

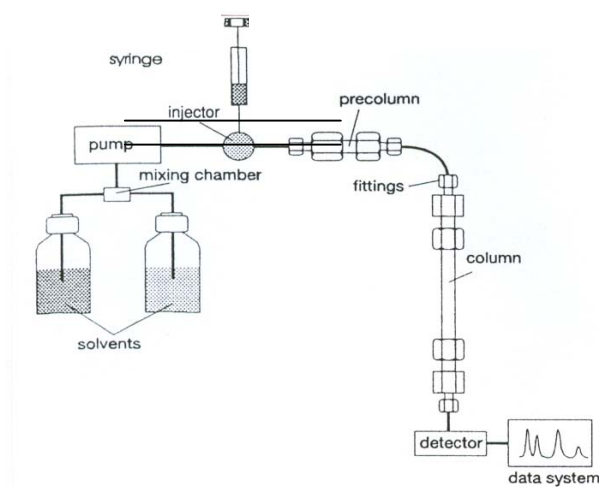
VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)

HPLC = *high performance liquid chromatography*
high pressure liquid chromatography

Separační principy kapalinové chromatografie

- adsorpce: anorg. sorbenty – Al_2O_3 , SiO_2 – klasická *adsorpční chromatografie* – chromatografie „na normální fázi“
- distribuce na základě rozdílné rozpustnosti: *rozdělovací chromatografie* – podle polaritý lze rozlišit
 - *chromatografii na „normální fázi“* (stacionární fáze je polární)
 - *chromatografii na „obrácené (reverzní) fázi“* (stac. f. nepolární)
- chemisorpce iontů, iontová výměna: iontoměničová chromatografie (IEC = *ion exchange chromatography*)
- molekulové vylučování, síťový efekt: gelová (permeační) chromatografie (GPC = *gel permeation chromatography*, *gel chromatography*, SEC = *size exclusion chromatography*)
- biospecifická interakce: *(bio)afinitní chromatografie*

Schéma kapalinového chromatografu



důležitý požadavek: minimální mrtvý objem aparatury

Jednotlivé části kapalinového chromatografu a jejich funkce

Zásobník(y) mobilní fáze

- zpravidla skleněné láhve s přívodní kapilárou z PTFE a filtrační fritou
- probublávání heliem (odstranění rozpuštěných plynů)

Vysokotlaké čerpadlo

Čerpadla isokratická (pro *isokratickou eluci*)

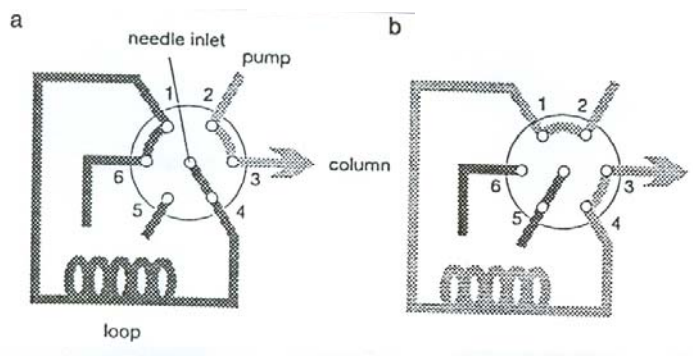
gradientová (pro *gradientovou eluci*, eluci s programovaným složením mobilní fáze: binární, ternární, kvarternární)

požadavky na kvalitní čerpadlo

- stálý průtok (0,01-10 ml/min), minimální tlakové pulsy
- chemická inertnost materiálů (ocel, PEEK)
- tlak běžně do 15 MPa
- automatické vypnutí při překročení nastaveného tlakového limitu
- (přesná tvorba gradientu)

Nástřikové zařízení (injektor)

obvykle šesticečný dávkovací ventil se smyčkou definovaného objemu



Nastřikovaný objem (řídí se rozměry kolony)

- 5-50 μl (většina analytických aplikací)
- 200 μl – 2 ml (semipreparativní a preparativní účely)

Předkolona

má ochrannou funkci, chrání kolonu před látkami s velmi silnou retencí; může a nemusí být instalována

Analytická kolona (může být uložena v termostatované skříni)

Rozměry

- obvykle délka 10-25 cm, vnitřní průměr 2-8 mm (nejčastěji 250x4,6 mm)
- větší průměry a délky u preparativních kolon

Materiály

- nerezavějící ocel, titanová ocel
- sklo, ocelový plášť
- PEEK (polyetheretherketon)

