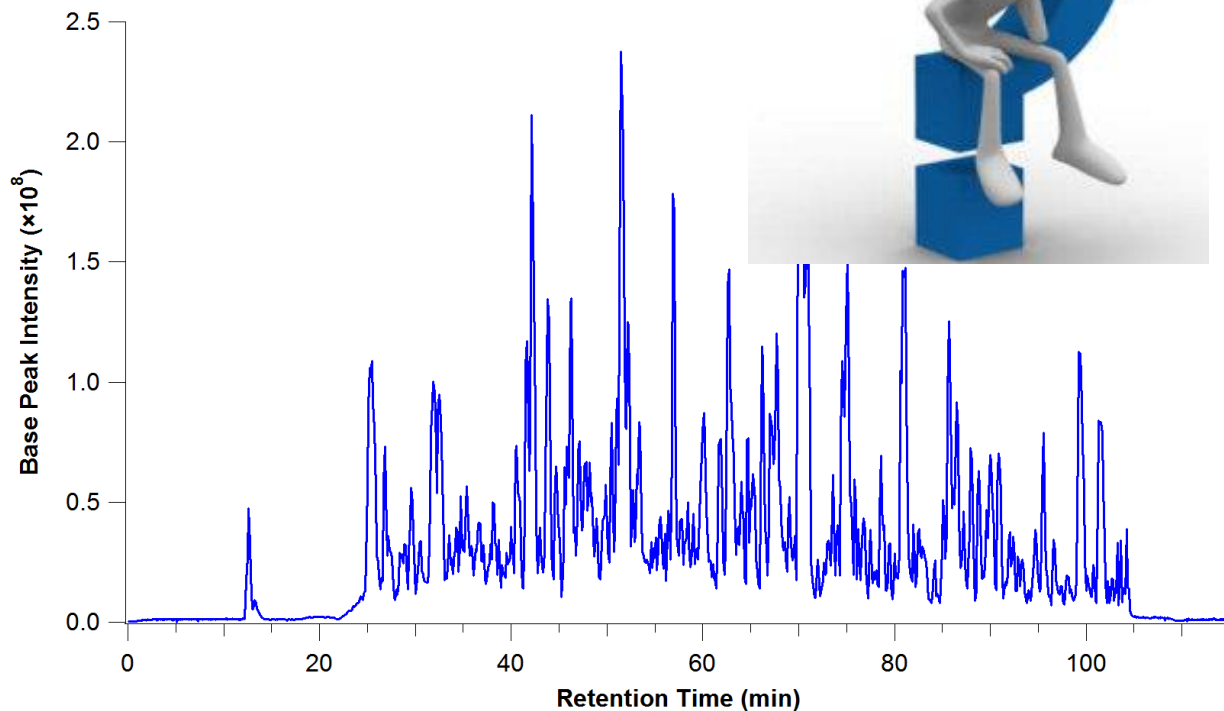


Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Petr Kozlík

Katedra analytické chemie

e-mail: kozlik@natur.cuni.cz



Sylabus přednášky:

Praxe v HPLC

- Mobilní fáze
- Chromatografická kolona
- Spoje v HPLC

Vývoj chromatografické metody

- Cíle metody
- Stacionární fáze
- Mobilní fáze
- Dávkování vzorku

Praxe v HPLC

Proč správná praxe v HPLC?

- Udržet HPLC systém v dobrém stavu
- Minimalizace finančních nákladů na opravu HPLC
- Ušetřit čas při řešení problému
- Porozumění činnosti HPLC

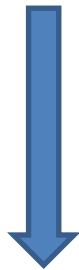
Praxe v HPLC

Mobilní fáze

čistota rozpouštědel: nutno používat rozpouštědla co nejvyšší čistoty

HPLC grade
HPLC gradient grade
HPLC LC-MS

další aditiva do MF (soli, iontopárová činidla atd.) musí být též nejvyšší kvality



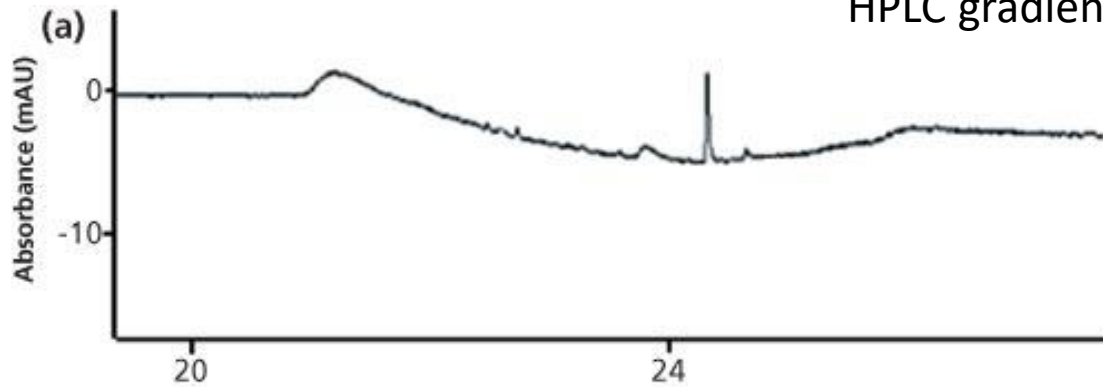
Nízká kvalita rozpouštědel a aditiv MF

- zvýší se šum, tím se sníží citlivost a limity detekce a kvantifikace
- mohou se objevit neznámé píky

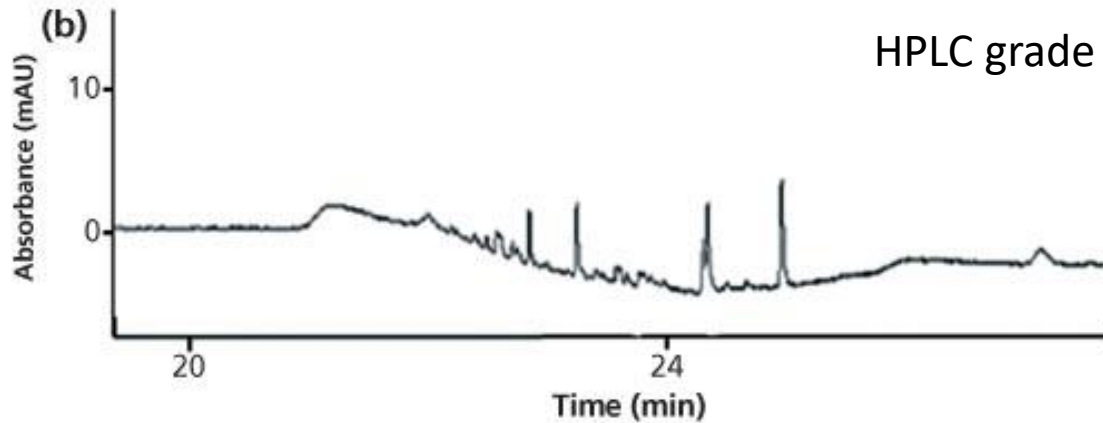
Praxe v HPLC

Mobilní fáze

HPLC gradient grade



HPLC grade



Praxe v HPLC

Mobilní fáze

Voda: musí se používat ultračistá voda – nejčastěji deionizovaná voda
destilovaná voda může obsahovat organické nečistoty

Uchování MF: **Ne** v plastových nádobách (kritické ve spojení s MS)

Uchovávat ve skleněných nádobách – **Ne dlouhodobě**

- adsorpce aditiv na povrch nádoby
- těkání nízkovroucích složek
- mikrobiální růst
- uvolňování silikátů ze skla

Praxe v HPLC

Mobilní fáze

Odstranění mechanických nečistot

Všechny připravené mobilní fáze filtrovat přes **filtr 0,45 μm** nebo menší (0,2 μm pro UPLC)



celulosové membránové filtry – vodné roztoky
teflonové membránové filtry – vodně-organické roztoky

Filtry MF v zásobnících MF



In line filtry



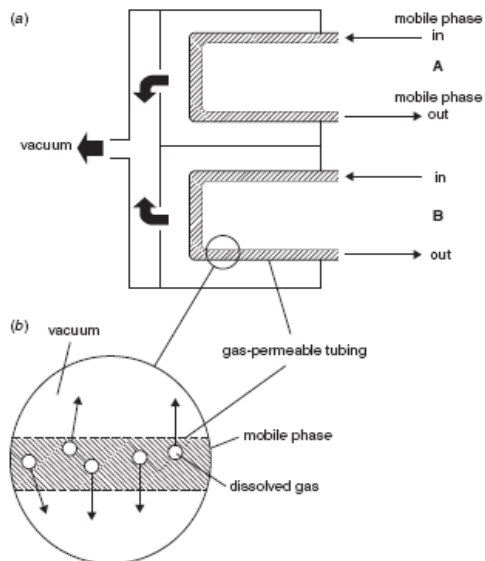
Praxe v HPLC

Mobilní fáze

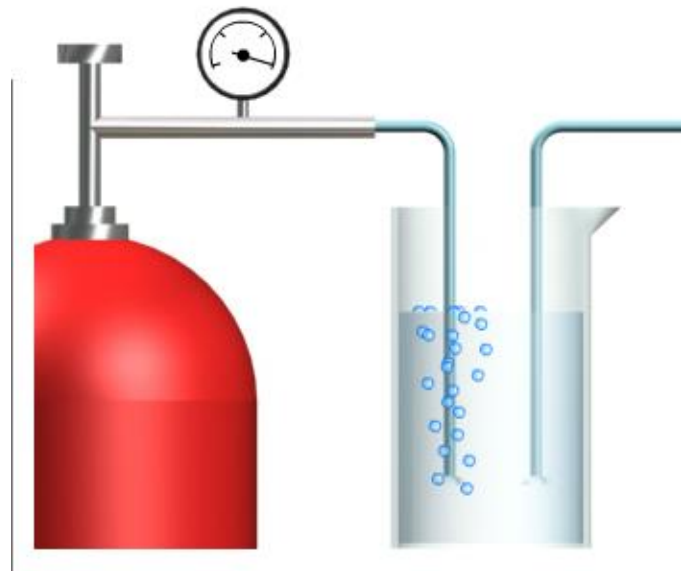
Odvzdušnění

- opakovatelné retenční časy
- nízký šum základní linie
- zvýšení citlivosti u některých detektorů (fluorescenční)

Membránový vakuový odplyňovač



Heliový odplyňovač



Praxe v HPLC

Mobilní fáze

Kompatibilita MF s detekcí

UV detekce:

Solvent	UV Cutoff (nm) ^a [2]
Acetone	330
Acetonitrile	190
1-Butanol	215
1-Chlorobutane	220
Chloroform	245
Cyclohexane	200
Dimethyl formamide	268
Dimethylsulfoxide	268
1,4-Dioxane	215
Ethyl acetate	256
Heptane	200
Hexane	195
Isooctane	215
Methanol	205
Methyl- <i>t</i> -butyl ether	210
Methylethyl ketone	329
Methylene chloride	233
<i>i</i> -Propanol	205
<i>n</i> -Propanol	210
Tetrahydrofuran	212
Toluene	284
Water	190

MS detekce a detektory na bázi aerosolu

Nutno používat těkavá aditiva:

- kyselina mravenčí
- kyselina octová
- amoniak
- mravenčan amonný
- octan amonný
- uhličitan amonný

