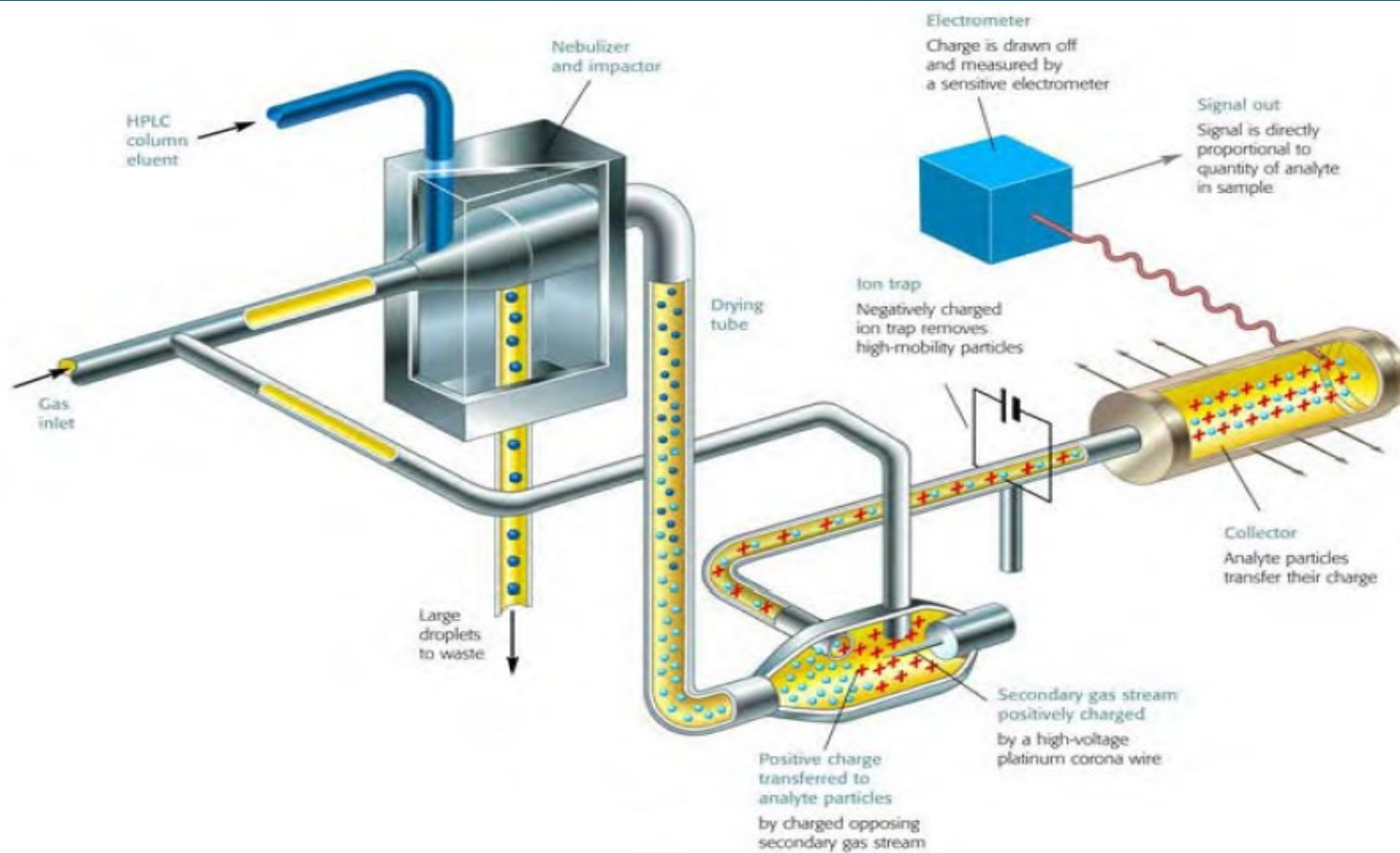
ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR



Kaddurah-Daouk R, et al. 2008.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48:653–83