Spojovací kapiláry

- z nerezavějící oceli nebo PEEKu
- spojují čerpadlo s předkolonou, předkolonu s kolonou, kolonu s detektorem

Detektor

průběžně měří analytický signál (index lomu, absorbanci, emisi záření el. proud, vodivost, proud iontů...) efluentu nejčastěji v průtočné cele

Druhy detektorů používané v LC

Detektor	selektivita	citlivost	pozn.
refraktometrický (RID)	neselektivní a univerzální	malá	jen pro isokratickou eluci
spektrofotometrický (UV, UV/VIS)	selektivní	dosti vysoká	
fluorimetrický (FLD)	velmi selektivní	velmi vysoká	
amperometrický (elektrochemický, ECD)	velmi selektivní	velmi vysoká	
vodivostní	neselektivní	vysoká	
hmotnostní spektrometr (MS)	univerzální a velmi selektivní	velmi vysoká	

Další možnost detekce:

derivatizace tj. chemická konverze analytu na derivát s vhodnými spektrálními nebo elektrochemickými vlastnostmi; může být předkolonová nebo pokolonová

Sběrač frakcí

na konci chrom. aparatury, která je určena k preparativním účelům

Adsorpční a rozdělovací kapalinová chromatografie

Stacionární fáze

tuhé stacionární fáze mohou být z hlediska velikosti a pórovitosti:

- klasické pórovité (velikost 25-80 μm)
- pelikulární (film polymerní stacionární fáze je nanesen na povrchu kulové částice anorganického nosiče)
- povrchově pórovité (na neporézní jádro je nanesená pórovitá vrstva anorganického materiálu případně s chemicky vázanou stac. fází – průměr 25-80 μm)
- pórovité mikropartikulární (průměr 2-20 μm): vysoký specifický povrch $\Rightarrow$ vysoká kapacita, retence a účinnost ale u velmi malých částic vysoký odpor $\Rightarrow$ vysoký pracovní tlak

Polární stacionární fáze

klasické anorganické sorbenty

- Al_2O_3 , SiO_2
- Florisil MgSiO_3 , MgO , hydroxyapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (používají se v nízkotlaké chromatografii)

Chromatografie na polárních stacionárních fázích

= *chromatografie na normální fázi*

Vysokou afinitu k polární stacionární fázi mají polární analyty (budou mít největší retenci). Přibližné pořadí retence tříd organických látek:

sulfokyseliny > karboxylové kyseliny > fenoly > alkoholy > amidy
karboxylových kyseliny > primární aminy > aldehydy > ketony >
estery karboxylových kyselin > nitrosloučeniny > nitrily > terc. aminy
> ethery > halogenderiváty > aromatické uhlovodíky > alifatické uhlovodíky

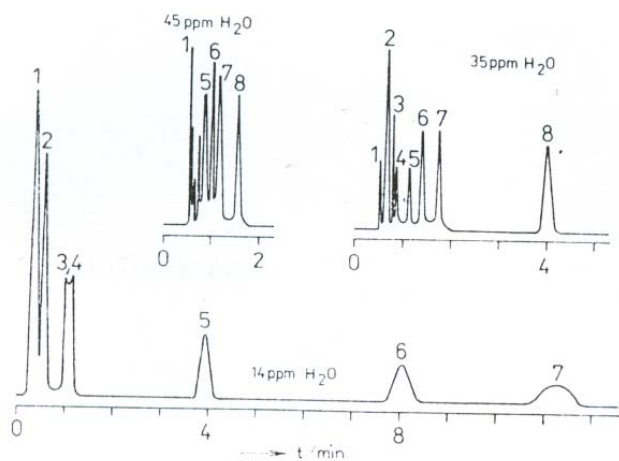
Mobilní fáze je nepolární rozpouštědlo nebo směs několika nepolárních rozpouštědel.

Eluční sílu mobilní fáze lze odhadnout podle postavení příslušného rozpouštědla v tzv. *eluotropní řadě* rozpouštědel

Rozpouštědlo	Index polarity P'	Eluční síla (SiO ₂)	t.v. (°C)	$\lambda_{\min}$ (nm)
fluoroalkany	<-2	-0,2		200
cyklohexan	0,04	0,03	80,7	200
n-hexan	0,1	0,01	69	200
tetrachlormethan	1,6	0,11	76	265
diisopropylether	2,4	0,22	67,8	220
toluen	2,4	0,22	111	285
diehylether	2,8	0,38	35	202
dichlormethan	3,1	0,34	40	233
tetrahydrofuran	4,0	0,35	66	230
chloroform	4,1	0,26	61	245
ethanol	4,3	0,68	78	205
octová kyselina	4,4	0,38	118	230
dioxan	4,8	0,49	101	215
methanol	5,1	0,73	65	208
acetonitril	5,8	0,50	82	212
nitromethan	6,0	0,49	101	380
voda	10,2	vysoká	100	190

Poznámka: pořadí eluční síly při chromatografii na nepolární stacionární fázi (v systému obrácených fází) bude opačné

Retenci látek na polárním adsorbentu lze ovlivnit nejen druhem mobilní fáze, ale také *aktivitou adsorbentu*, která souvisí se zbytkovým obsahem vody v adsorbentu.