Praxe v HPLC

Mobilní fáze

Mísitelnost mobilních fází

Výměna nemísitelných rozpouštědel
– nutno přes mezi krok

hexan – isopropanol - metanol

SOLVENT MISCIBILITY TABLE						
Solvent	Polarity Index	Refractive Index @20°C	UV(nm) Cutoff @1AU	Boiling Point(°C)	Viscosity (cPoise)	Solubility in water (%w/w)
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80	0.65	0.18
n-Butanol	4.0	1.394	254	125	0.73	0.43
Butyl Acetate	3.9	1.399	215	118	2.98	7.81
Carbon Tetrachloride	1.6	1.466	263	77	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.446	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.426	200	81	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane ¹	3.5	1.444	225	84	0.79	0.81
Dichloromethane ²	3.1	1.424	235	41	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.431	268	155	0.92	100
Dimethyl Sulfoxide ³	7.2	1.478	268	189	2.00	100
Dioxane	4.8	1.422	215	101	1.54	100
Ethanol	5.2	1.360	210	78	1.20	100
Ethyl Acetate	4.4	1.372	260	77	0.45	8.7
Di-Ethyl Ether	2.8	1.353	220	35	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.387	200	98	0.39	0.0003
Hexane	0.0	1.375	200	69	0.33	0.001
Methanol	5.1	1.329	205	65	0.60	100
Methyl-t-Butyl Ether ⁴	2.5	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl Ethyl Ketone ⁵	4.7	1.379	329	80	0.45	24
Pentane	0.0	1.358	200	36	0.23	0.004
n-Propanol	4.0	1.384	210	97	2.27	100
iso-Propanol ⁶	3.9	1.377	210	82	2.30	100
Di-iso-Propyl Ether	2.2	1.368	220	68	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	215	65	0.55	100
Toluene	2.4	1.496	285	111	0.59	0.051
Tichloroethylene	1.0	1.477	273	87	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100	1.00	100
Xylene	2.5	1.500	290	139	0.61	0.018

<input checked="" type="checkbox"/> Immiscible	Synonym Table
<input type="checkbox"/> Miscible	¹ Ethylene Chloride
	² Methylene Chloride
	³ Methyl Sulfoxide
	⁴ tert-Butyl Methyl Ether
	⁵ 2-Butanone
	⁶ 2-Propanol

Immiscible means that in some proportions two phases will be produced

Praxe v HPLC

Mobilní fáze

Pufrované mobilní fáze

Vhodné používat v oblasti $pK_a \pm 1$, kdy je dosaženo největší pufrovací kapacity.

Příprava pufru

- Smíchání vypočteného množství kyseliny a báze (podle požadovaného pH a iontové síly)
- Navážením vypočteného množství kyseliny (báze) a dotitrováním pomocí báze (kyseliny) na požadované pH

!Pozor na precipitaci pufru v organické složce MF!

Praxe v HPLC

Mobilní fáze

běžně používané kyseliny v HPLC

Kyselina	Teplota (°C)	pK ₁	pK ₂	pK ₃
ACES 2-[(2-amino-2-oxoethyl)amino]ethan sulfonová kyselina	20	6.90	-	-
CAPS 3-(cyklohexylamino)ethan sulfonová kyselina	20	10.40	-	-
Glycin	25	2.34	9.60	-
Glycylglycin	20	8.40	-	-
HEPES N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethan sulfonová kyselina	20	7.55	-	-
Imidazol	20	7.00	-	-
Kyselina boritá	20	9.14	12.74	13.8
Kyselina citronová	25	3.13	4.76	6.40
Kyselina fosforečná	25	2.12	7.21	12.67
Kyselina mravenčí	20	3.75	-	-
Kyselina octová	25	4.75	-	-
Kyselina šťavelová	25	1.27	4.28	-
Kyselina trifluoroctová	25	0.30	-	-
Kyselina trichloroctová	25	0.50	-	-
Kyselina uhličitá	25	6.37	10.25	-
MES 2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina	20	6.15	-	-
MOPS 3-(N-morfolino)propan sulfonová kyselina	20	7.20	-	-
TES 2-[tris(hydroxymethyl)methyl]aminoethan sulfonová kyselina	20	7.50	-	-
Tricin N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin	20	8.15	-	-
TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan	20	8.30	-	-

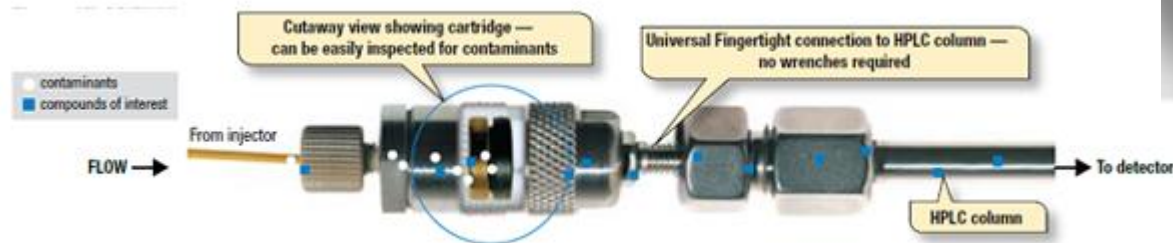
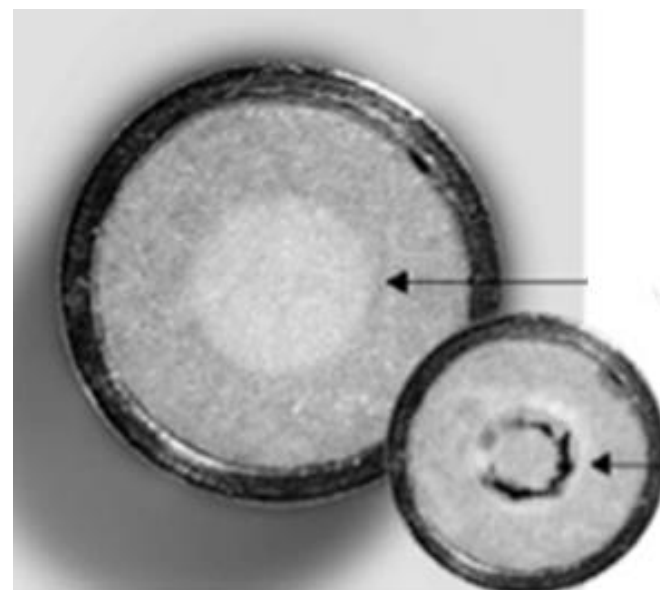
Praxe v HPLC

Chromatografická kolona

Nová kolona je uchována v rozpouštědle podle výrobce (Acetonitril, isopropanol)

Jak se chovat ke koloně?

- Kolonu nenechat vyschnout!
- Kolonu uchovávat v doporučeném rozpouštědle
- Kolonu uchovávat uzavřenou originálními zásepkami
- Chránit kolonu před nárazy
- Na konci analýzy kolonu promýt silným elučním činidlem
- U aplikacích reálných vzorků používat předkolonky



Praxe v HPLC

Chromatografická kolona

Kolony mají omezení tlakové, teplotní, rozsah pH a typ přípustných rozpouštědel (vše podle výrobce)

Kolony na bázi silikagelu: pH 2-8; teplota < 60 °C.

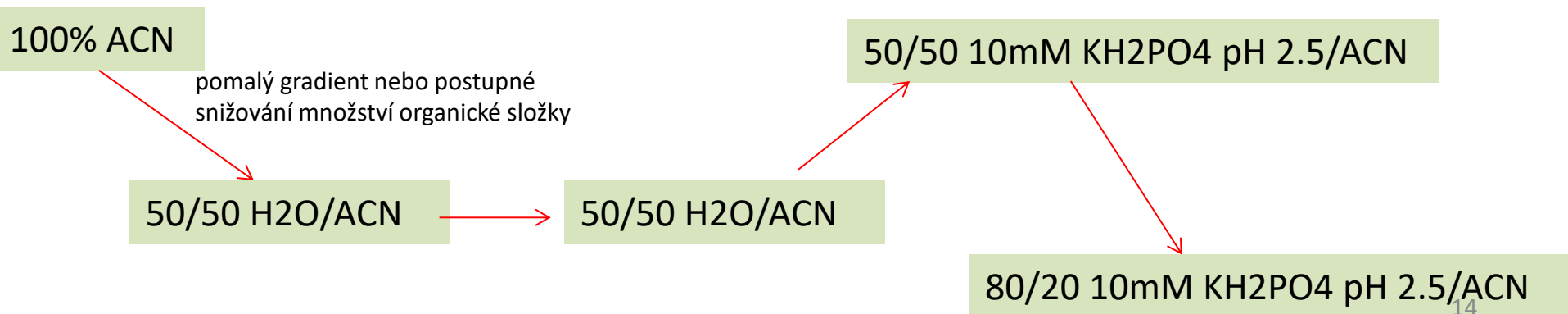
Kolony na bázi hybridních sorbentů, oxid zirkoničitý, grafitový uhlík: pH 1-13; teplota < 80 °C.

Ekvilibrace kolony:

nutná před každým použitím kolony

nutná kompatibilita rozpouštědla určeného k uchování kolony a použité MF

Příklad ekvilibrace: kolona uložena ve 100% ACN; MF: 80/20 (v/v) 10mM KH₂PO₄ pH 2.5/ACN



Praxe v HPLC

Spoje v HPLC

špatné spojení a špatné vnitřní průměry kapilár způsobují:

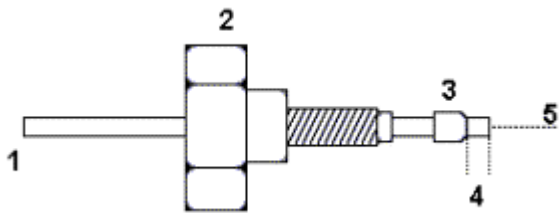
- rozšiřování elučních zón
- netěsnost v systému
- velký tlakový spád
- zvýšení šumu základní linie



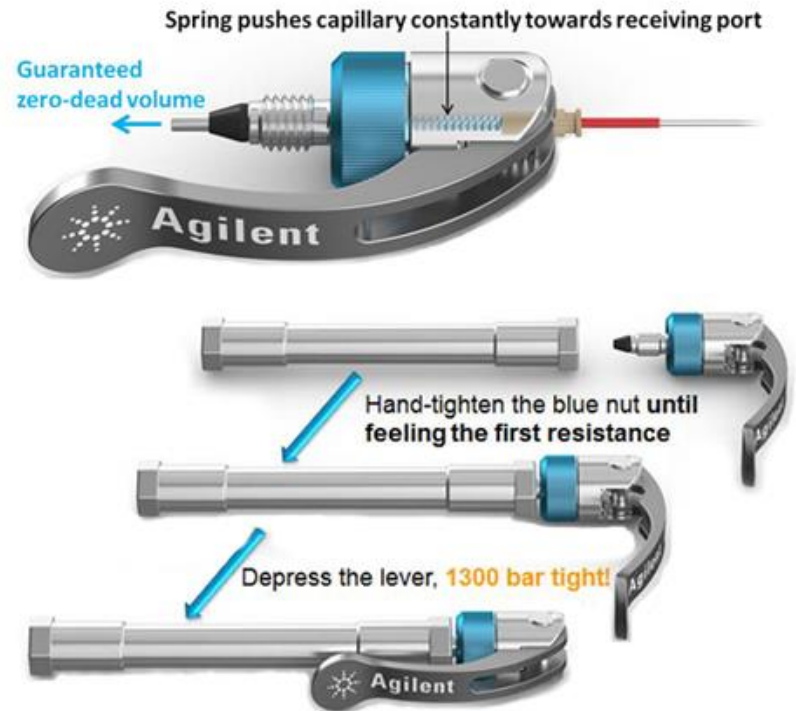
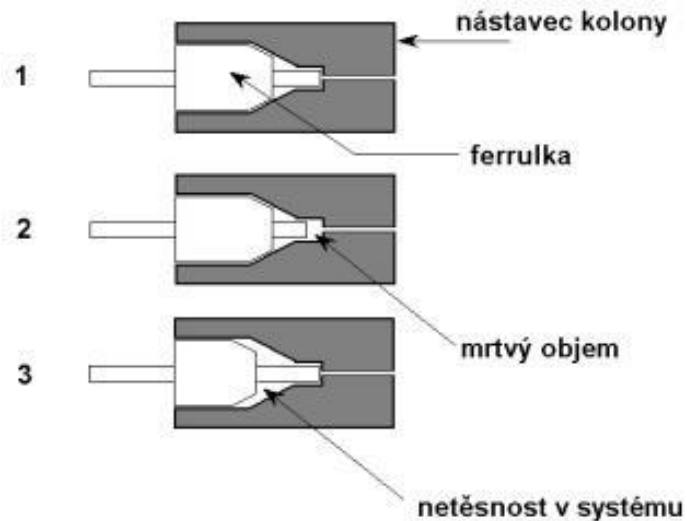
		rozměry		barevné označení PEEK kapilár
palce	"	mm		
1	=	25,3999560		
0,062	1/16"	1,59		přírodní
0,055	1/18"	1,40		přírodní
0,040	1/25"	1,00		přírodní
0,030	1/33"	0,750		zelená
0,020	1/50"	0,500		oranžová
0,015	1/66"	0,400		šedá
0,010	1/100"	0,250		modrá
0,007	1/143"	0,175		žlutá
0,006	1/166"	0,150		růžová
0,005	1/200"	0,125		červená
0,004	1/250"	0,100		černá
0,0025	1/400"	0,065		přírodní