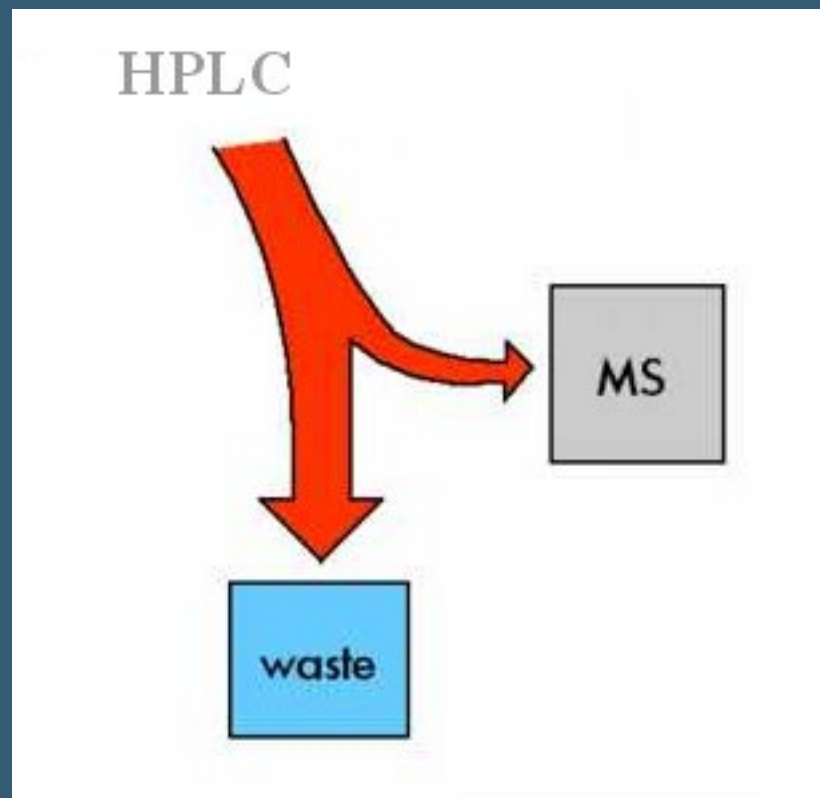
AEROSOLOVÝ DETEKTOR NABITÝCH ČÁSTIC



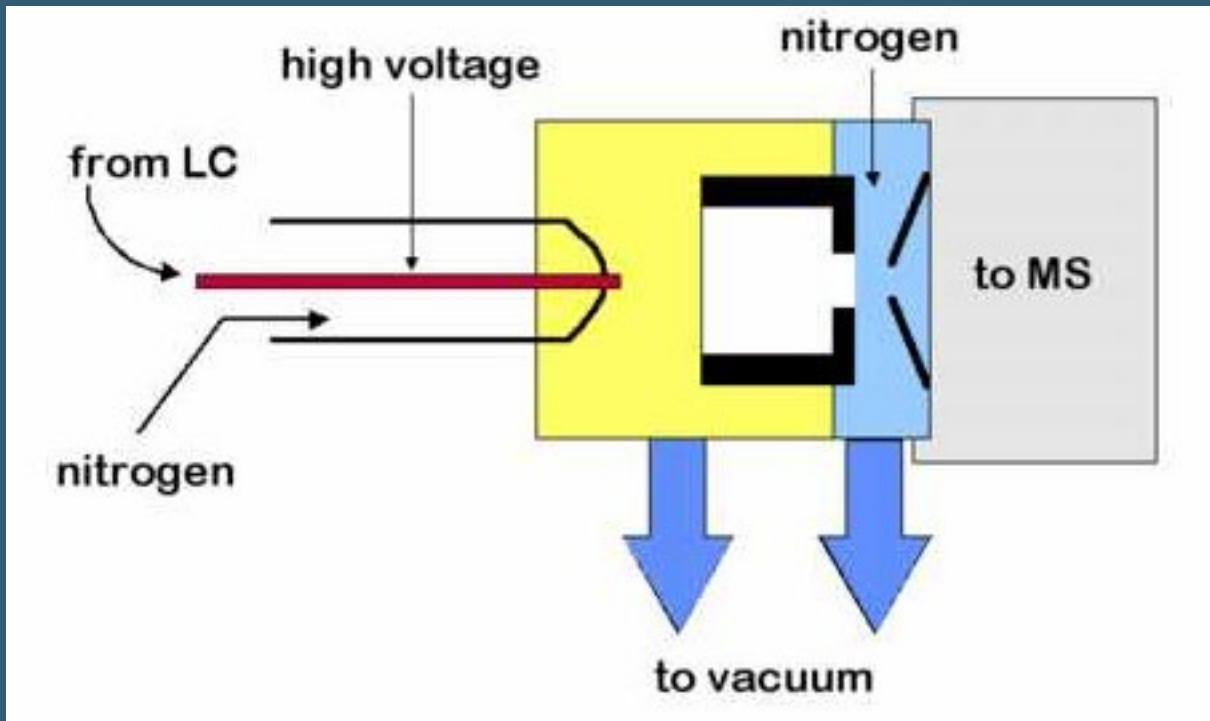
LC-MS

počet iontů

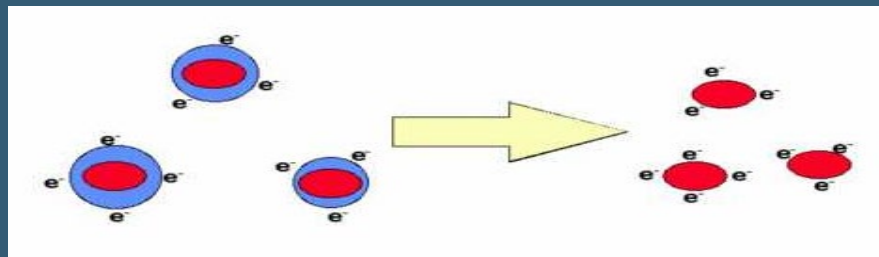
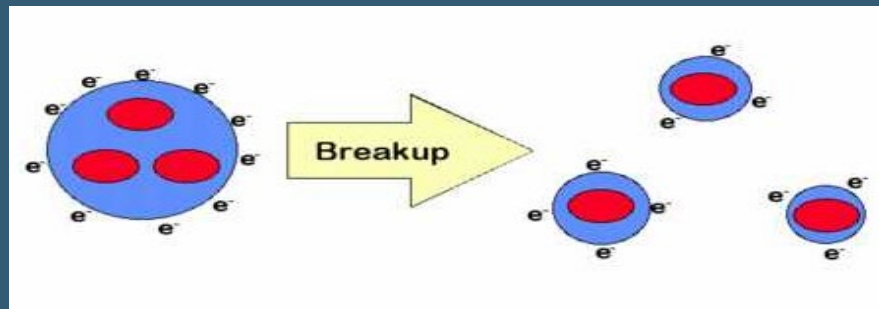
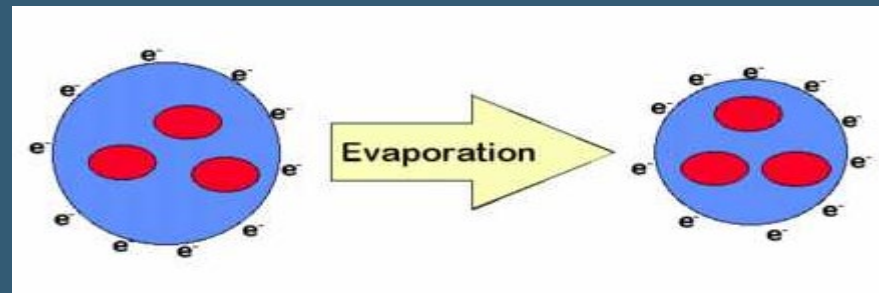
citlivost 10^{-13} g/ml