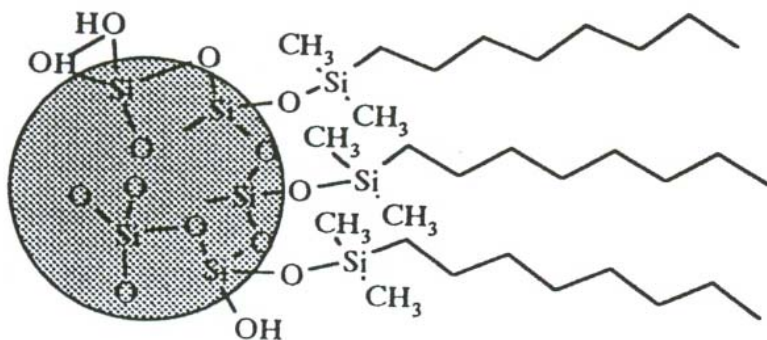


Chromatografie uhlovodíků na Al_2O_3 různé aktivity
kolona $150 \times 4,1$ mm, zrnitost $5 \mu\text{m}$
mobilní fáze: heptan

1 – tetrachlorethylen, 2 – benzen,
3 – naftalen, 4 – bifenylyl, 5 – anthracen,
6 – pyren, 7 – fluoranthen,
8 – 1,2-benzanthracen

Nepolární stacionární fáze

- nepolární sorbenty: uhlí, polyamidy, polystyreny
- *nepolární chemicky vázané fáze*, které vznikají chem. modifikací silikagelu (tj. kovalentní vazbou hydrofobních skupin na silanolové skupiny povrchu); nejčastěji používané typy jsou
 - oktadecylovaný silikagel (SiC_{18})
 - oktylovaný silikagel (SiC_8)
 - silikagel hydrofobizovaný vazbou fenylové skupiny (SiPhe)

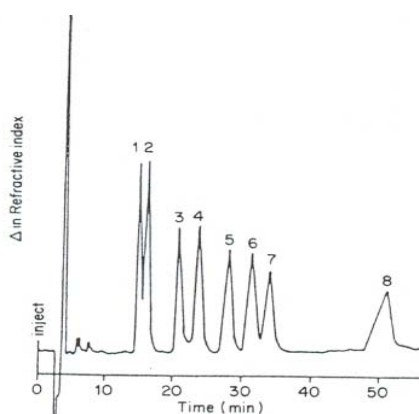


Chromatografie na nepolárních stacionárních fázích

= *chromatografie na obrácené (reverzní) fázi*

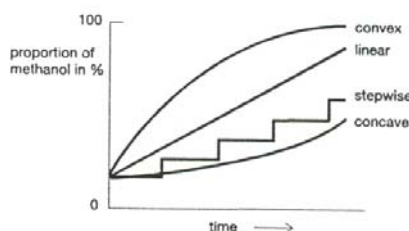
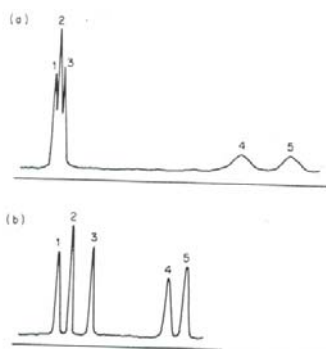
Na nepolární stacionární fázi (např. na oktadecylovaném silikagelu) je chování analytů je opačné vzhledem k chování na silikagelu. Jako mobilní fáze se používá směs polárních rozpouštědel: voda-metanol, voda-acetonitril, voda-isopropylalkohol..., vodná složka může obsahovat rozpuštěnou látku (sůl, kyselinu...)

Chromatografie na obrácené fázi je dnes mnohem častěji aplikována, než chromatografie na normální fázi. Důvodem jsou menší problémy (vyšší teploty varu a menší hořlavost rozpouštědel).