Praxe v HPLC

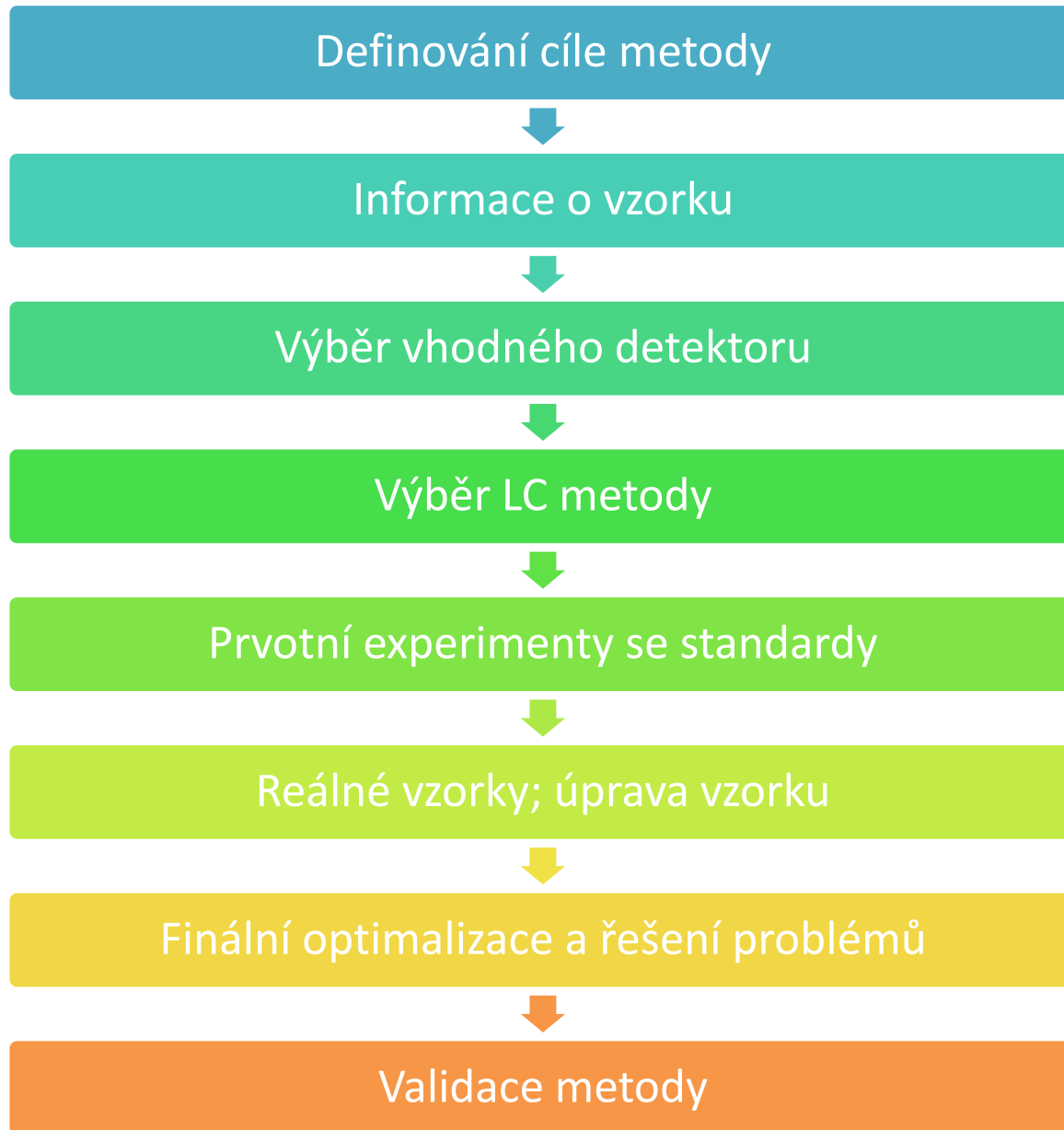
Spoje v HPLC



1 – kapilára (spojovací potrubí), 2 – tlakový šroub, 3 – ferrulka (těsnící kroužek), 4 – kritická vzdálenost pro každé hardwarové zařízení, 5 – konec spojovacího potrubí



Vývoj chromatografické metody



Definování cíle metody

- Jedná se o kvantitativní nebo kvalitativní analýzu?
- Pokud se jedná o kvantitativní analýzu, jaké jsou vyžadovány míry správnosti a přesnosti?
- Jaké jsou očekávané rozmezí koncentrací analytů?
- Pokud se jedná o kvalitativní analýzu, mají být identifikovány pouze hlavní píky nebo i minoritní?
- Je nutné rozdělit všechny složky vzorku?
- Jaká bude matrice vzorku?
- Kolik vzorků bude nutno analyzovat?
- Jsou dostupné standardy?
- Jaký HPLC systém mám k dispozici?

Informace o vzorku

Fyzikálně chemické vlastnosti vzorku

- Molekulová hmotnost
- Struktura látky a její funkční skupiny
- log P
- pKa
- UV spektrum
- Stabilita
- Rozpustnost

Studovat literaturu!

Výběr vhodného detektoru

Na základě:

- chemických a fyzikálních vlastností analytů
- Požadované citlivosti
- Různorodosti vzorku (interference)
- Dostupnosti detektoru

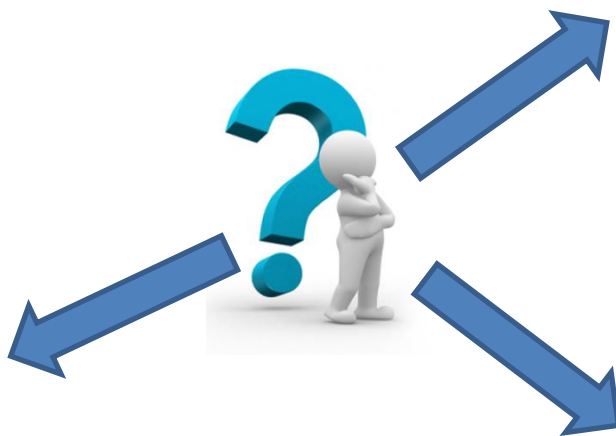
MS detekce



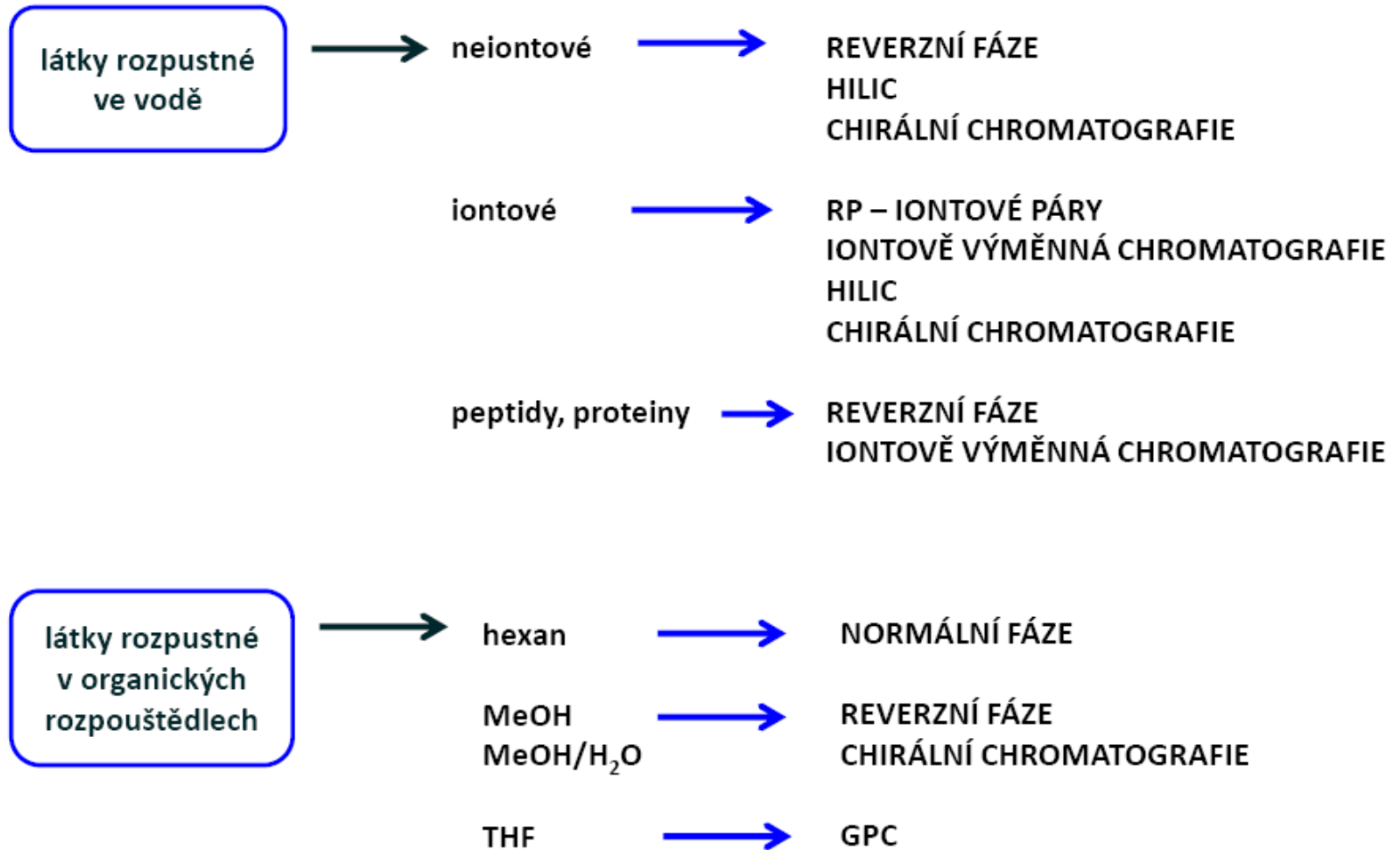
UV-VIS detekce



Coulometrická detekce



Výběr LC metody



Chromatografie na reverzních fázích

> 80 % aplikací

Stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární

Retence roste s hydrofobicitou látky

Stacionární fáze
Mobilní fáze

Stacionární fáze

Co očekáváme od stacionární fáze?