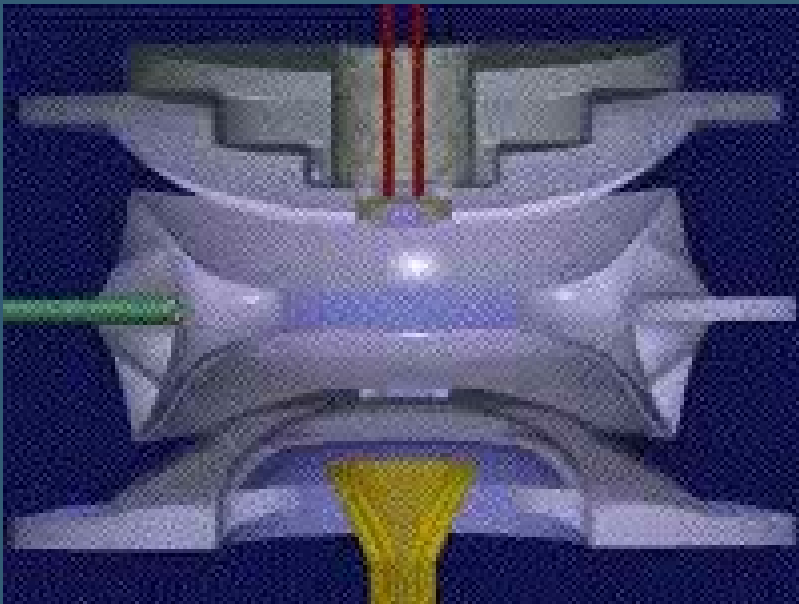
„ELECTROSPRAY“



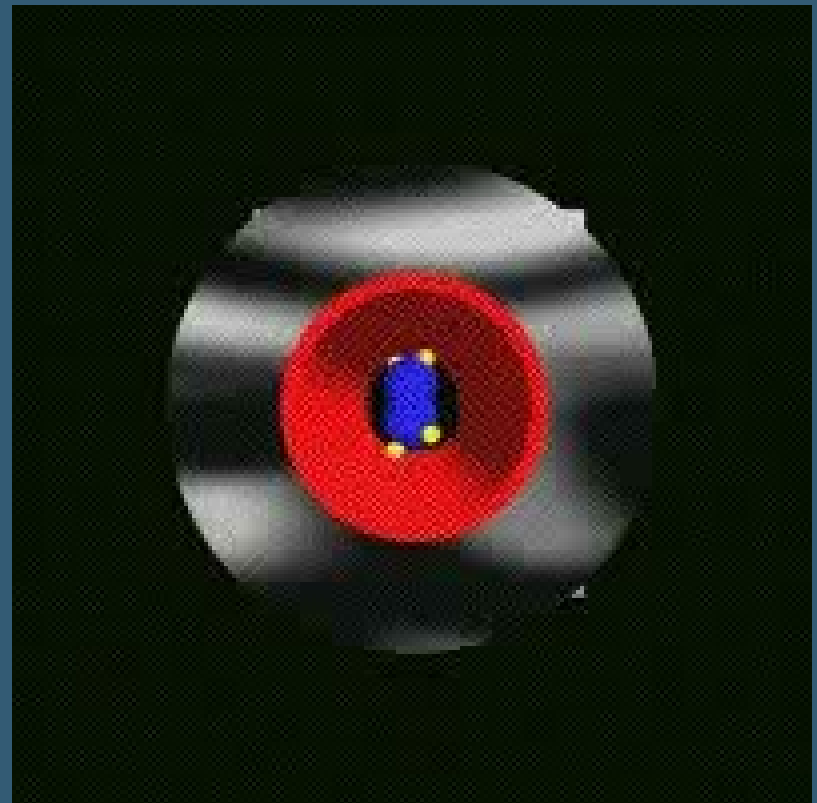
IONIZACE



ANALYZÁTOR

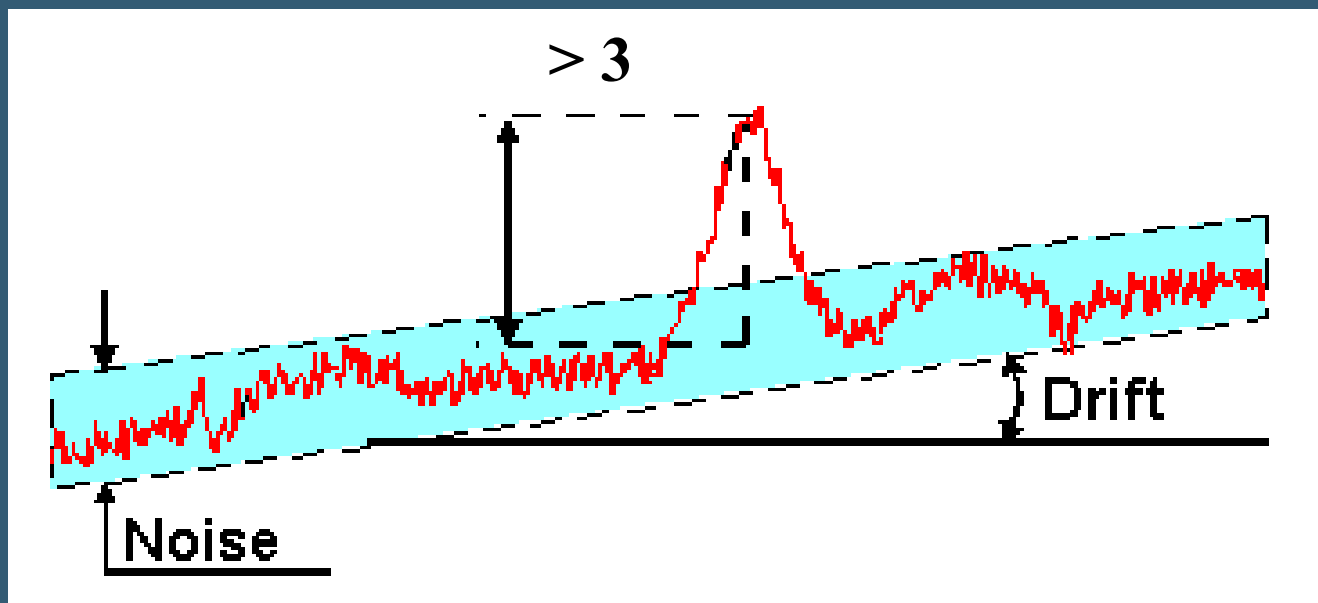


ION TRAP



KVADRUPOL

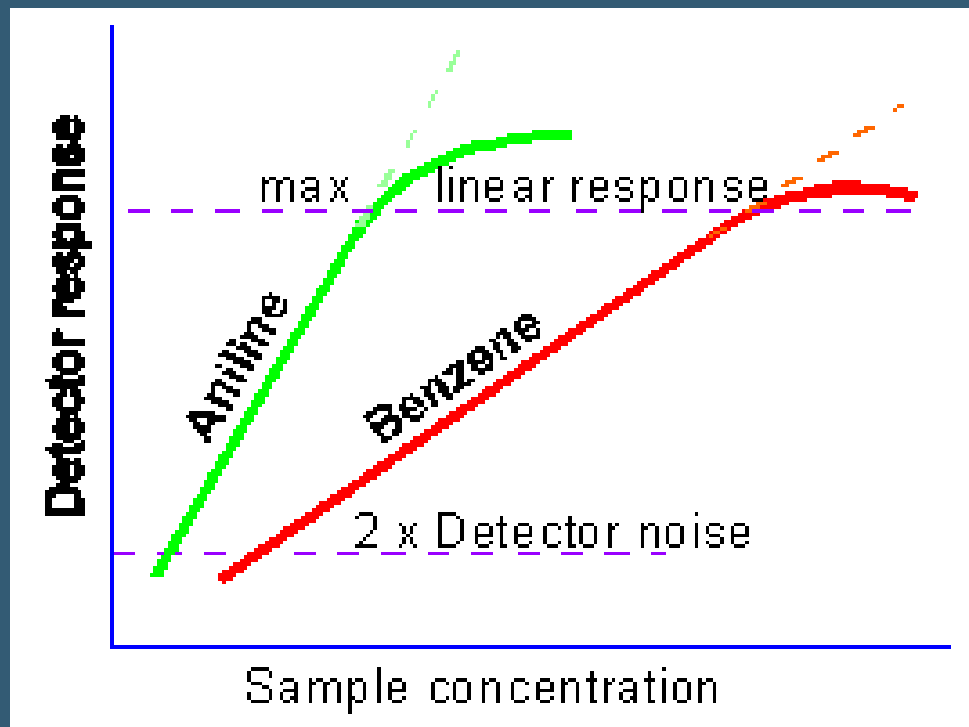
ŠUM A DRIFT DETEKTORU



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

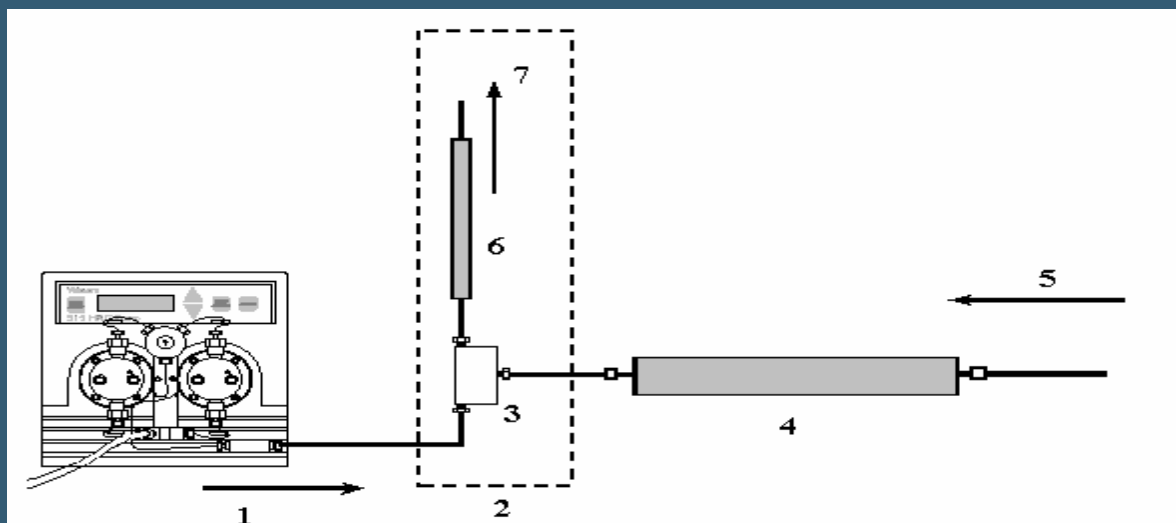
POŽADAVKY NA DERIVÁTY