RP-HPLC nederivatizovaných mastných kyselin:
 kolona Lichrosorb RP-8, 250×4,6mm×10 μm
 mobilní fáze: THF-CH₃CN-H₂O (3:67:30) + 0,1 %
 CH₃COOH, průtok 1,3 ml/min
 refraktometrická detekce
 píky:
 1 – linolenová kys., 2 – myristová kys.,
 3 – linolová kys., 4 – linoelaidová kys.,
 5 – palmitová kys., 6 – olejová kys.,
 7 – elaidová kys., 8 – stearová kys.

Optimálního rozlišení a přijatelné doby analýzy se dosahuje použitím *gradientové eluce* (v tomto případě dochází ke zvýšení eluční síly mobilní fáze zvýšením podílu méně polární složky a snížením obsahu vody v mobilní fázi)



Chromatografie na měničích iontů

Měníče iontů (ionexy) jsou stacionární fáze na bázi silikagelu nebo organických polymerů (styren-divinylbenzenové, methakrylátové polymery) s vázanými polárními funkčními skupinami (kyselými nebo bazickými), které mohou vlastní protiion vyměňovat s iontem v mobilní fázi

- katexy (měniče kationtů)
 - silně kyselé: funkční skupiny $-\text{SO}_3^- \text{H}^+$ (v H^+ cyklu)
 - slabě kyselé: funkční skupiny $-\text{COO}^- \text{H}^+$ (v H^+ cyklu)
- anexy (měniče aniontů)
 - silně bazické: funkční skupiny $-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}_3 \text{Cl}^-$ (v Cl^- cyklu)
 - slabě bazické: funkční skupiny např. $-\text{NH}^+\text{R}_2 \text{Cl}^-$ (v Cl^- cyklu)

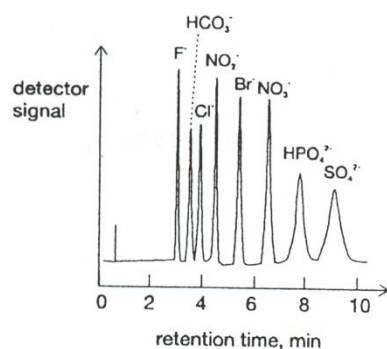
Stanovení anorganických iontů iontovou chromatografií

Detekce: vodivostní, vodivostní se supresorem
spektrofotometrická (pokolonová derivatizace)
nepřímá spektrofotometrická

Kationty: dělení na katexu

Ni, Mn, Co, Cu, Fe, Zn lze dělit na anexu ve formě chlorokomplexů (postupná eluce roztoky HCl s klesající koncentrací)

Anionty: dělení na anexu, eluce roztokem NaOH (gradient) nebo $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$



Dělení aniontů anorganických kyselin na anexu
mobilní fáze: 2,8 mM NaHCO_3 + 2,3 mM Na_2CO_3

Stanovení organických látek iontovou chromatografií

- stanovení aminokyselin (detekce poklonovou derivatizací s ninhydrinem...)
- dělení peptidů a bílkovin (podle isoelektrického bodu)
- stanovení monosacharidů a oligosacharidů
- další látky (hydrofilní vitaminy, organické kyseliny, nukleotidy...)

Gelová chromatografie

V gelové chromatografii dochází k dělení látek podle jejich molekulové hmotnosti (resp. podle velikosti molekuly). Roztok separovaných látek prochází vrstvou gelu (v koloně nebo tenké vrstvě) a molekuly podle své velikosti pronikají do pórů v částicích gelu. Větší permeace je umožněna menším molekulám, které pak mají větší eluční objem. Velmi malé molekuly vykazují tzv. *totální permeaci* (úplný průnik) do pórů gelu a jsou eluovány ještě později. V určitém intervalu molekulových hmotností dochází k *selektivní permeaci*. Naopak velké molekuly pronikají do pórů v gelových částicích méně a od určité meze (*vylučovací limit*, *exkluzní limit*) do pórů vůbec nepronikají. Látky, které velikostí své molekuly převyšují vylučovací limit jsou eluovány v mrtvém objemu.