- Dobrou retenci studovaných látek
- Vysokou účinnost separace
- Dobrý tvar píků
- Vhodnou selektivitu
- Stability (chemickou, termální, mechanickou)
- Dlouhou životnost kolony

Stacionární fáze

- Silikagelové stacionární fáze
- Polymerní stacionární fáze
- Hybridní stacionární fáze
- Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého
- Stacionární fáze na bázi porézního grafitického uhlíku

Silikagelové stacionární fáze

veliká mechanická odolnost, možnost navázání řady ligandů, kompatibilita se všemi rozpouštědly běžnými v LC

Silikagel typu A:

kyselý povrch; vyšší obsah kovů

Silikagel typu B:

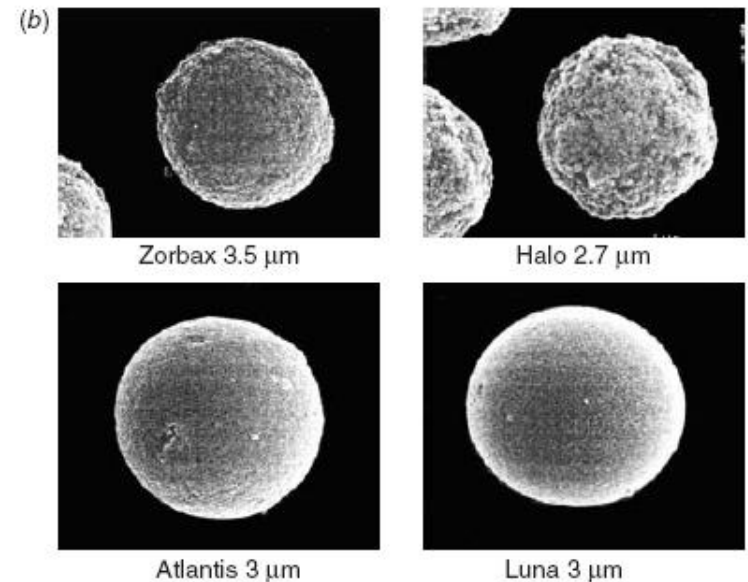
vysoká čistota

Silikagel typu C:

hydrosilovaný silikagel

Omezená chemická a mechanická stabilita: pH 2-7; do 60 C; do 40 MPa

specifický povrch	200 - 500 m ² /g
velikost částic	3 a 5 μm HPLC , < 2 μm UHPLC
velikost pórů	60 – 130 Å, 300 Å
navázání ligandu	mono-, di-, trifunkčně
pokrytí uhlíkem	cca 6-20 % (míra retence)
typ ligandu, ošetření volných silanolů	



Polymerní stacionární fáze

Stabilní v rozsahu pH 1-14, teplotně stabilní do 200 C, nižší mechanická stabilita do 20 mPa

Používá se polystyren, polyvinyl alkoholy, substituované metakryláty

V RP chromatografii nejsou zcela rozšířené, použití v iontové chromatografii

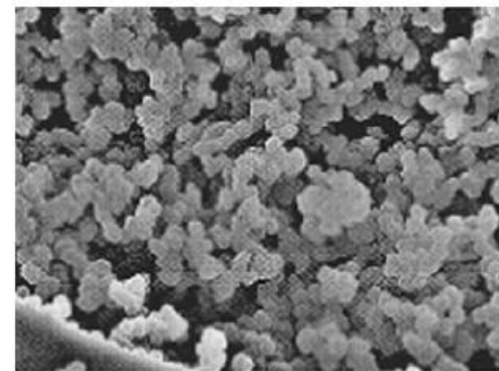
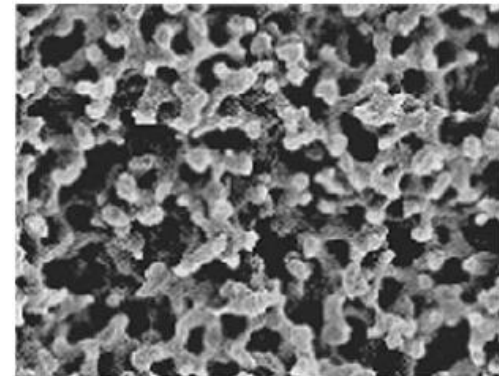
Monolitické stacionární fáze

Jeden celistvý kus náplně.

Obsahují makropory a mesopory. Možnost využívat vyšších průtoků za stále nízkého tlaku.

Nevýhodou je malá komerční dostupnost různorodých stacionárních fází.

Podle literatury často i neutrální látky tailují



Hybridní stacionární fáze

kombinace organické a anorganické složky

Figure 1: XTerra® Hybrid Particle Synthesis

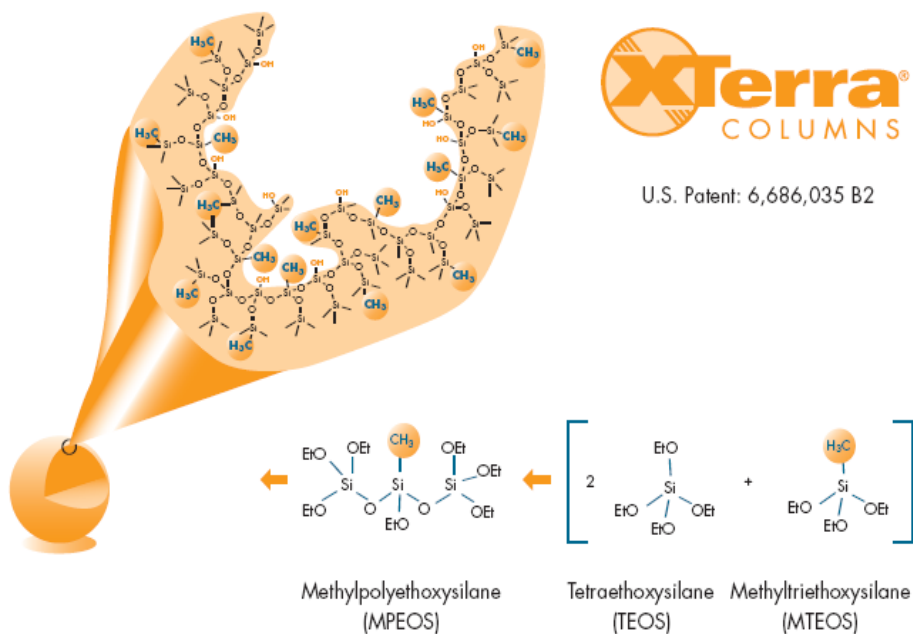
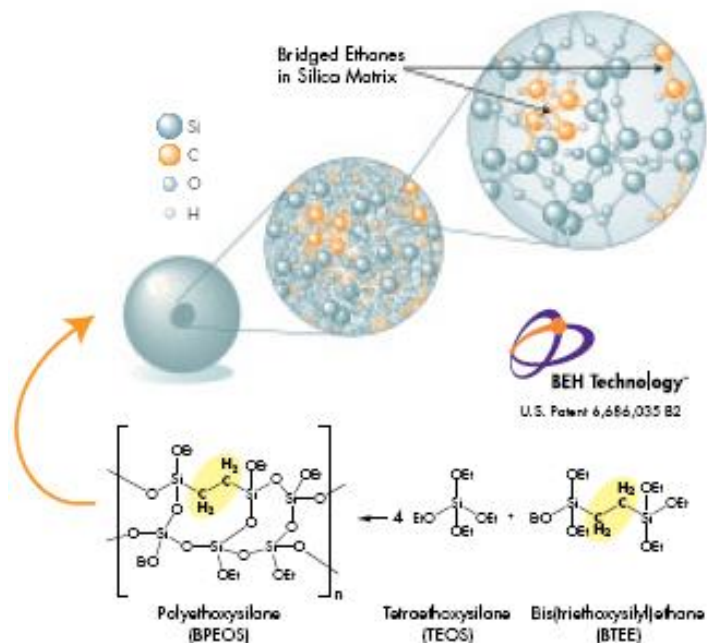


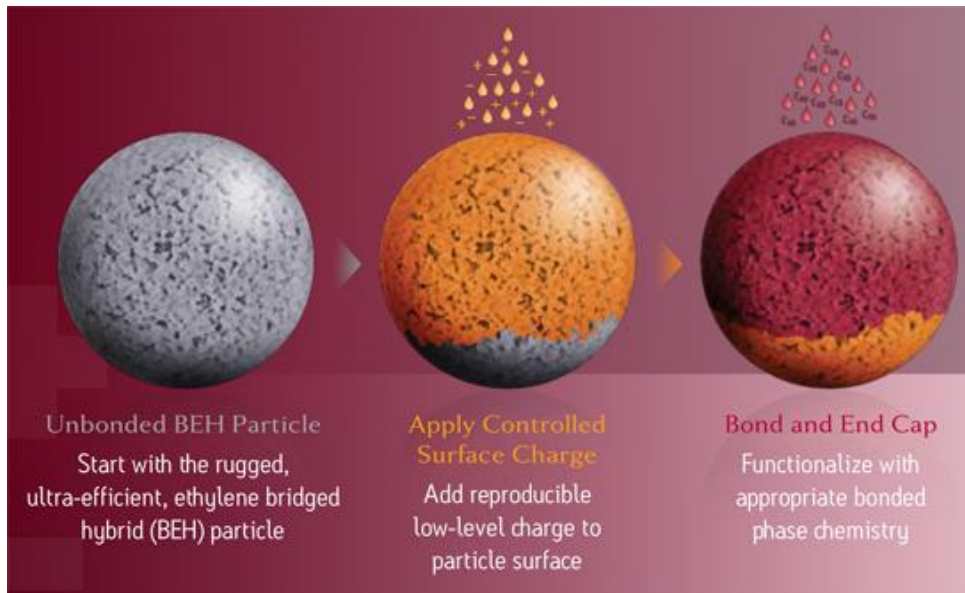
Figure 2: BEH Technology™ Particle Synthesis



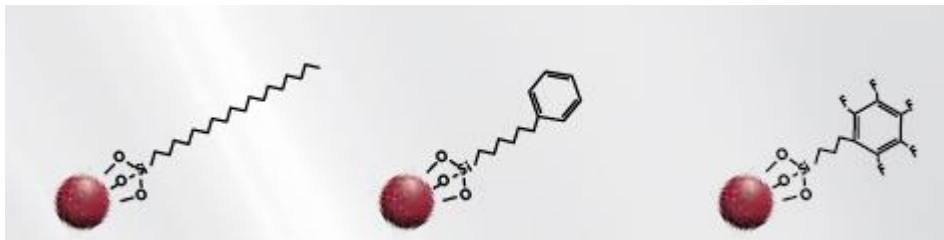
Vyšší stabilita díky silikagelu a polymeru: pH 1-12; teplota do 100 C

Hybridní stacionární fáze

CSH (Charged Surface Hybrid) Technology



Založeno na BEH technologii. Dochází k pokrytí BEH částic skupinami látek s nábojem. Tím dochází ke zlepšení tvarů píku bazických látek, změně selektivity oproti BEH kolonám.



Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

extrémní chemická a mechanická stabilita

pH 1-14 ; teplota do 200 C

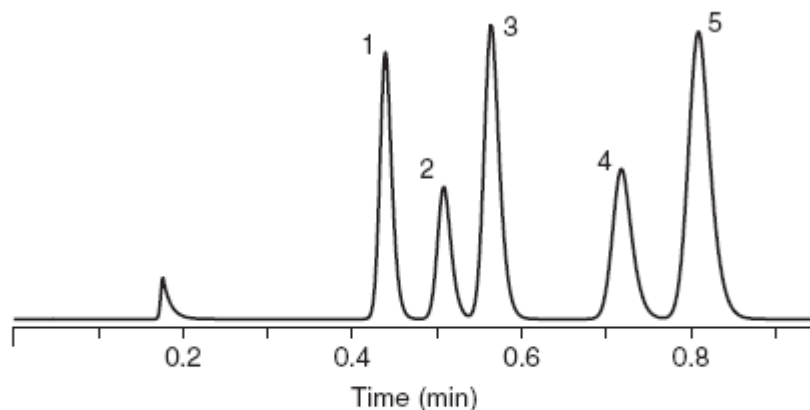
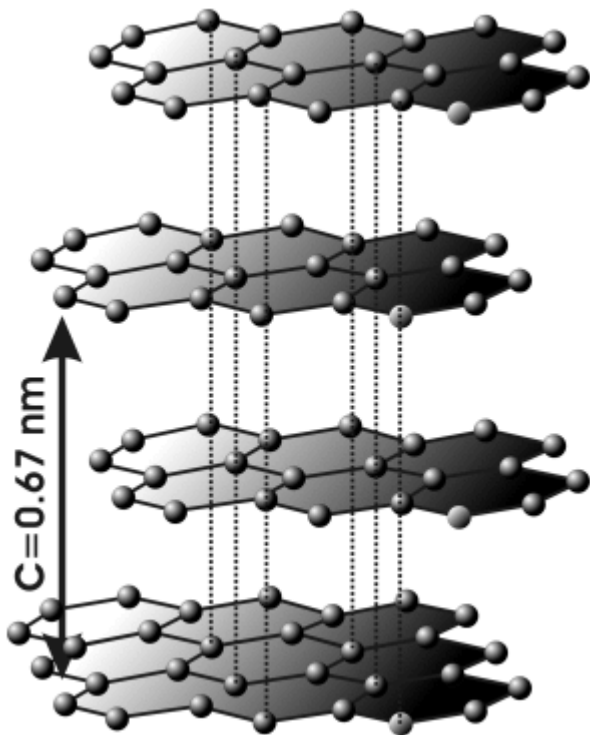


Figure 5.12 High-temperature separation of a pharmaceutical mixture. Sample: 1, doxylamine; 2, methapyrilene; 3, chlorpheniramine; 4, meclizine; 5, triprolidine. Conditions: 100 × 4.6-mm ZirChrom-PBD[®] column (zirconia); 20% acetonitrile/water with added tetramethylammonium hydroxide to control pH-13; 4.2 mL/min; 140°C; 2850 psi. Courtesy of ZirChrom Separations, Inc.

Stacionární fáze na bázi porézního grafitického uhlíku

inertní materiál
pH 1-14
teplota do 200 C



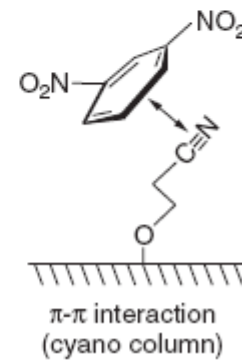
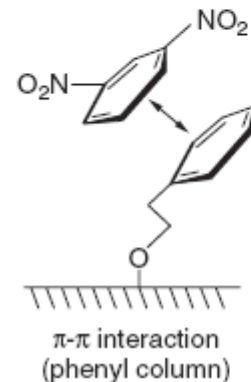
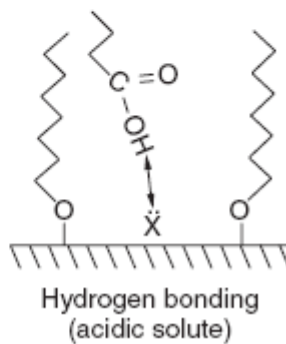
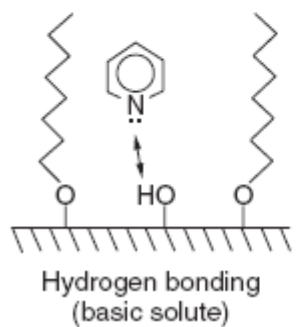
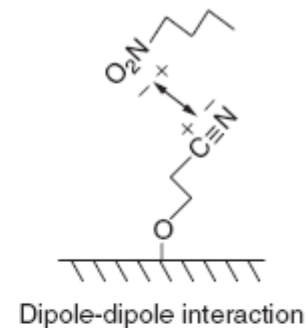
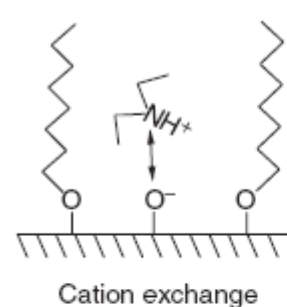
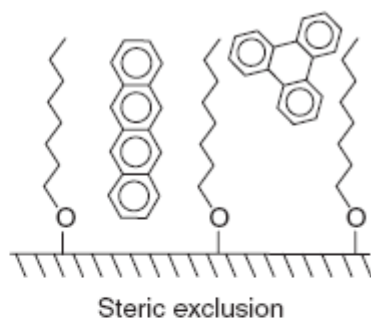
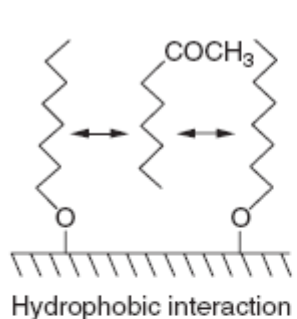
velmi odlišná selektivita oproti klasickým
silikagelovým stacionárním fázím

uplatňují se zejména hydrofóbní, elektrostatické
a $\pi - \pi$ interakce

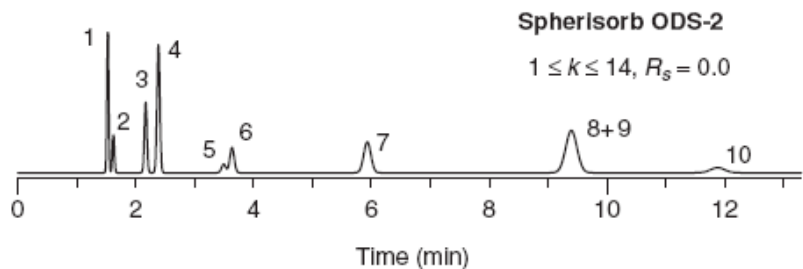
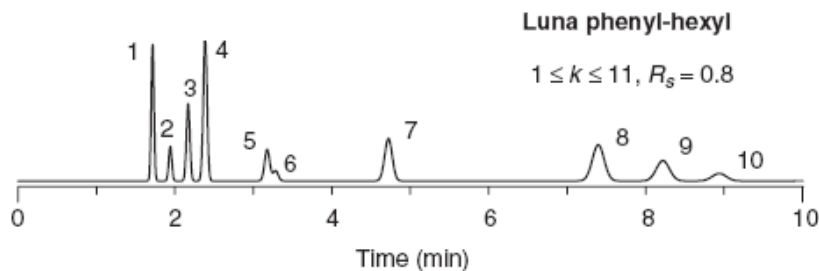
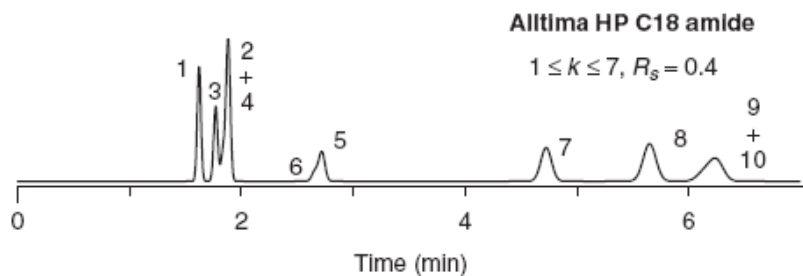
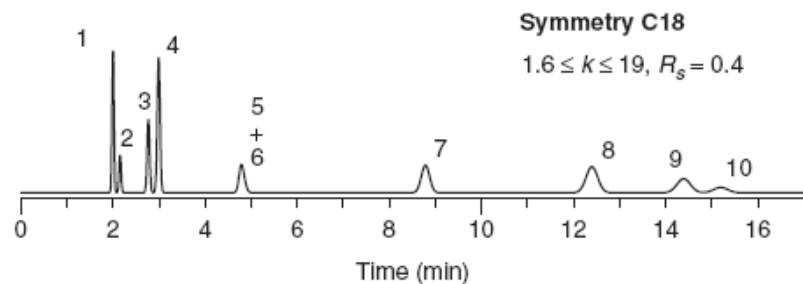
často uplatnění při chirálních separacích

Stacionární fáze

Selektivita stacionárních fází



Stacionární fáze

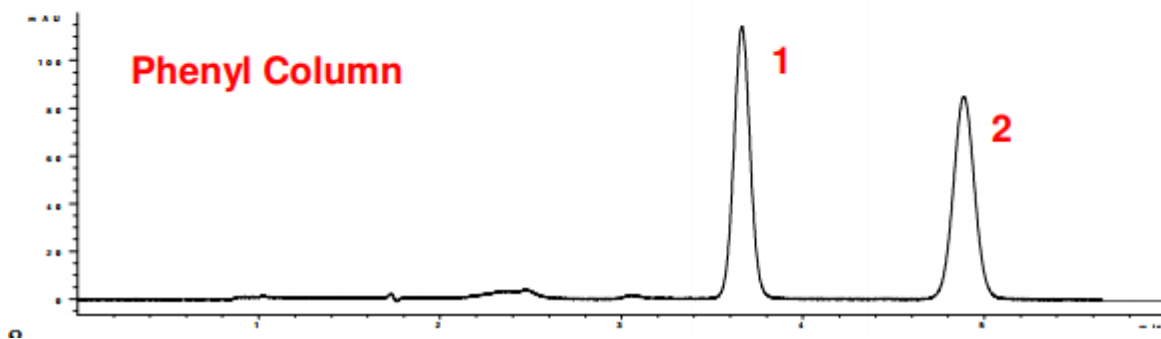
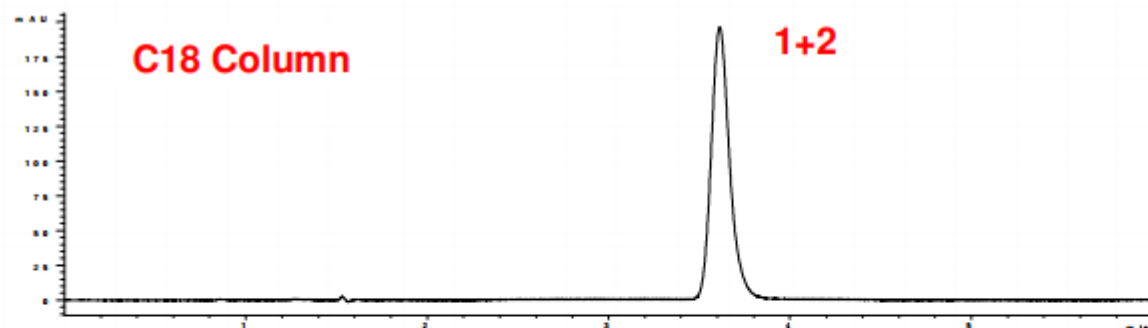
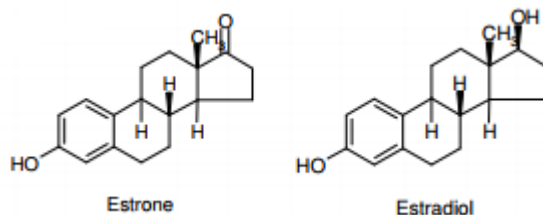


Ukázka různé selektivity různých kolon

Separation of a mixture of 10 organic compounds of diverse structure on four different columns. Sample: 1, 4-nitrophenol; 2, 5,5-diphenylhydantoin; 3, acetophenone; 4, benzonitrile; 5, 5-phenylpentanol; 6, anisole; 7, toluene; 8, *cis*-chalcone; 9, ethylbenzene; 10, *trans*-chalcone. Conditions: 150 × 4.6-mm (5- μ m) columns; 45% acetonitrile-water; 35°C; 2.0 mL/min.