- 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

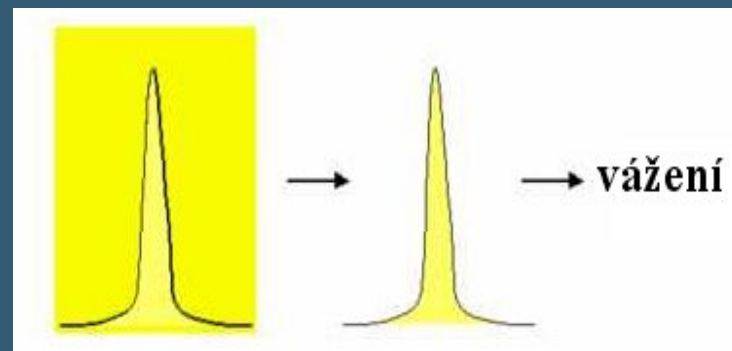
Jednostupňová postkoloná derivatizace

VYHODNOCENÍ

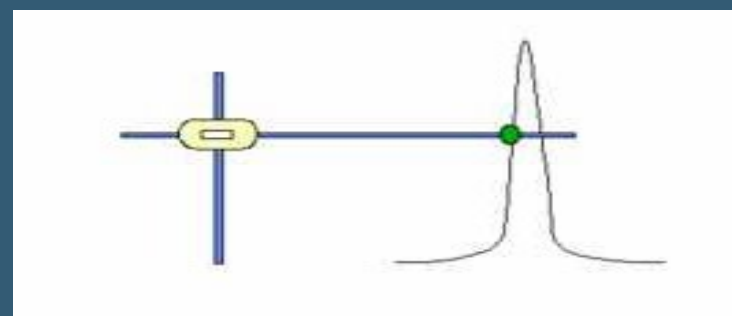
- Zapisovače
- Integratory
- Integrovaní software + PC

HISTORIE KVANTIFIKACE

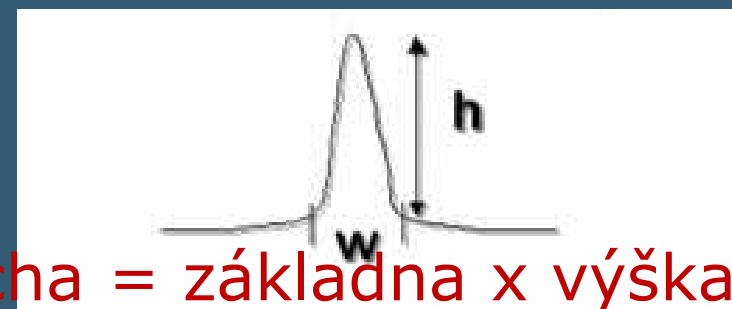
Zjištění plochy píků
u zapisovačů **vážením**