Základní vztahy

celkový objem kolony s gelovou náplní

$$V_t = V_0 + V_p + V_g$$

V_0 je mrtvý objem (objem kapaliny nacházející se mezi částicemi gelu)

V_p je objem kapaliny v pórech gelových částic

V_g je objem gelových částic

Eluční objem látky se v gelové chromatografii pohybuje v mezích V_0 až $V_0 + V_p$.

$$V_E = V_0 + K \cdot V_p$$

konstanta K nabývá hodnot 0 až 1

$$K = 0 \Rightarrow V_E = V_0$$

totální exkluze, $M_r >$ vylučovací limit

$$0 < K < 1 \Rightarrow V_0 < V_E < V_0 + V_p$$

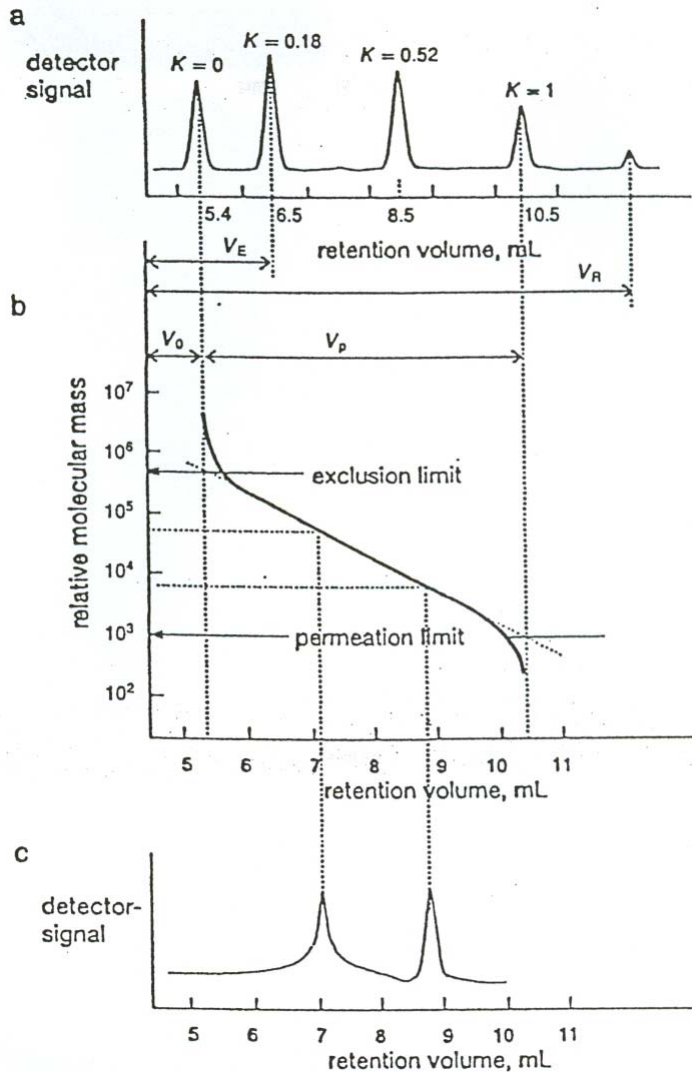
selektivní permeace, M_r je uvnitř frakcionačního rozsahu

$$K = 1 \Rightarrow V_E = V_0 + V_p$$

totální permeace, M_r se přibližně rovná spodní hranici frakcionačního rozsahu

Uvnitř frakcionačního rozsahu platí

$$\log M_r = a - b \cdot V_E$$



Vlastnosti gelů

- botnavost (ve vodě v organických rozpouštědlech)
- kompesibilita
- hydrofilnost/hydrofobnost
- frakcionační rozsah

Druhy náplní pro gelovou chromatografii

- modifikované polysacharidy
 - dextranové gely
 - Sephadex G10-G200
 - Sephadex LH 20
 - Superdex...
 - agarosové gely
- syntetické polymerní gely
 - polyakrylamidové gely
 - hydroxyalkylmethakrylátové gely (Spheron)
 - polystyrenové gely (Bio-Beads, Styragel)
 - polyvinylacetátové a polyethylenglykolové gely
- gely z kombinovaných polymerů (agarosa+polyakrylamid)
- gely na bázi pórovitého silikagelu a pórovitého skla

Mobilní fáze pro gelovou chromatografii

- vodné roztoky elektrolytů (NaCl + fosfátový pufr, Tris-HCl...) pro hydrofilní gely (přídavek NaN₃)
- organická rozpouštědla pro hydrofobní gely

Analytické využití gelové chromatografie

- separace, frakcionace a stanovení biopolymerů a biooligomerů (bílkovin, peptidů, sacharidů...) – dělené látky se musí lišit molekulovou hmotností alespoň o 10 %
- odhad molekulové hmotnosti dělených látek
- stanovení „polymerních“ lipidů v tucích
- čištění extraktů vzorků na hydrofobních gelech (odstranění lipidů)
- odsolování extraktů bílkovin (*gelová filtrace*)