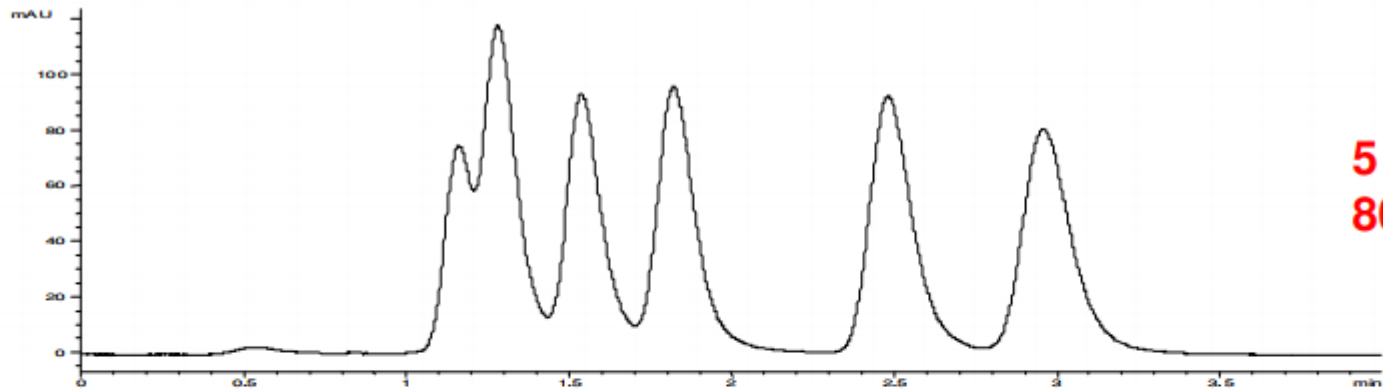
Stacionární fáze

Ukázka různé selektivity různých kolon

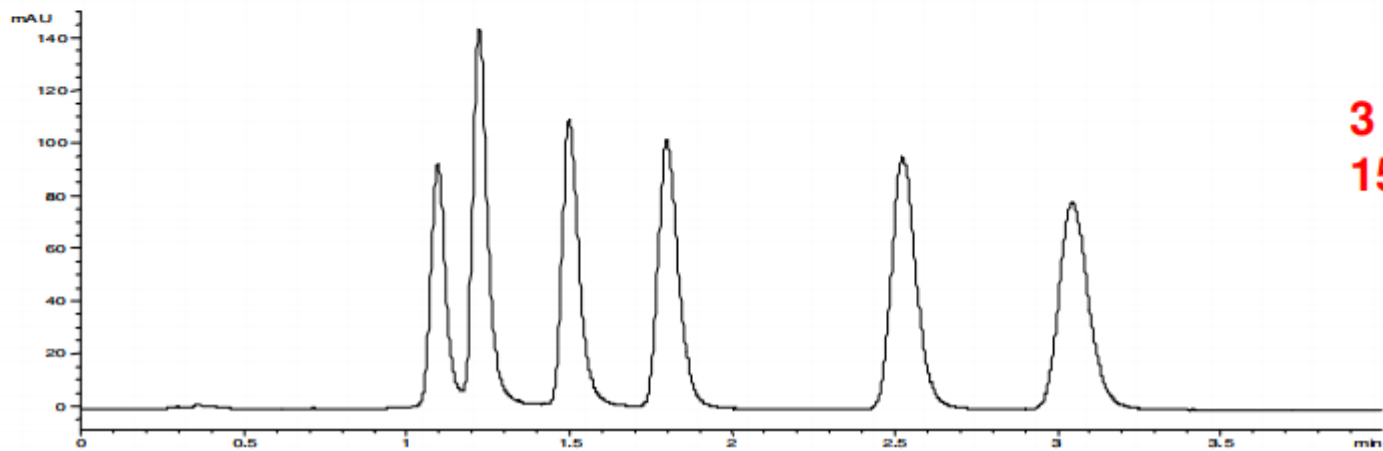


Stacionární fáze

Vliv účinnosti na rozlišení



5 µm
80,000 P/m



3 µm
150,000 P/m

Mobilní fáze

Vodná složka MF

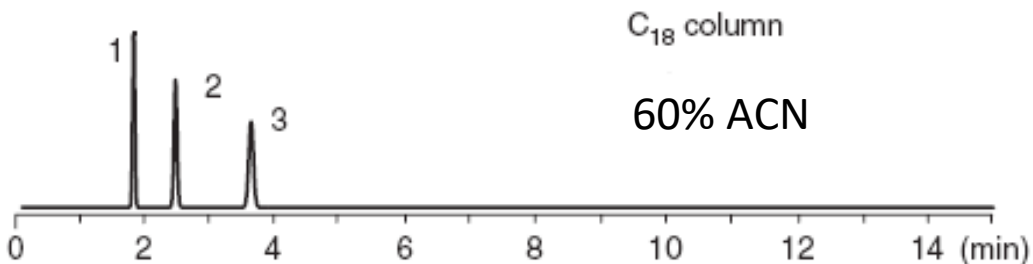
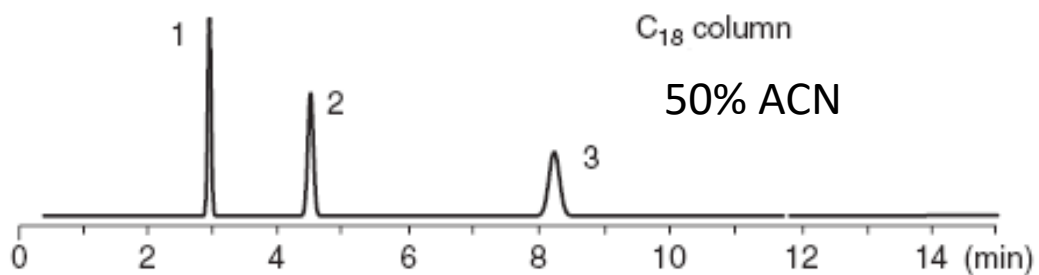
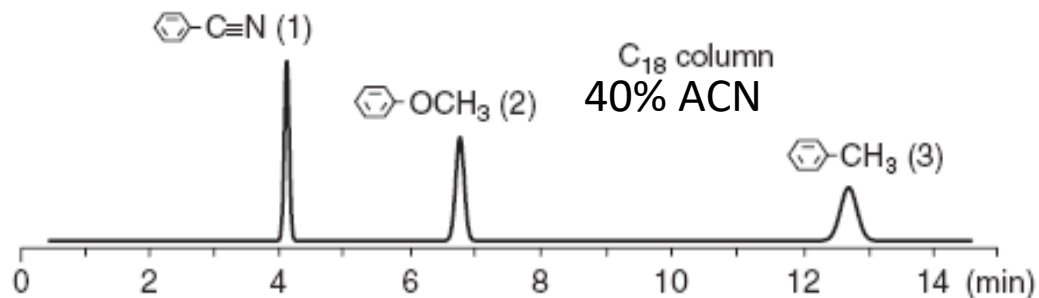
Buffer	pKa	pH range	UV cutoff (nm)
TFA	0.3	1.1 - 3.1	210 (0.1%)
Methane Sulphonic Acid	ca -2.0	>1.0	n / a
Phosphate, pKa 1	2.1	1.1 - 3.1	<200
Phosphate, pKa 2	7.2	6.2 - 8.2	<200
Phosphate, pKa 3	12.3	11.3 - 13.3	<200
Citrate, pKa 1	3.1	2.1 - 4.1	230
Citrate, pKa 2	4.7	3.7 - 5.7	230
Citrate, pKa 3	6.4	5.4 - 7.4	230
Carbonate, pKa 1	6.1	5.1 - 7.1	<200
Carbonate, pKa 2	10.3	9.3 - 11.3	<200
Formate	3.8	2.8 - 4.8	210 (10nM)
Acetate	4.8	3.8 - 5.8	210 (10nM)
Ammonia	9.3	8.3 - 10.3	200 (10nM)
Borate	9.2	8.2 - 10.2	N / A
Triethylamine	10.8	9.8 - 11.8	<200
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	8.3	7.3 - 9.3	205 (10nM)

Organická složka MF

Acetonitril
Methanol
Tetrahydrofuran

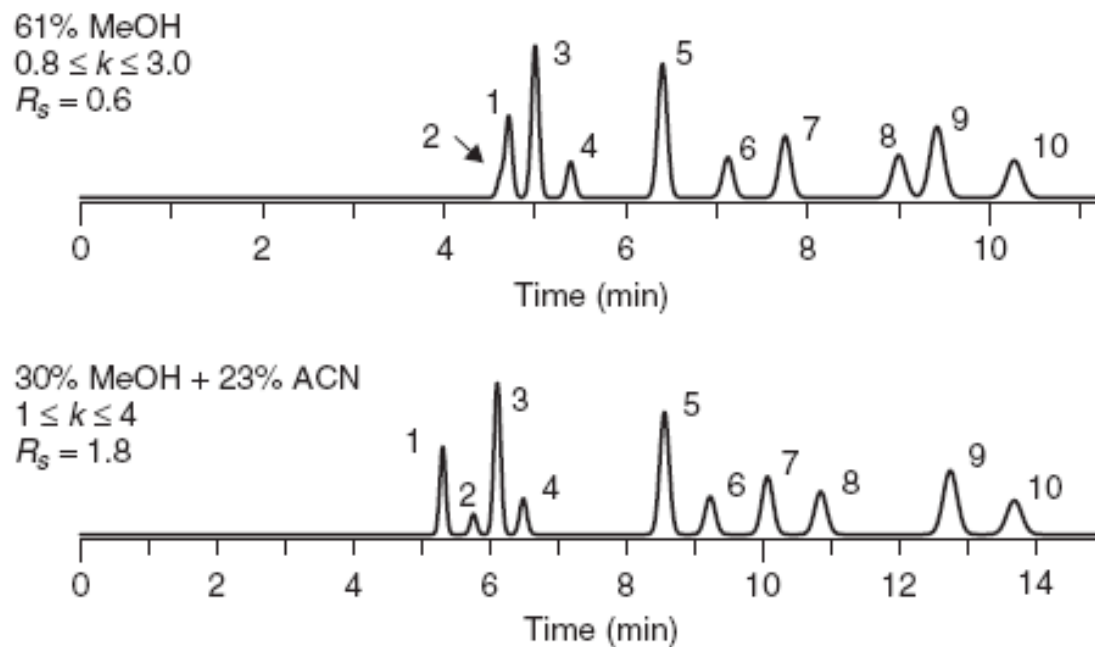
Mobilní fáze

Změna obsahu organické složky na retenci analytů



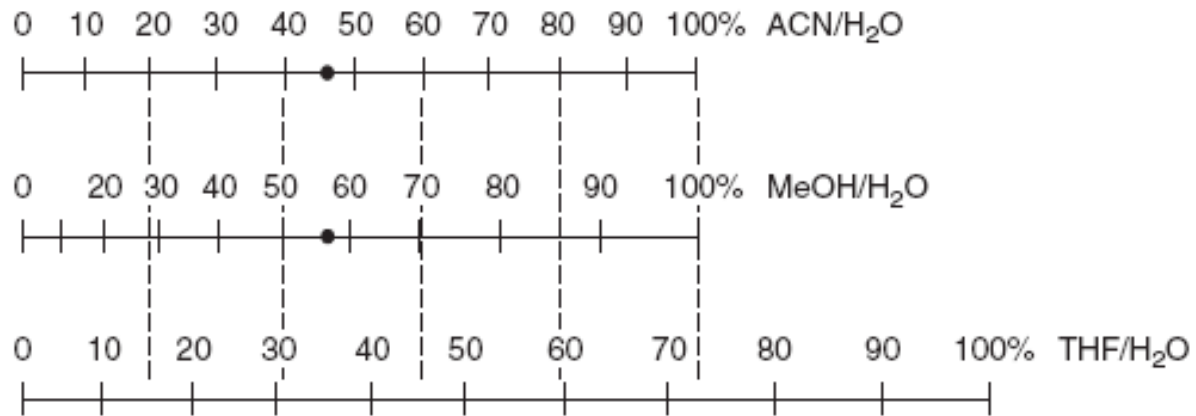
Mobilní fáze

vliv změny organické složky na selektivitu



Solvent-type selectivity. Separation of a mixture of substituted benzenes with methanol or mixtures of methanol-acetonitrile as mobile phase.