Zjištění plochy píků
u zapisovačů
planimetrem

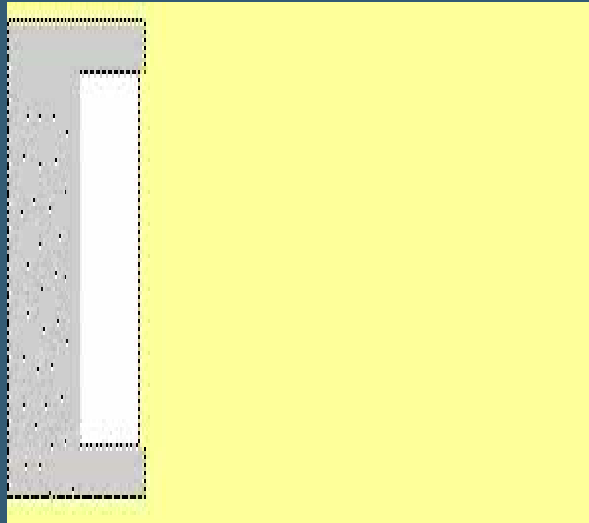


Zjištění plochy píků
u zapisovačů **výpočtem**



plocha = základna x výška

INTEGRATOR



PROVEDENÍ

- Analytické
- Preparativní

ANALÝZA KVALITATIVNÍ

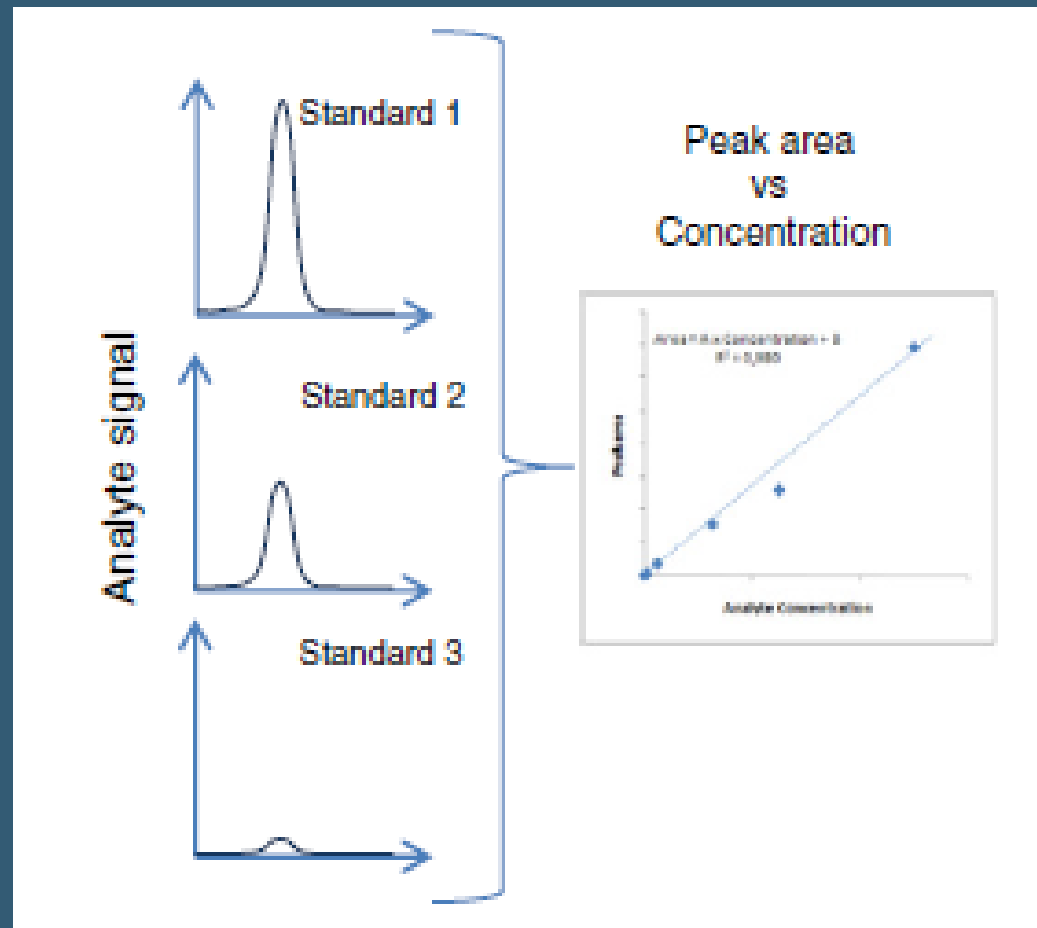
- Srovnání retenčních časů (objemů) píků u vzorku a standardů
- „spiking“ – přidání standardu do vzoru → nárůst výšky píků
- Specifická detekce – UV-VIS, fluorescence, elektrochemická
- MS

ANALÝZA KVANTITATIVNÍ



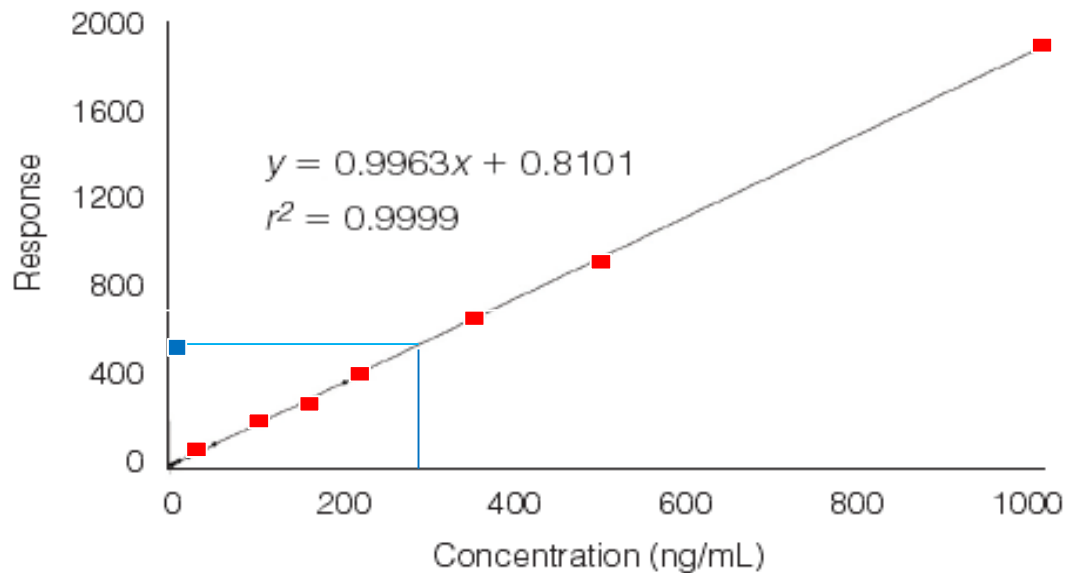
Plocha (výška) píku

METODA EXTERNÍHO STANDARDU



METODA EXTERNÍHO STANDARDU

Figure 1: Calibration plot of response versus concentration.