Mobilní fáze



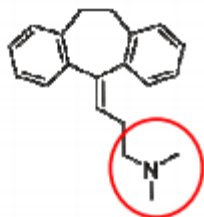
Solvent-strength nomograph for reversed-phase HPLC

Two mobile phases of equal strength (46% ACN and 57% MeOH) marked by ●

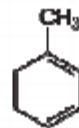
Mobilní fáze

Vliv pH na selektivitu

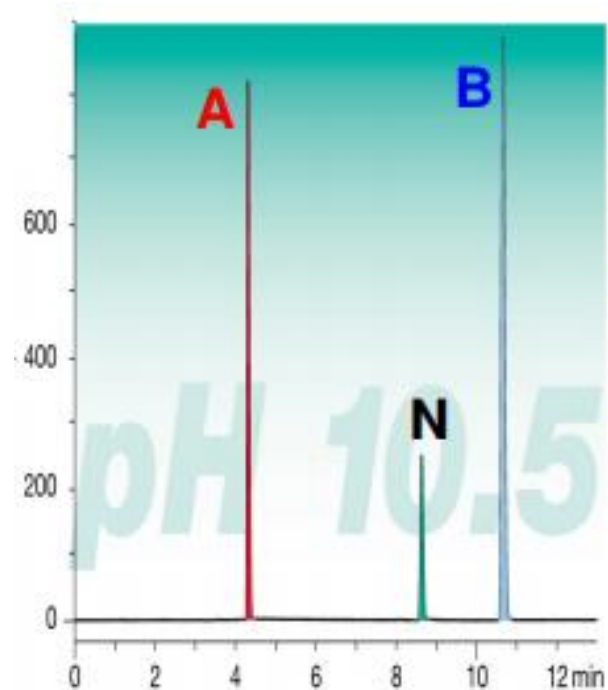
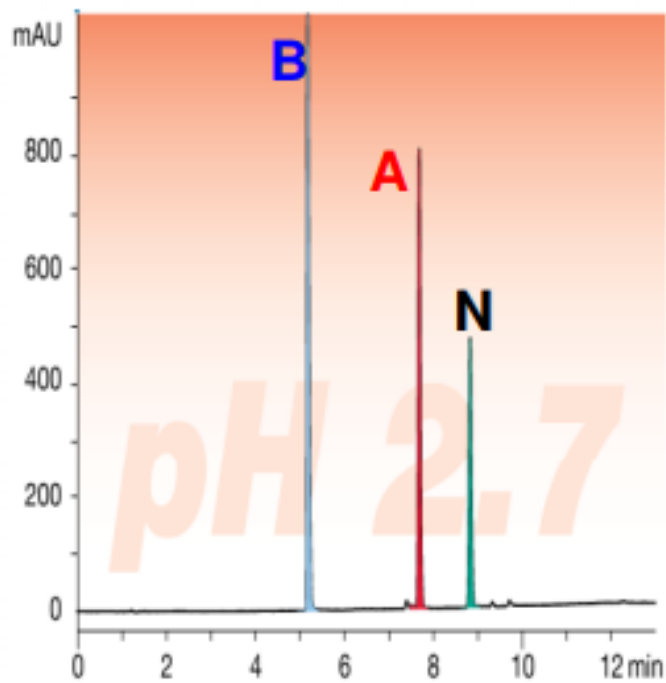
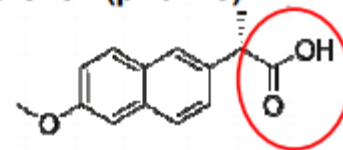
Amitriptyline (pKa 9.4)



Toluene



Naproxen (pKa 4.5)



Teplota na separační koloně

$$\log k = A + \frac{B}{T_k}$$

A, B jsou konstanty charakteristické pro daný separační systém

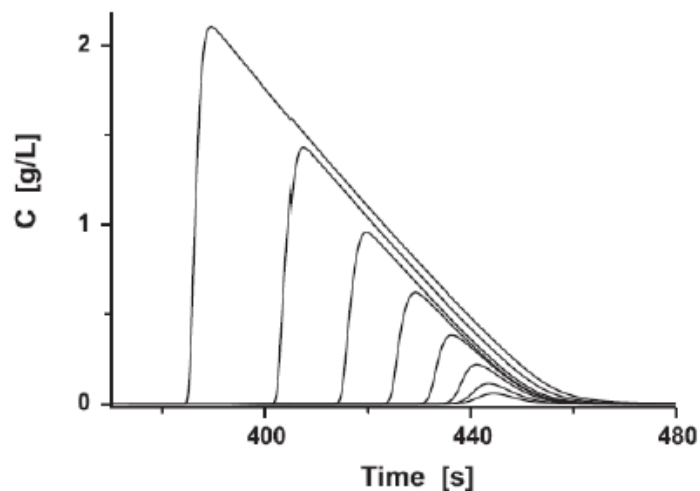
zvýšení teploty o 1 °C způsobí pokles retence o cca 1-2 % (není to pravidlo).

Dávkování vzorku

Analytická kolona má tzv. kapacitu kolony, což je maximální množství vzorku, které je daná kolona schopna separovat.

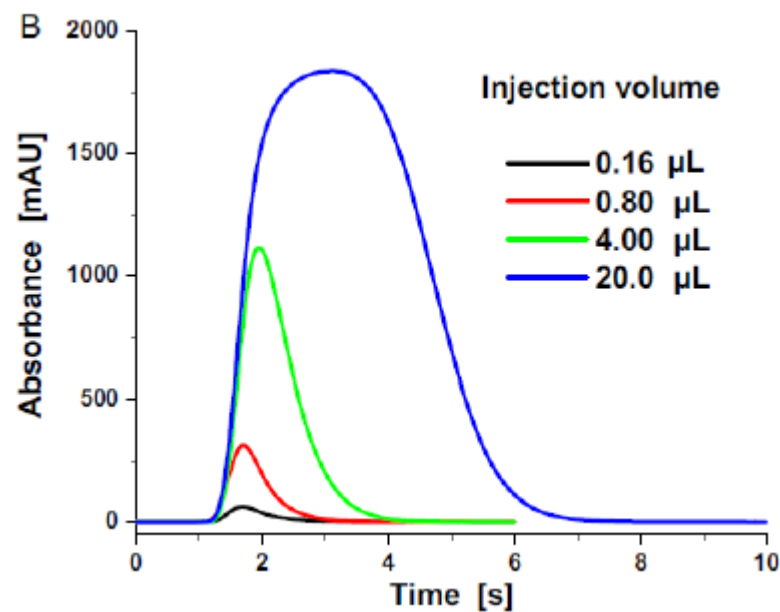
Kapacita kolony může být překročena objemovým přetížením nebo koncentračním přetížením

Koncentrační přetížení



- zkrácení retenčních časů
- pík eluuje dříve

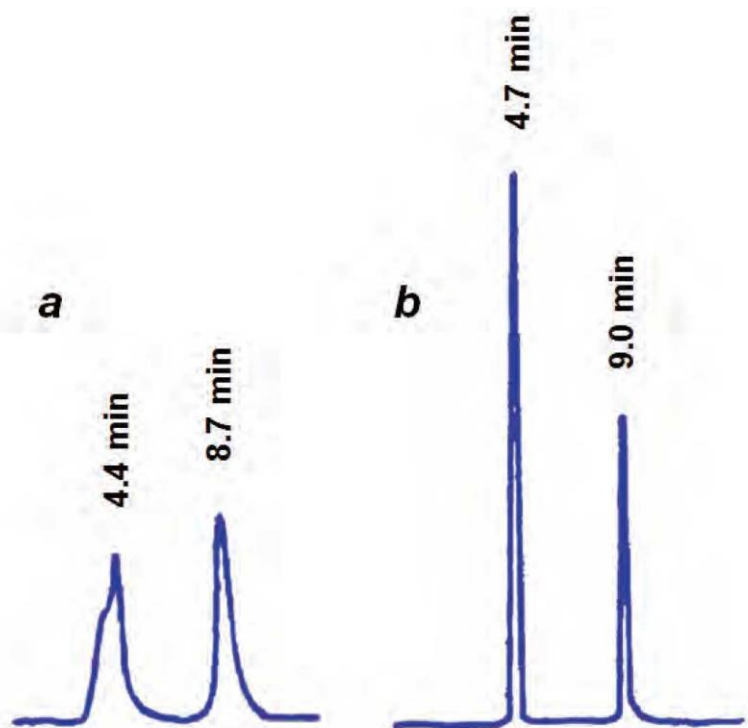
Objemové přetížení



- prodloužení retenčních časů
- počátek píku eluuje stejně

Dávkování vzorku

Vhodné rozpouštět vzorek v mobilní fázi. Dojde k eliminaci rozdílů fyzikálně chemických vlastností mezi rozpouštědlem pro vzorek a mobilní fází.



MF:

A: KH_2PO_4 10 mM pH 2.5

B: ACN

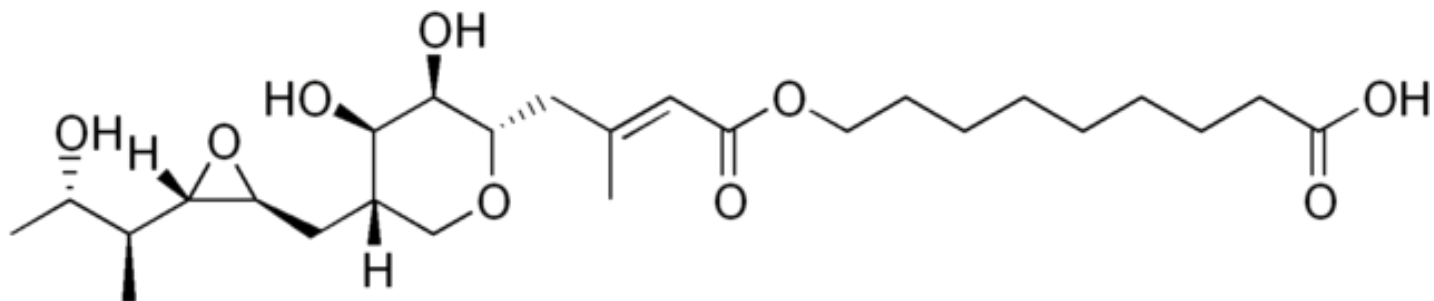
70/30 (v/v)