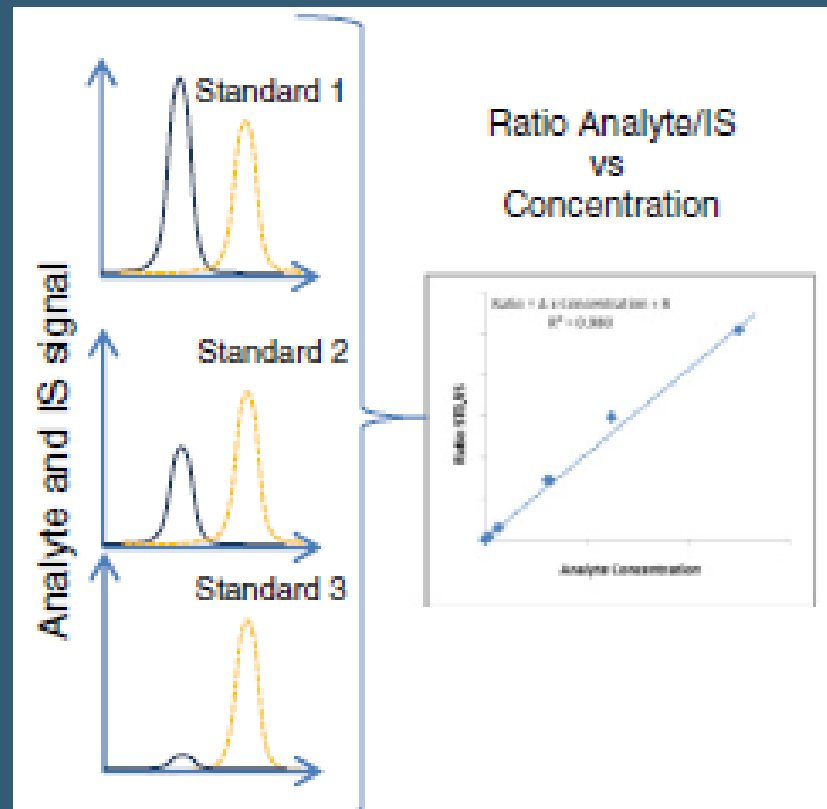
METODA VNITŘNÍHO STANDARDU

Kvantitace + eliminace chyb při přípravě vzorku

Vnitřní (Interní) standard IS

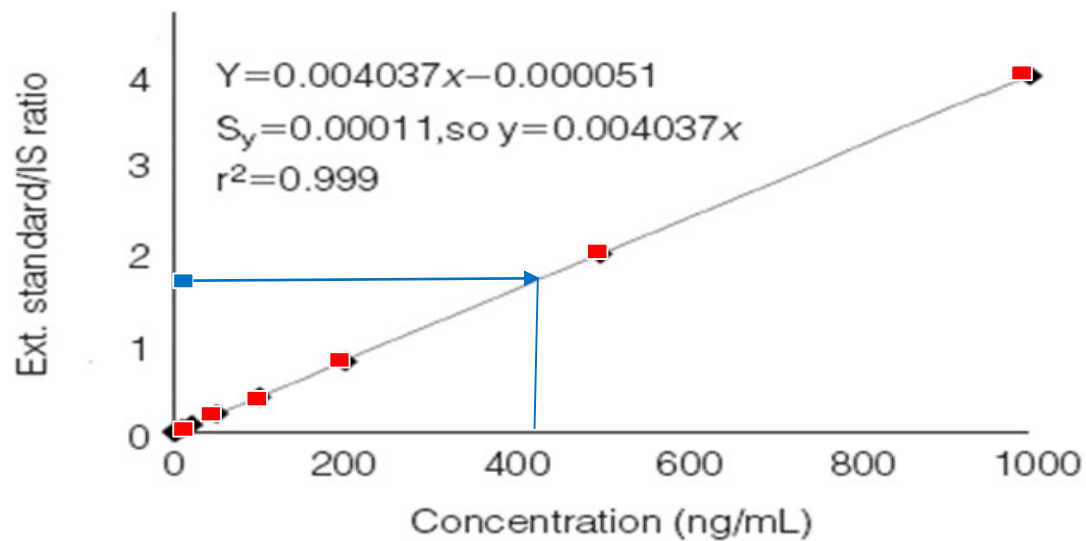
- nesmí být přítomna v původním vzorku
- nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku
- musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku
- musí se eluovat v blízkosti stanovované složky