Injection solvent: 100%ACN

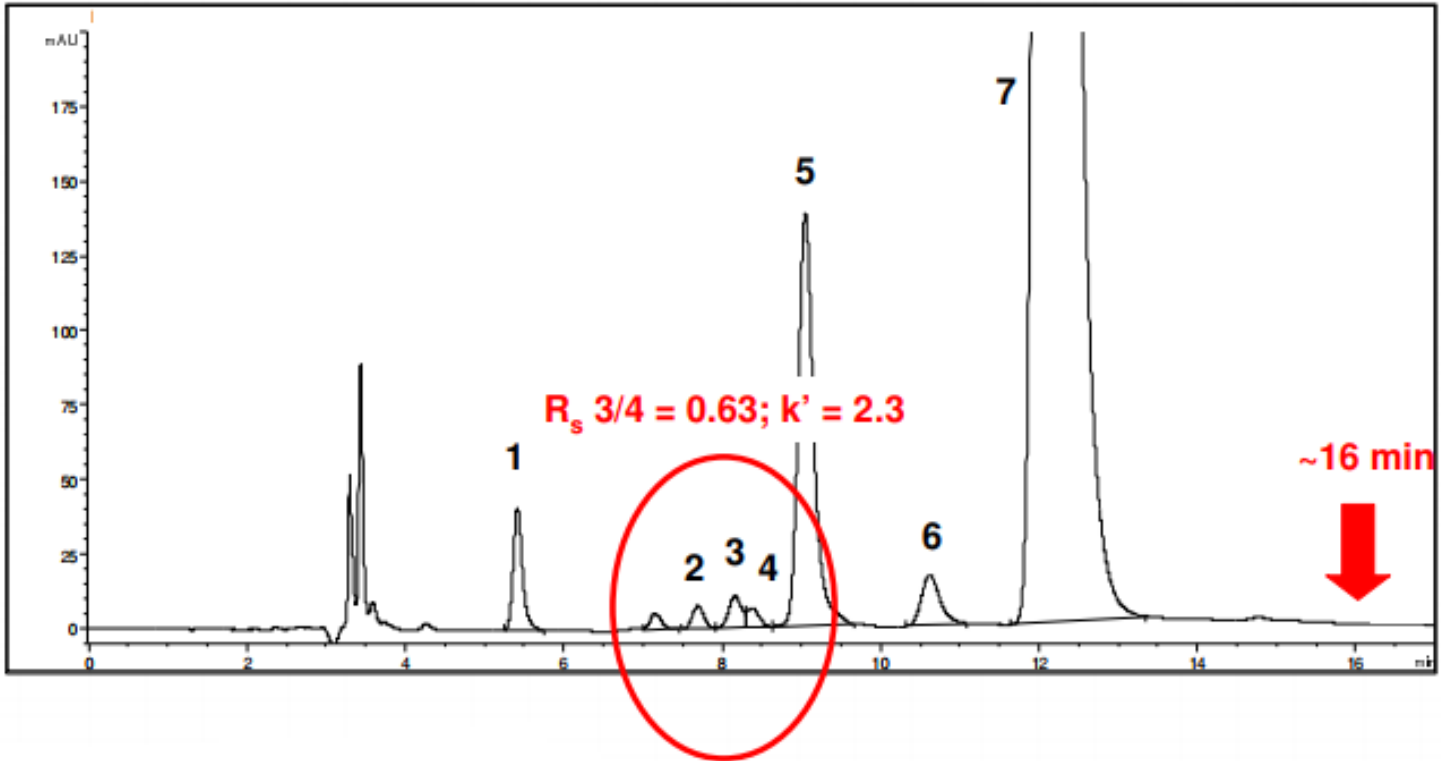
Injection solvent: složení jako MF

Příklad

Kolona:	Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 μ m
Mobilní fáze:	70/30 (v/v) 50mM octan amonný pH 5,7/ACN
Průtok mobilní fáze:	1 ml/min
Nástřik:	1 μ l
Analyty:	1-6 nečistoty A-G 7 Mupirocin

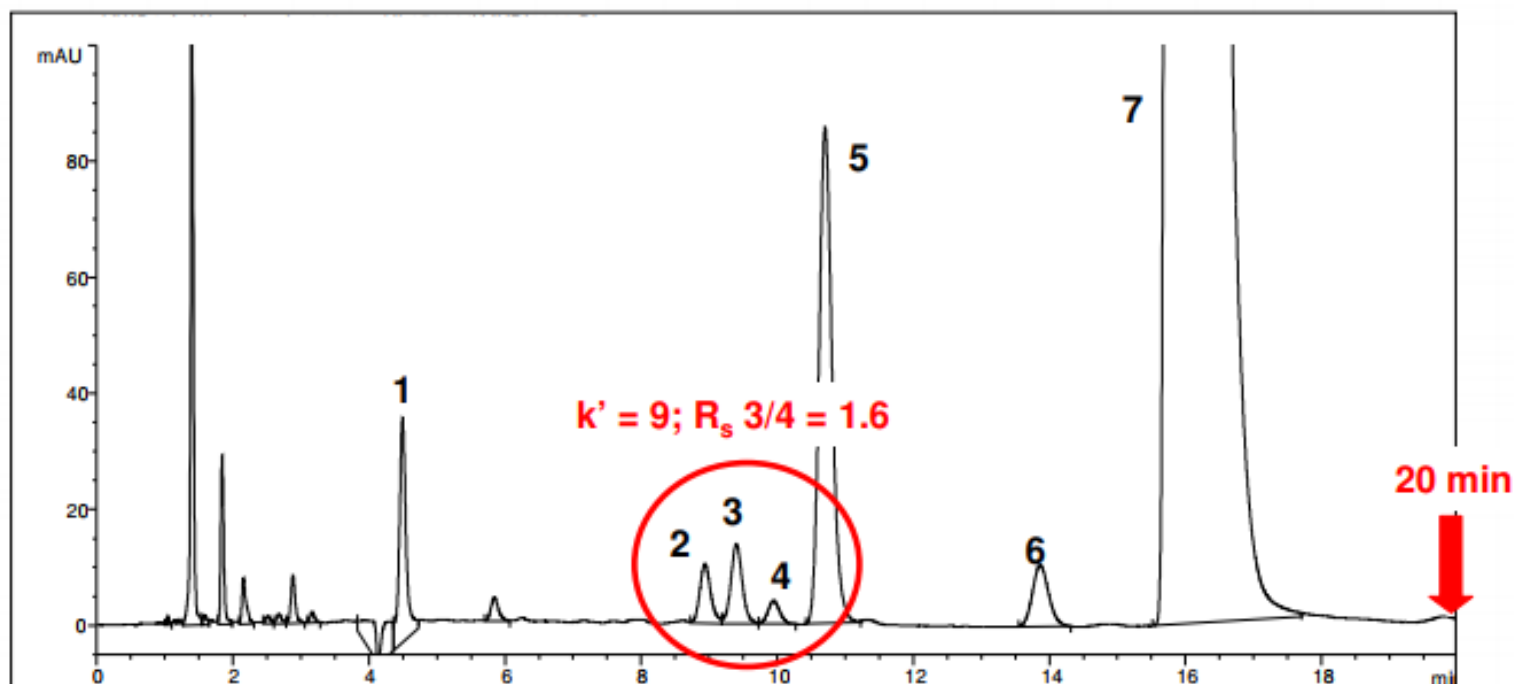


Příklad



Kolona: Luna C8, 250 x 4,6 mm, 5 μ m
Mobilní fáze: 70/30 (v/v) 50mM octan amonný pH 5,7/ACN
Průtok mobilní fáze: 1 ml/min

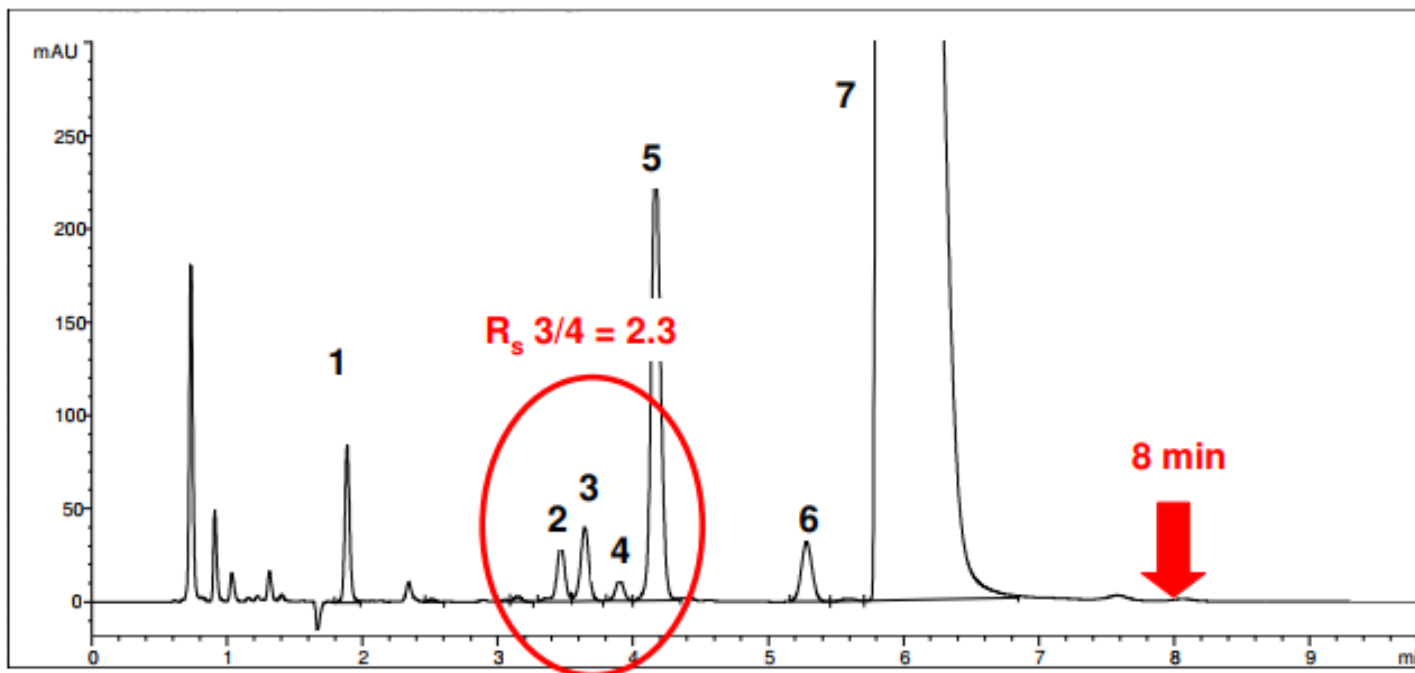
Příklad



Kolona: Luna C8, 250 x 4,6 mm, **3 μ m**
Mobilní fáze: **80/20** (v/v) 50mM octan amonný pH 5,7/ACN
Průtok mobilní fáze: **1,5** ml/min

Rozlišení se zvýšilo z 0,63 na 1,6
Čas analýzy vzrostl z 16 na 20 minut

Příklad



Kolona: Kinetex C8, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm
Mobilní fáze: 80/20 (v/v) 50mM octan amonný pH 5,7/ACN
Průtok mobilní fáze: 1,5 ml/min

Rozlišení se zvýšilo z 0,63 na 2,3
Čas analýzy klesl z 20 na 8 minut

Použité zdroje a zároveň doporučená literatura

Monografie:

Snyder R. L., Kirkland J. J.: Practical HPLC method development

Snyder R. L., Kirkland J. J.: Introduction to modern chromatography

Nováková L., Douša M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi (první a druhý díl)

Snyder R. L., Dolan J. W.: High performance gradient elution

Meyer V. R.: Practical high performance liquid chromatography

Dong M. W.: Modern HPLC for practicing scientists

Kromidas S.: More practical problem solving in HPLC

Internetové zdroje:

www.hpst.cz

www.waters.com

www.chromacademy.com

www.hplc.cz

<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/>

www.shimadzu.com

Časopisy:

Journal of Chromatography A, B

Journal of Separation Science

Analytical Chemistry

Chromatographia

Journal of Liquid Chromatography

LCGC