METODA VNITŘNÍHO STANDARDU

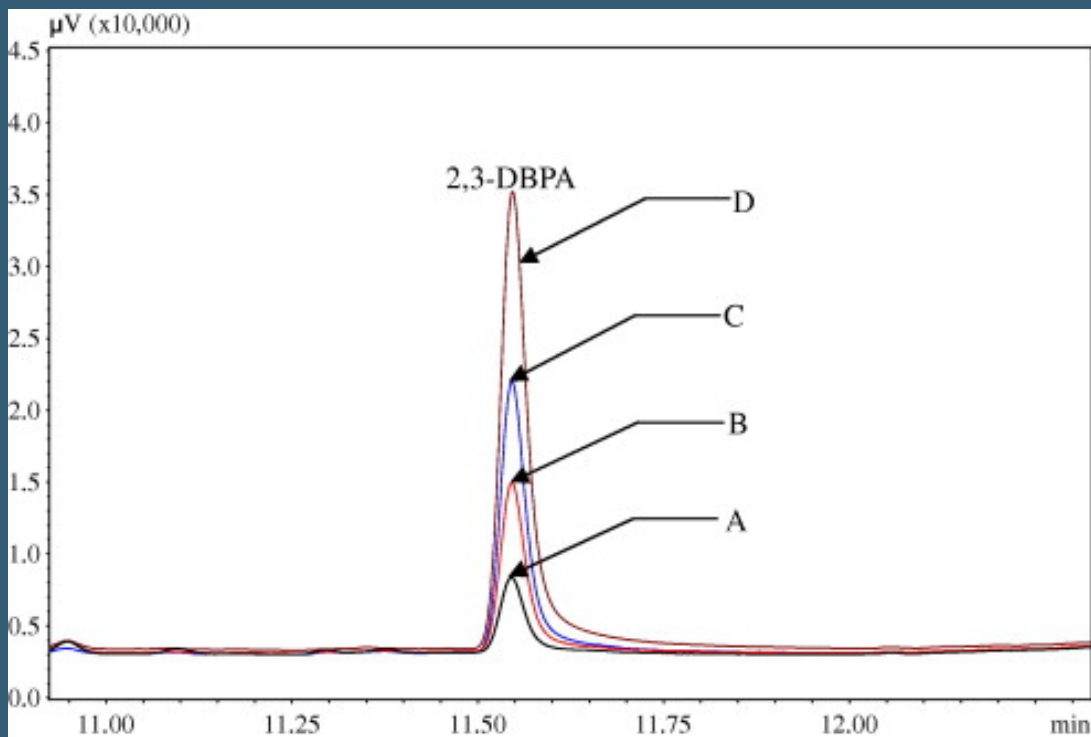


METODA VNITŘNÍHO STANDARDU

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

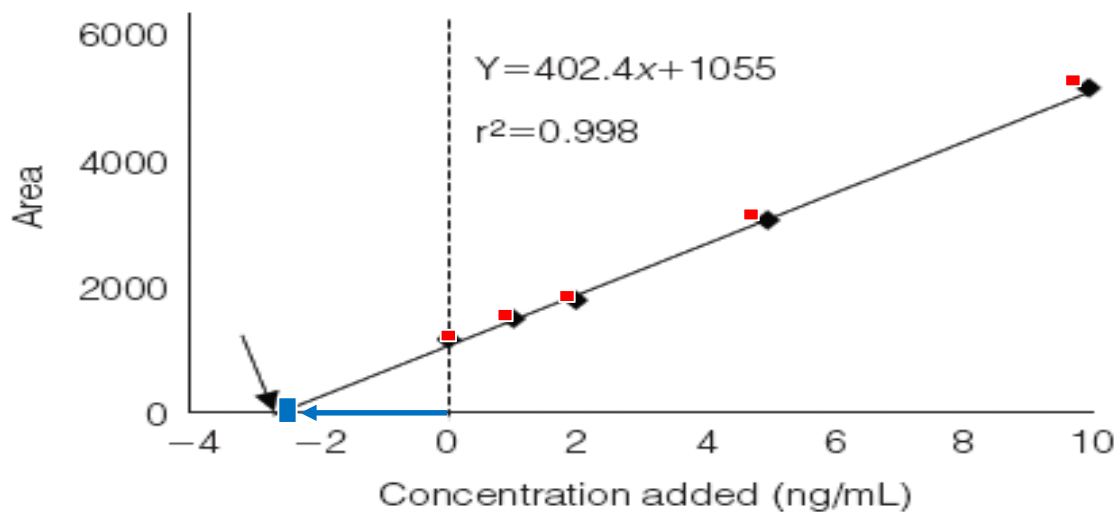


METODA STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU

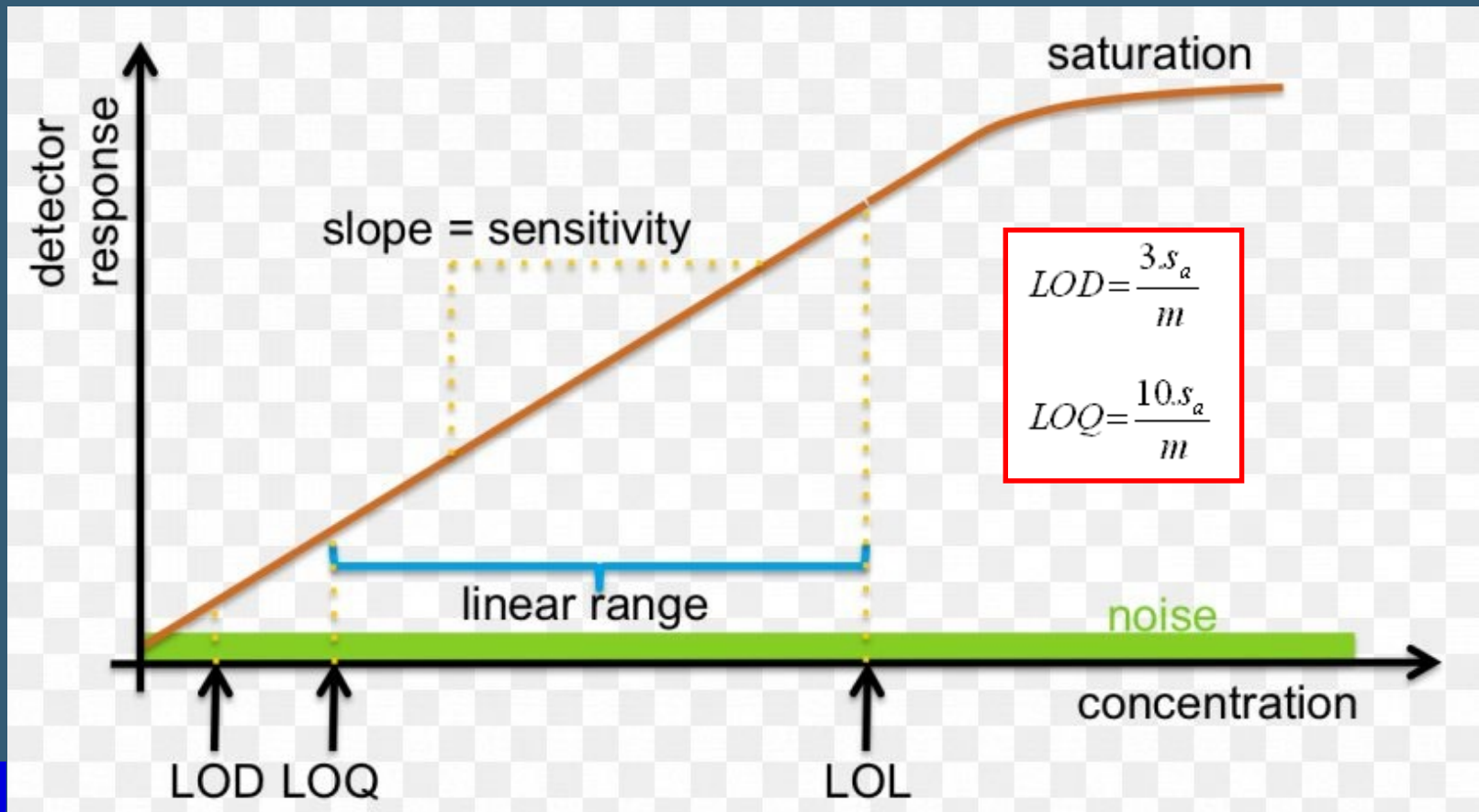


METODA STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU

Figure 3: Standard additions calibration plot from data in Table 1.



DŮLEŽITÉ KVANTATIVNÍ PARAMETRY



LC ANALÝZA

